

# 壳寡糖季铵盐衍生物纳米银的合成及其诱导烟株抗烟草花叶病毒活性

孙翠红<sup>1</sup>, 徐翠莲<sup>\*、2</sup>, 赵铭钦<sup>\*、1</sup>, 黄元炯<sup>3</sup>, 张露<sup>2</sup>,  
尤方芳<sup>1</sup>, 周伏叶<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学烟草学院国家烟草栽培生理生化研究基地, 郑州 450002;

2. 河南农业大学理学院, 郑州 450002; 3. 河南省烟草公司, 郑州 450002)

**摘要:**为开发符合高效、低毒且环境友好的新型烟草花叶病毒(TMV)抑制剂,以具有季铵盐结构的新型壳寡糖季铵盐衍生物为还原剂和稳定剂,合成了壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液,并研究了不同浓度该纳米银溶液诱导烟株产生抗TMV的活性。结果表明:所合成的壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液在透射电镜(TEM)下显示分布较均匀,粒径主要集中在7~12 nm。在珊西烟上以25 μg/mL的壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液对枯斑的抑制效果最好,抑制率为74.0%,比50 μg/mL壳寡糖溶液和2%宁南霉素水剂分别高41.5%和24.4%;对于普通烟K326,壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液可缓解被病毒侵染的烟草叶绿素含量的下降幅度,提高叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(PPO)的活性,降低丙二醛(MDA)的含量,提高可溶性蛋白含量。表明壳寡糖季铵盐纳米银溶液可提高烟株对TMV的抗病性。

**关键词:**壳寡糖季铵盐衍生物;纳米银;合成;烟草花叶病毒;防御酶

中图分类号:S435 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2015)04-0391-10

## Synthesis of silver nanoparticles using quaternized oligochitosan derivative and its induced resistance against TMV in tobacco plant

Sun Cuihong<sup>1</sup>, Xu Cuilian<sup>\*、2</sup>, Zhao Mingqin<sup>\*、1</sup>, Huang Yuanjiong<sup>3</sup>,  
Zhang Lu<sup>2</sup>, You Fangfang<sup>1</sup>, Zhou Fuyue<sup>1</sup>

(1. National Tobacco Cultivation & Physiology & Biochemistry Research Center, College of Tobacco, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 3. Tobacco Leaf Company of Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to develop a new type of inhibitors of tobacco mosaic virus (TMV), which is efficient, low toxic and environmentally friendly, silver nanoparticles in quaternized oligochitosan solution was synthesized by using novel oligochitosan derivative with structure of quaternary ammonium salt as reducing agent and stabilizer. Different concentrations of silver nanoparticles in quaternized oligochitosan solution were used to test the resistance against TMV. The results showed that the silver nanoparticles in quaternized oligochitosan solution showed uniform distribution observed under

收稿日期:2014-11-02; 录用日期:2015-04-19.

作者简介:孙翠红,女,硕士,主要从事烟草化学研究,E-mail:13838144121@163.com; \*徐翠莲,通信作者(Author for correspondence),女,博士,教授,从事应用化学研究,E-mail:xucuilian666@126.com; \*赵铭钦,共同通信作者(Co-author for correspondence),男,教授,主要从事烟草化学研究,E-mail:zhaomingqin@126.com

基金项目:河南省烟草公司重点科技攻关项目(HYKJ201015, HNNKY2013-062).

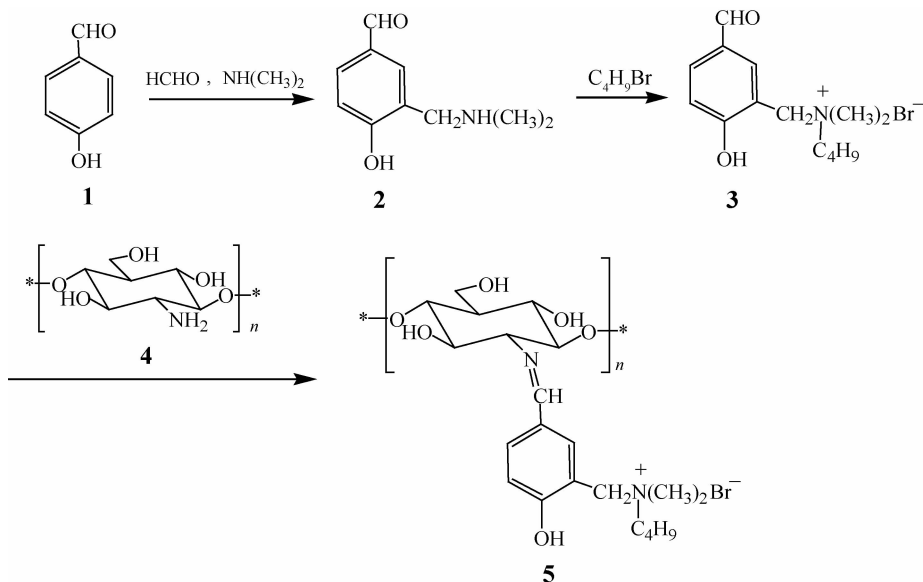
transmission electron microscope (TEM), the particle diameter were mainly 7 – 12 nm. The best inhibitory effect of silver nanoparticles in quaternized oligochitosan solution to necrosis spots on *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc NN was observed at 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , with inhibition rate of 74.0%, which was 41.5% and 24.4% higher than that of oligochitosan and ningnanmycin, respectively. On *Nicotiana tabacum* K326, silver nanoparticles in quaternized oligochitosan solution could relieve the decrease of chlorophyll content, improve the activities of defense enzymes such as superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) in TMV-inoculated leaves, reduce the content of malondialdehyde (MDA) and accumulate the content of soluble protein. The results suggested that silver nanoparticles in quaternized oligochitosan solution can improve the resistance of tobacco plant against TMV.

