

臭椿种子乙酸乙酯提取物抗烟草花叶病毒活性研究*

邹正彪¹, 祁进康¹, 王德艳¹, 胡世俊², 闫晓慧¹

(1. 西南林业大学 云南省森林灾害预警与控制重点实验室;
2. 西南林业大学 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室, 昆明 650224)

摘要:【目的】考察臭椿(*Ailanthus altissima*)种子乙酸乙酯提取物的抗病毒活性。【方法】采用硅胶柱层析对臭椿种子乙酸乙酯提取物进行了分离,以烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)为供试病毒,通过半叶枯斑法测定了不同柱层析馏分的抗TMV活性。【结果】当质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,馏分Fr1, Fr5, Fr6和Fr7对TMV有较强的钝化作用,抑制率在74.46%~83.09%之间;馏分Fr3对TMV枯斑寄主心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)的保护作用最强,对TMV的抑制率为81.63%;馏分Fr5, Fr6和Fr7对TMV增殖有明显的抑制作用,抑制率分别为91.61%, 89.47%和78.5%;各馏分对TMV的治疗作用相对较弱,抑制率均低于40%。【结论】臭椿种子乙酸乙酯提取物的各馏分均有一定的抗TMV活性,为进一步活性跟踪其中的抗病毒活性物质奠定了基础。

关键词:臭椿;烟草花叶病毒;抗病毒活性;半叶枯斑法

中图分类号:Q945.8

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2018)05-0115-05

植物病毒病历来就有“植物癌症”之称,每年都给全世界农业生产带来巨大的经济损失。烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)是目前世界上研究最为深入的模式病毒^[1],可侵染36个科的400多种植物,每年造成的农业经济损失相当巨大。该病毒抗逆性强,在世界各烟区普遍发生。在一般年份,TMV可导致烟叶产量减少20%~30%;在该病毒流行年份,则可导致毁种甚至绝收的情况出现^[2]。目前国际公认的抗TMV的特效药物尚未有研究报道,而寻找新型抗TMV药物仍是目前此类药物研发的重点和难点^[3]。

臭椿(*Ailanthus altissima*)为苦木科(Simaroubaceae)臭椿属(*Ailanthus*)植物^[4],是中国民间常用的中草药。其中,臭椿叶主治疮疥,风疽;臭椿根皮或干部内皮具有除热、燥湿、涩肠、止血等功效,主治久痢、久泻、肠风便血、崩漏、带下、遗精、白浊、蛔虫等^[5];臭椿种子也可入药,中药名为凤眼草^[4]。近些年来的研究已经发现臭椿树皮和枝叶的提取物具有较好的抗TMV作用^[6-7],但有关臭椿种子提取物抗病毒作用的研究报道甚少。为此,本研究对臭椿种子的乙酸乙酯提取物中不同馏分进行了抗TMV活性筛选,追踪具有抗TMV的有效成分,以便为开发新型植物源生物农药提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用于制备提取物的臭椿种子于2015年10月采集于辽宁朝阳。TMV普通株系U1摩擦接种于普通烟K326(*Nicotiana tabacum* cv. K326)上,采用Gooding等人^[8]的方法进行提纯。使用紫外分光光度计测得纯化后的TMV质量浓度为 $16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。实验中的系统侵染寄主为普通烟K326,枯斑寄主为心叶烟(*Nicotiana glutinosa*);将烟草种子播种于漂盘中,在温室内栽培,待烟苗长出6~8片叶子时,挑选健康植株备用。

* 收稿日期:2017-12-19 修回日期:2018-09-06 网络出版时间:2018-09-26 13:26

资助项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(No. 31560106);国家自然科学基金青年项目(No. 31200265);云南省高校森林有害生物科技术创新团队项目(No. 51600507);云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金项目(No. ZK150009);西南林业大学科研启动项目(No. 111712);云南省高校优势特色重点学科(生物学)建设项目(No. 50097505)

第一作者简介:邹正彪,男,研究方向为植物源农药,E-mail: 1076856880@qq.com;通信作者:闫晓慧,女,副教授,博士,E-mail: luckyxh@163.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20180926.1326.048.html>

