

一种新香菇病毒基因组部分 cDNA 序列 及病毒 RT-PCR 检测

姚立¹ 陈春乐¹ 张忠信^{1*} 应国华^{2,3*} 孙修炼¹ 吕明亮^{2,3} 薛振文^{2,3} 李伶俐^{2,3}

(1. 中国科学院武汉病毒研究所 病毒学国家重点实验室 湖北 武汉 430071)

(2. 浙江丽水市林业科研院 浙江 丽水 323000)

(3. 丽水市大山菇业研究开发有限公司 浙江 丽水 323000)

摘要: 本文报道从香菇菌丝体和子实体中分离到一种大小约 20 nm × (100–200) nm 的杆形病毒颗粒, 病毒基因组是大小约 8.0 kb 的 dsRNA。对病毒基因组部分 cDNA 序列进行克隆, 完成 1457 bp 的核酸序列测定(Accession No: GQ372842), 该序列含 1 个不完整 ORF, 编码 314 个氨基酸残基, 推测为病毒 RNA 聚合酶部分序列。病毒基因组部分 cDNA 序列与 GenBank 中的已知核酸序列无明显同源性, 表明它可能是新发现食用真菌病毒。为了对实验室和野外的香菇病毒进行快速检测, 我们根据得到的病毒基因组部分 cDNA 序列设计特异性引物, 建立了一种方便、有效检测香菇病毒的 RT-PCR 方法, 对感染病毒异常菌丝体中的病毒成功地进行了检测。

关键词: 香菇病毒, 双链 RNA, 基因组部分 cDNA 序列, RT-PCR 检测

The Partial Genome cDNA Sequence of a Novel dsRNA Virus from *Lentinus edodes* and the Virus Detected by RT-PCR

YAO Li¹ CHEN Chun-Le¹ ZHANG Zhong-Xin^{1*} YING Guo-Hua^{2,3*} SUN Xiu-Lian¹
LV Ming-Liang^{2,3} XUE Zheng-Wen^{2,3} LI Ling-Li^{2,3}

(1. State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences,
Wuhan, Hubei 430071, China)

(2. Lishui Forestry Research Institute, Lishui, Zhejiang 323000, China)

(3. Dashan Mushroom Product Company, Lishui, Zhejiang 323000, China)

Abstract: In this paper, a mycovirus was isolated from an edible mushroom, *Lentinus edodes*, in China. The virus particle is bacilliform with a size of 20 nm × (100–200) nm and contains a dsRNA genome about 8.0 kb. A fragment with 1457 bp of virus genome cDNA was cloned and sequenced (Accession No. GQ372842). This partial genome sequence has no obvious homology with known nucleic acid sequences in GenBank, which suggested that the virus may be a novel mycovirus. To detect the virus from *Lentinus edodes* in labo-

ratory or field, we developed a convenient and effective RT-PCR method. With this method, the specific RT-PCR product was successfully amplified from the abnormal mycelia.

Keywords: Lentinus edodes virus, Partial genome cDNA, Viruses detected, RT-PCR

真菌病毒几乎在所有真菌种类中都存在,食用真菌病毒可引起重要蘑菇病害,使具有经济价值的蘑菇生产遭受严重损失。从上世纪 60 年代开始,国内外就先后从双孢菇(*Agaricus bispore*)、香菇(*Lentinus edodes*)、平菇(*Pleurotus ostreatus*)、草菇(*Volvariella volvacea*)、茯苓(*Wolfiporia cocos*)、银耳(*Tremella fuciformis*)和金针菇(*Flammulina velutipes*)等中发现食用真菌病毒^[1-6]。然而,早期食用真菌病毒研究主要是进行病毒形态观察,病毒分子生物学研究报道甚少,直到近年才出现食用真菌病毒基因组序列的报道^[7]。

香菇是我国栽培的主要食用真菌,年产鲜香菇 140 多万吨。地处浙江南部山区的丽水市是世界人工栽培香菇的发源地,鲜香菇年产量 40-45 万吨,是目前全球最大的香菇产销集散地^[8-9]。但随着香菇栽培规模扩大,近年出现不同程度的香菇病毒病危害。香菇感染病毒后菌丝体生长缓慢,长势减弱,子实体畸形,质量和产量严重下降。香菇病毒病给菇农带来惨重经济损失,严重威胁香菇产业的健康发展。

香菇病毒和其他食用真菌病毒一样,通常以几种病毒混合的方式侵染宿主,在电镜下几种病毒也呈现不同的形态^[10-13],但香菇病毒分子生物学研究相对滞后,直到目前还未见香菇病毒基因组序列的报道,使病毒的早期检测和控制难以实现。本文在分离香菇病毒、电镜观察病毒形态结构的基础上,首次报道香菇病毒部分基因组序列,并根据部分基因组序列设计特异性引物,建立 RT-PCR 检测香菇病毒方法,对菌丝体中香菇病毒进行成功检测。本文研究结果为完成香菇病毒全基因组分析奠定了基础,也为建立香菇菌种脱毒技术,促进香菇产业持续优质高产奠定了很好的基础。

1 材料与方法

1.1 载体和宿主菌

克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司, pGEM-T Easy 克隆载体购自 Promega 公司, 宿主菌 DH5 α 为本

室保存。

1.2 主要试剂

Taq 酶、dNTP 和高保真 DNA 聚合酶 Pfu 均购自上海申能博彩公司; T4 DNA 连接酶、T4 RNA 连接酶、RNase A、RNase inhibitor、DNase I (RNase free)、限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司; 反转录酶 M-MLV 购自 Promega; 反转录酶 Superscript II 和 RNA 抽提 Trizol 购自 Invitrogen; 蛋白酶 K 购自天根公司; DNA 回收试剂盒, 质粒小量提取试剂盒均购自 Omega 公司; 标准分子量蛋白购自 TIANGEN 和 TaKaRa 公司; 蛋白酶抑制剂 PMSF 购自 Amresco 公司。

