



研究报告

中国香菇种质资源中主要真菌病毒的多重 RT-PCR 检测技术

孙艺嘉¹ 郭孟配¹ 王锦杰¹ 边银丙^{1,2} 徐章逸^{*1,2}

1 华中农业大学应用真菌研究所 湖北 武汉 430070

2 湖北省食用菌工程技术研究中心 湖北 武汉 430070

摘要:【背景】病毒是食用菌生产上较重要的一类潜在隐患。我们在前期的研究中发现,中国香菇(*Lentinula edodes*)种质资源中最常见的病毒有2种,分别为*L. edodes partitivirus 1* (LePV1)和*L. edodes mycovirus HKB* (LeV-HKB)病毒,这2种病毒能单一或复合感染香菇。【目的】建立香菇种质主要病毒的快速检测技术,提高香菇病毒检测效率,降低检测成本。【方法】依据香菇 β -actin 基因及病毒 LePV1 和 LeV-HKB 编码依赖 RNA 的 RNA 复制酶(*RdRp*)基因序列分别设计引物,以复合感染了这2种香菇病毒的菌丝体为材料,对影响 RT-PCR 反应的主要因素模板浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、退火温度和循环次数等进行优化筛选,建立同时检测 LeV-HKB 病毒(LeV-HKB 相关病毒)和 LePV1 病毒的多重 RT-PCR 检测技术。【结果】模板浓度、退火温度和循环次数对多重 RT-PCR 检测结果均有较大影响,而引物浓度和 dNTPs 浓度对检测结果的影响较小。所建立的多重 RT-PCR 技术在香菇核心种质病毒检测中表现为扩增目标条带清晰分明,检测结果与单重 RT-PCR 检测结果一致。对两种病毒的多重 RT-PCR 产物进行了序列测序,结果表明扩增片段序列与目标基因序列相似性在99%以上。【结论】所建立的多重 RT-PCR 检测体系具有较好的特异性与适用性,为室内和田间香菇病毒早期检测、病害流行的监测提供了技术储备。

关键词:香菇,食用菌,真菌病毒,检测

Development of multiplex RT-PCR for the detection of two main mycoviruses infecting Chinese *Lentinula edodes* germplasm resource

SUN Yi-Jia¹ GUO Meng-Pei¹ WANG Jin-Jie¹ BIAN Yin-Bing^{1,2} XU Zhang-Yi^{*1,2}

1 Institute of Applied Mycology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China

2 Hubei Engineering Research Center for Edible Mushroom, Wuhan, Hubei 430070, China

Abstract:【Background】*Lentinula edodes* virus disease is important for *L. edodes* production. Previous to this study, *L. edodes* mycovirus HKB (LeV-HKB) and *L. edodes partitivirus 1* (LePV1) were proved to be

Foundation items: Earmarked Fund for Modern Agroindustry Technology Research System on Edible Fungus of China (CARS-20); Program of State Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Central China, Ministry of Agriculture/Hubei Key Laboratory of Crop Diseases, Insect Pests and Weeds Control (2015ZTSJJ11)

*Corresponding author: Tel: 86-27-87282221; E-mail: zyxy2016@hotmail.com

Received: 13-07-2018; Accepted: 08-11-2018; Published online: 13-12-2018

基金项目: 国家现代农业产业技术体系“食用菌病害无害化轻简化防控”岗位科学家专项(CARS-20); 农业部华中作物有害生物综合治理重点实验室/农作物重大病虫害防控湖北省重点实验室开放基金(2015ZTSJJ11)

*通信作者: Tel: 027-87282221; E-mail: zyxy2016@hotmail.com

收稿日期: 2018-07-13; 接受日期: 2018-11-08; 网络首发日期: 2018-12-13

the two major mycoviruses identified in *L. edodes* germplasm, and co-infection of these two viruses was also prevalent. **[Objective]** The purpose of this study was to develop a quick and efficient technique for detection of these two viruses in the early stage of *L. edodes* production. **[Methods]** Three pairs of specific primers for LeV-HKB, LePV1 and actin genes (β -actin) of *L. edodes* were designed based on the reported sequences, respectively. The crucial factors of multiplex RT-PCR including template concentration, primers concentration, dNTPs concentration, annealing temperature, and number of cycles were then optimized. **[Results]** A multiplex RT-PCR detection method for LeV-HKB (or LeV-HKB related virus) and LePV1 was developed. **[Conclusion]** The multiplex RT-PCR assay developed in this study had high specificity and repeatability using the virus detection of *L. edodes* core collections.

