

干射香, 涂丽琴, 吴淑华, 等. 山东寿光黄瓜上瓜类褪绿黄化病毒的分子鉴定[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(5): 1047-1053.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.05.007

山东寿光黄瓜上瓜类褪绿黄化病毒的分子鉴定

干射香^{1,2}, 涂丽琴², 吴淑华², 范小燕², 吴瑞雪^{1,2}, 赵文浩², 程兆榜², 周益军²,
竺晓平³, 季英华², 章松柏¹

(1. 长江大学农学院, 湖北 荆州 434025; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所/省部共建国家重点实验室培养基地——江苏省食品质量安全重点实验室, 江苏 南京 210014; 3. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 2016年, 本研究在对山东黄瓜病毒病调查时发现当地黄瓜上出现一种叶片表现黄化植株伴有轻微矮缩的病害, 为明确其中伴随的病毒种类, 我们对田间病样进行了采集, 提取总 RNA 后利用瓜类病毒引物进行 RT-PCR 检测, 结果发现在利用瓜类褪绿黄化病毒(*Cucurbit chlorotic yellows virus*, CCYV) 引物检测样品时, 田间采集的 25 份疑似病样中 13 份能扩增到 400 bp 左右的目的条带。为进一步确认, 我们又针对 CCYV 的外壳蛋白基因(*CP*) 设计了特异性引物, 对 13 份阳性样品进行检测, 结果均能扩增到目的片段, 对获得的 *CP* 基因片段进行克隆并测定序列, 序列分析结果显示其 *CP* 基因序列全长 753 bp, 编码 1 个由 250 个氨基酸组成的分子量 28 700 的蛋白质。进一步序列分析结果显示其与 CCYV 已报道分离物有很高的同源性, 并聚类到同一个大的分支, 其中与日本分离物、希腊分离物及中国其他地区分离物相对近缘, 聚类到一支, 而与伊朗分离物近缘关系相对较远。这些结果说明山东黄瓜黄化病样上检测到的病毒为瓜类褪绿黄化病毒, 这也是该病毒在山东侵染黄瓜的首次报道。

关键词: 黄瓜; 瓜类褪绿黄化病毒; 分子鉴定

中图分类号: S642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)05-1047-07

Molecular identification of cucurbit chlorotic yellows virus on cucumber in Shouguang, Shandong province

GAN She-xiang^{1,2}, TU Li-qin², WU Shu-hua², FAN Xiao-yan², WU Rui-xue^{1,2}, ZHAO Wen-hao²,
CHENG Zhao-bang², ZHOU Yi-jun², ZHU Xiao-ping³, JI Ying-hua², ZHANG Song-bai¹

(1. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences State Key Laboratory Breeding Base-Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province, Nanjing 210014, China; 3. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

收稿日期: 2018-11-28

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0201208); 国家特色蔬菜产业技术体系项目(CARS-24-C-01); 国家自然科学基金基金项目(31572074, 31770168); 省部共建国家重点实验室培育基地自主研究课题(zb201705); 江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(18)2005); 江苏省农业科学院基金项目(6111614)

作者简介: 干射香(1994-), 女, 湖北黄冈人, 硕士, 研究方向为分子植物病毒学。

通讯作者: 章松柏, (E-mail) yangtze2008@126.com; 季英华, (E-mail) jiyinhua@jaas.ac.cn

Abstract: An investigation on cucumber virus in Shandong province was carried out in 2006 and a cucumber disease with yellowing leaves and mild dwarf symptoms was found. To clarify the types of viruses associated with the disease, 25 samples were collected and RNA was extracted. RT-PCR was performed using diverse cucumber-infecting virus primers and a fragment about 400 bp was amplified from 13 samples using primers CCYV-HSPS1 and CCYV-HSPS2, indicating that cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV) was present in these samples. To further confirm the result, a pair of specific primers

CCCP-F and CCCP-R were designed based on the coat protein (CP) gene of CCYV, and the target fragment was amplified from all 13 samples. Sequence analysis results showed that the CP obtained in this study was 735 bp in length and encoded a protein consisting of 250 amino acids with molecular weight of 28 700. Further sequence analysis results showed that it had high homology with other CCYV isolates, including Japanese isolates, Greece isolates and other isolates from China. All these results indicate that the virus detected in cucumber from Shandong province is CCYV, this is the first report of CCYV infecting cucumber in Shandong province.

