

海木提取物对菜青虫幼虫的生物活性

李典鹏¹, 刘金磊¹, 陈海珊¹, 卢海啸^{1,2,3}, 潘乔丹^{1,3}, 曾涛⁴

(1. 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 玉林师范学院 化学与生物系, 广西玉林 537000; 3. 广西师范大学 生命科学学院, 广西桂林 541004; 4. 广西农业科学院, 南宁 530007)

摘要: 测试了海木提取物对菜青虫幼虫的拒食活性, 并对拒食活性高的部分进行了乙酰胆碱酯酶活性、蛋白水解酶活性等测定。海木的氯仿部分表现出明显的拒食活性(拒食率 97.7%), 同时还能抑制菜青虫的乙酰胆碱酯酶活性, 提高蛋白水解酶活性, 降低菜青虫体内蛋白质含量。

关键词: 海木; 菜青虫; 拒食活性; 乙酰胆碱酯酶; 蛋白水解酶活性

中图分类号: TQ451; Q949.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)03-0453-04

Bioactivity of extract from *Heynea trijuga* against *Pieris rapae* larvae

LI Dian-Peng¹, LIU Jin-Lei¹, CHEN Hai-Shan¹,
LU Hai-Xiao^{1,2,3}, PAN Qiao-Dan^{1,3}, ZENG Tao⁴

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2. Department of Chemistry and Biology, Yulin Teachers' College, Yulin 537000, China; 3. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 4. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: The antifeedant activity of extract from *Heynea trijuga* against *Pieris rapae* larvae, and AshE activity and proteases activity of the highest antifeedant activity of *H. trijuga* were tested. Chloroform of *H. trijuga* was proved to be evident antifeedant activity (antifeedant rate: 97.7%). This part could restrain the activity of AshE, increase the proteases activity and decrease the protein quantity of *Pieris rapae* larvae.

Key words: *Heynea trijuga*; *Pieris rapae*; antifeedant activity; AshE; proteases activity

楝科(Meliaceae)植物——海木(*Heynea trijuga* Roxb.), 别名老虎楝、鹧鸪花, 乔木, 生于山坡林中, 分布于广西、贵州、云南等省区, 是具有一定毒性的药用植物(陈翼胜等, 1987; 广西植物研究所, 1971)。在民间用药中, 海木的根常被作为治疗关节炎、咽炎、扁桃体炎和其他疾病的药方(Chiangsu New Medical College, 1997)。它具有很强的耐霜冻、耐干旱、耐盐碱能力, 适应性强, 用途广, 可材用。夏天枝叶茂盛, 产量丰富。Kozhiparambil 等从印度产海木根、果皮中分离出来四个四降三萜(海木素

A, 海木素 B, 海木素 B 乙酸盐和 2-羟基-3-O-苧裕酰-6-O-乙酰基桃花心木内酯)(Purushothaman 等, 1987; Inada 等, 1994)。Zhang 等(2003)在对云南西双版纳产的海木根的乙醇提取物的研究中得到一个新排列的有新碳骨架的四降三萜(海木素 C)和一个新孕烷(3 β , 4 α -二羟基孕烷-16-碳), 但对这些化学成分均未见进一步生物活性测定。作者在杀虫植物筛选中发现, 该植物甲醇提取物具有好的昆虫拒食活性, 本文主要以菜青虫(*Pieris rapae*)为试虫, 对海木的不同抽提部分的生物活性进行研究。

收稿日期: 2005-10-11 修回日期: 2006-06-29

基金项目: 国家自然科学基金(30269002); 广西自然科学基金(桂科配 0339001)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (30269002); Natural Science Foundation of Guangxi(0339001)]

作者简介: 李典鹏(1968-), 男, 广西资源人, 副研究员, 从事植物资源的开发利用研究。

1 材料与方 法

1.1 材料

试虫从田间采集大小一致的4~5龄菜青虫幼虫直接用于实验。

海木枝叶于2003年10月采自广西永福县寿城,经广西植物研究所刘演副研究员鉴定为楝科植物海木(*Heynea trijuga* Roxb),采后切碎,阴干,60℃烘干,备用。

1.2 方法

1.2.1 植物提取方法 称取1 kg海木干枝叶,加入约6 000 mL 95%工业酒精,加热回流2 h,用2层纱布粗过滤,得到上清液即提取液。重复提取3次,合并提取液,减压回收溶剂,得膏状粗提物141.4 g。粗提物加入适量水溶解,超声振荡使成水悬浮液,然后5 000 rpm离心5 min得到沉淀(样I)和水相两部分。水相部分依次用正己烷、氯仿、乙酸乙酯萃取得到正己烷部分(样II)、氯仿部分(样III)、乙酸乙酯部分(样IV)和水溶部分(样V)。将各部分分别减压回收溶剂至干。最后得到样I:57 g,样II:2.25 g,样III:5.9 g,样IV:14.45 g,样V:49.6 g。得率分别为5.7%;0.225%;0.59%;1.445%;4.96%。

