

# 几丁聚糖在绿色防治番茄病毒病中的药效分析



梁芳<sup>1, #</sup>, 陈绍超<sup>1, #</sup>, 谢德珊<sup>1, #</sup>, 余少兵<sup>1</sup>, 裴文亮<sup>1</sup>, 吴南兴<sup>1</sup>, 王德海<sup>2</sup>, 道金荣<sup>3</sup>, 张仲恺<sup>4, \*</sup>, 黄永<sup>1, 5, \*</sup>

<sup>1</sup>成都特普生物科技股份有限公司生物农药研究中心, 四川成都 611731

<sup>2</sup>云南省农业农村厅植物保护站, 云南昆明 650034

<sup>3</sup>云南省农业农村厅植物推广站, 云南昆明 650051

<sup>4</sup>云南省农业科学院生物技术研究所, 云南昆明 650205

<sup>5</sup>成都中医药大学创新研究院, 四川成都 610075

**摘要:** 病毒病是危害番茄作物的首要病害, 发病率一般在 30.0% 以上, 严重时可高达 90.0%。控制病毒病害是作物保护领域的一项巨大挑战。常用的技术手段主要有应用杀虫剂通过减少昆虫载体来防止病毒传播, 以及采用作物育种技术和组织培养来产生抗病毒品种或无病毒幼苗。然而, 由于病毒突变, 这些方法在实践中通常并不奏效。据报道, 几丁聚糖作为一种高效的植物抗性诱导激发子, 能抑制病原菌侵染、诱导植保素生成和激发植物自身抗性, 目前已被广泛用于病毒病的防治。本研究通过对田间病害指数调查、监测每次施药前病叶及新叶中病毒的形态及含量, 明确了间隔 7 天, 连续喷施 3 次 0.5% 几丁聚糖水剂对番茄病毒病具有显著防治效果。负染电镜观察法直观地展现了叶片中病毒的存在及变化; RT-PCR 法解析了病毒种类为番茄斑萎病毒 (TSWV)、番茄褪绿病毒 (ToCV), 烟草花叶病毒; qRT-PCR 法进一步明确了 0.5% 几丁聚糖水剂对番茄斑萎病和番茄褪绿病毒的抑制率分别为 75.31%、67.18%。实验结果表明植物诱抗剂几丁聚糖 (a.i. 0.5%) 能够抑制作物细胞中的病毒复制, 防止番茄植株病毒病的症状加剧。因此对于番茄病毒病管理的策略是建议定期应用诱抗剂几丁聚糖, 以维持较低的病毒滴度, 防止病毒病的发生和蔓延。

**关键词:** 番茄病毒病; 植物诱抗剂; 几丁聚糖 (a.i.0.5%); 负染电子显微镜; 系统诱导抗性; 生物保护

**DOI:** 10.57237/j.jaf.2023.01.004

## Pharmacodynamic Acnalysis of Anti-chitosan in the Prevention and Treatment of Tomato Virus Diseases

Fang Liang<sup>1, #</sup>, Shaochao Chen<sup>1, #</sup>, Deshan Xie<sup>1, #</sup>, Shaobing Yu<sup>1</sup>, Wenliang Pei<sup>1</sup>, Nanxing Wu<sup>1</sup>, Dehai Wang<sup>2</sup>, Jinrong Dao<sup>3</sup>, Zhongkai Zhang<sup>4, \*</sup>, Yong Huang<sup>1, 5, \*</sup>

<sup>1</sup>Biopesticide Research Center, Chengdu Tepu Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 611731, China

基金项目: 成都市科技厅基金 (13ZHSD984NC-173, 2015-NY01-00080-NC).

\*通信作者: 黄永, Yonghuakj@hotmail.com; 张仲凯, Zhongkai99@sina.com

#梁芳, 陈绍超和谢德珊是共同一作.

收稿日期: 2023-01-30; 接受日期: 2023-03-20; 在线出版日期: 2023-03-28

<http://www.agrforestry.com>

<sup>2</sup>Plant Protection Station, Yunnan Provincial Department of Agriculture and Rural Affairs, Kunming 650034, China

<sup>3</sup>Plant Extension Station, Yunnan Provincial Department of Agriculture and Rural Affairs, Kunming 650051, China

<sup>4</sup>Institute of Biotechnology, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China

<sup>5</sup>Institute of Innovation, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

**Abstract:** Viral diseases are primary diseases of tomatoes with an occurrence rate generally reaching above 30% and up to 90% in severe cases. Control of viral diseases is an enormous challenge in crop protection. Application of insecticide for preventing virus transmission through reduction of insect vectors is considered an useful means. The crop breeding technology and tissue culture are also employed to generate viral resistant cultivar or virus-free seedlings. However, these methods are often less effective in practice because of viral mutations. It has been reported that chitosan, as an efficient plant resistance-inducing elicitor, can inhibit the infection of pathogenic bacteria, induce the production of phytochemicals and stimulate plant self-resistance, and has been widely used in the prevention and treatment of viral diseases. In this study, by investigating the field disease index and monitoring the form and content of the virus in the diseased leaves and new leaves before each application, it was clarified that continuous spraying of 0.5% chitosan water solution for 3 times at an interval of 7 days has a significant control effect of preventing tomato virus disease. Negative staining electron microscope observation method visually showed the existence and changes of virus in leaves; RT-PCR method analyzed the virus types as tomato spotted wilt virus (TSWV), tomato chlorosis virus (ToCV), tobacco mosaic virus (TMV); The qRT-PCR method further clarified that the inhibition rates of 0.5% chitosan solution on tomato spotted wilt and tomato chlorosis virus were 75.31% and 67.18%, respectively. It is concluded from our tests that the plant defence elicitor chitosan (a.i. 0.5%) is able to inhibit virus replication in crop cells and prevent the aggravation of tomato plant virus disease symptoms. Therefore, the strategy for the management of tomato virus disease is to apply the inducer chitosan regularly to maintain a low virus titer and prevent the occurrence and spread of virus disease.

