

瑞香狼毒根中异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对松材线虫和拟松材线虫的触杀活性研究

崔海燕^{1,2}, 金辉¹, 王丹丹¹, 路利芹¹, 秦波^{1*}

¹中国科学院兰州化学物理研究所中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室
甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 730000; ²中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要:从瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)根乙醇提取物中分离得到了两个二氢黄酮类化合物,结合核磁共振波谱学数据解析,确定其结构为异新狼毒素 A(isoneochamaejasmin A)和新狼毒素 B(neochamaejasmin B)。并采用实验室活体生物试验方法,研究了这两个化合物对松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)和拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus*)二龄幼虫的触杀活性。结果表明,异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对两种线虫均具有一定的触杀活性,且在相同的处理时间和浓度下,新狼毒素 B 对两种线虫的触杀活性均强于异新狼毒素 A。

关键词:瑞香狼毒;二氢黄酮;松材线虫;拟松材线虫;触杀活性

中图分类号: S763.7; S767.37

文献标识码: A

Nematicidal Activities of Isonochamaejasmin A and Neochamaejasmin B from the Roots of *Stellera chamaejasme* L. against *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*

CUI Hai-yan^{1,2}, JIN Hui¹, WANG Dan-dan¹, LU Li-qin¹, QIN Bo^{1*}

¹Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources and Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: Two biflavonoids were isolated from ethanol extract from the roots of *Stellera chamaejasme* L., and their chemical structures were identified as isoneochamaejasmin A and neochamaejasmin B by nuclear magnetic resonance spectral data. The nematicidal activities of the two compounds were tested by bioassay methods with second-stage juveniles (J2s) of *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*. The results showed these two biflavonoids exhibited significantly nematicidal activities against both *B. xylophilus* and *B. mucronatus*. Neochamaejasmin B displayed better nematicidal activity than isoneochamaejasmin A against two species nematodes under the same conditions.

Key words: *Stellera chamaejasme* L.; Biflavonoids; *Bursaphelenchus xylophilus*; *Bursaphelenchus mucronatus*; Nematicidal activity

松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*, PWN)引起的松树萎蔫病被视为松树的癌症,其主要危害黑松、马尾松、黄松、赤松、海岸松和黄山松等松属植物,是一种毁灭性森林病害^[1]。拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus*)与松材线虫的形态极为相似。关于拟松材线虫的致病性,一直以来存在着争议,分无致病性、弱致病性或潜在致病性以及强致病性的几种观点^[2,3]。从近年来的研究结果来看,

拟松材线虫的致病性受环境条件的影响较大,在一定条件下也能造成大片松树的死亡,而且拟松材线虫往往比松材线虫的分布范围更广,在同一地区常常是拟松材线虫先出现,然后才有松材线虫出现,例如在我国也在许多非松材线虫病疫区的松树尤其马尾松上也发现了大量的拟松材线虫。因此,在松材线虫病的防治方面,拟松材线虫理应和松材线虫一样受到重视。

目前对于松材线虫病的防治除了加强检疫、林分改造和其它农业措施之外,主要依赖化学防治。由于高毒杀线剂的使用,产生了环境污染和抗药性

等诸多问题。随着人类环保意识的提高,生物防治已成为线虫防治的主导。植物是天然活性物质的重要宝库,许多植物提取物对植物线虫具有良好的杀线虫活性^[4]。研究和开发具有选择性强、高效、低毒、环境友好、无公害的植物源线虫触杀活性物质,利用植物活性代谢物防治松树线虫病,是保护森林资源和生态环境、促进我国林业发展的有效途径。

瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)为瑞香科狼毒属植物,在我国东北、华北、西南、西北、内蒙古和黑龙江等地广泛分布^[5],其根中富含香豆素、双黄酮和萜类等生物活性物质^[6]。据我国民间记载,其根粉常被用来作为杀虫剂^[7],瑞香狼毒对山楂叶螨的毒力及酶活力影响和对蚜虫的杀虫活性已有报道^[8,9]。但对瑞香狼毒根中二氢黄酮类成分的杀线虫活性鲜有研究报道,只是以瑞香狼毒根部不同溶剂的萃取物对马铃薯腐烂茎线虫的触杀活性进行了报道,并没有明确其具体的杀线虫活性成分^[10]。因此,本文就瑞香狼毒根乙醇提取物中分离鉴定的两个二氢黄酮类化合物对松材线虫和拟松材线虫的触杀活性进行了研究,以期对植物资源的开发利用和松树线虫病的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物:植物材料于2009年10月采集于甘肃省定西市岷县高山草甸,由兰州大学生命科学院植物及植物生理研究所蒲训副教授鉴定为瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)的根,植物标本(GSM002)保存于中国科学院兰州化学物理研究所天然药物实验室。

