

利用小 RNA 测序技术鉴定吉林省甘薯病毒

张春雨, 李小宇, 刘峰, 王永志*

(吉林省农业科学院, 公主岭 136100)

摘要 在吉林省 7 个主要甘薯种植区共采集 85 份甘薯叶片样品, 利用小 RNA 深度测序技术对混合样品进行检测, 经 RT-PCR 和测序验证, 鉴定出样品中存在 10 种病毒, 包括 6 种 RNA 病毒和 4 种 DNA 病毒。分别是马铃薯 Y 病毒科马铃薯 Y 病毒属的甘薯羽状斑驳病毒 *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV)、甘薯潜隐病毒 *Sweet potato latent virus* (SPLV)、甘薯 G 病毒 *Sweet potato virus G* (SPVG)、甘薯 C 病毒 *Sweet potato virus C* (SPVC)、甘薯 2 号病毒 *Sweet potato virus 2* (SPV2); 长线形病毒科毛形病毒属的甘薯褪绿矮化病毒 *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV); 双生病毒科菜豆金色花叶病毒属的甘薯曲叶病毒 *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV); 玉米线条病毒属的甘薯无症状 1 号病毒 *Sweet potato symptomless virus 1* (SPSMV1); 花椰菜花叶病毒科杆状 DNA 病毒属的甘薯杆状 DNA 病毒 B *Sweet potato badnavirus B* (SPBV-B) 和甘薯隐症病毒 *Sweet potato pakakuy virus* (SPPV)。

关键词 甘薯病毒; 小 RNA 深度测序; 吉林

中图分类号: S 435.311 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2020090

Identification of viruses in sweet potato samples collected from Jilin province by small RNA sequencing

ZHANG Chunyu, LI Xiaoyu, LIU Feng, WANG Yongzhi*

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract 85 samples of sweet potato leaf were collected from seven main sweet potato areas in Jilin province. Ten species of sweet potato virus were identified, including six RNA viruses and four DNA viruses, by using small RNA deep sequencing, RT-PCR and sequencing. The 10 viruses were *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato latent virus* (SPLV), *Sweet potato virus G* (SPVG), *Sweet potato virus C* (SPVC) and *Sweet potato virus 2* (SPV2) in genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*; *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) in genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*; *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) in genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*; *Sweet potato symptomless virus 1* (SPSMV1) in genus *Mastrevirus*, family *Geminiviridae*; *Sweet potato badnavirus B* (SPBV-B) and *Sweet potato pakakuy virus* (SPPV) in genus *Badnavirus*, family *Caulimoviridae*.

Key words sweet potato viruses; small RNA deep sequencing; Jilin

甘薯 *Ipomoea batatas* (L.) Lam., 旋花科甘薯属, 是我国重要的粮食作物和经济作物。甘薯在吉林省广泛种植, 主产区在中部和西部, 由于种植区特殊的地理气候特点, 甘薯生长期昼夜温差大, 品质高, 口味佳, 深受老百姓喜爱, 是重要的经济作物, 种植面积逐年增加。甘薯为无性繁殖作物, 病毒病危害严重, 造成产量质量受损, 种质退化等。目前, 全

世界已鉴定出能够侵染甘薯的病毒共 32 种, 分属于 9 个科^[1-2]。在我国已发现侵染甘薯的病毒至少达 15 种^[2-4], 报道最多的是甘薯羽状斑驳病毒 *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV)、甘薯褪绿矮化病毒 *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) 和双生病毒科的甘薯曲叶病毒 *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) 等。近年来调查发现

吉林省甘薯病毒病害日趋严重,但相关报道几乎没有。本研究对吉林省主要甘薯种植区进行采样调查,利用小 RNA 深度测序和 RT-PCR 对样品进行鉴定,对病毒种类进行初步了解,为今后甘薯病毒病的防控和脱毒育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

调查吉林省甘薯主要种植区松原市长岭县、乾安县,白城市洮南市,长春市,辽源市,白山市抚松县,四平市梨树县等 7 个地区的大田和苗地病毒病发生情况,采集甘薯病毒病显症叶片及无症状(健康)叶片样品共 85 份,−80℃冰箱保存。

