

侵染守宫木的曼陀罗黄脉病毒的分离鉴定及其基因组序列分析

刘珊羽¹, 张添宏¹, 池毓斌², 徐钟天³, 谌星^{1,2*}, 朱丽娟^{1,2*}

1 三明学院, 国家公园研究中心, 福建 三明

2 三明学院, 药用植物开发利用工程研究中心, 福建 三明

3 宁波大学, 植物病毒学研究所, 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 浙江 宁波

刘珊羽, 张添宏, 池毓斌, 徐钟天, 谌星, 朱丽娟. 侵染守宫木的曼陀罗黄脉病毒的分离鉴定及其基因组序列分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4029-4041.

LIU Shanyu, ZHANG Tianhong, CHI Yubin, XU Zhongtian, CHEN Xing, ZHU Lijuan. Isolation, identification, and genomic sequence analysis of datura yellow vein virus infecting *Sauropus androgynus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(9): 4029-4041.

摘要: 守宫木具有较高的药用和食用价值, 其生长过程受到多种病毒病害的危害, 严重影响了守宫木的产量和质量。目前有关我国守宫木病毒病害研究的较少。【目的】分离鉴定我国守宫木病毒病原。【方法】分析本实验室前期守宫木叶片小 RNA 测序(small RNA sequencing, sRNA-seq)的数据; 利用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)对 10 种不同品种的守宫木叶片样品进行检测; 以阳性样品 S4 叶片的总 RNA 为模板, 结合 RT-PCR、cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)和 Sanger 测序技术获得曼陀罗黄脉病毒(datura yellow vein virus, DYVV)守宫木分离物(DYVV-sa)全基因组序列。【结果】基于 sRNA-seq 的数据分析发现守宫木中存在 DYVV, 不同品种样本经 RT-PCR 检测显示 S4 和 S12 表现为 DYVV 阳性。以 S4 品种为模板, 克隆获得 DYVV-sa 基因组全长序列, 其大小为 13 185 nt, 可编码 6 个开放阅读框(open reading frames, ORFs), 与分离自黑叶苏珊的 DYVV 序列相似性高达 95.8%–98.1%, 同时系统发育分析显示 DYVV-sa 与 DYVV 亲缘关系最密切, 因此确定 DYVV-sa 为 DYVV 的分离株。对 DYVV-sa 病毒来源的小干扰 RNA (virus-derived small interfering RNA, vsiRNA)进行分析发现, DYVV-sa-vsiRNA 大小以 21 nt 和 22 nt 为主, 其中 21 nt 更为丰富; DYVV-sa-vsiRNA 的 5'端第一个核苷酸优先偏好 U 和 C; 来源于负链的 vsiRNAs 所占比例高于正链, 并在整个病毒基因组中均有分布, 局部区域形成热点。【结论】本研究发现 DYVV 可侵染守宫木植株并克隆获得 DYVV-sa 分离株基因组全长序列, 研究结果拓展了 DYVV 的天然寄主范围, 为

资助项目: 福建省自然科学基金(2024J01908); 福建省中青年教育科研项目(JAT241135)

This work was supported by the Fujian Provincial Natural Science Foundation (2024J01908) and the Fujian Provincial Education and Scientific Research Project for Young and Middle-aged Teachers (JAT241135).

*Corresponding authors. E-mail: ZHU Lijuan, ljzhu@fjmu.edu.cn; CHEN Xing, kuailechenxing@163.com

Received: 2025-02-24; Accepted: 2025-04-02; Published online: 2025-05-29

DYVV 的多样性研究和进化分析提供了基础, 同时为守宫木病毒病害的防治提供了理论依据。

关键词: 守宫木; 曼陀罗黄脉病毒分离株; 病毒来源的小干扰 RNA

Isolation, identification, and genomic sequence analysis of datura yellow vein virus infecting *Sauropus androgynus*

LIU Shanyu¹, ZHANG Tianhong¹, CHI Yubin², XU Zhongtian³, CHEN Xing^{1,2*}, ZHU Lijuan^{1,2*}

1 National Park Research Center, Sanming University, Sanming, Fujian, China

2 Medical Plant Exploitation and Utilization Engineering Research Center, Sanming University, Sanming, Fujian, China

3 State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Institute of Plant Virology, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang, China

Abstract: *Sauropus androgynus* has high medicinal and edible values. However, its growth is threatened by various viral diseases, which severely affect both the yield and quality of *S. androgynus*. Since research is limited regarding the viral diseases affecting *S. androgynus* in China. **[Objective]** To isolation, identifying the viral pathogens of *S. androgynus* in China. **[Methods]** The small RNA sequencing (sRNA-seq) data of *S. androgynus* leaves from our previous study were analyzed. RT-PCR was employed to detect the datura yellow vein virus (DYVV) in leaf samples of 10 different varieties of *S. androgynus*. With the total RNA of positive S4 leaves as a template, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), rapid amplification of cDNA ends (RACE), and Sanger sequencing were employed to determine the full-length genome sequence of the DYVV isolate from *S. androgynus* (named DYVV-sa). **[Results]** The analysis of the sRNA-seq data revealed the presence of DYVV in *S. androgynus*. RT-PCR detection of different varieties showed that only S4 and S12 tested positive for DYVV, and the full-length sequence of DYVV-sa was cloned based on S4. The genome of DYVV-sa was 13 185 nt in length and contained six open reading frames (ORFs). The DYVV-sa showed the identity as high as 95.8%–98.1% with the DYVV sequences isolated from *Thunbergia alata*. Moreover, the phylogenetic tree also demonstrated that DYVV-sa shared the closest genetic relationship with DYVV, clearly indicating that DYVV-sa was an isolate of DYVV. In addition, the majority of DYVV-sa virus-derived small interfering RNA (vsiRNA) were 21 nt and 22 nt, and those of 21 nt were more abundant. The first nucleotide at the 5' termini of vsiRNAs derived from DYVV-sa preferred U and C. The proportion of vsiRNAs derived from the negative strand was higher than that from the positive strand. The distribution of vsiRNAs along the viral genome was generally even, with some hot spots formed in local regions. **[Conclusion]** This study found that DYVV can infect *S. androgynus* and successfully obtains the full-length genomic sequence of the DYVV-sa isolate. These findings expand the known natural host range of DYVV, provide crucial theoretical foundations for research on its genetic diversity and phylogenetic relationship, and offer clues for

the prevention and control of viral diseases attacking *S. androgynus*.