1.3 香菇菌株和菌丝体培养条件

香菇菌株由浙江丽水大山菇业研究开发有限公司提供。包括疑似病毒感染的 868-1 异常菌丝体、868-2 异常菌丝体、908 异常菌丝体及相应对照正常菌丝体, WL 畸形株(武香畸形株)菌丝体, 总计 7 种株型。

868-1 正常与异常株, 868-2 正常与异常株, 908 异常株和 WL 畸形株(武香畸形株) 6 种株型分别在实验室条件下扩大培养。扩大培养使用香菇完全培养基 PDA(固体培养基)或 PDY(液体培养基), 在 25℃ 恒温摇床中 200 r/min 振荡培养 20 d。

1.4 香菇病毒的分离纯化和电镜观察

香菇病毒的分离和电镜观察参照文献报道进行^[14-16]。收集培养的菌丝体(液体培养的过滤除去培养液), 用吸水纸尽量干燥(湿重 50 g)。放入-80℃ 冰箱保存备用。将菌丝体从-80℃ 取出, 放入 4℃ 冰箱让其缓慢融化。将菌丝体放入洗净预冷的研钵中。加入液氮充分研磨至粉末状。将研磨后的粉末加入适量体积的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(PBS, 含 0.1% 巯基乙醇, pH 6.8)。继续加入 0.05 mol/L EDTA, 2% Triton-X100 于冰上搅拌 30 min。破碎液 10000 r/min 离心 20 min。收集上清, 加入 PEG 6000 至 10%、NaCl 至 0.6 mol/L, 4℃ 过夜沉淀。将过夜处理的样品 12000 r/min 离心 30min, 弃上清, 收集沉淀。加入适量体积 PBS 重悬洗涤沉淀, 10000 r/min

离心 10 min, 收集上清。将收集到的上清超速离心: Beckman 70 Ti 转子 60000 r/min 离心 1.5 h, 所得沉淀用 0.2 mL PBS 重悬。将纯化的病毒滴在覆有 Formvar 的铜网上, 用 2% 的磷钨酸负染, 用日立 H-8100 透射电子显微镜观察照相。

1.5 香菇病毒核酸的分离与核酸类型鉴定

实验器具, 包括塑料制品和玻璃制品等, 全部用 0.1% DEPC 水浸泡处理。

为了提取香菇病毒基因组核酸, 对差速离心后得到的病毒粒子悬液, 使用 Invitrogen 公司的 Trizol 提取 RNA, 按试剂盒说明书进行操作。

为了鉴定香菇病毒基因组的核酸类型, 参照金针菇病毒和平菇病毒基因组鉴定方法^[5,19], 将提取的病毒核酸(500 ng)进行如下处理:

(1) 加入 RNase A (10 μ g/mL), 含高浓度的 NaCl (0.5 mol/L)。37°C 温育 30 min;

(2) 加入 RNase A (10 μ g/mL), 含低浓度的 NaCl (0.05 mol/L)。37°C 温育 30 min;

(3) 加入 DNase I (10 U/mL), 含适当浓度的 $MgCl_2$ (0.01 mol/L)。37°C 温育 30 min。

以上不同处理核酸样品进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 对病毒基因组的核酸类型进行鉴定。双链 RNA 阳性对照使用马尾松毛虫质型多角体病毒 (*Dendrolimus punctatus* cypovirus, DpCPV) 基因组第一片段(DpCPV S1)^[17]。

1.6 香菇病毒基因组部分 cDNA 的合成

香菇病毒基因组部分 cDNA 序列合成方法参照 Potgieter、刘莉和 Lambden 等的报道^[18-20]。使用 Invitrogen superscript II 反转录酶和六核苷酸的随机引物 (dN)₆, 合成香菇病毒基因组 RNA 的 cDNA 第 1 链。cDNA 第 2 链的合成参照 Sambrook 等的方法^[21]进行。

1.7 香菇病毒基因组部分 cDNA 的克隆与序列测定

在 T4 DNA 聚合酶作用下, 将扩增得到的 dsDNA 末端平滑化处理。在纯化后的 cDNA 末端加 poly(A)尾, 克隆到载体 pMD18-T 中。热处理转化 DH5 α 大肠杆菌。筛选阳性单克隆, 对筛选得到的重组子作酶切鉴定, 选择含较大插入序列的克隆样品进行序列测定。序列测定在上海英骏公司(Invitrogen)进行, 每个克隆样品测序至少重复 3 次。

1.8 RT-PCR 方法验证获得的 cDNA 序列来源于病毒基因组

为了验证获得的 cDNA 序列来源于病毒基因组 dsRNA, 根据获得的 cDNA 序列设计特异性引物, 用 RT-PCR 方法进行验证。正向引物(8 K-S1): 5'-CTA AGGCAAAGTCCAGGCACA-3', 反向引物 (8 K-A1): 5'-TCCAGCAGTATCAGAGTCCGTAGA-3', 验证方法参照文献报道方法进行^[15,22]。以病毒 8 kb dsRNA 为模板, 首先用反向引物和反转录酶产生第 1 链 cDNA, 然后使用序列特异性正向引物(8 K-S1)、反向引物(8 K-A1)和 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, PCR 的扩增条件为: 95°C 5 min; 94°C 50 s, 55°C 50 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min。

