

重庆南瓜病毒病病原 ELISA 检测及 CMV 变异分析

青 玲^{1,2}, 包凌云¹, 周常勇^{1,2,*}, 杨水英¹, 孙现超¹

(¹ 西南大学植物保护学院, 重庆 400716; ² 中国农科院柑橘研究所, 重庆 400712)

摘 要: 利用 7 种植物病毒的抗体, 对采自重庆 7 个区县的 67 份南瓜病毒病样品进行了抗原直接包被酶联免疫吸附分析 (ACP-ELISA) 检测。检测结果表明, 在这 67 份样品中, 至少 59 份感染了所要检测病毒, 其中, 感染黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)、番茄花叶病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV)、芜菁花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV)、蚕豆萎蔫病毒 2 号 (*Broad bean wilt virus 2*, BBWV-2)、马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY) 和马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 的样品分别为 80.60%、77.61%、74.63%、82.09%、76.12%、83.58% 和 55.22%。在检测呈阳性的 59 份样品中有 93.22% 的样品受到 2 种以上病毒的复合侵染, 而受 7 种病毒复合侵染的样品高达 60.00%, 表明在南瓜上病毒复合侵染现象相当严重。进一步对 54 份受 CMV 侵染的南瓜样品检测发现, CMV 亚组 I (CMV I) 病毒侵染的样品有 49 份, 占 90.74%, CMV 亚组 II (CMV II) 病毒侵染的样品为 11 份, 占 20.37%; 其中 6 份 (11.11%) 样品检测到 CMV I 和 CMV II 的复合侵染。以免疫捕获反转录 PCR (IC-RT-PCR) 扩增了一个 CMV I 分离物 (CMV-CQ) 近全长 CP 基因并进行序列分析, 结果证实其属于 CMV 亚组 I 型, 其核苷酸序列与国内 CMV I 型赤豆分离物 (CMV-RB) 的同源性最高, 为 98.1%。

关键词: 南瓜病毒病; ELISA 检测; 黄瓜花叶病毒亚组; 外壳蛋白基因; 序列变异

中图分类号: S 642.1; S 436 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2010) 03-0405-08

ELISA Detection of Infectious Pathogenic Viruses and Variation of CMV from Squash in Chongqing

QING Ling^{1,2}, BAO Ling-yun¹, ZHOU Chang-yong^{1,2,*}, YANG Shui-ying¹, and SUN Xian-chao¹

(¹ College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China; ² Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: The 67 squash samples with viral symptoms collected from seven squash-growing counties in Chongqing were detected by antigen-coated plate (ACP)-ELISA with antibodies against seven plant viruses. The results showed that at least 59 samples with in these 67 squash samples were infected by the viruses, of which 80.60%, 77.61%, 70.15%, 82.09%, 76.12%, 83.58% and 55.22% of the samples were infected by *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Broad bean wilt virus 2* (BBWV-2), *Potato virus Y* (PVY) and *Potato virus X* (PVX), respectively. Among 59 positive samples, 93.22% of the samples were mix-infected with more than two viruses, and about 60% samples were mix-infected by the above seven viruses, indicating the mix-

收稿日期: 2009-07-24; 修回日期: 2009-11-12

基金项目: 科技部科技基础性工作专项 (2006FY111000); 西南大学博士后基金项目 (207001)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: changyong@hotmail.com)

infections of viruses on squash were severely. Moreover, the results showed that among 54 samples infected by CMV, 49 (90.74%) samples were infected by CMV subgroup I (CMV I) and 12 (22.22%) samples by CMV subgroup. Comparison of the nucleotide sequences showed that it has the highest identity (98.1%) with the previously reported CMV I isolate infecting *Phaseolus angularis* (CMV-RB) from China.

