

棉花单宁-黄酮类化合物对棉铃虫的抗性潜力

武予清^{1,2}, 郭予元¹

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094; 2. 河南省农业科学院植物保护研究所, 郑州 450002)

摘要: 陆地棉棉叶甲醇提取物包含了棉花的大部分单宁-黄酮类化合物。这些化合物对棉花多种病虫害具有抗性作用。将这些化合物定量加入人工饲料中饲养棉铃虫 1 龄幼虫 5d, 结果表明, 儿茶素、缩合单宁、芸香苷和异槲皮苷在饲料中的浓度增加均与幼虫体重生长呈显著负相关, ED_{50} 分别为 0.81%, 0.49%, 0.57% 和 0.83%; 儿茶素则不存在这种关系; 用含 0.8% 的浓度 儿茶素、缩合单宁、芸香苷和异槲皮苷的饲料测试棉铃虫, 发现随取食量的增加, 相对生长率的增加显著低于对照 (不含次生物质), 即这些物质属于慢毒剂; 而儿茶素仅有阻食作用。

关键词: 单宁; 黄酮类化合物; 棉铃虫; 植物抗性

Potential resistance of tannins-flavonoids in upland cotton against *Helicoverpa armigera* (Hübner)

WU Yu-Qing^{1,2}, GUO Yu-Yuan¹ (1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. Institute of Plant Protection, He'nan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, 450002, China)

Abstract: Cotton tannins-flavonoids are important compounds associating with the host plant resistant to insect pests and diseases including *Heliothis* sp. and *Helicoverpa* sp.. The dosage responses on *H. armigera* larvae of different compounds are tested. After the 1st instar larvae fed 5 days on the diets contained compounds, the ED_{50} of larvae on gallo catechin, condensed tannins, rutin and isoquercitrin were 0.81%, 0.49%, 0.57% and 0.83% respectively. The results indicated that there were significantly negative correlation between the concentration of these compounds and the body weight of larvae. But there was irrelevant between concentration of catechin and larvae body weight. The increase of relative larval growth rate was significantly lower than that of the control as the increase of larval feeding amount on the diet separately contained 0.8% gallo catechin, condensed tannins, rutin and isoquercitrin. The results indicated that these compounds are chronic toxins.

Key words: tannins; flavonoids; upland cotton; resistance to cotton bollworm

文章编号: 1000-0933(2001)02-0286-04 中图分类号: S435, S622.9 文献标识码: A

由于棉花单宁-黄酮类化合物与蛋白质有较强的结合能力 (即涩性), 因此它们就具备了对棉铃虫等植食者致害作用的基础。有害物质对有机体的影响一般存在着剂量反应, 其影响的临界值是其生物活性表达的重要指标。Chan 等^[1]和 Hedin 等^[2]烟草夜蛾 (*Heliothis virescens*) 和美洲棉铃虫 (*Helicoverpa zea*) 对缩合单宁和亚洲棉中的黄酮类化合物都存在着剂量反应, 并指出不同的种类对这些化合物存在着剂量反应 (耐性) 差异。迄今为止, 棉花植株中分离出来的这些化合物对棉铃虫的剂量影响或抗性报道还不多见。

单宁-黄酮类化合物对植食昆虫的效应, 特别是棉花缩合单宁对棉铃虫类害虫 (*Helicoverpa* spp.) 的主要作用机理是拒食性还是毒性一直存在较大的争议, Klocke & Chen 证实含有棉花缩合单宁的饲料饲养 3

基金项目: 国家自然科学基金倾斜项目 (39770498) 和攀登计划资助项目

收稿日期: 1998-09-25; 修订日期: 1999-10-08

作者简介: 武予清 (1965-), 男, 河南新乡人, 博士, 副研究员。主要从事寄主植物与昆虫关系研究。

龄幼虫 *H. zea* 幼虫 5d, 其消化、转化率不受抑制而取食量与体重均下降^[3]。许刚和钦俊德^[4]和王琛柱^[5]用类似的缩合单宁特性的单宁酸掺入饲料中喂养棉铃虫, 发现单宁酸不影响食物利用率, 这些均表明了单宁具有拒食作用。也有许多研究表明, 抑食作用源于单宁的直接毒性, 如 Bernays 和 Berenbaum 就建议单宁破坏中肠细胞的完整性^[6,7], 而 Klocke & Chan 证实缩合单宁抑制美洲棉铃虫中肠蛋白酶的活性^[3]。Wagge & Hedin 报道亚洲棉中的黄酮类化合物影响烟芽夜蛾消化能力^[8]。但对于从陆地棉植株中分离得到的棉花单宁-黄酮类化合物对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 的抗性机理迄今尚未见报道, 为此作者进行了这方面的报道。

