

分类号: Q945.8  
学号: 20212006017

密级: 公开  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 桃 MuVA 全基因组 cDNA 克隆及侵染性研究

学位申请人	任彩霞
指导教师	郑银英 副教授
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研究方向	生物化学与分子生物学
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2024年5月

分类号: Q945.8  
学号: 20212006017

密级: 公开  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 桃 MuVA 全基因组 cDNA 克隆及侵染性研究

学位申请人	任彩霞
指导教师	郑银英 副教授
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研究方向	生物化学与分子生物学
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2024年5月

**Construction of genome-length cDNA of MuVA from peach  
and research of its infectivity**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Natural Science**

By

**Ren Cai-xia**

**(Biochemistry and Molecular Biology)**

Dissertation Supervisor: A/Prof.Zheng Yin-ying

May, 2024

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 任彩霞

时间： 2024 年 5 月 13 日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 任彩霞

时间： 2024 年 5 月 13 日

导师签名： 郑银荣

时间： 2024 年 5 月 13 日

## 摘要

目的：新疆桃种质资源丰富，品种多样，但由于其无性繁殖及来自不同生长区域的频繁交换和运输，使它们极易被多种病毒感染，造成严重的经济损失。所以明确我国新疆桃主产区病毒病的病原鉴定及其感染状况迫在眉睫，梅病毒 A (mume virus A, MuVA) 作为在 2018 年新发现的果树病毒之一，对其全基因组序列分析研究甚少，国内更是尚无报道。因此，本研究首先对石河子地区周边桃园中的样品进行 (类) 病毒检测，明确 MuVA 病毒在我国新疆的发生和分布。其次，针对 MuVA 开展其基因组序列分析与侵染性克隆等工作，以期了解其中国分离物的基因组特点和侵染性。

方法：使用 RT-PCR 方法对田间桃样品进行 (类) 病毒鉴定，又采用 3'/5' cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术来确定 MuVA pp 分离物的完整基因组序列。接着，运用 DNAMAN、NCBI BLASTn、MEGA11 等生物信息学软件分析 MuVA pp 分离物的基因组序列特征和系统进化关系。最后，利用 Gibson 组装策略构建该分离物的全长基因组 cDNA 克隆，并通过根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的方法对其侵染性进行接种测试。

结果：(1) 感染新疆石河子地区桃的主要 (类) 病毒有苹果褪绿叶斑病毒 (apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、樱桃绿环斑驳病毒 (cherry green ring mottle virus, CGRMV)、樱桃小果病毒-1 (little cherry virus 1, LChV-1)、亚洲李属病毒 2 (asian prunus virus 2, APV2)、MuVA、油桃茎痘相关病毒 (nectarine stem-pitting-associated virus, NSPaV)、桃相关黄症病毒属病毒 (peach associated luteovirus, PaLV)、李树皮坏死茎痘相关病毒 (plum bark necrosis stem pitting-associated virus, PBNSPaV)、桃病毒 T (peach virus T, PeVT)、李属坏死环斑病毒 (prunus necrotic ringspot virus, PNRSV)、桃褪绿叶斑病毒 (peach chlorotic leaf spot virus, PCLSV) 和桃潜隐花叶类病毒 (peach latent mosaic viroid, PLMVd)。其中，CGRMV、LChV-1、PBNSPaV、PaLV、PeVT 和 PCLSV 这 6 种病毒为新疆地区首次发现。(2) 病毒中检出率最高的是 PBNSPaV 和 CGRMV (74.6%)，MuVA 的检出率为 43.6%，复合感染率达 94.5%，其中，以 5 - 10 种复合感染类型为主。(3) MuVA pp 分离物基因组全长为 7647 nt，具有典型发样病毒属 (*Capillovirus*) 病毒成员的结构特征，即 5'非翻译区 (5' Untranslate region, 5' UTR)、3' UTR 和 2 个重叠的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。(4) 系统发育分析结果显示，MuVA pp 分离物与日本梅 pm 14 分离物的亲缘关系最近，且 MuVA 有宿主和地理特异性的趋势，李子分离物与梅分离物聚集成簇，桃分离物单独成支。(5) 成功构建了 MuVA pp 分离物的无 poly (A) 尾和有 poly (A) 尾的全基因组 cDNA 侵染性克隆，分别命名为 pCB301-MuVA 和 pCB301-MuVA-a。(6) 接种试验证实，pCB301-MuVA 能够系统性侵染苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*) (无明显症状)，侵染率为 16.7%，并能导致三生烟 (*Nicotiana tabacum* var. *Samsun NN*) 接种叶部位产生过敏性坏死，但不能引起系统侵染，也不能侵染昆诺藜 (*C. quinoa*)、心叶烟 (*N. glutinosa*)、西

