

研究报告

中国香菇核心种质真菌病毒多样性检测及其携带特点分析

刘贤伟¹, 郭孟配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

刘贤伟, 郭孟配, 边银丙, 徐章逸. 中国香菇核心种质真菌病毒多样性检测及其携带特点分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3120-3136

Liu Xianwei, Guo Mengpei, Bian Yinbing, Xu Zhangyi. Mycovirus diversity in Chinese *Lentinula edodes* core collections[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3120-3136

摘要: 【背景】香菇病毒通常具有潜隐性特征, 携带病毒的香菇菌株往往并不表现出明显症状, 然而一旦发生常造成较大的经济损失。【目的】解析中国香菇核心种质中真菌病毒多样性特点。【方法】以 56 个中国香菇核心种质为试验材料, 采用 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测技术对 34 种香菇病毒携带情况进行检测和分析。【结果】研究表明, 分别有 14 种和 5 种香菇病毒的目标基因在绝大多数阳性菌株中扩增出较亮和较暗的条带, RT-qPCR 结果也表明阳性带毒香菇菌株中病毒目标基因的扩增结果与病毒含量呈正相关, 即病毒在阳性菌株中的含量越高则病毒扩增条带越亮; 被检测的 34 种香菇病毒中, LeFV5 和 LeMV1 检测率为 100%; 21 个栽培种质和 35 个野生种质中分别有 8 种和 6 种香菇病毒检测率为 80% 以上, 而且其中 4 种病毒相同(LeDFV2、LeFV2、LeSV 和 LeHV2); 栽培菌株和野生菌株携带病毒数分别为 8–21 种和 9–23 种, 平均每个菌株携带 16.4 种和 16.7 种。【结论】香菇种质资源中普遍携带复杂的多种真菌病毒, 被检测的病毒在阳性菌株中扩增亮度不同, 而且存在明显遗传差异的香菇菌株中携带的一些高检测率病毒相似, 暗示这些病毒在香菇进化早期就存在。

关键词: 真菌病毒; 病毒多样性; RT-PCR 检测

基金项目: 国家重点研发计划子课题(2019YFD1001905-35); 国家现代农业产业技术体系岗位科学家专项(CARS-20)

Supported by: Sub-Project of National Key Research and Development Program of China (2019YFD1001905-35); Modern Agroindustry Technology Research System on Edible Fungus of China (CARS-20)

*Corresponding author: E-mail: xuzhangyi@mail.hzau.edu.cn

Received: 2021-11-06; Accepted: 2022-04-09; Published online: 2022-05-17

Mycovirus diversity in Chinese *Lentinula edodes* core collections

LIU Xianwei¹, GUO Mengpei¹, BIAN Yinbing^{1,2}, XU Zhangyi^{*1,2}

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

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

Abstract: [Background] Viruses in *Lentinula edodes* lie latent for long periods before the appearance of symptoms. However, once reactivated, they will cause great economic loss. [Objective] To analyze the mycovirus diversity in Chinese *L. edodes* core collections. [Methods] RT-PCR and RT-qPCR were used to detect 34 types of mycoviruses in 56 core collections of Chinese *L. edodes*. [Results] The target genes of 14 and 5 types of viruses in most of the positive strains showed bright and faint bands, respectively. The brightness of the bands was positively correlated with virus content. To be specific, the higher the virus content in the positive strain, the brighter the band. Among the 34 viruses, LeFV5 and LeMV1 were detected in all the 56 core collections. The detection rates of 8 viruses in 21 cultivated strains and 6 viruses in 35 wild strains were over 80% and 4 viruses (LeDFV2, LeFV2, LeSV, and LeHV2) were shared by the two. The cultivated strains and wild strains carried 8–21 and 9–23 viruses, respectively, with 16.4 and 16.7 on average. [Conclusion] *L. edodes* germplasms generally carry a variety of complex mycoviruses. The amplified bands have different brightness in positive strains. *L. edodes* germplasms with great genetic difference share some viruses with high detection rate, suggesting that these viruses arose early in the evolution of *L. edodes*.

Keywords: mycovirus; virus diversity; RT-PCR detection

香菇(*Lentinula edodes*)是世界上栽培范围最广的食用菌之一,在食用菌产业中占有重要地位。真菌病毒在自然界中广泛分布,最早发现于双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)中,给双孢蘑菇产业造成严重的经济损失,从而引起了人们的广泛关注^[1-2]。截至目前,在几十种食用菌中均发现了真菌病毒,其中有些真菌病毒影响食用菌质量和产量^[3-6]。香菇病毒最早报道于20世纪70年代初,有学者从正常和不正常生长的香菇菌丝中分离出多种不同直径的球状病毒颗粒^[7-8]。20世纪80-90年代,在上海郊区及其他部分产区暴发了疑似香菇病毒导致的症状,有多篇论文报道了从菌丝体生长或子实体形态异常样品中分离到不同病毒粒体的特征和

症状特点^[9-10]。姚立等^[11]首次获得了香菇杆状病毒的部分基因组序列(GenBank 登录号为GQ372842); Magae^[12]从香菇菌株中检测到 *Lentinula edodes* mycovirus HKB (LeV-HKB), 并克隆了其全基因组(GenBank 登录号为AB429556); Guo 等^[13]从异常栽培袋样品中发现病毒 *Lentinula edodes* partitivirus 1 (LePV1) 为直径 34 nm 的双分体病毒,克隆获得了其全长基因组序列。LeV-HKB 和 LePV1 是香菇中普遍携带的两种真菌病毒^[14]。尽管携带 LeV-HKB 或其相关病毒的大多数菌株生长正常,但有些菌株脱毒后其菌丝长速和漆酶活性明显较脱毒前高^[15]。近年来,随着高通量测序和生物信息学分析技术的发展,越来越多的香菇疑似病毒

序列被报道。Lin 等^[16]和 Guo 等^[17]分别采用高通量测序结合生物信息学分析技术,在香菇中共鉴定了至少 18 种真菌病毒,其中在香菇中首次检测到两种(-)ssRNA 病毒。申桂煜^[18]分析了其中一种(-)ssRNA 病毒 *Lentinula edodes negative-strand RNA virus 1* (LeNSRV1)对香菇的影响,其脱毒菌株的菌丝生长速度明显高于脱毒前菌株。

真菌病毒对宿主的影响具有多面性。一般而言,大多数真菌病毒并不引起宿主生物学表型发生变化,为无症状感染,但病毒对宿主的影响并非一成不变。有报道表明,温度能影响病毒对真菌寄主的致病能力。如真菌病毒在板栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)、异担子菌类(*Heterobasidion* spp.)和针叶树硬皮溃疡病菌(*Gremmeniella abietina*)等真菌中都表现出了温度依赖的表型差异^[19-21]。从统计学的角度也发现有的真菌病毒看似无症状感染,实质上对宿主有不利影响。如 Van Diepeningen 等^[22]采用 dsRNA 技术发现 668 个黑曲霉菌株中约 10% 的菌株感染同一种 dsRNA 病毒,而且仅有一个感染菌株表现出不产生孢子的异常症状,进一步的统计学分析结果暗示该 dsRNA 病毒对黑曲霉的菌丝生长速度和产孢能力有不利影响。目前有关香菇的真菌病毒多样性研究缺乏,人们对香菇与其携带的真菌病毒的互作关系所知更少。中国是世界上香菇最大生产国和最大出口国。探究香菇携带病毒情况及遗传背景不同香菇种质携带病毒多样性的特点,可为香菇安全生产提供重要信息,同时也为深入了解香菇与病毒互作奠定重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验供试香菇菌株共 56 个(表 1 和表 2),

