



甘薯羽状斑驳病毒 O 株系和 RC 株系中国分离物全基因组序列分析及其遗传特征

秦艳红, 王永江, 王爽, 乔奇, 田雨婷, 张德胜, 张振臣

(河南省农业科学院植物保护研究所/河南省农作物病虫害防治重点实验室/农业农村部华北南部作物有害生物综合治理重点实验室, 郑州 450002)

摘要: 【目的】对甘薯羽状斑驳病毒 (*Sweet potato feathery mottle virus*, SPFMV) O 株系中国分离物 (SPFMV-O-Ch1) 和 RC 株系中国分离物 (SPFMV-RC-Ch1) 的基因组全序列进行克隆, 明确 SPFMV-O-Ch1 和 SPFMV-RC-Ch1 的基因组结构特征及其遗传变异情况, 为研究甘薯羽状斑驳病毒的致病机制打下基础。【方法】根据 GenBank 中登录的 SPFMV 基因组全序列设计 2 对简并引物和 3 对特异性引物, 利用 RT-PCR 方法, 从感染 SPFMV 的甘薯叶片中扩增 SPFMV O 株系和 RC 株系中国分离物的基因组全长序列, 将目的片段分别克隆到 pMD19-T 载体上, 经序列测定、分析和拼接, 获得 SPFMV-O-Ch1 和 SPFMV-RC-Ch1 的全序列, 利用 DNAMAN 和 MEGA7 对 SPFMV 基因组全序列及不同编码区序列进行遗传变异和系统进化树分析, 利用 RDP 软件分析 SPFMV 基因组重组情况。【结果】经序列测定和拼接, 结果表明 SPFMV-O-Ch1 和 SPFMV-RC-Ch1 基因组分别包含 10 922 和 10 851 nt, 均包含一个开放阅读框, 分别由 10 557 和 10 482 nt 组成, 编码一个多聚蛋白, 分别由 3 518 和 3 493 个氨基酸残基组成。两个分离物均在 P1 蛋白内编码一个 P1N-PIPO 蛋白, 在 P3 蛋白内编码一个 P3N-PIPO 蛋白。基因组全序列核苷酸一致性分析表明, SPFMV-O-Ch1 与 SPFMV-RC-Ch1 的一致性为 87.3%, 与 GenBank 登录的其他分离物基因组全序列一致性为 86.0%—95.8%, 与 Ruk73 分离物的一致性最高, 为 95.8%, 与 11-1 分离物的一致性最低, 为 86.0%。SPFMV-RC-Ch1 与 GenBank 登录的其他分离物基因组全序列一致性为 85.9%—98.7%, 与 IS90 分离物的一致性最高, 为 98.7%, 与 Aus1-2B 分离物的一致性最低, 为 85.9%。基于多聚蛋白基因核苷酸序列的遗传进化树分析表明, SPFMV-O-Ch1 与 Ordinary、10-0 和 17-0 等 O 株系的分离物形成一个分支, SPFMV-RC-Ch1 与 S、IS90 和 CW137 等 RC 株系的分离物形成一个分支。重组分析结果表明, O-Ch1 分离物中发现 3 个重组事件, 分别发生在 7 731—9 710、135—10 012 和 4 825—6 948 nt, RC-Ch1 没有发现重组事件。【结论】我国的 SPFMV-O-Ch1 和 SPFMV-RC-Ch1 分离物的基因组结构与其他分离物相同, O-Ch1 与 O 株系分离物一致性较高, RC-Ch1 与 RC 株系分离物一致性较高, O-Ch1 分离物检测到 3 个重组事件, RC-Ch1 未发现重组事件。

关键词: 甘薯羽状斑驳病毒; 株系; 全基因组序列; 遗传变异; 重组分析

Complete Nucleotide Sequence Analysis and Genetic Characterization of the *Sweet potato feathery mottle virus* O and RC Strains Isolated from China

QIN YanHong, WANG YongJiang, WANG Shuang, QIAO Qi, TIAN YuTing,
ZHANG DeSheng, ZHANG ZhenChen

(Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences/Henan Key Laboratory of Crop Pest Control/
IPM Key Laboratory in Southern Part of North China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhengzhou 450002)

收稿日期: 2019-11-07; 接受日期: 2019-11-28

基金项目: 国家甘薯产业技术体系 (CARS-10-B13)、河南省自然科学基金 (162300410160)、河南省农业科学院自主创新基金 (2019ZC37)

联系方式: 秦艳红, E-mail: qinyanhong6040@163.com. 通信作者张振臣, E-mail: zhangzhenchen@126.com

Abstract: 【Objective】 The objective of this study is to clone the complete nucleotide sequence of Chinese isolate of *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) O and RC strains, elucidate the genomic structural characterization and variation of SPFMV-O-Ch1 and SPFMV-RC-Ch1, and to lay a foundation for the study of pathogenic mechanism of SPFMV. **【Method】** According to the SPFMV genome sequences available in GenBank database, 2 pairs of degenerate primers and 3 pairs of specific primers were designed, the whole genome of SPFMV O and RC strains isolated from China was amplified by RT-PCR from sweet potato leaves infection with SPFMV and subsequently cloned into vector pMD19-T and sequenced. The complete genome sequences of SPFMV-O-Ch1 and SPFMV-RC-Ch1 isolates were assembled by using DNAMAN. Genetic variation analyses of complete genomic sequences, polyproteins, and individual protein sequences were performed using DNAMAN. Neighbor-joining phylogenetic tree of SPFMV-O-Ch1 and SPFMV-RC-Ch1 isolates with other isolates was constructed using MEGA7.0 software. Recombination analyses were carried out using RDP software. **【Result】** The amplification and sequencing revealed that the complete nucleotide sequence of SPFMV-O-Ch1 and SPFMV-RC-Ch1 isolates was 10 992 nucleotides (nt) and 10 851 nt in length, respectively. The viral genome of SPFMV-O-Ch1 isolate contained a single open reading frame (ORF) of 10 557 nt encoding a polyprotein of 3 518 aa. SPFMV-RC-Ch1 isolate polyprotein consisted of 10 482 nt and encoded 3 493 aa. Two small ORFs, P1N-PISPO and P3N-PIPO were identified in the P1 and P3 proteins of these two isolates. Pairwise comparisons of the complete genome nucleotide sequence showed that O-Ch1 had 87.3% identity with RC-Ch1 isolate and shared 86.0%-95.8% sequence identity with other SPFMV isolates. It was most closely related to the isolate Ruk73 with 95.8% nt identity and lowest nt identity with 11-1 isolate (86.0%). RC-Ch1 and other SPFMV isolates shared 85.9%-98.7% sequence identity at the complete genome nucleotide sequence level. It had the highest nt identity with IS90 isolate (98.7%), and had lowest nt identity with Aus1-2B isolate (85.9%). Phylogenetic tree analysis based on polyprotein gene indicated that SPFMV-O-Ch1 formed a branch with the isolates of O strain containing Ordinary, 10-O and 17-O, and SPFMV-RC-Ch1 formed a branch with the isolates of RC strain containing S, IS90 and CW137. Recombination analysis showed that there were three potential significant recombination events occurred in 7 731-9 710, 135-10 012 and 4 825-6 948 nt of O-Ch1 isolate genome, respectively. No recombination event was detected in the complete genome of RC-Ch1 isolate. **【Conclusion】** The genomic organizations of SPFMV-O-Ch1 and SPFMV-RC-Ch1 isolates were same to other isolates. O-Ch1 isolate was closely related to the isolates of O strain and RC-Ch1 isolate was closely related to those isolates of RC strain. Three recombination events were detected in O-Ch1 isolate, but no recombination event was detected in RC-Ch1 isolate.

