基于全基因组编码区序列的烟草花叶病毒分子进化分析

刘天波[1,4]， 周志成[1]， 彭曙光[2]， 曾维爱[3]， 唐前君[4*]

（1. 湖南省烟草科学研究所，长沙 410004；2. 湖南省烟草公司，长沙 410004；
3. 湖南省长沙市烟草公司，长沙 410010；4. 湖南农业大学植物保护学院，长沙 410128）

摘要 为揭示烟草花叶病毒分子进化特征，从 GenBank 中下载已报道的烟草花叶病毒全基因组编码区序列，进行重组、系统发育、遗传变异、种群结构和基因漂流等分析。结果表明：突变和负选择作用是驱动烟草花叶病毒进化的主要作用力，种群结构稳定，处于扩张趋势中，基因变异程度低，重组在烟草花叶病毒分子进化中作用不明显。烟草花叶病毒不同分离物形成 3 个有一定地理相关性的种群 China Ⅰ、China Ⅱ和 Europe。欧洲分离物核苷酸序列多样性比中国的差异大，Europe 和 China Ⅰ种群可能受到遗传漂变影响，Europe 与 China Ⅱ、China Ⅰ与 China Ⅱ之间存在发生基因交流的渠道。

关键词 烟草花叶病毒； 全基因组编码序列； 系统发育； 分子进化

中图分类号： S 435.72 **文献标识码：** A **DOI：** 10.3969/j.issn.0529－1542.2017.05.013

Complete genomic coding sequence-based molecular evolutionary analysis of *Tobacco mosaic virus*

Liu Tianbo[1,4]， Zhou Zhicheng[1]， Peng Shuguang[2]， Zeng Wei'ai[3]， Tang Qianjun[4]

（1. *Tobacco Research Institute of Hunan Province*，*Changsha* 410004，*China*；2. *Tobacco Company of Hunan*，*Changsha* 410004，*China*；3. *Tobacco Company of Changsha*，*Hunan* 410010，*China*；
4. *College of Plant Protection*，*Hunan Agricultural University*，*Hunan* 410128，*China*）

Abstract To reveal the molecular evolution of *Tobacco mosaic virus*（TMV），the complete genomic coding sequences of TMV from GenBank were subjected to molecular evolutionary analysis，including recombination，phylogeny，genetic variation，population structure，gene flow，etc. The results indicated that mutation and negative selection were the main driving forces for TMV evolution，rather than recombination. The TMV populations had stable structure，but were expanding，and the gene mutation was low. Three geographically correlative species of TMV named China Ⅰ，China Ⅱ and Europe were found. The Europe isolates exhibited greater nucleotide diversity than the China ones；Europe and China Ⅰ populations could be influenced by genetic drift，and there were gene exchange channels between Europe and China Ⅱ and between China Ⅰ and China Ⅱ.

Key words *Tobacco mosaic virus*； complete genomic coding sequence； phylogenetics； molecular evolution

烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus*（TMV）是烟草花叶病毒属 *Tobamovirus* 的代表成员，是危害最严重的病毒之一[1]。由 TMV 侵染引起的烟草花叶病在全世界烟草栽培地区普遍发生，已成为威胁中国烟叶生产的主要病害之一，且近年来呈日趋严重的趋势[2]。TMV 寄主范围广，可侵染 30 个科、310 多种植物，地理分布广泛，分布于中国、韩国、西班牙和美国等多个国家[3-6]。TMV 具有较多的株系，目前没有统一的划分标准，主要株系有 TMV-OM、TMV-U1、TMV-Vulgare、TMV^{RS}、TMV^{C}、TMV^{N}、TMV^{Y}[7-8]。TMV 是一种正单链 RNA 病毒，基因组全长 6 395 个核苷酸（nucleotide，nt），共编码 4 个开放阅读框（open reading frame，ORF），ORF1 编码 126 kD 的蛋白质，其终止密码子（UAG）

收稿日期： 2016－12－19 **修订日期：** 2017－01－23
基金项目： 中国烟草总公司湖南省公司科技项目专项（14－16ZDAa02）；中国烟草总公司科技重点项目（110201502016）
* 通信作者 E-mail：78405158@qq.com

