

研究报告

Research Reports

甘蔗线条花叶病毒 HC-Pro 基因的分子变异分析

贺 振^{1,2}, 李文凤³, 张志想², 李世访^{2*}

(1. 扬州大学园艺与植物保护学院, 扬州 225009; 2. 中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; 3. 云南省农业科学院甘蔗研究所/云南省甘蔗遗传改良重点实验室, 开远 661699)

摘要 为了解析甘蔗线条花叶病毒 *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) 不同分离物 HC-Pro 基因的分子变异规律, 本研究利用 RT-PCR 法扩增获得 SCSMV HC-Pro 基因的序列, 通过生物信息学分析, 分别从重组、系统发生、选择压力等方面研究 SCSMV HC-Pro 基因的分子变异特征。共测定了 44 条 SCSMV HC-Pro 基因序列, 相似性最低值为 70%; HC-Pro 基因重组频率较低, 仅发现 3 个重组位点, 其中一个系首次报道; 与先前报道相比, 部分新测定云南蔗区的 SCSMV 分离物在 HC-Pro 基因上形成一个新组—第 III 组; HC-Pro 基因处于很强的负选择压力作用, 未发现正向选择作用位点。本研究结果进一步证明 SCSMV HC-Pro 基因具有高度的遗传多样性。

关键词 甘蔗线条花叶病毒; HC-Pro 基因; 分子变异

中图分类号: S 435.661 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.005

Molecular variation of HC-Pro gene of *Sugarcane streak mosaic virus*He Zhen^{1,2}, Li Wenfeng³, Zhang Zhixiang², Li Shifang²

(1. School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Yunnan Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kaiyuan 661600, China)

Abstract The objective of this study is to assess the molecular evolution and divergence of SCSMV according to HC-Pro gene sequences. The HC-Pro gene sequences of SCSMV were obtained by RT-PCR, and analyzed by bioinformatic software, in aspect of recombination, phylogenetics, selection, demography, and gene flow. In the present study, 44 HC-Pro gene sequences were determined with a 70% lowest similarity; only one novel recombination site together with two previous reported sites were found in HC-Pro gene, suggesting that infrequent recombination events were distributed in this gene of SCSMV; one novel lineage (lineage III) clustered by SCSMV sequences determined here was found; strong purifying selection was found in the HC-Pro gene of SCSMV. Our genetic study further indicates that the HC-Pro gene showed high genetic diversity in the genome of SCSMV.

Key words *Sugarcane streak mosaic virus*; HC-Pro; molecular variation

甘蔗线条花叶病毒 *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) 是近年来从甘蔗花叶病株上鉴定出的一种新病原, 属于马铃薯 Y 病毒科 *Potyviridae* 禾本科病毒属 *Poacevirus*^[1-2]。该病毒分子量大小约为 10 kb, 编码一个多聚蛋白, 经水解酶切割后可产生 10 个成熟的蛋白质, 在 P3 蛋白氨基端有一个 PIPO 蛋白^[2-3]。自然条件下, 该病毒可侵染甘蔗和

高粱, 目前尚未发现 SCSMV 的传毒介体^[1-3]。2012 年, 我们在云南省甘蔗产区首次发现该病毒, 经调查发现, SCSMV 在云南省甘蔗主产区发生越来越普遍, 部分地区呈现流行暴发趋势^[1, 4-5]。因此设计合理的 SCSMV 防治策略对于抑制其在中国蔗区传播流行具有十分重要的意义。RNA 病毒的分子进化研究有利于我们加深对于病毒传播途径、流行路线

收稿日期: 2016-03-30 修订日期: 2016-04-23

基金项目: 植物病虫害生物学国家重点实验室开放课题(SKLOF201518); 扬州大学科技创新培育基金(2015CXJ043)

* 通信作者 E-mail: sfli@ippcaas.cn

以及寄主相互适应方式等^[6-7]的研究,从而为设计合理的病毒病害防治策略提供依据。目前,针对 SC-SMV 的研究较少。Viswanathan 等^[8]和 Bagyalakshmi 等^[9]发现 SCSMV 印度分离物存在较高的遗传多样性。我们的前期研究发现 SCSMV 具有一个典型的“准种”结构,普遍存在同种病毒不同分离物或株系混合侵染的现象^[5];SCSMV 依据不同基因可划分为 9 个组(第 I~第 IX 组),并且存在重组现象^[5]。不同于 *Potyvirus*, HC-Pro 基因是 SCSMV 基因组中遗传多样性最高的一个基因^[5],前期研究中由于基因序列的限制,无法对其进行一个系统的分子进化分析,因此,本研究试图选取不同地区的多个典型分离物,在重组、系统发生、选择压力等方面,对其进行系统全面的分子进化分析。

