

抗TMV的植物筛选及提取条件对 抗病毒物质活性的影响^{*}

翟梅枝^{1,2}, 高芳奎¹, 沈建国¹, 林奇英¹, 谢联辉¹

(1 福建农林大学 植物病毒所, 福建 福州 350002;

2 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对26种植物样品进行了抗病毒(TMV)活性测定。结果表明, 不同植物提取物对TMV 侵染心叶烟的抑制效果不同, 其中莲、榕树、柿子、杨梅、水蜈蚣、叶下珠、羊蹄甲和菊花对TMV 的抑制率在90%以上; 对高活性抗病毒植物莲叶而言, 抗病毒物质的活性因提取溶剂和提取方法的不同而异, 水作为溶剂提取时, 提取物对TMV 的抑制率仅约为70%, 而以甲醇和体积分数95%的乙醇作溶剂提取时, 提取物对TMV 的抑制率约在98%以上; 用体积分数95%的乙醇为溶剂, 采用索氏提取、回流提取和冷浸提取时, 所得提取物对TMV 的抑制率均为100%。冷浸提取的优化条件是: 以体积分数95%的乙醇为提取溶剂, 料液比20:180(1:9)提取12 h。

[关键词] 植物源病毒抑制剂; 烟草花叶病毒; 植物活性筛选; 提取方法

[中图分类号] S767.3⁺7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)07-0045-05

植物病毒病一直是农业生产中的一大危害, 素有植物“癌症”之称, 由于防治的困难, 其危害程度仅次于真菌病害, 给农业生产造成了极大损失。

20世纪80年代初, 美国每年因病毒病造成的农业损失达15~20亿美元, 日本每年因植物病毒病造成的农业经济损失达800亿日元之多。据统计^[1], 全世界每年仅烟草花叶病毒(*Tobacco Mosaic Virus*, TMV)造成的损失就达1亿美元以上。

自1914年Allard首次报道商陆(*Phytolacca acinosa*)汁液中存在抗TMV活性物质后, 国内外学者对植物抗病毒活性物质进行了多方面的探索和研究^[2~8], 从已知的有机或无机化合物到植物粗提物中, 均发现了一些对TMV有较好效果的抑制剂。

植物含有丰富的次生代谢产物, 是天然药物的宝库。目前, 国内外对于植物活性成分的研究主要集中在次生代谢物质的研究方面。为了充分利用我国丰富的植物资源, 本研究采用生物活性跟踪的手段, 进行了抗TMV活性植物的筛选, 并在此基础上对高活性植物进行了提取条件的优化, 以期对植物资源的综合利用和植物源抗病毒剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物样品 供试植物共26种, 除核桃叶来源于西北农林科技大学外, 其余植物样品均来自福建农林大学植物园, 所有植物样本经福建农林大学生命科学院植物教研室黄春梅老师鉴定。供试植物及供试部位详见表1。植物样品采回后阴干, 放50℃恒温烘箱烘干后粉碎, 过20目筛(孔径0.84 mm), 然后密封于塑料袋内, 置冰箱中保存备用。

1.1.2 寄主植物 选用普通烟K326(*Nicotiana tabacum* var. K326)和心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)为寄主植物, 前者为TMV的系统侵染寄主, 用于病毒的繁殖; 后者为TMV的局部枯斑寄主。

供试烟苗均采用直播漂浮育苗技术进行培育, 经50 d水培后, 将幼苗移入直径15 cm的花盆中土培, 生长一定时间后, 选长势基本一致的幼苗用于病毒接种试验。

1.1.3 供试病毒 烟草花叶病毒(TMV)普通株系, 保存在普通烟K326植株上, 提纯后备用。

1.1.4 主要仪器及试剂 主要仪器有植物粉碎机、Beckman DU-600型分光光度计、高速离心机、旋转

^{*} [收稿日期] 2003-12-26

[基金项目] 福建省科技厅重点项目(99-Z-193, 98-Z-178)

