



徐汉虹, 赖 多, 张志祥. 植物源农药印楝素的研究与应用[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(4): 1-11.

植物源农药印楝素的研究与应用

徐汉虹¹, 赖 多², 张志祥¹

(1 天然农药与化学生物学教育部重点实验室/华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642;

2 广东省农业科学院 果树研究所/农业部南亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要:印楝素是目前世界上最优秀的植物源农药,田间登记应用已 30 多年,对全球作物保护和生态安全发挥了重要的作用。本文回顾了印楝素的发现和印楝在中国引种情况,总结了印楝素结构鉴定与全合成的历程,重点介绍印楝素拒食、抑制昆虫生长发育、诱导细胞凋亡和自噬的分子作用机理以及印楝分子生物学、印楝素生物合成研究的最新进展。1983 年,赵善欢等成功地将印楝引种中国,随后我国许多学者开展印楝引种与繁育,种植面积曾超过 6 万 hm²,为我国印楝素杀虫剂的规模化生产提供了原料保障。1997 年印楝素以新化合物结构作为新农药在我国登记,实现了商业化应用,2014 年成为农业部推荐使用的低毒低残留农药主要品种,获得了显著的经济和生态效益。我国学者发现了印楝素诱导细胞自噬现象,阐明了印楝素诱导细胞凋亡和自噬的分子调控机理。随着强化农产品质量安全的源头控制,印楝素的研究和应用将会越来越深入普及。今后要进一步加强基础研究,明确印楝素的分子靶标,为印楝素的科学使用提供理论基础。

关键词:印楝素; 印楝; 植物源农药; 拒食; 抑制生长发育

中图分类号:S482.1

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2017)04-0001-11

Research and application of botanical pesticide azadirachtin

XU Hanhong¹, LAI Duo², ZHANG Zhixiang¹

(1 Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education/College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Azadirachtin is primarily known as an effective botanical insecticide, it has been widely used in field practice for more than 30 years, and plays an important role in the global crop protection and ecological security. In this review, we traced the discovered history of azadirachtin and the situation of neem introduction, and summarized the molecular mechanism inducing autophagic apoptosis, the latest progresses of molecular mechanism and biosynthesis of azadirachtin, as well as molecular biology. The neem tree, *Azadirachta indica* A. Juss, was first introduced by Shin-Foon Chiu's group into China in 1983, and then Chinese scholars made great efforts to introduce and breed neem tree, planted more than sixty thousand hectares of neem trees, which provided material guarantee for the large-scale production of azadirachtin pesticide in China. The commercial application of azadirachtin was authorized by China's Ministry of Agriculture(CMA) as a new insecticide in 1997. Azadirachtin had become the main low toxicity and low residue pesticide recommended by CMA in 2014, and resulted in good social and ecological benefits. Chinese scholars discovered that azadirachtin could induce autophagy in insect cell, and illuminated the molecular regulation mechanism of apoptosis and autophagy induced by azadirachtin. As strengthe-

收稿日期:2017-02-22 优先出版时间:2017-06-21

优先出版网址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20170621.1923.004.html>

作者简介:徐汉虹(1961—),男,教授,博士,E-mail:hhxu@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(31471793,31601699);广东省应用型科技研发专项资金项目(2015B020230012)

ning the source control of quality and safety for agricultural product, the research and application of azadirachtin will be more and more widespread. The basic research should be intensified for future work to find out the molecular target of azadirachtin, which will provide a theoretical basis for scientific application of azadirachtin.

Key words: azadirachtin; neem; botanical pesticide; antifeedant; growth and development inhibition

印楝素(Azadirachtin)是一种柠檬苦素类活性物质,属于四环三萜类化合物,主要从印楝 *Azadirachta indica* A. Juss(图1)中分离提取,此外在非楝 *A. excelsa*^[1]、泰楝 *A. siamensis*^[2] 以及印楝内生真菌 *Eupenicillium parvum*^[3] 中也发现存在。印楝素是目前世界上公认的活性最强的拒食剂,对大多数昆虫和其他节肢动物的生长发育具有良好抑制作用,对脊椎动物安全,被认为是最优秀的生物农药之一,也是目前商品化开发最成功的植物源杀虫剂。由于其优越的生物活性、独特的作用机理和复杂的化学结构,印楝素一直是农药学乃至整个植物保护学科领域的研究热点,国内外有关印楝素和印楝的文献报道已超过2 000篇。近年来,印楝基因组的解析为印楝素生物合成途径提供了更多遗传信息,印楝素也成为我国农业部推荐使用的低毒低残留农药主要品种,其分子作用机理研究等方面也取得了较大的进展。随着我国化学农药零增长政策的实施,印楝素生物农药的应用会越来越普遍,影响越来越深远。为了更好地促进印楝素的健康发展,本文对印楝素的发现及历史、化学特性与合成、作用机理,特别是我国引种印楝及其开发应用等进行了总结和分析。



图1 印楝树及其花和果

Fig.1 The tree, flower and fruit of neem, *Azadirachta indica*

1 印楝素与印楝

1.1 印楝素的发现及历史

印楝素的名字始于印度一种名为印楝的植物
<http://xuebao.scau.edu.cn>

(图1),而它的发现源于苏丹的一场蝗灾。1959年,德国著名昆虫学家 Schmutterer 教授在苏丹学习考察过程中目睹成千上万蝗虫入侵后,几乎所有植物被吃尽,唯独印楝树的叶子完好无损。回国后,他在德国基尔大学发起了从印楝树中分离对蝗虫具有拒食或忌避作用活性成分的倡议,由此引起西方国家学者对印楝的研究热潮^[4-5],他也被誉为“现代印楝之父”。然而,印楝素在印楝叶子中含量极低,不易分离得到。直到1968年,印楝素才被 Butterworth 等^[6]从印楝的种子中分离出来,并命名为 Azadirachtin。随后,印楝素另一种生物活性也被发现,即对害虫具有强烈的抑制生长作用^[7]。印楝素的发现正好是《寂静的春天》出版引起全球对农药残留关注和美国禁止使用 DDT 法令颁布的时候,因而它的出现极大地引起了人们对天然农药的关注^[4]。1980年 Schmutterer 教授在德国组织召开了第1次国际印楝大会,主题为印楝及其生物活性^[8]。至今,在德国、印度、肯尼亚、加拿大、澳大利亚和中国等国家先后召开了8次国际印楝大会。我国于2001年在昆明还召开了印楝产业化发展国际研讨会,专门探讨印楝素的研究与开发,由此可见印楝素在天然农药中具有举足轻重的地位。

印楝素是一系列类似化合物的统称,包括印楝素 A、B、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、O、P、Q 等15种(图2),其中,印楝素 O、P 和 Q 是2005年 Kanokmedhakul 等^[9]从非楝中分离出来的。事实上,这种命名源于过去对印楝素结构相似性的误解。1986年, Klenk 等^[10]从印楝中鉴定出一种与印楝素具有相同活性的新化合物 3-tigloylazadirachtol。限于当时的技术水平,对印楝素结构认识仍很模糊, Rembold^[11]将 3-tigloylazadirachtol 误认为印楝素的同分异构体,从而引入了印楝素 A、B、C、D 的名字。然而,除印楝素 C 未分离鉴定外,严格意义上,印楝素 A、B、D 并不是同分异构体,而是3个不同类型的化合物^[4]。尽管如此,后人依然以此为参照将印楝或其他楝属植物中分离得到的系列类似化合物分别命名为印楝素 E、F、G 等,并沿用至今。

