湖南农业大学学报(自然科学版)　2017, 43(2):176–179. DOI:10.13331/j.cnki.jhau.2017.02.012
Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)

投稿网址：http://xb.hunau.edu.cn

稻瘟病菌 dsRNA 病毒筛选及其对寄主的影响

李斌[1,2]，陈传远[1,2]，钟杰[1,2*]，高必达[1,2*]

(1.湖南农业大学植物保护学院，湖南 长沙 410128；2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室，湖南 长沙 410128)

摘　要：应用纤维素吸附法对 60 个稻瘟病菌株进行真菌病毒筛选，发现 14 个菌株含有 dsRNA 病毒。对带毒菌株 GD45 通过利巴韦林–高温结合方法得到衍生脱毒菌株 GD45–4，与带毒菌株相比，其菌丝更为饱满、菌丝较直，在 PDA 平板上菌落形态显得更为蓬松，颜色偏白。推测菌株 GD45 dsRNA 病毒消除后会对其表现型产生一定影响。

关　键　词：稻瘟病菌；dsRNA；弱毒菌株

中图分类号：S435.111.4^{+}1　　文献标志码：A　　文章编号：1007–1032(2017)02–0176–04

Screening of dsRNA viruses and their impacts on *Magnaporthe oryzae*

LI Bin[1,2]，CHEN Chuanyuan[1,2]，ZHONG Jie[1,2*], GAO Bida[1,2*]

(1.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, China)

Abstract: In this study, we screened the presence of mycoviruses from a collection of 60 *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*) strains using the cellulose chromatography method and found that 14 strains harbored dsRNAs. A virus–curing derivative strain GD45–4 was obtained from the dsRNA–infecting strain GD45 by high temperature–ribavirin combined virus–curing methods. When compared to the original strain GD–45, strain GD45–4 showed a more full and straight hypha, and a whiter and fluffier colony morphology on PDA, indicating the elimination of dsRNAs affected the phenotype of strain GD45.

Keywords: *Magnaporthe oryzae*; dsRNA; hypovirulent strain

真菌病毒广泛存在于植物病原真菌中[1–2]。大部分真菌病毒对寄主表现为潜伏侵染，但有部分真菌病毒能引起寄主表型异常，即弱毒现象，表现为菌落形态异常、菌丝生长减缓、产孢减少、致病力减弱等。这类真菌病毒被认为是一种潜在的生防因子，可以用来防治植物真菌性病害。利用板栗疫病弱毒相关真菌病毒防治欧洲板栗疫病是真菌病毒生物防治实践应用的成功例子[3–4]。从核盘菌中首次发现 ssDNA 病毒 SsHADV–1 能显著降低田间油菜菌核病的发病率[5–7]。随着越来越多的弱毒相关真菌病毒的发现，真菌病毒作为生物防治的新途径显示出巨大的潜力[8–11]。

笔者采用纤维素吸附法对 60 个稻瘟病菌株进行了 dsRNA 筛选，筛选出 14 株带毒菌株，对带毒菌株进行脱毒处理后发现，脱毒菌株与原始菌株之间具有表现型差异，现将结果报道如下。

1　材料与方法

1.1　供试菌株

60 个稻瘟病菌株，由植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室保存。

收稿日期：2016–10–09　　修回日期：2017–01–20

基金项目：公益性行业(农业)科研专项(201103016)；湖南农业大学青年科学基金项目(16QN34)

作者简介：李斌(1991—)，男，湖南张家界人，硕士研究生，主要从事真菌病毒学研究，122642853@qq.com；*通信作者，钟杰，博士，副教授，主要从事真菌病毒学研究，wzzhtx@sina.com；高必达，博士，教授，主要从事分子植物病理学研究，bdgao@hunau.edu.cn

1.2　方法

1.2.1　稻瘟病菌 dsRNA 病毒检测

利用纤维素吸附法[12]提取稻瘟病菌 dsRNA 病毒。粗提 dsRNA 采用 DNase I 和 S1 核酸酶去除 DNA 和 ssRNA。采用 1%琼脂凝胶进行电泳，用凝胶成像仪观察电泳结果。

