

# 基于高通量测序检测甜菜生尾孢中真菌病毒多样性

李盈曦<sup>1</sup> 周梦轲<sup>1</sup> 杨一舟<sup>2</sup> 鲍方维<sup>1</sup> 韩成贵<sup>1</sup> 王颖<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学植物保护学院, 农业农村部病虫害监测与绿色管理重点实验室, 北京 100193;

2. 中国农业大学生物学院, 北京 100193)

**摘要:** 为明确甜菜生尾孢 *Cercospora beticola* 中真菌病毒的多样性, 2020 年自新疆维吾尔自治区、内蒙古自治区、黑龙江省和北京市采集感染褐斑病甜菜病叶, 鉴定获得 78 株甜菜生尾孢菌株, 运用高通量的宏转录组测序技术检测甜菜生尾孢所携带的真菌病毒种类; 将分离到的甜菜生尾孢按照菌落生长表型分为 4 组, 进行宏转录组测序, 将得到的序列经过拼接、聚类和基因功能注释, 筛选出真菌病毒相关同源序列。序列分析结果显示, 4 组样品共比对到 6 个真菌病毒科, 包括双分体病毒科 *Partitiviridae*、双核糖核酸病毒科 *Birnaviridae*、低毒病毒科 *Hypoviridae*、裸露 RNA 病毒科 *Narnaviridae*、泛欧尔密病毒科 *Botourmiaviridae* 和转座病毒科 *Metaviridae*, 以及未分科的负义单链 RNA 病毒。研究结果丰富了甜菜生尾孢真菌病毒资源库。

**关键词:** 甜菜生尾孢; 高通量测序; 真菌病毒; 低毒病毒; 双分体病毒

## The discovery of mycoviruses associated with the plant pathogenic fungus *Cercospora beticola* with high-throughput sequencing

Li Yingxi<sup>1</sup> Zhou Mengke<sup>1</sup> Yang Yizhou<sup>2</sup> Bao Fangwei<sup>1</sup> Han Chenggui<sup>1</sup> Wang Ying<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Pest Monitoring and Green Management of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193; 2. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** To explore the diversity of mycoviruses associated with the plant pathogenic fungus *Cercospora beticola*, 78 single-spore isolates of *C. beticola* collected from several fields in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Inner Mongolia Autonomous Region, Heilongjiang Province and Beijing City in 2020 were used for metatranscriptome sequencing analysis. Isolates were divided into four groups based on different colony phenotype and sequenced with high-throughput sequencing. Raw data were transcribed, clustered and functionally annotated. A total number of six virus families and a few unclassified (-)ssRNA viruses were identified according to the bioinformatics analysis. The identified fungi-associated viruses belong to *Partitiviridae*, *Birnaviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae*, *Botourmiaviridae* and *Metaviridae*. This study enriched the mycoviruses resource of *C. beticola*.

**Key words:** *Cercospora beticola*; high-throughput sequencing; mycovirus; *Hypovirus*; *Partitivirus*

甜菜是重要的制糖原料之一, 每年提供着世界约 20% 的总糖需求(Rangel et al., 2020)。褐斑病为甜菜叶部的第一大病害, 在世界各甜菜主产区均有发生, 病原菌为甜菜生尾孢 *Cercospora beticola*, 其属于球腔菌科尾孢菌属 *Cercospora* (Holtschulte,

2000)。甜菜褐斑病发病初期会在甜菜叶片上形成棕褐色至灰色带有暗紫色晕圈的圆斑, 随着病情不断扩展, 病斑连片, 严重时造成叶片的干枯脱落。一般年份该病可造成甜菜块根减产 10%~20%, 含糖率降低 1~2 度; 严重时块根减产 30%~40%, 含糖率降

基金项目: 国家级大学生创新训练项目(202010019010), 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-170304)

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: yingwang@cau.edu.cn

收稿日期: 2021-04-14

低2~3度(张杰等,2001)。目前,针对甜菜褐斑病的防治主要集中在以杀菌剂为主的化学防治,而杀菌剂的过量使用往往会导致甜菜产量及含糖率的下降以及抗药性的产生等问题(李春杰等,2013)。因此,寻找一种绿色环保可持续的生物防治方法成为人们关注的热点。

真菌病毒是一类能够侵染丝状真菌、酵母和卵菌并在其体内进行大量复制的病毒,其中一部分真菌病毒在降低寄主真菌致病力方面表现卓越,被认为是一种潜在的生防资源。与其他生物防治方法相比,真菌病毒具有速效且精准、持效期长、作用范围广、不会对寄主植物造成危害和诱导寄主植物产生免疫反应等优点(Xie & Jiang, 2014),应用真菌病毒防治植物病害已成为国内外真菌病害生物防治的热点领域。如Grente & Berthelay-Sauret(1978)将携带栗疫病菌低毒病毒1(*Cryphonectria hypovirus 1*, CHV1)的弱毒力菌株人工接种到栗树溃疡病斑上,有效控制了欧洲栗疫病的流行肆虐;华中农业大学姜道宏教授课题组从油菜菌核病的病原菌核盘菌*Sclerotinia sclerotiorum*中首次发现的DNA病毒(*Sclerotinia sclerotiorum* hypovirulence-associated DNA virus 1, SsHADV-1),认为该病毒可以通过机械摩擦和介体昆虫厉眼蕈蚊*Lycoriella ingenua*等胞外途径在田间进行传播(Liu et al., 2016),进一步研究发现SsHADV-1感染的核盘菌可以转变为与油菜互利共生的内生真菌,具有促进油菜生长和增强油菜抗病性的优点(Zhang et al., 2020)。因此,发现并鉴定更多具有较强侵染能力且能够诱导寄主产生低毒特性的真菌病毒是利用其进行生物防治最行之有效的方法之一。