方烟 (*N. occidentalis*)、本氏烟 (*N. benthamiana*)、番茄 (*Lycopersicon pimpinellifolium*)、黄瓜 (*Cucumis sativus*) 和南瓜 (*Cucurbita moschata*)，而 pCB301-MuVA-a 克隆对上述植物均无侵染活性。

结论：新疆石河子地区桃树已感染 11 种病毒和 1 种类病毒，复合感染严重。首次成功获得了蟠桃 MuVA pp 分离物的全基因组序列，并成功构建了 MuVA pp 分离物的全长 cDNA 克隆。通过农杆菌侵染、症状观察和 RT-PCR 检测，初步证实了 pCB301-MuVA 具有侵染活性，而 pCB301-MuVA-a 无侵染活性，这为进一步研究 MuVA 病毒的致病分子机理提供了参考依据。

**关键词：**桃；病毒/类病毒；梅病毒 A；序列分析；侵染性克隆

## Abstract

**Objective:** Xinjiang peach germplasm resources are rich and diverse, but due to their asexual reproduction and frequent exchange and transportation from different growing areas, they are easily infected by multiple viruses, resulting in serious economic losses. Therefore, it is urgent to determine the pathogen identification and infection status of viral diseases in the main peach producing areas of Xinjiang in China. mume virus A (MuVA), as one of the newly discovered fruit tree viruses in 2018, has rarely been studied on its whole genome sequence analysis, let alone reported in China. Therefore, in this study, samples from peach orchard around Shihezi area were detected (viroid) virus to determine the occurrence and distribution of MuVA in China. Secondly, genome sequence analysis and infectious cloning of MuVA were carried out in order to understand the genomic characteristics and infectivity of its Chinese isolates.

**Methods:** RT-PCR was used to identify the virus in the peach samples. The whole genome sequence of MuVA pp isolates was determined by 3'/5' rapid amplification of cDNA ends (5'/3' RACE). DNAMAN, NCBI BLASTn, MEGA11 and other bioinformatics software were used to analyze the genome sequence characteristics and phylogenetic relationships of MuVA pp isolates. A full-length cDNA clone of the isolate was constructed using Gibson assembly strategy, and its infectivity was tested by inoculation with *Agrobacterium tumefaciens*.

**Results:** (1) apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), cherry green ring mottle virus (CGRMV), little cherry virus 1 (LChV-1), asian prunus virus 2 (APV2), MuVA, nectarine stem-pitting-associated virus (NSPaV), peach associated luteovirus (PaLV), plum bark necrosis stem pitting-Associated virus (PBNSPaV), peach Virus T (PeVT), prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), peach chlorotic leaf spot virus (PCLSV) and peach latent mosaic viroid (PLMVd) were the main viruses that infected peaches in Shihezi, Xinjiang. Among them, CGRMV, LChV-1, PBNSPaV, PaLV, PeVT and PCLSV were found for the first time in Xinjiang. (2) PBNSPaV and CGRMV had the highest detection rate (74.6%), MuVA was 43.6%, and the combined infection rate was 94.5%, among which 5-10 types of combined infection were the main ones. (3) The total genome length of the MuVA pp isolate is 7647 nt, which has the structural characteristics of typical *Capillovirus* members. It consists of a 5' Untranslate region (5' UTR), 3' UTR, and two overlapping Open reading frames (ORF). (4) Phylogenetic analysis showed that the MuVA pp isolate was most closely related to the Japanese mume pm 14 isolate, and MuVA showed a trend of host and geographic specificity. The plum and mume isolates cluster together, and the peach isolates form individual branches. (5) Whole genome cDNA infectious clones of MuVA pp isolate without poly (A) tail and with poly (A) tail were successfully constructed, named pCB301-MuVA and pCB301-MuVA-a, respectively. (6) Inoculation test confirmed that

