

## 姬松茸粗多糖防治烟草花叶病毒病

胡 叠<sup>1</sup>, 唐前君<sup>2</sup>, 罗 坤<sup>2</sup>, 吴秋云<sup>1,3</sup>, 夏志兰<sup>1,3</sup>, 刘 敏<sup>2\*</sup>

1. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410000; 2. 湖南农业大学植物保护学院, 湖南长沙 410000; 3. 蔬菜生物学湖南省重点实验室, 湖南长沙 410000

**摘要:**烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 是导致茄科 (*Solanaceae*) 作物减产的重大因素, 为探寻防治烟草花叶病的食用菌源多糖材料, 采用半叶法、五点注射试验和系统寄主感染活性评价测定 6 种粗多糖对 TMV 的防治效果。结果表明: 姬松茸 (*Agaricus blazei*) 粗多糖提取率最高, 可达 24.32%, 其次是平菇 (*Pleurotus ostreatus*) 为 18.56%, 最低为杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii*) 10.04%。总糖含量中, 姬松茸总糖明显高于其他种类, 达到 37.71%, 其次是桑黄 (*Phellinus igniarius*) 和灵芝 (*Ganoderma lucidum*), 总糖含量均超过 32.00%, 此外姬松茸粗多糖的硫酸基含量高达 2.10%。半叶法测定 6 种粗多糖对 TMV 的防治效果, 结果显示, 多糖喷施 48 h 后对接种病毒能达到较好的预防效果, 其中云芝粗多糖、姬松茸粗多糖、平菇粗多糖的预防效果均达到 60.00% 以上。尤其是 24 mg/mL 姬松茸粗多糖的预防效果达 92.04%, 叶片的枯斑数目明显少于清水对照组。在五点注射试验中, 姬松茸粗多糖处理的荧光斑点亮度弱于对照组, 同时新叶上未出现荧光点, 抑制率达 38.18%, 在病毒侵入前期姬松茸粗多糖有抑制作用, 能够延缓 TMV 的移动速度, 减慢系统侵入进程。在系统寄主 NC-89 上, 姬松茸粗多糖对 TMV 的防治效果高达 76.81%, 效果优于 0.5% 香菇多糖水剂和 1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂处理组, 当姬松茸粗多糖浓度为 48 mg/mL 时植株出现损伤, 多糖浓度过高在植株表面形成沉淀, 引起植株黄化。大田试验显示, 姬松茸粗多糖对 TMV 的治疗效果为 70.31%, 对叶片扭曲、蜷缩、停止生长的植株有明显改善。同时对 TMV 有一定的抑制作用, 喷施姬松茸粗多糖的烟草发病时间延后, 烟草长势良好, 叶片伸展。本研究结果为进一步研究真菌多糖防治烟草花叶病毒的作用方式和机制奠定基础, 对绿色防控作物 TMV 有一定的理论意义和实际意义。

**关键词:** 姬松茸; 粗多糖; 烟草花叶病毒; 半叶法

中图分类号: S435.72 文献标识码: A

## Control of *Tobacco Mosaic Virus* Disease with Crude Polysaccharides of *Agaricus blazei*

HU Die<sup>1</sup>, TANG Qianjun<sup>2</sup>, LUO Kun<sup>2</sup>, WU Qiuyun<sup>1,3</sup>, XIA Zhilan<sup>1,3</sup>, LIU Min<sup>2\*</sup>

1. College of Horticulture, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410000, China; 2. College of Plant Protection, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410000, China; 3. Key Laboratory of Vegetable Biology of Hunan Province, Changsha, Hunan 410000, China

**Abstract:** *Tobacco mosaic virus* (TMV) is a major factor leading to the yield reduction of *Solanaceae* crops. In order to explore edible fungus-derived polysaccharide materials for the prevention and control of *Tobacco mosaic virus*, the control effect of six crude polysaccharides against TMV was determined by the half-leaf method, five-point injection test and systematic host infection activity evaluation. Among them, the extraction rate of crude polysaccharide from *Agaricus blazei*, 24.32%, was the highest, followed by *Pleurotus ostreatus* 18.56%, and that from *Pleurotus eryngii*, 10.04% was the lowest. The total sugar content of *A. blazei* was significantly higher than that of other species, reaching

收稿日期 2022-10-09; 修回日期 2022-12-15

基金项目 湖南省教育厅科学研究项目 (No. 20A262); 湖南省自然科学基金项目 (No. 2020JJ5237); 湖南省蔬菜产业技术体系食用菌岗位项目。

作者简介 胡 叠 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 园艺学。\*通信作者 (Corresponding author): 刘 敏 (LIU Min), E-mail: liumin8637@hunau.edu.cn。

37.71%， followed by that of *P. igniarius* and *G. Lucidum*, exceeding 32.00%。 In addition, the sulfate content of *A. blazei* crude polysaccharide was also as high as 2.10%。 In this research, the inhibitory effect of the crude polysaccharides was determined by the half leaf method. Among the 6 tested polysaccharide treatments, the polysaccharides that were inoculated after treated for 48 h had a good inhibition on TMV. The preventive effects of *P. ostreatus*, *C. versicolor* and *A. blazei* reached more than 60.00%。 Especially, the preventive effect of 24 mg/mL *A. blazei* crude polysaccharide was up to 92.04%， and the number of dead spots on the leaves was significantly less than those in the clear water control group. In the five-point injection test, the inhibition rate of *A. blazei* crude polysaccharide was 38.18%。 The brightness of the fluorescent spots was weaker than that in the control group, the fluorescent area did not change much, and did not appeared in the new leaves. *A. blazei* crude polysaccharide had an inhibitory effect in the early stage of virus infection, which could delay the moving speed of TMV and slow down the system invasion process. On NC-89, the control effect of agaricus antler polysaccharide on TMV was as high as 76.81%， which was better than that of 0.5% lentinan water agent and 1.8% octinamine acetate water agent. When the concentration was 48 mg/mL, the plants were damaged, and the excessive concentration of polysaccharide formed precipitation on the surface of the plants, causing the plants to yellow. Field test showed that the treatment effect of *A. blazei* crude polysaccharides on TMV was 70.31%。 The plants with twisted, curled leaves and stopped growing had an obvious improvement. At the same time, it had a certain inhibitory effect on TMV, the onset time of sprayed tobacco was delayed, the tobacco grew well, and the leaves were extended. The results of this study would lay a foundation for further study on the action mode and mechanism of fungal polysaccharides against *Tobacco mosaic virus*.

