

蚕豆萎蔫病毒 2 号安徽分离物全基因组序列测定与分析

严丹侃¹, 郑红英², 张海珊¹, 沈艳¹, 顾江涛¹, 章东方^{1*}, 燕飞^{2*}

(1. 安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 合肥 230031;

2. 浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所, 杭州 310021)

摘要 利用酶联免疫和 RT-PCR 技术对采自安徽地区的蚕豆病株进行检测, 确定其病原为蚕豆萎蔫病毒 2 号 *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2)。为明确 BBWV2 安徽分离物 (BBWV2-AH) 的分类地位, 克隆了该分离物的全基因组序列, 分析了其基因组特征。结果表明, BBWV2-AH RNA1 全长为 5 944 bp (GenBank 登录号: KY606992), 含有 1 个 ORF; BBWV2-AH RNA2 全长 3 587 bp (GenBank 登录号: KY606993), 含有 1 个 ORF。全序列核苷酸和氨基酸相似性分析显示, BBWV2-AH RNA1 与 BBWV2 其他分离物的核苷酸、氨基酸相似性分别为 78.4%~96% 和 87.1%~99%; BBWV2-AH RNA2 与 BBWV2 其他分离物的核苷酸、氨基酸相似性分别为 76.8%~95.5% 和 88.2%~98.3%。全基因组核苷酸序列系统发育分析显示, BBWV2-AH RNA1 与中国的 BBWV2-Hunan RNA1 的亲缘关系最近, 而 BBWV2-AH RNA2 与韩国的多个分离物聚集在一起, 再与中国的分离物 BBWV2-B935 形成一个分支。

关键词 蚕豆萎蔫病毒 2 号; 安徽分离物; 基因组; 序列分析

中图分类号: S 435.23 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017158

Identification and analysis of complete genomic sequence of *Broad bean wilt virus 2* Anhui isolate

YAN Dankan¹, ZHENG Hongying², ZHANG Haishan¹, SHEN Yan¹,

GU Jiangtao¹, ZHANG Dongfang¹, YAN Fei²

(1. *Institute of Plant Protection and Agro-Products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China;*

2. *Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China*)

Abstract BBWV2 was detected from broad bean plants in Anhui Province by DAS-ELISA and RT-PCR. To further characterize the BBWV2 Anhui isolate (BBWV2-AH), complete nucleotide sequence of BBWV2-AH was determined. Sequence analysis suggested that BBWV2-AH RNA1 was comprised of 5 944 nucleotides, encoding one ORF (GenBank accession no. KY606992); BBWV2-AH RNA2 was comprised of 3 587 nucleotides, also encoding one ORF (GenBank accession no. KY606993). The comparison of nucleotide sequences suggested that RNA1 and RNA2 of BBWV2-AH shared 78.4%–96% and 76.8%–95.5% nucleotide sequence identity with those of other BBWV2 isolates, respectively. Furthermore, the comparison of amino acid sequences suggested that RNA1 and RNA2 of BBWV2-AH shared 87.1%–99% and 88.2%–98.3% amino acid sequence identity with those of other BBWV2 isolates, respectively. Phylogenetic analysis based on nucleotide sequences showed that RNA1 of BBWV2-AH isolate was most closely related to BBWV2-Hunan isolate, while RNA2 of BBWV2-AH formed an independent branch with several Korean isolates, and was then closely related to BBWV2-B935 from China.

Key words *Broad bean wilt virus 2*; Anhui isolate; complete genome; sequence analysis

蚕豆是我国重要的经济作物, 据 FAO 统计, 我国 2014 年蚕豆收获面积为 92.5 万 hm², 总产量为 159.5 万 t, 是世界蚕豆生产第一大国, 产量占世界蚕豆总产量的 36.7%^[1]。蚕豆萎蔫病毒 *Broad*

收稿日期: 2017-05-02 修订日期: 2017-06-12

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303028); 安徽省农业科学院学科建设项目(17A1125); 安徽省蔬菜产业技术体系

* 通信作者 E-mail: dfzhang2002@163.com; fei.yan@mail.zaas.ac.cn

bean wilt virus (BBWV) 是危害蚕豆的主要病毒, 该病毒为豇豆花叶病毒科 *Comoviridae* 蚕豆病毒属 *Fabavirus* 的典型种, 其基因组由 2 条单链 RNA 分子组成, 分别是 6.0 kb 的 RNA1 和 3.6 kb 的 RNA2。BBWV 有 2 种血清型, 依据血清型差异将其区分为 2 个种, 即 BBWV1 和 BBWV2^[2]。