自Hollings(1962)首次在双孢蘑菇*Agaricus bisporus*中发现真菌病毒以来,已有19科29属(<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>)的真菌病毒被发现报道。近年来大量真菌病毒的发现与高通量测序技术密不可分,与传统的病毒鉴定方法相比,基于高通量的宏转录组测序技术可在序列未知的情况下直接快速、准确地鉴定环境样本中的病毒种类及序列信息,打破了传统病毒鉴定的局限性(Mokili et al., 2012),最大限度地富集病毒的核酸信息,对于病毒的研究更有目的性和针对性。如Mu et al.(2018)对84株来自澳大利亚的核盘菌分离株进行宏转录组测序分析时发现了57种真菌病毒,其中包括36种新病毒。截至目前,已对栗疫病菌*Cryphonectria*

*parasitica*(Lin et al., 2007)、核盘菌(Xie et al., 2006)、白纹羽菌*Rosellinia necatrix*(Ikeda et al., 2013)、灰葡萄孢*Botrytis cinerea*(Howitt et al., 2001)和禾谷镰刀菌*Fusarium graminearum*(Wang et al., 2013)等重要植物病原真菌,球孢白僵菌*Beauveria bassiana*等昆虫病原真菌(Kotta-Loizou et al., 2015)以及烟曲霉*Aspergillus fumigatus*等动物病原真菌(Kanhayuwa et al., 2015)中的真菌病毒进行了研究,而有关甜菜生尾孢中的真菌病毒报道较少。

本研究采用高通量的宏转录组测序技术对采自新疆维吾尔自治区(简称新疆)、内蒙古自治区(简称内蒙古)、黑龙江省和北京市的甜菜生尾孢所携带的病毒资源进行分类鉴定,以期为利用甜菜生尾孢中潜在的病毒资源防治甜菜褐斑病提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试样品:于2020年自内蒙古乌兰察布市、赤峰市、呼和浩特市、兴安盟,黑龙江省齐齐哈尔市依安县、哈尔滨市,新疆伊犁哈萨克自治州霍城县以及北京市海淀区上庄镇的甜菜种植地采集的感染褐斑病甜菜病叶,共分离获得78株菌株,置于液体石蜡中室温保存备用。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉15 g,蒸馏水定容至1 L。

试剂及仪器:琼脂,英国Oxoid公司;DL2000 DNA Marker、SapphireAmp® Fast PCR Master Mix,日本TaKaRa公司,其他化学试剂均为国产分析纯。Eppendorf 5404台式冷冻离心机,德国Eppendorf公司;JY600C电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;MM 400混合型球磨仪,德国Retsch公司;Nano-Drop 2000超微量分光光度计,美国Thermo公司;NovaSeq 6000测序仪,美国Illumina公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 甜菜褐斑病病原菌的鉴定

甜菜生尾孢为单孢分离菌株,将实验室之前分离得到的78株菌株采用CTAB法提取DNA(刘少华等,2005)。用特异性引物Cebe2-F(5'-CGCTTG-GAGTGTCTGGTT-3')和Cebe2-R(5'-GGGAGT-GATAGGCGAAA-3')进行PCR扩增(林杰等,2011)。25 μL PCR反应体系:SapphireAmp® Fast PCR Master Mix酶12.5 μL,Cebe2-F/Cebe2-R各1 μL、甜菜生尾孢

DNA模板1 μL, ddH<sub>2</sub>O补足至25 μL。PCR反应程序:95 °C预变性3 min;95 °C变性30 s,52 °C退火30 s,72 °C延伸1 min/kb,30个循环;72 °C再延伸3 min。反应结束后,采用1%琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳,上样量5 μL,130 V稳压电泳30 min,使用凝胶成像系统拍照。选取500 bp左右大小的条带送至北京擎科生物科技有限公司测序,测序结果经NCBI (<http://www.NCBI.com>)数据库比对进行鉴定。

### 1.2.2 甜菜生尾孢总RNA的提取与宏转录组测序

采用热酚法提取甜菜生尾孢的总RNA(姜宁,2019)。在PDA培养基上接种采集到的78株菌株,室温培养14 d后,根据菌落形态进行分类并编号。每株菌株取0.1 g菌丝,加液氮速冻研磨成粉,加入350 μL、预热的80 °C水饱和酚与等体积的RNA提取缓冲液振荡混匀,再加入350 μL氯仿,振荡混匀后12 000 r/min离心15 min。取上清液约350 μL,加入等体积的4 mol/L LiCl溶液混匀,-20 °C放置4 h,4 °C、12 000 r/min离心15 min。弃上清液,沉淀用70%乙醇洗涤2次,室温晾干,加入20 μL RNase-free水溶解,使用Nanodrop 2000超微量分光光度计检测浓度与纯度后置于-20 °C保存备用。

将78株菌株的总RNA各取1 μg,按不同类型进行混合,4种类型菌株混合后的总RNA送至北京百迈客生物科技有限公司建库测序。建库测序流程为:用带有Oligo(dT)的磁珠富集真核生物mRNA;加入Fragmentation Buffer将mRNA进行随机打断;以mRNA为模板,用六碱基随机引物合成第一条cDNA链,然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H和DNA polymerase I合成第二条cDNA链,利用AM-Pure XP beads纯化cDNA;纯化的双链cDNA再进行末端修复、加A尾并连接测序接头,然后用AM-Pure XP beads进行片段大小选择;最后通过PCR富集得到cDNA文库。库检合格后,用NovaSeq 6000进行高通量测序,测序读长为PE150。

### 1.2.3 甜菜生尾孢的宏转录组测序数据分析

参考Wu et al.(2010;2015)方法对甜菜生尾孢菌株进行高通量测序数据分析,并适当改良。将得到的原始数据利用hisat2 2.2.1软件比对到甜菜生尾孢基因组,参数设置为默认,并通过hisat2的--un-conc-gz参数将未比对到甜菜生尾孢基因组上的reads以fasta.gz的格式输出。利用megahit 1.2.9软件对未比对到甜菜生尾孢基因组上的reads进行序列组装,以期获得更加完整的病毒序列contigs。分

