

油桃茎痘相关病毒中国分离物基因组的分子特征分析

杨丽娟 许云霄 周俊 李世访 卢美光*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 为明确我国油桃茎痘相关病毒(nectarine stem-pitting-associated virus, NSPaV)基因组的分子特征, 利用RT-PCR和RACE技术对NSPaV中国分离物NSPaV-T04基因组进行克隆, 采用最大似然法对得到的NSPaV基因组序列和GenBank中的5条NSPaV基因组序列构建系统发育树, 应用RDP软件对NSPaV基因组序列进行重组分析。结果表明: 中国分离物NSPaV-T04基因组序列全长为4 991 nt, 包括4个开放阅读框(open reading frame, ORF), 其中ORF1与ORF2共同编码1个RdRp P1-P2融合蛋白, ORF3编码1个CP, ORF5与ORF3共同编码CP通读蛋白。系统发育树和序列比较分析结果显示, 中国分离物NSPaV-T04(MN095353)与美国分离物NSPaV/12P42(KT273410)的亲缘关系最近, 核苷酸序列同源性最高, 为96.4%; NSPaV-T04的RdRp P1变异较大, 与GenBank中5条NSPaV基因组核苷酸序列的同源性为90.5%~96.1%, CP较为保守, 核苷酸序列的同源性为96.6%~98.7%。重组分析结果显示, 中国分离物NSPaV-T04为鉴定的一个重组体(韩国分离物SK)的亲本序列, 表明中国分离物NSPaV-T04可能是一个实际的重组体。

关键词: 油桃茎痘相关病毒; 基因组; 分子特征

Molecular characterization of nectarine stem-pitting-associated virus from China

YANG Lijuan XU Yunxiao ZHOU Jun LI Shifang LU Meiguang*

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to molecularly characterize the nectarine stem-pitting-associated virus (NSPaV) from China, the complete nucleotide sequence of an NSPaV isolate T04 (named NSPaV-T04) from a sample of nectarine collected from China was determined by using RT-PCR and RACE methods. Phylogenetic analysis of NSPaV was conducted by using maximum likelihood and recombination analysis of NSPaV was performed by using RDP software. The results showed that the complete genome of NSPaV-T04 comprised 4 991 nucleotides (nt) and contained four open reading frames (ORF), which was similar to several NSPaV isolates deposited in GenBank. ORF1 and ORF2 encoded the RNA-dependent RNA polymerase P1, P2 fusion protein (RdRp P1-P2), and ORF3 encoded the coat protein (CP). ORF3 and ORF5 were identified to encode the CP read-through fusion protein. Phylogenetic analysis showed that isolate NSPaV-T04 (MN095353) was most closely related to isolate NSPaV/12P42 (KT273410) from America. Analysis of the nucleotide and amino acid sequences showed that the complete nucleotide sequence of NSPaV-T04 had the highest similarity (96.4% nt identity) with isolate NSPaV/12P42. Compared with the five NSPaV genome sequences available in GenBank, the NSPaV-T04 sequence in ORF1 (RdRp P1) was more variable compared with other domains, sharing 90.5%–96.1% nt identity. The NSPaV-T04 CP sequence was more conserved, with 96.6%–98.7% nt similarity.

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFE0110900)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: mglu@ippcaas.cn

收稿日期: 2019-07-17

The recombination analysis of all available genome sequences showed that the genome of a Korean isolate SK might be a recombinant. However, NSPaV-T04 might also be an actual recombinant, based on only one identified parental sequence in triplet in recombination analysis.

Key words: nectarine stem-pitting-associated virus; genome; molecular characterization

油桃是我国重要的一种栽培果树品种,经常遭受多种病毒的侵染,某些感染病毒的桃树叶片褪绿、斑驳,果实畸形,严重影响桃树生长和果品质量(董晓民等,2016)。目前国内外已发现了30多种可侵染桃的病毒,在我国已报道的有10多种(李世访和卢美光,2013; Yu et al., 2013; 冯佳等, 2017)。随着高通量测序技术的发展,在桃病毒鉴定方面有了很大进展,在我国桃树上鉴定到了一些新病毒,如油桃茎痘相关病毒(nectarine stem-pitting-associated virus, NSPaV)(Lu et al., 2017)、桃叶痘相关病毒(peach leaf pitting-associated virus, PLPaV)(He et al., 2017)、桃黄症相关病毒(peach associated luteovirus, PaLV)(Zhou et al., 2018a)和桃褪绿叶斑病毒(peach chlorotic leaf spot virus, PCLSV)(Zhou et al., 2018b)。