1 材料与方法

1.1 病毒分离物

2009—2012 年间从云南省 7 个甘蔗主产区和国家甘蔗种质资源圃内采集到具有典型花叶症状(图 1)的甘蔗样品 324 份。新鲜叶片样品经 RT-PCR 法检测鉴定,将 SCSMV 阳性样品冷冻干燥后,−80℃ 保存备用。本研究中所用样品详细信息见表 1。

1.2 克隆测序

根据 GenBank 已公布的 SCSMV 序列保守区,设计用于扩增 HC-Pro 基因的引物 SCSM-HC-Pro-F (5′-TGGACTCATTTGACGCCAGG-3′)和 SCSM-HC-Pro-R (5′-CGCTAACCTTGTGTGTCGT-3′),预期扩增的目的片段大小约为 1 500 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

采用 TRIzol 试剂法提取 SCSMV 甘蔗叶片中的总 RNA,提取方法参照试剂盒说明书进行。取 2 μL 总 RNA,采用 Promega 公司 MLV 反转录试剂盒,用反向引物 SCSM-HC-Pro-R 进行反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR。PCR 扩增采用 50 μL 反应体系:10×PCR buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, SCSM-HC-Pro-F (10 μmol/L) 2 μL, SCSM-HC-Pro-R (10 μmol/L) 2 μL, ddH₂O 34.5 μL, long *Taq* polymerase (5 U/μL) 0.5 μL, cDNA 2 μL。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;最后一轮循环后 72℃ 延伸 10 min。4℃ 保存。PCR 反应结束后,吸取产物 2 μL 进行 1% 的

琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物纯化后克隆至 pGEM-T 载体上,并转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5α 中。经菌落 PCR 鉴定获得阳性重组质粒,将筛选获得的阳性克隆随机选择 3~6 个送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。测序结果首先通过峰图及序列比对分析排除由 PCR 扩增引起的突变,然后通过 Bioedit 5.0.9 拼接完成。

1.3 重组分析

本研究中,经测序所得 SCSMV HC-Pro 基因的核苷酸序列共 44 条(GenBank 登录号分别为:KU314329~KU314372),BLAST 检索结果显示其与麦类花叶病毒 *Triticum mosaic virus* (TriMV) 具有最近的亲缘关系。因此,本研究选择 TriMV 分离物(NC012779)对应的 HC-Pro 基因序列作为序列比对分析的外组(outgroup)^[10]。结合 GenBank 中所有可用的 SCSMV HC-Pro 基因的核酸序列形成一个具有 106 条序列的数据集合。对该数据集合进行比对,过程如下:首先将核酸序列数据对应的氨基酸序列应用 CLUSTRAL X2^[11]和 TRANSALIGN(由 Georg Weiller 教授惠赠)比对,以保证经过序列比对后得到的核酸序列能够正确地编译出氨基酸序列。经过序列比对后,得到的删除 gap 后的 HC-Pro 基因的序列长度为 990 个核苷酸(nucleotide, nt)。对比对所得序列数据,利用 Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>)中 GARD 和 RDP 4.0 软件包^[12-13]中的 RDP^[12]、GENECONV^[14]、BOOTSCAN^[15]、MAXCHI^[16]、CHIMAERA^[17]、3SEQ^[18]和 SISCAN^[19]7 个程序进行重组检测,以发现可能存在的重组位点。在 RDP 4.0 检测时,各软件参数采用默认值,Bonferroni 校正的 *P* 为 0.05 或者 0.01,当某分离物有至少 3 个软件的检测结果 $P < 1.0 \times 10^{-6}$ 时,支持该分离物为重组体^[20-21]。在这些分析中,重组体序列会与非重组体序列存在部分相似,为了方便说明,我们将此非重组体作为该重组体的“亲本分离物”(parental isolates),据此,当重组体与亲本分离物位于同一组时,将此重组体命名为组内重组体(intralineage recombinant);当重组体与亲本分离物位于非同一组时,则命名为组间重组体(interlineage recombinant)^[20, 22]。最后,将 SCSMV 序列数据中外组 TriMV 序列删除,去除 TriMV 对 SCSMV 序列造成的 gap 影响,直接检测确认 SCSMV 的 HC-Pro 基因区的重组位点。

