

非洲山毛豆提取物及鱼藤酮对菜粉蝶幼虫和蛹体壁的影响

徐汉虹, 张业光, 黄继光, 赵善欢

(华南农业大学昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 用非洲山毛豆叶丙酮提取物或鱼藤酮点滴处理菜粉蝶幼虫, 出现畸形幼虫和畸形蛹。对畸形幼虫和畸形蛹的真皮细胞和内外表皮分别进行了超显微结构观察, 发现鱼藤酮及其类似物影响昆虫旧表皮的分解和新表皮的合成是导致虫体畸形的主要原因。并对畸形蛹体壁的几丁质、粗脂肪、粗蛋白的含量进行测定, 结果表明处理组与对照组存在明显的差异。

关键词: 非洲山毛豆; 鱼藤酮; 菜粉蝶; 体壁

中图分类号: S482.39

文献标识码: A

几十年来对非洲山毛豆的杀虫活性已做了不少的研究^[1~5], 主要集中在该植物提取物对害虫的急性毒杀作用方面。作者在用非洲山毛豆叶丙酮提取物点滴菜粉蝶幼虫时发现, 幼虫在蜕皮或化蛹时出现畸形, 说明以鱼藤酮及其类似物为主要杀虫活性成分的非洲山毛豆对菜粉蝶幼虫有生长发育抑制作用。到目前为止, 还未见有这方面的报道。作者对此作了初步研究。

1 材料与方法

在华南农业大学农场采集菜粉蝶 (*Pieris rapae* L.) 幼虫, 室内饲养一代后挑选发育整齐一致的 5 龄幼虫进行试验。非洲山毛豆 (*Tephrosia vogelii* Hook f.) 采于华南农业大学杀虫植物标本园内, 40~50℃ 烘干, 粉碎, 用丙酮浸提得粗提物, 最后定容至每克干植物材料 1 mL 丙酮, 密封待用。灭幼脲 I 号 (w 为 99%), 由河北唐山市化工厂提供; 鱼藤酮纯品 (w 为 97%), 由西德生产。

石蜡切片观察: 用不同剂量的非洲山毛豆叶丙酮提取物点滴处理 5 龄菜粉蝶幼虫, 把刚出现症状的畸形虫体用苦味酸固定液固定, 进行虫体整体横断面的石蜡切片, 用苏木精—伊红双重染色, 松油醇脱水透明, 封片后观察组织结构变化的情况。对照组选用与畸形蛹发育时期相同的虫体进行横切对比观察。

超薄切片透射观察: 用鱼藤酮 (400 $\mu\text{g/mL}$) 点滴处理 4 龄菜粉蝶幼虫, 取无法蜕皮进入 5 龄的畸形幼虫, 解剖体壁用戊二醛—锇酸固定, 乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 用透射电子显微镜放大 3 000~50 000 倍观察体壁真皮细胞和内外表皮结构的组织病变情况。对照组以开始蜕皮的 4 龄末期幼虫进

