

真菌病毒对植物病原物的生物防治作用及其研究进展

时婷婷, 覃茜, 张君成 (广西大学农学院, 广西南宁 530003)

摘要 综述了板栗疫病、玉米黑粉病、油菜菌核病利用真菌病毒来防治植物病原物的成功实例, 并分析了其致病机理, 通过其显著效果评述了生物防治植物病原物的意义, 并展望了该研究领域的应用前景。

关键词 真菌病毒; 致病力; 低毒力菌株; 生物防治; 生理特性

中图分类号 S432.4⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)03-131-02

The Biocontrol Effects and Research Advances of Mycoviruses against Plant Pathogens

SHI Ting-ting, QIN Qian, ZHANG Jun-cheng (Agricultural College of Guangxi University, Nanning, Guangxi 530003)

Abstract This paper summarized the successful instances of using mycoviruses to prevent and control plant pathogens, analyze its pathogenesis, at the same time review the meaning of biological control of plant pathogens through its significant effect on *Chestnut blight*, *Ustilago maydis* and *Rapesclerotiniarot*, in addition, the application prospect was forecasted.

Key words Mycoviruses; Pathogenicity; Low power strains; Biological control; Physiological characters

真菌病毒是以真菌为宿主的病毒。1962年英国的霍林斯等在电子显微镜(简称电真菌病毒镜)下从栽培蘑菇(*Agaricus*)中发现了与病害有关的3种病毒:直径为25和29 nm的球形病毒以及19 nm × 50 nm的短棒状病毒^[1]。Lampson等报道病毒的dsRNA是绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)产生干扰素诱导剂的来源; Klenschmidt等通过电镜在匍枝青霉(*P. stoloniferum*)的培养液或提取液(抗病毒部分)中发现了病毒颗粒; Banks等证实了匍枝青霉病毒(PsV)和绳状青霉病毒(PfV)都是dsRNA病毒; 姜道宏等从油菜菌核病的病原菌核盘菌致病力衰退菌株DT-8中分离鉴定出DNA病毒^[1]。

在真菌的各大类群中都发现过病毒, 约有100种真菌可被病毒感染, 包括1种病毒侵染几种真菌或1种真菌同时感染几种病毒。目前已知的真菌病毒有62种, 分布于50余属中, 其中仅蘑菇病毒就有5种类型。现有资料表明, 病毒和真菌之间的关系极为复杂, 真菌病毒已成为遗传学和分子生物学中很有价值的试验体系之一^[1]。为此, 笔者综述了真菌病毒在植物生物防治上的应用及其研究进展, 旨在为植物微生物学研究提供参考。

1 真菌病毒的形态特征和生理特性

1.1 真菌病毒的形态特征 大多数真菌病毒都是小的、球形或六边形颗粒, 直径为25~45 nm, 有单层衣壳(相当于高等动物或植物dsRNA病毒的内层衣壳), 分子量 $6 \times 10^6 \sim 131 \times 10^6$, 沉降系数为100~200 s, 少数为杆状、弯曲杆状、球棒状、线状病毒。如引起双孢蘑菇的病毒有直径19、25、29、34~35、50 nm的球状病毒和19~50 nm的杆状病毒, 其中直径25、35 nm的球状病毒和19~50 nm的杆状病毒最常见^[2]。

病毒通常分布在菌丝细胞的原生质或液泡内, 不规则聚合或有时在老菌丝体中呈晶格状排列, 并不与细胞核、线粒体或其他细胞相结合^[3]。真菌病毒不能以常规的摩擦或混合接种方法侵染菌体。在自然条件下, 病毒不是以细胞广泛裂

解的方式释放, 而是以菌体胞质割裂产生有性或无性孢子的方式传到后代——纵向传播; 或者由于病(带毒)、健康的可亲的菌丝、孢子之间融合发生胞质交换而传播——横向传播。