我国尚未见到 BBWV1 发生报道, 而 BBWV2 则普遍发生。BBWV2 通过汁液摩擦或蚜虫以非持久性方式传播, 不仅能侵染豆类作物^[3-4]、蔬菜、烟草、花卉和中草药^[5-7], 还能侵染葡萄等多种木本植物, 引起花叶、矮化、萎蔫和植株枯死, 造成严重危害^[8]。周雪平等^[9]测定了 BBWV2 中国分离物 (B935) 的全基因组序列, 并对其基因表达及蛋白功能进行了深入分析。牛颜冰等^[10]对山西太谷范村蔬菜种植基地的青椒病害进行调查, 明确青椒病毒病原为 BBWV2, 并获得 BBWV2 青椒分离物 (BBWV2-Ca) 的基因组全序列。王晓燕^[11]完成侵染一串红的 BBWV2 分离物 S4 的分子鉴定和基因组测定, 明确其与已报道的 BBWV2、辣椒分离物 XJP1-1 和番茄分离物 XJ14-3a 的序列差异。本研究对侵染安徽蚕豆的病毒分离物 BBWV2 进行了鉴定, 报道了 BBWV2 安徽蚕豆分离物 (BBWV2-AH) 的基因组全序

列, 并与已报道的 BBWV2 分离物进行系统进化关系分析, 为研究 BBWV2 的基因遗传和变异提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

病毒病样: 2016 年 3 月, 蚕豆病样采集于安徽省长丰县岗集镇安徽省农业科学院岗集试验基地, 保存于 -70℃ 冰箱中备用。

主要试剂: Mini BEST Plant RNA Extraction Kit 和 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司, 克隆载体 pUCm-T 和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒等购自上海生工生物工程有限公司, 蚕豆萎蔫病毒检测试剂盒 (DAS-ELISA) 购自美国 Agdia 公司。

引物: 用于 BBWV2-AH 全基因组序列扩增的 10 对引物 (表 1) 参考牛颜冰等^[7] 和 Hae-Ryun Kwa^[12-13] 的报道。引物委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

病毒 RNA: 使用 Mini BEST Plant RNA Extraction Kit 提取 100 mg 蚕豆叶片的总 RNA, 保存于 -80℃ 备用。

表 1 BBWV2-AH 基因组序列扩增引物
Table 1 Primers for determination of BBWV2-AH genome sequence

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence	位置 Position	
BBWV2 LCP-F	GGCTTGATGGAGGAAGATG	1 611-2 812	
BBWV2 LCP-R	TTGACCAAGCATGTACCTC		
RNA-1	BBWV21-1u	AAACAAACAGCTTTCGTTCCG	18-1 098
	BBWV21-1r	CTGAAATAGCTGCCATAGCAG	
	BBWV21-2f	TTTGCACCGTGGATGCC	830-1 905
	BBWV21-2r	CTTGTAGCCTGACCAAAAAGG	
	BBWV2(RNA1)-F2	SGCAGATTGGTTATSWGAR	1 509-2 389
	BBWV2(RNA1)-R2	ACCGTGAGRCCCACWAR	
	BBWV2(RNA1)-F3	MGRCGAAGRCACGCAGTRRT	2 125-3 208
	BBWV2(RNA1)-R3	AAGCACACTTGTGTCTMACAT	
	BBWV2(RNA1)-F4	CAAAGTGATRTKCCTAAYC	3 039-4 600
	BBWV2(RNA1)-R4	CCRTCAAAYCTGCTGTAA	
BBWV2(RNA1)-F5	CGSCTWGATCGTGGTCC	4 190-5 956	
BBWV2(RNA1)-R5	TTCCCTCACTACTGAAATTTACTC		
RNA-2	BBWV2(RNA2)-1F	CAAACAGCTTTCGTTCCGAA	21-967
	BBWV2(RNA2)-1R	AAGCCATCTGCCACCAATTC	
	BBWV2(RNA2)-2F	GCCATGTCAGGTGCTGGA	802-1 680
	BBWV2(RNA2)-1d	CGCATRGTYYCYGTRGCWGA	
	BBWV2(RNA2)-2u	TACAAYTTRCCTGGRCCCTAGC	1 354-2 449
	BBWV2(RNA2)-2r	CATGTTCCCAACCTTTTCAATGT	
	BBWV2(RNA2)-3u	ATTYTRGATTTTACYCTYATGAG	2 353-3 489
	BBWV2(RNA2)-3d	AGGTCATGGAACCCATTTTAATGG	

1.2 方法

蚕豆萎蔫病毒检测试剂盒(DAS-ELISA)检测参照说明书进行。

BBWV2-AH 全基因组序列的 RT-PCR 扩增:以 BBWV2-AH 侵染发病的蚕豆叶片组织总 RNA 为模板,按照 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit 说明书,以蚕豆萎蔫病毒外壳蛋白大亚基基因引物和覆盖 BBWV2 全基因组序列的 RNA1 的 6 对引物和 RNA2 的 4 对引物进行 PCR 扩增(表 1)。在 $1 \times$ TAE 电泳缓冲液中,经 1% 琼脂糖电泳分离 PCR 产物。

BBWV2-AH 全基因组序列的克隆和测序:使用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物并纯化,再与 pUCm-T 载体连接,转化入大肠杆菌 DH5 α 后培养,每个片段选取多个克隆进行鉴定,将阳性克隆委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序,每个片段通过比对选择 3 个测序结果相同的序列作为最终测序结果,拼接测序结果,获得 BBWV2-AH 全基因组序列。

