

黑胡椒和花椒中酰胺类物质对四种鳞翅目幼虫的拒食活性*

余明辉^{1**} 杨 景¹ 邢怀森¹ 原国辉¹ 李为争^{1,2***}

(1. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002; 2. 河南省害虫绿色防控国际联合实验室, 河南农业大学, 郑州 450002)

摘 要 【目的】胡椒属植物具有拒绝多食性棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 取食的共性特征。多食性昆虫味觉系统的可塑性比狭食性种类的更强, 本研究以前者为靶标筛选拒食剂, 有望兼治同域并发的其他狭食性害虫种类。【方法】采用生物测定追踪的柱层析分离和气相色谱-质谱联用技术, 鉴定了黑胡椒和花椒活性柱层析馏分中的主要物质, 并测试了来源于黑胡椒和花椒的 2 种酰胺类生物碱对夏玉米上生态位不同的 4 种鳞翅目幼虫 (棉铃虫、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、粘虫 *Mythimna separata* 及二点委夜蛾 *Athetis lepigone*) 的拒食活性。【结果】黑胡椒活性柱层析馏分中的酰胺类生物碱主要是胡椒碱 (6.22%); 花椒活性柱层析馏分中的酰胺类生物碱主要是山椒醇的各种异构体, 共占 8.32%。胡椒碱对 4 种鳞翅目幼虫的拒食活性普遍比山椒醇更强 (胡椒碱对棉铃虫: $t_{27}=4.92$, $P<0.000\ 1$; 胡椒碱对甜菜夜蛾 $t_{19}=6.11$, $P<0.000\ 1$; 胡椒碱对粘虫: $t_{15}=9.15$, $P<0.000\ 1$; 胡椒碱对二点委夜蛾: $t_{14}=6.06$, $P<0.000\ 1$)。就种间比较来看, 粘虫和二点委夜蛾对胡椒碱反应最敏感, 棉铃虫反应最不敏感, 山椒醇仅对甜菜夜蛾幼虫有拒食活性。【结论】胡椒碱有望成为夏玉米田鳞翅目害虫幼虫广谱性拒食剂研发的基本母核结构, 结合研究结果讨论了胡椒属植物酰胺类生物碱的生态学意义和作用机制。

关键词 棉铃虫; 甜菜夜蛾; 粘虫; 二点委夜蛾; 胡椒碱; 山椒醇; 拒食

Identification of chemical deterrents to insect feeding in *Piper nigrum* and *Zanthoxylum bungeanum* and the sensitivity of four caterpillar species to active compounds from these plants

YU Ming-Hui^{1**} YANG Jing¹ XING Huai-Sen¹ YUAN Guo-Hui¹ LI Wei-Zheng^{1,2***}

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan International Laboratory for Green Pest Control, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract 【Objectives】To identify components of volatile compounds of *Piper nigrum* and *Zanthoxylum bungeanum*, and determine the sensitivity of four caterpillar species to these compounds. 【Methods】Components of the active fractions of ethanol extracts from *Piper nigrum* and *Zanthoxylum bungeanum* were identified using bioassay-guided column chromatography and gas chromatography-mass spectrometry technologies. The deterrent effects of the major amide alkaloids derived from these two plants were tested on the larvae of four lepidopteran pest species; *H. armigera*, *Spodoptera exigua*, *Mythimna separata*, and *Athetis lepigone*, which have different ecological niches on summer corn crops. 【Results】The major amide alkaloid in pooled active fractions of *P. nigrum* was piperine (6.22%), whereas that in pooled active fractions of *Z. bungeanum* was various isomers of sanshool (8.32%). Generally, piperine was a stronger deterrent to feeding by pest larvae than sanshool (*H. armigera*: $t_{27}=4.92$, $P<0.000\ 1$; *S. exigua*: $t_{19}=6.11$, $P<0.000\ 1$; *M. separata*: $t_{15}=9.15$, $P<0.000\ 1$; *A. lepigone*: $t_{14}=6.06$, $P<0.000\ 1$). *M. separata* and *A. lepigone* larvae were the most sensitive to piperine, whereas those of *H. armigera* were least sensitive to this compound. In contrast, sanshool only significantly deterred feeding by *S. exigua* larvae.

*资助项目 Supported projects: 国家粮食丰产增效科技创新重点专项 (2018YFD0300706); 河南省重大科技专项 (201300111500)

**第一作者 First author, E-mail: minghuiyu1999@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wei-zhengli@163.com

收稿日期 Received: 2022-07-12; 接受日期 Accepted: 2022-10-08

[Conclusion] Piperine may be a suitable base compound for developing generic compounds to deter feeding by the larvae of Lepidopteran insect pests in summer corn fields. The ecological relevance and possible mode of action of amide alkaloids derived from the *Piper* genus is discussed in conjunction with our results.

Key words *Helicoverpa armigera*; *Spodoptera exigua*; *Mythimna separate*; *Athetis lepigone*; piperine; sanshool; feeding deterrent

拒食剂通过恶化农作物的适口性将害虫的危害遏制在早期阶段,且因其并未被害虫大量摄入体内,故对更高营养层天敌的负面影响较小,与生物防治的兼容性更强(李为争等,2015)。多食性昆虫味觉系统可塑性比狭食性种类更强(Bernays *et al.*, 2000),故针对前者为靶标筛选的拒食剂,有望兼治同域并发的其他狭食性害虫种类(Jermy, 1966)。在人类的6种基本呈味物质中,麻味代表物质花椒 *Zanthoxylum bungeanum* 的乙醇提取物和咸味代表物质氯化钠对多食性棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 拒食效应非常突出,暗示着调味料是环境友好型拒食剂的重要资源库(李为争等,2010)。在明确了棉铃虫拒食测试最佳基质和最佳提取溶剂的基础上(Yang *et al.*, 2013),以花椒乙醇提取物为参照对21种调味料进行系统筛选,发现胡椒 *Piper nigrum* 的两种加工产品(黑胡椒和白胡椒)、长叶胡椒 *P. longum* (又名“毕茛”)和白芷 *Angelica dahurica* 拒食活性最强,暗示着对棉铃虫的强拒食活性可能是胡椒属植物的共性特征(Li *et al.*, 2014)。此外,如果一种拒食剂能够控制同一作物不同生态位上的多种靶标害虫,就有望实现兼治的目的。为此,本文首先以棉铃虫作为研究对象,分离、鉴定了黑胡椒和花椒中的拒食活性物质,进一步测试了这些酰胺类拒食剂对夏玉米上生态位不同的4种鳞翅目幼虫(为害穗部的棉铃虫,食叶类的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和粘虫 *Mythimna separata*, 为害根系的二点委夜蛾 *Athetis lepigone*)的拒食活性。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫为室内饲养,饲养方法参考李为争等(2015),甜菜夜蛾幼虫、粘虫幼虫和二点委夜

