

海芋凝集素对豆蚜的抗生作用研究

潘科, 侯学文, 黄炳球

(华南农业大学昆虫毒理研究室, 广东广州510642)

摘要:从海芋 *Alocasia odora* (Roxb) C. Koch 不同部位提取出海芋凝集素粗品, 并将其分离纯化得到层析纯样品. 研究表明, 海芋凝集素对豆蚜有较强的抗生作用, 其中以胃毒作用为主, 有一定的生殖抑制作用, 对豆蚜的蜜露分泌有一定影响.

关键词:海芋凝集素; 豆蚜; 抗生作用

中图分类号: S482

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)03-0051-04

Study on the anti-cowpea aphid action of a lectin from *Alocasia odora*

PAN Ke, HOU Xue-wen, HUANG Bing-qiu

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

Abstract: Plant lectin is a sort of plant protein, which can be used to control pests. It is very safe to animal, environment, and very stable in many facets. In this paper, crude lectins of *Alocasia odora* lectin (AOL) were obtained from *Alocasia odora* (Roxb) C. Koch. Then obtained chromatographic purified AOL by fraction. It was identified that AOL had strong anti-aphid action, including most stomach toxic, quite reproductive inhibition and honeydew secretion inhibition.

Key words: *Alocasia odora* lectin; cowpea aphid; anti-cowpea aphid action

随着社会的发展, 越来越多的人致力于寻找更加符合可持续发展的防治害虫的方法. 植物凝集素成为新的研究方向^[1~4]. 雪花莲凝集素(GNA)是第一个被发现的凝集素, 对稻飞虱、叶蝉、蚜虫等同翅目害虫及线虫均有很强的毒杀作用; 对咀嚼式口器的害虫也有中等的毒杀作用. 迄今为止, *gna* 基因已成功转入到马铃薯、番茄、烟草等9种作物发挥抗虫作用, 取得了显著的社会经济效益^[5,6]. 此外, 应用于害虫防治的还有麦胚凝集素、豌豆外源凝集素、苜蓿凝集素、半夏凝集素等^[4].

海芋 *Alocasia odora* (Roxb) C. Koch 属天南星科, 多年生常绿草本植物, 野生于中国南方山坡林地, 生长茂盛, 少有病虫害. 在中草药上常作为狼毒使用, 是著名的抗癌中草药. 《土农药及生物防治》中记载, 海芋可防治稻叶蝉、稻苞虫、粘虫等^[7]. 本论文从

海芋中提取凝集素, 以豆蚜作为防治对象, 研究海芋凝集素对豆蚜的抗生作用, 为今后将海芋凝集素基因转入农作物防治害虫做好前期工作并进行有益探索.

1 材料与方法

1.1 供试植物及昆虫

海芋 *Alocasia odora* (Roxb) C. Koch, 采自华南农业大学昆虫毒理研究室杀虫植物标本园内;

豆蚜 *Aphis craccivora* Koch, 华南农业大学教学农场豇豆上采集, 接于玻璃网室的豇豆苗上自然繁殖.

1.2 海芋凝集素的分离纯化方法

海芋凝集素(AOL)粗品的提取: 参考侯学文等^[8]的方法. 分别取新鲜海芋叶、块茎捣碎, 生理盐水4℃下浸提24h, 加适量(NH₄)₂SO₄固体至上清液, 达到30%饱和度. 4℃下放置5h后, 离心所得沉淀即

收稿日期: 2003-09-09

作者简介: 潘科(1978-), 女, 硕士.

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(000643)

为海芋块茎(叶)0~30%盐析段凝集素粗品. 将剩下的上清液再加适量 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 达到80%饱和度, 4℃下放置5 h后, 离心所得沉淀物即为海芋块茎(叶)30%~80%盐析段凝集素粗品. 分别将沉淀透析除盐, 冷冻干燥, 即得海芋块茎(叶)0~30%盐析段凝集素粗品[以下简称块茎(叶)I]、海芋块茎(叶)30%~80%盐析段凝集素粗品[以下简称块茎(叶)II].