Key words: cucumber; cucurbit chlorotic yellows virus; molecular identification

黄瓜 (*Cucumis sativus*) 是一种具有重要经济价值的瓜果类蔬菜作物,在中国的蔬菜周年供应中起着重要的作用。但是近年来,随着耕作模式的调整及环境的变化,黄瓜上的病毒病呈现多发的态势,常见的如黄瓜花叶病毒病 (CM)、西瓜花叶病毒病 (WM)、小西葫芦黄花叶病毒病 (ZYM)、黄瓜绿斑驳花叶病毒病 (CGMM)、番木瓜环斑病毒病 (PRSV)、瓜类褪绿黄化病毒病 (CCYV) 等^[1-4],这些病毒病的发生严重影响了黄瓜的产量和品质,对黄瓜产业的健康发展造成了威胁。

瓜类褪绿黄化病毒是一种粉虱传植物病毒,可以侵染黄瓜、西瓜、甜瓜、丝瓜、南瓜、番木瓜等多种作物,导致寄主出现叶片褪绿黄化等症状,在田间表现症状为基部或中部叶片开始褪绿,而后黄化,逐步向上发展,严重时整株黄化,影响作物的产量和品质^[5-7]。CCYV 最早于 2004 年在日本发生^[8],之后土耳其^[9]、苏丹^[10]、黎巴嫩^[11]、希腊^[12]、埃及^[13]、伊朗^[14]、沙特阿拉伯^[15] 等多个国家和地区也出现其危害。2010 年中国首次出现该病毒危害报道^[16-17],之后该病毒迅速扩散蔓延,海南、河南^[18]、台湾^[16]、浙江、上海、山东^[19]、广西^[20]、新疆^[21]、北京^[22] 等省市均出现该病毒危害报道,严重威胁当地的甜瓜、西瓜、黄瓜等作物安全生产。

CCYV 是长线形病毒科 (*Closteroviridae*) 毛形病毒属 (*Crinivirus*) 重要成员,其基因组包含 2 条正单链 RNA (RNA1 和 RNA2),其中 RNA1 全长 8 607 nt,含有 4 个开放阅读框,ORF1a 编码甲基转移酶和 RNA 解旋酶,ORF1b 编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶,其余 2 个分别编码 P6 和 P22;RNA2 全长 8 041 nt,含有 8 个开放阅读框 (ORF),分别编码外壳蛋白 (CP)、小外壳蛋白 (CPm)、70 000 类热激蛋白 (HSP70H)、P59、P26、P9、P6、P4.9 蛋白^[23-24]。在毛形病毒属中 CP 是重要的结构蛋白,除参与病毒粒体组装及病毒侵染过程外,CP 与 CPm 和 Hsp70h 一

样,也是该属病毒种间分类的重要参考标准^[25]。

CCYV 在中国自 2010 年就有发生危害的报道,但其侵染寄主多为甜瓜等作物^[26]。而对于黄瓜作物,虽然 CCYV 在北京^[22]、海南^[27]、浙江^[19] 等地也有侵染危害报道,但到目前为止山东地区尚未见该病毒危害黄瓜的报道。2016 年我们在对山东寿光等地黄瓜上病毒病进行调查时发现田间有疑似病毒感染样品,我们对田间病样进行了采集,并通过 RT-PCR 进行了检测和鉴定,结果从中检测到了瓜类褪绿黄化病毒,进一步的 CP 基因克隆及序列分析结果也证实了这一结果,这是该病毒侵染山东黄瓜的首次报道。

1 材料和方法

1.1 供试病毒病样

病样为 2016 年采自山东寿光疑似感染病毒的黄瓜样本,样品采集后用液氮冷冻存放于 -80 ℃ 冰箱,用于 RNA 提取等后续试验。以健康的黄瓜植株叶片作为阴性对照。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂 (Trizol Reagent) 购自北京康为世纪生物技术有限公司,反转录试剂盒 Prime-script™ RT Master Mix、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP Mix、10×Ex Taq buffer、克隆载体 pMD18-T 均购自 TaKaRa 公司,PCR 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 菌株购自北京全式金生物技术有限公司,其他生化试剂及普通化学试剂均为进口或国产分析纯。引物委托 Invitrogen (上海) 贸易有限公司合成。

