



一株新型云南牛环状病毒的分离鉴定

杨振兴¹, 李占鸿¹, 廖德芳¹, 高翔², 胡忠燕², 谢佳芮¹, 李华春^{1*}, 杨恒^{1*}

¹云南省畜牧兽医科学院, 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南 昆明 650224

²景洪市动物疫病预防控制中心, 云南 景洪 666100

摘要: 【目的】为加深云南省动物虫媒病毒多样性的认知。【方法】在云南省景洪市设立哨兵牛, 定期采血接种细胞进行虫媒病毒的分离; 通过RT-PCR、电镜观察与基因组琼脂糖凝胶电泳对分离病毒进行初步鉴定; 扩增分离病毒的基因节段2 (Seg-2)与基因节段3 (Seg-3)全长序列进行分析与系统发生树的构建, 明确病毒的分类地位; 通过qRT-PCR与血清中和试验对病毒在动物上的感染进行回溯分析。

【结果】2019年7月, 从哨兵牛上采集的血液中分离到1株可在BHK-21细胞上引起细胞病变的病毒; 电镜下观察, 病毒粒子呈球形, 直径约70 nm; 琼脂糖凝胶电泳显示病毒基因组由双链RNA组成, 呈现“3-3-3”的带型特征。分离毒株的Seg-2编码环状病毒属病毒保守的T2蛋白, 与Mobuck virus具有最近的亲缘关系, 核酸与氨基酸序列相似度分别为72.8%与84.0%; 分离毒株的Seg-3编码决定环状病毒属病毒血清型的OC1蛋白, 与Mobuck virus的核酸与氨基酸序列相似度仅为60.2%与56.5%; 在T2与OC1蛋白构建的系统发生树上, 分离毒株形成独立于Mobuck virus的进化分支。对哨兵牛血液中的病毒核酸与血清中和抗体回溯分析结果显示, 从病毒感染哨兵动物至监测期结束的17周内, 动物血液中均可检测到病毒核酸; 动物感染病毒1周后, 开始产生特异性中和抗体, 随后上升至最高水平(抗体效价1:226), 至监测期结束, 中和抗体仍维持在较高水平(抗体效价1:113)。【结论】本研究首次报道了1种新型Mobuck virus在云南省哨兵牛上的分离与感染特性。研究结果丰富了对我国环状病毒属病毒的认知, 为开展病毒的诊断、流行病学与致病性研究奠定了基础。

关键词: 环状病毒属病毒, Mobuck 病毒, 病毒分离与鉴定, 进化分析, 感染动态分析

基金项目: 国家自然科学基金(31760744); 公益性行业(农业)科研专项(201303035); 国家重点研发计划(2017YFC1200505); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养项目(2017HB055)

*通信作者。E-mail: 李华春, li_huachun@hotmail.com; 杨恒, yangheng2008.cool@163.com

收稿日期: 2020-06-23; 修回日期: 2020-09-10; 网络出版日期: 2020-10-16

环状病毒属(*Orbivirus*)成员广泛分布于热带、亚热带与温带地区,病毒主要通过库蠓、蜱与蚊等吸血昆虫对动物的吸血性叮咬进行传播,可感染人、反刍动物、马属动物、有袋目哺乳动物、蝙蝠以及鸟类等多种动物并引发相关疾病,给公共卫生安全和家畜养殖业带来巨大的危害^[1-2]。环状病毒属中的蓝舌病病毒(bluetongue virus, BTV)与非洲马瘟病毒(African horse sickness virus, AHSV)感染动物引起的动物蓝舌病与非洲马瘟,被世界动物卫生组织(Office International des Epizooties, OIE)列为法定报告动物疫病^[3-4]。2006至2008年,欧洲暴发了有记录以来最为严重的动物蓝舌病,给欧洲各国的牛羊养殖业带来巨大的经济损失^[5]。2020年4月2日泰国暴发非洲马瘟,引起OIE和周边国家的高度重视,我国海关总署与农业农村部立即发布了《关于防止泰国非洲马瘟传入我国的公告》。

环状病毒属病毒粒子呈球形,具有二十面体对称结构,无囊膜,表面分布有大量纤维状突起;病毒基因组大小约为19–21 kb,由10个基因节段(Segment, Seg)的双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)构成,根据基因节段大小分别命名为Seg-1(约3.9–4.1 kb)至Seg-10(约0.7–0.8 kb)^[6]。病毒结构主要由外层衣壳、内层衣壳与内部核心等三部分组成^[7],构成病毒外层衣壳的OC1蛋白具有高度变异的特性,是诱导机体产生特异性中和抗体的主要蛋白,决定着病毒的血清型。构成病毒内层衣壳的T2蛋白在环状病毒属同种病毒间高度保守,根据T2蛋白氨基酸序列构建的系统发生树,可将环状病毒属病毒分为蚊传播环状病毒(mosquito-borne orbiviruses, MBOs)、库蠓传播环状病毒(culicoid-borne orbiviruses, CBOs)

与蜱传播环状病毒(tick-borne orbiviruses, TBOs)三大类^[8-10]。

2012年,国际病毒分类委员会(International Committee for the Taxonomy of Viruses, ICTV)确定了环状病毒属的22种病毒^[2]。但近年来不断有新型环状病毒被发现:Mobuck virus于2012年在美国伊利诺斯州发病死亡的白尾鹿(*Odocoileus virginianus*)体内分离获得^[11];秘鲁马瘟病毒(Peruvian horse sickness virus, PHSV)于1997年在秘鲁山区病马体内分离,曾导致该地区大量的马匹发病死亡^[12];CHeRI orbivirus于2019年从美国佛罗里达州发生急性出血性疾病死亡的白尾鹿中分离发现^[13]。此外还有一些致病性尚不清楚的环状病毒属病毒被陆续分离,例如2010年,在日本兵库县采集的蜱中分离到Muko virus (MUV)^[14],2013年在美国爱荷华洲蚊子中分离到Skunk river virus (SRV),2013年在非洲乌干达蝙蝠上分离出Bukakata orbivirus (BUKV)等^[15]。以上研究表明环状病毒属病毒具有高度的遗传多样性,对该属病毒多样性的认知是一个长期不断完善的过程。

我国也存在多种环状病毒属病毒的流行,其中BTV、动物流行出血病病毒(epizootic haemorrhagic disease virus, EHDV)与帕利亚姆血清群病毒(Palyam serogroup virus, PALV)广泛流行于我国南方地区,自2012年以来,本实验室在我国云南、广东与广西的哨兵动物上相继分离出了12种血清型BTV、5种血清型的EHDV和3种血清型的PALV^[16-18]共计300余株。此外,我国近年来也陆续分离出多种新型环状病毒属病毒:云南环状病毒(Yunnan orbivirus, YUOV)于2005年在云南的蚊中分离,病毒的致病性尚不明确^[19];西藏环状病毒(Tibet orbivirus, TIBOV)于2009年在我国西

藏墨脱县的蚊子中分离,在牛羊上均检测到病毒阳性抗体,表明病毒可感染多种动物^[20-21];广西环状病毒(Guangxi orbivirus, GXOV)于2015年在哨兵牛上分离获得^[22]。我国流行的环状病毒属病毒具有高度的多样性,在动物上往往具有不同程度的致病性,加深对我国环状病毒属病毒多样性与致病性的认知,在保障公共卫生安全与动物疫病防控方面具有极为重要的意义。