**Keywords:** *Agaricus blazei*; crude polysaccharide; *Tobacco mosaic virus*; half leaf method

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.04.016

烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 为单链正义 RNA 病毒, 经接种鉴定统计其寄主多达 350 多种植物, 除烟草外, 还为害多种经济作物, 例如茄科、十字花科等<sup>[1]</sup>。生产中病毒粒子的扩散和流行速度受温度、湿度、光照的影响, 在高温和强光环境下病毒延长潜育期, 一旦条件适宜再爆发病症。全国各烟区均有因烟草花叶病造成减产的问题, 尤其是云南、贵州烟区主要受 TMV 影响, 平均发病率为 20%~30%, 严重年份高达 60%~80%, 导致毁田和绝收<sup>[2]</sup>。

天然真菌多糖主要分布在大型真菌子实体和菌丝中, 多个单糖 (10 个以上) 以糖苷键连接组合成螺旋状高分子多聚物<sup>[3]</sup>, 结构形态近似于 DNA, 具有特殊生物活性<sup>[4]</sup>。经过深入研究, 研究人员发现一些真菌中含有多种农用活性物质<sup>[5]</sup>。真菌多糖在抑制病菌和病毒、杀线虫、防治害虫等方面有良好的效果, 已经在香菇属 (*Lentinus*)、蜡伞属 (*Hygrophorus*)、杯伞属 (*Clitocybe*) 和牛肝菌 (*Boletus*) 等菌类中均有发现<sup>[6-8]</sup>。张超等<sup>[9-10]</sup>以平菇、香菇和金针菇子实体为材料, 从中提取的多糖在枯斑寄主菟色藜上对 TMV 表现出不等的抑制作用。许玉娟等<sup>[10]</sup>发现经苍耳多糖处理后的心叶烟, 在接种 TMV 后, 枯斑明显少于对照组, 有效抑制了 TMV 浸染, 推测苍耳多糖诱导植株防御酶活性从而抑制病毒。吴艳兵

等<sup>[11]</sup>从体外钝化、预防、治疗三方面评价了毛头鬼伞多糖对 TMV 的抑制效果, 发现毛头鬼伞多糖具有较强的预防侵染作用, 可有效预防 TMV 病毒病的发生。香菇多糖为现市面具代表性的真菌多糖农药产品, 共登记 44 个产品信息, 以 0.5%~2.0% 水剂为主, 具有杀菌和植物抗性诱导作用。赵新保<sup>[12]</sup>研究表明, 0.5% 香菇多糖水剂用量为 18.75~26.25 g/hm<sup>2</sup> 时, 辣椒病毒病防效可达 62.0%~66.5%, 并且该药剂在有效浓度范围内对作物和环境安全。

随着社会经济的快速发展以及生活水平的不断提高, 食品安全意识也逐渐加强, 因此农业生产中绿色防控技术的需求增加。真菌多糖是真菌的代谢产物, 天然且安全, 残留在环境中也会被微生物分解, 不造成污染。真菌多糖可诱导植物提高抗病性、激发植物免疫力, 可以开发成农业生产上新型的植物抗病诱导剂, 具有非常好的应用前景。本研究在提取 6 种真菌多糖粗品的基础上, 采用半叶法和绿色荧光标记技术, 筛选出抗 TMV 效果最好的多糖, 研究结果对作物 TMV 的绿色防控具有一定的理论意义和实际意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试病毒 烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic*

virus, TMV), 由湖南农业大学植物保护学院植物病理学系唐前君老师提供。

1.1.2 供试作物 心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*)、普通烟 NC-89 (*N. tabacum* var. NC89)、本氏烟 (*N. benthamiana*)、云烟 87 (*N. Yunyan* 87), 由湖南农业大学植物保护学院植物病理学系唐前君老师提供。

1.1.3 供试药剂 0.5%香菇多糖水剂, 市购, 山东圣鹏科技股份有限公司生产; 1.8%辛菌胺醋酸盐水剂, 市购, 河南神华药业有限公司生产。

## 1.2 方法

1.2.1 烟草花叶病毒 (TMV) 悬浮液制备 取感染病毒的叶片 (云烟 87) 样品 100 g, 剪碎置于研钵内, 加入少许石英石和 20 mL 预冷磷酸缓冲液 (0.2 mmol/L, pH 5.7~8.0), 充分研磨, 过滤; 磷酸缓冲液定容至 100 mL, 制得烟草花叶病毒悬浮液, 置于 4 °C 备用。

1.2.2 真菌粗多糖制备 试验使用 6 种真菌子实体, 包括平菇 (*Pleurotus ostreatus*)、姬松茸 (*Agaricus blazei*)、云芝 (*Coriolus versicolor*)、杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii*)、灵芝 (*Ganoderma lucidum*)、桑黄 (*Phellinus igniarius*), 粗多糖提取步骤如下<sup>[13-15]</sup>: (1) 在干燥箱 37 °C 条件下干燥 24 h, 将子实体彻底烘干; (2) 上述烘干后的子实体各取 150 g, 利用中药小型粉碎机打成细粉, 按照水料质量比 15 : 1, 各子实体粉末中加入去离子水, 95 °C 水浴 6 h 后过滤, 滤渣重复水提一次, 收集最终滤液, 经 4000 r/min 高速离心 15 min 去除沉淀、循环真空水泵抽滤 3 次, 获得无明显颗粒杂质的滤液, 60 °C 下旋转蒸发仪 20 r/min 将滤液真空浓缩至原体积的 1/5; (3) 按体积比 1 : 1, 将配好的 sewage 工作试剂 (氯仿 : 正丁醇=4 : 1) 加入浓缩滤液中, 震荡 30 min 后, 经 4000 r/min 高速离心 15 min, 保留上层多糖溶液, 去除下层含蛋白质的溶液, 重复离心至下层溶液完全去除干净; (4) 加入 4 倍体积的 95% 乙醇, 与浓缩液充分混合, 置于 4 °C 冰箱静置 21 h, 经 4000 r/min 高速离心 15 min, 收集沉淀, 加入少量去离子水复溶沉淀, 再次醇沉, 收集所有沉淀置于 37 °C 烘箱放置 1 h, 除去残留的乙醇溶液, 然后经过冷冻干燥仪冻干, 得到子实体粗多糖。