PCR 产物克隆到 pMD18-T 上, 转化 DH5 α 大肠杆菌进行测序, 序列测定结果与前面获得的 cDNA 序列进行比较, 验证获得的 cDNA 序列是病毒基因组 dsRNA 的部分 cDNA 序列。

1.9 病毒基因组部分 cDNA 的序列分析

基因组部分 cDNA 序列 GenBank 中的核酸序列进行比较。用 ORF finding 程序对部分 cDNA 进行检索, 将发现的部分 ORF 编码序列通过 NCBI BLASTX 程序与已知蛋白氨基酸序列进行对比, 搜索具较高相似性的序列, 推测病毒部分 ORF 可能编码蛋白。

1.10 建立 RT-PCR 检测香菇病毒的方法

为了建立 RT-PCR 快速检测香菇病毒方法, 我们参考 Seo 等的报道^[22], 首先利用已获得的病毒基因组部分 cDNA 序列设计特异性引物, 引物与病毒基因组鉴定使用的引物相同, 分别为正向引物 (8 K-S1)和反向引物(8 K-A1), 该引物对应的核酸片段大小为 1457 bp, 称为长片段 RT-PCR 检测。检测以香菇菌丝体或子实体提取的总 RNA 为模板, 先用反向引物和反转录酶合成第 1 链 cDNA, 再使用 *Taq* DNA 聚合酶和双向引物进行 PCR 扩增, PCR 的扩增条件为: 95°C 5 min; 94°C 50 s, 55°C 50 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 15 min。

为了增加香菇病毒检测的灵敏性, 我们设计了另一对引物检测香菇病毒核酸, 对应分子大小为 400 bp, 称为短片段 RT-PCR 检测。正向引物(8 K-S2)为: 5'-ACAAAAAGCAAAAGCCGAGAGC-3', 反向引物(8 K-A2)为: 5'-ATTGCGAAGAAGCCCGTAAG AT-3'。检测方法与前面的长片段 RT-PCR 检测方法

相同,以菌丝体或子实体总 RNA 为模板,PCR 的扩增条件为: 95°C 5 min; 94°C 50 s, 57°C 50 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经电泳检测,克隆测序确定检测结果。

2 结果与分析

2.1 感染香菇病毒菌丝体特征

为了研究香菇病毒是否影响宿主菌丝体的影响,我们将疑似感染病毒的香菇菌丝体(868-1 异常, 908 异常, WL 畸形)以及正常的香菇菌丝体(868-1 正常, 908 正常)分别在 PDA 培养基上培养, 25°C 条件下培养 20 d 后,可明显看到不同菌株菌丝体生长出现差异。868-1 异常菌丝体较 868-1 正常菌丝体生长缓慢,且菌丝形状不规则; 908 异常菌丝体较 908 正常菌丝体同样生长缓慢,菌丝形状不规则; WL 畸形菌株症状与 868-1 异常和 908 异常相似。这些结果与以前报道的正常香菇菌丝体生长速度明显快于病毒感染菌株的结果^[23]相一致。

2.2 香菇病毒电镜检测结果

疑似感染病毒的菌丝体加液氮研磨,加缓冲液离心去除组织碎片和其他杂质,上清通过超速离心进一步分离纯化,得到的样品在透射电子显微镜下观察,可看到一种杆形病毒颗粒,大小约为 20 nm × (100–200) nm (图 1)。病毒颗粒在疑似染病的异常菌丝体以及人工培养的香菇子实体中均有发现。

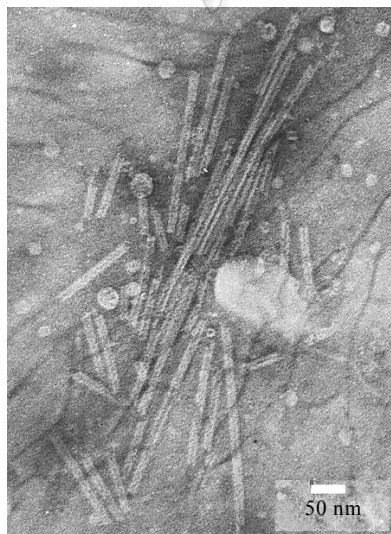


图 1 电镜下观察的香菇病毒

Fig. 1 Electron micrograph of the *Lentinus edodes* virus particles

Note: The bar: 50 nm. The size of the bacilliform virus particles is 20 nm × (100–200) nm.

2.3 香菇病毒核酸分离与核酸类型鉴定结果

利用本实验室保存的菌丝体,分离纯化香菇病毒。病毒悬液经降解后提取病毒基因组核酸,在琼脂糖凝胶上电泳分离,结果见图 2,在琼脂糖凝胶上至少出现一条明显的病毒核酸条带,分子大小约 8.0 kb。

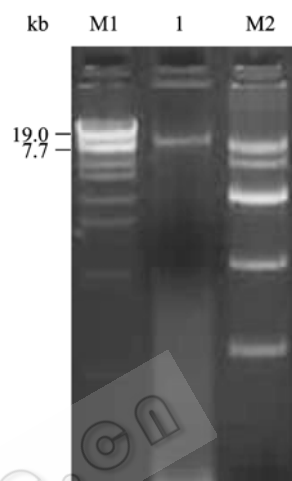


图 2 香菇病毒核酸 1%琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the nucleic acids from the purified *Lentinus edodes* bacilliform virus

Note: M1: λ -EcoT14 I digest DNA marker (TaKaRa); M2: Marker IV (TIANGEN); 1: The virus genome (8.0 kb).