行切片对比观察。

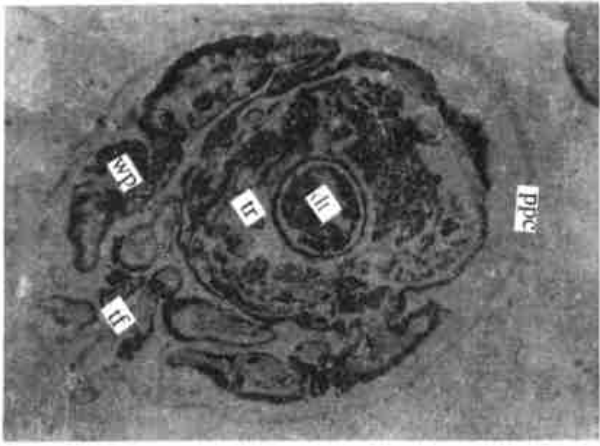
表皮成分分析: 用鱼藤酮 (400 $\mu\text{g/mL}$) 点滴 5 龄中期菜粉蝶幼虫胸部 1~3 节和腹部 1~2 节体段, 待畸蛹刚出现时, 挑选“幼虫—蛹”中间体的畸形幼虫 30 头, 先用蒸馏水冲洗干净体表, 解剖除去消化道、脂肪体等, 留下完整的体壁, 再在腹部第 2~3 节间横向剪断体壁分为前段和后段。并把各段的预蛹表皮和蛹体壁分离开 (分别简称为旧表皮和新表皮)。对照组选用即将蜕皮化蛹的虫体进行相同处理。各体段的新、旧表皮用双蒸水冲洗干净, 先用滤纸吸去水分, 然后放到红外线干燥器中烘干至恒质量。用电子分析天平称得各体段新、旧表皮的干质量。用滤纸包好干表皮装入索氏脂肪提取器, 以石油醚连续回流脱脂 24 h。将脱脂后的表皮再次烘干称质量。脱脂前后表皮干质量之差即为粗脂肪含量。再把脱脂后的干表皮用饱和氢氧化钠溶液在 160℃ 的甘油浴中煮 30 min, 碱解蛋白质后剩余透明的几丁质残基, 放到滤纸上用蒸馏水慢慢冲洗干净, 吸去水分, 烘干至恒质量。根据几丁质残基的质量计算出几丁质含量。并由脱脂表皮干质量与几丁质质量之差计算粗蛋白含量。本试验同时以灭幼脲 I 号 (500 $\mu\text{g/mL}$) 进行相同处理作为对比。

2 结果与分析

2.1 石蜡切片观察

选取用非洲山毛豆叶丙酮提取物点滴 5 龄中期菜粉蝶幼虫所形成的畸蛹 (蛹体被预蛹表皮包裹, 无法突破和蜕去旧表皮而呈“幼虫—蛹中间体”状态), 以只用纯丙酮点滴同期幼虫后获得的刚要羽化的虫体做对照, 进行石蜡包埋整体横切, 用光学显微镜观

察发现, 畸蛹中胸(点滴部位)有较完整的预蛹表皮包围着. 蛹体壁已形成得比较完善; 翅、胸足、消化道、脂肪体、气管等器官和组织均比较正常(图 1). 进一步处理观察表皮层结构发现畸蛹与对照虫体有非常明显的差异(图 2). 对照虫体的预蛹表皮只残余很薄的一层外表皮和上表皮, 蛹体壁上的表皮层为较厚的粉红色沉积层(图 2A), 并且可以看到有较明显的层次结构; 真皮细胞层排列得比较整齐(图 2B). 而畸蛹的预蛹表皮层仍比较厚. 除上表皮和外表皮层外, 还有明显的粉红色的内表皮层相连在一



wp-翅芽 wing pad, tf-胸足 thoracic feet, dt-消化道 digestive tract, ppc-预蛹表皮 prepupa cuticle tr-气管 tracheal trunk

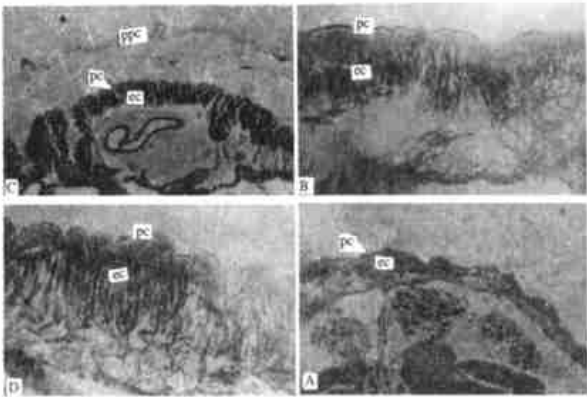
图 1 非洲山毛豆叶丙酮提取物(浓度为 0.5%)点滴的菜粉蝶畸蛹中胸横切片(33×)

