

真菌提取物抑制烟草花叶病毒 (TMV) 研究进展*

何海燕^{1,2} 张丹^{1**} 李斌³

¹中国科学院·水利部成都山地灾害与环境研究所 成都 610041

²中国科学院大学 北京 100049

³中国烟草总公司四川省公司 成都 610017

摘要 烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 是一种具有寄主范围广、抗逆性强、在农业生产上造成危害大和难以防治等特点的植物病毒。从真菌中筛选并获得具有抑制TMV的活性物质是当前研究热点。本文综述了国内外关于真菌中活性物质抑制TMV的研究进展, 内容包括3个方面: 具有抑制TMV活性物质的真菌种类, 主要为侧耳、白蘑、红菇等科中的真菌; 具有抑制TMV作用的活性物质成分, 主要为真菌多糖和蛋白质; 抑制TMV的作用机理, 主要包括通过钝化病毒和封闭侵染位点抑制病毒的侵染, 干扰病毒蛋白质合成和病毒离子装配抑制病毒增殖或扩散, 提高防御酶活性和激活抗性相关基因表达从而诱导植物产生抗性。此外对真菌提取物抗TMV田间应用缓慢的原因进行了讨论。随着对真菌中抗TMV的作用物质及其结构、理化性质、表达基因及抗病毒机制的研究深入, 人们对环境与安全问题的日益重视以及化学农药的使用限制, 真菌源抗TMV物质具有广阔的开发前景。(参57)

关键词 真菌提取物; 烟草花叶病毒; 活性物质; 抑制机理; 真菌源

CLC S432.4+1

Recent progress in research on fungal extracts inhibiting tobacco mosaic virus (TMV)*

HE Haiyan^{1,2}, ZHANG Dan^{1**} & LI Bin³

¹Institute of Mountain Hazards and Environment, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³China National Tobacco Corporation Sichuan, Chengdu 610041, China

Abstract *Tobacco mosaic virus* (TMV) is a kind of plant virus with a wide host range and strong stress resistance, greatly harmful to agricultural production and difficult to control. Screening anti-TMV substances from fungi has become a research hot spot. This paper reviews the recent research advancement on fungal extracts inhibiting TMV. It includes three major parts: the fungal species with anti-TMV activity, mainly in Pleurotaceae, Tricholomataceae, Russulaceae; the active antiviral substances from fungal mainly with polysaccharide and protein; the inhibition mechanisms of fungal extracts against TMV, including the inhibition of virus infection by inactivating virus and closing infection site, the inhibition of virus proliferation or diffusion by interfering virus protein synthesis and particles assembly, and the induction of resistance by increasing defense enzyme activity and activating resistance related gene expression. The reasons for the slow application in the field are also discussed. With more thorough studying on the TMV-inhibiting substances and their structures, physical and chemical properties, expressed genes and anti-virus mechanisms, finding anti-TMV substances from fungi has an ever broad development prospects, especially when people are more and more cautious about the environmental safety and more and more refrained from using chemical pesticides.

Keywords fungal extract; TMV; active antiviral substances; inhibition mechanism; fungal resource

烟草花叶病毒是烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*) 的主要类群, 是一种植物正链RNA病毒^[1]。从1892年俄国生物学家 Iwanowski发现TMV以来, 对其已有一个多世纪的研究历史, TMV是目前世界上研究最为深入的模式病毒^[2]。TMV的寄主范围广泛, 可侵染十字花科、茄科、菊科、藜科及苋科等36

科350种植物^[3]。TMV的危害不仅造成农作物减产, 而且降低农产品的品质, 给农业生产造成了极大的经济损失^[4]。据统计, TMV在全世界每年造成的经济损失超过1亿美元^[5]。由于病毒对植物细胞的绝对寄生性, 病毒复制所需的物质、能量和场所完全由寄主细胞提供^[6]。寄主植物没有完整的免疫系统, 病毒一旦侵染植物, 其增殖就与寄主的代谢融为一体, 对病毒有抑制作用的药物往往对寄主也产生药害。目前, 对烟草花叶病毒病缺乏安全有效的防治方法。我国真菌种类繁多, 资源丰富, 近年来, 从各种真菌中相继发现了多种蛋白和多糖类等物质, 它们表现出很强的抗TMV活性。

收稿日期 Received: 2015-07-20 接受日期 Accepted: 2015-09-06

*中国烟草总公司四川省公司重点科技项目 (SCYC201504) 资助
Supported by the Key Project of China National Tobacco Corporation
Sichuan (SCYC201504)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: daniezhang@imde.ac.cn)

1 具有抑制TMV作用的真菌种类

自Mulvania (1926)发现被细菌污染的植物病毒汁液很快丧失其侵染力后,一些科研工作者研究了微生物及其代谢产物对植物病毒的抑制作用^[7-8],尤其真菌提取物对TMV的抑制作用得到了重视.有研究报道,粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)、好食脉孢菌(*Neurospora sitophila*)、赤霉菌(*Gibberella subinetti*)、蓝绿边青霉(*Penicillium godlewskii*)、穗孢青霉(*P. spiculisporum*)、黑根霉(*Rhizopus nigricans*)、旋卷炭疽菌(*Colletotrichum circinans*)、果生核盘菌(*Sclerotinia fructicola*)、哈兹木霉(*Trichoderma harzianum*)、亮白曲霉(*Aspergillus candidus*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等的代谢产物都有抑制或钝化TMV的作用^[7,9].李娜等利用38种植物病原真菌和45种分离自恩施和襄樊的土壤和烟叶中的真菌开展了针对TMV的系统抗性实验,发现对TMV抑制率较高的菌株有16个,其中,山茶炭疽病菌(*Colletotrichum camelliae*)、棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、立枯丝核菌等菌株的抗性较高,枯斑抑制率均大于70%,最高可达96.44%^[10].

