

江苏省建兰齿兰环斑病毒的鉴定和遗传多样性分析

吴伟文 贺振* 刘娴 李良俊

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 为防控江苏省建兰上的齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ring spot virus*, ORSV), 采用酶联免疫吸附反应(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)和反转录-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)对采自江苏省扬州市的16份具有典型感染ORSV病害症状的建兰叶片样品进行检测鉴定, 并结合GenBank中已报道的相关序列对其进行多样性和系统发育树分析。结果显示, 扬州市建兰上ORSV检出率高达100%; 所获得的ORSV分离物与GenBank中其它141个分离物的核苷酸序列一致率均在94%以上, 所有ORSV分离物只能形成1个分组, 且组内多样性水平低, 不具备典型的寄主和地理特异性; 6个ORSV种群间差异较小, 种群多态性均较低, 其中ORSV印度尼西亚种群的种群多态性最高, 为0.025, ORSV德国种群和ORSV印度尼西亚种群之间的遗传距离最高, 为0.0244。表明不同地区、不同寄主种群ORSV分离物的遗传差异很小, 种群内不同分离物有很高的相似性。

关键词: 建兰; 齿兰环斑病毒; 序列分析; 系统发育分析

Identification and genetic diversity analysis of *Odontoglossum ring spot virus* in *Cymbidium ensifolium* in Jiangsu Province

Wu Weiwen He Zhen* Liu Xian Li Liangjun

(School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China)

Abstract: In order to prevent and control *Odontoglossum ring spot virus* (ORSV) in *Cymbidium ensifolium* in Jiangsu Province, 16 leaf samples collected from Yangzhou City were detected by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and their diversity and phylogenetic analysis were combined with the related sequences reported in GenBank. The detection rate of ORSV on *C. ensifolium* was 100%. Sequence analysis showed that the ORSV isolates obtained in this study and the other 141 isolates in GenBank shared over 94% similarity. The phylogenetic analysis showed that ORSV isolates clustered into one group with low diversity and did not possess typical host and geographic specificity. Low population polymorphism was also found among the different ORSV geographical populations, and the Indonesia population had the highest value (0.025). The small genetic differences of ORSV among different geographical populations were obvious, and the highest value (0.0244) was found between Germany and Indonesia populations. In summary, the genetic diversity of different host populations in different ORSV regions was very small, and there were high similarities between different isolates within the population.

Key words: *Cymbidium ensifolium*; *Odontoglossum ring spot virus*; sequence analysis; phylogenetic analysis

兰花是对兰科植物的统称,花香宜人,花形优美,花色鲜艳,花期较长,观赏价值较高(王卜琼等,2005)。建兰是兰科兰属多年生草本植物,是我国兰花的主要品种之一(罗金水等,2011)。兰花病害主要有污染引起的病害、缺乏营养素引起的生理性病害和病毒、细菌以及真菌引起的病害(沈淑琳,1988;柯鼎新,2004),其中病毒病是一种较严重的病害。建兰感染病毒后,叶片表现为褪绿、黑褐色斑点、条纹等症状,严重时叶片皱缩、变形(易绮斐等,2004;王一椒,2017)。目前发现的兰花病毒有50多种,其中分布最广、危害最严重是齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ring spot virus*, ORSV)和建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)(郑平等,2001;臧颖等,2019)。

ORSV属于烟草花叶病毒属,是严重危害兰花品质的主要病毒之一,主要通过机械传播(郑国华等,2010)。ORSV侵染兰花后,其叶片出现环斑、坏死斑、花叶等症状,部分兰花也可能不表现明显症状(彭博,2015)。目前,国内关于ORSV侵染蝴蝶兰(丁兰等,2012)、大花蕙兰(许传俊等,2012)、石斛兰(张振华,2011)、卡特兰(明艳林和郑国华,2003)以及文心兰(樊荣辉等,2015)等的相关报道较多,而关于ORSV侵染建兰的相关研究很少。

RNA病毒分子进化研究有助于加深对病毒传播途径、流行以及寄主相互适应方式等方面的理解(Holmes,2009;朱红娟等,2014;贺振等,2017a)。突变、重组、漂变、选择压力和迁移是驱动植物病毒分子进化的主要作用力(马进等,2008;Holmes,2009;任芳等,2010)。多种病毒的分子进化已经被报道,如甘蔗线条花叶病毒(*Sugarcane streak mosaic virus*, SCSMV)(He et al.,2016;贺振等,2017b)、豇豆蚜传花叶病毒(*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CAMV)(Wainaina et al.,2018)、虎眼万年青花叶病毒(*Ornithogalum mosaic virus*, OrMV)(Gao et al.,2018)、辣椒轻斑驳病毒(*Pepper mild mottle virus*, PMMV)(Guan et al.,2018)、烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)(Gao et al.,2019)、苹果锈果类病毒(*Apple scar skid viroid*, ASSVd)(赵玲玲等,2018)、烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)(贺振等,2018)等。目前ORSV的分子进化研究主要集中在外壳蛋白(coat protein, CP)基因的遗传多样性方面,如刘志昕等(1998)研究结果发现ORSV海南分离株的CP基因核苷酸以及编码的氨基酸序列与日本分离株具有极高的同源性,变异性较小;周

