

水仙黄条病毒和水仙退化病毒的种群结构及遗传多样性特征

甘海锋 陈雯 陈夕军 张坤 贺振*

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为防控水仙黄条病毒(narcissus yellow stripe virus, NYSV)和水仙退化病毒(narcissus degeneration virus, NDV), 于2017年4月在江苏省2个市采集24个水仙病样, 通过逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)检测, 从6个水仙样品中获得与预期大小一致的核苷酸片段, 通过克隆CP基因和序列分析, 结合GenBank中已报道的相关序列对所获得的4条NYSV序列和2条NDV序列进行种群结构及遗传多样性分析。结果显示, 仅在NYSV CP基因中发现4个重组位点; NYSV CP多样性程度很高, 相似值高于75%, 而NDV CP相似值高达96%; 在系统发育树中, NYSV分离物被分为4组, NDV分离物被分为2组; 日本NYSV分离物核苷酸多样性较高, 为0.136, 而NDV中国种群核苷酸多样性较高, 为0.012; NYSV CP基因中II组与III组的遗传距离最高, 为0.332, NDV中国分离物与日本分离物间的遗传距离差异明显, 为0.104; NYSV中国种群与日本种群的遗传差异为0.166, 存在一定的基因交流; NYSV与NDV的CP基因均处于负选择压力作用下。

关键词: 水仙黄条病毒; 水仙退化病毒; 种群结构; 遗传多样性

Population structure and genetic diversity of narcissus yellow stripe virus and narcissus degeneration virus

GAN Haifeng CHEN Wen CHEN Xijun ZHANG Kun HE Zhen*

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

Abstract: In order to prevent and control narcissus yellow stripe virus (NYSV) and narcissus degeneration virus (NDV), 24 narcissus samples were collected in two cities in Jiangsu Province in April 2017. The nucleic acid fragments with the expected size were obtained from six narcissus samples by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection. The CP gene was cloned and sequenced, and the population structure and genetic diversity of four NYSV sequences and two NDV sequences combined with the related sequences reported in GenBank were analyzed. The results of recombination analysis showed that four recombination sites were found in NYSV CP gene. The diversity of NYSV CP was very high, and its similar value was higher than 75%; the similar value of NDV CP was as high as 96%. NYSV was divided into four groups, and NDV was divided into two groups in the phylogenetic trees. Nucleotide diversity of NYSV isolates in Japan was as high as 0.136, while that of NDV Chinese population was as high as 0.012; the genetic distance between group II and group III of NYSV CP gene was the highest (0.332), and the genetic distance between NDV Chinese and Japanese isolates was obviously different (0.104); the genetic difference between NYSV Chinese population and Japanese population was 0.166, with a certain degree of gene flow. The CP genes of NYSV and NDV were under nega-

基金项目: 中央本级重大增减支项目(2060302-1904-11), 国家自然科学基金(31601604), 江苏省重点研发计划(现代农业)项目(BE2018359)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: hezhen@yzu.edu.cn

收稿日期: 2019-01-10

tive selection pressure.

Key words: narcissus yellow stripe virus; narcissus degeneration virus; population structure; genetic diversity

水仙为石蒜科多年生球根花卉,又名雅蒜、春玉,是原产于我国的十大名花之一,因其花色淡雅,被誉为“凌波仙子”。水仙病毒病的侵染导致水仙鳞茎退化,种球变小,花枝减少。水仙黄条病毒(narcissus yellow stripe virus, NYSV)主要侵染石蒜科的水仙和长寿花,症状是黄色条纹、花叶,严重时植株矮化,可通过蚜虫以非持久性方式传播(沈建国等, 2012)。NYSV分布较广,在中国、美国等国家均有分布(Asjes, 1996; Langeveld et al., 1997; Clark & Guy, 2000)。水仙退化病毒(narcissus degeneration virus, NDV)首次在英国水仙上发现(Brunt, 1966; Stone et al., 1975),寄主范围较窄,主要集中在石蒜科,其中包括中国水仙、红口水仙等(赵晟, 1983),感病植株常表现褪绿、条纹症状,常在感病叶肉细胞内形成风轮状内含体(Chen et al., 2007)。水仙潜隐病毒(narcissus latent virus, NLV)侵染后导致水仙叶片出现褪绿及条形斑纹等症状,这些病毒病严重影响了江苏省水仙的商品化生产和观赏价值(Chen et al., 2006)。

侵染水仙的病毒大都属于马铃薯Y病毒科,包括NDV、NYSV、NLV等(谢联辉等, 1990)。目前关于水仙病毒的报道主要集中在病毒检测方面,如梁艳等(2008)在水仙上检测到水仙普通潜隐病毒(narcissus common latent virus, NCLV)和NDV; Ward et al. (2009)在新西兰水仙中检测到水仙迟黄病毒(narcissus late season yellows virus, NLSYV)和NDV。张坤等(2019)在江苏省水仙样品中首次检测到NYSV、NDV以及NCLV三种病毒,明确了其扬州分离物与其它分离物之间的遗传差异性和地理特异性等特征。目前关于马铃薯Y病毒属成员分子进化的研究主要集中在马铃薯Y病毒(potato virus Y, PVY)以及TuMV等(Ogawa et al., 2012; Nguyen et al., 2013),而对于NYSV以及NDV的种群结构与遗传多样性分析较少。此外,经单斑分离获得的生物克隆是进行病毒种群结构及遗传多样性分析的关键,但在部分植物病毒中并无单斑寄主,可能出现不同基因组片段间的错误拼接,因此通常集中分析病毒的某些单一扩增片段(He et al., 2016)。

为明确NYSV和NDV种群结构和遗传多样性特征,本研究于2017年4月在江苏省扬州和宿迁

2个市采集有褪绿条纹、黄色条纹、花叶等典型病毒病疑似症状的水仙样品,利用水仙病毒通用引物Tu3T9M和POTYNIBNOT4P进行逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)扩增,通过克隆、测序分析是否含有NYSV和NDV两种病毒;对所得序列与数据库中已登录的分离物进行重组、系统多样性、遗传距离、基因流动和选择压力等分析,以期为江苏省水仙病毒病的防控提供指导依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:2017年4月在江苏省采集表现黄化、花叶和斑驳等病毒疑似症状的水仙样品24个,其中扬州市高邮市采集7个,扬州市广陵区采集6个,宿迁市宿豫区采集11个。