是前期基于 SRAP 和/或 ISSR 标记构建的 56 个香菇核心种质资源^[23],以上菌株均保存于华中农业大学应用真菌研究所。

2×*Taq* Plus Master Mix II、HiScript[®]II Q RT SuperMix for qPCR 和 AceQ[™] qPCR SYBR Green Master Mix, 诺唯赞生物科技(南京)公司; RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司。T100[™] Thermal Cycler PCR 仪和 CFX Connect 荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一生物科技有限公司。MYG 固体培养基: 麦芽浸粉 20.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 蛋白胨 1.0 g, 酵母浸粉 1.0 g, 琼脂粉 20.0 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 0.07 MPa 高压灭菌 30 min。

1.2 香菇菌丝体培养、收集及 RNA 提取

将待检香菇菌株在铺有玻璃纸的 MYG 培养基上于 25 °C 暗培养 7 d,用刮铲收集菌丝体,液氮速冻后置于-80 °C 冰箱保存或直接用于 RNA 提取。使用 RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒提取香菇菌丝体的总 RNA。

1.3 34 种香菇病毒 RT-PCR 检测

将前期实验中鉴定的 28 种香菇病毒部分基因组序列^[17]和 NCBI 上公布的香菇病毒序列进行汇总,对 34 种香菇病毒进行检测。分别采用 Primer5.0 和 IDT (<https://sg.idtdna.com>)设计其特异性引物,各检测病毒基因组登录号及病毒扩增引物信息见表 3。此外,根据香菇 *β-actin* 基因序列信息设计了一对特异性引物 *β-actin-F/β-actin-R* (表 3),用于验证香菇 cDNA 的合成质量。根据 HiScript[®]II Q RT SuperMix for qPCR 反转录试剂盒说明对提取的总 RNA 进行基因组 DNA 去除并合成 cDNA。RT-PCR 反应产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像系统检测 RT-PCR 结果。每个 RT-PCR 反应重复 3 次。

表 1 香菇栽培型菌株名称、来源及其试验编号

Table 1 The name, source and number of *Lentinula edodes* cultivated strain

序号 No.	菌株名 Strain name	菌株来源 Source	试验编号 Code	序号 Serial No.	菌株名 Strain name	菌株来源 Source	试验编号 Code
1	S605	上海 Shanghai	Z2	12	日丰-34 Rifen-34	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	Z48
2	Cr04	福建三明 Sanming, Fujian	Z6	13	森源-10 Senyuan-10	湖北宜昌 Yichang, Hubei	Z49
3	L12	福建三明 Sanming, Fujian	Z9	14	森源-1 Senyuan-1	湖北宜昌 Yichang, Hubei	Z50
4	L135	福建三明 Sanming, Fujian	Z10	15	森源-2 Senyuan-2	湖北宜昌 Yichang, Hubei	Z51
5	L856	福建三明 Sanming, Fujian	Z20	16	430	湖北武汉 Wuhan, Hubei	Z64
6	S602	上海 Shanghai	Z23	17	908	河南南阳 Nanyang, Henan	Z67
7	广香-51 Guangxiang-51	广东广州 Guangzhou, Guangdong	Z27	18	868	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	Z82
8	沪农-1 Hunong-1	上海 Shanghai	Z28	19	香九 Xiangjiu	广东广州 Guangzhou, Guangdong	Z85
9	华香-8 Huaxiang-8	湖北武汉 Wuhan, Hubei	Z31	20	雨花-2 Yuhua-2	河南驻马店 Zhumadian, Henan	Z87
10	庆科-20 Qingke-20	浙江丽水 Lishui, Zhejiang	Z42	21	雨花-4 Yuhua-4	河南驻马店 Zhumadian, Henan	Z88
11	秋-6 Qiu-6	湖北武汉 Wuhan, Hubei	Z47				

1.4 部分病毒 RT-qPCR 分析

分别针对 LeBeLV2-Hunong-1、LeDFV2 和 LeToLV1 病毒基因组序列设计病毒特异性 RT-qPCR 检测引物(表 4)。反应体系(10 μ L): AceQTM qPCR SYBR Green Master Mix 5 μ L、引物(0.25 μ mol/L)各 0.5 μ L、cDNA 2 μ L、ddH₂O 2 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环; 60 $^{\circ}$ C 读数。溶解曲线的温度设置为 60–95 $^{\circ}$ C, 每 0.5 $^{\circ}$ C 读取一次数据。使用 CFX Manager 3.1 (Bio-Rad) 软件分析 RT-qPCR 所得数据。每个 RT-qPCR 反应重复 3 次。

1.5 数据分析

34 种香菇病毒的 RT-PCR 检测结果为 3 次重复检测结果的校准结果, 根据 1%琼脂糖凝胶电泳中目标条带的亮暗程度分别赋值 1 (较暗)、

2 (较亮)和 3 (亮)。统计所有阳性扩增条带结果, 30%以下阳性样品中扩增条带亮度为 1 级的香菇病毒划分为 I 类病毒, 70%以上阳性样品中扩增条带亮度为 1 级的香菇病毒划分为 III 类病毒, 介于两者之间的香菇病毒划分为 II 类病毒。

2 结果与分析

2.1 供试香菇菌株 RNA 合成的 cDNA 质量分析结果

分别以 56 个供试香菇菌株采用上述方法合成的 cDNA 为模板, 对香菇 *β -actin* 基因进行 PCR 扩增, 所有样本中均能扩增得到非常明显的 258 bp 目标基因片段(图 1), 该结果表明供试菌株样本反转录的 cDNA 质量良好, 可进一步用于后续香菇病毒检测。

表 2 香菇野生型菌株名称、来源及其试验编号

Table 2 The name, source and number of *Lentinula edodes* wild strain

序号 Serial No.	菌株名 Strain name	菌株来源 Source	试验编号 Code	序号 Serial No.	菌株名 Strain name	菌株来源 Source	试验编号 Code
1	EFISAAS0229	云南景东 Jingdong, Yunnan	Y1	19	LMLH52	四川冕宁 Mianning, Sichuan	Y89
2	EFISAAS0351	云南景东 Jingdong, Yunnan	Y5	20	LMLH59	四川冕宁 Mianning, Sichuan	Y91
3	00167	云南姚安 Yao'an, Yunnan	Y7	21	LMLH116	四川冕宁 Mianning, Sichuan	Y94
4	00168	云南香格里拉 Xianggelila, Yunnan	Y8	22	LMLHA18	四川冕宁 Mianning, Sichuan	Y100
5	ACCC50786	安徽黄山 Huangshan, Anhui	Y11	23	LMLHA36	四川冕宁 Mianning, Sichuan	Y104
6	GAN059	甘肃康县 Kang county, Gansu	Y14	24	LMLHL22	四川冕宁 Mianning, Sichuan	Y110
7	HUB039	湖北神农架 Shennongjia, Hubei	Y29	25	LMLHL26	四川冕宁 Mianning, Sichuan	Y111
8	HUB040	湖北神农架 Shennongjia, Hubei	Y30	26	LMLHL210	四川冕宁 Mianning, Sichuan	Y113
9	HUB091	湖北长阳 Changyang, Hubei	Y37	27	LMYP62	四川米易 Miyi, Sichuan	Y118
10	HN002	湖南郴州 Chenzhou, Hunan	Y39	28	LPG82	四川普格 Puge, Sichuan	Y121
11	SHX044	陕西坝县 Ba county, Shanxi	Y51	29	YAASM234	云南南华 Nanhua, Yunnan	Y234
12	NO.41	江西修水 Xiushui, Jiangxi	Y55	30	YYAASM358	云南紫溪 Zixi, Yunnan	Y358
13	LeQc743s	四川青川 Qingchuan, Sichuan	Y70	31	YYAASM366	云南紫溪 Zixi, Yunnan	Y366
14	LeWs735	四川德昌 Dechang, Sichuan	Y76	32	YYAASM1515	云南漾濞 Yangbi, Yunnan	Y1515
15	LHLy14	四川会理 Huili, Sichuan	Y78	33	YAASM1518	云南漾濞 Yangbi, Yunnan	Y1518
16	LHLy217	四川会理 Huili, Sichuan	Y79	34	YAASM3334	云南龙陵 Longling, Yunnan	Y3334
17	LMLH14	四川冕宁 Mianning, Sichuan	Y84	35	YAASM3353	云南宜良 Yiliang, Yunnan	Y3353
18	LMLH36	四川冕宁 Mianning, Sichuan	Y88				

