江苏省扬州市水仙病毒检测鉴定与序列分析

张 坤， 陈 雯， 甘海峰， 罗云建， 陈夕军， 贺 振*

（扬州大学园艺与植物保护学院，扬州 225009）

摘要 水仙属于石蒜科水仙属，是重要的观赏花卉之一。2016 年－2017 年，在江苏省扬州市采集的水仙上发现典型的花叶、条斑等病毒病症状。利用已报道的水仙病毒通用引物对疑似病样进行 RT-PCR 检测，结果表明，扬州采集到的 3 份病样上均能扩增到与预期大小相同的 DNA 片段。经克隆测序和序列分析发现，所得序列包含 3 种不同的类型，分别与水仙普通潜隐病毒 *Narcissus common latent virus*（NCLV）、水仙退化病毒 *Narcissus degeneration virus*（NDV）和水仙黄条病毒 *Narcissus yellow stripe virus*（NYSV）有 93%、98%和 99%的相似性，表明江苏水仙受到了 NCLV、NDV、NYSV 3 种病毒侵染。这是江苏水仙上第一次发现 NCLV、NDV、NYSV。在系统树中，NCLV 可分为两个组，本研究所得 NCLV-YZ 与上海分离物位于同一组中；NDV 也可分为两个组，本研究所得 NDV 与其他中国分离物均位于第二组；而 NYSV 具有很高的多样性，可分为 4 个组，本研究所得 NYSV 与其他部分中国分离物和日本分离物位于第一组。NCLV 和 NDV 分组具有清晰的地理差异性，而 NYSV 受到地理隔离的影响不明显。

关键词 水仙病毒； 检测； 序列分析

中图分类号： S 436.81 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2018448

Detection, identification and sequence analysis of narcissus viruses in Yangzhou city, Jiangsu province

ZHANG Kun, CHEN Wen, GAN Haifeng, LUO Yunjian, CHEN Xijun, HE Zhen

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

Abstract Narcissus is an important ornamental flower, which belongs to the family Amaryllidaceae. In 2016－2017, typical viral infection symptoms, such as mosaic, and streak, appeared on Narcissus in Yangzhou, Jiangsu province. The previously reported narcissus virus universal pair of primers were used to perform the RT-PCR, and the results showed that the expected DNA fragments could be amplified from three samples collected from Yangzhou. Cloning, sequencing and analysis showed that the amplified sequence contained three different types, with 93%, 98% and 99% identities with the *Narcissus common latent virus* (NCLV), *Narcissus degeneration virus* (NDV) and *Narcissus yellow stripe virus* (NYSV), respectively. These results suggested that narcissus was infected by three viruses, NCLV, NDV and NYSV. This is the first report that the narcissus was infected by NCLV, NDV and NYSV in Jiangsu province. In the phylogenetic tree, all NCLV isolates were divided into two groups, while NCLV-YZ clustered with Shanghai isolates as one group; all NDV isolates were divided into two groups, and NDV-YZ clustered into group Ⅱ together with other Chinese isolates; all NYSV isolates were divided into four groups with highest diversity, and NYSV-YZ clustered into group Ⅰ together with some Chinese and Japanese isolates. The phylogenetic tree constructed with both NCLV and NDV rather than NYSV reflected obvious geographical specificity.

Key words narcissus viruses; detection; sequence analysis

水仙 *Narcissus tazetta* 为多年生草本植物，属于石蒜科 Amaryllidaceae 水仙属 *Narcissus*，是重要的观赏花卉之一。中国水仙 *N. tazetta* var. *chinensis* 是水仙属中观赏价值极高的一类，也是化工和制药业中的重要资源植物[1]。由于水仙长期无性繁殖，致使病毒在体内不断积累，严重影响水仙产品的外观和品

收稿日期： 2018－10－21 **修订日期**： 2019－01－02
基金项目： 国家自然科学基金(31601604,31500388)；江苏省重点研发计划(现代农业)项目(BE2018359)
* 通信作者 E-mail:hezhen@yzu.edu.cn

质,成为水仙生产的重要制约因素之一[2]。目前,在水仙上发现的病毒有 20 余种,主要以马铃薯病毒科 *Potyviridae*、线性病毒科 *Flexiviridae* 和豇豆花叶病毒科 *Secoviridae* 病毒为主[3]。

水仙普通潜隐病毒 *Narcissus common latent virus*(NCLV)属于乙型线状病毒科 *Betaflexiviridae* 香石竹潜隐病毒属 *Carlavirus*,病毒粒体线状,其基因组是一条正义单链 RNA,全长 8 539 个核苷酸(nucleotide,nt),含有 6 个开放阅读框[4]。基因组序列比对和系统进化树分析表明与其亲缘关系最近的是马铃薯 M 病毒 *Potato virus M*(PVM)、啤酒花潜隐病毒 *Hop latent virus*(HpLV)和乌头潜隐病毒 *Aconitum latent virus*(AcLV)[5]。NCLV 侵染水仙后,常常无明显症状。

