

刘畅,王芳,陈晓婷,等. 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜解毒酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(17):125-127.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.030

乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜解毒酶活性的影响

刘畅,王芳,陈晓婷,张蓉

(宁夏农林科学院植物保护研究所,宁夏银川 750002)

摘要:乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜具有触杀作用,但其作用机制尚未明确。采用有机溶剂超声提取乳浆大戟毒素,并利用生物化学方法测定枸杞棉蚜取食后体内相关解毒酶的活性变化。结果表明,随乳浆大戟毒素浓度升高,羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶活性降低,表明乳浆大戟毒素对这 2 种解毒酶具有抑制作用;碱性磷酸酶活性和 P450 酶含量显著升高,说明乳浆大戟毒素对这 2 种解毒酶具有诱导作用。乳浆大戟毒素可显著影响昆虫的代谢酶,且其对羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶的抑制作用可能与其毒杀作用有关。为阐明乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜致死的作用机制,开发以乳浆大戟为基础的枸杞蚜虫可持续控制新技术提供理论依据。

关键词:乳浆大戟;毒素提取;枸杞棉蚜;体内解毒酶;活性变化;绿色防控

中图分类号: S482.3⁺9;S435.671 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)17-0125-03

蚜虫是危害枸杞的重要害虫^[1-2],广泛分布于我国枸杞种植区^[3]。其中,枸杞蚜虫在宁夏回族自治区地区 1 年发生 15 代,繁殖系数高,世代重叠严重,对枸杞子的产量和品质影响极大^[4]。蚜虫聚集于枸杞新梢或茎部,吸食汁液,影响枸杞正常开花结果。目前,枸杞蚜虫的防治仍以化学防治为主,但是长期大量不合理使用化学农药,导致枸杞蚜虫抗药性日趋严重,加大了枸杞蚜虫的猖獗危害^[5]。同时,化学农药带来的农药残留超标、减少天敌数量及环境污染等一系列问题也日益突出。这些不利因素促使人们迫切寻求环境友好的植物保护方式。近年来,在农业生产实践中植物源农药主要来自于植物中具有活性的天然物质,比如噻吩类及多炔类化合物等^[6],这些杀虫剂的开发源于其新颖的靶标及专一性强、安全性高、不易产生抗药性等特点^[7-8]。因此研究具有杀虫活性的天然化合物致毒机制,探索新作用靶标,是农药开发研究范畴的重点和前沿。

乳浆大戟(*Euphorbia esula* Linn.)为大戟科,多年生草本植物,常见于干旱山坡、草地或路边,在宁夏主要分布于六盘山、罗山、贺兰山及固原市等草地,资源丰富。乳浆大戟根系发达,生命力极强,不仅占据草场面积,消耗草地的水分和养分,竞争取代其他有经济价值的优良牧草,使草场的产量和质量下降,而且植物本身有毒^[9],大面积草场因乳浆大戟的蔓延被牲畜忌避而荒废,给草地畜牧业生产造成很大的经济损失^[10]。乳浆大戟含有的白色或黄白色乳汁,对皮肤有刺激性和毒性,但可以抗肿瘤、抗菌和抗白血病等,具有重要的药用

价值^[11]。2013 年王芳等发现其对枸杞蚜虫具有一定的杀虫活性^[12],随后研制了乳浆大戟制剂,并明确了其作用方式,但对枸杞蚜虫的致死机制并不明确^[13]。为更好地建立以乳浆大戟为基础的枸杞蚜虫绿色防控新技术,明确其对枸杞蚜虫的致死作用机制尤为重要。通过测定乳浆大戟提取物对枸杞蚜虫体内解毒酶活性的变化,从毒理学揭示乳浆大戟对枸杞蚜虫致死的作用机制,为进一步深入了解其致死作用机制及建立枸杞蚜虫绿色防控新技术提供技术支撑,为化学农药的减施、枸杞害虫的可持续治理及枸杞安全生产提供有力保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试虫源 枸杞棉蚜(*Aphis gossypii* Glover)采自园林场枸杞园,均为个体大小一致、健康的无翅成蚜。采集时间为 2017 年 8 月。

