



低毒力病毒CHV1 (*Cryphonectria hypovirus 1*)的水平传播受到病毒毒株的影响

邓清超*, 叶云*, 苗苗, 方琴, 李涛, 王克荣†

南京农业大学植物病理学系, 南京 210095

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: wkr01@njau.edu.cn

2009-02-05 收稿, 2009-03-19 接受

国家自然科学基金资助项目(批准号: 30370918, 30470062)

摘要 观测到低毒力病毒 CHV1 在栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)菌株间的水平传播受病毒毒株的影响. 实验室条件下对 3 个 CHV1 低毒力病毒在栗疫病菌各营养体亲和菌株间进行了重复传播实验, 量化分析了 3 个病毒在相差 1~2 个 *vic* 基因位点时传播效率的差异. 结果表明, 不同的 CHV1 低毒力病毒具有不同的水平传播能力, 发现并使用传播能力更高的低毒力病毒, 将会显著提高对栗疫病的生物防治效率.

关键词
栗疫病菌
低毒力病毒
营养体不亲和性
水平传播
生物防治

栗疫病是世界上最重要的森林病害之一^[1], 20 世纪初它几乎造成了北美洲栗树的灭绝, 之后传入欧洲, 给欧洲栗树也造成了类似的灾难^[2,3]. 栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)细胞中的低毒力病毒是一类没有衣壳的双链 RNA 病毒, 可以使寄主栗疫病菌的分生孢子和色素的产量降低, 并引起雌性不育^[1,4~6]. 像其他真菌病毒一样, 低毒力病毒缺少细胞外的传播途径, 只能通过分生孢子进行垂直传播或通过感染菌株与未感染菌株间的菌丝融合进行水平传播^[7,8]. 在欧洲, 通过林间释放感染了 CHV1 (*Cryphonectria hypovirus 1*)病毒栗疫病菌低毒力菌株的方法对栗疫病菌的生物防治已经取得了成功^[9]. 然而类似的多次尝试在美洲却并不成功, 原因可能是因为美洲的栗疫病菌具有更为复杂的营养体不亲和群体. 栗疫病菌的营养体不亲和性(vegetative incompatibility, *vic*)由至少 8 个等位基因控制^[10]. 只有 2 个菌株的所有营养体不亲和基因都相同时菌株才是亲和的. 每个营养体不亲和基因对病毒水平传播的影

响不同, 通常菌株间营养体不亲和基因差异的个数越多, 病毒的传播难度越大^[11,12].

菌株间的营养体不亲和性阻碍了低毒力病毒的传播, 但是这种阻碍并非绝对. 事实上, 在实验室, 营养体不亲和菌株间的低毒力病毒传播可以获得成功^[12,13]. 一些在实验室中不能发生传播的不亲和菌株组合, 在田间, 只要给予足够的时间, 病毒传播也能够发生^[14,15].

我们测试了来自欧洲、美洲和亚洲的大量低毒力病毒的传播^[16] (部分数据未发表). 我们注意到, 在一些组合中, 病毒的供体和受体菌株的 *vic* 基因型差异完全一致的情况下, 不同低毒力病毒的传播效率大不相同.

低毒力病毒在栗疫病菌株之间传播的成功与否决定了生物防治能否取得足够成功. 显而易见, 如果不同的低毒力病毒具有不同的传播能力, 运用那些传播能力更高的低毒力病毒对栗疫病进行生物防治将会有更好的防治效率.

引用格式: 邓清超, 叶云, 苗苗, 等. 低毒力病毒 CHV1 (*Cryphonectria hypovirus 1*)的水平传播受到病毒毒株的影响. 科学通报, 2009, 54: 1436~1443
Deng Q C, Ye Y, Miao M, et al. The horizontal transmission of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) is affected by the virus strains. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0368-z

为了评估低毒力病毒对栗疫病菌营养体不亲和菌株间病毒传播的影响,我们选取3个已经测序的低毒力病毒毒株,在众多相差1~2个营养体不亲和基因的栗疫病菌菌株间进行了大量重复的病毒传播实验。

1 材料与方法

() 真菌菌株和低毒力病毒. 由于CHV1 低毒力病毒不能通过子囊孢子传播^[17-20],本实验中所有的不含有病毒的栗疫病菌菌株都是一些相差1~4个营养体不亲和基因的亲本菌株杂交的子囊孢子后代.最初的亲本菌株均分离自美国马里兰州Finzel的一块栗树林:MD7和MD17(*vic*基因型*AbCd*),MD8 (*vic*基因型*ABCD*),MD18,MD27(*vic*基因型*AbcD*)和MD32(*vic*基因型*abCD*)^[11,21-23].10个*vic*基因型的子囊孢子后代来自上文提到的6个MD菌株的7次杂交^[11],另外6个*vic*基因型的子囊孢子后代来自这些杂交后代的6次杂交^[24](部分数据未发表)。

我们从1995年开始就用*Aa*,*Bb*,*Cc*和*Dd*来定义这4个营养体不亲和(*vic*)基因位点^[24]:*vic Aa*,*vic Bb*,*vic Cc*和*vic Dd*,每个位点上有2个等位基因,分别用大小写区别.这4个营养体不亲和基因位点与Cortesi和Milgroom^[25]及Huber^[26]所鉴定的7个营养体不亲和基因位点间的对应关系有待进一步研究。

