

吉林省甘薯双生病毒鉴定

张春雨¹, 梁雨欣^{1,2}, 李小宇¹, 刘建青^{1,3}, 刘峰^{1*}, 王永志^{1*}

(1. 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100; 2. 吉林农业大学, 长春 130118; 3. 长春师范大学, 长春 130032)

摘要:本研究利用小RNA深度测序技术对吉林省7个甘薯产区采集的85份样本进行鉴定。发现混合样品中含有双生病毒科(Geminiviridae)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)和玉米线条病毒属(*Mastrevirus*)的同源序列。经PCR扩增、测序鉴定,有16份样品感染玉米线条病毒属的甘薯无症状1号病毒 Sweet potato symptomless virus (SPSMV1), 21份样品感染菜豆金色花叶病毒属的甘薯曲叶病毒 Sweet potato leaf curl virus (SPLCV)。

关键词:小RNA深度测序; 双生病毒; 甘薯无症状1号病毒; 甘薯曲叶病毒

中图分类号: S531.08

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)05-0066-05

Identification of Geminiviruses in Sweet Potato Samples Collected from Jilin Province

ZHANG Chunyu¹, LIANG Yuxin^{1,2}, LI Xiaoyu¹, LIU Jianqing^{1,3}, LIU Feng^{1*}, WANG Yongzhi^{1*}

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100; 2. Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 3. Changchun Normal University, Changchun 130032, China)

Abstract: In this study, we identified 85 samples of sweet potato leaf from 7 areas in Jilin Province by small RNA deep sequencing. The homologous sequences of virus in genus *Begomovirus* and *Mastrevirus*, family *Geminiviridae* were found from the total RNA. We identified 16 samples got SPSMV1 and 21 samples got SPLCV by PCR amplification and sequencing.

Key words: Small RNA deep sequencing; *Geminiviruses*; SPSMV1; SPLCV

甘薯是世界上重要的粮食作物、经济作物。我国是世界上最大的甘薯生产国,栽培面积和产量均居世界第一^[1]。根据气候条件和耕作制度的差异,分为北方薯区、长江流域薯区和南方薯区三大主产区^[2]。吉林省位于北方薯区,无霜期短,低温来临早,多栽种春薯,主产区在中部和西部。甘薯属无性繁殖作物,甘薯病毒病是危害甘薯生产的主要病害,目前全世界已报道的能够侵染甘薯的病毒有30多种,分属于9个科。其中侵染甘薯的DNA病毒主要分属于双生病毒科(Geminiviridae)和花椰菜花叶病毒科(Caulimoviridae)^[3]。甘薯双生病毒是近年来危害甘薯生产的重要病毒,自2006年至今,双生病毒的发生呈大规模上升趋势,且发生地域从热带地区迅速扩散至全球

各个甘薯产区。甘薯双生病毒对甘薯生长危害较大,可造成甘薯减产26%~63%^[4]。

本研究利用小RNA深度测序和PCR克隆测序技术,首次对吉林省甘薯双生病毒进行鉴定,初步掌握了吉林省甘薯双生病毒病的发生情况,为甘薯病毒病的防控和脱毒育种提供重要依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

采集吉林省长岭县、乾安县、洮南市、长春市、辽源市、抚松县、梨树县等7个地区的甘薯病毒病感病叶片样品共85份, -80℃冰箱保存。

1.2 总RNA提取

采集的甘薯混合叶片参照TRIzol说明书提取总RNA,测定浓度。

1.3 小RNA文库建立、测序及分析

混合样品总RNA由北京诺禾致源科技股份有限公司检测,样品检测合格后使用Small RNA Sample Pre Kit构建文库,文库构建完成后先使用Qubit 2.0初步定量,再使用Agilent 2100对文库的

收稿日期: 2023-01-10

基金项目: 吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2021ZY022)