1.2.2 拒食活性测定方法 为非选择性叶碟法。以拒食率来评价各部分拒食活性。拒食率公式如下:

$$\text{拒食率(\%)} = \frac{\text{对照组取食量} - \text{处理组取食量}}{\text{对照组取食量}} \times 100\%$$

1.2.3 乙酰胆碱酯酶活性测定方法 参照吴文君等(1998)的方法。(1)酶液的制备:将适量活性组分样品用少量丙酮溶解,用水稀释使浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。挑选大小一致的4龄菜青虫,放进试液中浸5 s后取出放在滤纸上吸干药液,然后把浸过药液的虫移到垫有滤纸的12 cm的培养皿中,以保鲜膜覆盖之,用昆虫针刺上多个通气孔。做4个重复,每重复20头虫。同时做一个对照。处理好后放进人工气候箱中(温度为25℃,湿度50%~60%)饲养,分别于0、2、4、8、12、24 h取对照组和处理组的菜青虫5头放进匀浆玻璃瓶中,加入在4℃预冷的0.2 mol/L pH7.4磷酸缓冲液1 mL,用匀浆器于冰浴中充分匀浆,匀浆液在5 000 r/min、4℃下离心5 min,取上清液作为乙酰胆碱酯酶活性测定的酶源,测定时适当稀释。

(2)乙酰胆碱酯酶活性测定:取A、B两支试管,在A

管中加入0.2 mol/L pH7.4的磷酸缓冲液3.2 mL、DTNB-磷酸盐-乙醇试剂3.6 mL、 8×10^{-3} mol/L 硫代乙酰胆碱0.1 mL、酶液0.2 mL;B管中加入0.2 mol/L pH7.4的磷酸缓冲液3.2 mL、 8×10^{-3} mol/L 硫代乙酰胆碱0.1 mL、酶液0.2 mL。然后在30℃水浴中振荡30 min,在B管中再加入DTNB-磷酸盐-乙醇试剂3.6 mL。摇匀,在412 nm处测OD值。

乙酰胆碱酯酶的比活力以 $[\text{mmol}/\text{min}/\mu\text{mol}(\text{Pr})]$ 表示。

1.2.4 蛋白酶的测定方法 参照郭鄂等(1988)的方法。(1)试虫体内蛋白质含量测定:用酪蛋白作标准蛋白、准确配制每毫升含1 mg蛋白的浓溶液,具体配法(略)。样品测定:样品液1 mL、Folin-酚试剂甲5 mL,10 min加试剂乙0.5 mL、30 min后在500 nm处比色,对照标准曲线求出未知样品蛋白质的浓度(g/L)。

(2)试虫体内蛋白水解酶活性测定:取A、B两支试管,各加入稀释的酶液1 mL。A管中加入2 mL在37℃水浴中预热5 min的0.5%酪蛋白溶液;B管中加入0.02 N磷酸缓冲液2 mL。然后再按制作标准曲线的程序测定A、B两管的光密度值(OD值)。蛋白水解酶活性计算:用A管的OD值减去B管的OD值,即为酶所分解酪蛋白为酪氨酸后显色反应的纯OD值,并以此OD值计算酶的比活力,以 μg 酪氨酸/mg蛋白/min表示。

拒食活性测定中样品用丙酮溶样,乙酰胆碱酯酶和蛋白水解酶测定中则是用水溶样。

2 结果与分析

2.1 拒食活性结果

表1显示海木各部分对菜青虫都有拒食活性,但以海木氯仿部分拒食活性最高,达到97.7%;其次为海木沉淀部分,为84.8%。海木氯仿部分喂毒后48 h虫体死亡率最高达100%。

2.2 乙酰胆碱酯酶活性结果

由表2和图1可以看出海木氯仿部分不管是500倍液还是1 000倍液都能抑制菜青虫乙酰胆碱酯酶的活性,乙酰胆碱酯酶比活力由0 h的3.754 2(500倍液)和3.852 5(1 000倍液)降到24 h的1.249 6(500倍液)和1.062 2(1 000倍液),比对照组的比活力(0 h为2.826,24 h为2.1061)降幅大

得多。在处理 0~4 h 处理组的乙酰胆碱酯酶的活性比对照组高,但处理后 4~24 h 乙酰胆碱酯酶活性即比对照组低。这和处理后菜青虫的表现相吻合,处理后约 10 min 菜青虫表现出摇头,步态不稳,到处走动,约 30 min 后菜青虫即进入昏迷前期,虫体静止不动,但对外界刺激尚有轻微反应,处理 4 h 后进入昏迷期而且对外界刺激无反应。处理 24 h 后试虫死亡率为 30%,没有死亡的试虫有恢复的迹象但活动远没有对照组活跃。