1.2.3 多糖理化性质测定 多糖化学组成测定包括总糖、蛋白质、糖醛酸、硫酸基含量。采用苯酚

硫酸法测定总糖含量<sup>[16]</sup>; 采用考马斯亮蓝测定蛋白质含量<sup>[17]</sup>; 采用硫化钡-明胶法测定硫酸基含量<sup>[18]</sup>; 采用间羟基联苯法测定多糖糖醛酸含量<sup>[19]</sup>。

1.2.4 抗 TMV 粗多糖筛选 药效测定参照陈年春<sup>[20]</sup>、逢丽丽等<sup>[21]</sup>的半叶法。

(1) 粗多糖对 TMV 的钝化作用。选取 7 叶期长势一致的心叶烟, TMV 病毒粒子为接种物 (按 1 : 100 稀释), 利用去离子水将粗多糖分别稀释至 6、12、24 mg/mL, 病毒分别与多糖溶液 1 : 1 混合, 静置 30 min, 采用半叶法摩擦接种到心叶烟的左半叶, 右半叶接种去离子水与病毒混合液作对照。每个处理 3 株, 重复 3 次。将处理后的叶片置于 25~28 °C、湿度 70%~80% 的条件下 5~6 d。记录形成的枯斑数, 根据公式计算钝化率, 评定真菌多糖对 TMV 的钝化效果。

$$\text{钝化率} = \frac{C - T}{C} \times 100\%$$

式中,  $C$  表示空白对照组的枯斑数量;  $T$  表示处理组的枯斑数量。

(2) 粗多糖对 TMV 的预防作用。将稀释为 6、12、24 mg/mL 的粗多糖溶液分别喷施到心叶烟叶片半叶, 另半片叶喷去离子水作对照, 连续处理 3 d。在最后一次喷施 24、48 h 后, 分别对各处理的叶片全叶接种病毒。然后置于温室中培养 5~6 d。记录形成的枯斑数, 根据公式计算预防率, 评定真菌多糖对 TMV 的防御效果。

$$\text{预防率} = \frac{C - T}{C} \times 100\%$$

式中,  $C$  表示空白对照组的枯斑数量;  $T$  表示处理组的枯斑数量。

(3) 粗多糖对 TMV 的治疗作用。将供试病毒摩擦接种到 7 叶期的心叶烟叶片, 分别在 24、48 h 后, 将粗多糖溶液分别喷施到心叶烟叶片半叶, 另半片叶喷去离子水作对照, 连续处理 3 d。培养 5~6 d 记录形成的枯斑数, 根据公式计算抑制率, 评定粗多糖对 TMV 的治疗效果。抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率} = \frac{C - T}{C} \times 100\%$$

式中,  $C$  表示空白对照组的枯斑数量;  $T$  表示处理组的枯斑数量。

1.2.5 五点注射法 由本实验室保存的 TMV-GFP 农杆菌菌株, 在含有 50 μg/mL Kana 和 25 μg/mL Rif LB 液体培养基中, 28 °C 180 r/min

条件下培养 24 h。5000 r/min 室温离心 10 min, 吸取上清液保留沉淀, 加入 5 mL 侵染液将菌体

沉淀重悬, 直至菌液  $OD_{600}$  为 0.8 左右。28 ℃ 90 r/min 诱导 4 h。侵染液配置见表 1。

表 1 侵染液配置  
Tab. 1 Preparation of infestation solutions

母液 Mother solution			侵染液 Infection solution		
溶质 Solute mass/g	溶剂 Solvent/mL	浓度 Concentration/(mmol·L <sup>-1</sup> )	母液剂量 Mother solution/mL	定容 Constant volume	浓度 Concentration/(mmol·L <sup>-1</sup> )
MgCl <sub>2</sub> 4.066	无菌水 100	200	5.00	加无菌水至 100 mL	10.0
MES 4.265	无菌水 100	200	5.00		10.0
AS 0.03924	DMSO 1	200	0.05		0.1

选取培养 1 个月左右, 生长状况良好、长势一致的本氏烟草, 用一次性注射器吸取药剂, 避开叶片主脉、次脉选取 5 个点, 使药剂连成环注射烟草叶片背面。用去离子水作对照, 3 次重复。24 h 后, 在药环的中心注射制备的 TMV-GFP 农杆菌菌液, 黑暗培养 12 h, 光照培养 2、5 d 后紫外灯照射, 每天观察荧光斑点扩散情况。采用十字交叉法测定荧光斑直径, 计算抑制率。

抑制率=

$$\frac{\text{对照荧光斑直径} - \text{处理荧光斑直径}}{\text{对照荧光斑直径}} \times 100\%$$

1.2.6 抗病粗多糖对系统寄主防效测定 将对 TMV 防治效果较好的粗多糖稀释为 6、12、24、48 mg/mL, 分别喷施 5~7 叶期且长势一致的 NC-89 烟草上, 48 h 后接种病毒, 各处理 40 株, 重复 3 次。以清水为阴性对照, 1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂 (60 mg/L) 为阳性对照 1, 0.5% 香菇多糖水剂 (26.25 mg/mL) 为阳性对照 2。处理后烟草置于防虫温室培养, 待阴性对照烟苗明显发病后记录各处理组的发病情况。

按照病叶级数, 计算各处理的病情指数。烟草病情分级标准及公式<sup>[22]</sup>如下: 0 级为全株无病; 1 级为新叶明脉, 少数叶片轻花叶; 3 级为全株 1/2 叶片花叶, 少数叶片变形或叶脉变黑; 5 级为全株 2/3 叶片花叶或有小枯斑, 植株矮化, 株高为健株 1/2, 结果少; 7 级为全株叶片花叶或叶片枯斑连片枯死, 植株严重矮化, 不结果或结果畸形。

$$\text{发病率} = (\text{发病植株} / \text{总株数}) \times 100\%$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{各级病株数} \times \text{相对级数值})}{\text{总株数} \times 7} \times 100\%$$