Keywords: *Sauropus androgynus*; datura yellow vein virus isolate; virus-derived small interfering RNA

守宫木 [*Sauropus androgynus* (L.) Meer] 又名五指山野菜、天绿香、树仔菜、越南菜、泰国枸杞、甜菜等, 属大戟科守宫木属的多年生常绿灌木。广泛分布于印度、马来西亚、中国等地区, 在我国普遍种植于海南、广东、广西、云南和福建。守宫木具有较高的食用和药用价值, 其嫩梢和嫩叶均可食用, 且与其他蔬菜相比维生素含量更高, 特别是维生素 A 和 C; 其根、叶和种子均可药用, 从中提取的植物化学和生物成分被报道可用于治疗各种疾病, 包括喉炎、咳嗽、肝炎、便秘、糖尿病、关节炎、癌症和衰老等^[1-4]。植物的生长及其活性化合物的代谢在非生物和生物胁迫下均会发生改变^[5], 病毒侵染是多年生植物常见的生物胁迫。因此对守宫木病毒的研究将有助于深入了解其所面临的生物胁迫。

守宫木在生长过程中易受到多种病毒的感染, 目前在泰国守宫木上发现了 4 种病毒, 分别为胜红蓟黄脉病毒 (*Ageratum yellow vein virus*, AYVV)、新德里番茄曲叶病毒 (tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV)、守宫木卷叶病毒 (*Sauropus leaf curl virus*, SaLCV)^[6] 和守宫木黄化病毒 (*Sauropus yellowing virus*, SaYV)^[7]。2024 年, 本实验室通过宏转录组测序 (metatranscriptome, RNA-seq), 在我国守宫木上发现并克隆了一个属于 *Allexivirus* 的新病毒——守宫木病毒 (*Sauropus androgynus virus*, SaV)^[8]。然而, 目前有关我国守宫木病毒病害的研究报道甚少, 导致其病害预防缺少理论依据。因此深入鉴定和研究我国守宫木病毒病原对于病害防治具有重要意义。

曼陀罗黄脉病毒 (*Datura yellow vein nucleorhabdovirus*, DYVV) 属于弹状病毒科 (Rhabdoviridae)、乙型弹状病毒亚科

(Betarhabdovirinae) 中的乙型细胞核弹状病毒属 (*Betanucleorhabdovirus*)^[9-11]。Thomas 等^[9] 于 20 世纪 80 年代在澳大利亚叶脉黄化病症的曼陀罗中首次分离获得该病毒。通过嫁接实验发现, 该病毒可感染几种番茄 (*Grosse Lisse*、*Floradade*、*Rutgers*、*Strobelee* 和 *Scorpio*)、茄子 (*Solanum melongena*)、心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 和普通烟 (*N. tabacum*), 但不感染矮牵牛 (*Petunia × hybrida*)、黄花烟草 (*N. rustica*)、假酸浆 (*Nicandra physalodes*)、辣椒 (*Capsicum annuum*)、龙葵 (*Solanum nigrum*) 和马铃薯 (*Solanum tuberosum*)^[9]。此外, 该病毒无法通过机械接种或种子传播^[9]。在介体昆虫研究中发现, DYVV 在银叶蝉 (*Omiya argentata*) 和阿朱尔叶蝉 (*Aljulia aljuljae*) 体内的潜伏期分别为至少 24 d 和 14 d; 在叶蝉 (leafhoppers) 与飞虱 (planthoppers) 混合种群中的潜伏期为 8–18 d; 而在蚜虫 (aphids) 和甲虫幼虫 (beetle larvae) 中未观察到明显潜伏期, 且这些介体昆虫均不具备传播该病毒的能力^[9]。随后, Dietzgen 等^[12] 从观赏植物黑叶苏珊 (*Thunbergia alata*) 中分离获得 DYVV, 利用简并引物获得了 DYVV 聚合酶基因的短片段, 证实了该分离物与 Thomas 等^[9] 报道的 DYVV 序列高度相似, 且与莴苣黄网弹状病毒 (*Sonchus yellow net nucleorhabdovirus*, SYNV) 具有最密切的系统发育关系^[13]。2015 年, Dietzgen 等^[14] 进一步分析了黑叶苏珊中 DYVV 全基因组序列, 发现该病毒为负单链 RNA 病毒, 全长 13 188 nt, 含互补的 3' 先导序列和 5' 尾序, 可编码由高度保守的基因间区隔开的 6 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs), 分别为核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N)、磷酸蛋白 (phosphoprotein, P)、运动蛋白 (movement protein, P3)、基质蛋白 (matrix protein, M)、糖蛋白 (glycoprotein, G) 和 RNA 依赖

的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, L)。利用瞬时表达系统观察发现, 在本生烟 (*Nicotiana benthamiana*) 中除 G 外, 其余蛋白均定位于细胞核, 其中 N 和 P 共表达时相互作用明显且 N 蛋白的存在可增加 P 核定位^[14]。除上述自然感染的 2 个寄主外, 尚未见 DYVV 自然侵染其他寄主的报道。因此进一步鉴定 DYVV 自然界中潜在的寄主, 可为其防控提供依据。

本研究从福建省福州市疑似感染病毒的守宫木植株中检测并克隆了 DYVV 分离物的基因组全长, 暂命名为 DYVV-sa, 并对其全基因组序列和 vsRNA 进行了分析, 以期对 DYVV 的多样性、进化和宿主拓展提供新的见解, 并为守宫木上该病毒的防治提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 植物样品

2023 年 9 月, 于福建省福州市福建农林大学田间种植区分别采集 10 种不同品种守宫木疑似病叶样品 2-3 片, 依次编号为 S1、S2、S3、S5、S4、S8、S10、S11、S13、S12。样品采集后立即装入纸带, 并迅速投入液氮中进行冷冻处理以确保 RNA 完整性, 随后转移至-80 °C 冰箱保存备用。

1.2 载体和菌株

载体 pMDTM 19-T 购自 TaKaRa 公司, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 由本实验室保存。

1.3 主要试剂和引物

水饱和酚 pH 4.7-5.5, 北京索莱宝科技有限公司; M-MLV Reverse Transcriptase Kit, Promega 公司; 2×*Taq* Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; StarMarker D2000 Plus, 北京康润诚业生物科技股份有限公司; 5' RACE 试剂盒, Invitrogen 公司; *E. coli* poly(A) polymerase, NEB 公司; 多功能 DNA 纯化回收试剂盒, 北京博迈德基因技术有限公司; 质粒提取试剂盒, Omega 公司; 其余常用化学药品, Sigma-

Aldrich 公司或国药集团化学试剂有限公司。本研究所用的引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 具体见表 1。

1.4 RNA 提取

取适量的守宫木叶片于灭菌的研钵中, 加入液氮并充分研磨成粉末后, 立即装入经液氮冻过的 2.0 mL 离心管中, 至 1/3 体积; 迅速加入 500 μL 80 °C 预热的 RNase 抑制剂与等体积的 RNA 提取缓冲液(0.1 mol/L LiCl、pH 8.0 10 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L EDTA 和 10% SDS), 振荡混匀 30 s, 静置 3-5 min; 再加入等体积的 CHCl₃, 与上述同样振荡和静置后; 常温 13 523×g 离心 10 min; 取 450-500 μL 上清于新的 1.5 mL 离心管中并加入等体积的 4 mol/L LiCl 溶液; 混匀并于-20 °C 静置≥4 h; 4 °C、13 523×g 离心 15 min, 取出 RNA 沉淀并用 75% 乙醇洗涤 2 次, 用适量的 DEPC H₂O 溶解, -20 °C 保存。