别使用cap3(Version Date: 02/10/15)和cd-hit-est 4.8.1对组装中的错误进行矫正(Huang & Madan, 1999),对序列存在重叠的contigs进行连接和以95%相似度对中高度相似的contigs进行聚类(Li & Godzik, 2006)。组装获得的contigs利用BLASTn和BLASTx工具分别与NCBI非冗余的核酸数据库及蛋白数据库进行比对。完成后对结果进行过滤,筛选出具有真菌病毒信息注释的contigs作为最后拼接得到的病毒基因组序列。

### 1.2.4 真菌病毒分类标准

依据国际病毒分类委员会(The International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)的真菌病毒分类标准对1.2.3拼接得到的病毒contigs进行分类,相关的6个病毒科下属的分类标准如下:双核糖核酸病毒科 *Birnaviridae* 下不同属的划分依据为RNA依赖RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)和外壳蛋白(coat protein, CP)的氨基酸序列相似性在30%~60%之间(Delmas et al., 2019);双分体病毒科 *Partitiviridae* 下不同属的划分依据为氨基酸序列相似性小于24%(Vainio et al., 2018);泛欧尔密病毒科 *Botourmiaviridae* 下不同属的划分依据为RdRp氨基酸序列相似性小于等于30%(Ayllón et al., 2020);转座病毒科 *Metaviridae* 下不同属的划分依据为病毒序列中是否包含env基因(Llorens et al., 2020);裸露RNA病毒科 *Narnaviridae* 下不同属主要依据侵染部位进行划分,裸露病毒属 *Narnavirus* 主要存在于细胞质中,线粒体病毒属 *Mitovirus* 的成员则局限于线粒体中(Hillman & Cai, 2013);低毒病毒科 *Hypoviridae* 下只有1个属。

## 2 结果与分析

### 2.1 甜菜生尾孢鉴定与宏转录组测序

78株菌株经NCBI序列比对确认为甜菜生尾孢,根据菌落形态进行分类,共分为4种类型,编号1~4号,其中1号类型菌株的菌落边缘规则,为普通型;2号类型菌株的菌落边缘部分突出呈扇形,为扇形突出型;3号类型菌株的菌落边缘不规则弯曲,为不规则型;4号类型菌株的菌落呈红色或黄色,为色素沉着型。将1~4号样品进行宏转录组测序后,分别得到46 891 706、45 509 718、45 602 628和46 647 448条原始序列,序列经组装后分别获得64 915、56 340、43 706和74 156条contigs(表1),每类样品contigs的碱基总长分别是65 835 097、51 257 176、

38 888 552 和 66 050 412 bp, N50 值分别是 1 754、1 496、1 408 和 1 586 bp, 最长 contig 分别为 16 216、10 989、13 136 和 12 339 bp, 各自 GC 含量范围在 52.44%~

52.84% 之间(表 1), 其中 N50 值越高表示拼接效果越好。

表 1 甜菜生尾孢总 RNA 的高通量测序数据统计与分析

Table 1 Summary and analysis of *Cercospora beticola* RNA high-throughput sequencing data

样品名 Sample	原始数据 Raw data	Contigs 总数 Total number of contigs	总长 Total length/bp	N50/bp	最长 contig Largest contig/bp	GC 含量 GC content/%
1	46 891 706	64 915	65 835 097	1 754	16 216	52.79
2	45 509 718	56 340	51 257 176	1 496	10 989	52.44
3	45 602 628	43 706	38 888 552	1 408	13 136	52.84
4	46 647 448	74 156	66 050 412	1 586	17 339	52.69

## 2.2 甜菜生尾孢宏转录组测序数据分析

将拼接后得到的 contigs 与 NCBI 数据库中的病毒序列进行比对, 并依据 ICTV 真菌病毒的分类标准, 共比对到 6 个真菌病毒科及部分未分科的真菌病毒(表 2)。6 个病毒科分别是双分体病毒科、双核糖核酸病毒科、低毒病毒科、裸露 RNA 病毒科、泛欧尔密病毒科以及转座病毒科(表 2)。将检测到的病毒 contigs 进行分类(表 2), 结果显示, 4 种样品之间同源病毒信息并无明显差别。真菌病毒同源 contigs 中低毒病毒所占比例最高, 为 42.37%; 其次是负义单链 ssRNA ((-)ssRNA) 病毒, 占比 28.81%; 泛欧尔密病毒和双分体病毒均约占 8.47%; 转座病毒、裸露 RNA 病毒和双核糖核酸病毒所占比例较低, 分别是 6.78%、3.39% 和 1.69%。根据病毒核酸类型进行分类发现, 正义单链 RNA ((+)ssRNA) 病毒所占序列比例最高, 为 54.24%; 其次是 (-)ssRNA 病毒, 为 28.81%; 双链 RNA (dsRNA) 病毒所占比例较少为 10.17%; 此外还检测到少量的反转录病毒。

拼接得到的序列中共有 59 条与真菌病毒同源的 contigs, 序列一致性为 25.57%~87.57%。其中, 17 条 contigs 比对到甘蔗镰孢菌低毒病毒 1 (*Fusarium sacchari* hypovirus 1, FsHV1)、链格孢低毒病毒 1 (*Alternaria alternata* hypovirus 1, AaHV1) 和 灰葡萄孢低毒病毒 2 (*Botrytis cinerea* hypovirus 2, BcHV2) 的聚合蛋白; 8 条 contigs 比对到菜豆壳球孢低毒病毒 1 (*Macrophomina phaseolina* hypovirus 1, MpHV1)、棘孢木霉低毒病毒 1 (*Trichoderma asperellum* hypovirus 1, TaHV1) 和 白粉菌相关低毒病毒 2 (*Erysiphe necator* associated hypovirus 2, EnaHV2) 的 RdRp; 5 条 contigs 比对到白粉菌相关类欧尔密病毒 10 (*Erysiphe necator* associated ourmia-like virus 10, EnaOLV10) 和 莴苣盘霜霉相关欧尔密病毒 1 (*Bremia lactucae* associated ourmia-like virus 1,

