

甘薯病毒病害(SPVD) 的分子生物学研究进展

孙钟毓^{1,2} 龚莺¹ 赵琳³ 石江³ 毛碧增^{1,2,*}

(¹浙江大学生物技术研究所 浙江 杭州 310058; ²农业农村部作物病虫害分子生物学重点实验室, 浙江 杭州 310021; ³杭州市农业科学研究院 浙江 杭州 310021)

摘要:甘薯病毒病害(SPVD) 是最主要的甘薯病毒病害之一, 研究表明甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV) 和甘薯褪绿矮化病毒(SPCSV) 共同侵染形成 SPVD。本文综述了 SPFMV 和 SPCSV 这 2 种病毒的生物学特性、检测方法、基因组结构与遗传变异等方面的研究进展, 为阐明多种病毒混合侵染机制和防控措施提供了一定的理论依据。

关键词:甘薯病毒病; 甘薯羽状斑驳病毒; 甘薯褪绿矮化病毒; 沉默抑制蛋白; 综合防控

DOI: 10. 11869/j.issn.100-8551. 2020. 01. 0071

我国是世界上最大的甘薯生产国, 据统计, 甘薯种植面积达 670 万 hm^2 , 年产量约 1 亿 t, 甘薯已成为我国主要的经济和粮食作物之一^[1]。但甘薯易受多种病毒病复合侵染, 造成巨大的经济损失^[2]。美国、肯尼亚、以色列等国家相继发现被甘薯病毒病(sweet potato virus disease SPVD) 侵染的植株表现出矮化、皱缩、褪绿、叶片变窄、花叶明脉等症状^[3]。1976 年, Schaefer 等^[4]发现以上病症是由甘薯羽状斑驳病毒(*Sweet potato feathery mottle virus*, SPFMV) 和甘薯褪绿矮化病毒(*Sweet potato chlorotic stunt virus*, SPCSV) 2 种病毒共同侵染形成 SPVD 造成的。此后, 大量研究者针对甘薯病毒病害进行了广泛研究。

本文综述了引起 SPVD 的 2 种病原的分子特征和部分基因功能及其遗传变异的最新研究进展, 初步探讨了 SPFMV 和 SPCSV 这 2 种病毒的协同致病机制, 旨在为 SPVD 和其他病毒病复合侵染的研究与防治奠定一定的理论基础, 为阐明多种病毒混合侵染机制研究提供一定的理论依据。

1 病毒生物学特性

SPCSV 为长线性病毒科(*Closteroviridae*) 毛形病毒属(*Crinivirus*) , 目前在西班牙、美国、中国等国家的

甘薯中分布较广泛^[5-7]。SPCSV 病毒粒子呈弯曲线状, 其长度为 850~950 nm, 传播介体主要为烟粉虱 B 型(*Bemisia tabaci biotype B*) 和纹翅粉虱(*Trialeurodes abutilonea*) , 以半持久方式传播, 不经汁液接种传播, 主要存在于寄主韧皮部细胞内, 并在维管束内堆积^[8-9]; SPFMV 为马铃薯 Y 病毒科(*Potyviridae*) 马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*) 是甘薯上最常见的病毒之一, 广泛分布于世界各地的甘薯中, 该病毒粒子为长丝状, 长约 830~850 nm, 是马铃薯 Y 病毒属中病毒粒子最长的成员^[10]。其可通过嫁接和机械摩擦传播, 也可由蚜虫非持久性传播, 不经种子、花粉或植物间接触传播。稀释限点为 10^{-3} ~ 10^{-4} , 体外存活期为 12 h, 热灭活温度为 60~65℃, 此外, SPFMV 在寄主内可诱导出胞质风轮状内含体^[11]。

2 检测方法

2.1 RT-PCR

虽然常规 PCR、限制性内切酶片段长度多态性分析(*restriction fragment length polymorphism*, RFLP)、扩增产物的测序等技术可用于多种病毒的快速鉴定和分析, 但由于甘薯富含多糖多酚物质, 严重干扰核酸的提取质量, 用以上方法效果不佳^[12]。Deng 等^[13]运用纳

收稿日期: 2018-07-13 接受日期: 2018-10-04

基金项目: 杭州市农科院重大科技推广项目(2017HNKT-04)

作者简介: 孙钟毓, 女, 主要从事作物健康种苗的培育研究。E-mail: 21616133@zju.edu.cn

* 通讯作者: 毛碧增, 女, 研究员, 主要从事作物健康种苗的培育研究。E-mail: maobz@zju.edu.cn

米磁珠 RT-PCR 技术发现,核酸吸附于纳米磁珠上,从黏性悬浮样品中抽离,提高了核酸提取质量;王文重等^[14]研究表明,免疫捕捉技术无需抽提病毒 RNA,便可将目标病毒与抗原结合后固定在固相上,经洗脱处理后富集病毒,再进行 RT-PCR 反应,避免了从植物组织中分离核酸的繁琐过程。表明纳米磁珠 RT-PCR 技术和免疫捕捉 RT-PCR 技术很好地解决了核酸提取的质量问题。