1.1.2 供试试剂 毒扁豆碱购自 Sigma 公司; α -乙酸萘酯、固蓝 B 盐、十二烷基硫酸钠(SDS)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)等均为国产生化试剂;谷胱甘肽-S-转移酶测定试剂盒、酸性磷酸酶(ACP)测试盒、碱性磷酸酶(AKP)测试盒、昆虫(Insect)细胞色素 P450(CYP450)ELISA 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫羧酸酯酶活性影响 将乳浆大戟干粉样品用乙醇超声波提取 3 次,合并提取液,旋转蒸发仪浓缩至干,得乳浆大戟毒素。参照 Asperen 的方法^[14],将枸杞棉蚜(每个处理 500 头以上)用乳浆大戟毒素 25、50、100、200 mg/mL 不同浓度药液处理,12 h 后挑选活虫 200 头,加 0.04 mol/L, pH 值 7.0 的磷酸缓冲液 5 mL,冰浴匀浆,匀浆液于转速 10 000 r/min 下,4 ℃离心 15 min,把上清液作为酶源。以 α -乙酸萘酯(3×10^{-4} mol/L,含 10^{-4} mol/L 毒扁豆碱)为底物,经酯酶水解后生成 α -萘酚与显色剂(5% 十二烷基硫酸钠水溶液中含 1% 坚牢蓝 B)作用变为深蓝色,测定波长 600 nm 处的吸光度,重复 3 次,以酶量(mL)为自变

收稿日期:2018-06-07

基金项目:宁夏自然科学基金(编号:NZ13122);宁夏农林科学院创新先导资金(编号:NKYJ-16-28);宁夏农林科学院科技创新先导资金(编号:NKYJ-17-16)。

作者简介:刘畅(1985—),女,辽宁沈阳人,硕士,助理研究员,主要从事植物源农药的开发与利用研究。E-mail: liuchangamy@126.com。

通信作者:张蓉,博士,研究员,主要从事生物农药研究。E-mail: yezhrnx@163.com。

量,吸光度为因变量,绘制标准曲线,计算 1 mL 酶液生成的 α -萘酚量,酶液再经考马斯亮蓝法测定蛋白质含量($\mu\text{g}/\text{头}$),代入标准曲线中算出羧酸酯酶的比活力 [$\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot 15 \text{ min})$]。

1.2.2 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫谷胱甘肽 *S*-转移酶影响 乳浆大戟毒素提取方法见“1.2.1”节,酶源处理参照“1.2.1”节。采用谷胱甘肽 *S*-转移酶测定试剂盒测定谷胱甘肽 *S*-转移酶活性。其原理为

谷胱甘肽 + 1-氯-2,4-二硝基苯 $\xrightarrow{\text{GST}}$ 谷胱甘肽二硝基苯复合物 + 盐酸;

$\text{GSH} + \text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2\text{Cl} \xrightarrow{\text{GST}} \text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2\text{GS} + \text{HCl}$ 。

还原型谷胱甘肽(GSH)在谷胱甘肽 *S*-转移酶催化下与 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB 底物)反应,在反应时间内,谷胱甘肽 *S*-转移酶活性与反应前后底物浓度呈正方向线性关系。谷胱甘肽 *S*-转移酶活性越强,谷胱甘肽含量减少越多。

1.2.3 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫磷酸酶活性影响 乳浆大戟毒素提取方法见“1.2.1”节,酶源处理参照“1.2.1”节。采用南京建成生物工程研究所的酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)测定试剂盒测定磷酸酶活性。其原理为磷酸苯二钠在酸性和碱性磷酸酶催化作用下产生游离酚和磷酸,酚与 4-氨基安替吡啉在碱性溶液中经铁氰化钾氧化变成红色,根据颜色深浅程度测定酶活性大小。