研究发现多种食用菌的提取物对TMV具有钝化或抑制作用.Wiggs (1968)采用蘑菇(*Agaricus campestris*)、蜜环菌(*Armillaria mellea*)等32种担子菌的子实体水提液和TMV混合后接种植物,发现TMV的感染被阻止.日本学者研究发现50种担子菌的子实体水提液对TMV的感染抑制率在80%以上^[11].Hiramatsu等报道香菇(*Lentinus edodes*)的子实体抽提物具有抑制TMV的活性^[12].田兆丰等研究了香菇、平菇(*Pleurotus ostreatus*)、虎奶菇(*P. tuber-regium*)、杏鲍菇(*P. eryngii*)、草菇(*Volvariella volvacea*)、双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)、灵芝(*Ganoderma lucidum*)、灰树花(*Grifola frondosa*)、长裙竹荪(*Dictyophora indusiata*)、毛木耳(*Auricularia polytricha*)、银耳(*Tremella fuciformis*)、毛头鬼伞(*Coprinus comatus*)、鸡枞(*Collybia albuminosa*)、彩色豆马勃(*Pisolithus arhizus*)、细裂硬皮马勃(*Scleroderma areolatum*)的磷酸抽提物对TMV的抑制作用,发现除彩色豆马勃外,其他真菌均对TMV有抑制作用^[13].马学萍等开展了鸡油菌(*Cantharellus minor*)、蘑菇、香菇、平菇、茶树菇(*Agrocybe aegerita*)、毛头鬼伞、真姬菇(*Hypsizygus marmoreus*)和金针菇(*Flammulina velutipes*)等8种食用菌子实体的乙醇提取物水溶液对TMV预防、钝化和治疗作用的研究,结果表明这8种食用菌的提取物在体外都具有钝化病毒和抑制病毒侵染的作用;除鸡油菌外,其他7种食用菌提取物对TMV均有不同程度的治疗作用^[14].许星研究了酵母抽提物、香菇和平菇的粗提物的抗TMV活性,结果表明酵母抽提物对TMV的抑制效果及体外钝化效果最好,浓度在5 mg/mL以上时,抑制率与钝化率几乎达到100%;香菇和平菇的粗提物对TMV的抑制效果及体外钝化效果也较好;此外,酵母抽提物、香菇和平菇的粗提物可以使寄主普通烟K₃₂₆的过氧化氢酶、多酚氧化酶、苯丙氨酸裂解酶和超氧化物歧化酶等酶活性均有不同程度的增强,能够产生一定程度的诱导抗性,从而提高寄主防御TMV侵染的能力^[15].李丹

等对采自云南的17种大型食用真菌子实体的浸提液,用半叶法在心叶烟上分别从预防、钝化和治疗3个方面进行抗TMV活性检测,结果表明16种食用菌子实体的浸提液对TMV有较好的预防和钝化作用,预防效果最好的真菌为密褶红菇(*Russula densifolia*),预防率达到99.95%;密褶红菇、罗氏乳菇(*Lactarius rugatus*)、绒白乳菇(*L. vellereus*)、淡红枝瑚菌(*Ramaria hemirubella*)、美味牛肝菌(*Boletus edulis*)、小美牛肝菌(*Boletus speciosus*)、鳞黄孔菌(*Albatrellus ellisii*)、枣翅鳞肉齿菌(黑虎掌菌, *Sarcodon aspratum*)、裸晶蘑(冬瓜菌, *Lepista nuda*)、西藏乳牛肝菌(*Suillus thibetanus*)、玉草离褶伞(*Lyophyllum shimeji*)的水浸液对TMV的钝化效果均在80%以上;绒白乳菇、枣翅鳞肉齿菌和裸晶蘑的治疗效果在70%以上^[16].此外,从灰树花、金顶侧耳(榆黄蘑, *Pleurotus citrinopileatus*)、杏鲍菇、金针菇、毛头鬼伞、平菇、花脸晶蘑(花脸蘑, *Lepista sordida*)、柱状田头菇(杨树菇, *Agrocybe aegerita*)等食用菌中分离得到的粗蛋白或纯蛋白都有较高的抗TMV的活性^[17-24].

研究发现食用菌深层发酵液和固体培养物的水浸液对TMV也有抑制作用.1977年日本学者详细研究了香菇、金针菇、双孢蘑菇、银耳、黑木耳(*Auricularia auricula*)等的固体培养物对病毒的影响,发现培养物的热水浸提物都能抑制TMV的侵染^[11].我国的王先彬等也报道香菇培养物的水浸液对TMV的侵染有明显抑制作用^[25];王启燕等用香菇培养液水浸物制造了X-75制剂,对TMV有较强的抑制作用^[26].卢娜研究了8个平菇菌株发酵滤液的抗TMV活性,结果表明这8个平菇菌株的发酵滤液对TMV均有抑制作用,其中黑平菇、灰平03和平杂3号菌株的发酵滤液对TMV侵染的抑制率超过了52%^[27].Shen Shuo研究了两株海洋真菌0312F₁和1008F₁发酵液的粗提物对TMV均具有较高的抑制活性,菌株0312F₁发酵液的水溶性部分具有抗病毒作用,而菌株1008F₁发酵液的脂溶性部分具有抑制TMV的活性,两者的活性成分不同^[28].李锡宏等从17种真菌发酵液中筛选诱导云烟97对TMV抗性的发酵液,研究发现油茶炭疽病菌、小麦赤霉病菌、苹果轮纹病菌(*Macrophoma kawatsukai*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、黑胫病菌(*Phytophthora parasitica*)等9种真菌的发酵液对TMV的防效均大于65%,其中苹果轮纹病菌的相对防效高达91%^[29].

