

河朔茺花对山楂叶螨作用机制的初步研究*

曹 挥^{1,2} 王有年¹ 张铁强¹ 赵莉茵³ 刘素琪² 师光禄¹

(1. 北京市农业应用新技术重点实验室 北京 102206; 2. 山西农业大学农学院 太谷 030801; 3. 中国科学院动物研究所
农业鼠害综合治理国家重点实验室 北京 100080)

摘 要: 对河朔茺花活性成分最佳流分 WCME-7 和 WCME-11 处理后的雌成螨进行症状观察, 初步推测它们可能通过影响山楂叶螨的神经传导和生殖、消化系统而导致雌成螨死亡。其中 WCME-11 击倒作用迅速, 从 12 h 开始山楂叶螨就进入了大量死亡期, 具有比 WCME-7 更为强烈的症状表现和更全方位的作用方式。WCME-11 能引起成螨体内的生理生化代谢, 解毒酶类的活性被激活, Ca^{2+} -ATP 酶和乙酰胆碱酯酶活性被强烈抑制。

关键词: 河朔茺花; 山楂叶螨; 作用机制

中图分类号: S768.7; S436.619 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2007)08-0065-06

Acarocidal Actions of *Wikstroemiae chamedaphne* against *Tetranychus viennensis*

Cao Hui^{1,2} Wang Younian¹ Zhang Tieqiang¹ Zhao Lili³ Liu Suqi² Shi Guanglu¹

(1 Key Laboratory of New Technology of Agricultural Application of Beijing Beijing 102206; 2 College of Agriculture, Shanxi Agricultural University Taihu 030801;
3 State Key Laboratory of Integrated Management of Insects and Rodents Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080)

Abstract: *Wikstroemiae chamedaphne* has good acarocidal activity against *Tetranychus viennensis*, a serious pest of many crops including apple trees in China. Its active constituents, WCME-7 and WCME-11, were separated and purified by column chromatography. The symptomatic observation showed that they had many actions, such as stomach poison, controlling development, controlling reproducing and so on. They maybe affect not only the nerve transmission but also digest, growing system. In contrast, WCME-11 showed more strong symptom phenomenon with more all directions function method, knocked down more quickly. From 12 h, the mites began to enter death period on large. Function mechanism of WCME-11 was studied in the experiment. The results indicate that the WCME-11 could cause the fast reaction of the enzymes inside the mites. Before 8 h, the enzymes were changed. WCME-11 could cause mite to counteract poison by GST_S and CarE, Ca^{2+} -ATP enzyme and AchE have been restrained strongly.

Key words: *Wikstroemiae chamedaphne*; *Tetranychus viennensis*; function mechanism

由于杀螨活性物质广泛存在于自然界, 因此从植物源天然产物中寻找新型化学结构物质, 成为杀螨剂研发的热点之一(罗万春等, 1997)。纵观目前的杀螨剂作用机制, 常用的大都是神经毒剂和几丁质抑制剂, 专一性程度低, 一些杀螨剂只对某一螨态有效, 有的甚至仅能杀卵, 杀螨谱广、速效性和持效性优良、不易产生抗性、对农作物安全的品种很少(浦定一, 1994)。因此, 高效、广谱、安全杀螨剂的研制开发已成为当务之急。深入研究杀螨剂的作用机制并设计全新化学结构的先导化合物, 仍是寻找新型杀螨剂的主要途径。河朔茺花作为新开发的植物源农药之一, 已经引起了人们的关注(王乃江等, 2002; 赵莉茵等, 2004)。为了更好地把河朔茺花(*Wikstroemiae chamedaphne*)研发为植物源杀螨剂, 本文以山楂叶螨(*Tetranychus viennensis*)为对象, 对河朔茺花活性成分 WCME-7 和 WCME-11 的杀螨作用机制进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验所用河朔茺花采自山西省太谷县大佛山(112°8' E, 38°9' N, 海拔 1 500 m)。全株洗净, 于通风处阴干后, 放入恒温箱内 45 °C 下烘干, 磨碎, 过 60 目筛, 供提取用。

收稿日期: 2005-11-09。

基金项目: 北京市科委区县专项资金项目(2006)、北京市都市农业学科群项目(XK100190553)、北京市属市管高校人才强教计划(PXM2007-014207-044536)、北京市属市管高校引进人才计划(PXM2007-014207-044538)、山西省科技攻关项目(051044)、山西省青年科学基金资助项目(20051036、2006021033)、山西农业大学创新基金(2004002)。

