

# Effects of Star Anise Extract on the Activity of Peach Aphid GSTs and AChE

Chuanfu Kuang<sup>1</sup>, Dexin Chen<sup>2</sup>, Shun Zhang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hunan Tobacco Company Chenzhou Company, Chenzhou Hunan

<sup>2</sup>Institute of Tobacco, China Academy of Agricultural Sciences Tobacco Research Institute, Qingdao Shandong

Email: 191063396@qq.com

Received: Aug. 26<sup>th</sup>, 2019; accepted: Sep. 5<sup>th</sup>, 2019; published: Sep. 12<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

Three solvent extracts of star anise, methanol, ethyl acetate and petroleum ether were used to spray the peach aphid. The results showed that low dose (0.063 mg/mL) methanol extracts induced GSTs after different doses of the three extracts. The activity of these two enzymes was inhibited by the other two treatments, and the inhibition increased with the increase of the treatment dose. All the extracts showed strong time effect on the activity of the two enzymes in the test. After the three extracts were treated with methanol 0.305 mg/mL, ethyl acetate 0.142 mg/mL and petroleum ether 0.270 mg/mL, the activity of two enzymes in the body of peach aphid showed an overall trend of inhibition and reactivation with the extension of treatment time. The effects of the three extracts on the activity of the two enzymes were slightly different in rate and degree of inhibition. The inhibition rates of methanol, ethyl acetate and petroleum ether extracts on GSTs activity in peach aphid reached the highest at 36 h, 60 h and 48 h after treatment, respectively, reaching 55.87%, 62.02% and 56.58%.

## Keywords

Star Anise Extract, Peach Aphid, Enzyme Activity

# 八角茴香提取物对桃蚜GSTs和AChE活性的影响

匡传富<sup>1</sup>, 陈德鑫<sup>2</sup>, 张 顺<sup>2</sup>

<sup>1</sup>湖南省烟草公司郴州市公司, 湖南 郴州

<sup>2</sup>中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛

Email: 191063396@qq.com

收稿日期: 2019年8月26日; 录用日期: 2019年9月5日; 发布日期: 2019年9月12日

## 摘要

采用八角茴香的甲醇、乙酸乙酯和石油醚3种溶剂提取物对桃蚜进行喷雾处理,测定3种提取物对桃蚜体内乙酰胆碱酯酶(AChE)、植物谷胱甘肽S-转移酶(GSTs)的剂量效应和时间效应。结果表明:3种提取物的不同剂量处理后,低剂量(0.063 mg/mL)的甲醇提取物对GSTs具有诱导作用;其它两个处理对桃蚜体内的这2种酶的活力均表现为抑制作用,而且抑制作用随着处理剂量的增大而升高。3种提取物对试虫体内2种酶的活性均表现出较强的时间效应。对甲醇0.305 mg/mL、乙酸乙酯0.142 mg/mL、石油醚: 0.270 mg/mL剂量的3种提取物处理后,桃蚜体内2种酶的活性随处理时间的延长整体表现为呈先抑制再激活的趋势;3种提取物对2种酶活性影响的差异在于抑制速度和程度上稍有不同,甲醇、乙酸乙酯、石油醚提取物对桃蚜体内GSTs活性的抑制率分别在处理后36 h、60 h和48 h达到最高,分别达到55.87%、62.02%和56.58%。

## 关键词

八角茴香提取物, 桃蚜, 酶活性

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

在与病虫害协同进化的过程中,植物产生了一些具毒杀、忌避、拒食和生长发育抑制等活性的次生代谢物,含这些成分的植物被称为杀虫植物。这些次生代谢物在自然界中有顺畅的降解途径,易降解消失,环境和谐性好,而且许多植物性杀虫成分还具有多种靶标和独特的作用机制,使害虫对其不易产生抗药性[1]。因此,杀虫植物的研究为植保领域的研究重点之一。迄今为止,国内已开发多种植物源农药并用于防治烟草害虫,如鱼藤酮、印楝素、苦参碱、苦皮藤素等。外源物进入昆虫体内后会与多种代谢酶系发生作用。一般认为,AChE和GSTs是昆虫与寄主植物之间以及昆虫与杀虫剂之间起关键作用的酶类。其中GSTs等解毒酶是在昆虫体内代谢过程中起着重要作用的酶类,AChE是有机磷杀虫剂和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标[2],这类酶在对外源化合物的解毒代谢方面起着重要作用,药剂对上述酶系的影响均会造成昆虫代谢紊乱而影响正常的生理生化过程。

