

烤烟 ‘K326’ 抗 TMV 防御物质初探

周文兵^{1,2}, 计思贵¹, 李江舟^{1,2}, 崔永和^{1,2}, 黄智华^{1,2}, 张立猛^{1,2*}

(1. 云南省烟草公司玉溪市公司, 玉溪 653100; 2. 烟草行业病虫害生物防治工程研究中心, 玉溪 653100)

摘要 烤烟主栽品种‘K326’在打顶后,随着次生代谢产物的积累,烟草花叶病症状呈减轻趋势。本试验利用半叶枯斑法对‘K326’的全株、根、茎、叶甲醇提取物及根部不同极性溶剂萃取物进行抗烟草普通花叶病毒活性筛选,结果表明:在浓度为 1 mg/mL 时,‘K326’各部位甲醇提取物中,根部甲醇提取物的活性最强,对 TMV 体外钝化、初侵染和复制增殖作用的抑制率分别为 74.50%、68.82%和 47.76%;利用不同极性溶剂对根部甲醇提取物萃取处理后,乙酸乙酯萃取物活性增强明显,对 TMV 体外钝化、初侵染和复制增殖作用的抑制率分别为 76.81%、78.02%、61.42%;经普通烟‘K326’进一步验证,根部甲醇提取物的乙酸乙酯萃取物活性最强。综上,‘K326’中抗病毒防御物质可能存在于根部甲醇提取物的乙酸乙酯萃取物中。

关键词 烤烟提取物; 烟草花叶病毒(TMV); 抑制活性

中图分类号: S 435.72 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.05.017

Anti-TMV activity of the extracts from tobacco ‘K326’

Zhou Wenbing^{1,2}, Ji Sigui¹, Li Jiangzhou^{1,2}, Cui Yonghe^{1,2}, Huang Zhihua^{1,2}, Zhang Limeng^{1,2}

(1. Yunnan Tobacco Company, Yuxi Branch, Yuxi 653100, China; 2. Research Center for Application Technology of Biological Control Engineering for Tobacco Diseases and Insect Pests of China Tobacco, Yuxi 653100, China)

Abstract The antiviral activity of the extract from ‘K326’ against Tobacco mosaic virus (TMV) was determined by a half-leaf necrosis method. The methanol extracts from different parts of ‘K326’ showed good inhibitory activities against TMV at 1 mg/mL. Especially the methanol extracts from roots exhibited the best inhibitory activities on TMV inactivation, primary infection, and proliferation with an inhibition rate of 74.50%, 68.82% and 47.76%, respectively; the methanol extracts from roots were disposed with different organic solutions, *i. e.*, petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol; after that, the antiviral activity of the extracts with ethyl acetate increased significantly, with an inhibition rate of 76.81%, 78.02% and 61.42%, respectively. Further experiments on ‘K326’ suggested that the antiviral activity of the extracts of ethyl acetate was the best.

Key words extraction from tobacco; Tobacco mosaic virus (TMV); inhibitory activity

烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus*, (TMV) 作为世界上最先发现并确定的病毒,严重危害烟叶的产量和质量,给烟农造成了巨大的经济损失^[1-3]。由于植物病毒对寄主细胞具有绝对寄生性,病毒传播方式具有多样性,且植物缺乏完整的免疫系统,因而高效抗病毒剂的开发存在极大困难,至今尚未有理想的防治药剂^[4]。目前采用的农业防治措施存在较大的局限性,化学防治则易引发环保问题,于是人们把目光转向了抗 TMV 天然产物的研究与开发^[5-7]。

‘K326’是我国主栽烤烟品种,烟草花叶病是该品种的主要病害之一,经多年观察,我们发现烤烟

‘K326’在打顶后,随着次生代谢产物的积累,烟草花叶病症状呈明显减轻趋势。因此,有必要对‘K326’中烟草花叶病的抗性物质进行系统研究,为‘K326’高感花叶病寻求一条新的解决途径的同时,也可以进一步拓宽烟草的使用空间。