是渗漏性的(leaky),产生了一个较大的 183 kD 的通读蛋白 ORF2,ORF2 的末端 5 个密码子与编码 30 kD 蛋白质的 ORF3 重叠,ORF3 终止于 ORF4 的起始密码子前两个核苷酸的位置,ORF4 编码 17.6 kD 的外壳蛋白[9-10]。

目前,源于不同国家或地区、不同寄主病毒分离物的基因序列不断被报道,通过生物信息学技术和方法对这些序列加以分析和研究,明确病毒不同分离物的起源、亲缘关系、遗传变异和分子进化,了解全球范围内或地域内病毒的发展动态和趋势,对监测和防控病毒病具有重要意义。但是,这类分析是建立在一定数量的病毒株系(或分离物)序列基础上,部分病毒由于报道的全序列或编码区序列数量有限,目前还无法全面分析其变异进化规律和株系间亲缘关系特征,另外基于一个或多个基因进行分析,其结果往往带有一定的片面性。贾琳等[11]对猪瘟病毒 *Classical swine fever virus* (CSFV) 基因组全编码区进行了选择压力及重组分析,发现重组改变了重组株所在的进化树分支,影响了 CSFV 的遗传多样性,针对宿主免疫系统的选择压力而产生的突变和重组推动了病毒编码区基因的进化。张新珩等[12]对鸡传染性贫血病毒 *Chicken anemia virus* (CAV)全基因组编码区进行变异点和分子进化分析,监测了广东省 CAV 序列变异情况及流行特点。这类基于基因组全编码区的分子进化分析,其分析结果更具参考价值。

TMV 全基因组序列的报道不断增加,研究多集中在单一序列的结构分析上,如复制酶、移动蛋白(movement protein, MP)、外壳蛋白(coat protein, CP)序列结构分析[13-15]等。但对来自不同国家或地区、不同寄主上的 TMV 株系或分离物,其起源、变异或重组、种群结构、进化机制等方面研究却鲜有报道。本研究以目前已报道的 TMV 全基因组编码区序列为研究对象,进行重组、系统发育、遗传变异、基因交流和种群结构分析,揭示 TMV 分子变异进化特征,为 TMV 的抗病育种和防治提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

从 NCBI 上下载目前已报道的所有的 TMV 分离物全基因组序列(截至 2016 年 10 月 31 日),共获得 72 条 TMV 分离物全基因序列,并选取 2 株近缘物种番茄花叶病毒 *Tomato mosaic virus*(ToMV)分离物作为外群。

1.2 方法

1.2.1 序列数据处理

用 BioEdit[16]对所有的数据进行修正处理,去掉序列中存在的瑕疵并删除终止密码子。将整理后的序列用 ClustralX2[17]比对,这种比对产生的结果可能存在部分 gap 不是 3 的倍数,因此将核苷酸序列数据对应的氨基酸序列再用 TransAlign[18]软件比对,以保证经过序列比对后得到的核苷酸序列能够正确地编译出氨基酸序列。TMV 的分离物 ORF3 和 ORF4 之间一般存在基因间隔区,经过上述一系列的序列处理后,去掉基因间隔区,然后将所有的 ORF 组装在一起进行后续的分析。

1.2.2 重组分析

利用 RDP4.0[19]软件包中的 RDP、Geneconv、Bootscan、Maxchi、Chimaera、3Seq 和 Siscan 检测可能存在的重组位点,利用 SimPlot 软件进行检测验证重组位点存在的可能性。当某分离物出现 4 个软件的检测结果都是 $P<1.0\times10^{-6}$时,则该分离物有可能的重组,否则没有重组或不存在潜在重组[20]。使用软件时采用系统默认值,设定置信值(P-value)为 0.01。

1.2.3 系统发育分析

采用 MEGA 5.0 中的 Clustral W[21]软件进行序列比对,利用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统进化树,重复 1 000 次。在 ML 法分析中,数据最适的核苷酸替代模型用 jModelTest 0.1.1 软件[22]计算,结果显示 TRG+I+G 为最适的核苷酸替代模型;在 ML 分析中采用自举法,进行1 000 倍模拟复制计算支长。

