网络出版时间:2025-08-07 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.02.013

尼润潜隐病毒内蒙古分离物全基因组序列扩增及遗传多样性分析

高金雨[1],郭孟泽[1],赵雪[1],孙平平[1],
张磊[1],白银凤[2],李正男[1]

(1 内蒙古农业大学 园艺与植物保护学院,内蒙古 呼和浩特 010018;
2 包头市农牧科学研究所,内蒙古 包头 014010)

[摘 要] 【目的】明确引起呼和浩特市庭院及包头市农牧科学研究所朱顶红育种基地朱顶红(*Hippeastrum rutilum*)叶片褪绿及花叶病的病毒种类,扩增其全基因组序列并分析其遗传多样性。【方法】以 2023 年 5 月从内蒙古自治区呼和浩特市庭院和包头市农牧科学研究所朱顶红育种基地采集的 320 份疑似感染病毒的朱顶红叶片为试验材料,通过高通量测序(HTS)技术明确造成该病害的病毒性病原为尼润潜隐病毒(nerine latent virus,NeLV),通过 RT-PCR 技术和 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术获得 NeLV 的全基因组序列,并将其命名为 23-HiRu1。利用 SDTv1.3 软件、MEGA 11.0 软件中的最大似然法以及 RDP4 和 DnaSP 软件对其进行序列一致性、系统发育、重组分析以及遗传多样性分析。【结果】23-HiRu1 基因组全长为 8 270 nt(GenBank 登录号:PQ261105),编码 6 个开放阅读框(ORFs),与已报道的 NeLV 基因组特征一致。该分离物与已报道的 NeLV 分离物全基因组核苷酸序列一致性为 75.4%~97.9%,CP 基因核苷酸和氨基酸一致性分别为 78.3%~98.2%和 90.2%~99.7%,符合 ICTV 对香石竹潜隐病毒属(*Carlavirus*)种的划分标准。系统发育分析结果显示,NeLV 各分离物可划分为 2 个亚群,其中本研究所获的分离物 23-HiRu1 在 Group Ⅰ中,且 23-HiRu1 与南非共和国朱顶红分离物 Amaryllis-1 isolate 19-3029 亲缘关系最近。遗传多样性分析结果表明,NeLV 具有较高的遗传多样性,整体受到了负选择压力,地理特异性明显,未发现重组事件。【结论】引起内蒙古朱顶红叶片褪绿和花叶病的病原为尼润潜隐病毒(NeLV),其与南非共和国朱顶红分离物 Amaryllis-1 isolate 19-3029 的亲缘关系最近;NeLV 具有较高遗传多样性,受较强负选择压力,地理特异性明显,未发现重组事件。该结果为 NeLV 的分子特征和遗传进化研究提供了重要依据。

[关键词] 尼润潜隐病毒;朱顶红;全基因组序列;系统发育分析;遗传多样性分析
[中图分类号] S436.8+1 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)02-0125-10

Complete genome sequence amplification and genetic diversity analysis of nerine latent virus Inner Mongolia isolate

GAO Jinyu[1],GUO Mengze[1],ZHAO Xue[1],SUN Pingping[1],
ZHANG Lei[1],BAI Yinfeng[2],LI Zhengnan[1]

(1 *College of Horticulture and Plant Protection,Inner Mongolia Agricultural University,Hohhot,Inner Mongolia* 010018,*China*;
2 *Baotou Institute of Agriculture and Animal Husbandry Science and Technology,Baotou,Inner Mongolia* 014010,*China*)

Abstract:【Objective】This research aims to identify the virus species that cause leaf chlorosis and mosaic virus disease in *Hippeastrum rutilum* in the courtyard of Hohhot and in the Zhudinghong breeding

[收稿日期] 2024-12-07 [修回日期] 2025-01-25
[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金项目(2022QN03018,2023LHMS03020);内蒙古自治区高等学校青年科技英才项目(NJYT23079);内蒙古自治区直属高校基本科研业务费项目(BR230128)
[作者简介] 高金雨(2001—),男,河南郑州人,在读硕士,主要从事植物病毒学研究。E-mail:gaojinyu@emails.imau.edu.cn
[通信作者] 李正男(1983—),男(满族),吉林白城人,教授,博士生导师,主要从事植物病毒学研究。E-mail:lizhengnan@imau.edu.cn

base of Baotou Institute of Agricultural and Animal Husbandry Science and Technology, amplify their whole genome sequences, and analyze their genetic diversity.【Method】 With 320 suspected virus-infected leaves collected from the courtyard of Hohhot City and Zhudinghong breeding base of Baotou Institute of Agricultural and Animal Husbandry Science and Technology in Inner Mongolia Autonomous Region in May 2023 as samples, the viral pathogen causing the disease was identified as nerine latent virus (NeLV) through high-throughput sequencing (HTS) technology. The complete genome sequence of NeLV was obtained through RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology, and was named as 23-HiRu1. Sequence consistency, phylogenetic, recombination analysis, and genetic diversity analysis were performed by using SDTv1.3 software, maximum likelihood method in MEGA 11.0 software, and RDP4 and DnaSP software.【Result】 The total length of the 23-HiRu1 genome is 8 270 nt (GenBank accession number: PQ261105), encoding 6 ORFs that are consistent with the reported NeLV genome features. The nucleotide sequence consistency of this isolate with the reported NeLV isolate is 75.4%－97.9%, and the nucleotide and amino acid consistency of the CP gene is 78.3%－98.2% and 90.2%－99.7%, respectively, which meets the ICTV classification criteria for the genus *Carlavirus* in *Caryophyllum*. The phylogenetic analysis results showed that the NeLV isolates can be divided into two subgroups. Among them, the isolate 23-HiRu1 obtained in this study belongs to Group Ⅰ, and 23-HiRu1 has the closest genetic relationship with the South African red isolate Amaryllis-1 isolate 19-3029. The results of genetic diversity analysis indicate that NeLV has high genetic diversity and obvious geographic specificity, which is subjected to negative selection pressure as a whole, with no recombination events found.【Conclusion】 This study identified the pathogen of red leaf chlorosis and mosaic virus disease in Inner Mongolia as NeLV. NeLV is most closely related to Amaryllis-1 isolate 19-3029 from the Republic of South Africa. NeLV has high genetic diversity and significant geographic specificity, which is subject to strong negative selection pressure, with no recombination events found. The study provides important evidence for the molecular characteristics and genetic evolution of NeLV.

