

文章编号 :1001 - 4829(2005)02 - 0168 - 04

美洲商陆粗提物对烟草花叶病毒的控制作用

马 萧^{1,2},祝水金¹,丁 伟³,张永强³

(1. 浙江大学农业与生物技术学院,浙江 杭州 310029 2. 重庆市烟叶生产有限公司,重庆 450002 3. 西南农业大学植物保护学院,重庆 400716)

摘 要 植物病毒病是仅次于真菌病害的一种重要的植物病害,每年都会给农业生产带来巨大的损失。为此以美洲商陆的三种粗提物以及两种对照药品,对这几种药剂的抗烟草花叶病毒活性进行研究,结果如下:当施药浓度分别在 200 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 条件下,2 % 宁南霉素、60 % 毒克星泡腾片剂和美洲商陆甲醇粗提物对 TMV 均表现出较好的抑制效果,其抑制率均在 80 % 以上。特别应该注意的是美洲商陆的甲醇粗提物对 TMV 的抑制活性与 60 % 毒克星泡腾片剂基本持平。质量浓度为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的美洲商陆甲醇粗提物与 TMV 混合后,立即接种,抑制率为 88.56 %,与 60 % 毒克星泡腾片剂和 2 % 宁南霉素相差不多。对 TMV 初侵染抑制作用结果表明,接种前以宁南霉素、60 % 毒克星泡腾片剂或美洲商陆甲醇粗提物处理心叶烟叶片,可抑制病毒的初侵染作用,相对防效为 94.39 %、92.52 % 和 87.85 %,且均使植株发病时间大约推迟了 3 ~ 5 d。
关键词 美洲商陆;粗提物;烟草花叶病毒;控制作用
中图分类号 S432.26 **文献标识码** A

Study on the controlling effects of pokeweed extracts against tobacco mosaic virus

MA Xiao^{1,2},ZHU Shui-jin¹,DING Wei³,ZHANG Yong-qiang³

(1.College of Agronomy and Life Science,Zhejiang University,Zhejiang Hangzhou 310029,China;2.Tobacco Corporation of Chongqing,Chongqing 400011,China;3.College of Plant Protection, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract Plant virus was an important plant diseases only inferior to fungi and caused great loss to agriculture products annually. Using three pokeweed extracts and two CK pesticides, the research of anti-TMV activity of several treatments was carried out. The results showed that 2 % ningnanmycin, 60 % dukexing effervesce troche and pokeweed methanol extracts all exhibited better inhibition effects against TMV. At 200 and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, all three treatments above mentioned showed all above 80 % inhibition effects, especially, the pokeweed methanol extract inhibition effects was the same as that of 60 % dukexing effervesce troche. At 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pokeweed methanol extracts mixed with TMV inoculation promptly after mixing, the inhibition rate was 88.56 % and was almost up to 60 % dukexing effervesce troche and 2 % ningnanmycin. The experiments of several treatments against TMV infectivity showed that *Nicotiana glutinosa* treated by using 2 % ningnanmycin, 60 % dukexing effervesce troche or pokeweed methanol extract before inoculation could inhibit primary infection. TMV infectivity could be controlled and the relative efficacy were 94.39 %, 92.52 % and 87.85 %, and so far the occurrence time of plant individual disease was delayed for 3 ~ 5 d.
Key words pokeweed extracts; tobacco mosaic virus; controlling effects

烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV), 系烟草花叶病毒属(Tobamovirus)的典型成员,在世界各地均有分布,其寄主范围较广,能在多种作物上引起严重病害。植物病毒病在栽培作物中发生的普遍性和严重性仅次于真菌病害,是植物医学和农业

生产上的重要问题。例如全世界每年因烟草花叶病毒(TMV)危害就造成 1 亿多美元的损失^[1]。但由于植物病毒的绝对寄生性,其生命周期需要寄主细胞能量与酶系统的参与。因此,植物病毒病的防治一直是植物病毒学研究中的难点和热点问题^[2]。一些能防治植物病毒病的保护剂、治疗剂和可以诱导植物抗病性药剂已开始投入使用,新的天然药物及合成药物也越来越多的被用于病毒病的防治^[3]。刘学端等^[4]报道了利用几种植物抽提物混配而成

