栽培型和野生型黄花蒿提取物对朱砂叶螨杀螨活性比较*

杨振国 张永强** 丁 伟 秦培元 罗金香
(西南大学植物保护学院,重庆 400716)

摘 要 研究了野生型和栽培型黄花蒿叶丙酮提取物对朱砂叶螨的生物活性。结果表明:栽培型和野生型48 h的LC_{50}分别为0.295和0.567 mg·ml^{-1},以栽培型的杀螨毒力较高;对2种提取物进行柱层析分离,野生型最终分离出19个馏分,栽培型分离出17个馏分,其中野生型的第11馏分与栽培型的第13馏分的杀螨活性在2.5 mg·ml^{-1},处理48 h的校正死亡率均为100%,与其他组分存在显著性差异;将杀螨活性较好的馏分进行毒力测定得出,处理48 h,野生型馏分11的LC_{50}为0.120 mg·ml^{-1};栽培型馏分10、12和13的LC_{50}分别为0.144、0.163和0.117 mg·ml^{-1}。表明栽培型黄花蒿叶丙酮提取物对朱砂叶螨的触杀活性优于野生型。

关键词 朱砂叶螨;黄花蒿;杀螨活性
中图分类号 S482.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2011)7-1398-05

Comparison of acaricidal bioactivity of natural and cultivated *Artemisia annua* leaves acetone extracts against *Tetranychus cinnabrinus*. YANG Zhen-guo, ZHANG Yong-qiang**, DING Wei, QIN Pei-yuan, LUO Jin-xiang (*College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing* 400716, *China*). *Chinese Journal of Ecology*, 2011, **30**(7): 1398-1402.

Abstract: A laboratory test was conducted on the acaricidal bioactivity of natural and cultivated *Artemisia annua* leaves acetone extracts against *Tetranychus cinnabarinus*. The LC_{50}, 48 h of natural and cultivated *A. annua* leaves acetone extracts was 0.295 and 0.567 mg·ml^{-1}, respectively, *i.e.*, the acetone extract of cultivated *A. annua* leaves had a higher acaricidal bioactivity. By column chromatography, a total of 19 and 17 fractions were isolated from the natural and cultivated *A. annua* leaves acetone extracts, respectively. At the concentration 2.5 mg·ml^{-1}, the 11th fraction of the extract of natural *A. annua* leaves and the 13th fraction of the extract of cultivated *A. annua* leaves could kill all test mites after treated for 48 h. The toxicity test showed that the LC_{50}, 48 h of the 11th fraction of the extract of natural *A. annua* leaves was 0.120 mg·ml^{-1}, and the LC_{50},48 h of the10th, 12th, and 13th fractions of the extract of cultivated *A. annua* leaves was 0.144, 0.163, and 0.117 mg·ml^{-1}, respectively. This study suggested that the acaricidal activity of the acetone extract of cultivated *A. annua* leaves against *T. cinnabarinus* was superior to that of the natural *A. annua* leaves.

Key words: *Tetranychus cinnabarinus*; *Artemisia annua*; acaricidal activity.

黄花蒿(*Artemisia annua*)系菊科蒿属1年生草本植物,是青蒿素来源的唯一植物(冯世鑫等,2009),也是我国传统的中草药,可用作消暑、退热、治感冒、治疗慢性久热、气管炎、癌症等,还具有抗疟疾、抗吸血虫、抗病毒与增强机体免疫力的作用(Efferth *et al.*,2001;Narendra *et al.*,2001;van der Kooy *et al.*,2008)。黄花蒿也有在农业生物活性方面的相关研究,如其提取物及其衍生物对单子叶及双子叶杂草具有一定的抑制生长作用(高志梅等,2007),另外还具有抗菌活性,能有效抑制某些菌丝生长(Zhai & Zhong,2008)。研究表明,野生型黄花

*科技部农业科技成果转化基金项目(2010GB2F100388)和中央高校基本科研业务费专项(XDJK2009C140)资助。
**通讯作者 E-mail: zhangyq80@tom.com
收稿日期: 2010-12-27 接受日期: 2011-03-22