Key words: nerine latent virus (NeLV); *Hippeastrum rutilum*; full genomic sequence; phylogenetic analysis; genetic diversity analysis

朱顶红(*Hippeastrum rutilum*)是石蒜科(Amaryllidaceae)朱顶红属(*Hippeastrum*)一种极具观赏价值和药用价值的多年生园艺植物。在我国南方是露地栽培,而在北方常见的是盆栽[1-3]。近年来,随着朱顶红栽培种植规模的扩大,朱顶红病毒病愈演愈烈,对其观赏性造成了严重影响[4-6]。据 NCBI 数据库统计,朱顶红褪绿环斑病毒(hippeastrum chlorotic ringspot orthotospo virus, HCRV)、尼润潜隐病毒(nerine latent virus, NeLV)、朱顶红花叶病毒(hippeastrum mosaic virus, HiMV)、朱顶红潜隐病毒(hippeastrum latent virus, HiLV)、番茄斑萎病毒(tomato spot wilt virus, TSWV)、凤仙花坏死斑病毒(impatiens necrotic spot virus, INSV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)、韭葱黄条病毒(leek yellow stripe virus, LYSV)、洋葱黄矮病毒(onion yellow dwary virus, OYDV)、菜豆金色黄花叶病毒(bean yellow mosaic virus, BYMV)、水仙潜隐病毒(narcissus latent virus, NLV)、水仙退化病毒(narcissus degeneration virus, NDV)、水仙晚季黄化病毒(narcissus late season yellows virus, NLSYV)、水仙黄条病毒(narcissus yellow stripe virus, NYSV)、蚕豆枯萎病毒 2(broad bean wilt virus2, BBWV-2)、花生环斑病毒(groundnut ringspot virus, GRSV)等 16 种病毒均可侵染朱顶红,且复合侵染现象明显[7-8]。被病毒侵染的朱顶红常表现黄化、斑驳、花叶以及卷曲等症状。

尼润潜隐病毒(NeLV)属于乙型线状病毒科(Betaflexiviridae)香石竹潜隐病毒属(*Carlavirus*),其基因组为单链正义 RNA,长 8.3 kb,含 6 个开放阅读框(open reading frame, ORF)。其中 ORF1 编码一个 RNA 复制酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP),ORF2～ORF4 编码一个三联基因区(triple gene block, TGB),ORF5 编码一个外壳蛋白(coat protein, CP),ORF6 编码一个核苷酸结合

蛋白(nucleotide binding protein，NBP)[9]。1972 年 NeLV 首次在荷兰的白花网球花上被发现，1996 年美国学者研究证明，鲍登纳丽花(尼润石蒜)和孤挺花也是 NeLV 的寄主；2016 年和 2018 年又有研究证明，血百合和文殊兰也是 NeLV 的寄主。NeLV 于 2006 年传入我国，首次在厦门机场被发现，随后又从台湾旅客携带的朱顶红种苗中被截获，说明其在国内的分布至少已经涉及厦门、台湾一带；随后我国对境外植物进行检疫时，多次在朱顶红、水仙(*Narcissus tazetta*)种苗中检测出该病毒[10]。目前，NeLV 主要侵染水仙和尼润(*Lycoris squamigera*)，侵染朱顶红后产生褪绿条纹症状[11]。已有研究发现，桃蚜(*Myzus persicae*)是 NeLV 传播的介体，此外，该病毒还可通过机械摩擦传播[12]。

笔者 2023 年 5 月调查发现，内蒙古自治区呼和浩特市庭院及包头市农牧科学研究所朱顶红育种基地的朱顶红叶片均患有褪绿条纹、花叶等疑似病毒病症状。本研究通过高通量测序(high-throughput sequencing，HTS)技术、cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends，RACE)技术以及 RT-PCR 技术[13-16]明确了该病毒性病原为 NeLV，且获得了该病毒的全基因组序列，并对其进行序列一致性、系统发育以及遗传多样性分析，旨在为揭示该病毒的遗传变异、流行情况以及分子适应性进化机制奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

2023 年 5 月，从内蒙古自治区呼和浩特市庭院及包头市农牧科学研究所朱顶红育种基地共采集 320 株疑似感染病毒的朱顶红叶片样本，其中呼和浩特市庭院 10 份，包头市农牧科学研究所 310 份，液氮速冻后保存于－80 ℃冰箱备用。

1.2　试验方法

1.2.1　高通量测序和数据分析　以 320 份朱顶红感病叶片为样品，每份样品取 0.1 g 进行混合，委托青岛百迈客生物科技有限公司进行总 RNA 提取和转录组文库构建。使用 Nova Seq6000 测序平台对混合样品进行高通量测序，获得的原始数据用 SPAdes(v3. 15. 3)软件(https://github. com/ablab/ spades)拼接成病毒相关的 contigs。最后通过 BLASTn 和 BLASTx 将获得的 contigs 在 NCBI 数据库中进行比对，以完成 contigs 的病毒注释。

1.2.2 设计引物　将高通量测序结果与 NCBI GenBank 数据库中已报道的 NeLV 全基因组进行序列比对，然后在序列保守区域进行特异性检测引物、RACE 引物以及全基因组序列扩增引物设计，所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，引物信息详见表 1。

表 1　NeLV 检测引物及其全基因组扩增引物信息

Table 1　NeLV detection primers and their whole genome amplification primer information