与常规 PCR 检测技术相比,多重 RT-PCR 技术能够在一次反应中同时检测多种病毒,极大缩短了反应时间,提高了检测效率。张盼等^[15]建立了能同时检测 SPVD 2 种病原的多重 RT-PCR 方法,且能够区分 SPFMV 的 2 个主要株系类型 SPFMV-CH 和 SPFMV-CH2。李华伟等^[16]发现甘薯 G 病毒(*sweet potato virus G*, SPVG)单独侵染甘薯时,症状不明显,与 SPFMV 和 SPCSV 共同侵染时造成严重的灾害,因此建立了准确高效且可同时检测这 3 种病毒的多重 RT-PCR 体系。多重 RT-PCR 具有成本低、效率高等特点,可将不同病毒的基因序列和特征进行对比分析并分离鉴定,能用于甘薯脱毒和病毒病快速检测。

2.2 实时荧光实时定量 PCR

实时荧光定量 PCR 反应可根据标准曲线对未知模板进行定量分析,实时监测整个 PCR 过程。实时荧光定量 PCR 需要将 mRNA 的扩增或宿主基因的编码序列分别作为 RNA 或 DNA 病毒检测的内部对照^[17]。甘薯的内参基因包括 18S、26S rRNA、细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase, COX)等,这些基因被用来测定实时荧光定量 PCR 反应中不同样品 RNA 和 DNA 浓度的差异。王丽等^[18]应用该方法对 SPCSV-WA 株系进行了定量检测,结果表明通过 1 个 TaqMan 定量检测系统可检测出 3.31 个拷贝数的目的病毒,灵敏度较普通 PCR 高 1 000 倍。卢会翔等^[19]采用双内参基因检测引物,建立了快速检测甘薯病毒病 SPVD 的实时荧光定量 PCR 反应,与硝酸纤维素膜-酶联免疫法(nitrocellulose membrane-enzyme-linked immunosorbent assay, NCM-ELISA)相比,更加准确高效。虽然实时荧光定量 PCR 技术较省时省力,检测灵敏度也较高,但其引物和 TaqMan 探针的序列特异性以及昂贵的试剂和仪器,可能会限制该方法的推广应用。

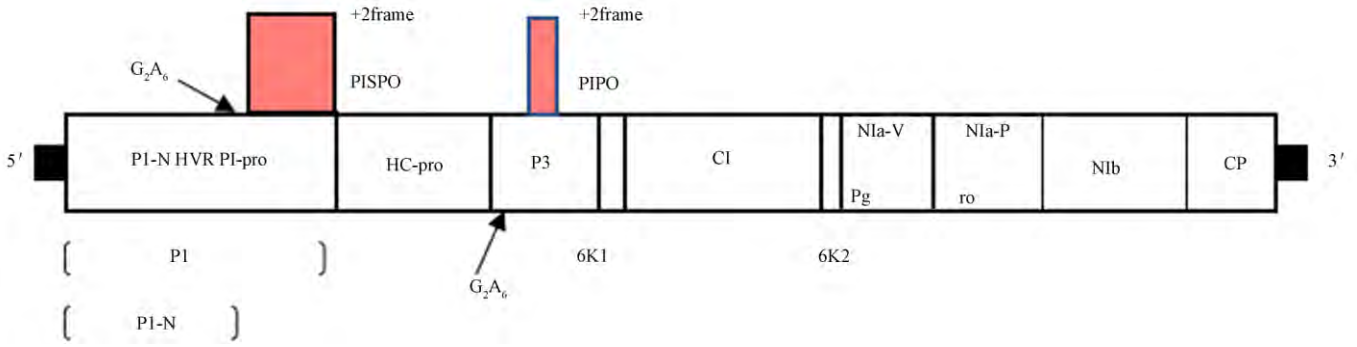
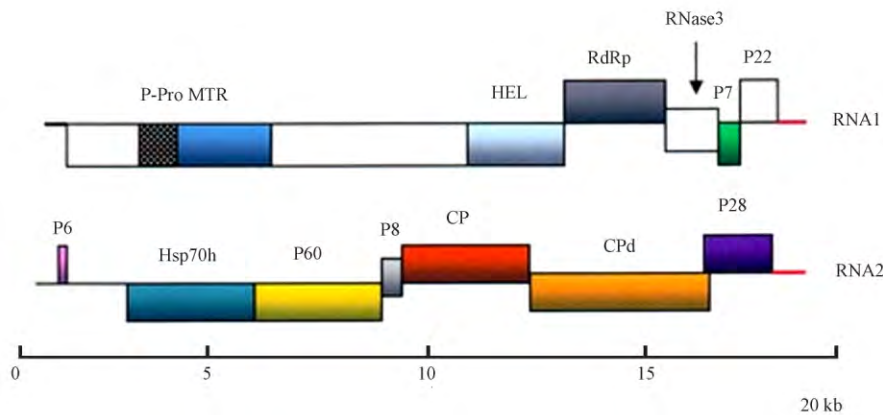
3 病毒基因组特征及分子变异

