

# 竹花叶病毒浙江麻竹分离物 全基因组序列及 siRNA 分析

费莉玢<sup>1</sup>, 侯盼盼<sup>1</sup>, 曹友志<sup>1</sup>, 姚佳越<sup>2</sup>, 苏秀<sup>1\*</sup>, 马良进<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>生物农药高效制备技术国家地方联合工程实验室, 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江农林大学, 临安 311300;

<sup>2</sup>山西省芮城县林业局, 芮城 044600)

Complete genome sequence and siRNAs analysis of bamboo mosaic virus isolates from *Dendrocalamus latiflorus* in Zhejiang province, China FEI Li-bin<sup>1</sup>, HOU Pan-pan<sup>1</sup>, CAO You-zhi<sup>1</sup>, YAO Jia-yue<sup>2</sup>, SU Xiu<sup>1\*</sup>, MA Liang-jin<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>National Joint Local Engineering Laboratory of Bio-pesticide High-efficient Preparation, State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China; <sup>2</sup>Ruicheng Forestry Bureau, Ruicheng 044600, China)

**Abstract:** Bamboo mosaic virus (BaMV) is an important virus that endangers bamboo plants and causes serious economic losses. In this study, the whole genome nucleotide sequence (MN635746) of BaMV isolated from Zhejiang *Dendrocalamus latiflorus* (BaMV-ZJMZ) was obtained by small RNA deep sequencing combined with RT-PCR. The genome of BaMV-ZJMZ is appropriate spacing 6 365 nucleotides (nts) long and contains five open reading frames, which is consistent with the structures of already reported BaMV isolates. BaMV-ZJMZ shares nucleotide sequence identities of 82.0%-83.7% with other 20 BaMV isolates at genomic level, and amino acid sequence similarity of CP gene ranging from 91.5% to 95.5%. In phylogenetic tree based on whole genome nucleotide sequences and CP amino acid sequences, BaMV-ZJMZ isolates formed a separate branch. Meanwhile, the small interference RNA (siRNA) derived from BaMV-ZJMZ were analyzed. It was found that the proportions of siRNA from sense and antisense of BaMV-ZJMZ genome were 72% and 28%, respectively, with 21 nt and 22 nt predominated and the 5'-terminal nucleotide base was biased towards "A", and the most abundant siRNAs were mainly located at the 5' terminal within both positive and negative strands of BaMV-ZJMZ genome. This is the first report of BaMV isolated from *Dendrocalamus latiflorus* in Zhejiang, which provides important information for further study on genetic evolution and molecular characteristics of BaMV.

**Key words:** bamboo mosaic virus; *Dendrocalamus latiflorus* Munro.; phylogenetic analysis; siRNA; deep sequencing

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2020)04-0499-06

已知有 3 种病毒可在自然条件下侵染竹类植物, 即竹花叶病毒 (bamboo mosaic virus, BaMV)<sup>[1]</sup>、樱桃坏死锈斑驳病毒 (cherry necrotic

rusty mottle virus, CNRMV) 和苹果茎沟病毒 (apple stem grooving virus, ASGV)<sup>[2,3]</sup>。其中, BaMV 是最早在巴西的金竹 (*Bambusa vulgaris* Cv.) 和孝顺

收稿日期: 2019-08-15; 修回日期: 2019-11-12; 网络出版时间: 2019-11-13

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20191113.0941.001.html>

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LQ17C160003); 浙江省教育厅一般科研项目 (Y201431042); 浙江农林大学科研训练项目 (KX20180067)

通讯作者: 苏秀, 博士, 副教授, 主要从事植物病毒学研究; E-mail: [suxiu@zafu.edu.cn](mailto:suxiu@zafu.edu.cn);

马良进, 博士, 教授, 主要从事林木病理学研究; E-mail: [malj@zafu.edu.cn](mailto:malj@zafu.edu.cn)

第一作者: 费莉玢, 硕士研究生, 主要从事林木病理学研究; E-mail: [805546142@qq.com](mailto:805546142@qq.com)。