本研究于2019年在云南省景洪市郊区选择牛作为哨兵动物,进行虫媒病毒的分离与鉴定,首次从哨兵动物的血液中分离出1株新型的Mobuck virus。本文对病毒的分离、鉴定与病毒在哨兵牛上的感染特性进行了报道,研究结果丰富了对我国环状病毒属病毒的认知,为开展新型环状病毒属病毒的诊断、流行病学与致病性研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 细胞与毒株

BHK-21细胞(仓鼠肾细胞)、C6/36细胞(白纹伊蚊细胞)由本实验保存,细胞以含10%胎牛血清的MEM分别培养于含5% CO₂的37 °C与27 °C培养箱。BTV血清1型Y863毒株(BTV-1/Y863)^[23]、EHDV血清10型毒株(EHDV-10/V277)^[24]和PALV毒株(PALV/SZ187)^[25]由本实验室分离保存。

1.2 主要试剂

胎牛血清与MEM培养基购自Gibco公司;RNA提取试剂RNAiso Plus、逆转录酶PrimeScript II Reverse Transcriptase、高保真DNA聚合酶Prime STAR GXL DNA Polymerase,高分辨率琼脂糖、DNA纯化试剂盒、一步法RT-PCR试剂盒与荧光

定量qRT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司;RNA纯化试剂盒Monarch RNA Cleanup Kit和T4 RNA Ligase I购自NEB公司;pLB平末端克隆试剂盒与大肠杆菌DH5 α 感受态细胞购自天根公司;磁珠法病毒RNA抽提试剂盒MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit购自Thermo Fisher公司。

1.3 哨兵动物的设立与血液样本的采集

2019年5月,在云南省景洪市勐罕镇(经纬度:100°59'53", N21°54'58", 海拔550米)设置3头年龄在1周岁,BTV、EHDV与阿卡斑病毒(Akabane virus, AKAV)血清学检测为阴性的云南黄牛,作为虫媒病毒监测的哨兵动物。哨兵动物不使用疫苗与驱虫药,采用放牧方式进行饲养。当年的5月初至10月底,每周定期由当地兽医从哨兵动物上采集肝素钠抗凝血、EDTA抗凝血与全血3种血液样本。采集的血液样品于4 °C冰盒保存,送至云南省热带亚热带动物病毒重点实验室进行虫媒病毒的检测与病毒分离工作。

1.4 病毒分离

取500 μ L肝素钠抗凝血离心收集红细胞,以PBS洗涤1次,加入灭菌水裂解,取200 μ L红细胞裂解液接种生长成单层的C6/36细胞,连续盲传3代后取细胞培养上清,接种BHK-21细胞,继续盲传5代,当接种细胞出现明显细胞病变(cytopathic effect, CPE)时,收获细胞上清,冻存于-80 °C,待进一步的病毒鉴定。

1.5 病毒的一步法RT-PCR鉴定

使用病毒RNA/DNA提取试剂盒提取待鉴定病毒的核酸。将提取的核酸于95 °C变性3 min,立即冰浴。取5 μ L变性的核酸为模板,使用PrimeScript One Step RT-PCR Kit,以BTV、

EHDV、PALV 和 AKAV 等 4 种病毒的特异性引物进行病毒的一步法 RT-PCR^[26-29]鉴定。

1.6 病毒基因组 dsRNA 的提取与电泳检测

取病毒液接种 BHK-21 细胞,待细胞开始出现 CPE 时,刮下病变细胞,8000 r/min 离心 30 min。在离心收集的细胞中加入核酸提取试剂 RNAiso-Plus,按说明书操作提取总 RNA。按照 Attoui 等^[30]的报道进行病毒基因组 dsRNA 的纯化,以 2%的高分辨率琼脂糖凝胶进行电泳,分析病毒基因组 dsRNA 的电泳带型特征。

1.7 病毒的电镜观察

取培养的病毒液,以 8000 r/min 离心 10 min,除去细胞碎片。将离心后的细胞上清转入超速离心管中,以 SW40 转头,在 Beckman 超速离心机以 40000 r/min 离心 3 h。将离心后的沉淀以适量 TNE buffer 重悬,置于 4 °C 过夜。次日以 12000 r/min 离心 5 min,取上清滴于铜网上,以 2%磷钨酸溶液(pH 6.8)进行负染,在透射电镜(日立 HT7800,日本)下观察病毒粒子的形态。

1.8 基因组 cDNA 的合成与 PCR 扩增

取 10 μL 纯化后病毒基因组 dsRNA 为模板,参照 Maan 等报道的全长 cDNA 扩增技术^[31]进行病毒全基因组 cDNA 的合成。以合成的 cDNA 为模板,使用 GXL 高保真 DNA 聚合酶进行病毒基因组的 PCR 扩增,扩增程序为:94 °C 3 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,68 °C 4 min,35 个循环。反应结束后,取 5 μL PCR 扩增产物电泳,检测病毒基因组扩增产物的完整性。

1.9 克隆测序

取病毒的基因组扩增产物于冰浴条件下,90 V 电压电泳约 6 h,待病毒基因组的各 DNA 条带在

凝胶上完全分离。切下含有 Seg-2 与 Seg-3 DNA 条带的凝胶,以胶回收试剂盒进行纯化。将纯化后的 DNA 片段与 pLB 平末端克隆载体连接,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,挑取菌落进行 PCR 鉴定,提取阳性菌落质粒,进行双向测序。

1.10 系统发生树的构建

使用 NCBI 的 ORF 分析软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)对病毒 Seg-2 与 Seg-3 基因节段编码的蛋白进行预测分析。从 GenBank 下载其他环状病毒属代表毒株的序列,使用 Mafft-win 软件^[32]与本研究获取的病毒序列进行比对,使用 BioEdit 计算核酸与氨基酸序列相似度(nt/aa),使用 Prottest (3.4.2)软件^[33]进行氨基酸序列进化模型的选择,使用 MEGA X 软件^[34]以最大似然法(maximum likelihood, ML)完成系统发生树的构建。在系统发生树上,本研究获取的病毒序列以红色三角表示,其他参考毒株的序列以“GenBank 序列号_病毒名称”进行表示。

1.11 病毒在动物上的感染特性分析

根据获取病毒的 Seg-2 序列,设计特异性探针与引物,并体外逆转录制备标准品 ssRNA,用于哨兵动物血液中病毒核酸拷贝数的实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR)检测,上游引物序列为 JHBOV-F: 5'-TCTCCATTAGTTCAGAATTTCG-3';下游引物序列为 JHBOV-R: 5'-GAGTCTCGCATATTAGTGTA-3'; TaqMan 探针序列为 JHBOV-Probe: 5'-AACACCTCAATATCTTCAACGACAG-3'。TaqMan 探针的 5'端标记 FAM (6-羧基荧光素)基团,3'端标记 BHQ1 淬灭基团。取 5 至 10 月份采集的哨兵牛血液 50 μL,使用磁珠法病毒 RNA 抽提试剂盒提取病毒核酸。取 4 μL 核酸为模板进行 qRT-PCR 反应,反应条件为