*BlaOLV1*) 的 RdRp; 2 条 contigs 比对到葡萄生轴霜霉相关裸露病毒 3 (*Plasmopara viticola* lesion associated narnavirus 3, PVaNarna3) 和 PVaNarna4 的 RdRp; 1 条 contig 比对到灰葡萄孢双核糖核酸病毒 2 (*Botrytis cinerea* binarnavirus 2, BcBNV2) 的 RdRp; 2 条 contigs 比对到指状青霉双分体病毒 1 (*Penicillium digitatum* partitivirus 1, PdPV1) 的 CP; 2 条 contigs 比对到灰黄青霉菌双分体病毒 1 (*Penicillium aurantiogriseum* partitivirus 1, PaPV1) 的 47 kD 蛋白; 1 条 contig 比对到稻黑孢菌双分体病毒 1 (*Nigrospora oryzae* partitivirus 1, NoPV1) 的 CP; 4 条 contigs 比对到黄褐孢霉 T-1 病毒 (*Cladosporium fulvum* T-1 virus) 的包膜蛋白同源物和核衣壳蛋白同源物; 7 条 contigs 比对到布尼亞病毒目 *Bunyavirales* 的非结构蛋白、核衣壳和 RdRp; 10 条 contigs 比对到未分科的 (-)ssRNA 病毒的 RdRp。

## 3 讨论

高通量测序技术能同时对数百万个 DNA 分子进行测序并一次性输出大量数据的特点使得其在新病毒鉴定、病毒遗传多样性研究以及病毒基因功能发掘等领域应用广泛, 对系统地研究样本所携带病毒的多样性和遗传进化具有重要意义 (Liu et al., 2011; 王兴春等, 2012; Nouri et al., 2018)。本研究利用宏转录组测序对甜菜生尾孢中潜在的真菌病毒种类进行鉴定, 得到的原始序列质控信息中 4 组样品的 GC 含量为 52.44%~52.84%, 与 NCBI 数据库显示甜菜生尾孢基因组 GC 含量(52%)接近, 可以被用于后续进一步分析。数据分析结果显示, 在我国新疆、内蒙古、黑龙江省和北京市等地区的甜菜生尾孢中共鉴定到 6 个与真菌病毒相关的病毒科以及部分未分科的 (-)ssRNA 病毒, 6 个病毒科包括双分体病毒科、双核糖核酸病毒科、低毒病毒科、裸露 RNA 病毒科、泛欧尔密病毒科和转座病毒科。

表2 甜菜生尾孢中经比对鉴定到的病毒  
Table 2 Viruses identified in *Cercospora beticola*

样品 Sam- ple	核酸 类型 Nucleic acid	科 Family	属 Genus	同源病毒 Matched virus	同源蛋白 Matched protein	Contig number	Contig number	相似性 Identifi- ty/%	E 值 E value	登录号 Accession number
1	dsRNA	双分体病毒科 <i>Partitiviridae</i>	-	指状青霉双分体病毒 1 Penicillium digitatum partitivirus 1	外壳蛋白 Coat protein	k141-59169	25.57	7×10 <sup>-11</sup>	AZT88595.1	
	(+)-ssRNA	低毒病毒科 <i>Hypoviridae</i>	低毒病毒属 <i>Hypovirus</i>	链格孢拟病毒 1 Alternaria alternata hypovirus 1	聚合蛋白 Polyprotein	contig2817	39.29	3×10 <sup>-17</sup>	QFR36339.1	
						k141-63002	54.88	2×10 <sup>-97</sup>	QFR36339.1	
						k141-41826	54.10	3×10 <sup>-9</sup>	QFR36339.1	
						k141-1313	54.95	4×10 <sup>-24</sup>	QFR36339.1	
					RNA 依赖 RNA 聚合酶 RNA-dependent RNA	contig2550	43.56	0	QHD64832.1	
					polymerase	k141-49228	70.59	5×10 <sup>-77</sup>	QHD64832.1	
						k141-16980	26.44	5×10 <sup>-12</sup>	ALD89099.1	
						k141-7467	26.18	4×10 <sup>-11</sup>	ALD89099.1	
					聚合蛋白 Polyprotein	contig2265	54.60	0	QIQ28422.1	
					RNA 依赖 RNA 聚合酶 RNA-dependent RNA	contig2381	41.33	6×10 <sup>-82</sup>	YP_009342443.1	
					polymerase	k141-57522	50.40	0	QIR30282.1	
					RNA 依赖 RNA 聚合酶 RNA-dependent RNA	k141-51878	68.07	3×10 <sup>-45</sup>	QIP68025.1	
					polymerase	k141-17237	73.13	3×10 <sup>-131</sup>	QGZ98430.1	
					核衣壳 Nucleocapsid 非结构蛋白	k141-12535	61.90	4×10 <sup>-48</sup>	AWN00473.1	
						k141-33118	68.33	3×10 <sup>-17</sup>	AWN00473.1	
						k141-54286	49.21	1×10 <sup>-35</sup>	AWN00472.1	
					Non-structural protein					
					RNA 依赖 RNA 聚合酶 RNA-dependent RNA	contig154	57.67	0	BCH36617.1	
					polymerase	k141-39090	81.45	0	QHD64777.1	
						k141-57732	87.57	2×10 <sup>-103</sup>	QHD64777.1	
					烟曲霉负链 RNA 病毒 1 Aspergillus fumigatus negative-stranded RNA virus 1					
					葡萄生轴霜霉相关单股负链 RNA 病毒 6 Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi					
					virus 6					
					葡萄生轴霜霉相关类布尼亚病毒 10 Plasmopara viticola lesion associated mycobunyavirales-like virus 10					