竹(*Bambusa multiplex* Raeusch.)<sup>[1]</sup>中发现的自然侵染竹类植物的病毒。1993年我国台湾的不同竹种中也鉴定出BaMV,随后美国加利福尼亚和佛罗里达也发现了该种病毒<sup>[4]</sup>,2015年Lin等<sup>[5]</sup>在我国四川成都和福建福州的48个竹子样品中检测出BaMV,2019年Zhu等<sup>[6]</sup>从浙江杭州8个竹种中检测到BaMV。

本研究采用小RNA深度测序结合RT-PCR技术,在浙江麻竹上鉴定到BaMV(以下简称BaMV-ZJMZ),获得该分离物的全基因组序列,通过对BaMV不同分离物全基因序列和CP序列的相似性分析及构建进化树,明确了BaMV-ZJMZ的遗传地位。同时,利用生物信息学分析方法对该病毒分离物的小RNA进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2016年6月,从浙江省温州市采集花叶疑似病毒侵染的麻竹叶片样品,置于-80℃冰箱保存。

### 1.2 植物总RNA提取及小RNA深度测序

采用TRIzol试剂(Invitrogen)提取麻竹病叶的总RNA,操作步骤参照说明书进行,用超微量紫外分光光度计Nanodrop-2000检测RNA纯度。将质量合格的样品送至深圳华大基因研究院HiSeq2500测序仪(Illumina)深度测序。

### 1.3 小RNA深度测序数据的生物信息学分析

根据Su等<sup>[7]</sup>的方法进行小RNA深度测序数据的预处理、序列拼接、BLAST分析、病毒相关序列的筛查及病毒来源siRNA的统计。

### 1.4 cDNA合成及PCR扩增

根据生物信息学分析拼接得到的序列设计病毒特异性全长引物(BaMV-F1: 5'-GACCTAGAAAACGAACTGCCAATTG-3', BaMV-R1: 5'-CTTTGGGAGCTCGGGTTCTTC-3'; BaMV-F2: 5'-CCTTTGAGACTCTGCTTGGCG-3', BaMV-R2: 5'-GCTGGTAGTCCGTGTGCAAGT-3'; BaMV-F3: 5'-CCTGGGACATGTTGATTGCGG-3', BaMV-R3: 5'-GCCGGGCATGTTTTACGATCATGCA-3'),以提取的病叶总RNA为模板,BaMV-R3为引物,利用PrimeScript II Reverse Transcriptase试剂盒进行反

转录(BioLabs),合成cDNA。以cDNA为模板,利用phusion超保真PCR试剂盒(NEB)进行PCR扩增。采用TaKaRa的SMARTer RACE试剂盒扩增3'和5'端的序列,其步骤参照说明书进行。

### 1.5 PCR产物克隆、测序及序列分析

PCR产物纯化后连接到PZeroBack载体(Tiangen),并转化*E. coli*菌株DH5<sub>α</sub>感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的LB平板上,培养过夜后挑选单菌落,用Taq DNA聚合酶(百泰克)进行PCR扩增鉴定阳性克隆,随机挑取2个阳性克隆送苏州金唯智生物科技有限公司进行测序,获得的序列用DNAMAN7.0软件进行处理和拼接,得到全基因组序列。在NCBI中利用BLASTn检索进行在线比对,使用MEGA7.0进行多重序列相似性分析,并用最大似然法(Maximum Likelihood, ML)和邻近法(Neighbor joining, NJ)构建系统进化树,重复1 000次,自引导值(Bootstrap Replication)为1 000,其他依照默认设置。

## 2 结果与分析

### 2.1 感病麻竹样品小RNA深度测序结果

感病麻竹样品深度测序后得到的原始reads经过滤后得到13 275 986条有效reads,用Velvet软件对长度为18-28 nt的有效reads进行拼接组装(Kmer值为17),得到的contig与NCBI进行比对,发现该样品中仅存在BaMV的核酸序列,共有64条contig与已知的BaMV有较高相似性,拼接得到的序列总长度覆盖BaMV-V(L77962)全长的73.68%(4 690/6 365),相似度为75.56%~100%。

