

4种柏科植物挥发油对松材线虫的室内毒力测定

张辉¹, 徐端妙¹, 林秀君¹, 陈莉娟¹, 刘浩凯²

(1. 浙江省景宁畲族自治县生态林业发展中心, 浙江 景宁 323500; 2. 浙江省景宁县畲族自治县自然资源和规划局, 浙江 景宁 323500)

摘要:通过水蒸气蒸馏法提取日本花柏 *Chamaecyparis pisifera*、日本扁柏 *C. obtusa*、细叶花柏 *C. pisifera* ‘Plumoso’ 和台湾扁柏 *C. obtusa* var. *formosana* 4种柏科 Cupressaceae 植物的挥发油, 采用浸渍法研究4种植物挥发油对松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 的毒杀作用。结果表明, 4种柏科植物挥发油对松材线虫均具有毒杀作用, 抑制作用呈现时间依赖性和浓度依赖性, 日本花柏、日本扁柏、细叶花柏及台湾扁柏挥发油在浸渍 72 h 时对松材线虫抑制的 LC_{50} (半致死浓度) 分别为 $2.84\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $2.77\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $2.37\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1.76\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 其中台湾扁柏挥发油对松材线虫的抑制作用最强。该研究为柏科植物挥发油资源的开发及其杀松材线虫天然活性物质的利用提供依据。

关键词: 柏科植物; 挥发油; 浸渍法; 松材线虫; 杀线虫活性; LC_{50}

中图分类号: S767.3⁺⁷ 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776(2022)02-0080-04

Nematicidal Activity of Essential Oil from Four Species of Cupressaceae against *Bursaphelenchus xylophilus*

ZHANG Hui¹, XU Duan-miao¹, LIN Xiu-jun¹, CHEN Li-juan¹, LIU Hao-kai²

(1. Ecological Forestry Development Center of Jingning She Autonomous County of Zhejiang, Jingning 323500, China; 2. Natural Resources and Planning Bureau of Jingning She Autonomous County of Zhejiang, Jingning 3235000, China)

Abstract: Essential oils were extracted by steam distillation from four species of Cupressaceae, namely *Chamaecyparis obtuse*, *Ch. pisifera* ‘Plumoso’, *Ch. pisifera*, *Ch. obtusa* var. *formosana* for experiment of their nematicidal activity by immersion method against *Bursaphelenchus xylophilus*. *B. xylophilus* was treated with different concentrations of essential oils for 24 h, 48 h and 72 h. The results showed the inhibitory effect of essential oils from four species of Cupressaceae on *B. xylophilus* had positive relation with duration and concentration. The median lethal concentration (LC_{50}) of four essential oils from *Ch. obtuse*, *Ch. pisifera* ‘Plumoso’, *Ch. pisifera*, *Ch. obtusa* var. *formosana* 72 h later was 2.84 mg/mL , 2.77 mg/mL , 2.37 mg/mL and 1.76 mg/mL respectively. The essential oil from *Ch. obtusa* var. *formosana* had the best effect.

Key words: Cupressaceae; essential oils; *Bursaphelenchus xylophilus*; nematicidal activity; LC_{50}

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 是世界范围内的检疫性害虫。松材线虫病是由松材线虫引起的具有毁灭性的森林病害, 具有危害高、传染快、治理困难等特点, 被称为“松树癌症”^[1]。针对松材线虫病的防治, 常规方法包括及时清理疫木、加强对媒介昆虫松墨天牛 *Monochamus alternatus* 的防治、生物防治和化学防治等, 其中, 化学防治效果明显, 但对环境造成了污染, 对生态系统造成了破坏, 如抗松材线虫的阿维菌素乳剂对水

收稿日期: 2021-09-06; 修回日期: 2021-12-23

基金项目: 景宁科技计划项目(2020A5)

作者简介: 张辉, 工程师, 从事林业资源保护方面的研究; E-mail: taoyuan31@126.com。通信作者: 徐端妙, 工程师, 从事林业资源保护方面的研究; E-mail: xdm13967051491@126.com。

