

抑制烟草花叶病毒(TMV)植物提取物的筛选

陈雅寒¹ 汝冰璐¹ 翟颖妍¹ 李晶² 成巨龙³ 安德荣^{1*}

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北大学生命科学学院, 油田微生物工程实验室, 西安 710065; 3. 陕西省烟草公司烟草所, 西安 710068)

摘要: 为开发新型植物源抗病毒剂, 以抗烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)活性为指标, 利用半叶枯斑法对13种常见中草药进行了抗病毒活性筛选, 并对筛选到的中草药进行了抗病机理的研究。结果表明: 马蓝、玉簪、鸦胆子、白薇和苦木5种中草药的30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 醇提取物抗TMV活性较好, 抑制率均达70.44%以上, 且高于8%宁南霉素水剂1000倍液的抗病毒活性, 其中马蓝醇提取物抗病毒活性最佳, 抑制率可达90.70%。对马蓝醇提取物防治烟草花叶病毒机理的研究发现, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 马蓝醇提取物能够保护TMV侵染的烟草原生质体细胞形态完整; 经马蓝醇提取物处理后, 烟草的苯丙氨酸解氨酶和过氧化物酶活性比清水对照组明显提高; 20~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的马蓝醇提取物能明显抑制TMV病毒外壳蛋白的表达。推测马蓝醇提取物可能是通过保护植物细胞而起到抗病毒作用, 可进一步开发为植物源抗病毒剂。

关键词: 烟草花叶病毒; 抑制作用; 马蓝

Screening and inhibitory effects of plant extracts against *Tobacco mosaic virus* (TMV)

Chen Yahan¹ Ru Binglu¹ Zhai Yingyan¹ Li Jing² Cheng Julong³ An Derong^{1*}

(1. Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. Laboratory of Microbial Engineering, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710065, Shaanxi Province, China; 3. Tobacco Company of Shaanxi Province, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China)

Abstract: To develop novel plant-derived virucide, 13 species of Chinese medicinal herbs were screened, and the anti-virus activities of herbs against *Tobacco mosaic virus* (TMV) were tested by a half-leaf method. Comparing with the ningnanmycin, *Baphicacanthus cusia*, *Hosta plantaginea*, *Brucea javanica*, *Cynanchum atratum*, *Picrasma quassioides*, showed higher anti-viral activity with more than 70.44% inhibition rates at the concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Among all treatments, the ethanol extract of *B. cusia* exhibited the highest anti-viral activity with 90.70% of inhibition efficiency. The protoplast cell integrity was maintained after treated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethanol extract of *B. cusia*. Moreover, the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and peroxidase (POD) activity in TMV-infected plants were significantly increased compared to the control. The expression of TMV capsid protein was inhibited by ethanol extract of *B. cusia* at the concentration of 20–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results indicated that the ethanol extract of *B. cusia* might effectively protect the tobacco to against TMV infection. Therefore, *B. cusia* could be used as anti-viral reagents in the field.

Key words: *Tobacco mosaic virus*; inhibition effect; *Baphicacanthus cusia*

植物病毒是一类在寄主活体细胞内进行核酸和蛋白质外壳复制的病原物,目前已发现种类有1 122个(Fauquet et al., 1995),对农作物的危害程度仅次于真菌病原物,素有“植物癌症”之称,几乎所有农作物都会遭受2~3种病毒病的危害(安德荣, 1994),全世界每年仅粮食作物一项的经济损失就高达200亿美元(谢联辉, 2009)。