1.3 黄瓜样品总 RNA 提取

黄瓜样品总 RNA 的提取参照吴淑华等^[28] 的方法:称取黄瓜叶片 0.1 g 于已灭菌的 2 ml 离心管中,在液氮中冷冻处理后置于研磨机中将样品研磨成粉末,加入 1 ml Trizol Reagent 混合,室温放置 5

min,加 200 μl 氯仿、异戊醇混合液(氯仿:异戊醇=24:1,体积比),震荡 15 s,室温放置2~3 min后,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心 15 min,取上清液至 1.5 ml 离心管中,加等体积的冰异丙醇,混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 20 min 以上,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心 10 min 后弃上清液,用 1 ml 75% 乙醇清洗沉淀 2 次,洗涤后 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 000 r/min离心 5 min,弃上清液,晾干,将 RNA 溶于 35 μl DEPC 水中,检测 RNA 的浓度和纯度后,放置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 CCYV 病毒检测

以样品总 RNA 为模板进行反转录合成第一链 cDNA,反转录体系(10.0 μl):模板 RNA 0.5 μl ,5 \times Prime script master mix 2.0 μl ,加 RNase-Free H_2O

7.5 μl 补足 10.0 μl 。反应条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

根据已报道的瓜类褪绿黄化病毒检测方法^[29]针对 CCYV 合成一对特异检测引物 CC-HSP-S2/CC-HSP-S1(表 1),以反转录获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增体系:ddH₂O 18.5 μl ,10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μl ,dNTP 0.5 μl ,上下游引物各 1.0 μl ,cDNA 1.0 μl ,Ex Taq DNA 聚合酶 0.5 μl ,总体积 25.0 μl 。扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,循环 34 次,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 反应完成后将扩增产物于 1.0%琼脂糖凝胶中电泳检测并拍照。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 ($^{\circ}\text{C}$)	片段大小 (bp)
CC-HSPS2	CGATTCTTTCCTCATGTACGATC	52.19	449
CC-HSPS1	GACTCTTCGCAAATTGTGCT	53.55	
CCCP-F	CGCCATATGGAGAAGACTGACAATAAAC	48.81	753
CCCP-R	GCGTCGACTTATTTACTACAACCTCCCGG	49.48	

1.5 CCYV CP 基因克隆

根据瓜类褪绿黄化病毒的外壳蛋白序列设计特异引物 CCCP-F 和 CCCP-R,(见表 1)以检测结果为阳性的病毒样品总 RNA 的转录产物为模板进行 PCR 扩增,CP 基因扩增体系:ddH₂O 18.5 μl ,10 \times Buffer 2.5 μl ,dNTP 0.5 μl ,上下游引物各 1.0 μl ,cDNA 1.0 μl ,Ex Taq DNA 聚合酶 0.5 μl ,总体积 25.0 μl 。扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,49 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,循环 34 次,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 反应结束后扩增产物于 1.0%琼脂糖凝胶中电泳检测,目的片段参照胶回收试剂盒说明书进行割胶回收。回收目的片段与 pMD18-T 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接,热激法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素(Amp)的培养基进行培养,挑取平板上的克隆进行菌落 PCR 和酶切鉴定,鉴定无误后将菌液送南京金斯瑞生物科技有限公司进行序列测定。

1.6 CCYV CP 序列分析

CP 序列测定完成后,根据基因扩增引物去除两端残留的载体序列,将获得的 CP 序列与已公开的 CCYV 不同分离物及同属其他病毒的 CP 序列进行分

析,序列分析使用 ClustalX、BioEdit、DNASTar 等软件及 NCBI 网站上的 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)完成,系统进化分析使用 MEGA6 完成。

2 结果与分析

2.1 病害田间症状

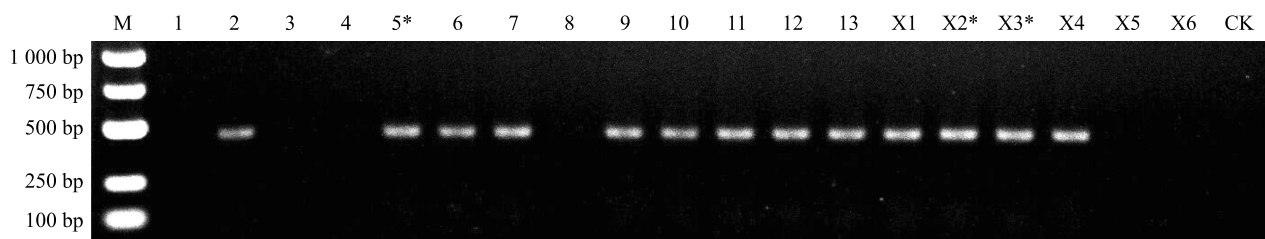
2016 年本研究在对山东省黄瓜病毒病进行调查时在寿光地区温室种植的黄瓜上发现一种叶片表现黄化症状的病害,该病害在当地发生已较为普遍,常规棚室的发病率为 3%~10%,重发棚室发病率超过 30%。病株在田间主要表现叶片黄化、植株矮化等症状,其中叶片黄化主要表现脉间黄化,而叶脉往往仍为绿色,早期病症主要表现在中下部叶片,与缺素症状非常接近,后期整株都会表现明显的黄化,同时植株会伴有矮化症状,对黄瓜的产量和品质有较大影响。

