

DOI:CNKI:61-1390/S.20111025.2133.035

网络出版时间:2011-10-25 21:33

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111025.2133.035.html>

山萆对南方根结线虫生长发育的影响

邓乐晔, 翁群芳, 张天柱, 胡美英, 朱富伟

(华南农业大学 昆虫毒理研究室, 天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东 广州 510642)

[摘要] **【目的】**研究山萆根茎提取物及其萃取物对南方根结线虫生长发育的影响, 为南方根结线虫的防治提供支持。**【方法】**以室内培养和盆栽试验的方法, 研究了山萆根茎提取物以及其不同萃取物对南方根结线虫胚胎发育、胚后发育和 2 龄幼虫孵化的影响。**【结果】**1 000 mg/L 山萆正己烷萃取物、氯仿萃取物对南方根结线虫的胚胎发育和卵的孵化具有明显的抑制作用, 2 种萃取物对南方根结线虫 2 龄幼虫 3, 6, 9 d 的孵化抑制率均为 100%; 山萆根茎甲醇粗提物对南方根结线虫胚后发育的影响, 主要表现在 4 龄幼虫发育为成虫的发育历期推迟了 3 d, 雌虫产卵的初产日推迟了 2 d, 并且雌虫产卵量减少。**【结论】**山萆根茎提取物对南方根结线虫生长发育具有明显的抑制作用。

[关键词] 山萆; 南方根结线虫; 胚胎发育; 胚后发育

[中图分类号] S482.3⁺9; S482.5⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)12-0134-05

Effect of *Kaempferia galanga* L. on the development of *Meloidogyne incongnita*

DENG Yue-ye, WENG Qun-fang, ZHANG Tian-zhu,
HU Mei-ying, ZHU Fu-wei

(Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University & Key Laboratory of
Pesticides and Chemical Biology Ministry of Education of P. R. China, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: **【Objective】**The objective of this paper was to study the effect of the extract of *Kaempferia galanga* L. on the development of root-knot nematode, *Meloidogyne incongnita*. **【Method】**The effects on embryonic development, postembryonic development as well as the hatching of second instar larvae of root-knot nematode, *M. incongnita* were studied by indoor culture and pot experiment. **【Result】**The results showed that the n-hexane extracts and the chloroform extracts could significantly inhibit embryonic development and larva hatching, the inhibition rate of hatching of the two extracts to second instar larvae on the 3rd, 6th, 9th day reached 100%; The pot experiments revealed that the development of post-embryonic from fourth instar larvae to adult was prolonged 3 days longer when treated with the methanol extracts of *K. galanga* L., while the the female reproduction was prolonged 2 days longer and the egg laying number was reduced significantly. **【Conclusion】**The extracts of *K. galanga* L. could significantly inhibit the development of root-knot nematode, *M. incongnita*, providing theoretical basis for applying *K. galanga* L. to control plant nematode diseases.

Key words: *Kaempferia galanga* L.; *Meloidogyne incongnita*; development of embryonic; development of post-embryonic

* [收稿日期] 2011-06-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30400037)

[作者简介] 邓乐晔(1987—), 女, 哈尼族, 云南普洱人, 在读硕士, 主要从事植物源农药研究。E-mail: dengyueye@163.com

[通信作者] 翁群芳(1972—), 女, 广东梅州人, 副教授, 在读博士, 硕士生导师, 主要从事植物源农药研究。

E-mail: wengweng@scau.edu.cn

植物病原线虫是植物病害的主要病原之一,其种类较多,每年给世界农业生产带来的损失难以估计^[1]。当前防治线虫的农药大多为高毒、高残留的化学杀线虫剂,因而从植物中寻找活性物质来防治线虫,已成为目前的研究热点^[2]。