* 师光禄为通讯作者。

山楂叶螨为室内饲养的敏感品系: 养虫室的温度(25 ± 1) °C, 相对湿度(50 ± 10)%, 光照(L: D 为 18 h: 6 h)。

1.2 河朔菱花活性成分的分离

将植物干粉加入 5 倍量的甲醇, 室温下(30 ± 2) °C 浸提 3 次, 每次 3~5 d, 过滤, 合并 3 次的提取液减压浓缩, 得甲醇提取物 WCME, 用 10 倍量含水 10% 的甲醇液溶解 WCME, 采用液-液分配法用石油醚萃取 3 次, 合并石油醚部分, 得到 WCME 石油醚萃取物。

称取 WCME 石油醚萃取物 10 g, 采用常压开管柱层析法进行柱层析分离(吴文君, 1998)。洗脱后的流分经检测合并, 收集流分 WCME-7、WCME-11。将 2 个流分减压浓缩至稠状, 待用。

1.3 症状观察

叶碟浸渍法(朱丽梅等, 2002): 取平展的苹果叶片洗干净, 叶面朝下放到水培养台上, 每一叶片挑入成螨 20 头以上, 待成螨稳定后, 夹取叶片浸入药液($2, 1, 0.5, 0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 中 5 s, 对照为清水, 将叶面朝下放到水培养台上, 叶片边缘用湿棉条围住, 防止螨体逃逸。从 2~24 h 每隔 2 h 观察 1 次成螨的状况, 并记录其活动情况及反应。

1.4 酶活性测定

1.4.1 酶液制备 分别取触杀处理后 4、8、12、16、20、24 h 山楂叶螨雌成虫 100 头, 根据测定的酶的不同, 放入不同的溶液中, 冰浴匀浆后, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 °C 下离心 15 min, 取上清液备用。其中蛋白含量、 Ca^{2+} -ATP 酶和单胺氧化酶为放入 0.25 mL 生理盐水中; 谷胱甘肽-S-转移酶置于 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0) 中; 羧酸酯酶置于 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0) 中; 乙酰胆碱酯酶置于 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.5) 中。

1.4.2 活性测定 蛋白含量测定: 1) 采用考马斯亮蓝 G-250 法(李娟等, 2000)。取酶液 0.1 mL 于试管中, 对照管中加入 0.1 mL 磷酸缓冲液, 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂, 混匀, 25 °C 水浴加热 2 min, 于 595 nm 波长处比色测定 OD 值。根据标准曲线计算出蛋白质含量。2) 谷胱甘肽-S-转移酶活性测定: 参照慕立义等(1994)的方法, 27 °C 下, 记录 5 min 内 OD 变化值。3) 羧酸酯酶测定: 参照姜家良等(1980)的方法, 以 α -乙酸萘酯作底物, 底物溶液中加入毒扁豆碱。条件为 30 °C, 保温 30 min。4) 乙酰胆碱酯酶活性测定: 参照何玉仙等(2003)的方法, 以 Ache 为底物, DTNB 为显色剂, 毒扁豆碱为抑制剂。反应条件为 27 °C, 保温 15 min。1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的毒扁豆碱 0.3 mL 终止反应, 在 412 nm 波长下测定光密度值。5) Ca^{2+} -ATP 酶活性测定: 参照刘素媛等(1999)的方法, 重复 3 次。6) 单胺氧化酶活性测定: 参照许妍姬等(2005)的方法, 以 MAO 的特异性底物苄胺为反应底物, 测定其反应产物苄醛的生成量。利用苄醛在紫外部分 $\lambda = 242 \text{ nm}$ 处的吸收高峰, 测定酶作用反应后的光吸收值, 测定 MAO 的酶活性, 重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 WCME-7 和 WCME-11 处理后雌成螨的症状表现

