

• 药材与资源 •

药用植物提取物抗烟草花叶病毒活性的研究

沈建国, 谢荔岩, 吴祖建, 谢联辉, 林奇英*

(生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福建农林大学植物病毒研究所, 福建 福州 350002)

摘要:目的 研究我国传统药用植物抗烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)的作用,为从植物中开发抗病毒类生物农药提供依据。方法 采用局部枯斑法和叶碟法对我国 78 科 162 种药用植物提取物的抗 TMV 侵染和增殖作用进行测定。结果 在 10 mg/mL 水平下,19 种植物提取物可有效抑制 TMV 侵染,9 种植物提取物有明显抑制 TMV 增殖作用。结论 大多数药用植物提取物具有一定抗 TMV 侵染活性,仅少数药用植物提取物有较好的抗 TMV 增殖作用。

关键词:药用植物;烟草花叶病毒;抗病毒活性

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)02-0259-03

Antiviral effect of medicinal plant extracts on tobacco mosaic virus

SHEN Jian-guo, XIE Li-yan, WU Zu-jian, XIE Lian-hui, LIN Qi-ying

(Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology of Ministry of Education, Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Objective To study antiviral activities of medicinal plant extracts against tobacco mosaic virus (TMV) and provide basis for exploitation of bio-pesticides from plant resource. **Methods** Using local lesion and leaf discs assay, extracts from 162 medicinal plant species belonging to 78 families in China were screened for antiviral activity against TMV. **Results** At a concentration of 10 mg/mL, extracts of 19 plant species could effectively inhibit TMV infection; nine plant extracts significantly inhibited the multiplication of TMV in infected leaf discs. **Conclusion** Most of the plant extracts exhibits certain antiviral activity of inhibiting TMV infection, but only a few have inhibitory effect on TMV multiplication.

Key words: medicinal plant; tobacco mosaic virus (TMV); antiviral activity

植物病毒病有“植物癌症”之称,是农业生产上重要病害之一。由于植物病毒属绝对内寄生物,自身无能量代谢系统,对寄主植物细胞具有高度依赖性,因而植物病毒病的防治一直是植物病害防治中的一大难题。为控制植物病毒病造成的危害,人们对其防治进行了许多有益的尝试。其中,植物源抗病毒剂的应用为病毒病的防治开创了一条新途径。自 1925 年 Duggert 等首次从商陆中发现抗植物病毒商陆蛋白 PAP 以来,国内外学者对植物中的抗病毒活性物质进行了广泛研究^[1~4]。

以天然植物活性物质为有效成分的植物源抗病毒剂具有环境兼容性好、安全、开发成本低等优点,符合未来农药发展的趋势与要求,有较好的开发和应用前景。近年来,植物源抗病毒剂的研究已日益受

到人们重视。为此,本实验以烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)为对象,对我国常见药用植物的抗病毒活性进行了研究,以期为我国传统药用植物资源的充分利用和新型植物源生物农药的研究与开发积累数据。

1 材料与方法

1.1 供试植物:78 科 162 种植物,除部分采自福建农林大学校园外,其余购自福建省医药公司,由福建农林大学生命科学院植物教研室何可镨副教授鉴定。经 50℃ 烘干后,粉碎,过 40 目筛,室温保存备用。

1.2 供试寄主:TMV 枯斑寄主心叶烟 *Nicotiana glutinosa* L., TMV 系统侵染寄主普通烟 *K₃₂₆* *Nicotiana tabacum* L. *K₃₂₆*, 防虫温室内培育。

1.3 供试毒源:烟草花叶病毒(TMV)普通株系,由

收稿日期:2005-06-25

基金项目:福建省科技厅重点资助项目(99-Z-193);福建省教育厅项目(K04037)

