

汉防己甲素对 5 种植物病原真菌的抑制作用及对灰葡萄孢的作用机制初探

王 雨¹, 王鑫伟¹, 刘 洋¹, 刘楚涵², 钱怡云¹, 宋萍萍^{1*}, 韦 敏^{1*}

(1. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏省植物资源研究与利用重点实验室, 南京 210014;

2. 南京中医药大学, 南京 210023)

摘要 为寻找环境友好型的农药先导化合物, 利用菌丝生长速率法研究了粉防己中汉防己甲素对常见植物病原真菌的抑制活性, 结果表明, 汉防己甲素对 5 种常见植物病原真菌均有抑制作用, 对立枯丝核菌的抑制作用最强, EC_{50} 为 33.49 mg/L; 对串珠镰孢和瓜类黑腐球壳菌的 EC_{50} 分别为 41.71 mg/L 和 43.97 mg/L, 抑制活性优于对照植物源药剂蛇床子素; 对灰葡萄孢的抑制活性与蛇床子素相当。接种蓝莓离体叶片的试验结果表明, 汉防己甲素对蓝莓灰霉病具有治疗和保护作用且作用效果与对照药剂蛇床子素基本相当; 激光共聚焦显微镜检测发现汉防己甲素可降低灰葡萄孢菌丝内钙离子浓度, 汉防己甲素分别与 $CaCl_2$ 及钙通道阻滞剂维拉帕米两者相互作用可降低灰葡萄孢对各药剂的敏感性, 表明其作用机制与钙离子及钙离子通道有关。本文首次报道汉防己甲素对 5 种植物病原真菌的抑制作用及其作用机制, 为其进一步的开发应用提供理论基础。

关键词 汉防己甲素; 植物病原真菌; 灰葡萄孢; 钙离子; 钙离子通道

中图分类号: S 482.292 **文献标识码:** B **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2022343

Inhibitory effect of tetrandrine on five plant pathogens and its mechanism on *Botrytis cinerea*

WANG Yu¹, WANG Xinwei¹, LIU Yang¹, LIU Chuhan², QIAN Yiyun¹, SONG Pingping^{1*}, WEI Min^{1*}

(1. Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract In order to search for more effective environment-friendly fungicide lead compounds, sensitivity of tetrandrine on five plant pathogens were determined by mycelium growth rate method. The results showed that tetrandrine had antifungal activity against all tested pathogens, displayed a strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani* isolate (EC_{50} = 33.49 mg/L), exhibited a higher activity against *Fusarium moniliforme* isolate (EC_{50} = 41.71 mg/L) and *Didymella bryoniae* isolate (EC_{50} = 43.97 mg/L) than osthole, and showed significant activity against *Botrytis cinerea* equal to osthole. The results of inoculation of blueberry leaves *in vitro* showed that tetrandrine had both therapeutic and protective activities against gray mold infections, equal to those of osthole. Laser confocal microscopy showed that tetrandrine could reduce the concentration of calcium ions in the mycelia of *B. cinerea*, and the interaction of tetrandrine with $CaCl_2$ and calcium channel blocker verapamil could reduce the sensitivity of *B. cinerea* to each reagent, indicating that the mechanism of tetrandrine against *B. cinerea* was related to Ca^{2+} and Ca^{2+} channels. Our work represents the first report of the antifungal properties of tetrandrine against five plant pathogens and its mechanism, providing a theoretical basis for its further development and application.

Key words tetrandrine; plant pathogens; *Botrytis cinerea*; Ca^{2+} ; Ca^{2+} channel

植物病原菌引起的植物病害严重影响农作物的产量和品质, 是农业发展面临的问题之一, 多年来人

收稿日期: 2022-06-18 修订日期: 2022-09-04

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31801793)

* 通信作者 E-mail: 宋萍萍 songpingping@cnbg.net; 韦敏 weimin@cnbg.com

们解决这一问题的主要方式是化学防治,但近年来化学防治带来的食品安全、环境污染及抗药性问题愈发突出^[1],因此亟须研发新型、安全、环保的防治药剂及绿色防控技术。已有研究证实植物中多种天然化合物对植物病原菌具有较好的抑制作用^[2-3],这些化合物因作用方式特异、不易产生抗药性、环境友好、对非靶标生物相对安全等特点逐渐引起人们的关注^[4]。