供试线虫:松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)和拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus*),均分离自江苏省溧水县感病的马尾松(*Pinus massoniana*)树上,由南京林业大学森林资源与环境学院森林保护教研室的韩正敏教授鉴定并提供虫源,然后在本实验室自行扩繁。

1.2 仪器与试剂

旋转蒸发器 SW-CJ-2G(瑞士Buchi公司),循环水式多用真空泵(上海豫康公司),AL104电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),恒温摇床(武汉瑞华仪器设备有限公司),HP250G-C型智能光照培养箱(武汉瑞华仪器设备有限公司),LDZX-40立式电热压力蒸汽灭菌(上海悦丰仪器仪

表有限公司),洁净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),倒置显微镜(上海光学仪器厂)。柱层析用硅胶(200~300目)由青岛海洋化工厂生产,薄层色谱用硅胶板 GF₂₅₄(0.20~0.25 mm,青岛海洋化工厂)。显色剂为5%硫酸乙醇溶液,加热显色。¹H和¹³C NMR谱在氘代溶剂(Acetone-*d*₆)中用Varian Mercury-400BB超导核磁共振仪测定,以四甲基硅烷(TMS)为内标。高效氟氯氰菊酯,购自广东瑞德丰生物技术有限公司。实验中所用的试剂均为分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 线虫的培养

在直径为9 cm的培养皿中加入约20 mL PDA固体培养基,待培养基凝固后,接入灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*),于28℃恒温箱中暗培养。待菌丝长满整个培养皿后,在培养基中央刻一小口,加入表面消毒过的线虫约500条。将培养皿用封口膜包好,正置放入28℃恒温箱中暗培养。接种培养2~3 d后将培养皿倒置,继续培养至菌丝消失,线虫长满平板。用无菌水将培养皿皿盖上的线虫悬浮,置于显微镜下,观察浓度及虫龄,准确选取二龄幼虫(简称J2),供测试用。

1.3.2 瑞香狼毒根提取物中二氢黄酮类化合物的分离

将瑞香狼毒干燥根20 kg进行粉碎,置于广口瓶内,95%乙醇中浸泡24 h,以渗漉法提取,渗漉液减压浓缩,得乙醇提取物浸膏4.5 kg。然后将乙醇提取物浸膏用4 L蒸馏水悬浮,依次分别用等体积的石油醚、氯仿和乙酸乙酯于室温下连续萃取3次,合并各萃取液,减压浓缩,依次制得瑞香狼毒根的石油醚、氯仿、乙酸乙酯及水相萃取物浸膏,待试验用。

将乙酸乙酯的萃取物浸膏1.46 kg上硅胶柱(18×145 cm,3600 g),用氯仿和甲醇(100:0~100:100)梯度依次洗脱,通过薄层色谱检测,合并相近组分,得到14个馏分(Fr1-14),将其中的Fr8(135.2 g)经硅胶柱(13×130 cm,900 g)层析,以氯仿和甲醇(40:0~3:1)梯度依次洗脱,通过薄层色谱检测,合并相近组分,得到6个组分(Fr8-1~8-6),将其中的Fr8-4(92.5 g)再上硅胶柱(2×75 cm,160 g),以氯仿和甲醇(20:0~2:1)梯度依次洗脱,得到两个淡黄色粉末状化合物1(79.4 mg)和化合物2(622.9 mg)。