1.2 实验仪器与试剂

本研究中主要的实验仪器为上海爱朗仪器有限公司生产的旋转蒸发仪、青岛海洋化工厂生产的柱层析硅胶及 GF254 薄层层析硅胶板;主要的试剂为德强生物股份有限公司生产的质量分数为 2% 的宁南霉素水剂, 甲醇、石油醚、乙酸乙酯、氯仿、二甲基亚砷等试剂均为分析纯。

1.3 臭椿种子提取物不同馏分的制备

取臭椿种子 10.5 kg 风干后粉碎, 采用乙醇加热回流提取法提取, 分别提取 3 次, 每次 3 h。合并 3 次提取液, 再用旋转蒸发仪减压浓缩至浸膏状, 获得乙醇提取物。将提取物用蒸馏水溶解, 依次用乙酸乙酯、正丁醇、石油醚各萃取 3 次, 合并萃取液, 浓缩至浸膏状得到不同溶剂萃取物, 并进行抗 TMV 活性测定(具体方法见后文 1.4 部分)。结果发现乙酸乙酯提取物的抗 TMV 活性最高, 因此本研究以乙酸乙酯提取物 100.62 g 为馏分样品, 经常压硅胶柱层析, 以石油醚-乙酸乙酯($V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=10:1\sim 0:1$)、氯仿-甲醇($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}}=1:1$)等溶剂系统依次进行梯度洗脱, 每 1 000 mL 收集 1 瓶, 共收集 134 瓶, 经薄层层析检测, 合并相同组分, 旋转蒸发浓缩回收溶剂, 得到 7 个不同馏分, 分别命名为 Fr1, Fr2, Fr3, Fr4, Fr5, Fr6 和 Fr7。准确称取少量各个馏分用二甲基亚砷溶解后配成质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液, 保存在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.4 抗 TMV 活性测定

1.4.1 抑制 TMV 侵染活性的测定 采用活体半叶枯斑法^[9-10], 设置 3 种施药方式: 1) 混合施药, 即将不同馏分与 TMV 混合 30 min 后接种于心叶烟上, 以测定不同馏分对 TMV 的体外钝化作用; 2) 先施药, 即将不同组分喷洒在心叶烟叶片上, 6 h 后接种病毒, 以测定各馏分对感染了 TMV 叶片的保护作用; 3) 后施药, 即在接种病毒 6 h 以后在心叶烟叶片上喷含有各馏分的水溶液, 以测定不同馏分对 TMV 的治疗作用。具体操作步骤为: 将各馏分用二甲基亚砷溶解并用蒸馏水稀释到质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时备用。挑选健康、生长良好的心叶烟, 每株选取长势相似的上部烟叶 3 片, 每片叶片的左半叶用不同提取物馏分处理, 右半叶用不含提取物但具有相同质量浓度的二甲基亚砷溶液处理作为对照, 每个馏分处理均重复 3 次。用金刚砂摩擦接种 TMV 于烟叶上, 10 min 后将烟叶上残留的金刚砂用蒸馏水冲洗干净。将处理后的烟苗放在无虫温室中培养, 3~4 d 后统计枯斑数, 并用公式“抑制率= $[(\text{对照平均枯斑数}-\text{馏分处理平均枯斑数})/\text{对照平均枯斑数}] \times 100\%$ ”计算抑制率。

1.4.2 抑制 TMV 增殖活性的测定 采用离体半叶枯斑法^[10-11]。挑选长势相似的 3 片上部烟叶, 全叶使用金刚砂摩擦接种 $200 \mu\text{L}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TMV。病毒接种 2 h 后将烟叶剪下, 剪除叶尖和叶柄部位, 并沿中脉将叶片剪成两半; 右半叶浸入盛有质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试馏分溶液的培养皿中作为实验组, 左半叶浸入盛有质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的二甲基亚砷溶液的培养皿中作为对照组。每个馏分的实验重复为 3 次, 对烟叶在室内进行培养, 48 h 后统计枯斑数, 并按上文 1.4.1 部分的公式计算抑制率。

此外, 本研究还使用宁南霉素以及未分离各馏分的乙酸乙酯提取物按上述方法对烟叶进行了处理, 用以比较各供试馏分、未分馏的乙酸乙酯提取物与宁南霉素的抗 TMV 活性的差异。

