

金鸡菊 (*Coreopsis drummondii*) 的抗TMV活性物质*

陈启建 欧阳明安 吴祖建 谢联辉 林奇英**

(福建农林大学植物病毒研究所 福州 350002)

摘要 采用活性跟踪法从金鸡菊根中分离获得抗病毒活性物质,经质谱和核磁共振分析,鉴定该物质为1-苯基-1,3,5-三庚炔。采用半叶枯斑法、叶圆盘法测定了该物质对烟草花叶病毒的抑制效果,结果表明,0.2 mg/mL的该化合物对TMV表现出较好的体外抑制侵染和增殖活性,其对TMV侵染和复制的抑制率分别为73.5%和84.3%。实时荧光定量PCR测定结果表明,该化合物对TMV外壳蛋白基因的表达式有明显的抑制作用,0.2 mg/mL的该化合物对TMV外壳蛋白基因表达的抑制率为79.8%。图6 表1 参19

关键词 金鸡菊; 抗TMV活性; 1-苯基-1,3,5-三庚炔; 活性物质分离

CLC S432.41

Anti-TMV Active Substances from *Coreopsis drummondii**

CHEN Qijian, OUYANG Ming'an, WU Zujian, XIE Lianhui & LIN Qiyang**

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

Abstract Production of plant secondary metabolites as a rich source of antimicrobial agents has been extensively applied in Chinese traditional medicine to treat viral diseases. Therefore, direct selection of antiphytoviral compounds from plants can be used to identify new potent antiviral agents. To screen antiviral compounds, tobacco mosaic virus (TMV) was chosen as a model target and the extracts with anti-TMV activity from 108 species of plants were analyzed. Among them, a extract from *Coreopsis drummondii*, predominantly suppressing the infection and replication of TMV was selected, and a constituent with anti-virus activity was isolated from it by bioassay. The compound was identified as 1-phenyl-1,3,5-triheptalkyne using MS and NMR. Its activity against TMV was investigated by local lesion and leaf discs assay. The results indicated that the compound showed a significant inhibitory activity against TMV *in vitro*, with 73.5% inhibitory rate against the infection of TMV and 84.3% against replication of TMV at a concentration of 0.2 mg/mL, while its inhibitory effect on TMV-CP gene expression in tobacco leaf discs was examined by real-time quantitative PCR, which showed that the compound obviously suppressed the expression of TMV-CP gene, with 79.8% inhibitory rate at the concentration of 0.2 mg/mL. Taken together, the anti-TMV activity of the compound contributes itself as a new potential candidate for development of antiviral drugs. Fig 6, Tab 1, Ref 19

Keywords *Coreopsis drummondii*; anti-TMV activity; 1-phenyl-1,3,5-triheptalkyne; isolation of active substance

CLC S432.41

烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV) 引起的病毒病不但危害严重,其防治也相当困难。TMV具有寄主范围广、抗逆性强、在生产上造成的危害大等特点。TMV的寄主范围很广,可侵染十字花科、茄科、菊科、藜科及苋科等多种植物,如烟草、番茄、茄子、辣椒、菠菜等;TMV的危害不仅造成农作物产量的损失,而且还使农产品的品质大大降低,给农业生产造成了极大损失,据估计全世界每年因TMV而造成的经济损失就超过1亿美元^[1]。由于植物病毒的绝对寄生,对其防治目前尚无理想的药剂^[2]。已有研究表明一些植物的次生代谢产物对病毒有良好的抑制效果^[3-7],因此,从植物中筛选抗病毒活性物质进而开发新型抗病毒剂具有广阔的前景。

我们在对108种植物浸提物抗病毒活性筛选中发现,金鸡菊 (*Coreopsis drummondii*) 浸提物对TMV具有较好的抑制

作用。为进一步探究该植物中的抗病毒活性物质及其抗病毒活性,采用活性跟踪法对其中的抗病毒物质进行分离纯化,并以烟草/TMV体系对分离获得的单体物质进行了抗病毒活性测定,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物: 新鲜金鸡菊样品采自福建省福州金山,经鉴定后用自来水洗净其外表面,晾干后保存备用。