作者简介:沈建国(1978—),男,安徽芜湖人,博士,研究方向为生物农药与仿生农药。

* 通讯作者 林奇英 Tel:(0591)83789439 Fax:(0591)83769704 E-mail:linqiying@126.com

本所保存于普通烟 K₃₂₆ 上。

1.4 仪器和试剂:UV—1600 紫外分光光度计(北京瑞利公司),高速、超速离心机(Beckman 公司),酶标仪(Bio-Rad 公司),福氏不完全佐剂、碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG(Sigma 公司)。

1.5 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、滤过、减压浓缩至膏状,称重并用少量二甲亚砜(DMSO)溶解后配成 10 mg/mL 的水溶液,置于 4℃冰箱备用。

1.6 病毒提纯及抗血清制备:(1)病毒提纯:参照 Gooding 等的方法^[5],略加修改。典型症状病叶经差速离心、PEG 沉淀及 10%~40%蔗糖不连续密度梯度离心后提纯病毒。提纯的病毒经紫外扫描和电镜观察确定质量浓度及质量分数。(2)抗血清制备:用提纯的病毒免疫注射家兔 5 次,每次注射间隔 1 周,最后一次注射后 10 d 颈动脉采血,制备的抗血清用间接 ELISA 法^[6]测定效价。

1.7 病毒质量浓度标准曲线的建立:将提纯的病毒稀释成 8 个不同质量浓度梯度,间接 ELISA 法测定 405 nm 波长处吸光度值(Y),建立病毒质量浓度(X)标准曲线 $Y=0.8895X+0.1384$, $r=0.9648$ 。

1.8 抑制侵染作用测定:采用局部枯斑法^[7]。选择健康、生长旺盛的 6~8 叶期心叶烟,左半叶接种提取物与病毒等体积混合液(病毒接种终质量浓度为 10 μg/mL),右半叶接种蒸馏水(含少量 DMSO)与病毒等体积混合液作对照,接种后用水冲洗。每处理接种 4~5 个叶片,重复 3 次,3 d 后统计枯斑数目,计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照枯斑数} - \text{处理枯斑数}}{\text{对照枯斑数}} \times 100\%$$

1.9 抑制增殖作用测定:采用叶碟法^[2,7]。在生长健康的系统侵染寄主(普通烟 K₃₂₆)叶片上接种病毒一定时间后,用打孔器从叶肉部分(避开叶脉)打取直径为 12 mm 的圆片,分别以漂浮于供试提取物溶液和蒸馏水(含少量 DMSO)中作为处理和阳性对照,同时设置以健康叶圆片漂浮于蒸馏水(含少量 DMSO)中作为阴性对照。48 h 后叶圆片以碳酸盐缓冲液按质量体积比为 1:20 包被,间接 ELISA 法测定吸光度,然后根据病毒浓度标准曲线求出病毒质量浓度,并计算抑制率。

2 结果与分析

2.1 病毒提纯及抗血清制备:提纯病毒经紫外扫描,呈典型的 TMV 核蛋白吸收曲线($A_{260}/A_{280} =$

1.20),病毒质量浓度为 20 mg/mL;提纯病毒负染后电镜下观察,病毒粒体形态呈杆状。间接 ELISA 法测定的自制 TMV 抗血清效价为 1:10 240。

2.2 具有抑制病毒侵染作用植物的筛选:以局部枯斑法,对 162 种植物提取物抗病毒侵染作用进行测定。结果表明,在 10 mg/mL 供试液下,绝大多数植物提取物具有一定的抑制病毒侵染作用,仅猫须草和柳树两种植物提取物表现为促进病毒侵染作用;抑制率在 50%以上的有 83 种(占供试药用植物总数 51.2%),其中抑制率达 95%以上的有 19 种(表 1)。

表 1 19 种抗病毒侵染作用较高的植物

Table 1 Nineteen plants with higher antiviral activity against TMV infection among tested plants

