

甘蔗杆状病毒基因组片段整合入 杂种甘蔗基因组的证据

蔡艳清, 许东林, 周国辉

(华南农业大学 资源环境学院 植物病毒研究室, 广东 广州 510642)

摘要:为研究甘蔗杆状病毒 *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV) 的基因组片段是否整合进杂种甘蔗 *Saccharum* inter-specific hybrids 基因组, 以采自广西甘蔗研究所的 1 株杂种甘蔗植株叶片总 DNA 为模板, 根据已报道的甘蔗杆状病毒基因组序列设计多条特异引物。经 PCR 扩增、产物克隆及序列分析, 获得 1 个全长为 5 364 bp 的核苷酸序列。该序列具有 SCBV 基因组结构特征, 含有 2 个完整的 ORF, 与 GenBank 中已报道的 2 个 SCBV 分离物之间的核苷酸及氨基酸序列同一性均大于 70%, 但该序列与完整的 SCBV 基因组全序列相比, 不具备完全的 ORF3, 缺失了对病毒复制过程极为重要的功能性基因 RNase H 的序列区段。通过 Southern-blot 杂交分析, 初步推测其为一段整合入杂种甘蔗基因组中的 SCBV 基因组序列。

关键词:甘蔗杆状病毒; 杂种甘蔗; 病毒同源序列; 序列分析

中图分类号:Q939.46

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)04-0019-05

Evidence of *Sugarcane bacilliform virus* DNA Fragment Integrated into the *Saccharum* Inter-Specific Hybrids Genome

CAI Yan-qing, XU Dong-lin, ZHOU Guo-hui

(Laboratory of Virology, College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to investigate whether fragments of *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV) were integrated into *Saccharum* inter-specific hybrids genome, a DNA fragment homologous to SCBV was amplified from a hybrid sugarcane plant (*Saccharum* inter-specific hybrids var. ROC 25) grown in Sugarcane Research Center in Guangxi Province with SCBV-specific primers. The amplified fragments were cloned and sequenced. The sequence analysis revealed that this fragment contains 5364 nucleotides and shares over 70% similarity at both the nucleotide level and amino acid level with reported isolates of SCBV. The sequence has two complete open reading frames (ORFs), which resembles to SCBV ORF1 and ORF2 organizationally, but the open reading frame of RNase H (RH) was absent compared with SCBV. Based on Southern-blot analysis, the amplified sequence might be a SCBV genomic DNA fragment integrated into hybrid sugarcane genome.

Key words: *Sugarcane bacilliform virus*; *Saccharum* inter-specific hybrids; viral homologous fragment; sequence analysis

甘蔗杆状病毒 *Sugarcane bacilliform virus*, B34104 上^[1], 由 Lockhart 和 Autrey^[2] 自甘蔗品种 (SCBV) 于 1985 年最先被报道发生于古巴甘蔗品种 Mex57-473 上首次提纯到。迄今为止, 世界上多个甘

收稿日期:2008-10-16

作者简介:蔡艳清(1981—), 女, 硕士; 通讯作者:周国辉(1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: ghzhou@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2003B21604); 广东省自然科学基金(5006669)

蔗种植区如澳大利亚、马达加斯加、马拉维、毛里求斯、南美洲、美国、马德里、摩洛哥、留尼汪(岛)、巴布亚新几内亚以及我国台湾^[3,4]等国家与地区均已有SCBV发生,造成部分品种产量下降^[2,5],而中国大陆迄今鲜见有关于该病毒的报道。

SCBV属于杆状DNA病毒属 *Badnavirus*^[6],病毒粒体杆状、无包膜,大小30 nm×130 nm.部分粒体包含多拷贝的基因组串联复合体,长度可达500 nm^[7]. SCBV基因组为双链环状DNA,含有3个ORF,其中ORF1及ORF2的编码产物功能不详,ORF3编码1个大于200 000的多聚蛋白.该多聚蛋白自N末端至C末端包含下列几个结构域:运动蛋白(Movement protein, MP)、外壳蛋白(Coat protein, CP)、天冬氨酸蛋白酶(Aspartic protease, AP)、反转录酶(Reverse transcriptase, RT)及RNA酶H(RNase H, RH)^[1].近年研究表明,杆状DNA病毒某些成员的基因组或基因组片段可整合入寄主基因组^[8,9].而对于SCBV,至今鲜见有关其基因组整合入寄主基因组的报道,有文献指出SCBV不会整合进甘蔗属高贵种 *Saccharum officinarum* 的基因组中^[7].由于SCBV基因组序列高度多变,不排除SCBV的某些株系整合入甘蔗属其他种基因组的可能性。