1.2.2　带毒菌株病毒的消除

参照 Aoki 等[13]的方法，采用利巴韦林高温尖端脱毒结合的方法对带毒菌株病毒进行消除。将带毒菌株接入含有利巴韦林的 PDA 培养基上，置于 33 ℃恒温箱培养。待长出新鲜菌丝，挑取菌丝尖端置于新的含有利巴韦林的 PDA 培养基上，连续转接 4 代。对病毒消除菌株经 3 次重复的 dsRNA 检测验证。

1.2.3　脱毒菌株的生物学特性观察

1) 菌落及菌丝形态观察。将带毒菌株与病毒消除后的衍生菌株接种于 PDA 和番茄燕麦培养基上，28 ℃恒温培养，7 d 后观察菌落形态和菌丝形态。

2) 菌丝生长速度观察。打取直径为 5 mm 菌饼，接于 PDA 培养基平板，28 ℃恒温培养，每间隔 24 h 采用十字交叉法，测定记录 1 次菌落直径，每个菌株 3 次重复。

3) 病原菌致病力测定。采用叶片离体划伤接种法[14]。接种后的叶片置于 28 ℃、相对湿度 100%的光照培养箱黑暗放置 1 d 后，光照放置 3 d 左右。以接种燕麦片培养基的处理为对照，每个处理重复 3 次。随时观察发病情况。

2　结果与分析

2.1　稻瘟病菌病毒 dsRNA 的筛选结果

通过纤维素吸附法对 60 株稻瘟病菌菌株进行病毒的初步检测，发现 14 株菌株内可能含有 dsRNA，含病毒率 23.3%，dsRNA 条带大小在 1 000 bp 到 15 000 bp，如图 1 所示。经多次提取发现，菌株 GD29、GD45、GD55 和 GD56 的 dsRNA 含量较高，且稳定存在。为了确定 dsRNA 对稻瘟病的影响，选取代表菌株 GD45 进一步研究。

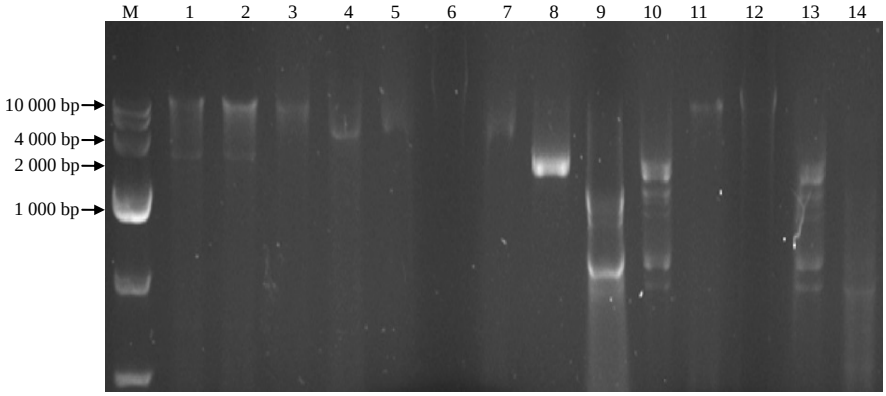


图 1　稻瘟病菌真菌病毒的电泳图谱

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis of the dsRNA extractions from *M. oryzae* strains

对菌株 GD45 采用采用纤维素吸附法进行 dsRNA 提取，提取物经过 DNase I 和 S1 Nuclease 处理去除污染的 DNA 和 ssRNA 后，进行琼脂糖凝胶电泳。结果显示该菌株内病毒 dsRNA 含有 3 条带，相对分子质量在 3 kb 左右(图 2)。

2.2　带毒菌株病毒消除结果

采用利巴韦林高温消除法对菌株 GD45 消除真菌病毒，经过连续 4 代培养发现，菌株 GD45 所携带的病毒已消除，如图 3 所示，该衍生菌株被命名为 GD45–4。