相对防治效果=

$$\frac{\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}}{\text{对照组病情指数}} \times 100\%$$

1.2.7 抗病粗多糖对 TMV 的大田防效测定 选取长势一致的烟草共 42 行, 每行 40 株, 自然发病, 第 1~6 行喷施 0.5% 香菇多糖水剂 (26.25 mg/mL), 7~12 行喷施 1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂 (60 mg/L), 13~18 行喷施清水, 19~24、25~30、31~36、37~42 行分别喷施 6、12、24、48 mg/mL 姬松茸粗多糖水溶液, 每 7 d 喷 1 次, 共喷 3 次, 试验期间不使用其他药剂, 病叶级数标准及公式参照 1.2.6。

### 1.3 数据处理

以各试验组防治效果数据为基础数据, 采用 Microsoft 365 Excel 软件进行数据整理并计算平均值、标准差和绘制图表; 采用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行显著性检验和 Pearson's 相关系数分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 6 种食用菌的粗多糖组分含量

经测定, 6 种食用菌多糖中, 姬松茸粗多糖提取率最高, 达 24.32%, 其次为平菇 18.56%, 最低为杏鲍菇 (表 2)。总糖含量中, 姬松茸总糖显著高于其他食用菌种类, 达到 37.71%, 其次是桑黄和灵芝粗多糖总糖含量, 均超过 32.00%。云芝粗多糖的糖醛酸含量为 6.81%, 显著高于其他 5 种食用菌粗多糖, 其次是灵芝粗多糖。姬松茸粗多糖硫酸基含量高达 2.10%, 已有研究表明, 硫酸基含量影响多糖的许多生物活性功能<sup>[23]</sup>。

### 2.2 抗 TMV 病毒的粗多糖筛选

通过半叶法测定粗多糖的药效, 结果如表 3 所示, 6 种食用菌粗多糖对 TMV 均具有一定的防治效果。均以喷施多糖溶液 48 h 后接种病毒的预防效果最好, 姬松茸、云芝、平菇粗多糖的预防率可达到 60.00% 以上, 尤其姬松茸粗多糖

表 2 不同食用菌粗多糖组分含量

Tab. 2 Content of crude polysaccharides in different edible fungi

食用菌 Edible fungi	粗多糖提取率 Extraction rate of rude polysaccharide	总糖 Total sugar	蛋白 Protain	硫酸基 Sulfate group	糖醛酸 Uronic acid
灵芝	13.59±1.65 <sup>d</sup>	32.05±0.44 <sup>c</sup>	0.27±0.01 <sup>a</sup>	0.66±0.02 <sup>f</sup>	6.60±0.02 <sup>b</sup>
姬松茸	24.32±1.06 <sup>a</sup>	37.71±0.05 <sup>a</sup>	0.28±0.02 <sup>a</sup>	2.10±0.02 <sup>a</sup>	1.71±0.02 <sup>c</sup>
平菇	18.56±0.02 <sup>b</sup>	26.27±0.33 <sup>d</sup>	0.25±0.01 <sup>ab</sup>	1.16±0.02 <sup>e</sup>	5.54±0.03 <sup>c</sup>
杏鲍菇	10.04±0.28 <sup>f</sup>	21.67±0.01 <sup>e</sup>	0.23±0.01 <sup>c</sup>	1.68±0.01 <sup>c</sup>	2.01±0.01 <sup>d</sup>
云芝	15.26±0.03 <sup>c</sup>	26.44±0.35 <sup>d</sup>	0.24±0.01 <sup>b</sup>	1.43±0.02 <sup>d</sup>	6.81±0.01 <sup>a</sup>
桑黄	11.76±0.14 <sup>e</sup>	35.87±0.76 <sup>b</sup>	0.23±0.01 <sup>c</sup>	1.85±0.02 <sup>b</sup>	2.10±0.01 <sup>d</sup>

