

苹果茎痘病毒内蒙古分离物基因组序列和生物学特征研究

孙平平, 鞠明岫, 马强*, 李正男*

(内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 利用 RT-PCR 结合 RACE 技术获得了苹果茎痘病毒 (*Apple stem pitting virus*, ASPV) 内蒙古‘金红’苹果分离物 (ASPV-NM) 全长基因组序列 (登录号: MK239268)。该分离物基因组除去 Poly A 尾共有 9 286 个核苷酸, 与 17 个已经报道的 ASPV 分离物全长基因组序列核酸一致性为 70.6% ~ 79.2%; 基于全长基因组、RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 基因和外壳蛋白 (Coat protein, CP) 基因分别将分离物 ASPV-NM 划分到组 III、组 III 和组 I; 在 ASPV-NM 基因组中检测到 1 个显著的重组事件; 将 ASPV-NM 摩擦接种到西方烟 37B 上, 可引起显著的褪绿黄化症状, 利用透射电子显微镜可以观察到典型的病毒粒子。

关键词: 苹果茎痘病毒; 内蒙古; RACE; 重组

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 10-2037-10

Genome and Biology of an Isolate of *Apple stem pitting virus* from Inner Mongolia, China

SUN Pingping, JU Mingxiu, MA Qiang*, and LI Zhengnan*

(College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: One *Apple spot pitting virus* (ASPV) isolate NM was collected from an infected ‘Jinhong’ apple in Hohhot, Inner Mongolia, China, and its complete genome sequence was determined by RT-PCR and RACE techniques. The Genbank accession No. is MK239268. The single-stranded positive RNA genome of ASPV-NM had 9286 nucleotides, excluding the poly A tail, and its shared sequence identities with the 17 published ASPV genomes in NCBI were from 70.6% to 79.2%. The phylogenetic trees based on complete genome, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and Coat protein (CP) sequences showed ASPV-NM clustered into Group III, III and I, respectively. One clear recombination event was identified in the isolate ASPV-NM. The ASPV-NM was sap-inoculated into *Nicotiana occidentalis* 37B, causing typical symptoms of yellow spots and chlorosis, and the infection was further confirmed by the transmission electron microscope.

Keywords: *Apple stem pitting virus*; Inner Mongolia; RACE; recombination

收稿日期: 2019-07-19; **修回日期:** 2019-08-28

基金项目: 内蒙古农业大学高层次人才科研启动金项目 (NDYB2018-3); 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31860540)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: nmmaqiang@126.com, lizhengnan@imau.edu.cn)

苹果茎痘病毒 (*Apple stem pitting virus*, ASPV) 属于乙型线形病毒科 (*Betaflexiviridae*) 凹陷病毒属 (*Foveavirus*)。该病毒是苹果和梨上普遍发生的潜隐性病毒 (Martelli & Jelkmann, 1998)。ASPV 最早于 1954 年在美国中西部的欧洲野苹果 (*Malus sylvestris*) 上被检测到 (Smith, 1954), 目前在全球的苹果、梨产区均有分布, 可以造成近 10% 的树势衰退和 30% 减产 (Cembali et al., 2003)。ASPV 可以引起弗吉尼亚小苹果 (Virginia Crab) 韧皮部凹陷, 造成 ‘司派 27’ (SPY27) 和 ‘光辉’ (Radiant) 等品种衰退和叶偏向上生长 (Stouffer, 1989); 有些 ASPV 分离物会造成梨树坏死斑点和脉黄等状况 (Jelkmann et al., 1991)。ASPV 的传播媒介尚不清楚, 但它可通过嫁接或摩擦接种传播 (Yanase et al., 1989)。ASPV 粒子长约 800 nm, 直径约 15 nm, 为弯曲线状 (Martelli & Jelkmann, 1998)。其基因组为正义单链 RNA, 含有约 9 306 个核苷酸 (nt), 编码 5 个开放阅读框 (open reading frames, ORF), ORF1 (34 ~ 6582 nt) 编码 247 kD 的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp); ORF2 (6685 ~ 7353 nt)、ORF3 (7358 ~ 7717 nt)、ORF4 (7629 ~ 7838 nt) 分别编码 25、13 和 7 kD 蛋白, 它们参与病毒移动; ORF5 编码 42 ~ 44 kD 的外壳蛋白 (Coat protein, CP) (Jelkmann, 1994)。

苹果是中国种植面积最大, 产量最高的经济树种, 主要分为西南冷凉、西北黄土高原、黄河故道、渤海湾和东北寒地苹果产区。ASPV 在上述 5 个苹果产区均有分布, 目前已有来源于陕西、山东和新疆的 ‘富士’ 苹果的 ASPV 全长基因组序列的报道 (Liu et al., 2012; 陈姗姗 等, 2014; Li et al., 2016; 龚卓群 等, 2018), 而源自其他地区或其他苹果品种的 ASPV 分离物全基因组序列尚未见报道。内蒙古属于干旱寒冷地区, 主要种植耐寒耐旱的苹果品种, 代表品种为 ‘金红’。为了提供中国 ASPV 分离物的更多信息, 从内蒙古 ‘金红’ 苹果上克隆了 ASPV 全基因组序列, 并对其进行生物学和基因组遗传变异分析, 为建立灵敏可靠的 ASPV 分子检测手段和有效的防控措施提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

2017 年 7 月 16 日在内蒙古呼和浩特市回民区的谦和苹果园, 随机选择 10 株 ‘金红’ 果树, 采集叶片, 并标记为 1 ~ 10, 将采集的叶片液氮冷冻后保存于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 DAS-ELISA 检测