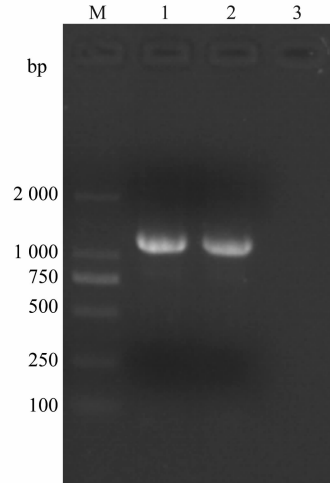
BBWV2-AH 全基因组序列分析:从 GenBank 中获得 BBWV2 其他 39 个分离物全基因组序列,以同属的广藿香轻型花叶病毒 *Patchouli mild mosaic virus* (PatMMV)^[14-15] 和蚕豆萎蔫病毒 1 号 *Broad bean wilt virus 1* (BBWV1)^[16] 为外群,根据其基因组 RNA1 和 RNA2 序列,使用 DNASTAR 软件中的 MegAlign 进行开放阅读框及非编码区序列比对分析,使用 MEGA 6.0^[17] 进行系统发育树分析,采用邻位相接聚类分析法分别构建系统发育树,用 1 000 次重复的自展检验评价系统发育树拓扑结构的可靠性。

2 结果与分析

2.1 蚕豆萎蔫病毒及其外壳蛋白大亚基基因(LCP)的检测

使用蚕豆萎蔫病毒检测试剂盒(DAS-ELISA)对采集自安徽的蚕豆病株叶片和健康叶片进行检测。病株叶片检测结果呈现黄色,为阳性,表明其中含有蚕豆萎蔫病毒;而健康叶片检测结果为透明,为阴性,表明不含蚕豆萎蔫病毒。使用 BBWV2 的外壳蛋白大亚基基因(large coat protein, LCP)引物 BBWV2 LCP-F 和 BBWV2 LCP-R 从蚕豆病株叶片中可扩增出约 1 200 bp 的条带,而健康蚕豆叶片未扩增出条带(图 1),对扩增得到的条带进行克隆后

测序,序列比对结果显示为蚕豆萎蔫病毒 2 号外壳蛋白大亚基基因(LCP)。



M: DL2000 DNA Marker; 1~2: 蚕豆病株叶片; 3: 蚕豆健康叶片
M: DL2000 DNA Marker; 1~2: Broad bean leaves infected by BBWV2; 3: Healthy broad bean leaves

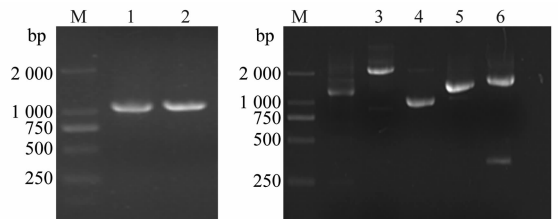
图 1 BBWV2 特异性引物 RT-PCR 检测

Fig. 1 Detection of BBWV2 using special primers by RT-PCR

2.2 BBWV2-AH 基因组全序列的克隆与测定

2.2.1 BBWV2-AH RNA1 的克隆

为明确 BBWV2 安徽分离物 BBWV2-AH 的分类地位,以提取的蚕豆病株叶片 RNA 为模板,分别以 BBWV21-1u/BBWV21-1r、BBWV21-2f/BBWV21-2r、BBWV2(RNA1)-F2/BBWV2(RNA1)-R2、BBWV2(RNA1)-F3/BBWV2(RNA1)-R3、BBWV2(RNA1)-F4/BBWV2(RNA1)-R4 和 BBWV2(RNA1)-F5/BBWV2(RNA1)-R5 为引物进行 BBWV2-AH RNA1 克隆。对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,分别得到大小为 1 081、1 076、881、1 084、1 562 bp 和 1 767 bp 的目的片段(图 2),测序后进行序列拼接,获得 BBWV2-AH RNA1 全长为 5 944 bp,含有 1 个 ORF,始于 216 bp,终止于 5 828 bp,编码 1 870 个氨基酸。



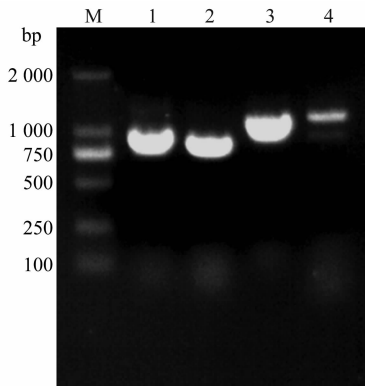
M: DL2000 DNA Marker; 1: BBWV21-1u/BBWV21-1r; 2: BBWV21-2f/BBWV21-2r; 3: BBWV2(RNA1)-F2/BBWV2(RNA1)-R2; 4: BBWV2(RNA1)-F3/BBWV2(RNA1)-R3; 5: BBWV2(RNA1)-F4/BBWV2(RNA1)-R4; 6: BBWV2(RNA1)-F5/BBWV2(RNA1)-R5

