

李属坏死环斑病毒辽宁桃树分离物基因组分析

李正男, 张双纳, 张尊平, 范旭东, 任芳, 胡国君, 董雅凤*

(中国农业科学院果树研究所, 国家落叶果树脱毒中心, 辽宁兴城 125100)

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 克隆了李属坏死环斑病毒 (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) 辽宁桃树分离物全长基因组。用 Vector NTI Advance 11 软件进行基因组结构注释。用 SDTv.1.0 软件分析该分离物与 GenBank 中公布的其他 PNRSV 分离物间的核酸一致性, 并用 MEGA5.0 软件和 RDP3 软件对各 PNRSV 分离物进行系统发育分析和重组分析。结果显示: PNRSV 辽宁桃树分离物基因组由 3 条正义单链 RNA 组成。RNA1 由 3 332 个核苷酸构成, 具有一个开放阅读框 (nt 30 ~ 3 167), 编码一个约 117.0 kD 的复制酶相关蛋白 P1。RNA2 由 2 591 个核苷酸构成, 具有一个开放阅读框 (nt 27 ~ 2 426), 编码一个约 99.0 kD 的复制酶相关蛋白 P2。RNA3 由 1 943 个核苷酸构成, 具有两个互不重叠的开放阅读框分别编码一个运动蛋白 (nt 175 ~ 1 026) 和一个外壳蛋白 (nt 1 100 ~ 1 774), 这两个开放阅读框的间隔区为 73 个核苷酸。PNRSV 辽宁桃树分离物的 RNA1、RNA2 和 RNA3 与其他已经公布的 PNRSV 分离物间, 核酸序列一致性分别为 91.8% ~ 98.8%, 93.3% ~ 99.2% 和 87.7% ~ 99.0%。基于 RNA1、RNA2 和 RNA3 全长序列构建的系统发育进化树, 分别将已报道的 PNRSV 分离物划分为 3 个、2 个和 3 个组, PNRSV 辽宁桃树分离物分别属于 RNA1 I 组、RNA2 I 组和 PV96 组。基于 RNA1、RNA2 和 RNA3 全长序列进行的重组分析表明各 PNRSV 分离物基因组间不存在重组。PNRSV 辽宁桃树分离物基因组序列是世界首个来源于桃树的 PV96 组基因组序列。

关键词: 李属坏死环斑病毒; 基因组; 复制酶相关蛋白; 运动蛋白; 外壳蛋白

中图分类号: S 662.3; Q 939.46 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2017) 12-2275-10

Analysis of the Complete Genome of *Prunus necrotic ringspot virus* Isolate Liaoning-peach

LI Zhengnan, ZHANG Shuangna, ZHANG Zunping, FAN Xudong, REN Fang, HU Guojun, and DONG Yafeng*

(National Center for Eliminating Viruses from Deciduous Fruit Tree, Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng, Liaoning 125100, China)

Abstract: The complete genomic cDNAs of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) strain Liaoning-peach were amplified using RT-PCR and RACE techniques. The obtained sequences were analyzed using Vector NTI Advance 11 for genome organization. Using software SDTv.1.0, the sequences were aligned with the other PNRSV sequences published in GenBank for nucleotide identity. Using software MEGA5.0 and RDP3, phylogenetic analysis and recombinational analysis were performed for collected PNRSV

收稿日期: 2017-08-04; 修回日期: 2017-12-13

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610182016017); 中国农业科学院科技创新工程项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yfdong1234@163.com)

isolates. The PNRSV Liaoning-peach has a segmented genome, consists of three positive single-stranded RNAs. The RNA1 has 3 332 nucleotides (nts), containing an open reading frame (ORF), encoding a replication-associated polymerase P1 (ca. 117.0 kD) (nt 30 - 3 167). The RNA2 has 2 591 nts, containing an ORF, encoding a replication-associated polymerase P2 (ca. 99.0 kD) (nt 27 - 2 426). The RNA3 has 1 943 nts, containing two non-overlapping ORFs. The two ORFs are separated by an intergenic spacer of 73 nts, and encode a movement protein (nt 175 - 1 026) and a coat protein (nt 1 100 - 1 774) respectively. The identities of nucleotide sequences of RNA1, RNA2 and RNA3 of PNRSV Liaoning-peach with other published PNRSV isolates were 91.8% - 98.8%, 93.3% - 99.2%, 87.7% - 99.0%, respectively. Based on the phylogenetic trees constructed from complete sequences of RNA1, RNA2 and RNA3, PNRSV isolates were classified into three, two and three groups, respectively. The PNRSV Liaoning-peach was classified into group RNA1 group I, RNA2 group I and group PV96, respectively. Recombination analysis of complete sequences of RNA1, RNA2 and RNA3 suggested that no recombinational cases occurred among the collected PNRSV isolates. This was the first report of complete genome sequences of PNRSV infecting peach worldwide.