供试病毒: 烟草花叶病毒普通株系保存于福建农林大学植物病毒研究所,其抗血清是由提纯的TMV经免疫家兔获得的,效价为1:20 480。

供试烟草: TMV枯斑寄主为心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*), 系统侵染寄主为普通烟草 (*N. tabacum*) K₃₂₆ 品种

仪器与试剂: Bruker AM-400 核磁共振仪, Agilent 6890 N/5973i 型气质联用仪, RI2000型高效液相色谱仪, Biometra T3 Thermocycler PCR仪, 层析用200~300目硅胶 (青岛海洋化工厂产品), 薄层层析用GF254层析板 (青岛海洋化工厂产品), 石油醚 (60~90 ℃) 和丙酮为分析纯, 95%乙醇为化

收稿日期: 2008-08-19 接受日期: 2008-11-05

*国家自然科学基金项目 (No. 30770089) 和福建省教育厅项目 (No. 2006F5017) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30770089) and the Project of the Administration of Education of Fujian, China (No. 2006F5017)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: linqiyang@126.com)

学纯,总RNA抽提试剂盒和荧光定量PCR试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™)购自宝生物(大连)工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 抗病毒物质的提取与分离 提取:晾干后的金鸡菊根部于烘干箱中45℃烘干后,经粉碎机粉碎并过40目筛。称取2.8 kg的干粉,用6倍体积的95%的乙醇浸泡4次,每次3 d,过滤浸液,滤液减压浓缩,合并每次浓缩所得浸膏,即为乙醇提取物(227 g)。

分离:样品的乙醇浸膏依次用石油醚、氯仿、正丁醇进行萃取。萃取时每次加入的溶剂体积大约是水体积的一半,直至加入的溶剂接近无色后更换另一种溶剂进行萃取。采用正丁醇萃取时,先于正丁醇中加入蒸馏水使之处于水饱和状态后再进行萃取。分别对所得的萃取物进行抗TMV活性测定,选择其中抗病毒活性最好的石油醚萃取物,采用柱层析对其进行进一步分离。将200~300目层析用硅胶置烘干箱中,于110℃下烘干活化1 h,冷却后,用石油醚装柱。取石油醚萃取物35 g用石油醚溶解后,加入一定量的硅胶混匀,待溶剂挥发后上柱。依次以石油醚、氯仿、丙酮为洗脱剂进行洗脱,流出液每250 mL收集一份,分别对各收集组分进行薄层层析分析,合并含相同组分的部分,并测定其抗病毒活性。发现由第20、21、22部分合并成的流出物抗病毒活性最好。取该流出物3.8 g再次进行硅胶层析分离,以不同配比的石油醚—丙酮为洗脱剂进行梯度洗脱,分别获得1个黄色和1个白色混晶R₁和R₂。分别采用高效液相色谱对R₁和R₂进一步分离纯化,以石油醚—丙酮(9:1)为洗脱剂,流速为4 mL/min进行分离,从R₁获得化合物1和化合物2;以氯仿—丙酮(9:1)为洗脱剂,流速为4 mL/min进行分离,从R₂中获得化合物3、化合物4和化合物5。

1.2.2 提取物结构鉴定 采用Agilent 6890 N/5973i气质联用仪进行化合物质谱分析。色谱柱为HP-5 MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm);载气为氦气,纯度>99.99%,流速1 mL/min;进样口温度为280℃,分流比为50:1;进样量为1 μL;炉温:初始80℃,以20℃/min上到280℃;溶剂延迟3 min。质谱条件:电离方式为EI,轰击能量70 eV,离子源温度250℃;传输线温度为280℃;质谱扫描范围为50~500 amu。

核磁共振测定采用Bruker AM-400核磁共振仪。

1.2.3 体外抗TMV活性测定 取分离获得的单体10 mg充分溶解于1 mL的二甲亚砜(DMSO)中,配制成10 mg/mL的母液备用。活性测定时取一定量的母液加蒸馏水配置成系列浓度,再分别加入提纯的TMV,使病毒终浓度为0.01 mg/mL。混合10 min后,采用半叶法摩擦接种枯斑寄主心叶烟,以含相同浓度的二甲亚砜和TMV的蒸馏水溶液为对照,每处理接种5个半叶,重复2次,待接种叶出现明显的枯斑后,记录枯斑数目,计算抑制率。