2.2 供试菌株中 34 种香菇病毒扩增目标条带亮暗程度分析及验证

以上述质量良好的 cDNA 为模板, 对 34 种香菇病毒进行扩增, 结果显示, 检测的病毒在扩增条带的亮暗程度上存在明显差别, 有些香菇病

毒在绝大多数阳性菌株中扩增出的目标条带较亮, 而有些病毒在绝大多数阳性菌株中扩增出的条带较暗(图 2-4)。I 类的病毒有 LeDFV2、LeFV2、LeFV5、LeHV2、LeMV1、LeNSRV1、LeNSRV2、LeNSRV3、LeNV1、LeMOLV2、

LeOuLV1、LePV1、LePV2 和 LeHV 共 14 种, II 类的病毒有 LeBeLV2-Hunong-1、LeFV1、LeFV4、LeMOLV1、LePV3、LeV-HKB、LeSV、LeV-F1、Le-HKA、LeNSRV2-HG3 和 LeSRMV 共 11 种, III 类的病毒有 LeBeLV1-YD、LeFV3、LePV4、LeToLV1 和 LeTyLV1 共 5 种(表 5)。

表 3 内参基因和 34 种病毒 RT-PCR 扩增所用的引物信息

Table 3 Primers used for RT-PCR amplification of reference genes and 34 viruses

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	扩增长度 Amplification length (bp)	基因组登录号 Genome GenBank accession No.
β-actin-F	GGAGAAGATTTGGCATCACACA	258	PRJNA278395
β-actin-R	GAAGAGCGAAACCCTCGTAGA		
LeBeLV1-YD-F	CTCCAGCCGTCCGATTATTT	718	MN744728
LeBeLV1-YD-R	ACTTCTCCTTAGCCGCTTTC		
LeBeLV2-Hunong-1-F	CATCCAACCTCATCCCGTATT	757	Unsubmitted
LeBeLV2-Hunong-1-R	GAGAGTCAAGTCCCCGAGTTATG		
LeBFLV1-F	TGGTTTGAAGGAGTGGATGG	697	MN744725
LeBFLV1-R	GGGCGACTTGGTGAGATAAA		
LeBPV1-F	CCCATTCCACTTCTTCTT	459	Unsubmitted
LeBPV1-R	GCCTCAACAAAGCACCATTC		
LeDFV1-F	CGCCATTCTCAACCAACATC	831	MN744723
LeDFV1-R	TGGAAGTAGACTTGTCAGGC		
LeDFV2-F	CCGTGTCTCCTGGTTTGATATG	767	MN744724
LeDFV2-R	CACACGAGTAAGAGGTGGAAAG		
LeFV1-F	GGCCTTTGGGATGAGATCAA	610	MN744720
LeFV1-R	CTCCGACCCAGACATCATTAC		
LeFV2-F	CACGACACTGATGGGAGATTAC	796	MN744721
LeFV2-R	CGATGGGCGCTTTCATTAC		
LeFV3-F	GGTCCTTCTGTTGGGAAGATAG	579	MN744722
LeFV3-R	CCTAGGGATGACAGTTGTGAAG		
LeFV4-F	TTGTCTTGTCTCCAGCTTGC	653	Unsubmitted
LeFV4-R	CAAGGACCACTGTTCAACAG		
LeFV5-F	TCCAGGTTGAGGGCTACTAA	649	Unsubmitted
LeFV5-R	CCACCAGGCACGATAAAGAA		
LeHV1-F	CGTCTCTTTGTCTGACGGATAC	604	MN744719
LeHV1-R	AGCGGATAAGCGTCTGTAATG		
LeHV2-F	TCCTGGATGGACGCATTAC	579	Unsubmitted
LeHV2-R	GATACACCACGCCGAATAA		
LeMV1-F	GCTCACCGAAGTGTCTCTAATG	636	MN744729
LeMV1-R	CTGGTCAACTCTGATGCTATCG		
LeNSRV1-F	CTGCCCTGCTTAGGCTATTT	933	MN744716
LeNSRV1-R	CGAGAGGATGAGTGCATGTTAG		
LeNSRV2-F	GGAGAGGTGTACAGGAAATAC	537	MN744714
LeNSRV2-R	GGTAGACTTCAGTCTCTCTCT		
LeNSRV3-F	CAGGTCAGCGAACACATAA	678	MN744718
LeNSRV3-R	GGTCACCCTCTTTACCAAATC		

(待续)

(续表 3)

LeNV1-F	CGCCTTTGACTGACGTTCTA	576	Unsubmitted
LeNV1-R	GGTCTAACCGATCCCAGTTAAG		
LeMOLV1-F	TAGGATCTGCACGATAGCAGC	647	MN744730
LeMOLV1-R	GCCACGAAGGACACACGAATC		
LeMOLV2-F	CATCGCATCTATCCTCCAACCTC	598	Unsubmitted
LeMOLV2-R	GCTGGGTCTTGTAGTCCAATAA		
LeOuLV1-F	CCGTGATATCCTTCCCGTTATT	762	Unsubmitted
LeOuLV1-R	GAACGGCGAAATGTGAGTATTG		
LePV1-F	GGAACTGAAGATGGAACCTACC	706	KX354972
LePV1-R	CAGGGACAGAAGTACCATCAAG		
LePV2-F	CGCTCAAGACTACCGTTCATAC	589	MN744710
LePV2-R	GTCAGGATGACCACCATTACAG		
LePV3-F	CCACTACCAACGTCTCCAATAC	480	MN744713
LePV3-R	GGGCTAGCTGAACTCCTTTATC		
LePV4-F	CTGAGTTGAAATGCCAGTC	610	Unsubmitted
LePV4-R	GGCCGGTAAGACCATAAGTG		
LeToLV1-F	GTCCTGAGCACTGGTATTT	738	MN744727
LeToLV1-R	GCGCAACACTGGTTTGTAAG		
LeTyLV1-F	GTGTTCCGTTATGCGAGAGTAG	534	MN744726
LeTyLV1-R	CCAGATCAGACCACGAGAGATA		
LeV-HKB-F	GATGCGGGACATTAAGAGTAGG	700	Unsubmitted
LeV-HKB-R	CACGTTTCGGTGCAACATTAG		
LeSV-F	GTAGTGCGTCACTGCTATATT	660	JQ687140
LeSV-R	CCTTTGTTTGCGAGCGTATTC		
LeHV-F	TAGAGGCGGTGAAGGGAATA	554	JQ687141
LeHV-R	AGCAGAGGATTGGGAGTAAATG		
LeV-F1-F	ATGGCGTACAACCTCAGTTATC	363	AB536721
LeV-F1-R	CGTGCAGAGCCTCATTAGTT		
Le-HKA-F	GGTGGCGTCACTGCTATATT	658	AB646992
Le-HKA-R	CCTTTGTTTGCGAGCGTATTC		
LeNSRV2-HG3-F	GAGGGTCATCTCACATTCAGTAG	508	LC466008
LeNSRV2-HG3-R	CTTCAGCTCTCTCAGCTTATCC		
LeSRMV-F	TCTGGCTTGATTCCGGCTTAC	696	AB647256
LeSRMV-R	CCTGATCCAGACGAACCTTAAC		