3.1 基因组特征

SPFMV 基因组长约 10 kb,为正义单链 RNA,5'末

端非编码区(untranslated regions, UTR)和共价结合的基因组连接蛋白(viral protein genome-linked, VPg)均对翻译起着特定的作用,3'末端为 poly(A)尾,该病毒基因组包含 1 个较大的开放阅读框(open reading frame, ORF),翻译成 1 个约 360 kD 的多聚蛋白,在蛋白水解酶的作用下催化裂解成 10 个成熟的蛋白质,即 P1、HC-pro、P3、6K1、CI、6K2、NIa-Vpg、NIa-Pro、NIb、CP^[20-21]。有研究表明,SPFMV 通过+2 移码在 P1 和 P3 内部编码 1 个额外的 P3N-PIPO 和 P1N-PISPO 蛋白^[22](图 1)。且发现 P1N-PISPO 仅存在于 SPFMV 组成员中,而 P3N-PIPO 存在于所有马铃薯 Y 病毒科病毒中^[23];SPCSV 基因组长约 15.3~16.0 kb,为双组份正义单链 RNA,2 个基因组 RNA 的 3'端 UTR 基本一致。Kreuze 等^[24]测定 RNA1 和 RNA2 分别含有 9 407 和 8 223 个核苷酸,其中 RNA1 包含 2 个相互重叠的 ORFs,编码能抑制 RNA 沉默的 RNase3 和 p22。RNA2 具有典型的长线形病毒科特征,ORFs 编码热激蛋白 70(heatshockprotein70, Hsp70)、55~64 kD 蛋白质产物、外壳蛋白(coat protein, CP)及外壳蛋白类似物(图 2)^[25]。

RNA 沉默(RNA silencing)是植物的抗病毒防御系统,是针对病毒 RNA、转基因 RNA、转座子 RNA、发夹结构 RNA 等的一种防御机制,而 RNA 沉默抑制蛋白(RNA silencing suppressor, RSS)是病毒为了成功侵染植物演化而来的反防御系统,是病毒与寄主之间共同进化的结果^[26]。Llave 等^[27]将携带 HC-Pro 表达载体的土壤杆菌注射进 GUS 转基因沉默的组织内,发现 HC-Pro 可抑制 1 个或多个沉默维持步骤;Untiveros^[28]通过瞬时表达的 SPFMV 基因产物与标记基因在本氏烟草中的渗透过滤表明,P1 和 P1N-PISPO 蛋白均有 RSS 的作用。P1N-PISPO 可能用过阻断传播至邻近细胞的信号,抑制沉默的细胞间移动,P1 蛋白仅在局部抑制沉默,位于 P1 的 P1N 部分的保守甘氨酸/色氨酸基序在 RSS 活性中起关键作用,已发现 SPCSV 存在 2 种 RNA 沉默抑制蛋白,即 RNase3 和 p22。Kreuze 等^[29]研究表明 SPCSV 的 RNase3 能增强 p22 的 RNA 沉默抑制活性,这 2 个独立的蛋白质共同参与 RNA 沉默抑制。RNase3 是 1 种双链 RNA 特异性内切核酸酶,Cuellar 等^[30]研究表达 RNase3 的转基因甘薯植株进一步发现,单独表达该蛋白质可消除植株的抗性,且在 SPFMV 侵染植物后产生 SPVD 症状。推测 RNase3 是通过降解病毒防御中的双链小干扰 RNA 分子(small interfering RNA, siRNA)来克服植物的防御反应^[31]。但目前关于 RNase3 具体作用机制尚不清楚,

图 1 SPFMV 的基因组结构图^[22]Fig.1 Genome organization of SPFMV^[22]图 2 SPCSV 的基因组结构图^[25]Fig.2 Genome organization of SPCSV^[25]