国辉等(2003)研究发现ORSV各分离物CP基因序列非常保守;郑国华等(2010)研究结果发现侵染文心兰的ORSV的CP基因序列同其它分离物存在很高的同源性,核苷酸序列同源性为97%~100%。

为明确江苏省ORSV种群结构和分子进化特征,于2017年在扬州市采集16份具有典型感染ORSV病症的建兰叶片样品,采用酶联免疫吸附反应(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和反转录-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法对其进行检测鉴定,克隆其CP基因并进行序列分析,构建ORSV建兰分离物与其它分离物CP基因核苷酸序列的系统发育树,明确其亲缘关系,从重组、系统发生、选择压力、基因交流等方面对其进行系统的分子进化分析,以期为ORSV的防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:于2018年2月在江苏省扬州市花鸟市场、江苏里下河地区农业科学研究所兰花种质资源圃以及广陵区家庭庭院内采集具有明显花叶、斑驳症状的建兰叶片样品16份,于-80℃保存备用。

试剂及仪器:MiniBEST Plant RNA Extraction Kit、DNA凝胶回收试剂盒、DNA Marker、pMD18-T载体,宝生物工程(大连)有限公司;HiScript[®] Enzyme Mix、2×RT MIX、Green Taq Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司;大肠杆菌*Escherichia coli* DH5α感受态细胞,南京百斯凯科技有限公司;ORSV ELISA检测试剂盒,上海桥杜生物科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯。AG 22331 PCR仪,德国Eppendorf公司;Gel Doc XR+凝胶成像系统;美国Bio-Rad公司;DYCP-28A、DYCP-31A型电泳槽,北京六一仪器厂;TH-50型恒温箱,无锡市苏意达试验设备有限公司;SpectraMax Paradigm卡盒式多功能微孔读板机,美国Molecular Devices公司;TRANSALIGN分析软件,澳大利亚国立大学Georg Weiller教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 建兰叶片总RNA提取及ELISA检测

参照MiniBEST Plant RNA Extraction Kit试剂盒说明书提取建兰叶片样品总RNA。采用ORSA ELISA检测试剂盒对建兰样品进行检测;从室温放置20 min的铝箔袋中取出所需板条,设置标准品孔和样本孔,标准品孔中各加不同浓度的标准品

50 μL ;在样本孔中先加 5 μL 建兰叶片样品总 RNA, 再加 45 μL 样品稀释液;空白孔中不加样品与试剂。除空白孔外,标准品孔和样本孔每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μL ,用封板膜封住反应孔,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 或恒温箱温育 60 min;弃去液体,用吸水纸拍干,每孔加满洗涤液,静置 1 min,甩去洗涤液,用吸水纸拍干,如此重复洗板 5 次;每孔加入试剂盒提供的底物 A、B 各 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min,每孔加入 50 μL 终止液,15 min 内在 450 nm 波长处使用 SpectraMax Paradigm 卡盒式多功能微孔读板机测定各孔的吸光度值。

1.2.2 建兰上 ORSV CP 基因 RT-PCR 扩增和序列测定

采用引物 ORSV-F(5'-GGAGAAAGTTCCTATGGCTGC-3') 和 ORSV-R(5'-CGGATAGTTCAACACTATCAACG-3')(Rao et al., 2015) 对 ORSV 进行 PCR 检测,引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以建兰叶片样品 RNA 为模板进行反转录,10 μL 反转录体系:建兰 RNA 2 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 1 μL 、RNase free ddH₂O 1 μL 、2 \times RT MIX 5 μL 、HiScript[®]Enzyme Mix 1 μL 。反转录反应条件:25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。将得到的 cDNA 自然冷却至室温,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。随后进行 PCR 扩增,25 μL PCR 扩增体系:cDNA 2 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 1 μL 、Green Taq Mix 12.5 μL 、ddH₂O 8.5 μL 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物冷却至室温,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。用 DNA 凝胶回收试剂盒将 PCR 产物纯化后克隆到 pMD18-T 载体上,转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,委托北京擎科新业生物技术有限公司南京分公司完成测序。每个样品至少测定 3 条克隆序列,若每个样品测定的 3 条克隆序列完全一致,则只选择任一个序列进行多序列比对与进化分析。

1.2.3 建兰上 ORSV CP 基因序列多样性比对分析

测序所得 ORSV CP 基因的核苷酸序列共 16 条,利用 BioEdit 软件以甜椒斑点病毒(*Bell pepper mottle virus*, BPMoV) CP 基因的核苷酸序列(登录号: DQ355023)为比对分析的外组,与 GenBank 中的 141 个 ORSV CP 基因的核苷酸序列进行比对分析。为保证序列比对后的核苷酸序列能正确编译出氨基酸序列,将核苷酸序列和氨基酸序列利用 CLUSTAL X2 和 TRANSALIGN 软件进行比对(Dayhoff et al., 1983)。经比对后利用 RDP 4.0 软件对所得序列

进行重组分析。去掉重组体序列,采用邻接法利用 MEGA 7.0 软件对所得到的序列进行系统发育树分析,采用自举法进行 1 000 次模拟计算(Huson & Bryant, 2006)。