生生物和有益昆虫具有毒副作用^[2]。因此,松材线虫的化学防治研究逐渐从高毒、高残留向低毒、低残留的绿色环保型方向发展。植物源杀虫剂以其对环境污染小、害虫较难产生抗药性、选择性强,对人、畜及天敌毒性低,开发和生产成本相对较低的优势越来越受到人们的重视。天然植物产生各种次生代谢产物用于保护自身免受害虫的取食为害和病原菌的侵染,包括各种植物寄生线虫的为害。因此,一些植物的次生代谢产物可以直接用于线虫防治或作为先导化合物开发利用,如苦参碱、苦豆碱对松材线虫有抑制作用^[3],植物挥发油类是一类新型植物源杀虫剂,具有多靶点作用、环境友好等特点,在植物保护中展现出很强的应用潜力,如青花椒 *Zanthoxylum schinifolium* 精油对松材线虫具有显著毒杀效果^[4]。本研究从日本花柏 *Chamaecyparis pisifera*、日本扁柏 *C. obtusa*、细叶花柏 *C. pisifera* ‘Plumoso’ 和台湾扁柏 *C. obtusa* var. *formosana* 4 种柏科 Cupressaceae 植物提取挥发油,以松材线虫为研究对象开展室内毒力测定,评价 4 种柏科植物挥发油对松材线虫的毒杀效果,为研究新型植物源杀虫剂提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料和菌株 植物材料来源于丽水市景宁畲族自治县草鱼塘森林公园的日本花柏、日本扁柏、细叶花柏和台湾扁柏的枝叶。番茄灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*, 购自北京北纳创联生物技术研究院。

1.1.2 培养基和缓冲溶液 自制马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 准备马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、MgSO₄ 1.5 g、KH₂PO₄ 3 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL, 首先,将马铃薯去皮切块放入锅中,加入适量蒸馏水加热至沸腾,保持 20~30 min,然后用四层纱布过滤,去除滤渣,再在滤液中加入葡萄糖、MgSO₄、KH₂PO₄、琼脂,加热待琼脂融化后,加蒸馏水至 1 000 mL,121℃灭菌 20 min。自制 M9 缓冲溶液:称取 KH₂PO₄ 3 g、Na₂HPO₄ 6 g、NaCl 5 g、MgSO₄ 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 柏科植物挥发油的制备 将新鲜采集的 4 种柏科植物的枝条,剪去老枝和枯叶,将剩余嫩枝和叶洗净、阴干、剪碎后备用。取处理好的柏树枝叶 500 g,置于植物精油提取装置,按液料比 1:5 加入蒸馏水,水蒸气蒸馏 2 h,收集挥发油部分,加二氯甲烷萃取 3 次,自然挥发二氯甲烷,以无水硫酸钠进行干燥,得黄色透明油状物即柏树挥发油。4 种柏科植物按相同方法分别提取,得到各自的挥发油。

1.2.2 松材线虫分离、鉴定 试验所用马尾松 *Pinus massoniana* 松材线虫病疫木由丽水市莲都区大港头森林防疫站提供。分别取疫木主干上、中、下 3 个位置的 5 cm 厚木圆盘,砍取木质部碎片,采用贝尔曼漏斗法分离松材线虫,接种于长满灰葡萄孢的 PDA 培养基上,28℃培养 3 d,可获得大量混合龄线虫。经形态学和分子生物学鉴定^[5-6]确认为其松材线虫。

形态学鉴定:用移液枪吸取线虫悬液置于载玻片上,酒精灯上加热 3~5 s,然后加盖玻片制成临时玻片,置于显微镜下观察雌虫尾尖突、阴门盖,雄虫交合伞等形态,典型特征明显,符合松材线虫的鉴定特征。

分子生物学鉴定:提取线虫 DNA,选择 ITS 特异性引物,以 DNA 为模板进行 PCR 扩增和测序,登陆 NCBI 网站中进行 BLAST 比对,与松材线虫(GenBank 登录号:MN2701176.1)的序列相似性为 99.87%。