[作者简介] 翟梅枝(1963-), 女, 河南西平人, 副教授, 博士, 主要从事植物病害生物防治研究。

薄膜蒸发仪、循环水真空泵、恒温水浴锅等; 试剂有乙醇、正丁醇、聚乙二醇、二甲亚砜, 均为分析级。

表 1 参试植物样品名录

Table 1 Catalogue of plant samples

编 号 Number	样品及学名 Samples and plant name	科名 Family	供试部位 Tested part
1	莲 <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	睡莲科 Nymphaeaceae	叶 Leaf
2	榕树 <i>Ficus microcarpa</i> L.	桑科 Moraceae	叶 Leaf
3	杨梅 <i>Myrica rubra</i> Sieb. et Zucc.	杨梅科 Myricaceae	叶 Leaf
4	叶下珠 <i>Phyllanthus urinaria</i> L.	大戟科 Euphorbiaceae	全株 The whole
5	柿子 <i>Diospyros kaki</i> L.	柿树科 Ebenaceae	叶 Leaf
6	水蜈蚣 <i>Kyllinga brevifolia</i> L.	莎草科 Kyllingaceae	叶 Leaf
7	菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i> L.	菊科 Compositae	叶 Leaf
8	羊蹄甲 <i>Bauhinia variegata</i> L.	豆科 Leguminosae	叶 Leaf
9	心叶落葵 <i>Amaranthus cordifolius</i> L.	落葵科 Basellaceae	叶 Leaf
10	核桃 <i>Juglans regia</i> L.	胡桃科 Juglandaceae	叶 Leaf
11	合欢 <i>Albizia julibrissin</i> Desf.	豆科 Leguminosae	叶 Leaf
12	侧柏 <i>Platycladus orientalis</i> L.	柏科 Cupressaceae	叶 Leaf
13	女贞 <i>Ligustrum lucidum</i> L.	木犀科 Oleaceae	叶 Leaf
14	鸡矢藤 <i>Paederia scandens</i> (L.) Miq.	茜草科 Rubiaceae	叶 Leaf
15	蟛蜞菊 <i>Wedelia chinensis</i> (L.) Merr.	菊科 Compositae	全株 The whole
16	飞扬草 <i>Euphorbia hirta</i> L.	大戟科 Euphorbiaceae	全株 The whole
17	棕竹 <i>Rhapis humilis</i> (L.) Presl	禾本科 Gramineae	叶 Leaf
18	鱼尾葵 <i>Caryota mitis</i> (L.) Presl	棕榈科 Arecaceae	叶 Leaf
19	假连翘 <i>Duranta repens</i> L. sp.	马鞭草科 Verbenaceae	叶 Leaf
20	一品红 <i>Euphorbia pulcherrima</i> (L.) Mill.	大戟科 Euphorbiaceae	叶 Leaf
21	青葙 <i>Celosia argentea</i> (L.) Mill.	苋科 Amaranthaceae	全株 The whole
22	垂柳 <i>Salix babingtoniana</i> (L.) W. & A.	杨柳科 Salicaceae	叶 Leaf
23	毛竹 <i>Phyllostachys pubescens</i> (L.) Presl	禾本科 Gramineae	叶 Leaf
24	芭蕉 <i>Musa basjoo</i> Sieb. et Zucc.	芭蕉科 Illiciaceae	叶 Leaf
25	刺楸 <i>Pterocarya fraxinifolia</i> (L.) Sieb.	蓼科 Polygonaceae	全株 The whole
26	蒲公英 <i>Taraxacum mongolicum</i> (L.) Nakai	菊科 Compositae	全株 The whole

1.2 方 法

1.2.1 植物样品提取液的制备 取植物样品粉末 10 g 倒于 250 mL 圆底烧瓶中, 用 100 mL 体积分数 95% 的乙醇在水浴条件下回流提取 3 次, 时间分别为 1, 0.5, 0.5 h, 合并 3 次提取液, 减压浓缩至膏状。称取一定量提取物, 用少量二甲亚砜(DMSO)溶解, 加蒸馏水定容, 提取物质量浓度为 0.01 g/mL, 将之置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 TMV 病毒的提纯 烟草花叶病毒(TMV)经心叶烟纯化后, 在普通烟 K326 上繁殖。TMV 的提纯参考 Gooding 等^[9]的方法略有修改, 即在第 1 次加入聚乙二醇(PEG)之前采取两次离心的方法, 离心速度为 5 000 r/min, 每次 30 min, 其他步骤不变。

1.2.3 病毒接种液的配制 取植物样品提取液 1 mL, 加入一定量的提纯病毒, 使提取液中病毒的终浓度为 30 μg/mL, 混合均匀后用于接种, 以不含样品提取物的相同浓度病毒溶液为对照接种液。

