

植物性提取剂对松材线虫活性影响测定

龙 绛 雪, 曹 福 祥, 彭 继 庆

(中南林业科技大学, 湖南 长沙 410004)

摘 要:为筛选具杀线虫活性的植物材料,测定了油茶籽饼等8种植物的甲醇或水粗提物对离体松材线虫的毒杀效果,并对接种后的马尾松进行防效试验。结果表明:8种植物的14种提取物对离体松材线虫均具有一定的抑制作用。其中油茶籽饼和雷公藤叶的水提取液(50 mg/mL)对离体松材线虫48 h后的活性抑制作用均达到100%。用10 mg/mL油茶籽饼和20 mg/mL雷公藤叶水提取液浸泡处理24 h,可以完全杀死马尾松苗离体茎段中接种的松材线虫。盆栽防效试验结果表明,油茶籽饼和雷公藤叶水提取液(50 mg/mL)浇灌2 a生马尾松苗后,可以有效抑制寄主马尾松中接种的松材线虫活性,特别是油茶籽饼效果最好。

关键词:松材线虫;植物粗提物;线虫活性

中图分类号:S 763.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)22-0148-03

松材线虫病(Pine Wilt Disease)是由(*Bursaphelenchus xylophilus*)通过松褐天牛等媒介昆虫传播的一种危险性极高的病原主导性病害。主要危害针叶树木,尤其是松属树种(*Pinus* spp.)^[1]。自1982年我国在南京中山陵发现该病害以来,此病已经蔓延到绝大多数松林地区,造成直接和间接损失累计上千亿元^[2]。由于该病原体致病机理复杂,松材线虫入侵过程中保持较高的种群遗传多样性、较强的繁殖潜能和竞争能力,至今对其还没有有效的防治方法^[3-4],目前仍以药剂防治为主。由于我国松林面积分布广,生长环境复杂,松材线虫又深居寄主体内,因此,寻找水溶性和内吸性强、药力持久而经济环保的新型杀线药剂成为近年研究的热点^[5-7]。该试验以油茶籽饼、雷公藤等8种具有驱虫效果的植物材料为提取原料,采用甲醇或水为提取剂,研究其提取物对松材线虫生物活性的影响,为筛选和开发高效、经济与环保的杀线药剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 青蒿、博落回、商陆、艾蒿、苦楝果和苦楝树皮(均采于长沙县金沙村),雷公藤根(购于长沙当地药店),雷公藤叶(采于校植物园引种栽培植株)、云南茛苕木根(购于云南畹町)、油茶饼(购于岳阳市平江县林场)。将阴干植物材料放至恒温烘箱内40℃充分干

燥后,用植物粉碎机将植物材料粉碎,过40目筛,密封保存备用。

1.1.2 供试线虫的分离 用贝尔曼漏斗分离技术分离广州从化市的松材线虫,寄主为马尾松(*Pinus massoniana*),线虫经1%的硫酸链霉素消毒后,用灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)喂养。10~15 d后,可见部分松材线虫在培养皿上盖的水珠内生长期繁殖,将其用蒸馏水冲洗收集备用。

1.2 试验方法

1.2.1 植物提取物的制备 植物材料的提取剂为甲醇或蒸馏水,采用超声波与浸提法取相结合。称取10 g植物干粉于500 mL锥形瓶内,加入50 mL提取剂,先超声波处理15 min,再浸提2 h(水剂提取加入的是90℃左右热水浸提至自然冷却),在浸提过程中间歇搅拌。过滤后将滤渣再重复提取1次,合并滤液即得植物粗提液。甲醇提取液经旋转蒸发仪减压浓缩至浓稠状,用蒸馏水配成相当于干粉100 mg/mL的母液。水提取液则直接定容,同时加几滴吐温-80乳化制成母液,冰箱保存备用。

1.2.2 不同植物提取物对离体松材线虫的活性测定 最佳杀线虫植物提取物的筛选:移入供试线虫100 μL(约80~100条)于2.0 mL的离心管内,加入500 μL 100 mg/mL粗提物及400 μL蒸馏水(含2%吐温-80)混匀,得50 mg/mL杀虫液,2次重复,以2%吐温-80为对照。置25℃恒温箱内,培养48 h后,用清水复苏2 h,在显微镜下检查线虫死亡数,统计死亡率和活性强弱^[8,9]。比较不同植物提取物对离体松材线虫的活性影响,其中具有强效杀线虫的植物材料进行下一步的试验。不同浓度的油茶籽饼和雷公藤叶提取物对离体松材线虫活性

第一作者简介:龙绛雪(1970),女,湖南双峰人,硕士,副教授,现主要从事植物生理生化方面的教学与研究工作。E-mail:ljxzl@126.com.

