

竹花叶病毒强弱株系对烟草转录组的影响

谢鸿志 俞超维 周梦茹 杨靓*

福建农林大学植物病毒研究所

DOI:10.12238/as.v7i6.2597

[摘要] 本研究以竹花叶病毒强病毒株系S和弱病毒株系HA7侵染的本氏烟为对象,利用转录组测序对不同样本间的基因表达差异进行比较。结果表明,与对照组相比,接种HA7,差异基因上调表达503个,下调表达601个,KEGG注释到79个差异基因,共富集到61条通路上,其中萜类骨架的生物合成和淀粉和蔗糖代谢通路富集程度最高;接种S,上调表达732个,下调表达656个,KEGG注释到87个差异基因,共富集到64条通路上,其中精氨酸-脯氨酸代谢和赖氨酸降解通路富集程度最高;但是接种S与接种HA7相比,差异性较少,有137个基因上调,下调表达了39个。统计发现,强弱病毒侵染后与对照组相比,差异表达的基因主要共同富集在类胡萝卜素的生物合成、氰氨基酸代谢、光合作用、光合作用-天线蛋白、植物激素信号转导和萜类骨架的生物合成。

[关键词] 竹花叶病毒; 烟草; 差异表达基因

中图分类号: S432.4+1 **文献标识码:** A

Effect of bamboo mosaic virus on tobacco

Hongzhi Xie Chaowei Yu Mengru Zhou Liang Yang*

Fujian Agriculture and Forestry University Plant Virus Research Institute

[Abstract] This study utilized transcriptome sequencing to analyze the differentially expressed genes of different tobacco samples infected by Bamboo mosaic virus of the strong virus strain S and the weak virus strain HA7. The results indicate that, compared to the control, 503 genes were up-regulated and 601 genes were down-regulated after HA7 inoculation. KEGG annotation identified 79 differential genes, which were enriched in 61 pathways, with the highest enrichment observed in the terpenoid biosynthesis and starch and sucrose metabolism pathways. Inoculation with S resulted in the up-regulation of 732 genes and down-regulation of 656 genes. KEGG annotated 87 differential genes, enriching a total of 64 pathways, particularly in arginine-proline metabolism and lysine degradation pathways. However, when compared inoculation with S to HA7, only 137 genes up-regulated and 39 down-regulated. Statistically, differentially expressed genes were primarily enriched in carotenoid biosynthesis, cyanoamino acid metabolism, photosynthesis, photosynthesis-antenna proteins, plant hormone signaling transduction, and terpenoid skeleton biosynthesis.

[Key words] Bamboo mosaic virus; tobacco; differentially expressed genes

引言

竹亚科(Bambusoideae)属单子叶禾本科(Gramineae)植物,全世界有70多属1200多种,我国竹类植物就有500多种。在竹类栽培过程中,竹花叶病毒(Bamboo mosaic virus, BaMV)的发生和流行威胁着竹类的生存且可能带来严重的经济损失^[1]。BaMV最早在巴西泰山竹(*Bambusa vulgaris*)和孝顺竹(*Bambusa multiplex*)上被发现,后来相继在中国台湾、美国加利福尼亚和佛罗里达以及中国福建等地的不同竹种中被发现,分布范围以及寄主相当广泛^[3-5]。BaMV可使叶片花叶、竹笋和竹秆内部呈褐色条纹病变,造成竹笋木质化、发笋率降低、竹秆节间变短,进而影响竹材的经济价值^[2]。

在电子显微镜下BaMV为长490~510nm的弯曲线形^[6],基因组为正单链RNA^[6],全长6366 bp左右,不计poly(A),5'端带有帽子结构,3'端带有poly(A)尾,基因组结构包含5个开放阅读框。ORF1可编码1个分子质量约为155KDa的复制酶(replicase)。ORF2、3和4组成重叠三基因功能区(triple gene block, TGB),其基因产物分别为TGBp1(28KDa)、TGBp2(13KDa)、TGBp3(6KDa),与病毒在寄主细胞间的运动有关,故又称运动蛋白^[7-9]。ORF5主要编码25KDa的外壳蛋白(coat protein, CP),起包被核酸的作用^[6, 10]。BaMV作为Potexvirus模式研究对象之一,其基因组结构和功能以及作为表达载体的应用上都有了较为深入研究。