图 2 BBWV2-AH RNA1 基因组 6 个片段的扩增结果

Fig. 2 Amplification results of six fragments of BBWV2-AH RNA1 genome

2.2.2 BBWV2-AH RNA2 的克隆

以蚕豆病株叶片总 RNA 为模板,分别以 BBWV2 (RNA 2)-1F/BBWV2(RNA 2)-1R, BBWV2(RNA 2)-2F/BBWV2(RNA 2)-1d, BBWV2(RNA 2)-2u/BBWV2 (RNA 2)-2r 和 BBWV2(RNA 2)-3u/BBWV2(RNA 2)-3d 为引物进行 PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分别得到大小为 951、875、1 092 bp 和 1 136 bp 的目的片段(图 3),测序后序列拼接分析表明 BBWV2-AH RNA2 全长 3 587 bp,含有 1 个 ORF,始于 209 bp,终止于 3 406 bp,编码 1 065 个氨基酸。



M: DL2000 DNA Marker; 1: BBWV2 (RNA 2)-1F/BBWV2 (RNA 2)-1R; 2: BBWV2 (RNA 2)-2F/BBWV2 (RNA 2)-1d; 3: BBWV2 (RNA 2)-2u/BBWV2 (RNA 2)-2r; 4: BBWV2 (RNA 2)-3u/BBWV2 (RNA 2)-3d

图 3 BBWV2-AH RNA2 全基因组 4 个片段的扩增结果

Fig. 3 Amplification results of four fragments of BBWV2-AH RNA2 genome

2.3 BBWV2-AH 分离物基因组序列分析

利用 DNASTar 软件对 BBWV2-AH RNA1(KY606992) 全序列与来自韩国、中国、日本、新加坡和菲律宾的 39 个 BBWV 分离物进行核苷酸序列、氨基酸序列同源性分析。BBWV2-AH RNA1 与 BBWV2 其他分离物核苷酸同源性为 78.4%~96%,氨基酸同源性为 87.1%~99%。与来自中国湖南的分离物 BBWV2-Hunan RNA1 (KJ789403.1)核苷酸、氨基酸同源性均为最高;与外群 PatMMV-Philippines 分离物 RNA1 (NC003975)核苷酸、氨基酸同源性为 89.3%和 95.7%;与 BBWV1-Ben 分离物 RNA1 (AY781171)核苷酸、氨基酸同源性分别为 64.4%和 60.6%(表 2)。

将 BBWV2-AH RNA2 (KY606993)与来自中国、韩国、日本、新加坡和菲律宾的 18 种分离物进行核苷酸序列、氨基酸序列同源性分析。BBWV2-AH RNA2 与 BBWV2 其他分离物核苷酸同源性为 76.8%~95.5%、氨基酸同源性为 88.2%~98.3%。与韩国 BBWV2-RP4 分离物 RNA2 (JX183228.1)核苷酸同源性最高、与中国分离物 BBWV2-B935 RNA2 (AJ132844)和韩国分离物 BBWV2-RP5 RNA2 (JX183230.1)氨基酸同源性最高;与外群 PatMMV-Philippines 分离物的 RNA2 (NC003974)核苷酸、氨基酸同源性为 83.9%和 91.9%;与 BBWV1-Ben 分离物 RNA2 (AY781172)的核苷酸、氨基酸同源性分别为 56.2%和 58.3%(表 2)。

表 2 BBWV2-AH 与其他相关分离物核苷酸和氨基酸序列相似性比对

Table 2 Nucleotide and amino acid sequence identities between BBWV2-AH and other related isolates