低毒力菌株CN280 分离自中国北方,含有低毒力病毒CHV1-CN280;低毒力菌株Euro7 (ATCC66021)分离自意大利,含有低毒力病毒CHV1-Euro7^[4],低毒力菌株EP713 (ATCC52571)是来自美国的野生型菌株EP155 (ATCC38755)被来自法国的低毒力菌株EP113 转化得到的低毒力菌株,含有低毒力病毒CHV1-EP713^[27].低毒力病毒通过直接或间接的转化,从原始的供体菌株中转入各个不含有病毒的菌株中,作为本实验中的供体菌株^[12,28,29]。

() 低毒力病毒的水平传播分析. 分析CHV1 低毒力病毒的水平传播采用配对培养的方法.含有供体和受体菌株的菌丝块在PDA平板表面相距5 mm 配对培养,25 °C 黑暗培养10 d^[11,12].在PDA培养基上,本实验中所有的野生型菌株均为橘黄色,所有低毒力菌株都为白色.发生成功转化的受体菌株在菌丝交界面附近会看到明显的形态改变,即由野生型菌株的橘黄色变成低毒力菌株的白色。

由于同一营养体亲和群的菌株之间低毒力病毒的传播率为100%,而相差3个或3个以上营养体不亲和基因

的菌株间的病毒传播率又特别低^[11,12],本实验中只测定了相差1和2个*vic*基因的菌株间的低毒力病毒传播。

() 数据分析. 根据先前的报道,低毒力病毒的水平传播主要是受*vic*基因的控制,但寄主的遗传背景对低毒力病毒的传播也具有相当大的影响^[12,29].本研究中,我们也注意到了相同*vic*基因位点不同的各个供体-受体组合间传播率的巨大差异.比如,当*Aa*位点上存在差异且*vic-a*处于受体位置时,CHV1-Euro7 的传播率变化从20%到100%不等,CHV1-EP713 则从0%到55%(表1).考虑到不同配对组合的寄主菌株的遗传背景对病毒的传播影响,3个CHV1 低毒力病毒传播数据的差异比较采用了双因素无重复方差分析:一个因素是病毒毒株,另一个因素是寄主菌株供体-受体组合.分析结果通过图1和2进行了直观的展示.实验统计分析中使用的统计软件是SAS 8.0 (Statistical Analysis System)。

2 结果

不同低毒力病毒在各供体和受体菌株间的转化结果见表1.同一低毒力病毒在其供体和受体菌株相差不同的*vic*基因时,其传播效率差别很大,这再次证明了不同的*vic*基因对病毒的水平传播具有不同的影响^[11,12].本研究中,*Cc*位点对病毒传播几乎没有影响,当供体和受体菌株只在*Cc*位点上存在差异时,3个病毒的传播率都是100%.除此之外,3个病毒在其他3个*vic*位点上的传播率都存在着较大的差异.*Aa*位点对病毒的传播具有中等程度的影响,但是当供体和受体菌株只有*Aa*位点存在差异时,3个病毒的传播率差异非常大.比如,当供体和受体菌株只在*Aa*位点上不同且*vic-a*处于受体位置时,CHV1-CN280 的传播率为78.75% (88/110),而CHV1-EP713 的传播率只有21.75% (28/110).*Dd*位点对病毒的传播影响非常大,该位点存在差异时,所有3个参试病毒传播率都很低,但是3个病毒的传播率之间仍然在统计上差异显著.当3个*vic*位点(*Aa*,*Bb*和*Dd*),特别是*Bb*位点存在差异时,病毒的传播都表现出明显的不均衡性,传播率取决于该位点上的哪一个等位基因处于供体或受体位置上.比如,当*Bb*位点存在差异时,如果*vic-B*处于受体位置,CHV1-CN280 的传播率为91.25% (83/90);如果*vic-b*处于受体位置,则传播率为25% (29/120).对应地,CHV1-Euro7 的传播率分别是75% (70/90)和12.5% (15/120),CHV1-EP713 分别