汉防己甲素又称粉防己甲素,是从防己科千金藤属植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 根茎中提取的一种生物碱,为中药粉防己的主要活性成分之一^[5]。现代药理学研究发现汉防己甲素具有心血管保护、神经保护、抗肝纤维化、镇痛、降压、降血糖和抗自由基损伤等多种药理作用,临床上主要用于治疗尘肺病、风湿痛、关节痛、神经痛等^[5-6]。文献报道汉防己甲素可抑制金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、白色念珠菌 *Candida albicans* 等细菌和真菌^[7-8],但在抑制植物病原真菌方面的研究未见有报道。基于此,本研究选用粉防己为原料,从中提取分离得到汉防己甲素,采用菌丝生长速率法测试了其常见植物病原真菌的抑制活性,初步探讨了汉防己甲素对灰葡萄孢的抑菌作用机制,为基于天然产物的植物源抑菌剂的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

粉防己块根:购自南京益丰大药房,将块根粉碎成粉末状,过三号筛,保存备用。

供试真菌:立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*,分离自水稻纹枯病病叶;灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*,分离自草莓灰霉病病株;禾谷镰孢 *Fusarium graminearum*,分离自小麦赤霉病病株;串珠镰孢 *Fusarium moniliforme*,分离自水稻恶苗病病株;瓜类黑腐球壳菌 *Didymella bryoniae*,分离自西瓜蔓枯病病株;供试菌株均由南京农业大学植物保护学院馈赠。

供试植物:‘蓝莓 1 号’植株栽培于江苏省中国科学院植物研究所温室中。

1.2 仪器与药剂

仪器:METTLER AE240 电子天平,梅特勒-托利多仪器公司;高压灭菌锅,上海申安医疗器械厂;SW-CJ-IFD 可调式垂直单向洁净工作台,上海天恒

医疗器械有限公司;SPX-150BSH-Ⅱ生化培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;Agilent 1260 UP-LC-DAD-6530 ESI-QTOF MS 液质联用仪,美国安捷伦公司;核磁共振谱仪,Bruker Avance 300;X-6 显微熔点测定仪,北京泰克仪器有限公司;摇床,上海智城分析仪器制造有限公司;Zeiss LSM 900 激光扫描共聚焦显微镜,蔡司公司。

试剂:98%汉防己甲素,陕西绿清生物工程有限公司;98%蛇床子素,四川省维克奇生物科技有限公司;琼脂、PBS,北京索莱宝科技有限公司;DMSO、葡萄糖,国药集团化学试剂有限公司;氯化钙,广东光华科技股份有限公司;Fluo-3 AM(钙离子荧光探针,5 mmol/L),碧云天生物技术有限公司;薄层层析硅胶,青岛海洋化工厂分厂;维拉帕米、色谱纯甲醇、色谱纯乙腈,阿拉丁公司;其他试剂均为分析纯。

PDA 固体培养基:200 g 去皮马铃薯切块,煮沸 10 min 后,取汁,加入 20 g 琼脂,加热至融化,再加入 20 g 葡萄糖,用去离子水定容至 1 L。

PD 培养液:200 g 去皮马铃薯切块,煮沸 10 min 后,取汁,加入 20 g 葡萄糖,用去离子水定容至 1 L。

含钙 PDA 培养基:取刚做好的 PDA 培养基,称取氯化钙加入其中,制成氯化钙终浓度分别为 40 000 mg/L 和 50 000 mg/L 的含钙培养基。

1.3 试验方法

1.3.1 粉防己根中汉防己甲素的提取分离纯化与鉴定

准确称取粉防己块根粉 2.0 kg,75%乙醇热回流提取,滤过,滤液浓缩成浸膏,加水溶解后二氯甲烷萃取 3 次,合并有机溶剂后浓缩成浸膏,浸膏溶解,粗硅胶拌样,柱层析纯化,用二氯甲烷:甲醇(20:1,10:1,5:1,2:1,1:1)梯度洗脱,硅胶板检测,将含有与汉防己甲素标准品化学位移值相同的溶液合并,反复硅胶柱层析制备得到汉防己甲素粗品,重结晶后制得的固体用丙酮溶解,加水沉析制备得到的晶体经 HPLC-MS 质谱及氢谱数据并与标准品比对鉴定得到纯度 98% 以上的汉防己甲素^[9-11],用制备得到的汉防己甲素作为供试品进行试验。

1.3.2 菌丝生长速率法测定汉防己甲素的抑菌活性

采用菌丝生长速率法^[12]测定汉防己甲素抑制植物病原菌的 EC_{50} 。用二甲基亚砜(DMSO)将汉防己甲素配成母液(10^4 mg/L)后加入 PDA 培养基中,

制成含有 5 个浓度梯度的含药平板($d=9\text{ cm}$),以蛇床子素原药为阳性对照,以加入相应 DMSO 溶剂为空白对照。将供试病原菌菌饼(直径为 0.5 cm)分别接种于含药 PDA 平板中央,每皿 1 块菌饼,菌丝面向下。接种后将培养皿用保鲜膜密封后放置于 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗培养 $3\sim 12\text{ d}$,待对照组菌丝长至超过平板直径 $2/3$ 时,用十字交叉法测量菌落直径,利用 DPS 软件计算抑制中浓度 EC_{50} 及斜率,用 GraphPad Prism 8 进行卡方检验。每处理重复 3 次,试验重复 3 次。

