

# 鄂尔多斯半日花提取物的杀线虫作用

田蕾, 刘强\*

(天津师范大学 化学与生命科学学院, 天津 300074)

**摘要:** 为全面了解濒危植物半日花的价值, 测定并比较半日花不同浓度的 6 种提取物药液对松材线虫的生物活性, 选出有较强杀线虫活性的甲醇、乙醇及水提取物, 系统研究了提取物种类、浓度和处理时间对松材线虫死亡率的影响。三因素方差分析表明, 提取物种类(A)、处理浓度(B)和处理时间(C), 三因素的互作效应(A×B×C)和双因素互作效应(A×B, A×C, B×C)对线虫的校正死亡率都有极显著影响。最佳药液处理为: 水提取物在 6 mg·L<sup>-1</sup> 浓度时与 1 d 的作用组合和乙醇提取物在 3 mg·L<sup>-1</sup> 浓度时与 5 d 的组合, 以上两种组合的校正死亡率均达到 100%。比较水、乙醇提取物 5 d 中的 LC<sub>50</sub> 值, 确定水是提取活性物质的首选溶剂。

**关键词:** 鄂尔多斯半日花; 松材线虫; 三因素分析; 最佳处理组合; LC<sub>50</sub>

中图分类号: Q946.88 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)06-0851-05

## Nematicidal activity of extracts of *Helianthemum ordosicum* against *Bursaphelenchus xylophilus*

TIAN Lei, LIU Qiang\*

(College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China)

**Abstract:** To found out the value of *Helianthemum ordosicum*, the biological activities of six kinds of extract on different concentrations were determined and compared. And the carbinol, ethanol and water extracts which have strong nematocidal activity were selected from those extracts. The influences of extract types, treatment concentrations and treatment time on *Bursaphelenchus xylophilus* were investigated. Variance analysis of three factors showed *Helianthemum ordosicum*'s corrected mortality was extremely influenced by type (A), treatment concentration (B) and treatment time (C), interaction effect of three factors (A×B×C) and interaction effects between factors (A×B, A×C, B×C) had the same effect. The optimal treatment combinations were solved: one was the water extract 6 mg·L<sup>-1</sup> on the 1st day; the other was ethanol extract 3 mg·L<sup>-1</sup> on the 5th day, the *Helianthemum ordosicum*'s corrected mortalities of the above two combinations were all 100%. The water and carbinol extract's LC<sub>50</sub> in 5 days were compared, and the nematocidal activity of water extract were significantly stronger than others.

**Key words:** *Helianthemum ordosicum*; *Bursaphelenchus xylophilus*; analysis of three factors; the optimal treatment combination; LC<sub>50</sub>

鄂尔多斯半日花 (*Helianthemum ordosicum*) 属半日花科 (Cistaceae) 半日花属的矮小灌木, 分布于内蒙古西部鄂尔多斯高原海拔 1 000~1 300 m 的石砾质山麓上, 为西鄂尔多斯荒漠特有种, 属国家

二级濒危植物 (傅立国, 1992)。近年来许多学者对半日花进行了各方面多层次的研究, 在生物活性方面, 有研究表明半日花具有较强的抑菌活性和杀虫活性 (田蕾等, 2007; 杨文思等, 2007), 但尚无有关其

收稿日期: 2007-06-16 修回日期: 2008-01-26

基金项目: 国家自然科学基金 (30760018, 30060011, 30570344) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30760018, 30060011, 30570344)]

作者简介: 田蕾 (1982-), 女, 天津市人, 硕士研究生, 研究方向为保护生物学, (E-mail) tjianlei@126.com.

\* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: lqtjnu@126.com)

提取物对松材线虫的生物活性的报道。本研究对其杀线虫活性进行了初步研究,证明该植物中含有活性较强的杀线虫活性物质。这项研究为从该植物中研发杀线虫化合物或杀线虫农药的先导化合物奠定了基础;也为半日花的保护与科学利用提供了一定的依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 半日花提取物的提取

半日花植物样品采自内蒙古乌海市,阴干后用粉碎机粉碎,过 20 目筛,备用。有机溶剂提取物采用冷浸法。称取半日花粉末用足量的石油醚、乙酸乙酯、丙酮、无水乙醇和甲醇浸泡 7 d,用旋转蒸发仪蒸馏浓缩,得到膏状提取物;水提取物采用煮沸法。

### 1.2 松材线虫的培养

松材线虫以灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)培养基培养。用贝尔曼(Baermann)漏斗法分离收集,用无菌水冲洗 2 次后配成 10 000 条/mL 线虫液备用。

### 1.3 杀线虫活性测定

采用触杀法测定植物提取物对松材线虫的毒杀作用。将药液和线虫液加入 24 孔细胞培养板中,每隔 24 h 在解剖镜下检查每孔中线虫死亡数量。水提取物用蒸馏水稀释成不同浓度的溶液。有机溶剂提取物先用丙酮溶解,后用蒸馏水稀释,使丙酮在溶液中的含量低于 5%;对照组为相应体积比的溶液。每组数据重复 4 次。

校正死亡率(%) =

$$\frac{\text{对照组的生存率} - \text{处理组的生存率}}{\text{对照组的生存率}} \times 100\%$$

### 1.4 数据统计分析

用 SPSS 程序进行方差分析和 LSD 多重比较,线虫校正死亡率均经反正弦变换。根据预实验设置 7~11 个浓度梯度,用 SPSS 程序求取  $LC_{50}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 半日花不同溶剂提取物的杀线虫活性

6 种提取物在  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度时对松材线虫的毒杀作用如图 1 所示。水提取物杀线虫效果最好,5 d 中校正死亡率均达到 100%。无水乙醇提取物的杀线虫效果次之,前 3 d 的校正死亡率在 30%~50% 之间,后 2 d 则接近 100%。甲醇提取物前 2 d 的杀

线率较低,后 3 d 杀线活性增强,杀线率都增至 50% 以上。乙酸乙酯提取物在前 4 d 杀虫活性都很小,到第 5 天其杀线虫率突然急剧增强至 94.17%,推测此提取物的杀线虫作用缓慢,有延迟现象。丙酮和石油醚提取物的杀线虫效果都很差,5 d 中杀线率都在 10% 以下。6 种提取物中,水、乙醇、甲醇及乙酸乙酯提取物都有明显的杀线虫活性。

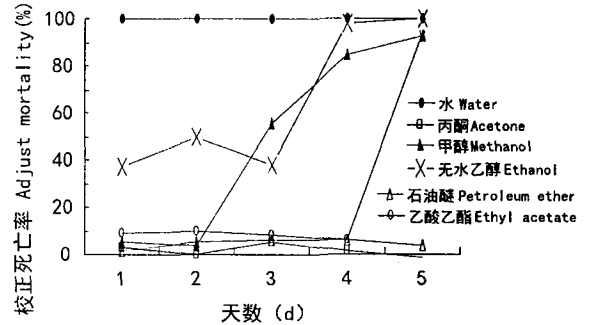


图 1 6 种提取物对松材线虫的杀线率  
Fig.1 The mortality rate of 6 kinds of extracts against *B. xylophilus*

### 2.2 提取物种类、浓度和处理时间对松材线虫死亡率的影响

2.2.1 提取物种类、浓度和处理时间对松材线虫死亡率的方差分析 通过对水、乙醇和甲醇 3 种提取物杀线活性进行种类、浓度及处理时间对松材线虫死亡率影响的方差分析,结果证明提取物种类(A)、浓度(B)和处理时间(C)以及三因素的互作效应(A×B×C)和双因素互作效应(A×B、A×C、B×C)对松材线虫校正死亡率的影响均达极显著水平(表 1)。

表 1 提取物种类处理浓度和处理时间对松材线虫校正死亡率的方差分析结果

Table 1 Variance analysis of different extracts, concentration and days against *B. xylophilus*

