

夹竹桃强心总甙灭螺活性与机理

王万贤¹, 杨毅^{1*}, 王宏², 舒丽慧¹, 张勇¹, 张佳磊¹, 侯金华¹

(1. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062; 2. 上海交通大学环境科学与工程技术学院, 上海 200240)

摘要:血吸虫病 (Schistosomiasis) 是严重危害人民身体健康的疾病。钉螺是血吸虫的唯一中间寄主, 是血吸虫生活周期中最脆弱环节, 灭螺能有效控制血吸虫病, 保护湿地和水资源。按强心总甙提取方法, 用有机溶剂提取, 从 118.1940g (相当于 100g 干材料) 夹竹桃新鲜叶中得到 0.9815g 夹竹桃强心总甙。将强心总甙按 5、10、15、20、25、30mg/L 配制成 6 个不同浓度梯度的处理溶液处理钉螺。取活钉螺 100 只为 1 组, 每 20 个装入一个尼龙网袋中, 分别将各组 (5 袋/组; 网孔 2mm) 钉螺浸入盛有 2000g 不同浓度的夹竹桃强心总甙灭螺剂水溶液的玻璃缸中, 设 1mg/L 氯硝柳胺水溶液和无氯清水对照。分别于处理 1、2、3、4、5d 后, 将各处理中的钉螺随机取出 1 袋, 用无氯水冲洗数次, 再放入清水中静置 1d, 然后作存活检查: 在解剖镜下针刺无反应的证实死亡。结果显示夹竹桃强心总甙具有很好的毒杀钉螺活性, 用 20mg/L 的夹竹桃强心总甙的水溶液处理 3~4d 的效果与 1mg/L 氯硝柳胺溶液处理 2~3d 的灭螺效果相当; 经统计分析: 用其水溶液灭螺的 LD_{50} 和 LD_{90} 浓度分别是 4.0500mg/L 和 22.2500mg/L。用 LD_{50} 浓度的夹竹桃强心总甙溶液处理 50 个钉螺之后, 取活螺用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 进行测试, 在处理 6h 时, 显示各处理样品的酶活高于对照组, 表现为酶带颜色加深, 有新的酶带出现; 而在处理 12h 和 24h 后, 各处理的样品酶带浅于对照组, 酶带颜色逐渐变浅, 直到消失。采用蒽酮显色法测定经夹竹桃强心总甙处理后钉螺软体的糖原含量, 糖原含量显著下降, 减少幅度从 9.9% 到 32.6%; 钉螺经夹竹桃强心总甙处理后蛋白质含量的变化不明显。分析了强化感作用植物夹竹桃植物新鲜叶中强心总甙的灭螺活性, 并在微观领域探究其化感作用导致钉螺的形态病理以及糖代谢、蛋白质代谢等生理变化等方面所表现出的杀伤钉螺的机理, 由此获得强化感作用植物夹竹桃灭螺的化学生态学证据, 为研制新的具中国特色的植物成份灭螺剂打下了基础, 并为合成仿生灭螺剂以及最终构建生态工程中强化感作用植物群落灭螺提供理论依据。

关键词:强心总甙; 夹竹桃; 钉螺; 化感作用

文章编号: 1000-0933(2006)03-0954-06 中图分类号: R184.38 文献标识码: A

Effect of cardiac glycosides from *Nerium indicum* on *Oncomelania hupensis*WANG Wan-Xian¹, YANG Yi^{1*}, WANG Hong², SHU Li-Hui¹, ZHANG Yong¹, ZHANG Jia-Lei¹, HOU Jin-Hua¹ (1. School of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China; 2. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(3): 954~959.

