

# 葡萄病毒 B 内蒙古分离物全基因组序列分析

刘晓萌<sup>1</sup>, 张磊<sup>1a</sup>, 李小燕<sup>1</sup>, 付崇毅<sup>2</sup>, 宋培玲<sup>2</sup>, 孙平平<sup>1\*</sup>, 李正男<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 呼和浩特 010018; <sup>2</sup>内蒙古农牧业科学院, 呼和浩特 010031)

**摘要:**【目的】获得葡萄病毒 B (*Grapevine virus B*, GVB) 内蒙古分离物全基因组序列, 并且分析该病毒基因组结构及与已报道的 GVB 分离物的序列一致性和系统进化关系。【方法】以阳光玫瑰葡萄叶片为样品, 提取 RNA, 根据 NCBI 中 Genbank 数据库中已报道的 22 条 GVB 全基因组序列的保守区分别设计 3 对 GVB 基因片段扩增所用引物, 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆 GVB 全基因组序列, 并进行序列分析和同源性比对以及系统进化关系的分析。【结果】成功获得了 2 个 GVB 内蒙古分离物全长基因组 (GVB Hohhot-1、GVB Hohhot-2), 大小均为 7609 nt, 均编码 5 个开放阅读框 (open reading frame, ORF)。GVB Hohhot-1、GVB Hohhot-2 分离物与 22 个已报道的 GVB 分离物全基因组核苷酸一致性分别为 74.9%~96.5% 和 74.8%~96.4%。系统发育分析结果表明, 24 个 GVB 分离物基于全基因组序列构建的进化树分为 2 个大组, 基于外壳蛋白 (coat protein, CP) 基因序列构建的进化树分为 4 组。本研究中 2 个 GVB 内蒙古分离物与加拿大分离物 (登录号: MZ440726) 的亲缘关系最近, 一致性分别为 96.5%、96.4%。在 24 个 GVB 全长基因组序列间无重组事件。【结论】首次获得 GVB 内蒙古分离物的全基因组序列, 分析了基因组的基本特征, 并且阐明了该病毒与已报道的 GVB 分离物的序列一致性和系统进化关系, 为我国 GVB 分类地位、病毒进化规律研究, 以及后续开展侵染性克隆奠定了一定基础。

**关键词:** 葡萄病毒 B; 基因组; 系统发育分析; 重组

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2022)10-1911-11

## Complete genome sequence analysis of *Grapevine virus B* isolated from Inner Mongolia

LIU Xiaomeng<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>1a</sup>, LI Xiaoyan<sup>1</sup>, FU Chongyi<sup>2</sup>, SONG Peiling<sup>2</sup>, SUN Pingping<sup>1\*</sup>, LI Zhengnan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China; <sup>2</sup>Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031, Inner Mongolia, China)

**Abstract:** 【Objective】The study aimed to obtain the whole genomes of GVB Inner Mongolia isolates and analyze their genome structures and sequence consistency and phylogenetic relationship with the reported GVB isolates. 【Methods】The total RNA was extracted from the Shine-Muscat grape leaves by Spectrum™ Plant Total RNA Kit, and the extracted total RNA was reversely transcribed into cDNA using the PrimeScript™ II 1<sub>ST</sub> Strand cDNA Synthesis Kit. According to the conserved regions of 22 GVB whole genome sequences reported in Genbank database in NCBI, 3 pairs of primers were designed for the amplification of GVB gene fragments. Using cDNA synthesized by reverse transcription as template, the reaction was conducted under conditions of initial 3 min denaturation at 95 °C, 35 cycles of 95 °C for 20 s, the annealing and extension temperatures of the three pairs of primers were 49 °C for 20 s, 72 °C for 3 min 30 s; 56 °C for 20 s, 72 °C for 1 min 10 s; 53 °C for 20 s, 72 °C for 2 min 30 s. The 5' -UTR and 3' -UTR were amplified using the KAPA HiFi HotStart Ready Mix PCR Kit. The the purification

收稿日期: 2022-02-14

接受日期: 2022-05-16

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目 (2022YFDZ0029, 2021GG0229); 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2019MS03021); 内蒙古农业大学高层次人才科研启动金项目 (NDYB2018-3, NDYB2019-1)

作者简介: 刘晓萌, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为园艺植物病毒病害。Tel: 15771211281, E-mail: 1565154066@qq.com。a 为共同第一作者。

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13238417255, E-mail: sunpingping@imau.edu.cn; Tel: 13015027909, E-mail: lizhengnan@imau.edu.cn

tion of PCR amplification products was performed following the instructions of agarose gel DNA recovery kit for specific steps. The purified PCR products were ligated and transformed using the zero-background PTOPO-TA cloning kit and *E. coli* JM109 Competent Cells, and the *E. coli* JM109 was transformed by heat shock method. The Vector NTI 10.1.1 was used for splicing and correction, and the full-length genome sequence was obtained. The BLAST algorithm was used to search the NCBI GenBank databases for homologous sequences and ascertain the identity of target gene. DNAMAN was used to analyze the GVB gene sequence. The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining (NJ) method in MEGA 6.0. The RDP4 was used to analyze the recombination of GVB isolates. 【Results】 The two full-length genomes of GVB Inner Mongolia isolates were successfully obtained by RT-PCR combined with RACE technology, and all sizes were 7609 nt. They were named GVB Hohhot-1 and GVB Hohhot-2 respectively and submitted to GenBank with the login number OM103705 and OM103706 respectively. The sequence alignment analysis showed that they all encoded 5 ORFs. The ORF1 encoded a 5133 nt RdRp, ORF2 encoded a 510 nt protein with unknown function, and ORF3 encoded an MP of 972 nt in length, ORF4 encoded a CP with a length of 591 nt, and ORF5 encoded a NABP with a length of 372 nt, 5' non-coding region of 310 nt, 3' non-coding region of 250 nt. Based on the comparison of the nucleotide sequence and the amino acid sequence of GVB isolates, the nucleotide homology of GVB Hohhot-1 and GVB Hohhot-2 isolates with 22 reported isolates was 74.9%–96.5% and 74.8%–96.4%, respectively. On the nucleotide and amino acid levels, the ORF2 had the lowest consistency with the other isolates and the largest variation, and the amino acid sequences of CP gene of 24 isolates had high homology. The phylogenetic tree was constructed from the whole genome sequences of 24 GVB isolates, using Grapevine Virus A (Accession Number: DQ787959) as external reference. The 24 GVB isolates were divided into two groups, the two GVB isolates obtained in this experiment were fused with GVB isolates from The United States (MN716773), Brazil (KX790785, MW357718), China (KF700375), Canada (MZ440726, MZ440728) and Japan (LC617945). The GVB isolates from Canada (MZ440727, MZ440725, MZ440724, MZ440723, KY426923, MZ344593), South Africa (GU733707, EF583906, KX522545, KJ524452), India (MT454065), Croatia (MF991949), The United States (JX513897) and Italy (NC\_003602, X75448) were clustered into another one. On the phylogenetic tree the 24 GVB isolates were divided into four groups. The two GVB isolates obtained in this experiment were fused to the isolates from Canada (MZ440726, MZ440728) and Japan (LC617945). The two isolates from Brazil (KX790785, MW357718) were divided into a group, and the isolates from China (KF700375) were separately divided into a group, and the isolates from Canada (KY426923, MZ440727, MZ440725, MZ440724, MZ440723, MZ344593), South Africa (EF583906, GU733707, KX522545, KJ524452), Croatia (MF991949), The United States (JX513897, MN716773), India (MT454065), Italy (NC\_003602, X75448) were divided into a group. The two isolates obtained from this study were most closely related to the isolate from Canada (accession number: MZ440726), the consistency was 96.5% and 96.4%. No recombination events were detected in the 24 GVB full-length genome sequences by RDP, GENECONV, BOOTSCAN, MACCHI, CHIMAERA, SISCAN, 3SEQ. 【Conclusion】 The study obtained the complete genome sequences of the two grape virus B Inner Mongolia isolates for the first time. We also analyzed the structure of the virus genome and its sequence consistency and phylogenetic relationship with reported GVB isolates. This study would enrich the genetic database of GVB, and lay a foundation for the further exploration of classification of GVB, the rule of the virus evolution and the subsequent development of infectious cloning in China.

