

平菇球形病毒外壳蛋白基因的克隆及病毒致病性的初步分析

李 硕¹, 戴 坚², 张艳敬^{1,2*}, 李 玉^{1,2*}

(1. 吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心, 长春 130118; 2. 吉林农业大学植物保护学院, 长春 130118)

摘 要:平菇是我国栽培面积最广的食用菌之一,在菌种繁育过程中经常会出现菌种退化、产量降低等问题,对平菇产业造成巨大经济损失,其原因之一是由病毒病害引起的。本试验采集了16株疑似平菇病毒病样品,分别选用特异扩增平菇球形病毒(Oyster mushroom spherical virus, OMSV)和平菇等轴病毒(Oyster mushroom isometric virus, OMIV)目标片段的引物,通过RT-PCR的方法鉴定出6株平菇样品感染了OMSV,而所有菌株中均未检测到OMIV。选取扩增OMSV条带最亮的6号平菇样品(Po6),克隆了OMSV外壳蛋白(coat protein, CP)基因全长片段,序列分析显示与OMSV韩国分离物(Genbank ID: NC_004560.1)CP基因的核酸序列相似度为98.18%,氨基酸序列相似度为97.89%。通过原生质体再生法对Po6菌株进行脱毒处理,发现脱毒后菌落形态更加整齐,菌丝生长速度增快,生物量增加,并且出菇试验中菇型更接近于健康菌株。这初步表明OMSV对平菇菌丝生长以及子实体发育具有抑制作用。

关键词:平菇球形病毒; 外壳蛋白; 序列测定; 病毒脱毒

中图分类号: S436.46

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)04-0043-05

Cloning of Coat Protein Gene of Oyster Mushroom Spherical Virus and Preliminary Analysis of Viral Pathogenicity

LI Shuo¹, DAI Jian², ZHANG Yanjing^{1,2*}, LI Yu^{1,2*}

(1. Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. College of Plant Protection, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: *Pleurotus ostreatus* is one of the most widely cultivated edible fungi in China and has been facing some challenges, such as strain degeneration and yield reduction probably due to viral infections. Sixteen virus-like infected strains of Oyster mushroom were collected. Oyster mushroom spherical virus (OMSV) was detected in six *P. ostreatus* strains and Oyster mushroom isometric virus (OMIV) was not detected in all strains by RT-PCR using specific primers. The full-length sequence of coat protein gene of OMSV in Po6 strain which has the strongest amplification was determined. The comparison of the coat protein sequence showed 98.18% nucleic acid identity and 97.89% amino acid identity with OMSV Korean isolate (Genbank ID: NC_004560.1). After eliminating OMSV in Po6 strain by protoplast regeneration method, the mycelia growth rate and biomass increased obviously, and the phenotype was closer to the healthy ones. It indicated that OMSV probably inhibits mycelia growth and fruiting body development of *P. ostreatus*.

Key words: Oyster mushroom spherical virus; Coat protein; Sequence determination; Virus elimination

病毒病是在食用菌生产中一大类重要病害,

其发病症状具有潜隐性的特点,只有到达某个时期才开始显症,因此一旦发病就难以控制。随着检测技术的不断发展,目前已经在双孢蘑菇^[1-3]、香菇^[4-5]、平菇^[6-8]、金针菇^[9-10]、杏鲍菇^[11]等食用菌中检测到病毒或病毒颗粒的存在,并且有些病毒的基因组序列已经公布。

平菇(*Pleurotus ostreatus*)又名糙皮侧耳,隶属于蘑菇纲、蘑菇目、侧耳科、侧耳属^[12],其子实体味

收稿日期: 2019-10-16

基金项目: 111 引智基地项目(D17014); 中国博士后科学基金项目(2017M621223); 吉林农业大学省级大学生创新创业训练计划项目(2017410)

