

15 种中草药抗烟草花叶病毒活性的研究

徐晓庆,张秀丽,郭勃予,尚艳茹,汤明威,张凯鑫,李晨* (东北林业大学生命科学学院,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的]测定 15 种中草药提取物抗 TMV 的活性。[方法]利用半叶枯斑法,初筛测定 15 种中草药对 TMV 钝化作用,复筛测定其对 TMV 初侵染和复制增殖作用。[结果]商陆、大黄、板蓝根、金银花 4 种中草药表现出明显的 TMV 体外钝化作用,其钝化抑制率均在 50% 以上;复筛测定 4 种中草药抗 TMV 初侵染和复制增殖活性,大黄表现出较好的活性,且与其他 3 种中草药相比差异显著。盆栽试验表明,植物提取液(大黄)在 100 倍液下,喷雾加灌根的施药方式对烟草病毒病的防效最好,达 49.00%,优于对照药剂 20% 吗啉胍·乙铜可湿性粉剂。[结论]15 种中草药中大黄具有较优的抗 TMV 活性,值得进一步研究。
关键词 中草药;烟草花叶病毒;心叶烟;曼陀罗
中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)06-01691-03

The Study of the Activity of 15 Kinds of Chinese Traditional Medicine Against Tobacco Mosaic Virus
XU Xiao-qing, ZHANG Xiu-li, LI Chen, et al (College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)
Abstract [Objective] The aim was to study the active determination of the extracts of 15 kinds of Chinese traditional medicine against TMV. [Method] Using half leaf blight spot method, 15 kinds of Chinese traditional medicine against TMV in vitro was determined in the experiment of initial screening, after screened again through the experiments of inhibiting TMV infection and inhibiting the multiplication of TMV. [Result] Four kinds of Chinese herbal medicine, *Phytolacca acinosa* Roxb., *Rheum palmatum* L., *Isatis tinctoria*, *Lonicera japonica* Thunb., had an obvious inactivation on TMV in vitro, and the inhibition rate was more than 50%. After screened again through the experiments of inhibiting TMV infection and inhibiting the multiplication of TMV, *Rheum palmatum* L. showed better activity. It had a significant difference compared with the other three kinds of Chinese traditional medicine. In the field plot trials, the extract of *Rheum palmatum* L. (100 times, spraying + pouring) was better than Moroxydine + Cupric acetate, W. P. (20%) and had the best inhibition rate(49.00%). [Conclusion] *Rheum palmatum* L. had the best activity against TMV, and was worth further studying.
Key words Chinese traditional medicine; TMV; *Nicotiana glutinosa* L.; *Datura stramonium* L.

植物病毒病的防治相对于病(真菌、细菌)、虫、草等的防治较为困难,全世界每年因其造成的经济损失高达数百亿元,然而成为商品的抗植物病毒剂较少^[1-5]。面对植物病毒病发生日益严重,抗植物病毒药剂依然匮乏的局面,继续深入开展抗植物病毒剂的研究具有十分重要的意义。

我国作为植物源农药研究和使用的最早的国家,其抗病毒问题的研究主要是伴随着中医和中草药的发展而出现的。很多具有较好抗病毒(动物)活性的中草药对于抗植物病毒活性的研究值得借鉴。基于此,笔者以烟草花叶病毒(TMV)为研究对象,将 15 种常见的抗病毒中草药的抗 TMV 活性进行比较研究^[6-8]。另外,为保证活性测定的准确性,选择心叶烟和曼陀罗 2 种枯斑寄主作为活性指示材料,在对 15 种中草药抗 TMV 体外钝化试验后,选择具有较优抗病毒活性的中草药进行复筛,并测定其在普通烟上的抗 TMV 活性,以期为我国植物源农药的研究与开发积累资料。

1 材料与方法

1.1 枯斑寄主 心叶烟(*Nicotiana glutinosa* L.)、曼陀罗(*Datura stramonium* L.)。将心叶烟或曼陀罗种子与一定量基质混匀后均匀洒在装有基质的育苗盘中,浇水适量,置于适宜条件下(温度 22℃,光照 16 h/d,湿度 60%)培养,当幼苗长至 4~6 片真叶时供试^[9]。

