

## 白鲜皮中 3 种柠檬苦素化合物抗松材线虫作用研究

于金英<sup>1,2</sup>, 高逸<sup>1</sup>, 孔振<sup>3</sup>, 汪冶<sup>1</sup>

(1. 丽水学院, 浙江 丽水 323000; 2. 浙江理工大学, 浙江 杭州 310018; 3. 丽水市莲都区森林病虫害防治检疫站, 浙江 丽水 323000)

**摘要:**对白鲜 *Dictamnus dasycarpus* 皮中 3 种柠檬苦素类化合物(桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯)进行分离鉴定, 并采用浸渍法开展桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯毒杀松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 研究。结果表明, 桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯对松材线虫均有一定的抑制作用, 其对松材线虫的  $LC_{50}$  分别为  $9.78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $15.99 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $17.91 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 其中, 桉酮在  $\geq 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 毒杀松材线虫的校正死亡率  $> 80\%$ , 杀线虫活性强。上述研究结果显示, 白鲜皮柠檬苦素类化合物具有开发为新型植物源杀松材线虫剂的潜力。

**关键词:** 白鲜; 柠檬苦素类化合物; 松材线虫;  $LC_{50}$

中图分类号: S482.5+1 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776(2022)02-0075-05

### Nematicidal Activity of Three Limonoids from *Dictamnus dasycarpus* against *Bursaphelenchus xylophilus*

YU Jin-ying<sup>1,2</sup>, GAO Yi<sup>1</sup>, KONG Zhen<sup>3</sup>, WANG Ye<sup>1</sup>

(1. Lishui University, Lishui 323000 China; 2. Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 3. Lishui Liandu Forest Pest Control and Quarantine Station of Zhejiang, Lishui 323000, China)

**Abstract:** Three limonoids, namely Fraxinellone, Obacunone, Evodin were isolated from bark of *Dictamnus dasycarpus* and were identified. Experiments were conducted on their nematicidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus*. The results showed that Fraxinellone, Obacunone, Evodin had inhibitory effect on *B. xylophilus*. The  $LC_{50}$  for *B. xylophilus* was as follows:  $9.78 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $15.99 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $17.91 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Key words:** *Dictamnus dasycarpus*; limonoids; *Bursaphelenchus xylophilus*;  $LC_{50}$

松树萎蔫病(Pine wilt disease)即松材线虫病,是由松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 引起的具有毁灭性的森林病害。松材线虫属我国重大外来入侵物种,同时也是世界性的检疫害虫<sup>[1]</sup>。阿维菌素是目前防治松材线虫病应用最为广泛的生物药,在果树、蔬菜、粮食种植过程中也可使用该类药物防治虫害。但是该类药物在环境污染方面存在一定的影响,所以找到一种防治效果好同时对环境没有影响的药物迫在眉睫,同时,由于长期的单一使用,许多害虫对阿维菌素类杀虫剂已产生不同程度的抗药性。因此,从生物源中寻找新的、对环境安全的杀线虫活性物质或先导化合物,并开发成线虫防治剂是一项紧迫的任务。

柠檬苦素类化合物(Limonoids)是来源于楝科 Meliaceae、芸香科 Rutaceae 和苦木科 Simaroubaceae 植物的一类高含氧的三萜类次生代谢产物,柠檬苦素类化合物已被证实具有抗癌、抗菌、抗炎、昆虫拒食等生物活性,

收稿日期: 2021-09-11; 修回日期: 2021-12-21

基金项目: 丽水市科技计划项目(2019GYX07)

作者简介: 于金英, 硕士, 从事生物资源开发利用研究; E-mail:3173845133@qq.com。通信作者: 汪冶, 博士, 研究员, 从事生物资源开发利用研究; E-mail:33301816@qq.com。