1.2.4 遗传差异以及基因交流

种群之间的遗传差异由 DnaSP 5.0[23]软件计算,统计 K_s,Z 和 S_{nn} 三个参数衡量[24-25]。如果 K_s 和 Z 统计值很小,$P<0.05$,则认为存在遗传差异。基因交流用 F_{st} 和 N_m 值来衡量,F_{st} 的绝对值小于 0.33,说明两个种群之间存在基因交流,反之,交流不频繁[26-27]。若 $N_m<1$,则说明在种群间很容易发生基因漂变,是群体发生遗传差异的主要原因;若 $Nm>1$ 则说明种群间存在可以发生基因交流的渠道或者地缘关系较近。

1.2.5 选择压力分析

将分离物按寄主和地理来源分为不同的组,应用 MEGA5.0 软件中 Pamilo-Bianchi-Li 法分别计算非同义和同义突变之间的比值(d_N/d_S)[28]。若 $d_N/d_S=1$ 则说明该组分离物存在中性选择;若 $d_N/d_S<1$ 则说明该组分离物存在负选择或净化;若 $d_N/d_S>1$ 则说明该组分离物存在正向选择或多样化选择。

1.2.6 突变位点和保守区域分析

利用 DnaSP 5.0 软件,对 TMV 编码区基因序列 5 937 个位点进行突变位点和保守区域分析。

1.2.7 种群结构分析

不同种群分离物的核苷酸多样性与单体型多样性采用 DnaSP 5.0 软件计算。基于 Tajima's D 和 Fu & Li's D 和 F 值进行中性检验分析,Tajima's D 和 Fu & Li's D 和 F 均为负值,说明该种群多样性较低,种群呈扩张趋势;相反,种群稳定选择,种群数量正在减少[29-30]。

2 结果与分析

2.1 重组分析

对处理后得到的 72 个分离物全基因组编码区序列进行重组分析,结果发现分离物的 P 值皆大于 1.0×10^{-6},没有发现明显的重组位点。为了进一步确认这一结果,运用 SimPlot 再次检测依然没有发现明显的重组位点。因此,可以确认在 TMV 分离物中不存在重组体或者不明显。

2.2 系统发育分析

对已报道的 72 个 TMV 全基因组编码区序列进行分析,如图 1 所示,TMV 不同分离物形成 3 个种群,分别为 China Ⅰ、China Ⅱ和 Europe, China Ⅰ聚集了除云南外中国各地区分离物,China Ⅱ以云南分离物为主体,Europe 除了少部分中国分离物以外,绝大部分来源于西班牙和美国,不同组间的分离物地理特征明显。

2.3 遗传差异以及基因交流

利用 K_s、Z 和 S_{nn} 三个统计量对 TMV 全基因组编码区序列的欧洲和中国(China Ⅰ、China Ⅱ)不同种群间的遗传变异进行了分析,结果表明 K_s 和 Z 统计值很小,$P<0.001$(表 1),TMV 在不同群组间的遗传变异明显,同时中国不同地区间形成的种群遗传差异也十分明显。在基因流动分析中,TMV 不同组间和中国不同地区种群间的 $F_{st}<0.33$,表明 TMV 在不同种群间基因交流的频率较高。TMV Europe 和 China Ⅰ种群 $N_m<1$,表明种群可能受到遗传漂变的影响,Europe 和 China Ⅱ,China Ⅰ和 China Ⅱ之间的 $N_m>1$,表明种群间存在可以发生基因交流的渠道。

表 1　TMV 的基因流动和遗传差异1)

Table 1　Gene flow and genetic differentiation of TMV

谱系及序列数 Lineage and number of sequences	参数 Parameter				
	K_s(P-valve)	Z(P-valve)	S_{nn}(P-valve)	F_{st}	N_m
Europe(n=18) vs. China Ⅰ(n=35)	4.095 43(0.000 0***)	370.344 08(0.000 0***)	0.979 17(0.000 0***)	0.241 85	0.78
Europe(n=18) vs. China Ⅱ(n=19)	4.118 81(0.000 0***)	272.173 17(0.000 0***)	0.940 54(0.000 0***)	0.165 36	2.52
China Ⅰ(n=35) vs. China Ⅱ(n=19)	4.380 52(0.000 0***)	711.919 51(0.000 0***)	0.932 20(0.000 0***)	0.129 04	3.39