2 真菌提取物抑制TMV的活性物质

国内外对真菌中抗TMV侵染活性物质的研究有不少报道,主要集中在从真菌中分离出的多糖和蛋白质.

2.1 多糖类

真菌多糖是从真菌中分离出的由10个以上的单糖以糖苷键连接而成的高分子聚合物,多由真菌子实体、菌丝体或发酵液中提取获得,其中由发酵液提取的称为胞外多糖,由菌丝体提取的称为胞内多糖.研究表明,真菌多糖类物质具有抗TMV的活性.日本学者报道食用香菇 β -1,3-葡聚糖、伞菌(*Agarica* sp.)多聚糖和裂褶菌(*Schizophyllum commune*)多糖对TMV等都具有一定的抑制作用^[30-31].Aoki等(1993)报道多糖10 μ g/mL FAb对TMV抑制率达76.6%^[32];日本Tayca

公司(2001)报道粗多糖产物(CFERMP-17459)对烟草花叶病防效为50%。张超等研究发现平菇、金针菇和香菇多糖对TMV有明显的抑制作用,抑制率都在80%以上^[33]。黄金光等从1株多孔菌(MP-01)发酵液中提取的多糖成分对TMV体外钝化有显著效果,对TMV的初侵染和增殖有一定抑制作用,而且能诱导烟草产生一定的抗病性^[34]。李丹等利用半叶法,对17种大型食用真菌的多糖组分分别从预防、钝化和治疗3个方面进行了抗TMV活性检测,结果表明密褶红菇、鸡枞、鳞盖红菇(*Russula lepida*)、小美牛肝菌、西藏乳牛肝菌、金顶侧耳、裸晶蘑、变绿红菇(*Russula virescens*)等8种食用菌多糖对TMV都具有明显的预防和钝化作用,抑制效果均超过90%,治疗效果相对不明显^[16]。沈小英研究发现真菌多糖在枯斑三生烟上对TMV具有显著的抑制效果,在12种供试多糖处理中,彩绒革盖菌(云芝, *Coriolus versicolor*)多糖、虫草(*Cordyceps* sp.)多糖、蜜环菌多糖和猪苓(*Grifola umbellata*)多糖对TMV有较好的抑制效果,均达85%以上;其中提前48 h用1 g/L云芝多糖处理的预防效果达92.12%;且云芝多糖可以延迟烟草病毒病的发病时间,利于烟苗生长^[35]。

TMV侵染寄主时,有一定的侵染点,而且建立一个侵染点需要一定数量的病毒颗粒。经过真菌多糖处理过的寄主植株,在植株接种病毒之前,真菌多糖封闭侵染点,病毒失去和细胞微伤口感受点结合的能力,因而使病毒的侵入降低或被阻止。同时,食用菌多糖也增强了寄主抗性^[36]。

2.2 蛋白质类

蛋白类抑制物是研究最早和最深入的一类抗植物病毒侵染的活性物质。近年来,对真菌蛋白质类物质抑制TMV作用的研究较多。Kobayashi等从香菇子实体中分离获得了一个分子量(M_r)为 23×10^3 抗植物病毒的碱性单亚基蛋白FBP,该蛋白大约由199个氨基酸残基组成,对TMV的抑制浓度为6.3 mg/kg^[37]。Sun Hui等从杨树菇中分离纯化出一种抑制TMV侵染的凝集素AAL,该凝集素亚基分子量为 15.8×10^3 ,为等电点3.8的酸性蛋白;当浓度为200 $\mu\text{g/mL}$ 时,其对TMV的枯斑抑制率达84.32%^[38]。方芳从云头菇(*Agrocybe* sp.)子实体干样中分离到一个分子量为 17×10^3 的抗病毒蛋白yy,和杏鲍菇鲜样中分离到一个 22.3×10^3 的抗病毒蛋白XB,通过半叶法在枯斑寄主心叶烟上检测其对20 $\mu\text{g/mL}$ TMV侵染的抑制效果,有效浓度分别为3.13 $\mu\text{g/mL}$ 和4.69 $\mu\text{g/mL}$,且发现XB蛋白可能是通过其与病毒外壳蛋白结合,导致病毒失去侵染力^[39]。吴丽萍等从新鲜食用菌毛头鬼伞子实体中分离纯化出一种碱性蛋白y3对TMV具有抑制作用,当其浓度为12.5 $\mu\text{g/mL}$ 时,对TMV在心叶烟上的侵染抑制率达83.0%^[21]。陈宁等从灰树花子实体中分离到一种具有抗TMV侵染活性的热稳定蛋白GFAP,用半叶钝化法检测证明,32 mg/L GFAP可完全抑制10 mg/L TMV的侵染^[17]。付鸣佳从杏鲍菇干样中分离得到多个蛋白组分,经枯斑寄主检测,发现多个蛋白组分均具有抗TMV活性,对TMV的抑制率均在70%以上,高者可达99%;同时还从榆黄蘑和金针菇中分别分离到一个纯化蛋白YP46-46和Zb,都具有较好的抗TMV活性^[40]。李洋等研究了裂褶菌蛋白粗提液对TMV抗性,结果表明当蛋白粗提液浓度达到100 $\mu\text{g/mL}$ 时,诱导烟草抗TMV的侵染枯斑抑制率

可达 $74.11\% \pm 3.7\%$,对TMV的体外钝化作用的枯斑抑制率为 $70.05\% \pm 1.25\%$ ^[41]。

此外,有研究表明,真菌的核酸及其衍生物也具有抗TMV活性。1969年日本学者从香菇中成功地分离出了一种特殊的双链RNA,这种RNA能刺激机体产生干扰素,简称“蘑菇RNA”(dsRNA)^[11]。它能强烈地抑制病毒增殖。Ryttee研究了25个香菇品种,发现23种含有dsRNA,并认为dsRNA的发生率与病毒侵染有关^[3]。香菇培养物抽提液Rentemin能抑制TMV的活性,其主要成分是3种含氮多糖体,均由葡萄糖、半乳糖、甘露醇、吡喃糖和15种氨基酸组合而成^[9]。

