

侵染葱鳞葡萄孢的一种新型 dsRNA 病毒

吴明德 汪青军 张静 杨龙 李国庆

华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 测定了葱鳞葡萄孢(*Botrytis squamosa*)菌株 LeekBc-10 和 GarlicBc-2 的菌丝生长速度、致病力和菌株 LeekBc-10 中一种 dsRNA 病毒的 cDNA 序列及其推定编码的蛋白质序列, 并对该病毒进行了系统进化分析。结果表明: 菌株 GarlicBc-2 菌丝生长较快、致病力较强, 菌株 LeekBc-10 菌丝生长较慢、致病力较弱。菌株 LeekBc-10 菌丝中有 2 条 dsRNA 片段(dsRNA-1 和 dsRNA-2), 序列测定表明: dsRNA-1 和 dsRNA-2 核苷酸序列与相对应 *Botrytis porri* RNA virus 1(BpRV1) 中 2 条 dsRNA 片段的相似性分别为 91.7% 和 97.7%, 故可判断菌株 LeekBc-10 中的 dsRNA 是一种真菌病毒, 暂时命名为 *Botrytis squamosa* RNA virus 1(BsRV1)。BsRV1 中 dsRNA-1 和 dsRNA-2 分别含有一个大的开放阅读框(ORF), 即 ORF I 和 ORF II, 各自编码长度为 1 901 和 1 788 个氨基酸的假定蛋白, 且分别与 BpRV1 中的对应假定蛋白的相似度为 97.1% 和 98.7%。对 BsRV1 ORF I 编码的假定蛋白的分析表明: 该蛋白含有 RdRp_4(RNA dependent RNA polymerase)超家族蛋白的保守结构域。BsRV1 的 RdRp 与 *Totiviridae*、*Chrysoviridae* 和 *Megabirnaviridae* 等科病毒的 RdRp 同源性为 19%~23%, 且具有上述病毒 RdRp 的 8 个保守结构域。系统发育分析表明: BsRV1 与 BpRV1 聚在一起形成一个独立分支, 属于同一种病毒, 且不能归到任何已有的病毒科中, 因而可能代表一个新的病毒科。

关键词 灰霉病; 葱鳞葡萄孢; 弱毒现象; 真菌病毒

中图分类号 Q 939.4; S 432.4⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0039-08

由葡萄孢属真菌(*Botrytis* spp.)侵染所致的作物灰霉病是中国主要经济作物的重要病害之一^[1]。由葱鳞葡萄孢(*Botrytis squamosa*)引起韭菜、葱和蒜等作物的灰霉病, 能造成严重的经济损失, 特别是近年灰霉病的发生日趋普遍^[2]。灰霉病的防治主要是采用化学防治, 但长期大量使用杀菌剂, 已引起抗药性问题并造成环境污染^[3-4]。生物防治将成为控制灰霉病的可能替代途径。

真菌病毒(Mycovirus)是侵染真菌并能在真菌体内复制增殖的病毒, 广泛存在于各类真菌中^[5]。已报道的绝大多数真菌病毒属于 RNA 病毒, 其基因组为双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)和单链 RNA(single-stranded RNA, ssRNA), 只有少数真菌病毒基因组为 DNA^[6]。多数真菌病毒的侵染对宿主真菌生长、繁殖和致病没有明显影响。少数真菌病毒的侵染能导致真菌生长、繁殖或致病力发生衰退^[5]。这表明真菌病毒存在着控制植物病原真菌的潜能。

Wu 等^[7]在大蒜盲种葡萄孢(*B. porri*)菌株 GarlicBc-72 中发现了一种新的双片段 dsRNA 病毒, 命名为 *Botrytis porri* RNA virus 1(BpRV1)。同时, 在葱鳞葡萄孢菌株 LeekBc-10 也检测到大小类似于 BpRV1 的 2 种 dsRNA。本试验测定了葱鳞葡萄孢(*Botrytis squamosa*)菌株 LeekBc-10 和 GarlicBc-2 的菌丝生长速度、致病力和菌株 LeekBc-10 中一种 dsRNA 病毒的 cDNA 序列及其推定编码的蛋白质序列, 并对该病毒进行了系统进化分析, 旨在明确菌株 LeekBc-10 的致病力和生长速度, 探讨菌株 LeekBc-10 中 dsRNA 的本质及其与 BpRV1 之间的关系。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养基

供试真菌菌株包括葱鳞葡萄孢菌株 LeekBc-10 和 GarlicBc-2, 以及大蒜盲种葡萄孢(*B. porri*)菌株 GarlicBc-72。菌株 LeekBc-10 分离自韭菜叶片, 菌

株 GarlicBc-2 和 GarlicBc-72 分离自大蒜叶片。供试培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

1.2 供试植物

供试植物为大蒜(*Allium sativum*),品种为丰蒜1号。在大蒜抽苔前,选取健壮嫩绿的叶片,测定不同菌株的致病力。

1.3 酶及其他试剂材料

*Taq*DNA聚合酶、T4 RNA连接酶、RNase抑制剂、RNase-free DNase I、pMD18-T载体克隆试剂盒、随机引物标记试剂盒及 M-MLV 反转录酶 cDNA 合成试剂盒均为 TaKaRa 公司产品(大连); M-MLV 反转录酶和 KOD-plus-DNA 聚合酶均为日本东洋纺公司产品; PCR 产物纯化试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒为美国 Axygen 公司产品; CF-11 纤维素为美国 Sigma 公司产品。

1.4 菌丝生长速度测定

将各供试菌株分别接种于 PDA 平板上,并置于 20℃的恒温箱中培养 3~4 d。用灭菌的打孔器(直径 6 mm)在菌落边缘打取菌饼,然后将菌饼转接到 PDA 平板中央(每皿含 20 mL PDA 培养基),置于 20℃下培养,各菌株设 5 次重复。逐天按十字交叉法测定菌落直径,并计算生长速度^[7]。