表 1 3 个 CHV1 低毒力病毒在栗疫病菌不同 *vic* 基因型间的传播结果

差异位点 ^{a)} 传播方向		供体		受体		病毒传播					
						CHV1-CN280		CHV1-Euro7		CHV1-EP713	
		菌株	<i>vic</i> 基因型 ^{b)}	菌株	<i>vic</i> 基因型	测试数	成功数	测试数	成功数	测试数	成功数
<i>Aa</i>	<i>A→a</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	LE-1-1	<i>aBcd</i>	20	16	20	13	20	4
		BB-1-5	<i>ABCd</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	20	14	20	7	20	7
		Q-1-9	<i>ABcD</i>	LX-1-8	<i>aBcD</i>	10	10	10	10	10	2
		BB-1-3	<i>ABCD</i>	LC-1-3	<i>aBCD</i>	10	10	10	9	10	2
		BB-1-6	<i>AbCD</i>	P-1-2	<i>abCD</i>	20	20	20	18	20	11
		Q-1-2	<i>AbcD</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	10	8	10	10	10	1
		CF-1-12	<i>Abcd</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	10	5	10	4	10	1
		BE-1-3	<i>AbCd</i>	P-2-12	<i>abCd</i>	10	5	10	2	10	0
	<i>a→A</i>	LE-1-1	<i>aBcd</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	10	5	10	4	10	1
		LA-1-6	<i>aBCd</i>	BB-1-5	<i>ABCd</i>	20	8	20	13	20	1
		LX-1-8	<i>aBcD</i>	Q-1-9	<i>ABcD</i>	10	8	10	8	10	2
		LC-1-3	<i>aBCD</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	10	10	10	9	10	1
		P-1-2	<i>abCD</i>	BB-1-6	<i>AbCD</i>	10	9	10	9	10	3
		F-2-6	<i>abcD</i>	Q-1-2	<i>Abcd</i>	10	4	10	4	10	0
		LD-1-7	<i>abcd</i>	CF-1-12	<i>Abcd</i>	10	2	10	0	10	2
		P-2-12	<i>abCd</i>	BE-1-3	<i>AbCd</i>	10	2	10	2	10	1
	<i>B→b</i>	BB-1-5	<i>ABcd</i>	BE-1-3	<i>AbCd</i>	10	2	10	0	10	0
		LX-1-8	<i>AbCd</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	10	4	10	0	10	1
		LA-1-6	<i>aBCd</i>	P-2-12	<i>abCd</i>	20	6	20	5	160	1
		Q-1-9	<i>ABcD</i>	Q-1-2	<i>Abcd</i>	20	3	20	0	20	1
		LE-1-1	<i>aBcd</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	20	5	20	4	100	3
		LC-1-3	<i>aBCD</i>	P-1-2	<i>abCD</i>	10	3	10	2	10	1
		BB-1-3	<i>ABCD</i>	BB-1-6	<i>AbCD</i>	10	2	10	3	10	0
		LB-1-3	<i>ABcd</i>	CF-1-12	<i>Abcd</i>	20	4	20	1	60	0
		BE-1-3	<i>AbCd</i>	BB-1-5	<i>ABCd</i>	10	9	10	7	10	1
		F-2-6	<i>abcD</i>	LX-1-8	<i>aBcD</i>	10	10	10	10	10	10
		P-2-12	<i>abCd</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	10	9	10	6	10	6
		Q-1-2	<i>Abcd</i>	Q-1-9	<i>ABcD</i>	10	10	10	10	10	9
<i>Bb</i>	<i>b→B</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	LE-1-1	<i>aBcd</i>	10	10	10	6	10	8
		P-1-2	<i>abCD</i>	LC-1-3	<i>aBCD</i>	10	10	10	10	10	10
		BB-1-6	<i>AbCD</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	20	20	20	20	20	20
		CF-1-12	<i>Abcd</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	10	5	10	1	10	0
	<i>C→c</i>	BB-1-5	<i>ABcd</i>	LB-1-3	<i>Abcd</i>	10	10	10	10	10	10
		BB-1-3	<i>ABCD</i>	Q-1-9	<i>ABcd</i>	10	10	10	10	10	10
		BB-1-6	<i>AbCD</i>	Q-1-2	<i>Abcd</i>	10	10	10	10	10	10
		LA-1-6	<i>aBCd</i>	LE-1-1	<i>aBcd</i>	10	10	10	10	10	10
		BE-1-3	<i>AbCd</i>	CF-1-12	<i>Abcd</i>	5	5	5	5	5	5
		P-2-12	<i>abCd</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	5	5	5	5	5	5
		LC-1-3	<i>aBCD</i>	LX-1-8	<i>aBcd</i>	5	5	5	5	5	5
		P-1-2	<i>abCD</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	5	5	5	5	5	5
	<i>c→C</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	BB-1-5	<i>ABCd</i>	10	10	10	10	10	10
		Q-1-9	<i>ABcD</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	10	10	10	10	10	10
		Q-1-2	<i>Abcd</i>	BB-1-6	<i>Abcd</i>	10	10	10	10	10	10
		LE-1-1	<i>aBcd</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	5	5	5	5	5	5
		CF-1-12	<i>Abcd</i>	BE-1-3	<i>AbCd</i>	5	5	5	5	5	5
		LD-1-7	<i>abcd</i>	P-2-12	<i>abCd</i>	5	5	5	5	5	5
		LX-1-8	<i>aBcd</i>	LC-1-3	<i>aBCD</i>	5	5	5	5	5	5
		F-2-6	<i>abcD</i>	P-1-2	<i>abCD</i>	10	10	10	10	10	10
	<i>D→d</i>	LX-1-8	<i>aBcd</i>	LE-1-1	<i>aBcd</i>	10	2	10	0	10	0
		Q-1-9	<i>ABcD</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	20	3	20	3	20	1
<i>Cc</i>	<i>C→c</i>	BB-1-5	<i>ABcd</i>	LB-1-3	<i>Abcd</i>	10	10	10	10	10	10
		BB-1-3	<i>ABCD</i>	Q-1-9	<i>ABcd</i>	10	10	10	10	10	10
<i>Cc</i>	<i>c→C</i>	BB-1-6	<i>AbCD</i>	Q-1-2	<i>Abcd</i>	10	10	10	10	10	10
		LA-1-6	<i>aBCd</i>	LE-1-1	<i>aBcd</i>	10	10	10	10	10	10
<i>Cc</i>	<i>C→c</i>	BE-1-3	<i>AbCd</i>	CF-1-12	<i>Abcd</i>	5	5	5	5	5	5
		P-2-12	<i>abCd</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	5	5	5	5	5	5
<i>Cc</i>	<i>c→C</i>	LC-1-3	<i>aBCD</i>	LX-1-8	<i>aBcd</i>	5	5	5	5	5	5
		P-1-2	<i>abCD</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	5	5	5	5	5	5
<i>Cc</i>	<i>C→c</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	BB-1-5	<i>ABCd</i>	10	10	10	10	10	10
		Q-1-9	<i>ABcD</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	10	10	10	10	10	10
<i>Cc</i>	<i>c→C</i>	Q-1-2	<i>Abcd</i>	BB-1-6	<i>Abcd</i>	10	10	10	10	10	10
		LE-1-1	<i>aBcd</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	5	5	5	5	5	5
<i>Cc</i>	<i>C→c</i>	CF-1-12	<i>Abcd</i>	BE-1-3	<i>AbCd</i>	5	5	5	5	5	5
		LD-1-7	<i>abcd</i>	P-2-12	<i>abCd</i>	5	5	5	5	5	5
<i>Cc</i>	<i>c→C</i>	LX-1-8	<i>aBcd</i>	LC-1-3	<i>aBCD</i>	5	5	5	5	5	5
		F-2-6	<i>abcD</i>	P-1-2	<i>abCD</i>	10	10	10	10	10	10
<i>Dd</i>	<i>D→d</i>	LX-1-8	<i>aBcd</i>	LE-1-1	<i>aBcd</i>	10	2	10	0	10	0
		Q-1-9	<i>ABcD</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	20	3	20	3	20	1

