

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0042-04

香樟叶对菜青虫拒食的活性成分研究

杨超伟,胡伟华*,夏莘,王炜炜

国家林业局泡桐研究开发中心,郑州 450003

摘要:用气质色谱法分析了香樟叶中的主要挥发性成分;用叶碟法测定了香樟叶不同试剂提取物对菜青虫的拒食作用、菜青虫对不同剂量的乙醇提取物拒食反应和香樟叶中主要成分芳樟醇和樟脑对菜青虫的拒食活性。结果表明,香樟叶中的主要挥发性成分分别为芳樟醇和樟脑 25.013%、桉油醇 13.572%。不同提取物的生测结果是乙醇提取物对菜青虫的拒食作用强于甲醇和乙酸乙酯提取物,拒食反应指数分别为 97.98、34.33 和 39.71;乙醇提取物的不同剂量测定结果表明,使用剂量越大对菜青虫的拒食作用越强;其主要成分芳樟醇和樟脑的拒食反应指数分别为 89.36 和 39.88,说明香樟叶的拒食活性主要是芳樟醇和樟脑的作用,其它成分或有协同。

关键词:香樟;菜青虫;拒食活性成分;生物测定

中图分类号:TQ91

文献标识码:A

Study on Antifeeding Active Constituent of Camphor Leaves to Pieris rapae

YANG Chao-wei, HU Wei-hua*, XIA Xin, WANG Wei-wei

Paulownia Research and Development Center of the State Forestry Administration, Zhengzhou 450003, China

Abstract: The main volatilize component from Camphor leaves was analyzed by GC/MS. The extracts from Camphor leaves using different solvents to the effect of anti-feeding, the response of anti-feeding to extracts of different doses of ethanol, the linalool and Camphor camphora of main components from Camphor leaves to activity of anti-feeding to Pieris rapae were measured by leaf disc test. The results show that the main volatilize components from Camphor leaves are the linalool and Camphor camphora taking 25.013% and eucalyptol taking 13.572% respectively. Bioassay results of different extracts show that the effect of ethanol to anti-feeding of Pieris rapae is stronger than that of methanol and ethyl acetate; the indexes of anti-feeding response are 97.98, 34.33, and 39.71 respectively. The results of extracts of different doses ethanol show that the large the doses, the stronger the anti-feeding. The indexes of anti-feeding response about the linalool and Camphor camphora from its main components are 89.36 and 39.88, it indicated that the anti-feeding activity of Camphor leaves is mainly the effect of linalool and Camphor camphora, and other components maybe have synergistic reaction.

Key words: *Cinnamomum camphora*; *Pieris rapae*; feeding deterrence active constituent; bioassay

菜青虫是菜粉蝶(*Pieris rapae*)的幼虫,是白菜、甘蓝、花椰菜等十字花科叶菜类的严重常发性害虫^[1],蔬菜遭受蛀食后其商品价值和产量均会受到严重的影响。当前,各蔬菜产区主要依赖阿维菌素及其结构改良产品进行防治,但对阿维菌素的过分依赖有大面积产生抗性的潜在风险。利用植物源拒食剂调控作物的适口性,可以将此类食叶类害虫的为害控制在蔬菜受害前。香樟树(*Innamomum camphora* sieb)别名樟木,属樟科常绿乔木,主要分布于中国长江流域、西南地区和日本,其植物组织的化学

成分有芳香油、樟油、芳樟醇、柠檬醛等物质,具有一定的抗虫性^[2]。以往以植物抽提物为主,对菜青虫活性的研究也很多^[3-9]。黄成华和姚安庆对樟树的枝叶提取物做了一些研究^[10],但没有做到具体的成分和剂量的研究。通过对香樟叶提取试剂、提取物拒食活性及作用机制的研究(另有研究论文),为开发新的植物源农药提供理论基础,而对香樟醇和樟脑的研究有可为其它拒食剂的开发提供增效剂。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫、植物材料和仪器、试剂

在河南农业大学科教园区花椰菜田采集菜青

虫,放入气候箱中用新鲜的花椰菜叶片饲养($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 10\%$ R.H., 14 L:10 D)。香樟树叶片采集于湖北省荆州市香樟基地,将叶片自然干燥并粉碎后备用。芳樟醇和樟脑(分析纯)分别购买于 Fluka Co Ltd. 和天津 Kermel 化学试剂有限公司,甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯、丙酮、石油醚购买于天津 Kermel 化学试剂有限公司。