使用双抗体夹心酶联免疫法 (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) 对 10 个样品的 ASPV、苹果褪绿叶斑病毒 (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) 和苹果茎沟病毒 (*Apple stem grooving virus*, ASGV) 进行检测。ACLSV 和 ASGV 的 ELISA 试剂盒购于安德珍生物技术 (北京) 有限公司, ASPV 的 ELISA 试剂盒购于美国 ACD 公司, 试验操作按照说明书进行。

1.3 RT-PCR 检测

采用 CTAB 法从冻存的 ‘金红’ 苹果叶片样品中提取总 RNA, 溶解于 50 μL 无核糖核酸酶水中。用 Nanodrop One 微量核酸蛋白浓度测定仪测定浓度, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测完整性。以 1 μg 总 RNA 为模板, 利用 Oligo (dT) 进行反转录, 剩余总 RNA 保存于 -80 °C 中备用。以反转录 cDNA

为模板, PCR 检测 ASPV、ACLSV 和 ASGV, 引物见表 1。PCR 反应混合物为 10 × PCR buffer 2.5 μL, dNTP (2.5 mmol · L⁻¹) 2.0 μL, 引物 (10 μmol · L⁻¹) 各 1 μL, *Taq* 酶 0.5 μL, cDNA 2 μL, 灭菌双蒸水补足至 25 μL。PCR 反应条件为: 98 °C 4 min; 98 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳鉴定, 选取 ASPV 阳性, ASGV 与 ACLSV 阴性的样品进行后续全基因组序列测定以及寄主范围检测。

1.4 ASPV-NM 全长基因组序列测定

参照已经公布的 17 个 ASPV 基因组序列设计了 7 对用于 ASPV-NM 全长基因组扩增引物(表 1), 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应混合物为 25 μL (同 1.3), 采用 SMARTerTM RACE 试剂盒 (Clontech, USA) 扩增 ASPV-NM 基因组 5'与 3'端, 操作参考说明书。PCR 产物用 1.0%琼脂凝胶电泳检测、回收。回收产物与 p^{TOPO} vector (Aidlab, China) 连接, 连接产物转入 *E. coli* DH5α 感受态细胞中 (TaKaRa), 均匀涂布于含 50 mg · L⁻¹ Amp 的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养过夜。随机挑选白色单克隆菌落过夜摇菌培养, 对 PCR 鉴定为阳性的菌液提取质粒, 质粒中酶切结果为阳性的送上海生工生物技术有限公司进行测序, 每个片段送 3 个阳性质粒, 对测序结果采用 Vector NTI Advance11 软件进行校正和拼接。

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

目的 Aims	基因 Gene	引物 Primer	序列 (5' - 3') ^a Sequence	位置 (nt) ^b Position
检测 detection	ACLSV	A52	CAGACCCTTATTGAAGTCGAA	NC001409 (7213 ~ 7233)
		A53	GGCAACCCCTGGAACAGA	NC001409 (6876 ~ 6892)
检测 detection	ASPV	ASP-C	CTCTTGAACCAGCTGATGGC	NC003462 (9019 ~ 9038)
		ASP-A	ATAGCCGCCCCGGTTAGGTT	NC003462 (9263 ~ 9282)
检测 detection	ASGV	H5873	CCCCTGTGGATTGATACACCTC	D14995 (5871 ~ 5895)
		C6396	CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT	D14995 (6373 ~ 6394)
5' 端扩增 5' RACE	ASPV	5'RACE	TGTTCCCTCAGAAGTGAATGA	NC003462 (101 ~ 121)
		5'RACE	TCCATGCATCCAGGAATGAG	NC003462 (553 ~ 571)
基因组片段扩增 Genome amplification	ASPV	ASPV1-F	GGATACGCAAACAACTCTGAA	AB045371 (1 ~ 22)
		ASPV1-R	CATGCADGGYTTRAARTGRTTRTC	NC003462 (3627 ~ 3650)
基因组片段扩增 Genome amplification	ASPV	ASPV2-F	AATCAYTTYAARCCHTGCATGCC	NC003462 (3630 ~ 3652)
		ASPV2-R	CAAAYTTBGTGCAVAGYTGRGACT	NC003462 (5725 ~ 5748)
基因组片段扩增 Genome amplification	ASPV	ASPV3-F	GATTGYCCWGTBGTGCTWGTTC	NC003462 (4752 ~ 4774)
		ASPV3-R	TTBGTGCAVAGYTGRGACTTCAT	NC003462 (5722 ~ 5745)
基因组片段扩增 Genome amplification	ASPV	ASPV4-F	GTCYCARCTBTGCACVAARTTTGA	NC003462 (5726 ~ 5749)
		ASPV4-R	TBAAHARACTVAGCACAGTTTCCAT	NC003462 (6711 ~ 6735)
基因组片段扩增 Genome amplification	ASPV	ASPV5-F	GTYTDDTTVAABGARTTTGGHTTTGA	NC003462 (6721 ~ 6751)
		ASPV5-R	DACYACRCCTGACCTARKGGGTG	NC003462 (7853 ~ 7876)
基因组片段扩增 Genome amplification	ASPV	ASPV6-F	GGTCAGGGCGTATCTGTTAATAT	NC003462 (7862 ~ 7886)
		ASPV6-R	GAAAATCTAGTTAAAACAAAATAAG	NC003462 (9307 ~ 9332)
3'端扩增 3' RACE	ASPV	3'RACE	AGCATGTCTGGAACCTCATGCT	NC003462 (8896 ~ 8917)
		3'RACE	GACTTCTTCTTTGGAGTTGAG	NC003462 (8988 ~ 9008)

注: ^a V = A + C + G; D = A + T + G; B = T + C + G; H = A + T + C; W = A + T; K = T + G; Y = C + T; R = A + G, ^b 结合位点主要涉及的分离物为 ACLSV (NC001409), ASGV (D14995), ASPV (AB045371; NC003462)。

Note: ^a V = A + C + G; D = A + T + G; B = T + C + G; H = A + T + C; W = A + T; K = T + G; Y = C + T; R = A + G, ^b The binding sites relates to ACLSV (NC001409), ASGV (D14995), ASPV (AB045371; NC003462) .

