



Emaravirus 属新病毒：中国枣树花叶伴随病毒全基因组测序

刘达^{1,2}, 白剑宇³, 方荣祥^{1,2}, 张莉莉^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

²中国科学院大学, 北京 100049

³新疆林业科学院经济林研究所, 新疆 乌鲁木齐 830063

摘要:【目的】2016年以来,新疆阿克苏等地区出现了一种新的枣树病害,严重威胁当地及周边红枣产业。本研究旨在鉴定引起此次病害的病原,探究病原体的传播方式,为生物防治策略的开发提供研究基础。【方法】对发病植株进行小RNA测序以鉴定病原体;对新鉴定的病毒,通过RNAseq和反转录PCR获取病毒全序列;体外表达重组的病毒结构蛋白并制备特异性抗体,通过Western斑点杂交法在发病植株中确证病毒蛋白;收集发病区域的媒介昆虫,通过反转录PCR在昆虫体内检测病毒的基因组,鉴定可能的传毒介体。【结果】本研究鉴定一种新的欧洲山柰环斑病毒属病毒为新疆新发枣树病害可能的病原体,命名为中国枣树花叶伴随病毒(Chinese date mosaic-associated virus, CDMaV)。CDMaV是一种多分段单链RNA病毒,基因组由5条负义RNA组成;RNA1–RNA5大小分别为7160、2224、1230、1493、971 nt,每条基因组RNA的互补链包含一个开放阅读框,共编码5个蛋白,依次为依赖RNA的RNA聚合酶、包膜糖蛋白、核衣壳蛋白和两个未知功能蛋白。在枣树寄生虫枣瘿螨体内扩增到病毒序列,表明该病毒可能以枣瘿螨为介体在枣树间进行传播。【结论】本研究为新疆新发枣树病害鉴定了相关病原体CDMaV,完成CDMaV全基因组测序,并鉴定枣瘿螨为可能的传毒介体。鉴定病原体和传播介体是建立病害防治方法的必要基础。

关键词: 新发枣树病害, 中国枣树花叶伴随病毒, 病毒基因组, 病毒传播介体

2016年新疆阿克苏市和温宿县的枣园中出现一种新的枣树病害,发病的枣树植株叶有黄斑、卷曲、皱缩,枝条呈黄绿色、弯曲,结果少、果实畸形皱缩、皱缩处不着色。发病的枣果口感差,

甜度下降,失去了商业价值。2016年只在阿克苏市郊和温宿县的果园中零星发现感病枣树;而到了2017年,上述两地发病规模进一步扩大的同时,在阿克苏地区的新和县、库车县也发现了感病的

基金项目:新疆维吾尔自治区科技援疆项目“新疆枣树病毒病封锁防控关键技术研究及示范”(2018E02026)

*通信作者。Tel: +86-10-64861838; Fax: +86-10-64838123; E-mail: zhangll@im.ac.cn

收稿日期: 2019-04-22; 修回日期: 2019-06-14; 网络出版日期: 2019-11-12

枣树；在 2018 年，除阿克苏地区之外，病害还扩散到了相邻的和田地区、喀什地区。在阿克苏地区，发病面积已占枣园总面积的 10% 以上，其中发病严重的地块病害率高达 100%，枣果完全绝收。此外，不同品种的枣树，如骏枣、灰枣等，均有发病现象，且发病状况无差异。目前，新疆枣树种植面积高达 670 余万亩，红枣产业现已成为新疆区域经济发展的主要支柱产业之一。从被发现至今，该病害显露出快速传播的特征，已经对新疆的红枣产业安全构成了严重威胁。