目前对于植物病毒的防治以抗病品种和化学防治为主,现有的抗病毒药剂品种单一,主要以预防为主,而且效果多不理想(侯玉霞等, 1998)。随着绿色防控理念和化肥农药的“两个零增长”目标的提出,生物农药越来越受到关注,具有抗病毒的生物农药成分主要是从植物、微生物、矿物质和动物等来源中筛选以及生物合成的(Zhao et al., 2015)。20世纪初首次发现商陆汁液对烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)具有抑制作用,经研究发现其汁液中存在一种能够减轻TMV侵染植株作用的美洲商陆抗病毒蛋白(Duggar & Arnustrong, 1925)。自此以后,人们开始在植物中寻找抗病毒活性物质。据不完全统计,目前已报道173种具有抗病毒活性的植物提取物(杜春梅等, 2004),主要集中在商陆科、豆科、藜科、卫矛科、菊科、萝藦科和苦木科等20多个科。这些植物源活性物质是植物体产生的次生代谢产物,根据化学分子结构可以分为蛋白质类、生物碱类、黄酮类、酚类、精油类和多糖类等不同类型(赵磊, 2016),它们分布在植物根、茎、叶、花和种子内,具有结构新颖独特,功能各异,易降解,无残留毒性,与环境相容等特点,成为近年来研究高效低毒的抗植物病毒剂的主要来源。

抗病毒活性物质能够诱导和激活TMV侵染的烟草体内分子免疫系统和一系列的代谢调控系统,促使植物产生抗病性。苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)和过氧化物酶(peroxidase, POD)是植物体内重要的防御酶,在活性氧清除及酚类、木质素和植保素等抗病相关物质合成等植物主动防御反应中具有重要意义(Chakraborty et al., 2009)。病毒外壳蛋白(coat protein, CP)主要作用是保护核酸物质不被酶降解,与TMV的远距离移动和寄主症状的表达相关,在病毒的生命历程中占有很重要的地位。牛春玉(2005)发现,当TMV的RNA复制过程和外壳蛋白CP表达过程受到抗病毒活性物质抑制或干扰,或者相关蛋白酶和核酸酶的活性对病毒合成过程产生影响,则可减轻花叶病毒的危害。

本研究选用TMV为研究对象,对13种常见中草药进行抗病毒活性筛选,选择抗病毒活性最佳的中草药醇提取物,观察其对TMV侵染的烟草原生质形态、PAL和POD等植物抗病相关酶活性以及对TMV外壳蛋白表达等的影响,探索其抗病毒机理,以为研究和开发新型、安全的植物源抗病毒剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:萝芙木、玉簪、米仔兰、徐长卿、灯台树、马蓝、狗舌草、苦木、竹节草、鸦胆子、紫草、绣线菊和白薇共13种新鲜植物均采自西北农林科技大学校园;中草药样购自陕西省医药公司,植物采集后在阴凉干燥的地方晾干后粉碎处理。

供试寄主及毒源:病毒TMV的枯斑寄主为心叶烟 *Nicotiana glutinosa*, 系统侵染寄主为普通烟 *N. tabacum* K₃₂₆, 由陕西省烟草公司烟草所提供,防虫温室内培育。TMV普通株系由西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室保存在普通烟 K₃₂₆植株上,备用。

药剂及仪器:8%宁南霉素(ningnanmycin)水剂,哈尔滨德强生物股份有限公司;BCIP(5-溴-4-氯-吲哚基-磷酸盐)/NBT(四唑硝基蓝)底物显色试剂盒、硝酸纤维素膜、单克隆抗体,生工生物工程(上海)股份有限公司;酶解液由1%纤维素酶、0.2%离析酶、0.6 mol/mL甘露醇、CPW盐溶液(27.2 mg/L KH₂PO₄ + 101.0 mg/L KNO₃ + 1 480.0 mg/L CaCl₂ · 2H₂O + 246.0 mg/L MgSO₄ · 7H₂O + 0.16 mg/L KI + 0.025 mg/L CuSO₄ · H₂O)组成,用KOH溶液调pH到5.8;其它均为国产分析纯。多功能粉碎机,永康市小宝电器有限公司;5804R高速离心机、Eporator电转化仪,德国艾本德股份公司;DU-800紫外分光光度计,美国Beckman公司;SDS-PAGE电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 植物样品提取液的制备

将13种供试植物放置于60℃恒温箱烘干粉碎,过40目筛(孔径0.45 mm),称取各样品10 g分别放置于250 mL三角瓶中,加入100 mL 95%乙醇,搅拌,超声波辅助提取2 h,过滤并蒸干滤液,得到样品提取物。称取一定量的植物提取物,加入少量二甲亚砜(DMSO)超声溶解,加入蒸馏水定容,获得浓度为0.02 g/mL的植物提取物溶液,4℃保存备用。

