

甘薯杆状病毒湖南分离物基因组全序列测定及比较分析

黄艳岚^{1,2}, 张超凡^{2*}, 邹学校^{1,3*}

(¹湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128; ²湖南省作物研究所, 长沙 410125; ³湖南农业大学, 长沙 410128)

摘要:利用 Small RNA 测序技术对采自湖南的甘薯杆状病毒进行鉴定, 获得与 SPBV-B 序列具有相似性的 contigs 161 个。首先设计小片段引物, PCR 扩增分离出 706 bp 的目的片段, 与 SPBV-B (FJ560944) 相似性为 78%。分段设计引物, 进行基因全序列 PCR 扩增。引物组合 SPBV-BF1/R1、SPBV-BF2/R4 和 SPBV-BF5/R5 分别扩增出 3 150、2 900 和 3 500 bp 目的条带。序列拼接获得 2 个 SPBV-B 基因组全序列, 大小分别为 7 894 bp (MK052980) 和 7 981 bp (MK052981), 包含完整编码阅读框。进化分析表明 MK052980 和 MK052981 与 SPPV 聚为同一分支, 与 SPPV 相似性分别为 81% 和 83%, 与 SPBV-B 相似性分别为 86% 和 94%。MK052980 和 MK052981 具有 89.5% 的相似性。经编码阅读框氨基酸序列比对, MK052980 序列的 ORF3a 氨基酸序列存在变异。这是国内首次报道 SPBV-B 全基因序列。

关键词: Small RNA 测序; 杆状病毒; 甘薯杆状病毒; 全基因序列; 序列分析

Complete genome sequencing and comparative analysis of Sweet potato badnavirus isolates from Hunan HUANG Yan-lan^{1,2}, ZHANG Chao-fan^{2*}, ZOU Xue-xiao^{1,3*} (¹ College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha410128, China; ² Crop Research Institute of Hunan, Changsha410125, China; ³ Hunan Agricultural University, Changsha410128, China)

Abstract: Sweet potato badnavirus, collected from Hunan province, were identified by Small RNA sequencing, and got 161 contigs homologous with the SPBV-B sequence. The target fragment of 706 bp was amplified by PCR, which was 78% homologous to SPBV-B (FJ560944). Three fragments of Sweet potato badnavirus B sequence, whose length were 3 150 bp, 2 900 bp and 3 500 bp, were amplified by SPBV-BF1/R1, SPBV-BF2/R4 and SPBV-BF5/R5 primers, respectively. Two complete genomic sequences of SPBV-B, 7 894 bp (MK052980) and 7 981 bp (MK052981), obtained by sequence assembly, contained complete ORFs. Phylogenetic analysis showed that MK052980, MK052981 and SPPV were in the same group with 81% and 83% sequencing similarity, respectively, and shared 86% and 94% homologies with SPBV-B, respectively. MK052980 and MK052981 were 89.5% sequence similarity. The ORF3a amino acid sequences of MK052980 was mutated by sequence alignment. It's the first report the complete genome sequences of SPBV-B in China.

Key words: Small RNA sequencing; badnavirus; SPPV; complete genome sequence; sequence analysis

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2019)06-0790-09

收稿日期: 2018-11-15; 修回日期: 2019-02-19; 网络出版时间: 2019-02-20

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20190220.1000.001.html>

基金项目: 湖南省农业科技创新团队(2017XC13); 湖南省自然科学基金(2016JJ6070); 湖南省甘薯工程技术研究中心(2018TP2032); 国家现代农业产业技术体系(CARS-11-C-16)

通讯作者: 张超凡, 博士, 研究员, 主要从事甘薯育种与栽培研究; E-mail: cfzhang2004@sina.com

邹学校, 博士, 研究员, 主要从事辣椒育种研究; E-mail: zouxuexiao428@126.com

第一作者: 黄艳岚, 硕士, 副研究员, 主要从事薯类栽培与病虫害防治研究; E-mail: huang-680@163.com。

甘薯 (*Ipomoea batatas*) 是重要的根茎类作物之一,也是重要的粮食、饲料、工业原料及能源用块根作物。在甘薯种植区,甘薯常受多种病毒病害的侵扰^[1]。