2.2 瓜类褪绿黄化病毒的检测

侵染黄瓜的病毒种类有很多,为明确山东寿光表现黄化症状的病株中是否有病毒感染,我们对田间采集的黄瓜病样叶片提取了总 RNA,并进行了

RT-PCR 检测,结果发现在利用引物 CC-HSPS2/CC-HSPS1 进行扩增时,田间采集的 25 份样品中有 13 份样品可以扩增到大小在 449 bp 的目的片段(图

1),而健康对照样品中没有扩增到任何条带。这些结果暗示了山东寿光采集到的黄瓜病样中存在瓜类褪绿黄化病毒感染。



M:DL5 000 DNA marker;1~13,X1~X6:黄瓜样品;CK:阴性对照。标星号样品为抽选 CP 基因克隆样品。

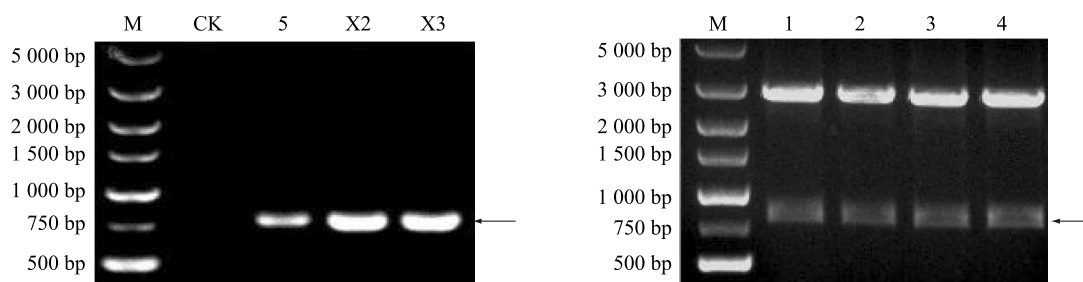
图1 部分病样中瓜类褪绿黄化病毒(CCYV)的 RT-PCR 检测

Fig.1 Detection of cucurbit chlorotic yellows virus(CCYV) in some samples by RT-PCR

2.3 CCYV 的 CP 基因克隆

为进一步确认检测到的病毒为 CCYV,我们针对该病毒 CP 基因序列设计了 1 对特异性引物 CCCP-F 和 CCCP-R,RT-PCR 结果显示 13 份检测结果为阳性的样品均能扩增到大小约 750 bp 的条带,与预期目的片段(753 bp)大小吻合。我们随机抽选

3 个(5、X2、X3)进行割胶纯化回收,回收的目的片段与 pMD18-T 连接,转化大肠杆菌(DH5 α)感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的培养基进行培养,通过菌落 PCR 和双酶切方法筛选阳性克隆(图 2),获得的阳性克隆抽选(每个样品随机抽选 2 个)送南京金斯瑞生物科技有限公司进行序列测定。



左图:CCYV CP 基因 RT-PCR 扩增(抽选样品);右图:阳性克隆的酶切验证(*Nde* I+*Sal* I)。M:DL5 000 DNA marker;5、X2、X3 为抽选的黄瓜样品编号;1、2、3、4 为 CP 基因阳性克隆编号。

图2 CCYV 编码的 CP 基因 RT-PCR 扩增及克隆

Fig.2 RT-PCR amplification and cloning of CP gene encoded by CCYV

2.4 CCYV CP 序列分析

对获得的序列信息进行分析,结果发现本研究获得的 6 个 CP 基因序列全长均为 753 bp,编码 1 个含有 250 个氨基酸、分子量大小约 28 700 的蛋白质,BLAST 分析结果显示其与 CCYV 同源性最高,暗示了其属于 CCYV 的一个分离物。

为进一步分析其分类地位,我们使用 ClustalX 软件将本研究测定的 CCYV CP 序列及已公开的其他 CCYV 分离物 CP 基因序列(表 2)进行了比对,并利用 MEGA6 软件,使用临近法(Neighbor-Joining, NJ)、Kimura 2-parameter 模型重建了系统进化树,各个分枝的 bootstrap 置信度用 1 000 次自导复制来评价。