pCB301-MuVA could systematically infect *Chenopodium amaranticolor* (without obvious symptoms), the infection rate was 16.7%. It can cause anaphylactic necrosis in the inoculated leaves of *Nicotiana tabacum* var. *Samsun NN*, but can not cause systemic infection. It also cannot infect *C. quinoa*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. benthamiana*, or *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Cucumis sativus* and *Cucurbita moschata*, while pCB301-MuVA-a clones had no infection activity against these plants.

Conclusion: Peach has been infected with 11 kinds of viruses and 1 viroid in Shihezi area of Xinjiang, and the complex infection is serious. The complete genome sequence of MuVA pp isolate of peach host was obtained for the first time, and the full-length cDNA clone of MuVA pp isolate was successfully constructed. Through *Agrobacterium tumefaciens* infection, symptom observation and RT-PCR detection, it was preliminarily confirmed that pCB301-MuVA has infection activity, while pCB301-MuVA-a has no infection activity, which has potential value for studying the pathogenic molecular mechanism of MuVA virus.

**Key words:** Peach; Virus/Viroid; Mume virus A; Sequence analysis; Infectious cloning

# 目录

摘要.....	I
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
目录.....	V
中英文缩略词对照表.....	IX
第一章 文献综述.....	1
引言.....	1
1.1 桃病毒病研究进展.....	2
1.1.1 桃病毒种类及危害.....	2
1.1.2 新发现病毒概况.....	2
1.2 乙型线性病毒科 ( <i>Betaflexiviridae</i> ) 概况.....	3
1.2.1 发样病毒属 ( <i>Capillovirus</i> ) 研究背景.....	3
1.2.2 MuVA 的研究进展.....	4
1.3 果树 RNA 病毒侵染性克隆的研究进展.....	4
1.3.1 侵染性克隆的构建策略.....	4
1.3.2 果树病毒基因功能研究.....	5
1.3.3 果树植物病毒全长 cDNA 克隆构建的难点.....	6
1.3.4 影响植物病毒 cDNA 克隆侵染性的因素.....	6
1.3.5 植物侵染性克隆的应用.....	7
1.4 研究目的与意义.....	8
第二章 田间桃病毒检测.....	10
2.1 实验材料.....	10
2.1.1 植物材料.....	10
2.1.2 菌株.....	10
2.1.3 载体.....	11
2.1.4 主要试剂.....	11
2.1.5 实验仪器.....	11
2.2 实验方法.....	11
2.2.1 引物设计与合成.....	11

