

## 万寿菊提取物对松材线虫的毒杀作用

巨云为<sup>1,2</sup>, 樊培峰<sup>1</sup>, 奚月明<sup>3</sup>, 薛中官<sup>4</sup>

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 南京林业大学 江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室, 江苏 南京 210037; 3. 江苏省南京市农林局, 江苏 南京 210008; 4. 江苏省连云港市林业技术指导站, 江苏 连云港 222001)

**摘要:** 用乙醇提取万寿菊 *Tagetes erecta* 的不同部位的粗提物, 然后用浸泡生测的方法测定对松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 的生物活性。结果表明, 万寿菊的根、茎、花的乙醇粗提物对松材线虫的活性较强, 0.010 g·L<sup>-1</sup> 质量浓度以上处理 72 h 后发现, 校正死亡率都能达到 60% 以上, 其中万寿菊根的乙醇粗提物的活性最强, 校正死亡率超过 90%。万寿菊的各部分粗提物的得率都达到 5% 以上, 这为利用植物提取物来毒杀松材线虫提供了初步的理论依据。图 1 表 1 参 13

**关键词:** 森林保护学; 松材线虫; 万寿菊; 提取物; 致死率

中图分类号: S763 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2010)02-0316-04

## Marigold (*Tagetes erecta*) extracts to kill *Bursaphelenchus xylophilus*

JU Yun-wei<sup>1,2</sup>, FAN Pei-feng<sup>1</sup>, XI Yue-ming<sup>3</sup>, XUE Zhong-guan<sup>4</sup>

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Management of Invasive Species, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 3. Forestry and Agriculture Enterprise of Nanjing City, Nanjing 210008, Jiangsu, China; 4. Forest Technical Guidance Station of Lianyungang City, Lianyungang 222001, Jiangsu, China)

**Abstract:** To determine the biological activity of *Bursaphelenchus xylophilus* with the live immersion method, three ethanol extraction of the roots, stems, and flowers of the marigold plant (*Tagetes erecta*) was used. A gradient test design with seven treatments of 1.000, 0.500, 0.100, 0.050, 0.010, 0.001 and 0 g·L<sup>-1</sup> with four replications were established to immerse *B. xylophilus* (100 number in one culture dish, 28 °C). After 72 h, death rate of *B. xylophilus* was determined. Results showed that ethanol extracts immersed for 72 h had a corrected death rate for *B. xylophilus* of >60%. From among the three plant parts, ethanol extracts coming from the marigold roots had the greatest success with a corrected death rate for *B. xylophilus* >90%. Also, the ratio of the three extracts to the raw materials was >5%. Thus, we believe marigold plant extracts could be used to control *B. xylophilus*. [Ch, 1 fig. 1 tab. 13 ref.]

**Key words:** forest protection; *Bursaphelenchus xylophilus*; *Tagetes erecta*; extract; death rate

松材线虫病 *Bursaphelenchus xylophilus* 是松树的一种毁灭性病害。该病自发现以来已经迅速在中国绝大多数松林地区爆发, 至今还没有有效的防治方法, 目前仍然以药剂防治为主, 但效果较差, 且污染环境<sup>[1]</sup>。随着人类文明程度的不断提高, 人们的环保意识及对自身生活质量的要求也不断提高, 因此, 使用高效低毒的药剂来防治线虫, 特别是在蔬菜、茶叶、中草药、花卉及园林植物上的应用尤其显得迫切。“生物合理性”农药的研制已成为当今农药研究领域的热点, 从植物的次生代谢物中寻

收稿日期: 2009-03-12; 修回日期: 2009-06-29

基金项目: “十一五”国家林业科技支撑计划项目(2006BAD08A19120); 南京林业大学科技创新基金资助项目(163010040)

作者简介: 巨云为, 副教授, 从事昆虫生态学和害虫防治等研究。E-mail: jyw6808@yahoo.com.cn

找具有杀虫活性的物质, 以获得研制新型、环保、和谐杀虫剂的模板化合物就是重要的途径之一<sup>[2-6]</sup>。菊科 Compositae 植物是被子植物中最大的科, 广布全球, 其中中国有 240 属, 特有 29 属, 占中国菊科野生属总数的 13.43%。菊科植物化学成分的复杂性和多样性均居植物界之首, 潜在着大量的杀菌、杀虫活性成分, 具有极高的研究价值和广阔的开发利用前景<sup>[7]</sup>。本研究通过测定万寿菊 *Tagetes erecta* 粗提物杀松材线虫活性, 从而为菊科植物源杀虫剂开发与利用提供一定的依据, 同时也为直接利用植物材料配制应用农药提供帮助。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 松材线虫 松材线虫取自南京地区病死的马尾松 *Pinus massoniana*。用贝曼氏漏斗法分离病树上的松材线虫, 在显微镜下经人工挑取纯化, 接种在严格灭菌的长满灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上, 置于 28 ℃培养箱中培养。约 7 d 后分离培养皿中的松材线虫, 用无菌水配制成含松材线虫约 100 条·滴<sup>-1</sup>的松材线虫悬浊液, 备用。