我们在发病的枣树植株内鉴定到一种新的欧洲山柰环斑病毒属(*Emaravirus*)病毒，鉴定其为可能的病原体，并将其命名为中国枣树花叶伴随病毒(CDMaV)。*Emaravirus* 为 2012 年以来发现的一个新的植物病毒属，生物学分类为 *Negarnaviricota* 门，*Polyploviricotina* 亚门，*Ellioviricetes* 纲，*Bunyavirales* 目，*Fimoviridae* 科。该属病毒呈球形，外有糖蛋白包膜，基因组通常含有 4–8 条负义单链 RNA，以该属病毒的命名种 *European mountain ash ringspot-associated virus* 为例：该病毒含有 4 条负义单链 RNA，分别编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-directed RNA polymerase, RdRp)、核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, NP)、包膜糖蛋白(Envelope glycoprotein, GP)和运动蛋白^[1–2]。本论文通过对 CDMaV 的全基因组测序，证明其为 *Emaravirus* 属新成员；在枣树寄生虫枣瘿螨体内检测到了 CDMaV 基因组，符合该属病毒由瘿螨科传播的特征^[3–6]。

1 材料和方法

1.1 枣树样品的取材与保存

枣树(*Ziziphus jujuba*)叶片和枣果于 2017 年

9 月和 2018 年 9 月取自阿克苏市郊果园，剪下整个枝条后用湿纸巾包住切口运输。材料在 -80 °C 冰箱冷冻保存。

1.2 小 RNA 测序与 RNAseq

小 RNA 测序在百迈克生物科技有限公司完成，样品为发病枣树的叶片，表面消毒除菌后提取植物总 RNA。测序平台为 Illumina HiSeq 4000 高通量测序仪，测序读长为单端 50 nt。将原始数据保留长度为 18–35 nt 的序列，去除接头和长度异常的序列，通过 velvet 软件^[7]和 PFOR2^[8]将短序列拼接成较长的 contigs，使用 BLAST 算法在 GenBank Virus RefSeq 等数据库中比对，从而注释序列信息。RNAseq 在华大基因进行，样品为发病枣树的叶片，经表面消毒和除菌提取总 RNA。测序平台为 Illumina HiSeq2000 高通量测序仪，读长为 200 nt。去除 rRNA 构建特异性文库，原始数据去除低质量序列后，使用 Tophat 和 Cufflinks 软件构建转录本，使用 BLAST 进行比对。最后将注释为新病毒的序列拼接，获取全基因组信息。

1.3 引物设计

参照小 RNA 测序和 RNAseq 的结果，设计引物扩增 CDMaV，其中扩增基因组时 RNA2–RNA5 采取全长扩增的方法，RNA1 采取分段扩增，引物设计主要依据扩增片段的长度。所用引物见表 1。

1.4 植物总 RNA 的提取

取 0.5 g 枣树叶片或果肉，液氮充分研磨后转移至 1.5 mL 离心管中，加入 600 μL PureLink Plant RNA Reagent (Cat#12322012, Invitrogen, USA)，轻微振荡后室温放置 5 min 对细胞进行裂解；离心 (12000 r/min, 2 min) 去除沉淀，在上清中依次加 100 μL 5 mol/L NaCl 和 300 μL 氯仿，离心去除蛋