1.5 逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

以总 RNA 为模板, 将其逆转录为互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。逆转录反应体系(10 μL): 将 1 μg RNA 与 0.5 μL 3'端下游引物(10 μmol/L)混匀并用 ddH₂O 补足至 5.5 μL, 65 °C 孵育 5 min 后冰浴 2 min, 依次加入 2 μL 5×M-MLV buffer, 2 μL 2.5 mmol/L dNTPs 和 0.5 μL M-MLV RT 酶(200 U/μL), 混匀后于 42 °C 孵育 30 min, 最后于 85 °C 加热 5 s 失活。以逆转录获得的 cDNA 为模板, 经 PCR 扩增获得目的片段。PCR 反应体系: cDNA 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 2×*Taq* mix 10 μL, ddH₂O 8 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸(1 kb/min), 共 30 个循环。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Note
DYVV-3705F	GATTTCTTCTGGATGCCC	Virus detection for DYVV-sa
DYVV-4276R	CTGCGACATAGTATCTTTAGCC	
DYVV-6946F	ATTTCTTGACGGAGCGAG	Virus detection for DYVV-sa
DYVV-7549R	GCAGCATTGAGAGGTTAGA	
DYVV-R1	ACGAACATGATTGTGGAGTC	5' RACE
DYVV-R2	CTCTATGAATTGGAAATGCATGC	
AAP	GGCCACGCGT CGACTAGTAC GGGGGGGGGG GGGGGGGG	
UAP	CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTAC	
DYVV-F1	TTATGTTTCAGTGCCACCTGCA	3' RACE
DYVV-F2	CTCTTCATCATTATAGTACTGATC	
R1	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTTT	
R2	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	
DYVV-001F	TAGAGATAGAAACACACAATATACAATCTACG	Amplification of full-genome
DYVV-1398R	CAACGTGAGGGTCACATCAG	
DYVV-1385F	TGACCCTCACGTTGGACCAT	Amplification of full-genome
DYVV-2949R	CCTTACCCGATATCCAATG	
DYVV-2934F	GGATATCGGGTGAAGGTATGC	Amplification of full-genome
DYVV-4378R	GGAGATTGACAGCTGTCAGC	
DYVV-4351F	GAATACGGGCTGACAGCT	Amplification of full-genome
DYVV-5817R	GCAGGCTGTTTCGAGTCAG	
DYVV-5786F	CATATGCTGGGGTCCTGAC	Amplification of full-genome
DYVV-7254R	CATCAGCAGAAGCAGCTGA	
DYVV-7233F	ATTTTCAGCTGCTTCTGCTGA	Amplification of full-genome
DYVV-8752R	CGCAAAGAAAGTACTAAATGCACTGA	
DYVV-8720F	GCCAACCTCAGTGCATTTAGTAC	Amplification of full-genome
DYVV-10225R	CGATAAGAGGACGGATATCAG	
DYVV-10213F	CGTCCTTATCGATATTACCGTA	Amplification of full-genome
DYVV-11677R	CCTTTCTAAGACATCTATCCTTCCTAG	
DYVV-11678F	AGGAGGAGGGAAGTTGACTG	Amplification of full-genome
DYVV-13185R	GAGATAGAAACACACAATATACTATCTGCTCA	

1.6 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术

1.6.1 5' RACE

取病毒阳性的 S4 样品总 RNA 5 μg , 加 0.25 μL 引物 R1 (10 $\mu\text{mol/L}$), 补水至 15.5 μL , 混匀后 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 冰浴 1 min; 依次加入 2.5 μL 10 \times PCR buffer, 1 μL 25 mmol/L MgCl_2 ,

2.5 μL 10 mmol/L dNTPs, 2.5 μL 0.1 mol/L DTT, 混匀后 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 min 后加入 1 μL SuperScriptTM II RT 酶, 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 min。向反应液加入 1 μL RNase mix, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 并按照 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends 试剂盒的说明书纯化获得 cDNA。接着取 10 μL cDNA, 5 μL 5 \times Tailing buffer, 2.5 μL 2 mmol/L dCTP 或

dATP, 6.5 μL ddH₂O 进行 cDNA 的 3' 末端加尾反应, 先 94 °C 加热 2–3 min, 冰浴 1 min, 后加入 1 μL 15 U/ μL 的 TdT 酶, 37 °C 孵育 10 min, 65 °C 加热 10 min。最后以加尾的 cDNA 为模板, 按照 1.5 节中的 PCR 方法进行第 1 轮扩增(引物 AAP/R1), 以稀释 50–100 倍的第 1 轮 PCR 产物为模板, 进行第 2 轮扩增(引物 UAP/R2)。

1.6.2 3' RACE

将 S4 样品提取的总 RNA 加上 poly(A) 尾, 具体为: 10 μg RNA, 5 μL 10 \times buffer, 5 μL ATP (10 mmol/L), 1 μL *E. coli* Poly(A) polymerase, ddH₂O 补足至 50 μL , 37 °C 反应 10 min。随后根据 TRIzol 试剂的说明书纯化 RNA, 最后利用与 5' RACE 相似策略 PCR 扩增目的片段。

1.7 PCR 产物测序

目的条带经 DNA 纯化试剂盒回收纯化后, 克隆至 pMDTM 19-T 载体, 并转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞。经菌落 PCR 筛选获得阳性克隆, 提质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 至少对 3 个阳性克隆进行了测序。

1.8 序列分析

利用 DNAMAN v10.0 和 SnapGene v4.4.2 拼接组装基因组全长序列、并对核苷酸和氨基酸序列进行分析比对。基于 MEGA X 中的最大似然法(maximum likelihood method)构建系统发育树^[15], bootstrap 设置为 1 000 次重复, 频率 < 50% 被隐藏。

1.9 小 RNA 测序(small RNA sequencing, sRNA-seq)数据分析

采用 FastQC 对原始 sRNA-seq 数据进行质量评估, 然后使用 Cutadapt 工具(v1.16)^[16] 进行处理以去除接头区域和低质量测序读段(reads), 只保留长度在 18–30 个核苷酸范围内且不含模糊碱基(N)的干净读段用于后续分析。使用 VirusDetect 软件鉴定的小 RNA 病毒组(默认参数设置)^[17], 首先将小 RNA 序列组装为重叠群(contigs), 所得重叠群通过 BLASTx/BLASTn 算

法与已知的病毒序列数据库进行比对。为了深入解析病毒来源的小干扰 RNA 的分子特征, 使用 Bowtie 软件将干净的小 RNA 读段与 DYVV-sa 病毒参考基因组进行比对^[18], 最多允许一次错配。分析来源于 DYVV-sa 病毒基因组的 vsRNAs, 研究其 vsRNA 大小分布、5' 端碱基偏好性、基因组分布以及链特异性等特征。

