

万寿菊根提取物对山楂叶螨谷胱甘肽 S-转移酶和蛋白酶及蛋白质含量的影响*

师光禄¹ 王有年^{1*} 王鸿雷² 赵莉茵² 刘素琪³ 曹挥³ 于同泉¹ 路苹¹

(¹北京农学院农业应用新技术北京市重点实验室,北京 102206; ²中国科学院动物研究所农业虫鼠害综合治理国家重点实验室,北京 100080; ³山西农业大学农学院,山西太谷 030801)

摘要 采用常规生化实验方法,探讨了山楂叶螨在光、暗条件下经万寿菊根的氯仿提取物(TPC)作用后谷胱甘肽 S-转移酶、蛋白酶活性及蛋白质含量. 生物样品采用活体处理和离体处理相结合的方法. 结果表明:万寿菊根氯仿提取物的光活化生物活性最高,其次为水提取物,最后为甲醇提取物;山楂叶螨经 TPC 处理后,谷胱甘肽 S-转移酶和蛋白酶活性显著升高,蛋白质含量明显下降,蛋白酶及蛋白质含量变化程度在光照条件下显著高于黑暗处理. 万寿菊根氯仿提取物中存在的活性物质,能够促进山楂叶螨离体酶液中蛋白酶的活化;TPC 通过激活试螨体内的蛋白酶而促进蛋白质的降解. 万寿菊次生物质的生物活性主要属于光活化活性.

关键词 万寿菊 山楂叶螨 谷胱甘肽 S-转移酶 蛋白酶 蛋白质含量

文章编号 1001-9332(2007)02-0400-05 **中图分类号** S436.6 **文献标识码** A

Effects of *Tagetes erecta* extracts on glutathione S-transferase and protease activities and protein content in *Tetranychus viennensis*. SHI Guang-lu¹, WANG You-nian¹, WANG Hong-lei², ZHAO Li-lin², LIU Su-qi³, CAO Hui³, YU Tong-quan¹, LU Ping¹(¹Key Laboratory of New Technology of Agricultural Application of Beijing, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China; ²State Key Laboratory of Integrated Management of Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; ³College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2007, 18(2): 400-404.

Abstract: With in vivo and in vitro *Tagetes erecta* roots under light and dark as test materials, this paper studied the effects of their extracts on the glutathione S-transferase and protease activities and protein content in *Tetranychus viennensis*. The results showed that the chloroform extract of *T. erecta* roots had the highest light-activated activity, followed by water extract, and methanol extract. After treated with chloroform extract, the glutathione S-transferase and protease activities in *T. viennensis* increased markedly, while its protein content decreased obviously. The variation degree of *T. viennensis* protease activity and protein content was significantly higher when the chloroform extract came from the *T. erecta* roots under light, suggesting that there existed active matters in the extract, which could promote the activation of protease, and thus, the decomposition of protein in *T. viennensis*. The bioactivity of *T. erecta* metabolites was mainly of light-activated one.

Key words: *Tagetes erecta*; *Tetranychus viennensis*; glutathione S-transferase; protease; protein content.

* 国家自然科学基金项目(30170759,30571506)、北京市自然科学基金重点项目(6071001)、北京市教委平台建设项目(2006)、北京市科委区县专项资金项目(2006)和北京市都市型果业学科与果树生态安全创新团队资助项目.

* * 通讯作者. E-mail: wynbac@sohu.com

2006-01-19 收稿,2006-11-09 接受.

1 引 言

植物中的杀虫物质主要是植物在与昆虫的长期协同进化过程中为抵御昆虫植食行为而产生的次生代谢物质. 具有显著光活化特性的次生物质在植物中分布广泛, 其作用靶广泛, 害虫不容易产生抗性, 在环境中无残留, 有特异的杀虫谱且对天敌影响小, 是理想的新型杀虫剂^[1,13,17]. 万寿菊 (*Tagetes patula*) 属菊科 (Compositae) 万寿菊属, 别名臭芙蓉、蜂窝菊、臭菊、千寿菊, 为 1 年生草本植物, 原产墨西哥, 现世界各地均有栽培, 在我国已有一千多年的驯化史, 它的根提取物对昆虫具有良好的光活化毒杀活性^[2,5,7].