本研究从烟草内源性抗烟草花叶病次生代谢物质出发,利用半叶枯斑法对‘K326’的全株、根、茎、叶甲醇提取物及根部不同极性萃取物进行抗烟草花叶病毒活性筛选,并用圆盘悬浮筛选法对筛选结果进行验证,为‘K326’中抗烟草花叶病的物质基础研究提供依据。

收稿日期: 2016-10-25

修订日期: 2017-01-09

基金项目: 中国烟草总公司云南省烟草公司科技计划项目(2015YN11)

* 通信作者 E-mail: zlm.d@163.com

1 材料与方法

1.1 烟草的培育

以心叶烟 *Nicotiana glutinosa* L. 和普通烟 *Nicotiana tabacum* L. ‘K326’ 为供试烤烟品种,烟草种子由玉溪中烟种子有限责任公司提供。将烟草种子播种于装有基质的育苗盘,漂于育苗池中,于适宜条件下(温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照 16 h/d, 湿度 60%) 培养,待幼苗长至三叶期移植于小花盆中,每盆 1 株。试验用苗均放置于 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 人工气候箱中,光照和黑暗循环为 12 h//12 h,待长至 4~6 片真叶时供试^[8]。

1.2 供试烟草样品

‘K326’ 样品由云南省烟草公司玉溪市公司烤烟生产技术中心提供,全株、根、茎和叶在烤烟打顶 30 d 后采收,样品分别剁碎, 50°C 烘干,粉碎,过 40 目筛,室温保存备用。

1.3 供试病毒

烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV) 普通株系,由云南省烟草农业科学研究院提供,由本实验室保存于普通烟 ‘K326’ 上。保存毒源的烟草用纱网罩严,并单独放置在 25°C 恒温温室中培养,温室光照条件为 L//D=16 h//8 h。培养过程中注意防虫,严防其他病毒及病害对毒源的污染^[9]。在开展抗病毒活性测定的当天按照下述方法提取 TMV 的粗提液,最大限度保证 TMV 活性。TMV 粗提液提取方法:选取幼嫩、新鲜的病叶 100 g,放置在研钵中,加入 200 mL 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS, pH=7.2, 内含 1% 的巯基乙醇),研磨过滤,取滤液并加入 8% 正丁醇,搅拌 15 min, 4°C 、10 000 g 离心 30 min, 取上清液,沉淀加入聚乙二醇 3000 (PEG3000) 至终浓度 4%,同时加 NaCl 至终浓度为 3%, 4°C 放置 1 h, 4°C 、10 000 g 离心 15 min, 弃上清,沉淀溶于 20 mL 0.01 mol/L PBS (pH=7.2) 缓冲液中,室温搅拌 2 h, 4°C 、10 000 g 离心 15 min, 取上清,按每 10 mL 加入 0.4 g 的 NaCl 及 0.4 g 的 PEG3000,边加边搅拌使其完全溶解,搅拌 1 h, 4°C 、10 000 g 离心 30 min, 取沉淀,按照原液每 100 mL 加入 2 mL 0.01 mol/L PBS (pH=7.2),待沉淀完全溶解后, 4°C 10 000 g 离心 30 min。上清液即为 TMV 粗提液,保存到 4°C 冰箱备用^[10]。病毒浓度用鲜叶质量(mg)与缓冲液的体积(L)比来定义,心叶

烟接种浓度为 20 mg/L,普通烟 ‘K326’ 接种浓度为 50 mg/L。

1.4 样品的制备

每样称取样品粉末 100 g,置 1 L 的三角烧瓶中,每次加入 500 mL 分析纯甲醇,室温下超声提取 3 次,每次 15 min,合并 3 次滤液,浓缩得粗提物^[11]。待粗提物回收无醇味,加入少量纯净水使样品混溶倒入分液漏斗,分别加入等体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,每溶剂萃取 5 次,回收各萃取液得各极性段样品,剩余水层回收得水提取物。称取少量提取物(约 100 mg),用少量二甲亚砜(DMSO)溶解后加水配成 100 mg/mL 的水溶液,按比例分别加水稀释成 10、1 和 0.1 mg/mL 的水溶液,置于 4°C 冰箱备用^[12-13]。对照药剂为宁南霉素 8% 水剂按质量浓度配制相应浓度的水溶液,宁南霉素 8% 水剂由上海丰农生物科技有限公司提供。

