

半夏乙醇提取物对小菜蛾幼虫生物活性的研究

李进步,方丽平,薛建平,晁飞朋,郭庆,张亚楠

(淮北煤炭师范学院生命科学学院资源植物生物学安徽省重点实验室,安徽淮北 235000)

摘要:【研究目的】为了有效控制小菜蛾的危害,研发新型、高效植物源杀虫剂。【方法】采用95%乙醇对半夏干粉进行索式提取,以叶片浸渍法和浸虫法测定了提取液对小菜蛾幼虫的杀虫活性。【结果】半夏乙醇提取物对小菜蛾3龄幼虫具有较好的拒食、触杀、胃毒和生长抑制的作用,提取物浓度越高,效果越明显。在触杀试验中,当提取物在100 mg/ml浓度下,处理72 h后小菜蛾幼虫的校正死亡率为61.44%。在选择性拒食试验中,提取物对3龄幼虫的AFC50分别为32.68 mg/ml(24 h)和39.16 mg/ml(48 h);在非选择性拒食试验中,提取物对3龄幼虫的AFC50分别为17.26 mg/ml(24 h)和21.32 mg/ml(48 h)。半夏乙醇提取物对小菜蛾的胃毒及生长发育抑制作用也明显。饲喂72 h时,浓度为100 mg/ml处理的小菜蛾幼虫校正死亡率高达69.41%;在处理48 h,浓度为100 mg/ml的提取物对小菜蛾3龄幼虫的生长抑制率为64.43%。【结论】半夏提取物对小菜蛾幼虫具有较高的生物活性和理想的控制效果。

关键词:半夏;乙醇提取物;小菜蛾;杀虫活性

中图分类号:S3 **文献标识码:**A

The Bioactivity of Ethanol Extracts of *Pinellia ternate* against *Plutella xylostella*

Li Jinbu, Fang Liping, Xue Jianping, Chao Feipeng, Guo Qing, Zhang Ya'nan

(Anhui Provincial Key Laboratory of Resource Plant Biology, Department of Biology,

HuaiBei Coal Industry Teachers College, Huaibei Anhui 235000)

Abstract: 【OBJECTIVE】In order to control the damage of *Plutella xylostella* effectively, the new style and high active plant insecticide was researched. 【METHOD】The Soxhlet's extraction method was used to extract the active material in *Pinellia ternate* by using 95% ethanol, and leaf immersion method and dipping pest method were used to test bioactivity of the extracts against on the larvae of diamondback moth (*Plutella xylostella* L.). 【RESULT】Results indicated that the extracts had many functional patterns against the larvae of diamondback moth as anti-feeding, contacting toxicity, stomach poisoning and inhibiting growth activities. The higher concentration, the more obviously the effect on the pest was. The corrected mortality of 3rd instar larvae of *Plutella xylostella* reaches 61.44% treated by contacting at concentration of 100 mg/ml at 72h. In the test of anti-feeding activity, the choice AFC50 were 32.68 mg/ml at 24h and 39.16 mg/ml at 48h, and the non-choice AFC50 were 17.26 mg/ml at 24h and 21.32 mg/ml at 48h respectively. The extracts displayed a higher stomach poisoning activities against 3rd instar larvae of *Plutella xylostella*, and the corrected mortality reached 69.41% at concentration of 100 mg/ml at 72h. The extracts also had significant inhibition to growth and development of larvae of *Plutella xylostella*, the inhibition rate at 48 h after treatment was 64.43% at concentration of 100 mg/ml. 【CONCLUSION】It was suggested that the extracts of *Pinellia ternate* had higher biological activity and efficacy against *Plutella xylostella*, and the study provides the basis for the development and utilization of this insecticidal plant in the future, and it has theoretical and practical meaning for the IPM.