植物名称	科 名	供试部分
麻黄 <i>Ephedra sinica</i>	麻黄科	茎
荔枝 <i>Litchi chinensis</i>	无患子科	种子
莲 <i>Nelumbo nucifera</i>	睡莲科	叶
木瓜 <i>Chaenomeles speciosa</i>	蔷薇科	果实
山楂 <i>Crataegus pinnatifida</i>	蔷薇科	果实
羊蹄 <i>Rumex japonicus</i>	蓼科	根
夜交藤 <i>Polygonum multiflorum</i>	蓼科	根
红板归 <i>P. perfoliatum</i>	蓼科	茎叶
火炭母 <i>P. chinense</i>	蓼科	全株
辣蓼 <i>P. flaccidum</i>	蓼科	全株
榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	桑科	叶
柿 <i>Diospyros kaki</i>	柿树科	叶
水蜈蚣 <i>Kyllinga brevifolia</i>	莎草科	全株
金石榴 <i>Osbeckia chinensis</i>	野牡丹科	全株
雷公藤 <i>Trypterygium wilfordii</i>	卫矛科	根
哥兰叶 <i>Celastrus gemmatus</i>	卫矛科	根
石韦根 <i>Pyrrosia lingua</i>	水龙骨科	根
杨梅 <i>Myrica rubra</i>	杨梅科	叶
鼠尾粟 <i>Sporobolus poiretii</i>	禾本科	全株

2.3 具有抑制病毒增殖作用植物的筛选:在健康的普通烟上接种病毒 6~8 h 后,叶碟法测定各植物提取物对病毒增殖的抑制作用。结果表明,大部分植物提取物在 10 mg/mL 下抗病毒增殖活性不强,仅有六角仙、藿香、柴胡、寒草、海州常山、龙葵、匍匐滨藜、雍菜、决明 9 种植物的提取物对病毒增殖具有明显抑制作用(表 2)。其中提取物对病毒增殖抑制率在 90%以上的植物有六角仙、藿香和柴胡 3 种。

3 讨论

植物中含有极其丰富的活性物质,据统计,全世界约 1/3 的药物来自植物,通过植物获取的药品工业产值占药品总产值的 50%^[8]。除作为医药外,许多植物在农业上应用也十分广泛。从植物中寻找具有抗病、杀虫和除草等活性的先导化合物是当前生物农药研究领域的热点之一。本实验对我国不同科属的 162 种药用植物提取物抗烟草花叶病毒活性进

表 2 9 种植物提取物对 TMV 增殖的抑制效果
Table 2 Inhibitory effect of nine plant extracts
on multiplication of TMV

植物名称	科 名	供试部分	抑制率/%
六角仙 <i>Rostellularia procumbens</i>	爵床科	全株	91.92
藿香 <i>Agastache rugosus</i>	唇形科	茎叶	90.06
柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>	伞形科	根	90.01
寒草 <i>Wahlenbergia marginata</i>	桔梗科	全株	83.5
海州常山 <i>Clerodendrum trichotomum</i>	马鞭草科	全株	81.48
龙葵 <i>Solanum nigrum</i>	茄科	茎叶	81.19
匍匐滨藜 <i>Atriplex repens</i>	藜科	全株	74.68
茛菪 <i>Ipomoea aquatica</i>	旋花科	茎叶	83.22
决明 <i>Cassia obtusifolia</i>	豆科	种子	81.81

行了研究,结果表明,大多数药用植物提取物对烟草花叶病毒具有不同程度的抑制作用,有的具有抑制病毒侵染作用,有的具有抑制病毒增殖作用,其中以抑制病毒侵染的居多。

抑制侵染和抑制增殖是抗病毒活性物质抑制病毒的两种主要作用方式。本研究结果发现,19 种抑制 TMV 侵染作用强的植物,抑制 TMV 增殖活性不高。而 9 种抗 TMV 增殖作用强的植物却无明显抑制 TMV 侵染活性,这表明植物的抗 TMV 活性往往可能以某一种作用方式为主,而不一定对病毒同时表现为多种抑制作用;在供试植物中,5 种蓼科植物均表现出很高的抗 TMV 侵染作用,其作用机制及其他蓼科植物抗病毒活性有待进一步探讨。由于在植物病毒病的防治中,具有抑制病毒增殖作用的药剂更有实际应用价值。因此,本实验筛选出的几种具有较高抗 TMV 增殖活性的药用植物,其抗病毒活性成分及作用机制值得进一步研究。