本研究以桃蚜为试虫,就八角茴香提取物对上述2种酶系的影响进行初步探讨,以期从生理生化角度探索提取物对试虫作用的靶标,及昆虫的解毒机制,阐述八角茴香提取物杀虫作用机理,为其开发应用提供理论依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 供试材料

八角茴香提取物,实验室内用甲醇、乙酸乙酯和石油醚3种溶剂对八角茴香干果粉末浸提所得,以3种有机溶剂采用冷浸法对八角茴香干果中的生物活性物质进行提取,采用滤纸过滤,置于4℃冰箱中保存备用。

用于饲养桃蚜的甘蓝叶片,采自中国农科院烟草研究所温室大棚内播种的甘蓝。

## 2.2. 供试昆虫

桃蚜采自即墨试验农场, 在中国农科院烟草研究所大棚温室内所栽的烟草上饲养繁殖 3 代以上, 选取大小一致, 活动正常的蚜虫供试。

## 2.3. 试剂与仪器

甲醇(Methanol), 上海振企化学试剂有限公司生产; 乙酸乙酯(Ethylacetate), 广东汕头市西陇化工厂生产; 丙酮(Acetone), 上海凌峰化学试剂有限公司。所有溶剂均为分析纯。离心机(TGL8R Refrigerated Centrifuge): Hema 公司; 分光光度计(DU730): BECKMAN COULTER 公司; 恒温水浴锅(B-260): 上海亚荣生化仪器公司; 冰箱(ULTRALOW): SANYO 公司; 光照培养箱。移液枪, 培养皿, 广口瓶, 毛笔等。

乙酰乙碱酯酶测定试剂盒、GSTs 测定试剂盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒。

## 2.4. 试虫处理

### 八角茴香提取物对桃蚜的处理方法

八角茴香提取物对桃蚜体内两种酶活性的剂量效应测定: 用 1:4 (v:v)的丙酮水溶液将八角茴香的甲醇、乙酸乙酯和石油醚 3 种溶剂提取物分别均稀释成 0.063、0.125、0.250、0.500、1.000 mg/mL (W/V) 5 个梯度浓度的药液, 用移液枪取各稀释液 3 mL, 滴入喷壶内, 用喷壶喷洒桃蚜体表, 每个浓度处理 100 头蚜虫, 重复 3 次。然后将桃蚜分别转移到培养皿 (直径 9 厘米)中, 培养皿内铺一层滤纸, 用蒸馏水打湿, 再铺一层事先剪好的菜叶, 作为蚜虫食物。用保鲜膜封闭, 再用昆虫针在保鲜膜上戳 20 个小洞作为通气孔。用丙酮水溶液作溶剂对照。将各处理放入(25 ± 1)°C、相对湿度 80%左右、光周期为 L:D = 14:10 h, 光照强度: 0~5500 LX 的恒温光照培养箱内。24 h 后取样固定, 以供制取酶液。

八角茴香提取物对桃蚜体内两种酶活性的时间效应测定: 将八角茴香 3 种溶剂提取物以 1:4 (v:v)的丙酮水溶液稀释后, 分别设 5 种剂量触杀处理试虫(无翅若蚜), 并设丙酮水溶液作为溶剂对照, 处理 72 h 后检查死亡虫数, 计算校正死亡率和 LC<sub>50</sub>。再用八角茴香 3 种溶剂提取物的 LC<sub>50</sub> 剂量(甲醇: 0.305 mg/mL; 乙酸乙酯: 0.142 mg/mL; 石油醚: 0.270 mg/mL)处理试虫。试虫的处理和饲养方法同上。每天换一次叶子, 除去死蚜。于处理后每隔 12 h 取样一次, 共取 6 次, 以供制取酶液。

## 2.5. 桃蚜体内酶活性测试

### 2.5.1. 酶液的制备

试虫先用生理盐水漂洗 2~3 次。准确称取干净的待测试虫重量, 按重量体积比(1:9)加生理盐水制成 10%的组织匀浆, 在 4°C 下以 3500 r/min 离心 10 min, 取上清液作为待测酶液。

