

黄皮酰胺纳米微乳剂对香蕉穿孔线虫的杀线活性和防治效果^①

齐振华¹, 王东伟¹, 周春娜²,
郑小玲³, 徐春玲¹, 谢 辉¹

1. 华南农业大学 资源环境学院 植物线虫研究室/植物检疫线虫检测与防疫研究中心, 广州 510640;
2. 广东省农业有害生物预警防控中心, 广州 510500; 3. 深圳市农业科技推广中心, 广东 深圳 518040

摘要: 通过室内测定和盆栽防治试验, 研究了黄皮酰胺纳米微乳剂(NMEC)对香蕉穿孔线虫的杀线活性和对红掌香蕉穿孔线虫病的防治效果. 杀线活性测定结果表明, 随着药剂处理时间延长, NMEC 的杀线活性增强, 在处理 12 h 时, NMEC 的杀线活性并不高于其他药剂; 而在处理 24 h 后, NMEC 的杀线活性开始高于或显著高于常规黄皮酰胺, 并与其他化学杀线剂差异不具有统计学意义; 处理 48 h 后, NMEC 的杀线活性高于或显著高于其他供试药剂, 并且较低用药量的 NMEC 杀线活性可以达到或接近较高用药量的其他药剂的杀线活性, 1 mL 的 NMEC (400 mg/L) 处理 48 h 的线虫校正死亡率高达 $99.33\% \pm 0.67\%$. 在盆栽试验中, NMEC 对红掌香蕉穿孔线虫病的防治效果显著好于常规黄皮酰胺, 而且在用药量达到 1 mg/盆及以上的施药量时, NMEC 与灭线磷和克线磷的防治效果无明显差异; 用 4 mg/盆 NMEC 处理的红掌病级数为 1 ± 0.32 , 显著低于 1 mg/盆和 2 mg/盆 NMEC 处理.

关键词: 黄皮酰胺纳米微乳剂; 杀线活性; 防治效果; 香蕉穿孔线虫

中图分类号: Q959.172+.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)07-0082-07

香蕉穿孔线虫 *Radopholus similis* 是一种迁移性内寄生植物线虫, 其寄主植物广泛, 能对多种作物造成毁灭性的危害, 被许多国家和地区列为检疫性有害生物^[1-3]. 近年来, 香蕉穿孔线虫随着进口的观赏植物传入我国少数地区的大棚和温室, 严重危害观赏植物, 造成重大损失. 目前, 对该线虫病害的防治仍主要以使用化学杀线剂的方法为主^[4]. 世界上生产使用的杀线剂大多是剧毒或残留持久的农药^[5], 长期、大量使用给环境造成极大的负面影响, 因此环保安全的生物农药的研发成为目前有害生物防治研究的热点. 黄皮酰胺 Clausenamide 是从黄皮 *Clausena lansium* 的果核中提取的生物碱, 黄皮酰胺对芒果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense、萝卜蚜 *Lipaphis erysimi*、松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 和爪哇根结线虫 *Meloidogyne javanica* 等均有较高的抑制活性^[6-9]. 由于黄皮酰胺极难溶于水, 其生物利用度很低, 另外生物农药传统剂型稳定性和持效性也不理想. 为了提高黄皮酰胺的生物利用度、稳定性和杀线效果, 齐振华等^[9]将黄皮酰胺制成纳米微乳剂, 并证实黄皮酰胺纳米微乳剂(NMEC)的稳定性以及对爪哇根结线虫的杀线活性和防治效果显著优于常规黄皮酰胺. 本文研究了 NMEC 对香蕉穿孔线虫的杀线活性和对红掌香蕉穿孔线虫病的防治效果, 这对我国目前观赏植物上

① 收稿日期: 2014-01-17

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(200903040); 广东省植物防疫检疫科研专项项目(2012ky002).

作者简介: 齐振华(1985-), 男, 山东德州人, 硕士研究生, 主要从事植物线虫学研究.

通信作者: 谢 辉, 教授, 博士研究生导师.

发生严重的香蕉穿孔线虫病的防治具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂

黄皮酰胺由华南农业大学资源环境学院天然农药与化学生物学教育部重点实验室万树青教授提供. 黄皮酰胺纳米微乳剂(NMEC)根据齐振华等^[9]的方法制备. 20%灭线磷乳油购自江苏丰山集团有限公司; 20%克线磷乳油购自山东寿光申达化工有限公司.