1.2.4 抗病毒活性的测定 采用半叶法混合接种。选择健康、生长旺盛的 6~8 叶期心叶烟, 左半叶接种含有 TMV 的植物样品提取液, 右半叶接种对照液。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。计算公式为:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照平均每叶枯斑数} - \text{处理平均每叶枯斑数}}{\text{对照平均每叶枯斑数}}$$

1.2.5 莲叶中抗病毒活性物质的提取 在提取时间 2 h、料液比(质量体积比)为 10:100 条件下, 分别用体积分数 95% 的乙醇、甲醇和水作溶剂, 采取索氏提取、回流提取和冷浸提取 3 种不同的提取方法, 提取莲叶中的抗病毒活性物质, 以半叶法接种心叶烟, 根据抑制效果确定适宜的提取溶剂和方法。

1.2.6 莲叶中抗病毒活性物质提取条件的优化 以乙醇质量分数、提取时间和料液比为因素, 设置 3 因素 3 水平 $L_9(3^3)$ 正交试验, 冷浸提取莲叶中的抗病毒活性物质, 根据活性跟踪结果确定适宜的提取条件。试验因素及水平见表 2。

表 2 试验因素及水平

水平 Level	因素 Factor		
	乙醇体积分数/% A	时间/h Time B	料液比(质量体积比) Ratio of material to solvent C
1	75	12	20 120
2	95	24	20 150
3	100	48	20 180

2 结果与分析

2 1 抗 TMV 活性植物的筛选

以体积分数 95% 的乙醇为溶剂, 对来自 20 个科的 26 种植物样品进行回流提取, 并对提取物进行抗病毒活性测定, 结果 (表 3) 显示: 供试植物材料

的乙醇提取物均对 TMV 侵染心叶烟有抑制作用, 但不同植物提取物对 TMV 的抑制效果不同。在 0.01 g/mL 剂量下, 26 种植物中有 10 种植物的抑制率在 80% 以上, 其中 8 种植物的抑制率在 90% 以上, 分别是莲、榕树、柿子、杨梅、水蜈蚣、叶下珠、羊蹄甲和菊花。

表 3 不同植物提取物对 TMV 侵染心叶烟的抑制作用

Table 3 Inhibition effect of extracts from different plants on TMV infection to <i>Nicotiana glauca</i>					
编号 Number	抑制率/% Inhibition rate	编号 Number	抑制率/% Inhibition rate	编号 Number	抑制率/% Inhibition rate
1	100.00	10	81.66	19	41.24
2	98.87	11	65.29	20	38.10
3	98.00	12	62.72	21	32.91
4	97.90	13	61.32	22	24.52
5	97.82	14	55.60	23	22.55
6	97.66	15	55.18	24	21.22
7	92.61	16	51.77	25	15.09
8	93.76	17	47.12	26	5.33
9	82.40	18	44.62		

在筛选出的 8 种抗 TMV 高活性植物中, 有的植物由于单宁、多糖含量高, 导致提取液的过滤、浓缩较为困难; 有的植物则由于生物量小, 限制了其开发利用。而莲在我国分布范围广, 是重要的药、食两用经济植物, 莲叶的生物产量极其丰富。综合考虑植物资源量、分布及获取的难易程度等因素后, 将莲叶作为后续研究的开发重点。

2 2 莲叶中抗 TMV 活性物质提取方法的研究

2 2 1 提取溶剂和方法对莲叶提取物抗 TMV 活性的影响 当提取时间、料液比一定时, 用不同溶剂、不同提取方法对莲叶进行活性物质的提取, 所得

提取物抗 TMV 活性跟踪测定结果 (表 4) 表明: 用体积分数 95% 的乙醇作提取溶剂时, 无论采用索氏提取、回流提取, 还是用冷浸提取法, 所得活性物质的抑制率均为 100%; 而以甲醇和水为溶剂提取时, 抑制率则分别在 98% 和 70% 左右。3 种供试溶剂中, 甲醇有毒, 价格高, 污染严重; 而水提物杂质多, 易发霉变质, 且提取液过滤、浓缩困难。因此, 从溶剂的安全性、经济性、实用性和便于浓缩回收及提取方法的简单易行来考虑, 莲叶活性物质的提取以体积分数 95% 的乙醇溶液冷浸提取为宜。

表 4 不同溶剂和方法提取的莲叶活性物质对 TMV 的抑制效果

Table 4 Inhibiting effect of the active substance from different solvents and methods in <i>Ficus microcarpa</i> leave to TMV infecting <i>Nicotiana glauca</i>				%
溶剂 Solvent	索氏 Soxhlet extraction	回流 Reflux	冷浸 Cold soak	
水 Water	70.00	73.00	73.00	
甲醇 Methanol	99.00	98.00	99.99	
95% 乙醇 Ethanol 95%	100.00	100.00	100.00	