表 1 菜青虫拒食活性结果

Table 1 Antifeedant activity of *Pieris rapae* larvae

样品 Sample	总取食面积 (cm ²) Total eaten area	平均取食面积 (cm ²) Average eaten area	拒食率 (%) (未校正) Anti-feedant rate (%) (no emendation)
对照 CK	248.17	49.63	—
沉淀部分 Part of deposition	37.82	7.56	84.8
正己烷部分 Part of hexane	132.05	33.01	33.5
氯仿部分 Part of chloroform	5.68	1.14	97.7
乙酸乙酯部分 Part of EtOAc	171	34.2	31.1
水溶部分 Part of water	171	34.2	31.1

注:试验浓度为 100 倍液。表中数据为 10 个重复的平均数。经 DMRT 法检验,5% 水平无显著差异。

Note: Concentration is diluted 100 times. Data is average of 10 repetitions in the table. No significant difference at 5% level by DMRT.

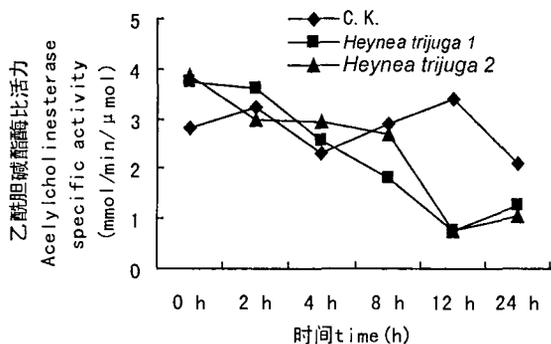


图 1 菜青虫的乙酰胆碱酯酶活性

Fig. 1 Acetylcholinesterase activity of *Pieris rapae* larvae
海木 *Heynea trijuga* (1:500 倍液; 2:1 000 倍液)

2.3 蛋白水解酶活性测定结果

由图 2 可知,海木的氯仿部分处理后菜青虫的蛋白水解酶活性升高,其比活力基本比对照组高,尤其是 36 h 后。可能是海木氯仿提取物可提高虫体内蛋白水解酶活性加速虫体蛋白质的分解(处理 48 h 后虫体死亡率达 80%),这在以下蛋白质含量测定中得到证实。

2.4 蛋白酶含量测定结果

从图 3 看出:用海木氯仿提取物处理组蛋白质

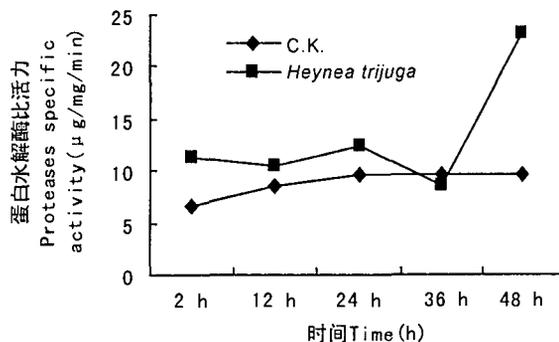


图 2 菜青虫的蛋白水解酶活性

Fig. 2 Proteases activity of *Pieris rapae* larvae

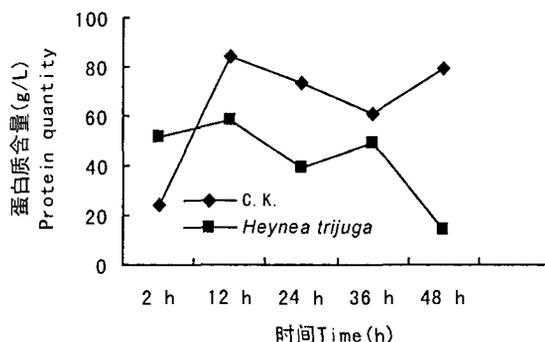


图 3 菜青虫蛋白质含量

Fig. 3 Protein content of *Pieris rapae* larvae

含量比对照组明显降低,尤其在处理后 36 h,因为这时试虫陆续死亡。这与蛋白酶活性的测定结果吻合。

由图 2、3 可推测:海木提取物对菜青虫的生物活性可能是通过提高菜青虫体内蛋白酶活性分解虫体内的蛋白质而导致菜青虫的死亡。

3 讨论

目前,对楝科植物研究甚多,包括研究其化学成分、药用和控制害虫等方面,从该科植物中发现了一些好的杀虫活性成分,如印楝素、苦楝素、川楝素等,其中印楝素是迄今为止最好的植物源农药之一(李典鹏等,2003;曾宪儒等,2005)。前人对海木的果皮和根皮进行过化学成分研究(Purushothaman 等,1987;Inada 等,1994;Zhang 等,2003),发现了一些结构类似于印楝素的四降三萜类成分如海木素 A (trijugins A),海木素 B(trijugins B),但未见其所分化学成分进一步的生物活性研究报道,况且果皮产量少,根皮需破坏树木的生长才能获得,资源均受