表 1. 本研究所用引物列表
Table 1. Primers used in this study

Primer name	Primer Sequences (5'→3')	Application
RNA1-1F	AGTAGTGAAGCTCCCTAAGAACTA	Amplification of 1–1541 nucleotides of RNA1
RNA1-1541R	AGTGTAACCCACATATCTCATTAT	
RNA1-1492F	TAAGTAATCCAAGAAAGACTTAC	Amplification of 1492–3019 nucleotides of RNA1
RNA1-3019R	ATCTTATTATATTTACCTCTCA	
RNA1-2950F	TGGAGAAAATAAACTATGGGA	Amplification of 2950–4550 nucleotides of RNA1
RNA1-4550R	TAAGATGCACATTTTGATGTAG	
RNA1-4479F	GACCTGATCAAGAAATATTTTG	Amplification of 4479–6007 nucleotides of RNA1
RNA1-6007R	GCTTCAGCCCCTTTGCCTCCAG	
RNA1-5948F	TAAGTATATTCAAAATCATTGGC	Amplification of 5948–7160 nucleotides of RNA1
RNA1-7160R	AGTAGTGTCTCCCTAAAAAACTG	
RNA2F	AGTAGTGTCTCCCAATAAACTTAAAAA ATAAAACAACTTGAATAATATATAATTTTT	Amplification of 1–2224 nucleotides of RNA2
RNA2R	AGTAGTGAAGCTCCCAATAAACTGACTATC AAAAACAAAACAACACGAAATATAAATATG	
RNA3F	AGTAGTGAAGCTCCTCAAAAAATAACCAAC TACATCAAAATCTTACAATCTTACACAAAT	Amplification of 1–1230 nucleotides of RNA3
RNA3R	AGTAGTGAAGCTCCCAATAAACTACCAACCT CAAACCTTGCAAACACA	
RNA4F	AGTAGTGAAGCTCCCATTAATAAACTGAATAACA GCTACAACCTAAAAACAAAATCAATA	Amplification of 1–1493 nucleotides of RNA4
RNA4R	AGTAGTGTCTCCCATCAAACTGCAAATCA TACCAAACAATGTAAATAGTATAAATAA	
RNA5F	AGTAGTGTCTCCCTAACAAAAATCAAAAA ATACTCAATCTCAACCCCATATAAACTTT	Amplification of 1–971 nucleotides of RNA5
RNA5R	AGTAGTGAGCTCCCTAACAAAAAAGCAAAC AGTTACAACATACAAAACAATTAATAAAAT	
RT1	AGTAGTGTCTCCCT	Specific reverse transcription primer 1
RT2	AGTAGTGAAGCTCCCT	Specific reverse transcription primer 2
RNA2-464F	CAATTTAACCTTGGCAAATCTGTGTC	Amplification of 464–1447 nucleotides of RNA2 for detection
RNA2-1447R	AAGTTCAATACATATGACCATTCTGG	
RNA3-586F	CTTTCTTTGCAATCTGTGAAGCTAGA	Amplification of 586–1365 nucleotides of RNA3 for detection
RNA3-1365R	AGTAGTGAAGCTCCTCAAAAAATAACC	
GP2FBamI	GGATCCGATGACAGTAAGTTCAATACATAT GACC	Primers for constructing protein expression vectors. <i>Bam</i> H I
GP2RECORI	GTTTGTAGATTTTGCCATCTATGACAAGCTTA AGAATTC	Primers for constructing protein expression vectors. <i>Eco</i> R I

白杂质, 取上层清液并加入等体积异丙醇沉淀核酸, 于 4 °C、12000 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 用 1 mL 75%乙醇洗涤后, 将沉淀风干, 溶于无 RNase 污染的 ddH₂O 并贮存于 -80 °C 备用。

1.5 反转录 PCR (RT-PCR)与 PCR

提取发病植株叶片的总 RNA, 通过 SuperScript III 反转录酶(Cat#18080044, Invitrogen, USA)及其反应体系, 按照该反转录酶的操作说明进行反

转录,获得包括病毒基因组 RNA 在内的 cDNA 产物,然后通过 PCR 对目的病毒片段进行扩增、测序及拼接。其中病毒基因组的 cDNA 合成所用引物包括随机引物或病毒基因组 RNA 末端特异性引物 RT1 和 RT2 的等比例混合。PCR 通过 KOD Plus (Cat#KOD-201, TOYOBO, Japan)及其反应体系进行,所用引物见表 1,退火温度按照不同引物进行设定,延伸时间由扩增序列的长度决定,每 1 kb 延伸 1 min。

1.6 抗体制备

将 CDMaV RNA2 编码的 GP 蛋白片段进行原核表达并纯化重组蛋白产生特异性抗体。表达载体为 pET-30a(+),宿主菌为 BL-21 菌株。通过双引物 GP2FBamI/GP2RECORI 从病叶总 cDNA 中扩增相应的 GP 基因片段,克隆至 pET-30a(+),转化 DH5 α 感受态细胞,对阳性克隆通过 T7 通用引物进行测序验证,将测序正确的重组质粒转化 BL-21 表达菌株。