Key words: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV); strain; complete nucleotide sequence; genetic variation; recombination analysis

0 引言

【研究意义】 甘薯羽状斑驳病毒 (*Sweet potato feathery mottle virus*, SPFMV) 属于马铃薯 Y 病毒科 (*Potyviridae*) 马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 病毒, 是侵染甘薯的重要病毒之一, 在全世界甘薯产区和主要甘薯品种上均有发生^[1]。SPFMV 的寄主范围较窄, 仅侵染旋花科植物^[2-3], 其传播介体为蚜虫, 靠蚜虫以非持久方式进行传播^[4]。SPFMV 单独侵染甘薯时一般产生轻微花叶症状或无症状表现, 对甘薯产量影响较小^[5], 但其在田间常与甘薯褪绿矮化病毒 (*Sweet potato chlorotic stunt virus*, SPCSV) 混合侵染甘薯, 产生甘薯复合病毒病 (*sweet potato virus disease*, SPVD), 表现为植株严重矮化, 叶片畸形、花叶、褪绿、明脉等症状, SPFMV 的含量比单独侵染时增加 600 倍, 对甘薯造成严重危害^[5-6]。根据核苷酸序列及在寄主上的症状类型, SPFMV 可划分为 SPFMV 普通株系

(Ordinary, SPFMV-O)、褐裂株系 (Russet Crack, SPFMV-RC) 和东非株系 (East Africa, SPFMV-EA) 3 个株系^[1,6-7]。获得 SPFMV 中国主要株系类型的基因组全序列, 对该病毒的遗传进化及分子变异研究具有重要意义。【前人研究进展】1990 年, 李汝刚等^[8]利用血清学方法首次从我国北京、江苏、四川和山东等地的甘薯样品上检测到 SPFMV。目前, SPFMV 在我国发生比较普遍, 在南方、北方和长江中下游三大甘薯产区的多个省(直辖市)均有分布^[9-10]。QIN 等^[10-11]对 SPFMV 的 CP 基因进行了分子变异分析, 明确了我国 SPFMV 的株系类型, 目前我国甘薯上存在 O、RC 和 EA 株系, O 株系是我国的优势株系, 分布最为广泛, 其次是 RC 株系。1997 年, SAKAI 等^[12]利用 RT-PCR 方法从日本甘薯上克隆了 SPFMV RC 株系 S 分离物的基因组全序列, 对该分离物的基因组结构和编码蛋白进行了分析, SPFMV 与马铃薯 Y 病毒属其他成员的结构相似, 包含一个开放阅读框 (open

reading frame, ORF), 经切割加工产生 P1、HC-Pro、P3、6K1、CI、6K2、VPg、NIa-Pro、NIb 和 CP 10 个成熟蛋白, 是基因组最大的马铃薯 Y 病毒属成员。2009 年, KREUZE 等^[13]利用深度测序结合 RT-PCR 方法从秘鲁获得了 EA 株系 Piu3 分离物的基因组全序列。2010 年, YAMASAKI 等^[14]从日本获得了 O 株系的两个分离物 Ordinary 和 10-O 的基因组全序列, 并对 Ordinary 和 10-O 分离物及 RC 株系的代表性分离物 S 和 EA 株系的代表性分离物 EA-Piu3 等的基因组结构、序列相似性等进行了比较分析。随后, 韩国、西班牙、澳大利亚、东帝汶、美国、日本、巴西、南非、阿根廷、秘鲁、肯尼亚和乌干达等多个国家和地区的不同分离物基因组全序列陆续被报道^[15-18]。与其他马铃薯 Y 病毒属病毒一样, SPFMV 在 P3 内部通过移码策略编码一个 P3N-PIPO 蛋白。近年来的研究表明, SPFMV 等 4 种侵染甘薯的马铃薯 Y 病毒属病毒在 P1 蛋白内通过移码还编码一个具有基因沉默抑制子功能的 PIN-PISPO 蛋白^[16,19-20]。【本研究切入点】目前, SPFMV 在中国仅有部分序列报道, 尚未见关于 SPFMV-O 株系和 SPFMV-RC 株系中国分离物基因组全序列的报道。【拟解决的关键问题】从我国甘薯样品中克隆获得 SPFMV-O 和 SPFMV-RC 株系中国分离物全基因组序列, 将两个株系的中国分离物与 GenBank 中登录的其他国家分离物进行比较分析, 了解 SPFMV-O 和 SPFMV-RC 株系中国分离物的基因组结构及遗传进化特征。

1 材料与方法

试验于 2015—2016 年在河南省农业科学院植物保护研究所完成。

1.1 材料

1.1.1 植物材料 2015 年 4 月, 在河南省南阳市唐河县采集植株矮化、叶脉发黄、叶片皱缩等症状的甘薯病毒病样品 1 份, 将甘薯植株种植于 25—28℃ 防虫温室中, 16 h 光照、8 h 黑暗培养。同时采集甘薯茎蔓上部幼嫩叶片保存于 -70℃ 冰箱中备用。

1.1.2 主要试剂 Trizol 总 RNA 提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Reverse Transcriptase XL 反转录试剂盒、2×Premix LA Taq DNA 聚合酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、pMD19-T 载体和 DL5000 分子量标准购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 胶回收试剂盒和柱式质粒小量抽提试剂盒均购自美国 OMEGA 公司; 大肠杆菌 TG1 感受态细胞为笔者实验

室制备并保存于 -70℃ 冰箱; 其他生化常用试剂为进口或国产分析纯。

1.1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 中登录的 SPFMV-O 株系和 SPFMV-RC 株系不同分离物的基因组全序列(表 1)设计了 2 对简并引物和 3 对特异性引物, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 2。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 称取约 0.1 g 甘薯病样叶片, 在液氮中迅速研磨成粉末, 按照 Trizol 总 RNA 提取试剂盒说明书提取甘薯病样叶片总 RNA, 保存于 -70℃ 冰箱中备用。

1.2.2 RT-PCR 扩增基因组序列 第一链 cDNA 合成参照 Reverse Transcriptase XL 反转录试剂盒说明书进行, 以 OligodT 为引物, 以总 RNA 为模板合成 cDNA。反转录反应体系(10 μL): 5×AMV Buffer 2 μL、OligodT 引物 1 μL、dNTP mixture(10 mmol·L⁻¹) 1 μL、AMV 反转录酶 0.5 μL、RNA 酶抑制剂 0.5 μL、RNA 模板 5 μL; 42℃ 保温 60 min, 16℃ 保温 5 min。PCR 反应体系(50 μL): cDNA 5 μL、2×Premix LA Taq DNA 聚合酶 25 μL、上游和下游引物(10 μmol·L⁻¹) 各 1 μL、加 ddH₂O 补足至 50 μL。反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 根据目的条带大小不同, 72℃ 延伸 2—6 min, 循环 30 次后, 72℃ 延伸 10 min。RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将电泳鉴定正确的目的条带利用 OMEGA 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒对目的片段进行切胶纯化。

1.2.3 PCR 产物的克隆及测序 参照 TaKaRa 公司 pMD19-T 载体说明书, 将纯化的目的片段分别连接至 pMD19-T 载体, 转化至大肠杆菌 TG1 感受态细胞。经菌液 PCR 鉴定筛选到阳性克隆, 每个样品选取 3—5 个克隆进行测序, 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 由宝生物工程(大连)有限公司进行 5'和 3'端 RACE 试验。利用 BLAST 比对测序结果。

1.2.4 全基因组序列拼接及分析 利用 DNAMAN 软件对测序成功的基因片段进行序列拼接, 利用软件 MEGA 7.0 将 SPFMV-O-Ch1 和 SPFMV-RC-Ch1 分离物与 GenBank 上登录的其他分离物(表 1)进行多序列比对分析, 利用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树, 系统进化树中各分支置信度(Bootstrap)进行 1 000 次重复分析。基因重组分析

表 1 本研究所用分离物的名称、株系、来源和登录号信息

Table 1 Name, strain, origin and accession number of all isolates used in this study