表 4 RT-qPCR 的引物信息

Table 4 Primers for the RT-qPCR

引物名称	引物序列	扩增长度	基因组登录号
Primer name	Primer sequence (5'→3')	Amplification length (bp)	Genome GenBank accession No.
LeBeLV2-Hunong-1-1F	AGCTGGGTTTAATGGGTTAGG	106	Unsubmitted
LeBeLV2-Hunong-1-1R	GAGACGGTATTGCTACTGGATG		
LeDFV2-1F	CTCCGTGAAGCAGTGAGAAA	96	MN744724
LeDFV2-1R	CGGATTTCCGGCTCCTTCTAAT		
LeToLV1-1F	GCACTCAAGCAACCTAACAAAG	102	MN744727
LeToLV1-1R	GCAAAGTACCAGAGAGCCATAG		

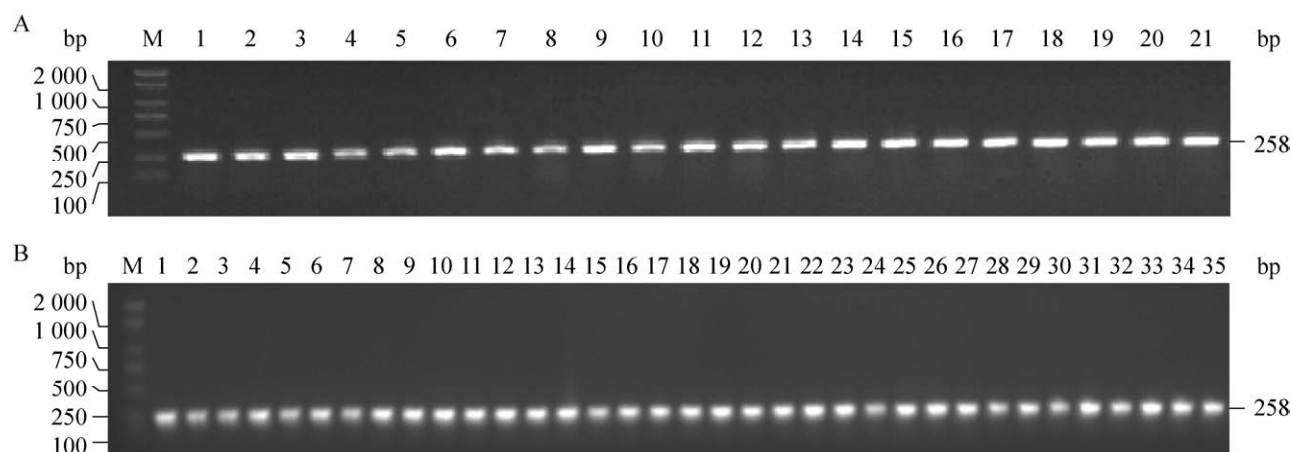


图 1 56 个香菇菌株内参基因 β -actin 的 RT-PCR 检测 M: BM2000+ Marker; A: 21 个栽培型菌株 β -actin 检测; B: 35 个野生型菌株 β -actin 检测

Figure 1 RT-PCR detection of the internal reference gene β -actin of 56 *Lentinula edodes* strains. M: BM2000+ Marker; A: Detection of β -actin in 21 cultivated strains; B: Detection of β -actin in 35 wild strains.

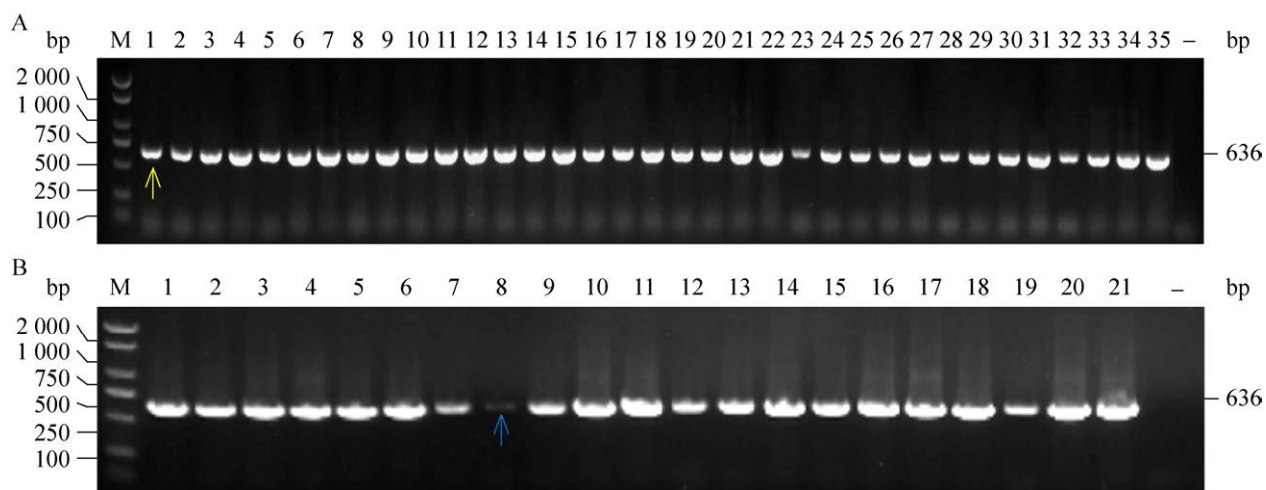


图 2 56 个香菇菌株中 LeMV1 病毒的 RT-PCR 检测 M: BM2000+ Marker; A: 35 个野生型菌株; B: 21 个栽培型菌株; 黄色箭头: 条带亮度为 3 级; 蓝色箭头: 条带亮度为 2 级; -: 阴性对照

Figure 2 RT-PCR detection of LeMV1 virus in 56 *Lentinula edodes* strains. M: BM2000+ Marker; A: Detection of LeMV1 in 35 wild strains; B: Detection of LeMV1 in 21 cultivated strains; Yellow arrow: Level 3 of band brightness; Blue arrow: Level 2 of band brightness; -: Negative control.

为了验证阳性菌株中扩增目标病毒条带的亮暗程度与菌株中病毒含量是否相关, 进一步采用 RT-qPCR 对病毒在阳性菌株中的相对含量进行了检测, 包括: 病毒 LeBeLV2-Hunong-1/菌株 Z2、Y79 (扩增条带亮度为 3 级)和 Y51、

Y100 (扩增条带亮度为 1 级), 病毒 LeDFV2/菌株 Z2、Y51 (扩增条带亮度为 2 级)和 Z10、Y11 (扩增条带亮度为 1 级), 以及病毒 LeToLV1/菌株 Y358 (扩增条带亮度为 3 级)、Y366 (扩增条带亮度为 2 级)和 Y100、Y1515 (扩增条带亮度