Abstract: The Schistosomiasis is a serious diseases threatening human being's health. *Oncomelania hupensis* is the only intermediate host of Schistosoma, and is the most fragile during its life cycle. To effectively control the occurrence of Schistosomiasis and protect wetland and water resource, it is an essential practice to destroy snails of *O. hupensis*. In the present study, cardiac glycosides were extracted from fresh leaves of *Nerium indicum* Mill and effects of the cardiac glycosides on mortality of *O. hupensis* were investigated. Six concentrations of the cardiac glycosides (5, 10, 15, 20, 25, 30mg/L) were used to treat *O. hupensis*, and treatments of *O. hupensis* with 1mg/L niclosamidum and dechlorided water were set as control. *O. hupensis* that had been treated with varying concentrations of cardiac glycosides for 1~5d was randomly chosen for testing the mortality after

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471506); 湖北省中药生物技术重点实验室基金资助项目(4300620103)**收稿日期:** 2005-06-29; **修订日期:** 2006-01-02**作者简介:** 王万贤 (1949~), 男, 湖南汉寿人, 教授, 主要从事植物生态及环境生物工程研究。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: yangyi2006@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30471506, 39670654) and Hubei Provincial Key Laboratory of Biotechnology of Traditional Chinese Medicine**Received date:** 2005-06-29; **Accepted date:** 2006-01-02**Biography:** WANG Wan-Xian, Professor mainly engaged in plant ecology and environmental biotechnology.

1d incubation in water following thoroughly rinsing with dechlorinated water. *O. hupensis* that did not respond to needle puncture as observed under a dissecting microscope was defined as death. Our results show that the cardiac glycosides obtained from fresh leaves of *N. indicum* effectively killed *O. hupensis*. The mortality of *O. hupensis* treated with 20mg/L cardiac glycosides for 3 ~ 4d was similar to that treated with 1mg/L niclosamidum for 2 ~ 3d. Statistical analysis revealed that the LD_{50} and LD_{90} values for the cardiac glycosides were 4.0500mg/L and 22.2500mg/L, respectively. Fifty *O. hupensis* treated with the LD_{50} concentration of cardiac glycosides was used to do PAGE test. The treated samples displayed higher activities of enzymes than the controls; the color of enzyme bands was enhanced and new enzyme bands were induced after 6h treatment. However, the color of enzyme bands was lower than that of the controls, and eventually disappeared after 12 and 24h treatments. There was a marked decrease in glycogen content (ranged from 9.9% to 32.6%) in response to treatments with the cardiac glycosides. The protein contents were not significantly changed by the treatments. This paper analyzed the molluscicidal activity of cardiac glucosides extracted from *N. indicum* and elucidated the mechanisms underlying the allelopathical effects of the cardiac glucosides on morphological pathology, metabolisms of sugar and protein of *O. hupensis*. We have obtained chemiecolgical evidence that *N. indicum* is capable of killing *O. hupensis*. These results provide the foundation for developing new plant molluscicide, and scientific grounds for synthesizing biomimetic molluscicide and constructing plant community to destroy *O. hupensis*.

Key words: cardiac glycosides; *Nerium indicum* mill; *Oncomelania hupensis*; allelopathy

血吸虫病(Schistosomiasis)是严重危害人民身体健康的疾病^[1]。钉螺(*Oncomelania hupensis* Gredler)是日本血吸虫(*Schistosoma japonicum* Katsurade)的唯一中间寄主^[2],是血吸虫病传播中不可缺少的环节^[3]。另一方面,钉螺也是血吸虫生活周期中最脆弱的一环,灭螺能有效地减少血吸虫病的传播^[4]。近半个世纪以来,灭螺措施倍受重视,成为控制血吸虫病的重心。利用化学药物灭螺成为首选方法。埃及于1940年用无机化合物 $CuSO_4$ 等灭螺^[5],从1946年到1955年,大约有7000种化学药物用于灭螺实验^[6],到1955年,筛选出了高效的五氯酚钠(pentachlorophenol),20世纪60年代早期出现了氯硝柳胺(niclosamidum)。 $CuSO_4$ 灭螺效果好,但易被土壤和生物体吸收,高pH值时失效;五氯酚钠灭螺效果好,但对非靶生物具有广谱毒性,早已被我国和日本等政府禁止使用;氯硝柳胺对钉螺生命周期的所有阶段都有效,并且对人,家畜和农作物无毒,但价格昂贵,对鱼类极为有害。尽管如此,到目前为止,化学控制仍然是灭螺的最重要方法。在流行病学上重要的水接触点集中使用,不仅可维持95%的灭螺率,也可减少大面积灭螺的费用。