旋转蒸发仪 RE-5299, 惠普 HP6890-5973N 气相色谱-质谱联用仪

1.2 香樟树叶挥发性活性成分测定

1.2.1 挥发油提取

取香樟树叶片粉末 15 g, 用石油醚提取, 每次 50 mL, 提取 3 次, 合并提取液, 过滤, 滤液用旋转蒸发仪蒸至近干, 再用氮气吹干溶剂, 得黄色挥发油, 密封保存, 供 GC/MS 分析用

1.2.2 色谱条件

HP6890-5973N 气相色谱-质谱联用仪(美国惠普公司), 配 HP-FFAP19091F-105 毛细管柱: 60 m × 0.25 mm × 0.25 μm; 进样口温度 240 °C 载气: He (纯度≥99.999%); 流量 0.7 mL/min(恒流模式); 程序升温: 40 °C (2 min) 5 °C/min 升至 180 °C, 再 5 °C/min 升至 230 °C (30 min); 进样量: 0.2 μL, 分流比: 50:1; 检测器: 5973 MSD; 电离方式: EI; 电离能量: 70 eV; 使用 NIST98 谱库进行图谱检索。CH₂Cl₂(色谱纯, 纯度≥99.95%, TEDIA 公司); 去离子水。

1.3 生物测定

1.3.1 香樟叶的不同溶剂提取物对菜青虫的拒食作用

采用新鲜无虫害的花椰菜叶碟作为取食基质进行选择性叶碟法取食测试。试验前首先将菜青虫 4 龄幼虫饥饿处理 12 h, 准确称取香樟叶干粉(叶片及叶柄自然风干, 粉碎, 过 40 目筛获得)5 份, 每份 50 g, 分别用甲醇 A、无水乙醇 B、乙酸乙酯 C 各 300 mL 浸提 24 h, 滤出浸提液, 再分别加入试剂 200 mL, 浸提 24 h, 过滤, 合并浸提液。用旋转蒸发仪蒸干溶剂, 得到浸提物浸膏。分别称取浸膏 1.5 克 5 份, 分别溶于 6 mL 丙酮溶剂中, 得到 A、B、C、D 浓度为 25% 的浸提物溶液, 待用。

测定时, 在 14 cm ID 培养皿底部铺上湿滤纸, 用打孔器制备 1.5 cm ID 叶碟, 放入 4 枚叶碟, 其中 2 枚作为处理, 另外 2 枚作为对照(交叉设置)。处理涂布 20 μL 浸提物溶液, 对照涂布等量的丙酮, 每

个培养皿引入 1 头试虫, 每组重复 20 次。采用透明坐标纸进行取食量测定。

1.3.2 菜青虫对不同剂量的香樟叶乙醇提取物的拒食反应

香樟叶粉末用无水乙醇(2 g/15 mL)常温提取 1 d, 经充分振荡后取上清液备用。实验时将其提取液分别稀释 1 倍、1.5 倍、2 倍、4 倍 4 个处理, 以溶剂作为空白对照。测试方法同上, 共 5 个试验组, 每组重复 19~21 次(表 1)。

1.3.3 香樟叶中的主要成分对菜青虫的拒食作用测定

为进一步确定香樟叶片中的拒食活性成分, 将其主要挥发物成分芳樟醇和樟脑按 100 mg/mL 溶于无水乙醇进行测试, 使用时每个处理叶碟涂布的样品剂量仍为 20 μL(相当于 2 mg 有效成分), 其他设置及测试方法同上。

1.4 数据处理

数据均采用配对 t 测验比较处理组内处理和对照被食量差异显著性($\alpha = 0.05$), 根据 Renwick and Huang X P(1995) 的方法计算拒食反应指数(Feeding deterrence index, FDI), 并对组间的 FDI 值差异进行方差分析和多重比较。

$$\text{拒食指数(FDI)} = \frac{CK - Tr}{CK + Tr}$$

其中, CK 和 Tr 分别是对照叶蝶和处理叶蝶的被食量。

2 结果与分析

2.1 香樟叶中的主要化学成分

在上述色谱条件下, 从香樟叶的挥发油中检出 90 多种化合物, 其主要化学成分为樟脑与芳樟醇(25.013%)、桉油醇(13.5723%)、α-松油醇(10.254%)、石竹烯(4.859%)。

2.2 香樟叶的不同提取物对菜青虫的拒食作用

从表 1 可看出, 香樟叶的不同提取物对菜青虫的拒食作用不同, 乙醇提取物对菜青虫的拒食作用最大, 拒食反应指数为 97.98, 而甲醇和乙酸乙酯的提取物对菜青虫的拒食反应指数为 34.33 和 39.71, 乙醇提取物对菜青虫的拒食作用明显强于甲醇和乙酸乙酯的提取物的拒食作用, 甲醇和乙酸乙酯的提取物的拒食作用又好于对照, 乙醇作为香樟的提取物的浸提试剂为好。