山萆(*Kaempferia galanga* L.)为姜科山萆属植物,又称沙姜、三萆子,属多年生草本植物,是中国传统的中药材^[3]。研究表明,山萆中的主要成分包括黄酮类物质和对甲氧基肉桂酸乙酯、肉桂酸乙酯、龙脑等^[4-6],具有抗氧化、抗肿瘤、抗真菌等生物活性^[7-10]。张天柱等^[11]研究认为,山萆对松材线虫、南方根结线虫、马铃薯茎腐烂线虫均具有显著的毒杀活性,并分离出 2 种活性物质对甲氧基肉桂酸乙酯和肉桂酸乙酯,其对南方根结线虫的 LC₅₀ 分别为 1.49 和 17.79 mg/L。

本研究以室内培养和盆栽实验的方法,研究山萆提取物及其活性物质对南方根结线虫生长发育的影响,以期为今后利用山萆防治根结线虫,用其活性物质作为合成高效杀线剂的优秀先导化合物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试植物

山萆购自广州常平中药市场。

1.2 山萆萃取物的制备

山萆粗提物的提取采用超声波提取法^[12]。将山萆放进 50℃ 的电热鼓风箱内烘干后,用电动粉碎机粉碎,加入 10 倍体积的甲醇,室温下超声波提取 15 min,将抽滤得到的滤液放在旋转蒸发仪上蒸发浓缩,直至成干粉或膏状物,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

山萆粗提物活性成分的初步分离采用液液分配萃取法^[13]。取山萆根茎甲醇粗提物,用少量甲醇溶解后,再加 300 mL 的蒸馏水热溶,转入分液漏斗,用正己烷 300 mL 萃取 3 次,水层用氯仿 300 mL 萃取 3 次,最后用正丁醇 300 mL 萃取 3 次。分别将正己烷、氯仿、正丁醇、乙酸乙酯以及剩余的水层减压浓缩得到各萃取物,通过活性追踪、柱层析、薄层层析等方法,从正己烷萃取物中得到对线虫具有室内毒杀活性的 2 种化合物肉桂酸乙酯和对甲氧基肉桂酸乙酯。

1.3 山萆各萃取物对南方根结线虫胚胎发育的影响

参照文献^[14]的方法,将患病的马铃薯病根冲洗干净,于解剖镜下摘取大小一致的卵囊,用体积分数 1% 的次氯酸钠溶液消毒 10 min,再用无菌水冲

洗 3 遍,用滴管吸取单胞卵 8~10 粒至凹玻片凹穴内,分别加 1 000 mg/L 的山萆各萃取物,设 3 次重复,以加无菌水为对照(CK)。在 25℃ 培养箱内培养,处理组 24 h 后除去提取液,换成清水继续观察。于 24,72,120,168 h 观察并记录卵的发育进度。

1.4 山萆萃取物对南方根结线虫卵孵化的影响

将患病的马铃薯病根冲洗干净,解剖镜下摘取大小一致的卵囊,用体积分数 1% 的次氯酸钠溶液消毒 5 min,再用无菌水冲洗 3 遍。将卵囊一分为二:一半作各萃取物处理;一半作清水对照。在 5 mL 的离心管中加入 1 000 mg/L 萃取物溶液 2 mL,再将半个卵囊放入离心管中,盖上盖子后,置于 25℃ 培养箱中培养,每处理重复 3 次,以清水作为对照。24 h 后,除去处理溶液,将卵囊置于直径 2 cm 的培养皿中,并加入 1 mL 的清水,置于 25℃ 的培养箱内孵化,于 3,6,9 d 后检查孵化的 2 龄线虫数,按下式计算各萃取物对 2 龄线虫幼虫孵化的抑制率:

2 龄幼虫孵化抑制率=(对照 2 龄幼虫孵化数-处理 2 龄幼虫孵化数)/对照 2 龄幼虫孵化数×100%。

1.5 山萆甲醇粗提物对南方根结线虫胚后发育的影响

将 100 mL 灭菌土壤装入直径 15 cm、高 13 cm 的花盆中,用无菌水浸湿,每盆中再加入约 1 000 条南方根结线虫 2 龄幼虫。处理组淋 1 000 mg/L 山萆甲醇粗提物水溶液 50 mL,对照组淋清水 50 mL,每处理设 4 个重复。处理当天每盆接 200 粒番茄种子。出苗后每天取样调查,每处理取 5 株番茄,将根冲洗干净,在解剖镜下解剖,记录各发育阶段幼虫出现的日期(50% 根结出现各个发育阶段幼虫的时间)和完成发育的历期、初产卵日及雌虫产卵量(初产日当天计算 10 个卵囊的平均卵粒数)。