1.5 致病力测定

采用离体叶片法^[7]测定各葡萄孢菌株对大蒜叶片的致病力。先在搪瓷盘中平铺 2 层吸水纸,并加入适量蒸馏水保持湿润。选取大小基本一致的新鲜健康大蒜叶片,用无菌水漂洗 3 次,擦干叶片表面,置于铺有湿润吸水纸的搪瓷盘中。用灭菌的打孔器(直径 6 mm)在各菌株菌落边缘打取 3 个菌饼,分别接种于大蒜叶片的上、中和下部,作为 1 次重复,各菌株共设 9 次重复。用保鲜膜覆盖接种盘,并将接种盘置于 20℃和光照条件下培养 48 h。沿叶脉方向测量各接种菌饼周围的病斑长度。

1.6 dsRNA 提取及纯化

将各菌株接种于铺有灭菌玻璃纸的 PDA 平板上,每皿接种 5 个菌饼,置于 20℃下培养 3~4 d,收集菌丝,并将菌丝置于-80℃冰箱中保存。取 3 g 菌丝样品置于研钵中,加入液氮后将其研磨成粉末。参考 Harmmar 等^[8]的方法提取和纯化菌丝中的 dsRNA。最后将提取物溶于 TE 缓冲液中,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离提取物中的核酸。电泳结束后将胶块置于溴化乙锭溶液(0.5 μg/mL)中染色。用 DNA 酶、RNA 酶和 S1 酶等核酸酶分别处理各菌株

核酸提取物,琼脂糖凝胶电泳检测各样品核酸带型。将不能被 DNA 酶和 S1 酶消解而能被 RNA 酶消解的核酸分子判定为 dsRNA^[7]。

1.7 cDNA 克隆及序列分析

菌株 LeekBc-10 中的 dsRNA 部分 cDNA 片段与 *Botrytis porri* RNA virus 1(BpRV1)有极高的同源性,因此,菌株 LeekBc-10 中 dsRNA 片段全长 cDNA 序列可基于已报道的 BpRV1 序列^[7],设计特异性引物运用反转录 PCR(RT-PCR) 进行。

菌株 LeekBc-10 中 dsRNA 的反转录是通过在 dsRNA 的 3' 末端加上一段已知序列的寡核苷酸片段(BPA),再使用与该序列互补的引物(RCBPA)进行反转录反应^[7]。操作方法:菌丝中提取的 dsRNA 用 DNase I 去除 DNA 后用凝胶回收纯化,然后进行接头的连接反应,反应体系: dsRNA 10 μL(约 200 ng), BSA(0.1%) 3 μL, RNase 抑制剂 1 μL(40 U/μL), T4 RNA 连接酶 2 μL(30 U/μL), 10 × T4 RNA 连接缓冲液 5 μL, 接头 BPA(50 μmol/L) 1 μL, 25 μL 40% PEG 6000 溶液, 最终补加 ddH₂O 至 50 μL, 在 16℃下反应 16~18 h。

连接反应完成后采用氯仿苯酚抽提,并对连接后的 dsRNA 进行回收纯化,使用引物 RCBPA 进行反转录。操作方法:将回收纯化后的 dsRNA 在沸水中变性 5 min 后,迅速置于冰上冷却,再依次加入 5 × 反转录反应缓冲液 5 μL, dNTP(10 mmol/L) 1 μL, RNase 抑制剂 1 μL, 接头互补引物 RCBPA(2 μmol/L) 1 L, M-MLV 反转录酶 1 μL 及 6 μL DEPC-H₂O, 混合均匀后 42℃水浴 1 h。

取上述反应液 0.5 μL 于 300 μL PCR 管中,再在冰上依次加入 1 μL 特异性引物对 RCBPA/101P1、101P2/101P3、101P4/RCBPA 或 RCBPA/102P1、102P2/102P3、102P4/RCBPA(20 μmol/L)、2 μL dNTP(2.5 mmol/L)、1 μL KOD-plus-DNA 聚合酶(1 U/μL)和 10 × PCR 缓冲液 5 μL, 补水至总体积为 50 μL, 然后进行 PCR 反应, 分别用于扩增 dsRNA-1 和 dsRNA-2 的 5' 末端序列、中间部分序列和 3' 末端序列。PCR 循环条件: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 50 s, 56℃ 退火 50 s, 68℃ 延伸 1.5 min, 总共 35 个循环, 最后 68℃ 延伸 5 min。PCR 反应完成后, 使用 1% 的琼脂糖进行凝胶电泳检测 RT-PCR 扩增结果。上述引物序列参见文献^[7]。

使用高保真 KOD-plus-DNA 聚合酶进行 PCR

扩增获得的 cDNA 片段, 需在其产物 3'末端加腺嘌呤(A)以便与 T 载体连接, 再进行大肠杆菌的转化和插入序列的测定。在加 A-Tailing 前, 对 PCR 所获得的 cDNA 片段, 需用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。取 10 μ L 的 cDNA 溶液, 加入 5 μ L dATP (10 mmol/L), 加入 5 μ L 10 \times TaqDNA 聚合酶缓冲液及 0.5 μ L TaqDNA 聚合酶(5 U/ μ L), 补水至 50 μ L 后置于 72 °C 反应 15 min 即可。

反应完全后再次使用 PCR 产物纯化试剂盒对 A-Tailing 后的 cDNA 片段进行回收纯化, 并使回收后溶液的体积控制在 10 μ L 左右。病毒基因组 cDNA 片段连接到 pMD18-T 克隆载体上并转化大肠杆菌, 经培养及检测后将阳性大肠杆菌送至上海生物工程公司进行序列测定。

1.8 cDNA 序列拼接及分析

用 DNAMAN 软件将试验中获取的病毒 cDNA 序列进行拼接, 得到 dsRNA-1 和 dsRNA-2 全长 cDNA 序列。采用 ORF FINDER 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)预测开放阅读框(ORF)及相应假定蛋白。用 BLASTn 和 BLASTp 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分别对病毒 cDNA 序列和推定氨基酸序列同源搜索。同时, 用 DNAMAN 软件对病毒 dsRNA-1 和 dsRNA-2 的 5' 和 3' 末端核酸序列进行比对分析。最后采用 MAGE 5.0 软件对病毒进行系统进化分析, 分析中所用的病毒见表 1。

分析所用的数据是病毒的依赖 RNA 的 RNA 复制酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)保守结构域(Motifs 1~8)。采用邻接法(NJ)构建系统进化树, 用 Bootstrap 程序(1 000 个重复)检验所生成系统发育树的自展支持率。

