

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(8):882–888; 4 August 2013
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

抗烟草黄瓜花叶病毒多糖筛选及其对烟草防御酶活性的影响

沈小英, 宋双, 罗晶, 张鑫, 安德荣*

旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100

摘要:【目的】筛选出对烟草黄瓜花叶病毒病有良好抑制作用的多糖并探索其对烟叶防御酶活性的影响。【方法】采用半叶法, 测定了安络小皮伞多糖等 21 种真菌多糖在枯斑三生烟上对 CMV 的钝化、预防及治疗效果, 并测定了抗病毒多糖处理后普通烟 NC-89 体内防御酶的变化。【结果】安络小皮伞多糖对 CMV 具有较好的钝化及预防效果, 其 200 倍液与等量供试病毒液混合 30 min 后接种, 钝化效果为 83.41%; 喷施安络小皮伞多糖 200 倍液 24 h 后接毒处理, 预防效果可高达 93.15%。安络小皮伞多糖对 CMV 防治机理的研究表明, 多糖处理后烟草相关防御酶 POD、PAL 和 PPO 活性增强, 其中喷施安络小皮伞多糖 24 h 后接毒处理的酶活增加最为显著, 该处理烟苗的 POD、PAL 和 PPO 的酶活峰值分别可增加至对照的 2.74、3.45 和 2.82 倍。【结论】安络小皮伞多糖通过增强烟草体内防御酶活性而提高烟草对烟草黄瓜花叶病毒病的抗性。

关键词: 安络小皮伞, 多糖, 黄瓜花叶病毒, 酶活

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)08-0882-07

黄瓜花叶病毒 (Cucumber Mosaic Virus, CMV) 属于雀麦花叶病毒科成员, 是分布最广, 危害最重, 最具经济重要性的病毒之一。世界范围内所有烟草和蔬菜种植区均有该病毒的分布和危害, 可侵染约 36 科双子叶和 4 科单子叶的千余种植物。烟草和蔬菜感染后造成品质和产量下降, 甚至绝收, 给农业生产带了严重的经济损失^[1]。

真菌多糖是存在于大型真菌子实体、菌丝体中通过糖苷键连接多个单糖而构成的高分子聚合物。真菌多糖资源丰富、具有丰富的生物活性, 而且易被微生物降解、对环境无污染, 是目前及具开发前景的药物新资源。安络小皮伞 (*Marasmius androsaceus*) 系

担子菌纲、白蘑科小皮伞属真菌, 主要活性组分是水溶性多糖, 相关医学研究表明其水溶性多糖具有提高机体免疫力, 抗肿瘤等多种活性, 是一种传统的镇痛和抗风湿的保健中药, 对人体无毒副作用^[2]。医学研究表明, 真菌多糖可通过抑制病毒吸附、干扰病毒复制和提高机体免疫力等途径, 有效抑制人体病毒病的侵染传播^[3–4]。Collins 等^[5]发现云芝多糖不但能抑制 HIV-1 与宿主细胞结合, 而且能显著抑制 HIV-1 逆转录酶活性, 从而抑制病毒复制。但真菌多糖对植物病毒的抑制作用鲜见报道, 吴艳兵^[6]发现毛头鬼伞多糖对 TMV 具有较强的体外钝化及抑制 TMV 侵染复制作用, 可有效预防 TMV 病毒病。

基金项目: 高等学校学科创新引智计划 (B07049); 新型生物杀菌剂真菌多糖在烟草病害防治中的研究和应用 (110201002024); 全国烟草有害生物普查 (KJ-2010-04); 烟草白粉病小种鉴定和防治研究 (110201002022)

* 通信作者。E-mail: anderong323@163.com

作者简介: 沈小英 (1986–), 女, 广西北海, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源利用。E-mail: sxm20060306@sina.com

收稿日期: 2012-11-07; **修回日期:** 2013-03-20;