引物名称 Primer name	引物序列(5′→3′) Sequence of primer	目的片段大小/bp Target fragment size
NeLV-F	ATTGGACGTCCTGCATTAAAG	612
NeLV-R	GCAACCATACAGCCCACC	
NeLV-1	ACTGGGTGCGAGTGAACCATGC	317
NeLV-2	AAGTGACTGGTGGGCTGTATGGTT	488
NeLV-3	AGGGAGTTCAGCATCAACCCCAA	530
NeLV-4	TTGGGACAAATCAACCACCAGCT	717
NeLV-5	GTCCCGCCTGAATCAATAGCA	218
NeLV-6	TTCGTCCCAATCATGTAGTTCC	
NeLV-7	TGAGAGGTAGCTAACCAACTTCT	3 383
NeLV-8	TCTTGGGCTGACGTAACATATTG	
NeLV-9	TCGAAACTCACTTCCGTAATGTCC	2 789
NeLV-10	TCGTGGACGCTCCTGATTCTGATG	
NeLV-11	TGTGAGAACCATAGTGCAGAAC	2 600
NeLV-12	TAGGCCTTTCATTAGGTTGAAGGTC	

1.2.3　朱顶红感病叶片总 RNA 提取、cDNA 合成及 NeLV 检测　根据 MiniBEST plant RNA extraction kit 试剂盒(宝日医生物技术(北京)有限公司)说明书提取朱顶红感病叶片总 RNA，并通过 1%琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计分别检测所提取 RNA 的质量和浓度，－80 ℃保存备用。按照 M5 逆转录酶(M5 super plus qPCR RT kit with gDNA remover)说明进行 cDNA 合成，并于－20 ℃

冰箱中保存备用。通过 DNA 聚合酶 2×M5 Hiper 超光速 mix(with blue dye)和 NeLV 特异性引物 NeLV-F/NeLV-R、NeLV-5/NeLV-6 验证 NeLV 的高通量测序检测结果,明确 NeLV 的发生情况。

1.2.4 NeLV 全基因组序列的扩增与测序 以 NeLV 检测为阳性的朱顶红叶片样品 RNA 为模板,通过 RACE 技术获得 NeLV 的双末端序列,试验严格按照 SMARTer® RACE 5'/3' Kit(宝日医生物技术(北京)有限公司)试剂盒说明书进行。获得 NeLV 的双末端序列后,分 3 个片段进行 NeLV 全基因组序列扩增,各片段之间重叠区域在 200 bp 以上。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,利用 SteadyPure DNA 凝胶回收试剂盒对目的条带进行割胶纯化后连接至 pTOPO-TA 载体,转化大肠杆菌 DH5α,将 RT-PCR 鉴定的阳性菌落送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。

1.2.5 NeLV 全基因组序列一致性、系统进化及遗传多样性分析 利用 Vector NTI 软件对所获得的 NeLV 全基因组序列进行 ORFs 预测分析,获得 NeLV 分离物的 5′端非编码区(5′-UTR)、3′端非编码区(3′-UTR)以及 ORFs 序列。从 GenBank 数据库下载所有 NeLV 分离物的全基因组序列,利用 MEGA 11.0 中的 CLUSTALW 对本研究所获的 NeLV 全基因组序列与 GenBank 数据库所下载的所有 NeLV 全基因组序列进行比对,然后利用 MEGA 11.0 软件中的最大似然法(maximum likelihood,ML)构建系统发育树,自展校正值为 1 000。利用 MODLES 程序[17]确定最佳进化模型,利用 RDP4 软件和 SDTv1.3 软件对 NeLV 各株系的 ORFs 进行重组分析和序列一致性分析[18-19],利用 DnaSP 软件对所有 NeLV 中国分离物全基因组序列进行遗传多样性分析,利用 Datamonkey 软件进行选择压力分析[10,20-21]。

2 结果与分析

2.1 内蒙古朱顶红感病叶片高通量测序结果与分析

对 320 份朱顶红感病叶片样品的高通量测序数据进行分析,使用 Trimmomatic 软件去除接头序列并排除低质量序列后,共获得 42 591 510 条干净读数,其 Q30 质量值为 94.55%。BLASTn,BLASTx 比对结果表明,5 个 contigs 分别比对到 NeLV 的分离物,且与分离物 NeLV-SK(GenBank 登录号:ON228217.1)的核苷酸序列一致性最高,为 97.91%~98.39%。

2.2 感病朱顶红表型症状及 NeLV 检出情况

利用 NeLV 的特异性引物 NeLV-F/NeLV-R 和 NeLV-5/NeLV-6,对呼和浩特市庭院及包头市农牧科学研究所朱顶红种植基地中采集的 320 份朱顶红样品进行 RT-PCR 检测。结果表明:呼和浩特市和包头市朱顶红 NeLV 检出率均较高,分别为 100%和 65.8%。观察发现感病朱顶红叶片主要表现为明显褪绿环斑条纹(图 1-A),危害严重的朱顶红则伴有局部坏死症状(图 1-B)。