将不同浓度的 WCME-7 和 WCME-11 处理雌成螨后, 进行症状观察, 结果表明: WCME-7 和 WCME-11 对成螨的作用大致可划分为以下几个阶段(图 1、2): 1) 静止期: WCME-7 为处理的 0~5 h, WCME-11 为处理的 0~4 h。症状表现为少数螨不停地运动, 但大部分静止, 足呈伸展放松状态, 无明显反应。2) 兴奋期: WCME-7 为处理的 5~7 h, WCME-11 为处理的 4~6 h。站立不稳, 步态失调, 运动不停, 四处逃散。3) 运动失调和过度兴奋期: WCME-7 为处理的 7~14 h, 表现为过度兴奋, 运动失调, 原地打滑; 身体重心抬高, 足痉挛; 停止颤抖, 表现前足孤立抽搐; 少数逃逸; 排泄物极少, 呈黑色; 产卵量急剧下降。WCME-11 为处理的 6~12 h, 除了 WCME-7 所有的症状之外, 还有以下特点: 表现比 WCME-7 更为强烈; 足极力伸展, 原地打转; 扩散现象严重; 腹部朝天仰卧, 努力翻身; 普遍前足孤立抽搐; 兴奋与静止轮流间隙; 少数有失水体湿现象; 无麻痹期, 身体颤抖并收缩至死亡。4) 麻痹期: WCME-7 为处理的 14~18 h, 螨体静止不动, 身体开始收缩; WCME-11 无麻痹期。5) 死亡期: WCME-7 为处理的 18~24 h, WCME-11 为处理的 12~24 h, 身体逐渐收缩至死亡。

WCME-7 和 WCME-11 处理后, 螨脱皮大量减少, 产生黑色液状排泄物。WCME-7 和 WCME-11 使单雌产卵量减少, 尤其是 WCME-11, 从 2 h 开始产卵量一直没有增加趋势, 强烈地抑制了山楂叶螨繁殖力。

