

张雪娇,王利平,赵振军,等. 来源于西洋梨的苹果茎沟病毒分离物基因组分子特性研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):43-47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.010

来源于西洋梨的苹果茎沟病毒分离物 基因组分子特性研究

张雪娇¹, 王利平², 赵振军¹, 郑银英¹, 陈 婕², 崔百明¹

(1. 石河子大学, 新疆石河子 832003; 2. 华中农业大学湖北省作物病害监测与安全控制重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要:为了获得来源于西洋梨红贝雷沙寄主潜带苹果茎沟病毒(ASGV)分离物的基因组全长序列,并明确其分子特性,采用 RT-PCR、RACE 末端克隆及生物信息学方法,对 ASGV 分离物基因组全长进行序列测定,并对其序列特点进行分析。结果发现,来源于西洋梨的 ASGV-HB 分离物的基因组全长序列为 6 496 nt (GenBank 登录号: KU605672),含有 2 个开放阅读框 ORF1、ORF2 及 2 个可变区 VI、VII。序列分析表明 ASGV-HB 与 GenBank 登录的 18 个 ASGV 分离物的基因组全长核苷酸序列同源性为 80.6%~87.7%;ORF1 和 ORF2 编码的氨基酸同源性分别为 84.3%~92.3%和 94.4%~98.7%;VI 和 VII 可变区的氨基酸序列同源性分别为 22.9%~68.8%和 48.8%~92.2%;系统发育树分析显示,来源于不同国家的相同寄主的 ASGV 分离物聚集为同一分支。结果表明,ASGV 的分子变异无地域相关性,具有一定的寄主选择性,研究结果为进一步探究 ASGV 的群体遗传进化机制及其防治提供了重要的分子信息。

关键词:梨;苹果茎沟病毒;基因组全长序列;系统发育树分析;同源性

中图分类号: S436.611.1⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0043-05

苹果茎沟病毒(apple stem grooving virus, ASGV)为 β -线性病毒科(Flexiviridae)发状病毒属(*Capillivirus*)的代表种^[1],是一种严重危害果树产业的潜隐性病毒。ASGV 感染梨树后一般不产生明显的症状,但对产量和品质有严重的影

响,给果树生产带来严重的经济损失。且 ASGV 一旦感染便较难脱除,脱除率仅为 68.9%^[2]。ASGV 存在多种分子变异,目前尚未报道西洋梨寄主 ASGV 分离物基因组全长序列信息,了解 ASGV 的分子序列变异特点为研究 ASGV 的群体遗传和果树防治提供重要的分子依据。自 1965 年 Waterworth 首次报道苹果被感染 ASGV 后,陆续在梨、杏、柑橘、百合、猕猴桃、樱桃等^[3-7]植株上发现该病毒。研究明确 ASGV 基因组含有 2 个重叠开放阅读框(open reading frame, ORFs),分别编码多聚蛋白(polyprotein)和运动蛋白(MP),多聚蛋白包含 4 个结构域,分别为甲基转移酶(Met)、类木瓜蛋白酶(P-Pro)、解旋酶(Hel)、RNA 聚合酶(RdRp)和外壳蛋白

收稿日期:2016-05-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31201488);国家梨产业技术体系(编号:nycytx-29-08)。

作者简介:张雪娇(1990—),女,河南周口人,硕士,研究方向为植物分子遗传学。E-mail:yaqifeixue62@sina.com。

通信作者:崔百明,博士,副教授,研究方向为植物分子遗传学。E-mail:2247237543@qq.com。

[5] Su M, Li X F, Ma X Y, et al. Cloning two *P5CS* genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment[J]. *Plant Science*, 2011, 181(6): 652-659.

[6] Székely G, Abrahám E, Cséplő A, et al. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis[J]. *Plant Journal*, 2008, 53(1): 11-28.

[7] 高明潇,郭娜,薛晨晨,等. 大豆 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 的克隆与过表达载体构建[J]. *大豆科学*, 2016, 35(1): 25-30, 38.

[8] Zhu B, Su J, Chang M, et al. Overexpression of a $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice[J]. *Plant Science*, 1998, 139(1): 41-48.