1) *, $0.01<P<0.05$; **, $0.001<P<0.01$; ***, $P<0.001$。

2.4 选择压力分析

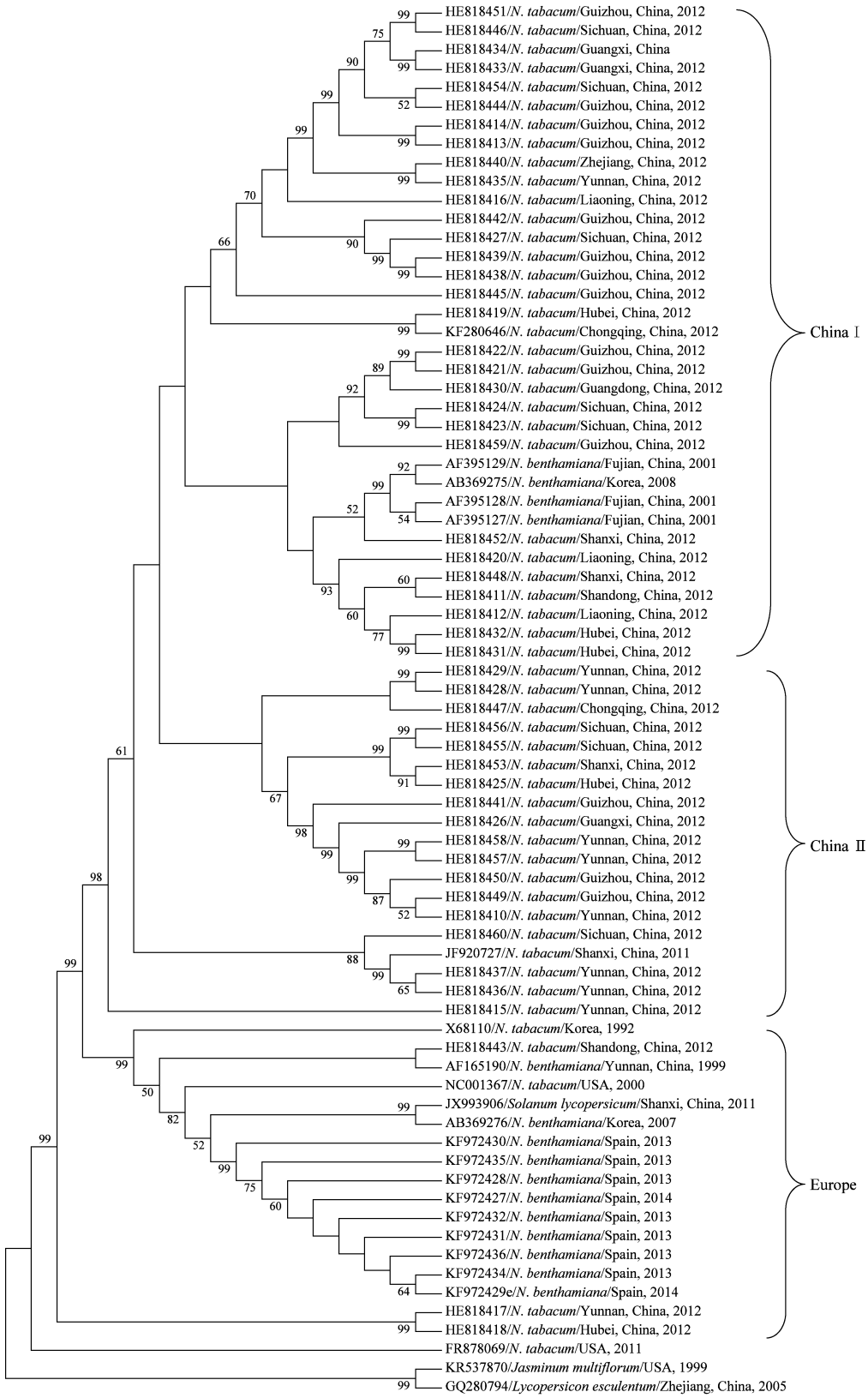
TMV 所有分离物的 d_N/d_S 的比率均远小于 1(表 2),突变为非同义突变,这表明 TMV 不同种群都处于较强的负选择压力下,受到自然界的纯化选择作用。

表 2　TMV 选择压力分析1)

Table 2　Selection pressure analysis of TMV

谱系 Lineage	序列数 Number of sequences	核苷酸多样性 Nucleotide diversity		
		d_N	d_S	d_N/d_S
Europe	18	0.02038±0.001 04	0.126 67±0.005 75	0.160 89
China Ⅰ	35	0.003 69±0.000 38	0.038 45±0.002 58	0.095 97
China Ⅱ	19	0.003 97±0.000 51	0.040 66±0.002 71	0.097 63
All	72	0.009 02±0.000 51	0.072 73±0.002 73	0.124 02

1) 表中数据为 d_N±标准差、d_S±标准差。下同。
Data in the table are d_N±SD, d_S±SD. The same below.