表 1 本研究中的 SCSMV 样品采集信息

Table 1 Information of *Sugarcane streak mosaic virus* samples in this study

| 分离物名称 Isolate | 样品来源 Origin | 采集时间/年-月-日 Collection time | 品种 Cultivar | 症状 Symptom |
|------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------|--------------------|
| GN12 | 中国开远 Kaiyuan, China | 2011-06-05 | Yunzhe91-16 | 花叶 Mosaic |
| GN34 | 中国开远 Kaiyuan, China | 2011-06-05 | F176 | 花叶 Mosaic |
| W4 | 古巴 Cuba | 2010-05-17 | MY55-14 | 线条花叶 Streak mosaic |
| W14 | 法国 France | 2010-05-17 | FR93-635 | 花叶 Mosaic |
| W17 | 印度尼西亚 Indonesia | 2010-08-26 | POJ2878 | 花叶 Mosaic |
| W18 | 留尼汪 Reunion | 2010-08-26 | R570 | 线条花叶 Streak mosaic |
| W32 | 美国 America | 2011-06-05 | CP85-1308 | 花叶 Mosaic |
| W69 | 巴西 Brazil | 2011-06-05 | SP71-6180 | 花叶 Mosaic |
| W75 | 澳大利亚 Australia | 2011-06-05 | Q71 | 花叶 Mosaic |
| W76 | 日本 Japan | 2011-06-05 | RK88-188 | 花叶 Mosaic |
| M55 | 中国常宁 Changning, China | 2008-06-15 | Q170 | 线条花叶 Streak mosaic |
| M61 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2008-11-15 | Unknown | 花叶 Mosaic |
| M62 | 中国新平 Xinping, China | 2009-07-15 | Yunyin10 | 花叶 Mosaic |
| M71 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2009-08-12 | Badila | 线条花叶 Streak mosaic |
| M85 | 中国红河 Honghe, China | 2010-08-10 | Yue79-177 | 花叶 Mosaic |
| M86 | 中国弥勒 Mile, China | 2010-08-20 | Yun99-91 | 花叶 Mosaic |
| M111 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | ROC22 | 花叶 Mosaic |
| M112 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | ROC22 | 花叶 Mosaic |
| M113 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | Yue60 | 花叶 Mosaic |
| M114 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | Yunyin3 | 花叶 Mosaic |
| M115 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | Yunyin3 | 花叶 Mosaic |
| M116 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | Yun03-258 | 花叶 Mosaic |
| M117 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | Yun98-136 | 花叶 Mosaic |
| M118 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | De03-83 | 花叶 Mosaic |
| M119 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | Yunyin58 | 花叶 Mosaic |
| M121 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | Yunyin58 | 花叶 Mosaic |
| M124 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | SP81-3250 | 花叶 Mosaic |
| M126 | 中国沅江 Yuanjiang, China | 2011-06-03 | Yun07-912 | 花叶 Mosaic |

1.4 系统发生分析

对上述处理后的序列分别利用 PhyML 3.0^[23] 中的最大似然法 (maximum-likelihood, ML)、MEGA 6.0^[24] 中的邻接法 (neighbour-joining, NJ) 以及 SPLITSTREE 4.11.3^[25] 中的邻接网法 (neighbor-net, NN) 进行系统发生分析。在 ML 法分析中,通过 jModeltest 0.1.1^[26] 分析确定 HC-Pro 数据的最适核苷酸替代模型为 GTR+I+ Γ 4。在 ML 和 NJ 法分析中,支长皆用自举法 (bootstrap) 进行 1 000 次模拟复制计算检验。系统发育树由 TREEVIEW^[27] 展示。核酸和氨基酸相似性分析分别依据 Kimura two-parameter method^[28] 和 Dayhoff PAM 001matrix^[29] 方法计算,种群内多样性分

析由 MEGA 6.0^[24] 计算。在本研究中,通过计算 HC-Pro 基因的 dN/dS 值 (非同义突变和同义突变之间的比值) 来预测该基因所承受的选择压力。计算基于 ML 法,通过以下两种方法进行检测。首先,利用 Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>) 中 SLAC (single-likelihood ancestor counting)、FEL (fixed-effects likelihood) 和 REL (random-effects likelihood) 在线检测不同位置密码子的选择压力; 第二,在 MEGA 6.0^[24] 中利用 Pamilo-Bianchi-Li method^[30] 计算系统树不同分支上密码子的选择压力。当 dN/dS < 1 时,该组分离物处于纯化或负向选择压力下; 当 dN/dS = 1 时,说明该组分离物处于中性选择压力中; 当 dN/dS > 1 时,说明该组分离物受正向选择或多样化选择作用。

1.5 多样性分析

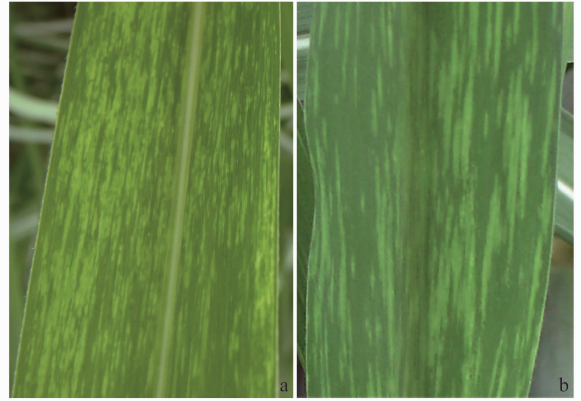
利用 DnaSP 5.0^[31] 估测不同种群分离物的核酸多样性(nucleotide diversity)和单体型多样性(haplotype diversity)。核酸多样性是指分离物序列间的平均差异;单体型多样性是指样本中单体型出现的频率和数量。一般而言,植物 RNA 病毒种群的单体型多样性的值较高,核酸多样性的值较低^[5, 22, 32-35]。SCSMV 的 HC-Pro 基因的核酸和氨基酸间的多样性分布图可通过 SDT 1.0^[36] 中的 Clustal W^[11] 法计算获得。