本文采用PCR技术在1个杂种甘蔗 *Saccharum L. inter-specific hybrids* 材料中检测到SCBV基因组同源序列,通过序列分析及Southern-blot杂交分析,认为其可能为一段整合入杂种甘蔗基因组中的SCBV序列。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2005年8月,在广西甘蔗研究所试验地采集杂种甘蔗品种新台糖25号 *Saccharum L. interspecific hybrids* var. ROC 25种茎,于华南农业大学植物病毒研究室防虫网室栽种成苗并扩繁。

1.2 甘蔗叶组织总DNA抽提

取供试植株幼嫩叶片100 mg,采用常规CTAB法抽提叶组织总DNA,抽提产物溶于100 μL双蒸水中,-20℃贮存备用。

1.3 SCBV检测引物设计及PCR扩增

采用文献[6]所用的SCBV基因组保守区域引物对SCBV-F5与SCBV-R5(扩增片段为221 bp)及SCBV-F1与SCBV-R1(扩增片段为425 bp),并根据GenBank中报道的SCBV澳大利亚分离物(SCBV-

IM,登录号AJ277091)与摩洛哥分离物(SCBV-M,登录号M89923)的保守序列,设计引物对SCBV-A(5'-TGGTATCAGAGCGAGGTATG-3')与SCBV-C2(5'-TCA/TCCTTGCCAA/CCCTTCATA-3')(预期扩增片段为2 196 bp)以及巢式引物对SCBV-W11(5'-GCAGCCGTAATCATTACCT-3')与SCBV-C2(预期扩增片段为1 063 bp).引物均由上海英骏生物技术有限公司合成(下同).

以供试植株叶组织总DNA抽提物为模板,采用rTaq酶[宝生物工程(大连)有限公司]进行PCR扩增.引物对SCBV-F5与SCBV-R5、引物对SCBV-F1与SCBV-R1的扩增参数均为:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃补充延伸5 min.引物对SCBV-A与SCBV-C2以及巢式引物对SCBV-W11与SCBV-C2的PCR扩增参数均为:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸2 min,30个循环;72℃补充延伸5 min.

扩增产物经12 g/L琼脂糖凝胶电泳,以安徽优晶生物技术有限公司的凝胶回收试剂盒纯化目的片段,由上海英骏生物技术有限公司进行克隆测序,获得的片段记为片段I.对片段I进行BLAST分析,获取该序列与已知病毒的同一性.

1.4 用于扩增SCBV基因组近全长序列的引物设计及PCR扩增

根据所获得的片段I序列设计特异引物对SCBV-P3(5'-GAACCTGTATACGCAGCAGCTCTTACC-3')与SCBV-P4(5'-GACTTCAAGTTCTGTTGTGCTC-CC-3')(预期扩增片段为7 300 bp),巢式引物对SCBV-P1(5'-GGTCACTGCTCTGAACGAAGGC-3')与SCBV-P2(5'-ACGCCGTAACACGTAGTCCTAAG-GT-3')(预期扩增片段为7 100 bp),试图扩增SCBV基因组近全长序列.

以供试植株叶组织总DNA抽提物为模板,采用LA Taq酶[宝生物工程(大连)有限公司]进行长片段PCR扩增.引物对SCBV-P3与SCBV-P4以及巢式引物对SCBV-P1与SCBV-P2的PCR扩增参数均为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,52℃退火30 s,68℃延伸7.5 min,30个循环;68℃补充延伸5 min.

扩增产物经12 g/L琼脂糖凝胶电泳,以凝胶回收试剂盒(安徽优晶生物技术有限公司)纯化目的片段.由上海英骏生物技术有限公司对该片段(记为片段II)进行克隆测序,所得序列在GenBank

中进行 BLAST 分析, 获取该序列与已知病毒的同一性。

1.5 序列分析

采用软件包 DNA Star5.01 对所获得的片段 I 和 II 进行拼接, 获得 SCBV 基因组疑似序列, 进而与已报道的杆状 DNA 病毒属各成员的基因组序列进行相似性分析。参与分析的病毒及基因组在 GenBank 中的登录号为: SCBV-IM (7 687 bp, AJ277091), SCBV-M(7 568 bp, M89923), 芋头杆状病毒 *Taro bacilliform virus* (TaBV, 7 458 bp, AF357836), 可可肿枝病毒 *Cacao swollen shoot virus* (CSV, 7 161 bp, L14546), 柑桔黄花叶病毒 *Citrus yellow mosaic virus* (CYMV, 7 559 bp, AF347695), 香蕉线条病毒 *Banana streak virus* (BSV, 7 722 bp, AY750155) 和鸭跖草黄斑驳病毒 *Commelina yellow mottle virus* (ComYMV, 7 489 bp, X52938)。

