基于全基因序列的中国北方3省(区)马铃薯Y病毒遗传多样性分析

马俊丰[1]， 李小宇[1]， 张春雨[1]， 周雪平[2]， 王永志[1,2*]

(1. 吉林省农业科学院植物保护研究所，公主岭 136100；2. 中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193)

摘要 本研究以马铃薯Y病毒(PVY)全基因组为基础，分析吉林、黑龙江和内蒙古3省(区)PVY群体遗传多样性和群体分化，并评估突变、重组、选择等遗传力所起的作用。根据已报道的PVY全基因序列保守区设计4对引物，采用片段重叠法对来自内蒙古和吉林的24个PVY分离物全基因序列进行测定，并联合NCBI中已登录的9个黑龙江分离物全基因组序列进行遗传多样性参数评估、群体分化检验和分子变异等分析。结果显示，我国北方3省(区)PVY群体遗传多样性高，其中内蒙古和黑龙江PVY群体遗传多样性高于吉林群体，并且3个群体之间呈现一定程度的遗传分化。分子变异分析发现在PVY基因组中存在1 786个变异位点，表明我国北方3省(区)PVY群体变异程度较高，并且这种高变异度有85.54%来自各个马铃薯种植区内PVY个体的遗传变异。重组分析和系统发育分析发现，我国北方3省(区)PVY群体中重组株系占比高达90.3%，并具有明显的株系多样性，表明PVY重组株系已成为我国北方3省(区)马铃薯种植区的流行株系。选择压力分析显示，使用FEL和IFEL法分别检测出501个和315个净化压力选择位点，这表明3省(区)PVY群体受净化选择压力为主。以上结果表明，中国北方3省(区)PVY群体遗传多样性高，突变、重组和自然选择都对遗传多样性和群体分化存在一定影响。

关键词 马铃薯Y病毒(PVY)； 遗传多样性； 基因组序列

中图分类号： S 432.41 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2019571

Genetic diversity analysis of *Potato virus Y* in three provinces of north China based on the full genomic sequences

MA Junfeng[1]， LI Xiaoyu[1]， ZHANG Chunyu[1]， ZHOU Xueping[2]， WANG Yongzhi[1,2*]

(1. *Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling* 136100, *China*;
2. *Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100193, *China*)

Abstract Complete genome sequences of *Potato virus Y* (PVY) from three provinces (Jilin, Heilongjiang and Inner Mongolia) of north China were used to investigate its genetic diversity and population differentiation. Meanwhile, the effects of mutations, recombination and selection on population genetic dynamics were evaluated. The complete genomes of 24 PVY isolates from Jilin and Inner Mongolia were amplified and sequenced using 4 pairs of primers designed according to the conserved regions of the reported PVY isolates, and were then combined with complete genome sequences of 9 Heilongjiang isolates for estimation of genetic variation, population differentiation, molecular variation, etc. The genetic diversity of the PVY populations in the three provinces was high. Furthermore, the genetic diversities of PVY isolates from Heilongjiang and Inner Mongolia were higher than that of PVY from Jilin and there was a certain degree of genetic differentiation among the three populations. Analysis of molecular variation revealed that there were 1 786 mutation sites in PVY genomes, which indicated that the degree of variation in PVY populations in the three provinces was high; 85.54% of the variation was from individuals of different potato planting areas. Recombination and phylogenetic analysis showed that 90.3% strains were recombinant and there was obvious strain diversity in the PVY populations, indicating that the recombinant strains

收稿日期： 2019-10-23 **修订日期**： 2020-01-06
基金项目： 吉林省科学技术厅重点项目(20180201013NY)；国家重点研发计划(2017YFD0201604)；吉林省农业科技创新工程人才基金(C82230811)
* 通信作者 E-mail：yzwang@126.com

had become the epidemic strain in the potato cropping regions of the three provinces. Totally 501 and 315 purifying selection sites were detected by using FEL and IFEL methods, respectively, suggesting that the PVY populations in the three provinces were mainly affected by purifying selection pressure. In summary, the PVY populations in the three provinces of northern China had high genetic diversity, and mutations, recombination and selection all contributed to the genetic diversity and population differentiation.

