

红蓼拒食活性组分的分离及其对小菜蛾幼虫消化酶活性的影响

李秀岚^{1,2}, 李友莲^{1*}, 张利军¹

(1. 山西农业大学农学院, 太谷 030801; 2. 青岛农业大学植物保护学院, 青岛 266109)

摘要 为了进一步评价红蓼(*Polygonum orientale* L.)的抗虫性,采用液-液分配萃取和硅胶柱层析的方法,从红蓼甲醇提取物中分离获得石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水的萃取物,测定了其对小菜蛾(*Plutella xylostella*)3龄幼虫拒食活性。结果显示,乙酸乙酯萃取物比其他4种萃取物具有更高的拒食活性,在5.0 mg/mL下,24 h和48 h的拒食率分别为68.42%和62.55%。乙酸乙酯萃取物经硅胶柱层析后,得到13个组分,比较13个组分的拒食活性发现,组分8的活性较高,在浓度为2.5 mg/mL时,24 h和48 h的拒食率分别为77.13%和68.53%。组分8对小菜蛾幼虫体内的蛋白酶、脂肪酶和 α 淀粉酶的活性具有一定的抑制作用。

关键词 红蓼; 小菜蛾幼虫; 拒食活性成分

中图分类号

Isolation of the antifeeding components from *Polygonum orientale* and its effects on the digestive enzymes of *Plutella xylostella* larvae

Li Xiulan^{1,2}, Li Youlian¹, Zhang Lijun¹

(1. College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Department of Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract To evaluate the resistance property of *Polygonum orientale* Linn. to insects, five extracts of it with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, n-butanol and water were tested for their antifeeding activity against *Plutella xylostella* larvae. The results showed that ethyl acetate extract was the most effective one among the five extracts. After 24 h and 48 h of treatment, the antifeeding rate of the ethyl acetate extract against the 3rd instar larvae of *P. xylostella* at 5.0 mg/mL was 68.42% and 62.55%, respectively. The ethyl acetate extract was further separated through silica gel column and the fractions were monitored with analytical thin layer chromatography (TLC). Thirteen fractions were obtained and also tested for their antifeeding activity against *P. xylostella* larvae. The bioassay results showed that fraction No. 8 at 2.5 mg/mL had higher antifeeding activity to the 3rd instar larvae of *P. xylostella* than other fractions. The antifeeding rate of fraction No. 8 was 77.13% after 24 h of treatment and 68.53% after 48 h of treatment. The inhibiting activity of the 8 fractions against the three digestive enzymes proteinase, lipase and α -amylase from *P. xylostella* larvae was also tested.

Key words *Polygonum orientale* Linn.; *Plutella xylostella* larvae; antifeeding component

红蓼(*Polygonum orientale* L.)属于蓼科、蓼属一年生草本植物,又称东方蓼、狗尾花,为有毒植物。民间

收稿日期: 2007-08-11 修订日期: 2008-01-28

基金项目: 山西省科技攻关项目(012012)

* 通讯作者 Tel: 0354-6289876 E-mail: liyoulian3616@sohu.com

常用医治清热解毒、散结消肿、活血止痛等症^[1-2]。本研究以小菜蛾(*Plutella xylostella* L.)为试虫,对红蓼开展了拒食活性成分的分离,提纯以及作用机理的初步研究,为寻找新的昆虫拒食活性物质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

红蓼采自于山西农业大学农场试验田。小菜蛾采自山西农业大学附近甘蓝菜田(未施任何化学药剂),在室温为(25±1)℃,相对湿度(70±10)%,光周期L/D=14 h/10 h条件下人工饲养。幼虫饲喂白菜叶,成虫饲喂10%蜜糖水,取同龄期的幼虫供试。