侵染甘薯的病毒有 30 多种^[2],目前已鉴定的甘薯病毒有甘薯褪绿矮化病毒 (Sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV)^[3,4]、甘薯羽状斑驳病毒 (Sweet potato feathery mottle virus, SPFMV)^[5,6]、甘薯曲叶病毒 (Sweet potato leaf curl virus, SPLCV)^[7-9]、甘薯潜隐病毒 (Sweet potato latent virus, SPLV)^[10-12]、甘薯 G 病毒 (Sweet potato virus G, SPVG)^[13,14]、甘薯 C 病毒 (Sweet potato virus C, SPVC)^[15,16]、甘薯病毒 2 (Sweet potato virus 2, SPV2)^[17-19]、甘薯无症病毒 1 (Sweet potato symptomless virus 1, SpSV/1)^[20,21]、甘薯明脉病毒 (Sweet potato vein clearing virus, SPVCV)^[22]、甘薯轻型斑点病毒 (Sweet potato mild speckling virus, SPMSV)^[23]、甘薯轻型斑驳病毒 (Sweet potato mild mottle virus, SPMMV)^[24]、甘薯褪绿斑病毒 (Sweet potato chlorotic fleck virus, SPCFV)^[25]、甘薯花椰菜花叶病毒 (Sweet potato collusive virus, SPCV)^[26]、甘薯金脉病毒 (Sweet potato golden Korea vein virus, SPGVKRV)^[27] 和甘薯杆状病毒 (Sweet potato pakakuy virus, SPPV)^[28]。

SPPV 也称为 Sweet potato badnavirus (SPBV), 属花椰菜花叶病毒科 (*Caulimoviridae*) 杆状 DNA 病毒属 (*Badnavirus*), 由粉蚧和蚜虫以半持续性方式传播^[29]。受 SPPV 侵染的甘薯植株无

症状或表现为 2 种以上病毒共同侵染的症状^[2,30]。Kreuze 等^[31]于 2009 年首次鉴定出 SPPV, 大小约 7 500 bp, 包含完整的 ORF1、ORF2 和 ORF3, 直到 2017 年报道获得 SPPV 全基因组序列, 全长分别为 8 082 bp 和 7 961 bp, 包含 4 个 ORFs^[1]。Nhlapo 等^[28]、Gu 等^[32]、Mbanzibwa 等^[33,34] 和 Qin^[35] 等报道的 SPPV 均为部分片段序列。

甘薯病毒检测包括指示植物检测、血清学检测、电子显微镜观察、核酸杂交、滚环扩增、核苷酸 PCR 检测、荧光定量 PCR 检测与深度测序等技术^[36]。深度测序技术已成为检测和鉴定未知病毒的关键技术, 其在葡萄^[39]、辣椒^[40]、鬼针草^[41]、丝棉木^[42]、香茅草^[43] 等植物中已鉴定出新病毒, 该技术较传统方法具有更高的灵敏度^[31,37,38]。甘薯病毒深度测序由 Kreuze 最早报道, 这也是 Small RNA 测序技术应用于植物新病毒鉴定的最早报道^[37]。

本研究对采自长沙、永州、邵阳等地的甘薯种质资源样本进行 Small RNA 深度测序, 旨在明确受侵染甘薯的 SPPV 种类, 为甘薯病毒病防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2015~2016 年从湖南长沙、邵阳、株洲、永州等地采集 6 份表现为叶片褪绿、皱缩、紫斑、叶缘上卷或植株节间短小等疑似病毒病症状甘薯植株样品 (图 1)。

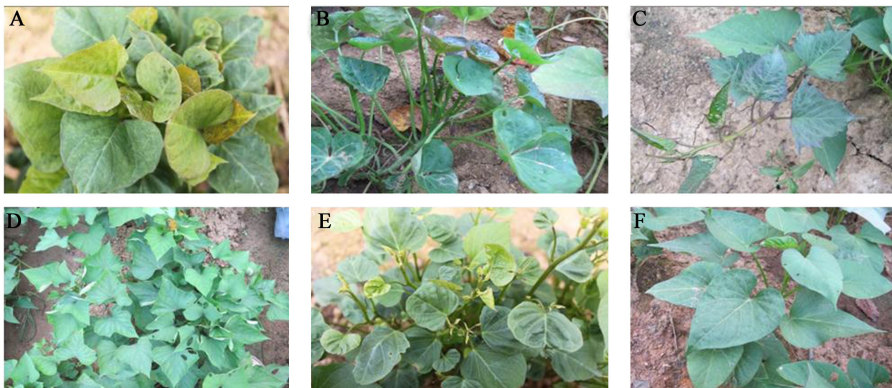


Fig. 1 Sampling symptoms of sweet potato virus disease in the field

A: Sweet potato germplasm number 2015432322; B: Sweet potato variety Xiangshu16; C: Sweet potato germplasm number P430581013; D: Sweet potato germplasm number 2015431119; E: Sweet potato variety 15-13-7; F: Sweet potato variety Zi-2.