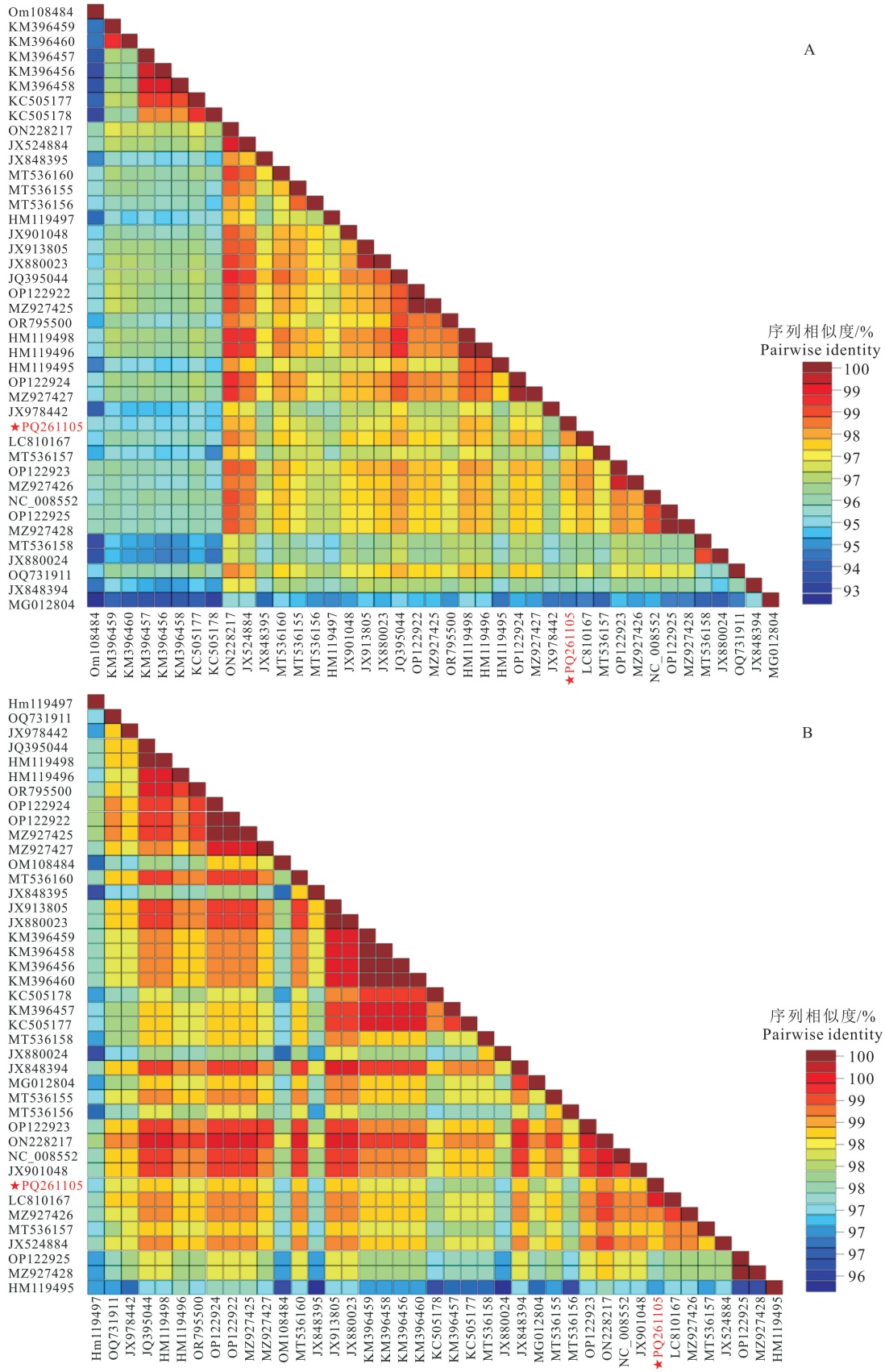
图 1 感染 NeLV 的朱顶红表型症状

Fig.1 Symptoms of NeLV infection in amaryllis samples

2.3 NeLV 全基因组序列及序列一致性分析

将采用 RACE 技术获得的 NeLV 双末端序列与 RT-PCR 扩增获得的 NeLV 基因组序列进行拼接,获得长度为 8 270 nt 的 NeLV 全基因组序列,将其命名为 23-HiRu1(GenBank 登录号:PQ261105)。基因组结构分析结果表明,23-HiRu1 编码 6 个 ORFs,具有 NeLV 基因组特征。

为明确 23-HiRu1 的序列变异情况,对 GenBank 数据库下载的所有 NeLV 分离物进行序列一致性分析。结果(图 2)表明,该分离物 23-HiRu1 与已知的 NeLV 分离物全基因组核苷酸序列一致性为 75.4%~97.9%,其中与韩国分离物 Ama-RNA(GenBank 登录号:LC810167)的全基因组核苷酸序列一致性最高。此外,23-HiRu1 与所有 NeLV 分离物 CP 区域序列一致性分析结果(图 2)显示,23-HiRu1 与其他 NeLV 分离物的 CP 区域核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 78.3%~98.2%和 90.2%~99.7%,其中与韩国分离物 Ama-RNA 的一致性最高。23-HiRu1 与 NeLV 分离物其他编码区序列一致性分析结果(表 2)表明,本研究所获分离物 23-HiRu1 与南非共和国分离物 19-3029(GenBank 登录号:MT536159)及澳大利亚分离物 Marijiniup 4(GenBank 登录号:NC_028111)序列一致性均较低,其寄主植物分别来自君子兰和水仙,或为不同株系。



A. CP 区域核苷酸序列一致性矩阵图；B. CP 区域氨基酸序列一致性矩阵图。

A. Nucleotide sequence consistency matrix diagram in CP region; B. Amino acid sequence consistency matrix diagram in CP region.

图 2　NeLV 分离物 CP 区域序列一致性矩阵图

Fig. 2　Sequence consistency matrix diagram in CP region of NeLV isolate

表 2 NeLV 分离物的序列一致性分析结果

Table 2 Sequence consistency analysis results of NeLV and other isolates for each coding region %

登录号 Login number	RDRP		TGB1		TGB2		TGB3		CP		NBP	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
OM10844	94.4	95.7	94.3	96.6	92.8	95.7	97.0	95.5	95.7	97.3	97.3	96.3
OQ731911	95.7	96.8	95.9	97.0	96.6	98.3	96.0	93.9	96.8	98.3	98.3	100.0
MT536157	95.9	96.3	96.1	98.3	95.1	95.7	94.0	92.4	97.2	98.7	98.8	99.3
MT536156	96.0	96.8	96.1	96.6	96.0	98.3	97.5	93.9	96.9	97.6	98.5	99.3
MT536155	95.9	96.8	97.0	97.0	95.7	99.1	96.5	90.9	97.2	98.3	99.3	100.0
MT536160	96.9	97.8	96.9	98.3	95.4	98.3	96.5	93.9	97.5	98.7	99.3	99.3
MT536158	95.9	97.7	96.7	97.4	96.0	97.4	94.5	92.4	96.4	98.0	99.0	100.0
JQ395044	97.4	98.2	97.9	98.7	96.8	99.1	98.0	95.5	97.9	98.7	99.3	100.0
LC810167	97.8	98.6	98.0	98.3	96.0	98.3	99.0	97.0	98.0	98.7	99.3	100.0
OP122922	97.4	97.5	97.1	97.0	96.6	99.1	97.0	92.4	97.2	98.7	98.0	97.8
OP122925	97.3	97.3	97.9	97.8	96.6	99.1	99.0	97.0	97.5	97.6	99.0	99.3
OP122924	97.3	97.8	97.9	97.8	96.8	98.3	98.0	97.0	97.5	98.7	99.0	98.5
OP122923	97.3	97.5	97.9	98.3	97.4	99.1	98.5	97.0	98.0	98.7	98.5	97.8
MG01284	93.8	95.5	94.7	95.7	93.1	96.5	94.0	87.9	94.6	98.0	97.1	96.3
MT536159	74.5	80.3	74.2	78.9	73.9	80.9	68.2	68.2	78.3	90.2	83.6	88.9
NC_028111	74.9	81.0	74.4	78.4	74.1	80.9	68.7	69.7	78.9	90.2	84.1	88.9

