

文章编号:1001-6880(2016)5-0719-06

半夏和苦豆子生物碱的抗线虫活性

王伟轩,王愧,徐建美,周立刚*

中国农业大学植物保护学院植物病理学系,北京 100193

摘要:首次研究了半夏和苦豆子生物总碱,以及3种主要的苦豆子单体生物碱(槐定碱、氧化苦参碱和氧化槐果碱)的抗线虫活性。半夏生物总碱处理24 h,对松材线虫、南方根结线虫、全齿复合线虫和秀丽隐杆线虫的半抑制浓度(IC_{50})分别为16.18, 20.25, 33.24和20.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。苦豆子生物总碱处理24 h,对上述4种线虫表现出更强的抑制活性, IC_{50} 值分别为0.622, 0.383, 1.476和1.224 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抗线虫活性强于或接近阳性对照阿维菌素。3种苦豆子单体生物碱均表现出明显的抗线虫活性,其中氧化槐果碱的抗线虫活性最强。研究结果为植物源杀线虫剂的研究和开发提供了依据。

关键词:生物碱;氧化槐果碱;抗线虫活性;半夏;苦豆子;松材线虫;南方根结线虫

中图分类号:Q946.8

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.014

Antinematodal Activity of the Alkaloids from *Pinellia ternata* and *Sophora alopecuroides*

WANG Wei-xuan, WANG Kui, XU Jian-mei, ZHOU Li-gang*

Department of Plant Pathology, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: The total alkaloids from *Pinellia ternata* and *Sophora alopecuroides* along with three main alkaloid monomers (*i.e.*, sophoridine, oxymatrine and oxysophocarpine) from *S. alopecuroides* were firstly screened for their antinematodal activity in this study. After 24 h of treatment, the total alkaloid of *P. ternata* showed antinematodal activity with the median inhibitory concentration (IC_{50}) values of 16.18, 20.25, 33.24 and 20.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on the nematodes *Bursaphelenchus xylophilus*, *Meloidogyne incognita*, *Panagrellus redivivus* and *Caenorhabditis elegans*, respectively. Similarly, the total alkaloid of *S. alopecuroides* showed antinematodal activity with IC_{50} values of 0.622, 0.383, 1.476 and 1.224 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on *B. xylophilus*, *M. incognita*, *P. redivivus* and *C. elegans*, respectively. The total alkaloid of *S. alopecuroides* showed either stronger antinematodal activity than the positive control avermectin or similar activity to it. Three alkaloid monomers from *S. alopecuroides* all showed their obviously antinematodal activity. Among them, oxysophocarpine exhibited the strongest activity. The results provided the support data for the development of plant-derived antinematodal agents.

Key words: alkaloids; oxysophocarpine; antinematodal activity; *Pinellia ternata*; *Sophora alopecuroides*; *Bursaphelenchus xylophilus*; *Meloidogyne incognita*

植物寄生线虫是植物重要的侵染性病原,对农林经济作物造成了相当程度的危害,线虫病害已成为作物种植和生产的严重障碍,如根结线虫(*Meloidogyne* spp.)为害黄瓜、番茄、辣椒等蔬菜的生产,松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)能导致松树的毁灭^[1]。防治植物病原线虫的措施主要有生物防治、栽培措施、抗性品种和化学防治,现仍以化学防治为主^[1]。由于化学农药的高毒性和对环境造成的破

坏,以及线虫产生的抗药性,许多杀线剂如涕灭威、克百威、灭线磷、苯线磷、溴甲烷等相继被禁用,这就要求我们不断寻找新的杀线虫成分^[2]。由于长期的协同进化,植物中含有丰富的抗(杀)线虫活性成分,这些杀线虫成分一方面可以直接开发成杀线虫剂,另一方面可以作为创制新型杀线剂的先导化合物^[3,4]。如来源于芝麻籽油或芝麻籽粉的“Dragon-fire-CPP Ontrol”(Poulenger USA Inc.)、来源于芝麻茎秆的“Neo-trol”(Barmac Industries, Australia)、来源于植物木质部的“Crop Guard”(Illova Sugar Ltd., South Africa)、来源于印楝的“Neem Nematic 10G”等已开发成植物源杀线虫剂^[5]。

收稿日期:2015-10-08 接受日期:2016-03-23

基金项目:国家高技术研究发展计划(2011AA10A202)
*通讯作者 Tel:86-10-62731199; E-mail:lgzhou@cau.edu.cn