蒿叶的丙酮提取物对朱砂叶螨(*Tetranychus cinnabrinus*)和柑桔全爪螨(*Panonychus citri*)均有较强的杀螨活性(Zhang *et al.*,2008;张永强等,2009)。

朱砂叶螨是一种重要的世界范围的植食性经济害螨,具有体积小、繁殖快、适应性强及易产生抗性等特点,是公认的最难防治的有害生物类群之一(何林等,2005)。长期以来,对于朱砂叶螨的控制主要依靠化学农药,过度频繁的使用化学农药致使“3R”问题日益突出,加之人们对绿色食品的需求不断地增加,因此宜采用生物源杀螨剂防治螨类。植物源杀螨剂是很有发展前景的研究方向之一,其研究成功与否受其原料来源限制较大。目前,重庆地区为开发青蒿素及其衍生物而广泛栽培黄花蒿,根据黄花蒿对朱砂叶螨生物活性的报道,有必要比较分析栽培型和野生型黄花蒿的杀螨活性差异。鉴于此,本文开展了栽培型(YY-2)和野生型黄花蒿叶的丙酮提取物对朱砂叶螨的触杀活性测定,并对两种黄花蒿提取物进行柱层析分离,采用生物活性追踪法测定两种黄花蒿叶的丙酮提取物柱层析所得不同馏分的杀螨活性,以此为依据比较两种黄花蒿的杀螨活性,以期为确定具有较高杀螨活性的黄花蒿品种提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试螨类　朱砂叶螨,最初采自重庆市北碚区田间的豇豆苗上,在智能人工气候室内 26 ℃±1 ℃、60% ~80% RH 条件下,用盆栽豇豆苗饲养了多年,未接触任何农药所获得的敏感品系。

1.1.2　供试植物材料的来源及处理　采集时间为 2009 年 7 月 20—25 日,栽培型为重庆市北碚区西南大学后山农场种植的酉阳黄花蒿(YY-2);野生型在西南大学周边采集。将采得的黄花蒿叶置于室内自然阴干,用小型家用粉碎机粉碎,过 80 目筛,干粉装入保鲜袋,置于冰箱中保存备用。

1.2　提取方法

1.2.1　黄花蒿提取物的制备　称取适量的栽培型和野生型黄花蒿叶粉碎物,用丙酮(丙酮与材料为 5∶1)常温浸泡提取 72 h,间歇摇动。将浸提液过滤通过中速滤纸,然后用 RE-2000 型旋转蒸发仪将滤液旋转蒸发浓缩,得浸膏,转入小瓶中待用。

1.2.2　黄花蒿杀螨活性成分的分离　采用柱层析分离,所用硅胶为 100 ~200 目(青岛海洋化工),湿法装柱。称取丙酮提取物 3 g,加等量硅胶拌匀,加于硅胶柱顶端,用石油醚:丙酮(10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、3:1、1:1、1:2、1:3)依次洗脱,控制洗脱剂流速在 200 ml·h^{-1},用 100 ml 三角瓶收集,每 100 ml 为一馏分。然后用薄层层析(石油醚∶丙酮=3∶1为展开剂)检测,根据比移值(R_f)的大小合并相同馏分,减压浓缩至溶剂挥干,可得白色针状结晶或黑色、淡黄色膏状物,将各馏分所得提取物收集备用。

1.3　测定方法

1.3.1　野生型和栽培型黄花蒿丙酮提取物杀螨活性测定　杀螨活性测定参照 FAO 推荐的测定螨类抗药性的标准方法——玻片浸渍法(FAO,1980)。将 3 ~5 日龄雌成螨挑在贴有双面胶的玻片上,在温度 26 ℃±1 ℃、60% ~80% RH 的环境下放置 4 h,用双目解剖镜检查,剔除死亡和不活泼的个体,记录活螨数。取适量的野生型和栽培型黄花蒿叶的丙酮提取物加入少量分析纯丙酮、吐温 80 和自来水(三者体积比例为 3∶0.5∶96.5)配成一定浓度母液,再用水稀释配置成 2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 mg·ml^{-1}的 5 种浓度的供试液,并以自来水(含 3% 丙酮和 0.5% 吐温 80)作对照。将玻片粘有螨的一端浸入供试液中 5 s 后取出,用滤纸将螨体周围的药液吸干。每个浓度和对照均处理 120 头,实验重复 5 次。处理后同样条件下培养 3 d,每 24 h 检查一次。用毛笔轻触螨体,以其螯肢不动者为死亡。