3 抗TMV作用的真菌源活性物质的作用机理

烟草花叶病毒的生命周期包括吸附、侵染、增殖、扩散、装配和释放等过程,防治烟草花叶病毒病,可选择抑制或阻断病毒增殖的某一环节或其中主要参与因子。目前,抗TMV的主要作用机理包括抑制病毒的侵染、病毒增殖或扩散、诱导植物产生抗性等,许多活性物质可能是其中的一种或者是多种共同起作用,从而表现出抗病毒活性。

3.1 抑制病毒侵染

活性物质抑制TMV的初侵染可以作用于病毒本身(钝化病毒)和病毒侵染位点。抑制物质在植物体外以某种方式,如使病毒粒子凝聚,使外壳蛋白变性,或与病毒形成抑制物—病毒复合体,使病毒丧失侵染性^[42-44]。Maeda提取的香菇素具有使TMV聚集的能力,其抑制作用是通过使病毒粒子聚集而失去侵染力来实现的^[45]。吴丽萍等从毛头鬼伞子实体中分离的蛋白y3与TMV混合后用核糖核酸酶(RNase)处理,测得侵染率为61.74%,比未用RNase处理的对照降低了38.26%,说明y3具有一定的体外脱衣壳作用,酶联免疫吸附实验(ELISA)检测结果进一步表明y3蛋白对TMV具有破坏作用;另外,电镜观察发现y3可使部分TMV粒体发生裂解、变短^[46]。

抗TMV物质也可以作用于寄主植物表面,改变寄主表面病毒接受位点的特性或使寄主细胞对病毒的敏感性降低,从而不能吸附病毒粒子,使病毒不能成功侵染。毛头鬼伞多糖对TMV侵染位点具有保护作用,也能强烈地抑制病毒增殖^[47]。王杰等研究表明,食用菌多糖能够封闭病毒的侵染位点和抑制病毒在寄主中的增殖,从而增强寄主的抗性^[48]。

3.2 抑制病毒增值或扩散

病毒的增殖包括核酸复制、病毒蛋白表达及病毒粒子的装配等过程。孙慧等发现杨树菇凝集素AAVP可以与TMV的外壳蛋白结合,抑制病毒蛋白质合成;通过Western印迹杂交试验表明,AAVP存在于菌丝、菌柄和菌盖等组织中;猴头菇(*Hericium erinaceus*)、香菇、草菇、杏鲍菇、灵芝等大型真菌的子实体中存在着多种与AAVP的抗血清有交叉反应的蛋白质,大多数大型真菌中可能存在着与AAVP具有相似血清学特征的蛋白质家族,因此,可能具有抗病毒活性^[49]。吴艳兵等研究发现,毛头鬼伞中的多糖CCP60a对TMV外壳蛋白的体外聚合具有较强的抑制作用,说明CCP60a对TMV外

壳蛋白的聚合过程具有较强的干扰作用,不利于病毒粒子的进一步装配,而未被装配的病毒核酸不能在寄主体内进行有效的长距离传播,从而影响病毒的进一步繁殖^[47]。

3.3 诱导寄主产生抗性

病毒侵染寄主植物后,植株本身会感受到病毒的存在,并通过内源信号分子产生抗病毒信号,传递至整株植物,进而激活寄主植物潜在的抗病基因,使植物发生一系列细胞学和生物学变化,激活和诱导寄主植物系统抗性,抑制病毒侵染^[50]。Menard等发现将 β -1,3-葡聚糖硫酸酯化后可以诱导烟草等植物上的水杨酸信号传导途径,从而提高对TMV侵染的防御反应^[51]。研究发现,在寄主与病毒互作过程中,诱导物可使苯丙氨酸裂解酶(PAL)、几丁质酶、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)活性大大增强^[52-53]。吴艳兵等研究发现,毛头鬼伞真菌多糖可提高POD、PPO、PAL、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性,酶活性的增强可能与其诱导烟草获得抗性有关^[54]。朱琳等研究发现,平菇蛋白粗提液能提高烟草叶片内PAL、SOD、和POD的活性,从而诱导烟草抗TMV的活性升高^[55]。王炳楠等从大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)的胞外分泌物中分离得到一种蛋白激酶PevD1,并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达了重组蛋白6His-PevD1,该重组蛋白激酶可以引起烟草悬浮细胞死亡提高烟草植株对TMV的系统获得抗性(SAR),枯斑抑制率最高可达46.64%;PAL、PPO、POD等防御酶活性的提高和抗性相关基因酸性病程相关基因1(PR1-a)、碱性病程相关基因1(PR1-b)、病程相关基因非表达子1(NPR1)和苯丙氨酸解氨酶基因(PAL)的诱导表达是PevD1诱导烟草产生系统性抗性的主要机制^[56]。Wang等研究也发现硫酸化的香菇多糖对TMV有一定的治疗作用,烟草植株体内的防御酶活性PAL活性提高,诱导植株产生系统抗性^[57]。

