河南农业科学，2014，43(4)：89-93
Journal of Henan Agricultural Sciences

不同制剂对感染 TMV 烟叶活性氧及抗氧化率的影响

刘　晗[1]，**刘华山**[1,2*]，**韩锦峰**[1]，**潘光伟**[1]，**郭盘盘**[2]
（1. 河南农业大学 农学院，河南 郑州 450002；2. 河南农业大学 生命科学学院，河南 郑州 450002）

摘要：为了防治烟草普通花叶病，研究了不同类型制剂对感染烟草花叶病毒（TMV）烟叶的活性氧含量、活性氧清除率及抗氧化率的影响。结果表明，同正常叶片相比，感染 TMV 烟叶的 $O_2^{\bar{\cdot}}$、·OH、H_2O_2 含量升高，而活性氧清除率及抗氧化率下降，施用不同制剂后，烟叶的活性氧含量降低，清除率及抗氧化率升高。与受害对照相比，喷施中草药配伍制剂处理 20 d 时，烟叶中的 $O_2^{\bar{\cdot}}$、·OH、H_2O_2 含量分别降低了 67.5%、60.0%、57.5%，$O_2^{\bar{\cdot}}$、·OH 清除率及抗氧化率分别提高了 57.3%、57.2%、75.6%。喷施制剂能降低感染 TMV 烟叶的活性氧含量，其中中草药配伍制剂效果好于化学制剂和抗生素试剂，并且制剂的预防效果优于治疗效果。

关键词：烟草；烟草花叶病毒；制剂；活性氧；抗氧化率
中图分类号：S572　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1004-3268(2014)04-0089-05

Effects of Different Preparations on Active Oxygen and Antioxidation Rate of TMV-Infected Tobacco Leaves

LIU Han[1]，LIU Hua-shan[1,2*]，HAN Jin-feng[1]，PAN Guang-wei[1]，GUO Pan-pan[2]
(1. College of Agronomy，Henan Agricultural University，Zhengzhou 450002，China；
2. College of Life Sciences，Henan Agricultural University，Zhengzhou 450002，China)

Abstract：With purpose to prevent and offer treatment to tobacco mosaic virus(TMV)，a research has been conducted for the possible influence of a variety of preparations on the active oxygen content，clearance ratio of active oxygen and antioxidant rate of tobacco leaves with infection of TMV. Findings indicated that the content of $O_2^{\bar{\cdot}}$，·OH and H_2O_2 in the TMV-infected tobacco leaves surged while the clearance ratio of active oxygen and antioxidant rate declined，if compared to the healthy leaves. Following the treatment of different preparations，the active oxygen content went down with the climbing clearance ratio and antioxidant rate. Contrasted to the harmed，the $O_2^{\bar{\cdot}}$，·OH and H_2O_2 content of leaves fell by 67.5%，60.0% and 57.5% respectively whilst the clearance ratio of $O_2^{\bar{\cdot}}$，·OH and the antioxidant rate for them conversely went up by 57.3%，57.2% and 75.6% respectively when the preparations with Chinese herbal medicine were applied. Offering the treatment of preparations can effectively reduce the active oxygen content of the TMV-infected tobacco leaves. And among all these preparations，the Chinese-herbal-medicine ones，which focus the attention on the function of prevention rather than cure，are more effective than the chemical and antibiotic preparations.

Key words：tobacco；TMV；preparation；active oxygen；antioxidation rate

烟草普通花叶病主要由烟草花叶病毒（tobacco mosaic virus，TMV）引起，是危害严重的病毒性病害，严重影响烟叶的产量和品质。据报道，全世界每年因烟草花叶病危害造成的损失达 1 亿多美元[1]。由于烟草花叶病毒对寄主的专性寄生性，加上植物缺乏完整的免疫代谢系统，使得烟草花叶病的防治十分困难。被 TMV 感染后，烟株产生大量的活性氧（roactive oxygen species，ROS）[2]，包括超氧阴离

收稿日期：2013-12-05
作者简介：刘　晗（1987-），男，河南南阳人，在读硕士研究生，研究方向：烟草栽培生理。E-mail：8925652llh@163.com
*通讯作者：刘华山（1951-），女，辽宁盖州人，教授，博士生导师，主要从事烟草栽培生理生化研究。E-mail：liuhs602@sina.com