培养基:LB (Luria-Bertani)培养基:胰蛋白胨10 g/L、NaCl 10 g/L、酵母提取物5 g/L,使用前加入氨苄青霉素,氨苄青霉素终浓度为50 g/L。

试剂及仪器:大肠杆菌*Escherichia coli* DH5 α , 本实验室保存;5 $\times$ M-MLV Buffer、dNTPs、MiniBEST Plant RNA Extraction Kit、M-MLV反转录酶、Marker、RNA酶抑制剂、pMD19-T载体,宝生物工程(大连)有限公司;2 $\times$ Taq Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司;AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒,康宁生命科学(吴江)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。XW-80A型漩涡振荡器,上海青浦沪西仪器厂;AG 22331 PCR仪,德国Eppendorf公司;JS-680B凝胶成像系统,上海培清科技有限公司;MicroCL 17微量离心机,美国Thermo Fisher Scientific公司;DYCP-28A、DYCP-31A型电泳槽,北京六一仪器厂;TRANSALIGN软件,澳大利亚国立大学Georg Weiller教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 叶片总RNA提取及cDNA合成

参照MiniBEST Plant RNA Extraction Kit试剂盒说明书提取水仙叶片总RNA,将RNA沉淀溶解于30 μ L无核酸酶水中。利用M-MLV反转录酶和马铃薯Y病毒科通用引物Tu3T9M (5'-AA-AAAAAAAAAAAAAGAGCTCGGA-3') (Zheng et

al., 2011; Ohshima et al., 2016a), 将总 RNA 反转录成第一链 cDNA。

1.2.2 PCR扩增、克隆和序列测定

在PCR管中依次加入无核酸酶水4 μL 、20 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 Tu3T9M 1 μL 、700 ng/ μL 总 RNA 1 μL , 混匀离心后, 于70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 迅速置于冰上冷却 5 min。将PCR管离心 5 s 后再加入5 $\times$ M-MLV Buffer 2 μL 、10 mmol/L dNTPs 0.5 μL 、40 U/ μL RNA 酶抑制剂 0.25 μL 、200 U/ μL M-MLV 反转录酶 0.25 μL 、无核酸酶水 1 μL , 混匀后离心 5 s, 于42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h、70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 冰上冷却 5 min, 将得到的 cDNA 溶液于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。50 μL PCR 反应体系: cDNA 2 μL 、上游引物 POTYNIbNOT4P (5'-GGGGCG-GCCGCATATGGGGTGAGAGAGGTNTGYGTNG-AYGAYTTYAAAYAA-3') 2 μL 、下游引物 Tu3T9M 2 μL 、5 U/ μL 2 $\times$ Taq Master Mix 25 μL 、ddH₂O 19 μL 。引物均委托北京擎科新业生物技术有限公司南京分公司合成。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 彻底延伸 10 min。全部PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 切取751 bp左右的目的条带, 用凝胶回收试剂盒回收纯化后克隆到pMD19-T载体, 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 。经PCR验证克隆呈阳性后, 随机选取30个克隆委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 利用BLASTN和BioEdit、DNAMAN软件对所得序列进行序列比对和分析。

1.2.3 NYSV与NDV CP基因序列重组分析

将所获得的NYSV和NDV CP基因序列与GenBank中已登录的所有可用序列进行分析。根据NYSV-ID分离物(登录号:NC011541),NYSV CP基因中共有4个明显的重组位点, 分别位于NYSV基因组第8 999、9 422、9 055和9 359位点。将核苷酸序列数据对应的氨基酸序列利用CLUSTAL X2 (Larkin et al., 2007)和TRANSALIGN软件比对, 确保比对后的核苷酸序列能够正确编译出氨基酸序列。通过Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>) 中GARD和RDP 4.0软件包(Martin & Rybicki, 2000; Martin et al., 2010)中RDP(Martin & Rybicki, 2000)、GENECONV (Sawyer, 1999)、BOOTSCAN (Salminen et al., 1995)、MAXCHI (Smith, 1992)、CHIMAERA (Posada & Crandall, 2001)、3SEQ (Boni et al., 2007)和SISCAN (Gibbs et al., 2000)七个软件对NYSV以及NDV CP基因序列进行重组检测。参

数均采用软件默认值, Bonferroni校正 P 值为0.05或者0.01, 在至少3个软件中某分离物 P 值均小于 1.0×10^{-6} , 则该分离物可能为重组体(Ohshima et al., 2002; Tomitaka & Ohshima, 2006)。删除分析中洋葱黄矮病毒(onion yellow dwarf virus, OYDV)和芜菁花叶病毒(turnip mosaic virus, TuMV)的外组序列, 即分别去除OYDV外组序列对NYSV序列、TuMV外组序列对NDV序列的缺口影响, 直接确定NYSV和NDV CP基因区域的重组位点。

1.2.4 NYSV与NDV CP基因序列比对和系统发育分析

分别以OYDV (GenBank 登录号: JX433020) 和TuMV (GenBank 登录号: AB701690) 作为NYSV和NDV 比对分析的外组。将所获得的序列分别与GenBank中已登录的37个NYSV分离物、21个NDV分离物进行比对分析。通过CLUSTAL X2和TRANSALIGN软件进行核苷酸序列和氨基酸序列的比对, 以确定比对后的核苷酸序列能正确编译出氨基酸。采用邻接法利用软件MEGA 7.0构建系统发育树, 采用支长自举法进行1 000模拟计算(贺振等, 2018)。

1.2.5 NYSV与NDV CP基因多样性和遗传距离分析

利用DnaSP 5.1软件对不同种群分离物的核苷酸多样性和单体型多样性进行计算(Librado & Rozas, 2009); 同时利用SDT 1.0软件计算NYSV以及NDV在CP基因上的核苷酸多样性(Muhire et al., 2014)。一般而言, 植物RNA病毒种群的单体型多样性较高, 而核苷酸多样性较低(He et al., 2016)。