1.2.2 TMV的提纯

参考 Gooding & Hebert (1967) 方法在新鲜心叶烟病叶上对 TMV 进行提纯。称取已去叶脉的病叶, 按质量体积比为 1:2 加入 pH 7.4、0.02 mol/L 的 PBS (含 1% β -巯基乙醇), 室温下匀浆, 然后用 4 层纱布过滤得到滤液。每 25 mL 滤液中加入 2 mL 正丁醇, 磁力搅拌 15 min。4℃、10 000 r/min 离心 3 次得到上清液, 每次 30 min。在 25 mL 上清液中边搅拌边加入聚乙烯二醇和氯化钠各 1 g, 静置 1 h 后, 4℃、10 000 r/min 离心 30 min, 得到沉淀, 按每 50 mL 原液加入 pH 7.4、0.01 mol/L PBS 缓冲液溶解沉淀 10 mL, 4℃过夜后, 4℃、10 000 r/min 离心 20 min, 得到的上清液即为所需的 TMV 病毒。

1.2.3 中草药醇提取物抗病毒活性的测定

采用半叶枯斑法测定中草药醇提取物的抗 TMV 活性。选择生长旺盛、健康的 5~6 叶期心叶烟, 左半叶接种含有 TMV 和少量二氧化硅混合物的浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的中草药提取液 (TMV 和中草药体积比为 1:1) 35 μL , 对照组接种等量的 1 000 倍 8% 宁南霉素水剂, 右半叶接种等浓度含有 TMV、二氧化硅和溶解植物提取物所用溶剂组成的混合物对照, 随后用清水冲洗干净, 每棵烟草上处理 2 片叶子, 重复 3 次, 3~5 d 后观察统计左右半叶的枯斑数目, 并计算抑制率, 抑制率=(对照平均枯斑数-处理平均枯斑数)/对照平均枯斑数 \times 100%。

1.2.4 马蓝醇提取物对烟草原生质体形态的影响

选取长势一致的 5~6 叶期普通烟 K₃₂₆ 植株, 接种浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的含有 TMV 和少量二氧化硅的磷酸缓冲液 35 μL , 分别用 0.3、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的马蓝醇提取物处理烟草叶片, 重复 3 次, 5 d 后分离烟草原生质体, 以清水处理作对照。

在每个处理的烟草植株上部取相同部位的叶片 2 g, 用 70% 酒精浸泡 3~5 s, 然后用 2% 次氯酸钠溶液浸泡 10 min, 最后用无菌水冲洗 2~3 次。用双面刀片将叶肉切成 0.5 mm 的细丝, 在直径 90 mm 的培养皿中酶解液分离原生质体, 酶解液体积和材料重量比为 10:1, 26℃ 黑暗条件下酶解 12~14 h, 中间摇动 2~3 次。停止酶解前摇动 30 min, 将酶解液用不锈钢筛网过滤, 除去未酶解完全的叶肉组织碎片, 常温环境下静置备用。在显微镜下镜检, 每个处理观察 5 个视野中原生质体的形态。

1.2.5 马蓝醇提取物对植物抗病相关酶活性的影响

选取长势一致的 5~6 叶期普通烟 K₃₂₆ 植株, 接种浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的含有 TMV 和少量二氧化硅的磷

酸缓冲液 35 μL , 然后用 1 mg/mL 的马蓝醇提取物处理烟草叶片, 分别在第 1、3、5、7 和 9 天测定烟草 PAL 和 POD 活性。试验重复 3 次。

取每个处理叶片 0.5 g, 加入 4℃ 预冷的 0.05 mol/L、pH 8.8 的硼酸缓冲液 2 mL 提取, 冰浴研磨至匀浆后, 4℃、1 000 r/min 离心 25 min, 上清液即酶液, -20℃ 保存备用。PAL 活性测定参考薛应龙等 (1983) 方法进行, 以每小时 OD₂₉₀ 值变化 0.01 为 1 个酶活单位, 在 37℃ 条件下, 在 1 mL 酶液中分别加入 1 mL 苯丙氨酸和 2 mL 硼酸盐, 静置 30 min, 然后冰置停止反应, 测定样品的 OD₂₉₀ 值。POD 活性测定参考王学奎 (2006) 方法进行, 以每分钟 OD₄₇₀ 值变化 0.01 为 1 个酶活单位, 在 37℃ 条件下, 50 μL 酶溶液中分别加入 100 mmol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 1 mL、10 mmol/L 过氧化氢 1 mL 和 20 mmol/L 愈创木酚 1 mL 后混合均匀, 每 15 s 测 1 次样品的 OD₄₇₀ 值。

