

马铃薯 Y 病毒多基因系统发育分析及其在株系鉴定中的应用

邹文超¹, 沈林林¹, 沈建国², 蔡伟³, 詹家绥^{1,4}, 高芳銮¹

1. 福建农林大学植物病毒研究所/福建省植物病毒学重点实验室, 福州 350002;
2. 福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心/福建省检验检疫技术研究重点实验室, 福州 350001;
3. 福清出入境检验检疫局综合技术服务中心, 福清 350300;
4. 福建农林大学闽台特色作物病虫害生态防控协同创新中心, 福州 350002

摘要: 为实现马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)常见株系的快速鉴定, 本文以 PVY 的 *PI*、*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 4 个基因为研究对象建立了快速准确的多基因联合体系。根据基因的不同组合建立 5 个不同数据集, 分别进行系统发育分析, 并通过贝叶斯标签关联显著性(Bayesian tip-association significance, BaTS)分析各数据集中代表分离物与株系的关联性, 以确定实现 PVY 快速鉴定的最佳组合。不同数据集的系统发育及 BaTS 分析结果显示, 除了联合 *PI*、*VPg* 和 *CP* 3 个基因数据集外, 其他 4 个数据集均无法实现 PVY 常见株系的准确鉴定。采用不同建树方法对联合 *PI*、*VPg* 和 *CP* 3 个基因数据集比较分析显示, 基于 ML 法和 NJ 法的系统发育树在拓扑结构上基本一致, 均优于基于贝叶斯算法的最大分支置信(maximum clade credibility, MCC)树。同时, 以 HLJ26 分离物为研究对象, 对建立的多基因联合体系进行实际应用, 结果显示该分离物与 PVY^{NTN-NW} 株系的 3 个分离物 SYR-II-2-8、SYR-II-Be1 和 SYR-II-DrH 以高置信值聚为一亚簇, 表明该分离物可能属于 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-II 型)。重组分析显示, HLJ26 基因组存在 4 个潜在的重组信号, 分别位于 *PI*、*HC-pro/P3*、*VPg* 和 *CP* 的 5'-末端, 与 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-II 型)的重组位点相一致, 表明其属于 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-II 型)。同时, 应用多重 RT-PCR 成功扩增出约为 1000 bp 和 400 bp 的 2 个特异性片段, 与 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-II 型)的特异条带大小相一致。这些结果进一步支持了多基因联合体系的鉴定结果。联合 *PI*、*VPg* 和 *CP* 3 个基因数据集系统发育分析, 可以实现 PVY 常见株系的准确鉴定。

关键词: 马铃薯 Y 病毒; 多基因系统发育分析; 系统发育与性状关联分析; SYR-II 型

收稿日期: 2017-06-13; 修回日期: 2017-09-10

基金项目: 国家现代农业马铃薯产业技术体系(编号: CARS-10), 国家重点研发计划项目(编号: 2016YFF0203203)和福清市科技计划项目(编号: FQ201501)资助[Supported by China Agriculture Research System (No. CARS-10), National Key Research and Development Program(No.2016YFF0203203) and Scientific and Technological Program of Fuqing (No. FQ201501)]

作者简介: 邹文超, 硕士研究生, 专业方向: 马铃薯病毒。E-mail: tsou2015@163.com

通讯作者: 高芳銮, 博士, 副研究员, 研究方向: 植物病毒的检测及分子进化。E-mail: rainy@fafu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-206

网络出版时间: 2017/9/21 13:33:51

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170921.1333.003.html>

A multigene phylogentic analysis of *Potato virus Y* and its application in strain identification

Wenchao Zou¹, Linlin Shen¹, Jianguo Shen², Wei Cai³, Jiasui Zhan^{1,4}, Fangluan Gao¹

1. Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University/Key Laboratory of Plant Virology of Fujian Province, Fuzhou 350002, China;

2. Inspection & Quarantine Technology Center of Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau/Fujian Key Laboratory for Technology Research of Inspection and Quarantine, Fuzhou 350001, China;

3. Comprehensive Technical Service Center of Fuqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuqing 350300, China;

4. Fujian-Taiwan Joint Centre for Ecological Control of Crop Pests, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: The objective of this study is to develop a rapid and accurate multigene phylogenetic analysis to identify *Potato virus Y* (PVY) strains. The phylogenetic relationships of strains within the PVY species were evaluated with isolate-strain association using five datasets of concatenated sequences from the *P1*, *HC-pro*, *VPg* and *CP* genes to determine the best dataset for PVY strain identification. Results from phylogenetic analyses and Bayesian tip-association significance (BaTS) tests indicated that the major PVY strains could be distinguished using the *P1*, *VPg* and *CP* concatenated sequences datasets but not the remaining concatenated sequence datasets. Phylogenetic trees reconstructed from the concatenated sequences of *P1*, *VPg* and *CP* genes revealed that the ML and NJ trees had broadly similar topologies and that both were better than the maximum clade credibility tree (MCC). Additionally, the full genome of HLJ26, one isolate randomly selected for the multigene phylogenetic analysis, was clustered with high confidence among members of the PVY^{NTN-NW} (SYR-II) strain, which includes isolates of SYR-II-2-8, SYR-II-Be1 and SYR-II-DrH. This suggests that it was a PVY^{NTN-NW} (SYR-II) isolate. Recombination analysis of this isolate identified four putative recombination joints in the *P1*, *HC-pro*/*P3*, *VPg* and the 5'-terminus of *CP*. This pattern is similar to that observed in the genomic structure of PVY^{NTN-NW} (SYR-I), supporting the classification of this isolate as the PVY^{NTN-NW} strain (SYR-II). Simultaneously, two expected fragments of approximately 1 000 and 400 bp in size were also amplified from the isolate by a multiplex RT-PCR, consistent with the expected band pattern of the PVY^{NTN-NW} (SYR-II) strain. This further supports the utility of the multigene phylogenetic method in identifying PVY strains. We propose that the major PVY strains could be distinguished accurately using multigene phylogenetic analysis based on the concatenated sequences from the *P1*, *VPg* and *CP* genes.