并作为高效低毒生物农药在农业生产中得到应用<sup>[2-3]</sup>。如来源于楝科植物印楝 *Azadirachta indica* 的印楝素 (Azadirachtin) 是目前世界上公认的广谱、高效、低毒、易降解、无残留的杀虫剂<sup>[4-5]</sup>；白鲜皮为芸香科白鲜属 *Dictamnus* 植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* 的干燥根皮，是常用中药，其味苦，性寒，具有祛风除湿，清热解毒，杀虫止痒等功效<sup>[6]</sup>。白鲜皮主要含有生物碱、柠檬苦素类化合物（桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯）（如图 1）等化学成分，目前尚未见白鲜皮中柠檬苦素类化合物对松材线虫影响的报道。为此，本研究在对白鲜皮中 3 种主要柠檬苦素类化合物（桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯）分离鉴定的基础上，采用浸渍法开展桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯毒杀松材线虫的研究，并对白鲜皮中柠檬素类化合物抗松材线虫效果进行评价。

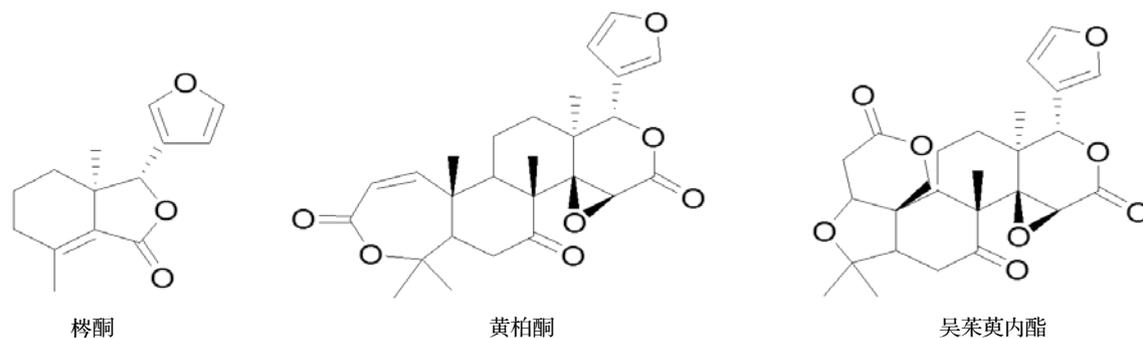


图 1 白鲜皮中 3 种主要柠檬苦素类化合物的化学结构

Figure 1 Chemical structure of three limonoids from bark of *D. dasycarpus*

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验药品 实验用白鲜皮购于安徽亳州中药材市场，桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯 3 种柠檬苦素化合物为丽水学院天然药物化学实验室从白鲜皮中分离制备。

1.1.2 实验菌株 实验所用灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 菌株为本实验室分离和保存。

1.1.3 实验虫株 实验所用松材线虫为本实验室分离保存。

1.1.4 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 采用马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL 自制马铃薯葡萄糖琼脂培养基。具体操作步骤为：将马铃薯去皮切块放入锅中，加入适量蒸馏水并加热至沸腾，维持 20 ~ 30 min，经四层纱布过滤去除滤渣，在马铃薯过滤液中加入葡萄糖和琼脂，加热待琼脂融化后，加蒸馏水至 1 000 mL，121℃灭菌 20 min。

1.1.5 M9 Buffer 自制 M9 Buffer。具体操作步骤为：取  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 g、NaCl 5g、 $\text{MgSO}_4$  0.12 g，加蒸馏水至 1 000 mL，121℃灭菌 20 min。

### 1.2 实验方法

1.2.1 柠檬苦素类化合物制备 称取白鲜皮药材 10.0 kg，用 6 倍量乙酸乙酯回流提取 3 次，每次 1 h，减压浓缩，得到浸膏 600 g，进行硅胶柱色谱 (200-300 目) 分离，用石油醚-乙酸乙酯 (100 : 1) ~ (1 : 1) 梯度洗脱，每份收集 500 mL，洗脱液经薄层色谱检识、合并。其中，Fr. 37-43 析出大量结晶状固体，经乙酸乙酯重结晶，得到化合物 1 (1.52 g)；Fr. 85-95 在洗脱过程中有晶体析出，用丙酮重结晶，分别得到化合物 2 (1.04 g) 和化合物 3 (0.67 g)。