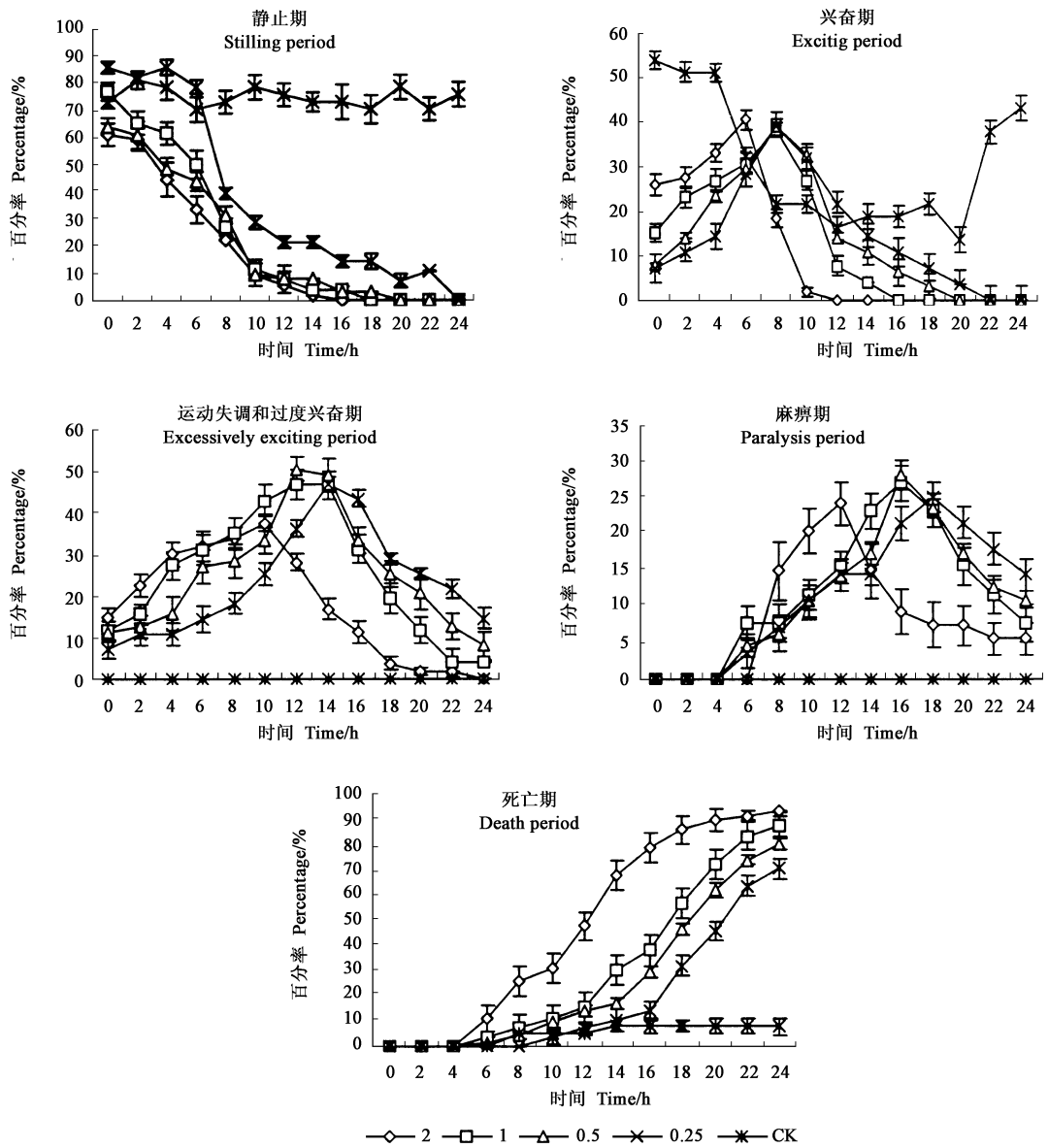


图 1 WCME- 7 处理后对山楂叶螨的症状学观察

Fig. 1 Symptomatic observation of *T. viennensis* contacted with WCME- 7

WCME- 7 和 WCME- 11 各个浓度梯度症状基本一致, 症状随着浓度降低而表现缓慢。它们对山楂叶螨表现出与神经毒剂相似的作用阶段, 但作用方式更为多样, 初步推测具有胃毒、忌避、抑制生长发育、抑制繁殖等多方面的作用。其中, WCME- 11 击倒作用迅速, 从 12 h 开始就进入了大量死亡期, 具有比 WCME- 7 更为强烈的症状表现和更全方位的作用方式, 没有明显的麻痹期, 直接进入死亡期。

2.2 对代谢酶活性的影响

2.2.1 蛋白含量 图 3 显示: 8 h 之前处理组与对照组之间的蛋白含量变化趋势相同而且差异很小; 从 8~20 h 之间蛋白含量上下波动; 但整体上蛋白含量变化不大, 受 WCME- 11 的影响不明显。

2.2.2 谷胱甘肽-S- 转移酶 由图 4 可见: 24 h 内处理组均显著高于对照组, 说明 WCME- 11 对山楂叶螨体内谷胱甘肽-S- 转移酶有强烈的激活作用。在 4 h 时, 处理的酶活力高达对照的 3.71 倍, 使螨体对药剂的解毒代谢增加。在 4 h 以后, 由于 WCME- 11 中的有毒物质在其体内的积累增多, 毒性增大而导致其解毒代谢稍受抑制, 谷胱甘肽-S- 转移酶活性有下降的趋势; 16~ 24 h 时, 谷胱甘肽-S- 转移酶又有回升趋势, 说明存活螨体内强烈的解毒反应是使其生命力延长的主要原因。