Key words: squash virus diseases; ELISA detection; CMV subgroups; CP sequence variation

我国已报道侵染南瓜的病毒主要有中国南瓜曲叶病毒 (*Squash leaf curl virus-China*, SLCV-Ch) (Hong et al., 1995), 南瓜花叶病毒 (*Squash mosaic virus*, SqMV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 和西瓜花叶病毒 2 号 (*Watermelon mosaic virus 2*, WMV-2) (李凤梅, 2002), 以及番木瓜环斑病毒西瓜株系 (*Papaya ringspot virus W*, PRSV-W)、小西葫芦黄花叶病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)、番茄斑萎病毒属病毒 (*Tospovirus*) 及粉虱传双生病毒 (*Whitefly transmitted geminiviruses*, WTGs) (杨国慧, 2003; 杨国慧 等, 2007), 其中, 在部分省市 CMV、PRSV-W 和 WMV-2 是南瓜上的优势毒源 (李凤梅 等, 2002; 杨国慧, 2003; 方琦 等, 2004)。

在实际生产中, 从南瓜病毒病叶表现的症状上很难判断究竟是由哪一种或哪几种病毒引起, 因而病害防治也缺乏针对性。为了了解重庆地区南瓜上的病毒种类, 以及 CMV 在南瓜上的危害情况及亚组类型, 为进一步开展南瓜花叶病毒病的防治提供科学依据, 作者利用 ELISA 技术对采自重庆 7 个区县南瓜种植区的花叶病毒病样品, 进行了针对 7 种常见蔬菜病毒的血清学检测, 并对 CMV 南瓜分离物进行了亚组鉴定, 同时利用免疫捕获反转录 PCR (IC-RT-PCR) 技术扩增 CMV 南瓜分离物近全长 CP 基因, 并进行了序列变异性分析。

1 材料与方法

1.1 材料

自 2007 年来连续 3 年从重庆北碚、綦江、合川、忠县、江津、涪陵和石柱等区县南瓜种植区采集表现花叶症状的南瓜病毒病样品共计 67 份, 保存于 -80°C 冰箱。

CMV I 和 CMV II、TMV、番茄花叶病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV)、芜菁花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV) 及蚕豆萎蔫病毒 2 号 (*Broad bean wilt virus 2*, BBWV-2) 等 5 种病毒相应的抗原及单抗由浙江大学周雪平教授惠赠, 马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY) 和马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 相应的抗原及多抗由本实验室分离、制备和保存, 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 购自美国 Promega 公司。

1.2 病毒种类的血清学检测

参考青玲等 (2005) 已报道的 ACP-ELISA 方法, 用抗原直接包被 ELISA 板, 经封闭后加入待测病毒的特异性抗体, 再与碱性磷酸酶标记的羊抗兔或羊抗鼠 IgG 充分反应, 然后用硝基苯磷酸酯钠盐显色, 室温放置至显色反应完全后在 550 型酶联免疫检测仪 (BIO-AD) 上测各孔在 405 nm 的 OD 值, 以 $P/N > 0.5$, $P/N > 2.1$ 作为阳性判断标准。

1.3 引物设计及免疫捕获反转录 PCR

参考 Yu 等 (2005) 已报道的方法, 根据 GenBank 中已登录的 CMV 亚组 I 分离物的 CP 序列, 设计合成出两条用于扩增 CMV I 近全长 CP 的特异性引物 (CMV I -F: CGACTTAATAAGACGTTAGC AGC; CMV-R: TGCTCRAYGTCRACATGAAG)。

在 0.5 mL PCR 管中加入 200 μL 适当稀释的抗血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 用 PBST 洗 3 次; 加入 200 μL 病毒感染的南瓜叶片汁液的上清液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h; 弃去抗原液, 用 PBST 洗 3 次, ddH₂O 洗 1 次; 再往管中加入 19 μL ddH₂O, 8 μL 5 \times RT 缓冲液, 4 μL 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs, 4 μL 100 mmol \cdot L⁻¹ DTT, 2 μL 3'引物 CMV-R (20 μmol), 混匀后置 84 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 min, 迅速置冰上 3 min, 加 2 μL AMV 反转录酶 (200 U \cdot L⁻¹), 1 μL RNasin inhibitor (20 U \cdot L⁻¹), 离心混匀后置 42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 1 h。

在 50 μL 反应体系中加入 10 μL cDNA 产物, 5 μL 10 \times 反应缓冲液, 3 μL 25 mmol MgCl₂, 1 μL 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs, 3'端及 5'端引物各 1 μL , 0.25 μL (5 U \cdot L⁻¹) *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 循环 35 次; 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。上述 PCR 产物进行 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 CMV 近全长 CP 基因的序列测定和分子变异分析