1.2 Small RNA 测序与数据分析

将采集的甘薯叶片称重混合,用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 提取总 RNA,对样本进行纯化,筛选 18-30 nt 大小的片段,再连接 5' 端接头,3' 端接头,RT-PCR 扩增,完成小 RNA 测序文库的构建。用 Illumina HiSeq2000 SE50 平台测序。

Small RNA 高通量测序所得 50 (HiSeq 平台)、35 (Solexa 平台) 碱基长度的序列,通过去接头、去低质量、去污染等过程完成数据处理得到 Clean data,对其进行序列长度分布的统计及样品间公共序列统计。将 clean data 进行分类注释,获得样品中包含的 RNA 组分及表达量信息,筛选出未注释片段进行 novel miRNA 的预测。建库和测序委托杭州晶佰生物技术有限公司进行。利用组装软件 Velvet 对 miRNA 中的短 reads 进行组装,组装后的 reads 分别与植物 non-redundant 数据库和细菌 uniprotein 库进行比对, Evalue 值设定 $1e^{-3}$ 。

1.3 SPBV 基因全序列克隆

田间采集节间短小、叶片畸形(扇形)、皱缩、黄色斑点的甘薯叶片,按照植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305) 提取甘薯叶片组织 DNA。根据 Small RNA 测序结果,用 NCBI-blast 筛选与 SPBV 相似性较高的序列,设计小片段扩增引物(表 1)。取甘薯叶片总 DNA 各 3 ng 为模板,利用小片段扩

增的引物组合 SPBV-F1、SPBV-R1、SPBV-F2、SPBV-R2、SPBV-F3、SPBV-R3 进行 PCR 扩增,10 μL 反应体系为:DNA 模板($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、 $2 \times \text{EasyTaq PCR SuperMix}$ 5 μL 、上下游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL 、ddH₂O 补足 10 μL 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,35 个循环。用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。经 PCR 扩增,产物回收后与 PMDTM18-T Vector 连接,转化 JM109 感受态细胞,筛选阳性克隆,测序委托上海生工生物工程有限公司进行。

经确定小片段扩增鉴定的序列为 SPBV 序列,设计引物 SPBV-B-F1,按 Small RNA 测序 contigs 与 SPBV 具有相似性的序列比对分析,分段设计 SPBV-B-R1、SPBV-F2、SPBV-B-R4、SPBV-B-F5、SPBV-B-5R 全长扩增引物(表 1),PCR 反应体系 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min,其余反应条件与转化鉴定及测序同上。

1.4 序列分析

序列用 Blast 进行比对,用 MEGA6 软件对 Badnavirus 的核酸序列进行进化分析,用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树,分支可信度 Bootstrap 为 1 000。用 DNAMAN 做全基因序列结构示意图。

Table 1 Sweet potato badnavirus amplification primers

Primer name	Primers sequence (5'-3')	Size/bp	GenBank accession	Primer position/aa	Overlapping area size/bp
SPBV-F1	AAGAGGTCCCTGACAGTAGAGT	538-736	FJ560944	153	-
SPBV-R1	AGGGTCATAAGTAAGGGTAAATCCGA			685	-
SPBV-F2	GAGCGAGTATCAGTCTGTAAGT	538-736	FJ560944	82	-
SPBV-R2	TCATACCAGTCCTGAAGGGATTCTC			743	-
SPBV-F3	CACGACTGAGCCGACGAT	538-736	FJ560944	14	-
SPBV-R3	CGAGAATCATAACCAGTCCTG			749	-
SPBV-B-F1	TGGTATCAGAGCGAGTATCAGTC	3 150	FJ560944	1-3233	
SPBV-B-R1	TGGCCCATGGTTGTATCTTC				
SPBV-B-F2	AGGAAAGAGGGTAACCCCCT	2 900	FJ560944	2987-5890	246
SPBV-B-R4	GAGCACCATCCTTTGCTTGC				
SPBV-B-F5	CGCCATCAATGGCAAGACCA	3 500	FJ560944	4395-7903	1495
SPBV-B-R5	TGTAAATTGAGATCCTTATA				

2 结果与分析

2.1 甘薯叶片组织 Small RNA 深度测序分析

甘薯叶片样品经 Small RNA 测序,去除低质量 Reads,分别获得 18 971 899 (SP3)、17 260 805 (SP4)个 clean reads (15~30 nt)(表 2)。用 Velvet 软件对 miRNA 中的短 reads 进行组装,获得 22 546 个 contigs,0-40 nt 序列占比最高,为 40.53% (图 2)。将组装后的结果与病毒数据库进行比对,甘薯样本存在的 SPBV-B 病毒 contigs 数量为 161,长度为 31-114 bp,拼接获得 5 202 bp 的 SPBV 基因组序列,覆盖基因组全长的 62%。

2.2 PCR 鉴定

共采集 15 个甘薯叶片疑似病毒病症状样品,经筛选,用引物组合 SPBVF3/R2 在 DNA 样品编号 2、3、7、8、9、10、12、13 中扩增出大小约 700 bp 的清晰条带(图 3),样品编号 1、4、5 扩增出微弱的

目的条带;样品编号 6、11、14、15 未能扩增出条带。目的条带经回收测序,大小为 706 bp,Blast 序列分析显示该序列与 SPBV-B(FJ560944)相似性为 78%。

