

硅藻病毒研究进展

Review of diatom viruses

陈保国, 李登峰, 严小军

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

中图分类号: Q939.99 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)09-0123-08

doi: 10.11759/hyxx20140604001

硅藻不仅分布广, 而且在水域中占很大优势, 是海洋生态系统初级生产者浮游植物的主要成员, 其生产率在贫营养化与富营养化水体中分别达到 35% 和 75%^[1], 是主要的赤潮藻^[2]和重要的海洋污损生物^[3]。

赤潮是公认的海洋环境灾害, 对海洋渔业生产和海洋生态平衡表现出很强的破坏性。赤潮治理常用物理、化学方法, 物理治理工程量大、运作周期长、一次性投入成本高, 化学治理容易造成二次污染。海洋污损生物附着于军事、运输、工程等的海洋结构, 已经成为人类从事海洋开发活动的一大障碍。海洋生物污损的实质就是微生物的附着^[4]。附着硅藻是导致海洋生物污损的主要微生物^[5]。防污损方法主要有物理、物理化学、化学等, “环境友好型”生物防污剂逐渐成为防污损事业发展的主要趋势^[6]。病毒可以裂解藻细胞, 是导致藻类死亡的主要生物因素^[7]。水体中存在大量浮游病毒, 是海洋和湖泊中最丰富的生物类群, 其中在海洋中数量达到 4×10^{30} 个^[8]。病毒以纳米尺度驱动全球生物地球化学循环, 调节水生态系统结构^[9-11]。它们是近年来才被认识到的重要的生物资源, 藻病毒可以用作控藻因子, 如可将特定病毒喷洒在赤潮海域, 将特定病毒涂抹于污损表面, 将优势藻裂解。用病毒来控制赤潮、硅藻污损较物理、化学方法更具发展潜力。病毒控藻技术的主要优势在于它能够强化系统固有生态功能, 其利用藻—病毒回路的作用, 实现营养物向高营养级的传递, 恢复生态系统平衡, 同时利用病毒感染的特异性, 将技术的生态风险控制到很低水平^[12-13]。

硅藻还是海水养殖中的优质育种饵料藻, 目前被广泛应用于鱼、虾、贝和海参的育苗过程中, 是影响幼苗成活率和质量的关键因素之一, 如果饵料藻

大量死亡, 就会导致育苗失败^[14-15]。

硅藻病毒的研究将为赤潮、污损控制, 饵料藻病害防治等奠定理论与技术基础。

1 硅藻病毒研究现状

2004 年 Nagasaki^[16]等首次发现并分离了赤潮藻—刚毛根管藻的 RNA 病毒(*Rhizosolenia setigera* RNA virus, RsRNAV)。迄今已有 15 种硅藻病毒陆续被分离、报道(表 1)。它们分别是刚毛根管藻病毒(RsRNAV^[16])、角毛藻病毒(CsNIV^[17-18])、CspNIV^[19]、CtenRNAV01^[20]、CdebDNAV^[21]、CsfrRNAV^[22]、CwNIV^[23-24])、*Chaetoceros muelleri* virus^[25]、ClorDNAV^[26]、CtenDNAV^[27]、Csp0-5DNAV^[28]、Csp03RNAV^[29]、Csp07DNAV^[30]、冰河拟星杆藻(*Asterionellopsis glacialis*)病毒(AglRNAV)与菱形海线藻(*Thalassionema nitzschioides*)病毒(TnitDNAV)^[31]。

1.1 RsRNAV

刚毛根管藻 RNA 病毒是最先报道的硅藻病毒, 于 2004 年由 Nagasaki^[16]等从日本有明海 Ariake Sea 分离。RsRNAV 存在于藻细胞质中, 呈二十面体结构, 无尾, 直径为 32 nm。

核酸类型为单链 RNA 分子, 虽然变性琼脂糖电泳偶尔检测到一些大小为 0.6、1.2、1.5 kb 的小片段 RNA 分子, RsRNAV 基因组主要为为 11.2 kb 的

收稿日期: 2014-06-04; 修回日期: 2015-04-20

基金项目: 国家星火计划项目(2012GA701006); 浙江省自然科学基金项目(LY12C19004); 浙江省教育厅项目(Y201327815); 宁波市农业攻关项目(2011C10004); 浙江省重中之重一级学科开放基金项目(E02009124200); 宁波大学王宽诚幸福基金资助项目