1.2.3 松材线虫的同期化培养 为了获得处于同一生长水平的实验用松材线虫,对大量混合龄松材线虫进行同期化处理。用 M9 缓冲溶液把混合虫龄的线虫从培养基上冲洗下来,4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃去上清液,同样方法重复清洗沉淀一次,最后在 1.5 mL EP 管内将松材线虫定容至 300 μL。然后加入 700 μL 的裂解液,混合震荡 3 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃去上清液,保留沉淀。沉淀用 M9 缓冲溶液反复冲洗 3 次。同期化处理使成虫裂解死亡,获得松材线虫虫卵。加入 1 mL 无菌水配置含虫卵的悬液,接种于新的灰葡萄孢中,28℃培养 3 d,得到同期化松材线虫。

1.2.4 柏科植物挥发油对松材线虫的毒杀作用 采用浸渍法测定 4 种柏科植物挥发油的杀松材线虫活性。分别取 4 种柏科植物的挥发油 80、40、20、10、5 μL,加入 9 mL 1%二甲亚砜(DMSO)溶解,形成不同浓度的挥发

油,取48孔板每孔加入100 μL的松材线虫液(含松材线虫25~40条),再加入900 μL的各浓度挥发油,通过减重法求得各精油的质量,将浓度换算为mg·mL⁻¹使得日本扁柏挥发油的终浓度梯度为7.55、3.78、3.89、0.94、0.47 mg·mL⁻¹;日本花柏挥发油的终浓度梯度为7.31、3.65、1.82、0.91、0.46 mg·mL⁻¹;台湾扁柏挥发油的终浓度梯度为7.68、3.84、1.92、0.96、0.48 mg·mL⁻¹;细叶花柏挥发油的终浓度梯度为7.28、3.64、1.82、0.91、0.45 mg·mL⁻¹,分别于24、48、72 h时在体视显微镜下观察松材线虫的存活情况。以1%二甲亚砜作为空白对照,每个浓度设置3个平行实验。虫体运动呈“S”形、卷曲形或螺旋形者判为活虫;虫体不运动且呈“J”形或“C”形,或者虫体僵直、体壁无折光性者判为死虫。按以下公式计算松材线虫的死亡率和校正死亡率:死亡率(%)=(死虫数/供试虫数)×100%;校正死亡率(%)=(处理组死亡率-对照组死亡率)/(1-对照组死亡率)×100%。

1.3 数据分析

按照Chandravadana等的分级标准^[7]对杀松材线虫的活性强弱进行分级:“-”表示校正死亡率≤10%,无杀线虫活性;“+”表示校正死亡率为>10%~30%,杀线虫活性弱;“++”表示校正死亡率为>30%~50%,杀线虫活性中等;“+++”表示校正死亡率为>50%~80%,杀线虫活性较强;“++++”表示校正死亡率>80%,杀线虫活性强。生物活性测定结果的平均数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

实验数据采用Graphpad Prism 5.0软件进行统计分析、LC₅₀以及方差计算。

2 结果与分析

2.1 4种柏科植物挥发油对松材线虫的毒杀活性

将松材线虫置于不同给药浓度的日本扁柏、日本花柏、台湾扁柏、细叶花柏挥发油样品溶液中,在浸渍24、48、72 h时分别观察松材线虫的存活情况,结果见表1。由表1可知,4种柏科植物挥发油在浸渍24、48 h时对松材线虫的毒杀作用均不明显,其校正死亡率均≤30%,随着作用时间的进一步延长,在浸渍72 h时均显示出明显的毒杀活性,部分处理的校正死亡率≥80%,并且呈现出随着发酵液浓度的提高而增加的趋势。根据校正死亡率进行方差分析,发现4种柏木挥发油在72 h与24 h、48 h毒杀松材线虫的校正死亡率存在显著性差异($P < 0.05$)。

表1 4种柏科植物挥发油对松材线虫的毒杀活性
Table 1 Nematicidal activity of essential oil from four species of Cupressaceae against *B. xylophilus*.