2.2.2	总 RNA 提取 .....	11
2.2.3	RT-PCR 检测 .....	11
2.2.4	PCR 产物回收纯化 .....	12
2.2.5	大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞的制备 .....	12
2.2.6	PCR 产物连接、转化 .....	12
2.2.7	重组质粒的菌落 PCR 阳性筛选 .....	13
2.2.8	序列测定及分析 .....	13
2.3	结果与分析 .....	13
2.3.1	石河子地区桃田间病毒病症状 .....	13
2.3.2	总 RNA 的提取 .....	13
2.3.3	RT-PCR 鉴定桃病毒种类 .....	14
2.3.4	样品带毒检出率及复合侵染状况 .....	16
2.3.5	Sanger 测序结果分析 .....	18
2.4	讨论与结论 .....	19
第三章	MuVA 桃分离物全基因组序列分析 .....	21
3.1	实验材料 .....	21
3.1.1	植物材料 .....	21
3.1.2	主要试剂 .....	21
3.1.3	实验仪器 .....	21
3.2	实验方法 .....	21
3.2.1	植物总 RNA 的提取 .....	21
3.2.2	植物总 RNA 加 poly (A) .....	21
3.2.3	MuVA 3'/5'端序列扩增 .....	22
3.2.4	胶回收、TA 克隆、测序 .....	22
3.2.5	基因组结构分析 .....	22
3.2.6	CP 和 MP 的生物信息学分析 .....	22
3.2.7	序列一致性及系统发育分析 .....	23
3.2.8	重组分析 .....	24
3.3	结果与分析 .....	24
3.3.1	蟠桃 MuVA 基因组结构 .....	24
3.3.2	MuVA pp 5' UTR 的二级结构预测 .....	25
3.3.3	MuVA pp 分离物 CP 的生物信息学分析 .....	26
3.3.4	MuVA pp 分离物 MP 的生物信息学分析 .....	27
3.3.5	序列一致性及 <i>Capillovirus</i> 属保守基序分析 .....	28

3.3.6 MuVA pp 分离物的系统发育分析 .....	29
3.3.7 重组分析 .....	31
3.4 讨论与结论 .....	32
第四章 MuVA 全基因组 cDNA 侵染性克隆构建 .....	34
4.1 实验材料 .....	34
4.1.1 植物材料 .....	34
4.1.2 菌株 .....	34
4.1.3 载体 .....	34
4.1.4 主要试剂 .....	34
4.1.5 实验仪器 .....	35
4.2 实验方法 .....	35
4.2.1 引物设计 .....	35
4.2.2 MuVA 全长 cDNA 的扩增 .....	35
4.2.3 DNA 的回收及纯化 .....	36
4.2.4 目的片段与 T 载体连接 .....	36
4.2.5 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞的制备 .....	36
4.2.6 热激转化 .....	36
4.2.7 碱裂解法提取质粒 DNA .....	36
4.2.8 单酶切鉴定及测序 .....	37
4.2.9 MuVA pp cDNA 侵染性克隆构建 .....	37
4.3 结果与分析 .....	42
4.3.1 MuVA 全长 cDNA 分段扩增 .....	42
4.3.2 MuVA pp 分离物侵染性克隆载体的构建 .....	42
4.3.3 酶切鉴定 .....	43
4.3.4 MuVA 侵染性克隆在草本寄主上侵染活性检测 .....	44
4.3.5 pCB301-MuVA 侵染性克隆在桃实生苗上的致病性鉴定 .....	49
4.4 讨论与结论 .....	49
第五章 全文结论与展望 .....	52
5.1 全文总结 .....	52
5.2 创新点 .....	53
5.3 展望 .....	53
参考文献 .....	54
附录 A .....	65
附录 B .....	67

附录 C .....	69
附录 D .....	72
致谢 .....	74
作者简介 .....	75

## 中英文缩略词对照表

缩略词	英文全名	中文名
ACLSV	Apple chlorotic leaf spot virus	苹果褪绿叶斑病毒
APV2	Asian prunus virus 2	亚洲李属病毒 2
CGRMV	Cherry green ring mottle virus	樱桃绿环斑驳病毒
LChV-1	Little cherry virus 1	樱桃小果病毒-1
MuVA	Mume virus A	梅病毒 A
NSPaV	Nectarine stem-pitting-associated virus	油桃茎痘相关病毒
PaLV	Peach associated luteovirus	桃相关黄症病毒属病毒
PBNPaV	Plum bark necrosis stem pitting-associated virus	李树皮坏死茎痘相关病毒
PeVT	Peach virus T	桃病毒 T
PNRSV	Prunus necrotic ringspot virus	李属坏死环斑病毒
PCLSV	Peach chlorotic leaf spot virus	桃褪绿叶斑病毒
PLMVd	Peach latent mosaic viroid	桃潜隐花叶类病毒
bp	Base pair	碱基对
nt	Nucleotide	核苷酸
ORF	Open reading frame	开放阅读框
CP	Coat protein	外壳蛋白
MP	Movement protein	运动蛋白
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶
kDa	Kilodalton	千道尔顿
NJ	Neighbor-joining	邻接法
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Reverse transcription-PCR	反转录 PCR
NCBI	National Center for Biotechnology Information	生物技术信息中心
Kan	Kanamycin	卡那霉素
+ssRNA	Positive-sense single-stranded RNA	正义单链 RNA 病毒
5'/3' UTR	5'/3' Untranslate region	5'/3'非翻译区
ICs	Infectious cDNA clones	感染性 cDNA 克隆