将携带 GP 基因表达质粒的 BL-21 培养至 OD₆₀₀=0.5,加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 于 16 °C、160 r/min 过夜诱导,通过 SDS-PAGE 分别检测 GP 蛋白在菌体可溶或不可溶蛋白组分中的含量。由于该蛋白被证明主要存在于包涵体中,将诱导表达后的细胞裂解并弃去上清,将沉淀溶解在 8 mol/L 尿素中(含 0.1 mmol/L PMSF、0.1 mol/L NaH₂PO₄、0.01 mol/L Tris-HCl),通过变性法进行亲和纯化,纯化的蛋白通过凝胶电泳检测纯度,目的蛋白的含量超过总蛋白的 95%,将纯化的 GP 蛋白免疫家兔获得抗血清(中国科学院遗传与发育学研究所实验动物中心)。

1.7 Western 杂交

取 5 g 叶片或枣果,液氮充分研磨后加入 5 mL

0.02 mmol/L Na₂SO₄,离心去除杂质,将 800 μ L 上清转移至 1.5 mL 离心管,加入 200 μ L 5 \times SDS-loading,蛋白煮沸变性,通过 SDS-PAGE 凝胶(10%)分离蛋白,将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜。将 PVDF 膜于封闭液[TBST(Tris-buffered saline-Tween)+5% 脱脂奶粉]中对非特异性蛋白进行封闭;室温 1 h 后,去除封闭液,加入 1:2000 稀释于封闭液的抗 GP 蛋白的兔血清(一抗),室温反应 1 h;去除一抗,使用 TBST 清洗 3 遍,加入 1:10000 溶于封闭液的羊抗兔抗血清,室温孵育 1 h;TBST 洗 3 遍后通过增强化学发光法(ECL)进行显色。

1.8 媒介昆虫的收集和 RNA 提取

使用小毛刷轻扫新鲜枣树叶片的正反面,在体视显微镜下可以看到被扫下的枣瘿螨(*Epirimerus zizyphagus* Keifer)和枣蓟马(*Frankliniella intonsa*)。枣瘿螨体长约 0.10–0.15 mm,梭型,全身呈乳白色,可缓慢爬行;枣蓟马约 0.8–1.5 mm,细长,若虫淡黄色,成虫黄褐色,两对翅。用针头挑起小虫置入细胞裂解液中进行 RNA 的提取。提取每个 RNA 样本,所用枣瘿螨和枣蓟马的数量分别为 300 只和 40 只。

2 结果和分析

2.1 枣树病症

发病植株采集自新疆阿克苏市阿依库勒镇 5 大队 4 村枣树果园,该村周边既有成片发病的骏枣和灰枣果园,也有无枣树发病的骏枣和灰枣果园。田间健康枝条呈自然弯曲、浅绿色,叶片较饱满、深绿色,上表面一致朝上(图 1-A);发病早期的枝条弯曲程度与健康枝条无明显可见差异、颜色泛黄,叶片轻微内卷、叶脉开始呈现浅黄色,



图 1. 发病枣树的症状

Figure 1. Symptoms of jujube tree by pathogen infection. Leaves (A) and fruits (C) from healthy plants; Infected plants in early- (B) and late-infection (C) stages; Fruits from infected (D) and healthy plants (E).

有些叶片下表面翻转朝上(图 1-B); 发病晚期的枝条重度弯曲、颜色更近黄色, 叶片严重卷曲皱缩、有马赛克样黄斑, 上下表面的朝向混乱无规则(图 1-C)。病发无品种差异, 新疆常见的骏枣、酸枣等均感病。病害对于枣果的大小和总体形态没有明显的影响, 但是发病的枣果区域性畸形、皱缩, 总体着色不充分, 皱缩处完全不着色(图 1-D 和 E)。

2.2 枣树病叶的小 RNA 测序揭示了 Emaravirus 属新病毒

首先通过小 RNA 测序对该枣树病害的病原体进行鉴定^[9-10], 结果发现多条 Raspberry leaf blotch virus (RLBV) 的同源序列(表 2): 包括与 RdRp 同源的序列 53 条, 与包膜糖蛋白、核衣壳蛋白、P4 蛋白同源的序列 12 或 13 条, 与 P8a 同源的 1 条。目前 Emaravirus 属病毒在枣树中尚未见报道, 该病毒是一种新发枣树病毒。由于该病毒在枣树上鉴定, 我们将其命名为中国枣树花叶伴随病毒, 简称为 CDMaV。