根据 PCR 已鉴定的序列与 Small RNA 的测序序列分段设计引物,共设计 3 对引物组合 SPBV-BF1/R1、SPBV-BF2/R4 和 SPBV-BF5/R5 (表 1),对 10 个 DNA 样品进行 SPBV-B 全长序列 PCR 扩增,其中样本编号 4、6、7、8 和 10 均能扩增出目的条带(图 4)。经测序,目的条带大小分别为 3 230 bp、2 899 bp 和 3 503 bp。将序列与 SPBV-B 进行

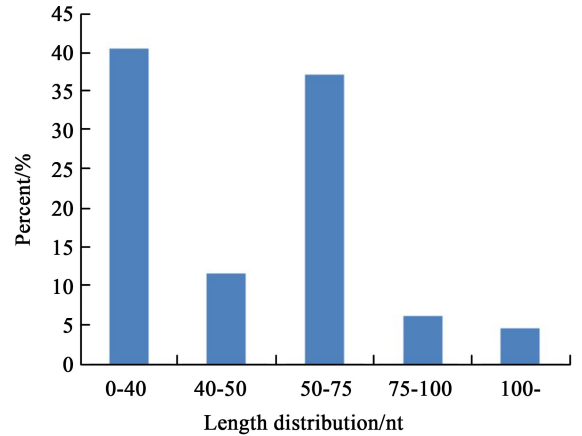


Fig. 2 Percentage of assembled reads length

The vertical dashed lines were percentage of assembled reads length. The horizontal dashed line indicates length distribution of velvet reads.

Table 2 Small RNA sequencing data filtering statistics

Sample	Clean reads	Low quality reads	Raw reads	Clean reads (15-30 nt)
SP3	18 996 190	537 924	19 534 114	18 971 899
SP4	17 281 646	389 893	17 671 539	17 260 805

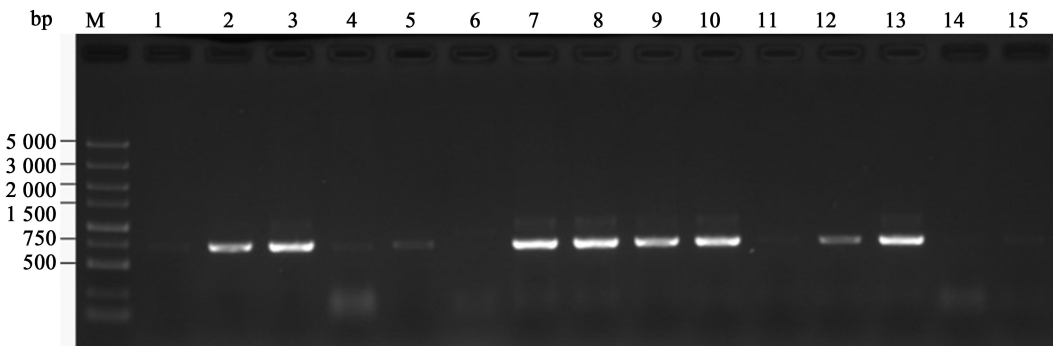


Fig. 3 PCR amplification of primers SPBVF3/R2

M: DL5000 DNA Marker; 1: Sweet potato germplasm number 2015432322; 2: Sweet potato variety Xiangshu16; 3: Sweet potato germplasm number P430581013; 4: Sweet potato germplasm number 2015431119; 5: Sweet potato variety 15-13-7; 6: Sweet potato variety Zi-2; 7: Sweet potato variety 17-4-5; 8: Sweet potato variety 17-6-14; 9: Sweet potato variety 17-9-33; 10: Sweet potato variety 17-3-1; 11: Sweet potato germplasm 2016431181; 12: Sweet potato variety Xiangshu19; 13: Sweet potato variety Sim-1; 14: Sweet potato germplasm number P430681038; 15: Sweet potato germplasm number P430522019.