黄症病毒属 *Luteovirus* 病毒对双子叶植物和单子叶植物的侵染均能造成严重的经济损失(Domier & D'Arcy, 2008),如菜豆卷叶病毒(bean leafroll virus, BLRV)、马铃薯卷叶病毒(potato leafroll virus, PLRV)以及大豆矮缩病毒(soybean dwarf virus, SDV)。而有些黄症病毒属的病毒如花生莲座病毒(groundnut rosette assistor virus, GRAV),本身并不会引起症状,但可作为辅助病毒促进其它病毒对寄主植物的侵染,从而引发相关症状(Murant, 1990)。NSPaV最早由 Bag et al.(2015)在美国加利福尼亚州出现茎痘症状的油桃树中分离得到,随后该病毒在中国(Lu et al., 2017)、日本(Candresse et al., 2017)、匈牙利(Krizbai et al., 2017)和韩国(Jo et al., 2017)相继被发现。感染NSPaV的桃树树根发育不良,叶片和树皮上没有明显症状,但剥去树皮后其茎上木质体显示有明显的点蚀凹痕,且这种点蚀仅在接穗的木质体中发现,而砧木部分没有症状,但病害症状与NSPaV的关系有待进一步研究确认(Bag et al., 2015)。

Bag et al.(2015)对高通量测序鉴定的NSPaV进行基因组序列扩增,发现其基因组结构类似于黄症病毒属成员,基因组长度为4 991 nt,包含4个开放性阅读框(open reading frame, ORF)。目前,在GenBank中已登录的NSPaV基因组序列仅5条,包括4条美国分离物和1条韩国分离物。本课题组于

2017年利用高通量测序技术和RT-PCR方法在我国油桃样品中首次检测到NSPaV,随后又对54个桃和油桃样品进行NSPaV检测,发现油桃品种中NSPaV的检出率较高,占检测油桃总数的44%(11/25),而在普通桃样品中未检测到NSPaV(Lu et al., 2017)。目前,关于NSPaV病原特征、引发病害症状的研究相对较少,而来自中国的NSPaV分离物基因组全长序列尚未见报道。因此,本研究拟对NSPaV中国分离物的基因组全长序列进行克隆和分子特征分析,以期NSPaV的侵染和流行研究以及我国桃树油桃茎痘相关病毒病的预防提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:油桃样品于2017年5月采自辽宁省大连市大田温室,栽培品种为中油4号,自然感病症状为果实凹凸不平。感病的新鲜叶片用塑料袋分装,液氮处理后于-80℃保存备用。

培养基:LB(Luria-Bertani)培养基:酵母提取物5 g、胰蛋白胨10 g、氯化钠10 g、琼脂粉15 g,无菌蒸馏水定容至1 L。

试剂:大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞、多糖多酚植物总RNA提取试剂盒RNAprep Pure Plant Kit、2 \times Taq Plus PCR MasterMix、2 \times Pfu PCR Master Mix和TIANGel琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;pMD18-T载体、SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit试剂盒,日本TaKaRa公司;200 U/ μ L M-MLV RT、5 \times M-MLV Buffer、10 mmol/L dNTP Mix、40 U/ μ L RNase Inhibitor、10 μ mol/L Oligo(dT)₁₈,普洛麦格(北京)生物技术有限公司;pTOPO-Blunt载体,北京艾德莱生物科技有限公司;随机六聚引物,北京六合华大基因科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:TL2010高通量组织研磨仪,北京昊诺斯科技有限公司;5424离心机,德国Eppendorf公司;VX200涡旋混合仪,美国莱伯特公司;My Cycler IQ2 PCR仪,美国Bio-Rad公司;DYY-6B型稳压电泳仪,北京六一仪器厂;Tanon-2500凝胶成像系统,北京原平皓生物技术有限公司;DHP-9162恒温培养箱,太

仓市实验设备厂。

1.2 方法

1.2.1 NSPaV基因组序列RT-PCR扩增和基因克隆

植物总RNA提取和引物设计:取50~100 mg供试感病叶片样品,使用多糖多酚植物总RNA提取试剂盒提取其总RNA(高蕊等,2016),具体步骤参见试剂盒说明书。提取的总RNA置于-80℃保存备用。根据GenBank中已登录的NSPaV基因组序列(登录号KT273410),使用Primer Premier 5.0软件设