为了避免化学合成灭螺剂对环境的污染,人们一直想获得纯天然的植物灭螺药物。自Archibald第1次用*Balanites aegyptiace*的果实进行灭螺以来,至今已有1000余种植物用于灭螺试验^[1,7];在这方面我国研究人员也做了大量的研究工作,但研究水平仍然处于较低的阶段,文献报道仅仅是用植物的粉末直接灭螺,或用植物提取的混合物灭螺^[8],研究的结果不能进行标准化评价,难以在国际上被认可。

前期研究表明:活体夹竹桃具有毒杀钉螺作用,在一桶清水(约20kg)中投放2~3片鲜叶能在3~4d内杀灭所饲养的全部实验螺^[9]。在此基础上,从夹竹桃新鲜叶中提取、分离、纯化得到化感作用灭螺活性物质夹竹桃强心总甙,并对其灭螺活性与机理进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用钉螺采自湖南省洞庭湖区,转入23℃温室饲养,选用能正常活动的阴性成螺作为实验材料。实验用夹竹桃新鲜叶采自湖北大学校园内。

1.2 植物材料的处理

按强心总甙提取方法^[10]。将夹竹桃新鲜叶洗净,加75%乙醇适量灭活,搅碎后,用10倍于鲜叶重量的70%~75%乙醇加热至70℃温浸12h,提取3次后去除残渣,减压回收乙醇,沉淀过滤除杂;接着用乙醚处理浓缩滤液,弃醚层;再在水溶液中加饱和碱式醋酸铅水溶液,过滤去沉淀;然后将滤液通入 H_2S 气体之后再次过

滤去沉淀;浓缩滤液静置可析出结晶或快速风干成固体状物质,便得到夹竹桃强心总甙。从 118.1940g 新鲜叶(相当于 100g 干材料)中获得 0.9815g 夹竹桃强心总甙。

1.3 灭螺活性的测定

实验采用浸泡法。将夹竹桃强心总甙按 5、10、15、20、25、30mg/L 配制成 6 个不同浓度梯度的处理溶液。取活钉螺 100 只为 1 组,每 20 个装入一个尼龙网袋中,分别将各组(5 袋/组)钉螺浸入盛有 2000g 不同浓度的夹竹桃强心总甙灭螺剂水溶液的玻璃缸中,另设 1mg/L 氯硝柳胺水溶液和无氯清水对照。实验温度控制在 $(23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。分别于处理 1、2、3、4、5d 后,将各处理中的钉螺随机取出 1 袋,用无氯水冲洗数次,再放入清水中静置 1d,然后作存活检查:开庠爬行者为活螺,余下的用敲碎和解剖针刺的方法,鉴别死活。实验重复 3 次,取其平均值作为实验结果。

1.4 同工酶电泳分析

用夹竹桃强心总甙按低于 LD_{50} 浓度配制溶液。将 50 个钉螺分别浸养于浓度为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0mg/L 夹竹桃强心总甙溶液中,处理 6h、12h 和 24h 后分别取出活钉螺,并用无氯清水漂洗干净,吸干水分,敲碎螺壳,取出整个软体组织,加磷酸缓冲液^[10]滴/螺,冰浴匀浆。匀浆液 0°C 8000r/min 冷冻离心,上清液与溴酚蓝指示剂等量混合后作为电泳样品。正常饲养螺作为对照组。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。使用 Hoefer SE600 垂直板电泳仪,所有电泳及染色药品均为亚法公司进口分装。贮液配制参照 B. D. Hames 和 D. Rickwood 等以及 Hoefer 公司电泳指南。采用 Tris-Gly 高 pH 不连续缓冲系统(7.5%分离胶-3.75%浓缩胶),板距 1mm,板胶 16mm $\times$ 17mm。每槽加样 15 μ l,恒流 20mA,22 $^{\circ}\text{C}$ 条件下电泳 6h 左右。染色,冲洗,固定,拍照。