蛾幼虫均采集于大田玉米上。

1.2 供试材料

本试验所用的花椒为晋产红花椒,而非绿色的青麻椒,简称“花椒”,与黑胡椒均购于郑州市金水区黄河食品城。山椒醇(CAS: 504-97-2)购买于河南倍特生物科技公司,胡椒碱(CAS: 94-62-2)购于上海鼎瑞化工公司。本试验涉及到的常规有机溶剂正己烷、乙醚、二氯甲烷、无水乙醇、石油醚等购于天津 Kermel 公司,均为分析纯。填充层析柱的 Florisil 粉购于德尔塔齐岳生物试剂公司。

1.3 样品制备

将晒干后的花椒和黑胡椒颗粒分别粉碎,过40目筛。每种粉末取30g,放入索氏提取器(上海亚荣化玻仪器公司)中,添加225mL无水乙醇提取,热源温度设置为42℃。发生5次虹吸后停止提取,分别得到花椒和黑胡椒的粗提物。然后,将两种粗提物分别用 Heidolph 4011 型旋转蒸发仪减压浓缩,至无溶剂滴下为止,然后用无水乙醇以少量多次的方式将粘附于旋转蒸发仪浓缩瓶壁上的材料洗涤下来,并用无水乙醇定容至30mL(以下称为“柱层析之前的材料浓缩物”)。采用棉铃虫作为被试昆虫,初步验证这些浓缩物是否具有拒食活性,以便为下述柱层析操作提供基础依据(具体生物测定方法详述于后)。

常压液相层析柱长度50cm,内径1cm。Florisil 粉在160℃的恒温鼓风干燥箱中烘6h,冷却后与60-90℃沸程的石油醚混合形成糊状物,小心用橡胶棒轻轻敲击层析柱,并将糊状物填充至层析柱约2/3高度处,用玻璃棒将糊状物上面摊平,盖一片1cm直径的滤纸碟。将1g/mL当量花椒提取物上样5mL,收集第一个馏分(Fr1),并以棉铃虫为试虫进行拒食测定,用于

检验未添加洗脱溶剂时 Florisil 硅胶粉是否能够约束所有拒食活性成分。然后,依次用下述重蒸溶剂淋洗:正己烷(2次×15 mL),乙醚(2次×15 mL),二氯甲烷(2次×15 mL),乙醇(5次×15 mL)。每次添加洗脱溶剂的同时,更换层析柱下部的馏分收集瓶。1 g/mL 当量的黑胡椒提取物柱层析方法与上述相似,洗脱溶剂系统为:正己烷(15 mL),乙醚(2次×15 mL),二氯甲烷(2次×15 mL),乙醇(4次×15 mL)。

1.4 生物测定

1.4.1 柱层析之前的材料浓缩物测试 采用选择性叶碟法进行生物测定。在每个 14 cm 内径的培养皿底部铺湿滤纸,内缘等距离放置 4 枚 1.5 cm 直径的烟草叶碟,呈“十”字交叉型。沿着一条直径的两枚叶碟作为处理,另外两枚叶碟作为对照。处理叶碟每面涂布 20 μ L 黑胡椒或者花椒的 1 g/mL 当量浓缩物,对照叶碟每面涂布 20 μ L 的无水乙醇。在培养皿的中央释放一头饥饿 12 h 的棉铃虫 3 龄幼虫,置于黑暗环境下,4 h 后用 1 mm² 规格的透明方格纸测定每片叶碟的被食面积。黑胡椒和花椒的浓缩物分别重复 34 次和 35 次。

1.4.2 柱层析产物的生物测定 3 龄棉铃虫幼虫作为试虫,采用叶碟选择性取食法。黑胡椒柱层析馏分测试时,按照洗脱顺序将 9 个馏分分为 3 组(Fr1-Fr3, Fr4-Fr6, Fr7-Fr9),每组搭配一个对照。生物测定时,在培养皿中放入 4 个烟草叶碟,每个叶碟上分别涂布 3 种馏分或无水乙醇(每面 20 μ L)。第 1、2、3 组馏分分别重复 18、20 和 23 次。每次重复测试时,涂布不同测试液的叶碟位置随机化处理。花椒柱层析馏分测试时,按照洗脱顺序将 12 个馏分分为 3 组(Fr1-Fr4, Fr5-Fr8, Fr9-Fr12),每组搭配一个对照。生物测定时,在培养皿底部内缘等距离放置 5 个烟草叶碟,每个叶碟上分别涂布 4 种馏分或无水乙醇(每面 20 μ L)。第 1、2、3 组馏分分别重复 14、17、15 次。每次重复测试时,涂布不同测试液的叶碟位置随机化处理。