RNase A 在高盐的浓度(0.3 mol/L NaCl 或者更高)条件下,只能特异性切割单链 RNA,而在低盐浓度(0–100 mmol/L NaCl)条件下,可同时切割单链 RNA 和双链 RNA^[21]。为了鉴定病毒基因组是单链 RNA 还是双链 RNA,我们分别在高盐和低盐浓度条件下用 RNase A 处理病毒基因组核酸,电泳结果见图 3。香菇病毒基因组核酸未用任何核酸酶处理的样品为对照(图 3 中 1);香菇病毒基因组核酸用 DNase I 酶处理,电泳带型与对照样品完全一样,说明病毒基因组核酸不是 DNA 而可能是 RNA;在高盐浓度(0.5 mol/L NaCl)条件下,香菇病毒基因组核酸用 RNase A 处理后,电泳带型与对照样品仍然一致(图 3 中 3),而在低盐浓度(0.05 mol/L NaCl)条件下用 RNase A 处理,病毒基因组的 8.0 kb 条带消失(图 3 中 4),表明香菇病毒基因组核酸是双链 RNA。阳性对照样品 DpCPV S1 dsRNA 的处理方法与上相同,电泳结果也相似(图 3 中 5–7),再次说明香菇病毒基因组核酸与 DpCPVS1 dsRNA 相同。

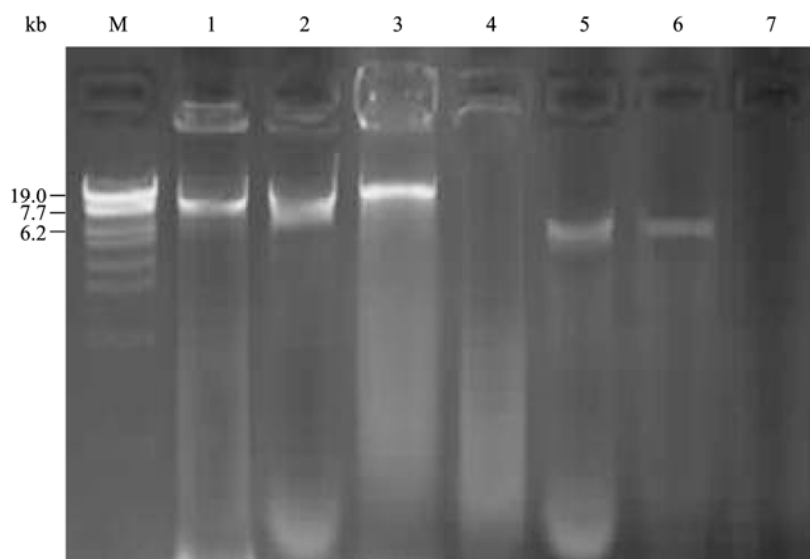


图 3 香菇病毒核酸类型鉴定

Fig. 3 Ionic strength dependent sensitivity of purified viral nucleic acids to hydrolysis by nucleases

Note: M: λ -EcoT14 I digest DNA marker (TaKaRa); 1: The viral nucleic acids (8.0 kb) was incubated without nuclease; 2: The nucleic acids was treated with DNase I (10 U/mL); 3,4: The nucleic acids was treated with RNase A (10 μ g/mL) in 0.5 mol/L NaCl and 0.05 mol/L NaCl, respectively; 5: The DpCPV S1 dsRNA was treated with DNase I (10 U/mL) as positive control; 6,7: The DpCPV S1 dsRNA was treated with RNase A (10 μ g/mL) in 0.5 mol/L NaCl and 0.05 mol/L NaCl, respectively.

2.4 香菇病毒基因组部分 cDNA 序列的合成、克隆和序列分析结果

2.4.1 病毒 8 kb dsRNA 基因组部分 cDNA 序列的合成和克隆:

利用 Invitrogen Superscript II 反转录酶和随机引物六聚体, 以病毒 8 kb dsRNA 基因组为模板, 合成病毒基因组部分 cDNA 序列。将纯化后的 cDNA 末端加 poly(A) 尾, 克隆到载体 pMD18-T 中。热处理转化 DH5 α 大肠杆菌。筛选阳性单克隆, 对筛选得到的重组子做酶切鉴定。筛选得到 6 个独立克隆子, 含有分子大小不等的病毒基因组 cDNA 片段。其中一个克隆子含较大的 cDNA 片段, 分子大小约为 1.5 kb 左右, 命名为 8 k-n1, 图 4 显示含 8 k-n1 片段克隆子的双酶切鉴定结果。

2.4.2 8 k-n1 不完整 ORF 编码序列推测是病毒 RNA 聚合酶片段:

经过序列测定, 发现病毒基因组部分 cDNA 8 k-n1 的序列长度为 1457 bp, 该序列已被 GenBank 接收(Accession No: GQ372842)。将得到的序列通过 NCBI 的 BLAST 进行, 发现 8 k-n1 序列与 GenBank 中的已知核酸序列无明显同源性。通过 NCBI 的 ORF Finder 检索, 发现一个不完整的 ORF, 编码 314 个氨基酸残基, 命名为 8 k-n1 ORF 1(图 5)。

使用 BLASTP 程序在 NCBI 中进行对比, 发现 8 k-n1 ORF 1 与植物毛果杨染色质修复复合体亚单位 [Chromatin remodeling complex subunit (*Populus trichocarpa*)] 有同源性, 毛果杨是完成全基因组序列

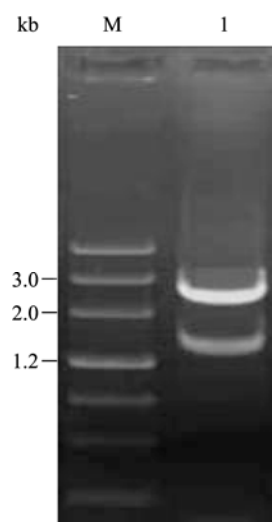


图 4 含 8 k-n1 片段 cDNA 克隆子双酶切鉴定的电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of the 8 k-n1 cDNA clone digested by two endonucleases

Note: M: DNA marker III (TaKaRa); 1: The 8 k-n1 cDNA clone digested by *Bam*H I and *Hind* III endonucleases.