4 存在问题及前景展望

目前,对真菌中各种活性物质的研究主要集中在分离纯化和功能分析等方面,其中对蛋白质和多糖类物质的研究较为深入,从这两大类物质中发现的活性成分种类较多,功能多样。较多试验研究表明,从真菌中分离获得的部分蛋白或多糖类物质对TMV具有很好的抑制或钝化效果,也有一定的治疗作用。但田间应用进展缓慢,其主要原因有:(1)真菌抗TMV研究相当一部分是以真菌粗提物为对象,其作用物质和作用靶标尚不清楚,抑制病毒机理等基础研究缺乏深度;(2)真菌中活性蛋白含量低,提取和纯化获得率不高,而且蛋白质分子量大,作物吸收缓慢,蛋白质在体外稳定性差,一旦条件改变就会影响其结构和活性;(3)多数真菌提取物对TMV的抑制作用仅限于室内盆栽试验,未经大田综合防效的检验,实际应用价值有待评估。

尽管如此,从真菌中分离和筛选蛋白质或多糖等活性物质仍不失为寻找抗植物病毒制剂的有效方法。从防治TMV的效果来看,真菌具有一些独特优势:(1)自然界中真菌类繁多,材料来源广,是生物活性化合物的天然宝库,其产生的次生代谢产物种类繁多,其中不乏抗植物病毒病的有效成分;(2)随着生物化学和分子生物学等学科发展,对多糖或

蛋白类等抑制物的结构、理化性质及表达基因的研究越来越深入,这有利于充分了解其抗病毒机制、活性中心和解决体外稳定性等问题;(3)多数蛋白质抑制剂抗病毒谱广,对寄主伤害小,仅针对病毒产生作用;(4)将蛋白质的基因转入原核或真核表达系统获得高产量的蛋白质,形成相应的制剂可以克服蛋白质产量低和在体外活性期短的缺点;(5)真菌中具有抗病毒活性的蛋白质或多糖可以作为植物抵抗病虫害新的基因源,利用转基因技术将其导入非抗性作物品种,从而构建基因工程植物,提高作物对病毒的抗性;(6)多数真菌可以通过发酵的方式大量生产,利于产业化生产。

随着人们对环境与安全问题的日益重视,化学农药的使用受到越来越多的限制,因而植物保护工作者将研究重点逐渐放在寻求资源丰富的天然抗病毒物质上。对大量来自真菌的天然活性物质的分离和筛选,寻找和挖掘新的抗植物病毒蛋白、糖类或其他物质,不仅有利于扩大蛋白类和糖类等植物病毒抑制物的筛选谱,获得新的抗植物病毒抑制物,也能更好地利用广泛存在的真菌资源。

致谢 感谢中国科学院·水利部成都山地灾害与环境研究所蒋豪博士对本文的重要修改和建议。

参考文献 [References]

- 邓光兵, 万波, 胡厚芝, 陈家任, 余懋群. 宁南霉素对烟草花叶病毒的生物活性[J]. 应用与环境生物学报, 2004, **10** (6): 695-698 [Deng GB, Qan B, Hu HZ, Chen JR, Yu MQ. Biological activity of Ningnanmycin on tobacco mosaic virus [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2004, **10** (6): 695-698]
- 耿召良, 商胜华, 陈兴江, 曹毅. 植物源抗烟草花叶病毒天然产物研究进展[J]. 中国烟草科学, 2011, **32** (1): 84-91 [Geng ZL, Shang SH, Chen XJ, Cao Y. Advance in natural products from plants with anti-TMV activity [J]. *Chin Tob Sci*, 2011, **32** (1): 84-91]
- 吴艳兵, 颜振敏, 谢荔岩, 林奇英, 谢联辉. 天然抗烟草花叶病毒大分子物质研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, **35** (7): 1096-1101 [Wu YB, Yan ZM, Xie LY, Lin YQ, Xie LH. Recent development in research of national anti-TMV big molecular substances [J]. *Microbiology*, 2008, **35** (7): 1096-1101]
- 陈启建, 欧阳明安, 吴祖建, 谢联辉, 林奇英. 金鸡菊(*Coreopsis drummondii*)的抗TMV活性物质[J]. 应用与环境生物学报, 2009, **15** (5): 621-625 [Chen QJ, Ouyang MA, Wu ZJ, Xie LH, Lin QY. Anti-TMV active substances from *Coreopsis drummondii* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, **15** (5): 621-625]
- Mcgrath MT, Shishkoff N. Evaluation of biocompatible products for managing cucurbit powdery mildew [J]. *Crop Prot*, 1999, **18**: 471-478
- 何灿兵. 六角仙(*Rostellularia procumbens*)抗烟草花叶病毒生物活性及其作用机制研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2008 [He CB. Antiviral activity and mechanism of anti-viral constituents against TMV from *Rostellularia procumbens* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2008]
- 杜春梅, 吴元华, 赵秀香, 朱春玉, 姜革, 闰学明. 天然抗植物病毒物质的研究进展[J]. 中国烟草学报, 2004, **10** (1): 34-39 [Du CM, Wu YH, Zhao XX, Zhu CY, Jiang G, Yan XM. Recent development in research of natural antiphytoviral substances [J]. *Acta Tab Sin*, 2004, **10** (1): 34-39]
- 严凯. 新型抗烟草花叶病毒的药物筛选及作用机理初步研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008 [Yan K. Screening new drugs of anti-TMV and