1.3.2　柱层析分离馏分杀螨活性测定　参照 FAO(1980)推荐的测定螨类抗药性的标准方法,并加以改进的玻片毛细管法。称取适量不同馏分提取物,将其配制成浓度为 2.5 mg·ml^{-1}的供试药液(配制方法同 **1.3.1**);作毒力回归分析时,在初试的基础上选用 5 ~7 个浓度,用玻璃毛细管(内径 0.5 mm)定量吸取 0.78 μl 药液,小心点滴于 60 头螨体上(每头平均受药量 0.013 μl),其他处理同 **1.3.1**。

1.3.3　数据分析　试验结果进行方差分析,并用 Duncan 新复极差法比较各处理间的效果差异,毒力回归式由机率值分析法计算,由 SPSS 软件(SPSS 17.0)统计完成。

2　结果与分析

2.1　野生型和栽培型黄花蒿提取物对朱砂叶螨的触杀活性比较

两种黄花蒿叶丙酮提取物处理朱砂叶螨雌成螨

表 1 2 种黄花蒿提取物对朱砂叶螨的触杀活性比较

Table 1 Comparison of the toxicity of extracts from *Artemisia annua* against *Tetranychus cinnabrinus*

提取物	毒力回归方程	相关系数 (r)	LC_{50} ($mg \cdot ml^{-1}$)	LC_{95} ($mg \cdot ml^{-1}$)
野生型	$y=2.339+0.966x$	0.980	0.567±0.156	28.581±7.883
栽培型	$y=2.496+1.014x$	0.985	0.295±0.089	12.353±3.726

LC_{50}和 LC_{95}为平均值±标准误。

48 h 后(表 1),触杀活性存在明显差异,杀螨活性较高的为栽培型,其 LC_{50}为 0.295 $mg \cdot ml^{-1}$,而野生型的 LC_{50}为 0.567 $mg \cdot ml^{-1}$,二者相差近两倍。二者的 LC_{95}也存在相同的变化趋势,并且根据毒力回归方程可看出,随着药剂浓度的增大,栽培型黄花蒿提取物对朱砂叶螨的致死率比野生型的增加稍快。

2.2 野生型和栽培型黄花蒿提取物不同柱层析馏分的杀螨活性比较

为进一步研究野生型和栽培型黄花蒿叶丙酮提取物对朱砂叶螨的触杀毒力,用柱层析分离两种提取物,经薄层层析检查两类提取物柱层析的不同馏分,根据比移值(R_f)的大小合并相同流份后,野生型最终分离出 19 个馏分,栽培型分离出 17 个馏分。采用生物活性追踪法测定了两种提取物柱层析不同馏分的杀螨活性,其 2.5 $mg \cdot ml^{-1}$,处理 48 h 的结果见表 2。

从纵向来看,两种黄花蒿杀螨活性较好的馏分都始于第 10 个馏分,野生型集中于馏分 10 和 11 中,处理 48 h,2.5 $mg \cdot ml^{-1}$的平均校正死亡率分别为 90.6%、100.0%,其次是馏分 4 和 6,平均校正死亡率分别为 84.3%、68.8%;栽培型集中于 10、11、12 和 13 四个馏分中,馏分 10 和 13 的杀螨活性最高,处理 48 h,2.5 $mg \cdot ml^{-1}$的平均校正死亡率分别为 99.0%、100.0%,馏分 11 和 12 次之。

从横向来看,在第 10 馏分之前,野生型提取物的杀螨活性总体比栽培型的要高(除馏分 2、3、9 外);第 10 馏分之后,野生型的馏分 10 和 11 与栽培型的馏分 10、11、12 和 13 的杀螨活性相当,是所有馏分中杀螨活性最高的,与其他馏分存在显著性差异;之后的各馏分均以栽培型的杀螨活性较高。从相对含量方面看,具有较高杀螨活性的馏分有些含量较高,有些含量较小,而从整体来看,栽培型的杀螨活性较强的物质相对含量优于野生型。

