

文章编号: 1001-4829(2010)02-0405-05

藁本提取物杀桔全爪螨活性研究

胡军华¹, 马丽娜^{1,2}, 冉春¹, 李鸿筠¹, 姚廷山¹, 刘浩强¹, 蔡锦娥², 雷慧德¹

(1. 中国农业科学院柑桔研究所, 柑桔学重点实验室, 重庆 400712; 2. 西南大学植物保护学院, 重庆 400716)

摘要: 本试验研究了藁本对桔全爪螨的触杀活性, 分别测定了藁本乙醇、无水乙醚、乙酸乙酯、苯和丙酮平行提取物的杀螨活性。以乙醇提取物对桔全爪螨成螨的触杀活性最强, $LC_{50} = 0.0001 mg \cdot mL^{-1}$, 对桔全爪螨产卵抑制作用也最好, 抑制率达到 47.15%, 所需浓度是 0.165 mg \cdot mL $^{-1}$; 丙酮提取物对桔全爪螨卵的触杀活性最强, $LC_{50} = 0.204 mg \cdot mL^{-1}$ 。进一步将藁本乙醇提取物萃取分离获得组分 G1 和 G2 并测定它们的杀螨活性, 发现组分 G1、G2 均具有杀螨杀卵活性, 组分 G2 还具有较好的杀卵活性 ($LC_{50} = 0.0094 mg \cdot mL^{-1}$) 和产卵抑制作用 (72.13%)。

关键词: 藁本; 桔全爪螨; 杀螨活性; 杀卵活性

中图分类号: S433.6 文献标识码: A

Acaricidal Activity of Extract of *Ligusticum sinense* against *Panonychus citri*

HU Jun-hua¹, MA Li-na^{1,2}, RAN Chun¹, LIU Hong-jun¹, YAO Ting-shan¹, LIU Hao-qiang¹, CAI Jin-e², LEI Hui-de¹

(1. Citrus Research Institute Chinese Academy of Agricultural Sciences National Engineering Research Center for Citrus Chongqing 400712, China 2. College of Plant Protection Southwest University Chongqing 400716 China)

Abstract Acaricidal activity of *Ligusticum sinense* against *Panonychus citri* was tested in the laboratory. Five solvents were used to prepare crude extracts—ethanol, ether, ethyl acetate, benzene and acetone, among which ethanol was the most effective one. The results showed that ethanol extracts of *L. sinense* had eminent acaricidal activity and oviposition inhibition effect, which the LC_{50} values of female mites was 0.0001 mg \cdot mL $^{-1}$, the oviposition inhibition effect (47.15%) against *P. citri* when the used dose was 0.165 mg \cdot mL $^{-1}$. The acetone extract of *L. sinense* had the best ovicidal activities. The LC_{50} values of eggs were 0.204 mg \cdot mL $^{-1}$. After liquid chromatography and thin layer chromatography, the concentrated extracts were separated into 2 groups of fractions and further tests for their acaricidal and ovicidal activities were conducted. Fractions G1 and G2 were found to possess acaricidal and ovicidal activities. Fraction G2 was found to possess higher ovicidal activities (LC_{50} values of eggs was 0.0094 mg \cdot mL $^{-1}$) and oviposition inhibition effect (72.13%).

Key words *Ligusticum sinense*; *Panonychus citri*; Acaricidal activity; Ovicidal activity

桔全爪螨 (*Panonychus citri*) 是柑桔生产中重要的有害生物, 它以刺吸式口器吸食柑桔叶片、果实和嫩茎表皮的汁液, 使受害部位呈现白色斑点, 引起落叶、落花和落果, 严重影响柑桔树势和产量。它的寄主范围极广, 适应性强, 给综合治理带来了较大难度。有机农药的连续使用造成了害螨抗药性不断增强的同时也杀死了害螨的天敌, 而且还导致了较为严重的农药残留问题, 造成了严重的环境污染。目

前, 在我国桔全爪螨已发展成为柑桔最普遍、最重要而且最难防治的害虫^[1~2]。寻找新的桔全爪螨防治的有效方法非常重要。目前关于植物源杀螨剂的报道比较少, 从植物次生物质中寻找有效成分防治害螨受到国内外研究人员的广泛关注^[3~16]。

