

## 灰比诺葡萄病毒内蒙古分离物全基因组分析

郭孟泽, 徐磊, 闫雨婷, 孙平平, 张磊, 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:** 【目的】获取灰比诺葡萄病毒 (grapevine pinot gris virus, GPGV) 内蒙古分离物全基因组序列, 并对该病毒群体进行序列一致性、系统发育、基因重组以及群体遗传多样性等分析。【方法】以 GPGV 阳性样品为实验材料, 通过 RT-PCR 技术和 cDNA 末端快速扩增技术 (Rapid amplification of cDNA ends, RACE) 克隆 GPGV 内蒙古分离物的全基因组序列, 并通过分子生物学分析软件对其进行全基因组序列分析。【结果】成果克隆了两条 GPGV 内蒙古分离物 (20IM-ViVi1 和 20IM-ViVi2) 的全基因组序列, 序列全长均为 7250 nt, 且均编码 3 个 ORFs; 序列一致性分析结果显示, 20IM-ViVi1 与 20IM-ViVi2 基因组序列核苷酸一致性为 96.4%, 与其他分离物的全基因组序列一致性分别为 79.7%~96.8%、79.5~97.7%; 系统进化分析表明, GPGV 所有全基因组分离物可划为 4 个分支, 其中本研究所获得的两个分离物 20IM-ViVi1 与 20IM-ViVi2 均聚集在第 I 分支, 均与中国夏黑分离物 SRR2845691-GPGV 亲缘关系最近; 遗传多样性分析结果表明, GPGV 具有较高的遗传多样性, 其中 GPGV 亚洲分离物遗传多样性最高。【结论】首次获得 GPGV 内蒙古分离物的全基因组序列, 并阐述了 2 个 GPGV 内蒙古分离物与已知病毒之间的进化关系, 可为我国 GPGV 株系划分、遗传进化研究奠定理论基础。

**关键词:** 灰比诺葡萄病毒; 系统进化分析; 序列一致性; 遗传多样性

中图分类号: S663.1; S436.631 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2024)11-0001-08

## Complete genome sequence analysis of grapevine pinot gris virus isolates from Inner Mongolia

GUO Mengze, XU lei, YAN Yuting, SUN Pingping, ZHANG Lei, LI Zhengnan\*

(<sup>1</sup>College of horticulture and plant protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018)

**Abstract:** 【Objective】To obtain the complete genomic sequences of grapevine pinot gris virus (GPGV) isolate from Inner Mongolia, and to perform analyses on the viral population concerning sequence identity, phylogenetic relationships, genetic recombination, and genetic diversity.

【Methods】The complete genomic sequences of the GPGV Inner Mongolia isolate were cloned using RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques, with GPGV positive samples serving as the experimental material. Subsequent genomic sequence analyses were conducted using molecular biology software. 【Results】Two complete genomic sequences of the

收稿日期: 2024-07-08

接受日期: 2024-09-09

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目(2022YFDZ0029); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2022QN03018); 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持项目”(NJYT23079)

作者简介: 郭孟泽, 男, 在读博士研究生, 研究方向为植物病毒学。E-mail: [modeiguo@gmail.com](mailto:modeiguo@gmail.com)

\*通信作者 Author for correspondence. E-mail: [lizhengnan@imau.edu.cn](mailto:lizhengnan@imau.edu.cn)

GPGV Inner Mongolia isolates (20IM-ViVi1 and 20IM-ViVi2) were cloned, with both having a full length of 7250 nucleotides and encoding three open reading frames (ORFs). Sequence identity analysis revealed that the genomic sequences of 20IM-ViVi1 and 20IM-ViVi2 exhibited 96.4% nucleotide identity, while their identities with other isolates' complete genomic sequences ranged from 79.7% to 96.8% and from 79.5 to 97.7%, respectively. Phylogenetic analysis indicated that all GPGV complete genomic sequences could be classified into four clades, with the two isolates from this study, 20IM-ViVi1 and 20IM-ViVi2, grouped in the first clade and showed the closest genetic relationship to *Vitis vinifera* cultivar *Summer Black* isolate SRR2845691-GPGV. Genetic diversity analysis demonstrated that GPGV possesses a high level of genetic diversity, with the Asian isolates displaying the highest level. **【Conclusion】** This study represents the first time the complete genomic sequences of GPGV isolates from Inner Mongolia have been obtained, and it elucidates the evolutionary relationships between the two GPGV Inner Mongolia isolates and known viruses, providing a foundational theory for the classification of GPGV strains and genetic evolutionary studies in China.

**Keywords:**grapevine pinot gris virus; phylogenetic analysis; sequence identity; genetic diversity

葡萄 (*Vitis vinifera*) 是极富营养价值和经济价值的一种园艺作物<sup>[1]</sup>。据粮农组织 (FAO) 统计, 2021 年, 中国葡萄产量为 1126.99 万吨, 位居世界第一; 种植面积为 58.2728 万公顷, 位居世界第四。但近年来我国葡萄产区病毒性病原日益流行, 葡萄已知的病毒性病原种类多达 100 余种<sup>[2-4]</sup>, 成为了感染病毒种类最多的果树。目前, 葡萄感染病毒后一般会出现芽变延迟、芽节间缩短、枝叶畸形、浆果坏死、浆果变酸、花叶、斑驳、脉明、环斑以及木质部凹陷等症状<sup>[5-6]</sup>, 严重影响葡萄经济的发展。

灰比诺葡萄病毒 (grapevine Pinot gris virus, GPGV) 是乙型线形病毒科 (*Betafexiviridae*) 纤毛病毒属 (*Trichovirus*) 的代表成员, 基因组为正义单链 RNA 分子, 编码 3 个重叠的开放阅读框 (open reading frame, ORF), ORF1 编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)、ORF2 编码运动蛋白 (movement protein, MP)、ORF3 编码外壳蛋白 (coat protein, CP)。GPGV 所引起的葡萄病害最早始于意大利特伦蒂诺地区葡萄园种植的灰比诺上<sup>[1]</sup>。但该病毒是在 9 年后才被发现, 随后世界上大多数主要的葡萄种植区都检测到了 GPGV, 例如欧洲的法国、德国、俄罗斯、捷克共和国、希腊、斯洛伐克、斯洛文尼亚、土耳其、西班牙和葡萄牙; 亚洲的中国、韩国和巴基斯坦; 北美洲的美国、加拿大; 南美洲的乌拉圭; 大洋洲的澳大利亚<sup>[7-17]</sup>。目前, GPGV 在我国葡萄主要种植区较为流行, 可造成葡萄叶片斑驳和变形病 (grapevine leaf mottling and deformation, GLMD) 并且浆果酸度增加, 严重影响葡萄以及葡萄酒产业的发展。但是一些几乎无症状的葡萄样本也检测到了 GPGV, 因此这些症状相关的原因尚不清楚<sup>[18]</sup>。此外, 白花蝇子草 (*Silene latifolia*) 和藜 (*Chenopodium album*) 是 GPGV 的草本寄主<sup>[19]</sup>, 葡萄缺节瘿螨 (*Colomerus newkirk*) 是 GPGV 传播的昆虫载体<sup>[20]</sup>。