1 材料与方法

1.1 供试棉铃虫幼虫

来自本课题组提供的禹州实验种群

1.2 人工饲料

参照吴坤君^[9], 主要成分包括玉米粉, 大豆粉, 酵母粉, 蔗糖, 维生素 C, 山梨酸钾, 威氏盐, 琼脂糖和水。

1.3 棉铃虫幼虫对棉花单宁-黄酮类化合物的剂量反应实验

本课题组从陆地棉川简系棉叶中提取单宁-黄酮类化合物, 包括 儿茶素(纯度>90%)、儿茶素(纯度>90%)、棉芸香苷(纯度>95%)、异槲皮苷(纯度>95%)和缩合单宁(纯度>86%)。按以下的饲料干重比例配制不同含量的人工饲料(%):

儿茶素 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1.0%, 2.0%; 儿茶素 0.2%, 0.4%, 0.8%, 1.6%, 3.2%; 棉芸香苷 0.2%, 0.4%, 0.8%, 1.6%, 3.2%; 异槲皮苷 0.2%, 0.4%, 0.8%, 1.6%, 3.2%; 缩合单宁 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.8%, 1.6%; 空白对照。

以各个饲料处理饲育棉铃虫 1 龄幼虫于指形管中, 每管 1 头, 每处理 8 头, 重复 3 次。在 25℃, 相对湿度 75% 条件下饲养 5d 后, 立即在 60℃ 下 36h 烘干称重, 计算相当于对照体重的比例作为相对生长量的指标; 根据各个组分的浓度梯度, 计算相对生长量(%)与剂量之间的关系, 求得影响体重 50% 时的剂量- ED_{50} 作为有害剂量指标。对于各个级分的饲育结果, 用新复级差进行多重比较, 以了解它们对棉铃虫的影响。

1.4 棉花单宁-黄酮类化合物对棉铃虫的作用方式

测定原理 Blau 等建立了用相对生长率(RGR)与相对取食量(RCR)的回归线评价寄主植物的次生代谢物质对昆虫抗性的方式^[10]。一般说来, 随着植食昆虫取食量的增加, 昆虫的生长率也随之增加, 二者之间存在着显著的回归关系。评价方法是, 首先建立该昆虫的相对生长率依于它取食不同量的无害食物所获得的 RCR 的标准回归线, 然后将次生物质加入饲料中, 再测定 RGR 依于 RCR 的回归关系。如果该次生物质仅仅是一种阻食剂, 那么, 它的回归线斜率与标准回归线斜率相比没有显著差异; 如果次生物质是一种毒剂, 那么, 它的回归线斜率应显著低于标准回归线斜率, 也就是说, 随着在含有次生物质饲料上的取食量的增加, 昆虫生长率的增加显著低于它在无害饲料上的生长, 从而起到抗生作用。

按前面所述的饲料配制方法, 分别配制含有 0.8% 缩合单宁, 0.8% 的芸香苷, 0.8% 的异槲皮苷, 0.8% 的 儿茶素, 3.2% 的儿茶素的饲料(均为饲料的干重比), 以及不加次生物质的标准饲料。以人工饲料饲养棉铃虫幼虫至 40mg 作为试虫, 饥饿 24h 称重备用; 以含不同次生物质的上述人工饲料, 按梯度设置称取不同的饲料量(0~400mg), 各设 10 个梯度分置于指形管中喂养棉铃虫, 每管 1 头, 在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度为 75% 的条件下饲育 48h, 迅速将棉铃虫及剩余饲料称重, 并用冻干法测定幼虫及饲料的含水量, 根据这些数据计算相对生长率(RGR)和相对取食量(RCR)。用 ANOVA 程序计算取食含不同次生物质的饲料的棉铃虫的 RGR 与 RCR 的回归关系, t 测验各个回归斜率与取食标准饲料的回归斜率之间的差异显著性。

