

华北大黑鳃金龟性信息素组分的分离与鉴定*

王 惠, 张 兴, 米宏彬

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 对华北大黑鳃金龟性信息素活性腺体和非活性腺体的甲醇提取液分别进行了 GC 分析, 筛选出与活性有关的组分 A。经 GC-MS 分析数据库检索鉴定 A 为 1 个环状二肽。人工合成这种环状二肽及与其有关的甘氨酸甲酯等 4 种氨基酸酯, 作为华北大黑鳃金龟性信息素的候选化合物。将候选化合物纯化后进行室内活性测定, 结果表明, 甘氨酸甲酯可激活华北大黑鳃金龟雄虫的性行为, 是华北大黑鳃金龟性信息素的组分。

[关键词] 华北大黑鳃金龟; 性信息素; 分离; 鉴定

[中图分类号] S433.5; S763.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)02-0091-05

华北大黑鳃金龟(*H. olotrichia oblite* Fald.) 属鞘翅目金龟甲总科昆虫, 主要危害草坪、林木幼苗及花生、马铃薯等农作物。成虫和幼虫均能造成危害, 使草坪、农田缺苗断垄甚至毁种绝收。对金龟甲的防治目前仍以化学防治为主, 但效果不佳。随着人们保护环境意识的增强, 在追求高效防治途径的同时, 把农药的环境效应也列为必须考虑的因素。因此, 对昆虫性引诱剂这种高效且无污染的生物农药的需求愈来愈强烈, 与之相应的研究工作也日益受到重视。国外自 90 年代以来, 在金龟甲性信息素的研究方面有很大进展^[1], 我国对金龟甲性信息素的研究报道极少^[2]。本研究仅对华北大黑鳃金龟性信息素的分离及鉴定结果进行报道。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

甲醇、乙醇、磷酸和硫酸铜均为分析纯, 使用前进行纯化处理^[3]; 气相色谱仪: GC-9AM 型(日本岛津), 30 m HP-5 弹性石英毛细柱; 气相色谱-质谱联用仪: HP-5890A (GC), 5989B (MSD), 50 m HP-5 弹性石英毛细柱; 性信息素候选物: 甘氨酸甲酯、甘氨酸乙酯、L-脯氨酸甲酯、L-脯氨酸乙酯、吡咯并[1, 2-]呋嗪-3, 6-二酮(简称环状二肽)均为实验室合成^[4-5], 提纯后, 经薄层色谱检验为单一组分。

1.2 虫 源

4 月中下旬傍晚在校园采集华北大黑鳃金龟成虫, 雌雄分开, 在 22~ 28 ℃ 玻璃温室和自然光照条

件下饲养。饲养容器为直径 30 cm、高 30 cm 的玻璃缸, 底部装有 10 cm 厚的过筛腐殖质土(其水分质量分数为 12%~ 16%)供昆虫栖息。缸上罩以尼龙纱网以保证空气流畅。

1.3 试验方法

1.3.1 性信息素提取液的制备 在华北大黑鳃金龟求偶高峰期^[6], 分别于 8:00 和 20:00 摘取雌性信息素腺体各 70 个, 用甲醇在 4 ℃ 下浸提 20 h, 然后在 5 000 r/min 离心机上离心, 上清液用氮气吹蒸浓缩至浓度 $c = 100$ 雌虫当量($\mu\text{g/mL}$), 再离心, 上清液于 4 ℃ 下封口保存。

1.3.2 室内活性试验 将不同时间摘取的雌虫腺体及其提取液分别作为试样, 以性成熟的雄虫为试虫分别进行活性测定^[7], 测定装置见图 1, 各支路分别装有试样管 1 个(作为对照)。通入净化空气后, 观察试虫的反应行为。以雄虫向气源聚集并在 10 m 内表现振翅为正反应, 以雄虫反应率衡量活性。

反应率/% = [(样品反应虫数 - 对照反应虫数) / (供试虫数 - 对照反应虫数)] × 100

1.3.3 活性组分的分离及鉴定 将提取液用气相色谱仪进行分离, 确定不同提取液的组分差异, 选择最佳分离条件使提取液中有差异的各组分得到很好分离。然后将提取物进行 GC-MS 分析, 利用计算机检索系统定性, 作为性信息素的候选化合物。