通过DnaSP 5.1软件根据Tajima's D (Tajima, 1989)、Fu & Li's D 和Fu & Li's F (Fu & Li, 1993) 3个参数进行中性检测分析。基于多态位点的数量以及核苷酸平均数量计算Tajima's D 值; 基于单突变位点的数量和总突变位点的数量计算Fu & Li's D ; 基于单突变位点的数量和核苷酸序列间差异的平均值计算Fu & Li's F 。若这3个参数值均为负值, 说明种群多态性较低, 存在选择压力或者种群扩张的可能(Tajima, 1989; Tsompana et al., 2005); 反之, 则认为种群存在大量中等频率的等位基因, 处于收缩状态或者平衡状态。

采用最大组成似然模型, 利用MEGA 7.0软件计算不同分组、不同地理区域的NYSV分离物、NDV分离物的遗传距离, 采用支长自举法进行1 000模拟计算。

1.2.6 NYSV与NDV CP基因遗传差异和基因交流分析

利用DnaSP 5.1软件中 K_s 、 Z 和 S_m 这3个统计量

分析不同分组、不同地理区域的 NYSV、NDV 遗传差异以及基因交流状况; K_s 和 Z 是以序列为基础的数据统计分析。 K_s 值用来衡量种群之间遗传差异的参数,它是由不同序列的数量决定,与序列来源无关 Z 值是秩统计量。如果 K_s 和 Z 统计值很小,则拒绝无遗传差异的假设(贺振等,2016)。 S_{nn} 是近邻统计分析,适用于自2个以上的地区采集的样品,可以对相同地理学空间上相邻序列的出现频率进行计算分析。种群间的遗传分化程度和基因交流用 F_{st} 和 N_m 值来衡量; F_{st} 值为种群间等位基因频率的标准差异,或者为种群间遗传差异的构成; N_m 值为产生的有效大小的单个种群数量和它们的迁移率。一般 F_{st} 绝对值在0~1之间,当 F_{st} 值绝对值小于统计阈值0.33时,表明2个地区之间存在频繁的基因交流,当 $0.33 \leq |F_{st}| \leq 1.00$ 时则交流的频率很低(He et al., 2016)。若 $N_m < 1$ 时,种群间很容易发生遗传漂变,表明遗传漂变是促使群体发生遗传分化的主要原因;如果 $N_m > 1$,表明地缘关系较近或者种群间存在可以发生基因交流的渠道(Wei et al., 2009; Zhang et al., 2011; Nguyen et al., 2013)。

1.2.7 NYSV与NDV CP基因选择压力分析

利用MEGA 7.0软件的Pamilo-Bianchi-Li method程序对不同组内以及不同地理种群内的NYSV和NDV CP基因的非同义突变dN与同义突变dS之间的比值进行计算,用dN/dS值来测算NYSV及NDV CP基因所承受的选择压力。当dN/dS>1时,

表明该组分离物受正向选择或多样化选择作用;当dN/dS=1时,表明该组分离物处于中性选择压力下;当dN/dS<1时,表明该组分离物处于纯化或负向选择压力下(贺振等,2017)。

2 结果与分析

2.1 水仙样品中2种病毒的RT-PCR检测及序列分析

通过水仙病毒通用引物Tu3T9M和POTYNIB-NOT4P对所采集的24个水仙样品进行RT-PCR扩增,从6个水仙样品中获得与预期大小一致的核苷酸片段,将RT-PCR产物纯化回收后进行克隆、测序,共分离得到4条NYSV序列和2条NDV序列。多序列比对分析结果显示,4条NYSV序列与其它NYSV分离物的核苷酸序列相似性均在75%以上,与福建分离物(GenBank登录号为JQ911732)的相似性最低,为74.7%;2条NDV序列与其它NDV分离物的核苷酸序列相似性均在96%以上,与日本分离物(GenBank登录号分别为LC158498和LC158497)的相似性最低,为96%。

2.2 NYSV和NDV CP基因重组分析

NYSV和NDV CP基因序列重组分析结果显示,在41个NYSV CP基因序列中发现3个明显的重组体,分别是NAR1-JQ686724、NAR2-KU516386、NAR2-KM066972,其中后两者为亲本分离物,两者的重组体序列存在相似性(表1),而在NDV CP基因序列中未发现重组位点。

表1 在水仙黄条病毒CP基因序列上的重组体

Table 1 Recombinants on the CP gene of narcissus yellow stripe virus

重组体 Recombinant	亲本 Parent (major× minor)	重组位点 Recombination site	不同检测软件的P值 P value tested by different software programs						
			RDP	GENE- CONV	BOOTSCA N	MAXCHI	CHIMAE- RA	SISCAN	3SEQ
NAR1- JQ686724	EH173-LC3× NYSV2-12	8 999~9 422	2.654×10 ⁻¹⁹	1.348×10 ⁻¹⁶	1.853×10 ⁻¹⁹	1.662×10 ⁻⁷	3.286×10 ⁻¹⁷	2.838×10 ⁻²⁰	8.512×10 ⁻³⁵
NAR2- KU516386	EH173-LC3× NYSV2-12	9 005~9 359	2.654×10 ⁻¹⁹	1.835×10 ⁻⁷	1.098×10 ⁻⁶	1.662×10 ⁻⁷	2.849×10 ⁻⁸	1.783×10 ⁻⁸	1.137×10 ⁻¹⁶
NAR2- KM066972	EH173-LC3× NYSV2-12	9 005~9 359	2.654×10 ⁻¹⁹	1.835×10 ⁻⁷	1.098×10 ⁻⁶	1.662×10 ⁻⁷	2.849×10 ⁻⁸	1.783×10 ⁻⁸	1.137×10 ⁻¹⁶

2.3 NYSV与NDV CP基因序列多样性及系统发育分析

2.3.1 NYSV与NDV CP基因序列多样性分析

NYSV CP基因序列多样性程度较高,相似值均在75%以上,形成I、II、III和IV四个组群(图1-A);NDV CP相似值高于96%(图1-B),形成I和II两个组群。

2.3.2 NYSV与NDV CP基因序列系统发育分析

系统发育树分析结果显示,38个NYSV分离物

被分为4组,各组间没有明显的地理特异性(图2-A);23个NDV分离物同样被分为2组,其中,日本、澳大利亚的分离物聚成一组,印度、中国的分离物聚为另一组,组间具有明确的地理特异性(图2-B)。