1.3.3 采用离体叶片法测定汉防己甲素对灰霉病的保护和治疗作用

保护作用测定^[13]:采摘新鲜的蓝莓叶片用水洗净晾干,分别喷洒用含有 0.1% 吐温 80 的去离子水稀释的浓度为 $0, 20, 40, 60, 80, 100\text{ mg/L}$ 的化合物,将叶片放置于底部有湿润滤纸的培养皿中,于 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗培养。 24 h 后,挑取灰葡萄孢菌饼(直径 0.5 cm)接种于各试验组长势基本一致的蓝莓叶片中央部位。将接种后的培养皿置于 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗培养, 3 d 后,用十字交叉法测定病斑直径,计算防治效果。每处理 10 个重复,试验重复 2 次。

治疗作用测定^[13]:采摘新鲜的蓝莓叶片用水洗净晾干后,将灰葡萄孢菌饼(直径 0.5 cm)接种于各试验组长势基本一致的蓝莓叶片中央部位,将叶片放置于底部有湿润滤纸的培养皿中,置于 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗培养。 24 h 后,分别喷洒用含有 0.1% 吐温 80 的去离子水稀释的浓度为 $0, 20, 40, 60, 80, 100\text{ mg/L}$ 的化合物,培养 3 d 后,用十字交叉法测定病斑直径,计算防治效果。每处理 10 个重复,试验重复 2 次。

防治效果=(对照组病斑直径-处理组病斑直径)/(对照组病斑直径- 0.5) $\times 100\%$ 。

1.3.4 外源性钙离子对汉防己甲素抑菌作用的影响

采用菌丝生长速率法测定外源性钙离子对汉防己甲素抑菌作用的影响^[12,14]。制备含不同浓度 CaCl_2 ($40\ 000, 50\ 000\text{ mg/L}$)、汉防己甲素(30 mg/L)及二者联用的含药培养基,以加入相应 DMSO 溶剂为空白对照组,将供试病原菌菌饼(直径为 0.5 cm)分别接种于含药平板上,保鲜膜密封后置于 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗培养 $3\sim 4\text{ d}$,观察菌丝生长情况,用十字交叉法测量菌落直径,计算各药剂对各病原菌的生长抑制率。

1.3.5 激光共聚焦显微镜检测汉防己甲素对灰葡萄孢菌丝内钙离子浓度的影响

Fluo-3 AM 作为最常用的检测细胞内钙离子浓度的荧光探针之一,可穿透细胞膜被剪切成 Fluo-3,继而与钙离子结合产生较强的荧光,且荧光在一定时间内强度恒定^[15],因此可用来观察药剂对钙离子浓度的影响。将 5 个灰葡萄孢菌饼(直径为 0.5 cm)接入 150 mL PD 培养液中,于 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 125 r/min 摇培 60 h ,夹取灰葡萄孢菌丝于培养皿中,PBS 洗 3 次,放置于含有 $3\text{ }\mu\text{L}$ Fluo-3 AM 钙离子探针的 $500\text{ }\mu\text{L}$ PBS 的 EP 管中避光冰水浴超声 30 min ,激光共聚焦显微镜检测后有荧光。放入含 100 mg/L 汉防己甲素的 PBS 溶液中,用激光共聚焦显微镜观察药剂处理过的菌丝体内钙离子浓度的变化^[14]。设置激发波长 488 nm ,发射波长 525 nm ,分别在 $5, 10\text{ min}$ 时进行观察。以相应溶剂处理菌丝作为对照组,每处理设 3 次重复。

1.3.6 钙通道拮抗剂维拉帕米对汉防己甲素抑菌作用的影响

采用菌丝生长速率法测定钙通道拮抗剂维拉帕米对汉防己甲素抑菌作用的影响^[12]。制备含 200 mg/L 维拉帕米(去离子水为溶剂)、 40 mg/L 汉防己甲素及二者联用的含药培养基,以加入相应 DMSO 溶剂为空白对照组,将供试病原菌菌饼(直径为 0.5 cm)分别接种于含药平板上,保鲜膜密封后置于 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗培养 $3\sim 4\text{ d}$,观察菌丝生长情况,用十字交叉法测量菌落直径,计算各药剂对各病原菌的生长抑制率。