2 结果与分析

2.1 活体半叶枯斑法结果

2.1.1 钝化作用 通过活体混合施药的方式测定臭椿种子乙酸乙酯提取物及该提取物的不同馏分对 TMV 的体外钝化作用, 结果发现当质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 各馏分对 TMV 均有一定的钝化作用(表 1)。馏

表 1 对 TMV 的钝化作用

Tab. 1 Inactivation effects against TMV infection

施药类型	对照枯斑数 平均值/个	施药处理枯斑数 平均值/个	<i>p</i> 值*	抑制率/%
乙酸乙酯提取物	15.00	5.00	0.027	65.56±2.94 ^b
馏分 Fr1	17.67	4.33	0.016	74.46±0.55 ^a
馏分 Fr2	20.00	9.67	0.199	52.73±9.73 ^b
馏分 Fr3	20.33	18.00	0.057	11.45±1.45 ^b
馏分 Fr4	28.33	13.67	0.011	52.98±5.98 ^b
馏分 Fr5	17.67	3.00	0.011	83.09±0.24 ^a
馏分 Fr6	25.33	6.00	0.002	75.26±5.17 ^a
馏分 Fr7	20.67	4.33	0.007	78.09±3.39 ^a
宁南霉素	18.67	2.00	0.001	88.78±3.41 ^a

注: 1) 表中枯斑数、抑制率数据为 3 次实验重复的平均值; 2) 乙酸乙酯提取物及各馏分的质量浓度均为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 宁南霉素的质量分数为 2%; 3) * 为各类型施药处理与对照枯斑数差异的 *t*-检验结果, $p < 0.05$ 时表示两者差异具有统计学意义; 4) 乙酸乙酯提取物和它的各馏分与宁南霉素的抑制率差异采用多重比较(LSD), 不同字母表示数据间差异有统计学意义($p < 0.05$)。下同

分 Fr1,Fr5,Fr6 和 Fr7 对 TMV 的钝化效果较好,抑制率均在 70% 以上;其中 Fr5 的活性最强,抑制率为 83.09%,仅次于宁南霉素的抑制率(88.78%)(封二彩图 1a)。馏分 Fr6,Fr7 处理后烟叶的枯斑数与对照烟叶的枯斑数差异具有统计学意义($p < 0.01$)。研究结果也显示未分离各馏分的乙酸乙酯提取物对 TMV 也有较高的钝化活性,抑制率为 65.56%;馏分 Fr2,Fr4 对 TMV 也表现出一定的钝化作用,抑制率分别为 52.73%,52.98%;馏分 Fr3 对 TMV 的钝化作用最弱,抑制率仅为 11.45%。

2.1.2 保护作用 采用心叶烟活体半叶枯斑法先施药的方式测定了臭椿种子乙酸乙酯提取物及该提取物的不同馏分对 TMV 初侵染的抑制作用。研究结果显示,各馏分对 TMV 的初侵染均有一定的抑制作用,抑制率在 26.11%~81.63% 之间,表明它们对 TMV 的枯斑宿主心叶烟具有一定的保护作用,可以有效减轻 TMV 侵染心叶烟(表 2)。其中馏分 Fr3 对心叶烟的保护作用最强(封二彩图 1b),其次为馏分 Fr2,两者的抑制率分别为 81.63%,63.89%,均高于宁南霉素的抑制率(42.22%),与后者的差异均具有统计学意义($p < 0.05$)。此外未分离各馏分的乙酸乙酯提取物以及馏分 Fr1,Fr6,Fr7 对心叶烟也有较好的保护作用,它们的抑制率均高于宁南霉素的抑制率。 t -检验结果显示馏分 Fr2,Fr3 处理后烟叶的枯斑数与对照烟叶的枯斑数的差异具有统计学意义($p < 0.01$);馏分 Fr1,Fr6 处理后烟叶的枯斑数与对照烟叶的枯斑数的差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