抑制率(%)=[(对照组平均枯斑数—处理组平均枯斑数)/对照组平均枯斑数]×100。

1.2.4 抑制TMV增殖作用的测定 采用叶盘法测定提取物对TMV增殖的抑制作用。选取生长良好的普通烟K₃₂₆,叶片接种TMV 6 h后,用打孔器从接种叶打取直径约为15 mm的叶圆盘,将叶圆盘分别漂浮于用母液配制成不同浓度的提取物

水溶液中,并分别以漂浮于蒸馏水中接种病毒的叶圆盘和不接种病毒的健康烟草叶圆盘为阳性对照和阴性对照,每处理6片叶圆盘。处理48 h后分别将各叶圆盘用1:20(w/V)的碳酸盐缓冲液包被,间接ELISA法检测其D_{405 nm}值,试验重复2次,取其平均值。

1.2.5 实时荧光定量PCR测定对TMV外壳蛋白基因表达的影响 引物设计与合成:病毒外壳蛋白基因(CP)及管家基因(Actin)的引物见表1,由宝生物(大连)工程有限公司设计并合成。

表1 实时定量PCR引物
Table 1 Primers for real-time PCR

Gene	Primer sequence	Product size (bp)
CP	F: 5'-ATTAGACCCGCTAGTCACAGCAC-3' R: 5'-GTGGGGTTCGCCTGATTTT-3'	84
Actin	F: 5'-CAAGGAAATCACCGCTTTGG-3' R: 5'-AAGGGATGCGAGGATGGA-3'	106

RNA的提取:烟草叶片中总RNA的提取采用Trizol法提取,提取的RNA经紫外分光光度计测定A_{260 nm}/A_{280 nm}值进行定量和纯度分析。

cDNA合成:以总RNA为模板,分别用TMV外壳蛋白基因及管家基因的反向引物进行逆转录合成上述2个基因的cDNA。cDNA合成采用20 μL逆转录反应体系:总RNA 4 μL, 3'引物(10⁻² mol/L) 1 μL, DEPC H₂O 7.5 μL, 5×buffer 4 μL, RNA抑制剂(40 U/μL) 0.5 μL, dNTP(10⁻² mol/L) 2 μL, AMV逆转录酶(5 U/μL) 1 μL, 逆转录反应条件为42℃ 60 min, 70℃ 15 min, 反应结束后加入80 μL灭菌超纯水,混匀,—40℃低温保存备用。

PCR反应体系与程序:实时荧光定量PCR反应体系:SYBR Premix Ex Taq™ 12.5 μL, 引物F、R(10⁻² mol/L)各0.5 μL, cDNA 2 μL, PCR级水9.5 μL, 总反应体系为25 μL。反应程序:95℃ 10 s(×1), 95℃ 5 s(×40), 56℃ 25 s(×40),在每个循环结束后检测荧光信号。

标准曲线的制作:将合成获得的2个基因的cDNA分别用含Carrier tRNA的DEPC水做10倍系列稀释,从1×10¹、1×10²、1×10³、1×10⁴直至1×10⁵。采用荧光定量PCR试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™),在T3 Thermocycler PCR仪上进行PCR反应。随着PCR反应在每一个循环结束后测定吸光值,即可获得以cDNA稀释度的对数值为纵坐标,C_t值(C_t值是指每个反应体系内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数)为横坐标的标准曲线。

熔解曲线的测定:熔解曲线的测定于荧光PCR反应结束后进行,从65℃到90℃每隔0.2℃测定其吸光值,即可得到以温度为横坐标、吸光值为纵坐标的熔解曲线。

对病毒外壳蛋白基因表达的影响测定:将活性物质用蒸馏水配制成质量体积浓度为0.2 mg/mL溶液,以不含活性物质的蒸馏水为对照溶液,取双层滤纸分别于配制的溶液中浸泡数分钟,将吸饱溶液的滤纸分别铺放于不同的培养皿中。选取生长良好的普通烟品种K₃₂₆,接种TMV(0.02 mg/mL) 30 min后,从接种叶取直径约为15 mm的圆盘,叶面朝上分别置于吸有各处理溶液的滤纸上,盖好皿盖,置于光照培养箱