[9] 张霞,唐维,刘嘉,等. 过量表达水稻 *OsP5CS1* 和 *OsP5CS2* 基因提高烟草脯氨酸的生物合成及其非生物胁迫抗性[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(4): 717-722.

[10] Bates L S, Waldren R P, Teare I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies[J]. *Plant and Soil*, 1973, 39(1):

205-207.

[11] Xu J, Duan X, Yang J, et al. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1517-1528.

[12] 胡伟,颜彦,韦运谢,等. 木薯 *MeASR* 基因克隆及表达分析[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(10): 125-130.

[13] 张积森,陈由强,李伟,等. 甘蔗 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因(*P5CS*)的克隆及其表达分析[J]. *热带作物学报*, 2009, 30(9): 1337-1344.

[14] 周精华,邢虎成,揭雨成,等. 苧麻 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶(*P5CS*)基因的克隆和表达分析[J]. *作物学报*, 2012, 38(3): 549-555.

[15] Ehsanpour A A, Zarei S, Abbaspour J. The role of over expression of *P5CS* gene on proline, catalase, ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plant under *in vitro* drought stress[J]. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2012, 4(1): 43-49.

(CP)^[8]; ORF2 编码 36 ku 运动蛋白(MP),与复制酶和 CP 之间存在重叠^[9]。ASGV 基因组中存在 2 个可变区(variable regions),称为 VI 和 VII, V ~ I 可变区在基因组 523 ~ 570 aa 位置处, VII 可变区在复制酶和 CP 之间,位于 1 583 ~ 1 868 aa 位置处跟 ORF2 区域存在重叠。Liebenberg 等通过对 VI 和 VII 区进行压力选择分析及系统发育树分析,发现 ASGV 的多样性与寄主存在一定的相关性^[10]。目前 GenBank 登录了来源于日本百合分离物 CTLV - L 和 CTLV - Li - 23, 韩国砂梨分离物 ASGV - P、德国苹果分离物 ASGV - AC 和印度日本苹果分离物 ASGV - P209 及来自中国台湾柑橘分离物 CTLV - K 和 CTLV - LCd - NA - 1 等 18 个 ASGV 分离物的全基因组序列,而国内外尚未报道来源于西洋梨寄主的 ASGV 分离物基因组全长序列。本研究根据 GenBank 上登录的 ASGV 分离物基因组全长序列设计引物,并结合 RACE 技术首次从西洋梨品种红贝雷沙中获得 ASGV 分离物,命名为 ASGV - HB,分析了其基因组结构并进行生物信息学分析,明确其分子进化地位以及该病毒与地域起源和寄主种类的相关性,旨在为进一步探究果树 ASGV 的群体遗传和防治提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料

红贝雷沙枝条于 2010 年 4 月采自中国农业科学院郑州果树研究所,取枝条韧皮部作为检测材料,采用引物 ASGV - U(5' - CCCGCTGTGGATTGATACACCTC - 3')/ASGV - 2(5' - GGAATTTTCACAGACTCTAACCTCC - 3')^[11],经 RT - PCR 检测证实感染 ASGV;通过芽尖组织培养获得的离体植株保存于华中农业大学“国家果树无毒种质资源室内保存中心”,取其叶片和茎尖作为本研究提取核酸的材料。

1.2 总 RNA 的提取

参照报道的 CTAB 法^[12-13],取待检材料嫩叶和茎尖 0.1 g,加液氮研磨成粉末,后加入 2% 的 CTAB 缓冲液[2% CTAB、1.5 mol/L NaCl、2% PVP - 40、100 mmol/L Tris - HCl (pH 值 8.0)、20 mmol/L EDTA]和 2% β - 巯基乙醇,65 °C 水浴后加入等体积水饱和酚:氯仿:异戊醇[25:24:1],取上清加入 2.5 倍体积无水乙醇和 10% 3 mol/L 醋酸钠(pH 值 5.2)沉降 RNA,溶于 DEPC 水中, - 80 °C 保存。

