

赵 慧, 徐 迪. 鬼臼毒素及 4'-去甲基鬼臼毒素对黄曲条跳甲的拒食活性研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(4): 67-70.

鬼臼毒素及 4'-去甲基鬼臼毒素对黄曲条跳甲的拒食活性研究

赵 慧, 徐 迪
(华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究鬼臼毒素及其类似物对黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* 的拒食活性.【方法】从窝儿七 *Rhizoma et Radix Diphylleiae Diphylleia sinensis* Li 提取分离得到鬼臼毒素和 4'-去甲基鬼臼毒素,并分别配制成 500、1 000、2 000、3 000 和 4 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5 种质量浓度,喂食黄曲条跳甲,比较不同浓度化合物在不同处理时间下对黄曲条跳甲的拒食率.【结果和结论】鬼臼毒素对黄曲条跳甲有显著的选择性拒食作用,且有一定持效性;4'-去甲基鬼臼毒素只在高质量浓度(4 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)下表现出选择性拒食活性,其他质量浓度无明显拒食作用.从两者分子结构推测鬼臼毒素母核上的甲氧基是拒食活性的决定基团.

关键词:窝儿七; 鬼臼毒素; 4'-去甲基鬼臼毒素; 黄曲条跳甲; 拒食活性
中图分类号:Q965.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)04-0067-04

Antifeedant activities of podophyllotoxin and 4'-demethylpodophyllotoxin against the adult of striped flea beetles, *Phyllotreta striolata*

ZHAO Hui, XU Di
(College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】Antifeedant activities of podophyllotoxin and 4'-demethylpodophyllotoxin against the adult of stried leaf beetles *Phyllotreta striolata* were studied.【Method】Podophyllotoxin and 4'-demethylpodophyllotoxin were extracted and separated from Chinese umbrellaleaf rhizome. The antifeedant activities of podophyllotoxin and 4'-demethylpodophyllotoxin against *P. striolata* were made at 500, 1 000, 2 000, 3 000 and 4 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ concentrations for 24 h and 48 h respectively.【Result and conclusion】Podophyllotoxin showed a selective antifeedant effect, and the activities remained unchanged as time extended. By contrast, 4'-demethylpodophyllotoxin had no obvious influence on antifeedant activities except under high concentration (4 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). The indexes of 4'-methyl were speculated to be the key functional group to affect the antifeedant activities according to the molecular structures of podophyllotoxin and 4'-hydroxypodophyllotoxin.

Key words: Chinese umbrellaleaf rhizome; podophyllotoxin; 4'-demethylpodophyllotoxin; *Phyllotreta striolata*; antifeedant activity

收稿日期:2013-11-25 优先出版时间:2014-06-03
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7671/j.issn.1001-411X.2014.04.013.html>
作者简介:赵 慧(1977—),女,讲师,博士,E-mail: totom2008@163.com; 通信作者:徐 迪(1977—),女,讲师,博士, E-mail: kitty2010420@163.com
基金项目:广东省高校优秀青年创新人才培养计划资助项目(粤财教[2009]400号)

黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* Fabricius 属鞘翅目叶甲科^[1], 主要危害十字花科蔬菜, 尤其对油菜等经济作物有较严重的危害^[2]. 目前对黄曲条跳甲主要采用化学方法防治, 且多以防治成虫为主, 叶面喷药无法兼顾土中幼虫、蛹和卵, 药剂持效期一过, 成虫不断羽化出土为害, 使得喷药次数和药量增加, 害虫产生抗性, 加重农药残留和环境污染.