限制。本文立足于海木粗提取物对昆虫拒食活性的初筛结果,着重研究其枝叶提取物中不同极性成分的生物活性及活性机制,理论和实际上都有重要意义。

实验结果表明:海木氯仿部分提取物对菜青虫幼虫的拒食率达 97.7%,喂毒后 48 h 虫体死亡率最高达 100%;进一步研究其对菜青虫活性的作用机理可能是:提取物一方面通过降低菜青虫体内的乙酰胆碱酯酶活性来抑制菜青虫的神经系统,从而使菜青虫昏迷,另一方面通过提高菜青虫体内消化系统中的蛋白水解酶活性,导致虫体内蛋白质的分解而导致菜青虫死亡。但到底是哪种化合物在起作用,化学结构如何,有待进一步研究证实,跟踪分离单体活性成分的工作我们正在进行中。

参考文献:

- 广西植物研究所. 1971. 广西植物名录(第 2 册)[M]. 广西植物研究所:450.
- 吴文君,刘惠霞,朱靖博,等. 1998. 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,338
- 陈冀胜,郑硕. 1987. 中国有毒植物[M]. 北京:科学出版社:402
- 郭鄂,忻介六. 1988. 昆虫实验方法[M]. 北京:科学出版社:184—194.
- Chiangsu New Medical College. 1977. Dictionary of Chinese crude drugs[M]. Shanghai: Shanghai Scientific Technologic Publisher:1 925
- Purushothaman KK, Venkatanarasimhan M, Sarada A. *et al.* 1987. Can. Trijugins Aand B, tetranortriterpenoids with a novel rearranged carbon skeleton from *Heynea trijuga* (Meliaceae)[J]. *J Chem*, **65**: 35
- Inada A, Konishi M, Murata H, *et al.* 1994. Structures of new limonois and a new triterpenoid derivative from pericarps of *Trichilia connaroides*[J]. *J Nat Prod***57**:1 446.
- Li DP(李典鹏), Zhang HR(张厚瑞), Chen HS(陈海珊), *et al.* 2003. Research and utilization of plant pesticides(植物源农药的研究利用)[J]. *Guihaia*(广西植物), **23**(4):373—378
- Zhang HP, Wu SH, Shen YM, *et al.* 2003. A pentanortriterpenoid with a novel carbon skeleton and a new pregnane from *Trichilia connaroides*[J]. *Can J Chem*, **81**:253—257
- Zeng XR(曾宪儒), Chen HS(陈海珊), Liu Y(刘演), *et al.* 2005. Insecticidal activity of wild Meliaceae plant extracts from Guangxi on the *Lipaphis erysimi* Kaltentbach(广西野生楝科植物提取物对萝卜蚜的杀虫作用初步研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **25**(5):494—496
- Mo B, Bewley JD. 2003. The relationship between-mannosidase and endo-mannanase activities in tomato seeds during and following germination; a comparison of seed populations and individual seeds[J]. *J Experi Bot*, **54**(392): 2 503—2 510
- Nascimento WM, Cantliffe DJ, Huber DJ. 2000. Endo-mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature conditions[J]. *Acta Hort*, **517**, ISHS
- Nascimento WM, Cantliffe DJ, Huber DJ. 2001. Endo-mannanase activity and seed germination of thermosensitive and thermotolerant lettuce genotypes in response to seed priming[J]. *Seed Sci Res*, **11**(3):255—265
- Nonogaki H, Gee OH, Bradford KJ. 2000. A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds[J]. *Plant Physiol*, **123**: 1 235—1 246
- Ren Yf, Wang XF. 2005. Temporal and special expression of endo- β -mannanase in germinating and germinated rice (*Oryza sativa*) seeds[C]. 8th international Workshop on Seeds Germinating new ideas:053
- Still DW, Kent J, Bradford. 1997. Endo- β -mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radicle tips in relation togermination rates[J]. *Plant Physiol*, **113**:21—29
- Still DW, Dahal P, Bradford KJ. 1997. A single-seed assay for endo- β -mannanase activity from tomato endosperm and radicle tissues[J]. *Plant Physiol*, **113**:13—20
- Toorop PE, van Aelst AC, Hilhorst HWM. 1998. Endosperm cap weakening and endo-mannanase activity during priming of tomato seeds are initiated upon crossing a threshold water potential[J]. *Seed Sci Res*, **8**:483—491
- Zheng XY, Li XQ, Xu Y. 2005. Study on germination barriers and hydropriming treatment of triploid watermelon seeds [J]. *Sci Agric Sin*, **38**(6):1 238—1 243

(上接第 507 页 Continue from page 507)