仍需进一步更深入的研究。

3.2 病毒遗传多样性

CP 蛋白氨基酸序列以及核苷酸序列的系统发育和遗传多样性分析表明,SPFMV 可分为 3 个株系^[32],分别为普通(ordinary,O),东非(East African,EA),和龟裂 RC(russet crack)。SPCSV 分为 2 个株系^[33],分别为东非(East African,EA)和西非(West African,WA)。Ishak 等^[34]分析了 SPVD 的 2 种病原物的遗传多样性,基于 3'末端的基因组序列分析表明,SPFMV 分离株属于 RC 株系,利用单克隆抗体的血清学检测和 *Hsp70* 基因的部分序列的系统发育分析表明,SPCSV 为非 EA 株系。Kwark 等^[35]对侵染甘薯的 SPFMV 分离物进行 RFLP 分析,将其分为 SPFMV-RC,SPFMV-O+SPFMV-RC 和 SPFMV-O 共 3 种类型,且基于 CP 基因序列分析表明,其中 17 个 SPFMV 分离株可分为 2 组,组内和组间的一致性分别为 97%~99%和 91%~93%。根据 CP、*Hsp70h* 基因序列和 EA 株系的单克隆抗体分析表明,非洲的 SPCSV-EA 核苷酸序

列显示出高度的保守性,CP 核苷酸序列的两两比对显示 SPCSV-EA 分离株之间差异小于 4%。但这些序列与已报道的 SPCSV-WA 的 *Hsp70h* 序列相比较,核苷酸序列一致性最高达 34.6%,证实了 EA 和 WA 株系的 *Hsp70h* 序列之间的关系较远^[36]。

2012 年,张振臣等^[37]对来自广东、江苏、四川、安徽等地的 10 份 SPVD 分离株进行全面分析表明,SPFMV CP 基因核苷酸序列一致性为 77%~94%,SPCSV *Hsp70* 基因的核苷酸序列一致性达 78%~99%。根据系统进化树分析发现我国甘薯的 SPFMV 和 SPCSV 均存在明显的株系分化。Deng 等^[13]分析了四川甘薯 SPFMV 分离物的 CP 基因序列遗传多样性,结果表明,核苷酸序列一致性达 77.3%~99.8%。系统发育分析将 SPFMV 分离株分成 RC、O 和 C 组。包改丽等^[38]研究表明云南甘薯上的 SPFMV 分离物存在 EA、O 株系,且与已发现的株系亲缘关系较远,有可能是新的株系。姜珊珊等^[39]分析了来自山东的 6 个 SPFMV CP 基因序列,其核苷酸和氨基酸的相似性分

别为 77.43%~98.52%和 82.86%~98.1%,并发现山东的 SPFMV 种群发生了新变化。Qin 等^[40]基于 *Hsp70* 基因序列系统发育,研究了来自四川、安徽、江苏、福建等地的 20 个 SPCSV 分离物的遗传多样性,发现核苷酸和氨基酸序列的一致性分别为 79%~100%和 92%~100%,且大多数为 WA 株系,表明 WA 株系在我国的地理分布较 EA 株系更广泛。

3.3 病毒分子进化

RNA 病毒依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)或复制酶,自身缺乏校正功能,导致 RdRp 错配率接近 10^{-4} ,植物 RNA 病毒通过点突变、重组、缺失、插入、重配等变异,以提高病毒适应不同寄主能力和生存力^[41]。研究表明重组是马铃薯 Y 病毒科病毒进化过程中的重要变异,因此识别重组热点的基因组区域对于理解重组在新病毒株进化中的作用具有重要意义^[42]。Tugume 等^[43]对 14 种野生 SPFMV 分离株进行序列分析表明,SPFMV 不同株系之间存在一定程度的重组现象,且 6K2-Vpg-N1a-Pro 区是 SPFMV-EA 基因组上的 1 个重组热点区域,EA 株系在东非国家有很高的遗传多样性。Kwak 等^[44]基于成熟蛋白质氨基酸序列的系统发育树分析发现, P1 蛋白是感染甘薯马铃薯 Y 病毒属的种内和种间高度可变的区域,且 HC-Pro 和 N1a-Nib 也被认为是重组中的热点区域。

4 SPVD 的协同作用侵染机制

目前,虽然对 SPVD 病毒引起的症状观察、病原鉴定和检测的研究较多,但对病毒分子水平的研究主要集中在全基因组测序和遗传多样性分析上,对病毒基因编码蛋白的功能及其协同致病机理的研究还不够深入。Kokkinos 等^[45]运用 cDNA 微阵列技术比较 SPFMV-RC 和 SPCSV 的单一侵染与混合侵染对甘薯基因表达的影响,结果表明单独侵染 SPFMV 和 SPCSV 的植物中差异表达的基因数量分别仅有 3 个和 4 个,受 SPVD 侵染的植物有超过 200 个基因是差异表达的。

Karyeija 等^[46]发现甘薯植株感染 SPVD 后,SPFMV 的含量比单独 SPFMV 侵染时大约高 600 倍,而 SPCSV 的含量却几乎不受影响或者稍微降低。马铃薯 Y 病毒属病毒在协同作用中通常是增强子, P1 和 HC-Pro 融合表达抑制 RNA 沉默,表明 SPCSV 增强了 SPFMV 的作用^[47]。Choi 等^[48]发现 SPCSV 与 SPMMV 复合侵染甘薯的表现出的形状与 SPVD 的 2 种病原