寻找高效、快速、方便、经济且活性高、毒性小的植物次生物质, 并通过化学结构上的修饰或模拟等方法获得的植物化合物是当前的研究热点^[3-4]. 利用植物的次生物质来防治黄曲条跳甲是保护农作物的途径之一^[5]. 已有研究表明多种植物次生物质对黄曲条跳甲成虫具有选择性和非选择性拒食作用^[6-10]. 多项研究显示鬼臼毒素及其衍生物对菜粉蝶 *Pieris rapae*、粘虫 *Mythimna separata* 等鳞翅类害虫和鞘翅类昆虫均有拒食、毒杀、抑制生长发育等作用^[11-12]. 对鬼臼毒素进行结构修饰获得的衍生物能扩大杀虫范围和提高杀虫活性^[13]. 笔者研究了鬼臼毒素及其衍生物 4'-去甲基鬼臼毒素对黄曲条跳甲的拒食活性, 鬼臼毒素具有抗肿瘤、抗病毒作用, 其衍生物能降低药物副作用^[14], 因此将鬼臼毒素及其衍生物用于黄曲条跳甲防治, 对人类健康和环境没有危害, 鬼臼毒素及其衍生物有望成为防治黄曲条跳甲的一种新型生物农药.

1 材料与方法

1.1 供试材料和仪器

窝儿七 *Rhizoma et Radix Diphylleiae Diphylleia sinensis* Li 购自广州清平中药市场; 黄曲条跳甲成虫采自华南农业大学试验基地并无农药饲养 2 代; 吐温、石油醚 (60-90)、三氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、无水乙醇、无水甲醇等溶剂 (均为分析纯) 为天津化学试剂一厂生产; 柱层析硅胶 (100~200 目)、薄层层析硅胶 (H 与 GF₂₅₄) 为青岛海洋化工厂有限公司生产; 羧甲基纤维素钠 (CMC) 为上海化学试剂分厂生产. Varian Unity INOVA500 型核磁仪 (美国 Varian 公司); VGAutospec-500 质谱仪 (美国 Beckman 公司); FINNIGAN TRACE GC-MSTM, TR201818 (美国 Thermo Finnigan 公司).

1.2 窝儿七次生物质的提取分离

取窝儿七干燥茎根粉末 1 kg, 加 φ 为 95% 的乙醇溶液浸没生药粉, 加热回流 2 h, 过滤, 残渣再加 φ 为 95% 乙醇溶液回流 1 h, 浓缩乙醇提取物至糖浆状, 放冷, 倾入 500 mL 水中, 黄棕色树脂状沉淀析出. 滤集沉淀, 得窝儿七树脂. 将树脂研碎后用三氯

甲烷 450 mL 分 3 次分散溶解, 分成三氯甲烷溶解部分和不溶部分.

将三氯甲烷溶解部分蒸出三氯甲烷后, 残渣在苯和 φ 为 95% 乙醇的混合溶液 (体积比 1:1) 中重结晶, 放置过夜, 得鬼臼毒素. 将不溶物采用硅胶反复柱层析, 用石油醚/乙酸乙酯 (体积比 100:0、80:20、50:50) 溶液洗脱得 4'-去甲基鬼臼毒素.

1.3 鬼臼毒素类似物结构鉴定

采用 FINNIGAN TRACE GC-MSTM 分析化合物结构^[10]. 气相色谱进样口温度 230 °C, 载气为氦气, 流速 5 mL · min⁻¹, 非极性柱 BP-5 [30 m × 0.32 mm × 0.25 mm], 初始柱温 100 °C 保持 5 min, 以 10 °C · min⁻¹ 程序升温至 200 °C, 保持 5 min, 以 5 °C · min⁻¹ 线性升温至 220 °C, 保持 3 min, 分流比 20:1. TR201818 MSTM: 电压 70 eV, 质核比 m/z 35~335 amu, 借助 Wiley & Mainlib 数据库分析化合物结构.

1.4 窝儿七化合物不同浓度对黄曲条跳甲成虫的非选择性和选择性拒食作用的测定

将化合物鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素用 φ 为 50% 丙酮溶液和 φ 为 0.3% 吐温水溶液配制成 500、1 000、2 000、3 000 和 4 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5 个质量浓度. 采集较嫩的甘蓝无虫孔叶片, 选择叶面平整, 厚度接近的叶片, 用打孔器 ($d=1.8$ cm) 制备成圆形叶片. 用小毛笔蘸取适量溶液, 每片叶片正反面均匀涂药 2 次, 晾干. 对照叶片涂未加待测样品的空白溶液. 用培养皿和透明塑料硬纸制成高为 10 cm 的养虫笼, 下方培养皿中放置潮湿滤纸保湿. 上方的培养皿用保鲜薄膜封好, 防止虫子跑出.