### 2.2 BaMV-ZJMZ全基因组序列测定及分析

根据拼接得到的序列分别设计3对特异性引物,BaMV-F1/R1扩增约1 300 bp的片段,BaMV-F2/R2扩增片段长度约为3 600 bp,BaMV-F3/R3扩增约1 700 bp的片段,阴性对照则没有扩增到相应条带(图1-A)。用DNAMAN7.0将BaMV-ZJMZ分离物扩增的3个片段及RACE测序所得3'端和5'端序列(图1-B)拼接,获得全长为6 365 nt的基因组全序列(MN635746),该序列的长度及结构与已知的BaMV其他分离物一致。



化树显示 BaMV-ZJMZ 单独形成一个小分支,与我国台湾的分离物 (BaMV-Au、BaMV-Pu、BaMV-Bo、BaMV-V、BaMV-O) 及印度尼西亚分离物 (BaMV-Yogya1、BaMV-Yogya2) 等的亲缘关系较近,形成了一个大的分支。

在基于 BaMV 的 CP 氨基酸序列的系统进化树中(图 3),BaMV-ZJMZ 仍然单独形成一个小分支,与台湾分离物 (BaMV-Au、BaMV-Pu、BaMV-Bo、BaMV-V、BaMV-O) 及福建分离物 (BaMV-MATMS1、BaMV-MAZSL1、BaMV-BSTLZHA6、BaMV-CHGZHA4、BaMV-HCLTZHA15) 等的亲缘关系较近,形成了一个大的分支。

#### 2.4 BaMV-ZJMZ 来源 siRNA 分析

共有 19 518 条 BaMV-ZJMZ 来源 siRNA,20-24 nt 长度 siRNA 数量占总数的百分比分别为 3.16%、55.91%、34.28%、2.82%、1.59%,其他长度占 2.25% (图 4-A)。有 5 432 个来自正义链,14 086 个来自负义链,正链比例(28%)远低于负链

比例(72%)。总的 BaMV-ZJMZ 来源的 siRNA 中,5'端起始核苷酸碱基以“A”、“G”、“C”、“U”开头的比例分别是 41.24%、12.48%、29.03% 和 17.25%,以“A”开头的 siRNA 最多,在不同长度和不同极性的 siRNA 中均遵循这样的规律(图 4-B、C)。利用 Perl 语言脚本的程序分析了 BaMV-ZJMZ 来源 siRNA 在寄主中的热点分布(图 4-D)。BaMV-ZJMZ 来源的 siRNA 特异序列几乎覆盖了该病毒的全基因组,来自病毒负义链的 siRNA 比来自正义链的要多,并且二者均在 BaMV-ZJMZ 的 5'端出现的频率最高。

### 3 讨论

BaMV 可侵染多种竹类植物,分布范围广泛,NCBI 上收录了来源于我国福建、台湾及印度尼西亚 BaMV 分离物的全基因组序列。Lin 等<sup>[8]</sup>对我国台湾和大陆的 BaMV 分离物部分 CP 核苷酸序列进行了系统进化分析,发现所有来自台湾的分离物