2.2.3 羧酸酯酶 当药剂处理约 6 h 后, 山楂叶螨通过体内的生理生化机制, 羧酸酯酶活性被 WCME- 11

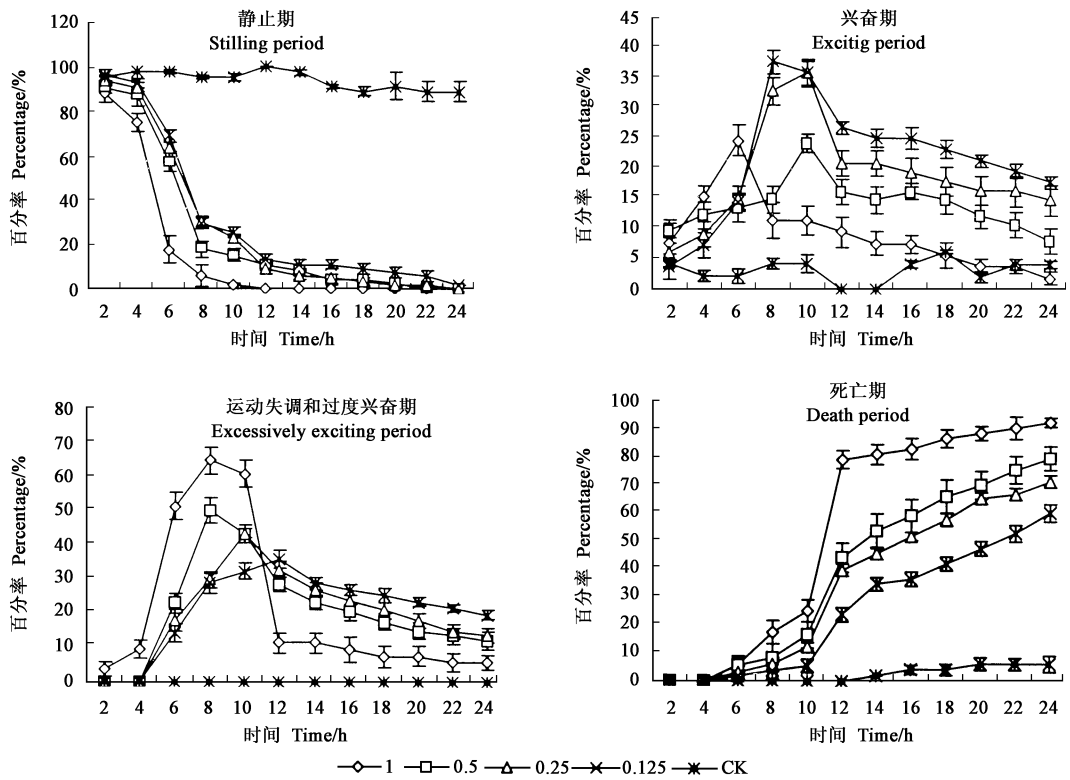


图2 WCME-11 处理后对山楂叶螨的症状学观察

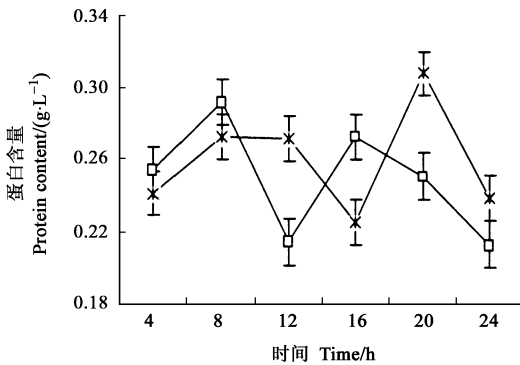
Fig. 2 Symptomatic observation of *T. iinnensis* contacted with WCME-11

图3 WCME-11 对山楂叶螨蛋白含量的影响

Fig. 3 Effects of WCME-11 on protein contents

□ WCME-11 × CK 下同。The same below.

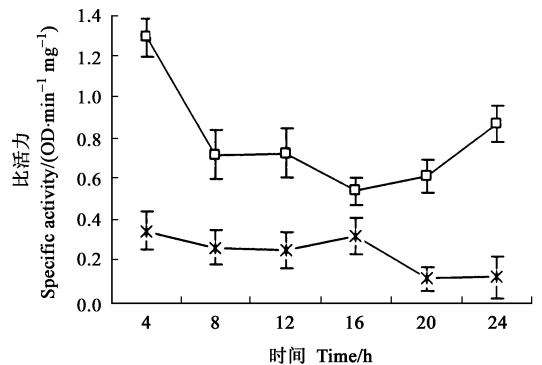


图4 WCME-11 对山楂叶螨 GSTs 的影响

Fig. 4 Effects of WCME-11 on GSTs

的次生代谢物质诱导激活,处理组的酶活力开始高于对照组。在 8 h 之前处理和对照都有一个急速上升的过程,之后就都在各自的小范围内上下波动,12 h 时处理组酶活力增长幅度最大,为对照组的 1.84 倍。整体上,WCME-11 使得螨体内羧酸酯酶被激活 1.40 倍,山楂叶螨通过增加水解酶活性来克服因外源物的加入所引起的体内代谢不平衡(图 5)。

2.3 对神经系统靶标酶活性的影响

2.3.1 单胺氧化酶 从图 6 可以看出:8 h 之前螨体内的单胺氧化酶活性被抑制,但在 12 h 时当对照组活力继续下降时,处理却急剧上升;12 h 后酶活性变化幅度大,呈快速下降、上升的急剧变化,但整体活力高于对照组,为对照组酶活力的 1.07 倍。总之,单胺氧化酶没有被抑制,也许不是 WCME-11 在螨体内的作用靶标,相反,它通过某种方式激活了螨的解毒机制,使积累的有毒胺类被氧化。