近年来, GPGV 的基因组特征、危害症状、地理分布和起源中心受到了广泛关注, 较多

研究表明 GPGV 种群的遗传多样性处于中等水平,且我国也是起源中心的主要指向之一<sup>[17]</sup>。然而,关于 GPGV 中国分离物的全基因组序列报道较少。因此,为了深入了解 GPGV 的遗传多样性和系统发育关系,本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术获得了两条 GPGV 的内蒙古分离物(20IM-ViVi1 和 20IM-ViVi2),并将其与 NCBI GenBank 数据库所下载的其他 GPGV 分离物进行了序列一致性分析、系统发育分析、重组分析以及遗传多样性分析,以期为中国 GPGV 的防治提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料为前期研究中检测为 GPGV 阳性的葡萄叶片样品,分别于 2020 年 6 月 8 日和 2020 年 7 月 15 日在内蒙古呼和浩特市周边不同的设施葡萄园采集,并经液氮速冻后存放于 -80°C 冰箱备用。

### 1.2 总 RNA 提取

取上述感染 GPGV 的葡萄样品 100 mg,按照植物总 RNA 提取试剂盒(Spectrum™ Plant Total RNA Kit)说明书进行总 RNA 的提取,通过 1%的琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计分别对所提取 RNA 的质量和浓度进行检测,并于 -80°C 保存备用。

### 1.3 引物设计

本研究利用 Vector NTI 软件对 NCBI Genbank 数据库已报道的所有 GPGV 全长基因组序列进行序列比对,在序列保守区设计了 3 个引物对(GPGV-1F/GPGV-1R、GPGV-2F/GPGV-2R、GPGV-3F/GPGV-3R)用于 GPGV 全基因组序列扩增,相邻扩增片段间重叠片段长度均大于 200 bp,随后结合上述扩增结果设计了用于扩增 GPGV 末端序列的引物(GPGV3、GPGV1)。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**表 1 本研究所使用的引物信息**

**Table 1. Primer information used in this study**

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	退火温度/°C Annealing Temperature	产物大小/bp Amplified fragment length	位点 Site
GPGV-1F	GATCAATTGATCCCGTGTAGTG	56	2619	19-2637
GPGV-1R	RAAGCACCCAACTTTTGGYAG			
GPGV-2F	TGCAGGTGTATGAACARGATG	56	2892	2339-5230
GPGV-2R	CCAAAGCACACATGTCATCAC			
GPGV-3F	GGAGTTTTTGCATTGAATCAG	56	2314	4911-7224
GPGV-3R	GAAGTTACGYGCTCMTATGAG			
GPGV3	CCAAATGCCCTATGTGACTG	56	937	1-937
GPGV1	TGACTTTTCGTCAAGTGTGT	54	369	6892-7260

注:扩增产物所对应的位点以 GPGV 国际标准序列(GenBank 登录号: NC\_015782)为参考。

Note: The amplified product sites are referenced to the International Standard Sequence of GPGV (GenBank Accession No.: NC\_015782).

### 1.4 GPGV 全基因组序列扩增

以提取的总 RNA 为模板，采用反转录试剂盒（SuperScript™ III Reverse Transcriptase）合成 cDNA，反应条件：50℃，1 h，70℃，15 min。以 cDNA 为模板，在高保真酶（Q5 High-Fidelity 2×Master Mix）的作用下分段扩增 GPGV 的核苷酸序列，循环参数为：98℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 2 min，35 个循环。利用 SMARTer® RACE 5'/3' Kit 试剂盒扩增 GPGV 5'和 3'末端序列。PCR 产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段。纯化后的产物连接至 pTOPO-Blunt 克隆载体，并转化 JM109 大肠杆菌，经 PCR 进行菌液鉴定后，取适量菌液送至华大基因进行测序，剩余菌液用 50% 甘油保存，置于-80℃备用。