## 第一章 文献综述

### 引言

桃 (*Prunus persica* L.) 属于一种温带落叶、可食用、结核果的经济作物<sup>[1]</sup>, 是最具遗传特征的物种之一, 被称作蔷薇科 (*Rosaceae*) 的模式植物<sup>[2]</sup>, 具备一些分子和商业优势, 如自交亲和性、幼年期短和基因组小 (224.6Mb) <sup>[3]</sup>。桃被列为世界上第六大最重要的果树作物, 起源和演化于中国西南地区<sup>[4]</sup>, 经过 4000 多年的栽培演化<sup>[5]</sup>, 桃已广泛分布于 80 多个国家和地区<sup>[6]</sup>, 是中国、意大利、西班牙、美国和希腊这五个主要生产国的商业水果作物<sup>[7]</sup>, 说明桃在经济发展和营养价值中占有重要地位。

桃是我国种植最广泛的果树之一, 目前, 已在 29 个省市自治区有桃的产业化栽培<sup>[4]</sup>。在 2019 年, 我国桃产量 1500 多万吨<sup>[7]</sup>, 居世界首位。据研究评估, 全世界可食用桃品种高达 5000 种以上, 而我国的栽种品种就有 1000 多种<sup>[8]</sup>。所以形成了丰富的品种类型和栽培资源。其中新疆是我国西北高旱桃区之一, 主要种植“土桃”和蟠桃, 蟠桃主要分布于石河子、乌鲁木齐等北疆地区<sup>[9]</sup>。近年来, 桃的栽培面积和总产量均快速增长, 新疆桃树种植面积在 2017 年达  $1.57 \times 10^4 \text{ hm}^2$ , 与 2008 年相较, 扩大了 0.34 倍<sup>[10]</sup>。年产量超过 5000 t<sup>[11]</sup>, 已成为当地农民增收的主要来源。

桃树由于寿命长, 加上无性繁殖, 以及来自不同生长区域的频繁交换和运输, 使它们容易被一种或多种病毒病原体感染, 这些病毒性疾病引起的生物胁迫是导致桃果实数量降低的最主要原因。桃病毒的感染会引起桃树叶片发黄、马赛克图案、斑驳、皱缩等症状<sup>[12]</sup>, 且症状会随树体年龄、病毒株系、气候条件等的变化而变化, 结果将导致树体逐渐衰退、果实畸形、斑点变色、繁殖材料的生根能力减弱, 成为影响桃树生长和果实质量的关键因素<sup>[13]</sup>。所以调查感染桃的病毒种类和分布情况可用于更新新疆地区核果行业病毒和类病毒的疾病状况。

梅病毒 A (mume virus A, MuVA) 是近两年新发现的桃病毒之一, 前期的研究工作只针对于发现此病毒, 到目前为止, NCBI 中仅有两条 MuVA 近全长序列, 分别是日本 MuVA pm14 分离物和中国 MuVA pp 分离物, 并且对 MuVA 全基因组序列的遗传多样性分析研究甚少, 国内更是尚无报道。因此, 针对 MuVA 开展其基因组序列分析与侵染性克隆等工作, 以期了解其中国分离物的基因组特点和侵染性。研究结果不仅可以扩展我国对桃树病毒种类和病毒分类地位的认识, 而且有利于进一步明确 MuVA 与宿主关系的理解, 为桃树病毒病的研究提供新的研究思路和预防策略。

