

## 几种植物提取液对 TMV 体外活性及烟草叶片超微结构的影响

刘华山<sup>1,2</sup>, 白海群<sup>2</sup>, 韩锦峰<sup>2</sup>, 孟凡庭<sup>1</sup>, 朱大恒<sup>3</sup>, 范艺宽<sup>4</sup>, 李晶新<sup>2</sup>, 李中规<sup>5</sup>, 陈启龙<sup>6</sup>

(<sup>1</sup>河南农业大学生命科学院, 郑州 450002; <sup>2</sup>河南农业大学农学院, 郑州 450002; <sup>3</sup>郑州大学生物工程系, 郑州 450001; <sup>4</sup>河南省烟草公司, 郑州 450002; <sup>5</sup>河南省烟草公司襄城县分公司, 河南襄城 461700; <sup>6</sup>河南省烟草公司临颖县分公司, 河南临颖 462600)

**摘要:** 【目的】烟草普通花叶病毒病 (TMV) 是对烟叶产量和质量影响严重的一种病害。本研究为利用环保型植物源制剂防治烟草花叶病毒病提供理论依据。【方法】分别用水煎煮和乙醇浸提 2 种方法提取白花蛇舌草、莲叶和配伍多种植物的提取液。取等体积的植物提取液与烟草花叶病毒混合, 观察 TMV 粒体形态及体外钝化效果, 将提取液喷施感染 TMV 的烟叶上, 观察烟草叶片超微结构的变化, 并进行大田试验。【结果】正常的 TMV 粒体呈刚直、杆状, 植物提取液与 TMV 等体积混合后, 由于提取液的种类和作用时间不同, TMV 粒子有不同程度的破坏、断裂或凝聚, 感染 TMV 叶片细胞中存在大量杆状病毒粒子及其堆叠成的结晶体, 叶绿体肿胀, 外膜破裂, 基粒片层紊乱、解体, 细胞器消失, 细胞空泡化。经植物提取液处理后, 上述症状明显减轻。植物提取液对 TMV 的体外钝化效果分别为: 白花蛇舌草 50.77%—60.61%、莲叶 73.39%—85.19%、制剂 91.30%—92.13%, 制剂比其它 2 种效果明显, 大田试验验证制剂防治效果达 71.02%—81.92%。【结论】植物提取液对 TMV 粒体有明显的破坏作用, 因而能减轻 TMV 对烟草的危害。

**关键词:** 烟草; TMV; 钝化效果; 超微结构

## Effects of Several Plants Extracts on the Activativity of TMV *in Vitro* and Ultrastructure of Tobacco Leaves

LIU Hua-shan<sup>1,2</sup>, BAI Hai-qun<sup>2</sup>, HAN Jin-feng<sup>2</sup>, MENG Fan-ting<sup>1</sup>, ZHU Da-heng<sup>3</sup>, FAN Yi-kuan<sup>4</sup>, LI Jing-xin<sup>2</sup>, LI Zhong-gui<sup>5</sup>, CHEN Qi-long<sup>6</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002; <sup>2</sup>College of Agronomy, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002; <sup>3</sup>Department of Bio-Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001; <sup>4</sup>Henan Tobacco Corporation, Zhengzhou 450001; <sup>5</sup>Henan Xiangcheng Tobacco Company, Xiangcheng 461700, Henan; <sup>6</sup>Henan Linying Tobacco Company, Linying 462600, Henan)

**Abstract:** 【Objective】 Tobacco mosaic virus (TMV) is a kind of plant disease, it affects the leaf tobacco output and quality. The aim of this study is to provide a theoretical basis for prevention and control of tobacco mosaic virus with agents of plant origin. 【Method】 Active substances were extracted from *Oldenlandia diffusa* Roxb. and *Nelumbo nucifera* Garetn. and compounds with constitutes of many plants were prepared by water and ethanol. The plant extracts were mixed with equivalent TMV and the inactivation effects of plant extracts on TMV *in vitro*, and the plant extracts were sprayed on tobacco leaves with TMV for observing the changes of ultrastructure of tobacco leaves. 【Result】 The shape of TMV was rigid and rod-shaped, but the destruction and the break or condenses were different after mixing equivalent plant extracts as the difference in action time and the difference in plant extracts from different species of plants. There were many TMV particles and crystals in cells of tobacco leaves with TMV, and the chloroplast was swell and the ectoplasm of chloroplast ruptured, and the grana lamella was disorderly and disassembled, the cell organ disappear and the cell was vacuolated. The systemic symptoms were alleviated after treatment. The effects of plant extracts on the inactivation of TMV *in vitro* were significant: 50.77%–60.61% (*Oldenlandia diffusa* Roxb.), 73.39%–85.10% (*Nelumbo nucifera* Garetn.), and 91.30%–92.13% (compound preparation), respectively. In field the control and curative effects of the compound

收稿日期: 2009-06-16; 接受日期: 2009-10-26

基金项目: 河南省烟草专卖局科技攻关项目 (H YJ K200820)

作者简介: 刘华山, 教授。Tel: 0371-63558113; E-mail: liuhs602@sina.com。通信作者韩锦峰, 教授, 博士。E-mail: jinfeghan2002@126.com

preparation on TMV were 71.02%-81.9%. 【Conclusion】 Plant extracts have obvious damage effects on TMV, so, it can reduce the harm of TMV to tobacco.