1.3.4 确证试验 利用化学合成方法制备候选化合物, 利用生物测定方法进一步确定候选化合物活性。

* [收稿日期] 2001-03-29

[作者简介] 王 惠(1959-), 女, 陕西临潼人, 副教授, 在读博士, 主要从事植物化学保护研究。

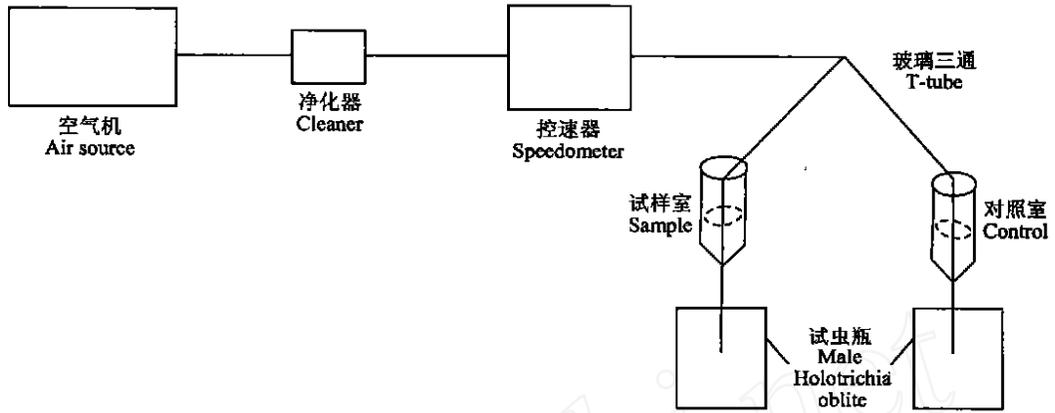


图 1 活性测定装置

Fig 1 Device of bioassay

2 结果与分析

2.1 提取液的活性

活性试验发现,晚上 20:00 摘取的性信息素腺体及提取液均有活性,早上 8:00 摘取的均无活性。

这与华北大黑鳃金龟夜间求偶交配的生活习性一致,表明晚上制备的提取液中含有活性组分,早上制备的提取液中没有活性组分。

2.2 GC 分离结果

对提取液分别进行 GC 分离,色谱见图 2。

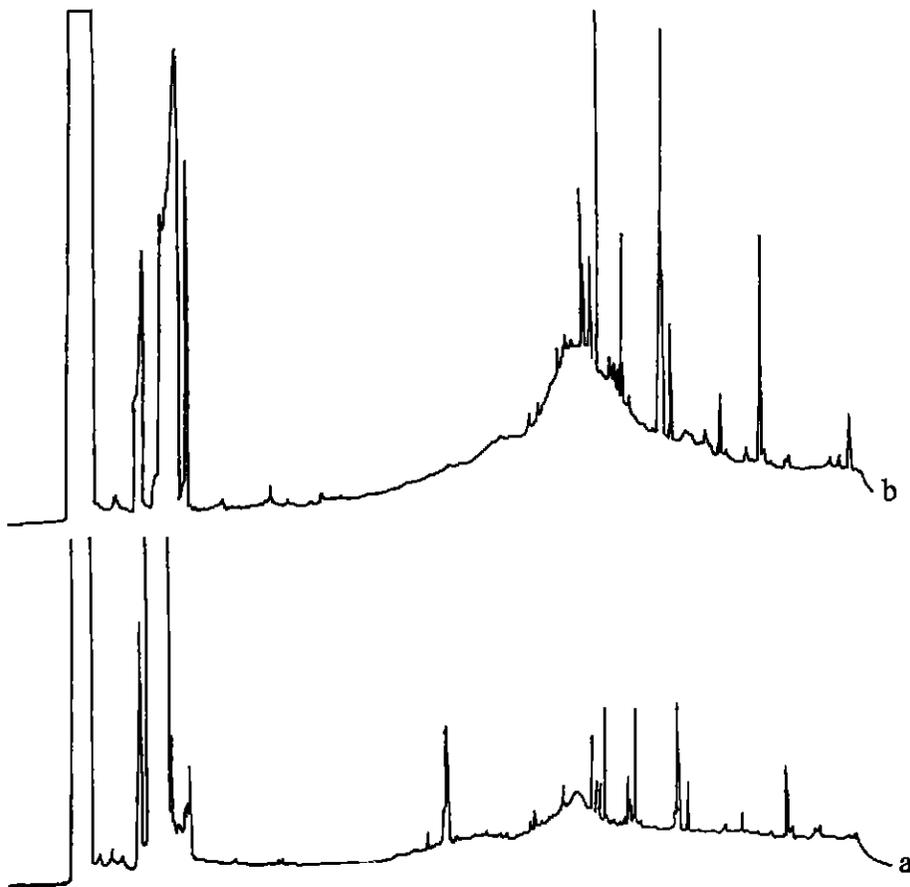


图 2 甲醇提取液的 GC 图

a 活性腺体提取液; b 非活性腺体提取液; 柱温: 60(1 min)~ 200 (20 min), 5 /min; 200~ 260 , 10 /min

Fig 2 Gas chromatogram of extracts of active gland and inactive gland

a active gland; b inactive gland; Column Temperature: 60(1 min)- 200 (20 min), 5 /min; 200- 260 , 10 /min

由图 2 可以看出, 在同样的色谱条件下, 活性提取液在 27.0 min 处出现 1 个峰(A), 而非活性提取液在 27.0 min 处几乎看不到峰, 两色谱图的其他部分未见明显差异。因此可以初步认为, A 组分可能是活性组分或者与活性组分有关。

2.3 GC-MS 分析结果

对活性腺体提取液进行 GC-MS 分析, 其总离

子流图见图 3。对图 3 中各组分进行计算机检索的结果表明, A 组分是一个由甘氨酸和脯氨酸脱去 2 分子水形成的环状二肽(其结构式见图 3)。此外还检出乙醇、甲醇、脯氨酸、脯氨酸乙酯的两分子自缩合产物。