1.3 RT - PCR 扩增基因组全长序列

根据 GenBank 上登录的 ASGV (GenBank 登录号: D16681)基因组序列保守区域设计引物,对 ASGV - HB 部分片段进行扩增并送公司测序,结合测序结果设计引物扩增其间隔序列。RT - PCR 体系 20 μ L:总 RNA 2 μ g、6 碱基随机引物 1 μ L,加 RNase Free dH₂O 补足 10 μ L,混匀后 90 °C 温浴 7 min,冰浴 3 min,后加入 5 \times M - MLV Buffer 4 μ L、dNTPs

1 μ L、RRI 0.5 μ L、M - MLV 0.5 μ L 和 RNase Free dH₂O 4 μ L。反应条件:37 °C 1.5 h, - 20 °C 备用。

PCR 反应体系 25 μ L:10 \times Taq DNA polymerase Buffer (Mg²⁺) 2.5 μ L、dNTPs 0.5 μ L、引物 0.5 μ L、Taq DNA Polymerase 0.25 μ L、cDNA 2 μ L、加水补足 25 μ L。PCR 扩增程序:95 °C 3 min,95 °C 30 s,55 °C 30 s(可变),72 °C 1 min(可变),34 个循环;72 °C 延伸 10 min。采用 5'RACE 和 3'RACE(TaKaRa 公司)技术获得 5'端和 3'端序列,送至上海生工生物公司测序。

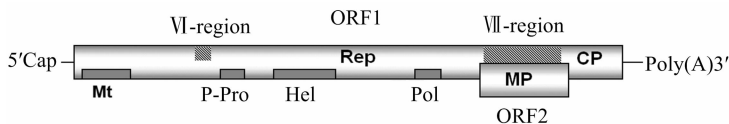
1.4 ASGV 基因组全长序列克隆和序列分析

选取经 PCR 鉴定为阳性的菌液提交至上海生工生物工程公司武汉分公司测序,采用 Vector NTI Advance 11.5.3 完成对序列的拼接,多重比对用 BioEdit、RDP4 等生物学软件完成,系统发育树构建采用 DNAMAN(7.0)、MEGA6.0 软件,Neighbor - Joining 法进行分析,设置 1 000 次重复,并隐藏了支撑值低于 50 的数值。

2 结果与分析

2.1 来源于中国西洋梨 ASGV - HB 分离物基因组全长核苷酸序列分析

将扩增得到的序列利用 Vector NTI Advance 11.5.3 软件进行拼接,获得 ASGV - HB 分离物基因组全长为 6 496 nt(不含 PloyA 尾),其序列递交 GenBank,获得的登录号为 KU605672。利用在线工具对其进行核苷酸编码的开放阅读框预测(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>),ASGV - HB 基因组结构与报道的 ASGV 分离物一致,可编码 2 个重叠的开放阅读框,为 ORF1(37 ~ 6 354 nt)和 ORF2(4 788 ~ 5 750 nt),分别编码 2 105 aa 分子量为 241 ku 的多聚蛋白和 320 aa 分子量为 36 ku 的蛋白;多聚蛋白含有甲基转移酶、木瓜蛋白酶、解旋酶和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶以及位于基因组 C 末端 27 ku 的外壳蛋白。5'UTR 含有 36 个核苷酸,3'UTR 含有 142 个核苷酸。通过 BioEdit 软件对 ORF1 氨基酸进行多重比对发现,ASGV - HB 基因组中存在与其他 ASGV 分离物基因组相似的 2 个可变区,分别为 VI(532 ~ 570 aa)和 VII(1 538 ~ 1 868 aa)。VII 区与 ORF2 部分区域重叠。因此,基于预测的蛋白保守功能结构域,ASGV - HB 分离物基因组结构见图 1。将 ASGV - HB 分离物与 GenBank 上收录的来源于不同寄主及不同地域的 18 个 ASGV 分离物的基因组全长序列及部分编码区氨基酸进行同源性比较,结果(表 1、表 2)表明,ASGV - HB 与此 18 个 ASGV 分离物的基因组全长核苷酸序列相似性为 80.6% ~ 87.7%。其中 ASGV - HB 全长序列与日本苹果上的 P - 209 分离物全长序列相似性最高,为 87.7%;ORF1 和 ORF2 氨基酸同源性分别为