Key words: *Pinellia ternate*, ethanol extracts, *Plutella xylostella* L., bioactivity

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金“半夏提取物对十字花科蔬菜几种害虫的生物活性研究”(kj2007b172)。

第一作者简介:李进步,男,1979年出生,安徽砀山人,硕士,讲师,研究方向:昆虫生态学与害虫综合治理,已发表论文10余篇。通信地址:235000 安徽省淮北市东山路100号淮北煤炭师范学院生命科学学院, Tel: 0561-3802225, E-mail: lijibu0991@sina.com。

收稿日期:2008-12-16, **修回日期:**2009-01-13。

0 引言

【本研究的重要意义】小菜蛾(*Plutella xylostella* L.)属鳞翅目(Lepidoptera)菜蛾科(Plutellidae),是十字花科蔬菜上的一种重要害虫,也是当今世界上最难对付的害虫之一^[1]。它不但对许多化学杀虫剂产生了不同程度的抗性,而且对苏云金杆菌(Bt)也产生了抗性^[2-5],全球每年防治费用高达10亿美元^[6]。因此,开辟小菜蛾防治新途径成为当前蔬菜生产亟待解决的问题,而研制高效、低毒、低残留、与环境友好的植物源农药防治其危害是当前人们关注的焦点。【前人研究进展】从植物中筛选和发现化学结构新颖、对环境安全、选择性高的杀虫活性物质,进而开发出具有一定作用特点的植物源农药是新农药开发研究的一个重要方面^[7-8]。据《本草纲目》记载:中药植物百部、藜芦、狼毒、苦参等都有较好的杀虫作用。近年来,华南农业大学和西北农林科技大学等单位研究较多的杀虫植物印楝、苦皮藤、黄杜鹃、菖蒲、雷公藤等展现了良好的应用价值。因此,从中药植物中筛选杀虫活性物质是植物性杀虫剂研究的关键和重点之一。【本研究切入点】半夏的原植物为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* Breit,以块茎入药,是中国的传统中药,其性温、味辛、有毒,不仅具有降逆止呕、燥湿化痰、消痞散节的功效,而且具有抗早孕、驱蚊、杀虫等功效^[9-11]。已有报道半夏提取液对菜青虫、棉蚜、茄二十八星瓢虫有较好的杀虫活性^[12-15],但有关半夏对小菜蛾的生物活性研究目前国内外未见报道。【拟解决的关键问题】研究半夏对十字花科蔬菜重要害虫小菜蛾的生物活性,明确半夏对小菜蛾的杀虫活性及其作用方式,为安全、高效植物性杀虫剂新品种的开发应用及仿生合成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

试验于2007年4月—2008年10月在淮北煤炭师范学院生命科学学院资源植物学重点实验室完成。

1.2 供试虫源

小菜蛾参照杨峰山等^[16]的方法饲养。供试小菜蛾采自淮北市无公害蔬菜种植基地,带回室内以甘蓝和萝卜苗续代饲养,用蜂蜜水增加小菜蛾成虫的寿命。室内温度控制在(26±1)℃,光周期L:D=14:10 h,相对湿度RH 70%~80%。

1.3 半夏及提取物制备

1.3.1 提取物制备 半夏采自淮北煤炭师范学院半夏试验基地,自然晾干,然后将半夏块茎用多功能食品粉碎机粉碎,过40目筛制成干粉,采用索式提取法提取,准

确称取干粉50 g,用95%乙醇溶剂索式提取10 h,然后分别将提取液转入旋转蒸发器内减压浓缩至稠膏状。将稠膏用丙酮稀释定容至50 ml(1 ml中含1 g干粉),然后分别装入棕色广口瓶中置于冰箱中备用。

1.3.2 提取液稀释 将供试半夏95%乙醇提取物用浓度为0.1%十二烷基硫酸钠水溶液稀释100.0、75.0、50.0、25.0和12.5 mg/ml,对照为0.1%十二烷基硫酸钠水溶液稀释后的丙酮溶液。

1.4 生物活性测定

1.4.1 拒食活性 采用浸渍叶碟法^[17]。将新鲜甘蓝叶片用圆形打孔器($\phi=1.5$ cm)打成叶碟,分别放入处理药液和对照溶液中浸渍5 s,待叶碟上溶液挥发后,放入直径为9 cm的保湿培养皿中。选择性拒食作用试验中,每皿内等距离放4个叶碟,对照、处理叶碟各2个,十字交叉型排列;非选择性拒食作用试验中,每皿内放4个处理叶碟,另设对照。接人饥饿了3 h的3龄中期幼虫,每皿5头作为一次重复,重复6次。然后把供试幼虫放入温度(26±1)℃,光周期L:D=14:10 h,相对湿度70%~80%的培养箱中饲养,分别于24 h、48 h后用座标纸测量出被取食的叶面积,根据下式计算拒食率,然后将拒食率转化为几率值、浓度转化成对数后进行线性回归,计算拒食中浓度(AFC50)。