1.6 地高辛标记探针 Southern-blot 杂交检测

采用 DIG High prime DNA labeling and detection starter kit I(罗氏生物公司)进行 Southern-blot 杂交分析。以含片段 I 的 pMD18-T 重组质粒为模板, 采用引物 SCBV-A 和 SCBV-W11 经 PCR 扩增获得 SCBV 片段, 电泳纯化后按试剂盒说明制备地高辛标记探针。以常规 CTAB 法提取供试甘蔗植株叶组织总 DNA, 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 再经毛细管转移法转印至尼龙膜上, 按试剂盒说明与标记探针杂交和免疫反应显色, 照相记录显色结果, 以 *Hind* III 酶切 λ 噬菌体 DNA 为相对分子质量标准。

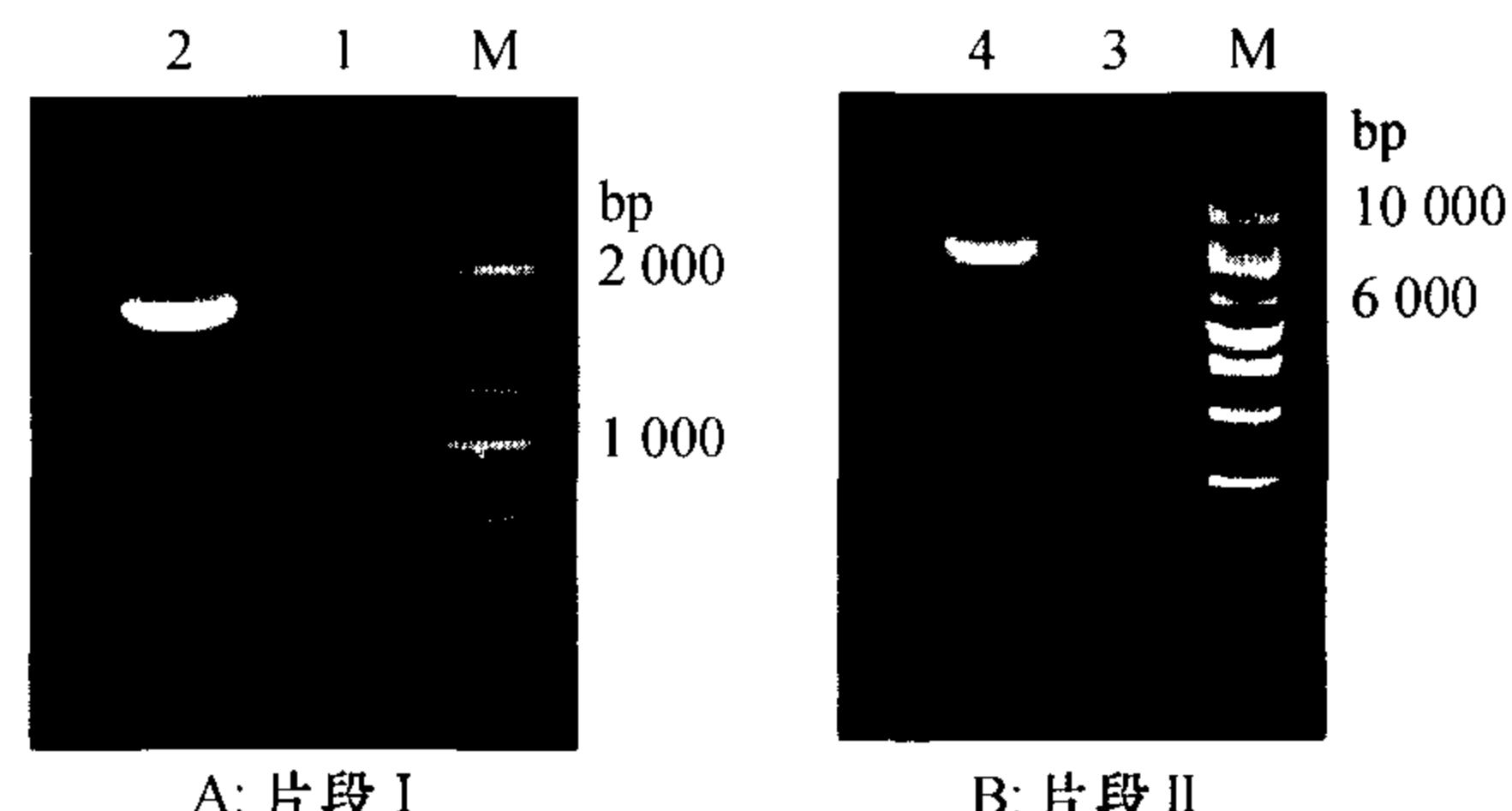
2 结果与分析

2.1 SCBV 同源序列的 PCR 检测及序列测定

采用文献[6]报道的 SCBV 基因组保守区域通用引物对 SCBV-F5 与 SCBV-R5 及 SCBV-F1 与 SCBV-R1 对供试甘蔗样品进行 PCR 检测, 均未获得阳性结果。