

牡丹皮、黄连、大黄提取物对松材线虫生理代谢的影响

焦宏伟, 张璐, 刘东*, 赵宝华*

(河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050024)

摘要 对3种中草药黄连、牡丹皮、大黄的乙醇提取物毒杀松材线虫作用机制进行了初步研究。测定了其对线虫体内总糖和蛋白含量的影响,处理前后线虫体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和乙酰胆碱酯酶(AChE)酶活性变化和丙二醛(MDA)含量变化,处理前后SOD、CAT、GSH-Px和AChE表达量变化;并用松枝水培试验测定3种提取物对松材线虫病害的防控效果。结果表明,提取物处理后线虫体内总糖及蛋白含量显著下降,线虫体内糖及蛋白质的代谢受到干扰;线虫体内SOD、CAT、GSH-Px酶活性提高,POD活性显著下降,MDA含量升高,表明线虫体内氧化与抗氧化作用失衡,细胞功能受到极大影响;AChE活性被抑制,表明线虫的神经系统受到破坏,SOD、CAT、GSH-Px和POD表达量与酶活性变化基本一致。松枝水培试验表明中药提取物能够有效控制松材线虫病害发生。综上,3种提取物引起的松材线虫体内众多生理指标的改变是造成线虫死亡的主要原因。

关键词 中草药提取物; 松材线虫; 生理代谢

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2014.06.004

Effects of the extracts of Cortex Moutan Radicis, Coptis Chinensis Franch and Radix et Rhizoma Rhei on physiological metabolism of *Bursaphelenchus xylophilus*

Jiao Hongwei, Zhang Lu, Liu Dong, Zhao Baohua

(College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China)

Abstract The objective of this study is to identify the poisoning mechanism of the ethanol extracts of three traditional Chinese medicinal herbs, Cortex Moutan Radicis, Coptis Chinensis Franch and Radix et Rhizoma Rhei, against *Bursaphelenchus xylophilus*. The effects of these extracts were evaluated on the metabolism of total sugar and protein and activities of protective enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), glutathione peroxidase (GSH-Px), acetylcholinesterase (AChE), and the content of malondialdehyde (MDA) from *B. xylophilus*. The gene expression of SOD, CAT, GSH-Px and AChE was also analyzed. The control effects of the extracts on *B. xylophilus* were measured in water-potted plants. The extracts of three TCM herbs interfered with the metabolism of total sugar and protein of *B. xylophilus*. The activities of SOD, CAT, and GSH-Px were improved; the activity of POD was inhibited; MDA content was increased. Oxidation and antioxidant were imbalance, which greatly affected cell functions. The activity of AChE was inhibited, and the nervous system was damaged. The level of SOD, CAT, GSH-Px and AChE was consistent with enzyme activity. The results revealed that the extracts can effectively control the pine wood nematode disease. It is concluded that the changes of some physio-biochemical indexes of *B. xylophilus* *in vivo* caused by the extracts of three TCM herbs were the main causes of its death.

Key words Chinese herb extract; *Bursaphelenchus xylophilus*; physiological metabolism

收稿日期: 2014-01-03

修订日期: 2014-05-12

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2013205103), 河北师范大学博士基金项目(L2010B10)

