

引诱赤眼蜂产卵的他感化合物 活性物质的提取及分析

万方浩¹, 仝赞华¹, 陶淑霞¹, 赵奎军²

¹农业部农作物病虫害生物防治资源研究与利用重点实验室,

中国农业科学院生物防治研究所, 北京 100081; ²东北农业大学植保系, 哈尔滨 150030

摘要:棉铃虫雌蛾腹部鳞片正己烷粗提液的气相色谱分析结果表明,粗提液含多种组分,在15~35min的保留时间内峰群较集中,其气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析结果显示,具引诱产卵刺激活性的主要成分为C₁₂~C₃₆直链烷烃类物质。正己烷粗提液经纸层析分离后,在R_f=0.92展层区段内,赤眼蜂在处理区的滞留搜索蜂数与对照区之间差异极显著(P<0.01)。薄层层析分离的结果显示,在距溶剂前缘2cm处有一条荧光带,但无引诱活性;在R_f=0.97和R_f=0.73的两个展层区段内,螟黄赤眼蜂的滞留搜索情况,处理区与对照区之间差异极显著(P<0.01);在R_f=0.83的展层区段内,处理区与对照区差异显著(P<0.05)。柱层析分离后的生测结果显示:135~137ml收集段洗脱液的引诱活性与对照区相比差异极显著(P<0.01);138~140ml收集段洗脱液与对照区相比差异显著(P<0.05);活性物质集中在135~140ml的洗脱段收集液中。该段收集液浓缩后的GC-MS分析结果显示,浓缩液中含多种活性成分,其中C₂₃、C₂₅、C₂₇、C₂₈含量高。将棉铃虫雌蛾腹部鳞片的正己烷提取液(浓度为1.7mg/ml)涂在赤眼蜂人工卵卡表面,可使螟黄赤眼蜂在处理人工卵卡上的寄生率提高14.3%,使松毛虫赤眼蜂在人工卵卡上的寄生率提高18.0%。

关键词:棉铃虫;螟黄赤眼蜂;松毛虫赤眼蜂;他感化合物

中图分类号:S476 **文献标识码:**A **文章编号:**0578-1752(2001)03-0277-06

Allelochemicals for Egg Parasitoids, *Trichogramma chilonis* and *T. dendrolimi*: Component Analyses of Active Materials

WAN Fang-hao¹, TONG Zan-hua¹, TAO Shu-xia¹, ZHAO Kui-jun²

¹ Key Lab of Bio-control Resources, Research & Utilization, MOA, Biological Control Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

² Plant Protection Department, North-eastern Agricultural University, Harbin 150030

Abstract: The n-hexane-extract of female *Helicoverpa armigera* abdominal scale were separated and purified by paper chromatography (PC), silica gel thin-layer chromatography (TLC) and silica gel column chromatography (CC) for oviposition attractants. The "T-shaped tube" bioassay was used for evaluation of different attractant impacts on *Trichogramma* spp. The result of bioassay of extractive purified by PC showed that the active components located at the zone of R_f=0.92. The active components purified by TLC scattered the zone of R_f=0.97 and R_f=0.73. Between the tow active zones there was a fluorescence strip without activity. The active extract purified by CC was concentrated at 135~140 ml of eluant. The result of the analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) showed that the active components mainly are Tricosane, Pentacosane, Heptacosane and Octacosane. The observation on the act of artificial egg cards treated by the n-hexane-extract showed that the parasitization was significantly higher than that in the control.