1.1.2 供试线虫及植物

供试线虫为在胡萝卜愈伤组织上保存和繁殖的香蕉穿孔线虫, 由华南农业大学植物线虫研究室采集、鉴定和培养保存. 供试植物为从广州花卉研究中心购买的组培红掌 *Anthurium andraeanum* 幼苗. 炼苗 1~2 周后, 将其移栽至装有 1 200 cm³ 介质土的花盆(1 500 cm³)中, 介质土使用前经 120 ℃、2 h 高温灭菌处理.

1.2 试验方法

1.2.1 香蕉穿孔线虫的扩繁培养

胡萝卜愈伤组织的制备主要参考 Pinochet 等^[10]的方法. 采用 Fallas 等^[11]的方法在制备好的胡萝卜愈伤组织上培养和扩繁香蕉穿孔线虫备用.

1.2.2 香蕉穿孔线虫的分离和计数

胡萝卜愈伤组织中线虫的分离和计数: 把接种线虫 56 d 后的胡萝卜愈伤组织用搅拌机打碎至悬浮液, 将其倒入 100 目(孔径为 0.075 mm)、400 目(孔径为 0.025 mm)的组合筛中, 用自来水反复清洗, 最后再用洗瓶将 400 目筛网的线虫冲洗到小烧杯中定容, 用移液管吸取 1 mL 线虫悬浮液放入培养皿中, 在解剖镜下分别统计线虫数量, 重复 3 次取平均值, 确定定容线虫悬浮液中线虫的密度.

植物根中线虫的分离和计数: 将供试植株根系完整取出, 根系洗净后剪成 1~2 cm 的小段放入搅拌机中, 加入适量水, 将剪碎的根系搅拌成悬浮液, 采用贝曼漏斗法分离根系悬浮液中的线虫^[12], 将分离到的线虫液倒入画格的培养皿中, 在解剖镜下统计虫数.

土壤中线虫的抽样与分离: 将取出植株后花盆中的介质土混匀, 用烧杯定量抽取 100 mL 采用贝曼漏斗法分离线虫, 将分离得到的线虫液倒入画格的培养皿中, 在解剖镜下统计虫数, 将统计的线虫数乘以 12 即得到土壤中线虫总数.

1.2.3 NMEC 对香蕉穿孔线虫的杀线活性测定

取 24 孔细胞培养板, 每个孔中加入 1 mL 不同处理质量浓度的药液, NMEC、常规黄皮酰胺、灭线磷和克线磷的处理质量浓度设为 5 个梯度: 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, 以清水作为对照处理. 在每一个孔中放入 30 条香蕉穿孔线虫活雌虫, 放在 25 ℃培养箱保存, 分别于 12 h, 24 h 和 48 h 后检测和统计线虫的死亡率, 每个处理重复 5 次. 用 Oka 等^[13]的方法确定线虫死活, 将处理后的线虫取出放入清水中清洗 3 次, 24 h 后观察针刺不动的线虫为死亡线虫. 死亡率与校正死亡率计算公式如下:

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死亡线虫数}}{\text{供试线虫数}} \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{处理组线虫死亡率} - \text{对照组线虫死亡率}}{1 - \text{对照组线虫死亡率}} \times 100\%$$

1.2.4 红掌盆栽实验

将灭过菌的基质土与沙子按 1:1 体积比(pH=7.6)装入 1 500 cm³ 的塑料花盆中, 每盆装土约 1 200 cm³. 将育好的红掌苗移栽到花盆中, 长到 3 叶龄后接种供试线虫, 接种时在红掌根部周围挖 3 个 3 cm 深的洞, 将香蕉穿孔线虫的悬浮液注入洞中, 每盆接种混合虫态的香蕉穿孔线虫 1 000 条. 接种 24 h 后

施药, 供试药剂为 NMEC、黄皮酰胺、灭线磷和克线磷, 每种药剂的质量浓度分别为 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, 施用量为每盆 10 mL. 每种药剂的每个质量浓度为一个处理, 清水处理作为对照, 花盆随机放置在温室中, 每个处理重复 5 次. 花盆随机放置在温室中, 施用药剂 56 d 后, 测量记录红掌植株根部鲜质量、地上鲜质量、根际虫数和根部病级数. 根部病级数(发病程度)参照 Zhang 等^[14]分为 0~5 级.

1.2.5 数据统计分析方法

实验数据分析、处理与绘图采用 SPSS(13.0)和 EXCEL2007 软件; 采用邓肯氏新复极差法(Duncan's multiple ranger test, DMRT), 在 $p=0.05$ 水平上进行差异显著性比较.