1.3.3 触杀活性测定

取线虫悬浮液和二甲亚砜(DMSO)溶解的样品加到直径为 9 cm 的培养皿中,样品制成浓度为 80 mmol/L 的母液,将上述母液于无菌滤膜过滤,分别稀释至 5、10、20 和 40 mmol/L 四个浓度梯度。于 24 孔板中每孔加入一定浓度的线虫悬浮液 495 μ L,将实验样品的五个浓度梯度溶液各 5 μ L 依次加入 24 孔板,使实验样品浓度占总浓度的 1%,每个浓度重复两次,以相同比例的 DMSO 作为对照,在摇床上(180 rpm, 2 min)混合均匀后,置于温度为 28 $^{\circ}$ C、湿度为 50% ~ 60% 的培养箱中暗培养。每个处理选取 3 个视野,重复两次。处理后在 40 倍显微镜下 24、48、72 h 分别记录各处理组线虫的死亡情况,计算公式如下:

$$\text{线虫校正死亡率}(\%) =$$

$$\frac{\text{处理组线虫死亡率} - \text{对照组线虫死亡率}}{1 - \text{对照组线虫死亡率}} \times 100\%$$

1.4 数据处理

采用 Excel 2007 和 SPSS 16.0 软件对试验数据进行整理和统计分析。数据结果以校正死亡率的平均值 \pm 标准偏差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,同一时间点五个不同处理浓度的校正死亡率相互间的显著性差异用邓肯氏新复极差检验法(Duncan's Multiple Ranger Test, DMRT)。

2 结果与分析

2.1 异新浪毒素 A 和新浪毒素 B 的分离与结构鉴定

瑞香狼毒根乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物经过反复硅胶柱层析,分别得到两个淡黄色粉末状固体化合物 **1** (79.4 mg) 和化合物 **2** (622.9 mg),在 254 nm 处有强吸收。以 Acetone- d_6 为溶剂,结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据对其结构进行了分析鉴定。

化合物 **1** 的 ^1H NMR 中包含双二氢黄酮的 C_2 , C_2'' 位的两个质子 [δ 5.42 (2H, s, $J = 0$ Hz)], C_3 , C_3'' 位的两个质子 [δ 3.37 (2H, s, $J = 0$ Hz)] 信号,包含的 12 个芳香质子信号 [δ 5.80 ~ 7.04] 表明存在两个典型的 5,7-二氧取代的 A 环 [δ 5.80 (2H, s, $J = 0$ Hz), 5.93 (2H, s, $J = 0$ Hz)] 和两个典型的对位氧取代的 B 环 [δ 6.77 (4H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.04 (4H, d, $J = 8.0$ Hz)], 同时化合物 **1** 的 ^{13}C NMR 中显示了两个羰基碳 (δ_c 194.9, 194.9) 的信号,典型的 5,7-二氧取代的 A 环上 6-, 8-位的碳信号 (δ_c

96.4, 95.3) 和典型的对位氧取代的 B 环上 2-, 3-, 5-, 6-位的碳信号 (δ_c 128.1, 115.9, 115.6, 128.1)。C-2, C-2'' (δ_c 81.2, 81.2) 和 C-3, C-3'' (δ_c 47.2, 47.2) 信号表明化合物 **1** 是由两个二氢黄酮单位组成的。通过与已知 C-3/C-3'' 双二氢黄酮的相应质子的 J 值 (0 和 0 Hz) 比较,化合物 **1** 的 C-2/C-3 和 C-3''/C-2'' 位的相对构型被确定为 *cis-cis*。 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 没有甲氧基信号,提示化合物 **1** 没有甲氧基取代,结构是高度对称的。化合物 **1** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 信号与异新浪毒素 A 非常相似,通过与文献对照^[11],故确定其为异新浪毒素 A (isoneochamaejasmin A)。

化合物 **2** 的 ^1H NMR [δ 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz)], [δ 7.08 (2H, d, $J = 8.4$ Hz)], [δ 7.15 (2H, d, $J = 8.4$ Hz)], [δ 7.28 (2H, d, $J = 8.4$ Hz)] 为两个对位取代苯环的信号。比较化合物 **2** 和化合物 **1** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR,可以看出化合物 **2** 与化合物 **1** 的 ^{13}C NMR 数据基本一致,但是在化合物 **2** 的 ^1H NMR 数据中, C_2 , C_2'' 位的两个质子 [5.75 (1H, d, $J = 4.4$ Hz), 5.14 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)], C_3 , C_3'' 位的两个质子 [3.14 (1H, s, $J = 0$ Hz), 3.34 (1H, d, $J = 3.2$ Hz)] 不同于化合物 **1** 的 C_2 , C_2'' 位的两个质子和 C_3 , C_3'' 位的两个质子,说明二者的立体结构不同,通过与已知 C-3/C-3'' 双二氢黄酮的相应质子的 J 值比较,化合物 **2** 的 C-2/C-3 和 C-3''/C-2'' 位的相对构型被确定为 *cis-trans*, 化合物 **2** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 信号与新浪毒素 B 非常相似,通过与文献对照^[12],故确定其为新浪毒素 B (neochamaejasmin B)。化合物 **1** 和化合物 **2** 的结构如图 1 所示。