计3对特异性引物2422-F/R、1338-F/R和1014-F/R,对NSPaV基因组片段进行PCR扩增,预期目的片段大小分别为2 422、1 338、1 014 nt(表1);根据已获得的NSPaV基因组片段序列,分别设计5'末端序列的外部/内部引物5' RACE-outer/inner和3'末端序列的外部/内部引物3' RACE-outer/inner,用SMARTer® RACE 5'/3' Kit试剂盒扩增预期目的片段大小分别为766 nt和623 nt的5'和3'末端序列(表1)。引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成。

表1 本研究所用的NSPaV基因组序列扩增引物

Table 1 Primers used in amplifying the genomic sequences of NSPaV in this study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	基因位置/nt Location	产物大小/bp Product size	退火温度/℃ Annealing temperature
5' RACE-outer	CCAGAGTCCGATCCGAGACC	1 140-1 121	766	60
5' RACE-inner	TCTCCCTGCTCTTCCCTCGC	766-747		62
2422-F	ATGACACGCTGGATGAC	529-545	2 422	54
2422-R	GCTGTAGCTGCTTGCTG	2 950-2 934		
1338-F	AAGCGGCAAAGAAGAAATCC	2 882-2 901	1 338	50
1338-R	TAGTCGCAACTGACCGTGGG	4 219-4 200		
1014-F	ATCTGGGAATTACAACGGACAT	3 672-3 693	1 014	51
1014-R	CAACGTGGACCTTGTGTTGC	4 685-4 666		
3' RACE-outer	ACCCGTGGAATCTGTGAAGG	4 146-4 165	623	55
3' RACE-inner	GATCCTGATCGGAGCCAAAT	4 369-4 388		55

常规RT-PCR扩增:以植物总RNA为模板,使用Oligo(dT)₁₈和随机六聚引物进行反转录合成cDNA。反转录反应体系:RNA 1 μL、M-MLV 0.5 μL、5×M-MLV Buffer 2 μL、dNTPs 0.5 μL、RNase Inhibitor 0.5 μL、Oligo(dT)₁₈ 0.5 μL、随机六聚引物0.5 μL、ddH₂O补足至10 μL,42℃下温育60 min。将得到的cDNA产物置于-20℃冰箱保存备用。PCR反应体系:cDNA 1.5 μL、2×Taq Plus PCR Master Mix 12.5 μL、10 μmol/L正反向引物各1 μL、ddH₂O补足至25 μL。反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,各自相应退火温度下退火30 s,72℃延伸1 min,35个循环;最后72℃再延伸10 min。获得的PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳进行分析。

5'/3' RACE的RT-PCR扩增:由于黄症病毒属的病毒3'末端无Poly(A)结构,所以为了更好地完成扩增,需要预先在RNA的3'末端加入A碱基,为cDNA合成提供Oligo-dT引物结合位点。反应体系:RNA 10 μL、10×Buffer 2 μL、10 mmol/L ATP 2 μL、100 U/L Poly(A) Polymerase 2 μL、ddH₂O补足至20 μL,37℃下温育20 min。随后,使用3'末端已加入A碱基的RNA,根据SMARTer® RACE 5'/3' Kit说明书操作步骤合成5'/3' cDNA,然后再以获得的cD-

NA作为模板,利用巢式PCR扩增获得5'和3'末端序列。巢式PCR反应体系包含两轮PCR反应。第1轮PCR反应体系:cDNA 1.5 μL、10×Universal Primer A Mix 1 μL、5'/3' RACE外部引物各1 μL、2×Pfu PCR Master Mix 12.5 μL、ddH₂O补足至25 μL;反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,各自相应退火温度下退火30 s,72℃延伸2 min,35个循环;最后72℃再延伸10 min。第2轮PCR反应:第1轮PCR反应产物1.5 μL、Universal Primer Short 1 μL、5'/3' RACE内部引物各1 μL、2×Pfu PCR Master Mix 12.5 μL、ddH₂O补足至25 μL;反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,各自相应退火温度下退火30 s,72℃延伸2 min,30个循环;最后72℃再延伸10 min。所得PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳进行分析。

目的基因片段的克隆:PCR目的片段用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒纯化。3'和5' RACE的RT-PCR扩增得到的片段纯化产物连接到克隆载体pTOPO-Blunt。常规RT-PCR扩增得到的NSPaV-2422、NSPaV-1338和NSPaV-1014片段的纯化产物连接到克隆载体pMD18-T,然后将连接产物转化到大肠杆菌*Escherichia coli* DH5α感受态细胞,筛选白色单菌落置于含有0.1%氨苄青霉素的800 μL LB培养基