Keywords: *Potato virus Y*; multigene phylogenetic analysis; phylogeny-trait association analysis; SYR-II genotype

马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)是全球广泛分布并严重影响马铃薯生产的植物病毒之一。中国是马铃薯的主要生产国之一^[1], 随着国家“马铃薯”主粮化战略的推动, 马铃薯的种植面积必将不断扩大, 而 PVY 已成为制约马铃薯可持续生产的重要植物病原之一。近几十年来, 该病毒在亚洲地区各大马铃薯产区普遍发生, 并有进一步蔓延的趋势^[2,3]。PVY 是马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)的典型代表成员^[4], 其基因组由正单链 RNA 构成, 通过不同表达策略^[5,6], 最终生成 P1、HC-pro、P3、6K1、CI、6K2、VPg、

NIa、NIb、CP 和 P3N-PIPO 共 11 个成熟的多功能蛋白。该病毒侵染马铃薯种薯后, 容易引起种质退化。PVY 株系分化严重, 根据寄主植物的反应不同, 已被广泛认可的 PVY 主要株系包括 PVY^O、PVY^C 和 PVY^N 株系。除此之外, 还有一些新分化出来的 PVY^{NTN}、PVY^{N-Wi} 和 PVY^{NTN-NW} 等重组株系, 这些株系被认为是 PVY^N 和 PVY^O 在基因组不同基因区段重组而来^[7,8]。相比较于其他株系, PVY^{NTN} 和 PVY^{NTN-NW} 株系具有很强的致病性, 侵染种薯并导致马铃薯块茎坏死环斑病(potato tuber necrosis rin-

gspot disease, PTNRD)^[9], 严重降低马铃薯的品质和产量, 给马铃薯生产带来巨大的经济损失^[10]。因此, 建立准确而有效的 PVY 株系鉴定体系, 有利于了解该病毒病的发生、流行及变异趋势, 为其有效防控奠定理论依据。

目前生产上多采用传统生物学和血清学等方法综合应用分析进行 PVY 株系的鉴定, 但这些方法均有一定的局限性, 比如传统生物学需要接种指示植物、耗时长, 不适合 PVY 的快速检测; 血清学快速灵敏, 适用于 PVY 种薯的批量筛查, 但无法准确检测 PVY 的重组株系; 同样地, 通过全基因组的序列分析, 虽然可以非常准确确定 PVY 的株系归属^[11~13], 但其相对测序成本较高, 且不易在一般实验室实现, 从而在实际应用中受到极大的限制。因此, 从全基因组中选择几个基因进行联合分析, 即多基因序列分析(multigene sequence analysis)是目前植物病原鉴定中广泛使用的一种方法。例如, 曾莉莎等^[14]利用 *ITS*、*TEF-1 α*、*IGS*、*histone H3*、*β-tubulin* 等多基因序列分析, 确定了不同来源的尖孢镰孢菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc)菌株之间的亲缘关系及其与非病原尖孢镰孢菌的关系, 并评价这些基因在香蕉枯萎病菌生理小种鉴定上的应用价值。

PVY 株系分化严重, 不同株系的基因组结构不同。其中, *PI*、*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 4 个基因差异最为明显^[15], 因而联合这些基因进行分析, 为 PVY 株系的准确鉴定提供了可能。杨庆东等^[16]等联合 *PI* 和 *CP* 基因进行系统发育分析, 实现了 PVY 部分株系的鉴定。但仅联合这两个基因仍无法准确区分 PVY^{N-Wi} 与 PVY^{NTN-NW} 株系, 因为这两个株系的 *PI* 和 *CP* 基因的基因型相同。但是, 利用 *PI*、*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 4 个基因中的哪几个基因进行联合分析可以准确鉴定 PVY 株系, 这是本研究拟解决的关键问题。本文以 PVY 的 *PI*、*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 4 个基因为研究对象, 设置联合基因的不同组合, 建立 5 个不同数据集, 分别进行了系统发育分析, 并通过贝叶斯标签关联显著性(Bayesian tip-association significance, BaTS)检验各种组合中代表分离物与株系的关联系数及相关参数, 最终确定多基因联合的最

佳组合, 建立 PVY 株系的快速鉴定体系, 并进行了实际应用, 旨在为 PVY 的发生、流行及生态防控奠定理论依据。

1 材料和方法

1.1 PVY 分离物

HLJ26 分离物于 2012 年随机采集于黑龙江省马铃薯种植区, 经前期 ELISA 检测、电镜观察及 *CP* 基因扩增确定为 PVY 分离物^[2], 检测后的样本置于密封袋内, 保存于 -80℃ 超低温冰箱。同时, 根据前期研究^[13]选择 32 个已知株系的 PVY 分离物作为参考标准(表 1)。

1.2 系统发育与株系关联分析

PVY 参考分离物的 4 个基因序列, 根据数据集的划分组合不同, 使用 SequenceMatrix^[17]进行联合, 分别得到 5 个数据集: (1)*PI*、*HC-pro* 和 *VPg* 基因联合的数据集; (2)*PI*、*HC-pro* 和 *CP* 基因联合的数据集; (3)*PI*、*VPg* 和 *CP* 基因联合的数据集; (4)*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 基因联合的数据集; (5)*PI*、*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 基因联合的数据集。

联合的数据集使用 MEGA5^[18]的 MUSCLE 算法^[19]基于密码子方式分别进行多重序列比对, 通过 jModeltest 2.1.7^[20]对选择各数据集的最佳核苷酸替换模型, 并参照 AICc 标准设置相应的位点模型(site model)参数。使用 BEAST 1.8.3^[21]基于马尔科夫蒙特卡洛(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)法进行分析, MCMC 共运行 10⁸ 代保证所有参数的收敛。由于缺乏时间戳(Time stamp), 根据软件作者建议采用宽松的分子钟模型, 并通过贝叶斯因子(Bayes factors, BF)法确定不同数据集的最适宽松分子钟模型。

PVY 分离物与所属株系的关联性采用文献^[13]中系统发育与性状关联方法进行验证, 即使用 BaTS v2.0^[22]对所获得的样本分别计算关联系数(association index, *AI*)、简约分值(parsimony score, *PS*)和最大单系分支(maximum monophyletic clade, *MC*)。若 3 个统计参数相应的 *P* 值均 ≤ 0.05, 则说明分离物与所属株系之间具有很强的关联性。