**Keywords:** quaternized oligochitosan derivative; silver nanoparticles; synthesis; tobacco mosaic virus; defense enzymes

壳寡糖(CS)是一种聚合度在3到10之间,交联度低于5%的低聚 $\beta$ -(1,4)-2-脱氧-2-氨基葡萄糖<sup>[1]</sup>,可诱导植物产生防御反应<sup>[2]</sup>。研究表明,壳寡糖具有抗真菌<sup>[3]</sup>和抗病毒活性<sup>[4-5]</sup>。对植物或接种过病毒的叶片喷施壳寡糖,可以防治由烟草坏死病毒(TNV)、烟草花叶病毒(TMV)、花生矮化病毒(PSV)、黄瓜花叶病毒(CMC)和马铃薯X病毒引起的植物局部或全身感染<sup>[6-7]</sup>。席夫碱(Schiff base)是指由活性羰基和氨基通过缩水形成的含亚氨基或烷亚氨基的有机化合物,席夫碱衍生物及其金属络合物不仅是一种重要的化学分析试剂和有机合成中间体,还具有抗菌、灭菌等生物活性<sup>[8]</sup>。宋宝安等<sup>[9]</sup>研究表明,含不同取代基的席夫碱衍生物具有不同的抗TMV活性,其中取代基为2-氯-5-硝基的衍生物活性最强。孟凡德等<sup>[10]</sup>研究表明,水杨

酸与L-氨基酸缩合形成席夫碱后,再与银形成配合物,对TMV具有很好的抑制作用。

烟草花叶病对烟田的危害十分严重,可造成烟草品质下降,等级降低,因此研究一种绿色有效的抗烟草花叶病的药剂十分重要。目前,国内外相继合成的壳寡糖席夫碱、壳寡糖烷基化衍生物的抗病效果明显提高<sup>[11-12]</sup>。随着研究的深入,壳寡糖诱导植物抗病性的作用机理将逐渐被了解,并为植物抗病基因工程奠定理论基础,壳寡糖及其衍生物的应用前景将会更加广阔<sup>[13]</sup>。笔者以具有季铵盐结构的新型壳寡糖席夫碱季铵盐衍生物为还原剂和稳定剂合成了其纳米银,并研究了经不同浓度的该纳米银溶液处理后烟株中相关生理生化指标的变化,初步探讨了其诱导烟株产生抗TMV活性的机理,旨在为开发高效、环保型抗病毒药剂提供依据。



Scheme 1

壳寡糖季铵盐席夫碱衍生物的合成路线见 Scheme 1。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试植物 检测抗 TMV 活性所用的枯斑寄主为珊西烟 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc; TMV 系统侵染寄主为普通烟 *Nicotiana tabacum* K326。

1.1.2 供试病毒 烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV),由贵州大学提供,采用常规汁液摩擦接种法在普通烟上繁殖。

1.1.3 药剂及试剂 2% 宁南霉素水剂(ningnanmycin AS,用蒸馏水稀释 260 倍),德强生物股份有限公司。壳寡糖(oligochitosan 平均相对分子质量约为 5 000)及正溴丁烷(98%),上海海曲化工有限公司;甲醛(37%),洛阳市化学试剂厂;二甲胺水溶液(>40%),天津科密欧化学试剂厂;对羟基苯甲醛(98%),阿拉丁试剂;乙腈(HPLC 级),天津赛孚瑞有限公司;甲醇,色谱纯,湖北杜文化工有限公司;其余试剂均为市售分析纯。

1.1.4 仪器 CL-2 型恒温加热磁力搅拌器(郑州国瑞科技仪器有限公司);FEI TECNALG2 型透射电子显微镜(荷兰 FEI 公司);GSL-101BI 激光颗粒分布测量仪(辽宁仪表研究所有限责任公司);安捷伦 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)。

1.1.5 色谱条件 EclipseXDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);采用 A 和 B 双泵系统,流动相 A 为甲醇(色谱纯),流动相 B 为超纯水;流速 1 mL/min;柱温 30 °C;进样量 15 μL;检测波长 254 nm。

### 1.2 试验方法

1.2.1 壳寡糖季铵盐衍生物的合成

1.2.1.1 3-二甲氨基甲基-4-羟基苯甲醛(2)的合成 参考文献[14]方法,但略有改进。在 100 mL 三口瓶中,加入 4.50 g(0.05 mol)37% 甲醛、3.24 g(0.04 mol)40% 二甲胺水溶液和 15 mL 乙醇,磁力搅拌下加热回流(约 50 °C)10 min 后,加入 0.996 g(0.008 mol)对羟基苯甲醛,再加热回流 12 h;减压下旋转蒸发除去溶剂,用乙酸乙酯萃取 4 次(30 mL/次),减压脱溶,所得固体用石油醚重结晶,抽滤得无色针状晶体 3.24 g,收率为 45.2%。熔点 79.5~80.6 °C(文献值<sup>[14]</sup>80~81 °C)。

1.2.1.2 溴化二甲基丁基(5-甲酰-2-羟基)苯甲基

铵(3)的合成 在 100 mL 圆底烧瓶中,加入 0.723 g(0.004 mol)化合物 2,先用 5 mL 乙腈溶解,再加入 0.006 mol 正溴丁烷,磁力搅拌下加热回流 5~8 h(回流管上安装干燥管,用高效液相色谱[HPLC,流动相 V(甲醇):V(水)=0.3:1]监测至反应结束;冷却至室温,加入大量乙酸乙酯,出现白色固体粉末,抽滤,用乙酸乙酯洗涤 3 次,于真空干燥箱中干燥,得白色固体 0.586 g,收率 62.0%。

1.2.1.3 壳寡糖季铵盐衍生物 5 的合成 在 100 mL 圆底烧瓶中,加入一定量的化合物 3,用 15 mL 甲醇溶解后,分别加入 2 mL 冰乙酸和 0.483 g(0.003 mol)壳寡糖(4),磁力搅拌下加热回流 10~12 h(回流管上安装干燥管);抽滤,以乙醇为溶剂进行索氏提取 10~12 h,在 50 °C 下真空干燥 12 h,得土黄色固体粉末(5),密封保存。

1.2.2 壳寡糖季铵盐衍生物纳米银的合成 向 50 mL 烧杯中加入 15 mL 壳寡糖季铵盐衍生物(5)溶液(1 mg/mL),在 80 °C、搅拌下缓慢加入 0.2 mL 银氨溶液(其中[Ag(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>]=0.0042 mol/L),继续搅拌 10 min,得橙红色壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液 15 mL(以下简称纳米银溶液)。

1.2.3 纳米银粒子形貌观察 将稀释后的纳米银溶液滴加于透射电子显微镜覆有碳膜的铜网网格上,室温下真空干燥 30 min,待溶剂挥发后观察纳米银粒子的形貌。加速电压为 200 kV。

1.2.4 枯斑抑制筛选试验 采用枯斑寄主半叶法<sup>[15-16]</sup>。TMV 病毒汁液质量浓度为 3.33 μg/mL,采用常规汁液摩擦接种法。

选取长势一致、具有 4~5 片真叶的盆栽珊西烟,剪去顶部。将供试药剂与 TMV 等体积混合 1 h 后喷洒到带微伤的半片烟叶上;另一半喷施清水与 TMV 等体积混合的溶液,作为对照。每处理重复 3 次(即每处理选取一株珊西烟,并选取顶部 3 片子作为 3 次重复),观察发病情况,计算枯斑抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{对照枯斑数} - \text{施药处理枯斑数}}{\text{对照枯斑数}} \times 100$$