注: 提取物的供试质量浓度为 0.01 g/mL; 表中数据为 3 次重复提取物对 TMV 抑制率的平均值。
Note: Concentration inoculated is 0.01 g/mL. Data of the table is the average of three repetitions
© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.2 莲叶抗 TMV 活性物质提取条件的优化

由正交试验结果(表 5)的直观分析可以看出: (1) 3 个试验因素对活性物质抗 TMV 抑制率的影响顺序依次为: A (乙醇浓度) > C (料液比) > B (提取时间), 即乙醇浓度为影响提取物抗 TMV 活性的主要因素。所以, 进行莲叶中活性物质的提取时, 必须将乙醇浓度控制在最优水平上, 对于次要因素则可在一定范围内选取适当的水平。(2) 莲叶中活性物质提取的适宜条件为 A₂B₁C₃ 和 A₂B₃C₂, 这两种组合所

得的提取物, 对 TMV 的抑制率均为 100%。但两者的提取物得率因料液比、提取时间不同而差异较大, A₂B₁C₃ 组合提取 12 h, 得率为 15.26%; A₂B₃C₂ 组合提取 48 h, 得率为 9.18%, 前者的提取得率为后者的 1.7 倍。综合考虑提取时间、料液比和提取物得率等因素对活性成分的影响, 选择 A₂B₁C₃ 作为最优组合。即以 95% 的乙醇为提取溶剂, 料液比 20:180 (1:9), 冷浸 12 h, 所得活性物质对 TMV 抑制作用最强, 且提取物得率较高。

表 5 正交试验设计方案及提取物抗病毒效果

Table 5 Effects of extract antivirus by orthogonal test

试验号 Number	浓度 A Concentration	时间 B Time	料液比 C Ratio of material to solvent	提取得率/% Extract rate	抑制率/% Inhibition rate
1	1	1	1	7.06	99.00
2	1	2	2	8.64	98.00
3	1	3	3	9.03	99.99
4	2	1	3	15.26	100.00
5	2	2	1	8.76	99.99
6	2	3	2	9.18	100.00
7	3	1	2	8.98	91.20
8	3	2	3	12.36	91.00
9	3	3	1	10.58	89.98
K ₁	296.99	290.20	288.97		
K ₂	299.99	288.99	289.20		
K ₃	272.18	289.97	290.99		
$\bar{K}_1$	98.99	96.73	96.32		
$\bar{K}_2$	99.99	96.33	96.40		
$\bar{K}_3$	90.73	96.66	97.00		
R	9.26	0.40	0.68		

注: 1) K₁, K₂, K₃ 分别代表浓度为 1, 2, 3 水平提取时, 各水平 3 个组合提取物对 TMV 的抑制率之和; $\bar{K}_1$, $\bar{K}_2$, $\bar{K}_3$ 分别代表 K₁, K₂, K₃ 的平均值; R 代表各因素不同水平平均值的极差; 2) 提取物接种时的供试质量浓度为 0.01 g/mL。

Notes: 1) K₁, K₂, K₃ respectively indicates the sum of inhibition rates from the corresponding level, $\bar{K}_1$, $\bar{K}_2$, $\bar{K}_3$ respectively represents the average of K₁, K₂, K₃, R is the extreme value; 2) Concentration inoculated is 0.01 g/mL.

3 讨论

1) 在抗 TMV 活性植物的筛选中, 常以体积分数 95% 的乙醇为溶剂提取样品中的活性成分。从植物化学成分提取的角度来看, 提取物多为次生代谢产物。由于植物材料的来源不同, 所含次生物质的种类、数量也不尽相同。尽管提取方法相同, 但提取物中活性物质的种类及数量则因植物种类、提取部位等的不同而异, 因此不同植物样品的提取物对 TMV 侵染心叶烟的抑制效果有所不同。

2) 在对抗病毒植物筛选的研究中, 人们往往只注重从草本植物尤其是从中草药中寻找高活性植物。刘学端等^[5]经过大量试验筛选, 利用商陆、甘草、连翘等几种中草药复配成 MH11-4 可湿性粉剂, 对 TMV 和 CMV 有强烈的体外钝化作用, 并能明显地