1.9 数据处理

采用 SAS 软件进行统计分析, 比较菌株 Leek-Bc-10 和 GarlicBc-2 菌丝生长速度和病斑长度, 并采用单因素 *t* 测验法比较二者在各指标上的差异显著性。

表 1 系统发育树分析中所用的病毒

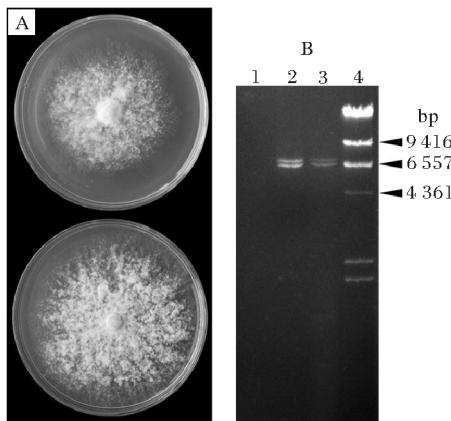
Table 1 Viruses used in phylogenetic analysis

病毒名称	Name of virus	GenBank 登录号	No.	GenBank
玉米黑粉菌病毒 H1 <i>Ustilago maydis</i> virus H1, UmVH1		NC_003823		
酿酒酵母菌病毒 L-A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> virus L-A, ScV-L-A		J04692		
酿酒酵母菌病毒 L-BC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> virus L-BC, ScV-L-BC		U01060		
维多利蠕孢菌病毒 145S <i>Helminthosporium victoriae</i> virus 145S, HvV145S		AF297176		
产黄青霉病毒 <i>Penicillium chrysogenum</i> virus, PeV		AF296339		
尖孢镰刀菌金色病毒 <i>Fusarium oxysporum chrysotrichum</i> 1, FoCV1		EF152346		
曲霉菌金色病毒 <i>Aspergillus fumigatus</i> chrysotrichum, AfV		FN178512		
栗疫属金色病毒 <i>Cryphonectria nitschkei</i> chrysotrichum, CnV1		GQ290650		
阿马西亚樱桃病害相关金色病毒 Amasya cherry disease-associated chrysotrichum, ACDACV		NC_009947		
大丽轮枝孢产黄病毒 <i>Verticillium dahliae</i> chrysotrichum, VcV		HM004067		
双孢菇病毒 1 <i>Agaricus bisporus</i> virus 1, AbV1		X94361		
樱桃褪绿相关金色病毒 Cherry chlorotic rusty spot-associated chrysotrichum, CCRSCV		AJ781397		
桑紫纹羽病 17 号双链 RNA 病毒 <i>Helicobasidium mompa</i> no. 17 dsRNA virus, Hm17V		AB085814		
松枯梢病菌 RNA 病毒 1 <i>Sphaeropsis sapinea</i> RNA virus 1, SsRV1		NC_001963		
稻瘟病菌病毒 1 <i>Magnaporthe oryzae</i> virus 1, MoV1		AB176964		
针叶树溃疡病 RNA 病毒 L1 <i>Gremmeniella abetina</i> RNA virus L1, GaVL1		AF337175		
富氏葡萄孢盘菌全病毒 1 <i>Botryotinia fuckeliana</i> totivirus 1, BfTV1		AM491608		
燕麦疫病菌病毒 190S <i>Helminthosporium victoriae</i> virus 190S, HvV190S		U41345		
白纹羽病病毒 1 <i>Rosellinia necatrix</i> megabirnavirus 1, RnBMV1		AB512282		
苜蓿膜翅角蝉病毒 1 <i>Spissistilus festinus</i> virus 1, SFV1		GU979419		
甜菜叶蝉病毒 1 <i>Cirulifer tenellus</i> virus 1, CiTV1		GU979420		
大伏革菌双链 RNA 真菌病毒 1 <i>Phlebiopsis gigantea</i> mycovirus dsRNA 1, PGV1		AM111096		
小麦赤霉病双链 RNA 真菌病毒 3 <i>Fusarium graminearum</i> dsRNA mycovirus 3, FgV3		NC_013469		
色二孢属无梗囊霉 RNA 病毒 1 <i>Diplodia scrobiculata</i> RNA virus 1, DsRV1		NC_013699		
大伏革菌双链 RNA 真菌病毒 2 <i>Phlebiopsis gigantea</i> mycovirus dsRNA 2, PGV2		AM111097		
香菇真菌病毒 HKB <i>Lentinula edodes</i> mycovirus HKB, LEV		AB429554		
大蒜盲种葡萄孢 RNA 病毒 1 <i>Botrytis porri</i> RNA virus 1, BpRV1		JF716350		
白纹羽病四分体病毒 1 <i>Rosellinia necatrix</i> quadrivirus 1, RnQV1		AB620063		

2 结果与分析

2.1 菌丝生长、致病力及 dsRNA 比较

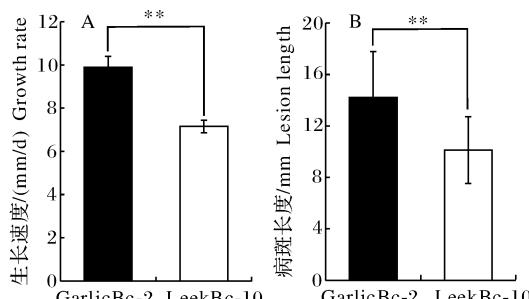
试验结果表明:在20℃条件下,菌株GarlicBc-2菌丝生长较快,平均生长速度为9.9 mm/d,培养4~5 d后长满整个培养皿;菌株LeekBc-10菌丝生长较慢,平均生长速度为7.2 mm/d,培养4~5 d后,菌落仅覆盖培养皿约一半的面积(图1-A,图2-A)。统计分析结果表明,2个菌株的菌丝生长速度存在极显著差异($P<0.01$),但在菌落形态方面,2个菌株之间没有太大差别。



A: 菌株 LeekBc-10(上)和菌株 GarlicBc-2(下)的菌丝。
Mycelium of LeekBc-10 (upper) and GarlicBc-2 (lower);
B: 1. GarlicBc-2, 2. GarlicBc-72, 3. LeekBc-10, 4. Marker.