山楂叶螨 (*Tetranychus viennensis*) 属蛛形纲 (Arachnida) 蜱螨目 (Acarina) 叶螨科 (Tetranychidae), 广泛分布于亚洲、欧洲和大洋洲. 我国各地均有分布, 是我国北方落叶果树的主要害螨之一. 近年来在各地均猖獗蔓延, 以中部黄河故道和西北高温干旱果区受害较重. 严重受害果树叶片提前脱落, 不仅当年产量减少、质量下降, 而且次年花序、花朵座果率显著减少, 减产严重. 大量多次重复使用化学农药使山楂叶螨抗药性日益增强, 其种群数量增长更快, 防不胜防^[4,9-10,12]. 鉴于上述情况, 我们尝试采用万寿菊次生物质控制这种农业害螨, 收到了良好效果.

外源性有害物质在生物体内的代谢要先经过氧化、还原、水解等原发性代谢过程降解, 再经过轭合等继发性代谢过程形成易溶于水的化合物, 然后排出体外. 其中水解和轭合是昆虫解毒代谢的重要方式, 由一系列酶系催化完成^[16]. 谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase GST) 广泛存在于动物组织内, 能催化生物体内的还原型谷胱甘肽 (GSH) 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, GST 的升高可作为动物组织损伤的敏感指标. 蛋白酶 (protease) 与蛋白含量在生物体接近死亡时往往表现出高度的负相关, 由大量细胞生理机能的衰退而导致的蛋白酶活性急剧升高和蛋白质含量开始下降是这一时期的主要标志之一^[8].

本试验以植物次生物质提取和植物提取物对山楂叶螨的生物活性测定为基础, 着重探讨上述生化指标在万寿菊次生物质作用下的变化规律.

2 材料与方 法

2.1 植物材料的来源及次生物质的提取方法

试验所用万寿菊采自山西太谷 (38°9'N, 112°8'E, 海拔 780 m). 将万寿菊根于 50 °C 下烘干, 粉碎, 过 40 目筛. 取根粉 5 g 置于索氏提取器中, 按 1 g 植物材料 20 ml 溶剂的比例, 分别以 100 ml 氯仿、甲醇、水作为溶剂, 连续回流提取 6 h, 提取液减压浓缩至浸膏状. 取一定量上述氯仿提取物, 先以少量无水乙醇充分溶解, 再用蒸馏水稀释成不同浓度 ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$); 甲醇和水提取液直接稀释, 作为生物测定及酶抑制处理药剂^[9].

2.2 试螨的采集与饲养

供试山楂叶螨采自山西农业大学附近平地果园, 为日龄和生长条件一致、未受农药污染的健康成螨. 平时饲以新鲜苹果树叶片.

2.3 生物测定方法

生物活性测试采用双面胶带法^[11]. 将双面胶带纸贴在载玻片一端, 于解剖镜下用零号毛笔将日龄一致、健康活泼的雌成螨背面向下固定在胶带纸上, 剔除死螨, 保证每一载玻片上有成螨 20 头. 将粘有试螨的载玻片浸入不同提取物溶液中, 5 s 后取出, 用滤纸吸干多余液体, 置于 DRZ-日光色镉灯下照光 2 h, 解剖镜下观察记录试螨死亡情况. 为消除高浓度提取物中有机溶剂的影响, 设 10% 乙醇作为溶剂对照.

2.4 生化测定方法

根据生物测定结果, 选用万寿菊根氯仿提取物 (TPC) 作为处理药剂. 测定方法包括: 1) 活体处理. 对经过提取物处理的试螨直接取样测定; 2) 离体处理. 预先使试螨离体酶制备液和植物提取物进行反应产生前抑制 (或激活), 然后加入基质测定残余活性.

2.4.1 活体处理样品制备 试螨预先进行药剂喷雾处理, 即将上述药剂 (TPC) 用喉头喷雾器均匀喷布于试螨体表, 经过 20 ~ 24 h 黑暗期后置于 DRZ-日光色镉灯下照光 1.5 ~ 2 h, 定时取样测定, 同时设黑暗处理组和 10% 乙醇溶剂对照.

取经处理的试螨 100 头加 250 μl 生理盐水, 低温匀浆, 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 冷冻离心 15 min, 上清液进行生化测定.

2.4.2 试螨离体酶液的制备 为防止螨体内天然抑制剂的影响, 在测定不同种类酶活性时, 需采用不同的缓冲液制备离体酶液^[11]. 1) 谷胱甘肽 S-转移酶. 取新鲜试螨 800 头, 加 2 000 μl 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.0 磷酸缓冲液 (含 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA), 冰浴匀浆, 4 °C 下 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液作酶制

备液,测定时需加入辅酶 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 还原型谷胱甘肽 (GSH); 2) 蛋白酶及蛋白质含量. 取新鲜试螨 2 200 头,加 $6\ 050 \mu\text{l}$ 生理盐水,冰浴匀浆, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液待测.