1.3 不同算法重建的系统发育树拓扑结构比较

选取确定的最佳数据集作为目的序列，使用 MEGA 5^[18]分别使用邻接法(neighbor-joining, NJ)和表 1 PVY 的参考分离物

Table 1 PVY reference isolates in this study

分离物	寄主来源	国家	株系	定义性状	GenBank 登录号
SON41	龙葵 (<i>Solanum nigrum</i>)	法国	C	C	AJ439544
LYE84.2	番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	西班牙	C	C	AJ439545
Adgen	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	法国	C	C	AJ890348
SASA-110	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	英国	O	O	AJ585195
Oz	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	美国	O	O	EF026074
O-139	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	加拿大	O	O	U09509
SCRI-N	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	英国	N	N	AJ585197
Mont	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	美国	N	N	AY884983
N-605	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	瑞士	N	N	X97895
SASA-61	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	英国	N	NA-N	AJ585198
Tu 660	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	加拿大	N	NA-N	AY166866
RRA-1	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>))	美国	N	NA-N	AY884984
PB312	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	美国	NTN	NTN-a	EF026075
PVY-AST	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	巴西	NTN	NTN-a	JF928460
Hun-NTN	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	匈牙利	NTN	NTN-a	M95491
12-94	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	波兰	NTN	NTN-b	AJ889866
34/01	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	波兰	NTN	NTN-b	AJ890342
Gr99	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	波兰	NTN	NTN-b	AJ890343
Mb112	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	加拿大	N-Wi	N:O	AY745491
L56	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	加拿大	N-Wi	N:O	AY745492
PB209	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	美国	N-Wi	N:O	EF026076
Wilga5	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	德国	N-Wi	N-Wi	AJ890350
PN10A	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	美国	N-Wi	N-Wi	DQ008213
N1	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	美国	N-Wi	N-Wi	HQ912863
HN2	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	中国	NTN-NW	SYR-I	GQ200836
ShX14	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	中国	NTN-NW	SYR-I	KJ634024
SYR-NB-16	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	叙利亚	NTN-NW	SYR-I	AB270705
SYR-II-2-8	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	叙利亚	NTN-NW	SYR-II	AB461451
SYR-II-Be1	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	叙利亚	NTN-NW	SYR-II	AB461452
SYR-II-DrH	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	叙利亚	NTN-NW	SYR-II	AB461453
PVY-MON	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	巴西	E	E	JF928458
PVY-AGA	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	巴西	E	E	JF928459

(maximum composite likelihood)模型计算各核苷酸的进化距离；构建 ML 树时，最佳核苷酸替换模型通过 jModeltest 2.1.7^[20]计算获得，并参照 AICc 标准设置相应参数。NJ 树和 ML 树各分支节点的置信值

最大似然法(maximum likelihood, ML)重建系统发育树。使用 MEGA 5 构建 NJ 树时，采用最大似然复合

通过 1000 次自举(Bootstrap)抽样进行评估。

1.4 多基因系统发育分析的应用

从前期采集的 PVY 样品中随机选取分离物

HLJ26 为研究对象,通过 RT-PCR 分别扩增最佳数据集所需的基因片段,并采用上节确定的最佳算法重建系统发育树,根据该分离物的聚类结果,判定其株系归属。

为验证多基因系统发育分析的结果准确性,同时采用两个方法进行验证:(1)根据 Chikh Ali 等^[24]建立的多重 RT-PCR 体系,即:通过 6 对特异性引物对单一或混合侵染的 PVY 样品进行 RT-PCR 扩增,根据 PCR 产物凝胶电泳产生的条带大小及不同条带的组合判定 PVY 的株系类型;(2)采用 Overlapping 方法获得该分离物的全基因组序列,并对序列特征进行分析。

2 结果与分析

2.1 多基因系统发育分析

本研究的 5 个数据集多重比对后的序列长度为 2826 bp、3081 bp、2250 bp、2778 bp 和 3645 bp,经 Gblock 裁去冗余序列后分别得到长度为 2736 bp、2973 bp、2169 bp、2733 bp 和 3537 bp 的序列保守区。建树序列最佳核苷酸替换模型,除了 *PI*、*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 数据集为 $GTR+\Gamma_4$ 外,其他 4 个数据集的均为 $GTR+I+\Gamma_4$ 模型。同样,最适分子钟模型除了 *PI* + *HC-pro* + *CP* 数据集为对数正态分布的宽松分子钟(relaxed clock log normal)外,其他 4 个数据集的均为指数分布的宽松分子钟(relaxed clock exponential)模型(表 2)。

联合 *PI*、*HC-pro* 和 *VPg* 基因重建的最大分支置信(maximum clade credibility, MCC)树分析发现, PVY 分离物 SYR-NB-16(SYR-I 型)、PVY-AGA (PVY^E)、PVY-MON(PVY^E)聚为一小簇, SYR-II-2-8(SYR-II 型)和 Wilga5(PVY^{N-Wi})各自独立一个分支,其他分离物均以较高的后验概率(posterior probability, PP)与所属株系优先相聚(图 1A)。虽然 MC_{SYR-I} 、 MC_{SYR-II} 和 MC_{N-Wi} 统计检验显著(表 3, $P \leq 0.05$),但其平均值分别为 2.00、2.00 和 2.23,均小于该组最大的分离物数 3,说明以该数据集重建的系统发育树未能较好地将 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-II 型)以及 PVY^{N-Wi} 株系内的各分离物准确区分开(SYR-NB-16

除外);联合 *PI*、*HC-pro* 和 *CP* 基因,分离物 SYR-NB-16 和 Wilga5 均独立一个分支,未能与其所属株系相聚成簇,剩余各分离物均以较高的 PP 值与所属株系优先相聚(图 1B)。BaTS 分析显示, MC_{SYR-I} 和 MC_{N-Wi} 统计检验显著(表 3, $P \leq 0.05$),但其平均值分别为 2.06 和 2.17,均小于该组最大的分离物数 3,表明以该数据集重建的系统发育树未能较好地将 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-I 型)以及 PVY^{N-Wi} 株系内的分离物准确区分开;联合 *HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 基因, PVY 分离物 SYR-NB-16(SYR-I 型)与 SYR-II 型的分离物聚为一簇,剩余各分离物均以较高的 PP 值与所属株系相聚成簇(图 1C)。BaTS 分析显示, $MC_{SYR-II} = 1.02$,且统计检验不显著(表 3, $P \geq 0.05$),表明以该数据集重建的系统发育树未能较好地将 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-II 型)内的分离物准确区分开;联合 *PI*、*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 4 个基因,分离物 SYR-NB-16 和 Wilga5 均独立一个分支,未能与其所属株系优先相聚,剩余各分离物也均以较高的 PP 值与所属株系优先相聚(图 1D)。BaTS 分析显示, $MC_{N-Wi} = 2$,且统计检验不显著(表 3, $P \geq 0.05$),表明除了分离物 SYR-NB-16 外,该数据集重建的系统发育树,无法实现 PVY^{N-Wi} 株系内各分离物的准确鉴定;联合 *PI*、*VPg* 和 *CP* 基因重建的系统发育分析发现,除 SYR-NB-16 外, PVY 各分离物以较高的 PP 值与各自所属的株系相聚成簇(图 2A)。该结果也得 BaTS 的进一步支持,表明该数据集重建的系统发育树,可以实现 PVY 株系的准确鉴定(SYR-NB-16 除外)。

综合以上 5 个 MCC 树(图 1, A~D 和图 2A)可知,叙利亚分离物 SYR-NB-16 和中国分离物 HN1 和 ShX14 虽然同属于 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-I 型),但在系统发育关系上,其与中国分离物较远,存在明显的地区特异性。

