

# 平菇病毒 dsRNA 的提取及脱除

付月月, 杨洪一

(东北林业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:**以平菇为试材,采用改进 SDS 法从平菇组织中提取病毒特异 dsRNA,并分别采用化学药剂-菌丝尖端处理和高温-菌丝尖端处理对平菇中的病毒进行了脱毒处理。结果表明:病毒 dsRNA 特点显示其与国外报道的平菇病毒 dsRNA 一致。其中高温-菌丝尖端脱除处理的效果最好,可有效脱除平菇病毒;病毒唑、放线菌酮及病毒唑与盐酸吗啉胍联合菌丝尖端脱除处理,可使病毒 dsRNA 条带减弱。该试验建立了从平菇组织中提取病毒 dsRNA 的技术体系,可有效对平菇中的病毒进行鉴定。

**关键词:**平菇;dsRNA;脱毒

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0111-03

平菇属伞菌目(Agaricales)侧耳科(Pleurotaceae)侧耳属(*Pleurotus*),是我国广泛栽培的一种食用菌。平菇营养丰富,子实体味道鲜美、肉质肥嫩,是一种高蛋白、低脂肪的食品。随着平菇栽培时间的延长,平菇病毒病日趋严重,导致平菇产量和品质严重下降,制约了平菇生产的发展和菇农经济效益的提高<sup>[1]</sup>。

食用菌病毒的检测主要通过电子显微镜技术、血清学方法、dsRNA 技术、PCR 技术等进行,其中 dsRNA 技术是目前检测食用菌病毒较常用的方法。dsRNA 技术的基本方法是将含有去垢剂、抗氧化剂及螯合剂的缓冲液和有机溶剂加入充分磨碎的食用菌菌丝或子实体组织中,使其变性去除蛋白质,且没有复制的中间体和复制形式的 dsRNA 被分离出来,样品中的 dsRNA 在 17% 乙醇的作用下,被纤维素粉吸附,之后再洗脱下来,达到提取、纯化的目的<sup>[2]</sup>。

食用菌病毒的脱除主要借鉴植物病毒脱除的策略,主要采用热处理、菌丝尖端脱毒处理、药剂处理技术<sup>[3]</sup>。热处理的原理是基于病毒粒子不耐高温,高温条件下使病毒钝化,然后选择适当的温度和处理时间,抑制病毒繁殖、延缓其扩散速度,使寄主细胞的生长速度超过病毒扩散速度,从而在高温下长出的新菌种可能不带有病毒。菌丝尖端脱毒处理主要通过多次切取菌丝尖端来获得无病毒菌种的措施。药剂处理技术则通过化学药剂来抑制病毒增殖,从而起到脱毒的目的。

为了解平菇的受病毒侵染状况,该研究利用 dsRNA 技术对生产中的一些平菇菌种的病毒侵染状况进行了鉴定,获得了较多受病毒侵染的菌株,在此基础上,进一步结合多种策略对病毒脱除进行了探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

平菇菌株保存于东北林业大学微生物学实验室;平菇子实体购自农贸市场。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 dsRNA 提取** 由参考文献[4]的 dsRNA 提取方法改进而成,具体步骤如下:适量平菇子实体或菌丝,加入 2×STE 缓冲液,在匀浆机中匀浆。取 500 μL 液体,加入 500 μL 酚:氯仿:异戊醇:混合液(25:24:1)、50 μL 体积分数为 10% SDS 和 15 μL β-巯基乙醇,涡旋混匀 3 min。4℃ 12 000 r/min 离心 3 min,收集上清液。用无水乙醇将上清液调至含 17% 乙醇的混合液,涡旋混匀。加入 0.06 g CF-11 纤维素粉,涡旋 3 min 后 4℃ 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入 1 mL 含有 17% 乙醇的 1×STE 混合液,涡旋 3 min 后于 4℃ 12 000 r/min 离心 3 min,弃上清液;重复该步骤多次,直至离心管中的纤维素粉颜色变白为止。加入 400 μL 不含乙醇的 1×STE,涡旋 3 min 后 4℃ 12 000 r/min 离心 3 min,收集上清液。上清液按 2:3 的比例加入预冷的异丙醇,混匀后-20℃ 静置 5 min,随后于 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。沉淀溶于 30~50 μL TE 溶液中,-20℃ 保存。采用常规琼脂糖凝胶电泳对提取的 dsRNA 进行分析。