作者简介: 陈保国(1985-4), 男, 山东济宁, 硕士生, 主要从事环境病毒学研究, 电话: 15257495589 E-mail: weishan85475135@163.com; 李登峰, 通信作者, 电话: 13819823176, E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn

ssRNA 分子。蛋白电泳显示, RsRNAV 主要结构蛋白有 3 种, 大小分别为 41.5、41.0、29.5 ku。RsRNAV 易感宿主不仅具有种特异性, 还存在株特异性, 分离的 9 株 RsRNAV(RsRNAV01~09)分别对刚毛根管藻的不同藻株易感。RsRNAV 潜伏期为 2 d, 分别把病毒接入对数期和稳定期的刚毛根管藻中培养, 藻裂解释病毒的放量分别为 3 100 和 1 010 个感染单位/细胞, 把含有 3.01×10^8 感染单位/mL 的病毒悬液, 4 °C 黑暗处静置 17 d 后, 再次测定病毒效价为 3.50×10^8 感染单位/mL, 表明 RsRNAV 的温度耐受性较好。另外, 透射电镜照片显示, 刚毛根管藻细胞表面的硅藻微孔长约(91±6) nm、宽约(73±6) nm 的气孔, 因其较病毒大, 猜测它可能是病毒侵染藻细胞的一个途径。

1.2 CsNIV

2005 年, Nagasaki^[17]等从日本有明海 Shiotsuka 河的河口底泥富集病毒, 过滤后接种 38 种硅藻, 分离到了一株裂解角毛藻——*C. salsugineum* Ch42 细胞核包涵体病毒(*Chaetoceros* nuclear inclusion virus, CsNIV), 它是被发现的第二株能够裂解硅藻的病毒, 也是第一株被发现的感染硅藻的 DNA 病毒。该病毒呈二十面体结构, 无尾, 无包膜, 直径为 38 nm, 在细胞核内复制, 形成包涵体。CsNIV 具有独特的基因组型, 由一个共价闭环的长度为 6 005 个核苷酸的单链环状 DNA 分子和一段长度为 997 个核苷酸的线状单链 DNA 分子组成, 线状 DNA 与环状 ssDNA 的一部分互补, 形成含部分双链结构的环状 ssDNA 分子。通过 SDS-PAGE 图表明 CsNIV 有两种主要结构蛋白, 大小分别为 46.0、43.5 ku, 两种次要结构蛋白大小分别为 42.0、36.0 ku。用 CsNIV 接种 58 株真核藻(包括 16 株角毛藻), 结果它只能侵染并裂解 *C. salsugineum* Ch42, 表明其具有很高的宿主专一性。CsNIV 在 20、10、4、-20、-196 °C 等条件下黑暗处保存 28 d 后, 仍保留很高的活性, 显示出良好的温度耐受性。CsNIV 潜伏期为 12~24 h, 把病毒接入对数期的宿主藻中培养, 藻裂解时病毒粒子的释放量约 325 个感染单位/细胞。对 CsNIV 的基因组序列进行分析, 部分序列与基因组同为闭合环状 ssDNA 分子的圆环病毒(circoviruses)的复制酶基因有较低但明显的相似度。2009 年 Park^[18]等对 CsNIV 的基因组做了进一步的分析, 推断 CsNIV 基因组存在 6 个开放阅读框(ORF)。Park 等克隆并重组表达了其中长约 1.2 kb 的 ORF3, 用表达产物制备了抗血清, 蛋白印迹检测到抗血清与大小为 46.0 ku 的病毒结构蛋白结

合。为了进一步验证其特异性, 用质谱分析了该 46.0 ku 的蛋白, 其中的 14 个肽段推导出的核苷酸序列与 CsNIV 的 ORF3 序列匹配上。为了研究 ORF3 在宿主细胞中的表达, 构建了病毒的 cDNA 文库, 对文库进行序列测定, 得到的序列均含有 ORF3 与 ORF4, 而没有发现单独的 ORF3 克隆。以 ORF3 特定探针进行 Northern blotting 只得到一个 2.5 kb 的转录本。这些结果表明 ORF3 与 ORF4 是共同转录的。

1.3 CspNIV

2005 年, Bettarel^[19]等从美国的切萨皮克海湾水体分离到了一种可以裂解角毛藻——*C. cf. gracilis* 的小型核内包涵体病毒(*C. cf. gracilis* small nuclear inclusion virus, CspNIV)。CspNIV 在核内完成复制, 病毒粒子无包膜, 呈二十面体, 直径 25 nm, 成晶格状排列于细胞核中。将该病毒接种 20 株藻进行宿主范围检测, 结果显示 CspNIV 具有高度的宿主专一性, 专一感染 *C. cf. gracilis*。CspNIV 的感染潜伏期小于 24 h。在切萨皮克海湾(Chesapeake Bay)表层海水中的宿主藻消失后, CspNIV 在水中保持活性的时间不到 1 个月。CspNIV 的核酸类型和基因组大小尚不清楚。