续表2 Continued

样品 Sam- ple	核酸 类型 Nucleic acid	科 Family	属 Genus	同源病毒 Matched virus	同源蛋白 Matched protein	Contig number	Contig number	相似性 Identifi- ty/%	E值 E value	登录号 Accession number	
ssRNA-RT 转座病毒科 <i>Metaviridae</i>	转座病毒属 <i>Metavirus</i>	转座病毒属 <i>Metavirus</i>	—	黄褐孢霉 T-1 病毒 Cladosporium fulvum T-1 virus 灰黄青霉菌双分体病毒 1 Penicillium aurantiogriseum partitivirus 1	核衣壳蛋白同源物 Gag homologue 47 kD 蛋白 47 kD protein	k141-38712	30.26	2×10 <sup>-35</sup>	YP_00966307.1		
2 dsRNA <i>Paritityviridae</i>	双分体病毒科 <i>Paritityviridae</i>	双核糖核酸病毒科 <i>Hypoviridae</i>	—	灰葡萄孢双核糖核酸病毒 2 Botrytis cinerea binarnavirus 2	RNA 依赖 RNA 聚合酶 RNA-dependent RNA polymerase	k141-44306	25.94	2×10 <sup>-13</sup>	YP_009182331.1		
(+)ssRNA 低毒病毒科 <i>Hypoviridae</i>	低毒病毒属 <i>Hypovirus</i>	低毒病毒属 <i>Hypovirus</i>	—	链格孢低毒病毒 1 Alternaria alternata hypovirus 1	聚合蛋白 Polyprotein	contig1397 k141-20910 k141-17325 k141-45450 contig1993	27.14 64.29 64.29 86.84 52.36	2×10 <sup>-7</sup> 2×10 <sup>-12</sup> 4×10 <sup>-12</sup> 6×10 <sup>-14</sup> 1×10 <sup>-85</sup>	QFR36339.1 QFR36339.1 QFR36339.1 QFR36339.1 QJT73706.1		
(-)ssRNA	—	—	—	Botrytis cinerea hypovirus 2 甘蔗镰孢菌低毒病毒 1 Fusarium sacchari hypovirus 1 白粉菌相关低毒病毒 2 Erysiphe necator associated hypovirus 2 菜豆壳孢低毒病毒 1 Macrohomina phaseolina hypovirus 1 棘孢木霉低毒病毒 1 Trichodermia asperellum hypovirus 1 葡萄生轴霜霉相关单股负链 RNA 病毒 5 Plasmopara viticola lesion associated mononugaambivirus 5	RNA 依赖 RNA 聚合酶 RNA-dependent RNA polymerase	contig3558 contig4473 contig3466 k141-6204 k141-55778 k141-29364 k141-39151	53.48 55.67 31.12 29.38 64.81 43.90 53.37	0 0 1×10 <sup>-16</sup> 2×10 <sup>-84</sup> 7×10 <sup>-16</sup> 1×10 <sup>-77</sup> 0	QIQ28422.1 QIQ28422.1 QHD64832.1 QHD64832.1 ALD89099.1 AZT88614.1 QHD64776.1		
ssRNA-RT 转座病毒科 <i>Metaviridae</i>	转座病毒属 <i>Metavirus</i>	—	—	葡萄生轴霜霉相关类布尼亞病毒 10 Plasmopara viticola lesion associated mycobunyavirales-like virus 10 葡萄生轴霜霉相关类布尼亞病毒 4 Plasmopara viticola lesion associated mycobunyavirales-like virus 4	RNA 依赖 RNA 聚合酶 RNA-dependent RNA polymerase	k141-15719 k141-26880 k141-13335 k141-23000	80.82 53.33 69.81 54.76	1×10 <sup>-70</sup> 3×10 <sup>-46</sup> 3×10 <sup>-46</sup> 2×10 <sup>-38</sup>	QJX19789.1 QJX19789.1 QJX19789.1 QGY72641.1		
				核衣壳 Nucleocapsid 核衣壳蛋白同源物 Gag homologue	—	k141-14865 k141-25120 k141-27828	67.63 61.59 30.26	2×10 <sup>-63</sup> 4×10 <sup>-44</sup> 2×10 <sup>-35</sup>	QNZ74050.1 QNZ74050.1 YP_00966307.1		