* 通信作者 E-mail: 刘东 liudong410@163.com; 赵宝华 zhaobaohua86178@sohu.com

松材线虫病是通过松墨天牛携带松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*, Steiner & Buhrer)在松树间相互传播而引起的一种特大毁灭性病害^[1-2]。松材线虫寄生在松树体内取食营养而导致树木萎蔫并迅速枯死,因其蔓延迅速,防治难度极大,引起疫区的恐慌而被称为“松树癌症”,“无烟的森林火灾”^[3-4]。此病自1905年被发现、1934年被报道以来,已广泛分布于全世界多个国家^[5]。目前对松材线虫病的防治多采用化学防治、轮作及抗病品种的选育,但效果均不太理想,且存在众多弊端^[6]。目前使用的化学杀线虫剂多为高毒性、高残留,与环境相容性差,对土壤微生物、植物、水源和大气层造成严重污染或破坏,而且在植物体内残留的药物会直接危害人类健康^[7-9]。因此,开发环境友好型、对人类和生态环境安全的杀松材线虫剂成为重要研究课题^[10]。目前对松材线虫病防治的研究逐渐倾向于从天然植物中寻找更有效、更安全的杀线虫活性物质。植物源农药具有毒性较低、与环境相容性好、无残留、害虫不易产生抗性等特点,符合绿色环保的要求,因此越来越受到人们的重视^[11]。国外在利用植物提取物防治植物寄生线虫方面的研究较多,目前已发现多种植物来源的杀松材线虫物质^[12-15]。近些年在我国,植物杀线虫剂的研究也逐渐成为了热点^[16-17]。翁群芳、钟国华等采用28种植物提取物进行杀线虫试验,发现多种具有杀线活性的物质,并对其生理活性和生理效应进行了测定^[18-19]。巨云为等利用万寿菊、亚菊和银杏的提取物进行杀线虫试验,获得明显效果,并且经毒性测试发现从万寿菊中提取出的135种馏分中24种对松材线虫具有毒杀活性^[20]。松材线虫的防治从生态学和生产实践出发也需要高效、安全、低毒的植物源杀线剂。目前研究主要集中在杀线虫植物的调查以及杀线活性筛选等方面,但有关杀线虫机理方面还不是很清楚,有待进一步研究^[21-22]。作者在前期进行的具有杀松材线虫活性中草药的筛选与研究中发现,牡丹皮、黄连、大黄提取物对松材线虫及其虫卵具有良好的毒杀活性。本研究初步确定了3种中草药对松材线虫生理代谢的影响,为松材线虫病的有效防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与松材线虫

供试中草药:牡丹皮(*Cortex Moutan Radicis*)、

黄连(*Coptis Chinensis* Franch)和大黄(*Radix et Rhizoma Rhei*)购买于河北省石家庄市锦绣大地药业公司。

供试线虫:松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*),由河北师范大学动物学实验室提供。松材线虫用以PDA培养基培养的多毛孢菌(*Cordyceps sinensis*)饲养(26℃),至线虫长满平板,置于4℃保存。使用时先将含有线虫的培养基挑出,放入贝氏漏斗中,无菌水冲洗,将流出液浓缩配制成50条/ μL 的线虫液。

1.2 中药活性成分的分离与提取

乙醇粗提物的提取:分别称取3种中草药细粉末各200g,加入95%乙醇室温下进行浸泡处理,乙醇浸液2d更换1次。将连续浸泡提取3次后的提取液先用400目网筛过滤1次,然后再对提取液进行抽滤以去除残渣。70℃回流、提取24h,使用旋转蒸发仪对提取液进行减压浓缩,得到黏稠状提取物,放4℃冰箱中备用。

1.3 供试线虫处理方法

采用浸渍处理法测定3种提取物对松材线虫的毒力^[23]。准确称取3种中药粗提物适量,统一配制浓度为100g/L的溶液。在1.5mL离心管中放入浓度为10g/L的3种提取物1mL,以及100 μL 松材线虫液(约5000条),同时以无菌水处理为对照,每处理重复4次,置于26℃培养箱中处理24h。

1.4 线虫体内总糖及蛋白含量测定

将浸渍处理后的线虫于2000r/min离心5min,去除浸渍液后,沉淀用无菌水反复冲洗、离心(3500r/min,4min)3次。用1.5mL低温预冷的匀浆介质对线虫进行匀浆,低温离心(5000r/min,15min)取上清,得到10%的组织匀浆液。总糖含量测定采用蒽酮法;蛋白质含量测定采用Bradford法进行测定,利用紫外分光光度计在波长为595nm处测量吸光值(A_{595})。

1.5 线虫体内保护性酶活性测定

本研究采用南京建成生物工程研究所生产的超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、过氧化物酶(POD)测试盒、过氧化氢酶(CAT)测试盒和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒,按照说明书要求进行测定。