Key words: tobacco; TMV; inactivation; ultrastructure

## 0 引言

【研究意义】烟草普通花叶病毒病 (tobacco mosaic virus, TMV) 是对烟叶产量和质量影响严重的一种病害。据报导, 全世界 TMV 每年给烟农造成的经济损失就达 1 亿多美元<sup>[1]</sup>。化学制剂防治 TMV 既不环保, 效果也不太明显。近年来, 利用植物源制剂防治烟草花叶病引起了国内外学者的极大的兴趣, 它具有环保、无毒副作用, 并且还有改善烟叶品质的作用。

【前人研究进展】研究表明, 植物提取液对烟草花叶病有一定的抑制作用, 在中国登记的抗植物病毒药剂已有多种<sup>[2]</sup>。江山等<sup>[3]</sup>研究了大豆卵磷脂等几种植物病毒抑制剂对 TMV 衣壳蛋白有体外聚合作用。侯玉霞等<sup>[4]</sup>研究表明, 紫草中提取的抗 TMV 活性物质可以通过抑制烟草花叶病毒核酸与植物核糖体的结合抑制病毒的复制。很多学者也进行了一些其它生理研究<sup>[5-6]</sup>, 但尚少见植物提取液对感染 TMV 后烟草叶片超微结构影响的研究。【本研究切入点】选择前人尚未研究过的白花蛇舌草 (*Oldenlandia diffusa* Roxb., 有抗肿瘤的作用<sup>[7]</sup>), 莲叶 (*Nelumbo nucifera* Gaertn., 有抑制鼻咽癌的作用<sup>[8]</sup>) 和多种植物配伍的制剂为材料, 通过心叶烟来观察它们对体外 TMV 的钝化作用, 在电子显微镜下观察病毒粒体形态及烟叶超显微结构的变化, 并在大田验证其防治 TMV 的效果。【拟解决的关键问题】本文研究出植物提取液防治烟草花叶病毒病的作用机理, 为进一步找出新的防治烟草花叶病毒病环保型植物制剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料和试验设计

TMV 系统寄主为普通烟草 (*Nicotiana tabacum* L.), 烤烟品种为 K326, 枯斑寄主为心叶烟 (*Nicotiana cordifolia*)。

白花蛇舌草水提取液的制备: 所用材料在 60℃ 下烘干后, 放入砂锅中煎煮, 材料重量与水的比例为  $m : v = 1 : 10$ , 按照煎煮中药的方法, 先浸泡 20 min, 煎煮 30 min 后, 滤出液体, 再煎煮 1 次, 2 次液体混合成 10 mL 的体积 (不够加水补充) 备用, 莲叶提取液同白花蛇舌草水提取液制备的方法一样。

白花蛇舌草乙醇提取液制备: 所用材料在 60℃ 烘干、粉碎后, 用 95% 乙醇在常温下浸提 ( $m : v = 1 : 10$ ), 24 h 后滤出液体, 再重复 1 次, 2 次液体混合成与水提取液相同的体积, 在 45℃ 左右减压浓缩去除乙醇, 为乙醇浓缩物并置于 4℃ 冰箱中备用。使用时用蒸馏水稀释 10 倍, 即为白花蛇舌草乙醇提取液。莲叶乙醇液提取同白花蛇舌草乙醇提取液提取的方法。

配伍制剂提取液制备: 由河南省植物生长发育重点实验室研制的由 20 种植物加工而成的一种植物源抗病毒制剂 (以下简称制剂), 采用同样的方法 (水提取和乙醇提取) 提取, 植物提取液的体积各为 200 mL。在使用时按 1 : 15 稀释, 进行比较。

供试毒源 TMV 是河南省植物生长发育重点实验室保存在烤烟 K326 上, 在使用前采用 Gooding 等<sup>[9]</sup>的方法提纯。经 200 nm—300 nm 紫外扫描确定纯度和浓度, 在 JEM-100SX 型透射电镜下观察 TMV 粒体形态。

共设 6 个处理: 白花蛇舌草乙醇提取液与 TMV 等体积混合 (T1); 白花蛇舌草水提取液与 TMV 等体积混合 (T2); 莲叶乙醇提取液与 TMV 等体积混合 (T3); 莲叶水提取液与 TMV 等体积混合 (T4); 制剂乙醇提取液与 TMV 等体积混合 (T5); 制剂水提取液与 TMV 等体积混合 (T6); 清水与 TMV 等体积混合 (试验对照), 大田试验在河南襄城县和临颖县。喷施白花蛇舌草、莲叶及制剂提取液各 20 亩, 喷清水作对照, 移栽返苗后喷施第 1 次, 以后每隔 10 d 喷 1 次, 共 3 次, 在第 3 次喷药后 7 d 调查各项指标, 计算方法为: 发病率 (%) = 发病株数 / 调查总株数 × 100; 病情指数 =  $[\sum (\text{各级病株} \times \text{该病级值}) / (\text{调查总株数} \times 4)] \times 100$ ; 防治效果 (%) =  $[(\text{对照病指数} - \text{处理病指数}) / \text{对照病情指数}] \times 100$ 。

### 1.2 方法

1.2.1 TMV 病毒粒体电镜观察 提纯病毒溶液 ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 分别加入等体积的植物提取液, 对照加等体积的清水, 每个处理, 在 25℃ 下分别放置 1、2 和 3 h 后, 采用负染法<sup>[10]</sup>进行 TMV 粒体电镜观察。

1.2.2 体外抑制 TMV 效果的测定 乙醇提取液与 TMV 等体积混合 1、2 和 3 h 后, 对照用清水与 TMV 等体积混合, 在心叶烟枯斑寄主上采用半叶法磨擦接种, 左半叶涂抹植物提取液与 TMV 混合液, 右半叶涂抹

等体积清水与 TMV 混合液作对照。每处理接种 4 片叶, 每半片叶接种 TMV 量为 50  $\mu\text{L}$ 。3 d 后调查枯斑数目并计算抑制率。试验重复 3 次, 水提取液直接与 TMV 等体积混合 1、2 和 3 h 后接种, 处理和乙醇一样。

抑制率(%)=[(对照枯斑数-处理枯斑数)/对照枯斑数] $\times 100$ , 以平均抑制率进行评价。

**1.2.3 烟草叶片透射电镜样品的制备** 待烟株长到 6—7 片叶时, 选取感病一致的烟株, 分别喷施提取液, 对照喷施清水。9 d 后分别取新叶中脉附近的叶肉和叶脉组织, 用刀片切成 1 mm $\times$ 1 mm 小片, 用于电镜样品的制备。