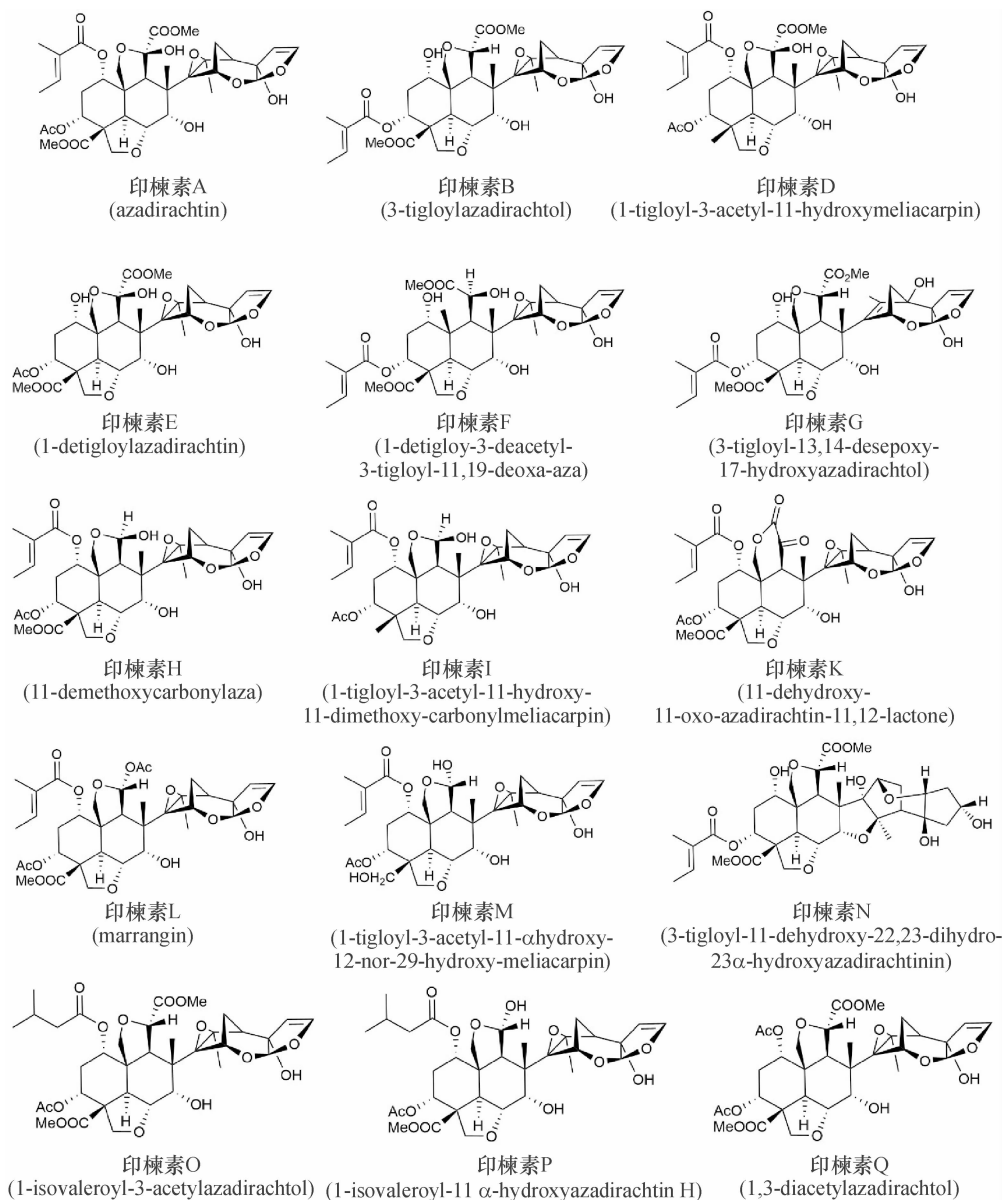


图2 印楝素 A ~ Q 的结构

Fig. 2 The structures of azadirachtins A ~ Q

1.2 印楝素的化学特性

在印楝素 10 多种类似物中,印楝素 A 的含量最高、拒食活性最强。值得注意的是,通常所说的印楝素是指印楝素 A,其 CAS 登录号为 11141-17-6,分子式 $C_{35}H_{44}O_{16}$,相对分子质量 720.71。另一个重要成分是印楝素 B (3-tigloylazadirachtol),其 CAS 登录号为 95507-03-2,分子式 $C_{33}H_{42}O_{14}$,相对分子质量 662.69。印楝素 B 化学结构与印楝素 A 相似,含量和拒食活性低于印楝素 A,但抑制昆虫生长发育的活性比印楝素 A 高。

印楝素 A 是无色或略带黄色的结晶或结晶性粉末,味微苦,熔点 $174\text{ }^{\circ}\text{C}$,旋光度 $-13.1 (c=1.75, \text{丙酮})$ 或 $-71.4 (c=0.21, \text{CHCl}_3)$,易溶于丙酮、乙醇、甲醇、二甲基亚砜等极性有机溶剂,微溶于水、氯仿

和苯,分子中具有酯基、环氧基和烯醚基等不稳定基团,在紫外光、阳光和高温下极易分解。

印楝素属于四环三萜类化合物,其化学结构大体可分为十氢化萘和三环呋喃左右两部分,共含有 16 个手性中心,包括 7 个季碳、9 个仲碳和 16 个氧原子^[12]。这使其化学结构鉴定变得十分困难,印楝素自分离到结构的确定一共耗费了 17 年时间。1975 年,Zanno 等^[13]提出了印楝素的第 1 个化学结构,尽管后来被证明是错误的^[14-15],但对印楝素正确的化学结构解析起到了一定的推动作用;至 1985 年,印楝素的化学结构才被 Bilton 等^[14]正确地解析出来,随后得到了 X 射线晶体结构数据^[16]和核磁共振 NMR 图谱证实^[17],成为印楝素化学结构鉴定史上的转折点。

1.3 印楝的分布及其在中国的引种

印楝属于楝科楝属常绿乔木,原产于印度次大陆印度、缅甸等地,现广泛分布于中南半岛、印度尼西亚、西非以及南美洲等热带亚热带干旱地区。早在1 000多年前,当地人就发现印楝在治疗麻风病、牙龈炎、皮肤病等方面的神奇功能,印楝树被当地土著居民封为“神树”。至1959年Schmutterer发现其具有杀虫活性后,全球兴起种植印楝的热潮。1993年,国际印楝网络(International Neem Network, INN)成立并致力于印楝种源的遗传改良、适应性评价和推广种植。联合国粮食及农业组织、联合国亚太经济与社会理事会、国际林业研究组织联盟等组织,推荐印楝为南亚、东南亚和非洲等干热地区优先发展的树种^[18],现已被引种到中国、美国、澳大利亚、斐济和毛里求斯等50多个国家。

印楝由于含有活性物质——印楝素而著名,联合国报告中称其为“20世纪对当地居民的最大恩赐”,被美国农业部誉为“可解决全球问题的树”^[19]。印楝是印楝素生物农药产品加工的唯一原料,大多