**Keywords:** Viral Diseases; Plant Defence Elicitor; Chitosan (a.i.0.5%); Negative Staining Electron Microscopy; Induced Systemic Resistance; Biological Protection

## 1 引言

目前农业病害防治主要依靠化学杀菌剂, 由此引发的农药残留和环境污染问题引发了人们的密切关注[1]。为了满足对绿色和优质产品日益增长的需求, 环保产品和技术成为植保领域的首选。病毒从活细胞中获取营养并在胞内复制[2, 3], 这使得它们一旦感染植物, 便可以持续到宿主死亡, 从而难以控制。植物本身具有抵御病原体感染的能力[4], 其防御方式包括防止病原体感染的模式触发免疫 (PTI) 和抑制病原体发展的免疫触发效应 (ETI)。病毒病的高发生率和难以控制的性质构成了植物保护的巨大挑战[5], 人们在抗性栽培品种的 RNA 沉默和遗传操作投入了大量的精力[6-8], 同时还研究了温和病毒株的交叉保护, 但实际效果并不理想[9, 10]。目前, 预防病毒感染的实用方法主要依赖培育抗性品种和制备无病毒种子和幼苗, 生长期喷施化学农药是种植者防止昆虫传播病毒的主要选择[11]。然而, 由于病毒是胞内寄生, 因此在病毒开始感染后, 很少有商业产品可用于控制作物病毒病。

激活植物免疫反应以诱导植物抗性的诱导因子被认为是一种抑制病毒病的新方法, 防御诱导因子依据其产生免疫系统时涉及多种代谢途径[12]而在病毒病管理中具有巨大潜力[13]。然而这些药剂对植物细胞中病毒复制的抑制作用尚未在电子显微镜下从形态学上清楚地检测到。

许多研究报告验证了几丁聚糖在植物保护中的广泛应用[14-16]。但是很少有几丁聚糖产品独立作为生物农药在农业领域实际施用, 这可能是源于报道中的几丁聚糖在植物病害控制中大多起预防作用, 少有治疗效果[17]。此外, 包括几丁聚糖在内的 SAR 试剂通常在科学研究中处于接种单一病毒的胁迫[18], 而田间病毒病害常受多种病毒的侵染, 这可能也制约了其商业应用。太抗 0.5% 几丁聚糖作为国内首家注册为植物诱抗剂的生物农药, 已在西番莲、茄子、黄瓜、瓜类、辣椒、烟草、番茄等作物上进行商业化应用, 对田间混合病毒病具有显著的预防和治疗作用。因此, 了解

用几丁聚糖处理后植物细胞中的病毒发生了什么是非  
常有意义的。

常用的病毒检测手段包括电镜观察法[19]依据可  
以直接观察病毒粒子的形态结构、大小、病毒在寄主  
细胞内的存在状态的优势，是目前快速鉴定病毒种类  
及结构研究重要手段之一，分子生物学技术中的  
RT-PCR [20]扩增以快捷简便、灵敏度高、特异性强的  
特点，已成为植物病毒研究必不可少的常规手段之一。  
鉴于云南省多发性病毒感染普遍，已造成了严重的  
经济损失。本实验对该地区的番茄病苗应用太抗几丁  
聚糖进行防治，通过病情指数分析和监测处理后植株  
中病毒形态、数量上的动态变化，评估、解释了几丁  
聚糖在抑制番茄植物病毒病中的作用，以期更好地了  
解生物防治措施在抑制病毒病方面的影响。

2 材料与方

2.1 试验材料

试验安排在历年番茄病毒病发生严重的云南省保  
山市隆阳区河图乡柳上村进行，番茄品种为长势良好  
的中杂 9 号。每试验小区 20 平方米，植株数为 25 株，  
区组随机排列，共重复 4 次。各小区的土壤类型、栽  
培条件及水肥管理等均匀一致，试验地前两周不曾施  
用杀菌剂及防病毒药剂。

2.2 试验药剂及处理

0.5% 几丁聚糖水剂购自成都特普生物科技股份有  
限公司，于 2021 年 11 月 1 日、11 月 7 日和 11 月 14  
日施药，共施药 3 次。每隔 7 天喷施一次。

表 1 0.5% 几丁聚糖水剂试验设计

Table 1 Experimental design of 0.5% chitosan water preparation

处理编号 Handling number	药剂 medicine	制剂用药量（倍） Preparation dosage (times)	有效成分量（mg/kg） Active ingredient amount (mg/kg)
A1	0.5% 几丁聚糖水剂	500	10.00
A2	0.5% 几丁聚糖水剂	300	16.67
A3	0.5% 几丁聚糖水剂	100	50.00
CK	空白对照	—	—

2.3 病情调查方法

病株分级标准为：0 级：无症状；1 级：明脉，  
轻花叶；3 级：心叶及中部叶片花叶；5 级：心叶及  
中部叶片共叶，少数叶片畸形，皱缩或植株轻度矮化；  
7 级：重花叶，多数叶片畸形，皱缩或植株矮化；9  
级：重花叶，叶片明显畸形，线叶，植株严重矮化，  
甚至死亡。

药效计算方法：

病情指数(%) =  $\frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总株数} \times 9} \times 100$

防治效果(%) =  $\frac{CK_1 \text{病情指数} - Pt_1 \text{病情指数}}{CK_1 \text{病情指数}} \times 100$