中, 25 ℃下光照/黑暗 (14 h/10 h) 交替培养, 并随时补充相应的溶液进行保湿. 48 h后取出并用蒸馏水漂洗各圆盘, 用滤纸吸干表面水分后, 分别提取各处理叶圆盘中的总RNA, 对各处理中病毒CP基因表达情况进行实时荧光定量PCR检测, 试验重复3次, 结果以目标基因与内参基因 (*Actin*) 的mRNA拷贝数比值表示.

2 结果与分析

2.1 提取物结构分析

化合物1为白色针状结晶, 经鉴定该化合物为1-苯基-1,3,5-三庚炔 (1-phenyl-1,3,5-triheptalkyne), 分子量为164, 其化学式为 $C_{13}H_{10}$, 化学结构式见图1. EI-MS (m/z) 164 (M^+); IR ν_{max} (film) / cm^{-1} : 2 219; 1H -NMR δ 7.57 (2H, dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz), 7.28 (2H, br.d, $J = 8.0$ Hz), 7.35 (1H, m), 1.85 (3H, s); ^{13}C -NMR δ 121.1 (C-1'), 133.5 (C-2'), 129.3 (C-3'), 130.5 (C-4'), 129.3 (C-5'), 133.5 (C-6'), 76.3 (C-1), 75.2 (C-2), 59.6 (C-3), 65.3 (C-4) 68.5 (C-5), 80.3 (C-6), 4.3 (C-7). 化合物1为首次从该植物中分离获得.

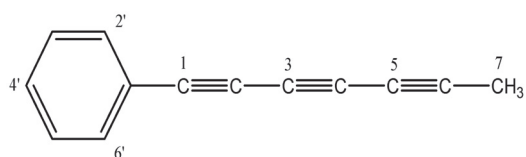


图1 化合物1的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of compound 1 from *C. drummondii*

化合物2为淡黄色无定形粉末, 结构鉴定结果表明, 该化合物为 (*IE*)-1-(3-hydroxy-butenyl)-1,2,4-trihydroxy-2,6,6-trimethyl-cyclohexane [反-1-(3-羧基-丁烯基)-1,2,4-三羧基-2,6,6-三甲基-环己烷], 化学式为 $C_{13}H_{24}O_4$, 分子量为244. 化合物3为白色片状结晶, 经鉴定该化合物为 β -豆甾醇 (β -stigmasteryl), 化学式为 $C_{29}H_{48}O$, 分子量为412. 化合物4为白色片状结晶, 经鉴定该化合物为豆甾醇 (Stigmasteryl), 化学式为 $C_{29}H_{48}O$, 分子量为412, 与化合物3为同分异构体.

2.2 体外抑制TMV活性

采用半叶枯斑法分别测定分离获得的化合物与提纯病毒混合后对TMV的抑制活性, 当各化合物的质量浓度为0.4 mg/mL时, 化合物1、2、3、4和5对TMV的抑制率分别为83.3%、42.6%、34.1%、31.2%和24.1%. 结果表明, 当质量浓度为0.4 mg/mL时, 只有化合物1表现出较好的抑制效果, 其余4个化合物的抑制率均较低.

对抑制效果较好的化合物1进一步测定其在不同浓度下的体外抑制TMV效果, 测定结果 (图2) 表明, 化合物1对TMV具有体外抑制作用, 其抑制作用随浓度的增大而逐渐明显, 具有浓度依赖性, 其浓度在0.05 mg/mL以上时对TMV有明显的抑制活性, 大于0.1 mg/mL浓度时其对TMV有良好的体外抑制作用.