处理 Treatment	校正死亡率 Adjust mortality	
	F	Sig.
提取物种类(A) Extract type	129.732	0.000
处理浓度(B) Concentration	57.773	0.000
处理时间(C) Days	41.521	0.000
A×B	10.663	0.000
A×C	58.289	0.000
B×C	1.527	0.000
A×B×C	2.788	0.000

2.2.2 提取物种类在不同时间对松材线虫毒杀作用的多重比较 提取物种类在不同时间下对松材线虫

的毒杀作用,结果见表 2。水提取物在前 3 d 中对线虫的毒杀作用均强于甲醇和乙醇提取物,而在第 4、5 天中乙醇提取物的毒杀效果显著强于水和甲醇提取物。

表 2 提取物种类处理时间对松材线虫毒杀作用的多重比较结果

Table 2 Multiple comparisons of different extracts against *B. xylophilus* in different days

处理时间/d Days	提取物溶剂 Extractant	校正死亡率( SE)/% Adjust mortality
1	水 Water	65.4±2.1a
	甲醇 Methanol	6.2±3.5b
	乙醇 Ethanol	11.9±7.5b
2	水 Water	67.1±2.7a
	甲醇 Methanol	5.2±3.7b
	乙醇 Ethanol	16.2±3.9ab
3	水 Water	64.5±8.5a
	甲醇 Methanol	17.0±1.8b
	乙醇 Ethanol	20.9±6.8b
4	水 Water	43.8±9.6b
	甲醇 Methanol	19.5±3.5c
	乙醇 Ethanol	78.4±11.4a
5	水 Water	36.48±5.6b
	甲醇 Methanol	47.4±3.7b
	乙醇 Ethanol	96.9±15.4a

注: 表内数据为 4 次重复平均值, 同列数据后标有相同字母者表示在 5% 水平差异不显著。以下各表同。

Note: Data are means of four replications. Little letters which follow the data mean significant difference at  $P=0.05$ . The same below.

2.2.3 药液浓度在不同时间对松材线虫影响的多重比较 比较不同时间下药液浓度对线虫死亡率的影响, 见表 3。除第 5 天中  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理的线虫校正死亡率高于其他各浓度外, 其余各天中线虫的校正死亡率基本上是随药液浓度的增加而增加, 但各浓度间的死亡率差异并不显著。

### 2.3 提取物种类、浓度及处理时间对线虫毒杀作用的最佳处理组合

为了选出不同时间下杀线虫最适宜的提取物处理组合, 对每天中提取物种类和浓度对线虫的校正死亡率进行了多重比较, 结果如表 4。由表 4 可知, 最佳的药液处理组合分别为: 水提取物在  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度时与 1 d 的作用组合最佳; 乙醇提取物在  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度时与 5 d 的组合也为最佳, 以上两种组合的校正死亡率均达到 100%。

### 2.4 水和乙醇提取物的 $\text{LC}_{50}$ 值

求得杀线虫效果最好的水提取物和无水乙醇提取物 5 d 中的  $\text{LC}_{50}$  值, 水提取物的  $\text{LC}_{50}$  值依次为

表 3 处理浓度在不同时间对松材线虫死亡率的多重比较结果

Table 3 Comparisons of different concentration against *B. xylophilus* in different days

处理时间/d Days	处理浓度/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Concentration	校正死亡率( SE)/% Adjust mortality
1	0.5	8.1±2.6b
	1	16.3±4.6ab
	1.5	27.7±7.4ab
	2	37.8±2.4ab
	2.5	40.4±1.7ab
	3	38.0±8.9ab
2	6	52.8±2.3b
	0.5	-0.7±9.8b
	1	15.2±6.8ab
	1.5	30.7±4.6ab
	2	42.4±3.6b
	2.5	39.5±3.7ab
3	3	49.4±9.7a
	6	56.1±5.8ab
	0.5	11.3±4.9b
	1	17.0±6.8b
	1.5	35.1±7.7b
	2	42.2±6.3b
4	2.5	38.5±4.6b
	3	48.4±6.8b
	6	67.9±2.5a
	0.5	16.2±6.1c
	1	20.0±1.7c
	1.5	33.8±8.5bc
5	2	49.6±7.9bc
	2.5	45.1±2.3bc
	3	69.0±4.7ab
	6	94.6±8.6a
	0.5	42.5±7.1bc
	1	29.2±2.5c
	1.5	38.0±5.6c
	2	64.9±abc
	2.5	53.5±bc
	3	79.4±ab
	6	97.7±a

