

# 植物提取液对感染 TMV 烟叶中自由基含量及 TMV 增殖的影响

刘华山<sup>1</sup>, 孟 南<sup>1</sup>, 韩锦峰<sup>1\*</sup>, 左 涛<sup>1</sup>, 王晓军<sup>1</sup>, 陈秀华<sup>2</sup>, 范艺宽<sup>2</sup>, 白海群<sup>3</sup>

(1. 河南农业大学, 河南 郑州 450002; 2. 河南省烟草公司, 河南 郑州 450001;

3. 云南省普洱市烟草公司, 云南 普洱 665000)

**摘要:** 研究了商陆、落葵、毛叶子花和配伍植物(板蓝根等 20 种植物混合)的水提取液对感染 TMV 烟叶中自由基含量和 TMV 增殖的影响, 并探讨了其防治 TMV 的效果。结果表明, 不论在接种 TMV 毒液之前施用, 还是接毒后施用上述植物提取液都能使  $O_2^-$  和  $^{\circ}OH$  含量降低, 且对 TMV 增殖有较好的抑制作用, 其中配伍植物提取液对 TMV 的防治效果优于单一植物提取液, 并且预防效果大于治疗效果。

**关键词:** 植物提取液; 自由基; TMV 增殖; 防治效果

中图分类号: S435.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2010)12-0088-04

## Inhibitory Effects of Plant Extracts on Free Radicals and Multiplication of TMV in Treated Tobacco

LIU Hua-shan<sup>1</sup>, MENG Nan<sup>1</sup>, HAN Jin-feng<sup>1\*</sup>, ZUO Tao<sup>1</sup>, WANG Xiao-jun<sup>1</sup>,

CHEN Xiu-hua<sup>2</sup>, FAN Yi-kuan<sup>2</sup>, BAI Hai-qun<sup>3</sup>

(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Tobacco Corporation, Zhengzhou 450001, China; 3. Puer Tobacco Corporation of Yunnan Province, Puer 665002, China)

**Abstract:** The inhibitory effects of plant extracts on free radicals and multiplication of TMV were studied. The results showed that the single plant extracts and mixture extracts of many plants had strong inhibitory effects on free radicals and multiplication of TMV either before or after inoculation by TMV. The mixture extract had better effects than any single extract in controlling TMV. The defending effect was greater than curing effect.

**Key words:** Plant extracts; Free radicals; Multiplication of TMV; Controlling effects

烟草普通花叶病毒病是对烟草生产危害极大的病害, 由烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)侵染引起。由于农业措施防治的局限性和化学防治易引发环保问题, 近年来不少研究者把注意力集中在用植物提取液防治 TMV 上, 从防治效果和作用机制上进行了多方面研究<sup>[1-6]</sup>。TMV 感染烟草后在烟株体内大量增殖, 造成烟株体内自由基大量的生成和积

累, 引起 DNA 损伤, 酶失活及膜脂氧化以及细胞死亡<sup>[7]</sup>。植物提取液对烟叶感染 TMV 后自由基产生和 TMV 增殖的影响尚未见报道, 为此, 研究了几种单一植物和多种配伍植物的提取液对感染 TMV 烟叶中自由基的影响及对 TMV 增殖的抑制效果, 旨在为深入探讨植物提取液防治 TMV 的作用机制和为生产上利用植物提取液防治 TMV 提供理论依据。

收稿日期: 2010-09-26

基金项目: 河南省烟草专卖局科学研究与技术开发项目(200812)

作者简介: 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: Lihhs602@sina.com

\*通讯作者: 韩锦峰(1934-), 男, 河南太康人, 教授, 主要从事烟草栽培生理生化研究。E-mail: Jinfenghan2002@126.com

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试系统侵染寄主为烤烟 K326 (*Nicotiana tobac*co cv K326), 检测 TMV 增殖用的是局部枯斑寄主心叶烟 (*N. glutinosa* L.), 均采用漂浮育苗。商陆 (*Phytolacca americana* L.)、落葵 (*Basella rubra* L.)、毛叶子花 (*Bougainvillea willd*) 及配伍植物 (板蓝根、商陆、落葵、毛叶子花、菠菜等 20 种植物混合) 用于制备提取液。TMV 毒源由中国农业科学院烟草研究所提供。