中,于37℃、200 r/min条件下摇培8~12 h,通过对菌液进行PCR检测鉴定重组质粒。每个片段各筛选至少3个阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。利用DNAMAN 6.0软件对克隆测序得到的序列进行拼接获得NSPaV基因组全长序列。

1.2.2 NSPaV基因组的序列分析

从GenBank中下载已登录的NSPaV所有5条基因组序列,包括4条美国分离物和1条韩国分离物,利用BioEdit软件(Hall, 1999)将1.2.1扩增到的中国分离物NSPaV-T04基因组核苷酸序列和不同蛋白功能区氨基酸序列与其余5条NSPaV基因组序列进行两两比对,分析其序列相似性,以明确中国分离物NSPaV-T04基因组的分子特征。

1.2.3 NSPaV基因组的系统发育树构建

为确定NSPaV基因组的分类地位,利用MEGA 6(Tamura et al., 2011)软件采用最大似然法(maximum likelihood, ML)对得到的中国分离物NSPaV-T04基因组核苷酸序列与GenBank中所有可用的5条NSPaV基因组核苷酸序列构建系统发育树,选择General Time Reversible model和Gamma Distributed (G)模式运行程序,Bootstrap值设为1 000次。

1.2.4 NSPaV基因的重组分析

对所有GenBank中可用的NSPaV基因组序列进行重组检测,以PaLV基因组序列作为外组。利用RDP 4.0软件包(Martin et al., 2005)中的RDP、GENECONV、Bootscan、MaxChi、Chimaera、3Seq和SiScan七个程序检测存在的重组位点。重组检测时,各程序参数采用默认值,当某分离物至少有3个程序的检测结果显示 $P < 1.0 \times 10^{-6}$ 时,表示支持该分

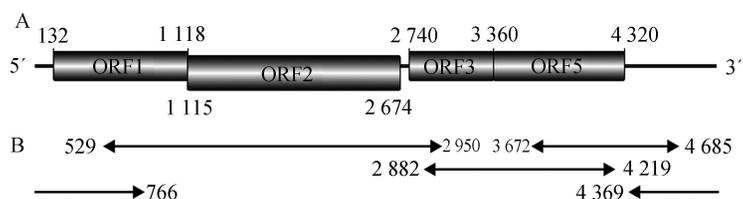
离物为重组体(Gao et al., 2017)。

2 结果与分析

2.1 NSPaV基因组序列的扩增与拼接

利用3对NSPaV特异性引物通过RT-PCR扩增得到3条片段大小为2 422、1 338、1 014 bp的目的片段,用RACE技术和巢式PCR扩增获得3'和5'末端序列,片段大小分别为623 bp和766 bp。通过测序和DNAMAN序列分析,表明扩增得到的片段与NSPaV目的基因片段一致。

DNAMAN序列拼接和分析结果表明,中国分离物NSPaV-T04基因组序列全长为4 991 nt,提交到GenBank获得登录号MN095353,包含4个ORF(图1),ORF1(132~1 118 nt)和ORF2(1 115~2 674 nt)分别编码P1和P2蛋白,共同形成依赖于RNA的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) P1-P2复合物。ORF3(2 740~3 360 nt)编码外壳蛋白(coat protein, CP),ORF5紧随ORF3,共同构成CP通读蛋白,在NSPaV基因组中,未发现与其它黄症病毒属病毒基因组相似的ORF4。此外,与大多数黄症病毒属病毒相似,中国分离物NSPaV-T04在第1 326~1 331、2 627~2 632和3 167~3 172位的核苷酸位置上存在保守序列GUAAAG,但在第2~7位的核苷酸位置上未发现相似的这个序列。与已报道的韩国SK分离物和美国NSPaV/12P42分离物相似,中国分离物NSPaV-T04基因组在第1 149~1 167位核苷酸序列位置上存在由19个碱基组成的保守序列CCCCGUUUUCUCUUUUGGG。



A: 基因组结构图; B: 扩增引物的核苷酸位置。A: Diagram of the genomic structure of NSPaV; B: nucleotide positions of primers used in NSPaV genome in amplification.