分离物 Isolate	寄主 Host	国家 Country	RNA1 登录号 RNA1 accession no.	核苷酸同源性/% Nucleotide identity	氨基酸同源性/% Amino acid identity	RNA2 登录号 RNA2 accession no.	核苷酸同源性/% Nucleotide identity	氨基酸同源性/% Amino acid identity
MB7	<i>Vicia faba</i>	日本	AB013615	89.3	95.5	AB013616	83.6	94.8
IP	<i>Capsicum annuum</i>	日本	AB023484	78.7	87.8	AB018698	79.7	90.6
IA	<i>Gentiana</i> spp.	日本	AB051386	88.2	94.6	AB032403	84.4	94.1
K	<i>Capsicum annuum</i>	韩国	AF144234	91.9	90.6	AF104335	83.4	95.0
B935	<i>Vicia faba</i>	中国	AF149425	86.3	94.5	AJ132844	91.3	98.3
XJ14-3	<i>Lycopersicon esculentum</i>	中国	FN985164	94.1	98.5	HQ283389	83.4	93.2
RP1	<i>Capsicum annuum</i>	韩国	JX183221.1	78.8	87.8	JX183222.1	94.4	97.9
RP2	<i>Capsicum annuum</i>	韩国	JX183223.1	78.8	87.8	JX183224.1	93.8	97.6
RP3	<i>Capsicum annuum</i>	韩国	JX183225.1	94.2	98.1	JX183226.1	95.3	97.6
RP4	<i>Capsicum annuum</i>	韩国	JX183227.1	78.7	87.9	JX183228.1	95.5	98.0
RP5	<i>Capsicum annuum</i>	韩国	JX183229.1	79.1	88.0	JX183230.1	94.9	98.3
RP6	<i>Capsicum annuum</i>	韩国	JX183231.1	79.0	87.9	JX183232.1	95.3	98.1
RP7	<i>Capsicum annuum</i>	韩国	JX183233.1	79.0	87.9	JX183234.1	79.3	90.5
BB2	<i>Vicia faba</i>	韩国	KC625492	79.0	88.0	KC625506	80.0	90.9
BB5	<i>Vicia faba</i>	韩国	KC625493	93.9	98.3	KC625507	92.8	97.7
BB9	<i>Vicia faba</i>	韩国	KC625494	78.5	87.8	KC625508	95.3	98.1
GP2	<i>C. annuum</i> var. <i>gulosum</i>	韩国	KC625495	78.9	88.0	KC625509	94.5	98.1
GP4	<i>C. annuum</i> var. <i>gulosum</i>	韩国	KC625496	78.9	88.1	KC625510	94.5	98.1
GP5	<i>C. annuum</i> var. <i>gulosum</i>	韩国	KC625497	78.9	88.1	KC625511	94.4	98.0
P2	<i>Pisum sativum</i>	韩国	KC625498	94.0	98.2	KC625512	93.3	98.0
P3	<i>Pisum sativum</i>	韩国	KC625499	93.9	98.1	KC625513	93.3	98.1
PAP1	<i>C. annuum</i> var. <i>gulosum</i>	韩国	KC625500	78.9	88.2	KC634010	93.1	97.9
PAP2	<i>C. annuum</i> var. <i>gulosum</i>	韩国	KC625501	79.1	87.9	KC625514	93.0	97.7

续表 2 Table 2(Continued)

分离物 Isolate	寄主 Host	国家 Country	RNA1 登录号	核苷酸同源性/%	氨基酸同源性/%	RNA2 登录号	核苷酸同源性/%	氨基酸同源性/%
			RNA1 accession no.	Nucleotide identity	Amino acid identity	RNA2 accession no.	Nucleotide identity	Amino acid identity
PAP3	<i>C. annuum</i> var. <i>gulosum</i>	韩国	KC625502	79.0	88.3	KC625515	92.9	98.1
SP1	<i>Spinacia oleracea</i>	韩国	KC625503	78.7	88.1	KC625516	94.5	98.1
SP2	<i>Spinacia oleracea</i>	韩国	KC625504	78.7	88.1	KC625517	94.4	98.0
SP	<i>Spinacia oleracea</i>	韩国	KC625505	78.8	88.1	KC625518	93.3	98.0
XJP1-1	Tomato	中国	KC790225.1	88.5	95.7	HQ283390.1	81.6	91.0
Ca	<i>Capsicum annuum</i>	中国	KF498696	92.8	96.9	KF498697	81.3	91.9
SG1	<i>Dioscorea opposita</i>	中国	KJ789136.1	87.9	94.8	KJ789137.1	84.1	93.0
hunan	Chilli	中国	KJ789403.1	96.0	99.0	KJ825857	84.3	93.2
LS2	<i>Leonurus sibiricus</i>	韩国	KM076648	88.9	93.1	KM076649.1	80.0	91.3
DO	<i>Dioscorea opposita</i>	韩国	KT246495	88.0	94.8	KT246496	94.2	92.8
RP1	<i>Capsicum annuum</i>	韩国	KT380022.1	78.8	87.8	KT380023.1	84.7	97.5
BBWV-BRI	<i>Dioscorea oppositi folia</i>	韩国	KU641565.1	88.2	95.0	KU309314.1	84.4	93.0
SN	<i>Gynura procumbens</i>	韩国	KX686589.1	89.0	95.2	KX686590.1	84.2	94.2
ME	<i>Megaskepasma erythroclamyis</i>	新加坡	NC003003	78.4	87.1	NC003004	76.8	88.2
PatMMVa	<i>Pogostemon patchouli</i>	日本	NC003975	89.3	95.7	NC003974	83.9	91.9
BBWV1	<i>Capsicum annuum</i>	西班牙	AY781171	64.4	60.6	AY781172	56.2	58.3