水平分支的长度参照0.05的标尺按比例绘制。以番茄花叶病毒分离物（登录号：KR537870，GQ280794）作为外群。
Horizontal branch lengths are drawn to scale, with the bar indicating 0.05 nt replacement per site. The sequences (accession nos. KR537870, GQ280794) from the isolates of *Tomato mosaic virus* were used as the outgroups.

图 1　基于 TMV 全基因组编码区序列采用最大似然法(ML)构建树

Fig. 1　Maximum likelihood tree calculated based on the complete genomic coding sequences of TMV

2.5　种群结构分析

在 TMV 分离物种群间的核苷酸序列差异介于 0.013 45±0.000 74 和 0.043 49±0.001 35 之间,欧洲分离物核苷酸序列多样性值比中国的差异大,单体型差异介于 0.980±0.028 和 0.997±0.008 之间,China Ⅰ 种群单体型差异更大(表 3)。

表 3　TMV 的核苷酸和单体型差异比较

Table 3　Comparison of the nucleotide and haplotype diversities of TMV

谱系 Lineage	序列数 The number of sequences	差异值 Differences	
		核苷酸多样性 Nucleotide diversity	单体型多样性 Haplotype diversity
Europe	18	0.043 49±0.001 35	0.980±0.028
China Ⅰ	35	0.013 45±0.000 74	0.997±0.008
China Ⅱ	19	0.014 57±0.000 75	0.994±0.019
All	72	0.025 60±0.000 89	0.998±0.003

2.6　突变位点和保守区域分析

突变位点分析发现有可变位点 1 423 个,单突变位点 604 个,其中两个变异型 569 个,三个变异型 35 个,简约信息位点 819 个,其中两个变异型 643 个,三个变异型 168 个,四个变异型 8 个。

保守区域分析发现 TMV 整个编码区的保守性(Sequence conservation)高达 0.76,基因编码的氨基酸保守值(conservation threshold)高于 0.85 的保守区域共有 6 个(conserved regions)(表 4)。由此可见,TMV 基因编码区突变率很低,比较保守。

表 4　TMV 基因编码区的保守区域

Table 4　Conserved regions of the coding sequences of TMV

保守区域 Conserved Region	位置 Location	保守性 Sequence conservation	一致性 Consistency	*P* 值 *P*-value
1	814～926	0.876	0.988	0.001 5
2	2 068～2 189	0.869	0.989	0.002 0
3	3 569～3 638	0.871	0.991	0.015 7
4	3 583～3 652	0.886	0.994	0.006 6
5	4 609～4 740	0.879	0.994	0.000 4
6	4 744～4 854	0.874	0.993	0.002 0

2.7　中性检测分析

TMV 不同组间的中性检测统计值均为负值,说明 TMV 种群多态性较低,处于扩张趋势(表 5)。总体而言,在独特的地理分组中进行 3 个中性平衡模型偏差分析,连同其高单体型多样性及低核苷酸多样性,揭示了 TMV 种群在扩张。

表 5　TMV 的中性检测

Table 5　Neutrality tests of TMV

谱系 Lineage	序列数 Number of sequences	Tajima's D	Fu & Li's D	Fu & Li's F
Europe	18	−1.952 77	−2.227 88	−2.467 92
China Ⅰ	35	−1.922 83	−1.598 70	−2.036 97
China Ⅱ	19	−1.231 99	−1.169 93	−1.399 33
All	72	−2.403 21	−4.596 02	−4.423 11