子自由基($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基(·OH)、过氧化氢(H_2O_2)等。这些活性氧的产生一方面对烟株起保护作用,如参与过敏反应、诱导烟株合成植保素、调控防卫基因的表达[3];但另一方面,这些大量产生的活性氧会损伤叶绿体、线粒体等细胞器,引发膜脂过氧化,导致 DNA 链的断裂以及蛋白质的损伤[4-5]。

近年来,国内外学者进行了大量防治烟草花叶病药剂的研究,并取得了一定成果[6-8]。但是大部分都是单一类型制剂对烟草普通花叶病的防治研究,而关于不同类型制剂对感染 TMV 烟株叶片活性氧的影响尚未见报道,鉴于此,研究了 3 种不同类型制剂对感染 TMV 烟叶活性氧含量、活性氧清除率及抗氧化率的影响,旨在为大田普通烟草花叶病的预防和治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试烤烟品种为 K326,采用漂浮育苗。中草药配伍制剂采用熬制中草药的方法制成,主要原料为商陆、白花蛇草、黄芩等具有抗病毒作用的中草药;化学制剂的主要成分为壳寡糖,主要作用为提高烟叶中保护酶的含量,进而提高烟叶对 TMV 的抗性;抗生素制剂主要成分为多肽抗生素,主要作用是抑制 TMV 的繁殖。化学制剂和抗生素制剂均由河南农业大学作物生理实验室复配而成。TMV 毒源保存在 K326 上,使用前采用 Gooding 等[9]的方法进行提纯。

1.2 试验设计

烟苗长出 8 片叶时,将其移入塑料盆中(盆直径 25 cm,高 40 cm),待生长至 10 片叶时,选择生长一致的烟株进行处理,共设 8 个处理。其中,2 个对照处理,即正常对照(CK1):健康烟株喷施清水,受害对照(CK2):感病烟株喷施清水;3 个预防处理,即 A1:先喷施中草药配伍制剂后接种 TMV 毒液,A2:先喷施化学制剂后接种 TMV 毒液,A3:先喷施抗生素制剂后接种 TMV 毒液;3 个治疗处理,即 B1:接种 TMV 毒液 24 h 后喷施中草药配伍制剂,B2:接种 TMV 毒液 24 h 后喷施化学制剂,B3:接种 TMV 毒液 24 h 后喷施抗生素制剂。每个处理重复 3 次。

1.3 烟叶接种及取样方法

选取烟草的同一叶位(由上而下第 4～6 片叶)进行处理。先用金刚砂摩擦叶片,形成微伤口,然后用毛笔接种毒液,24 h 后喷施制剂(或先喷施制剂,24 h 后接种毒液)。在处理后的第 5、10、15、20 天取样,取中部叶,将叶片叶脉、叶尖和叶基部去除后剪碎混匀,称取质量,用液氮速冻 15 min 后,放入 −40 ℃冰箱保存,待测各项生理指标。

1.4 测定项目及方法

$O_2^{\cdot-}$ 含量测定按照孙群等[10]的方法;·OH 含量测定按照王爱国等[11]的方法,略有改进;H_2O_2 含量测定参照 Kang 等[12]的方法;$O_2^{\cdot-}$ 清除率的测定参照罗学平[13]的方法;·OH 清除率及抗氧化率测定采用李玲[14]的方法。

2 结果与分析

2.1 不同制剂对感染 TMV 烟叶 $O_2^{\cdot-}$ 含量的影响

$O_2^{\cdot-}$ 在生物体内具有很强的毒害作用[15-17],它能启动膜脂不饱和脂肪酸的过氧化作用,而在过氧化作用过程中又会产生 $O_2^{\cdot-}$,如此反复,使质膜受到严重伤害[18]。由图 1 可以看出,感染 TMV 的病叶(CK2)中 $O_2^{\cdot-}$ 含量最高,而不论是先喷施制剂还是后喷施制剂,处理烟叶中的 $O_2^{\cdot-}$ 含量均较受害对照明显降低,这表明喷施制剂能够减少感染 TMV 烟叶中 $O_2^{\cdot-}$ 的含量,在预防处理第 20 天时,相比受害对照,中草药配伍制剂使 $O_2^{\cdot-}$ 含量降低 67.5%。由图 1 还可看出,同种制剂处理中,先喷施制剂的 $O_2^{\cdot-}$ 含量均低于后喷施制剂的,表明制剂的预防效果比治疗效果更好。3 种制剂降低病叶中 $O_2^{\cdot-}$ 含量的效果表现为中草药配伍制剂>化学制剂>抗生素试剂。

