

· 基础研究 ·

黄花蒿叶甲醇粗提物对尖孢镰刀菌的抑制作用[△]马玉楠¹, 陈传娇¹, 马晓惠¹, 程永现², 董鲜^{1*}, 徐福荣^{1*}

(1. 云南中医学院, 云南 昆明 650500; 2. 深圳大学 医学部 药学院, 广东 深圳 518060)

[摘要] 目的: 探讨黄花蒿叶甲醇粗提物对尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 的抑菌活性。方法: 通过体外抑菌实验, 利用牛津杯法、琼脂平板表面萌发法、吖啶橙和碘化丙啶染色法, 测定不同质量浓度黄花蒿叶甲醇提取物对三七根腐病主要致病菌尖孢镰刀菌的孢子萌发率、孢子活力、菌丝生长以及产孢量的影响。结果: 黄花蒿叶甲醇提取物能降低尖孢镰刀菌的孢子萌发率和孢子活力, 抑制菌丝的生长和产孢量的增加, 且随着黄花蒿叶甲醇提取物浓度的增大, 其对尖孢镰刀菌的抑制作用变强。当质量浓度为 25.65 mg·mL⁻¹ 时, 与对照组相比, 孢子萌发率、孢子活力分别降低了 13.25% 和 12.50%; 产孢量也显著降低, 较对照组降低了 90.61%。结论: 黄花蒿叶甲醇提取物对尖孢镰刀菌的生长有抑制作用, 该研究将为三七根腐病的生态防控以及新农药的开发利用提供重要科学依据。

[关键词] 黄花蒿; 三七; 甲醇粗提物; 尖孢镰刀菌; 根腐病

Influence of Methanolic Extract of *Artemisia annua* Leaves on *Fusarium oxysporum*MA Yu-nan¹, CHEN Chuan-jiao¹, MA Xiao-hui¹, CHENG Yong-xian², DONG Xian^{1*}, XU Fu-rong^{1*}

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antifungal activity of the methanolic extract from *Artemisia annua* leaves on *Fusarium oxysporum*. **Methods:** *In vitro* experiment was explored by using Oxford Cup method, agar plate surface germination method, acridine orange propidium iodide staining method to determine the effects of the different concentration methanol extract from *A. annua* leaves on the spore germination rate, spore viability, hypha growth and spore yields of *F. oxysporum*, which is the main pathogen of *Panax notoginseng* root-rot diseases. **Results:** The methanolic extract of *A. annua* could reduce the spore germination rate and spore activity. Furthermore, it could inhibit the mycelium growth and sporulation of *F. oxysporum*. With the increasing concentration of the methanol extract from *A. annua* leaves, the inhibition effect on *F. oxysporum* became stronger. When the concentration was 25.65 mg·mL⁻¹, compared with the control group, the spore germination rate and spore activity decreased by 13.25% and 12.50%, respectively. The spore yield was also decreased by 90.61% compared with the control group. **Conclusion:** The methanolic extract from *A. annua* leaves inhibited the growth of *F. oxysporum*. Taken together, the present study would lend supports for both ecological control and development of new pesticides of *P. notoginseng*.

[Keywords] *Artemisia annua*; *Panax notoginseng*; methanol extract; *Fusarium oxysporum*; root-rot disease

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180103004

三七是我国传统道地中药材, 为五加科人参属多年生草本植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根及根茎^[1], 具有散瘀止血、消肿

定痛等功能。主要用于治疗冠心病、心绞痛等心脑血管疾病, 其用药范围甚广, 社会需求量日益增加, 从而引起种植面积的急剧扩大。由于三七生长环境

[△] [基金项目] 国家自然科学基金(81660626, 81460581); 云南应用基础研究计划-青年项目(2015FD034); 云南省科学技术厅-云南中医学院应用基础研究联合专项(2017FF116(-014)); 国家重点研发计划(2017YFD0201402); 云南省教育厅资助性项目(2017ZZX288)

* [通信作者] 董鲜, 博士, 副教授, 研究方向: 微生态与中药材品质; Tel: (0871)65918204, E-mail: dongxian_1655129@163.com