收稿日期:1999-11-30

基金项目: 国家科委“九五”攻关项目(96-005-01-11-02)

作者简介: 万方浩(1956-), 男, 湖南临澧人, 研究员, 博士, 主要从事昆虫生态、害虫及杂草生物防治研究。Tel: 010-68975297; Fax: 010-68975297; E-mail: bcicaas@public.bta.net.cn

Key words: *Helicoverpa armigera*; *Trichogramma chilonis*; *T. dendrolimi*; Allelochemicals

赤眼蜂是棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 卵的寄生蜂, 赤眼蜂的大量繁殖是田间大面积用以防治棉铃虫的重要前提。用柞蚕卵大量繁殖赤眼蜂受到柞蚕产地的限制, 为便于非柞蚕产地赤眼蜂的大量繁殖, 我国已研制出机械化生产人工寄主卵的生产线, 但由于人工卵卡的膜表面过于光滑, 加之高分子膜弹性大等原因, 使赤眼蜂在人工卵卡上的寄生率不太稳定。本研究试图从对螟黄赤眼蜂 (*Trichogramma chilonis*) 和松毛虫赤眼蜂 (*T. dendrolimi*) 有明显产卵引诱和刺激作用的棉铃虫雌蛾腹部鳞片正己烷提取液^[1]中分离纯化出对赤眼蜂有直接产卵引诱和刺激作用的主要活性成分, 并对其进行成分分析, 了解主要活性成分属于何种物质, 以期将该类物质喷涂于人工卵卡表面, 达到提高赤眼蜂在人工卵卡上的寄生率的目的。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 棉铃虫的饲养 在恒温养虫室内饲养。

1.1.2 鳞片的收集 取初羽化的棉铃虫雌蛾在冰箱冷冻层中放置 5min 后取出, 用小毛笔轻轻将其腹部的鳞片扫下, 收集于小玻璃瓶中备用。

1.1.3 赤眼蜂人工卵卡 未接蜂的新鲜人工卵卡, 规格 14×10(粒), 由北京市农林科学院植保环保所提供。

1.1.4 蜂种 螟黄赤眼蜂 (*Trichogramma chilonis*), 松毛虫赤眼蜂 (*T. dendrolimi*)。

1.1.5 试剂 异丙醇、乙酸乙酯、正己烷, 均为分析纯(北京化工厂生产)。

1.2 实验方法

1.2.1 鳞片中的利它素的抽提 取棉铃虫鳞片 100mg, 加入 150ml 正己烷, 4℃ 搅拌提取 24h, 过滤, 滤液浓缩至 25ml; 滤后的鳞片再加入 200ml 正己烷, 70℃ 回流 10h, 抽提液过滤, 浓缩至 25ml, 合并冷提取和回流抽提的浓缩液为粗提液。将粗提液分别浓缩成 5mg/ml(用于分离、纯化和在人工卵卡进行生测实验); 20mg/ml(用于 GC 分析); 50mg/ml(用于 GC-MS 分析)。

1.2.2 粗提液的纸层析分离 对棉铃虫雌蛾腹部鳞片正己烷粗提液进行纸层析分离, 层析滤纸为新华 1#(杭州新华纸业生产), 展开剂为异丙醇-乙酸乙酯-水(3.6 : 3.6 : 2.8), 点样量为

60 μ l, 展层距离 12cm。将展层后晾干的滤纸条裁成 2cm 一段放入小指形瓶(Φ 0.8cm×4cm)中待测生物活性。生测时以不点样展层滤纸的相应区段为对照。

1.2.3 粗提液的薄层层析分离 GF₂₅₄ 硅胶板(20cm×5cm), 展开剂为异丙醇-乙酸乙酯-水(5 : 3 : 2), 点样量为 200 μ l, 展层距离 16cm。展层后在紫外灯下观察有无暗带或荧光带, 将荧光带单独刮下, 其余展层部分按每 2cm 分段刮下, 荧光带前后分开, 分别以 1~2ml 正己烷浸提 24h, 待测生物活性。生测时以不点样的相应展层区段作对照。

1.2.4 粗提液的柱层析分离 装柱用硅胶为 140~200 目, 120℃ 活化 2h, 装柱(Φ 2cm×25cm); 加样量为 3ml; 洗脱剂为异丙醇-乙酸乙酯-水(5 : 3 : 2)。样品收集: 前 80 ml 洗脱液集中收集; 80~110ml 区段 5ml/管; 110~140ml 区段 3ml/管; 140~160ml 区段 5ml/管; 160~180ml 区段 10ml/管。各管收集液待测生物活性; 活性部分合并收集, 浓缩, 备 GC 分析和 GC-MS 分析用。生测时以洗脱剂作对照。