以上酶液提取都是在冰浴中进行, 所用生理盐水、匀浆器都需要进行遇冷处理, 以防止酶失活。所提酶样均放入-20°C 冰箱内储藏备用。

### 2.5.2. 酶活性的测定

AChE、GSTs 和蛋白质含量的具体测定方法按照南京建成生物工程公司生产的试剂盒说明书进行。每处理重复 3 次。

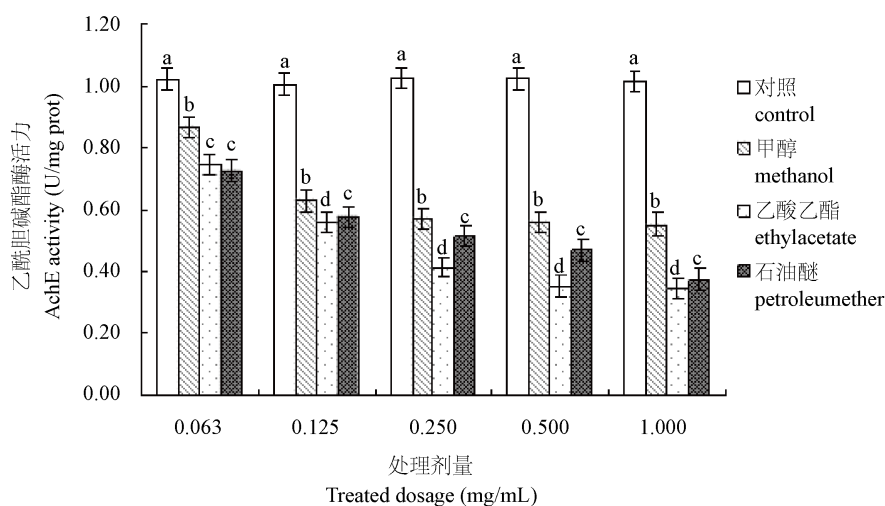
### 2.5.3. 数据统计分析

用 DPS 软件统计酶活性的平均值和标准误, 并采用 Duncan's 新复极差法检验比较各处理间的差异显著性。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 八角茴香提取物对桃蚜 AChE 活力的影响

分别用 1.000、0.500、0.250、0.125、0.063 mg/mL 5 种剂量的八角茴香 3 种有机溶剂提取物处理桃蚜，24 h 时测定试虫体内 AChE 活性的变化如图 1。结果表明：八角茴香提取物的 3 种溶剂提取物对 AChE 活性均有抑制作用，而且作用随着处理剂量的增加而提高。在最大处理剂量(1.000 mg/mL)下，八角茴香的甲醇、乙酸乙酯和石油醚提取物对 AChE 活性的抑制率分别达到 45.62%、62.75%和 63.32%。



注：a-对照；b-甲醇；c-乙酸乙酯；d-石油醚。

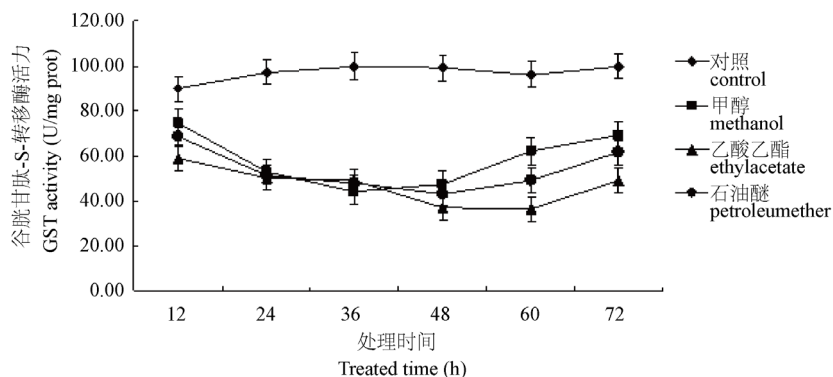
**Figure 1.** Effect of different treatment dose of 3 solvent extracts of octagonal anise on ache activity of peach aphid