图1 2个菌株的菌丝生长比较及其 dsRNA 电泳检测

Fig. 1 Compare two strains of mycelial growth and dsRNA electrophoresis detection



“* *”表示菌株GarlicBc-2和LeekBc-10之间差异达极显著水平($P<0.01$)。The symbol “* *” indicates significant difference ($P<0.01$) between strains GarlicBc-2 and LeekBc-10 in mycelial growth rate and lesion length.

图2 2个菌株的菌丝生长速度和致病力比较

Fig. 2 Comparison of mycelial growth rate and lesion length between two strains

在离体大蒜叶片上进行致病力测定的结果表明:菌株GarlicBc-2致病力较强,在大蒜叶片上引起的病斑较大,平均病斑长度为14.2 mm;菌株LeekBc-10的致病力较弱,在大蒜叶片上引起的病斑较小,病斑长度为10.1 mm(图2)。统计分析结果表明,2个菌株所引起的病斑长度差异极显著($P<0.01$)。

对菌株GarlicBc-2和LeekBc-10菌丝中dsRNA检测结果表明:菌株LeekBc-10中存在2条dsRNA片段,其大小与菌株GarlicBc-72中BpRV1的dsRNA片段大小一致;在菌株GarlicBc-2中未检测到任何dsRNA片段(图1-B)。

2.2 菌株LeekBc-10中dsRNA属性鉴定

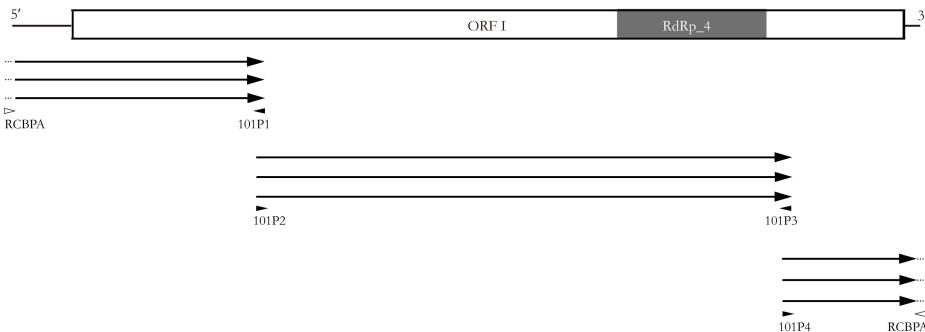
试验结果表明,菌株LeekBc-10中的dsRNA片段大小(分别命名为dsRNA-1和dsRNA-2)与BpRV1的2种dsRNA片段一致。由此可见,菌株LeekBc-10中的dsRNA可能是一种dsRNA病毒,故将其暂时命名为*Botrytis squamosa* RNA virus 1(BsRV1)。

通过对BsRV1的2条dsRNA分别进行cDNA克隆和序列拼接,可获得BsRV1的全长cDNA序列(图3)。BsRV1的dsRNA-1全长为6 214 bp,较BpRV1的dsRNA-1少一个核苷酸,两者同源性达到91.7%。BsRV1的dsRNA-2全长为5 879 bp,与BpRV1的dsRNA-2长度完全一样,且两者的同源性达到97.7%。BsRV1的dsRNA-1和dsRNA-2在5'端近500 bp区域同源性高达95%(图4)。

对BsRV1全长cDNA序列进行开放阅读框(ORF)预测,结果表明,dsRNA-1与dsRNA-2各有1个大的ORF,编码长度分别为1 901个和1 788个氨基酸的假定蛋白,且其位置与BpRV1中的2个ORF位置相似^[7]。

另外,BsRV1中dsRNA-1和dsRNA-2编码假定蛋白与BpRV1编码假定蛋白的同源性分别达到97.1%和98.7%。BLASTp分析表明:BsRV1中dsRNA-1编码的假定蛋白在靠近C'端的蛋白序列与单分病毒科Totiviridae、产黄青霉病毒科Chrysoviridae和巨大双分病毒科Megabirnaviridae等科病毒的RdRp同源性达到19%~23%。BsRV1中dsRNA-1编码的蛋白与BpRV1中dsRNA-1编码的蛋白均含有RdRp的8个保守结构域(图5),且都属于RdRp_4超家族。

dsRNA-1 (6 214 bp)



dsRNA-2 (5 879 bp)

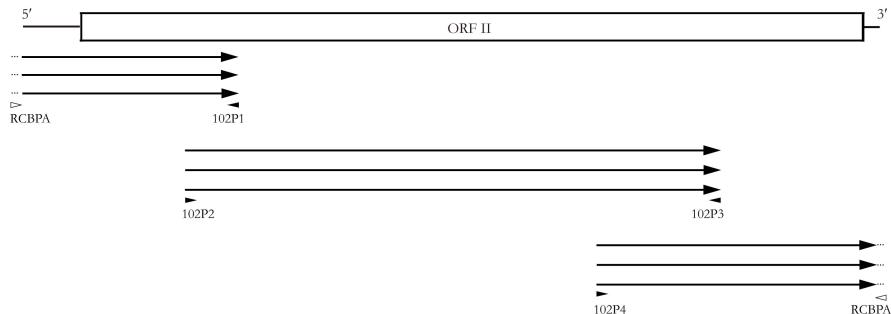


图 3 葱鳞葡萄孢菌株 LeekBc-10 中 BsRV1 的基因组全长 cDNA 克隆策略模式图

Fig. 3 A schematic diagram showing the strategy used for full-length cDNA cloning of BsRV1 in strain LeekBc-10 of *Botrytis squamosa*