1.2.5 纳米银溶液诱导 K326 烟株对 TMV 侵染的抗性 选取长势一致、具有 7~8 片真叶的盆栽 K326 烟株供试。在喷雾施药 24 h 后,采用常规汁液摩擦接种法于每株下部第 3 片真叶上接种 TMV(3.33 μg/mL),试验设 4 个处理:处理 1(喷施稀释 260 倍的 2% 宁南霉素水剂后接种 TMV, Control);处理 2(喷施 50 μg/mL 纳米银溶液后接种 TMV,

T1);处理3(喷施 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纳米银溶液后接种 TMV, T2);处理4(喷施 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纳米银溶液后接种 TMV, T3)。每处理重复 3 次。分别于接种后 1、4、7、10、13 和 16 d 取样装入锡箔纸内,置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

采用 Gooding 等<sup>[17]</sup>的方法提纯 TMV。采用乙醇提取法<sup>[18]</sup>测定叶绿素含量;参照李合生的方法<sup>[19]</sup>测定超氧化物歧化酶(SOD)含量;参照文献<sup>[20]</sup>方法测定过氧化物酶(POD)含量;参照李靖等的方法<sup>[21]</sup>测定多酚氧化酶(PPO)活性;采用考马斯

亮蓝 G-250 染料结合法<sup>[22]</sup>测定可溶性蛋白含量;参照赵世杰<sup>[23]</sup>的方法测定丙二醛(MDA)含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 壳寡糖季铵盐衍生物 5 的合成与红外表征

通过 Mannich 甲基化反应和烷基化反应,先将季铵盐单元引入到对羟基苯甲醛结构中,再通过其与壳寡糖的缩合反应制得了土黄色粉末状的壳寡糖季铵盐希夫碱 5,其与壳寡糖比对的红外光谱见图 1。

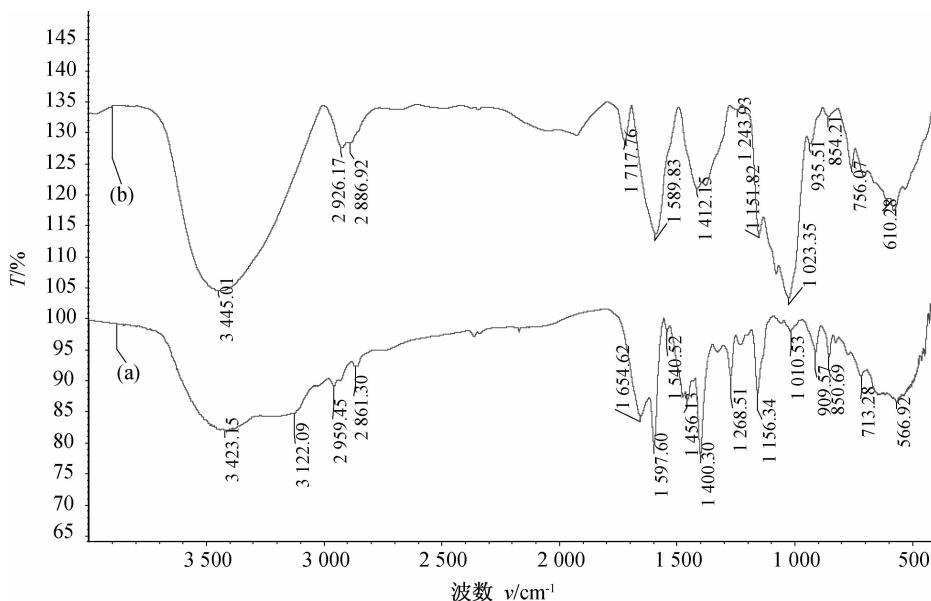


图 1 壳寡糖季铵盐衍生物 5 (a)与壳寡糖(b)的的红外光谱对比

Fig. 1 Infra-red spectra of oligochitosan quaternary ammonium salt derivative 5 (a) and bligochitosan (b)

从图 1 可以看出:与壳寡糖的相比,壳寡糖季铵盐衍生物 5 的红外光谱发生了明显变化:在  $3445\text{ cm}^{-1}$  处的 O—H 和 N—H 伸缩振动峰明显减弱,并移至  $3423\text{ cm}^{-1}$  处,说明壳寡糖上的氨基发生了缩合反应;在  $3122\text{ cm}^{-1}$  出现了苯环氢的特征吸收峰;在  $2959$  和  $2861\text{ cm}^{-1}$  出现了季铵盐基团中甲基和亚甲基中的 C—H 伸缩振动峰;壳寡糖中  $1590\text{ cm}^{-1}$  处氨基的 N—H 变形振动吸收峰消失,而在  $1655\text{ cm}^{-1}$  处出现了 C=N 的伸缩振动吸收峰;此外,在  $1598$ 、 $1541$  和  $1456\text{ cm}^{-1}$  出现了苯环的特征骨架峰, $1400\text{ cm}^{-1}$  处是甲基和亚甲基中的 C—H 变形振动峰。这些特征峰表明壳寡糖季铵盐希夫碱的形成。

### 2.2 不同浓度的壳寡糖季铵盐衍生物对纳米银溶液生成的影响

固定  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$  溶液的体积为  $0.5\text{ mL}$ , 在

$80\text{ }^{\circ}\text{C}$  下,考察加入不同浓度壳寡糖季铵盐衍生物 (5) 反应 30 min 后生成其纳米银溶液的紫外光谱。由图 2 可看出:化合物 5 的质量浓度对纳米银的形成影响较大,当其质量浓度为 1 和 2  $\text{mg}/\text{mL}$  时,在 420 nm 处出现了球形纳米银粒子的特征等离子共振吸收峰,表明有纳米银粒子形成,同时可得到稳定的红色纳米银溶液;而从 1  $\text{mg}/\text{mL}$  增加到 3  $\text{mg}/\text{mL}$  的过程中,其吸收峰的强度逐渐下降,在 3  $\text{mg}/\text{mL}$  时,420 nm 处的吸收峰完全消失,同时反应溶液中出现大量 AgBr 沉淀。这是由于当化合物 5 质量浓度增加时,体系中溴负离子浓度也同时增加,其与银离子反应的速率大于  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$  被还原为  $\text{Ag}^0$  的速率,导致  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$  最终转化为 AgBr。因此合适的壳寡糖季铵盐衍生物的质量浓度为 1  $\text{mg}/\text{mL}$ 。