图1 中国分离物NSPaV-T04基因组的结构图

Fig. 1 Diagram of the genomic structure of Chinese isolate NSPaV-T04

2.2 NSPaV基因组的序列分析结果

相似性比对分析结果显示,中国分离物NSPaV-T04与美国分离物NSPaV/12P42(KT273410)的核苷酸序列相似性最高,为96.4%(表2)。对ORF几个蛋白编码区的核苷酸和氨基酸序列分析结果表明,ORF1(RdRp P1)和ORF5(CP通读蛋白)的变异

较大,与GenBank中5条NSPaV基因组的核苷酸序列相似性分别为90.5%~96.1%和93.3%~97.1%,氨基酸序列相似性分别为89.9%~98.1%和93.1%~97.1%;而ORF3(CP)较为保守,与GenBank中5条NSPaV基因组的核苷酸序列和氨基酸序列的相似性均最高,分别为96.6%~98.7%和97.5%~99.5%。

表2 中国分离物 NSPaV-T04 与 GenBank 中其它 5 条 NSPaV 分离物的核苷酸和氨基酸序列相似性比对结果

Table 2 Similarity comparison of nucleotide and amino acid sequences among NSPaV-T04 and the other five NSPaV isolates deposited in GenBank

GenBank 登录号 GenBank accession number	基因组 核苷酸 Genome nucleotide	5'端非编码区核苷酸 5' UTR nucleotide	开放阅读框1 ORF1		开放阅读框2 ORF2		开放阅读框3 ORF3		开放阅读框5 ORF5		3'端非编码区核苷酸 3' UTR nucleotide
			核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid							
NC_027211	95.4	92.3	93.4	95.1	96.5	98.4	98.5	99.5	93.3	93.1	97.1
KP638562	95.4	92.3	93.4	95.1	96.5	98.4	98.5	99.5	93.3	93.1	97.1
KT273409	95.6	90.0	93.9	95.4	96.5	99.0	98.7	99.5	93.6	93.4	97.3
KT273410	96.4	95.4	96.1	98.1	96.0	96.1	98.0	99.0	96.1	96.5	97.6
MF326520	95.6	93.1	90.5	89.9	96.9	98.6	96.6	97.5	97.1	97.1	97.9

2.3 NSPaV 基因组序列的系统发育树分析

NSPaV 基因组核苷酸序列的系统发育树分析结果表明, 6 条 NSPaV 基因组序列分为 3 组, 3 个美

国分离物聚在 1 组, 韩国分离物 SK 单独聚为一组, 中国分离物 NSPaV-T04 与美国分离物 NSPaV/12P42 聚在一组, 亲缘关系最近(图 2)。

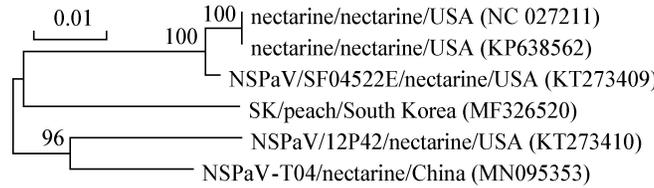


图2 基于 NSPaV 基因组序列以最大似然法构建中国分离物 NSPaV-T04 与其它 5 条分离物的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of Chinese isolate NSPaV-T04 and other five isolates based on the whole NSPaV genome sequences by using the maximum likelihood method

图中所示内容为分离物/寄主/来源(GenBank 登录号)。The isolate/host/origin (GenBank accession number) are shown in the figure.

2.4 NSPaV 基因组序列的重组分析

利用 RDP 4.0 软件包中的 7 个程序 RDP、GENECONV、Bootscan、MaxChi、Chimaera、3Seq 和 SiScan 对所有 6 条 NSPaV 分离物基因组序列进行重组分析, 结果显示韩国分离物 SK 基因组可能为一个重组体, 其中 3 个程序 MaxChi、Chimaera、SiScan 的鉴定检测 P 值小于 1.0×10^{-6} , 重组开始断点在基因组第

3 336 位核苷酸位置, 结束位点在第 4 991 位核苷酸位置。但在重组三联体中只鉴定到一个亲本序列(中国分离物 NSPaV-T04), 另一个亲本序列(美国分离物 NSPaV/SF04522E)无法确定, 因此, 中国分离物 NSPaV-T04 被认为也许是实际的重组体(表 3), 有待进一步研究验证。