许玉娟^[7]发现喷施苍耳多糖后,可有效抑制 TMV 侵染心叶烟,推测可能是苍耳多糖通过诱导增强防御酶活性进而抑制 TMV。

为了筛选得到对烟草上黄瓜花叶病毒病 (CMV) 具有显著抑制作用的真菌多糖,明确真菌多糖处理对烟苗相关防御酶的影响,本实验将采用半叶法,从安络小皮伞多糖等 21 种真菌多糖中筛选出对 (CMV) 具有显著抑制作用的多糖,并探索其对烟苗相关防御酶活性变化的影响,为进一步开发安络小皮伞多糖防治 CMV 病毒病提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试多糖:表 1 中 21 种多糖均由本实验室提取、制备和纯化^[2],并于铝箔袋密封室温保存备用。

表 1. 试验供试多糖
Table 1. Polysaccharides for experiment

Polysaccharides	Content/%
<i>Agrocybe cylindracea</i> polysaccharide	59.2
<i>Pleurotus citrinipileatus</i> Singpolysaccharide	43.6
<i>Tremella fuciformis</i> polysaccharide	58.9
<i>Suillus thibetanus</i> (Pat.) Tai polysaccharide	64.2
<i>Flammulina velutipes</i> polysaccharide	47.8
<i>Poria cocos</i> polysaccharide	56.5
<i>Pleurotus ostreatus</i> polysaccharide	40.7
<i>Pholiota nameko</i> polysaccharide	43.7
<i>Agaricus blazei</i> Murill polysaccharide	39.3
<i>Inonotus obliquus</i> (Fr.) Pilát polysaccharide	44.8
<i>Coprinus comatus</i> polysaccharide	51.0
<i>Coriolus versicolor</i> polysaccharide	61.5
<i>Pleurotus eryngii</i> polysaccharide	48.2
<i>Agaricus bisporus</i> polysaccharide	34.7
<i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharide	58.9
<i>Grifola umbellata</i> polysaccharide	43.7
<i>Armillaria mellea</i> polysaccharide	32.1
<i>Auricularia auricula</i> polysaccharide	46.2
<i>Albatrellus ellisii</i> (Berk.) Pouzar polysaccharide	42.9
<i>Cordyceps sinensis</i> polysaccharide	46.1
<i>Marasmiusa ndrosaceus</i> polysaccharide	57.6

1.1.2 供试作物:枯斑三生烟(*Nicotiana tabacum* var. Samsun NN)、普通烟 NC-89(*Nicotiana tabacum* var. NC89),由陕西省烟草研究所提供。所用育苗物质经消毒后,于防虫温室内种植。

1.1.3 供试病毒:黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic

Virus, CMV),为西北农林科技大学植物保护学院保存在防虫温室中普通烟草上。制备供试病毒接种液时,取 1 g CMV 感病叶片,加少量石英砂,于 10 mL PBS 溶液中研磨成匀浆,纱布过滤,无菌水稀释至 100 mL 备用。

1.1.4 主要试剂和仪器:邻苯二酚,购于国药集团化学试剂有限公司;L-苯丙氨酸,购于国药集团化学试剂有限公司;愈创木酚,购于国药集团化学试剂有限公司;紫外分光光度计(DU800 nucleic acid/protein analyzer, 购于 Beckman Coulter 公司);高速冷冻离心机(Avanti[®] J-E Centrifuge, 购于 BECKMAN COULTER 公司)。

1.2 多糖的提取

本实验所用的 21 种多糖均按照改良后的谢红旗^[8]方法提取;菌株子实体预处理 → 沸水浸提 → 提取液合并、浓缩 → 乙醇沉淀 → 冷冻干燥 → 粗多糖 → 乙醇沉淀洗涤(3 次)→ 水溶解 → Sevag 除蛋白 → 透析 → 活性炭脱色 → 透析 → 冷冻干燥 → Molisch 反应鉴定多糖。

1.3 抗病毒多糖的筛选

1.3.1 对 CMV 的体外钝化效果:选取 7 叶期长势一致的枯斑三生烟,打顶,留 3 - 4 片叶,培养 1 周。将 50 mL 稀释为 200 和 400 倍液的 21 种多糖液分别与等量的供试病毒接种液混合,静置 30 min 后,用半叶法摩擦接种到烟叶半叶,另半叶摩擦接种清水与供试病毒液混合物为对照。然后于温室中培养,每处理 3 株,重复 3 次。待出现典型枯斑症状后统计枯斑数,计算钝化效果:

钝化效果 = (处理半叶枯斑数 - 对照半叶枯斑数) / 对照半叶枯斑数 × 100% 。

1.3.2 对 CMV 的预防效果:将稀释为 200 和 400 倍液的 21 种多糖液分别喷施到 7 叶期枯斑三生烟烟叶半叶,另半叶为喷清水对照。于喷施处理 24、48 h 后,对各处理及对照烟叶全叶摩擦接种病毒液。然后于温室中培养,待出现典型枯斑症状后统计枯斑数,计算预防效果:

预防效果 = (处理半叶枯斑数 - 对照半叶枯斑数) / 对照半叶枯斑数 × 100% 。

1.3.3 对 CMV 的治疗效果:将供试病毒接种液摩擦接种到 7 叶期枯斑三生烟烟苗叶片全叶,分别于处理 0,24 h 后,将稀释为 200 和 400 倍液的 21 种多糖液喷施到处理烟叶半叶,另半叶为喷施清水对照。

然后于温室中培养,待出现典型枯斑症状后统计枯斑数,计算治疗效果:

治疗效果 = (处理半叶枯斑数 - 对照半叶枯斑数) / 对照半叶枯斑数 × 100%。

1.4 不同浓度多糖液对 CMV 抑制效果测定

在 2.3 实验基础上,选择对 CMV 抑制效果最好的多糖,将其稀释为 100、200、400、800 倍液等 4 个不同浓度的多糖液,采用半叶法在枯斑三生烟上分别测定其对 CMV 的体外钝化效果、预防效果及治疗效果。

1.5 安络小皮伞多糖处理后酶活性测定

1.5.1 幼苗处理:待普通烟 NC-89 烟苗长至 3 或 4 片真叶时作如下处理:处理 1,喷施安络小皮伞多糖稀释液不接种供试病毒接种液;处理 2,供试病毒接种液与等量的安络小皮伞多糖稀释液混合 30 min 后摩擦接种;处理 3,喷施安络小皮伞多糖稀释液 24 h 后摩擦接种供试病毒接种液,以喷施清水不接种供试病毒接种液为对照。上述处理所用多糖液浓度为 200 倍稀释液,供试病毒接种液制备方法同 2.1.3。每处理 30 株,重复 3 次。接种后第 2、4、6、8、10、12、14 天固定叶位取样(3 或 4 片),制为待测酶液于 -20℃ 保存备用。

1.5.2 待测酶液制备:参照薛应龙的方法^[9],称取 0.6 g 烟叶,放入预冷的研钵中,加 3 mL 磷酸缓冲液(0.2 mol/L pH7.8)冰浴条件下研磨成匀浆。 2.85×10^3 g, 4℃ 下离心 20 min,取上清液于 -20℃ 冰箱内保存,测定 PPO 及 POD 酶活。另称取 0.2 g 烟叶,放入预冷的研钵中,加 2 mL 硼酸缓冲液(0.2 mol/L pH8.7)及少许聚乙烯吡咯烷酮,冰浴条件下研磨,2850 × g, 4℃ 离心 20 min,上清液于 -20℃ 冰箱内保存,测定 PAL 酶活。

1.5.3 酶活性的测定:分别测定多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和过氧化物酶(POD)的活性变化。酶提液用相应缓冲液稀释 2 倍后,分别加入邻苯二酚、L-苯丙氨酸和愈创木酚为底物制备多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶和过氧化物酶待测液^[9]。参考朱广廉^[10]的方法,DU800 紫外分光光度计于各酶适合波长下测定 OD 值,每隔 1 min 读数一次。每个样品重复 3 次,以每分钟 OD 变化值表示酶活性大小。