1.2.2 松材线虫培养 将灰葡萄孢菌株接种于 PDA 培养基上，置于 28℃恒温培养箱中培养，当培养基表面长满灰葡萄孢的菌丝时备用。

1.2.3 柠檬苦素类化合物对松材线虫的毒杀作用 采用浸渍法测定柠檬苦素类化合物的杀线虫活性。将 3 种柠檬苦素类化合物分别用 1% DMSO 溶解，分别配制为 5.5、11.1、16.6、22.2、33.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  5 种浓度，取 24 孔板

加入 100  $\mu\text{L}$  的松材线虫液 (30 条左右), 再加入各浓度样品溶液 900  $\mu\text{L}$ , 使化合物溶液的终浓度分别为 5.0、10.0、15.0、20.0、30.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (组 1、组 2、组 3、组 4、组 5)。以 1% DMSO 作为空白对照, 每个浓度设置 3 个平行实验, 分别于处理 24 h、48 h、72 h 时在体视显微镜下观察松材线虫的存活情况, 虫体运动呈“S”形、卷曲形、螺旋形者均判断为活虫; 虫体不运动且呈“J”形或“C”形, 或者虫体僵直、体壁无折光性则判为死虫<sup>[7]</sup>。按以下公式计算松材线虫的死亡率和校正死亡率:

$$\text{死亡率}(\%) = (\text{死虫数}/\text{供试虫数}) \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率}(\%) = [(\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}) / (1 - \text{对照组死亡率})] \times 100\%$$

### 1.3 数据分析

生物活性测定结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Graphpad Prism 8.0 非线性拟合计算  $\text{LC}_{50}$  值。按照 Chandravadana 的分级标准<sup>[8]</sup>对杀线虫活性强弱进行分级: “-”表示校正死亡率  $\leq 10\%$ , 无杀线虫活性; “+”表示校正死亡率为  $> 10\% \sim 30\%$ , 杀线虫活性弱; “++”表示校正死亡率为  $> 30\% \sim 50\%$ , 杀线虫活性中等; “+++”表示校正死亡率为  $> 50\% \sim 80\%$ , 杀线虫活性较强; “++++”表示校正死亡率  $> 80\%$ , 杀线虫活性强。

## 2 结果与分析

### 2.1 柠檬苦素类化合物结构的鉴定

化合物 1: 无色棱柱状晶体 (乙酸乙酯), 5% 硫酸乙醇溶液显色为墨绿色。 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_3$ , EI-MS  $m/z$ : 232 $[\text{M}]^+$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 0.86 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -9), 2.14 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -8), 4.88 (1H, s, H-3), 6.35 (1H, d,  $J=0.8$  Hz, H-4'), 7.44 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-5'), 7.48 (1H, s, H-2').  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ : 170.4 (C-1), 84.3 (C-3), 43.8 (C-3a), 20.9 (C-4), 32.0 (C-5), 32.8 (C-6), 149.3 (C-7), 128.3 (C-7a), 140.5 (C-2'), 121.0 (C-3'), 109.4 (C-4'), 144.8 (C-5'), 19.4 (C-9), 18.9 (C-8)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道的桉酮一致, 确认化合物 1 为桉酮。