水仙退化病毒 *Narcissus degeneration virus*(NDV)属于马铃薯病毒科 *Potyviridae* 马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus*,在中国主要分布于上海崇明[6]和福建漳州[7];在新西兰[8]和澳大利亚[9]也有报道。NDV 侵染水仙后在叶片上表现褪绿条纹、斑驳、畸形等症状。

水仙黄条病毒 *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV)也属于马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus*。NYSV 感染植株的典型症状是叶脉呈黄色条斑,病情严重时植株瘦小、矮化,和其他病毒复合侵染时症状更为严重。有报道其与水仙迟黄病毒 *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV)复合侵染能够引起叶片变黄,花朵的质量下降[10]。

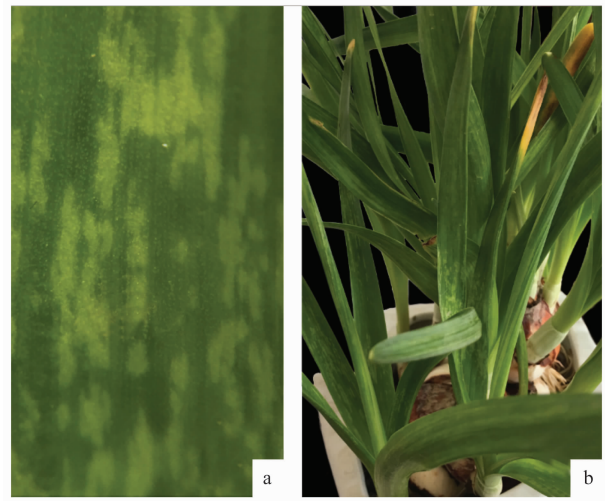
为明确江苏省水仙病毒的发生情况,2016 年—2017 年,我们收集了水仙上表现花叶、黄色条斑等典型的病毒病害症状样品,提取总 RNA,采用 RT-PCR 序列测定和比对分析,结果鉴定到 3 种病毒,分别为 NDV、NCLV 和 NYSV,并对这 3 种病毒进行了序列和系统发育分析。

1　材料与方法

1.1　材料

供试植物:2016 年—2017 年度,在江苏省扬州市开心农场、花卉市场、高邮市花卉市场采集到表现黄化、花叶和斑驳等疑似病毒病症状(图 1)的样品共 9 株。

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



a: 叶片; b: 植株
a: Leaf; b: Plant

图 1　采自江苏省扬州市的患病毒病水仙

Fig. 1　Narcissus samples collected from Yangzhou, Jiangsu province

试剂:TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit、5×M-MLV Buffer、dNTPs、RNA 酶抑制剂、反转录酶 M-MLV、Marker、pMD19-T 载体,宝生物工程(大连)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;烟草脆裂病毒 ELISA 试剂盒,上海桥杜生物科技有限公司;2× *Taq* Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司。

仪器:Eppendorf AG 22331 PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;培清 JS-680B 凝胶成像系统,上海培清公司;XW-80A 型漩涡振荡器,上海青浦沪西仪器厂;DYCP-28A、DYCP-31A 型电泳槽,北京市六一仪器厂;Thermo Scientific MicroCL 17 微量离心机,Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2　方法

1.2.1　叶片总 RNA 提取

取 0.1 g 水仙叶片,参照 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒说明书,提取总 RNA。最终将 RNA 溶解于 40 μL 无核酸酶水中。

1.2.2　cDNA 合成及 PCR 扩增、克隆和序列测定

利用反转录酶 M-MLV(Promega),通过水仙病毒反向通用引物 Tu3T9M(5′-AAAAAAAAAA-AAAAAGAGCTCGGA-3′)[11-13]将总 RNA 反转录成第 1 链 cDNA。在 PCR 管中依次加入下列试剂:20 μmol/L 下游引物 Tu3T9M 1 μL、700 ng/μL 总 RNA 1 μL、无核酸酶水 4 μL。混匀离心后,于 70℃

孵育 10 min，然后迅速置于冰上冷却 2 min。离心 5 s后再加入下列试剂：5×M-MLV Buffer 2 μL、dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL、40 U/μL RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor) 0.25 μL、200 U/μL 反转录酶 M-MLV 0.25 μL、无核酸酶水 1 μL。混匀后离心 5 s，于 42℃孵育 1 h，70℃孵育 15 min，冰上冷却 2 min。得到的 cDNA 溶液保存于－20℃待用。