2 结果和分析

2.1 抗病毒多糖筛选结果

由表 2 可看出,21 种真菌多糖对 CMV 的钝化效果均低于 82%,其中安络小皮伞多糖钝化效果最好,钝化效果为 81.49%,其次为虫草多糖,其钝化效果为 81.35%;21 种真菌多糖对 CMV 的预防效果差异显著,其中,安络小皮伞多糖喷施 24 h 后接毒处理对 CMV 的预防效果最好,高达 94.74%,其次为猪苓菌多糖喷施 48h 后接毒处理,其预防效果为 90.24%,其余处理对 CMV 的预防效果均低于 90%;21 中真菌多糖对 CMV 的治疗效果均不明显,接毒 48h 后喷施多糖处理对 CMV 的治疗效果较接毒 24h 后喷施多糖处理差,其治疗效果均低于 60%。多糖不同处理方式及浓度均影响其对 CMV 的抑制效果,处理方式的影响尤为明显。

2.2 安络小皮伞多糖室内对烟草黄瓜花叶病毒的抑制效果

依据抗病毒多糖初筛结果,选择钝化效果及预防效果相对较好的安络小皮伞多糖,进一步测定不同浓度的安络小皮伞多糖对 CMV 的抑制效果。

从表 3 可以看出,安络小皮伞多糖对黄瓜花叶病毒的钝化效果与处理浓度有关,其 20 倍液对 CMV 的钝化效果最好,为 83.41%;安络小皮伞多糖对 CMV 具有较强的预防效果,喷施安络小皮伞多糖 200 倍液 24 h 后接毒处理的预防效果最佳,其预防效果高达 93.15%,喷施安络小皮伞多糖 48 h 后接毒处理的预防效果随浓度减小而减弱;安络小皮伞多糖对 CMV 的治疗效果不如预期好,治疗效果均低于 65%。

2.3 安络小皮伞多糖处理后的烟草防御酶系变化

为了探讨安络小皮伞多糖抑制烟草上黄瓜花叶病毒病的生理机制,将采集的烟叶制成酶液,加入相应底物后测定烟叶体内 POD、PPO 和 PAL 酶的活性变化。

2.3.1 烟草经处理后体内 POD 活性变化:从图 1 可看到,各处理组烟叶体内 POD 活性变化显著,呈先增加后降低的趋势。单独喷施安络小皮伞多糖处理 POD 酶活变化相对较小,低于其余两处理,同时,在第 10 天出现峰值,出现时间相对较晚;安络小皮伞多糖与等量病毒液混合 30 min 后接种和喷施安

络小皮伞多糖 24 h 后接病毒两处理酶活变化显著，
且在第 8 天峰值出现后呈现急剧下降的趋势,其中，
喷施安络小皮伞多糖 24 h 后接病毒处理变化最为
显著,其峰值为对照的 2.74 倍,其次为安络小皮伞