1.5 夹竹桃强心总甙对钉螺软体组织重量的影响

夹竹桃强心总甙及使用剂量与同工酶电泳相同,另正常饲养螺作为对照组。每组使用 50 只大小基本一致的成螺,浸杀 2d 后取出整个软体组织,称量湿重,烘箱常温吹干,再称量干重,磨粉。

1.6 夹竹桃强心总甙对钉螺糖原的影响

用钉螺软体组织重量测定后的干粉。每次取样 10mg 左右,加 30% KOH 溶液 2ml,置沸水浴 20min,冷却后加入 95% 乙醇 10ml,离心后沉淀物即为糖原。采用蒽酮显色法。反应呈现的绿色,用 721 分光光度计在 620nm 处比色,读取光密度值。用葡萄糖作标准曲线。实验重复 3 次,平均值作为实验结果。

1.7 提取物对钉螺蛋白质的影响

与糖原测试样品相同。KND-04 全自动凯氏定氮仪,上样量 30mg 左右。按蛋白质含量 = $6.25 \times$ 氮含量计算。实验重复 3 次,平均值作为实验结果。

2 结果与分析

2.1 夹竹桃强心总甙灭螺活性结果与分析

用不同浓度的夹竹桃强心总甙水溶液处理钉螺,在不同时间的处理下,钉螺死亡率存在差异。其规律是随处理浓度的增加,钉螺死亡率呈上升趋势。15 ~ 20mg/L 以上的夹竹桃强心总甙灭螺剂水溶液具有 100% 的明显毒杀钉螺致死效果(表 1)。

表 1 夹竹桃强心总甙灭螺效果统计

Table 1 The mortality of Snails after treated by the cardiac glycosides of <i>N. indicum</i> Mill					
处理液浓度 Concentration (mg/L)	钉螺死亡率 Mortality(%)				
	1d	2d	3d	4d	5d
5	6.7	16.7	20	26.7	36.7
10	13.3	33.3	43.3	50	66.7
15	13.3	33.3	46.7	66.7	100
20	16.7	46.7	63.3	100	100
25	33.3	75	100	100	100
30	63.3	95.4	100	100	100
氯硝柳胺 Niclosamidum	78.5	95.4	100	100	100
清水对照 Water	0	0	0	1.7	1.7

氯硝柳胺是普遍使用的化学灭螺剂。将夹竹桃强心总甙的灭螺效果与之对照,可知 20mg/L 的夹竹桃强

心总甙的水溶液约与 1mg/L 氯硝柳胺溶液的灭螺效果相当。不过夹竹桃强心总甙的毒效较氯硝柳胺略慢。用 1mg/L 氯硝柳胺溶液处理钉螺 2~3d 可达 100% 死亡, 而用 20mg/L 的夹竹桃强心总甙水溶液处理需要 3~4d 才能达到同样的效果。

2.2 夹竹桃强心总甙灭螺 LD_{50} 和 LD_{90} 值分析

研究结果显示夹竹桃强心总甙具有很强的活性。经统计分析: 用其水溶液灭螺的 LD_{50} 和 LD_{90} 浓度分别是 4.0500mg/L 和 22.2500mg/L(图 1)。

2.3 酯酶同工酶电泳结果与分析

得到的 EST 电泳图谱如图 1、图 2、图 3 所示。未做酶谱的薄层扫描, 但从凝胶显色时颜色的深浅可以大致判断酯酶的活性强弱。在处理 6h 时, 显示各处理样品的酶活高于对照组, 表现为酶带颜色加深, 有新的酶带出现(图 2); 而在处理 12h(图 3)和 24h(图 4)后, 各处理的样品酶带浅于对照组, 酶带颜色逐渐变浅, 直到消失。这与正常的病理反应完全一致。在中毒早期, 药物刺激 EST 的表达, 增强钉螺肝脏的解毒能力; 在中毒中后期, 由于药物作用时间或强度超过钉螺生理阈限, 其体内物质和能量代谢出现紊乱, 从而抑制酶的合成; 在接近死亡的机体中, 酯酶的合成几乎停止。