## 1.1 桃病毒病研究进展

### 1.1.1 桃病毒种类及危害

病毒性疾病对核果行业的发展构成严重威胁, 在过去 30 年里, 全球范围内由于病毒性疾病造成的作物损害总成本超过 100 亿美元<sup>[14]</sup>。据报道, 国内外已鉴定的可侵染桃的病毒及类病毒有 45 种 (见附录 A), 分别属于 11 个科 19 个属。先前的报告表明, 感染桃的(类)病毒中最常见的有苹果褪绿叶斑病毒 (apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV), 在桃树上呈潜伏或导致深绿色凹陷斑及叶片和果实的形变, 可导致产量下降 30% - 40%<sup>[15]</sup>; 杏假褪绿叶斑病毒 (apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus, APCLSV) 主要引起枝条和茎干开裂、花叶果实凹陷、叶脉黄化等症状; 李属坏死环斑病毒 (prunus necrotic ringspot virus, PNRSV) 会导致树木生长减少 12% - 17%, 产量下降 5% - 70%<sup>[16]</sup>; 李矮缩病毒 (prune dwarf virus, PDV) 会导致桃树发育迟缓<sup>[17]</sup>; 杏潜隐病毒 (apricot latent virus, ApLV) 会导致桃小行星斑点病<sup>[18]</sup>; 李树皮坏死与茎纹孔伴随病毒 (plum bark necrosis stem pitting-associated virus, PBNSPaV) 与桃树皮坏死和茎秆凹陷病有关<sup>[19,20]</sup>, 樱桃绿环斑驳病毒 (cherry green ring mottle virus, CGRMV) 在世界各地广泛分布, 在桃树上常表现为潜隐性症状; 常见的还有李痘病毒 (plum pox virus, PPV)<sup>[21]</sup>, 是十大最具破坏性的植物病毒之一。以及对桃树极为敏感的两种类病毒: 桃潜隐花叶类病毒 (peach latent mosaic viroid, PLMVd) 和啤酒花矮化类病毒 (hop stunt viroid, HSVd)<sup>[22,23]</sup>, 虽然大多数感染了 HSVd 和 PLMVd 的桃树是无症状的, 但一些 PLMVd 分离株会引起严重的症状, 如桃白化病、果实变色、茎凹陷和树木过早老化<sup>[24,25]</sup>。

中国是一个桃病毒病发生较严重的国家<sup>[26]</sup>, 已鉴定了 23 种桃病毒, 包括 ACLSV、APCLSV、PNRSV、PPV、PDV、CGRMV、PBNSPaV、PLMVd、HSVd<sup>[27]</sup>、亚洲李属病毒 1 (asian prunus virus 1, APV1)、亚洲李属病毒 2 (asian prunus virus 2, APV2)、桃病毒 D (peach virus D, PeVD)<sup>[28]</sup>、亚洲李属病毒 3 (asian prunus virus 3, APV3)、桃病毒 1-4 (peach virus 1-4, PeV1-4)<sup>[29]</sup>、樱桃坏死锈斑病毒 (cherry necrotic rusty mottle virus, CNRMV)<sup>[30]</sup>、油桃茎痘相关病毒 (nectarine stem-pitting associated virus, NSPaV)<sup>[31]</sup>、桃叶痘点相关病毒 (peach leaf pitting-associated virus, PLPaV)<sup>[32]</sup>、桃黄症相关病毒 (peach associated luteovirus, PaLV)<sup>[33]</sup>、桃褪绿叶斑病毒 (peach chlorotic leaf spot virus, PCLSV)<sup>[34]</sup>、MuVA<sup>[35]</sup>。其他病毒在我国的感染情况尚待研究。