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^[14]测定。选取生长旺盛的 4~6 叶期心叶烟,将浓度为 1 mg/mL 的 ‘K326’ 各提取物溶液和对应剂量的溶剂分别与等体积的 TMV 溶液混合钝化 30 min,然后分别摩擦接种于心叶烟左半叶和右半叶。待叶片干后用清水将叶片冲洗干净。随后在光照培养箱中保温保湿培养,温度 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照 12 h/d,湿度 60%,3~4 d 后观察并记录枯斑的数目。每处理 3 株,每株 3~4 片叶;每处理重复 3 次。

1.5.2 各提取物对 TMV 初侵染和复制增殖抑制作用测定

采用半叶枯斑法^[14]测定。选取生长旺盛的 4~6 叶期心叶烟,初侵染试验在左半叶涂施一定浓度的粗提物溶液,右半叶涂对应剂量的溶剂作对照。间隔 12 h 后再摩擦法全叶接种病毒;复制增殖作用先全叶摩擦接种病毒,待叶片干后 12 h,左半叶涂施提取物溶液,右半叶涂施对应剂量的溶剂作对照。随后在光照培养箱中保温保湿培养,温度 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照 12 h/d,湿度 60%,3~4 d 后观察并分别记录左右半叶枯斑的数目。每处理 3 株,每株 3~4 片叶;每处理重复 3 次。

1.5.3 各提取物对 TMV 在 ‘K326’ 体内增殖抑制活性测定

采用叶圆片悬浮筛选法^[15-16]进行测定。用摩擦

法接种 TMV 于‘K326’叶片,6 h 后用清水冲洗叶片,2 h 后(叶片淋洗水变干),用打孔器在接种叶片上切取直径 12 mm 的圆盘。将接种面朝上,让其漂浮在含不同浓度供试液的培养皿中,3 d 后磨碎叶片,用间接 ELISA 法检测病毒含量,并分别设药剂空白接种病毒和不接种病毒的阳性和阴性叶片为对照。每处理 6 个圆盘。

1.5.4 结果计算与统计方法

(1)枯斑抑制率计算公式如下:

供试化合物对烟草花叶病的抑制率(%)计算公式为:抑制率(%)=[(对照枯斑数-处理枯斑数)/对照枯斑数]×100。

(2)病毒增殖抑制率计算公式如下:

病毒增殖抑制率(%)=[(药剂空白阳性叶片对

照病毒含量-药剂处理叶片病毒含量)/药剂空白阳性叶片对照病毒含量]×100。

2 结果与分析

2.1 ‘K326’提取物对 TMV 侵染活性的抑制作用

2.1.1 体外钝化作用

从表 1 可见:用‘K326’各部位提取物溶液对病毒提取液钝化处理后接种烟叶,‘K326’全株及根、茎、叶的甲醇提取物对 TMV 均表现出一定钝化作用;根、茎部甲醇提取物活性高于全株提取物,抑制率分别为 74.50%和 37.56%;对根部甲醇提取物用不同极性溶剂萃取后,较根部甲醇提取物,乙酸乙酯萃取物活性稍有增强,对 TMV 侵染的抑制率达到 76.81%,其他极性溶剂萃取物活性降低。

表 1 ‘K326’不同部位提取物对 TMV 的钝化作用¹⁾

Table 1 Inhibition effects of the extracts from *Nicotiana tabacum* ‘K326’ against TMV

处理 Treatment	枯斑数/个 Local lesions		抑制率/% Inhibition rate
	处理 Treatment	对照 Control	
全株甲醇提取物 The methanol extract of the whole-plant	21.0	31.5	33.33 bc ¹
根部甲醇提取物 The methanol extract of root	8.4	33.0	74.50 a ¹
茎部甲醇提取物 The methanol extract of stem	25.6	41.0	37.56 b ¹
叶部甲醇提取物 The methanol extract of leaves	33.0	45.0	26.67 c ¹
根部石油醚萃取物 The petroleum ether extract of root	28.8	70.0	58.93 b ²
根部乙酸乙酯萃取物 The ethyl acetate extract of root	15.7	67.6	76.81 a ²
根部正丁醇萃取物 The <i>n</i> -butanol extract of root	68.5	83.8	51.33 b ²
根部水提取物 The water extract of root	27.3	43.3	36.93 c ²
8%宁南霉素水剂 8% Ningnanmycin AS	5	63.3	92.10

1) 数字上标表示显著性分析组别,不同字母表示组内差异显著($P<0.05$);下同。
Numeric superscript indicates the groups and different lowercase letters indicates significant difference ($P<0.05$); the same below.