2 试验结果

2.1 棉铃虫幼虫对从棉叶中分离出来的化合物的剂量反应(见图 1)

棉花单宁-黄酮类化合物饲育棉铃虫的结果表明, 对于缩合单宁、 儿茶素、棉芸香苷和异槲皮苷, 随着浓度含量的增加, 棉铃虫的相对生长量与之有显著的负相关关系, 它们的 ED_{50} 分别为 0.49%, 0.81%, 0.57% 和 0.83%。

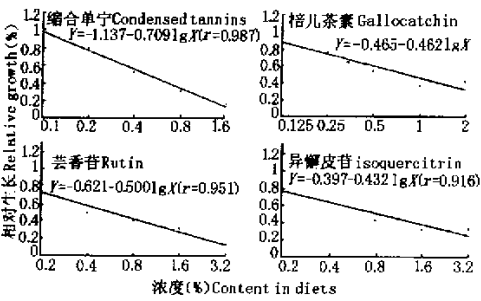


图 1 棉铃虫幼虫对棉花单宁-黄酮类化合物剂量反应

Fig. 1 The dosage responses of *Helicoverpa armigera* larva growth to condensed tannins and flavonoids in the artificial diet

表 1 棉铃虫取食次生物质的 RGR 与 RCR 的回归斜率 *t* 测验

Table 1 *T*-tests on slopes of regressions for *Helicoverpa armigera* larvae relative growth rate and relative consumption rate

处理 Treatments	<i>N</i>	回归斜率 <i>b</i> Slope	回归截距 Intercept	与对照 <i>b</i> 值相比差异显著性 (<i>p</i>) Significance (<i>p</i>)
对照 ^①	10	0.130	-0.045	
缩合单宁 ^②	10	0.076	-0.067	<i>P</i> < 0.01
儿茶素 ^③	10	0.039	-0.106	<i>P</i> < 0.01
异槲皮苷 ^④	11	0.109	-0.126	<i>P</i> < 0.05
芸香苷 ^⑤	10	0.103	-0.026	<i>P</i> < 0.01
儿茶素 ^⑥	10	0.111	-0.059	<i>P</i> > 0.05 No significance

* 儿茶素的 RGR 依于 RCR 的回归斜率与标准对照无显著差异,表明高浓度的儿茶素对棉铃虫仅起到阻食作用。

①Control, ②Condensed tannins, ③Galocatechin, ④Isoquercitrin, ⑤Rutin, ⑥Catechin

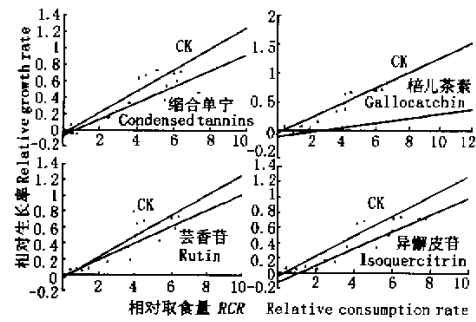


图 2 棉铃虫幼虫的取食量与的生长率关系

Fig. 2 The regressions for *Helicoverpa armigera* larva relative rate and relative consumption rate on the artificial diet contained condensed tannins and flavonoids

儿茶素的浓度的增加与幼虫的生长之间相关不显著,显著性测验结果表明,在浓度为 0.4% 与 3.2% 喂养棉铃虫体重差异不显著。

2.2 棉花单宁-黄酮类化合物对棉铃虫的作用方式

喂养试验结果表明,除儿茶素以外,幼虫取食所有次生物质时的 RGR 依于 RCR 的回归斜率均显著低于标准对照(表 1, 图 2),说明这些物质加入饲料后,随着棉铃虫取食量的增加,它的相对生长率的增加显著低于标准对照。这种对昆虫的抑制作用来自次生物质对食物利用(消化及转化)的影响,属于毒剂之列。根据前面的研究结果,这些次生物质随着浓度的增加,生长的体重下降而非致死作用,表明它们属于慢毒剂,在植物的抗性表达中可以起到抗生性。