的植物之一^[24]。8 k-n1 ORF 1 编码序列的第 152–212 位氨基酸残基与毛果杨染色质修复复合体亚单位对应区域的氨基酸序列一致性为 29%，相似性 40%。8 k-n1 ORF 1 还与酵母 RNA 聚合酶有同源性，第 241–305 位氨基酸残基与真核生物酵母 RNA 聚合酶 II 对应区域的氨基酸序列一致性为 38%，相似性为 50% (图 5)。尽管 8 k-n1 ORF 1 是一个不完整的 ORF，但根据现有序列分析结果推测，8 k-n1 ORF 1 可能编码病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶或相关蛋白的部分序列。

另外，本研究在筛选含病毒基因组部分 cDNA 序列克隆中，还得到多个独立 cDNA 克隆子，含有较短的 cDNA 片段，这些 cDNA 片段的分子大小在 100–800 bp 之间，由于这些 cDNA 序列片段比较小且没有明显的 ORF，序列分析意义不大，没有在此一一列举，但这些小 cDNA 片段在以后的研究中可用来设计特异引物，利用 RT-PCR 方法扩增病毒基因组全长 cDNA 序列。

2.5 特异性引物 RT-PCR 试验证明，8 k-n1 片段来源于病毒基因组 RNA

为了验证从克隆子中所得到的 8 k-n1 序列是病毒基因组 8 kb dsRNA 中的部分 cDNA 序列，以得到的序列信息设计一对特异性引物 Primer 8 K-A1 和 Primer 8 K-S1，病毒颗粒中分离纯化到的 8 kb dsRNA 为模板，用反向引物和反转录酶合成 cDNA 第 1 链，然后利用 Primer 8 K-A1 和 Primer 8 K-S1 进行 PCR 扩增。RT-PCR 产物是一条约 1.5 kb 条带 (图 6)。将 RT-PCR 产物克隆 pMD18-T 中，转化 DH5 α 大肠杆菌，筛选阳性克隆，酶切鉴定正确后测序。测序结果与原序列一致，因此确定 1457 bp 片段 (8 k-n1) 是香菇病毒基因组 dsRNA (8 kb) 的部分 cDNA 序列。

2.6 dsRNA 方法检测香菇病毒感染的结果

在植物病毒的研究中，利用 dsRNA 方法可检测病毒感染。为了确定香菇病毒感染是否也能用 dsRNA 方法检测。提取对照 908 正常菌丝体、感染病毒的 908 异常菌丝体和 WL 畸形总 RNA 电泳，结果见图 7，对照 908 正常菌丝体中没有 8 kb dsRNA 条带 (图 7 中 1)；而 908 异常菌丝体和 WL 畸形中出现 8 kb dsRNA 条带 (图 7 中 2、3)，但条带不十分清晰，说明香菇病毒检测需要开发新的方法。

```

516 ttggcctgggggctagtgatcgtgagtcctatattttttcacg
    L A W G L V N R E S Y I I F T (15)
561 gatgagaactccttgctgaccttgccctttacctttctgatcat
    D E N S L L T L P F T F P D H (30)
606 ttctctgctgtttctctctcatcgatactctccccctacactct
    F L V V S S L I D T L P L H S (45)
651 cacctgctcttcagattcgtaacgcggattacagggtccacgacg
    H L L F R F V N A D Y R S T T (60)
696 agaactatcgatagtagacagataacgacggatgggggtgtgtgaa
    R T I D S T D N D G W G L L E (75)
741 aagtgggtcgatgaatcattttccaacaaagccagggaatgatt
    K W F D E S F S N Q S Q G M I (90)
786 caaacgtatcgacacatctcagtcctcggtacagggtggaaac
    Q N V S H T S Q S S V Q G W N (105)
831 ccatatgccacctccacacccccgactgtcaactattattgacc
    P Y A T S T P P D C Q T Y L T (120)
876 tcaagtctctctaccaacacctccaagtctcggtttatacatcacct
    S S S P T N P P S S V Y T S P (135)
921 tcatttttttcgacctctacttccacatttgactctgcatcc
    S F F S T S T S P F D T L P S (150)
966 ggtagcacctcgatgctaccacgcctctggagcgagggtatggc
    G S T S M L P P L W S E G Y G (165)
1011 aactttgatcagggtggttcattccatagtcctctcccgaatca
    N F D Q G G S F H S P S P E S (180)
1056 ctgcaacaagagcgagggtgtcgcgggtgccatcattcgccctttcc
    L Q Q E R G V A V P S F G L S (195)
1101 gcaacctcaggcgtagtgcactctgggcagcagttgcctacgact
    A T S G V G H S G Q Q L P T T (210)
1146 tatctctgggtaccagtcgcaagttccttgggtctgatatcgtgagt
    Y P G Y Q S Q V P W S D I V S (225)
1191 gaaggccaagctcaacaatttcagagcgacttccgtttcttgacc
    E G Q A Q Q F Q S D F R F L T (240)
1236 cgcacttccaaccaccaggagtagacgctgacactcaatcctac
    R T S N H Q G V H A D T Q S Y (255)
1281 cagaaggccctgctgctcaagccacctctgacgcgtgcgcaagc
    Q K A P A A Q A T S D R R R S (270)
1326 cagaacgtgttctgttcagacgacgacgaagcggagatgaagac
    Q K R V R S D D D E D G D E D (285)
1371 agtgtgagaccaagtggcgaagcgtacagaccagtgagacgaat
    S V R P S G K R S R P S G R N (300)
1416 cgatcccaaaacgagggtatctacgactctgatactgctgga 1457
    R S Q N E V S T D S D T A G