1.6 数据统计与分析

2 龄幼虫孵化率等数据用 EXCEL2000 统计,除明确说明外,2 龄幼虫孵化抑制率结果均以“平均数±标准误差(SE)”表示。采用邓肯式新复极差检验法(Duncan’s Multiple Ranger Test,DMRT)进行方差分析。统计分析均采用 SAS 国际通用统计软件进行。

2 结果与分析

2.1 山萆各萃取物对南方根结线虫胚胎发育的影响

表 1 结果表明,1 000 mg/L 山萆甲醇提取物的

不同萃取物对南方根结线虫胚胎发育的影响存在一定差异。其中正己烷萃取物、氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物可显著抑制供试线虫的胚胎发育,正丁醇萃取物和水萃取物处理则与 CK 无明显差异,对甲氧

基肉桂酸乙酯和肉桂酸乙酯 2 种活性物质对线虫胚胎发育的抑制作用更为明显,主要表现为胚胎发育明显滞后于 CK,大部分胚胎停留在单胞至多胞期。

表 1 山萘各萃取物对南方根结线虫胚胎发育的影响

Table 1 Effect of ertraction of *Kaempferia galanga* L. on the embryonic development of *Meloidogyne incongnita*

培养时间/h Time	处理 Treatment	胚胎所占比例/% Percentage of embryonic				
		单胞期 1 cell	双胞期 2 cell	多胞期 3cell or more	囊胚期 Blastula	1 龄期 Juvenile 1
24	正己烷萃取物 Hexane extarct	88.00	12.00	—	—	—
	氯仿萃取物 Chloroform extarct	91.50	8.50	—	—	—
	乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extarct	70.00	10.00	20.00	—	—
	正丁醇萃取物 n-buranol extarct	50.00	24.50	25.50	—	—
	水萃取物 Water extarct	60.00	20.00	20.00	—	—
	对甲氧基肉桂酸乙酯 Ethyl P-Methoxyl cinnamate	92.00	8.00	—	—	—
	肉桂酸乙酯 Ethyl cinnamate	90.00	10.00	—	—	—
	清水 CK Water(CK)	65.00	15.00	20.00	—	—
72	正己烷萃取物 Hexane extarct	61.00	8.00	31.00	—	—
	氯仿萃取物 Chloroform extarct	54.00	10.00	23.00	13.00	—
	乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extarct	25.00	10.00	10.00	50.00	5.00
	正丁醇萃取物 n-buranol extarct	11.00	4.00	30.00	30.00	25.00
	水萃取物 Water extarct	10.00	5.00	30.00	30.00	25.00
	对甲氧基肉桂酸乙酯 Ethyl P-Methoxyl cinnamate	70.00	10.00	20.00	—	—
	肉桂酸乙酯 Ethyl cinnamate	60.00	11.00	29.00	—	—
	清水 CK Water(CK)	20.00	13.00	—	53.00	14.00
120	正己烷萃取物 Hexane extarct	50.00	16.00	26.00	8.00	—
	氯仿萃取物 Chloroform extarct	34.00	—	27.00	34.00	5.00
	乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extarct	10.00	—	23.00	57.00	10.00
	正丁醇萃取物 n-buranol extarct	—	—	14.00	26.00	60.00
	水萃取物 Water extarct	—	—	15.00	19.00	66.00
	对甲氧基肉桂酸乙酯 Ethyl P-Methoxyl cinnamate	59.00	6.00	31.75	4.25	—
	肉桂酸乙酯 Ethyl cinnamate	52.00	18.00	24.00	6.00	—
	清水 CK Water(CK)	—	—	15.00	17.00	68.00
168	正己烷萃取物 Hexane extarct	45.00	—	50.00	5.00	—
	氯仿萃取物 Chloroform extarct	16.00	—	36.00	42.00	6.00
	乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extarct	6.00	—	16.00	48.00	30.00
	正丁醇萃取物 n-buranol extarct	—	—	—	10.00	90.00
	水萃取物 Water extarct	—	—	—	10.00	90.00
	对甲氧基肉桂酸乙酯 Ethyl P-Methoxyl cinnamate	59.00	6.00	31.75	4.25	—
	肉桂酸乙酯 Ethyl cinnamate	49.00	21.00	25.00	5.00	—
	清水 CK Water(CK)	—	—	—	8.00	92.00