BpRV1-1	CGAAATAAAAGAGCTGCCTT	78
BpRV1-2	GCAAATAAAAGAGCTGCCTT	79
BsRV1-1	GCAAATAAAAGAGCTGCCTT	80
BsRV1-2	GCAAATAAAAGAGCTGCCTT	79
BpRV1-1	CGGGTTAGAAAAGCCAGCGCTGTGAGTAGTAGTCACACTAGCTGGTAATTCTATTTGGAAAC	158
BpRV1-2	AGGGTTAGAAAAGCCAGCGCTGTGAGTAGTAGTCACACTAGCTGGTAATTCTATTTGGAAAC	159
BsRV1-1	AGGGTTAGAAAAGCCAGCGCTGTGAGTAGTAGTCACACTAGCTGGTAATTCTATTTGGAAAC	160
BsRV1-2	AGGGTTAGAAAAGCCAGCGCTGTGAGTAGTAGTCACACTAGCTGGTAATTCTATTTGGAAAC	159
BpRV1-1	TCGGACACTCTAACCGCCTTGTCAAGGATATCAGGGATGTGAATAGACGTGTGGAACACAAAGT	238
BpRV1-2	TCGGACACTCTAACCGCCTTGTCAAGGATATCAGGGATGTGAATAGACGTGTGGAACACAAAGT	239
BsRV1-1	TCGGACACTCTAACCGCCTTGTCAAGGATATCAGGGATGTGAATAGACGTGTGGAACACAAAGT	240
BsRV1-2	TCGGACACTCTAACCGCCTTGTCAAGGATATCAGGGATGTGAATAGACGTGTGGAACACAAAGT	239
BpRV1-1	CAACTGCTCTTTAGTGTATAAATCAGAAGGATAGTTAACCGAGATCTCTAGAGAAGGGCTACCTGGCA	318
BpRV1-2	CAACTGCTCTTTAGTGTATAAATCAGAAGGATAGTTAACCGAGATCTCTAGAGAAGGGCTACCTGGCA	319
BsRV1-1	CAACTGCTCTTTAGTGTATAAATCAGAAGGATAGTTAACCGAGATCTCTAGAGAAGGGCTACCTGGCA	320
BsRV1-2	CAACTGCTCTTTAGTGTATAAATCAGAAGGATAGTTAACCGAGATCTCTAGAGAAGGGCTACCTGGCA	319
BpRV1-1	GGGCGTAGTATACTACGATATCGGAGGAATTGAAGCCTTCTGTAAATCCCCAGTACCCAGGCTCTAGGGTAAAGTG	398
BpRV1-2	GGGCGTAGTATACTACGATATCGGAGGAATTGAAGCCTTCTGTAAATCCCCAGTACCCAGGCTCTAGGGTAAAGTG	399
BsRV1-1	GGGCGTAGTATACTACGATATCGGAGGAATTGAAGCCTTCTGTAAATCCCCAGTACCCAGGCTCTAGGGTAAAGTG	400
BsRV1-2	GGGCGTAGTATACTACGATATCGGAGGAATTGAAGCCTTCTGTAAATCCCCAGTACCCAGGCTCTAGGGTAAAGTG	399
BpRV1-1	AGAGAATGAAATTCAAATGCCTTACAACACACAAACCGCCTCCTCGGCCAAGGGACAACAGAGTGGAGAATGTTGCT	478
BpRV1-2	AGAGAATGAAATTCAAATGCCTTACAACACACAAACCGCCTCCTCGGCCAAGGGACAACAGAGTGGAGAATGTTGCT	479
BsRV1-1	GGAGAATGAAATTCAAATGCCTTACAACACACAAACCGCCTCCTCGGCCAAGGGACAACAGAGTGGAGAATGTTGCT	480
BsRV1-2	AGAGAATGAAATTCAAATGCCTTACAACACACAAACCGCCTCCTCGGCCAAGGGACAACAGAGTGGAGAATGTTGCT	479
BpRV1-1	AAATCAGCTCCAGAAAATCAAACCTTCCCTGAGAATTGTGG	520
BpRV1-2	AAATCATCTCCAGCAAAACCGCTCAACCTAAGAGCAAGAA.	520
BsRV1-1	AAATCAGCTCCAGAAAATCAAACCTTCCCGCTGAATTGT..	520
BsRV1-2	AAATCATCTCCAGCAAAACCGCTCAACCTAAGAGCAAGAA.	520