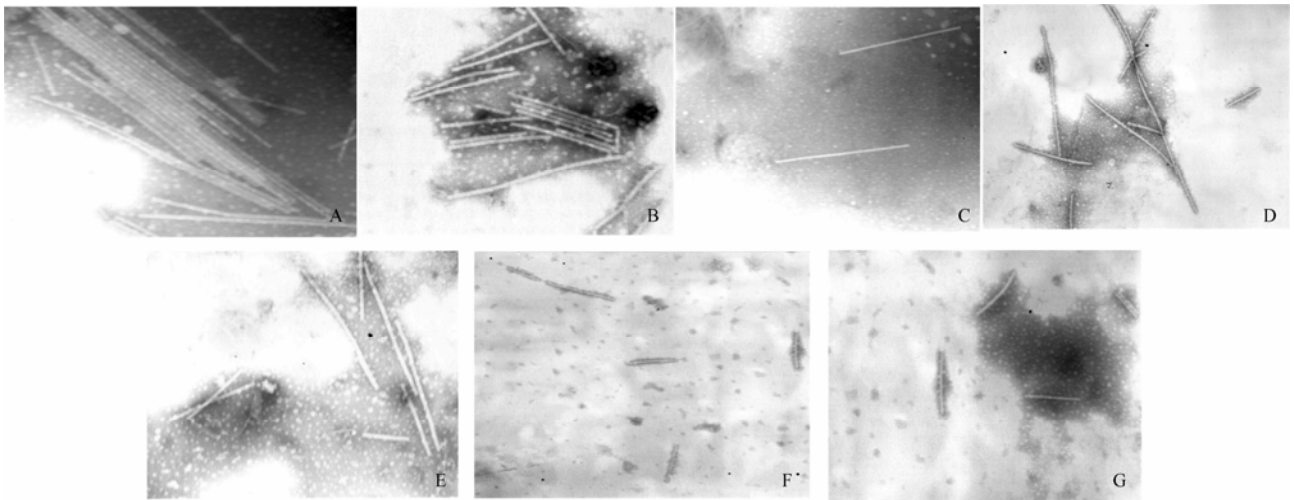
样品用戊二醛-锇酸双重固定法固定。材料先经 4% 戊二醛固定, 经过磷酸缓冲液冲洗后, 再用 1% 四氧化锇固定。磷酸缓冲液冲洗, 系列丙酮脱水, 梯度渗透液渗透后, 用 Epon 812 环氧树脂包埋, 钻石刀切成超薄切片, 经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色, 在 JEM-100SX 型透射电镜下观察并拍照<sup>[1]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 TMV 粒体形态的电镜观察

通过 JEM-100SX 电镜观察, 正常的 TMV 粒子刚直、整齐、匀称成短杆状, 偶有粒子的断裂(图 1-A), 这是病毒在提纯过程中造成的, 属于正常情况。但经过植物提取液处理 TMV 粒体形态均发生了不同程度的变化(图 1—3)。

**2.1.1 植物提取液对 TMV 粒体形态的影响** 在作用 1 h 时, 制剂水提取中, TMV 粒子几乎完全断裂, 未见完整的 TMV 粒子(图 1-F); 在莲叶水提取中, TMV 粒子多数断裂, 变细, 柔韧而弯曲(图 1-D); 而在白花蛇舌草水提取中, TMV 粒子刚直、整齐、匀称成短杆状, 偶有断裂(图 1-B)。在作用 2 h 时, 制剂水提取中, 外壳蛋白完全受到破坏, 几乎看不到杆状病毒的存在(图 2-E); 在莲叶水提取中, TMV 粒子断裂、破碎、边缘模糊(图 2-C); 而在白花蛇舌草水提取中, 部分变细而柔软、弯曲(图 2-A)。在作用 3 h 时, 制剂水提取中, TMV 粒子完全破碎而聚集成团, 看不到有杆状存在(图 3-E); 在莲叶水提取中, TMV 粒子几乎完全破碎, 但没有聚集成团(图 3-C); 而白花蛇舌草水提取中, TMV 粒子部分断裂、破碎变细而弯曲(图 3-A)。说明这 3 种植物提取液对 TMV 粒体均有一定的破坏作用, 但以制剂的破坏作用最大,