1.2.5 生物活性测定(T 型管法) T 型管长 20cm, 直径 2.5cm。“T”型管中部有一直径 1cm 的圆孔, 蜂由“T”型的竖管(长 10cm、外径 1cm)进入, T 型管两横端, 一侧放处理, 一侧为对照; T 型管放入上端开口的黑色有机玻璃盒内, 上方挂一盏 40w 日光灯, 使光线均匀地由上向下照射, T 型管与灯管平行放置。测定温度 25±1℃, 相对湿度 60±10%, 每次接入 15 头羽化 1d 的雌蜂, 接蜂后观察蜂在处理区和对照区的滞留搜索情况, 10min 后把 T 型管旋转 180°, 再观察赤眼蜂的滞留搜索情况。每样 12 个重复。

1.2.6 气相色谱(GC)分析 HP 6890 气相色谱仪, FID 检测器, HP-5 (SE-54) 毛细管柱(30m×0.32mm×0.25 μ m), 检测温度 280℃, 载气 N₂(30cm/s), 程序升温 150℃(5min)~270℃(10min), 5℃/min, 进样量 2 μ l, 280℃。

1.2.7 气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析 (1)正己烷粗提液的 GC-MS 分析: T(S) 200℃, E = 70 ev, 程序升温 100℃(1min)~280℃, 3℃/min, 保留 30min, 进样量 1 μ l, 扫描速度 1/s, 间隔 0.5s。(2)活性洗脱液的 GC-MS 分析: 程序升温 100℃(1min)~280℃, 5℃/min, 保留 20min, 进样量 2 μ l。其它条件同(1)。

1.2.8 引诱活性物质对赤眼蜂在人工卵卡上寄生率的影响 将棉铃虫雌蛾腹部鳞片正己烷提取液配成 1.7mg/ml 的浓度,用毛笔涂于人工卵卡表面,以正己烷作对照;待有机溶剂挥发后,将人工卵卡置于 $\Phi 20\text{cm} \times 30\text{cm}$ 的圆柱形玻璃缸内,处理和对照分别相对粘在侧壁上;引入赤眼蜂,控制蜂卵比为 3:1,接蜂时间 10h;接蜂温度控制在 25℃,相对湿度 60%,黑暗接蜂;6d 后检查寄生率;每个处理 840 粒卵。

2 结果与分析

2.1 正己烷粗提液 GC 及 GC-MS 分析

正己烷粗提液的 GC 分析结果(图 1)显示,棉铃虫雌蛾腹部鳞片的正己烷粗提液中含多种组分,

主要峰值的保留时间集中在 15~35min 之间;进一步的 GC-MS 分析结果显示,提取液中具有产卵引诱活性的成分主要是 $\text{C}_{12} \sim \text{C}_{36}$ 的直链烷烃,另有少量其它化合物。

2.2 正己烷粗提液的纸层析分离

正己烷粗提液在滤纸上展层后,不同展层区段的生测结果(表 1)显示,在 $R_f=0.92$ 区段内,滞留搜索的蜂数为 8.50,相应对照区的搜索蜂数为 3.17,处理区与对照区之间差异极显著($p < 0.01$);而在其它展层区段内,处理区与对照区之间差异均不显著($p > 0.05$),这表明经纸层析分离后,活性物质集中在靠近溶剂前缘的 2cm 区段内。