- preliminary study on mechanism of its work [D]. Guiyang: Guizhou University, 2008]
- 9 陈力力, 高必达. 微生物抗植物病毒活性物的研究进展[J]. 中国生物防治, 2006, **22** (4): 255-260 [Chen LL, Gao BD. Progress of the research on microbial metabolites against plant virus diseases [J]. *Chin J Biol Control*, 2006, **22** (4): 255-260]
- 10 李娜, 李锡宏, 许汝冰, 薛守聪, 郭利, 任加庆, 霍瑞, 王晓丽, 杜修智, 赵秀云. 筛选诱导烟草对烟草花叶病毒产生系统抗性的真菌[J]. 中国烟草科学, 2014, **35** (4): 79-93 [Li N, Li XH, Xi RB, Xue SC, Guo L, Ren JQ, Huo R, Wang XL, Du XZ, Zhao ZY. Selecting fungi which can induce tobacco creating systemic resistance against tobacco mosaic virus [J]. *Chin Tob Sci*, 2014, **35** (4): 79-93]
- 11 王晶英, 郑雅莺, 张建光, 张朝臣. 食用菌代谢产物研究及其在农业上的应用[J]. 中国食用菌, 1997, **16** (2): 6-7 [Wang JY, Zhen YY, Zhang JG, Zhang CC. Research of metabolic products of edible fungi and usage in agriculture [J]. *Edib Fungi Chin*, 1997, **16** (2): 6-7]
- 12 Hiramatsu A, Kobayashi N, Osawa N. Properties of two inhibitors of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes* and from leaves of *Yucca recurvifolia* Salisb [J]. *Agric Biol Chem*, 1987, **51**(3): 897-904
- 13 田兆丰, 裴季燕, 刘伟成, 李永丹, 刘德文. 植物及大型真菌抽提物抗植物病毒活性的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, **35** (24): 7514-7515, 7530 [Tian ZF, Qiu JY, Liu WC, Li YD, Liu DW. Study on the anti-virus of the extracts from plant or edible fungus [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2007, **35** (24): 7514-7515, 7530]
- 14 马学萍, 段云晖, 孔宝华, 李丹. 食用菌提取物对烟草花叶病毒的抑制作用 [J]. 云南农业大学学报, 2007, **22** (2): 296-295 [Ma XP, Duan YH, Kong BH, Li D. Inhibition of incidence of TMV by extracts from the fungus [J]. *J Yunan Agric Univ*, 2007, **22** (2): 296-295]
- 15 许星. 三种食用菌的抗烟草花叶病毒(TMV)活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2008 [Xu X. Study on anti-TMV activity of three kinds of edible mushrooms [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2008]
- 16 李丹, 赵文红, 孔宝华, 叶敏, 陈海如. 云南大型真菌提取物及其多糖组分对TMV的抑制作用[J]. 云南农业大学学报, 2009, **24** (2): 175-180 [Li D, Zhao WH, Kong BH, Ye M, Chen HR. Inhibition effects of the extracts and polysaccharide in macro fungus on TMV [J]. *J Yunan Agric Univ*, 2009, **24** (2): 175-180]
- 17 陈宁, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 灰树花中一种抗烟草花叶病毒的蛋白质的纯化及其性质[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, **31** (3): 283-31 [Chen N, Wu ZJ, Lin QY, Xie LH. Purification and partial characterization of a protein inhibitor of tobacco mosaic virus infection from the maitake (*Grifola frondosa*) [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (3): 283-31]
- 18 付鸣佳, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 榆黄蘑中一种抗病毒蛋白的纯化及其抗TMV和HBV的活性[J]. 中国病毒学, 2002, **17** (4): 350-353 [Fu MJ, Wu ZJ, Lin QY, Xie LH. Purification of a antiviral protein in *Pleurotus citrinopileatus* and its activities against tobacco mosaic virus and Hepatitis B virus [J]. *Virol Sin*, 2002, **17** (4): 350-353]
- 19 付鸣佳, 林健清, 吴祖健, 林奇英, 谢联辉. 杏鲍菇抗烟草花叶病毒蛋白的筛 [J]. 微生物学报, 2003, **43** (1): 29-34 [Fu MJ, Lin JQ, Wu ZJ, Lin QY, Xie LH. Screening of proteins anti-tobacco mosaic virus in *Pleurotus eryngii* [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2003, **43** (1): 29-34]
