

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201902009

景洪哥纳香毒杀线虫活性研究*

李 玥^{1#}, 周文兵^{2#}, 王晓倩¹, 段熊仙¹, 何承刚¹, 徐俊驹^{1**}

(1. 云南农业大学 烟草学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省烟草公司玉溪市公司, 云南 玉溪 653100)

摘要:【目的】研究景洪哥纳香对线虫的毒杀活性。【方法】利用甲醇、水、二氯甲烷和乙酸乙酯等溶剂对景洪哥纳香的茎、叶部位进行提取，并且于 24、48 和 72 h 后，通过浸渍法分别检测不同质量浓度粗提物对秀丽隐杆线虫的毒杀活性。【结果】景洪哥纳香茎、叶的二氯甲烷与乙酸乙酯粗提物毒杀线虫活性较好，而水提物活性很弱。当质量浓度为 12.5 mg/mL 时，在处理 72 h 后景洪哥纳香茎、叶的乙酸乙酯粗提物对线虫的毒杀活性最好，其校正死亡率分别为 69.9%、70.3%；当质量浓度为 25 mg/mL 时，在处理 72 h 后景洪哥纳香茎、叶的乙酸乙酯粗提物对线虫的毒杀活性最好，其校正死亡率分别为 80.2%、80.4%；当质量浓度为 50 mg/mL 时，在处理 72 h 后景洪哥纳香茎、叶的二氯甲烷和乙酸乙酯粗提物对线虫的毒杀活性最好，其校正死亡率范围为 87.7%~99.0%。【结论】景洪哥纳香茎、叶部分二氯甲烷与乙酸乙酯粗提物均显示较强杀线活性，具有进一步开发植物源杀线剂的潜力。

关键词: 景洪哥纳香; 线虫; 粗提物; 毒杀活性

中图分类号: S 482.51; S 567.239

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X(2020)03-0526-04

Nematicidal Activity against *Caenorhabditis elegans* of *Goniothalamus cheliensis* Hu

LI Yue¹, ZHOU Wenbing², WANG Xiaoqian¹, DUAN Xiongjian¹, HE Chenggang¹, XU Junju¹

(1. College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yuxi Branch of Yunnan Tobacco Company, Yuxi 653100, China)

Abstract: [Purpose] To study the nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans* of *Goniothalamus cheliensis* Hu. [Methods] The extracts of methanol, water, dichloromethane, and ethyl acetate were obtained from stems and leaves of *G. cheliensis*. After 24, 48 and 72 h, the nematicidal activity of the above extracts with different concentration gradients against *C. elegans* were detected by using impregnation method. [Results] The extracts of dichloromethane and ethyl acetate from stems and leaves of *G. cheliensis* showed nematicidal activity against *C. elegans*, while water extract showed weak activity. After 72 h, the ethyl acetate extracts from stems and leaves showed better nematicidal activity with the adjust mortality of 69.9% and 70.3% at a mass concentration of 12.5 mg/mL, and of 80.2% and 80.4% at a mass concentration of 25 mg/mL, respectively; after 72 h, the ethyl acet-

收稿日期: 2019-02-17 修回日期: 2019-03-06 网络首发时间: 2020-06-20 10:01:18

*基金项目: 国家自然科学基金项目(31760098); 云南省中青年技术后备人才项目(2014HB013); 云南省农业联合专项面上项目(2018FG001-023); 中国烟草总公司云南省公司科技计划项目(2018530000241012, 2020530000242023)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。李玥(1993—), 女, 云南昆明人, 在读硕士研究生, 主要从事烟草化学研究。E-mail: zz1246044562@126.com; 周文兵(1983—), 男, 湖北襄

阳人, 博士, 农艺师, 主要从事烟草化学和烟草植保研究。E-mail: yaowufx2001@163.com

**通信作者 Corresponding author: 徐俊驹(1977—), 男, 湖北武汉人, 博士, 教授, 主要从事烟草化学研究。E-mail: junjuxu007@126.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200619.0945.003.html>

ate extracts from stems and leaves showed potential nematicidal activity with the adjust mortality ranged from 87.7% to 99.0% at a mass concentration of 50 mg/mL. [Conclusions] The extracts of chloromethane and ethyl acetate from stems and leaves of *G. cheliensis* showed better nematicidal activity and it has the potentiality to further develop them as botanical pesticides.