数研究都是围绕如何提高印楝中印楝素含量开展。印楝素含量差异主要取决于印楝的品种,也会受种植地气候条件(如温度、湿度、雨水)影响。根据生物气候区和纬度,印楝种源(原产地品种)被国际印楝网络划分为25个^[20],其中印度的种源最多,有8个(表1)。印楝从第2—3年开始结果,成熟的楝树可收获果实20~50 kg,收获期可延续几十年。印楝素在不同收获期果实中含量差异显著,随绿果形成而开始积累,大约10 d后含量达到了最大值,之后随着种子中油脂的积累,印楝素含量会稍微降低^[21]。有研究报道可通过人工接种丛枝菌根来提高印楝种子中印楝素的含量^[22]。印度学者则发现喷施多胺类物质(如腐胺、亚精胺和精胺)可提高印楝种子中印楝素的含量^[23]。但是,这些技术措施在实际生产中均未得到推广应用。

印楝在我国无自然分布,1983年赵善欢首次将印楝从国外引入华南农业大学昆虫毒理研究室杀虫植物标本园并试种成功^[24]。为了发展印楝素生物农药的原料基地,1986年赵善欢等^[25]又成功地从非洲

表1 国际印楝网络划分的印楝种源概况^[20]

Tab.1 Neem seed sources summarized by the International Neem Network

种源序号	种源地名	纬度	经度	海拔/m	年均降雨量/mm	旱季	采集期
01/BGD/Naz	孟加拉	22°38'N	91°44'E	15~25	2 800	9—4月	5—6月
02/BGD/Cha	孟加拉	24°41'N	87°54'E	17	1 540	10—3月	6月中—7月中
03/IND/Man	印度	26°18'N	73°01'E	224	373	9—6月	6月中—7月中
04/IND/Chi	印度	14°02'N	76°04'E	615	417	3—6月	6月末—7月
05/IND/All	印度	25°28'N	81°54'E	320	910	3—6月	6月末—7月初
06/IND/Ann	印度	11°17'N	77°07'E	360	875	3—6月	6月中—7月中
07/IND/Gha	印度	13°22'N	77°34'E	950	741	3—6月	7月
08/IND/Sag	印度	21°51'N	78°45'E	527	1 405	3—6月	6月末—7月初
09/IND/Bal	印度	19°51'N	79°25'E	250	1 000	4—6月	6—7月
10/IND/Ram	印度	19°05'N	83°49'E	250	1 100	3—6月	6月
11/LAO/Vie	老挝	18°00'N	102°45'E	180	1 540	11—3月	4—5月
12/MYA/Yez	缅甸	19°51'N	96°16'E	100	1 269	11—5月	5—7月
13/MYA/Mye	缅甸	22°03'N	95°13'E	76	809	11—4月	5—7月
14/NEP/Lam	尼泊尔	27°52'N	82°31'E	350~440	1 500	11—5月	5—7月
15/NEP/Get	尼泊尔	28°46'N	80°34'E	170	1 725	11—4月	5—7月
16/PAK/Tib	巴基斯坦	28°24'N	70°18'E	115	140	4—6月,10—2月	6—7月
17/PAK/Mul	巴基斯坦	30°11'N	71°29'E	>150	276	10—2月	6—7月
18/SRL/Kul	斯里兰卡	07°08'N	80°0'E		1 397	1—2月,7—8月	7月
19/THA/Tun	泰国	09°09'N	99°07'E	4	1 755	1—4月	3—4月
20/THA/Non	泰国	14°05'N	99°40'E	40	1 145	11—3月	3—4月
21/THA/Bo	泰国	16°17'N	103°35'E	150	1 400	10—4月	3—4月
22/THA/Doi	泰国	17°57'N	98°41'E	300	1 250	11—4月	3—4月
23/GHA/Sun	加纳	07°21'N	02°21'W	950~1 000	1 270~1 400	12—3月	6—8月
24/SEN/Ban	塞内加尔	14°30'N	17°02'W	50	436	10—6月	8月
25/TAN/Cha	坦桑尼亚	06°20'S	35°50'E	1 030	475		3月

多哥将印楝树大面积引种到海南万宁县和广东省徐闻县,并建议在海南岛、雷州半岛和云南省西双版纳等地推广种植。印楝在引种地正常开花结果,果仁中印楝素含量与原产地相当。自此以后,我国开始大规模引种印楝,华南农业大学和中国林业科学研究院资源昆虫研究所等机构相继开展了大量的印楝引种、选育和驯化工作。原成都绿金生物科技有限公司董事长吴成奎在印楝种植和产业化方面作出了重要贡献,解培惠在攀枝花建立了印楝种质资源圃。目前,我国已成为世界上印楝人工种植面积最大的国家,高峰时云南省、四川省、海南省和广东省雷州半岛等地区种植面积曾超过 6 万 hm^2 ^[26],创造了我国植树史上继橡胶引种后的又一创举,为我国印楝素杀虫剂的规模化生产提供了原料保障。此外,印楝的大面积推广种植不仅具有构筑长江上游生态屏障、改善生态环境等生态效益,也为云南及四川金沙江、元江和怒江的广大农民开辟了一条脱贫致富的新路,对保护生态环境、防止水土流失、改良土壤、发展山区经济、促进农业可持续发展均具有重大的意义和深远的影响。在这过程中,我国政府及有关部门对印楝种植与开发极为重视,国家林业局、云南省科委及生物资源开发创新办公室均立项对印楝进行引种栽培和综合利用研究,云南省将印楝列为生物资源重点发展项目之一,四川省将印楝引种列为省府督办的 1 号工程,海南省把印楝种植作为建设生态省的重要项目。2001 年,时任国务院总理朱镕基在听取了华南农业大学笔者有关印楝项目的汇报后,对印楝的生态保护作用给予了高度评价。2007 年,笔者领衔的“印楝生态林建设与印楝环保农药的研究推广”项目获得了原国家环境保护总局授予的“环境保护科学技术一等奖”。

21 世纪初期,印度科学家提出印楝基因组计划并于 2011 年宣告完成。该计划通过对印楝基因组测序分析,揭示印楝基因组大小为 364 Mbp,编码约 2 万个基因,进化上与芸香科植物甜橙 *Citrus sinensis* 近缘^[27-28],其序列信息可从印楝基因组数据库获得 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA176672>)。目前,对印楝不同组织(根、茎、叶、花和果实)的转录组测序也相继完成^[27, 29-30],与此同时我国科研人员也完成了国内种植的印楝的转录组测序^[31]。为全面揭示印楝中活性物质柠檬苦素类化合物的生物合成途径奠定了基础,也意味着对印楝的研究进入了分子生物学阶段。

2 印楝素的制备与合成

2.1 印楝素的生产制备

印楝的种子、叶片、枝条和树皮等多个部位均含

有印楝素,其中种子的印楝素含量最高, w 通常为 0.3% ~ 0.5%,个别品种最高可达 1%。但是种子收获具有季节性,生产供给能力有限,其贮藏条件也对后续制备产生影响。国内外学者尝试通过植物组织培养技术对印楝素进行大规模稳定生产^[32-37],但 这些技术仍需优化。目前印楝种子仍是提取制备印楝素的唯一有效途径。

印楝素的工厂化生产关键在于其原药提取制备工艺,通常包括以下 2 步:1) 去油:压榨印楝种仁,得到印楝油,压榨后的残渣即是印楝饼。将印楝饼粉碎,得到种仁粉,该粉是生产印楝素原药的主要原料。2) 印楝素原药的制备:以印楝种仁粉为原料制备,常用提取方法主要有溶剂萃取法、超临界萃取法和微波萃取法。其中,溶剂萃取法使用最多、最成熟;超临界萃取法由于整个分离过程在暗场中进行,萃取温度接近室温,特别适合对光热不稳定的印楝素提取。