基金项目:湖南省教育厅科技资助项目(06C-892)。

收稿日期:2010-09-07

测定: 将油茶籽饼、雷公藤叶的水或甲醇提取液与线虫液按上述方法配成 40、20、10、5、2.5、1.25 mg/mL 的杀虫液, 测定不同浓度提取物的杀线虫效果。

1.2.3 油茶籽饼和雷公藤叶提取物对寄主马尾松中松材线虫活性测定 对离体马尾松枝条中松材线虫活性的测定: 取 2 a 生马尾松健康枝条, 截成 3 cm 长的小段, 用 50 mg/mL 的油茶籽饼和雷公藤叶的水提取物浸泡 24 h, 用人工皮接法接种松材线虫悬浮液 0.5 mL (约含线虫 2 000 条), 置 25℃ 恒温箱用纱布保湿培养。每组设 5 样段重复。15 d 后将每一样段砍成碎片, 用贝尔曼漏斗分离并定容至 5 mL, 显微镜下检测线虫并统计条数。对盆栽马尾松中松材线虫活性的测定: 选择 2 a 生盆栽长势一致的马尾松, 用 50 mg/mL 的提取液浇灌透, 随后于马尾松健康枝条接种松材线虫悬浮液 0.5 mL (约含线虫 2 000 条/株), 3 d 后再重复浇灌提取液 1 次。每组设 20 样株重复, 对照组接种线虫后浇灌清水, 定期管理。15 d 后将其中的 10 株于枝条接种处上下 1.0 cm 位置截下(总长约 3.0 cm), 将截下的枝条砍成碎片并分离, 检测统计线虫条数。另外 10 株继续观察, 定期检查并于 45 d 后统计发病情况。

2 结果与分析

2.1 不同植物提取物对松材线虫活性的影响

植物杀虫剂中的活性成分一般为生物碱, 故提取时一般用甲醇、乙醇等有机溶剂提取。该试验中根据文献和民间土农药偏方, 针对部分植物材料采取了甲醇和水 2 种溶剂提取, 以比较这 2 种溶剂提取物的杀线虫效果。从表 1 可看出, 8 种植物 14 种提取物均具有一定的杀虫活性。其中菊科中的青蒿和艾叶提取物杀线虫效果相对较差, 校正死亡率低于 50%。博落回茎叶、商陆根茎、罗芙木根和苦楝树皮的醇提取物杀线虫效果中等, 但苦楝果实的杀线效果明显低于其树皮。

表 1 不同植物提取物对松材线虫的毒杀作用				
植物名称	部位	提取剂	校正死亡率 %	线虫活性
青蒿	全株	甲醇	23.5	+
艾叶	叶	甲醇	36.8	++
商陆	根茎	甲醇	68.4	+++
罗芙木	叶	甲醇	56.3	+++
罗芙木	根	甲醇	77.6	++++
苦楝	果肉	甲醇	52.3	+++
苦楝	树皮	甲醇	70.6	+++
博落回	茎叶	甲醇	78.5	+++
博落回	茎叶	水	58.6	+++
雷公藤	根	甲醇	83.1	++++
雷公藤	根	水	72.8	+++
雷公藤	叶	水	100	++++
油茶	油茶饼	甲醇	100	++++
油茶	油茶饼	水	100	++++
对照(CK)			0	—

注 ①校正死亡率=(对照组的生存率-处理组的生存率)/对照组的生存率×100%(下同)。②“—”表示无活性, 校正死亡率≤10%; “+”表示弱活性, 校正死亡率为 10%~30%; “++”表示中等活性, 校正死亡率为 30%~50%; “+++”表示较强活性, 校正死亡率为 50%~80%; “++++”表示强活性, 校正死亡率>80%。