45 °C 5 min, 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。

将病毒液 10 倍梯度稀释后接种 BHK-21 细胞, 以 Karber 法测定病毒的 TCID₅₀; 将采集的动物血清 56 °C 灭活处理 30 min, 10 倍梯度稀释备用。取 100 TICD₅₀ 的病毒悬液与梯度稀释的动物血清作用, 在 96 孔板上采用“固定病毒-稀释血清”的方法测定梯度稀释的血清对病毒引起细胞 CPE 的抑制作用。通过 Karber 法计算血清中和抗体的效价, 分析感染动物血清中和抗体水平的动态变化。

2 结果和分析

2.1 病毒的分离与初步鉴定结果

2019 年在景洪设立的哨兵牛上共采集血液样本 75 份, 每头哨兵牛各采集 EDTA 抗凝血、肝素钠抗凝血和常规血各 25 份。将 3 头哨兵牛上每周采集的血液样本分别接种 C6/36 与 BHK-21 细胞进行病毒的盲传分离, 相继分离与鉴定出 BTV、EHDV、PALV 与芒市病毒 MSV (Mangshi virus, MSV) 等虫媒病毒, 提示该地区流行动物虫媒病毒的多样性。

3 号哨兵牛 7 月 9 日采集的血液样本接种 C6/36 细胞盲传 3 代, 未观察到细胞 CPE。将 C6/36 细胞

培养物接种 BHK-21 细胞继续盲传 2 代, BHK-21 细胞开始出现规律的 CPE, 表现为接种后的 72–120 h, 细胞逐步出现聚集、变圆、脱落与细胞裂解(图 1)。提取病变细胞的核酸, 以 BTV、EHDV、PALV 与 AKAV 的一步法 RT-PCR^[26–29]进行扩增检测, 结果无任何扩增条带出现。离心收集病变细胞培养液的上清, 将其命名为 YNJH/V292/2019。

2.2 分离病毒的基因组电泳与电镜观察结果

提取 YNJH/V292/2019 与作为参照的 BTV-1/Y863、EHDV-10/V277 和 PALV/SZ187 毒株的核酸, 以 2% 的高分辨率琼脂糖进行电泳分析。结果显示, YNJH/V292/2019 毒株的基因组含多个基因节段的 dsRNA, 在凝胶上的带型特征呈现“3-3-3”的特征, 与 PALV/SZ187 的基因组带型特征(“3-3-3-1”)有较大差异, 与 BTV-1/Y863 和 EHDV-10/V277 的基因组带型特征类似, 但各基因节段的迁移率呈明显不同(图 2-A)。电镜下观察, YNJH/V292/2019 的病毒粒子呈“指环状”, 直径约 60–70 nm, 病毒表面可见明显的花瓣状突起, 与文献报道^[21]的环状病毒属病毒粒子特征接近(图 2-B)。YNJH/V292/2019 毒株基因组 dsRNA 琼脂糖凝胶电泳与电镜观察结果提示该毒株可能为环状病毒属病毒。

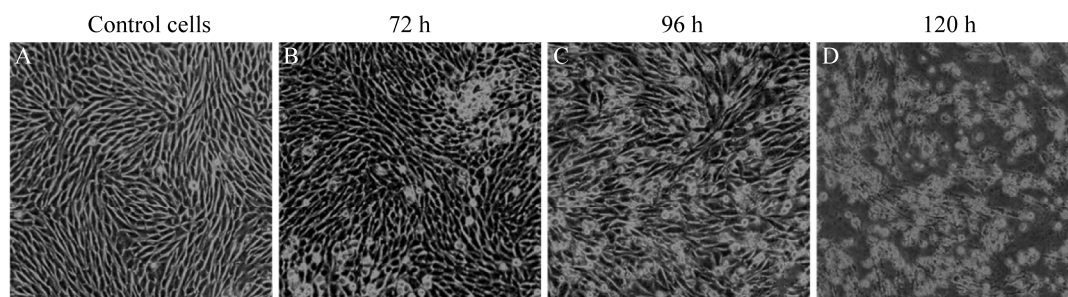


图 1. YNJH/V292/2019 接种 BHK-21 细胞后引起的 CPE (100×)

Figure 1. Cytopathic effect of YNJH/V292/2019 on BHK-21 cells (100×). A: uninfected BHK-21 control cells at 120 h; B, C, D: the cytopathic effect of BHK-21 after inoculated with YNJH/V292/2019 for 72 h, 96 h and 120 h.

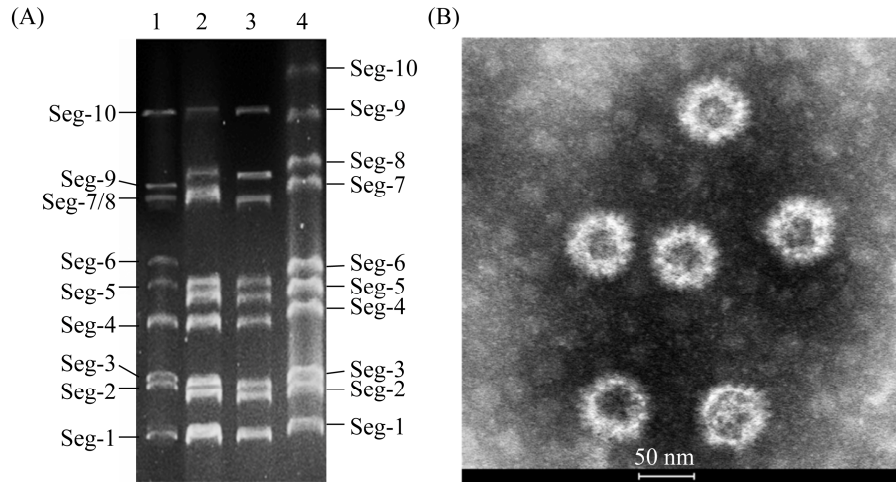


图 2. 病毒基因组 dsRNA 琼脂糖凝胶电泳和病毒粒子电镜观察结果

Figure 2. Results of agarose gel electrophoresis of viral genomic dsRNA and electron microscopy observation of virions. A: agarose gel electrophoresis of genomic dsRNA of YNJH/V292/2019 and other orbiviruses. Lane 1: YNJH/V292/2019; lane 2: BTV-1/Y863; lane 3: EHDV-10/V277; lane 4: PALV/SZ187. B: electron microscopy observation of YNJH/V292/2019 (110000 \times).

2.3 分离病毒的 Seg-2/T2 序列分析结果

T2 蛋白构成环状病毒属病毒的内层衣壳, 该蛋白在同种环状病毒属病毒之间具有高度保守特性^[8-10]。蚊传播环状病毒属病毒(MOBs)与蝉传播环状病毒属病毒(TBOs)的 T2 蛋白均由基因节段 Seg-2 编码, 而库蠓传播环状病毒属病毒(COBs)的 T2 蛋白则由 Seg-3 编码^[8-10,14]。对 YNJH/V292/2019 毒株 Seg-2 全长序列的测定与 BLAST 比对结果显示, 该病毒的 Seg-2 全长为 2852 bp, GC 含量为 39.8%, 5'和 3'端非编码区(non-coding region, NCR)长度分别为 11 bp 和 67 bp, 可编码 924 个氨基酸残基的 T2 蛋白。

为明确 YNJH/V292/2019 与其他环状病毒之间的进化关系, 选择环状病毒属病毒的 T2 蛋白氨基酸序列进行 ML 树的构建, 最适氨基酸进化模型为 LG+G+F, 构建的系统发生树显示,