作者简介: 李 硕(1994-),女,在读硕士,研究方向: 食用菌病毒。

通讯作者: 张艳敬,女,博士,副教授, E-mail: yjzhang77@126.com

李 玉,男,博士,教授, E-mail: fungi966@126.com

道鲜美、营养丰富,是我国广泛栽培的一种食用菌。在平菇菌种繁育过程中经常会出现菌种退化、产量降低等问题,对平菇产业造成巨大经济损失,而病毒病害是造成其原因之一^[13]。平菇所携带的病毒大部分是双链RNA病毒,如平菇病毒1(*Pleurotus ostreatus* virus 1, PoV1)^[7]、平菇等轴病毒(*Oyster mushroom isometric virus*, OMIV)^[8],也有单链RNA病毒,如平菇球形病毒(*Oyster mushroom spherical virus*, OMSV)^[6],其中, PoV1是一种潜隐病毒,对寄主的菌丝生长和子实体发育不造成影响^[7]。平菇球形病毒首次在韩国被发现和分离,能够导致平菇的顶死病(Die-back),症状复杂,传播迅速,可造成大面积减产。平菇球形病毒颗粒直径为27 nm,基因组为正单链RNA,长度为5 784 nt,共编码7个开放阅读框(open reading frame, ORF)。ORF1编码复制酶,ORF2编码外壳蛋白(coat protein, CP),外壳蛋白分子量约为28.5 kDa,其他的阅读框所推测的氨基酸序列与已知病毒序列没有明显的同源性^[6]。在中国也有关于平菇球形病毒的报道^[14-16]。

在吉林农业大学菌菜基地菇房中发现菌种平菇615有部分子实体出现畸形,如菌盖变小,菌柄中生,喇叭花形状等症状,是典型的平菇病毒病症状。用OMSV和OMIV病毒的特异性引物检测,发现存在OMSV病毒侵染,而没有OMIV病毒的侵染。进一步克隆了OMSV病毒完整的CP基因,并通过原生质体脱毒的方法获得了脱毒菌株,结果表明脱毒菌株在菌丝生长速度、生物量以及菇形等方面均优于带毒菌株,说明OMSV能够抑制平菇菌丝的生长以及子实体的发育。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

供试平菇子实体采自吉林农业大学菌菜基地菇房,品种为平菇615。

1.2 试剂

植物总RNA提取试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、质粒提取试剂盒、氨苄青霉素、Taq DNA聚合酶购自天根生化科技有限公司;反转录试剂盒(GoScript™ Reverse Transcription System)购于Promega公司;载体pMD19-T Vector购于TaKaRa公司;FastPfu DNA聚合酶、感受态细胞5α、DL2000 Marker均购于北京全式金生物技术有限公司;溶壁酶(Lywallzyme)购自广东省微生物所;甘露醇、琼脂糖等购自北京鼎国昌盛生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 平菇样品总RNA的提取

采用植物总RNA提取试剂盒,按照说明书进行总RNA的提取,然后通过琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计(Quawell Q5000)进行总RNA的浓度和质量检测。

1.3.2 RT-PCR检测与CP全长基因克隆测序

按照反转录试剂盒说明书,将平菇的总RNA在RNase-Free的离心管进行反转录合成cDNA,用18S rRNA(18SF: 5'-TTAGTTGGTGGAGTGATTG-3', 18SR: 5'-GCTGGCTCTGTCACTGTAG-3')检测作为对照。根据已发表的OMIV的核苷酸序列(Genbank ID: AY308801),设计了特异性扩增OMIV复制酶基因的引物(OMIVF: 5'-ATGCTGAACATTCAAATTCTCGGCTCC-3', OMIVR: 5'-TCAATGTTTCATGAGCAGGAGAACCGTC-3'),并且利用已发表的OMSV特异检测引物(OMSV4910F: 5'-TACCCCCCAGGATCTCAAGCTTCT-3', OMSV5556R: 5'-TGAAAGCGCGTCCATCAGAACCATTTC-3')^[14]分别PCR扩增OMIV复制酶基因与OMSV病毒外壳蛋白基因的部分片段。根据已发表的OMSV韩国分离物的基因组全长序列(Genbank ID: NC_004560.1)设计了一对特异扩增OMSV全长CP基因的引物(OMSV4271F: 5'-ACTTCACCCTCAAGTACGTGTTTCC-3', OMSV5685R: 5'-TCAAAATGAAAGAAAGGGAAAAACATTT-3'),使用高保真酶Fast-Pfu PCR扩增,目的片段大小约1.5 kb,使用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒对目的条带进行切胶回收,回收产物连接到pMD 19-T载体上。阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.3.3 原生质体再生脱毒