2.3 通过 RNAseq 对 CDMaV 全基因组测序

通过 RNAseq 对该枣树病毒的全基因组序列进行测定和拼接(图 2)。CDMaV 基因组共含有 5 条 RNA, 其中 RNA1 全长 7160 nt, 编码 271 kDa 的 RdRp, 其核酸序列与 RLBV 的 RNA1 同源性为 83%; RNA2-RNA5 全长分别为 2224、1230、1493、971 nt, 与 RLBV 相应基因组 RNA 的核酸序列同源性分别为 65%、54%、69% 和 22%^[6,11], 依次编码 75.9 kDa 的包膜糖蛋白、33.1 kDa 的核衣壳蛋白以及两个大小分别为 42.5 kDa 和 33 kDa

表 2. 小 RNA 测序结果汇总

Table 2. Summarized results of the small RNA sequencing

Viral protein [Virus]	Contig/s
RNA-directed RNA polymerase [RLBV]	53
Envelope glycoprotein [RLBV]	12
Nucleocapsid protein [RLBV]	12
P4 protein [RLBV]	13
P8a [RLBV]	1

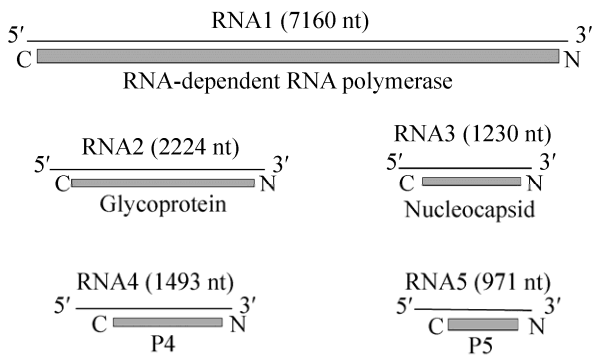


图 2. CDMaV 基因组结构示意图

Figure 2. Schematic diagram for the CDMaV genome. The genome is segmented and consists of five segments of linear negative-sense and single-stranded RNA. The complete genome is 13.078 kb.

的未知功能蛋白。CDMaV 与 RLBV 具有最高的序列同源性，但基因组比 RLBV 少 3 条 RNA。CDMaV 的所有 5 条 RNA 在首尾两端含有约 15 个核苷酸的反向互补区域，与 Emaravirus 属的其他成员的特征吻合^[1,6]。

2.4 RT-PCR 检测 CDMaV

为了确保高通量测序的准确性，使用 RT-PCR 的方法将病毒基因组克隆测序。为确保病毒 cDNA 的完整性，我们尝试了多种反转录酶和引物的组合，最终确定了两种反转录方案：除 Superscript RT III 反转录酶和随机引物的组合之外，我们设计了 Superscript RT III 和 RT1、RT2 引物的等比混合反转录体系。如表 3 所示，CDMaV 的 5 条 RNA 在首尾两端均有约 15 个核苷酸的反向互补区段，但 5 条 RNA 的反向互补区段不完全相同，主要区别在于第 8 和第 9 位核苷酸，RNA1、3、4 的第 8、9 位核苷酸是 AA，而 RNA2、5 的第 8、9 位核苷酸是 TT。RT1 和 RT2 的设计正是基于 CDMaV 的这种特征，其中 RT1 的第 8、9 位核苷酸选择了 TT，RT2 选择了 AA，当两条引物等比混合时，进行的反转录可以获得完整的病毒 cDNA。这两种

表 3. RNA1–RNA5 的末端特异序列和反转录引物

Table 3. The 5' and 3' end sequences of RNA1–RNA5 and the designed RT-PCR primers

