

一种昆虫源提取物的生物活性测定

崔顺艳¹,李丹¹,刘玉升²,王洪庆¹,盛志¹,李旭¹,李秀颖¹,陈凯^{1*}

1. 沈阳化工研究院有限公司生物技术研究室, 辽宁 沈阳 110021

2. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018

摘要: 以微波干燥的黄粉虫为原料, 采用索氏抽提法和柱层析法对黄粉虫粉末提取, 并测定了提取物对小麦白粉病和玉米锈病的防治效果。利用红外法初步鉴定了提取物中抗菌物质的有效成分。实验结果表明, 黄粉虫的甲醇提取物对小麦白粉病和玉米锈病的防治效果分别为 60% 和 65%。

关键词: 生物农药; 昆虫源提取物; 黄粉虫; 小麦白粉病; 玉米锈病

中图分类号: S4

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2015)03-0357-03

Bioassay on Biological Activity of the Extract from *Tenebrio molitor* Linnaeus

CUI Shun-yan¹, LI Dan¹, LIU Yu-Sheng², WANG Hong-qing¹, SHENG Zhi¹, LI Xu¹, LI Xiu-ying¹, CHEN Kai^{1*}

1. Biotechnology Laboratory/Shenyang Research Institute of Chemical Industry, Shenyang 110021, China

2. College of Plant Protection/Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

Abstract: This paper extracted from the dry larva of yellow mealworm dried to a powder by microwave with soxhlet extraction and column chromatography and the extract had been used to determine on wheat powdery mildew and corn rust, and preliminarily identified the antibacterial components from the exact with the infrared method. The results showed that the control effects were 60% and 65%, respectively against wheat powdery mildew and corn rust.

Keywords: Bio-pesticide; insect extracts; yellow mealworm; wheat powdery mildew; corn rust

传统高毒、高残留、环境危害大的农药已经越来越不适用于农业生态文明建设和农业可持续发展的需要, 生物农药相对于化学农药来说一般具有绿色环境友好、低残留和不易产生抗药性等特性, 因此近年来一直是国际国内的研究热点^[1,2,3]。生物农药主要来源包括从植物中的提取物、微生物活体和微生物代谢产物、动物中提取的毒素和昆虫的信息素农药(即性信息素和激素)^[4]。昆虫是地球上数量最多的动物群体, 已发现超过 100 万种, 其中单鞘翅目中所含的总数就比其它所有动物界中的总数还多。如此数量巨大的昆虫, 蕴藏着巨大的资源有待于开发利用。昆虫可以生存在异常恶劣环境条件中的原因是, 其体内具有一定量的抗菌物质, 可以高效地杀死或抑制病原微生物^[5,6]。在医药领域昆虫源抗菌物质具有一定研究, 但是由于其来源有限并且提纯过程较为复杂昂贵, 目前在农药领域的应用研究极少。

近年来一些昆虫如黄粉虫被应用于处理规模化养殖带来的禽畜粪便以及餐厨尾菜所带来的环境污染问题, 并且取得了很好的处理效果^[6,7]。黄粉虫因其养殖投资少、技术简单易学等特点, 已经被广泛工厂化养殖, 被昆虫专家称为是继家蚕和蜜蜂之后的第三大昆虫产业。黄粉虫又叫面包虫, 在昆虫分类学上隶属于鞘翅目, 拟步行虫科, 粉甲虫属(拟步行虫属)。原产于北美洲, 50 年代从苏联引进我国饲养, 黄粉虫干品含脂肪 30%, 含蛋白质高达 50% 以上, 并含有多种常规和微量元素^[8-10]。本文探讨了不同方式提取的黄粉虫提取物对小麦白粉病和玉米锈病的防治效果, 为这 2 种病害的防治提供了一些数据参考。

1 材料与方

1.1 供试黄粉虫

黄粉虫由山东农业大学提供。在冻干机(型号)冻干以后于 4 °C 冰箱保存备用。

收稿日期: 2014-04-01

修回日期: 2014-04-25

作者简介: 崔顺艳(1984-), 女, 辽宁抚顺人, 助理工程师。研究方向: 生物农药。E-mail: cuishunyan@sinochem.com

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail: chen kai05@sinochem.com