**1.2.2 高温-菌丝尖端脱毒处理** 切取 PDA 平板最边缘的 3~5 mm 幼嫩菌丝,经高温 34℃ 培养后再次切取,

**第一作者简介:**付月月(1986-),女,硕士,研究方向为食用菌学。E-mail:fuyueyue045186@163.com

**责任作者:**杨洪一(1978-),男,博士,副教授,现主要从事微生物学研究等工作。E-mail:hyi01@tom.com

**收稿日期:**2013-01-16

连续切取 4 次<sup>[3]</sup>。

1.2.3 化学药剂-菌丝尖端处理 PDA 平板中分别加入病毒唑、放线菌酮,或同时加入病毒唑与盐酸吗啉胍,之后切取 PDA 平板最边缘的 3~5 mm 幼嫩菌丝进行脱毒处理,连续切取 4 次<sup>[3]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 平菇病毒 dsRNA 的提取

利用改进的 SDS 法,以平菇子实体或菌丝体为试材,提取出了平菇病毒特异 dsRNA。提取结果见图 1。由图 1 可知,提取样品中包含 DNA、核糖体 RNA 和病毒 dsRNA,其中病毒 dsRNA 共 3 条,大小约为 2.5、2.0 和 1.8 kb。基于 dsRNA 特点,该病毒与国外报道的平菇病毒是同一种病毒,其可能为双分体病毒<sup>[5-7]</sup>。

常规病毒 dsRNA 提取时一般采用 DNA 酶酶解 DNA,采用 RNA 酶酶解 RNA,该研究前期试验中显示酶解过程在酶解 DNA 和 RNA 的同时也会破坏 dsRNA,因而该研究中去除了酶解过程。

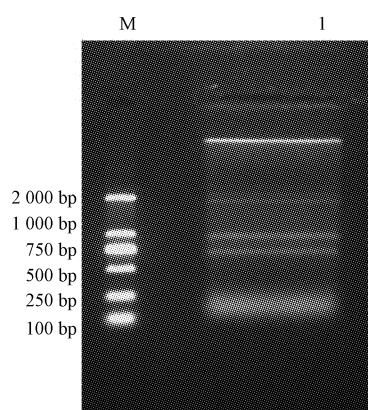


图 1 平菇病毒 dsRNA 提取

注:M;DL 2 000 Marker;1:平菇病毒 dsRNA。

Fig. 1 Extraction of viral dsRNA from *Pleurotus ostreatus*

Note:M;DL 2 000 Marker;1:Viral dsRNA from *Pleurotus ostreatus*.

### 2.2 平菇病毒的脱除

通过切取 PDA 平板最边缘的 3~5 mm 幼嫩菌丝,经高温 34℃ 培养后再次切取,连续切取 4 次,经提取病毒 dsRNA 鉴定,该方法可有效脱除病毒。图 2 为高温-菌丝尖端脱毒处理后菌株的 dsRNA 提取结果。可见,经过该方法处理,脱毒菌株未见病毒特异 dsRNA 条带,仅见菌株 DNA 和核糖体 RNA 条带,而未处理菌株则可见明显病毒特异 dsRNA 条带。