2 结果与分析

2.1 汉防己甲素的鉴定

白色粉末, $m.p.$ $223\sim 224.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (文献^[9-11]: $216\sim 222\text{ }^{\circ}\text{C}$)。ESI-MS (m/z): $623.38[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , CDCl_3) δ : $2.34(\text{s}, 3\text{H}), 2.38\sim 2.40(\text{m}, 1\text{H}), 2.48(\text{d}, J=33.8, 13.8\text{ Hz}, 1\text{H}), 2.63(\text{s}, 3\text{H}), 2.67\sim 3.12(\text{m}, 6\text{H}), 3.19(\text{s}, 3\text{H}), 3.27(\text{dd}, J=12.3, 5.2\text{ Hz}, 1\text{H}), 3.37(\text{s}, 3\text{H}), 3.38\sim 3.40(\text{m}, 1\text{H}), 3.46\sim 3.48(\text{m}, 1\text{H}), 3.75(\text{s}, 4\text{H}), 3.88(\text{dd}, J=10.8, 5.6\text{ Hz}, 1\text{H}), 3.93(\text{s}, 3\text{H}), 6.00(\text{s}, 1\text{H}), 6.29(\text{s}, 1\text{H}), 6.30(\text{s}, 1\text{H}), 6.53(\text{d}, J=13.1\text{ Hz}, 2\text{H}), 6.80(\text{d}, J=8.3\text{ Hz}, 1\text{H}), 6.86(\text{d}, J=8.1\text{ Hz}, 1\text{H}), 6.89(\text{d}, J=8.2\text{ Hz}, 1\text{H}), 7.15(\text{d}, J=8.1,$

2.5 Hz, 1H), 7.35(d, $J=8.2$, 2.0 Hz, 1H)。
 $^1\text{H-NMR}$ 谱数据、质谱数据、熔点数据与文献^[9-11]一致,故该化合物鉴定为汉防己甲素(tetrandrine)。经 HPLC-MS 测定标准品及提取分离纯化的汉防己甲素纯度均超过 98%。

2.2 汉防己甲素的抑菌活性

2.2.1 汉防己甲素对 5 种常见病原菌的 EC₅₀

按照 1.3.2 抑菌活性测试方法测定汉防己甲

素对 5 种植物病原菌的 EC₅₀ 结果如表 1 所示。在 5 种植物病原真菌中,汉防己甲素对禾谷镰孢的抑制活性较低,对其他 4 种植物病原菌的抑制活性较好,对立枯丝核菌的抑制活性最强($\text{EC}_{50}=33.49\text{ mg/L}$);对串珠镰孢、瓜类黑腐球壳菌的 EC₅₀ 分别为 41.71 mg/L 和 43.97 mg/L,抑制活性优于对照药剂蛇床子素;对灰葡萄孢的抑制活性与对照药剂蛇床子素相当。

表 1 汉防己甲素对常见 5 种植物病原真菌的 EC₅₀¹⁾

Table 1 The EC₅₀ values of tetrandrine against five common plant fungal pathogens

病原菌 Pathogen	化合物 Compound	斜率 Slope±SE	χ^2	df	EC ₅₀ / mg·L ⁻¹
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	汉防己甲素	1.533±0.708	1.442	3	33.49
	蛇床子素	2.651±0.442	0.071	3	25.88
禾谷镰孢 <i>Fusarium graminearum</i>	汉防己甲素	3.716±0.044	2.116	3	78.90
	蛇床子素	4.555±0.061	0.052	3	21.30
灰葡萄孢 <i>Botrytis cinerea</i>	汉防己甲素	0.459±0.661	6.134	3	51.97
	蛇床子素	2.497±0.377	1.541	3	48.65
串珠镰孢 <i>Fusarium monili forme</i>	汉防己甲素	3.105±0.441	1.801	3	41.71
	蛇床子素	4.017±0.148	0.263	3	50.16
瓜类黑腐球壳菌 <i>Didymella bryoniae</i>	汉防己甲素	1.438±0.140	0.092	3	43.97
	蛇床子素	3.294±0.389	0.407	3	63.34

1) 蛇床子素为阳性对照,利用 DPS、GraphPad Prism 8 软件进行数据处理。
Osthole is positive control. The data are analyzed by DPS and GraphPad Prism 8.