1.4 CtenRNAV01

2008 年, Shirai^[20]等在 Shiotsuka 川的河口分离到一株可以感染麦尼埃角毛藻的病毒(*C. tenuissimus* RNA virus, CtenRNAV01), 该病毒粒子无包膜, 呈二十面体结构, 直径约 31 nm, 无尾。CtenRNAV01 的每毫升藻裂解液含量高达 10^{10} 个感染单位, 较其它藻病毒高。电镜下观察整个宿主细胞的胞质中充满病毒粒子。CtenRNAV01 的潜伏期不超过 24 h, 病毒粒子裂解藻细胞释放量约为 1×10^4 个感染单位/细胞。相对于对数生长期, 稳定期的藻较对数期易感。CtenRNAV01 具有高度的宿主专一性, 专性感染麦尼埃角毛藻。CtenRNAV01 在 20、10、4、-20、-80、-196 °C 等条件下保存 28 d 后, 仍保留很高的感染活性, 显示出良好的温度耐受性。CtenRNAV01 基因组为两条单链 RNA, 长度分别为 8.9 和 4.3 kb。聚丙烯酰胺凝胶电泳显示 CtenRNAV01 主要蛋白有 3 种, 分子量分别为 33.5、31.5 和 30.0 ku。对整个病毒基因组测序结果仅获得一条长度为 9 431 个碱基的序列(不包括 3'端 Ploy(A)尾, DDBJ, AB375474), 暗示 CtenRNAV01 基因组的两条 ssRNA 存在重叠。根据 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp)结构域中的保守氨基酸序列构建进化树, 显示 CtenRNAV01 与刚毛根

管藻病毒(RsRNAV)各分属一个单系,但有一个共同节点,表明在自然水域中,存在一个感染硅藻的 ssRNA 病毒类群。

1.5 CdebDNAV

2008年, Tomaru^[21]等从日本有明海 Shiotsuka 河的河口上层水及底层淤泥中采集样品,分离到了一株可感染角毛藻——*C. debilis* 的 DNA 病毒(*C. debilis* DNA virus, CdebDNAV)。该病毒呈正二十面体结构,无尾,无包膜,直径为 30 nm。电镜观察显示病毒粒子主要聚集在藻细胞细胞质中。CdebDNAV 具有高度的宿主专一性,株特异。CdebDNAV 在 20、10、4、-20、-80、-196 °C 等条件下黑暗处保存 28 d 后,仍保留很高的感染活性,显示出良好的温度耐受性。CdebDNAV 潜伏期为 12~24 h,病毒粒子裂解藻细胞释放量约为 55 个感染单位/细胞。SDS-PAGE 显示 CdebDNAV 有两种主要结构蛋白,大小分别为 41.0、37.5 ku。CdebDNAV 核酸类型为 ssDNA,具体的基因组结构有待进一步研究,完成部分序列测定与比对后,发现 CdebDNAV 的 1 个长度为 744 nt 的 ORF 的氨基酸序列与推定的角毛藻细胞核包涵体病毒 CsNIV 复制酶有高度的相似性(E value = 10⁻⁵⁶)。

1.6 CsfrRNAV

2009年, Tomaru^[22]等从日本 Hiroshima 海湾表层水分离到了一株角毛藻——*C. socialis f. radians* 病毒(*C. socialis f. radians* RNA virus, CsfrRNAV),该病毒直径约 22 nm,二十面体结构,无尾,无包膜。病毒粒子在藻细胞质中复制堆积。病毒潜伏期在 48 小时以内,病毒粒子裂解藻细胞释放量约为 66 个感染单位/细胞。在感染 210 h 以后,培养基中的藻细胞并未全部裂解,可见大量休眠孢子,这些休眠孢子在高达 5.1×10⁷ 个感染单位/mL 的病毒悬液中都能生存。病毒侵染与休眠孢子形成之间的关系还需进一步的研究。把病毒接入 28 株藻中进行宿主范围鉴定,结果显示 CsfrRNAV 具有高度的宿主专一性。将 CsfrRNAV 在 20、10、4、-20、-80、-196 °C 下保存 50 天后,再次测定效价,分别为原来的 25%、66%、145%、143%、245%、185%,显示了良好的温度耐受性。提取病毒核酸进行序列测定分析,显示 CsfrRNAV 基因组为单链 RNA(ssRNA),去除 3'端 poly(A)尾巴后,CsfrRNAV 基因组全长为 9.467 kb。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳显示,CsfrRNAV 基因组大小却为 11 kb,造成这种差别的原因可能是该病毒带

有较长的 3'端 Ploy(A)尾巴,也有可能是病毒基因组上粘连了一些结合蛋白。CsfrRNAV 基因组合两个开放阅读框,推定这两个 ORFs 可能编码与病毒复制相关的蛋白和病毒的外壳蛋白。聚丙烯酰胺凝胶电泳显示 CsfrRNAV 主要蛋白有 3 种,分子量分别为 32.0、28.5 和 25.0 ku,另外一种次要蛋白分子量为 31.0 ku。根据 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp)结构域中的保守氨基酸序列构建进化树,结果显示 CsfrRNAV、CtenRNAV01 与刚毛根管藻病毒(RsRNAV)具有同一节点,它们的 A/U 比率分别为 60.4%、61.1%、63.7%,非常相近。这些结果与 Yoko 等^[20]提出的在自然界可能存在一个可以感染硅藻的 ssRNA 病毒类群的假设一致,因此, Tomaru 等^[22]建议新设一个 ssRNA 病毒科 Bacillariornaviridae。