植物中的抗(杀)线虫活性物质包括脂肪酸类、聚乙炔类、聚噻吩类、呋喃类、萜类和生物碱类,其中多数活性物质为生物碱^[3,6],如从长春花(*Catharanthus roseus*)根中分离到的蛇根碱(Serpentine)能抑制南方根结线虫卵的孵化^[7],从苦参(*Sophora flavescens*)中分离到的喹诺里西啶类生物碱能明显地抑制松材线虫的繁殖^[8]。

半夏(*Pinellia ternata*)和苦豆子(*Sophora alopecuroides*)分别属于天南星科和豆科,是主要分布在我国的资源植物。半夏含有麻黄碱、胆碱等生物碱,具有解毒、止痛和消肿等功效^[9]。苦豆子富含槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱等生物碱,是一种抗逆性很强的多年生药用植物^[10,11]。杜小凤等报道苦豆子甲醇提取物对南方根结线虫有一定的防效^[12],尚未见半夏和苦豆子生物总碱抗线虫活性的报道。本论文以两种植物病原线虫(松材线虫和南方根结线虫),以及1种非寄生线虫(全齿复合线虫)和1种模式线虫(秀丽隐杆线虫)为供试线虫,对半夏和苦豆子生物总碱,以及苦豆子主要单体生物碱——槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱进行抗线虫活性评价,为植物源杀线虫剂的研究和开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

AL-104型电子分析天平(Mettler Toledo仪器上海有限公司),FLC-3型超净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司),LS-B55L型蒸汽灭菌锅(江阴滨江医疗仪器厂),DRP-9162型恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司),DELTA-320型pH计(Mettler Toledo仪器上海有限公司),RE50型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),TTL-30C型超纯水器(北京同泰联科技发展有限公司),XTB-01体视显微镜(广西桂光仪器有限公司),DP70型倒置显微镜(Olympus, Japan),96孔培养板(北京),孢子计数器(绍兴医疗器械厂),TG16W微孔板离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)等。

甲醇、乙醇、氯仿、丙酮等试剂均为分析纯。阿维菌素(Avermectin)由农业部农药检定所袁善奎博士提供。苦豆子生物碱单体:槐定碱(Sophoridine)、氧化苦参碱(Oxymatrine)和氧化槐果碱(Oxysophocarpine)购自中国药品生物制品检定所,含量为99.9%。

1.2 植物样品和供试线虫

半夏(*Pinellia ternata*)块茎由山东菏泽市菏泽丰源中药材研究所提供。苦豆子(*Sophora alopecuroides*)种子由内蒙古鄂尔多斯金陀药业有限责任公司提供。松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)由中国农业科学院蔬菜花卉研究所谢丙炎研究员提供,将灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)菌丝接种到PDA平板上,在25℃下黑暗培养3~5d,待菌丝长满整个平板,接种松材线虫于平板中央,继续在25℃下黑暗培养7d,即可繁殖到大量的松材线虫。南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)由中国农业大学植物病理学系简恒教授提供,在温室中栽培蕹菜(*Ipomoea aquatica*),采用灌根法接种二龄幼虫(J2),1个月后取下发病根结上胶质卵囊,置于孔径为400目的尼龙网上进行孵化,2~7d后陆续有J2s孵化出来,即可用于抗线虫活性测定。全齿复合线虫(*Panagrellus redivivus*)由云南大学生物资源保护与利用省属重点实验室张克勤教授提供,全齿复合线虫在25℃下于燕麦培养基(每升培养基中含燕麦片100g,琼脂15g,121℃湿热灭菌20min)上暗培养3~5d,即可得到大量的线虫。秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)由中国科学院遗传与发育研究所杨崇林研究员提供,首先用LB培养基培养大肠杆菌(*Escherichia coli*),然后接种秀丽隐杆线虫,继续培养3~5d,繁殖的线虫即可长满平板。

1.3 生物总碱的制备

半夏生物总碱的制备^[13]:半夏块茎经干燥粉碎后,取60g,加氨水60mL使材料湿润,加氯仿浸泡3次,每次24h(3×0.5L),合并氯仿提取液,浓缩得生物总碱(0.5g,得率为0.83%)。

苦豆子生物总碱的制备^[14]:苦豆子种子干燥粉碎后,取500g,用pH值为3的酸水提取3次,提取液用石油醚萃取,水层部分用25%氨水调pH值至10,用氯仿萃取,浓缩氯仿提取液得苦豆子生物总碱(3.1g,得率为0.64%)。