2.1.3 治疗作用 臭椿种子乙酸乙酯提取物及该提取物的不同馏分对 TMV 的治疗作用结果如表 3 所示。除馏分 Fr5 对 TMV 无治疗作用外,其他各馏分以及未分离各馏分的乙酸乙酯提取物对 TMV 均表现出一定的治疗作用。乙酸乙酯萃取物以及馏分 Fr1,Fr3 和 Fr7 对 TMV 的治疗作用高于宁南霉素的抑制作用,馏分 Fr7 的治疗作用最好(封二彩图 1c)。但是,乙酸乙酯提取物及各馏分的抑制率均低于 40%,与对 TMV 的钝化作用和对烟草的保护作用相比,它们对感染 TMV 烟草的治疗作用相对较弱。

2.2 离体半叶枯斑法结果分析

表 4 显示了臭椿种子乙酸乙酯提取物及从该提取物分离得到的馏分对 TMV 增殖的抑制作用结果。乙酸乙酯提取物及各

表 2 对 TMV 初侵染时心叶烟的保护作用

Tab. 2 Protective effects against TMV infection on *N. glutinosa*

施药类型	对照枯斑数 平均值/个	施药处理枯斑数 平均值/个	p 值	抑制率/%
乙酸乙酯提取物	17.00	7.00	0.037	57.58±3.14 ^b
Fr1	11.00	6.00	0.018	45.35±0.51 ^a
Fr2	8.33	3.00	0.000	63.89±1.39 ^b
Fr3	14.67	2.67	0.000	81.63±1.93 ^b
Fr4	17.00	11.33	0.066	33.67±1.84 ^b
Fr5	4.00	3.00	0.288	26.11±3.89 ^b
Fr6	7.00	2.67	0.023	61.27±2.82 ^b
Fr7	9.00	4.33	0.132	51.88±4.93 ^a
宁南霉素	10.00	5.67	0.251	42.22±2.22 ^a

表 3 对 TMV 的治疗作用

Tab. 3 Curative effects against TMV infection

施药类型	对照枯斑数 平均值/个	施药处理枯斑数 平均值/个	p 值	抑制率/%
乙酸乙酯提取物	23.33	16.00	0.072	31.29±6.44 ^a
Fr1	35.00	23.67	0.241	33.56±4.09 ^a
Fr2	18.33	14.00	0.521	23.67±5.23 ^a
Fr3	26.67	17.33	0.198	35.17±2.84 ^a
Fr4	56.33	51.33	0.865	5.99±0.91 ^b
Fr5	8.33	11.33	0.066	—
Fr6	30.67	22.67	0.002	24.14±4.95 ^a
Fr7	39.67	25.67	0.001	35.39±2.25 ^a
宁南霉素	36.33	26.67	0.070	27.03±8.69 ^a

表 4 对 TMV 增殖的抑制作用

Tab. 4 Proliferation effects against TMV infection

施药类型	对照枯斑数 平均值/个	施药处理枯斑数 平均值/个	p 值	抑制率/%
乙酸乙酯提取物	48.00	16.67	0.002	65.27±1.42 ^b
Fr1	41.67	24.67	0.038	40.62±0.76 ^b
Fr2	29.67	15.67	0.003	47.18±0.71 ^b
Fr3	48.00	33.00	0.427	31.71±0.83 ^b
Fr4	39.00	25.00	0.136	36.92±3.82 ^b
Fr5	39.67	3.33	0.039	91.61±3.24 ^b
Fr6	41.67	4.67	0.001	89.01±1.09 ^b
Fr7	47.67	9.67	0.017	78.72±2.49 ^b
宁南霉素	29.00	13.00	0.001	55.12±0.83 ^a

馏分对 TMV 增殖均表现出一定的抑制作用。其中抑制作用最强的为馏分 Fr5, 当质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 它对 TMV 增殖的抑制率高达 91.61%; 馏分 Fr6 (封二彩图 2), Fr7 以及未分离各馏分的乙酸乙酯提取物对 TMV 增殖也表现出较好的抑制效果, 抑制率分别为 89.01%, 78.72% 和 65.27%, 并且均高于宁南霉素的抑制率(55.12%)。