2.1.2 保护作用

从表 2 可见:在 TMV 侵染过程中,‘K326’各部位的甲醇提取物对 TMV 寄主均表现出一定的保护作用,根和茎的甲醇提取物活性高于全株甲醇提取物,

对 TMV 侵染抑制率分别达到 68.82%和 59.46%;对根部甲醇提取物用不同极性溶剂萃取后,较根部甲醇提取物,乙酸乙酯萃取物活性增强明显,对 TMV 寄主的保护作用达到 78.02%。

表 2 ‘K326’不同部位提取物对 TMV 初侵染的抑制作用

Table 2 Protection effects of the extracts from *Nicotiana tabacum* ‘K326’ on primary infection of TMV

处理 Treatment	枯斑数/个 Local lesions		抑制率/% Inhibition rate
	处理 Treatment	对照 Control	
全株甲醇提取物 The methanol extract of the whole-plant	22.8	40.3	43.42 c ¹
根部甲醇提取物 The methanol extract of root	13.0	41.7	68.82 a ¹
茎部甲醇提取物 The methanol extract of stem	15.0	37.0	59.46 b ¹
叶部甲醇提取物 The methanol extract of leaves	28.0	38.1	26.51 d ¹
根部石油醚萃取物 The petroleum ether extract of root	39.7	82.0	52.62 b ²
根部乙酸乙酯萃取物 The ethyl acetate extract of root	19.8	90.1	78.02 a ²
根部正丁醇萃取物 The <i>n</i> -butanol extract of root	42.7	72.2	40.90 c ²
根部水提取物 The water extract of root	46.0	63.2	27.20 d ²
8%宁南霉素水剂 8% Ningnanmycin AS	13.0	45.7	71.55

2.1.3 治疗作用

从表 3 可见:TMV 侵染初期,除烟叶的甲醇提取物外,‘K326’各部位甲醇提取物对 TMV 侵染均表现出一定的治疗作用,根和茎的甲醇提取物活性高于全株提取物,对 TMV 侵染的抑制率分别为

47.76%和 42.40%;对根部甲醇提取物用不同极性溶剂萃取后,较根部甲醇提取物,乙酸乙酯和石油醚萃取物对 TMV 侵染的治疗作用明显增强,抑制率分别为 61.42%和 53.78%。

表 3 ‘K326’不同部位提取物对 TMV 复制增殖的抑制作用¹⁾

处理 Treatment	枯斑数/个 Local lesions		抑制率/% Inhibition rate
	处理 Treatment	对照 Control	
全株甲醇提取物 The methanol extract of the whole-plant	18.0	24.3	25.92 b ¹
根部甲醇提取物 The methanol extract of root	14.0	26.8	47.76 a ¹
茎部甲醇提取物 The methanol extract of stem	16.0	27.8	42.40 a ¹
叶部甲醇提取物 The methanol extract of leaves	35.5	29.0	—
根部石油醚萃取物 The petroleum ether extract of root	31.1	67.3	53.78 b ²
根部乙酸乙酯萃取物 The ethyl acetate extract of root	30.6	79.4	61.42 a ²
根部正丁醇萃取物 The <i>n</i> -butanol extract of root	64.2	77.4	17.05 c ²
根部水提取物 The water extract of root	71.3	62.7	—
8%宁南霉素水剂 8% Ningnanmycin AS	9	33.3	72.97

1) “—”表示没有活性。
“—” indicates no inhibitory activity.