序号 Number	分离物名称 Isolate name	株系 Strain	地理来源 Geographic origin	登录号 Accession number
1	RC-Ch1	RC	中国 China	KY296451
2	O-Ch1	O	中国 China	KY296450
3	CW137	RC	韩国 South Korea	KP115608
4	IS90	RC	韩国 South Korea	KP115610
5	GJ122	O	韩国 South Korea	KP115609
6	S	RC	日本 Japan	D86371
7	10-O	O	日本 Japan	AB439206
8	Ordinary	O	日本 Japan	AB465608
9	17-O	O	日本 Japan	AB509454
10	11-8	RC	美国 USA	MH782223
11	95-204R	RC	美国 USA	MH782224
12	11-1	RC	美国 USA	MH778648
13	TFSW-1J	RC	美国 USA	MH782227
14	95-2T	O	美国 USA	MH782225
15	Aus7D	RC	澳大利亚 Australia	MF572046
16	Aus12D	RC	澳大利亚 Australia	MF572049
17	Aus8-8CA	RC	澳大利亚 Australia	MG656422
18	Aus11D	RC	澳大利亚 Australia	MF572048
19	Aus15-21CA	RC	澳大利亚 Australia	MG656429
20	Aus11-13CA	RC	澳大利亚 Australia	MG656425
21	Aus6-3B	RC	澳大利亚 Australia	MG656420
22	Aus9-9B-2	RC	澳大利亚 Australia	MG656423
23	Aus10-10D	RC	澳大利亚 Australia	MG656424
24	Aus13-18B-1	RC	澳大利亚 Australia	MG656427
25	Aus4D	RC	澳大利亚 Australia	MF572047
26	Aus3D	RC	澳大利亚 Australia	MF572052
27	Aus7-7B	RC	澳大利亚 Australia	MG656421
28	Aus2D	RC	澳大利亚 Australia	MF572051
29	Aus4-3A	RC	澳大利亚 Australia	MG656418
30	Aus9D	RC	澳大利亚 Australia	MF572054
31	Aus14-20CA	RC	澳大利亚 Australia	MG656428
32	Aus12-16B	RC	澳大利亚 Australia	MG656426
33	Aus16-24A	RC	澳大利亚 Australia	MG656430
34	Aus3-2BC	RC	澳大利亚 Australia	MG656417
35	Aus17-11D	O	澳大利亚 Australia	MG656431
36	Aus5-3B	O	澳大利亚 Australia	MG656419
37	Aus13B	O	澳大利亚 Australia	MF572050
38	Aus1-2B	O	澳大利亚 Australia	MG656415
39	Aus2-2BC	O	澳大利亚 Australia	MG656416
40	UNB-01	RC	巴西 Brazil	MF185715
41	TM33C	O	东帝汶 East Timor	MF572055
42	TM64B	O	东帝汶 East Timor	MF572053
43	TM66B	O	东帝汶 East Timor	MF572056
44	Ruk73	O	乌干达 Uganda	KP729265
45	RC-Arg	RC	阿根廷 Argentina	KF386014
46	O-Arg	O	阿根廷 Argentina	KF386013
47	SRF109a	O	肯尼亚 Kenya	MH264535
48	ZA-O	O	南非 South Africa	KT069222
49	Piu3	EA	秘鲁 Peru	FJ155666
50	AM-MB2		西班牙 Spain	KU511268

表 2 引物序列及目的片段大小

Table 2 Primer sequences and expected size of the PCR product for each primer pair

扩增片段	引物名称	引物序列	目的片段大小
Amplified fragment	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Expected size (bp)
O-1/RC-1	1-F	AATAACACAACWCAAYACAACAYAASAAAAC	4784/4711
	4711-R	GTGATATCATCTAARCTYTGATG	
O-2	4689-F	CATCARAGYTTAGATGATATCAC	5692
	10380-R	CATATCGCGCAAGACTCATATC	
O-3	SPFMV-O-4160-F	AAGCGACAGAGCAACAGACTTATGTACTA	1124
	SPFMV-O-5284-R	GATATTGCGTTGTAAATTC AACCTCACGTC	
RC-2	SPFMV-RC-4260-F	AAGTTTGTGAATATGCTACTAGTCATCA	3814
	SPFMV-RC-8220-R	TACCTTCTAGGTCTGTGATCAGTTTAGAC	
RC-3	SPFMV-RC-7580-F	CCGATAGCTAGCGTCATATGCCATCTCG	3426
	SPFMV-11000-R	TTGGCTCGATCACGAACCAAAAAGGCT	

采用 Recombination Detection Program (RDP v5.3) 软件,利用 RDP5 软件中的 RDP、GENECONV、Chimaera、MaxChi、BootScan、SiScan 和 3Seq 7 种方法对序列进行重组分析,以 $P\leq 0.05$ 为标准,当 3 种以上方法同时检测到重组时,认为其为有意义的重组事件^[21-23]。

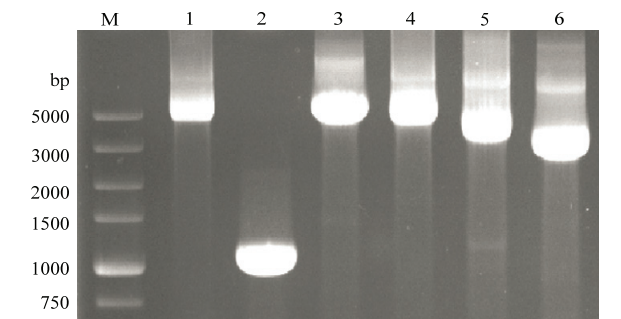
2 结果

2.1 RT-PCR 扩增

利用设计的 1-F/4711-R、4689-F/10380-R、SPFMV-O-4160-F/SPFMV-O-5284-R、SPFMV-RC-4260-F/SPFMV-RC-8220-R、SPFMV-RC-7580-F/SPFMV-11000-R 等引物扩增 SPFMV-O 株系中国分离物和 SPFMV-RC 株系中国分离物的不同基因组片段,扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析,结果表明获得了预期大小的目的条带,条带大小分别约为 4 790 bp(O-1)、1 270 bp(O-2)、5 700 bp(O-3)、4 710 bp(RC-1)、3 820 bp(RC-2)、3 420 bp(RC-3)(图 1)。

2.2 SPFMV-O 和 SPFMV-RC 株系中国分离物基因组全序列克隆及结构分析

重组质粒经 PCR 鉴定为阳性,对阳性克隆进行序列测定,通过 RACE 试验获得了两个分离物的 5'和 3'末端序列,确保引物及重叠区域碱基无变异,拼接后获得了 SPFMV-O 和 SPFMV-RC 株系中国分离物的全基因组序列,分别命名为 SPFMV-O-Ch1 (GenBank 登录号为 KY296450) 和 SPFMV-RC-Ch1 (GenBank 登录号为 KY296451)。SPFMV-O-Ch1 和 SPFMV-RC-Ch1 与已报道的其他分离物基因组结构特征相一致,3'末端均包含一个 poly (A)尾序,编码一个大的多聚蛋



M: DL5000 分子量标准 DL5000 marker; 1: O-1 扩增片段 Amplification of O-1; 2: O-2 扩增片段 Amplification of O-2; 3: O-3 扩增片段 Amplification of O-3; 4: RC-1 扩增片段 Amplification of RC-1; 5: RC-2 扩增片段 Amplification of RC-2; 6: RC-3 扩增片段 Amplification of RC-3

图 1 O-Ch1 和 RC-Ch1 分离物基因组不同片段 RT-PCR 产物
Fig. 1 RT-PCR products of different genomic segments of O-Ch1 and RC-Ch1 isolates