2.2.2 离体条件下汉防己甲素对灰霉病的保护和
治疗作用

保护作用的防效测定结果显示(表 2),在用药浓度为 20、40、60 mg/L 时,汉防己甲素与对照药剂蛇床子素的作用效果无明显差异,用药浓度为 80、100 mg/L 时,蛇床子素的作用效果较好;保护作用的防治效果随用药浓度增加而增强,且本试验用药浓度的保护防效均在 43%以上。

治疗作用的防效测定结果显示(表 2),在用药浓度为 20 mg/L 时,蛇床子素的作用效果较好,用药浓度为 40、60、80、100 mg/L 时,汉防己甲素与对照药剂蛇床子素之间的作用效果无显著差异;治疗作用的防治效果均随用药浓度增加而增强,且本试验用药浓度的治疗效果均在 41%以上。

2.3 汉防己甲素抑菌作用机制初探

2.3.1 外源性钙离子对汉防己甲素抑菌作用的
影响

由表 3 数据可知,汉防己甲素单独使用时对灰葡萄孢的抑制率为 26.46%,浓度为 40 000 mg/L

的 CaCl₂ 单独使用时抑制率为 40.54%,但二者混合使用时抑制率为 40.27%,与 CaCl₂ 单独使用时的抑制率相近;当添加的 CaCl₂ 浓度为 50 000 mg/L 时抑制率为 56.01%,联合使用后抑制率变为 49.48%,较 CaCl₂ 单独使用的抑制率没有上升反而明显下降。两个结果都说明汉防己甲素的抑菌活性与 CaCl₂ 的抑菌活性没有相加作用,汉防己甲素可降低灰葡萄孢对 CaCl₂ 的敏感性,因此推断汉防己甲素的抑菌作用机制与钙离子有关。

2.3.2 利用激光共聚焦显微镜检测汉防己甲素对
灰葡萄孢菌丝内钙离子浓度的影响

为进一步确定汉防己甲素对灰葡萄孢菌丝内钙离子的影响,通过激光共聚焦显微镜进行观察。本试验加入 Fluo-3 AM 后 2 h 内用激光共聚焦显微镜观察灰葡萄孢菌丝荧光强度未发现有变化,而加入汉防己甲素后荧光强度明显减弱(如图 1 所示),表明灰葡萄孢菌丝内钙离子浓度降低,且观察时间越长,降低程度越明显。此结果说明汉防己甲素对灰葡萄孢的抑菌作用与钙离子有关。

表 2 汉防己甲素在蓝莓离体叶片上对灰霉病的保护及治疗作用¹⁾

Table 2 Protective and therapeutic effects of tetrandrine on *Botrytis cinerea* in blueberry leave

药剂 Reagent	浓度/mg · L ⁻¹ Concentration	保护作用 Protective effect		治疗作用 Therapeutic effect	
		病斑直径/cm Lesion diameter	防治效果/% Control efficacy	病斑直径/cm Lesion diameter	防治效果/% Control efficacy
汉防己甲素 tetrandrine	0	(2.73±0.16)a	—	(2.89±0.10)a	—
	20	(1.88±0.16)b	(43.00±0.06)c	(1.89±0.11)b	(41.82±4.47)c
	40	(1.41±0.11)c	(59.14±0.05)b	(1.43±0.06)c	(60.93±2.66)b
	60	(1.16±0.07)cd	(70.52±0.03)b	(1.33±0.07)c	(65.12±2.74)b
	80	(1.00±0.04)d	(77.61±0.02)ab	(1.06±0.05)cd	(76.45±2.22)ab
	100	(0.77±0.03)d	(87.96±0.01)a	(0.90±0.03)d	(83.26±1.24)a
蛇床子素 osthole	0	(2.73±0.16)a	—	(2.89±0.10)a	—
	20	(1.75±0.17)b	(44.02±0.08)c	(1.65±0.07)b	(52.04±2.87)b
	40	(1.42±0.12)bc	(58.80±0.05)bc	(1.47±0.09)bc	(59.34±3.91)b
	60	(1.20±0.07)c	(68.65±0.03)b	(1.27±0.08)bc	(67.91±3.18)ab
	80	(0.85±0.03)d	(84.33±0.01)a	(1.08±0.09)c	(75.93±3.85)a
	100	(0.61±0.03)d	(94.96±0.01)a	(0.88±0.08)c	(84.30±3.13)a

1) 表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同小写字母表示同一种药剂处理后,病斑直径之间、防治效果之间分别在 0.05 水平上差异显著。利用软件 GraphPad Prism 8 进行数据处理。
Data in the table are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between colony diameters and control efficacy treated by same pesticides at 0.05 level, respectively. The data are analyzed by GraphPad Prism 8.

表 3 外源性钙离子对汉防己甲素抑制灰葡萄孢作用的影响¹⁾

Table 3 Effect of exogenous calcium ions to the inhibitory effect of tetrandrine on *Botrytis cinerea*

药剂 Reagent	浓度/mg · L ⁻¹ Concentration	抑制率/% Inhibition rate
汉防己甲素 tetrandrine	30	(26.46±2.06)d
氯化钙 CaCl ₂	40 000	(40.54±2.40)c
氯化钙 CaCl ₂	50 000	(56.01±2.74)a
汉防己甲素+氯化钙 tetrandrine+CaCl ₂	30+40 000	(40.27±0.61)c
汉防己甲素+氯化钙 tetrandrine+CaCl ₂	30+50 000	(49.48±0.34)b

1) 表中抑制率为平均值±标准误。同列数据后不同小写字母表示不同药剂处理后,抑制率之间在 0.05 水平上差异显著。利用软件 Graph-Pad Prism 8 进行数据处理。
The inhibition rates in the table are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate the inhibition rates of the different pesticides are significantly different at 0.05 level. The data are analyzed by GraphPad Prism 8.