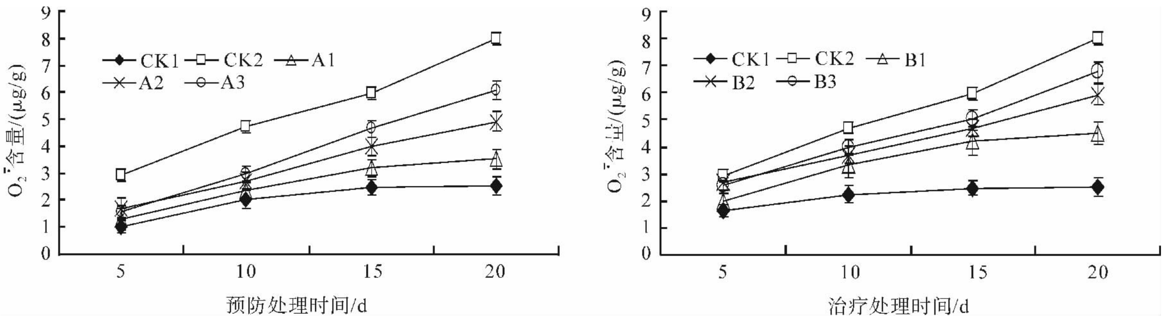


图 1 不同制剂对感染 TMV 烟叶 $O_2^{\cdot-}$ 含量的影响

2.2　不同制剂对感染 TMV 烟叶·OH 含量的影响

·OH 可与糖、蛋白质、核酸及脂类等发生氧化反应,引起生物膜脂发生过氧化。图 2 显示,各种制剂不论是先喷施还是后喷施,感染 TMV 烟叶中的·OH 含量均降低,其中在预防处理第 20 天时,相比受害对照,中草药配伍制剂降低·OH含量 60.0%。同种制剂处理中,先喷施制剂对·OH 含量的降低效果好于后喷施。其中,中草药配伍制剂降低·OH 的效果好于另外 2 种制剂。

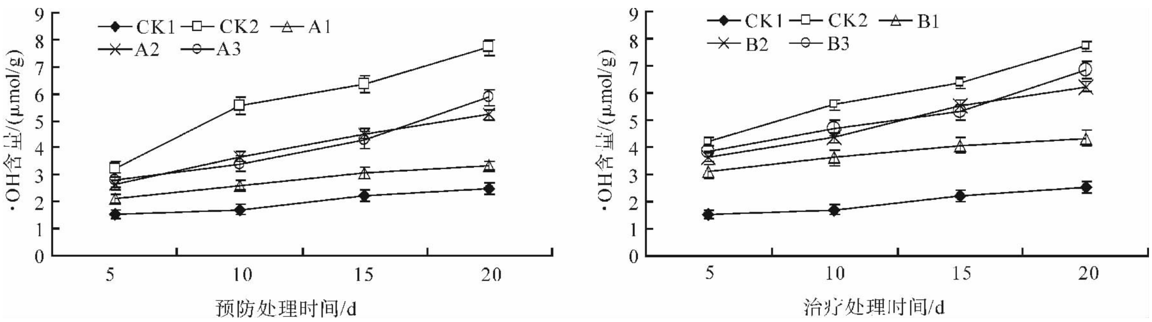


图 2　不同制剂对感染 TMV 烟叶·OH 含量的影响

2.3　不同制剂对感染 TMV 烟叶 H_2O_2 含量的影响

正常条件下,H_2O_2 在植株体内不断产生,又不断被清除,维持在极低的有利无害的水平。从图 3 可以看出,受害对照烟株叶片中 H_2O_2 含量最高,而无论是先喷施制剂还是后喷施制剂,都能使 H_2O_2 含量降低,并且同种制剂处理中,先喷施制剂对 H_2O_2 含量的降低效果好于后喷施制剂,这表明制剂的预防效果好于治疗效果。其中,中草药配伍制剂对 H_2O_2 含量的降低效果最好,在预防处理第 20 天时,相比受害对照,其使 H_2O_2 含量降低 57.5%。

