

植物及大型真菌抽提物抗植物病毒活性的研究

田兆丰, 裘季燕, 刘伟成, 李永丹, 刘德文

(1. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100089; 2. 中国农业大学植物保护系, 北京 100094)

摘要 对40科100多种野生植物、中草药及十几种大型真菌抽提物进行了抗植物病毒筛选的研究, 发现有多种植物及大型真菌抽提液对烟草花叶病毒(TMV)或黄瓜花叶病毒(CMV)有钝化作用, 其中藜科植物S.L.抽提液对TMV及CMV兼有钝化作用和一定的治疗效果。对部分有参考价值的植物和大型真菌材料的抗病毒筛选结果进行了总结和分析。

关键词 植物或大型真菌; 抽提物; 抗植物病毒

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)24-07514-02

Study on the Anti-virus Activity of the Extracts from Plant or Edible Fungus

TIAN Zhao-feng et al. (Institute of Plant & Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture & Forestry Sciences, Beijing 100089)

Abstract Over one hundred species of plants belonging to 40 families were screened for their anti-virus effect on tobacco mosaic virus or cucumber mosaic virus. It was found that S.L. extracts belonging to chenopodiaceae both had the function to inactivate virus in vitro and had the therapeutic effect on virus disease. Partial results was summarized.

Key words Plant or edible fungus; Extract; Anti-virus activity

由于种植结构及气候的变化, 植物病毒病害发生非常普遍, 特别是蔬菜病毒病害, 有逐年加重的趋势。由于病毒是寄生于寄主细胞之内, 其防治比其他植物病害更加困难, 所以植物病毒病素有“植物癌症”之称。植物病毒病的防治主要有抗病品种、抗病毒农药及栽培管理等措施。目前, 生物农药由于无公害、无污染、低残留而成为当前抗病毒农药研究的热点。

植物是抗生物物质的重要来源, 已有试验证明, 从植物体筛选植物病毒病治疗物质是可能的。早在1925年就发现商陆(*Phytolacca decandra*)抽提液中有对TMV有强烈体外钝化作用的物质^[1]。Mituogun, Verma等在20世纪70年代以后相继报道了一些植物抽提液对烟草花叶病毒等多种植物病毒引起的病毒病害有治疗作用^[2-4]。多年来, 研究者曾经从植物中发现过不少有效的抗病物质, 如植物蛋白^[5]、脂肪酸^[6]、多糖等^[7-8], 这些物质本身属于生物体的一部分, 易于被生物体代谢降解, 且不会引起环境污染等副作用。因而, 从植物体筛选抗病毒物质, 是寻找病毒病治疗物质的途径之一, 应加以探讨和研究。

1 材料与方 法

1.1 抗病毒材料 野生植物材料及野生蘑菇采自北京及其周边地区的菜田地头、公园或野外山坡等地, 食用菌及抗病毒中草药购于市场或各大药房。

1.2 寄主植物 TMV的枯斑寄主采用三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. Sansun NN), 其系统寄主采用NG83普通烟(*Nicotiana tabacum*); CMV的枯斑寄主采用苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*), 其系统寄主采用三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. Sansun NN)。播种前试验植物种子用10% Na_3PO_4 浸种30 min。幼苗培育在防虫温室中。烟苗4~6片真叶期使用。

1.3 病毒毒原的繁殖和保存 黄瓜花叶病毒(CMV)采自宁夏, 烟草花叶病毒(TMV)毒原来自北京市农林科学院植保所病毒研究室。CMV、TMV分别繁殖保存于枯斑三生烟及普通

烟上。病毒接种液由新鲜毒原和磷酸缓冲液(PB)(pH值7.2)以1:10的比例研磨, 过滤, 取上清液接种寄主植物。

1.4 病毒抗血清 TMV、CMV抗血清购自美国Agdia生化试剂公司, 保存在冰箱中备用。

1.5 抗病毒抽提物的制备 收集的供试植物材料(通常为叶片)一般不表现明显的病毒病害症状。新鲜植物材料或菇类以100倍磷酸缓冲液抽提; 干材料以80℃烘干、粉碎、研磨并以200倍磷酸缓冲液(pH值7.0)抽提(室温, 1h), 8000 r/min离心10 min, 取上清液进行抗病毒试验。

1.6 枯斑法对病毒钝化效果测定 选择健康的三生烟或苋色藜, 半叶法接种TMV或CMV: 浸提液和蒸馏水分别涂抹于三生烟(心叶烟)或苋色藜的左、右半叶, 待叶片表面自然干燥后左右半叶同时接种病毒, 接种病毒后的植株置于25~30℃的温室中, 48~72 h后叶片上出现病毒侵染的枯斑, 分别记录左、右半叶的枯斑数。每个抽提物接种10株, 每株接种3片叶。计算病毒侵染抑制率。