2 结果与分析

2.1 守宫木中 DYVV 病毒检测

本实验前期对疑似病毒病症守宫木叶片进行 sRNA-seq, 并将获得的数据经序列组装、拼接及比对发现, 除了存在本实验前期报道的 SaV^[8] 外, 还存有 DYVV。因田间种植的守宫木品种不同, 为了明确 DYVV 在不同品种守宫木中的感染情况, 本研究基于实验前期拼接获得的守宫木中 DYVV 参考序列, 设计 2 对引物(DYVV-3705F/4276R 和 DYVV-6946F/7549R) 对 10 个不同品种样品进行 RT-PCR 检测。结果发现其中 2 种样品(S4 和 S12) 可扩增到大小约 600 bp 的特异性目的条带(图 1), 经测序确定为病毒序列, 结果表明守宫木确实存在 DYVV 感染, 但感染率较低。

观察发现 S4 和 S12 守宫木叶片呈现卷叶和皱缩的病症(图 2), 但经检测发现两者均含有 SaV (数据未显示), 因此目前无法确定 DYVV 单独感染而引发的病症。

2.2 DYVV 守宫木分离物 5' 和 3' 末端序列的确定

为了明确守宫木中 DYVV 的 5' 和 3' 末端序列, 基于拼接的参考序列设计相关引物, 以提取 S4 样品的总 RNA 为模板, 利用 5' 和 3' RACE 技术获得该病毒的末端片段(图 3)。获得的片段经纯化克隆至 pMD19-T 载体, 均筛选 10 个阳性克隆进行测序, 测序结果经比对发现 5' 和 3' 末端所有克隆的序列几乎一致(图 4), 因此可确定 5' 和 3' 末端的序列。

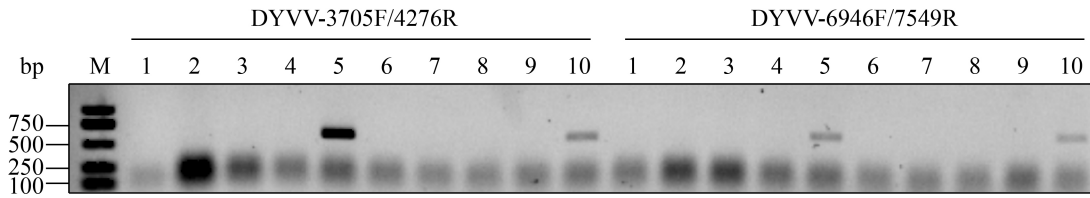


图1 田间守宫木叶片样品的RT-PCR检测及样品的病症。M: DNA marker; 1-10: 分别为田间采集的S1、S2、S3、S5、S4、S8、S10、S11、S13和S12不同品种守宫木样品。

Figure 1 Detection of field *Sauropus androgynus* leaf samples by RT-PCR. M: DNA marker; 1-10: Representing different varieties of *Sauropus androgynus* samples collected from the field, designated as S1, S2, S3, S5, S4, S8, S10, S11, S13 and S12, respectively.

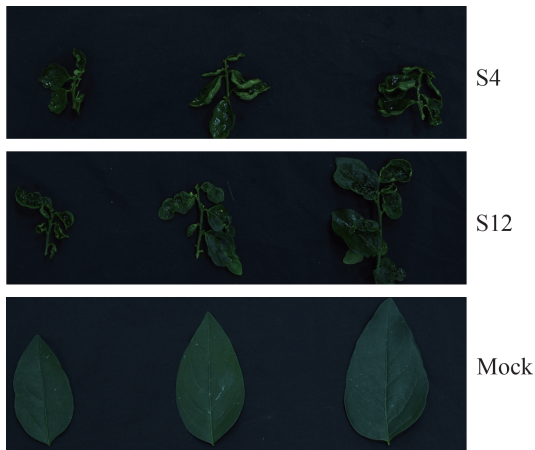


图2 田间守宫木DYVV阳性叶片的症状

Figure 2 Symptoms of DYVV-positive samples in *S. androgynus* leaves.

2.3 DYVV 守宫木分离物基因组全长的扩增

基于上述确定的 5'和 3'末端序列及拼接获得的参考序列, 设计 9 对覆盖全基因组的引物(表 1), 同样以 S4 的总 RNA 为模板, 分别进行 RT-PCR。每对引物可扩增获得与预期大小一致的特异性目的片段, 约为 1 500 bp(图 3)。经纯化后与 pMD™ 19-T 载体连接, 并转化感受态细胞, 至少筛选 3 个阳性克隆进行双向测序。最后, 将所有测序结果以及上述确定的 5'和 3'末端序列拼接获得 DYVV 守宫木分离物基因组全序列信息, 暂命名为 DYVV-sa, 并提交至 NCBI

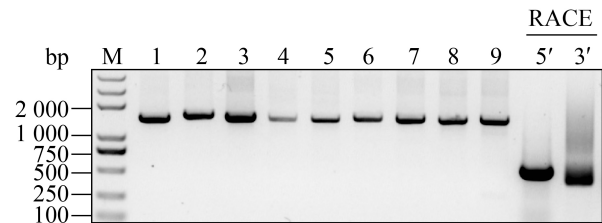


图3 DYVV-sa基因组全长及5'和3'末端的扩增。泳道M: DNA marker; 泳道1-9: 分段扩增DYVV-sa的重叠PCR产物; 5' RACE: 5'末端扩增的PCR产物; 3' RACE: 3'末端扩增的PCR产物。

Figure 3 Amplification of the full-length genome and its 5' and 3' terminal regions of DYVV-sa. Lane M: DNA marker; Lanes 1-9: Overlapping RT-PCR products; 5' RACE: Amplification product of 5' terminal; 3' RACE: Amplification product of 3' terminal.

数据库, 登录号为 PQ816761。

2.4 DYVV 守宫木分离物全基因组结构分析

DYVV-sa 全基因组由 13 185 nt 组成, 比黑叶苏珊中获得的 DYVV 分离物(NC_028231)少 3 个核苷酸, G+C 含量为 53.2%。经预测反向互补链 RNA (complementary RNA, cRNA)可编码 6 个 ORFs, 其基因组结构如图 5 所示。DYVV 5' UTR 和 3' UTR 长度分别为 164 nt 和 149 nt。ORF1 (165-1 517 nt)编码 50.59 kDa N 蛋白, 是病毒核衣壳的主要组成成分, 可调节基因组