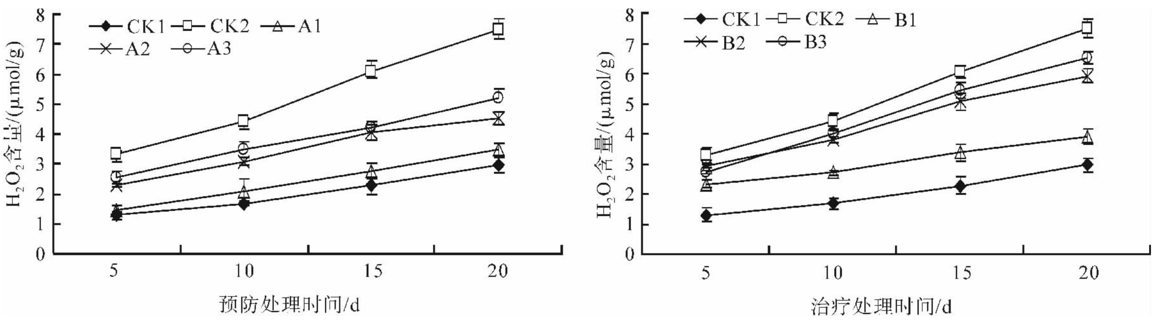


图 3　不同制剂对感染 TMV 烟叶 H_2O_2 含量的影响

2.4　不同制剂对感染 TMV 烟叶 $O_2^{\cdot-}$ 清除率的影响

$O_2^{\cdot-}$ 清除率表示植物清除体内 $O_2^{\cdot-}$ 的能力。由图 4 可知,不同制剂清除 TMV 烟叶中 $O_2^{\cdot-}$ 的效果存在差异,先喷施制剂的清除效果优于后喷施制剂,并且随着处理时间的增加,各处理 $O_2^{\cdot-}$ 清除率呈升高的趋势。各种制剂对病叶中 $O_2^{\cdot-}$ 的降低效果依次为 A1>A2>A3,B1>B2>B3。预防处理第 20 天,中草药配伍制剂、化学制剂及抗生素制剂对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率分别达到 68.9%、62.8%、57.7%,其中相比受害对照,中草药配伍制剂使烟叶的 $O_2^{\cdot-}$ 清除率提高了 57.3%。

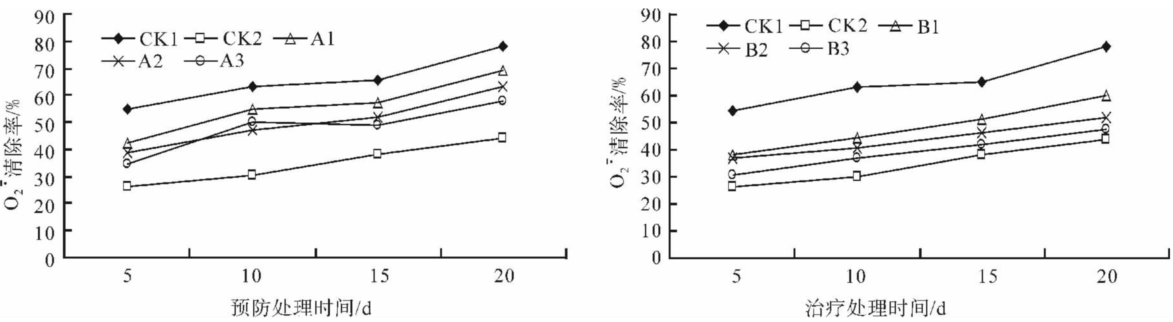
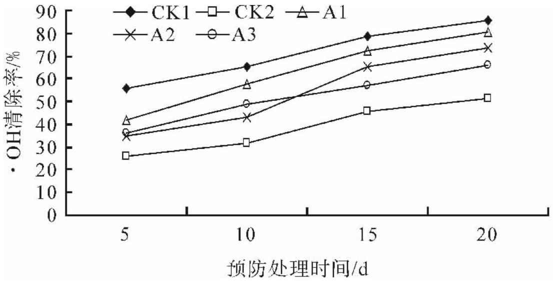