藁本 (*Ligusticum sinense*) 又名西芎, 系伞形科藁本属植物, 其根茎为常用中药材。藁本具有很高的药用价值, 主要成分为挥发油类, 其苯酞类成分具有镇静抗惊、解痉止痛、平喘的中枢神经调节作用, 倍半萜没红药醇酮类成分具有免疫、消炎作用, 多羟取代肉桂基类成分具有降酶保肝活性、阿魏酸具有抗血小板聚集、镇静作用。万传星等从藁本中分离到的细辛醚成分对粘虫、小菜蛾、家蝇、棉铃虫和黄粉虫有较好的杀虫活性^[17]。华燕青从藁本根茎氯仿

收稿日期: 2009-07-21

基金项目: 国家公益基金项目 (nyhyzx07-057); 国家科技支撑项目 (2007BAD47B04, 2008BAD92B08)

作者简介: 胡军华 (1971-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事植物源农药的研究和开发, Tel 023-68349005 E-mail: dhu_jh@yahoo.com.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

萃取相中分离得到细辛醚、佛手柑内酯、阿魏酸和异香草醛 4个活性化合物, 佛手柑内酯对菜青虫和粘虫有较高拒食和胃毒毒杀活性^[18]。到目前为止, 关于藁本杀螨活性和杀卵活性的系统研究未见报道, 杀螨活性物质的极性分布也没有报道。本文在实验室对藁本杀螨活性成分进行了初步的分离提取和活性评价, 明确藁本杀螨活性物质的系统分布, 以便从天然产物中研发新型杀螨剂和全面评价该属植物在农业害虫防治领域的价值提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试螨

桔全爪螨采自中国农业科学院柑桔研究所(重庆北碚)的柑桔园。试验前选择新鲜柑桔叶片, 往每株柑桔盆栽苗上挑桔全爪螨雌成螨 30只, 任其产卵 12 h 移去成螨。待螨卵孵化之后, 同样条件下培养 8~9 d 作为供试螨。

1.2 供试药剂

藁本购自成都荷花池中药材市场。经植物研究所专家鉴定, 置于 60 ℃烘箱烘干, 粉碎, 过 80 目筛。取植物粉碎样品 30 g 分别加入无水乙醇、乙醚萃取、丙酮、乙酸乙酯、苯等溶剂超声萃取 3 次 (500 mL/次, 提取 30 min, 60 ℃), 重复 3 次。滤液合并, 减压浓缩, 选取活性较高的提取物浸膏, 采用硅胶吸附柱层析的方法, 流动相为氯仿-甲醇溶剂, 按不同的比例进行洗脱, 得到不同柱层析流分, 选取萃取率较高的成分作为活性测定的研究对象。

1.3 试验方法

1.3.1 藁本提取物对桔全爪螨雌成螨的触杀活性评价 采用叶片残毒法, 有所改进^[19] 取直径为 9 cm 的培养皿依次铺上 0.7 cm 厚的海绵、滤纸, 直径逐渐减小, 加水至滤纸, 制成水隔离台。摘取完整、生长旺盛的柑桔叶片, 浸水洗净, 剪成平整片段, 叶面向下置于滤纸隔离台上, 用零号毛笔挑取体色鲜艳、健康活泼的雌成螨, 转移到柑桔叶片上, 每片叶 30 头, 待螨体稳定后, 剔除死亡和受伤个体, 将带螨叶片在稀释成系列浓度的药液中浸渍 5 s 后取出, 吸去多余药液。处理时先用清水作对照, 再由低浓度向高浓度依次处理, 每一浓度重复 3 次, 水隔离台置于温度 (25 ± 1) ℃, RH 85 %, 光照 L:D = 16:8 的生化培养箱中, 24 h 后用双目镜检查死亡及存活个体。用毛笔轻触螨体, 以螨足不动者为死亡。对照组死亡在 10% 以下为有效试验。对所得数据利用 Abbott 公式: 校正死亡率 = $\frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100$ 进行校正, 用 RM