Mt—甲基转移酶; P-Pro—类木瓜蛋白酶; Hel—解旋酶; Pol—依赖 RNA 的 RNA 聚合酶; MP—移动蛋白; CP—外壳蛋白; Rep—复制相关蛋白;

ORF—开放阅读框; V-region—可变区,长方框表示开放阅读框

图1 ASGV-HB 基因组结构

表 1 GenBank 收录的不同 ASGV 分离物的寄主及地理来源

分离物	寄主	来源	GenBank 登录号
J2	梨	Hubei, China	KU198289
HH	梨	Hubei, China	JN701424. 1
P-209	苹果	Japan	DI4995. 2
T47	苹果	Beijing, China	KF434636. 1
CHN	苹果	Shanxi, China	JQ308181. 1
YTG	苹果	Beijing, China	KJ579253. 1
AC	苹果	Germany	JX080201. 1
P12	苹果	India	HE978837. 1
L	百合	Japan	DI6681. 1
Li-23	百合	Japan	AB004063. 1
PK	柑橘	Taiwan, China	JX416228. 1
MTH	柑橘	Beijing, China	KC588948. 1
ML	柑橘	USA	EU553489. 1
Lcd-NA-1	柑橘	Taiwan, China	FJ355920. 1
STJ	柑橘	Hubei, China	JQ765412. 1
K	柑橘	Taiwan, China	AY646511. 1
XHC	柑橘	Chongqing, China	KC588947. 1
SK	梨	South Korea	AY596172

84.3%~92.3%和94.4%~98.7%,可变区Ⅵ(532~570 aa)和Ⅶ(1 583~1 852 aa)氨基酸相似性分别为22.9%~68.8%和48.85%~92.2%,5'端UTR和3'端UTR核苷酸相似性分别为100%和98.6%。

将ASGV-HB和GenBank数据库上收录的来源于不同国家或地区的苹果、梨、柑橘和百合寄主的18个ASGV分离物基因组全长序列进行系统发育树分析(图2)。结果表明,19个ASGV分离物可聚为3个组群,分别命名为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ。Ⅰ组群分为2个分支,其中来源于日本的百合Li-23和L聚为1个分支,ASGV-HB分离物为独立分支,与日本和中国的苹果、柑橘和梨分离物(YTG、HH、CHN、MTH、P209和T47)聚为Ⅰ组群。Ⅱ组群由3个分支组成,其中来源于美国和中国寄主的柑橘分离物(分别为STJ、XHC、K、Lcd-NA-1、PK、ML)聚集为1个分支;来源于印度和德国的苹果寄主AC和P12的分离物聚集为另一个分支,来源于中国砂梨的分离物ASGV-J2单独为1个分支;来源于韩国寄主的梨SK分离物单独聚为Ⅲ组。