系统进化分析结果(图 3)显示,本研究测定的 3 个样品(6 个序列)全部聚类到 CCYV 分支中,说明其属于 CCYV 的 1 个分离物。同时分析基于 CP 基因序列构建的系统进化树可以看到有 2 个大分支(NC003618 为外群):其中山东黄瓜分离物与日本、希腊及中国其他地方的分离物均聚类到第一个分支中,形成聚类簇 I;而伊朗分离物则聚类到另一个分支中,形成聚类簇 II,表明山东黄瓜分离物与希腊、日本及中国其他地方的分离物相对近缘,而与伊朗分离物之间的关系相对较远。对 CCYV 聚类簇 I 中的分离物编码的 CP 序列分析发现其 CP 序列高度同源,在系统进化分析中未发现有明显的地域分化或者寄主分

化特征,本研究测定的黄瓜分离物与其他地域分离的黄瓜分离物并未聚类到相近的同一个簇中,同时其与中国其他地方分离到的 CCYV 序列也未呈现相对更近的亲缘关系,这些结果一方面说明了本研究从山东黄瓜上分离到的病毒为 CCYV 一个分离物,同时也表明中国 CCYV 分离物编码的 *CP* 相对保守,与日本、希腊 CCYV 分离物同源性较高。

表 2 系统进化分析中病毒序列信息

Table 2 Related information about CCYV mentioned in the phylogenetic analysis

登录号	分离物	寄主	国家(地区)
KY400633	ShangHai	甜瓜	中国上海
LT716006	A3	甜瓜	希腊罗得岛
LT716005	EL37	刺蒺藜	希腊罗得岛
LT716002	EE55	芥菜	希腊罗得岛
LT716001	EE34	苜蓿	希腊罗得岛
LT716000	CC75	黄瓜	希腊克里特岛
KX118632	GX-BH	甜瓜	中国广西
KP896506	sdhz-cc	西瓜	中国山东
JQ904629	Beijing	黄瓜	中国北京
JN126046	Yilan	甜瓜	中国台湾:宜兰
KY400634	HeNan	甜瓜	中国河南
KY400632	XinJiang	甜瓜	中国新疆
LT716004	EZ2	喷瓜	希腊罗得岛
LT716003	EL32	藜	希腊罗得岛
KY618799	TW (pKCCYV2-14)	甜瓜	中国台湾
KJ735450	SDLuffa	丝瓜	中国山东
KJ149806	shjd	甜瓜	中国山东
JF502222	TW	甜瓜	
JN126045	Erlun	甜瓜	中国台湾
HMS81658	nbc	黄瓜	中国宁波
KU507602	pCCYCRNA27	甜瓜	中国河南
KC577202	Ivanakey	甜瓜	伊朗
KC577201	Bushehr	甜瓜	伊朗
KC577203	Varamin	黄瓜	伊朗
NC_018174	CCYV	甜瓜	日本熊本
NC_003618	92	烟草	

其中 NC_003618 为外群。

3 讨论

瓜类褪绿黄化病毒是一种重要的粉虱传植物病毒,危害多种瓜类作物。该病毒自 2010 年在中国出现危害报道,近年来持续扩散蔓延至浙江、海南、广西等地,对产区的甜瓜、西瓜、黄瓜等作物的生产造成了

严重的威胁^[30]。本研究在对 2016 年山东地区采集的黄瓜样品中病毒病种类进行检测时,发现寿光采集的表现黄化症状的样品中疑似存在 CCYV 感染,我们进一步通过基因克隆等方法对其进行了鉴定,结果显示它属于 CCYV 的一个分离物,虽然山东之前有报道西瓜和甜瓜上检测到 CCYV 发生^[17,31],但目前尚未见到该病毒侵染黄瓜的报道,因此本研究也是山东省黄瓜上 CCYV 的首次报道。CCYV 侵染黄瓜常会造成植株叶片黄化而影响光合作用,减少果实养分的积累,成为限制黄瓜产业健康发展的重要的潜在风险性因子^[32],而山东是中国重要的蔬菜基地,近年来随着设施园艺技术的推广利用,黄瓜的种植范围和栽培规模不断扩大,CCYV 的发生可能会给当地黄瓜生产造成严重的威胁。同时山东亦是全国重要的种苗基地,全国范围的种苗调运极有可能进一步加剧 CCYV 在更大范围的扩散蔓延,因此该病害在黄瓜上的危害值得相关部门密切关注。