Keywords: *Prunus necrotic ringspot virus*; genome; replication-associated polymerase; movement protein; coat protein

李属坏死环斑病毒 (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) 属于雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*) 等轴不稳定环斑病毒属 (*Ilarviruses*) 成员。该病毒为多分体病毒, 基因组由 3 条正义单链 RNA 组成。RNA1 和 RNA2 分别编码复制酶蛋白 P1 和 P2, RNA3 编码运动蛋白 (movement protein, MP) 和外壳蛋白 (coat protein, CP) (Francki, 1985; Sánchez-Navarro & Pallás, 1997; Fauquet et al., 2005)。该病毒寄主范围广泛, 对蔷薇科李属核果类果树危害最为严重, 可以通过嫁接、种子和花粉传播 (Fiore et al., 2008; Oliver et al., 2009)。开展该病毒的基因组研究是后续开展该病毒侵染性克隆载体构建和致病机制研究的基础。

自 1941 年 Cochran 与 Hutchins (1941) 首次在表现环斑症状的桃树和李树上发现 PNRSV 以来, 该病毒已经在世界范围内报道发生。南欧、东欧、中东、北非、加拿大、中国等国家和地区均开展过该病毒发生情况的调查和检测 (Pallas et al., 2012; Cui et al., 2012a, 2015; 李正男 等, 2017)。目前世界范围内仅有 3 个 PNRSV 全长基因组的报道, 分别是加拿大樱桃分离物 Chr3、桃分离物 Pch12 和中国樱桃分离物 ChrYL (Cui et al., 2012b; Song et al., 2016)。基于 RNA3 编码的 MP 和 CP 基因可以将 PNRSV 划分为 4 个组: PV32、PV96、PE5 和 CH30 (Aparicio et al., 1999; Vašková et al., 2000; Aparicio & Pallás, 2002; Glasa et al., 2002; Hammond, 2003; Fiore et al., 2008; Cui et al., 2012a)。在已经报道的 3 个 PNRSV 基因组中加拿大 Chr3 分离物属于 PV32 组, 加拿大 Pch12 分离物和中国 ChrYL 分离物属于 PV96 组, 目前还没有 PNRSV PE5 和 CH30 组分离物全基因组的报道。李正男等 (2017) 对辽宁省辽西地区 PNRSV 进行了多样性分析, 基于 MP 和 CP 基因的系统进化分析证明辽西地区发生的 PNRSV 为 PV32 和 PV96 两个组; PV32 组检出率为 44%, PV96 组检出率为 56%, 故以 PV96 组为主流株系。

为了明确辽西 PNRSV 主流株系的基因组特征、分类地位和重组情况, 以编号为 Pch8 的 PNRSV 阳性桃树毒源为材料, 开展了该分离物全基因组克隆, 与世界范围内已报道 PNRSV 不同分离物的基因组进行了系统发育分析和重组分析研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

试验于 2015—2017 年在中国农业科学院果树研究所果树病毒课题组实验室完成。

以保存于超低温冰箱（-86℃）的桃树枝条冻样 Pch8 为材料, 该样品于 2015 年 8 月采自辽宁兴城, 经 PCR 鉴定为 PNRSV 阳性, 并基于 MP 和 CP 基因将 PNRSV 辽宁桃树分离物(PNRSV-Pch8) 划分到了 PV96 组（李正男等, 2017）。

SMARTer[®] RACE 5'/3'Kit、Poly (A) Polymerase、DH5 α 感受态细胞购自宝生物工程（大连）有限公司。KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit 购自北京普凯瑞生物科技有限公司。克隆载体 CV14-Zero Background pTOPO-TA Cloning Kit、琼脂糖凝胶回收试剂盒、高纯度质粒小量快速提取试剂盒购自艾德莱技术有限公司。DL2000 Plus DNA Marker 购自近岸蛋白质科技有限公司。QIAGEN 无核糖核酸酶水购自上海慧颖生物科技有限公司。Invitrogen[™] SuperScript[®] III Reverse Transcriptase Kit 购自 Invitrogen 公司, 内含 5 \times First Strand Buffer、SuperScript III 反转录酶、0.1 mol \cdot L⁻¹ DTT、10 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 和 RNA Inhibitor。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 样品总 RNA 提取

采用 CTAB 法提取总 RNA (Li et al., 2009), 并溶解于 50 μ L 无核糖核酸酶水中, 采用 Eppendorf BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪测定浓度, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测完整性后, 于超低温冰箱（-86℃）中保存备用。

1.2.2 PNRSV 基因组扩增

以 Pch8 总 RNA 为模板进行反转录。反转录引物为 PNR-R（表 1）, 根据 GenBank 数据库中的 PNRSV RNA1、RNA2 及 RNA3 全长序列的 3'端保守区设计。反转录程序如下: 总 RNA 1 μ g、PNR-R（2 μ mol \cdot L⁻¹）1 μ L、无核糖核酸酶水补齐至 12 μ L, 65℃ 5 min; 添加 5 \times First Strand Buffer 4 μ L、DTT（0.1 mol \cdot L⁻¹）1 μ L、RNA Inhibitor 1 μ L、dNTPs（10 mmol \cdot L⁻¹）1 μ L、SuperScript III 反转录酶（200 U \cdot μ L⁻¹）1 μ L, 50℃ 70 min, 70℃ 15 min。