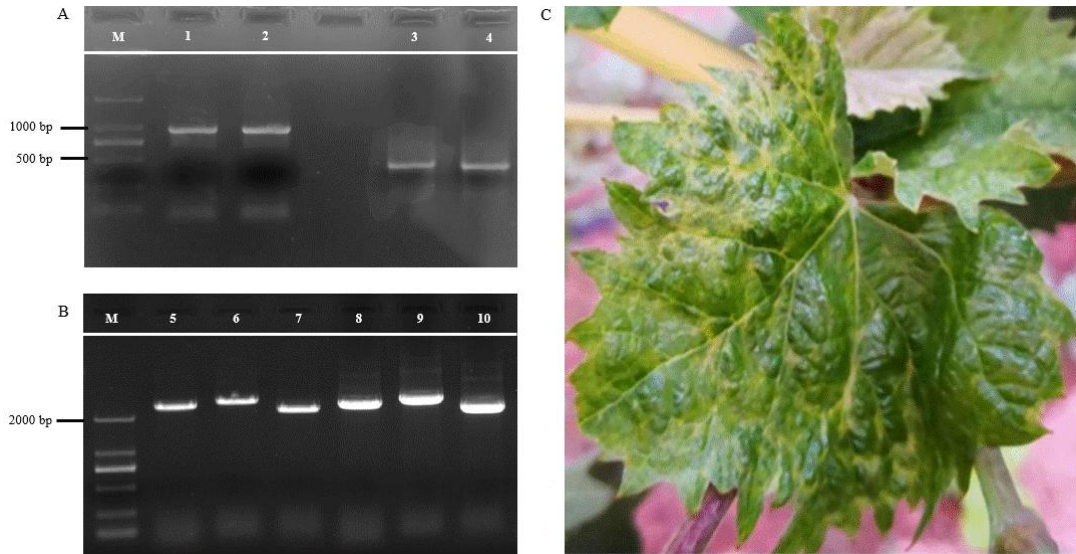
### 1.5 GPGV 基因组序列分析

采用 Vector NTI 软件将 RT-PCR 扩增以及 cDNA 末端快速扩增（RACE）得到的 GPGV 基因组序列进行组装，获得 GPGV 的完整基因组序列。利用 NCBI ORF finder（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>）进行 ORFs 预测，获得 GPGV 分离物的 5'端非编码区（5'-UTR）、3'端非编码区（3'-UTR）和 ORFs 的序列。利用 EMBOSS transeq（[https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)）进行 ORFs 的翻译，获得氨基酸序列。利用 Mega 11 的 ClustalW 方法对 GPGV 在 NCBI 数据库中所有的完整基因组序列（152 个分离物）进行多重序列比对，并以最大似然法（Maximum-Likelihood method，ML）构建了系统进化树，MODLES 程序确定了建树参数，自展值设为 1000。利用 BioEdit 7.2 软件对完整基因组序列以及 ORFs 的核苷酸与氨基酸序列进行一致性分析。利用 RDP4 软件提供的七种重组检测算法对得到的分离物全基因组序列进行重组分析。利用 DNAsp v.6.12.03 对 GPGV 分离物进行群体遗传多样性分析<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 GPGV 内蒙古分离物全基因组序列扩增与基因组结构特征

将葡萄叶片样品提出的总 RNA 反转录为 cDNA 后，通过 RACE 技术和 RT-PCR 技术扩增出 3 段重叠的基因组序列以及末端序列（图 1）。使用 Vector NTI 软件将各序列片段进行拼接组装，获得了两条 GPGV 分离物（20IM-ViVi1 和 20IM-ViVi2）的完整基因组序列（登录号：OR935780、OR935781）。两条全基因组序列长度均为 7250 nt，3'和 5'非编码区（UTR）长度均为：95 nt，82 nt，基因组结构均与已报道的 GPGV 基因组结构一致，含 3 个重叠的 ORFs，ORF1（96~5563 nt，1855 aa）编码了病毒甲基转移酶（methyltransferases，MT）、2OG-Fe II-Oxy 加氧酶结构域、病毒 RNA 解旋酶以及 RNA 依赖型的 RNA 聚合酶（RdRp），ORF2（5569~6696 nt，375 aa）和 ORF3（6581~7168 nt，195 aa）分别编码了纤毛病毒属的运动蛋白（MP）和外壳蛋白（CP）。



**图 1 RACE 和 RT-PCR 扩增结果及感染 GPGV 的葡萄植株田间发病症状**

**Fig.1 Amplification results of RACE and RT-PCR and field symptomatology of grapevine plants infected with GPGV.**

注：M：DL2000marker；1、3、5、6、7 为 GPGV 分离物 20IM-ViVi1 的 RACE 及 RT-PCR 扩增结果；2、4、8、9、10 为 GPGV 分离物 20IM-ViVi2 的 RACE 及 RT-PCR 扩增结果。

Note：M：DL2000 marker；Lanes 1, 3, 5, 6, 7 show the RACE and RT-PCR amplification results of GPGV isolate 20IM-ViVi1；Lanes 2, 4, 8, 9, 10 display the RACE and RT-PCR amplification results for GPGV isolate 20IM-ViVi2.

## 2.2 GPGV 分离物序列一致性分析

将本研究所获得的 2 个内蒙古 GPGV 分离物与其它 GPGV 中国分离物进行全基因组序列一致性分析，结果表明，GPGV 中国分离物彼此之间的全基因组序列一致率在 82.0%~99.9%之间，其中分离物 20IM-ViVi1 与 20IM-ViVi2 之间具有较高的全基因组序列一致率，为 96.4%（图 2）。将本研究所获得的 2 个序列分别与 GenBank 中其它 GPGV 全基因组序列进行成对对比，结果表明，分离物 20IM-ViVi1 与其它 GPGV 完整基因组序列的核苷酸序列一致率在 79.7~96.8%之间，其中与俄罗斯白羽分离物 Rk3（GenBank 登录号：OL961512）之间的全基因组序列一致率最高，为 96.9%；与日本紫葛葡萄（*Vitis coignetiae*）分离物 H-JP2（GenBank 登录号：LC601812）之间的全基因组序列一致率最低，为 78.8%；分离物 20IM-ViVi2 与其它 GPGV 完整基因组序列的核苷酸序列一致率在 79.5~97.7%之间，其中与中国夏黑分离物 SRR2845691GPGV（GenBank 登录号：BK011076）之间的全基因组序列一致率最高，为 97.7%；与日本紫葛葡萄分离物 H-JP2 之间的全基因组序列一致率最低，为 79.5%。

为分析 GPGV 内蒙古分离物分子多样性的具体区域，本研究将所获得的 GPGV 内蒙古分离物的各 ORFs 与 GenBank 中其它 GPGV 的 ORFs 进行成对对比，结果表明分离物 20IM-ViVi1 的 RdRp（ORF1）的核苷酸与氨基酸序列一致率的范围分别为 78.9%~97.5%、

87.6%~98.9；MP（ORF2）的核苷酸与氨基酸序列一致率的范围分别为 80.1%~97.4%、86.6%~98.9%； CP（ORF3）的核苷酸与氨基酸序列一致率的范围分别为 84.8%~95.7%、92.3%~100.0%。分离物 20IM-ViVi2 的 RdRp（ORF1）的核苷酸与氨基酸一致率的范围分别为 78.6%~97.6%、86.4%~98.7%； MP（ORF2）的核苷酸与氨基酸序列一致率的范围分别为 79.9%~98.4%、86.6%~99.2%； CP（ORF3）的核苷酸与氨基酸一致率的范围分别为 85.1%~98.1%、92.3%~100.0%。

