

研究简报

Research Notes

铺散亚菊挥发油化学成分组成及其对马铃薯茎线虫的毒杀作用

王思敏, 朱婕妮, 张迪, 康涛, 李佳玲, 梁俊玉*

(西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

摘要 马铃薯茎线虫是造成当归麻口病的主要原因。本试验研究了铺散亚菊挥发油的化学组成及其对马铃薯茎线虫的毒杀作用。采用水蒸气蒸馏法提取挥发油, GC/MS 分析了挥发油的成分及其相对含量; 贝曼漏斗法从当归中分离马铃薯茎线虫, 以灰葡萄孢培养线虫; 药液浸泡法测定挥发油的杀线虫活性。结果显示: 从铺散亚菊挥发油中鉴定出 25 种化合物, 占挥发油总成分的 98.44%, 其主要成分为樟脑(13.20%)、桉叶油醇(13.16%)、百里香酚(10.96%)、 β -水芹烯(9.66%)、伞柳酮(9.40%)、4-乙基-1-(1-甲基乙基)-二环[3.1.0]-2-戊烯(7.60%)和侧柏酮(6.18%)。铺散亚菊挥发油对马铃薯茎线虫的 LC_{50} 为 3.83 mg/mL, 而阳性对照 35% 甲基异柳磷乳油的 LC_{50} 为 0.14 mg/mL。铺散亚菊挥发油对当归茎线虫有较好的毒杀作用, 能够为铺散亚菊挥发油防治马铃薯茎线虫提供一定的理论依据, 对提高当归的质量和产量有一定意义。

关键词 铺散亚菊; 挥发油; 马铃薯茎线虫; 杀线虫活性

中图分类号: S 435.32 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017185

Chemical composition and contact toxicity of essential oils extracted from *Ajania khartensis* against *Ditylenchus destructor*

WANG Simin, ZHU Jieni, ZHANG Di, KANG Tao, LI Jialing, LIANG Junyu

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract *Ditylenchus destructor* is one of the main causes for Makou disease of *Angelica sinensis*. Here the nematocidal activity of *Ajania khartensis* essential oils against *D. destructor* was investigated. The essential oils were extracted by steam distillation method, and the compositions of *A. khartensis* essential oils were analyzed by GC-MS. *D. destructor* was obtained by using the Berman funnel method from *A. sinensis* infected with Makou disease. The nematocidal activity of *A. khartensis* essential oils against *D. destructor* was tested by liquid immersion method. The results showed that 25 compounds were identified and the sum of their contents accounted for 98.44% of the essential oils. The main components of *A. khartensis* essential oils were camphor (13.20%), eucalyptol (13.16%), thymol (10.96%), β -phellandrene (9.66%), umbellulone (9.40%), 4-ethyl-1-(1-methyl ethyl)-bicycto[3.1.0]-2-pentene (7.60%) and thujone (6.18%). The essential oils of *A. khartensis* showed certain nematocidal activity (LC_{50} = 3.83 mg/mL) compared with the positive control isofenphos-methyl 35% EC (LC_{50} = 0.14 mg/mL) against *D. destructor*. These results can provide the theoretical basis for controlling *D. destructor* by using *A. khartensis* essential oils.

Key words *Ajania khartensis*; essential oil; *Ditylenchus destructor*; nematocidal activity

当归是伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根, 味甘平, 性温, 具有补血活血, 调经止痛、润肠通便的功效^[1]。我国当归产地主要分布于甘肃、云

南、贵州等地。近几年来, 在甘肃当归主产区岷县, 由马铃薯茎线虫 *Ditylenchus destructor* 引起的当归麻口病发病率高, 严重影响到当归的质量和产

收稿日期: 2017-05-18 修订日期: 2017-08-28

基金项目: 国家自然科学基金(81660632)

* 通信作者 E-mail: liangjunyu@nwnu.edu.cn

量^[2-5]。目前马铃薯茎线虫的防治主要以化学药剂防治为主,但长期使用化学合成药剂会出现农药残留、害虫耐药性增加以及环境污染等诸多问题^[6]。植物挥发油作为一种次生代谢产物,表现出多种生物活性,同时具有对环境和非目标生物体低毒、易降解的特点。所以植物挥发油对线虫的防治作用已成为研究者寻找化学杀虫剂替代物的新方法之一^[7-11]。

亚菊属植物具有清热解毒、消炎止痒、驱蚊杀虫等多种功效,且多数亚菊属植物含有挥发油^[12]。文献报道灌木亚菊 *Ajania fruticulosa* 挥发油对赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和嗜卷书虱 *Liposcelis bostrychophila* 具有明显的触杀、熏蒸和趋避活性^[13]。铺散亚菊 *Ajania khartensis* 产于宁夏、甘肃、青海等地^[14],在藏药典籍《晶珠本草》中记载为蒿阿仲,主要用于治疗肺热症^[15]。当前植物挥发油对线虫的活性研究主要集中在根结线虫和松材线虫,对马铃薯茎线虫的报道很少。关于铺散亚菊挥发油杀线虫活性也未见文献报道。本试验研究铺散亚菊挥发油的化学成分及其对马铃薯茎线虫的毒杀作用,以期对马铃薯茎线虫病的绿色防治提供一定的研究基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料的收集和挥发油提取