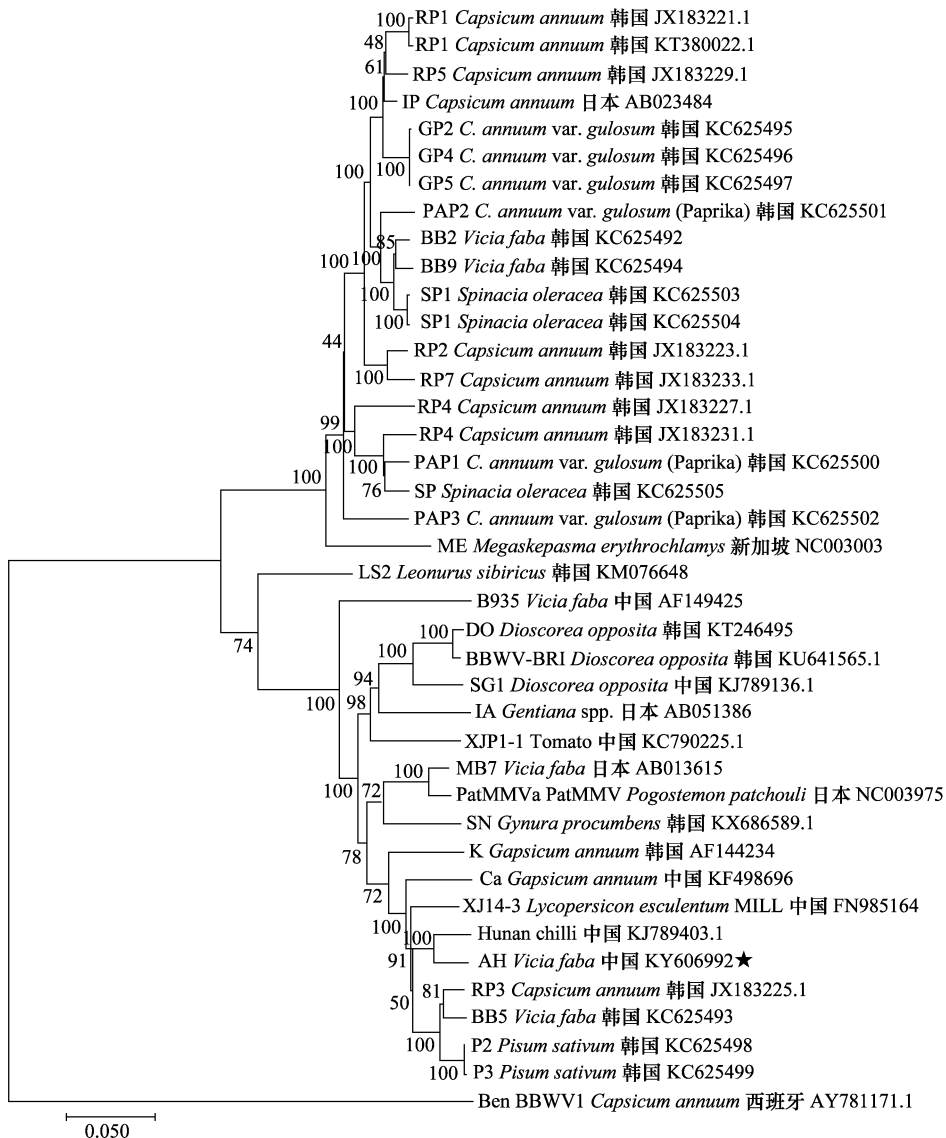


图 4 基于 BBWV2-AH RNA1 全长基因组序列的 BBWV2 分离物系统进化关系

Fig. 4 Phylogenetic relationships of BBWV2-AH RNA1 with other isolates based on genome sequences

2.4 BBWV2-AH 与其他分离物系统进化分析

为研究 BBWV2-AH 的起源与进化关系,以同属的 BBWV1-Ben 和 PatMMV-Philippines 为外群,分别构建该分离物与已报道的 BBWV2 分离物的 RNA1 和 RNA2 核苷酸序列系统进化树(图 4~5)。从进化树上可以看出, BBWV2-AH RNA1 与中国的 BBWV2-Hunan 的亲缘关系最近,并与中国的分离物 BBWV2-B935、BBWV2-SG1、BBWV2-XJP1-1、

BBWV2-Ca 和 BBWV2-XJ14-3,韩国的分离物 BBWV2-LS2、BBWV2-DO、BBWV2-BBWV-BRI、BBWV2-SN、BBWV2-K、BBWV2-RP3、BBWV2-BB5、BBWV2-P2、BBWV2-P3 和日本的分离物 BBWV2-MB7、BBWV2-IA 聚集成一个大支。而韩国的其他分离物和新加坡的 BBWV2-ME 分离物成一大支。以上两支与西班牙的 BBWV1-Ben 分离物亲缘关系较远(图 4)。