Keywords: *Lentinula edodes*, Edible fungi, Mycovirus, Detection

香菇(*Lentinula edodes*)是世界上栽培范围最广泛的食用菌之一,在食用菌产业中占有举足轻重的地位^[1]。香菇病毒的最早报道源于20世纪70年代初,日本学者从不正常香菇菌丝中分离出直径分别是25、30和39 nm的球状病毒颗粒^[2];在我国,于善谦等从菌丝生长不正常的栽培菌种中分离到球状病毒颗粒^[3];沈学仁等报道了上海郊区香菇生产区暴发较大面积香菇病毒病的症状特点,并从发病香菇菌丝中分离到基因组分别为dsRNA和ssRNA的球状病毒颗粒^[4];梁振普等在香菇中发现了直径约为30 nm的球状病毒和头部直径约为40 nm的噬菌体两种病毒颗粒^[5]。近年来,随着香菇代料栽培技术发展和栽培规模的日益扩大,香菇代料大规模生产中出现疑似病毒病症状的现象越来越普遍,症状表现为菌丝体生长或转色异常,难以形成子实体或子实体畸形,香菇质量和产量下降等^[6-9]。近期一些研究报道表明,从这些生长不正常香菇菌株中分离到杆状或球状病毒颗粒(*L. edodes* spherical virus, 简称LeSV),并克隆了分离到病毒的部分基因组序列^[8]。日本学者Magae也报道了生长不正常和正常菌株中均能检测到*L. edodes* mycovirus HKB (LeV-HKB)病毒的裸露dsRNA,并首次克隆了该病毒全长基因组序列(NCBI基因登录号为AB429556)^[7];此外,该课题组也报道了从香菇上分离到的另一种病毒*L. edodes* mycovirus HKA (LeV-HKA)^[10]。然而,上述已测香菇球状病毒LeSV部分复制酶基因(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)序列与LeV-HKB或LeV-HKA RdRp氨基酸

序列相似性高达95%以上,暗示这几个病毒为LeV-HKB相关病毒。最近,我们从症状表现为菌丝生长退化、转色异常和不能正常形成子实体的香菇栽培菌株SX12中检测到一种直径为34 nm的双分体病毒*L. edodes* partitivirus 1 (LePV1),并克隆了其全长基因组序列(NCBI登录号为KX354971和KX354972)^[11]。

香菇病毒研究中传统的检测手段主要是电子显微镜观察和dsRNA技术。随着现代分子生物学技术的发展,一些香菇病毒基因组相继被公布,为香菇病毒的快速检测奠定了重要的分子基础。陈春乐等^[12]依据克隆的香菇杆状病毒部分基因组序列信息建立了该病毒的快速RT-PCR检测技术;Won等^[8]采用RT-PCR技术对84个香菇菌株携带球状病毒LeSV的情况进行了分析。相比较单重RT-PCR检测技术而言,多重反转录PCR(Multiplex-RT-PCR)可以同时检测多种病毒,具有缩短检测时间、降低检测成本、提高检测效率以及简化试验步骤的特点,被广泛应用于植物病毒检测^[13-15],然而食用菌病毒中未见有相关报道。我们前期采用dsRNA检测技术对从全国各地广泛收集的90个香菇栽培菌株和125个野生香菇菌株病毒携带情况进行了调查,结果表明LeV-HKB(或LeV-HKB相关病毒)和LePV1的携带率最高,而且存在复合感染的现象^[16]。本研究旨在针对中国香菇种质资源中的2种主要病毒类型LeV-HKB(LeV-HKB相关病毒)和LePV1,以单一RT-PCR为基础,通过对反应条件和参数的摸索与优化,建立了同时检测这两种病毒的多重

RT-PCR 检测技术, 为从源头(菌种)控制香菇病毒病害发生, 以及追踪类似病毒流行监控等方面奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

用于本试验的供试菌株为 56 个香菇核心种质菌株^[17], 其中栽培菌株由中国菌种专业保藏单位惠赠, 野生菌株采自自然保护区或远离香菇栽培的大山/森林或由中国菌种专业保藏单位惠赠。以上菌株均保存于华中农业大学应用真菌研究所。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

反转录试剂盒 Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper), 南京诺唯赞生物科技有限公司; *rTaq*, 大连宝生物工程有限公司; DNA marker BM2000、BM2000+, 北京博迈德基因技术有限公司。超微量分光光度计, DeNovix 公司; PCR 仪, 东胜兴业科学仪器有限公司; 离心机, Eppendorf 公司; 凝胶成像分析系统, 上海天能科技有限公司。

MYG 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 麦芽浸膏 20.0, 蛋白胨 1.0, 酵母浸粉 1.0, 琼脂 20.0, 加蒸馏水至 1 L。1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.3 菌丝体培养和收集

供试菌株接种在 MYG 培养基上活化 5–7 d 后, 转接于预先铺有无菌玻璃纸的 MYG 平板上, 25 °C 无光照培养 10 d 后收集菌丝体, 用滤纸吸干后称