以获得的 cDNA 为模板。50 μL PCR 反应体系：cDNA 2 μL、水仙病毒通用引物 Tu3T9M 和 POTYNIbNOT4P(5′-GGGGCGGCCGCATATGGGGTGAGAGAGGTNTGYGTNGAYGAYTTYAAYAA-3′) 各 2 μL、5 U/μL 2×*Taq* Master Mix 25 μL、超纯水 19 μL。PCR 反应条件：94℃变性 1 min，按下列条件进行 30 个循环：94℃变性 30 s，60℃退火 30 s，72℃延伸 1 min 30 s，最后 72℃延伸 10 min。全部 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后，切取大小为 1 000～1 500 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* DH5α。经菌液 PCR 验证阳性克隆后，随机选取 20 个克隆由生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，所得序列利用 BLASTn 和 BioEdit 软件进行序列比对和分析。

1.2.3 多样性比对和系统发育分析

分别以马铃薯 M 病毒（KY364848）、芜菁花叶病毒 *Turnip mosaic virus*（AB701690）和芜菁花叶病毒 TuMV（KT934662）作为 NCLV、NDV 和 NYSV 比对分析的外组。将 GenBank 中已登录的 4 个 NCLV 分离物，18 个 NDV 分离物，38 个 NYSV 分离物与本研究中获得的序列，通过 DNAMAN、Clustal X2 和 transAlign（由 Georg Weiller 教授惠赠）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。

用软件 MEGA 7.0 对上述 3 组序列通过邻接法（neighbor-joining，NJ）进行系统发育分析，用自举法（bootstrap）进行 1 000 次模拟复制计算检验。

2 结果与分析

2.1 水仙样品 RT-PCR 检测

利用水仙病毒通用引物 Tu3T9M 和 POTYNIbNOT4P 进行 RT-PCR 扩增，在 YZ7、YZ8、YZ15 三个样品中有与预期大小相同的特异片段，长度在 1 000～1 500 bp 之间，健康的水仙样品中未扩增出任何片段。

2.2 序列鉴定

将检测出来的 YZ7、YZ8、YZ15 进行克隆测序，发现了 3 个不同的序列。BLASTn 比对结果显示这 3 个序列分别与上海崇明水仙上分离的 NCLV（EU200454）和 NDV（AJ311374）具有 93%和 98%的相似性，与福建漳州水仙上分离的 NYSV（AM158908）有 99%的相似性。表明江苏水仙受到了 NCLV、NDV、NYSV 3 种病毒侵染。其中，NCLV 测定获得长 1 445 nt 基因组 C 端序列，包括部分的三联体运动蛋白 2（triple-gene block 2，TGB2）序列（132 nt），完整的外壳蛋白（coat protein，CP）序列（906 nt）和核酸结合蛋白（nucleic acid-binding protein，NABP）序列（327 nt），完整的 3′端非编码区（3′-untranslated region，3′-UTR）序列（75 nt）；获得 NDV 的片段长度为（1 177 nt），包括 243 nt 的核内含体 b 蛋白（nuclear inclusion b protein，NIb）片段，全部的 CP 序列（786 nt）和 3′-UTR 序列（148 nt）；NYSV 的片段长 1 276 nt，包括 240 nt 的 NIb 片段，完整的 CP 序列（825 nt）和 3′-UTR 序列（211 nt）。将这 3 个分离物序列提交到 GenBank 数据库中，所得 NCLV、NDV 和 NYSV 扬州分离物（YZ）序列的登录号分别为 MH182708、MH1824726 和 MH582714。

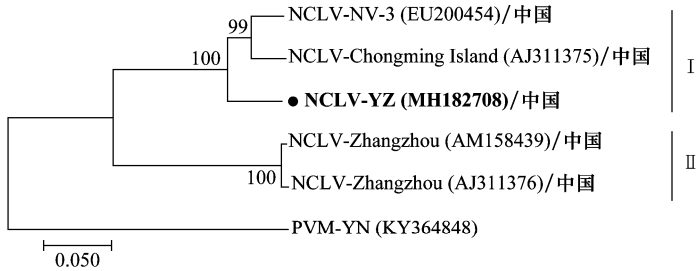
2.3 多样性分析和系统发育分析结果

将得到的分离物序列与 GenBank 登录的 NCLV、NDV 和 NYSV 的 CP 和 3′-UTR 核苷酸序列通过 DNAMAN 和 Clustal X2 进行相似性比对。结果显示，NCLV-YZ CP 序列和福建分离物（AM158439 和 AJ311376）的同源性为 77.4%；与上海分离物（EU200454 和 AJ311375）的序列同源性约 92.1%。而在 3′-UTR 序列上，NCLV-YZ 与福建分离物（AM158439、AJ311376）、上海分离物（EU200454、AJ311375）的序列同源性在 94.7%～97.3%（表 1）。序列分析表明，NCLV-YZ 与上海分离物遗传关系较近，而与福建分离物存在较大的遗传差异。系统发育分析结果与之类似，依据 CP 基因序列，NCLV 分为两个组，NCLV-YZ 与上海分离物位于同一组中，福建分离物位于另外一个组中（图 2）。这表明在国内，NCLV 具有较为明显的地理差异性。