1.4.3 胡椒碱和山椒醇对 4 种鳞翅目幼虫的拒食活性测定 为了测试山椒醇和胡椒碱对玉米上

不同生态位的鳞翅目幼虫是否具有广谱的拒食活性,分别测定了两种酰胺类拒食剂对棉铃虫、粘虫、二点委夜蛾和甜菜夜蛾取食量的影响。将购买的胡椒碱和山椒醇用无水乙醇稀释为 1% (w/v) 浓度的测试液。每个培养皿中放置 4 枚玉米叶碟,处理叶碟和对照叶碟交叉放置,处理叶碟每面涂布 20 μ L 山椒醇或胡椒碱的测试液,对照叶碟每面涂布 20 μ L 的无水乙醇,然后将这 4 种幼虫(均为 3 龄期,饥饿 12 h 之后)释放在培养皿底部中央(1 头/皿)。黑暗环境下使被试昆虫取食 4 h 后,用方格纸测定每片叶碟的被食面积。山椒醇测试粘虫、二点委夜蛾和甜菜夜蛾,分别重复 17、14 和 23 次;胡椒碱测试粘虫、二点委夜蛾和甜菜夜蛾,分别重复 16、15 和 20 次。

1.5 GC-MS 分析

将黑胡椒连续性活性馏分(Fr2-Fr7)和花椒连续性活性馏分(Fr6-Fr8)分别合并进行 GC-MS 分析。气相色谱-质谱联用仪的型号为 Agilent 5890 + Trace-GC ultra DSQ 2,配置 DB-5 ms 石英毛细管柱(30 m 长,0.32 mm 内径,0.25 μ m 固定液涂层厚度)。气相色谱进样口温度为 270 $^{\circ}$ C,分流比设置为 100 : 1,载气氮气的流量为 1 mL/min。程序升温条件为 80 $^{\circ}$ C 保留 3 min,然后以 20 $^{\circ}$ C/min 上升到 250 $^{\circ}$ C,保留 20 min。离子源温度为 250 $^{\circ}$ C,MS 扫描范围 33-400 amu, EI 离子源能量为 70 eV。

1.6 统计分析

黑胡椒和花椒柱层析之前的浓缩物测试数据采用配对 t 检验,比较处理叶碟和相应的对照叶碟被取食量之间的差异显著性。执行配对 t 检验之前,用 Shapiro-Wilk 检验判断每组试验中处理叶碟和对照叶碟被取食量的差值是否满足正态分布。黑胡椒和花椒柱层析馏分的生物测定数据,因不满足样本独立性的要求,故采用非参数的 Friedman 检验判断每组馏分整体上的差异显著性,以及每种馏分与对照的差异显著性。

针对胡椒碱和山椒醇对不同昆虫种类的拒食活性,分为两个分析维度:(1)采用配对 t 检验判断每种物质针对每种昆虫测试时,处理叶碟

和对照叶碟被取食量之间的差异显著性; (2) 计算拒食指数 (Feeding deterrence index, FDI) 的公式如下: $FDI = (CK - Tr) \times 100\% / (CK + Tr)$ 。式中, Tr 表示每个培养皿虫 2 枚处理叶碟被食面积之和, CK 表示每个培养皿中 2 枚对照叶碟被食面积之和。然后, 以拒食指数作为因变量, 采用双因素方差分析判断昆虫种类、供试物质及二者交互效应的显著性。根据方差分析结果, 采用 SNK (Student-Newman-Keuls) 多重比较法对不同昆虫种类的拒食指数进行比较检验。如果实测概率 $P < 0.05$, 视为显著; 实测概率 $P < 0.01$, 视为极显著。所有分析在 SPSS for windows 19.0 软件上进行。

2 结果与分析

2.1 花椒和黑胡椒浓缩物的拒食活性测定

首先验证了柱层析操作之前的花椒浓缩物和黑胡椒浓缩物对棉铃虫的拒食活性, 结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出, 花椒浓缩物测试时, 处理组被取食量 $[(20.40 \pm 6.56) \text{ mm}^2]$ 极显著少于对照被取食量 $[(148.03 \pm 13.61) \text{ mm}^2]$ ($t_{34} = 8.66$,

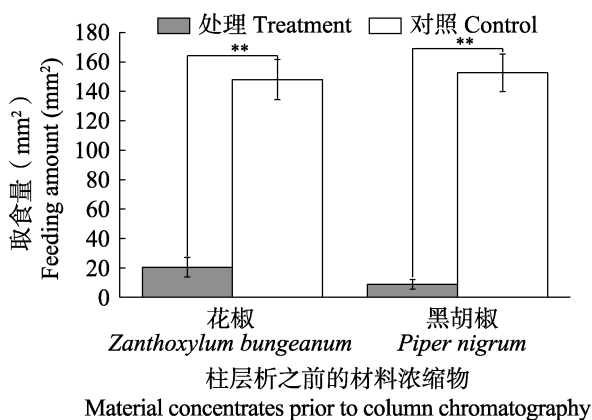


图 1 柱层析步骤之前花椒和黑胡椒提取浓缩物对棉铃虫的拒食活性

Fig. 1 Feeding deterrence of concentrates of *Piper nigrum* and *Zanthoxylum bungeanum* extracts prior to column chromatography against *Helicoverpa armigera* third instar larvae

“**”表示在 $P = 0.01$ 的水平上具有显著性差异, 配对 t 检验。

“***” indicates significant differences at 0.01 level, paired t -test.