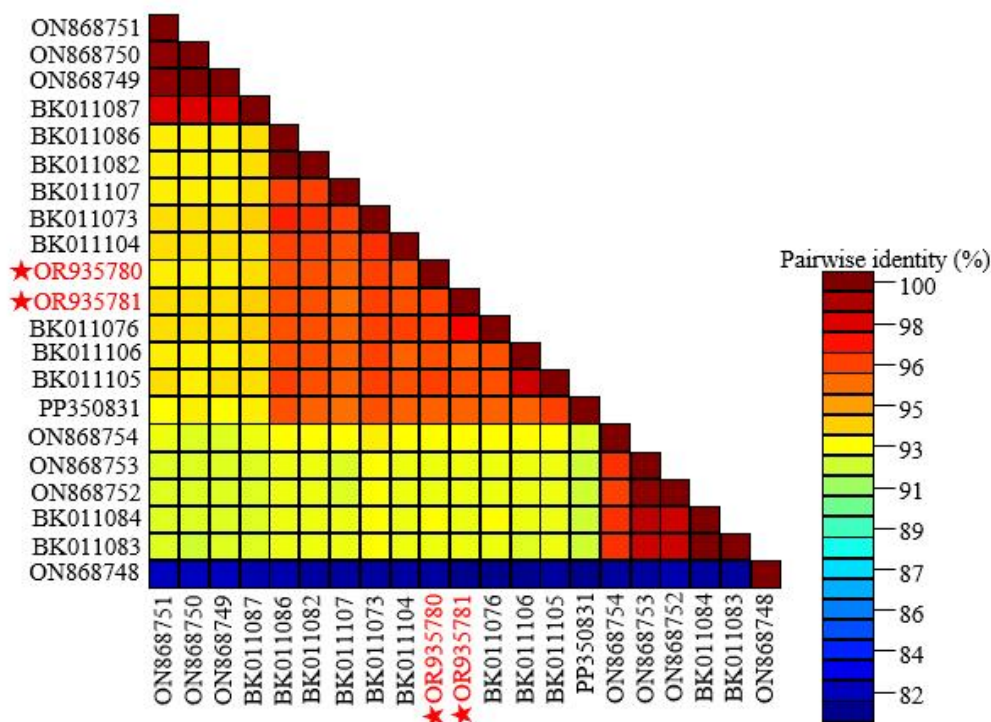


图 2 中国不同地区 GPGV 分离物的全基因组序列一致性

Fig.2 The complete sequence identities among GPGV isolates from various regions in China

### 2.3 GPGV 系统进化分析

为明确本研究所获得的 GPGV 内蒙古分离物与 NCBI GenBank 数据库已报道的 GPGV 分离物之间的亲缘关系，利用 MEGA11 软件以最大似然法构建了系统进化树，MODLES 程序判定了最大似然法的最佳进化模型（GTR+G+I）。结果显示（图 3），GPGV 现有的 152 个完整基因组被分为 4 个分支，第 III 分支和第 IV 分支又被分为 a、b 两个小的分支。其中本研究所获得的两个分离物 20IM-ViVi1 与 20IM-ViVi2 均聚集在第 I 分支，并均与中国夏黑分离物 SRR2845691-GPGV 亲缘关系最近。

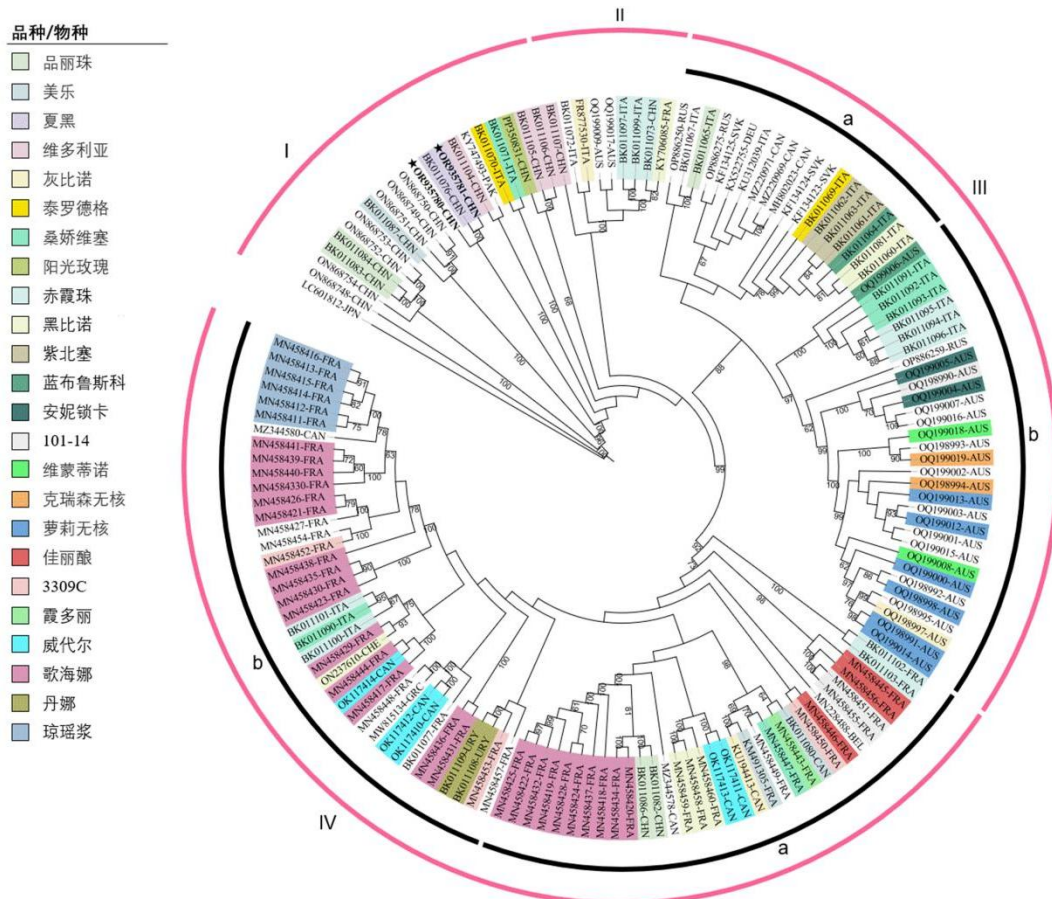


图 3 基于 GPGV 全基因组构建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree constructed on the base of the complete genome of GPGV

注：品丽珠、美乐、夏黑、维多利亚、灰比诺、泰罗德格、桑娇维塞、阳光玫瑰、赤霞珠、黑比诺、紫北塞、蓝布鲁斯科、安妮锁卡、克瑞森无核（Crimson seedless）、茉莉无核（Ralli seedless）、佳丽酿（Carignan）、霞多丽（Chardonnay）、威代尔（Vidal）、歌海娜（Grenache）、丹娜（Tannat）、琼瑶浆（Gewurztraminer）均为葡萄品种。

Note: Cabernet Franc, Merlot, Summer Black, Victoria, Pinot Gris, Teroldego, Sangiovese, Shine Muscat, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Alicante Bouschet, Lambrusco, Ansonica, Crimson Seedless, Ralli Seedless, Carignan, Chardonnay, Vidal, Grenache, Tannat, and Gewurztraminer are all grape varieties.