1.2 真菌病毒的生理特性 目前根据核酸类型不同将真菌病毒分为3种: dsRNA病毒、dsDNA病毒和ssRNA病毒。大多数真菌病毒属dsRNA, 如蘑菇(*A. bisporus*)、香菇(*Lentinus edodes*)、玉蜀黍长蠕孢(*Helminthosporium maydis*)及小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis*)^[4]。据Hollings(1979)统计, 在所有已知的dsRNA病毒中, 真菌病毒占第1位; 而大多数的植物病毒和脊椎动物病毒为ssRNA病毒^[1]。2010年5月4日, 国际权威刊物《美国科学院院刊》(PNAS)发表了华中农业大学微生物学国家重点实验室姜道宏教授课题组的研究结果, 报道他们从油菜菌核病的病原菌——核盘菌致病力衰退菌株DT-8中分离鉴定出DNA病毒(SsHADV-1), 并详细描述了菌株的菌落形态, 同时对该DNA病毒的序列结构、系统进化、转染以及传播特性进行了研究^[5]。近期他们与美国肯塔基大学研究人员共同努力, 发现在很简单的遗传转化条件下纯化的该病毒颗粒和寄生在核盘菌上的病毒颗粒均易转移到蔬菜病原菌核盘菌中, 能够进行胞外转移, 说明该DNA真菌病毒具有与RNA病毒完全不同的启动感染宿主的方式^[6]。目前发现属于ssRNA真菌病毒的是引起双孢蘑菇的17 nm × 50 nm的杆状病毒^[7]和香菇菌丝中一种直径为34 nm的球状病毒颗粒^[8]。

2 真菌病毒在植物病原真菌生物防治上的应用

2.1 板栗疫病 板栗疫病是由栗疫菌(*Cryphonectria parasitica* = *Endothia parasitica*)引起的栗树病, 主要表现为树皮及树干发生溃疡, 严重时可导致死亡。该病在国内外都相当普遍^[9-10]。在栗疫病菌的低致病力菌株中分离到dsRNA, 其对强毒力栗疫病菌的致病作用降低了栗疫病菌对栗树的侵染性^[11]。天然含dsRNA低毒力菌株的出现使得濒临灭绝的欧洲栗树林得以恢复。当然, 该种致病力作用或侵染性的降低也有可能是低毒力菌株对寄主植物的诱导抗病或位点竞争等保护作用^[4]。若干年来, 欧美等地用低毒力菌株进行生物防治取得了明显的治疗效果^[12]。低毒力菌株以其应用简

作者简介 时婷婷(1991-), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物真菌病害及其防治。

收稿日期 2014-12-11

便、无污染、成本低、效果明显等特点在生物防治中日益受到重视。

2.2 玉米黑粉病 毒素的产生是由特定的 dsRNA 和病毒颗粒决定的,黑粉菌具有 3 种杀伤型和 3 种免疫型,对 6 种菌株分析,都有直径 40 nm 的病毒颗粒,但 dsRNA 不相同,其致死体系至少是由 1 个核基因的 2 个等位基因控制的。黑粉菌的致死型菌株产生的胞外毒素杀死或抑制敏感型菌株,致死型菌株是自身免疫的,并且对属于同一专业化类群的其他致死菌株也是免疫的,而对不同专业化群的致死菌株是敏感的,该种致死-免疫特性是与胞质遗传和含有特殊的 dsRNA 片段的病毒颗粒的存在相关的。玉米黑粉菌生物防治的可行性是由其致死体系决定的。研究表明,玉米黑粉菌产生的胞外蛋白质毒(致死蛋白质 KP1、KP4 和 KP6)对相近的禾本科黑粉菌也有致死性。真菌病毒影响真菌产生次生代谢产物,没有病毒颗粒并不意味着没有病毒,可能是病毒在分解状态或其他尚未被识别的状态,但对寄主生理还是有影响的^[13]。