续表2 Continued

样品 Sam- ple	核酸 Nucleic acid	科 Family	属 Genus	同源病毒 Matched virus	同源蛋白 Matched protein	Contig number	名称 Contig number	相似性 Identifi- ty/%	E值 E value	登录号 Accession number
3	dsRNA	双分体病毒科 <i>Partitiviridae</i>	-	稻黑苞菌双分体病毒 1 <i>Nigrospora oryzae partitivirus 1</i>	外壳蛋白 Coat protein	k141-415	27.27	2×10 <sup>-13</sup>	YP_009182331.1	
	(+)ssRNA	低毒病毒科 <i>Hypoviridae</i>	低毒病毒属 <i>Hypovirus</i>	链格孢低毒病毒 1   Alternaria alternata hypovirus 1 甘蔗镰孢菌低毒病毒 1 <i>Fusarium sacchari hypovirus 1</i>	聚合蛋白 Polyprotein	k141-13671 contig1357	74.36 51.73	4×10 <sup>-10</sup> 0	QFR36339.1 QIQ28422.1	
		泛欧尔密病毒科 <i>Botovirinaviridae</i>	欧尔密病毒属 <i>Ourniavirus</i>	甘蓝盘霜霉相关低毒病毒 1 Bremia lactucae associated ourmia-like virus 1 白粉菌相关类欧尔密病毒 10 Erysiphe necator associated ourmia-like virus 10	RNA 依赖 RNA 聚合酶 RNA-dependent RNA polymerase	k141-31123 k141-18635	53.64 64.91	0 2×10 <sup>-40</sup>	QIQ28422.1 QIP68025.1	
	(-)ssRNA	-	-	葡萄生轴霜霉相关单股负链 RNA 病毒 5 Plasmopara viticola lesion associated mononegatambivirus 5 葡萄生轴霜霉相关单股负链 RNA 病毒 6 Plasmopara viticola lesion associated mononegatambivirus 6 葡萄生轴霜霉相关类布尼亚病毒 4 Plasmopara viticola lesion associated mycobunyavirales-like virus 4	RNA 依赖 RNA 聚合酶 RNA-dependent RNA polymerase	k141-36573	72.38	1×10 <sup>-151</sup>	QGZ98430.1	
4	dsRNA	双分体病毒科 <i>Partitiviridae</i>	-	灰黄青霉菌双分体病毒 1 Penicillium aurantiogriseum partitivirus 1 指状青霉菌双分体病毒 1 Penicillium digitatum partitivirus 1 甘蔗镰孢菌低毒病毒 1 <i>Fusarium sacchari hypovirus 1</i> 葡萄生轴霜霉相关裸露病毒 4 Plasmopara viticola lesion associated narravirus 4 欧尔密病毒属 <i>Nannavirus</i>	非结构蛋白 Non-structural protein	k141-12481	53.51	2×10 <sup>-37</sup>	QNQ74053.1	
	(+)ssRNA	低毒病毒科 <i>Hypoviridae</i>	低毒病毒属 <i>Hypovirus</i>	47 kD 蛋白 47 kD protein 外壳蛋白 Coat protein 聚合蛋白 Polyprotein	47 kD 蛋白 47 kD protein 外壳蛋白 Coat protein 聚合蛋白 Polyprotein	k141-68964 k141-44384 k141-35317	25.94 25.57 51.73	1×10 <sup>-13</sup> 4×10 <sup>-11</sup>	YP_009182331.1 AZT88595.1	
		裸露病毒科 <i>Nanaviridae</i>								QIQ28422.1
		泛欧尔密病毒科 <i>Botovirinaviridae</i>								QIR30283.1
	ssRNA-RT	转座病毒科 <i>Metaviridae</i>	转座病毒属 <i>Metavirus</i>	Erysiphe necator associated ourmia-like virus 10 黄褐孢霉 T-1 病毒 <i>Cladosporium fulvum T-1 virus</i>	Gag homologue 包膜蛋白同源物 Env homologue	k141-41134 k141-31340	28.78 64.29	3×10 <sup>-28</sup> 3×10 <sup>-22</sup>	YP_009666307.1 YP_009666309.1	

由于目前ICTV对于新报道的真菌病毒分类信息并不明确,因此本研究中部分测序所得contigs并未比对到具体的病毒科属。在所有contigs中与低毒病毒和双分体病毒具有较高同源性的序列所占比例较高,目前这2个科中与弱毒力相关的真菌病毒的研究也较详细(Grente & Berthelay-Sauret, 1978; Xie et al., 2011; Zheng et al., 2014)。低毒病毒科病毒寄主范围广泛,在多个重要植物病原真菌中均有发现,如栗疫病菌中的CHV1(Lin et al., 2007)和CHV2(Hillman et al., 1994)、核盘菌中的核盘菌低毒病毒1(Sclerotinia sclerotiorum hypovirus 1, SsHV1)(Xie & Jiang, 2014)和核盘菌低毒病毒2(Sclerotinia sclerotiorum hypovirus 2, SsHV2)(Hu et al., 2014)以及禾谷镰刀菌的禾谷镰刀菌低毒病毒1(Fusarium graminearum hypovirus 1, FgHV1)(Wang et al., 2013)和FgHV2(Li et al., 2015)等。低毒病毒科病毒既可以通过无性孢子进行垂直传播,又可以借助菌丝融合进行水平传播,是可以被用来防治真菌病害的潜在生防资源。例如在20世纪90年代欧洲栗疫病大流行时,利用CHV1进行生物防治成功挽救了大批的欧洲栗树林(Heiniger & Rigling, 1994)。然而同样利用CHV1对美洲栗疫病进行生物防治时,因美洲栗疫病菌的营养不亲和群体比欧洲复杂,导致最终收效甚微(Anagnostakis, 1982)。近年来,在镰刀菌中也发现了能够降低寄主致病力的低毒病毒科病毒,如Son et al.(2013)利用转录组学和蛋白组学发现将镰刀菌中的过氧化物酶体蛋白编码基因HEXI敲除后,菌株出现致病力下降、有性孢子产生量减少、病毒RNA累积量水平显著降低的现象,这表明寄主的HEXI基因与FgHV1的累积量相关。双分体病毒寄主范围非常广泛,除侵染真菌外,还能够侵染植物和原生动物(Vainio et al., 2018)。Xiao et al.(2014)从核盘菌WF-1菌株中鉴定到一种新的双分体病毒(Sclerotinia sclerotiorum partitivirus 1, SsPV1/WF-1),发现SsPV1不仅能侵染核盘菌导致该菌弱毒性,而且也可侵染灰葡萄孢引起该病原菌的致病力降低,这种交叉侵染现象在真菌病毒中尚属首例,为研究真菌病毒与寄主之间的互作提供了新思路和参考。

在本次测序结果中,还检测到许多与未分科的(-)ssRNA病毒具有较高同源性的contigs。此前,Kondo et al.(2013)利用已知的(-)ssRNA病毒序列对真菌的基因组和转录组文库进行了全面分析,首次证实了(-)ssRNA病毒能够感染真菌。随后又在

核盘菌、禾谷镰刀菌和灰葡萄孢中发现了这类病毒的存在(Gale et al., 2002; Liu et al., 2014; Hao et al., 2018),其中核盘菌单股负链RNA病毒1(Sclerotinia sclerotiorum negative-stranded RNA virus 1, SsNSRV-1)与Nyamiviridae和博尔纳病毒科Bornaviridae具有较近的亲缘关系,后被归类为一个新的科——单股负链RNA病毒科Mymonaviridae。被SsNSRV-1侵染的寄主真菌表现出低毒力的特性,如生长缓慢、产孢能力下降和致病力下降等(Liu et al., 2014)。因此,对这些能够诱发寄主产生低毒力现象的真菌病毒进行进一步分离纯化,对于甜菜褐斑病的生物防治具有重要意义。