注：同列不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

表 3 6 种食用菌粗多糖对 TMV 的防治效果

Tab. 3 Control effect of crude polysaccharides from six edible fungi on TMV

多糖种类 Polysaccharide type	浓度 Concentra- tion/(mg·mL <sup>-1</sup> )	钝化率 Passivation rate/%	预防率 Prevention rate/%		治疗率 Treatment rate/%	
			24 h	48 h	24 h	48 h
			姬松茸	6	51.67±0.93 <sup>a</sup>	58.46±1.26 <sup>a</sup>
	12	56.23±1.46 <sup>a</sup>	67.57±4.98 <sup>b</sup>	86.91±1.09 <sup>b</sup>	38.87±0.97 <sup>a</sup>	33.83±0.69 <sup>a</sup>
	24	59.06±2.67 <sup>b</sup>	71.61±1.62 <sup>b</sup>	92.04±1.39 <sup>b</sup>	44.53±2.25 <sup>a</sup>	31.38±0.85 <sup>a</sup>
灵芝	6	45.44±0.68 <sup>a</sup>	52.97±2.01 <sup>a</sup>	56.65±0.87 <sup>a</sup>	27.78±1.16 <sup>a</sup>	26.22±1.67 <sup>a</sup>
	12	45.89±0.86 <sup>a</sup>	56.36±0.60 <sup>a</sup>	63.95±1.42 <sup>b</sup>	36.17±0.67 <sup>b</sup>	31.77±0.69 <sup>b</sup>
	24	54.67±0.82 <sup>b</sup>	62.12±1.59 <sup>b</sup>	74.44±1.89 <sup>c</sup>	33.15±2.37 <sup>c</sup>	39.55±1.68 <sup>c</sup>
云芝	6	43.00±2.07 <sup>a</sup>	53.44±0.60 <sup>a</sup>	60.58±1.38 <sup>a</sup>	34.64±3.83 <sup>a</sup>	22.75±2.56 <sup>a</sup>
	12	39.49±2.30 <sup>a</sup>	52.20±2.79 <sup>a</sup>	74.91±5.04 <sup>b</sup>	35.78±2.52 <sup>a</sup>	33.75±0.63 <sup>b</sup>
	24	49.04±1.74 <sup>b</sup>	63.62±0.54 <sup>b</sup>	83.94±4.21 <sup>c</sup>	41.36±1.00 <sup>a</sup>	32.67±2.68 <sup>c</sup>
平菇	6	51.01±0.69 <sup>a</sup>	54.71±2.57 <sup>a</sup>	62.62±2.46 <sup>a</sup>	23.73±2.38 <sup>a</sup>	-
	12	52.68±1.26 <sup>a</sup>	60.48±1.60 <sup>a</sup>	67.55±1.62 <sup>a</sup>	32.45±2.04 <sup>b</sup>	21.75±0.99
	24	62.41±1.48 <sup>b</sup>	59.85±3.95 <sup>a</sup>	74.47±3.23 <sup>b</sup>	29.09±2.52 <sup>a</sup>	-
杏鲍菇	6	34.68±0.78 <sup>a</sup>	38.17±0.81 <sup>a</sup>	45.07±0.27 <sup>a</sup>	33.21±1.67 <sup>a</sup>	37.68±1.59 <sup>a</sup>
	12	37.64±0.91 <sup>a</sup>	38.95±1.07 <sup>a</sup>	52.29±1.29 <sup>b</sup>	28.87±0.21 <sup>b</sup>	32.45±1.98 <sup>a</sup>
	24	43.45±2.41 <sup>b</sup>	51.42±1.52 <sup>b</sup>	61.60±0.93 <sup>c</sup>	21.48±1.24 <sup>c</sup>	-
桑黄	6	-	43.69±7.63 <sup>a</sup>	45.44±6.28 <sup>a</sup>	22.10±2.28 <sup>a</sup>	24.47±1.56 <sup>a</sup>
	12	-	53.01±2.63 <sup>a</sup>	53.79±1.75 <sup>a</sup>	32.65±2.79 <sup>b</sup>	17.17±1.60 <sup>b</sup>
	24	23.18±0.65	51.92±1.04 <sup>a</sup>	64.43±1.32 <sup>b</sup>	22.27±1.42 <sup>a</sup>	20.56±1.64 <sup>a</sup>

注：同列不同小写字母表示同一多糖不同浓度间差异显著 ( $P<0.05$ )。-表示无防治效果，不作记录。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference among different concentrations of the same polysaccharide ( $P<0.05$ ). - indicates no control effect and no data is recorded.

24 mg/mL 处理的预防效果最好，高达 92.04%；其次是 12 mg/mL 姬松茸粗多糖的预防率为 86.91%。6 种食用菌粗多糖对 TMV 的治疗效果不明显，除了接种病毒 24 h 后喷施 24 mg/mL 姬松茸粗多糖的治疗效果可达到 44.53% 以外，其余处理的预防效果均低于 42.00%。食用菌多糖对 TMV 的钝化效果比预防效果差，除 24 mg/mL 平菇粗多糖处理组钝化率为 62.41%，其他均低于 60.00%。不同时间姬松茸粗多糖处理叶片对 TMV 的预防效

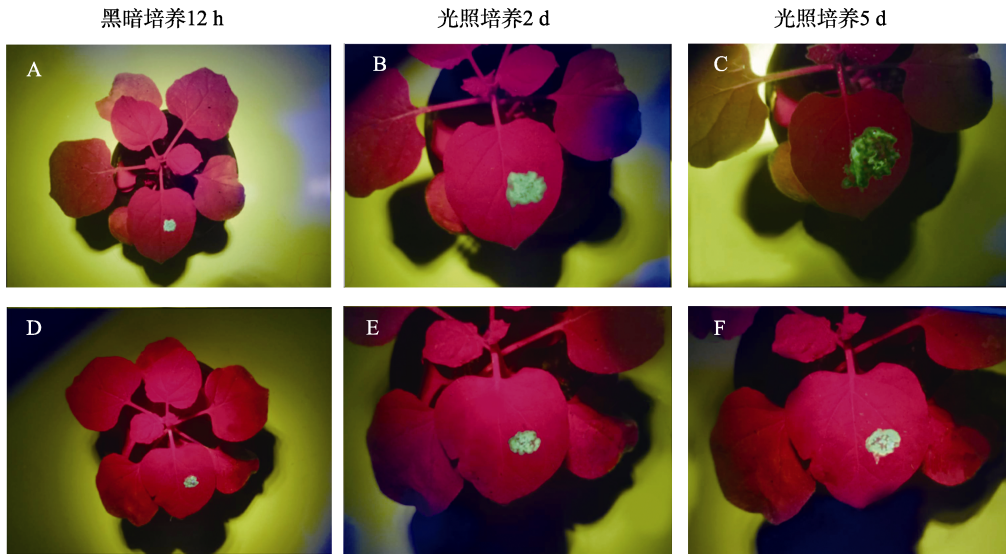
果存在差异，处理 48 h 后叶片的预防效果优于处理 24 h 后。粗多糖的使用浓度和处理方式对防治效果均有一定影响，部分粗多糖在相同浓度不同施药方式下对病毒的抑制效果不同，此外，相同施药方式的抑制效果也并未随施药浓度的增加而提高。

### 2.3 绿色荧光蛋白标记试验

将 24 mg/mL 姬松茸粗多糖按照五点注射法流程处理烟草，黑暗培养 12 h 后注射点绿色荧光

蛋白的表达随着时间的推进，荧光点的大小、强弱均发生变化（图 1A，图 1D），这间接反映了病毒的分布、扩散和增殖情况。在光照培养 2 d 后，粗多糖处理组的荧光斑直径（平均直径 0.83 cm）明显小于去离子水对照组（平均直径 1.18 cm），抑制率为 29.66%（图 1B，图 1E）。并且光照培养 5 d 时，粗多糖处理后的荧光斑点亮度弱于对照组（图 1C，图 1F），说明其在病毒

侵染前期对 TMV 的增殖有抑制作用，明显可看出对照组荧光区域进一步扩大（平均直径 1.65 cm），荧光点开始明显向叶片其他区域移动，新叶上发现少量荧光点，光照培养 5 d，粗多糖处理组（平均直径 1.02 cm）与光照培养 2 d 时相比，荧光区域变化不大且新叶未出现荧光点，抑制率为 38.18%。表明姬松茸粗多糖延缓了 TMV 的移动速度，减缓系统侵染进程。



A、B、C：对照；D、E、F：粗多糖处理。  
A, B, C: CK; D, E, F: Crude polysaccharide treatment.