分别利用病毒唑、放线菌酮及病毒唑与盐酸吗啉胍联合进行脱毒处理,并结合菌丝尖端切除脱毒技术对平菇病毒进行了脱除。由图 3 可知,病毒唑、放线菌酮结合菌丝尖端切除处理,未能有效脱除病毒,但病毒 dsRNA 条带减弱,推测可能病毒的复制受到一定影响。病毒唑与盐酸吗啉胍联合并结合菌丝尖端切除脱毒也

未能脱除病毒,但病毒 dsRNA 条带极弱,仅可见少量模糊 dsRNA 条带。此外,也未见菌株核糖体 RNA 条带。

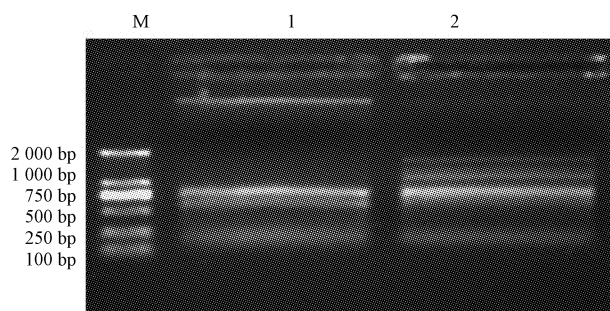


图 2 高温-菌丝尖端脱毒处理结果

注:M;DL 2 000 Marker;1:利用高温-菌丝尖端脱毒处理脱除病毒;2:未进行脱毒处理。

Fig. 2 Elimination of virus with the high temperature-mycelial tip-cutting method

Note: M; DL 2 000 Marker; 1; Elimination of virus with the high temperature-mycelial tip-cutting methods; 2; Unsettled sample.

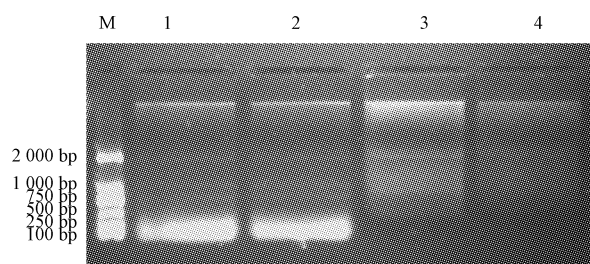


图 3 化学药剂-菌丝尖端脱毒处理结果

注:M;DL 2 000 Marker;1:病毒唑-菌丝尖端脱毒处理;2:放线菌酮-菌丝尖端脱毒处理;3:未进行脱毒处理;4:病毒唑与盐酸吗啉胍联合并结合菌丝尖端切除脱毒处理。

Fig. 3 Elimination of virus with reagent-mycelial tip-cutting method

Note:M;DL 2 000 Marker;1;Ribavirin-mycelial tip-cutting method;2;Cycloheximide-mycelial tip-cutting method;3;Unsettled sample;4;Ribavirin and moroxydine hydrochloride-mycelial tip-cutting method.

## 3 结论与讨论

该研究建立了从平菇子实体或菌丝体中提取病毒特异 dsRNA 的技术体系,该技术可有效对平菇中的病毒进行鉴定。提取病毒的 dsRNA 条带与国外报道的大小一致。分别采用化学药剂-菌丝尖端处理和高温-菌丝尖端处理对平菇中的病毒进行了脱毒处理,其中高温-菌丝尖端脱除处理的效果最好,可有效脱除平菇病毒;病毒唑、放线菌酮及病毒唑与盐酸吗啉胍联合菌丝尖端脱除处理,使病毒 dsRNA 条带减弱,可能干扰了病毒的复制,但其具体机制尚不确切。

研究中显示,市场中销售的平菇子实体多受病毒侵染,说明该病毒可能已在国内随菌种销售而广泛扩散,因而有必要对菌种进行大规模筛查,提高菌种质量。

# 多菌灵对豇豆枯萎病病原菌抑菌效果及包衣后对种子生活力的影响

于海龙, 古瑜, 韩启厚, 夏俊峰, 周彦辉, 王钦

(天津科润蔬菜研究所, 天津 300384)