2.2 根部提取物对 TMV 增殖的抑制活性

为了进一步验证‘K326’根部提取物对 TMV 的抑制活性,我们在普通烟‘K326’上采用圆盘悬浮筛选法对‘K326’根部甲醇提取物、乙酸乙酯、石油醚萃取物对 TMV 增殖的抑制活性进行测定。从图 1 可见:通过 0.1、1、10 mg/mL 3 个浓度的筛选发现,随着样品浓度的提高,3 个提取物对 TMV 增殖的抑制率逐渐提高,表现出显著的剂量效应;3 种浓度下,均以乙酸乙酯萃取物活性最强,石油醚萃取物活性最弱。

外研究者对烟草进行了大量研究,从中发现并鉴定的化学成分已有 2 549 种。同时,学者也从烟草中发现了具有抗病毒作用的活性物质,Cotelle 等发现,烟草中酚类化合物对清除自由基作用良好,并且富含抗氧化活性^[17-18]。流行病学研究表明,抗氧化化合物一般都具有一定的抗病毒活性^[19-20]。Ohnishi 等也发现烟草中含量较高的绿原酸的水解产物咖啡酸具有抑制单纯疱疹病毒的功效^[21]。德国 Free 大学 Eich 教授在研究植物次生代谢物作为抗逆转录病毒剂时,发现绿原酸及其衍生物具有较好的抗艾滋病毒(HIV)活性^[21-22]。

以上研究主要是烟草中活性物质在抗人类疾病中的应用,但对其在对抗自然界逆境而形成的抵御病害的化学防御物质却涉猎较少。本研究基于烟草种植过程中发现的自然现象,首次从化学防御角度对‘K326’在对抗 TMV 侵袭过程中产生的防御物质进行了初步研究。发现‘K326’的全株、根、茎和叶的甲醇提取物对 TMV 体外钝化、初侵染和复制增殖均具有一定的抑制活性,根的甲醇提取物活性最强;对根部甲醇提取物用不同极性溶剂萃取后,较根部甲醇提取物,乙酸乙酯萃取物活性增强明显,石油醚、水和正丁醇萃取物活性均不同程度降低;经对根部甲醇提取物、乙酸乙酯、石油醚萃取物活性进一步验证,3 个提取物均表现出明显的剂

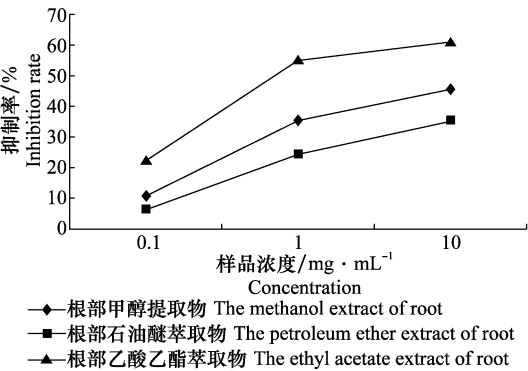


图 1 不同浓度‘K326’根部提取物对 TMV 增殖的抑制活性

Fig.1 Inhibitory effects of different concentrations of the root extracts of ‘K326’ on TMV proliferation

3 讨论

烟草中的化学成分极为复杂,近几十年来,国内

量效应,乙酸乙酯萃取物活性最强。以上结果表明,‘K326’中抗 TMV 化学防御物质可能存在于根部甲醇提取物的乙酸乙酯萃取物中,在今后的研究中我们将对根部甲醇提取物的乙酸乙酯萃取物进行跟踪提取分离鉴定,对其抗 TMV 化学防御物质进一步研究发掘。