植物材料于 2016 年 9 月采于甘肃省夏河县(经纬度 34°94'97"N,102°87'92"E,海拔 2 900 m)。由西北师范大学晏民生副教授鉴定为铺散亚菊 *Ajania khartensis*。称取 1 000 g 阴干的铺散亚菊地上部分粉碎,采用水蒸气蒸馏法提取挥发油。蒸馏 6~8 h 后收集挥发油,用无水硫酸钠干燥,得到铺散亚菊挥发油,计算得油率和比重。将提取得到的挥发油放至玻璃瓶中密封置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 马铃薯茎线虫的培养

采用贝曼漏斗法^[16]从患麻口病的当归中分离线虫。用 3% 双氧水对分离得到的线虫悬浮液消毒,离心,底部留 2 mL 左右液体,得到无菌线虫悬浮液。用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养灰葡萄孢,4 d 后将无菌线虫悬浮液接种到此 PDA 平板上,正置放到 25℃ 的培养箱中培养 15 d 左右。然后在培养皿底部加入 1~2 mL 无菌水,再倒置培养,1~2 d 后吸出含线虫的无菌水,即得大量线虫悬浮液,备用。

1.3 铺散亚菊挥发油的 GC-MS 分析

采用 Agilent 7890B 气相色谱和 Agilent 5977A

质谱仪分析铺散亚菊挥发油化学成分。色谱柱为石英毛细管柱 HP-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm)。气相色谱升温程序为:初始温度为 60℃,保持 2 min,以 10℃/min 升温速率升至 180℃,保持 1 min,再以 20℃/min 升温速率升至 260℃,保持 15 min。气相色谱控制参数为:汽化室温度 250℃,载气为高纯氮气,进样量为 1 μL,流速为 1.0 mL/min,分流比为 100:1。质谱参数:电离方式为 EI 电离,电子能量为 70 eV,离子源温度 230℃,质量扫描范围 20~550 m/z。与质谱 NIST 2.0 数据库比对,并结合相关文献,鉴定化合物种类。采用峰面积归一化法,计算出各化学成分在挥发油中的相对百分含量(质量分数)。

1.4 铺散亚菊挥发油室内毒杀活性测定(药液浸泡法)^[17]

将铺散亚菊挥发油用适量吐温-80 混合后加水配制成一定浓度的乳油样品备用。通过预试验,寻找合适的测试浓度范围。将 90 μL 不同浓度的挥发油样品注入 24 孔细胞培养板的样品孔内,再加入 10 μL 马铃薯茎线虫悬浮液(含 50~100 条线虫),共计 100 μL。以不加药物的吐温-80 和水混合液为阴性对照。混合均匀后置于 25℃,湿度为 80%~90% 的培养箱中。以 35% 甲基异柳磷乳油作为阳性对照。每个处理重复 5 次,处理 48 h 后分别检查各组的线虫死亡/存活情况,计算线虫死亡率和校正死亡率,采用 IBM SPSS V 20.0 统计软件的 Probit analysis 计算半致死浓度 LC₅₀。

2 结果与分析

2.1 铺散亚菊挥发油的 GC-MS 分析结果

通过水蒸气蒸馏法收集到铺散亚菊挥发油 10 mL,得率为 1.0%,比重为 0.98。挥发油气相色谱总离子流图和 GC-MS 分析结果见图 1、表 1。

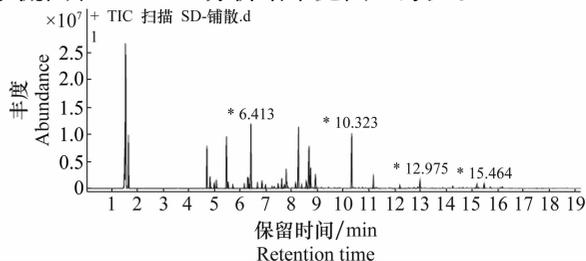


图 1 铺散亚菊挥发油的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatography of *Ajania khartensis* essential oils

表 1 铺散亚菊挥发油化学成分及其相对百分含量

Table 1 Chemical components and their relative content of *Ajania khartensis* essential oils