3 讨论与结论

TMV 对烟草的绝对寄生性和独特的致病性^[12]使它很难被根治, 目前尚未发现国际公认的抗 TMV 的特效药物。植物中含有丰富的次生活性物质, 全世界 1/3 的药物来自于植物。自第 1 个植物病毒抑制物从高陆 (*Phytolacca acinosa*) 中发现以来^[13], 植物源抗病毒活性物质就已经引起了研究者的广泛关注。臭椿作为中药, 具有清热燥湿、止痢、止血等功效; 现代药理学研究则表明臭椿具有抗肿瘤、抗病毒、抗疟疾、抗阿米巴等多种药理活性^[14-18], 在农业上有一定的抗虫活性^[19-20]和除草活性^[21-22], 具有广泛的开发前景。

前期研究发现臭椿乙醇提取物有明显的抗 TMV 活性^[7]; 本研究则考察了臭椿种子乙酸乙酯提取物不同馏分的抗 TMV 活性。心叶烟离体半叶枯斑法实验结果发现, 臭椿种子乙酸乙酯提取物及各馏分对 TMV 增殖均表现出一定的抑制作用, 抑制率在 31.71%~91.61% 之间, 其中馏分 Fr5 对 TMV 增殖的抑制作用最强。通过活体半叶枯斑法结合不同施药方式测定了乙酸乙酯提取物及各馏分对 TMV 侵染的抑制活性, 其中: 1) 混合施药处理结果表明馏分 Fr1, Fr5, Fr6 和 Fr7 对 TMV 的钝化作用明显, 抑制率均在 70% 以上, 馏分 Fr5 的抑制率最高(83.09%); 2) 先施药处理结果表明各馏分对 TMV 的初侵染均有一定的抑制作用, 抑制率在 26.11%~81.63% 之间, 除馏分 Fr4, Fr5 外其余各馏分对 TMV 的抑制率均高于宁南霉素的抑制率(42.22%); 3) 后施药处理结果表明与钝化作用、保护作用相比, 各馏分对感染 TMV 烟草的治疗作用相对较弱, 抑制率均低于 40%。上述结果显示, 各馏分对 TMV 的抑制作用差异明显, 可能是因为各馏分中化学成分存在差异和抗病毒物质的不同所致。

总之, 本研究发现臭椿种子乙酸乙酯提取物中的馏分 Fr5, Fr6 和 Fr7 对 TMV 的抑制作用较好, 今后将对 3 个馏分中具体起作用的化学成分进行分析, 为进一步开发绿色无公害、环境友好型植物源生物农药提供理论基础和科学依据。

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.
GENG S L, SHANG S H, CHEN X J, et al. Advance in natural products from plants with anti-TMV activity[J]. Chinese Tobacco Science, 2011, 32(1): 84-91.
- [2] 毕亚玲, 王公明, 王波, 等. 白头翁提取物抗 TMV 生物活性初探[J]. 农药, 2011, 50(12): 921-923.
BI Y L, WANG G M, WANG B, et al. Primary study on anti-TMV activity of extracts from *Pulsatilla chinensis* (bunge) regei[J]. Agrochemicals, 2011, 50(12): 921-923.
- [3] 葛永辉, 张婕, 刘开兴, 等. 垂序商陆抗烟草花叶病毒活性物质提取及分离[J]. 农药, 2013, 52(9): 680-683.
GE Y H, ZHANG J, LIU K X, et al. Extraction and Separation of Anti-TMV Activity Extracts from *Phytolacca*[J]. Agrochemicals, 2013, 52(9): 680-683.
- [4] 赵春超, 王金辉, 李文, 等. 凤眼草的化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2003, 37(4): 1768-1771.
ZHAO C C, WANG J H, LI W, et al. Study on the chemical constituents of *Fructus Ailanthi altissimae* [J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2003, 37(4): 1768-1771.
- [5] 刘继梅, 张中伟, 姚佳, 等. 臭椿树枝化学成分研究[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(4): 121-127.
LIU J H, ZHANG Z W, YAO J, et al. Chemical constituents of the branches of *Ailanthus altissima* Swingle[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2013, 33(4): 121-127.
- [6] 沈建国, 张正坤, 吴祖建, 等. 臭椿抗烟草花叶病毒活性物质的提取及其初步分离[J]. 中国生物防治, 2007, 23(4): 348-352.
SHEN J G, ZHANG Z K, WU Z J, et al. Extraction and preliminary isolation of antiviral substances from *Ailanthus altissima* against TMV[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2007, 23(4): 348-352.
- [7] 沈建国, 张正坤, 吴祖建, 等. 臭椿和鸦胆子抗烟草花叶病毒作用研究[J]. 中国中药杂志, 2007(1): 27-29.
SHEN J G, ZHANG Z S, WU J Z, et al. Antiviral effect of *Ailanthus altissima* and *Brucea javanica* on tobacco mosaic virus[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007(1): 27-29.
- [8] GOODING J R G, HEBERT T. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities [J]. Phytopathology, 1967, 57(11): 1285-1290.
- [9] 闫晓慧, 刘丽, 张东华, 等. 入侵植物紫茎泽兰的抗烟草花叶病毒活性研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(12): 99-100.