**Key words:** *Grapevine virus B* (GVB); Genomes; Phylogenetic analysis; Recombination

葡萄皱木复合征(rugose wood complex disease)是一种普遍发生且危害严重的葡萄病毒病<sup>[1]</sup>,症状包括茎沟、茎痘以及砧木或幼芽木质部的扭曲,葡萄病毒B(*Grapevine virus B*, GVB)是引起葡萄皱木复合征的病毒之一<sup>[2-5]</sup>。研究发现,大部分欧洲种葡萄一旦嫁接到带有GVB的美洲种砧木上,就会引起植株的早春延迟萌芽,枝蔓树皮粗糙且松散,木质部出现沟或槽,严重影响产量及品质,并易造成藤的早期死亡,对鲜食葡萄和酿酒葡萄产区危害极大。GVB是在1999年于澳大利亚第一次被检出<sup>[6]</sup>,目前该病毒已在中国、美国、南非、意大利、以色列、法国、希腊和印度等多个国家和地区发生危害<sup>[7-10]</sup>。在我国的河南、湖北、四川、辽宁、山东、河北、新疆以及宁夏等地也均有该病毒病的发生<sup>[11-13]</sup>。

GVB属于乙型线形病毒科(Betaflexiviridae)葡萄病毒属(*Vitivirus*)成员,该病毒粒子呈线性弯曲状,长725~825 nm,直径12~13 nm<sup>[14]</sup>,基因组为正义单链RNA分子(positive-sense single stranded RNA, +ssRNA),病毒基因组含有核苷酸约为7600个,不包含3'端poly(A)尾巴<sup>[15]</sup>。基因组编码5个开放阅读框(open reading frame, ORF), ORF1~ORF5分别编码194.7 ku复制酶蛋白(replication protein, RP)、20.2 ku的未知功能蛋白、36.5 ku运动蛋白(movement protein, MP)、21.5 ku外壳蛋白(coat protein, CP)和13.9 ku核酸结合蛋白(nucleic acid binding protein, NABP)。5'端非编码区(untranslated region, UTR)大小为48 nt, 3'-UTR大小为142~148 nt。GVB主要是通过拟葡萄粉蚧(*Pseudococcus affinis*)和榕臀纹粉蚧(*planococcus ficus*)进行传播<sup>[16-17]</sup>,该病毒的草本寄主分别是本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)、西方烟(*N. occidentalis*)和凯维科拉烟(*N. cavicola*)<sup>[18]</sup>。

笔者所在实验室于2018—2020年之间开展了内蒙古自治区葡萄病毒的检测工作<sup>[19]</sup>,旨在丰富GVB的基因数据库,明确GVB的遗传进化情况,为我国GVB分类地位、病毒进化规律研究,以及后续开展侵染性克隆奠定一定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

从内蒙古自治区7个市区共采集69份葡萄样品,其中从2株采自内蒙古自治区呼和浩特市赛罕

区的阳光玫瑰葡萄样品中检测到了GVB的侵染,感病葡萄表现为叶片斑驳皱缩并轻微畸形。采样中将2个样品(GVB内蒙古分离物,下同)分别命名为22号和28号,GVB的检出频率为2.9%(2/69)。

### 1.2 主要试剂

总RNA提取试剂盒Spectrum™ Plant Total RNA Kit购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;M5超光速mix购自北京聚合美生物科技有限公司;琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、克隆载体CV14-Zero Background pTOPO-TA Cloning Kit购自艾德莱生物技术有限公司;SMARTer® RACE 5'/3' Kit购自宝生物工程(大连)有限公司;KAPA HiFi HotStart Ready Mix PCR Kit购自北京普凯瑞生物科技有限公司;Marker(DNA Marker III、DL2000)购自天根生化科技(北京)有限公司;大肠杆菌感受态*Escherichia coli* JM109 Competent Cells购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 总RNA提取 总RNA提取具体步骤参考试剂盒Spectrum™ Plant Total RNA Kit说明书。将最终得到的总RNA经微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司)测定浓度和纯度,进行电泳检测其完整性,并保存于-20℃冰箱备用。

1.3.2 反转录合成cDNA第一链 使用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit[普洛麦格(北京)生物技术有限公司]试剂盒将提取的总RNA反转录成cDNA。步骤如下:总RNA 1.5 μL, Oligo (DT) 1 μL, dNTP mixture (2.5 mmol) 4 μL, RNase free ddH<sub>2</sub>O 6.5 μL,溶液混合后瞬离,于PCR仪中65℃变性5 min后迅速冰浴1 min,再加入5× First Strand Buffer 4 μL, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> DTT 1 μL, RNase Inhibitor 1 μL, SuperScript III 1 μL,总体积为20 μL。PCR仪中50℃变性1 h, 70℃反应15 min。反转录产物在-20℃冰箱保存。

1.3.3 GVB基因组的克隆 引物设计。根据NCBI中Genbank数据库中已报道的22条GVB全基因组序列的保守区分别设计3对GVB基因片段扩增所用引物GVB 1/GVB 2、GVB 3/GVB 4、GVB 5/GVB 6与3'RACE、5'RACE引物及其简并引物进行RT-PCR扩增,分3段对该基因片段序列进行克隆,最终

将获得的所有序列片段拼接整合得到GVB基因组全序列,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。

GVB基因组扩增。以反转录合成的cDNA为模板,使用2×M5 Hiper超光速mix对22号和28号阳光玫瑰葡萄样品分3段分别扩增GVB基因组。PCR

表1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used for detection and amplification of full-length genome of GVB