2.2 ASGV-HB 分离物 *mp* 基因核苷酸序列分析

ASGV-HB分离物与报道的18个分离物*mp*基因核苷

表 2 ASGV-HB 与 GenBank 收录的 18 个 ASGV 基因组序列在核苷酸及氨基酸水平上的同源性比较

寄主	分离物	基因组		5'UTR		ORF1			ORF2			3'UTR	
		核苷酸数 (个)	核苷酸 同源性 (%)	核苷酸数 (个)	核苷酸 同源性 (%)	核苷酸数 (个)	核苷酸 同源性 (%)	氨基酸 同源性 (%)	核苷酸数 (个)	核苷酸 同源性 (%)	氨基酸 同源性 (%)	核苷酸数 (个)	核苷酸 同源性 (%)
梨	HB	6 496		36		6 318			963			142	
	J2	6 497	84.4	37	100	6 318	84.1	92.3	963	97.1	98.7	142	95.0
	HH	6 496	85.2	36	100	6 318	84.8	88.4	963	85.3	96.2	142	95.7
	SK	6 497	79.4	36	97.1	6 318	78.9	84.5	963	83.9	93.4	143	95.0
	P-209	6 495	87.7	35	100	6 318	87.4	90.5	963	87.2	97.8	142	98.6
苹果	T47	6 496	87.6	36	100	6 318	87.3	90.3	963	86.7	96.6	142	98.6
	CHN	6 495	84.3	35	97.1	6 318	84.0	87.8	963	84.4	94.4	143	94.3
	YTG	6 495	84.4	35	100	6 318	84.1	88.0	963	87.0	97.5	142	96.5
	AC	6 496	81.1	36	100	6 318	80.7	86.6	963	85.2	97.2	142	97.9
	P12	6 478	80.6	33	100	6 303	80.1	84.0	961	84.3	95.0	143	96.5
百合	L	6 496	82.5	35	100	6 318	82.2	87.0	963	85.4	96.2	143	95.7
	Li-23	6 495	82.4	35	97.1	6 318	82.0	86.8	963	85.8	96.2	142	95.7
柑橘	PK	6 496	81.6	36	97.1	6 318	81.1	85.6	963	84.3	96.9	142	97.2
	MTH	6 497	86.8	36	100	6 318	86.5	89.3	963	86.2	97.2	143	95.0
	ML	6 495	81.4	36	97.1	6 318	81.1	86.2	963	86.1	96.9	141	89.4
	Lcd-NA-1	6 496	81.6	35	100	6 318	81.2	86.0	963	84.7	96.9	143	96.5
	STJ	6 497	81.5	36	100	6 318	81.1	85.5	963	83.6	95.9	142	96.5
	K	6 496	81.7	35	100	6 318	81.4	85.7	963	84.1	96.6	143	95.0
	XHC	6 497	81.1	36	100	6 318	80.7	84.8	963	82.7	95.6	143	95.0

酸序列同源性为78.5%~96.4%,与报道的中国砂梨分离物ASGV-J2相似性最高。进而对其ASGV分离物的*mp*基因在核苷酸水平上进行系统发育树分析,结果表明,共分析的19个分离物分为2个组群,分别命名为Ⅰ和Ⅱ组群。Ⅰ组群包含2个分支,其中来源于中国和美国的柑橘*mp*分离物均聚为1个分支,来源于南非、印度和德国的梨与苹果寄主的*mp*分离物聚为另一个分支。Ⅱ组群主要分为2个分支,其中ASGV-HB西洋梨分离物与来源于中国的砂梨J2分离物聚为同一分支;来源于中国和日本的苹果、梨、柑橘和百合分别聚集为同一个分支的随寄主而选择的不同簇(图3)。

2.3 ASGV-HB 分离物 *cp* 基因核苷酸序列分析

将ASGV-HB分离物与选取的GenBank上登录的来源于中国、日本、南非、印度、韩国、德国的苹果、梨、百合、柑橘和竹子寄主上的34个ASGV分离物基于*cp*基因序列的同源性为88.85%~95.5%,与来源于日本的P209苹果分离物的同源性为95.2%。进而对*cp*基因进行系统发育树分析,结果(图4)表明,来源于不同寄主的35个ASGV分离物可分为3个组群,分别命名为Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ。Ⅰ组群包含2个分支,其中来源于南非的苹果独立成簇,与中国不同地区柑橘的*cp*基因分离物聚为1个分支;来源于巴西、日本、中国、印度、南非和