2 结果分析

2.1 SCSMV HC-Pro 基因的序列分析

2009—2012 年对云南 7 个甘蔗主产地州和国家甘蔗种质资源圃内甘蔗花叶病中 SCSMV 的发生情况进行了调查分析,结果发现:SCSMV 在云南省甘蔗种植区平均发病率 30%(96 个阳性样品);在甘蔗产区,SCSMV 在沅江、开远、新平、常宁、红河和弥勒等县区分布较为广泛^[4];在资源圃内,部分品种的甘蔗种质中 SCSMV 具有较高的检出率(59.1%)。

在 SCSMV 阳性样品中,选取 28 个具有典型花叶、线条花叶症状(图 1)的样品,对其 HC-Pro 基因克隆测序。测序结果显示,每个样品中所得不同克隆的序列相似性很高,选取其中差异性较大的序列(44 条)登录到 GenBank 数据库中。去掉引物序列,本研究所获得的 HC-Pro 基因区段序列长度为 1 002 nt。在 SCSMV 的 HC-Pro 基因中,并没有发现在马铃薯 Y 病毒属病毒的 HC-Pro 基因中广泛存在的 KITC、GE、FRNK 和 PTK 等结构域。



a: 花叶; b: 线条
a: Mosaic; b: Streak

图 1 甘蔗花叶病症状

Fig. 1 Symptoms of the sugarcane mosaic disease

2.2 重组分析结果

将本研究所测定的以及在 GenBank 中获取的共计 105 个 SCSMV HC-Pro 基因序列进行重组分析。在利用 NN 法构建的网状树中,部分分离物之间存在明显的序列交叉,表明部分 SCSMV 分离物在 HC-Pro 基因中存在明显的重组现象(数据未显示)。利用 RDP 4.0^[13] 分析发现,在 HC-Pro 基因中共有 3 个明显的重组位点,分别位于 SCSMV 基因组(位点依据 SCSMV-ID 分离物,登录号: JF488066)的第 1 575、1 736 和 2 273 位点,其中,前两个位点在先前的研究中有过报道,2 273 位点是本研究中新发现的一个重组位点(表 2)。在 105 个 SCSMV 序列中,共发现 4 个明显的重组体,分别为 M117-CL2、M117-CL3、M117-CL7 和 CB419。本研究所获得的 SCSMV 序列中没有发现明显的重组位点。

表 2 在 SCSMV 的 HC-Pro 基因上发生的重组事件¹⁾

Table 2 Recombination event in the HC-Pro gene of SCSMV

| 重组体 Recombinant | 亲本 Parent (Major× Minor) | 重组位点 Recombination site | 不同检测方法的 P 值 P-value tested by different methods | | | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--|-------------------------|----------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | RDP | GENECONV | BOOTSCAN | MAXCHI | CHIMAERA | SISCAN | 3SEQ |
| M117-CL2 | M126-CL1× M115-CL6 | 1 575~2 273 | 4.120×10 ⁻²⁷ | 4.070×10 ⁻²⁵ | — | 1.185×10 ⁻¹⁷ | 1.647×10 ⁻⁸ | 1.417×10 ⁻³⁰ | 5.674×10 ⁻⁴⁹ |
| M117-CL7 | M126-CL1× M115-CL6 | 1 575~2 273 | 4.120×10 ⁻²⁷ | 4.070×10 ⁻²⁵ | — | 1.185×10 ⁻¹⁷ | 1.647×10 ⁻⁸ | 1.417×10 ⁻³⁰ | 5.674×10 ⁻⁴⁹ |
| M117-CL3 | M126-CL1× M115-CL6 | 1 575~2 273 | 1.515×10 ⁻²¹ | 2.739×10 ⁻²⁷ | — | 8.297×10 ⁻¹⁸ | 1.647×10 ⁻⁸ | 5.937×10 ⁻³³ | 2.244×10 ⁻⁵⁵ |
| CB419 | CBBaragua× CB08-04 | 1 736~2 273 | 1.771×10 ⁻⁴ | 1.128×10 ⁻² | — | 1.339×10 ⁻⁸ | 1.723×10 ⁻¹ | 2.599×10 ⁻⁷ | 8.918×10 ⁻¹² |

1) 核苷酸位点依据 SCSMV-ID 分离物(GenBank 登录号: JF488066)。

Regions and sites in accordance to the SCSMV ID isolates (GenBank accession no. JF488066).