白,加工产生 10 个成熟蛋白,从 N 端到 C 端依次为 P1、HC-Pro、P3、6K1、CI、6K2、VPg、NIa-Pro、NIb 和 CP。除多聚蛋白外,还通过移码策略分别编码一个 P1N-PISPO 和 P3N-PIPO 蛋白。SPFMV-O-Ch1 基因组全长为 10 922 nt,5'和 3'非翻译区 (UTR) 分别含有 114 和 251 nt,多聚蛋白基因位于基因组的 115—10 671 处,由 10 557 nt 组成,多聚蛋白大小为 3 518 aa。SPFMV-RC-Ch1 基因组全长为 10 851 nt,5'和 3'非翻译区 (UTR) 分别含有 121 和 248 nt,多聚蛋白基因位于基因组的 122—10 603 处,由 10 482 nt 组成,多聚蛋白含 3 493 aa。SPFMV-O-Ch1 编码的 P1 蛋白含有 689 aa,SPFMV-RC-Ch1 编码的 P1 蛋白含有 664

aa, 两者大小不同。两个分离物编码的其他蛋白大小相同, 依次为 HC-Pro (458 aa)、P3 (352 aa)、6K1 (52 aa)、CI (643 aa)、6K2 (53 aa)、VPg (192 aa)、NIa-Pro (243 aa)、NIb (521 aa) 和 CP (315 aa)。

2.3 基因组序列一致性分析

利用 DNAMAN 软件对 SPFMV-O-Ch1、SPFMV-RC-Ch1 分离物以及 GenBank 中登录的其他 48 个分离物基因组序列进行比对分析(表 3), 结果表明 SPFMV-O-Ch1 与 SPFMV-RC-Ch1 之间的全序列核苷酸一致性较低, 为 87.3%, 多聚蛋白的核苷酸和氨基酸一致性分别为 88.2%和 94.0%, 属于不同的株系。SPFMV-O-Ch1 与 GenBank 中登录的 48 个分离物基因组全序列核苷酸一致性为 86.0%—95.8%, 与乌干达的 Ruk73 分离物一致性最高(95.8%), 与美国的 11-1 分离物一致性最低(86.0%)。多聚蛋白的比对结果表明, SPFMV-O-Ch1 与 48 个分离物核苷酸一致性范围为 87.0%—95.8%, 与 Ruk73 分离物一致性最高, 为 95.8%, 与 11-1 和澳大利亚 Aus3-2BC 分离物一致性最低, 为 87.0%; 氨基酸一致性范围为 92.1%—97.6%, 与阿根廷 O-Arg 分离物一致性最高, 为 97.6%, 与肯尼亚 SRF109a 分离物一致性最低, 为 92.1%。

SPFMV-RC-Ch1 与其他 48 个分离物全基因组核苷酸一致性为 85.9%—98.7%, 与韩国的 IS90 分离物一致性最高(98.7%), 与澳大利亚的 Aus1-2B 分离物一致性最低(85.9%)。多聚蛋白的比对结果表明, SPFMV-RC-Ch1 与韩国 IS90 分离物的核苷酸和氨基酸一致性最高, 分别为 98.8%和 99.3%, 与澳大利亚 Aus1-2B 分离物的核苷酸和氨基酸一致性最低, 分别为 87.0%和 92.8%。

在 SPFMV 编码的 10 个蛋白中, P1 蛋白变异最大, O-Ch1、RC-Ch1 分离物与 48 个分离物氨基酸序列一致性分别为 81.2%—96.4%和 80.6%—99.2%, 而且不同株系 P1 蛋白的大小不同, 属于 O 株系的 O-Ch1 分离物 P1 蛋白包含 689 aa, 属于 RC 株系的 RC-Ch1 分离物 P1 蛋白包含 664 aa, 而属于 EA 株系的 Piu3 分离物 P1 蛋白包含 724 aa。最保守的是 CI 蛋白, O-Ch1、RC-Ch1 分离物与 48 个分离物氨基酸序列一致性分别为 97.0%—99.7%和 97.5%—99.8%。

2.4 系统进化关系分析

基于 SPFMV 多聚蛋白基因核苷酸序列构建的系统进化树分析表明, O-Ch1 分离物与来自乌干达的 O 株系 Ruk73 分离物形成一个小分支, 亲缘关系最近, 与其他属于 O 株系的分离物在一个大分支上, 而与来

表 3 O-Ch1、RC-Ch1 与其他分离物核苷酸和氨基酸序列一致性

Table 3 Sequence identities between O-Ch1, RC-Ch1 and other isolates at nucleotide and amino acid levels

基因组区域 Genome region	O-Ch1 蛋白大小及与 48 个分离物比对 Protein size of O-Ch1 and comparison with 48 isolates			RC-Ch1 蛋白大小及与 48 个分离物比对 Protein size of RC-Ch1 and comparison with 48 isolates			O-Ch1 与 RC-Ch1 比对 Comparison of O-Ch1 and RC-Ch1
	蛋白大小 (氨基酸)	核苷酸 一致性	氨基酸 一致性	蛋白大小 (氨基酸)	核苷酸 一致性	氨基酸 一致性	核苷酸(氨基酸) 一致性
	Protein size (aa)	nt identity (%)	aa identity (%)	Protein size (aa)	nt identity (%)	aa identity (%)	nt (aa) identity (%)
全长 Complete sequence	-	86.0-95.8	-	-	85.9-98.7	-	87.3 (-)
多聚蛋白 Polyprotein	3518	87.0-95.8	92.1-97.6	3493	87.0-98.8	92.8-99.3	88.2 (94.0)
P1	689	83.4-97.8	81.2-96.4	664	82.8-99.0	80.6-99.2	85.4 (83.9)
HC	458	83.3-98.2	91.9-98.9	458	83.4-99.0	92.1-100.0	84.0 (93.2)
P3	352	93.2-98.5	95.5-98.6	352	92.8-99.3	94.3-99.4	93.8 (96.0)
6K1	52	92.9-100.0	92.3-100.0	52	91.7-98.7	94.2-100.0	94.2 (98.1)
CI	643	89.0-98.0	97.0-99.7	643	89.7-98.9	97.5-99.8	89.9 (98.0)
6K2	53	91.2-98.7	94.3-100.0	53	89.3-98.7	96.2-100.0	91.8 (98.1)
NIa-VPg	192	78.1-97.7	90.6-100.0	192	83.9-99.3	89.6-100.0	84.4 (97.4)
NIa-Pro	243	83.4-96.3	93.4-98.8	243	79.0-98.6	92.6-99.6	85.9 (96.3)
NIb	521	86.3-97.3	93.1-98.5	521	85.3-98.7	92.9-99.8	89.5 (96.2)
CP	315	76.7-96.6	94.0-99.7	315	79.9-98.9	95.6-99.7	92.5 (96.8)

--: 没有相应的氨基酸 No corresponding amino acid

自秘鲁的 EA 株系 Piu3 分离物亲缘关系也较近。RC-Ch1 分离物与来自韩国 RC 株系的 IS90 分离物聚类到同一个小分支上, 亲缘关系最近, 与属于 RC 株系其他 31 个分离物形成一个大分支。对变异最大的 P1 蛋白基因核苷酸序列构建进化树, 结果表明

O-Ch1 分离物与阿根廷的 O-Arg、日本的 Ordinary 及 17-O 等属于 O 株系的分离物形成一个小分支, 亲缘关系较近。RC-Ch1 分离物与 RC 株系的 IS90 分离物 (韩国) 聚类在同一个小分支上, 亲缘关系最近 (图 2)。