Primer	5' end sequence	3' end sequence
RNA1	AGTAGTGAAGCTCCCT-	-AGGGAGAACACTACT
RNA2	AGTAGTGTTCCTCCCA-	-TGGGAGTTCACTACT
RNA3	AGTAGTGAAGCTCCT-	-AGGAGAACACTACT
RNA4	AGTAGTGAAGCTCCCA-	-TGGGAGAACACTACT
RNA5	AGTAGTGTTCCTCCCT-	-AGGGAGCTCACTACT
RT1	AGTAGTGTTCCTCCCT	
RT2	AGTAGTGAAGCTCCCT	

方案反转录获得的病毒全基因组信息，通过各基因组 RNA 的特异性引物进行全长扩增，或分段扩增并拼接全长，扩增引物见表 1。其中 RNA2–RNA5 均可以通过首末端引物获得全长，而 RNA1 由于序列太长，采用分段扩增的方式，分五段扩增并对序列进行拼接后获得全长。

2.5 在发病植株中检测 CDMaV 的病毒蛋白

为了进一步在发病植株中确证 CDMaV，我们设计合成了该病毒的 GP 蛋白的抗体，Western 杂交发现 CDMaV 的 GP 蛋白在不同时期发病的枣树叶片和果实中均能检测到，而在健康枣树中则检测不到(图 3)。该结果进一步验证了 CDMaV 与发病枣树的相关性。

2.6 CDMaV 可能通过枣瘿螨在枣树之间传播

由于 Emaravirus 属多种病毒以瘿螨(*Eriophyid mites*)为媒介进行传播，我们从枣园中收集枣瘿螨和枣蓟马，通过 RT-PCR 检测虫体内是否携带 CDMaV。以发病枣树的总 RNA 作为阳性对照，我们对 RNA1–RNA3 三条 RNA 的部分片段进行扩增(引物序列见表 1)。结果发现，3 个 CDMaV 特异性 RNA 片段均能从枣瘿螨中检测到，而在枣蓟马中检测不到(图 4)，表明枣瘿螨可能是 CDMaV 潜在的传播介体。

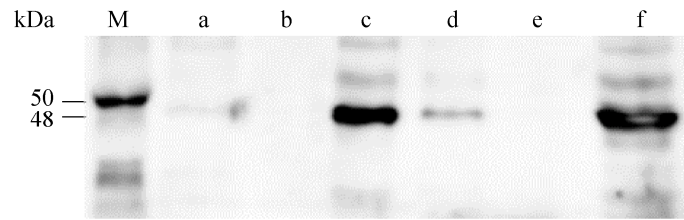


图 3. Western blotting 斑点杂交法检测病毒蛋白

Figure 3. Western blotting to detect CDMaV GP protein in healthy and infected plants. Anti-GP antiserum was used as the primary antibody. a, c, d, f: Proteins were extracted from the leaves or fruits of infected plants in different time. a: leaves in September 2017, c: leaves in September 2018, d: fruits in September 2017, f: fruits in September 2018. b, e: Proteins were extracted from the leaves (b) or fruits (e) of healthy plants in September 2018. M: Protein standard. The CDMaV GP protein has a predicted molecular weight of 48 kDa.

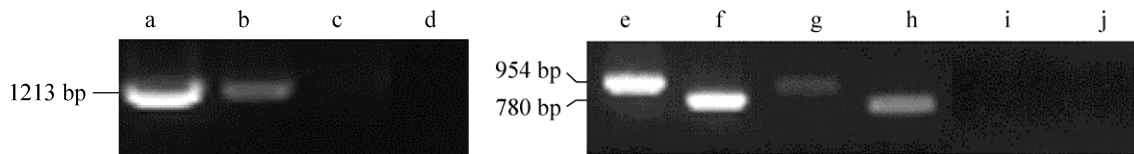


图 4. PCR 在媒介昆虫体内鉴定 CDMaV

Figure 4. PCR to show the CDMaV sequences carried by *E. zizyphagus*. a–d: Primer pair RNA1-5948F/RNA1-7160R to amplify CDMaV sequences from infected plant leaves (a), the body of *E. zizyphagus* (b), the body of *F. intonsa* (c) and ddH₂O as a negative control (d). e, g, i: Primer pair RNA2-464F/RNA2-1447R to amplify CDMaV sequences from infected leaves (e), the body of *E. zizyphagus* (g) and ddH₂O (i). f, h, j: Primer pair RNA3-586F/RNA3-1365R to amplify CDMaV sequences from infected leaves (f), the body of *E. zizyphagus* (h) and ddH₂O (j).