1.2.4 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫细胞色素 P450 酶含量影响 乳浆大戟毒素提取方法见“1.2.1”节,酶源处理参照“1.2.1”节。采用细胞色素 P450 试剂盒测定昆虫细胞色素 P450 酶含量。试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验。往酶标板的微孔中,依次加入标本、标准品、辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体,经过温育洗涤。3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)在过氧化物酶的催化下变蓝色,并在酸的作用下变成黄色。颜色的深浅程度和样品的细胞色素 P450 酶活性呈正相关关系。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度,计算样品 P450 酶含量。

2 结果与分析

2.1 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜羧酸酯酶活性的影响

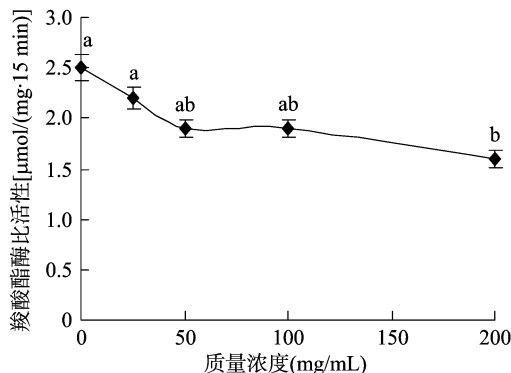
由图 1 可见,乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫羧酸酯酶活性有一定的抑制作用,当乳浆大戟浓度为 50 mg/mL 时,抑制作用达到 20%,当乳浆大戟毒素浓度达到 200 mg/mL 时,抑制作用达到 40%。

2.2 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫谷胱甘肽 *S*-转移酶活性的影响

由图 2 可见,乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫谷胱甘肽 *S*-转移酶活性有显著的抑制作用($P < 0.05$),随着毒素浓度增加,抑制作用增强,与对照相比,当乳浆大戟毒素浓度达到 200 mg/mL 时,抑制作用达到 90%。

2.3 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性影响

用微板法测定乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫 ACP 和 AKP 活性的影响,结果见图 3。乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫 ACP 活性没有显著性影响。AKP 具有诱导作用,当乳浆大



图中数值为 3 次重复试验平均值±标准误。不同小写字母表示不同处理组间差异显著($P < 0.05$)。下图同。

图1 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫羧酸酯酶活性的影响

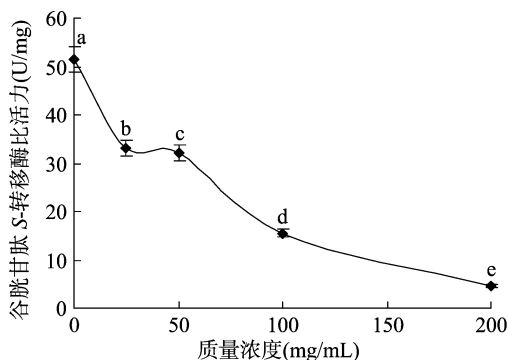


图2 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫谷胱甘肽 *S*-转移酶活性的影响

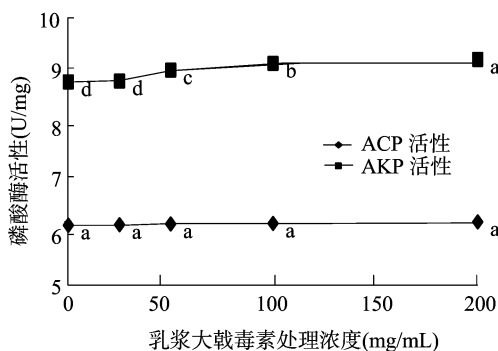


图3 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫酸性和碱性磷酸酶活性的影响

戟毒素浓度增加时,AKP 活性升高,当乳浆大戟毒素浓度达到 50 mg/mL 时,与对照相比 AKP 活性显著升高($P < 0.05$)。

2.4 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫细胞色素 P450 酶含量影响

采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附法测定乳浆大戟毒素对细胞色素 P450 酶含量的影响,结果见图 4。乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫细胞色素 P450 酶含量有显著的诱导作用。随着浓度增加,P450 酶含量显著升高,当乳浆大戟毒素浓度达到 200 mg/mL 时,P450 酶含量变化与乳浆大戟毒素浓度 100 mg/mL 时相比不显著。