1.1.2 供试材料 万寿菊的花、茎和根等 3 个部分。

### 1.2 粗提物的制备

1.2.1 材料的处理方法 将收集得到的万寿菊材料分成根、茎和花等 3 个部分, 然后将这 3 部分分别洗净, 放在干燥箱中, 在 50 ℃的温度下进行干燥处理。干燥完成后, 将它们分别用 Jw6312 型粉碎机粉碎成细粉末状。

1.2.2 粗提物的提取方法 取万寿菊根、茎和花的粉碎物各 100 g, 分别将它们放在体积分数为 99% 的乙醇中室温下进行浸泡处理, 2 d 更换 1 次乙醇浸液。先用 400 目网筛过滤 1 次浸液, 然后再对过滤的浸液进行抽滤过滤。连续浸泡提取 3 次后合并提取液。最后采用旋转蒸发仪将提取液进行减压蒸发, 得到 3 种黏稠状(胶状)粗提物。将得到的胶状粗提物密封, 放 4 ℃冰箱中备用。

### 1.3 生测方法

1.3.1 药液的配制 用分析天平准确称取各种粗提物适量, 用无菌水进行溶解, 将各种粗提物分别配制成 1.000, 0.500, 0.100, 0.050, 0.010, 0.001 g·L<sup>-1</sup> 共 6 个质量浓度的溶液, 备用。

1.3.2 浸泡生测法 取若干直径 2 cm 的小玻璃培养皿, 然后把各种药液按不同质量浓度取 3 mL 放入小培养皿中, 各种提取物做 4 组平行组, 用清水做为对照组。每个培养皿中加入大约 100 条松材线虫, 放在 28 ℃培养箱中培养, 24 h 观察记录 1 次松材线虫的死亡率, 72 h 后结束观察<sup>[8]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 提取物的粗提结果

称量蒸发浓缩所得各粗提物质量, 计算粗提物得率。粗提物得率 = [浓缩所得粗提物质量/取用的材料的质量(100 g)] × 100%。

所得万寿菊茎的乙醇粗提物为 10 g, 粗提物得率为 10%。所得万寿菊根的乙醇粗提物为 8 g, 粗提物得率为 8%。所得万寿菊花乙醇粗提物为 6 g, 粗提物得率为 6%。

### 2.2 粗提物的杀线活性测定结果

观察并统计不同质量浓度的各种粗提物药液对松材线虫的致死率, 并采用直线回归法计算毒力回归方程以及半致死浓度  $C_{50}$ 。

2.2.1 万寿菊各部分粗提物的杀松材线虫活性测定结果 测定结果见图 1。

2.2.2 万寿菊各部分粗提物的最终生测结果分析 测定结果见表 1。从以上图 1 和表 1, 我们可以看出, 万寿菊的根、茎和花的粗提物对松材线虫的

表 1 万寿菊各部分粗提物的生测结果数据分析

Table 1 Data analysis about toxicity of marigold extracts against *Bursaphelenchus xylophilus*

提取部位	回归曲线方程	相关系数	$C_{50}/(g \cdot L^{-1})$
万寿菊茎	$y = 1.1586x - 0.6424$	0.9517	0.0138
万寿菊根	$y = 1.2906x - 1.1460$	0.9642	0.0063
万寿菊花	$y = 1.3480x - 1.7338$	0.9689	0.0100