分别用引物对 PNR1-F/PNR-R、PNR2-F/PNR-R、PNR3-F/PNR-R（表 1）扩增 PNRSV RNA1、RNA2、RNA3 近全长片段。PNR1-F、PNR2-F 和 PNR3-F 分别根据 GenBank 数据库中的 PNRSV RNA1、RNA2、RNA3 全长序列的 5'端保守区设计。PCR 反应体系为 25 μ L, 包括: 2 \times KAPA HiFi HotStart ReadyMix 12.5 μ L、引物（10 μ mol \cdot L⁻¹）各 1 μ L、cDNA 2 μ L, 双蒸水补平至 25 μ L。PCR 反应条件为: 98℃ 4 min; 30 个循环: 98℃ 30 s, 65℃ 45 s, 72℃ 1 kb \cdot min⁻¹; 72℃ 10 min。PNRSV RNA1、RNA2 和 RNA3 的 5'和 3'端 cDNA 合成根据 SMARTer[®] RACE 5'/3'Kit [宝生物工程（大连）有限公司]提供的步骤进行; 进行 3'末端序列扩增前, 用 Poly (A) Polymerase [宝生物工程（大连）有限公司]对总 RNA 3'末端加 Poly (A) 尾。5'和 3'端的 PCR 扩增使用 KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit, 反应混合物的准备同上所述, 反应的引物包括 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 试剂盒提供的 UPM 引物和序列特异性引物。PNRSV RNA1、RNA2 和 RNA3 的 3'端序列特异性引物分别为 GSP1-F、GSP2-F 和 GSP3-F（表 1）; 5'末端序列特异性引物分别为 GSP1-R、GSP2-R 和 GSP3-R（表 1）。RNA1~RNA3 的 3'端和 5'端特异性引物根据测序后的 RNA1~RNA3 近全长片段设计。PCR 反应条件为: 98℃ 4 min; 30 个循环: 98℃ 30 s, 60℃ 45 s, 72℃ 45 s; 72℃ 10 min。PCR 产物（5 μ L）

由 1%琼脂糖凝胶电泳分离检测, EB 染色后在凝胶成像系统下成像。

表 1 本研究中所用引物
 Table 1 Primers used in the present work

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence ^a	基因组中位置/nt Genome location
PNR-R	ACTTCWCGTYGTRGGCATCTGC	3 289 ~ 3 310 (RNA1) 2 548 ~ 2 569 (RNA2) 1 910 ~ 1 931 (RNA3)
PNR1-F	GTTTTTAGTTCGTGGTTGAACT	2 ~ 23 (RNA1)
PNR2-F	GTTTTGTACTCGTGGTTGAGTT	2 ~ 24 (RNA2)
PNR3-F	GTTTTACAAATTGAAATCGTAACAT	4 ~ 29 (RNA3)
GSP1-R	CTTCTTTGTCCTTCTTAGTCAACGCAGC	610 ~ 639 (RNA1)
GSP1-F	GACGAGTGTTCCTTACAACACGCCGGTTG	2 512 ~ 2 540 (RNA1)
GSP2-R	ACTGCACTACTCGACCAACTGTCTCTAAT	633 ~ 661 (RNA2)
GSP2-F	GAAAGAAGGTTTTGGCTGTCCGAATGCT	2 027 ~ 2 055 (RNA2)
GSP3-R	CCCGAGGTCGTTGCCTGAATGATCGGTAC	461 ~ 489 (RNA3)
GSP3-F	CGAGAGGTGACGACGACGGAGGCAGTGA	1 364 ~ 1 391 (RNA3)
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	—

^a W = A/T; Y = C/T; R = A/G.

1.2.3 PCR 产物的纯化、克隆及序列测定

采用琼脂糖凝胶回收试剂盒对扩增获得的近全长 RNA1、RNA2、RNA3 片段和 RNA1、RNA2 和 RNA3 的 3'和 5'末端片段进行纯化。纯化产物与 pTOPO-TA Simple vector 室温下连接 5 min, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。经蓝白斑筛选, 挑取白色菌落过夜培养。对 PCR 鉴定为阳性的菌液提取质粒, 酶切鉴定为阳性的质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序; 每个分离物送 3 个以上阳性质粒测序。

1.2.4 基因组结构和序列一致性分析

采用 Vector NTI Advance 11 软件对测序结果进行校正、拼接, 并绘制基因组结构图。采用在线分析工具 Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 对基因组编码的基因进行保守结构域的预测。通过 BLASTn 对拼接的基因组序列进行相似序列检索, 以确定序列的分子身份。采用 SDTv.1.0 软件分析 PNRSV Pch8 分离物与其他 PNRSV 分离物间的序列一致性, 比对时选 Clustal W 算法 (Muhire et al., 2014)。序列注释后, 提交并存储到 GenBank 数据库。

1.2.5 基于 RNA1、RNA2 和 RNA3 全长序列的系统发育分析和重组分析

基于本研究获得的 PNRSV Pch8 分离物 RNA1、RNA2 和 RNA3 全长序列和其他 PNRSV 分离物基因组序列 (表 2), 进行系统发育分析和重组分析。应用 MEGA5.0 软件构建系统发育进化树, 建树过程中采用 Clustal W 算法对序列进行比对; 用比邻 (NJ) 法进行系统发育树构建, 自展校正值为 1 000; 并以 50%为阈值显示系统发育树 (Larkin et al., 2007; Tamura et al., 2011), 苹果花叶病毒 (*Apple mosaic virus*, ApMV) 印度苹果分离物基因组 RNA1 ~ RNA3 作为外参 (HE574162 ~ HE574164)。