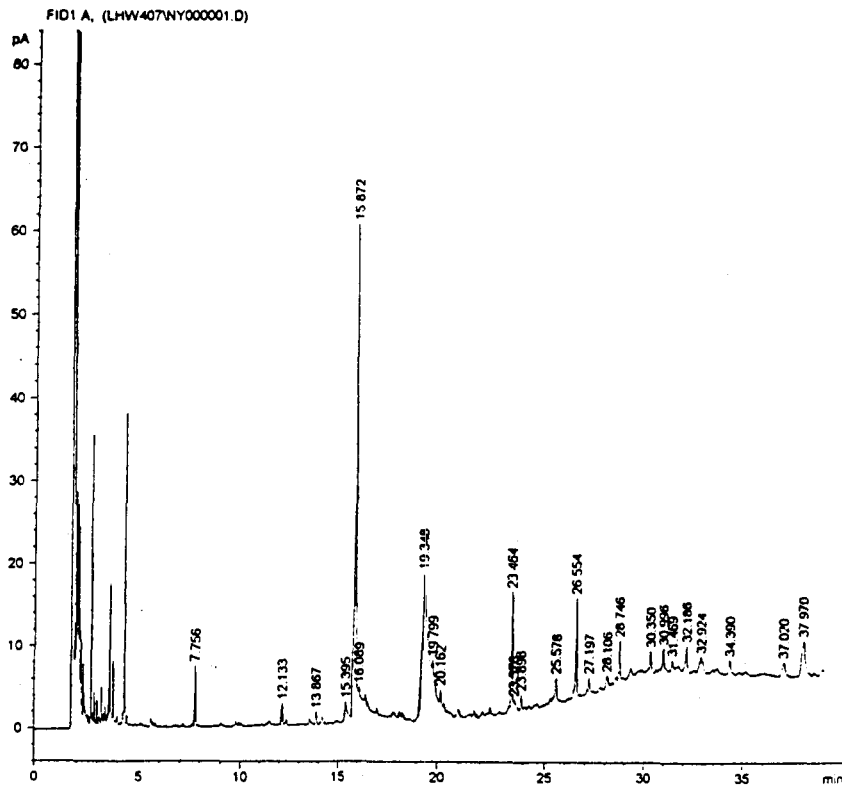


图 1 正己烷粗提液的气相色谱分析图谱

Fig. 1 Gas chromatography of 12-hexane-extracts of *Helicoverpa armigera* female abdomen scales

2.3 正己烷粗提液的薄层层析分离

正己烷粗提液在 GF₂₅₄ 硅胶板上展层后,在距溶剂前缘 2cm 处有一条荧光带,对荧光带及各展层区段的生测结果(表 2)表明,在 $R_f=0.97$ 和 $R_f=0.73$ 的两个展层区段内,螟黄赤眼蜂的滞留搜索情况,处理区与对照区之间差异均极显著($P < 0.01$);在 $R_f=0.83$ 的展层区段内,处理区与对照区的搜索

蜂数分别为 8.63 和 6.00,差异显著($P < 0.05$);而在荧光带区段($R_f=0.91$)的搜索蜂数与对照区无显著差异($P > 0.05$)。此结果提示,引诱活性物质的不同组分经硅胶板层析分离后可能分布在不同的展层区域,且活性物质无紫外吸收和荧光。

2.4 正己烷粗提液的柱层析分离

正己烷粗提液经过柱层析分离后,对分段收集

表 1 纸层析不同展层区段所含的提取物对蛭黄赤眼蜂滞留及搜索的影响

Table 1 Impacts of extractants in different zones by paper chromatography on behaviors of *Trichogramma chilonis*

展层距离 Different zones	处理区搜索蜂数 No. of <i>T. chilonis</i> in treated area	对照区搜索蜂数 No. of <i>T. chilonis</i> in non-treated area	T-检验 T-test
12~10cm	8.50±1.38	3.17±1.94	**
10cm~8cm	8.75±1.71	6.00±1.83	
8~6cm	6.00±0.82	5.75±0.50	
6~4cm	6.25±1.26	5.00±0.82	
4~2cm	5.75±2.06	5.25±1.26	
2~0cm	6.00±1.41	6.25±2.22	

表 2 GF₂₅₄硅胶板不同展层区段所含的提取物对蛭黄赤眼蜂滞留及搜索的影响

Table 2 Impacts of extracts in different zones by silica gel thin-layer chromatography (GF₂₅₄) on behaviors of *Trichogramma chilonis*