而由笔者根据已报道的 SCBV-IM 分离物与 SCBV-M 分离物基因组序列所设计的巢式引物对 SCBV-W11 与 SCBV-C2 则可从样品中扩增出 PCR 产物(图 1A, 记为片段 I), 克隆测序获知其大小为 1.6 kb, 符合预期。

将片段 I 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 揭示其核苷酸序列与 SCBV-IM 和 SCBV-M 相应片段的同一性分别为 74.2% 和 70.0%。根据片段 I 序列设计引物对 SCBV-P3 与 SCBV-P4 以及巢式引物对 SCBV-P1 与 SCBV-P2, 尝试进行 SCBV 基因

组片段扩增, 结果获得 PCR 扩增产物(图 1B, 记为片段 II), 克隆测序获知其大小为 4.7 kb, 比预期小约 2.4 kb。



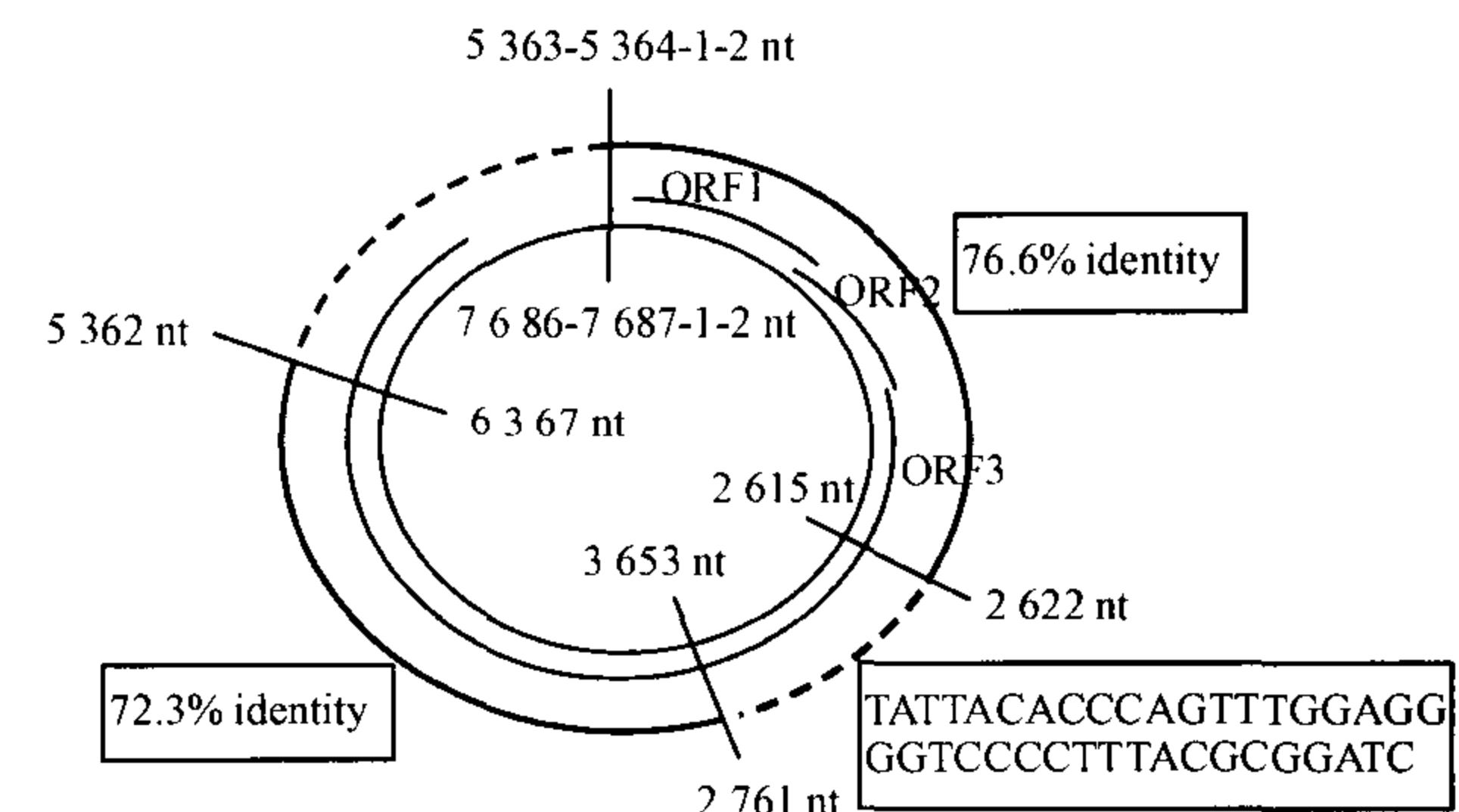
M: DNA Marker; 1: 引物对 SCBV-A 与 SCBV-C2 的 PCR 扩增产物; 2: 引物对 SCBV-W11 与 SCBV-C2 的巢式 PCR 扩增产物; 3: 引物对 SCBV-P3 与 SCBV-P4 的 PCR 扩增产物; 4: 巢式引物对 SCBV-P1 与 SCBV-P2 的 PCR 扩增产物