1.7 CwNIV

2009年, Eissler^[23]等从美国的切萨皮克海湾水体分离到了一株可以裂解角毛藻——*C. cf. wighamii* 的细胞核包涵体病毒(*C. cf. wighamii* nuclear inclusion virus, CwNIV)。将该病毒与藻培养液混合后,不到 8 h,病毒颗粒即出现在藻细胞核内。藻细胞裂解通常伴随着叶绿体退化,因此可以利用叶绿素 a 荧光计来判断藻细胞是否裂解。病毒接入 16 h 后,藻细胞荧光度开始下降,到 72 h 后,接入病毒的藻培养液的荧光度降到对照组的 19%。CwNIV 不仅裂解周期短,而且有很高的释放量,平均为 26 400 个病毒粒子/细胞。利用 CwNIV 可以有效地控制藻的生长。病毒颗粒以两种形式存在于藻细胞核中,即亚晶阵列排列的直径为(12±2) nm 的杆状粒子和大小为(22~28) nm 的正二十面体粒子,这两种形式的粒子总是保持一定的比例,由此推断杆状粒子有可能是正二十面体的前体,经过一定阶段断裂产生 1 个正二十面体粒子。曾有文献报道有些形状为正二十面体的藻病毒的 1 个顶点上连着一个杆状突起,起到刺破藻细胞的作用,刺破藻细胞后有可能断裂,从而形成在藻细胞中看到的那些杆状粒子^[24]。CwNIV 基因组的核酸类型和大小还有待进一步的研究。

1.8 牟勒氏角毛藻病毒

2011年,吴庆喜^[25]等从宁波象山港采取水样,经反冲超滤法对水样进行浓缩,然后用其对培养的多种赤潮藻进行侵染,分离到了一株能裂解海洋牟勒氏角毛藻(*C. muelleri*)的病毒。该病毒具有很强的感染力,稀释 10⁸ 倍以后仍具明显感染效果。负染电

镜照片显示,病毒为正二十面体,大小为 58 nm,核酸类型为 DNA,大小约为 23 kb。该病毒具有严格的宿主专一性。

1.9 ClorDNAV

2011年, Tomaru^[26]等从 Hiroshima 海湾一个渔港表层海水中分离到了 1 株可以感染掌状洛氏角毛藻 (*C. lorenzianus*) 的病毒 (*C. lorenzianus* DNA virus, ClorDNAV)。该病毒为二十面体结构,直径约 34 nm,无尾,无包膜,多以非包涵体形式存在于藻细胞细胞核内,偶有 9~10 个病毒颗粒组成戒指状、呈蜈蚣状结构。SDS-PAGE 电泳谱显示 ClorDNAV 仅含 1 个大小为 225 ku 的结构蛋白。ClorDNAV 具有高度的宿主专一性。ClorDNAV 在 20、10、4、-20、-80、-196 °C 等条件下黑暗处保存 50 d 后,再次测定效价,分别为原来的 15%、36%、105%、59%、79%、45%,显示了良好的温度耐受性。ClorDNAV 潜伏期小于 48 h,病毒粒子释放量约为 2.2×10^4 个感染单位/细胞。ClorDNAV 的基因组由 1 个长度为 5 813 个核苷酸的共价闭环单链 DNA 分子和一段长度为 979 个核苷酸的线状单链 DNA 分子组成,线状 DNA 链序列与环状 ssDNA 分子互补,结合在环状 DNA 分子上,形成具部分双链区域的环状结构。对 ClorDNAV 的基因组序列进行分析,ClorDNAV 基因组至少含有 3 个 ORFs,其中的最大的一个 ORF 与 CsNIV、CtenDNAV、CdebDNAV 的编码与病毒复制相关的蛋白序列存在高的相似性,其他两个 ORFs 仅与 CsNIV、CtenDNAV 的蛋白编码序列有较高的相似性,另外 1 个存在于互补双链区的 ORF 与已知的蛋白没有发现有明显相似性,由此推想这条与环状 ssDNA 分子互补的单链 DNA 仅起到病毒复制引物的作用。继 CsNIV、CtenDNAV, ClorDNAV 是硅藻闭环单链 DNA 病毒属 (*Bacilladnavirus*) 的第三个成员。

1.10 CtenDNAV

2011年, Tomaru^[27]等分离到了一株可感染麦尼埃角毛藻的病毒 (*C. tenuissimus* DNA virus, CtenDNAV),该病毒大小 37 nm,无尾,无包膜。病毒主要聚集在藻细胞细胞核中,主要为六边形的粒子,外缘还发现了呈杆状粒子,但裂解物负染后电镜下没有观察到杆状粒子。CtenDNAV 具有高度的宿主专一性。温度耐受性实验显示, CtenDNAV 在黑暗处 4°C 条件下保存 181 d 后,病毒效价为初始效价的 1.4%,而在 -20、-80 °C 条件下保存,病毒的感染活性均能得到