$1.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.69 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 乙醇提取物的  $\text{LC}_{50}$  分别为  $6.98 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $6.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $8.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.91 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。各天中水提取物的数值均显著低于乙醇, 进一步说明鄂尔多斯半日花水提取物中杀线虫活性物质的含量或者活性是最强的。

## 3 结论与讨论

(1) 从实验结果可看出, 在 6 种提取物中, 极性较强的水、甲醇、乙醇和乙酸乙酯提取物表现出较强

表 4 提取物种类及其浓度处理不同时间对松材线虫毒力的多重比较结果  
Table 4 Comparisons of different extracts, concentrations and days against *B. xylophilus*

处理时间 Time (d)	提取物种类及其浓度 Extractants and concentrations (mg · L <sup>-1</sup> )	校正死亡率(SE) Adjust mortality (%)	处理时间 Time (d)	提取物种类及其浓度 Extractants and concentrations (mg · L <sup>-1</sup> )	校正死亡率(SE) Adjust mortality (%)			
1	水 Water	0.5	18.6 ± 1.4ef	3	甲醇 Methanol	2.5	28.4 ± 4.2cde	
		1	35.7 ± 2.6de			3	13.4 ± 1.3de	
		1.5	59.5 ± 7.5cd			6	55.1 ± 3.5bc	
		甲醇 Methanol	2		87.2 ± 5.2bc	乙醇 Ethanol	0.5	14.7 ± 0.8de
			2.5		92.1 ± 11.7b		1	13.8 ± 2.1de
			3		64.4 ± 15.3cd		1.5	20.2 ± 2.7de
	6		100 ± 1.3a	2	16.4 ± 4.3de			
	0.5		1.24 ± 1.7f	2.5	19.8 ± 1.7de			
	1		1.75 ± 7.6f	3	23.8 ± 2.5de			
	乙醇 Ethanol	1.5	4.7 ± 2.1ef	水 Water	6	37.8 ± 3.5cde		
		2	4.6 ± 1.3ef		0.5	10.0 ± 4.6e		
		2.5	4.5 ± 1.6ef		1	-1.6 ± 9.7e		
		3	21.6 ± 2.7ef		1.5	17.2 ± 3.5cde		
		6	5.3 ± 1.1ef		2	53.8 ± 7.1abcde		
		0.5	1.0 ± 1.1f		2.5	33.1 ± 6.2cde		