- YAN X H, LIU L, ZHANG D H, et al. Study on the anti-TMV activity of *Eupatorium adenophorum* [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(12): 99-100.
- [10] 祁进康, 邹正彪, 王德艳, 等. 11种植物提取物抗烟草花叶病毒活性研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2017, 37(6): 129-134.
- QI J K, ZOU Z B, WANG D Y, et al. Anti-Tobacco Mosaic Virus Activity of 11 Plant Extracts [J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences), 2017, 37(6): 129-134.
- [11] 闫晓慧, 唐贵华, 李亚婷, 等. 18种入侵植物的抗烟草花叶病毒活性研究[J]. 现代农业科技, 2013(9): 122-123.
- YAN X H, TANG G H, LI Y T, et al. Study on Anti-TMV Activities of 18 Invasive Plant [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2013(9): 122-123.
- [12] 汪代斌, 辛静, 王晗, 等. 烟草花叶病发生规律及生物源抗病毒研究进展[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(11): 2174-2176.
- WANG D B, XIN J, WANG H, et al. Progress in occurrence regularity and bio-antivirus material of tobacco virus [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(11): 2174-2176.
- [13] KASSINIS B, KLECZKOWSKI A. The isolation and some properties of a virus-inhibiting protein from *Phytolacca esculents* [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1948(2): 143-153.
- [14] de FEO V, MARTINO L D, SANTORO A, et al. Anti-proliferative effects of tree of heaven (*Ailanthus altissima* Swingle) [J]. Phytotherapy Research, 2005, 19(3): 226-230.
- [15] CHANG Y S, WOO E R. Korean medicinal plants inhibiting to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion [J]. Phytotherapy Research, 2003, 17(4): 426-429.
- [16] CHANG Y S, MOON Y H. Virus-cell fusion inhibitory compounds from *Ailanthus altissima* Swingle [J]. Korean Journal of Pharmacognosy, 2003, 34(1): 28-32.
- [17] OKUNADE A L, BIKOFF R E, CASPER S J, et al. Antiplasmodial activity of extracts and quassinoids isolated from seedlings of *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) [J]. Phytotherapy Research, 2003, 17(6): 675-677.
- [18] CASINOVI C G, CECCHERELLI P, FARDELLA G, et al. Isolation and structure of a quassinoid from *Ailanthus glandulosa* [J]. Phytochemistry, 1983, 22(12): 2871-2873.
- [19] 吕建华. 臭椿树皮提取物对四种主要储粮害虫的生物活性研究[J]. 粮食储藏, 2007(2): 17-20.
- LV J H. The insecticidal activities of *Ailanthus altissima* extracts on several kinds of important stored-grain insects [J]. Grain Storage, 2007(2): 17-20.
- [20] 李莉, 金山, 铁军. 臭椿叶乙醇提取物对菜青虫生物活性的影响[J]. 北方园艺, 2016(13): 122-124.
- LI L, JIN S, TIE J. Biological activities of extracts from *Ailanthus altissima* Swingle leaves by 95% alcohol against *Pieris rapae* Larvae [J]. Northern Horticulture, 2016(13): 122-124.
- [21] de FEO V, DE MARTINO L, QUARANTA E, et al. Isolation of phytotoxic compounds from tree-of-heaven (*Ailanthus altissima* Swingle) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(5): 1177-1180.
- [22] HEISEY R M, HEISEY T K. Herbicidal effects under field conditions of *Ailanthus altissima* bark extract, which contains ailanthone [J]. Plant and Soil, 2003, 256(1): 85-99.