3 讨论

本研究中我们鉴定了新疆阿克苏地区新发枣树病害的病原体，命名为中国枣树花叶伴随病毒 CDMaV，完成 CDMaV 的全基因组测序，并鉴定枣瘿螨为 CDMaV 可能的传播媒介。

Emaravirus 属成员的基因组通常由多条 RNA 组成，CDMaV 基因组符合该基因组特征，由 5 条单链 RNA 组成。除 RNA1 与其他 Emaravirus 属病毒相应序列高度保守之外，其余 4 条 RNA 与近亲种 RLBV 的核酸序列同源性为 22%–69%，表明这是一种新的 Emaravirus 属病毒。根据 2018 年 ICTV 第 10 次报告，Emaravirus 属病毒已有 9 个正式

种^[12–14]，CDMaV 为该属的第 10 个正式种。

我们通过多种实验对 Emaravirus 属病毒 CDMaV 与新疆新发枣树病害之间的关联性进行证明，包括通过小 RNA 测序证明发病枣树中存在一种新发 Emaravirus 属病毒；通过全基因组测序在发病枣树中获得了 CDMaV 全序列；通过 Western 杂交证明 CDMaV 的蛋白选择性地存在于发病的枣树中。未来还需要将病毒接种到健康的枣树植株，并获得相应的病害表型，来确定 CDMaV 是否该枣树病害的病原体。本研究鉴定枣瘿螨为可能的传播介体，除了为病害防治提供灭虫指导之外，还将为病毒侵染健康的枣树植株提供有效的接种手段。

我们考察枣园时注意到, 尽管该病害扩散能力很强、速度很快, 仍会在发病严重的地块附近看到完全不感病的地块, 两块枣园相隔约 1 km, 气候环境完全相同, 差别在于, 未感病的枣园合理密植, 且始终在专家指导下定期喷洒杀虫剂和除草剂。该现象一方面表明现有的种植和灭虫手段可以暂时阻止该病害扩散, 另一方面也表明了合理种植和有效灭虫在防控该病害中的重要作用。从根本上防控该病害的发生和发展, 则需要建立在明确的病毒生活史、病毒传播路径和侵染机制的基础上。

参 考 文 献

- [1] Mielke N, Muehlbach HP. A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *The Journal of General Virology*, 2007, 88(4): 1337–1346.
- [2] Mielke-Ehret N, Mühlbach HP. Emaravirus: a novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. *Viruses*, 2012, 4(9): 1515–1536.
- [3] Elbeaino T, Digiario M, Martelli GP. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. *Archives of Virology*, 2009, 154(11): 1719–1727.
- [4] Elbeaino T, Digiario M, Uppala M, Sudini H. Deep sequencing of dsRNAs recovered from mosaic-diseased pigeonpea reveals the presence of a novel emaravirus: pigeonpea sterility mosaic virus 2. *Archives of Virology*, 2015, 160(8): 2019–2029.
- [5] Kumar PL, Jones AT, Reddy DVR. A novel mite-transmitted virus with a divided RNA genome closely associated with pigeonpea sterility mosaic disease. *Phytopathology*, 2003, 93(1): 71–81.
- [6] McGavin WJ, Mitchell C, Cock PJA, Wright KM, MacFarlane SA. Raspberry leaf blotch virus, a putative new member of the genus *Emaravirus*, encodes a novel genomic RNA. *The Journal of General Virology*, 2012, 93(2): 430–437.
- [7] Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 2008, 18(5): 821–829.
- [8] Zhang ZX, Qi SS, Tang N, Zhang XX, Chen SS, Zhu PF, Ma L, Cheng JP, Xu Y, Lu MG, Wang HQ, Ding SW, Li SF, Wu QF. Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(12): e1004553.
- [9] Barba M, Czosnek H, Hadidi A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 2014, 6(1): 106–136.
- [10] Roossinck MJ, Martin DP, Roumagnac P. Plant virus metagenomics: advances in virus discovery. *Phytopathology*, 2015, 105(6): 716–727.
- [11] Lu YW, McGavin W, Cock PJA, Schnettler E, Yan F, Chen JP, MacFarlane S. Newly identified RNAs of raspberry leaf blotch virus encoding a related group of proteins. *The Journal of General Virology*, 2015, 96(11): 3432–3439.
- [12] Zheng YZ, Navarro B, Wang GP, Wang YX, Yang ZK, Xu WX, Zhu CX, Wang LP, Di Serio F, Hong N. Actinidia chlorotic ringspot-associated virus: a novel emaravirus infecting kiwifruit plants. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(4): 569–581.
- [13] Tatineni S, McMechan AJ, Wosula EN, Wegulo SN, Graybosch RA, French R, Hein GL. An eriophyid mite-transmitted plant virus contains eight genomic RNA segments with unusual heterogeneity in the nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, 2014, 88(20): 11834–11845.
- [14] Di Bello PL, Laney AG, Druciarek T, Ho T, Gergerich RC, Keller KE, Martin RR, Tzanetakis IE. A novel emaravirus is associated with redbud yellow ringspot disease. *Virus Research*, 2016, 222: 41–47.