**图 1.** 八角茴香 3 种溶剂提取物不同处理剂量对桃蚜的 AChE 活力的影响

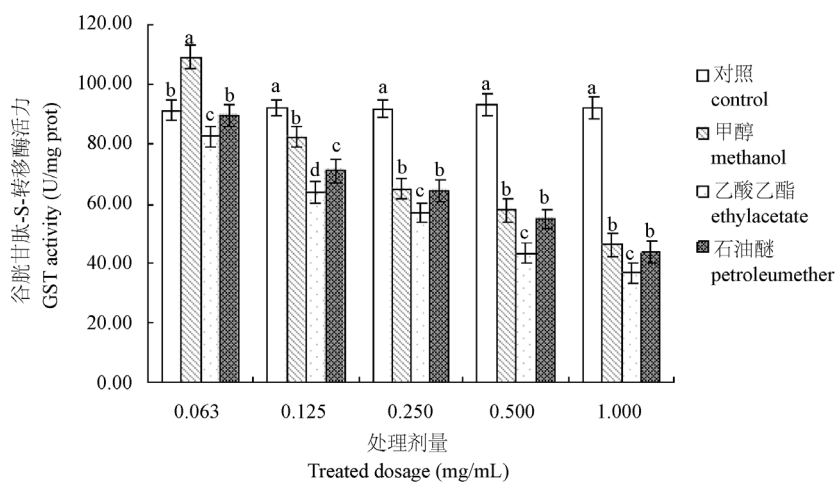
分别用八角茴香的 3 种溶剂提取物的致死中浓度 LC50 (甲醇:0.305 mg/mL; 乙酸乙酯:0.142 mg/mL; 石油醚: 0.270 mg/mL)处理试虫，分别于处理后的 12、24、36、48、60、72 h 测定桃蚜体内 AChE 活性的变化如图 2。结果表明：与对照相比较，八角茴香 3 种溶剂提取物对 AChE 均有明显的抑制作用，而且具有一定的时间效应：乙酸乙酯提取物在 36 h 内，甲醇、石油醚提取物在 48 h 时内对 AChE 抑制作用，随着处理时间的延长而增强。随后，乙酰胆碱酯活性又有一定程度的恢复，这可能是害虫对有毒物质侵入后的自身调节反应的结果。恢复后所达到的最高活力分别只有对照的 68.68%、54.15%和 55.64%。乙酸乙酯提取物对桃蚜体内 AChE 活性的抑制率在处理 36 h 最高，达到 55.76%；而甲醇、石油醚提取物在 48 h 最高，分别为 51.68%和 51.23%。

#### 3.2. 八角茴香提取物对桃蚜 GSTs 活力的影响

分别用 1.000、0.500、0.250、0.125、0.063 mg/mL 5 种剂量的八角茴香 3 种有机溶剂提取物处理桃蚜，24 h 时测定试虫体内 GSTs 酶活性的变化如图 3。结果表明：在以 0.063 mg/mL 的最低剂量处理时，甲醇提取物处理后，桃蚜的 GSTs 活性比对照上升了 19.56%，石油醚提取物与对照相比差异不显著，乙酸乙酯提取物比对照降低了 9.57%。在 0.125 mg/mL 以上的剂量处理中，八角茴香的 3 种溶剂提取物对 GSTs 酶活性均表现为抑制作用，而且抑制作用随着处理剂量的增加而提高。在最大处理剂量(1.000 mg/mL)下，八角茴香的甲醇、乙酸乙酯和石油醚提取物对 GSTs 酶活性的抑制率均为最高，分别达到 50.13%、60.34%和 52.76%。

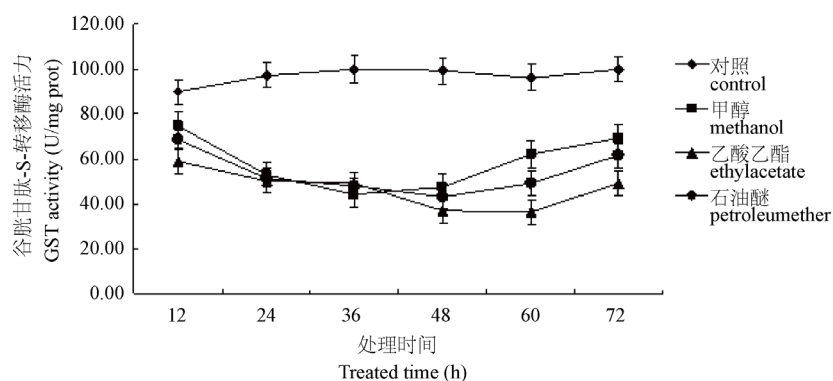


**Figure 2.** Effect of 3 solvent extracts of anise on AChE activity of aphid at different times  
**图 2.** 八角茴香的 3 种溶剂提取物不同时间对桃蚜的 AChE 活力的影响



注: a-对照; b-甲醇; c-乙酸乙酯; d-石油醚。

**Figure 3.** Effect of different dose of 3 solvent extracts of anise on GSTs activity of peach aphid  
**图 3.** 八角茴香 3 种溶剂提取物不同剂量对桃蚜的 GSTs 活力的影响



**Figure 4.** Effect of 3 solvent extracts of anise on GSTs activity of aphid at different times  
**图 4.** 八角茴香的 3 种溶剂提取物不同时间对桃蚜的 GSTs 活力的影响