利用天根生化科技有限公司的 PCR 产物纯化试剂盒, 对 CMV CP 的 IC-RT-CR 产物进行纯化后送上海英俊生物技术有限公司完成序列测定。序列编辑和分析借助 DNASTar (Madison, Wis., USA) 和 DNAMAN Version 4.0 (Lynnon Biosoft, Quebec Canada) 软件进行。采用 Clustal V 方法和 DNA Star 软件进行多序列比较, 进化树构建采用 DNAMAN 的邻近相连法 (Neighbor-joining), 构建后步查 100 次分析, 步查值大于 90% 的置于分支点边上。用于比较的 CMV 亚组 I 和亚组 II 分离物见表 4。以黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*) 中花生矮化病毒 (*Peanut stunt virus*, PSV) (U15730) 的 CP 核苷酸序列作为系统进化树的根序列。

2 结果与分析

2.1 南瓜样品的病毒种类分析

2.1.1 主要病毒种类 在 67 份南瓜样品中, 有 59 份检测到 CMV、TMV、ToMV、TuMV、BBWV-2、PVY 和 PVX 等 7 种病毒中的 1 种或多种病毒。如表 1 所示, 以 PVY 的总检出率最高, 为 83.58%; 除此之外, CMV、TuMV 的侵染现象也很普遍, 总检出率分别为 80.60% 和 82.09%; TMV、BBWV-2 和 ToMV 的总检出率次之, 分别为 77.61%、76.12% 和 74.63%; PVX 的总检出率最低, 为 55.22%。PVY 是北碚地区南瓜上的优势毒源, 而綦江和忠县地区南瓜上的优势毒源则是 TuMV。綦江样品中未检出 ToMV, 在石柱样品中没有检测到 TMV 和 ToMV。由于 14 个江津样品中有 6 个检测呈阴性, 綦江样品中也有 2 个未检出病毒, 因而这 7 种病毒在这 2 个地区的检出率较其它地区偏低。

表 1 地区南瓜病毒病主要毒原的 ELISA 检测结果
Table 1 ELISA detection of squash virus diseases in Chongqing

地点 County	样品编号 Original number of samples	样品数量 Number of samples	病毒检出率/% Percentages of viruses detected						
			CMV	TMV	ToMV	TuMV	BBWV-2	PVY	PVX
北碚 Beibei	CQ-1~9,19,20,51~53,57~59,80,81	19	94.74	94.74	94.74	94.74	94.74	100.00	21.05
綦江 Qijiang	CQ-41~43,66~68,137~140	10	50.00	50.00	30.00	70.00	40.00	60.00	50.00
江津 Jiangjin	CQ-21~25, 90~94,146~149	14	57.14	57.14	57.14	57.14	57.14	57.14	57.14
合川 Hechuan	CQ-35~39,70~73	9	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	88.89
忠县 Zhongxian	CQ-10~16,77~79	10	90.00	90.00	90.00	100.00	90.00	90.00	90.00
涪陵 Fuling	CQ-115,117,128	3	100.00	100.00	100.00	66.67	66.67	100.00	100.00
石柱 Shizhu	CQ-107,108	2	100.00	-	-	50.00	50.00	100.00	50.00
平均 Average			80.60	77.61	74.63	82.09	76.12	83.58	56.72

注: -表示未检出该类病毒, 下同。

Note: - = no virus detected, the same below.

2.1.2 病毒复合侵染 除检测呈阴性的 8 个样品外, 在 59 份阳性样品中, 只有 4 份仅受 1 种病毒侵染, 其中采自北碚和綦江的样品各有 1 份检测到 PVY 单独侵染, 采自忠县和綦江的样品各有 1 份检测到 TuMV 单独侵染。在 55 份复合侵染样品中, CMV、TMV、ToMV、TuMV、BBWV-2、PVY 和 PVX 等 7 种病毒复合侵染是最主要的侵染类型, 检出率高达 60%; CMV、TMV、ToMV、TuMV、BBWV-2 和 PVY 等 6 种病毒复合侵染次之, 16 份样品检测到此复合侵染类型, 其中有 15 份采自北碚, 1 份采自合川; 另有 4 份样品受 5 种病毒复合侵染; 检测到 2 种病毒复合侵染的样品最少, 仅有 2 份 (表 2)。且北碚、江津和合川的样品受病毒复合侵染的现象特别严重, 6 种以上病毒复合侵染率接近 100%。