本研究在对 CCYV 不同分离物的 *CP* 基因序列进行分析时发现,从山东黄瓜样品中分离的 CCYV *CP* 基因序列之间的同源性异常高(100%),同时其与日本、希腊及中国其他分离物(聚类簇 I 中的其他 CCYV 分离物)之间的同源性也高于 99.87%(仅存在 2 个核苷酸差异),鉴于 CCYV 最早在日本发生,而中国 CCYV 又与其有极高的同源性,因此有理由怀疑中国发生的 CCYV 最初可能来源日本。

黄瓜是一种重要的葫芦科作物,在世界范围都有广泛种植,而近年来黄瓜上的病毒病也呈现多发态势,目前有报道的可以侵染黄瓜导致危害的病毒就有多种:如史利雪等 2017 年在对北京、山东、广东黄瓜上的病毒病调查时发现当地黄瓜存在黄瓜花叶病毒、西瓜花叶病毒、小西葫芦黄花叶病毒、番木瓜环斑病毒、黄瓜绿斑驳花叶病毒、瓜类褪绿黄化病毒等病毒侵染^[1];熊艳等在重庆地区调查发现当地侵染黄瓜造成危害的病毒包括黄瓜花叶病毒、西瓜花叶病毒、小西葫芦黄花叶病毒、南瓜花叶病毒(Squash mosaic virus, SqMV)、芜菁花叶病毒(Turnip mosaic virus, TuMV)等^[33]。张艳超在湖北地区调查蔬菜病毒时发现侵染当地黄瓜的主要病毒为黄瓜花叶病毒^[34];刘雪建在浙江、江西地区调查时发现当地黄瓜存在黄瓜花叶病毒、西瓜花叶病毒、小西葫芦黄花叶病毒、甜瓜黄斑病毒(Melon yellow spot virus, MYSV)、瓜类褪绿黄化病毒等多种病毒侵染^[35]。鉴于黄瓜上的病毒种

类多,因此在本研究中我们除了对 CCYV 进行检测外,也对其他常见病毒进行了检测,结果在这批样品中未检测到其他病毒,这一结果可能与田间样品采集有关,本研究主要采集的是田间表现黄化症状的样品,而对常见的花叶、扭曲、畸形等症状的样品并未采集。因此要系统了解当地黄瓜病毒病种类还需要更广泛

的调查和采样。同时本研究中在山东采集的表现黄化症状的黄瓜样品中检测到了 CCYV,说明田间叶片黄化的病株中伴随有 CCYV 的侵染,但 CCYV 侵染是否为黄瓜植株田间表现叶片黄化症状的主要原因还需要进一步的试验验证。