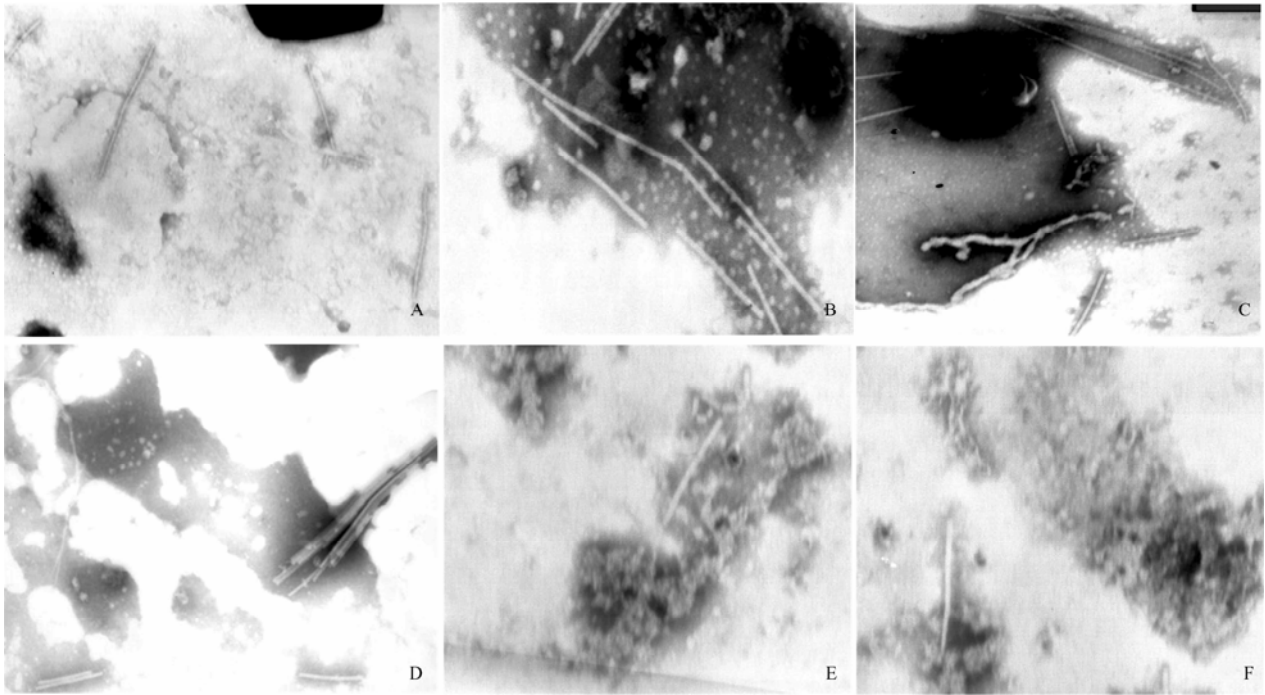


A: 正常的 TMV 粒体形态; B: 白花蛇舌草水提取液处理后的 TMV 粒体形态; C: 白花蛇舌草乙醇提取液处理后的 TMV 粒体形态; D: 莲叶水提取液处理后的 TMV 粒体形态; E: 莲叶乙醇提取液处理后的 TMV 粒体形态; F: 制剂水提取液处理后的 TMV 粒体形态; G: 制剂乙醇提取液处理后的 TMV 粒体形态

A: Normal crystalline shape of TMV; B: TMV crystalline shape by treatment TMV with water extract from *Oldenlandia diffusa*; C: TMV crystalline shape by treatment TMV with ethanol extract from *Oldenlandia diffusa*; D: TMV crystalline shape by treatment TMV with water extract from leaves of *Nelumbo nucifera*; E: TMV crystalline shape by treatment TMV with ethanol extract from leaves of *Nelumbo nucifera*; F: TMV crystalline shape by treatment TMV with water extract from compound preparation; G: TMV crystalline shape by treatment TMV with ethanol extract from compound preparation

图 1 不同提取方法植物提取液作用 1 h 对 TMV 粒体形态的影响 ( $\times 30\ 000$ )

Fig. 1 Effects of plant extracts extracted by different methods on shapes of TMV after one hour



A: 白花蛇舌草水提取液处理后的 TMV 粒体形态; B: 白花蛇舌草乙醇提取液处理后的 TMV 粒体形态; C: 莲叶水提取液处理后的 TMV 粒体形态; D: 莲叶乙醇提取液处理后的 TMV 粒体形态; E: 制剂水提取液处理后的 TMV 粒体形态; F: 制剂乙醇提取液处理后的 TMV 粒体形态  
 A: TMV crystalline shape by treatment TMV with water extract from *Oldenlandia diffusa*; B: TMV crystalline shape by treatment TMV with ethanol extract from *Oldenlandia diffusa*; C: TMV crystalline shape by treatment TMV with water extract from leaves of *Nelumbo nucifera*; D: TMV crystalline shape by treatment TMV with ethanol extract from leaves of *Nelumbo nucifera*; E: TMV crystalline shape by treatment TMV with water extract from compound preparation; F: TMV crystalline shape by treatment TMV with ethanol extract from compound preparation

图 2 不同提取方法植物源制剂作用 2 h 对 TMV 粒体形态的影响 ( $\times 30\,000$ )

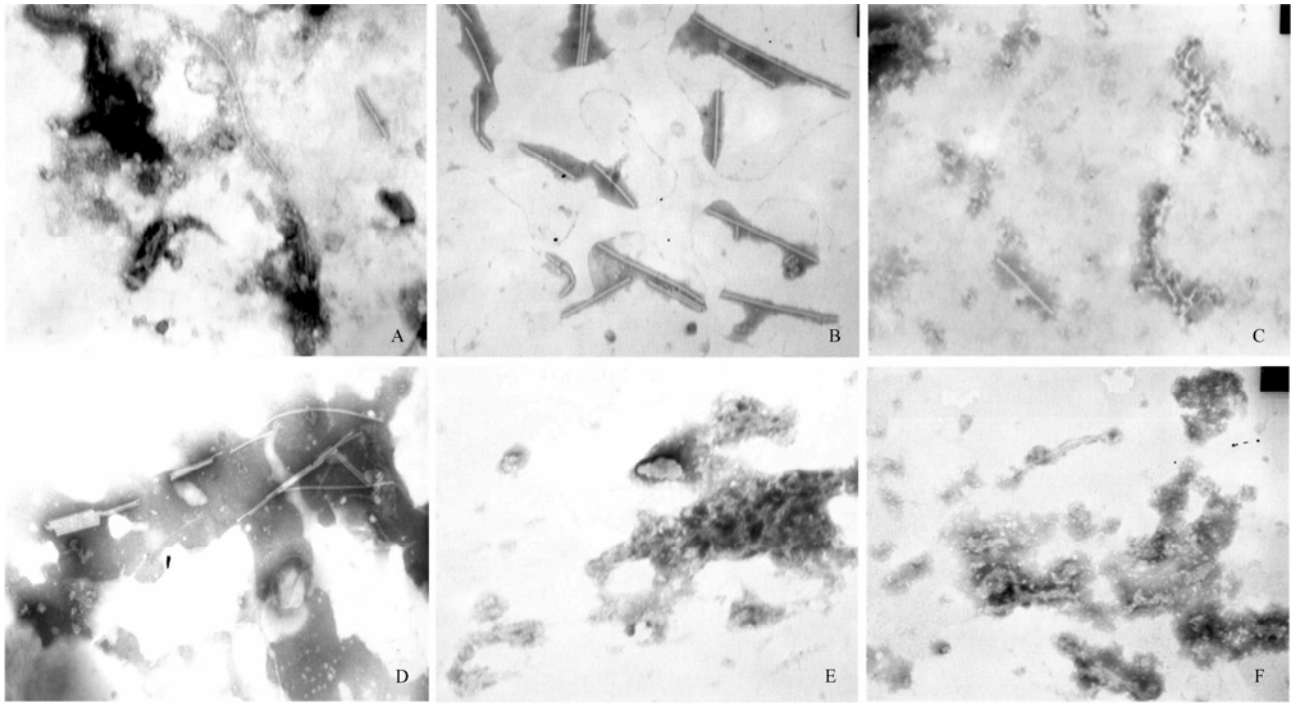
Fig. 2 Effects of plant extracts extracted by different methods on shapes of TMV after two hours