保留。CtenDNAV 潜伏期 < 4 d,裂解藻细胞病毒粒子的释放量约为 3.2×10^2 个感染单位/细胞。CtenDNAV 基因组由 1 个共价闭环环的 ssDNA 分子 (5639 nt) 和一段线状单链 DNA 分子组成,其中线状 DNA 与部分环状 DNA 互补,形成具部分双链区域 (875 bp) 的环状 ssDNA 分子。CtenDNAV 基因组至少包含 3 个 ORFs,其中的 1 个 ORF 导出的氨基酸序列与已发现的感染硅藻的 ssDNA 病毒 (CsalDNAV、CdebDNAV) 编码其与复制相关的蛋白的氨基酸序列有一定的相似性,依据 CtenDNAV 的基因组结构以及宿主范围,可以将它归类于硅藻闭环单链 DNA 病毒属 (*Bacilladnavirus*)。SDS-PAGE 谱显示 CtenDNAV 仅有一个主要蛋白,分子量为 38.5 ku。继 CtenRNAV01^[20], CtenDNAV 是迄今分离到的第二个可以感染麦尼埃角毛藻的病毒。据此,麦尼埃角毛藻自然种群至少受到两种不同核酸类型的病毒影响。

1.11 Csp05DNAV

2012年, Toyoda^[28]等从日本英虞湾表层海水与底层沉积物中分离到了一株特异性感染角毛藻的病毒 (*Chaetoceros* sp. TG07-C28 DNA virus, Csp05DNAV),该病毒正二十面体结构,直径 32~34 nm,无尾,无包膜,病毒颗粒主要以非包涵体的形式散布于藻细胞细胞核内。宿主细胞核中还发现了呈杆状的粒子,但是裂解液负染观察并没有发现杆状粒子。Csp05DNAV 的基因组由 1 个共价闭环单链 DNA 分子与一段 0.9kbp 的线状单链 DNA 分子组成,两者互补形成具有部分双链区域的环状 ssDNA 分子。SDS-PAGE 对病毒蛋白进行初步分析,显示 Csp05DNAV 结构蛋白有 3 种大小分别为 40、75、86 是 ku。同时 Csp05DNAV 显示了良好的温度耐受性,在 4°C 以下至少可稳定保存 1 a。Csp05DNAV 的潜伏期 < 24 h,病毒粒子释放量约为 4.3×10^2 个感染单位/cell。分析 Csp05DNAV 的部分序列,基因组中一个含 534 个氨基酸的 ORF 与 ClorDNAV、CsalDNAV、CtenDNAV、CdebDNAV 编码病毒复制相关蛋白的序列存在较高的相似性,除了这些病毒外,没有其他的病毒与 Csp05DNAV 有相似性,由此 Csp05DNAV 被归入 genus *Bacilladnavirus* (硅藻 DNA 病毒属),成为其第五个成员。

1.12 Csp07DNAV

Kimura^[29]等于 2013 年从日本 Hiroshima 海湾表

层水分离到了能感染并裂解角毛藻——*Chaetoceros* sp. strain SS628-11 的病毒 Csp07DNAV。该病毒粒子为二十面体结构,直径为 $34\text{nm}\pm 2\text{nm}$,无尾,无包膜,聚集于藻细胞细胞核中。与上述角毛藻病毒 ClorDNAV^[26]、CtenDNAV^[27]、Csp05DNAV^[28]类似,宿主细胞核内还并存杆状病毒粒子。但是,这3种病毒样品在负染后电镜观察不到杆状粒子,故杆状粒子可能是其前体形式,而 Csp07DNAV 的负染样品中仍可见杆状粒子,推测可能是两种病毒共感染。Csp07DNAV 病毒的潜伏期 $<12\text{h}$,裂解藻细胞病毒粒子的释放量约为29个感染单位/细胞。Csp07DNAV 的基因组由一个长度为5552个核苷酸的共价闭环环状单链DNA分子和一段长度为827个核苷酸的线状单链DNA分子组成,线状DNA链序列与环状ssDNA分子互补,结合在环状DNA分子上,形成具部分双链区域的环状结构。Csp07DNAV 有3个ORFs。SDS-PAGE谱显示Csp07DNAV的主要结构蛋白为37ku,与CtenDNAV结构蛋白(分子量为38.5ku)类似。结合形态学与生化特性,将Csp07DNAV归为Bacilladnavirus。