PAL 活性= $A_{290} \times V / (V_t \times t \times W \times 0.01)$; POD 活性= $\Delta A_{470} \times V / (V_t \times t \times W \times 0.01)$, 其中 A_{290} 为 290 nm 测定的吸光值、 ΔA_{470} 为反应时间内 OD 值的变化、 V 为醇体液总体积、 V_t 为测定酶活性所用体积、 t 为反应时间、 W 为样品重量。

1.2.6 马蓝醇提取物对 TMV 外壳蛋白表达的影响

TMV 外壳蛋白的制备: 试验分 5 个处理, 分别用 10、20、30、40 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同浓度的马蓝醇提取物溶液处理烟草叶片, 1 d 后将提纯的含有 TMV 和少量二氧化硅的磷酸缓冲液 35 μL 接种到各处理组的烟草叶片上。每个处理重复 3 次, 以清水作对照。

按照 Fraenkel-Conrat & Williams (1995) 的醋酸法制备 TMV 外壳蛋白。取约 0.1 g 各处理组的烟草叶片, 加入液氮研磨成粉末状, 加入 200 μL 提取缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl、4.5% SDS、7.5% β -巯基乙醇和 9 mmol/L 尿素, pH 6.8), 冰浴条件下研磨呈匀浆。在室温下以 10 000 r/min 离心 8 min, 取上清液, 加入等体积的 2 \times 载样缓冲液, 在沸水中加热 10 min, 10 000 r/min 离心 15 min, 去上清液得到 TMV 外壳蛋白溶液。

Western 印迹分析: 将得到的 TMV 外壳蛋白样品与 5 \times SDS 上样缓冲液煮沸 10 min 后加样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后, 取凝胶, 切除浓缩胶, 用蒸馏水冲洗后转移至缓冲液中浸泡约 15 min, 将已浸泡过的凝胶、NC 膜、吸水滤纸及海绵按负极到正极的顺序依次叠放在电转仪上, 间隙间的气泡用干净的玻璃棒滚动赶走, 电泳 1.5 h。电泳结束后, 将 NC 膜转移到含有 Tris-HCl、NaCl 和 Tween-20

的TBST缓冲液中完全浸润、浸泡,进行洗涤后,将NC膜浸泡在封闭液中,4℃过夜;将膜浸入在用TBST适当倍数稀释的单克隆抗体中,37℃在摇床上振荡孵育1 h;用TBST洗涤5次,每次5 min,加入适量的现配BCIP/NBT显色液,室温下避光反应5~15 min,直至特异性条带明晰;倒去显色液,将显色反应好的膜迅速放置于去离子水中,观察并进行拍照。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 17.0软件进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 中草药醇提取物的抗病毒活性

供试13种植物材料醇提取物对TMV有不同的抗病毒活性,其中萝芙木根部、玉簪、徐长卿茎部和马蓝根部等7种材料提取物抗TMV活性均高于53.00%,马蓝根部和玉簪提取物抗TMV活性最好,抑制率分别为90.70%和85.23%,其次是鸦胆子种子、白薇根部和苦木叶的提取物,抗TMV活性较好,抑制率分别为75.25%、72.00%和70.44%,均高于1 000倍8%宁南霉素水剂的抗病毒活性(表1)。