Key words *Potato virus Y*(PVY); genetic diversity; genome sequence

马铃薯病毒是危害马铃薯的主要病原物之一,已有报道显示,世界范围内能够侵染马铃薯的病毒至少有 53 种,其中 10 种已在我国被发现[1]。在我国已经发现的 10 种病毒中,马铃薯 Y 病毒 *Potato virus Y*(PVY)发生范围最广,造成经济损失最为严重。近些年在我国多个马铃薯种植区检测到 PVY[2-7]。PVY 侵染马铃薯可引起叶脉坏死、叶面黄化褪绿、块茎环斑坏死等症状,导致马铃薯种质退化,产量降低,给马铃薯的生产造成严重损失[8-10]。

PVY 是马铃薯 Y 病毒科 *Potyviridae* 马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus* 代表成员,其病毒粒体呈弯曲线状,每个病毒粒体包含一套完整的基因组。该基因组由正义单链 RNA 构成,长约 9.7 kb,包含一个大的开放阅读框(open reading frame, ORF),两端含有非编码区(untranslated regions,UTRs)。基因组翻译时,开放阅读框先编码一个多聚蛋白(polyprotein),随后再通过自身编码的 3 个蛋白酶将多聚蛋白切割加工为 P1、HC-Pro、P3 等 10 个成熟蛋白[11]。除此之外,PVY 基因组内还有一个通过移码翻译产生的蛋白——PIPO,该蛋白与 P3 蛋白的 N′端以 P3N-PIPO 融合形式存在[12]。最终,PVY 基因组通过这两种方式生成 11 个成熟的多功能蛋白,使整个基因组呈现不同程度的遗传多样性。

近些年,PVY 呈高变异、多株系发展趋势,因此,PVY 研究已不局限在分子检测、株系鉴定、蛋白质功能验证等方面[13-17],遗传变异及分子进化已成为新的研究方向。已有工作主要是选择其中 1～2 个功能基因研究 PVY 的遗传多样性[18-20],不能全面地反映 PVY 进化和遗传机制。因此,本研究通过扩增、克隆等手段获得吉林(JL)和内蒙古(NMG)PVY 分离物全基因组序列 24 条,并联合 GenBank 中已提交的 9 条黑龙江(HLJ)分离物的全基因组序列进行序列比对分析、遗传多样性参数评估及群体分化检验等一系列分析,旨在基于全基因组序列更为准确地探明我国北方 3 省(区)PVY 群体遗传多样性及进化机制。该研究结果将有助于了解我国北方地区 PVY 的发生、流行及变异趋势,为其有效防控提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　毒源

2017 年—2018 年从吉林、内蒙古马铃薯种植区,用随机抽样法采集带有花叶、褪绿和坏死等典型病毒症状的马铃薯叶片。先采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检验病毒,之后对病毒 *CP* 基因进行扩增,将确定为 PVY 分离物的叶片密封保存在－80℃超低温冰箱中。

1.2　主要试剂

RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN 公司;ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit,赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific);TaKaRa LA *Taq*、pMD18-T Vector Cloning Kit、DNA Marker,宝生物工程有限公司;AxyPrep DNA Gel Extraction Kit,爱思进生物技术公司(Axygen)。

1.3　试验方法

1.3.1　RNA 提取及基因克隆

按照 RNeasy Plant Mini Kit 说明书,从感染 PVY 的马铃薯叶片中提取总 RNA。以提取的叶片总 RNA 为模板,以 OligodT 为引物,按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。根据 GenBank 中已提交的 PVY 不同分离物基因组序列的保守区,设计用于扩增 PVY 全基因序列的简并引物和特异性引物(表 1)。引物委托吉林省库美生物科技有限公司合成。

PCR 扩增采用 50 μL 反应体系:TaKaRa LA*Taq*(5 U/L)0.5 μL、10×LA PCR buffer Ⅱ(Mg^{2+} Plus)5 μL、dNTP mixture 5 μL、cDNA 1 μL、正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL、超纯水 36.5 μL。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,退火 30 s(退火温度视基因片段而定),72℃延伸若干分钟(延伸时间按 1 kb/min 计算),共 30 个循环;最后 72℃再延伸 10 min。

表 1 PVY 基因组扩增引物

Table 1 Primers for PVY genome amplification

片段 Segment	引物 Primer	引物序列(5′-3′) Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	片段大小/bp Expected size
A	PVY-AF	AAATTAAAACAACTCAATACAAC	42	3 720
	PVY-AR	GATGATGTTCGAATTGTGTCCTC		
B	PVY-BF	AGTGGTAGCATTTATGGCTTTAGTC	51	2 279
	PVY-BR	TTCCTGTATGCAGATCCAAAGAATTC		
C	PVY-CF	AGCAGGCGCTGTTGCAATTGGTGG	52	3 387
	PVY-CR	ATATACGCTTCTGCAACATCTGAG		
D	PVY-DF	GSAAAYGAYACAATYGATGC	42	1 129
	PVY-DR	GTCTCCTGATTGAAGTTTACAGTC		

取 4 μL PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测。检测后切取目的条带，利用胶回收试剂盒进行纯化，纯化产物分别与 pMD18-T 载体连接，连接产物转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中。经菌液 PCR 验证后筛选出阳性克隆，随机选取 3～5 个阳性克隆，委托吉林省库美生物科技有限公司进行测序，并通过测序峰图及序列比对排除 PCR 过程中可能引起的突变。