SPFMV 和 SPCSV 相互作用相似。通过实时荧光定量 PCR 分析发现,SPCSV 使 SPMMV 含量提高了约 1 000 倍,而 SPCSV 含量降低了 2 倍,表明二者存在拮抗作用。Kokkinos 等^[49]发现 SPCSV 增强了甘薯 Y 病毒(*Sweet potato virus Y, SPVY*)、甘薯 G 病毒(*Sweet potato virus G, SPVG*)的复制能力。

5 综合防治策略

5.1 推广应用脱毒健康种苗

甘薯脱毒苗的培育过程是利用甘薯顶端分生组织无毒的原理,将茎尖分生组织离体培养诱导成苗,并进行病毒检测,确认完全脱除病毒后进行快繁、种植。目前,甘薯脱毒的主要技术有热处理脱毒法、化学疗法、组织培养脱毒法和超低温脱毒法等^[50]。马代夫等^[51]经过多年多点鉴定生产上推广面积较大的几个甘薯品种的脱毒效果,发现不论地点、年份和品种,脱毒甘薯均表现出增产,增产幅度为 14.95%~91.61%。Wang 等^[52]利用茎尖结合超低温冷冻疗法脱除 SPFMV 和 SPCSV,效果显著,茎尖再生率为 100%。但目前关于国内将多种脱毒方法相结合脱除 SPVD 的研究尚未见报道。

5.2 SPVD 抗病种质的创制

筛选和种植抗病品种是经济有效的防治 SPVD 的方法之一,而建立科学的 SPVD 抗性鉴定方法是筛选抗病品种的基础^[53]。Mwanga 等^[54]利用劈接技术进行嫁接,可使接穗的成活率达 100%,进而能快速鉴定甘薯群体对 SPVD 的抗性。王爽等^[55]建立了田间人工嫁接病毒接穗的方法,有效地对 12 个甘薯品种进行了大规模的田间抗性鉴定。研究发现普遍侵染 SPCSV 的地区往往有抗 SPVD 的品种,如 New Kawogo 为 SPCSV 抗性最强的甘薯之一^[55]。

5.3 转基因培育抗病品种

随着生物技术的迅猛发展,自 20 世纪 90 年代中期以来,基因工程已被广泛应用于培育甘薯抗病品种。如 Cipriani 等^[56]利用水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因水解马铃薯 Y 病毒属的多聚蛋白功能,诱导甘薯产生对 SPFMV 的抗性。Okada 等^[57]成功将 SPFMV 的 CP 基因导入到受体细胞中,并发现这些转基因植株嫁接到不同地域的分离物中同样具有抗性。近年来, RNA 沉默介导诱导抗性植株的技术已应用于多种植物抗病毒的转基因育种中,但对于甘薯植株中抗病毒的转基因报道较少。Kreuze 等^[29]以靶向 SPCSV 和 SPFMV 的复制酶编码序列为目标,利用内含剪接发夹的结构

对秘鲁甘薯 Huachano 进行改造。在 3 次转化试验中, 利用高毒性农杆菌菌株和胚胎再生获得了 28 个独立的转基因植株, 其中 10 个转基因植株在感染后表现出轻微或无任何症状, 且 SPCSV 含量显著降低。采用 RNA 干扰技术同时靶向引起 SPVD 的 SPFMV、SPCSV 编码的 RSS, 为未来抗病分子育种的研究提供了新方向。

5.4 加强病害流行病学检测与引种的检疫

甘薯是无性繁殖作物, 种苗和种薯调运是 SPVD 远距离传播的主要材料, 减少跨区调运可有效减少病害远距离传播, 蚜虫和烟粉虱分别是 SPFMV、SPCSV 近距离传播的介体, 由于 SPFMV 普遍存在, 防治 SPCSV 的传播是控制 SPVD 流行的根本。而加强对甘薯大田烟粉虱的防治, 可有效防控 SPVD 的流行, 加强产地检疫, 此外, 采用高效快速的检测技术也可有效预防 SPVD 的传播与流行^[58]。

6 展望

我国是世界上最大的甘薯生产国, 已发现 SPCSV 与大多数马铃薯 Y 病毒科病毒如 SPMMV、SPVG 等共同侵染甘薯, 在 SPVD 的基础上引起更严重的病毒侵染病害。但目前关于 SPVD 的 2 种病毒的非典型性协同作用机制的研究尚鲜见报道, 对 SPVD 的综合防控能力较弱。新发现的 RSS 蛋白 P1N-PISPO 可能与 SPVD 有关, 但需要更深入的研究, 才能阐明 SPCSV 的 RNase 3 和 SPFMV 的 P1N-PISPO 在 SPVD 协同侵染中的具体作用机制。