引物名称 Primer name	引物序列(5'—3') Sequences(5'—3')	退火温度 Tm/°C	引物长度 Size/bp	引物位置 Primer location/bp
GVB 1	AGTAATGTCAATATCCGTCTC	58	21	45~65(MZ440726)
GVB 2	TTCHGGTTACCCCTTRTAACC	64	21	3883~3903(MZ440726)
GVB 3	GTACAGGTTAGGTGAGCACCT	64	21	4962~4982(MZ440726)
GVB 4	GGTCTATCAGCRAACACGCTT	64	21	7427~7447(MZ440726)
GVB 5	CTAGAGCCACAAAGAACTCA	58	20	3754~3773(MZ440726)
GVB 6	GAGGARAGGGAGTGCTACTC	64	20	5086~5105(MZ440726)
3'RACE	AATAGTCTATCCCTGATTYC	55	20	7590~7609(MZ440726)
5'RACE	ACACTCGTRTGWACCCCTTT	60	20	1~20(MZ440726)

反应总体系为20 μL,2×M5 Hiper超光速mix 10 μL,引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各1 μL,cDNA 2 μL,RNase free ddH<sub>2</sub>O补平20 μL,分别使用引物对GVB 1/GVB 2、GVB 3/GVB 4、GVB 5/GVB 6(表1)。GVB基因组PCR扩增程序按下列条件进行35个循环:95 °C预变性3 min,95 °C变性20 s,GVB 1/GVB 2引物对49 °C退火20 s,72 °C延伸210 s;GVB 3/GVB 4引物对56 °C退火20 s,72 °C延伸70 s;GVB 5/GVB 6引物对53 °C退火20 s,72 °C延伸150 s,最后72 °C补平5 min,12 °C降温2 min。

使用KAPA HiFi HotStart Ready Mix PCR Kit试剂盒扩增5'和3'端,PCR反应总体系为25 μL,2×KAPA HiFi HotStart Ready Mix 12.5 μL,引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各1 μL,cDNA 2 μL,RNase free ddH<sub>2</sub>O补平至25 μL,引物包括SMARTer®RACE 5'/3'Kit试剂盒提供的UPM引物、GVB 3'末端序列特异性引物3'RACE以及5'末端序列特异性引物5'RACE。5'和3'端PCR扩增按以下程序进行:98 °C预变性4 min,30个循环:98 °C变性30 s,60 °C退火45 s,72 °C延伸45 s;72 °C补平5 min,12 °C降温1 min。将PCR产物通过1.0%(w)琼脂糖凝胶电泳并在紫外灯下进行检测,判断是否扩增出目标条带。在紫外灯下将目标条带切下,放进2 mL离心管中备用。

1.3.4 PCR产物回收纯化、连接及转化 将PCR扩增产物进行胶回收。具体步骤参考琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒说明书。纯化后的PCR产物使用

零背景pTOPO-TA克隆试剂盒和*E.coli* JM109 Competent Cells进行连接转化,挑取清晰饱满的白色单菌落进行扩繁。连接产物用热激法转化*E. coli* JM109。PCR纯化产物连接反应体系如下:DNA 1~8 μL,pTOPO-TA Vector 1 μL,10×Enhance 1 μL,RNase free ddH<sub>2</sub>O 0~7 μL,总体系为10 μL。

将体系置于37 °C连接2 h。经蓝白斑筛选,挑取白色菌落在1 mL LB液体培养基(含有氨苄青霉素)中37 °C、180 r·min<sup>-1</sup>培养,直至菌液混浊。对PCR鉴定为阳性的菌液进行测序,得到阳性克隆后随机送2个对应的菌液进行测序。

1.3.5 基因组结构与序列一致性 为明确2个GVB内蒙古分离物基因组的分子特征,分别将得到2个分离物的3段GVB序列片段与3'RACE、5'RACE序列使用Vector NTI 10.1.1软件进行拼接和校正,获得全长基因组序列。将拼接成功的全长基因组序列通过NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的BLASTn程序进行同源性搜索,确定其是否为GVB。从Genbank数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载所有已报道的GVB分离物全基因组序列用于后续一致性分析和系统进化分析。利用DNA MAN 1.2.1软件对本试验获得的2个分离物的基因组全序列进行相似性比对,并分析其与GenBank数据库中其他22个GVB分离物之间的全基因序列以及各个ORF之间的核苷酸和氨基酸相似性。

1.3.6 系统发育分析和重组分析 用MEGA 6.0软件对本试验获得的2个GVB内蒙古分离物以及来

自不同国家和寄主的22个GVB分离物基于全长基因组及CP基因核苷酸序列进行系统发育分析。采用邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建进化树,自展值设为1000,阈值为50%。用于分析的GVB分离物基因组序列一致性、系统发育分析以及重组分析的具体信息如表2所示。

应用RDP4软件对GVB各分离物进行重组分析,分析过程中采用RDP、GENECO NV、BOOTSCAN、MAXCHI、CHIMAERA、SISCAN和3SEQ共7种方法,且以上7种方法中应有5种被验证才能称之为重组。软件运行过程中除了分子类型选择线性外,其他均为默认设置。

## 2 结果与分析

### 2.1 GVB分离物基因组的扩增

利用GVB 1/GVB 2、GVB 3/ GVB 4、GVB 5/GVB 6与5'RACE、3'RACE分别进行RT-PCR扩增,获得的特异性条带大小为3780、2489、1047、310、250 bp,与预期相符(图1~2)。

### 2.2 GVB的2个分离物基因组结构和序列一致性分析

将测序成功的GVB 3段基因组片段和5'、3'末端片段进行拼接,获得的2个GVB内蒙古分离物基因组全长均为7609 nt,分别命名为GVB Hohhot-1和GVB Hohhot-2,将其提交至GenBank,登录号分别为OM103705、OM103706。通过序列比对分析后,结果表明含有5个ORF,分别编码5种蛋白。ORF1编码1个长度为5133 nt(49~5181 bp)的RdRp;ORF2编码1个长度为510 nt(5174~5683 bp)但功能未知的蛋白;ORF3编码1个长度为972 nt(5553~6524 bp)的MP;ORF4编码1个长度为591 nt(6448~7038 bp)的CP;ORF5编码1个长度为372 nt(7083~7454 bp)的NABP。5'非编码区为310 nt,3'非编码区为250 nt。

应用SDTV.1.0软件分析了本试验获得的2个GVB内蒙古分离物与已报道的22个GVB分离物间基因组核苷酸一致性以及各个ORF之间的核苷酸与氨基酸一致性。GVB Hohhot-1和GVB Hohhot-2的核苷酸同源率为99%。GVB Hohhot-1与22个GVB分离物全基因组核苷酸同源率为74.8%~96.5%,GVB Hohhot-1 RdRp的核苷酸与氨基酸序列与其他22种分离物的一致性分别为74.3%~