表 1　NCLV-YZ 分离物与已报道的其他分离物在 CP 和 3′-UTR 区域的同源性分析

Table 1　Nucleotide identity analysis of CP and 3′-UTR between NCLV-YZ isolate and other reported isolates

登录号 Accession no.	地理来源 Geographic origin	寄主 Host	一致率/% Identity	
			CP	3′-UTR
AM158439	中国福建 Fujian, China	*Narcissus tazetta* var. *chinensis*	77.4	94.7
EU200454	中国上海 Shanghai,China	*N. tazetta* var. *chinensis*	92.1	96.0
AJ311375	中国上海 Shanghai,China	*Narcissus* sp.	91.9	97.3
AJ311376	中国福建 Fujian, China	*Narcissus* sp.	77.4	94.7



分离物在进化树中以分离物名称(登录号)/采集地点的形式表示。PVM的核酸序列(KY364848)作为外组。黑色圆点标注的是本研究获得的分离物

Isolates are indicated in the tree by isolate name (accession number)/geographical origin of collection. The nucleotide sequence of PVM (KY364848) was used as outgroup. The isolate marked by dot is obtained in this study

图 2　基于 CP 基因核苷酸构建的 NCLV 与其他 NCLV 分离物的系统进化树

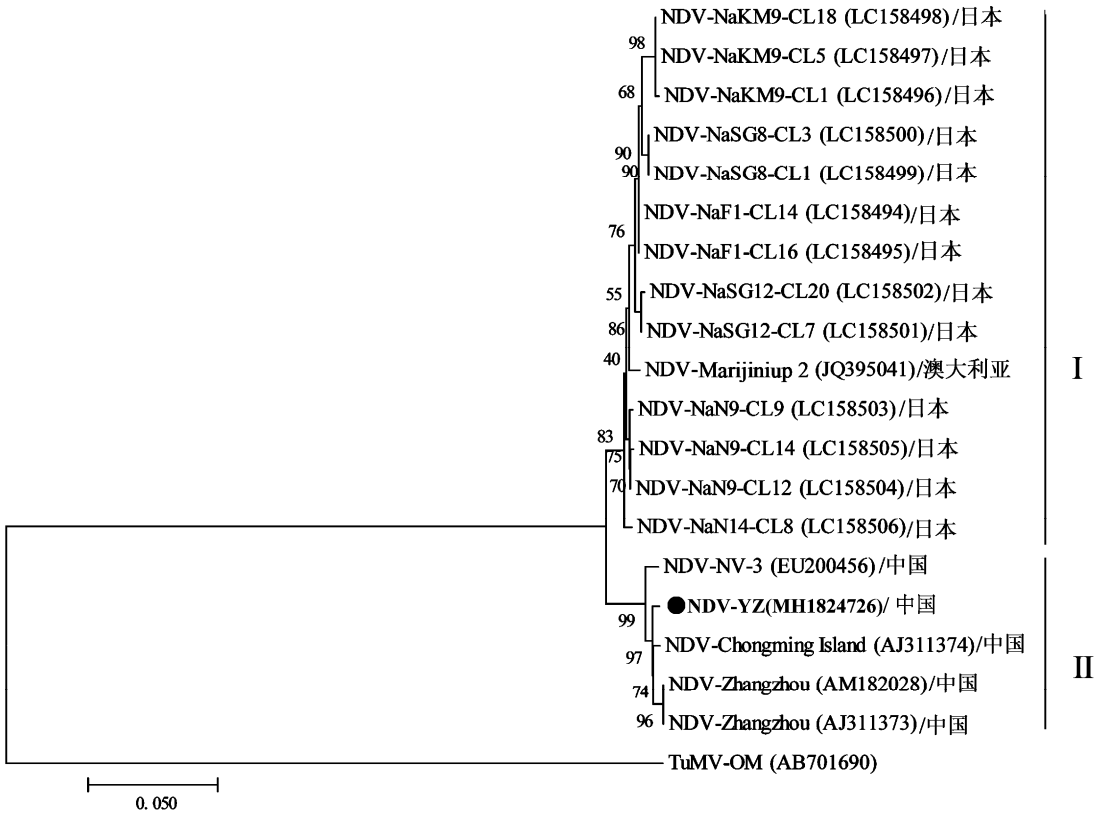
Fig. 2　Phylogeny tree of NCLV and other NCLV isolates based on CP gene nucleotide sequences