表 2 南瓜样品的病毒复合侵染类型和比例
Table 2 Types and percentages of co-infections of viruses in squash samples

病毒复合侵染类型 Types of co - infections of viruses	阳性样品编号 Original number of positive samples	阳性检出率/% Positive rate
CMV + PVY	CQ-107	1.82
TuMV + BBWV - 2 + PVY	CQ-68	1.82
CMV + TMV + ToMV + PVY + PVX	CQ-128	1.82
CMV + TMV + TuMV + PVY + PVX	CQ-138,140	3.64
CMV + TuMV + BBWV - 2 + PVY + PVX	CQ-108	1.82
CMV + TMV + ToMV + TuMV + BBWV - 2 + PVY	CQ-1,6~9,19,20,35,51~53,57~59,80,81	29.09
CMV + TMV + ToMV + TuMV + BBWV - 2 + PVY + PVX	CQ-3~5,10~14,16,21,23~25,36~39,42,70~73, 77~79,92~94,115,117,137,139,146	60.00

2.2 CMV 南瓜分离物的亚组鉴定

根据 54 份 CMV 阳性样品对 CMV I 和 CMV II 的特异性单克隆抗体的血清学反应结果对其进行亚组分析, 结果表明有 49 份样品受 CMV 亚组 I 侵染, 有 11 份样品受 CMV 亚组 II 侵染, 其检出率分别为 90.74%和 20.37% (表 3), 表明在重庆受 CMV 侵染的南瓜植株中 CMV I 属优势类型。其中有 6 份样品检出 CMV I 和 CMV II 复合侵染, 复合侵染率为 11.11%。另外, CMV I 和 CMV II 在重庆不同地区的分布也有所不同, 在采自綦江、合川、忠县和涪陵 4 个区县的南瓜样品中只检测到 CMV I, 未发现有 CMV II 侵染; 而采自石柱的样品仅检测到 CMV II 侵染。在北碚和江津的样品中均检测到 CMV 2 个亚组病毒的侵染, 其中 CMV I 的检出率分别为 83.33%和 100%, CMV II 在北碚的检出率较高, 为 44.44%, 且在這些样品中检测到 CMV I 和 CMV II 的复合侵染, 复合侵染率分别为 27.78%和 12.50% (表 3)。

表 3 重庆不同地区南瓜上 CMV I 和 CMV II 的检出率
Table 3 Percentages of CMV I and CMV II on squash in different counties of Chongqing

地点 County	样品数 Number	CMV I		CMV II		CMV I + CMV II	
		编号 No.	阳性检出率/% Positive rate	编号 No.	阳性检出率/% Positive rate	编号 No.	阳性检出率/% Positive rate
北碚 Beibei	18	CQ-1,3~5,7~9,19,20,51,52,57, 59,80,81	83.33	CQ-6,8,52,53,57,58, 59,81	44.44	CQ-8,52,57,59,81	27.78
綦江 Qijiang	5	CQ-42,137~140	100.00	-	-	-	-
江津 Jiangjin	8	CQ-21,23,24,25, 92,93,94,146	100.00	CQ-94	12.50	CQ-94	12.50
合川 Hechuan	9	CQ-35,36,37,38,39,70,71,72,73	100.00	-	-	-	-
忠县 Zhongxian	9	CQ-10,11,12,13,14,16,77,78,79	100.00	-	-	-	-
涪陵 Fuling	3	CQ-115,117,128	100.00	-	-	-	-
石柱 Shizhu	2	-	-	CQ-17,18	100.00	-	-
平均 Average		49	90.74	11	20.37	6	11.11

2.3 CMV CP 基因的 IC-RT-PCR 扩增

由于CMV I 在重庆南瓜CMV分离物中属优势亚组类型, 为了了解CMV的变异情况, 选取采自重庆北碚的ELISA检测为CMV亚组I阳性的3个南瓜样 (CQ-1、CQ-19和CQ-20), 利用CMV I CP基因的特异性引物对CMV I -F/CMV-R对其进行IC-RT-PCR扩增。