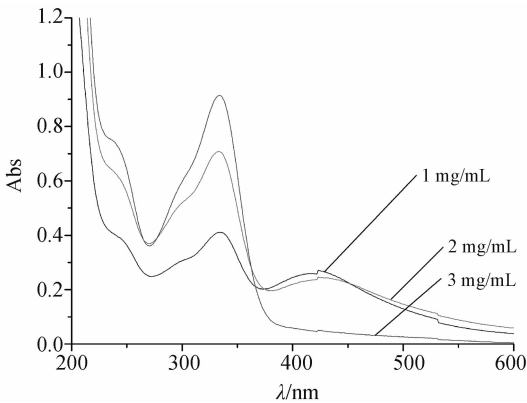


图2 壳寡糖季铵盐衍生物(5)质量浓度对形成的纳米银紫外光谱的影响

Fig. 2 Effects of oligochitosan quaternary ammonium salt derivative concentration on UV-Vis spectra of silver nanoparticles solution

### 2.3 不同浓度的银氨[ $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ ]溶液对纳米银生成的影响

图3是银氨溶液[ $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ ]的加入量对纳米银溶液 UV-Vis 光谱的影响,其中反应温度为  $80\text{ }^\circ\text{C}$ ,反应时间为 30 min,壳寡糖季铵盐衍生物的质量浓度为 1 mg/mL,银氨溶液的加入量分别为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL。随着银氨溶液加入量的增加,纳米银溶液的  $A_{\text{max}}$  (最大吸光度) 不断增大,溶液的颜色逐渐加深,后 3 组完全成为黑色。从稳定性上看,当银氨溶液的加入量在 1.0 mL 以上时,均得不到稳定的纳米银溶液。由此说明,随着银氨溶液加入量的增加,还原反应速率加快,溶液中纳米银粒子浓度迅速增加。但当银氨浓度过大时,由于单位时间内形成的晶核数目增加太快,银纳米粒子还来不及被壳寡糖季铵盐衍生物覆盖在其表面形成保护层,就因粒子之间发生碰撞而沉淀。因此适宜的银氨溶液的加入量为 1 mL。

### 2.4 纳米银溶液的形貌分析

由  $4.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  的银氨溶液与 1 mg/mL 壳寡糖季铵盐衍生物在  $80\text{ }^\circ\text{C}$  下反应 30 min 后制得的纳米银溶液的透射电镜 (TEM) (图4) 可以看出:纳米银为规则球形,分散性好,粒径 7~12 nm,且分布均匀。纳米银粒子表面包裹着一层可视觉度较低的物质,这是由于修饰后的壳寡糖链缠绕在球形纳米银颗粒的表面,对纳米银形成了一种保护作用,证明了壳寡糖季铵盐衍生物的稳定作用。同时由于壳寡糖季铵盐衍生物结构中含有的大量羟基、季铵离子以及还原反应后产生的羰基等亲水基团,促使纳米颗

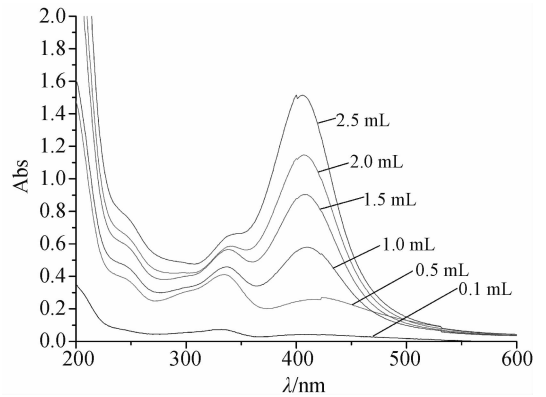


图3 银氨溶液[ $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ ]的加入量对纳米银紫外光谱的影响

Fig. 3 Effects of  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$  concentration on UV-Vis spectra of silver nanoparticles solution

粒具有良好的亲水性能,因此,在这种糖链保护下,合成的纳米银粒子能够很好地分散在水中,形成透明、稳定的溶液。

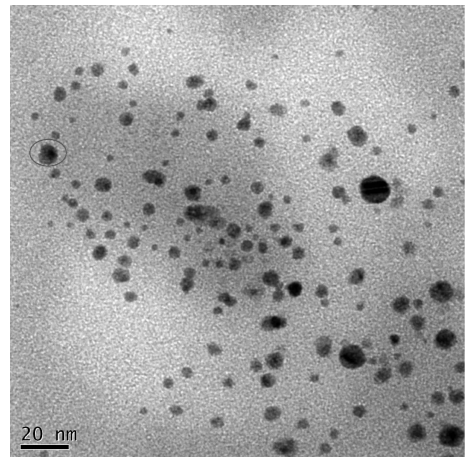


图4 壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液的透射电镜 (TEM) 分析图

Fig. 4 TEM image of oligochitosan quaternary ammonium salt derivative silver nanoparticles

### 2.5 纳米银溶液对珊西烟枯斑的抑制效果

不同药剂对珊西烟 TMV 枯斑的钝化抑制效果见表1。可以看出,不同浓度的壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液对枯斑的抑制效果与壳寡糖、宁南霉素和壳寡糖季铵盐衍生物相比有明显提高,其中以  $25\text{ }\mu\text{g/mL}$  的纳米银溶液抑制效果最好,为 74.0%,分别比  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  壳寡糖溶液和 2% 宁南霉素水剂高 41.5% 和 24.4%;  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  的壳寡糖季铵盐衍生物对枯斑抑制效果稍高于壳寡糖,但无显著差异;与 2% 宁南霉素水剂相比,除  $25\text{ }\mu\text{g/mL}$  的纳米银处

理和 10 μg/mL 的纳米银处理差异显著外,其他处理间均无显著差异。可见,壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液对 TMV 枯斑的抑制效果较好。

25 μg/mL 的纳米银溶液对珊西烟 TMV 枯斑的抑制效果见图 5。

表 1 供试药剂对珊西烟 TMV 的钝化抑制效果

Table 1 Inhibition of the test reagent against TMV diseases on *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc

供试药剂 Test reagent	质量浓度 Concentration/ (μg/mL)	每 cm <sup>2</sup> 枯斑数 Lesion unumbers in one cm <sup>2</sup> leave		抑制率 Inhibition rate %
		药剂处理组 Reagent treatment	清水处理组 Water treatment	
壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液 oligochitosan quaternary ammonium salt derivative silver nanoparticles	50	0.109	0.309	64.7 bc
	25	0.0732	0.282	74.0 a
	10	0.119	0.436	72.7 ab
壳寡糖季铵盐衍生物 oligochitosan quaternary ammonium salt derivative	50	0.133	0.292	54.5 d
	25	0.146	0.329	55.6 d
壳寡糖溶液 oligochitosan	50	0.174	0.365	52.3 d
2% 的宁南霉素水剂 2% ningnanmycin AS	稀释 260 倍 Dilute 260 times	0.122	0.301	59.5 cd

注:同列数据后不同小写字母表示不同处理 5% 水平下差异显著。

Note: Data in a column followed by different small letters are significant difference at 5%.