图 1 五点注药处理叶片后荧光斑扩散情况

Fig. 1 Fluorescent spot spread after five injections of viral inhibitors

### 2.4 姬松茸粗多糖对系统寄主的防效

姬松茸粗多糖在系统寄主 NC-89 上对 TMV 有一定的防治效果（表 4）。与对照相比，处理组烟苗的病情指数明显降低，6、12、24 mg/mL 姬松茸粗多糖对病毒的相对防效均在 52.00% 以上，在 48 mg/mL 浓度时植株出现损伤，多糖浓度过高在植株表面形成沉淀，引起植株黄化。当粗多糖浓度为 24 mg/mL 时，对 TMV 的防治效果高达 76.81%，其防治效果略高于 0.5% 香菇多糖水剂和 1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂处理组。姬松茸多糖能有效防治 TMV，延迟植株发病，有利于烟草的生长。

### 2.5 姬松茸粗多糖对 TMV 的大田防效试验

在发病烟草田中第 3 次喷洒 24 mg/mL 姬松茸粗多糖溶液后 7 d，对 TMV 的防治效果为 70.31%，略低于 0.5% 香菇多糖水剂和 1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂处理组（表 5）。48 mg/mL 姬松茸粗多糖溶

表 4 姬松茸粗多糖对 TMV 的抑制作用

Tab. 4 Inhibitory effect of *A. blazei* crude polysaccharides on TMV

处理 Treatment	发病率 Incidence rate/%	病情指数 Disease index	防效 Control effect/%
6 mg/mL 粗多糖溶液	75.00	23.58	52.18±1.45 <sup>c</sup>
12 mg/mL 粗多糖溶液	66.67	20.96	57.49±2.54 <sup>b</sup>
24 mg/mL 粗多糖溶液	38.33	11.43	76.81±2.61 <sup>a</sup>
48 mg/mL 粗多糖溶液	—	—	—
1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂	51.67	13.34	72.95±3.57 <sup>ab</sup>
0.5% 香菇多糖水剂	47.50	13.22	73.19±2.17 <sup>ab</sup>
CK	100.00	49.29	—

注：同列不同小写字母表示处理间差异显著（ $P < 0.05$ ）。— 表示植株受药害，不作记录。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between treatments ( $P < 0.05$ ). — indicates that plants are harmed by drugs, and no data is recorded.

表 5 姬松茸粗多糖对 TMV 的大田防治效果  
Tab. 5 Control of TMV by *A. blazei* crude polysaccharides in field

处理 Treatment	药前病情指数 Pre-drug disease index	第 1 次药后 7 d 7 d after 1st application		第 2 次药后 7 d 7 d after 2nd application		第 3 次药后 7 d 7 d after 3rd application	
		病情指数 Disease index	防效 Control effect	病情指数 Disease index	防效 Control effect	病情指数 Disease index	防效 Control effect
6 mg/mL 粗多糖溶液	3.45	6.19	27.26±3.43 <sup>c</sup>	7.32	52.33±4.59 <sup>d</sup>	8.51	61.04±2.41 <sup>c</sup>
12 mg/mL 粗多糖溶液	3.33	5.65	33.55±4.91 <sup>d</sup>	6.85	55.43±4.75 <sup>c</sup>	7.74	64.59±1.98 <sup>b</sup>
24 mg/mL 粗多糖溶液	3.39	5.24	38.45±6.85 <sup>b</sup>	5.71	62.8±5.3 <sup>ab</sup>	6.49	70.31±1.61 <sup>ab</sup>
48 mg/mL 粗多糖溶液	3.21	5.60	34.25±5.73 <sup>c</sup>	—	—	—	—
1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂	3.57	5.18	39.1±3.15 <sup>ab</sup>	5.65	63.19±4.97 <sup>ab</sup>	6.25	71.40±1.71 <sup>ab</sup>
0.5% 香菇多糖水剂	3.27	5.06	40.55±4.13 <sup>a</sup>	5.54	63.93±3.53 <sup>a</sup>	6.07	72.21±1.03 <sup>a</sup>
清水	3.69	8.51	—	15.36	—	21.87	—

注：同列不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。—表示植株受药害，不作记录。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between treatments ( $P < 0.05$ ). — indicates that plants are harmed by drugs, and no data is recorded.

液在第 2 次施药后，植株出现黄化，局部叶片坏死的情况。姬松茸粗多糖对 TMV 的防治效果十分显著，对叶片扭曲、卷缩、停止生长的植株有明显改善，病情指数低的植株完全能够恢复正常。同时对 TMV 有一定的抑制作用，喷施过姬松茸粗多糖的烟草发病时间延后，烟草长势良好，叶片伸展，而喷施清水的植株明显矮化，叶片发黄。

### 3 讨论

已有研究得出糖醛酸含量较高的多糖具有某些特殊生理活性，一般高含量糖醛酸多糖大多出现在植物类多糖中<sup>[24]</sup>。本研究得出，云芝粗多糖的糖醛酸含量为 6.81%，显著高于其他 5 种食用菌多糖，高于刘玮<sup>[25]</sup>研究的糖醛酸含量，其原因可能是原材料的品种、产地及栽培方式不同导致的。硫酸基含量指多糖结构中所带的硫酸基的个数，本研究测得姬松茸粗多糖硫酸基含量高达 2.10%，施娅楠等<sup>[23]</sup>研究得出，多糖的许多生物活性功能与硫酸基含量有直接关系，导致多糖的抗氧化性存在差异，进而可能影响其抗病毒或抑菌能力。如 BACH 等<sup>[26]</sup>通过 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 法、2,2'-联氮双-二胺盐 (ABTS) 法测定不同真菌提取物的抗氧化能力，观察到 DHHP 法中的抗自由基活性依次为：巴西蘑菇>双孢蘑菇>香菇>金针菇，ABTS 法中依次为：巴西蘑菇>双孢蘑菇>金针菇>香菇。