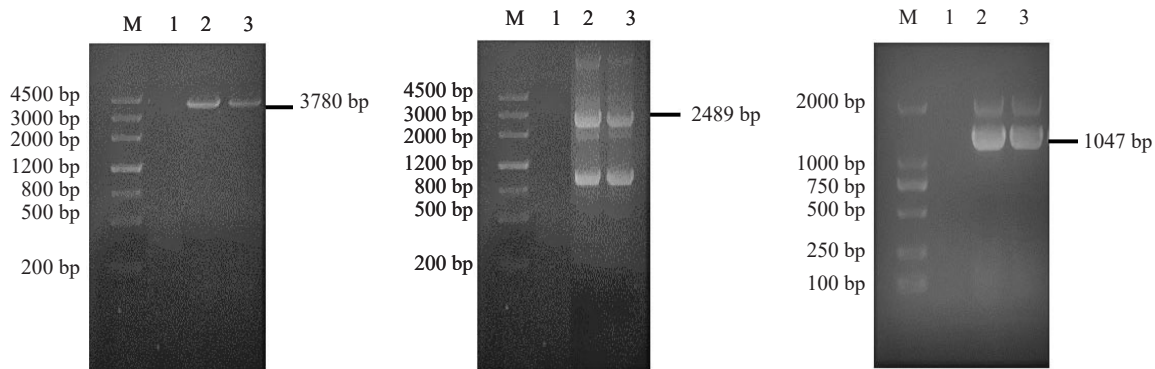
表2 用于一致性、系统发育和重组分析的GVB基因组参考序列

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

分离物 Isolate	NCBI 登录号 NCBI accession No.	寄主 Host	长度 Length/nt	国家 Country
8415	KY426923	雷司令 Riesling	7614	加拿大 Canada
GVB-QMWH	KF700375	葡萄 Grapevine	7610	中国 China
ISA-BR	KX790785	葡萄 Grapevine	7605	巴西 Brazil
GVB 248	KX522545	葡萄 Grapevine	7602	南非 South Africa
GVB 953-1	KJ524452	葡萄 Grapevine	7601	南非 South Africa
-	NC_003602	葡萄 Grapevine	7599	意大利 Italy
94/971	EF583906	葡萄 Grapevine	7599	南非 South Africa
GVB-H1	GU733707	葡萄 Grapevine	7599	南非 South Africa
VD-102	MF991949	多布里契奇 Dobricic	7598	克罗地亚 Croatia
12G455	MZ440726	葡萄 Grapevine	7609	加拿大 Canada
g2	LC617945	葡萄 <i>Vitis</i> sp.	7563	日本 Japan
GVB-BIB-BR	MW357718	杂交葡萄 Hybrid grapevine	7599	巴西 Brazil
-	X75448	葡萄 Grapevine	7599	意大利 Italy
Cultivated-TN1	MN716773	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	8012	美国 USA
20PRT01	MZ344593	葡萄 Grapevine	7605	加拿大 Canada
17VT16	MZ440728	葡萄 Grapevine	7489	加拿大 Canada
16GVP005	MZ440727	葡萄 Grapevine	7598	加拿大 Canada
12G435	MZ440725	葡萄 Grapevine	7583	加拿大 Canada
12G4133	MZ440724	葡萄 Grapevine	7594	加拿大 Canada
12G413	MZ440723	葡萄 Grapevine	7592	加拿大 Canada
TS_GVB	MT454065	汤普森无核葡萄 Thompson Seedless	7565	印度 India
GVB 3138-01	JX513897	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	7601	美国 USA

注:“-”代表分离物名称不明确。下同。

Note:“-” indicates that the isolate name is not clear. The same below.

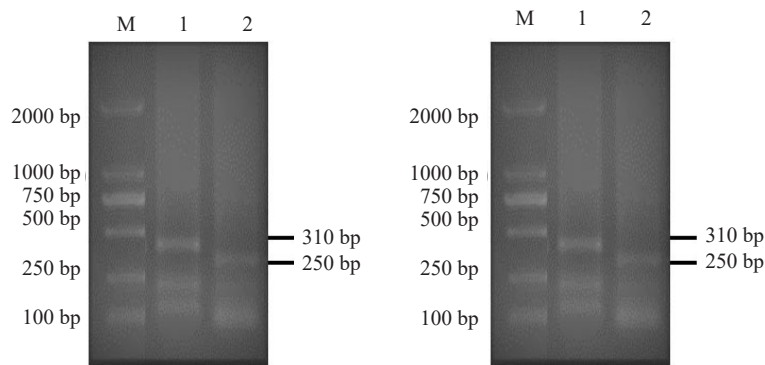


M. Marker III、DL2000; 1. 清水对照; 2. 22 号阳光玫瑰葡萄叶片扩增条带; 3. 28 号阳光玫瑰葡萄叶片扩增条带。

M. Marker III, DL2000; 1. Water control; 2. Leaf amplified band of No.22 Shine Muscat; 3. Leaf amplification band of No.28 Shine Muscat.

图 1 GVB 基因组片段扩增结果

Fig. 1 RT-PCR detection result



M. DL2000; 1. 5' RACE; 2. 3' RACE.

图 2 GVB 基因组 5' RACE 和 3' RACE 扩增结果

Fig. 2 5' RACE and 3' RACE detection result

96.4%和 83.4%~98.0%;其中,核苷酸序列与加拿大分离物(MZ440726)和日本分离物(LC617945)一致性最高,与南非分离物(KJ524452)一致性最低,氨基酸序列与加拿大分离物(MZ440726)一致性最高,与意大利分离物(X75448、NC\_003602)一致性最低。ORF2的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 62.5%~94.9%和 57.6%~91.8%,核苷酸和氨基酸一致性都与日本分离物(LC617945)最高,核苷酸序列与加拿大分离物(MZ440724)一致性最低,氨基酸序列与加拿大分离物(MZ440727)和印度分离物(MT454065)一致性最低。MP的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 73.7%~95.5%和 75.4%~95.1%,核苷酸序列与日本分离物(LC617945)和加拿大分离物(MZ440726)一致性最高,氨基酸序列与日本分离物(LC617945)和加拿大分离物(MZ440728)一致性最高,核苷酸和氨基酸序列都与加拿大分离物(MZ440727)一致性最低。CP基因相对较保守,不

同分离物之间的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 78.0%~98.3%和 87.3%~99.5%,核苷酸和氨基酸序列与日本分离物(LC617945)一致性均为最高,核苷酸序列与 2 个加拿大分离物(MZ440725、MZ440724)和美国分离物(JX513897)一致性最低,氨基酸序列与美国分离物(MN716773)一致性最低。NABP的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 83.1%~97.6%和 84.7%~98.4%,核苷酸序列与加拿大分离物(MZ440726)一致性最高,与加拿大分离物(KY426923)一致性最低,氨基酸序列与加拿大分离物(MZ440726)和日本分离物(LC617945)一致性最高,与美国分离物(MN716773)一致性最低。