1.4 抗线虫活性测定

在预试验的基础上,选择合适的溶剂溶解生物碱,配制成不同浓度的母液。半夏生物总碱溶于30%的丙酮中,母液浓度分别为1000、500、250、125和62.5μg/mL。苦豆子生物总碱和各单体生物碱溶于蒸馏水中,母液浓度分别为25、20、10、7.5、5.0、0.5、0.25μg/mL。

首先制备高浓度的线虫水悬浮液,在倒置显微

镜下记数,用蒸馏水稀释成浓度为300~500头/mL的线虫水悬浮液。取96微孔板,每孔加入90 μL线虫悬浮液,然后加入待测样品液10 μL,6次重复,设置同等浓度的溶剂为阴性对照,阿维菌素为阳性对照,蒸馏水为空白对照^[15]。

1.5 数据处理

采用Microsoft Excel软件进行数据处理。在分析中,供试样品浓度(μg/mL)取对数(X),抑制率(%)换算成生物统计机率值(Y),求得抑制活性回归方程(Y=aX+b),从而可以求得半抑制浓度(IC₅₀)值。

2 结果与分析

2.1 生物总碱对松材线虫的抑制活性

两种植物生物总碱对松材线虫的抑制活性见表1。半夏生物总碱处理24 h和48 h,对松材线虫半抑制浓度(IC₅₀)值分别为16.18 μg/mL和12.25 μg/mL。苦豆子生物总碱处理24 h和48 h,对松材线虫的IC₅₀值分别为0.622 μg/mL和0.453 μg/mL,表现出较强的抗松材线虫的活性,且活性明显强于阳性对照阿维菌素(对应的IC₅₀值分别为1.568 μg/mL和0.871 μg/mL)。

表1 生物总碱对松材线虫的抑制活性

Table 1 Antinematodal activity of the total alkaloids on *B. xylophilus*

生物碱 Total alkaloid	处理时间 Period of treatment(h)	线性方程 Linear equation $Y = aX + b$	相关系数 Correlation coefficient (R)	半抑制浓度 IC ₅₀ (μg/mL)
半夏生物总碱 Total alkaloid from <i>P. ternate</i>	12	$Y = 0.482X + 4.340$	0.9848	23.40
	24	$Y = 0.713X + 4.423$	0.9860	16.18
	48	$Y = 0.545X + 4.407$	0.9929	12.25
苦豆子生物总碱 Total alkaloid from <i>S. alopecuroides</i>	12	$Y = 1.510X + 4.782$	0.9638	1.394
	24	$Y = 1.361X + 5.281$	0.9905	0.622
	48	$Y = 1.365X + 5.469$	0.9894	0.453
阳性对照(阿维菌素) CK ⁺ (Avermectin)	12	$Y = 1.239X + 4.599$	0.9727	2.103
	24	$Y = 1.198X + 4.766$	0.9823	1.568
	48	$Y = 0.816X + 5.049$	0.9854	0.871

2.2 生物总碱对南方根结线虫的抑制活性

两种植物生物总碱对南方根结线虫的抑制活性见表2,结果与对松材线虫的抑制活性类似。半夏生物总碱处理24 h和48 h,对南方根结线虫的IC₅₀

值分别为20.25 μg/mL和17.77 μg/mL。苦豆子生物总碱处理24 h和48 h,对南方根结线虫的IC₅₀值分别为0.383 μg/mL和0.363 μg/mL,表现出较强的抗南方根结线虫的活性,且活性明显强于阳性对

表2 生物总碱对南方根结线虫的抑制活性

Table 2 Antinematodal activity of the total alkaloids on *M. incognita*

生物总碱 Total alkaloid	处理时间 Period of treatment(h)	线性方程 Linear equation $Y = aX + b$	相关系数 Correlation coefficient(R)	半抑制浓度 IC ₅₀ (μg/mL)
半夏生物总碱 Total alkaloid from <i>P. ternate</i>	12	$Y = 1.024X + 3.536$	0.9849	26.89
	24	$Y = 1.031X + 3.653$	0.9905	20.25
	48	$Y = 1.041X + 3.699$	0.9905	17.77
苦豆子生物总碱 Total alkaloid from <i>S. alopecuroides</i>	12	$Y = 1.555X + 5.458$	0.9777	0.508
	24	$Y = 2.266X + 5.944$	0.9828	0.383
	48	$Y = 1.626X + 5.716$	0.9762	0.363
阳性对照(阿维菌素) CK ⁺ (Avermectin)	12	$Y = 0.936X + 4.744$	0.9798	1.877
	24	$Y = 1.033X + 4.804$	0.9894	1.547
	48	$Y = 1.283X + 4.946$	0.9820	1.102