另外，为明确我国 GPGV 分离物的系统发育关系，本研究以最大似然法对 22 个中国 GPGV 分离物进行了系统发育树的重建，结果显示（图 4），中国分离物主要分为 4 个分支，其中 GPGV 新疆分离物 Shihezi-1 与其他分离物的具有较高的遗传距离，亲缘关系较远，被单独分在了第 I 分支。而本研究所获得的分离物 20IM-ViVi1 与 20IM-ViVi2 均被聚集在第 IV 分支，并且均与中国夏黑分离物 SRR2845691-GPGV 亲缘关系最近。

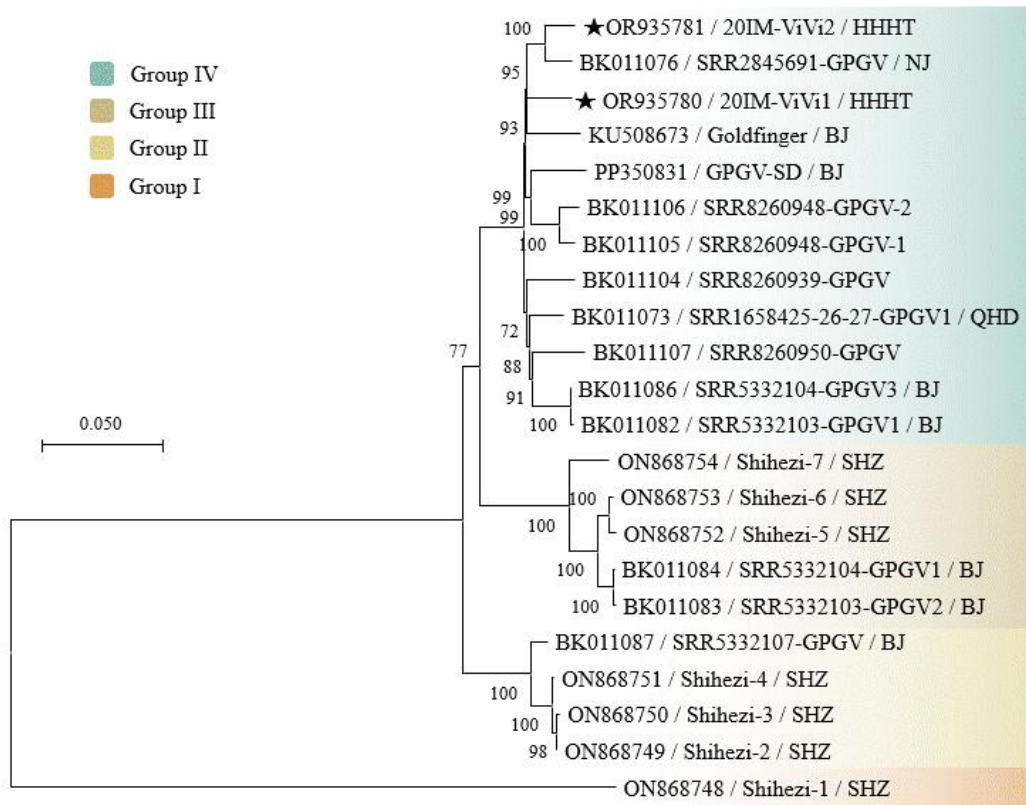


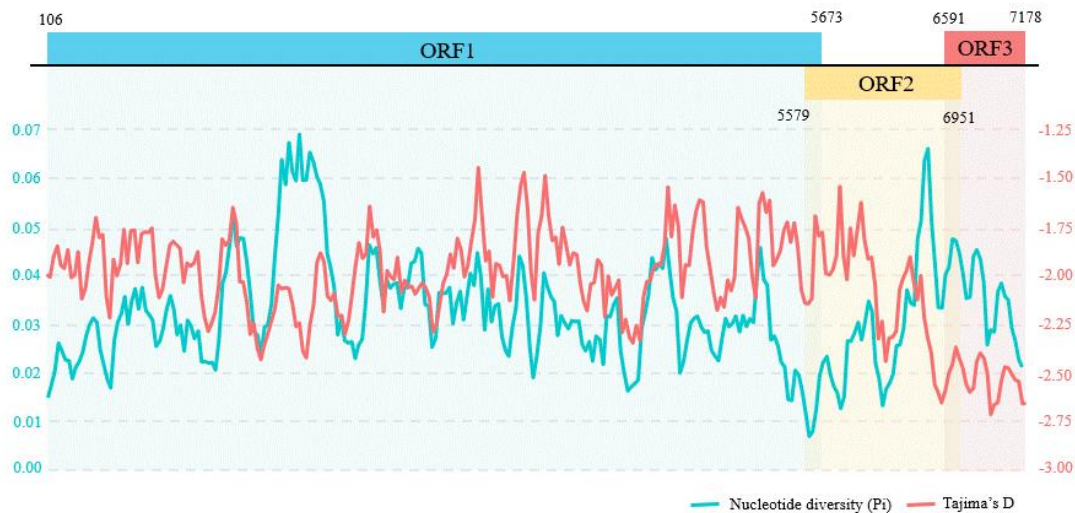
图 4 基于 GPGV 中国分离物所构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree constructed based on the isolates of GPGV from China

#### 2.4 GPGV 的遗传多样性分析

通过 DNAsp v.6 软件对 152 个 GPGV 分离物进行了中性测试以及核苷酸多态性分析，并延 ORFs 基因组序列走向绘制等比例趋势图。其中中性测试结果显示（图 5），GPGV 群体在 RdRp、MP 以及 CP 编码区均处的 Tajima's D 中性检测值分别为 -2.23492、-2.13745、-2.05923，且支撑该数值的 P 值均小于 0.05，表明 GPGV 三个 ORFs 均受到了显著的负向选择。核苷酸多态性分析结果显示，GPGV 群体在 RdRp、MP 以及 CP 编码区域的核苷酸多态性 ( $\pi$ ) 为 0.03288 ( $\pm 0.00154$ )、0.02859 ( $\pm 0.00325$ )、0.02827 ( $\pm 0.00450$ )，表明 GPGV 具有较高的遗传多样性。此外，亚洲 GPGV 分离物的核苷酸多态性 ( $\pi = 0.07870 \pm 0.01469$ ) 显著高于其它大洲 GPGV 分离物的核苷酸多态性（表 2），但亚洲 GPGV 分离物的中性检测值并不显著，可能遵循中性进化的原则。





**图 5 GPGV 群体进化中的中性测试及核苷酸多态性分析**

**Fig. 5 Analysis of neutrality tests and nucleotide polymorphism for the GPGV populations**

注：蓝色线段代表 GPGV 群体之间的核苷酸多态性，左侧坐标轴为核苷酸多态性的变化区间；红色线段为 GPGV 群体间的 Tajima's D 中性测试，右侧坐标轴为 Tajima's D 值的变化区间。

Note: The blue line segments represent nucleotide polymorphisms among the GPGV populations, with the left y-axis indicating the range of variation in nucleotide polymorphisms; the red line segments depict Tajima's D neutrality tests between GPGV populations, with the right y-axis indicating the range of variation in Tajima's D values.

