

侵染大豆的花生斑驳病毒公主岭分离物 基因组测序及分析

张春雨¹, 李小宇¹, 王晨^{1,2}, 战笑蕾^{1,3}, 刘建青^{1,3}, 王永志^{1*}

(1. 吉林省农业科学院, 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 深度测序法在大豆叶片上检测到 1 株花生斑驳病毒 *Peanut mottle virus* (PeMoV), 根据小 RNA 深度测序结果和 GenBank 公布的 PeMoV 基因组序列设计引物克隆了 PeMoV 公主岭分离物 (PeMoV-Gongzhuling) 的基因组序列。测序结果经拼接后获得了 PeMoV-Gongzhuling 基因组, 大小为 9 709 个核苷酸 (GenBank 登录号: MT790744)。该基因组在第 123 位—第 9 422 位存在 1 个大的开放阅读框 (ORF), 编码 1 个多聚蛋白 (分子量 351.28 kD)。PeMoV-Gongzhuling 与 GenBank 中已登录的其他 PeMoV 分离物的基因组的核苷酸序列一致性为 95.88%~99.53%, 氨基酸序列一致性为 97.39%~99.84%, 其中与韩国分离物 GYBU-92 (MT603819) 在核苷酸和氨基酸水平上的一致性均为最高。

关键词 花生斑驳病毒; 基因组; 大豆

中图分类号: S435.29 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2020544

Sequencing and analysis of the genome of *Peanut mottle virus* (PeMoV) Gongzhuling isolate infecting soybean

ZHANG Chunyu¹, LI Xiaoyu¹, WANG Chen^{1,2}, ZHAN Xiaolei^{1,3}, LIU Jianqing^{1,3}, WANG Yongzhi^{1*}

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

Abstract In this study, the *Peanut mottle virus* (PeMoV) from soybean leaves was detected by small RNA deep sequencing. Primers were designed according to results of sRNA deep sequencing and the published genome sequences of PeMoV on GenBank, and the segments of genome of PeMoV Gongzhuling isolate (PeMoV-Gongzhuling) was amplified by RT-PCR. The assembled genome of PeMoV-Gongzhuling was 9 709 nucleotides (GenBank accession no. MT790744). A large open reading frame (ORF) was found located between the 123th and the 9422th nucleotides, which encoded a polypeptide of 351.28 kD. By comparing it with other isolates of PeMoV, the nucleotide identity was 95.88%–99.53%, and the amino acid identity was 97.39%–99.84%, and it shared the highest identity with the South Korea isolate GYBU-92 (MT603819).

Key words *Peanut mottle virus* (PeMoV); genome; soybean

花生斑驳病毒 *Peanut mottle virus* (PeMoV) 是马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus* 成员, 主要靠汁液接触、种子或由蚜虫以非持久方式传播。PeMoV 除严重危害花生外, 其寄主范围仅局限于豆科植物, 例如菜豆、大豆、豌豆、豇豆等^[1]。1972 年 Kuhn 等^[2]首次在美国佐治亚州发现 PeMoV 侵染大豆; 之后陆续在美国的弗吉尼亚州、南卡罗莱纳州, 澳大利亚, 东非等地发现 PeMoV 侵染大豆^[3-4]; 1984 年薛宝娣等^[5]首次报道了 PeMoV 在我国大豆上的

侵染情况, 并进行了 PeMoV 对不同品种大豆的侵染试验; 2014 年 Lim 等^[6]在韩国首次发现 PeMoV 侵染大豆并获得了全基因组序列。PeMoV 侵染大豆后叶片表现为明脉、花叶、黄脉、坏死等症状, 一般可导致大豆减产 12%~28%^[4], 一些感病品种可达到 41%, 还会导致大豆含油量降低, 品质下降^[3]。

本研究利用小 RNA 深度测序方法在感病大豆叶片上检测到 1 株花生斑驳病毒, 分段克隆测序获

收稿日期: 2020-10-16

修订日期: 2020-11-24

基金项目: 吉林省科技厅重点研发计划(20180201013NY); 吉林省农业科技创新工程(CXGC2021ZY022)

* 通信作者 E-mail: yzwang@126.com

得了全基因组序列并进行了同源性分析,为大豆花生斑驳病毒病的防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