```

图 5 8 k-n1 ORF 1 编码序列

Fig. 5 Partial coding sequences of 8 k-n1 ORF 1

Note: The lowercase letters indicate the partial genome cDNA of the *Lentinus edodes* virus, the capital letters indicate the corresponding amino acid sequence encoded by the virus, the numbers in parentheses are the locations of the amino acid sequence; The capital letters in bold are part of the amino acid sequences homologized to the chromatin remodeling complex subunit of *Populus trichocarpa*; The italic capital letters are the amino acid sequences homologized to the RNA polymerase of yeast.

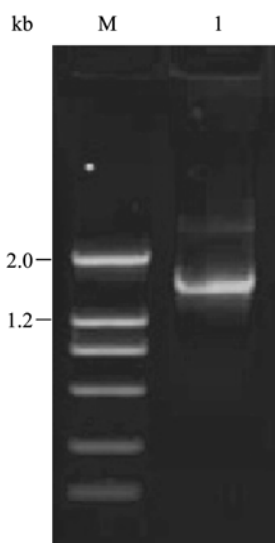


图 6 特异引物 RT-PCR 从病毒基因组 RNA 扩增 8 k-n1 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of 8 k-n1 amplified by RT-PCR from the viral genome dsRNA

Note: M: DL2000 marker (TaKaRa); 1: RT-PCR product of 8 k-n1.

2.7 建立 RT-PCR 方法检测香菇病毒的结果

2.7.1 长片段 RT-PCR 方法检测香菇病毒的结果:

香菇病毒可通过电镜观察病毒粒子及提取病毒基因组 RNA 进行鉴定,但由于香菇子实体和菌丝体含有大量多糖物质,从菌丝体和子实体中分离病毒颗粒非常困难,需要从数百克乃至上千克的病毒感染材料中才能得到少量病毒颗粒,而且需要大型电子显微镜观察,在香菇生产单位难以用电镜观察来检测病毒;由于病毒颗粒难以分离,病毒基因组也难以提取,且香菇中还含有本身的 RNA,因此用 dsRNA 方法检测香菇病毒的效果也不甚理想(图 7)。香菇病毒病防治中急需发展快速有效的香菇病毒检测方法。

RT-PCR 方法是快速灵敏检测蘑菇病毒的方法之一^[11,18],只要用少量的病毒感染材料就可快速检测病毒。为了建立 RT-PCR 检测香菇病毒的方法,我们首先根据 8 k-n1 序列设计特异性引物 Primer 8 K-S1 和 Primer 8 K-A1,引物对应的核酸片段为 1457 bp,建立长片段 RT-PCR 检测方法,以少量菌丝体或病毒感染样品提取 RNA 为模板,进行 RT-PCR 反应。试验结果显示,以 908 正常菌丝体提

取 dsRNA 为模板,没有扩增出明显条带(图 8 中 1);而以感染病毒 908 异常菌丝体和 WL 畸形株提取 dsRNA 为模板,均扩增出一条约 1.5 kb 特异性条带(图 8 中 2、3)。克隆测序证明这一条带与 8 k-n1 的序列一致。这些结果表明,用 RT-PCR 扩增 1457 bp 长片段核酸的方法,可以对感染香菇菌丝体或子实体的病毒进行快速检测。

2.7.2 短片 RT-PCR 检测香菇病毒: RT-PCR 扩增病毒感染宿主中的长片段(1457 bp) cDNA 虽然可以快速检测感染的病毒,但为了增加检测灵敏性,或建立更为方便灵敏的 RT-PCR-ELISA 方法,RT-PCR 扩增较短的核酸片段更为有利。因此,我们设计另一对特异性引物(正向引物 8 K-S2,反向引物 8 K-A2),对应于 8 k-n1 中的 400 bp 片段,以提取的总 RNA 为模板,建立短片 RT-PCR 检测香菇病毒的方法。RT-PCR 结果显示:在香菇 908 异常菌丝体与 WL 中,均可得到一条大小约为 400 bp 的条带(图 9 中 2、3),且该条带克隆测序结果与 8 k-n1 中对应区域的序列一致;而在对照香菇 908 正常菌丝体中,则没有发现明显的条带(图 9 中 1)。

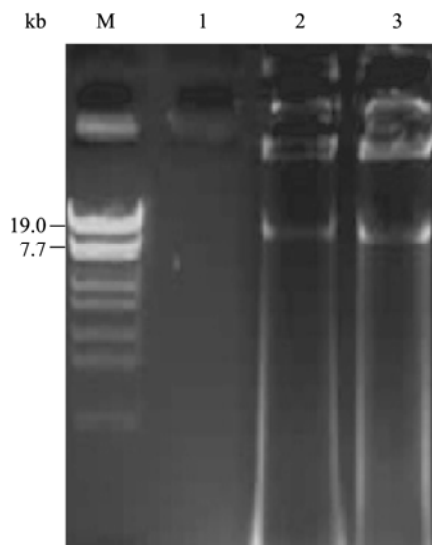


图 7 香菇菌丝体总 RNA 琼脂糖电泳检测

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of dsRNA detected in total nucleic acids of *L. edodes* mycelia

Note: M: λ -EcoT14 I digest DNA marker (TaKaRa); 1: Healthy mycelia of strain 908; 2: Diseased mycelia of strain 908; 3: Diseased mycelia of strain WL.