NDV-YZ 的 CP 序列与已经报道的福建、上海、澳大利亚和日本分离物的同源性都在 96%以上。并且 3′-UTR 序列与已经报道的序列同源性都在 97%以上（表 2）。序列分析表明,NDV-YZ 与已报道的分离物遗传关系都较近。系统发育分析表明,日本、澳大利亚的分离物聚成一组,中国分离物聚为第二组（图 3）。该结果表明,尽管 NDV 不同来源分离物间具有较低的遗传分化,但仍受到较为清晰的地理隔离的影响。

表 2　NDV-YZ 与已报道的其他分离物在 CP 和 3′-UTR 区域的相似性分析

Table 2　Nucleotide identities of CP and 3′-UTR regions between NDV-YZ isolate and other reported isolates

登录号 Accession no.	地理来源 Geographic origin	寄主 Host	一致率/% Identity	
			CP	3′-UTR
EU200456	中国上海 Shanghai, China	*Narcissus tazetta* var. *chinensis*	99.0	97.3
JQ395041	澳大利亚 Australia	*Narcissus* sp.	96.8	100.0
AM182028	中国福建 Fujian, China	*N. tazetta*	99.4	100.0
AJ311374	中国上海 Shanghai, China	*Narcissus* sp.	99.5	100.0
AJ311373	中国福建 Fujian, China	*Narcissus* sp.	99.4	100.0
LC158506	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	96.9	100.0
LC158505	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	97.1	100.0
LC158504	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	97.2	100.0
LC158503	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	97.1	100.0
LC158502	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	96.5	99.3
LC158501	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	96.7	99.3
LC158500	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	96.4	100.0
LC158499	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	96.4	100.0
LC158498	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	96.2	98.6
LC158497	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	96.2	98.6
LC158496	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	96.3	98.6
LC158495	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	96.8	100.0
LC158494	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	96.8	100.0



分离物在进化树中以分离物名称(登录号)/采集地点的形式表示。TuMV的核酸序列(AB701690)作为外组。黑色圆点标注的是本研究获得的分离物
Isolates are indicated in the tree by isolate name (accession number)/geographical origin of collection. The nucleotide sequence of TuMV (AB701690) was used as outgroup. The isolate marked by dot is obtained in this research

图 3 基于 CP 基因核苷酸构建的 NDV 与其他 NDV 分离物的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of NDV and other reported NDV isolates based on CP gene nucleotide sequences

NYSV-YZ 的 CP 序列与 GenBank 上已报道的分离物一致率为 77.3%～99.5%(表 3),其中与福建分离物(AM158908、NC011541、AJ311372)序列同源性最高(99.5%);与澳大利亚分离物(JQ395042)和日本分离物(LC314394)的序列同源性最低(77.3%)。NYSV-YZ 的 3′-UTR 序列与已报道报道的分离物一致率为 70.0%～100%(表 3)。根据 CP 系统发育分析结果,可将来自中国、日本、印度的 NYSV 分为 4 个组(图 4),NYSV-YZ 与部分中国和日本分离物聚为一组(第一组),各组间没有明显的地理特异性。

表 3 NYSV-YZ 与其他 NYSV 分离物在 CP 和 3′-UTR 区域的同源性

Table 3 Nucleotide identities of CP and 3′-UTR regions between NCLV-YZ isolate and others reported isolates

登录号 Accession no.	地理来源 Geographic origin	寄主 Host	一致率/% Identity	
			CP	3′-UTR
AM158908	中国福建 Fujian,China	*Narcissus tazetta* var. *chinensis*	99.5	100.0
JQ911732	中国福建 Fujian, China	*N. tazetta* var. *chinensis*	77.4	74.9
KU516386	中国福建 Fujian, China	*Narcissus*	95.7	96.1
JQ395042	澳大利亚 Australia	*Narcissus* sp.	77.3	70.9
JQ911735	中国福建 Fujian, China	*N. tazetta* var. *chinensis*	74.6	41.0
NC011541	中国福建 Fujian, China	*N. tazetta* var. *chinensis*	99.5	100.0
KM060972	印度 India	*N. tazetta*	95.7	96.1
JQ686724	印度 India	*Narcissus* sp.	87.7	77.3
AJ311372	中国福建 Fujian, China	*Narcissus* sp.	99.5	100.0
LC314391	日本 Oita, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	98.9	100.0
LC314392	日本 Kumamoto, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	77.8	70.0
LC314393	日本 Kumamoto, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	78.4	70.0
LC314394	日本 Chiba, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	77.3	74.9

续表 3　Table 3(Continued)

