

抑制烟草花叶病毒活性植物的筛选

林中正^{1,2}, 谢娇枚³, 李基光⁴, 周鹏¹, 魏润洁¹, 肖启明^{1*}

(1.湖南农业大学生物安全科学技术学院,长沙 410128;2.江苏省淮安市农业委员会,江苏 淮安 223001;

3.国家植物功能成分利用工程技术研究中心,长沙 410128;4.湖南省西瓜甜瓜研究所,长沙 410125)

摘要:本研究采用半叶枯斑法和烟草病害分级标准,对抗 TMV 的活性植物进行筛选,系统测定了艾蒿、板蓝根、柴胡等 24 种植物的粗提取物对烟草花叶病毒 (TMV) 的抑制效果,包括体外钝化 TMV 作用、抑制 TMV 初侵染;并采用盆栽法,研究植物粗提取物对烟草花叶病的保护和治疗作用等。试验表明,银杏、栀子、商陆、赤芍等植物粗提取物的综合防治效果较好,有进一步开发和利用的前景。

关键词: TMV; 抗病毒活性; 植物提取物; 烟草

中图分类号: S572.08

文章编号: 1007-5119 (2013) 06-0089-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2013.06.017

The Screening of Plants Inhibiting Tobacco Mosaic Virus Activity

LIN Zhongzheng^{1,2}, XIE Jiaomei³, LI Jiguang⁴, ZHOU Peng¹, WEI Runjie¹, XIAO Qiming^{1*}

(1. College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Huai'an Agriculture Commission, Huai'an, Jiangsu 223001, China; 3. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional ingredients, Changsha 410128, China; 4. Hunan Institute of Watermelon and Muskmelon, Changsha 410125, China)

Abstract: In this paper, screening of plants inhibiting Tobacco Mosaic Virus (TMV) activity was achieved under the disease measuring standard with half leaf lesion experiment. Botanical extracts were obtained from 24 kinds of plants, including *Artemisia Argyi*, *Radix Isatis*, *Bupleurum*, etc, and their inhibiting effect on TMV activity were tested by passive activation of TMV in vitro and inhibiting TMV primary infection. Pot experiments were used to investigate the protection and therapeutic effect of virus. The results indicated that the abstracts from ginkgo, gardenia, *Phytolacca* and red peony root had great inhibiting effect on TMV, which is promising for further development and utilization.

Keywords: tobacco mosaic virus; antiviral activity; plant extract; tobacco

烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV) 是烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*) 的单链 RNA (ssRNA) 病毒, 侵染烟草后, 会引起普通烟草花叶病, 对烟草产区造成严重影响^[1]。就目前而言, 尚无理想药剂能有效预防普通烟草花叶病^[2]。植物提取物抗病毒物质具有安全、有效、毒害作用低等特点, 适于开发抗病毒药剂。本试验选取 24 种植物材料, 制备粗提物, 系统测定其对 TMV 的抑制效果^[3-4], 主要包括体外钝化 TMV 作用、TMV 初侵染抑制和对烟草花叶病的保护和治疗作用, 为进一步开发植物源农药提供依据^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试烟草品种 病毒枯斑寄主为心叶烟 (*Nicotiana glutinosa* L.), 病毒系统侵染寄主为普通烟 (*Nicotiana tabacum* L.), 品种为 K326, 由湖南农业大学烟草基地提供。

1.1.2 供试毒源 室内供试毒源为 TMV, 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供, 保存于普通烟的烟叶上。

基金项目: 湖南省烟草专卖局项目 (09-11Aa29)

作者简介: 林中正, 男, 硕士, 研究方向为农业管理及植物病害防治。E-mail: nazhijian@126.com。* 通信作者, E-mail: xqm-xqm@shou.com

收稿日期: 2012-07-24

修回日期: 2013-01-17

1.1.3 供试植物材料 供试植物材料购自湖南省人民医院药房等药店,部分植物材料采自湖南湘西地区,一共有24种植物材料。据《本草纲目》及标准参考文献显示,这些植物对人或动物具有一定的抗病毒效果。

1.2 方法

1.2.1 植物粗提物的制备 新鲜的植物根、茎、叶或果实样品用烘箱40℃烘干后,用中药粉碎机进行粉碎,已经晒干的中药材则直接用中药粉碎机粉碎^[6]。粉碎成粉末后,用溶剂浸渍法提取植物有效成分,在室温下加入样品量的6倍的分析甲醇(V/M),浸泡72h,期间不断搅拌,使其充分溶解。然后用布氏漏斗过滤,再用旋转蒸发器水浴浓缩获得提取物,提取物为膏状物,置于4℃冰箱保存^[7]。天然植物提取物供试药剂均由提取的膏状物样品配置。