(害虫抗药性检测管理)软件计算毒力回归方程、致死中浓度 (LC₅₀)、LC₅₀值的置信限等。

1.3.2 藁本提取物对桔全爪螨卵的触杀活性评价

参考 IRAC (Insecticide Resistance Committee 2000) 方法^[19], 前同 1.3.1。任其产卵 12 h 移去成螨, 将带卵叶片在稀释成系列浓度的药液中浸渍 5 s 后取出, 吸去多余药液。处理时先用清水作对照, 再由低浓度向高浓度依次处理, 每一浓度重复 3 次, 水隔离台置于温度 (25 ± 1) ℃, RH 85 % 左右的生化培养箱中, 每 24 h 观察卵孵化情况, 观察 7 d 当对照卵全部孵化时, 处理卵仍没有孵化的作为判断死亡的标准, 计算死亡率, 并用 Abbott 公式校正, 用 RM(害虫抗药性检测管理)软件计算毒力回归方程、致死中浓度 (LC₅₀)、LC₅₀值的置信限等。

1.3.3 藁本提取物对桔全爪螨雌成螨生殖力测定

采用叶片涂布法。从田间柑桔树上采取未曾施过药的叶片, 洗净晾干。叶背朝上放置在垫一层湿海绵的培养皿中, 区域两侧用湿棉花覆盖, 使叶片紧贴棉花。叶片上涂布药液后接入大小一致的 30 头雌成螨, 统计 24 h 的产卵量, 计算活螨平均产卵量, 产卵抑制指数和产卵抑制率。

$$\text{产卵抑制指数} = \frac{(\text{对照产卵数} - \text{处理产卵数})}{(\text{对照产卵数} + \text{处理产卵数})}$$

$$\text{产卵抑制率 (\%)} = \frac{(\text{对照产卵数} - \text{处理产卵数})}{\text{对照产卵数}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 藁本不同溶剂平行提取物对桔全爪螨雌成螨和卵的触杀活性

藁本不同溶剂的平行提取物对桔全爪螨的触杀毒力不同(表 1)。分析乙醇粗提物及其它有机溶剂的平行提取物的 LC₅₀, 发现乙醇提取物的触杀毒力最高, 其 LC₅₀ 为 0.0014 mg·mL⁻¹, 乙酸乙酯提取物毒力最低, 其 LC₅₀ 为 7.4090 mg·mL⁻¹, 各提取物的毒力(以 LC₅₀ 比较)高低次序依次为: 乙醇提取物、丙酮提取物、苯提取物、乙醚提取物、乙酸乙酯提取物。各提取物的致死敏感性(以斜率 b 值比较)高低次序依次为: 乙醚提取物、乙醇提取物、乙酸乙酯提取物、苯提取物、丙酮提取物。各提取物毒力顺序与极性强弱顺序并不一致(乙醇 > 丙酮 > 乙酸乙酯 > 乙醚 > 苯)。

藁本不同溶剂的平行提取物对桔全爪螨卵的触杀毒力结果表明, 丙酮提取物的触杀毒力最高, 其 LC₅₀ 为 0.204 mg·mL⁻¹; 乙酸乙酯提取物毒力最低, 其 LC₅₀ 为 4.1738 mg·mL⁻¹。各提取物的毒力(以 LC₅₀ 比较)高低次序依次为: 丙酮提取物、苯提

表 1 薤本平行提取物对桔全爪螨雌成螨和卵的毒力

Table 1 The mortality of *Panonychus citri* and eggs with the parallel extracts of *Ligusticum sinense*