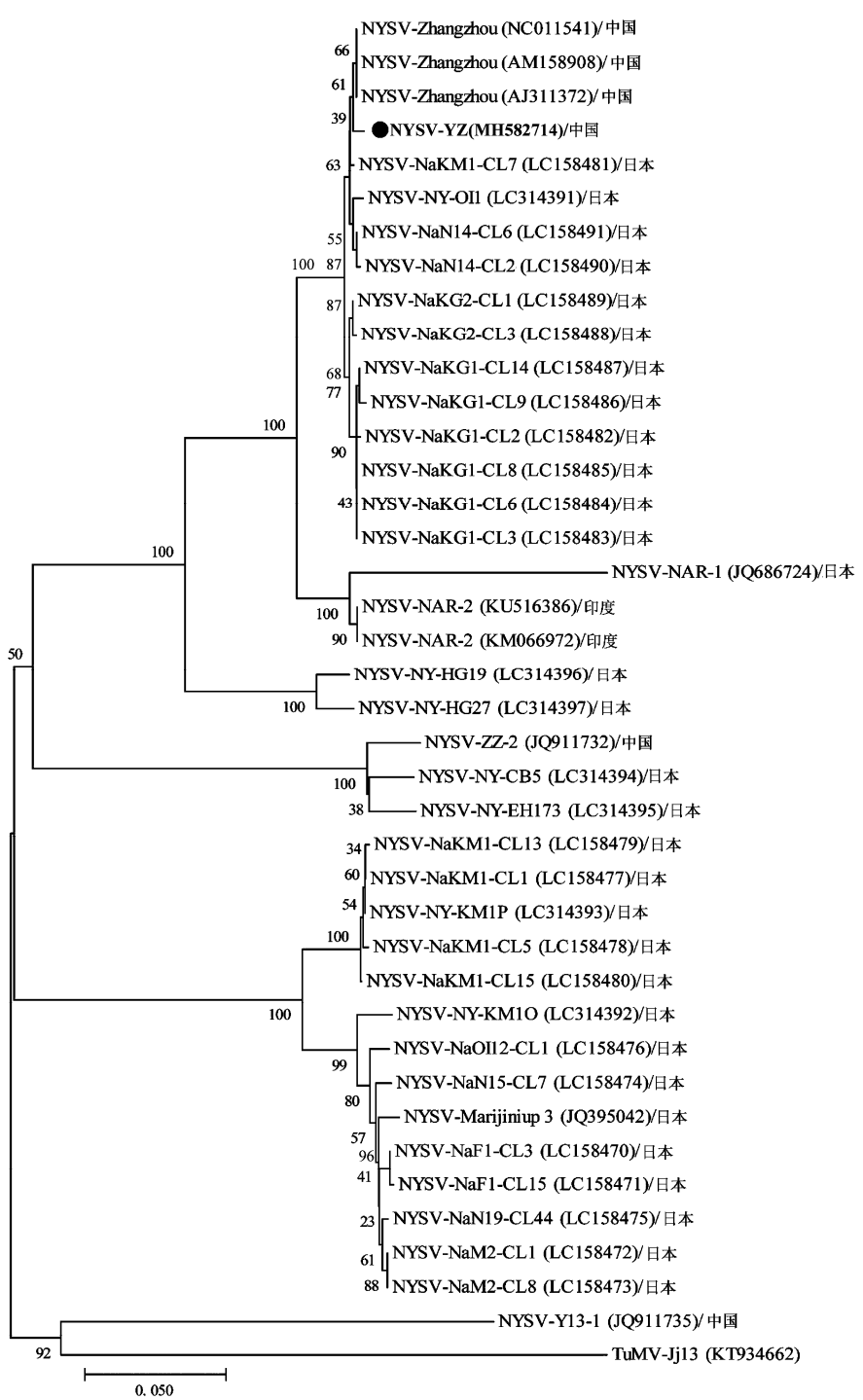
登录号 Accession no.	地理来源 Geographic origin	寄主 Host	一致率/% Identity	
			CP	3′-UTR
LC314395	日本 Ehime, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	87.3	76.8
LC314396	日本 Hyogo, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	88.2	95.6
LC314397	日本 Hyogo, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	88.2	97.0
LC314370	日本 Hyogo, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	77.7	70.4
LC314371.	日本 Hyogo, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	77.5	70.4
LC158472	日本 Hyogo, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	77.8	70.4
LC158473	日本 Hyogo, Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	77.8	70.4
LC158491	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	99.3	100.0
LC158490	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	99.1	100.0
LC158489	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	99.0	99.5
LC158488	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	98.9	99.5
LC158487	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	98.8	99.0
LC158486	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	98.5	99.5
LC158485	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	98.9	99.5
LC158484	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	98.9	99.5
LC158483	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	98.9	99.5
LC158482	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	98.8	99.0
LC158481	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	99.4	100.0
LC158480	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	78.5	70.0
LC158479	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	78.3	70.0
LC158478	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	78.4	70.0
LC158477	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	78.4	70.0
LC158476	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	77.8	70.4
LC158475	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	77.8	70.4
LC158474	日本 Japan	*N. tazetta* var. *chinensis*	77.7	70.4