$P < 0.0001$); 黑胡椒浓缩物测试时的处理组被取食量 $[(8.79 \pm 3.35) \text{ mm}^2]$ 也极显著少于对照的被取食量 $[(152.65 \pm 12.85) \text{ mm}^2]$ ($t_{33} = 11.12$, $P < 0.0001$)。这些结果说明, 两种材料从索氏提取到旋转蒸发的过程中, 活性成分并未损失。

2.2 黑胡椒和花椒柱层析馏分的拒食活性测定

黑胡椒和花椒柱层析馏分对棉铃虫幼虫的拒食活性测试结果分别如图 2 和图 3 所示。

从图 2 中可以看出, 在黑胡椒的 3 组柱层析馏分生物测定中, 每个组内叶碟被取食量的 Friedman 检验均有极显著差异 (第 1 组: $\chi^2_{(3)} = 35.07$, $P < 0.0001$; 第 2 组: $\chi^2_{(3)} = 38.51$, $P < 0.0001$; 第 3 组: $\chi^2_{(3)} = 28.63$, $P < 0.0001$)。Friedman 检验之后的两两比较结果表明, 在第 1 组中, 除了 Fr1 馏分之外, Fr2 和 Fr3 两个馏分处理的叶碟被取食量和对照叶碟被取食量之间均有显著性差异; 第 2 组的所有 3 种馏分处理的叶碟被取食量和对照叶碟被取食量之间均有显著性差异; 第 3 组中馏分 Fr7 和 Fr9 处理的叶碟被取食量和对照叶碟被取食量之间均有显著性差异。因此, 随后的 GC-MS 分析, 是将表现出显著拒食活性且连续性的馏分 Fr2 至 Fr7 合并起来, 进行 GC-MS 分析。

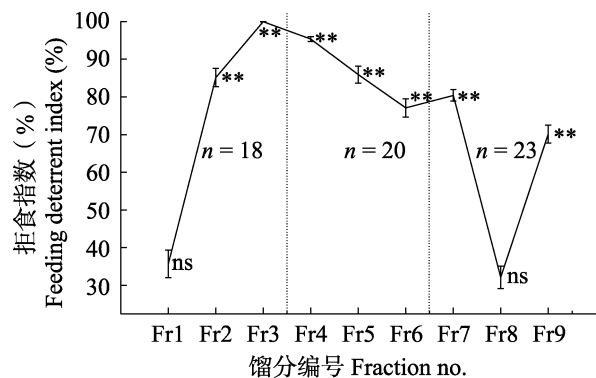


图 2 黑胡椒柱层析产物对棉铃虫 3 龄幼虫的拒食活性
Fig. 2 Feeding deterrence of different fractions of *Piper nigrum* column chromatography against *Helicoverpa armigera* third instar larvae

“ns”表示没有显著性差异, “*”和“**”分别表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 的水平上有显著性差异 (t 检验)。

图 3, 图 4 同。

“ns” indicates not significant difference, “*” and “**” indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels by t -test, respectively. The same for Fig.3 and Fig.4.

从图 3 中可以看出,在花椒的 3 组柱层析馏分生物测定中,第 1 组和第 2 组组内被取食量的 Friedman 检验均有极显著差异(第 1 组: $\chi^2_{(4)}=13.59, P=0.008\ 7$;第 2 组: $\chi^2_{(4)}=31.35, P<0.000\ 1$),第 3 组的组内差异也达到了显著性水平($\chi^2_{(4)}=12.18, P=0.016\ 1$)。Friedman 检验之后的两两比较结果表明,在第 1 组中,除了 Fr3 馏分之外,

其他馏分处理的叶碟被取食量和对照叶碟被取食量之间均无显著性差异;第 2 组中除了馏分 Fr5 外,其他 3 种馏分处理的叶碟被取食量和对照叶碟被取食量之间均有显著性差异;第 3 组中则没有发现 1 种具有显著拒食活性的馏分。因此,将表现出显著拒食活性且连续性的馏分 Fr6、Fr7 和 Fr8 合并起来,进行 GC-MS 分析。

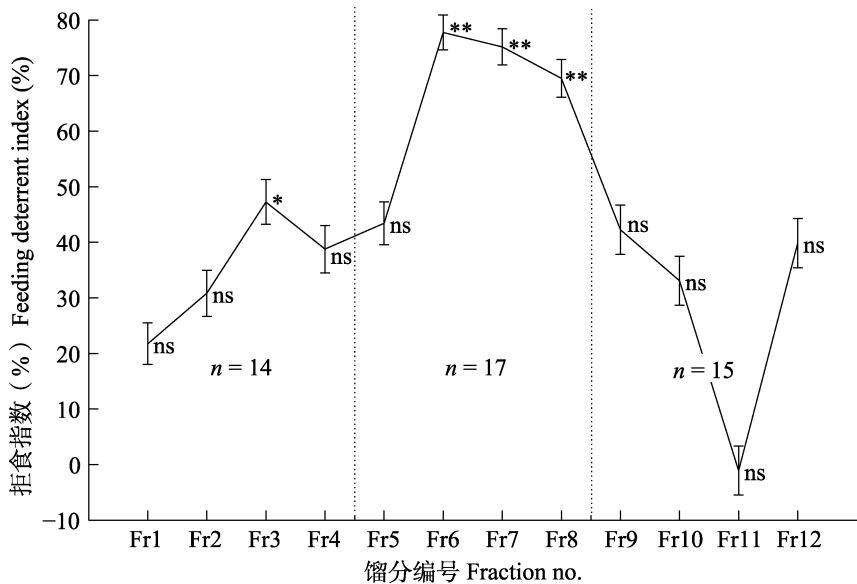


图 3 花椒柱层析产物对棉铃虫 3 龄幼虫的拒食活性
Fig. 3 Feeding deterrence of different fractions of *Zanthoxylum bungeanum* column chromatography against *Helicoverpa armigera* third instar larvae

2.3 黑胡椒和花椒活性柱层析产物的 GC-MS 分析

黑胡椒和花椒柱层析产物的 GC-MS 分析结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出,黑胡椒活性柱层析馏分总共鉴定出 27 种化学成分,挥发性成分主要是 β -水芹烯(16.22%)、3-蒎烯(20.22%)和 β -石竹烯(35.77%),非挥发性成分主要是胡

椒碱(6.22%)。花椒活性柱层析馏分共鉴定出 20 种化学成分,其中保留时间为 10.87 min 的化合物尚未定性。挥发性成分主要是芳樟醇(29.65%)和 D-柠檬烯(21.89%),非挥发性成分主要是山椒醇的各种异构体,共占 8.32%。虽然这两种植物来自不同的科(胡椒科和芸香科),但存在 15 种共同成分。