基金项目 东北林业大学生命科学学院创新试验校级项目(201310225123)。
作者简介 徐晓庆(1994-),女,黑龙江绥化人,本科生,专业:生物技术。张秀丽(1980-),女,吉林舒兰人,博士研究生,研究方向:植物生理与植物营养。徐晓庆和张秀丽为同等贡献作用。*通讯作者,助教,硕士,从事植物源农药的开发与应用研究。
收稿日期 2014-02-03

1.2 供试植物 15 种中草药全部购自黑龙江省医药公司,经相关专家鉴定确认后,50℃烘干后,粉碎,过 40 目筛,室温保存备用。

1.3 供试毒源 烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV)由西北农林科技大学农业部植物病理研究所提供。参照王人元^[10]的方法对其提纯,提纯后的病毒经紫外扫描呈典型的 TMV 核蛋白吸收曲($A_{260}/A_{280} = 1.20$),病毒接种液用 PBS 缓冲液定容为 20 μg/ml。

1.4 植物提取物的制备 称取各植物材料 50 g,5 倍量 95% 乙醇回流提取 3 次,每次 30 min,合并 3 次提取液,过滤,减压浓缩至膏状,称重后用少量二甲亚砜(DMSO)溶解后配成 10 mg/ml 的水溶液,置于 4℃冰箱备用。

1.5 试验方法

1.5.1 对 TMV 体外钝化作用测定。采用半叶枯斑法^[11]测定。选取生长旺盛的 4~6 叶期心叶烟或曼陀罗,左半叶接种供试药剂与病毒等体积混合液(用植物提取液 50 倍液钝化病毒),右半叶接种蒸馏水与病毒等体积混合液(对照)。试验重复 3 次,5~7 d 后计算枯斑数,枯斑抑制率按照“1.7”中公式计算。

1.5.2 对 TMV 初侵染和复制增殖作用测定。采用半叶枯斑法^[11]测定。选取生长旺盛的 4~6 叶期心叶烟或曼陀罗,初侵染试验中先在供试植物左半叶施药,间隔 5 min 后,再全叶接种病毒;复制增殖试验中先全叶接种病毒,间隔 5 min 后,再在供试植物左半叶施药。中草药提取液供试浓度为 50 倍水稀释液,吗啉胍·乙铜施药浓度为 400 倍液,病毒接种浓度为 10 mg/L。试验重复 3 次,5~7 d 后计算枯斑数,按“1.7”中公式计算枯斑抑制率。

1.6 盆栽试验 试验设大黄提取液 100 倍液和 200 倍液 2 个剂量,喷雾、灌根、喷雾加灌根 3 种处理方法,以 20% 的吗啉胍·乙铜可湿性粉剂 400 倍液常量喷雾为对照,并设清水对照,共计 8 个处理,每个处理重复 3 次,每个重复 10 株烟苗;自发病初期开始施药,每隔 7 d 施药 1 次,共 3 次。3 次施药 7 d 后调查病情,统计防效。病情分级标准:0 级:全株无病;1 级:心叶脉明或轻微花叶,植株无明显矮化;3 级:1/3 叶片花叶但不变形,或植株矮化为正常株高的 3/4;5 级:1/3 ~ 1/2 叶片花叶,或少数叶片变形,或主脉变黑,或植株矮化为正常株高的 2/3 ~ 3/4;7 级:1/2 ~ 2/3 叶片花叶、变形或主侧脉坏死,或植株矮化为正常株高的 1/2 ~ 2/3 以上;9 级:全株叶片花叶、严重变形或坏死,或植株矮化为正常株高的 1/2 以上^[12]。

1.7 结果计算与统计方法^[9]