参照文献[17]的方法稍做修改,具体如下:将平板中的菌丝接种到液体培养基中振荡培养7 d,收集菌丝球。在无菌条件下,用灭菌的蒸馏水和0.6 mol/L的甘露醇溶液分别冲洗菌丝球2次。取0.2 g菌丝球,悬浮于0.6 mL 2%的溶壁酶溶液(用0.6 mol/L的甘露醇溶液配制,过滤除菌),30 ℃水浴中静置酶解5 h。然后用灭菌的脱脂棉过滤,将滤液3 000 r/min离心5 min,弃上清液,得到纯化的原生质体。用甘露醇溶液将纯化的原生质体稀释到 $10^4 \sim 10^5$ 个/mL。取0.2 mL原生质体悬浮液,均匀涂布于原生质体再生培养基中,在25 ℃下培养观察再生情况。将前3 d长出的菌落剔除,挑取7 d之后的星芒状菌落,转移到新的PDA平板中。

1.3.4 菌丝生长速度的测定

将出发菌株、脱毒菌株和健康菌株分别接种到PDA平板中活化,等到菌丝长满1/2平板时,用灭菌打孔器打取菌落边缘,将菌饼转移至新的PDA培养基中25℃培养。采用十字交叉法测量菌落直径,从接种后第2天开始测量,每24 h测量一次,用于测定生长速度。

1.3.5 摇瓶菌丝生物量的测定

将用灭菌的打孔器打取长满平板的出发菌株、脱毒菌株和健康菌株的菌丝体,分别接入装有100 mL液体培养基的250 mL锥形瓶中,每个处理3次重复,放入25℃,130 r/min摇床中培养8~9 d,当大量菌丝球出现、液体培养基变澄清后停止培养。将菌液3 000 r/min离心10 min,去除上清,放在培养皿中,60℃烘至恒重后称量。

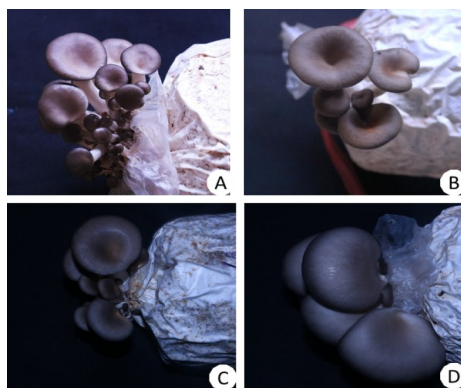
1.3.6 栽培试验

按照木屑78%,麦麸20%,石灰1%,石膏1%,含水量60%的配方称取各种栽培料。首先将木屑按照比例称量并加水润湿,放置1 d后按配方依次加入麦麸、石灰和石膏,搅拌均匀后装入17 cm×33 cm规格的聚丙烯菌袋中。菌袋高度约为14.5 cm,重量约为0.6 kg,并将塑料打孔棒插入菌袋中心打孔,121℃高温灭菌2 h。待菌袋冷却后接种,每袋接种10个直径为5 mm的菌块,每种菌株接种10个菌袋。接种后移入菇房,在温度25℃、湿度65%的条件下进行发菌培养。等到菌丝长满菌袋之后开袋,进行常规出菇管理。

2 结果与分析

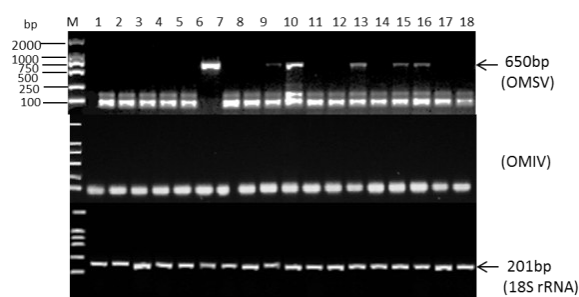
2.1 平菇病毒的检测

在吉林农业大学菌菜基地中发现一部分栽培的平菇菌盖呈现喇叭花形状,菌柄中生,菌盖较小(图1, A~C),而健康的平菇菌盖较大,菌柄侧生(图1, D)。采集了16株畸形平菇以及2株健康平菇的样品,分别提取总RNA,然后反转录,用OMIV的特异性检测引物(OMIVF和OMIVR)与OMSV的特异性检测引物(OMSV4910F和OMSV5556R)分别进行RT-PCR检测。在所有菌株中均未检测到OMIV的目的片段,而在6株畸形平菇样品中扩增到约650 bp的OMSV病毒片段条带,其中6号样品(Po6)条带最亮(图2)。经过对Po6样品扩增条带进一步克隆测序,发现与平菇球形病毒韩国分离物(NC_004560.1)的CP基因核苷酸序列相似度为98.15%,说明菌菜基地的部分平菇菌株受到了OMSV的侵染。