1.2.2 接种液的制备 剪取新鲜的带TMV病毒的烟叶,按一定比例加入PBS缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2)加入500目的石英砂少许,研磨得匀浆,用4层纱布过滤掉残渣得病毒原液备用^[8]。其浓度采用剪取新鲜的质量(mg)与PBS缓冲液的体积(L)比来定义,心叶烟接种浓度为20 mg/L,普通烟接种浓度为50 mg/L。

1.2.3 植物粗提物室内生物活性测定 体外钝化作用,选取生长旺盛、健康的5~6叶期心叶烟,左半叶接种供试植物提取物与病毒液等体积混合液,右半叶接种病毒液与PBS缓冲液等体积混合液(对照),24种植物提取物的质量浓度均为1 mg/L,接种病毒浓度为20 mg/L,钝化时间分别为1 h和2 h,共48个处理,3片叶子,重复3次。采用半叶枯斑法测定,5 d后统计枯斑数,计算抑制率^[9-10]。

抑制TMV初侵染试验,选取生长旺盛、健康的5~6叶期心叶烟,左半叶涂抹供试植物提取物,右半叶涂抹等体积的PBS缓冲液(对照),分两组,一组24 h后,另一组48 h后,全叶接种病毒液,24种植物提取物的质量浓度均为1 mg/L,接种病毒浓度为20 mg/L,两组,共48个处理,3片叶子,

重复3次,采用半叶枯斑法测定,分别在接种病毒5 d后统计枯斑数,计算抑制率^[11]。

抑制率(%)=[(对照枯斑数-处理枯斑数)/对照枯斑数]×100%

1.2.4 室内防治烟草花叶病试验 选取生长旺盛、健康的5~6叶期普通烟K326,采用盆栽试验,测定植物提取物对烟草花叶病的药效,试验分两种方式,即保护组(喷洒植物提取物3次后,接种病毒液)和治疗组(接种病毒液后,植物提取物3次),此外还设空白(CK)对照组(只接种病毒液,不喷洒植物提取物)。采用喷雾法,每5 d喷洒植物提取物一次,共3次,保护组最后1次喷洒植物提取物后接种TMV;治疗组在第1次喷洒植物提取物前接种TMV。均在接种病毒液后的14 d和21 d调查发病情况,并计算病情指数和防治效果。每个样20株苗,重复3次,病害分级标准参照烟草花叶病分级标准^[12-13]。病情指数=∑(病级数×病株数)/(最高病级×各处理总株数)×100;防治效果(%)=(对照病指-处理病指)/对照病指×100%。

以上试验于2011年7月1日至9月5日在湖南农业大学生物防治实验室完成。

2 结果

2.1 植物提取物对TMV的体外钝化作用

采用半叶枯斑法测定,植物提取物对TMV的体外钝化作用,结果见表1。

从表1可以看出,24种植物的提取物对TMV均表现一定的钝化作用,但钝化效果有明显的差别,其中银杏、栀子、商陆、赤芍表现的钝化作用较强,在体外钝化2 h的抑制率均在80%以上。提取物对TMV的钝化效果表现为时间效应,随着钝化作用时间的延长,对TMV的抑制效果也逐渐增强,如效果比较好的银杏,在钝化1、2 h后,抑制率分别为89.65%、90.31%。

2.2 植物提取物对TMV的初侵染抑制作用

采用半叶枯斑法测定,植物提取物对TMV的初侵染抑制作用,详见表2。

表 1 植物提取物对 TMV 的体外钝化作用

Table 1 Inactivation of plant extracts to TMV

植物提取物	钝化 1 h 抑制率/%	钝化 2 h 抑制率/%
艾蒿	18.91	24.24
板蓝根	48.18	52.22
柴胡	49.55	50.32
赤芍	85.41	86.83
大黄	32.14	35.09
大青叶	51.18	53.44
丁香	72.44	73.45
合欢皮	61.66	62.44
黄连	70.38	73.08
黄芪	14.56	18.33
黄芩	55.81	67.23
藿香	59.86	60.32
马齿苋	32.11	41.77
玫瑰	80.10	82.57
佩兰	10.15	12.45
蒲公英	10.63	12.98
商陆	83.22	84.56
苏叶	50.86	55.23
无花果	14.35	15.23
鸦胆子	68.97	72.76
银杏	89.65	90.31
柚子	50.08	53.44
鱼腥草	20.34	25.32
栀子	88.70	90.02