表 1(续)

差异位点 ^{a)} 传播方向		供体		受体		病毒传播					
		菌株	vic 基因型 ^{b)}	菌株	vic 基因型	CHV1-CN280		CHV1-Euro7		CHV1-EP713	
						测试数	成功数	测试数	成功数	测试数	成功数
<i>d</i> → <i>D</i>		LC-1-3	<i>abcd</i>	LA-1-6	<i>ABcd</i>	10	3	10	2	10	0
		BB-1-3	<i>ABCD</i>	BB-1-5	<i>ABcd</i>	10	1	10	1	320	1
		BB-1-6	<i>AbCD</i>	BE-1-3	<i>AbCd</i>	10	1	10	0	10	0
		Q-1-2	<i>AbcD</i>	CF-1-12	<i>Abcd</i>	10	1	10	0	10	0
		F-2-6	<i>abcD</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	10	2	10	4	10	0
		P-1-2	<i>abCD</i>	P-2-12	<i>abCd</i>	10	2	10	1	10	0
		LE-1-1	<i>ABcd</i>	LX-1-8	<i>aBcD</i>	20	2	20	3	20	0
		LB-1-3	<i>ABcd</i>	Q-1-9	<i>ABcD</i>	10	0	10	0	10	0
		LA-1-6	<i>aBCd</i>	LC-1-3	<i>aBCD</i>	10	2	10	1	10	1
		BB-1-5	<i>ABcd</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	10	1	10	1	10	0
		BE-1-3	<i>AbCd</i>	BB-1-6	<i>AbCD</i>	10	1	10	0	10	0
		CF-1-12	<i>Abcd</i>	Q-1-2	<i>AbcD</i>	10	0	10	1	10	0
		LD-1-7	<i>abcd</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	10	1	10	0	10	0
		P-2-12	<i>abCd</i>	P-1-2	<i>abCD</i>	10	0	10	0	10	0
<i>Aa, Bb</i>	<i>AB</i> → <i>ab</i>	Q-1-9	<i>ABcd</i>	LX-1-8	<i>aBcD</i>	20	1	20	2	20	0
		BB-1-3	<i>ABCD</i>	P-1-2	<i>abCD</i>	20	4	20	4	20	0
		BB-1-5	<i>ABcd</i>	P-2-12	<i>abCd</i>	10	0	10	0	10	0
	<i>Ab</i> → <i>aB</i>	BB-1-6	<i>AbCD</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	10	1	10	0	10	0
		Q-1-2	<i>AbcD</i>	LX-1-8	<i>aBcD</i>	10	9	10	5	10	0
		CF-1-12	<i>Abcd</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	10	3	10	0	10	0
	<i>aB</i> → <i>Ab</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	BE-1-3	<i>AbCd</i>	20	3	20	0	20	0
		LX-1-8	<i>aBcd</i>	Q-1-2	<i>AbcD</i>	10	0	10	0	10	0
	<i>ab</i> → <i>AB</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	Q-1-9	<i>ABcD</i>	10	3	10	5	10	0
		P-1-2	<i>abCD</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	10	5	10	3	10	0
<i>Aa, Cc</i>	<i>AC</i> → <i>ac</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	LX-1-8	<i>aBcD</i>	10	7	10	10	10	2
		BB-1-6	<i>AbCD</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	10	10	10	9	10	4
		BB-1-5	<i>ABcd</i>	LE-1-9	<i>aBcd</i>	10	10	10	4	10	6
	<i>Ac</i> → <i>aC</i>	Q-1-9	<i>ABcd</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	10	1	10	2	10	0
		LB-1-3	<i>ABcd</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	10	10	10	8	10	3
	<i>aC</i> → <i>Ac</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	10	5	10	7	10	4
		LC-1-3	<i>aBCD</i>	Q-1-9	<i>ABcd</i>	10	7	10	7	10	1
	<i>ac</i> → <i>AC</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	BB-1-6	<i>AbCD</i>	10	6	10	8	10	0
		LE-1-9	<i>aBcd</i>	BB-1-5	<i>ABcd</i>	10	8	10	2	10	2
		LX-1-8	<i>aBcd</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	10	7	10	10	10	2
<i>Aa, Dd</i>	<i>AD</i> → <i>ad</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	20	2	20	0	20	0
		Q-1-2	<i>Abcd</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	10	2	10	0	10	0
	<i>Ad</i> → <i>aD</i>	BB-1-5	<i>ABcd</i>	LC-1-3	<i>aBCD</i>	10	1	10	0	10	0
		CF-1-12	<i>Abcd</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	10	0	10	0	10	0
		BE-1-3	<i>AbCd</i>	P-1-2	<i>abCD</i>	10	0	10	0	10	0
	<i>aD</i> → <i>Ad</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	CF-1-12	<i>Abcd</i>	10	1	10	0	10	1
		LX-1-8	<i>aBcd</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	10	0	10	0	10	0
	<i>ad</i> → <i>AD</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	10	0	10	1	10	0
		P-1-2	<i>abCD</i>	CF-1-12	<i>Abcd</i>	10	0	10	0	10	0
<i>Bb, Cc</i>	<i>BC</i> → <i>bc</i>	LA-1-6	<i>aBCd</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	10	0	10	1	10	0
		BB-1-3	<i>ABCD</i>	Q-1-2	<i>Abcd</i>	20	1	20	0	20	0
		BB-1-5	<i>ABcd</i>	CF-1-12	<i>Abcd</i>	10	0	10	0	10	0
	<i>Bc</i> → <i>bC</i>	LC-1-3	<i>aBCD</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	10	3	10	2	10	1
		LX-1-8	<i>aBcd</i>	P-1-2	<i>abCD</i>	10	2	10	0	10	0
	<i>bC</i> → <i>Bc</i>	BB-1-6	<i>AbCD</i>	Q-1-9	<i>ABcd</i>	20	20	20	20	20	20
		P-1-2	<i>abCD</i>	LX-1-8	<i>aBcd</i>	10	10	10	10	10	10