1.2 拒食活性组分的提取、分离与活性测定

将采集的红蓼洗净,晾干或烘干(45℃)粉碎,过40目筛,采用冷浸提取法,得到甲醇提取物;采用液-液分配萃取,分别得到石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水层萃取物,测定各萃取物对试虫的拒食活性方法如下^[3]:先用打孔器将新鲜的甘蓝叶片打成直径为1 cm的叶碟,再放入供试提取物样品溶液中浸3 s即取出(对照组叶碟以丙酮溶剂作相同处理)。待叶碟晾干后,将其放入直径9 cm的培养皿中(内垫滤纸,加少量蒸馏水保湿),每个培养皿中放入3片处理叶碟(对照为4片),接入1头饥饿6 h的3龄幼虫。每处理重复10次,24、48 h用叶面积测量仪调查取食情况,并计算试虫取食面积和拒食率。

$$\text{拒食率} = \frac{\text{对照组取食面积} - \text{处理组取食叶面积}}{\text{对照组取食叶面积}} \times 100\%.$$

采用硅胶吸附柱层析的方法,流动相为石油醚丙酮溶剂,按不同的比例进行洗脱,得到乙酸乙酯萃取得物流分,经硅胶板薄层层析,碘显色,将显色点相同的流分合并,得到13个组分并测定其拒食活性,以确定活性组分。

1.3 消化酶活性的测定

酶液制备:酶原的提取参照文献^[4]、^[5]方法。将组分8用丙酮配制在所测浓度的药液,将药液均匀涂布在饲养小菜蛾的甘蓝叶碟上,放入培养皿中,接入3龄小菜蛾幼虫,每隔24 h更换滤纸,并用药液重新处理新鲜叶碟,每处理10个重复。分别在12、24、36、48、60、72 h选取10头试虫,置于0.1 mol/L pH 7.0的磷酸缓冲液中,然后在冰浴条

件下进行匀浆。在4℃低温下10 000 r/min,离心15 min,取上清液备用。

1.3.1 蛋白酶活性的测定

蛋白酶的活性检测参照文献^[6]、^[7]方法。

酶活力测定:取1 mL酶液,在37℃水浴锅中预热5 min,加入预热到37℃的1%酪蛋白溶液(pH=7.0),37℃保温15 min,加入3 mL 10%三氯乙酸,混合均匀后4 000 r/min离心10 min。对照是将三氯乙酸和酪蛋白溶液的加入顺序颠倒即可。离心结束后,取上清液2 mL,加入5 mL 0.5 mol/L的碳酸钠,1 mL Follin-酚,37℃下显色15 min,于752型紫外可见光光度计680 nm处比色。

在37℃下水解酪蛋白产生1 μg/min酪蛋白的酶量定义为一个活力单位,从标准曲线上查出;与OD值相对应的酪蛋白含量测定酶原蛋白含量,即可按下列公式计算出比活力。

$$\text{酶的比活力}(U) = \frac{\text{酪氨酸含量}(\mu\text{g/mL}) \times \text{酶稀释倍数}}{\text{反应时间}(\text{min}) \times \text{蛋白含量}(\text{mg/mL})}.$$

1.3.2 脂肪酶抑制活性测定

甘油三酯标准曲线制作参照文献^[8]、^[9]方法。

酶活力测定:取A、B两支试管,各依次加入橄榄油乳剂2.5 mL,Tris-HCl缓冲液(pH=8.8)1.5 mL,酶液0.5 mL,立即盖上帽子,颠倒5次。对A管立即在420 nm处测OD值;将B管在30℃水浴中温育30 min后,在420 nm处测OD值,根据A、B管OD值之差,计算比活力(μmol·mg⁻¹·min⁻¹)。

1.3.3 α-淀粉酶活性的测定

麦芽糖标准曲线制作和α-淀粉酶活力的测定参照文献^[10]、^[11]、^[12]方法。

酶活力测定:取A、B两支试管,分别加入1 mL酶液和1 mL磷酸缓冲液(pH=8.0, 0.02 mol/L),在A管中加入2 mL 1%淀粉酶溶液,30℃水浴中温育20 min,加入4 mL 0.4 mol/L NaOH;在B管中先加入4 mL 0.4 mol/L NaOH,摇匀后加入2 mL 1%淀粉液,在30℃水浴中温育20 min。在A、B两支试管中各取混合液1 mL,按标准曲线制作方法测定管,根据A、B管OD值之差,求比活力(mg·mg⁻¹·min⁻¹)。