图 4 病毒 BsRV1 和 BpRV1 的 5' 端核苷酸序列分析

Fig. 4 Alignment of the 5'-terminal sequences of BsRV1 and BpRV1

BpRV1-1	MKFKMPYNTQTASSAQEDNRVENVAKSAPQNINLPAELWALVSS	SLQSYDCAVVSKCVGSSHPLVVAMMSRAADEYKYP	80
BsRV1-1	MKFKMPYNTQTASSAQEDNRVENVAKSAPQNINLPAELWALVNSL	SLQSYDCAVVSKCVGSSHPLVVAMMSRAADEYKYP	80
BpRV1-1	CPAERRVYAVPCGCKAFMRSTVGHLVVKDDEVGSFICCAYGTRTSRCKSGSMSWTTQDREEAIRQDLLAYARQTKGR	160	
BsRV1-1	CPAERRVYAVPCGCKAFMRSTVGHLVVKNEVGSTFICCAYGTRTSRCKSGSMSWTTQDREEAIRKHDLLAYARQTKGR	160	
BpRV1-1	YGPNPTESEMEEKDREDRDLADWRYLRYCAEVVLEEDL	LKALFFSRELTVLGPKGADEIGPSDPVPPPSGPVLDRET	240
BsRV1-1	YGPNPTESEMEEKDREDRDLADWRYLRYCAEVVLEEDL	LKALFFSRELTVLGPKGADEIGPSDPVPPPSGPVLDRET	240
BpRV1-1	VGDDTVPDQVTGPDLPVAAAPTGVNPGEDEAAAE	QENSGNKENYEVNLSNERSGQPVEEPEHAGLWSLNLNEDDTMFDRYAGTI	320
BsRV1-1	VGDDTVPDQVTGPDLPVAAAPTGVNPGEDEAAAE	QENSGNKENYEVNLSNERSGQPVEEPEHAGLWSLNLNEDDTMFDRYAGTI	320
BpRV1-1	MRSARHKAWEPALQGHWNNTFTIGGDIMRDVKAHHTVAMSLSPHVTWGYGEFTPATITKAGYIDSYEVQCTTDRRTV	400	
BsRV1-1	MRSARHKAWEPALQGHWNNTFTIGGDIMRDVKAHHTVAMSLSPHVTWGYGEFTPATITKAGYIDSYEVQCTTDRRTV	400	
BpRV1-1	MIPFARDTIAYNVPFGMSVYNRAQPFNSTASVTPLSLDILSAVEDDKALTSAYNSLILTSSSKGNNHIALGCTMYMRLMALE	480	
BsRV1-1	MIPFARDTIAYNVPFGMSVYNRAQPFNSTASVTPLSLDILSAVEDDKALTSAYNSLILTSSSKGNNHIALGCTMYMRLMALE	480	
BpRV1-1	MLAEQGAATYIDLTAEGFNRFLPVEDGDD	APIRKVARSVVAHQPYNMITLDPQSDASDAILMYYLAGNSRITTYVTAGP	560
BsRV1-1	MLAEQGAATYIDLTAEGFNRFLPVEDGDD	APIRKVARSVVAHQPYNMITLDPQSDASDAILMYYLAGNSRITTYVTAGP	560
BpRV1-1	GAPDLAVHSTIDLVYVPEQRFITLCPNGSELIEERDSDDDGAFKVDAYRARSLVSRYLTAHNWLQQFPVMRAFWALLAHP	640	
BsRV1-1	GAPDLAVHSTIDLVYVPEQRFITLCPNGSELIEERDSDDDGAFKVDAYRARSLVSRYLTAHNWLQQFPVMRAFWALLAHP	640	
BpRV1-1	ATSVNIQYPAPMHTADQLNLFNPASIEHGRVILGERDHQTSLSVTAARMAEEVLTDISVSTVVEAGIEYTNPAYT	720	
BsRV1-1	ATSVNMQYPAPMHTADQLNLFNPASIEHGRVILGERDHQTSLSVTAARMAEEVLTDISVSTVVEAGIEYTNPAYT	720	
BpRV1-1	GTVEQELGRHLHYGHAHIMPIVEKLLGDTFFELTQYLAQDVLALEHCTTGRDLRKKFRASSYLCM	800	
BsRV1-1	GTVEQELGRHLHYGHAHIMPIVEKLLGDTFFELTQYLAQDVLALEHCTTGRDLRKKFRASSYLCM	800	
BpRV1-1	SESRRKQ1LQQEYCTEREQOLTLWLTQKVAQENVGAVTYQHEILPSESVDTPVVRGLKGNRLLDYLRGABILWGTBT	880	
BsRV1-1	SESRRKQ1LQQDCTEREQOLTLWLTQKVAQENVGAVTYQHEILPSESVDTPVVRGLKGNRLLDYLRGABILWGTBT	880	
BpRV1-1	AVAYKHSQRVKFQLESNELGPPGTLFAQKLYEKRQVNSEAMIREDEEALGTTASHREEKGWAPKLEPKREEKKEEVVVB	960	
BsRV1-1	AVAYKHSQRVKFQLESNELGPPGTLFAQKLYEKRQVNSEAMIREDEEALGTTASHREEKGWAPKLEPKREEKKEEVVVB	959	
BpRV1-1	RPTATKTKPVRQQVPLAVRAVSPDKECGLPVYGGARPSVQVTRMTTMMGKSPMKVANSTPKVRRTLSGGYKPKTP	1 040	