徐福荣, 博士, 研究员, 研究方向: 中药资源开发与利用; Tel: (0871)65918204, E-mail: xfrong99@163.com

的特殊性,造成其连作障碍十分严重,制约着三七产业的健康发展,是三七产业发展急需解决的问题^[2]。据报道,连作障碍易导致三七根部的腐烂。Miao等^[3]通过对三七的腐烂根际真菌微生物进行研究,表明毁坏柱孢菌 *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten、腐皮镰刀菌 *Fusarium solani* (Mart.) Sacc 和尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* Schltdl 是三七根腐病的主要病原真菌,其中分离频率最高的为柱孢属真菌^[4-5]。镰刀菌属类病原菌能引发多数作物根腐病的发生,给作物生产带来严重损失。

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 为菊科 Asteraceae 蒿属 *Artemisia* 1年生草本植物,是我国传统的中草药,具有很高的药用价值。黄花蒿的主要化学成分包括挥发性成分和非挥发性成分,其中非挥发性成分的主要代表是青蒿素,挥发性成分主要包括芳香族、脂肪族及萜类化合物^[6]。本课题组经过长期的田间试验,发现在三七土壤表面覆盖黄花蒿能促进三七植株的生长,与无黄花蒿覆盖的三七相比,叶绿素含量(SPAD)升高,株高和根系干重也有所增加,覆盖黄花蒿的三七发病率(10%)显著低于无黄花蒿覆盖的三七发病率(33.13%),黄花蒿对三七根腐病的防控效果高达76.60%^[7]。本实验用甲醇为溶剂对黄花蒿的叶进行超声提取,测定其提取物对尖孢镰刀菌的孢子萌发、孢子活力、菌丝生长及产孢量的影响,试图揭示黄花蒿抑制三七根腐病的发生机理,从而寻求防治三七根腐病的新途径,为消减三七连作障碍及规模化种植提供理论依据。

1 材料

供试黄花蒿:黄花蒿种子由云南省农业科学院提供,在云南省道地濒危中药材繁育与栽培工程技术研究中心内种植。

供试菌株:菌株分离自发病三七植株根系,经鉴定为尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*,对三七植株有强致病性。在PDA培养基上进行活化,接种3~4次后,取生长旺盛的菌株备用。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂20g,蒸馏水1000mL。

2 方法

2.1 黄花蒿叶甲醇粗提物的制备

将黄花蒿叶片阴干,粉碎,过40目筛,称取

50g用甲醇超声提取(100mL×2h×3次)。过滤,冷冻干燥得粉末2.565g,制备成质量浓度分别为3.66、5.13、8.55、25.65mg·mL⁻¹的甲醇溶液,置于4℃冰箱备用,空白对照为甲醇溶液。

2.2 尖孢镰刀菌孢子萌发率的测定

用琼脂平板表面萌发法^[8]。取培养7d的尖孢镰刀菌,加20mL无菌水到培养皿中,用无菌载玻片将菌丝和孢子轻轻刮下,8层无菌纱布过滤除去菌丝和培养基,最后配制成浓度为5×10³个·mL⁻¹的孢子悬浮液。采用2%水琼脂培养基,在无菌条件下,每个培养皿中加入15mL的水琼脂和1mL无菌黄花蒿叶甲醇提取物,充分混匀。待培养基冷却凝固后,在每个培养皿中加入50μL上述已制备好的孢子悬浮液,使用无菌涂布棒将孢子悬浮液顺时针均匀涂布在培养基上。涂布完成后,将培养皿放置在微生物培养箱中,28℃黑暗条件下培养72h,每个处理设5个重复,按公式(1)计算孢子的萌发率。