表 1 黑胡椒和花椒活性柱层析产物 GC-MS 分析			
Table 1 GC-MS analyses of active fractions eluted from <i>Piper nigrum</i> and <i>Zanthoxylum bungeanum</i> concentrates			
保留时间 (min) Retention time (min)	化学成分 Component	相对含量 (%) Relative content (%)	
		黑胡椒 <i>P. nigrum</i>	花椒 <i>Z. bungeanum</i>
2.45	正庚烷 n-Heptane	0.25	ND
4.09	烯丙基环戊烷 Allylcyclopentane	0.23	ND
5.36	β -侧柏烯 β -Thujene	1.30	ND
6.02	β -水芹烯 β - Phellandrene	16.22	8.26

续表 1 (Table 1 continued)

保留时间 (min) Retention time (min)	化学成分 Component	相对含量 (%) Relative content (%)	
		黑胡椒 <i>P. nigrum</i>	花椒 <i>Z. bungeanum</i>
6.15	α -蒎烯 α -Pinene	ND	6.54
6.42	3-蒎烯 3-Carene	20.22	6.98
6.51	2-蒎烯 2-Carene	0.03	5.12
6.64	D-柠檬烯 D-Limonene	1.30	21.89
6.69	L-薄荷醇 L-Menthol	2.20	0.34
6.75	三甲基癸烷 Trimethyldecane	1.30	ND
6.94	γ -萜品烯 γ -Terpinene	0.25	0.58
7.12	未鉴定 Unidentified	ND	0.22
7.33	β -芳樟醇 β -Linalool	1.35	29.65
8.15	未鉴定 Unidentified	ND	0.33
8.27	α -萜品烯 α -Terpinene	0.23	ND
8.52	乙酸芳樟酯 Linalyl acetate	0.15	0.31
8.74	枯茗醛 Cuminaldehyde	2.22	ND
9.12	肉桂醛 Cinnamaldehyde	3.33	ND
9.34	5-蒎烯醇 5-Caraneol	1.21	0.17
9.51	丁香酚 Eugenol	1.01	ND
9.54	β -石竹烯 β -Caryophyllene	35.77	ND
10.46	2, 4-二叔丁基苯酚 2, 4-Di-tert-butylphenol	0.05	0.19
10.54	古巴烯 Copaene	0.03	2.28
10.87	未鉴定 Unidentified	ND	2.12
11.20	洋芹子油脑 Apiol	0.08	0.21
11.70	广藿香醇 Patchouli alcohol	0.25	ND
11.97	肉豆蔻酸 Myristic acid	0.36	0.21
12.04	山椒醇 Sanshool	ND	8.32
12.76	胡椒碱 Piperine	6.22	ND
12.98	棕榈酸 Palmitic acid	0.15	0.12
14.27	亚油酸 Linoleic acid	0.28	0.00
20.45	丁基油酸酰胺 Butyl oleamide	2.12	ND

ND: 没有检测到。ND: not detected.

2.4 胡椒碱和山椒醇对 4 种鳞翅目幼虫拒食活性的比较

本试验研究的是基于接触性化学感觉的拒食活性，而不是基于嗅觉的引诱或驱避活性。因此，分别购置黑胡椒中的主要非挥发性成分胡椒碱和花椒中的主要非挥发性成分山椒醇，测试了

这些物质对二点委夜蛾、棉铃虫、甜菜夜蛾和粘虫 4 种鳞翅目幼虫的拒食活性。

每种昆虫对每种物质处理叶碟和对照叶碟取食量之间的配对 *t* 检验结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出，二点委夜蛾幼虫对胡椒碱处理叶碟的取食量显著少于相应的对照叶碟 ($t_{14}=6.06$,

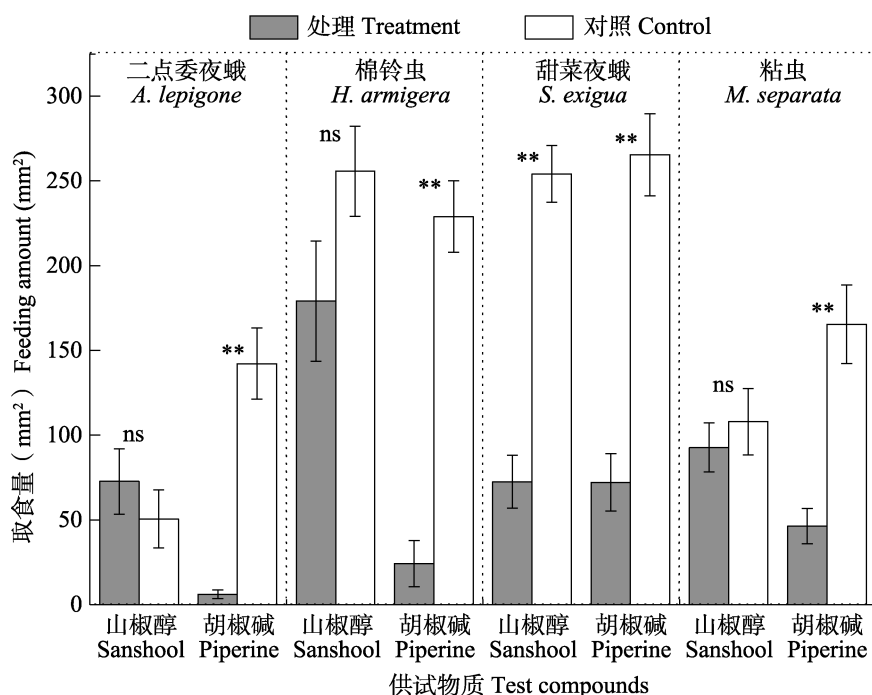


图4 胡椒碱和山椒醇对4种鳞翅目幼虫拒食活性测试的组内检验

Fig. 4 Within-group test of feeding deterrence of piperine and sanshool against four caterpillar species