本研究利用高通量测序对我国黑龙江省、内蒙古、新疆和北京市的甜菜褐斑病病原菌甜菜生尾孢所携带真菌病毒的多样性进行了初步分析,发现了多种感染甜菜生尾孢的真菌病毒,丰富了真菌病毒资源库,为研究真菌病毒与寄主之间的分子互作及病毒致病性打下基础,也为甜菜褐斑病的生物防治开辟了一条新途径。今后将进一步对甜菜生尾孢中具有低毒特性的真菌病毒进行分离鉴定,挖掘其在生防领域的应用潜力。

**致谢:**中国农业大学于嘉林、李大伟、王献兵和张永亮教授以及本课题组刘琪、冯振国、祁厚辰和董刚刚研究生对本研究提供了建议与帮助,特此感谢!

## 参 考 文 献 (References)

- Anagnostakis SL. 1982. Biological control of chestnut blight. *Science*, 215(4532): 466–471
- Ayllón MA, Turina M, Xie JT, Nerva L, Marzano SL, Donaire L, Jiang DH, ICTV Report Consortium. 2020. ICTV virus taxonomy profile: Botourmiaviridae. *Journal of General Virology*, 101(5): 454–455
- Delmas B, Attoui H, Ghosh S, Malik YS, Mundt E, Vakharia VN. 2019. ICTV virus taxonomy profile: Birnaviridae. *Journal of General Virology*, 100(1): 5–6
- Gale LR, Chen LF, Hernick CA, Takamura K, Kistler HC. 2002. Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in eastern China. *Phytopathology*, 92(12): 1315–1322
- Grente J, Berthelay-Sauret S. 1978. Biological control of chestnut blight in France.// MacDonald WF, Cech FC, Luchock J, Smith C. Proceedings of the American Chestnut Symposium. Morgantown, WV, USA: American Chestnut Proceedings, pp. 30–34
- Hao FM, Wu MD, Li GQ. 2018. Molecular characterization and geographic distribution of a mymonavirus in the population of *Botrytis cinerea*. *Viruses*, 10(8): 432
- Heiniger U, Rigling D. 1994. Biological control of chestnut blight in

- Europe. Annual Review of Phytopathology, 32: 581–599
- Hillman BI, Cai G. 2013. The family *Narnaviridae*: simplest of RNA viruses.//Ghabrial SA. Advances in virus research. San Diego: Academic Press, pp. 149–176
- Hillman BI, Halpern BT, Brown MP. 1994. A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. Virology, 201(2): 241–250
- Hollings M. 1962. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. Nature, 196(4858): 962–965
- Holtschulte B. 2000. *Cercospora beticola* worldwide distribution and incidence.//Asher MJC, Holtschulte B, Molard MR, Rosso F, Steinrücken G, Beckers R. *Cercospora beticola* Sacc. biology, agronomic influence and control measures in sugar beet. Brussels, Belgium: International Institute for Beet Research Publishing, pp. 5–16
- Howitt RLJ, Beever RE, Pearson MN, Forster RLS. 2001. Genome characterization of *Botrytis virus F*, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant ‘potex-like’ viruses. Journal of General Virology, 82(1): 67–78
- Hu ZJ, Wu SS, Cheng JS, Fu YP, Jiang DH, Xie JT. 2014. Molecular characterization of two positive-strand RNA viruses co-infecting a hypovirulent strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. Virology, 464–465: 450–459
- Huang XQ, Madan A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. Genome Research, 9(9): 868–877
- Ikeda K, Inoue K, Kida C, Uwamori T, Sasaki A, Kanematsu S, Park P. 2013. Potentiation of mycovirus transmission by zinc compounds via attenuation of heterogenic incompatibility in *Rosellinia necatrix*. Applied and Environmental Microbiology, 79(12): 3684–3691
- Jiang N. 2019. Development of beet necrotic yellow vein virus-based expression vectors and functional analysis of *NbGLY1L*. PhD thesis. Beijing: China Agricultural University (in Chinese) [姜宁. 2019. 甜菜坏死黄脉病毒表达载体的研制及NbGLY1L基因功能研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学]
- Kanhayuwa L, Kotta-Loizou I, Özkan S, Gunning AP, Coutts RHA. 2015. A novel mycovirus from *Aspergillus fumigatus* contains four unique dsRNAs as its genome and is infectious as dsRNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(29): 9100–9105
- Kondo H, Chiba S, Toyoda K, Suzuki N. 2013. Evidence for negative-strand RNA virus infection in fungi. Virology, 435(2): 201–209
- Kotta-Loizou I, Sipkova J, Coutts RHA. 2015. Identification and sequence determination of a novel double-stranded RNA mycovirus from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Archives of Virology, 160(3): 873–875
- Li CJ, Han CG, Zhu XM, Han BJ. 2013. Control effect of several fungicides on *Cercospora* leaf spot of sugarbeet. Sugar Crops of China, 35(3): 62–63, 65 (in Chinese) [李春杰, 韩成贵, 朱向明, 韩秉进. 2013. 5种杀菌剂对甜菜褐斑病的防治效果. 中国糖料, 35(3): 62–63, 65]
- Li PF, Zhang HL, Chen XG, Qiu DW, Guo LH. 2015. Molecular characterization of a novel hypovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. Virology, 481: 151–160
- Li WZ, Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics, 22(13): 1658–1659
- Lin HY, Lan XW, Liao H, Parsley TB, Nuss DL, Chen BS. 2007. Genome sequence, full-length infectious cDNA clone, and mapping of viral double-stranded RNA accumulation determinant of hypovirus CHV<sub>1</sub>-EP721. Journal of Virology, 81(4): 1813–1820
- Lin J, Liu M, Wu XH, Ren ZS, Han CG. 2011. Rapid detection of *Cercospora* leaf spot fungus in sugar beet using specific Cebe2 primers in China. Journal of Plant Protection, 38(2): 185–186 (in Chinese) [林杰, 刘梅, 吴学宏, 任志山, 韩成贵. 2011. 我国甜菜褐斑病菌的PCR快速检测. 植物保护学报, 38(2): 185–186]
- Liu LJ, Xie JT, Cheng JS, Fu YP, Li GQ, Yi XH, Jiang DH. 2014. Fungal negative-stranded RNA virus that is related to bornaviruses and nyaviruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(33): 12205–12210
- Liu S, Xie JT, Cheng JS, Li B, Chen T, Fu YP, Li GQ, Wang MQ, Jin HN, Wan H, et al. 2016. Fungal DNA virus infects a mycophagous insect and utilizes it as a transmission vector. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113(45): 12803–12808
- Liu SH, Lu JP, Zhu RL, Dai FM. 2005. A rapid and simple extraction method for plant pathogenic fungi. Acta Phytopathologica Sinica, 35(4): 362–365 (in Chinese) [刘少华, 陆金萍, 朱瑞良, 戴富明. 2005. 一种快速简便的植物病原真菌基因组DNA提取方法. 植物病理学报, 35(4): 362–365]
- Liu SJ, Vijayendran D, Bonning BC. 2011. Next generation sequencing technologies for insect virus discovery. Viruses, 3(10): 1849–1869
- Llorens C, Soriano B, Krupovic M, ICTV Report Consortium. 2020. ICTV virus taxonomy profile: *Metaviridae*. Journal of General Virology, 101(11): 1131–1132
- Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. 2012. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. Current Opinion in Virology, 2(1): 63–77
- Mu F, Xie JT, Cheng SF, You MP, Barbetti MJ, Jia JC, Wang QQ, Cheng JS, Fu YP, Chen T, et al. 2018. Virome characterization of a collection of *S. sclerotiorum* from Australia. Frontiers in Microbiology, 8: 2540
- Nouri S, Matsumura EE, Kuo YW, Falk BW. 2018. Insect-specific viruses: from discovery to potential translational applications. Current Opinion in Virology, 33: 33–41
- Rangel LI, Spanner RE, Ebert MK, Pethybridge SJ, Stukenbrock EH, de Jonge R, Secor GA, Bolton MD. 2020. *Cercospora beticola*: the intoxicating lifestyle of the leaf spot pathogen of sugar beet. Molecular Plant Pathology, 21(8): 1020–1041
- Son M, Lee KM, Yu J, Kang MJ, Park JM, Kwon SJ, Kim KH. 2013. The *HEX1* gene of *Fusarium graminearum* is required for fungal asexual reproduction and pathogenesis and for efficient viral RNA