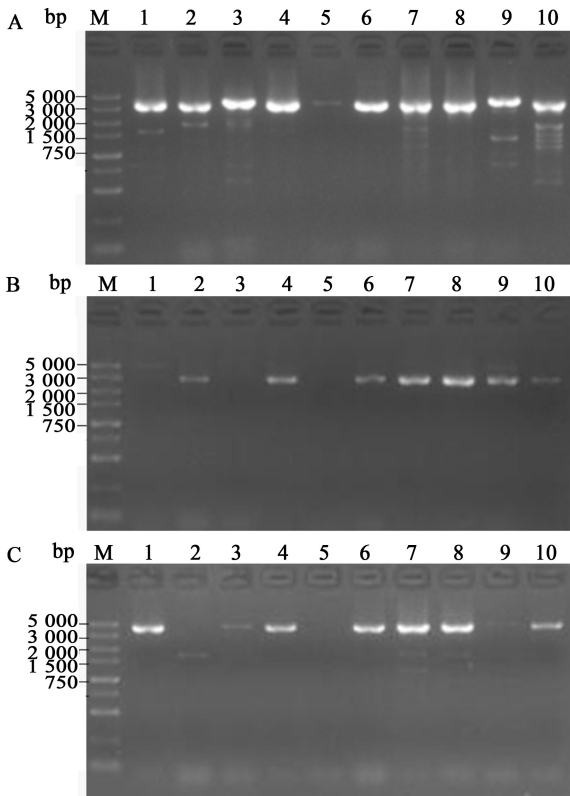


Fig. 4 PCR amplification of primers SPBV-BF1/R1、SPBV-BF2/R4 and SPBV-BF5/R5

A: PCR amplification of primers SPBV-BF1/R1; B: PCR amplification of primers SPBV-BF2/R4; C: PCR amplification of primers SPBV-BF5/R5. M: DL5000 DNA Marker; 1: Sweet potato variety Xiangshu16; 2: Sweet potato germplasm number P430581013; 3: Sweet potato germplasm number 2015431119; 4: Sweet potato variety 15-13-7; 5: Sweet potato variety 17-4-5; 6: Sweet potato variety 17-6-14; 7: Sweet potato variety 17-9-33; 8: Sweet potato variety 17-3-1; 9: Sweet potato variety Xiangshu19; 10: Sweet potato variety Sim-1.

Blast 比对, 分别位于 SPBV-B 的 70~3 306 bp、3 052~5 958 bp、4 463~7 964 bp 区域。将重叠区域序列组装拼接(图 5), 共获得 2 个 SPBV-B 全基因组序列, 大小分别为 7 894bp 和 7 981bp, 分别命名为 MK052980 和 MK052981, 包含完整编码阅读框, 与 SPBV-B 相似性分别为 86% 和 94%, 与 SPPV(FJ560943) 相似性分别为 81% 和 83%。而 MK052980 和 MK052981 具有 89.5% 的相似性。

2.3 Badnavirus 甘薯分离物的系统进化分析

将 MK052980、MK052981 分离物与 NCBI 下载的共 49 个杆状病毒全基因组序列构建系统进化树(图 6)。结果显示 49 个杆状病毒共聚为 5 个不同的分支, 本研究得到的 MK052980、MK052981 分离物与侵染葡萄(KX610317、KT907478 和 KJ725346)、雪莲果(KM229702)、芋头(MG017322)、黑莓(KJ413252)、甘蔗(M89923)、富贵竹(EF494181 和 DQ473478)、醋栗(HQ852251 和 HQ852248)、悬钩子(KM078034)的杆状病毒同聚为一个分支, 与侵染甘薯的杆状病毒聚为一个亚支。结果表明 MK052980 和 MK052981 为 SPPV 的不同分离物, MK052981 与 SPBV-B 的亲缘关系更近。

2.4 SPPV 阅读编码框氨基酸序列分析

SPPV 共包括 5 个 ORF: ORF1、ORF2、ORF3a、ORF3b、ORF4, 分别编码 142、152、1 170、771、193 个氨基酸。MK052980、MK052981 与 SPBV-B 各 ORFs 氨基酸序列相似性分别为 ORF1 98.59%、ORF2 93.86%、ORF3a 95.80%、ORF3b 96.97%、ORF4 97.24%。其中 MK052980 序列 ORF3a 编码蛋白序列中第 414、560 位点的 2 个氨基酸缺失, 同时增加了 6 个氨基酸, 分别位于第 459-461 aa、509 aa、540-541 aa 位点(图 7)。

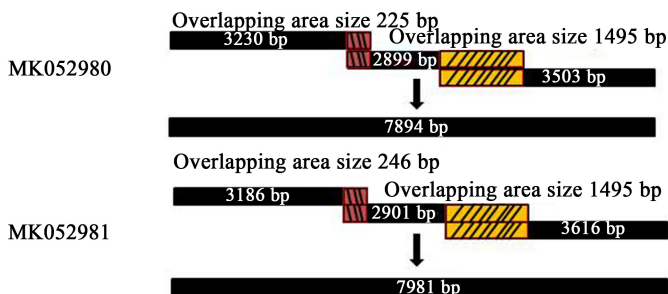


Fig. 5 Diagram of the MK052980 and MK052981 sequence assembly

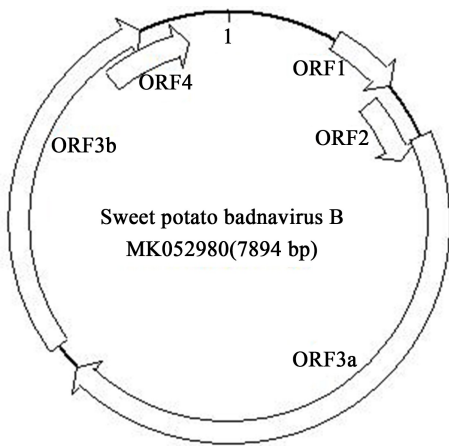


Fig. 8 Diagram of genome structure of SPBV-B (MK052980) sequence making with DNAMAN

Complete length of Sweet potato badnavirus B (MK052980) is 7 894 bp, contained five ORFs (ORF1、ORF2、ORF3a、ORF3b、ORF4).