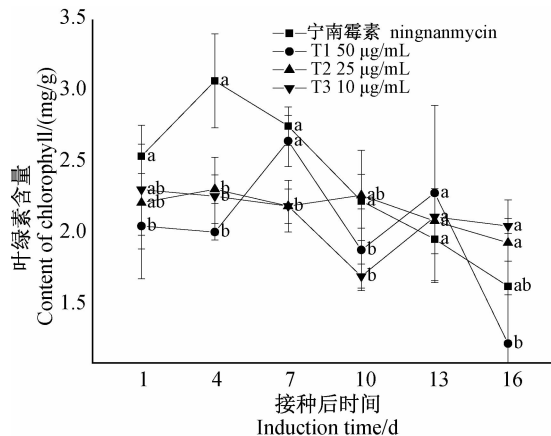


图 5 25 μg/mL 壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液对珊西烟上由 TMV 侵染产生枯斑的抑制效果

Fig. 5 Inhibition of necrosis spots on *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc by 25 μg/mL oligochitosan quaternary ammonium salt derivative silver nanoparticles

### 2.6 纳米银溶液对烟叶中叶绿素含量的影响

不同浓度的药剂处理对烟叶中叶绿素含量的影响见图 6。结果表明:2% 宁南霉素水剂处理的叶绿素含量在第 4 天时明显升高,之后骤然下降,呈现出单峰曲线变化;50 μg/mL 的纳米银溶液(T1 处理组)叶绿素含量变化幅度较大,前 4 d 处于平稳状态,7 d 时含量骤增并达到最大值,之后



注:不同小写字母表示不同处理 5% 水平下差异显著。

Note: Different small letters are significant difference at 5%.

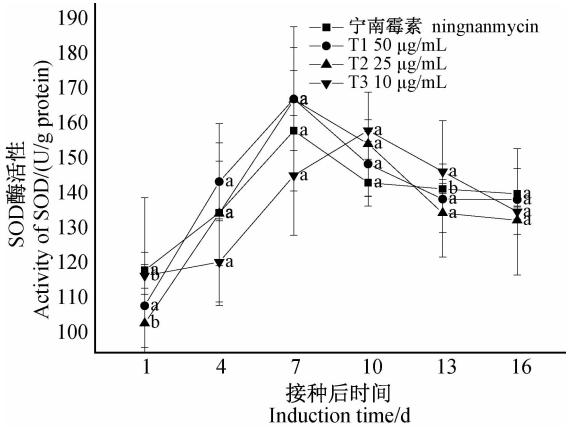
图 6 不同浓度壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液(T1 ~ T3)及 2% 宁南霉素水剂处理下叶绿素的含量变化

Fig. 6 Changes of the contents of chlorophyll under treatment of oligochitosan quaternary ammonium salt derivative silver nanoparticles (T1 - T3) and 2% ningnanmycin AS

骤降,13 d 时又骤增,16 d 时又骤降;25 μg/mL 的纳米银溶液(T2 处理组)叶绿素含量变化较平稳,仅在 10 d 时达到最大值;10 μg/mL 的纳米银溶液(T3 处理组),除 10 d 时叶绿素含量下降幅度较大外,其他时间段变化均较平缓。总之,喷施不同浓度的纳米银溶液均可在不同程度上降低被 TMV 侵染后烟草叶片中叶绿素含量下降的幅度。

### 2.7 纳米银溶液对防御酶活性的影响

2.7.1 纳米银溶液对 SOD 酶活性的影响 结果(图 7)显示:各处理下 SOD 酶活性整体呈现出倒“V”型动态变化。除 T3 处理在第 10 天出现最大酶活性外,其余各处理均在第 7 天出现最大酶活性。各处理的酶活性曲线变化整体上表现为先升高再降低最后趋于平缓。整体看,各处理与 2% 宁南霉素水剂处理间几乎无差异。表明喷施不同浓度的纳米银溶液可有效提高烟叶中 SOD 酶活性。



注:不同小写字母表示不同处理 5% 水平下差异显著。  
Note: Different small letters are significant difference at 5% .

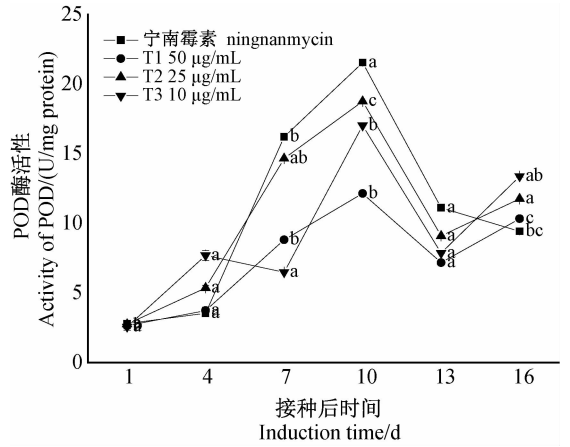
图 7 不同浓度壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液 (T1 ~ T3) 及 2% 宁南霉素水剂处理下 SOD 酶的活性变化  
Fig. 7 Changes of the activity of SOD under treatment of oligochitosan quaternary ammonium salt derivative silver nanoparticles (T1 - T3) and 2% ningnanmycin AS

2.7.2 纳米银溶液对 POD 酶活性的影响 喷施一定浓度的纳米银溶液可有效提高烟叶中 POD 酶活性,4 个处理 POD 酶活性均在第 10 天达到最大值,其中 2% 宁南霉素水剂和 T2 处理下 POD 酶活性整体高于 T1 和 T3 处理,T1 处理酶活性最低(图 8)。

2.7.3 纳米银溶液对 PPO 酶活性的影响 结果如图 9 所示。4 个处理下烟叶中 PPO 酶活性均随时间的延长而明显升高,表明在一定时间内喷施纳米银溶液可有效的提高烟叶中 PPO 酶活性。

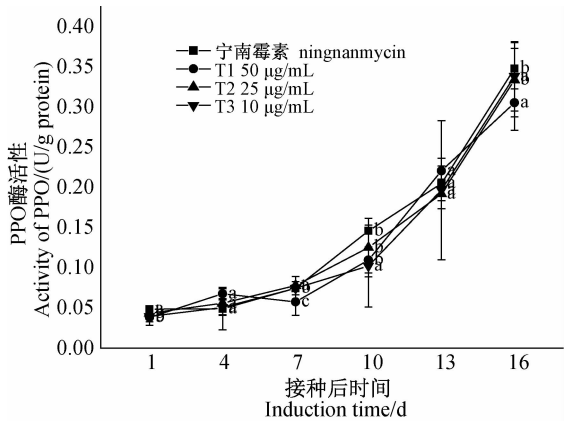
### 2.8 纳米银溶液处理对烟叶中其他相关生理生化指标的调控效应

2.8.1 纳米银溶液对烟叶中丙二醛含量的影响 结果(图 10)显示:T1、T2 和 T3 处理下烟叶中丙二醛的含量变化与宁南霉素处理相似,均为在第 1~7 天表现出较为明显的下降趋势,第 10 天明显上升达最大值,之后趋于下降;虽然 4 个处理间存在



注:不同小写字母表示不同处理 5% 水平下差异显著。  
Note: Different small letters are significant difference at 5% .