收稿日期:2004 - 09 - 17
作者简介:马 萧(1973 -),男,河南省沈丘市人,助理农艺师,硕士,主要从事烟草生产与有害生物控制工作。

的植物源农药 MH11-4 防治烟草花叶病的室内和田间小区试验 结果证明 MH11-4 对由 TMV 和 CMV 引起的烟草花叶病的防效 ,在室内盆栽试验和田间小区试验中均表现出优于目前常用农药植病灵、NS-83 的效果 ,是一种具有开发价值的新型天然无公害农药。付鸣佳等^[5]报道了杏鲍菇抗烟草花叶病毒蛋白的筛选 ,采用离子交换层析和凝胶层析方法 ,从杏鲍菇干样中分离得到多个蛋白组分 ,经枯斑寄主检测 ,发现多个蛋白组分都有抗烟草花叶病毒 (TMV) 的活性 ,对 TMV 的抑制率均在 70 % 以上 ,高者可达 99 %。吴丽萍等^[6]从毛头鬼伞 *Coprinus comatus* 分离出一种碱性蛋白 ,并且试验证明了这种碱性蛋白对 TMV 具有明显的抑制活性。但有关中药植物美洲商陆 *Phytolacca americana* Linn 的抗烟草花叶病毒活性的报道还不多见 ,本文就美洲商陆几种粗提物的抗烟草花叶病毒活性进行了研究 ,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

烟草花叶病毒 (Tobacco Mosaic Virus ,TMV) 与病毒抗血清均由福建农林大学植物病毒研究所提供。

美洲商陆 (*Phytolacca americana* Linn) :商陆科商陆 根和叶。样品采回后 ,根和叶于干燥箱中 60℃烘干 ,粉碎后密封保存备用。以石油醚、苯、甲醇为提取溶剂 ,采用浸渍法对样品进行平行提取。所得各提取液减压浓缩 ,得到 3 种美洲商陆的粗提物。

对照药剂 2 % 宁南霉素购自黑龙江强生生化技术开发有限公司海林生物农药厂 ,60 % 毒克星泡腾片剂购自齐齐哈尔四友化工有限公司。

表 1 半叶枯斑法测定不同商陆粗提物及对照药品对 TMV 抑制率

Table 1 The inhibition rate against TMV of different pokeweed extracts and control pesticide using by half leaf method					
粗提物及药剂 Extracts & pesticide		抑制率(%) Inhibition rate			
		200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
石油醚粗提物					
Petroleum ether extract		68.54	54.52	49.24	40.79
苯粗提物		72.96	65.59	59.84	50.51
Benzene extract					
甲醇粗提物		87.57	80.53	72.51	61.24
Methanol extract					
2 % 宁南霉素		95.62	92.47	89.97	85.67
2 % Ningnanmycin					
60 % 毒克星泡腾片剂		92.48	88.57	80.42	75.58
60 % Dukexing effervesce troche					

万方数据

1.2 半叶枯斑法测定不同商陆粗提物对 TMV 的抑制率

以半叶枯斑法测定不同粗提物抗 TMV 活性。枯斑寄主为心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 配制 200、100、50 和 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 等不同质量浓度的粗提物溶液 ,分别加入一定量的 TMV ,混合 5 min ,使粗提物溶液病毒终质量浓度为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以半叶法摩擦接种心叶烟 ,每处理接种 5 个叶片的半叶 ,以相同病毒含量的水溶液处理为对照 ,并设置两个药剂(2 % 宁南霉素和 60 % 毒克星泡腾片剂)对照 ,3 d 后计算枯斑数及抑制率。重复 2 次 ,以平均抑制率进行评价。

抑制率(%)=[(对照枯斑数-处理枯斑数)/对照枯斑数]×100。

1.3 作用时间对 TMV 抑制率影响的测定

配制一系列的粗提物溶液 ,与 TMV 混合时间设置为 3 个处理 :混合后立即接种 ,混合 30 min 和 1 h 后接种。采用半叶枯斑法测定其抑制效果。

1.4 对 TMV 初侵染的抑制作用

选取 3~4 叶期的普通烟草 ,分别于接种病毒前、后 12 h 喷施 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的粗提物溶液 ,并分别以接种病毒且喷清水和不接种病毒的烟草为阳性对照和阴性对照。每处理 9 株 ,重复 3 次 ,处理后连续观察 30 d ,记录发病情况。病情指数划分参照黄遵锡等^[7]的方法 ,分为 0、1、2、3、4 五个等级。0 级 :全株无病 ;1 级 :心叶明脉或轻微花叶 ;2 级 :1/2 叶片花叶 ,少数叶片变形 ;3 级 :2/3 叶片花叶变形 ,植株较健株矮 1/2 左右 ;4 级 :全株叶片花叶 ,叶片严重变形或坏死 ,植株严重矮化。