多糖与等量病毒液混合 30min 后接种处理,其峰值
为对照的 2.36 倍。对照组酶活几乎不变,趋于稳
定,且显著低于处理。

表 2. 不同多糖对 CMV 的抑制作用

Table 2. The inhibition effect of different polysaccharides on CMV

Polysaccharides	Dilution ratio/%	Deactivating effect/%	Preventing effect/%		Treating effect/%	
			24 h	48 h	0 h	24 h
<i>A. cylindracea</i> polysaccharide	200times	59.34	78.56	64.53	43.21	32.49
	400times	46.89	70.15	62.37	42.97	28.37
<i>P. citrinipileatus</i> polysaccharide	200times	48.27	56.24	57.34	38.64	31.74
	400times	46.21	50.14	49.37	34.95	25.64
<i>T. fuciformis</i> polysaccharide	200times	31.25	78.34	68.17	28.45	24.16
	400times	29.64	76.29	64.26	24.31	21.94
<i>S. thibetanus</i> polysaccharide	200times	48.35	55.13	54.67	46.39	41.28
	400times	42.18	58.46	43.29	51.29	34.62
<i>F. velutipes</i> polysaccharide	200times	74.89	88.13	76.95	82.33	46.98
	400times	68.54	82.34	80.15	78.36	48.52
<i>P. cocos</i> polysaccharide	200times	38.76	49.31	52.49	28.37	46.33
	400times	41.95	46.19	49.21	37.64	48.27
<i>P. ostreatus</i> polysaccharide	200times	67.34	85.13	72.61	56.34	45.34
	400times	59.94	82.04	64.94	51.55	42.18
<i>P. nameko</i> polysaccharide	200times	59.36	69.84	64.38	76.51	53.64
	400times	48.31	68.67	56.91	70.26	42.55
<i>A. blazei</i> polysaccharide	200times	76.34	72.34	68.34	43.25	32.17
	400times	64.59	64.59	64.92	38.66	29.80
<i>I. obliquus</i> polysaccharide	200times	58.61	63.58	58.61	72.19	49.68
	400times	52.08	64.12	72.18	68.22	41.97
<i>C. comatus</i> polysaccharide	200times	77.31	82.13	79.61	59.84	42.31
	400times	71.28	79.64	74.38	57.33	31.54
<i>C. versicolor</i> polysaccharide	200times	69.05	81.05	76.29	59.64	46.60
	400times	64.79	76.44	71.34	56.20	45.22
<i>P. eryngii</i> polysaccharide	200times	34.21	68.34	72.18	55.24	49.86
	400times	28.66	69.37	64.59	49.65	44.36
<i>A. bisporus</i> polysaccharide	200times	46.34	51.34	75.35	22.97	—
	400times	42.19	56.28	71.94	15.64	—
<i>G. lucidum</i> polysaccharide	200times	79.33	81.31	85.34	49.34	26.33
	400times	72.48	68.22	72.95	25.48	21.08
<i>G. umbellata</i> polysaccharide	200times	59.34	82.01	90.24	29.36	—
	400times	75.63	75.46	82.17	28.94	—
<i>A. mellea</i> polysaccharide	200times	79.21	86.31	84.92	64.22	26.94
	400times	62.34	79.22	79.28	56.77	22.14
<i>A. auricula</i> polysaccharide	200times	81.34	72.13	76.44	52.68	19.55
	400times	79.34	70.66	72.19	46.37	—
<i>A. ellisii</i> polysaccharide	200times	69.98	85.34	76.34	65.87	59.34
	400times	65.80	81.90	71.59	59.37	46.37
<i>C. sinensis</i> polysaccharide	200times	81.35	85.56	73.89	46.34	52.66
	400times	76.98	82.34	68.44	41.06	46.32
<i>M. androsaceus</i> polysaccharide	200times	81.49	94.74	86.34	58.49	38.18
	400times	72.14	89.36	79.61	49.27	37.92

* The data of the table are the average of 3 repetitions.

表 3. 不同浓度的安络小皮伞多糖溶液对 CMV 的抑制作用

Table 3. The inhibition effect of *M. androsaceus* envelope with different concentrations on cucumber mosaic virus

Dilution ratio	Deactivating effect/%	Preventing effect/%		Treating effect/%	
		24 h	48 h	0 h	24 h
100 times	67.61 ± 0.52 B	89.85 ± 1.06 B	86.64 ± 0.76 A	62.30 ± 0.74 A	58.78 ± 0.62 A
200 times	83.41 ± 1.14 A	93.15 ± 0.42 A	79.03 ± 0.61 B	60.11 ± 0.95 A	54.92 ± 0.40B
400 times	70.87 ± 1.31 C	83.35 ± 1.06 C	70.89 ± 1.15C	52.11 ± 0.35 B	51.78 ± 0.90C
800 times	51.90 ± 0.20 D	69.21 ± 0.96 D	50.49 ± 1.71D	49.28 ± 0.78B	45.78 ± 0.51D

* The data of the table are the average of 3 repetitions. Data followed by the different small letters in the same column indicated significant differences(*P* < 0.01).