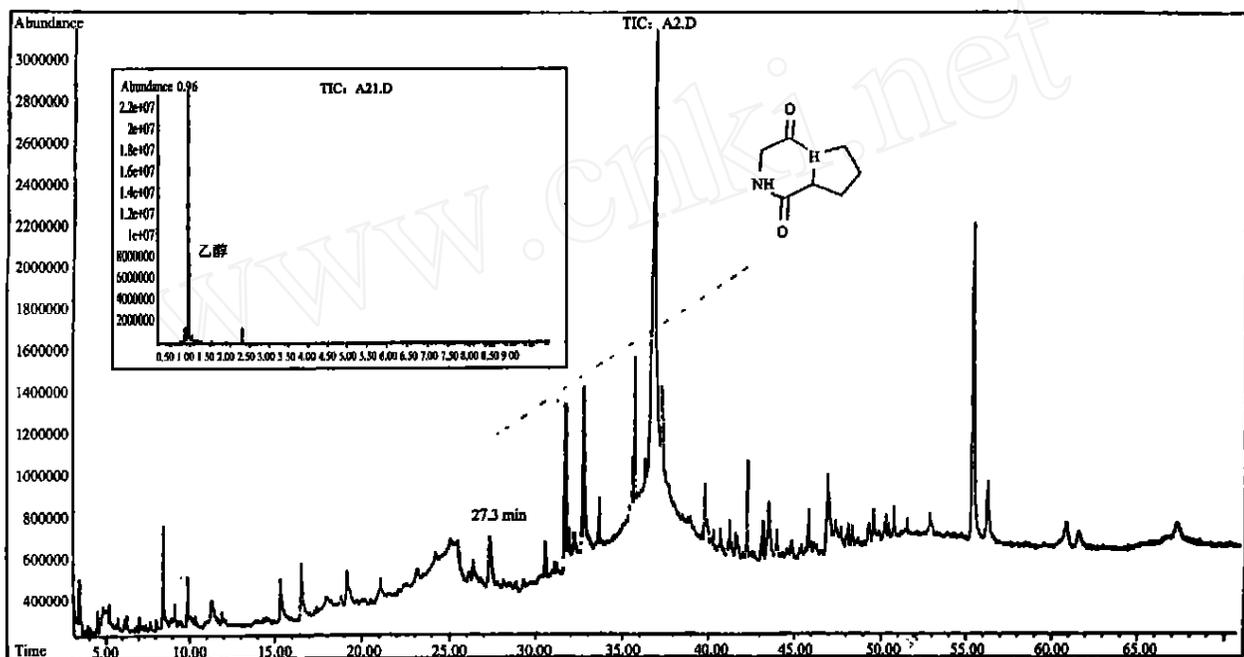


图 3 活性腺体提取液的 TIC 图

柱温: 60 (1 min)~ 260 (20 min), 4 /min

Fig. 3 TIC of active gland extract

Col Temp.: 60 (1 min) - 260 (20 min), 4 /min

2.4 候选化合物的室内活性测定结果

室内活性试验发现, 4 种氨基酸酯都有一定活性, 均可刺激试虫向诱源聚集, 并表现振翅趋向。尤

其甘氨酸甲酯可使 60% 以上华北大黑鳃金龟雄虫产生振翅行为, 但环状二肽却未表现出活性。表 1 是 4 种氨基酸酯的活性测定结果。

表 1 4 种氨基酸酯的室内活性试验结果

Table 1 Bioassay results of 4 amino acids

试样 Sample	用量/ μg Amount	反应率/% Responsible rate	平均/% Average	试样 Sample	用量/ μg Amount	反应率/% Responsible rate	平均/% Average
活性腺体 Active gland	2*	90	90	L-脯氨酸甲酯 Methyl L-prolinate	200	20	
甘氨酸甲酯 Methyl glycinate	0.02	70			0.02	15	
	2	75	65		2	25	20
	200	50		L-脯氨酸乙酯 Ethyl L-prolinate	0.02	15	
甘氨酸乙酯 Ethyl glycinate	0.02	10			2	10	15
	2	15	15		200	20	
	200	20					

注: 活性腺体用量为 2 个腺体, 每次供试雄虫数为 20 头, 表中数据为 5 次平均值。