1.3.2 序列处理

测序获得的吉林和内蒙古 PVY 分离物各序列片段使用 DNAMAN 6.0 软件进行拼接，并通过 PVY 参考序列(GenBank 登录号为 NC_001616)进行校正。校正时先使用 MEGA 6.0 软件中的 Muscle 程序对 PVY 全基因组序列进行多重比对，之后使用 Muscle(codon)程序对 PVY 基因组编码区进行比对，最后将编码区翻译为相应的氨基酸序列，进行人工校正，以确保基因组序列的准确性。试验所用的黑龙江 PVY 分离物基因组序列均为 NCBI 中已登录的序列(序列名称及登录号见图 1)。最终用于本试验研究的 PVY 全基因组序列共 33 条。

1.3.3 遗传多样性参数评估及群体分化检验

使用 DnaSP 5.10 软件计算遗传多样性参数：多态性位点数目(segregating sits，*S*)、单倍型数目(number of haplotypes，*h*)、单倍型多样性(haplotype diversity，*Hd*)、核苷酸差异平均数(average number of nucleotide differences，*k*)、核苷酸多样性(nucleotide diversity，*Pi*)。使用 Arlequin 3.5 软件计算群体分化系数(fixation index，*Fst*)并根据 *Fst* 值的大小判断群体间分化程度。当 $0<Fst\leqslant 0.05$ 时，群体轻微分化；当 $0.05<Fst\leqslant 0.15$ 时，群体中度分化；当 $0.15<Fst\leqslant 0.25$ 时，群体高度分化；当 $Fst>0.25$ 时，群体严重分化。群体间遗传分化显著水平采用 *Kst*、*Z*、*Snn*[21-22] 3 种独立统计方法进行检验，并通过排列检验法(1 000 permutations)进行判断。

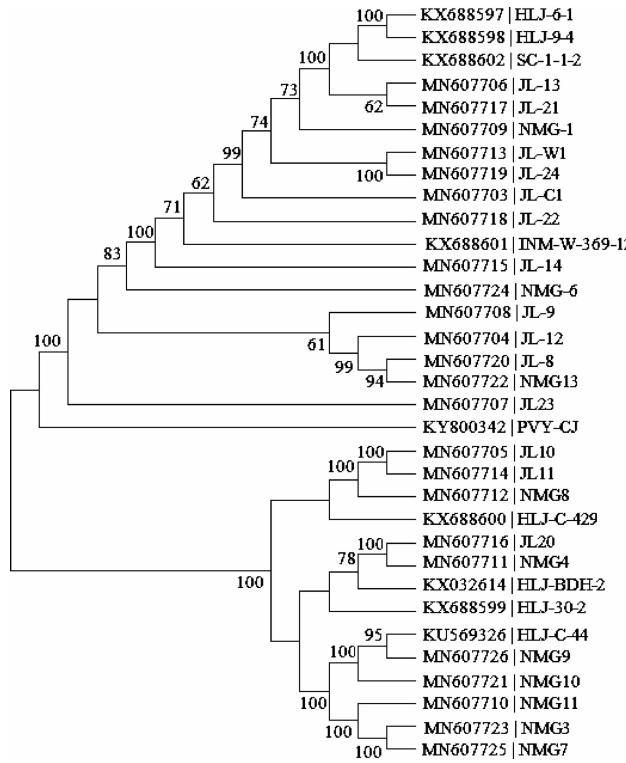

图 1 基于全基因组序列构建的中国北方 3 省(区) PVY 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of PVY from three provinces of northern China based on complete genome sequences

1.3.4 PVY 基因组的分子变异

以 PVY 全基因组序列为分子标记，利用 Arlequin 3.5 软件进行不同群体的分子变异分析(analysis of molecular variance，AMOVA)。使用 DnaSP 5.10 软件进行变异位点分析。在网站 http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/上进行序列一致性分析。

1.3.5 PVY 基因组的重组

以 PVY^{O} 株系分离物 Oz(EF026074)和 PVY^{N}

株系分离物 Mont(AY884983)作为亲本,使用 SimPlot 3.5 软件进行重组分析。同时在网站(http://www.datamonkey.org)使用遗传算法中的重组检测法(genetic algorithm recombination detection,GARD)[23]进行重组位点检测及可靠性评估。

1.3.6 压力分析

使用在线网站(http://www.datamonkey.org),基于密码子,通过 IFEL(internal branches fixed-effects likelihood)、FEL(fixed effects likelihood)、MEME(mixed effects model of evolution)3 种不同方法,对 PVY 基因组进行压力检测及统计检验。压力选择方向根据非同义核苷酸替换速率(dN)与同义核苷酸替换速率(dS)比值($\omega=d$N/dS)大小进行判断。当 $\omega>1$ 且群体差异显著时,说明基因组受到正向选择(positive selection)作用;当 $0<\omega<1$ 时,说明基因组受到净化选择(purifying selection)作用;当 $\omega=1$ 时,基因组不受压力选择[24]。