1.2 总 RNA 提取

采集的甘薯叶片混合样品参照 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 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/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 RT-PCR 验证

根据小 RNA 测序获得的结果,设计病毒引物(表 1),以反转录合成的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。50 μL PCR 反应体系:2×SanTaq PCR Mix 25 μL,引物各 2 μL,模板 cDNA 0.5 μL,ddH₂O 20.5 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 min,35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃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。

表 1 甘薯病毒 RT-PCR 特异性引物
Table 1 Specific primers for identification of sweet potato viruses by RT-PCR

编号 No.	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	目的片段长度/bp Amplified fragment length
1	SPFMV-F	TCCACCACCCACAATAAC	601
	SPFMV-R	ACGGTTTCGCATYTCTAT	
2	SPSMV-F	AAGGTGGAGGCGTGGGATAAT	389
	SPSMV-R	CTCGCATAGAAAGCCTTATC	
3	SPLV-F	GTCCATCAGATAAGG	742
	SPLV-R	GTCCACATCTGTTGC	
4	SPVG-F	TCTGCTGAAGAGATATACGATGC	960
	SPVG-R	CTGCACACCCCTCATACCCAAG	
5	SPVC-F	GCACCAGAAATCACAG	714
	SPVC-R	GTGTGCTTCTTTAGCACG	
6	SPV2-F	CCAACAGATCCACCACCT	790
	SPV2-R	CAAACCAAACAGGCGATTC	
7	SPCSV-F	CGTCTTATGACTGAGAGT	478
	SPCSV-R	ACCACTRGTTAACTCCAT	
8	SPLCV-F	TTCCCTGTGCGTGAATCCAT	300
	SPLCV-R	GAATTCCCACTATCTTCCTCTGC	
9	SPBV-F	AGCAGAGGTGTACGAACCCTAC	273
	SPBV-R	GACCATCCCAGTCCAAGACTTC	
10	SPPV-F	GCAGCAGTCACAGAAGT	548
	SPPV-R	GTTACGTTGGGGATGATA	

2 结果与分析

采集的甘薯混合叶片提取的总 RNA 浓度为 1 459 ng/μL,对其进行质量分析,符合建库要求。样本共获得 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,其长度分布见图 1。由于病毒感染的植物,富集的viral sRNAs 长度主要是 3 个 class,21 nt(15.91%),22 nt(23.69%)和 24 nt(24.36%),因此筛选 18~26 nt 的 sRNA 进行后续分析。

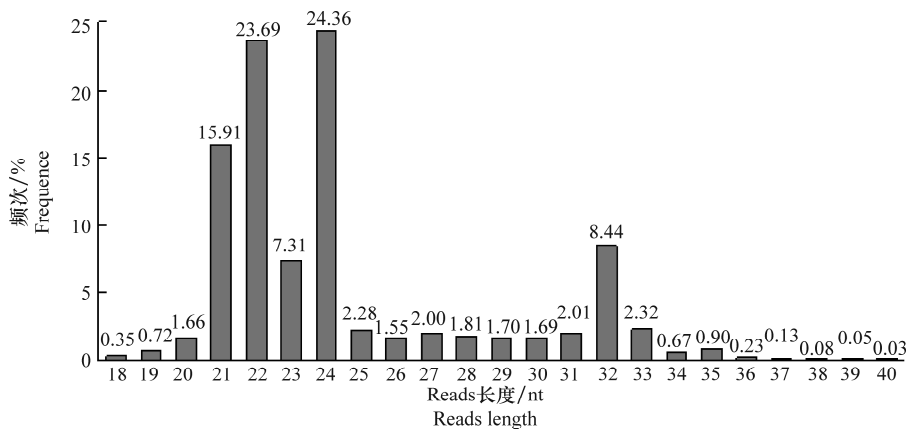


图 1 甘薯叶片样品小 RNA 测序的 reads 长度分布

Fig. 1 Length distribution of clean reads in sweet potato samples by small RNA sequencing