Note: The amount of active gland is 2 glands. The male beetle number for test each time is 20. The data in the table is the average of 5

表 1 表明,对甘氨酸甲酯表现出性行为反应的华北大黑鳃金龟雄虫数目超过了供试雄虫的 50%。可以认为,甘氨酸甲酯是华北大黑鳃金龟的性信息素组分。但甘氨酸甲酯的活性远低于雌虫性信息素腺体的活性,表明甘氨酸甲酯不是该虫性信息素的惟一组分。

3 讨 论

3.1 甘氨酸甲酯是华北大黑鳃金龟性信息素组分

甘氨酸甲酯在本试验的生物测定中表现出明显活性,表明甘氨酸甲酯是华北大黑鳃金龟性信息素的组分。理论上甘氨酸甲酯具有较大的挥发性,也符合昆虫信息素的一般特性。本试验在 GC-MS 中没有直接鉴定出甘氨酸甲酯,却检出了吡咯并[1,2-]哌嗪-3,6-二酮(简称环状二肽),该化合物又未表现出生物活性。分析认为,本试验在 GC-MS 中没有直接鉴定出甘氨酸甲酯有两种可能,一是提取液中的甘氨酸甲酯发生部分水解,形成了环状二肽,未水解部分因量太低无法检出;二是甘氨酸甲酯挥发性太大,在分流进样中随载气从分流口完全流出,未能进入色谱柱。为了证明这两点,将合成的甘氨酸甲酯和脯氨酸乙酯混合溶解于含水甲醇中,在同样条件下进行分析,也未检出甘氨酸甲酯,而且同时检出了环状二肽。而将此溶液进行薄层层析时,发现板上有甘氨酸斑点。这些试验表明,华北大黑鳃金龟性信息素的提取液中含有甘氨酸甲酯,只是由于以上原因在本试验 GC-MS 条件下未能检出而已。

3.2 二肽来源

本试验中环状二肽未表现活性,表明其不是华北大黑鳃金龟的性信息素。在纯的甘氨酸甲酯和脯氨酸乙酯的含水甲醇溶液中检出这种二肽,表明这种二肽是在色谱分离条件下形成的新物质。GC-MS 进样口(温度 260℃,柱前压 68.8 kPa)完全符合氨