2.3.3 钙通道拮抗剂维拉帕米对汉防己甲素抑菌作用的影响

由表 4 数据可知,汉防己甲素单独使用时对灰葡萄孢的抑制率为 37.19%,维拉帕米单独使用时抑制率为 44.79%,但二者混合使用时抑制率为

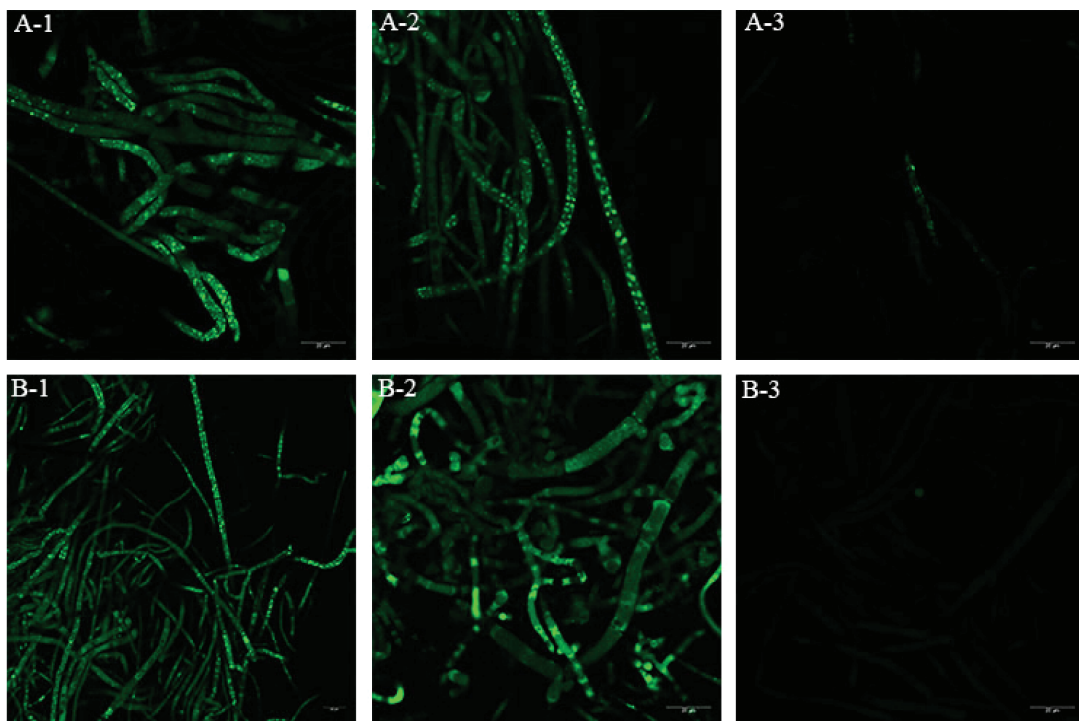
51.86%。此结果说明汉防己甲素的抑菌活性与维拉帕米的抑菌活性并不是单纯的相加作用,两者相互作用可降低灰葡萄孢对各自的敏感性,因此可推断出汉防己甲素的抑菌作用机制也与钙通道有关。

表 4 维拉帕米对汉防己甲素抑制灰葡萄孢作用的影响¹⁾

Table 4 Effect of verapamil to the inhibitory effect of tetrandrine on *Botrytis cinerea*

药剂 Reagent	浓度/mg · L ⁻¹ Concentration	抑制率/% Inhibition rate
汉防己甲素 tetrandrine	40.0	(37.19±3.35)c
维拉帕米 verapamil	200.0	(44.79±1.98)b
汉防己甲素+维拉帕米 tetrandrine+verapamil	40.0+200.0	(51.86±1.18)a

1) 表中抑制率为平均值±标准误。同列数据后不同小写字母表示不同药剂处理后,抑制率之间在 0.05 水平上差异显著。利用软件 Graph-Pad Prism 8 进行数据处理。
The inhibition rates in the table are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate the inhibition rates of the different pesticides are significantly different at 0.05 level. The data are analyzed by GraphPad Prism 8.