非选择性拒食作用的测定: 每个笼子放 6 片涂样小叶, 接 10 头黄曲条跳甲成虫, 为 1 个处理, 每处理 3 个重复. 24 和 48 h 后分别用九宫方格图版记录成虫取食面积.

选择性拒食作用的测定: 培养皿中滤纸用铅笔画 1 个“十”, 将其平均分成 4 个区域, 其中不相邻的区域放涂有试样的叶片 4 片, 并作上标记, 另外 2 个区域放空白对照的叶片 4 片, 接 10 头黄曲条跳甲成虫, 为 1 个处理, 每处理 3 个重复. 24 和 48 h 后分别用九宫方格图版记录成虫取食面积.

1.5 数据分析

采用 SAS 9.1.3 分析数据, 非选择性拒食活性采用 DMRT 法进行分析, 选择性拒食活性采用 T 检验法分析. 对差异显著者, 按下列公式计算拒食率, 差异不显著者, 不计算拒食率.

拒食率 = (对照组取食面积 - 处理组取食面积) / 对照组取食面积 × 100%.

2 结果与分析

2.1 鬼臼毒素及其类似物结构鉴定

鬼臼毒素(图1):¹H—NMR(CDCl₃): 1.74 (w, 1H, OH), 2.82 (t, 1H,—CH), 3.76 (s, 6H,—OCH₃×2), 3.82 (s, 3H,—OCH₃), 4.12 (m, 1H,

CH), 4.16 (m, 2H,—CH₂), 5.97 (s, 2H,—OCH₂O—), 6.37 (s, 2H, Ar—H×2), 6.50 (s, 1H, Ar—H), 7.12 (s, 1H, Ar—H). MSESIm/z: 415 [M+1]⁺. 4'-去甲基鬼臼毒素:MSESIm/z: 401 [M+1]⁺(图1).

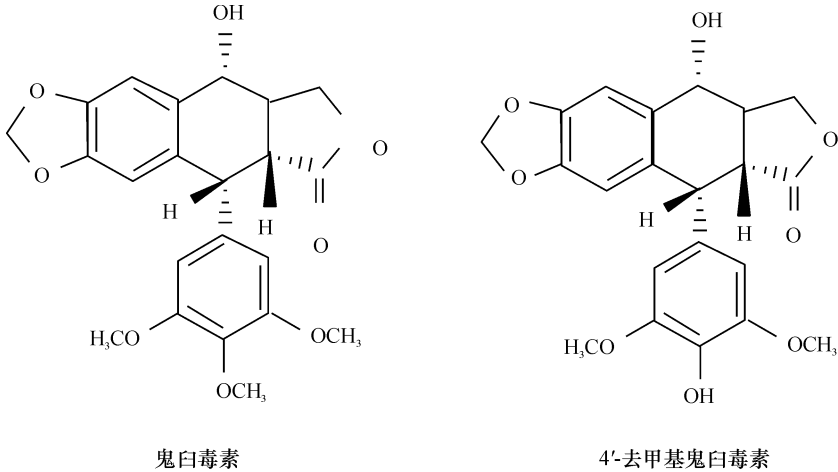


图1 鬼臼毒素及其类似物的分子式

Fig. 1 Molecular structural formula of podophyllotoxin and 4'-demethylpodophyllotoxin

2.2 窝儿七化合物不同质量浓度对黄曲条跳甲成虫的非选择性拒食作用

由表1可知,鬼臼毒素对照与处理差异显著,具有非选择性拒食活性,并随着质量浓度增加,拒食活性增加.在24h,浓度500μg·mL⁻¹时,拒食率为43.49%,4000μg·mL⁻¹时,拒食率达93.79%,但浓

度在1000~4000μg·mL⁻¹范围内的拒食活性差异不显著.除3000~4000μg·mL⁻¹浓度下的拒食活性差异不显著外,48h各组间拒食活性差异显著,其拒食活性均低于相同浓度条件下24h的拒食活性,但下降不显著.相同条件下,不同浓度4'-去甲基鬼臼毒素处理组与对照组就拒食活性均无显著差异.