基酸发生脱水缩合反应的条件。因此认为,图 3 中鉴定出的二肽并不是提取液中的固有活性组分,而是由提取液中的活性组分——甘氨酸酯和脯氨酸酯水解产生的甘氨酸和脯氨酸经脱水缩合形成的。

3.3 氨基酸酯的水解反应条件

将实验室制备的甘氨酸甲酯和乙酯与脯氨酸甲酯和乙酯分别制成甲醇溶液,直接等量混合后进气相色谱仪,结果发现在 27 min 无任何组分出现,但向溶液中滴加一滴水,摇匀放置 1 d,取上清液进气相色谱仪,无论是甘氨酸甲酯或乙酯与脯氨酸乙酯的混合物在 27 min 均出现此组分,与提取液中相应的峰型完全一致。同时在 34 min 左右也出现脯氨酸乙酯双分子自缩合产物。这一试验结果进一步证明,图 3 中鉴定的二肽是脯氨酸酯和甘氨酸酯的水解产物——脯氨酸和甘氨酸脱水缩合形成的。本试验在提取液中除检出甲醇和乙醇外,尚未检出其他醇类化合物,表明提取液中存在的酯只可能是甲酯和乙酯。本试验中甲醇是溶剂,图 3 中鉴定的甲醇中是否含有氨基酸甲酯水解出的甲醇无法知道,因此单从 GC-MS 鉴定不能排除甲酯的存在。至于提取液中水的来源,笔者认为是在 GC 进样前,用 N₂ 吹蒸法浓缩时管壁上的冷凝水进入所致。

3.4 鳃金龟甲性信息素主要是氨基酸酯类化合物

目前已鉴定的鳃金龟甲的性信息素多是氨基酸酯类化合物。暗黑鳃金龟的性信息素是 L-异亮氨酸甲酯等; *P. elenans* 和 *P. viciana* 金龟的性信息素是 N-formyl-L-异亮氨酸甲酯、N-乙基-L-异亮氨酸甲酯和 L-异亮氨酸甲酯; *P. anxia* 的性信息素是 L-缬氨酸和 L-异亮氨酸甲酯^[1]。本试验又发现甘氨酸甲酯是华北大黑鳃金龟性信息素的组分,因此进一步说明了鳃金龟甲主要以氨基酸酯类化合物作性信息素。

[参考文献]

- [1] Leal W S. Chemical ecology of phytophagous scarab beetles[J]. *Annu Rev Entomol*, 1998, 43: 39- 61.
- [2] 刘孟英. 昆虫信息素研究及应用的新进展[J]. *昆虫知识*, 1994, 31(1): 56- 59.
- [3] 段长强, 孟庆芳, 张 泰, 等. 试剂手册(第一分册, 通用试剂) [M]. 北京: 化学工业出版社, 1986.
- [4] Myron L B, Byron W T. The kinetics and Oxygen Exchange of the cupric ion-catalysed Hydrolysis of amino Esters[J]. *J Am Chem Soc*, 1957, 79: 1889- 1893.
- [5] Johnstone R A, Povall W, Jeffery T. Methods of peptide sequencing I. conversion of oligopeptides into cyclic dipeptides Gas chromatographic-mass spectrometric study[J]. *J Chem Soc*, 1975, 13: 1297- 1300.
- [6] 王 惠, 胡忠郎, 李科友. 华北大黑鳃金龟雌虫产卵器分泌物的活性研究[J]. *陕西农业科学*, 1994, (3): 19- 20.
- [7] 杜家纬. 昆虫信息素及其应用[M]. 北京: 中国林业出版社, 1986. 43.

Isolation and identification of sex pheromone of *H. olatrichia oblita* Fald

WANG Hui, ZHANG Xing, M I Hong-bin

(College of Plant Protection, Northw estern Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Compared with the extract of inactive glands, a cyclo-dipeptid was identified By GC-MS in extract of active sex-pheromone glands of *H. olatrichia oblita* Fald. However, it is inactive. Then methyl glycinate, ethyl glycinate, methyl-L-prolinate and ethyl-L-prolinate were estimated as the components of the sex pheromone system of *H. oblita*. The activity of the four synthetic compounds was determined by bioassay, the result showed that methyl glycinate activated significantly more male beetle's sex behavior than another compounds even though it was not as effective as the glands. Thus, methyl glycinate has been identified as a component, but not the only one, of sex pheromone system of *H. oblita*.