2.2 印楝素的化学合成

实现印楝素化学合成是解决印楝素产品加工原料不足的重要手段。国内外许多研究人员对印楝素的全合成和骨架合成进行了大量研究。印楝素的化学结构复杂,是 C - 开环柠檬素类化合物,由于 C-8 和 C-14 的位阻使得 C-8 和 C-14 相连接困难。英国剑桥大学 Ley 教授的研究组于 2007 年首次完成了印楝素的全合成,整个过程包括 71 步反应,其中一个片断需 48 步反应才能得到,最终总收率仅为 0.000 15%^[5,38]。由于合成路线长、收率低,Sanderson^[39]称这一合成手段根本不具备实际生产意义,还不如从印楝种仁中直接提取分离方便。随后,Ley 等^[40]开始优化印楝素合成路线,并成功将其中一个片段的合成由 26 步缩短到 17 步。尽管无法实现工厂化生产,但是 Ley 等的研究工作在复杂天然产物的全合成探索中仍然具有重要的里程碑意义,不仅为后人化学合成印楝素提供了思路,而且有助于人们更好地了解印楝素分子的中间代谢物及其衍生物对昆虫的生物活性。

在印楝素及其衍生物的结构关系研究方面,Yamasaki 等^[41]研究表明印楝素 A 的 C-22 与 C-23 位双键氢化加成后,明显增加了分子稳定性,而且印楝素的羟基对生物活性具有重要贡献,当具有亲油基团时活性较高。Simmonds 等^[42]指出印楝素母体分子碳环上 C-7、C-11、C-22 和 C-23 是决定生物活性的关键位置,基因取代能明显影响其活性。有学者认为印楝素母体分子结构的微小改变可能导致其对昆虫行为反应的变化。Madyastha 等^[43]利用生物催化法对印楝素的官能团和主体骨架进行修饰,所得化合物对昆虫具有较好的拒食活性。印楝素 C-12 位的一

COOCH₃ 不是其活性基团,但可明显提高其生物活性,将—COOCH₃ 降解为—COOH,其生物活性有所降低,但没有出现质的改变,C-12 水解的印楝素 A 对小菜蛾 *Plutella xylostella*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫具有较好的生物活性^[44-45]。

2.3 印楝素的生物合成

由于印楝素化学合成的难度大,人们便把目光转向其生物合成。早期的研究主要集中于印楝素生物合成的化学代谢途径,近年来,随着基因组和转录组技术发展,人们企图去探明参与印楝素生物合成的关键基因或蛋白。借助放射性同位素示踪法,Akhila 等^[46]利用标记的乙酸和甲羟戊酸来研究印楝素及其类似物 Nimbin 和 Salannin。尽管目前对其确切的合成途径还不清晰,但已初步描绘了印楝素生物合成的框架。类固醇三萜甘遂醇(Tirucallol)被认为是印楝中柠檬苦素三萜类次生代谢物的前体物^[20,47]。首先,两分子法呢烯基焦磷酸(Farnesyl diphosphate, FPP)结合形成甘遂醇,甘遂醇通过烯丙基异构化反应生成丁酰鲸鱼醇(Butyrospermol),丁酰鲸鱼醇被氧化重排形成 Apotirucallol;接着, Apotirucallol 侧链末端的 4 个碳被去除^[47-48],其余的碳环化形成呋喃环,然后进一步被氧化形成碳开环柠檬苦素类似物,如印楝二酮(Azadiradione)、Nimbin、茄碱昔(Salanin)^[20,47,49];最后,茄碱昔分子进一步氧化和环化形成印楝素以及 Meliacarpin、Azadirachtol^[4,50],但是目前尚不能够明确这 3 个化合物形成的先后次序。

在分子生物学方面,印楝素在植物体内的生物合成途径研究正处于起始阶段,尽管取得了一些进展,但其合成机制仍不清楚。印楝素是印楝中一种高度氧化的柠檬苦素类化合物,初始合成路径分为 4 个阶段:第 1 阶段,合成 C5 骨架的异戊烯基焦磷酸(IPP)和其双键异构体二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP);第 2 阶段,在法呢烯基焦磷酸合成酶作用下 DMAPP 加上 2 分子的 IPP 合成具有 C15 骨架的法呢烯基焦磷酸(FPP);第 3 阶段,2 分子 FPP 在鲨烯合成酶的作用下生成 C30 骨架的鲨烯,接着在鲨烯环氧酶催化下生成 2,3-环氧化鲨烯;第 4 阶段,2,3-环氧化鲨烯经过一系列的质子化、环化、重排和去质子化作用最终合成柠檬苦素类化合物。这 4 个阶段的合成反应需要多种酶参与完成,所涉及的酶大部分已清楚,但是对后续合成途径中甘遂醇至印楝素所需关键酶的了解很少。最近, Kuravadi 等^[30]联合第 2 代高通量测序和超高效液相色谱(UHPLC)技术对印楝果实、叶、花等各种组织的差异表达基因和印楝素类似物进行系统分析,通过权重

基因关联网络分析(Weighted correlation network analysis, WGCNA)算法获得了 150 多个可能涉及甘遂醇至印楝素合成途径的候选基因,其中转酮醇酶和脱氢酶等基因在印楝果实中高表达。Krishnan 等^[27]则认为倍半萜和三萜类化合物生物合成途径中 8 个基因 *PS21*、*lytB/ispH*、*ispE*、*GGPS*、*FDPS*、*FDFT1*、*SQLE* 和 (+)-neomenthol dehydrogenase 在印楝体内代谢合成印楝素中起到重要作用。

3 印楝素的生物活性与作用机理

3.1 印楝素的生物活性

印楝素的防治谱非常广,对鳞翅目 Lepidoptera、膜翅目 Hymenoptera、鞘翅目 Coleoptera 等 10 余目 400 多种农、林、储粮和卫生害虫有生物活性^[51];对害虫的作用方式多种多样,包括拒食、抑制生长发育、忌避、胃毒和绝育等作用,其中以拒食和抑制昆虫生长发育尤为显著,这 2 种作用方式在植物源农药研究中也最具代表性。

印楝素生物活性的研究已有很多报道, Schmutterer^[52]调查研究了印楝素对不同目昆虫的生物活性。华南农业大学昆虫毒理研究室从 1981 年开始对印楝提取物及印楝素的杀虫活性进行了研究,先后对菜青虫 *Pieris rapae*、斜纹夜蛾、小菜蛾、中华稻蝗 *Oxya chinensis*、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*、东亚飞蝗 *Locusta migratoria*、三化螟 *Tryporyza incertulas*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*、稻瘿蚊 *Orseolia oryzae*、玉米象 *Sitophilus zeamais*、米象 *S. oryzae*、荔枝蝽 *Tessaratoma papillosa*、柑桔红蜘蛛 *Panonychus citri*、柑桔潜叶蛾 *Phyllocnistis citrella*、马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus*、黄脊竹蝗 *Ceracris kiangsu*、青脊竹蝗 *C. nigricornis*、松突圆蚧 *Hemiberlesia pitysophila*、黑卵蜂 *Tiphodytes robertae*、拟环纹狼蛛 *Lycosa pseudoamulata*、家白蚁 *Coptotermes formosanus*、粘虫 *Mythimna separata* 和致倦库蚊 *Culex fatigans* 幼虫等 20 多种昆虫进行了生物活性测定^[53]。大多数研究都是用印楝不同部位提取物或印楝油来做试验,印楝素单体的活性效果往往不如那些含有大量活性未知的柠檬苦素类化合物的“印楝粗提物”;印楝粗提物中未知化合物、印楝油与印楝素具有协同增效作用^[54-55]。