1.2.4 建兰上 ORSV CP 基因遗传多样性分析

ORSV 目前已在中国、韩国、日本、印度尼西亚、德国、新加坡、巴西等国家和地区的兰花上分离得到,本试验选用分离物数量较多的 6 个种群进行遗传多样性分析。核苷酸多样性是指分离物序列之间的平均差异;单体型多样性是指样本中单体型出现的频率和数量(贺振等, 2017b)。一般情况下,植物 RNA 病毒种群的单体型多样性指标较高,核苷酸多样性指标较低(He et al., 2016; 贺振等, 2017b; 2018)。使用 DnaSP 5.0 软件采用木村双参数法(Kimura, 1980)计算 6 个 ORSV 种群的核酸多样性指标和单体型多样性指标。利用 Tajima's *D*、Fu & Li's *D* 和 Fu & Li's *F* 对 6 个 ORSV 种群进行中性检验分析,若 Tajima's *D*、Fu & Li's *D* 和 Fu & Li's *F* 均为负值,说明该种群的遗传多样性较低,种群呈扩张趋势;若均为正值,则该种群稳定选择,种群数量正在减少(Tajima, 1989)。

1.2.5 ORSV 种群间遗传分化分析

使用 DnaSP 5.0 软件对 6 个 ORSV 种群进行种群间遗传分化和基因漂移分析。参照 Wright(1931)方法计算种群间遗传分化系数 F_{st} , $F_{st}=1/(4N_m+1)$, N_m 为基因流。采用 DnaSP 5.0 软件中 K_s 、 Z 和 S_{nn} 三个统计量分析种群间的遗传差异, K_s 由不同序列的数量决定,与序列来源无关; Z 是秩统计量; S_{nn} 是近邻统计量,当 3 个统计量同时显著,则显著。 $0<|F_{st}|<1$, 当 $0<|F_{st}|<0.33$ 时,表明 2 个地理种群之间存在频繁的基因交流, $0.33\leq|F_{st}|<1$ 时,表明基因交流的频率很低。当 $N_m<1$ 时,表明种群间很容易发生遗传漂变,无法抵制遗传漂变,会促使种群发生遗传分化;当 $N_m>1$ 时,基因流可以抵制遗传漂变的作用,同时防止种群分化发生;当 $N_m=1$ 时,种群较为稳定,不易发生基因流与遗传漂变。通过 MEGA 7.0 软件,运用最大组成似然模型计算不同 ORSV 分离物地理种群的遗传距离,种群间的遗传距离越大,表明有更高的多样性,采用自举法进行 1 000 次模拟计算(Kumar et al., 2016)。

1.2.6 建兰上 ORSV CP 基因选择压力分析

选择压力是 ORSV CP 基因的非同义突变 dN 和同义突变 dS 之间的比值。利用 DnaSP 5.0 软件采用最大似然法(Librado & Rozas, 2009)计算系统发育

树中不同分支上密码子的选择压力。当 $dN/dS < 1$ 时,该组种群处于纯化或负向选择压力中;当 $dN/dS = 1$ 时,该组种群处于中性压力选择中;当 $dN/dS > 1$ 时,该组种群处于正向选择或多样化选择中。

2 结果与分析

2.1 建兰上ORSV检测结果及CP基因序列多样性比对

经ELISA检测,16份建兰样品全为阳性,ORSV检出率为100%;经RT-PCR检测,16份建兰样品均扩增获得767 bp片段,检出率也为100%。将所得序列提交到GenBank中,其登陆号为MH397319~MH397334。去掉引物序列,本研究所获得的完整ORSV CP基因序列长度为477 bp,多样性比对结果显示,16份阳性样品与GenBank中已报道的141个ORSV分离物CP基因的核苷酸序列一致性均在94%以上。

2.2 建兰上ORSV CP基因重组和系统发育树分析

在所有ORSV CP基因序列中未发现明显的重组位点和重组体。所测定的16份建兰样品的ORSV分离物与GenBank中已登陆的141个ORSV分离物只能形成一个分组,不具备典型的寄主和地理特异性(图1)。

2.3 建兰上ORSV种群间遗传多样性分析

在6个种群中,ORSV中国种群的核苷酸多样性较低,为0.005,仅高于日本种群,ORSV印度尼西亚种群的核苷酸多样性最高,为0.025;ORSV德国种群和新加坡种群单体型多样性都为1.000,日本种群单体型多样性最低,为0.500。不同地理种群间ORSV的遗传差异不明显,非亚洲种群的单体型多样性高且核苷酸多样性低。6个ORSV种群群的Tajima's D 、Fu & Li's D 和Fu & Li's F 均为负值,说明这6个种群多态性较低,种群扩张可能存在瓶颈效应;除中国种群的Tajima's D 、Fu & Li's D 、Fu & Li's F 和韩国种群的Fu & Li's D 和Fu & Li's F 差异显著外,其它ORSV种群群的Tajima's D 、Fu & Li's D 和Fu & Li's F 均差异不显著(表1)。

2.4 ORSV种群间遗传分化分析

除与德国种群间遗传差异不显著外,中国种群与其它种群间的遗传差异显著;韩国种群与中国种群、日本种群、印度尼西亚种群的遗传差异显著,与新加坡种群、德国种群的遗传差异不显著;新加坡种群与中国种群、日本种群的遗传差异显著,与其它种群间的遗传差异不显著;德国种群与日本种群、印度