烟草花叶病毒 (TMV) 依赖寄主提供的场所、底物和酶等一系列物质在寄主活细胞内进行自我复制和装配<sup>[26-28]</sup>。真菌多糖不仅能针对病毒粒子，也能作用于寄主植株，诱发寄主抗病性<sup>[29]</sup>。真菌多糖对烟草花叶病有一定的抑制作用，喷施多糖溶液 48 h 后接种 TMV 的预防效果较好，姬松茸、云芝、平菇粗多糖的预防效果均达到 60.00% 以上。尤其是 24 mg/mL 姬松茸粗多糖处理的预防效果最好，高达 92.04%。从总体来看，真菌多糖对 TMV 的预防效果较好，与沈小英等<sup>[30]</sup>的研究结果一致，其他报道的扫把菌、奶浆菌、安络小皮伞和火炭菌等多糖对 TMV 的防治效果超过 80%<sup>[31]</sup>。从产品的生产成本来看，人工种植菌株更有优势。

室内试验表明，姬松茸粗多糖的防治效果稍优于香菇多糖，而大田试验防效略低，与标准农药产品相比，由于技术上的差异，姬松茸多糖水溶液的稳定性 and 纯度不够。施药方式不同，姬松茸多糖均能相应缓解植株的病情，但防治效果有差异，这可能与姬松茸多糖的作用方式有多指向性，既能切断病毒与细胞的结合，还能抑制病毒复制，或保护寄主植株有关。

### 参考文献

- [1] CHEN Z L, GU H, LI Y, SU Y, WU P, JIANG Z, MING X, TIAN J, PAN N, QU L J. Safety, assessment for genetically

- odified sweet pepper and tomato[J]. *Toxicology*, 2003, 188(2/3): 297-307.
- [2] 吕春霞. 烟草花叶病毒病的发生及化学防治机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.  
LYU C X. Study on the occurrence and chemical control mechanism of *Tobacco mosaic virus* disease[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2003. (in Chinese)
- [3] 张恒. 食用菌多糖功能性研究进展[J]. 现代食品, 2016(20): 1-5.  
ZHANG H. Advances in functional research of edible fungus polysaccharides[J]. *Modern Food*, 2016(20): 1-5. (in Chinese)
- [4] 李玲艳, 包海鹰. 云芝的化学成分及药理活性研究概况[J]. 菌物研究, 2011, 9(3): 180-186.  
LI L Y, BAO H Y. Research on chemical constituents and pharmacological activities of *Lucidum yunnanensis*[J]. *Fungal Research*, 2011, 9(3): 180-186. (in Chinese)
- [5] 王杰, 王开运. 香菇多糖对植物真菌和病毒病害的抗病机理[J]. 农药, 2011, 50(1): 16-19.  
WANG J, WANG K Y. Resistance mechanism of lentinan to plant fungal and viral diseases[J]. *Pesticide*, 2011, 50(1): 16-19. (in Chinese)
- [6] BRAVO J, REAL F, PADILLA D, OLVEIRA J G, GRASSO V, ROMAN L, ACOSTA F. Effect of lipopolysaccharides from *Vibrio alginolyticus* on the *Mx* gene expression and virus recovery from gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) experimentally infected with Nodavirus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 383-386.
- [7] 杨晓彤, Jennifer M F W, 糜可, 冯慧琴, Daniel K O C, 杨庆尧. 鲎 G 因子实验法定量测定药用、食用蘑菇多糖中的(1,3)- $\beta$ -葡聚糖含量[J]. 菌物系统, 2003(2): 296-302.  
YANG X T, JENNIFER M F W, MI K, FENG H Q, DANIEL K O C, YANG Q Y. The quantification of (1,3)- $\beta$ -glucan in edible and medicinal mushroom polysaccharides by using Limulus G test[J]. *Bacterial Systems*, 2003(2): 296-302. (in Chinese)
- [8] 王先彬, 王启燕. 香菇培养物水浸液对烟草花叶病毒(TMV)浸染心叶烟的抑制作用[J]. 微生物学报, 1986, 26(4): 363-365.  
WANG X B, WANG Q Y. Inhibition effect of *Lentinus edodes* culture aqueous solution on *Tobacco mosaic virus* (TMV) impregnated tobacco smoke[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1986, 26(4): 363-365. (in Chinese)
- [9] 张超, 操海群, 陈莉, 王杰. 食用菌多糖对植物病毒抑制作用的初步研究[J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32(1): 15-18.  
ZHANG C, CAO H Q, CHEN L, WANG J. Preliminary study on inhibitory effect of edible fungus polysaccharide on plant virus[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2005, 32(1): 15-18. (in Chinese)
- [10] 许玉娟, 范素素, 齐文静, 尹向田, 任红梅, 刘振宇. 苍耳多糖对烟草花叶病毒的抑制作用及对烟草几种防御酶活性的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2010, 41(4): 485-488.  
XU Y J, FAN S S, QI W J, YIN X T, REN H M, LIU Z Y. The inhibition effect of polysaccharides of *Xanthium sibiricum* on *Tobacco mosaic virus* and the influence on the defense enzymes activities of tobacco[J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2010, 41(4): 485-488. (in Chinese)
- [11] 吴艳兵, 颜振敏, 谢荔岩, 林奇英, 谢联辉. 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(7): 1096-1101.  
WU Y B, YAN Z M, XIE L Y, LIN Q Y, XIE N H. Research progress of macromolecular substances with natural resistance to *Tobacco mosaic virus*[J]. *Chinese Journal of Microbiology*, 2008(7): 1096-1101. (in Chinese)
- [12] 赵新保. 0.5%香菇多糖水剂对辣椒病毒病的田间防治初探[J]. 南方农业, 2018, 12(29): 18-19.  
ZHAO X B. Preliminary study on field control of pepper virus disease by 0.5% *Lentinus edodes* polysaccharide water agent[J]. *Southern Agriculture*, 2018, 12(29): 18-19. (in Chinese)
- [13] 王馨. 姬松茸多糖生物活性研究与产品开发[D]. 成都: 西华大学, 2020.  
WANG X. Bioactivity and product development of *Agaricus blazei* polysaccharides[D]. Chengdu: Xihua University, 2020. (in Chinese)
- [14] 杨开. 姬松茸多糖的提取、纯化和结构分析[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2003.  
YANG K. Extraction, purification and structure analysis of *Agaricus blazei* polysaccharides[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2003. (in Chinese)
- [15] 张水华. 食品分析实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.  
ZHANG S H. Food analysis experiment[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006. (in Chinese)
- [16] 李然, 段梦颖, 尚红梅, 杨君研. 干燥方式对白三叶多糖理化性质和抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 98-103.  
LI R, DUAN M Y, SHANG H M, YANG J Y. Effects of drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Trifolium lactis*[J]. *Food Science*, 2018, 39(17): 98-103. (in Chinese)
- [17] 陈树俊, 李佳益, 王翠连, 张君梅, 李乐, 石玥. 黄梨渣多糖的提取、分离纯化和结构鉴定[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 278-286.