Keywords: *Goniothalamus cheliensis*; *Caenorhabditis elegans*; extraction; nematicidal activity

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 是一种遗传背景清楚、生命周期短、虫体半透明易于观察、可以独立生存的线虫^[1]。自 1965 年起, 科学家 SYDNEY BRENNER 利用线虫作为分子生物学和发育生物学研究领域的模式生物^[1,2]。其优点如下: 在实验室条件下易于培养; 生长周期短、繁殖快, 在较短时间内就可获得大量线虫个体; 体积小, 可在 96 孔板上实现通量筛选; 秀丽隐杆线虫与其他类型的寄生线虫之间具有很高的保守性^[3]。因此, 利用秀丽隐杆线虫作为模式生物进行杀线虫化合物通量筛选不仅能够克服寄生线虫难以培养的缺点, 而且对于杀线虫农药先导分子的发现具有重要的意义。

番荔枝科哥纳香属 (*Goniothalamus*) 植物约 160 种, 多分布于亚洲热带及亚热带地区, 中国产 10 种^[4]。该属植物多为东南亚及中国南方省区的民间草药, 常用作镇痛和杀虫药^[5]。据文献报道: 哥纳香属所含成分结构类型主要有苯乙烯内酯、生物碱、黄酮、乙酰精宁和挥发油等^[6]。该属植物景洪哥纳香 (*Goniothalamus cheliensis* Hu) 分布于缅甸、泰国、印度以及中国的云南等地, 目前尚未有人工引种栽培。李朝明等^[7]对该植物化学成分进行了研究, 发现景洪哥纳香甲素对人胃癌细胞 SGC-7901 和人肝癌细胞 7404 等均有显著的抗肿瘤活性。并且对 S180 肉瘤体内试验(腹腔注射 10 mg/kg)作用明显, 抑制率在 50% 以上, 其急性毒性 LD₅₀ 为 70 mg/kg。该植物的研究主要集中在苯乙烯内酯类成分的抗肿瘤作用方面, 而对线虫病害的毒杀活性未见报道。本试验对景洪哥纳香茎、叶粗提物进行了杀线活性研究, 以期为该植物的进一步研究开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 秀丽隐杆线虫

秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 购于 Caenorhabditis Genetics Center (CGC), 于 20 °C 条件下于铺有

尿嘧啶缺失型大肠杆菌 (*Escherichia Coli* OP50) 的 NGM 平板上培养。

1.1.2 景洪哥纳香

景洪哥纳香 (*G. cheliensis* Hu) 于 2018 年采集自云南西双版纳南部地区。

1.1.3 仪器与试剂

甲醇、乙酸乙酯和二氯甲烷均为分析纯, 试验用水为蒸馏水, NGM 培养基 (NaCl 3 g、Agar 17 g、Tryptone 2.5 g、1 mL 1 mol/L CaCl₂、1 mL 1 mol/L MgSO₄、1 mL 5 mg/mL 胆固醇、25 mL 1 mol/L pH 6 K₂HPO₄/KH₂PO₄、蒸馏水 975 mL), M9 缓冲液 (K₂HPO₄ 1.2 g、Na₂HPO₄ 2.4 g、NaCl 2 g、蒸馏水 400 mL)。

N-1300 型旋转蒸发仪, EYELA (东京理化器械株式会社); OSB-2200 型水浴锅, EYELA; SW-CJ-1FD 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; FZ102 型微型植物粉碎机, 天津泰斯特仪器有限公司; Research plus 型手动单道可调式移液器 (2~20 μL、100~1 000 μL、0.5~5 mL), 德国艾本德集团; YXQ-SG46-280 型手提式压力蒸汽灭菌器, 上海华线医用核子仪器有限公司; CKX31 型生物倒置显微镜, 奥林巴斯株式会社。

1.2 方法

1.2.1 景洪哥纳香茎、叶提取物的制备

将采集的景洪哥纳香的茎、叶分别烘干、捣碎, 并分别用甲醇、二氯甲烷、蒸馏水和乙酸乙酯多次冷浸提取, 过滤提取液, 用旋转蒸发仪回收溶液, 浓缩得到不同提取剂浸提的粗提物。

1.2.2 景洪哥纳香茎、叶提取物对线虫的活性测定

提取物均用纯甲醇溶解。秀丽隐杆线虫由 M9 缓冲液从 NGM 平板上冲洗获得线虫悬浮液, 取一定体积秀丽隐杆线虫的二龄幼虫悬浮液分别放入 24 孔细胞培养板中, 使线虫数量均保持在 200~400 条之间。处理为 20、10 和 5 μL 的 1 g/mL 粗提物溶液加 380、390 和 395 μL 的虫液, 使药品终质量浓度分别为 50、25 和 12.5 mg/mL。每处理重复 3 次, 以同质量浓度的甲醇为空白对照。