GVB Hohhot-2 与 22 个 GVB 分离物全基因组核苷酸同源性为 74.7%~96.4%。RdRp 的核苷酸与氨基酸序列与其他分离物的一致性分别为 74.1%~96.4%和 83.1%~97.6%。ORF2 的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 62.9%~94.5%和 57.1%~90.6%。

MP的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为73.2%~95.3%和74.5%~94.8%。CP的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为77.2%~98.1%和86.8%~99.0%。NABP的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为82.3%~97.3%和83.9%~96.0%,其中与22个GVB分离物的序列一致性最高和最低与GVB Hohhot-1基本一致(表3~4)。

### 2.3 GVB 2个分离物的系统进化树分析

对24个GVB分离物全基因组序列构建系统进化树,以葡萄病毒A(*Grapevine virus A*, GVA)(登录号:DQ787959)为外参基因。结果显示,供试24个GVB分离物共分为2个大组。本试验得到的2个GVB内蒙古分离物与美国(MN716773)、巴西(KX790785、MW357718)、中国(KF700375)、加拿大(MZ440726、MZ440728)、日本(LC617945)的GVB分离物聚为一支,并且与来自加拿大(MZ440726)的GVB分离物亲缘关系最近;来自加拿大(MZ440727、MZ440725、MZ440724、MZ440723、KY426923、MZ344593)、南

非(GU733707、EF583906、KX522545、KJ524452)、印度(MT454065)、克罗地亚(MF991949)、美国(JX513897)和意大利(NC\_003602、X75448)的GVB分离物聚为一支(图3)。

将24个GVB分离物的CP基因序列构建进化树,以GVA(登录号:DQ787959)为外参基因。结果显示,24个GVB分离物共分为4组。本试验获得的2个GVB内蒙古分离物与来自加拿大(MZ440726、MZ440728)、日本(LC617945)的分离物聚为一支,其中GVB Hohhot-1和GVB Hohhot-2与来自加拿大(MZ440726)的分离物亲缘关系最近;来自巴西(KX790785、MW357718)的2个分离物分为一支;来自中国(KF700375)的分离物单独分为一支;来自加拿大(KY426923、MZ440727、MZ440725、MZ440724、MZ440723、MZ344593)、南非(EF583906、GU733707、KX522545、KJ524452)、克罗地亚(MF991949)、美国(JX513897、MN716773)、印度(MT454065)和意大利(NC\_003602、X75448)

表3 GVB Hohhot-1与其他22个GVB分离物核苷酸与氨基酸一致性  
Table 3 The nucleotide and amino acid identities of GVB Hohhot-1 and 22 other GVB isolates

分离物(登录号) Isolate name (accession number)	全长基因组同源性 Full-length genome homology/%	RdRp一致性 (核苷酸/氨基酸) RdRp identity nt/aa/%	ORF2一致性 (核苷酸/氨基酸) ORF2 identity nt/aa/%	MP一致性(核 苷酸/氨基酸) MP identity nt/aa/%	CP一致性(核 苷酸/氨基酸) CP identity nt/aa/%	NABP一致性(核 苷酸/氨基酸) NABP identity nt/aa/%
8415(KY426923)	75.7	75.1/85.8	67.3/59.4	76.0/80.1	81.7/91.9	83.1/86.3
GVB-QMWH(KF700375)	78.5	77.7/90.0	72.2/70.0	78.6/84.4	82.4/92.9	87.1/89.5
ISA-BR(KX790785)	79.1	78.1/90.4	72.5/69.4	79.3/83.5	83.1/92.4	87.9/91.9
GVB 248(KX522545)	75.0	74.8/86.2	64.8/61.1	74.7/76.0	78.2/89.3	86.3/88.7
GVB 953-1(KJ524452)	74.9	74.3/85.0	65.1/59.4	74.8/77.9	80.2/90.4	83.9/87.1
-(NC_003602)	75.8	75.2/83.4	67.5/61.2	76.2/81.0	81.6/91.9	83.7/87.8
94/971(EF583906)	75.8	75.4/86.1	64.5/60.0	76.9/77.6	79.0/91.6	84.9/87.9
GVB-H1(GU733707)	75.2	74.6/85.7	65.0/60.6	75.5/76.6	79.4/91.9	86.6/89.5
VD-102(MF991949)	75.3	74.6/85.8	64.7/60.6	76.1/77.9	80.2/91.4	86.0/85.5
12G455(MZ440726)	96.5	96.4/98.0	93.7/90.0	95.5/94.8	98.1/99.0	97.6/98.4
g2(LC617945)	96.4	96.4/96.8	94.9/91.8	95.5/95.1	98.3/99.5	96.5/98.4
GVB-BIB-BR(MW357718)	78.7	77.6/90.5	72.5/69.4	79.3/84.1	82.7/92.4	87.9/91.9
-(X75448)	75.8	75.2/83.4	67.5/61.2	76.2/81.0	81.6/91.9	83.7/87.8
Cultivated-TN1(MN716773)	77.2	77.3/88.5	71.0/68.8	74.1/79.1	78.3/87.3	83.6/84.7
20PRT01(MZ344593)	75.3	74.4/86.1	67.4/63.5	75.6/81.0	82.6/92.4	84.3/86.2
17VT16(MZ440728)	94.2	94.0/97.9	92.5/91.2	93.8/95.1	95.9/99.0	96.5/96.8
16GVP005(MZ440727)	75.3	74.9/85.8	65.6/57.6	73.7/75.4	79.2/90.4	86.3/88.7
12G435(MZ440725)	74.8	74.5/85.4	64.0/60.0	75.5/76.6	78.0/90.4	85.2/87.1
12G4133(MZ440724)	74.8	74.5/85.6	62.5/60.0	75.2/76.3	78.0/91.4	83.9/87.1
12G413(MZ440723)	75.3	74.6/85.6	65.8/60.6	75.2/77.6	79.5/91.4	86.6/88.7
TS_GVB(MT454065)	75.3	75.1/86.4	63.9/57.6	74.6/76.6	79.2/90.9	86.3/85.5
GVB 3138-01(JX513897)	75.0	74.8/85.7	63.7/59.4	75.4/76.9	78.0/90.9	85.2/87.1

表 4 GVB Hohhot-2 与其他 22 个 GVB 分离物核苷酸与氨基酸一致性

Table 4 The nucleotide and amino acid identities of GVB Hohhot-2 and 22 other GVB isolates