| 植物 | 挥发油浓度 (mg·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 |
| 日本扁柏 | 7.55 | 11.28±0.23 b | + | 20.29±0.05 b | + | 81.86±0.02 a | ++++ |
| | 3.78 | 9.55±0.18 b | - | 18.41±0.07 b | + | 65.94±0.10 a | +++ |
| | 3.89 | 8.20±0.09 b | - | 12.85±0.13 b | + | 25.08±0.01 a | + |
| | 0.94 | 4.75±0.21 b | - | 9.99±0.16 b | - | 21.26±0.19 a | + |
| | 0.47 | 0.88±0.15 b | - | 7.54±0.04 b | - | 18.95±0.05 a | + |
| 日本花柏 | 7.31 | 4.30±0.16 b | - | 9.68±0.12 b | - | 65.19±0.15 a | +++ |
| | 3.65 | 3.54±0.12 b | - | 5.11±0.10 b | - | 58.71±0.03 a | +++ |
| | 1.82 | 3.08±0.06 b | - | 4.71±0.05 b | - | 48.69±0.21 a | ++ |
| | 0.91 | 1.80±0.02 b | - | 3.51±0.06 b | - | 19.04±0.10 a | + |
| | 0.46 | 0.46±0.13 b | - | 1.02±0.03 b | - | 9.35±0.08 a | - |
| 台湾扁柏 | 7.68 | 6.26±0.07 b | - | 10.25±0.10 b | + | 82.32±0.05 a | ++++ |
| | 3.84 | 5.60±0.03 b | - | 4.94±0.06 b | - | 72.28±0.07 a | +++ |
| | 1.92 | 4.66±0.15 b | - | 4.21±0.08 b | - | 46.80±0.19 a | ++ |
| | 0.96 | 2.80±0.01 b | - | 3.93±0.03 b | - | 39.55±0.13 a | ++ |
| | 0.48 | 0.50±0.05 b | - | 1.29±0.02 b | - | 18.21±0.03 a | + |
| 细叶花柏 | 7.28 | 6.26±0.07 b | - | 7.54±0.14 b | - | 77.74±0.01 a | +++ |
| | 3.64 | 5.60±0.03 b | - | 6.94±0.03 b | - | 61.11±0.13 a | +++ |
| | 1.82 | 4.66±0.15 b | - | 4.57±0.04 b | - | 47.26±0.08 a | ++ |
| | 0.91 | 2.80±0.01 b | - | 4.31±0.06 b | - | 20.51±0.04 a | + |
| | 0.45 | 0.50±0.05 b | - | 1.94±0.17 b | - | 13.23±0.11 a | + |

注:表中数据为平均值±标准差;同行中不同小写字母表示不同时间之间在0.05水平存在显著性差异。

2.2 半致死浓度 LC₅₀ 的计算

运用 Graphpad Prism 5.0 对不同处理组松材线虫 72 h 时的死亡率进行拟合得到 LC₅₀, 结果显示 (表 5), 日本花柏、日本扁柏、细叶花柏及台湾扁柏 4 种柏科植物挥发油在浸渍 72 h 时对松材线虫抑制的 LC₅₀ 分别为 2.84、2.77、2.37、1.76 mg·mL⁻¹, 表明台湾扁柏挥发油对松材线虫的毒杀效果最好, 随后依次为细叶花柏、日本扁柏和日本花柏。

表 2 4 种柏科植物挥发油对松材线虫抑制的 LC₅₀
Table 2 LC₅₀ of the essential oil from four species of Cupressaceae

| 挥发油种类 | 时间/h | LC ₅₀ | 95%置信度区间 |
|-------|------|-------------------------|-------------------------|
| | | /(mg·mL ⁻¹) | /(mg·mL ⁻¹) |
| 日本扁柏 | 72 | 2.77 | 1.48 ~ 5.77 |
| 日本花柏 | 72 | 2.84 | 1.62 ~ 6.63 |
| 台湾扁柏 | 72 | 1.76 | 1.27 ~ 2.42 |
| 细叶花柏 | 72 | 2.37 | 1.89 ~ 2.99 |