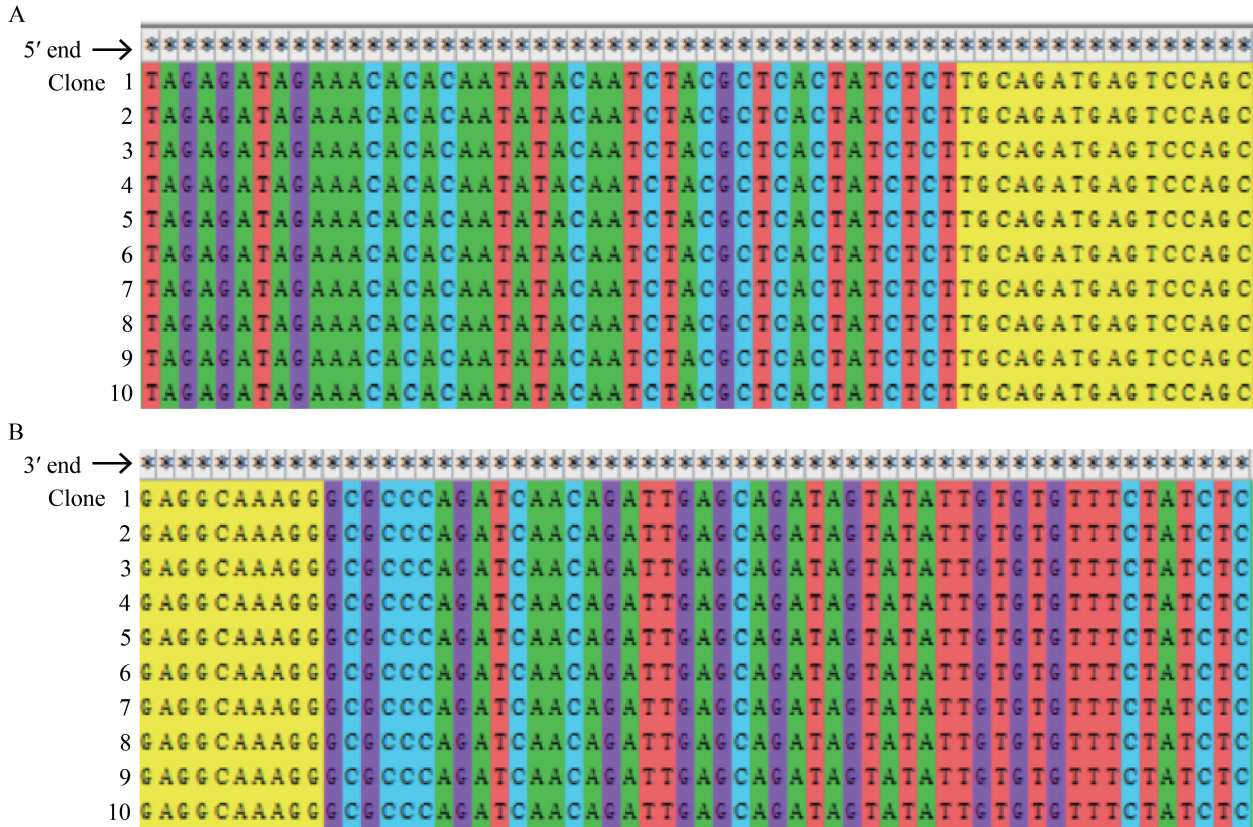


图4 DYVV-sa 5'和3'末端序列的确定。A: 5' RACE的测序结果; B: 3' RACE测序结果。

Figure 4 Confirmation of 5' and 3' terminal sequences of DYVV-sa. A: The sequencing results of 5' RACE; B: The sequencing results of 3' RACE.

的转录和复制，还可诱导细胞介导的免疫应答反应^[11]；ORF2 (1 578–2 561 nt)和 ORF3 (2 642–3 607 nt)分别编码 36.86 kDa 的 P 蛋白和 36.30 kDa 的 P3 蛋白，被认为是病毒聚合酶的辅助因子，主要介导 L 蛋白在 N-RNA 模板上正确定位与连接^[11]；ORF4 (3 730–4 584 nt)编码 31.53 kDa M 蛋白，该蛋白被认为可调节基因组 RNA 转录、促进植物弹状病毒的芽生过程以及参与核质间的运输和基因的表达，是病毒粒体的内部组分^[11]；ORF5 (4 626–6 554 nt)编码 70.73 kDa 的 G 糖蛋白，主要负责与宿主细胞受体的结合，并引发细胞介导的免疫反应^[11]；ORF6 (6 716–13 036 nt)编码 240.05 kDa 的 L 聚合酶，主要参与病毒的转录与复制^[11]。

2.5 DYVV 守宫木分离物全基因组相似性比对

进一步将 DYVV-sa 与乙型细胞核弹状病毒属的其他成员进行多序列比对，结果发现与 DYVV 最为相似，基因组核苷酸一致性为 97.2%，各 ORFs 氨基酸一致性为 95.8%–98.1% (表 2)，远高于该属成立新种的标准——全基因组的核苷酸序列一致性小于 75%，因此明确 DYVV-sa 是 DYVV 在守宫木上的一个分离株。

2.6 DYVV 守宫木分离物的亲缘关系

根据 ICTV 分类标准，本研究采用弹状病毒科常用的 L 蛋白构建系统发育树^[11]，以明确 DYVV-sa 在乙型细胞核弹状病毒属中的进化地位。基于 MEGA X 软件，选用 LG+G+I+F 模

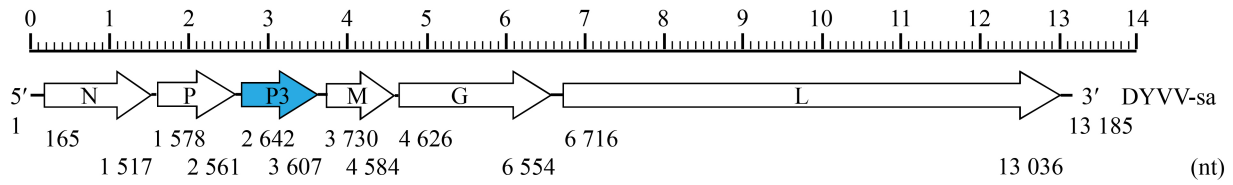


图5 DYVV-sa基因组反向互补链(正链)的示意图。1-13 185 nt: 指DYVV-sa基因组全长; 165-1 517 nt: 编码N蛋白; 1 578-2 561 nt: 编码P蛋白; 2 642-3 607 nt: 编码假定细胞间运动的蛋白P3 (蓝色填充); 3 730-4 584 nt: 编码M蛋白; 4 626-6 554 nt: 编码G蛋白; 6 716-13 036 nt: 编码L蛋白。

Figure 5 Schematic representation of DYVV-sa genomes shown in reverse (positive-sense) polarity. 1-13 185 nt: Complete genome of DYVV-sa; 165-1 517 nt: Encoding N protein; 1 578-2 561 nt: Encoding P protein; 2 642-3 607 nt: Encoding putative cell-to-cell movement protein P3 is highlighted by blue; 3 730-4 584 nt: Encoding M protein; 4 626-6 554 nt: Encoding G protein; 6 716-13 036 nt: Encoding L protein.