1.2 供试菌株

小麦白粉病原菌和玉米锈病病原菌由沈阳化工研究院有限公司生测室提供。

1.3 供试仪器

红外光谱仪:布鲁克 ALPHA;索氏提取器;柱层析硅胶 100~140 目,产自青岛海洋化工厂分厂,其余所有化学试剂均为市售分析纯试剂。

1.4 黄粉虫的提取和分离

1.4.1 黄粉虫的粉碎 取经过干燥后黄粉虫幼虫于研钵中,加入适量液氮对其进行急速冷却,然后将黄粉虫幼虫干研碎。

1.4.2 乙醇索氏提取黄粉虫 称取 60.0 g 黄粉虫粉末,加入 300 mL 乙醇使用索氏提取器回流提取 5 h,将上述溶液进行减压蒸馏浓缩,浓缩至溶液呈粘稠状棕褐色液体,经过常温挥发得到 19.79 g 提取物。

1.4.3 柱层析 称取 5.0 g 步骤 1.4.2 中的提取物加入约 20 mL 甲醇进行溶解后拌入适量硅胶,常温挥发后装柱。依次分别使用 200 mL 石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇和水进行洗脱分离,收集得到分段分离物。其中石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和丙酮馏分中分离出物质量极少,不足以进行杀菌活性后续试验。

1.5 活体试验方法

1.5.1 对小麦白粉病的活性测定 准备一定浓度的黄粉虫提取物母液,按一定比例稀释,稀释液备用。选择生长整齐一致的盆栽小麦幼苗(1叶1心期),按试验设计浓度进行喷雾处理,另喷施清水作对照,盆栽幼苗经药剂处理后自然晾干。24 h 后接种小麦白粉病菌孢子,移至温室中正常管理(温室条件:温度 22~30 °C,湿度 40~60%),7 d 后调查防效。

1.5.2 对玉米锈病的活性测定 准备一定浓度的黄粉虫提取物母液,按一定比例稀释,稀释液备用。选择生长整齐一致的盆栽三叶期玉米幼苗,按照试验设计浓度进行喷雾处理,另喷施清水作对照,盆栽幼苗经药剂处理后自然晾干。24 h 后接种玉米锈病菌孢子悬浮液,置于人工气候室保湿处理 8 h,移至温室中正常管理(温室条件:温度 22~30 °C,湿度 40~60%),7 d 后调查防效。

2 试验结果

2.1 红外试验结果

对 1.4.3 各柱层析分离物,进行红外吸收光谱测试,IR 结果如下:

1) 二氯甲烷洗脱份 IR 数据: 2920 cm^{-1} 、2850 cm^{-1} 、1462 cm^{-1} 、1376 cm^{-1} 、719 cm^{-1} , 结构鉴定为蜡质油;

2) 乙酸乙酯、丙酮、乙醇洗脱份 IR 数据基本相同: 3007 cm^{-1} 、2925 cm^{-1} 、2854 cm^{-1} 、1746 cm^{-1} 、1656 cm^{-1} 、1238 cm^{-1} 、1163 cm^{-1} 、1099 cm^{-1} 、722 cm^{-1} , 结构鉴定为饱和脂肪(三脂肪酸甘油酯);

3) 甲醇洗脱份(软蜡状半固体) IR: 3356 cm^{-1} 、2923 cm^{-1} 、2853 cm^{-1} 、1645 cm^{-1} 、1516 cm^{-1} 、1464 cm^{-1} 、1376 cm^{-1} 、1231 cm^{-1} 、1102 cm^{-1} 、1074 cm^{-1} 、1031 cm^{-1} 、993 cm^{-1} 、720 cm^{-1} , 主要显示为多糖及蛋白质谱带的特征吸收峰。

2.2 活体试验结果

2.2.1 黄粉虫提取物对小麦白粉病的防治效果 不同方法提取的黄粉虫提取物对小麦白粉病的防治效果见表 1。

表 1 黄粉虫提取物对小麦白粉病的防治效果

提取溶剂	稀释倍数	防治效果 (%)	提取溶剂	稀释倍数	防治效果 (%)
Extraction solvent	Dilution times	Control effect	Extraction solvent	Dilution times	Control effect
黄乙—甲醇	15	60	黄乙—乙醇	15	35
	30	55		30	30
	60	50		60	10
	90	30		90	0
	270	0		270	0