海芋凝集素的纯化方法: 参考侯学文等^[8]的方法. 将粗品溶于PBS(pH7.0, 0.001 mol/L), 上经起始缓冲液平衡的Q Sepharose Fast Flow柱(2.6 cm × 30.0 cm), 用起始缓冲液洗脱至流出液 $D_{280\text{nm}} < 0.02$ 为止. 用0.001 mol/L PBS(0.1 mol/L NaCl)梯度洗脱, 分部收集, 流速为6滴/min, 洗脱至流出液在 $D_{280\text{nm}} < 0.02$ 为止. 通过血凝活性检测收集活性峰, 透析除盐, 冷冻干燥后得到海芋凝集素的层析纯样品.

1.3 海芋凝集素对豆蚜抗生作用测定方法

1.3.1 忌避作用测定 采用营养液法, 参考李友莲^[9]、毛雪^[10]的方法. 将石蜡膜截成边长为1.5 cm的正方形, 将其拉开, 覆盖在双通管($d = 2.5\text{ cm}$, $h = 3.0\text{ cm}$)的一端, 另取相同大小的石蜡膜与双通管一同放至紫外灯下照射15 min. 在超净工作台上, 于双通管的石蜡膜上滴100 μL海芋凝集素药液, 对照滴营养液. 用紫外线照射的石蜡膜将药液封好使之成为一个载有液体的小囊. 每管接入10头豆蚜, 双通管另一端用纱布扎住. 重复5次. 27℃、湿度为80%、12 h光/12 h暗的光照条件下培养. 2 d换1次营养液. 每天记录每管中取食定居的蚜虫数, 走动及饲料外的不计算在内.

1.3.2 蜜露分泌抑制作用测定 采用营养液法, 参考李友莲^[9]的方法. 将无翅孤雌胎生雌蚜中等若蚜接于含海芋凝集素的蚜虫营养液装置中, 对照为不加药品的蚜虫营养液, 每管10虫, 重复5次. 用1张浸泡过溴甲酚蓝溶液(2 mg/mL乙醇)的滤纸(处理前置于75℃的干燥箱中干燥后变为桔黄色)封住管口底部, 蜜露滴到滤纸上变为孔雀蓝色, 每天检查并记录滴数, 计算蜜露分泌抑制率.

1.3.3 毒杀作用测定 采用营养液法, 方法同

1.3.1. 每天检查死亡虫数.

1.3.4 生殖抑制作用测定 采用营养液法, 方法同

1.3.1. 每天检查所产若蚜数.

2 结果与分析

2.1 忌避作用

2.1.1 海芋凝集素粗品对豆蚜的忌避作用 测定结果表明海芋凝集素粗品对豆蚜有一定的忌避作用. 观察发现, 用10 g/L海芋凝集素粗品处理1 d后, 处理组有的豆蚜四处爬动, 不能安定取食, 而对照组基本能安定取食, 说明海芋凝集素粗品对豆蚜有一定的忌避作用. 块茎II对豆蚜的忌避作用较其他粗品强(图1).

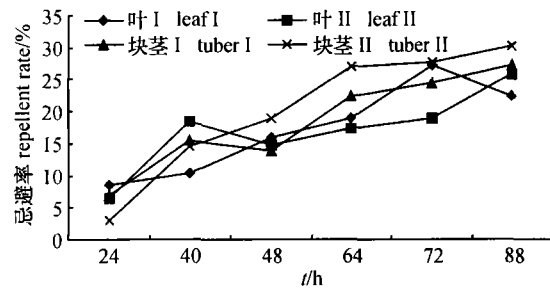


图1 10 g/L海芋凝集素粗品对豆蚜的忌避作用
Fig. 1 Repellent action of 10 g/L crude *Alocasia odorata* lectin on cowpea aphid

2.1.2 海芋凝集素层析纯样品对豆蚜的忌避作用 用含有海芋凝集素层析纯样品的营养液饲养豆蚜, 处理开始的第1、2 d, 忌避率较低; 处理后第3~5 d, 忌避率有明显增高, 且处理浓度与忌避率呈正相关. 1.25 g/L海芋凝集素层析纯样品处理豆蚜后, 第3、4、5 d忌避率分别为32.65%、30.00%、34.40%(表1). 质量浓度为0.625 g/L和1.250 g/L的海芋凝集素层析纯样品处理豆蚜的第1~2 d, 前者忌避率稍高于后者, 这可能是由于在处理初期0.625 g/L的质量浓度可以对豆蚜产生最强或是接近最强的忌避作用, 但是随着时间延长, 处理的药品浓度可能有所降低, 因此在处理后期呈现浓度与忌避率正相关趋势.