1.3.7 系统发育分析

使用最大似然法(maximum likelihood, ML)基于全基因组序列编码区(coding sequence, CDs)核苷酸序列构建 PVY 系统发育树。建树前,使用 MAFFT 软件对建树的 33 条 PVY 编码区核苷酸序列进行多重比对,并使用 DAMBE 软件检测核苷酸替换是否饱和,之后利用 MEGA 6.0 软件选择最优化的核苷酸替换模型,并参照 BIC(Bayesian information criterion)标准设置相应参数,最后通过1 000 次自举(bootstrap)抽样来对各分支节点的置信值进行评估。

2 结果与分析

2.1 全基因组序列特征

本研究共获得 24 个 PVY 分离物全基因组序列(9 698 nt 或 9 699 nt),5′非编码区长度为 184 nt 或 185 nt,3′非编码区长度为 328 nt,编码区长度为 9 186 nt;其中在编码区部分,大开放阅读框对应的多聚蛋白编码序列长度为 9 186 nt,编码一个包含 3 061个氨基酸残基的多聚蛋白;小开放阅读框对应的蛋白 PIPO 编码序列长度为 195 nt 或 228 nt,并通过移码翻译编码一个包含 65 或 76 个氨基酸残基的蛋白 PIPO(表 2)。

表 2　新获得的 PVY 分离物基因组信息

Table 2　Genome information of newly obtained PVY isolates

分离物 Isolate	非编码区 UTR		开放阅读框 1 ORF1		开放阅读框 2 ORF2	
	5′UTR/nt	3′UTR/nt	Polyprotein/nt	AA	PIPO/nt	AA
JL-C1	184	328	185～9 370	3 061	2 914～3 144	76
JL-W1	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
JL10	184	328	185～9 370	3 061	2 914～3 144	76
JL11	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
JL12	184	328	185～9 370	3 061	2 914～3 144	76
JL13	184	328	185～9 370	3 061	2 914～3 144	76
JL14	184	328	185～9 370	3 061	2 914～3 144	76
JL20	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 112	65
JL21	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
JL22	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
JL23	184	328	184～9 369	3 061	2 914～3 144	76
JL24	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
JL8	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
JL9	184	328	184～9 369	3 061	2 914～3 144	76
NMG1	184	328	184～9 369	3 061	2 914～3 144	76
NMG10	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
NMG11	184	328	184～9 369	3 061	2 914～3 144	76
NMG13	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
NMG3	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
NMG4	184	328	185～9 370	3 061	2 914～3 111	65
NMG6	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
NMG7	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76
NMG8	184	328	185～9 370	3 061	2 914～3 144	76
NMG9	185	328	186～9 371	3 061	2 915～3 145	76

2.2 遗传多样性参数评估及群体分化检验

PVY 基因组遗传多样性参数如表 3 所示：3 个群体的多态性位点数目（*S*）表现出一定差异，其中黑龙江和内蒙古群体 *S* 值相对较大，多态性位点数目分别为 1 232 个和 1 229 个，吉林群体相对较小，多态性位点数目为 807 个；核苷酸差异平均数（*k*）方面，黑龙江和内蒙古群体 *k* 值较大，分别为491.361 和 526.933，吉林群体 *k* 值较小为249.659；单倍型多样性（*Hd*）方面，3 个群体 *Hd* 值均为 1，大于 0.5，且 33 个分离物中共发现 33 种单倍型（*h*），未出现两条完全一致的序列，各个群体均表现出较高的单倍型多样性；核苷酸多样性方面（*Pi*），3 个群体的 *Pi* 值分别为 0.050 61、0.025 72、0.054 29，均大于 0.005，表明 3 个群体均具有较高的核苷酸多样性。以上数据表明我国北方 3 省（区）PVY 群体遗传多样性高，且黑龙江和内蒙古 PVY 群体遗传多样性高于吉林群体。

以 PVY 基因组为分子标记，黑龙江和吉林 PVY 群体之间 *Fst* 值为 0.051 71，*Z* 统计显著，*Kst* 和 *Snn* 值统计不显著，表明在黑龙江和吉林种植区的 PVY 群体间呈现中度分化但差异不显著；黑龙江和内蒙古，群体之间 *Fst* 值为 0.072 52，*Z*、*Kst* 和 *Snn* 统计均不显著，表明黑龙江和内蒙古种植区的 PVY 群体呈现中度分化，但差异不显著；吉林和内蒙古群体之间 *Fst* 值为 0.233 52，*Kst* 统计显著，*Z* 统计极显著，*Snn* 统计不显著，表明吉林和内蒙古种植区的 PVY 群体呈现高度分化且差异显著（表 4）。