1.5 ASPV-NM 基因组结构、序列一致性、系统发育以及重组分析

使用 Vector NTI 11.5(Thermo Fisher Scientific, USA)软件对测序结果进行组装。除了 ASPV-NM, 在 NCBI 中已经有 17 个已经公布的 ASPV 全基因组序列 (表 2), 使用 SDT 软件的 MUSCLE 序列比对程序 (Edgar, 2004) 将 ASPV-NM 基因组序列与 17 个 ASPV 参考基因组序列进行两两比对。采用 MEGA 6.0 软件 (Tamura et al., 2013) 分别构建基于全长基因组序列、全长 RdRp 基因和全长 CP 基因的系统发育进化树, 沙地葡萄茎痘病毒 (*Grapevine rupestris stem pitting virus*, GRSPaV) 全长基因组序列作为外参 (JX559646)。建树方法采用比邻法, 自展重复值设置为 1 000。

利用 RDP 软件 (Martin & Rybicki, 2000) 的 RDP、GENECONV、Bootscan、MaxChi、Chimaera、SiScan 和 3Seq 方法检测 18 个 ASPV 全长基因组序列中的重组事件。各个检测方法的参数都设为默认值, 只勾选了“线性序列”和“绝对复制”两个选项, 同时设置 $P < 10^{-6}$ 。有至少 5 种以上方法检测到的重组事件被认定为是显著重组事件。

表 2 本研究所用的 18 个 ASPV 全基因组序列

Table 2 Complete genome sequences of 18 APSV used in this study

NCBI 登录号 NCBI accession No.	分离物 Isolate	寄主 Host	国家 Country	序列长度/nt Length
AB045371	IF38	苹果 Apple	日本 Japan	9 293
EU095327	PR1	梨 Pear	中国 China	9 336
FR694186	Palampur	苹果 Apple	印度 India	9 267
JF946772	KL9	梨 Pear	中国 China	9 265
JF946775	KL1	梨 Pear	中国 China	9 265
KF319056	PM8	苹果 Apple	德国 Germany	9 284
KF321966	PB66	苹果 Apple	英国 United Kingdom	9 363
KF321967	Hannover	苹果 Apple	德国 Germany	9 324
KF915809	YT	苹果 Apple	中国 China	9 270
KJ522472	YL	苹果 Apple	中国 China	9 262
KU308398	HB-HN1	梨 Pear	中国 China	9 270
KY242757	AKS	苹果 Apple	中国 China	9 296
KY490039	NM	苹果 Apple	中国 China	9 286
KY702580	GA2	苹果 Apple	中国 China	9 358
KY702581	GA4	苹果 Apple	中国 China	9 276
LM999967	N	无寄主信息 No host information	印度 India	9 254
MG763895	LYC	梨 Pear	中国 China	9 273
NC_003462 (D21829)	PA66	苹果 Apple	德国 Germany	9 332

1.6 草本寄主鉴定

采用摩擦接种进行草本寄主鉴定。接种的寄主包括 4 周龄的苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、昆诺藜 (*C. quinoa*)、西方烟 37B (*Nicotiana occidentalis*) 和本氏烟 (*N. benthamiana*)。接种时将大约 1 g 的‘金红’叶片加入 5 mL 含有 0.15% (体积比) β - 巯基乙醇和 0.45% (体积比) 二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DIECA) 的磷酸缓冲液中研磨。在研磨液中加入一药勺 400 目的石英砂后, 利用无菌海绵将叶片提取液轻轻摩擦到接种叶片上。将只接种磷酸缓冲液的叶片作为阴性对照。接种后的植株保存在湿度 65%, 16 h 光照/8 h 黑暗的培养箱中培养观察。当接种植株表现出发病症状后采集表症植物叶片, 利用 RT-PCR 进行检测。

1.7 病毒粒子透射电镜观察

取少许表症的西方烟 37B 叶片置于载玻片上, 加入 2.5%戊二醛固定液后快速切碎, 切碎样品放置于铜网膜上, 利用 pH 6.5 的 1%磷钨酸染色 2~3 min, 烘烤灯烘干后置于透射电子显微镜 (HT7700) 下观察。

2 结果与分析

2.1 样品带毒情况

DAS-ELISA 与 RT-PCR 检测结果一致(表 3), 采集的 10 份样品中只在 5 号样品上检测到 ASPV, 未检测到 ASGV 与 ACLSV, 因此选取 5 号样品进行后续的全基因组扩增和草本寄主范围测定。其他样品检测结果详见表 3。

表 3 10 份‘金红’苹果叶片样品中的 ACLSV、ASGV 与 ASPV 的 DAS-ELISA 与 RT-PCR 检测结果
Table 3 The results of DAS-ELISA and RT-PCR detection on ACLSV, ASGV and ASPV in collected
10 samples of ‘Jinhong’ apple leaves

样品编号 Sample	苹果褪绿叶斑病毒 ACLSV	苹果茎沟病毒 ASGV	苹果茎痘病毒 ASPV
1	+	+	-
2	+	+	+
3	-	+	-
4	+	-	+
5	-	-	+
6	-	+	-
7	+	+	-
8	-	-	-
9	-	+	+
10	+	+	-

注: “+” 阳性, “-” 阴性。

Note: “+” positive, “-” negative.