根据上述结果,对活性较高的野生型的第 10 和 11 馏分与栽培型的第 10、11、12 和 13 馏分进行了毒力测定,其处理 48 h 的结果列于表 3。

表 2 2 种黄花蒿提取物柱层析馏分的杀螨活性

Table 2 Acaricidal activities of the fraction compounds separated from two *Artemisia annua* by column chromatography

不同馏分	野生型		栽培型	
	相对含量 (%)	校正死亡率 (%)	相对含量 (%)	校正死亡率 (%)
1	6.8	25.2±0.8 h	3.6	3.2±1.6 h
2	1.3	17.8±0.1 ij	2.4	58.3±5.4 b
3	8.8	20.7±2.8 hi	4.6	60.8±1.0 b
4	2.8	84.3±2.8 c	2.3	36.1±2.1 cde
5	2.6	51.6±1.4 f	1.6	41.8±4.8 cd
6	1.7	68.8±2.9 d	7.5	44.6±2.4 c
7	1.6	58.7±1.0 e	2.4	32.6±2.2 def
8	12.6	79.6±0.9 c	5.4	7.4±0.8 h
9	2.6	42.7±3.7 g	8.8	61.5±1.9 b
10	2.3	90.6±0.8 b	14.3	99.0±1.0 a
11	12.3	100.0±0.0 a	8.6	93.6±1.9 a
12	5.2	41.7±0.6 g	6.5	95.0±2.6 a
13	8.4	2.4±1.2 l	11.3	100.0±0.0 a
14	2.8	15.1±0.9 j	3.8	60.7±9.1 b
15	4.9	1.5±0.2 l	2.7	25.7±4.7 efg
16	4.4	16.8±0.3 ij	11.4	19.0±1.0 g
17	13.3	37.8±1.0 g	2.6	23.8±2.2 fg
18	3.5	20.4±1.8 hij	–	–
19	2.0	7.8±0.6 k	–	–

校正死亡率为平均值±标准误;同列不同字母为差异显著($P<0.05$,Duncan 新复极差测验)。

表 3 活性较高馏分对朱砂叶螨的毒力回归分析

Table 3 Toxicity regression analysis of the higher acaricidal fractions against *Tetranychus cinnabrinus*

处理		毒力回归方程	相关系数	LC_{50} ($mg \cdot ml^{-1}$)	LC_{95} ($mg \cdot ml^{-1}$)
野生型	10	$y=5.102+2.234x$	0.989	0.900±0.078	4.905±0.428
	11	$y=0.225+2.296x$	0.986	0.120±0.012	0.625±0.063
栽培型	10	$y=-0.702+2.641x$	0.974	0.144±0.012	0.604±0.048
	11	$y=5.453+2.044x$	0.967	0.600±0.044	3.829±0.278
	12	$y=0.171+2.183x$	0.983	0.163±0.014	0.925±0.081
	13	$y=-0.122+2.476x$	0.990	0.117±0.011	0.540±0.052

LC_{50}和 LC_{95}为平均值±标准误。

根据表 1 和表 3,从分离馏分与提取物之间的比较来看,在野生型中杀螨活性较好的馏分 10 和 11,经 48 h 处理后,得到其 LC_{50}分别为 0.900 和 0.120 $mg \cdot ml^{-1}$。而野生型黄花蒿丙酮提取物的 LC_{50}为 0.567,大约为馏分 11 的 5 倍,而馏分 10 则比提取物的还大,表明野生型黄花蒿的杀螨活性物质主要为馏分 11 的提取物。在栽培型中杀螨活性较好的馏分 10、11、12 和 13 的 LC_{50}分别为 0.144、0.600、0.163 和 0.117 $mg \cdot ml^{-1}$,除馏分 11 比其提

取物的 LC_{50} 0.295mg · ml^{-1}高出近两倍外,其余的 3 个馏分都显示出对朱砂叶螨有较高的触杀活性,特别是馏分 13,同时也表明这些馏分里的物质为栽培型黄花蒿杀螨的主要活性物质。