分离物(登录号) Isolate name (accession number)	全长基因组同源性 Full-length genome homology/%	RdRp 一致性 (核苷酸/氨基酸) RdRp identity nt/aa/%	ORF2 一致性(核 苷酸/氨基酸) ORF2 identity nt/aa/%	MP 一致性(核 苷酸/氨基酸) MP identity nt/aa/%	CP 一致性(核 苷酸/氨基酸) CP identity nt/aa/%	NABP 一致性(核 苷酸/氨基酸) NABP identity nt/aa/%
8415(KY426923)	75.6	75.1/85.5	67.7/60.6	75.8/78.8	80.9/90.9	82.3/83.9
GVB-QMWH(KF700375)	78.3	77.6/89.7	71.6/68.8	77.8/82.2	81.4/91.9	86.3/87.1
ISA-BR(KX790785)	78.8	78.0/90.1	72.0/68.8	78.5/82.6	82.4/91.4	87.1/89.5
GVB 248(KX522545)	75.0	74.8/86.0	65.2/60.5	74.6/75.4	77.5/88.3	84.9/87.1
GVB 953-1(KJ524452)	74.8	74.1/84.7	65.9/59.4	75.0/77.3	79.7/89.8	83.1/85.5
-(NC_003602)	75.8	75.2/83.1	68.1/61.8	75.9/79.1	80.7/90.9	82.9/85.4
94/971(EF583906)	75.6	75.2/85.8	64.1/59.4	76.8/77.6	79.0/90.6	84.1/86.3
GVB-H1(GU733707)	75.1	74.5/ 85.4	65.4/60.0	75.0/75.1	78.5/90.9	85.8/87.9
VD-102(MF991949)	75.2	74.5/ 85.4	65.1/60.0	76.0/77.6	79.5/90.4	85.2/83.9
12G455(MZ440726)	96.4	96.3/97.6	93.3/89.4	95.3/94.8	98.1/99.0	97.3/96.0
g2(LC617945)	96.2	96.4/96.4	94.5/90.6	94.9/93.8	97.6/98.5	96.2/96.0
GVB-BIB-BR (MW357718)	78.4	77.5/90.2	72.0/68.8	78.5/83.2	82.1/91.4	87.1/89.5
-(X75448)	75.8	75.2/83.1	68.1/61.8	75.9/79.1	80.7/90.9	82.9/85.4
Cultivated-TN1(MN716773)	77.0	77.2/88.2	70.4/68.2	73.8/78.5	77.7/86.8	83.3/83.9
20PRT01(MZ344593)	75.3	74.5/85.8	67.8/63.5	75.1/79.4	81.6/91.4	84.0/85.4
17VT16(MZ440728)	94.0	93.8/97.5	92.2/90.6	93.5/94.4	95.6/99.0	96.2/94.4
16GVP005(MZ440727)	75.1	74.9/85.5	65.6/57.1	73.2/74.5	78.7/89.3	85.5/87.1
12G435(MZ440725)	74.8	74.4/85.1	64.4/59.4	75.5/75.7	77.2/89.3	84.4/85.5
12G4133(MZ440724)	74.7	74.4/85.2	62.9/59.4	75.3/75.7	77.3/90.4	83.1/85.5
12G413(MZ440723)	75.0	74.4/85.4	66.2/60.0	74.7/76.0	78.7/90.4	85.8/87.1
TS_GVB (MT454065)	75.1	74.9/86.1	64.1/57.6	74.5/76.0	79.2/89.8	85.5/85.5
GVB 3138-01(JX513897)	74.9	74.7/85.3	64.0/58.8	75.4/76.0	77.2/89.8	84.4/85.5

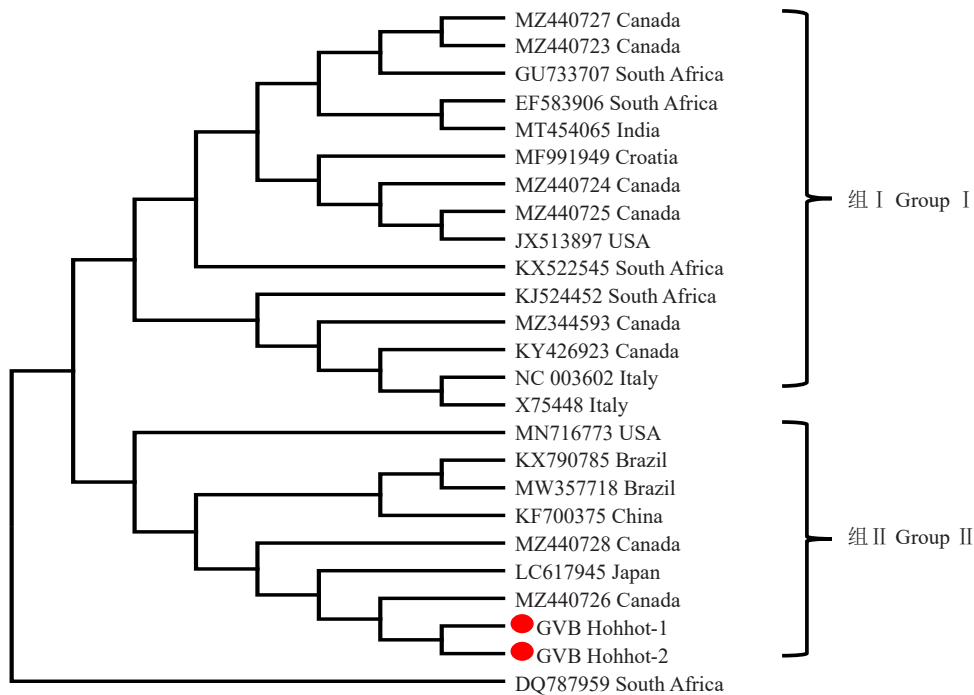


图 3 基于 24 个 GVB 全长基因组序列构建的系统进化树

Fig. 3 A phylogenetic tree based on complete genome of 24 GVB isolates



的分离物分为一支(图4)。

## 2.4 GVB分离物重组分析

通过 RDP4 软件对包括 GVB Hohhot-1 和 GVB Hohhot-2 在内的共 24 条 GVB 全长基因组序

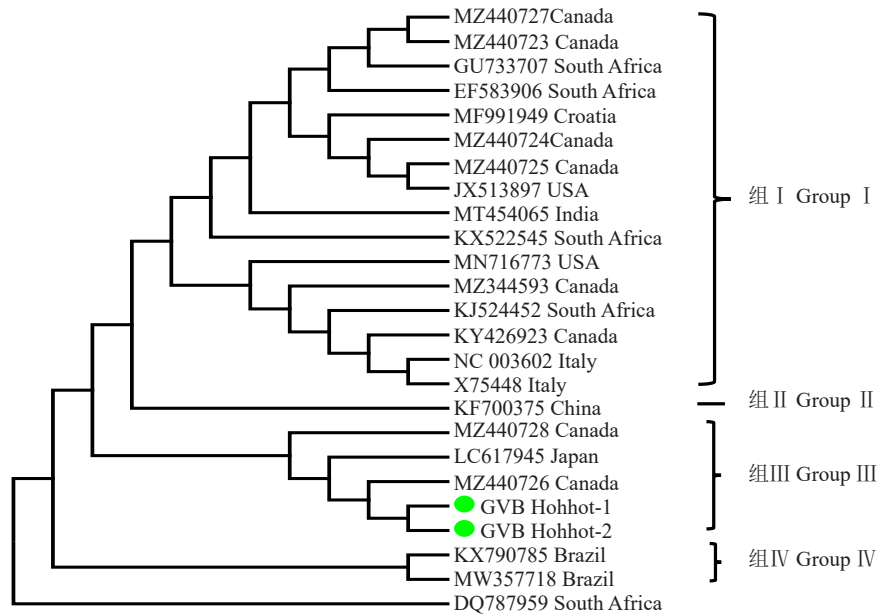


图4 基于24个GVB CP基因组序列构建的系统进化树

Fig. 4 A phylogenetic tree based on CP genome of 24 GVB isolates

列进行重组分析,经 RDP、GENECONV、BOOTSCAN、MACCHI、CHIMAERA、SISCAN、3SEQ 7 种方法在 24 条 GVB 全长基因组序列中均没有检测到重组事件。