Fig. 1 Lateral view of mesothoracic of malformed pupa of *Pieris rapae* treated with topical application of 0.5% acetone extracts of *Tephrosia vogelii* leaves

2.2 电子显微镜观察

用透射电镜观察 4~5 龄蜕皮时的幼虫体壁超微结构发现, 在 4 龄期间用鱼藤酮(400 μg/mL)点滴胸背所形成的畸形虫胸部体壁, 可观察到不完整的 5 龄表皮层与无法蜕去的 4 龄表皮层重叠在一起(图 3). 其 5 龄表皮层很薄, 没有明显的横列片层结构以及上表皮、外表皮和内表皮的层次特点. 4 龄表皮虽有部分已被消化, 但仍存留较厚的由上表皮、外、内表皮组成的一层, 且 4 龄和 5 龄的表皮之间有很明显的溶离层. 这表明幼虫在蜕皮时, 新表皮的沉积形成和旧表皮的分解消化过程受到了阻遏. 畸形虫体壁真皮细胞的细胞质中有较多的空泡, 细胞质内容物的染色反差度明显小于对照. 细胞内的各种细胞器和内容物的结构比较疏松模糊, 并且很难观察到完整的细胞核(图 3A、C). 而相同发育时期的对照幼虫体壁已形成比较完整和丰厚的表皮层. 表皮层有很明显的横列片层结构, 并可看到蜡道孔. 残余的 4 龄表皮层已经与新形成的 5 龄表皮层分离. 真皮层的细胞质比较稠密, 染色反差度较大. 细胞核清楚完整, 各种细胞器和细胞质内容物的结构较紧密有序

起. 畸蛹的蛹体壁上表皮层很薄, 而且不明显. 真皮细胞层排列不如对照整齐(图 2C、D). 因此, 作者认为非洲山毛豆叶丙酮提取物的作用致使预蛹表皮的内表皮层在蜕皮过程中没有完全消化分解, 而新形成的蛹体壁中的表皮层物质没有充分合成、分泌和沉积形成完整的表皮层. 这可能正是畸蛹的预蛹表皮厚韧和蛹体壁薄软的主要原因, 因而又是致使化蛹时变畸形的主要原因. 但是, 观察远离点滴部位的体壁切片, 发现处理者与对照之间没有上述明显的差异.



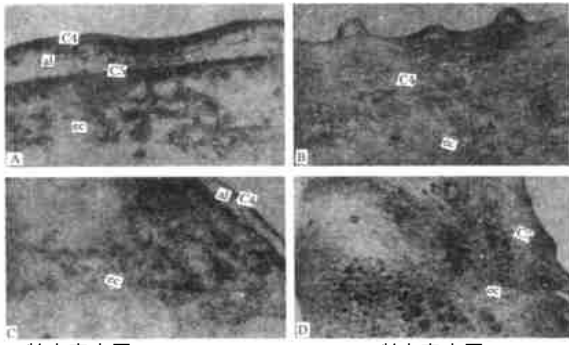
ppc 预蛹表皮 prepupa cuticle pc 蛹表皮 pupa cuticle ec 真皮细胞层 epidermal cell layer

A. 对照 control (310×), B. 对照 control (930×), C. 畸蛹 malformed pupa (310×), D. 畸蛹 malformed pupa (930×)

图 2 菜粉蝶蛹和畸蛹胸背体壁横断面显微结构

Fig. 2 Lateral view of microscopic structure of cuticle of thoracic back of pupa and malformed pupa of *Pieris rapae*

(图 3B、D). 整个电镜观察的结果再次证实鱼藤酮干扰蜕皮过程的作用, 并且表明被点滴部位的真皮细胞层发生了改变. 这种病变可能会影响细胞的正常生理功能, 因而使蜕皮过程中旧表皮的消化分解与新表皮的合成沉积过程受到干扰, 结果导致蜕皮受阻而形成了畸形虫体.