$$\text{萌发率}(\%) = \frac{\text{萌发孢子数}}{\text{孢子总数}} \times 100\% \quad (1)$$

2.3 尖孢镰刀菌孢子活力的测定

黄花蒿叶甲醇提取物对尖孢镰刀菌的生长抑制作用参照牛津杯法^[9],孢子活力测定采用吖啶橙-碘化丙啶荧光染色法^[10]。在无菌操作条件下,每个培养皿中倒入15mL PDA培养基,待冷却凝固后,取在PDA培养基上培养7d的尖孢镰刀菌,用直径5mm的打孔器沿菌落边缘打取菌块,接种于培养基中央,然后将4个无菌牛津杯距离真菌块25mm处等距离放置,每个牛津杯加入200μL上述不同质量浓度的黄花蒿叶甲醇提取物(事先用0.22μm有机系滤头过滤除菌),于微生物培养箱中28℃恒温培养。每个处理设5个重复。生长1周后,刮下菌丝,用无菌水制成孢子悬浮液(1×10⁶个·mL⁻¹)。取50μL的菌悬液,加入50μL的无菌水和20μL碘化丙啶(2%)和40μL吖啶橙(0.1%)。混合均匀后在室温黑暗条件下放置5min进行染色。染色完成后,10000×g离心5min。再用100μL的无菌水冲洗菌悬液。将染色液完全洗净后,取10μL样品,用荧光显微镜进行观察。激发光波长为450~490nm。计算活细胞的百分率。

2.4 尖孢镰刀菌的生长曲线测定

参照牛津杯法^[9],测定黄花蒿叶甲醇粗提取物对

尖孢镰刀菌菌丝生长的影响,具体实验步骤按 2.3 的牛津杯方法。测量菌落直径采用“十字交叉法”,每 24 h 测量 1 次,直至第 8 d。用折线图表示尖孢镰刀菌的生长曲线。

2.5 尖孢镰刀菌产孢量测定

按 2.4 方法,测定菌落直径后,加入 10 mL 无菌水到培养皿中,用接种环将培养基中的菌丝和孢子轻轻刮下,再用布氏漏斗过滤,用 10 mL 的无菌水清洗漏斗,最后定容到 30 mL,在双目生物显微镜下用血球计数板对孢子的产量进行测定。

2.6 数据统计分析

利用 Microsoft Excel 和 SPSS 19.00 软件对实验数据进行处理和分析,以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。

3 结果与分析

3.1 尖孢镰刀菌的孢子萌发率

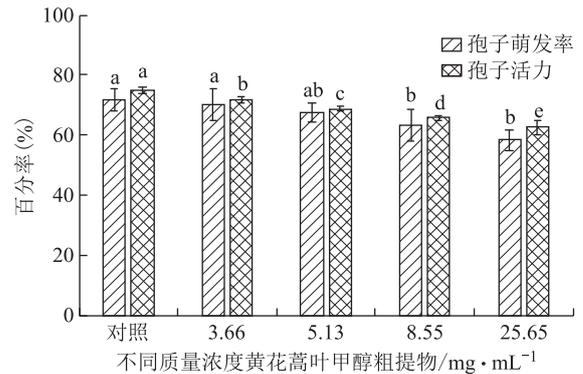
图 1 结果表明,黄花蒿叶甲醇提取物在一定程度上能抑制尖孢镰刀菌的孢子萌发,随着黄花蒿叶甲醇提取物浓度的增加,其对孢子萌发率的抑制作用显著增强。与对照组相比,当质量浓度为 3.66、5.13 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,孢子萌发率没有明显差异。当质量浓度为 8.55、25.65 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,孢子萌发率分别是 63.32%、58.42%,相比对照显著降低。

3.2 尖孢镰刀菌的孢子活力

用吖啶橙-碘化丙啶对孢子进行染色后在荧光显微镜下观察尖孢镰刀菌孢子状态。吖啶橙能透过完整的细胞膜进入细胞,将活细胞染成绿色。碘化丙啶则可进入死细胞,与 DNA 结合,将细胞染成红色。图 1 和图 2 的结果表明,当黄花蒿叶甲醇提取物质量浓度为 3.66 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,尖孢镰刀菌孢子活力为 71.6%,与对照组相比有统计学意义($P < 0.05$)。当质量浓度增加到 25.65 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,与对照组相比,孢子的活力降低了 12.5%。因此,尖孢镰刀菌的孢子活力随着黄花蒿叶甲醇粗提物质量浓度的增加显著降低。