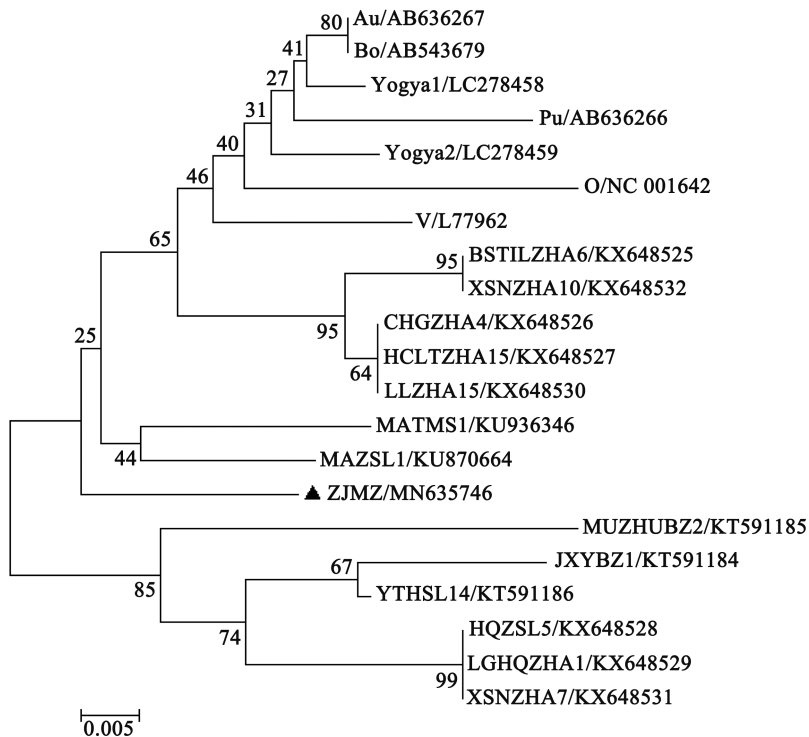


Fig. 3 Phylogenetic tree based on coat protein amino acid sequences of known BaMV isolates using neighbor-joining method

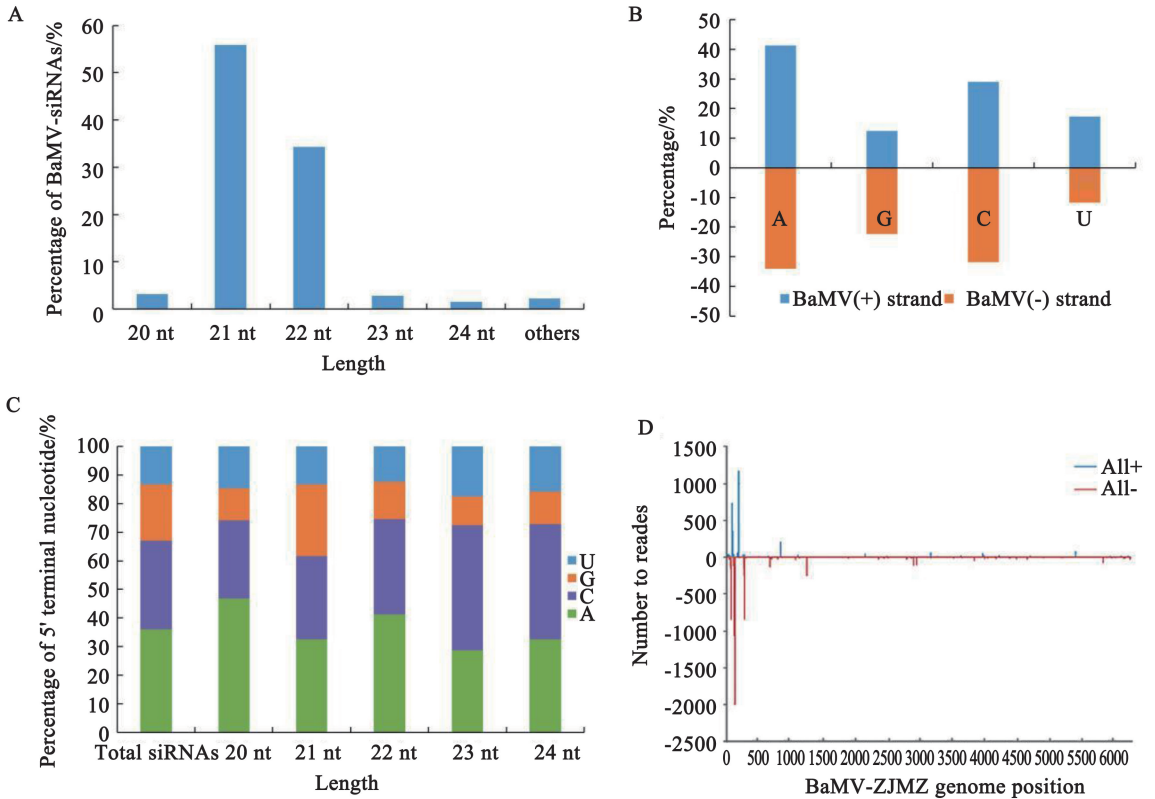


Fig. 4 Analysis of BaMV-ZJMZ derived siRNAs

A: Size distribution of BaMV-ZJMZ derived siRNAs; B: Relative frequency of the 5'-terminal nucleotides of all sense and antisense BaMV-derived siRNAs; C: Relative frequency of the 5'-terminal nucleotides in 20-24 nt siRNAs and total siRNAs; D: The siRNAs are shown in blue above (positive strand) and in red below (negative strand) the horizontal line. The X axis represents the length of the genome, and the Y axis represents the number of siRNAs.