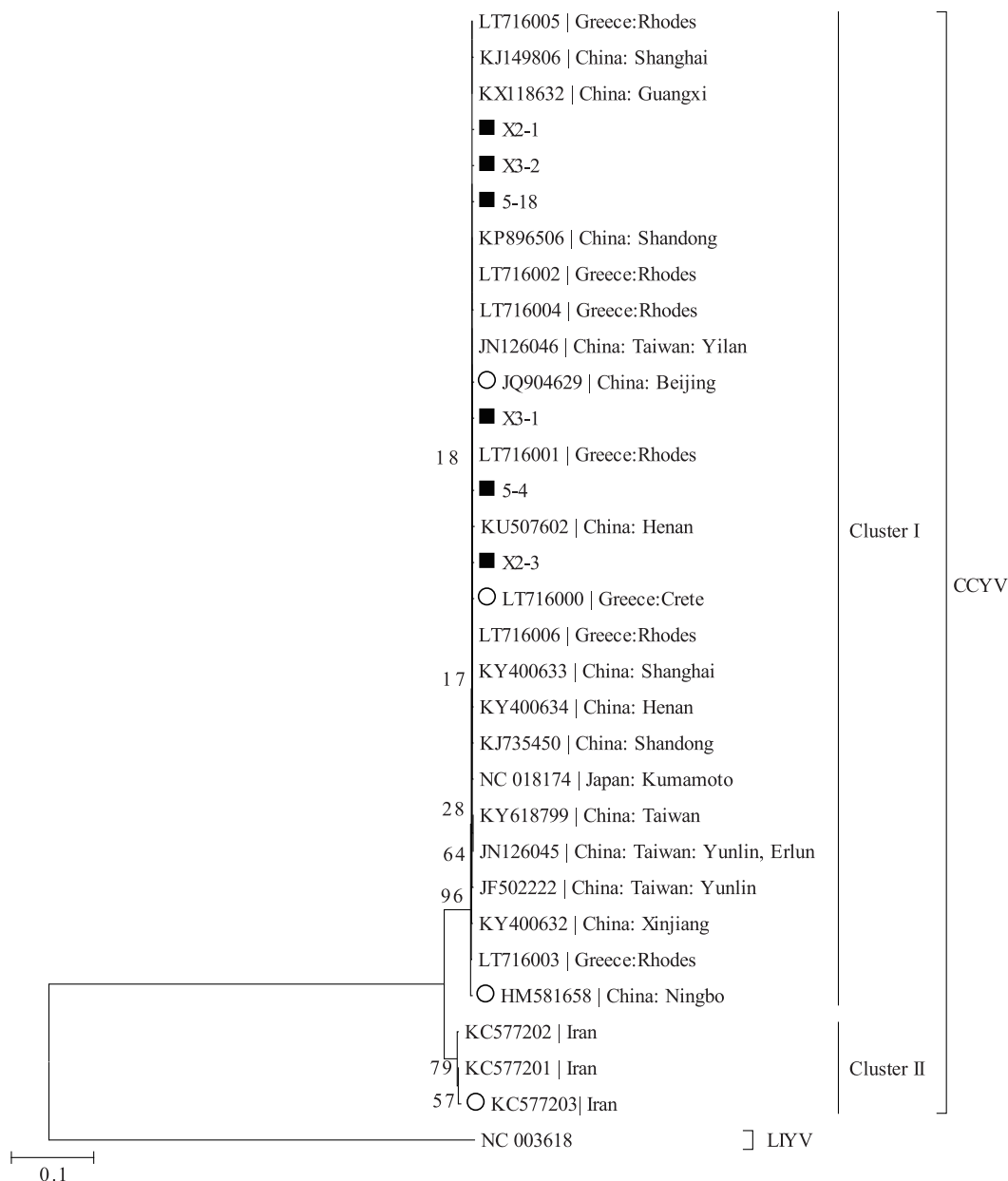


图 3 根据瓜类褪绿黄化病毒 (CCYV) CP 基因核苷酸序列同源性重建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on nucleotide sequence homology of CP encoded by CCYV

参考文献:

- [1] 毛晓红,于毅,张秀霞,等.春季西葫芦日光温室黄瓜花叶病毒病发生规律与防虫网的防控效果[J].江苏农业科学,2017,45(16):96-98.
- [2] 史利雪,张圣平,苗晗,等.北京、山东和广东黄瓜病毒检测