表1 13种植物提取物抗TMV活性筛选结果

Table 1 The antiviral activity screening results of 13 plants extracts on TMV

| 植物 Plant | 科 Family | 提取部位 Extracted part | 抑制率 Inhibition rate (%) |
|---|--------------------|------------------------|----------------------------|
| 萝芙木 <i>Rauvolfia verticillata</i> | 夹竹桃科 Apocynaceae | 根 Root | 58.10±1.71 Gg |
| 玉簪 <i>Hosta plantaginea</i> | 百合科 Liliaceae | 全草 Herba | 85.23±0.68 Bb |
| 米仔兰 <i>Aglaia odorata</i> | 楝科 Meliaceae | 叶 Leaf | 8.30±0.20 Ll |
| 徐长卿 <i>Cynanchum paniculatum</i> | 萝藦科 Asclepiadaceae | 茎 Stem | 63.50±1.94 Ff |
| 白薇 <i>Cynanchum atratum</i> | 萝藦科 Asclepiadaceae | 根 Root | 72.00±2.50 CDd |
| 灯台树 <i>Cornus controversa</i> | 山茱萸科 Cornaceae | 叶 Leaf | 19.37±1.36 Kk |
| 马蓝 <i>Baphicacanthus cusia</i> | 爵床科 Acanthaceae | 根 Root | 90.70±2.31 Aa |
| 狗舌草 <i>Tephrosia kirilowii</i> | 菊科 Asteraceae | 全草 Herba | 37.50±0.99 li |
| 苦木 <i>Picrasma quassioides</i> | 苦木科 Simaroubaceae | 叶 Leaf | 70.44±1.26 DEd |
| 鸦胆子 <i>Brucea javanica</i> | 苦木科 Simaroubaceae | 种子 Seed | 75.25±1.45 Cc |
| 竹节草 <i>Chrysopogon aciculatus</i> | 禾本科 Poaceae | 全草 Herba | 24.58±2.64 Jj |
| 紫草 <i>Lithospermum erythrorhizon</i> | 紫草科 Boraginaceae | 全草 Herba | 53.00±1.52 Hh |
| 绣线菊 <i>Spiraea salicifolia</i> | 蔷薇科 Rosaceae | 叶 Leaf | 3.90±0.23 Mm |
| 1 000倍8%宁南霉素水剂 1 000 times 8% ningnanmycin SL | - | - | 67.40±1.10 Ff |

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同大、小写字母分别表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the table are mean±SD. Different uppercase or lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.01$ or $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.2 马蓝醇提取物对烟草原生质体形态的影响

供试13种植物材料醇提取物抗TMV活性测定的结果显示,马蓝根部提取物活性最好,所以选择用不同浓度的马蓝醇提取物处理后,对TMV侵染的植物原生质形态的影响(图1)。结果显示,用0.5 μg/mL马蓝醇提取物处理时,原生质体细胞形态完整,富含细胞质,呈圆球形(图1-A);醇提取物浓度减少时,部分原生质膜破裂,原生质体数量减少,少量细胞呈碎片状(图1-B);而清水对照组烟草叶片原生质体被破坏,观察不到完整的圆球状原生质体,出现很多细胞碎片(图1-C)。表明马蓝醇提取物处理后对TMV侵染的烟草原生质体均有保护作用,在一定浓度范围内,随着马蓝醇提取物浓度的增加,保护作用

越强。

2.3 马蓝醇提取物对植物抗病相关酶活性的影响

经1 mg/mL马蓝醇提取物处理烟草后,测定不同时间内马蓝醇叶片PAL和POD活性的变化,结果显示,叶片内PAL活性在24 h内明显升高,7 d后达到高峰,为41.89 U·mg⁻¹FW·h⁻¹,约为清水对照组的2.3倍,为TMV处理组的1.6倍;随后下降缓慢,9 d内活性都高于对照组。清水对照组烟草的PAL活性在9 d整个过程内变化不大。TMV处理过的烟草PAL活性在第5天达到峰值,为28.94 U·mg⁻¹FW·h⁻¹,整个过程中与清水对照相比也有所升高(图2-A)。马蓝醇提取物处理烟草后,POD活性在7 d内一直上升且达到峰值45.78 U·mg⁻¹FW·h⁻¹,之后下降,但

到9 d时仍高于对照组。清水对照组草的POD活性在9 d内一直缓慢升高。TMV处理过的烟草POD活性在第7天达到峰值,为 $28.52 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ FW} \cdot \text{h}^{-1}$,显