均单独聚为一个大支,而来自大陆的一部分聚为一个大支,另一部分与台湾分离物聚为一簇。本研究发现,来自台湾的分离物无论是基于全基因组核苷酸序列,还是 CP 氨基酸序列,进化树均显示台湾分离物间亲缘关系较近,而来自大陆的分离物则有不同的进化关系。BaMV 的寄主和分布范围广泛,不同地域分离株的遗传和进化关系如何,还有待于进一步探明。

本研究利用 siRNA 深度测序,首次分析了侵染浙江麻竹的 BaMV 来源的 siRNA,与已报道的福建麻竹分离物(BaMV-MAZSL1)的 siRNA 特异性相似<sup>[9]</sup>,来自基因组正义链和负义链的 siRNA 长度均以 21 nt 和 22 nt 为主,推测 DCL4 和 DCL2 在麻竹抗病毒中起了主要的作用;不同长度和不同极性的 BaMV-ZJMZ 来源的 siRNA 中,5'端起始核

苷酸碱基均是“A”最多,在麻竹与 BaMV 互作过程中,导致该病毒 siRNA 形成的 AGO 复合物是否都遵循这样的偏好性规律还需要进一步研究。BaMV-ZJMZ 来源 siRNA 在寄主中的热点分布区位于 BaMV 基因组的 5'端,这与 Lin 等<sup>[5]</sup>的报道一致,而与 BaMV 接种本氏烟和拟南芥后在寄主中的热点区分布不同<sup>[10]</sup>。BaMV 来源 siRNA 在寄主中产生的热点区不同,是否与寄主、病毒分离株、地理条件等因素有关尚待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Lin M T, Kitajima E W, Cupertino F P, *et al.* Partial purification and some properties of bamboo mosaic virus[J]. *Phytopathology*, 1977, 67(12): 1439-1443.
- [2] Awasthi P, Ram R, Zaidi A A, *et al.* Molecular

- evidence for bamboo as a new natural host of cherry necrotic rusty mottle virus [ J ]. *Forest Pathology*, 2015, 45(1) : 42-50.
- [ 3 ] Bhardwaj P, Awasthi P, Prakash O, *et al.* Molecular evidence of natural occurrence of apple stem grooving virus on bamboos [ J ]. *Trees*, 2017, 31(1) : 367-375.
- [ 4 ] Elliott M S, Zettler F W. Bamboo mosaic virus detected in ornamental bamboo species in Florida [ C ]. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society, Florida; Florida State Horticultural Society, 1996:24-25.*
- [ 5 ] Lin W W, Zhang J, Yang W T, *et al.* First report of bamboo mosaic virus infecting bamboo in the mainland of China [ J ]. *Plant Disease*, 2015, 99(8) : 1189.
- [ 6 ] Zhu F X, Chen J L, Zhang Z J. Development and application of SYBR green II reverse transcription real-time fluorescence quantitative PCR assay for detection of bamboo mosaic virus ( in Chinese ) [ J ]. *Journal of Agricultural Biotechnology ( 农业生物技术学报 )*, 2019, 27(4) : 752-760.
- [ 7 ] Su X, Xu Y, Chen S, *et al.* Detection of viruses infecting *Wisteria sinensis* by deep sequencing and assembly of small RNA ( in Chinese ) [ J ]. *Acta Phytopathologica Sinica ( 植物病理学报 )*, 2015, 45(1) : 88-92.
- [ 8 ] Wang I N, Yeh W B, Lin N S. Phylogeography and coevolution of bamboo mosaic virus and its associated satellite RNA [ J ]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8 : 886.
- [ 9 ] Lin W, Yan W, Yang W, *et al.* Characterisation of siRNAs derived from new isolates of bamboo mosaic virus and their associated satellites in infected ma bamboo ( *Dendrocalamus latiflorus* ) [ J ]. *Archives of Virology*, 2017, 162(2) : 505-510.
- [ 10 ] Lin K Y, Cheng C P, Chang B C H, *et al.* Global analyses of small interfering RNAs derived from bamboo mosaic virus and its associated satellite RNAs in different plants [ J ]. *PLoS One*, 2010, 5(8) : e11928.

责任编辑:于金枝