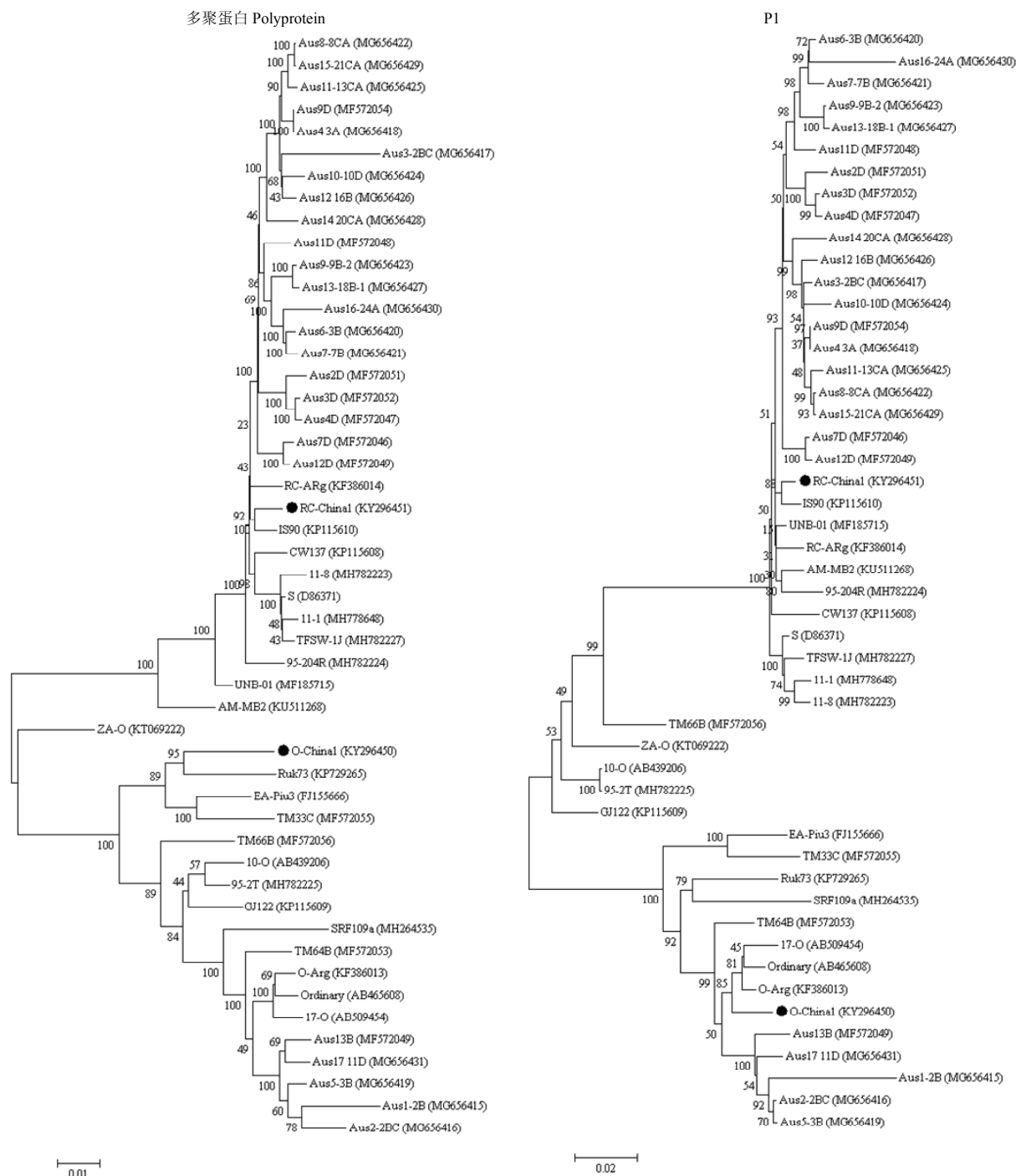


图 2 SPFMV 分离物多聚蛋白和 P1 蛋白核苷酸序列遗传进化分析

Fig. 2 Phylogenetic trees reconstructed using the nucleotide sequences of polyprotein and P1 protein of SPFMV isolates

比较保守的 CI 蛋白核苷酸序列进化树分析结果显示, O-Ch1 分离物与来自东帝汶的 O 株系 TM66B 分离物亲缘关系最近, RC-Ch1 分离物与 IS90 分离物亲缘关系最近。对 CP 蛋白核苷酸序列构建进化树,

结果与 P1 蛋白系统进化树相似, O-Ch1 与 O-Arg、10-O、Ordinary 及 17-O 等属于 O 株系的分离物形成一个小分支, 亲缘关系较近, RC-Ch1 与 IS90 分离物在同一个小分支上, 亲缘关系最近 (图 3)。

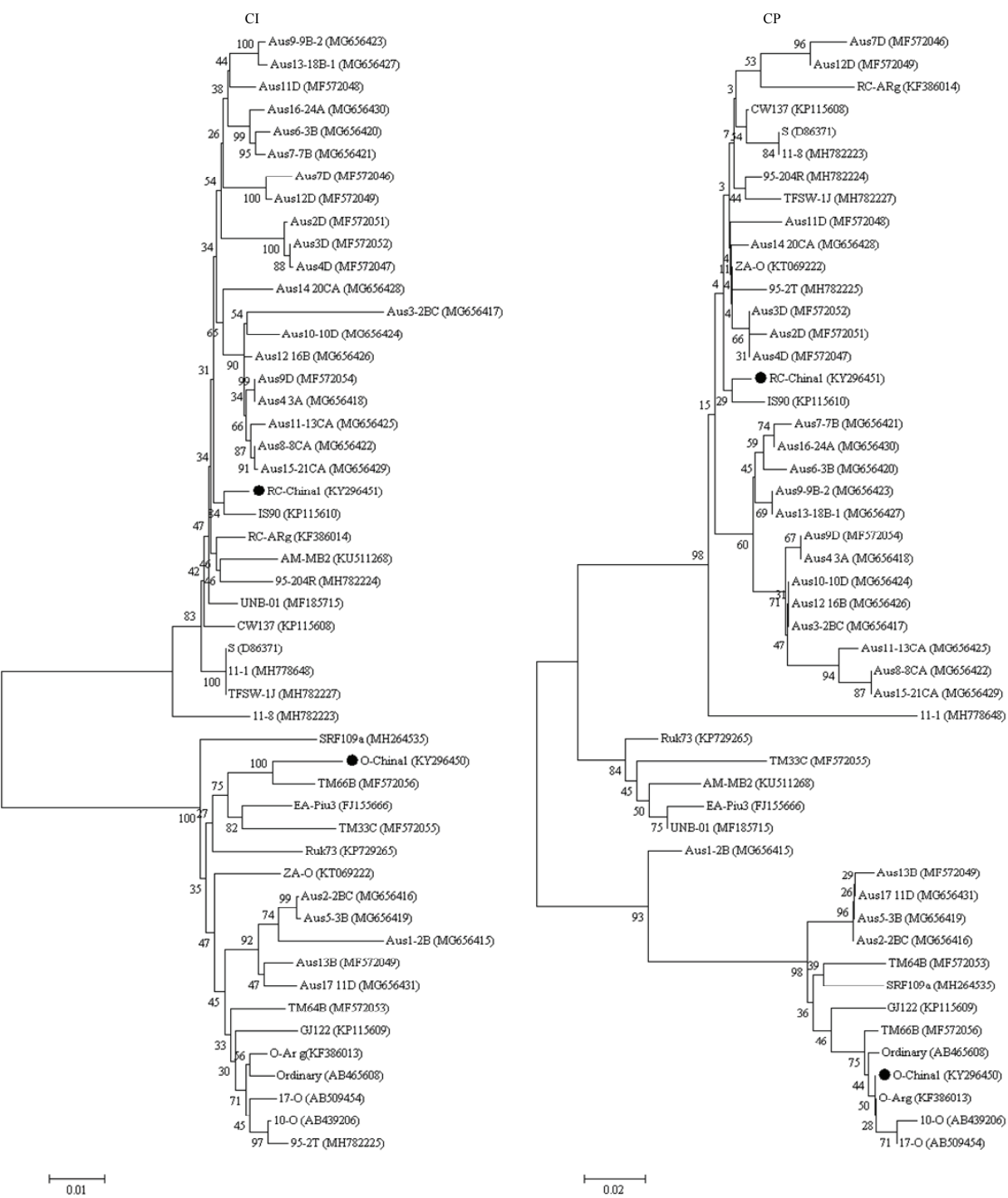


图 3 SPFMV 分离物 CI 蛋白和 CP 蛋白核苷酸序列遗传进化分析

Fig. 3 Phylogenetic trees reconstructed using the nucleotide sequences of CI and CP proteins of SPFMV isolates