2.3 对TMV增殖的抑制作用

不同浓度的化合物1对烟草叶圆盘中TMV复制的抑制效果 (图3) 显示, 在离体条件下, 化合物1对TMV复制的抑制作用随其浓度的增大而升高, 质量浓度在0.025 mg/mL时对烟

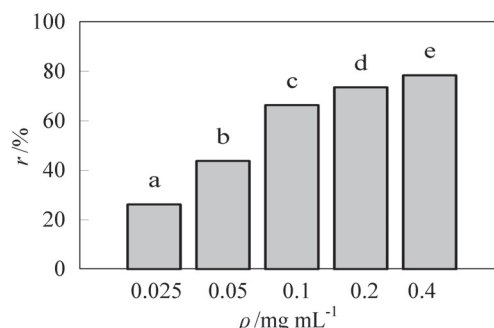


图2 化合物1对TMV的体外抑制效果

Fig. 2 Inhibiting effect of compound 1 on TMV *in vitro*

柱上端不同字母表示在0.05水平差异显著, 下同
Different letters in columns mean significant difference at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range test. The same below

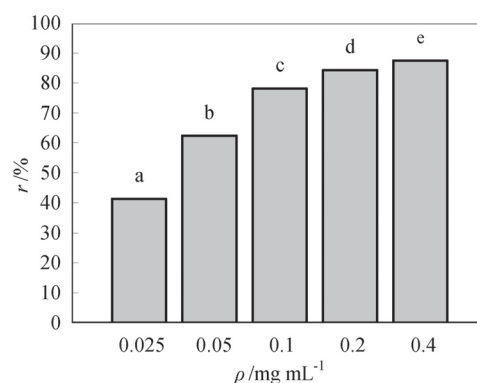


图3 化合物1对TMV增殖的抑制效果

Fig. 3 Inhibiting effect of compound 1 on TMV replication in leaf discs

草叶圆盘中TMV复制的抑制率仅为41.3%, 0.05 mg/mL浓度时对TMV复制的抑制率为62.4%, 0.1mg/mL浓度时其抑制率达78.2%, 0.2 mg/mL浓度时其抑制率可达84.3%, 结果表明, 在离体条件下化合物1对TMV的增殖具有明显的抑制作用, 其抑制效果具有浓度依赖性, 随浓度的提高而增大.

2.4 对TMV CP基因表达的抑制效果

2.4.1 标准曲线的制作 将逆转录合成的cDNA用DEPC水做10倍系列稀释, 经实时荧光定量PCR仪测定的标准曲线 (图4) 显示, *Actin* 的标准曲线方程为: $y_a = -0.2827x_a + 9.50$, 其相关系数为0.998; 外壳蛋白基因的标准曲线方程为: $y_c = -0.251x_c + 8.22$, 其相关系数为0.991. 其中 y 代表起始模板拷贝数以10为底的对数, x 代表 C_t 值. 2个基因标准曲线方程的相关系数均大于0.99, 说明标准曲线线性好, 可用于通过未知样品的 C_t 值来计算未知样品的浓度. 从图4 还可以看出, 在 10^{-10} 范围内, 起始模板拷贝数以10为底的对数和 C_t 值有很好的线性关系, 表明可以在较宽的范围内对目的基因进行定量检测.

2.4.2 溶解曲线分析 利用溶解曲线可将特异和非特异产物区分开, 图5为TMV外壳蛋白基因 (*CP*) 和烟草管家基因 (*Actin*) 扩增产物的溶解曲线. 从图中可以看出, TMV外壳蛋白基因扩增产物的特异峰出现在77.8 ℃处 (图5-a), *Actin* 的扩增产物在82.3 ℃处也出现特异峰 (图5-b), 2个特异峰峰值之前的曲线均比较平滑, 未见其他显著的峰值, 说明没有引物二聚体及非特异性扩增产物出现, 表明本试验中对2个