重, 液氮速冻后保存于–80 °C 备用。

1.4 引物设计与合成

根据 LeV-HKB 和 LePV1 病毒的 *RdRp* (依赖 RNA 的 RNA 复制酶) 基因序列分别设计一对特异性引物 LeV-F/LeV-R 和 LePV1-F/LePV1-R, 用于检测香菇菌株中携带 LeV-HKB 和 LePV1 病毒的情况; 此外根据香菇转录组的 *β-actin* 基因序列设计一对特异性引物 *actin-F/actin-R*, 用于分析病毒的表达量。所有引物序列信息见表 1, 引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.5 RNA 提取

参考 STE 法提取香菇菌丝体总 RNA^[18]。具体方法: (1) 取约 0.1 g 菌丝体置于预冷的研钵, 加入适量的液氮, 用预冷的研棒迅速用力研磨至粉末状, 迅速转入 1.5 mL 的离心管中; (2) 立即加入 300 μL 抽提缓冲液和 600 μL PCI (25:24:1 体积比的水饱和酚:氯仿:异戊醇), 于微管振荡器上强烈振荡约 30 s, 12 000 r/min 离心 10 min; (3) 小心吸取上清液于另一离心管中, 加入等体积的 PCI, 于微管振荡器上强烈振荡 20 s, 12 000 r/min 离心 10 min; (4) 小心吸取上清液于另一离心管中, 加入 1/10 体积的 NaAc (pH 5.5), 混匀后, 加入 2.5 倍体积的无水乙醇, 于微管振荡器上振荡均匀, –20 °C 沉淀约 40 min, 12 000 r/min 离心 10 min; (5) 弃上清液, 加入 750 μL 70% 的乙醇洗涤沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min, 小心倒掉乙醇, 于超净工作台上干燥 5–10 min, 之后加 50 μL 用 DEPC 处理过的 ddH₂O

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primers sequence and name

基因来源或类别 Classification	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	扩增长度 Amplification length (bp)	退火温度 <i>T_m</i> (°C)
HKB	LeV-F	CTCCGTAGTCGTCAGATTGTCC	589	55
	LeV-R	GTGACGCTACTACCGATTTAGCC		
LePV1	LePV1-F	GGACTCAAACCCATTCTAAAT	389	55
	LePV1-R	TTCGAGCCCATAACATAATACA		
<i>β-actin</i>	<i>actin-F</i>	GGAGAAGATTTGGCATCACACA	258	55
	<i>actin-R</i>	GAAGAGCGAAACCCCTCGTAGA		

溶解沉淀,用超微量分光光度计测 RNA 浓度后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 多重 RT-PCR 体系优化

在 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的单重 RT-PCR 反应体系基础上,对多重 RT-PCR 检测反应体系及反应条件中下列参数进行优化:反转录体系中 RNA 浓度(50 和 $37.5\text{ ng}/\mu\text{L}$)、PCR 中 cDNA 浓度(50 、 10 、 5 、 1 、 0.5 、 0.1 和 $0.05\text{ ng}/\mu\text{L}$)、引物浓度(0.15 、 0.20 、 0.25 、 0.30 和 $0.35\text{ }\mu\text{mol/L}$)、dNTP 浓度(0.15 、 0.20 、 0.25 、 0.30 和 $0.35\text{ }\mu\text{mol/L}$)、退火温度(48 – $60\text{ }^{\circ}\text{C}$)以及循环次数(30 、 35 和 40 次)。反转录根据试剂盒 Q RT SuperMix for qPCR 的说明书进行; $20\text{ }\mu\text{L}$ PCR 反应体系中 *rTaq* ($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.2\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , 48 – $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s , (30 、 35 、 40)个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min 。RT-PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 180 V 电泳 30 min , 溴化乙锭染色 10 min 后于凝胶成像系统检测 RT-PCR 结果。

1.7 多重 RT-PCR 检测体系适用性能评价

从香菇的核心种质 56 个菌株的菌丝中提取 RNA 进行多重 RT-PCR 检测,将检测结果与前期研究获得的核心种质带毒情况相比较,验证多重

RT-PCR 检测结果。

1.8 RT-PCR 扩增产物序列鉴定

选择部分样品扩增的 PCR 产物送北京擎科新业生物技术有限公司测序,将测序结果与数据库中登录的病毒序列进行同源性比较。

2 结果与分析

2.1 RNA 浓度和退火温度对多重 RT-PCR 扩增效率的影响

以结合 dsRNA 检测和单重 RT-PCR 检测验证复合感染有 LeV-HKB 和 LePV1 病毒的 ZP28 菌株为材料,采用 STE 法提取 RNA。在使用的 RNA 浓度范围内, RNA 浓度为 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 时多重 RT-PCR 产物扩增的 3 个目标条带亮度均大于 $37.5\text{ ng}/\mu\text{L}$ 时的扩增条带(图 1A);退火温度对多重 RT-PCR 扩增效率的影响表现为 *β -actin* 目标条带亮度随退火温度的升高差异不显著, LeV-HKB 目标条带亮度随退火温度的升高而增强,而 LePV1 目标条带亮度随退火温度的升高而减弱(图 1B)。