说明: 表中  $y$  为死亡率率值,  $x$  为粗提物质量浓度。

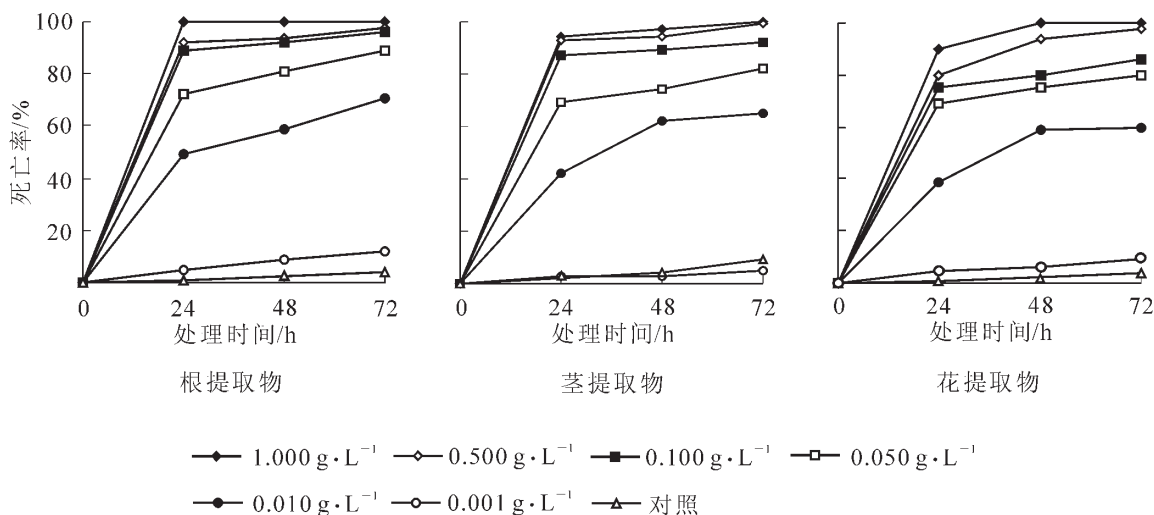


图1 不同质量浓度万寿菊各部分粗提取物对松材线虫作用

Figure 1 Toxicity of marigold root against the nematode

毒杀效果都比较明显,并且从图中可以看出松材线虫的致死率随着粗提取物药液质量浓度的增加也有增长的趋势,其中万寿菊根粗提取物的杀松材线虫活性最为显著,0.1 g·L<sup>-1</sup>以上质量浓度时,72 h内的线虫致死率在90%以上,其半致死质量浓度  $C_{50}$  达到0.006 3 g·L<sup>-1</sup>。

### 3 结论与讨论

通过本次实验发现,万寿菊的根、茎和花各部分的粗提取物对松材线虫都具有一定的毒性,其中根的粗提取物最为显著。随着粗提取物药液质量浓度的增加,对松材线虫的毒性也有增加的趋势,当质量浓度达到一定程度时就可以全部杀死松材线虫。并且发现,粗提取物药液对松材线虫的抑制作用有随着时间的延长而增强的趋势。结合前人的研究和本次实验,进一步说明了万寿菊粗提取物具有较强的杀松材线虫活性,在防治松材线虫病方面具有良好的应用前景。

本次实验只是对万寿菊的根、茎和花的粗提取物单一的进行对松材线虫毒性的测试,并没有进行它们之间的混配实验,而且并没有对其粗提取物中所含的有效成分的进一步分离和鉴定,这些将是我们下一步研究的方向和重点。

万寿菊具有同印楝 *Azadirachta indica*, 川楝 *Melia toosendan*, 烟草 *Nicotiana tabacum* 和鱼藤 *Derris trifoliata* 等同样的地位,成为从2 400种已记载控害植物中挑选出来的43种广谱控害植物之一,被誉为“控害的精华”<sup>[8-9]</sup>。万寿菊化学成分包括噻吩类、精油、色素、黄酮及苷类等。随后的研究又发现万寿菊的提取物对多种线虫和昆虫有毒杀作用,并且对多种植物病原菌有明显的抑制作用<sup>[10-11]</sup>。Zechmeister 和 Sease 首次从万寿菊花中分离出三聚噻吩和它的衍生物,并有人发现在紫外光(320~400 nm)照射下,噻吩类化合物对线虫有生物活性。Uhlenbroek 等测试了从万寿菊根中分出的噻吩及合成噻吩对3种线虫的活性,结果显示万寿菊中的杀线虫活性成分是噻吩物质。乐海洋在从万寿菊中分离杀虫物质,进行光活化基础理论和应用研究时发现,中国生长的万寿菊所含的杀虫有效成分比国外的要高<sup>[11-13]</sup>,因此,中国的万寿菊在生物农药研究方面有更好的研究价值。

#### 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,2003:1-9.
- [2] 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].福建林学院学报,1998,18(4):291-293.  
CAI Qiuqing, LUO Wanzhen, CHEN Changxiang, et al. Study on extraction and killing effect of plant nematocide [J]. *J Coll Fujian For*, 1998, 18(4): 291-293.
- [3] 潘宏阳.当前我国松材线虫病的治理对策[J].森林病虫通讯,2000(6):44-47.