其次为莲叶，白花蛇舌草效果较差。

**2.1.2 植物提取液不同提取方法对 TMV 粒体形态的影响** 2 种提取方法对 TMV 粒体均有破坏作用，但作用效果不同。在作用 1 h 时，莲叶乙醇提取液中，TMV 粒子刚直成短杆状，少有断裂，并且直径较大（图 1-E）；而在莲叶水提取液中，TMV 粒子多数断裂、变细、柔韧而弯曲（图 1-D），表明植物水提取液对 TMV 粒子作用大于乙醇提取液。在作用 2 h 时，莲叶乙醇提取液中，TMV 粒子断裂，部分略变细，少数变细而柔韧弯曲（图 2-D）；而莲叶水提取液中，TMV 粒子部分断裂，变细，边缘模糊（图 2-C），说明两者外壳蛋白均受到破坏，且后者大于前者。在作用 3 h 时，莲叶乙醇提取液中，TMV 粒子断裂、变细、柔韧而弯曲（图 3-D）；而莲叶水提取液中，TMV 粒子断裂、破碎、边缘模糊，外壳蛋白受到完全破坏，几乎看不到杆状病毒的存在（图 3-C）。以上可以看出，水提取法好于乙醇提取法，可能由于水提取液中的有效成分多于乙醇中的有效成分。

**2.1.3 植物提取液不同作用时间对 TMV 粒体形态的影响** 植物提取液对 TMV 粒体的破坏作用随时间而不同。制剂水提取液与 TMV 混合 1 h 后，病毒粒子有断裂现象（图 1-F）；混合 2 h 后，病毒粒子不仅断裂，并且外壳蛋白因受到破坏而变得模糊，聚集成团，偶有杆状（图 2-E）；在混合 3 h 后，这种破坏作用更加明显，病毒粒子外壳蛋白受到完全破坏而聚集成团，看不到有杆状存在（图 3-E）。这表明植物提取液中的有效成分对病毒粒子的结构具有一定的破坏作用，随着作用时间的增加而加剧。从以上结果可以看出，植物提取液对 TMV 有破坏效果，其中以制剂水提取液与 TMV 作用 3 h 时，破坏效果最明显。

**2.2 植物提取液对 TMV 体外钝化效果的影响** 将不同提取液与等体积的 TMV 混合 1、2 和 3 h 后，分别接种到心叶烟上，左半叶涂抹植物提取液与 TMV 混合液，右半叶涂抹等体积清水与 TMV 混合液作对照，3 d 后，计算枯斑数。从表 1—3 可以看出：① 3 种植物源提取液对 TMV 均有一定的抑制效果，制剂提取



A: 白花蛇舌草水提取液处理后的 TMV 粒体形态; B: 白花蛇舌草乙醇提取液处理后的 TMV 粒体形态; C: 莲叶水提取液处理后的 TMV 粒体形态; D: 莲叶乙醇提取液处理后的 TMV 粒体形态; E: 制剂水提取液处理后的 TMV 粒体形态; F: 制剂乙醇提取液处理后的 TMV 粒体形态  
 A: TMV crystalline shape by treatment TMV with water extract from *Oldenlandia diffusa*; B: TMV crystalline shape by treatment TMV with ethanol extract from *Oldenlandia diffusa*; C: TMV crystalline shape by treatment TMV with water extract from leaves of *Nelumbo nucifera*; D: TMV crystalline shape by treatment TMV with ethanol extract from leaves of *Nelumbo nucifera*; E: TMV crystalline shape by treatment TMV with water extract from compound preparation; F: TMV crystalline shape by treatment TMV with ethanol extract from compound preparation

图 3 不同提取方法植物源制剂作用 3 h 对 TMV 粒体形态的影响 (×30000)

Fig. 3 Effects of plant extracts extracted by different methods on shapes of TMV after three hours

液抑制率最高，在 3 h 时可达 91.3%—92.13%，其次是莲叶抑制率，达 73.39%—85.19%，白花蛇舌草最低，达 50.77%—60.61%；②作用时间越长，抑制效

表 1 植物提取液对 TMV 的体外钝化效果 (1 h)

Table 1 Effects of plant extracts on inactivation of TMV *in vitro* (1 h)

处理 Treatments	对照枯斑数(个) Dry spots of control	处理枯斑数(个) Dry spots of treatment	抑制率 Inhibition rate (%)
T1	133±2.0b	100±2.0a	24.81±0.37e
T2	143±6.0a	95±2.0a	33.57±0.39d
T3	130±5.0b	80±5.0b	38.46±0.48c
T4	134±4.5b	75±2.6bc	44.03±0.41b
T5	138±6.0ab	70±3.5cd	49.28±0.37a
T6	132±4.0b	66±3.5d	50±0.17

小写字母不同表示处理间差异达 5% 显著水平，n=3。下同  
 Different letters in lower case indicate that significant difference reached 5% level between treatments, n=3. The same as below

表 2 植物提取液对 TMV 的体外钝化效果 (2 h)