2.4.3 植物提取物对试螨离体制备液的前处理 预先使离体制备液和不同浓度提取物按 1:1 体积比混合,在 DRZ-日光色镉灯下照光 1 h, 产生前抑制或激活, 然后加入基质测定残余活性. 同时设黑暗和相应乙醇溶剂对照.

2.4.4 酶活性及蛋白质含量测定方法 采用 1-氯-2,4-二硝基苯比色法测定谷胱甘肽 S-转移酶^[6]. 采用酪氨酸比色法测定蛋白酶^[14]. 采用 Folin-酚试剂法测定蛋白质含量^[15].

3 结果与分析

3.1 万寿菊根不同溶剂提取物对山楂叶螨的光活化生物活性

由表 1 可见,光照条件下,3 种提取物作用后山楂叶螨的死亡率均高于对照,说明 3 种提取物对试螨皆有有毒杀活性,而活性大小各不相同. 光照 1 h 和 2 h 试螨死亡率由高到低均为氯仿 > 水 > 甲醇,可见万寿菊根氯仿提取物的光活化生物活性最高,其次为水提取物,最后为甲醇提取物. 同时通过光照 1 和 2 h 后试螨死亡率变化差值比较可以看出,随光照时间延长,试螨死亡率呈上升趋势.

表 1 万寿菊根不同溶剂提取物对山楂叶螨的光活化生物活性

Tab.1 Light-activating bioactivities on different solvent extracts from *Tagetes patula* roots against *Tetranychus viennensis*

提取物 Extract ($30 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	死亡率 Mortality (%)		死亡率 变化值* Variable value of mortality
	1 h	2 h	
氯仿 Chloroform	88.33 ± 8.50	96.67 ± 2.36	8.34
甲醇 Methyl alcohol	31.67 ± 11.79	65.00 ± 8.16	33.33
水 Water	68.33 ± 2.36	73.33 ± 6.24	5.00
10% 乙醇 10% ethyl alcohol	6.67 ± 2.36	11.67 ± 4.71	5.00

* 死亡率变化值 = 光照 1 h 后的死亡率 (%) 值 - 光照 2 h 后的死亡率 (%) 值 Variable value of mortality = Mortality (%) after in light for 1 h - Mortality (%) after in light for 2 h.

3.2 TPC 处理后谷胱甘肽 S-转移酶活性变化

从图 1 可以看出,试螨体内的谷胱甘肽 S-转移酶在 24 h 黑暗期内基本维持在较低的活力水平,经光照后有所上升,光照期平均酶活力 ($0.215 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) 相当于黑暗期平均水平 ($0.113 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) 的 1.9 倍. 未经 TPC 处理的试螨体内的 GST 活力在黑暗期与 TPC 处理组基本处于同一

水平,在光照后亦有所升高.

从图 2 可以看出,无论光、暗处理,山楂叶螨离体 GST 活性在 TPC 作用下均显著升高,平均酶活力为 0.152 和 $0.121 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 分别相当于无 TPC 处理时的 5.73 和 5.48 倍.

试验结果表明,山楂叶螨谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 在万寿菊根氯仿提取物 (TPC) 处理下活性显著升高,可能与其积极参与对外源化合物的解毒代谢有关,可将其作为试螨在植物次生物质作用下的敏感指标.

3.3 TPC 处理后蛋白酶活性变化

从图 3 可以看出,20 h 黑暗期内,试螨体内的蛋白酶活性变化不大. 经光照作用后,酶活性显著升

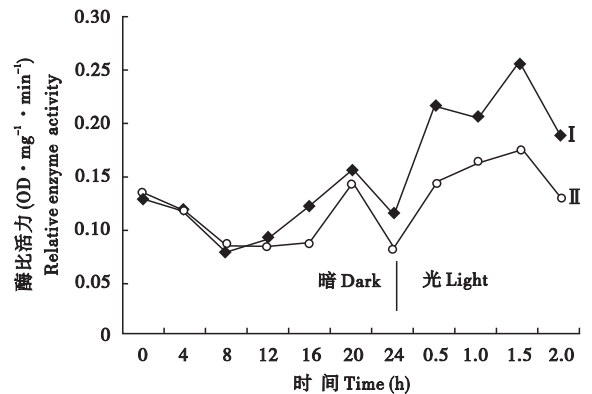


图 1 光、暗条件下 TPC 对山楂叶螨体内谷胱甘肽 S-转移酶的影响

Fig.1 Effect of TPC on the activities of GSTs of *T. viennensis* under light and dark.