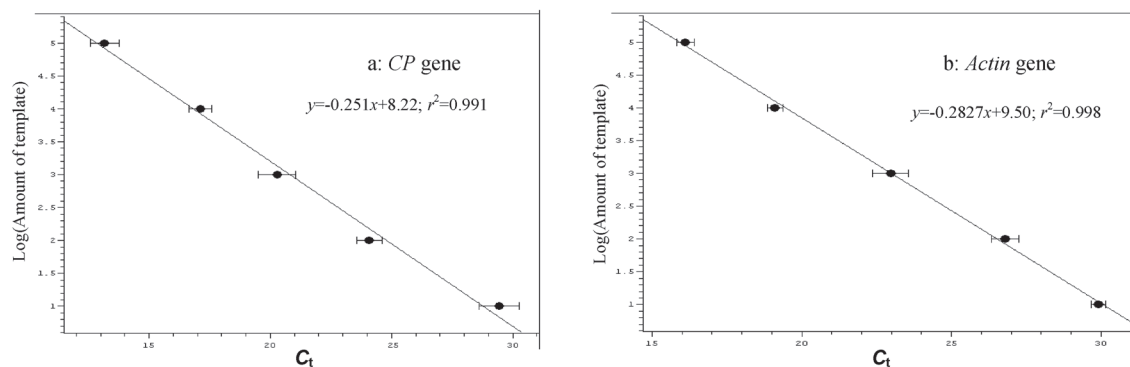


图4 标准曲线

Fig. 4 Standard curves of CP gene and Actin gene

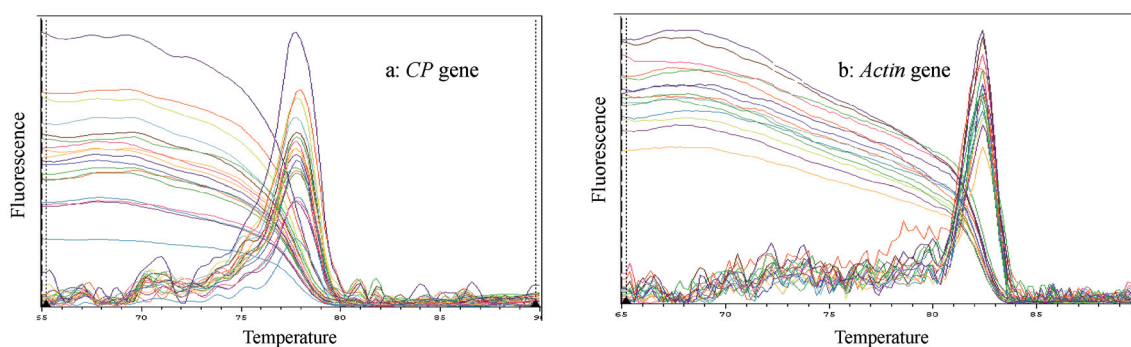


图5 扩增产物的溶解曲线

Fig. 5 Dissociation curves of CP gene and Actin gene

基因扩增所使用的引物均有强的特异性,且扩增条件合理,所获得的扩增产物均具有较强特异性。

2.4.3 对病毒外壳蛋白基因表达的抑制 采用实时荧光定量PCR对化合物1处理的病毒外壳蛋白基因表达情况进行了检测,在相对定量检测中,为减少样本间RNA提取效率、逆转录及扩增效率的差异对定量结果造成的误差,在测定目的基因的同时测定内源性管家基因*Actin*作为内参基因,结果以目标基因与内参基因(*Actin*)的mRNA拷贝数比值进行评价(图6)。从图6中可看出,与对照相比,化合物1处理的病毒外壳蛋白基因的表达水平明显下降($P < 0.05$)。对照组病毒CP基因表达水平(目的基因拷贝数与管家基因拷贝数的比值)为 37.28 ± 8.88 ,处理组CP基因的表达水平为 7.52 ± 1.82 ,约是对照组表达水平的20.2%。结果表明,0.2 mg/mL的化合物处理对烟草中TMV CP基因的表达具有显著的抑制作用。