Table 2 Effects of plant extracts on inactivation of TMV *in vitro* (2 h)

处理 Treatments	对照枯斑数(个) Dry spots of control	处理枯斑数(个) Dry spots of treatment	抑制率 Inhibition rate (%)
T1	133±4.0a	80±3.0a	39.85±0.44f
T2	130±4.0a	75±2.0b	42.3±0.23e
T3	129±4.0a	69±3.0c	46.51±0.66d
T4	125±4.5a	58±2.0d	53.6±0.12c
T5	131±5.5a	45±2.0e	65.65±0.10b
T6	130±4.0a	30±2.0f	76.92±0.37a

果越明显。在 1 h 时，制剂水提取液的抑制率达 49.28%—50.00%，2 h 时达 65.65%—76.92%，在 3 h 时，达到 91.30%—92.13%；③水提取方法对 TMV 的抑制效果好于乙醇提取法，在 3 h 时，白花蛇舌草水提取抑制率达 60.61%，而白花蛇舌草乙醇提取达 50.77%。

表 3 植物提取液对 TMV 的体外钝化效果 (3 h)

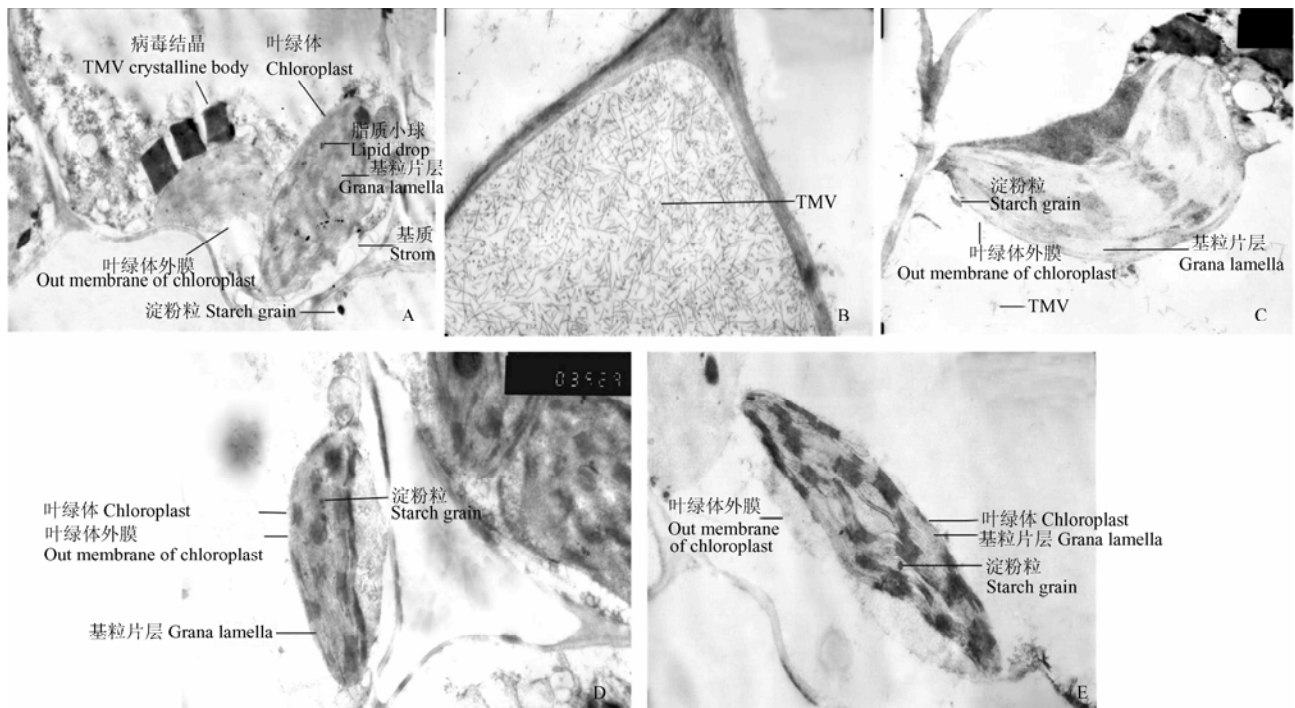
Table 3 Effects of plant extracts on the inactivation of TMV *in vitro* (3 h)

处理 Treatments	对照枯斑数(个) Dry spots of control	处理枯斑数(个) Dry spots of treatment	抑制率 Inhibition rate (%)
T1	130±4.0abc	64±2.0a	50.77±0.23e
T2	132±6.0abc	52±3.0b	60.61±0.48d
T3	124±4.5c	33±2.0c	73.39±0.65c
T4	135±4.5ab	20±2.6d	85.19±0.44b
T5	138±3.5a	12±2.0e	91.30±0.23a
T6	127±3.0bc	10±1.0e	92.13±0.35a

可见,植物提取液对体外 TMV 有较好的抑制作用,这与电镜观察的结果一致。

### 2.3 TMV 烟草叶片细胞的超微结构

2.3.1 植物提取液对烟叶细胞内 TMV 粒体的影响 烟草在感染 TMV 后,烟草叶片的栅栏组织和海绵组织薄壁细胞的细胞质内存在大量杆状病毒粒子,有多层病毒粒子堆积形成的结晶,韧皮部筛管内也存在大量病毒粒子(图 4-A,图 4-B)。经植物提取液处理烟草叶片细胞中病毒粒子显著减少,分布零散,未见病毒结晶,偶见病毒粒子集中现象(图 4-C,图 4-D,图 4-E),其中制剂效果最好,莲叶次之,白花蛇舌草最差。



A、B: 喷施清水的烟草叶片细胞的超微结构; C: 喷施白花蛇舌草水提取液的烟草叶片细胞的超微结构; D: 喷施莲叶提取液的烟草叶片细胞的超微结构; E: 喷施制剂水提取液的烟草叶片细胞的超微结构