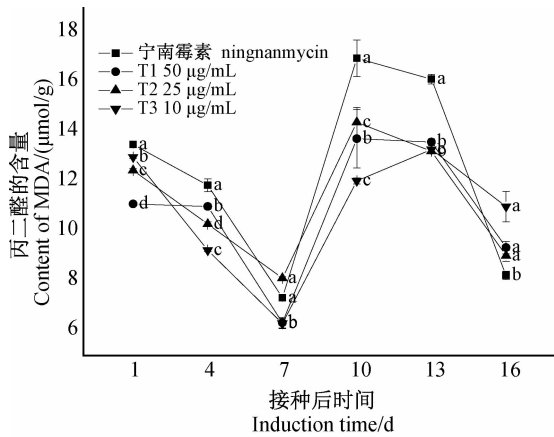
图 8 不同浓度壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液 (T1 ~ T3) 及 2% 宁南霉素水剂处理下 POD 酶的活性变化  
Fig. 8 Changes of the activity of POD under treatment oligochitosan quaternary ammonium salt derivative silver nanoparticles (T1 - T3) and 2% ningnanmycin AS



注:不同小写字母表示不同处理 5% 水平下差异显著。  
Note: Different small letters are significant difference at 5% .

图 9 不同浓度壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液 (T1 ~ T3) 及 2% 宁南霉素水剂处理下 PPO 酶的活性变化  
Fig. 9 Changes of the activity of PPO under treatment of oligochitosan quaternary ammonium salt derivative silver nanoparticles (T1 - T3) and 2% ningnanmycin AS

显著差异,但仍表明在一定时间内,喷施一定浓度的纳米银溶液可有效降低烟叶中丙二醛的含量。  
2.8.2 纳米银溶液对可溶性蛋白含量的影响 结果(图 11)表明:喷施纳米银溶液可有效增加烟叶中可溶性蛋白的含量。4 个处理下烟叶中可溶性蛋白含量的变化曲线基本一致,均表现为先增后减再增的趋势。

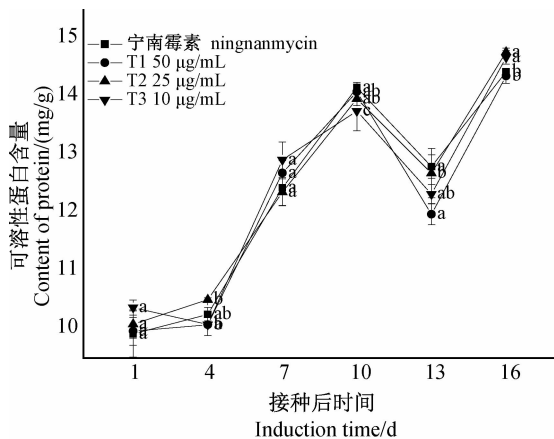


注:不同小写字母表示不同处理5%水平下差异显著。

Note: Different small letters are significant difference at 5%.

图 10 不同浓度壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液处理 (T1 ~ T3) 下丙二醛的含量变化

Fig. 10 Changes of MDA content under treatment of oligochitosan quaternary ammonium salt derivative silver nanoparticles (T1 - T3)



注:不同小写字母表示不同处理5%水平下差异显著。

Note: Different small letters are significant difference at 5%.

图 11 不同浓度壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液处理 (T1 ~ T3) 下可溶性蛋白的含量变化

Fig. 11 Changes of soluble protein content under treatment of oligochitosan quaternary ammonium salt derivative silver nanoparticles (T1 - T3)

### 3 结论与讨论

1) 以壳寡糖为原料,经氨甲基化、烷基化和缩合3步反应合成了新的壳寡糖季铵盐衍生物,进一步以其作为还原剂和保护剂与银氨溶液反应制备了壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液。研究发现,当银氨溶液浓度为  $4.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 、壳寡糖季铵盐衍生物的质量浓度为  $1 \text{ mg/mL}$ 、反应温度为  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 、反应

时间为  $30 \text{ min}$  时,制得的壳寡糖季铵盐衍生物纳米银的溶液分散性好,粒径在  $7 \sim 12 \text{ nm}$ 。

2) 珊西烟上的盆栽试验结果表明,不同浓度的纳米银溶液对 TMV 枯斑的抑制效果均较好,其中以  $25 \text{ } \mu\text{g/mL}$  的纳米银溶液抑制效果最好,为  $74.0\%$ ,比  $50\%$  的壳寡糖溶液和  $2\%$  宁南霉素水剂分别高  $41.5\%$  和  $24.4\%$ ;与壳寡糖相比,壳寡糖季铵盐衍生物溶液具有较好的枯斑抑制效果。在由壳寡糖季铵盐衍生物生成纳米银的过程中,壳寡糖季铵盐结构中的酚羟基与银离子作用会被氧化成醌类结构<sup>[24]</sup>,也可能加强其生物活性,包括对病毒的抑制作用。研究表明,一些酚类和醌类物质对番茄黄化曲叶病毒、I 型人疱疹病毒等具有较好的抑制作用<sup>[25-26]</sup>,本课题组合成的具有酚羟基结构的壳寡糖希夫碱纳米银溶液也表现出了较强的抑菌作用<sup>[24]</sup>。本研究表明,壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液对 TMV 枯斑的抑制效果明显优于壳寡糖季铵盐衍生物溶液,这可能与纳米银中所含的酚类或醌类的抗病毒活性有关,也可能与纳米银自身或壳寡糖的抗病毒活性<sup>[4-5,27]</sup>有关,或者跟酚类或醌类的抗病毒活性与纳米银和壳寡糖的抗病毒活性的协同作用有关。