- [J]. 中国蔬菜, 2018(4): 48-52.
- [3] 刘 锦,李亦晴,黄显德,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒外壳蛋白基因原核表达及抗血清制备[J]. 山东农业科学, 2017, 49(5): 10-13.
- [4] 范小燕,杨 柳,季英华,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒 CP 基因克隆及亚细胞定位[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(2): 281-287.
- [5] 卢少华,李静静,刘明杨,等. 瓜类褪绿黄化病毒对烟粉虱取食行为的影响[J]. 华中昆虫研究, 2015, 11(2): 310-311.
- [6] 古勤生,彭 斌,刘珊珊,等. 瓜类新病毒病害(一):瓜类褪绿黄化病[J]. 中国瓜菜, 2011, 24(3): 32-33.
- [7] 安 娜,张荣萍,陈 萍. 番木瓜感染畸形花叶病毒后的生理变化及扫描电镜观察[J]. 南方农业学报, 2018, 49(4): 714-720.
- [8] GYOUTOKU Y, OKAZAKI S, FURUTA A, et al. Chlorotic yellows disease of melon caused by Cucurbit chlorotic yellows virus, a new Crinivirus[J]. Japanese Journal of Phytopathology, 2009, 75(2): 109-111.
- [9] ORFANIDOU C G, MALIOGKA V I, KATIS N I, et al. First report of Cucurbit chlorotic yellows virus in cucumber in Turkey[J]. Plant Disease, 2017, 99(2): 533.
- [10] HAMED K, MENZEL W, DAFALLA G, et al. First report of Cucurbit chlorotic yellows virus infecting muskmelon and cucumber in Sudan[J]. Plant Disease, 2011, 95(10): 132.
- [11] ABRAHAMIAN PE, SOBH H, ABOU-JAWDAH Y. First report of Cucurbit chlorotic yellows virus on cucumber in Lebanon [J]. Plant Disease, 2012, 96(11): 1704-1705.
- [12] ORFANIDOU C, MALIOGKA V I, KATIS N I. First report of Cucurbit chlorotic yellows virus in cucumber, melon, and watermelon in Greece[J]. Plant Disease, 2014, 98(10): 1446-1447.
- [13] AMER M A. Serological and molecular characterization of Cucurbit chlorotic yellows virus affecting cucumber plants in Egypt[J]. International Journal of Virology, 2015, 11(1): 1-11.
- [14] BANANEJ K, MENZEL W, KIANFAR N, et al. First report of Cucurbit chlorotic yellows virus infecting cucumber, melon, and squash in Iran[J]. Plant Disease, 2013, 97(7): 1005.
- [15] SHAKEEL M T, AMER M A, AL-SALEH M A, et al. Molecular characterization of Criniviruses involved in the etiology of cucumber yellowing disease in Riyadh region, Saudi Arabia[J]. European Journal of Plant Pathology, 2018, 150(9): 39-47.
- [16] HUANG L H, TSENG H H, LI J T, et al. First report of Cucurbit chlorotic yellows virus infecting cucurbits in Taiwan[J]. Plant Disease, 2010, 94(9): 1168.
- [17] ZENG R, DAI F M, CHEN W J, et al. First report of cucurbit chlorotic yellows virus Infecting Melon in China[J]. Plant Disease, 2011, 95(3): 354.
- [18] 刘珊珊,彭 斌,吴会杰,等. 海南省和河南省发生甜瓜褪绿黄化病的分子鉴定[J]. 果树学报, 2013, 30(2): 291-293.
- [19] GU Q S, LIU Y H, WANG Y H, et al. First report of cucurbit chlorotic yellows virus in cucumber, melon, and watermelon in China[J]. Plant Disease, 2011, 95(1): 73.
- [20] 杨世安,李战彪,秦碧霞,等. 广西三种甜瓜病毒分离物的分子检测与鉴定[J]. 植物保护, 2017, 43(3): 83-89.
- [21] 潘卫萍,张以和,吉艳玲. 吐鲁番首次发生甜瓜褪绿黄化病毒病[J]. 蔬菜, 2017(2): 60-61.
- [22] 张汝楠,李源源,李大伟,等. 瓜类褪绿黄化病毒北京分离物基因组序列分析[C]//郭泽建,李保筠. 中国植物病理学会2012年学术年会论文集. 青岛:中国农业科学技术出版社, 2012: 628.
- [23] OKUDA M, OKAZAKI S, YAMASAKI S, et al. Host range and complete genome sequence of cucurbit chlorotic yellows virus, a new member of the genus crinivirus[J]. Phytopathology, 2010, 100(6): 560-566.
- [24] DOLJA V V, KREUZE J F, VALKONEN J P. Comparative and functional genomics of closteroviruses[J]. Virus Research, 2006, 117(1): 38-51.
- [25] KING A M, ADAMS M J, CARSTENS E B, et al. Virus taxonomy-ninth report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012: 996-1001.
- [26] 刘珊珊. 甜瓜褪绿黄化病病原的分子多样性分析及发生规律研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2013.
- [27] TANG X, SHI X, ZHANG D, et al. Detection and epidemic dynamic of ToCV and CCYV with Bemisia tabaci and weed in Hainan of China[J]. Virology Journal, 2017, 14(1): 169.
- [28] 吴淑华,赵文浩,李廷芳,等. 南京辣椒上一种斑驳类型病毒病的分子鉴定[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1284-1290.
- [29] ABRAHAMIAN PE, SEBLANI R, SOBH H, et al. Detection and quantitation of two cucurbit criniviruses in mixed infection by real-time RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 193(2): 320-326.
- [30] 马二磊,臧全宇,丁伟红,等. 甜瓜褪绿黄化病毒病综合防控技术[J]. 宁波农业科技, 2014(3): 31-32.
- [31] 乔 宁,魏家鹏,李美芹,等. 两种甜瓜病毒寿光分离物的分子检测与鉴定[J]. 植物保护, 2015(5): 130-133.
- [32] 彭 斌,刘莉铭,刘珊珊,等. 瓜类褪绿黄化病毒新疆分离物基因组分析[J]. 植物病理学报, 2017, 47(6): 730-737.
- [33] 熊 艳,孙 森,王鹤冰,等. 重庆黄瓜病毒病病原分子鉴定及序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(8): 650-658.
- [34] 张艳超. 湖北省蔬菜病毒病田间调查及毒源种类鉴定[D]. 武汉:华中农业大学, 2015.
- [35] 刘雪建. 浙江省和江西省蔬菜病毒鉴定与变异研究[D]. 杭州:浙江大学, 2015.

(责任编辑:陈海霞)