应用 RDP3 软件对 PNRSV 各分离物进行重组分析 (Martin et al., 2010), 分析过程中采用 RDP、GENECONV、BOOTSCAN、MAXCHI、CHIMAERA、SISCAN 和 3SEQ 等 7 种方法, 一个重组事件需要被上述 7 种方法中的 5 种所验证, 并且每种方法的 p 值小于 10⁻⁶, 软件运行过程中除了分子类型选择线性外, 其他均为软件默认设置。

2 结果与分析

2.1 PNRSV 基因组扩增

应用引物对 PNR1-F/PNR-R、PNR2-F/PNR-R、PNR3-F/PNR-R 通过 RT-PCR 分别获得了约 3.3、2.5 和 1.9 kb 的目标片段, 这些片段依次为预期的 PNRSV RNA1、RNA2 和 RNA3 的近全长片段; 应用引物对 GSP1-F/UPM, GSP2-F/UPM、GSP3-F/UPM、GSP1-R/UPM, GSP2-R/UPM、GSP3-R/UPM 通过 RT-PCR 分别获得了约 0.7、0.7、0.5、0.9、0.6、0.6 kb 的目标片段, 这些片段依次为预期的 PNRSV RNA1、RNA2 和 RNA3 的 5'末端和 3'末端片段。因 UPM 为 RACE 试剂盒提供引物, 长度为 45 bp, 所以 5'末端和 3'末端扩增片段都要比预期片段略长。

每个克隆片段均测序 3 个以上阳性克隆, 测序结果返回后需要去除载体两端序列和 UPM 序列, 然后在 GenBank 数据库进行 Blastn 比对, 获得的一致性序列均为 PNRSV 基因组序列。

2.2 PNRSV 基因组结构特征

将 PNRSV Pch8 的基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 全长序列提交至 GenBank, 登录号依次为 MF198441、MF198442 和 MF198443。

RNA1 含有 3 332 个核苷酸 (nt), 具有一个开放阅读框 (open reading frames, ORF), 编码约 117.0 kD 的复制酶相关蛋白 P1 (nt 30 ~ 3 167); 5'非编码区 (untranslated region, UTR) 长度为 29 nt, 3'UTR 长度为 165 nt。

RNA2 为 2 591 nt, 含有一个 ORF, 编码约 99.0 kD 的复制酶相关蛋白 P2 (nt 27 ~ 2 426); 5'UTR 长度为 26 nt, 3'UTR 长度为 165 nt。

RNA3 为 1 943 nt, 含有两个互不重叠的 ORF, 分别编码一个运动蛋白 MP (nt 175 ~ 1 026) 和一个外壳蛋白 CP (nt 1 100 ~ 1 774), 这两个 ORF 间的间隔区长度为 73 nt; 5'UTR 长度为 174 nt, 3'UTR 长度为 169 nt。

PNRSV Pch8 的基因组结构详见图 1。

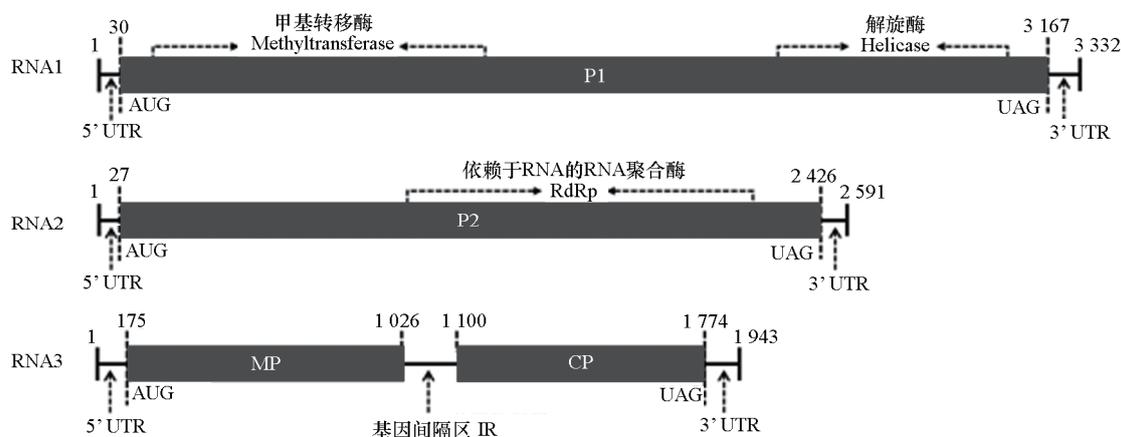


图 1 PNRSV 辽宁桃树分离物 (PNRSV-Pch8) 基因组结构示意图

Fig. 1 The genome organization of PNRSV-Pch8

采用 Motif Scan 对 Pch8 分离物的 P1 和 P2 序列进行保守结构域分析 (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan), 结果表明 P1 包含两个保守结构域, 分别为 N 端甲基转移酶结构域 (氨基酸 43 ~ 418) 和 C 端螺旋酶结构域 (氨基酸 753 ~ 1 010), 此特征为 *Bromoviridae* 科成员典型特征。P2 包含一个保守结构域: 依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 结构域 (氨基酸 311 ~ 745)。另外, 已经公布的 5 条 RNA1 全长序列长度在 3 321 ~ 3 333 nt 间; 5 条 RNA2 全长序列长度在 2 591 ~ 2 592 nt 间; 9 条 RNA3 全长序列长度在 1 941 ~ 1 957 nt 间 (Cui et al., 2012b); Pch8 分离物基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 全长序列长度也在这个范围内。经 Vector NTI 比对分析, 发现 PNRSV 各分离物间基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 编码的 P1、P2 和 MP 基因的起始位置略有差异, 但是 ORF 长度相同 (数据未显示)。PNRSV 各分离物间 RNA3 编码的 CP 基因分为两类, 一类是编码 224 个氨基酸, 另一类是编码 226 个氨基酸 (Cui et al., 2012b), Pch8 RNA3 编码的 CP 基因属于前者。