表 2 葡萄灰比诺病毒不同编码区选择压力分析参数

**Table 2 Analysis parameters of selection pressure on different coding regions of GPGV**

Genetic regions	ENC <sup>a</sup>	d <sub>N</sub>	d <sub>S</sub>	d <sub>N</sub> /d <sub>S</sub> <sup>b</sup>	Normalized dN-dS <sup>c</sup>		Number of NS <sup>d</sup>			Codons under PS <sup>e</sup>					
					Log (L)	Mean(dN/dS)	FEL	SLAC	FUBAR	FEL	SLAC	FUBAR			
RDRP	1885	0.00795	0.12297	0.064649	-48777.95	0.1040	1038	713	1362	470, 585, 613, 585, <b>657</b> , 669, 1011, 189, 638, <b>657</b> , 622, 638, <b>657</b> , 1011, 1556, 1713, 1850					
MP	459	0.01123	0.08504	0.132055	-8810.42	0.1750	156	134	212	300, <b>338</b> , <b>344</b> , 277, <b>338</b> , <b>344</b> , <b>346</b> , 300, <b>338</b> , <b>344</b> , <b>346</b> , <b>356</b> , <b>366</b> , <b>356</b> , <b>366</b> , <b>346</b> , <b>356</b> , <b>366</b>					
CP	195	0.00554	0.10757	0.051501	-4431.55	0.0677	99	65	132	<b>32</b> , <b>32</b> , <b>32</b> , 64					

注: a: ENC: 有效密码子数; b: d<sub>N</sub>、d<sub>S</sub> 以及 d<sub>N</sub>/d<sub>S</sub> 比值由 DnaSP6 软件估算; c: 通过 SLAC 方法计算了葡萄灰比诺病毒群体的 dN-dS 值 (dN-dS 值除以树的长度总和), 这是一个自然选择的指标。Mean(dN/dS)=1, <1 和 >1 分别表示每个基因特异性序列数据集为中性进化、负向 (净化) 选择和正向选择; d、e: 使用 Datamonkey 中实现的 SLAC、FEL、和 RUBAR 方法获得的负性选择和正性选择的密码子数量。

a: ENC: effective number of codons; b: d<sub>N</sub>, d<sub>S</sub>, and the d<sub>N</sub>/d<sub>S</sub> were estimated by DnaSP6; c: Normalized dN-dS values (dN-dS divided by the total length of the tree), an indicator of natural selection, was calculated for Shallot yellowstripe virus isolates by using SLAC method. Mean (dN/dS) value = 1, < 1 and > 1 indicate neutral evolution, negative (purifying) selection and positive (diversifying) selection, respectively, for each gene-specific sequence data set; d, e: Number of negatively and positively selected codons, obtained using the SLAC, FEL, and FUBAR methods implemented in Datamonkey.

为了评估 GPGV 进化过程中每个编码区的选择压力变化, 使用 DNAsp v. 6 计算 dN/dS 比值(表 2)。所有 GPGV 编码区的 dN 值均小于 dS 值(dN/dS 比值 $<1$ ), 表明纯化选择限制了群体的变异性。然而, 纯化选择压力在整个基因组中并不是均匀分布的(图 6)。CP 受到的纯化选择最强, 其 dN/dS 值最低, 为 0.051501。MP 受到的纯化选择最弱, 其 dN/dS 值最高, 为 0.132055。此外, 通过使用 HyPhy 软件包中的 SLAC 方法进一步表明 MP 编码区具有较多的正选择位点(图 6), 且 FEL、FUBAR、SLAC 三种方法均筛选出了强正选择位点(表 2), 其中共同被筛选的位点为 RdRp 编码区的 657, MP 编码区的 388、344、346、356、366 以及 CP 编码区的 32。

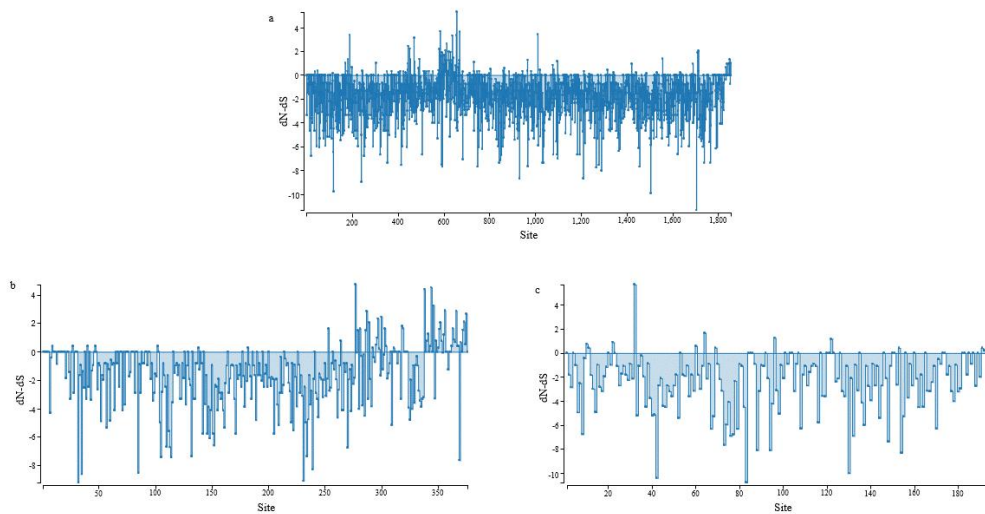


图 6 基于 SLAC 方法对 GPGV 分离物进行的选择压力分析

Fig. 6 Selection analyses for GPGV populations by SLAC method

### 3 讨论

GPGV 是造成葡萄叶片发病、浆果品质变差的主要病原之一<sup>[22-23]</sup>, 前人研究表明在大多数情况下 GPGV 与葡萄发育迟缓以及叶片发生的褪绿、斑驳、畸形等症状有关<sup>[1]</sup>, 而在 SILDARELLI 等<sup>[18]</sup>的调查中发现 GPGV 更多的存在于一些几乎无症状的葡萄样品中。BERTAZZON 等<sup>[13]</sup>发现有症状的植株的 GPGV 量高于感染 GPGV 但无症状的植株。而本研究分离得到的 GPGV 分离物的寄主症状并不相同, 考虑到多种病毒复合侵染情况, 两个 GPGV 分离物的致病性有待进一步研究。关于 GPGV 的草本寄主以及昆虫载体, 本研究尚未有所收获, 然而现有研究表明 GPGV 还可感染白花蝇子草、藜等草本植物<sup>[19]</sup>, 这些草本植物在世界各地的葡萄园中随处可见。并且在这些草本植物中可能会增加病毒的感染繁殖能力、持久性以及传播范围, 进而传播给邻近的葡萄寄主<sup>[19]</sup>。