表 2 系统发育分析参数
Table 2 Parameters for phylogenetic analysis

数据集	序列长度 (bp)		位点模型	分子钟模型
	比对后	裁切后		
<i>PI + HC-pro + VPg</i>	2826	2736	<i>GTR+I+Γ₄</i>	Relaxed clock exponential
<i>PI + HC-pro + CP</i>	3081	2973	<i>GTR+I+Γ₄</i>	Relaxed clock log normal
<i>PI + VPg + CP</i>	2250	2169	<i>GTR+I+Γ₄</i>	Relaxed clock exponential
<i>HC-pro + VPg + CP</i>	2778	2733	<i>GTR+I+Γ₄</i>	Relaxed clock exponential
<i>PI + HC-pro + VPg + CP</i>	3645	3537	<i>GTR+Γ₄</i>	Relaxed clock exponential

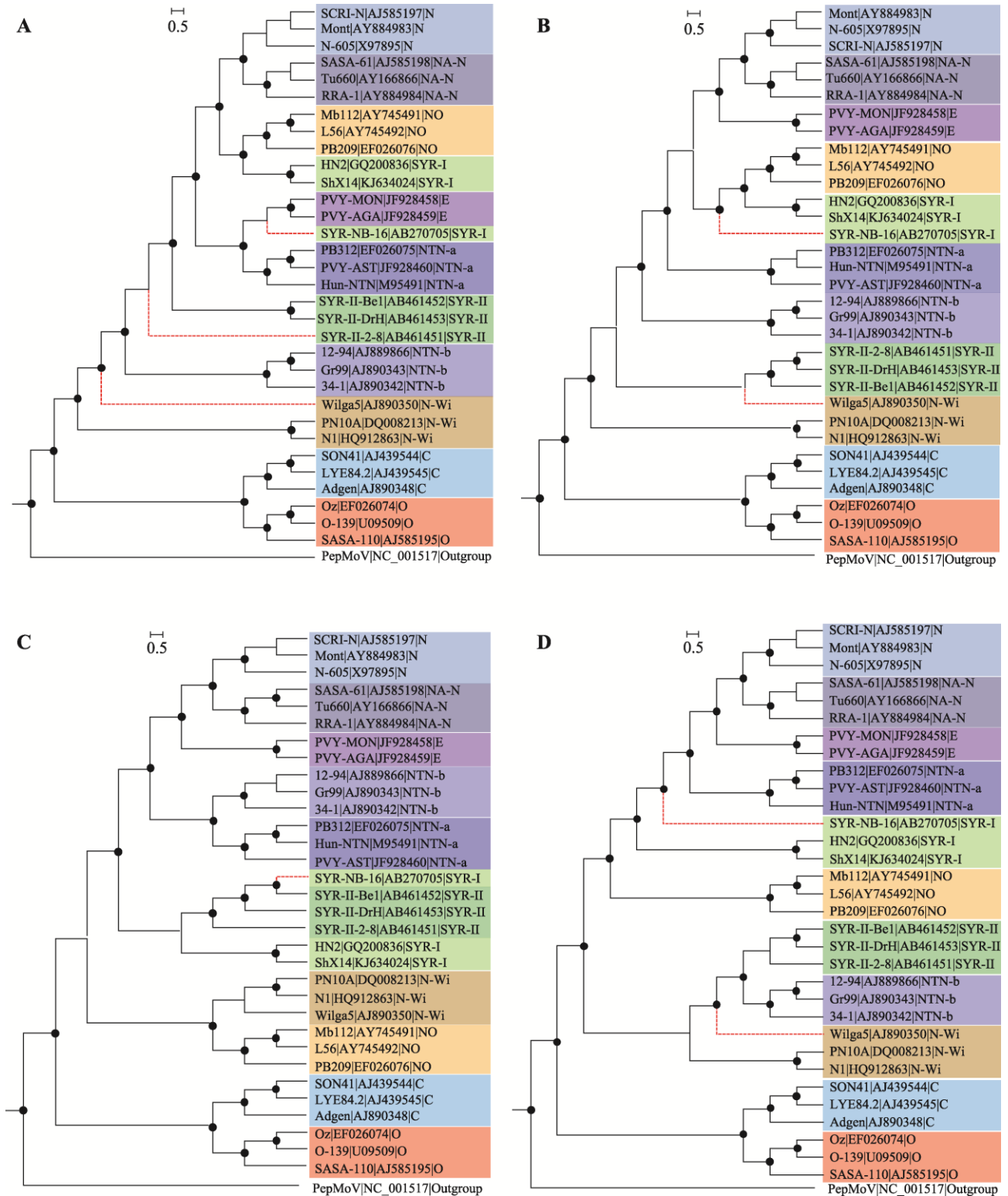


图 1 联合 *PI*、*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 基因不同数据集重建的 MCC 树

Fig. 1 MCC phylogenetic trees based on datasets of the concatenated sequences of *PI*, *HC-pro*, *VPg* and *CP* genes

A: *PI*、*HC-pro* 和 *VPg* 基因数据集; B: *PI*、*HC-pro* 和 *CP* 基因数据集; C: *HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 基因数据集; D: *PI*、*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 基因数据集。圆点显示为后验概率 $\geq 70\%$ 的分支节点, 红线虚线显示株系归属不准确的分离物, 辣椒斑驳病毒 (Pepper mottle virus, PepMoV) 作为外群 (Outgroup)。

表 3 PVY 株系的系统发育-性状关联检验
Table 3 Phylogeny-trait association tests of PVY-strain clustering

统计检验	数据集				
	<i>PI+HC-pro+VPg</i>	<i>PI+HC-pro+ CP</i>	<i>PI+VPg+CP</i>	<i>HC-pro+VPg+CP</i>	<i>PI+HC-pro+VPg+CP</i>
<i>AI</i>	0.15 (0.08–0.24)***	0.11 (0.06–0.17)***	0.09 (0.05–0.14)***	0.45(0.42–0.50)***	0.08(0.06–0.12)***
<i>PS</i>	11.08 (11.00–12.00)***	11.05 (11.00–11.10)***	11.00 (11.00–11.00)***	12.00(12.00–12.00)***	11.00(11.00–11.00)***
<i>MC (C)</i>	2.99 (2.95–3.00)**	2.95 (2.90–3.00)**	2.99 (2.98–3.00)**	3.00 (2.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**
<i>MC (O)</i>	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**
<i>MC (N)</i>	2.78 (2.00–3.00)**	2.86 (2.00–3.00)**	2.44 (1.00–3.00)**	2.78 (2.00–3.00)**	2.82 (2.00–3.00)**
<i>MC (NA-N)</i>	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)*	3.00 (3.00–3.00)**
<i>MC (N:O)</i>	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**
<i>MC (N-Wi)</i>	2.23 (2.00–3.00)*	2.17 (2.00–3.00)*	2.52 (2.00–3.00)*	2.59 (2.00–3.00)*	2.00 (2.00–2.00) ^{ns}
<i>MC (NTN-a)</i>	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**
<i>MC (NTN-b)</i>	2.83 (2.00–3.00)**	2.98 (2.96–3.00)**	2.99 (2.95–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**	3.00 (3.00–3.00)**
<i>MC (SYR-I)</i>	2.00 (2.00–2.00)**	2.06 (2.00–3.00)*	2.44 (2.00–3.00)**	2.00 (2.00–2.00)*	2.09 (2.00–3.00)*
<i>MC (SYR-Ⅱ)</i>	2.00 (1.00–3.00)*	2.93 (2.00–3.00)**	2.55 (2.00–3.00)**	1.02 (1.0–1.08) ^{ns}	2.67 (2.00–3.00)**
<i>MC (E)</i>	2.00 (2.00–3.00)**	2.00 (2.00–2.00)*	2.00 (2.00–2.00)**	2.00 (2.00–2.00)**	2.00 (2.00–2.00)**