表 2 不同混合时间条件下商陆粗提物及对照药品对 TMV 抑制率效果

Table 2 The inhibition effects against TMV of different pokeweed extracts and control pesticide under different mixing times				
粗提物及药剂 Extracts & pesticide (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抑制率(%) Inhibiting rate			
	混合后立即接种 Prompt inoculation after mixing	混合后 30 min 接种 Inoculation 30 min after mixing	混合后 1h 接种 Inoculation 1h after mixing	
石油醚粗提物				
Petroleum ether extract	75.42	74.25	68.84	
苯粗提物	80.25	81.65	76.94	
Benzene extract				
甲醇粗提物	88.56	85.54	84.76	
Methanol extract				
2 % 宁南霉素	96.45	89.57	80.62	
2 % Ningnanmycin				
60 % 毒克星泡腾片剂	94.56	90.25	87.54	
60 % Dukexing effervesce troche				

表 3 不同商陆粗提物及对照药品对 TMV 初侵染抑制效果

Table 3 The inhibition effects against TMV infectivity of different pokeweed extracts and control pesticide

粗提物及药剂 Extracts & pesticide (200 μg·mL ⁻¹)	株数 Plant No.	病株级数 Disease score					病情指数 Disease index	相对防效(%) Relative efficacy
		0	1	2	3	4		
石油醚粗提物 Petroleum ether extract	27	9	8	5	5	0	30.56	69.15
苯粗提物 Benzene extract	27	11	7	5	1	3	29.63	70.09
甲醇粗提物 Methanol extract	27	20	3	2	2	0	12.04	87.85
2 % 宁南霉素 2 % Ningnanmycin	27	23	2	2	0	0	5.56	94.39
60 % 毒克星泡腾片剂 60 % Dukexing effervesce troche	27	21	4	2	0	0	7.41	92.52
接种病毒且喷清水 Inoculating virus & spraying water	27	0	0	0	1	26	99.07	—
不接种病毒 Non-inoculation virus	27	27	0	0	0	0	—	—

2 结果与分析

2.1 不同商陆粗提物对 TMV 抑制率的测定结果

植物感染病毒病后 ,14 d 左右植物体内病毒含量最高 ,因而选择接种 14 d 进行病毒浓度测定。用枯斑抑制率表示抗病毒侵染活性。

表 1 中看出 ,不同药剂的不同浓度溶液与 TMV 混合 5 min 后 ,对 TMV 体外抑制效果表明 :2 % 宁南霉素、60 % 毒克星泡腾片剂和美洲商陆甲醇粗提物均表现出较好的抑制效果 ,其 200 和 100 μg·mL⁻¹条件下 ,对 TMV 抑制率均在 80 % 以上 ,而美洲商陆的石油醚和苯粗提物仅在 200 μg·mL⁻¹时表现出一定的抑制活性。

2.2 作用时间对 TMV 抑制率的影响的测定结果

一定质量浓度的商陆粗提物和药剂与 TMV 混合 ,在混合后不同时间接种 ,对 TMV 的抑制效果如表 2 所示。

质量浓度为 200 μg·mL⁻¹的美洲商陆甲醇粗提物与 TMV 混合后 ,立即接种 ,抑制率为 88.56 % ,与 60 % 毒克星泡腾片剂和 2 % 宁南霉素相差不多 ;与 TMV 混合 30 min、1 h 后接种 ,抑制率分别为 85.54 % 和 84.76 % ,三者抑制效果相近 ,并且在其他的商陆粗提物上也表现出这一结果。表明美洲商陆甲醇粗提物对 TMV 体外作用时间迅速 ,对其体外钝化效果不受作用时间影响。

2.3 对 TMV 初侵染的抑制作用效果

试验结果表明 :处理后 10 d 接种且喷清水处理的部分植株的新生叶出现轻微症状 ;处理后 15 ~ 17 d 先喷药后接种处理组的部分植株也开始出现症状。连续观察 30 d 发现 ,先喷药后接种处理组的部分植株出现明显症状 ,而对照组的症状出现得早且严重。结果(表 3)表明 ,接种前以宁南霉素、60 % 毒克星泡腾片剂或美洲商陆甲醇粗提物处理心叶烟叶片 ,可抑制病毒的初侵染作用 ,相对防效为 94.39 %、