表 1(续)

差异位点 ^{a)} 传播方向	供体		受体		病毒传播					
	菌株	vic 基因型 ^{b)}	菌株	vic 基因型	CHV1-CN280		CHV1-Euro7		CHV1-EP713	
					测试数	成功数	测试数	成功数	测试数	成功数
<i>bc</i> → <i>BC</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	LC-1-3	<i>aBCD</i>	20	20	20	20	20	20
	Q-1-2	<i>AbcD</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	10	10	10	10	10	10
<i>Bb, Dd</i> <i>BD</i> → <i>bd</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	BE-1-3	<i>AbCd</i>	10	0	10	0	10	0
	LX-1-8	<i>aBcD</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	10	0	10	0	10	0
<i>Bd</i> → <i>bD</i>	BB-1-5	<i>ABCd</i>	BB-1-6	<i>AbCD</i>	10	0	10	0	10	0
	LA-1-6	<i>aBCd</i>	P-1-2	<i>abCD</i>	10	0	10	0	10	0
<i>bD</i> → <i>Bd</i>	BB-1-6	<i>AbCD</i>	BB-1-5	<i>ABCd</i>	10	1	10	0	10	0
	F-2-6	<i>abcD</i>	LE-1-1	<i>aBcd</i>	10	3	10	0	10	1
<i>bd</i> → <i>BD</i>	Q-1-2	<i>AbcD</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	10	0	10	0	10	0
	P-2-12	<i>abCd</i>	LC-1-3	<i>aBCD</i>	10	0	10	0	10	0
	BE-1-3	<i>AbCd</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	10	1	10	1	10	0
<i>Cc, Dd</i> <i>CD</i> → <i>cd</i>	BB-1-3	<i>ABCD</i>	LB-1-3	<i>ABcd</i>	20	1	20	0	20	0
	P-1-2	<i>abCD</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	10	1	10	2	10	0
<i>Cd</i> → <i>cD</i>	BB-1-5	<i>ABCd</i>	Q-1-9	<i>ABcD</i>	10	1	10	1	10	0
	LA-1-6	<i>aBCd</i>	LX-1-8	<i>aBcD</i>	10	2	10	3	10	0
<i>cD</i> → <i>Cd</i>	F-2-6	<i>abcD</i>	P-2-12	<i>abCd</i>	10	2	10	2	10	0
	Q-1-2	<i>AbcD</i>	BE-1-3	<i>AbCd</i>	10	0	10	0	10	0
<i>cd</i> → <i>CD</i>	LD-1-7	<i>abcd</i>	P-1-2	<i>abCD</i>	10	0	10	1	10	0
	CF-1-12	<i>Abcd</i>	BB-1-6	<i>AbCD</i>	10	0	10	1	10	1

a) 供体菌株和受体菌株间不同的vic位点; b) vic基因型的缩写, 由菌株在vic位点Aa, Bb, Cc和Dd上的等位基因名称(大写或小写)构成. 已经报道的vic位点有 7 个. 这里只显示本实验中用到的菌株间差异的 4 个位点, 其他位点不存在差异^[26,27].

是 67.5% (64/90)和 3.6%(7/310)(图 1).
相差 2 个 vic 位点时的传播率通常要比只相差 1 个 vic 位点时的传播率低, 但 3 个病毒传播率之间仍然差异显著(图 2).
总的来说, CHV1-EP713 的传播率要明显低于 CHV1-CN280 和 CHV1-Euro7, 而在此次研究中, CHV1-CN280 表现出了最高的传播能力(图 2).

3 讨论

该研究表明, 不仅 vic 基因和寄主菌株的遗传背景对低毒力病毒在菌株间的水平传播具有影响, 病毒本身对其传播也有明显的影响, 进一步分析更加表明, 不同的低毒力病毒具有不同的水平传播能力. 在本次研究中, 来自中国的低毒力病毒 CHV1-CN280 表现出了最高的水平传播能力.
关于低毒力病毒的传播, Liu和Milgroom^[11]比较了 2 种低毒力病毒CHV1-EP43 和CHV2-NB58, 认为它们的传播没有差别. 同样, Huber^[26]比较了 CHV1-EP713 和CHV3-GH2, 以及Cortesi等人^[12]比较了 CHV1-E13 和CHV1-TE9, 也都没有发现不同.
尽管栗疫病和低毒力病毒最早是在美洲和欧洲发现^[6,30], 但亚洲东部才是它们的原产地. 目前所观