2.2 ASPV-NM 基因组结构、序列一致性和系统发育分析

同一个片段 3 个克隆测序结果一致, 基于获得的 6 个基因组片段和 5'与 3'RACE 片段彼此间存在至少 100 nt 的重叠区, 通过 Vector NTI 11.5 软件的 ContigExpress Project 下面的 Assemble 功能组装获得 ASPV-NM 的全长基因组序列, 长度为 9 286 nt, 登录号 MK239268。该基因组编码 5 个开放阅读框, 分别为 RdRp (61 ~ 6 612 nt, ORF1), TGB1 (6 719 ~ 7 390 nt, ORF2); TGB2 (7 392 ~ 7 754 nt, ORF3); TGB3 (7 663 ~ 7 890 nt, ORF4) 和 CP (7 964 ~ 9 154 nt, ORF5), 5'与 3'端非编码区域长度分别为 132 nt 和 60 nt。分别分析了 ASPV-NM 分离物与 NCBI 中公布的 17 个 ASPV 分离物全基因组核酸序列, 5'UTR、3'UTR、RdRp、TGB1、TGB2、TGB3、CP 的核酸一致性和氨基酸一致性(表 4)。

ASPV-NM 分离物与 17 个 ASPV 分离物全基因组核酸一致性为 70.6% ~ 79.2%, 与凹陷病毒属的 ASPV 模式分离物 IF38 (AB045371) 的序列一致性最高, 为 79.2%, 与中国梨分离物 PR1 (EU095327) 一致性最低为 70.6%; 与 17 个 ASPV 分离物 5'UTR 的核酸一致性为 82.8% ~ 90.9%, 3'UTR 的核酸一致性为 67.9% ~ 82.3%, 其中与印度苹果分离物 Palampur(FR694186)无论是 5'UTR 还是 3'UTR 核酸一致性都是最低的; 与 17 个 ASPV 分离物 RdRp 基因的核酸一致性为 68.5% ~ 79.6%, 氨基酸一致性为 67.4% ~ 91.5%; 与 17 个 ASPV 分离物 TGB1 基因的核酸一致性为 76.7% ~ 83.9%, 氨基酸一致性为 88.3% ~ 96.9%; 与 17 个 ASPV 分离物 TGB2 基因的核酸一致性为 74.7% ~ 84.4%, 氨基酸一致性为 73.3% ~ 84.2%; 与 17 个 ASPV 分离物 TGB3 基因的核酸一致性为 76.4% ~ 86.4%, 氨基酸一致性为 71.4% ~ 90.7%; 与 17 个 ASPV 分离物 CP 基因的核酸一致性为 69.3% ~ 87.6%, 氨基酸一致性为 44.3% ~ 92.7%。

表 4 ASPV-NM 与 17 个已发表的 ASPV 分离物之间的一致性百分数
Table 4 The percent of sequence identity between ASPV-NM and 17 published ASPV isolates

登录号 Accession No.	核苷酸/nt Genome	5'端核苷 酸/nt 5'UTR	RdRp/(nt/ aa)	基因盒/ (nt/aa) Triple gene block			外壳蛋白 / (nt/aa) CP	3'端核苷 酸/nt 3'UTR
				TGB1	TGB2	TGB3		
AB045371	79.2	86.7	79.6/91.5	80.3/94.6	76.1/78.3	80.9/77.3	77.9/86.4	82.2
EU095327	70.6	87.9	68.5/67.4	77.7/88.3	75.8/73.3	77.3/73.3	76.6/44.3	76.3
FR694186	76.7	82.8	75.7/85.9	82.1/95.1	81.7/82.5	84.4/89.3	78.2/86.1	67.9
JF946772	74.4	87.9	74.6/85.6	78.6/92.4	74.7/77.5	77.0/71.4	69.9/71.3	74.6
JF946775	75.1	87.9	74.9/85.5	79.5/91.0	78.9/80.0	77.9/77.1	72.7/72.6	78.9
KF319056	78.9	85.0	78.7/90.3	83.3/95.5	81.7/81.7	83.6/88.0	76.0/83.1	80.8
KF321966	78.2	83.3	75.5/88.3	83.9/96.9	81.9/84.2	84.0/90.7	87.6/92.7	82.3
KF321967	74.8	83.3	75.0/86.1	79.7/91.9	75.0/78.3	77.0/81.4	71.0/78.0	79.2
KF915809	76.8	86.4	75.9/88.2	77.6/90.6	84.4/84.2	86.4/88.6	78.8/86.6	79.1
KJ522472	78.9	90.9	79.1/89.5	78.3/93.3	79.2/81.7	80.0/76.0	76.4/83.8	79.5
KU308398	77.5	83.3	76.1/88.2	82.2/96.4	79.4/82.5	85.8/86.7	80.8/85.3	79.5
KY242757	75.3	86.4	75.9/88.4	78.8/91.9	75.6/81.7	76.4/74.7	69.4/75.1	74.2
KY702580	76.2	85.0	75.9/88.0	77.4/91.0	78.1/80.8	78.2/76.0	75.1/83.3	81.8
KY702581	77.5	86.4	76.1/88.6	82.5/96.4	77.8/83.3	82.6/88.6	81.4/89.1	77.9
LM999967	75.0	87.9	75.9/86.7	77.7/91.9	75.6/78.3	78.2/77.3	69.3/73.1	76.0
MG763895	75.5	86.4	75.7/88.4	76.7/89.7	78.1/80.8	79.1/80.0	71.4/76.4	78.0
NC_003462 (D21829)	77.2	84.7	76.0/87.0	81.9/96.0	82.2/83.3	84.0/88.6	81.1/85.4	75.0