试验结果表明:研磨后的黄粉虫用乙醇使用索氏提取器回流提取后,分别利用甲醇(黄乙-甲醇)、乙醇(黄乙-乙醇)分离的提取物在15倍、30倍、60倍、90倍、270倍稀释的条件下,对小麦白粉病的防治效果存在差异较大。其中利用甲醇分离的提取物对小麦白粉病有较好的防治效果。在15倍稀释的条件下,防治效果可高达60%,且在60倍稀释的情况下防治效果也可达到50%。利用乙醇分离的提取物在15倍稀释的情况下对小麦白粉病仅有35%左右的防治效果,当稀释到90倍时,几乎没有防治效果。当稀释到270倍时,两种提取方式都没有防治效果。

2.2.2 黄粉虫提取物对玉米锈病的防治效果 不同方法提取的提取物对玉米锈病的防治效果见表2。

表2 黄粉虫提取物对玉米锈病的防效效果

提取溶剂	稀释倍数	防治效果 (%)	提取方式	稀释倍数	防治效果 (%)
Extraction solvent	Dilution times	Control effect	Extraction solvent	Dilution times	Control effect
黄乙—甲醇	15	65	黄乙—乙醇	15	50
	30	55		30	40
	60	50		60	20
	90	30		90	10
	270	0		270	0

试验结果表明:研磨后的黄粉虫用乙醇使用索氏提取器回流提取后,分别利用甲醇、乙醇分离的提取物在15倍、30倍、60倍、90倍、270倍稀释的条件下,对玉米锈病的防治效果存在些差异。其中利用甲醇分离的提取物对玉米锈病有较好的防治效果。甲醇分离的提取物在15倍稀释的条件下,防治效果可达到65%。在90倍稀释的情况下防治效果在30%左右。利用乙醇分离的提取物在15倍、30倍稀释的情况下对玉米锈病的防治效果分别为50%和40%。在90倍稀释的情况下为10%左右。当稀释到270倍时,两种提取方式都没有防治效果。

3 讨论

本文选用了世界性的病害,小麦白粉病和玉米锈病(此两种病害在各主要产小麦和玉米国均有分布)来测定黄粉虫的提取物对这两种常见病原菌的抑制效果。结果表明:黄粉虫经乙醇索氏提取后,再用柱层析分离,其中甲醇提取物对小麦白粉病和玉米锈病均有较好的防治效果。在15倍稀释的条件下,小麦白粉病和玉米锈病的防治效果可达到60%和65%。

目前,化学杀菌剂通常被认为是最便宜且能有效控制小麦白粉病和玉米锈病的主要手段。但化学杀菌剂长期和大量使用,存在有损人类健康和环境污染等方面的问题,因此寻找一种安全有效、无公害的生物性杀菌剂是生产绿色食品和控制环境污染的需要。研究结果显示黄粉虫脂类抗菌物质对小麦白粉病和玉米锈病有较好的防治效果,可考虑将其替代化学杀菌剂用于小麦白粉病和玉米锈病病害的生物防治。

本研究仅观察了黄粉虫体内提取的抗菌物质对小麦白粉病和玉米锈病的防治效果,对其它病害是否存在防治效果,以及其抑菌机理尚待进一步的实验研究。

参考文献

- [1] 招衡,张翼翮.生物农药及其未来研究和应用[J].世界农药,2010,32(2):16-24
- [2] 战兴花.关于我国生物农药应用问题探讨[J].中国新技术产品,2011(10):238
- [3] 邱德文.生物农药研究进展与未来展望[J].植物保护,2013,39(5):81-89
- [4] 潘有祥.动物源农药及其仿生生物农药研究进展[J].现代农业科技,2006,23:65-67
- [5] 万方浩,王韧,叶正楚.我国天敌昆虫产品产业化的前景分析[J].中国生物防治,1999,15(3):135-138
- [6] 耿俊丽.黄粉虫体内脂类抗菌活性物质级凝集素的研究[D].福州:福州师范大学,2009
- [7] 刘玉升.黄粉虫[M].北京:中国农业出版社,2002:12
- [8] 刘玉升,王付彬,崔俊霞,等.黄粉虫资源研究利用现状与进展[J].环境昆虫学,2010,32(1):106-114
- [9] 邱德文,杨秀芬.蛋白质农药研究与产业化进展[J].中国农业科技导报,2006,8(6):1-4
- [10] HULTMARK D, ENGSTROM A, BOMAN HG, *et al.* Insect immunity: isolation and structure of *Cercopla* pupae[J]. *Eur J Biochem*, 1982,127:207-217