选择性拒食率=

$$\frac{\text{对照取食量} - \text{处理取食量}}{\text{对照取食量} - \text{处理取食量}} \times 100\%$$

非选择性拒食率=

$$\frac{\text{对照取食量} - \text{处理取食量}}{\text{对照取食量}} \times 100\%$$

1.4.2 触杀活性 采用浸虫法^[18],将小菜蛾3龄幼虫放入圆桶状滤网中,浸于处理液中5 s后迅速取出,用滤纸吸干多余药液,置于有新鲜甘蓝叶并垫有保湿滤纸的培养皿($\phi=9$ cm)中,每处理30头,重复3次,用对照溶液做同样处理。将培养皿置于上述培养箱内观察,于24、48、72 h后调查死亡情况,计算死亡率、校正死亡率。

$$\text{死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡虫数}}{\text{供试总虫数}} \times 100$$

校正死亡率(%)=

$$\frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100$$

1.4.3 胃毒作用 将洁净的甘蓝叶片在供试药液中浸5 s后取出,自然凉干后,放入铺有滤纸保湿的培养皿($\phi=9$ cm)中,随即接入饥饿3 h的健康均匀的小菜蛾3龄幼虫。每处理30头试虫,重复3次,以0.1%十二烷基

硫酸钠水溶液稀释后的丙酮溶液处理作对照。置于上述培养箱中继续饲养,于处理后24、48、72 h检查幼虫死亡情况,计算死亡率、校正死亡率。

1.4.4 生长发育抑制作用测定 采用饲喂称重法^[19]。叶片处理同拒食作用,每皿2片叶碟,接入1头已饥饿3 h的3龄小菜蛾幼虫,每处理10头试虫,重复4次,对照用0.1%十二烷基硫酸钠水溶液稀释后的丙酮溶液作同样处理。处理后第0、24、48 h分别称虫体质量(每天更换新鲜处理叶碟),计算生长抑制率。

抑制率(%)=

$$\frac{\text{对照组平均体重增加量} - \text{处理组平均体重增加量}}{\text{对照组平均体重增加量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 提取物对小菜蛾幼虫的拒食活性

半夏乙醇提取物对小菜蛾3龄幼虫的拒食作用测定结果见表1、表2和表3。半夏乙醇提取物对小菜蛾幼虫表现出较强的拒食作用,拒食率随提取物浓度增加而升高。非选择性拒食作用大于选择性拒食作用,24 h的拒食活性明显高于48 h的拒食活性。在选择性条件下(表1),幼虫在处理叶上的取食量随提取物浓度的升高而减少,且各浓度间有显著差异,24、48 h的AFC₅₀值分别为32.68、39.16 mg/ml。在非选择性条件下(表2),幼虫在处理叶上的取食面积比在对照叶上显著减少,在高浓度的处理叶上又比在低浓度的处理叶上显著减少,24、48 h的AFC₅₀值分别为17.26、21.32 mg/ml。

表1 半夏乙醇提取物对小菜蛾3龄幼虫的选择性拒食作用

浓度/(mg/ml)	24 h 取食面积/mm ²		24 h 拒食率/%	48 h 取食面积/mm ²		48 h 拒食率/%
	处理	对照		处理	对照	
100	2.35±0.63c	26.73±2.42a	83.84±3.12a	4.55±2.69c	37.15±1.63a	78.18±1.63a
75	3.86±0.61c	26.85±1.98a	74.86±2.56a	7.18±1.43bc	36.46±1.63a	67.09±1.63b
50	6.45±0.72b	25.24±2.37a	59.29±2.75b	11.26±2.72b	36.2±1.63a	52.55±1.63c
25	9.25±1.17ab	25.37±2.68a	46.56±2.49c	13.32±3.13ab	35.75±1.63a	45.71±1.63c
12.5	11.55±1.79a	24.85±2.53a	36.54±2.63d	17.15±2.82a	32.95±1.63a	31.54±1.63d