- 20 付鸣佳, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 金针菇中一种抗病毒蛋白的纯化及其抗烟草花叶病毒特性[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003, **32** (1): 84-88 [Fu MJ, Wu ZJ, Lin QY, Xie LH. The purification of antiviral protein in *Flammulina velutipes* and its characteristic against tobacco mosaic virus [J]. *J Fujian Agric For Univ (Nat Sci Edt)*, 2003, **32** (1): 84-88]
- 21 吴丽萍, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 毛头鬼伞(*Coprinus comatus*)中一种碱性蛋白的纯化及其活性 [J]. 微生物学报, 2003, **43** (6): 793-798 [Wu LP, Wu ZJ, Lin QY, Xie LH. Purification and activities of an alkaline protein from mushroom *Coprinus comatus* [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2003, **43** (6): 793-798]
- 22 朱琳, 林秀敏, 钟鸣. 平菇蛋白提取物对烟草花叶病毒的抑制活性初探[J]. 现代农业科技, 2009, (12): 12-14 [Zhu L, Lin XM, Zhong M. Study on *Pleurotus ostreatus* extract against TMV [J]. *Mod Agric Sci Tech*, 2009 (12): 12-14]
- 23 马凤金, 燕继晔, 严红, 张丽叶, 李兴红. 花脸蘑(*Lepista sordida*)蛋白粗提液抗烟草花叶病毒活性研究[J]. 河南农业大学学报, 2009, **32** (6): 92-96 [Ma FJ, Yan JY, Yan H, Zhang LY, Li XH. Study on the activity of anti-tobacco mosaic virus of crude protein from *Lepista sordida* [J]. *J Agric Univ Hebei*, 2009, **32** (6): 92-96]
- 24 孙慧, 吴祖建, 谢联辉, 林奇英. 杨树菇(*Agrocybe aegerita*)中一种抑制TMV侵染的蛋白质纯化及部分特性[J]. 生物化学与生物物理学报, 2009, **33** (3): 351-354 [Sun H, Wu ZJ, Lin QY, Xie LH. Purification and characterization of AAVP, a protein inhibitor of TMV infection, from the edible fungus, *Agrocybe aegerita* [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **33** (3): 351-354]
- 25 王先彬, 王启燕. 香菇培养物水浸液对烟草花叶病毒(TMV)侵染心叶烟的抑制作用[J]. 微生物学报, 1986, **26** (4): 363-365 [Inhibitory action of anti-tobacco mosaic virus of water extract from *Lentinus edodes* culture [J]. *Acta Microbiol Sin*, 1986, **26** (4): 363-365]
- 26 王启燕, 王先彬. 植物病毒生防制剂——X-75的初步研究 [J]. 北京农业科学, 1989 (1): 39-40 [Wang QY, Wang XB. Preliminary study on the preparation of plant virus, X-75 [J]. *Beijing Agric Sci*, 1989 (1): 39-40]
- 27 卢娜. 平菇(*Pleurotus ostreatus*)抗烟草花叶病毒菌株的筛选及其发酵工艺优化[D]. 北京: 北京化工大学, 2009 [Lu N, Selected of *Pleurotus ostreatus* strains of tobacco mosaic virus and optimization of fermentation process [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2009]
- 28 Shen S, Li W, Ouyan MG, Wu ZJ, Lin QY, Xie LH. Identification of two marine fungi and evaluation of their antiviral and antitumor activities [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2009, **49** (9): 1240-1246
- 29 李锡宏, 许汝冰, 李娜, 薛守聪, 任加庆, 霍瑞, 赵秀云. 抗烟草花叶病毒及抗性物质的初步研究[J]. 湖北农业科学, 2014, **53** (24): 6018-6021 [Li XH, Xu RB, Li N, Xue SC, Ren JQ, Huo R, Zhao XY. Study on fungal fermentation broth and resistance substance of anti-tobacco mosaic virus [J]. *Hebei Agric Sci*, 2014, **53** (24): 6018-6021]
- 30 金林红, 宋宝安, 杨松, 胡德禹. 天然产物抗植物病毒剂国内外研究进展[J]. 农药, 2003, **42** (4): 10-12 [Jin LH, Song BA, Yang S, Hu DY. The recent progress of natural product as plant virucides [J]. *Agrochemicals*, 2003, **42** (4): 10-12]
- 31 朱春玉. 噬肽霉素抗烟草花叶病毒(TMV)作用机制研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2005: 3 [Zhu CY. The action mechanism of cytosinpeptidomycin on tobacco mosaic virus [J]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2005: 3]
- 32 Aoki M, Tan M, Fukushima A, Hieda T, Kubo S, Takabayashi M, Ono K, Mikami Y. Antiviral substances with systemic effects produced by Basidiomycetes such as *Fomes fomentarius* [J]. *Biosci Biotech Biochem*,