3　结论与讨论

关于 TMV 基因组的研究多集中在 TMV 分离物复制酶、MP、CP 序列结构或比较分析方面,而对 TMV 分子变异进化报道很少。对 TMV 全基因组编码区序列进行了重组、系统发育、遗传变异、基因交流和种群结构分析,结果表明 TMV 分离物没有明显的重组体,所有的分离物可以分为 China Ⅰ、China Ⅱ 和 Europe 3 个种群,种群间具有比较明显的地理相关性。在不同群组间的遗传变异明显,基因交流的频率较高,Europe 和 China Ⅰ 种群可能受到遗传漂变影响,Europe 和 China Ⅱ、China Ⅰ 和 China Ⅱ 之间存在可以发生基因交流的渠道。TMV 欧洲分离物核苷酸序列多样性值比中国的差异大,China Ⅰ 种群单体型差异较大,地缘关系较近的不同种群都处于较强的负选择压力下,并处于扩张趋势中,负选择和突变是潜在的驱动 TMV 分子进化的动力,自然选择是 TMV 进化过程中的有效推动力。

在植物 RNA 病毒中,重组是遗传多样性的重要来源,也是促进进化的主要动力之一[31],如马铃薯 Y 病毒科 *Potyviridae* 中重组发生特别频繁,对塑造 PVY 种群遗传结构产生很重要的影响[32]。重组不仅能帮助病毒适应新寄主或扩大寄主范围,也可使病毒的致病力发生改变从而更加适应当地的环境。但在不同 RNA 病毒间重组率差异很大,对 TMV 全基因组的编码区进行重组分析中,并没有发现重组现象。尽管由于分离物数量以及来源地比较单一等方面的限制,可能导致某些重组体未被发现,但是相对于 PVY 重组在驱动 TMV 进化方面,不能起到与其类似的作用[33]。中国 TMV 的发生率一直相对比较稳定,可能与 TMV 不存在重组株系有一定的关系。

系统发育分析中,TMV 分离物形成 3 个相对独立的种群,种群间具有一定的地理特异性。China Ⅰ

聚集了除云南外中国各地区分离物，China Ⅱ以云南、贵州、四川分离物为主体，TMV 中国分离物在不同省份间形成两个独立的分支，遗传变异明显，可能不同种群独立进化。Europe 种群绝大部分来源于西班牙和美国，但也有个别中国分离物，表明 TMV 种群在中国与欧洲之间交流较频繁。TMV 3 个种群起源于何处？又是怎样传播的？什么因素导致云南分离物与中国其他地区分离物种群间有明显遗传差异？推测中国种群起源有可能与烟草传入中国有关，中国种群由美洲（美国）迁入欧洲（西班牙），再由欧洲进入中国，在中国又分为南北两条途径，可能由于地理阻隔等原因导致各自独立进化，形成了云南和其他地区种群，因不同地区间烟草种苗交流传播，使得两个种群间既有遗传差异，也有基因相互交流。对于这个推测，尚需要进一步的试验验证。

病毒在寄主体内是以“突变云”或者“准种”形式存在，突变是驱动 TMV 进化的主要作用力之一。利用 d_N/d_S 的值，计算选择压力，大部分植物病毒处于强的负选择压力下。TMV d_N/d_S 远小于 1，表明 TMV 进化受到强的负选择压力的驱动，自然选择是其进化的主要驱动力。变异分析发现 TMV 的种群遗传结构相对比较稳定，基因组序列变异较少，比较保守，这与宋丽云[34]的研究结果一致；而谢扬军[35]解释各分离物之间的差异，是由于 TMV 主要以点突变的方式来适应不同的生态环境带来的选择压力而造成的。

大量的研究表明，培育抗病毒品种是植物病毒病害防治经济有效的方法之一。但植物病毒一般具有广泛的寄主和较强的地域适应性，在与寄主植物互作过程中，易发生株系分化和变异，造成抗病品种抗性的减弱和丧失，使抗病毒育种工作难度加大。要减轻或者消除 TMV 对烟草等作物生长所带来的不利影响，培育抗病毒品种，必须弄清病毒的遗传变异机制，开展种群遗传研究，追踪病毒的起源、进化以及流行途径，才能为抗病毒病育种提供指导。深入分析 TMV 的重组、系统发育、遗传变异、种群结构等分子进化机制，结果表明 TMV 种群间不存在重组现象，种群结构相对稳定，基因组序列变异少，因此培育抗病毒品种可能是防治 TMV 持久有效的方法之一。本研究开展的 TMV 全基因组编码区序列分子进化分析，深入揭示 TMV 分子变异进化特征，对 TMV 的抗病育种和病害防治具有重要意义。

参考文献

[1] 朱贤朝，王彦亭，王智发. 中国烟草病害[M]. 北京：中国农业出版社，2002：76－89.