2.2 cDNA 浓度及循环次数对多重 RT-PCR 扩增效率的影响

在以上研究的基础上,将反转录获得的 cDNA 分别稀释至 50 、 25 、 5 、 2.5 、 0.5 、 0.25 和 $0.05\text{ ng}/\mu\text{L}$,

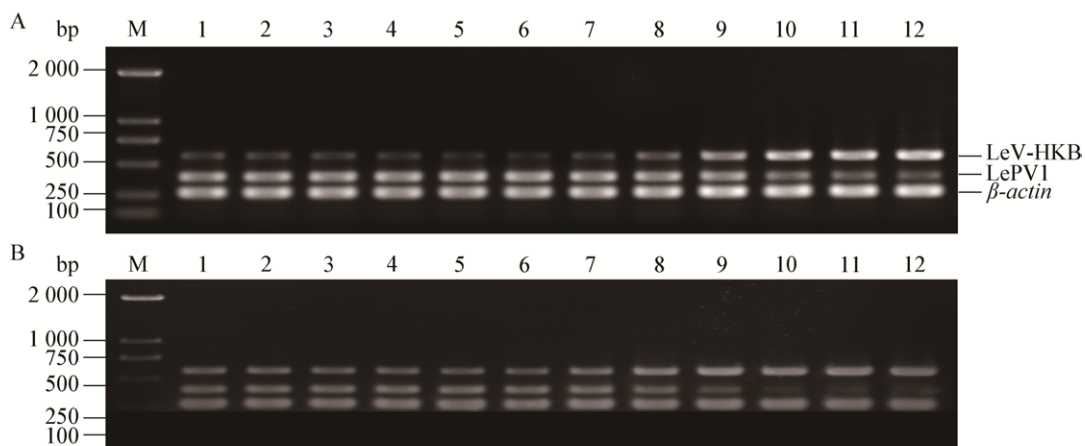


图 1 RNA 浓度和退火温度对多重 RT-PCR 反应的影响

Figure 1 Effects of the concentration of RNA and annealing temperature on mRT-PCR

注: M: DNA marker BM2000; 1–12: 退火温度依次为 48 、 48.7 、 49.5 、 50.6 、 51.8 、 53.2 、 54.7 、 56.1 、 57.4 、 58.6 、 59.4 和 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

A: cDNA 在反转录时添加的 RNA 总量为 $1\ 000\text{ ng}$; B: RNA 总量为 750 ng 。

Note: M: DNA marker BM2000; 1–12: The annealing temperature is 48 , 48.7 , 49.5 , 50.6 , 51.8 , 53.2 , 54.7 , 56.1 , 57.4 , 58.6 , 59.4 , and $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. A: The total amount of RNA in reverse transcription reaction is $1\ 000\text{ ng}$; B: The total amount of RNA in reverse transcription reaction is 750 ng .

循环次数分别设计为 30、35 和 40 次进行多重 RT-PCR 扩增。研究表明, 当循环数为 30 时, 3 个扩增的目标片段亮度随 cDNA 浓度降低而减弱, 且在本试验使用的浓度范围内扩增香菇 β -actin、LePV1 和 LeV-HKB 能获得清晰目的条带的最低 cDNA 浓度分别为 0.05、0.25 和 5.00 ng/ μ L (图 2A); 当循环数为 35 时, LePV1 和香菇 β -actin 的亮度随 cDNA 浓度变化不显著, 但 LeV-HKB 病毒的目标片段随 cDNA 浓度降低而减弱, 在使用的浓度范围内扩增香菇 β -actin、LePV1 和 LeV-HKB 能获得清晰目的条带的最低 cDNA 浓度分别为 0.05、0.05 和 0.50 ng/ μ L (图 2B); 当循环数为 40 时, 3 个目标条带亮度随 cDNA 浓度变化不明显(图 2C)。