		1	5.1 ± 1.6ef	3	94.3 ± 15.3ab			
		1.5	8.3 ± 4.3ef	6	100 ± 1.0a			
		2	5.0 ± 2.6ef	甲醇 Methanol	0.5	7.89 ± 4.6de		
		2.5	7.5 ± 1.2ef		1	1.5 ± 0.6e		
		3	19.1 ± 1.5ef		1.5	7.3 ± 1.4de		
		6	37.3 ± 1.6de		2	12.3 ± 2.6cde		
	2	水 Water	0.5		-6.2 ± 2.5d	乙醇 Ethanol	2.5	13.6 ± 3.2cde
			1		31.8 ± 1.8bcd		3	9.9 ± 1.6de
			1.5	65.8 ± 3.8b	6		84.2 ± 5.2abcde	
2			99.1 ± 3.8a	0.5	32.8 ± 7.3bcde			
2.5			91.1 ± 9.6bcd	1	67.3 ± 8.5abcde			
3			87.9 ± 7.4cd	1.5	82.5 ± 4.0abcde			
甲醇 Methanol		6	100 ± 1.3cd	2	81.4 ± 8.1abcde			
		0.5	0.3 ± 1.0cd	2.5	92.6 ± 13.2abcd			
		1	-0.5 ± 5.7cd	3	94.4 ± 11.6abc			
		1.5	2.8 ± 2.4cd	6	97.9 ± 10.9ab			
		2	-1.0 ± 6.4cd	5	水 Water	0.5	18.9 ± 9.0de	
		2.5	-0.5 ± 8.7cd			1	-5.8 ± 11.5e	
3	31.4 ± 5.3cd	1.5	-7.6 ± 21.5e					
6	3.7 ± 1.6cd	2	44.5 ± 2.5cd					
0.5	5.7 ± 2.1cd	2.5	22.1 ± 5.5de					
1	8.8 ± 5.1cd	3	83.3 ± 9.6abc					
乙醇 Ethanol	1.5	12.0 ± 3.7bcd	6	100 ± 3.7a				
	2	10.2 ± 1.3bcd	甲醇 Methanol	0.5	21.8 ± 3.5de			
	2.5	10.7 ± 1.7bcd		1	11.8 ± 2.6de			
	3	15.9 ± 0.8bcd		1.5	42.0 ± 8.5cd			
	6	50.0 ± 0.9bc		2	59.8 ± 6.9abcd			
	0.5	14.7 ± 3.2de		2.5	50.0 ± 3.6cd			
	1	27.0 ± 1.4de		3	53.4 ± 2.6bcd			
	3	水 Water	1.5	67.3 ± 5.7bc	乙醇 Ethanol	6	92.4 ± 3.8abc	
			2	89.1 ± 3.2b		0.5	94.6 ± 8.1abc	
			2.5	60.1 ± 1.3bcd		1	93.3 ± 13.9abc	
			3	93.0 ± 11.3bc		1.5	93.9 ± 6.8abc	
			6	100 ± 0.8b		2	97.3 ± 5.7abc	
0.5			3.2 ± 5.3e	2.5		99.4 ± 3.6ab		
甲醇 Methanol		1	6.9 ± 0.5e	3	100 ± 3.5a			
		1.5	6.9 ± 0.3e	6	100 ± 2.1a			
		2	5.2 ± 1.1e					