展层距离 Different zones (cm)	处理区搜索蜂数 No. of <i>T. chilonis</i> in treated area	对照区搜索蜂数 No. of <i>T. chilonis</i> in non-treated area	T-检验 T-test
15~16 (R _f =0.97)	9.75±2.29	5.75±3.11	**
14~15 (R _f =0.91)	7.44±2.50	7.06±2.24	
12.5~14 (R _f =0.83)	8.63±3.79	6.00±1.86	*
11~12.5 (R _f =0.73)	8.88±3.05	5.63±1.89	*

的洗脱液进行了生物活性测定,结果如表 3 所示,135~137ml 收集段洗脱液的引诱活性与对照区相比差异极显著(P<0.01);138~140ml 收集段洗脱液与对照区相比差异显著(P<0.05);而其它收集段洗脱液与对照区之间均无显著差异。这表明有活性的物质集中在 135~140ml 的范围内(表 3)。

表 3 蛭黄赤眼蜂对以提取液柱层析的不同收集区段洗脱液的反应

Table 3 Responses of *T. chilonis* to active eluant collected from different zones by silica gel column chromatography

收集液区段 Different parts (ml)	处理区搜索蜂数 No. of <i>T. chilonis</i> on treated area	对照区搜索蜂数 No. of <i>T. chilonis</i> on non-treated area	T-检验 T-test
131~134	5.88±1.55	5.63±2.50	
135~137	7.75±2.09	4.08±2.58	**
138~140	6.50±2.62	4.38±0.92	*

2.5 活性洗脱液的 GC-MS 分析

正己烷粗提液经柱层析分离并分段收集后,对有引诱生物活性的浓缩液进行 GC-MS 分析,结果显示浓缩液中含多种活性成分,其中以 C₁₈、C₂₃、C₂₄、C₂₅、C₂₆、C₂₇、C₂₈、C₂₉、C₃₀ 等 9 种直链烷烃为主(图 2,表 4),尤以 C₂₃、C₂₅、C₂₇、C₂₈ 含量高(图 3)。