目前, 培育栽培抗病甘薯品种的进程缓慢, 耗时较长, 而病毒进化又会进一步干扰抗病品种的选育。采用 RNA 干扰技术同时靶向引起 SPVD 的 SPFMV、SPCSV 编码的主要 RSS, 是未来抗病分子育种研究的新方向。建立甘薯脱毒健康种苗体系已是十分成熟的常规实验操作技术, 脱毒苗生产基地已初具规模, 但仍存在生产上所用脱毒甘薯品种单一、茎尖分生组织培养的再生率比较低、耗时长等问题。脱毒效果因甘薯品种的基因型不同存在较大差异, 传统的脱毒方法已无法满足多种病毒侵染的甘薯健康种苗培育体系的建立, 因此采用生物技术对进一步开拓和完善多种病毒侵染的机制具有重要意义。本文为甘薯多种病毒侵染机制的研究提供了方向, 同时也为遗传育种工作提供了一定的理论依据。

参考文献:

[1] 季志仙, 王美兴, 范宏环, 吴列洪, 朱金庆. 基于 ISSR 指纹的甘

薯食用品种的遗传多样性分析[J]. 核农学报, 2014, 28(7): 1197-1202

- [2] 张有林, 张润光, 王鑫腾. 甘薯采后生理、主要病害及贮藏技术研究[J]. 中国农业科学, 2014, 47(3): 553-563
- [3] Ngeve J M, Bouwkamp J C. Effects of sweet potato virus disease (SPVD) on the yield of sweet potato genotypes in Cameroon [J]. Experimental Agriculture, 1991, 27(2): 221-225
- [4] Schaefer G A, Terry E R. Insect transmission of sweet potato disease agents in Nigeria [J]. Phytopathology, 1976, 66(5): 642-645
- [5] Valverde R A, Lozano G, Navascastillo J, Ramos A, Valdes F. First report of Sweet potato chlorotic stunt virus and Sweet potato feathery mottle virus infecting sweet potato in Spain [J]. Plant Disease, 2004, 88(4): 428
- [6] Abad J A, Parks E J, New S L, Fuentes S, Jester W, Moyer J W. First report of Sweet potato chlorotic stunt virus, a component of sweetpotato virus disease, in North Carolina [J]. Plant Disease, 2007, 91(3): 327
- [7] Qiao Q, Zhang Z C, Qin Y H, Zhang D S, Tian Y T, Wang Y J. First report of Sweet potato chlorotic stunt virus infecting sweet potato in China [J]. Plant Disease, 2011, 95(3): 356
- [8] Briddon R W, Ghabrial S, Lin N S, Palukaitis P, Scholthof K B G, Vetter H J. Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005: 807-818
- [9] Gamarra H A, Fuentes S, Morales F J, Glover R, Malumphy C, Barker I. Bemisia afer sensu lato, a vector of Sweet potato chlorotic stunt virus [J]. Plant Disease, 2010, 94(5): 510-514
- [10] Moyer J W, Cali B B. Properties of Sweetpotato feathery mottle virus RNA and capsid protein [J]. Journal of General Virology, 1985, 65: 1185-1189
- [11] Edwardson J R, Christie R G. The Potyvirus Group. Vol. I-IV [M]. Florida: Florida Agricultural Experiment Station Monograph, 1991: 16
- [12] 马丽, 张春庆, 周玉亮. 甘薯病毒病检测技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2005(2): 88-91, 114
- [13] Deng X G, Zhu F, Chen Y J, Liu J, Zhu T, Li J Y. A more sensitive and rapid multiplex RT-PCR assay combining with magnetic nanobeads for simultaneous detection of viruses in sweet potato [J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 140(1): 111-117
- [14] 王文重, 张抒, 于德才. 马铃薯病毒分子检测技术研究进展[J]. 中国马铃薯, 2009, 23(1): 40-43
- [15] 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 检测方法及其在应用[J]. 植物保护, 2013, 39(2): 86-90
- [16] 李华伟, 许泳清, 邱思鑫, 刘中华, 邱永祥, 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[J]. 核农学报, 2015, 29(8): 1464-1470
- [17] 袁亚男, 刘文忠. 实时荧光定量 PCR 技术的类型、特点与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(3): 27-30
- [18] 王丽, 王振东, 乔奇, 秦艳红, 张德胜, 田雨婷, 王爽, 张立军, 张振臣. 甘薯褪绿矮化病毒西非株系实时荧光定量 PCR 检测方