用 bowtie 将数据过滤后的 sRNA 与 GenBank Virus RefSeq 核酸数据库进行比对,初步鉴定样品感染病毒的 list,其中能比对到参考序列的 reads 数占总 reads 数的 4.06%。通过 PFOR 和 velvet 拼接,获得 6 082 个 contigs,长度分布见图 2。将拼接所得的 contigs 进行分类注释,其中与已知的甘薯病毒相关的有 11 种,见表 2。

为验证 sRNA 注释结果的可靠性,根据拼接序列设计了 10 种病毒的特异性引物,其中甘薯上海曲叶病毒 Sweet potato leaf curl Shanghai virus(SPLCShV)和甘薯加纳利曲叶病毒 Sweet potato leaf curl Canary virus(SPLCCV)同为菜豆金色花叶病毒属 Begomovirus 成员,因此设计了一对该属的通用引物。以反转录获得的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 检测,均扩增出与预期大小一致的片段(图 3)。

其中甘薯褪绿矮化病毒 Sweet potato chlorotic stunt virus SPCSV 条带较弱,将回收的 PCR 产物测序,结果通过 NCBI 进行 BLASTn 分析,扩增片段均符合目的病毒序列,表明深度测序结果准确。

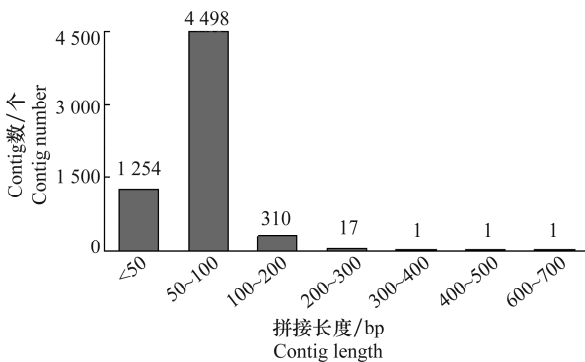


图 2 拼接所得 contigs 长度分布图

Fig. 2 Length distribution diagram of the matching contigs

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 BLAST analysis of contigs with reference from NCBI

病毒名称 Virus name	病毒数据库 序列号 Virus identity	病毒长度/bp Virus length	平均覆盖度 Average coverage	比对到该 病毒的 sRNA 数 Mapped sRNA	比对到该病毒的 sRNA 数占比对 到病毒数据库的 总 sRNA 数/% Mapped sRNA/ total mapped sRNA	比对到该病毒的 sRNA 数占 总 sRNA 数/% Mapped sRNA/ total sRNA
甘薯 G 病毒 <i>Sweet potato virus G</i>	JQ824374.1	10 798	132	64 462	27.63	1.12
甘薯 2 号病毒 <i>Sweet potato virus 2</i>	JN613807.1	10 731	102.4	50 237	21.53	0.88
甘薯羽状斑驳病毒 <i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	D86371.1	10 820	67.09	33 194	14.23	0.58
甘薯杆状 DNA 病毒 B <i>Sweet potato badnavirus B</i>	FJ560944.1	7 961	36.2	13 080	5.61	0.23
甘薯 C 病毒 <i>Sweet potato virus C</i>	GU207957.1	10 820	22.45	11 044	4.73	0.19

续表 2 Table 2(Continued)

病毒名称 Virus name	病毒数据库 序列号 Virus identity	病毒长度/bp Virus length	平均覆盖度 Average coverage	比对到该 病毒的 sRNA 数 Mapped sRNA	比对到该病毒的 sRNA 数占比 到病毒数据库的 总 sRNA 数/% Mapped sRNA/ total mapped sRNA	比对到该病毒的 sRNA 数占 总 sRNA 数/% Mapped sRNA/ total sRNA
甘薯无症状 1 号病毒 <i>Sweet potato symptomless virus 1</i>	KY565237. 1	2 886	41. 77	5 401	2. 32	0. 09
甘薯隐症病毒 <i>Sweet potato pakakuy virus</i>	FJ560943. 2	8 082	11. 86	4 359	1. 87	0. 08
甘薯潜隐病毒 <i>Sweet potato latent virus</i>	KC443039. 1	10 081	4. 68	2 166	0. 93	0. 04
甘薯上海曲叶病毒 <i>Sweet potato leaf curl Shanghai virus</i>	KF040467. 1	2 834	4. 37	524	0. 22	0. 01
甘薯加纳利曲叶病毒 <i>Sweet potato leaf curl Canary virus</i>	KU992909. 1	2 837	3. 51	429	0. 18	0. 01
甘薯褪绿矮化病毒 <i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i>	AJ428554. 1	9 407	0. 90	381	0. 16	0. 01