照。20℃培养24、48和72 h时,通过体态观察法和针刺法检查线虫的活动情况,计算各药剂处理对两种线虫的相对致死率。杀线样品质量浓度和线虫存活死亡计数标准参照文献统计方法^[8-12]。

1.2.3 统计方法

线虫死亡率=死亡线虫数/供试线虫数×100%;

线虫校正死亡率=(处理组线虫死亡率-对照组线虫死亡率)/(1-对照组线虫死亡率)×100%。

按文献方法^[1]将杀线活性分为五级:(1)“-”表示校正死亡率≤10%,无杀线活性;(2)“+”表示校正死亡率为>10%~30%,杀线活性弱;(3)“++”表示校正死亡率为>30%~50%,杀线活性中等;(4)“+++”表示校正死亡率为>50%~80%,杀线活性较强;(5)“++++”表示校正死亡率>80%,杀线活性强。

2 结果与分析

2.1 景洪哥纳香茎杀线活性测定

由表1可知:不同溶剂景洪哥纳香茎提取物的杀线活性都是随其质量浓度增大而逐渐提高的。当质量浓度为12.5 mg/mL时,杀线活性大小依次为乙酸乙酯粗提物>二氯甲烷粗提物>甲醇粗提物>蒸馏水粗提物,乙酸乙酯粗提物在处理72 h后已有较强杀线活性;当质量浓度为25 mg/mL时,依然呈现上述规律且乙酸乙酯粗提物在处理72 h后表现出强烈的杀线活性;当质量浓度为50 mg/mL时,二氯甲烷与乙酸乙酯提取物在

处理72 h后线虫校正死亡率分别为95.1%和87.7%,杀线活性很强,甲醇提取物杀线活性较强,蒸馏水提取物杀线活性较弱。总体而言,二氯甲烷与乙酸乙酯粗提物杀线活性较好。

2.2 景洪哥纳香叶杀线活性测定

由表2可知:不同溶剂景洪哥纳香叶提取物杀线活性都是随其质量浓度增大而逐渐提高的。当质量浓度为12.5 mg/mL时,杀线活性大小依次为乙酸乙酯粗提物>二氯甲烷粗提物>甲醇粗提物>蒸馏水粗提物,乙酸乙酯粗提物在处理48 h后已有较强杀线活性;当质量浓度为25 mg/mL时,依然呈现上述规律,且乙酸乙酯粗提物在处理72 h后表现出强烈的杀线活性;当质量浓度为50 mg/mL时,二氯甲烷与乙酸乙酯提取物在处理48 h后线虫校正死亡率分别为88.2%和83.6%,72 h后线虫校正死亡率分别为99.0%和88.7%,杀线活性较强,甲醇提取物杀线活性强,蒸馏水提取物杀线活性较弱。总体而言,二氯甲烷与乙酸乙酯粗提物杀线活性较好。

3 讨论

线虫防治现在仍以化学手段为主,然而杀线剂的种类较少,全世界杀线剂品种(单剂)仅有30余种,常用的有10余种,且多属高毒农药,防治药剂单一,以及线虫对常用药剂产生抗性^[2]。相比于化学农药,植物源农药具有分解快、毒性小、残留低、污染少、害虫不易产生抗性等特点,符

表1 景洪哥纳香茎粗提物的杀线活性

Tab. 1 Nematicidal activity against *C. elegans* of different extracts from stems of *G. cheliensis*

茎粗提物 extracts from stems	$\rho/(mg\cdot mL^{-1})$	24 h		48 h		72 h	
		校正死亡率/% adjust mortality	活性强度 activity degree	校正死亡率/% adjust mortality	活性强度 activity degree	校正死亡率/% adjust mortality	活性强度 activity degree
甲醇 methanol	12.5	7.8	-	7.8	-	13.6	+
	25.0	17.4	+	34.4	++	47.9	++
	50.0	38.5	++	51.7	+++	61.7	+++
二氯甲烷 dichloromethane	12.5	24.0	+	33.9	++	42.2	++
	25.0	30.3	++	46.5	++	58.6	+++
	50.0	69.7	+++	85.3	++++	95.1	++++
乙酸乙酯 ethyl acetate	12.5	38.2	++	47.9	++	69.9	+++
	25.0	53.7	+++	68.2	+++	80.2	++++
	50.0	56.0	+++	77.5	+++	87.7	++++
蒸馏水 water	12.5	0.0	-	0.0	-	0.0	-
	25.0	0.0	-	5.4	-	6.9	-
	50.0	9.5	-	20.0	+	28.4	+

表 2 景洪哥纳香叶不同粗提物的杀线活性

Tab. 2 Nematicidal activity against *C. elegans* of different extracts from leaves of *G. cheliensis*