$P < 0.0001$), 但对山椒醇处理叶碟和相应的对照叶碟的取食量没有显著性差异 ($t_{13} = 0.78$, $P = 0.4521$)。棉铃虫和粘虫作为试虫时得到了和二点委夜蛾类似的结果, 即胡椒碱有显著拒食活性但山椒醇无效 (胡椒碱对棉铃虫: $t_{27} = 4.92$, $P < 0.0001$; 胡椒碱对粘虫: $t_{15} = 9.15$, $P < 0.0001$; 山椒醇对棉铃虫: $t_{30} = 0.64$, $P = 0.5280$; 山椒醇对粘虫: $t_{16} = 2.01$, $P = 0.0611$)。甜菜夜蛾对胡椒碱和山椒醇处理叶碟的取食量均显著少于相应的对照叶碟 (胡椒碱: $t_{19} = 6.11$, $P < 0.0001$; 山椒醇: $t_{22} = 11.45$, $P < 0.0001$)。

拒食指数的双因素方差分析结果表明, 昆虫种类 ($F_{(3, 156)} = 5.24$, $P = 0.0018$)、供试物质 ($F_{(1, 156)} = 37.96$, $P < 0.0001$) 以及二者的交互效应 ($F_{(3, 156)} = 6.72$, $P = 0.0003$) 均达到了极显著差异。由于图4的结果表明山椒醇仅对甜菜夜蛾有拒食作用, 故仅比较了胡椒碱对不同昆虫种类拒食指数的种间差异。从图5可以看出, 胡椒碱对粘虫和二点委夜蛾的拒食指数最高, 且彼此没有显著性差异 ($P > 0.05$), 但二者均显著高于胡椒碱对棉铃虫的拒食指数 ($P < 0.05$), 胡椒碱对甜菜夜蛾的拒食指数居中。

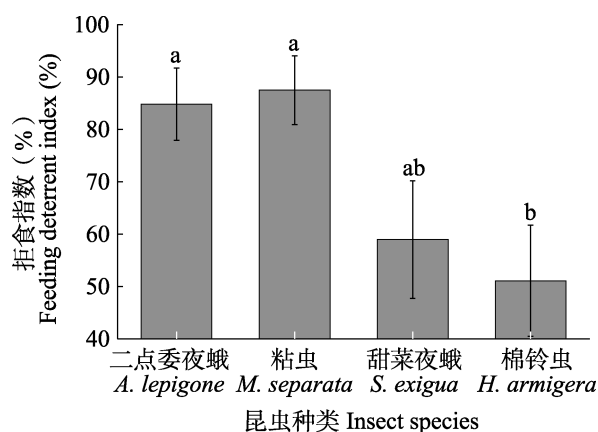


图5 胡椒碱对4种鳞翅目幼虫拒食指数差异的种间比较

Fig. 5 Interspecific comparison of feeding deterrent indices of piperine against four caterpillar species

柱上标有相同小写字母表示拒食指数没有显著性差异 ($P > 0.05$, SNK 多重比较法)。

Histograms with the same lowercase letters indicate no significant difference at 0.05 level by Student-Newman-Keuls multiple range test.

3 讨论

本文发现黑胡椒活性柱层析馏分中的挥发

性成分主要是 β -水芹烯、3-葑烯和 β -石竹烯，非挥发性成分主要是胡椒碱；花椒活性柱层析馏分中，挥发性成分主要是芳樟醇和 D-柠檬烯，非挥发性成分主要是山椒醇的各种异构体。此前许多胡椒属植物的化学成分鉴定结果与本文有着很多相似性。例如，Khani 等（2011）将黑胡椒的主要化学成分鉴定为胡椒碱（74.34%）和石竹烯（18.53%）。黑胡椒中含量较大的挥发性成分包括 β -石竹烯（23.49%）和 3-葑烯（22.20%），毕菱中超过 20% 以上的成分也是 β -石竹烯（33.44%）（Liu *et al.*, 2007）。Verzele 和 Qureshi（1980）将黑胡椒中的非挥发性成分鉴定为胡椒碱、异胡椒碱、胡椒脂碱和异胡椒脂碱等，其中胡椒碱为主要成分。Akinbuluma 等（2021）从几内亚胡椒 *P. guineense* 中鉴定出 6 种生物碱：Dihydrowisanine（1.01%），几内亚胡椒碱（Guineensine）（0.22%），胡椒碱（6.64%），毕菱明宁碱（Piperlonguminine）（0.25%），丙哌维林（Propiverine）（0.16%），Trichostachine（3.80%）。

本文测试了胡椒碱和山椒醇对 4 种鳞翅目幼虫的拒食活性。从整体上来讲，胡椒碱对 4 种鳞翅目幼虫的拒食活性普遍比山椒醇更强。就种间比较结果来看，粘虫和二点委夜蛾对胡椒碱反应最敏感，棉铃虫反应最不敏感。山椒醇仅在甜菜夜蛾幼虫上才能表现出一定的拒食活性。胡椒属植物及其衍生的酰胺类生物碱对各种鳞翅目昆虫的生物活性也已经有许多报道。例如，胡椒碱衍生物 N-[3-(3', 4'-亚甲二氧苯基)-反 2-丙烯酰基]哌啶对草地贪夜蛾 *S. frugiperda* 的致死中量为 1.07 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 幼虫体重（Batista-Pereira *et al.*, 2006）。Piper ribersoides 中的胡椒碱及其各种同系物对斜纹夜蛾 *S. litura* 有拒食活性（Kitayama *et al.*, 2013）。假毕菱 *P. retrofractum* 中的（2E, 4E, 14Z）-N-isobutylicos-2,4,14-trienamide 对斜纹夜蛾幼虫有很强杀虫活性（Yooboon *et al.*, 2019）。几内亚胡椒种子的乙醇提取物和水提取物对海灰翅夜蛾 *S. littoralis* 3 龄幼虫有显著拒食活性（Ntonifor *et al.*, 2006）。以胡椒碱为基本母核结构，Yang 等（2018）从