照阿维菌素(对应的 IC_{50} 值分别为 1.547 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.102 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2.3 生物总碱对全齿复合线虫的抑制活性

两种植物生物总碱对全齿复合线虫的抑制活性见表 3。半夏生物总碱处理 24 h 和 48 h, 对全齿复合线虫的 IC_{50} 值分别为 33.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 29.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。苦豆子生物总碱处理 24 h 和 48 h, 对全齿复合线虫的 IC_{50} 值分别为 1.476 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.360 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表现出较强的抗全齿复合线虫的活性, 但抑制活性弱于阳性对照阿维菌素(对应的 IC_{50} 值分别为 0.976 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.781 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

表 3 生物总碱对全齿复合线虫线虫的抑制活性

Table 3 Antinematodal activity of the total alkaloids on *P. redivivus*

生物总碱 Total alkaloid	处理时间 Period of treatment (h)	线性方程 Linear equation $Y = aX + b$	相关系数 Correlation coefficient (<i>R</i>)	半抑制浓度 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
半夏生物总碱 Total alkaloid from <i>P. ternate</i>	12	$Y = 1.444X + 2.615$	0.9813	44.84
	24	$Y = 1.334X + 2.970$	0.9889	33.24
	48	$Y = 1.314X + 3.077$	0.9925	29.07
苦豆子生物总碱 Total alkaloid from <i>S. alopecuroides</i>	12	$Y = 1.429X + 4.432$	0.9984	4.495
	24	$Y = 1.433X + 4.757$	0.9920	1.476
	48	$Y = 1.587X + 4.788$	0.9823	1.360
阳性对照(阿维菌素) CK ⁺ (Avermectin)	12	$Y = 1.001X + 4.741$	0.9990	1.814
	24	$Y = 0.971X + 5.001$	0.9880	0.976
	48	$Y = 1.129X + 5.120$	0.9813	0.781

2.4 生物总碱对秀丽隐杆线虫的抑制活性

两种植物生物总碱对秀丽隐杆线虫的抑制活性见表 4。半夏生物总碱处理 24 h 和 48 h, 对秀丽隐杆线虫的 IC_{50} 值分别为 20.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 13.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。苦豆子生物总碱处理 24 h 和 48 h, 对秀丽隐杆

线虫的 IC_{50} 值分别为 1.224 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.095 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表现出较强的抗秀丽隐杆线虫的活性, 苦豆子生物总碱的抗线虫活性稍强于阳性对照阿维菌素(对应的 IC_{50} 值分别为 1.542 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.448 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

表 4 生物总碱对秀丽隐杆线虫的抑制活性

Table 4 Antinematodal activity of the total alkaloids on *C. elegans*

生物总碱 Total alkaloid	处理时间 Period of treatment (h)	线性方程 Linear equation $Y = aX + b$	相关系数 Correlation coefficient (<i>R</i>)	半抑制浓度 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
半夏生物总碱 Total alkaloid from <i>P. ternate</i>	12	$Y = 0.429X + 4.390$	0.9965	26.41
	24	$Y = 0.438X + 4.423$	0.9860	20.77
	48	$Y = 0.512X + 4.425$	0.9930	13.27
苦豆子生物总碱 Total alkaloid from <i>S. alopecuroides</i>	12	$Y = 2.545X + 4.379$	0.9500	1.754
	24	$Y = 2.616X + 4.770$	0.9813	1.224
	48	$Y = 2.761X + 4.891$	0.9787	1.095
阳性对照(阿维菌素) CK ⁺ (Avermectin)	12	$Y = 1.457X + 4.652$	0.9798	1.733
	24	$Y = 1.638X + 4.692$	0.9767	1.542
	48	$Y = 1.884X + 4.697$	0.9823	1.448