1.6 乙酰胆碱酯酶(AChE)活性测定

采用南京建成生物工程研究所生产的测试盒,参照说明书要求进行测定。

1.7 丙二醛(MDA)含量测定

采用南京建成生物工程研究所生产的丙二醛(MDA)测定试剂盒,采用硫代巴比妥反应(TBA)染色法进行。

1.8 松材线虫体内相关酶的 Western blot 检测

SOD、CAT、GSH-Px 和 AChE 的 4 种兔抗人多克隆抗体与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 均购自 Proteintech Group。首先按照 1.4 所述方法得到经过 3 种提取物处理的松材线虫虫体蛋白,将蛋白样品进行 SDS-PAGE 后,电转印至 PVDF 膜上,加入 4 种一抗和标记二抗,以四甲基联苯胺(TMB)为显色底物显色,进行蛋白印记分析。

1.9 松枝水培试验

采集 1~2 年生,胸径约 30 cm 健康马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)松枝,参照文献[24]方法进行松枝水培试验。

用清水分别将制备所得 3 种中药提取物配制成 250 μg/mL 溶液,准确取 250 mL 药液装入 500 mL 三角瓶中,将大小基本一致的供试健康松枝插入药液中。瓶口用保鲜膜密封。采用截枝套管法接种线虫:选取离体松枝侧枝,在离主枝约 5 cm 处削去枝梢,使截面朝上,在截面基部缠绕少许脱脂棉,套上长度约 8 cm 的乳胶管,用细绳扎紧乳胶管基部,从管口注入线虫悬浮液,接种量 1 000 条/枝。然后用湿润的脱脂棉塞住管口,以维持乳胶管内湿度,便于线虫侵入。分别设“提取物水培枝+线虫”、

“水培枝+线虫”和“水培枝”对照试验 3 组。每处理重复 3 次。

接入松材线虫后每 10 d 观察松枝外部症状,松枝病情分级标准如下:0 级,松枝正常,针叶绿色;1 级,1/4 以下针叶发黄;2 级,1/4~3/4 针叶发黄;3 级,3/4 以上针叶发黄,1/2 以下针叶枯萎;4 级,1/2 以上针叶枯萎,松枝濒死或死亡。按下式计算病情指数,比较各处理病害严重程度。其中 X_i 为各病级的松枝数, a_i 为各病级, a_{max} 为最高病级⁴[19]。

病情指数 = $\sum(X_i \times a_i) / \sum(X_i \times a_{max}) \times 100$ 。

1.10 数据统计

采用 SPSS 16.0 for Windows 和 Excel 软件进行统计,所得数据均用平均数±标准误差表示,用 Duncan 新复极差法比较差异显著性($P < 0.05$);比值计算为处理值/对照值。

2 结果与分析

2.1 对松材线虫体内总糖及总蛋白含量的影响

3 种提取物对松材线虫体内总糖及总蛋白含量影响的测定结果见表 1。经处理后,松材线虫体内总糖含量相比对照明显降低,大黄处理组甚至降低了 50 % 左右;总蛋白含量相比对照水平降低更加明显,黄连处理组甚至降低了 80 %。这表明 3 种提取物严重干扰了线虫体内的糖代谢和蛋白代谢,造成线虫体内总糖及总蛋白含量的显著降低,这可能是造成线虫死亡的重要原因。

表 1 3 种提取物对松材线虫体内总糖及总蛋白含量的影响

Table 1 Effects of the extracts of three TCM herbs on the contents of total sugar and protein in *B. xylophilus*

中药 Herb species	总糖 Total sugar		总蛋白 Protein	
	含量/μg · (10 ⁵ 条) ⁻¹	比值 Ratio	含量/mg · mL ⁻¹	比值 Ratio
	Concentration		Concentration	
牡丹皮 Cortex Moutan Radicis	2.146	0.74	0.83	0.65
黄连 Coptis Chinensis Franch	2.377	0.82	0.25	0.19
大黄 Radix et Rhizoma Rhei	1.568	0.54	0.70	0.55
CK	2.897	1.00	1.26	1.00