2.4 NYSV和NDV CP基因遗传多样性和遗传距离分析

2.4.1 NYSV与NDV CP基因遗传多样性分析

NYSV CP基因4个组的核苷酸多样性分析结

果显示,III组的核苷酸多样性最高,为0.034,I组的核苷酸多样性最低,为0.026;与NYSV中国分离物相比,NYSV日本分离物的核苷酸多样性更高,为0.136。中性检测分析结果显示,NYSV CP基因I组及中国种群的Tajima's *D*、Fu & Li's *D*和Fu & Li's

*F*检测统计值皆为负值,表明该NYSV种群处于扩张趋势中;NYSV CP基因日本种群的Tajima's *D*、Fu & Li's *D*和Fu & Li's *F*统计检测值为正值,表明该种群处于收缩或者平衡状态中(表2)。

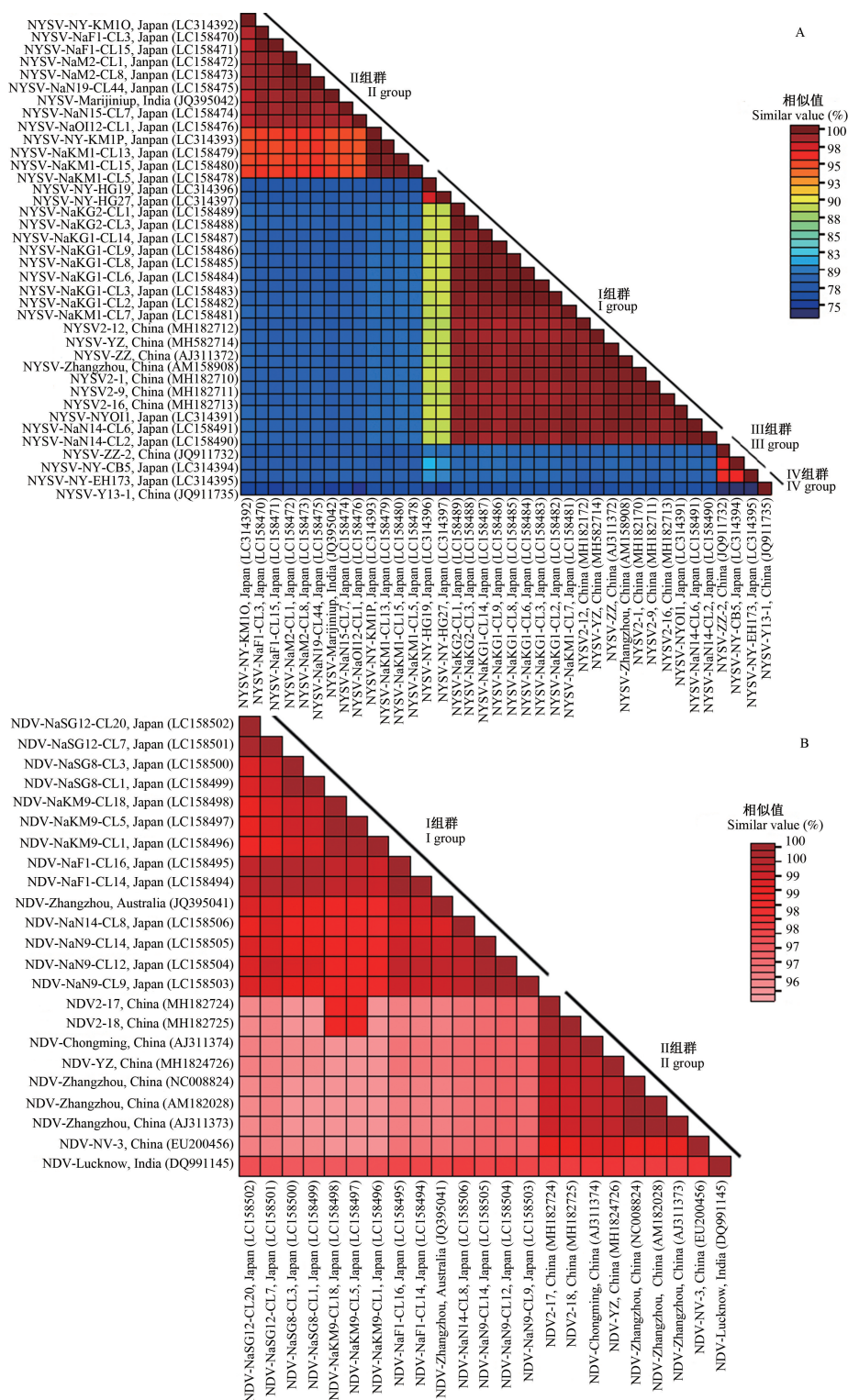
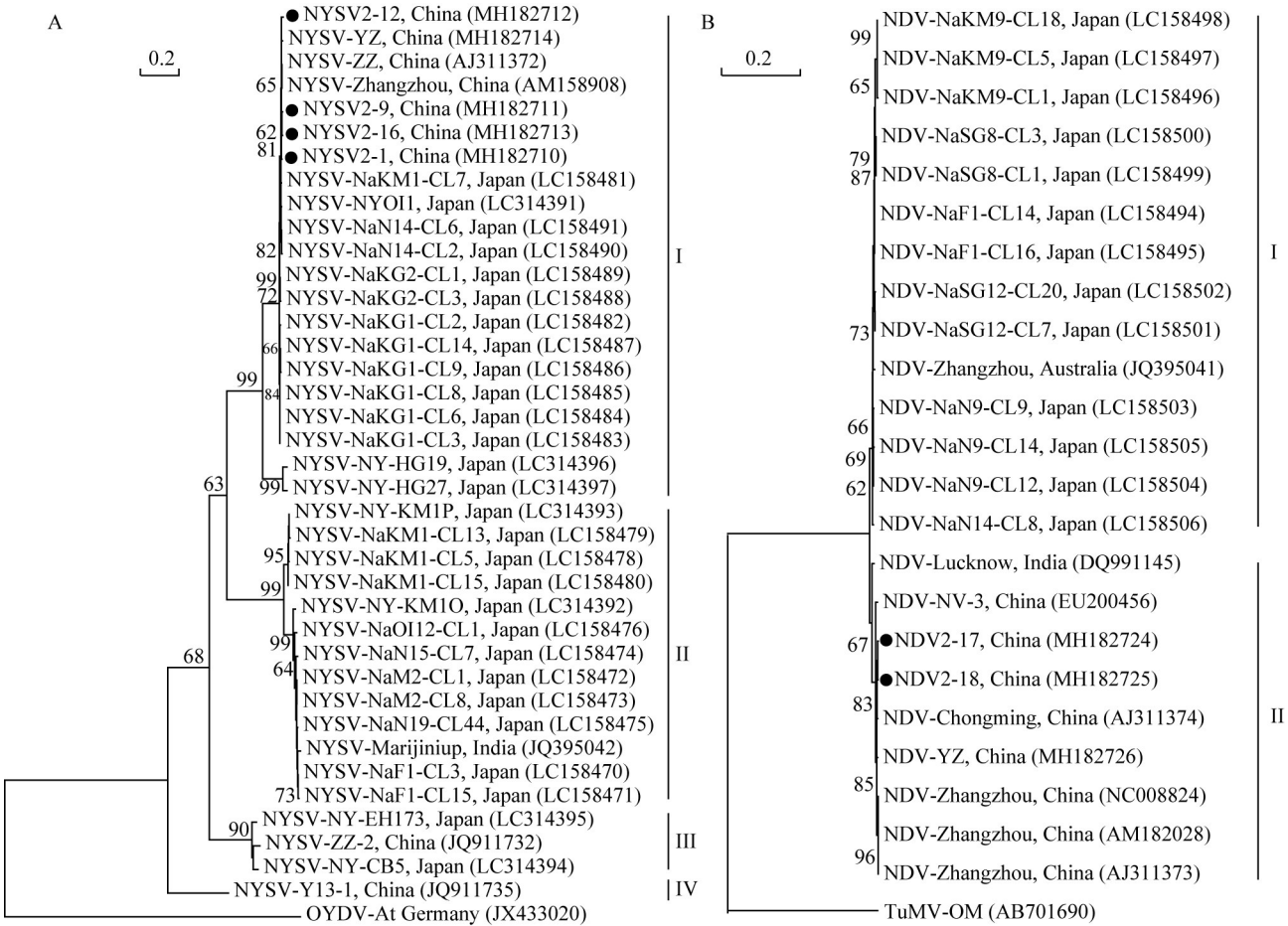