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, 设 9 个处理: ①接 TMV 毒液 (接毒); ②先施落葵提取液, 24 h 后接 TMV 毒液 (L+接毒); ③先接种 TMV 毒液, 24 h 后施落葵提取液 (接毒+L); ④先施毛叶子花提取液, 后接毒 (M+接毒); ⑤先接种毒液, 后施毛叶子花提取液 (接毒+M); ⑥先施商陆提取液, 后接毒液 (S+接毒); ⑦先接种毒液, 后施商陆提取液 (接毒+S); ⑧先施配伍植物提取液, 后接种毒液 (P+接毒); ⑨先接种毒液, 后施配伍植物提取液 (接毒+P)。每个处理 5 株, 5 次重复。

1.3 方法

1.3.1 提取液的制备 用水煎煮提取。材料与水质量比为 1 : 15, 按中药煎煮的方法, 先冷水浸泡 20 min, 第一次煎煮 30 min, 第二次煎煮 20 min, 均用 4~6 层纱布过滤, 2 次滤液合并, 使用时稀释 15 倍。

1.3.2 TMV 病毒的提纯 参考 Gooding 等<sup>[8]</sup>的方法。取 TMV 感染的烟叶, 冷冻, 加入 0.5 mol/L PBS, pH7.2 (含 0.1% 巯基乙醇和 0.01 mol/L EDTA-Na), 组织捣碎成匀浆, 双层纱布过滤, 得滤液; 5000 r/min 离心 20 min, 留上清液, 加 6% PEG, 1%

Triton X-100 和 0.1 mol/L NaCl, 磁力搅拌, 待 PEG 充分溶解, 4℃冰箱过夜; 8000 r/min 离心 25 min, 收取沉淀, 悬浮于 0.01 mol/L PBS, pH7.2 (含 0.1 mol/L MgCl<sub>2</sub>), 6000 r/min 离心 20 min, 得上清液; 加入 15% 蔗糖, 4000 r/min 离心 2 h, 收取沉淀物悬浮于 0.01 mol/L PBS, pH7.2, 10000 r/min 离心 15 min, 得上清液即为接毒液, 保存于一 20℃。

1.3.3 叶片接种 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 后喷施植物提取液 (或先喷施植物提取液, 24 h 后接种毒液)。

1.3.4 测定项目与方法 超氧阴离子自由基 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 及羟自由基 (·OH) 含量的测定按宋松泉等<sup>[9]</sup>的方法。

抑制率 = (对照株斑点数 - 处理株斑点数) / 对照株斑点数 × 100%,  
防治效果 = (对照株病情指数 - 处理株病情指数) / 对照株病情指数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同植物提取液对感染 TMV 烟叶中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量的影响

植物在正常情况下, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量维持在一个动态平衡, 一旦 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 增加, 会引起核酸破坏, 酶活性降低和膜脂氧化。由表 1 可以看出, 感染 TMV 的病叶 (CK) 中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量最高, 而不论是先施用植物提取液还是后施植物提取液, 处理烟叶中的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量都比对照有明显降低, 且达到显著水平, 表明植物提取液能减少感染 TMV 烟叶中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生。表 1 还显示, 同一组处理中, 先施用植物提取液的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量均比后施植物提取液的低, 这提示提取液的预防效果比治疗效果更好。各种植物提取液降低病叶中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量的效果依次为配伍植物提取液 > 落葵提取液 > 商陆提取液 > 毛叶子花提取液。

表 1 植物提取液对感染 TMV 烟叶中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量的影响 μmol/g

处理	处理时间/d			
	3	6	9	12
L+ 接毒液	17.86±1.05c	27.13±1.41c	14.52±0.43d	10.35±0.34e
接毒液+L	21.44±1.02b	29.55±1.52c	16.01±0.39c	12.16±0.41d
S+ 接毒液	17.26±0.98c	23.50±1.83b	18.12±0.48c	14.87±0.63c
接毒液+S	20.44±1.28b	28.93±1.42c	15.51±0.51c	15.56±0.51c
M+ 接毒液	18.86±0.99c	30.14±1.11c	22.55±1.81b	16.53±0.98b
接毒液+M	21.40±2.01b	32.23±1.35b	25.17±1.22b	17.05±1.02b
P+ 接毒液	12.52±1.11e	27.32±1.26d	10.51±0.56e	6.71±0.29f
接毒液+P	15.87±1.04d	32.53±1.17b	14.62±0.71d	10.50±0.24e
接毒液(CK)	32.53±2.15a	37.66±2.19a	43.58±2.72a	48.33±2.54a