2.2 提取物对松材线虫体内保护性酶活性的影响

线虫体内的超氧化物歧化酶(SOD),过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)能够清除自由基,从而保持体内的活性氧浓度平衡。因此检测线虫体内 3 种酶的活性可以间接反映体内氧自由基水平。

3 种提取物对松材线虫体内保护性酶活性影响的测定结果见表 2。经提取物处理后,线虫体内保

护性酶活性均有明显变化,与对照水平相比:SOD 与 CAT 酶活性提高,黄连提取物处理后的效果最为明显。这表明 3 种提取物处理能够明显影响线虫体内氧自由基代谢,提高氧自由基含量,从而造成线虫体内保护性酶活性提高。而 POD 酶活力则明显降低,牡丹皮处理组甚至降低了 90 % 左右。POD 酶活力的降低使得线虫体内保护系统失去作用,从而使活性氧浓度失衡,造成虫体损伤。

表 2 3 种提取物对松材线虫体内保护性酶活性的影响

Table 2 Effects of the extracts of three TCM herbs on the activity of protective enzymes in *B. xylophilus*

中药 Herb species	超氧化物歧化酶 SOD		过氧化物酶 POD		过氧化氢酶 CAT	
	酶活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	比值 Ratio	酶活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	比值 Ratio	酶活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	比值 Ratio
	Activity		Activity		Activity	
牡丹皮 Cortex Moutan Radicis	84. 1	1. 18	0. 59	0. 11	52. 06	1. 03
黄连 Coptis Chinensis Franch	132. 8	1. 87	1. 77	0. 35	67. 06	1. 32
大黄 Radix et Rhizoma Rhei	71. 9	1. 01	1. 01	0. 20	52. 57	1. 04
CK	70. 7	1. 00	5. 07	1. 00	50. 60	1. 00

2.3 对线虫体内神经靶标酶及 GSH-Px 活性的影响

乙酰胆碱酯酶(AChE)是神经传导中的一种关键酶,在神经传导中起关键作用。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是机体内广泛存在的一种重要的分解过氧化物的酶,它特异地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化物的还原反应。经中药提取物处理后,GSH-Px 酶活显著升高,为对照的 2 倍左右,表明提取物使线虫体内产生大量有毒的过氧化物代谢物,对线虫细胞造成损伤,结果见表 3。

表 3 3 种提取物对乙酰胆碱酯酶与谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响

Table 3 Effects of the extracts of three TCM herbs on the activity of AChE and GSH-Px in *B. xylophilus*

中药 Herb species	乙酰胆碱酯酶 AChE		谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px	
	酶活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	比值 Ratio	酶活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	比值 Ratio
	Activity		Activity	
牡丹皮 Cortex Moutan Radicis	0. 54	0. 20	11. 12	1. 82
黄连 Coptis Chinensis Franch	1. 02	0. 38	11. 99	1. 96
大黄 Radix et Rhizoma Rhei	0. 48	0. 18	10. 98	1. 80
CK	2. 65	1. 00	6. 10	1. 00

2.4 对松材线虫体内相关酶表达量的影响

3 种提取物对松材线虫体内酶表达量的影响测定结果见图 1。共检测了 4 种酶的蛋白表达情况。经 Western-blot 检测得到图谱,线虫体内 3 种保护性酶,GSH-Px、CAT 和 SOD 的表达量均明显提高,AchE 表达量明显降低,结果与酶活测定结果基本保持一致。

2.5 对松材线虫体内丙二醛含量的影响

丙二醛(MDA)是氧自由基引起的脂质过氧化物的降解终产物,具有强烈的氧化作用,能引起细胞的损伤、老化和死亡。因此检测 MDA 含量可间接反映线虫体内氧自由基的水平。3 种提取物对线虫体内 MDA 含量影响的测定结果见表 4。经提取物