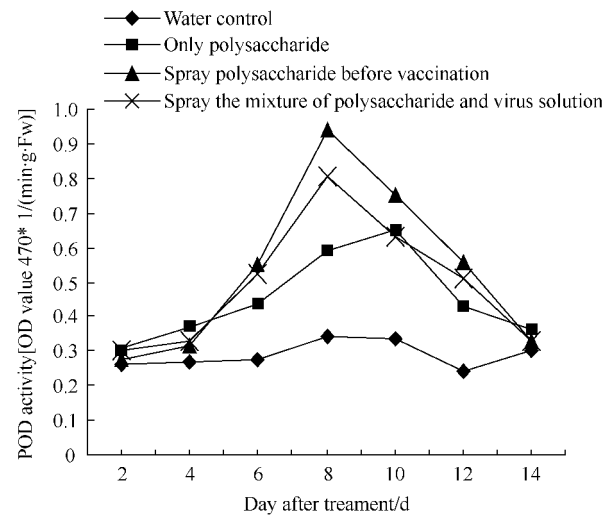


图 1. 不同处理烟草 POD 酶活性变化

Figure 1. The enzyme activity diversification of POD on tobacco after treatment.

2.3.2 烟草经处理后体内 PAL 活性变化:由图 2 可看出,各处理烟叶的 PAL 活性变化显著,明显高于对照。三处理组的 PAL 酶活变化趋势一致,均为先增加后降低,且均于第 8 天出现活性峰值后急剧下降,第 10 天后 PAL 酶活变化相对趋缓,对照组的 PAL 活性变化不大,较为平稳。喷施安络小皮伞多糖 24 h 后接毒处理组的 PAL 变化最明显,峰值最高,为对照的 3.45 倍,其次为安络小皮伞多糖与等量病毒液混合 30 min 后接种处理组;单独喷施安络小皮伞多糖处理烟叶酶活变化相对较小,其峰值显著低于另两处理。

2.3.3 烟草经处理后体内 PPO 活性变化:从图 3 看出,三处理组的 PPO 酶活变化较对照组显著。单独喷施安络小皮伞多糖处理组的 PPO 酶活前阶段缓慢升高,直至第 10 天出现峰值后降低;喷施安络小皮伞多糖 24 h 后接毒处理组 PPO 酶活变化显著,于第 4 天出现一个小高峰后降低,随后继续升高直至第 10 天出现峰值,为对照的 2.82 倍;安络小皮伞

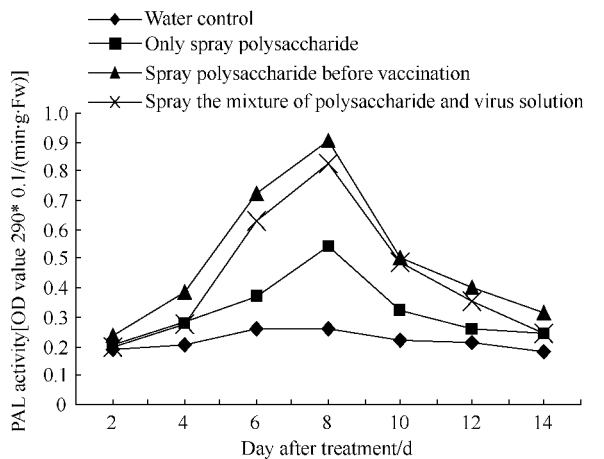


图 2. 不同处理烟草 PAL 酶活变化

Figure 2. The enzyme activity diversification of PAL on tobacco after treatment.

多糖与等量病毒液混合 30 min 后接种处理组的 PPO 酶活变化趋势与喷施多糖 24 h 后接毒处理组的变化趋势相似,但在第 12 天才出现峰值且低于喷施多糖 24 h 后接毒处理组的峰值。

3 结论和讨论

本研究表明安络小皮伞多糖对 CMV 有显著的体外钝化和预防效果,喷施安络小皮伞多糖 200 倍液 24 h 后接 CMV 病毒液,预防效果可高达 93.15%。安络小皮伞多糖不同处理方式及浓度影响其对 CMV 的防治效果。

植物抗病是一个多种因素互作的过程,其中包括木质素、植保素、酚类合成和其他病程相关蛋白合成的相关因子^[11]。过氧化物酶(POD)在植物机体防御体系中起重要作用。不仅是重要的内源活性氧清除剂,还参与了木质素聚合过程,POD 活性升高有利于细胞壁木质化而对病原菌的侵染和扩展有一定的限制作用。PAL 是植物苯丙烷类次生代谢途