表2 DYVV-sa与乙型细胞核弹状病毒属其余成员全基因组核苷酸和各ORFs氨基酸序列的两两比较
Table 2 Pairwise comparisons of nucleotide (nt) and putative amino acid (aa) sequence identities between DYVV-sa and other betanucleorhabdoviruses

Virus	Nucleotide sequence identity (%)	Amino acid sequence identity (%)					
		N	P	P3	M	G	L
AaNv	41.8	36.8	12.5	23.2	14.3	25.5	37.4
ApRVA	44.0	45.7	17.1	20.0	17.2	28.3	39.2
AscSyV2	44.2	40.9	15.3	20.2	19.3	25.4	38.2
BCaRV	49.6	49.1	25.7	26.6	32.2	39.8	49.1
BFTV	39.6	9.6	11.0	8.4	10.6	9.4	50.2
BmV2	66.2	78.7	64.4	72.3	60.6	71.4	67.8
CdVVCV	50.2	57.4	6.5	33.5	28.5	39.1	47.1
CnV1	51.0	53.2	30.3	31.9	31.2	39.3	48.0
DYVV	97.2	96.4	97.6	98.1	95.8	97.1	97.7
PBRV1	53.3	42.8	18.9	22.7	21.8	39.8	43.1
PleArV1	61.9	71.0	46.3	63.9	48.9	65.7	43.1
RhoDeV1	46.6	41.5	20.6	24.1	25.4	32.6	44.3
SYNV	47.2	48.9	24.4	26.6	24.4	40.8	43.5
SYVV	51.8	55.8	29.8	35.6	31.0	47.7	49.0
TarBRV1	48.9	52.5	24.6	24.3	29.4	40.3	45.6
TBRV1	53.7	59.2	32.8	41.1	10.2	9.1	50.0
TBRV2	53.6	59.7	28.8	41.7	37.3	51.4	67.8
ZPNRV	31.8	68.2	36.4	47.7	37.6	49.1	49.0

基因组及各蛋白的比对结果中相似性最高的值加粗。

The maximum percentage of identity observed for the genome and each protein is shown in bold.

型, 通过极大似然算法构建了DYVV-sa的L蛋白与该属其他病毒的系统发育树。结果显示DYVV-sa与DYVV (NC_028231)具有高度相关性, 聚集在一支(图6), 进一步证实了本研究鉴定的病毒为DYVV分离株。

2.7 DYVV-sa 病毒来源的小干扰 RNA 分子特征分析

RNA 沉默是通过产生 21-24 nt 病毒来源的小干扰 RNA (virus-derived small interfering RNA, vsiRNA)介导抗病毒感染的有效防御机制。深入解析 vsiRNAs 的分子特征有助于增强对病毒-宿主相互作用的理。本研究从守宫木样品中共测得 23 085 103 条原始数据, 经严格的质量控制后, 17 610 053 条序列被保留用于下游分析, 其中有 3 207 条 vsiRNAs 被比对到 DYVV-sa 基因组, 基于比对结果发现绝大多数 DYVV-sa vsiRNAs 呈现出两极性特征, 其大小以 21 nt 和 22 nt 为主, 且在 21 nt 处有一个主峰值(图 7A)。已有研究表明, AGO 蛋白(argonaute)对 sRNAs 5'端核苷酸偏好性具有调控作用^[19]。因此, 本研究分析鉴定了 DYVV-sa vsiRNAs 5'端核苷酸的分布, 结果发现其 5'端核苷酸偏好性存在极为显著的差异, 其中以尿嘧啶[uridine (U), 占比 57%]和胞嘧啶[cytosine (C), 占比 33.74%]最为丰富(图 7B)。对 vsiRNAs 基因区域偏好性分析发现, DYVV-sa vsiRNAs 在整个病毒基因组中

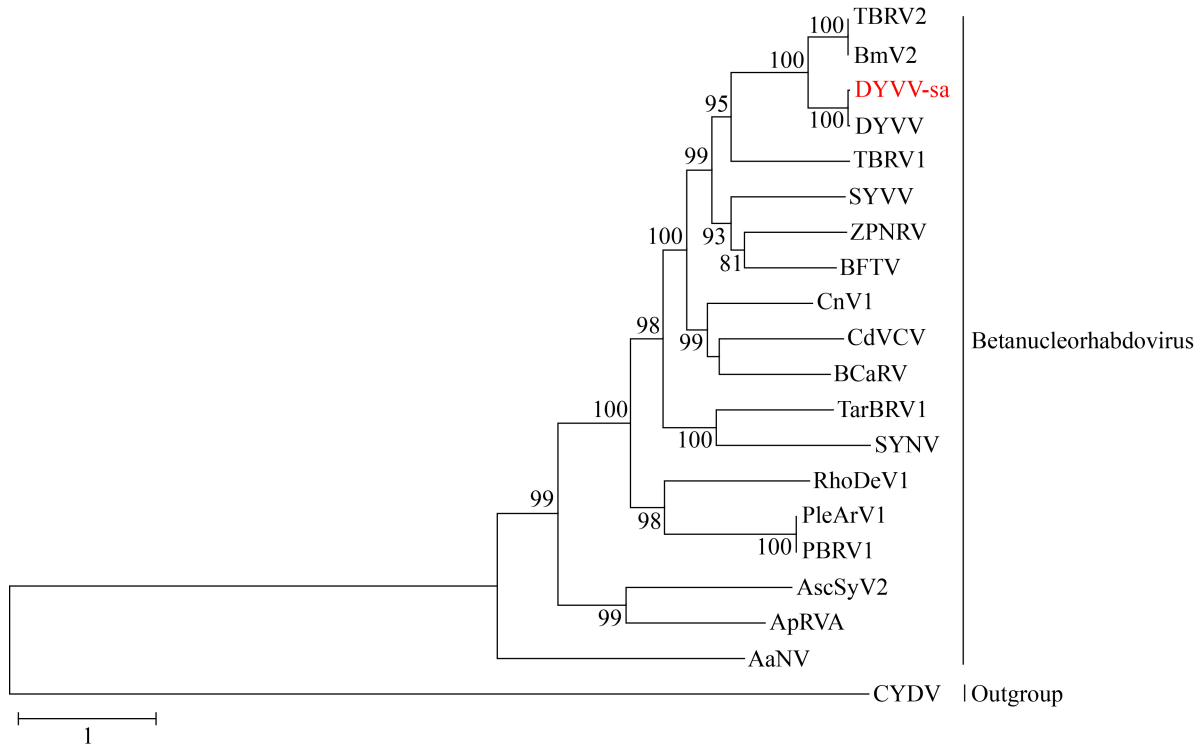


图6 DYVV-sa L蛋白氨基酸序列与乙型细胞核弹状病毒属其他成员系统发育树。基于LG+G+I+F模型，以CYDV为外群，使用MEGA X软件中最大似然法构建发育树，百分比超过50%在分支旁边显示，病毒分离株、缩写、基因组长度和GenBank登录号列于表3。

Figure 6 Phylogenetic trees built on amino acid sequence of L protein of DYVV-sa and other members of genus Betanucleorhabdovirus. The trees were generated using MEGA X and the maximum-likelihood algorithms with 1 000 bootstrap replications based on the LG+G+I+F model, CYDV as the outgroup, the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1 000 replicates) above 50% are shown next to the branches, virus isolates, abbreviations, genomic length and GenBank accession numbers are listed in Table 3.