2.3 油菜菌核病 核盘菌引起的菌核病严重威胁到油菜和豆类等 450 多种植物的安全生产,是油菜的第一大病害。人们一直认为只有 RNA 病毒才能感染真菌,姜道宏教授课题组在油菜菌核病的病原菌-核盘菌致病力衰退菌株 DT-8 中分离鉴定出的真菌 DNA 病毒打破了这一观念,为真菌 DNA 病毒的进一步研究提供了理论支持。经脱毒处理过的 DT-8VF 菌株能重新恢复毒性形成正常菌落,将其与致病力衰退的 DT-8 菌株接触后又出现致病力衰退现象,为生物防治植物真菌病害开辟了广阔的研究前景。另外,该研究团队通过室内和 4 年田间的试验证明空气喷盾壳霉能用于油菜菌核病的生物防治^[14]。

预测核盘菌致病力衰退相关 DNA 病毒(SsHADV-1)能在田地中自然传播,其寄主范围可能扩大到其他重要的植物病原菌^[5]。通过感染马铃薯葡萄糖琼脂培养基上的核盘菌菌丝和拟南芥叶子等试验,结果表明该真菌病毒能抑制病原菌的扩繁,减缓病情的蔓延,同时能够显著提高野外培养油菜籽的产量,为开发新的天然生物农药提供了新的思路 and 方向。

综上,真菌病毒对植物病原真菌的生物防治作用主要存在 3 种机理:低毒力菌株的产生;其代谢物对病原物的致死作用;保护作用。

3 真菌病毒在植物病原真菌生物防治上的意义与展望

化学污染最重要、最直接的根源是农药、化肥的不断追加和非理性施用,给生态环境造成的污染和破坏与日俱增^[15]。现今,控制真菌病害的主要方法依然是使用化学杀菌剂,为了减少杀菌剂的使用,开发一种既高效又环保的方法来有效控制真菌病害十分必要。例如,用活体微生物来防治有害生物的微生物体农药包括了以细菌、真菌、昆虫、病毒、线虫以及拮抗微生物所开发的农药等。目前我国能大规模生产的生物农药品种主要有 4 个,即苏云金芽孢杆菌、井冈霉素、阿维菌素和赤霉素^[16]。病毒与真菌次生代谢产物

关系以及利用病毒防治植物病原真菌病害可以从生态角度出发,保护环境,减少化学农药带来的弊端,提高自然防护系统的扩展。

真菌中 dsRNA 致死因子的存在是一种重要的生物学现象^[17]。近年来对 *B. cinerea* 低毒力菌株的研究较热门,它是继 *E. parasitica* 后又一研究焦点,可作为生物防治的手段之一^[18]。国内于云南、广西找到低毒力菌株,成功地实现了低毒力基因转移,使强毒力菌株基因转变为低毒力菌株^[12]。研究低毒力相关的 dsRNA 与其他真菌病毒 dsRNA 的关系,可为真菌病毒 dsRNA 的基础研究以及调控病原真菌 dsRNA 对寄主的毒力提供依据^[19]。另外,国际上首次有关真菌 DNA 病毒报道,不仅拓宽了人们对病毒生态学及进化的认识,也为进一步利用真菌 DNA 病毒防治植物菌核病提供了新途径。

将真菌病毒应用于生产实际,需要解决的问题很多,植物的栽培条件、栽培措施、自然环境、微生态环境、真菌病毒的形态稳定性等因素都影响真菌病毒发挥作用,因此利用真菌病毒进行大田防病,必须考虑它的生态学、病理学和形态学等方面的影响。另外,真菌病毒的分离及筛选方法也有需改进和完善之处。

真菌病毒特殊的致病作用决定了真菌病毒既有理论研究的广度和深度,又有多方面的应用潜力,是个潜力巨大、尚待开发的微生物新资源。一方面,在长期的进化过程中它们与宿主真菌之间的诱导抗性 or 位点竞争关系能够减轻病原真菌的致病作用;另一方面,认为它们能够产生多种生物活性物质,所以可以用于包括生物农药在内的药物研发。因此,开展植物真菌病毒的研究不仅对植物微生物学科的基础研究有重要的理论价值,而且对农业可持续发展也有重要的实践意义^[20]。