- PAN Hongyang. Current countermeasures about pine wood nematode disease [J]. *For Pest Dis*, 2000 (6): 44 – 47.
- [4] 杨秀娟, 何玉仙, 陈福如, 等. 不同植物提取液的杀线虫活性评价[J]. 江西农业大学学报, 2002, **24** (3): 386 – 389.  
YANG Xiujuan, HE Yuxian, CHEN Furu, *et al.* Evaluation on nematicidal activity of different plant extracts [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*, 2002, **24** (3): 386 – 389.
- [5] 赵博光. 苦豆碱对松材线虫病的杀线活性[J]. 林业科学, 1996, **32** (3): 243 – 247.  
ZHAO Boguang. Nematicidal activity of aloperine against pine wood nematode[J]. *Sci Silv Sin*, 1996, **32** (3): 243 – 247.
- [6] 赵博光, 高蓉, 巨云为, 等. 抗生素对松材线虫病的影响[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2000, **24** (4): 75 – 77.  
ZHAO Boguang, GAO Rong, JU Yunwei, *et al.* Effects of antibiotics on the pine wilt disease [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci*, 2000, **24** (4): 75 – 77.
- [7] 李玉平, 龚宁, 慕小倩, 等. 菊科植物资源及其开发利用研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, **31** (增刊): 151 – 156.  
LI Yuping, GONG Ning, MU Xiaoqian, *et al.* A brief review on the Compositae resource and its utilization [J]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agric For Nat Sci Ed*, 2003, **31**(supp): 151 – 156.
- [8] 巨云为, 毕庆泗, 赵博光. 苦楝提取物对松材线虫的致死活性[J]. 林业科技开发, 2002, **16** (3): 26 – 27.  
JU Yunwei, BI Qingsi, ZHAO Boguang. *Melia azedarach* extracts on the lethal activity of *Bursaphelenchus* [J]. *China For Sci Technol*, 2002, **16** (3): 26 – 27.
- [9] 王新国, 徐汉虹, 赵善欢. 杀虫植物万寿菊的研究进展[J]. 西安联合大学学报, 2002, **5** (2): 2 – 8.  
WANG Xinguo, XU Hanhong, ZHAO Shanjuan. Progress in insecticidal plant marigold, *Tagetes erecta* [J]. *J Xi'an Univ*, 2002, **5** (2): 2 – 8.
- [10] 王新国, 徐汉虹, 刘新清, 等. 4 种菊科植物  $\alpha$ -三萜噻吩的含量测定及杀虫活性研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, **22** (3): 26 – 28.  
WANG Xinguo, XU Hanhong, LIU Xinqing, *et al.* The analysis of  $\alpha$ -terthienyl in Compositae plants and their bioactivity against Mosquito larvae [J]. *J South China Agric Univ*, 2001, **22** (3): 26 – 28.
- [11] 吴云骥, 周海梅, 赵萍, 等. 万寿菊化学成分的研究(I)万寿菊挥发油的 GC/MS 分析[J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2004, **17** (4): 417 – 419.  
WU Yunji, ZHOU Haimei, ZHAO Ping, *et al.* Analysis of the chemical composition of *Tagetes erecta*(I) analysis of the composition of essential oils in *Tagetes erecta* by GC/MS [J]. *J Xinyang Norm Univ Nat Sci Ed*, 2004, **17** (4): 417 – 419.
- [12] 乐海洋, 赵善欢. 万寿菊提取物对白纹伊蚊幼虫的光活化活性及有效成分研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, **19** (2): 8 – 12.  
LE Haiyang, ZHAO Shanjuan. Photoactivated toxicities of extracts from *Tagetes erecta* to larvae of *Aedes albopictus* and analysis of their insecticidal principles [J]. *J South China Agric Univ*, 1998, **19** (2): 8 – 12.
- [13] 崔德君. 万寿菊粗提物对小菜蛾的生物活性及作用机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 1997.  
CUI Dejun. *Studies on the Mode of Action and Biological Activities of the Crude Extracts from the Marigold (Tagetes erecta) to Diamondback Moth(Plutella xylostella)* [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 1997.