近年来 GPGV 在世界各地的发现越来越多, 但是完整基因组序列的报道仍然有限, 以至于其起源问题仍然模糊不清, 本研究对于内蒙古 7 个地级市(呼和浩特、包头、赤峰、通辽、巴彦淖尔、鄂尔多斯、乌海)的 69 个葡萄样本进行多病毒检测时发现了其中 4 个地级

市（呼和浩特、包头、赤峰、通辽）的 16 个葡萄样本含 GPGV，检出率高达 23.18%，可见 GPGV 在内蒙古非常流行，对当地葡萄的产量与品质十分不利。因此，本研究对于感染 GPGV 的阳性样品进行了全基因组扩增、克隆，得到了两个 GPGV 内蒙古分离物 20IM-ViVi1 和 20IM-ViVi2 的全基因组序列。内蒙古的两个 GPGV 分离物基因组结构特征与已报道的一致，含 3 个重叠的开放阅读框（ORF），ORF1 编码了病毒甲基转移酶（MT）、2OG-Fe II-Oxy 加氧酶结构域、病毒 RNA 解旋酶以及 RNA 依赖型的 RNA 聚合酶（RdRp），ORF2 和 ORF3 分别编码了纤毛病毒属的运动蛋白（MP）和外壳蛋白（CP）<sup>[24-28]</sup>。

目前，关于 GPGV 的起源中心研究较多，大多数研究认为 GPGV 或起源于亚洲，其中 HILY 等<sup>[12]</sup>认为我国极有可能是起源中心。而本研究所获得的 GPGV 分离物 20IM-ViVi1 和 20IM-ViVi2 与其它已知的 GPGV 全基因组序列一致率分别介于 79.7%~96.8%、79.5~97.7%，其中日本紫葛葡萄分离物 H-JP2 与本研究所获得的分离物序列一致率均为最低，序列变异较大<sup>[29]</sup>，序列相似性分析结果也证实了这一结果。给予 GPGV 分离物全基因组序列构建的系统进化树显示，本研究所获得的夏黑分离物 20IM-ViVi2 与南京夏黑分离物 SRR2845691-GPGV 聚集在同一分支，且亲缘关系最近。在品丽珠、维多利亚、歌海娜以及琼瑶浆等葡萄品种中所克隆到的 GPGV 全基因组序列也存在近缘关系。因此，寄主差异在一定程度上影响了 GPGV 的遗传进化，基于 GPGV 中国分离物重建的系统进化树同样证明了这一点。基于 GPGV 全基因组序列所构建的系统进化树中还显示出 GPGV 分离物具有较强的地理特异性，如 GPGV 中国分离物大多数聚集在第 I 分支，GPGV 澳大利亚分离物和意大利分离物大多数聚集在第 III 分支，GPGV 法国分离物和加拿大分离物大多数聚集在第 IV 分支。基于 GPGV 中国分离物全基因组序列重建的系统进化树表明，本研究所获的分离物与我国东部地区所克隆到的 GPGV 分离物具有较近的亲缘关系。

物种起源中心通常是其遗传多样性多样性最高的地区<sup>[30-31]</sup>，本研究对 GPGV 进行的群体遗传多样性分析结果表明 GPGV 亚洲分离物的遗传多样性（ $\pi=0.03195 \pm 0.00135$ ）高于其它四大洲的 GPGV 分离物，因此，亚洲应是 GPGV 的起源中心。但考虑到本研究基于 GPGV 全基因组序列所构建的 ML 树第一节点为日本分离物，HILY 等<sup>[17]</sup>所预测中国是起源地这一观点便不成立。目前，已知的日本分离物有限且变异较大，早期断定的起源时间有待 GPGV 序列进一步完善后重新分析<sup>[17]</sup>。序列相似性网络分析以及 Tajima's D 中性测试结果显示，GPGV 法国/欧洲分离物具有广泛的序列相似性且受到了显著的负向选择，表明近期 GPGV 在法国/欧洲发生了种群扩张。

#### 4 结论

本研究获得了两条 GPGV 完整基因组序列，分析结果表明，两个 GPGV 分离物基因组全长为 7250 nt，含 3 个 ORFs，与现有 GPGV 分离物全基因组序列具有较高的一致性（日本分离物 H-JP2 除外），一致性范围分别为 79.7%~96.8%、79.5~97.7%。此外基于所有 GPGV 全基因组序列组构建的系统进化树可分为 4 个分支，本研究所获得的分离物均具聚在第 I 分支。重组分析未发现与本研究所获得分离物相关的重组事件。通过遗传多样性分析发现亚洲