1.7 系统侵染法对病毒病治疗效果测定 每克新鲜植物或菇类组织加100 ml磷酸缓冲液研磨, 8000 r/min离心10 min, 上清液作为病毒病治疗物质。烟草在病毒接种前、后分别用上述抽提液喷洒2次(接种前48, 24 h和接种后1, 12 h), 每次喷洒都用新的抽提液, 清水代替抽提液作为对照。每个处理30株烟草。

ELISA检测: 接种病毒12~15 d后采用双抗夹心酶联法(ELISA)测定烟草体内的病毒浓度。烟草病叶加样品抽提缓冲液研磨(1:10), 8000 r/min离心3 min后, 上清液作待检测液。用繁殖保存的病毒作阳性对照, 用健康叶作阴性对照。操作步骤按常规ELISA双抗夹心方法进行。反应用2 ml/L硫酸终止后, 马上用酶标仪测定各孔的光密度值 OD_{450} 。

2 结果与分析

该试验对100多种植物材料及10多种食用或野生真菌及部分可能有抗病毒活性的中草药进行了抗病毒筛选。每批对15种左右的植物进行试验, 选出2~3种有希望者。然后把各批有希望的种类收集在一起参加第二轮比较试验, 从中选出几种效果较好者, 最后再从这几种抽提物中选出1~2种效果最稳定者进行重复试验。

基金项目 北京市科委科技新星计资助项目(HD13610030113)。

作者简介 田兆丰(1966-), 女, 山西榆社人, 副研究员, 从事植物病毒及其生物防治的研究。

收稿日期 2007-03-06

2.1 部分植物抽提物对病毒的钝化 经过初筛,选出几种较有希望的植物是:藜科植物S.L、灰绿藜、猪毛菜、萝摩、臭椿、複草和玉簪,并比较了这7种植物抽提液的治疗效果。虽然各次重复结果有所差异,但S.L、萝摩、臭椿三种植物抽提液一直保持了对TMV、CMV 较好的钝化效果(表1、2)。

表1 部分植物抽提液对TMV(CMV) 的体外钝化作用

材料种类	枯斑数		抑制率 %
	处理	对照	
褪蓄(TMV)	30.2	18.6	-62.4
核桃叶(TMV)	38.2	27.0	-41.5
猪毛菜(TMV)	19.0	45.3	58.1
複草(TMV)	20.4	58.6	65.2
萝摩(TMV)	0.5	36.8	98.6
萝摩(CMV)	3.6	39.0	90.8
灰绿藜(TMV)	29.0	16.2	79.0
臭椿(TMV)	0.1	28.9	99.7
臭椿(CMV)	3.6	47.0	92.3
玉簪(TMV)	0.5	29.0	98.3
藜科植物S.L(TMV)	1.8	39.3	96.0
藜科植物S.L(CMV)	5.0	42.5	88.2

注:表中枯斑数是30片叶的平均值。

以上几种植物抽提液除褪蓄、核桃叶之外,对TMV 或CMV 都有不同程度的体外钝化作用。其中萝摩、臭椿、藜科植物S.L 钝化TMV 和CMV 的效率都达到了90%左右。而褪蓄、核桃叶抽提液对TMV 的侵染有促进作用。

2.2 部分抽提物对病毒系统侵染的抑制作用 由表1、2可知,苦木科的臭椿和旋花科的萝摩抽提液都表现出比藜科植物S.L 抽提液高的钝化病毒活性,而它们却没有或只有较弱的病毒病治疗作用。相反,藜科植物S.L 抽提液同时表现了较好的病毒钝化和病毒病治疗效果。

表2 8种植物材料抽提液对烟草体内TMV 浓度的影响(酶联法)

植物材料	吸光值 OD ₄₅₀				平均值
	1	2	3	4	
藜科S.L	0.245	0.373	0.476	0.302	0.349*
灰绿藜	0.532	0.458	0.361	0.540	0.472
萝摩	0.338	0.424	0.590	0.528	0.470
臭椿	0.502	0.407	0.418	0.330	0.414
複草	0.572	0.433	0.401	0.302	0.427
褪蓄	0.510	0.587	0.500	0.491	0.522
猪毛菜	0.461	0.531	0.513	0.487	0.498
玉簪	0.320	0.408	0.413	0.398	0.385
对照	0.551	0.509	0.517	0.498	0.519

注:以上数值为四次重复的平均值;* : 在0.05 水平上差异显著。

2.3 大型真菌对病毒的抑制作用 由表3可见,在所有供试的十几种大型食用真菌和野生菌中,几乎所有的大型真菌(除彩色豆马勃)对TMV 都有抑制作用。大型真菌在新陈代谢中合成核酸、蛋白、氨基酸、糖、生长调节物质等多种代谢产物,因此,食用菌的浸提液中含有种类丰富的生物活性物质,这些活性物质可能在抑制植物病毒侵染的过程中都有一定的作用。由于菌类物质可以通过发酵的方式大量生产,因此,从产业化的角度看,大型真菌抗病毒活性物质更有开发