式中：CK<sub>1</sub> 一空白对照区施药前病情指数；

PT<sub>1</sub> 一药剂处理区施药前病情指数。

防治效果采用反正弦转换后，再用 SAS 统计软件  
分析，并做多重比较差异显著性测验。

2.4 病毒形态观察

取少许褪绿或黄绿交界处叶片（病毒含量高且寄  
主细胞内容物丰富），用刀片切碎至汁液渗出，铜网  
膜面朝下吸附汁液 2min 后，用镊子夹住边缘吸干多余  
水分；将铜网样品面覆于钼酸胺染液上计时 1.5min 后，  
夹取铜网放于滤纸上晾干备用。实验采用 TECNAI 透  
射电子显微镜进行观察[21]。每组叶片随机制作三个铜  
网，分别至少拍摄 10 个有效视图。

2.5 病毒种类检测和滴度估计

2.5.1 叶样总 RNA 提取

1g 样品液氮速冻后研磨成粉，加入 1mL Simply P  
Total RNA Extraction Kit 裂解液对总 RNA 进行抽提，  
上清液转移至新离心管后用氯仿充分抽提，抽提产物  
经 75% 乙醇和无水乙醇各清洗 2 次后溶于 30 μL RNase  
Free H<sub>2</sub>O 中，NanoDrop 检测仪测定 RNA 的纯度

(A260/A280) 及浓度 (A260/A230) 后, -80 ℃ 储存备用。

2.5.2 目的基因的扩增

以 1mg 总 RNA 为模板, 使用全式金 First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (TransGen, China) 进行第一链 cDNA 的合成。PCR 反应体系由 10× PCR buffer 2.5μL、dNTP 4μL、正反向引物各 0. 5μL、Taq 酶 1μL、cDNA 模板 2μL 和 ddH<sub>2</sub>O 14. 5μL 组成, 总体积为 25μL。扩增程序为: 94 ℃ 3min; 94 ℃ 30s, 60 ℃ 30s, 72 ℃ 1min,

35 个循环; 72 ℃ 延伸 10min。吸取 10μL PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行靶基因验证。

2.5.3 引物设计

根据 NCBI Gen Bank 注册的 TMV、PVY、CMV 的 cp 基因、TSWV N 基因和 ToCV CPm 基因序列, 采用 Primer 5.0 软件设计特异性检测引物。参照文献记载的番茄[22]内参基因引物进行 PCR 扩增、克隆和测序 (表 2) 。

表 2 用于病毒扩增的引物  
Table 2 Primers used in virus amplification

用途 Usage	基因名称 Gene name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
q-RT-PCR Quantitative real-time PCR	TMV-F	CACCGTTGCGTCGTCTACTCTACG
	TMV-R	GTGTTCTTGTCAGCGTGGGC
	CMV-F	ACATAGCAGAGATGGCGGCAACG
	CMV-R	ACCCAACCTTTGTAGGGAGTGAGCG
	PVY-F	ATACGTGGTATGAGGCAGTG
	PVY-R	ACGCTTCTGCAACATCTGAG
	ToCV-F	CTTTCTGGATGGTTTGCGGC
	ToCV-R	TCCCCAACCAATGGTCGTTT
	TSWV-F	GTGAAAGGGAAAGAGTATGCTGC
	TSWV-R	GGGGTTAAAAAACAGGCAAACTCAC
内参 Primers for internal control	Tomato-Actin-F	TGCGTATGTCGCACTGGATTATG
	Tomato-Actin-R	ATAGGACTTCAGGGCAACGGAAC

2.5.4 实时荧光定量 PCR 扩增

使用 Applied Biosystems Step One Plus PCR 仪进行 qRT-PCR 扩增。10μL 反应体系分别为 2×SYBRGreen PCR Mix 5μL、上下游引物各 0.5μL、cDNA 模板 4μL, 三步法 PCR 扩增程序: 95 ℃ 预变性 60 s; 95 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 30 s, 40 个循环。采集和分析荧光值变化曲线和溶解曲线, 得到的循环阈值 (Ct) 使用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目标基因的相对表达量。

3 结果

3.1 田间药效试验结果

试验结果表明, 每 666.7 平方米使用 0.5% 几丁聚糖水剂制剂量 500 倍、300 倍和 100 倍, 即有效使用浓度 10.00 毫克/千克, 16.67 毫克/千克, 50.00 毫克/千克, 三次用药后田间的病情指数由 5.08 降至 1.53, 1.26, 0.99, 对番茄病毒病的防治效果分别达 69.81%, 75.23% 和 80.61%。很大程度上缓解了番茄病毒病对植株的影响。

表 3 0.5% 几丁聚糖防治番茄病毒病田间药效试验结果  
Table 3 The results of field efficacy test of 0.5% chitosan in the control of tomato virus disease

药剂处理 Pharmacy	平均病指 average disease index	平均防效 (%) (各重复平均值) Average control effect (%) (average of each replicate)	差异显著性 significant difference	
			P < 0.05	P < 0.01
A1	1.53	69.81	C	C
A2	1.26	75.23	B	B
A3	0.99	80.61	A	A
CK	5.08			



### 3.2 透射电镜下病毒检测

从电镜观察结果可知，病叶内随处可见球状和短棒状病毒颗粒。经测量球状病毒粒子直径为 80~90nm，部分完整地包裹于囊泡中，也有部分边缘残存少量囊泡，属于典型的番茄斑萎病毒 TSWV [23]。大量的短棒状颗粒则被证实为烟草花叶病毒属 TMV 粒子（图 1）。对照组中 TSWV 球状病毒(a-c)和 TMV 病毒(g-i)的数量随着实验时间的延长而增加，增殖速度不相上