从野生型与栽培型二者之间的比较来看,野生型的馏分 10 和栽培型的馏分 11 杀螨活性最差,而野生型的馏分 11 与栽培型的馏分 10、12 和 13 的杀螨活性相当,整体表明,栽培型黄花蒿叶提取物对朱砂叶螨的触杀活性优于野生型。

3 讨 论

黄花蒿在医药领域具有很重要的价值,青蒿素的使用使之闻名于世。然而同种植物在不同生长期、不同的环境条件下,其次生代谢产物的种类和含量可能不同(蒋运生等,2008;韦树根等,2009),特别是光照强度及长度(曹建国等,2005;何金明等,2010)、土壤矿质元素和湿度(闫立英等,2010)等环境因素均能引起植物体内次生代谢产物的积累。关于野生型与栽培型黄花蒿的一些研究表明,黄花蒿中青蒿素及其他代谢产物的生产能力与黄花蒿叶片光合性能呈正相关,即光强有利于青蒿素的合成和大量积累(刘春阳等,1999);而栽培黄花蒿的光合能力比野生黄花蒿的要强得多(张荣沭等,2008);青蒿素及酰胺、芳香类物质的含量均以栽培黄花蒿茎和叶片中多(孔德鑫等,2010);酉阳的黄花蒿(YY-2)的青蒿素含量为现有黄花蒿品种中最高的,其质量分数为 0.668%(王满莲等,2007)。土壤水分、矿质元素等对青蒿素及其他次生代谢物的含量均有影响(孙年喜等,2009;王满莲等,2009;吴叶宽等,2010)。栽培型黄花蒿无论从光照、温湿度、营养元素等生长环境均优于野生型,并且黄花蒿 YY-2 经过多年育种驯化,在长势和次生代谢物质的积累都优于其他品种的黄花蒿。根据上述研究可知,生态环境越好越有利于黄花蒿的生长和青蒿素及其他次生代谢物的累积。从分离的情况来看,野生型的分离出 19 个馏分,而栽培型的分离出 17 个馏分,可推断,野生型与栽培型黄花蒿的化学组分存在明显差异,其主要因素可能受遗传背景及生长环境的影响。

野生型黄花蒿对朱砂叶螨和柑桔全爪螨有较高的触杀活性已被证实。本实验所使用的野生型黄花蒿对朱砂叶螨的触杀活性与已报道的相似(张永强等,2007;Zhang *et al.*,2008)。通过野生型与栽培型黄花蒿的杀螨活性相比表明,栽培型对朱砂叶螨的触杀活性优于野生型,栽培型丙酮提取物处理 48 h 的 LC_{50}为 0.295 mg · ml^{-1}是野生型的 1/2。经对野生型与栽培型黄花蒿叶丙酮提取物进行柱层析分离,栽培型在杀螨活性物质馏分、含量和生物活性方面均优于野生型。目前,黄花蒿主要用于青蒿素的提取和青蒿茶的开发,重庆大面积种植黄花蒿可为开发植物性杀螨剂提供原料。

综上所述,两种黄花蒿的活性物质可能因两者品种和所在环境的土壤水分、矿质元素、温度、光照、有害生物等生态因素的改变,使栽培型的比野生型的多出馏分 10 和 12 中的活性物质,或者其他辅助成分及其他次生代谢物存在差异而导致杀螨活性存在差异;也有可能是相同物质而存在含量差异。各馏分所含物质是否相同有待于进一步的研究,而栽培型(YY-2)黄花蒿的高效杀螨活性物质,将会成为未来植物源杀螨剂的重要来源之一,黄花蒿(YY-2)将是提取该物质的首选品种之一。本研究一方面可明确具有较高杀螨活性的黄花蒿品种,为开发植物性杀螨剂提供理论依据;另一方面对黄花蒿的引种驯化与良种选育工作及我国黄花蒿产业的发展也将会有一定指导意义。

参考文献

曹建国, 祖元刚, 杨逢建, 等. 2005. 不同生境下刺五加金丝桃甙含量的季节变化. 应用生态学报, **16**(6): 1007-1010.

冯世鑫, 马小军, 闫志刚, 等. 2009. 加工方法对黄花蒿提取青蒿素含量的影响. 广西植物, **29**(6): 857-859.