表 1 香樟叶中不同提取物对菜青虫的拒食作用

Table 1 Feeding deterrence of different extracts of *Cinnamomum camphora* leaf against *Pieris rapae* larvae

处理 Treatment	重复次数 <i>N</i>	被食量 ± 标准误 Leaf consumption ± SE		<i>t</i> 值 <i>t</i> -value	拒食反应指数 FDI	组间显著性 Between-group sig.
		处理 Treatment	对照 CK			
丙酮 Acetone	20	108.90 ± 14.45	114.65 ± 13.50	0.25	1.89	C
甲醇 Methyl alcohol	20	52.33 ± 11.36	120.95 ± 12.09	6.98	34.33	B
乙酸乙酯 Ethyl acetate	20	48.99 ± 10.50	125.42 ± 10.75	4.54	39.71	B
乙醇 Ethanol	20	3.58 ± 1.39	330.70 ± 14.33	37.98	97.98	A

注:与空白对照组比较, $P < 0.0001$ 。

Note: Compare with control, $P < 0.0001$.

2.3 菜青虫对香樟树叶提取物的剂量反应

为进一步研究香樟树叶提取物的拒食作用及适当的用量, 我们对菜青虫对香樟树叶提取物的剂量反应做如下测定。从表 2 可以看出, 完全不含香樟树叶提取物的组处理和对照的花椰菜被食量没有显著性差异($t = 8.12$), 其余组的处理和对照被食量之间均存在极显著差异, 20 μL 时拒食反应指数最

高($FDI = 98.08$)。从组间显著性来看, 20 μL 的剂量和 15 μL 的剂量的 FDI 之间差异不显著, 而 10 μL 与 5 μL 剂量差异不显著, 但前两者剂量的 FDI 指数显著大于后两者, 所有含有香樟树叶的提取物均有一定拒食活性且其拒食作用随着用量的增加而增强。

表 2 不同剂量的香樟树叶提取物对菜青虫拒食活性

Table 2 Feeding deterrence of different doses of *Cinnamomum camphora* leaf extracts against *Pieris rapae* larvae

稀释倍数 Dilution times	重复次数 <i>N</i>	被食量 ± 标准误 Leaf consumption ± SE		<i>t</i> 值 <i>t</i> -Value	拒食反应指数 FDI	组间显著性 Between-group sig.
		处理 Treatment	对照 CK			
CK	20	110.60 ± 16.61	106.00 ± 19.81	0.18	-8.12	C
4	20	50.00 ± 12.45	144.65 ± 13.50	7.42	55.29	B
2	21	42.33 ± 10.36	110.95 ± 17.09	3.42	41.33	B
1.5	19	26.79 ± 10.50	130.42 ± 17.95	5.78	67.71	A
1	20	3.50 ± 1.29	305.70 ± 15.33	38.02	98.08	A

注:与空白对照组比较, $P < 0.0001$ 。

Note: Compare with control, $P < 0.0001$.

2.4 芳樟醇和樟脑的拒食活性

从香樟叶成分的 GC-MS 看出, 芳樟醇和樟脑的含量达 25.013%, 是其成分中含量最高的成分, 为

进一步确定其是不是在香樟叶乙醇提取物的对菜青虫的拒食作用中占主导地位, 我们对芳樟醇和樟脑的拒食活性作如下测定, 结果见表 3。

表 3 香樟树叶主要挥发物成分对菜青虫的拒食活性

Table 3 Feeding deterrence of the major volatiles contained in *Cinnamomum camphora* leaf extracts against *Pieris rapae* larvae

物质(μL) Compound	重复次数 <i>N</i>	选项 Options	被食量 ± 标准误 Leaf consumption ± SE	<i>t</i> 值 <i>t</i> -Value	拒食反应指数 FDI
芳樟醇 Linalool	21	处理 Treatment	10.95 ± 2.35	8.38	89.36
		对照 CK	135.00 ± 14.56		
樟脑 Camphor	20	处理 Treatment	72.25 ± 14.00	3.35	39.88
		对照 CK	138.75 ± 12.24		

注:与空白对照组比较, $P < 0.0001$ 。

Note: Compare with control, $P < 0.0001$.