3.2 印楝素的作用机理

3.2.1 拒食作用 一般认为,印楝素直接或间接地通过破坏昆虫口器上的化学感受器,刺激其特异性抑制型感觉细胞,或者阻断对取食刺激物(如蔗糖)起反应的感受器受体细胞的信号输入,从而抑制昆虫的取食行为。Simmonds 等^[56]对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 等鳞

翅目昆虫的神经生理学研究表明,印楝素可以刺激化学感受器上的抑制型神经元细胞,同时也会抑制对蔗糖敏感的神经细胞。Luo 等^[57]发现印楝素对菜青虫中间的栓锥感觉器的抑制型感受细胞虽然有很强的刺激作用,但对两侧栓锥感觉器的蔗糖、氨基酸和芥子糖苷感受细胞没有作用。Mordue 等^[58]对多食性和寡食性昆虫研究显示,印楝素及其大部分类似物对化学感受器的抑制型神经元细胞都有刺激作用,而多食性和寡食性昆虫对印楝素敏感性有较大的差异,但不能确定这种差异是否与化学感受器上神经元受体的特异性和密度有关。

Qiao 等^[59]利用电生理膜片钳技术在果蝇离体脑组织水平上研究了印楝素的拒食作用机理,发现印楝素通过抑制果蝇食道下神经节(Suboesophageal ganglion, SOG)区中间神经元的钙离子通道,降低胆碱能兴奋性突触后电流(mEPSCs)的频率,进而抑制 SOG 区胆碱能神经信号的传导。昆虫大多数味觉神经元投射于 SOG, SOG 是初级味觉信息的处理中心,与取食行为密切相关。推测印楝素通过抑制昆虫 SOG 兴奋性胆碱能突触传递和钙离子通道,干扰昆虫神经中枢系统信息传导和处理,从而起到对昆虫的拒食作用。

3.2.2 抑制生长发育 抑制昆虫生长发育是印楝素最显著特点之一。印楝素处理会导致昆虫体内蜕皮激素的滴度发生变化,如峰期延迟、下降或滞留时间延长,使其表现出不能正常蜕皮、蜕皮受阻死亡、蜕皮后形成幼虫-蛹中间体、畸形蛹、羽化延迟或永久幼虫等典型症状。为此, Ruscoe 等^[7]认为印楝素的结构与 20-羟基蜕皮酮(即蜕皮激素)相似,可能直接与蜕皮激素竞争其受体从而抑制生长发育。实际上,这种观点是错误的,那是在印楝素化学结构尚未解析前对两者的误解。Koolman 等^[60]采用放射免疫法研究发现,印楝素并没有竞争蜕皮激素,也没有与蜕皮激素受体结合的活性,表明印楝素不能直接与蜕皮激素受体结合。此外,应用放射免疫技术对离体培养前胸腺(添加印楝素及促前胸腺激素 PTTH)的研究表明,印楝素对前胸腺合成蜕皮激素没有直接作用^[61-62]。说明蜕皮激素滴度的下降很可能是印楝素作用靶器官后的间接结果。赵善欢等^[63]发现印楝素可导致亚洲玉米螟大脑萎缩,咽侧体和心侧体表现为稍肿大并较透明,前胸腺表现出病理变化症状。而放射性同位素标记印楝素的研究显示:印楝素对飞蝗若虫脑神经分泌蛋白的合成或释放具有抑制作用,但是印楝素不能突破血脑屏障,只能分布其周缘^[64-65]。也有研究认为,印楝素并不直

接干扰昆虫脑神经分泌蛋白的合成,只是间接影响其合成量^[66]。

近年来,印楝素抑制昆虫生长发育的机理研究在分子水平上取得了一些重要进展。Lai 等^[67]构建了印楝素作用下昆虫的差异基因表达谱,提出印楝素通过昆虫幼虫营养-胰岛素信号途径调控蜕皮激素、抑制幼虫生长发育。在此基础上,研究发现果蝇成虫盘是印楝素的重要靶器官,印楝素通过诱导幼虫成虫盘发生细胞凋亡,上调胰岛素样肽 *dilp8* 表达,进而降低 PTTH 的分泌;在果蝇 PTTH 神经元、全脑或全身 *ptth* 过表达可明显减缓或消除印楝素对果蝇幼虫生长发育的抑制^[68]。

也有学者认为印楝素对昆虫生长发育的抑制活性是由其拒食作用引起的间接效应。Mordue 等^[69]则认为印楝素拒食效应与抑制昆虫生长发育两者间是相互独立的作用方式。赖多^[68]利用昆虫取食行为和发育检测模型测定了印楝素对果蝇幼虫取食和发育的影响,结果表明印楝素拒食与抑制昆虫生长发育是 2 个相互独立的作用方式,印楝素抑制昆虫生长发育不是由拒食作用引起的。

3.2.3 诱导细胞自噬和凋亡 印楝素引起昆虫个体发生复杂的生理效应,很大程度上影响了其机理的研究。从 20 世纪 90 年代开始,印楝素的作用机理研究逐渐从虫体转到细胞水平。自 1993 年 Rembold 等^[70]报道印楝素可影响草地贪夜蛾卵巢细胞 Sf9 的增殖和蛋白合成后, β -微管蛋白^[71-72]、肌动蛋白^[73]和热激蛋白 Hsp60^[74]先后被认为是印楝素的可能靶标。但仍然难以解释印楝素引起昆虫生长发育抑制的复杂生理效应,例如,无法合理解析印楝素造成蜕皮激素滴度降低现象。

2008 年以来,华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室在国内率先从细胞水平探讨印楝素的作用机理,从细胞形态学上分别证明了印楝素能够抑制粉纹夜蛾 Hi-5、斜纹夜蛾 SL-1、草地贪夜蛾 Sf9 和粉纹夜蛾 BTI-Tn-5B1-4 等多种昆虫细胞增殖,影响细胞骨架正常功能,诱导细胞凋亡^[75-78]。进一步研究表明,印楝素可促使 Sf9 细胞中线粒体膜电位下降、p53 蛋白上调以及溶酶体通透性增加,从而诱发凋亡^[79-81]。Huang 等^[82]研究发现印楝素致使细胞死亡的另一条途径,诱导细胞发生自噬,并通过抑制信号通路 PI3K-AKT-Tor 的磷酸化水平而诱导自噬产生,同时通过线粒体途径激活 Caspase-3 引发凋亡,且印楝素诱导的自噬信号先于凋亡发生,并通过激活 *tAtg5* 分子开关促发自噬向凋亡转化(图 3)^[83-84]。