感病大豆叶片采自吉林省长春市公主岭市(124°4'E,43°31'N),-80℃保存。

1.2 感病大豆叶片总 RNA 提取

参照 TRIzol(Invitrogen)说明书提取感病大豆叶片总 RNA,NanoDrop 微量核酸蛋白浓度测定仪(Thermo Scientific)测定浓度。

1.3 小 RNA 文库建立、测序及分析

样品总 RNA(2 个重复)质量由北京诺禾致源科技股份有限公司检测,质量合格后使用 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 对文库中插入片段的大小(insert size)进行检测,插入片段大小符合预期后使用 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/MiSeq 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 PCR 扩增、测序和序列分析

根据小 RNA 测序获得的拼接片段和 GenBank 中已报道的 PeMoV 分离物基因组序列,分段设计 4 组病毒引物(表 1),以大豆叶片总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL):2×SanTaq PCR Mix 25 μL,10 μmol/L 引物各 1 μL,模板 cDNA 1 μL,ddH₂O 22 μL。扩增条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1~4 min(根据目的片段大小调整时间),35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。扩增产物经 1%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。根据测序结果设计用于扩增 5′、3′非编码区的引物 PeMoV-R、PeMoV-F,采用 SMARTer RACE 5′/3′试剂盒(TaKaRa)扩增 5′、3′非编码区。利用 DNAMAN 软件拼接序列,使用 MEGA 7.0 软件进行进化分析,采用 neighbor-joining 法构建系统发育树。

表 1 用于花生斑驳病毒全基因组扩增的特异性引物

Table 1 Specific primers used for amplification of complete genome of Peanut mottle virus

编号 No.	引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	目的片段长度/bp Amplicon length
1	PeMoV-1s	AAACTCTCAATCACACATATACAAAAACG	4 380
	PeMoV-1a	CACCTTGCCCTTGACTTTGTGC	
2	PeMoV-2s	GACTAGTGGGTTTGCACTTC	2 679
	PeMoV-2a	GTAGTTTCTGTCCGATTTCGTG	
3	PeMoV-3s	GAGTCATATGGCAAAGAAAGACATG	2 219
	PeMoV-3a	CTTGTGAGCCTGTATCAACATC	
4	PeMoV-4s	CACGGAAGTAGATGAAGACG	922
	PeMoV-4a	TGAAGCACACAGTCTCAAGG	
5	PeMoV-R	CTGAAGGAGACTGTTTGTCC	605
6	PeMoV-F	CGTGAATCCACATGCAGATG	452

2 结果与分析

2.1 田间感病大豆植株症状

对公主岭大豆田进行病毒病调查时,发现 1 株染病大豆植株相对矮小,叶片褪绿、斑驳,叶肉呈泡状突起(图 1)。

2.2 大豆叶片 sRNA 深度测序分析

提取大豆叶片总 RNA,经 sRNA 测序共获得 18 822 100 个 reads,去除含有接头的、低质量的 reads,获得 clean reads 17 549 725 个。筛选 18~40 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(表 2)。其



图 1 田间染病大豆植株症状

Fig. 1 Symptoms of infected soybean in the field

中比对到花生斑驳病毒(PeMoV)的 reads 数占比对 到数据库的总 reads 数的 11.8%。

表 2 拼接序列与已报道病毒序列一致性及覆盖率分析

Table 2 Identity and coverage analysis between contigs and reported sequences of virus					
病毒信息 Virus description	病毒数据库 序列号 Accession no. of virus	平均覆 盖度 Average coverage	比对到该病毒 的 reads 数 Mapped sRNA	比对到该病毒的 reads 数占比对到 数据库的总 reads 数比率/% Mapped sRNA/total mapped sRNA	比对到该病毒 的 reads 数占总 reads 数比率/% Mapped sRNA/ total sRNA
大豆花叶病毒 <i>Soybean mosaic virus</i>	D00507.2	4 716.95	2 137 103	86.33	13.06
花生斑驳病毒 <i>Peanut mottle virus</i>	AF023848.1	640.75	292 137	11.80	1.79
夜来香花叶病毒 <i>Telosma mosaic virus</i>	DQ851493.1	37.6	17 280	0.70	0.11
黄瓜花叶病毒 <i>Cucumber mosaic virus</i>	D00356.1	103.31	15 701	0.63	0.10
辣椒褪绿斑点病毒 <i>Pepper chlorotic spot virus</i>	KX247379.1	6.13	2 459	0.10	0.02