综上所述，基于 O-Ch1 分离物基因组不同编码区域构建的系统进化树，亲缘关系最近的分离物不尽相同；而 RC-Ch1 分离物基因组不同编码区域构建的系统进化树分析结果相一致，均与来自韩国 RC 株系的 IS90 分离物亲缘关系最近。推测 O-Ch1 分离物可能发生了重组。

2.5 基因组全序列重组分析

为了明确我国的 O-Ch1、RC-Ch1 分离物是否存在潜在的重组事件，利用 RDP5 软件中的 7 种算法（ $P \leq 0.05$ 为显著），将 O-Ch1、RC-Ch1 与 GenBank 登录的其他 48 个分离物基因组全序列进行重组分析。结果表明（表 4），在 O-Ch1 分离物中检测到 3 个潜在的重组事件（其他分离物重组事件未列出）。重组

事件 1 发生在 7 731—9 710 nt，获得 7 种算法支持，最低 P 值为 1.095×10^{-44} (3Seq)，最高 P 值为 8.317×10^{-17} (GENECONV)，主要亲本为日本的 O 株系 Ordinary 分离物，次要亲本为东帝汶的 O 株系 TM33C 分离物。重组事件 2 发生在 135—10 012 nt，获得 4 种算法支持，最低 P 值为 1.561×10^{-56} (3Seq)，最高 P 值为 7.437×10^{-3} (Chimaera)，主要亲本为秘鲁的 EA 株系 Piu3 分离物，次要亲本为澳大利亚的 O 株系 Aus5-3B 分离物。重组事件 3 发生在 4 825—6 948 nt，获得 3 种算法支持，最低 P 值为 1.104×10^{-3} (MaxChi)，最高 P 值为 1.256×10^{-2} (3Seq)，主要亲本为澳大利亚的 O 株系 Aus13B 分离物，次要亲本为秘鲁的 EA 株系 Piu3 分离物。RC-Ch1 分离物未检测到重组事件发生。

表 4 O-Ch1 分离物的重组分析
Table 4 Recombination analysis of O-Ch1 isolate

序号 Number	主要亲本 Major parent	次要亲本 Minor parent	位置 Position (nt)	P 值 P-Value						
				RDP	GENECONV	BootScan	MaxChi	Chimaera	SiScan	3Seq
1	Ordinary- AB465608	TM33C- MF572055	7731- 9710	5.583×10^{-33}	8.317×10^{-17}	7.407×10^{-31}	3.758×10^{-20}	3.466×10^{-22}	2.430×10^{-25}	1.095×10^{-44}
2	EA-Piu3- FJ155666	Aus5-3B- MG656419	135- 10012	-	-	-	8.783×10^{-4}	7.437×10^{-3}	1.803×10^{-20}	1.561×10^{-56}
3	Aus13B- MF572050	EA-Piu3- FJ155666	4825- 6948	-	-	-	1.104×10^{-3}	1.071×10^{-2}	-	1.256×10^{-2}

3 讨论

SPFMV 是甘薯上分布最广泛的病毒之一，其可以与 SPCSV 发生协生作用，形成毁灭性病害 SPVD。自我国首次检测到 SPFMV 的发生以来，SPFMV 在我国逐渐扩散蔓延，成为甘薯上最重要的病毒之一。国内对 SPFMV 开展了多项研究，主要集中在病毒的分离纯化^[2,24-25]、生物学性状^[26]、抗体制备^[27]、检测技术^[28-38]、分布及遗传多样性^[9-11,39-40]等方面，而对 SPFMV 中国分离物的基因组序列测定还未开展相关研究。笔者研究室前期对 SPFMV 的发生、分布及分子变异等进行了研究，明确了我国 SPFMV 的主要株系类型为 O 和 RC，在此基础上，继续对我国 SPFMV O 株系和 RC 株系的基因组开展了相关研究，利用 RT-PCR 方法结合 RACE 技术获得了这两个主要株系的基因组全序列，获得的 O-Ch1 和 RC-Ch1 分离物是中国 SPFMV 完整基因组的首次报道。

对 O-Ch1 和 RC-Ch1 两个分离物的基因组结构及编码的主要蛋白分析发现，O 株系和 RC 株系编码的

P1 蛋白大小不同，不同株系（分离物）之间 P1 蛋白的氨基酸一致性最低，变异最大；而其余蛋白大小均相同，氨基酸一致性高于 P1 蛋白。YAMASAKI 等^[14]对 SPVC 和 SPFMV 的 O、RC 和 EA 3 个株系代表分离物的基因组进行了比较分析，表明不同株系之间 P1 蛋白的核苷酸和氨基酸一致性低于其余 9 个蛋白；KWAK 等^[15]对韩国 SPFMV 等 5 种侵染甘薯的马铃薯 Y 病毒属病毒基因组分析结果表明，无论是种间还是株系间，P1 蛋白的变异均最大。本研究结果与前人的报道^[14-15]相一致。

早期的研究表明，依据 CP 基因序列分析，SPFMV 可分为 C、O、RC 和 EA 4 个株系，C 株系与其他 3 个株系遗传关系较远，已将其作为新种重新命名为甘薯病毒 C (*Sweet potato virus C*, SPVC)，EA 株系仅在东非的一些地区存在，而 O 和 RC 株系不存在地理局限性^[41]。近年来，随着种质资源的扩散和种薯的调运，EA 株系现在已不仅局限于东非地区，我国已报道了 EA 株系的存在^[10]。本研究获得的 O-Ch1 和 RC-Ch1 两个分离物分别与 O 株系和 RC 株系的分离

物聚类成一个分支, O-Ch1 变异较大, 推测可能是由于 O 株系为我国的优势株系, 地理分布上最广泛, 更易随着频繁种质资源交换和调运, 而发生变异重组等。

SPFMV 经常发生种内重组, 不同株系之间重组很常见, 比如对 10-O 分离物的分析结果表明, 该分离物是由 O、RC 和 EA 3 个株系重组形成的, P1 蛋白是重组的热点区域^[20]。韩国的 GJ122 分离物与 10-O 分离物类似, 也发生了株系间重组, 在 P1 蛋白区域内存在重组位点, 是由 O 株系和 RC 株系重组产生的^[15]。本研究获得的 O-Ch1 分离物可能是由 O 株系和 EA 株系重组产生的, 重组位点发生在 N1a-N1b 基因、P1 基因、CI 基因和 CP 基因处。由于田间常常发生 SPFMV 不同株系混合侵染现象, 不同株系基因组之间容易发生重组变异, 从而增强病毒群体的适应能力, 种内重组可能是造成 SPFMV 株系分化较复杂的主要原因, 不同株系之间的重组还可能形成新的株系, 甚至产生更多的新种等, 分析病毒的重组并明确重组热点区域对了解病毒的进化至关重要。

4 结论

完成了甘薯羽状斑驳病毒 O 株系和 RC 株系中国分离物基因组全序列测定。基因组结构分析结果显示, 我国两个分离物与其他国家分离物的基因组结构相一致。两个分离物之间序列相似性较低, 变异较大, 分别属于两个不同的株系。遗传进化树分析结果表明, SPFMV-O-Ch1 与 O 株系的分离物形成一个分支, SPFMV-RC-Ch1 与 RC 株系的分离物形成一个分支, 基因组重组分析结果显示, O-Ch1 分离物检测到 3 个重组事件, RC-Ch1 未检测到重组事件。