的杀线虫活性,而石油醚及丙酮提取物的杀线活性较弱。说明鄂尔多斯半日花的杀线虫活性成分主要分布于这个极性范围内,而且以极性最强水溶性的活性最强。(2)本文充分考虑了提取物种类(A)、浓度(B)和处理时间(C)以及三因素的互作效应(A×B×C)和双因素互作效应(A×B、A×C、B×C)对线虫校正死亡率的显著影响,选出两个最佳的药液处理组合:水提取物在 6 mg·L<sup>-1</sup>浓度时与 1 d 的作用组合、乙醇提取物在 3 mg·L<sup>-1</sup>浓度时与 5 d 的组合。

### 参考文献:

- 吴文君,刘慧霞,朱靖博,等. 1998. 天然产物杀虫剂——原理·方法·实践[M]. 西安:陕西科学技术出版社:338
- 郭郭,忻介六. 1998. 昆虫实验方法[M]. 北京:科学出版社:184—194
- 傅立国. 1992. 中国植物红皮书——稀有濒危植物[M]. 北京:科学出版社:2—18
- Chandradana MV, Eugene S. 1996. Nematicidal activity of some plant extracts[J]. *Nematol*, **26**:148—151
- Li DP(李典鹏), Liu JL(刘金磊), Chen HS(陈海珊), et al. 2007. Bioactivity of extract from *Heynea trijuga* against *Pieris rapae* larvae(海木提取物对菜青虫幼虫的生物活性)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(3):453—456
- Nonogaki H, Gee OH, Bradford KJ. 2000. A germination-specific endo-β-mannanase gene is expressed in the micropylar endo sperm cap of tomato seeds[J]. *Plant Physiol*, **123**:1 235—1 246
- Suresh Walia. 2003. An efficient method for the purification and characterization of nematicidal azadirachtins A, B and H using MPLC and ESIMS[J]. *Agric Food Chem*, **51**:3 966—3 972
- Tian L(田蕾), Yang J(杨静), Liu Q(刘强). 2007. On fungistasis of the extracts from *Helianthemum ordosicum* for pathogenic germs of plants(鄂尔多斯半日花提取物对 4 种植物病原菌的抑菌性)[J]. *J Tianjin Norm Univ(Nat Sci Edi)*(天津师范大学学报·自然科学版), **27**:32—38
- Yang WS(杨文思), Tian L(田蕾), Liu Q(刘强). 2007. The toxicity of the water extract from *Helianthemum ordosicum* against *Plutella xylostella*(鄂尔多斯半日花水煮膏对小菜蛾的毒杀作用)[J]. *J Mongolia Norm Univ(内蒙古师范大学学报)*, **36**:202—204
- Zeng XR(曾宪儒), Chen HS(陈海珊), Liu Y(刘演), et al. 2005. Insecticidal activity of wild Meliaceae plant extracts from Guangxi on the *Lipaphis erysimi* Kaltendbach(广西野生楝科植物提取物对萝卜蚜的杀虫作用初步研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **25**(5):494—496
- 
- ( 上接第 822 页 Continue from page 822 )
- Pan Q(潘琦), Chen SY(陈绍媛), Jiang WM(姜维梅), et al. 2006. Study on the podophyllotoxin in the *Dysosma versipellis* and its callus' materials(八角莲的愈伤组织和组培根及野生根状茎的鬼臼毒素含量比较研究)[J]. *J Zhejiang Univ(浙江大学学报)*, **32**(1):56—59
- Qin JM(秦佳梅), Zhang WD(张卫东), Zhao SW(赵书巍). 2006. Study on dormancy mechanism and handling technique of seed of *Senecio cannabi folius*(返魂草种子休眠机理及处理技术研究)[J]. *Seed(种子)*, **25**(2):4—5,9
- Qiu HX(邱荷香), Qiu YX(邱英雄). 2002. Advances in research on the endemic and endangered plant of *Dysosma* in China and its exploitation prospects(中国特有濒危植物八角莲的研究进展及其开发前景)[J]. *J Anqing Teachers Coll(安庆师范学院学报)*, **8**(4):91—93
- Shang MY(尚明英), Xu LS(徐路珊), Li P(李萍), et al. 2002. Study on pharmacodynamics of Chinese herbal drug *Guijiu* and its ligna(鬼臼类中药及其木脂素类成分的药效学研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs(中草药)*, **33**(8):722—724
- Toshio M, Masaru M, Kazutaka I. 1998. Production of podophyllotoxin in *Juni perus chinensis* callus culture treated with oligosaccharids and biogenetic precursor[J]. *Phytochemistry*, **49**(2):491—496
- Yang HL(杨慧玲), Liu JQ(刘建全). 2005. Seed germination of *Suertia mussotii*, an important application in tibetan folk medicine(重要藏药川西獐牙菜种子萌发的研究)[J]. *Acta Bot Yunnan(云南植物研究)*, **27**(3):295—300
- Yao LY(姚莉韵), Wang LP(王丽平). 1999. Isolation of effective constituents from the hydrophilic fraction of *Dysosma Versipellis* and their antiviral effect on CB1-6V and HSV-1 virus(八角莲水溶性有效成分的分离与抗病毒活性的测定)[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Second Shanghai(上海第二医科大学学报)*, **16**(10):234—237
- Yang QH(杨期和), Liao FL(廖富林), Wen XH(温献环), et al. 2005. Study on dormancy and germination of *Areca triandra* seeds(三药槟榔种子休眠与萌发的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **25**(6):549—554