表1 海芋凝集素层析纯样品对豆蚜的忌避作用¹⁾

Tab. 1 Repellent action of chromatographic purification sample of *Alocasia odorata* lectin to cowpea aphid

$\rho / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	忌避率 repellent rate / %				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
0.313	4.72 ± 0.52c	8.94 ± 0.48c	22.33 ± 1.33c	20.88 ± 0.94c	22.88 ± 1.45c
0.625	6.67 ± 0.23a	11.92 ± 0.31a	26.98 ± 0.83b	26.44 ± 0.86b	28.84 ± 1.87b
1.250	5.28 ± 0.26b	9.77 ± 0.44b	32.65 ± 1.12a	30.00 ± 1.36a	34.4 ± 1.94a

1)表中同列数据后字母相同者表示在5%水平差异不显著(DMRT法)

2.2 蜜露分泌抑制作用测定

2.2.1 海芋凝集素粗品对豆蚜的蜜露分泌抑制作用

从表2可以看出,海芋叶凝集素粗品对豆蚜的蜜露分泌抑制作用比海芋块茎凝集素粗品更强.海芋叶I对豆蚜的蜜露分泌抑制作用最强,处理后第3 d蜜露分泌抑制率为74.23%,海芋块茎I对豆蚜蜜露

分泌抑制作用最弱,蜜露分泌抑制率仅为27.84%.

2.2.2 海芋凝集素层析纯样品对豆蚜的蜜露分泌抑制作用

海芋凝集素层析纯样品对豆蚜蜜露分泌有较强烈的影响,1.25 g/L海芋凝集素层析纯样品处理豆蚜4 d,蜜露分泌抑制率为84.21%(表3).

表2 10 g/L海芋不同部位及盐析段凝集素粗品对豆蚜蜜露分泌的影响¹⁾

Tab.2 Inhibition action of honeydew secretion of 10 g/L *Alocasia odora* lectin crude of different organ and salt out part to cowpea aphid

处理 treatment	蜜露分泌抑制率 inhibition rate of honeydew secretion / %			
	1 d	2 d	3 d	4 d
叶 I leaf I	30.56 ± 0.094a	63.64 ± 0.080a	74.23 ± 0.025b	100.00 ± 0.00c
叶 II leaf II	38.89 ± 0.042ab	54.55 ± 0.260a	60.82 ± 0.011b	91.76 ± 0.029b
块茎 I tuber I	52.78 ± 0.055b	62.34 ± 0.220a	27.84 ± 0.046a	72.94 ± 0.034a
块茎 II tuber II	50.00 ± 0.089b	50.65 ± 0.180a	63.92 ± 0.019b	80.00 ± 0.028a

1)表中同列数据后字母相同者表示在5%水平差异不显著(DMRT法)

表3 海芋凝集素层析纯样品对豆蚜蜜露分泌的影响¹⁾

Tab.3 Inhibition action of honeydew secretion of chromatographic purification sample of *Alocasia odora* lectin to cowpea aphid

$\rho/(g \cdot L^{-1})$	蜜露分泌抑制率 inhibition rate of honeydew secretion / %			
	1 d	2 d	3 d	4 d
1.250	43.21 ± 0.084a	71.19 ± 0.052b	76.00 ± 0.018b	84.21 ± 0.031b
0.625	38.27 ± 0.100a	12.82 ± 0.079a	56.00 ± 0.044a	67.11 ± 0.053a

1)表中同列数据后字母相同者表示在5%水平差异不显著(DMRT法)

2.3 胃毒作用测定

2.3.1 海芋凝集素粗品对豆蚜的胃毒作用测定

营养液法测定结果表明,海芋凝集素粗品对豆蚜有较强的胃毒作用.块茎II对豆蚜的胃毒作用最强,10 g/L质量浓度处理豆蚜,48 h时死亡率为60.04%;72 h时豆蚜死亡率为79.30%.表明海芋凝集素粗品对豆蚜有较强的胃毒作用,其中海芋块茎凝集素粗品对豆蚜的胃毒作用强于海芋叶凝集素粗品;30%~80%盐析段凝集素粗品对豆蚜的胃毒作用强于0~30%盐析段凝集素粗品(图2).