2.3 引物浓度和 dNTP 浓度对多重 RT-PCR 扩增效率的影响

在以上研究的基础上, 对引物浓度(0.15、0.20、0.25、0.30 和 0.35 μ mol/L)和 dNTP 浓度(0.15、0.20、

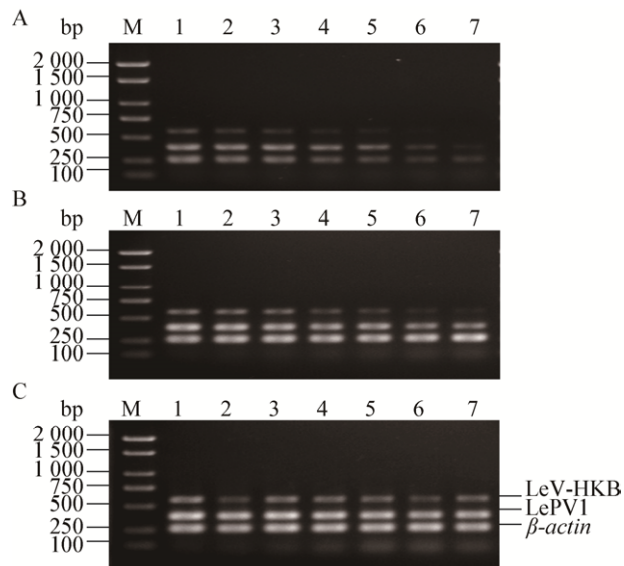


图2 cDNA 浓度和循环次数对多重 RT-PCR 反应的影响
Figure 2 Effects of cDNA template concentration and cycles on mRT-PCR

注: M: DNA marker BM2000+; 1-7: 20 μ L PCR 体系中 cDNA 浓度分别为 50、25、5、2.5、0.5、0.25 和 0.05 ng/ μ L。A: 循环数为 30; B: 循环数为 35; C: 循环数为 40。

Note: M: DNA marker BM2000+; 1-7: cDNA concentration in the 20 μ L PCR system as followed, 50, 25, 5, 2.5, 0.5, 0.25 and 0.05 ng/ μ L. A: 30 cycles; B: 35 cycles; C: 40 cycles.

0.25、0.30 和 0.35 μ mol/L)进行了筛选。研究结果(图 3)表明, 多重 RT-PCR 扩增的 3 个目标片段在引物浓度和 dNTP 浓度均为 0.25 μ mol/L 时最亮。

2.4 多重 RT-PCR 检测体系确立及适用性评价

根据以上研究结果, 确定 LeV-HKB (或 LeV-HKB 相关病毒)和 LePV1 半定量多重 RT-PCR 检测的反应体系。半定量多重 RT-PCR 反应体系(20 μ L)为 RNA 浓度 50 ng/ μ L 进行反转录; PCR 反应体系: 10 \times PCR buffer (Mg²⁺ plus) 2 μ L, 10 μ mol/L dNTPs 1 μ L, 10 μ mol/L LeV-HKB (或 LeV-HKB 相关病毒)引物 0.5 μ L, 10 μ mol/L LePV1 引物 1 μ L, 5 U/ μ L rTaq 0.2 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 加 ddH₂O 补足 20 μ L。优化的半定量多重 PCR 条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

利用该多重检测体系, 对 56 个香菇核心种质菌株(表 2)进行 LeV-HKB (或 LeV-HKB 相关病毒)和 LePV1 病毒检测的结果表明, 这 2 种病毒扩增的目的条带清晰分明(图 4), 且检测的供试菌株中

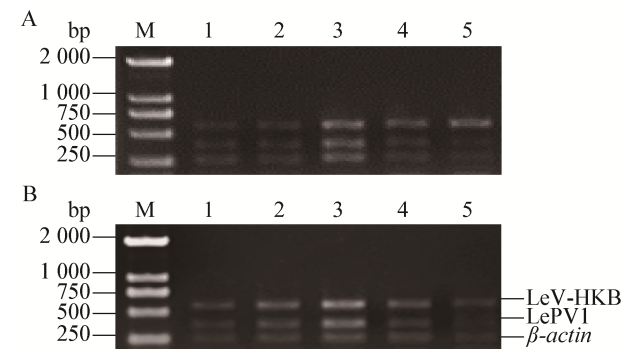


图3 引物浓度和 dNTP 浓度对多重 RT-PCR 检测结果的影响

Figure 3 Effects of primer and dNTP concentration in mRT-PCR

注: M: DNA marker BM2000。A: 引物浓度对检测结果的影响, 1-5: 引物浓度分别为 0.15、0.20、0.25、0.30 和 0.35 μ mol/L; B: dNTP 浓度对检测结果的影响, dNTP 浓度分别为 0.15、0.20、0.25、0.30 和 0.35 μ mol/L。

Note: M: DNA marker BM2000. A: Effects of primer concentration in detection, 1-5: The concentrations of primers were 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 and 0.35 μ mol/L; B: Effects of dNTP concentration in detection, 1-5: The concentrations of dNTP were 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 and 0.35 μ mol/L.