BsRV1-1	RPTATKTKPVRQQVPLAVRAVSPDKECGLPVYGGARPSVQVTRMTTMMGKSPMKVANSTPKVRRTLSGGYKPKTP	1 039	
BpRV1-1	WHLRASREEEEAALKKGAEARKSFESRPLSLGLRLRILLEKEQTSaedrKEIDRYYDRGMDAALKRAPYTAGVMWSKRQI	1 120	
BsRV1-1	WHLRASREEEEAALKKGAEARKSFESRPLSLGLRLRILLEKEQTSaedrKEIDRYYDRGMDAALKRAPYTAGVMWSKRQI	1 119	
BpRV1-1	IAKNKTRIAHLKTAMLNGAYGKNAWMVTGLWIMTNTMDNCFEDILEKEGIKTTSTEYSDWNSKWAISNDIIRNKWAKGEK	1 200	
BsRV1-1	IAKNKTRIAHLKTAMLNGAYGKNAWMVTGLWIMTNTMDNCFEDILEKEGIKTTSTEYSDWNSKWAISNDIIRNKWAKGEK	1 199	
Motif-I			
BpRV1-1	HTPDDLVQCLYIANYMVRPHRECWDDEVKKRTRNVGEIKIARNGKMPADESQQLEEEILQMLLKEGSIRVKKPKTFEQF	1 280	
BsRV1-1	HTPDDLVQCLYIANYMVRPHRECWDDEVKKRTRNVGEIKIARNGKMPADESQQLEEEILQMLLKEGSIRVKKPKTFEQF	1 279	
Motif-II			
BpRV1-1	YSSRGNWNMIGSASGERMLISEYK	1 360	
BsRV1-1	YSSRGNWNMIGSASGERMLISEYK	1 359	
Motif-III			
BpRV1-1	AIYGSLYAHYVLGFWSTYLEDVTLASASMNKDNRSR1AETMQRaiscrsgrwivcldyadfnahsgmaqrsvirtly	1 440	
BsRV1-1	AIYGSLYAHYVLGFWSTYLEDVTLASASMNKDNRSR1AETMQRaiscrsgrwivcldyadfnahsgmaqrsvirtly	1 439	
Motif-IV			
BpRV1-1	AIYGSLYAHYVLGFWSTYLEDVTLASASMNKDNRSR1AETMQRaiscrsgrwivcldyadfnahsgmaqrsvirtly	1 440	
BsRV1-1	AIYGSLYAHYVLGFWSTYLEDVTLASASMNKDNRSR1AETMQRaiscrsgrwivcldyadfnahsgmaqrsvirtly	1 439	
Motif-V			
BpRV1-1	KWAKMGMGQPTEEFNRISEWYADSFTNQWFQRPDNKQWVRAVSGMFSGVRQTTLINTILNLTYYHHIAMKNCYNLGQKVEC	1 520	
BsRV1-1	KWAKMGMGQPTEEFNRISEWYADSFTNQWFQRPDNKQWVRAVSGMFSGVRQTTLINTILNLTYYHHIAMKNCYNLGQKVEC	1 519	
Motif-VI			
BpRV1-1	LQTYVLGDDGWEFSTKEEAEMYVVAARMMGEINAIIQKLIQGQKGEYLRLIYDVGRVRCPVRSLASFVHGNVENKQ	1 600	
BsRV1-1	LQTYVLGDDGWEFSTKEEAEMYVVAARMMGEINAIIQKLIQGQKGEYLRLIYDVGRVRCPVRSLASFVHGNVENKQ	1 599	
BpRV1-1	SVGQQRITEMYSQACMLVRRGLDPAWQKVFEDLAIYEIGTQVSRGQCLKYLGSKRSRGGGLMLPLNTATDRVAKLPV	1 680	
BsRV1-1	SVGQQRITEMYSQACMLVRRGLDPAWQKVFEDLAIYEIGTQVSRGQCLKYLGSKRSRGGGLMLPLNTATDRVAKLPV	1 679	
BpRV1-1	EAEAAAEEVDAQI1LADS1VEGRVANKFKASSDVGTLTREYGVWVHKHNGKIKATAQVAASNLVEGITNVGAEEHEVLKMR	1 760	
BsRV1-1	EAEAAAEEVDAQI1LADS1VEGRVANKFKASSDVGTLTREYGVWVHKHNGKIKATAQVAASNLVEGITNVGAEEHEVLKMR	1 759	
BpRV1-1	VLGAQLEKAKWLEAMNWDRWNNGPLIGPENIEKQYRKIRVSEKDLKLLSTVTKVAKLAHLMSAESVEAQMKIAADLDVSVT	1 840	
BsRV1-1	VLGAQLEKAKWLEAMNWDRWNNGPLIGPENIEKQYRKIRVSEKDLKLLSTVTKVAKLAHLMSAESVEAQMKIAADLDVSVT	1 839	
BpRV1-1	AVKHSFKSASVLRGEQIDYIPKPKVMAPELEGIYTQWLTVNNDSSQOMSIPRVIADYTAVALRY	1 902	
BsRV1-1	AVKHSFKSASVLRGEQIDYIPKPKVMAPELEGIYTQWLTVNNDSSQOMSIPRVIADYTAVALRY	1 901	