A, B: Ultrastructure in tobacco leave cell by spraying water; C: Ultrastructure in tobacco leave cell by spraying extract from *Oldenlandia diffusa* Roxb.; D: Ultrastructure in tobacco leave cell by spraying extract from *Nelumbo nucifera* Garetn.; E: Ultrastructure in tobacco leave cell by spraying extract from compound preparation

图 4 植物提取液对感染 TMV 烟草叶片细胞的超微结构的影响 ( $\times 10\ 000$ )

Fig. 4 Effects of plant extracts on ultrastructure in tobacco leave cell with TMV

### 2.3.2 植物提取液对 TMV 烟叶细胞超微结构的影响

烟草在感染 TMV 后的叶片薄壁细胞发生了病变,细胞器遭到破坏,叶绿体变化最明显。多数细胞的叶绿体严重肿胀,基粒片层排列紊乱,模糊甚至降解,脂质小球数目增加。部分细胞叶绿体外膜破裂,基质流出,基粒片层和淀粉粒逸散在细胞质中。病变严重的

细胞各种细胞器解体,细胞质空泡化(图 4-B)。

经植物提取液处理后,多数薄壁细胞中的细胞器有不同程度的修复。经白花蛇舌草水提取液处理后,叶绿体还有肿胀,基粒片层排列紊乱、模糊,外膜有破裂的现象,有少量的淀粉粒(图 4-C);而莲叶提取液处理后,薄壁细胞中各种细胞器基本完好,叶绿体

仅有轻度病变, 叶绿体外膜基本完好, 片层略完整, 稍疏松, 有淀粉粒 (图 4-D); 经制剂处理后, 薄壁细胞中细胞器及叶绿体外膜完好, 片层完整、垛叠紧密、基质略有减少, 出现较大的淀粉粒 (图 4-E)。这说明植物体提取液对烟草花叶病有一定的治疗作用。

表 4 植物提取液对烟草 TMV 的防治效果

Table 4 Effects of plants extracts on the control of TMV in field

试验地点 Test site	处理 Treatments	发病率 Disease percentage (%)	病情指数 Infection index	防治效果 Protective effects (%)
河南临颖 Henan Linying	对照 Control	19.80±1.86a	6.25±0.19a	0
	白花蛇舌草提取液 Extracts by <i>Oldenlandia diffusa</i>	13.30±1.23b	5.33±0.12a	14.72±1.07c
	莲叶提取液 Extracts by <i>Nelumbo nucifera</i>	10.10±1.02c	3.80±0.19b	39.02±2.64b
	制剂提取液 Extracts by compound preparation	6.38±0.09d	1.13±0.13c	71.02±6.03a
河南襄城 Henan Xiangcheng	对照 Control	24.50±2.13a	15.67±1.82a	0
	白花蛇舌草提取液 Extracts by <i>Oldenlandia diffusa</i>	20.30±1.18c	11.26±1.02b	28.14±4.14c
	莲叶提取液 Extracts by <i>Nelumbo nucifera</i>	12.10±1.18c	8.74±0.39c	44.22±3.31b
	制剂提取液 Extracts by compound preparation	8.02±0.23d	4.54±0.28d	81.92±5.12a

### 3 讨论

单一植物提取液对体外 TMV 有一定的钝化作用, 这同翟梅枝等<sup>[12]</sup>的研究结果一致, 但本试验证明植物配伍制剂的效果更好一些, 这可能是复合提取液的有效成分多, 对 TMV 的抑制起到增效作用, 当然植物提取液的作用机理需深入研究。

植物液提取的方法有水提取和乙醇提取。有人认为乙醇提取液的效果好一些<sup>[12]</sup>, 本试验的结果表明, 水提取液对 TMV 的钝化效果优于乙醇, 这可能是水提取的有效成分多于乙醇, 由于乙醇在减压浓缩过程中挥发性的物质减少一部分, 提取方法不同, 可能导致效果有差异。

植物中含有丰富的次生活性物质, 全世界 1/3 的药物来自植物<sup>[13]</sup>。本试验证明, 植物提取液能钝化烟草普通花叶病毒粒子, 在电镜下观察到植物提取液处理的 TMV 粒子外壳蛋白结构受到不同程度的破坏, 看不到杆状存在, 发生断裂凝聚成团, 可能是由于植物提取液有效成分的活性物质破坏了 TMV 粒子衣壳蛋白亚基之间的结合力, 致使结构松散、断裂, 这与江山等<sup>[3]</sup>的研究结果一致, 其中制剂提取液抑制 TMV 对烟草的侵染力最强, 在大田有较好的防治效果。可以预见, 植物配伍制剂在防治烟草花叶病毒病方面有较好的发展潜力, 还能提供有机营养, 改善烟叶品质

### 2.4 植物提取液对 TMV 烟草防治效果的影响

田间试验效果由表 4 可以看出, 植物提取液对烟草花叶病都有防治效果, 分别为白花蛇舌草 14.72%—28.14%, 莲叶 39.02%—44.22%, 制剂 71.02%—81.92%, 以制剂效果最好, 与盆栽试验效果一致。

的作用<sup>[14]</sup>, 今后应研究单一植物有效成分及其制剂增效作用机理, 以便科学地走出一条环保有效的防治烟草花叶病毒的新途径。中草药配伍制剂在治疗人类疾病方面的效果相当好, 是中国宝贵的医学财富。植物提取液用来防治烟草 TMV 有较好的防治效果, 具有环保、无污染、又无副作用的优点。但是, 中国研究者多是研究单一防治 TMV, 防治效果有大有小。本试验表明, 配伍植物制剂的有效成分多, 起到加成作用。所用材料是中国所产, 中草药市场大量出售, 收集容易, 生产成本较低, 每亩地约用 15—20 元, 有较好的生产应用及推广前景。