表 2 香菇核心种质菌株名称、来源及试验编号

Table 2 The name, source and number of *Lentinula edodes* core collection

菌株名 Strain name	菌株来源 Source	试验编号 Number	菌株名 Strain name	菌株来源 Source	试验编号 Number
S605	上海 Shanghai	Z2	EFISAAS0229	贵州省仁怀市 Huairan, Guizhou	Y1
Cr04	福建三明 Sanming, Fujian	Z6	EFISAAS0351	云南省景东县 Jingdong, Yunnan	Y5
L12	福建三明 Sanming, Fujian	Z9	00167	云南省姚安县 Yaoan, Yunnan	Y7
L135	福建三明 Sanming, Fujian	Z10	00168	云南省香格里拉县 Xianggelila, Yunnan	Y8
L856	福建三明 Sanming, Fujian	Z20	ACCC50786	安徽省黄山市 Huangshan, Anhui	Y11
S602	上海 Shanghai	Z23	GAN059	甘肃省康县 Kangxian, Gansu	Y14
广香-51 Guangxiang-51	广东广州 Guangzhou, Guangdong	Z27	HUB39	湖北省神农架林区 Shennongjia, Hubei	Y29
沪农-1 Hunong-1	上海 Shanghai	Z28	HUB40	湖北省神农架林区 Shennongjia, Hubei	Y30
华香-8 Huaxiang-8	湖北武汉 Wuhan, Hubei	Z31	HUB91	湖北省长阳县 Changyang, Hubei	Y37
庆科-20 Qingke-20	浙江丽水 Lishui, Zhejiang	Z42	HN002	湖南省郴州市 Chenzhou, Hunan	Y39
秋-6 Qiu-6	湖北武汉 Wuhan, Hubei	Z47	SHL044	陕西省坝县 Baxian, Shaanxi	Y51
日丰-34 Rifen-34	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	Z48	NO.41	江西省修水县 Xiushui, Jiangxi	Y55
森源-10 Senyuan-10	湖北宜昌 Yichang, Hubei	Z49	LeQc743s	四川省青川县 Qingchuan, Sichuan	Y70
森源-1 Senyuan-1	湖北宜昌 Yichang, Hubei	Z50	LeWs735	四川省德昌县 Dechang, Sichuan	Y76
森源-2 Senyuan-2	湖北宜昌 Yichang, Hubei	Z51	LHLy14	四川省会理县 Huili, Sichuan	Y78
430	湖北武汉 Wuhan, Hubei	Z64	LHLy217	四川省会理县 Huili, Sichuan	Y79
908	河南南阳 Nanyang, Henan	Z67	LMLH14	四川省冕宁县 Mianning, Sichuan	Y84
868*	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	Z82	LMLH36	四川省冕宁县 Mianning, Sichuan	Y88
香九 Xiangjiu	广东广州 Guangzhou, Guangdong	Z85	LMLH52	四川省冕宁县 Mianning, Sichuan	Y89
雨花-2 Yuhua-2	河南驻马店 Zhumadian, Henan	Z87	LMLH59	四川省冕宁县 Mianning, Sichuan	Y91
雨花-4 Yuhua-4	河南驻马店 Zhumadian, Henan	Z88	LMLH116	四川省冕宁县 Mianning, Sichuan	Y94

(待续)

			(续表 2)		
YAASM234	云南省南华县 Nanhua, Yunnan	Y234	LMLHA18	四川省冕宁县 Mianning, Sichuan	Y100
YAASM358	云南省楚雄市 Chuxiong, Yunnan	Y358	LMLHA36	四川省冕宁县 Mianning, Sichuan	Y104
YAASM366	云南省楚雄市 Chuxiong, Yunnan	Y366	LMLHL22	四川省冕宁县 Mianning, Sichuan	Y110
YAASM1515	云南省漾濞县 Yangbi, Yunnan	Y1515	LMLHL26	四川省冕宁县 Mianning, Sichuan	Y111
YAASM1518	云南省漾濞县 Yangbi, Yunnan	Y1518	LMLHL210	四川省冕宁县 Mianning, Sichuan	Y113
YAASM3334	云南省龙陵县 Longling, Yunnan	Y3334	LMYP62**	四川省米易县 Miyi, Sichuan	Y118
YAASM3353	云南省宜良县 Yiliang, Yunan	Y3353	LPG82**	四川省普格县 Puge, Sichuan	Y121