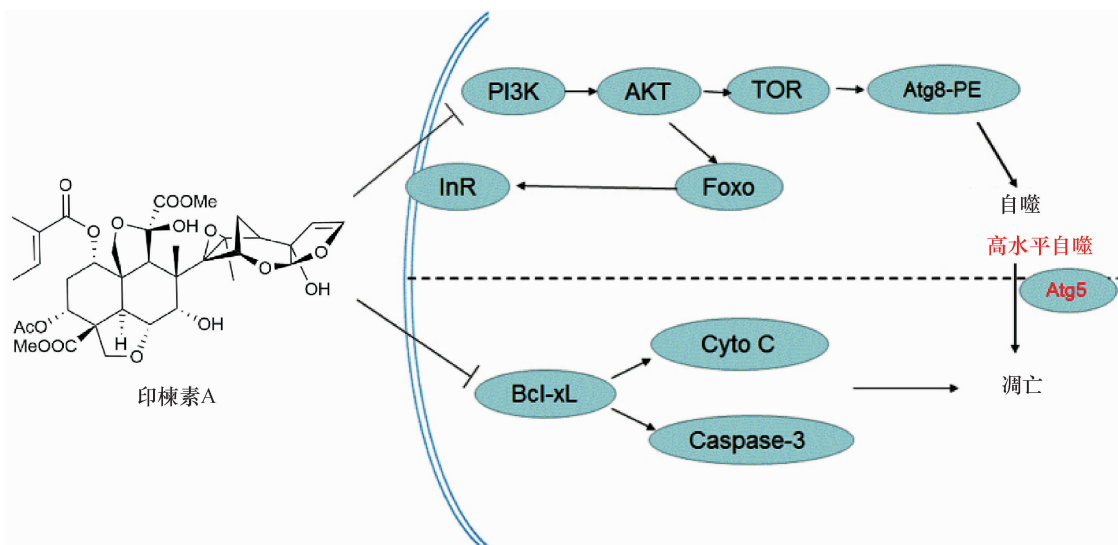


图3 印楝素诱导昆虫细胞自噬和凋亡的分子机理模型^[83]

Fig.3 A proposed mechanism underlying model of molecular -induced autophagy and apoptosis in insect cells

4 印楝素的应用和展望

4.1 印楝素产品在中国的登记和应用

自第1个商品化印楝素产品于1985年在美国获批登记,印楝素生物农药在全球得到了广泛应用。目前,印楝素产品在中国、印度、斯里兰卡、美国、德国、意大利、瑞士、澳大利亚、新西兰、墨西哥、智利、加拿大等20多个国家获得登记。

中国由华南农业大学开发出了商品化的0.3%印楝素乳油制剂,1997年以新结构化合物在国内首先获得临时登记^[85]。该制剂1999年获得“国家重点新产品”证书;2004年,印楝素植物性杀虫剂制剂获得首届“广东省发明专利金奖”。与华南农业大学建立校企合作的成都绿金生物科技有限责任公司是我国最早取得印楝素产品正式登记的生产企业,其产品主要包括10%印楝素母药和0.3%印楝素乳油。到2017年2月,我国共有印楝素生产企业13家,批准登记产品17个,其中包括2个原药、11个乳油制剂产品(含2个混剂)^[86]。目前,印楝素杀虫剂已成为我国三大植物性农药品种之一,2014年成为我国农业部推荐使用的低毒低残留农药主要品种,主要用于防治十字花科蔬菜上的小菜蛾、菜青虫和斜纹夜蛾,茶树的茶毛虫 *Euproctis pseudoconspersa* 和茶小绿叶蝉 *Empoasca pirusuga*,以及柑橘树的潜叶蛾、高粱的玉米螟、烟草的烟青虫、草原的蝗虫等害虫;在沙糖橘、荔枝、水稻、蔬菜等植物上都得到了成功的推广应用,在新疆草原的蝗虫、贵州仁怀高粱的蚜虫、四川雅安茶叶的叶蝉等害虫防治上取得了明显的经济效益和生态效益。

4.2 展望

印楝素作为全球公认的最优秀的生物农药,在 <http://xuebao.scau.edu.cn>

中国推广应用已20年,为从源头上保障我国农产品质量安全作出了重要贡献,是中国农药发展历史上里程碑式的农药品种,影响深远。它使植物保护工作的目的回归到保护作物,而不是杀死害虫。印楝素作为天然的典型昆虫拒食剂,引领了“和谐植保”、“生态植保”的植物保护可持续发展方向。新农药不再强调快速杀死害虫,而是要求害虫不再取食或减少取食为害,昆虫拒食剂、忌避剂、生长发育抑制剂成为新农药发展的新亮点,广大农业生产者通过印楝素的使用认识到非杀生型、缓效型农药的经济效益更加明显,使用更加安全、环境压力小,这为替代高毒农药提供了坚实的理论支撑和物质保障。

印楝素对高等动物安全,对大鼠急性经口 LD_{50} 值低至 $5\,000\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,属于相对无毒级。印楝素的成功推广应用改变了人们“农药即是毒药”的观念,引领农药向更加安全的方向发展。目前,我国的农业生产主体还是分散生产,从业者众、文化素质相对较低,其生产观念的改变是一个长期的过程。今后,需要政府加大政策和资金支持力度,扶植一批印楝素生产的龙头企业,巩固和发展“印楝种植-印楝素提取-生物农药配制-安全农产品生产”的绿色产业链;加强基础研究,进一步明确印楝素的分子靶标,为印楝素的科学使用提供理论基础。

2015年农业部实施农药使用量零增长行动计划,史上最严的《食品安全法》正式实施,2017年2月新修订的《农药管理条例》获得国务院审核通过,对农药提出了更高的要求。大力推广应用“生物农药、高效低毒低残留农药,替代高毒高残留农药”必将进一步提速,印楝素生物农药也将迎来发展的新契机。

参考文献:

- [1] ERMEL K, KALINOWSKI H O, SCHMUTTERER H. Isolierung und charakterisierung von marrangin, einer neuen, die insektenmetamorphose störenden substanz aus samenkernen des marrangobaumes *Azadirachta excelsa* (Jack)[J]. J Appl Entomol, 1991, 112(1/2/3/4/5): 512-519.
- [2] KALINOWSKI H O, KRACK C, ERMEL K, et al. Isolation and characterization of 1-tigloyl-3-acetylazadirachtol from the seed kernels of the Thai neem, *Azadirachta siamensis* Valetton[J]. Z Naturforsch B, 1997, 52(11): 1413-1417.
- [3] KUSARI S, VERMA V C, LAMSHOEFT M, et al. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss that produces azadirachtin[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2012, 28(3):1287-1294.
- [4] MORGAN E D. Azadirachtin, a scientific gold mine[J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(12): 4096-4105.
- [5] VEITCH G E, BOYER A, LEY S V. The azadirachtin story[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47(49): 9402-9429.
- [6] BUTTERWORTH J H, MORGAN E D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts[J]. Chem Commun, 1968(1): 23-24.
- [7] RUSCOE C N E. Growth disruption effects of an insect antifeedant[J]. Nature New Biol, 1972, 236(66): 159-160.
- [8] SCHMUTTERER H, ASCHER K R S. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants[C]// GTZ. Proceedings of the 1st international neem conference. Germany: GTZ, 1980: 297.
- [9] KANOKMEDHAKUL S, KANOKMEDHAKUL K, PRAJUABSUK T, et al. Azadirachtin derivatives from seed kernels of *Azadirachta excelsa*[J]. J Nat Prod, 2005, 68(7): 1047-1050.
- [10] KLENK A, BOKEL M, KRAUS W. 3-Tigloylazadirachtol (tigloyl = 2-methylcrotonoyl), an insect growth regulating constituent of *Azadirachta indica*[J]. J Chem Soc-Chem Commun, 1986(7): 523-524.
- [11] REMBOLD H. Focus on phytochemical pesticides[C]// JACOBSON M. The neem tree. Boca Raton: CRC Press, 1989: 47-67.
- [12] 徐汉虹, 何道航, 魏孝义, 等. 国产印楝种子中印楝素的结构鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(3): 20-22.
- [13] ZANNO P R, MIURA I, NAKANISHI K, et al. Structure of the insect phagorepellent azadirachtin: Application of PRFT/CWD carbon-13 nuclear magnetic resonance[J]. J Am Chem Soc, 1975, 97(7): 1975-1977.
- [14] BILTON J N, BROUGHTON H B, LEY S V, et al. Structural reappraisal of the limonoid insect antifeedant azadirachtin[J]. J Chem Soc-Chem Commun, 1985(14): 968-971.
- [15] KRAUS W, BOKEL M, KLENK A, et al. The structure of azadirachtin and 22, 23-dihydro-23 β -methoxyazadirachtin[J]. Tetrahedron Lett, 1985, 26(52): 6435-6438
- [16] BROUGHTON H B, LEY S V, SLAWIN A M Z, et al. X-ray crystallographic structure determination of detigloyldihydroazadirachtin and reassignment of the structure of the limonoid insect antifeedant azadirachtin[J]. J Chem Soc-Chem Commun, 1986(1): 46-47.
- [17] BILTON J N, BROUGHTON H B, JONES P S, et al. An X-ray crystallographic, mass spectroscopic, and NMR study of the limonoid insect antifeedant azadirachtin and related derivatives[J]. Tetrahedron, 1987, 43(12): 2805-2815.
- [18] BISWAS S A S, SINGH P, CHANDRA S. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss): A versatile multipurpose tree [J]. The Indian Forester, 1995, 121(11): 1057-1062.
- [19] Natinonal Research Council. Neem: A tree for solving global problems[M]. Washington D C: National Academy Press, 1992.
- [20] THOMSEN A, GRAUDAL L, HANSEN C P. International provenance trials of neem: Description of neem seed sources in the international neem network [EB/OL]. [2017-2-20]. <http://www.fao.org/DOCREP/005/AC618E/AC618E01.htm>.
- [21] JOHNSON S, MORGAN E D, PEIRIS C N. Development of the major triterpenoids and oil in the fruit and seeds of neem (*Azadirachta indica*)[J]. Ann Bot, 1996, 78(3): 383-388.
- [22] VENKATESWARLU B, PIRAT M, KISHORE N, et al. Mycorrhizal inoculation in neem (*Azadirachta indica*) enhances azadirachtin content in seed kernels[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24(7): 1243-1247.
- [23] SABHERWAL S. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) [M]. Germany: Lambert Academic Publishing, 2012: 212.
- [24] 张兴, 赵喜欢. 国产印楝树皮中印楝素测试初报[J]. 西北农业大学学报, 1992, 20(4): 90-94.
- [25] 赵喜欢, 张业光, 蔡德智, 等. 印楝引种试验初报[J]. 华南农业大学学报, 1989, 10(2): 34-39.
- [26] 徐汉虹, 张志祥, 查友贵. 中国植物性农药开发前景[J]. 农药, 2003, 42(3): 1-10.
- [27] KRISHNAN N M, PATTHAIK S, JAIN P, et al. A draft of the genome and four transcriptomes of a medicinal and pesticidal angiosperm *Azadirachta indica* [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 464.
- [28] KRISHNAN N M, JAIN P, GUPTA S, et al. An improved genome assembly of *Azadirachta indica* A. Juss [J]. G3: Genes Genom Genet, 2016, 6(7):1835-1840.

- [29] KRISHNAN N M, PATTNAIK S, DEEPAK S A, et al. De novo sequencing and assembly of *Azadirachta indica* fruit transcriptome[J]. *Curr Sci*, 2011, 101(12): 1553-1561.
- [30] KURAVADI N A, YENAGI V, RANGIAH K, et al. Comprehensive analyses of genomes, transcriptomes and metabolites of neem tree[J]. *Peer J*, 2015, 3:e1066.
- [31] WANG Y, CHEN X, WANG J, et al. Comparative analysis of the terpenoid biosynthesis pathway in *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* by RNA-seq[J]. *SpringerPlus*, 2016, 5(1):819.
- [32] SCHULTZ F A. Tissue culture of *Azadirachta indica* [C] // SCHMUTTERER H, ASCHER K R S. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants: Proceedings of the 2nd international neem conference. Eschborn: GTZ, 1984: 539-542.
- [33] KEARNEY M L, ALLAN E J, HOOKER J E, et al. Antifeedant effects of *in vitro* culture extracts of the neem tree, *Azadirachta indica* against the desert locust (*Schistocerca gregaria* (Forskål)) [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1994, 37(1): 67-71.
- [34] PRAKASH G, SRIVASTAVA A K. Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures [J]. *Process Biochem*, 2005, 40(12): 3795-3800.
- [35] 雷光富, 朱西儒, 张云开, 等. 印楝愈伤组织形成及其印楝素含量测定[J]. *热带亚热带植物学报*, 1998, (3): 267-270.
- [36] 杨国荣. 印楝固体组织培养条件及对印楝素含量的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [37] 张云竹, 方佳, 钟秋平. 响应面优化诱导子促进印楝悬浮细胞培养产印楝素的研究[J]. *热带农业科学*, 2015, 35(2): 86-91
- [38] VEITCH G E, BECKMANN E, BURKE B J, et al. Synthesis of azadirachtin: A long but successful journey[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, 46(40): 7629-7632.
- [39] SANDERSON K. Chemists synthesize a natural-born killer [J]. *Nature*, 2007, 448(7154): 630-631.
- [40] BOYER A, VEITCH G E, BECKMANN E, et al. Second-generation synthesis of azadirachtin: A concise preparation of the propargylic mesylate fragment [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(7):1317-1320.
- [41] YAMASAKI R B, KLOCKE J A. Structure-bioactivity relationships of azadirachtin, a potential insect control agent [J]. *J Agric Food Chem*, 1987, 35 (4): 467-471.
- [42] SIMMONDS M S J, BLANEY W M, LEY S V. Behavioral and neurophysiological responses of *Spodoptera littoralis* to azadirachtin and a range of synthetic analogs[J]. *Entomol Exp Appl*, 1995, 77(1):69-80.
- [43] MADYASTHA K M, VENKATAKRISHNAN K. Biocatalyst-mediated expansion of ring D in azadirachtin, a potent insect antifeedant from *Azadirachta indica* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40(28):5243-5246.
- [44] 张志祥, 程东美, 徐汉虹, 等. C₁₂ - 水解印楝素 A 的制备、结构鉴定及生物活性[J]. *天然产物研究与开发*, 2005, 17(4): 471-474.
- [45] 张志祥. 印楝素杀虫活性、稳定性及其衍生物的研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 1990.
- [46] AKHILA A, SRIVASTAVA M, RANI K. Production of radioactive azadirachtin in the seed kernels of *Azadirachta indica* (the Indian neem tree)[J]. *Nat Prod Lett*, 1998, 11(2): 107-110.
- [47] LEY S V, DENHOLM A A, WOOD A. The chemistry of azadirachtin[J]. *Nat Prod Rep*, 1993, 10(2):109-157.
- [48] DEWICK P M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach [M]. 3ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009: 187-310.
- [49] PURI H S. Neem: The divine tree *Azadirachta indica* [M]. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1999: 182.
- [50] AERTS R J, MORDUE (LUNTZ) A J. Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids[J]. *J Chem Ecol*, 1997, 23(9): 2117-2132.
- [51] 徐汉虹. 杀虫植物与植物性杀虫剂[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [52] SCHMUTTERER H. The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss and other meliaceous plants [M]. 2ed. Mumbai: Neem Foundation, 2002: 411-456.
- [53] 徐汉虹. 中国印楝产业化发展国际研讨会: 印楝在中国[J]. *农药*, 2001, 40(9): 47.
- [54] STARK J D, WALTER J F. Neem oil and neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43: 507-512.
- [55] 张志祥, 程东美, 徐汉虹, 等. 印楝油对印楝素的增效作用和保护作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2005, 17 (2): 199-202.
- [56] SIMMONDS M S J, BLANEY W M. Some effects of azadirachtin on *Lepidopterous* larvae[C] // SCHMUTTERER H, ASCHER K R S. Natural products from the neem tree and other tropical plants: Proceedings of the 2nd international neem conference. Eschborn: GTZ, 1984: 163-180.
- [57] LUO L, VAN LOON J J A, SCHOONHOVEN L M. Behavioural and sensory responses to some neem compounds by *Pieris brassicae* larvae[J]. *Physiol Entomol*, 1995, 20 (2): 134-140
- [58] MORDUE (LUNTZ) A J, SIMMONDS M S J, LEY S V, et al. Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects[J]. *Pesti Sci*, 1998, 54(3): 277-284.
- [59] QIAO J, ZOU X, LAI D, et al. Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila* [J]. *Pest Manag Sci*, 2014, 70(7):1041-1047.