注: *: 0.01< *P* <0.05; **: 0.001< *P* <0.01; ***: *P* <0.001; ^{ns}: 不显著。

2.2 系统发育树拓扑结构比较

NJ 法和 ML 法重建的系统发育树在拓扑结构相一致, 只是分支上的置信值略有差异, 但关键分支的自举(Bootstrap, BP)值均高于 70, 表明基于这两种算法构建的系统发育树均可以将 PVY 各株系的系统发育关系解析得较好(图 2, B 和 C)。除此之外, SYR-NB-16 分离物也与其所属的 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-I 型)优先相聚, 进一步表明这两种算法构建的系统发育树在 PVY 株系区分上更优于基于贝叶斯算法的 MCC 树。

2.3 应用多基因系统发育分析鉴定 HLJ26 的株系归属

应用 NJ 法和 ML 法联合 *PI*、*VPg* 和 *CP* 基因重建的系统发育树虽然在个别分支上的 *BP* 值略有差异, 但拓扑结构完全一致, HLJ26 分离物与 PVY^{NTN-NW} 株系的 3 个分离物(SYR-Ⅱ-2-8、SYR-Ⅱ-Be1 和 SYR-Ⅱ-DrH)聚为一亚簇(图 3)。结果表明, 该分离物在系统发育关系上与 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-Ⅱ型)最为接近。

2.4 HLJ26 的基因组特征及多重 RT-PCR 验证

经过测序得到的 HLJ26 分离物的全基因组序列, 除去 3'末端的 Poly(A)以外, HLJ26 分离物序列全长大小确定为 9724 nt(GenBank 登录号为: MF-134425), 基因组中 5'-UTR 和 3'-UTR 的非编码区长度分别为 189 和 349 nt, 多聚蛋白编码区为 190~9 375 nt。通过与参考分离物的两两比对可知, HLJ26 与 Mont、Oz、SYR-Ⅱ-2-8 分别各有 763、908 和 126 个碱基的差异(图 4A), 而与 SYR-Ⅱ-2-8 的差异最小。通过 Simplot 序列相似性作图分析可知, HLJ26 基因组存在 4 个潜在的重组信号, 分别位于 P1、HC-pro/P3、VPg 和 CP 的 5'-末端(图 4B), 与 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-Ⅱ型)的重组位点相一致, 表明 HLJ26 属于 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-Ⅱ型)。多重 RT-PCR 扩增后 HLJ26 分离物获得约为 1000 bp 和 400 bp 左右的 2 个特异性条带(图 4C), 和 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-Ⅱ型)预期的 2 个特异性条带——1076 bp 和 441 bp 的大小相吻合, 同时电泳成像结果显示阴性对照(健康马铃薯叶片)和空白对照都没有获得类似条带, 从而确定 HLJ26 分离物属于 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-Ⅱ型)。