下，在较短的时间内即可形成大面积侵染。这与 L. Jiang 等人[24]研究发现 TSWV 病毒现已在云南地区广泛分布，造成了严重的经济损失的研究结果一致。而连续三次使用几丁聚糖处理的叶子中，球形 TSWV 病毒颗粒不仅囊泡膜从完整(d)，变为部分破裂(e)，直至完全消失(f)，病毒数量也显著下降。此外杆状 TMV 颗粒显著减少，且排列杂乱，表明几丁聚糖抑制了两种病毒粒子的增殖。

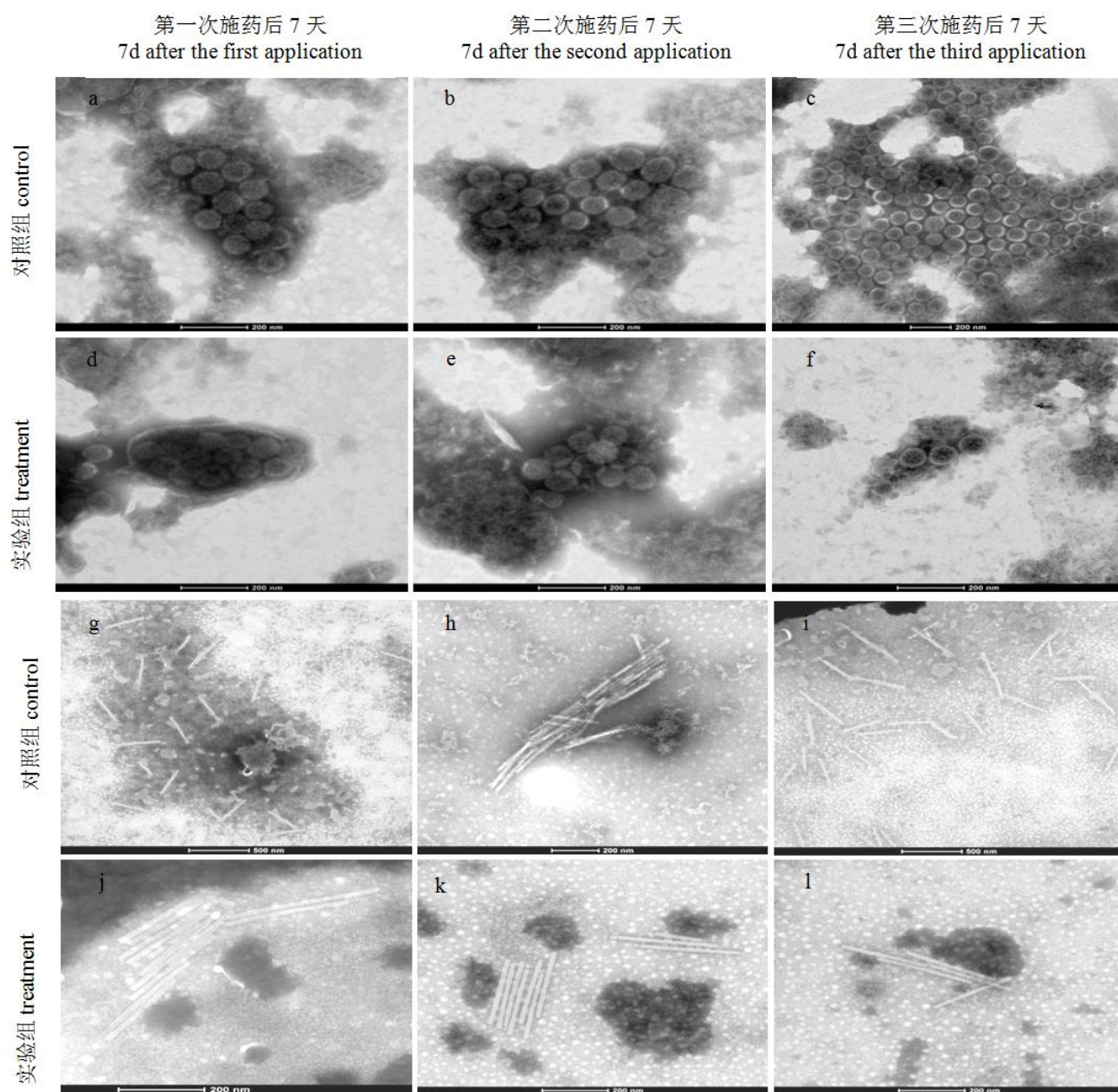


图 1 番茄病毒病叶片电镜显微观察图

Figure 1 Electron microscope observation of tomato virus diseased leaves

### 3.3 RT-PCR 法检测病毒病种类

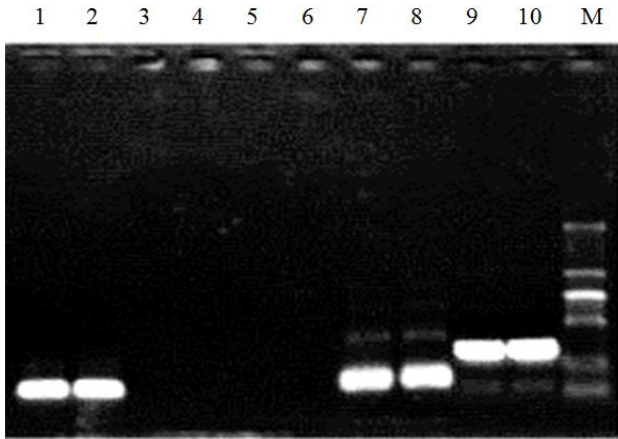


图 2 RT-PCR 法检测番茄病叶组织中的病毒种类

Figure 2 Detection of virus species in diseased tomato leaves by RT-PCR

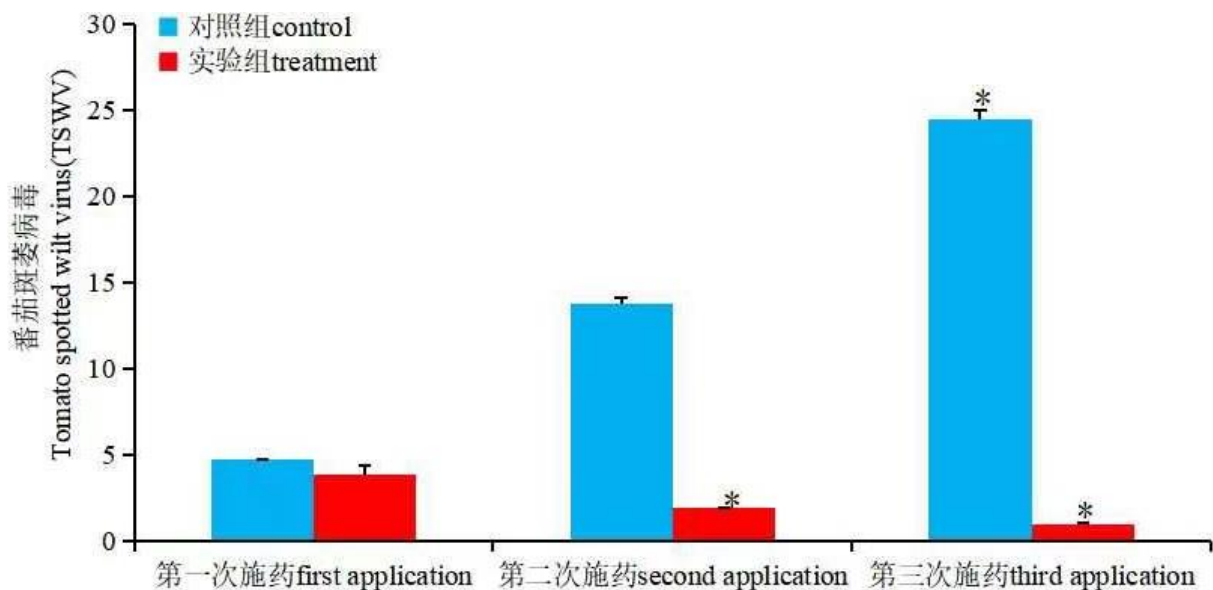
M: DNA Marker DL2000; 1, 2: TMV; 3, 4: CMV; 5, 6: PVY; 7, 8: ToCV; 9, 10: TSWV

以 cDNA 为模板，利用不同病毒粒子特异性引物扩增部分目的片段，由于烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒、马铃薯 Y 病毒在病毒病苗中被广泛报道，因此本研究中对样品进行了多种引物检测[25, 26]电泳检测结果如图 2：番茄样品出现了 TSWV、TMV、ToCV 3 种阳性条带。