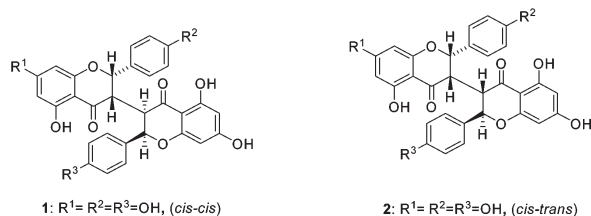


图 1 化合物 **1** 和 **2** 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds **1** and **2**

异新浪毒素 A 和新浪毒素 B 的核磁共振波谱数据如下:

异新浪毒素 A: ^1H NMR (Acetone- d_6 , 400 MHz) δ : 5.42 (2H, s, H-2, H-2''), 3.37 (2H, s, H-3, H-3''), 5.80 (2H, s, H-6, H-6''), 5.93 (2H, s, H-8, H-8''), 7.04 (4H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', H-2''', H-6', H-6'''),

6.77 (4H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', H-3'', H-5', H-5''); ^{13}C NMR (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ : 81.2 (C-2, C-2''), 47.2 (C-3, C-3''), 194.9 (C-4, C-4''), 163.5 (C-5, C-5''), 96.4 (C-6, C-6''), 167.2 (C-7, C-7''), 95.3 (C-8, C-8''), 163.8 (C-9, C-9''), 103.2 (C-10, C-10''), 127.8 (C-1', C-1''), 128.1 (C-2', C-2''), 115.9 (C-3', C-3''), 157.7 (C-4', C-4''), 115.6 (C-5', C-5''), 128.1 (C-6', C-6'').

新狼毒素 B: ^1H NMR (Acetone- d_6 , 400 MHz) δ : 5.14 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2''), 5.75 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-2), 3.34 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, H-3''), 3.14 (1H, s, H-3), 5.96 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6''), 5.83 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.10 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8''), 5.98 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 7.15 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', H-6'), 7.28 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'', H-6''), 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', H-5'), 7.08 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'', H-5''); ^{13}C NMR (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ : 80.8 (C-2), 82.8 (C-2''), 49.0 (C-3), 49.8 (C-3''), 196.0 (C-4), 198.1 (C-4''), 165.0 (C-5), 165.3 (C-5''), 97.0 (C-6), 97.1 (C-6''), 167.3 (C-7), 167.7 (C-7''), 96.0 (C-8), 96.8 (C-8''), 162.8 (C-9), 164.7 (C-9''), 103.7 (C-10), 104.8 (C-10''), 128.6 (C-1'), 129.9

(C-1''), 128.5 (C-2', C-6'), 130.6 (C-2'', C-6''), 116.3 (C-3', C-5'), 116.4 (C-3'', C-5''), 158.3 (C-4'), 158.6 (C-4'').

2.2 异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对松材线虫的室内触杀活性测定结果

分别精确称取异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 减压干燥样品溶于 DMSO 中制成样品为 80 mmol/L 的母液。试验时以适量 DMSO 将母液依次稀释成浓度分别为 5、10、20 和 40 mmol/L 四个浓度梯度的试液,对松材线虫进行室内生物活性测定。试验中设计与试验药液相应浓度的 DMSO 作为对照,异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对松材线虫的室内触杀活性试验结果见表 1。处理 24 h 后,800 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对松材线虫的触杀活性分别为 10.98% 和 31.22%,此浓度下二者对松材线虫的触杀活性与 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下相比差异极显著 ($P < 0.01$)。随着处理时间和浓度的增加,两个化合物对松材线虫的触杀活性逐渐增强。处理 72 h 后,800 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对松材线虫的触杀活性分别为 47.13% 和 54.32%,此浓度下二者对松材线虫的触杀活性与 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下相比差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 1 瑞香狼毒根中活性物质对松材线虫的触杀活性影响