处理后,线虫体内 MDA 含量明显升高,黄连组甚至提高至对照水平的 5 倍。这表明提取物能够影响线虫体内氧自由基代谢,MDA 的含量显著提高,引起线虫细胞的损伤。

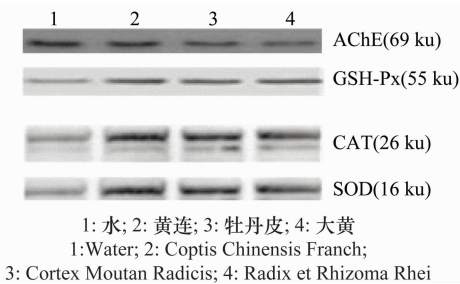


图 1 中药提取物对松材线虫体内多种酶基因表达量的影响

Fig. 1 Effects of the extracts of three TCM herbs on gene expression of the enzymes in *B. xylophilus*

表 4 3 种提取物对线虫体内丙二醛含量的影响

Table 4 Effects of the extracts of three TCM herbs on the concentration of MDA in *B. xylophilus*

中药 Herb species	丙二醛 MDA	
	含量/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	比值 Ratio
	Concentration	
牡丹皮 Cortex Moutan Radicis	1. 721	1. 517
黄连 Coptis Chinensis Franch	5. 714	5. 038
大黄 Radix et Rhizoma Rhei	2. 040	1. 799
CK	1. 134	1. 000

2.6 松枝水培试验结果

松枝水培试验结果表明,3 种中药提取物 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (无菌水配制)处理后 40 d 内松枝均不发病,病情指数为 0,与水培枝(CK)的病情指数相同。“水培枝+线虫”处理组 10 d 后开始出现针叶失水病情,处理 13~15 d 后,松枝尖端迅速变红,萎蔫,15 d 时病情指数达到 70,30 d 后松枝全部变成红褐色,萎蔫坏死,病情指数为 100,与翁群芳等^[18-19]报道的现象相似。结果表明 3 种中药提取物能够明显阻止及延缓松材线虫引起的松树萎蔫病的发生与发展。结果见表 5 所示。

表 5 3 种提取物松枝水培试验处理对
松材线虫的控制作用

Table 5 Effects of the extracts of three TCM herbs
against *B. xylophilus* in water-potted pine branches

处理 Treatment	病情指数 Index of disease			
	10 d	15 d	30 d	40 d
牡丹皮 Cortex Moutan Radicis	0	0	0	0
黄连 Coptis Chinensis Franch	0	0	0	0
大黄 Radix et Rhizoma Rhei	0	0	0	0
水培枝+线虫 Pine branches inoculated with <i>B. xylophilus</i>	20	70	100	100
水培枝(CK) Pine branches inoculated with water	0	0	0	0

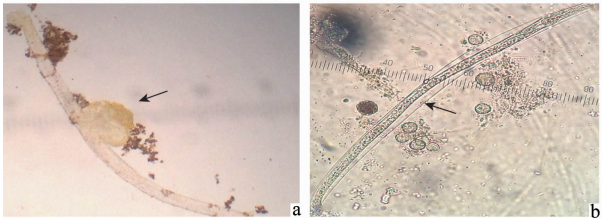
3 讨论

目前国内外对于黄连、牡丹皮、大黄等中草药的研究主要集中于医药领域,而对其在农林业害虫防治方面的研究鲜见报道。在前期研究中,作者对 36 种中草药杀线虫活性进行筛选,确定了 3 种中药乙醇提取物对松材线虫及虫卵的毒杀活性^[25]。为了进一步揭示中药提取物对松材线虫的生理活性和作用机制,我们进行了深入研究。