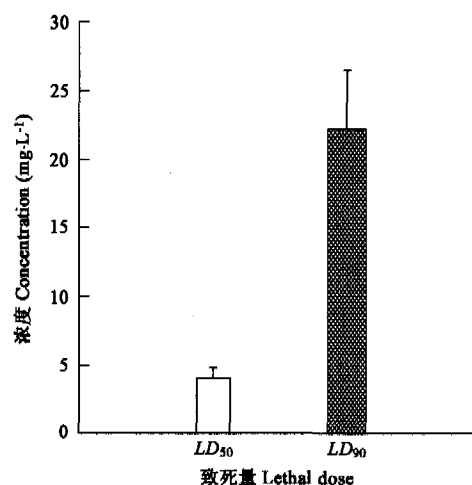


图 1 夹竹桃强心总甙灭螺的 LD_{50} 和 LD_{90}

Fig.1 LD_{50} and LD_{90} of the cardiac glycosides of *N. indicum* Mill

CK 1 1' 2 2' 3 3' CK' 4 4' 5 5' 6 6' CK''

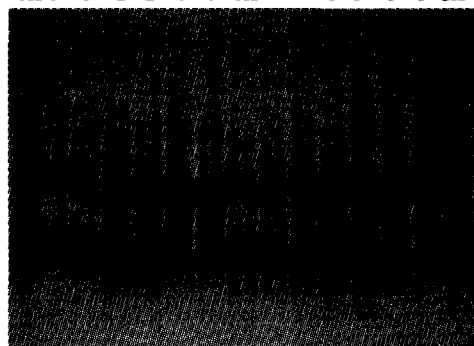


图 2 夹竹桃强心总甙处理 6h 时钉螺酯酶同工酶图谱

Fig.2 EST isozyme profiles after treated in 6h*

CK, CK', CK'': 对照样品 Samples controlled; 1, 1': 浓度为 4.0mg/L 的夹竹桃强心总甙处理样品 Samples treated by 4.0mg/L of the cardiac glycosides of *N. indicum* Mill.; 2, 2': 浓度为 1.5mg/L 的夹竹桃强心总甙处理样品 Samples treated by 1.5mg/L of the cardiac glycosides of *N. indicum* Mill.; 3, 3': 浓度为 2.5mg/L 的夹竹桃强心总甙处理样品 Samples treated by 2.5mg/L of the cardiac glycosides of *N. indicum* Mill.; 4, 4': 浓度为 3.0mg/L 的夹竹桃强心总甙处理样品 Samples treated by 3.0mg/L of the cardiac glycosides of *N. indicum* Mill.; 5, 5': 浓度为 3.5mg/L 的夹竹桃强心总甙处理样品 Samples treated by 3.5mg/L of the cardiac glycosides of *N. indicum* Mill.; 6, 6': 浓度为 2.0mg/L 的夹竹桃强心总甙处理样品, 图 2 与图 3 的注释相同 Samples treated by 2.0mg/L of the cardiac glycosides of *N. indicum* Mill, Same notes used in Fig.2 and Fig.3

CK 1 1' 2 2' 3 3' CK' 4 4' 5 5' 6 6' CK''

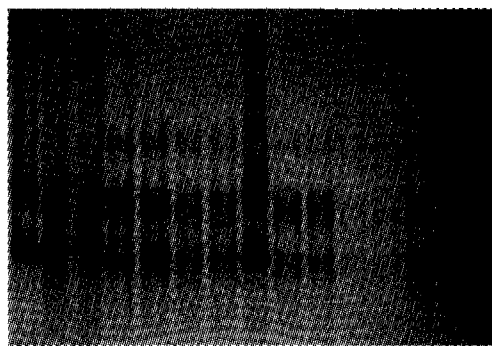


图 3 夹竹桃强心总甙处理 12h 时钉螺酯酶同工酶图谱

Fig.3 EST isozyme profiles after treated in 12h

CK 1 1' 2 2' 3 3' CK' 4 4' 5 5' 6 6' CK''