表 3 遗传多样性参数统计[1)]

Table 3 Summary statistics for genetic diversity

种群 Population	*N*/个	*S*/个	*h*/种	*Hd*	*k*	*Pi*
黑龙江 HLJ	9	1 232	9	1.000	491.361	0.050 61
吉林 JL	14	807	14	1.000	249.659	0.025 72
内蒙古 NMG	10	1 229	10	1.000	526.933	0.054 29
总计 Total	33	1 786	33	1.000	442.576	0.045 60

1) *N*：样本数；*S*：多态性位点；*h*：单倍型数目；*Hd*：单倍型多样性；*k*：核苷酸差异平均数；*Pi*：核苷酸多样性。
N: Number of sample; *S*: Segregating sites; *h*: Number of haplotype; *Hd*: Haplotype diversity; *k*: Average number of nucleotide differences; *Pi*: Nucleotide diversity.

表 4 不同种植区群体分化检验[1)]

Table 4 Subdivision test statistics of PVY from different cropping regions

种群 Population	*Ks*	*Kst*	*P* 值 *P* value	*Z*	*P* 值 *P* value	*Snn*	*P* 值 *P* value	*Fst*
黑龙江 *vs* 吉林 HLJ *vs* JL	344.238 29	0.028 40	0.164 0 ns	119.43	0.044 0*	0.608 70	0.224 0 ns	0.051 71
黑龙江 *vs* 内蒙古 HLJ *vs* NMG	510.083 33	0.039 45	0.122 0 ns	81.36	0.123 4 ns	0.473 68	0.591 0 ns	0.072 52
吉林 *vs* 内蒙古 JL *vs* NMG	365.190 17	0.141 13	0.011 0*	119.82	0.003 0**	0.625 00	0.187 0 ns	0.233 52

1) ns：无统计差异；*：$0.01<P<0.05$；**：$0.001<P<0.01$。
ns: No significance; *: $0.01<P<0.05$; **: $0.001<P<0.01$.

2.3 分子变异分析

全基因组序列一致性比对分析结果显示，本研究获得的 24 个分离物之间核苷酸一致性为 90.3%～99.0%，氨基酸一致性为 99.0%～100%，进一步与 NCBI 中已登录的 9 个黑龙江 PVY 分离物比对发现，核苷酸一致性在 89.3%～99.5%之间，氨基酸一致性在 98.6%～100%之间。综上所述，本次研究 3 个群体之间核苷酸一致性为 89.3%～99.5%，氨基酸一致性为 98.6%～100%。

突变位点分析发现，3 个群体 PVY 全基因组多态性位点（polymorphic sites）共 1 786 个，其中单一变异位点（singleton variable sites）450 个，简约信息位点（parsimony informative sites）1 336 个，表明 PVY 基因组存在较高程度的变异。

以 PVY 基因组为基础，AMOVA 分析结果如表 5 所示，14.46%的变异来自群体间，85.54%的变异来自群体内，因此不同种植区 PVY 群体之间的遗传变异主要来自各个种植区内 PVY 个体的遗传变异。

表 5 不同种植区群体分子变异分析

Table 5 Analysis of molecular variance of PVY populations from different cropping regions

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	方差组分 Variation component	变异百分比/% Percentage of variation
种植区间 Among cropping regions	112	33.58	14.46
种植区内 Within cropping regions	596	198.65	85.54
总计 Total	708	232.23	100.00

2.4　重组分析

使用 Simplot 软件分析发现,33 个 PVY 分离物中有 30 个检测到潜在重组信号,约占分离物总数的 90.3%,并且所有检测到的重组分离物均为 N×O 重组类型。吉林和黑龙江 PVY 群体分离物均存在重组,而内蒙古 PVY 群体存在 3 个 O 株系非重组分离物。进一步通过 GARD 程序确认,3 个群体存在 4 个或 5 个重组位点,每个重组位点都具有较高的模型支持率,且 KH 检验均达到显著水平(表 6)。

表 6　GARD 分析结果[1)]

Table 6　GARD analysis result

种群 Population	重组位点/个(位点支持率/%) Breakpoint (support rate for breakpoint)				
黑龙江 HLJ	309(99)***	519(84)***	2 319(99)***	5 676(83)**	8 362(93)***
吉林 JL	309(99)***	—	2 281(92)***	5 641(90)***	8 381(91)***
内蒙古 NMG	306(98)***	516(90)***	2 281(91)***	5 661(87)***	8 362(90)**

1) 黑龙江和内蒙古群体有 5 个重组位点,吉林群体有 4 个重组位点;**:0.001<P<0.01;***:P<0.001。
There are five breakpoints in HLJ and NMG populations and four breakpoints in JL populations. **: 0.001<P<0.01; ***: P<0.001