本研究选取BaMV强病毒株系S和弱病毒株系HA7分别侵染本

氏烟,接种16天后,对本氏烟草材料进行转录组测序和生物信息学分析,探究被强、弱病毒株系侵染的本氏烟与正常生长的材料之间的基因表达差异,为更好地了解烟草如何抵御病毒侵染和病毒如何影响寄主的生长,以及为植病互作机理的解析提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料: 本氏烟种子由本实验室保存

病毒材料: BaMVS强病毒株系和HA7弱病毒株系

1.2 方法

1.2.1 BaMV病毒的接种。待烟草幼苗长至2~3片真叶时,接种BaMVS强病毒株系和HA7弱病毒株系,利用RT-PCR检测确认BaMV感染,16天后提取叶片RNA送交转录组测序。

1.2.2 生物信息学分析。基因组参考序列比对使用TopHat软件,得到本氏烟序列与reads序列的基因组对比,根据比对结果对reads进行组装;计算基因丰度的方法为RPKM^[11]:RPKM在0.1到3.75之间表示基因低丰度表达;在3.75到15之间为中等丰度;大于15为高丰度水平;差异表达基因分析参数为 $P < 0.05$ 且差异倍数大于2,对样本进行差异表达基因进行筛选,最后用KEGG注释的基因功能信息进行生物学通路的注释和预测,找出在差异表达基因中显著性富集的Pathway,功能富集显著性标准为 $P < 0.05$ 。

1.2.3 荧光定量PCR分析。反应体系为: $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物各 $0.4 \mu\text{L}$ 、ddH₂O $8.2 \mu\text{L}$ 和Master mix $10 \mu\text{L}$ 。反应管中加入待测样品cDNA各 $1 \mu\text{L}$ 。反应条件为: 95°C 预变性30秒, 95°C 变性5秒, 62°C 退火30秒,40个循环。55~ 95°C 的熔解曲线分析,荧光波长为FAM 490nm。数据处理采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法。

2 结果与分析

2.1 转录组测序及拼接分析

表 2-1 转录组测序数据质量分析

Sample	raw_reads	clean_reads	clean_bases	error_rate	Q20	Q30	GC_pct
HA7_1	74312064	73374920	22.01G	0.02	97.71	96.26	43.48
HA7_2	73503047	71833123	21.56G	0.02	97.82	96.07	43.37
HA7_3	70217109	69753543	20.93G	0.02	97.51	95.7	42.6
MOCK_1	44884322	44239017	13.27G	0.02	97.75	95.95	42.77
MOCK_2	41604649	41041259	12.31G	0.02	97.92	96.59	42.66
MOCK_3	44310033	43620761	13.09G	0.02	97.85	96.13	42.78
S_1	64207883	63446358	19.03G	0.02	97.58	96.06	42.14
S_2	64835960	63880528	19.16G	0.02	97.43	95.83	42.51
S_3	62032241	61244504	18.37G	0.02	97.65	96.16	42.21

过滤得到有效转录组数据,测序质量情况如表2-1。对获得的27个数据库的测序质量进行评估,每一个数据库中的error rate小于等于0.02%,对照组、接种HA7弱病毒株系和接种S强病

毒株系9个样品的过滤后的序列数据均大于 4.1×10^8 ;得到的碱基长度不少于12.3G;Phred数值大于20的碱基占总碱基的百分比都大于97.4%;Phred数值大于30的碱基占总碱基的百分比在95%以上;GC含量在42.14%~43.48之间,弱病毒株系HA7的GC含量略高于对照组,对照组的GC含量略高于强度株系S;说明测序数据可靠,达到了信息分析要求。