从表 3 可以看出, 芳樟醇和樟脑处理和对照被食量均存在极显著差异, 芳樟醇的 FDI 指数为 89.36, 樟脑的 FDI 指数为 39.88, 芳樟醇的活性更

强。由此进一步确定香樟叶中具有拒食作用的主成分为芳樟醇和樟脑, 而香樟叶的乙醇提取物的拒食指数高于芳樟醇和樟脑, 也说明提取物中其它成分

或有协同作用。

3 讨论

不同提取物的生物测定结果表明乙醇提取物对菜青虫的拒食作用强于甲醇和乙酸乙酯提取物,拒食反应指数分别为 97.98、34.33 和 39.71;乙醇提取物的不同剂量生测结果表明,提取物使用剂量越大对菜青虫的拒食作用越强,但在 20 μL 的剂量和 15 μL 的剂量的 FDI 之间差异不显著,而 10 μL 与 5 μL 剂量差异也不显著,在 10 μL 和 15 μL 之间确有显著差异,说明菜青虫对药剂用量有一定的恰当值,小于这个值无效,多了浪费,这可在以后的研究中做更细致的工作。其主要成分芳樟醇和樟脑的拒食反应指数分别为 89.36 和 39.88,说明香樟叶的拒食活性主要是芳樟醇和樟脑的作用,而其拒食指数小于乙醇提取物,说明提取物中其它成分或有协同作用,也可进一步研究。

当前,蔬菜重要害虫菜青虫的拒食剂筛选范围不断扩大,但真正能够用于防治实践替代阿维菌素及类似药剂的活性物质非常少。我们认为,应当根据植食者-寄主的系统发育保守假说^[11-15],精选与十字花科植物亲缘关系较远的植物作为拒食剂的筛选资源。通过对香樟叶的研究,由于其提取物对菜青虫拒食指数高达 90 左右,可作为开发拒食剂的植物资源。

参考文献

- Hong XY(洪晓月), Ding JH(丁锦华). *Agricultural entomology (second edition)*. Beijing: China Agricultural Press(农业昆虫学), 2007, 225-228.
- Yuan Z(袁争). Studies on the impacts of the extracts from 4 kinds of plants on the growth of *ectropis oblique prout* and two protective enzymes of *Camellia sinensis*. *Anhui Agric Univ*(安徽农业大学), PhD. 2012.
- Sun MM(孙梅梅), Chen SR(陈树仁), Miu Y(缪勇), et al. The study of antifeedant of three plant extracts to cabbage caterpillar. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2007, 19:623-625.
- Shi QT(石启田), Liu H(刘欢), Lu RC(鲁荣彩), et al. The study on antifeedant of cabbage caterpillar using ginkgo. *Biom Chem Eng*(生物质化学工程), 2009, 43:13-16.
- Wu LM(吴利民), Lu NH(鲁宁海), Wang GC(王国昌), et al. The study of antifeedant of volatile secondary compounds from caraway. *Guangdong Agri Sci*(广东农业科学), 2012, 39(8):79-80.
- Liu Y(刘亚), Li MC(李茂昌), Zhang CC(张承聪), et al. Chemical constituent analysis of *Cinnamomum camphora* oil, *Analysis Lab*(分析实验室), 2008, 1:88-92.
- Li SQ(刘素琪), Li XH(李向花), Zhang ZY(张勇智), et al. Antifeeding acting of larvae of *Pieris rapae* to chloroform extracts of *Litsea populifolia* gamble. *J Shanxi Agric Univ, Nat Sci Ed*(山西农业大学学报, 自科版), 2007, 27:381-383.
- Li TG(李廷刚), Duan YC(段友臣), Deng P(邓鹏), et al. Contact and antifeeding activity on ethanol extracts from the leaves of *Ginkgo Biloba* against *Pieris rapae*. *Shandong Agric Sci*(山东农业科学), 2011, 1:76-77.
- Zhu JS(朱九生), Qiao XW(乔雄梧), Wang J(王静), et al. The antifeedant and controlling effect to cabbage caterpillar using primary extract by ethyl alcohol from roots and bark of *Periploca sepium*. *Insect Knowledge*(昆虫知识), 2004, 41:548-552.
- Yao AQ(姚安庆), Liang DH(梁德华). *Modern Agrochemicals*(现代农药), 2004, 3(2):28-29.
- Renwick JJA, Huang XP. Rejection of host plant by larvae of cabbage butterfly: diet-dependent sensitivity to an antifeedant. *J Chem Ecol*, 1995, 21:465-475.
- Farrell B, Mitter C. Phylogenesis of insect/plant interaction: have *Phyllobrotica* leaf beetles (Chrysomelidae) and the lami-ales diversified in parallel. *Evolution*, 1990, 44:1389-1403.
- Futuyma DJ, McCafferty SS. Phylogeny and the evolution of host plant associations in the leaf beetle genus *Ophraella* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Evolution*, 1990, 44: 1885-1905.
- Weiblen GD, et al. Phylogenetic dispersion of host use in a tropical insect herbivore community. *Ecology*, 2006, 87: 62-75.
- Agrawal AA. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends Ecol Evol*, 2007, 22:103-109.