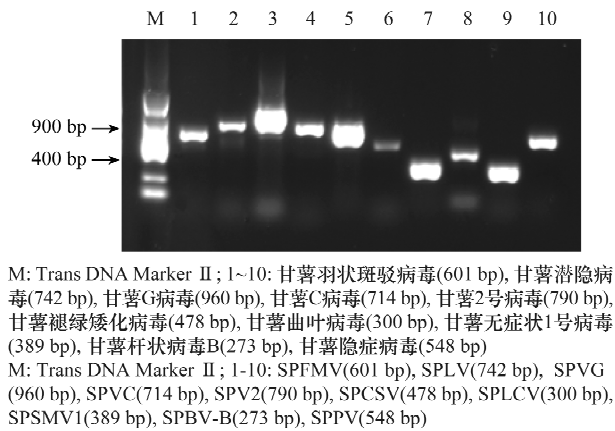


图 3 10 种甘薯病毒 PCR 产物

Fig. 3 PCR result of 10 species of sweet potato virus

3 讨论

本研究利用小 RNA 测序技术,从采集的甘薯叶片混合样本 cDNA 文库中检测到 SPFMV、SPLV、SPVG、SPVC、SPV2、SPCSV、SPLCShV、SPLCCV、SPSMV1、SPBV-B、SPPV 等共 11 种病毒,并应用 RT-PCR 进行了验证。

其中 SPFMV、SPLV、SPVG、SPVC、SPV2 为马铃薯 Y 病毒科 *Potyviridae* 马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus* 成员。SPFMV 是近年来报道侵染甘薯的病毒中分布最广泛,危害最大的病毒,被其单独侵染

的植株多数不表现症状或叶片呈轻度斑驳。SPFMV 通常与线性病毒科 *Closteroviridae* 毛形病毒属 *Crinivirus* 的 SPCSV 共同侵染,产生的病害简称甘薯病毒病害 sweet potato virus diseases (SPVD)^[5]。SPVD 造成植株丛生矮化,叶片变小,扭曲畸形,叶绿素含量降低,严重时造成 70% 以上的减产,甚至绝收,其发生症状与病毒积累量有一定关系,潜伏期可长达 3 年^[6]。

SPLCV 为双生病毒科 *Geminiviridae* 菜豆金色花叶病毒属 *Begomovirus* 成员。田间被 SPLCV 侵染的植株并不常表现典型的曲叶症状,或者表现症状维持的时间很短^[7],但会对某些品种的甘薯造成严重的产量损失。例如 Clark 等^[8],Ling 等^[9]发现 SPLCV 侵染甘薯品种‘Beauregard’虽不表现典型的曲叶症状,却导致甘薯产量损失 26% 及 63%。目前,侵染甘薯的 *Begomovirus* 病毒共分为 13 个正式种,本研究中小 RNA 深度测序比对到的 *Begomovirus* 病毒有 2 种,分别为 SPLCShV 和 SPLCCV,其中 SPLCShV 为暂定种。设计了一对该属病毒的通用引物,对 RT-PCR 获得的片段测序分析,鉴定为甘薯曲叶病毒 *Sweet potato leaf curl virus*。在后续试验中,会进一步对单个样品感染的 *Begomovirus* 病毒进行序列分析鉴定。