杀线效果好的有油茶籽饼和雷公藤。油茶籽饼提

取物的杀虫活性成分主要是茶皂素^[10-11], 茶皂素在热水和醇溶液中均具有很好的溶解性, 因此其水和醇的提取物杀虫效果相当, 致死性均达到 100%。在雷公藤的 3 种提取物中, 效果最好的是雷公藤叶的水提取物, 校正死亡率达到 100%; 其次是雷公藤根的甲醇提取物, 校正死亡率达到 83.1%; 雷公藤根中活性成分主要为生物碱类, 生物碱易溶于醇类但水溶性较差; 而雷公藤叶中毒性最强的是雷公藤内酯醇(甲素), 其水溶性好^[12]。考虑到实际生产中水剂提取可以节约成本、有效成分内吸性好等优点, 因此在后续试验中选择油茶籽饼和雷公藤叶二者的水提取物进行杀虫活性的进一步测定。

2.2 不同浓度的油茶籽饼和雷公藤叶水提取物对松材线虫活性的影响

从表 2 可看出, 离体的松材线虫校正死亡率与药物浓度呈正相关关系。当提取剂浓度在 10~40 mg/mL 范围时, 油茶籽饼和雷公藤叶二者都具有很好的杀虫效果。相对而言, 油茶籽饼具有更强的杀线虫能力。随着处理浓度的降低, 二者的杀线虫效果也越来越弱甚至消失。试验发现 10 mg/mL 油茶籽饼提取液和 20 mg/mL 雷公藤叶提取液对离体的松材线虫具有完全的致死效果。

表 2 不同浓度油茶籽饼和雷公藤叶水提取物杀线活性的校正死亡率 %

提取液	浓度 mg · mL ⁻¹					
	1.25	2.5	5	10	20	40
油茶籽饼	8.5	22.9	80.1	100	100	100
雷公藤叶	0	6.0	44.3	88.9	100	100

2.3 油茶籽饼和雷公藤叶水提取物对寄主马尾松中松材线虫活性的影响

由表 3 可看出, 油茶籽饼和雷公藤叶 2 种水提取液(50 mg/mL)对离体马尾松枝条中的松材线虫有完全的致死效果, 防效率达到 100%。盆栽马尾松枝条(15 d 后)中的松材线虫防效率分别为 100%和 62.1%。说明这 2 种植物提取液对松材线虫的防治具有一定的效果, 特别是对离体松枝中的线虫防治效果很好。这为松材线虫高发地区疫木的处理和再利用提供了新的思路。

表 3 油茶籽饼和雷公藤叶水提取物对寄主马尾松中松材线虫活性的影响

处理液	分离线虫数/条 · mL ⁻¹		防效/%	
	离体松枝段	盆栽松枝段	离体松枝段	盆栽松枝段
油茶籽饼	0	0	100	100
雷公藤叶	0	17	100	62.1
对照(CK)	38	61	0	0

3 结论与讨论

3.1 8 种植物材料 14 种提取物杀线虫活性比较分析

通过对 8 种植物材料不同器官部位、不同溶剂处理的 14 种提取物杀线虫活性的试验表明, 这 14 种植物提

取物对松材线虫均具有一定的抑制作用。其中油茶籽饼的醇和水提取液、雷公藤根的醇提取液和叶水提取液(50 mg/mL)对离体松材线虫活性抑制作用达到80%以上。10 mg/mL油茶籽饼和20 mg/mL雷公藤茎叶水提取液对2 a生马尾松离体茎段中接种的松材线虫具有完全的灭杀效果。盆栽试验表明,油茶籽饼和雷公藤叶水提取液(50 mg/mL)浇灌2 a生马尾松苗后,可以有效抑制寄主马尾松中接种的松材线虫活性。

3.2 油茶籽饼和雷公藤可以作为新型的植物水溶性杀线虫剂开发利用

松材线虫病一直是南方森林的顽症,我国林业工作者也一直在筛选控制该病的有效药源。一般的杀线药剂由于水溶性和内吸性差而降低了药效。该试验根据民间用油茶籽饼泡水毒鱼虫及雷公藤嫩叶煎水可导致中毒的现象,设计了直接用水提取油茶籽饼和雷公藤叶中的水溶性物质,并获得了很好的杀线效果。雷公藤在我国自然资源丰富,人工栽培也已获得成功并大面积推广应用,但对雷公藤叶利用率低。油茶籽饼作为我国南方油茶榨油后的副产品,来源广泛、价格低廉。将这2种植物材料(特别是油茶籽饼)的粗提物加工成杀线农药,用来处理因感染砍伐的疫木或进行林间治疗与预防松材线虫病,具有很好的开发应用前景。