利用的潜能。

表3 菇类抽提液对TMV 的体外钝化作用

菇类	枯斑数		抑制率 %
	处理	对照	
香菇	2.2	38.6	94.3
平菇	5.3	41.4	87.2
草菇	4.4	32.6	86.5
双孢蘑菇	2.8	30.4	90.8
灵芝	1.8	38.3	95.3
灰树花	4.3	37.7	88.6
竹荪	5.3	37.1	85.7
毛木耳	15.8	45.8	65.5
黑木耳	12.1	40.6	70.2
银耳	8.9	27.7	67.9
虎奶菇	3.2	33.0	90.3
杏鲍菇	3.4	45.9	92.6
鬼伞	8.3	55.7	85.1
鸡从菌	4.6	40.0	88.5
彩色豆马勃	33.6	34.1	±
细裂硬皮马勃	28.2	42.0	32.9

注:表中枯斑数是30片叶的平均值。± 为对病毒侵染没有影响。

3 结论与讨论

该试验通过对100多种植物、菇类及中草药的筛选,发现有不少植物抽提液对烟草花叶病毒有不同程度的钝化作用,部分植物抽提液对干状(TMV) 和球形病毒(CMV) 都有很好的钝化效果。同时还发现个别种类植物的抽提液有增强病毒侵染的作用。说明自然界中生物界的生存链是一物降一物的,一定存在能更好抑制病毒侵染的微生物源或植物源活性物质有待去探索发现。同时,研究病毒侵染促进物质对了解病毒的侵染特性及更好地利用抗病毒物质具有积极意义。

通过对效果较好的几种植物抽提液对病毒病钝化和治疗作用的研究,发现有不少植物抽提液对病毒病有很强的体外钝化作用,其中部分抽提液有一定的病毒病治疗作用。但这两种作用之间似乎不一定有相关性,如苦木科的臭椿和旋花科的萝摩抽提液都表现出比S.L 抽提液更高的病毒钝化效果,但它们却没有或只有较弱的病毒病治疗作用。

通过多次系统侵染试验,肯定了藜科杂草S.L 抽提液对病毒病的治疗效果。通过CMV 在苋色藜寄主上的侵染试验表明,S.L 同时对干状病毒TMV 和球形病毒CMV 均有显著的钝化作用,同时对这两种病毒病也表现了一定的治疗效果。S.L 是一种田间杂草,取材方便,因此,有必要在其活性成分及其作用机理方面做进一步的研究。

前人的研究结果表明,大多数大型真菌浸提液对治疗病毒病有较好的效果,其作用有钝化病毒和诱导抗性两个方面^[9]。所以,对大型真菌浸提液中的抗病毒活性物质进行提纯并详细分析它们的抗病毒机理,对抗病毒活性物质的理论研究和实际应用都有重要指导意义。

参考文献

- [1] DUGGER B M, ARMSTRONG J K. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants [J]. Ann Missouri Bot Garden, 1925, 12: 359-366.
- [2] MULLUOLINT. Virus inhibitors in store fruit plant spp. [J]. Phytopath, 1976, 85: 49-64.
- [3] VERMA H N. Isolation of the virus inhibitor from the root extract of boerhaavia diffusa induces systemic resistance in plant [J]. Canadian Journal of Botany, 1979, 57: 1214-1217.

(上接第7515 页)

- [4] VERMA H N, ABD ALLI KHAN M M. Management of Bant Virus Diseases by *Pseuderanthemumbicdar* Leaf Extract [J]. Bant Disease and Protection, 1984 (91) : 266 - 272 .
- [5] 林毅, 张文增. 13 种(科) 植物中蛋白质提取物的抗TMV 活性 [J]. 福建农业大学学报, 2001 (30) : 211 - 212 .

- [6] 雷新云, 裘维蕃. 一种病毒抑制物质 NS 83 的研制及其对番茄预防 TMV 被侵染的研究 [J]. 植物病理学报, 1984 (14) : 1 - 7 .
- [7] 王岳五, 张海波, 史玉荣, 等. 甘草多糖 GPS 对病毒的抑制作用 [J]. 南开大学学报: 自然科学, 2001, 34 (2) : 126 - 128 .
- [8] 王长云, 管华诗. 多糖抗病毒作用研究进展 I [J]. 生物工程进展, 2000, 20 (1) : 17 - 19 .
- [9] 闽三弟. 真菌的药用价值 [J]. 食用菌学报, 1996, 3 (4) : 55 - 64 .