察到的栗疫病菌最大的营养体亲和群(VCG)数量是在中国发现的, 而中国的CHV1 病毒也具有最大的遗传差异性^[10,31,32]. 病毒对传播率的影响之所以在以前的研究中未被发现, 主要原因可能是因为研究中测试的病毒数量太少, 而且亚洲的低毒力病毒未参与测试^[11,12,26]. 低毒力病毒对传播率的影响未被发现的另一个可能原因是, 有时两种病毒的传播率差异太小, 区别不很明显, 如果没有足够多的重复实验支持以消除随机误差的话就很难注意到这种差别. 比如, 如果本实验只分析 1 个vic位点的 64 对寄主菌株组合的数据或只分析 2 个vic位点的 55 对寄主菌株组合的数据, CHV1-CN280 和CHV1-Euro7 的传播率都没有显著差异. 但是当把相差 1 个vic位点和 2 个vic位点的 119(64+55) 对组合的数据放到一起分析时, CHV1-CN280 和CHV1-Euro7 的传播率就表现出了显著差异(图 2).
在真菌中, 营养体不亲和现象是一种自我-非自我的识别机制, 当不亲和的个体间发生细胞融合时就会发生程序化的细胞凋亡(PCD)过程^[33-35], 它阻止了异核体的形成并抑制病毒的传播^[14,36]. 在动物系统中有许多例子, 寄主通过PCD来抑制病毒的传播, 而病毒也能通过抑制动物细胞的PCD来增强自身的

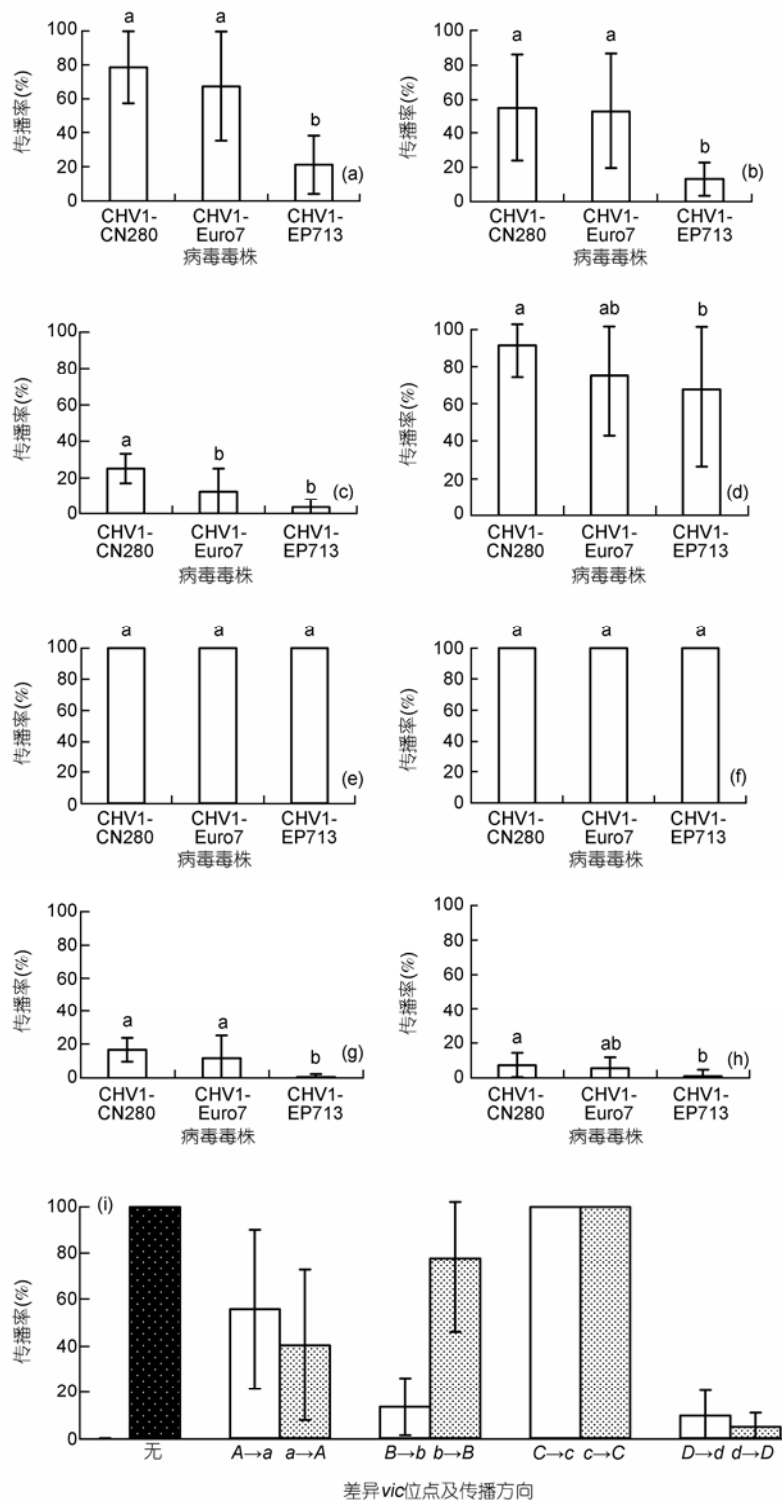


图1 3个CHV1病毒在菌株间存在1个*vic*位点差异时的传播情况

数据全部来自表1, 只包含相差1个*vic*位点时的数据, 误差线表示相同*vic*基因差异的不同组合间的标准差((a)~(h)), 代表传播率平均值的柱状图上面的字母不同, 表示在0.05的显著性水平上存在差异. (a) 供体与受体菌株间, 营养体不亲和基因位点*vic Aa*存在差异且*vic-a*作为受体; (b) 位点*vic Aa*存在差异且*vic-A*作为受体; (c) 位点*vic Bb*存在差异且*vic-b*作为受体; (d) 位点*vic Bb*存在差异且*vic-B*作为受体; (e) 位点*vic Cc*存在差异且*vic-c*作为受体; (f) 位点*vic Cc*存在差异且*vic-C*作为受体; (g) 位点*vic Dd*存在差异且*vic-d*作为受体; (h) 位点*vic Dd*存在差异且*vic-D*作为受体; (i) 3个病毒传播率的平均值