2 结果与分析

2.1 NMEC 对香蕉穿孔线虫的杀线活性

NMEC 和其他供试药剂对香蕉穿孔线虫活性测定试验结果表明(图 1), NMEC 对香蕉穿孔线虫具有较高的杀线活性. 在药剂处理 12 h 后, 经 25 mg/L, 50 mg/L 和 100 mg/L 各质量浓度不同药剂处理线虫校正死亡率差异不具有统计学意义, 经 200 mg/L 和 400 mg/L 灭线磷和克线磷处理线虫校正死亡率要显著高于 NMEC. 但是在药剂处理 24 h 后, 200 mg/L NMEC 处理线虫校正死亡率为 $72.67\% \pm 3.40\%$, 显著高于同质量浓度其他药剂处理, 且与 400 mg/L NMEC、灭线磷和克线磷处理线虫校正死亡率差异不具有统计学意义. 药剂处理 48 h 后, NMEC 各质量浓度处理的线虫校正死亡率高于同质量浓度其他药剂处理, 其中 25 mg/L NMEC 处理的线虫校正死亡率与同具有统计学意义浓度的其他供试药剂处理差异具有统计学意义, 并且和 50 mg/L 常规黄皮酰胺、灭线磷和克线磷差异不具有统计学意义; 50 mg/L NMEC 处理的线虫校正死亡率显著高于同质量浓度的其他供试药剂, 并且和 100 mg/L 常规黄皮酰胺、灭线磷差异不具有统计学意义; 100 mg/L NMEC 处理的线虫校正死亡率显著高于质量浓度 200 mg/L 的常规黄皮酰胺, 并且与 200 mg/L 灭线磷和克线磷差异不具有统计学意义; 400 mg/L NMEC 处理的线虫校正死亡率达 $99.33\% \pm 0.67\%$, 高于所有其他处理, 除了与同质量浓度的灭线磷和克线磷处理以及 200 mg/L NMEC 处理的线虫校正死亡率差异不具有统计学意义外, 与其他所有处理差异具有统计学意义.

以上结果表明, 在处理时间延长后纳米制剂的高活性逐渐体现, 处理 48 h 后纳米制剂的杀线活性最高, 同时纳米微乳剂在较低药量可以达到或接近较高药量对照药剂的杀线活性, 这反映了纳米制剂对香蕉穿孔线虫的杀线活性具有缓释、高效的特性.

2.2 红掌盆栽试验

盆栽红掌施药试验结果表明, 在红掌根际接种香蕉穿孔线虫后, 施药的各处理红掌植株和根系的长势明显好于未施药的接种对照处理(图 2、图 3), 接种对照处理红掌植株黄化矮小(图 2-M)、根系明显腐烂(图 3-M). 200 mg/L 和 400 mg/L NMEC 处理的红掌长势与健康空白对照相近(图 2). 各供试药剂处理的红掌地上鲜质量均大于未经药剂处理的接种对照植株(图 4-A), 与接种对照相比, 除了 100 mg/L 和 200 mg/L 常规黄皮酰胺处理差异不具有统计学意义, 其他处理差异均具有统计学意义. 其中, 100 mg/L NMEC 处理的地上鲜质量(4.72 ± 0.30) g 高于同质量浓度其他 3 种药剂处理, 与同质量浓度和 200 mg/L 的常规黄皮酰胺处理差异具有统计学意义, 与 200 mg/L 其他药剂处理和 400 mg/L 各供试药剂处理差异不具有统计学意义.

各供试药剂处理的红掌根部鲜质量均大于未经药剂处理的接种对照植株(图 4-B), 除了 100 mg/L 和 200 mg/L 常规黄皮酰胺处理和接种对照差异不具有统计学意义, 其他药剂处理差异与接种对照差异均具有统计学意义, 其中, 100 mg/L NMEC 处理的根部鲜质量为(4.63 ± 0.64) g 高于同质量浓度其他 3 种药剂处理, 与同质量浓度常规黄皮酰胺处理差异具有统计学意义, 与 200 mg/L 和 400 mg/L 供试药剂处理无明显差异. 200 mg/L 各供试药剂处理的根鲜质量, NMEC 和克线磷处理显著大于常规黄皮酰胺处理, 其他处理间差异不具有统计学意义; 400 mg/L 各供试药剂处理间差异均不具有统计学意义.