注:表中数据为平均值±标准误;同列数据后字母相同者表示Duncan氏检验差异不显著($P>0.05$)。下同。

表2 半夏乙醇提取物对小菜蛾3龄幼虫的非选择性拒食作用

浓度/(mg/ml)	24h 取食面积/mm ²	24 h 拒食率/%	48 h 取食面积/mm ²	48 h 拒食率/%
100	3.85±0.92d	86.51±3.67a	5.98±1.55e	86.04±2.97a
75	5.42±1.47cd	81.02±4.11a	9.34±2.48d	78.20±2.84ab
50	7.85±1.35c	72.50±3.28b	13.28±3.17c	69.01±3.63b
25	11.45±3.15bc	59.89±3.16c	19.62±3.26bc	54.21±3.12c
12.5	15.25±3.29b	46.58±2.47d	23.15±3.75b	45.97±2.59d
对照	28.55±3.38a	—	42.85±3.58a	—

表3 半夏乙醇提取物对小菜蛾3龄幼虫的拒食作用

处理	时间/h	回归方程	相关系数(r)	AFC ₅₀ /(mg/ml)	95%置信区间
选择性拒食活性	24h	Y=2.1236+1.8195x	0.9578	32.68	11.29~56.98
	48h	Y=2.3125+1.4273x	0.9676	39.16	13.52~68.34
非选择性拒食活性	24h	Y=3.6359+0.9324x	0.9721	17.26	4.29~31.15
	48h	Y=3.7540+0.8816x	0.9816	21.32	4.73~35.26

2.2 提取物对小菜蛾幼虫的触杀活性

采用浸虫法对小菜蛾3龄幼虫进行触杀活性测定,结果见表4。半夏乙醇提取物对小菜蛾3龄幼虫具有较强的触杀作用,触杀效果随提取物浓度增加而升高,但其作用表现较为缓慢。提取物在100 mg/ml浓度下,处理24 h后小菜蛾幼虫的校正死亡率仅为22.22%,当处理72 h后小菜蛾幼虫的校正死亡率高达

61.44%。

2.3 提取物对小菜蛾幼虫的胃毒作用

用半夏乙醇提取物浸渍甘蓝叶碟饲喂小菜蛾幼虫的胃毒作用见表5,死亡率随处理浓度的增加而提高,浓度越高,处理与对照死亡率的差异越显著。随着处理时间延长,各处理的小菜蛾幼虫的校正死亡率随之升高。

表4 半夏乙醇提取物对小菜蛾3龄幼虫的触杀作用

浓度/(mg/ml)	24 h		48 h		72 h	
	死亡率/%	校正死亡率/%	死亡率%	校正死亡率/%	死亡率/%	校正死亡率/%
100	22.22±2.48a	22.22±2.48a	42.22±4.16a	40.23±3.74a	64.44±4.42a	61.44±4.28a
75	16.67±2.23ab	16.67±2.23ab	35.56±4.52a	33.34±3.69a	57.78±4.17a	54.22±4.03a
50	12.22±2.17b	12.22±2.17b	25.56±3.37b	22.99±3.26b	42.22±4.52b	37.35±4.19b
25	8.89±2.74bc	8.89±2.74bc	18.89±3.44bc	16.09±3.38bc	32.22±3.48c	26.50±3.25c
12.5	5.56±1.86c	5.56±1.86c	12.22±3.12c	9.20±2.82c	21.11±3.33d	14.46±2.98d
CK	0.00±0.00	-	3.33±3.33d	-	7.78±2.22e	-