2.3 序列一致性、系统发育和重组分析

应用 SDTv.1.0 软件分析了 PNRSV Pch8 分离物 RNA1、RNA2、RNA3 与从 GenBank 数据库获得的不同 PNRSV 分离物间全长 RNA1、RNA2 和 RNA3 间的核酸 (序列信息详见表 2) 的一致性。PNRSV Pch8 的 RNA1 (MF198441) 与其他 5 个 PNRSV 分离物之间一致性为 91.8% ~ 98.8%, RNA2 (MF198442) 与其他 5 个 PNRSV 分离物间一致性为 93.3% ~ 99.3%, RNA3 (MF198443) 与其他 9 个不同 PNRSV 分离物间一致性为 87.7% ~ 99.0% (图 2)。PNRSV Pch8 RNA1 与美国樱桃和昆诺藜分离物 (AF278534、NC004362) 的核酸一致性最低, 为 91.80%, 与加拿大 Pch12 (JN416774) 核酸一致性最高, 为 98.80%。PNRSV Pch8 RNA2 与中国 ChrYL (KT444702) 的核酸一致性最低, 为 93.3%, 与加拿大 Pch12 (JN416775) 核酸一致性最高, 为 99.30%。PNRSV Pch8 RNA3 (MF198443) 与美国桃树分离物 (L38823) 的核酸一致性最低, 为 87.70%, 与德国樱桃分离物 (S78312) 核酸一致性最高, 为 99.00%。

表 2 用于一致性分析、系统进化树构建和重组分析的 PNRSV 基因组参考序列

Table 2 Reference sequences of PNRSV genome used for identity, phylogenetic and recombination analyses

基因组类型 Type of sequence	登录号 Accession No.	大小/bp Size	寄主 Host	分布 Distribution
RNA1	NC004362	3 332	昆诺藜 <i>Chenopodium quinoa</i>	美国 USA
	AF278534	3 332	樱桃 Cherry	美国 USA
	JN416771	3 333	樱桃 Cherry	加拿大 Canada
	JN416774	3 332	桃 Peach	加拿大 Canada
	KT444701	3 321	樱桃 Cherry	中国 China
RNA2	NC004363	2 591	昆诺藜 <i>Chenopodium quinoa</i>	美国 USA
	AF278535	2 591	樱桃 Cherry	美国 USA
	JN416772	2 591	樱桃 Cherry	加拿大 Canada
	JN416775	2 591	桃 Peach	加拿大 Canada
	KT444702	2 592	樱桃 Cherry	中国 China
RNA3	NC004364	1 957	桃 Peach	美国 USA
	L38823	1 941	桃 Peach	美国 USA
	Y07568	1 951	苹果 Apple	美国 USA
	U57046	1 957	桃 Peach	美国 USA
	JN416773	1 943	樱桃 Cherry	加拿大 Canada
	JN416776	1 951	桃 Peach	加拿大 Canada
	S78312	1 943	樱桃 Cherry	德国 Germany
	FJ610344	1 957	玫瑰 Rose	中国 China
	KT444703	1 954	樱桃 Cherry	中国 China