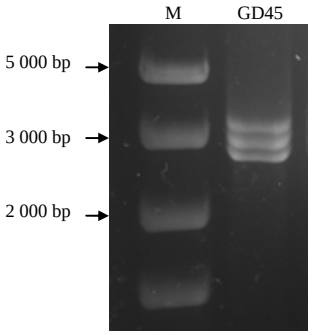


图 2　菌株 GD45 的 dsRNA 电泳图谱

Fig.2　Agarose gel electrophoresis of the dsRNAs extracted from the GD45 strain

2.3 脱毒菌株的生物学特性

GD45 菌株及 GD45–4 菌株的菌落形态及菌丝形态如图 4 所示。GD45 菌落呈灰色至灰白色，菌丝紧凑，气生菌丝较少；GD45–4 菌株，白色气生菌丝较 GD45 多，菌丝蓬松，在番茄燕麦培养基上尤为明显。GD45 菌株菌丝纠结成团，而 GD45–4 菌株菌丝较直，很少纠结在一起。

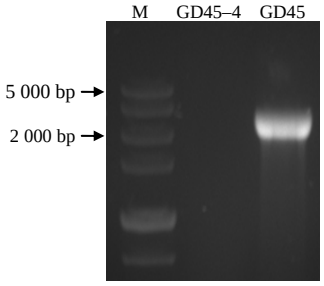
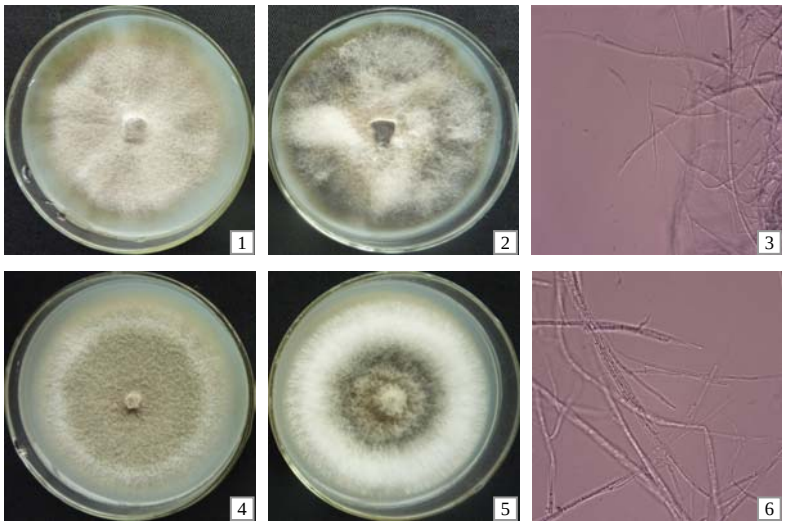


图 3 菌株 GD45 和 GD45–4 的 dsRNA 电泳图谱

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of dsRNAs extracted from the *M. oryzae* strains GD45 and GD45–4



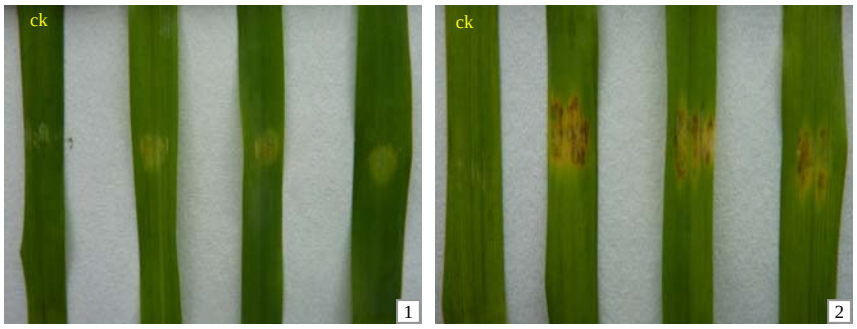
1，2 GD45 和 GD45–4 在 PDA 培养基菌落形态；3，4 GD45 和 GD45–4 在番茄燕麦培养基菌落形态；5 GD45 菌丝形态；6 GD45–4 菌丝形态。