表5 半夏乙醇提取物对小菜蛾3龄幼虫的胃毒作用

浓度/(mg/ml)	24 h		48 h		72 h	
	死亡率/%	校正死亡率/%	死亡率%	校正死亡率/%	死亡率/%	校正死亡率/%
100	27.78±2.53a	27.78±2.53a	55.56±4.52a	54.55±2.48a	71.11±2.48a	69.41±2.48a
75	20.00±2.16ab	20.00±2.16ab	44.44±4.61b	43.18±2.48b	57.78±2.48b	55.29±2.48b
50	14.44±2.48b	14.44±2.48b	34.44±4.37c	32.95±2.48c	46.67±2.48c	43.53±2.48c
25	11.11±2.72bc	11.11±2.72bc	25.56±3.65d	23.86±2.48d	33.33±2.48d	29.41±2.48d
12.5	6.67±1.45ac	6.67±1.45ac	12.22±3.22e	10.23±2.48e	21.11±2.48e	16.47±2.48e
CK	0.00±0.00	-	2.22±1.11f	-	5.56±2.48f	-

表6 半夏乙醇提取物对小菜蛾3龄幼虫的生长发育抑制作用

浓度/(mg/ml)	幼虫体重/(mg/头)			生长抑制率/%	
	0 h	24 h	48 h	24 h	48 h
	100	1.86±0.12a	1.88±0.42c	1.91±0.52d	45.66±3.28a
75	1.84±0.15a	1.93±0.37c	2.02±0.58cd	44.22±3.35a	62.38±3.37a
50	1.79±0.16a	2.11±0.52bc	2.36±0.62c	39.02±3.11b	56.05±3.62b
25	1.85±0.20a	2.18±0.48bc	2.61±0.76bc	36.99±2.74b	51.40±3.42bc
12.5	1.82±0.18a	2.45±0.55b	2.88±0.85b	29.19±2.43c	46.37±3.19c
CK	1.81±0.11a	3.46±0.74a	5.37±1.08a	-	-

2.4 提取物对小菜蛾幼虫生长发育的抑制作用

用不同浓度提取物浸渍过的叶碟饲喂小菜蛾3龄幼虫,各处理幼虫体重变化及生长抑制百分率见表6。幼虫的体重均随处理药液浓度的增加而呈减小趋势,处理组与对照组间幼虫体重的差异显著。在处理48 h,浓度为100 mg/ml的提取物对小菜蛾3龄幼虫的生长抑制率为64.43%。

3 讨论

杀虫植物对植食性昆虫普遍具有的作用方式是拒食性。在该文拒食试验中,无论在选择性取食条件下,还是在非选择性取食条件下,随着半夏提取物浓度的增加,试虫的取食量逐渐减少,拒食率逐渐增加,24 h的拒食效果略高于48 h。表明半夏乙醇提取物中存在某种或几种物质,使小菜蛾对食物的兴趣降低,或消化食物的速度减缓,或引起生理上的不适;也可能是提取物对小菜蛾中枢神经系统的神经细胞具有药理作用,干扰了中枢神经系统的“信息编码”,从而影响其取食

行为。

以拒食、产卵忌避和生长抑制为目标,筛选对植食性昆虫有效的植物次生物质用于害虫防治,有利于延缓害虫抗药性产生和害虫持续控制^[20]。非嗜食植物提取物或植物次生物质主要是通过影响植食性昆虫的内分泌系统、生殖系统,以及昆虫体内相关酶系平衡和其它生理指标,从而干扰或抑制植食性昆虫的生长发育,导致昆虫发育历期延长、幼虫和蛹畸形、生殖能力减退等生理现象^[21-23]。在胃毒作用和生长发育抑制试验中,处理组试虫体重的增加量均小于对照组,在较高浓度下,提取物还可使小菜蛾的幼虫死亡,可能是因为胃毒作用而引起体内代谢失调而使生长发育受抑制。

4 结论

该试验结果表明,半夏乙醇提取物对小菜蛾幼虫具有多种作用方式,主要表现在对幼虫的触杀、胃毒、拒食、抑制生长发育作用,这些结果为进一步从中筛选和分离杀虫活性成分奠定了基础。研究杀虫活性植物

主要是为了寻找提供化学合成的先导化合物,再以此为模板开发新型的高效杀虫剂。由于半夏提取物对小菜蛾幼虫具有多种作用方式,对半夏提取物中所含的活性物质进行分离、鉴定及提纯,明确其活性成分和作用机制,是需要今后进一步研究的内容,对于进一步开发和利用这一植物资源,研制新型的环境友好植物杀虫剂,具有较大的理论和实践意义。