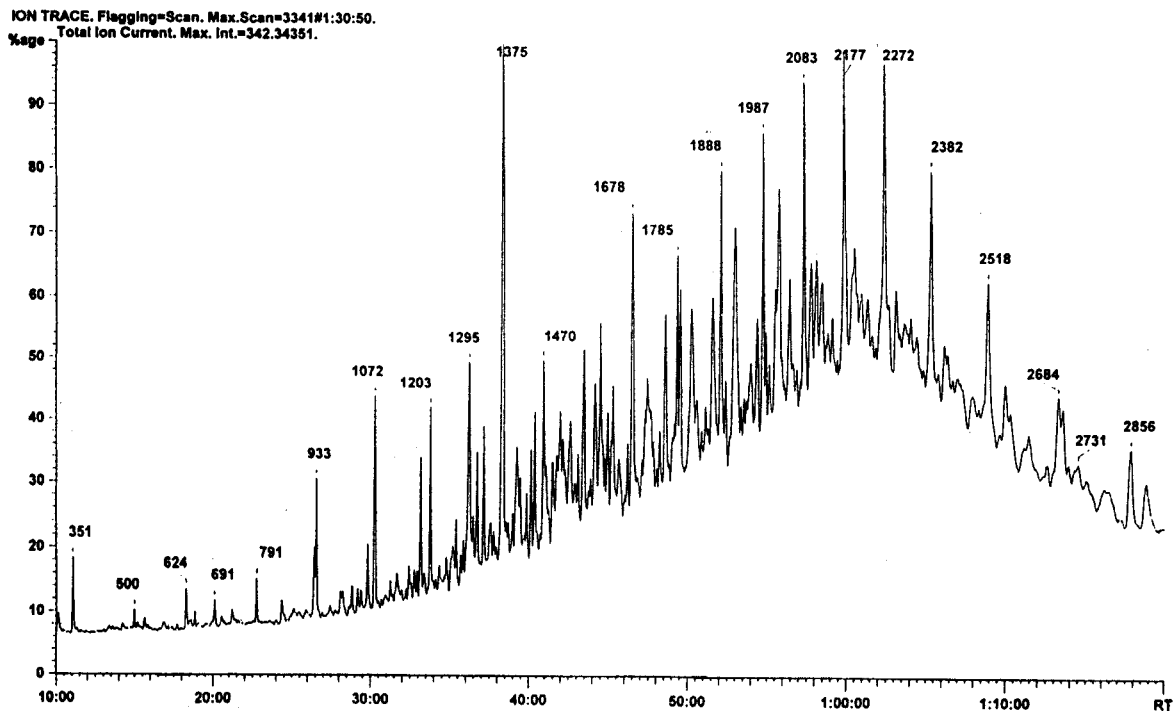


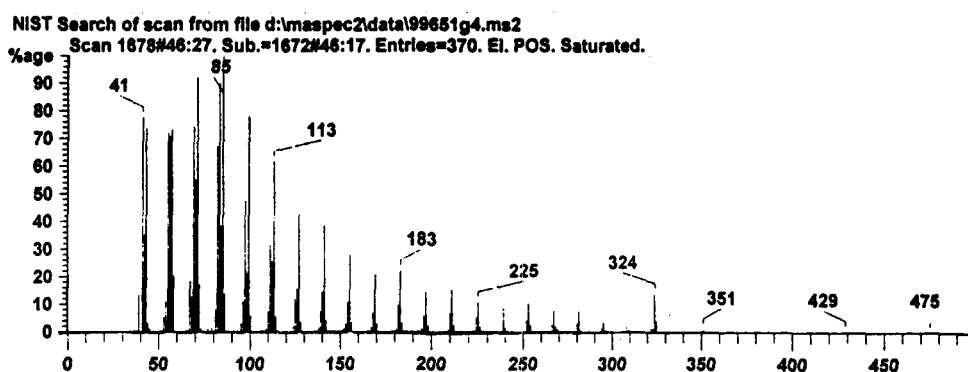
图 2 活性洗脱液的 GC-MS 扫描图谱

Fig. 2 GC-MS of active eluant of *Helicoverpa armigera* female abdomen scales

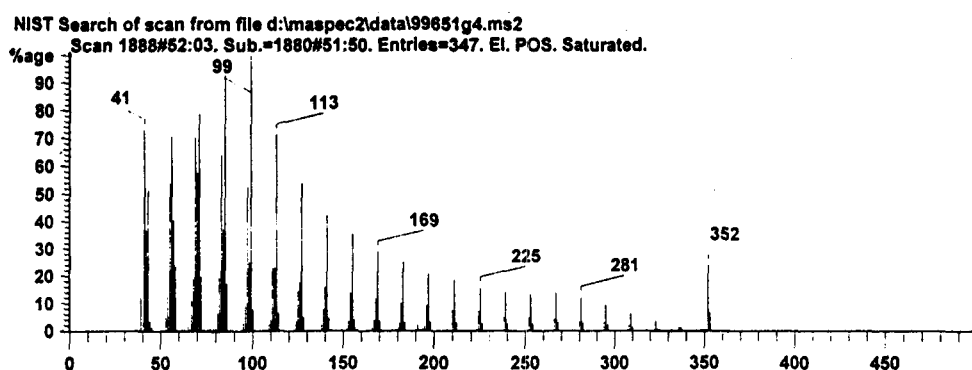
表 4 具引诱活性的柱层析洗脱液中各成分的 MS 分析

Table 4 Component analyses of active eluant

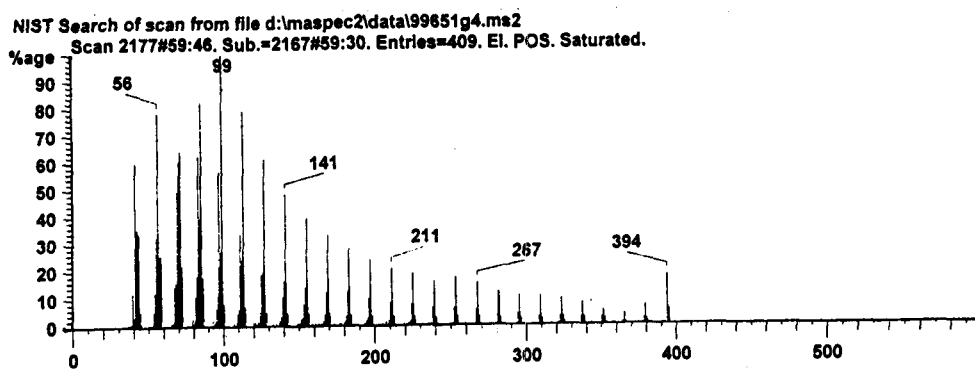
扫描次数 Scan times	质谱特征 Mass-spectrometric characterization										分子量 MW	分子式 Formula	化学名称 Chemical name	
1071	41	57	85	99	113	141	155	183	197	225	254	254	C ₁₈ H ₃₈	Octadecane
1678	41	85	113	183	225	324						324	C ₂₃ H ₄₈	Tricosane
1785	41	85	113	155	183	225	281	295	338			338	C ₂₄ H ₅₀	Tetracosane
1888	41	99	113	169	225	281	352					352	C ₂₅ H ₅₂	Pentacosane
1987	41	85	99	141	183	225	267	309	366			366	C ₂₆ H ₅₄	Hexacosane
2083	41	85	99	141	183	225	281	309	380			380	C ₂₇ H ₅₆	Heptacosane
2177	41	99	141	211	167	394						394	C ₂₈ H ₅₈	Octacosane