1.4 数据统计分析

采用SAS V8-1分析整理数据,对试验结果采用邓肯氏新复极差多重比较法(Duncan's multiple range test, DMRT)进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同萃取物对小菜蛾3龄幼虫的拒食活性

根据液-液分配法所得各萃取物配制成浓度为5 mg/mL,分别对小菜蛾3龄幼虫进行了拒食活性的测定(表1)。测定结果表明,与其他萃取物比较,乙酸乙酯对小菜蛾3龄幼虫的拒食活性最高,24 h和48 h的拒食率分别为68.42%和62.55%。

表1 不同处理时间红蓼不同萃取物对小菜蛾3龄幼虫的拒食活性¹⁾

处理	取食面积($\bar{x} \pm S. E.$)/mm ²		拒食率/%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
石油醚层	(44.23±2.73)a	(56.32±6.01)a	32.45	29.15
氯仿层	(37.71±7.26)ab	(53.21±6.69)a	37.87	33.72
乙酸乙酯层	(15.02±3.21)d	(25.18±4.62)c	68.42	62.55
正丁醇层	(21.59±4.26)cd	(50.41±3.38)ab	55.18	36.22
水层	(30.34±1.45)ab	(51.05±1.53)ab	42.39	35.81
对照	(47.72±5.24)a	(65.12±6.24)a	—	—

1) 同列数据后字母相同的表示经方差分析(DMRT法)在5%水平上差异不显著。

2.2 不同组分对小菜蛾3龄幼虫的拒食活性

将乙酸乙酯萃取物进行硅胶柱层析,经TLC检测后,合并Rf值相同的流分,获得13个组分,将所得各组分配制成浓度为2.5 mg/mL,对小菜蛾3龄幼虫进行了拒食活性作用的测定。其结果表明,在13个组分中,对小菜蛾幼虫表现出不同程度的拒食活性,各处理组与对照组取食面积差异显著。其中组分8的拒食活性最高,24 h和48 h的拒食率分别达到了77.13%和68.53%(表2)。

表2 不同处理时间红蓼乙酸乙酯萃取物各组分对小菜蛾3龄幼虫的拒食活性¹⁾

组分编号	取食面积/mm ²		拒食率/%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
1	(36.32±2.91)cde	(75.66±7.88)bcd	42.02	31.10
2	(41.13±3.38)bcd	(66.55±6.36)cd	44.85	39.21
3	(48.33±8.54)bc	(89.03±11.06)abc	23.40	18.85
4	(53.12±1.53)ab	(83.59±5.81)abc	15.43	23.71
5	(28.31±8.29)def	(43.41±4.10)de	54.79	59.49
6	(22.67±5.21)ef	(61.10±13.01)cd	63.83	44.38
7	(36.01±7.02)cde	(65.72±12.73)cd	42.55	40.12
8	(14.45±1.45)fg	(40.01±7.02)e	77.13	68.53
9	(44.22±4.06)bc	(67.67±8.51)cd	29.26	38.30
10	(18.64±2.19)f	(60.58±5.24)cd	70.21	44.69
11	(21.71±3.28)ef	(69.11±15.39)cd	65.43	37.08
12	(20.02±2.52)f	(73.05±4.62)bcd	68.09	33.44
13	(47.33±5.78)bc	(101.54±20.04)ab	24.47	20.06
CK	(62.68±2.91)a	(109.69±7.97)a	—	—

1) 同列数据后字母相同的表示经方差分析(DMRT法)在5%水平上差异不显著。

2.3 组分8对小菜蛾幼虫消化酶活性的影响

2.3.1 组分8对小菜蛾幼虫蛋白酶活性的影响

图1是小菜蛾幼虫在不同时间内蛋白酶活性的变化。结果显示,处理组试虫体内蛋白酶活性变化呈先下降后上升再下降的趋势,在处理后12 h,表现为处理组虫体蛋白酶活性明显高于对照组。由于组分8对小菜蛾幼虫体内蛋白质的影响和破坏,激活了昆虫体内蛋白酶的活性,表现出活性高于对照组。处理后24~72 h,处理组虫体蛋白酶活性低于对照组,表现出明显的抑制作用。处理组试虫体内的蛋白酶活性低于对照组,说明幼虫接近老化,其体内蛋白质遭到一定程度破坏。