References

- [1] RÄNNÄLI M, CZEKAJ V, JONES R A C, FLETCHER J D, DAVIS R I, MU L, VALKONEN J P T. Molecular characterization of *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) isolates from Easter Island, French Polynesia, New Zealand and southern Africa. *Plant Disease*, 2009, 93(9): 933-939.
- [2] 孟清, 张鹤龄, 张喜印, 杨永嘉, 邢继英, 宋伯符. 甘薯羽状斑驳病毒的分离与提纯. *植物病理学报*, 1994, 24(3): 227-232.
- [3] MENG Q, ZHANG H L, ZHANG X Y, YANG Y J, XING J Y, SONG B F. Isolation, purification of *Sweet potato feathery mottle virus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1994, 24(3): 227-232. (in Chinese)
- [4] MOYER J W, KENNEDY G G. Purification and properties of *Sweet potato feathery mottle virus*. *Phytopathology*, 1978, 68: 998-1004.
- [5] KARYEINA R F, KREUZE J F, GIBSON R W, VALKONEN J P T. Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology*, 2000, 269(1): 26-36.
- [6] UNTIVEROS M, FUENTES S, KREUZE J. Molecular variability of *Sweet potato feathery mottle virus* and other potyviruses infecting sweet potato in Peru. *Archive of Virology*, 2008, 153(3): 473-483.
- [7] TAIRO F, MUKASA S B, JONES R A C, KULLAYA A, RUBAIHAYO P R, VALKONEN J P T. Unravelling the genetic diversity of the three main viruses involved in sweet potato virus disease (SPVD), and its practical implications. *Molecular Plant Pathology*, 2005, 6(2): 199-211.
- [8] 李汝刚, 蔡少华, SALAZAR L F. 中国甘薯病毒的血清学检测. *植物病理学报*, 1990, 20(3): 189-194.
- [9] LI R G, CAI S H, SALAZAR L F. Serological detection of viruses on sweet potato in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1990, 20(3): 189-194. (in Chinese)
- [10] 乔奇, 张振臣, 张德胜, 秦艳红, 田雨婷, 王永江. 中国甘薯病毒种类的血清学和分子检测. *植物病理学报*, 2012, 42(1): 10-16.
- [11] QIAO Q, ZHANG Z C, ZHANG D S, QIN Y H, TIAN Y T, WANG Y J. Serological and molecular detection of viruses infecting sweet potato in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2012, 42(1): 10-16. (in Chinese)
- [12] QIN Y H, ZHANG Z C, QIAO Q, ZHANG D S, TIAN Y T, WANG Y J. Molecular variability of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) and five potyviruses infecting sweet potato in China. *Archive of Virology*, 2013, 158(2): 491-495.
- [13] 王晓华, 张振臣, 乔奇, 秦艳红, 张德胜, 田雨婷. 甘薯羽状斑驳病毒外壳蛋白基因的分子变异. *植物保护*, 2012, 38(2): 114-116.
- [14] WANG X H, ZHANG Z C, QIAO Q, QIN Y H, ZHANG D S, TIAN Y T. Molecular variation of *Sweet potato feathery mottle virus* coat protein gene. *Plant Protection*, 2012, 38(2): 114-116. (in Chinese)
- [15] SAKAI J, MORI M, MORISHITA A, TANAKA M, HANADA K, USUGI T, NISHIGUCHI M. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Sweet potato feathery mottle virus* (S strain) genomic RNA: The large coding region of the P1 gene. *Archive of Virology*, 1997, 142(8): 1553-1562.
- [16] KREUZE J F, PEREZ A, UNTIVEROS M, QUISPE D, FUENTES S, BARKER I, SIMON R. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses.

- Virology*, 2009, 388(1): 1-7.
- [14] YAMASAKI S, SAKAI J, FUJI S, KAMISOYAMA S, EMOTO K, OHSHIMA K, HANADA K. Comparisons among isolates of *Sweet potato feathery mottle virus* using complete genomic RNA sequences. *Archive of Virology*, 2010, 155(5): 795-800.
- [15] KWAK H R, KIM J, KIM M K, SEO J K, JUNG M N, KIM J S, LEE S C, CHOI H S. Molecular characterization of five potyviruses infecting Korean sweet potatoes based on analyses of complete genome sequences. *The Plant Pathology Journal*, 2015, 31(4): 388-401.
- [16] MINGOT A, VALLI A, RODAMILANS B, LEON D S, BAULCOMBE D C, GARCIA J A, LOPEZ-MOYA J J. The PIN-PISPO trans-frame gene of sweet potato feathery mottle potyvirus is produced during virus infection and functions as RNA silencing suppressor. *Journal of Virology*, 2016, 90(7): 3543-3557.
- [17] MAINA S, BARBETTI M J, EDWARDS O, DE ALMEIDA L, XIMENES A, JONES R A C. *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato virus C* from East Timorese and Australian sweetpotato: Biological and molecular properties, and biosecurity implications. *Plant Disease*, 2018, 102(3): 589-599.
- [18] MAINA S, BARBETTI M J, MARTIN D P, EDWARDS O R, JONES R A C. New isolates of *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato virus C*: Biological and molecular properties, and recombination analysis based on complete genomes. *Plant Disease*, 2018, 102(10): 1899-1914.
- [19] CLARK C A, DAVIS J A, ABAD J A, CUELLAR W J, FUENTES S, KREUZE J F, GIBSON R W, MUKASA S B, TUGUME A K, TAIRO F D, VALKONEN J P T. Sweetpotato viruses: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases. *Plant Disease*, 2012, 96(2): 168-185.
- [20] UNTIVEROS M, QUISPE D, KREUZE J. Analysis of complete genomic sequences of isolates of the *Sweet potato feathery mottle virus* strains C and EA: Molecular evidence for two distinct potyvirus species and two P1 protein domains. *Archive of Virology*, 2010, 155(12): 2059-2063.
- [21] LIU Q L, WANG Y J, ZHANG Z C, LV H, QIAO Q, QIN Y H, ZHANG D S, TIAN Y T, WANG S, LI J Q. Diversity of sweepoviruses infecting sweet potato in China. *Plant Disease*, 2017, 101(12): 2098-2103.
- [22] 张凤桐, 程林发, 耿超, 田延平, 原雪峰, 白艳菊, 李向东. 一株 PVY^{NTN-NW} 黑龙江马铃薯分离物的检测鉴定. *植物病理学报*, 2019, 49(4): 512-519.
- ZHANG F T, CHENG L F, GENG C, TIAN Y P, YUAN X F, BAI Y J, LI X D. Detection and identification of a *Potato virus Y* (PVY)^{NTN-NW} isolate from potato in Heilongjiang, China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019, 49(4): 512-519. (in Chinese)
- [23] 李科, 时洪伟, 荆陈沉, 孙现超, 周常勇, 青玲. ACLSV 山东苹果分离物基因组重组及 CP 序列多样性分析. *中国农业科学*, 2015, 48(14): 2857-2867.
- LI K, SHI H W, JING C C, SUN X C, ZHOU C Y, QING L. Analysis of genome recombination and CP sequence diversity of ACLSV apple isolate from Shandong. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(14): 2857-2867. (in Chinese)
- [24] 李汝刚, 朱笑梅, 薛爱红, 蔡少华, 王小凤. 甘薯病毒病的研究. I 甘薯羽状斑驳病毒的分离、鉴定. *植物病理学报*, 1992, 22(4): 319-322.
- LI R G, ZHU X M, XUE A H, CAI S H, WANG X F. Identification of Langfang isolate of *Sweet potato feathery mottle virus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1992, 22(4): 319-322. (in Chinese)
- [25] 朱作为, 薛启汉, 杨永嘉, 邢继英. 甘薯羽状斑驳病毒的分离和提纯. *江苏农业学报*, 1994, 10(1): 47-49.
- ZHU Z W, XUE Q H, YANG Y J, XING J Y. Isolation and purification of *Sweet potato feathery mottle virus*. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 1994, 10(1): 47-49. (in Chinese)
- [26] 杨崇良, 路兴波, 王升吉, 尚佑芬, 赵玖华, 李长松. 甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)生物学性状研究. *山东农业科学*, 2001, 33(1): 26-29.
- YANG C L, LU X B, WANG S J, SHANG Y F, ZHAO J H, LI C S. Biological characteristics research on *Sweet potato feathery mottle virus*. *Shandong Agricultural Sciences*, 2001, 33(1): 26-29. (in Chinese)
- [27] 张振臣, 李大伟, 陈健夫, 于嘉林, 乔奇, 靳秀兰. 甘薯羽状斑驳病毒外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达及特异抗血清的制备. *农业生物技术学报*, 2000, 8(2): 177-179.
- ZHANG Z C, LI D W, CHEN J F, YU J L, QIAO Q, JIN X L. Overexpression of *Sweet potato feathery mottle virus* coat protein in *E. coli* and preparation of its specific antiserum. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2000, 8(2): 177-179. (in Chinese)
- [28] 张盼, 兰新芝, 乔奇, 张德胜, 秦艳红, 田雨婷, 王爽, 张振臣. 甘薯病毒病害(SPVD)的多重 RT-PCR 检测方法及其应用. *植物保护*, 2013, 39(2): 86-90.
- ZHANG P, LAN X Z, QIAO Q, ZHANG D S, QIN Y H, TIAN Y T, WANG S, ZHANG Z C. Development and application of a multiplex RT-PCR detection method for sweet potato virus disease (SPVD). *Plant Protection*, 2013, 39(2): 86-90. (in Chinese)
- [29] 许冰清, 李华伟, 刘中华, 邱永祥, 罗文彬, 纪荣昌, 汤浩, 邱思鑫, 余华. 甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)ELISA 鉴定及 RT-PCR 检测方法的建立. *福建农业学报*, 2013, 28(12): 1267-1272.
- XU Y Q, LI H W, LIU Z H, QIU Y X, LUO W B, JI R C, TANG H,