2271	41	85	99	141	183	225	281	323	351	408		408	C ₂₉ H ₆₀	Nonacosane
2382	41	85	99	141	183	225	267	309	351	422		422	C ₃₀ H ₆₂	Triacosane
2518	41	71	99	141	183	253	281	309	365	394	346	436	C ₃₁ H ₆₄	Hentriacontane



(1) 二十三碳烷 Tricosane



(2) 二十五碳烷 Pentacosane



(3) 二十八碳烷 Octacosane

图 3 二十三碳烷、二十五碳烷和二十八碳烷的 MS 图谱

Fig. 3 MS spectrum of Tricosane, Pentacosane and Octacosane

2.6 引诱活性物质对赤眼蜂在人工卵卡上寄生率的影响

用含有引诱活性物质的棉铃虫雌蛾腹部鳞片提取液处理人工卵卡后,能够明显地提高松毛虫赤眼蜂和螟黄赤眼蜂在人工卵卡上的寄生率,螟黄赤眼蜂在处理组卵卡上的寄生率比对照组提高 14.3%,松毛虫赤眼蜂在处理组卵卡上的寄生率比对照组提高 18.0%,此结果证明棉铃虫雌蛾腹部鳞片的提取液中的确含有可引诱赤眼蜂产卵的刺激物(表 5)。

表 5 棉铃虫雌蛾腹部鳞片的提取液对人工卵卡寄生率的影响
Table 5 Impacts of extracts of female abdomen scales on parasitism of *Trichogramma* spp.

蜂种 Species	处理组寄生率 Treatment (%)	对照寄生率 Check (%)	T-检验 T-test
螟黄赤眼蜂 <i>T. chilonis</i>	40.7±6.97	26.4±5.26	*
松毛虫赤眼蜂 <i>T. dendrolimi</i>	53.2±7.05	35.2±6.25	*