Study on Anti-TMV Activity of Ethyl Acetate Extracts from Seed of *Ailanthus altissima*

ZOU Zhengbiao¹, QI Jinkang¹, WANG Deyan¹, HU Shijun², YAN Xiaohui¹

(1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Southwest Forestry University;

2. Key Laboratory of State Forestry Administration on Biodiversity Conservation in Southwest China, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: [Purposes] In order to study the antiviral activities of ethyl acetate extracts from seed of *Ailanthus altissima*. [Methods] The anti tobacco mosaic virus (TMV) activities of different chromatography fractions of ethyl acetate extracts from seed of *A. altissima* were screened by half-leaf method. [Findings] Four fractions, Fr1, Fr5, Fr6, and Fr7 showed potent inactivation activities against TMV with inhibition in the range of 74.46%~83.09% at the concentration of 1 mg·mL⁻¹. The fraction Fr5 showed prominent protective effect against TMV infection of *Nicotiana glutinosa* with inhibition rate of 81.63%. Fractions, Fr5, Fr6, and Fr7 showed potent anti-TMV proliferation activities with inhibition rate of 91.61%, 89.47%, and 78.5%, respectively. Curative effects of all the chromatography fractions against TMV were relatively weak with inhibition rate no more than 40%. [Conclusions] The antivirus components of these chromatography fractions from seed of *A. altissima* are worth further investigation.

Keywords: *Ailanthus altissima*; tobacco mosaic virus; antivirus assay; half-leaf method

(接正文36页)

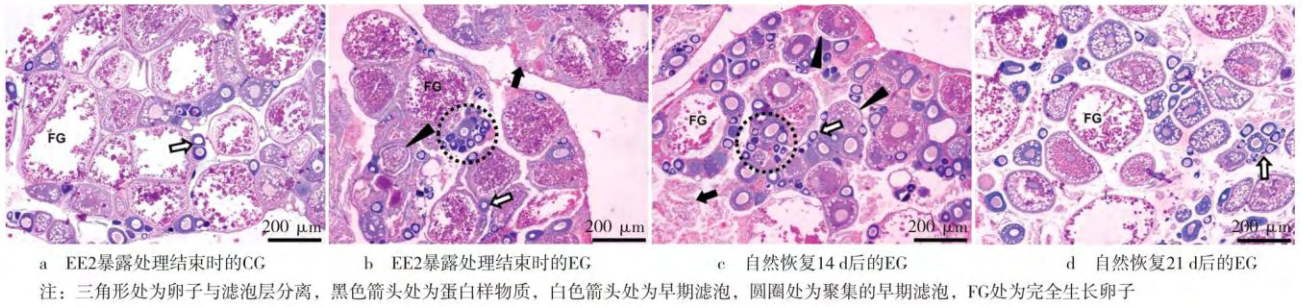


图2 斑马鱼雌性成鱼的卵巢结构

Fig. 2 Ovarian structure of zebrafish female adults

(接正文73~76页)