2.5　选择压力分析

PVY 全基因组选择压力分析显示(表 7),使用 FEL、IFEL、MEME 3 种检测方法均检测到大量选择压力位点,在 3 个群体中利用 FEL 和 IFEL 法分别检测出 501 个和 315 个净化选择位点,但仅检测出 9 个和 12 个正向选择位点;使用 MEME 法检测出 43 个正向选择位点。而以上 3 种方法共同检测出 6 个正向选择位点,且这些位点均显著(表 8)。以上结果表明尽管 PVY 基因组受净化选择压力为主,但基因组中也存在个别密码子位点受到强烈的正向选择压力。

表 7　PVY 基因组选择压力分析

Table 7　Analysis of selection pressure of PVY genome

密码子数量/个 Number of codon	净化选择位点/个 Purifying selection		正向选择位点/个 Positive selection		
	FEL	IFEL	FEL	IFEL	MEME
3 061	501	315	9	12	43

2.6　系统发育分析

建树序列多重比对后长度为 9 186 nt,根据 MEGA 6.0 软件的 BIC 标准,建树序列最合适的核苷酸替换模型为 GTR+I+G。ML 法构建的系统发育树如图 1 所示。从图中可以看出 3 省(区)PVY 分离物并未以地区为标准相聚成簇,因此北方 3 省(区)PVY 分离物在系统发育关系上与地理分布无显著联系。根据 Chang 等[25]的研究结果,以 PVY 基因组编码区构建系统发育树,相同株系的分离物会相聚成簇,表现出明显的株系特异性,因此,本研究中 33 个 PVY 分离物是以不同株系类型为标准相聚成簇,由此可以看出北方 3 省(区)的 PVY 群体具有较为明显的株系多样性。

表 8　PVY 基因组正向选择压力检测[1)]

Table 8　Detection of positive selection pressure of PVY genome

密码子位置 Position of codon	FEL		IFEL		MEME	
	dN/dS	P 值 P value	dN/dS	P 值 P value	dN/dS	P 值 P value
62	>100	0.050*	>100	0.077*	>100	0.002**
522	>100	0.085*	>100	0.029*	>100	0.008**
744	>100	0.052*	>100	0.016*	>100	1.32e-09***
900	>100	0.090*	>100	0.097*	>100	0.092*
1 150	>100	0.057*	>100	0.060*	>100	0.071*
2 792	>100	0.089*	>100	0.051*	>100	0.096*

1) FEL、IFEL 方法检测选择压力位点,其方向根据核苷酸替换率 dN/dS 判断;MEME 方法仅检测正向选择压力位点,其核苷酸替换率 dN/dS 用 ω^+ 表示;*:0.01<P<0.05;**:0.001<P<0.01;***:P<0.001。
FEL and IFEL methods are used to detect the selection pressure site, and the site direction is judged according to the nucleotide substitution rate dN/dS. MEME method only detects the positive selection pressure site, and their nucleotide substitution rate dN/dS is replaced by ω^+; *: 0.01<P<0.05; **: 0.001<P<0.01; ***: P<0.001.

3　讨论

遗传多样性是体现病原物群体对环境适应力的一项重要指标,是突变、基因重组、基因流(基因迁移)、随机漂变和自然选择 5 种遗传力长期相互作用的结果。遗传多样性直接影响着病原物群体的进化潜力。高遗传多样性的病原物具有更强的生存和进化优势,能更快适应新的寄主和生存环境[26]。开展病原物遗传多样性及群体分化研究有助于了解植物

病原物的发生规律，流行机制，并为相关病害的监测及防控提供理论依据。

中国北方 3 省(区)PVY 遗传多样性参数结果表明，黑龙江、吉林和内蒙古 3 省(区)PVY 群体遗传多样性高，与前人研究结果一致，符合中国 PVY 群体遗传多样性高的特征[27-28]。3 省(区)的马铃薯种植区存在一定程度的种薯调运，这会导致不同种植区间 PVY 群体的二次接触，从而造成高遗传多样性。此外，种群内这种高遗传多样性的形成是一个长期过程，本次研究的 3 个省(区)PVY 群体基因组单倍型多样性(*Hd*)均大于 0.5，核苷酸多样性(*Pi*)均大于 0.005，且两两种植区之间 PVY 群体呈现一定程度的群体分化，表明 3 省(区)PVY 群体是由一个相对较大且稳定的群体经过长期演化所形成的。