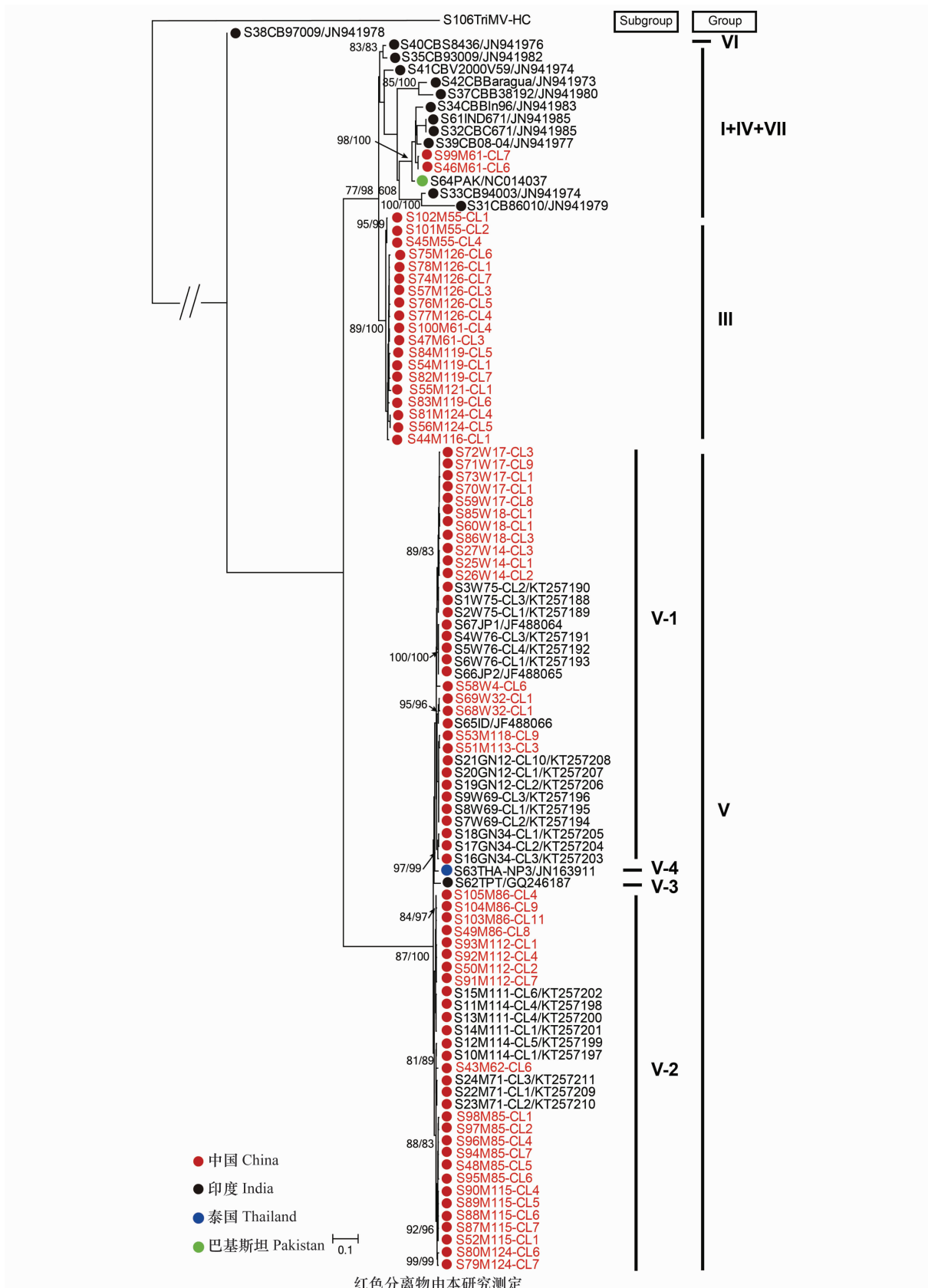


图 2 利用 ML 法对 SCSMV HC-Pro 基因的系统发生分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the helper-component proteinase (HC-Pro) gene sequences of *Sugarcane streak mosaic virus* using ML method

2.3 系统发育分析

将上述数据集合去掉重组体,对剩余的 SC-SMV 序列进行系统发生分析,ML 法和 NJ 法构建的系统发育树具有相似的拓扑结构,ML 树如图 2 所示。在先前的报道^[5]中,SCSMV 依据不同基因至少可分为 9 个组(第 I~第 IX 组),而依据 HC-Pro 基因包含第 V、VI、VII 和第 I+IV 组。在本研究中,所有分离物共分为 4 个组,分别为第 III、V、VI 和第 I+IV+VII 组,其中第 V 组又可以分为 4 个亚组(V-1、V-2、V-3 和 V-4)。SCSMV 不同地区具有较为明显的地理特异性,其中中国分离物主要集中在第 III 和第 V 组,而印度分离物主要集中在第 VI 和第 I+IV+VII 组。本研究所得的 SCSMV 分离物在系统树中广泛分布,且部分来自于云南甘蔗产区的