均有分布，且在基因组前半部分呈现出相对热点区域，同时 21 nt 和 22 nt vsiRNAs 是其主要类型(图 7C)。对 DYVV-sa vsiRNAs 的极性分析结果显示，来源于负链的 vsiRNAs 所占比例相较于正链更高，分别为 58.09% 和 41.91%(图 7D)。

3 讨论与结论

DYVV 最早是于曼陀罗中分离发现的一种乙型细胞核弹状病毒属病毒，后于黑叶苏珊中获得其基因组全长序列，通过嫁接实验可侵染几种番茄品种、茄子、烟草等植株^[9,12-14]，

目前 GenBank 数据库中仅有一条 DYVV 序列 (NC_028231)。

本研究通过对采自福建农林大学田间疑似感染病害的守宫木的 sRNA-seq 数据进行分析，发现除了存在本实验前期报道的 SaV 外^[8]，还存在 DYVV。随后，通过 RT-PCR 检测发现仅 S4 和 S12 两个品种样品表现为 DYVV 阳性。推测感染率低的原因可能是：不同品种守宫木的种植区相互间隔一定距离，并设有物理隔离，有效阻断了病毒传播；其他守宫木品种抗病性较强；本次采样处于病害流行初期，病毒载量

表3 本研究用于系统发育分析的病毒的描述

Table 3 Description of the viruses used for phylogenetic analyses in this article

Species	Virus name	Acronym	GenBank accession number	Genome length (nt)	Genus
Betanucleorhabdovirus alphalycopersici	Tomato Betanucleorhabdovirus 1	TBRV1	OL472119	13 426	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus asclepiadis	Asclepias syriaca virus 2	AscSyV2	BK014299	12 940	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus bacopae	Bacopa monnieri virus 2	BmV2	BK014480	13 165	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus betalycopersici	Tomato Betanucleorhabdovirus 2	TBRV2	OL472114	13 423	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus cardamomi	Cardamom vein clearing virus	CdVCV	MN273311	13 392	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus cnidii	Cnidium virus 1	CnV1	MZ983390	14 002	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus daturae	Datura yellow vein virus	DYVV	KM823531	13 188	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus loti	Birds-foot trefoil-associated virus	BFTV	BK010826	13 626	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus mali	Apple rootstock virus A	ApRVA	MH778545	14 043	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus medicagonis	Alfalfa-associated nucleorhabdovirus	AaNV	MG948563	13 875	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus picridis	Picris betanucleorhabdovirus 1	PBRV1	OL472117	15 193	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus plectranthi	Plectranthus aromaticus virus 1	PleArV1	BK014300	12 994	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus retesonchi	Sonchus yellow net virus	SYNV	L32603	13 720	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus rhododendri	Rhododendron delavayi virus 1	RhoDeV1	BK014301	13 719	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus ribes	Black currant-associated rhabdovirus	BCaRV	MF543022	14 432	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus taraxi	Taraxacum betanucleorhabdovirus 1	TarBRV1	OL472118	13 716	Betanucleorhabdovirus
Betanucleorhabdovirus venasonchi	Sowthistle yellow vein virus	SYVV	MT185675	13 721	Betanucleorhabdovirus

未达到检测阈值。同时, 还将 S4 和 S12 守宫木样品委托云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所分别采用病叶汁液负染和病叶组织超薄切片 2 种方法进行电镜观察, 但在 2 种处理方式下均未观察到典型的病毒粒子结构, 目前猜测可能是由于病毒滴度低而导致的。以 S4 的总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR、RACE 和 Sanger 测序相结合的方法成功获得守宫木中 DYVV 分离物的全基因组序列, 暂命名为 DYVV-sa, 提交至 NCBI 数据库, 序列登录号为 PQ816761。DYVV-sa 的基因组全长为 13 185 nt, 可编码 6 个 ORFs, 依次为 N、P、P3、M、G 和 L 蛋白。目前, 研究表明 N、P 和 L 蛋白主要参与病毒的转录与复制, N、G 蛋白与昆虫介体的

传毒有关^[11]。经多序列比对发现, DYVV-sa 与 DYVV (NC_028231) 最为相似, 一致性高达 95.8%–98.1%, 远高于该属成立新种的标准——全基因组的核苷酸序列一致性小于 75%, 因此明确 DYVV-sa 是 DYVV 在守宫木上的一个分离物, 且不同寄主 DYVV 进化变异程度低。系统发育树分析结果显示, DYVV-sa 与 DYVV 分离物(NC_028231)亲缘关系最近, 聚集在一支, 该结果进一步说明了 DYVV-sa 是 DYVV 的分离株。

进一步分析 DYVV-sa 的 vsiRNAs 的分子特征, 发现 DYVV 感染能引发守宫木 RNA 沉默介导的抗病毒免疫, 来自 DYVV-sa 的 vsiRNAs 主要为 21 nt 和 22 nt, 其中 21 nt 最为丰富。各

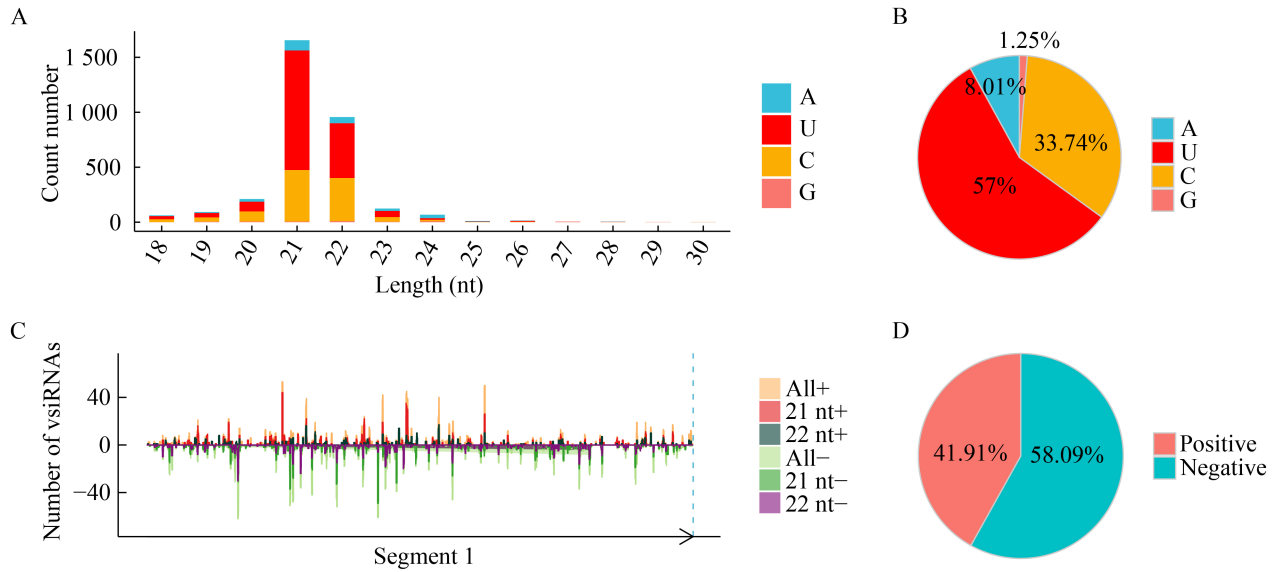


图7 DYVV-sa来源的小干扰RNA的概述。A: DYVV-sa来源的小干扰RNA的长度分布; B: DYVV-sa来源的小干扰RNA 5'端核苷酸的偏好性; C: DYVV-sa来源的小干扰RNA沿病毒基因组的分布; D: DYVV-sa来源的小干扰RNA正负链比例。

Figure 7 Profile of DYVV-sa derived small interfering RNAs (vsiRNAs). A: Length distribution of DYVV-sa vsiRNAs; B: 5' terminal nucleotide preference of DYVV-sa vsiRNAs; C: Distribution of vsiRNAs alongside the viral genome of DYVV-sa; D: vsiRNAs polarity of DYVV-sa.