3) 通过盆栽试验对壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液的诱导烟株抗 TMV 活性进行了初步研究,在普通烟 K326 上测定了不同浓度的纳米银溶液处理后与抗病性相关的酶 SOD、POD、PPO 活性的变化规律。活性氧是植物正常代谢过程中的有毒副产物,其积累可导致膜脂过氧化。有研究表明,与活性氧清除有关的防御酶包括 SOD、POD、PPO 等。杜昱光等<sup>[28-31]</sup>发现,感染 TMV 的烟叶经壳寡糖处理后其防御酶活性得到提高,本研究也得到了类似的结果。与目前国内广泛用来防治 TMV 的药剂宁南霉素相比,一定浓度的壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液也可明显提高叶片中 SOD、POD 和 PPO 的活性,从而达到对活性氧的有效清除,提高烟草的抗病性。这表明壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液可诱导烟草对 TMV 产生抗性。

4) 丙二醛是细胞膜膜脂氧化的最终产物,丙二醛的积累对植物具有毒害作用,其含量的高低反映了细胞膜质的过氧化水平以及植物对逆境条件反映的强弱<sup>[32]</sup>。本研究结果表明:喷施一定浓度的壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液在一定时期内可有效降低烟叶中丙二醛的含量。可溶性蛋白属于渗透调节物质,可阻碍氧自由基的产生<sup>[33]</sup>。研究表明,染



病的植物组织细胞内可溶性蛋白质含量降低<sup>[34]</sup>。王海河等<sup>[35]</sup>研究发现,受黄瓜花叶病毒(CMV)感染的烟草(K326)叶片中可溶性蛋白含量在病毒感染初期到症状出现时明显升高,之后随着症状的加重,含量逐渐降低。本研究表明,一定浓度的壳寡糖季铵盐衍生物纳米银溶液可提高叶片中可溶性蛋白的含量,从而提高烟草的抗病性。

## 参考文献(Reference):

[1] Zhang Hu, Du Yuguang, Yu Xingju, *et al.* Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme[J]. *Carbohydr Res*, 1999, 320(3-4): 257-260.

[2] Hadwiger L A, Ogawa T, Kuyama H. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1994, 7(4): 531-533.

[3] Xu Junguang, Zhao Xiaoming, Han Xiuwen, *et al.* Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro* [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2007, 87(3): 220-228.

[4] Feng B, Chen Y, Zhao C, *et al.* Isolation of a novel Ser/Thr protein kinase gene from oligochitosan-induced tobacco and its role in resistance against tobacco mosaic virus [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44(10): 596-603.

[5] Zhao Xiaoming, She Yuguang, Du Yaoping, *et al.* Induction of antiviral resistance and stimulatory effect by oligochitosan in tobacco[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2007, 87(1): 78-84.

[6] Pospieszny H, Chirkov S, Atabekov J. Induction of antiviral resistance in plants by chitosan[J]. *Plant Sci*, 1991, 79(1): 63-68.

[7] Chircov S N, Il'ina A V, Surgucheva N A, *et al.* Effect of chitosan on systemic viral infection and some defense responses in potato plants[J]. *Russian J Plant Physiol*, 2001, 48(6): 774-779.

[8] 朱传方, 吴爱斌, 徐汉虹. 2,4-二羟基苯乙酮席夫碱化合物的合成[J]. *化学试剂*, 2001, 23(3): 150-151.  
Zhu Chuanfang, Wu Aibin, Xu Hanhong. Synthesis of 2,4-dihydroxyacetophenone Schiff base[J]. *Chem Reagents*, 2001, 23(3): 150-151. (in Chinese)

[9] 高兴文, 蔡学建, 宋宝安, 等. 4-(3H)-喹啉酮类 Schiff 碱的合成与抗烟草花叶病毒活性[J]. *有机化学*, 2008, 28(10): 1785-1791.  
Gao Xingwen, Cai Xuejian, Song Bao'an, *et al.* Synthesis and anti-tobacco mosaic virus activity of 4-(3H)-Quinazolinone Schiff base[J]. *Chin J Org Chem*, 2008, 28(10): 1785-1791. (in Chinese)

[10] 孟凡德, 赵全芹, 李明霞, 等. 银-氨基酸席夫碱配合物的合成、表征及对烟草花叶病毒抑制作用初探[J]. *化学试剂*, 2000, 22(3): 176-177.  
Meng Fande, Zhao Quanqin, Li Mingxia, *et al.* Synthesis and

characterization of Ag(I)-amino acid Schiff base complexes and inhibition to tobacco mosaic virus [J]. *Chem Reagents*, 2000, 22(3): 176-177. (in Chinese)

- [11] Huang Junmin, Chen Ruyu. An overview of recent advances on the synthesis and biological activity of  $\alpha$ -aminophosphonic acid derivatives[J]. *Heteroatom Chem*, 2000, 11(7): 480-492.
- [12] Miao Zhiwei, Fu Cuirong, Wang Bin, *et al.* Synthesis and electrospray ionization mass spectra of N-(1, 3, 2-dioxaphosphorinan-2-ylmethyl) thiophosphoramidates [J]. *Chin J Chem*, 2007, 25(9): 1344-1348.
- [13] 赵小明, 尹恒. 寡糖免疫调节剂(疫苗)在作物上的应用 [C]. 2011.  
Zhao Xiaoming, Yin Heng. The application of oligochitosan on crop [C]. 2011.
- [14] Fang Xubin, Fang Lei, Gou Shaohua, *et al.* Design and synthesis of dimethylaminomethyl-substituted curcumin derivatives/analogues: Potent antitumor and antioxidant activity, improved stability and aqueous solubility compared with curcumin [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(5): 1297-1301.
- [15] Hadidi A, Khetarpal R K, Koganezawa H. Plant Virus Disease Control [M]. St Paul, Minnesota: The American Phytopathol Society, 1998: 154-162.
- [16] French C J, Towers G H N. Inhibition of infectivity of potato virus X by flavonoids [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(9): 3017-3020.
- [17] Gooding G V Jr, Hebert T T. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities [J]. *Phytopathology*, 1967, 57(11): 1285.
- [18] 李虎林, 白青竹, 姬文秀, 等. 不同类型烟草叶片叶绿素和类胡萝卜素含量比较分析[J]. *延边大学农学学报*, 2008, 30(3): 153-156.  
Li Hulin, Bai Qingzhu, Ji Wenxiu, *et al.* Comparison and analysis of chlorophyll and carotenoid content in leaves for different kind of tobacco[J]. *J Agri Sci Yanbian Univ*, 2008, 30(3): 153-156. (in Chinese)
- [19] 刘炳辉, 董晓颖, 李志军, 等. 硬肉桃果实成熟前后几种与果实软化相关的生理指标的变化[J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(5): 887-890.  
Liu Binghui, Dong Xiaoying, Li Zhijun, *et al.* Changes in several physiological indexes related to fruit softening of crisp peach fruits before and after ripening [J]. *Plant Physiol J*, 2008, 44(5): 887-890. (in Chinese)
- [20] Chen Yafei, Zhan Yong, Zhao Xiaoming, *et al.* Functions of oligochitosan induced protein kinase in tobacco mosaic virus resistance and pathogenesis related proteins in tobacco [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47(8): 724-731.
- [21] 李靖, 利容千, 袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. *植物病理学报*, 1991, 21(4): 277-283.  
Li Jing, Li Rongqian, Yuan Wenjing. On the change of enzyme activities of cucumber leaf infected by pseudoperonospora cubensis (Berk, ET CTRT) rosus [J].