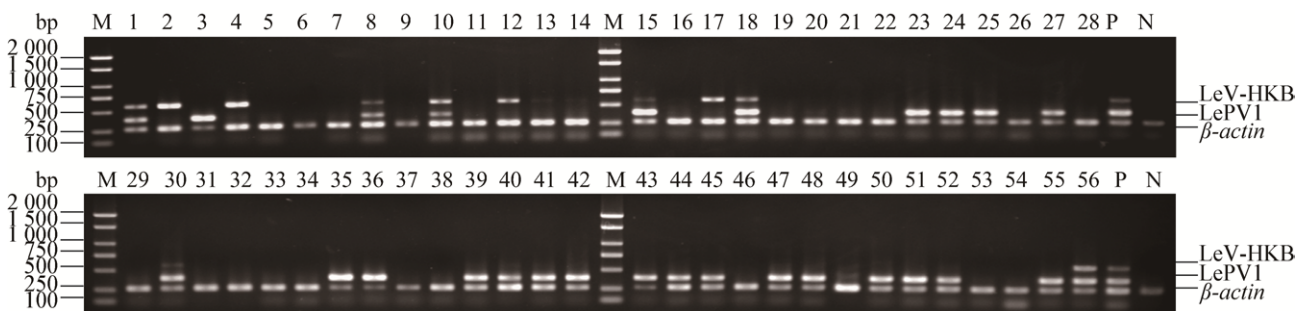


图 4 优化的多重 RT-PCR 检测香菇核心种质中病毒携带情况

Figure 4 Viruses detection of *Lentinula edodes* core collections using the developed multiplex RT-PCR

Note: M: DNA marker BM2000+; P: Positive control (viruses infected); N: Negative control (viruses-free). 1-55: ZP2, ZP6, ZP9, ZP10, ZP20, ZP23, ZP27, ZP28, ZP31, ZP42, ZP47, ZP48, ZP49, ZP50, ZP51, ZP64, ZP67, ZP82, ZP85, ZP87, ZP88, YS1, YS5, YS7, YS8, YS11, YS14, YS29, YS30, YS37, YS39, YS51, YS55, YS70, YS76, YS78, YS79, YS84, YS88, YS89, YS91, YS94, YS100, YS104, YS110, YS111, YS113, YS118, YS121, YS234, YS358, YS366, YS1515, YS1518, YS3334 and YS3353.

仅感染 LeV-HKB 病毒的菌株有 6 个, 仅感染 LePV1 的菌株 20 个, 复合感染 LeV-HKB 和 LePV1 病毒的菌株有 7 个(图 4), 该结果与单重 RT-PCR 检测结果一致^[11,16]。

2.5 多重 RT-PCR 产物测序

选择多重 RT-PCR 扩增的 ZP28 菌株的 2 个病毒目标片段进行克隆测序, 结果表明, 扩增的 LeV-HKB 片段序列与 NCBI 数据库中 LeV-HKB 病毒 RdRp 序列(GenBank 登录号为 AB429556)相似性为 99%, 而扩增的 LePV1 片段序列与 LePV1

病毒序列(GenBank 登录号为 KX354971)相似性为 100%。

3 讨论与结论

与其他真菌病毒的研究相比较, 食用菌病毒的研究起步较晚, 范围较窄, 研究基础也较薄弱^[19]。大多数食用菌病毒的研究多停留在病毒的发现及检测上, 而且检测技术还有待进一步改进^[20]。真菌病毒主要通过带毒和不带毒菌丝之间的胞质融合进行水平传播, 以及通过带毒孢子进行垂直传播。

建立快速灵敏的病毒检测技术,在带毒菌株潜隐阶段或在带孢子弹射之前及早发现病毒和及时清理,是控制食用菌病毒病危害的一种较为有效的方法。本试验建立了能同时检测香菇中2种主要病毒LeV-HKB病毒(或LeV-HKB相关病毒)和LePV1病毒的多重RT-PCR检测技术,目的片段大小分别为589 bp和389 bp;此外,在RT-PCR体系中增加香菇 β -actin的特异性引物(目的片段258 bp)作为内参,一方面可以反映RNA提取及cDNA反转录的质量,另一方面可以通过比较病毒目的条带与 β -actin目的条带亮度半定量地反映病毒含量。在大量检测香菇样品,尤其是复合感染样品时,与单一RT-PCR相比,本研究建立的多重RT-PCR检测方法具有操作简便、成本低廉、耗时少的优点。该方法是在食用菌病毒检测中的首次应用,未来在发现更多香菇病毒及其分子特征的基础上,可尝试在该反应体系中增加扩增相应新发现病毒的特异性引物,进行更多香菇病毒的多重RT-PCR检测。