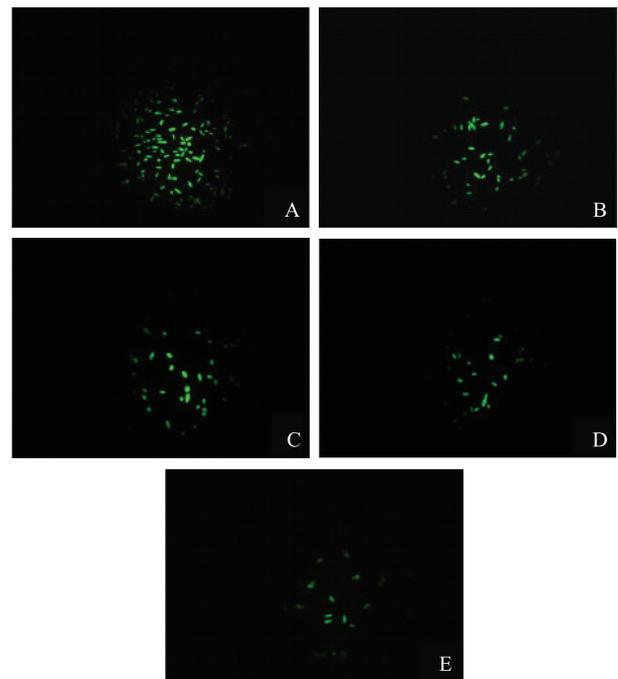
3.3 尖孢镰刀菌的菌丝生长曲线

图 3 的结果表明,从第 3 天开始,各处理组与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着培养时间的增加,黄花蒿叶甲醇提取物质量浓度增大,其对尖孢镰刀菌的菌落生长抑制作用逐渐增强。在第 8 天时,与对照组相比,菌落直径差异有统计



注:同系列不同字母表示差异有统计学意义($P < 0.05$);同系列相同字母表示差异无统计学意义($P > 0.05$)。

图 1 黄花蒿叶甲醇提取物粗提物对孢子萌发率、孢子活力的影响



注: A. 对照; B. 3.66 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; C. 5.13 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; D. 8.55 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; E. 25.65 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

图 2 不同质量浓度黄花蒿叶甲醇粗提物对尖孢镰刀菌孢子活力的抑制作用

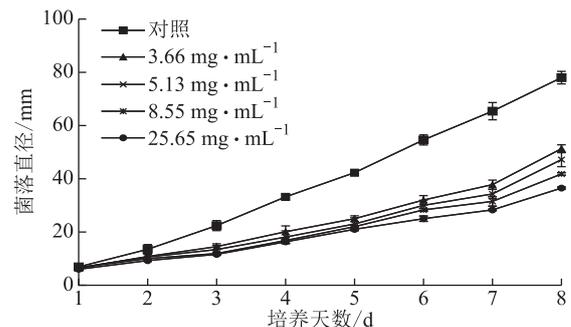


图 3 不同质量浓度黄花蒿叶甲醇粗提物对尖孢镰刀菌菌落生长的影响

学意义($P < 0.05$)。图3为培养8 d的尖孢镰刀菌生长曲线,随着黄花蒿叶甲醇提取物浓度的增加,菌落的直径显著降低。图4的结果显示,第8天时,对照组的菌落直径为78.0 mm,当黄花蒿叶甲醇粗

提物质量浓度增加到 $25.65 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,菌落直径最小为36.5 mm。上述结果表明,随着黄花蒿叶甲醇粗提物质量浓度的增加,对尖孢镰刀菌的菌丝生长抑制作用显著增强。

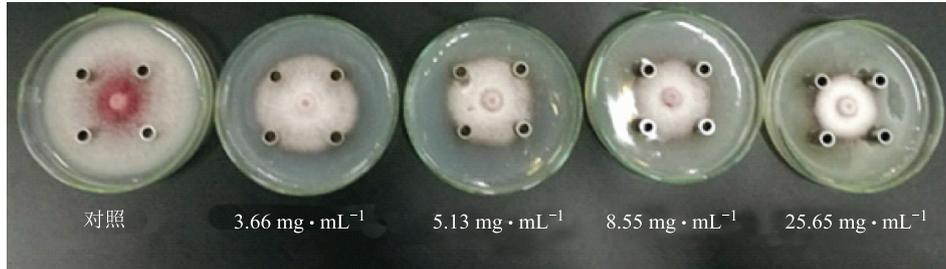
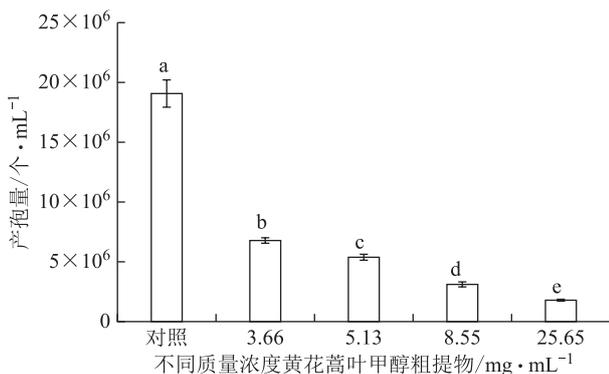