Key words: *H. oblita* Fald; sex pheromone; isolation; identification

“西藏一江两河农业开发与青藏高原农业发展研究”通过鉴定

受教育部委托, 2002-01-12 西北农林科技大学邀请全国 13 位专家教授组成鉴定委员会, 对西北农林科技大学杨改河教授主持的“西藏一江两河农业开发与青藏高原农业发展研究”项目进行了鉴定。鉴定委员会认为, 该项目在近 10 年的研究中, 做了大量的实地调研分析计算和试验示范工作, 整个研究的 4 个方面涉及了青藏高原的重点地区——西藏一江两河、西藏全部和青藏高原, 对西藏一江两河、整个西藏地区和青藏高原的开发潜力, 人地关系, 农业发展模式, 高寒农业分类, 农业结构调整和农作物、牧草、蔬菜、畜禽良种的引进试验示范, 配合饲料的研制, 高原太阳能发酵工程及应用等方面进行了深入的研究, 对研究这些地区农业的可持续发展道路, 提高生产水平, 具有重要的理论和实践意义。是迄今为止关于西藏和青藏高原农业持续发展的第一个既有理论又有实践的较为深入全面系统的研究成果, 部分研究成果达国际领先水平, 整体研究成果达国际先进水平。具体成果如下:

查清了天然草场的产草量, 预测了天然草场的载畜量和耕地的生产潜力, 认为一江两河种植业有较大潜力可供开发, 天然草场已明显超载, 提出一江两河畜牧业的发展应依靠农区提高单产, 压缩粮食种植面积, 发展人工牧草, 利用作物秸秆, 由天然放牧转入农区舍饲。量化提出一江两河开发重点为种植业, 强化农牧结合, 开发的程度与规模应与市场需要相吻合, 对一江两河开发有重要的参考意义, 且一些结论已被政府采纳。在该研究内容中, 将区域开发潜力、程度、模式和市场需求结合起来, 提出了较为系统的区域开发潜力研究思路, 具有明显的新意。从理论上提出并论证了农业区域开发决策的“三重公理”和“三重决定论”及农业区域开发的“三阶段论”, 并分析了每个阶段所必须的条件、动因和过程, 丰富和发展了农业区域开发的理论。分析了西藏土地资源的能量平衡与物质平衡以及西藏人口历史演变的特征, 对未来人口及消费模式进行了预测, 制订了未来的消费模式, 在此基础上估算了西藏土地资源的人口承载量。得出在西藏人口自然增长率 20%的情况下, 其生产的发展与人口的增长极不相适应, 为保证生态脆弱地区安全及可持续发展, 应及早进行人口控制。这对指导西藏国民经济的发展及制定中长期发展规划, 具有重要参考价值, 理论上具有重要创新。通过实际试验, 得出该区到 2010 年种植业结构分别为 65.5%、19.4%、13.1% (其他占 2%), 配合种植业结构调整共引进试种农作物及饲草品种 330 份, 经 3 年试种筛选出有适用推广价值的油菜、小麦、豌豆、蔬菜和畜禽品种近 30 个。首次成功地将罗曼、海兰、关中黑猪等优良畜禽引进到海拔 4 040 m 的高原, 并有良好的繁殖能力, 为该地区农业技术引入打下了一定的基础。成功地在海拔 4 040 m 的高原建起了世界第一个太阳能酿造厂, 制出了达国家一级标准的酱油, 解决了高原缺氧条件下微生物的繁殖与发酵难题, 填补了空白。这些成果对促进西藏农业的发展已起到了极大的推动作用。系统总结了我国高寒农业的理论与发展道路, 提出了高寒农业的概念模式、基本特征和任务; 将我国高寒农业分为高原亚热带、高原温带、高原亚寒带和高原寒带 4 个气候带和 9 个农业类型区; 提出我国高寒农区的发展前提是维护和建设好高寒生态圈。分析得出我国高寒农区目前农业的主体依然处于传统农业或初级农业阶段, 在由初级向发展阶段过渡中, 除充分发挥内部力量外, 也需积极调动外力的积极性, 共同推动该区发展。这对国家制定高寒农业的发展政策具有重要参考价值。

(温晓平 供稿)