图 1 SCBV 同源片段 I 和 II PCR 扩增产物的电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis of PCR products of SCBV homologous fragment I and II

2.2 SCBV 疑似序列结构分析

片段 I 和 II 的 2 个末端符合预期, 各有数十个核苷酸完全相同, 二者可拼接成为 1 个环状 DNA 分子, 拼接后总长 5 364 bp, 命名为 SCBV 疑似序列 (SCBV-YS)。与 GenBank 中已报道的 SCBV 基因组序列相比, SCBV-YS 有 2 段序列缺失, 缺失部分分别对应于 SCBV-IM 基因组第 2 615 ~ 2 653 nt 和第 6 367 ~ 7 685 nt。第 1 个缺失 995 bp, 对应于 SCBV-IM 反转录酶编码区部分序列, 该缺失由 39 个核苷酸替换, 替换序列在 GenBank 数据中未能搜索到同源序列。第 2 个缺失 1 320 bp, 对应于 SCBV-IM RNase H 编码区, 该缺失无替换序列。SCBV-YS 其余部分与 SCBV-IM 具有较高的同源性, 核苷酸同一性分别为 76.6% 和 72.3% (图 2)。



内环示 SCBV-IM 基因组; 外环示 SCBV-YS 序列, 其中虚线示缺失区域

图 2 SCBV-YS 与 SCBV-IM 比对示意图

Fig. 2 Comparison between SCBV-YS and SCBV-IM genomic sequence

SCBV-YS 正链第 1 ~ 19 nt 处有 1 段杆状 DNA

病毒保守序列,即蛋氨酸 tRNA (Methionine transfer RNA, tRNA^{met})结合区,该区段的 19 个碱基 (TGG-TATCAGAGCGAAGGTA) 中有 15 个(加下划线部分)与植物胞质起始 tRNA^{met}保守区 (ACCATAGTCTCG-GTCCAAA) 互补(表 1)。

表 1 SCBV-YS 与其他杆状 DNA 病毒 tRNA^{met}结合区序列比对¹⁾

Tab. 1 Comparison among SCBV-YS and other *Badnavirus* tRNA^{met} binding domain sequences