图 4　不同制剂对感染 TMV 烟叶 $O_2^{\cdot-}$ 清除率的影响

2.5 不同制剂对感染TMV烟叶·OH清除率的影响

·OH清除率反映植物清除体内·OH的能力。图5显示,随着处理时间的延长,·OH清除率呈升高趋势。受害对照的·OH清除率明显低于其他处理,表明不同制剂对·OH有明显的清除效果,但是清除率仍低于正常对照,并且先喷施制剂的清除效果好于后喷施制剂的。预防处理第20天,中草药配伍制剂、化学制剂、抗生素制剂对感染TMV烟叶中·OH的清除率达80.5%、73.4%、65.9%,其中相比受害对照,中草药配伍制剂使烟叶·OH清除率提升最高,幅度达到57.2%。



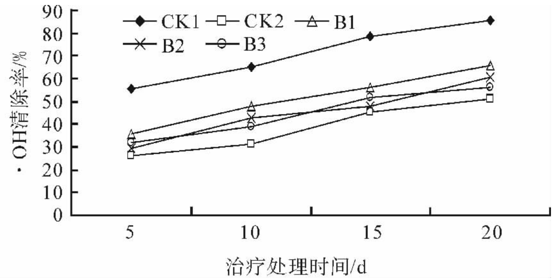
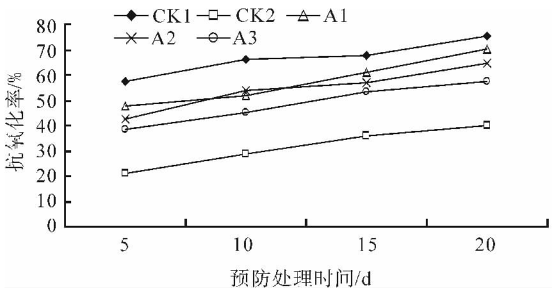


图5 不同制剂对感染TMV烟叶·OH清除率的影响

2.6 不同制剂对感染TMV烟叶抗氧化率的影响

抗氧化率是反映植株自身抵抗氧化的能力。从图6可以看出,烟草叶片的抗氧化率随着处理时间的延长呈升高的趋势,并且受害对照的抗氧化率最低,经制剂喷施后抗氧化率均升高,但仍低于正常对照。预防处理第20天,中草药配伍制剂、化学制剂和抗生素制剂处理感染TMV烟叶的抗氧化率可以达到70.3%、64.7%、57.4%,其中,中草药配伍制剂对烟叶抗氧化率的提升效果最好,幅度达到75.6%,叶片的抗氧化率最接近于正常对照,并且制剂的预防效果要好于治疗效果。



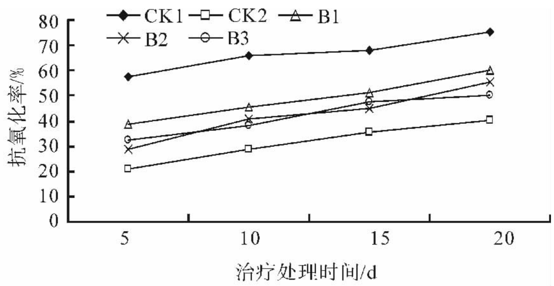


图6 不同制剂对感染TMV烟叶抗氧化率的影响

3 结论与讨论

本试验结果表明,烟株感染TMV后,活性氧含量会急剧上升,这与刘华山等[19]的研究结果一致,而喷施制剂后,感染TMV烟株的叶片内O_2^{-}、·OH、H_2O_2含量均明显下降,活性氧清除率提高,这也与刘华山等[20]的研究结果一致。由于烟株叶片活性氧清除率升高致使活性氧含量下降,这就使活性氧含量维持在一个动态平衡状态,减少了活性氧对烟株的危害,这与马志卿等[21]、曹慧等[22]的研究结果一致。

植物体内的许多天然产物和它们的衍生物具有很好的抗氧化能力,能够对抗或减缓氧自由基对机体造成的破坏作用,提高抗氧化率,从而增强烟株的抗性[23]。感染TMV的烟株与正常烟株相比,其抗氧化率下降,喷施制剂后逐渐升高,这可能是由于制剂能诱导烟株体内多种抗病防卫反应的发生,从而提高了烟株的抗氧化能力。

本试验结果显示,喷施3种制剂均使烟株叶片活性氧含量降低,O_2^{-}、·OH清除率以及抗氧化率升高,其中以中草药配伍制剂的效果最好,这可能是由于中草药配伍制剂中含有的一些生物有效成分,一方面破坏了TMV病毒粒子,使其感染作用减弱[24];另一方面又使烟株体内抗氧化酶含量升高,降低TMV感染对烟株的危害,但中草药配伍制剂中的有效成分如何作用于TMV和烟叶以及这些有效成分中的主要物质是什么,还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Mcgrath M T, Shishkoff N. Evaluation of biocompati-

ble products for managing cucurbit powdery mildew [J]. Crop Protect,1999,18:471-478.