松材线虫常以灰霉菌(*Botrytis cinerea*)、小长喙霉(*Ophiostoma minus*)和长喙壳菌(*Ceratocystis* spp.)等真菌的菌丝为食^[26],这就表明一种理想的杀松材线虫药物应当具备抑真菌和杀线虫双重活性。但目前为止还没有一种此类双功能杀线虫剂投入使用。虽然一些化合物如酒石酸莫仑太尔(morantel tartrate)、阿维菌素(abamectin)和甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(emamectin benzoate)已被用于防治松材线虫病^[27-29],但是由于它们水溶性差、防治效果不理想以及成本过高等问题,使用并不广泛。因此一种理想的松材线虫病防治药物应当易溶于水、具备抑真菌与杀线虫双重活性,这样不仅对线虫有毒杀作用并且能够杀灭线虫的食物来源真菌^[30]。根据这一研究思路,Oh 等建立了一种高通量筛选方法,筛选到具有杀线活性的 206 种活性化合物,其中一种编号 HWY-4213,化学名为“1-n-undecyl-2-[2-fluorophenyl]methyl-3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-isoquinolinium chloride”的小檗碱衍生物具有良好的毒杀松材线虫和抑真菌活性^[31]。黄连中的小檗碱是黄连的主要活性物质,含量高达 5.20%~7.69%,因此我们确认黄连中的小檗碱是黄连的主要杀线活性物质。

糖类的重要作用是为生物体提供生命活动所需要的能量,目前早已证明线虫体内含有多种糖类物质^[32],总糖含量的降低表明线虫的营养情况正在逐步恶化。有文章报道选取牛心朴子中活性物质处理线虫后,造成线虫总糖含量的下降,影响了线虫的新陈代谢^[33]。

松材线虫体表有一层由脂质蛋白组成的角质层,可起到防御细菌或有害物质入侵、阻止水分蒸发等作用从而保护线虫^[32]。经中药提取物处理后的死亡线虫体表出现囊泡状结构(如图 2a 所示)、内部组织收缩、体壁分离等症状(如图 2b 所示),这很可能是由于中药提取物抑制线虫体内蛋白质的产生或者破坏蛋白特定结构,进而影响线虫体内脂质蛋白角质层的正常功能,使内含物外泄,最终导致线虫死亡。



a: 线虫虫体出现囊泡状结构; b: 线虫虫体出现内部组织收缩、体壁分离
a: Vesicle-like structure of *B. xylophilus*; b: Overflow reduction of nematode tissue and separated body-wall

图 2 松材线虫组织结构形态改变示意图
Fig. 2 Morphological changes of *B. xylophilus*

自由基具有很强的生物活性,很容易与生物大分子反应,直接损害或者通过一系列氧化链式反应引起广泛的生物结构破坏,导致细胞凋亡^[34]。本研究发现,SOD、POD、CAT 的活性以及 MDA 的含量可间接反映松材线虫体内氧自由基水平。经 3 种提取物处理后,线虫体内 SOD 和 CAT 活性与表达量及 MDA 含量均明显提高,这表明线虫体内存在着大量的氧自由基,而 POD 的活性却被抑制,这可能会使线虫体内氧化与抗氧化作用失衡,细胞的功能受到极大影响,最终导致线虫死亡。

研究表明,线虫能够产生 2 种谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px,一种分泌到线虫体表,能够清除体表有害的大分子过氧化物和脂肪酸过氧化物,保护线虫;另一种在细胞内,能够清除代谢产生的过氧化物代谢产物,阻断脂质过氧化连锁反应,从而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用^[35]。经 3 种提取物处理后,线虫 GSH-Px 活性显著提高,表明线虫受到

了大量过氧化物及代谢产物的损伤。

AChE 在神经传导中执行着重要的功能,该酶能够降解乙酰胆碱,终止神经递质对于突触后膜兴奋刺激作用,保证神经信号分子在生物体内正常的传导,是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标^[36],而且还是细胞凋亡的潜在标记和调节因子之一^[37]。经 3 种提取物处理后,松材线虫体内的 AChE 活性及表达量明显降低,导致神经递质无法正常降解,造成突触后膜的持续兴奋,最终导致线虫死亡。这可能是中药毒杀松材线虫的另一重要原因。