参考文献

- [1] 裴维蕃. 植物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1985:331-338.
- [2] 梁平彦, 陈开英. 立枯丝核菌的 dsRNA 与致病力的研究[J]. 微生物学报, 1992, 32(2): 91-98.
- [3] USHIYAMA R. Studies on a virus associated with shiitake Mushroom, *Lentinus edodes*[J]. Repors of the Tottori Mycological Institute, 1983, 21(1): 1-60.
- [4] 胡开辉, 陈体强. 植物病原真菌及食用菌病毒研究及进展[J]. 福建农业学报, 1999, 14(S1): 190-200.
- [5] Genomics and Applied Biology (GAB). 中国科学家发现首例真菌 DNA 病毒[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(3): 409-410.
- [6] 吴慧玲. DNA 真菌病毒可作为天然杀虫剂[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(2): 198.
- [7] MYHEW D W, COOK A L, GULYA T J. Isolation and characterization of a mycovirus from *Plasmopara halstedii* [J]. Can J Bot, 1992, 70: 1734-1737.
- [8] 沈学仁, 陈明杰. 一种含有单链 RNA 的香菇球状病毒[J]. 中国病毒学报, 1992, 7(1): 99-105.
- [9] 于远斌, 齐邦显, 驰昌. 用神平液防治栗疫病的试验[J]. 森林病虫害通讯, 1988(2): 24-25.
- [10] 陈秀虹. 板栗溃疡病疫菌的名称[J]. 西南林学院学报, 1988(1): 68-76.
- [11] 梁平彦, 周淑敏. 来源不同 V-C 组不同的小麦全蚀病菌病毒的特性[J]. 病毒学杂志, 1989(1): 68-75.
- [12] 全勇, 梁平彦, 陈开英, 等. 我国和欧美栗疫菌低毒株 dsRNA 同源性比较[J]. 微生物学报, 1994, 34(1): 1-5.
- [13] 覃瑛. 真菌病毒的研究进展[J]. 广西农业科学, 2005(3): 280-283.

样品敷育,洗板后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG。经洗涤,加底物显色后,2 mol/L 硫酸终止,测定 450 nm 处光吸收值。利用 Check board 法,确定最适包被偶联物和抗体的浓度,以百分吸光度对 AHD 浓度的对数作图,绘制标准曲线(图 5),其中百分吸光度值的计算公式如下:

$$\text{百分吸光度值}(\%) = (B/B_0) \times 100$$

式中, B 为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值; B_0 为 0 ng/ml 标准溶液的平均吸光度值。

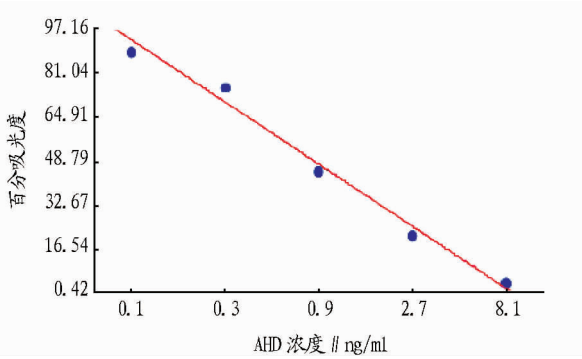


图 5 呋喃妥因代谢物的酶免疫试剂盒的标准曲线

2.4 交叉反应性 1 个好的抗体要求其特异性要好。测定了 A007 号抗体和呋喃唑酮的代谢物 AOZ、呋喃它酮的代谢物 AMOZ、呋喃西林的代谢物 SEM 的交叉反应性,先将代谢物用邻硝基苯甲醛进行衍生,然后测定半数抑制浓度 IC_{50} ,发现交叉反应性均少于 0.1% (表 4)。

表 4 抗体与呋喃妥因及其他硝基呋喃代谢物的交叉反应

品名	IC_{50} / ng/ml	交叉反应性 (CR, %)
海特因	0.9	100
AOZ	> 1 000	< 0.1
AMOZ	> 1 000	< 0.1
SEM	> 1 000	< 0.1