[2] Doke N,Ohashi Y. Involvement of $O_2^{\cdot -}$ generation system in the induction of necrotic lesions on tobacco leves infected with TMV[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1988,32:163-168.

[3] 郑荣梁,黄中洋. 自由基生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2007:290-291.

[4] Gomes J M,Hemand J A. Differential response of antioxidantive enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants[J]. Free Radic Res,1999,31:11-18.

[5] Taylar N L,Day D A,Millar A H. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism[J]. Exp Botany,2004,55:1-10.

[6] 陈启建,刘国坤,吴祖建,等. 26 种植物提取物抗烟草花叶病毒活性[J]. 福建农林大学学报,2004,19(3):300-303.

[7] 喻大昭,周忠良,杨振荣,等. 病毒抑制剂防治烟草花叶病田间试验[J]. 烟草科技,2003(8):46-48.

[8] 朱春玉,吴元华,赵秀香,等. 嘧肽霉素抗烟草花叶病毒作用机理初步研究[J]. 植物病理学报,2006,36(4):314-316.

[9] Gooding G V,Hebert T A. A simple technique forpurification of tobacco mosaic virus in large quantities[J]. PhytopathoIogy,1967,57:1255-1289.

[10] 孙群,胡景江. 植物生理学研究技术[M]. 杨凌:西北农林科技大学出版社,2003:174-176.

[11] 王爱国,罗广华. 羟自由启动脱氧核糖降解及 TBA 反应[J]. 生物化学与生物物理进展,1993,20(2):150-152.

[12] Kang G Z,Wang Z X,Sun G C. Participation of H_2O_2 in enhancement of cold chilling by salicylic acid in banana seedlings[J]. Acta Botanica Sinica,2003,45(5):567-573.

[13] 罗学平. 儿茶素及其氧化产物与茶多糖清除氧化自由基的研究[J]. 福建茶叶,2007(4):26-28.

[14] 李玲. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京:科学出版社,2009:92-95.

[15] 陈由强. 植物体内单线态氧的产生及其猝灭[J]. 植物生理学通讯,1987(1):1-5.

[16] Dhindsa R S,Dhindsa P P,Thorpe T A. Leaf senescence:Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide ismutase and catalase[J]. J Exp Bot,1981,32:93-97.

[17] 陈贻竹,帕特森. 低温对植物叶片超氧物歧化酶,过氧化氢酶和过氧化物酶水平的影响[J]. 植物生理学报,1988,14(4):323-328.

[18] 陈由强,叶冰莹,朱锦懋,等. 渗透胁迫对花生幼叶活性氧伤害和膜脂过氧化作用的影响[J]. 中国油料作物学报,2000,22(1):53-56.

[19] 刘华山,李晶新,韩锦峰,等,二氯喹啉酸胁迫下 SNP 对烟苗活性氧及保护酶系统的修复效应[J]. 华北农学报,2010,25(2):156-159.

[20] 刘华山,孟南,韩锦峰,等. 植物提取液对感染 TMV 烟叶中自由基含量及 TMV 增殖的影响[J]. 河南农业科学,2010(12):88-91.

[21] 马志卿,殷培军,郭志波,等. 植物源病毒抑制剂 VFB 诱导烟草花叶病毒机理的初步研究[J]. 植物病理学报,2007,37(3):296-300.

[22] 曹慧,兰彦平,曹冬梅,等. 水分胁迫对短枝型苹果叶片活性氧清除酶类活性的影响[J]. 山西农业科学,2000,28(4):48-51.

[23] 朱树华,刘孟臣,周杰. 一氧化氮熏蒸对采后肥城桃果实细胞壁代谢的影响[J]. 中国农业科学,2006,39(9):1878-1884.

[24] 刘华山,白海群,韩锦峰,等. 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[J]. 中国农业科学,2010,43(5):957-964.