通过 RT-PCR 法检测到番茄褪绿病毒 ToCV，却在显微镜下没有观察到。为进一步验证 RT-PCR 检测结果的可靠性，对 TMV、TSWV、ToCV

引物的扩增产物进行分子鉴定，并与 GenBank 登记的相关病毒核酸序列进行比对。结果表明，3 个片段长度分别为 122 bp、140 bp 和 230 bp，与数据库中 TMV、TSWV 和 ToCV 病毒上的部分基因具有高度同源性。这表明虽然电子显微镜能够揭示病毒的形态学和颗粒密度，但无法可视化组织中的所有病毒。因此，将显微镜与分子技术相结合对于病毒性疾病的全面表征是必要的。

### 3.4 qRT-PCR 法检测番茄病毒含量

qRT-PCR 法依据高灵敏度和快捷性，被广泛用于微量变化的测定，本研究利用该方法进一步量化几丁聚糖对病毒病的抑制效果。利用番茄肌动蛋白基因作为内参基因，分子技术分析发现番茄病毒病是由 TSWV、ToCV 和 TMV 复合感染引起的。在对照幼苗的实验过程中，所有三种病毒都呈指数倍增（图 3）。在使用几丁聚糖 3 次后，它们的密度显著降低。整体来看，影响番茄生长的主要病毒种群为 TSWV，TMV、ToCV 则表现为潜伏状态。TSWV、ToCV 和 TMV 易受第二次喷雾处理的影响，分别达到 51.12%、54.47% 和 53.95% 的抑制率，并且在之后保持低水平。TSWV 对几丁聚糖处理的抵抗力更强，需要 3 次应用才能达到 75.31% 的抑制。误差条代表三个生物学重复之间的变化。\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ 。