[2] 洪健，李德葆，周雪平. 植物病毒分类图谱[M]. 北京：科学出版社，2001：189－193.

[3] 邵碧英，吴祖建，林奇英，等. 烟草花叶病毒及其弱毒株基因组的 cDNA 克隆和序列分析[J]. 植物病理学报，2003，33(4)：296－301.

[4] Korbelin J，Willingmann P，Adam G，et al. The complete sequence of *Tobacco mosaic virus* isolate Ohio V reveals a high accumulation of silent mutations in all open reading frames [J]. Archives of Virology，2012，157(2)：387－396.

[5] Peña E J，Ferriol I，Sambade A，et al. Experimental virus evolution reveals a role of plant microtubule dynamics and TORTIFOLIA1/SPIRAL2 in RNA trafficking[J]. PLoS ONE，2014，9(8)：e105364－e105364.

[6] Fillmer K，Adkins S，Pongam P，et al. Complete genome sequence of *Tomato mosaic virus* isolated from jasmine in the United States [J]. Genome Announcements，2015，3(4)：e00706－e00715.

[7] 王劲波，王凤龙，钱玉梅，等. 山东烟区主要病毒的株系鉴定[J]. 中国烟草学报，1998，4(1)：24－32.

[8] 雷彩燕，王振跃，张振臣，等. 烟草花叶病毒株系研究进展[J]. 河南农业科学，2005(12)：14－16.

[9] Goelet P，Lomonossoff G P，Butler P J G，et al. Nucleotide sequence of *Tobacco mosaic virus* RNA [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences，USA，1982，79：5818－5822.

[10] Regenmortel M H V V，Fauquet C M，Bishop D H L，et al. Virus taxonomy：classification and nomenclature of viruses：seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. San Diego：Academic Press，2000.

[11] 贾琳，姚玉婷，肖明. 猪瘟病毒编码区基因选择压力及重组分析[J]. 科学通报，2013，58(34)：3570－3578.

[12] 张新珩，刘远佳，吴波良，等. 广东省鸡传染性贫血病毒编码区基因的克隆与分子进化分析[J]. 中国兽医学报，2014，34(3)：402－405.

[13] 丁铭，方琦，张丽珍，等. 云南五个不同地区烟草花叶病毒外壳蛋白基因的序列比较[J]. 中国病毒学，2004，19(1)：76－78.

[14] 秦西云，卢训，方琦，等. 云南烟草中烟草花叶病毒株系比较与分析[J]. 中国烟草学报，2013，19(6)：106－113.

[15] 刘金亮，王凤婷，魏毅，等. 烟草花叶病毒南瓜分离物 CP 基因的克隆、序列分析及其原核表达[J]. 华北农学报，2010，25(5)：6－10.

[16] Alzohairy A M. BioEdit：An important software for molecular biology [J]. Gerf Bulletin of Biosciences，2011，2(1)：60－61.

[17] Larkin M A，Blackshields G，Brown N P，et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics，2007，23(21)：2947－2948.

[18] Goffard N，Weiller G. PathExpress：a web-based tool to identify relevant pathways in gene expression data[J]. Nucleic Acids Research，2007，35(S2)：176－181.

（下转 107 页）

Crop Protection, 1998, 17(5): 373 - 386.

[8] Taylor W E. Recent trends in grain legume pest research in Sierra Leone [M]// Singh S R, van Emden H F, Taylor T A. Pests of grain legumes: ecology and control. London: Academic Press Inc. (London) Ltd. , 1978: 93 - 98.

[9] Jackai L E N. Use of an oil-soluble dye to determine the oviposition sites of the legume pod borer, *Maruca testulalis* (Geyer) (Lepidoptera: Pyralidae)[J]. Insect Science and its Application, 1981, 2(4): 205 - 207.

[10] Sharma H C, Saxena K B, Bhagwat V R. The legume pod borer, *Maruca vitrata*: bionomics and management [R]. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics: Information Bulletin No. 55, 1999.

[11] 文礼章,肖新平,邓培云. 豆荚野螟的生物学特性与防治技术研究[J]. 昆虫知识, 2000, 37(5): 274 - 278.

[12] Karel A K. Yield losses from and control of bean pod borers, *Maruca testulalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 1985, 78(6): 1323 - 1326.