SPBV-B 和 SPPV 为花椰菜花叶病毒科 *Caulimoviridae* 杆状病毒属 *Badnavirus* 成员,其中 SPBV-B 为暂定种。

本文首次对吉林省的甘薯病毒病进行了初步普查,利用小 RNA 深度测序方法鉴定出分属 4 个科的 10 种病毒,为甘薯脱毒繁育提供了重要的理论依据。

参考文献

- [1] CLARK A, DAVIS J A, ABAD J A, et al. Sweet potato viruses: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(2): 168–185.
- [2] 乔奇, 张振臣, 张德胜, 等. 中国甘薯病毒种类的血清学和分子检测[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(1): 10–16.
- [3] WANG Qingmei, ZHANG Liming, WANG Biao, et al. Sweetpotato viruses in China [J]. *Crop Protection*, 2010, 29(2): 110–114.

- [4] 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.
- [5] 张振臣, 乔奇, 秦艳红, 等. 我国发现由甘薯褪绿矮化病毒和甘薯羽状斑驳病毒协生共侵染引起的甘薯病毒病害[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(3): 328–333.
- [6] 刘新亮, 阜阳市甘薯复合病毒病(SPVD)现状与预防措施[J]. *农业灾害研究*, 2019, 9(4): 18–19.
- [7] VALVERDE R A, CLARK C A, VALKONEN J P T. Viruses and virus disease complexes of sweetpotato [J]. *Plant Viruses*, 2007, 1(1): 116–126.
- [8] CLARK C A, HOY M W. Effects of common viruses on yield and quality of Beauregard sweetpotato in Louisiana [J]. *Plant Disease*, 2006, 90(1): 83–88.
- [9] LING Kaishu, JACKSON D M, HARRISON H, et al. Field evaluation of yield effects on the U. S. A. heirloom sweetpotato cultivars infected by *Sweet potato leaf curl virus* [J]. *Crop Protection*, 2010, 29(7): 757–765.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 159 页)

- [17] YU Junjie, SUN Wenxian, YU Mina, et al. Characterization of mating-type loci in rice false smut fungus *Villosiclava virens* [J]. *FEWS Microbiology Letters*, 2015, 362(9): 1–9.
- [18] FU Rongtao, YIN Chuanchun. Mating type loci analysis indicates that *Villosiclava virens*, the casual agent of false smut disease of rice, is a homothallic fungus [J]. *Tropical Plant Pathology*, 2014, 39(3): 203–209.
- [19] REDONDO C, CUBERO J, MELGAREJO P. Characterization of *Penicillium* species by ribosomal DNA sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR analysis [J]. *Mycopathologia*, 2009, 168(1): 11–22.
- [20] VICENTE J G, ROBERTS S J. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 117(4): 383–392.
- [21] 贾切. 稻曲病菌接种、群体遗传结构及致病力分化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [22] 张荣胜, 陈志谊, 刘永峰. 水稻细菌性条斑病菌遗传多样性和致病型分化研究[J]. *中国水稻科学*, 2011, 25(5): 523–528.

- [23] 李燕, 刘永峰, 张荣胜, 等. 江苏省稻曲病菌的群体遗传结构 [J]. *江苏农业学报*, 2011, 28(2): 296–301.
- [24] 王疏, 白元俊, 周永力, 等. 稻曲病菌的病原学 [J]. *植物病理学报*, 1998, 28(1): 19–24.
- [25] 高新华. 蛹虫草(*Cordyceps militaris*)的交配型研究 [J]. *食用菌学报*, 2008, 15(1): 1–5.
- [26] ZHANG Yong, ZHANG Kang, FANG Anfei, et al. Specific adaptation of *Ustilaginoidea virens* in occupying host florets revealed by comparative and functional genomics [J/OL]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3849. DOI: 10.1038/ncomms4849.
- [27] 于俊杰, 尹小乐, 陈志谊, 等. 稻曲菌交配型初探 [J]. *植物病理学报*, 2012, 42(6): 561–568.
- [28] 王疏. 稻曲病菌生物学特性与发生规律[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 1997.
- [29] CASSELTON L A. Mate recognition in fungi [J]. *Heredity*, 2002, 88(2): 142–147.

(责任编辑: 杨明丽)