尼西亚种群的遗传差异显著,与其它种群遗传差异不显著;印度尼西亚种群与新加坡种群的遗传差异不显著,与其它种群遗传差异均显著;日本种群与其它种群间遗传差异均显著(表2)。ORSV日本种群与中国种群、韩国种群、新加坡种群的遗传分化系数大于0.362,说明ORSV日本种群与这3个种群间存在频繁的基因交流,遗传分化程度较高;其余种群间基因交流较少,遗传分化系数较小(表2)。ORSV日本种群与其它5个种群间基因流 $N_m < 1$,说明ORSV日本种群受遗传漂变的影响(表2)。在6个ORSV种群中,ORSV德国种群和印度尼西亚种群之间的遗传距离最大,为0.0244,新加坡种群与印度尼西亚种群之间的遗传距离也较大,为0.0238,中国种群与日本、韩国种群之间的遗传距离最小,分别为0.073和0.084(表3)。

2.5 建兰上ORSV CP基因选择压力分析

6个ORSV种群的 dN/dS 值均小于1,表明其处于负选择压力作用中,ORSV韩国种群的 dN/dS 值最低,为0.176,而ORSV印度尼西亚种群 dN/dS 值最高,为0.700(表4)。这表明ORSV CP基因处于相对较弱的负向选择压力作用中,与核苷酸多样性分析结果一致。

3 讨论

本研究对采自扬州市表现出花叶、斑驳症状的16份建兰叶片样品进行了ELISA和RT-PCR检测,ORSV阳性检出率均为100%,表明ORSV在建兰上的发生十分普遍。在兰花病毒中,ORSV与CymMV在侵染兰花时叶片表现相似的病状,并且常常存在复合侵染的现象(郑平等,2001;彭博,2015),本研究中未发现CymMV,可能是由于采样地点集中在扬州市区,样品数量较少所造成的。植物病毒间CP基因的同源性是病毒株系划分的主要依据。周国辉等(2003)研究结果表明,从世界各地获得的分离物基因组序列之间,尤其是CP基因序列之间具有高度的同源性。本研究所获得的完整ORSV CP基因序列长度为477 bp,与已报道的141个ORSV分离物的CP基因核苷酸相似性为94%以上,并且未发现重组位点。同时ORSV系统进化树结果显示,这些病毒分离物只可分为一类,不具备典型的寄主和地理特异性,推测ORSV可能起源于世界的某一地,在其进化了相当长的时间之后再向世界各地扩散。