结果表明, 从3个样品中均扩增得到约500 bp的条带, 与预期条带大小 (Yu et al., 2005) 一致 (图1)。

2.4 CMV CP 基因的序列变异性分析

将CQ-1号南瓜样品CMV (命名为CMV-CQ) CP的IC-RT-PCR产物进行纯化, 经测序获得CMV-CQ 486个碱基 (nt) 的近全长CP基因片段。将所测序列与GenBank中已登录的26个CMV分离物序列进行比较分析。结果表明CMV-CQ CP与已知的19个CMV亚组 I 分离物CP的核苷酸序列同源性均在92.2%以上; 而与7个CMV亚组 II 分离物CP的核苷酸同源性最高为78.4%, 最低为76.5%。和国内13个CMV亚组 I 分离物相比, CMV-CQ CP与国内CMV赤豆分离物 (CMV-RB) 的核苷酸序列同源性最高, 为98.1%。但与另两个CMV南瓜分离物 (YN和HLJ) 的核苷酸同源性较低, 分别为93.6%和92.4% (表4)。

为进一步分析CMV-CQ的变异情况, 将CMV-CQ的CP核苷酸序列与GenBank中已登录的26个CMV分离物CP及PSV ER株系CP核苷酸序列构建系统关系树 (图2)。结果表明, CMV-CQ与已知的19个CMV亚组 I 分离物形成一个大的分支, 其余7个CMV亚组 II 分离物形成另一个大的分支, 表明CMV-CQ与这些CMV亚组 I 分离物之间有近的亲缘关系, 同属CMV亚组 I 分离物。

同时, CMV-CQ又与RB、PE等国内分离物形成一个小的分支, 表明它们之间有更近的亲缘关系。而与另两个CMV南瓜分离物 (TFN和ZJ2) 位于不同的小分支上。

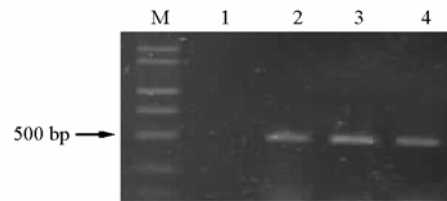


图1 南瓜样品CMV CP基因的IC-RT-PCR扩增

M: DNA Marker III ladder; 1: 健康植株; 2: CQ-1 号样品;
3: CQ-19 号样品; 4: CQ-20 号样品。

Fig. 1 Amplification of CMV CP gene in squash samples by IC-RT-PCR

M: DNA Marker III ladder; 1: Healthy plant; 2: Sample CQ-1;
3: Sample CQ-19; 4: Sample CQ-20.

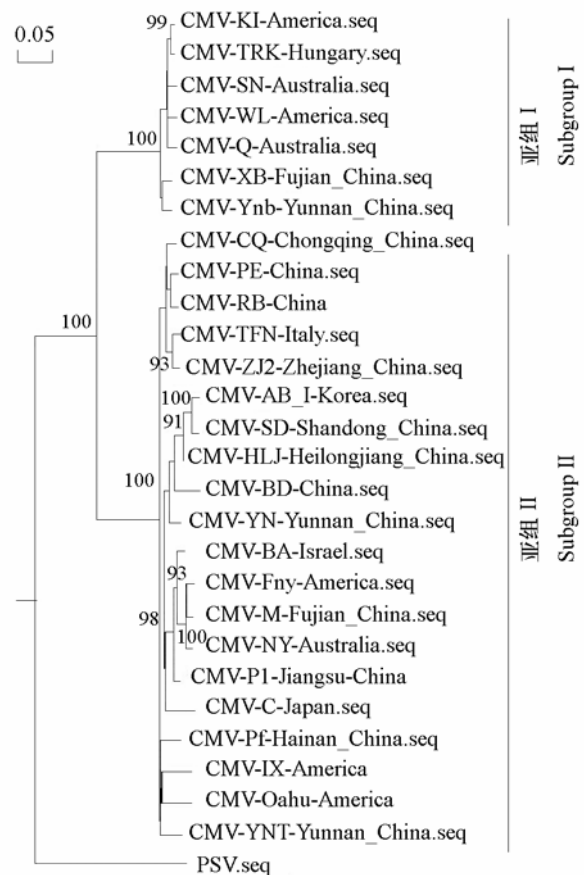


图2 基于 CMV 近全长 CP 基因核苷酸序列构建的系统关系树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the alignment of nearly full-length nucleotide sequences of CMV CP genes