图1 水仙黄条病毒(A)与水仙退化病毒(B)CP基因序列的相似值

Fig. 1 Similar values of the CP gene sequences of narcissus yellow stripe virus (A) and narcissus degeneration virus (B)



I~IV 和 I~II 为组群。OYDV 核苷酸序列为 NYSV 外组；TuMV 核苷酸序列为 NDV 外组。●：本研究获得的分离物。
I~IV and I~II are groups. The nucleotide sequence of OYDV was used as NYSV outgroup; the nucleotide sequence of
TuMV was used as NDV outgroup. ●: Isolates obtained in this study.

图2 基于CP基因序列构建水仙黄条病毒(A)与水仙退化病毒(B)及其相关分离物的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic trees of narcissus yellow stripe virus (A) and narcissus degeneration virus (B)
and the related isolates based on the CP gene sequences

表2 水仙黄条病毒和水仙退化病毒CP基因的单体型和核苷酸多样性分析
Table 2 Haplotype and nucleotide diversity analysis of narcissus yellow stripe virus and
narcissus degeneration virus based on CP gene

病毒 Virus	分组 Group	数目 Number	中性检测分析Neutrality test			单体型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity
			Tajima's <i>D</i>	Fu & Li's <i>D</i>	Fu & Li's <i>F</i>		
NYSV	I	21	-1.468	-0.023	-0.544	0.981±0.023	0.026±0.010
	II	13	0.207	-0.027	0.040	0.987±0.035	0.027±0.003
	III	3	-	-	-	1.000±0.272	0.034±0.009
	中国 China	9	-1.713	-1.681	-1.899	0.972±0.064	0.098±0.043
	日本 Japan	28	0.953	1.148	1.280	0.989±0.014	0.136±0.009
NDV	I	14	-0.442	-0.364	-0.442	0.967±0.037	0.008±0.001
	II	9	-1.167	-1.258	-1.387	0.917±0.092	0.009±0.002
	中国 China	8	-1.318	-1.502	-1.626	0.893±0.111	0.012±0.005
	日本 Japan	13	-0.128	0.070	0.019	0.962±0.041	0.008±0.001

NDV CP 基因 2 个组的核苷酸多样性分析结果显示, II 组的核苷酸多样性最高, 为 0.009, 中国种群核苷酸多样性比日本种群核苷酸多样性高, 为 0.012。中性检测分析结果显示, NDV CP 基因 I 组、

II组以及中国种群的Tajima's D 、Fu & Li's D 和Fu & Li's F 检测统计值都是负值,说明NDV种群处于扩张趋势中;日本种群的Fu & Li's D 和Fu & Li's F 统计检测值为正值,表明该种群处于收缩或者平衡状态中(表2)。

2.4.2 NYSV与NDV CP基因遗传距离分析

在NYSV CP基因中,II组与III组的遗传距离最高,为0.332,I组与II组遗传距离最低,为0.249(表3)。通过NDV不同分组内的遗传距离分析,组I内的遗传距离为0.017,组II内遗传距离为0.016,遗传差异不明显。对NDV不同组间以及国家间的遗传距离进行分析,发现组I和组II间地理种群的遗传距

离为0.101,遗传差异显著;在地域遗传距离分析中发现,中国与日本种群之间的遗传距离差异明显,为0.104。

2.5 NYSV与NDV CP基因遗传差异和基因交流

NYSV CP基因各分组、各种群之间的遗传差异 F_{st} 介于0.166~0.873之间,其中中国与日本种群之间的遗传差异最小,为0.166,但仍小于0.33,表明中国与日本种群之间存在一定的基因交流;NDV CP基因各分组、各种群之间的遗传差异 F_{st} 分别为0.722和0.670(表4)。NYSV CP基因各组间 $N_m < 1$,NDV CP基因各组间、各种群间 $N_m < 1$ (表4),表明遗传漂变是影响NYSV种群、NDV种群的主要原因。

表3 水仙黄条病毒各分组间的遗传距离分析

Table 3 Genetic distance analysis of narcissus yellow stripe virus between different groups

组群 Group	I	II	III	IV
I		0.249(0.022)	0.290(0.024)	0.257(0.023)
II			0.332(0.027)	0.262(0.023)
III				0.301(0.024)
IV				

括号内为标准差。Standard deviations are shown in parentheses.