I : $30 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ TPC 处理 30 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ TPC treatment; II : 10% 乙醇 10% ethyl alcohol. 下同 The same below.

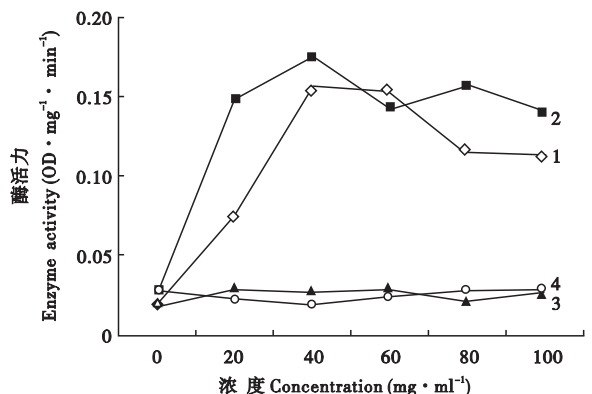


图 2 光、暗条件下 TPC 对山楂叶螨离体谷胱甘肽 S-转移酶的影响

Fig.2 Effect of TPC on the isolating body of GSTs of *T. viennensis* under light and dark.

1) TPC 光照处理 TPC treatment (Light); 2) TPC 暗处理 TPC treatment (Dark); 3) 乙醇对照(光) Ethyl alcohol control (Light); 4) 乙醇对照(暗) Ethyl alcohol control (Dark). 下同 The same below.

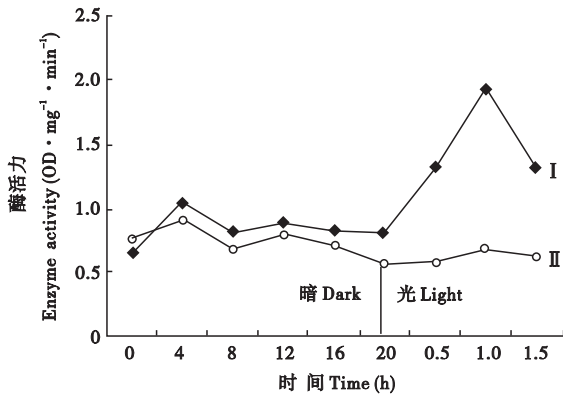


图3 光、暗条件下 TPC 对山楂叶螨体内蛋白酶活性的影响
Fig.3 Effect of TPC on the activities of protease of *T. viennensis* under light and dark.

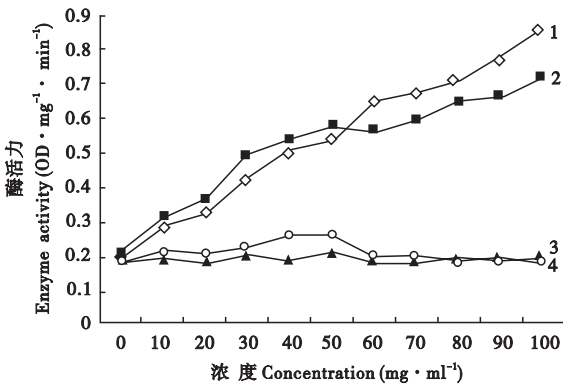


图4 光、暗条件下 TPC 对山楂叶螨离体蛋白酶活性的影响
Fig.4 Effect of TPC on the isolating body of protease of *T. viennensis* under light and dark.

高,光照期试螨体内蛋白酶平均酶活力($1.526 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)为黑暗期平均酶活力($0.847 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的 1.8 倍.说明在光照条件下 TPC 对蛋白酶有较大的激活作用,推测这种作用与光照后试螨死亡有密切的关系.

从图 4 可以看出,随 TPC 处理浓度增大,试螨离体蛋白酶活性均持续升高,其线性分析回归方程及相关系数分别为光照处理组: $y = 0.0647x + 0.1465$ ($r = 0.9941$);黑暗处理组: $y = 0.0464x + 0.2352$ ($r = 0.9594$).

TPC 活体处理组蛋白酶在黑暗期基本无变化,照光后酶活性迅速升高,这与生物测定中绝大多数试螨在照光后开始死亡的情况相一致;而 TPC 离体处理组蛋白酶在光、暗处理下均表现出随 TPC 浓度增大而升高的趋势.说明万寿菊根氯仿提取物中可能存在某些活性物质,能够促进山楂叶螨离体酶液中蛋白酶的活化.