分别分析了 NCBI 中公布的 17 个 ASPV 分离物全基因组核酸序列, 5'UTR、3'UTR、RdRp、TGB1、TGB2、TGB3、CP 的核酸一致性和氨基酸一致性。17 个 ASPV 分离物全基因组核酸一致性为 70.7%~92.4%; 其 5'UTR 的核酸一致性为 75.9%~100.0%, 3'UTR 的核酸一致性为 73.8%~95.5%; 其 RdRp 基因的核酸一致性为 68.0%~94.0%, 氨基酸一致性为 67.2%~97.6%; 其 TGB1 基因的核酸一致性为 75.6%~92.9%, 氨基酸一致性为 87.9%~98.7%; 其 TGB2 基因的核酸一致性为 72.5%~94.5%, 氨基酸一致性为 72.5%~94.2%; 其 TGB3 基因的核酸一致性为 74.2%~94.3%, 氨基酸一致性为 67.1%~97.1%; 其 CP 基因的核酸一致性为 67.4%~96.6%, 氨基酸一致性为 36.9%~98.0%。

基于全长基因组序列构建的系统发育进化树(图 1, A)将 18 个 ASPV 分离物分成 4 个组, ASPV-NM 分离物 MK239268 与中国苹果分离物 KJ522472、德国苹果分离物 KF319056、日本苹果分离物 AB045371 聚集在一起, 构成了组 III, 外参沙地葡萄茎痘病毒(JX559646)单独形成分支。

基于 RdRp 基因构建的系统发育进化树(图 1, B)将 18 个 ASPV 分离物分成 4 个组, ASPV-NM 分离物 MK239268 与德国苹果分离物 KF319056、日本苹果分离物 AB045371 聚集在一起, 构成了组 III, 外参沙地葡萄茎痘病毒(JX559646)单独形成分支。

基于 CP 基因构建的系统发育进化树(图 1, C)将 18 个 ASPV 分离物分成 4 个组, ASPV-NM 分离物 MK239268 与英国苹果分离物 KF321966、中国苹果分离物(KY702581、KF915809、KJ522472、KY702580)、中国梨分离物(KU308398、EU095327)、德国苹果分离物(NC003462、KF319056)、印度苹果分离物 FR694186 和日本苹果分离物(AB045371)聚集在一起, 构成了组 I, 外参沙地葡萄茎痘病毒(JX559546)单独形成分支(图 1)。