2.2 差异表达基因的筛选及聚类

图2-1可见,与对照组相比,接种HA7,差异基因上调表达503个,下调表达601个;接种S,上调表达732个,下调表达656个;但是接种S与HA7相比,差异性较少,有137个基因上调,下调表达了39个。层次聚类分析显示:总体来说BaMV HA7和S聚为一类,与对照组在一些基因种类上表达不同,基因聚类结果有较明显的差异,说明强弱病毒间有相似的表达模式;但是在聚类图的下面部分,S与HA7又有部分不同的表达模式,强弱病毒之间基因表达量存在差异性,而组内样品间差异基因的表达模式相似。从聚类结果可以发现接种BaMV后,大量的基因表达发生变化,样品中的差异表达基因可能参与病毒与寄主之间的应答互作通路,具体功能有待进一步研究。

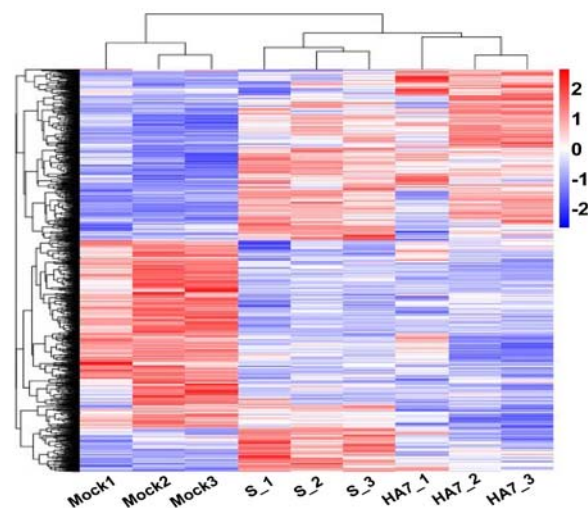


图2-1 差异表达基因的聚类分析

注:列代表不同的样品,行代表不同的差异基因,红色:高表达基因,蓝色:低表达基因

2.3 差异基因的KEGG分析

利用KEGG富集分析如图2-2可见,在S株系处理中,注释到87个差异基因,共富集到64条通路上,其中精氨酸和脯氨酸代谢和赖氨酸降解通路富集程度最高;在HA7处理中,注释到79个差异基因,共富集到61条通路上,其中萜类骨架的生物合成和淀粉和蔗糖代谢通路富集程度最高;统计发现,HA7与S差异表达的基因主要共同富集在类胡萝卜素的生物合成、氨基酸代谢、光合作用、光合作用-天线蛋白、植物激素信号转导和萜类骨架的生物合成。其中KEGG富集分析最显著差异类别是萜类骨架的生物合成,说明萜类骨架的生物合成在病毒胁迫中参与了主要的信号转导和代谢途径。

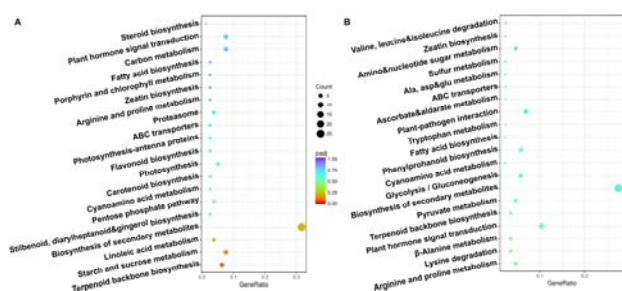


图2-2 差异表达基因的KEGG富集分析

注: 横坐标为KEGG通路上的差异基因数与差异基因总数的比值, 纵坐标为KEGG通路

2.4 差异表达基因的验证

结合已有报道的文献, 从这些差异基因中筛选出均上调表达的生长素IAA响应因子咪唑乙酸酰胺合成酶基因GH3和与ABA通路相关的丝/苏氨酸蛋白激酶SnRK2基因。通过实时荧光定量PCR验证其表达。结果如图2-3所示, 与对照组相比, BaMV均可诱导这2个基因的上调表达, 与转录组测序结果一致。