表 4 CMV-CQ近全长CP与其它CMV分离物CP核苷酸序列的同源性比较
Table 4 Percentages of nucleotide sequence identities among the nearly full-length CP of
CMV-CQ isolates and other selected ones

CMV 亚组 CMV subgroups	分离物 Isolations	国家或地区 Countries or areas	寄主 Hosts	登录号 GenBank accession	同源性/% CMV-CQ
亚组 I Subgroup I	CMV-RB	中国 China	赤豆 <i>Phaseolus angularis</i>	AJ006990	98.1
	CMV-PE	中国 China	西番莲 Passionflower	AF268597	96.3
	CMV-TFN	意大利 Italy	番茄 Tomato	Y16926	95.7
	CMV-ZJ2	中国浙江 Zhejiang, China	萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	AY138992	93.0
	CMV-SD	中国山东 Shandong, China	烟草 Tobacco	AB008777	93.4
	CMV-AB I	韩国 Korea	剑兰 <i>Gladiolus</i>	L36525	92.4
	CMV-HLJ	中国黑龙江 Heilongjiang,	南瓜 Squash	DQ459481	92.4
	CMV-YN	中国云南 Yunnan, China	南瓜 Squash	DQ459482	93.6
	CMV-BD	中国 China	黄瓜 Cucumber	X65017	92.2
	CMV-M	中国福建 Fujian, China	不确定 Uncertain	AF268599	92.8
	CMV-PI	中国江苏 Jiangsu, China	豌豆 Garden Pea	AJ006988	94.0
	CMV-Pf	中国海南 Hainan, China	鸡蛋果 <i>Passiflora edulis</i>	AF368192	94.0
	CMV-YNT	中国云南 Yunnan, China	烟草 Tobacco	AJ239098	94.9
	CMV-Fny	美国 U.S.A	不确定 Uncertain	D10538	94.7
	CMV-BA	以色列 Israel	小果野蕉 <i>Musa acuminata</i>	U43888	94.7
	CMV-Ix	美国 U.S.A	番茄 Tomato	U20219	92.8
	CMV-NY	澳大利亚 Australia	不确定 Uncertain	U22821	94.7
	CMV-Oahu	美国 U.S.A	香蕉 Banana	U31220	92.2
	CMV-C	日本 Japan	不确定 Uncertain	D42079	93.2
亚组 II Subgroup II	CMV-Ynb	中国云南 Yunnan, China	烟草 Tobacco	AJ242585	77.4
	CMV-XB	中国福建 Fujian, China	香蕉 Banana	AF268598	77.8
	CMV-Q	澳大利亚 Australia	不确定 Uncertain	M21464	78.4
	CMV-WL	美国 U.S.A	番茄 Tomato	D00463	77.6
	CMV-SN	澳大利亚 Australia	不确定 Uncertain	U22822	77.6
	CMV-KI	美国 U.S.A	烟草 Tobacco	Z12818	77.6
	CMV-TRK	匈牙利 Hungary	不确定 Uncertain	L15336	76.5

3 讨论

本研究结果表明从重庆南瓜样品中检测到 CMV、TMV、ToMV、TuMV、BBWV-2、PVY 和 PVX 等 7 种常见蔬菜病毒。其中 PVY、TuMV 和 CMV 的检出率均在 80%以上，是重庆地区南瓜上的优势毒源。除 CMV 属已知侵染南瓜的病毒种类外，在国内还未见另外 6 种病毒自然侵染南瓜的报道。由于已有报道大多未针对这 6 种病毒进行血清学或分子生物学的检测，因而不能排除其侵染南瓜的可能性。且 CMV 编码的 2b 蛋白和 PVY 编码的 HC-Pro 蛋白（Anandalakshmi et al., 1998; Brigneti et al., 1998）均是 RNA 沉默的抑制子，这 2 种病毒若成功侵染南瓜将抑制寄主的防御机制从而有利于其它病毒的入侵。另一方面，本研究中所用 ELISA 技术虽可用于鉴定样品是否带毒及所带病毒的种类，但由于本研究所用 PVY 和 PVX 的血清是多抗，故不能排除在检测中出现假阳性的可能。且本研究中供试病毒抗血清都不是标准的抗血清，故检测结果也会受此影响，特别是对于 TMV 和 ToMV 这 2 个血清学关系密切且株系复杂的病毒种类，更需做进一步的分子鉴定。因而本研究