样品形成一个新组—第 III 组。SCSMV 在 HC-Pro 基因的 dN/dS 为 0.21,没有发现正向选择作用位点;不同种群间的 dN/dS 值远小于 1,其中第 III 组具有最小的 dN/dS 值(0.036),说明 SCSMV 不同种群都处于较强的负选择压力作用下。

2.4 多样性分析结果

利用 SDT 1.0^[36] 统计计算 SCSMV 在 HC-Pro 基因上的核苷酸多样性分布,结果如图 3 所示。所有 SC-SMV 分离物序列在 HC-Pro 基因上的核苷酸多样性程度很高,相似性值低至 70%(图 3)。在系统发生所分的 4 个组中,第 III 组具有较高的单体型多样性(0.982±0.022)和最低的核苷酸多样性(0.011 21±0.001 25)(表 3)。相对于 SCSMV 印度分离物,在中国 SCSMV 不同分离物间遗传相似性程度更高(表 3)。

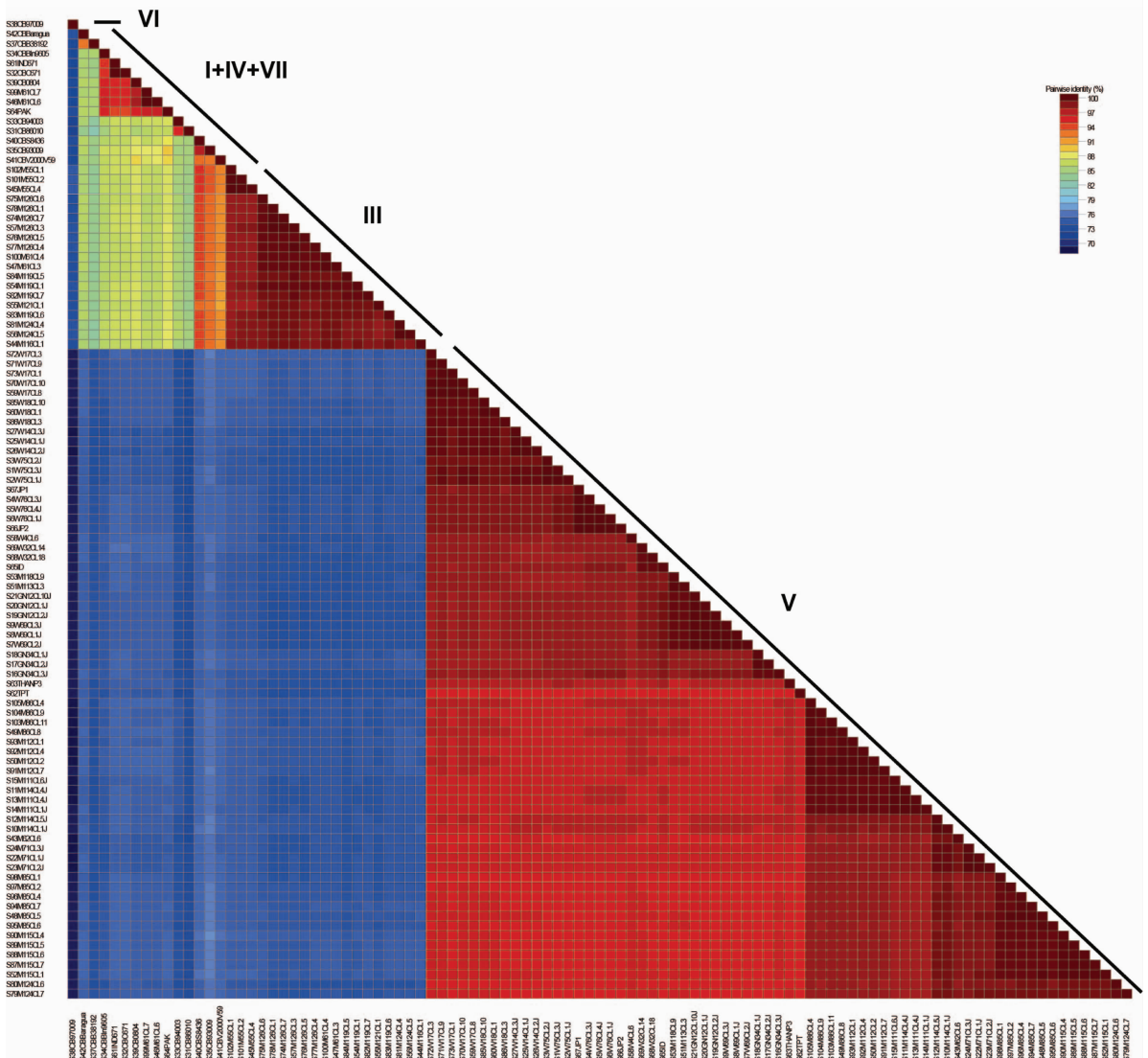


图 3 SCSMV HC-Pro 基因序列一致率分布图

Fig. 3 Distribution of pairwise identity scores of the helper-component proteinase (HC-Pro) gene of *Sugarcane streak mosaic virus*