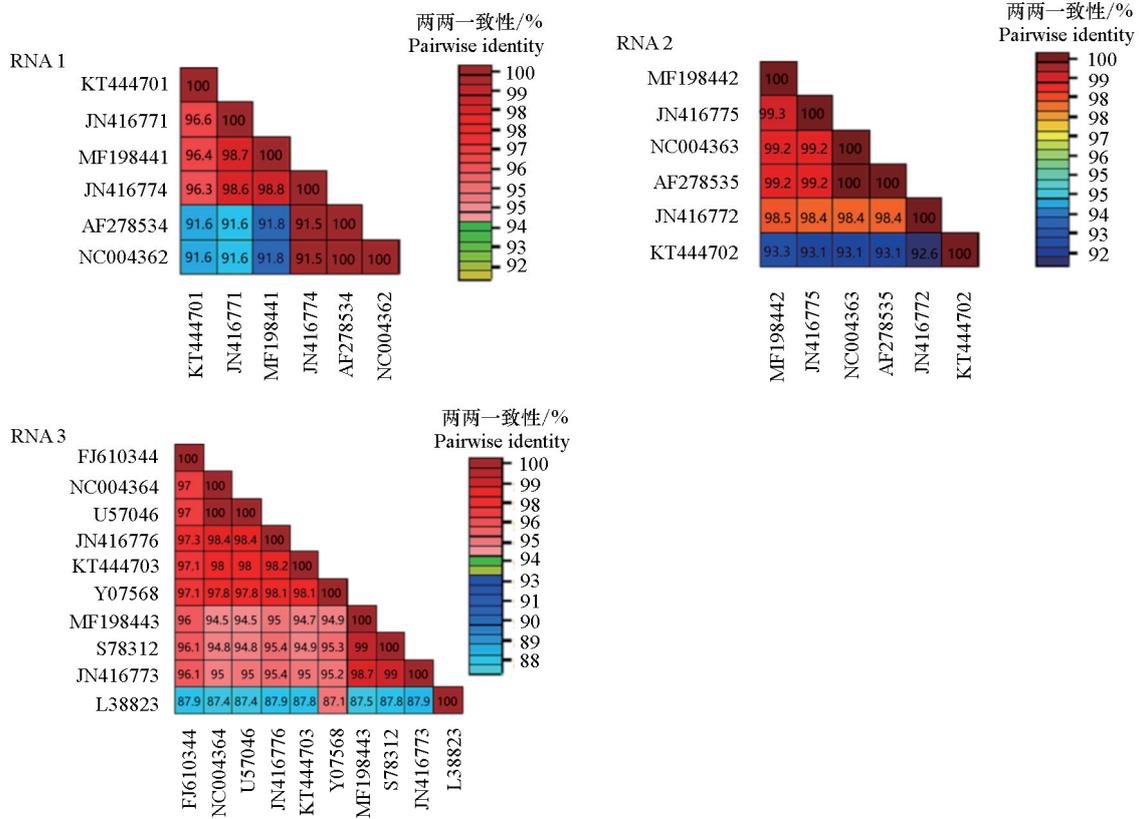


图 2 PNRSV Pch8 分离物与其他 PNRSV 分离物间基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 核酸一致性矩阵
Fig. 2 Matrixes of nucleotide identity of RNA1, RNA2 and RNA3 between Pch8 and other PNRSV isolates

应用 MEGA5.0 软件, 分别构建了基于 PNRSV 全长 RNA1、RNA2 和 RNA3 的系统发育进化树。基于全长 RNA1 构建的系统发育进化树(图 3)显示: 6 个 PNRSV 分离物聚类为 2 个组, PNRSV Pch8 位于组 I, 与来自于加拿大的 Chr3 (JN416771)、Pch12 (JN416774) 和中国的 ChrYL (KT44701) 聚集在一起; 来源于美国的樱桃分离物 (AF278534) 和昆诺藜分离物 (NC004362) 聚集在一起形成组 II。

基于全长 RNA2 构建的系统发育进化树(图 3)显示: 6 个 PNRSV 分离物聚类为 3 个组, PNRSV Pch8 位于组 I, 与来自于加拿大的 Pch12 (JN416775)、美国的樱桃分离物 (AF278535) 和昆诺藜分离物 (NC004363) 聚集在一起; 来自于加拿大的 Chr3 (JN416772) 和中国的 ChrYL (KT444702) 各自形成分支, 构成组 II 和组 III。

基于全长 RNA3 构建的系统发育进化树 (图 3) 显示: 10 个 PNRSV 分离物聚类为 3 个组, 即 PV32、PV96 和 PE5 组。来自于美国的 2 个桃树分离物 (NC004364 和 U57046)、苹果分离物 (Y07568) 与加拿大 Pch12 (JN416776) 和中国的 ChrYL (KT444703)、玫瑰分离物 (FJ610344) 聚集在一起构成 PV32 组; Pch8 分离物与来自于加拿大的 Chr3 (JN416773) 和德国的樱桃分离物 (S78312) 聚集在一起位于 PV96 组; 来自于美国的桃树分离物 (L38823) 单独形成 PE5 组, 苹果花叶病毒印度苹果分离物基因组 RNA1 ~ RNA3 作为外参在基于 RNA1 ~ RNA3 构建的系统进化树中分别形成独立的分支。

应用 RDP3 软件对包括本研究获得的 Pch8 分离物在内, 世界范围内报道的 6 条 PNRSV RNA1 全长序列、6 条 PNRSV RNA2 全长序列和 10 条 PNRSV RNA3 全长序列进行重组分析, 在 RNA1 ~ RNA3 全长基因组序列间没有检测到任何重组事件的发生。