提取物 Extract	虫态 Age	毒力回归方程 Regressive equation	相关系数 Correlation coefficient	致死中浓度及置信区间 $LC_{50} \pm SE_{50}$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	卡方检验值 χ^2
乙醇	雌成螨	$6.5381 + 1.7917x$	0.9766	0.0014 ± 0.0002	1.8066
	卵	$3.258 + 0.653x$	0.9715	0.4651 ± 0.0016	0.9525
乙醚	雌成螨	$3.5763 + 1.8745x$	0.9823	5.7477 ± 0.1700	0.7315
	卵	$-2.6020 + 2.4759x$	0.9525	1.1761 ± 0.0037	5.3432
乙酸乙酯	雌成螨	$1.221 + 0.977x$	0.4898	7.4090 ± 0.0056	5.9790
	卵	$2.300 + 0.746x$	0.8111	4.1738 ± 0.0048	2.2629
苯	雌成螨	$2.483 + 0.899x$	0.9379	0.6304 ± 0.0005	1.2068
	卵	$0.088 + 1.879x$	0.9916	0.4117 ± 0.0000	3.6584
丙酮	雌成螨	$2.879 + 0.775x$	0.9235	0.5435 ± 0.0002	1.9128
	卵	$2.775 + 0.963x$	0.9867	0.2040 ± 0.0017	0.2047

取物、乙醇提取物、乙醚提取物、乙酸乙酯提取物。各提取物的致死敏感性(以斜率 b 值比较)高低次序依次为:乙醚提取物、苯提取物、丙酮提取物、乙酸乙酯提取物、乙醇提取物。各提取物毒力顺序与极性强弱顺序并不一致(乙醇>丙酮>乙酸乙酯>乙醚>苯)。

2.2 薤本不同溶剂平行提取物对桔全爪螨产卵抑制作用

从表 2 中看出,无论从产卵抑制指数还是产卵抑制率来看,薤本不同溶剂平行提取物对桔全爪螨产卵的抑制作用都是随浓度的减小而降低。薤本不同溶剂平行提取物对桔全爪螨成螨产卵的抑制效果

表 2 薤本平行提取物对桔全爪螨产卵的抑制作用

Table 2 The oviposition inhibition effect of parallel extracts from *Ligusticum sinense* on *Panonychus citri*

提取溶剂 Solvent	浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration	20头虫产卵数 No of egg per 20 females	抑制指数 Oviposition inhibition	抑制率 (%) Oviposition inhibition rate
乙醇	0.165	12.8	0.3136	47.75
	0.0825	16.34	0.1718	29.33
	0.04125	19.46	0.0859	15.83
	0.02063	22.24	0.0194	3.81
乙酸乙酯	2072	14.76	0.2207	36.16
	1036	17.18	0.1474	25.69
	518.5	17.74	0.1317	23.27
	259	21.34	0.04	7.70
丙酮	2720	17.24	0.1457	25.43
	1360	17.36	0.1423	24.91
	680	18.14	0.1207	21.54
	340	21.24	0.0424	8.13
乙醚	4960	17.3	0.1440	25.17
	2480	17.92	0.1267	22.49
	1240	18.3	0.1164	20.85
	620	22.04	0.0239	4.67
苯	186	8.58	0.4587	62.89
	93	9.1	0.4351	60.64
	46.5	9.44	0.4201	59.17
	23.25	10.22	0.3869	55.80
对照	-	23.12	-	-

表 3 薤本乙醇提取物萃取组分 G1、G2的萃取率

Table 3 The extraction rate of G1, G2 of ethanol extracts from *Ligusticum sinense*

组分 Fraction	形态颜色 Shape color	乙醇初膏重 (g) Ethanol extracts weight	萃取物重 (g) Extracts weight	萃取率 (%) Extract rate
G1	上清, 淡褐色	5.28	0.82	15.53
G2	下浊, 褐色	5.28	1.72	32.58

是: 乙醇 > 苯 > 乙酸乙酯 > 丙酮 > 乙醚。乙醇平行提取物的产卵抑制率达到 47.75% 时所需浓度是 0.165 mg·mL⁻¹。

2.3 薤本乙醇提取物的活性成分的分离

采用硅胶吸附柱层析的方法, 流动相为氯仿-甲醇溶剂, 按不同的比例进行洗脱, 得到乙醇提取物柱层析流分, 经硅胶板薄层层析, 碘显色, 将显色点相同的流分合并, 得到 9 个组分, 记录为 G1~G9。在此主要以 G1 和 G2 两种萃取率较高、极性较低的成分为研究对象, 其萃取率见表 3。