注: A~C为畸形平菇; D为健康平菇

图1 平菇疑似病毒病症状

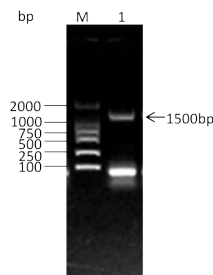


注: M为DNA marker(DL2000); 1~16为采集的各个畸形平菇样品; 17~18为健康平菇样品

图2 RT-PCR检测平菇样品中的平菇球形病毒和平菇等轴病毒

2.2 平菇球形病毒CP基因全长序列的测定

由于上述扩增的650 bp条带不是OMSV完整的基因片段,因此,根据已报道的OMSV韩国分离物的全长序列(Genbank ID: NC_004560.1)设计了能够扩增完整CP基因的引物(OMSV4271F: 5'-ACTTCACCCCTCAAGTACGTGTTTCC-3', OMSV5685R: 5'-TCAAAATGAAAGAAAGGGAAAAACATTT-3'),对上述表现为畸形的平菇样品Po6进行RT-PCR扩增,得到了一条约1 500 bp大小的目的片段(图3)。对其进行克隆测序,在NCBI网站进行BLAST比对,发现与已经发表的OMSV CP基因的核苷酸序列相似性为98.18%,氨基酸序列相似度为97.89%。这是首次获得平菇球形病毒中国分



注: M为DNA marker(DL2000); 1为平菇样品Po6

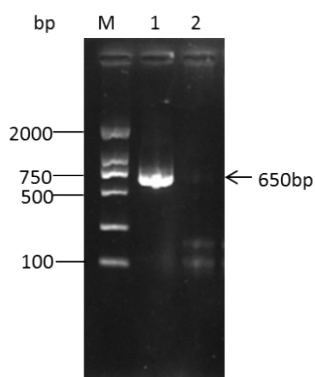
图3 平菇球形病毒外壳蛋白全长基因克隆

离物的完整 CP 序列,将其提交到 Genbank 中,序列登录号为 MK628733。

2.3 平菇球形病毒对平菇致病性的初步研究

2.3.1 原生质体脱毒

有研究表明,在平菇中通过原生质体脱毒的方法能够将病毒部分或全部脱去^[18]。将样品 Po6 的菌丝尖端细胞制备成原生质体,通过原生质体再生技术获得脱毒菌株。提取再生菌株的总 RNA,用 OMSV4910F 和 OMSV5556R 引物进行 RT-PCR 检测,发现其中一株原生质体再生菌株经多次检测都未能检测到平菇球形病毒 CP 基因条带,而带毒菌株 Po6 均能够扩增出较亮的目的条带(图 4),证明通过原生质体再生的方法能够成功地将平菇球形病毒脱除。

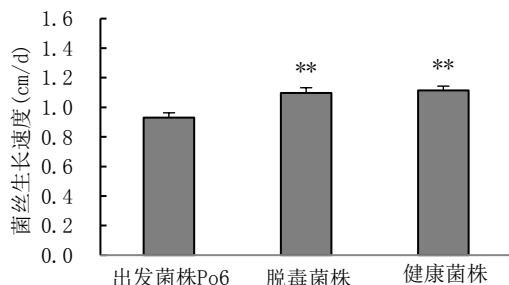


注:M为DNA marker(DL2000);1为出发菌株Po6;2为脱毒菌株

图4 OMSV脱毒菌株的RT-PCR检测

2.3.2 生长速度的测定

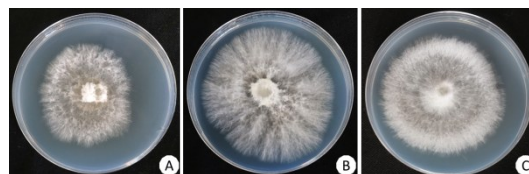
分别将出发菌株 Po6、脱毒菌株、健康菌株对照接种于 PDA 平板上,观察菌落形态特征并对其生长速度进行测定。结果表明,与含 OMSV 病毒菌株 Po6 相比,脱毒菌株的菌丝生长速度显著提高($P<0.01$),脱毒菌株的生长速度和健康菌株相似(图 5),这说明脱除 OMSV 病毒后,菌株恢复了原来的生长速度。通过观察平板中菌落的形态发现,含 OMSV 病毒的菌株 Po6 菌落边缘不整齐,菌落明显小于健康菌株,而脱毒菌株的菌落边缘更加整齐,并且菌落大小也