表3 NSPaV 基因组的重组鉴定

Table 3 Recombination events detected in the NSPaV genome dataset

重组体* Recombinant	亲本序列 Parental sequence		重组断点 Breakpoint /nt		检测程序 Program	P
	主要序列 Major	次要序列 Minor	开始 Beginning	结束 Ending		
SK	Unknown 未知 (NSPaV/SF04522E)	NSPaV-T04	3 336	4 991	RDP	2.84×10^{-1}
					GENECONV	1.64×10^{-3}
					Bootscan	3.31×10^{-4}
					MaxChi	8.22×10^{-7}
					Chimaera	1.03×10^{-7}
					SiScan	5.62×10^{-9}
					3Seq	2.89×10^{-4}

: 只鉴定到一个亲本序列, 另一个亲本序列无法确定, 因此 NSPaV-T04 被认为也许是实际的重组体。: Due to only one parental sequence in triplet and possible misidentification of recombinant, NSPaV-T04 may be actual recombinant.

3 讨论

由于RNA病毒序列的多样性,因此在扩增RNA病毒基因组序列时,为避免基因克隆和拼接中序列错配,采用DNA聚合酶、设计扩增较长片段的引物以及保证2个相邻片段有较长的重叠区域至关重要。RACE PCR扩增技术被用于基因组全长序列的5'/3'末端序列的快速扩增(陈姗姗等,2014;Gao et al., 2016),但由于不同病毒基因组的特异性,能否成功获得5'/3'末端序列是最终获得基因组全长序列的关键。Xu et al.(2019)从油桃中试图扩增NSPaV基因组全长序列,但仅扩增到除5'/3'末端序列的大小为4 578 nt的NSPaV序列。本研究使用RACE PCR扩增技术时,依据黄症病毒属病毒3'末端无Poly(A)结构的特点,在3'末端序列扩增前,先在RNA 3'末端加入A碱基,为cDNA的合成提供Oligo-dT引物结合位点,同时采用巢式PCR方法扩增5'/3'末端序列,最终保证了中国分离物NSPaV-T04基因组的成功克隆。

本研究利用RT-PCR和RACE技术首次获得了NSPaV中国分离物NSPaV-T04基因组,全长为4 991 nt,包含4个ORF,未发现与其它黄症病毒属病毒基因组相似的编码运动蛋白的ORF4,与Bag et al.(2015)和Villamor et al.(2016)报道的基因结构一致。由于NSPaV缺乏运动蛋白,也许需要其它病毒共侵染来完成NSPaV在细胞间的转移。NSPaV中国分离物NSPaV-T04在第1 326~1 331、2 627~2 632和3 167~3 132位核苷酸位置上存在相同的保守序列GUAAAG,与已报道的大多数黄症病毒属病毒相似(Domier et al., 2002),但在第2~7位核苷酸位置上未发现已报道的相似保守序列GUAAAG。大多数黄症病毒属病毒在第1 149~1 167位核苷酸位置存在由19个碱基组成的保守序列CCCCUUUUU-CUCUUUUGGG,并被认为负责核糖体移码翻译(Domier et al., 2002)。中国分离物NSPaV-T04基因组序列中也发现该保守序列,但在第1 153位置的U被G置换,与已报道的韩国分离物SK和美国分离物NSPaV/12P42一致。遗传进化分析结果表明,中国分离物NSPaV-T04与美国分离物NSPaV/12P42的亲缘关系最近,基因组核苷酸相似性为96.4%。对NSPaV-T04中国分离物ORF几个蛋白编码区的核苷酸和氨基酸序列比对分析结果表明,RdRp P1和CP通读蛋白的变异较大,而CP较为保守。ORF3编码的CP是黄症病毒科的保守区(Mayo & Miller, 1999;Chomič et al., 2010);RdRp是病毒复制相关蛋白,而ORF5编码的CP通读蛋白对于蚜虫传毒非常

重要(Brault et al., 1995;Chay et al., 1996)。本研究获得的中国分离物NSPaV-T04在该病毒的复制和传毒功能区均发现较大变异,表明这2个功能区在病毒与寄主共进化过程中可能起着重要作用。

RNA病毒是所有生物中变异较大、变异速度最快的物种。其中,RNA病毒中RdRp缺乏相应的校对功能,导致病毒在复制过程中会发生较高频率的突变。这是其致病性的重要因素之一(Drake & Holland, 1999)。重组是推动RNA病毒变异、进化的主要动力之一,如重组事件在樱桃病毒A(cherry virus A, CVA)、葡萄病毒A(grapevine virus A, GVA)和苹果褪绿叶斑病毒(apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)等基因组进化上起着重要作用(Alabi et al., 2014;Chen et al., 2014;Kesanakurti et al., 2017)。本研究对NSPaV基因组的重组分析结果表明存在基因重组事件,韩国分离物SK和中国分离物NSPaV-T04基因组可能存在重组变异。中国分离物NSPaV-T04是从果实表面出现凹凸不平症状的油桃叶片样品中获得,推测RdRp与ORF5的序列变异以及序列重组与寄主表型变化共进化有关,但中国分离物NSPaV-T04与油桃果实的症状关系有待进一步研究验证。