注：表中数据均为 3 次重复的平均值，下同。

表 2 植物提取物对 TMV 初侵染抑制作用

Table 2 Inhibiting infectivity of plant extracts to TMV

植物提取物	初侵染 24 h	初侵染 48 h
	抑制率/%	抑制率/%
艾蒿	13.44	15.83
板蓝根	27.27	34.43
柴胡	29.39	31.54
赤芍	68.32	70.23
大黄	15.37	16.78
大青叶	34.65	36.78
丁香	45.44	48.90
合欢皮	36.89	37.45
黄连	48.12	51.67
黄芪	7.84	8.23
黄芩	42.56	43.32
藿香	41.32	42.78
马齿苋	27.76	29.36
玫瑰	46.88	47.89
佩兰	5.13	6.18
蒲公英	6.34	7.12
商陆	68.34	70.23
苏叶	30.23	31.22
无花果	7.24	7.91
鸦胆子	52.33	53.45
银杏	80.21	82.33
柚子	26.98	27.67
鱼腥草	9.26	9.78
栀子	78.12	79.23

从表 2 可以看出，24 种植物的提取物均表现出了对 TMV 的初侵染抑制作用，但抑制效果有明显

差别，且同一植物提取物涂抹后 24 h 和 48 h 接种病毒的抑制作用较为接近，时间效应不明显。与体外钝化效果相比，同一植物提取物对 TMV 的初侵染抑制作用较体外钝化的抑制效果总体来说会略微弱一点，比如银杏提取物对 TMV 的初侵染抑制作用，24 h 和 48 h 后接种病毒液，抑制率分别为 80.21%、82.33%，比体外钝化 2 h 的抑制率(90.31%)微低。

2.3 室内防治烟草花叶病试验

植物提取物对烟草花叶病的保护作用，结果见表 3。

表 3 植物提取物对烟草花叶病的保护作用

Table 3 Protection effect of plant extracts on TMV

植物提取物	接种病毒液 14 d		接种病毒液 21 d	
	病情	防治	病情	防治
	指数	效果/%	指数	效果/%
艾蒿	22.82	18.25	38.24	11.36
板蓝根	20.12	34.71	35.13	22.86
柴胡	20.27	21.33	34.16	17.68
赤芍	8.67	68.20	17.24	47.33
大黄	22.03	32.01	35.12	18.25
大青叶	16.52	38.17	30.14	29.16
丁香	12.10	53.83	24.34	42.71
合欢皮	13.25	49.52	22.41	40.21
黄连	11.38	54.52	23.12	43.76
黄芪	23.42	16.73	39.14	11.26
黄芩	15.34	42.14	27.78	38.71
藿香	16.23	40.12	28.87	36.12
马齿苋	21.91	33.31	34.21	20.15
玫瑰	9.25	63.23	19.13	46.78
佩兰	24.12	14.73	40.74	10.23
蒲公英	25.02	12.71	41.34	9.13
商陆	8.54	75.23	18.76	46.33
苏叶	18.54	36.87	32.34	28.16
无花果	24.04	15.23	40.14	11.92
鸦胆子	9.14	62.13	17.32	47.33
银杏	6.32	75.23	15.65	50.11
柚子	18.34	36.27	32.14	27.26
鱼腥草	23.02	18.72	38.34	13.31
栀子	7.12	74.33	16.66	48.14

从表 3 可以看出，植物提取物对烟草花叶病均有一定的保护作用，其中，商陆和栀子表现的保护作用较明显，在接种病毒液 14 d 后，防治效果分别达到 75.23%、74.33%。病情指数和防治效果都存在时间效应，随着时间的递增病情指数上升，防治效果下降。