作者简介: 张春雨(1988-),女,助理研究员,硕士,主要从事植物病毒病防治研究。

通讯作者: 刘峰,男,研究员, E-mail: tyslf@126.com

王永志,男,博士,研究员, E-mail: yzwang@126.com

insert size 进行检测, insert size 符合预期后使用 qPCR 对文库有效浓度进行准确定量, 以保证文库质量。文库检测合格后进行 HiSeq 测序, 采用无参考基因组寄主病毒 sRNA 分析流程进行候选病毒评估。

1.4 RT-PCR 验证

根据小 RNA 测序获得的结果, 设计甘薯无症状 1 号病毒引物 SPSMV-F/R、甘薯 *Begomovirus* 病毒通用引物 SPLCV-F/R (表 1), 以反转录合成的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 50 μ L PCR 反应

体系: 2 \times SanTaq PCR Mix 25 μ L, 引物各 1 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收目的片段由吉林省库美生物科技有限公司测序。根据测序结果进一步设计 SPLCV CP 引物 SPLCVCP-F/R (表 1), 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收目的片段测序。

表 1 PCR 特异性引物

编号	引物名称	引物序列(5'-3')	目的片段长度(bp)
1	SPSMV-F	AAGGTGGAGCGCTGGGATAAT	389
	SPSMV-R	CTCGCATAGAAAGCCTTATC	
2	SPLCV-F	TCCCTGTGCGTGAATCCAT	300
	SPLCV-R	GAATCCCACTATCTTCTCTGCG	
3	SPLCVCP-F	CCYTAGGGTTCGAGCTCTGTTCCGG	1 272
	SPLCVCP-R	AGCATGGATTACGCACAGGGGAATC	

1.5 序列分析

测序结果用 Blast 进行比对, 用 MEGA 7.0 软件进行进化分析, 用 Neighbor Joining 法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 甘薯叶片 sRNA 深度测序分析

提取甘薯混合叶片的总 RNA 浓度为 1 459 ng/ μ L,

sRNA 测序共获得 26 418 427 个 reads, 去除含有接头的、低质量的 reads, 获得 clean reads 26 160 127 个。筛选 18~26 nt 的序列与 GenBank Virus RefSeq 核酸数据库进行比对, 初步鉴定样品感染病毒种类, 其中比对到参考序列的 reads 数占总 reads 数的 4.06%, 比对到双生病毒序列的 reads 数占比对到数据库的总 reads 数的 2.64%。比对到的甘薯病毒序列有 15 株, 其中双生病毒有 7 株(表 2)。

表 2 甘薯双生病毒比对信息

病毒信息	病毒数据库序列号	平均覆盖度	比对到该病毒的 reads 数	比对到该病毒的 reads 数占比对到数据库的总 reads 数(%)	比对到该病毒的 reads 数占总 reads 数(%)
甘薯无症状 1 号病毒	KY565237.1	390.5	50 427	2.36	0.19
甘薯上海曲叶病毒	KF040467.1	14.61	1 790	0.08	0.01
甘薯加纳利曲叶病毒	KU992909.1	13.21	1 624	0.08	0.01
甘薯曲叶病毒	AF104036.1	8.14	1 000	0.05	0
甘薯加纳利曲叶病毒	FJ529203.1	5.55	684	0.03	0
甘薯孟加拉曲叶病毒	FN432356.2	3.43	429	0.02	0
甘薯乔治亚曲叶病毒	AF326775.1	3.29	408	0.02	0

2.2 PCR 鉴定

以 85 份样品的 cDNA 为模板, SPSMV-F/R、SPLCV-F/R 为引物分别进行 PCR 鉴定(图 1), 共检测出 21 份样品感染 *Begomovirus* 病毒, 片段大小约为 300 bp; 16 份感染 SPSMV1, 片段大小约为 400 bp, 回收产物测序结果与预期相符。

以测得感染 *Begomovirus* 病毒的 21 份样品的 cDNA 为模板, SPLCVCP-F/R 为引物扩增其 CP 基因, 均获得大小约为 1 300 bp 的片段, 与预期一致, 回收 PCR 产物测序, 结果通过 NCBI-BLAST 比对, 与 7 株不同株系的 SPLCV 同源性最高, 同源性为 97.12%~99.74%。鉴定该 21 份样品均感染 SPLCV。