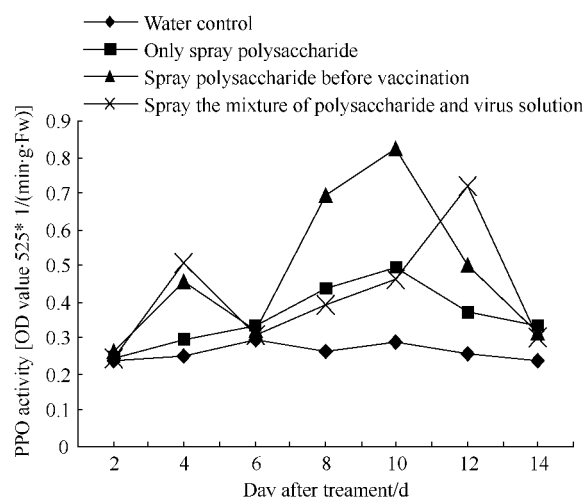


图 3. 不同处理烟草 PPO 酶活变化

Figure 3. The enzyme activity diversification of PPO on tobacco after treatment.

径关键酶和限速酶,催化苯丙氨酸脱氨基后产生肉桂酸并最终转化为木质素。病菌入侵时,植物细胞受到刺激后启动 PAL 系统产生木质素并沉积在细胞壁周围,限制病原物在一定的细胞范围内而阻止其扩散^[12]。大量研究^[13-14]结果表明,PPO 能促进木质素前体酚类化合物在受侵染部位的合成和积累,促进细胞壁和组织的木质化,以抵抗病原的侵染。此外,大量的酚被氧化成能钝化病原物呼吸酶的醌,阻碍病原物的生长,同时,醌的次生反应所产生痂可阻止病原菌扩散。大多抗病机制研究认为 PPO 活性与植物抗病性呈正相关。

实验结果表明安络小皮伞多糖可诱导烟苗相关防御酶 POD、PAL 和 PPO 的活性,呈现先增加,达到峰值后急剧降低的变化趋势。同时,POD、PAL 和 PPO 酶活峰值期与对照烟苗顶部叶片出现明显的花叶症状时间相同,分析安络小皮伞多糖诱导烟草相关防御酶活性进而提高烟苗的抗病性。

参考文献

- [1] McGrath MT, Shishkoff N. Evaluation of biocompatible products for managing cucurbit powdery mildew. *Crop Protect*, 1999, (18):471-478.
- [2] Wang Y, Hou A, Hu C, Zhang Y, Zhang N, Wang C, Meng Q, Teng L. Study on the extraction of polysaccharides from *Marasmiusandrosaceus* mycelium. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2007, 30 (5): 213-216. (in Chinese)

王艳珍,候阿澧,胡成旭,张益波,张娜,汪传高,孟庆繁,滕利荣.安络小皮伞菌丝体多糖提取条件的研究. *中药材*, 2007, 30 (5):213-216.