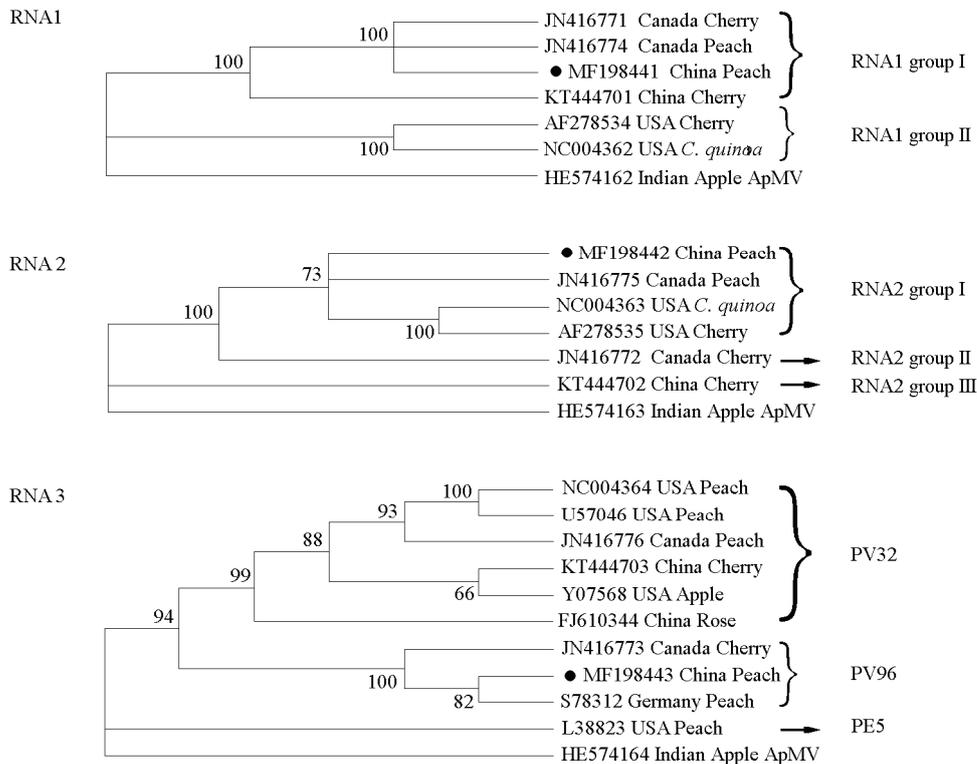


图 3 基于 PNRSV 的全长 RNA1、RNA2 和 RNA3 构建的系统发育进化树
 ApMV 印度苹果分离物基因组 RNA1、RNA2、RNA3 作为外参。

Fig. 3 Phylogenetic trees based on complete sequences of RNA1, RNA2 and RNA3 of PNRSV
 The sequences of RNA1, RNA2 and RNA3 of ApMV isolate apple in India as references.

3 讨论

常规的 RACE 试剂盒对于 3'末端含有 Poly (A) 尾巴的病毒非常适用, 在自然界中存在大量的 3'末端不含有 Poly (A) 尾巴的病毒。本研究中的 PNRSV 就属于该类病毒, 在进行这类病毒的基因组 3'末端扩增时需要在病毒 RNA 的 3'末端加上 PolyA 尾巴, 然后纯化加过 PolyA 尾巴的 RNA 使用常规的 RACE 试剂盒进行操作即可获得病毒的 3'末端序列。本研究采用该方法完成了 PNRSV RNA1 ~ RNA3 3'末端序列扩增的。

Hammond 等通过田间样品症状观察、样品采集、MP、CP 基因克隆发现大部分强致病性 PNRSV 分离物位于 PV32 组, 弱致病性分离物位于 PV96 组 (Hammond & Crosslin, 1998; Hammond, 2003)。Cui 等 (2013) 将加拿大 PNRSV Pch12 和 Chr3 分别构建为侵染性克隆证明 Pch12 分离物是强致病力株系, Chr3 分离物是弱致病力株系, 病毒的致病力是由 RNA1 的 1C 和 RNA2 的 2M 区段共同决定的, 其中 Pch12 属于 PV32 组, Chr3 属于 PV96 组, 二者的研究结果是相互印证的。本研究中的

PNRSV Pch8 分离物在分类上属于 PV96 组, 按照上述研究结果该株系应该属于弱致病力株系, 但在进行核酸一致性分析的时候发现 Pch8 分离物 RNA1、RNA2 核酸一致性均是与加拿大 PNRSV Pch12 (PV32 组) 最高。因此, 该分离物的致病力仍需要将该分离物构建成为侵染性克隆后方可确定, 该基因组的获得为将其构建为侵染性克隆进行致病机制研究奠定了基础。

从各 PNRSV 分离物间 RNA1、RNA2 和 RNA3 的一致性范围可以看出 RNA3 变异性大于 RNA1 和 RNA2; 对全长 RNA1 ~ RNA3 的重组分析证明已经报道的 PNRSV 分离物间不存在重组, 上述两点表明 PNRSV 在世界范围内分子变异程度低。在之前的研究中对 PNRSV 进行群组划分主要基于 MP 基因、CP 基因和全长 RNA3 (Aparicio et al., 1999; Vašková et al., 2000; Aparicio & Pallás, 2002; Glasa et al., 2002; Hammond, 2003; Fiore et al., 2008; Cui et al., 2012a; Zindović et al., 2015; 李正男等, 2017)。基于全长 RNA3 的系统发育分析结果证明美国的两个桃树分离物、苹果分离物及加拿大 Pch12 和中国 ChrYL、玫瑰分离物均属于 PV32 组; 加拿大 Chr3 和德国樱桃分离物及本研究的 Pch8 分离物均属于 PV96 组。在本研究中将 RNA1 和 RNA2 应用到 PNRSV 的系统发育分析中, 基于 RNA1 的分类结果证明加拿大 Pch12、Chr3 分离物与中国的 ChrYL 和本研究的 Pch8 分离物处于同一组; 基于 RNA2 的分类结果证明美国樱桃、昆诺藜及加拿大 Pch12 分离物和本研究的 Pch8 分离物处于同一组。由此可以看出, RNA1、RNA2 和 RNA3 的分类结果不一致, 这也是在世界上首次探讨基于 RNA1 和 RNA2 对 PNRSV 分离物进行组群划分, 二者作为分子标准获得的划分组群是不一致的, 因此, 将二者作为 PNRSV 群组划分的分子标准仍需要更多 RNA1 和 RNA2 全长基因组序列的验证, 但这对 PNRSV 的遗传多样性研究意义重大。