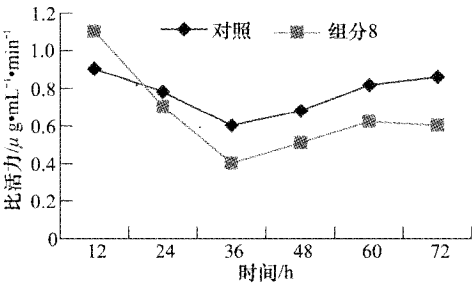


图1 组分8对小菜蛾幼虫蛋白酶活性的影响

2.3.2 组分8对小菜蛾幼虫脂肪酶活性的影响

图2是小菜蛾幼虫在不同时间内脂肪酶活性的变化。从图中可以看出,处理后12~48 h,处理组试虫与对照组试虫体内脂肪酶活性变化呈上升趋势,处理48 h后,两者试虫体内脂肪酶活性都呈下降趋势,处理组试虫体内的酶活性下降幅度明显高于对照组,表现出明显的抑制作用。说明组分8进入小菜蛾幼虫体内抑制了脂肪酶的活力,可能是引起小菜蛾幼虫死亡的一个重要原因。

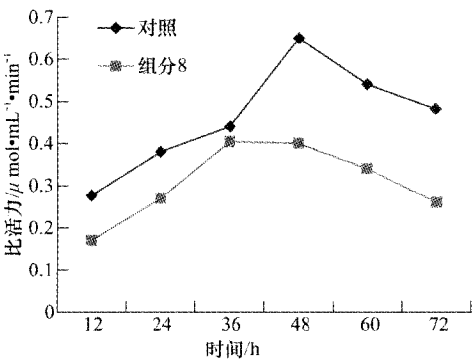


图2 组分8对小菜蛾幼虫脂肪酶活性的影响

2.3.3 组分8对小菜蛾幼虫α-淀粉酶活性的影响

图3是小菜蛾幼虫在不同时间内α-淀粉酶活性测定。结果显示,处理组试虫与对照组试虫体内α-

淀粉酶活性变化趋势基本一致,所不同的是,60~72 h处理组试虫体内 α -淀粉酶活性均有所下降,而对照组试虫体内 α -淀粉酶活性呈水平直线趋势。对照组高于处理组,有一定的抑制作用。

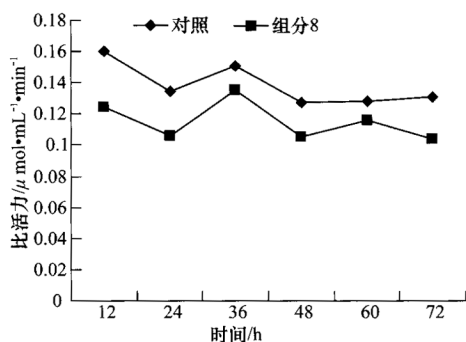


图3 组分8对小菜蛾幼虫 α -淀粉酶活性的影响

3 结论与讨论

植食性昆虫对寄主植物的选择是由于不同植物中含有不同的次生物质所造成,这些物质一般有防御昆虫取食的作用,引起昆虫离弃植物或拒绝取食。当昆虫对某些次生物质不能适应时,便不以含有这种成分的植物为食。从植物中分离出来的次生物质多数对昆虫会引起拒食作用^[13]。次生物质对昆虫作用性质、方式和强度上的差异,是决定植物不同抗性水平的重要化学基础^[14],如对昆虫有拒食作用的植物次生代谢物质生物碱、酚类和萜类等化合物。本研究通过对红蓼拒食活性物质的分离,在5种溶剂萃取物中,乙酸乙酯萃取物对小菜蛾3龄幼虫的拒食活性较高,24 h和48 h的拒食率分别为68.42%和62.55%。表明红蓼拒食活性物质主要存在于乙酸乙酯溶剂中,将乙酸乙酯萃取物进行硅胶柱层析,经TLC检测,对相同成分者合并后所得的13个组分并对其进行拒食活性测试。结果表明小菜蛾幼虫表现出不同程度的拒食活性,其中组分8的拒食活性较高,24 h和48 h的拒食率分别达到了77.13%和68.53%。由此可以看出,植物红蓼中含有对小菜蛾3龄幼虫拒食的活性物质。对活性组分8,进一步分离提纯,得到3个化合物(另文发表)。