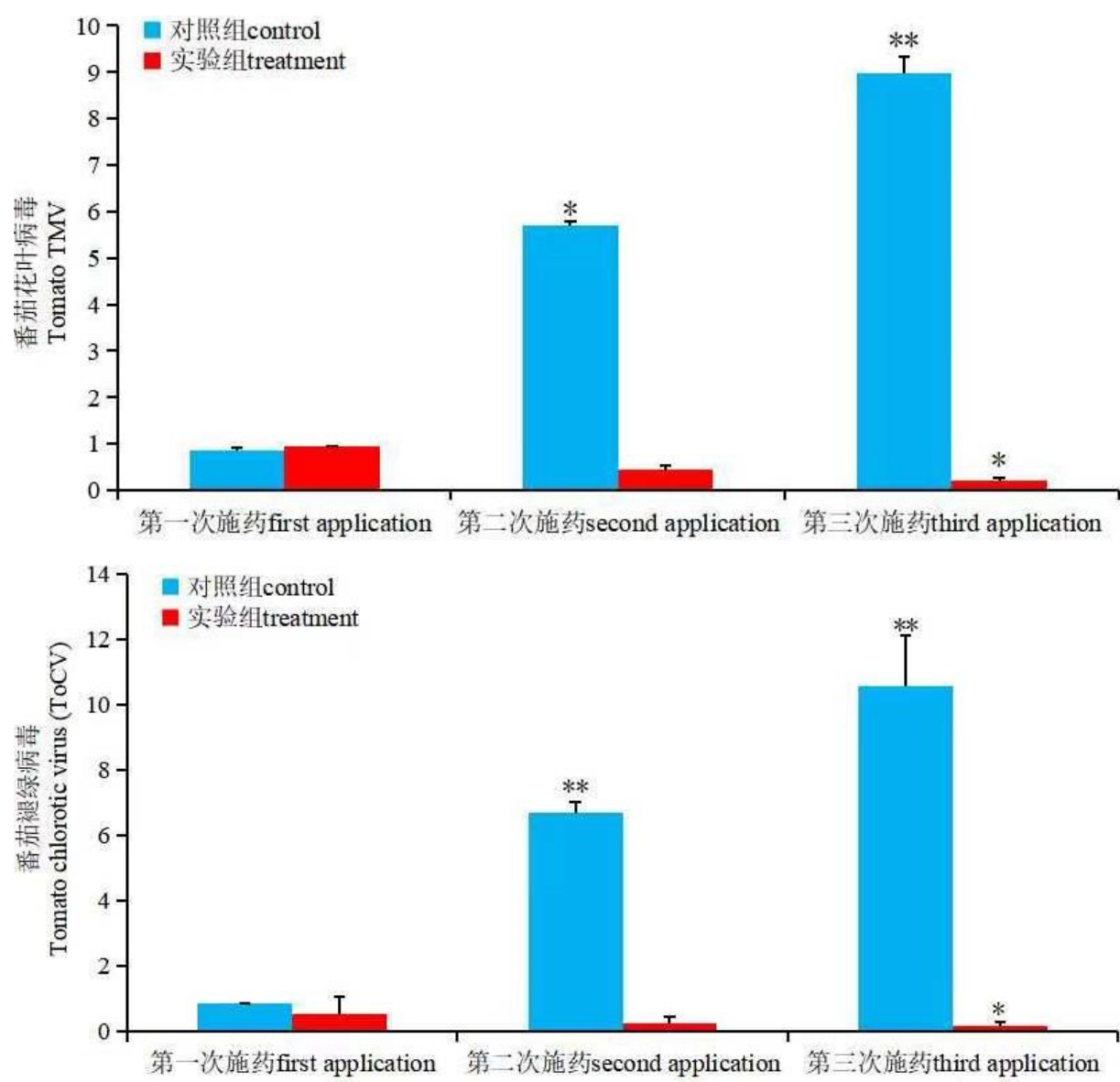


图 3 qRT-PCR 法检测番茄病叶中 TSWV, TMV、ToCV 病毒含量

Figure 3 Detection of TSWV, TMV and ToCV virus contents in tomato diseased leaves by qRT-PCR t-test, \*  $\alpha = 0.05$ , \*\*  $\alpha = 0.01$ .

## 4 讨论

近年来，安全无公害的生物抗病毒剂的研发正成为防治病毒病开发中的热门，植物源抗病毒活性物质丁香酚[27]、极细链格孢激活蛋白产品阿泰灵等各类生物农药已成为众多绿色、有机蔬菜水果种植基地的首选用药。大多数植物病毒由于易于快速进化以及胞内寄生的特性使其难以控制。很少有有效的药剂可以在不干扰植物组织的情况下消除感染植物的病毒。一般来说，在病毒感染前使用宁南霉素和 BTH 能够提供一些有利的防护[28, 29]。人们普遍认为，一旦病毒病大

面积爆发，就很难进行田间治疗[30]。本研究中所采用的几丁聚糖在防治病害和促进生长等方面均有显著成效，目前已被国内外多家公司进行研发，包装剂型以水剂、干粉为主。Rendina N 等[31]评价了相关抗性基因 CEVI-1, NPR1, PSY2 和 PAL5 的表达, V Nagorskaya 等[32]则重点关注了烟草叶片中水解酶的活性变化, 但他们主要还是从基因和蛋白水平验证了植株病害的减轻, 并不能说明病毒粒子的具体情况。

本研究在前期田间应用几丁聚糖能在发病初期延缓或减轻病毒感染和症状出现的基础上, 借助电子显微观察以及 2 种 RCP 检测手段, 定量监测了施加几丁



聚糖后叶片中病毒粒子的累积状况,以病毒为研究重点,从微观的角度阐述了几丁聚糖的药效评价。我们的结果表明,供试药剂 0.5% 几丁聚糖水剂对番茄花叶病毒病有较好的防效,其防效随用药量的增加而明显提高,每 666.7 平方米使用制剂量 10.00 毫克/千克—50.00 毫克/千克连续 3 次施药后的防效可达 69.81%—80.61%,基本上能控制番茄病毒病,浓度越高防治效果越好。供试药剂对试验作物安全,无药害,对环境无不良影响,可大面积推广使用。几丁聚糖 (a.i. 0.5%) 对抑制已经感染番茄植物的病毒 TMV、TSWV 和 ToCV 的复制具有广泛的活性。电子显微镜发现,随着几丁聚糖施用量从一倍增加到三倍,病毒数量明显减少。qRT-PCR 进一步证实了这一点: TSWV 对几丁聚糖的抵抗力明显,随着施用量从 1 倍增加到 3 倍,番茄叶片中几丁聚糖的抗性逐渐降低至 75.31%。ToCV 和 TMV 对治疗更敏感,一次应用的抑制率分别达到 67.18% 和 78.61%。