2.3 PeMoV-Gongzhuling 基因组序列分析

根据小 RNA 测序获得的拼接片段和 GenBank 中已报道的 PeMoV 分离物基因组序列,设计引物进行分段扩增,获得与预期大小一致的片段,对回收产物进行测序。根据测序结果设计 5′、3′非编码区引物,采用 SMARTer RACE 5′/3′试剂盒扩增目的片段(图 2),回收产物测序。

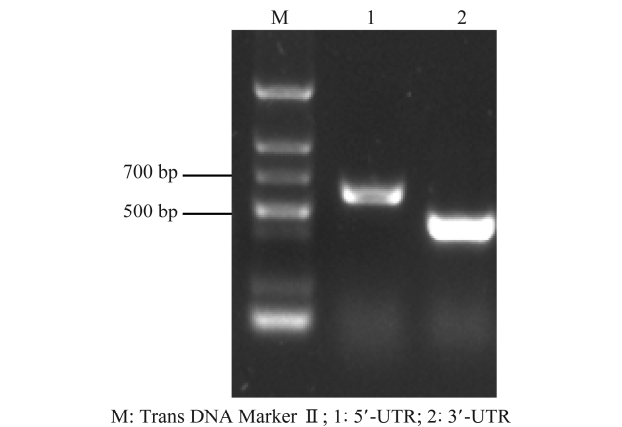


图 2 花生斑驳病毒 PeMoV-Gongzhuling 5′和 3′非编码区扩增产物

Fig. 2 PCR products of PeMoV-Gongzhuling 5′-UTR and 3′-UTR

对分段测序结果进行拼接、校正后,除 poly (A) 尾外,获得的 PeMoV-Gongzhuling 的基因组序列长 9 709 bp,提交到 GenBank 取得的登录号为 MT790744。序列中 A、T、C、G 4 种碱基的含量分别为 32.66%、25.18%、18.17%、23.99%, 5′-非编码区(5′-UTR)包含 122 个碱基,3′-非编码区(3′-UTR)包含 287 个碱基。PeMoV-Gongzhuling 在第 123 位-第 9422 位存在 1 个大的开放阅读框(ORF),编码 1 个由 3 099 个氨基酸组成的多聚蛋白(分子量 351.28 kD)。该多聚蛋白自身分解为 10 个成熟的蛋白质,从 N 端到 C 端依次为 P1(36.82 kD)、HC-Pro(51.29 kD)、P3(40.31 kD)、6K1(5.75 kD)、CI(70.91 kD)、6K2(6.08 kD)、NIa-Vpg(21.35 kD)、NIa-Pro(27.75 kD)、NIb(59.58 kD)和 CP(31.60 kD)。通过与其他 PeMoV 分离物的氨基酸序列比对,确定了多聚蛋白的 9 个切割位点,分别为 KIHQY/S、HYVVG/G、PVVYQ/A、TVRYQ/S、TVQYQ/S、PVKYQ/G、VVATE/G、SVEYQ/S、EVRVYQ/S(图 3)。