表1 鬼臼毒素和4'-去甲基鬼臼毒素对黄曲条跳甲的非选择性拒食活性¹⁾

Tab.1 Nonselective antifeedant activities of podophyllotoxin and 4'-demethylpodophyllotoxin against <i>Phyllotreta striolata</i>							
ρ(鬼臼毒素)/ (μg·mL ⁻¹)	24 h		48 h		ρ(4'-去甲基鬼臼毒素)/ (μg·mL ⁻¹)	<i>S</i> _{取食} /mm ²	
	<i>S</i> _{取食} /mm ²	拒食率/%	<i>S</i> _{取食} /mm ²	拒食率/%		24 h	48 h
0	53.67±27.25a		119.33±41.88a		0	46.67±41.00a	75.67±24.87a
500	30.33±5.45b	43.49	81.33±5.17b	31.84	500	39.67±16.54a	64.67±41.37a
1000	14.67±9.41c	72.67	51.67±34.81c	56.70	1000	42.33±36.19a	82.67±22.54a
2000	9.00±10.83c	83.23	35.00±23.96d	70.67	2000	37.00±9.94a	83.70±51.70a
3000	7.00±8.61c	87.96	23.00±23.96e	80.73	3000	33.00±13.83a	65.67±41.00a
4000	3.33±3.80c	93.79	17.67±24.12e	85.20	4000	41.67±13.68a	57.00±17.39a

1) 同列数字后凡具有一个相同小写字母者,表示在P=0.05水平差异不显著(DMRT检验)

2.3 窝儿七化合物不同质量浓度对黄曲条跳甲成虫的选择性拒食作用

由表2可知,鬼臼毒素对照与处理差异显著,具有选择性拒食活性,随着质量浓度增加,拒食活性增加.在500μg·mL⁻¹时,24h拒食率为46.12%,4000μg·mL⁻¹时,24h拒食率达最大,为100%.相等质量

浓度下,48h的拒食活性均比对应的24h的活性略低,但下降不显著.4'-去甲基鬼臼毒素在1000和4000μg·mL⁻¹浓度下24h表现出拒食活性,4000μg·mL⁻¹下48h表现出拒食活性(53.03%),其余拒食活性表现不显著.

表 2 鬼臼毒素,4'-去甲基鬼臼毒素对黄曲条跳甲的选择性拒食活性¹⁾

Tab.2 Selective antifeedant activities of podophyllotoxin and 4'-demethylpodophyllotoxin against *Phyllotreta striolata*

化合物	$\rho/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	24 h			48 h		
		$S_{\text{对照}}/\text{mm}^2$	$S_{\text{处理}}/\text{mm}^2$	拒食率/%	$S_{\text{对照}}/\text{mm}^2$	$S_{\text{处理}}/\text{mm}^2$	拒食率/%
鬼臼毒素	500	55.67±23.48	30.00±16.29 *	46.12	128.67±7.98	105.00±17.39 *	18.40
	1 000	38.67±19.93	17.33±7.59 *	55.18	100.00±22.08	54.33±15.17 **	45.67
	2 000	30.67±34.80	5.33±13.68 *	82.63	158.33±31.94	71.00±21.22 **	55.16
	3 000	50.33±31.45	2.33±7.99 *	95.37	138.67±23.61	47.00±26.17 *	66.11
	4 000	91.00±2.48	0.00±0.00 **	100.00	175.33±23.61	9.67±12.25 **	94.49
4'-去甲基鬼臼毒素	500	31.67±6.25	23.67±7.99		66.00±22.08	54.00±9.94	
	1 000	30.67±1.44	16.00±8.96 *	47.83	72.33±29.43	64.67±33.55	
	2 000	25.33±23.48	17.00±7.45		84.00±37.26	57.00±12.42	
	3 000	38.67±33.36	19.00±13.14		75.70±60.70	48.67±24.51	
	4 000	38.00±45.20	13.00±7.45 *	65.79	82.33±20.07	38.67±19.30 **	53.03