A-1: 空白对照 0 min; A-2: 空白对照 5 min; A-3: 汉防己甲素处理 5 min; B-1: 空白对照 0 min; B-2: 空白对照 10 min; B-3: 汉防己甲素处理 10 min。
A-1: Blank control 0 min; A-2: Blank control 5 min; A-3: Tetrandrine treatment for 5 min; B-1: Blank control 0 min; B-2: Blank control 10 min; B-3: Tetrandrine treatment for 10 min.

图 1 加入汉防己甲素后灰葡萄孢菌丝荧光强度变化的激光共聚焦显微镜观察

Fig. 1 Observation on the change of fluorescence intensity of *Botrytis cinerea* mycelia with tetrandrine by laser confocal microscope

3 结论与讨论

汉防己甲素具有心血管保护、降压、降血糖等多种药理作用^[5-6],还可抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌等细菌和真菌^[7-8],但在抑制植物病原真菌方面的研究未见有报道。本试验以粉防己块根为原料进行提取分离纯化得到含量为 98% 以上的汉防己甲素,采用菌丝生长速率法对其抑菌活性进行研究,发现其对供试病原真菌均有抑制作用,且汉防己甲素对灰霉病的保护和治疗作用效果与对照药剂蛇床子素相当,有进一步研究的价值。

汉防己甲素为一种非选择性的钙离子通道阻滞剂,动物细胞试验表明,其可调节细胞外 Ca^{2+} 内流,平衡细胞内外 Ca^{2+} 浓度,维持 Ca^{2+} 在内环境的稳态等^[16-19]。真菌中, Ca^{2+} 可调控很多内在的代谢及外在环境刺激过程,如细胞周期、孢子萌发、菌丝顶端生长、生物钟以及渗透胁迫、热休克、机械刺激及氧化胁迫等^[20-23]。目前钙/钙调神经磷酸酶信号通路已被认为是抗菌剂的潜在作用靶标^[24],通路中有 Ca^{2+} 通道蛋白、钙调磷酸酶等重要蛋白。钙离子通道阻滞剂作用于 Ca^{2+} 通道蛋白,加入钙通道阻滞剂可以影响真菌的正常生理过程,例如 Shaw 等报道

钙拮抗剂可降低叶点霉 *Phyllosticta ampellicida* 分生孢子萌发率和附着胞的形成率^[22],钙拮抗剂维拉帕米可使胃肠道定殖的白色念珠菌细胞显著减少^[25]。汉防己甲素已被证明为钙离子通道阻滞剂,作用于钙通道蛋白,故推测其抑菌作用机制可能与 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 通道蛋白有关。基于此,本文研究了添加外源性 Ca^{2+} 及钙通道阻滞剂维拉帕米对汉防己甲素抑菌活性的影响,并通过激光共聚焦显微镜检测汉防己甲素对灰葡萄孢菌丝内钙离子浓度的影响,结果证明汉防己甲素对灰葡萄孢的抑菌作用机制与钙离子及钙离子通道有关。

汉防己甲素是防己科千金藤属植物粉防己中分离提取的双苄基异喹啉类生物碱,已作为临床药物用于抗风湿及阵痛、抗肺癌、抗矽肺等。虽然已开展了许多工作,但对于抑制植物病原真菌方面的研究未见有报道。本文首次发现汉防己甲素具有抑制植物病原真菌的作用,并对其抑菌作用机制进行了初步探索,为进一步开发高效低毒的新型杀菌剂提供理论基础。

参考文献

- [1] 宋佳露,程星凯,刘鹏飞,等. 植物病原菌对杀菌剂多药抗性的发生现状[J]. 植物保护, 2021, 47(6): 28-33.