- accumulation of *Fusarium graminearum* virus 1. *Journal of Virology*, 87(18): 10356–10367
- Vainio EJ, Chiba S, Ghabrial SA, Maiss E, Roossinck M, Sanadzovic S, Suzuki N, Xie JT, Nibert M, ICTV Report Consortium. 2018. ICTV virus taxonomy profile: *Partitiviridae*. *Journal of General Virology*, 99(1): 17–18
- Wang SC, Kondo H, Liu L, Guo LH, Qiu DW. 2013. A novel virus in the family *Hypoviridae* from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virus Research*, 174(1–2): 69–77
- Wang XC, Yang ZR, Wang M, Li W, Li SC. 2012. High-throughput sequencing technology and its application. *China Biotechnology*, 32(1): 109–114 (in Chinese) [王兴春, 杨致荣, 王敏, 李玮, 李生才. 2012. 高通量测序技术及其应用. 中国生物工程杂志, 32(1): 109–114]
- Wu QF, Ding SW, Zhang YJ, Zhu SF. 2015. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. *Annual Review of Phytopathology*, 53: 425–444
- Wu QF, Luo YJ, Lu R, Lau N, Lai EC, Li WX, Ding SW. 2010. Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(4): 1606–1611
- Xiao XQ, Cheng JS, Tang JH, Fu YP, Jiang DH, Baker TS, Ghabrial SA, Xie JT. 2014. A novel partitivirus that confers hypovirulence on plant pathogenic fungi. *Journal of Virology*, 88(17): 10120–10133
- Xie J, Wei DM, Jiang DH, Fu YP, Li GQ, Ghabrial SA, Peng YL. 2006. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of General Virology*, 87(1): 241–249
- Xie JT, Jiang DH. 2014. New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 45–68
- Xie JT, Xiao XQ, Fu YP, Liu HQ, Cheng JS, Ghabrial SA, Li GQ, Jiang DH. 2011. A novel mycovirus closely related to hypoviruses that infects the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology*, 418(1): 49–56
- Zhang HX, Xie JT, Fu YP, Cheng JS, Qu Z, Zhao ZZ, Cheng SF, Chen T, Li B, Wang QQ, et al. 2020. A 2-kb mycovirus converts a pathogenic fungus into a beneficial endophyte for *Brassica* protection and yield enhancement. *Molecular Plant*, 13(10): 1420–1433
- Zhang J, Cao XL, Yang JF, E XS. 2001. Occurrence and control of beet brown spot disease. *Sugar Crops of China*, 23(2): 48 (in Chinese) [张杰, 曹秀丽, 杨金凤, 鄂雪松. 2001. 甜菜褐斑病的发生和防治. 中国糖料, 23(2): 48]
- Zheng L, Zhang ML, Chen QG, Zhu MH, Zhou EX. 2014. A novel mycovirus closely related to viruses in the genus *Alphapartitivirus* confers hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Virology*, 456–457: 220–226

(责任编辑:王璇)