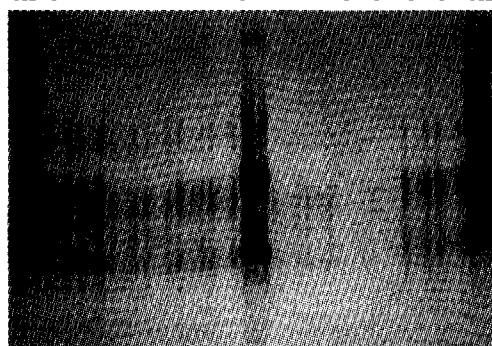


图 4 夹竹桃强心总甙处理 24h 时钉螺酯酶同工酶图谱

Fig.4 EST isozyme profiles after treated in 24h

2.4 钉螺软体组织重量测试结果及分析

钉螺经夹竹桃强心总甙处理后的软体组织的平均干重、湿重及干湿比如表 2 所示。由表 2 可知,所选用的钉螺软体组织重量基本一致,经处理后钉螺软体的含水量也未见明显变化。其干重约为湿重的 1/5 到 1/4 之间。

表 2 夹竹桃强心总甙处理后钉螺的软体组织重量

Table 2 Weight of soft tissues of snails after treated by the cardiac glycosides of <i>N. indicum</i> Mill							
项目 Item	1	2	3	4	5	6	对照 CK
平均湿重 Average wet weight (mg/snail)	12.72	12.14	13.35	13.14	12.08	12.96	13.01
平均干重 Average dry weight (mg/snail)	3.01	3.06	3.11	2.96	2.99	3.21	3.03
干湿比(Average dry weight)/(Average wet weight) (%)	23.8	25.2	23.0	22.5	24.0	24.8	23.3

2.5 糖原测试结果及分析

钉螺经夹竹桃强心总甙处理后糖原含量的变化如表 3 所示。由表 3 可知,经夹竹桃强心总甙处理 2d 后,钉螺软体的糖原含量有显著下降,减少幅度从 9.9%到 32.6%,减少幅度从大到小依次与夹竹桃强心总甙处理液浓度呈正相关,表现出与灭螺活性基本一致的规律。

表 3 夹竹桃强心总甙处理后钉螺的软体组织糖原含量

Table 3 Glycogen Content of soft tissues of snails after treated by the cardiac glycosides of <i>N. indicum</i> Mill.							
项目 Item	1	2	3	4	5	6	对照 CK
干粉含量 Content of dry powder (%)	7.51	10.22	9.17	9.15	8.92	9.83	11.31
处理后减少率 Decreasing rate (%)	32.6	9.9	18.9	19.1	21.1	13.1	—

2.6 蛋白质测试结果及分析

钉螺经夹竹桃强心总甙处理后蛋白质含量的变化如表 4 所示。由表 4 可知,经夹竹桃强心总甙处理 2d 后,钉螺软体的蛋白质含量均有下降,减少幅度从 14.9%到 22.0%,夹竹桃强心总甙的灭螺活性与作用后蛋白质的减少似乎没有关系。

表 4 夹竹桃强心总甙处理后钉螺软体组织蛋白质含量

Table 4 Total protein content of soft tissues of snails after treated by the cardiac glycosides of <i>N. indicum</i> Mill							
项目 Item	1	2	3	4	5	6	对照 CK
干粉含量 Content of dry powder (%)	26.23	29.32	28.64	28.22	27.11	29.11	34.05
减少率 Decreasing rate (%)	22.0	13.9	15.9	17.1	20.4	14.9	—

3 讨论

3.1 由于化学灭螺剂污染环境,研究和利用生物源灭螺剂成为当前国内外的热点^[11],而其中利用植物的化学成份灭螺是目前国内外灭螺研究的前沿,有机合成新的仿生灭螺剂是最时新的研究^[12]。我们项目组对孳生钉螺的长江中下游水域江滩、湖洲及沟渠两旁生长的近 100 种水生与湿生植物,采取随机选取样地的方法,开展了它们对钉螺分布影响的调查研究,发现其中夹竹桃等近 20 种植物与钉螺的相关性系数 $\chi^2_1 > 6.635$,能明显抑制钉螺的繁衍^[1,9]。实验室研究进一步证实了夹竹桃具有很强的灭螺活性,20mg/L 的夹竹桃强心总甙的水溶液约与 1mg/L 氯硝柳胺溶液的灭螺效果相当;不过夹竹桃强心总甙的毒效较氯硝柳胺略慢,用 1mg/L 氯硝柳胺溶液处理钉螺 2~3d 可达 100%死亡,而用 20mg/L 的夹竹桃强心总甙水溶液处理需要 3~4d 才能达到同样的效果,但夹竹桃强心总甙属于生物源类药物,对人类的生存及生态环境较化学灭螺剂氯硝柳胺等要安全得多。