经 3 种提取物处理后,松材线虫体内 AChE、GSH-Px、CAT 和 SOD 的活性与其表达量呈现正相关性,因此我们初步推测中药提取物作用于线虫,使其体内产生了大量的氧自由基,从而诱发线虫体内各种保护性酶的表达发生变化并改变其活性,最终导致线虫死亡。在今后的研究中我们将从分子角度探究各种酶表达量变化的原因与机制,对此观点加以验证。

参考文献

- [1] Mota M, Vieira P. Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems [M]. Heidelberg, Germany: Springer, 2008: 259 - 278.
- [2] 杨益琴. α -蒎烯含氮衍生物的合成及其杀松材线虫活性的研究[J]. 化学学报, 2009, 67(21): 2463 - 2474.
- [3] 潘沧桑. 松材线虫病研究进展[J]. 厦门大学学报, 2011, 50(2): 176 - 183.
- [4] 董锦艳, 李钊, 张克勤. 松材线虫生物防治研究进展[J]. 植物保护, 2005, 31(5): 9 - 15.
- [5] Zhao B G. Pine wilt disease in China [M]// Zhao B G, Futai K, Sutherland J R, et al. Pine wilt disease. Tokyo, Japan: Springer, 2008: 18 - 25.
- [6] Chitwood D J. Nematicides [M]// Encyclopedia of agrochemicals. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, 2003: 1104 - 1115.
- [7] 彭双, 闫淑珍, 陈双林. 具杀线虫活性植物内生细菌的筛选和活性产物[J]. 微生物学报, 2011, 51(3): 368 - 376.
- [8] Dong L Q, Zhang K Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction [J]. Plant and Soil, 2006, 288: 31 - 45.
- [9] 杨秀娟. 植物提取液对南方根结线虫的抑杀作用[J]. 福建农业学报, 2004, 19(2): 78 - 81.
- [10] Cui H, Jin H, Liu Q. Nematicidal metabolites from roots of *Stellera chamaejasme* against *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* [J]. Pest Management Science, 2014, 70(5): 827 - 835.
- [11] Rice E L, 胡敦孝. 天然化学物质与有害生物的防治[M]. 北京:

科学出版社, 1998: 30 - 33.

- [12] Kim J, Seo S M, Lee S G, et al. Nematicidal activity of plant essential oils and components from coriander (*Coriandrum sativum*), oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(16): 7316 - 7320.
- [13] Park I K, Kim J, Lee S G, et al. Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*) and litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus Xylophilus*) [J]. Journal of Nematology, 2007, 39(3): 275 - 279.
- [14] Barbosa P, Lima A S, Vieira P, et al. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Journal of Nematology, 2010, 42(1): 8 - 16.
- [15] Faria J M, Barbosa P, Bennett R N, et al. Bioactivity against *Bursaphelenchus xylophilus*; nematotoxics from essential oils, essential oils fractions and decoction waters [J]. Phytochemistry, 2013, 94: 220 - 228.
- [16] 赵博光. 苦豆碱对松材线虫的杀线活性[J]. 林业科学, 1996, 32(3): 243 - 246.
- [17] 郑良, Ferris H. 58 种中(草)药对植物寄生线虫 *Meloidogyne javanica* 和 *Pratylenchus vulnus* 的药效研究[J]. 植物病理学报, 2001, 31(2): 175 - 183.
- [18] 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.
- [19] 翁群芳, 钟国华, 胡美英, 等. 骆驼蓬提取物对松材线虫的生物活性及生理效应[J]. 中国农业科学, 2005, 38(10): 2014 - 2022.
- [20] 巨云为, 樊培峰, 奚月明, 等. 万寿菊提取物对松材线虫的毒杀作用[J]. 浙江林学院学报, 2010, 27(2): 316 - 319.
- [21] 李继平, 漆永红, 陈书龙, 等. 利用杀线植物资源防治植物寄生线虫的研究进展[J]. 草业学报, 2013, 22(3): 297 - 305.
- [22] 闫磊, 肖婷, 牛洪涛, 等. 15 种植物源化合物对马铃薯茎线虫的活性比较[J]. 植物保护, 2008, 34(1): 85 - 89.
- [23] Yap C A. Screening for nematicidal activities of *Bacillus* species against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) [J]. American Journal of Experimental Agriculture, 2013, 3(4): 794 - 805.
- [24] 王明祖. 中国植物线虫研究[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 10 - 92.
- [25] 焦宏伟, 张璐, 赵宝华, 等. 36 种中草药提取物杀松材线虫活性研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(2): 239 - 246.
- [26] Maehara N, Tsuda K, Yamasaki M, et al. Effect of blue-stain fungi on the number of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) carried by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. Nematology, 2005, 7(2): 161 - 167.
- [27] Takai K, Tomoyuki S, Toshio S, et al. Emamectin benzoate as a candidate for a trunk injection agent against the pine wood

- nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Pest Management Science, 2000, 56(10):937-941.
- [28] Takai K, Tomoyuki S, Toshio S, et al. Development of a water-soluble preparation of emamectin benzoate and its preventative effect against the wilting of pot-grown pine trees inoculated with the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Pest Management Science, 2001, 57(5):463-466.
- [29] Takai K, Toshio S, Kazuyoshi K. Development and preventative effect against pine wilt disease of a novel liquid formulation of emamectin benzoate [J]. Pest Management Science, 2003, 59(3):365-370.
- [30] Hofstetter R W, Mahfouz J B, Klepzig K D, et al. Effects of tree phytochemistry on the interactions among endophloedic fungi associated with the southern pine beetle [J]. Journal of Chemical Ecology, 2005, 31(3):539-560.
- [31] Oh W S, Jeong P Y, Joo H J, et al. Identification and characterization of a dual-acting antinematodal agent against the pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. PLoS ONE, 2009, 4(11):A22-A30.
- [32] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [33] 杨静, 高雯芳, 刘强. 牛心朴子的杀线虫机理[J]. 天津师范大学学报, 2010, 30(3):69-72.
- [34] 陆怡, 潘华珍, 许彩民. 氧化与细胞凋亡[J]. 生物化学与生理进展, 1996, 23(2):118-121.
- [35] Jones J T, Reavy B, Smant G, et al. Glutathione peroxidases of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* [J]. Gene, 2004, 324:47-54.
- [36] 张明, 李盾, 陈仪本, 等. 乙酰胆碱酯酶分子生物学研究进展[J]. 农药, 2006, 45(1):8-11.
- [37] Zhang X J, Yang L, Zhao Q, et al. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types [J]. Cell Death and Differentiation, 2002, 9(8):790-800.
- ~~~~~
- (上接 6 页)
- [33] Arashida R, Kakizawa S, Hoshi A, et al. Heterogeneous dynamics of the structures of multiple gene clusters in two pathogenetically different lines originating from the same phytoplasma [J]. DNA and Cell Biology, 2008, 27(4):209-217.
- [34] Bai X D, Correa V R, Toruno T Y, et al. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, 22(1):18-30.
- [35] Sugio A, Kingdom H N, MacLean A M, et al. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(48):1254-1263.
- [36] Hoshi A, Oshima K, Kakizawa S, et al. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(15):6416-6421.
- [37] Sugawara K, Honma Y, Komatsu K, et al. The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic processing of the bacterial peptide TENGU [J]. Plant Physiology, 2013, 162(4):2005-2014.
- [38] Mou H Q, Lu J, Zhu S F, et al. Transcriptomic analysis of paulownia infected by paulownia witches'-broom phytoplasma [J]. PLoS ONE, 2013, 8(10).
- [39] Pracros P, Renaudin J, Eveillard S, et al. Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(1):62-68.
- [40] Himeno M, Neriya Y, Minato N, et al. Unique morphological changes in plant pathogenic phytoplasma-infected petunia flowers are related to transcriptional regulation of floral homeotic genes in an organ-specific manner [J]. Plant Journal, 2011, 67(6):971-979.
- [41] MacLean A M, Sugio A, Makarova O V, et al. Phytoplasma effector SAP54 induces Indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants [J]. Plant Physiology, 2011, 157(2):831-841.