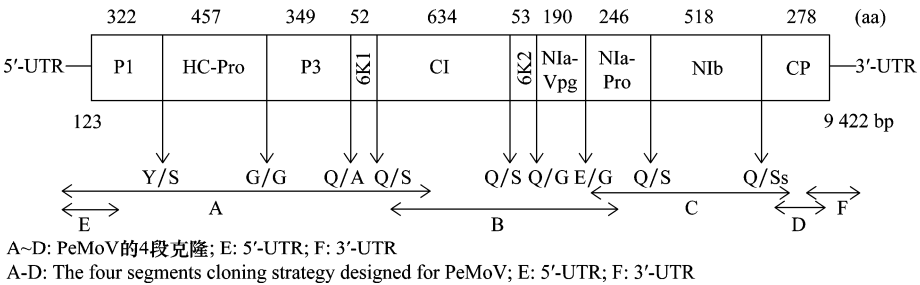


图 3 花生斑驳病毒公主岭分离物 PeMoV-Gongzhuling 的基因组结构及其克隆策略

Fig. 3 Organization of the genome of PeMoV-Gongzhuling and its cloning strategy

2.4 PeMoV-Gongzhuling 与 PeMoV 其他分离物的
同源性比较

利用 DNAMAN 软件将 PeMoV-Gongzhuling 全基因组序列与 GenBank 中已公布的其他 PeMoV 分离物基因组进行序列一致性分析,发现 PeMoV-Gongzhuling 与它们在核苷酸水平上的一致性为 95.88%~99.53%,在氨基酸水平上的一致性为 97.39%~99.84%,其中与韩国分离物 GYBU-92 (MT603819)的同源性在该两种水平上均为最高。在单个基因区段上,HC-Pro、NIa-Pro、CP 基因的序

列一致性多数高于全基因组序列一致性的平均值,变异程度较低(表 3)。

以马铃薯 Y 病毒 *Potato virus Y* (PVY)为外组生物构建系统发育树,所有分离物聚成 3 个簇群,其中哥伦比亚分离物 PeMoV-pintoi (KU708532)单独成为 1 簇,美国分离物 PeMoV-M (AF023848)、墨西哥分离物 PeMoV-INIFAP SJ8-5 (MG640414)、巴西分离物 PeMoV (KY350138)聚成 1 簇,其余分离物聚成 1 簇。PeMoV-Gongzhuling 与 PeMoV-GYBU-92 (MT603819)的亲缘关系最近(99.53%) (图 4)。

表 3 花生斑驳病毒公主岭分离物 PeMoV-Gongzhuling 与 GenBank 中其他 PeMoV 分离物全基因组核苷酸/氨基酸序列一致性分析

Table 3 Consistency analysis of nucleotide/amino acid sequences of the whole genomes between
PeMoV-Gongzhuling and other PeMoV isolates from GenBank

分离物 Isolate	登录号 Accession no.	地区 Country	寄主 Host	核苷酸/氨基酸序列一致性/% Nucleotide/Amino acid sequence identity					
				基因组/氨基酸 Genome/ Amino acid		5'-UTR	P1	HC-Pro	P3
PeMoV-GYBU-92	MT603819	韩国	大豆	99.53/99.84	97.54	99.48/99.69	99.71/100.00	99.43/99.43	99.36/100.00
PeMoV-Liaoning	MH270528	中国	花生	99.52/99.68	97.54	99.59/99.69	99.12/99.56	99.52/99.14	99.36/100.00
PeMoV-GAWO-p	MT603816	韩国	大豆	99.33/99.74	96.72	99.38/99.69	99.20/99.56	99.14/98.85	100.00/100.00
PeMoV-Daegu	MT603852	韩国	大豆	99.25/99.58	95.08	99.07/99.07	99.27/99.56	99.14/98.85	99.36/100.00
PeMoV-GYBU-p	MT603818	韩国	大豆	99.27/99.65	97.39	99.17/99.69	99.05/99.34	98.95/98.85	98.72/100.00
PeMoV-Habin	KF977830	韩国	大豆	99.15/99.42	96.72	99.17/99.38	99.20/99.56	98.66/98.57	100.00/100.00
PeMoV-JEBU-p	MT603817	韩国	大豆	99.15/99.61	94.87	99.17/99.38	99.20/99.56	98.76/99.14	98.72/100.00
PeMoV-GC	LC260649	韩国	赤豆	99.06/99.32	95.90	99.28/99.69	99.12/99.34	98.57/98.57	98.72/98.08
PeMoV-CHBU-p	MT603815	韩国	大豆	99.34/99.68	—	99.17/100.00	99.20/100.00	99.04/98.57	99.36/100.00
PeMoV-Para	MK396065	巴西	花生	99.06/99.26	94.78	98.86/99.07	99.12/99.56	98.85/97.99	98.72/98.08
PeMoV partial genome	KY350138	巴西	花生	97.69/99.03	91.01	96.69/96.89	97.52/99.34	97.71/98.57	96.79/100.00
PeMoV-INIFAP SJ8-5	MG640414	墨西哥	—	97.16/98.55	93.44	96.89/96.58	97.59/99.12	97.13/98.57	96.79/100.00
PeMoV-M	AF023848	美国	—	97.13/98.23	94.26	97.00/95.96	97.74/98.91	97.52/96.85	98.08/100.00
PeMoV-pintoi	KU708532	哥伦比亚	花生	95.88/97.39	—	90.80/90.37	96.13/96.94	97.33/96.85	96.79/98.08
PeMoV-KALRO2-23	LC433738	肯尼亚	花生	98.18/—	77.78	96.36/—	97.13/—	96.27/—	98.08/—