- [3] Zhang C, Chao H, Chen L, Wang J. Preliminary study on the inhibition of polysaccharide of Edible Fungi to plant virus. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2005, 32 (1):15-18. (in Chinese)
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. *安徽农业大学学报*, 2005, 32 (1):15-18.
- [4] Wu Y, Xie L, Xie L, Lin Q, Lin S. A preliminary study on anti-TMV activity of polysaccharide from *Coprinuscomatus*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23 (5):338-341. (in Chinese)
吴艳兵,谢荔岩,谢联辉,林奇英,林诗发.毛头鬼伞多糖抗烟草花叶病毒 (TMV) 活性研究初报. *中国农学通报*, 2007, 23 (5):338-341.
- [5] Collins RA, Ng TB. Polysaccharopeptides from *Coriolusversicolor* has potential against human immunodeficiency virus type I infection. *Life Science*, 1997, 60 (25): 383-387.
- [6] Wu Y, Xie L, Xie L, Lin Q. Effects of *Coprinuscomatus* polysaccharide on the activities of enzymes and isoenzymezymogram in tobacco leaves. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 27 (5): 29-33. (in Chinese)
吴艳兵,谢荔岩,谢联辉,林奇英.毛头鬼伞多糖对烟草酶活性和同工酶谱的影响. *微生物学杂志*, 2007, 27 (5):29-33.
- [7] Xu Y, Fan S, Qi W, Yi X, Ren H, Liu Z. The inhibition effect of polysaccharides of *Xanthium Sibiricum* on tobacco mosaic virus and the influence on the defense enzymes activities of tobacco. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*, 2010, 41 (4): 485-488. (in Chinese)
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. *山东农业大学学报 (自然科学版)*, 2010, 41 (4):485-488.
- [8] 谢红旗.香菇多糖提取、纯化、结构表征及生物活性的研究. *中南大学学位论文*, 2007.
- [9] 薛应龙.植物生理学实验手册.上海:上海科技技术出版社,1985:105-114.
- [10] 朱广廉,钟海文,张爱琴.植物生理学实验.北京:北京大学出版社,1990:37-40.
- [11] Milton Z. Advances in understanding plant viruses and

- virus diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 2000, 9 (38): 117-143.
- [12] Ouyang G, Xue Y. Physiological role and regulation of phenylpropanoid metabolism in plant. *Message of Plant Physiology*, 1988, 14(3): 9-16. (in Chinese)
欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控. *植物生理学通讯*, 1988, 14(3): 9-16.
- [13] Bol JF, Linthorst HJM, Cornelissen BJC. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, 1990, 9(28): 113-138.
- [14] Song R, Ding Y, Gong C. Research advances in relationship between tobacco resistance and protective enzymes activity. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(5): 309-314. (in Chinese)
宋瑞芳, 丁永乐, 宫长荣. 烟草抗性和保护酶活性的关系的研究进展. *中国农学通报*, 2007, 23(5): 309-314.

Polysaccharides inhibiting cucumber mosaic virus and their influence on tobacco defensive enzyme activities

Xiaoying Shen, Shuang Song, Jing Luo, Xin Zhang, Derong An*

State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas/College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: [Objective] Polysaccharides inhibiting cucumber mosaic virus (CMV) on tobacco were screened and their influence on tobacco defensive enzyme activities was explored. [Method] We detected the deactivating, preventing and treating effect of 21 polysaccharides on CMV by half leaf method on *Nicotiana tabacum* var. Samsun NN. We detected the variation of enzyme activity of *Nicotiana tabacum* var. NC89 handled by antiviral polysaccharide. [Result] Results show that *Marasmius androsaceus* polysaccharide had good deactivating and preventing effect on CMV. The preventing rate could reach 83.41% when the tobacco was dealt with the admixture of its 200-fold dilution and equivalent virus liquid for 30 min. The inhibition rate could reach 93.15% when the tobacco was inoculated after spraying with *M. androsaceus* polysaccharide for 24 h. Moreover, the diversification of enzyme activity of tobacco-related was detected. Results show that peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activities significantly enhanced. *M. androsaceus* polysaccharide sprayed on tobacco after inoculating CMV for 24 h. Its enzyme activities increased. The peak of POD, PPO and PAL activities of the treatment were 2.74, 3.45 and 2.82 times of the value of comparison, respectively. [Conclusion] *M. androsaceus* polysaccharide can increase the resistance of tobacco on CMV by enhancing defense enzyme activity of tobacco.

Keywords: *Marasmius androsaceus*, polysaccharides, cucumber mosaic virus (CMV), enzyme activity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the 111 Project from the Education Ministry of China (B07049), by the Research and Application of New Bio-fungicide Polysaccharides Fungus on Disease Prevention and Treatment on Tobacco (110201002024), by the General Survey of Agricultural Pest in Tobacco in China (KJ-2010-04) and by the Identification and Prevention of Tobacco Powdery Mildew (110201002022)

* Corresponding author. E-mail: anderong323@163.com

Received: 7 November 2012/Revised: 20 March 2013