著高于清水对照(图2-B)。表明马蓝醇提取物诱导烟草产生对TMV的抗性与PAL和POD活性密切相关。

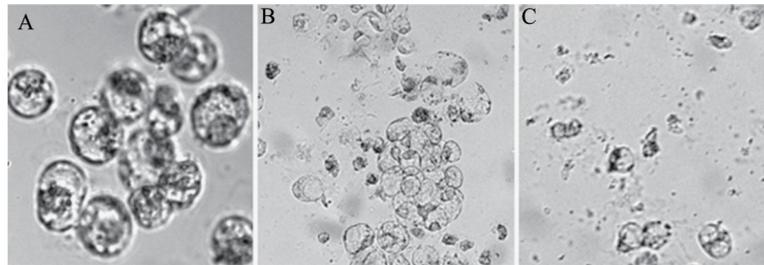


图1 不同浓度马蓝醇提取物对烟草原生质体形态(40×)的影响

Fig. 1 Effect of ethanol extract of *Baphicacanthus cusia* on change of protoplasts morphology of tobacco (40×)

A: $0.5 \mu\text{g/mL}$ 马蓝醇提取物; B: $0.3 \mu\text{g/mL}$ 马蓝醇提取物; C: 对照。A: $0.5 \mu\text{g/mL}$ *B. cusia* extracts; B: $0.3 \mu\text{g/mL}$ *B. cusia* extracts; C: control.

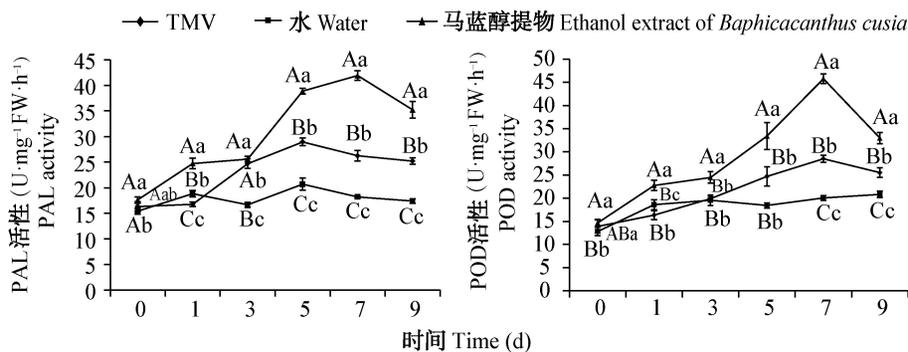


图2 马蓝醇提取物对烟草PAL和POD酶活性的影响

Fig. 2 Effect of ethanol extract of *Baphicacanthus cusia* on PAL and POD activities in tobacco

图中数据为平均数±标准差。不同大、小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different uppercase or lowercase letters indicate significant difference at $P<0.01$ or $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.4 马蓝醇提取物对TMV外壳蛋白的影响

通过Western印迹分析方法对TMV外壳蛋白进行检测,结果所示,与清水对照组相比,随着马蓝醇提取物浓度增加外壳蛋白的积累量逐渐减少,当马蓝醇提取物浓度达到 $20 \mu\text{g/mL}$ 时外壳蛋白的积累量完全受到抑制,而浓度达到 $30 \mu\text{g/mL}$ 时,积累量明显上调,之后随着浓度增大又明显下调,当提取物浓度达到 $50 \mu\text{g/mL}$ 时,外壳蛋白的积累量极少甚至为0(图3)。因此,推测马蓝醇提取物能有效抑制TMV外壳蛋白的表达,并且呈现剂量效应。

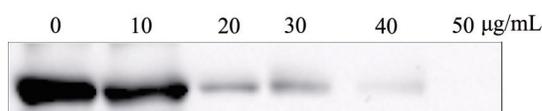


图3 马蓝醇提取物对TMV外壳蛋白的影响

Fig. 3 Effect of ethanol extract of *Baphicacanthus cusia* on TMV coat protein

3 讨论

目前对于植物病毒的防治主要是使用化学药剂,而高效、绿色无污染的植物源抗病毒剂较少,市场上使用的抗植物病毒药剂对植物无害或低毒的制剂很少,大多对病毒有高度选择性。因此,开发出低毒、高效、广谱的植物源抗病毒制剂迫在眉睫。本研究以TMV为防治对象,对13种中草药植物的醇提取物进行了病毒抑制率筛选,证明马蓝醇提取物具有作为抗病毒制剂的开发潜力。从生物学、生理学、分子和细胞学4个层面对其防治机制进行了研究。