参考文献

- [1] Talekar N.S, Yang J.C. Influence of crucifer cropping system on the parasitism of *Plutella xylostella* by *Cotesia plutellae* and *Diadegma semiclausum*[J].Entomophaaga,1993,38(4):541-550.
- [2] Tabashnik B.E, Cushing N.L, Jihson M.W. Diamondback moth resistance to insecticides in Hawaii:intra-island variation and cross-resistance[J].Journal of Economic Entomology,1987,80:1091-1099.
- [3] Tabashnik B.E, Cushing N.L, Finson N. Field development of resistance to *Bacillus Thuringiensis* in diamondback moth[J].Journal of Economic Entomology,1990,83(5):1671-1676.
- [4] 唐振华.上海地区小菜蛾的抗药性及增效剂的作用[J].植物保护学报,1992,19(2):179-185.
- [5] Perez C.J, Tang J.D, Shelton A.M. Resistance of diamondback moth to *Bacillus Thuringiensis* Berliner in central America[J].Journal of Economic Entomology,1997,90(1):87-93.
- [6] Talekar NS , Shelton AM. Biology,ecology, and management of the diamondback moth[J]. Annual Review Entomology,1993,38:275-301.
- [7] 吴文君,刘惠霞,朱靖博.天然产物杀虫剂—原理、方法、实践[M].西安:陕西科学技术出版社,1998:10-42.
- [8] Benner P. Pesticidal compounds from higher plants[J].Pesticide Science,1993,(39):95.
- [9] 肖培根.半夏.新编中药志[M].北京:化学工业出版社,2002:372.
- [10] 孙册,徐继华,翟世康,等.半夏蛋白的若干生物学性质[J].生物化学与生物物理学报,1983,15(4):333-338.
- [11] 刘振民,席甲英,李玉厚,等.芫花、半夏毒杀天牛幼虫试验[J].山东农业科学,1990,(6):40.
- [12] 刘国庆.半夏和苦楝汁液对菜青虫杀虫活性的研究初报[J].中国植保导刊,2004,24(4):7-8.
- [13] 黄大昉,潘映红,张淑香,等.从掌叶半夏和半夏中发现对几种蚜虫有致死活性的蛋白[J].中国农业科学,1997,30(2):94-96.
- [14] 李进步,薛建平,方丽平,等.半夏提取物对棉蚜的毒杀和拒食活性[J].中国中药杂志,2007,32(10):973-975.
- [15] 李小艳,亓东明,孙成仁.半夏乙醇提取物对茄二十八星瓢虫的拒食活性研究初报[J].西华师范大学学报:自然科学版,2008,29(1):59-62.
- [16] 杨峰山,张友军,张文吉,等.用甘蓝苗连续饲养小菜蛾的技术[J].昆虫知识,2004,41(5):483-486.
- [17] 张兴,潘文亮.缓效型杀虫剂室内生物测定的计算和评价[J].北京农业科学,1989,(3):6-10.
- [18] 薛超文,王海迎,孙强,等.五种杀虫剂对小菜蛾的室内生物活性研究[J].农药研究与应用,2006,10(3):25-28.
- [19] 秦小萍,赵红艳,杨美林.坡柳种子提取物对菜青虫取食和生长发育的影响[J].农药,2007,46(7):494-496.
- [20] 庞雄飞.植物保护剂与植物免害工程—异源植物次生化合物在害虫防治中的应用[J].世界科技研究与发展,1999,21(2):24-28.
- [21] 罗万春,李云寿,幕立义.几种苦豆子生物碱对小菜蛾部分生理指标的影响[J].昆虫知识,1997,34(4):212-215.
- [22] Saxena RC, Khan ZR. Aberrations caused by neem oil odour in green leafhopper feeding on rice plants[J].Ent.Exp.Appl., 1986,42:279-284.
- [23] Tanzubil PB, McCaffery AR. Effect of Azadirachtin on reproduction in the African armyworm(*Spodoptera exempta*)[J].Ent. Exp.Appl., 1990,57:115-121.