- Acta Phytopathol Sinica*, 1991, 21 (4): 277 - 283. (in Chinese)
- [22] 张龙翔, 张廷芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 312 - 313.  
Zhang Longxiang, Zhang Tingfang, Li Lingyuan. Method and Technique of Biochemical Experiment[M]. 2nd Ed. Beijing: Higher Education Press, 1997: 312 - 313. (in Chinese)
- [23] 赵世杰, 许长成, 邹琦, 等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 1991, 30(3): 207 - 210.  
Zhao Shijie, Xu Changcheng, Zou Qi, et al. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues [J]. *Plant Physiol Commu*, 1991, 30(3): 207 - 210. (in Chinese)
- [24] Wang Zhimin, Xu Cuilian, Zhao Mingqin, et al. One-pot synthesis of narrowly distributed silver nanoparticles using phenolic-hydroxyl modified chitosan and their antimicrobial activity[J]. *RSC Adv*, 2014, 4(87): 47021 - 47030.
- [25] 王春梅. 丁香酚和接种番茄黄化曲叶病毒对番茄几丁质酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的影响[J]. 江西农业学报, 2013, 25(9): 78 - 80.  
Wang Chunmei. Effects of eugenol and TYLCV inoculation on activities of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in tomato[J]. *Acta Agri Jiangxi*, 2013, 25(9): 78 - 80. (in Chinese)
- [26] 杨虹, 邓成国, 张端莲, 等. 虎杖多种醌类化合物对I型人疱疹病毒感染豚鼠皮肤的感染率分析[J]. 数理医药学杂志, 2004, 17(4): 306 - 307.  
Yang Hong, Deng Chengguo, Zhang Duanlian, et al. Tissue change of on antiviral effect of ethy acetate extract component of *Rhizoma polygong cuspidate* on human simplex virus-I[J]. *J Math Med*, 2004, 17(4): 306 - 307. (in Chinese)
- [27] Lu Lei, Sun R W Y, Chen Rong, et al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication[J]. *Antivir Ther*, 2008, 13(2): 253 - 262.
- [28] 惠娜娜, 郭成瑾, 高文静, 等. 壳寡糖诱导和TMV侵染烟草防御酶活性的变化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(3): 213 - 216.  
Hui Nana, Guo Chengjin, Shang Wenjing, et al. Changes of activities of defensive enzymes in tobacco leaves treated with chito-oligosaccharide and inoculated with TMV [J]. *J Northwest A & F Univ (Nat Sci Ed)*, 2007, 35(3): 213 - 216. (in Chinese)
- [29] 杜昱光, 白雪芳, 赵小明, 等. 壳寡糖对烟草防御酶活性及同工酶酶谱的影响[J]. 中国生物防治, 2002, 18(2): 83 - 86.  
Du Yuguang, Bai Xuefang, Zhao Xiaoming, et al. The effect of oligochitosan on the activity of defensive enzyme and zymogram of isoenzyme in tobacco leaves [J]. *Chin J Biol Control*, 2002, 18(2): 83 - 86. (in Chinese)
- [30] 马镛, 赵秀香, 吴元华. 壳寡糖对烟草花叶病毒的抑制作用及其对烟草酶活性的影响[J]. 中国生物防治, 2008, 24(2): 154 - 158.  
Ma Di, Zhao Xiuxiang, Wu Yuanhua. Inhibition of chito-oligosaccharide against plant virus diseases [J]. *Chin J Biol Control*, 2008, 24(2): 154 - 158. (in Chinese)
- [31] 郭卫华, 赵小明, 杜昱光. 壳寡糖对烟草幼苗生长和光合作用及其相关生理指标的影响[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(6): 1155 - 1157.  
Guo Weihua, Zhao Xiaoming, Du Yuguang. Effects of oligochitosan on the growth and photosynthesis and physiological index related to photosynthesis of tobacco seedlings [J]. *Plant Physiol Commun*, 2008, 44(6): 1155 - 1157. (in Chinese)
- [32] 蒋靓, 庄杰云, 樊叶杨, 等. 与水稻耐逆性相关的叶片丙二醛含量的 QTL 分析[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(4): 436 - 438.  
Jiang Jing, Zhuang Jieyun, Fan Yeyang, et al. QTL mapping for leaf malondialdehyde content associated with stress tolerance in rice [J]. *Chinese J Rice Sci*, 2007, 21(4): 436 - 438. (in Chinese)
- [33] 彭志红, 彭克勤, 胡家金. 渗透胁迫下植物脯氨酸积累的研究进展[J]. 中国农学通报, 2002, 18(4): 80 - 83.  
Peng Zhihong, Peng Keqin, Hu Jiajin. Research progress on accumulation of proline under osmotic stress in plants [J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2002, 18(4): 80 - 83. (in Chinese)
- [34] 景岚, 王丽芳, 康俊. 不同抗性的向日葵品种接种锈菌后叶片中可溶性蛋白、可溶性总糖及叶绿素含量的变化[J]. 临沂师范学院学报, 2008, 30(6): 76 - 80.  
Jing Lan, Wang Lifang, Kang Jun. Changes of soluble protein, total sugar and chlorophyll in the leaves of different resistant sunflower varieties [J]. *J Linyi Teachers Univ*, 2008, 30(6): 76 - 80. (in Chinese)
- [35] 王海河, 蒋继宏, 吴祖建, 等. 黄瓜花叶病毒 M 株系 RNA3 的变异分析及全长克隆的构建[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(2): 180 - 185.  
Wang Haihe, Jiang Jihong, Wu Zujian, et al. Diversity analysis of RNA3 of cucumber mosaic virus strain M and construction of its full-length cDNA clone [J]. *J Agri Biotechnol*, 2000, 8(2): 180 - 185. (in Chinese)

(责任编辑: 金淑惠)