Ko et al. (2006)和Li et al. (2007)报道,马蓝醇提取物中分离的双裂孕烷甾体及其单糖苷具有显著的抗TMV活性,本研究结果表明马蓝醇提取物对TMV的抑制率可达90.70%,再次验证了以上结论,说明马蓝醇提取物对TMV具有抑制作用。本试验

结果显示,马蓝醇提取物处理的烟草叶片中PAL和POD两种酶活性均比对照组有不同程度的提高,酶活性达到高峰期的时间均为第7天,然后活性急剧下降,这与罗琰(2013)和Zhao et al.(2015)分别用香菇多糖和云芝多糖诱导烟草叶片后酶活性变化的结果相似。PAL和POD这2种酶在植物抗病机制中扮演着很重要的角色,能够催化一些诱导型抗病物质的合成,间接促使植物产生抗病性(Passardi et al., 2005)。本试验通过Western印迹分析测定了不同浓度马蓝醇提取物对TMV外壳蛋白合成的影响,发现随着醇提取物浓度增大,蛋白表达量逐渐减少,呈现剂量效应,这与Li et al.(2007)和王杰(2014)分别用双裂孕烷甾体和香菇多糖诱导烟草叶片后的Western印迹分析试验结果相似。本试验还观察了不同浓度的马蓝醇提取物处理后对TMV侵染的烟草原生质体形态变化,结果表明0.5 μg/mL马蓝醇提取物对烟草原生质体具有保护作用,能够保持原生质体细胞形态完整。这主要可能是因为经过马蓝醇提取物处理后的烟草叶肉细胞原生质体中的TMV增殖严重受抑制,是系统抗病性在细胞水平的表现(Murphy & Carr, 2002),此现象在珊西烟与番茄花叶病毒(*Tomato mosaic virus*, TOMV)、榨菜与芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)、大豆与大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV)的互作研究中均有发现(Xu et al., 1996; Hong et al., 1999; Zhi et al., 2005)。

抗病毒剂可以从抑制病毒和诱导抗性两个角度实施抗病毒策略,本研究结果证明马蓝醇提取物既具有抑制病毒又具有诱导抗性的作用,从分子层面解析马蓝醇提取物的抗病毒机制将是下一步的工作重点。理想的植物源抗病毒剂不仅能够抑制病毒在植物细胞内的复制,同时不影响寄主细胞的正常代谢和生长(吕印谱等, 2007),马蓝醇提取物对烟草原生质体具有保护作用,证明马蓝作为生物源农药的原料,具有广阔的应用前景。

参 考 文 献 (References)