1) S 表示黄曲条跳甲的取食面积;“*”、“**”分别表示相同处理时间处理与对照差异达 0.05、0.01 水平(T 检验)。

3 结论

植食性昆虫主要借助化学感受器来鉴别植物信号,而植物信号以植物次生物质为主.从鬼臼毒素和 4'-去甲基鬼臼毒素对黄曲条跳甲的拒食研究可知,鬼臼毒素在 24 和 48 h 对黄曲条跳甲的选择性拒食活性均高于非选择性拒食活性,表明鬼臼毒素对黄曲条跳甲具有更好的选择性拒食活性,且有一定的持效性.相比之下,4'-去甲基鬼臼毒素只在高浓度(4 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)条件下,对黄曲条跳甲才表现出选择性拒食活性.鬼臼毒素和 4'-去甲基鬼臼毒素分子结构骨架相似,但拒食活性研究结果差异很大,可能与分子母核上所带官能团不同有关.鬼臼毒素比 4'-去甲基鬼臼毒素多 1 个甲基,拒食活性也随之增大,推测可能是羟基的氢键作用阻碍了 4'-去甲基鬼臼毒素与相关受体的结合,从而降低了拒食活性.类似作用也表现在鬼臼毒素的其他衍生物上,如鬼臼毒素 C-4 位引入氨基二苯醚基团后,发现该衍生物的选择性和杀虫范围增强,其杀虫活性也得到一定程度的提高^[15].

参考文献:

[1] 沈金发.黄曲条跳甲的发生与综合防治技术[J].福建农业科技,2007(2):58-59.

[2] EKBOM B. Pests and their enemies in spring oilseed rape in Europe and challenges to integrated pest management [M]//WILLIAMS I H. Biocontrol-based integrated management of oilseed rape pests. New York: Springer Netherlands,2010: 151-165.

[3] MARTIN R M, GOPALAKRISHNAN S. Insecticidal activity of aerial parts of *Synedrella nodiflora* Gaertn (Compositae) on *Spodoptera litura* (Fab.) [J]. J Cent Eur Agric,2005,6(3):223-228.

[4] BARKAT D A. Insecticidal and antifeedant activities and

chemical composition of *Casimiroa edulis* La Llave & Lex (Rutaceae) leaf extract and its fractions against *Spodoptera littoralis* Larvae[J]. Aust J Basic App Sci,2011,5(9): 693-703.

[5] KHAN Z R, MIDEGA C A O, BRUCE T J A, et al. Exploiting phytochemicals for developing a ‘push-pull’ crop protection strategy for cereal farmers in Africa[J]. J Exp Bot, 2010, 61(15):4185-4196.

[6] KOUL O. Phytochemicals and insect control: An antifeedant approach[J]. Crit Rev Plant Sci, 2008, 27(1):1-24.

[7] RAUSHER M D. Co-evolution and plant resistance to natural enemies [J]. Nature,2001, 411(6839): 857-864.

[8] 郭成林,覃柳燕,陈海珊,等.楝科植物提取物对黄曲条跳甲成虫拒食及毒杀活性研究[J].广西科学,2006,13(1):71-74.

[9] 张兴.砂地柏杀虫作用研究概况[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2002, 30(4):130-134.

[10] XU D, Huang Z, CEN Y J, et al. Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against adult of stripeflea beetles, *Phyllotreta striolata* [J]. J Pest Sci, 2009,82(2):195-202.

[11] 谷文祥,何衍彪,何庭玉,等.苦槛蓝提取物对小菜蛾的生物活性[J].应用生态学报,2004,15(7):1171-1173.

[12] 侯军,马志卿,冯俊涛,等.鬼臼毒素对小菜蛾的生物活性及其几种代谢酶系的影响[J].昆虫学报,2007,50(9):895-899.

[13] XU Duming, YU Xiangyang, LIU Yingqian, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for podophyllotoxin[J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(11): 1583-1592.

[14] NEGAR N, JAT R K, SAHAAN R, et al. Podophyllotoxin and their glycosidic derivatives [J]. Pharmacophore, 2011,2(2):124-134.

[15] LIU Yingqian, YANG Liu, LIU Yangqing, et al. Synthesis and insecticidal activities of novel derivatives of podophyllotoxin[J]. Nat Prod Res,2007,21(11):967-974.

【责任编辑 霍欢】