Full genome sequence of Chinese date mosaic-associated virus, a new member of the genus *Emaravirus*

Da Liu^{1,2}, Jianyu Bai³, Rongxiang Fang^{1,2}, Lili Zhang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ Institute of Economic Forest, Xinjiang Academy of Forestry Sciences, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] A new jujube disease has emerged in Aksu and other areas in Xinjiang since 2016, seriously threatening the local and surrounding jujube industries during the last three years. This study aims to identify the causative pathogen(s) and to investigate the pathogen transmission route(s), therefore providing guides for the disease control strategies. [Methods] Small RNA sequencing was performed to identify potential pathogen(s), which revealed a new jujube virus. RNAseq and reverse transcription PCR (RT-PCR) were performed to obtain the whole genomic sequence of the identified virus. A viral protein was *in-vitro* expressed for antibody preparation. Western blotting with the viral specific antibody confirmed the specific existence of the viral protein in infected plants. Insects were collected in the disease-occurred areas and RT-PCR was performed to identify potential virus-transmission vector(s). [Results] This study identified a new virus, belonging to *Emaravirus* and named as Chinese date mosaic-associated virus (CDMaV) in this study, as a correlated causative agent for Xinjiang jujube disease. We obtained the whole genomic sequence of this viral strain. The CDMaV genome is segmented and consists of five segments of linear negative-sense and single-stranded RNA. The complete genome is 13.078 kb, with RNA1–RNA5 containing 7160 nt, 2224 nt, 1230 nt, 1493 nt, and 971 nt, respectively. The complementary strand of each genomic RNA encodes a single open reading frame, sequentially the five encoded proteins are RNA-dependent RNA polymerase, envelope glycoprotein, nucleocapsid protein, and two unknown functional proteins. The virus specific sequences could be amplified from *Epirimerus zizyphagus*, indicated that CDMaV might be transmitted from infected jujube trees to the healthy plants via this insect vector. [Conclusion] This study identified CDMaV as the correlated causative agent for the newly emerged jujube disease in Xinjiang, sequenced the viral genome and identified *E. zizyphagus* as a potential insect vector for viral transmission. Identification of pathogen and its transmission route would efficiently guide the development of disease control strategies.

Keywords: newly emerged jujube disease, Chinese date mosaic-associated virus, viral genome, insect vector

(本文责编: 李磊)

Supported by the Xinjiang Uygur Autonomous Region Science and Technology Aid Project “Research and Demonstration of Key Technology for the Prevention and Control of Jujube Virus Disease in Xinjiang” (2018E02026)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64861838; Fax: +86-10-64838123; E-mail: zhangll@im.ac.cn

Received: 22 April 2019; Revised: 14 June 2019; Published online: 12 November 2019