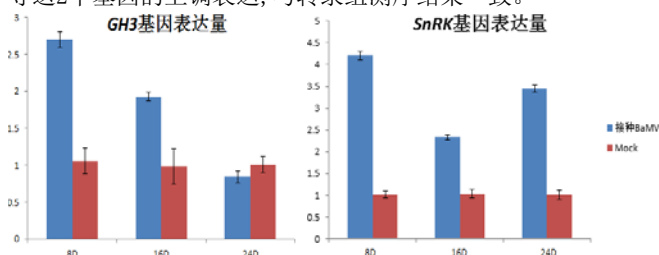


图2-3 差异表达基因的相对定量分析

3 讨论

本研究构建了病毒侵染后烟草的均一化cDNA文库, 可有效地使不同丰度基因的拷贝数趋于一致, 克服了基因转录水平上的差异给测序效率带来的障碍; 也相对提高了低丰度基因的拷贝数, 更容易检测出因时空特异性低表达的基因, 大大增加了低丰度基因的测序几率, 避免了相同基因的重复测序。竹花叶病毒侵染过后的烟草由营养生长转为生殖生长, 株高明显高于健康烟草, 叶片的叶脉凸出变黄枯萎, 开花提前, 但结实率较低。将本氏烟接种BaMV强、弱病毒株系, 经过差异基因的富集分析、KEGG代谢通路分析, 可以推断: 竹花叶病毒会影响GH3.1基因的表达, 从而影响激素IAA的分泌; 同时也会影响SnRK基因家族的表达, 此外我们还发现CP可与SAPK1和SAPK3互作, 从而引起激素ABA的分泌异常^[12], 这些都可能造成本氏烟的生长过程发生改变, 至于具体的作用机理, 仍有待下一步探究。

[基金项目]

国家自然科学基金项目(No.32070177)。

[参考文献]

[1] Lin WW, Gao FL, Yang WT, et al. Molecular characterization and detection of a recombinant isolate of bamboo mosaic virus

from China. Archives of Virology, 2016, 161(4): 1091–1094.

[2] Wang JD, Hsu YH, Lee YS, et al. Importin α 2 participates in RNA interference against bamboo mosaic virus accumulation in *Nicotiana benthamiana* via NbAGO10a-mediated small RNA clearance. Mol Plant Pathol, 2024, 25(1): e13422.

[3] Huang YW, Lee CW, Lin NS, et al. First Report of Distinct Bamboo mosaic virus (BaMV) Isolates Infecting *Bambusa fungho* mii in Vietnam and the Identification of a Highly Variable Region in the BaMV Genome. Viruses, 2022, 28(14): 698.

[4] Lin WW, Wang L, Yan WK, et al. Identification and characterization of Bamboo mosaic virus isolates from a naturally occurring coinfection in *Bambusa xiashanensis*. Archives of Virology, 2017, 162(5): 1335–1339.

[5] Lin MT, Kitajima EW, Cupertino FP, et al. Partial purification and some properties of bamboo mosaic virus. Phytopathology, 1977, 67(12): 1439–1443.

[6] Lin NS, Lin FZ, Huang TY, et al. Genome properties of bamboo mosaic virus. Phytopathology, 1992, 82(7): 731–734.

[7] Lin MK, Hu CC, Lin NS, et al. Movement of potexviruses requires species-specific interactions among the cognate triple gene block proteins, as revealed by a trans-complementation assay based on the bamboo mosaic virus satellite RNA-mediated expression system. Journal of General Virology, 2006, 87(5): 1357–1367.

[8] Wung CH, Hsu YH, Liou DY, et al. Identification of the RNA-binding sites of the triple gene block protein 1 of bamboo mosaic potexvirus. Journal of General Virology, 1999, 80(5): 1119–1126.

[9] Ju HJ, Brown JE, Ye CM, et al. Mutations in the central domain of potato virus X TBP2 eliminate granular vesicles and virus cell-to-cell trafficking. Journal of Virology, 2007, 81(4): 1899–1911.

[10] Lin NS, Lin BY, Lo NW, et al. Nucleotide sequence of the genomic RNA of bamboo mosaic potexvirus. Journal of General Virology, 1994, 75(9): 2513–2518.

[11] Mortazavi A, Williams BA, McCue K et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature methods, 2008, 5: 621–628.

[12] 李桂芳. 竹花叶病毒CP与寄主激酶SAPK3的互作效应[D]. 福建农林大学, 2020.

*通讯作者:

杨靓(1981—), 女, 汉族, 福建福州人, 博士, 副教授, 研究方向: 分子植物病毒。