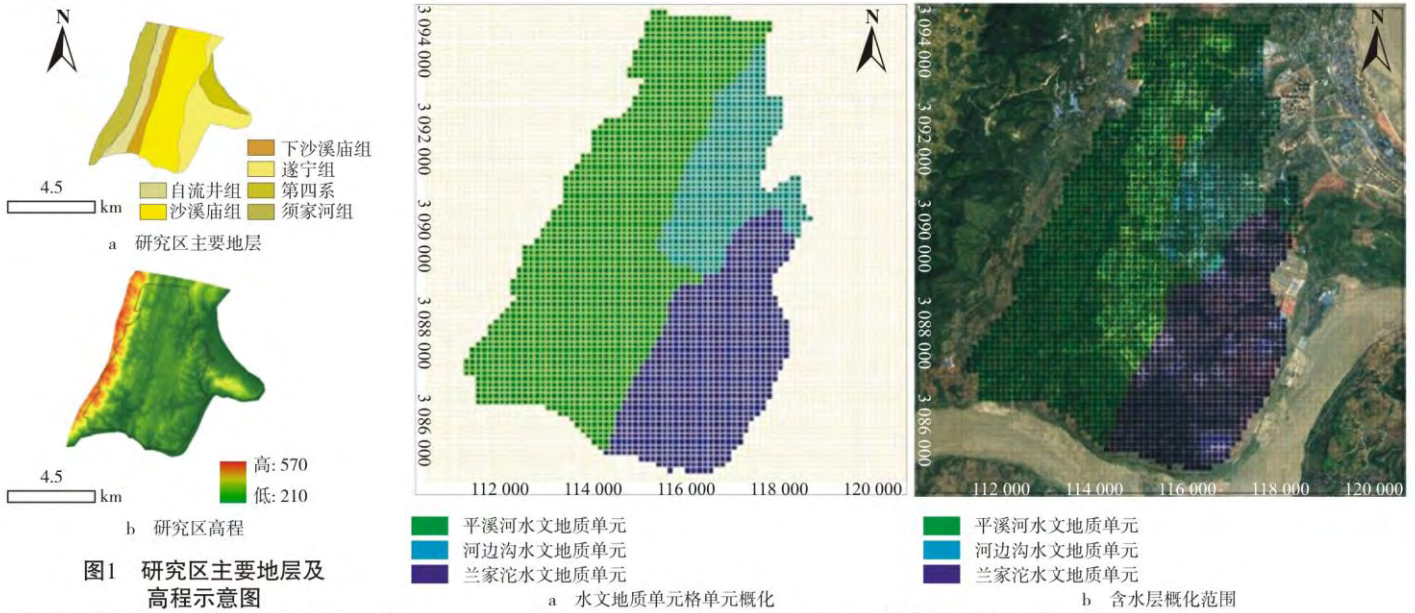


图1 研究区主要地层及高程示意图

Fig. 1 Sketch map of the main strata and elevation of the study area

图4 研究区水文地质单元分区概化示意图

Fig. 4 Sketch map of hydrogeological unit zoning in study area

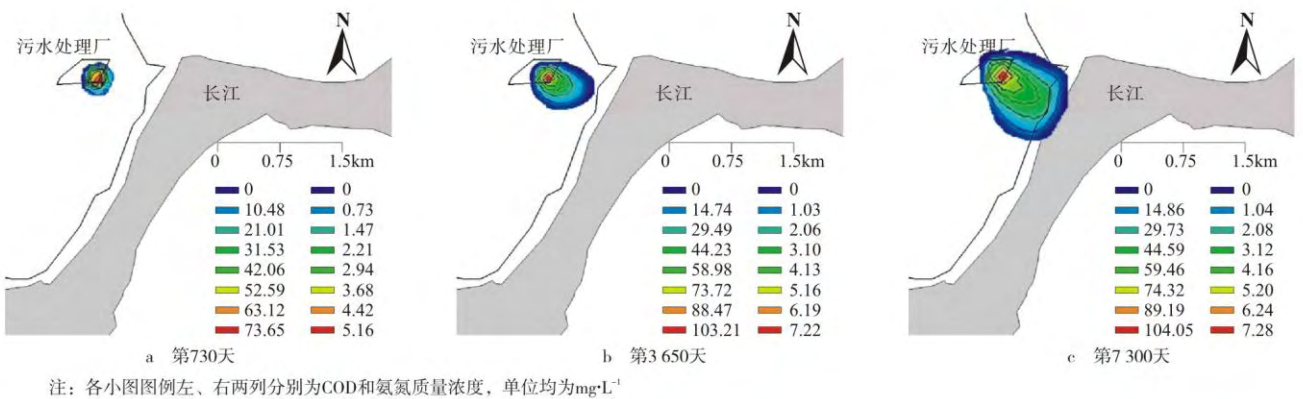


图6 污染物运移平面图

Fig. 6 The pollutant transport plan

(接正文117~118页)



图1 活体半叶枯斑法实验结果

Fig. 1 Results of *in vivo* half-leaf method



注: 左半叶为对照, 右半叶为施药处理

图2 馏分Fr6离体半叶枯斑法活性结果

Fig. 2 Results of *in vitro* half-leaf method of fraction Fr6