高志梅, 李拥军, 谷文祥. 2007. 青蒿化感作用的初步研究. 华南农业大学学报, **28**(1): 122-124.

何 林, 赵志模, 曹小芳, 等. 2005. 朱砂叶螨抗甲氰菊酯品系选育及遗传分析. 中国农业科学, **38**(4): 719-724.

何金明, 肖艳辉, 王羽梅, 等. 2010. 光照长度对茴香植株生长及精油含量和组分的影响. 生态学报, **30**(3): 652-658.

蒋运生, 漆小雪, 韦记青, 等. 2008. 播种期对黄花蒿生长、产量及青蒿素含量的影响. 种子, **27**(10):14-15.

孔德鑫, 韦记青, 邹 蓉, 等. 2010. 栽培与野生黄花蒿中化学组分的 FTIR 表征及青蒿素含量比较分析. 基因组学与应用生物学, **29**(2): 349-354.

刘春阳, 王玉春, 欧阳藩. 1999. 青蒿素研究进展. 化学进展, **11**(1): 41-48.

孙年喜, 李隆云, 钟国跃, 等. 2009. 不同生长期土壤水分处理对黄花蒿生理特性及产量的影响. 中国中药杂志, **34**(4): 386-389.

王满莲, 韦　霄, 蒋运生, 等. 2007. 野生与栽培黄花蒿净光合速率对光强和 CO_2 浓度的响应. 热带亚热带植物学报, **15**(1): 45-49.

王满莲, 韦　霄, 蒋运生, 等. 2009. 氮对黄花蒿生长、光合特性和青蒿素含量的影响. 广西植物, **29**(2): 260-263.

韦树根, 马小军, 付金娥, 等. 2009. 不同产地与类型及采收方法对黄花蒿中青蒿素含量的影响. 广西植物, **29**(6): 853-856.

吴叶宽, 李隆云, 马　鹏, 等. 2010. 锌锰硼对黄花蒿产量和青蒿素含量的影响. 中国中药杂志, **35**(3): 275-278.

闫立英, 娄丽娜, 冯志红, 等. 2010. 不同生态环境下雌雄同株黄瓜单性结实性遗传的比较. 应用生态学报, **21**(1): 61-66.

张荣沭, 赵　敏, 韩　颂. 2008. 引种的不同种源黄花蒿青蒿素含量的研究. 林产化学与工业, **28**(6): 83-87.

张永强, 丁　伟, 田　丽, 等. 2009. 黄花蒿提取物对柑橘全爪螨的生物活性. 中国农业科学, **42**(6): 2217-2222.

张永强, 丁　伟, 赵志模, 等. 2007. 不同生长时期黄花蒿提取物对朱砂叶螨的生物活性. 生态学杂志, **26**(12): 1969-1973.

Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, *et al*. 2001. The antimalarial artesunate is also active against cancer. *International Journal of Oncology*, **18**: 767-773.

FAO. 1980. Plant production and protection 21, recommended methods for measurement of resistance to pesticides. FAO, Israel: 49-54.

Narendra P, Singh NP, Henry L. 2001. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sciences*, **70**: 49-56.

van der Kooy F, Verpoorte R, Marion Meyer JJ. 2008. Metabolomic quality control of claimed anti-malarial *Artemisia afra* herbal remedy and *A. afra* and *A. annua* plant extracts. *South African Journal of Botany*, **74**: 186-189.

Zhai DD, Zhong JJ. 2008. Simultaneous analysis of two bioactive compounds in *Artemisia annua* L. hairy root cultures by reversed-phase high performance liquid chromatography-diode array detector. *Journal of Biotechnology*, **136**: 350-357.

Zhang YQ, Ding W, Zhao ZM, *et al*. 2008. Studies on acaricidal bioactivities of *Artemisia annua* L. extracts against *Tetranychus cinnabarinus* Bois. (Acari: Tetranychidae). *Agricultural Sciences in China*, **7**: 577-584.

作者简介　杨振国,男,1986年生,硕士研究生。主要从事植物源杀螨剂的开发与研制。E-mail: zhenguoyang@qq.com

责任编辑　刘丽娟