REFERENCES

- [1] Chang ST, Miles PG. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact[M]. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2004: 1-9
- [2] Ushiyama R, Nakai Y, Ikegami M. Evidence for double-stranded RNA from polyhedral virus-like particles in *Lentinus edodes* (Berk.) Sing[J]. Virology, 1977, 77(2): 880-883
- [3] Yu SQ, Wang MQ, Zhang RP, et al. Studies on *Lentinus edodes* virus diseases I. The occurrence of *Lentinus edodes* viruses in China[J]. Acta Mycologica Sinica, 1985, 4(2): 125-129 (in Chinese)
于善谦, 王鸣岐, 张若平, 等. 香菇病毒的研究 I. 发生在我国的香菇病毒[J]. 真菌学报, 1985, 4(2): 125-129
- [4] Shen XR, Shen JY, Chen ZY, et al. A single-stranded virus isolated from Shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing[J]. Virologica Sinica, 1992, 7(1): 99-105 (in Chinese)
沈学仁, 沈菊英, 陈作义, 等. 一种含有单链RNA的香菇球状病毒[J]. 中国病毒学, 1992, 7(1): 99-105
- [5] Liang ZP, Zhang XX, Gao P, et al. Two kind viruses isolated from fruitbody of *Lentinus edodes*[J]. Edible Fungi of China, 2005, 24(6): 32-33 (in Chinese)
梁振普, 张小霞, 高鹏, 等. 从香菇子实体中分离了两种病毒[J]. 中国食用菌, 2005, 24(6): 32-33
- [6] Yao L, Chen CL, Zhang ZX, et al. The partial genome cDNA sequence of a novel dsRNA virus from *Lentinus edodes* and the virus detected by RT-PCR[J]. Microbiology China, 2010, 37(1): 61-70 (in Chinese)
姚立, 陈春乐, 张忠信, 等. 一种新香菇病毒基因组部分cDNA序列及病毒RT-PCR检测[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 61-70
- [7] Magae Y. Molecular characterization of a novel mycovirus in the cultivated mushroom, *Lentinula edodes*[J]. Virology Journal, 2012, 9(1): 60
- [8] Won HK, Park SJ, Kim DK, et al. Isolation and characterization of a mycovirus in *Lentinula edodes*[J]. Journal of Microbiology, 2013, 51(1): 118-122
- [9] Kim JM, Jung JE, Park JA, et al. Biological function of a novel chrysovirus, CnV1-BS122, in the Korean *Cryphonectria nitschkei* BS122 strain[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(1): 1-3
- [10] Ohta C, Taguchi T, Takahashi S, et al. Detection of double stranded RNA elements in cultivated *Lentinula edodes*[J]. Mushroom Science and Biotechnology, 2008, 16: 155-158
- [11] Guo MP, Bian YB, Wang JJ, et al. Biological and molecular characteristics of a novel partitivirus infecting the edible fungus *Lentinula edodes*[J]. Plant Disease, 2017, 101(5): 726-733
- [12] Chen CL, Zhang ZX, Ying GH, et al. Detection of a rod-shaped virus in *Lentinula edodes* mycelium using RT-PCR[J]. Acta Edulis Fungi, 2011, 18(3): 79-82 (in Chinese)
陈春乐, 张忠信, 应国华, 等. 香菇菌丝体杆形病毒的RT-PCR检测及鉴定[J]. 食用菌学报, 2011, 18(3): 79-82
- [13] Thompson JR, Wetzel S, Klerks MM, et al. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control[J]. Journal of Virological Methods, 2003, 111(2): 85-93
- [14] Pei GQ, Dong YF, Zhang ZP, et al. Detection of four grapevine leafroll-associated viruses by multiplex RT-PCR[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(1): 21-26 (in Chinese)
裴光前, 董雅凤, 张尊平, 等. 4种葡萄卷叶伴随病毒多重RT-PCR检测[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 21-26
- [15] Jiang SH, Cheng XM, Song CX, et al. Establishment of multiplex RT-PCR system for detection of three viruses in sweet potato[J]. Plant Protection, 2017, 43(1): 126-130 (in Chinese)
蒋素华, 程喜梅, 宋彩霞, 等. 三种甘薯病毒多重RT-PCR检测技术的建立[J]. 植物保护, 2017, 43(1): 126-130

- [16] Wang JJ, Guo MP, Sun YJ, et al. Detection of the occurrence of two major viruses *Lentinula edodes* mycovirus HKB and *L. edodes* partitivirus 1 in Chinese *L. edodes* germplasm resources[J]. *Mycosystema*, 2018, 37(4): 522-537 (in Chinese)
王锦杰, 郭孟配, 孙艺嘉, 等. 中国香菇种质资源中两种主要病毒的携带情况检测[J]. *菌物学报*, 2018, 37(4): 522-537
- [17] Xiao Y, Cheng XJ, Liu J, et al. Population genomic analysis uncovers environmental stress-driven selection and adaptation of *Lentinula edodes* population in China[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36789
- [18] Shui PR, Zheng XB, Lin JF, et al. A rapid and efficient method for isolating high quality total RNA from edible fungi[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2008, 15(1): 32-36
税丕容, 郑晓冰, 林俊芳, 等. 简便高质量的食用菌总 RNA 提取方法[J]. *食用菌学报*, 2008, 15(1): 32-36
- [19] Sahin E, Akata I. Viruses infecting macrofungi[J]. *Virusdisease*, 2018, 29(1): 1-18
- [20] Wu XP, Wang L, Xie BG, et al. Studies on virus-free strain of *Lentinula edodes*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(24): 44-49 (in Chinese)
吴小平, 王丽, 谢宝贵, 等. 香菇菌株的脱毒研究[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(24): 44-49

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊, 中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今, 本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”、“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.1451)