YNJH/V292/2019 与 Mobuck virus^[11]、PHSV^[12]、CHERI orbivirus^[13]、YOUV^[19]和本实验室前期分离的 GXOV^[22]等蚊传播环状病毒聚为一簇(图 3), 与 Mobuck virus 具有最高的序列相似度, 核酸与氨基酸序列(nt/aa)相似度分别为 72.8%与 84.0%, 与 TBOs 的序列相似度较低, 与 COBs 的序列相似度最低(表 1)。以上结果表明, YNJH/V292/2019 与环状病毒属病毒中的 Mobuck virus 有着最近的亲缘关系, 很可能为一种蚊传播的环状病毒属病毒。

2.4 分离病毒的 Seg-3/OC1 序列分析结果

环状病毒属病毒外层衣壳 OC1 蛋白受宿主动物强烈免疫压力的选择作用, 具有高度变异的特性, 决定着同种环状病毒属病毒的血清型; MOBs 与 COBs 的 OC1 蛋白分别由 Seg-3 与 Seg-2 基因节段编码^[8-10]。对 YNJH/V292/2019 毒株

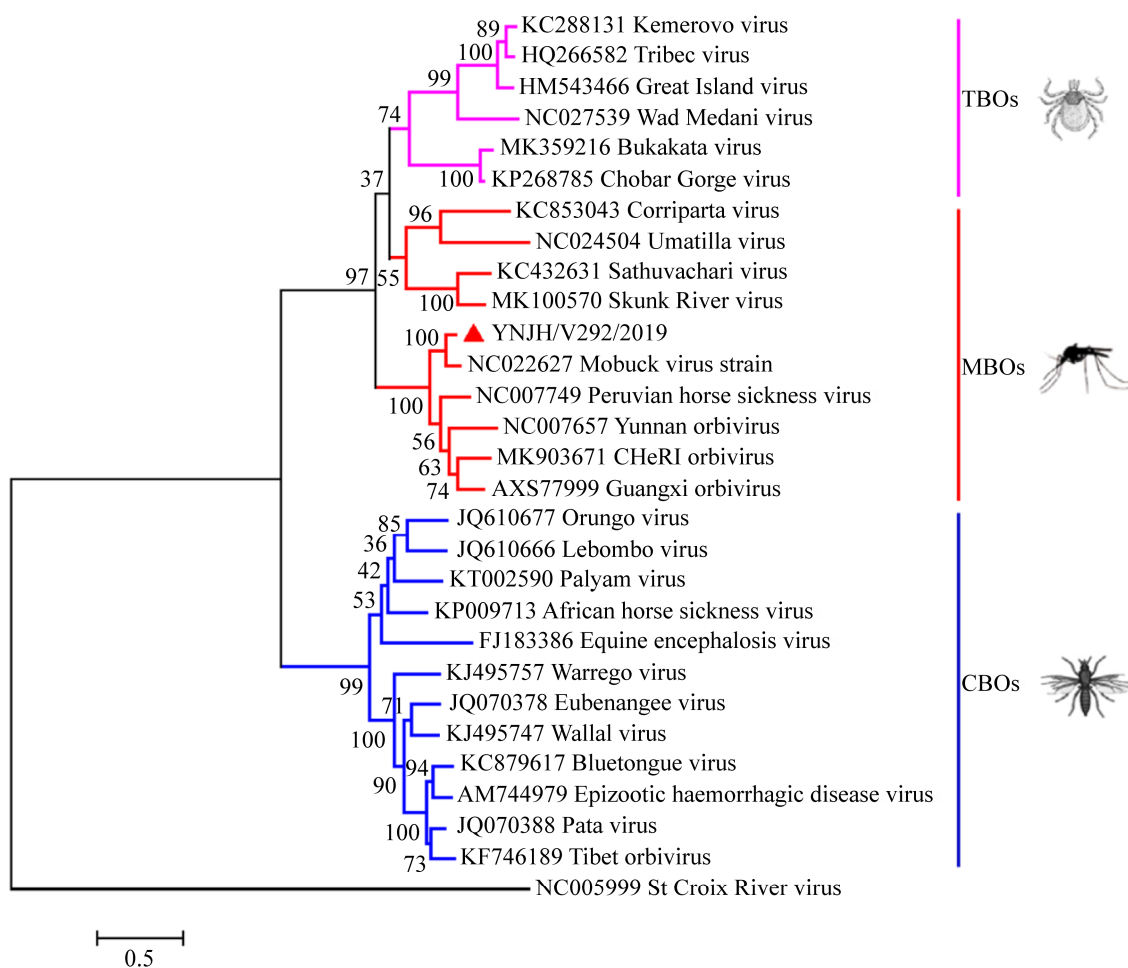


图 3. YNJH/V292/2019 毒株 T2 蛋白的 ML 系统发生树

Figure 3. Maximum likelihood (ML) tree of T2 proteins showing phylogenetic relationship of YNJH/V292/2019 with other orbiviruses. ML tree was constructed using MEGA X with model of LG+G+F and 500 bootstrap replicates. YNJH/V292/2019 was represented as red triangle. The number at nodes of tree indicates bootstrap confidence. Different orbivirus species were indicated as GenBank accession number_virus name, culicoides-borne orbiviruses, mosquito-borne orbiviruses and tick-borne orbiviruses were represented as CBOs, MBOs and TBOs, respectively. St Croix River virus infected tick was used as an out-group.

Seg-3 全长序列分析结果显示, 该病毒的 Seg-3 全长为 2706 bp, GC 含量 34.4%, 5'和 3'端 NCR 长度分别为 18 bp 和 51 bp, 可编码 878 个氨基酸残基的 OC1 蛋白。与已知环状病毒序列比对结果显示, YNJH/V292/2019 的 Seg-3/OC1 与 Mobuck virus 序列相似度最高, 但仅为 60.2/56.5%, 明显低于两种病毒间 Seg-2/T2 的相

似度(表 1)。环状病毒属 OC1 蛋白氨基酸序列构建的 ML 系统发生树显示, YNJH/V292/2019 与 Mobuck virus 在系统发生树上聚为一簇, 但形成了 2 个相对独立的分支(图 4)。以上结果表明, YNJH/V292/2019 与 Mobuck virus 有着最近的遗传关系, 但很可能代表着该种病毒两种不同的血清型。

表 1. YNJH/V292/2019 毒株与环状病毒属病毒的核酸及氨基酸序列相似度(%)

Table 1. Nucleotide and amino acid sequence identity (%) of YNJH/V292/2019 with other orbiviruses

Orbivirus species	Vectors	Seg-2 (T2) sequence identity level (nt/aa%)	Seg-3 (OC1) sequence identity level (nt/aa%)
Mobuck virus	Mosquito	72.8/84.0	60.2/56.5
Yunnan orbivirus	Mosquito	62.5/63.0	44.1/35.0
Guangxi orbivirus	Mosquito	64.5/65.2	47.7/32.9
Peruvian horse sickness virus	Mosquito	66.8/69.5	41.7/29.3
CHeRI orbivirus	Mosquito	63.8/65.7	41.8/33.4
Corriparta virus	Mosquito	50.6/43.7	12.1/8.5
Umatilla virus	Mosquito	51.0/44.3	17.1/9.2
Sathuvachari virus	Mosquito	52.5/47.9	17.3/12.1
Skunk River virus	Mosquito	50.8/46.3	16.1/11.0
Kemerovo virus	Tick	47.6/45.4	8.7/8.3
Tribec virus	Tick	48.2/46.7	8.4/8.2
Great Island virus	Tick	47.7/45.1	8.1/7.0
Chobar Gorge virus	Tick	50.8/46.5	9.0/8.5
African horse sickness virus	Culicoides	45.4/35.8	14.1/5.4
Bluetongue virus	Culicoides	46.1/37.2	12.2/7.0
Epizootic haemorrhagic disease virus	Culicoides	46.8/36.6	17.5/6.9
Warrego virus	Culicoides	46.2/35.9	19.4/6.9
Palyam virus	Culicoides	45.5/35.8	18.5/6.9
Pata virus	Culicoides	45.5/35.0	11.1/6.6