3 讨论

棉叶单宁-黄酮类化合物对棉铃虫生长有显著的影响,其中缩合单宁、芸香苷较强烈的抑制作用,棉花植株中缩合单宁和黄酮类化合物对棉铃虫的近缘种美洲棉铃虫和烟芽夜蛾有较强的毒性,缩合单宁对美洲棉铃虫的 ED_{50} 为 0.15%^[1],棉芸香苷和异槲皮苷对烟芽夜蛾的 ED_{50} 各为 0.031% 和 0.06%^[2]。与这两种近缘种相比,棉铃虫对这些化合物有较强的耐性,但是,从剂量反应结果来看,这些化合物仍表现了对棉铃虫抗性的良好潜力,以缩合单宁最好(ED_{50} 最小)。

一般来说,植物的次生代谢物质对植食昆虫的作用可以分为两个阶段的效应,摄食前效应(Preingestive effects)和摄食后效应(Postingestive effects)。摄食前效应一般与习性有关,起到拒食剂的作用,在植物抗性中表现抗异性(不选择性);摄食后

效应一般是作用于消化、转化等生理过程,称为毒性(表 2)。

棉花缩合单宁及黄酮类化合物是比较典型的量的防御物质,特别是棉花缩合单宁,由于它是一系列分子量不等的大分子化合物的复合体,植食者要对它产生适应性或解毒是比较困难的,因此,这类化合物作为棉花抗虫性的重要内源物质,在棉花育种上值得加以利用。

表 2 次生代谢物质对植食昆虫的作用特点

Table 2 Active traits of metabolic substances effecting insect herbivores

作用特点 Traits of effects	摄食前 Pre-ingestive	摄食后 Post-ingestive	
直接影响 Active results	拒食或排拒 Deterrents or repellence	急毒性 Acute	慢毒性 Chronic
作用途径 Approach of effects	取食习性 Feeding behavior	生理代谢 Physiologic metabolize	食物消化转化 Digestibility
植物抗性表达 Express of plant resistance	抗异性(不选择性) Antixenosis or non-preference	抗生素(质的防御) Antibiotic (qualitative defense)	抗生素(量的防御) Antibiotic (quantitative defense)
植物-昆虫互作后果 Evolution of reaction between plants and insects	昆虫易适应 Easily adaptation on insects	昆虫易适应 Easily adaptation on insects	昆虫不易适应 Not easily adaptation on insects

参考文献

[1] Chan BG, *et al.* Condensed tannin, an antibiotic chemical from *Gossypium hirsutum*. *J. Insect Physiol.*,1978,**24**(2):113~118.

[2] Hedin P A, *et al.* Evaluation of flavonoids in *Gossypium arboreum* (L.) cotton as potential source of resistance to tobacco budworm. *J. Chem. Ecol.*,1992, **18**(2):105~114.

[3] Klocke J A and Chan B G. Effects of cotton condensed tannin on feeding and digestion in the cotton pest, *Heliothis zea*. *J. Insect Physiol.*,1982, **28**(11):911~915.

[4] 许刚,钦俊德. 实夜蛾属二近缘种对寄主植物次生物质的反应:次生物质对幼虫生长和食物利用的影响. *昆虫学报*,1987,**30**(4):359~364.

[5] 王琛柱,等. 棉酚和可水解单宁对棉铃虫的抗性机理研究. *植物保护学报*,1997,**24**(1):13~17.

[6] Bernays E A. Tannns; an alternative viewpoint. *Entomol. Exp. Appl.*,1978. **24**:44~53.

[7] Berenbaum M. Effects of tannin ingestion on two species of papilionid caterpillar *Entomol. Exp. Appl.*,1983, **34**:245~250.

[8] Waage S K and Hedin P A, Biologically-active flavoids from *Gossypium arboreum* *Phytochemistry* 1984,**23**:2509~2511.

[9] 吴君坤. 棉铃虫的人工饲料. *昆虫知识*,1980,**17**(1):36~37.

[10] Blau P A, *et al.* Allylglucosinolate and herbivorous caterpillars: a contrast in toxicity and tolerance. *Science*,1978, **200**:1296~1298.