### 4 结论

植物提取液对烟草 TMV 有一定钝化和破坏作用, 使 TMV 粒子数量减少, TMV 粒体发生断裂、粗细不均等畸变现象, TMV 粒子结构松散、模糊成团, 病毒侵染力降低, 与此同时, 植物提取液处理的薄壁细胞中细胞器及叶绿体膜基本完好, 片层较完整, 垛叠较紧密, 表明植物提取液对烟草薄壁细胞有一定防护作用。植物水提取液和乙醇提取液效果相比较, 水提取液对 TMV 的钝化效果优于醇提取液。盆栽和大田试验结果表明, 植物提取液对 TMV 感染枯斑率有明显的抑制作用, 白花蛇舌草、莲叶和制剂的抑制率分别为 50.77%—60.61%、73.39%—85.19% 和

91.30%—92.13%，大田试验防治效果可达 71.02%—81.92%。

## References

- [1] 吴云峰, 曹 让, 魏宁生, 周广和. 生物病毒农药筛选及应用. 世界农业, 1995(5): 35-36.  
Wu Y F, Cao R, Wei N S, Zhou G H. The selection and application of bio-virus pesticide. *World Agriculture*, 1995(5): 35-36. (in Chinese)
- [2] 刘 刚. 农作物病毒防治药剂登记情况综述. 农药科学与管理, 2005, 26(1): 32-33.  
Liu G. The review on prevention and treatment reagent of crop virus disease. *Pesticide Science and Administration*, 2005, 26(1): 32-33. (in Chinese)
- [3] 江 山, 郭雪柳, 韩焄莱. 一些抗植物病毒剂对烟草花叶病毒衣壳蛋白体外聚合过程的影响. 中国病毒学, 1996, 11(1): 77-79.  
Jiang S, Guo X L, Han X L. Influence of some antiphytoviral substances on the polymerization (*in vitro*) of coat protein of tobacco mosaic virus (TMV). *Virologica Sinica*, 1996, 11(1): 77-79. (in Chinese)
- [4] 侯玉霞, 李重九, 马立新, 丁 群. 中草药中抗植物病毒 TMV 活性物质 PZ1 作用机理研究. 中国农业大学学报, 2000, 5(1): 21-24.  
Hou Y X, Li C J, Ma L X, Ding Q. Studies on the mechanism of antiviral (TMV) active compound PZ1 isolated from Chinese medicine plant. *Journal of China Agricultural University*, 2000, 5(1): 21-24. (in Chinese)
- [5] 陈 宁, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 灰树花中一种抗烟草花叶病毒的蛋白质的纯化及其性质. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(3): 283-286.  
Chen N, Wu Z J, Lin Q Y, Xie L H. Purification and partial characterization of a protein inhibitor of tobacco mosaic virus infection from the maitake (*Grifola frondosa*). *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2004, 31(3): 283-286. (in Chinese)
- [6] 刘国坤, 谢联辉, 林奇英, 吴祖建, 陈启建. 15 种植物的单宁提取物对烟草花叶病毒(TMV)的抑制作用. 植物病理学报, 2003, 33(3): 279-283.  
Liu G K, Xie L H, Lin Q Y, Wu Z J, Chen Q J. Inhibition of the infectivity of TMV by tannins. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33(3): 279-283. (in Chinese)
- [7] 谢来成. 武当山药用植物(第一卷). 北京: 中国医药科技出版社, 2006: 118.  
Xie L C. *WU Dang Shan Medicinal Plant (vol. 1)*. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2006: 118. (in Chinese)
- [8] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志(第四卷). 北京: 科学出版社, 1986: 138.  
Institute of Botany, Yun Nan, the Chinese Academy of Sciences. *Yun Nan Flora (vol. 4)*. Beijing: Science Press, 1986: 138. (in Chinese)
- [9] Gooding G V, Jr., Hebert T T. A simple technique for purification of Tobacco mosaic virus in large quantities. *Phytopathological Notes*, 1967, 57(11): 1285-1289.
- [10] 田 波, 裴美云. 植物病毒研究方法. 北京: 科学出版社, 1987: 201-203.  
Tian B, Pei M Y. *Research Methods of Plant Virus*. Beijing: Science Press, 1987: 201-203. (in Chinese)
- [11] 商文静, 吴云锋, 赵小明, 杜显光, 商鸿生. 壳寡糖诱导烟草抗烟草花叶病毒的超微结构研究. 植物病理学报, 2007, 31(1): 56-61.  
Shang W J, Wu Y F, Zhao X M, Du Y G, Shang H S. Ultrastructure of induced resistance of tobacco to tobacco mosaicvirus by chito-oligosaccharides. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 31(1): 56-61. (in Chinese)
- [12] 翟梅枝, 高芳奎, 沈建国, 林奇英, 谢联辉. 抗TMV的植物筛选及提取条件对抗病毒物质活性的影响. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(7): 45-49.  
Zhai M Z, Gao F L, Shen J G, Lin Q Y, Xie L H. Screening of plants with resistance to TMV and the influence of extracting condition on the activity of antiviral substance. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2004, 32(7): 45-49. (in Chinese)
- [13] 王海鹏, 马志卿, 何 军, 殷培军, 张亚妮, 冯俊涛, 张 兴. 植物源农药 VFB 抗烟草花叶病毒(TMV)活性初步研究. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(3): 176-180.  
Wang H P, Ma Z Q, He J, Yin P J, Zhang Y N, Feng J T, Zhang X. Primary study on anti-TMV activity of botanical-derived VFB. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2008, 36(3): 176-180. (in Chinese)
- [14] 刘华山, 白海群, 韩锦峰, 孟凡庭, 田效园, 李晶新. 毛叶子花提取液对感染 TMV 烟株的生理效应及品质的影响. 贵州农业科学, 2008, 36(6): 17-19.  
Liu H S, Bai H Q, Han J F, Meng F T, Tian X Y, Li J X. Effects of extract from *Bougainvillea spectabilis* willd. on hysiological and quality tobacco with TMV. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2008, 36(6): 17-19. (in Chinese)

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)