2.5 病毒在牛上感染特性分析

为明确 YNJH/V292/2019 在动物上的感染特性,采用 qRT-PCR 与血清中和试验对感染动物血液中的病毒核酸拷贝数与血清中和抗体效价进行回溯分析。将检测到病毒核酸阳性的采血时间设为第 1 周,建立以病毒核酸拷贝数为左纵坐标和病毒中和抗体效价为右纵坐标的双轴图(图 5)。从图中可以看出,病毒感染哨兵动物的 1-3 周,血液中病毒核酸量迅速升高并达最高点(656.15 拷贝/ μL),随后血液中病毒核酸量逐步减少,直到感染后的第 17 周,血液中依然能检测到病毒核酸(47.83 拷贝/ μL)。

血清中和抗体检测结果显示,病毒感染哨兵牛的第 2 周,可检测到中和抗体的产生(抗体

效价 1:14),感染后的 3 周至 9 周,血清中病毒中和抗体效价迅速升高,在第 9 周到达最高点(抗体效价 1:226)。第 12 周中和抗体水平出现降低,在检测期结束的第 17 周,抗体水平仍维持在较高水平(抗体效价 1:113)。以上结果提示 YNJH/V292/2019 感染牛后,可在短时间内达到病毒血症高峰,虽然动物很快产生中和抗体,但血液中的病毒核酸可持续存在 16 周以上。

为分析 YNJH/V292/2019 是否感染同群的其他哨兵动物,取另两头哨兵牛 5-10 月每月最后一次采集的血液与血清样本分别进行病毒核酸与中和抗体的回溯检测,结果均为阴性,表明病毒仅感染了 3 头哨兵牛中的 1 头。

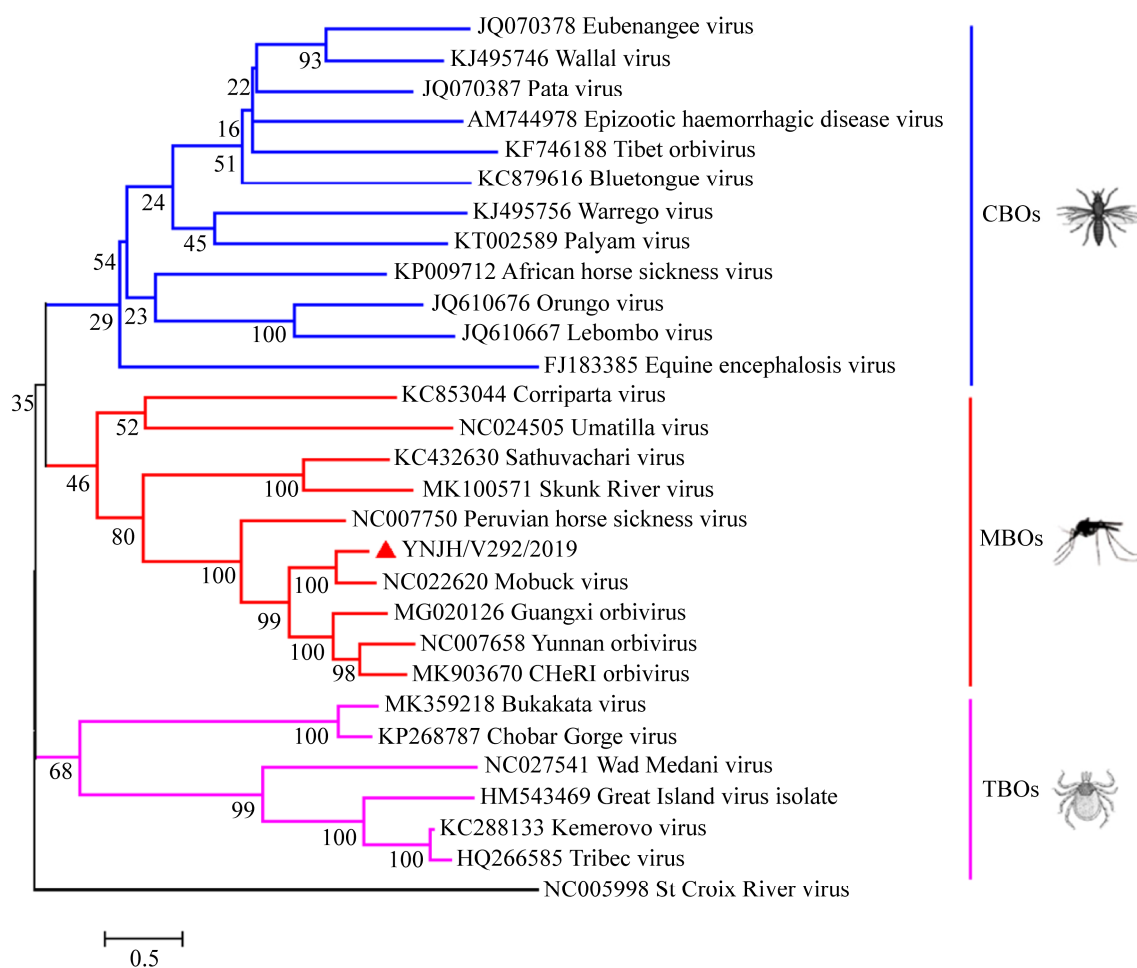


图 4. YNJH/V292/2019 毒株 OC1 蛋白 ML 系统发生树

Figure 4. Maximum likelihood (ML) tree showing phylogenetic relationship of OC1 proteins of YNJH/V292/2019. ML tree was constructed using MGEA X with model of LG+G+F. YNJH/V292/2019 was represented as red triangle. The number at nodes indicates bootstrap confidence with 500 bootstrap replicates. St Croix River virus infected tick was used as out-group. Different orbivirus species were indicated as GenBank accession number plus virus name. Culicoides-borne orbiviruses, mosquito-borne orbiviruses and tick-borne orbiviruses were represented as CBOs, MBOs and TBOs, respectively.