注:nt 表示核苷酸序列一致性;aa 表示氨基酸序列一致性。

Note:nt represents nucleotide sequence consistency;aa represents amino acid sequence consistency.

2.4 23-HiRu1 的系统进化分析

为了明确 NeLV 内蒙古朱顶红分离物的分类地位,本研究利用 MEGA 11.0 中的 CLUSTALW 对所有 NeLV 分离物全基因组序列进行比对,并利用 MODELS 程序确定了最佳进化模型为(GTR+G+I),再利用最大似然法构建系统发育树。结果(图 3)表明,所有 NeLV 分离物可分为 2 个亚群,其中 23-HiRu1 与南非共和国朱顶红分离物 Amaryllis-1 isolate 19-3029(登录号:MT536158)亲缘关系较近,并共同聚集在 Group I;而与另一南非共和国朱顶红分离物 Amaryllis-2 isolate 19-3029(登录号:MT536159)和澳大利亚的朱顶红分离物 Marijiniup 4(登录号:JQ395043)的亲缘关系较远,或为不同株系。

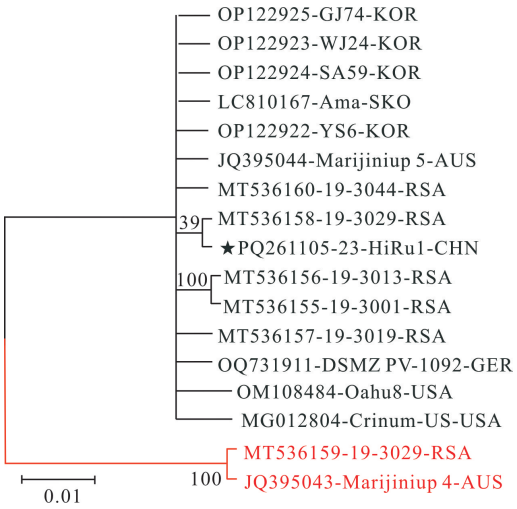


图 3 基于 NeLV 全基因组序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on NeLV whole genome sequence

2.5 23-HiRu1 的遗传多样性分析

将克隆得到的 NeLV 内蒙古分离物全基因组序列与 NCBI GenBank 数据库中所有 NeLV 参考序列进行重组分析,结果显示 23-HiRu1 与其他已知 NeLV 均不存在重组事件。为了评估 NeLV 进化过程中每个编码区的选择压力变化情况,使用 DnaSp 计算 dN/dS,结果(表 3)表明 NeLV 所有编码区的 dN 值均小于 dS 值($dN/dS<1$),表明纯化选择限制了群体的变异性。但纯化选择压力在整个基因组中并不是均匀分布的,纯化选择压力最强的是 CP 区域,其次是 TGB2 区域,dN/dS 分别为 0.090 和 0.129;但 TGB3 区域受到的纯化选择压力相对较弱,dN/dS 仅为 0.300,利用 Datamonkey 软件进行的选择压力分析同样证实了该结果。此外,基于 SLAC、FEL 以及 FUBAR 等 3 种算法鉴定出 RdRp 的第 1 373 位点受到了正向选择。

为了揭示不同群体 NeLV 之间的遗传关系,本研究计算了不同系统群、地理位置以及寄主 NeLV 群体的遗传多样性参数和每代迁移个体数(Nm),结果(表 4)表明,NeLV 亚洲群体与非洲群体以及亚洲群体与美洲群体之间的每代迁移个体数(Nm)均大于 1,且遗传分化程度较低($F_{ST}<0.33$),表明其亲缘关系较近;其他不同地理位置 NeLV 群体之间的 Nm 均小于 1,表明其亲缘关系较远,NeLV 地理特异性明显。NeLV 水仙群体与文殊兰群体、郁金香群体之间的 Nm 远大于 1;NeLV 其他寄主群体之间分化程度较低($F_{ST}<0.33$)。此外,所有 NeLV 分离物的单倍体多样性和核苷酸多样性均显

示了高度的遗传多样性。在中性检验中，除了NeLV 朱顶红群体外，NeLV 其他寄主群体和不同地理位置群体的群体遗传参数均为负值，表明背景选择、遗传搭便车或群体扩张导致了大量的低频突变。

表 3　NeLV 编码区的选择压力

Table 3　Analysis of selection parameters acting on different coding regions of nerine latent virus isolates

区域 Regions	ENC	dN	dS	dN/dS	归一化 dN-dS 值 Normalized dN-dS values	
					lg (L)	Mean (dN/dS)
RdRp	1 877	0.043 10	0.266 03	0.162	−22 210.60	0.157
TGB1	232	0.038 53	0.253 15	0.152	−2 605.80	0.132
TGB2	115	0.032 14	0.248 45	0.129	−1 254.42	0.114
TGB3	66	0.064 31	0.214 49	0.300	−799.19	0.304
CP	297	0.021 19	0.235 63	0.090	−2 842.98	0.070
RBP	135	0.023 48	0.139 71	0.168	−1 143.66	0.200

区域 Regions	负选择密码子数 Number of negatively selected codon			正选择密码子位点 Site of positively selected codon		
	FEL	SLAC	FUBAR	FEL	SLAC	FUBAR
RdRp	476	263	978	467,540,758,784,1 262,1 265,1 373	620,1 373	690,758,1 262,1 373
TGB1	110	37	87	22	0	22,69,75
TGB2	45	16	35	0	0	0
TGB3	45	6	9	0	0	53
CP	140	42	146	4	0	4,13,42
RBP	32	6	13	77	0	77

注：ENC. 有效密码子数；Mean(dN/dS)＝1，＜1 和＞1 分别指示中性进化、负(净化)选择和正(多样化)选择。

Note: ENC. Number of valid codons; Mean(dN/dS) value is 1, with＜1 and＞1 indicating neutral evolution, negative (purification) selection, and positive (diversification) selection, respectively.