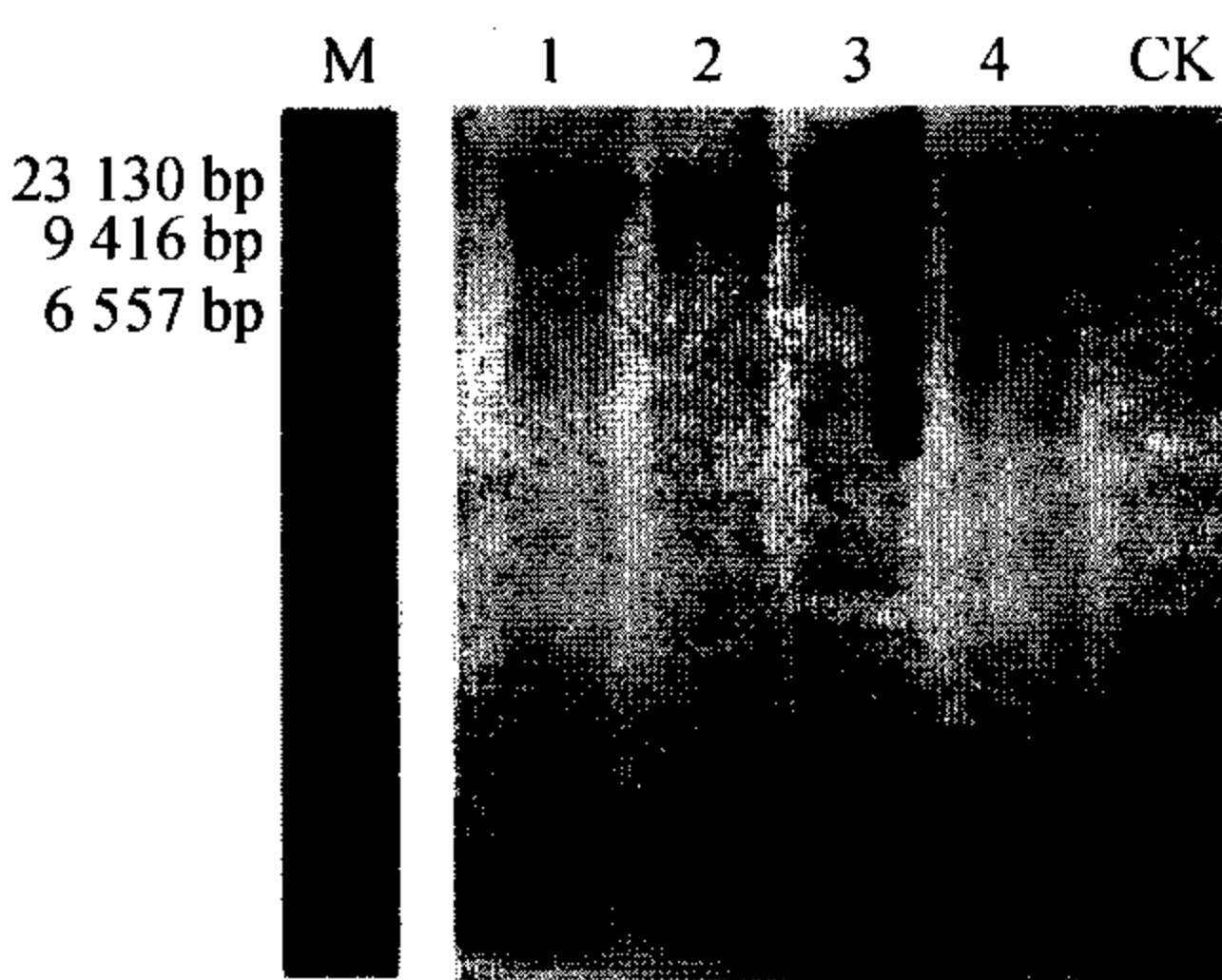
病毒名称	tRNA ^{met} 结合区序列
tRNA ^{met} C	TGGTATCAGAGCCAGGTTT
SCBV-YS	***** G * A * G * A
SCBV-IM	***** G **** A *
SCBV-M	***** G *****
TaBV	***** T * T * G * A
CSV	***** A ***** A
CYMV	***** TT **** A
BSV	***** A *****

1) tRNA^{met} C: 植物蛋氨酸 tRNA 保守区互补序列; * 为与植物 tRNA^{met} 相同的碱基

用 DNA Star5.01 软件进行分析,SCBV-YS 序列正链具有 2 个完整的开读框,分别命名为 ORF-A 及 ORF-B,均编码大于 10 000 的蛋白,负链则不编码任何大于 10 000 的蛋白。分别将 SCBV-YS 的 2 个 ORFs 核苷酸序列与其他杆状 DNA 病毒相应 ORFs 核苷酸序列进行比较分析,结果显示 SCBV-YS ORF-A 与其他杆状 DNA 病毒 ORF1 核苷酸序列同一性为 33.2% ~ 76.1%,其中与 SCBV-IM 同一性最高(76.1%),与 TaBV 同一性最低(33.2%);ORF-B 与其他杆状 DNA 病毒 ORF2 核苷酸序列同一性为 24.4% ~ 73.4%,其中与 SCBV-IM 同一性最高(73.4%),与 CYMV 同一性最低(24.4%)。虽然 SCBV-YS 只含有 2 个 ORF,但第 1 543 ~ 1 546 nt 为起始密码子 ATG,对应于 SCMV-IM ORF3 的起始位点,由于其后的终止密码子缺失,SCBV-YS 没有完整的 ORF3。从该起始密码子开始进行推导氨基酸序列分析,可发现几个与 SCBV ORF3 编码的多聚蛋白高度一致的基序,分别为天冬氨酸蛋白酶基序(ALLDTGAT)、反转录酶基序(SKFDLKSGFHQVAMDPEIPLTAFT-AYNELYEWLVMPFGLKNAPAVFQRKMDNCFRGTER-FIAVYIDDILVFS)、运动蛋白基序(HLGALAIRIQPL-HATWSGKLAFLVLRDVRNNPPTTLGAMEVDLSKG)、富含半胱氨酸的锌指状 RNA 结合区(CRCFVCGSP-DHLMKDCKSPMRK)及第 2 个富含半胱氨酸区(CK-RCLKTVGKGEYAYCKTCKVGVCNDC)。