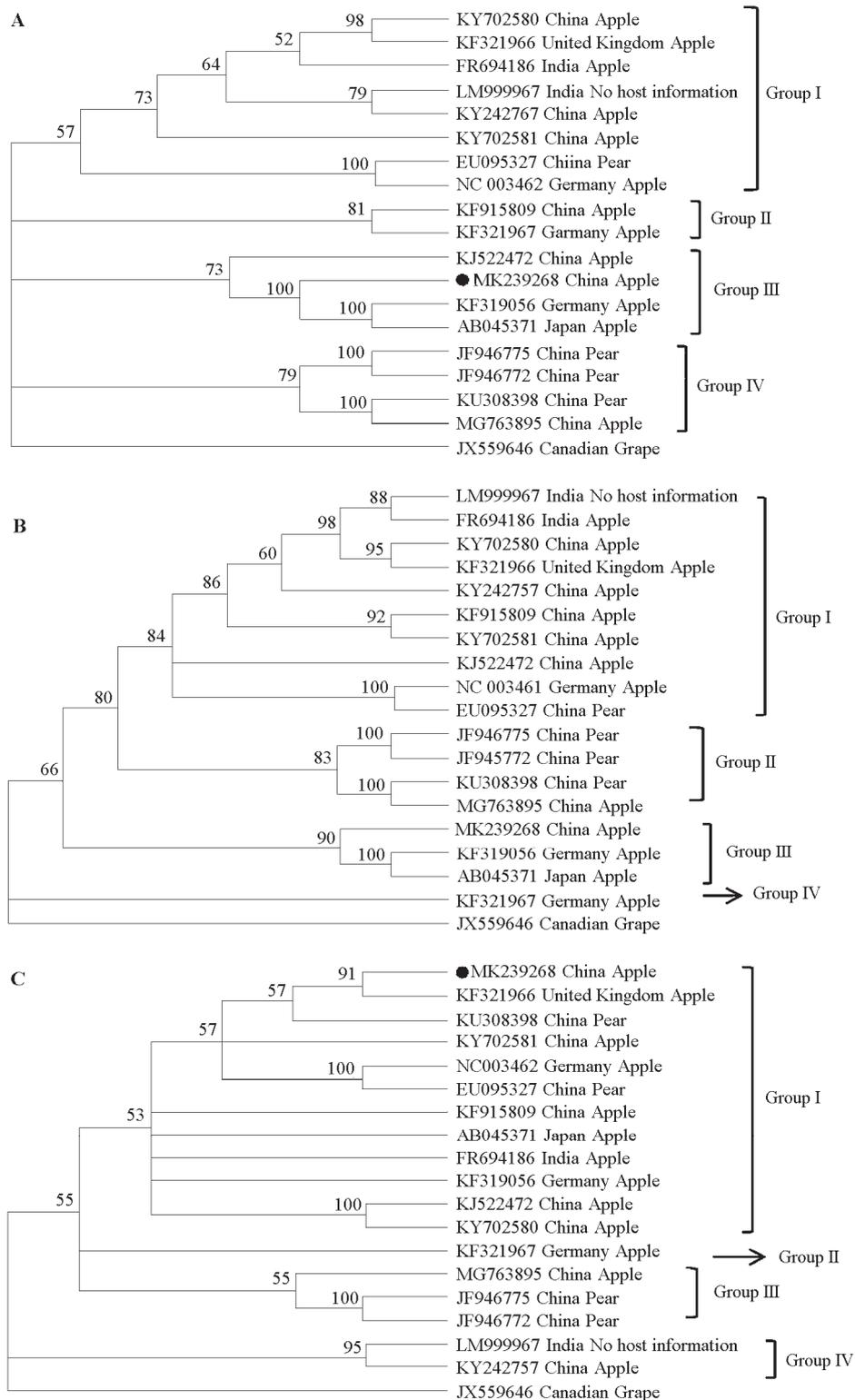


图 1 基于全基因组序列 (A)、RdRp (B) 以及 CP (C) 基因构建 18 个 ASPV 分离物的进化树

分枝处数值表示重复 1 000 次的可信值, 其中圆点表示 ASPV-NM 分离物。

Fig. 1 Phylogenetic analysis of 18 ASPV based on the complete genome (A), RdRp genome (B) and CP genome sequences (C)

Numbers at the branches indicate bootstrap percentages (1000 replications), and the black round spot indicated ASPV-NM.

2.3 重组分析

在 18 个 ASPV 分离物基因组序列中共检测到 31 个重组事件，其中有 16 个分离物基因组中存在重组事件，只有在印度苹果分离物 FR694186 和德国苹果分离物 KF319056 基因组中没有检测到重组事件，在日本苹果分离物 AB045371、中国梨分离物 EU095327、中国苹果分离物 (KF915809、KY702580、KY702581) 5 个基因组中各检测到了 3 个重组事件，在中国梨分离物 (JF946775、KU308398、MG763895)、英国苹果分离物 (KF321966)、印度分离物 (LM999967) (没有寄主信息) 的基因组中各检测到了 2 个重组事件，其他分离物均检测到 1 个重组事件 (表 5)。

表 5 苹果茎痘病毒分离物的潜在重组事件
Table 5 Potential recombination events of *Apple stem pitting virus* isolates.

编号 No.	重组分离物 Recombinant	检测方法 Method ^a	母本 Major parent ^b	父本 Minor parent	P 值 P-value ^c	重组位置 Recombination region
1	AB045371	RGMCS	LM999967	KF319056	9.417×10^{-53}	1 ~ 4 673
2	AB045371	RGMS ₃	ASPV-NM	Unknown (KF319056)	9.758×10^{-17}	1 ~ 2 812
3	AB045371	RGCS ₃	Unknown (KY702581)	ASPV-NM	6.352×10^{-6}	4 676 ~ 6 596
4	MK239268	RGMCS	LM999967	KF319056	9.417×10^{-53}	6 ~ 4 674
5	EU095327	RGBMCS ₃	MG763895	Unknown (KY702581)	2.202×10^{-19}	2 ~ 1 855
6	EU095327	RGMCS	KJ522472	JF946775	7.808×10^{-17}	2 627 ~ 2 990
7	EU095327	RBMCS	LM999967	Unknown (KJ522472)	9.434×10^{-8}	2 024 ~ 2 292
8	JF946772	RGBMCS ₃	MG763895	Unknown (KY702581)	2.202×10^{-19}	1 ~ 1 855
9	JF946775	RGBMCS ₃	MG763895	Unknown (KY702581)	2.202×10^{-19}	1 ~ 1 855
10	JF946775	RGMCS	Unknown (EU095327)	JF946772	2.921×10^{-12}	926 ~ 1 872
11	KF321966	RGMCS	KF319056	Unknown (FR694186)	1.594×10^{-17}	1 ~ 2 770
12	KF321966	RGMCS	Unknown (FR694186)	KF321967	1.045×10^{-32}	2 774 ~ 6 617
13	KF321967	RGMCS	KF319056	Unknown (FR694186)	1.594×10^{-17}	1 ~ 2 009
14	KF915809	RGBMCS	Unknown (FR694186)	MG763895	8.220×10^{-22}	1 ~ 1 907
15	KF915809	RGMCS	Unknown (FR694186)	KY242757	4.888×10^{-32}	1 859 ~ 6 618
16	KF915809	RGMCS	MG763895	KY702581	4.896×10^{-23}	6 658 ~ 7 899
17	KJ522472	RGBMCS ₃	MG763895	Unknown (KY702581)	2.202×10^{-19}	1 ~ 1 885
18	KU308398	RGMCS	KF319056	Unknown (FR694186)	1.594×10^{-17}	2 ~ 2 766
19	KU308398	RGMCS	Unknown (KY702581)	KF321966	7.719×10^{-33}	2 783 ~ 6 554
20	KY242757	RGBMCS	Unknown (FR694186)	MG763895	8.22×10^{-22}	1 ~ 1 907
21	KY702580	RGMCS	Unknown (FR694186)	KF321967	1.045×10^{-32}	2 774 ~ 6 610
22	KY702580	RGMCS	KY702581	KF321966	2.448×10^{-18}	6 671 ~ 7 831
23	KY702580	RGMCS	KF319056	Unknown(FR694186)	1.594×10^{-17}	1 ~ 2 768
24	KY702581	RGMCS	MG763895	KF915809	1.449×10^{-11}	115 ~ 957
25	KY702581	RGBMCS	Unknown (FR694186)	MG763895	8.220×10^{-22}	1 ~ 1 855
26	KY702581	RGMCS	Unknown (FR694186)	KY242757	4.888×10^{-32}	1 858 ~ 6 654
27	LM999967	RGBMCS ₃	MG763895	unknown (KY702581)	2.202×10^{-19}	1 ~ 1 855
28	LM999967	RGMCS	JF946775	KJ522472	6.018×10^{-10}	2 039 ~ 2 293
29	MG763895	RGBMCS	FR694186	NC_003462	1.936×10^{-11}	2 ~ 1 891
30	MG763895	RGMCS	KY242757	Unknown (KY702581)	6.775×10^{-11}	1 927 ~ 6 635
31	NC_003462	RGMCS ₃	KY702581	MG763895	2.921×10^{-10}	2 661 ~ 3 016