3 讨论

Small RNA 测序技术已在甘薯病毒鉴定中广泛应用^[17,22,34]。本研究应用 Small RNA 测序技术在甘薯样品中检测出 11 种甘薯病毒: SPFMV、SPCSV、SPCFV、SPCV、SPGVaV、SPLCV、SPV2、SPGC、SPVG、SPPV 和 SPLV。测序样本共获得 161 个 SPBV-B contigs, 长度分布在 31~144 bp, 拼接获得 5 202 bp 的 SPBV 基因组序列, 覆盖 SPBV 全长的 62%, 覆盖起始位点为 74 bp 和 7 633 bp。

SPPV 最早是通过 Small RNA 测序技术发现, Kreuze 等^[1,31]共分离 2 个 SPPV 全基因组序列, 全长分别为 8 082 bp (FJ560943) 和 7 961 bp (FJ560944), 两序列具有 79.5% 的相似性。本研究在甘薯种质资源样品中鉴定出 2 个 SPBV-B 全基因组序列 MK052980 (图 8) 和 MK052981, 与 SPBV-B、SPPV 进行系统进化分析, 结果表明 MK052981 与 SPBV-B 的相似性较 MK052980 与 SPBV-B 的相似性高。

已报道的其它 SPPV 序列均为部分基因序列, 如 Gu 等^[32]分离出大小为 575 bp 片段, 包含 SPPV、SPBV-B; Mbanzibwa 等^[33]先分离获得 787 bp 大小的 SPBV 序列, 与 SPBV-B、SPPV 相似性为 99.4% 和 96.8%; 又从坦桑尼亚分离出 3 065 bp 的 SPPV, 编码假定蛋白、运动蛋白和外壳蛋白, 与 SPBV-B 和 SPPV 相似性分别为 86.3% 和 73.1%^[34]。Nhlapo

等^[28]从南非甘薯种质分离出 SPPV 和 SPBV-B, 大小分别为 593 bp 和 679 bp, 与 SPPV 序列相似性为 99%~100%。Qin 等^[35]从我国 34 份甘薯样品中分离获得大小为 861 bp 的 SPPV 序列, 与 SPPV 序列相似性为 87.6%~96.7%。系统进化分析表明本研究分离的 MK052980、MK052981 序列为 SPPV 的不同分离物, 是国内首次报道侵染甘薯的杆状病毒全基因序列。

在热带和亚热带地区, Badnavirus 可侵染 32 种植物产生严重病害, 如香蕉黄斑条纹、黑胡椒黄色斑驳、可可肿胀枝条、柑橘黄色花叶、甘蔗带状条纹、芋扇状叶等^[33]。受 Badnavirus 侵染的甘薯症状多数为 2 种病毒以上共同侵染。Kashif 等^[30]在经病毒指示剂接种后的甘薯植株中检测 SPBV, 从一个无症状甘薯植株中分离出 SPBV-B, 其余检测出 SPPV 的甘薯叶片均有不同程度的黄化、明脉、皱缩、黄斑、畸形等。Mbanzibwa 等^[33]搜集甘薯病毒病症状样品, 从叶片卷曲、黄脉、黄化、生长发育迟缓和棕色斑点的样本中检测出 SPPV 和 SpSV/1。Qin 等^[35]从 34 份甘薯叶片中检测出 SPBV-A。用 Small RNA 测序技术从甘薯叶片表现上卷、明脉、褪绿斑点的样品中检测出 SPLCV, 本研究从甘薯扇形叶片、节间短小、畸形等甘薯植株中检测出 SPBV-B, 这些甘薯植株是否存在其它病毒侵染还需进一步验证。

Badnavirus 是一种无包膜杆状 DNA 病毒, 其基因组约为 7.2~9.2 kb, 编码 3~7 个开放阅读框^[29], 其中 ORF3 编码运动蛋白和外壳蛋白, 在病毒之间高度变异^[1]。聚类分析显示 4 个 SPBV 聚为第一亚类的一个小分支, 这与 SPBV 的 ORF3 结构相关。SPBV-ORF3 分为 ORF3a 和 ORF3b, 其中 ORF3a 包含运动蛋白 (MP) 和外壳蛋白 (CP) 结构域, ORF3b 包含天冬氨酸蛋白酶、逆转录酶 (RT) 和 RNaseH (RH) 结构域, 并由一个短的非编码区分离^[1], 由此区别 SPBV 与其它 Badnavirus 的不同之处。进一步对 MK052980、MK052981 和 SPBV-B 的 ORF3a 编码蛋白进行比对, 结果表明 MK052980 序列 ORF3a 编码蛋白发生变异。关于 ORF3 编码蛋白的功能有待进一步验证。