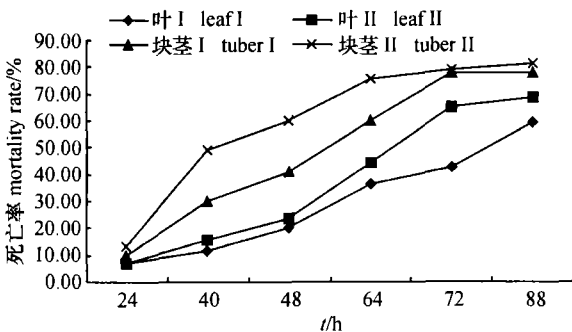


图2 10 g/L海芋凝集素粗品对豆蚜的胃毒作用

Fig.2 Stomach toxic action of 10 g/L crude *Alocasia odora* lectin on cowpea aphid

2.3.2 海芋凝集素层析纯样品对豆蚜的胃毒作用测

定 采用营养液法,用海芋凝集素层析纯样品处理豆蚜,结果表明海芋凝集素层析纯样品对豆蚜有较强的胃毒作用.质量浓度为5和10 g/L的海芋凝集素粗品处理后第2 d,死亡率分别为41.03%和60.04%,而同浓度的海芋层析纯样品,死亡率达75.51%和77.55%,分别提高了34.48%和17.51%;质量浓度为5和10 g/L的海芋凝集素粗品处理后,第3 d死亡率分别为75.17%和79.3%,而同质量浓度的海芋层析纯样品,死亡率达85.42%和89.59%,分别提高了10.25%和10.29%(表4).

2.4 生殖抑制作用

2.4.1 海芋凝集素粗品对豆蚜的生殖抑制作用测定

海芋凝集素粗品对豆蚜的生殖率有一定的影响,块茎0~30%段和30%~80%段粗品及叶30%~80%段粗品处理豆蚜后,生殖率明显降低,且产若蚜高峰期有不同程度的推迟,5 g/L块茎0~30%和30%~80%段粗品处理豆蚜后,产若蚜高峰期分别为第8 d和第6 d,与对照的第4 d相比分别推迟7和5 d.5 g/L叶0~30%段粗品处理,产若蚜高峰期未推迟,产若蚜数量仅有轻微降低(图3a).

2.4.2 海芋凝集素层析纯样品对豆蚜的生殖抑制作用

海芋凝集素层析纯样品对豆蚜生殖率有明显抑制作用(图3b).1.25g/L海芋层析纯样品处理豆蚜,

表4 海芋凝集素层析纯样品对豆蚜胃毒作用¹⁾Tab. 4 Stomach toxic action of chromatographic purification sample of *Alocasia odora* lectin to cowpea aphid

$\rho/(g \cdot L^{-1})$	相对死亡率 relative mortality / %			
	1 d	2 d	3 d	4 d
40	66.00 ± 5.48a	95.92 ± 5.48a	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a
20	6.00 ± 5.48b	81.63 ± 4.47b	93.75 ± 5.47ab	97.92 ± 4.47a
10	4.00 ± 5.48b	77.55 ± 4.47b	89.59 ± 7.07bc	97.92 ± 4.47a
5.0	2.00 ± 4.47b	75.51 ± 5.48bc	85.42 ± 5.48c	93.75 ± 5.48ab
2.5	0.00 ± 0.00b	69.39 ± 7.07c	75.00 ± 5.48d	87.50 ± 8.37b

1)表中同列数据后字母相同者表示在5%水平差异不显著(DMRT法)