参考文献

- [1] 耿召良,商胜华,陈兴江,等. 植物源抗烟草花叶病毒天然产物研究进展[J]. 中国烟草科学,2011,32(1):84-91.
 - [2] 吴艳兵,颜振敏,谢荔岩,等. 天然抗烟草花叶病毒大分子物质研究进展[J]. 微生物学通报,2008,35(7):1096-1101.
 - [3] 夏纬跃. 吉林省烟草重要病害防治关键技术研究[D]. 长春:吉林农业大学,2014.
 - [4] 许良忠,郭玉晶,张书圣. 植物病毒病化学防治研究进展[J]. 青岛化工学院学报,2000,21(4):293-297.
 - [5] 吴艳兵,谢荔岩,谢联辉,等. 毛头鬼伞多糖 CCP60a 对 TMV 外壳蛋白的影响[J]. 植物资源与环境学报,2008,17(3):63-66.
 - [6] 祝雯,林志铿,吴祖建,等. 河蚬中活性蛋白 Cfp-a 的分离纯化及其活性[J]. 中国水产科学,2004,11(4):349-353.
 - [7] 耿召良,商胜华,陈兴江,等. 植物源抗烟草花叶病毒天然产物研究进展[J]. 中国烟草科学,2011,32(1):84-91.
 - [8] 郭亮,蔡海林,何命军,等. 植物源活性天然提取物抗烟草花叶病毒的研究进展[J]. 湖南农业科学,2012(23):77-79,83.
 - [9] 陈丕庭,马树杰,殷培军,等. 植物源抗病毒剂 VFB-1 防治烟草花叶病毒病研究[J]. 中国烟草学报,2015,21(3):93-99.
 - [10] 王人元. PEG-一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] 徐晓庆,张秀丽,郭勃予,等. 15 种中草药抗烟草花叶病毒活性的研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(6):1691-1693.
 - [12] 田兆丰,刘伟成,刘霆,等. 小链霉菌 Yn168 发酵产物抗植物病毒活性的研究[J]. 中国生物防治学报,2011,27(4):569-572.
 - [13] 操海群,岳永德,彭镇华,等. 竹提取物的抗真菌作用[J]. 植物保护学报,2003,30(1):35-39.
 - [14] 谢鑫,桑维钧,张新强,等. 6 种病毒抑制剂对烟草花叶病毒的抑制作用及其机制初探[J]. 河南农业科学,2011,40(5):104-107.
 - [15] 李在国,黄润秋. 植物病毒防治剂的作用机制[J]. 植物保护,1999,25(3):37-39.
 - [16] 陈齐斌,李重九,滕晓红,等. 24 种中草药提取物抗病毒活性筛选[J]. 云南农业大学学报,2012,27(1):19-22.
 - [17] Velioglu Y S, Mazza G, Gao L, et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46 (10):4113-4117.
 - [18] Zheng W, Wang S Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49 (11): 5165-5170.
 - [19] Owen R W, Giacosa A, Hull W E. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil [J]. European Journal of Cancer, 2000, 36 (10): 1235-1247.
 - [20] Sala A, Redo M D, Giner R M, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum* [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2002,54 (3): 365-371.
 - [21] 高锦明,张鞅灵,张康健,等. 绿原酸分布、提取与生物活性研究综述[J]. 西北林学院学报,1999,14(2):73-82.
 - [22] 周恒,许自成,赵会纳,等. 烟草多酚类物质的研究进展[J]. 浙江农业科学,2009(5):949-953.
- (责任编辑:田 喆)
- ~~~~~
- (上接 73 页)
- [23] 刘培. 云南赛葵上双生病毒的分子鉴定[D]. 杭州:浙江大学,2008.
 - [24] 李静. 我国六种双生病毒的分子鉴定及两种病毒的致病性研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.
 - [25] Garcia-Andres S, Tomas D M, Sanchez-Campos S, et al. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses [J]. Virology, 2007, 365(1): 210-219.
 - [26] Albuquerque L C, Varsani A, Fernandes F R, et al. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil [J]. Archives of Virology, 2012, 157(4): 747-752.
 - [27] Rocha C S, Castillo-Urquiza G P, Lima A T M, et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location [J]. Journal of Virology, 2013, 87(10): 5784-5799.
 - [28] She Xiaoman, He Zifu, Yin Guohua, et al. A New alpha satellite molecule associated with Ageratum yellow vein China virus in the Philippines [J]. Journal of Phytopathology, 2015, 163 (1): 54-57.
 - [29] Guo Wei, Jiang Tong, Zhang Xian, et al. Molecular variation of satellite DNA β molecules associated with *Malvastrum yellow vein virus* and their role in pathogenicity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(6): 1909-1913.
- (责任编辑:田 喆)