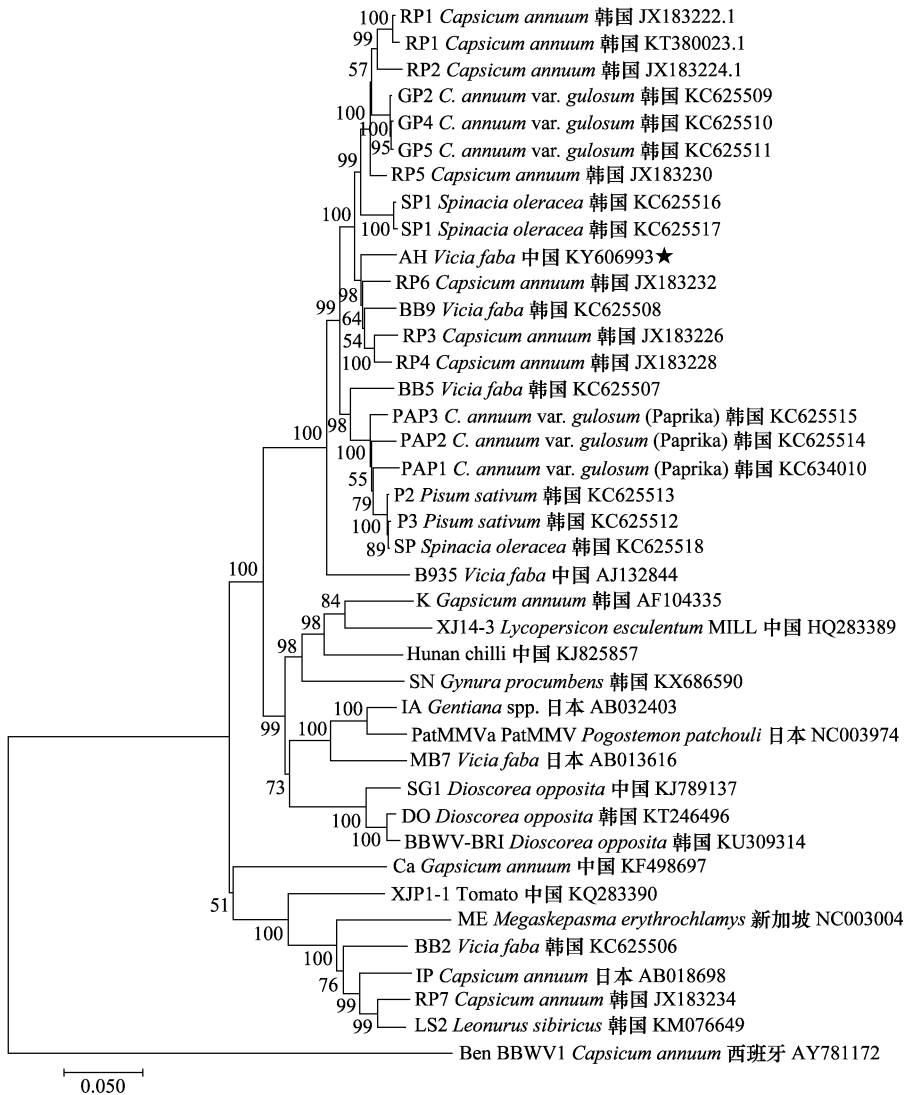


图 5 基于 BBWV2-AH RNA2 全长基因组序列的 BBWV2 分离物系统进化关系

Fig. 5 Phylogenetic relationships of BBWV2-AH RNA2 with other isolates based on genome sequences

从构建的 BBWV2 RNA2 系统进化树(图 5)可以看出 BBWV2-AH 分离物与韩国的分离物 BBWV2-RP1(JX183222)、BBWV2-RP1(KT380023)、BBWV2-RP2、BBWV2-GP2、BBWV2-GP4、BBWV2-GP5、BBWV2-RP5、BBWV2-SP1、BBWV2-SP2、BBWV2-RP6、BBWV2-BB9、BBWV2-RP3、BB-

WV2-RP4、BBWV2-BB5、BBWV2-PAP3、BBWV2-PAP2、BBWV2-PAP1、BBWV2-P2、BBWV2-P3、BBWV2-SP 以及中国的分离物 BBWV2-B935 形成一个独立分支,亲缘关系最近。该分支再与韩国的分离物 BBWV2-K、BBWV2-SN、BBWV2-DO、BBWV2-BBWV-BRI,中国的分离物 BBWV2-XJ14-3、

BBWV2-Hunan、BBWV2-SG1 和日本的分离物 BBWV2-IA、BBWV2-MB7 形成一个大支。其他的分离物形成另一大支,与 BBWV2-AH 亲缘关系相对较远。以上两个分支均与西班牙的 BBWV1-Ben 分离物亲缘关系最远。

3 讨论

BBWV2 寄主范围广,在蚕豆、辣椒、番茄等上均有发生,是我国豆科作物和一些重要蔬菜作物上的主要病毒病。蚕豆被病毒侵染后往往出现花叶、矮化、萎蔫直至枯死等症状,导致生长受阻,产量和品质下降。作者通过酶联免疫和外壳蛋白大亚基基因的 RT-PCR 法对田间具有明显矮缩、萎蔫症状的蚕豆进行了检测,发现了蚕豆萎蔫病毒 2 号存在,并克隆、测定了 BBWV2 安徽分离物(BBWV2-AH)全基因组序列。