表 4　NeLV 不同分离物的遗传多样性

Table 4　Genetic diversity of different isolates of NeLV

比较 Comparisons	Ks*	Kst*	Snn	F_{ST}	Nm
系统群 System group					
Group Ⅰ vs Group Ⅱ	5.859 39	−0.026 71	0.833 33	−0.097 91	−5.61
地理起源 Geographical origin					
亚洲 vs 非洲 Asia vs Africa	5.673 46	0.017 72**	0.769 23**	0.043 13	11.09
亚洲 vs 美洲 Asia vs Americas	5.130 00	0.069 59	0.777 78	0.055 97	8.43
亚洲 vs 大洋洲 Asia vs Oceania	5.128 03	0.094 11	0.777 78	−0.005 97	−84.31
非洲 vs 美洲 Africa vs Americas	6.357 57	0.003 63	0.750 00	−0.010 75	−47.03
非洲 vs 大洋洲 Africa vs Oceania	6.358 51	0.014 09	0.250 00	−0.295 33	−2.19
美洲 vs 大洋洲 Americas vs Oceania	0.000 00	1.000 00	0.250 00	−0.074 85	−7.18
寄主 Host					
百子莲 vs 文殊兰 *Agapanthus* vs *Crinum asiaticum*	0.000 00	1.000 00	0.500 00	0.206 90	1.92
百子莲 vs 君子兰 *Agapanthus* vs *Clivia miniata*	0.000 00	1.000 00	0.750 00	0.301 30	1.16
百子莲 vs 朱顶红 *Agapanthus* vs *Hippeastrum*	6.679 12	−0.028 73	1.000 00	0.272 83	1.33
百子莲 vs 水仙 *Agapanthus* vs *Narcissus*	0.000 00	1.000 00	1.000 00	0.382 69	0.81
百子莲 vs 郁金香 *Agapanthus* vs *Tulipa*	4.994 12	0.057 26	1.000 00	0.434 44	0.65
文殊兰 vs 君子兰 *Crinum asiaticum* vs *Clivia miniata*	0.000 00	1.000 00	0.500 00	0.017 64	0.44
文殊兰 vs 朱顶红 *Crinum asiaticum* vs *Hippeastrum*	6.679 12	−0.000 32	0.714 29	0.121 69	3.61
文殊兰 vs 水仙 *Crinum asiaticum* vs *Narcissus*	0.000 00	1.000 00	0.500 00	0.036 90	13.05
文殊兰 vs 郁金香 *Crinum asiaticum* vs *Tulipa*	4.990 74	0.112 92	0.666 67	0.066 75	6.99

表 4(续) Table 4(continued)

比较 Comparisons	Ks*	Kst*	Snn	F_{ST}	Nm
君子兰 vs 朱顶红 *Clivia miniata* vs *Hippeastrum*	6.679 12	−0.026 88	0.571 43	0.178 66	2.30
君子兰 vs 水仙 *Clivia miniata* vs *Narcissus*	0.000 00	1.000 00	0.250 00	−0.003 97	−126.50
君子兰 vs 郁金香 *Clivia miniata* vs *Tulipa*	4.994 12	0.053 16	0.666 67	0.014 27	34.53
朱顶红 vs 水仙 *Hippeastrum* vs *Narcissus*	6.677 85	−0.041 58	0.571 43	0.201 90	1.98
朱顶红 vs 郁金香 *Hippeastrum* vs *Tulipa*	6.001 36	0.021 83	0.444 44	0.226 08	1.71
水仙 vs 郁金香 *Narcissus* vs *Tulipa*	4.994 12	0.019 92	0.333 33	0.010 29	48.09

注:Ks* 和 Kst*. 基于单倍型频率的群体间遗传分化指标,用于检测群体结构;Snn. 基于单倍型或个体间遗传距离的群体分化指;Nm. 每代迁移个体数;$F_{ST}<0.33$ 表示基因流动频繁;* * 表示群里分化极显著($P<0.01$)。

Note: Ks* and Kst*. Genetic differentiation index between populations based on haplotype frequency and are used to detect population structure; Snn. Population differentiation indicators based on haplotypes or genetic distance between individuals; Nm. The number of migrating individuals per generation; $F_{ST}<0.33$ indicates frequent gene flow; * * indicates nighly significant differentiation within the group($P<0.01$).

3 讨 论

随着高通量测序技术的发展,花卉病毒的研究取得显著进展。目前国际上已报道侵染朱顶红的病毒多达 16 种,其中 HCRV、HiMV、HiLV、NLV 在我国已有分布,而 NeLV 此前仅在海关检疫中被检测到[9],表明该病毒具有潜在的生物安全风险。本研究发现,呼和浩特市和包头市朱顶红种植区的 NeLV 检出率分别高达 100%和 65.8%,证实该病毒已在我国局部地区扩散,对朱顶红产业构成严重威胁。NeLV 传播途径复杂,主要包括鳞茎带毒、汁液机械传播和昆虫介体传播,其中人为调运带毒种苗是导致该病毒跨区域扩散的主要风险因素。该病毒寄主范围广泛,可侵染石蒜科和百合科的多种观赏植物,在亚洲、大洋洲及北美洲均有分布。受侵染植物初期多隐症,随环境变化可表现出黄化、斑驳、环斑等典型症状,严重影响其品质。作为防控动植物疫情跨境传播的第一道防线,海关检疫在阻止 NeLV 等有害生物入侵、保护我国生物多样性和农业生产安全方面发挥着关键作用。鉴于 NeLV 已在我国局部地区定殖,亟需加强监测预警,建立有效的防控体系,以遏制其进一步扩散蔓延[5]。