3 讨论

目前国内外对他感化合物的研究多处在查明处在部位,探索提取、分离纯化方法以及活性成分的鉴定阶段。但迄今为止,有关鉴定出他感化合物化学结构的报道不多,且多属于幼虫和蛹寄生蜂,在卵寄生蜂方面研究的较少。有研究表明刺激广赤眼蜂产卵的活性物质为 22~25 碳直链烷烃,存在于美洲棉铃虫的鳞片^[2],三化螟卵毛中的甘氨酸和丝氨酸是刺激螟卵啮小蜂产卵管插入和触角敲打的利他素^[3]。有报道指出用 7% 的聚乙烯醇水溶胶加二十三碳烷可作赤眼蜂产卵的引诱剂^[4],在人工寄主卵卵表喷涂 0.6% 的二十三碳烷或 7% 的碳酸钠水溶液,试图刺激松毛虫赤眼蜂产卵,亦能够在一定程度上提高寄生率^[5]。本研究从具有产卵引诱和刺激活性的棉铃虫雌蛾腹部鳞片正己烷提取液中纯化了活性成分并鉴定出其主要为 C₁₈~C₃₀ 的 9 种直链烷烃,以 C₂₃、C₂₅、C₂₇、C₂₈ 含量较高,此结果与张良武、张其秀等人的实验也有一致性。因而可以推测,二十三碳烷、二十五碳烷、二十八碳烷的直链烷烃很可能是棉

铃虫雌蛾腹部鳞片中引诱并刺激螟黄赤眼蜂和松毛虫赤眼蜂产卵的利他素。这一推测,可以在进一步研究中予以确认。

本研究亦对棉铃虫雌蛾腹部鳞片上引诱活性物质的不同提取溶剂系统进行过比较,生测结果表明,正己烷作提取溶剂,提取液引诱活性最好,三氯甲烷次之,丙酮、甲醇、水等提取液均无引诱活性,证明正己烷是最佳提取溶剂。继而对用正己烷提取的不同提取方式进行了比较,证明冷抽提(4℃ 搅拌 24h)与热抽提(70℃ 回流 10h)之间,在抽提液的引诱活性上无显著差异,两种方法均适宜。

本研究只比较了棉铃虫雌蛾腹部鳞片正己烷提取液对寄生率的影响,以 C₂₃、C₂₅、C₂₈ 等饱和烷烃为主的纯化物对赤眼蜂寄生率的影响将在进一步研究中确认。

References:

- [1] Tao S X, Wan F H, Tong Z H, et al. Allelochemicals for egg parasitoids, *Trichogramma chilonis* and *T. dendrolimi*; resources and activity bioassay[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2000, 33(6):59-66. (in Chinese)
陶淑霞, 万方浩, 全赞华, 等. 引诱赤眼蜂产卵的他感化合物研究: I. 物质源及生物活性测定[J]. 中国农业科学, 2000, 33(6): 59-66.
- [2] Lewis W J, Jones R L, Gross Jr H R, et al. The roles of kairomones and other behavioral chemicals in host finding by parasitic insects[J]. Behavior Biology, 1976, 26:267-289.
- [3] Du J W, Fu W J, Ding D C, et al. Isolation chemical structure identification of oviposition kairomone for *Tetrastichus schoenobii* [J]. Chinese Science Bulletin, 1981, 18:1132-1134. (in Chinese)
杜家伟, 符文俊, 丁德诚, 等. 螟卵啮小蜂产卵行为利它素的分离和化学结构鉴定[J]. 科学通报, 1981, 18:1132-1134.
- [4] Zhang L W. Attractive material for the oviposition of *Trichogramma dendrolimi* on artificial "eggs"[J]. Natural Enemies of Insects, 1993, 15(3): 101-105. (in Chinese)
张良武. 在人工寄主卵上引诱赤眼蜂产卵物质的研究[J]. 昆虫天敌, 1993, 15(3):101-105.
- [5] Zhang Q X, Li Q. Effects of different stimulants sprayed on artificial egg-card surface for oviposition of *Trichogramma dendrolimi* [A]. Researches on *Trichogramma* Artificial Eggs [M]. Wuchang: Wuhan University Press, 1989, 182-185. (in Chinese)
张其秀, 李 群. 人工寄主卵卵表喷涂不同的物质对诱集松毛虫赤眼蜂在其上产卵效应的比较[A]. 赤眼蜂人工寄主卵研究[M]. 湖北省赤眼蜂人工寄主卵研究协作组编, 武昌: 武汉大学出版社, 1989, 182-185.