Motif I 至 Motif VIII 表示蛋白中的 8 个保守结构域。BpRV1-1 和 BsRV1-1 分别表示 BpRV1 和 BsRV1 中 dsRNA-1 编码的蛋白。

Motif I to Motif VIII represent eight motifs present in the protein sequence. BpRV1-1 and BsRV1-1 represent the putative proteins encoded by dsRNA-1 of BpRV1 and dsRNA-1 of BsRV1, respectively.

图 5 BsRV1 和 BpRV1 中 dsRNA-1 编码的蛋白质序列比对分析

Fig. 5 Alignment of the protein sequences encoded by dsRNA-1 of BsRV1 and dsRNA-1 of BpRV1

2.3 菌株 LeekBc-10 中 dsRNA 病毒的系统进化

为进一步明确葱鳞葡萄孢菌株 LeekBc-10 中 BsRV1 的分类地位, 根据其 RdRp 保守结构域序列构建系统发育进化树(图6)。首先, 从进化树中可

以发现 BsRV1 与 BpRV1 的亲缘关系最近, 两者聚在一起形成单独的一支, 自展支持率为 100%; 其次, 它们再与 SFV1、CiTV1 和 UmVH1 聚在一起形成一支, 但是其自展支持率较低, 仅为 61%。

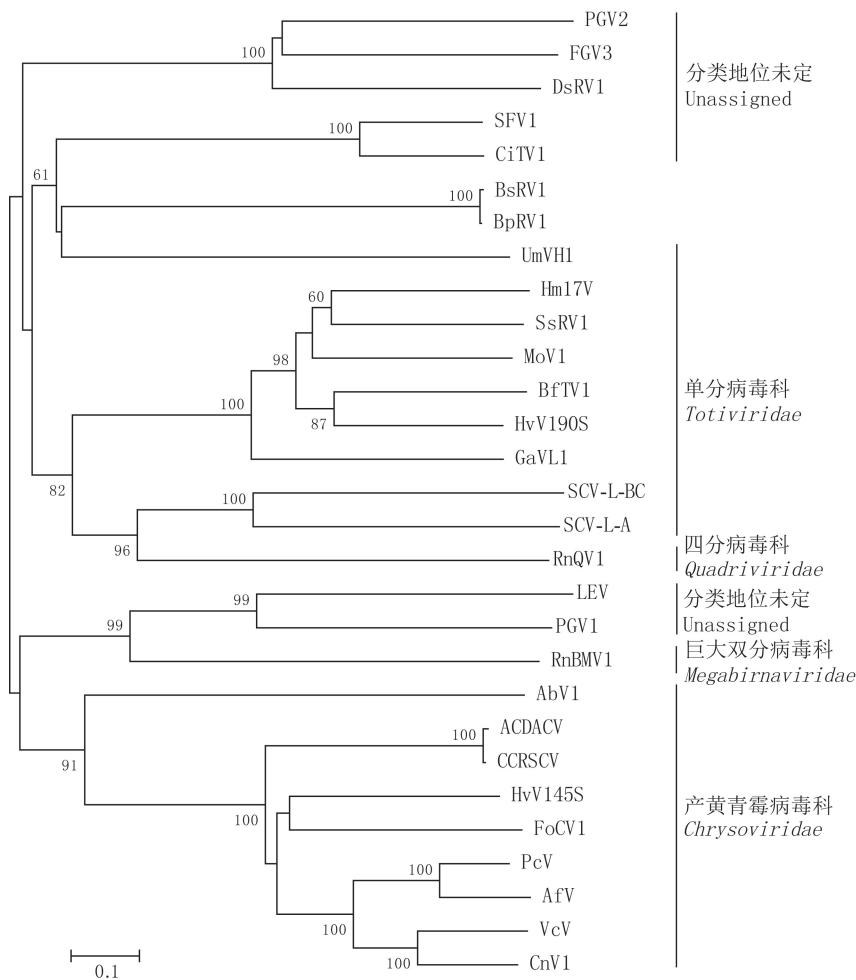


图 6 BsRV1 和其他真菌病毒的系统进化分析

Fig. 6 Phylogenetic analysis of BsRV1 and other mycoviruses

3 讨 论

本试验结果表明, 相对葱鳞葡萄孢菌株 *GarlicBc-2* 而言, 菌株 *LeekBc-10* 的生长速度较慢、致病力较弱。从菌株 *LeekBc-10* 的菌丝中可以检测到 *BsRV1* 基因组含有 2 条 dsRNA 片段 (dsRNA-1 和 dsRNA-2)。全长 cDNA 序列测定结果表明, *BsRV1* 中 dsRNA-1 和 dsRNA-2 与对应 *BpRV1* 中 2 条 dsRNA 片段序列的相似性分别为 91.7% 和 97.7%, 因此, 可以认为 *BsRV1* 与 *BpRV1* 是同一种真菌病毒。*BpRV1* 的寄主为大蒜盲种葡萄孢 (*B. porri*), 并可引起大蒜盲种葡萄孢致病力的衰退^[7]。含有 *BsRV1* 的菌株 *LeekBc-10* 的致病力也出现了一定程度的衰退, 但这种衰退是否由 *BsRV1* 引起的, 还需将 *BsRV1* 的病毒粒体导入强毒葱鳞葡萄孢菌株中加以验证。

真菌病毒在自然界中的传播主要依靠相同真菌菌丝之间的融合^[9-10]。大蒜盲种葡萄孢和葱鳞葡萄孢分属于不同物种, 它们之间进行菌丝融合的可能性极低。但是, *BpRV1* 与 *BsRV1* 属于同种病毒, 同一真菌病毒出现在不同的寄主之中, 这种现象以前仅在线粒体病毒中有报道^[7,11]。由于大蒜盲种葡萄孢和葱鳞葡萄孢均可寄生葱属植物, 故它们具有相似的生态位点。*BsRV1* 或 *BpRV1* 可能在田间以较低频率在一种真菌中寄生后再侵染另一种真菌。但是, 传染是通过菌丝融合还是通过自然介体尚不清楚, 因此有必要进行深入研究, 以揭示这种病毒在田间扩散的具体途径。

已有的研究表明, *BpRV1* 具有球形的病毒粒体, 直径约为 35 nm^[7]。*BsRV1* 是否也具有类似大小的病毒粒体, 尚不十分清楚, 因而有必要对其菌丝进行病毒粒体的分离与纯化。纯化后的病毒粒体可

用于原生质体的转化,以确定其对寄主的影响。BpRV1在侵染大蒜盲种葡萄孢时,可造成寄主真菌致病力严重衰退^[7],但BsRV1对其寄主的影响似乎没有那么大。该现象是因同种真菌病毒的不同毒株所造成的,还是因同种真菌病毒对不同寄主真菌影响不同,仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 林慧珍,苟萍.灰葡萄孢菌的诱变及其致病性研究[J].新疆农业科学,2011,48(5):877-881.
- [2] LEROCH M, PLESKEN C, WEBER R W S, et al. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79:159-167.
- [3] 张玮,乔广行,黄金宝,等.中国葡萄灰霉病菌对嘧霉胺的抗药性检测[J].中国农业科学,2013,46(6):1208-1212.
- [4] 齐永霞,陈方新,李欠欠.几种杀菌剂对草莓灰霉病菌的室内毒力测定[J].中国农学通报,2009,25(1):169-171.
- [5] GHABRIAL S A, SUZUKI N. Viruses of plant pathogenic fungi [J]. Annual Review of Phytopathology, 2009, 47:353-384.
- [6] YU X, LI B, FU Y P, et al. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2010, 107:8387-8392.
- [7] WU M D, JIN F Y, ZHANG J, et al. Characterization of a novel bipartite double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Botrytis porri* [J]. Journal of Virology, 2012, 86:6605-6619.
- [8] HARMMAR S, FULBRIGHT D W, ADARMS G C. Association of double-stranded RNA low virulence in an isolate of *Leucostoma Persoonii* [J]. Phytopathology, 1989, 79:568-569.
- [9] GHABRIAL S A. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses [J]. Virus Genes, 1998, 16:119-131.
- [10] NUSS D L. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005(3):632-642.
- [11] WU M D, ZHANG L, LI G Q, et al. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea* [J]. Phytopathology, 2007, 97:1590-1599.

A novel dsRNA mycovirus infecting the phytopathogenic fungus *Botrytis squamosa*

WU Ming-de WANG Qing-jun ZHANG Jing YANG Long LI Guo-qing

College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The growth rate and pathogenicity of strains LeekBc-10 and GarlicBc-2 of *Botrytis squamosa* have been determined in this study. Double stranded RNAs (dsRNAs) in strain LeekBc-10 were cDNA cloned and the resulting cDNA sequences were used to infer proteins and taxonomic status. The results showed that the strain LeekBc-10 was inferior in growth on potato dextrose agar and more vulnerable to infection of garlic leaves, compared to the strain GarlicBc-2. Two dsRNAs, dsRNA-1 and dsRNA-2, were detected in the mycelia of strain LeekBc-10. Sequences of dsRNA-1 and dsRNA-2 are 91.7% and 97.7% identical to the corresponding sequences of dsRNA-1 and dsRNA-2 from *Botrytis porri* RNA virus 1 (BpRV1). Therefore, the dsRNAs in the strain LeekBc-10 are the genome of a RNA virus, designated as *Botrytis squamosa* RNA virus 1 (BsRV1). Two open reading frames (ORF), ORF I and ORF II, were predicted on the dsRNA-1 and dsRNA-2 of BsRV1, respectively. They putatively encode two proteins with 1 901 and 1 788 amino acid residues respectively, which were 97.1% and 98.7% similar to the proteins putatively encoded by ORF I and ORF II of BpRV1 respectively. The protein encoded by ORF I of BsRV1 contains the RdRp_4 (RNA-dependent RNA polymerase) superfamily domain. The RdRp of BsRV1 has eight conserved motifs for viruses belonging to *Totiviridae*, *Chrysomaviridae* and *Megabirnaviridae* and is 19%-23% identical to those encoded by the viruses in these families. This study suggests that BsRV1 and BpRV1 belong to the same virus species, possibly representing a novelvirus family.

Key words gray mold; *Botrytis squamosa*; hypovirulence; mycovirus

(责任编辑:陈红叶)