所得 ELISA 检测结果只是关于重庆地区南瓜病毒种类的一个极为初步的血清学检测结果, 要准确鉴定每一种病毒还需要利用生物学和分子生物学等多种手段, 并从基因组水平提出更准确而可靠的依据。在本研究中有 8 个南瓜样品未检测到待测的 7 种病毒, 但样品病毒病症状明显, 表明这些样品中可能仍含有其它病毒种类未被检测出。由于没有 SqMV、ZYMV 和 WMV-2 等可侵染南瓜的病毒的抗血清, 未对样品进行针对这些病毒的检测, 因而不能排除样品感染这些病毒的可能性。

田间病毒侵染的情况通常比较复杂, 笔者在调查重庆市外来有害生物的过程中, 从一些菜田周边的一种杂草——葎草上检出复合侵染的 7 种病毒, 且复合侵染的比例高达 80% (青玲 等, 2009)。本研究中有 93.22% 的南瓜阳性样品均受病毒复合侵染, 且 7 种病毒同时复合侵染的情况相当普遍, 占复合侵染样品的 60%, 这一结果与葎草中的检测结果类似。一种可能是自然界确实存在如此严重的复合侵染现象, 但由于已有研究未同时利用这些病毒的血清来检测样品, 因而此现象一直没有被发现; 另一方面, 检测过程中可能存在的假阳性也是复合侵染率偏高的一个重要原因。鉴于病毒在南瓜上的复合侵染现象很严重, 因此, 在制定病毒防治策略时, 在以主要病毒防治为主的前提下, 还应兼顾其它病毒。

CMV 是世界范围内广泛分布的最具经济重要性的植物病毒之一, 根据其寄主反应、血清学反应、肽链图谱分析、dsRNA 分析、RT-PCR、核酸杂交及核苷酸序列分析等方法, 可将 CMV 分离物划分为亚组 I 和亚组 II (Edwards & Gonsalves, 1983; Rizos et al., 1992; Hsu et al., 2000), 且我国 CMV 分离物以亚组 I 为主 (冯兰香和杨翠荣, 2000; Yu et al., 2005; 杨国慧 等, 2006)。本试验结果表明, 重庆地区南瓜上 CMV I 型占优势地位, 同时在受 CMV 侵染的南瓜样品中还发现 11.11% 的样品存在 CMV I 和 CMV II 的复合侵染。

本研究中运用 IC-RT-PCR 技术 (Jansen et al., 1990), 从南瓜样品中扩增到 CMV 近全长 CP 基因 (CMV-CQ)。序列比较表明, CMV-CQ CP 与国内外已知的 CMV I 分离物 CP 的核苷酸序列同源性明显高于与 CMV II 分离物 CP 核苷酸序列的同源性, 其中又与国内 CMV I 型赤豆分离物 (CMV-RB) 的核苷酸序列同源性最高。构建 CMV 近全长 CP 基因核苷酸序列系统关系树, CMV-CQ 与已知的 CMV I 分离物形成一个分支, 表明此分离物属 CMV I, 序列比对结果与 ELISA 检测结果相吻合。该体系的建立为进一步开展重庆地区蔬菜上 CMV 的分子变异奠定了基础。

References

- Anandalakshmi R, Pruss G J, Ge X, Marathe R, Mallory A C, Smith T H, Vance V B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 95 (22): 13079 - 13084.
- Brigneti G, Voinnet O, Li W X, Ji L H, Ding S W, Baulcombe D C. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal*, 17 (22): 6739 - 6746.
- Edwards M C, Gonsalves D. 1983. Grouping of seven biologically defined isolates of *Cucumber mosaic virus* by peptide mapping. *Phytopathology*, 73: 1117 - 1120.
- Fang Qi, Yang Guo-hui, Ding Ming, Li Ting-ting, Zhang Li-zhen, Peng Lu-bo, Su Xiao-xia, Zhang Zhong-kai. 2004. Cytopathologic observation on main viruses causing disease of pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 23 (4): 348 - 348. (in Chinese)
- 方 琦, 杨国慧, 丁 铭, 李婷婷, 张丽珍, 彭璐波, 苏晓霞, 张仲凯. 2004. 南瓜主要病毒病的细胞病理观察. *电子显微学报*, 23 (4): 348 - 348.
- Feng Lan-xiang, Yang Cui-rong. 2000. The Identification of Subgroup of CMV from Tomato in China by DAS - ELISA. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (6): 418 - 422. (in Chinese)