(1) 枯斑抑制率计算公式如下:

$$\text{枯斑抑制率}(\%) = (\text{对照枯斑数} - \text{处理枯斑数}) / \text{对照枯斑数} \times 100$$

(2) 盆栽试验中,调查各处理的病情,计算病情指数及防效,公式如下:

$$\text{病情指数} = \sum (\text{病级数} \times \text{病株数}) / (\text{最高病级} \times \text{各处理总株数}) \times 100$$

$$\text{防效}(\%) = (1 - \frac{\text{CK 区药前病指} \times \text{处理区药后病指}}{\text{CK 区药后病指} \times \text{处理区药前病指}}) \times 100$$

(3) 试验中,测定的数据均按照完全随机设计中单因素试验统计分析,其多重比较方法为 Turkey 法。

2 结果与分析

2.1 15 种中草药提取液对 TMV 体外钝化作用的比较 对 15 种中草药提取液对 TMV 体外钝化作用进行了比较,结果见表 1。

表 1 15 种中草药提取液对 TMV 体外钝化作用

中草药样品(拉丁学名)	平均枯斑数				抑制率//%	
	心叶烟		曼陀罗		心叶烟	曼陀罗
	处理	对照	处理	对照		
商陆(<i>Phytolacca acinosa</i> Roxb.)	14.05	33.00	19.25	51.00	57.42 c	62.25 b
大黄(<i>Rheum palmatum</i> L.)	11.00	34.78	19.20	57.69	68.37 b	66.72 b
柴胡(<i>Bupleurum chinense</i>)	20.00	26.85	22.38	26.33	25.51 f	15.00 h
板蓝根(<i>Isatis tinctoria</i>)	12.25	29.33	18.00	29.25	58.23 c	38.46 e
连翘(<i>Forsythia suspensa</i>)	20.10	33.10	26.67	32.00	39.27 d	16.66 h
蒲公英(<i>Herba Taraxaci</i>)	33.00	29.67	30.50	22.85	0.00 h	0.00 j
甘草(<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	24.25	40.89	29.00	39.50	40.69 d	26.58 f
虎杖(<i>Polygonum cuspidatum</i>)	17.33	18.65	24.33	26.00	7.08 g	6.42 i
鱼腥草(<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.)	19.75	22.00	28.89	34.10	10.23 g	15.28 h
黄芩(<i>Scutellaria rehderiana</i>)	29.75	32.75	37.10	47.33	9.16 g	21.61 g
黄柏(<i>Phellodendron chinense</i> Schneid. var. <i>Glabriusculum</i> Schneid.)	31.00	34.33	40.43	42.56	9.70 g	5.00 i
丹参(<i>Salvia miltiorrhiza</i>)	24.00	35.20	36.34	49.68	31.82 e	26.85 f
茵陈(<i>Artemisiacapillaris</i> Thunb.)	26.50	39.85	22.74	37.33	33.50 e	39.08 de
金银花(<i>Lonicera japonica</i> Thunb.)	15.75	26.00	20.00	40.65	39.42 d	50.80 c
紫草(<i>Lithospermum erythrorhizon</i>)	14.00	22.65	29.10	49.83	38.19 de	41.60 d
药剂对照(CK)	13.83	49.33	15.20	59.00	71.96 a	74.24 a

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);表中未注明药剂对 TMV 钝化时间的,钝化时间均为 5 min;药剂对照是 20% 的吗啉胍·乙铜可湿性粉剂。

由表 1 可知,15 种中草药提取液对 TMV 体外钝化作用差别很大,商陆、大黄、板蓝根、金银花 4 种中草药表现出明显的 TMV 体外钝化作用,其钝化抑制率均在 50% 以上。特别是中草药大黄在 2 种枯斑寄主上均表现出较优的 TMV 体外