3.4 TPC 处理后蛋白质含量变化

从图 5 可以看出,试螨体内蛋白质含量在黑暗期有所下降,在光照期继续下降,说明 TPC 在光、暗条件下均可促进山楂叶螨体内蛋白质降解,而光照条件下降解作用较强.

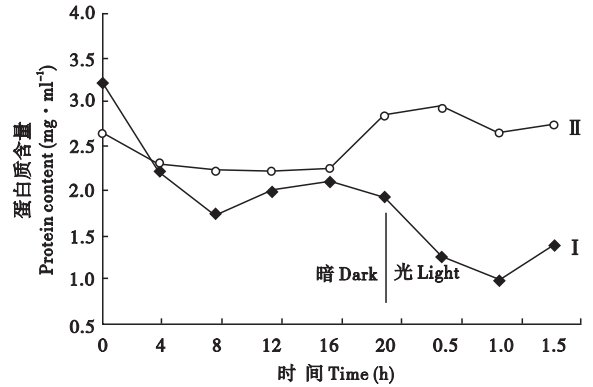


图5 光、暗条件下 TPC 对山楂叶螨体内蛋白质含量的影响
Fig.5 Effect of TPC on the protein content of *T. viennensis* under light and dark.

从图 6 可以看出,随 TPC 处理浓度增大,光照和黑暗条件下试螨离体蛋白质含量均有所下降.经 TPC 处理,试螨离体蛋白质含量变化规律与活体处理试验相符.说明无论在活体处理组中随处理时间的延长,还是在离体处理组中随 TPC 浓度的增加,试螨蛋白质含量均有所下降,并且活体和离体试验光照处理下蛋白质含量下降程度基本上都高于暗处理.推测 TPC 在一定程度上通过激活试螨体内的蛋白酶而促进蛋白质的降解.

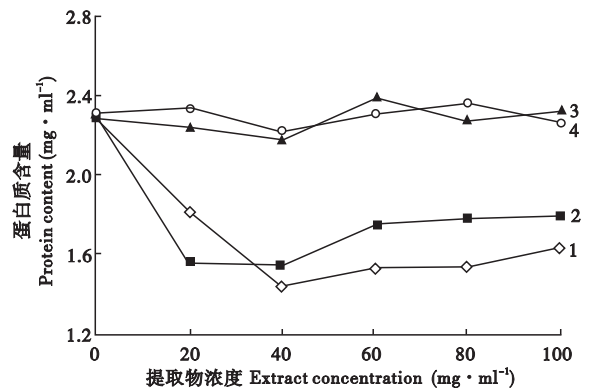


图6 光、暗条件下 TPC 对山楂叶螨离体蛋白质含量的影响
Fig.6 Effect of TPC on the isolating body of protein content of *T. viennensis* under light and dark.

4 结 语

谷胱甘肽 (glutathione) 是包含在许多细胞功能中的三肽,如细胞的运输、保护作用以及许多外源化

合物的代谢作用等. 它能与高反应性的化合物结合, 使其解毒. GST 是昆虫对杀虫药剂代谢中重要的共轭酶系之一, 它能使有毒的亲电化合物与内源性的还原型谷胱甘肽 (GSH) 进行共轭代谢, 保护其它亲核的中心, 如蛋白质和核酸等. 脂溶性外源化合物通过共轭作用, 形成易溶于水的化合物, 再经代谢排出, 达到解毒作用^[3,16]. 山楂叶螨谷胱甘肽 S-转移酶在万寿菊根氯仿索氏提取物处理下活性显著升高, 可作为试螨解毒代谢植物次生物质的敏感指标; 在由万寿菊根氯仿提取物处理而造成的山楂叶螨死亡过程中, 蛋白酶活性显著升高, 蛋白质含量则持续下降, 可见植物提取物中可能存在某些活性物质在蛋白酶的激活过程中起作用. 万寿菊根氯仿提取物处理下山楂叶螨几种酶系变化程度在光照条件下显著高于黑暗处理, 说明万寿菊次生物质的生物活性主要属于光活化活性, 从黑暗条件下各指标的变化情况看, 提取物中也存在不依赖于光活化的生物活性. 而试螨各离体指标在 TPC 处理下的变化受光、暗条件影响较小, 这可能是由于在离体条件下各酶系失去了原有的天然屏障——生物膜系统的保护, 而直接暴露于外界不良环境中的缘故. 由此可以推测, 试螨完整的生物膜系统 (包括体壁) 是其赖以防御外界不良环境条件的前提, 而对于光活化生物毒素来说, 很可能通过在光照条件下破坏靶标生物体内的膜系统, 从而促进其本身或其它外源有害物质通过膜传递而起作用. 另外, 植物次生代谢产物往往从多作用位点对靶标生物产生影响, 而生物体内对外源性有害物质的解毒代谢机理也是多方面的, 各生化指标间并不是各自独立, 而是相互联系、互为补充的. 在研究万寿菊次生物质对山楂叶螨羧酸酯酶活性的影响时发现, 随提取物浓度增高及光照时间的延长, 试螨活体和离体酯酶都有规律地受到抑制. 高活性谷胱甘肽 S-转移酶与酯酶之间在解毒代谢过程中的相互关系如何, 以及蛋白酶与蛋白质含量之间的对应关系等问题有待进一步研究.