图4 不同质量浓度黄花蒿叶甲醇粗提物对尖孢镰刀菌生长的抑制作用

3.4 尖孢镰刀菌的产孢量

图5结果表明,黄花蒿叶甲醇提取物对尖孢镰刀菌的产孢量有显著抑制作用,各处理组与对照相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。随着黄花蒿叶甲醇粗提物质量浓度的增加,尖孢镰刀菌的产孢量显著降低。对照组的产孢量为 1.91×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,而当黄花蒿叶甲醇粗提物质量浓度增加到 $25.65 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,尖孢镰刀菌的产孢量最低,为 1.79×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,与对照组相比降低了90.61%。



注:图中不同字母表示差异有统计学意义($P < 0.05$);相同字母表示差异无统计学意义($P > 0.05$)。

图5 黄花蒿叶甲醇粗提物对尖孢镰刀菌孢子产量的影响

4 讨论

在农业生产过程,根腐病是一种毁灭性病害。三七根腐病有多种表现症状,包括茎基干枯型、干裂型、髓烂型、黄腐型、湿腐型和急性青枯型等,其中较常见的是黄腐型,在三七生长的不同年限里均可发生。三七的根腐病制约着三七的产量和质量,阻碍了三七产业的持久发展。目前,对三七根腐病

的防治主要是生物防治、化学防治和轮作。生物防治在一定程度上可以促进三七种子的出苗,但是对于三七根腐病的防治却没有达到理想的效果。轮作虽然可以缓解根腐病的发生,但因其年限较长,而不能够大面积推广。化学防治虽然能够在一定程度上缓解三七的根腐病,但不能够完全控制,而且会降低药材的质量并对土壤有一定的污染。三七根腐病的病原菌具有多样性,不但真菌可侵染,细菌和线虫亦可侵染致病,其中以真菌为主。根据不同的病原菌引起的根腐病进行系统、全面的研究,才能有效揭示根腐病的发生和发展的相关过程,从而为三七根腐病的防治研究提供理论基础^[11]。

尖孢镰刀菌在土壤中生存能力较强,是一种土壤习居菌,其产生的厚垣孢子可在土壤中存活10年之久。病原菌从植株的根系侵染植株,并产生分生孢子,以小型分生孢子的形态随蒸腾流运输到植株地上部,继而定殖于根系和上部茎,导致植株地上部发病。在运输过程中,尖孢镰刀菌会产生对植株有害的次生代谢产物,即镰刀菌酸,对植株的生长也有一定的破坏作用。本研究结果表明,黄花蒿叶的甲醇提取物对尖孢镰刀菌的生长有显著的抑制作用。不同浓度的黄花蒿叶甲醇提取物抑菌效果不同,并且抑菌效果随质量浓度的增大而加强。当黄花蒿叶甲醇粗提物的质量浓度为 $25.65 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,尖孢镰刀菌的孢子萌发受到抑制,萌发率较对照组显著降低(见图1);从而导致孢子活力的降低和孢子产量的减少(见图1、图5);病原菌菌丝的生长受到抑制(见图3、图4)。