3　讨论

目前,病毒病是水仙上经常暴发的一类病害,并且经常多种病毒复合侵染[1]。水仙大多以无性繁殖为主,种球一旦带毒,病毒将在种球内不断积累,导致种性退化并影响子代[14]。水仙病毒可汁液传播,寄主广泛,病毒介体主要是蚜虫和线虫[15]。水仙病毒病的防治极其困难,现主要的防治手段仍是加强病毒检疫来预防病毒病的暴发[2]。已经报道的水仙病毒病在中国主要分布在福建、上海、浙江等地区,国外主要分布在日本、澳大利亚、英国等。

本研究利用水仙病毒通用引物,从江苏省扬州市采集的水仙上鉴定到 3 种病毒,其中,NCLV 主要分布在中国,且在国内其分布也具有明显的地理差异性,NCLV-YZ 与上海分离物聚为一组,而福建漳州分离物聚为另一组,可能是由于目前国内水仙种球生产南北集中在福建省漳州市和江苏省宿迁市,而江苏和上海地区水仙可能来源于宿迁造成的。目前已报道的 NDV 集中在中国和日本,且不同来源的分离物间具有极高的相似性,但系统发育分析结果表明 NDV 在中国和日本间仍具有清晰的地理差异性。NYSV 在这 3 个病毒中具有最高的遗传差异,来自于中国、日本、印度的 NYSV 在不同组间相互交叉,没有明显的地理差异性,这表明 NYSV 不同株系都能在中国、日本、印度等地区侵染扩散。NYSV 可通过多种蚜虫以非持久性方式传播,包括甜菜蚜 *Aphis fabae*、豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 和大戟长管蚜 *Macrosiphum euphorbiae* 等[16]。NYSV 如此多样的遗传差异,可能正是由于上述多样的传播介体决定的。这与已报道的黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus*(CMV)、芜菁花叶病毒 *Turnip mosaic virus*(TuMV)、马铃薯 Y 病毒 *Potato virus Y*(PVY)和花椰菜花叶病毒 *Cauliflower mosaic virus*(CaMV)等相似[17-20]。

本研究在江苏省扬州市水仙上鉴定到 NCLV、NDV 和 NYSV,并且对这 3 种病毒分别进行了序列多样性的系统发育分析,明确了 NCLV、NDV 和 NYSV 扬州分离物与已报道的其他分离物遗传差异、聚类分布和地理特异性特征,为水仙病毒病的合理防控提供了理论依据。



分离物在进化树中以分离物名称(登录号)/采集地点的形式表示。TuMV的核酸序列(KT934662)作为外组。黑色圆点标注的是本研究获得的分离物

Isolates are indicated in the tree by isolate name(accession number)/geographical origin of collection. The nucleotide sequence of TuMV (KT934662) was used as outgroup. The isolate marked by dot is obtained in this study

图 4 基于 CP 基因核苷酸构建的 NYSV 与其他 NYSV 分离物的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of NYSV and other NYSV isolates based on CP gene nucleotide sequences

参考文献

[1] 陈段芬,高健,彭镇华. 水仙属植物研究进展[J]. 林业科学,2008,44(3):140-146.

[2] 郑红英,鲁宇文,沈嘉乐,等. 侵染水仙的虎眼万年青花叶病毒外壳蛋白的原核表达、抗血清制备及应用[J]. 浙江农业学报,2009,21(3):198-201.

[3] 郑红英,林林,鲁宇文,等. 水仙普通潜隐病毒基因组全序列及

其与香石竹潜隐病毒属病毒的关系[C]. 彭友良. 中国植物病理学会 2006 年学术年会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社,2006.

[4] 臧颖,严纯,戴凯新,等. 水仙病毒病研究进展[J]. 北方园艺,2019(5):153 - 160.

[5] ZHENG H Y, CHEN J, ADAMS M J, et al. Complete nucleotide sequence and affinities of the genomic RNA of *Narcissus common latent virus* (genus *Carlavirus*)[J]. Archives of Virology, 2006, 151(8):1667 - 1672.

[6] 梁艳,宋荣浩,杨翠云,等. 上海崇明水仙病毒病病原种类鉴定[J]. 植物病理学报,2008,38(5):456 - 461.

[7] 林双庆. 福建漳州水仙病毒病的病原鉴定及两病毒基因组全序列分析[D]. 福州:福建农林大学,2012.

[8] WARD L I, VEERAKONE S, TANG J, et al. First report of *Narcissus degeneration virus*, *Narcissus late season yellows virus*, and *Narcissus symptomless virus* on Narcissus in New Zealand [J]. Plant Disease, 2009, 93(9): 964.

[9] CHEN J, CHEN J P, LANGEVELD S A, et al. Molecular characterization of Carla-and Potyviruses from *Narcissus* in China [J]. Journal of Phytopathology, 2010, 151(1): 26 - 29.