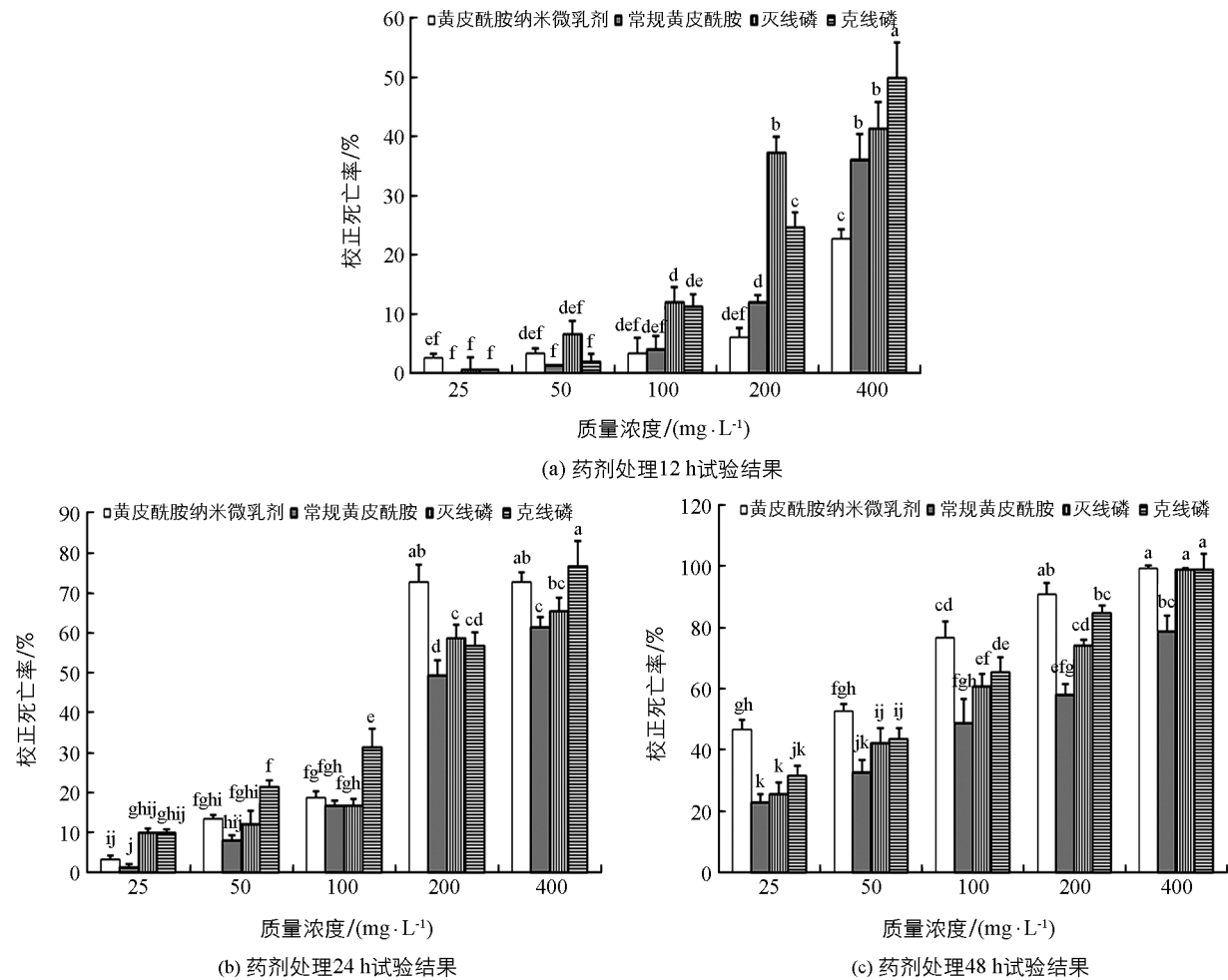


图 1 中数据为 5 次重复的平均值±标准误；图 1 中相同字母者表示在 $p \geq 0.05$ 水平上差异不具有统计学意义。

图 1 1 mL 不同质量浓度杀线剂处理后香蕉穿孔线虫的校正死亡率

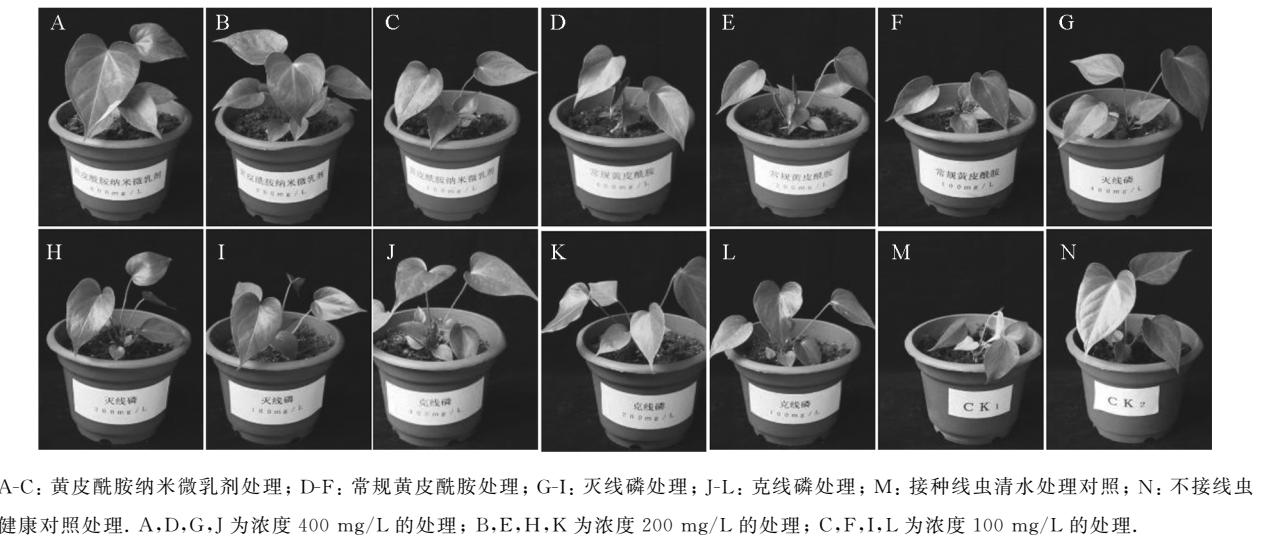
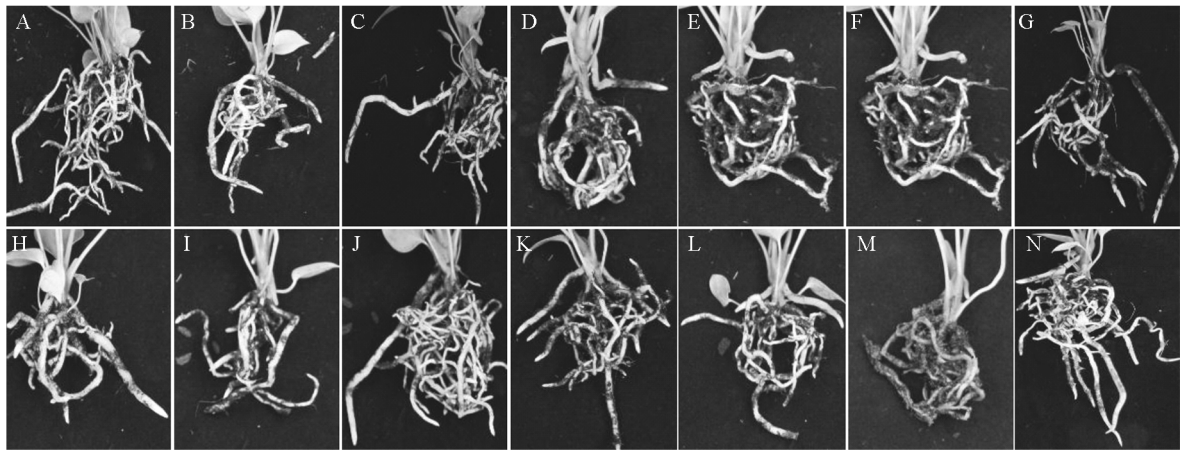


图 2 不同杀线剂(10 mL/盆) 处理后的红掌生长状况

经供试药剂处理的红掌根部病级数,除了 100 mg/L 和 200 mg/L 常规黄皮酰胺处理和接虫对照处理差异不具有统计学意义外,其他药剂处理均显著小于对照处理(图 4-C). 质量浓度 100 mg/L 各供试药

剂处理的根部病级数, NMEC 处理显著小于常规黄皮酰胺处理, 但显著大于克线磷处理, 与灭线磷处理差异不具有统计学意义; 质量浓度 200 mg/L 和 400 mg/L 各供试药剂处理的根部病级数, NMEC 处理显著小于同质量浓度的常规黄皮酰胺处理, 与同质量浓度的其他药剂处理差异不具有统计学意义. 不同质量浓度的 NMEC 处理之间的根部病级数随着药剂质量浓度的增加显著降低, 400 mg/L NMEC 处理的病级数 1 ± 0.32 最低.