- 1993, **27** (2): 278-282
- 33 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[J]. 安徽农业大学学报, 2005, **32** (1): 15-18 [Zhang C, Cao HQ, Chen L, Wang J. Preliminary study on the inhibition of polysaccharide of edible fungi to plant virus [J]. *J Anhui Agric Univ*, 2005, **32** (1): 15-18]
- 34 黄金光, 李怀方, 宋爱荣. 多孔菌MP-01菌株提取液抑制TMV生物活性研究[J]. 青岛农业大学(自然科学版), 2007, **24** (1): 19-20 [Huang JG, Li HF, Song AR. Studies on the TMV biology activity of the extracts of MP-01 [J]. *J Qingdao Agric Univ (Nat Sci)*, 2007, **24** (1): 19-20]
- 35 沈小英. 抗病毒多糖筛选、提取及其对烟草花叶病毒的抑制作用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013 [Shen XY. Screening and extraction of antiviral polysaccharide against tobacco mosaic virus [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2013]
- 36 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[J]. 中国农学通报, 2007, **25** (5): 338-341 [Wu YB, Xie LY, Lin YQ, Xie LH, Lin SF. A preliminary study on anti-TMV activity of polysaccharide from *Coprinus comatus* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2007, **25** (5): 338-341]
- 37 Kobayashi N, Hiramatsu A, Akatuka T. Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruit bodies of *Lentinula edodes* [J]. *Agric Biol Chem*, 1987, **51** (3): 883-890
- 38 Sun H, Zhao CG, Tong X, Qi YP. A lectin with mycelia differentiation and antiphytovirus activities from the edible mushroom *Agrocybe aegerita* [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2003, **36** (2): 214-222
- 39 方芳. 杏鲍菇和云耳菇中抗病毒蛋白的分离纯化、理化性质及其生物活性[D]. 福建: 福建农林大学, 2003 [Fang F. Purification, characteristics and bioactivity antiviral from the *Pleurotus eryngii* and *Agrocybe* sp. [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2003]
- 40 付鸣佳. 食用菌抗病毒蛋白的特性、基因克隆与表达[D]. 福州: 福建农林大学, 2002 [Fu MJ. The characteristics of antiviral protein from mushrooms and the gene clone and expression [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2002]
- 41 李洋, 周莹, 李兴红, 王红清. 裂褶菌蛋白粗提液抗植物病毒活性初探[J]. 中国农学通报, 2012, **28** (24): 250-255 [Li Y, Zhou Y, Li XH, Wang HQ. Preliminary research on the activity of anti-tobacco mosaic virus and anti-pepper virus of crude protein extracts from *Schizophyllum commune* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, **28** (24): 250-255]
- 42 江山, 郭雪柳, 韩嘉莱. 一些抗植物病毒剂对烟草花叶病毒衣壳蛋白体外聚合过程的影响[J]. 中国病毒学, 1996, **11** (1): 77-79 [Jiang S, Guo XL, Han XL. Influence of some antiphytoviral substances on the polymerization (*in vitro*) of coat protein [J]. *Virol Sin*, 1996, **11** (1): 77-79]
- 43 王芳, 鄢波, 王玲仙, 方琦, 黄兴奇. 云南烟草花叶病毒外壳蛋白基因的分克隆及序列分析[J]. 西南农业学报, 1999, **12** (2): 7-11 [Wang F, Yan B, Wang LX, Fang Q, Huang XQ. Cloning and sequencing of the gene encoding coat protein from tobacco mosaic virus (Yunnan strain) [J]. *SW Chin J Agric Sci*, 1999, **12** (2): 7-11]
- 44 易克, 彭冠云, 周清明. 抗植物病毒天然产物开发利用的研究进展[J]. 湖南农业科学, 2009 (2): 42-45 [Yi K, Peng GY, Zhou QM. Research of utilization of natural products of anti-plant virus [J]. *Huinan Agric Sci*, 2009 (2): 42-45]
- 45 郭明. 植物病毒抑制的研究进展[J]. 甘肃农业科技, 1992 (7): 28-29 [Guo M. Research of plant virus inhibitor [J]. *Gansu Agric Sci Tech*, 1992 (7): 28-29]
- 46 吴丽萍, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 一种食用菌提取物y3对烟草花叶病毒的钝化作用及其机制[J]. 中国病毒学, 2004, **19** (1): 54-57 [Wu LP, Wu ZJ, Lin QY, Xie LH. Study on inactivation of tobacco mosaic virus by y3 from mushroom (*Coprinus comatus*) [J]. *Virol Sin*, 2004, **19** (1): 54-57]
- 47 吴艳兵, 谢荔岩, 谢联辉, 林奇英. 毛头鬼伞多糖CCP60a对TMV外壳蛋白的影响 [J]. 植物资源与环境学报, 2008, **17** (3): 63-66 [Wu YB, Xie LY, Lin YQ, Xie LH. Effect of polysaccharide CCP60a from *Coprinus comatus* on TMV coat protein [J]. *J Plant Resour Environ*, 2008, **17** (3): 63-66]
- 48 王杰, 王开运. 香菇多糖对植物真菌和病毒病害的抗病机理[J]. 农药, 2011, **50** (1): 16-19 [Wang J, Wang KY. Discussion on the mechanism of resistance of the polysaccharide of *Lentinula edodes* against pathogenic bacteria and virus of plant [J]. *Agrochemicals*, 2011, **50** (1): 16-19]
- 49 孙慧, 赵辰光, 全鑫, 齐义鹏. 杨树菇凝集素AAVP具有抗病毒和促进菌丝分化功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, **19** (2): 210-214 [Aun H, Zaho CG, Tong X, Qi YP. *Agrocybe aegerita* lectin AAVP with antiviral and mycelium differentiation promotion activities [J]. *Chin J Biochem Molec Biol*, 2003, **19** (2): 210-214]
- 50 郭亮, 蔡海林, 何命军, 谢鹏飞, 张万良, 梁棋政. 植物源活性天然提取物抗烟草花叶病毒的研究进展[J]. 湖南农业科学, 2012 (23): 77-79, 83 [Guo L, Cai HL, He MJ, Xie PF, Zhang WL, Liang QZ. Advances in bioactive natural extracts from plants against TMV [J]. *Hunan Agric Sci*, 2012 (23): 77-79, 83]
- 51 Menard R, Alban S, de Ruffray P, Jamois F, Franz G, Fritig B, Yvin J C, Kauffizzann S. Beta-1,3 glucan sulfate, but not beta-1,3 glucan, induces the salicylic acids signaling pathway in tobacco and Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2004, **16** (11): 3020-3032
- 52 Ross AF. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts [J]. *Virology*, 1961, **4**: 329-339
- 53 李兴红, 贾月梅, 商振清, 崔丽华. VA系统诱导烟草对TMV抗性与细胞内防御酶系统的关系[J]. 河北农业大学学报, 2003, **26** (4): 21-24 [Li XH, Jia YM, Shang ZQ, Cui LH. Correlation between induced systemic resistances (ISR) to TMV and defense enzymes induced by VA in tobacco [J]. *J Agric Univ Hebei*, 2003, **26** (4): 21-24]
- 54 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[J]. 微生物学杂志, 2007, **27** (5): 29-33 [Wu YB, Xie LY, Lin YQ, Xie LH. Effects of *Coprinus comatus* polysaccharide on the activities of enzymes and isoenzyme zymogram in tobacco leave [J]. *J Microbiol*, 2007, **27** (5): 29-33]
- 55 朱琳, 燕继晔, 钟鸣, 李兴红. 平菇蛋白粗提液诱导烟草对TMV的抗性与细胞中防御酶活性的关系[J]. 植物保护, 2009, **35** (6): 56-59 [Zhu L, Yan JY, Zhong M, Li XH. The relationships between the anti-TMV activity of tobacco induced by *Pleurotus ostreatus* crude protein and the activity of defense enzymes in the cells [J]. *Plant Prot*, 2009, **35** (6): 56-59]
- 56 王炳楠, 王双超, 檀贝贝, 邱德文, 杨秀芬. 大丽轮枝菌蛋白激酶PevD1诱导的烟草对烟草花叶病毒(TMV)系统获得性抗性及其分子机制 [J]. 农业生物技术学报, 2012, **20** (2): 188-195 [Wang BN, Wang SC, Tan BB, Qiu DW, Yang XF. Systemic acquired resistance to tobacco mosaic virus (TMV) induced by protein elicitor from *Verticillium dahliae* (PevD1) and its mechanisms in tobacco [J]. *J Agric Biol*, 2012, **20** (2): 188-195]
- 57 Wang J, Yu G, Li Y, Shen L, Qian Y, Yang J, Wang F. Inhibitory effects of sulfated lentinan with different degree of sulfation against tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco seedlings [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2015, **122**: 38-43