3 讨论

快速、准确检测 PVY 株系, 对于及时跟踪 PVY

变异株系的发生与分布动态乃至有效防控病毒病具有十分重要的意义。由于 PVY 变异频繁, 传统上采

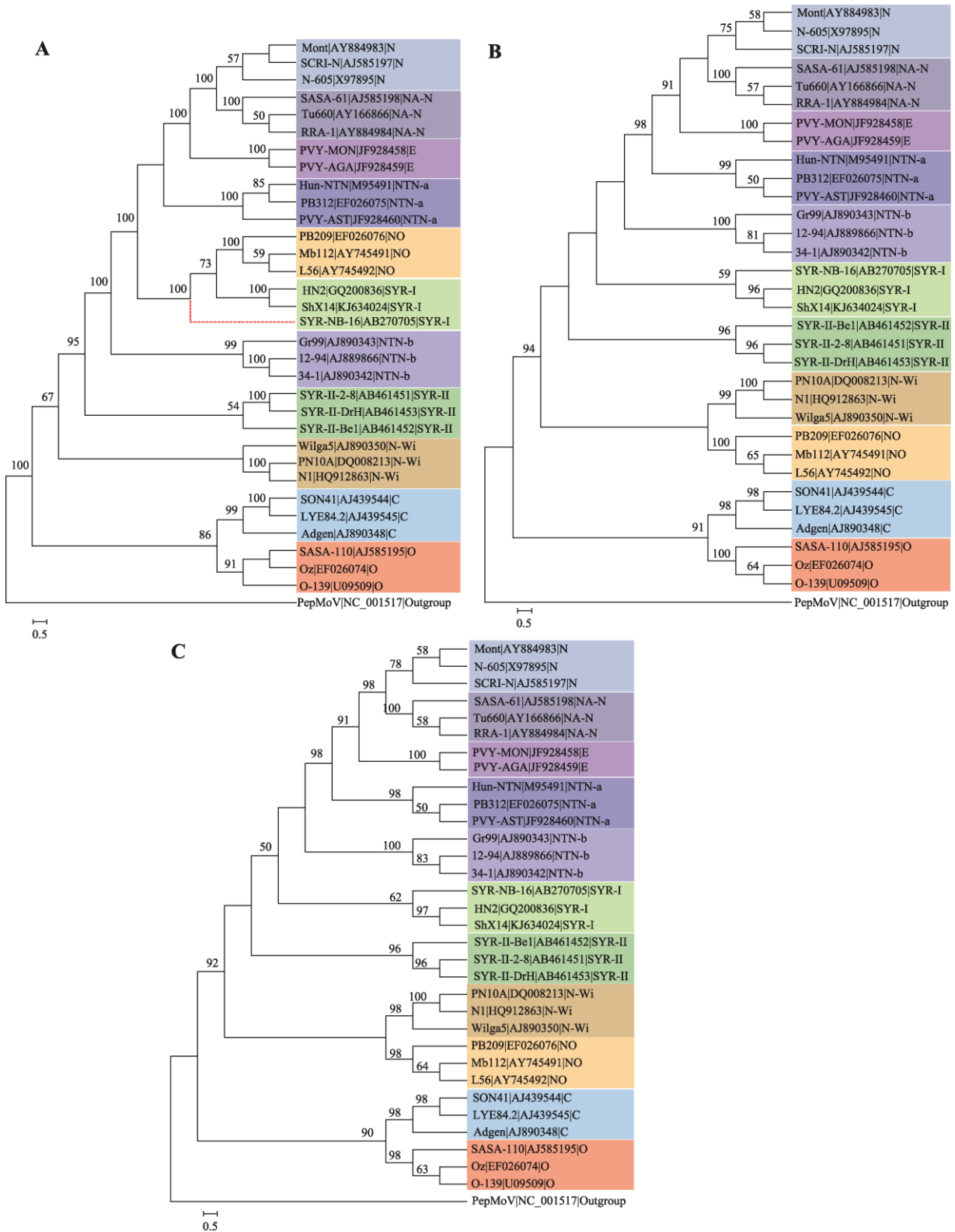


图 2 基于不同算法重建的 PVY *PI*、*VPg* 和 *CP* 联合基因系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic trees constructed using different methods based on the concatenated sequences from *PI*, *VPg* and *CP* genes
A: MCC 树; B: NJ 树; C: ML 树。红线虚线显示株系归属不准确的分离物, PepMoV 作为外群(Outgroup)。

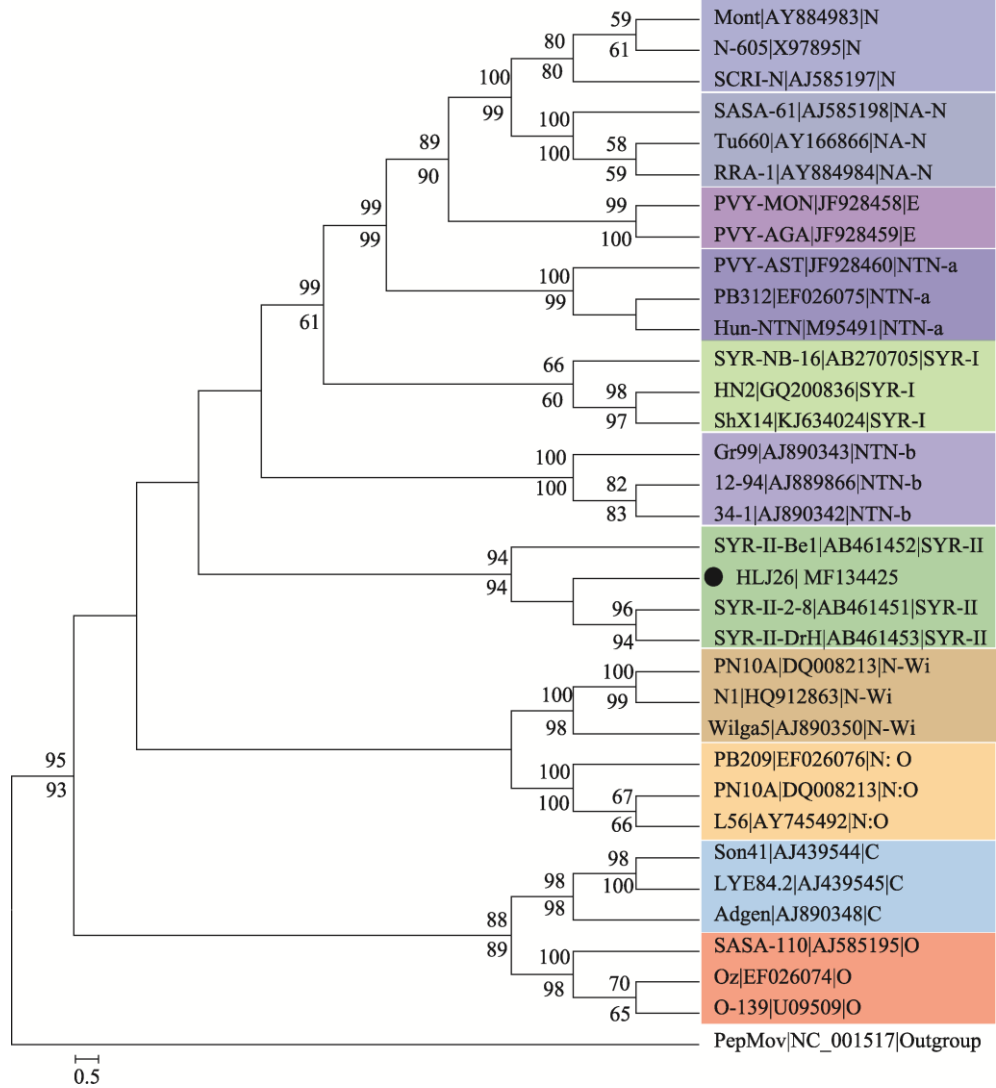


图 3 基于 ML 法和 NJ 法重建的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic trees of PVY reconstructed based on the ML and NJ methods
分支上的数值分别为 NJ 法(上)和 ML 法(下)的自举值(仅显示>50%), 黑色圆点显示的为 HLJ26 分离物, PepMoV 作为外群(Outgroup)。

用高度保守的 *CP* 基因进行系统发育分析, 已无法正确地反映出 PVY 不同株系的进化关系, 尤其 *CP* 基因型相同的株系。即使联合了 *PI* 和 *CP* 基因分析, 对于近年来新报道的 PVY^{NTN-NW} 株系, 同样也会造成误判^[24~26]。本文研究结果说明, 至少需要联合 3 个基因, 而且必须 *PI*、*VPg* 和 *CP* 基因的组合, 才可以将 PVY 常见株系的系统发育关系解决得比较好 (图 2)。

目前分子系统发育研究中的建树方法, 常见有最大简约法(maximum parsimony, MP)法、NJ 法、ML 法和 BI 法等, 各有优缺点。5 个数据集基于贝叶斯法重建的 MCC 树中, SYR-NB-16 均未与 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-I 型)的其他分离物相聚成簇。究其原因, PVY 的进化除了受寄主驱动外^[27], 还在一定程度上受地区所驱动^[28]。参考分离物是影响 PVY 系统发育分析结果的关键因素之一。因此, 在