注: 同列不同小写字母, 表示差异显著 (P> 0.05)。下同

2.2 不同植物提取液对感染 TMV 烟叶中 °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,也引起生物膜脂发生过氧化。如表 2 所示,与其对病叶中 O<sub>2</sub><sup>-</sup>含量的影响一样,植物提取液不论先喷施还是后喷施,都使病叶中的 °OH 含量迅速降低。同一组处理中,也是先施植物提取液对 °OH 降低效果优于后施植物提取液的,且达到显著水平,表明预防效果较治疗效果好一些。其中,配

伍植物提取液降低 °OH 含量的效果优于任一单一植物提取液。

2.3 不同植物提取液对 TMV 增殖的影响

由表 3 可以看出,配伍植物提取液抑制 TMV 增殖的效果最好,抑制率显著高于其他植物提取液,达到 67.17%~77.13%。落葵的抑制作用较差,为 50.63%~59.02%,商陆和毛叶子花的抑制效果居中。表 3 结果还显示,先用植物提取液处理的 TMV 增殖抑制效果优于后处理的。

表 2 不同植物提取液对感染 TMV 烟叶中 °OH 含量的影响 μmol/g

处理	处理时间/d			
	3	6	9	12
L+ 接毒液	2.67±0.25c	4.40±0.88e	7.38±103b	3.42±0.21d
接毒液+L	2.77±0.31c	5.22±1.01b	7.74±1.25b	3.70±0.19c
S+ 接毒液	2.56±0.42d	4.51±0.72c	6.89±1.14c	3.24±0.32d
接毒液+S	2.75±0.28c	4.78±1.02c	7.63±1.18b	3.76±0.22c
M+ 接毒液	2.47±0.21d	4.61±0.71c	7.05±1.09c	3.72±0.34c
接毒液+M	3.19±0.19b	4.90±0.68c	7.25±1.19b	4.07±0.23b
P+ 接毒液	2.68±0.35c	5.11±0.61b	5.62±1.07d	2.94±0.29f
接毒液+P	3.08±0.41b	5.27±0.47b	5.83±1.21d	3.14±0.33e
接毒液(CK)	6.34±0.66a	8.14±0.92a	10.26±1.03a	6.83±0.42a

表 3 不同植物提取液抑制 TMV 增殖的效果

处理	接种叶数/片	枯斑数/个	抑制率/%
L+ 接毒液	6	227.4±5.8d	59.02±0.15e
接毒液+L	6	274.1±6.3b	50.63±0.43e
S+ 接毒液	6	215.7±5.7d	60.59±0.61c
接毒液+S	6	282.8±6.1d	49.04±0.28e
M+ 接毒液	6	216.5±3.2d	60.91±0.34c
接毒液+M	6	252.6±4.5c	54.49±0.35d
P+ 接毒液	6	149.1±2.2f	73.13±4.55a
接毒液+P	6	182.1±3.4e	67.17±0.61b
接毒液(CK)	6	555.2±10.7a	—

表 4 不同植物提取液对 TMV 的防治效果

处理	发病率/%	病情指数	防效/%
L+ 接毒液	61.3±2.23d	15.1±0.64c	64.6±1.26c
接毒液+L	69.4±3.10b	17.6±0.97b	69.2±0.83f
S+ 接毒液	55.7±1.89e	12.8±0.51d	58.3±0.02d
接毒液+S	70.1±2.01b	18.4±1.14b	51.4±0.99e
M+ 接毒液	61.2±2.31d	14.1±0.62c	64.0±1.14c
接毒液+M	65.8±2.25c	17.5±1.01b	51.7±0.79e
P+ 接毒液	35.2±1.86f	6.40±0.23e	82.3±2.53a
接毒液+P	40.2±1.32f	8.20±0.19e	77.3±2.01b
毒株(CK)	98.3±5.34a	36.2±1.94a	—

2.4 不同植物提取液对 TMV 的防治效果

从表 4 可知,不论是单一植物提取液还是配伍植物提取液都有防治 TMV 的作用,其中配伍植物提取液的防治效果最好,达 77.3%~82.3%,显著高于其他植物提取液。落葵的防效为 64.6%~69.2%,毛叶子花的防效为 54.49%~60.91%,商陆的防效最差,为 51.4%~58.3%。从处理方法看,4 组处理中,都是先用植物提取液处理的效果显著优于后用植物提取液处理的。