- CHEN S J, LI J Y, WANG C L, ZHANG J M, LI L, SHI Y. Extraction, purification and Structure identification of polysaccharide from pear residue[J]. Food Science, 2018, 39(20): 278-286. (in Chinese)
- [18] 张庆, 袁源, 邓扬龙, 周翔宇, 李玉锋. 不同栽培方式银耳多糖单糖组成分析及体外抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 54-60.
- ZHANG Q, YUAN Y, DENG Y L, ZHOU X Y, LI Y F. Analysis of polysaccharide monosaccharides in different cultivation methods and comparison of antioxidant activities *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(8): 54-60. (in Chinese)
- [19] 苏平, 孙昕, 宋思圆, 魏丹. 提取方法对黄秋葵花多糖的结构组成及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(15): 93-100.
- SU P, SUN X, SONG S Y, WEI D. Effects of extraction methods on structure composition and antioxidant activity of polysaccharide from okra flower[J]. Food Science, 2018, 39(15): 93-100. (in Chinese)
- [20] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1990: 194.
- CHEN N C. Biometrics of pesticides[M]. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1990: 194. (in Chinese)
- [21] 逢丽丽, 宋宝安, 汪华, 金林红. 宁南霉素、病毒 A、娃儿藤碱对烟草花叶病毒的室内毒力活性测定[J]. 农药, 2005(4): 176-178.
- PANG L L, SONG B A, WANG H, JIN L H. Determination of indoor virulence activity of ningnanmycin, virus A and valerine against *Tobacco mosaic virus*[J]. Pesticides, 2005 (4): 176-178. (in Chinese)
- [22] 庄占兴, 韩书霞, 王德红. 菇类蛋白多糖对烟草、番茄和黄瓜病毒病防治效果研究[J]. 农药科学与管理, 2006, 25(11): 38-41.
- ZHUANG Z X, HAN S X, WANG D H. Effect of mushroom proteoglycans on tobacco, tomato and cucumber virus disease control[J]. Pesticide Science and Management, 2006, 25(11): 38-41. (in Chinese)
- [23] 施娅楠, 谢文祥, 陶亮, 黄艾祥. 贯筋藤多糖的提取及其单糖组分分析[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(11): 11-15.
- SHI Y N, XIE W X, TAO L, HUANG A X. Extraction and monosaccharide components analysis of polysaccharide of *Dregea sinensis* Hemsl[J]. Food Research and Development, 2019, 40(11): 11-15. (in Chinese)
- [24] 李亚平, 周鸿立. 多糖中糖醛酸含量测定方法的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 49(17): 207-211.
- LI Y P, ZHOU H L. Research progress of methods for determination of uronic acid in polysaccharides[J]. Food Research and Development, 2019, 49(17): 207-211. (in Chinese)
- [25] 刘玮. 姬松茸多糖 ABD 的纯化、结构鉴定和生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- LIU W. Purification, structural identification and bioactivity of *Agaricus blazei* polysaccharide ABD[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017. (in Chinese)
- [26] BACH F, ZIELINSKI A A F, HELM C V, MACIEL G M, PEDRO A C, STAFUSSA A P, HAMINIUK C W I. Bio compounds of edible mushrooms: *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities[J]. LMT-Food Science and Technology, 2019, 107: 214-220.
- [27] 何海芳, 李静静, 张泽龙, 张蓓蓓, 闫明辉, 史保争, 闫凤鸣. 我国植物病毒病及其昆虫介体研究概况[J]. 华中昆虫研究, 2020, 16: 3-21.
- HE H F, LI J J, ZHANG Z L, ZHANG B B, YAN M H, SHI B Z, YAN F M. Research on plant virus diseases and insect mediators in China[J]. Insect Research in Central China, 2020, 16: 3-21. (in Chinese)
- [28] JONES D A, DAIGO T. Plant innate immunity-direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules[J]. Current Opinion in Immunology, 2004, 16(1): 48-62.
- [29] JIAN C, YUSUF C. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses and production[J]. Biotechnology Advances, 2003, 21(2): 109-122.
- [30] 沈小英, 牛小义, 段军娜, 刘伟, 宋双, 安德荣. 多糖对烟草花叶病毒(TMV)的抑制作用研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(12): 115-120.
- SHEN X Y, NIU X Y, DUAN J N, LIU W, SONG S, AN D R. Inhibitory effect of polysaccharides on *Tobacco mosaic virus* (TMV)[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2012, 40(12): 115-120, 126. (in Chinese)
- [31] 黄民凤, 夏志兰, 罗坤, 刘顺才, 肖益芳. 金针菇菌渣多糖防治作物病毒病的试验[J]. 食用菌, 2015, 37(3): 64-65.
- HUANG M F, XIA Z L, LUO K, LIU S C, XIAO Y F. Effects of *Flammulina velutifolia* residue polysaccharide on crop virus disease control[J]. Journal of Edible Fungi, 2015, 37(3): 64-65. (in Chinese)