[13] Arodokoun D Y, Tamò M, Cloutier C, et al. Importance of alternative host plants for the annual cycle of the legume pod borer, *Maruca vitrata* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) in Southern and Central Benin [J]. Insect Science and its Application, 2003, 23(2): 103 - 113.

[14] 王琳,沈叔平,曾玲. 豆荚野螟卵在寄主上分布的研究[C]// 中国昆虫学会 2001 年学术年会. 北京:中国农业科技出版社,2001.

[15] Wang Pan, Lu Pengfei, Zheng Xialin, et al. New artificial diet for continuous rearing of the bean pod borer, *Maruca vitrata* [J]. Journal of Insect Science, 2013, 12 (121): 1 - 11.

[16] Atachi P, Dannon E A, Arodokoun Y D, et al. Distribution and sampling of *Maruca vitrata* (Fabricius) (Lep. , Pyralidae) larvae on *Lonchocarpus sericeus* (Poir) HB and K [J]. Journal of Applied Entomology, 2002, 126(4): 188 - 193.

[17] Costa A M, Amorim F O, Anjos-Duarte C S, et al. Influence of different tropical fruits on biological and behavioral aspects of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) [J]. Revista Brasileira de Entomologia, 2011, 55(3): 355 - 360.

[18] 钦俊德. 植食性昆虫食性的生理基础[J]. 昆虫学报, 1980, 23 (1): 106 - 122.

[19] 张庆贺,姬兰柱. 植食性昆虫产卵的化学生态学[J]. 生态学杂志, 1994, 13(6): 39 - 43.

[20] Jayasinghe R C, Premachandra W T S D, Neilson R. A study on *Maruca vitrata* infestation of Yard-long beans (*Vigna unguiculata* subspecies *sesquipedalis*) [J]. Heliyon, 2015, 1(1): e00014.

(责任编辑: 田　喆)

(上接 92 页)

[19] Martin D P. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes [J]. Virus Evolution, 2015,1(1): vev003.

[20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731 - 2739.

[21] Tomitaka Y, Ohshima K. A phylogeographical study of the *Turnip mosaic virus* population in East Asia reveals an 'emergent' lineage in Japan [J]. Molecular Ecology, 2006, 15(14): 4437 - 4457.

[22] Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging [J]. Molecular Biology and Evolution, 2008, 25(7): 1253 - 1256.

[23] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. Genetics, 1997, 147(2): 915 - 925.

[24] Hudson R R. A new statistic for detecting genetic differentiation [J]. Genetics, 2000, 155(4): 2011 - 2014.

[25] Pamilo P, Bianchi N O. Evolution of the Zfx and Zfy genes: rates and interdependence between the genes [J]. Molecular Biology and Evolution, 1993, 10(2): 271 - 281.

[26] Nguyen, H D, Tran, H T N, Ohshima K. Genetic variation of the *Turnip mosaic virus* population of Vietnam: a case study of founder, regional and local influences [J]. Virus Research, 2013, 171(1): 138 - 149.

[27] Yin Xiao, Zheng Fangqiang, Tang Wei, et al. Genetic structure of *Rice black-streaked dwarf virus* populations in China [J]. Archives of Virology, 2013, 158(12): 2505 - 2515.

[28] Fu Y X, Li W H. Statistical tests of neutrality of mutations [J]. Genetics, 1993, 133(3): 693 - 709.

[29] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. Genetics, 1989, 123 (3): 585 - 595.

[30] Librado P, Rozas J. DnaSP v 5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451 - 1452.

[31] Roossinck, M J. Mechanisms of plant virus evolution [J]. Annual Review of Phytopathology, 1997, 35: 191 - 209.

[32] Cuevas J M, Delaunay A, Rupar M, et al. Molecular evolution and phylogeography of *Potato virus Y* based on the CP gene [J]. Journal of General Virology, 2012, 93: 2496 - 2501.

[33] Ogawa T, Nakagawa A, Hataya T, et al. The genetic structure of populations of *Potato virus Y*, in Japan; based on the analysis of 20 full genomic sequences [J]. Journal of Phytopathology, 2012, 160(11/12): 661 - 673.

[34] 宋丽云. 我国烟草 TMV 和 CMV 种群结构遗传分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.

[35] 谢扬军. 烟草普通花叶病毒株系分化研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.

(责任编辑: 田　喆)