分离物 Isolate	核苷酸/氨基酸序列一致性/% Nucleotide/Amino acid sequence identity						
	CI	6K2	NIa-Vpg	NIa-Pro	NIb	CP	3'-UTR
PeMoV-GYBU-92	99.42/99.84	99.37/98.11	99.65/100.00	99.73/100.00	99.42/100.00	99.76/100.00	100.00
PeMoV-Liaoning	99.53/99.84	99.37/98.11	99.82/100.00	99.73/100.00	99.49/99.61	99.88/100.00	100.00
PeMoV-GAWO-p	99.37/99.84	100.00/100.00	99.30/100.00	99.73/100.00	99.36/100.00	99.40/100.00	99.30
PeMoV-Daegu	99.32/99.84	99.37/98.11	99.65/100.00	99.59/99.59	99.23/100.00	99.16/99.64	100.00
PeMoV-GYBU-p	99.42/99.84	98.74/98.11	99.65/99.47	99.73/100.00	99.42/100.00	99.04/100.00	100.00
PeMoV-Habin	99.32/99.84	100.00/100.00	99.12/98.95	99.46/99.59	98.97/99.23	99.16/99.64	99.66
PeMoV-JEBU-p	99.32/99.84	99.37/98.11	99.47/99.47	99.73/100.00	98.97/99.61	99.16/100.00	100.00
PeMoV-GC	99.21/99.37	99.37/98.11	99.47/100.00	99.46/100.00	98.78/99.03	99.28/100.00	99.31
PeMoV-CHBU-p	99.37/99.68	98.74/98.11	99.65/99.47	99.59/99.59	99.42/100.00	99.52/100.00	99.65
PeMoV-Para	99.16/99.53	99.37/98.11	99.12/98.95	99.32/99.59	99.16/100.00	99.16/98.92	99.63
PeMoV partial genome	97.74/99.37	98.11/98.11	96.84/99.47	98.24/99.19	98.20/99.42	98.80/99.64	98.71
PeMoV-INIFAP SJ8-5	98.00/99.53	98.11/96.23	96.67/97.89	97.29/98.37	96.07/98.26	97.96/98.92	96.19
PeMoV-M	97.63/99.21	98.11/98.11	96.84/98.42	97.15/98.78	96.07/98.26	97.24/98.20	96.21
PeMoV-pintoi	96.84/99.53	94.97/96.23	97.37/98.42	97.02/98.78	96.14/98.46	96.76/98.20	96.19
PeMoV-KALRO2-23	96.16/—	87.29/—	94.96/—	98.78/—	99.49/93.24	96.50/100.00	91.35

1) “—”表示 GenBank 上未登录该序列。
“—”means the sequence is not registered on GenBank.