序号 No.	保留时间/min Retention time	化合物 Component	分子式 Molecular formula	匹配度/% Similarity index	相对含量/% Relative content
1	4.70	4-乙基-1-(1-甲基乙基)-二环[3.1.0]-2-戊烯	C ₁₀ H ₁₆	95	7.60
2	4.82	α -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	94	2.08
3	4.99	2,4(10)-萜二烯	C ₁₀ H ₁₄	90	0.90
4	5.07	茨烯	C ₁₀ H ₁₆	93	1.30
5	5.47	β -水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	93	9.66
6	5.53	β -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	92	1.03
7	5.71	β -月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	89	0.74
8	6.15	萜品油烯	C ₁₀ H ₁₆	91	0.61
9	6.29	3-异丙基甲苯	C ₁₀ H ₁₄	93	1.88
10	6.31	崖柏醇	C ₁₀ H ₁₆ O	92	2.56
11	6.41	桉叶油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	97	13.16
12	6.84	γ -松油烯	C ₁₀ H ₁₆	94	1.32
13	6.98	环己醇	C ₁₀ H ₁₈ O	92	1.56
14	7.61	侧柏酮	C ₁₀ H ₁₆ O	93	6.18
15	8.15	顺式香桉醇	C ₁₀ H ₁₆ O	91	1.14
16	8.26	樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	96	13.20
17	8.38	伞柳酮	C ₁₀ H ₁₄ O	83	9.40
18	8.56	茨醇	C ₁₀ H ₁₈ O	90	1.90
19	8.73	4-松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	94	3.40
20	8.92	α -松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	93	3.06
21	10.32	百里香酚	C ₁₀ H ₁₄ O	94	10.96
22	11.16	乙酸松油酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	94	2.16
23	12.20	石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	96	0.60
24	15.19	杜松脑	C ₁₅ H ₂₆ O	86	1.14
25	15.46	α -甜没药醇	C ₁₅ H ₂₆ O	91	0.91
合计 Total					98.44

由表 2 可见,从铺散亚菊挥发油中鉴定出了 25 种化合物,占总挥发油的 98.44%。其主要成分为樟脑(13.20%)、桉叶油醇(13.16%)、百里香酚(10.96%)、 β -水芹烯(9.66%)、伞柳酮(9.40%)、4-乙基-1-(1-甲基乙基)-二环[3.1.0]-2-戊烯(7.60%)和侧柏酮(6.18%)。张兴旺等^[18]采集于青海省的铺散亚菊挥发油的主要成分为 4-甲基-1-[1-甲基乙基]-二环[3.1.0]己烯 3-酮(32.42%)、樟脑(15.73%)、3,7,7-三甲基-二环[4.1.0]-3-庚烯(9.39%)、1-甲基-4-甲基乙基-1,4-环己二烯(7.99%)、2,4(10)-thujadiene(6.50%)、侧柏酮(6.09%)。本研究与上述文献比较,挥发油中都含有樟脑和侧柏酮,且含量很接近。除了相同的组分外,两种挥发油也含有很多不同的组分。这和植物材料采集的地点、时间有一定的关系。达洛嘉等^[19]采用超临界 CO₂ 萃取法分离铺散亚菊中的物质,该物质经 GC-MS 鉴定,主要化

合物为亚油酸、棕榈酸等脂肪酸类,与本研究的结果差异很大。这些成分不属于植物挥发油组成,它们更多存在于植物种子中。推测达洛嘉等采集的植物材料中含有较多的种子。

2.2 铺散亚菊挥发油杀线虫活性

铺散亚菊挥发油和阳性对照 35% 甲基异柳磷乳油对马铃薯茎线虫的毒杀作用见表 2。

由表 2 可以看出,在处理 24 h 以后,铺散亚菊挥发油对马铃薯茎线虫的 LC₅₀ 为 3.83 mg/mL,阳性对照 35% 甲基异柳磷乳油的 LC₅₀ 为 0.14 mg/mL。从处理时间来看,与处理 24 h 的杀线虫活性相比较,处理 48 h 后,铺散亚菊挥发油对马铃薯茎线虫的触杀活性几乎没有变化;而处理 72 h 后,铺散亚菊挥发油对马铃薯茎线虫的触杀活性有所增强,但是增强不明显。说明挥发油对马铃薯茎线虫的触杀活性与处理时间的关联不是很明显。

表 2 铺散亚菊挥发油在测试 24、48、72 h 后的杀线虫活性

Table 2 Nematicidal activity of *Ajania khartensis* essential oils after exposed for 24, 48 and 72 h

样品名称 Sample	处理时间/h Processing time	半数致死浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LC_{50}	95% 置信区间/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 95% Confidence limit	截距土标准误 Slope \pm SE	P 值 P value	自由度 df	卡方 Chi-square
铺散亚菊挥发油 Essential oil of <i>A. khartensis</i>	24	3.83	3.40~4.37	3.15 \pm 0.15	<0.01	23	36.71
	48	3.75	3.33~4.11	3.14 \pm 0.10	<0.01	23	141.25
	72	3.40	3.03~3.79	3.09 \pm 0.11	<0.01	23	109.55
35% 甲基异柳磷 EC isofenphos-methyl 35% EC	24	0.14	0.13~0.16	2.95 \pm 0.11	<0.01	23	74.19
	48	0.14	0.13~0.16	3.14 \pm 0.19	<0.01	23	125.14
	72	0.12	0.11~0.14	5.48 \pm 4.56	<0.01	23	143.86