2.3.2 Ca²⁺-ATP 酶 从图 7 中可以看出处理组与对照组酶活力变化趋势基本一致,都有一个先上升后下降

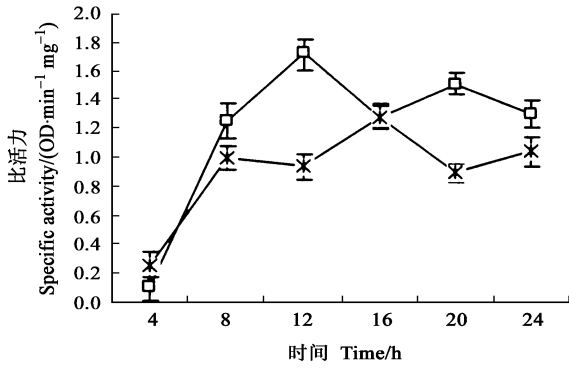


图 5 WCME- 11 对羧酸酯酶的影响

Fig. 5 Effects of WCME- 11 on CarE

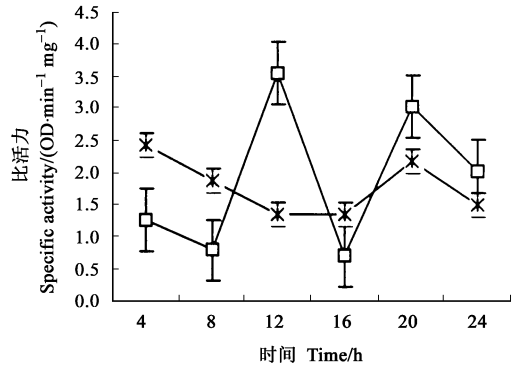


图 6 WCME- 11 对 MFO 的影响

Fig. 6 Effects of WCME- 11 on MFO

的过程。Ca²⁺-ATP 酶在整个 24 h 被显著抑制, 平均比活力是对照的 50. 68%。在 8 h 时下降幅度最大, 处理组只有对照组活力的 21. 87%; 随着作用时间的推移, 到 24h 时酶活力降到极低, 比活力只有 0.037。可以说明, Ca²⁺-ATP 酶有可能是 WCME- 11 在山楂叶螨体内的重要靶标之一, WCME- 11 对 Ca²⁺-ATP 酶的抑制是山楂叶螨导致死亡的重要因素之一。

2.3.3 乙酰胆碱酯酶 试验证明(图 8): 用 WCME- 11 处理山楂叶螨能够显著抑制乙酰胆碱酯酶, 使螨体内的乙酰胆碱酯酶活性降低, 在 4~ 8 h 之间酶活力就大幅度下降, 8 h 以后随着中毒时间的延长继续下降, 尤其在 12 h 时受抑制程度最大, 其体内的酶活性仅为对照组的 25%, 之后一直没有回升的趋势, 24 h 时降至极低水平。乙酰胆碱酯酶可能是 WCME- 11 在山楂叶螨体内重要的靶标酶之一。