注:“**”表示在0.01水平差异显著,下同

图5 平菇 Po6 菌株脱毒前后菌丝生长速度比较

更接近于健康菌株(图 6)。这初步说明 OMSV 对平菇菌丝的生长具有抑制作用。



注:A为出发菌株Po6;B为脱毒菌株;C为健康菌株,下同

图6 平菇 Po6 菌株脱毒前后菌落形态观察

2.3.3 摇瓶菌丝生物量的测定

在装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中分别接种同样菌丝量的出发菌株 Po6、脱毒菌株以及健康菌株,在摇床上培养 9 d 之后计算菌丝生物量即菌丝干重。结果显示,脱毒菌株和健康菌株菌丝生物量显著高于出发菌株 Po6 ($P<0.01$),这也说明平菇球形病毒对平菇菌丝的生长具有抑制作用(图 7)。

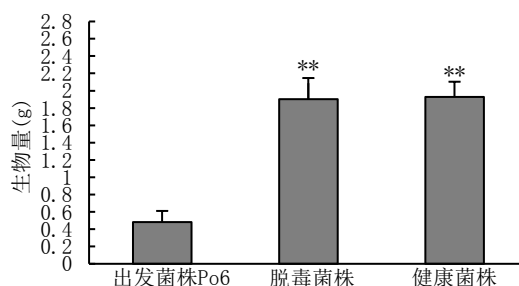


图7 平菇 Po6 菌株脱毒前后的菌丝生物量比较

2.3.4 栽培试验

为了进一步证明平菇球形病毒对平菇子实体发育的影响,对出发菌株 Po6、脱毒菌株、健康菌株分别进行出菇试验。结果表明,含有 OMSV 病毒的菌株 Po6 大多会出现菌盖呈现喇叭花形状,菌盖变小,菌柄中生的现象,而脱毒菌株呈现和健康菌株相似的表型,即菌盖平坦呈扇形,菌柄侧生(图 8)。这暗示了 OMSV 能够抑制平菇子实体的发育,对平菇具有致病性。



图8 平菇 Po6 菌株脱毒前后子实体的差异

3 讨论

本试验针对吉林农业大学菌菜基地的疑似病毒病感染的平菇样品,分别采用 OMSV 和 OMIV 病毒的特异性引物进行分子检测,从 16 份样品中检测到 6 份 OMSV 病毒阳性,感染率为 37.5%,而未

检测到 OMIV。对其中 Po6 样品中 OMSV 的 CP 基因进行了全长克隆,序列比对发现与报道的 OMSV 韩国分离物(Genbank ID: NC_004560.1)的核苷酸序列相似性为 98.18%,氨基酸序列相似性为 97.89%。进一步对 Po6 菌株进行原生质体脱毒,结果表明,脱除 OMSV 病毒后菌丝生长速度显著提高,菌落边缘更加整齐,摇瓶菌丝生物量增加,并且栽培试验中菇形更加接近于健康平菇,产量有所增加。这初步表明 OMSV 对平菇菌丝生长以及子实体的发育均具有抑制作用。

目前报道的 OMSV 经常和 OMIV 复合侵染平菇,造成平菇的畸形症状^[8]。因此选用这两种病毒的特异性引物对畸形平菇样品进行 RT-PCR 检测。结果显示采集的所有样品中不存在 OMIV 侵染,6 株平菇样品存在 OMSV 侵染。这些样品的子实体普遍呈现喇叭花形状,菌柄中生,这之前报道的北京郊区发生的平菇病毒病的症状相似,并且北京郊区平菇的 OMSV 发生率为 32.8%^[15],这也与本试验中 37.5% 感染率的结果相当。对这 16 株畸形平菇样品进行宏转录组测序,测序拼接结果显示存在 OMSV 的 contig 序列,而没有 OMIV 的 contig 序列(未发表数据),这也进一步验证了这一试验结果。平菇的畸形症状除了病毒感染以外,也有可能是环境因素如温度和 CO₂ 浓度造成的^[19]。本试验在 16 份样品中检测到 6 份 OMSV 病毒阳性,另外的畸形样品很可能是环境因素或者除 OMSV 和 OMIV 之外的其他病毒感染造成的。