叶粗提物 extracts from leaves	ρ / (mg·mL ⁻¹)	24 h		48 h		72 h	
		校正死亡率/% adjust mortality	活性强度 activity degree	校正死亡率/% adjust mortality	活性强度 activity degree	校正死亡率/% adjust mortality	活性强度 activity degree
甲醇 methanol	12.5	17.4	+	24.3	+	29.5	+
	25.0	21.1	+	37.4	++	50.8	+++
	50.0	40.8	++	63.8	+++	74.5	+++
二氯甲烷 dichloromethane	12.5	27.0	+	35.8	++	48.2	++
	25.0	40.3	++	59.0	+++	66.1	+++
	50.0	71.1	+++	88.2	++++	99.0	++++
乙酸乙酯 ethyl acetate	12.5	47.2	++	59.7	+++	70.3	+++
	25.0	55.7	+++	72.1	+++	80.4	++++
	50.0	60.0	+++	83.6	++++	87.7	++++
蒸馏水 water	12.5	0.0	-	0.0	-	0.0	-
	25.0	0.0	-	5.5	-	12.1	+
	50.0	11.0	+	22.5	+	25.4	+

合当今绿色生产的理念^[3]。因此, 提取植物杀线虫活性物质研制植物性杀线剂成为研究的热点之一。

近 10 年来, 从哥纳香属植物中分离鉴定了苯乙烯内酯类化合物 51 种, 生物碱类化合物 40 种, 黄酮类化合物 10 种, 乙酰精宁类化合物 4 种, 其他类化合物 23 种^[13]。其中苯乙烯内酯类化合物据研究表明有强烈的抗肿瘤细胞毒作用, 已成为抗肿瘤药物研究的热点之一。在景洪哥纳香的研究中, 李朝明等^[7]研究发现景洪哥纳香甲素对人胃癌细胞 SGC -7901、人肝癌细胞 7404 等均有显著的抗肿瘤活性; 李莉等^[14]研究发现景洪哥纳香醇提取物对人胃癌细胞 MKN-28、人肝癌细胞 SMMC-7721 具有显著的抗肿瘤活性。因此该植物的研究多集中在抗肿瘤方面, 但对其杀线作用的研究鲜有报道, 本试验对景洪哥纳香茎、叶的不同溶剂粗提物杀线活性的分析表明: 二氯甲烷和乙酸乙酯粗提物总体而言效果较好, 推测有效的杀线成分可能是脂溶性的且极性较小。本研究对景洪哥纳香茎、叶粗提物进行了杀线活性研究, 但是未揭示其有效成分。因此, 分离并筛选出线虫毒杀活性成分将是下一步的研究重点, 以期为该属植物的进一步研究开发提供参考, 同时增加可利用的植物源农药品种和类型。

4 结论

对景洪哥纳香的杀线活性分析表明: 景洪哥纳香茎、叶部分的粗提物杀线效果相似, 二氯甲

烷与乙酸乙酯粗提物杀线活性最好, 其次为甲醇粗取物, 而蒸馏水提取物的活性很弱, 说明其杀线活性成分主要集中在较小极性部分。当质量浓度为 12.5 mg/mL 时, 在处理 72 h 后景洪哥纳香茎、叶的乙酸乙酯粗提物对线虫的毒杀活性最好, 其校正死亡率分别为 69.9%、70.3%; 当质量浓度为 25 mg/mL 时, 在处理 72 h 后景洪哥纳香茎、叶的乙酸乙酯粗提物对线虫的毒杀活性最好, 其校正死亡率分别为 80.2%、80.4%; 当质量浓度为 50 mg/mL 时, 在处理 72 h 后景洪哥纳香茎、叶的二氯甲烷粗提物对线虫的毒杀活性最好, 其校正死亡率分别为 95.1%、99.0%。未来可以结合植物化学分离技术, 将不同哥纳香属粗提物中的活性物质进行分离、纯化, 以期开发出高效、低毒、环保的新型杀线虫农药。

[参考文献]

- [1] 邓瑛, 马玲, 高珊, 等. 模式生物线虫在化学品快速高通量毒性筛选评价中的应用[J]. 毒理学杂志, 2012, 26(4): 301. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2012.04.015.
- [2] BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*[J]. Genetics, 1974, 77(1): 71.
- [3] SILVERMAN G A, LUKE C J, BHATIA S R, et al. Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. Pediatric Research, 2009, 65(1): 10. DOI: 10.1203/pdr.0b013e31819009b0.
- [4] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志: 第三十卷第二分册[M]. 北京: 科学出版社, 1978.

(下转第 540 页)