化合物 2: 无色方晶 (丙酮), 5% 磷酸乙醇溶液显蓝色。 $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_7$ , EI-MS  $m/z$ : 454 $[\text{M}]^+$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 1.13, 1.25, 1.46, 1.48, 1.48 (5 $\times$ - $\text{CH}_3$ ), 1.51 (6H, s, H-24, 25), 2.99 (1H, t, H-5), 3.65 (1H, s, H-15), 5.47 (1H, s, H-17), 5.98 (1H, d,  $J=11.6$  Hz, H-2), 6.37 (1H, d, H-22), 6.53 (1H, d,  $J=11.6$  Hz, H-1), 7.41 (1H, t, H-23), 7.43 (1H, d, H-21).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ : 158.2 (C-1), 123.0 (C-2), 167.0 (C-3), 83.9 (C-4), 57.1 (C-5), 41.1 (C-6), 208.9 (C-7), 52.9 (C-8), 49.4 (C-9), 44.3 (C-10), 18.1 (C-11), 32.7 (C-12), 38.5 (C-13), 66.6 (C-14), 54.5 (C-15), 167.0 (C-16), 78.3 (C-17), 120.9 (C-20), 142.6 (C-21), 110.5 (C-22), 139.8 (C-23), 32.1, 27.4, 21.4, 20.5, 16.2 (5 $\times$ - $\text{CH}_3$ )。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道的黄柏酮一致, 确认化合物 2 为黄柏酮。

化合物 3: 无色针晶晶 (丙酮), 5% 硫酸乙醇溶液显黄棕色。 $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_8$ , EI-MS  $m/z$ : 470 $[\text{M}]^+$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 1.08, 1.18, 1.18, 1.30 (4 $\times$ - $\text{CH}_3$ ), 1.52 (1H, m, H-12), 1.64 (2H, s, H-11), 2.22 (1H, dd,  $J=3.2, 14.4$  Hz, H-5), 2.46 (1H, dd,  $J=3.2, 15.6$  Hz, H-6a), 2.55 (1H, dd,  $J=2.8, 12.4$  Hz, H-9), 2.67 (1H, dd,  $J=1.2, 16.4$  Hz, H-2a), 2.86 (1H, d,  $J=15.2$  Hz, H-6b), 2.96 (1H, dd,  $J=4.0, 16.8$  Hz, H-6b), 4.04 (1H, s, H-15), 4.45 (1H, d,  $J=13.2$  Hz, H-19a), 4.75 (1H, d,  $J=13.2$  Hz, H-19b), 5.47 (1H, s, H-17), 6.34 (1H, s, H-21), 7.42 (1H, t, H-23).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ : 79.4 (C-1), 36.5 (C-2), 169.7 (C-3), 81.0 (C-4), 60.3 (C-5), 37.1 (C-6), 207.1 (C-7), 49.9 (C-8), 48.3 (C-9), 46.5 (C-10), 19.1 (C-11), 30.3 (C-12), 38.3 (C-13), 67.2 (C-14), 55.1 (C-15), 167.6 (C-16), 78.2 (C-17), 20.3 (C-18), 66.2 (C-19), 121.1 (C-20), 142.1 (C-21), 110.5 (C-22), 143.8 (C-23), 30.1 (C-28), 21.6 (C-29), 17.9 (C-30)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道的吴茱萸内酯一致, 确认化合物 3 为吴茱萸内酯。

### 2.2 3 种柠檬苦素类化合物对松材线虫的毒杀活性

采用浸渍法, 将松材线虫浸渍于不同浓度的桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯给药溶液中, 在处理 24、48 和 72 h

时分别观察松材线虫的存活情况,结果见表1。由表1显示,3种柠檬苦素类化合物对松材线虫的毒杀作用均随着给药浓度的增加而增强,并随着处理时间的增加而增强。在处理24 h、48 h时,3种柠檬苦素类化合物对松材线虫的校正死亡率均<50%,毒杀作用均不明显;随着作用时间延长至72 h,3种柠檬苦素类化合物均表现出较为明显的毒杀松材线虫作用,且呈现一定的量效关系,其中,桉酮在 $\geq 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,毒杀松材线虫的校正死亡率>80%,杀线虫活性强,而在桉酮为 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、黄柏酮为 $\geq 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、吴茱萸内酯为 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时均表现为杀线虫活性较强。

表1 3种柠檬苦素类化合物对松材线虫的毒杀活性  
Table 1 Toxic activity of three limonoids against *B. xylophilus*