## 3 讨论

本研究通过 RT-PCR 方法并结合 RACE 技术成功获得了 2 个 GVB 全长基因组。截至目前,在我国仅仅报道了 1 个 GVB 中国分离物的全基因组序列(表 2),该分离物报道于辽宁省兴城市<sup>[20]</sup>。本试验获得的 2 个 GVB 内蒙古分离物与我国已报道的中国分离物聚为一支,且与南非(EF583906、GU733707)、美国(JX513897)和意大利(X75448)分离物共处一支。通过表 3 和表 4 可以看出,ORF2 在核苷酸和氨基酸水平上与其他分离物序列一致性最低,变异幅度最大,这与 Goszczynski<sup>[8]</sup>和 Hu 等<sup>[20]</sup>的研究结果一致。通过 24 个 GVB 分离物的 CP 基因序列一致性比对结果发现,CP 基因转录氨基酸序列有较高的同源性,该结果与 Shi 等<sup>[7]</sup>、Goszczynski<sup>[8]</sup>和 Hu 等<sup>[20]</sup>研究结果一致。但是,系统发育分析证明 24 个 GVB 分离物基于全基因组序列与 CP 基因序列分别构建进化树有一定差距,我国(KF700375)的分离物单独分为一支,确切原因还不能确定。此外,

GVB Hohhot-1 和 GVB Hohhot-2 分离物与来源于加拿大分离物(MZ440724)的基因组核苷酸一致性最低(74.7%、74.8%),却与加拿大分离物(MZ440726)基因组核苷酸一致性最高(96.5%、96.4%)的结果,以及系统进化树分成的 2 个大组中分别聚集的分离物都证明了 GVB 不具有地域分布规律。

通过观察已报道的 GVB 分离物基因组序列比对结果发现了短而连续的区域,这些区域的氨基酸序列显示出该病毒变种之间极显著的差异,而且在 Goszczynski<sup>[8]</sup>的研究中进一步证明了 ORF5 编码的 RNA 结合蛋白在这些区域的氨基酸序列中发生了置换,这些氨基酸替换对于病毒的变异都有着巨大影响。病毒的自然变异是一个很缓慢的过程,如果改变环境或受到刺激将会加速其变异,而且葡萄大部分都是通过嫁接或无性繁殖方式进行繁殖,嫁接在加快其繁殖效率的同时,也常常会导致病毒的迅速传播,这都可能是 GVB 变异的原因。而且地理位置的差异是否会导致 GVB 的变异仍不能确定,这也许也是不同国家分离株适应不同环境的结果,因此下一步还可以深入研究 GVB 基因组变异及致病性,探讨防控新策略和新方法,以减轻 GVB 对我国葡萄产业的危害,促进我国葡萄产业健康优质发展。

Davino 等<sup>[21]</sup>对 ORF5 采用农杆菌注射法进行功

能验证,证明 GVB 的 ORF5 是一个沉默抑制子,但内容还不够全面,因此可以深入研究 GVB ORF5 的基因沉默功能及形式功能的具体区域。对于植物来说,基因沉默是普遍存在的抗病毒防御机制,在世界上已发现的基因沉默抑制子包括苹果褪绿叶斑病毒 (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) 的运动蛋白 P50<sup>[22]</sup>、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 编码的 2b 蛋白<sup>[23]</sup>、草莓镶脉病毒 (*Strawberry vein band virus*, SVBV) P6<sup>[24]</sup>、番茄丛矮病毒 (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) 编码的 p19<sup>[25]</sup> 等,因此深入研究 ORF5 的基因沉默功能有助于深入认识 GVB ORF5 抵御寄主植物的防御机制,对解析寄主植物和双链 DNA 病毒之间防御和反防御机理均具有重要意义。

## 4 结 论

2 个 GVB 内蒙古分离物基因组全长均为 7609 nt, 含有 5 个 ORF, 与 22 个已报道的 GVB 分离物全基因组核苷酸一致性分别为 74.9%~96.5% 和 74.8%~96.4%, 24 个 GVB 分离物基于全基因组序列与 CP 基因序列构建的进化树分别分成 2 组和 4 组, 与加拿大分离物 (登录号: MZ440726) 的亲缘关系最近, 在 24 个 GVB 全长基因组序列间无重组事件。本研究为我国 GVB 分类地位、病毒进化规律以及后续开展侵染性克隆奠定了一定基础。