PVY 系统发育分析时, 应尽可能选取地区来源相同的分离物作为参考序列。在系统发育重建的 4 种算法中, NJ 法是基于距离的算法^[29], 序列一致性高的

序列优先相聚成簇。相比较于其他算法, NJ 法建树速度更快, 实际操作更为简单。然而, 在进化模型确定的情况下, ML 法是与进化事实吻合最好的建树

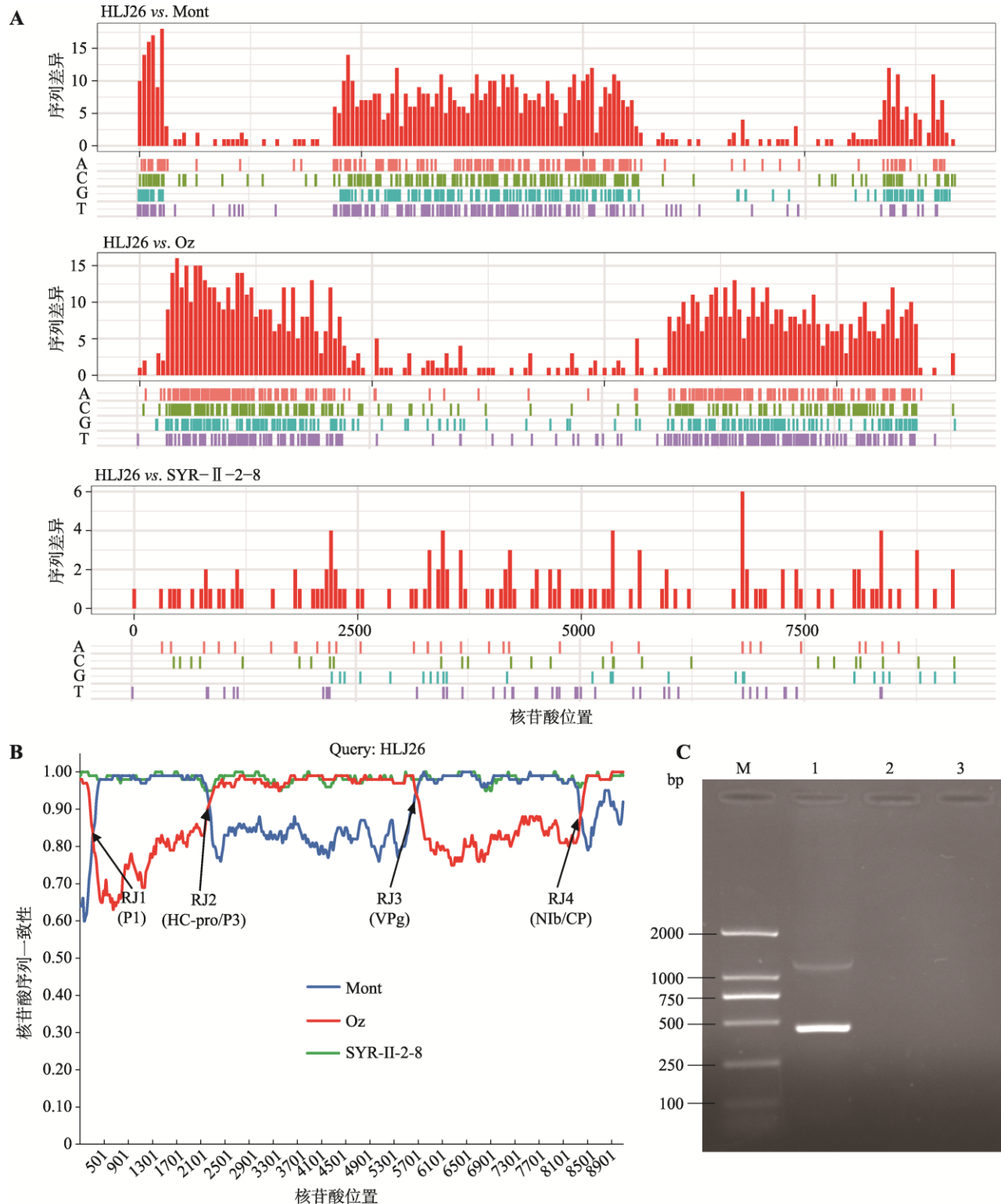


图 4 HLJ26 的基因组结构特征及多重 RT-PCR 检测结果

Fig. 4 Features of genomic structures and the multiplex RT-PCR assays of the HLJ26 sequence

A: HLJ26 与 Mont (PVY^N)、Oz (PVY^O) 和 SYR-II-2-8 (PVY^{NTN-NW}) 序列差异比较; B: HLJ26 的 Simplot 一致性分析; RJ1-RJ4 为潜在的重组位点, 括号内显示的是重组位点所在的基因区段; C: HLJ26 的多重 RT-PCR 检测结果, 其中 M 为 D2000 分子量标准, 泳道 1 为 HLJ26 分离物的多重 RT-PCR 扩增产物, 泳道 2 和 3 分别为阴性对照(健康植株)和空白对照(水)。

算法之一^[30]。本文通过 RT-PCR 分别扩增了 HLJ26 分离物的 *PI*、*VPg* 和 *CP* 基因, 并基于 NJ 法和 ML 法多基因系统发育分析, 获得一致的结果, 表明该分离物属于 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-II 型)。随后的 HLJ26 全基因组序列分析(图 4, A 和 B)和多重 RT-PCR 检测结果(图 4C)验证了多基因联合体系在 PVY 株系鉴定上的准确性, 表明该体系在实际应用中具有很强的可行性。

Chikh-Ali 等^[23]等建立的多重 RT-PCR 体系, 是 PVY 株系鉴定中最常用的方法之一。利用该体系可以将包括 PVY^{NTN-NW} 在内的常用株系鉴定出来。然而, 由于 PVY 侵染的复杂性, 对于复合侵染的样品, 产生的条带组合较为凌乱, 无法准确判断株系组成。同时, 该法基于已知分离物设计的引物, 也无法准确鉴定新重分离物。而本文建立的多基因联合体系, 还可以实现对新重组分离物的预判, 例如 Gao 等^[12]利用该方法鉴定一株新的重组分离物 GF_YL20, 表明其更优于多重 RT-PCR 技术, 可以用于马铃薯生产上 PVY 的快速鉴定。