本研究首次获得NSPaV中国分离物基因组全长序列,并对该分离物的分子特征进行了分析,这是我国NSPaV基因组全长序列及其分子特征的首次报道。研究结果不仅丰富了全球NSPaV基因组序列信息,而且为NSPaV在我国的侵染流行、检测和预防提供了重要的理论基础。

参 考 文 献 (References)

- ALABI OJ, AL RWAHNIH M, MEKURIA TA, NAIDU RA. 2014. Genetic diversity of *Grapevine virus A* in Washington and California vineyards. *Phytopathology*, 104(5): 548-560
- BAG S, AL RWAHNIH M, LI A, GONZALEZ A, ROWHANI A, UYEMOTO K, SUDARSHANA MR. 2015. Detection of a new luteovirus in imported nectarine trees: a case study to propose adoption of metagenomics in post-entry quarantine. *Phytopathology*, 105(6): 840-846
- BRAULT V, VAN DEN HEUVEL JF, VERBEEK M, ZIEGLER-GRAFF V, REUTENAUER A, HERRBACH E, GARAUDE JC, GUILLEY H, RICHARDS K, JONARD G. 1995. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *The EMBO Journal*, 14(4): 650-659
- CANDRESSE T, FAURE C, THEIL S, MARAIS A. 2017. First report of nectarine stem pitting-associated virus infecting *Prunus mume* in Japan. *Plant Disease*, 101(2): 393
- CHAY CA, GUNASINGE UB, DINESH-KUMAR SP, MILLER WA, GRAY SM. 1996. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are con-