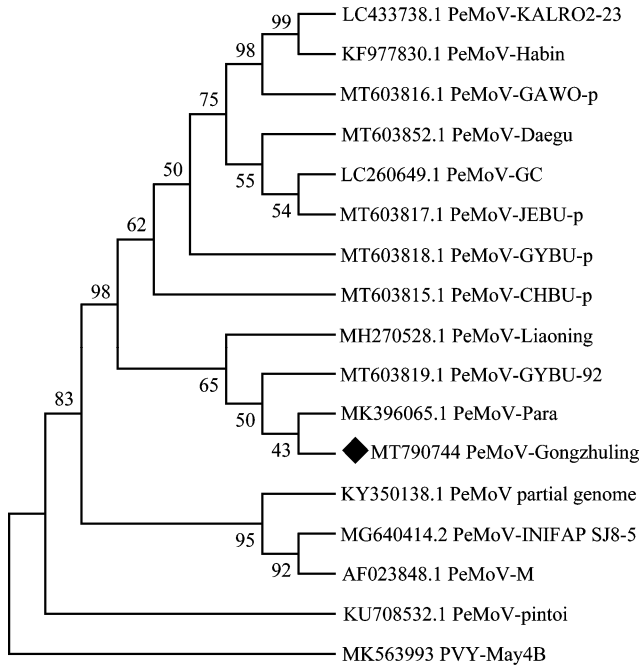


图 4 基于全基因组序列的花生斑驳病毒公主岭分离物 PeMoV-Gongzhuling 与其他分离物的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of PeMoV-Gongzhuling with other reported isolates based on complete genome

3 讨论

PeMoV 侵染大豆的情况已陆续在世界各地报道,在我国各地也普遍发生,目前 GenBank 上已报道的 PeMoV 大豆分离物全基因组序列均来自韩国。本研究首次在吉林公主岭大豆上克隆得到了 PeMoV-Gongzhuling 的全基因组序列,对其进行一致性分析发现,PeMoV-Gongzhuling 与侵染大豆的韩国分离物 GYBU-92 (MT603819) 一致性最高 (99.53%), 其次是侵染花生的辽宁分离物 (MH270528) (99.52%)。对 PeMoV-Gongzhuling 的基因产物比对发现,P1、P3、CI、Nla-Vpg、Nla-Pro、Nlb 和 CP 在核苷酸水平均与辽宁分离物 (MH270528) 一致性最高,HC-Pro 与韩国分离物 GYBU-92 (MT603819) 一致性最高,而 6K1 和 6K2 与侵染大豆的韩国分离物 PeMoV-GAWO-p (MT603816) 和 PeMoV-Habin (KF977830) 一致性最高。

吉林省作为国家粮食主产区之一,大豆、花生、杂粮杂豆等种植面积广泛,近年来随着花生种植效益优势日益凸显,吉林省花生种植面积由 2000 年的不足 6 万 hm^2 到 2017 年统计的 27 万 hm^2 左右,增长了近 5 倍^[7],2018 年达到 33 万 hm^2 左右,超过同期大豆的种植面积。PeMoV 是侵染花生及豆科植物的重要病害,尤其在花生和大豆毗邻种植区,更易造成病毒病

大面积暴发,严重影响花生、大豆的产量及种质资源。目前吉林省 PeMoV 侵染大豆的情况还未见报道,田间也未见大面积发病,更应予以重视,及时防控。

本研究为后续研究 PeMoV 基因组结构和功能,基因进化机制以及病毒与寄主的互作等研究提供了理论基础,同时对大豆的 PeMoV 检测、防控以及抗病育种等工作具有重要意义。

参考文献

[1] 蒲绪志. 花生斑驳病毒病的发生与防治[J]. 农业灾害研究, 2018, 8(4): 78 - 79.

[2] KUHN C W, DEMSKI J W, HARRIS H B. *Peanut mottle virus* in soybeans [J]. Plant Disease Reporter, 1972, 56: 146 - 147.

[3] BOERMA H R, KUHN C W. Inheritance of resistance to *Peanut mottle virus* in soybeans [J]. Crop Science, 1976, 16 (4): 533 - 534.

[4] DEMSKI J W, KUHN C W. A soybean disease caused by *Peanut mottle virus* [J]. Research Bulletin Georgia Agricultural Experiment Stations, 1977, 196: 36.

[5] 薛宝娣, 陈永莹, 施志新. 大豆上发生的花生斑驳病毒[J]. 中国油料作物学报, 1987, 9(2): 38 - 40.

[6] LIM S, LEE Y H, IGORI D, et al. First report of *Peanut mottle virus* infecting soybean in South Korea [J]. Plant Disease, 2014, 98(9): 1285.

[7] 牛海龙, 李玉发, 何中国, 等. 吉林省花生产业发展需求报告 [J]. 东北农业科学, 2019, 44(3): 11 - 13.

(责任编辑: 杨明丽)