选取感染 OMSV 的菌株 Po6 进行原生质体脱毒,脱毒后菌丝生长速度、生物量均能恢复到健康菌株水平,并且在出菇栽培试验中显示平菇的子实体形态与健康菌株相似,即菌柄侧生,菌盖扇形扩展。这说明 OMSV 病毒能够抑制菌丝生长和子实体发育。当然,最有说服力的证据是回接试验,即提取 OMSV 病毒粒子,感染平菇菌丝或原生质体,验证能否造成平菇的畸形症状。但是由于平菇遗传转化系统欠完善,目前还没有用病毒粒子对平菇侵染成功的报道。将针对这一问题进行下一步尝试,最终探明平菇球形病毒的致病性。

参考文献:

- [1] Revill P A, Davidson A D, Wright P J. Identification of a subgenomic mRNA encoding the capsid protein of *Mushroom bacilliform virus*, a single-stranded RNA mycovirus[J]. Virology, 1999, 260(2): 273-276.
- [2] Goodin M M, Schlagnhauser B, Romaine C P. Encapsidation of the La France disease-specific double-stranded RNAs in 36nm-isometric virus like particles[J]. Phytopathology, 1992, 82(3): 285-290.
- [3] Grogan H M, Adie B T, Gaze R H, et al. Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus* [J]. Mycological Research, 2003, 107(2): 147-154.
- [4] Magae Y. Molecular characterization of a novel mycovirus in the cultivated mushroom, *Lentinula edodes*[J]. Virology Journal, 2012, 9: 60.
- [5] Guo M, Bian Y, Wang J, et al. Biological and molecular characteristics of a novel partitivirus infecting the edible fungus *Lentinula edodes*[J]. Plant Disease, 2017, 101(5): 726-733.
- [6] Yu H J, Lim D, Lee H S. Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*[J]. Virology, 2003, 314(1): 9-15.
- [7] Lim W S, Jeong J H, Jeong R D, et al. Complete nucleotide sequence and genome organization of a dsRNA partitivirus infecting *Pleurotus ostreatus*[J]. Virus Research, 2005, 108(1): 111-119.
- [8] Ro H S, Lee N J, Lee C W, et al. Isolation of a novel mycovirus OMIV in *Pleurotus ostreatus* and its detection using a triple antibody sandwich-ELISA[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 138: 24-29.
- [9] Magae Y, Hayashi N. Double-stranded RNA and virus-like particles in the edible basidiomycete *Flammulina velutipes*(Enokitake)[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 180(2): 331-335.
- [10] Magae Y, Sunagawa M. Characterization of a mycovirus associated with the brown discoloration of edible mushroom, *Flammulina velutipes*[J]. Virology Journal, 2010, 7: 342.
- [11] Ro H S, Kang E J, Yu J S, et al. Isolation and characterization of a novel mycovirus, PeSV, in *Pleurotus eryngii* and the development of a diagnostic system for it[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(1): 129-135.
- [12] 李 玉,李泰辉,杨祝良,等.中国大型菌物资源图鉴[M]. 郑州:中原农民出版社,2015:989-990.
- [13] 徐章逸,边银丙.食用菌病毒病害研究进展[J]. 食用菌学报,2008,15(3):80-84.
- [14] 王少杰,王 甘,师迎春,等.应用深度测序技术鉴定平菇球形病毒[J].生物技术通报,2014(12):86-91.
- [15] 师迎春,谢爱婷,王秀玲,等.北京地区平菇球形病毒病检测及防控[J]. 中国植保导刊,2016,36(5):9-12.
- [16] Qiu L Y, Li Y P, Liu Y M, et al. Particle and naked RNA mycoviruses in industrially cultivated mushroom *Pleurotus ostreatus* in China[J]. Fungal Biology, 2010, 114: 507-513.
- [17] Go S J, Shin G C, Yoo Y B. Protoplast formation, regeneration and reversion in *Pleurotus ostreatus* and *P. sajor-caju*[J]. The Korean Journal of Mycology, 1985, 13(3): 169-177.
- [18] 关园园,周素静,王 震,等.原生质体再生对糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* 病毒脱除的效果[J]. 菌物学报,2011,30(1): 108-115.
- [19] Bellettini M B, Bellettini S, Fiorda F A, et al. Diseases and pests noxious to *Pleurotus spp.* mushroom crops[J]. Revista Argentina de Microbiología, 2018,50(2): 216-226.

(责任编辑:刘洪霞)