处理 120 h 后,CK 与正丁醇和水萃取物处理的卵已全部进入多胞期,而且有 60% 以上的卵进入 1 龄幼虫期而完成了胚胎发育历程,而正己烷萃取物处理组仍有 50% 的卵处于单胞期,氯仿萃取物与乙酸乙酯萃取物处理组分别有 34% 和 10% 的卵处于单胞期。168 h 后,CK 与正丁醇和水萃取物处理组有 90% 以上的卵进入 1 龄幼虫期,而正己烷萃取物处理组及对甲氧基肉桂酸乙酯、肉桂酸乙酯 2 种活性物质处理组仍分别有 45%,59% 和 49% 的卵处于

单胞形态,且没有卵发育为 1 龄幼虫;氯仿萃取物与乙酸乙酯萃取物处理组的大部分卵处于囊胚期,且仍有少数的卵停留在单胞期,有 6% 和 30% 的卵发育为 1 龄幼虫。

2.2 山萘各萃取物对南方根结线虫 2 龄幼虫孵化的影响

从表 2 可以看出,正己烷、氯仿、乙酸乙酯萃取物水溶液对南方根结线虫 2 龄幼虫的孵化具有明显的抑制作用,用 1 000 mg/L 的各萃取物水溶液分别

处理线虫卵囊 3,6,9 d 后,正己烷和氯仿萃取物对 2 龄幼虫的孵化抑制率均为 100%,乙酸乙酯萃取物对 2 龄幼虫孵化的抑制率分别为 86.88%,85.45% 和 85.27%。而正丁醇与水萃取物对 2 龄幼虫的孵

化无明显抑制作用,处理 9 d 后其对 2 龄幼虫孵化的抑制率均在 5% 左右;甲氧基肉桂酸乙酯和肉桂酸乙酯 2 种活性物质对 2 龄幼虫孵化的抑制率均为 100%。

表 2 山萘各萃取物对南方根结线虫 2 龄幼虫孵化的影响

处理 Treatment		孵化抑制率/% Inhibition rate of hatching		
		3 d	6 d	9 d
正己烷萃取物 Hexane extarct		100 a	100 a	100 a
氯仿萃取物 Chloroform extarct		100 a	100 a	100 a
乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extarct		86.88±0.005 6 b	85.45±0.068 4 b	85.27±0.064 2 b
正丁醇萃取物 n-buranol extarct		19.31±0.107 8 c	13.71±0.122 3 c	5.24±0.134 2 c
水萃取物 Water extarct		11.28±0.087 4 c	13.94±0.075 3 c	3.11±0.103 4 c
对甲氧基肉桂酸乙酯 ethyl P-Methoxyl cinnamate		100 a	100 a	100 a
肉桂酸乙酯 ethyl cinnamate		100 a	100 a	100 a

2.3 山萘甲醇粗提物对南方根结线虫胚后发育的影响

表 3 结果表明,山萘根茎甲醇粗提物对南方根结线虫胚后发育有明显的抑制作用。对照组从 2 龄幼虫侵入根内到根内出现雌成虫的历程为 12 d,而

使用 50 mL/盆 1 000 mg/L 山萘根茎甲醇粗提物处理后,其发育历期延长为 15 d,较对照组推迟了 3 d。推迟期处于从 4 龄幼虫发育为成虫阶段,对照组从 4 龄幼虫发育为成虫需要 3 d,而处理组需要 6 d。