- tained in the coat protein read-through domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology*, 219(1): 57–65
- CHEN SS, ZHANG ZX, LIU GJ, LU MG, LI SF, WANG HQ. 2014. Identification and analysis of complete genomic sequence of *Apple stem pitting virus* isolated from apple in China. *Journal of Plant Protection*, 41(2): 248–249 (in Chinese) [陈姗姗, 张志想, 刘国杰, 卢美光, 李世访, 王红清. 2014. 苹果茎痘病毒苹果分离物的基因组序列测定及分析. *植物保护学报*, 41(2): 248–249]
- CHEN SY, ZHOU Y, YE T, HAO L, GUO LY, FAN ZF, LI SF, ZHOU T. 2014. Genetic variation analysis of apple chlorotic leaf spot virus coat protein reveals a new phylogenetic type and two recombinants in China. *Archives of Virology*, 159(6): 1431–1438
- CHOMIĆ A, PEARSON MN, CLOVER GRG, FARREYROL K, SAUL D, HAMPTON JG, ARMSTRONG KF. 2010. A generic RT-PCR assay for the detection of *Luteoviridae*. *Plant Pathology*, 59(3): 429–442
- DOMIER LL, D' ARCY CJ. 2008. *Luteoviruses*.//MAHY BWJ, VAN REGENMORTEL MHV. *Encyclopedia of virology*. 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press. pp. 231–238
- DOMIER LL, MCCOPPIN NK, LARSEN RC, D' ARCY CJ. 2002. Nucleotide sequence shows that *Bean leaf roll virus* has a *Luteovirus*-like genome organization. *Journal of General Virology*, 83 (Pt7): 1791–1798
- DONG XM, ZHANG Y, LIU W, LI GX, WANG HR, ZHANG AN. 2016. Research status of viral disease in peach and detection technology. *Northern Horticulture*, (3): 199–203 (in Chinese) [董晓民, 张毅, 刘伟, 李桂祥, 王海荣, 张安宁. 2016. 桃病毒病及检测技术研究进展. *北方园艺*, (3): 199–203]
- DRAKE JW, HOLLAND JJ. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 96(24): 13910–13913
- FENG J, LI G, ZHU XP, SONG HR, CHEN WY, PENG FT, LI SF, LIU HX. 2017. Molecular detection and identification of viruses and viroids infecting Feicheng peach. *Plant Protection*, 43(2): 146–151 (in Chinese) [冯佳, 李刚, 竺晓平, 宋红日, 陈文玉, 彭福田, 李世访, 刘会香. 2017. 侵染肥城桃的病毒和类病毒分子检测与鉴定. *植物保护*, 43(2): 146–151]
- GAO R, LI SF, LU MG. 2016. Complete nucleotide sequences of two isolates of *Cherry virus A* from sweet cherry in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(7): 1667–1671
- GAO R, LIANG YB, LI SF, MAHMUT-MIJIT, LU MG. 2016. Preparation and application of cRNA poly 2 probe for the detection of *Cherry green ring mottle virus* and *Peach latent mosaic viroid*. *Journal of Plant Protection*, 43(6): 1055–1056 (in Chinese) [高蕊, 梁颖博, 李世访, 麦合木提江·米吉提, 卢美光. 2016. 同时检测樱桃绿环斑病毒和桃潜隐花叶类病毒二聚cRNA探针制备和应用. *植物保护学报*, 43(6): 1055–1056]
- GAO R, XU YX, CANDRESSE T, HE Z, LI SF, MA YX, LU MG. 2017. Further insight to genetic variation and haplotype diversity of *Cherry virus A* from China. *PLoS ONE*, 12(10): e0186273
- HALL TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98
- HE Y, CAI L, ZHOU LL, YANG ZK, HONG N, WANG GP, LI SF, XU WX. 2017. Deep sequencing reveals the first fabavirus infecting peach. *Scientific Reports*, 7(1): 11329
- JO Y, CHO JK, CHOI H, LIAN S, CHO WK. 2017. First report of nectarine stem pitting-associated virus and *Plum bark necrosis and stem pitting-associated virus* infecting a peach cultivar in Korea. *Plant Disease*, 101(6): 1067
- KESANAKURTI P, BELTON M, SAEED H, RAST H, BOYES I, ROTT M. 2017. Comparative analysis of cherry virus A genome sequences assembled from deep sequencing data. *Archives of Virology*, 162(9): 2821–2828
- KRIZBAI L, KRISTON E, KREUZE J, MELIKA G. 2017. Identification of nectarine stem pitting-associated virus infecting *Prunus persica* in Hungary. *New Disease Reports*, 35: 18
- LI SF, LU MG. 2013. Research status and control strategies of peach tree virus disease. *China Fruit News*, 30(10): 80–81 (in Chinese) [李世访, 卢美光. 2013. 桃树病毒病研究现状与防控对策. *中国果业信息*, 30(10): 80–81]
- LU MG, ZHANG C, ZHANG ZX, WANG CA, LI SF. 2017. Nectarine stem-pitting-associated virus detected in peach trees in China. *Plant Disease*, 101(3): 513
- MARTIN D, WILLIAMSON C, POSADA D. 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignment. *Bioinformatics*, 21(2): 260–262
- MAYO MA, MILLER WA. 1999. The structure and expression of luteovirus genomes.//SMITH HG, BARKER H. *The Luteoviridae*. Wallingford, Oxon: CABI Publishing, pp. 23–42
- MURANT AF. 1990. Dependence of groundnut rosette virus on its satellite RNA as well as on groundnut rosette assistant *luteovirus* for transmission by *Aphis craccivora*. *Journal of General Virology*, 71(Pt9): 2163–2166
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739
- VILLAMOR DEV, MEKURIA TA, PILLAI SS, EASTWELL KC. 2016. High-throughput sequencing identifies novel viruses in nectarine: insights to the etiology of stem-pitting disease. *Phytopathology*, 106(5): 519–527
- XU YX, LI SF, NA CY, YANG LJ, LU MG. 2019. Analyses of virus/viroid communities in nectarine trees by next-generation sequencing and insight into viral synergisms implication in host disease symptoms. *Scientific Reports*, 9(1): 12261
- YU Y, ZHAO Z, QIN L, ZHOU Y, FAN H, ZHANG Z, WU Z, LI S. 2013. Incidence of major peach viruses and viroids in China. *Journal of Plant Pathology*, 95(3): 603–607
- ZHOU J, ZHANG Z, LU M, XIAO H, HABILI N, LI S. 2018b. Complete nucleotide sequence of a new virus, peach chlorotic leaf spot virus, isolated from flat peach in China. *Archives of Virology*, 163(12): 3459–3461
- ZHOU J, ZHANG Z, LU M, XIAO H, LI S. 2018a. First report of peach-associated luteovirus from flat peach and nectarine in China. *Plant Disease*, 102(12): 2669

(责任编辑:李美娟)