初步研究表明,植物中的活性成分对真菌的作用机制较复杂,目前此方面的研究主要是植物的粗

提液对病原菌的直接抑制作用。主要表现为抑制附着孢子的形成、孢子的游动、菌丝体的生长及体外钝化效果等。尖孢镰刀菌侵染三七植株,主要通过病原菌产生的孢子、菌丝附着在三七的根部,进而导致三七的根部变黄腐烂,在本实验中,制得黄花蒿叶甲醇提取物对尖孢镰刀菌的孢子活力、孢子萌发及菌丝的生长都有一定的抑制作用,且随着质量浓度的增加抑制作用增强,进而可从源头上抑制三七根腐病的发生。黄花蒿提取物的作用范围广泛,对不同的菌类都有一定的抑制作用。相关研究表明,黄花蒿不同溶剂得到的提取物,对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、单核增多性李氏杆菌、大肠杆菌等细菌均有不同程度的抑菌作用^[12-13]。另有一些研究表明黄花蒿有机溶剂提取物对许多植物性病原菌如黑曲霉、黄曲霉、青霉、毛霉等真菌也具有显著的抑制作用^[14-17]。

本研究主要针对黄花蒿叶甲醇提取物对尖孢镰刀菌生长的抑制作用进行分析,但对于具体成分未进行深入的研究,黄花蒿能否与三七间作从而解决三七连作问题也待进一步观察。今后,可对黄花蒿叶甲醇提取物的成分进一步研究,找出其抑制土传病害病原菌的主要活性成分,为绿色农药的生产及生物制药开辟新的道路。黄花蒿在我国分布广、产量大,若能以其为原料对黄花蒿资源进一步开发,寻求病虫害防治的新途径,将具有广阔的前景和深远的意义。

参考文献

- [1] Guo H B, Cui X M, Nan N, et al. Sanchi ginseng (*Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen) in China: distribution, cultivation and variations [J]. Genet Resour Crop Evol, 2010, 57 (3): 453-460.
- [2] 刘莉, 刘大会, 金航. 三七连作障碍的研究进展 [J]. 山地农业生物学报, 2011, 30(1): 70-75.
- [3] Miao C P, Mi Q L, Qiao X G, et al. Rhizospheric fungi of *Panax notoginseng*: diversity and antagonism to host phytopathogens [J]. J Ginseng Res, 2015, 21(2): 127-134.
- [4] 缪作清, 李世东, 刘杏忠, 等. 三七根腐病病原研究 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1371-1378.
- [5] 谭勇, 崔尹瞻, 季秀玲, 等. 三七连作的根际、根内微生物变化与生态学研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 391-399.
- [6] 智亚楠, 陈月华, 马宇明, 等. 河南省黄花蒿挥发油的组分分析及抑菌作用测定 [J]. 河南农业科学, 2016, 45(12): 105-109.
- [7] 赵雅萌, 马玉楠, 陈传娇, 等. 黄花蒿叶水提物对三七根际尖孢镰刀菌生长的抑制作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(3): 373-378.
- [8] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 142-156.
- [9] 张建华, 李敏, 张波, 等. 八种单体多酚对葡萄酒微生物的抑菌活性比较 [J]. 食品与发酵工程, 2016, 42(2): 101-106.
- [10] Karina M, Valencia M, Valdés-Santiago L, et al. Naphthalene acetic acid potassium salt (NAA-K⁺) affects conidial germination, sporulation, mycelial growth, cell surface morphology and viability of *Fusarium oxysporum* f. sp. radici-lycopersici and *F. oxysporum* f. sp. cubense *in vitro* [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(44): 8315-8323.
- [11] 毛忠顺, 龙月娟, 朱书生, 等. 三七根腐病研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(12): 2051-2054.
- [12] 张佳, 王莹, 张峰, 等. 滤纸片法测定黄花蒿提取物对霉菌的抑制活性 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48(5): 1153-1154.
- [13] 张佳, 张峰. 黄花蒿叶中抑菌成分提取方法的研究 [J]. 江苏农业科学, 2009(3): 138-139.
- [14] 吴静, 丁伟, 张永强, 等. 黄花蒿 (*Artemisia annua*) 提取物对两种病原真菌的生物活性 [J]. 农药, 2007, 6(10): 713-715, 718.
- [15] 刘芳. 青蒿挥发油抗植物病原真菌活性的研究 [J]. 白城师范学院学报, 2009, 23(6): 26-28.
- [16] 韩小冰, 马玲, 马伟, 等. 不同方法提取蒿属植物有效物质的抑菌活性研究 [J]. 森林工程, 2008, 24(3): 13-16.
- [17] 高志玲, 陈艳, 谢英辉. 黄花蒿挥发油的体外抑菌活性研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(19): 209-211.

(收稿日期 2018-01-03)