3 讨论

铺散亚菊挥发油主要成分为单帖和倍半萜,相关研究表明萜类化合物对马铃薯茎线虫通过胃毒方式产生毒杀作用,并能降低神经组织乙酰胆碱的含量,阻断神经肌肉的传导,从而使线虫出现挛缩性麻痹的中毒症状。同时萜类化合物对茎线虫来说是一种良好的阻食剂,可通过阻食引起线虫死亡^[20]。铺散亚菊挥发油的杀线虫活性与其主要成分桉叶油醇、樟脑、百里香酚等是否有关联还需进一步研究。甲基异柳磷禁止在中药材中使用,本文仅利用其强杀虫效果作为对照,与样品进行对比,确定挥发油及其组分的杀线虫活性。

植物源农药是一种环保型农药,将铺散亚菊挥发油及其活性成分开发为新型植物型熏蒸剂或防护剂用于马铃薯茎线虫防治具有一定意义。但目前对亚菊属植物抗虫活性成分的研究较少,对其具有挥发作用的活性物质、毒杀机制等还有待于进行深入研究。从目前来看,植物源农药具有广阔的应用前景,在不久的将来,它的研究和开发将会取得更大的进展。

参考文献

- [1] 王雪梅,李应东. 当归有效成分及其药理作用的研究进展[J]. 甘肃中医, 2009, 22(11): 50-51.
- [2] 王艳,王引权,晋玲,等. 甘肃省当归病害种类调查及其病原鉴定[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(7): 1352-1354.
- [3] 顾志荣,师富贵,金岩. 当归麻口病研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013(26): 10615-10616.
- [4] 刘霞霞,坚晋卓,徐鹏刚,等. 甘肃岷县马铃薯茎线虫病发生情况调查分析[J]. 草原与草坪, 2015(4): 1-4.
- [5] 王引权,杜戮,晋玲,等. 甘肃当归生产中存在的问题及对策[J].

- 甘肃农业科技, 2008(11): 31-33.
- [6] 韩相鹏. 中药材病虫害防治技术[J]. 农业科技与信息, 2006(2): 40.
- [7] LIU X C, BAIC Q, LIU Q Z, et al. Evaluation of nematicidal activity of the essential oil of *Homalomena occulta* (Lour.) Schott rhizome and its major constituents against *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood [J]. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2014, 2(4): 182-186.
- [8] KIM J, SEO S M, PARK I K. Nematicidal activity of plant essential oils and components from *Gaultheria fragrantissima* and *Zanthoxylum alatum* against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Nematology, 2011, 13(1): 87-93.
- [9] 陈晓娟. 植物挥发油的杀虫活性研究及乳油的初配[J]. 重庆工贸职业技术学院学报, 2011(1): 51-57.
- [10] 李强. 辣蓼挥发油的提取、化学成分分析及杀虫活性测定[D]. 海口: 华南热带农业大学, 2007.
- [11] 卫强,翟义祥,孙涛,等. 龙爪槐叶和茎中挥发油的 GC-MS 分析及活性研究[J]. 华西药学杂志, 2016(5): 490-494.
- [12] 罗建军,曾涌,陈卫琼,等. 亚菊属植物化学成分和药理活性研究进展[J]. 中药材, 2014(12): 2304-2311.
- [13] LIANG Junyu, GUO Shanshan, YOU Chunxue, et al. Chemical constituents and insecticidal activities of *Ajania fruticulosa* essential oil [J]. Chemistry & Biodiversity, 2016, 13(8): 1053-1057.
- [14] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志, 76 卷(1)[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 113.
- [15] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 193.
- [16] 李世通,肖顺,章淑玲,等. 腐烂茎线虫的培养[J]. 福建农林大学学报, 2014, 43(1): 11-13.
- [17] 万树青. 杀线虫剂生物活性测定[J]. 农药, 1994, 35(5): 10-11.
- [18] 张兴旺,朱鹏程,梅丽娟,等. 铺散亚菊挥发油化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(S2): 36-38.
- [19] 达洛嘉,马家麟,白雪,等. 铺散亚菊超临界 CO₂ 萃取挥发油成分及其抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2016(4): 4-7.
- [20] 付佳,王洋,阎秀峰. 萜类化合物的生理生态功能及经济价值[J]. 东北林业大学学报, 2003, 31(6): 59-62.

(责任编辑: 杨明丽)