Table 1 Effects of two isolated compounds from the roots of *S. chamaejasme* on the mortality of *B. xylophilus*

化合物 Compounds	浓度 ($\mu\text{mol/L}$) Concentrations	松材线虫 <i>B. xylophilus</i>		
		24 h	48 h	72 h
异新狼毒素 Isoneochamaejasmin A	50	1.34 \pm 4.42Bb	8.38 \pm 5.32Cc	18.18 \pm 2.67Bb
	100	5.08 \pm 3.90ABab	11.74 \pm 2.68BCbc	22.44 \pm 9.47Bb
	200	8.52 \pm 3.87ABa	13.85 \pm 3.15ABCb	40.58 \pm 6.75Aa
	400	10.42 \pm 3.77Aa	15.65 \pm 2.59ABab	44.77 \pm 4.07Aa
	800	10.98 \pm 7.16Aa	19.16 \pm 4.19Aa	47.13 \pm 3.70Aa
新狼毒素 B Neochamaejasmin B	50	10.1 \pm 2.97Bb	15.66 \pm 7.27Cc	33.22 \pm 3.76Cc
	100	19.13 \pm 3.58Bb	19.34 \pm 7.10Bb	34.26 \pm 3.82Cc
	200	21.58 \pm 5.40ABb	23.68 \pm 2.12Bb	42.09 \pm 7.92CBb
	400	23.27 \pm 3.13ABb	28.24 \pm 6.70Bb	49.92 \pm 3.94ABa
	800	31.22 \pm 5.86Aa	43.20 \pm 7.16Aa	54.32 \pm 5.72Aa

注:1)表中数据为 $\bar{x} \pm s$, \bar{x} 代表 6 次重复的平均值, s 为标准偏差;2)表中数值后不同大小写字母代表 0.01 和 0.05 水平上的差异显著性。
Note:1) The data in the table was $\bar{x} \pm s$, \bar{x} meant the average of six replicates, s was standard error;2) The capital and small letters after the values meant significant difference at 0.01 and 0.05 levels respectively.

2.3 异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对拟松材线虫的室内触杀活性测定结果

试验方法同 2.2, 然后对拟松材线虫进行室内

生物活性测定。异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对拟松材线虫的室内触杀活性试验结果见表 2。处理 24 h 后,800 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下异新狼毒素 A 和新狼毒素

B 对拟松材线虫的触杀活性分别为 9.00% 和 18.08%, 此浓度下异新狼毒素 A 对拟松材线虫的触杀活性与其他浓度下相比差异不显著, 而新狼毒素 B 在 800 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对拟松材线虫的触杀活性与 50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下相比差异极显著

($P < 0.01$)。随着处理时间和浓度的增加, 两个化合物对拟松材线虫的触杀活性逐渐增强。处理 72 h 后, 在最大浓度下异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对拟松材线虫的触杀活性分别达到了 49.00% 和 65.24%。

表 2 瑞香狼毒根中活性物质对拟松材线虫的触杀活性影响

Table 2 Effects of two isolated compounds from the roots of *S. chamaejasme* on the mortality of *B. mucronatus*

化合物 Compounds	浓度 Concentrations ($\mu\text{mol/L}$)	拟松材线虫 <i>B. mucronatus</i>		
		24 h	48 h	72 h
异新狼毒素 A Isonochamaejasmin A	50	2.21 \pm 4.70Aa	4.40 \pm 7.62Bc	35.31 \pm 3.71Bd
	100	5.82 \pm 5.20Aa	10.12 \pm 9.41ABbc	42.25 \pm 3.11Ac
	200	7.66 \pm 6.60Aa	13.58 \pm 1.56ABa	47.63 \pm 6.28Aab
	400	7.66 \pm 6.60Aa	13.58 \pm 1.56ABa	47.63 \pm 6.28Aab
	800	9.00 \pm 8.60Aa	16.98 \pm 4.72Aa	49.00 \pm 2.58Aa
新狼毒素 B Neochamaejasmin B	50	1.81 \pm 5.39Bb	7.48 \pm 5.88Cc	38.12 \pm 2.67Bd
	100	5.57 \pm 4.48Bb	9.78 \pm 1.91BCbc	41.91 \pm 3.56Bcd
	200	6.77 \pm 7.74Bb	15.28 \pm 4.71ABCab	45.43 \pm 4.55Bc
	400	9.23 \pm 6.73ABb	17.65 \pm 4.49ABa	58.76 \pm 3.39Ab
	800	18.08 \pm 4.54Aa	19.85 \pm 8.69Aa	65.24 \pm 8.24Aa