分别用八角茴香的 3 种溶剂提取物的致死中浓度 LC<sub>50</sub> (甲醇:0.305 mg/mL; 乙酸乙酯:0.142 mg/mL; 石油醚: 0.270 mg/mL)处理桃蚜, 分别于处理后的 12、24、36、48、60、72 h 测定桃蚜体内 GSTs 酶活性的变化如图 4。结果表明: 与对照相比较, 八角茴香 3 种溶剂提取物对 GSTs 酶均有明显的抑制作用,



而且具有一定的时间效应：甲醇提取物在 36 h 内，乙酸乙酯、石油醚提取物在 48 h 时对 GSTs 酶抑制作用，随着处理时间的延长而增强。随后，GSTs 酶活性又有一定程度的恢复，这可能是害虫对有毒物质侵入后的自身调节反应的结果。在处理后的 72 h 时，甲醇、乙酸乙酯、石油醚提取物处理的桃蚜的 GSTs 酶活力分别恢复到对照的 69.39%、49.20%和 61.63%。甲醇、乙酸乙酯、石油醚提取物对桃蚜体内 GSTs 活性的抑制率分别在处理后 36 h、60 h 和 48 h 达到最高，分别达到 55.87%、62.02%和 56.58%。

#### 4. 小结与讨论

1) 八角茴香提取物对桃蚜体内重要代谢酶活性有强烈的抑制作用，导致试虫对其难以代谢，抑制了蚜虫的正常生理机能，可以使其中毒致死。

2) 低剂量(0.063 mg/mL)的甲醇提取物对 GSTs 具有诱导作用，这可能是昆虫的一种应激性反应，即增强对植物次生物质的解毒代谢。

3) AChE 是生物体内影响神经系统的主要酶，其主要生物学功能是催化乙酰胆碱水解为乙酸和胆碱，从而保证神经传导的正常进行。它是有机磷类和氨基甲酸酯类等多种杀虫剂的重要作用靶标。八角茴香提取物强烈抑制了桃蚜的 AChE 活性，必然会使其中枢神经系统轴突传导被阻断，而最终引起试虫的死亡，由此推测，八角茴香提取物可能含有神经毒剂类杀虫物质，对桃蚜具有神经毒剂作用。

4) 八角茴香提取物可明显影响桃蚜的 AChE 和 GSTs 等代谢酶系活性，这种影响与其对桃蚜的毒杀作用密切相关。3 种提取物对桃蚜体内 AChE 的抑制作用正好与它们在对桃蚜的毒力测定中的表现相吻合，因为从 3 种提取物对桃蚜的致死中浓度(甲醇：0.305 mg/mL；乙酸乙酯：0.142 mg/mL；石油醚：0.270 mg/mL)来看，其毒力大小依次为：乙酸乙酯提取物 > 石油醚提取物 > 甲醇提取物。AChE、GSTs 活力的下降可能是造成试虫在药剂处理后死亡的主要原因。对此还有必要进一步研究。

5) 马志卿等[3] (2008)研究表明，松油烯-4-醇对粘虫 5 龄幼虫的 GSTs (GSTs)则表现出先抑制后恢复的趋势，与本研究结果一致。

6) 八角茴香提取物含有多种植物次生物质，进入桃蚜体内后，强烈抑制了 GSTs 的活性，从而使桃蚜体内的正常解毒代谢受到影响，导致有毒物质在体内积累，同时也严重抑制了昆虫的正常代谢，致使其正常的生理机能受到影响而加速其中毒致死速度。因而，八角茴香提取物作为混剂使用在桃蚜抗性治理上具有潜在应用价值。

7) 生物体对外源性有害物质反应机制是多方面的，各生化指标间是相互联系、互为补充作用的[4]，因此，桃蚜体内几种酶在受到八角茴香提取物处理后，相互之间作用的影响有待进一步研究。

#### 基金项目

湖南省烟草公司重点科研项目(项目编号：14-16ZDAa02)资助。

#### 参考文献

- [1] 张洁. 中国植物源杀虫剂发展历程研究[D]: [博士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [2] 苏宏华, 宋彬, 李丽, 等. 甜菜夜蛾的抗性及其机理研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(6): 1659-1663.
- [3] 马志卿, 冯俊涛, 郭志波, 等. 松油烯-4-醇对家蝇几种代谢酶及酚氧化酶的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2008, 34(5): 509-515.
- [4] 叶萱. 植物源杀虫剂发展新方向[J]. 世界农药, 2018, 40(1): 1-10.