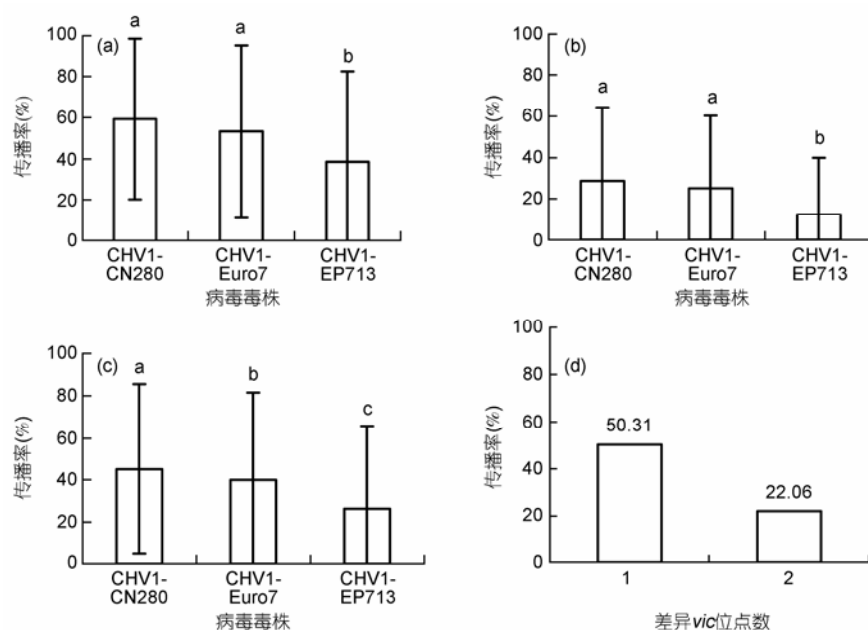


图 2 3 个 CHV1 病毒在菌株间 1 或 2 个 *vic* 位点上存在差异时的传播情况

数据全部来自表 1, 误差线表示相同 *vic* 基因差异的不同组合间的标准差. 代表传播率平均值的柱状图上面的字母不同, 则表示在 0.05 的显著性水平上存在差异: (a) 1 个 *vic* 位点存在差异; (b) 2 个 *vic* 位点存在差异; (c) 3 个 CHV1 病毒在 1 个或 2 个 *vic* 位点存在差异时总的传播率; (d) 3 个 CHV1 病毒的平均传播率

传播^[37,38]. 在丝状真菌中, PCD现象也与病毒的传播具有相关性. 如果发生融合的细胞表现出较低的凋亡频率或凋亡现象发生延迟, 就能观测到较高的病毒传播率. 另一方面, 病毒的侵染也能对PCD产生显著的、菌株特异的正向或反向的影响^[33]. 本研究中不同的低毒力病毒表现出不同的传播能力, 可能就是病毒对寄主菌株的PCD过程影响差异的体现.

本研究中我们还注意到, CHV1-EP713 比CHV1-Euro7 和CHV1-CN280 对其寄主栗疫病菌的毒性更强, 它能更剧烈地改变栗疫病菌的表型, 比如降低其生长速率、色素和致病力等^[4,39](部分数据未显示). 我们推测, 有可能CHV1-EP713 对栗疫病菌更强的毒性能够部分解释其更低的传播能力. 有关低毒力病毒毒性和传播能力之间的相关性, 之前并没有任何相关研究报道, 我

们会在接下来的研究中对此有所涉及.

从这些*vic*基因位点的特点和已经发表的MD菌株的营养体亲和(vegetative compatibility, VC)型数据^[11,12,23], 我们初步推测, *vic Aa*, *vic Bb*, *vic Cc*和*vic Dd*可能是Huber^[26], Cortesi和Milgroom^[25]所鉴定的 7 个 *vic*基因位点中的 4 个, 它们分别对应*vic3*, *vic7*, *vic4*和*vic2*. 当然最终的确定还有待我们的菌株与Cortesi和Milgroom^[25]所建立的栗疫病菌VC型标准菌株间的亲和性测定结果.

本研究中用到的 3 个低毒力病毒都已经测序并构建了全长可侵染性cDNA克隆^[4,40](部分数据未发表), 在后续的研究中, 可以通过CHV1-CN280, CHV1-Euro7 和CHV1-EP713 的区段互换, 构建一些重组病毒来确定决定CHV1 病毒水平传播能力的关键位点.

致谢 广西大学生命科学与技术学院陈宝善教授. 美国康奈尔大学植物病理学的 Micheal G. Milgroom 博士和马里兰大学生物技术研究院 Donald L. Nass 博士为本研究提供了部分菌株, 特此致谢.