- 冯兰香, 杨翠荣. 2000. 中国番茄黄瓜花叶病毒血清组的鉴定. 园艺学报, 27 (6): 418 - 422.
- Hong Y G, Wang X F, Tian B, Cai J H. 1995. Chinese squash leaf curl virus: A new whitefly-transmitted geminivirus. Science in China (Series B), 38 (2): 179 - 186.
- Hsu H T, Barzuna L, Hsu Y H, Bliss W, Perry K L. 2000. Identification and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* with mouse monoclonal antibodies. Phytopathology, 90 (6): 615 - 620.
- Jansen R W, Siegl G, Lemon S M. 1990. Molecular epidemiology of human hepatitis a virus defined by an antigen - capture polymerase chain reaction method. Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, 87 (8): 2867 - 2871.
- Li Feng-mei, Cui Chong-shi, Yang Guo-hui. 2002. Research advance of squash virus. Journal of Northeast Agricultural University, 33 (1): 1 - 7. (in Chinese)
- 李凤梅, 崔崇士, 杨国慧. 2002. 南瓜病毒病的研究进展. 东北农业大学学报, 33 (1): 1 - 7.
- Li Feng-mei. 2002. Study on valuation of pumpkin virus in heilongjiang province and selection of resistant pumpkin resources [Ph.D.Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 李凤梅. 2002. 黑龙江省南瓜病毒病原鉴定和品种资源抗性筛选的研究[博士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Qing Ling, Liu Ying-hong, Ma Li-na. 2005. Preliminary identification of tobacco virus types in wulong county. Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science, 27 (3): 319 - 322. (in Chinese)
- 青 玲, 刘映红, 马丽娜. 2005. 武隆烟区烟草病毒病的病原初步鉴定. 西南农业大学学报: 自然科学版, 27 (3): 319 - 322.
- Qing Ling, Yang Shui-ying, Sun Xian-chao, Wang Jin-jun, Zhou Chang-yong. 2009. Detection of several co-infected viruses in *Humulus scandens*. Plant Protection, 35 (4): 138 - 139. (in Chinese)
- 青 玲, 杨水英, 孙现超, 王进军, 周常勇. 2009. 从葎草中检出复合侵染的多种病毒. 植物保护, 35 (4): 138 - 139.
- Rizos H, Gumn V G, Pares R D. 1992. Differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates using the polymerase chain reaction. Journal of General Virology, 73 (8): 2099 - 2103.
- Yang Guo-hui, Zhang Zhong-kai, Cui Chong-shi. 2006. Sequence analysis of CP genes of CMV from pumpkin in Yunnan and Heilongjiang Provinces. Acta Horticulturae Sinica, 33 (6): 1237 - 1240. (in Chinese)
- 杨国慧, 张仲凯, 崔崇士. 2006. 滇黑两省黄瓜花叶病毒南瓜分离物外壳蛋白基因序列分析. 园艺学报, 33 (6): 1237 - 1240.
- Yang Guo-hui, Zhang Zhong-kai, Cui Chong-shi. 2007. Identification of pumpkin viruses and comparisons between viruses from Yunnan and Heilongjiang provinces. Journal of Northeast Agricultural University, 38 (1): 23 - 26. (in Chinese)
- 杨国慧, 张仲凯, 崔崇士. 2007. 云南、黑龙江两省南瓜主要病毒病原种类鉴定. 东北农业大学学报, 38 (1): 23 - 26.
- Yang Guo-hui. 2003. Identification of pathogenic viruses infecting pumpkin in Yunnan and Heilongjiang Provinces and cloning of their coat Protein genes [Ph.D.Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 杨国慧. 2003. 滇黑两省南瓜病毒病原鉴定及其外壳蛋白基因克隆 [博士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Yu C, Wu J X, Zhou X P. 2005. Detection and subgrouping of cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. Journal of Virological Methods, 123 (2): 155 - 161.