注：^a 各个检测方法的简写：R: RDP; G: GENECONV; B: Bootscan; M: MaxChi; C: Chimaera; S: SiScan; 3: 3Seq; ^b 基因登录号; ^c P 值是检测方法中下划线标注方法的 P 值，该值是所列检测方法中最低的 P 值。

Note: ^a Abbreviation for each methods; R: RDP; G: GENECONV; B: Bootscan; M: MaxChi; C: Chimaera; S: SiScan; 3: 3Seq; ^b GenBank accession number; ^c The reported P-values are for the methods underlined, and are the lowest P-values calculated for the region quoted.

2.4 接种试验和病毒粒子观察

接种后两周西方烟 37B 有 3 株表现出明显的褪绿和黄斑 (图 2, B)，但其他待测植物上均未表现症状。利用 RT-PCR 检测接种叶片，只在 3 株表现症状的西方烟 37B 上检测到 ASPV，而在其他未表现症状的西方烟 37B 以及接种的苋色藜、昆诺藜和本氏烟上均未检测到 ASPV。电镜观察表症的西方烟叶片，能够看到典型的线形病毒粒子，其长约 800 nm，宽约 15 nm (图 2, C)。

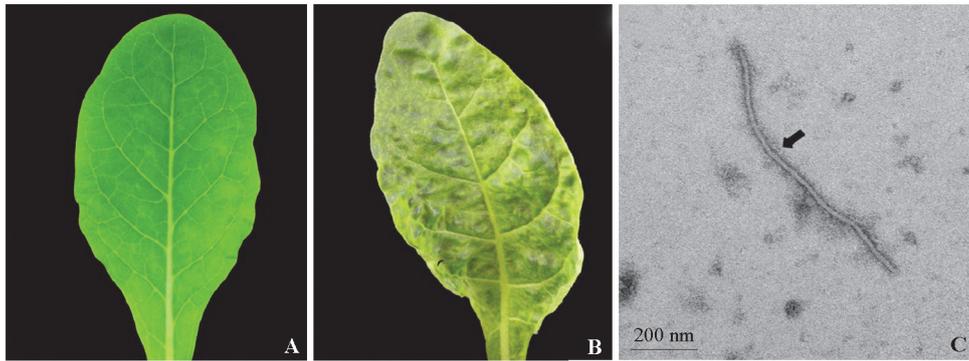


图 2 未接种 (A) 和接种 ASPV-NM 的西方烟叶片 (B) 以及扫描电镜观察到的病毒粒子 (C)

Fig. 2 The negative control (A), ASPV inoculated *N. occidentalis* 37B leaves (B), and transmission electron micrograph of virus in symptomatic *N. occidentalis* 37B (C)

3 讨论

第九次国际病毒分类会议建议凹陷病毒属不同种的 RdRp 基因或者 CP 基因的核酸序列一致性低于 72% 或者氨基酸序列一致性低于 80% (Adams et al., 2012)。ASPV-NM 的 RdRp 基因和 CP 基因与 ASPV 模式分离物 IF38 的 RdRp 基因和 CP 基因核酸一致性分别为 79.6% 和 77.9%，氨基酸一致性为 91.5% 和 86.4%，这些数据证明该分离物属于 ASPV。通过核酸一致性分析我们可以发现 ASPV-NM 与其他 17 个 ASPV 分离物的基因组核酸一致性为 70.6% ~ 79.2%，其他 17 个 ASPV 分离物彼此间基因组核酸一致性为 70.7% ~ 92.4%，ASPV-NM 与已经报道的 ASPV 分离物具有较低的核酸一致性。虽然在采集的苹果样品上没有表现出任何症状，但是该样品可以作为毒源将 ASPV 摩擦接种到西方烟 37B 上，说明 ASPV-NM 是一个有侵染性的 ASPV 分离物。

Ma 等 (2016) 从中国 12 个省采集的 451 份梨样品、14 份苹果样品中获得了 48 个 ASPV 的 CP 基因和 66 个 ASPV 的 TGB 基因。根据得到 ASPV 的 CP 基因和 TGB 基因序列构建的进化树显示各分离物依据苹果、梨和韩国梨聚合为 3 支，表明 ASPV 分离物不仅表现出地理位置相关而且有寄主相关性。但在本研究中基于 18 个 ASPV 分离物的全长基因组序列，RdRp 基因和 CP 基因构建的系统发育进化树不能支持 ASPV 分离物间呈现地理位置相关性和寄主相关性，这可能与样本量较少有关。基于全长基因组序列、RdRp 基因和 CP 基因构建的系统发育进化树虽然都将 18 个 ASPV 分离物划分为 4 个组，但是基于全长基因组划分的 4 个组与基于 RdRp 基因和 CP 基因划分的 4 个组组内成员是不同的，说明使用不同的基因进行系统发育分析会得到不同结果，这也提示在以后的系统进化分析中尽量使用更多的分子标注，以达到更加准确的分类结果。