C4-4 龄虫表皮层 cuticle of 4-instar larva, C5-5 龄虫表皮层 cuticle of 5-instar larva, al-溶离层 abscission layer, ec-真皮细胞 epidermal cell layer A. 畸形幼虫表皮层 cuticle of malformed larva (10 588×), B. 正常幼虫表皮层 cuticle of normal larva (6 470×), C. 畸形幼虫真皮细胞层 epidermis of malformed larva (8 235×), D. 正常幼虫真皮细胞层 epidermis of normal larva (1 765×),

图 3 菜粉蝶幼虫体壁超微结构

Fig. 3 Ultramicroscopic structure of integument of *Pieris rapae* larvae

2.3 表皮成分分析

用鱼藤酮(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)点滴 5 龄中期菜粉蝶幼虫(4 $\mu\text{L}/\text{虫}$), 挑选出同一症状的畸形蛹体, 解剖获得预蛹表皮和蛹体壁进行几丁质、粗脂肪和粗蛋白质含

量分析. 并以灭幼脲 I 号(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理的畸蛹体壁作为对比, 以丙酮点滴的化蛹前(3 h 以内)预蛹的体壁作对照, 其分析结果见表 1.

结果表明, 用鱼藤酮点滴所产生的畸形蛹胸段

表 1 菜粉蝶畸蛹体壁(表皮)几种主要成分含量分析结果¹⁾

Tab. 1 The content of several main ingredients of cuticle of malformed pupae of *Pieris rapa*

样品 sample	部位 part	药剂 ²⁾ pesticides	表皮体壁干质量 dry weight of cuticle/ (mg·虫 ⁻¹)	w(几丁质 chitin)/ %	w(粗脂肪 total fats)/ %	w(粗蛋白 total proteins)/ %
畸蛹胸段 thorax of malformed pupa	蛹体壁	鱼藤酮	2. 03±0. 06c	2. 70±0. 27c	11. 84±0. 12b	85. 64±0. 46b
		灭幼脲 I 号	5. 14±0. 11a	4. 03±0. 49b	7. 55±0. 28c	88. 42±0. 51a
		对照	4. 56±0. 14b	5. 85±0. 08a	24. 10±0. 40a	69. 78±0. 57c
	预蛹表皮	鱼藤酮	1. 44±0. 10a	16. 05±0. 57a	20. 37±0. 48b	63. 58±0. 71b
		灭幼脲 I 号	0. 82±0. 06b	5. 53±0. 25c	17. 07±0. 55c	77. 41±0. 63a
		对照	0. 81±0. 07b	12. 84±0. 41b	28. 93±0. 49a	58. 23±0. 41c
畸蛹腹段 abdom of malformed pupa	蛹体壁	鱼藤酮	4. 26±0. 23a	5. 04±0. 15ab	17. 21±0. 52b	77. 66±0. 43b
		灭幼脲 I 号	4. 99±0. 29a	4. 55±0. 40b	9. 62±0. 39c	85. 83±0. 51a
		对照	4. 40±0. 32a	5. 90±0. 45a	21. 65±0. 53a	72. 45±0. 46c
	预蛹表皮	鱼藤酮	1. 03±0. 25a	3. 26±0. 25b	29. 44±0. 31a	67. 28±0. 39b
		灭幼脲 I 号	1. 25±0. 22a	3. 63±0. 21b	20. 13±0. 50c	76. 26±0. 52a
		对照	0. 81±0. 09a	11. 02±0. 24a	22. 62±0. 49b	6. . 35±0. 47b

1) 表中数据均为 $\bar{x} \pm SE$, 同列数据后具相同字母者, 表示在 5% 水平上差异不显著 (DMRT 法); 2) 处理每虫点滴鱼藤酮 1. 6 μg 或灭幼脲 I 号 2 μg , 对照每虫点滴丙酮 4 μL