3 讨论

近年来, 随着全球经济一体化进程的加深与人类对自然环境的不断改变, 各种新发与再发传染病不断出现, 扰乱了世界秩序, 给人类社会带来了深重的灾难^[35-36]。环状病毒属病毒具有高度的遗传多样性, 新型环状病毒属病毒

被陆续发现, 部分新发现病毒在动物上表现出较强的致病性^[11-13], 对畜牧养殖业和人类健康带来了新的挑战。对环状病毒属病毒多样性、流行范围、感染宿主范围与致病性的认知, 是一个长期不断完善的过程, 获取该方面的知识, 对保障公共卫生安全与动物疫病防控具有重要的意义。

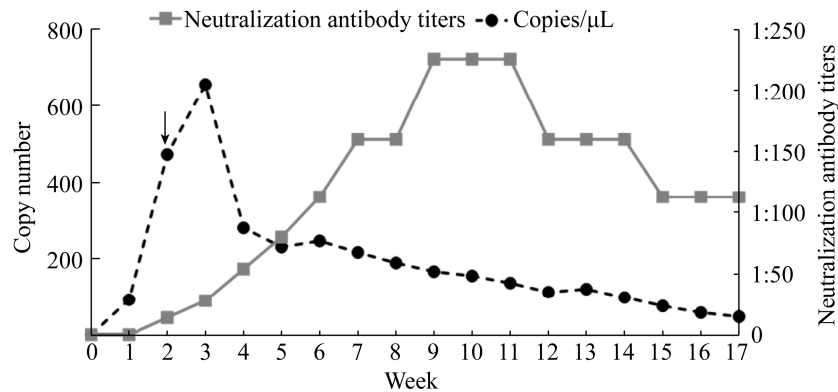


图 5. 感染动物血液中 YNJH/V292/2019 病毒核酸与特异性中和抗体监测结果

Figure 5. Results of monitoring viral nucleic acid and neutralization antibody against YNJH/V292/2019 from blood samples of infected animal. Y axis (left): qRT-PCR results of viral nucleic acid detection in the blood of infected animal; Y axis (right): neutralization antibody titers against YNJH/V292/2019 in the sera of the infected animal. X axis: the number of week for the blood sample collection; the week when the viral nucleic acid was detected in the blood sample was assigned as week one. Black arrow indicates the time point when YNJH/V292/2019 was isolated from blood sample.

本研究首次报道了 1 种新型 Mobuck virus (毒株号: YNJH/V292/2019) 在我国的分离与鉴定。在分离获得 YNJH/V292/2019 毒株后, 考虑到 BTV、EHDV、PALV 与 AKAV 均可感染牛, 且在云南省广泛流行^[16-18], 因此我们首先通过特异性 RT-PCR 对这 4 种病毒进行鉴定, 但结果均为阴性。病毒基因组琼脂糖凝胶电泳、病毒粒子的电镜观察均为 ICTV 推荐用于环状病毒属病毒鉴定的方法^[2]。病毒基因组琼脂糖凝胶电泳可在 2 个小时内对病毒是否为 dsRNA 病毒得出鉴定结果, 因此我们考虑首先判断 YNJH/V292/2019 毒株的核酸类型。提取病毒的核酸进行琼脂糖凝胶电泳分析, 结果显示病毒的基因组为 dsRNA, 电泳带型特征与 BTV 和 EHDV 接近(图 2-A), 电镜下观察, YNJH/V292/2019 的病毒粒子呈“指环状”, 无囊膜, 病毒粒子表面分布大量的纤维状突起(图 2-B), 病毒形态与文献报道^[21]的环状病毒属病毒特征较接近, 因此我们基本认为

V298/YNJH/2019 为环状病毒属病毒的一员。

环状病毒属病毒的 T2 蛋白在同种环状病毒之间具有高度保守特性, 对该蛋白氨基酸序列的分析是鉴定环状病毒属病毒种属关系间的重要依据, 当两种环状病毒属病毒的 T2 蛋白氨基酸序列相似度>83%基本可判定为同一种环状病毒^[8-10]。与已知环状病毒属病毒的序列比对结果显示, YNJH/V292/2019 毒株和美国分离的 Mobuck virus 毒株^[11] T2 蛋白氨基酸序列的相似度为 84.0% (表 2), 略高于同种环状病毒属病毒 T2 蛋白氨基酸序列的最低相似度(83%); 在根据 T2 蛋白氨基酸序列构建的 ML 系统发生树上, YNJH/V292/2019 与 Mobuck virus 处于同一进化支系, 有着最近的亲缘关系(图 3)。YNJH/V292/2019 与 Mobuck virus 的 Seg-2 核酸序列相似度较低(72.8%), 核苷酸的变异主要发生在三联密码子的第三位, 表明 2 种病毒在各自的地域环境下有着相对独立的进化, 导致在 Seg-2 的核酸序列中积累了大量沉默突变。

Mobuck virus 与 YNJH/V292/2019 毒株分别从白尾鹿和牛上分离, 目前对传播两种病毒的媒介昆虫尚不清楚, 但我们认为两种病毒很可能通过蚊传播, 主要基于以下两方面的证据。第一, 从基因节段编码蛋白情况来看, Mobuck virus 与 YNJH/V292/2019 毒株均符合 MOBs 的特征: MOBs 的 T2 蛋白由基因节段 Seg-2 编码, OC1 蛋白由基因节段 Seg-3 编码, 而 COBs 的 T2 蛋白则由 Seg-3 编码, OC1 蛋白由基因节段 Seg-2 编码^[8-10]。第二, 环状病毒属病毒与媒介之间存在共进化关系, 在根据环状病毒属病毒 T2 蛋白氨基酸序列构建的系统发生树上, 可将环状病毒属病毒分为 CBOs、MBOs 与 TBOs 三类, 这种分类也与自然界中病毒对应的传播媒介相吻合^[8-10]。在本研究构建的 T2 蛋白系统发生树上, YNJH/V292/2019 与 MBOs 家族的 Mobuck virus、PHSV、YOUV 和 CHeRI Orbivirus 等聚为一簇, 也表明了蚊很可能是 Mobuck virus 与 YNJH/V292/2019 的主要传播媒介(图 4)。

环状病毒属病毒的 OC1 蛋白决定病毒的血清型, 由于该蛋白高度变异, 同种环状病毒属病毒往往具有多种血清型, 例如 BTV 已发现 28 种不同血清型^[37], EHDV 与 ASHV 已发现 9 种不同的血清型^[4,24]。本研究中分离的 YNJH/V292/2019 毒株与 Mobuck virus 的 Seg-3 核酸序列相似度为 60.2%, OC1 蛋白氨基酸序列相似度仅为 56.5%。在根据 OC1 蛋白氨基酸序列构建的系统发生树上, YNJH/V292/2019 形成了独立于 Mobuck virus 的独立进化分支, 以上结果表明 YNJH/V292/2019 毒株代表着 Mobuck virus 的一种新的血清型。由于缺乏 Mobuck virus 毒株的参考阳性血清, 我们目前尚无法通过血清中和实验判定 Mobuck virus 与 YNJH/V292/2019 毒株的阳性血清是否存在交

叉保护反应。

通过对保存血液与血清样本的回溯分析, 我们对 YNJH/V292/2019 毒株在哨兵牛上的动态感染情况进行了连续监测。研究结果显示哨兵动物 7 月 5 日采集的血液样本中可检测到 YNJH/V292/2019 的病毒核酸(92.05 拷贝/ μ L), 1 周后感染动物体内产生了病毒的中和抗体且抗体效价持续升高, 但在随后 4 个月的监测期, 血液中均能检测到病毒核酸, 表明病毒很可能在感染动物上形成了长时间的持续感染(图 5), 这与 BTV-25 型在山羊上的长时间持续感染比较类似^[38]。同时发现病毒核酸在动物血液中持续长达 17 周, 但分离病毒存在一个窗口期, 病毒核酸检测刚转阳, 动物血清抗体还未完全升高时, 更容易分离到病毒, 这可能是动物机体产生抗体后, 抗体与病毒结合抑制了血液中病毒对细胞的感染, 我们虽然使用病毒核酸阳性血液接种细胞, 但无法分离到病毒的主要原因。