## 参考文献 References:

- [1] 朱红娟, 胡国君, 范旭东, 张尊平, 任芳, 董雅凤. 我国部分地区沙地葡萄茎痘相关病毒分离物外壳蛋白序列变异分析[J]. 植物保护学报, 2014, 41(2): 169-175.  
ZHU Hongjuan, HU Guojun, FAN Xudong, ZHANG Zunping, REN Fang, DONG Yafeng. Genetic variation analysis of the coat protein of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* isolates from China[J]. Journal of Plant Protection, 2014, 41(2): 169-175.
- [2] 王泽琼. 引起葡萄皱木复合症的两种线形病毒的分子特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.  
WANG Zeqiong. Study on molecular characterization of two filamentous viruses associated with grapevine rugose wood complex[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.
- [3] 胡国君, 董雅凤, 张尊平, 范旭东, 任芳. 基于巢式反转录-聚合酶链式反应技术检测葡萄病毒 A 和葡萄病毒 B[J]. 植物保护学报, 2019, 46(4): 937-938.  
HU Guojun, DONG Yafeng, ZHANG Zunping, FAN Xudong, REN Fang. Identification of Grapevine virus A and Grapevine virus B by using nested reverse transcription-polymerase polymerase chain reaction[J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46(4): 937-938.
- [4] CHITARRA W, CUOZZO D, FERRANDINO A, SECCHI F, PALMANO S, PERRONE I, BOCCACCI P, PAGLIARANI C, GRIBAUDO I, MANNINI F, GAMBINO G. Dissecting interplays between *Vitis vinifera* L. and grapevine virus B (GVB) under field conditions[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(12): 2651-2666.
- [5] NAKAUNE R, INOUE K, NASU H, KAKOGAWA K, NITTA H, IMADA J, NAKANO M. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of *Rupestris stem pitting-associated virus*[J]. Journal of General Plant Pathology, 2008, 74(2): 156-163.
- [6] HU G J, DONG Y F, ZHANG Z P, FAN X D, FANG R, ZHU H J. Detection and sequence analysis of grapevine virus B isolates from China[J]. Acta Virologica, 2014, 58(2): 180-184.
- [7] SHI B J, HABILIN, GAFNY R, SYMONS R H. Extensive variation of sequence within isolates of grapevine virus B<sup>+</sup>[J]. Virus Genes, 2004, 29(2): 279-285.
- [8] GOSZCZYNSKI D E. Divergent molecular variants of Grapevine virus B (GVB) from corky bark (CB)-affected and CB-negative LN33 hybrid grapevines[J]. Virus Genes, 2010, 41(2): 273-281.
- [9] 任芳, 张尊平, 范旭东, 胡国君, 李正男, 董雅凤. 葡萄病毒 B CP 基因植物表达载体构建及烟草遗传转化[J]. 植物保护, 2018, 44(3): 11-16.  
REN Fang, ZHANG Zunping, FAN Xudong, HU Guojun, LI Zhengnan, DONG Yafeng. Construction of a plant expression vector of the Grapevine virus B coat protein gene and transformation into *Nicotiana tabacum*[J]. Plant Protection, 2018, 44(3): 11-16.
- [10] KUMAR S, SINGH L, FERRETTI L, BARBA M, ZAIDI A A., HALLAN V. Evidence of Grapevine leafroll associated virus-1 - 3, Grapevine fleck virus and Grapevine virus B Occurring in Himachal Pradesh, India[J]. Indian Journal of Virology, 2013, 24(1): 66-69.
- [11] 刘永清, 王国平. 葡萄病毒种类调查与检测技术研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2004(4): 27-28.  
LIU Yongqing, WANG Guoping. Techniques for detecting grapevine virus[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2004(4): 27-28.
- [12] 刘晓, BOSCIA D, RAIMONDI T, BROGGIO M, 陈建, 李洪雯, 王建辉, 刘建军. 四川葡萄病毒田间普查及血清学鉴定[J]. 西南农业学报, 2004, 17(1): 52-56.  
LIU Xiao, BOSCIA D, RAIMONDI T, BROGGIO M, CHEN Jian, LI Hongwen, WANG Jianhui, LIU Jianjun. Field investigation and serological detection of grapevine viruses in Sichuan Province[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2004, 17(1): 52-56.
- [13] 王国平, 洪霓, 张尊平, 张少瑜, 姜修凤. 辽宁、山东葡萄与核果

- 病毒病的田间调查[J]. 中国果树, 1996(4):39-41.
- WANG Guoping, HONG Ni, ZHANG Zunping, ZHANG Shaoyu, JIANG Xiufeng. Field investigation of grape and stone fruit virus diseases in Liaoning and Shandong[J]. China Fruits, 1996 (4):39-41.
- [14] ADAMS M J, ANTONIW J F, BAR-JOSEPH M, BRUNT A A, CANDRESSE T, FOSTER G D, MARTELLI G P, MILNE R G, ZAVRIEV S K, FAUQUET C M. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation[J/OL]. Archives of Virology, 2004, 149(8): 1672.
- [15] 王泽琼, 洪霓, 王国平. 葡萄病毒 B 的检测与分子鉴定[C]//中国植物病理学会 2006 年学术年会论文集. 北京: 中国科学技术出版社, 2006:206-207.
- WANG Zeqiong, HONG Ni, WANG Guoping. Detection of Grapevine virus B and its molecular identification[C]// Proceedings of 2006 Academic Annual Meeting of Chinese Society of Plant Pathology. Beijing: Science and Technology of China Press, 2006:206-207.
- [16] MARTELLI G P, CANDRESSE T, NAMBA S. *Trichovirus*, a new genus of plant viruses[J]. Archives of Virology, 1994, 134 (3/4):451-455.
- [17] KUNIYUKI H, GIORIA R, REZENDE J, DE WILLINK C G, NOVO J P S, YUKI V A. Transmission of the grapevine virus B by the mealybug pseudococcus longispinus targioni-tozzetti (hemiptera: pseudococcidae) in Brazil[J]. Summa Phytopathologica, 2006, 32(2): 151-155.
- [18] 刘晓萌, 李小燕, 张斌, 张磊, 孙平平, 李正男. 侵染葡萄的葡萄病毒属病毒研究进展[J]. 中国果树, 2021(8):12-18.
- LIU Xiaomeng, LI Xiaoyan, ZHANG Bin, ZHANG Lei, SUN Pingping, LI Zhengnan. Advances in *Vitivirus* research members of the genus *Vitivirus*[J]. China Fruits, 2021(8):12-18.
- [19] 闫雨婷. 内蒙古自治区葡萄病毒鉴定和葡萄灰比诺病毒内蒙古分离物全基因组序列分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- YAN Yuting. Identification of grapevine viruses in Inner Mongolia autonomous region and full-genome sequence analysis of grapevine pinot Gris virus Inner Mongolia isolate[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.
- [20] HU G J, DONG Y F, ZHANG Z P, FAN X D, REN F, ZHU H J. Complete nucleotide sequence of a new isolate of Grapevine virus B from China[J]. Journal of Plant Pathology, 2014, 96(2): 403-406.
- [21] DAVINO S, RUIZ-RUIZ S, SERRA P, FORMENT J, FLORES R. Revisiting the cysteine-rich proteins encoded in the 3'-proximal open reading frame of the positive-sense single-stranded RNA of some monopartite filamentous plant viruses: Functional dissection of p15 from grapevine virus B[J]. Archives of Virology, 2020, 165(10):2229-2239.
- [22] YAEGASHI H, TAMURA A, ISOGAI M, YOSHIKAWA N. Inhibition of long-distance movement of RNA silencing signals in *Nicotiana benthamiana* by *Apple chlorotic leaf spot virus* 50 kDa movement protein[J]. Virology, 2008, 382(2): 199-206.
- [23] DONG K, WANG Y, ZHANG Z, CHAI L X, TONG X, XU J, LI D W, WANG X B. Two amino acids near the N-Terminus of *Cucumber mosaic virus* 2b play critical roles in the suppression of RNA silencing and viral infectivity[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(2):173-183.
- [24] 冯明峰. 草莓镶脉病毒 RNA 沉默抑制子功能分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.
- FENG Mingfeng. Function analysis of suppressor of RNA silencing encoded by strawberry vein banding virus[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2016.
- [25] 吴根土. 两种植物病毒编码的 RNA 沉默抑制子在寄主体内的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- WU Gentu. Function analysis of two viral suppressors of RNA silencing in hosts[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.