- QIU S X, YU H. ELISA identification and development of RT-PCR detection of *Sweet potato feathery mottle virus*. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28(12): 1267-1272. (in Chinese)
- [30] 王丽, 王振东, 乔奇, 秦艳红, 张德胜, 田雨婷, 王爽, 张立军, 张振臣. 甘薯羽状斑驳病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. 沈阳农业大学学报, 2013, 44(2): 129-135.
- WANG L, WANG Z D, QIAO Q, QIN Y H, ZHANG D S, TIAN Y T, WANG S, ZHANG L J, ZHANG Z C. Development of real-time fluorescent quantitative PCR assay for detection of *Sweet potato feathery mottle virus*. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2013, 44(2): 129-135. (in Chinese)
- [31] 何海旺, 何虎翼, 谭冠宁, 刘义明, 何新民, 唐洲萍, 李丽淑, 王晖. 反向斑点杂交法快速检测甘薯羽状斑驳病毒和甘薯 G 病毒. 南方农业学报, 2014, 45(1): 43-48.
- HE H W, HE H Y, TAN G N, LIU Y M, HE X M, TANG Z P, LI L S, WANG H. Detection of SPFMV and SPVG by using reverse dot blot hybridization system. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45(1): 43-48. (in Chinese)
- [32] 许泳清, 李华伟, 邱思鑫, 刘中华, 邱永祥, 罗文彬, 纪荣昌, 汤浩, 余华. 甘薯羽状斑驳病毒和褪绿矮化病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立. 福建农业学报, 2014, 29(11): 1114-1117.
- XU Y Q, LI H W, QIU S X, LIU Z H, QIU Y X, LUO W B, JI R C, TANG H, YU H. Development of dutiplex RT-PCR for the detection of SPFMV and SPCSV in sweet potato. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 29(11): 1114-1117. (in Chinese)
- [33] 李华伟, 许泳清, 邱思鑫, 刘中华, 邱永祥, 罗文彬, 汤浩, 余华. 侵染甘薯的 SPCSV、SPVG、SPFMV 多重 RT-PCR 检测方法的建立及应用. 核农学报, 2015, 29(8): 1464-1470.
- LI H W, XU Y Q, QIU S X, LIU Z H, QIU Y X, LUO W B, TANG H, YU H. Establishment and application of a multiplex RT-PCR detection method for SPCSV, SPVG and SPFMV Infecting sweetpotato. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(8): 1464-1470. (in Chinese)
- [34] 卢会翔, 吕长文, 吴正丹, 罗凯, 尹旺, 杨航, 王季春, 张凯. 甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)和甘薯褪绿矮化病毒(SPCSV)荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立. 中国农业科学, 2016, 49(1): 90-102.
- LU H X, LÜ C W, WU Z D, LUO K, YIN W, YANG H, WANG J C, ZHANG K. Development of detection method for *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) and *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) through fluorescence quantitative RT-PCR. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(1): 90-102. (in Chinese)
- [35] 蒋素华, 程喜梅, 宋彩霞, 许申平, 梁芳, 崔波. 三种甘薯病毒多重 RT-PCR 检测技术的建立. 植物保护, 2017, 43(1): 126-130.
- JIANG S H, CHENG X M, SONG C X, XU S P, LIANG F, CUI B. Establishment of multiplex RT-PCR system for detection of three viruses in sweet potato. *Plant Protection*, 2017, 43(1): 126-130. (in Chinese)
- [36] 姜姗姗, 冯佳, 张眉, 王升吉, 辛志梅, 吴斌, 辛相启. 甘薯羽状斑驳病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立. 中国农业科学, 2018, 51(7): 1294-1302.
- JIANG S S, FENG J, ZHANG M, WANG S J, XIN Z M, WU B, XIN X Q. Development of RT-LAMP assay for rapid detection of *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV). *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(7): 1294-1302. (in Chinese)
- [37] 黄广学, 孟利前, 朱建晨, 张进, 李庞博, 肖海峻. 甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)和褪绿矮化病毒(SPCSV)的双重 RT-PCR 检测技术体系构建. 沈阳农业大学学报, 2018, 49(6): 724-729.
- HUANG G X, MENG L Q, ZHU J C, ZHANG J, LI P B, XIAO H J. Establishment of duplex RT-PCR detection method for SPFMV and SPCSV infecting sweet potato. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2018, 49(6): 724-729. (in Chinese)
- [38] 肖海峻, 孟利前, 朱建晨, 张进, 李庞博, 黄广学. 甘薯羽状斑驳病毒的 RT-PCR 检测技术构建. 分子植物育种, 2019, 17(13): 4302-4306.
- XIAO H J, MENG L Q, ZHU J C, ZHANG J, LI P B, HUANG G X. Construction of RT-PCR detection technique for *Sweet potato feathery mottle virus*. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(13): 4302-4306. (in Chinese)
- [39] 张振臣, 乔奇, 秦艳红, 张德胜, 田雨婷. 我国发现由甘薯褪绿矮化病毒和甘薯羽状斑驳病毒协生共侵染引起的甘薯病毒病害. 植物病理学报, 2012, 42(3): 328-333.
- ZHANG Z C, QIAO Q, QIN Y H, ZHANG D S, TIAN Y T. First evidence for occurrence of sweet potato virus disease (SPVD) caused by dual infection of *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato chlorotic stunt virus* in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2012, 42(3): 328-333. (in Chinese)
- [40] 张新新, 王旭芳, 林坚淳, 余竞成, 黄立飞, 董章勇. 甘薯毁灭性病毒病害(SPVD)的研究进展. 中国农学通报, 2019, 35(1): 118-126.
- ZHANG X X, WANG X F, LIN J C, YU J C, HUANG L F, DONG Z Y. Sweetpotato virus diseases (SPVD): Research progress. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(1): 118-126. (in Chinese)
- [41] KREUZE J F, KARYEIJIA R F, GIBSON R W, VALKONEN J P T. Comparisons of coat protein gene sequences show that Ease African isolates of *Sweet potato feathery mottle virus* form a genetically distinct group. *Archive of Virology*, 2000, 145(3): 567-574.

(责任编辑 岳梅)