参考文献

[1] Kreuze J, Perez A, Galvez M, et al. Badnaviruses of

- sweetpotato: symptomless co-inhabitants on a global scale [J]. Biorxiv.org, 2017. dx. doi.org/10.1101/140517.
- [2] Clark C A, Davis J A, Abad J A, *et al.* Sweetpotato viruses: 15 Years of progress on understanding and managing complex diseases[J]. Plant Disease, 2012, 96(2):168-185.
- [3] Qiao Q, Zhang Z C, Qin Y H, *et al.* First report of *Sweet potato chlorotic stunt virus* infecting sweet potato in China[J]. Plant Disease, 2011, 95(3): 356.
- [4] Adikini S, Mukasa S B, Mwanga R O M, *et al.* Effects of *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato chlorotic stunt virus* on the yield of sweet potato in Uganda [J]. Journal of Phytopathology, 2016, 164(4): 242-254.
- [5] Souza C A, Rossato M, Melo F L, *et al.* Complete genome sequences of *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato virus G* from Brazil[J]. Genome Announcements, 2018, 6(5): 17.
- [6] Varanda C M R, Santos S J, Oliveira M D M, *et al.* Detection of *Sweet potato virus C*, *Sweet potato virus 2* and *Sweet potato feathery mottle virus* in Portugal[J]. Acta Virologica, 2015, 59(2):185-188.
- [7] Fiallo-Olive E, Lapeira D, Louro D, *et al.* First report of *Sweet potato leaf curl virus* and *Sweet potato leaf curl deltasatellite 1* infecting blue morning glory in Portugal[J]. Plant Disease, 2018, 102(5):1043-1044.
- [8] Martino J M, Fontenele R S, Ferreira F A, *et al.* First report of *Sweet potato leaf curl Georgia virus* in sweet potato in Argentina [J]. Plant Disease, 2017, 101(3):513.
- [9] Luan Y S, Zhang J, An L J. First report of *Sweet potato leaf curl virus* in China[J]. Plant Disease, 2006, 90(8):1111.
- [10] Lan P X, Li F, Abad J, *et al.* Simultaneous detection and differentiation of three Potyviridae viruses in sweet potato by a multiplex TaqMan real time RT-PCR assay [J]. Journal of Virological Methods, 2018, 252:24-31.
- [11] Jiang S S, Xie L, Wu B, *et al.* Identification and genetic diversity analysis on sweet potato viruses in Shandong Province (in Chinese)[J]. Journal of Plant Protection(植物保护学报), 2017, 44(1):93-102.
- [12] Wang M, Abad J, Fuentes S, *et al.* Complete genome sequence of the original Taiwanese isolate of *Sweet potato latent virus* and its relationship to other potyviruses infecting sweet potato[J]. Archives of Virology, 2013, 159(10): 2189-2192.
- [13] Wang L Y, Cheng Y H, Wang N Y, *et al.* First report of *Sweet potato virus G* infecting sweet potato in Taiwan[J]. Plant Disease, 2013, 97(9):1260.
- [14] Li F, Xu D, Abad J, *et al.* Phylogenetic relationships of closely related potyviruses infecting sweet potato determined by genomic characterization of *Sweet potato virus 2* and *Sweet potato virus G* [J]. Virus Gene, 2012, 45(1):118-125.
- [15] Maina S, Barbetti M J, Edwards O R, *et al.* *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato virus C* from East Timorese and Australian sweetpotato: biological and molecular properties, and biosecurity implications[J]. Plant Disease, 2018, 102(3):589-599.
- [16] Bejerman N, Zanini A, Rodriguez Pardina P, *et al.* Use of 454-pyrosequencing for the characterization of *Sweet potato virus C* and *Sweet potato feathery mottle virus* isolates from Argentina and development of a multiplex one-step RT-PCR for their simultaneous detection [J]. Journal of Phytopathology, 2016, 164(6): 386-394.
- [17] Maina S, Edwards O R, Almeida L de, *et al.* Complete genome sequences of the Potyvirus *Sweet potato virus 2* from East Timor and Australia[J]. Genome Announcements, 2016, 4(3): 16.
- [18] Ateka E M, Barg E, Njeru R W, *et al.* Biological and molecular variability among geographically diverse isolates of *Sweet potato virus 2* [J]. Archives of Virology, 2007, 152(3): 479-488.
- [19] Zhang Y H, Qin Y H, Qiao Q, *et al.* Cloning and expression of coat protein of *Sweet potato vein mosaic virus* in *E. coli* and preparation of antiserum (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica(植物病理学报), 2011, 41(1):57-63.
- [20] Cao M, Lan P, Li F, *et al.* Genome characterization of *Sweet potato symptomless virus 1*: a mastrevirus with an unusual nonnucleotide sequence[J]. Archives of Virology, 2017, 162(9):2881-2884.
- [21] Wang Y J, Zhang D S, Zhang Z C, *et al.* First report on *Sweet potato symptomless virus 1* (genus *Mastrevirus*, family *Geminiviridae*) in sweetpotato in China[J]. Plant Disease, 2015, 99(7):1042.
- [22] Wu L, Liu H, Abad J, *et al.* Structure and genome organization of a novel fiji strain of *Sweet potato vein clearing virus* identified by high-throughput sequencing [J]. Genome Announcements, 2018, 6(24):18.
- [23] Huang L L, Pham B, He F L, *et al.* The pathogenic virus species detection of sweet potato viral diseases in Guangxi (in Chinese) [J]. Genomics and Applied Biology(基因组学与应用生物学), 2016, 35(5):