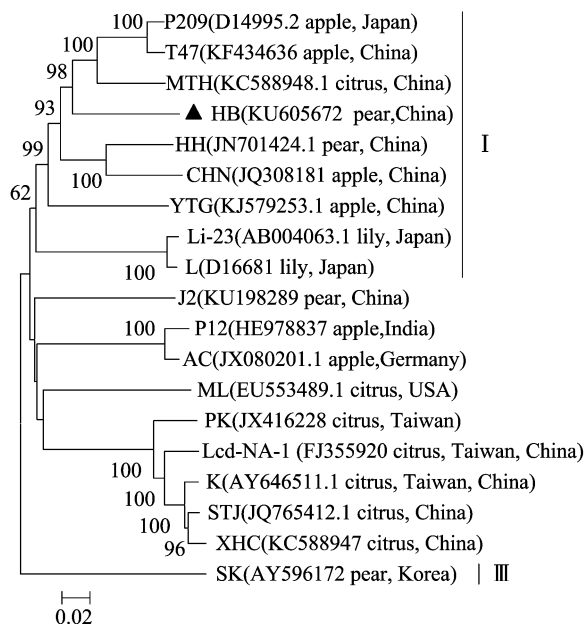


图2 ASGV-HB 与 GenBank 收录的 18 个 ASGV 全长核苷酸序列系统发育树分析

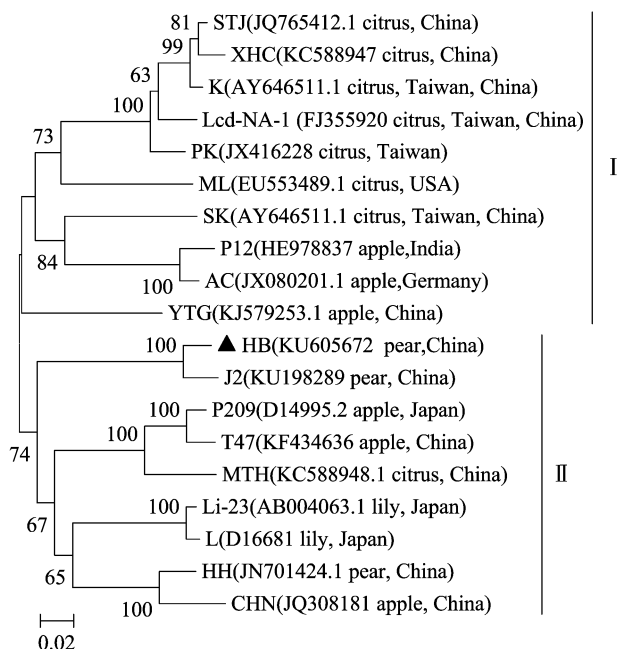


图3 ASGV-HB 分离物 mp 基因核苷酸系统发育树分析

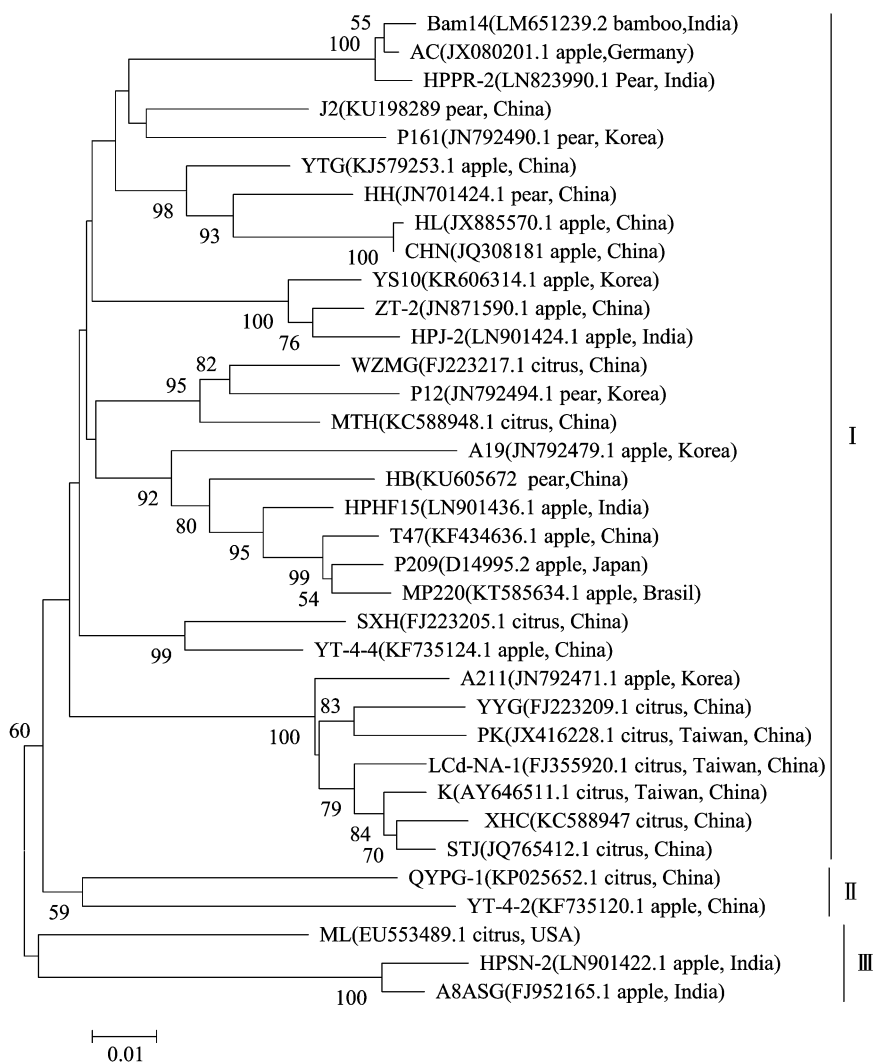


图4 ASGV-HB 分离物 cp 基因系统发育树分析

德国的梨、苹果、柑橘和竹子的 *cp* 分离物分别聚集为同一个分支的随寄主而选择的不同簇,其中 ASGV - HB *cp* 基因分离物与来源于南非、巴西、日本和中国的梨与苹果的 *cp* 分离物 (A19、HPHF15、T47、P209 和 MP220) 聚为此分支的同一簇;来源于中国的苹果和柑橘聚为第 II 组;来源于美国的柑橘单独成簇,与来源于印度的苹果聚为第 III 组。

3 讨论与结论

本研究采用 RT - PCR 结合末端 RACE 法首次对采集自中国农业科学院郑州果树研究所西洋梨红贝雷沙样品的 ASGV 分离物,即 ASGV - HB 的基因组进行扩增和测序,获得其全长序列为 6 496 nt (不含 ployA),包含 2 个完整的 ORFs。其中 ORF1 编码含有 4 个保守结构域的复制酶蛋白 (Rep) 以及外壳蛋白 (CP),ORF2 编码运动蛋白 (MP),以及序列变异明显的 VI 和 VII 区。报道显示,ASGV 的 *cp* 和 *mp* 基因均通过亚基因组表达^[14],*cp* 通过亚基因组表达引起寄主系统感染,在 *cp* 亚基因组 (subgenomic RNA, sgRNA) 编码区上游存在转录起始位点 AUG 及 *cp* sgRNA 表达所需的 6 碱基保守核心启动子序列 UUAGGU,共同调控 *cp* 基因表达,同时对 ASGV 的侵染活性有重要影响^[15]。本研究得到的 ASGV - HB 基因组序列 5 602 ~ 5 607 nt 位置处含有此六碱基序列 UUAGGU,此序列为 *cp* sgRNA 起始转录位点的核心碱基序列。在其后 5 640 ~ 5 642 nt 位置处推测为 *cp* sgRNA 的起始位点 AUG。