[10] WYLIE S J, JONES M G. Complete genome sequences of seven carlavirus and potyvirus isolates from *Narcissus* and *Hippeastrum* plants in Australia, and proposals to clarify their naming [J]. Archives of Virology, 2012, 157(8):1471 - 1480.

[11] WYLIE S J, LI Hua, SIVASITHAMPARAM K, et al. Complete genome analysis of three isolates of *Narcissus late season yellows virus* and two of *Narcissus yellow stripe virus*: three species or one? [J]. Archives of Virology, 2014, 159(6):1521.

[12] ZHENG L, RODONI B C, GIBBS M J, et al. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses [J]. Plant Pathology, 2010, 59(2):211 - 220.

[13] OHSHIMA K, MURAOKA S, YASAKA R, et al. First report of *Scallion mosaic virus*, on wild Japanese garlic (*Allium macrostemon*) in Japan [J]. Journal of General Plant Pathology, 2015, 82(1):1 - 4.

[14] OHSHIMA K, NOMIYAMA R, MITOMA S, et al. Evolutionary rates and genetic diversities of mixed potyviruses in *Narcissus* [J]. Infection Genetics & Evolution, 2016, 45:213 - 223.

[15] 林含新, 林奇英. 水仙病毒病及其研究进展[J]. 植物检疫, 1996(4): 227 - 229.

[16] 沈建国, 高芳銮, 蔡伟, 等. 进境欧洲水仙种球上病毒的检测与鉴定[J]. 植物保护学报, 2017, 44(2): 283 - 289.

[17] 沈建国, 高芳銮, 林双庆, 等. 一步 RT-PCR 检测水仙黄条病毒[J]. 生物技术, 2014(1): 44 - 48.

[18] RYOSUKE Y, NGUYEN H D, HO S Y W, et al. The temporal evolution and global spread of *Cauliflower mosaic virus*, a plant pararetrovirus [J/OL]. PLoS ONE, 2014, 9(1):e85641.

[19] OHSHIMA K, YAMAGUCHI Y, HIROTA R, et al. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread [J]. Journal of General Virology, 2002, 83(6):1511 - 1521.

[20] OHSHIMA K, MATSUMOTO K, YASAKA R, et al. Temporal analysis of reassortment and molecular evolution of *Cucumber mosaic virus*: Extra clues from its segmented genome [J]. Virology, 2015, 487: 188.

[21] 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(11):2496 - 2501.

(责任编辑:张文蔚)

(上接 83 页)

[5] ABRAHAMS P, BATEMAN M, BEALE T, et al. Fall armyworm: Impacts and implications for Africa (September 2017) [R]. CABI, UK, 2017.

[6] PRASANNA B M, HUESING J E, EDDY R, et al. Fall armyworm in Africa: a guide for integrated pest management (January 2018) [R]. US Agency for International Development, CGIAR Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security, 2018.

[7] 张智, 郑乔, 张云慧, 等. 草地贪夜蛾室内种群抗寒能力测定[J/OL]. 植物保护: 1 - 9 [2019 - 09 - 02]. https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2018430.

[8] 崔丽, 芮昌辉, 李永平, 等. 国外草地贪夜蛾化学防治技术的研究与应用[J]. 植物保护, 2019, 45(4): 7 - 13.

[9] 于欣, 武海斌, 张坤鹏, 等. 19 种杀虫剂对桃小食心虫卵的毒力测定[J]. 山东农业科学, 2012, 44(5): 96 - 98.

[10] GARDNER W A. Ovicidal properties of fenoxycarb against the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. The Florida Entomologist, 1991, 74(2): 257 - 261.

[11] TYSOWSKY M, GALLO T. Ovicidal activity of ambush™, a synthetic pyrethroid insecticide, on corn earworm, fall armyworm, and cabbage looper [J]. Florida Entomologist, 1977, 60(4): 287 - 290.

[12] 赵胜园, 孙小旭, 张浩文, 等. 常用化学杀虫剂对草地贪夜蛾防效的室内测定[J]. 植物保护, 2019, 45(3): 10 - 14.

[13] 陈沛, 弓惠芬, 王瑞, 等. 灭幼脲类及昆虫保幼激素类似物对玉米螟卵的生物活性[J]. 植物保护学报, 1982(1): 35 - 40.

[14] 姚永生, 李春芳, 周永锋. 虱螨脲对棉铃虫的生物活性及应用研究[J]. 江西棉花, 2009, 31(2): 18 - 21.

[15] MOHAMMAD M, HABIB A, AZIZ S G, et al. Effectiveness of indoxacarb and hexaflumuron on eggs, larvae and adults of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2010, 53(12): 1424 - 1428.

[16] 洪珊珊, 贾变桃, 李琴, 等. 6 种杀虫剂对小菜蛾不同虫态室内活性研究[J]. 现代农药, 2014, 13(5): 43 - 47.

(责任编辑:杨明丽)