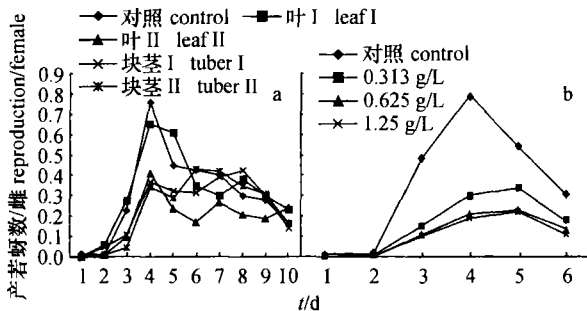


图3 5 g/L海芋凝集素粗品(a)及层析纯样品(b)对豆蚜生殖率的影响

Fig. 3 Reproduction rate action of 5 g/L crude *Alocasia odora* lectin (a) and its chromatographic purification sample (b) on cowpea aphid

每雌产若蚜数明显降低,产若蚜高峰期推迟1 d,且每雌产若蚜数平均为0.22头,比对照减少了0.57头。

3 讨论

自20世纪80年代转基因植物研究兴起以来,包括转 *Bt* 在内的多种杀虫基因均不能有效防治同翅目等刺吸式口器害虫,而经近年来的研究发现,植物凝集素对鳞翅目、鞘翅目、特别是对同翅目蚜虫、飞虱、叶蝉等刺吸式口器害虫高效^[11],并且还具有对高等动物安全、对环境无污染、稳定性好^[12-13]等优点。因此,筛选出对刺吸式口器害虫高效的植物凝集素,并对它进行分离纯化,探讨其杀虫活性具有非常重要的意义。

本研究证明了海芋凝集素对豆蚜有较强的抗生作用,其中以胃毒作用为主、有一定的生殖抑制作用,对豆蚜的蜜露分泌有一定影响。海芋凝集素粗品中,块茎30%~80%段凝集素粗品对豆蚜的抗生作用最强。纯化后,海芋凝集素层析纯样品对豆蚜的抗生作用比粗品增强。这将为今后用海芋凝集素进行抗虫(特别是抗豆蚜)试验提供有力的前提条件。

参考文献:

[1] 侯学文,谢建军,曾鑫年,等. 生物技术在植物性杀虫剂

研究开发中的应用[J]. 植物保护学报,2001,28(1): 77-82.

[2] 周永刚,田颖川,莽克强. 苋菜凝集素基因的克隆及在转基因烟草中抗蚜性研究[J]. 生物工程学报,2001,17(1):34-39.

[3] MACHUKA J, VAN DAMME E J M, PEUMANS W J. Effect of plant lectins on larval development of the legume pod borer, *Maruca vitrata* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1999, 93(2): 179-187.

[4] 潘科,黄炳球. 植物凝集素在病虫害防治中的研究进展[J]. 植物保护,2002,28(4): 42-44.

[5] 王志斌,李学勇,郭三堆. 植物凝集素与抗虫基因工程[J]. 生物技术通报,1998,2:5-10.

[6] BELL H A, FITCHES E C, DOWN R E. The effect of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Journal of Insect Physiology, 1999, 45(11): 983-991.

[7] 全国供销合作总社农业生产资料局. 土农药及生物防治[M]. 北京:化学工业出版社,1979.3.

[8] 侯学文,吴伯良,曾仲奎,等. 海芋凝集素的理化性质鉴定[J]. 暨南大学学报,1998, 19(3):89-93.

[9] 李友莲,吴海军. 植物凝集素对桃蚜生长发育的影响[J]. 山西农业大学学报,2000,20(2):93-96.

[10] 毛雪,高雪峰,李彩霞,等. 植物凝集素对蚜虫的抗生效应[J]. 山西农业大学学报,1999, 19(2):121-125.

[11] 周兆澜,朱祯. 植物抗虫基因工程研究进展[J]. 生物工程进展, 1994,14:18-24.

[12] 王志斌,张秀梅,郭三堆. 在转基因植物中利用植物凝集素防治害虫的研究[J]. 植物学通报,2000, 17(2): 108-113.

[13] HILDER V A, POWELL K S, GATEHOUSE A M R, et al. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids[J]. Transgenic Research, 1995, 4:18-25.

【责任编辑 周志红】