为了进一步明确其分子序列特性和遗传进化关系,将 ASGV - HB 分离物与 GenBank 上登录的来源于国内外的梨、苹果、柑橘和百合共 4 种寄主的 18 个 ASGV 分离物进行基因组核苷酸水平相似性比较,结果表明,ASGV - HB 分离物与来源于日本的苹果分离物 P209 相似性最高,且在系统发育树中聚为同一组群同一分支 (表 2、图 2)。对 19 个分离物进行 *mp* 基因水平上的序列分析结果也显示,ASGV - HB 分离物与 P209 位于同一组群,但是聚集为不同分支,与来源于中国的砂梨 J2 分离物聚集为同一分支,遗传距离最近。另外,我们对 ASGV - HB 分离物与 GenBank 登录的 34 个分离物进行 *cp* 基因遗传进化关系分析,结果也表明,来源于不同国家和地区的寄主分离物聚集为同一组群同一分支。因此,基于 ASGV 基因组全长核苷酸、*mp* 和 *cp* 基因核苷酸水平上的遗传进化分析均表明,ASGV 具有分子变异特点,显示出与寄主的相关性。进而分析了 ASGV - HB 分离物 VI 和 VII 区氨基酸序列,结果表明,ASGV - HB 分离物 VI 区氨基酸序列同源性仅为 22.9% ~ 68.8%,VII 区同源性为 48.8% ~ 92.2%,且遗传进化关系也揭示了该分离物与来源于苹果和梨寄主的分离物进化关系较近。赵磊研究结果表明 ASGV 的 *cp* 基因分子变异趋势具有一定的寄主选择性,不存在明显的地理差异^[16]。本研究结果与 Liebenberg 等^[10]报道的 ASGV 分离物变异区 VI 和 VII 的进化分析也揭示了遗传进化关系与寄主有相关性,而与地理位置无任何关联相似。推测可能与不同国家间种质材料交换而导致了携带该病毒的分子遗传进化与来源无相关性有关。研究结果为进一步研究 ASGV 的群体遗传和深入探讨其进化机制提供了重要的分子信息,也为深入探究其基因组