3 结论与讨论

植物挥发油 (精油) 是存在于植物组织中的一类重要次生代谢产物, 主要由分子量较小的单萜、倍半萜及其氧化物组成。植物挥发油作为一种新型植物源杀虫剂在农业、林业害虫综合防治中发挥着重要作用^[8-9], 具有作用方式多样、作用机制新颖及对非靶标生物安全等特点, 可以通过趋避、引诱、触杀、熏蒸、拒食和抑制生长发育等多种途径毒杀发挥抗虫效果^[10], 植物挥发油在温室、仓储害虫防治方面具有重要的应用价值^[11]。另外, 植物挥发油在松材线虫防治方面也展现出潜在的应用价值, 如丁香 *Syzygium aromaticum*、百里香 *Thymus mongolicus* 等挥发油具有显著的毒杀松材线虫作用^[12]; 黄山木兰 *Magnolia cylindrica* 和香榧 *Torreya grandis* ‘Merrillii’精油对松材线虫具有较强的致死活性, 其对松材线虫的 LC₅₀ 分别为 947.10 μL·L⁻¹ 和 960.47 μL·L⁻¹^[13]; 刘昕超等发现臭常山 *Dichroa febrifuga* 和飞龙掌血 *Toddalia asiatica* 精油具有杀线虫活性, 这 2 种精油对松材线虫和南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 的 LC₅₀ 在 30 ~ 480 mg·mL⁻¹^[14]。

本实验首次报道了日本扁柏、日本花柏、台湾扁柏和细叶花柏 4 种柏科植物挥发油对松材线虫的影响。研究结果显示, 4 种柏科植物挥发油对松材线虫均具有毒杀作用, 呈现时间依赖性和浓度依赖性。4 种柏科植物挥发油对松材线虫的毒杀作用也表现出一定的差异性, 日本花柏、日本扁柏、细叶花柏及台湾扁柏对松材线虫的 LC₅₀ 分别为 2.84 mg·mL⁻¹、2.77 mg·mL⁻¹、2.37 mg·mL⁻¹ 和 1.76 mg·mL⁻¹, 其中台湾扁柏挥发油对松材线虫的毒杀效果较好, 这可能与挥发油成分的组成和比例等有关。本研究结果显示, 柏科植物挥发油具有作为松材线虫毒杀药剂的开发潜力。柏科植物挥发油提取工艺简单、成本低、产量大且天然环保, 将柏科植物挥发油作为植物源杀虫剂开发利用将产生良好的经济效益和生态效益。

参考文献:

[1] 潘沧桑. 松材线虫病研究进展[J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2011, 50 (2): 476-483.
[2] 郝勇斐, 汪明, 潘保良. 阿维菌素类药环境毒理学研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2008 (11): 56-58.
[3] 赵博光, 赵贞伟, 王华光. 苦豆草生物碱对松材线虫的抑制作用[J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2006, 30 (6): 129-131.
[4] 束成杰, 张孟丽, 赵孔发, 等. 青花椒水提物及精油对松材线虫的防治探究[J]. 中国野生植物资源, 2019, 185 (2): 15-19.
[5] 于海英, 吴昊, 黄瑞芬, 等. 辽宁抚顺樟子松松材线虫分离与鉴定[J]. 中国森林病虫, 2020, 39 (2): 6-10.
[6] 潘龙, 理永霞, 崔嵘, 等. 湖北日本落叶松中松材线虫的分离与鉴定[J]. 温带林业研究, 2020, 3 (4): 52-56.
[7] CHANDRAVADANA M V, EUGENG S, NIDIRY J, et al. Nematicidal activity of some plant extracts[J]. Ind J Nematol, 1996, 25 (2): 148-151.
[8] 吴佩文. 植物精油类农药[J]. 世界农药, 1999, 21 (6): 23-26.
[9] 刘学文, 徐汉虹, 鞠荣, 等. 植物精油在农药领域中的研究进展[J]. 香料香精化妆品, 2004 (2): 36-39.
[10] 苏柳, 钱文焱, 国金昱, 等. 植物精油防治害虫及作用机理研究进展[J]. 内蒙古林业科技, 2018, 44 (1): 61-64.
[11] 江志利, 张兴, 冯俊涛. 植物精油研究及其在植物保护中的利用[J]. 陕西农业科学, 2002 (1): 32-36.
[12] ELBADRI, GAMAL AA, LEE D W, et al. Nematocidal screening of essential oils and herbal extracts against *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Plant Pathol J, 2008, 24 (2): 178-182.
[13] 史冬辉. 几种木本植物精油对植物病原物的抑制活性研究[D]. 杭州: 浙江林学院, 2008.
[14] 刘昕超. 臭常山和飞龙掌血的杀虫活性成分[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.