消化酶是由昆虫中肠上皮细胞形成和分泌的,昆虫对食物的消化主要依赖于分泌消化液中的消化酶。蛋白酶是昆虫最主要的消化酶之一,其活性直接影响昆虫对食物中蛋白质的消化、吸收。不同的植物次生代谢物质对昆虫蛋白酶活性的影响往往各

不相同^[11,15-16]。本试验小菜蛾幼虫取食活性组分8处理的叶碟后,结果造成试虫体内蛋白酶活性降低,表明组分8具有拒食活性物质,导致其取食不足甚至是完全拒食,使虫体内蛋白质合成的原料缺乏。同时活性组分8对小菜蛾幼虫体内脂肪酶和 α -淀粉酶活性有一定的抑制作用,笔者认为作用于试虫中肠细胞的内质网,影响了中肠细胞合成消化酶的分泌减少,可导致消化酶活性的降低。而消化酶活性的显著降低直接抑制了小菜蛾幼虫对蛋白质食物的消化、吸收,进一步抑制了试虫对食物的摄取、营养物质的吸收来维持生理功能和生长发育的需要,因而影响试虫的正常生长发育(另文发表)。

参考文献

- [1] 陈冀胜,郑 硕. 中国有毒植物[M]. 北京:科学出版社,1987: 242-244.
- [2] 郑尚珍,王定勇,孟军才,等. 红蓼中木脂素成分的研究[J]. 植物学报,1998,40(5):466-469.
- [3] 慕立义. 植物化学保护研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1994:67-71.
- [4] Michael J, Smirle D, Thomas L, et al. Influence of neem oil on detoxication enzyme activity in the obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1996,56:220-230.
- [5] 陈长琨. 昆虫生理生化实验[M]. 北京:中国农业出版社,1993: 5-25.
- [6] 沙捷云. 黏虫肠道蛋白酶在苏云金杆菌肯尼亚变种“7407”晶体致病中的作用[J]. 昆虫学报,1981,24(3):237-243.
- [7] 刘惠霞,董育新,吴文君. 苦皮藤素 V 对东方黏虫中肠细胞及其消化酶活性的影响[J]. 昆虫学报,1998,41(3):258-262.
- [8] 西北农业大学. 基础生物化学实验指导[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1986:78-104.
- [9] 陈 立. 神农架林区杀虫植物研究[D]. 广州:华南农业大学,2001.
- [10] Guibault G G. Analytic handbook of enzyme[M]. Shanghai: Shanghai Sci-Tech Press,1983:32-41.
- [11] 张 兴,赵善欢. 川楝素对菜青虫体内几种酶系活性的影响[J]. 昆虫学报,1992,35(2):171-177.
- [12] 杨东升,张金桐. 川楝素对家蝇幼虫中肠细胞及淀粉酶活性的影响[J]. 寄生虫与医学昆虫学报,2002,9(1):39-42.
- [13] 钦俊德. 昆虫与植物的关系[M]. 北京:科学出版社,1987:39-170.
- [14] 王琛柱,张青文,杨奇华,等. 植物抗虫性的化学基础[J]. 植物保护,1993,19(6):39-41.
- [15] 钟国华. 黄杜鹃杀虫成分、作用机制及构效关系研究[D]. 广州:华南农业大学,2002.
- [16] 付昌斌,张 兴. 砂地柏提取物对黏虫幼虫体内几种酶系活性的影响[J]. 植物保护学报,2000,27(1):75-78.