本文通过 PVY 的 *PI*、*HC-pro*、*VPg* 和 *CP* 4 个基因 5 个不同数据集的系统发育分析和 BaTS 检验, 明确了联合 *PI*、*VPg* 和 *CP* 3 个基因重建 PVY 系统发育分析关系, 可以实现 PVY 常见株系的准确鉴定; 同时, 利用该体系的实际应用中, 鉴定到一株 PVY^{NTN-NW} 株系(SYR-II 型)的分离物 HLJ26。本研究建立的多基因联合体系, 可为后续深入开展 PVY 的株系组成及其分布特征等研究奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] Wang B, Ma YL, Zhang ZB, Wu ZM, Wu YF, Wang QC, Li MF. Potato viruses in China. *Crop Prot*, 2011, 30(9): 1117–1123.
- [2] Gao FL, Shen JG, Shi FY, Fang ZG, Xie LH, Zhan JS. Detection and molecular variation of *Potato virus Y CP* gene in China. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(15): 3125–3133.
高芳奎, 沈建国, 史凤阳, 方治国, 谢联辉, 詹家绥. 中国马铃薯 Y 病毒的检测鉴定及 CP 基因的分子变异. 中国农业科学, 2013, 46(15): 3125–3133.
- [3] Ali MC, Karasev AV, Furutani N, Taniguchi M, Kano Y, Sato M, Natsuaki T, Maoka T. Occurrence of *Potato virus Y* strain PVY^{NTN} in foundation seed potatoes in Japan, and screening for symptoms in Japanese potato cultivars. *Plant Pathol*, 2013, 62(5): 1157–1165.
- [4] King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2011.
- [5] Gao FL, Shen JG, Shi FY, Chang F, Xie LH, Zhan JS. Sequence variation and protein structure of *pipo* gene in *Potato virus Y*. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(9): 1125–1134.
高芳奎, 沈建国, 史凤阳, 常飞, 谢联辉, 詹家绥. 马铃薯 Y 病毒 *pipo* 基因的分子变异及结构特征分析. 遗传, 2013, 35(9): 1125–1134.
- [6] Chung BYW, Miller WA, Atkins JF, Firth AE. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5897–5902.
- [7] Singh RP, Valkonen JPT, Gray SM, Boonham N, Jones RAC, Kerlan C, Schubert J. Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch Virol*, 2008, 153(1): 1–13.
- [8] Ali MC, Maoka T, Natsuaki T, Natsuaki KT. PVY^{NTN-NW}, a novel recombinant strain of *Potato virus Y* predominating in potato fields in Syria. *Plant Pathol*, 2010, 59(1): 31–41.
- [9] Beczner L, Horváth J, Romhányi I, Förster H. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Res*, 1984, 27(3): 339–352.
- [10] Rahman MS, Akanda AK. Performance of seed potato produced from sprout cutting, stem cutting and conventional tuber against PVY and PLRV. *Bangladesh J Agril Res*, 2009, 34(4): 609–622.
- [11] Wei MC. Comparative analysis of genome sequences of four isolates of *Potato virus Y* infecting tobacco [Dissertation]. Nanning: Guangxi University, 2011.
韦茂春. 侵染烟草的四个马铃薯 Y 病毒分离物基因组序列比较分析[学位论文]. 南宁: 广西大学, 2011.
- [12] Gao FL, Chang F, Shen JG, Shi FY, Xie LH, Zhan JS. Complete genome analysis of a novel recombinant isolate of *Potato virus Y* from China. *Arch Virol*, 2014, 159(12): 3439–3442.

- [13] Gao FL, Chang F, Shen JG, Xie LH, Zhan JS. Complete genome analysis of a PVY^{NTN-NW} recombinant isolate from Yulin of China. *Sci Agric Sin*, 2015, 48(2): 270–279.
高芳奎, 常飞, 沈建国, 谢联辉, 詹家绥. PVY^{NTN-NW} 榆林分离物的全基因组序列测定与分析. *中国农业科学*, 2015, 48(2): 270–279.
- [14] Zeng LS, Lü S, Liu WQ, Zhao ZH, Wang F, Zhou JK, Li HB, Chen S, Du CX. The identification on race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* based on multi-gene sequence analysis. *Mycosystema*, 2014, 33(4): 867–882.
曾莉莎, 吕顺, 刘文清, 赵志慧, 王芳, 周建坤, 李洪波, 陈石, 杜彩娴. 基于多基因序列分析对尖孢镰孢菌古巴专化型(香蕉枯萎病菌)生理小种的鉴定. *菌物学报*, 2014, 33(4): 867–882.
- [15] Hu XJ, Karasev AV, Brown CJ, Lorenzen JH. Sequence characteristics of *Potato virus Y* recombinants. *J Gen Virol*, 2009, 90(12): 3033–3041.
- [16] Yang QD, Wu XQ, Chen SH, Liu XL. Molecular variation and identification of *Potato virus Y* strains. *Chin Potato J*, 2011, 25(3): 166–169.
杨庆东, 吴兴泉, 陈士华, 刘晓磊. PVY 株系间的分子变异及分子鉴定方法. *中国马铃薯*, 2011, 25(3): 166–169.
- [17] Vaidya G, Lohman DJ, Meier R. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 2011, 27(2): 171–180.
- [18] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [19] Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(5): 1792–1797.
- [20] Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*, 2012, 9(8): 772–772.
- [21] Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol*, 2012, 29(8): 1969–1973.
- [22] Parker J, Rambaut A, Pybus OG. Correlating viral phenotypes with phylogeny: accounting for phylogenetic uncertainty. *Infect Genet Evol*, 2008, 8(3): 239–246.
- [23] Ali CM, Maoka T, Natsuaki KT, Natsuaki T. The simultaneous differentiation of *Potato virus Y* strains including the newly described strain PVY^{NTN-NW} by multiplex PCR assay. *J Virol Methods*, 2010, 165(1): 15–20.
- [24] Chen SH, Liu XL, Zhang XT, Wu XQ. Study on the PVY strain differentiation and identification of some potato producing areas in China. *J Henan Agric Univ*, 2011, 45(5): 548–551.
陈士华, 刘晓磊, 张晓婷, 吴兴泉. 中国部分马铃薯产区马铃薯 Y 病毒(PVY)的株系分化与鉴定. *河南农业大学学报*, 2011, 45(5): 548–551.
- [25] Chen SH, Liu XL, Zhang XT, Wu XQ. Identification and molecular characters of the PVY strains with high pathogenicity in Henan. *J Henan Agric Univ*, 2010, 44(4): 443–447.
陈士华, 刘晓磊, 张晓婷, 吴兴泉. 河南 PVY 高致病性株系的发现及其分子特征研究. *河南农业大学学报*, 2010, 44(4): 443–447.
- [26] Liu HY, Liang WS, Liu ZM, Zhang HX, Yang LQ. Identification of *Potato virus Y* strains in infected potato plants from some places of Heilongjiang Province. *J Northeast Agric Univ*, 2014, 45(1): 47–52.
刘洪义, 梁五生, 刘忠梅, 张洪祥, 杨立群. 黑龙江省部分地区马铃薯 Y 病毒株系检测. *东北农业大学学报*, 2014, 45(1): 47–52.
- [27] Chang F, Zou WC, Gao FL, Shen JG, Zhan JS. Comparative analysis of population genetic structure of *Potato virus Y* from different hosts. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(2): 292–301.
常飞, 邹文超, 高芳奎, 沈建国, 詹家绥. 不同寄主来源的马铃薯 Y 病毒群体遗传结构的比较分析. *遗传*, 2015, 37(3): 292–301.
- [28] Cuevas JM, Delaunay A, Rupar M, Jacquot E, Elena SF. Molecular evolution and phylogeography of *Potato virus Y* based on the CP gene. *J Gen Virol*, 2012, 93(11): 2496–2501.
- [29] Yang ZH, Rannala B. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(5): 308–314.
- [30] Huang Y. *Molecular Phylogenetics*. Beijing: Science Press, 2012: 323–324.

(责任编辑: 谢建平)