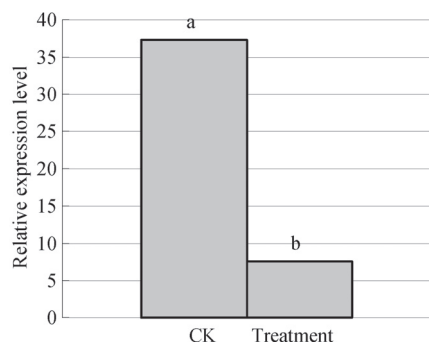


图6 化合物1处理对TMV CP基因表达的影响

Fig. 6 Effect of compound 1 on TMV CP gene expression

4 讨论

烟草花叶病毒基因组为正义单链RNA,可编码4种蛋白,其中相对分子质量为 126×10^3 和 183×10^3 (126×10^3 的通读蛋白)的复制酶是其基因组RNA的翻译产物, 17.5×10^3 的外壳蛋白和 30×10^3 的运动蛋白是TMV亚基因组RNA的翻译产物^[8-9]。外壳蛋白的主要功能是保护被其包被的RNA不受降解,也是TMV颗粒在寄主体内长距离运动所必需的^[10-11]。有研究表明,从植物中分离出的次生代谢物质双裂孕烷甾体glaucogenin C及其苷类化合物对TMV亚基因组具有选择性抑制作用,从而表现出对TMV复制的良好抑制效果^[12]。商文静等(2007)采用实时荧光定量PCR方法研究了壳寡糖诱导对烟草体内TMV-CP基因表达的影响,结果表明,经壳寡糖诱导的烟草表现出对TMV的系统获得抗性,其叶片中CP基因的表达量比未经处理的对照烟草显著降低^[13]。因此,寄主植物体内TMV-CP基因的表达量可反应TMV在寄主体内的增殖动态。本试验采用荧光定量PCR方法测定了接种TMV的烟草叶盘经1-苯基-1,3,5-三庚炔处理后其中CP基因的相对表达量,可在分子水平上较为精确地评价该化合物对病毒增殖的抑制效果,为进一步研究奠定基础。

目前,植物病毒病的防治仍缺乏有效的防治药剂,一些植物源抗病毒剂,如由从油菜中提取的混合脂肪酸研制而成的耐病毒诱导剂88-D^[14],采用百合科和忍冬科的一些植物配制成的植毒灵^[15],由锦葵科植物中提取的抗病毒物质多羟基双萜醇制成的抗病毒剂WCT-II^[16],虽然已在病毒病防治生产实践中发挥了重要的作用,但由于药剂品种较单一,且植物病毒具有较其他病原微生物易变异的特点,使病毒容易

对这些药剂产生抗性。因此,若能获得一些新的抗病毒活性物质,进而研制成新的抗病毒剂,将其与其他抗病毒剂交替使用或混配使用,既可减缓病毒抗药性的产生,又可提高病毒病的防效,在农业生产上将具有广阔的应用前景。TMV是正义单链RNA病毒的模式病毒,烟草/TMV体系是最常被用于抗植物病毒药物的筛选及其作用机制等研究的体系^[17-19]。本试验以烟草/TMV体系对金鸡菊提取物的抗病毒活性进行评价,采用活性跟踪法对其中的抗病毒成分进行分离,获得4种化合物单体,其中1-苯基-1,3,5-三庚炔为首次从金鸡菊中分离获得。其抗病毒活性测定结果表明,0.2 mg/mL的该化合物具有显著的抗TMV活性;实时荧光定量PCR测定结果表明该物质可明显抑制烟草体内TMV外壳蛋白基因的表达。这些研究结果表明,该物质可作为研制新型抗病毒剂的候选物质进一步加以探究,其抗病毒机制和理化性质等方面值得进一步研究。