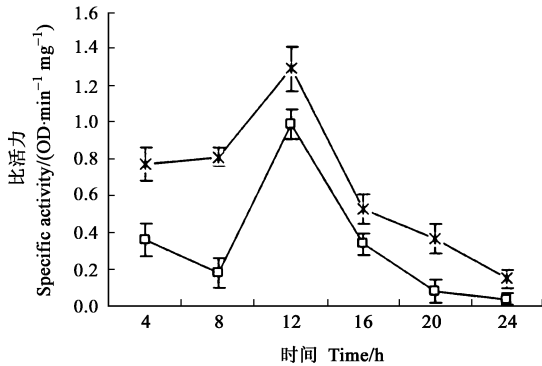


图 7 WCME- 11 对 Ca²⁺-ATP 酶的影响

Fig. 7 Effects of WCME- 11 on Ca²⁺-ATP enzyme

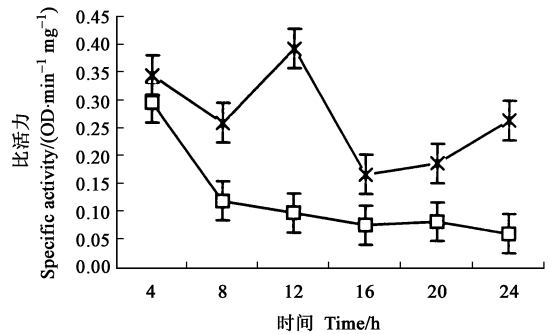


图 8 WCME- 11 对山楂叶螨乙酰胆碱酯酶的影响

Fig. 8 Effects of WCME- 11 on AChE

3 结论与讨论

植物源杀虫剂具有对害虫作用谱广, 对天敌干扰少, 无明显脊椎动物毒性和环境中降解迅速、资源丰富、可再生等优点(江建云, 1991)。在对川楝素等多种植物源杀虫物质的研究中发现, 它们对害虫的作用不同于常规化学农药, 其作用靶标和作用机制较为特殊, 全方位进行作用, 既抑制神经电位的正常传达, 又干扰体内激素平衡, 抑制解毒酶系, 特别是对消化系统作用明显, 对肌肉系统也有毒害作用。植物源杀虫剂以其独特的作用方式使害虫不易产生抗药性。

本试验中 WCME- 11 能引起山楂叶螨快速反应, 对雌成螨症状观察可以看出, 河朔莼花对山楂叶螨具有多种作用方式, 推测可能影响神经传导, 并对消化、生殖系统也会产生影响。进一步的作用机制研究证明了螨体内无论解毒代谢酶还是靶标酶都在 8 h 之前产生较大变化, 从而引起成螨体内的生理生化代谢。

就整个过程而言, WCME- 11 可以激发解毒酶类的活性, 对药剂进行水解、集团转移等降解作用。在解毒酶类中, 谷胱甘肽-S- 转移酶是最活泼的解毒酶系之一, 能催化生物体内的还原型谷胱甘肽与外源化合物的亲电子基团发生轭合, 最终形成硫醚氨酸排出体外, 从而降低它们的细胞毒性。此外, 该酶在谷胱甘肽过氧化物酶活力高的条件下, 具有清除体内脂质过氧化物的功能, 酶活力的升高可作为昆虫解毒代谢作用的

敏感指标(沈同, 1999)。另一类是羧酸酯酶, 它有 2 个作用: 一是催化羧酸酯或酰酯的水解, 另一个作用是作为结合蛋白, 保护乙酰胆碱酯酶不受破坏(宗静等, 2000; 陈巧云, 1980; 李腾武等, 1988)。在 WCME-11 处理螨后, 0~4 h 之间谷胱甘肽-S- 转移酶活性首先被激活, 在解毒代谢反应方面可能起主要作用; 羧酸酯酶活性在 4~8 h 之间被激活, 但此时谷胱甘肽-S- 转移酶的变化幅度有所减小, 两者以不同方式共同对 WCME-11 进行分解反应, 降低毒性。

神经系统是目前大多数农药的作用靶标, 其中重要的靶标酶是乙酰胆碱酯酶、单胺氧化酶和 Ca^{2+} -ATP 酶。乙酰胆碱酯酶可水解乙酰胆碱, 使其成为乙酸和胆碱。乙酰胆碱的释放是昆虫神经突触传递所必需, 但是, 它必须迅速地分解、除去, 乙酰胆碱的积累会引起神经传导的异常反应, 直至最终阻断突触传递, 使昆虫死亡。单胺氧化酶被抑制, 会造成神经胺积累起来, 神经胺是某些神经突触传递处的传递物质, 这些物质的积累与乙酰胆碱在胆碱激性突触处的积累一样, 也会引起神经传导阻断。ATP 酶存在于组织细胞及细胞器膜上, 是生物膜的一种蛋白酶, 在物质运送、能量转换及信息传递方面有重要作用(冷欣夫等, 1996)。

从 WCME-11 对神经系统靶标酶来看, 在 0~4 h, 单胺氧化酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性都被强烈抑制, 但乙酰胆碱酯酶活性抑制程度小, 加上谷胱甘肽-S- 转移酶的解毒作用, 螨体症状表现不明显, 处于静止期; 4~6 h, 随着谷胱甘肽-S- 转移酶活性的减小, 羧酸酯酶未被激活之际, 单胺氧化酶和 Ca^{2+} -ATP 酶抑制程度稍有加强, 尤其是乙酰胆碱酯酶抑制程度明显加大, 引起突触传导不能正常进行, 螨体进入兴奋期; 6~12 h, Ca^{2+} -ATP 酶和乙酰胆碱酯酶的活性被强烈抑制, 中枢神经系统轴突传导逐渐被阻断, 周缘神经正常突触传递受阻严重, 出现痉挛症状; 特别到 12 h 时, 靶标酶活力抑制程度最大, 螨体衰竭, 进入大量死亡期。