**摘要:**以“丰豇一号”豇豆为试材,研究了不同浓度多菌灵对豇豆枯萎病的抑制效果。结果表明:多菌灵抑制豇豆枯萎病的最佳浓度为 400 mg/L。应用该浓度对豇豆种子进行包衣后,对豇豆种子的出苗率和成苗率、苗期长势影响较小,较耐储藏,可以在豇豆种子包衣生产中的应用。

**关键词:**豇豆枯萎病;包衣;种子生活力

**中图分类号:**S 436.43 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0113-03

豇豆枯萎病是半知菌亚门真菌尖孢镰刀菌嗜导管专化型 *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *tracheiphilum* (E. F. Smith) Snyd. et Hans 引起的一种典型土传病害。近年来在一些豇豆主要种植区,由于多年的重茬种植,

豇豆枯萎病逐渐成为豇豆上发病最重、危害最大、防治最困难的病害之一,严重影响豇豆的种植效益<sup>[1-2]</sup>。

种子包衣技术目前已经广泛应用于粮食种子和蔬菜种子的加工处理。据文献报道,在普通包衣剂中加入杀菌剂,可以通过包衣剂在土壤中的缓慢释放,杀死种子本身携带的和周围土壤中存在的病原菌,或部分药剂被植株根系吸收,传导到植株地上部,杀死侵入的病害,促进植株生长<sup>[3-4]</sup>。因此,尤其对土传病害防治效果明显。

**第一作者简介:**于海龙(1980-),男,硕士,助理研究员,现主要从事菜豆及豇豆的新品种选育及繁育等研究工作。

**收稿日期:**2013-01-31

## 参考文献

- [1] 周素静. 平菇菌株病毒脱除技术研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2009.
- [2] 邱立友, 戚元成, 李彦鹏, 等. dsRNA 技术在食用菌病毒研究中的应用[J]. 菌物学报, 2007(26):140-148.
- [3] 张朝辉, 刘映森, 戚元成, 等. 食用菌病毒脱毒方法的比较[J]. 病毒学报, 2010, 30(2):249-254.
- [4] 李贺, 代红艳, 张志宏, 等. 草莓植株中病毒 dsRNA 的分离和鉴定[J]. 中国农业科学, 2006, 39(1):145-152.

- [5] Yu H J, Lim D B, Lee H S. Characterization of a novel single-strand RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*[J]. Virology, 2003, 314:9-15.
- [6] Won S L, Ji H J, Rae D J. Complete nucleotide sequence and genome organization dsRNA partitivirus infecting *Pleurotus ostreatus* virus[J]. Virus Research, 2005, 108:111-119.
- [7] Qiu L Y, Li Y P, Liu Y M. Particle and naked RNA mycoviruses industrially cultivated mushroom *Pleurotus ostreatus* in China[J]. Fungal Biology, 2010, 114:507-513.

## Extraction and Elimination of Virus of dsRNA from *Pleurotus ostreatus*

FU Yue-yue, YANG Hong-yi

(College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

**Abstract:** Taking *Pleurotus ostreatus* as material, the special dsRNAs of virus were extracted from *Pleurotus ostreatus* with modified SDS method, and elimination of virus in *Pleurotus ostreatus* was performed with reagent-mycelial tip-cutting and high temperature-mycelial tip-cutting methods. The results showed that the dsRNA was the same as one in foreign studies. The virus could be effectively eliminated with reagent-mycelial tip-cutting method, and the methods, including of ribavirin-mycelial tip-cutting, cycloheximide-mycelial tip-cutting, ribavirin and moroxydine hydrochloride-mycelial tip-cutting, could reduce the quantity of dsRNA of virus. The system of extraction of dsRNA was developed using tissues of *Pleurotus ostreatus* as material. In addition, the technique could effectively detect virus in *Pleurotus ostreatus*.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*; dsRNA; elimination of virus