3 结论与讨论

一直以来,科研人员致力于开发具有生物活性的植物源

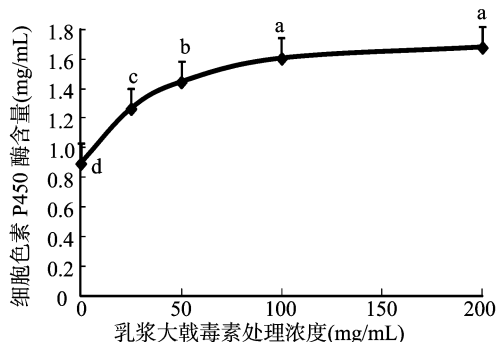


图4 乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜成虫细胞色素 P450 酶含量的影响

农药,对植物源农药的应用,采用简单方法就是用粗提物进行加工利用,以达到防治害虫的目的。乳浆大戟作为植物源农药原材料来防治枸杞棉蚜,具有很大的发展潜力。笔者实验室前期研究发现,乳浆大戟对枸杞棉蚜具有显著的毒杀作用,并且以触杀作用为主。枸杞棉蚜在取食有毒有害植物时,体内的酶也会发生变化,接触植物毒性严重影响棉蚜体内的酶活性变化。棉蚜对有毒物质刺激反应的剧烈程度可能与化合物的毒性大小有关。本研究从解毒代谢方面揭示了乳浆大戟对枸杞棉蚜的致死作用机制。随着乳浆大戟毒素浓度升高,羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶活性降低,说明乳浆大戟毒素对这 2 种解毒酶具有抑制作用;碱性磷酸酶活性和 P450 酶含量显著升高,说明乳浆大戟毒素对这 2 种解毒酶具有诱导作用。

羧酸酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶、酸性/碱性磷酸酶和细胞色素 P450 酶系^[15]是昆虫体内重要的解毒代谢酶,参与水解、还原、氧化、耦合等代谢过程^[16-18]。本研究发现,枸杞棉蚜取食后,成虫体内羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶活性受到显著抑制,导致其乳浆大戟有毒物质的解毒代谢能力下降,引起昆虫死亡。羧酸酯酶可以与进入昆虫体内的有毒物质迅速结合,将有毒物质在到达靶标作用位点前阻隔或降解。当枸杞棉蚜取食乳浆大戟毒素后,羧酸酯酶活性降低,降解毒素能力下降,因此毒素迅速到达靶标作用位点而发挥作用。谷胱甘肽 S-转移酶是昆虫对农药或者有毒物质代谢中重要的共轭酶系之一,它能使外源的亲电基团与体内的还原型谷胱甘肽发生共轭代谢,而保护体内其他亲核的中心^[19-20],乳浆大戟毒素对谷胱甘肽 S-转移酶活性的抑制,可能会使谷胱甘肽 S-转移酶对内源或外源毒素的降解能力下降。乳浆大戟毒素处理枸杞棉蚜后碱性磷酸酯酶和细胞色素 P450 酶被诱导激活,可能是昆虫的一种应激性反应,即增强昆虫对毒素解毒代谢,以起到解毒作用^[21]。这种激活作用与昆虫对植物的抗性有关,可能是由于乳浆大戟毒素影响了昆虫体内的水解代谢,或外源物乳浆大戟毒素刺激枸杞棉蚜增强了水解代谢,提高了昆虫本身的耐药性。如果开发为植物源药剂,可通过与代谢酶抑制剂进行复配来提高乳浆大戟毒素的药效。

综上所述,乳浆大戟毒素对枸杞棉蚜羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶的抑制与其毒杀作用有关,随着毒素浓度升高,其毒杀作用增强,昆虫的解毒代谢能力变弱,最终死亡。羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶是昆虫体内重要的解毒代谢酶,其可能是乳浆大戟的作用靶标之一,由于乳浆大戟的致毒机制复杂多样,至今作用靶标还不明确,因此有必要对其进一步从微观层面深入研究,将有望开发出作用机制独特的植物源农药。