References

- Aparicio F, Myrta A, Di Terlizzi B, Pallás V. 1999. Molecular variability among isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* from different *Prunus* spp. *Phytopathology*, 89 (11): 991 - 999.
- Aparicio F, Pallás V. 2002. The molecular variability analysis of the RNA 3 of fifteen isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* sheds light on the minimal requirements for the synthesis of its subgenomic RNA. *Virus Genes*, 25 (1): 75 - 84.
- Cochran L C, Hutchins L M. 1941. A severe ringspot virus on peach. *Phytopathology*, 31: 860.
- Cui H, Hong N, Wang G, Wang A. 2012a. Detection and genetic diversity of *Prunus necrotic ringspot virus* in the Niagara Fruit Belt, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34 (1): 104 - 113.
- Cui H, Hong N, Wang G, Wang A. 2012b. Molecular characterization of two *Prunus necrotic ringspot virus* isolates from Canada. *Archives of Virology*, 157 (5): 999 - 1001.
- Cui H, Hong N, Wang G, Wang A. 2013. Genomic segments RNA1 and RNA2 of *Prunus necrotic ringspot virus* codetermine viral pathogenicity to adapt to alternating natural *Prunus* hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26 (5): 515 - 527.
- Cui H G, Liu H Z, Chen J, Zhou J F, Qu L N, Su J M, Wang G P, Hong N. 2015. Genetic diversity of *Prunus necrotic ringspot virus* infecting stone fruit trees grown at seven regions in China and differentiation of three phylogroups by multiplex RT-PCR. *Crop Protection*, 74 (1): 30 - 36.
- Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L A. 2005. *Virus taxonomy: eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- Fiore N, Fajardo T V M, Prodan S, Herranz M C, Aparicio F, Montealegre J, Elena S F, Pallás V, Sánchez-Navarro J. 2008. Genetic diversity of the movement and coat protein genes of South American isolates of *Prunus necrotic ringspot virus*. *Archives of Virology*, 153 (5): 909 - 919.
- Francki R I B. 1985. *The viruses and their taxonomy*. New York: Plenum Press: 1 - 19.
- Glása M, Betinová E, Kúdela O, Šubr Z. 2002. Biological and molecular characterisation of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates and possible approaches to their phylogenetic typing. *Annals of Applied Biology*, 140 (3): 279 - 283.

- Hammond R W, Crosslin J M. 1998. Virulence and molecular polymorphism of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates. *Journal of General Virology*, 79 (7): 1815 - 1823.
- Hammond R W. 2003. Phylogeny of isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* from the *Ilarvirus* ringtest and identification of group-specific features. *Archives of Virology*, 148 (6): 1195 - 1210.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. 2007. CLUSTAL W and CLUSTAL X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947 - 2948.
- Li Z N, Wu K K, Zhang C P, Zheng X, Wu W J, Wu Y F. 2009. A new Chinese isolate of *Prunus necrotic ringspot virus* from sweet cherry. *Journal of Plant Pathology*, 91 (2): 505.
- Li Zheng-nan, Dong Ya-feng, Zhang Shuang-na, Zhang Zun-ping, Fan Xu-dong, Ren Fang, Hu Guo-jun. 2017. Detection and genetic diversity analysis of *Prunus necrotic ringspot virus* in West Liaoning. *Acta Phytopathologica Sinica*, 47 (1): 15 - 25. (in Chinese)
- 李正男, 董雅凤, 张双纳, 张尊平, 范旭东, 任芳, 胡国君. 2017. 辽西李属坏死环斑病毒检测及其多样性分析. *植物病理学报*, 47 (1): 15 - 25.
- Martin D P, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. 2010. Rdp3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 26 (19): 2462.
- Muhire B M, Varsani A, Martin D P. 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE*, 9: e108277.
- Oliver J E, Freer J, Andersen R L, Cox K D, Robinson T L, Fuchs M. 2009. Genetic diversity of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates within a cherry orchard in New York. *Plant Disease*, 93 (6): 599 - 606.
- Pallas V, Aparicio F, Herranz M C, Amari K, Sanchez-Pina M A, Myrta A, Sanchez-Navarro J A. 2012. Ilarviruses of *Prunus* spp.: a continued concern for fruit trees. *Phytopathology*, 102 (12): 1108 - 1120.
- Sánchez-Navarro J A, Pallás V. 1997. Evolutionary relationships in the *Ilarviruses*: nucleotide sequence of *Prunus necrotic ringspot virus* RNA 3. *Archives of Virology*, 142 (4): 749 - 763.
- Song S, Li Z, Song W, Chen W, Wu Y. 2016. Complete genomic sequence of a sweet cherry isolate of *Prunus necrotic ringspot virus* from China. *Journal of Plant Pathology*, 98 (1): 163 - 166.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum-likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731 - 2739.
- Vašková D, Petrzik K, Karešová R. 2000. Variability and molecular typing of the woody-tree infecting *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*. *Archives of Virology*, 145 (4): 699 - 709.
- Zindović J, Rubies A C, Ratti C. 2015. Molecular characterization of the coat protein gene of *Prunus necrotic ringspot virus* infecting peach in montenegro. *European Journal of Plant Pathology*, 143 (4): 881 - 891.