3 讨论

作为完全抗原其分子结构上需要同时具备 T 细胞和 B

细胞表位,小分子物质结构简单,难以同时具有这 2 种表位,需先将它接种到载体蛋白上,借助载体蛋白的 T 细胞表位间接诱导 B 细胞的活化、增值,才能诱导产生针对小分子半抗原的抗体。常用的载体蛋白有铜蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白、结核杆菌毒素蛋白和人工合成的多抗原肽系统。

蛋白质上常用来连接小分子的基团有氨基、羧基、巯基、酪氨酸的苯环等。小分子与蛋白质相连的位置、臂长等直接影响抗体对小分子的亲合力。邻硝基苯甲醛和海特因的衍生物没有直接连接到蛋白质上的基团,利用间羧基苯甲醛与海特因的衍生物上的羧基跟蛋白质上的氨基相连,虽然苯环上少了 1 个硝基,多了 1 个羧基,但作出的抗体跟邻硝基苯甲醛和海特因的衍生物仍有很强的亲和力。ELISA 检测结果可以精确到 0.1 ng/ml。

单克隆抗体具有结构均一、重复性好、细胞株可以冷冻保存、易于生产的优点。该研究制备的单抗具有特异性高、灵敏的优点,可为开发 ELISA 酶联检测试剂盒以及方便、快速检测呋喃妥因残留奠定了基础。

参考文献

- [1] 傅国, 李宁毅. 硝基呋喃类和硝基咪唑类的研究进展[J]. 青岛大学医学院学报, 2003, 39(4): 486-488.
- [2] MCOSKER C C, FITZPATRICK P M. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens[J]. J Antimicrob Chemother, 1994, 33(SA): 23.
- [3] ASIM K D, CORWIN H. Mechanistic interpretation of the geno-toxicity of nitrofurans using quantitative structure-activity relationship and comparative molecular field analysis[J]. J Med Chem, 1993, 36: 1007.
- [4] VROOMEN L H M, BERGHMANS M C J, VAN LEEUWEN P, et al. Kinetics of 14C-furazolidone in piglets upon oral administration during 10 days and its interaction with tissue macromolecules[J]. Food Addit Contam, 1986, 3: 331-346.
- [5] HEDDY ZOLA. 单克隆抗体手册[M]. 周宗安, 等, 译. 南京: 南京大学出版社, 1991: 48-63.
- [6] 郭德华, 汪国权, 王东辉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中硝基呋喃类代谢物残留量[J]. 化学分析计量, 2005, 14(4): 16-18.
- [7] VASS M, KOTKOVA L, DIBLIKOVA I, et al. Production and characterisation of monoclonal antibodies for the detection of AOZ, a tissue bound metabolite of furazolidone[J]. Vet Med Czech, 2005, 50(7): 300-310.
- [8] ROBYN L, HOWITT J. Genome characterization of Botrytis virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant 'potex-like' viruses[J]. Journal of Neel Virology, 2000, 82: 67-78.
- [9] ENEBAK S A, HILLMAN B L, MACDONALD W L. A hypovirulent isolate of *Cryphonectria parasitica* with multiple, genetically unique dsRNA segments[J]. The American Phytopathological Society, 1994, 7(5): 590-595.
- [10] 林玲, 乔勇升, 顾本康, 等. 植物内生细菌及其生物防治植物病害的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2008(6): 102-109.
- [11] LI G Q, HUANG H C, MIAO H J, et al. Biological control of sclerotinia diseases of rapeseed by aerial applications of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2006, 114(4): 354-365.
- [12] 谢联辉. 21 世纪我国植物保护问题的若干思考[J]. 中国农业科技导报, 2003, 5(5): 5-7.
- [13] 施跃峰. 试论生物农药产业及其在我国的发展策略[J]. 安徽农学通报, 2004(4): 85-89.
- [14] 田波, 龚祖焜. 病毒与农业[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 245-258.

(上接第 132 页)