表 3 甘蔗线条花叶病毒 HC-Pro 基因的
单体型和核苷酸多样性分析¹⁾

Table 3 Haplotype and nucleotide diversity analysis
of the HC-Pro gene of *Sugarcane streak mosaic virus*

| 分组 Group | 数目 No. | 单体型多样性 H | 核苷酸多样性 II |
|--------------|-----------|-------------|-------------------|
| Ⅲ | 19 | 0.982±0.022 | 0.011 21±0.001 25 |
| I + IV + VII | 14 | 0.989±0.031 | 0.112 04±0.014 32 |
| V | 67 | 0.987±0.007 | 0.024 99±0.000 59 |
| VI | 1 | ND | ND |
| 中国 China | 86 | 0.991±0.004 | 0.104 89±0.01 043 |
| 印度 India | 13 | 0.987±0.035 | 0.163 23±0.02 332 |

1) II: 依据序列样本中碱基间的平均差异计算。ND: 未测定。

II: Nucleotide diversity was estimated by the average pairwise difference between sequences in a sample, based on all sites. ND: Not detected.

3 结论与讨论

目前,已经报道了多种植物病毒分子进化与种群结构的研究,特别是 *Potyvirus*, 包括 PVY^[33, 37-38]、TuMV^[20, 22] 以及 TVBMV^[35] 等。我们先前对 SC-SMV 的分子进化研究发现,HC-Pro 基因是其基因组中遗传多样性最高的基因,但限于分离物数量有限,未能作充分的研究^[5]。在本研究中,我们从云南省甘蔗产区以及国家甘蔗种质资源圃内选择了 28 个具有典型甘蔗花叶症状的样品,测定了其 HC-Pro 基因序列,结合 GenBank 中已报道的序列信息,对其进行系统的分子变异与种群特征分析。植物病毒在每个单独的寄主中,是以一个“突变云”或者“准种”^[39] 方式存在的。因此,经单斑分离获得单一纯化的生物克隆是进行分子变异和种群结构分析的必要条件。而在部分植物病毒中,由于没有单斑寄主,无法排除不同基因组片段间错误拼接的可能,因此通常集中于分析病毒的某些单一扩增片段^[4-5]。在本研究中,我们通过单一扩增 SCSMV 的 HC-Pro 基因,测定不同克隆序列的方式进行分析,以确保不存在可能的拼接错误。

重组是遗传多样性的重要来源,是促进病毒进化的主要动力之一。在 PVY^[32] 和 TuMV^[20, 22] 等 *Potyvirus* 中,HC-Pro 基因的重组发生频率很高。而在本研究中,SCSMV 的 HC-Pro 基因中仅发现 3 个重组位点,这表明 SCSMV HC-Pro 基因中发生重组的频率很低。He 等^[5] 的研究中,由于分离物的数量限制,SCSMV 依据 HC-Pro 基因可分为 4 个组,分别为第 V、VI、VII 和第 I + IV 组。本研究中测定的部分源自云南蔗区的分离物序列形成一个新组,对

照 SCSMV P1 基因的系统树,将其定名为第 III 组。第 III 组 SCSMV 分离物的发现,增加了 HC-Pro 基因与 P1 和 CP 基因在系统发生分析上的一致性。SCSMV 不同组间具有清晰的地理特异性,中国分离物主要集中在第 III 组和第 V 组。本研究测定的 SCSMV 资源圃和甘蔗产区分离物位于不同分支,遗传差异较大,具有很明显的亚组结构,这表明云南甘蔗产区和资源圃内 SCSMV 可能具有不同的起源。通常,大部分的动植物病毒处于强的负选择压力下。本研究中,HC-Pro 基因的 dN/dS 远小于 1,表明 SCSMV 在此基因上受到强的负选择压力作用,这可能是与其基因功能的稳定性相适应的。核苷酸多样性分布结果与系统发生结果相一致,进一步证明 SCSMV HC-Pro 基因具有高度的遗传多样性,而该结果可能与其功能相适应,尽管目前尚不明确 SCSMV HC-Pro 的基因功能。