注:1)表中数据为 $\bar{x} \pm s$, \bar{x} 代表 6 次重复的平均值, S 为标准偏差;2)表中数值后不同大小写字母代表 0.01 和 0.05 水平上的差异显著性。
Note:1) The data in the table was $\bar{x} \pm s$, \bar{x} meant the average of six replicates, S was standard error;2) The capital and small letters after the values meant significant difference at 0.01 and 0.05 levels respectively.

2.4 异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对松材线虫和拟松材线虫的触杀活性测定结果比较

异新狼毒素 A 和新狼毒素 B 对松材线虫和拟松材线虫的触杀活性试验比较结果见表 3。

处理 24 h 后, 异新狼毒素 A 对松材线虫和拟松材线虫的 LC_{50} 值分别为 39.15 和 599.90 mmol/L , 新狼毒素 B 对松材线虫和拟松材线虫的 LC_{50} 值分

别为 6.57 和 12.49 mmol/L , 处理 72 h 后, 异新狼毒素 A 对松材线虫和拟松材线虫的 LC_{50} 值分别为 0.71 和 0.76 mmol/L , 新狼毒素 B 对松材线虫和拟松材线虫的 LC_{50} 值分别为 0.48 和 0.20 mmol/L , 从表 3 可以看出, 在相同的处理时间下, 新狼毒素 B 对两种线虫的触杀活性均强于异新狼毒素 A 对二者的触杀活性。

表 3 瑞香狼毒根中活性物质对松材线虫和拟松材线虫的触杀活性影响

Table 3 Nematicidal effect of the active compounds from the roots of *S. chamaejasme* on J2 of *B. xylophilus* and *B. mucronatus*

化合物 Compounds	线虫 Nematodes	时间 Time (h)	回归方程 Regression equation	卡方 χ^2	LC_{50} (mmol/L)	95% 置信区间 95% CI
异新狼毒素 A Isonochamaejasmin A	<i>B. xylophilus</i>	24	$Y = 0.663X - 3.043$	2.810	39.15	$5.35 - 2.92 \times 10^5$
		48	$Y = 0.400X - 2.026$	0.240	115.60	ND ^a
		72	$Y = 0.758X - 2.162$	4.275	0.71	0.46 - 1.58
		24	$Y = 0.523X + 2.230$	0.769	599.90	ND
新狼毒素 B Neochamaejasmin B	<i>B. mucronatus</i>	48	$Y = 0.596X + 2.380$	0.862	38.65	$4.93 - 6.41 \times 10^5$
		72	$Y = 0.290X + 4.166$	0.919	0.76	$0.30 - 2.45 \times 10^5$
		<i>B. xylophilus</i>	24	$Y = 0.546X - 2.085$	1.617	6.57
48	$Y = 0.653X - 2.183$		1.587	2.07	0.97 - 5.81	
72	$Y = 0.497X - 1.335$		0.578	0.48	0.28 - 1.62	
24	$Y = 0.827X + 1.628$		0.923	12.49	3.35 - 598.53	

高效氟氯氰菊酯 Lambda cyhalothrin ^b	<i>B. mucronatus</i>	48	$Y = 0.543X + 2.640$	0.959	25.51	$3.93-8.49 \times 10^4$
		72	$Y = 0.602X + 3.612$	0.937	0.20	0.13-0.33
	<i>B. xylophilus</i>	24	$Y = 0.549X - 0.538$	2.781	0.0096	0.0039-0.016
		48	$Y = 0.205X + 0.093$	0.450	0.00040	ND
		72	$Y = 0.390X + 0.072$	1.951	0.00070	0.00-0.0029
		24	$Y = 0.251X - 0.592$	0.628	0.23	ND
	<i>B. mucronatus</i>	48	$Y = 0.184X - 0.244$	0.338	0.021	ND
		72	$Y = 0.525X - 0.024$	1.270	0.0011	0.00004-0.0032

注:^aND:未检测到;^b阳性对照。

Note:^aND:Not detected;^b Positive control.