本研究首次报道了 1 种新型 Mobuck virus 在哨兵牛上的分离, 丰富了对我国流行环状病毒多样性与感染特性的认知。在进一步的工作中, 我们拟完成 YNJH/V292/2019 毒株的全基因组测序, 调查病毒可能的传播媒介, 完善病毒相应的诊断方法, 在云南省开展新型环状病毒的流行病学、致病性分析与调查研究, 为病毒的防控提供依据。

参 考 文 献

- [1] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy: eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005: 466-483.
- [2] King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. London: Elsevier Academic Press, 2011: 1221-1234.
- [3] Maclachlan NJ. Bluetongue: history, global epidemiology,

- and pathogenesis. *Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 102(2): 107–111.
- [4] Carpenter S, Mellor PS, Fall AG, Garros C, Venter GJ. African horse sickness virus: history, transmission, and current status. *Annual Review of Entomology*, 2017, 62: 343–358.
- [5] Carpenter S, Wilson A, Mellor PS. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(4): 172–178.
- [6] Howerth EW, Stallknecht DE, Kirkland PD. Bluetongue, epizootic hemorrhagic disease, and other orbivirus-related diseases//Williams ES, Barker IK. Infectious diseases of wild mammals. 3rd ed. Ames: Iowa State University Press, 2001: 123–149.
- [7] Roy P. Orbivirus structure and assembly. *Virology*, 1996, 216(1): 1–11.
- [8] Belaganahalli MN, Maan S, Maan NS, Pritchard I, Kirkland PD, Brownlie J, Attoui H, Mertens PPC. Full genome characterization of the *Culicoides*-borne marsupial orbiviruses: wallal virus, mudjinbarry virus and warrego viruses. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e108379.
- [9] Belaganahalli MN, Maan S, Maan NS, Nomikou K, Guimera M, Brownlie J, Tesh R, Attoui H, Mertens PCC. Full genome sequencing of corriparta virus, identifies california mosquito pool virus as a member of the *Corriparta virus* species. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e70779.
- [10] Jaafar FM, Belhouchet M, Belaganahalli M, Tesh RB, Mertens PPC, Attoui H. Full-genome characterisation of orungo, lebombo and changuinola viruses provides evidence for co-evolution of orbiviruses with their arthropod vectors. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e86392.
- [11] Cooper E, Anbalagan S, Klumper P, Scherba G, Simonson RR, Hause BM. Mobuck virus genome sequence and phylogenetic analysis: identification of a novel *Orbivirus* isolated from a white-tailed deer in Missouri, USA. *Journal of General Virology*, 2014, 95(1): 110–116.
- [12] Attoui H, Mendez-Lopez MR, Rao SJ, Hurtado-Alendes A, Lizaraso-Caparo F, Jaafar FM, Samuel AR, Belhouchet M, Pritchard LI, Melville L, Weir RP, Hyatt AD, Davis SS, Lunt R, Calisher CH, Tesh RB, Fujita R, Mertens PPC. Peruvian horse sickness virus and Yunnan orbivirus, isolated from vertebrates and mosquitoes in Peru and Australia. *Virology*, 2009, 394(2): 298–310.
- [13] Ahasan MS, Subramaniam K, Campos Krauer JM, Sayler KA, Loeb JC, Goodfriend OF, Barber HM, Stephenson CJ, Popov VL, Charrel RN, Wisely SM, Waltzek TB, Lednický JA. Three new *Orbivirus* species isolated from farmed white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the United States. *Viruses*, 2019, 12(1): 13.
- [14] Ejiri H, Lim CK, Isawa H, Kuwata R, Kobayashi D, Yamaguchi Y, Takayama-Ito M, Kinoshita H, Kakiuchi S, Horiya M, Horiya M, Kotaki A, Takasaki T, Maeda K, Hayashi T, Sasaki T, Kobayashi M, Saijo M, Sawabe K. Genetic and biological characterization of Muko virus, a new distinct member of the species *Great Island virus* (genus *Orbivirus*, family *Reoviridae*), isolated from Ixodid ticks in Japan. *Archives of Virology*, 2015, 160(12): 2965–2977.
- [15] Fagre AC, Lee JS, Kityo RM, Bergren NA, Mossel EC, Nakayiki T, Nalikka B, Nyakarahuka L, Gilbert AT, Peterhans JK, Crabtree MB, Towner JS, Amman BR, Sealy TK, Schuh AJ, Nichol ST, Lutwama JJ, Miller BR, Kading RC. Discovery and characterization of bukakata orbivirus (*Reoviridae:Orbivirus*), a novel virus from a Ugandan bat. *Viruses*, 2019, 11(3): 209.
- [16] Yang H, Xiao L, Wang J, Meng J, Lv M, Liao D, Song J, Gao L, Xiong H, He Y, Niu B, Chuang X, Li H. Phylogenetic characterization genome segment 2 of *Bluetongue virus* strains belonging to serotypes 5, 7 and 24 isolated for the first time in China during 2012 to 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(4): 1317–1321.
- [17] Yang H, Xiao L, Li ZH, Meng JX, Yang ZX, Lü MN, Lin XH, Liao DF, Niu BS, Li HC. Sequence analysis of palyam serogroup virus isolated in South China from 2012 to 2016. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(4): 761–770. (in Chinese)
杨恒, 肖雷, 李占鸿, 孟锦昕, 杨振兴, 吕敏娜, 林栩慧, 廖德芳, 牛保生, 李华春. 2012–2016 年中国南方地区帕利亚姆血清群病毒的分离与序列特征分析. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(4): 761–770.
- [18] Yang ZX, Li ZH, Wu JM, Wang JP, Xiao L, Kou ML, Zhu JB, Liao DF, Li HC, Yang H. Characterization of strains of epizootic haemorrhagic disease virus serotype 5 isolated in China from 2013 to 2016. *Chinese Journal of Virology*, 2020, 36(3): 475–483. (in Chinese)
杨振兴, 李占鸿, 吴健敏, 王金萍, 肖雷, 寇美玲, 朱建波, 廖德芳, 李华春, 杨恒. 2013–2016 年中国流行性出血病病毒血清型 5 型的分离与遗传特征分析. *病毒学报*, 2020, 36(3): 475–483.
- [19] Attoui H, Jaafar FM, Belhouchet M, Aldrovandi N, Tao SJ, Chen BQ, Liang GD, Tesh RB, de Micco P, de Lamballerie X. *Yunnan orbivirus*, a new orbivirus species isolated from

- Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes in China. *Journal of General Virology*, 2005, 86(12): 3409–3417.
- [20] Li MH, Zheng YY, Zhao GY, Fu SH, Wang D, Wang ZY, Liang GD. *Tibet orbivirus*, a novel *Orbivirus* species isolated from *Anopheles maculatus* mosquitoes in Tibet, China. *PLoS ONE*, 2014, 9(2): e88738.
- [21] Lei WW, Guo XF, Fu SD, Feng S, Nie K, Song JD, Li Y, Ma XJ, Liang GD, Zhou HN. Isolation of Tibet orbivirus, TIBOV, from culicoides collected in Yunnan, China. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0136257.
- [22] Yang H, Li ZH, Zhang YX, Gao L, Xie JR, Liao DF, Wu JM, Li HC. Isolation and genomic characterization of a novel orbivirus strain from the blood of cattle. *Chinese Journal of Virology*, 2018, 34(1): 75–84. (in Chinese)
杨恒, 李占鸿, 张怡轩, 高林, 谢佳芮, 廖德芳, 吴健敏, 李华春. 牛血液中一株新型环状病毒的分离与全基因组序列分析. *病毒学报*, 2018, 34(1): 75–84.
- [23] Zhu JB, Yang H, Li HC, Xiao L, Wang JP, Li N, Zhang NZ. Full-genome sequence of bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) strain y863, the first BTV-1 isolate of eastern origin found in China. *Genome Announcements*, 2013, 1(4): e00403-13.
- [24] Li ZH, Xiao L, Yang ZX, Meng JX, Liao DF, Gao L, Li HC, Yang H. Isolation and identification of the epidemic hemorrhagic fever virus serotype 10 strain from cattle in China. *Chinese Journal of Virology*, 2019, 35(1): 112–120. (in Chinese)
李占鸿, 肖雷, 杨振兴, 孟锦昕, 廖德芳, 高林, 李华春, 杨恒. 牛源流行性出血病病毒(EHDV)血清 10 型毒株在我国分离鉴定. *病毒学报*, 2019, 35(1): 112–120.
- [25] Yang H, Xiao L, Meng JX, Xiong HL, Liao DF, Li HC. Complete genome sequence of a Chuzan virus strain isolated for the first time in mainland China. *Archives of Virology*, 2016, 161(4): 1073–1077.
- [26] Yang ZX, Zhu JB, Liao DF, Li ZH, Xiao L, Gao L, Li N, Yang H, Li HC. Development and application of one-step RT-PCR method for the detection of epizootic haemorrhagic disease virus. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(3): 280–286. (in Chinese)
杨振兴, 朱建波, 廖德芳, 李占鸿, 肖雷, 高林, 李楠, 杨恒, 李华春. 流行性出血病病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立及应用. *中国兽医科学*, 2019, 49(3): 280–286.
- [27] Li ZH, Liao DF, Yang ZX, Zhang J, Xiao L, Li HC, Yang H. The development of a one-step RT-PCR assay for the detection of PALV. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(1): 40–45. (in Chinese)
李占鸿, 廖德芳, 杨振兴, 张洁, 肖雷, 李华春, 杨恒. 帕利亚姆血清群病毒一步法 RT-PCR 检测技术的建立. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(1): 40–45.
- [28] Camarão AAR, Swanepoel R, Boinas F, Quan M. Development and analytical validation of a group-specific RT-qPCR assay for the detection of the Simbu serogroup orthobunyaviruses. *Journal of Virological Methods*, 2019, 271: 113685.
- [29] Billinis C, Koumbati M, Spyrou V, Nomikou K, Mangana O, Panagiotidis CA, Papadopoulos O. Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparison with conventional methods. *Journal of Virological Methods*, 2001, 98(1): 77–89.
- [30] Attoui H, Billoir F, Cantaloube JF, Biagini P, de Micco P, de Lamballerie X. Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes. *Journal of Virological Methods*, 2000, 89(1/2): 147–158.
- [31] Maan S, Rao SJ, Maan NS, Anthony SJ, Attoui H, Samuel AR, Mertens PPC. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. *Journal of Virological Methods*, 2007, 143(2): 132–139.
- [32] Katoh K, Asimenos G, Toh H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT/Posada D. *Bioinformatics for DNA sequence analysis*. New York: Humana Press, 2009: 39–64.
- [33] Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. Prottest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 2011, 27(8): 1164–1165.
- [34] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [35] Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, 579(7798): 265–269.
- [36] Gaudreault NN, Madden DW, Wilson WC, Trujillo JD, Richt JA. African swine fever virus: an emerging DNA arbovirus. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 215.
- [37] Bumbarov V, Golender N, Jenckel M, Wernike K, Beer M, Khinich E, Zalesky O, Erster O. Characterization of bluetongue virus serotype 28. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(1): 171–182.
- [38] Vöggtlin A, Hofmann MA, Nenniger C, Renzullo S, Steinrigl A, Loitsch A, Schwermer H, Kaufmann C, Thür B. Long-term infection of goats with bluetongue virus serotype 25. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166(1/2): 165–173.

Identification of a novel *Orbivirus* strain isolated from sentinel cattle in Yunnan Province

Zhenxing Yang¹, Zhanhong Li¹, Defang Liao¹, Xiang Gao², Zhongyan Hu², Jiarui Xie¹, Huachun Li^{1*}, Heng Yang^{1*}

¹ Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Disease Laboratory, Yunnan Academy of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Kunming 650224, Yunnan Province, China

² Animal Epidemic Prevention and Control Center of Jinghong, Yunnan 666100, Yunnan Province, China

Abstract: [Objective] Deepen our understanding about the diversity of epidemic arboviruses of Yunnan Province [Methods] Blood samples regularly collected from sentinel cattle placed in Jinghong city of Yunnan Province, were inoculated on cells for arboviruses isolation. The isolated virus strain was initially identified by RT-PCR, viral genomic agarose gel electrophoresis (AGE) and electron microscope (TEM). Full-length segment 2 (Seg-2) and segment 3 (Seg-3) of the isolated virus were sequenced and the virus classification was conducted by phylogenetic tree construction. The infection kinetics of the isolated virus on the sentinel cattle was retrospectively traced back by qRT-PCR and serum neutralization test. [Results] An unidentified virus strain, causing significant cytopathic effect on BHK-21 cells, was isolated from the blood sample of sentinel cattle. The genome of isolated virus is composed of double stranded RNA showing “3-3-3” migration pattern by AGE analysis. TEM observation revealed that the virus particles exhibited typical characteristics of *Orbivirus* with ring-shaped structure about 70 nm in diameter. Seg-2 of the isolated virus encoding the conserved T2 protein of *Orbivirus*, showed the closest relationship with Mobuck virus with nucleic acid (nt) and amino acid (aa) sequence identities of 72.8% and 84.0% respectively. Meanwhile, Seg-3 of the isolated virus encoding *Orbivirus* serotype decisive OC1 protein, only showed 60.2% (nt) and 56.5% (aa) sequences identity with Mobuck virus. Furthermore, on the phylogenetic tree of T2 and OC1, the isolated virus formed a distinctive branch from Mobuck virus. Retrospective tracing results of the virus infected cattle showed viral RNA lasted in the blood for 17 weeks until supervision terminated. Neutralization antibodies (antibody titer 1:14) were detected one week after virus infection, peaked at the 9th week (antibody titer 1:226) and remained at a high level (antibody titer 1:113) to the end of monitoring. [Conclusion] We reported here, for the first time, the isolation and infection kinetics of a novel Mobuck virus strain isolated from sentinel cattle in Yunnan Province. The results of this study enriched our knowledge about orbiviruses in China, and laid a foundation for the diagnosis, epidemiology and pathogenicity of this novel virus.

Keywords: *Orbivirus*, Mobuck virus, virus isolation and identification, phylogenetic analysis, infection kinetics

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760744), by the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201303035), by the National Key Research and Development Program (2017YFC1200505) and by the Reserve Talents Training Program for Young and Middle-Aged Academic and Technical Leaders in Yunnan Province (2017HB055)

*Corresponding authors. E-mail: Huachun Li, li_huachun@hotmail.com; Heng Yang, yangheng2008.cool@163.com

Received: 23 June 2020; Revised: 10 September 2020; Published online: 16 October 2020