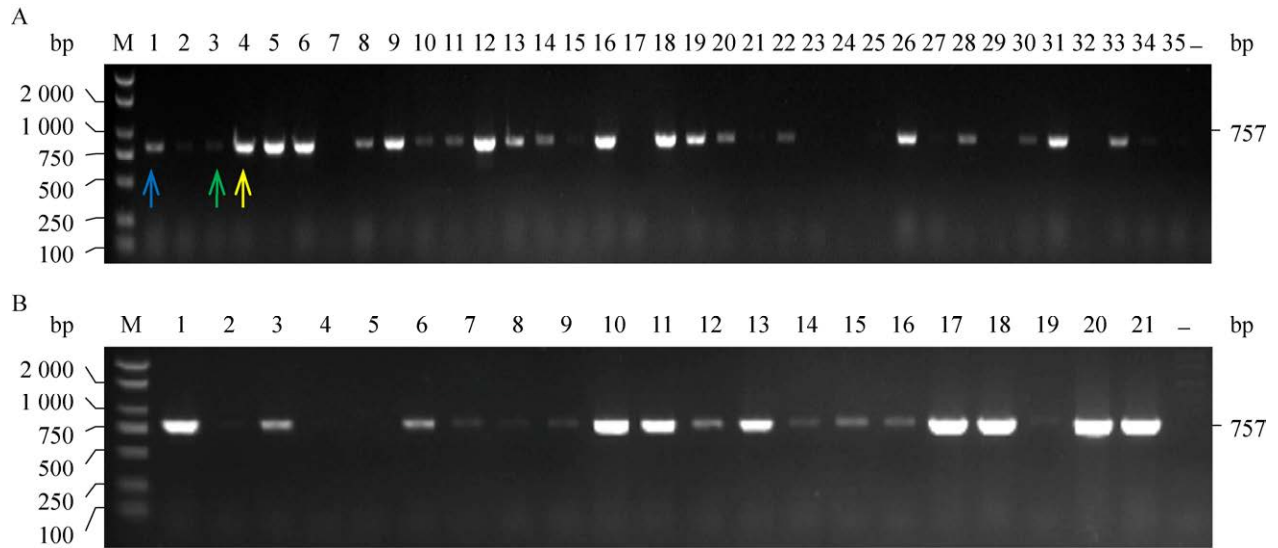


图3 56个香菇菌株中LeBeLV2-Hunong-1病毒的RT-PCR检测 M: BM2000+ Marker; A: 35个野生型菌株; B: 21个栽培型菌株的; 黄色箭头: 条带亮度为3级; 蓝色箭头: 条带亮度为2级; 绿色箭头: 条带亮度为1级; -: 阴性对照

Figure 3 RT-PCR detection of LeBeLV2-Hunong-1 virus in 56 *Lentinula edodes* strains. M: BM2000+ Marker; A: Detection of LeBeLV2-Hunong-1 in 35 wild strains ; B: Detection of LeBeLV2-Hunong-1 in 21 cultivated strains; Yellow arrow: Level 3 of band brightness; Blue arrow: Level 2 of band brightness; Green arrow: Level 1 of band brightness; -: Negative control.

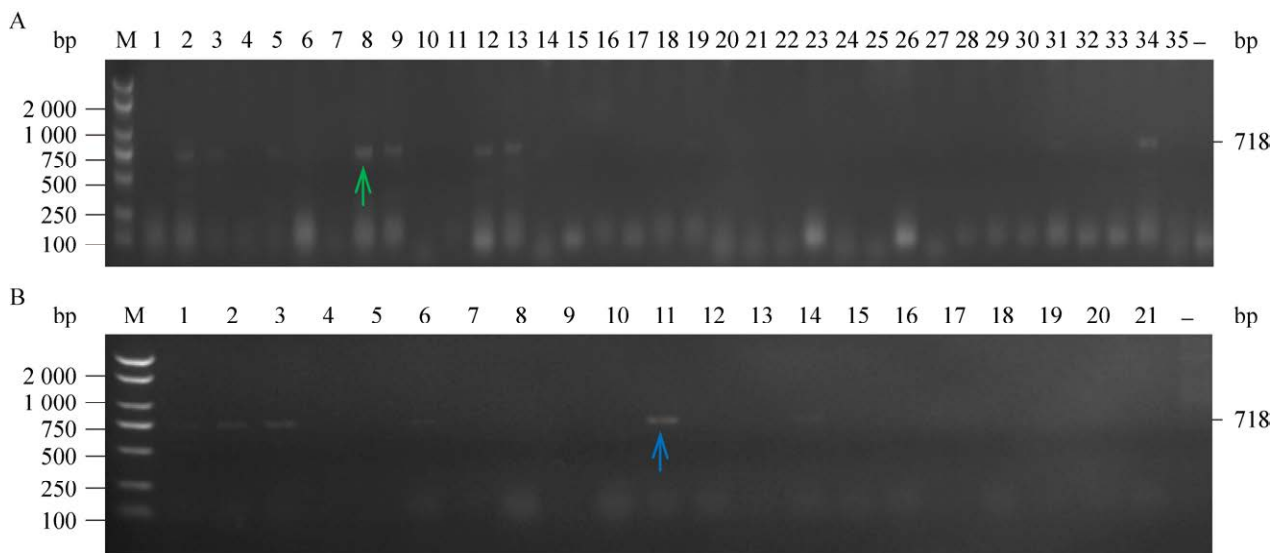


图4 56个香菇菌株中LeBeLV1-YD病毒的RT-PCR检测 M: BM2000+ Marker; A: 35个野生型菌株; B: 21个栽培型菌株; 蓝色箭头: 条带亮度为2级; 绿色箭头: 条带亮度为1级; -: 阴性对照

Figure 4 RT-PCR detection of LeBeLV1-YD virus in 56 *Lentinula edodes* strains. M: BM2000+ Marker; A: Detection of LeBeLV1-YD in 35 wild strains; B: Detection of LeBeLV1-YD in 21 cultivated strains; Blue arrow: Level 2 of band brightness; Green arrow: Level 1 of band brightness; -: Negative control.

表 5 香菇种质中存在的 34 种病毒检测条带暗亮类型

Table 5 Amplification band types of 34 viruses in *Lentinula edodes* core collections

Band brightness type	Virus species	Total
I	LeDFV2, LeFV2, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV1, LeNSRV2, LeNSRV3, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV1, LePV2, LeHV	14
II	LeBeLV2-Hunong-1, LeFV1, LeFV4, LeMOLV1, LePV3, LeV-HKB, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LeSRMV	11
III	LeBeLV1-YD, LeFV3, LePV4, LeToLV1, LeTyLV1	5

注: I: 30%以下阳性样品中扩增条带亮度为 1 级的香菇病毒; II: 30%–70%以上扩增条带亮度为 1 级的香菇病毒; III: 70%以上扩增条带亮度为 1 级的香菇病毒。所检测的 34 种病毒中, 有 4 种未检测到条带。

Note: I: Viruses with band brightness of level 1 were amplified in less than 30% positive samples; II: Viruses with band brightness of level 1 were amplified between 30% and 70% of positive samples; III: Viruses with band brightness of level 1 were amplified more than 70% of positive samples. Bands were not detected for 4 of the 34 viruses detected.

为 1 级)。结果显示, 阳性带毒香菇菌株中病毒的目的基因扩增条带的亮暗程度与病毒含量呈正相关, 病毒扩增条带的亮度越显著, 病毒的含量越高。此外, 在同一菌株中不同病毒的含量也存在差异, Z2 菌株中病毒 LeBeLV2-Hunong-1 比 LeDFV2 含量高, 而 Y51 菌株中 LeBeLV2-Hunong-1 的含量比 LeDFV2 低, Y100 菌株中 LeBeLV2-Hunong-1 与 LeToLV1 含量差异不显著(图 5)。

2.3 供试 56 个香菇种质中携带的病毒情况分析

依据上述 RT-PCR 扩增结果, 对 56 个香菇核心种质中检测到的香菇病毒携带多样性进行了分析。结果表明, 供试的香菇菌株均携带有病毒, 而且均为复合带毒, 详细携带病毒情况见表 6。经统计发现, 21 个栽培菌株中各菌株携带病毒数为 8–21 种不等, 其中, 菌株 Z27 携带病毒种类最少, 为 8 种; 菌株 Z87 携带最多, 为 21 种, 平均每个菌株的病毒携带数为 16.4 种。35 个野生菌株中各菌株携带病毒数为 9–23 种不等, 其中, 菌株 Y84、Y29、Y121 和 Y104 携带病毒种类最少, 为 9 种; 菌株 Y70 和 Y37 携带最多, 为 23 种, 平均每个菌株的病毒携带数为 16.7 种。