抑制植株体内 TMV 和 CMV 的增殖。姚宇澄等^[6]研究表明, 牛心朴子草地上部分醇粗提取物对 TMV 有高抑制活性。本研究从 26 种植物样品筛选出 8 种高活性植物, 分别是莲、榕树、柿子、杨梅、水蜈蚣、叶下珠、羊蹄甲和菊花, 其中既有一年生草本植物, 也有多年生的高大乔木, 草本植物和木本植物各占 50%。由此说明, 在进行抗病毒活性植物的筛选时, 充分扩大筛选范围, 有利于从中发现高活性植物, 对高活性植物的进一步深入研究, 则有可能发现抗病毒的先导化合物, 并由此开发出高效植物源抗病毒抑制剂。

3) 冷浸法、回流法和索氏提取法是活性物质提取中的最常用方法。采用回流法和索氏法时, 由于持续加热提取都有可能破坏材料中非耐热活性成分, 因此, 在进行活性物质的提取时, 特别是当活性成分

的耐热性较差时,宜选用冷浸法。

4) 莲叶的乙醇提取物具有较高的抗病毒(TMV)活性,因其分布广泛,资源量大,在生产实践中有着重要的实际应用价值。而莲叶提取物中所含

物质种类多,成分复杂,将提取物直接加工成制剂用于病毒病防治,则可以充分发挥提取物中各成分间的协同增效作用。因此,莲叶防治植物病毒病的开发利用具有广阔的应用前景。

[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] 李重九, 侯玉霞, 王蔚霞, 等. 植物病毒病选择性治疗药剂的筛选研究[J]. 植物病理学报, 1997, 27(4): 343- 348
- [3] 侯玉霞, 李重九, 马立新. 中草药中抗植物病毒 TMV 活性物质 PZ₁ 作用机理研究[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(1): 21- 24
- [4] 孙 惠, 吴祖建, 谢联辉, 等. 杨树菇(*Agricybe aegerita*)中一种抑制 TMV 侵染的蛋白质纯化及部分特性[J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(3): 351- 354
- [5] 刘学端, 肖启明. 植物源农药防治烟草花叶病机理初探[J]. 中国生物防治, 1997, 13(3): 128- 131.
- [6] 姚宇澄, 安天英. 牛心朴子草抗植物病毒组分的生物活性研究[J]. 内蒙古工业大学学报, 2002, 21 (1): 1- 4
- [7] French C J, Elder M, Leggett F, et al Flavonoids inhibit infectivity of tobacco mosaic virus[J]. Can J Plant Pathol, 1991, 13(1): 1- 6
- [8] Friedrich L, Lawton K, Dincher S, et al Benzo thiadiazole induces systemic acquired resistance in tobacco[J]. Plant J, 1996, 10: 61- 70
- [9] Gooding G V, Hebert T A. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities[J]. Phytopathology, 1967, 57: 1285- 1289

Screening of plants with resistance to TMV and the influence of extracting condition on the activity of antiviral substance

ZHA IM ei-zhi^{1,2}, GAO Fang-luan¹, SHEN J àn-guo¹, L IN Qi-yìng¹, XIE L ian-hui¹

(1 Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;

2 College of Forestry, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The antiviral activities were determined by extracts from 26 plants. The results showed that: Different plant extracts have different inhibitory effect on TMV infecting *Nicotiana glutinosa*; Among them, inhibition rates on TMV of *Ficus microcarpa*, *Nelumbo nucifera* Gaertn., *Myrica rubra* Sieb. et Zucc., *Diospyros kaki*, *Kyuringa brevifolia*, *Phyllanthus urinaria*, *Bauhinia variegata* and *Chrysanthemum morifolium* extracts are all over 90%; As for lotus leaves, the antiviral substance activity is dissimilar based on extracts from lotus leaves with different solvent and methods, inhibition rate on TMV of the extract with water is only around 70%, whereas, inhibitory rate of methanol or 95% (V/V) ethanol are over 98%; The inhibition rate on TMV of the extract from lotus leaves with 95% (V/V) ethanol by Soxhlet extractor, reflux and cold soak are all 100%. Optimum condition of the cold soak are: 95% (V/V) ethanol is used as solvent, the ration of material to solvent is 20 : 180 (1 : 9), soak time is 12 h.

Key words: botanical virucides; Tobacco Mosaic Virus (TMV); plant activity screening; *Nelumbo nucifera* Gaertn.; extracted method