植物源农药的开发利用可分为直接利用和间接利用两个方面。考虑到植物病毒病的特殊性,筛选到对病毒有效而对寄主无害的高选择性化合物有很大的难度。因而可考虑一方面在寻找具有抗病毒活性先导化合物的同时,另一方面对那些粗提物抗病毒活性高,但活性成分一时难以明确的植物单独直接利用或者开发成复方制剂加以应用。在田间, TMV 主要是通过病株汁液接触传播的,特别以人为因素造成的这种传播较为严重。本实验筛选出的具有抗 TMV 生物活性的药用植物提取物不仅原材料来源广、而且提取方法简单,因此可尝试将其中稳定性好的某些提取物加工成一定剂型后直接作为保护剂来

使用,如在移栽、打顶等农事操作前后分别喷施抗病毒侵染和增殖的提取物药液,可能对 TMV 侵染烟草起到较好的预防作用,但这尚需进一步试验加以验证。

近年来,已有多种中草药被报道具有较好的抗人体病毒作用。研究表明,某些防治人体病毒的中草药同时也具有一定的抗植物病毒作用,如商陆、大黄、板蓝根、紫草等^[9]。在本实验中,麻黄、山楂、雷公藤、水蜈蚣、杨梅、藿香、柴胡 7 种抗人体病毒药用植物,也表现出明显的抗植物病毒作用,对 TMV 分别具有显著的抑制侵染或抑制增殖活性。目前已报道的抗植物病毒植物大多集中在商陆科、藜科、苋科和紫茉莉科^[9],从本实验结果来看,除上述几种植物外,其他科一些植物也具有较好的抗植物病毒作用,如蓼科、蔷薇科、卫矛科、爵床科植物等。因此在进行抗植物病毒活性植物的筛选时,应扩大筛选对象范围,以发现抗病毒作用强的活性植物,为进一步从活性植物中寻找抗病毒活性化合物奠定基础。此外,在本实验筛选到的具有明显抑制 TMV 侵染或抑制 TMV 增殖的活性植物中,除雷公藤和辣蓼作为植物源杀虫剂研究较多外,其余活性植物在植物源农药上的应用还较少,有待进一步研究和开发。

References:

- [1] Zhu S F, Qiu W F. A primary study of the therapeutic effects of some medicinal herb-extracts on the pepper mosaic caused by CMV [J]. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 1989, 19(2): 123-127.
- [2] French C J, Towers G H N. Inhibition of infectivity of potato virus X by flavonoids [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(9): 3017-3020.
- [3] Verma H N, Baranwal V K, Srivastava S. *Antiviral Substances of Plant Origin* [M]. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 1998.
- [4] Patel A B, Pandey S M, Patel J, et al. Effect of phyto-extracts on urdbean leaf crinkle virus [J]. *J Mycol Plant Pathol*, 2001, 31(1): 98.
- [5] Gooding G V J R, Hebert T T. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities [J]. *Phytopathology*, 1967, 57(11): 1285.
- [6] Xie L H, Lin Q Y. *Plant Virology* (植物病毒学) [M]. Beijing: Agriculture Press, 2004.
- [7] Chen N C. *Bioassay Technology of Pesticides* (农药生物测定技术) [M]. Beijing: China Agriculture University Press, 1990.
- [8] Chen H F. *Dictionary of Plant Active Compound* (植物活性成分辞典) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2000.
- [9] Du C M, Wu Y H, Zhao X X, et al. Recent development in research of natural antiphytoviral substances [J]. *Acta Tabacaria Sin* (中国烟草学报), 2004, 10(1): 34-40.