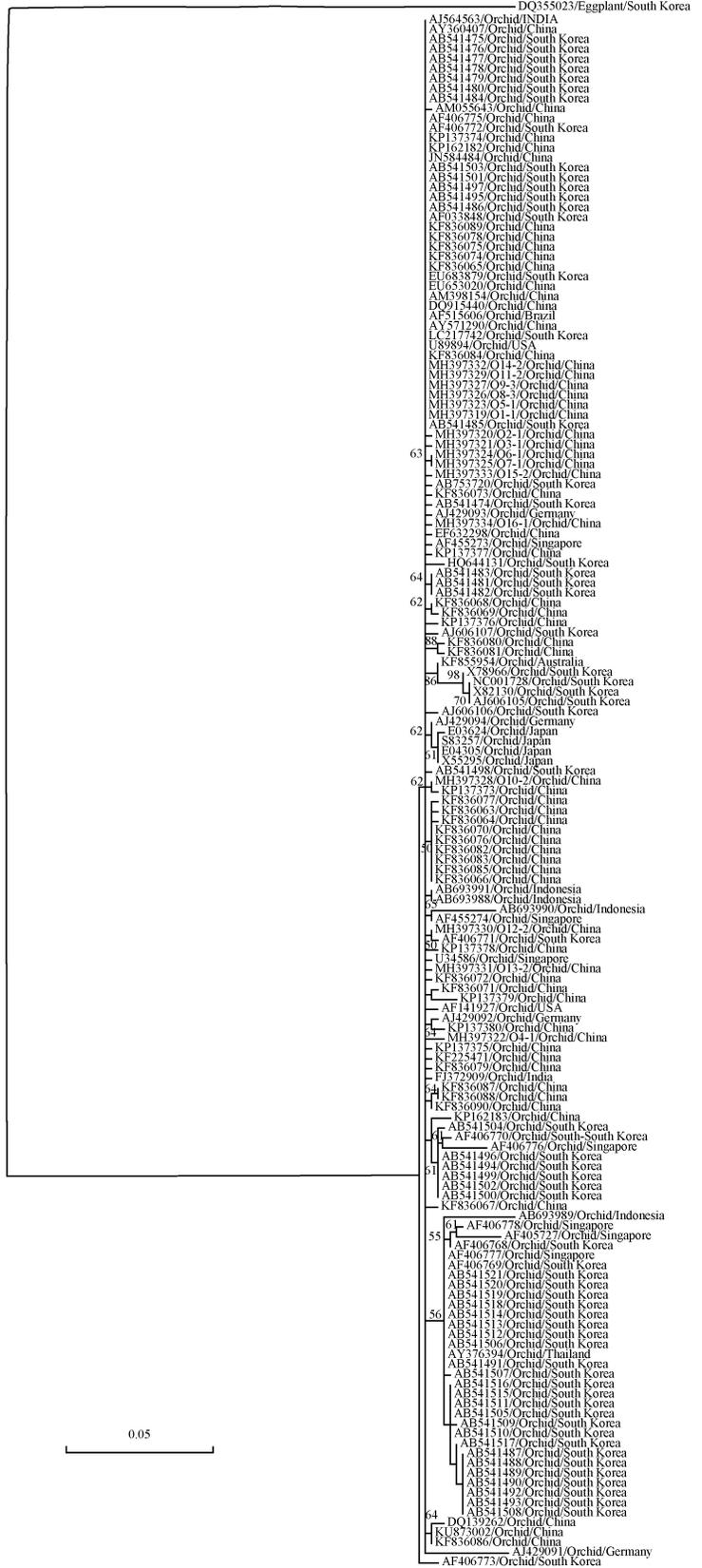


图1 基于邻接法构建 16 份建兰样品 ORSV 分离物与其它 141 个 ORSV 分离物 CP 基因的核苷酸序列的系统发育树
 Fig. 1 Phylogenetic tree of CP gene nucleotide sequences of 16 ORSV isolated from *Cymbidium ensifolium* and other 141 isolates based on neighbor-joining method
 分离物以登录号/寄主/采集地点的形式表示。Isolates are indicated by accession number/hosts/collection locations.

表1 ORSV种群的单体型和核苷酸遗传多样性分析
Table 1 Haplotype and nucleotide diversity analysis of ORSV

种群 Population	Tajima's <i>D</i>	Fu & Li's <i>D</i>	Fu & Li's <i>F</i>	单体型多样性	核苷酸多样性
				Haplotype diversity analysis	Nucleotide diversity analysis
中国种群 China population	-2.655**	-5.471*	-5.258*	0.884±0.036	0.005±0.001
德国种群 Germany population	-0.850	-0.851	-0.875	1.000±0.177	0.018±0.007
韩国种群 Korea population	-1.616	-3.105*	-3.044*	0.890±0.024	0.008±0.001
新加坡种群 Singapore population	-1.012	-1.116	-1.206	1.000±0.076	0.018±0.005
印度尼西亚种群 Indonesia population	-0.857	-0.857	-0.893	0.833±0.222	0.025±0.008
日本种群 Japan population	-0.612	-0.612	-0.479	0.500±0.265	0.001±0.001

表中数据为平均数±标准差。*和**分别表示在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean±SD. * or ** indicates significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ level, respectively.

表2 ORSV种群间基因漂移和遗传差异分析
Table 2 Gene flow and genetic differentiation among ORSV populations

种群 Population	种群 Population	遗传差异统计量 Statistical magnitude for genetic difference			遗传分化系数 Genetic differentiation coefficient F_{st}	基因流 Gene flow N_m
		K_s	Z	S_{nn}		
中国种群 China population ($n=66$)	韩国种群 Korea population	2.972**	3 887.978**	0.735**	0.155	1.37
	新加坡种群 Singapore population	2.731**	1 258.760*	0.932**	0.089	2.55
	德国种群 Germany population	2.495	1 181.552*	0.942*	0.003	75.51
	日本种群 Japan population	2.038**	1 119.171**	1.000**	0.606	0.16
	印度尼西亚种群 Indonesia population	2.667**	1 162.617*	0.993**	0.127	1.71
	韩国种群 Korea population ($n=65$)	新加坡种群 Singapore population	4.269	1 257.306	0.893**	-0.009
新加坡种群 Singapore population ($n=7$)	德国种群 Germany population	4.097	1 148.520*	0.942*	0.079	2.91
	日本种群 Japan population	3.633**	1 115.740*	1.000**	0.539	0.21
	印度尼西亚种群 Indonesia population	4.271*	1 131.936*	0.986**	0.108	2.06
	德国种群 Germany population	8.424	26.932	0.582	0.058	4.03
	日本种群 Japan population	5.515*	23.435*	1.000*	0.362	0.44
	印度尼西亚种群 Indonesia population	9.515	25.129	0.706	0.075	3.07
德国种群 Germany population ($n=4$)	日本种群 Japan population	4.500*	10.208*	0.875*	0.250	0.75
	印度尼西亚种群 Indonesia population	10.000*	12.750*	0.708*	0.091	2.50
	印度尼西亚种群 Indonesia population	6.000*	9.750*	1.000*	0.314	0.55

印度尼西亚分离物数量过少,不能计算,未列出。 n : 分离物数量; *和**分别表示在 $P<0.05$ 和 $P<0.001$ 水平差异显著。The number of isolates in Indonesia is too small to be calculated. n : the number of isolate; * or ** indicates significant difference at $P<0.05$ or $P<0.001$ level, respectively.