GPG 分离物具有较高的遗传多样性，或是起源中心，但种群扩张发生在欧洲。本研究可为 GPGV 分子特征、进化关系以及遗传多样性研究奠定了基础。

### 参考文献 References:

- [1] GIAMPETRUZZI A, ROUMI V, ROBERTO R, MALOSSINI U, YOSHIKAWA N, LA NOTTE P, TERLIZZI F, CREDI R, SALDARELLI P. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris[J]. *Virus Research*, 2012,163(1):262-268.
- [2] FUCHS M. Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2020,102(3):643-653.
- [3] GOMEZ T S, ALONSO R, LUNA F, LANZA V M, BUSCEMA F. Occurrence of nine grapevine viruses in commercial vineyards of mendoza, Argentina[J]. *Viruses*, 2023,15(1):177.
- [4] BELKINA D, KARPOVA D, POROTIKOVA E, LIFANOV I, VINOGRADOVA S. Grapevine virome of the don ampelographic collection in russia has concealed five novel viruses[J]. *Viruses*, 2023,15(12):2429.
- [5] KAUR K, RINALDO A, LOVELOCK D, RODONI B, CONSTABLE F. The genetic variability of grapevine pinot gris virus (GPGV) in Australia[J]. *Virology Journal*, 2023,20(1):211.
- [6] TARQUINI G, PAGLIARI L, ERMACORA P, MUSETTI R, FIRRAO G. Trigger and suppression of antiviral defenses by grapevine pinot gris virus (GPGV): novel insights into virus-host interaction[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2021,34(9):1010-1023.
- [7] BEUVE M, CANDRESSE T, TANNIÈRES M, LEMAIRE O. First report of grapevine pinot gris virus (GPGV) in grapevine in France[J]. *Plant Disease*, 2015, 99(2): 293.
- [8] REYNARD, JEAN-SÉBASTIEN, STEFAN S, WULF M, JEAN-JACQUES F, PATRICIA B, MIROSLAV G, THIERRY W, FUCHS R. First report of grapevine pinot gris virus in german vineyards[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(12): 2545.
- [9] GAZEL M, KADRIYE Ç, EMINUR E, LOKMAN Ö. First Report of Grapevine Pinot gris virus in Grapevine in Turkey[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(3): 657.
- [10] 夏炎, 黄松, 武雪莉, 刘一琪, 王苗苗, 宋春晖, 白团辉, 宋尚伟, 庞宏光, 焦健, 郑先波. 基于宏病毒组测序技术的苹果病毒病鉴定与分析[J]. *园艺学报*, 2022, 49(07): 1415-1428.  
XIA Y, HUANG S, WU X L, LIU Y Q, WANG M M, SONG C H, BAI T G, SONG S W, PANG H G, JIAO J, ZHENG X B. Identification and Analysis of Apple Viral Diseases Based on Metavirion Sequencing Technology[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49(07): 1415-1428.
- [11] CANDRESSE T, FAURE C, MARAIS A. First report of grapevine pinot gris virus infecting grapevine in Pakistan[J]. *Plant Disease*, 2017, 101(11): 1958.
- [12] PLEŠKO IM, MARN MV, SELJAK G, ŽEŽLINA I. First report of grapevine pinot gris virus infecting grapevine in Slovenia[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(7): 1014.
- [13] BERTAZZON N, FILIPPIN L, FORTE V, ANGELINI E. Grapevine Pinot gris virus seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy[J]. *Archive of Virology*, 2016, 161(3): 711-714.
- [14] JO Y, CHOI H, CHO J K, YOON J Y, CHOI S K, CHO W K. In silico approach to reveal viral populations in grapevine cultivar Tannat using transcriptome data[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 15841.
- [15] GLASA M, PREDAJŇA L, KOMÍNEK P, NAGYOVÁ A, CANDRESSE T, OLMOS A. Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech

- grapevines[J]. *Archive of Virology*, 2014, 159(8): 2103-2107.
- [16] WU Q, HABIL N. The recent importation of Grapevine Pinot gris virus into Australia[J]. *Virus Genes*, 2017, 53(6): 935-938.
- [17] HILY J, NILS P, THIERRY C, EMMANUELLE V, MONIQUE B, LAURIANE R, AMANDINE V, ANNE-SOPHIE S, OLIVIER L. Datamining, genetic diversity analyses, and phylogeographic reconstructions redefine the worldwide evolutionary history of grapevine pinot gris virus and grapevine berry inner necrosis virus[J]. *Phytobiomes Journal*, 2020, 4(2): 165-177.
- [18] SALDARELLI P, GIAMPETRUZZI A, MORELLI M, MALOSSINI U, PIROLO C, BIANCHEDI P, GUALANDRI V. Genetic variability of grapevine pinot gris virus and its association with grapevine leaf mottling and deformation[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(4): 555-563.
- [19] GUALANDRI V, ELISA A, PIER LB, LAURA C, MATTEO B, UMBERTO M, PAOLA B, PASQUALE S, AZEDDINE SA. Identification of herbaceous hosts of the grapevine pinot gris virus (GPGV)[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2017, 147: 21-25.
- [20] MALAGNINI V, DE LILLO E, SALDARELLI P, BEBER R, DUSO C, RAIOLA A, ZANOTELLI L, VALENZANO D, GIAMPETRUZZI A, MORELLI M, RATTI C, CAUSIN R, GUALANDRI V. Transmission of grapevine Pinot gris virus by *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) to grapevine[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161: 2595-2599.
- [21] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [22] REYNARD JS, BRODARD J, ZUFFEREY V, RIENTH M, GUGERLI P, SCHUMPP O, BLOUIN AG. Nuances of responses to two sources of grapevine leafroll disease on pinot noir grown in the field for 17 years[J]. *Viruses*. 2022, 14(6): 1333.
- [23] MILJANIĆ V, JAKŠE J, KUNEJ U, RUSJAN D, ŠKVARČ A, ŠTAJNER N. Virome Status of Preclonal Candidates of Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) From the Slovenian Wine-Growing Region Primorska as Determined by High-Throughput Sequencing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 830866.
- [24] MORÁN F, OLMOS A, LOTOS L, PREDAJŇA L, KATIS N, GLASA M, MALIOGKA V, RUIZ-GARCÍA AB. Association between genetic variability and titre of Grapevine Pinot gris virus with disease symptoms[J]. *Plant Pathology*. 2017, 66(6): 949-959.
- [25] 范旭东, 张尊平, 任芳, 胡国君, 李正男, 董雅凤. 我国灰比诺葡萄病毒分离物检测及基因序列分析[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(04): 466-473.
- FAN XD, ZHANG ZP, REN F, HU G J, LI Z N, DONG Y F. Detection of grapevine pinot gris virus isolates in china and analysis of their gene sequences[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2018, 48(04): 466-473.
- [26] MURRAY GG, WANG F, HARRISON EM, PATERSON GK, MATHER AE, HARRIS SR, HOLMES MA, RAMBAUT A, WELCH JJ. The effect of genetic structure on molecular dating and tests for temporal signal[J]. *Methods in ecology and evolution*, 2016, 7(1): 80-89.
- [27] TARQUINI G, DE AMICIS F, MARTINI M, ERMACORA P, LOI N, MUSETTI R, BIANCHI GL, FIRRAO G. Analysis of new grapevine Pinot gris virus (GPGV) isolates from Northeast Italy provides clues to track the evolution of a newly emerging clade[J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(6): 1655-1660.
- [28] XIAO, HUOGEN, MEHDI S, WENDY M, MENG B Z. First report of grapevine pinot gris virus in commercial grapes in Canada[J]. *Plant Disease*, 2015, 100(5): 1030.
- [29] ABE J, NABESHIMA T. First report of grapevine pinot gris virus in wild grapevines (*Vitis coignetiae*) in

- Japan[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2021, 103(2): 725.
- [30] VALOUZI H, SHAHMOHAMMADI N, GOLNARAGHI A, MOOSAVI MR, OHSHIMA K. Genetic diversity and evolutionary analyses of potyviruses infecting narcissus in Iran[J]. *Journal of Plant Pathology*. 2022, 104(1): 237-250.
- [31] JONES D R. Plant viruses transmitted by thrips[J]. *European Journal of Plant Pathology*. 2005, 113(2): 119-157.