PVY 具有高度变异性，而突变在 PVY 的遗传变异过程中起到重要作用。PVY 是 RNA 病毒，其依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase，RdRp)缺乏校正功能，会在复制过程中产生大量的点突变[29]，在所产生的突变中有利突变会被逐渐积累，而有害突变则在自然选择过程中被逐渐淘汰，由此突变常被视作推动 PVY 进化的原始动力。本试验基于 PVY 全基因序列发现了大量变异位点，表明我国北方 3 省(区)PVY 群体存在较高程度的变异。AMOVA 分析结果显示 3 省(区)PVY 群体之间的遗传变异主要来自各个种植区内 PVY 个体的遗传变异。在序列一致性方面，3 个 PVY 群体之间的核苷酸一致性为 89.3%～99.5%，符合同一种病毒全基因序列一致性不低于 85.0%的标准[11]。

基因重组同样是 PVY 遗传变异的主要驱动力，在 PVY 群体中发挥着重要的作用。已经确认的重组位点主要集中在 *P*1、*HC-Pro*/*P*3、*VPg*、*NIb* 和 *CP* 基因区域[30-32]。本试验 3 个 PVY 群体中均检测出大量的重组分离物，并且 3 个 PVY 群体中都存在着多个重组位点，表明相较于基因突变，基因重组可能是 PVY 进化过程中更为重要的机制，因为重组产生的遗传变异远比仅由突变造成的变异更快、更频繁[33]。常飞等在进行 PVY 群体遗传分析时并未检测到重组信号[28]，原因是选用的 *P*3 和 *PIPO* 基因位于 PVY 基因组的非重组区域，因此基于全基因序列的重组分析可以更准确的了解 PVY 群体的重组状况。此外 PVY N×O 重组分离物的大量发现也表明此类型重组株系已成为北方 3 省(区)马铃薯种植区的主流株系。而 PVY 重组株系的频繁发生可以归纳于以下两点：一是重组分离物相较于非重组分离物有着更强的致病性；二是重组分离物兼具非重组分离物的适应性优势，可以快速适应环境变化，并发展为优势株系[10,34]。因此，在生产上需密切关注重组株系的流行趋势。

选择压力分析中，中国北方 3 省(区)PVY 群体基因组净化选择位点远高于正向选择位点，表明 PVY 基因组中多数位点的突变是有害的，在进化过程中这些有害突变会被剔除，从而保证 PVY 各个基因发挥正常功能。而采用 3 种方法共同检测到 6 个显著的正向选择压力位点，表明 PVY 基因组中存在个别位点的突变是有利于该病毒生存竞争的，在遗传进化过程中这些有利突变会被不断积累。

CP 和 *PIPO* 基因由于高度保守的特点，在进行 *Potyvirus* 病毒系统发育分析时，常被用以构建系统发育树[12]，但对于 PVY 等变异程度高，重组频繁的病毒来说，单基因建树不足以准确地反映同种病毒不同株系分离物之间的系统发育关系，因此，以全基因组构建系统发育树成为解决此类问题的有效方法[25,35]。本研究以我国北方 3 省(区)PVY 分离物全基因序列进行系统发育分析，准确地反映出了 PVY 分离物的系统发育关系，为我国北方 3 省(区)PVY 群体遗传多样性研究提供了准确数据。

参考文献

[1] 路秉翰，汤亚飞，于琳，等. 基于小 RNA 深度测序和 RT-PCR 检测侵染广东省冬种马铃薯的病毒[J]. 植物保护学报，2019，46(3)：604－610.

[2] 刘洪义，张洪祥，李明福，等. 黑龙江省马铃薯病毒病的普查及鉴定[J]. 东北农业大学学报，2006，37(3)：307－310.

[3] 钟婷婷，蒲志刚，何俊蓉，等. 四川省马铃薯主产区最新病毒病普查及血清学鉴定[J]. 西南农业学报，2008，21(1)：96－99.

[4] 胡新喜，雷艳，何长征，等. 湖南省马铃薯主产区马铃薯病毒种类及流行分析[J]. 中国马铃薯，2012，26(6)：358－361.

[5] 黄丹，余琨，陈建斌，等. 马铃薯病毒 PVY、PVS 和 PLRV 多重 RT-PCR 检测[J]. 云南农业大学学报，2015，30(4)：535

- 540.

[6] 苑智华. 乌兰察布市马铃薯病毒病调查分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 189 - 191.

[7] 王炳森, 王丽, 陈惠兰. 山东省马铃薯病害调查[J]. 中国马铃薯, 2017, 31(2): 104 - 112.

[8] NOLTE P, WHITWORTH J L, THORNTON M K, et al. Effect of seedborne *Potato virus Y* on performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody potato [J]. Plant Disease, 2004, 88(3): 248 - 252.

[9] RAHMAN M S, AKANDA A K. Performance of seed potato produced from sprout cutting, stem cutting and conventional tuber against PVY and PLRV [J]. Bangladesh Journal of Agricultural Research, 2009, 34(4): 609 - 622.