柠檬苦素类 化合物	给药浓度 /( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	24 h		48 h		72 h	
		校正死亡率/%	活性强度	校正死亡率/%	活性强度	校正死亡率/%	活性强度
桉酮	5	7.18±1.12	-	12.38±1.29	+	34.50±2.60	++
	10	14.83±0.88	+	24.19±2.30	+	42.25±1.04	++
	15	21.37±1.22	+	35.24±0.69	++	56.76±2.80	+++
	20	18.84±1.15	+	41.39±2.84	++	87.61±0.58	++++
	25	22.81±1.32	+	46.96±1.68	++	80.46±1.49	++++
黄柏酮	5	9.29±0.54	-	12.89±1.70	+	32.40±3.32	++
	10	6.75±0.63	-	21.47±0.71	+	37.60±1.32	++
	15	12.08±0.84	+	31.83±1.14	++	46.23±1.80	++
	20	15.79±0.54	+	41.01±1.49	++	51.81±1.22	+++
	25	14.19±0.68	+	45.36±0.62	++	64.11±2.04	+++
吴茱萸内酯	5	6.55±0.58	-	12.07±0.57	+	24.08±0.88	+
	10	6.87±0.34	-	21.01±1.85	+	31.97±1.32	++
	15	8.78±0.63	-	25.38±1.83	+	42.63±2.32	++
	20	9.88±0.69	-	32.95±2.08	++	48.18±0.58	++
	25	11.29±0.82	+	45.64±3.13	++	66.16±2.96	+++

### 2.3 半致死浓度 $\text{LC}_{50}$ 值的计算

运用 Graphpad Prism 8.0 对松材线虫暴露于3种柠檬苦素类化合物给药溶液72 h的死亡率数据进行拟合分别得到其  $\text{LC}_{50}$  值,结果如表2。由表2结果显示,桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯对松材线虫的毒杀活性的  $\text{LC}_{50}$  值分别为9.78、15.99、17.91  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,表明桉酮对松材线虫表现出较强的抑制作用。

表2 3种柠檬苦素类化合物杀松材线虫作用的  $\text{LC}_{50}$  值  
Table 2  $\text{LC}_{50}$  of three limonoids against *B. xylophilus*

柠檬苦素 类化合物	时间/h	$\text{LC}_{50}$ /( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	95%置信度区 间/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
桉酮	72	9.78	7.78 ~ 11.72
黄柏酮	72	15.99	13.96 ~ 18.65
吴茱萸内酯	72	17.91	15.90 ~ 20.61

## 3 结论与讨论

目前,关于白鲜皮杀虫活性研究的报道主要有:白鲜皮提取物对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 杀虫活性<sup>[12-13]</sup>,白鲜碱和桉酮对仓储害虫的拒食作用<sup>[14]</sup>,桉酮对鳞翅目 *Lepidoptera* 昆虫的毒杀作用等<sup>[15]</sup>。但对白鲜皮提取物或化学成分抗松材线虫的研究均未见报道,因此,本研究首次开展了白鲜皮中柠檬苦素类化合物毒杀松材线虫实验。

白鲜皮中的桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯在结构分类上均属于柠檬苦素类化合物,但桉酮属于降解型柠檬苦素类化合物,黄柏酮、吴茱萸内酯属于高度氧化柠檬苦素,因此它们在毒杀松材线虫活性上表现出一定的差异性,其中,桉酮在 $\geq 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,毒杀松材线虫的校正死亡率>80%,杀线虫活性强,值得进一步深入研究。

柠檬苦素类化合物可通过多种途径发挥抗虫作用,如印楝素可通过作用于昆虫内分泌系统来影响昆虫的正常发育过程,从而发挥杀虫作用<sup>[16]</sup>。桉酮可通过触杀或胃毒或拒食发挥抗虫效果。本研究中桉酮、黄柏酮、吴茱萸内酯3种柠檬苦素类化合物通过何种作用机制毒杀松材线虫仍需要进一步深入探究。