- An DR. 1994. The research present situation and facing problems of plant virus chemical control. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 6(2): 15-18 (in Chinese) [安德荣. 1994. 植物病毒化学防治的研究现状和所面临的问题. *生命科学*, 6(2): 15-18]
- Chakraboty M, Karun A, Mitra A. 2009. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*, 166(1): 63-71
- Du CM, Wu YH, Zhao XX, Zhu CY, Jiang G, Yan XM. 2004. Recent development in research of natural antiphytoviral substances. *Acta Tabacaria Sinica*, 10(1): 34-40 (in Chinese) [杜春梅, 吴元华, 赵秀香, 朱春玉, 姜革, 闫学明. 2004. 天然抗植物病毒物质的研究进展. *中国烟草学报*, 10(1): 34-40]
- Duggar BM, Arnustrong JK. 1925. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juice of various plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 12: 359-366
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. 1995. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press. 10(12): 313-314
- Fraenkel-Conrat H, Williams RC. 1995. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 141: 690-698
- Gooding GV, Hebert TA. 1967. A simple technique for purification of *Tobacco mosaic virus* in large quantities. *Phytopathology*, 57: 1285-1289
- Hong J, Xue ZY, Xu Y. 1999. Ultrastructural alteration of host infected with *Tomato mosaic virus*. *Acta Botanica Sinica*, 41(12): 1259-1263
- Hou YX, Li CJ, Zhang WJ. 1998. Research of anti-virus agents for plants. // *Proceedings of the 9th Academic Annual Conference of Chemical Industry and Engineering Society of China of pesticides*. Shanghai, pp. 49 (in Chinese) [侯玉霞, 李重九, 张文吉. 1998. 抗植物病毒剂的研究进展. // *中国化工学会农药专业委员会第九届年会论文集*. 上海, pp. 49]
- Ko HC, Wei BL, Chiou WF. 2006. The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-infected human epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(2): 205-210
- Li YM, Wang LH, Li SL, Chen XY, Shen YM, Zhang ZK, He HP, Xu WB, Shu YL, Liang GD, et al. 2007. Seco-pregnane steroids target the subgenomic RNA of alphavirus-like RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19): 8083-8088
- Lü YP, Ding ZY, Song BA, Xue W. 2007. Research advances on the action mechanism of antiviral agents. *China Plant Protection*, 27(10): 14-16 (in Chinese) [吕印谱, 丁征宇, 宋宝安, 薛伟. 2007. 抗植物病毒剂作用机制研究进展. *中国植保导刊*, 27(10): 14-16]
- Luo Y. 2013. Inhibitory effect of lentinan against *Tobacco mosaic virus*. *Modern Agricultural Science and Technology*, (24): 147 (in Chinese) [罗琰. 2013. 香菇多糖对烟草花叶病毒的抑制作用研究. *现代农业科技*, (24): 147]

- Murphy AM, Carr JP. 2002. Salicylic acid has cell-specific effects on *Tobacco mosaic virus* replication and cell-to-cell movement. *Plant Physiology*, 128(2): 552-563
- Niu CY. 2005. Research action mechanism on TMV from cytosinpeptidemycin. Ph. D Thesis. Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese) [牛春玉. 2005. 嘧肽霉素抗烟草花叶病毒(TMV)作用机制研究. 博士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学]
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5): 255-265
- Wang J. 2014. Preparation and action mechanism on TMV of polysaccharide from spent mushroom substrate. Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [王杰. 2014. 香菇多糖的制备及抗烟草花叶病毒(TMV)作用机制的研究. 泰安: 山东农业大学]
- Wang XK. 2006. The experiment principle and technique on plant physiology and biochemistry. Beijing: Higher Education Press, pp. 169-171 (in Chinese) [王学奎. 2006. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, pp. 169-171]
- Xie LH. 2009. Plant virus: pathology and molecular biology. Beijing: Science Press, pp. 2-7 (in Chinese) [谢联辉. 2009. 植物病毒: 病理学与分子生物学. 北京: 科学出版社, pp. 2-7]
- Xu JH, Li DB, Seng FJ. 1996. Studies on cytopathological ultrastructure of three different disease resistance tuber mustard varieties infected with *Turnip mosaic virus*. *Virologica Sinica*, (1): 61-68
- Xue YL, Ouyang GC, Ao SG. 1983. The research of phenylalanine ammonia lyase of plant: IV the dynamic changes of the PAL activity in rice seedlings. *Plant Physiology Journal*, 9(3): 87-92 (in Chinese) [薛应龙, 欧阳光察, 澳绍根. 1983. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究-IV 水稻幼苗中 PAL 活性的动态变化. 植物生理学报, 9(3): 87-92]
- Zhao L. 2016. Research of antiviral agents zaixichun and polysaccharide peptide on their isolation, identification and mechanism of action. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [赵磊. 2016. 甾烯醇与云芝糖肽等抗病毒物质的分离鉴定及其作用机理研究. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Zhao L, Hao XA, Wu YF. 2015. Inhibitory effect of polysaccharide peptide (PSP) against *Tobacco mosaic virus* (TMV). *International Journal of Biological Macromolecules*, 75: 474-478
- Zhi HJ, Gai JY, Guo DQ. 2005. Ultrastructural characterization of soybeans with different types of resistance to *Soybean mosaic virus*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 28(1): 6-10

(责任编辑:王 璇)