生物是一个有机的整体, 当外来物质进入后, 生物体会调动各种系统来保护生命活动的正常进行, 从本试验结果来看, WCME-11 激了解毒代谢酶类的活性, 对药剂降解, 但与解毒作用相比, WCME-11 对神经系统靶标酶的抑制作用更为强烈, 活性被强烈抑制, Ca^{2+} -ATP 酶和乙酰胆碱酯酶可能就是导致螨体死亡的重要靶标。目前已从河朔葵花中提取分离到芫花酯甲(yuanhuacine)(康少文等, 1985)和从种子中分离出的河朔葵花素(simplexin), 同属二萜原酸酯类结构(王成瑞等, 1981)。该类物质可能与其毒性有关, 但杀螨活性物质是否为同类或同一物质, 仍需进一步的研究。

植物中广泛存在杀螨物质, 但植物源杀螨剂的开发还是一个漫长的过程。本试验的结果对河朔葵花的开发将提供理论依据。

参 考 文 献

- 陈巧云. 1980. 淡色库蚊对敌百虫抗性的研究——水解酶同敌百虫抗性的关系. 昆虫学报, 23(4): 350-357
- 何玉仙, 王长方, 陈 锋, 等. 2003. 杀虫剂处理对甜菜夜蛾幼虫体内酶活性的影响. 江西农业大学学报, 25(6): 896-899
- 康少文, 于永芳, 魏清波, 等. 1985. 从黄芩花中分离出芫花酯甲. 中草药, 16(6): 37
- 冷欣夫, 唐振华, 王荫长. 1996. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性. 北京: 中国农业出版社, 18-21
- 李 娟, 张耀庭, 曾 伟, 等. 2000. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量. 中国生物制品学杂志, 13(2): 118-120
- 李腾武, 高希武. 1988. 不同地区小菜蛾种群羧酸酯酶的毒理学性质的研究. 昆虫学报, 41(1): 26-33
- 刘素媛, 孙黎光, 邢 伟, 等. 1999. 慢性染铅对大鼠海马区神经细胞 Ca^{2+} 浓度及 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响. 卫生毒理学杂志, 13(1): 102-103
- 罗万春, 慕立义, 李云寿. 1997. 植物源生物碱的杀虫作用. 农药, 36(7): 11-15
- 姜家良, 陈巧云, 黄 刚. 1980. 抗有机磷淡色库蚊的羧酸酯酶研究. 昆虫学研究集刊, (1): 69-76
- 江建云. 1991. 植物性农药研究进展. 湖南农业科学, (6): 43-46
- 慕立义. 1994. 植物化学保护研究方法. 北京: 中国农业出版社, 160-161
- 浦定一. 1994. 研制杀螨剂的一些思考. 农药, 39(2): 24-26
- 沈 同. 1999. 生物化学. 2 版. 北京: 高等教育出版社
- 王成瑞, 黄慧珠, 韩 玫, 等. 1981. 抗生育有效成分河朔葵花素的分离与鉴定. 中草药, 12(8): 1-3
- 王乃江, 刘建军, 令志哲, 等. 2002. 河朔葵花灌丛特性及其毒性的初步研究. 陕西林业科技, (3): 1-5
- 吴文君. 1998. 天然产物杀虫剂——原理·方法·实践. 陕西文艺出版社, 199-200
- 许妍姬, 韩春姬, 俞 星. 2005. 沙棘汁对铅中毒小鼠脑组织单胺氧化酶活性的影响. 延边大学医学学报, 28(2): 97-99
- 赵莉茜, 刘素琪, 侯 辉, 等. 2004. 河朔葵花对山楂叶螨活性的研究. 山西农业大学学报, 24(2): 184-186
- 宗 静, 张 帆, 孙光芝, 等. 2000. 繁殖寄主对赤眼蜂羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的影响. 昆虫学报, 43(Suppl): 70-76
- 朱丽梅, 倪钰萍, 黄春霞, 等. 2002. 螨的综合测试方法的研究. 南京农专学报, 17(1): 13-17

(责任编辑 朱乾坤)