表4 水仙黄条病毒和水仙退化病毒种群遗传差异和基因漂移分析

Table 4 Gene flow and genetic differentiation of narcissus yellow stripe virus and narcissus degeneration virus populations

病毒 Virus	种群 Population	种群 Population	K_s	Z	S_{nn}	F_{st}	N_m
NYSV	I	II	20.625***	147.789***	1.000***	0.873	0.04
		III	21.191***	108.440***	1.000***	0.854	0.04
	II	III	21.916**	40.144**	1.000**	0.858	0.04
		中国 China	97.871*	313.819*	0.930***	0.166	1.25
NDV	I	II	7.091***	62.981***	1.000***	0.722	0.10
	中国 China	日本 Japan	7.709***	59.720***	0.952***	0.670	0.12

K_s 和 Z :以序列为基础的数据统计分析; S_{nn} :近邻统计; F_{st} :种群间遗传差异; N_m :基因交流。*: $0.01 < P < 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. K_s and Z : The sequence-based statistics; S_{nn} : the nearest-neighbor statistic; F_{st} : the inter-population component of genetic variation of the standardized variance in allele frequencies across populations; N_m : the gene flow. *: $0.01 < P < 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.6 NYSV及NDV CP基因选择压力分析

NYSV CP基因中国种群、日本种群的dN/dS值均小于1,表明其处于负选择压力作用下;在I、II、III、IV这4组中,II组的dN/dS值最高,为0.226,III组的dN/dS值最低,为0.047;NDV与NYSV结果一致,NDV CP基因中国种群、日本种群的dN/dS值均小于1,表明其处于负选择压力作用下,且中国种群的dN/dS值比日本种群的dN/dS值更高,为0.600;在I、II组中,II组的dN/dS值最高,为0.412(表5)。

3 讨论

重组在病毒的进化过程中起着重要推动作用,

特别是马铃薯Y病毒属病毒TuMV(Ohshima et al., 2002; Tomitaka & Ohshima, 2006)和PVY(Cuevas et al., 2012)的重组频率比较高。Nguyen et al.(2013)对155个TuMV分离物的重组分析结果显示有118个TuMV分离物有重组现象;Ogawa et al.(2008)发现已报道的63% PVY全长分离物属于重组体且重组位点多样;而Ohshima et al.(2016b)对日本水仙NYSV种群进行重组分析时未在CP基因上发现重组位点。本研究对NYSV中国和日本水仙种群进行重组分析,在CP基因中首次发现4个重组位点,说明NYSV CP基因中发生重组的频率较低,与马铃薯Y病毒科禾草病毒属的甘蔗线条花叶病毒(sugar-

cane streak mosaic virus, SCSMV) 相似 (He et al., 2016; 贺振等, 2016; 2017)。

表 5 水仙黄条病毒和水仙退化病毒的选择压力分析

Table 5 Selection pressure analysis of narcissus yellow stripe virus and narcissus degeneration virus

病毒 Virus	分组 Group	数目 Number	非同义突变 Non-synonymous	同义突变 Synonymous	非同义突变/同义突变 Non-synonymous/synonymous
NYSV	I	21	0.005±0.002	0.104±0.013	0.048
	II	13	0.014±0.003	0.062±0.011	0.226
	III	3	0.005±0.003	0.107±0.019	0.047
	IV	1	n/c	n/c	n/c
	中国 China	9	0.051±0.009	0.482±0.074	0.106
	日本 Japan	28	0.057±0.008	0.676±0.076	0.084
NDV	I	14	0.004±0.002	0.018±0.005	0.222
	II	9	0.007±0.002	0.017±0.005	0.412
	中国 China	8	0.006±0.003	0.010±0.004	0.600
	日本 Japan	13	0.004±0.002	0.017±0.005	0.235

n/c: 未计算。n/c: Not counted.

本研究结果的系统发育分析表明, NYSV 分离物可分为 4 组, 组间不具有明显的地理特异性; 与 Wei et al. (2009) 对水稻条纹病毒 (rice stripe virus, RSV) 种群间地理特异性的分析结果一致, NDV 中国分离物与日本分离物之间的地理差异性明显, 这可能是由于中国和日本两国相距较远, 存在一定的物理障碍。但 Zhang et al. (2011) 发现烟草脉带花叶病毒 (tobacco vein banding mosaic virus, TVBMV) 云南分离物种群间地理差异性显著的原因除了存在一定的物理阻隔外, 还与该病毒的传播方式有关。因此, NDV 种群间地理差异性较大可能还与病毒的长期进化和传播方式有关, 这有待于进一步研究。

为适应寄主与环境的变化, 病毒 CP 基因遗传多样性较丰富 (高瑞珍, 2011)。马铃薯 Y 病毒科中的辣椒脉斑驳病毒 (chilli veinal mottle virus, ChiVMV) CP 基因受到地理因素的影响而表现出较高的遗传多样性 (Gao et al., 2016); Achon et al. (2012) 发现玉米矮花叶病毒 (maize dwarf mosaic virus, MDMV) P1 基因种群间具有极高的遗传多样性, 这与样品来源多样有关。本研究对 NYSV 和 NDV CP 基因遗传多样性和遗传距离的分析发现 NYSV 日本种群核苷酸多样性较高, 而 NDV 中国种群核苷酸多样性较高, 中国种群与日本种群的遗传距离差异明显, 这可能与植物病毒长期自然进化以及受地理环境因素影响有关 (García-Arenal et al., 2001)。遗传分化和基因交流分析结果表明, NYSV 中国分离物与日本分离物具有明显的遗传差异, NYSV 与 NDV 各组间存在一定的基因交流, 与匡云波等 (2017) 关于蚕豆萎蔫病毒 2 号 (broad bean wilt vi-

rus 2, BBWV2) 以及 TuMV 的遗传差异和基因交流的结果类似, 有限的基因交流频率促使种群间有较高的遗传分化, 遗传漂变可能导致分离物间的遗传分化。