参考文献

- 1 Anagnostakis S L. Biological control of chestnut blight. Science, 1982, 215: 466—471[DOI]
- 2 Grente J, Sautet S. Biological control of chestnut blight in France. In: MacDonald W L, Ceeh F C, Luchok J, et al., eds. Proceedings of the American Chestnut Symposium. Morgantown: West Virginia University Books, 1978. 30—34

- 3 Hepting G H. Death of the American chestnut. *J For Hist*, 1974, 18: 60—67
- 4 Chen B S, Nuss D L. Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: A comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *J Virol*, 1999, 73: 985—992
- 5 Craven M G, Pawlyk D M, Choi G H, et al. Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus. *J Virol*, 1993, 67: 6513—6521
- 6 Nuss D L. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiol Rev*, 1992, 56: 561—576
- 7 Anagnostakis S L, Day P R. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, 1979, 69: 1226—1229[DOI]
- 8 van Alfen N K, Jaynes R A, Anagnostakis S L, et al. Chestnut blight: Biological control by transmissible hypovirulence in *Endothia parasitica*. *Science*, 1975, 189: 890—891[DOI]
- 9 Heiniger U, Rigling D. Biological control of chestnut blight in Europe. *Ann Rev Phytopathol*, 1994, 32: 581—599[DOI]
- 10 王克荣, 邵见阳, 陆家云. 苏皖地区栗疫病菌营养体亲和性研究. *南京农业大学学报*, 1991, 14(4): 44—48
- 11 Liu Y C, Milgroom M G. Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, 1996, 86: 79—86[DOI]
- 12 Cortesi P, McCulloch C E, Song H, et al. Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*, 2001, 159: 107—118
- 13 Bissegger M, Rigling D, Heiniger U. Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology*, 1997, 87: 50—59[DOI]
- 14 Milgroom M G, Cortesi P. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. *Annu Rev Phytopathol*, 2004, 42: 311—338[DOI]
- 15 Ding P, Liu F X, Xu C X, et al. Transmission of *Cryphonectria hypovirus* to protect chestnut trees from chestnut blight disease. *Biol Control*, 2007, 40: 9—14[DOI]
- 16 王克荣, 成桂英, 刘怡君等. 栗疫病菌的营养体亲和性基因和 dsRNAs 对病毒传播的影响. *菌物系统*, 1997, 16: 30—35
- 17 Elliston J E. Characterization of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. *Phytopathology*, 1985, 75: 151—158[DOI]
- 18 Anagnostakis S L. *Cryphonectria parasitica*, cause of chestnut blight. *Adv Plant Pathol*, 1988, 6: 123—136
- 19 Carbone I, Liu Y C, Hillman B I, et al. Recombination and migration of *Cryphonectria hypovirus* 1 as inferred from gene genealogies and the coalescent. *Genetics*, 2004, 166: 1611—1629[DOI]
- 20 Prospero S, Conedera M, Heiniger U, et al. Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. *Phytopathology*, 2006, 96: 1337—1344[DOI]
- 21 Milgroom M G, Lipari S E. Population differentiation in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in eastern North America. *Phytopathology*, 1995, 85: 155—160[DOI]
- 22 Milgroom M G, Wang K R, Zhou Y, et al. Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia*, 1996, 88: 179—190[DOI]
- 23 Milgroom M G, Cortesi P. Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 10518—10523[DOI]
- 24 王克荣, 刘怡君, Milgroom M G. 栗疫病菌营养体亲和性的基因型. 见: 谭万忠, 主编. 中国中青您菌物学家研究进展. 重庆: 西南师范大学出版社, 1995. 126—130
- 25 Cortesi P, Milgroom M G. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 2988—2994
- 26 Huber D H. Genetic analysis of vegetative incompatibility polymorphisms and horizontal transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Doctor Dissertation. East Lansing, MI: Michigan State University, 1996. 1—10
- 27 Anagnostakis S L. Conversion to curative morphology in *Endothia parasitica* and its restriction by vegetative compatibility. *Mycologia*, 1983, 75: 777—780[DOI]
- 28 Peever T L, Liu Y C, Cortesi P, et al. Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus hypovirus interaction. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 4863—4869[DOI]
- 29 Papazova-Anakieva I, Sotirovski K, Cortesi P, et al. Horizontal transmission of hypoviruses between vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Macedonia. *Eur J Plant Pathol*, 2008, 120: 35—42[DOI]
- 30 Anagnostakis S L. Chestnut blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*, 1987, 79: 23—37[DOI]
- 31 Liu Y C, Milgroom M G. High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. *Mycologia*, 2007, 99: 279—284[DOI]
- 32 Liu F X, Ding P, Xu C X, et al. Genetic Diversity of *Cryphonectria hypovirus* 1 in China, Japan and Italy. *J Phytopathology*, 2007, 155: 662—669[DOI]
- 33 Biella S, Smith M L, Aist J R, et al. Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. *Proc R Soc London B*, 2002, 269: 2269—2276[DOI]
- 34 Glass N L, Kaneko I. Fatal attraction: Noneself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungus. *Eukaryot Cell*, 2003, 2: 1—8[DOI]
- 35 Saupe S J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64: 489—502[DOI]
- 36 Smith M L, Gibbs C C, Milgroom M G. Heterokaryon incompatibility function of barrage-associated vegetative incompatibility genes (*vic*) in *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia*, 2006, 98(1): 43—50[DOI]
- 37 Clem R J, Fechheimer M, Miller L K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 1991, 254: 1388—1390[DOI]
- 38 Birnbaum M J, Clem R J, Miller L K. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol*, 1994, 68: 2521—2528
- 39 Chen B S, Geletka L M, Nuss D L. Using chimeric hypoviruses to fine-tune the interaction between a pathogenic fungus and its plant host. *J Virol*, 2000, 74: 7562—7567[DOI]
- 40 Choi G H, Nuss D L. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science*, 1992, 257: 800—803[DOI]