参考文献:

- [1] 李 锋,杨 芳,李云翔,等. 枸杞蚜虫发育的有效积温和发育起点温度测定[J]. 宁夏农林科技,2002(3):18-19.
- [2] 赵紫华,张 蓉,贺达汉,等. 不同人工干扰条件下枸杞园害虫的风险性评估与防治策略[J]. 应用生态学报,2009,20(4):843-850.
- [3] 张润志,张 蓉. 宁夏危害枸杞的蚜虫种类为棉蚜、桃蚜和豆蚜[J]. 应用昆虫学报,2016,53(1):218-222.
- [4] 李建领,刘 赛,徐常青,等. 宁夏枸杞主要害虫发生规律与防治策略[J]. 中国现代中药,2017,19(11):1599-1604.
- [5] 王 芳,刘 畅,何 嘉,等. 宁夏地区枸杞蚜虫抗药性测定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2017,45(12):61-67.
- [6] Dayan F E, Cantrell C L, Duke S O. Natural products in crop protection[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry,2009,17(12):4022-4034.
- [7] Rattan R S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin[J]. Crop Protection,2010,29(9):913-920.
- [8] 鲁艳辉,高广春,郑许松,等. 诱集植物香根草对二化螟幼虫致死的作用机制[J]. 中国农业科学,2017,50(3):486-495.
- [9] 王庆海,李 翠,庞 卓,等. 中国草地主要有毒植物及其防控技术[J]. 草地学报,2013,21(5):831-841.
- [10] 刘爱萍. 乳浆大戟天敌-大戟天蛾生物学特性研究:昆虫与环境-中国昆虫学会 2001 年学术年会论文集[C]. 北京:中国农业出版社,2001:494-501.
- [11] 师彦平,贾忠建. 我国大戟二萜酯及其生理活性研究新进展[J]. 高等学校化学学报,1997,18(7):1107-1112.
- [12] 王 芳,南宁丽,周一万,等. 10 种植物粗提物对枸杞主要害虫的杀虫活性[J]. 甘肃农业大学学报,2013,12(6):88-91.
- [13] 刘 畅,王 芳,张 蓉. 乳浆大戟提取物对枸杞蚜虫作用方式研究:2014 年中国植物保护学会学术年会论文集[C]. 北京:中国农业科技出版社,2014:259-264.
- [14] Asperen K V. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method[J]. Journal of Insect Physiology,1962,8(4):401-416.
- [15] Elzaki M E A, Zhang W, Han Z. Cytochrome P450 CYP4DE1 and CYP6CW3v2 contribute to ethiprole resistance in *Laodelphax striatellus* (Fallén) [J]. Insect Molecular Biology,2015,24(3):368-376.
- [16] Furihata T, Hosokawa M, Satoh T, et al. Synergistic role of specificity proteins and upstream stimulatory factor 1 in transactivation of the mouse carboxylesterase 2 microsomal acylcarnitine hydrolase gene promoter[J]. Biochemical Journal,2004,384(15):101-110.
- [17] Duan H, Schuler M A. Differential expression and evolution of the *Arabidopsis* CYP86A subfamily [J]. Plant Physiology,2005,137(3):1067-1081.
- [18] Després L, David J, Gallet C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals[J]. Trends in Ecology and Evolution,2007,22(6):298-307.
- [19] 吕 敏,刘惠霞,吴文君. 谷胱甘肽 S-转移酶与昆虫抗药性的关系[J]. 昆虫知识,2003,40(3):204-207,228.
- [20] Hayes J D, Flanagan J U, Jowsey I R. Glutathione transferases[J]. Arabidopsis Book,2005,8(45):e0131.
- [21] 王志超,康志娇,史雪岩,等. 有机磷类杀虫剂代谢机制研究进展[J]. 农药学报,2015,17(1):1-14.