正向选择压力的存在有利于提高病毒的适应性 (程德杰等, 2017)。Mbanzibwa et al. (2011) 发现木薯褐条病毒 (cassava brown streak virus, CBSV) 部分基因中的部分碱基处于较强的正向选择压力下; Zhou et al. (2014) 研究表明, 菜豆普通花叶病毒 (bean common mosaic virus, BCMV) P1 基因的 159、246、390 以及 P3 基因的 453、1 069、1 074 等位点处在正向选择压力下; Zhou et al. (2015) 发现大豆花叶病毒 (soybean mosaic virus, SMV) P1、Hc-Pro、P3 基因均处于较强的正向选择压力下。与大多数动植物病毒选择压力计算结果类似, 本研究结果发现 NYSV 以及 NDV 中国种群和日本种群的 dN/dS 均小于 1, 说明两者都处于负选择压力下, 这可能是由于较窄的寄主范围所引起的。

本研究从分子水平探究了 NYSV 和 NDV 中国种群和日本种群之间的种群结构以及遗传多样性。但是由于样品来源单一, 数量少, 在后续研究中需要增加江苏省不同地区的采样地点和样品数量, 进一步明确江苏省水仙病毒病的具体分布情况以及采自不同地区的水仙病毒的种群结构与遗传多样性差异, 以期在水仙病毒病的防控提供理论依据。

参 考 文 献 (References)

ACHON MA, LARRAÑAGA A, ALONSO-DUEÑAS N. 2012. The population genetics of maize dwarf mosaic virus in Spain. Ar-

- chives of Virology, 157(12): 2377–2382
- ASJES CJ. 1996. Control situation of virus diseases in narcissus in the Netherlands. *Acta Horticulturae*, 432: 166–175
- BONI MF, POSADA D, FELDMAN MW. 2007. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics*, 176(2): 1035–1047
- BRUNT AA. 1966. Narcissus mosaic stripe virus. *Annals of Applied Biology*, 58(1): 13–23
- CHEN J, LU YW, SHI YH, ADAMS MJ, CHEN JP. 2006. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of narcissus yellow stripe virus from Chinese narcissus in Zhangzhou City, China. *Archives of Virology*, 151(8): 1673–1677
- CHEN J, SHI YH, ADAMS MJ, ZHENG HY, QIN BX, CHEN JP. 2007. Characterization of an isolate of narcissus degeneration virus from Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*). *Archives of Virology*, 152(2): 441–448
- CHENG DJ, YAN ZL, HUANG XD, TIAN YP, YUAN XF, LI XD. 2017. Complete genomic sequence and analysis of two sugarcane mosaic virus isolates from Shandong Province, China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 47(3): 357–363 (in Chinese) [程德杰, 闫志勇, 黄显德, 田延平, 原雪峰, 李向东. 2017. 甘蔗花叶病毒 2 个山东分离物的全基因组序列分析. *植物病理学报*, 47(3): 357–363]
- CLARK VR, GUY PL. 2000. Five viruses in *Narcissus* spp. from New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 29(4): 227–229
- CUEVAS JM, DELAUNAY A, RUPAR M, JACQUOT E, ELENA S. 2012. Molecular evolution and phylogeography of potato virus Y based on the CP gene. *Journal of General Virology*, 93(11): 2496–2501
- FU YX, LI WH. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3): 693–709
- GAO FL, JIN J, ZOU WC, LIAO FR, SHEN JG. 2016. Geographically driven adaptation of chilli vein mottle virus revealed by genetic diversity analysis of the coat protein gene. *Archives of Virology*, 161(5): 1329–1333
- GAO RZ. 2011. The distribution and genetic diversity of rice black streaked dwarf virus and southern rice black streaked dwarf virus in China. Master Thesis. Yangzhou: Yangzhou University (in Chinese) [高瑞珍. 2011. 两种水稻黑条矮缩病毒在我国分布及其遗传多样性. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学]
- GARCÍA-ARENAL F, FRAILE A, MALPICA JM. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1): 157–186
- GIBBS MJ, ARMSTRONG JS, GIBBS AJ. 2000. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequence. *Bioinformatics*, 16(7): 573–582
- 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, LI WF, LI SF. 2016. A novel phylogenetic lineage clustered by *Nla* gene of sugarcane streak mosaic virus Yunnan isolates. *Acta Microbiologica Sinica*, 56(11): 1802–1810 (in Chinese) [贺振, 李文凤, 李世访. 2016. 云南蔗区甘蔗线条花叶病毒分离物 *Nla* 基因形成新簇. *微生物学报*, 56(11): 1802–1810]
- HE Z, LI WF, ZHANG ZX, LI SF. 2017. 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. 2017. 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
- KUANG YB, YE W, LI JH, YU JJ, YE ZY. 2017. Genetic polymorphism and phylogenetic analysis of broad bean wilt virus 2 CP genes isolated from *Pseudostellaria heterophylla*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 47(4): 470–478 (in Chinese) [匡云波, 叶炜, 李金辉, 于静静, 叶祖云. 2017. 太子参蚕豆萎蔫病毒 2 号 CP 基因的遗传多样性及分子进化分析. *植物病理学报*, 47(4): 470–478]
- LANGEVELD SA, DERKS AFLM, KONICHEVA V, MUÑOZ D, ZHIN-NAN C, DENKOVA ST, LEMMERS MEC, BOONEKAMP PM. 1997. Molecular identification of potyviruses in Dutch stocks of *Narcissus*. *Acta Horticulturae*, 430: 641–648
- LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948
- LIANG Y, SONG RH, YANG CY, LU JP, JIANG JX, DAI FM. 2008. Identification of viruses infecting narcissus in Chongming Island of Shanghai. *Acta Phytopathologica Sinica*, 38(5): 456–461 (in Chinese) [梁艳, 宋荣浩, 杨翠云, 陆金萍, 蒋军喜, 戴富明. 2008. 上海崇明水仙病毒病原种类鉴定. *植物病理学报*, 38(5): 456–461]
- LIBRADO P, ROZAS J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452
- MARTIN DP, LEMEY P, LOTT M, MOULTON V, POSADA D, LEFEUVRE P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 26(19): 2462–2463
- MARTIN DP, RYBICKI EP. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequence. *Bioinformatics*, 16(6): 562–563
- MBANZIBWA DR, TIAN YP, TUGUME AK, PATIL BL, YADAV JS, BAGEWAD B, ABARSHI MM, CHANGADEYA W, MKUMBIRA J, MULI MB, et al. 2011. Evolution of cassava brown streak disease-associated viruses. *Journal of General Virology*, 92: 974–987
- MUHIRE BM, VARSANI A, MARTIN DP. 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE*, 9(9): e108277
- NGUYEN HD, TRAN HTN, OHSHIMA K. 2013. Genetic variation of the turnip mosaic virus population of Vietnam: a case study of