本研究通过 RT-PCR 技术和 RACE 技术获得长度为 8 270 nt 的香石竹潜隐病毒属病毒的全基因组序列,并将其命名为 23-HiRu1。基因组特征分析结果表明,23-HiRu1 编码 6 个 ORFs,与 NeLV 基因组特征完全一致。序列一致性分析结果表明,23-HiRu1 与已知其他 NeLV 分离物 CP 区域核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 78.3%～98.2%和 90.2%～99.7%。按世界病毒分类委员会关于香石竹潜隐病毒属新物种的划分标准,可以明确该分离物 23-HiRu1 为 NeLV。系统发育分析结果表明,23-HiRu1 属于 NeLV Group Ⅰ亚组,且与南非共和国朱顶红分离物 Amaryllis-1 isolate 19-3029(登录号:MT536158)亲缘关系较近。此外,基于 NeLV 全基因组序列构建的系统发育树中,相同国家的 NeLV 分离物亲缘关系较近,表明该病毒具有一定的地理特异性[22]。遗传多样性分析结果显示,不同地理起源的 NeLV 群体之间遗传差异较大,或为不同株系,但由于序列数量有限,仅在 NeLV 亚洲与非洲群体之间存在中等程度的遗传分化($0.05<F_{ST}<0.15$)。NeLV 不同寄主群体之间的遗传分化较为明显,其中 NeLV 百子莲与君子兰、朱顶红、水仙以及郁金香群体之间的遗传分化程度非常高($F_{ST}>0.25$),或为不同株系。基于 DnaSP 软件和 Datamonkey 软件进行的选择压力分析结果显示,NeLV 群体受到了较多负选择压力,表明其基因组和功能可能在当前环境中达到了一个相对稳定和适应的状态[23-24]。此外,本研究通过 FEL、FUBAR 和 SLAC 等 3 种算法,在分离物 23-HiRu1 的 RdRp 区域筛选出 1 个阳性选择位点,为其生物适应性、进化机制和致病机制等研究提供了参考依据。中性检测结果显示,负选择压力移除了有害突变,导致低频变异积累,表明 NeLV 群体正在发生种群扩张或遇到了瓶颈效应[25];但检测结果并不显著,说明 NeLV 可能正处于自然选择与中性进化之间的过渡状态[26-27],此外,序列样本数量不足也可能是导致该检测结果不显著的原因,后期待数据库丰富后再进行进一步验证。

[参考文献]

[1] DE ANDRADE J P，PIGNI N B，TORRAS-CLAVERIA L，et al. Alkaloids from the *Hippeastrum genus*：chemistry and biological activity[J]. Revista Latinoamericana de Química，2012，40(2)：83-98.

[2] 褚云霞，邓姗，黄志城，等. 朱顶红新品种 DUS 测试数量性状筛选与分级[J]. 植物遗传资源学报，2016，17(3)：466-474.
CHU Y X，DENG S，HUANG Z C，et al. Selection and classification for *Amaryllis*（*Hippeastrum*）DUS testing quantitative traits[J]. Journal of Plant Genetic Resources，2016，17(3)：466-474.

[3] 于洪娟，张慧丽，朱小琼，等. 进境秘鲁朱顶红种球携带菌群组成及潜在致病菌初探[J]. 植物检疫，2024，38(1)：23-32.
YU H J，ZHANG H L，ZHU X Q，et al. Preliminary study on the composition of the fungal and bacterial community and potential pathogen carried by the imported *Hippeastrum vittatum* bulb from Peru[J]. Plant Quarantine，2024，38(1)：23-32.

[4] 娄晓鸣，吕文涛，周玉珍，等. 朱顶红新品种繁殖技术初探[J]. 北方园艺，2016(15)：78-80.
LOU X M，LÜ W T，ZHOU Y Z，et al. Preliminary study on propagation of new varieties of *Hippeastrum hybridum*[J]. Northern Horticulture，2016(15)：78-80.

[5] 董轩瑜，杨一舟，张宗英，等. 利用高通量测序检测朱顶红病毒[C]//中国植物病理学会 2023 年学术年会论文集. 山东泰安：中国植物病理学会，2023：403.
DONG X Y，YANG Y Z，ZHANG Z Y，et al. Using high-throughput sequencing to detect *Hippeastrum* virus[C]//Proceedings of the 2023 Academic Annual Meeting of the Chinese Society of Plant Pathology. Tai'an，Shandong：Chinese Society of Plant Pathology，2023：403.

[6] 桂敏. 番茄斑萎病毒和朱顶红褪绿环斑病毒复合侵染增效机理研究[D]. 昆明：云南农业大学，2023.
GUI M. Study on the synergistic mechanism of tomato spot wilt virus and hippeastrum chlorosis ring spot virus coinfection[D]. Kunming：Yunnan Agricultural University，2023.

[7] XU X H，TANG W，GAO R，et al. First report of hippeastrum mosaic virus in *Hippeastrum* spp. in mainland China[J]. Plant Disease，2017，101(6)：1064.

[8] DONG J H，YIN Y Y，FANG Q，et al. A new tospovirus causing chlorotic ringspot on *Hippeastrum* sp. in China[J]. Virus Genes，2013，46(3)：567-570.

[9] 陈细红，蔡伟，肖颖，等. 双重 RT-PCR 快速检测水仙普通潜隐病毒和尼润潜隐病毒[J]. 中国口岸科学技术，2020，2(12)：43-47.
CHEN X H，CAI W，XIAO Y，et al. Rapid detection of narcissus common latent virus and nerine latent virus by duplex RT-PCR[J]. China Port Science and Technology，2020，2(12)：43-47.