体壁干质量只有对照的 44. 52%, 而残留的预蛹表皮干质量却比对照增加了 43. 75%. 但没有用鱼藤酮直接点滴的腹段, 其畸蛹体壁的干质量与对照没有显著的差异; 不过其残留的预蛹表皮干质量比对照增加了 21. 75%. 由此再次说明鱼藤酮对旧表皮的分解和新形成体壁的质量有明显的影响. 这种影响程度与接触鱼藤酮部位的距离有关系. 以灭幼脲 I 号进行相同的处理所产生的畸形蛹, 其胸段残留预蛹表皮干质量与对照差异不显著, 其蛹体壁干质量反而略高于对照. 腹段残留预蛹表皮干质量比对照高了 35. 2%, 蛹体壁干质量却大于对照. 可见鱼藤酮与灭幼脲 I 号对菜粉蝶虽然都有致畸作用, 但对体壁(表皮)质量的影响却有不同的特点.

鱼藤酮处理可使新形成的畸蛹体壁中几丁质含量减少. 被鱼藤酮直接点滴的胸段体壁中几丁质含量只有对照的 46. 09%, 没直接接触鱼藤酮的腹段蛹体壁几丁质含量差异较小. 胸段残留旧表皮的几丁质却明显高于对照, 但腹段的却低于对照. 灭幼脲 I 号处理形成的畸形蛹无论胸段或腹段, 无论蛹体壁或残留预蛹表皮, 其几丁质含量均明显低于对照. 这种局部点滴造成全身表皮几丁质含量受影响的系统性作用特点又与鱼藤酮局部性作用有明显的差异.

粗脂肪和粗蛋白含量分析结果表明, 鱼藤酮和

灭幼脲 I 号处理的蛹表皮和预蛹表皮中, 粗脂肪含量均不同程度低于对照; 粗蛋白的含量又均不同程度高于对照. 这可能是由于被处理后生理活动受到了干扰的结果. 相比之下, 灭幼脲 I 号对粗脂肪和粗蛋白含量的影响均比鱼藤酮更显著一些.

3 讨论

非洲山毛豆叶丙酮提取物的主要有效成分是鱼藤酮及其类似物^[6], 鱼藤酮通过影响昆虫体壁的组成成分而使菜粉蝶幼虫在化蛹时出现畸形, 说明鱼藤酮有抑制生长发育的作用, 在这以前鲜见有这方面的报道. 当前已知对昆虫生长发育有干扰、抑制或调节作用活性物质主要有两大类型: 第一类是调节或干扰昆虫内分泌系统, 影响昆虫体内激素的协调和平衡. 例如, 昆虫保幼激素和蜕皮激素以及天然或人工合成的各类激素, 使昆虫体内激素分泌的协调和平衡的生理功能受到扰乱; 抗保幼激素(早熟素)和印楝素也属于此类, 其中抗保幼激素作用于昆虫的咽侧体, 明显抑制保幼激素的产生; 而印楝素作用于昆虫神经和内分泌系统, 干扰了蜕皮激素和保幼激素的正常分泌, 导致各器官逐渐表现出系统性的病变. 这类物质干扰和抑制昆虫的正常生长发育, 引起的症状除了昆虫蜕皮变态时出现各种各样的畸形

虫体外,常常还可以观察到行为的混乱和各发育阶段历期的延长或缩短。另一类型是抑制昆虫几丁质的合成,致使蜕皮时不能形成正常的新表皮,造成畸形或死亡。具有这一机理的物质主要有灭幼脲等苯酰基脲类化合物,还包括人工合成的噻嗪酮以及从蓝雪科植物 *Plumbago capensis* 根部分离得到的蓝雪花素(plumbagin)^[7]。这类物质造成各种畸形虫体的症状特点常与新表皮不能形成和变薄软的特点相联系,很少有如影响激素物质所导致的行为混乱和历期延长或缩短的现象。根据本研究的结果,作者认为非洲山毛豆的抑制生长发育机理与灭幼脲类有一些相似之处。例如新形成表皮中几丁质含量降低,表皮层沉积很薄,畸形虫体的新体壁变薄,以及点滴处理后5龄幼虫历期没有明显的缩短或延长。这些反应和症状特点与灭幼脲点滴后有共同之处。张宗炳^[8]在灭幼脲中毒征象和毒理机制的综述中也提到,灭幼脲的中毒征象——早期的不取食、不活动到后期逐渐的死亡——与鱼藤酮中毒的征象有些相似。灭幼脲对呼吸代谢也是有影响的,其可能与呼吸抑制有关。然而,已知的非洲山毛豆活性成分与几丁质合成抑制剂在化学结构上没有很密切的联系。但非洲山毛豆点滴处理后残留的旧表皮较厚且韧,畸形特点与点滴部位有关的局部性作用现象与灭幼脲I号的作用又是不同的。