2.5 苦豆子单体生物碱对 4 种线虫的抑制活性

3 种苦豆子单体生物碱(槐定碱、氧化苦参碱和氧化槐果碱)对 4 种线虫(松材线虫、南方根结线

虫、全齿复合线虫和秀丽隐杆线虫)的抑制活性见表 5。3 种单体生物碱均表现出明显的抗线虫活性, 其中氧化槐果碱对 4 种供试线虫均表现出最强的抗

线虫活性,处理48 h,对松材线虫、南方根结线虫、全齿复合线虫和秀丽隐杆线虫的 IC_{50} 值分别为0.283、0.263、0.960和0.395 $\mu\text{g}/\text{mL}$,槐定碱的抗线虫活性中等,氧化苦参碱的抗线虫活性相对较弱,说明这3种单体生物碱均为苦豆子总碱中的抗线虫活性成分。由于氧化槐果碱分子中含有烯键,极性相对较

小,这也许是其抗线虫活性强的原因。3种单体生物碱对松材线虫、南方根结线虫和秀丽隐杆线虫的抑制活性较强,而对全齿复合线虫的抑制活性相对较弱,说明不同种类的线虫对苦豆子生物碱的敏感性不同。

表5 苦豆子单体生物碱对4种线虫的抑制活性

Table 5 Antinematodal activity of the alkaloid monomers from *S. alopecuroides* on *C. elegans*

生物碱 Alkaloid	处理时间 Period of treatment (h)	半抑制浓度 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
		松材线虫 <i>B. xylophilus</i>	南方根结线虫 <i>M. incognita</i>	全齿复合线虫 <i>P. redivivus</i>	秀丽隐杆线虫 <i>C. elegans</i>
槐定碱 Sophoridine	12	1.497	1.518	4.192	2.163
	24	0.822	0.683	2.486	1.224
	48	0.453	0.371	1.173	0.785
氧化苦参碱 Oxymatrine	12	1.694	1.608	5.203	3.754
	24	0.722	0.784	2.593	1.823
	48	0.554	0.463	1.362	1.095
氧化槐果碱 Oxsophocarpine	12	1.094	0.622	3.244	0.827
	24	0.622	0.391	1.631	0.514
	48	0.283	0.263	0.960	0.395

注:阳性对照(阿维菌素)对4种线虫的 IC_{50} 值分别见表1~表4。

Note: The IC_{50} values of the positive control (avermectin) on four nematodes were shown in Tables 1-4.

3 结论

我国植物种类繁多,资源丰富,然而植物源抗线虫活性成分的研究还处于初步阶段^[3]。本研究首次评价了半夏和苦豆子生物总碱,以及苦豆子的3种主要单体生物碱对松材线虫、南方根结线虫、全齿复合线虫和秀丽隐杆线虫的抑制活性。两种生物总碱均表现出较好的抗线虫活性,且苦豆子生物总碱的抗线虫活性更强。3种苦豆子单体生物碱中,氧化槐果碱对4种供试线虫均表现出强的抗线虫活性。半夏生物总碱中的单体生物碱,以及苦豆子总碱中的其它单体生物碱的抗线虫活性有待深入研究。本研究结果为植物源杀线虫剂的研究和开发提供了依据。

参考文献

- Hassan MA, Pham TH, Shi H, et al. Nematodes threats to global food security. *Acta Agric Scand B-Soil Plant Sci*, 2013, 63:420-425.
- Zasada IA, Halbrendt JM, Kokalis-Burelle N, et al. Managing nematodes without methyl bromide. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48:311-328.

- Zhou L, Wang J, Wang K, et al. Secondary metabolites with antinematodal activity from higher plants. *Stud Nat Prod Chem*, 2012, 37:67-114.
- Ntalli NG, Caboni P. Botanical nematicides: a review. *J Agric Food Chem*, 2012, 60:9929-9940.
- Perry RN, Moens M. *Plant Nematology*, Wallingford, UK: CABI Publishing, 2006.
- Chitwood DJ. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annu Rev Phytopathol*, 2002, 40:221-249.
- Rao MS, Reddy PP, Mittal A, et al. Effect of some secondary plant metabolites as seed treatment agents against *Meloidogyne incognita* on tomato. *Nematol Mediterr*, 1996, 24:49-51.
- Matsuda K, Yamada K, Kimura M, et al. Nematicidal activity of matrine and its derivatives against pine wood nematodes. *J Agric Food Chem*, 1991, 29:189-191.
- Zhang YJ(张跃进), Meng XH(孟祥海), Yang DF(杨东风), et al. Comparative study on chemical constituents of *Pinellia ternata* under different light intensities. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), 2009, 27:533-536.
- Li AH(李爱华), Sun ZJ(孙兆军). The developmental situation and application potential of *Sophora alopecuroides*. *J Ningxia Univ*(宁夏大学学报), 2000, 21:354-356.

(下转第744页)