表 4 薤本乙醇提取物萃取组分对桔全爪螨雌成螨和卵的触杀毒力曲线

Table 4 The toxicity regression line of ethanol extracts from *Ligusticum sinense* against *Panonychus citri* and eggs

处理 Treatment	提取物 Extract	毒力回归方程 Regressive equation	相关系数 Correlation coefficient	致死中浓度及置信区间 $LC_{50} \pm SE_{50}$ mg·mL ⁻¹	卡方检验值 χ^2
雌成螨	乙醇提取物	6.538+ 1.792x	0.9766	0.0014±0.0187	1.8066
	G1	2.827+ 1.346x	0.9753	0.041±0.0153	1.3219
	G2	0.069+ 1.570x	0.9064	1.381±0.6537	2.3553
卵	乙醇提取物	3.258+ 0.653x	0.9714	0.4651±0.1624	0.9525
	G1	3.299+ 1.001x	0.9626	0.0500±0.0078	6.9721
	G2	4.624+ 0.386x	0.8752	0.0094±0.0083	4.5527

表 5 薤本乙醇提取物萃取组分对桔全爪螨产卵抑制率

Table 5 The oviposition inhibition effect of ethanol extracts from *Ligusticum sinense* on *Panonychus citri*

组分 Fraction	浓度 (mg·mL ⁻¹) Concentration	20头虫产卵数 No of egg per 20 females	抑制指数 Oviposition inhibition	抑制率 (%) Oviposition inhibition rate
乙醇	0.165	12.8	0.3136	47.75
	0.0825	16.34	0.1718	29.33
	0.04125	19.46	0.0859	15.83
	0.02063	22.24	0.0194	3.81
CK	-	23.12	-	-
G1	820	6.5	0.2912	45.10
	410	6.9	0.2636	41.72
	205	7.54	0.2219	36.32
G2	102.5	7.76	0.2082	34.50
	430	3.3	0.5641	72.13
	215	5	0.4062	57.77
	107.5	5.9	0.3348	50.17
	53.75	7.26	0.2398	38.68
CK	-	11.84	-	-

LC_{50} 分别为0.0094、0.0500和0.4651 mg \cdot mL $^{-1}$ 。很明显薰本萃取物G2对螨卵的触杀活性好于乙醇平行提取物、G1。

2.5 薰本萃取物对桔全爪螨成螨产卵抑制作用

从表5中看出,无论从抑制指数还是产卵抑制率来看,乙醇平行提取物、G1和G2的生物活性在不同浓度下都是随着浓度的下降而减小。乙醇平行提取物抑制率为47.55%时所需浓度是0.165 mg \cdot mL $^{-1}$,而G1抑制率为36.22%所需浓度是205 mg \cdot mL $^{-1}$,G2抑制率为38.68%所需浓度是53.57 mg \cdot mL $^{-1}$,G1和G2在抑制率更小时所需浓度比乙醇平行提取物抑制率为47.55%时所需浓度大。从抑制率来看G2的活性大于G1的活性。

3 讨论与结论

本文研究了薰本的平行提取物对桔全爪螨和卵的毒杀作用,结果证实中药植物薰本的乙醇提取物有明显的杀螨活性和杀卵活性,对桔全爪螨生殖力的影响,有明显的产卵抑制效果。而薰本乙醚提取物对害螨的敏感性高于乙醇提取物,表明有效成分可能位于极性较低的位置。其杀螨作用机理和杀螨有效成分的确定等有待进一步研究。

薰本乙醇提取物不同组分的生物活性测定结果表明,薰本杀螨活性物质主要存在于G1、G2两种极性较低的组分中,与平行提取物的推测相吻合,且得率较高,表明薰本对桔全爪螨具有生物活性的化合物主要分布在极性较低的位置,G2组分对柑桔全爪螨雌成螨、卵的毒力最高,要研究薰本的杀螨作用,应该对G2提取物进一步的研究,以获得薰本植物杀螨作用的最好效果。