钝化作用,其钝化抑制率在 65% 以上。

2.2 4 种中草药提取液抗 TMV 初侵染活性的比较 由表 2 可知,大黄抗 TMV 初侵染活性高于商陆、板蓝根和金银花,且在心叶烟上表现差异显著。

表 2 4 种中草药提取液抗 TMV 初侵染活性的比较

中草药样品(拉丁学名)	平均枯斑数				抑制率//%	
	心叶烟		曼陀罗		心叶烟	曼陀罗
	处理	对照	处理	对照		
商陆(<i>Phytolacca acinosa</i> Roxb.)	10.25	20.33	21.33	43.65	49.58 c	51.13 b
大黄(<i>Rheum palmatum</i> L.)	16.00	36.40	19.67	44.00	56.04 b	55.30 b
板蓝根(<i>Isatis tinctoria</i>)	18.67	33.00	28.10	50.79	43.42 d	44.67 c
金银花(<i>Lonicera japonica</i> Thunb.)	11.89	23.06	22.00	39.93	48.44 cd	44.90 c
药剂对照(CK)	12.43	36.87	18.43	49.24	66.29 a	62.57 a

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);表中未注明药剂对 TMV 钝化时间的,钝化时间均为 5 min;药剂对照是 20% 的吗啉胍·乙铜可湿性粉剂。

2.3 4 种中草药提取液抗 TMV 复制增殖活性的比较 由表 3 可知,大黄抗 TMV 复制增殖活性高于商陆、板蓝根和金

银花,且在心叶烟上表现出显著差异。虽然大黄抗 TMV 复制增殖活性并不是很高,但与对照药剂相比差异不显著,值

表 3 4 种中草药提取液抗 TMV 复制增殖活性的比较

中草药样品 (拉丁学名)	平均枯斑数				抑制率//%	
	心叶烟		曼陀罗		心叶烟	曼陀罗
	处理	对照	处理	对照		
商陆 (<i>Phytolacca acinosa</i> Roxb.)	24.00	38.83	39.15	66.67	38.19 b	41.28 ab
大黄 (<i>Rheum palmatum</i> L.)	21.35	37.76	40.00	70.75	43.46 a	43.46 a
板蓝根 (<i>Isatis tinctoria</i>)	24.80	36.64	42.30	67.50	32.31 c	37.33 b
金银花 (<i>Lonicera japonica</i> Thunb.)	22.37	35.20	44.25	67.50	36.45 bc	34.44 c
药剂对照 (CK)	22.78	40.05	38.25	69.00	43.12 a	44.57 a

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);表中未注明药剂对 TMV 钝化时间的,钝化时间均为 5 min;药剂对照是 20% 的吗啉胍·乙铜可湿性粉剂。

得进一步研究。

2.4 大黄提取液防治烟草病毒病的盆栽试验结果 由表 4 可知,植物提取液(大黄)对烟草病毒病具有良好的防效。其 100 倍液 3 种施药方式均可有效地防治烟草病毒病,3 次施药后 7 d 防效明显优于对照药剂 20% 的吗啉胍·乙铜可湿性粉剂,且喷雾加灌根防效最好。

表 4 大黄提取液防治烟草病毒病盆栽试验病情指数

处理	施药方式	稀释 倍数	施药前 病情指数	施药后 病情指数	防效 %
植物提取液(大黄)	喷雾	100 ×	6.42	13.43	46.26 ab
植物提取液(大黄)	灌根	100 ×	8.15	18.07	43.05 b
植物提取液(大黄)	喷雾+灌根	100 ×	6.85	13.60	49.00 a
植物提取液(大黄)	喷雾	200 ×	7.30	21.94	22.80 e
植物提取液(大黄)	灌根	200 ×	7.25	20.14	28.64 d
植物提取液(大黄)	喷雾+灌根	200 ×	8.04	21.14	32.46 d
药剂对照	喷雾	400 ×	7.63	18.37	38.15 c
发病对照	喷雾	—	6.25	24.33	—

3 小结与讨论

(1)该研究对 15 种中草药样品进行了抗 TMV 活性研究。在对 TMV 体外钝化作用方面,商陆、大黄、板蓝根、金银花 4 种中草药表现出较好的活性,在抗 TMV 初侵染和复制增殖方面,大黄表现出较好的活性。盆栽试验中植物提取液(大黄)在 100 倍液下,喷雾加灌根的施药方式对烟草病毒病的防效最好,达 49.00%,优于对照药剂 20% 吗啉胍·乙铜可湿性粉剂。