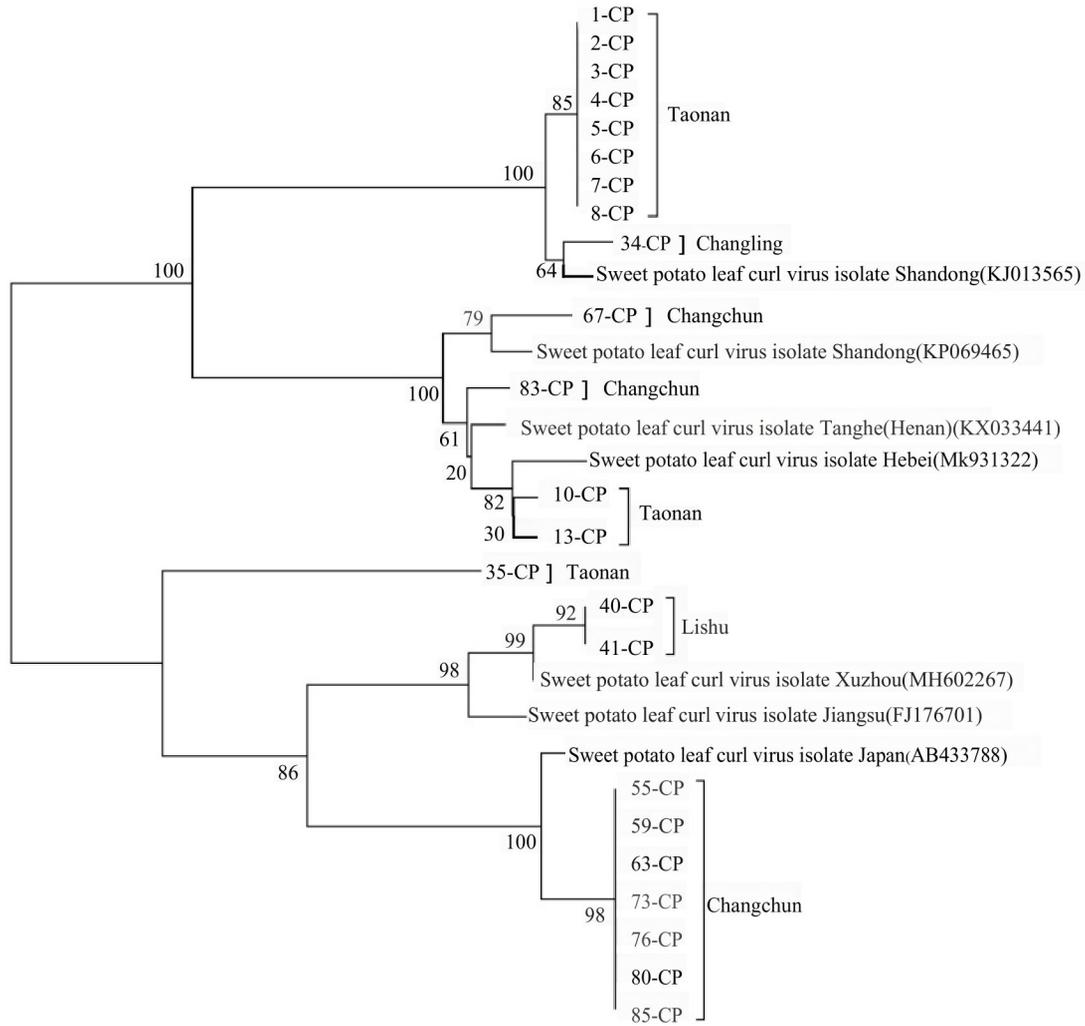


图3 SPLCV CP系统进化树分析

一大簇,与已报道的甘薯曲叶病毒徐州、江苏、日本分离物亲缘关系较近。

3 讨论与结论

双生病毒最早由 Bock 等^[5]于 1974 年在玉米条纹病株和甘蔗条纹病株上发现,1977 年 Harrison 等^[6]首次证实这类病毒是单链环状 DNA 病毒,具有孪生的颗粒体形态,正式命名为双生病毒。双生病毒科的病毒总数达 485 个^[3,7],是植物 DNA 病毒中数目最多的。根据基因组结构特征、寄主范围和传播介体等将其划分为 9 个属,分别为:菜豆金色花叶病毒属 (*Begomovirus*)、玉米线条病毒属 (*Mastrevirus*)、曲顶病毒属 (*Curtovirus*)、番茄伪曲顶病毒属 (*Topocuvirus*)、甜菜曲顶病毒属 (*Becurtovirus*)、芜菁曲顶病毒属 (*Turncurtovirus*)、画眉草病毒属 (*Eragrovirus*)、孔雀大戟潜隐病毒属 (*Capulavirus*) 和葡萄红斑病毒属 (*Grablovirus*)^[8]。这类病毒主要侵染寄主的韧皮部,主要由叶蝉、烟粉虱、蚜虫、角蝉等昆虫持久性传播^[9]。双生病毒最初

主要在热带和部分亚热带地区发生^[10],且寄主范围相对较小,并未引起人们重视,但随着经济全球化和近年来 B 型烟粉虱的爆发等原因,双生病毒的发生范围不断扩大,目前已经成为危害全球植物的主要病毒病害^[11-12]。目前已报道的能够侵染甘薯的双生病毒科病毒仅限于菜豆金色花叶病毒属和玉米线条病毒属的病毒^[13]。

菜豆金色花叶病毒属是双生病毒科中成员最多的属,截至 2020 年 5 月已确立了 424 个正式种。*Begomovirus* 病毒由烟粉虱或其同种昆虫传播侵染双子叶植物,染病植物通常表现为曲叶、花叶、黄化、金斑等症状。