螨的繁殖速度决定了植物源杀螨剂筛选的重点是发现既具有杀虫活性,也具有杀卵活性的植物,但已报道兼具杀螨卵活性的植物很少。同时,植物资源的大规模稳定供应和获取难度系数大;活性成分在植物体内分布常随地域、季节、光照的变化而变化;植物杀螨活性成分比较复杂,很多都是多种活性成分协同作用。因此,杀螨活性成分的提纯与结构鉴定的工作量和难度非常大,所需经费较多,剂型加工设计难度大,今后应对研究方法进行创新,寻求综合开发利用杀螨植物的途径。

参考文献:

- [1] Chen D-M, Chen W-M. Studies on the effect of two pyrethroids on the development of citrus red mite [J]. Acta Phytophyl Sin, 1990, 17(3): 279-282.
- [2] Mai X-H, Li S-X, Xiong J-J, et al. Control citrus red mite by protecting *Amblyseius novemsetosus* (Evans) in citrus orchards in mountain area [J]. Natural Environ Insects, 1979, 1(1): 52-56.
- [3] Sundaram K M S, SLoane L. Effects of pure and formulated azadirachtin, a neem-based pesticide on the phytophagous spider mite *Tetranychus urticae* Koch [J]. Sci Health, 1995, 30: 801-814.
- [4] Wang Y-N, Shi G-L, Zhao L-I, et al. A caridical activity of *Juglans regia* leaf extracts on *Tetranychus viennensis* and *Tetranychus cinnabarinus* (Acaridae) [J]. J Econ Entomol, 2007, 100(4): 1298-1303.
- [5] HOU H, ZHAO L-L, SHI G-L, et al. Studies on the acaricidal activity of the extracts of *Kochia scoparia* [J]. Plant Protection, 2004, 30(3): 42-45.
- [6] Chiasson H, B Langer A, Bostanian N, et al. Acaricidal properties of *Atemnosia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction [J]. J Econ Entomol, 2001, 94(1): 167-171.
- [7] Pan W, Luo P, Fu R, et al. A caridical activity against *Panonychus citri* of a ginkgolic acid from the external seed coat of *Ginkgo biloba* [J]. Pest Manag Sci, 2006, 62(3): 283-287.
- [8] Antonious G F, Meyer J E, Rogers J A, et al. Growing hot pepper for cabbage loop ex *Trichoplusian* (Hbner) and spider mite, *Tetranychus urticae* (Koch) control [J]. Environmental Science and Health Part B, 2007, 42: 559-567.
- [9] Mo M-J, Wu H-J, Han S-C, et al. Bioactivity of the alcohol extracts from 16 plant species against citrus red mite *Panonychus citri* McGregor [J]. Journal of Environmental Entomology, 2008, 30: 44-49.
- [10] Venzon M, Rosado M C, Molina-Rugama A J, et al. Acaricidal efficacy of neem against *Polyphago tarsonemus latus* (Banks) (Acaridae) [J]. Crop Protection, 2008, 27: 869-872.
- [11] 岑伊静, 庞雄飞, 徐长宝, 等. 薰甘菊乙醇提取物对桔全爪螨群的控制作用 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(4): 754-757.
- [12] 杨会芝. 石椒草提取物对桔全爪螨和朱砂叶螨的生物活性及其作用机理研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [13] 韩建勇, 曾鑫年, 杜利香. 白花丹根提取物的杀螨活性 [J]. 植物保护学报, 2004, 31(2): 85-90.
- [14] 曹 挥, 刘素琪. 瑞香狼毒对山楂叶螨的生物活性及酶活性的影响 [J]. 林业科学, 2003, 39(1): 98-102.
- [15] 赵莉蔺, 刘素琪, 侯 辉, 等. 河朔盏花对山楂叶螨活性的研究 [J]. 山西农业大学学报, 2004, 24(2): 184-186.
- [16] 张永强. 中药植物姜黄杀虫杀螨及其作用机理研究 [D]. 重庆: 西南农业大学, 2005.
- [17] 万传星, 李广泽, 何 军, 等. 薰本提取物杀螨活性初步研究 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(10): 2093.
- [18] 华燕青. 薰本中活性成分的初步研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [19] 孟和生. 两种生物方法对杀螨剂毒力测定结果的影响比 [J]. 植物保护, 2002, 28(3): 49-51.

(责任编辑 李正华)