2.3 SCBV-YS 序列 Southern-blot 分析

以片段 I 为探针,对采自广西甘蔗研究所试验地的 4 株新台糖 25 号甘蔗样品总 DNA 进行 Southern-blot 检测。结果(图 3)表明,这 4 株甘蔗植株中,杂交信号均出现在大于 20 kb 的位置,说明 SCBV-YS 片段 I 并非以病毒基因组(7.5 kb)形式存在,可能是整合在甘蔗基因组中。



M: λ -Hind III Digest DNA marker; 1 ~ 4: 甘蔗植株叶片总 DNA; CK: 含 SCBV-YS 片段 I 的质粒

图 3 甘蔗植株总 DNA 中 SCBV-YS 片段 I Southern-blot 检测结果

Fig. 3 Southern-blot results of SCBV-YS fragment I in total DNA from sugarcane

3 讨论与结论

本文根据已报道的 SCBV 基因组 ORF1 和 ORF2 序列设计引物对 SCBV-A 与 SCBV-C2 及引物对 SCBV-W11 与 SCBV-C2,对杂种甘蔗新台糖 25 号植株叶组织总 DNA 进行 PCR 扩增,获得了阳性结果,扩增产物核苷酸序列与已报道的 SCBV 具有较高的同一性,表明供试样品中含有 SCBV 同源序列。依据所获得的核苷酸序列,进一步设计引物,试图扩增病毒环状 DNA 基因组全长序列,采用分段扩增及重迭序列拼接法获得了 1 个与 SCBV 相似的环状 DNA 序列(命名为 SCBV-YS)。该序列与已报道的 SCBV-IM 与 SCBV-M 之间具有较高的核苷酸同一性,具有 SCBV 基因组结构特征,包含了病毒 ORF1 和 ORF2,并在与 SCBV 对应位点具有 ORF3 的起始密码子及多个重要功能基序,可以确定其为 SCBV 同源序列。但是,与 SCBV 相比,SCBV-YS 发生了 2 个长片段缺失,第 1 个缺失位于反转录酶编码区域,第 2 个缺失使其失去了 ORF3 的终止密码子及 RNase H 的编码区域,而 RNase H 是病毒复制所必须的重要组分^[1,7,10],因此,SCBV-YS 不太可能是完整的病毒基因组。Southern-blot 分析表明,SCBV-YS 的杂交信号位于大于 20 kb 处,远大于病毒基因组 7.5 kb。这些证据表明,SCBV-YS 可能为杂种甘蔗新台糖 25 号基

因组中的病毒整合序列。

Geijskes 等^[7]的研究表明,SCBV 不会整合进甘蔗高贵种 *Saccharum officinarum* 的基因组。但 Staginnus 等^[11]通过对已知的植物基因组中病毒整合序列的研究结果进行分析,提出了下列推论,即种间杂交及染色体多倍化是促进病毒向植物基因组整合的重要因素,无性繁殖是稳定这种整合的重要条件。甘蔗是无性繁殖作物,在育种过程中,栽培种之间、栽培种与野生种之间实现了复杂的种间杂交及高度多倍化^[12-13]。本研究在杂种甘蔗基因组中发现 SCBV 整合序列,支持了 Staginnus 等^[11]的推论。

已有研究表明,杆状 DNA 病毒可以全序列或分段序列整合于寄主基因组中,通常整合序列两侧具有正向重复序列^[14]。正是因为这种正向重复序列的存在,使得采用反向引物对整合序列进行 PCR 扩增时可以获得阳性结果,并使扩增产物序列可通过部分重迭拼接成环状结构。本研究获得的 SCBV-YS 中第 1 个缺失位点存在 1 个长度为 39 bp 的不明插入序列,该插入序列极有可能是整合片段的旁侧重复序列。我们曾试图采用 TAIL-PCR、反向 PCR 及 DNA 片段接头 PCR 的方法获取整合片段侧翼序列,但未能成功,相关的研究仍在进行中。