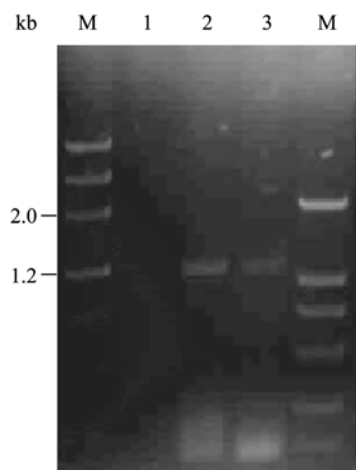


图 8 长片段 RT-PCR 检测香菇病毒结果的电泳

Fig. 8 Agarose gel electrophoresis of 1457 bp cDNA fragment amplified by RT-PCR from virus-infected or virus-free mycelia.

Note: M: Molecular markers; 1: RT-PCR products of healthy mycelia of strain 908; 2: RT-PCR products of diseased mycelia of strain 908; 3: RT-PCR products of diseased mycelia of strain WL.

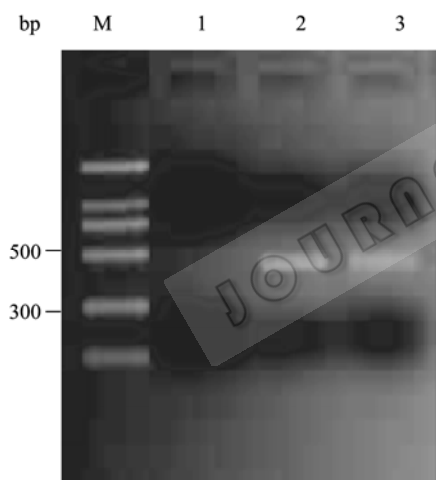


图 9 短片段 RT-PCR 方法检测香菇病毒结果的电泳

Fig. 9 Agarose gel electrophoresis of 400 bp cDNA fragment amplified by RT-PCR from virus-infected or virus-free mycelia

Note: M: DL2000 marker (TaKaRa); 1: RT-PCR product of Healthy mycelia of strain 908; 2: RT-PCR product of diseased mycelia of strain 908; 3: RT-PCR product of diseased mycelia of strain WL.

以上的试验结果说明, 利用 8 k-n1 中 400 bp 短片段的特异性引物, 通过 RT-PCR, 可以灵敏地检测香菇菌丝体中存在的病毒, 菌丝体样品可仅用 1 g 左右。这就为香菇病毒的检测提供了一种简便而灵敏的方法。该方法操作简单易行, 只需要少量的香菇菌丝体或子实体材料, 通过研磨匀浆后, 提取总

RNA, 利用 RT-PCR 的方法即可检验有无病毒。利用这种检测方法, 我们已对一批新培育的菌种组培进行选择, 培育了一些无病毒菌种。这些无毒菌种经扩繁, 无论通过电镜观察还是核酸鉴定, 都没有发现病毒感染的迹象。这些工作为今后开发更加灵敏高效香菇病毒检测试剂盒及培育优质无毒香菇菌种奠定了很好的基础。

3 讨论

通过分离和纯化, 本实验从浙江丽水市林科院、丽水市大山菇业研究开发有限公司提供的疑似病毒感染香菇菌丝体中成功分离到了一种病毒粒子。病毒形状为杆形, 大小约为 20 nm × (100–200) nm (图 1)。病毒颗粒在疑似染病的异常菌丝体以及人工培养的香菇子实体均有发现。上世纪 70 年代, Takehara 等在香菇中发现 2 种类病毒颗粒, 其中一种病毒颗粒与我们报道的病毒形态相似^[11], 但他们报道的病毒形态更细更长, 称为线状类病毒颗粒。另外, 在其他食用真菌如平菇、双孢菇和金针菇等中也发现类似的杆形病毒颗粒^[5,25]。

香菇病毒自从上世纪 60 年代日本科学家报道以来, 只做过形态学上的研究, 且研究近年来几乎停滞, 国内只有沈学仁等(1992)发现香菇菌丝中存在一种直径 34 nm 含 ssRNA 的球状病毒颗粒^[26], 梁振普报道香菇中存在球状和蝌蚪状病毒^[23]。本文报道的香菇杆形病毒, 在国内尚属首次报导。通过进一步的分析和实验, 我们发现病毒基因组是分子大小约 8.0 kb 的 dsRNA (图 2、3)。

对于分离到的 8 kb dsRNA, 我们用随机引物法进行 cDNA 合成, 得到了一些含不同分子大小的 cDNA 克隆, 其中一个克隆含较大的片段, 分子大小约为 1.5 kb (8 k-n1)。通过序列测定, 得到 1457 bp 的 8 k-n1 序列, 通过 NCBI 的 BLAST 分析发现, 这个序列与目前已知核酸序列无明显的同源性, 预示我们分离的香菇病毒可能是一个新真菌病毒。通过 NCBI 的 ORF Finder 和 DNASTAR 分析软件分析, 发现该片段有一个不完整 ORF, 编码 314 个氨基酸残基, 推测是病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶或相关