A-C 黄皮酰胺纳米微乳剂处理; D-F 常规黄皮酰胺处理; G-I 灭线磷处理; J-L 克线磷处理; M: 清水处理对照; N: 不接虫健康对照处理. A, D, G, J 为具有统计学意义浓度 400 mg/L 的处理; B, E, H, K 为具有统计学意义浓度 200 mg/L 的处理; C, F, I, L 为具有统计学意义浓度 100 mg/L 的处理.

图 3 不同杀线剂(10 mL/盆)处理后的红掌根部生长情况

经供试药剂处理的红掌根际线虫数都显著小于未经药剂处理的接种红掌根际线虫数(图 4-D). 图 4 质量浓度 100 mg/L 和 200 mg/L 各供试药剂处理的根际线虫数, NMEC 处理显著小于同质量浓度常规黄皮酰胺处理, 与同质量浓度的其他药剂处理差异不具有统计学意义; 质量浓度 400 mg/L 各供试药剂处理的根际线虫数, NMEC 处理与其他药剂处理差异均不具有统计学意义; 各质量浓度 NMEC 处理的根际线虫数随着质量浓度增加而降低, 但仅 100 mg/L 和 400 mg/L 处理差异具有统计学意义, 400 mg/L NMEC 处理的根际线虫数为 $(1\ 244.2 \pm 123.30)$ 条.

以上结果表明, NMEC 对红掌香蕉穿孔线虫病的防治效果不仅显著好于常规黄皮酰胺, 而且与化学杀线剂的防治效果无明显差异, 常规黄皮酰胺药剂的防治效果最差.

3 讨 论

本研究结果显示, NMEC 对香蕉穿孔线虫的杀线活性和对红掌香蕉穿孔线虫病的防治效果显著好于常规黄皮酰胺, 在作用时间延长后的杀线效果甚至好于化学杀线剂, 在施药量达到 1 mg/盆或更多时的防治效果也和化学杀线剂的效果无明显差异. 这个结果相似于齐振华等^[9]报道的 NMEC 对爪哇根结线虫的杀线活性和对空心菜根结线虫病的防治效果. 香蕉穿孔线虫是典型的迁移型植物寄生线虫, 根结线虫则是典型的固着型植物寄生线虫, NMEC 对这两大类型植物寄生线虫的显著杀线活性和防治效果, 表明了其具有应用于植物线虫病害防治的潜力和前景.

NMEC 对植物寄生线虫表现出的杀线活性和防治效果显著高于黄皮酰胺常规制剂的特性源于其纳米微乳剂的剂型. 由于纳米微乳剂的有效成份被分散到纳米级后, 颗粒小、分散度高、表面积大, 与靶标的亲和性、接触时间和接触面积显著增加, 同时纳米化的药剂颗粒表面张力小, 具有隧道效应, 易于穿透线虫的表皮^[9, 15], 因此一种农药纳米化制剂的活性和防治效果会显著高于其常规制剂. 另外, 生物类农药的常规剂型在阳光照射下极易分解, 也导致其稳定性、持效性和生物利用度不够理想. 当该类农药制成纳米微乳剂后, 有效成分被包裹在微胶囊内不易受阳光和生物酶等因素的影响而很快分解. 齐振华等^[9]报道

NMEC 在紫外光照射 4 h 和 6 h 的光降解率比黄皮酰胺丙酮溶液低 18.5% 和 14.3%，可见生物类农药制成纳米微乳剂后，提高了其活性物质的稳定性和持效性。因此，将生物农药纳米化是提高生物农药防效和拓宽其应用前景的重要途径。