表 3 山萘甲醇粗提物对南方根结线虫胚后发育的影响

处理 Treatment		2 龄 Second stage juvenile		3 龄 Third stage juvenile		4 龄 Fourth stage juvenile		雌成虫 Adult female		雌成虫初产卵日期 Day of spawn	雌虫产卵量/(粒·卵囊 ⁻¹) Amount of eggs
		虫态出现日期 Emerging date of stage	完成虫态时间/d Days of completing the development stage	虫态出现日期 Emerging date of stage	完成虫态的时间/d Days of completing the development stage	虫态出现日期 Emerging date of stage	完成虫态的时间/d Days of completing the development stage	虫态出现日期 Emerging date of stage	发育历期/d Develop-mental period		
甲醇粗提物 Methanol extarct		08-22	3	08-28	6	08-31	3	09-06	15	09-15	54*
CK		08-22	3	08-28	6	08-31	3	09-03	12	09-10	13

注:1)番茄出苗日期为 08-19;2)* 表示数据经 t 检验差异显著(0.01<P<0.05)。产卵量为 09-22 统计结果。
Note:1) The date of to tomato seedling is 08-19;2)* means there were significant differences at 0.01<P<0.05 using t test. The fecundity was the results on 22nd,September.

山萘根茎甲醇粗提物对南方根结线虫胚后发育的影响,还表现在降低雌虫产卵量方面,调查发现,处理组雌虫的平均产卵量为 54 粒/卵囊,而对照组的平均产卵量为 13 粒/卵囊。此外,处理组还能推迟初产卵日期,对照组从出现雌虫到雌虫产卵需要 7 d,而处理组则需要 9 d,即处理组的初产卵日期较对照组推迟了 2 d。

3 结论与讨论

1 000 mg/L 山萘根茎甲醇提取物的 5 种萃取物中,正己烷萃取物与氯仿萃取物对南方根结线虫的胚胎发育具有明显的抑制作用,抑制作用主要表现在胚胎发育进程较对照相对滞后,或者停留在某

一时期而不能完成胚胎发育,对 2 龄幼虫孵化的抑制率达到 100%。与正己烷萃取物中分离到的活性物质对甲氧基肉桂酸乙酯和肉桂酸乙酯对南方根结线虫胚胎发育、2 龄幼虫孵化的抑制作用相一致。可以初步推断,正己烷萃取物中发挥作用的物质为对甲氧基肉桂酸乙酯与肉桂酸乙酯 2 种活性物质。

1 000 mg/L 的山萘根茎甲醇粗提物处理对南方根结线虫胚后发育的影响,主要表现为其可推迟 4 龄幼虫到成虫的发育,与对照相比,雌虫产卵的初产日推迟了 2 d,雌虫产卵量也显著降低,但对其作用机理还有待进一步研究。

目前对植物病原线虫的防治,主要还是选用高毒、高残留的化学农药,对环境造成了严重的危害,

而利用杀线虫植物进行植物病原线虫的生物防治已成为研究热点^[15-16]。本研究从植物源农药入手,为山萆应用于植物线虫病的防治提供了理论基础,也表明山萆在防治植物线虫病方面具有一定的田间应用前景。

[参考文献]

[1] 刘青娥,曹鹏飞. 植物线虫的研究与防治 [J]. 安徽农业科学, 2006,34(18):4644-4645.
Liu Q E, Cao P F. Research progress in the control of plant nematode [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34 (18):4644-4645. (in Chinese)

[2] Sangwan N K, Verma K K, Dhindsa K S. Nematicidal activity of some essential plant oils [J]. Pestic Sci, 1990, 28:331-335.