目前,侵染甘薯的 *Begomovirus* 包括 14 个正式种,分别为:甘薯曲叶病毒 Sweet potato leaf curl virus (SPLCV)、甘薯中国曲叶病毒 Sweet potato leaf curl China virus (SPLCCNV)、甘薯乔治亚曲叶病毒 Sweet potato leaf curl Georgia virus (SPLCGV)、甘薯加纳利曲叶病毒 Sweet potato leaf curl Canary virus (SPLCCV)、甘薯圣保罗曲叶病毒 Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus (SPLCSPV)、甘

薯南卡罗莱纳曲叶病毒 Sweet potato leaf curl South Carolina virus (SPLCSCV)、甘薯河南曲叶病毒 Sweet potato leaf curl Henan virus (SPLCHnV)、甘薯湖北曲叶病毒 Sweet potato leaf curl Hubei virus (SPLCHbV)、甘薯四川曲叶病毒 1 Sweet potato leaf curl Sichuan virus 1 (SPLCSiV1)、甘薯四川曲叶病毒 2 Sweet potato leaf curl Sichuan virus 2 (SPLC-SiV2)、甘薯广西曲叶病毒 Sweet potato leaf curl Guangxi virus (SPLCGxV)、甘薯山东曲叶病毒 Sweet potato leaf curl Shandong virus (SPLCSdV)、甘薯韩国金脉病毒 Sweet potato golden vein Korea virus (SPGVKRV) 和甘薯斑驳病毒 Sweet potato mosaic virus (SPMoV)^[7]。Begomovirus 病毒可根据其进化关系分为旧世界病毒和新世界病毒,旧世界病毒包括分布在亚洲、非洲、欧洲和澳洲的 Begomovirus 病毒,其中少数为双组分病毒,多数为单组分病毒,并伴随卫星分子;新世界病毒指分布在美洲的 Begomovirus 病毒,一般是双组分病毒。系统发育分析发现,侵染甘薯的双生病毒各个分离物聚成一簇,与旧世界病毒和新世界病毒分离开来,因此甘薯双生病毒又被称为“sweepoviruses”^[14]。