参考文献

- [1] Hao N-B (郝乃斌), Ge Q-Y (戈巧英). 1998. Research and application of botanical insecticide. *Technology and Popularization of Plant Protection* (植保技术与推广), **18**: 35 - 37 (in Chinese)
- [2] Isman MB. 1994. Botanical insecticides and antifeedants: New sources and perspectives. *Journal of Pesticide Research*, **6**: 11 - 19
- [3] Leng X-F (冷欣夫), Tang Z-H (唐振华), Wang Y-C (王荫长). 1996. Molecule Poisonology and Insect Antipesticide of Insecticides. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- [4] Li Z-H (李照会), Shi G-L (师光禄), Xu Z-H (徐志宏), et al. 2004. Horticultural Plant Entomology. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- [5] Morallo-Rejesus B. 1987. Botanical pest control research in the Philippines. *Philippine Entomology*, **7**: 1 - 30
- [6] Mu L-Y (慕立义). 1994. Study Methods of Chem-Protection of Plants. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- [7] Philogene BJR, Arnason JT, Berg CW, et al. 1985. Synthesis and evaluation of the naturally occurring phototoxin, alpha-terthienyl, as a control agent for larvae of *Aedes intrudens*, *A. atropalpus* (Diptera: Culicidae) and *Simulium verecundum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of Economic Entomology*, **78**: 121 - 126
- [8] Shen T (沈同), Wang J-Y (王镜岩). 1990. Biochemistry. Beijing: Higher Education Press. (in Chinese)
- [9] Shi GL, Liu SQ, Cao H, et al. 2004. Acaricidal activities of extracts of *Stellera chamaejasme* against *Tetranychus viennensis* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, **97**: 1912 - 1916
- [10] Shi G-L (师光禄), Zheng W-Y (郑王义), Dang Z-P (党泽普), et al. 1994. Fruit Pests. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- [11] Wang H-L (王鸿雷), Liu S-Q (刘素琪), Ding Q-S (丁起盛), et al. 2003. The inhibiting effects of the extracts of *Tagetes erecta* on the activities of esterase isoenzyme in *Tetranychus viennensis* Zacher. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), **39**(2): 109 - 113 (in Chinese)
- [12] Wu J-X (仵均祥), Yuan G-H (原国辉), Shi S-S (史树森), et al. 2004. Agricultural Entomology. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- [13] Yuan L (袁林), Xue M (薛明), Liu Y-Q (刘雨晴), et al. 2006. Toxicity and oviposition-deterrence of *Vitex negundo* extracts to *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **17**(4): 695 - 698 (in Chinese)
- [14] Zhang G-Z (张国珍). 1992. Biochemistry of Food. Beijing: China Agriculture Press: 340 - 341 (in Chinese)
- [15] Zhang L-X (张龙翔), Zhang T-F (张庭芳). 1981. Method and Technology of Biochemical Experiment. Beijing: People Education Press. (in Chinese)
- [16] Zhang Z-B (张宗炳), Fan D-F (樊德方). 1989. Environmental Poisonology of Helminthic Medicament. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- [17] Zhou T (周天), Guo J-X (郭继勋), Han D-F (韩德复), et al. 2006. Chemical components of *Artemisia scoparia* volatile oil and its poison activity to mosquito. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **17**(5): 907 - 910 (in Chinese)

作者简介 师光禄,男,1958年生,教授,博士生导师.主要从事昆虫生态与害虫综合治理研究,发表论文110多篇,出版学术专著5部. E-mail: glshi@126.com

责任编辑 肖红