田间试验和分子检测表明水溶性几丁聚糖 (a.i. 0.5%) 对多种病毒具有很强的灭活作用,可将番茄病毒病的严重程度降低 60-80%。鉴于病毒病的难治愈性,通常防治效果在 50% 以上即可在田间大力推广。Elvira Fiallo - Olivé 等[33]研究发现 ToCV 病毒现已成为危害多个地区番茄植株生长及果实品质的主要因素,本实验通过电镜负染观察方法并未检测到该病毒的典型性状,但对番茄样品的分子检测中除了扩增到 TSWV、TMV 之外,ToCV 条带的出现也表明了伴随着地域间的相互交流,ToCV 病毒也在逐步向西南地区扩展。

多项研究表几丁聚糖对植物病毒的植物保护模式是由于系统获得性抗性 (SAR),其中抗性蛋白和植物激素如 ABA、JA、PO、PPO 以及胍胍质附着可能被激活[34-38]。系统获得性抗性 (SAR) 是一种诱导抗性模式,可保护植物免受病原体感染。在植物暴露于病原体或经合成或天然试剂 (包括苯并噻二唑 (BTH)、宁南霉素和微生物) 处理后,已经提出了特定的防御信号通路[39-42]。这些途径包括先天病原体相关分子模式通过以下途径触发免疫受体信号转导抑制病原体感染[43]和效应器触发的免疫通过抗性蛋白识别病毒蛋白并激活免疫系统以抑制病毒免受全身感染。几丁聚糖作为一种众所周知的有机聚合物,被美国 and 欧盟的主管部门列为一般安全且免于注册的有机聚合物。它作为生物防治剂的应用被认为是环保的,有利于减少化学品的使用。

## 5 结论

田间试验结果表明番茄病毒病发病初期,使用太抗几丁聚糖 100-500 倍叶面喷施,间隔 7 天,持续 3 次,有效防止了病毒病的症状加剧,降低了病害严重程度,其作用机理是几丁聚糖 (a.i. 0.5%) 能降低番茄病毒的活性,抑制细胞中的病毒复制。我们的研究结果验证了水溶性几丁聚糖对植物病毒的治愈作用,为植物病害的防治铺平了道路。

## 参考文献

- [1] Wang Xifeng; Liu Yan; Han Chenggui; Wu Yunfeng; Zhao Zhonghua. Present situation and development strategies for the research and control of wheat viral diseases. *Plant Protection*. 2010.
- [2] Ng J C K; Falk B W. Virus-Vector Interactions Mediating Nonpersistent and Semipersistent Transmission of Plant Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44 (1): 183-212.
- [3] Jiawei Wang; Dongzi Zhu; Yue Tan; Xiaojuan Zong; Hairong Wei; Rosemarie W. Hammond; Qingzhong, Liu. Complete nucleotide sequence of little cherry virus 1 (LChV-1) infecting sweet cherry in China. *Archives of Virology*, 2016, 161 (3): 749-753.
- [4] Gao Xiquan; Cox Kevin L; He Ping. Functions of Calcium-Dependent Protein Kinases in Plant Innate Immunity. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2014, 3 (1): 160-76.
- [5] Zhang Rongzhi; Zheng Fengya; Wei Shugen; Zhang Shujuan; Li Genying; Cao Peijian; Zhao Shancen. Evolution of Disease Defense Genes and Their Regulators in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (2).
- [6] Valérie Nicaise. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. *Frontiers in Plant Science*, doi: 10.3389/fpls.2014.00660.
- [7] Singh K; Dardick C; Kundu J K. RNAi-Mediated Resistance Against Viruses in Perennial Fruit Plants. *Plants*, 2019, 8 (10): 359.
- [8] Sanfaçon; Hédane. Plant Translation Factors and Virus Resistance. *Viruses*, 2015, Vol. 7, Pages 3392-3419.
- [9] Mandadi K K; Scholthof K. Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *Plant Cell*, 2013, 25 (5): 1489-1505.
- [10] NJ Spence; A Mead; A Miller; ED Shaw; DGA Walkey. The effect on yield in courgette and marrow of the mild strain of zucchini yellow mosaic virus used for cross-protection. *Annals of Applied Biology*, 1996, 129 (2).