表3 ORSV 种群间的遗传距离分析

Table 3 Genetic distances among ORSV populations

种群 Population	中国种群 China population	德国种群 Germany population	韩国种群 Korea population	新加坡种群 Singapore population	印度尼西亚种群 Indonesia population	日本种群 Japan population
中国种群 China population		0.0121	0.0084	0.0129	0.0165	0.0073
德国种群 Germany population			0.0148	0.0204	0.0244	0.0126
韩国种群 Korea population				0.0133	0.0191	0.0104
新加坡种群 Singapore population					0.0238	0.0152
印度尼西亚种群 Indonesia population						0.0188
日本种群 Japan population						

表4 ORSV 种群的选择压力

Table 4 Selection pressure of ORSV populations

种群 Population	分离物数量 Number	非同义突变 Non-synonymous mutation dN	同义突变 Synonymous mutation dS	dN/dS
中国种群 China population	66	0.003±0.001	0.008±0.001	0.375
德国种群 Germany population	4	0.011±0.004	0.030±0.010	0.367
韩国种群 Korea population	65	0.003±0.001	0.017±0.006	0.176
新加坡种群 Singapore population	7	0.012±0.003	0.027±0.009	0.444
印度尼西亚种群 Indonesia population	4	0.021±0.007	0.030±0.010	0.700
日本种群 Japan population	4	0.001±0.001	0.000±0.000	/

表中数据为平均数±标准差。/: 未计算。Data are mean±SD. /: Not counted.

每个 ORSV 种群的单倍型多样性表现不同,可能是各种群的自然生长环境差异所致。ORSV 各种群核苷酸多样性数值较低,表明 ORSV 种群多态性较弱。突变、重组和遗传漂变促使植物病毒具有较高的遗传多样性(Holmes, 2009; He et al., 2016)。如贺振等(2018)研究结果发现,在江苏省牡丹上 TRV 具有较高的遗传差异性,受较强的地理隔离和寄主选择作用; Guan et al. (2018)研究结果证明 PMMV 处于快速进化动态中; Gao et al. (2018)研究结果表明,负向选择和寄主适应性驱动 OrMV 的分子进化。ORSV 属于烟草花叶病毒属,该属病毒基因组通常十分保守,变异少(Yoon et al., 2010; Gao et al., 2019)。在本研究结果发现 ORSV 种群受负向选择压力的驱动,但是不同国家种群中负向选择压力值都相对较高,而且未发现明显的重组体,这可能是 ORSV 在不同地区、不同寄主种群的遗传差异很小、

种群多态性较低的主要原因。培育抗病毒品种是有效防控植物病毒的方法,但是许多植物病毒寄主范围广、适应性强,容易发生变异,加大了培育的难度(Yoon et al., 2010; Lin et al., 2015)。本研究结果中 ORSV 遗传多样性小,韩国种群、新加坡种群、德国种群和印度尼西亚种群的 ORSV 可能是同一个病毒种群,并且 ORSV 中国种群与韩国种群、新加坡种群和印度尼西亚种群间亦存在高频率的基因交流。这种相对稳定保守的种群结构,利于抗病毒兰花品种的培育。

综上所述,本研究对 ORSV CP 基因进行系统的分子进化分析,证明负向选择压力是驱动 ORSV 种群进化的主要作用力,探究了 ORSV 不同种群间的结构特征,明确了不同种群间的基因交流情况,对于抗 ORSV 品种培育和防控具有重要意义。但是由于部分国家 ORSV 分离物较少,在后续试验中可以增

加样品数量和采样地点,扩增 ORSV 的全基因组序列,进一步确定 ORSV 的种群分布、遗传交流与分子进化特征。

参 考 文 献 (References)