31 种胡椒碱同系物中筛选出大量对粘虫和小菜蛾 *Plutella xylostella* 有杀灭活性的大量新物质，Qu 等（2013）从 26 种胡椒碱的脲类衍生物中发现 3 种脲类对粘虫 3 龄幼虫活性甚至超过了 1 mg/mL 川楝素（Toosendanin）。但花椒属植物的拒食或者杀虫活性报道较少。

据报道，胡椒科植物大约有 3 600 种，仅胡椒属就有大约 2 000 种（Jeon *et al.*, 2019）。胡椒碱等酰胺类物质的生态学意义是作为胡椒属植物自身免受植食性昆虫取食的化学防卫，并且这种防卫很大程度上是通过酰胺类物质的多样性而实现的。例如，短穗胡椒 *P. cenocladum* 产生的酰胺类物质混合在一起对杂食性蚂蚁、切叶蚁 *Atta* sp. 和一些直翅目昆虫有明显拒食作用（Dyer *et al.*, 2001）。网纹胡椒 *P. reticulatum* 利用各种彼此有增效作用的酰胺类物质防止繁殖器官遭受虫害（Whitehead *et al.*, 2013）。短穗胡椒和 *P. imperiale* 的酰亚胺和酰胺类物质在一种专食性尺蠖 *Eois nympha* 和多食性草地贪夜蛾幼虫的拒食活性测试中有显著增效作用（Richards *et al.*, 2010）。短穗胡椒中的 3 种酰胺混合对多食性草地夜蛾、2 种专食性尺蠖 *Eois* spp.、巨首芭切叶蚁 *A. cephalotes* 和子弹蚁 *Paraponera clavata* 都有明显的增效作用，并且所有试验中均是 3 种酰胺全混合物拒食活性和生理毒性最强，通常超过期望的加成效应（Dyer *et al.*, 2003）。这些研究的启示是，黑胡椒中含量较低的其他酰胺类生物碱也需要重视，因为它们有可能对主要成分胡椒碱起着关键的增效作用。

黑胡椒对于害虫的生物学活性是多样化的。例如，黑胡椒粉不仅能直接致死谷象 *Sitophilus granarius* 和谷蠹 *Rhyzopertha dominica*，还能抑制这些害虫 F_1 代的繁殖（Ashouri and Shayesteh, 2009），对米象 *S. oryzae* 具有致死、驱避、拒食和抑制 F_1 代产卵等多种生物学功能（Khani *et al.*, 2011）。几内亚胡椒能够抑制四纹豆象 *Callosobruchus maculatus*（Umeozor and Pessu, 2003）、豆荚螟 *Maruca testulalis* 和非洲豆荚螟 *Clavigralla tomentosicollis*（Ekesi, 2000）卵的孵化。另一种胡椒 *Piper kelleyi* 的叶片提取物能

延缓甜菜夜蛾室内种群生长发育 (Jeffrey *et al.*, 2014)。因此, 未来需要在更长测试时间尺度上, 系统地探讨这两种酰胺类生物碱的更多生物学活性。此外, 本文的“拒食效应”, 指的是特定时间之后被试昆虫取食量下降的表面现象, 未必这些物质就是通过这些鳞翅目幼虫的味觉感受器发挥作用的。对比此前文献不难发现, 胡椒碱和山椒醇有可能是通过抑制这些昆虫中肠的某些解毒酶系, 从而造成其对原本能够克服的自然寄主含有的毒素耐受力的下降。例如, 胡椒碱能抑制马铃薯甲虫特异性解毒酶的活性 (Scott *et al.*, 2003)。胡椒碱的结构类似物胡椒基丁酮能够增强烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫中肠 P450 解毒酶的活性 (Snyder and Glendinning, 1996), 但能作为粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 细胞色素 P450 抑制剂, 使幼虫不能克服毒参中的毒芹碱和 δ -去氢毒芹碱等, 造成生长发育受阻 (Castells and Berenbaum, 2008), 该物质也影响棉铃虫幼虫体内细胞色素 P450 单氧加氧酶的酶活, 进一步影响其对拟除虫菊酯类农药的耐受力 (Chen *et al.*, 2018)。花椒毒素能诱导珀凤蝶 *Papilio polyxenes* 中肠 P450 单加氧酶合成 (Cohen *et al.*, 1989)。未来需要进一步探讨这些酰胺类物质对各种鳞翅目幼虫中肠解毒酶系的影响。

参考文献 (References)