- [2] 宋萍萍. 五种类型天然香豆素化合物的活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [3] 徐曙, 赵兴增, 周倩, 等. 甘草根中黄酮类化合物的提取、分离与衍生化及其抑菌活性研究[J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29(6): 32–41.
- [4] 石志琦, 范永坚, 王裕中. 天然化合物在农药中的应用研究[J]. 江苏农业学报, 2002(4): 241–245.
- [5] 刘继红, 赖月琴, 王浩宇, 等. 汉防己甲素全合成研究进展[J]. 合成化学, 2022, 30(2): 146–152.
- [6] 张翔宇, 曹世杰, 王小莹, 等. 汉防己甲素及其衍生物的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2022, 32(1): 10.
- [7] 李杨. 异喹啉类生物碱及其衍生物体外抗菌活性研究[D]. 昆明: 昆明医学院, 2010.
- [8] 李水秀, 刘朝红, 张宏, 等. 汉防己甲素对氟康唑抗白念珠菌生物膜增效活性的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(11): 953–957.
- [9] 傅志慧, 应志洪, 严突明, 等. 汉防己甲素的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(9): 948–949.
- [10] 菲索查克. 汉防己甲素原料药的质量控制及稳定性研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2016.
- [11] 郭为. 汉防己甲素原料药的制备工艺及结构确证研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2016.
- [12] SONG Pingping, ZHAO Jun, LIU Zongliang, et al. Evaluation of antifungal activities and structure-activity relationships of coumarin derivatives [J]. Pest Management Science, 2017, 73(1): 94–101.
- [13] HOU Yipin, MAO Xuewei, WU Luoyu, et al. Impact of fluzinam on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019, 155(3): 81–89.
- [14] SONG Pingping, WANG Yu, HOU Yiping, et al. Crucial role of Ca^{2+} /CN signalling pathway in the antifungal activity of dis-enecioyl-cis-khellactone against *Botrytis cinerea* [J]. Pest Management Science, 2022, 78(11): 4649–4659.
- [15] 王春梅, 张杰, 陈浩, 等. 天然化合物丁香酚对灰葡萄孢菌丝脂质过氧化和膜损伤的影响[J]. 农药学学报, 2009, 11(1): 104–108.
- [16] 孔晓旭, 左红艳, 李杨. 粉防己碱的药理作用及临床应用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(7): 496–501.
- [17] LIU Kuoching, LIN Yajing, HSIAO Y, et al. Tetrandrine induces apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW 039 cells by endoplasmic reticulum stress and Ca^{2+} /calpain pathways [J]. Anticancer Research, 2017, 73(11): 6107–6118.
- [18] 张乐之, 何华美, 李新芳, 等. 粉防己碱的抗炎作用与炎症白细胞 cAMP 的关系[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(7): 791–796.
- [19] 徐友涵, 倪基德. 粉防己碱-红细胞膜依赖钙调蛋白 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的一种新的天然抑制剂[J]. 科学通报, 1985, 30(17): 1348–1351.
- [20] ULRIKE B, CHU Meiling, NICK D R, et al. The antifungal activity of the *Penicillium chrysogenum* protein PAF disrupts calcium homeostasis in *Neurospora crassa* [J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(9): 1374–1382.
- [21] GADD G M. Singal transduction in fungi [M]//GROW N A, GADD G M. The growing fungus. London: Chapman & Hall, 1994: 183–210.
- [22] SHAW B D, HOCH H C. Ca^{2+} regulation of *Phyllosticta am-pelicida* pycnidiospore germination and appressorium formation [J]. Fungal Genetics & Biology, 2000, 31(1): 43–53.
- [23] BENELOUJAEPHAJRI E, COSTA A, L' HARIDON F, et al. Production of reactive oxygen species and wound-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Botrytis cinerea* are preceded and depend on a burst of calcium [J/OL]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1): 160. DOI:10.1186/1471-2229-13-160.
- [24] LIU Shuyuan, HOU Yinglong, LIU Weiguo, et al. Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets [J]. Eukaryotic Cell, 2015, 14(4): 324–334.
- [25] YU Qilin, DING Xiaohui, ZHANG Bing, et al. Inhibitory effect of verapamil on *Candida albicans* hyphal development, adhesion and gastrointestinal colonization [J]. FEMS Yeast Research, 2014, 14(4): 633–641.

(责任编辑: 田 喆)

曾士迈张树榛奖励基金公告

我们面向全国设立“曾士迈张树榛优秀学科贡献奖”和“曾士迈张树榛未来之星奖”两个奖项。今年进行第三次评选。拟评选出3名获奖者, 奖金总额为6万元。

“曾士迈张树榛优秀学科贡献奖”奖励1名学术思想活跃, 学风正派并在植物病害流行、植保系统工程、宏观植物病理和植物抗病育种等一个或多个方向的研究中做出突出贡献的科技人员。获奖者要求近5年在科研与教学中取得重要成果: 提出重要的理论、观点和技术, 发表了重要的学术论文或著作。

“曾士迈张树榛未来之星奖”奖励2名在读硕士研究生、博士研究生、博士后以及不满35岁且尚不具备副高级技术职称的优秀青年工作者。获奖者除了学习成绩优异、品行端正外, 要有志于从事上述4个研究方向并取得较好的进展。

基金管理委员会决定自2023年6月1日起到2023年7月31日止接受2023年度的申请。欢迎相关学会、专业委员会和各相关单位及专家推荐合乎要求的杰出个人, 优秀个人也可以自荐的方式申请, 如实填写申请书, 连同相应论文或说明材料(均需用电子版), 寄送基金秘书吴波明(电话: 18510081892 E-mail: bmwu@cau.edu.cn)。也欢迎电邮咨询基金相关事宜或索取基金章程。基金管理委员会将组织专家评审, 并于2023年11月30日之前公布获奖者名单, 向获奖者颁发奖励证书与奖金。

曾士迈张树榛奖励基金管理委员会
2023年5月