- Dayhoff MO, Barker WC, Hunt LT. 1983. Establishing homologies in protein sequences. *Methods in Enzymology*, 91: 524-545
- Ding L, Guo Y, Dong G, Yang L, Zhang L, Liu GA. 2012. A preliminary study carried by domestic *Phalaenopsis* seedlings *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) investigation and detoxified. *Northern Horticulture*, (2): 137-140 (in Chinese) [丁兰, 郭艳, 董刚, 杨玲, 张丽, 刘国安. 2012. 国产蝴蝶兰种苗携带建兰花叶病毒(CymMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)的调查及脱毒的初步研究. 北方园艺, (2): 137-140]
- Fan RH, Huang ML, Zhong HQ, Wu JS, Luo YH. 2015. Multiplex RT-PCR for simultaneous detection of three viruses in *Oncidium*. *Fujian Journal of Agricultural Science*, 30(7): 697-700 (in Chinese) [樊荣辉, 黄敏玲, 钟淮钦, 吴建设, 罗远华. 2015. 文心兰 3 种主要病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立. 福建农业学报, 30(7): 697-700]
- Gao F, Du Z, Shen J, Yang H, Liao F. 2018. Genetic diversity and molecular evolution of *Ornithogalum mosaic virus* based on the coat protein gene sequence. *Peer J*, 6: e4550
- Gao F, Liu X, Du Z, Hou H, Wang X, Wang F, Yang J. 2019. Bayesian phylodynamic analysis reveals the dispersal patterns of *Tobacco mosaic virus* in China. *Virology*, 528: 110-117
- Guan X, Yang C, Fu J, Du Z, Ho SYW, Gao F. 2018. Rapid evolutionary dynamics of *Pepper mild mottle virus*. *Virus Research*, 256: 96-99
- He Z, Chen CF, Luo YJ, Chen XJ. 2018. Molecular detection, identification and genetic diversity of *Tobacco rattle virus* on peony. *Journal of Plant Protection*, 45(4): 893-899 (in Chinese) [贺振, 陈春峰, 罗云建, 陈夕军. 2018. 侵染牡丹的烟草脆裂病毒的检测鉴定及序列分析. 植物保护学报, 45(4): 893-899]
- He Z, Chen CF, Zhang ZX, Li SF. 2017a. Advances in molecular evolution of viruses in the family *Potyviridae*. *Plant Protection*, 43(3): 13-22 (in Chinese) [贺振, 陈春峰, 张志想, 李世访. 2017a. 马铃薯 Y 病毒科分子进化研究进展. 植物保护, 43(3): 13-22]
- He Z, Li WF, Zhang ZX, Li SF. 2017b. Molecular variation of *HC-Pro* gene of *Sugarcane streak mosaic virus*. *Plant Protection*, 43(2): 29-36 (in Chinese) [贺振, 李文凤, 张志想, 李世访. 2017b. 甘蔗线条花叶病毒 HC-Pro 基因的分子变异分析. 植物保护, 43(2): 29-36]
- He Z, Yasaka R, Li WF, Li SF, Ohshima K. 2016. Genetic structure of populations of *Sugarcane streak mosaic virus* in China: comparison with the populations in India. *Virus Research*, 211: 103-116
- Holmes EC. 2009. The evolutionary genetics of emerging viruses. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 40: 353-372
- Huson DH, Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2): 254-267
- Ke DX. 2004. Prevention and control of major diseases of orchids. The 5th Annual Young Academic Conference of Fujian Agronomy Society. Fuzhou: Fujian Agricultural Association, pp. 259 (in Chinese) [柯鼎新. 2004. 兰花主要病害的防治. 福建省农学会第五届青年学术年会论文集. 福州: 福建省农学会, pp. 259]
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of sequence sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111-120
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology & Evolution*, 33(7): 1870
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452
- Lin PC, Hu WC, Lee SC, Chen YL, Lee CY, Chen YR, Liu LY, Chen PY, Lin SS, Chang YC. 2015. Application of an integrated omics approach for identifying host proteins that interact with *Odontoglossum ringspot virus* capsid protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(6): 711-726
- Liu ZX, Pan JS, Shao HS, Zheng XQ. 1998. Molecular cloning and sequencing of coat protein gene of *Odontoglossum ringspot virus*. *Chinese Journal of Virology*, 14(1): 93-96 (in Chinese) [刘志昕, 潘俊松, 邵寒霜, 郑学勤. 1998. 齿兰环斑病毒外壳蛋白基因克隆及序列分析. 病毒学报, 14(1): 93-96]
- Luo JS, Wu ZJ, Xie LH. 2011. Prokaryotic expression and antiserum preparation of the *CP* gene of *Odontoglossum ringspot virus*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27(19): 115-120 (in Chinese) [罗金水, 吴祖建, 谢联辉. 2011. 齿兰环斑病毒 CP 基因的原核表达及其产物抗血清制备. 中国农学通报, 27(19): 115-120]
- Ma J, Song YZ, Li KD, Zhu CX, Wen FJ. 2008. The analysis of molecular variability of *Rice stripe virus* isolate (RSV-SD-JN2) in Jinling, Shandong. *Journal of Plant Protection*, 35(5): 415-420 (in Chinese) [马进, 宋云枝, 李开东, 朱常香, 温孚江. 2008. 水稻条纹病毒山东济宁分离物 RSV-SD-JN2 分子变异分析. 植物保护学报, 35(5): 415-420]
- Ming YL, Zheng GH. 2003. Advances on *Odontoglossum ringspot virus*. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 18(4): 152-156 (in Chinese) [明艳林, 郑国华. 2003. 齿兰环斑病毒的研究进展. 云南农业大学学报, 18(4): 152-156]
- Peng B. 2015. Genetic transformation and detection of the *Cymbidium hybridum* with the CymMV or ORSV coat protein gene. Master Thesis. Beijing: Chinese Academy of Forestry (in Chinese) [彭博. 2015. 大花蕙兰转建兰花叶病毒与齿兰环斑病毒外壳蛋白基因及检测. 硕士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院]
- Rao X, Yuan L, Jie S, Li X, Li MH, Xiang MM. 2015. Genetic diversities of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* isolates based on the coat protein genes from orchids in Guangdong Province, China. *Journal of Phytopathology*, 163(4): 324-329