[10] CHEN J，SHI Y H，LU Y W，et al. Narcissus symptomless virus：a new carlavirus of daffodils[J]. Archives of Virology，2006，151(11)：2261-2267.

[11] WYLIE S J，JONES M G K. 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.

[12] PRAJAPATI M R，GUPTA S，SINGH J，et al. First report of cucumber mosaic virus (CMV) naturally infecting *Amaryllis*（*Hippeastrum hybridum*）in India[J]. Journal of Plant Pathology，2024，106(1)：295-296.

[13] 冯兰香，杨翠荣. 北京地区番茄病毒病毒原种类的监测与黄瓜花叶病毒株系的鉴定[J]. 中国蔬菜，1991(5)：9-11.
FENG L X，YANG C R. Monitoring of tomato virus original species and identification of cucumber mosaic virus strains in Beijing area[J]. China Vegetables，1991(5)：9-11.

[14] 田如燕，冯兰香，蔡少华. 北京地区辣椒病毒病毒原种类及黄瓜花叶病毒株系鉴定[J]. 植物保护，1989，15(4)：9-11.
TIAN R Y，FENG L X，CAI S H. Identification of the original types of chili virus and cucumber mosaic virus strains in Beijing area[J]. Plant Protection，1989，15(4)：9-11.

[15] 金磊磊，张本厚，陈集双. 1 株侵染白三叶草的苜蓿花叶病毒全基因组序列分析及其寄主生物学研究[J]. 核农学报，2015，29(6)：1061-1067.
JIN L L，ZHANG B H，CHEN J S. Complete nucleotide sequence and biological characteristics of a new alfalfa mosaic virus isolate infecting *Trifolium repens*[J]. Journal of Nuclear Agriculture Science，2015，29(6)：1061-1067.

[16] 高艳玲，范国权，程胜群，等. 苜蓿花叶病毒 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测技术体系的建立与应用[J]. 植物保护学报，2022，49(2)：515-527.
GAO Y L，FAN G Q，CHENG S Q，et al. Development and application of RT-PCR and RT-qPCR for detection of alfalfa mosaic virus[J]. Journal of Plant Protection，2022，49(2)：515-527.

[17] SONG S，LIU H，ZHANG J H，et al. Identification and characterization of complete genome sequence of alfalfa mosaic virus infecting *Gynostemma pentaphyllum*[J]. European Journal of Plant Pathology，2019，154(2)：491-497.

[18] BRÖLMAN-HUPKES J E. Tentative description of hippeastrum latent virus in *Hippeastrum hybridum* plants and differentiation from hippeastrum mosaic virus[J]. Netherlands Journal of Plant Pathology，1975，81(6)：226-236.

[19] MAAT D Z，HUTTINGA H，HAKKAART F A. Nerine latent virus：some properties and serological detectability in *Nerine bowdenii*[J]. Netherlands Journal of Plant Pathology，1978，84(2)：47-59.

[20] 田文，邱艳红，秦文韬，等. 北京地区侵染茄子的番茄斑萎病毒分子鉴定与分析[J]. 植物保护，2024，50(2)：246-251.
TIAN W，QIU Y H，QIN W T，et al. Molecular identification and analysis of tomato spotted wilt virus on eggplant in Beijing[J]. Plant Protection，2024，50(2)：246-251.

[21] 梁海文，兰平秀，柳勤海，等. 侵染花叶青木的病毒种类鉴定及其基因序列分析[J]. 中国农业科学，2023，56(10)：1893-1904.
LIANG H W，LAN P X，LIU Q H，et al. Viruses identifica-

tion and their gene sequences analysis infecting *Aucuba japonica* var. *variegata*[J]. China Agricultural Science,2023,56(10):1893-1904.

[22] VALLI A,LÓPEZ-MOYA J J,GARCÍA J A. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family *Potyviridae*[J]. Journal of General Virology,2007,88(3):1016-1028.

[23] JONES D R. Plant viruses transmitted by thrips[J]. European Journal of Plant Pathology,2005,113(2):119-157.

[24] VALOUZI H,SHAHMOHAMMADI N,GOLNARAGHI A,et al. Genetic diversity and evolutionary analyses of potyviruses infecting narcissus in Iran[J]. Journal of Plant Pathology,2021,104(1):1-14.

[25] D'ATTOMA G,MINAFRA A,SALDARELLI P,et al. Molecular evidence for the presence of wisteria vein mosaic virus in Italy:shedding light on genetic diversity and evolutionary dynamics of virus geographic populations[J]. Agriculture,2023,13(5):1090.

[26] SLATKIN M,BARTON N H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow[J]. Evolution,1989,43(7):1349-1368.

[27] ROZAS J,FERRER-MATA A,SANCHEZ-DELBARRTO J C,et al. DnaSP 6:DNA sequence polymorphism analysis of large data sets[J]. Molecular Biology and Evolution,2017,34(12):3299-3302.

(责任编辑:陈丽)

(上接第124页)

[37] 孙明艳,刘可丹,李春牛,等.一种茉莉炭疽病病原菌的鉴定、生物学特性及药剂筛选[J].热带农业科学,2024,44(3):41-47.
SUN M Y,LIU K D,LI C N,et al. Identification,biological characterization,and fungicide screening of pathogens causing anthracnose in *Jasminum sambac*[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture,2024,44(3):41-47.

[38] 但雨柔,马万里,汤子萱,等.多花黄精松针炭疽菌生物学特性及防治药剂筛选[J].中药材,2023,46(8):1876-1881.
DAN Y R,MA W L,TANG Z X,et al. Biological characteristics of pine needle anthracnose of *Polygonatum cyrtonema* and screening of control agents[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials,2023,46(8):1876-1881.

[39] 蒋朝阳,于泽洋,杨花,等.宁夏地区葡萄炭疽病病原菌鉴定及生物学特性研究[J].西北农业学报,2024,33(6):1112-1121.
JIANG Z Y,YU Z Y,YANG H,et al. Identification and biological characteristics of *Colletotrichum* species causing anthracnose on grapevine in Ningxia[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2024,33(6):1112-1121.

(责任编辑:陈丽)