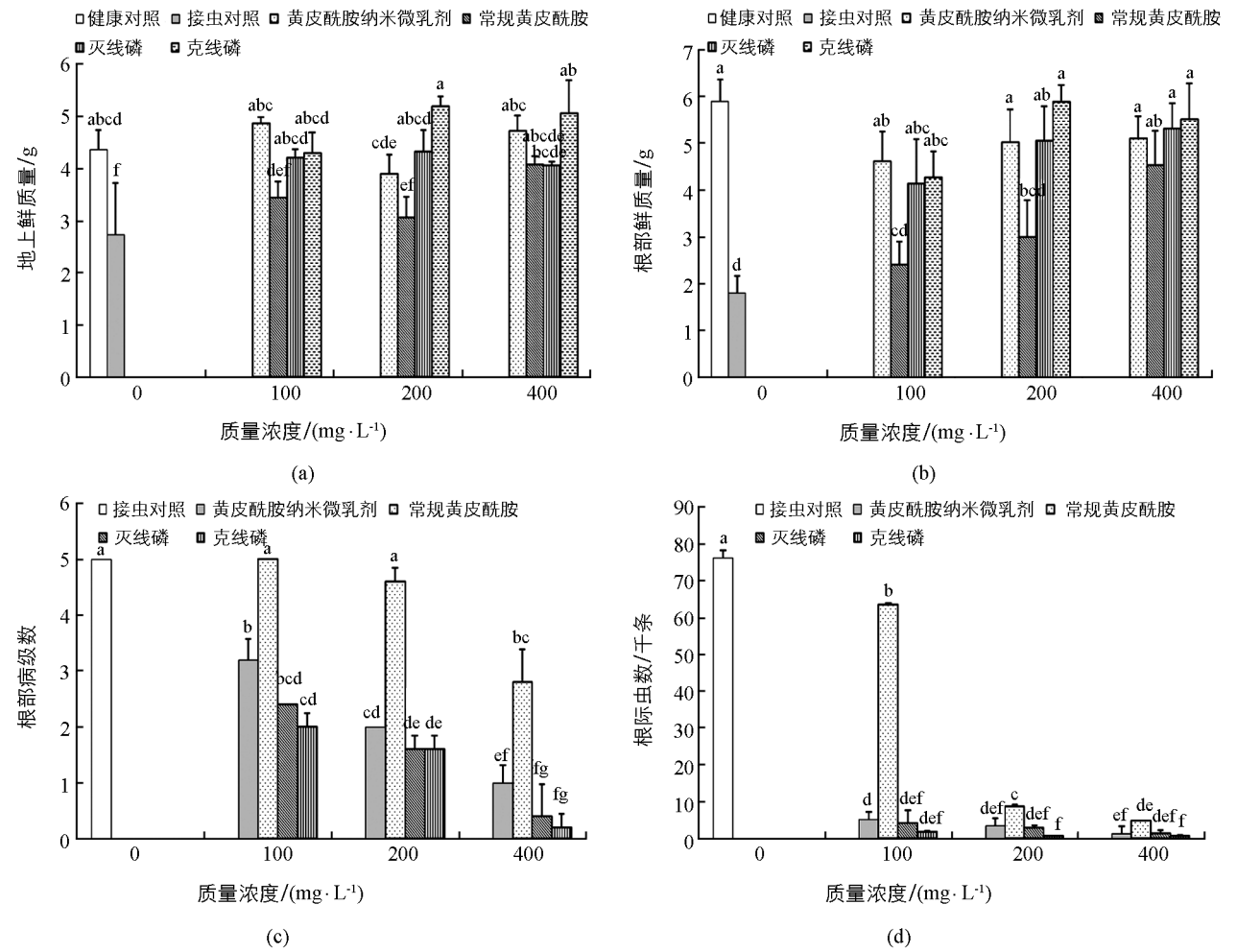


图 1 中数据为 5 次重复的平均值±标准误；图 1 中相同字母者表示在 $p \geq 0.05$ 水平上差异不具有统计学意义

图 4 不同质量浓度杀线剂 (10 mL) 对红掌生长量、发病情况和根际香蕉穿孔线虫数量的影响

参考文献：

[1] COTTON J, VAN RIEL H. Quarantine: Problems and Solutions [M] //Evans K, Trudgill D L, Webster J M. Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture [M]. Wallingford: CAB International, 1993: 593—607.

[2] Centre Agriculture Bioscience International, European and Mediterranean Plant Protection Organization. Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe [M]. Wallingford: CAB International, 1998: 167.

[3] 谢 辉. 香蕉穿孔线虫及其检测和防疫控制 [J]. 植物检疫, 2006, 20(5): 321—324.

[4] 杨新玲, 张利兰. 植物寄生线虫防治的新策略 [J]. 世界农药, 2001, 23(5): 26—27.