综合已有的资料和本试验的结果,作者对非洲山毛豆抑制生长发育机理作如下理解:点滴处理后,活性成分可以穿透蜡层和外内表皮层到达真皮细胞。由于受到细胞内和组织内各种屏障的阻滞和解毒作用的分解,致使其在虫体内的转移和扩散受到限制,是作用的局部性特点的原因。鱼藤酮等活性成

分的作用导致真皮细胞发生病变,使其正常生理功能受到影响。因此在菜粉蝶幼虫蜕皮过程中旧表皮中内表皮层的消化分解,以及新表皮的合成、分泌和沉积形成过程无法正常顺利完成,最终出现旧表皮难以蜕出,新表皮薄软的各种畸形症状。至于真皮细胞的病变及生理功能受影响是否与呼吸代谢的抑制有关,或是活性成分对蜕皮过程中各种酶活性的直接影响等问题目前还缺乏证据,需要进一步研究。

参考文献:

- [1] ARANT F S. Relative effectiveness of several rotenone containing insecticides against various insect[J]. J Econ Entomol, 1942, 35(6): 873—878.
- [2] WORSLEY R R L. The insecticidal properties of some East African plants[J]. J Ann Appl Biol, 1934, 21(4): 649—699.
- [3] HANSBERRY R, CLANSEN R T. Insecticidal properties of miscellaneous plants[J]. J Econ Entomol, 1945, 38(3): 305—307.
- [4] IRVINE J E, FREYRE R H. Occurrence of rotenoids in some species of the genus *Tephrosia*[J]. J Agri Food Chem, 1959, 7: 106—107.
- [5] CREMLYN R. Pesticides: Preparation and mode of action [M]. New York: New York Press, 1978. 41—42.
- [6] 张业光. 非洲山毛豆提取物对菜青虫生物活性及其有效成分研究[D]. 广州: 华南农业大学, 1990. 63—75.
- [7] KUBO I J, KLOCKE A, MATSUMOTO J, et al. Plumbagin as model for insect ecdysis inhibitory activity[A]. LITTLE J A. Rational and Biorational Design of Pesticides and Growth Regulators[C]. Utah: Paragon Press, 1983. 73—76.
- [8] 张宗炳. 昆虫毒理学的新进展[M]. 北京: 北京大学出版社, 1982. 39—72.

Effects of Extracts of *Tephrosia vogelii* and Rotenone on Cuticle of Larvae and Pupae of *Pieris rapae*

XU Han-hong, ZHANG Ye-guang, HUANG Ji-guang, CHIU Shin-foon

(Lab. of Insect Toxicology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China)

Abstract: The larvae of *Pieris rapae* L. topically treated with acetone extracts of the leaves of *Tephrosia vogelii* Hook f. or rotenone developed into the malformed larvae and pupae. The ultra-structure of the integument of the malformed larvae and pupae were observed. It was found that the deformation caused by rotenone and its analogs mainly resulted from the influences of decomposition of the old cuticle and synthesis of new cuticle. Significant differences in content of the chitin, total fats and total proteins between the treatment and control occurred.

Key words: *Tephrosia vogelii* Hook f.; rotenone; *Pieris rapae* L.; integument

【责任编辑 周志红】