- [60] KOOLMAN J, BIDMON H J, LEHMANN M, et al. On the mode of action of azadirachtin in blowfly larvae and pupae[C] // SEHNAL F, ZABZA A, DENLINGER D L. Endocrinological frontiers in physiological insect ecology. Wroclaw: Wroclaw Tech Univ Press, 1988: 55-67.
- [61] PENER M P, ROWNTREE D B, BISHOFF S T, et al. Azadirachtin maintains prothoracic gland function but reduces ecdysteroid titres in *Manduca sexta* pupae: *In vivo* and *in vitro* studies[C] // SEHNAL F, ZABZA A, DENLINGER D L. Endocrinological frontiers in physiological insect ecology. Wroclaw: Wroclaw Tech Univ Press, 1988: 41-54.
- [62] BARNBY M A, KLOCKE J A. Effects of azadirachtin on levels of ecdysteroids and prothoracicotropic hormone-like activity in *Heliothis virescens* (Fabr.) larvae[J]. J Insect Physiol, 1990, 36(2): 125-131.
- [63] 赵善欢, 张兴, 刘秀琼, 等. 印楝素对亚洲玉米螟幼虫生长发育的影响[J]. 昆虫学报, 1984, 37(3): 241-247.
- [64] REMBOLD H, SUBRAHMANYAM B, MULLER T. Corpus cardiacum: A target for azadirachtin[J]. Experientia, 1989, 45(4): 361-363.
- [65] SUBRAHMANYAM B, REMBOLD H. Effect of azadirachtin A of neuroendocrine activity in *Locusta migratoria* [J]. Cell Tiss Res, 1989, 256: 513-517.
- [66] SUBRAHMANYAM B. Inhibition of turn over neurosecretion by azadirachtin in *Locusta migratoria* [J]. J Insect Physiol, 1989, 35(6): 493-500.
- [67] LAI D, JIN X, WANG H, et al. Gene expression profile change and growth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin[J]. J Biotechnol, 2014, 185: 51-56.
- [68] 赖多. 印楝素调控果蝇幼虫变态发育的分子机理[D]. 广州: 华南农业大学, 2014.
- [69] MORDUE (LUNTZ) A J, BLACKWELL A. Azadirachtin: An update[J]. J Insect Physiol, 1993, 39: 903-924.
- [70] REMBOLD H, ANNADURAI R S. Azadirachtin inhibits proliferation of Sf9 cells in monolayer culture [J]. Zeitschrift Für Naturforschung C, 1993, 48 (5/6): 495-499.
- [71] NISBET A J, MORDUE (LUNTZ) A J, WILLIAMS L M, et al. Autoradiographic localization of [22 , 23 - $^3\text{H}_2$] dihydroazadirachtin binding sites in desert locust testes and effects of azadirachtin on sperm motility[J]. Tiss Cell, 1996, 28(6): 725-729.
- [72] NISBET A J, MORDUE (LUNTZ) A J, GROSSMAN R B, et al. Characterization of azadirachtin binding to Sf9 nuclei *in vitro* [J]. Arch Insect Biochem Physiol, 1997, 46(1/2): 78-86.
- [73] ANURADHA A, ANNADURAI R S, SHASHIDHARA L S. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid azadirachtin A [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2007, 37(6): 627-634.
- [74] ROBERTSON S L, NI W, DHADIALLA T S, et al. Identification of a putative azadirachtin-binding complex from *Drosophila* Kc167 cells[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2007, 64(4): 200-208.
- [75] 李文欧, 徐汉虹, 张志祥, 等. 印楝素 A 对粉纹夜蛾 Hi-5 细胞的毒性机理[J]. 昆虫学报, 2008, 51(8): 824-829.
- [76] 钟国华, 水克娟, 吕朝军, 等. 印楝素对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用[J]. 昆虫学报, 2008, 51(6): 618-627.
- [77] 程杏安, 黄劲飞, 胡美英, 等. 印楝素 A 诱导 Sf9 细胞凋亡的显微和超微形态变化[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(4): 52-58.
- [78] 黄星艳, 李文欧, 张志祥, 等. 印楝素 A 与印楝素 B 对粉纹夜蛾 BTI-Tn-5B1-4 的细胞毒性[J]. 昆虫学报, 2010, 53(6): 664-669.
- [79] HUANG J F, SHUI K J, LI HY, et al. Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* SL-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53 [J]. Pestic Biochem Phys, 2011, 99(1): 16-24.
- [80] HUANG J F, LV C, HU M, et al. The mitochondria-mediate apoptosis of Lepidopteran cells induced by azadirachtin[J]. PLoS One, 2013, 8: e58499.
- [81] WANG Z, CHENG X, MENG Q, et al. Azadirachtin-induced apoptosis involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2015, 64: 126-135.
- [82] HUANG X, LI W, XU H. Induction of programmed death and cytoskeletal damage on *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 cells by azadirachtin [J]. Pestic Biochem Physiol, 2010, 98: 289-295.
- [83] SHAO X, LAI D, ZHANG L, et al. Induction of autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/TOR pathways by azadirachtin A in *Spodoptera litura* cells[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35482.
- [84] 邵雪花. 印楝素 A 诱导斜纹夜蛾卵巢细胞自噬和凋亡的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [85] 张子明. 农药登记公告[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [86] 中华人民共和国农业部农药检定所. 农药登记数据 [DB/OL]. [2017-2-20]. <http://www.chinapesticide.gov.cn/hysj/index.jhtml>.

【责任编辑 周志红】