植物提取物对烟草花叶病的治疗作用，结果见表 4。

表4 植物提取物对烟草花叶病的治疗作用
Table 4 Remedial effect of plant extracts on TMV disease

植物提取物	接种病毒液 14 d		接种病毒液 21 d	
	病情 指数	防治 效果/%	病情 指数	防治 效果/%
艾蒿	42.48	19.45	71.38	11.68
板蓝根	37.18	40.83	64.96	26.58
柴胡	37.28	23.49	63.12	19.74
赤芍	14.38	84.43	29.28	58.29
大黄	40.91	37.33	64.98	20.25
大青叶	29.68	45.31	54.68	34.78
丁香	21.24	65.79	43.18	52.33
合欢皮	23.34	60.16	39.42	49.79
黄连	19.16	66.66	40.84	53.68
黄芪	43.78	17.19	72.78	11.48
黄芩	27.51	50.52	50.26	47.23
藿香	29.30	47.26	52.34	43.56
马齿苋	40.36	39.73	63.22	22.95
玫瑰	15.64	77.69	32.96	57.14
佩兰	45.58	14.19	76.58	10.09
蒲公英	46.93	12.23	77.38	8.69
商陆	13.21	85.82	32.42	57.98
苏叶	33.82	43.71	59.38	33.48
无花果	44.93	15.59	74.88	12.96
鸦胆子	15.12	76.39	29.34	58.39
银杏	9.38	93.59	26.23	61.93
柚子	33.42	42.91	58.98	32.38
鱼腥草	42.85	20.16	71.28	14.13
栀子	11.28	92.39	28.12	59.32

从表4可以看出,植物提取物对烟草花叶病有一定的治疗作用,防治效果明显好于保护作用。其中,喷洒银杏提取物的烟草植株在接种病毒液14 d后的治疗效果可达93.59%。

3 讨论

本试验研究表明,供试的24种植物提取物对TMV均具有一定的钝化作用,对TMV初侵染抑制效果略差。其中以银杏、栀子、商陆、赤芍等植物提取物的效果较好,其体外钝化效果明显高于TMV初侵染的抑制作用。室内盆栽试验也表明,以银杏、栀子、商陆、赤芍等植物提取物对烟草花叶病的保护和治疗效果比较明显。从本试验结果可以看出,银杏、栀子、商陆、赤芍等提取物对烟草花叶病毒(TMV)具有明显的抑制作用。

面对日趋严重的烟草花叶病带来的危害,抗病毒药剂的研发面临新挑战,从目前发展情况来看,运用基因工程技术开发转基因抗病品种、弱毒疫苗等仍不成熟,且存在一定争议。而传统的抗病毒制剂往往对植物有毒害、高副作用。植物提取物抗病

毒的效果已经大部分研究证实,植物提取物治疗效果不亚于化学合成制剂,一般不会造成环境污染和残留毒性问题,具有广阔的发展前景^[14]。如果能在研究单一植物提取物对烟草花叶病毒(TMV)抑制作用的基础上,深入分析其抗病毒有效成分,并运用中药复方理论,对效果较好的植物提取物按比例进行复配,开发出更稳定、高效、可供农业生产上实际应用的植物源农药,那其应用前景就更广阔,使用价值就更加巨大。

参考文献

- [1] 朱贤朝,王彦亭,王智发. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] 王利国,马祁. 天然产物对植物病毒的抑制作用[J]. 中国生物防治, 2000, 16(3): 127-130.
- [3] 沈建国. 两种药用植物对植物病毒及三种介体昆虫的生物活性[D]. 福州: 福建农林大学, 2005.
- [4] 王海鹏,马志卿,何军,等. 植物源农药VFB抗烟草花叶病毒(TMV)活性初步研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(3): 176-180.
- [5] 伍小良. 抗烟草花叶病毒病的药剂筛选及复配增效作用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [6] 李丽青. 中药材中农药多残留分析方法研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [7] 操海群,岳永德,彭镇华,等. 竹提取物的抗真菌作用[J]. 植物保护学报, 2003, 30(1): 35-39.
- [8] 田兆丰,刘伟成,刘霆,等. 小链霉菌Yn168发酵产物抗植物病毒活性的研究[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(4): 569-572.
- [9] 江红甲,刘勇,李永平. 威百亩对烟草漂浮苗干根中烟草花叶病毒的失活效果[J]. 现代农药, 2009, 8(2): 48-50.
- [10] 刘勇. 蒸汽对烟草漂浮苗干根中烟草花叶病毒的失活效果[J]. 中国烟草科学, 2008, 29(2): 47-49.
- [11] 黄金光,李怀方,宋爱荣. 树舌MP-01菌株提取液抑制TMV生物活性研究[J]. 现代农药, 2007, 28(2): 47-48.
- [12] 杨玉丽,周义彬. 两种不同类型农药防治烟草花叶病毒病药效的比较研究[J]. 湖北植保, 2010(3): 42-43.
- [13] 田波,裴美云. 植物病毒研究方法: 上册[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [14] 陈丽,安德荣. 几种药剂防治烟草病毒病药效试验[J]. 植物保护, 2004, 30(3): 78-80.