在检测的 34 种病毒中, 除 LeBFLV1、LeBPV1、LeDFV1 和 LeHV1 这 4 种病毒在 56 个供试香菇种质中未被检测到, 其他 30 种病毒均存在阳性菌株。如表 7 所示, 56 个供试香菇种质中, 香菇病毒 LeFV5 和 LeMV1 病毒携带率最高(检测率为 100%), 而香菇病毒 LeNSRV3 和 LeHV 携带率最低(检测率为 7.14%); 21 个栽培菌株中, 共有 10 种香菇病毒检测率在 80% 以上, 分别是香菇病毒 LeFV5、LeMV1、LeDFV2、LeFV2、LeSV、LeHV2、LeV-F1、LeBeLV2-Hunong-1、LeFV4 和 LeFV1, 香菇病毒 LePV4 和 LeNSRV3 携带率最低(4.76%); 35 个野生菌株中, 共有 8 种香菇病毒检测率在 80% 以上, 分别是香菇病毒 LeFV5、LeMV1、LeDFV2、LeFV2、LeSV、LeHV2、LeMOLV2 和 LeOuLV1, 香菇病毒 LeHV 携带率最低(2.86%); LeToLV1 仅能在野生香菇菌株中检测到。此外, 有些病毒在栽培菌株和野生菌株中的检测率存在明显差异。如香菇病毒 LeFV1、LeV-HKB、LeNSRV2-HG3 和 LeNSRV2 在栽培菌株中的携带率显著高于野生菌株, 而 LeOuLV1、LeSRMV、LePV1、LePV3、LePV4 和 LePV2 在野生菌株中的携带率显著高于栽培菌株(表 7)。

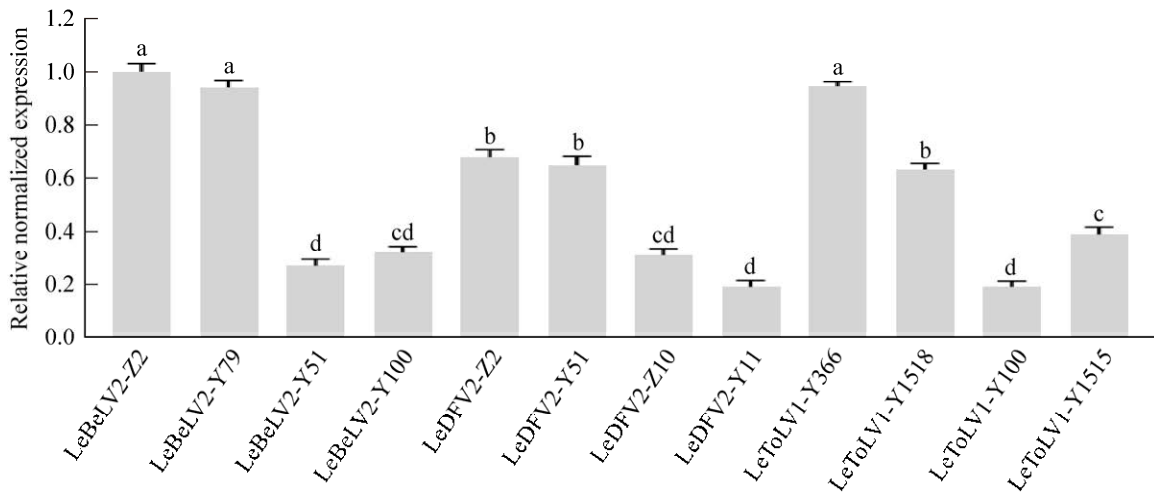


图5 RT-qPCR检测不同亮度条带的病毒含量 LeBeLV2-Hunong-1和LeDFV2为II类病毒, LeToLV1为III类病毒;不同小写字母代表显著性差异($P<0.05$); LeBeLV2-Hunong-1-(Z2、Y79、Y51、Y100): 扩增LeBeLV2-Hunong-1病毒的Z2、Y79(条带亮度为3级)和Y51、Y100(条带亮度为1级)菌株; LeDFV2-(Z2、Y51、Z10、Y11): 扩增LeDFV2病毒的Z2、Y51(条带亮度为2级)和Z10、Y11(条带亮度为1级)菌株; LeToLV1-(Y358、Y366、Y100、Y1515): 扩增LeToLV1病毒的Y358(条带亮度为3级)、Y366(条带亮度为2级)、Y100和Y1515(条带亮度为1级)菌株

Figure 5 RT-qPCR detection of virus expression in different brightness bands. LeBeLV2-Hunong-1 and LeDFV2 are type II virus; LeToLV1 is type I virus; a, b, c, cd, d: Different lowercase letters represent significant differences ($P<0.05$); LeBeLV2-Hunong-1-(Z2, Y79, Y51, Y100): Amplification of the Z2, Y79 (Level 3 of band brightness) and Y51, Y100 (Level 2 of band brightness) strain of LeBeLV2-Hunong-1; LeDFV2-(Z2, Y51, Z10, Y11): Amplification of the Z2, Y51 (Level 2 of band brightness) and Z10, Y11 (Level 1 of band brightness) strain of LeDFV2; LeToLV1-(Y358, Y366, Y100, Y1515): Amplification of the Y358 (Level 3 of band brightness), Y366 (Level 2 of band brightness) and Y100, Y1515 (Level 1 of band brightness) strain of LeToLV1.

表6 香菇种质中菌株携带病毒详情

Table 6 Details of virus carried by strains in *Lentinula edodes* core collect

Code	Virus species	Total
Z2	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LePV1, LeV-HKB	18
Z6	LeBeLV1-YD, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeV-HKB	15
Z9	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeNV1, LeMOLV2, LePV2, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, LeNSRV2-HG3, LePV1	19
Z10	LeDFV2, LeFV2, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeMOLV2, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeV-HKB	10
Z20	LeDFV2, LeFV2, LeFV5, LeMV1, LeNSRV1, LeMOLV2, LeSV, LeHV, LeV-F1, Le-HKA	10
Z23	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeNV1, LePV2, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, LeNSRV2-HG3	17
Z27	LeBeLV2-Hunong-1, LeFV1, LeFV5, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeSV, LeV-F1	8
Z28	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV3, LePV4, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LePV1, LeV-HKB	16

(待续)

(续表 6)

Z31	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV1, LeNSRV2, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV2, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LeSRMV	20
Z42	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeNV1, LePV3, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LeSRMV, LePV1, LeV-HKB	20
Z47	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LeSV, LeV-F1, Le-HKA	16
Z48	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeMOLV2, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LeSRMV, LeV-HKB	17
Z49	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeMOLV2, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LeV-HKB	15
Z50	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV2, LePV3, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LeV-HKB	19
Z51	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeNV1, LePV2, LePV3, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LePV1, LeV-HKB	20
Z64	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV2, LePV3, LeSV, LeNSRV2-HG3	16
Z67	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV1, LeNSRV2, LeMOLV2, LeSV, LeHV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LeSRMV, LeV-HKB	17
Z82	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeNV1, LeMOLV2, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LeSRMV, LePV1, LeV-HKB	20
Z85	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV1, LeNSRV2, LeNV1, LeTyLV1, LeNSRV2-HG3	14
Z87	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeMV1, LeNSRV1, LeNSRV2, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LePV2, LeSV, LeHV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LeSRMV, LeV-HKB	21
Z88	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeNV1, LeMOLV2, LePV2, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3	18
Y1	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LeSV, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LePV1, LeV-HKB	16
Y5	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeMV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1, LeV-HKB	17
Y7	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV4, LeFV5, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1, LeV-HKB	18
Y8	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV5, LeMV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1, LeV-HKB	12
Y11	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LePV4, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LeSRMV	22
Y14	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LePV4, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1	18
Y29	LeDFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV3, LeMOLV2, LeOuLV1	9
Y30	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV	19
Y37	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1, LeV-HKB	23

(待续)

(续表 6)