1.13 Csp03RNAV

2013年, Tomaru^[30]等从八代海表层海水中分离到了一株感染并裂解角毛藻的病毒(*Chaetoceros* sp. SS08-C03 RNA virus; Csp03RNAV),该病毒为正二十面体结构,直径32nm,无尾,无包膜。病毒粒子散布在宿主藻细胞质中。病毒潜伏期 $<48\text{h}$ 。把病毒接入28株藻中进行宿主范围鉴定,结果显示Csp03RNAV具有高度的宿主专一性。提取病毒核酸进行分析,Csp03RNAV基因组为单链RNA(ssRNA),除3'端poly(A)尾,Csp03RNAV基因组全长为9417b,包含两个开放阅读框,推定这两个ORFs编码与病毒复制相关的蛋白和病毒的结构蛋白。SDS-PAGE谱表明,Csp03RNAV主要蛋白有3种,分子量分别为42.0、34.0和28.0ku。根据RNA依赖的RNA聚合酶(RdRp)结构域中的保守氨基酸序列构建系统进化树,结果显示Csp03RNAV、CsfrRNAV、CtenRNAV01与刚毛根管藻病毒RsRNAV 4个单系具有同一节点,且它们的A/U比率分别为59.7%、60.4%、61.1%、63.7%,非常相近,同属于Bacillarnavirus属,成为该属的第四个成员。

1.14 AglaRNAV 与 TnitDNAV

2012年 Tomaru^[31]等首次发现了可以感染羽纹

类硅藻的病毒:冰河拟星杆藻病毒(*Asterionellopsis glacialis* RNA virus, AglaRNAV)与菱形海线藻病毒(*Thalassionema nitzschioides* DNA virus, TnitDNAV),它们分别感染冰河拟星杆藻、菱形海线藻。AglaRNAV大小31nm,散布在藻细胞质中,潜伏期2d,基因组为9.5kb的单链RNA。TnitDNAV大小为35nm,集聚在藻细胞核中,潜伏期通常为10d左右,基因组由长度为5.5kb的共价闭环环状ssDNA分子和一段与之部分序列互补的长度为0.6kbp的线状单链DNA分子组成。AglaRNAV与TnitDNAV的基因组序列正在被进一步的深入研究中。

2 小结与讨论

已报道的15种硅藻病毒的研究工作主要由日本学者完成(12/15),美国和中国科研人员分别报道了2种和1种。

报道的硅藻病毒多为球形多面体,无尾,无包膜,直径在(22~58)nm,多数约30nm。DNA病毒多存在于藻细胞核中, RNA病毒多存在于藻细胞质中。硅藻病毒潜伏期较短,多在4d以内。感染后释放量差别很大,最小的为29个感染单位/细胞,最大的为 2.2×10^4 个感染单位/细胞。多数病毒温度耐受性较好,在各个温度下(如4、-20、-80、-196℃)均能保存数月之久。这些硅藻宿主高度专一,有些甚至具株特异性。病毒结构蛋白多为1~4种,大小不一。已发现的硅藻DNA病毒基因组多在6~7kb,较特殊的是一株牟勒氏角毛藻病毒,达到了23kb。RNA硅藻病毒基因组多为ssRNA,序列长度多为10kb左右。DNA硅藻病毒多由共价闭环环状ssDNA分子和一段与之互补的片段,形成含有部分双链的环状DNA分子结构,构成独特的病毒类群Bacilladnavirus。

表1所列的已报道的硅藻病毒与其他藻病毒相比,无论从形态大小,还是从基因组大小方面来看,都是相对较小的。目前已知的真核藻类病毒,大小从25nm左右到220nm以上不等,基因组大小从4.4kb左右到500kb以上不等,其中大型双链DNA病毒较常见^[32]。感染各种真核藻的藻类脱氧核糖核酸病毒科(Phycodnaviridae)成员直径大多大于100nm。迄今,大型藻病毒Phycodnaviridae中尚无硅藻病毒,这可能与报道的硅藻病毒大多用角毛藻进行筛选,所用宿主种类太单一有关,也有可能受限于其研究方法。这些硅藻病毒文献在进行病毒分离、鉴定时,预先将待分离材料用0.1 μm 滤膜过滤,这样就很难分离得