参考文献

- [1] Xu D L, Zhou G H, Xie Y J, et al. Complete nucleotide sequence and taxonomy of *Sugarcane streak mosaic virus*, member of a novel genus in the family *Potyviridae* [J]. *Virus Genes*, 2010, 40(3): 432 - 439.
- [2] Hema M, Sreenivasulu P, Savithri H S. Taxonomic position of *Sugarcane streak mosaic virus* in the family *Potyviridae* [J]. *Archives of Virology*, 2002, 147(10): 1997 - 2007.
- [3] Li Wenfeng, He Zhen, Li Shifang, et al. Molecular characterization of a new strain of *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) [J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(11): 2101 - 2104.
- [4] He Zhen, Li Wenfeng, Yasaka R, et al. Molecular variability of *Sugarcane streak mosaic virus* in China based on an analysis of the P1 and CP protein coding regions [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(5): 1149 - 1154.
- [5] He Zhen, Yasaka R, Li Wenfeng, et al. Genetic structure of populations of *Sugarcane streak mosaic virus* in China: Comparison with the populations in India [J]. *Virus Research*, 2016, 211: 103 - 116.
- [6] García-Arenal F, Fraile A, Malpica J M. Variability and genetic structure of plant virus populations [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2001, 39(1): 157 - 186.
- [7] Gibbs A, Ohshima K. *Potyviruses* and the digital revolution [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2010, 48(1): 205 - 223.
- [8] Viswanathan R, Balamuralikrishnan M, Karuppaiah R. Characterization and genetic diversity of *Sugarcane streak mosaic virus* causing mosaic in sugarcane [J]. *Virus Genes*, 2008, 36(3): 553 - 564.
- [9] Bagyalakshmi K, Parameswari B, Chinnaraja C, et al. Genetic variability and potential recombination events in the HC-Pro gene of *Sugarcane streak mosaic virus* [J]. *Archives of Virolo-*

- gy, 2012, 157(7): 1371 - 1375.
- [10] Fellers J P, Seifers D, Ryba-White M, et al. The complete genome sequence of *Triticum mosaic virus*, a new wheat-infecting virus of the high plains [J]. Archives of Virology, 2009, 154(9): 1511 - 1515.
- [11] 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.
- [12] Martin D P, Rybicki E P. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences [J]. Bioinformatics, 2000, 16(6): 562 - 563.
- [13] Martin D P, Lemey P, Lott M, et al. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination [J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2462 - 2463.
- [14] Sawyer SA (1999) GENECONV: a computer package for the statistical detection of gene conversion [M]. Distributed by the author, Department of Mathematics, Washington University in Louis.
- [15] Salminen M O, Carr J K, Burke D S, et al. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning [J]. AIDS Research and Human Retroviruses, 1995, 11(11): 1423 - 1425.
- [16] Smith J M. Analyzing the mosaic structure of genes [J]. Journal of Molecular Evolution, 1992, 34(2): 126 - 129.
- [17] Posada D, Crandall K A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2001, 98(24): 13757 - 13762.
- [18] Boni M F, Posada D, Feldman M W. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets [J]. Genetics, 2007, 176(2): 1035 - 1047.
- [19] Gibbs M J, Armstrong J S, Gibbs A J. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences [J]. Bioinformatics, 2000, 16(7): 573 - 582.
- [20] 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.
- [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] 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.
- [23] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies; assessing the performance of PhyML 3.0 [J]. Systems Biology, 2010, 59(3): 307 - 321.
- [24] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725 - 2739.
- [25] Huson D H, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies [J]. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23(2): 254 - 267.
- [26] Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging [J]. Molecular Biology and Evolution, 2008, 25(7): 1253 - 1256.
- [27] Page R D M. Tree view: An application to display phylogenetic trees on personal computers [J]. Bioinformatics, 1996, 12(4): 357 - 358.
- [28] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111 - 120.
- [29] Dayhoff M O, Barker W C, Hunt L T. Establishing homologies in protein sequences [J]. Methods in Enzymology, 1983, 91: 524 - 545.
- [30] 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.
- [31] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451 - 1452.
- [32] Ogawa T, Tomitaka Y, Nakagawa A, et al. Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations [J]. Virus Research, 2008, 131(2): 199 - 212.
- [33] Wei Taiyun, Yang Jinguang, Liao Fulong, et al. Genetic diversity and population structure of rice stripe virus in China [J]. Journal of General Virology, 2009, 90(4): 1025 - 1034.
- [34] 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.
- [35] Zhang Chengling, Gao Rui, Wang Jie, et al. Molecular variability of *Tobacco vein banding mosaic virus* populations [J]. Virus Research, 2011, 158(1): 188 - 198.
- [36] Muhire B M, Varsani A, Martin D P. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation [J]. PLoS ONE, 2014, 9(9): e108277.
- [37] 高芳鑫, 沈建国, 史凤阳, 等. 中国马铃薯 Y 病毒的检测鉴定及 CP 基因的分子变异 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(15): 3125 - 3133.
- [38] 高芳鑫, 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.
- [39] Roossinck M J. Mechanisms of plant virus evolution [J]. Annual Review of Phytopathology, 1997, 35(1): 191 - 209.

(责任编辑: 田 喆)