- Akinbuluma MD, Ewete FK, Oladosu IA, 2021. Amide alkaloids from *Piper guineense* and its crude extract as protectants against *Sitophilus zeamais*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(6): 1557–1564.
- Ashouri S, Shayesteh N, 2009. Insecticidal activities of black pepper and red pepper in powder form on adults of *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus granarius*. *Pakistan Entomologist*, 31(2): 122–127.
- Batista-Pereira LG, Castral TC, da Silva MTM, Amaral BR, Fernandes JB, Vieira PC, da Silva MFGF, Corrêa AG, 2006. Insecticidal activity of synthetic amides on *Spodoptera frugiperda*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(3/4): 196–202.
- Bernays EA, Oppenheim S, Chapman RF, Kwon H, Gould F, 2000. Taste sensitivity of insect herbivores to deterrents is greater in specialists than in generalists: A behavioral test of the hypothesis with two closely related caterpillars. *Journal of Chemical Ecology*, 26(2): 547–563.
- Castells E, Berenbaum MR, 2008. Resistance of the generalist moth *Trichoplusia ni* (Noctuidae) to a novel chemical defense in the invasive plant *Conium maculatum*. *Chemoecology*, 18(1): 11–18.
- Chen CY, Han P, Yan WY, Wang SY, Shi XY, Zhou XG, Desneux N, Gao XW, 2018. Uptake of quercetin reduces larval sensitivity to lambda cyhalothrin in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Pest Science*, 91(2): 919–926.
- Cohen MB, Berenbaum MR, Schuler MA, 1989. Induction of cytochrome P450-mediated detoxification of xanthotoxin in the black swallowtail. *Journal of Chemical Ecology*, 15(9): 2347–2355.
- Dyer LA, Dodson CD, Beihoffer J, Letourneau DK, 2001. Trade-offs in antiherbivore defenses in *Piper cenocladum*: Ant mutualists versus plant secondary metabolites. *Journal of Chemical Ecology*, 27(3): 581–592.
- Dyer LA, Dodson CD, Stireman JO, Tobler MA, Smilanich AM, Fincher RM, Letourneau DK, 2003. Synergistic effects of three piper amides on generalist and specialist herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 29(11): 2499–2514.
- Ekesi S, 2000. Effect of volatiles and crude extracts of different plant materials on egg viability of *Maruca vitrata* and *Clavigralla tomentosicollis*. *Phytoparasitica*, 28(4): 305–310.
- Jeffrey CS, Leonard MD, Glassmire AE, Dodson CD, Richards LA, Kato MJ, Dyer LA, 2014. Antiherbivore prenylated benzoic acid derivatives from *Piper kelleyi*. *Journal of Natural Products*, 77(1): 148–153.
- Jeon HJ, Kim K, Kim YD, Lee SE, 2019. Naturally occurring piper plant amides potential in agricultural and pharmaceutical industries: Perspectives of piperine and piperlongumine. *Applied Biological Chemistry*, 62(1): 1–10.
- Jermey T, 1966. Feeding inhibitors and food preference in chewing phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 9(1): 1–12.
- Khani M, Awang RM, Omar D, Rahmani M, Rezazadeh S, 2011. Tropical medicinal plant extracts against rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(2): 259–265.
- Kitayama T, Yasuda K, Kihara T, Ito M, Fukumoto H, Morimoto M, 2013. Piperine analogs in a hydrophobic fraction from *Piper ribersoides* (Piperaceae) and its insect antifeedant activity. *Applied Entomology and Zoology*, 48(4): 455–459.
- Li WZ, Fu GX, Wang YH, Yuan GH, Zhang YC, Chai XL, 2010. Feeding responses of *Helicoverpa armigera* larvae to taste compounds of humans. *Acta Ecologica Sinica*, 30(21): 5709–5715. [李为争, 付国需, 王英慧, 原国辉, 张元臣, 柴晓乐, 2010. 棉铃虫对人类基本呈味物质的取食反应. 生态学

- 报, 30(21): 5709–5715.]
- Li WZ, Hu JJ, Li HL, Guo XR, Yan FM, Yuan GH, 2015. Effect of piperine and sanshool-experiences on larval feeding of *Helicoverpa armigera*. *Journal of Integrative Agriculture*, 48(10): 2076–2084. [李为争, 胡晶晶, 李慧玲, 郭线茹, 闫凤鸣, 原国辉, 2015. 胡椒碱和山椒醇经历对棉铃虫幼虫取食的影响. *中国农业科学*, 48(10): 2076–2084.]
- Liu L, Song GX, Hu YM, 2007. GC-MS Analysis of the essential oils of *Piper nigrum* L. and *Piper longum* L. *Chromatographia*, 66(9): 785–790.
- Li WZ, Hu JJ, Yang J, Yuan GH, Guo XR, Luo MH, 2014. Feeding deterrence of common spices against *Helicoverpa armigera* larvae. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(13): 1025–1031.
- Ntonifor NN, Mueller-Harvey I, van Emden HF, Brown RH, 2006. Antifeedant activities of crude seed extracts of tropical African spices against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 26(2): 78–85.
- Qu H, Yu X, Zhi XY, Lv M, Xu H, 2013. Natural-product-based insecticidal agents 14. Semisynthesis and insecticidal activity of new piperine-based hydrazone derivatives against *Mythimna separata* Walker in vivo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(20): 5552–5557.
- Richards LA, Dyer LA, Smilanich AM, Dodson CD, 2010. Synergistic effects of amides from two piper species on generalist and specialist herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 36(10): 1105–1113.
- Scott IM, Jensen H, Scott JG, Isman MB, Arnason JT, Philogène BJR, 2003. Botanical insecticides for controlling agricultural pests: Piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(4): 212–225.
- Snyder MJ, Glendinning JI, 1996. Causal connection between detoxification enzyme activity and consumption of a toxic plant compound. *Journal of Comparative Physiology A*, 179(2): 255–261.
- Umeozor OC, Pessu PO, 2003. Insecticidal effects of *Dennettia tripetala* (Bak.f.) and *Piper guineense* (Thonn.) against immature *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae) on stored cowpea, *Vigna unguiculata* Walp. *Indian Journal of Agricultural Research*, 37(3): 169–174.
- Verzele M, Qureshi S, 1980. HPLC determination of piperine in pepper and in pepper extracts. *Chromatographia*, 13(4): 241–243.
- Whitehead SR, Jeffrey CS, Leonard MD, Dodson CD, Dyer LA, Bowers MD, 2013. Patterns of secondary metabolite allocation to fruits and seeds in *Piper reticulatum*. *Journal of Chemical Ecology*, 39(11/12): 1373–1384.
- Yang J, Li WZ, Chai XL, Yuan GH, Fu GX, Wang YH, Guo XR, Luo MH, 2013. Antifeedant activity of numb and salty taste compounds against the larvae of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Ecologica Sinica*, 33(1): 7–11.
- Yang RG, Lv M, Xu H, 2018. Synthesis of piperine analogs containing isoxazoline/pyrazoline scaffold and their pesticidal bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(43): 11254–11264.
- Yooboon T, Pengsook A, Ratwatthananon A, Pluempanupat W, Bullangpoti V, 2019. A plant-based extract mixture for controlling *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6(1): 1–7.