表 1 已报道的硅藻病毒

名称	宿主	基因组(kb)	直径(d/nm)	结构蛋白(kDa)	胞内分布	潜伏期	释放量(感染单位/细胞)	参考文献
RsrNAV	<i>R. setigera</i>	SsRNA11.2	32	41.5+41.0+29.5	细胞质	2 d	对数期 3100; 稳定期 1010	[16]
CtenRNAV01	<i>C. tenuissimus</i>	SsRNA8.9+4.3	31	33.5+31.5+30.0	细胞质	<24 h	1 × 10 ⁴	[20]
CsfrRNAV	<i>C. socialis/radians</i>	SsRNA9.467	22	32.0+28.5+25.0+31.0	细胞质	48 h	66	[22]
Csp03RNAV	<i>Chaetoceros</i> sp. (SS08-C03)	ssRNA9.417	32	42.0+34.0+28.0	细胞质	<48 h		[29]
AglaRNAV	<i>A. glacialis</i>	ssRNA, 9.5	31		细胞质	2 d		[31]
CsNIV	<i>C. salsugineum</i>	(ss+ds)DNA 6.005+0.997	38	46.0+43.5 42.0+36.0	细胞核	12~24 h	325	[17, 18]
ClorDNAV	<i>C. lorenzianus</i>	(ss+ds)DNA 5.813+0.979	34	225	细胞核	<48 h	2.2 × 10 ⁴	[26]
Csp05DNAV	<i>Chaetoceros</i> sp. (TG07-C28)	(ss+ds) DNA 5.5+0.9	33	40+75+86	细胞核	<24 h	4.3 × 10 ²	[28]
CtenDNAV	<i>C. tenuissimus</i>	(ss+ds) DNA 0.875+5.639	37 ± 2	38.5	细胞核	<4 d	3.2 × 10 ²	[27]
TnitDNAV	<i>T. nitzschioides</i>	(ss+ds) DNA 5.5+0.6	35		细胞核	约 10 d		[31]
Csp07DNAV	<i>Chaetoceros</i> sp.(SS628-11)	(ss+ds) DNA	34		细胞核	<12 h	29	[30]
CspNIV	<i>C. cf. gracilis</i>		25		细胞核	<24 h		[19]
CdebDNAV	<i>C. debilis</i>	DNA	30	41.0+37.5	细胞质	12~24 h	55	[21]
CwNIV	<i>C. cf. wighamii</i>		22~28		细胞核	16 h	26 400	[23, 24]
<i>C. muelleri</i> virus	<i>C. muelleri</i>	DNA, 23	58					[25]

注: 空白处为未知项

到大型病毒。我们课题组参考 Phycodnaviridae 病毒的分离办法,对中国东海沿岸海水进行病毒的浓缩与分离,获得了对中肋骨条藻有明显裂解活性的大型双链 DNA 病毒。

藻病毒分离存在的瓶颈主要是分离得到病毒的几率太低。这与病毒浓度及藻病毒高度的宿主专一性有关。水温较高的富营养化水体^[33]中藻生物量大,病毒浓度相对较高。由水温较高的富营养化水体取水样,分离优势藻的裂解病毒成功的可能性较高。藻病毒虽然在低温时能保持长时间的活性,但在较高的温度下存活时间有限,如在切萨皮克海湾赤潮消失 1 个月后,即无法再分离到 CspNIV^[19],所以最好在赤潮消退过程中或赤潮后期采集水样^[34]。水样用切向流抽滤能有效提高病毒浓度,提高成功的可能性。此外,将浓缩水样去侵染尽可能多的不同种类的藻,也可以提高成功率。

藻病毒分离的另一个棘手的问题是即使添加病毒的藻液发生变化,也不能确定是由病毒感染所致还是由于其他因素的干扰。为了确认病毒的感染和裂解,还需结合其他技术手段,如用光学显微镜观察藻细胞的变化、用叶绿素 a 荧光计来监测叶绿体的退化、用电子显微镜观察病毒粒子的存在和超微病变的关系、利用分子生物学技术获得病毒的基因组的序列等。

本实验室经过几年的努力,从海水中分离到了多株硅藻裂解病毒,对这些病毒进行了光、电镜观察、理化特性分析、宿主特异性分析等。其中,对一株中肋骨条藻裂解病毒进行了深入研究,该病毒为单链 DNA 病毒,具有很强的宿主特异性,宿主易感性与其表面的糖蛋白有关。相信不久的将来,将有越来越多的硅藻病毒被分离、鉴定与利用。

参考文献:

- [1] Nelson D M, Treguer P, Brzezinski M A, et al. Production and dissolution of bio-genic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation[J]. *Global Biogeochem Cycles*, 1995, 9: 359-372.
- [2] Rines J B E, Hargraves P E. The *Chaetoceros Ehrenberg* (Bacillariophyceae) flora of Narragansett Bay, Rhode Island, USA[J]. *Bibliotheca Phycologica*, 1988, 79: 1-196.
- [3] 忻夏莹, 靳翠丽, 周晓见. 抗硅藻附着活性细菌的筛选、鉴定与发酵条件优化[J]. *海洋科学*, 2013, 37(10): 90-97.
- [4] Huggett M J, Williamson J E, Nys R, et al. Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae[J]. *Oecologia*, 2006, 149: 604-619.
- [5] 黄宗国. 海洋污损生物及其防除(下册)[M]. 北京: 海洋出版社, 2008.
- [6] 周世伟, 杨翠云, 夏传海. 天然产物防除海洋污损生物的研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23: 186-197.
- [7] Suttle C A, Chan A M, Cottrell M T. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary production[J]. *Nature*, 1990, 347: 467-469.
- [8] Fuhrman J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. *Nature*, 1999, 399: 541-548.
- [9] 张奇亚, 桂建芳. 一类不可忽视的战略生物资源——淡水与海水中的病毒及其在生态系统中的作用[J]. *中国科学院院刊*, 2009, 24(4): 414-420.
- [10] 李升康, 李传标. 海洋病毒在海洋微生物群落及生物地球化学循环中的作用研究进展[J]. *海洋科学*, 2013, 37(3): 117-121.
- [11] 李洪波, 肖天, 林凤翱. 海洋浮游病毒的研究方法[J]. *海洋科学*, 2010, 34(9): 97-101.
- [12] 汪小雄, 姜成春, 朱佳, 等. 微生物除藻方面的应用研究[J]. *工业水处理*, 2011, 31(2): 1-4.
- [13] 曹晓星, 苏建强, 郑天凌, 等. 海洋微生物的多样性在赤潮调控中的利用[J]. *海洋科学*, 2007, 31(5): 63-69.
- [14] 梁妍, 邹宁, 潘曰磊. 角毛藻培养研究进展[J]. *生命科学仪器*, 2008, 6: 25-27.
- [15] 周一春, 胡超群, 彭鹏飞, 等. 一株底栖硅藻——双眉藻的优化培养[J]. *海洋科学*, 2012, 36(10): 40-47.
- [16] Nagasaki K, Tomaru Y J, Katanozaka N, et al. Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia setigera*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 704-711.
- [17] Nagasaki K, Tomaru Y J, Takao Y, et al. Previously unknown virus infects marine diatom[J]. *Applied and*

- Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 3528-3535.
- [18] Park Y J, Jung S E, Tomaru Y J, et al. Characterization of the *Chaetoceros salsaugineum* nuclear inclusion virus coat protein gene[J]. Virus Research, 2009, 142: 127-133.
- [19] Bettarel Y, Kan J, Wang K, et al. Isolation and preliminary characterization of a small nuclear inclusion virus infecting the diatom *Chaetoceros cf. gracilis*[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2005, 40: 103-114.
- [20] Shirai Y, Tomaru Y, Takao Y, et al. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus* meunier[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(13): 4022-4027.
- [21] Tomaru Y J, Shirai Y K, Suzuki H, et al. Isolation and characterization of a new single-stranded DNA virus infecting the cosmopolitan marine diatom *Chaetoceros debilis*[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2008, 50: 103-112.
- [22] Tomaru Y J, Takao Y, Suzuki H, et al. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Chaetoceros socialis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(8): 2375-2381.
- [23] Eissler Y, Wang K, Chen F, et al. Ultrastructural characterization of the lytic cycle of an intranuclear virus infecting the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* (Bacillariophyceae) from Chesapeake Bay, U.S.A.[J]. Journal of Phycology. 2009, 45(4): 787-797.
- [24] Cherrier M V, Kostyuchenko V A, Xiao C, et al. An icosahedral algal virus has a complex unique vertex decorated by a spike[J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2009, 106(27): 11085-11089.
- [25] 吴庆喜, 程凯, 杨季芳, 等. 一株海洋牟勒氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*) 病毒的分离与初步鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(3): 455-459.
- [26] Tomaru Y J, Takao Y, Suzuki H, et al. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting *Chaetoceros lorenzianus* Grunow[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(15): 5285-5293.
- [27] Tomaru Y J, Shirai Y, Toyoda K, et al. Isolation and characterisation of a single-stranded DNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus*[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2011, 64(2): 175-184.
- [28] Toyoda K, Kimura K, Naotsugu H T, et al. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros* sp. (strain TG07-C28) [J]. Plankton Benthos Research, 2012, 7(1): 20-28.
- [29] Kimura K, Tomaru Y J. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting the marine diatom *Chaetoceros* sp. strain SS628-11 isolated from western JAPAN[J]. Plos One, 2013, 12(8): 1-9.
- [30] Tomaru Y J, Toyoda K, Kimura K, et al. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus that infects the marine planktonic diatom *Chaetoceros* sp.(SS08-C03)[J]. Phycological Research, 2013, 61: 27-36.
- [31] Tomaru Y J, Toyoda K, Kimura K, et al. First evidence for the existence of pennate diatom viruses[J]. The ISME Journal, 2012, 6: 1445-1448 .
- [32] 柏仕杰, 王慧, 郑天凌. 海洋藻类病毒与赤潮防治[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(6): 1056-1065.
- [33] 郭亚新, 程凯, 赵以军, 等. 淡水噬藻体及其他溶藻因子的分布与感染力[J]. 中国环境科学, 2003, 23(2): 167-170 .
- [34] 郑天凌, 苏建强. 海洋微生物在赤潮生消过程中的作用[J]. 水生生物学报, 2003, 27(30): 291-295.

(本文编辑: 谭雪静)