致病性功能及构建其侵染性克隆提供了材料。

参考文献:

- [1] Martelli G P, Adams M J, Kreuze J F, et al. Family flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity [J]. *Phytopathology*, 2007, 45: 73 - 100.
- [2] 张尊平, 张少瑜, 洪 霓, 等. 热处理脱除梨病毒技术研究 [J]. *北方果树*, 2001 (5): 8 - 9.
- [3] Wu Z B, Zheng Y X, Su C C, et al. Identification and characterization of apple stem grooving virus causing leaf distortion on pear (*Pyrus pyrifolia*) in Taiwan [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 128 (1): 71 - 79.
- [4] Inouye N, Maeda T, Mitsuhashi K. Citrus tatter leaf virus isolated from lily [J]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1979, 45: 712 - 720.
- [5] Lovisolo O, Accotto G P, Masenga V, et al. An isolate of apple stem grooving virus associated with Cleopatra mandarin fruit intumescence [J]. *Tropical Plant Pathology*, 2003, 28 (1): 54 - 58.
- [6] Clover G, Pearson M, Elliott D, et al. Characterization of a strain of apple stem grooving virus in *Actinidia chinensis* from China [J]. *Plant Pathology*, 2003, 52 (3): 371 - 378.
- [7] Campbell A. The effect of some latent virus infections on the growth and cropping of apples [J]. *Journal of Horticultural Science*, 1963, 38 (1): 15 - 19.
- [8] Hirata H, Lu X, Yamaji Y, et al. A single silent substitution in the genome of apple stem grooving virus causes symptom attenuation [J]. *Journal of General Virology*, 2003, 84 (9): 2579 - 2583.
- [9] Zhou Y, Holmes E C. Bayesian estimates of the evolutionary rate and age of hepatitis B virus [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2007, 65 (2): 197 - 205.
- [10] Liebenberg A, Moury B, Sabath N, et al. Molecular evolution of the genomic RNA of apple stem grooving capillovirus [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2012, 75 (3/4): 92 - 101.
- [11] James D. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT - PCR and in a multiplex PCR assay [J]. *Journal of Virological Methods*, 1999, 83 (1/2): 1 - 9.
- [12] 张 涛, 韩 梅, 刘翠晶, 等. 人参总 RNA 提取方法及后转录酶的比较 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43 (8): 34 - 37.
- [13] 董 璐, 贾红梅, 刘 迪, 等. 菊花叶片总 RNA 提取方法的比较研究 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44 (3): 67 - 69.
- [14] Hirata H, Yamaji Y, Komatsu K, et al. Pseudo - polyprotein translated from the full - length ORF1 of capillovirus is important for pathogenicity, but a truncated ORF1 protein without variable and CP regions is sufficient for replication [J]. *Virus Research*, 2010, 152 (1/2): 1 - 9.
- [15] Komatsu K, Hirata H, Fukagawa T, et al. Infection of capilloviruses requires subgenomic RNAs whose transcription is controlled by promoter - like sequences conserved among flexiviruses [J]. *Virus Research*, 2012, 167 (1): 8 - 15.
- [16] 赵 磊. 苹果茎沟病毒的全基因组测序及其侵染性克隆载体的构建 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013: 19 - 21.