### 1.1.2 新发现病毒概况

由于缺乏有效的植物保护方法针对这些病原体的侵染, 果树病毒病害的问题日益加剧, 预防病原体的侵染变得尤为重要。迄今为止, 对感染植物的病毒和类病毒的鉴定都

依赖于收集显示病毒疾病症状的样本，然后使用 RT-PCR 或血清学方法直接进行检测。然而，这种方法只能识别已知的病毒和类病毒，而不能识别新的病毒病原体<sup>[36]</sup>。随着分子和诊断技术的重大进步，高通量测序技术（High-throughput sequencing, HTS）的出现使我们能够表征新的和正在出现的病原体以及已知病原体的新菌株。因此，许多新型果树病毒被发现<sup>[37,38]</sup>。近几年来，已有 20 多种核果类果树新病毒通过高通量测序技术被发现<sup>[39]</sup>。例如，油桃病毒 M（nectarine virus M, NeVM），桃子病毒 T（peach virus T, PeVT），桃子病毒 D（peach virus D, PeVD），桃子病毒 M（peach virus M, PeVM）和桃叶痘点相关病毒（peach leaf pitting-associated virus, PLPaV）<sup>[40-43]</sup>，MuVA<sup>[44]</sup>。除此之外，利用高通量测序技术首次鉴定出一种新的负义单链（ss）RNA 病毒，并将其命名为桃病毒 1（peach virus 1, PeV1）<sup>[45]</sup>。

## 1.2 乙型线性病毒科（*Betaflexiviridae*）概况

乙型线性病毒科（*Betaflexiviridae*）成员具有 6.5 - 9.5 Kb 的正义单链多聚腺苷酸化 RNA 基因组，它们已在许多草本和木本植物中被发现，其无包膜的弯曲丝状病毒粒子直径通常为 12 - 13 nm，长度为 600 - 1000 nm，甚至更长，具体取决于属和种<sup>[46]</sup>。根据属的不同，基因组包含三到六个开放阅读框（open reading frame, ORF）不等，科内成员均在 5'端有一个编码复制相关蛋白的基因，并且该基因始终具有最大的 ORF，其具有病毒甲基转移酶（methyltransferase, Met）、2OG-Fe（II）加氧酶超家族（2OG-FeII-Oxy-2-domain）、病毒 RNA 解旋酶（helicase, Hel）和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase, RdRp）等保守结构域<sup>[47]</sup>。其余较小的 ORF 编码参与细胞运动的蛋白质，即三基因亚科（*Trivirinae*）中 30K 超家族的单个运动蛋白（movement protein, MP）或五基因亚科（*Quinvirinae*）中的三基因连锁模块（Triple gene blocks, TGB）以及外壳蛋白（coat protein, CP）。在 *Betaflexiviridae* 家族的一些成员中，CP 基因后跟着一个编码假定核酸结合蛋白的基因<sup>[48]</sup>。该科是基于复制蛋白的系统发育分析和基因组结构的共同特征而建立<sup>[49,50]</sup>。目前 *Betaflexiviridae* 共有 108 种病毒，属于 13 个属<sup>[51]</sup>：发样病毒属（*Capillovirus*）、纤毛病毒属（*Trichovirus*）、西瓜病毒属（*Wamavirus*）、美洲茶蔗子 A 病毒属（*Ravavirus*）、簇叶兰 A 病毒属（*Divavirus*）、葡萄病毒属（*Vitivirus*）、柑橘病毒属（*Citriovirus*）、弦状病毒属（*Chordovirus*）、李病毒属（*Prunovirus*）、马铃薯 T 病毒属（*Tepovirus*）、香石竹潜隐病毒属（*Carlavirus*）、锈病毒属（*Robigovirus*）、凹陷病毒属（*Foveavirus*）。

### 1.2.1 发样病毒属（*Capillovirus*）研究背景

发样病毒属（*Capillovirus*）属于三基因亚科（*Trivirinae*），包括苹果茎沟病毒（apple