References

- 1 Wu YF (吴云峰), Cao R (曹让), Wei NS (魏宁生), Zhou GH (周广和). Screening and application of bio-virus pesticide. *World Agric* (世界农业), 1995 (5): 35~36
- 2 Deng GB (邓光兵), Wan B (万波), Hu HZ (胡厚芝), Chen JR (陈任), Yu MQ (于懋群). Biological activity of ningnanmycin on tobacco mosaic virus. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2004, **10** (6): 695~698
- 3 Ouyang MA, Wein YS, Zhang ZK, Kuo YH. Inhibitory activity against tobacco mosaic virus (TMV) replication of pinosresinol and syringaresinol lignans and their glycosides from the root of *Rhus javanica* var. *roxburghian*. *J Agric Food Chem*, 2007, **55** (16): 6460~6465
- 4 WU ZJ, Ouyang MA, Wang CZ, Zhang ZK, Shen JG. Anti-tobacco mosaic virus (TMV) triterpenoid saponins from the leaves of *Ilex oblonga*. *J Agric Food Chem*, 2007, **55** (5): 1712~1717
- 5 Shen JG, Zhang ZK, Wu ZJ, Ouyang MA, Xie LH, Lin QY. Antiphytoviral activity of bruceine-D from *Brucea javanica* seeds. *Pest Manage Science*, 2008, **64** (2): 191~196
- 6 Yao YC (姚宇澄), An TY (安天英), Gao J (高俊), Yang Z (杨昭), Yu XS (于学舜), Li GR (李广仁), Huang RQ (黄润秋), Zhu CQ (朱常青), Wen FJ (温孚江). Research of chemistry and bioactivity of active compounds antiphytovirus in *Cynaneum komarovii*. *Chin J Org Chem* (有机化学), 2001, **21** (11): 1024~1028
- 7 Chen QJ (陈启建), Ouyang MA (欧阳明安), Xie LH (谢联辉), Lin QY (林奇英). Isolation and detection of anti-TMV activity constituent from *Parthenium hysterophorus*. *Acta Laser Biol Sin* (激光生物学报), 2008, **17** (4): 544~548
- 8 Goregaoker SP, Culver JN. Oligomerization and activity of the helicase domain of the tobacco mosaic virus 126- and 183-kilodalton replicase proteins. *J Virol*, 2003, **77** (6): 3549~3556
- 9 Reichel C, Beachy RN. Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J Virol*, 2000, **74** (7): 3330~3337
- 10 Saito T, Meshi T, Takamatsu N, Okada Y. Coat protein gene sequence of tobacco mosaic virus encodes a host response determinant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** (17): 6074~6077
- 11 Hilf ME, Dawson WO. The tobamovirus capsid protein functions as a host-specific determinant of long-distance movement. *Virology*, 1993, **193** (1): 106~114
- 12 Li YM, Wang LH, Li SL, Chen XY, Shen YM, Zhang ZK, He HP, Xu WB, Shu YL, Liang GD, Fang RX, Hao XJ. Seco-pregnane steroids target the subgenomic RNA of alphavirus-like RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104** (19): 8083~8088
- 13 Shang WJ (商文静), Wu YF (吴云锋), Shang HS (商鸿生), Zhao XM (赵小明), Du YG (杜昱光). Inhibitory effect to TMV-CP gene expression in tobacco induced by chito-oligosac-charides. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 2007, **37** (6): 637~641
- 14 Sun FC (孙凤成), Lei XY (雷新云). The virus inhibitor 88-D induces production of PR proteins and resistance to TMV infection in tobacco. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 1995, **25** (4): 345~349
- 15 Huang ZX (黄遵锡), Chen WJ (陈文久), Cheng LZ (程隆藻), Zhang ZY (张祖渊), He XP (何兴普). Preliminary studies on the control effect of chemical "Zhiduling" on tobacco mosaic virus. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 1997, **10** (2): 94~96
- 16 Zhang JX (张建新), Wu YF (吴云锋), Fan B (樊兵). Antiviral physiopathology of WCT extracts of polyhydroxy dinaphthaldehyde. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 2005, **35** (6): 514~519
- 17 Herms S, Seehaus K, Koehle H, Conrath U. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* Pv *tabaci*. *Plant Physiol*, 2002, **130**: 120~127
- 18 Menard R, Alban S, De Ruffray P, Jamois F, Franz G, Fritig B, Yvin J, Kauffmann S. β -1,3 glucan sulfate, but not β -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and arabidopsis. *Plant Cell*, 2004, **16**: 3020~3032.
- 19 Murphy AM, Carr JP. Salicylic acid has cell-specific effects on tobacco mosaic virus replication and cell-to-cell movement. *Plant Physiol*, 2002, **128**: 552~563