(2)该研究采用心叶烟和曼陀罗 2 种指示植物作为枯斑寄主,主要是考虑到接种病毒的不确定因素很多,接种时每次摩擦的轻重、接种后到对接种叶片进行水洗之前的时间、水洗时间等方面都影响到病斑数的多少;同时由于心叶烟和曼陀罗本身对 TMV 的抗性也不相同,采用 2 种枯斑寄主会大大增加试验结果的可靠性。

(上接第 1659 页)

坚持前促、中稳、后补原则,基肥占 60%,分蘖肥占 15%,穗粒肥占 25%。

3.4 科学管水 浅水栽秧、寸水活棵,薄水分蘖,深水抽穗扬花,后期干湿交替,适时排水搁田,最高苗不超过 375 万株/hm²,收获前 5 d 断水。

3.5 综合防治病虫害 播前用药剂防治恶苗病和干尖线虫

(3)室内盆栽试验表明,植物提取液(大黄)以喷雾加灌根施药效果最好,由此初步推测植物提取液(大黄)可能具有一定的内吸作用。这可能与植物提取液(大黄)中含有大量的小分子抗病毒物质有关,而小分子物质来源于植物,易被植物吸收。关于植物提取液(其他类中草药)是否普遍都具有内吸作用还有待于进一步深入研究。

(4)该研究以烟草花叶病毒作为基本防治对象,实际大田作物发病时往往是多种病毒的混合感染,所以用烟草花叶病毒筛选出的抗病毒中草药是否对其他病毒也具有较好的防效还值得进一步研究。

参考文献

[1] 陈齐斌,沈嘉祥. 抗植物病毒剂研究进展和面临的挑战与机遇[J]. 云南农业大学学报,2005,20(4):505-511.
[2] SLUSARENKO A J,FRASER R S,VAN LOON L C. Mechanisms of Resistance to Plant Disease[M]. Netherlands:Kluwer Academic Publishes,2000:480.
[3] CULVER J N,PADMANABBAN M S. Virus-induced disease:Altering host physiology one interaction at a time[J]. Annual Review of Phytopathology, 2007,4:221-243.
[4] 江山,韩熹莱. 植物病毒病化学防治的研究进展[J]. 中国病毒学,1995,10(1):1-7.
[5] 邱平生,王敏. 植物病毒学的研究进展[J]. 中国病毒学,2004,19(3):309-312.
[6] 苏水方,裘维蕃. 几种中草药的抽提物对黄瓜花叶病毒引起的辣椒花叶病治疗作用初步研究[J]. 植物病理学报,1989,19(2):123-128.
[7] 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.
[8] 安天英,杨诏,李在国,等. 牛心朴子草中抗烟草花叶病毒活性成分的分离与鉴定[M]//张兴. 植物农药与药剂毒理学研究进展. 北京:中国农业科学出版社,2002:212-217.
[9] 李晨. 植物源抗病毒剂 VFB 的配方及加工工艺优化[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.
[10] 王人元. PEG-蔗糖正反浓度梯度离心法提纯植物病毒的研究[J]. 东北农业大学学报,1990,21(3):298-302.
[11] 田波,裴美云. 植物病毒研究方法:上册[M]. 北京:科学出版社,1987.
[12] 全国烟草总公司青州烟草研究所. 中华人民共和国国家标准:GB/T 23222-2008 烟草病虫害分级及调查方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

病等种传病害;秧苗期注意防治灰飞虱、稻蓟马、蚜虫;大田期重点防治稻瘟病、白叶枯病、纹枯病、黑条矮缩病、螟虫、褐飞虱等病虫害。

参考文献

[1] 曹凑贵,蔡明历,张似松,等. 湖北水稻生产现状及技术对策[J]. 湖北农业科学,2004(4):28-30.
[2] 黄咏虹,郭明涛,蔡思敏,等. 丰两优 1 号在汕头的试种表现及高产栽培要点[J]. 杂交水稻,2004,19(5):46-47.