[5] 黄耀师, 梁 震, 李 丽. 我国植物线虫研究和防治进展 [J]. 农药, 2000, 39(2): 11—13.

[6] 刘艳霞, 巩自勇, 万树青. 黄皮酰胺类生物碱的提取及对 7 种水果病原真菌的抑菌活性 [J]. 植物保护, 2009, 35(5): 53—56.

[7] 万树青, 郑大睿. 几种植物提取物对萝卜蚜的光活化杀虫活性 [J]. 植物保护, 2005, 31(6): 55—57.

[8] 马伏宁, 万树青, 刘序铭, 等. 黄皮种子中杀松材线虫成分分离及活性测定 [J]. 华南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 30(1): 23—26.

[9] 齐振华, 万树青, 郑小玲, 等. 黄皮酰胺纳米微乳剂的制备和特性及其对爪哇根结线虫杀线活性的测定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(9): 95—102.

- [10] PINOCHET J, FERNANDEZ C, SARAH J L. Influence of Temperature in Invitro Reproduction of *Pratylenchus Coffeae*, *Pratylenchus Goodeyi* and *Radopholus similis* [J]. *Fundamenta and Applied Nematology*, 1995, 18(4): 391–392.
- [11] FALLAS G A, SARAH J L. Effect of Storage Temperature on the in Vitro Reproduction of *Rahodpholus Similis* [J]. *Nematropica*, 1994, 24(2): 175–177.
- [12] 谢 辉. 植物线虫分类学 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2005: 38–41.
- [13] OKA Y, SHUKER S, TKACHI N. Nematicidal Efficacy of MCW-2, a New Nematicide of the Fluoroalkenyl Group, Against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne Javanica* [J]. *Pest Manag Sci*, 2009, 65(10): 1082–1089.
- [14] ZHANG Chao, XIE Hui, XU Chun-ling, et al. Differential Expression of Rs-eng-1b in Two Populations of *Radopholus similis* (Tylenchida: Pratylenchidae) and Its Relationship to Pathogenicity [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2012, 133(4): 899–910.
- [15] BOUCHEMAL K, BRIANCON S, PERRIER E, et al. Nano-Emulsion Formation Using Spontaneous Emulsification: Solvent, Oil and Surfactant Optimisation [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 280(1–2): 241–251.

The Nematicidal Activity and Control Efficiency of Clausenamide Nano-Microemulsion Against *Radopholus similis*

QI Zhen-hua¹, WANG Dong-wei¹, ZHOU Chun-na²,
ZHENG Xiao-ling³, XU Chun-ling¹, XIE Hui¹

1. Laboratory of Plant Nematology/Research Center of Nematodes of Plant Quarantine, College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China;

2. Early Warning and Control Center of Agricultural Pests of Guangdong, Guangzhou 510500, China;

3. Promotion Center of Agricultural Science & Technology of Shenzhen, Shenzhen Guangdong 518040, China

Abstract: Laboratory bioassay and pot experiment in greenhouse were made to study the nematicidal activity and control efficiency of clausenamide nano-microemulsion (NMEC) against *Radopholus similis*. Determination of nematicidal activity against *R. similis* showed that the nematicidal activity of NMEC was enhanced with increasing treatment time. The nematicidal activity of NMEC was no higher than that of other nematicides studied with 12 h-treatment, but when *R. similis* was treated with 24 h, the nematicidal activity of NMEC was higher or significantly higher than that of the conventional clausenamide and was non-significantly different from that of other chemical nematicides. When *R. similis* was treated with 48 h, the nematicidal activity of NMEC was higher or significantly higher than that of all the other nematicides and, at lower dosage, it gave a nematicidal activity comparable with or close to that of other nematicides at higher dosages. The corrected mortality of nematodes treated with 1 mL NMEC (400 mg/L) for 48 h was up to $99.33 \pm 0.67\%$. In the pot experiment, the control efficiency of NMEC on burrowing nematode disease of *Anthurium andraeanum* was significantly better than that of the conventional clausenamide. When the dosage of NMEC was 1 mg/pot or above, its control efficiency on *R. similis* was non-significantly different from that of ethoprophos and fenamiphos. The disease progression of anthurium was 1 ± 0.32 when the dosage of NMEC was 4 mg/pot, significantly lower than that of the treatments with an NMEC dosage of 1 mg/pot and 2 mg/pot.

Key words: clausenamide nano-microemulsion; nematicidal activity; control efficiency; *Radopholus similis*