Y39	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV	16
Y51	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LeToLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV	17
Y55	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LeToLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LeSRMV	21
Y70	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LePV4, LeToLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeNSRV2-HG3, LeSRMV	23
Y76	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1, LeV-HKB	22
Y78	LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LePV1	13
Y79	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV2, LePV3, LeSV, LeV-F1, LeSRMV	16
Y84	LeFV2, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LeSRMV	9
Y88	LeBeLV2-Hunong-1, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1	16
Y89	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV4, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1	18
Y91	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LePV4, LeToLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LePV1	19
Y94	LeDFV2, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV2, LeNSRV3, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LePV4, LeToLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LePV1	20
Y100	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LePV4, LeToLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1	20
Y104	LeDFV2, LeFV2, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeMOLV2, LePV3, LeSV, LePV1	9
Y110	LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LePV4, LeToLV1, LeTyLV1, LeSV, LeSRMV, LePV1	17
Y111	LeDFV2, LeFV2, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LePV4, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA	13
Y113	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LeToLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, LeSRMV, LePV1	19
Y118	LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV4, LeTyLV1, LeSV, LeHV, LeV-F1, Le-HKA, LePV1	17
Y121	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LeToLV1	9
Y234	LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeMV1, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV4, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1	17
Y358	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV3, LeToLV1, LeV-F1, LePV1	14
Y366	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LeToLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1	20
Y1515	LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV4, LeFV5, LeMV1, LePV2, LePV3, LeToLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA	13

(待续)

(续表 6)

Y1518	LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV1, LeFV2, LeFV3, LeFV4, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV2, LePV3, LeToLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV	20
Y3334	LeBeLV1-YD, LeBeLV2-Hunong-1, LeDFV2, LeFV2, LeFV3, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNV1, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LePV4, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, LeSRMV, LePV1	18
Y3353	LeDFV2, LeFV2, LeFV5, LeHV2, LeMV1, LeNSRV3, LeMOLV1, LeMOLV2, LeOuLV1, LeTyLV1, LeSV, LeV-F1, Le-HKA, LeSRMV, LePV1, LeV-HKB	16

表 7 34 种病毒感染香菇种质的检测分析

Table 7 Detection and analysis of *Lentinula edodes* core collections infected by 34 viruses

Virus abbreviation	Number of cultivated-type strains	Carrying rate (%)	Number of wild-type strains	Carrying rate (%)	Total	Total carriage rate (%)
LeFV5	21	100.00	35	100.00	56	100.00
LeMV1	21	100.00	35	100.00	56	100.00
LeDFV2	20	95.24	33	94.29	53	94.64
LeFV2	20	95.24	33	94.29	53	94.64
LeSV	20	95.24	29	82.86	49	87.50
LeHV2	18	85.71	30	85.71	48	85.71
LeMOLV2	15	71.43	33	94.29	48	85.71
LeV-F1	19	90.48	26	74.29	45	80.36
LeBeLV2-Hunong-1	18	85.71	25	71.43	43	76.79
Le-HKA	16	76.19	25	71.43	41	73.21
LeFV4	17	80.95	23	65.71	40	71.43
LeOuLV1	5	23.81	32	91.43	37	66.07
LeFV1	18	85.71	18	51.43	36	64.29
LeFV3	12	57.14	24	68.57	36	64.29
LeNV1	11	52.38	23	65.71	34	60.71
LeSRMV	8	38.10	24	68.57	32	57.14
LeTyLV1	10	47.62	21	60.00	31	55.36
LePV1	6	28.57	22	62.86	28	50.00
LePV3	6	28.57	21	60.00	27	48.21
LeV-HKB	12	57.14	7	20.00	19	33.93
LeBeLV1-YD	5	23.81	12	34.29	17	30.36
LeNSRV2-HG3	13	61.90	4	11.43	17	30.36
LeMOLV1	3	14.29	13	37.14	16	28.57
LeNSRV2	12	57.14	3	8.57	15	26.79
LeToLV1	0	—	13	37.14	13	23.21
LePV4	1	4.76	12	34.29	13	23.21
LePV2	8	38.10	3	8.57	11	19.64
LeNSRV1	7	33.33	3	8.57	10	17.86
LeHV	3	14.29	1	2.86	4	7.14
LeNSRV3	1	4.76	3	8.57	4	7.14
LeBFLV1	0	—	0	—	0	—
LeBPV1	0	—	0	—	0	—
LeDFV1	0	—	0	—	0	—
LeHV1	0	—	0	—	0	—

注: —: 无数据

Note: —: No data.

3 讨论与结论

香菇病毒(*Lentinula edodes mycovirus* HKB, LeV-HKB)或其相关病毒 *Lentinula edodes mycovirus* (LeSV 或 LeV), 以及香菇双分体病毒(*Lentinula edodes partitivirus* 1, LePV1)是目前报道的香菇种质资源中普遍携带的真菌病毒^[14,24]。本研究分析了中国香菇核心种质中真菌病毒多样性的特点。被检测的 34 种香菇病毒,除了 LeV-HKB 和 LePV1,其他多种香菇病毒携带率也非常高。21 个栽培菌株和 35 个野生菌株中检测率超过 80%的香菇病毒分别有 10 种和 8 种,而且其中 6 种病毒相同(LeFV5、LeMV1、LeDFV2、LeFV2、LeSV 和 LeHV2);此外,LeFV5 和 LeMV1 检测率为 100%。真菌病毒主要通过亲和性菌丝体间的胞质融合进行水平传播,或通过产生无性孢子或有性孢子进行垂直传播^[25-26]。本试验供试的菌株为前期实验室基于分子指纹建立的遗传背景存在差异的 56 个香菇核心种质^[23]。这种存在明显遗传差异的香菇菌株中携带的高检测率病毒如此相似,暗示这些病毒在香菇进化早期就存在。

不同病毒在阳性菌株中的扩增亮度具有差异,RT-qPCR 结果也表明阳性带毒香菇菌株中病毒目的基因扩增条带的亮暗程度与病毒含量呈正相关,即病毒扩增条带的亮度越显著,病毒的含量越高。本课题组前期研究发现,LePV1 在异常香菇菌株 SX12 和多个正常香菇菌株中都可以扩增到比较亮的病毒目标条带,在排除可能因分子变异导致出现表型差异的原因外,发现从异常香菇菌株 SX12 相同质量菌丝体中提取的 LePV1 dsRNA 浓度要显著高于携带 LePV1 但表型正常的 Y3334 菌株^[27]。对双孢蘑菇子实体褐化的病因学研究也发现,褐变子实体中 *Agaricus bisporus virus* 16 (AbV16)及其复

合感染病毒 AbV6 RNA2 的丰度显著高于其他样品或病毒^[28]。香菇中检测到的病毒在寄主中的丰度与寄主生物学表型变化的相关性也是后续研究值得关注的一个方面。

香菇种质资源中普遍携带复杂的多种真菌病毒。无论是供试的栽培菌株还是野生菌株,每个香菇菌株均携带多种病毒,而且同一菌株中复合感染的病毒在分类地位上涉及不同病毒分类单元(表 6 和表 7)。该研究结果与双孢蘑菇中报道的病毒复杂性类似^[2,29-30]。已有研究表明,同一种真菌复合感染多种真菌病毒,病毒之间会表现出协同、拮抗、共生等相互作用或导致病毒基因组重排现象^[30-32]。香菇中这种复合感染的多个病毒之间的相互作用及对香菇生产的影响,有必要进行进一步研究。此外,基于病毒组学重构的病毒-宿主关系,对于研究两者的共进化历史和生态学平衡有着重要意义,如病毒组学研究重新界定了无脊椎动物的 RNA 病毒圈,刷新了人们对 RNA 病毒进化史及生态学意义的认识^[33]。从生态学角度重新审视真菌病毒与食用菌的关系以及如何维持两者之间的平衡也是今后需要研究的方向。