图 4 GD45 与 GD45–4 菌落及菌丝形态

Fig.4 Colony and hypha morphology of strain GD45 and GD45–4

经测算，GD45–4 菌株菌丝生长速率(7 mm/d)，比 GD45 菌株(6.7 mm/d)略快，差异较小，推测 GD45 菌株中 dsRNA 病毒对生长速率没有影响。

离体接种结果(图 5)表明，GD45–4 的致病力强于 GD45。推测 GD45 中所含 dsRNA 病毒可能引起寄主致病力减弱。



1 接种 GD45；2 接种 GD45–4。

图 5 菌株 GD45 与 GD45–4 的致病力

Fig. 5 Pathogenicity of strain GD45and GD45–4

3 结论与讨论

对 60 株稻瘟病菌株进行了 dsRNA 病毒的初步筛选，筛选出 14 株含有真菌病毒的稻瘟病菌株，对病毒含量和稳定性都较高的菌株 GD45 通过利巴韦林高温尖端消除法进行脱毒，脱毒菌株 GD45–4 表现型与 GD45 存在一定差异，致病力更强。

为了确定 GD45 中 dsRNA 病毒与寄主的关系，

后续将对该病毒进行全基因组测序，明确其基因组结构和分类地位，对于含有病毒粒子的病毒，拟通过提取病毒粒子进行转染来进一步验证病毒对寄主的作用。

感谢广东省农业科学院植物保护研究所朱小源研究员提供部分稻瘟病菌株。

参考文献：

[1] GHABRIAL S A，SUZUKI N．Viruses of plant pathogenic fungi[J]．Annu Rev Phytopathol，2009，47：353–384．

[2] XIE J，JIANG D．New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases[J]．Annu Rev Phytopathol，2014，52：45–68．

[3] NUSS D L．Biological control of chestnut blight：an example of virus–mediated attenuation of fungal pathogenesis[J]．Microbiological Reviews，1992，56(4)：561–576．

[4] NUSS D L．Hypovirulence：mycoviruses at the fungal–plant interface[J]．Nat Rev Microbiol，2005，3(8)：632–642．

[5] YU Xiao，LI Bo．Age minivirus–related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2010，107(18)：8387–8392．

[6] YU X，LI B，FU Y，et al．Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2013，110(4)：1452–1457．

[7] LIU S，XIE J，CHENG J，et al．Fungal DNA virus infects a mycophagous insect and utilizes it as a transmission vector[J]．Proceedings of the National Academy of Sciences，2016，113(45)：12803–12808．

[8] XIE J，WEI D，JIANG D，et al．Characterization of debilitation–associated mycovirus infecting the plant–pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. J Gen Virol，2006，87(1)：241–249．

[9] CHIBA S，SALAIPETH L，LIN Y H，et al．A novel bipartite double–stranded RNA mycovirus from the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*：molecular and biological characterization，taxonomic considerations，and potential for biological control[J]．J Virol，2009，83(24)：12801–12812．

[10] XIAO X，CHENG J，TANG J，et al．A novel partitivirus that confers hypovirulence on plant pathogenic fungi[J]. Journal of Virology，2014，88(17)：10120–10133．

[11] GHABRIAL S A，CASTón J R，JIANG D，et al．50–plus years of fungal viruses[J]．Virology，2015，479：356–368．

[12] MORRIS T J，DODDS J A．Isolation and analysis of double–stranded RNA from virus–infected plant and fungal tissue[J]．Phytopathology，1979，69(8)：854–858．

[13] AOKI N，MORIYAMA H，KODAMA M，et al．A novel mycovirus associated with four double–stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternate* [J]. Virus research，2009，140(1)：179–187．

[14] 张海旺，房文文，刘翠翠，等．离体水稻叶片划伤接种鉴定稻瘟菌的致病型[J]．植物保护，2014，40(5)：121–125．

责任编辑：罗慧敏
英文编辑：罗　维