- Ren F, Qing L, Xiong Y, Tan WZ. 2010. Genetic structure and population variation of satellite DNA β associated with *Tomato yellow leaf curl China virus* in *Nicotiana glutinosa*. *Journal of Plant Protection*, 37(1): 31–36 (in Chinese) [任芳, 青玲, 熊艳, 谭万忠. 2010. 中国番茄黄化曲叶病毒卫星DNA β 在心叶烟中的遗传结构及种群变异. *植物保护学报*, 37(1): 31–36]
- Shen SL. 1988. Virus species, inspection and control of orchids. *Plant Quarantine*, 2(2): 144–150 (in Chinese) [沈淑琳. 1988. 兰花病毒的种类、检验和防治. *植物检疫*, 2(2): 144–150]
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585–595
- Wainaina JM, Kubatko L, Harvey J, Ateka E, Makori T, Karanja D, Boykin LM, Kehoe MA. 2018. Evolutionary insights into *Bean common mosaic necrosis virus* and *Cowpea aphid borne mosaic virus* using global isolates and thirteen new near complete genomes from Kenya. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/266858>
- Wang BQ, Li ZL, Yu CX. 2005. Progress on orchid breeding study. *Acta Horticulturae Sinica*, 32(3): 551–556 (in Chinese) [王卜琼, 李枝林, 余朝秀. 2005. 兰花育种研究进展. *园艺学报*, 32(3): 551–556]
- Wang YJ. 2017. Occurrence and control of two main orchid viral diseases in China. *Chinese Horticulture Abstracts*, (9): 120–122 (in Chinese) [王一椒. 2017. 国内2种主要兰花病毒病的发生与防控. *中国园艺文摘*, (9): 120–122]
- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian population. *Genetics*, 16(3): 97–158
- Xu CJ, Huang JM, Zeng BY, Zhang WH, Xu WJ. 2012. Influence of ribavirin on *Cymbidium hybridum virus* eradication. *Subtropical Plant Science*, 41(1): 7–9 (in Chinese) [许传俊, 黄珺梅, 曾碧玉, 张文慧, 许文江. 2012. 病毒唑对大花蕙兰CyMV及ORSV脱毒效果初探. *亚热带植物科学*, 41(1): 7–9]
- Yi QF, Liu DM, Chen HF, Huang XX, Xing FW. 2004. Main diseases of orchids and their control. *Plant Protection*, 30(1): 71–73 (in Chinese) [易绮斐, 刘东明, 陈红锋, 黄向旭, 邢福武. 2004. 兰花主要病害及其防治. *植物保护*, 30(1): 71–73]
- Yoon JY, Chung BN, Choi SK. 2010. High sequence conservation among *Odontoglossum ringspot virus* isolates from orchids. *Virus Genes*, 42(2): 261–267
- Zang Y, Yan C, Dai KX, Gan HF, He Z. 2019. Research progress in *Narcissus virus* diseases. *Northern Horticulture*, (5): 153–160 (in Chinese) [臧颖, 严纯, 戴凯新, 甘海峰, 贺振. 2019. 水仙病毒病研究进展. *北方园艺*, (5): 153–160]
- Zhao LL, Liu J, Song LQ, Zhang XY, Zhang S, Jiang ZW. 2018. Genetic analysis of *Apple scar skin viroid* from Fuji apple in Yantai, China. *Journal of Plant Protection*, 45(4): 856–863 (in Chinese) [赵玲玲, 刘娟, 宋来庆, 张学勇, 张硕, 姜中武. 2018. 烟台市富士苹果上苹果锈果类病毒分子变异分析. *植物保护学报*, 45(4): 856–863]
- Zhang ZH. 2011. The study on *Dendrobium* and *Oncidium* by genetic transformation with *CyMV-CP*、*ORSV-CP* gene. Master Thesis. Haikou: Hainan University (in Chinese) [张振华. 2011. 石斛兰文心兰转 *CyMV-CP*、*ORSV-CP* 基因研究. 硕士学位论文. 海口: 海南大学]
- Zheng GH, Ming YL, Wu Q, Su YB. 2010. Cloning and sequence analysis of coat protein gene of an *Odontoglossum ringspot virus* from *Oncidium*. 2010 Annual Conference Proceedings. Xiamen: Chinese Society for Plant Pathology, pp. 4 (in Chinese) [郑国华, 明艳林, 吴琦, 苏勇波. 2010. 侵染文心兰齿兰环斑病毒外壳蛋白基因的测定与分析. 中国植物病理学会2010年学术年会论文集. 厦门: 中国植物病理学会, pp. 4]
- Zheng P, Liu RW, Xu MQ, Zhao GL, Wang T, Liu Q. 2001. A comprehensive survey of two main orchid viruses in China. *Guangdong Agricultural Science*, (6): 37–40 (in Chinese) [郑平, 刘荣维, 徐明全, 赵贵林, 王韬, 刘擎. 2001. 国内两种主要兰花病毒病的综合普查研究. *广东农业科学*, (6): 37–40]
- Zhou GH, Chen XQ, Li HP, Li MH, Zhou JL, Tang TH, Feng SX, Guo LJ. 2003. Cloning and sequencing of *Odontoglossum ringspot virus* infecting orchids in Guangdong. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 18(4): 30–31 (in Chinese) [周国辉, 陈晓琴, 李华平, 李梅辉, 周洁浪, 唐添华, 冯盛祥, 郭丽晶. 2003. 侵染广东兰花的齿兰环斑病毒外壳蛋白基因克隆及序列分析. *云南农业大学学报*, 18(4): 30–31]
- Zhu HJ, Hu GJ, Fan XD, Zhang ZP, Ren F, Dong YF. 2014. Genetic variation analysis of the coat protein of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* isolates from China. *Journal of Plant Protection*, 41(2): 169–175 (in Chinese) [朱红娟, 胡国君, 范旭东, 张尊平, 任芳, 董雅凤. 2014. 我国部分地区沙地葡萄茎痘相关病毒分离物外壳蛋白序列变异分析. *植物保护学报*, 41(2): 169–175]

(责任编辑:张俊芳)