种 Dicers/DCLs 参与不同大小 vsiRNAs 的加工过程, DCL4 主要负责产生 21 nt vsiRNAs, 而 DCL2 则负责产生 22 nt vsiRNAs, 后者在 DCL4 的活性受到抑制或受损时在对抗 RNA 病毒方面发挥着关键作用^[20-21]。碱基偏好性发现 DYVV-sa 的 vsiRNAs 5'端偏好 U 和 C, 已知 sRNA 的 5'端初始核苷酸通常可调节其进入植物中特定 AGO 复合物的类型, 该结果表明 AGO1 或 AGO5 参与了 DYVV-sa 来源的 siRNAs 招募和分类^[19]。本研究结果拓展了 DYVV 潜在的天然寄主, 丰富了守宫木病毒病害的病原类型, 为 DYVV 分离株的遗传多样性研究和进化分析提供了基础, 更为守宫木病毒病害的防治提供了理论依据。

作者贡献声明

刘珊羽: 参与实验及初稿撰写; 张添宏: 实验实施与数据分析; 池毓斌: 实验设计与结果监管; 徐钟天: sRNA-seq 数据分析; 谌星:

提供守宫木病叶样本并参与文稿修改; 朱丽娟: 研究框架设计、论文撰写、投稿及全程修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] ZHANG BD, CHENG JX, ZHANG CF, BAI YD, LIU WY, LI W, KOIKE K, AKIHISA T, FENG F, ZHANG J. *Sauropus androgynus* L. Merr.: a phytochemical, pharmacological and toxicological review[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 257: 112778.
- [2] MADHU CS, MANUKUMAR HM, BASAVARAJU P. New-vista in finding antioxidant and anti-inflammatory property of crude protein extract from *Sauropus androgynus* leaf[J]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2014, 13(4): 375-383.
- [3] PURBA RAP, PAENGKOUM P. Exploring the phytochemical profiles and antioxidant, antidiabetic, and antihemolytic properties of *Sauropus androgynus* dried leaf extracts for ruminant health and production[J]. *Molecules*, 2022, 27(23): 8580.

- [4] EKASARI W, FATMAWATI D, KHOIRIAH SM, BAQIUDDIN WA, NISA HQ, MAHARUPINI AAS, WAHYUNI TS, OKTARINA RD, SUHARTONO E, SAHU RK. Antimalarial activity of extract and fractions of *Sauropus androgynus* (L.) Merr[J]. *Scientifica*, 2022, 2022: 3552491.
- [5] SHAHRAJABIAN MH, KUANG Y, CUI HR, FU L, SUN WL. Metabolic changes of active components of important medicinal plants on the basis of traditional Chinese medicine under different environmental stresses[J]. *Current Organic Chemistry*, 2023, 27(9): 782-806.
- [6] SHIH SL, TSAI WS, LEE LM, KENYON L. Molecular characterization of begomoviruses infecting *Sauropus androgynus* in Thailand[J]. *Journal of Phytopathology*, 2013, 161(2): 78-85.
- [7] KNIERIM D, MAISS E, MENZEL W, WINTER S, KENYON L. Characterization of the complete genome of a novel polerovirus infecting *Sauropus androgynus* in Thailand[J]. *Journal of Phytopathology*, 2015, 163(9): 695-702.
- [8] ZHU LJ, SU LY, CHEN X, PAN SF, XIA FG, HAN YH, XU ZT, XU Q. Characterization of the complete genome of a novel allexivirus infecting *Sauropus androgynus* in China[J]. *Archives of Virology*, 2024, 170(1): 16.
- [9] THOMAS JE, DIETZGEN RG. Characterisation of *datura* yellow vein virus, a newly described rhabdovirus from Australia[J]. *Annals of Applied Biology*, 1991, 118(2): 339-349.
- [10] KUHN JH, ADKINS S, ALIOTO D, ALKHOVSKY SV, AMARASINGHE GK, ANTHONY SJ, AVŠIČ-ŽUPANČIČ T, AYLLÓN MA, BAHL J, BALKEMA-BUSCHMANN A, BALLINGER MJ, BARTONIČKA T, BASLER C, BAVARI S, BEER M, BENTE DA, BERGERON É, BIRD BH, BLAIR C, BLASDELL KR, et al. 2020 taxonomic update for phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(12): 3023-3072.
- [11] WALKER PJ, FREITAS-ASTÚA J, BEJERMAN N, BLASDELL KR, BREYTA R, DIETZGEN RG, FOOKS AR, KONDO H, KURATH G, KUZMIN IV, RAMOS-GONZÁLEZ PL, SHI M, STONE DM, TESH RB, TORDO N, VASILAKIS N, WHITFIELD AE, ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: *Rhabdoviridae* 2022[J]. *Journal of General Virology*, 2022, 103(6): 001689.
- [12] DIETZGEN RG, GOWANLOCK DH, THOMAS JE. Purification and identification of a rhabdovirus from *Thunbergia alata*[J]. *Journal of Phytopathology*, 1992, 135(2): 99-106.
- [13] DIETZGEN RG, TAN ER, YONG AHS, FENG CWA. Partial polymerase gene sequence, phylogeny and RT-PCR diagnostic assay for *datura* yellow vein nucleorhabdovirus[J]. *Australasian Plant Disease Notes*, 2013, 8: 21-25.
- [14] DIETZGEN RG, INNES DJ, BEJERMAN N. Complete genome sequence and intracellular protein localization of *datura* yellow vein nucleorhabdovirus[J]. *Virus Research*, 2015, 205: 7-11.
- [15] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [16] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. *EMBnet Journal*, 2011, 17(1): 10.
- [17] ZHENG Y, GAO S, PADMANABHAN C, LI RG, GALVEZ M, GUTIERREZ D, FUENTES S, LING KS, KREUZE J, FEI ZJ. VirusDetect: an automated pipeline for efficient virus discovery using deep sequencing of small RNAs[J]. *Virology*, 2017, 500: 130-138.
- [18] LANGMEAD B, TRAPNELL C, POP M, SALZBERG SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(3): R25.
- [19] MI SJ, CAI T, HU YG, CHEN YM, HODGES E, NI FR, WU L, LI S, ZHOU HY, LONG CZ, CHEN S, HANNON GJ, QI YJ. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis Argonaute* complexes is directed by the 5' terminal nucleotide[J]. *Cell*, 2008, 133(1): 116-127.
- [20] DIAZ-PENDON JA, LI F, LI WX, DING SW. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(6): 2053-2063.
- [21] DING SW. Transgene silencing, RNA interference, and the antiviral defense mechanism directed by small interfering RNAs[J]. *Phytopathology*, 2023, 113(4): 616-625.