3.3 对接种松材线虫后的盆栽马尾松苗观察后的思考

对接种松材线虫半个月后的盆栽松苗进行线虫分离发现,用油茶籽处理组的马尾松植株内没有发现线虫,用雷公藤叶处理的植株线虫数量也明显比对照组少,说明这2种提取物对线虫的繁殖有很好的抑制作用。试验同时发现对照组植株内的松材线虫并没有出现大量增加的趋势。在此后连续2个月(6~7月)的观察发现,油茶籽饼水提取物处理过的马尾松未见发病,雷公藤叶水提取液处理过的发病率为20%;对照组的发病率也仅为30%,出现低感病症状。仔细观察马尾松接种处的划伤,松脂流出明显,伤口也在不久后逐渐愈合

成疤痕并把原来缠绕保护的封口带绷断,表明这些枝条生长旺盛,并没有受到松材线虫侵染的影响。根据目前的研究认为,马尾松对松材线虫并不具有高抗性,作者认为此现象有2种解释:其一是试验用的这批马尾松苗生长健康,代谢旺盛,具有一定的抗松材线虫的能力,抑制了松材线虫的繁殖并最终导致群体数量少甚至死亡而失去侵染能力。谢丙炎等^[4]研究表明,松材线虫种群增长速度与致病力有关;另马尾松林群落生长量等指标越强,流脂等级越高,松树的抵抗力也越强。其二是此批松材线虫因室内继代培养时间长(将近5 a),近亲繁殖导致后代野外生存能力下降而成为弱毒株系,因此浸染能力降低。具体原因有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 杨宝君,潘宏阳,汤坚,等.松材线虫病[M].北京:中国林业出版社,2003:126.
- [2] 万方浩,郑小波,郭建英.农林重要入侵物种的生物学与控制[M].北京:科学出版社,2005:573-616.
- [3] 谢立群,赵博光.松材线虫病的病理学研究进展[J].江西农业大学学报,2003,25(2):204-208.
- [4] 谢丙炎,成新跃,石娟,等.松材线虫入侵种群形成与扩张机制[J].中国科学C辑:生命科学,2009,39(4):333-341.
- [5] 聂谷华,王文琪.松材线虫防治方法现状及其展望[J].安徽农业科学,2009,37(24):11612-11616.
- [6] 马力,葛迎春,毕冰,等.1.2%阿维菌素微胶囊悬浮剂防治松材线虫田间药效试验[J].中国林副特产,2010,105(2):30-31.
- [7] 巨云为,樊培峰,奚月明,等.万寿菊提取物对松材线虫的毒杀作用[J].浙江林学院学报,2010,27(2):316-319.
- [8] 蔡秋锦,罗婉珍,陈长雄,等.植物性杀线剂的提取与毒杀效果[J].福建林业学报,1998,18(4):291-293.
- [9] Chandravada M V, Eugene S, Nidiry J, et al. Nematicidal activity of some plant extracts[J]. Indian J Nematol, 1996, 26(2): 148-151.
- [10] 柳荣祥,朱全芬,夏春华.茶皂素生物活性应用研究进展及发展趋势[J].茶叶科学,1996,16(2):81-86.
- [11] 朱艳芳,张世萍,李大命,等.油茶籽饼水浸液对黄鳝的急性毒性和生理指标的影响[J].水利渔业,2006,26(5):97-99.
- [12] 吕鹏.雷公藤中毒原因探讨[J].天津药学,2001,13(6):49-50.

Effect of Plant Extracts on Nematicidal Activity of *Bursaphelenchus xylophilus*

LONG Jiang-xue, CAO Fu-xiang, PENG Ji-qing

(Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004)

Abstract: The oil-tea camellia seed cake and other plant materials extracted with methanol or water were tested to screen the effect on controlling *B. xylophilus*. The results indicated that the all crude extracts had inhibition activity to *B. xylophilus in vitro*. The crude contents of oil-tea camellia seed cakes, the leaves of *Tripterygium wilfordii* Hook extracted with water caused nematocidal activity up to 100% after 48 h exposure time at concentration of 50.0 mg/mL. And they also could completely kill *B. xylophilus* which inoculated in pine stems *in vivo* respectively at concentration of 10.0 mg/mL and 20 mg/mL. And in the pot test the crude extracts of oil-tea camellia seed cakes exhibited with significantly activity.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; plant extract; nematocidal activity