蛋白的部分序列。

无论是利用电镜观察病毒颗粒, 还是提取病毒 dsRNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 都可以有效进行香菇病毒检测。但由于香菇中含有大量多糖和次生代谢产物, 分离电镜检测所需的高纯度病毒颗粒或提取质量高且数量满足的香菇 RNA 都不容易^[27], 而且需要大量的病毒感染材料。实践中这两种方法检测香菇病毒都不方便。为了提高香菇病毒检测的灵敏性和便捷性, 我们根据测序且已经证明是病毒部分基因组的 8 k-n1 序列, 分别设计 2 对特异性引物, 一个目的片段大小 1457 bp, 称为长片段, 另一个为 400 bp, 称为短片段。以提取的香菇总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR。结果显示: 在感染香菇病毒的样品中, 均可得到相应大小的条带, 且核酸序列正确, 而在对照正常样品中, 则没有发现明显的条带。这说明利用特异性引物的 RT-PCR 方法, 可以快速方便检测香菇菌丝体中病毒的存在。这就为香菇无毒菌种培育中香菇病毒的检测提供了一种简便而灵敏的方法。对香菇栽培产业的持续稳定发展具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Hollings M. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature*, 1962(196): 962-964.
- [2] Schisler LC, Siden JW, Sigel EM. Etiology, symptomatology, and epidemiology of virus disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology*, 1967(57): 519-526.
- [3] Dieleman-van ZA. Intracellular appearance of mushroom virus infructing bodies and basidiospores of *Agaricus bisporus*. *Virology*, 1972(47): 94-104.
- [4] Ushiyama R, Nakai Y. Presence of polyhedral virus-like particles in shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Rep Tottori Mycol Ins (Japan)*, 1975(12): 53-60.
- [5] Magae Y, Hayashi N. Double-stranded RNA and virus-like particles in the edible basidiomycete *Flammulina velutipes* (Enokitake). *FEMS Microbiology Letters*, 1999(180): 331-335.
- [6] 徐章逸, 边银丙. 食用菌病毒病害研究进展. *食用菌学报*, 2008(15): 80-84.
- [7] Lim WS, Jeong JH, Jeong RD, *et al*. Complete nucleotide sequence and genome organization of a dsRNA partiti-virus infecting *Pleurotus ostreatus*. *Virus Res*, 2005(108): 111-119.
- [8] 张新华, 吴庆其. 丽水莲都区食用真菌产业发展现状及对策. *浙江林业科技*, 2006, 26(4): 73-76.
- [9] 顾新伟, 许志鸣, 张海娟, 等. 丽水香菇产业发展与森林资源利用状况分析. *浙江林业科技*, 2004, 24(2): 71-74.
- [10] Ushiyama R, Nakai Y, Ikegami M. Evidence for double-stranded RNA from polyhedral virus-like particles in *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Virology*, 1977(77): 880-883.
- [11] Takehara M, Kuida K, Mori K. Antiviral activity of virus-like particles from *Lentinus edodes* (Shiitake). *Arch Virol*, 1979(59): 269-274.
- [12] Ushiyama R, Nakai Y. Ultrastructural features of fungal virus-like particles from *Lentinus edodes*. *Virology*, 1982(123): 93-101.
- [13] 梁振普, 张小霞, 高鹏, 等. 从香菇子实体中分离了两种病毒. *中国食用真菌*, 2005(124): 32-33.
- [14] Kim YJ, Kim JY, Kim JH, *et al*. Identification of a novel PoV and determination of the distribution of viruses in mushroom spores. *The Journal of Microbiology*, 2008(46): 95-99.
- [15] Kim YJ, Park S, Yie SW, *et al*. RT-PCR detection of dsRNA mycoviruses infecting *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus blazei* Murrill. *Plant Pathol J*, 2008(21): 343-348.
- [16] Ro HS, Kang EJ, Yu JS, *et al*. Isolation and characterization of a novel mycovirus, PeSV, in *Pleurotus eryngii* and the development of a diagnostic system for it. *Bio-technol Lett*, 2007(29): 129-135.
- [17] Zhao SL, Liang CY, Hong JJ, *et al*. Genomic sequence analyses of segments 1 to 6 of *Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus. *Arch Virol*, 2003(148): 1357-1368.
- [18] Potgieter AC, Steele AD, Dijk AA. Cloning of complete genome sets of six dsRNA viruses using an improved cloning method for large ds RNA genes. *J Gen Virol*, 2002(83): 2215-2223.
- [19] 刘莉, 陈集双, 喻珊, 等. 萝卜中一未知 dsRNA 全长 cDNA 克隆及其序列. *园艺学报*, 2005(32): 881-884.
- [20] Lambden PR, Cooke SJ, Caul EO, *et al*. Cloning of non-cultivable human rotavirus by single primer amplification. *J Virol*, 1992(66): 1817-1822.
- [21] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [22] Seo JJ, Lim WS, Jeong JH, *et al*. Characterization and RT-PCR detection of dsRNA mycovirus from Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Plant Pathol J*, 2004(20): 200-205.
- [23] 杨清香, 王栋, 陈建军, 等. 香菇病毒对香菇菌丝生长

- 和漆酶活性的影响. 西北农业学报, 2008(17): 243-246.
- [24] Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, *et al.* The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 2006(313): 1596-1604.
- [25] Tavantzis SM, Romaine CP, Smith SH. Purification and partial characterization of a bacilliform virus from *Agaricus bisporus*: A single stranded RNA mycovirus. *Virology*, 1980(105): 94-102.
- [26] 沈学仁, 陈明杰. 一种含有单链RNA的香菇球状病毒. 中国病毒学, 1992(7): 99-105.
- [27] Li Jun-hui, Tang Chuan-hong, Song Chun-yan, *et al.* A simple, rapid and effective method for total RNA extraction from *Lentinula edodes*. *Biotechnol Lett*, 2006(28): 1193-1197.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《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的, 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。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程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和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高校教改纵横(原高等院校教学)、名师名课(原名师讲堂)、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 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、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 4 页以内, 研究报告 4-7 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“*et al.*”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, **34**(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2010-00-00; 接受日期: 2010-00-00

(下转 p.77)