- founder, regional and local influences. *Virus Research*, 171(1): 138–149
- OGAWA T, NAKAGAWA A, HATAYA T, OHSHIMA K. 2012. The genetic structure of populations of *Potato virus Y* in Japan; based on the analysis of 20 full genomic sequences. *Journal of Phytopathology*, 160: 661–673
- OGAWA T, TOMITAKA Y, NAKAGAWA A, OHSHIMA K. 2008. Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Research*, 131: 199–212
- OHSHIMA K, MURAOKA S, YASAKA R, ADACHI S, TOKUDA M. 2016a. First report of scallion mosaic virus on wild Japanese garlic (*Allium macrostemon*) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 82(1): 61–64
- OHSHIMA K, NOMIYAMA R, MITOMA S, HONDA Y, YASAKA R, TOMIMURA K. 2016b. Evolutionary rates and genetic diversities of mixed potyviruses in narcissus. *Infection, Genetics and Evolution*, 45: 213–223
- OHSHIMA K, YAMAGUCHI Y, HIROTA R, HAMAMOTO T, TOMIMURA K, TAN ZY, SANO T, AZUHATA F, WALSH JA, FLETCHER J, et al. 2002. Molecular evolution of turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology*, 83(6): 1511–1521
- POSADA D, CRANDALL KA. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequence: computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24): 13757–13762
- SALMINEN MO, CARR JK, BURKE DS, MCCUTCHAN FE. 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 11(11): 1423–1425
- SAWYER SA. 1999. GENECONV: a computer package for the statistical detection of gene conversion. Louis: Washington University
- SHEN JG, GAO FL, CAI W, YU WT, YU Y, LI M, YAN C. 2012. Establishment and application of RT-PCR for detection of narcissus virus. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 28(31): 206–210 (in Chinese) [沈建国, 高芳奎, 蔡伟, 于文涛, 虞赟, 李敏, 闫诚. 2012. 水仙花叶病毒 RT-PCR 检测方法的建立及应用. 中国农学通报, 28(31): 206–210]
- SMITH JM. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution*, 34(2): 126–129
- STONE OM, BRUNT AA, HOLLINGS M. 1975. The production, propagation and distribution of virus-free clones of *Narcissus tazetta*. *Acta Horticulturae*, 47: 77–81
- TAJIMA F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595
- TOMITAKA Y, OHSHIMA K. 2006. A phylogeographical study of the turnip mosaic virus population in East Asia reveals an ‘emergent’ lineage in Japan. *Molecular Ecology*, 15(14): 4437–4457
- TSOMPANA M, ABAD J, PURUGGANAN M, MOYER JW. 2005. The molecular population genetics of the tomato spotted wilt virus (TSWV) genome. *Molecular Ecology*, 14(1): 53–66
- WARD LI, VEERAKONE S, TANG J, CLOVER GRG. 2009. First report of narcissus degeneration virus, narcissus late season yellows virus, and narcissus symptomless virus on narcissus in New Zealand. *Plant Disease*, 93(9): 964
- WEI TY, YANG JG, LIAO FR, GAO FL, LU LM, ZHANG XT, LI F, WU ZJ, LIN QY, XIE LH, et al. 2009. Genetic diversity and population structure of rice stripe virus in China. *Journal of General Virology*, 90(Pt 4): 1025–1034
- XIE LH, LIN QY, ZHENG XY, XIE LY. 1990. Studies on the etiology of virus diseases in Chinese narcissus. *Scientia Agricultura Sinica*, 23(2): 89–90 (in Chinese) [谢联辉, 林奇英, 郑祥洋, 谢利妍. 1990. 中国水仙病毒病的病原学研究. 中国农业科学, 23(2): 89–90]
- ZHANG CL, GAO R, WANG J, ZHANG GM, LI XD, LIU HT. 2011. Molecular variability of tobacco vein banding mosaic virus populations. *Virus Research*, 158(1/2): 188–198
- ZHANG K, CHEN W, GAN HF, LUO YJ, CHEN XJ, HE Z. 2019. Detection, identification and sequence analysis of narcissus viruses in Yangzhou City, Jiangsu Province. *Plant Protection*, 45(6): 106–113 (in Chinese) [张坤, 陈雯, 甘海峰, 罗云建, 陈夕军, 贺振. 2019. 江苏省扬州市水仙病毒检测鉴定与序列分析. 植物保护, 45(6): 106–113]
- ZHAO S. 1983. Survey of research on foreign daffodil virus disease. *Fujian Science & Technology of Tropical Crops*, (4): 30–35 (in Chinese) [赵晟. 1983. 国外水仙花病毒病研究概况. 福建热作科技, (4): 30–35]
- ZHENG L, RODONI BC, GIBBS MJ, GIBBS AJ. 2011. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology*, 59(2): 211–220
- ZHOU GC, SHAO ZQ, MA FF, WU P, WU XY, XIE ZY, YU DY, CHENG H, LIU ZH, JIANG ZF, et al. 2015. The evolution of soybean mosaic virus: an updated analysis by obtaining 18 new genomic sequences of Chinese strains/isolates. *Virus Research*, 208: 189–198
- ZHOU GC, WU XY, ZHANG YM, WU P, WU XZ, LIU LW, WANG Q, HANG YY, YANG JY, SHAO ZQ, et al. 2014. A genomic survey of thirty soybean-infecting bean common mosaic virus (BCMV) isolates from China pointed BCMV as a potential threat to soybean production. *Virus Research*, 191: 125–133

(责任编辑:张俊芳)