[10] CHIKH A M, MAOKA T, NATSUAKI T, et al. PVY$^{NTN\text{-}NW}$, a novel recombinant strain of *Potato virus Y* predominating in potato fields in Syria [J]. Plant Pathology, 2010, 59(1): 31 - 41.

[11] KING A M, LEFKOWITZ E, ADAMS M J, et al. Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2012.

[12] 高芳銮, 沈建国, 史凤阳, 等. 马铃薯 Y 病毒 *pipo* 基因的分子变异及结构特征分析[J]. 遗传, 2013, 35(9): 1125 - 1134.

[13] LORENZEN J H, MEACHAM T, BERGER P H, et al. Whole genome characterization of *Potato virus Y* isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada [J]. Archives of Virology, 2006, 151(6): 1055 - 1074.

[14] CHIKH A M, GRAY S M, KARASEV A V. An improved multiplex IC-RT-PCR assay distinguishes nine strains of *Potato virus Y* [J]. Plant Disease, 2013, 97(10): 1370 - 1374.

[15] GAO Fangluan, CHANG Fei, SHEN Jianguo, et al. Complete genome analysis of a novel recombinant isolate of *Potato virus Y* from China [J]. Archives of Virology, 2014, 159(12): 3439 - 3442.

[16] GLAIS L, FAUREZ F, TRIBODET M, et al. The amino acid 419 in *HC-Pro* is involved in the ability of PVY isolate N605 to induce necrotic symptoms on potato tubers [J]. Virus Research, 2015, 208: 110 - 119.

[17] KIM J, CHA D J, KWON M, et al. *Potato virus Y* (PVY) detection in a single aphid by one-step RT-PCR with boiling technique [J]. Entomological Research, 2016, 46(4): 278 - 285.

[18] TIAN Yanping, LIU Jinliang, ZHANG Chengling, et al. Genetic diversity of *Potato virus Y* infecting tobacco crops in China [J]. Phytopathology, 2011, 101(3): 377 - 387.

[19] GAO Fangluan, ZOU Wenchao, XIE Lianhui, et al. Adaptive evolution and demographic history contribute to the divergent population genetic structure of *Potato virus Y* between China and Japan [J]. Evolutionary Applications, 2017, 10(4): 379 - 390.

[20] MAO Yanzhi, SUN Xuhong, SHEN Jianguo, et al. Molecular evolutionary analysis of *Potato Virus Y* infecting potato based on the *VPg* gene [J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1708. DOI:10.3389/fmicb.2019.01708.

[21] HUDSON R R, BOOS D D, KAPLAN N L. A statistical test for detecting geographic subdivision [J]. Molecular Biology and Evolution, 1992, 9(1): 138 - 151.

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

[23] KOSAKOVSKY P S L, POSADA D, GRAVENOR M B, et al. GARD: a genetic algorithm for recombination detection [J]. Bioinformatics, 2006, 22(24): 3096 - 3098.

[24] NIELSEN R. Molecular signatures of natural selection [J]. Annual Review of Genetics, 2005, 39(1): 197 - 218.

[25] CHANG Fei, GAO Fangluan, SHEN Jianguo, et al. Complete genome analysis of a PVY$^{N\text{-}Wi}$ recombinant isolate from *Solanum tuberosum* in China [J]. Potato Research, 2015, 58(4): 377 - 389.

[26] 祝雯, 詹家绥. 植物病原物的群体遗传学[J]. 遗传, 2012, 34(2): 157 - 166.

[27] 史凤阳. 中国 4 个省份马铃薯 Y 病毒(PVY)P1 基因的群体遗传结构[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.

[28] 常飞. 马铃薯 Y 病毒 *pipo* 基因的遗传结构分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.

[29] 谢联辉, 林奇英. 植物病毒学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.

[30] LORENZEN J H, PICHE L M, GUDMESTAD N C, et al. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures [J]. Plant Disease, 2006, 90(7): 935 - 940.

[31] VISSER J C, BELLSTEDT D U, PIRIE M D. The recent recombinant evolution of a major crop pathogen, *Potato virus Y* [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(11): 50631. DOI: 10.1371/journal.pone.0050631.

[32] QUENOUILLE J, VASSILAKOS N, MOURY B. *Potato virus Y*: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity [J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14(5): 439 - 452.

[33] CHAO Lin. Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet [J]. Nature, 1990, 348(6300): 454 - 455.

[34] STEINHAUER D A, HOLLAND J J. Rapid evolution of RNA viruses [J]. Annual Review of Microbiology, 1987, 41(1): 409 - 433.

[35] ADAMS M J, ANTONIW J F, FAUQUET C M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae* [J]. Archives of Virology, 2005, 150(3): 459 - 479.

(责任编辑: 田　喆)