3 讨论

通过对瑞香狼毒根乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位进行分离鉴定,得到了两个二氢黄酮类化合物,异新狼毒素 A 和新狼毒素 B,并研究了这两个二氢黄酮类化合物对林业上危害严重的松材线虫和与松材线虫形态相似的拟松材线虫的触杀活性。结果表明,两个二氢黄酮类化合物对松材线虫和拟松材线虫均显示出一定的触杀活性,且在相同的处理时间和浓度下,新狼毒素 B 对两种线虫的触杀活性均强于异新狼毒素 A。两个二氢黄酮类化合物的结构差别仅在于新狼毒素 B 的相对构型是 *cis-trans*,而异新狼毒素 A 的相对构型则为 *cis-cis*,说明两种化合物的活性差异可能与其立体构型有关。

瑞香狼毒是草原上广泛分布的一种毒草,与化学农药相比,它具有很多的优势如高效、低毒、无污染且对环境友好,如将其开发成植物源杀线虫剂具有一定的意义。再者将其变废为宝同时对于草原生态的建设也有一定的影响。本研究通过对瑞香狼毒根中活性物质的研究,为植物源杀线虫剂的开发提供了先导化合物,对我国林业线虫病的防治具有重要的意义。

致谢:感谢兰州大学生命科学院植物及植物生理研究所蒲训副教授对供试植物的鉴定以及南京农业大学森林资源环境学院韩正敏教授对供试线虫的提供与鉴定。

参考文献

- 1 Yang J(杨静),Li JJ(李敬君),Liu Q(刘强). Bioassay of methanol extracts from *Cynanchum komarovii* AL. iijinski on *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2009,21:840-843.
- 2 Xu FY(徐福元),Xi K(席客),Xu G(徐刚),et al. Study

- on the resistances of various year classes of *Pinus massoniana* to pine wood nematode(PWN), *Bursaphelenchus xylophilus*. *J Nanjing Fores Univ*(南京林业大学学报),1994,3:27-33.
- 3 Wei SZ(魏素珍),Shi YM(史延梅),Chen FM(陈凤毛). *Bursaphelenchus mucronatus* and its pathogenicity. *J Anhui Agri Sci*(安徽农业科学),2010,38:20666-20667.
 - 4 Gowen SR. Chemical control of nematodes: efficiency and side-effects. *J Pestic Sci*,2002,2:65-106.
 - 5 Liu Y(刘英),Long RJ(龙瑞军),Yao T(姚拓). Research progress on *Stellera chamaejasme* L. in grassland. *Pratac Sci*(草业科学),2004,6:55-61.
 - 6 Jiang ZH,Tanaka T,Sakamoto T,et al. Biflavonones, diterpenes and coumarins from the roots of *Stellera chamaejasme* L. *Chem Pharm Bull*,2002,1:137-139.
 - 7 Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). Dictionary Traditional Drugs(中药大辞典). Shanghai:Shanghai Scientific and Technical Publishers,1977. 1898.
 - 8 Cao H(曹挥),Liu SQ(刘素琪),Zhao LL(赵莉茜),et al. The effects of the extracts from *Stellera chamaejasme* L. on the biological and enzyme activity of *Tetranychus viennensis* Zacher. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学),2003,1:98-102.
 - 9 Hou TP(侯太平),Cui Q(崔球),Chen SH(陈淑华). New compounds against *Aphides* from *Stellera chamaejasme* L. *Chin J Org Chem*(有机化学),2002,1:67-70.
 - 10 Guo X(郭霞),Ding WJ(丁文娇),Yang JY(杨甲月),et al. Studies on the nematicidal effective fraction of *Stellera chamaejasme* root extracts to *Ditylenchus destructor*. *Plant Prot*(植物保护),2011,1:128-131.
 - 11 Feng BM(冯宝明),Pei YH(裴月湖),Zhang HL(张海龙),et al. Chemical constituents from roots of *Stellera chamaejasme*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2004,35:12-14.
 - 12 Niwa M,Tatematsu H,Liu GQ,et al. Isolation and structures of two new C-3/C-3"-biflavonones neochamaejasmin A and neochamaejasmin B. *Chem Lett*,1984,13:539-542.