3.2 酯酶(EST)是动物体内一种重要的解毒酶系统,且是钉螺对外界刺激反应最强烈的同工酶之一^[13,14]。得到的 EST 电泳图谱所反映的明显变化揭示 EST 具有特定的病理生化意义,可以作为钉螺中毒的指标。从三张酶谱中可见样品总的 EST 的变化规律为中毒早期经处理样品的酶活高于对照组,表现为酶带颜色加深,但图中的第 1 号样品酶带浅于对照组,这可能是因为在之前的某一时刻就已经达到酶活高峰,制样的时候已处于酶活下降的阶段。而在中毒中期和后期经处理样品的酶活低于对照组,直至酶带完全消失。这与正常的病理反应完全一致。在中毒早期,药物刺激 EST 的表达,增强钉螺肝脏的解毒能力;在中毒中后期,由于药物作用时间或强度超过钉螺生理阈限,其体内物质和能量代谢出现紊乱,从而抑制酶的合成;在接近死亡的机体中,酯酶的合成几乎停止。

3.3 夹竹桃强心总甙能够显著地降低钉螺体内的糖原含量。可能是:(1)夹竹桃强心总甙影响钉螺的肝功能使局部肝细胞坏死,可直接影响糖原合成;(2)夹竹桃强心总甙对酶的作用,能够激活或钝化某些酶,促进糖原分解和抑制糖原合成,导致糖原含量下降;(3)提取物能够影响消化道功能,引起摄食量减少,细胞摄取葡萄糖减少,糖原合成下降。夹竹桃强心总甙能够在一定程度上降低钉螺体内的蛋白质含量,但减少量不及糖原的减少量那样显著。

3.4 对植物提取物灭螺活性的研究是目前国际上灭螺研究的热点,目前所做的工作也是偏重于这一方面。但灭螺研究的发展趋势是生态灭螺^[1,11],这使得仅有实验室的工作是远远不够的,尤其是对分布于我国、日本、菲律宾的两栖习性的湖北钉螺^[15~17],还需要更多地开展野外调查及人工灭螺植物群落中钉螺消长规律的研究,如江滩生态环境的改建,人工林各层次植物种类的选择,各植物的搭配比例,栽培密度,人工辅助能量的供给等;植物对生活在其周围的钉螺等生物的化感作用机理^[18,19],这些都是今后工作的重点。只有综合两方面的工作,生态灭螺才能真正实施并造福于人类。

References:

- [1] Wang W X, Yang Y, Ke W S, et al. Killing Effect of soaking of fresh *Pterocarya stenoptera* on *Oncomelania hupensis*. Chinese of Applied Ecology, 1999, 10(4):478 ~ 480.
- [2] Zhang X D, Yang X C, Peng Z H. Relationships between the surviving *Oncomelania* and beaches environmental factors. Acta Ecologica Sinica, 1999, 19(2):265 ~ 269.
- [3] Marston P. and Hostettmann K. Review Article Number 6: Plant Molluscicides. Phytochemistry, 1985, 24(4): 639 ~ 652.
- [4] Barbosa F S. Determination and Control of Schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1995, 90(2): 155 ~ 159.
- [5] Perrett S. and Whitfield P J. Currently Available Molluscicides. Parasitology Today, 1996, 12(4): 156 ~ 159.
- [6] Souza C P. Molluscicide Control of Snail Vectors of Schistosomiasis. Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1995, 90(2): 165 ~ 168.
- [7] Archibald R G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. Trans. R. Soc. Med. Hyg., 1933, 27:207 ~ 211.
- [8] Li S Y, Wang H P, Cen H X, et al. Isolation of constituents from Oleander *Nerium indicum* with molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis*. Journal of Hubei University(Natural Science Edition), 1999, 21(4):376 ~ 378.
- [9] Yang Y, Ke W S, Wang W X, et al. Effect of *Nerium indicum* on killing *Oncomelania hupensis*. Chinese of Applied Ecology, 2000, 11(6):959 ~ 960.
- [10] Tang D S. Traditional Chinese medicine chemistry. Beijing: People Health Press, 1986. 217 ~ 218.
- [11] Yu F A, Peng W P, Peng Z H, et al. Plant allelopathy effects. Chinese of Applied Ecology, 1996, 7(4): 407 ~ 410.
- [12] Yang Y, Wang W X, Li X Y, et al. Preliminary study on the killing effectiveness of the soaking liquid of *Pterocarya stenoptera* on *Oncomelania* in one year. Journal of Hubei University(Natural Science Edition), 1998, 20(4):390 ~ 393.
- [13] Guo Y H. Plant molluscoide studies in the People's Republic of China. In: Mott, K. E. ed. Plant Molluscoides. A Willy Medical Publication, 1987. 289 ~ 298.
- [14] Dias L C S, Maecal Junior O, Glasser C M. Control of Schistosomiasis Transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1995, 90(2): 285 ~ 288.
- [15] Peng G H. The primary research of microwane resource(2450MC. 600W) inactivation on *Oncomelania hupensis* under several stimulant ecotopes. Journal of Hubei University(Natural Science Edition), 1985, 7(2):376 ~ 378.
- [16] Liu Y Y. Notes on the lassification of the Cinese oncomelanid snails. Acta Zoologica Sinica, 1974, 20(3): 223 ~ 230.
- [17] Zhang Y, Feng T, George M D. Study on allele frequency in *Oncomelania* from the mainland of China. Chinese Journal of Parasitic Diseases, 1994, 12(3):172 ~ 177.
- [18] Kong C H. Allelopathy in China. Allelopathy Journal, 2005, 15(1): 2 ~ 2, 2005.
- [19] Wang P, Liang W J, Kong C H, et al. Allelopathic potential of volatile allelochemicals of *Ambrosia trifida* L. on other plants. Allelopathy Journal, 2005, 15(1): 131 ~ 136.

参考文献:

- [1] 王万贤,杨毅,柯文山,等. 枫杨水浸液灭螺实验研究. 应用生态学报, 1999, 10(4):478 ~ 480.
- [2] 张旭东,杨晓春,彭镇华. 钉螺分布与滩地环境因子的关系. 生态学报, 1999, 19(2):265 ~ 269.
- [8] 李顺意,王慧平,陈怀新,等. 夹竹桃灭螺活性成份的分离纯化. 湖北大学学报(自然科学版), 1999, 21(4):376 ~ 378.
- [9] 杨毅,柯文山,王万贤,等. 夹竹桃灭螺效果初报. 应用生态学报, 2000, 11(6):959 ~ 960.
- [10] 唐得时. 中药化学. 北京: 人民卫生出版社, 1986. 217 ~ 218.
- [11] 於凤安,彭卫平,彭镇华,等. 利用植物他感作用灭螺效果的研究. 应用生态学报, 1996, 7(4):407 ~ 410.
- [12] 杨毅,王万贤,李晓宇,等. 枫杨水浸液周年灭螺实验初报. 湖北大学学报(自然科学版), 1998, 20(4):390 ~ 393.
- [15] 彭光汉. 2450MC、600W 微波源对钉螺在几种模拟生态条件下灭活效应的初探. 湖北大学学报(自然科学版), 1985, 2:121 ~ 126.
- [16] 刘月英. 关于我国钉螺的分类问题. 动物学报, 1974, 20(3):223 ~ 230
- [17] 张仪,冯婷, George M Davis. 中国大陆钉螺等位基因点的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1994, 12(3): 172 ~ 177.