- 1213-1218.
- [24] Tugume A K, Mukasa S B, Kalkkinen N, *et al.* Recombination and selection pressure in the ipomovirus *Sweet potato mild mottle virus* (*Potyviridae*) in wild species and cultivated sweetpotato in the centre of evolution in East Africa[J]. *Journal of General Virology*, 2010, 91(4):1092-1108.
- [25] Deng X G, Zhu F, Zhu T, *et al.* First report of *Sweet potato chlorotic fleck virus* infecting sweet potato in Sichuan Province, China[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(1):163.
- [26] Souza J de, Cuellar W J. Sequence analysis of the replicase gene of '*Sweet potato caulimo-like virus*' suggests that this virus is a distinct member of the genus *Cavemovirus*[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(3):535-537.
- [27] Kil E J, Kim J, Byun H S, *et al.* First report of *Sweet potato golden vein associated virus* infecting sweet potato in Korea[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(8):1163.
- [28] Nhlapo T F, Mulabisana J M, Odeny D A, *et al.* First report of *Sweet potato badnavirus A* and *Sweet potato badnavirus B* in South Africa[J]. *Plant Disease*, 2018, 102(9):1865.
- [29] Ishwara B A, Thomas H, Ramasamy S. Badnaviruses: The current global scenario[J]. *Viruses*, 2016, 8(6):177-206.
- [30] Kashif M, Pietilä S, Artola K, *et al.* Detection of viruses in sweetpotato from Honduras and Guatemala augmented by deep-sequencing of small-RNAs [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(10):1430-1437.
- [31] Kreuze J F, Perez A, Untiveros M, *et al.* Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNA: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses[J]. *Virology*, 2009, 388(1):1-7.
- [32] Gu Y H, Tao X, Lai X J, *et al.* Exploring the polyadenylated RNA virome of sweet potato through high-throughput sequencing [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e98884.
- [33] Mbanzibwa D R, Tugume A K, Chiunga E, *et al.* Small RNA deep sequencing-based detection and further evidence of DNA viruses infecting sweetpotato plants in Tanzani [J]. *Annals of Applied Biology*, 2014, 165(3):329-339.
- [34] Mbanzibwa D R, Tairo F, Gwandu C, *et al.* First report of sweetpotato symptomless virus 1 and sweetpotato virus A in sweetpotatoes in Tanzania[J]. *Plant Disease*, 2011, 95(2):224.
- [35] Qin Y H, Li X C, Zhang Z C, *et al.* First report of *Sweet potato badnavirus A* in China[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(4):1081.
- [36] Dong F, Zhang D W, Huang Y L, *et al.* Preliminary study of *Sweet potato leaf curl virus* detection and infection analysis of sweet potato germplasm resources in Hunan province (in Chinese) [J]. *Journal of Plant Genetic Resources* (植物遗传资源学报), 2017, 18(6):1088-1104.
- [37] Li Y, Wang H, Zhang C, Ma X J. Advance in deep sequencing of small RNAs of virus identification and discovery (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2015, 31(4):457-462.
- [38] Johanna S, Valkonen J P T. Sensitivity of small rna-based detection of plant viruses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 939(9):1-5.
- [39] Yu C, Qian Y K, Yu Z X, *et al.* Eight virus were detected from Xinjiang grapes by deep sequencing of virus and viroid-derived small RNAs (in Chinese) [J]. *Journal of Plant Protection* (植物保护学报), 2018, 45(3):649-650.
- [40] Feng G, Xin M, Cao M J, *et al.* Identification of multiple viruses infecting hot pepper in Guiyang by deep sequencing (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报). 2017, 47(5):591-597.
- [41] Yin Y Y, Li T T, Lu X, *et al.* Detection and analyses of the *Orthotospoviruses* in plant and insect hot species by deep sequencing (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2018, 48(4):501-508.
- [42] Yang C X, Han T, Fu J J, *et al.* Characterization of the complete genome of euonymus yellow vein associated virus, a distinct member of the genus *Potexvirus*, family *Alphaflexiviridae*, isolated from *Euonymus bungeanus* Maxim in Liaoning, Northern China [J]. *Archives of Virology*, 2018;163(2):563-566.
- [43] Grisoni M, Marais A, Filloux D, *et al.* Two novel *Alphaflexiviridae* members revealed by deep sequencing of the Vanilla (*Orchidaceae*) virome [J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(12):3855-3861.