- 法的建立及应用[J]. 植物病理学报, 2014, 44(5): 461-468
- [19] 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[J]. 中国农业科学, 2016, 49(1): 90-102
- [20] Chung B Y W, Miller W A, Atkins J F, Firth A E. An overlapping essential gene in the Potyviridae [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(15): 5897-5902
- [21] 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 [J]. Plant Disease, 2012, 96(2): 168-185
- [22] Untiveros M, Olsper A, Artola K, Firth A E, Kreuzer J F, Valkonen J P. A novel sweet potato potyvirus open reading frame (ORF) is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing [J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(7): 1111-1123
- [23] Mingot A, Valli A, Rodamilans B, San León D, Baulcombe D C, García J A, López-Moya J J. The P1N-PISPO trans-frame gene of *Sweet potato feathery mottle potyvirus* is produced during virus infection and functions as an RNA silencing suppressor [J]. Journal of Virology, 2016, 90(7): 3543-3557
- [24] Kreuze J F, Savenkov E I, Valkonen J P. Complete genome sequence and analyses of the subgenomic RNAs of *Sweet potato chlorotic stunt virus* reveal several new features for the genus Crinivirus [J]. Journal of Virology, 2002, 76(18): 9260-9270
- [25] Kreuze J F, Karyeija R F, Gibson R W, Valkonen J P T. Comparisons of coat protein gene sequences show that East African isolates of *Sweet potato feathery mottle virus*, form a genetically distinct group [J]. Archives of Virology, 2000, 145(3): 567-574
- [26] 牛颜冰, 青玲, 周雪平. RNA 沉默机制及其抗病毒应用[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2): 76-79
- [27] Llave C, Kasschau K D, Carrington J C. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(24): 13401-13406
- [28] Untiveros L M. Molecular Variability, Genetic Relatedness and a Novel Open Reading Frame (pispo) of Sweet Potato-infecting Potyviruses [D]. Helsingin: Helsingin Yliopisto, 2015: 2342-5431
- [29] Kreuze J F, Klein I S, Lazaro M U, Chuquiyuri W J, Morgan G L, Mejia P G, Ghislain M, Valkonen J P. RNA silencing-mediated resistance to a crinivirus (Closteroviridae) in cultivated sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) and development of sweet potato virus disease following co-infection with a potyvirus [J]. Plant Pathology, 2008, 9(5): 589-598
- [30] Cuellar W J, Kreuze J F, Rajamäki M L, Cruzado K R, Untiveros M, Valkonen J P. Elimination of antiviral defense by viral RNase III [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(25): 10354-10358
- [31] Weinheimer I, Boonrod K, Moser M, Wassenegger M, Krczal G, Butcher S J. Binding and processing of small dsRNA molecules by the class I RNase III protein encoded by *Sweet potato chlorotic stunt virus* [J]. Journal of General Virology, 2014, 95(2): 486-495
- [32] Mukasa S B, Rubaihayo P R, Valkonen J P T. Incidence of viruses and viruslike diseases of sweetpotato in Uganda [J]. Plant Disease, 2003, 87(4): 329-335
- [33] Hoyer U, Maiss E, Jelkmann W, Lesemann D E, Vetten H J. Identification of the coat protein gene of a sweet potato sunken vein closterovirus isolate from Kenya and evidence for a serological relationship among geographically diverse closterovirus isolates from sweet potato [J]. Phytopathology, 1996, 86(7): 744-750
- [34] Ishak J A, Kreuze J F, Johansson A, Mukasa S B, Tairo F, AboEI-Abbas F M, Valkonen J P T. Some molecular characteristics of three viruses from SPVD-affected sweet potato plants in Egypt [J]. Archives of Virology, 2003, 148(12): 2449-2460
- [35] Kwak H R, Kim M K, Jung M N, Lee S H, Park J W, Kim K H, Choi H S. Genetic Diversity of *Sweet potato feathery mottle virus* from sweet potatoes in Korea [J]. Plant Pathology Journal, 2007, 23(1): 13-21
- [36] Aritua V, Barg E, Adipala E, Gibson R W, Vetter H J. Further evidence for limited genetic diversity among east African isolates of *Sweet potato chlorotic stunt virus* [J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156(3): 181-189
- [37] 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感染引起的甘薯病毒病害 [J]. 植物病理学报, 2012, 42(3): 328-333
- [38] 包改丽, 左瑞娟, 饶维力, Li R H, 李凡. 云南甘薯病毒的检测及主要病毒的多样性分析 [J]. 微生物学通报, 2013, 40(2): 236-248
- [39] 姜珊珊, 谢礼, 吴斌, 辛相启, 陈剑平, 赵玖华. 山东甘薯主要病毒的鉴定及多样性分析 [J]. 植物保护学报, 2017, 44(1): 93-102
- [40] Qin Y, Zhang Z, Qiao Q, Tian Y, Wang Y. Molecular variability of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) and five potyviruses infecting sweet potato in China [J]. Archives of Virology, 2013, 158(2): 491-495
- [41] 王德亚, 原雪峰. 植物 RNA 病毒不依赖帽子翻译机制的研究进展 [J]. 病毒学报, 2017(4): 652-660
- [42] 贺振, 陈春峰, 张志想, 李世访. 马铃薯 Y 病毒科分子进化研究进展 [J]. 植物保护, 2017, 43(3): 13-22
- [43] Tugume A K, Cuélar W J, Mukasa S B, Valkonen J P. Molecular genetic analysis of virus isolates from wild and cultivated plants demonstrates that East Africa is a hotspot for the evolution and diversification of *Sweet potato feathery mottle virus* [J]. Molecular Ecology, 2015, 19: 3139-3156
- [44] Kwak H R, Kim J, Kim M K, Seo J K, Jung M N, Kim J S, Lee S, Choi H S. Molecular characterization of five potyviruses infecting Korean sweet potatoes based on analyses of complete genome sequences [J]. Plant Pathology Journal, 2015, 31(4): 388-401
- [45] Kokkinos C D, Clark C A. Effect of sweet potato virus disease and its viral components on gene expression levels in Sweetpotato [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2006, 47