3 结论与讨论

本试验所用的几种植物提取液喷施感染 TMV 的烟株,都能明显降低感染 TMV 烟叶中急剧产生的自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>、°OH)含量,同时对 TMV 的增殖也有很好的抑制作用,具有一定的防治烟草花叶病毒病的效果,其中配伍植物提取液的效果优于单一植物提取液。

从植物提取液施用方法对自由基含量、TMV 的增殖及防治效果等方面综合来看,在未感染

TMV 之前,先喷施植物提取液处理的效果优于在感染 TMV 后喷施处理的,这表明植物提取液对 TMV 的预防效果大于治疗效果,当然,还需进一步试验验证。

已有不少有关植物提取液防治 TMV 的报道,但研究多是用的单一植物<sup>[10-15]</sup>。本试验中既有单一植物的提取液,也有多种植物配伍的提取液,结果证明,配伍植物提取液对烟株体内自由基的清除、抑制叶片中 TMV 的增殖以及防治效果都比单一植物提取液处理的好,这一结果与刘华山等<sup>[4]</sup>的结果一致。这可能是单一植物提取液对 TMV 抑制的有效物质比较单一,而配伍植物提取液则因其多种有效物质而起到互补或增效作用,因此,具有较强的抑制 TMV 增殖和降低  $O_2^-$  和  $^{\circ}OH$  产生的作用。中药医学是祖国瑰宝,相信利用配伍植物提取液在防治烟草花叶病毒病方面将会有广阔的发展和应用前景。

# 参考文献:

[ 1 ] Kailash C, Pratibha C, Singh K L, *et al.* Antiviral activity of an extract of *Syzygium megacarpum* against encephalitis causing virus[ J ]. Indian Journal of Virology, 1998, 14(1): 31-35.

[ 2 ] 刘国坤, 谢联辉, 林奇英, 等. 15 种植物的单宁提取物对 TMV 的抑制作用[ J ]. 植物病理学报, 2003, 3(33): 279-283.

[ 3 ] 侯玉霞, 李重九, 马立新, 等. 中草药中抗植物病毒 TMV 活性物质 PZI 作用机理研究[ J ]. 中国农业大学学报, 2000, 5(1): 21-24.

[ 4 ] 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.

[ 5 ] 陈宁, 吴祖建, 林奇英, 等. 灰树花中一种抗烟草花叶病毒的蛋白质的纯化及其性质[ J ]. 生物化学和生物物理进展, 2004, 31(3): 283-286.

[ 6 ] 刘华山, 杨素勤, 韩锦峰, 等. 中草药剂对烟草普通花叶病毒病的防治效果[ J ]. 河南农业科学, 2002(12): 22-24.

[ 7 ] 李政, 王国良, 金珊, 等. 31 种常见抗菌中药对 DPPH 自由基清除作用的分析[ J ]. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 38-40.

[ 8 ] Gooding G V, Hebert T A. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities [ J ]. Phytopathology, 1967, 57: 1255-1289.

[ 9 ] 宋松泉, 程红焱, 龙春林, 等. 种子生物学研究指南[ M ]. 北京: 科学出版社, 2005: 106-107.

[ 10 ] 马萧, 祝水金, 丁伟, 等. 美洲商陆粗提取物对烟草花叶病毒的控制作用[ J ]. 西南农业学报, 2005, 18(2): 168-171.

[ 11 ] 陈启建, 刘国坤, 吴祖建, 等. 三叶鬼针草中黄酮甙对烟草花叶病毒病的抑制作用[ J ]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2003, 32(2): 181-184.

[ 12 ] 沈建国, 张正坤, 吴祖建, 等. 臭椿和鸦胆子抗烟草花叶病毒作用研究[ J ]. 中国中药杂志, 2007, 32(1): 27-29.

[ 13 ] 白建军, 孙素娟, 李重九, 等. 几种野生植物提取物对烟草花叶病生物活性初报[ J ]. 农药学报, 1999, 1(3): 94-96.

[ 14 ] 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: 自然科学版, 2004, 19(3): 300-303.

[ 15 ] 刘华山, 韩锦峰, 张玉丰, 等. 落葵提取液抑制普通烟草病毒病的生物效应研究[ J ]. 华北农学报, 2006, 21(6): 184-187.