本研究共检测出 21 份样品感染 Begomovirus 病毒,其中 9 份来自洮南,1 份来自长岭,2 份来自梨树,9 份来自长春。通过扩增其 CP 基因,鉴定该 21 份样品均感染 SPLCV,与小 RNA 测序结果略有差异。从系统发育树看,来自相同地区同一品种的分离物大多聚集为一簇,具有较高的同源性。其中大部分的洮南分离物和长岭分离物与山东分离物(KJ013565)聚为一簇,梨树分离物与徐州分离物(MH602267)聚为一簇,以上地区同为北方春薯种植区,种植品种大致相同;长春的 9 份样品分别为来自日本、山东、河南 3 个不同地区的种质资源,检测到的甘薯曲叶病毒分离物与其对应地区分离到的病毒株系有较高的同源性,说明吉林省 SPLCV 来源为种薯带毒的可能性很大。

玉米线条病毒属中能够侵染甘薯的病毒目前已报道的只有甘薯无症状 1 号病毒 Sweet potato symptomless virus (SPSMV1)^[15],一般症状为叶片条斑,植株矮缩等。本研究共检测出 16 份样品感染 SPSMV1,其中 3 份来自长岭,其他 13 份均来自洮

南。获得的 SPSMV1 序列经 NCBI 比对,发现其与中国河南省、中国台湾省、美国、乌拉圭、肯尼亚、坦桑尼亚、秘鲁等地报道的分离物核酸序列相似性达到 99.44%,说明该病毒 CP 基因具有较高的保守性。

参考文献:

- [1] 崔 坤,王晓梅,宋丽润,等.甘薯的实用价值及在我国发展前景分析[J].东北农业科学,2007,32(3):63-65.
- [2] Xie Y P, Xing J Y, Li X Y, et al. Survey of sweetpotato viruses in China[J]. Acta Virologica, 2013, 57(1):81-84.
- [3] ICTV. ICTV-Master-Species-List-2019. v1[EB/OL]. <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/9601>.
- [4] Zhang S C, Ling K S. Genetic diversity of sweet potato begomoviruses in the United States and identification of a natural recombinant between Sweet potato leaf curl virus and Sweet potato leaf curl Georgia virus[J]. Archives of Virology, 2011, 156(6):955-968.
- [5] Bock K R, Guthrie E J, Woods R D, et al. Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak diseases of sugar cane and *Panicum maximum*[J]. Annals of Applied Biology, 1974, 77:289-296.
- [6] Hatrison B D, Barker H, Bock K R, et al. Plant virus with circular single-stranded DNA[J]. Nature, 1977, 270:760-762.
- [7] Zerbini F M, Bridson R W, Idris A, et al. ICTV virus taxonomy profiles: Geminiviridae[J]. Journal of General Virology, 2017, 98(2):131-133.
- [8] ICTV. ICTV Taxonomy history: Begomovirus[EB/OL]. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201903174.
- [9] 纠 敏,周雪平,刘树生.烟粉虱传播双生病毒研究进展[J].昆虫学报,2006,49(3):513-520.
- [10] 杨秀玲.中国番茄黄曲叶病毒抵御 RNA 沉默的机制和番茄黄曲叶病毒的分子变异研究[D].杭州:浙江大学,2011.
- [11] 刘起丽.中国甘薯双生病毒种类鉴定、分子变异及检测方法研究[D].北京:中国农业大学,2015.
- [12] Varma A, Malathi V G. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production[J]. Annals of Applied Biology, 2003, 142(2):145-164.
- [13] 刘起丽,张建新,李学成,等.侵染甘薯的 DNA 病毒研究进展[J].植物保护,2017,43(3):36-42.
- [14] Clark C A, Valverde R A, Fuentes S, et al. Research for improved management of sweetpotato pests and diseases: cultivar decline[J]. Acta Horticulturae, 2002, 583(11):103-112.
- [15] Clark C A, Davis J A, Abad J A, et al. Sweetpotato virus: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases[J]. Plant Disease, 2012, 96(2):168-185.

(责任编辑:范杰英)