[3] 钱信忠. 山 萆. 中国本草彩色图谱:常用中药篇 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
Qian X Z. *Kaempferia galanga* L. Chinese materia medica i- cones: Common use Chinese medicine discourse [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1996. (in Chinese)

[4] 洪 莉. 中药山萆挥发油主要成分的测定 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(11):1021-1023.
Hong L. Determination of main component in volatilization oil from *Kaempferia galanga* L. [J]. China Journal of Tradition- al Chinese Medicine and Pharmacy, 2008, 23(11):1021-1023. (in Chinese)

[5] 张 岩,徐玉娟,王 萍. 沙姜类黄酮类物质的功能研究进展 [J]. 广东农业科学, 2009(1):73-74.
Zhang Y, Xu Y J, Wang P. Research advance on the function of sand ginger and flavonoids [J]. Guangdong Agricultural Sci- ences, 2009(1):73-74. (in Chinese)

[6] Choochate W, Kananopth D, Panthong A. Larvicidal, adulticidal and repellent effects of *Kaempferia galanga* [J]. Southeast A- sian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 1999, 30 (3):470-476.

[7] 薛 颖,村上明,小清水泓. 沙姜中抗促癌有效成分的分离鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7):522-524.
Xue Y, Cun S M, Xiao Q S H. Isolation and Identification of an- ti-promoting effective components of sand ginger [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2002, 27(7):522-524. (in Chinese)

[8] 郑公铭. 山萆抗氧化物的应用性能研究 [J]. 食品科学, 2003, 24(1):64-66.
Zheng G M. Studies on applied property of antioxidant extrac- ted from *Kaempferi galanga* L. [J]. Food Science, 2003, 24

(1):64-66. (in Chinese)

[9] Huang L F, Yagura T, Chen S L. Sedative activity of hexane extract of *Keampferia galanga* L. and its active compounds [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 120(1):123-125.

[10] 谭 城,朱文元,鲁 严. 山奈素对 melan-a 黑素细胞株黑素 生成的影响 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(9):732-734.
Tan C, Zhu W Y, Lu Y. Effect of kaempferol on the melano- genesis of melan-a [J]. China J Lepr Skin Dis, 2006, 22(9): 732-734. (in Chinese)

[11] 张天柱,曾 勇,朱富伟,等. 山萆杀线虫活性成分的分离及鉴 定 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(12):2524-2529.
Zhang T Z, Zeng Y, Zhu F W, et al. Isolation and identification of nematicide component from *Kaempferia galanga* L. [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(12):2524- 2529. (in Chinese)

[12] 翁群芳,钟国华,丘 麒,等. 28 种植物提取物对松材线虫的 毒杀作用 [J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(5):459-464.
Weng Q F, Zhong G H, Qiu Q, et al. Biological activities of extracts of 28 species of plants against *Bursaphelenchus xylo- philus* [J]. Journal of Huazhong Agricultural, 2005, 24(5): 459-464. (in Chinese)

[13] 冯 岗,张 静,冯俊涛,等. 小果博落回中 2 种杀虫活性成分 的分离及鉴定 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(1):0179-0182.
Feng G, Zhang J, Feng J T, et al. Isolation and identification of insecticidal composition of *Macleaya microcarpa* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2008, 28(1):179-182. (in Chinese)

[14] 文艳华,冯志新. 三尖杉对花生根结线虫发育的影响 [J]. 植 物病理学报, 2003, 33(6):509-512.
Wen Y H, Feng Z X. Effect of *Cephalotaxus fortunei* on the development of the root-knot Nematode, *Meloidogyne arena- ria* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(6):509-512. (in Chinese)

[15] 毛 琦,张 荣,张小艳,等. 陕西省温室蔬菜根结线虫的种类 鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2007, 35(8): 135-138.
Mao Q, Zhang R, Zhang X Y, et al. Identification of root-knot nematodes on greenhouses vegetable in Shaanxi Province [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edi- tion, 2007, 35(8):135-138. (in Chinese)

[16] 雷敬超,黄慧琴. 南方根结线虫生物防治进展 [J]. 中国生物 防治, 2007, 23(增刊):76-81.
Lei J C, Huang H Q. Research advance on biological control of the *Meloidogyne incognita* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2007, 23(S):76-81. (in Chinese)