重组在病毒进化中起着非常重要的作用，该现象在侵染植物的单链 RNA 病毒中研究较多 (Sztuba-Solińska et al., 2011)。因为 ASPV 可以通过嫁接传播，而对其传播媒介仍不清楚 (Adams et al., 2012)，被感染的植物材料在不同地区的长距离运输，以及在不同树上的多重嫁接可能促进不同地区以及不同寄主之间的重组进化。ASPV 的 CP 基因重组事件已有报道 (Yoon et al., 2014)，而且基于 12 个 ASPV、苹果绿皱相关病毒 (*Apple green crinkle associated virus*, AGCaV)、杏潜隐病毒 (*Apricot latent virus*, ApLV) 以及桃褪绿叶斑病毒 (*Peach chlorotic mottle virus*, PCMoV) 的重组事件研究表明 ASPV 具有较高的重组率 (Li et al., 2016)。本研究中检测了 18 个 ASPV 分离物基因组中的重组事件，结果显示 5 个 ASPV 分离物具有三重重组事件，5 个 ASPV 分离物具有双重重组事

件, 该结果再次证明了重组是 ASPV 进化的主要因素。在得到的 ASPV-NM 分离物中检测到 1 个重组事件, 表明 ASPV-NM 是一个重组进化的产物。推测长距离运输以及多重嫁接促进了 ASPV 在不同寄主之间的重组。

References

- Adams M, Candresse T, Hammond J, Kreuze J, Martelli G, Namba S, Pearson M, Ryu K, Saldarelli P, Yoshikawa N. 2012. Family *Betaflexiviridae*, genus *Carlavirus*// King A M Q, Adams M J, Carstens E B, Lefkowitz E J. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. London: Academic Press: 1143 - 1147.
- Cembali T, Folwell R J, Wandschneider P, Eastwell K C, Howell W E. 2003. Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the US. *Crop Protection*, 22 (10): 1149 - 1156.
- Chen Shan-shan, Zhang Zhi-xiang, Liu Guo-jie, Lu Mei-guang, Li Shi-fang, Wang Hong-qing. 2014. Identification and analysis of complete genomic sequence of *Apple stem pitting virus* isolated from apple in China. *Acta Phytopythologica Sinica*, 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.
- Edgar R C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5 (1): 113.
- Gong Zhuo-qun, Hao Lu, Xie Ji-peng, Guo Li-yun, Zhou Tao. 2018. Determination and analysis of whole genome sequence of *Apple stem pitting virus* isolate AKS from Xinjiang, China. *Journal of Plant Protection*, 45 (4): 923 - 924. (in Chinese)
- 龚卓群, 郝璐, 谢吉鹏, 国立耘, 周涛. 2018. 苹果茎痘病毒新疆阿克苏分离物基因组全序列测定及分析. *植物保护学报*, 45 (4): 923 - 924.
- Jelkmann W. 1994. Nucleotide sequences of *Apple stem pitting virus* and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex-and carlaviruses. *Journal of General Virology*, 75 (7): 1535 - 1542.
- Jelkmann W, Kunze L, Vetten H J, Lesemann D E. 1991. cDNA cloning of dsRNA associated with apple stem pitting disease and evidence for the relationship of the virus-like agents associated with apple stem pitting and pear vein yellows. *Acta Horticulturae*, 309: 55 - 62.
- Li Z, Kondo H, Andika I B, Liu P, Sun L, Wu Y. 2016. Identification of genome recombination among *Apple stem pitting virus* isolates. *Journal of Plant Pathology*, 98 (3): 595 - 601.
- Liu N, Niu J X, Zhao Y. 2012. Complete genomic sequence analyses of *Apple stem pitting virus* isolates from China. *Virus Genes*, 44 (1): 124 - 130.
- Ma X, Hong N, Moffett P, Wang G. 2016. Genetic diversity and evolution of *Apple stem pitting virus* isolates from pear in China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38 (2): 218 - 230.
- Martelli G P, Jelkmann W. 1998. *Foveavirus*, a new plant virus genus. *Archives of Virology*, 143 (6): 1245 - 1249.
- Martin D, Rybicki E. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16 (6): 562 - 563.
- Smith W W. 1954. Occurrence of stem pitting and necrosis in some body stocks for apple trees. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science. Journal of American Society for Horticultural Science*, 63: 101 - 113.
- Stouffer R F. 1989. *Virus and virus like diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders*// Friedlund P R. *Apple stem pitting virus*. Washington, USA: 138 - 144.
- Sztuba-Solińska J, Urbanowicz A, Figlerowicz M, Bujarski J J. 2011. RNA-RNA recombination in plant virus replication and evolution. *Annual Review of Phytopathology*, 49 (1): 415.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725 - 2729.
- Yanase H, Koganezawa H, Fridlund P R. 1989. Correlation of pear necrotic spot with pear vein yellows and apple stem pitting, and a flexuous filamentous virus associated with them. *Acta Horticulturae*, 235: 157 - 158.
- Yoon J Y, Joa J H, Choi K S, Do K S, Lim H C, Chung B N. 2014. Genetic diversity of a natural population of *Apple stem pitting virus* isolated from apple in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 30 (2): 195 - 199.