REFERENCES

- [1] Hollings M. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom[J]. *Nature*, 1962, 196: 962-965
- [2] Goodin MM, Schlagnhauser B, Romaine CP. Encapsidation of the La France disease-specific double-stranded RNAs in 36-nm isometric viruslike particles[J]. *Phytopathology*, 1992, 82(3): 285
- [3] Yu HJ, Lim D, Lee HS. Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*[J]. *Virology*, 2003, 314(1): 9-15
- [4] Rao JR, Nelson DWA, McClean S. The enigma of double-stranded RNA (dsRNA) associated with mushroom virus X (MVX)[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2007, 9(2): 103-121
- [5] Magae Y, Sunagawa M. Characterization of a mycovirus associated with the brown discoloration of edible

- mushroom, *Flammulina velutipes*[J]. Virology Journal, 2010, 7: 342
- [6] Sahin E, Akata I. Viruses infecting macrofungi[J]. Virusdisease, 2018, 29(1): 1-18
- [7] Inouye T, Furuya K, Nisikado Y. Virus-like particles found in shiitake[J]. Ann Phytopathol Soc Japan, 1970, 36: 356
- [8] Ushiyama R, Nakai Y, Ikegami M. Evidence for double-stranded RNA from polyhedral virus-like particles in *Lentinula edodes* (Berk.) Sing[J]. Virology, 1977, 77(2): 880-883
- [9] 于善谦, 王鸣岐, 张若平, 蔡同润, 沈中霞. 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
Yu SQ, Wang MQ, Zhang RP, Cai TR, Shen ZX. Studies on *Lentinula edodes* virus diseases I. The occurrence of *Lentinula edodes* viruses in China[J]. Mycosystema, 1985, 4(2): 125-129 (in Chinese)
- [10] 沈学仁, 沈菊英, 陈作义, 龚祖垠, 陈明杰, 潘迎捷, 汪昭月, 方炳初, 王鸣岐. 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
Shen XR, Shen JY, Chen ZY, Gong ZX, Chen MJ, Pan YJ, Wang ZY, Fang BC, Wang MQ. A single-stranded virus isolated from shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing[J]. Virologica Sinica, 1992, 7(1): 99-105 (in Chinese)
- [11] 姚立, 陈春乐, 张忠信, 应国华, 孙修炼, 吕明亮, 薛振文, 李伶俐. 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
Yao L, Chen CL, Zhang ZX, Ying GH, Sun XL, Lv ML, Xue ZW, Li LL. The partial genome cDNA sequence of a novel dsRNA virus from *Lentinula edodes* and the virus detected by RT-PCR[J]. Microbiology China, 2010, 37(1): 61-70 (in Chinese)
- [12] Magae Y. Molecular characterization of a novel mycovirus in the cultivated mushroom, *Lentinula edodes*[J]. Virology Journal, 2012, 9: 60
- [13] Guo MP, Bian YB, Wang JJ, Wang GZ, Ma XL, Xu ZY. Biological and molecular characteristics of a novel partitivirus infecting the edible fungus *Lentinula edodes*[J]. Plant Disease, 2017, 101(5): 726-733
- [14] 王锦杰, 郭孟配, 孙艺嘉, 边银丙, 徐章逸. 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
Wang JJ, Guo MP, Sun YJ, Bian YB, Xu ZY. 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)
- [15] Kim JM, Song HY, Choi HJ, Yun SH, So KK, Ko HK, Kim DH. Changes in the mycovirus (LeV) titer and viral effect on the vegetative growth of the edible mushroom *Lentinula edodes*[J]. Virus Research, 2015, 197: 8-12
- [16] Lin YH, Fujita M, Chiba S, Hyodo K, Andika IB, Suzuki N, Kondo H. Two novel fungal negative-strand RNA viruses related to mymonaviruses and phenuiviruses in the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*)[J]. Virology, 2019, 533: 125-136
- [17] Guo MP, Shen GY, Wang JJ, Liu MJ, Bian YB, Xu ZY. Mycoviral diversity and characteristics of a negative-stranded RNA virus LeNSRV1 in the edible mushroom *Lentinula edodes*[J]. Virology, 2021, 555: 89-101
- [18] 申桂煜. 中国香菇核心种质中三种负链 RNA 病毒的检测及 LeNSRV1 对寄主生物学影响研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2020
Sheng GY. Research on detection of three negative-stranded RNA virus in Chinese *Lentinula edodes* germplasm resources and investigation of the biological influences of LeNSRV1 on the host[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [19] Bryner SF, Rigling D. Temperature-dependent genotype-by-genotype interaction between a pathogenic fungus and its hyperparasitic virus[J]. The American Naturalist, 2011, 177(1): 65-74
- [20] Hyder R, Pennanen T, Hamberg L, Vainio EJ, Piri T, Hantula J. Two viruses of *Heterobasidion* confer beneficial, cryptic or detrimental effects to their hosts in different situations[J]. Fungal Ecology, 2013, 6(5): 387-396
- [21] Botella L, Dvořák M, Capretti P, Luchi N. Effect of temperature on GaRV6 accumulation and its fungal host, the conifer pathogen *Gremmeniella abietina*[J]. Forest Pathology, 2017, 47(1): e12291
- [22] Van Diepeningen AD, Debets AJM, Hoekstra RF. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations[J]. Fungal Genetics and Biology, 2006, 43(6): 446-452
- [23] 刘俊. 中国香菇核心种质资源库的构建及其重要农艺性状的关联分析[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2015
Liu J. Establishment core collections and association analysis of important agronomic traits of *Lentinula edodes* in China[D]. Wuhan: Master's Thesis of

- Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [24] Won HK, Park SJ, Kim DK, Shin MJ, Kim N, Lee SH, Kwon YC, Ko HK, Ro HS, Lee HS. Isolation and characterization of a mycovirus in *Lentinula edodes*[J]. Journal of Microbiology: Seoul, Korea, 2013, 51(1): 118-122
- [25] Pearson MN, Beever RE, Boine B, Arthur K. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(1): 115-128
- [26] Son M, Yu J, Kim KH. Five questions about mycoviruses[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(11): e1005172
- [27] Wang JJ, Guo MP, Sun YJ, Bian YB, Zhou Y, Xu ZY. Genetic variation and phylogenetic analyses reveal transmission clues of *Lentinula edodes* partitivirus 1 (LePV1) from the Chinese *L. edodes* core collection[J]. Virus Research, 2018, 255: 127-132
- [28] Dobbs E, Deakin G, Bennett J, Fleming-Archibald C, Jones I, Grogan H, Burton K. Viral interactions and pathogenesis during multiple viral infections in *Agaricus bisporus*[J]. mBio, 2021, 12(1): e03470-e03420
- [29] Grogan HM, Adie BAT, Gaze RH, Challen MP, Mills PR. Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus*[J]. Mycological Research, 2003, 107(2): 147-154
- [30] Deakin G, Dobbs E, Bennett JM, Jones IM, Grogan HM, Burton KS. Multiple viral infections in *Agaricus bisporus*: characterisation of 18 unique RNA viruses and 8 ORFans identified by deep sequencing[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 2469
- [31] Bartholomäus A, Wibberg D, Winkler A, Pühler A, Schlüter A, Varrelmann M. Deep sequencing analysis reveals the mycoviral diversity of the virome of an avirulent isolate of *Rhizoctonia solani* AG-2-2 IV[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0165965
- [32] Osaki H, Sasaki A, Nomiyama K, Tomioka K. Multiple virus infection in a single strain of *Fusarium poae* shown by deep sequencing[J]. Virus Genes, 2016, 52(6): 835-847
- [33] Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, Qin XC, Li J, Cao JP, Eden JS, et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere[J]. Nature, 2016, 540(7634): 539-543