- (1): 1063-1063
- [46] Karyeija 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 [J]. *Virology*, 2000, 269(1): 26-36
- [47] Steck M B. Interactions between a crinivirus, an ipomovirus and a potyvirus in coinfecting sweetpotato plants [J]. *Plant Pathology*, 2006, 55(3): 458-467
- [48] Choi S H, Mukasa S B, Kwon S T, Andronikov A V. Sr, Nd, Pb and Hf isotopic compositions of late Cenozoic alkali basalts in South Korea: Evidence for mixing between the two dominant asthenospheric mantle domains beneath East Asia [J]. *Chemical Geology*, 2006, 232(3): 134-151
- [49] Kokkinos C D, Clark C A. Interactions among *Sweet potato chlorotic stunt virus* and different potyviruses and potyvirus strains infecting sweetpotato in the United States [J]. *Plant Disease*, 2006, 90(10): 1347-1352
- [50] Feng C, Yin Z, Ma Y, Zhang Z, Chen L, Wang B, Li B, Huang Y, Wang Q. Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(1): 84-93
- [51] 马代夫, 李秀英, 李洪民, 谢逸萍, 王毅, 张立明, 李强, 刘章维. 甘薯脱毒苗特性鉴定及亲本利用评价 [J]. *中国农业科学*, 2001, 34(2): 146-152
- [52] Wang Q C, Valkonen J P. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy [J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 154(2): 135-145
- [53] 王爽, 刘顺通, 乔奇, 张德胜, 秦艳红, 张振臣. 甘薯病毒病害 SPVD 抗性鉴定方法及产量损失估计 [J]. *植物保护学报*, 2014, 41(2): 176-181
- [54] Mwangi R O M, Yencho G C, Gibson R W, Moyer J W. Methodology for inoculating Sweetpotato virus disease: Discovery of Tip Dieback, and plant recovery and reversion in different clones [J]. *Plant Disease*, 2013, 97(1): 30-36
- [55] Aritua V, Alicai T, Adipala E, Carey E E, Gibson R W. Aspects of resistance to Sweet potato virus disease in sweet potato [J]. *Annals of Applied Biology*, 2010, 132(3): 387-398
- [56] Cipriani G, Fuentes S, Bello V, Salazar L F, Ghislain M, Zhang D P. Transgene expression of rice cysteine proteinase inhibitors for the development of resistance against *Sweet potato feathery mottle virus* [C] // *Scientist and farmer: partners in research for the 21st Century. Program Report 1999-2000. Lima: CIP. 2001: 267-271*
- [57] Okada Y, Saito A. Evaluation of resistance to complex infection of SPFMVs in transgenic sweet potato [J]. *Breeding Science*, 2008, 58(3): 243-250
- [58] McGregor C, Miano D, Bonte D L, Hoy M, Clark C. The effect of the sequence of infection of the causal agents of Sweet potato virus disease on symptom severity and individual virus titres in sweet potato cv. Beauregard [J]. *Journal of Phytopathology*, 2010, 157(7/8): 514-517

Advances in Researches on Molecular Biology of SPVD

SUN Zhongyu^{1,2} GONG Ying¹ ZHAO Lin³ SHI Jiang³ MAO Bizeng^{1,2,*}

(¹Institute of Biotechnology Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058; ²Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hangzhou, Zhejiang 310021;

³Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021)

Abstract: Sweet potato virus disease (SPVD) is one of the most important viral diseases of sweet potato. Previous studies have documented that SPVD is formed by the co-infection of *sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) and *sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV). In this paper, the biological characteristics, detection methods, genome structure and genetic variation of SPFMV and SPCSV were reviewed, which may provide a theoretical basis for elucidating the mechanism as well as preventing and controlling mixed infection of various viruses.

Keywords: sweet potato virus disease, *Sweet potato feathery mottle virus*, *Sweet potato chlorotic stunt virus*, RNA silencing suppressor, comprehensive prevention and control