92.52 % 和 87.85 % ,且均使植株发病时间大约推迟了 3 ~ 5 d。

3 讨 论

本文研究美洲商陆的 3 种粗提物对 TMV 的抑制活性 ,结果证实美洲商陆的甲醇提取物对 TMV 有明显的抑制活性 ,值得引起重视。但对于其有效成分的确定及作用机理等有待进一步研究。

已有文献^[8-12]证实 ,商陆的化学成分大致分为水溶性成分、脂溶性成分、蛋白多肽类成分及其他成分等 4 类。水溶性成分包括多种具生理活性的三萜皂苷及其配糖体 ;两种酸性杂多糖 ,商陆多糖 I 和 II ;以及浆果中富含的红色素甜菜苷。脂溶性成分主要是棕榈酸十四酯、油酸乙酯、亚油酸-2 单甘油酯等 8 种。蛋白多肽类成分包括分子量大、组分较复杂的商陆素 ;从美洲商陆不同组织或不同生长阶段分离到一系列商陆抗病毒蛋白(Pokeweed Antivirus Proteins ,PAP)及单多肽链抗真菌蛋白。PAP 有抑制植物病毒的活性 ,能抗黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus ,CMV)、烟草花叶病毒、苜蓿花叶病毒(Alfalfa mosaic virus ,AMV)等病毒病。通过基因工程获得的转 PAP 基因植物 ,可抗 PVX、PVY、CMV 和芜菁花叶病毒(Turnip mosaic virus ,TuMV)。但本文得出的试验结果是否 PAP 起唯一作用 ,还是多种成分共同作用的效果 ,还需进一步的研究工作得以证实。

参考文献 :

[1] 吴云峰 . 生物病毒农药筛选及应用 [J]. 世界农业 ,1995 (5) :35 - 36.
[2] 孙 慧 ,吴祖建 ,林奇英 ,等 . 小分子植物病毒抑制物质研究进展 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版) , 2002 ,31(3) :311 - 316.
[3] 吴秋豫 ,陈新华 ,丁 铭 ,等 . 用二种 ELISA 法进行烟草花叶病快速诊断试剂盒的研究 [J]. 华中师范大学学报(自然科学版) , 2000 ,34(1) :468 - 470.

[4]刘学端 ,朱宏志 ,何 昆 ,等 . 植物源农药防治烟草花叶病试验 [J]. 湖南农业大学学报 ,2000 ,24(6) :193 – 195 .

[5]付鸣佳 ,吴祖建 ,林奇英 ,等 . 金针菇中一种抗病毒蛋白的纯化及其抗烟草花叶病毒特性[J]. 福建农林大学学报(自然科学版) ,2003 ,32(1) :84 – 88 .

[6]吴丽萍 ,吴祖建 ,林奇英 ,等 . 毛头鬼伞(*Coprinus comatus*)中一种碱性蛋白的纯化及其活性[J]. 微生物学报 ,2003 ,43(6) :793 – 798 .

[7]黄遵锡 ,陈文久 ,程隆藻 ,等 . “ 植毒灵 ” 防治烟草花叶病研究初报 [J]. 西南农业学报 ,1997 ,10(2) :94 – 99 .

[8]杨 柯 ,刘景生 . 中药高陆的研究进展 [J]. 中国医学文摘·肿瘤学 ,2003 ,17(2) :186 – 188 .

[9]Chen Z C , White R F ,Antoniw J F ,et al . Effect of pokeweed antiviral protein (PAP) on the infection of plant viruses[J]. Plant Pathology ,1991 ,40(3) :612 – 620 .

[10]张海燕 ,田颖川 ,周奕华 ,等 . 将商陆抗病毒蛋白(PAP) cDNA 导入油菜获得抗病毒转基因植株[J]. 科学通报 ,1998 ,43(23) :2534 – 2537 .

[11]Lodge J K , Kaniewski W K ,Tumer N E . Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein [J]. Proc . Natl . Acad . Sci . USA ,1993 ,90 :7089 – 7093 .

[12]张海燕 ,党本元 ,周奕华 ,等 . 用激光微束穿刺法将 PAP cDNA 导入油菜获得抗病毒转基因植株[J]. 中国激光 ,1999 ,26(11) :1053 – 1056 .

(责任编辑 李正华)