- [11] Yang Xiuling; Li Yinzi. Research Advances in Potyviruses: From the Laboratory Bench to the Field. *Annual Review of Phytopathology*, 2021, 59 (1).
- [12] Dodds J A; Lee S Q; Tiffany M. Cross protection between strains of cucumber mosaic virus: effect of host and type of inoculum on accumulation of virions and double-stranded RNA of the challenge strain. *Virology*, 1985, 144 (2): 301-309.
- [13] Su Qi. Defence priming in tomato by the green leaf volatile (Z)-3-hexenol reduces whitefly transmission of a plant virus. *Plant, Cell & Environment*, 2020, 43 (11).
- [14] Franco Faoro, Franco Gozzo. Is modulating virus virulence by induced systemic resistance realistic? *Plant Science*, 2015, 234: 1-13.
- [15] HS Younas; M Abid; M Shaaban; M Ashraf. Influence of silicon and chitosan on growth and physiological attributes of maize in a saline field. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2021, 1-11.
- [16] Jiuxing He. Functions of Oligosaccharides in Improving Tomato Seeding Growth and Chilling Resistance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2021, 1-11.
- [17] Nunzia; Rendina; Maria; Nuzzaci; Antonio; Scopa; Ann; Cuypers; Adriano; Sofo. Chitosan-elicited defense responses in Cucumber mosaic virus (CMV)-infected tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 234: 9-17.
- [18] Li Xiangyang; Hao Gefei; Wang Qingmin; Chen Zhuo. Ningnanmycin inhibits tobacco mosaic virus virulence by binding directly to its coat protein discs. *Oncotarget*, 2017, 8 (47).
- [19] Hazelton P R; Gelderblom H R. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations [J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9: 294-303.
- [20] LC Papayiannis; IS Harkou; YM Markou; CN Demetriou; NI Katis. Rapid discrimination of Tomato chlorosis virus, Tomato infectious chlorosis virus and co-amplification of plant internal control using real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2011, 176 (1-2): 53-59.
- [21] Juan, Carlos Cabrera; Johan, Messiaen; Pierre, Cambier; Pierre, Van Cutsem. Size, acetylation and concentration of chito oligosaccharide elicitors determine the switch from defence involving PAL activation to cell death and water peroxide production in Arabidopsis cell suspensions. *Physiologia Plantarum*, 2010, 127 (1): 44-56.
- [22] ALM Lacerda; LN Fonseca; R Blawid; LS Boiteux; SG Ribeiro; ACM Brasileiro. Reference Gene Selection for qPCR Analysis in Tomato-Bipartite Begomovirus Interaction and Validation in Additional Tomato-Virus Pathosystems. *PLoS one*, 2015, 10 (8): e0136820.
- [23] Zhang Zhongkai; Zheng Kuanyu; Dong Jiahong; Fang Qi; Hong Jian; Wang Xifeng. Clustering and cellular distribution characteristics of virus particles of Tomato spotted wilt virus and Tomato zonate spot virus in different plant hosts. *VIROL J*, 2016, 13.
- [24] L Jiang; Y Huang; L Sun; B Wang; X Tao. Occurrence and diversity of Tomato spotted wilt virus isolates breaking the Tsw resistance gene of *Capsicum chinense* in Yunnan, southwest China. *Plant Pathology*, 2017, 66 (6): 980-989.
- [25] Huan Liu; Kuan Wu; Wei Weili; Mi Xingan; Hao Yunfeng. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of six main RNA viruses in tomato plants. *Journal of Virological Methods*, 2018.
- [26] Mengnan An; Tao Zhou; Yi Guo; Xiuxiang Zhao; Yuanhua Wu. Molecular Regulation of Host Defense Responses Mediated by Biological Anti-TMV Agent Ningnanmycin. *Viruses*, 2019, 11, 815; doi: 10.3390/v11090815.
- [27] Jaimie R. Kenney; Marie-Eve Grandmont; Kerry E Mauck. Priming Melon Defenses with Acibenzolar-S-methyl Attenuates Infections by Phylogenetically Distinct Viruses and Diminishes Vector Preferences for Infected Hosts. *Viruses*, 2020, 12, 257; doi: 10.3390/v12030257.
- [28] Xiuling Yang; Yinzi Li; Aiming Wang. Research Advances in Potyviruses: From the Laboratory Bench to the Field. *Annual Review of Phytopathology*, 2021, 59 (1).
- [29] A El Hadrami; LR Adam; I El Hadrami; F Daayf. Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 2010, doi: 10.3390/md8040968.
- [30] Kenney J R; Grandmont M E; Mauck K E. Priming Melon Defenses with Acibenzolar-S-methyl Attenuates Infections by Phylogenetically Distinct Viruses and Diminishes Vector Preferences for Infected Hosts. *Viruses*, 2020, 12 (3): 257.
- [31] Orzali L; Corsi B; Forni C. Chitosan in agriculture: A new challenge for managing plant disease. *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*, 2017.
- [32] Silva Nayara Sousa da. Antimicrobial Activity of Chitosan Oligosaccharides with Special Attention to Antiparasitic Potential. *Marine Drugs*, 2021, 19 (2): 110-110.
- [33] BuzónDurán Laura; Natalia Langa-Lomba; Vicente González; José Casanova. On the Applicability of Chitosan Oligomers-Amino Acid Conjugate Complexes as Eco-Friendly Fungicides against Grapevine Trunk Pathogens. *Agronomy*, 2021, 11 (2): 324-324.

- [34] MND Silva; CS Santos; A Cruz; A López-Villamor; MW Vasconcelos. Chitosan increases *Pinus pinaster* tolerance to the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) by promoting plant antioxidative metabolism. Scientific Reports, 2021, 11 (1).
- [35] Zahir Shah Safari; Phebe Ding; Jaafar Juju Nakasha; Siti Fairuz Yusoff. Controlling *Fusarium oxysporum* Tomato Fruit Rot under Tropical Condition Using Both Chitosan and Vanillin. Coatings, 2021, 11 (3): 367.
- [36] Sadiq Shah; Majid Suhail Hashmi; Ihsan Mabood Qazi; Yasser Durrani. Pre-storage chitosan-thyme oil coating control anthracnose in mango fruit. Scientia Horticulturae, 2021, (284): 110139.
- [37] Marcello; Iriti; Franco; Faoro. 2008, Absciscic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). Plant Physiology and Biochemistry, 46 (12): 1106-1111.
- [38] Nandeeshkumar P; Sudisha J; Ramachandra K K; HS Prakash; SR Niranjana; SH Shekar. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2008, 72 (4-6): 188-194.
- [39] Faoro Franco; Marcello Iriti. Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens. Caryologia, 2007, 60 (1-2): 121-124.
- [40] Bhatti A. A.; Haq S.; Bhat R. A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. Microb. Pathog. 2017, 111, 458-467.
- [41] Onaka H. Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes. Journal of Antibiotics, 2017, 70, 865-870.
- [42] Deshan Xie; Xuewei Cai; Chunping Yang; Linjun Xie; Guangwei Qin; Min Zhang; Yong Huang; Guoshu Gong; Xiaoli Chang; Huabao Chen. Studies on the control effect of *Bacillus subtilis* on wheat powdery mildew. Pest management science, 2021, 77 (10).
- [43] Gouveia B. C.; Calil I. P.; Machado J. P.; Santos A. A.; Fontes E. P. Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. Front. Microbiol. 2016, 7, 2139.