寄主基因组中病毒整合序列的存在,对病毒分子检测会造成干扰。我们采用 SCBV ORF1 及 ORF2 引物对供试样品及其他一些品种的杂种甘蔗进行 PCR 检测,获得了多个阳性结果(结果未显示)。但是,采用文献[6]报道的 SCBV 基因组保守区域通用引物 SCBV-F5 与 SCBV-R5 及 SCBV-F1 与 SCBV-R1 对这些样品进行 PCR 检测,均为阴性结果,这是因为这 2 对引物是基于病毒重要功能基因 RNase H 的编码区域设计的,而整合序列 SCBV-YS 恰巧缺失了这一区域。我们认为,对于 SCBV 检测,仅仅依据病毒基因组部分片段 PCR 扩增的结果是不能做出正确判断的,开发基于游离病毒粒子或病毒全长基因组的检测方法十分必要。

Maori 等^[15]对蜜蜂的研究表明,基因组中的病毒整合序列明显地改变了宿主的表型,尤其是使宿主获得了对病毒的抗性。杂种甘蔗中 SCBV 整合序列的功能及其与抗病性的关系值得深入研究。

参考文献:

- [1] GEIJEKES R J, BRAITHWAITE K S, DALE J L, et al. Sequence analysis of an Australian isolate of *Sugarcane bacilliform badnavirus* [J]. *Archives of Virology*, 2002, 147 (12):2393-2404.
- [2] LOCKHART B E L, AUTREY L J C. Occurrence in sugar- cane of a bacilliform virus related serologically to *Banana streak virus* [J]. *Plant Disease*, 1988, 72 (3):230-233.
- [3] COMSTOCK J C, LOCKHART B E L. Worldwide spread occurrence of *Sugarcane bacilliform virus* in the U. S. sugarcane germplasm collections [J]. *Plant Disease*, 1990, 74: 536.
- [4] VISWANATHAN R, ALEXANDER K C, VARMA A. Occurrence of *Sugarcane bacilliform virus* in sugarcane germplasm collection [J]. *Indian Phytopathology*, 1998, 51 (2): 91.
- [5] COMSTOCK J C, LOCKHART B E L. Effect of *Sugarcane bacilliform virus* on biomass production of three sugarcane cultivars [J]. *Sugarcane*, 1996, 4:12-15.
- [6] BRAITHWAITE K S, EEGSKOV N M, SMITH G R. Detection of *Sugarcane bacilliform virus* using the polymerase chain reaction [J]. *Plant Disease*, 1995, 79 (8):792-796.
- [7] GEIJSKES R J, BRAITHWAITE K S, SMITH G R, et al. *Sugarcane bacilliform virus* encapsidates genome concatamers and does not appear to integrate into the *Saccharum officinarum* genome [J]. *Archives of Virology*, 2004, 149 (4): 791-798.
- [8] HARPER G, OSUJI J O, HESLOP-HARRISON J S, et al. Integration of *Banana streak badnavirus* into the *Musa* genome: Molecular and cytogenetic evidence [J]. *Virology*, 1999, 255 (2):207-213.
- [9] YANG I C, HAFNER G J, REVILL P A, et al. Sequence diversity of South Pacific of *Taro bacilliform virus* and the development of a PCR-based diagnostic test [J]. *Archives of Virology*, 2003, 148 (10):1957-1968.
- [10] BOUHIDA M, LOCKHART B E L, OLSZEWSKI N E. An analysis of the complete sequence of a *Sugarcane bacilliform virus* genome infectious to banana and rice [J]. *Journal of General Virology*, 1993, 74 (1):15-22.
- [11] STAGINNUS C, RICHERT-POGGELE R K. Endogenous pararetroviruses: Two-faced travelers in the plant genome [J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11 (10):485-491.
- [12] 蔡青,范源洪,AITKEN K,等.利用 AFLP 进行“甘蔗属复合体”系统演化和亲缘关系研究 [J]. 作物学报, 2005, 31 (5):551-559.
- [13] 李奇伟.现代甘蔗改良技术 [M]. 广州:华南理工大学出版社,2000:2-18.
- [14] GEERING A D W, OLSZEWSKI N E, DAHAL G, et al. Analysis of the distribution and structure of integrated *Banana streak virus* DNA in a range of *Musa* cultivars [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2001, 2 (4):207-213.
- [15] MAORI E, TANNE E, SELA I. Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes [J]. *Virology*, 2007, 362 (2):342-349.