为进一步明确 BBWV2-AH 的分类地位和系统发育关系,将 BBWV2-AH RNA1 与 39 个不同来源的 BBWV2 进行核苷酸序列、氨基酸序列同源性比较分析。结果表明,我们从蚕豆上鉴定的 BBWV2-AH 分离物的 RNA1 与湖南的辣椒分离物 BBWV2-Hunan 核苷酸、氨基酸同源性均为最高,而 RNA2 则与韩国辣椒分离物 BBWV2-RP4 的核苷酸同源性最高、与中国蚕豆分离物 BBWV2-B935 和韩国辣椒分离物 BBWV2-RP5 的氨基酸同源性最高。进一步将获得的安徽分离物 BBWV2-AH 全基因组序列和 39 个蚕豆病毒属分离物进行系统发育分析,发现 BBWV2-AH RNA1 与中国的 BBWV2-Hunan RNA1 的亲缘关系最近,而 BBWV2-AH RNA2 与韩国的多个分离物聚集在一起,再与中国的分离物 BBWV2-B935 形成一个分支,与序列同源性分析结果基本一致。BBWV 分离物 RNA1 和 RNA2 在系统进化关系及聚类分析中表现的差异是否与该病毒在田间容易通过蚜虫在不同种类的寄主植物间传播相关? 该病毒在长期的进化过程中是否通过重组或重排以适应多种不同寄主植物并扩展其寄主范围等问题还需要进一步研究。

本研究测定了 BBWV2 安徽分离物(BBWV2-AH)全基因组序列,分析了其与已报道的 BBWV2 其他分离物的序列差异和系统发育关系,发现了 BBWV2 RNA1 和 RNA2 与其他分离物聚类分析时的差异,为揭示该病毒的基因组进化方式提供了信息。

参考文献

- [1] 周俊玲,张蕙杰. 世界蚕豆生产及贸易形势分析[J]. 世界农业, 2016(11): 107 - 111.
- [2] MURPHY F A, FAUQUET C M, BISHOP D H L, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Academic Press, 1999.
- [3] 周雪平,余永杰,刘勇,等. 侵染豌豆和蚕豆的蚕豆萎蔫病毒研究[J]. 浙江农业大学学报,1995,21(3):221 - 226.
- [4] 戚益军,周雪平,李德葆. 侵染大豆的蚕豆萎蔫病毒研究[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(1):69 - 72.
- [5] 周颖,张瑞,郭颂,等. 北京地区地黄花叶病病原的分子鉴定[J]. 植物保护学报,2010,37(5):447 - 452.
- [6] 匡云波,陈满足,陆伊荣,等. 太子参芫菁花叶病毒和蚕豆萎蔫病毒的双重 RT-PCR 检测[J]. 园艺学报,2017,44(4):784 - 791.
- [7] 寇丽莎,赵慧琪,王德富,等. 药用植物柴胡病毒病原物的分子鉴定[J]. 病毒学报,2017,33(4):610 - 616.
- [8] EDWARDSON J R, CHRISTIE R G. Fabaviruses [M]//CRC Handbook of viruses infection legumes BocaRaton, FL: CRC Press, 1991: 263 - 274.
- [9] 周雪平,戚益军,李凡,等. 蚕豆萎蔫病毒 2 中国分离物全基因组结构及可能的基因表达方式[J]. 生物物理与生物化学学报, 2001, 33(1): 46 - 52.
- [10] 牛颜冰,赵欣,赵慧琪,等. 蚕豆萎蔫病毒 2 号山西分离株的全基因组序列测定与分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(9): 927 - 932.
- [11] 王晓燕. 侵染一串红的蚕豆萎蔫病毒 2 号的分子鉴定[D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- [12] KWAK H R, KIM M K, NAM M, et al. Genetic compositions of *Broad bean wilt virus 2* infecting red pepper in Korea [J]. Plant Pathology Journal, 2013, 29(3): 274.
- [13] KWAK H R, KIM M K, LEE Y J, et al. Molecular characterization and variation of the *Broad bean wilt virus 2* isolates based on analyses of complete genome sequences [J]. Plant Pathology Journal, 2013, 29(4): 397 - 409.
- [14] IKEGAMI M, KAWASHIMA H, NATSUAKI T, et al. Complete nucleotide sequence of the genome organization of RNA2 of *Patchouli mild mosaic virus*, a new fabavirus [J]. Archives of Virology, 1998, 143: 2431 - 2434.
- [15] IKEGAMI M, ONOORI Y, SUGIMURA N, et al. Complete nucleotide sequence and the genome organization of *Patchouli mild mosaic virus* RNA1 [J]. Intervirology, 2001, 44: 355 - 358.
- [16] KOBAYASHI Y O, KOBAYASHI A, NAKANO M, et al. Analysis of genetic relations between *Broad bean wilt virus 1* and *Broad bean wilt virus 2* [J]. Journal of General Plant Pathology, 2003, 69: 320 - 326.
- [17] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 30: 2725 - 2729.