

广东地区冬瓜感染的小西葫芦黄花叶病毒检测及其外壳蛋白基因多样性分析

赵 芹^{1,*}, 谢大森¹, 何晓明¹, 李华平², 尤 毅³, 罗少波¹, 彭庆务¹

(¹广东省农业科学院蔬菜研究所, 广州 510640; ²华南农业大学农学院植物病毒研究室, 广州 510642; ³广东省农业科学院环境园艺研究所, 广州 510640)

摘 要: 小西葫芦黄花叶病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) 是危害广东省冬瓜的常见病毒。摸索了冬瓜叶片总 RNA 最佳提取方法, 通过基于 ZYMV 病毒外壳蛋白基因 (coat protein gene, *cp*) 序列的 RT-PCR 扩增, 检测采集自广东省 9 个冬瓜产区的 76 份病毒侵染样品的病毒田间发病率; 将扩增产物克隆测序, 利用 MegAlign 软件构建系统发育进化树分析 *cp* 基因遗传变异与系统进化。结果表明, 24 份样品检测为阳性, 田间发病率为 31.59%; 所有参试病毒分离物 *cp* 基因全长 840 bp, 编码 279 个氨基酸的多肽; 测序的 16 个分离物 *cp* 基因的核苷酸序列与推导蛋白的氨基酸序列相似性分别为 98.1% ~ 100% 与 96.1% ~ 100%; 所有广东分离物的推导氨基酸序列基序保守, 除 GD121-9 增加 2 个人类白细胞抗原外, 其他均包含 5 个人类白细胞抗原及 1 个 N 糖基化位点, 均包含保守 potyv_CP 功能域及与病毒蚜传相关的结构域 DAG 三联盒 “Asp-Ala-Gly”; 系统进化分析表明, ZYMV 病毒划分为 7 个基因型, 广东分离物均属于同一基因型 I, 包含 3 个株系; 广东地区的 16 个分离物分为 3 组, 无明显地域选择性。总体上广东 ZYMV-*cp* 比较保守, 分子变异较小。明确了广东省冬瓜上 ZYMV 病毒的侵染情况及外壳蛋白基因的变异特点, 为对其致病性和抗病毒基因工程等研究提供依据。

关键词: 冬瓜; 小西葫芦黄花叶病毒; 外壳蛋白基因; 遗传变异

中图分类号: S 642.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2016) 01-0151-10

Detection of *Zucchini yellow mosaic virus* Infecting Wax Gourd in Guangdong Province and Genetic Variation of Its Coat Protein Gene

ZHAO Qin^{1,*}, XIE Da-sen¹, HE Xiao-ming¹, LI Hua-ping², YOU Yi³, LUO Shao-bo¹, and PENG Qing-wu¹

(¹Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; ²Plant Virology Laboratory of Agricultural College, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ³Environmental Horticulture Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Zucchini yellow mosaic virus* was a common virus infecting wax gourd in Guangdong Province. Total RNA extraction methods of wax gourd leaves were compared, and then 76 wax gourd samples from 9 main production regions in Guangdong Province were collected and detected based on

收稿日期: 2015-09-25; 修回日期: 2015-12-09

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31311643); 广州市珠江科技新星项目 (2013086)

* E-mail: zhaoqin0802@126.com

RT-PCR amplification of coat protein gene (*cp*) of ZYMV. The amplification products were sequenced and genetic variation analysis were carried out. The results showed that 24 samples were determined as positive with incidence ratio of 31.59%, sequence analysis revealed that full-length of *ZYMV-cp* of 16 isolates was 840 bp encoding a peptide with 279 amino acids. Further alignment analysis indicated that similarities of *ZYMV-cp* nucleotide acid and amino acid sequences ranged from 98.1% to 100% and from 96.1% to 100% respectively. The motifs of deduced amino acids sequences were conserved, all isolates contained 5 HLA sites (Human Leukocyte Antigen) and 1 N-glycosylation site except GD121-9 with 2 additive HLA motifs. The CP protein of all isolates included conserved domain potyv_CP and DAG triple box (Asp-Ala-Gly) crucial for potyvirus transmission by aphid. Phylogenetic analysis suggested that all isolates were clustered into 7 genotypes, Guangdong isolates belonged to genotype I and contained 3 strains; All Guangdong isolates were further clustered into 3 groups with no obvious geographical differentiation. Generally *ZYMV-cp* in Guangdong isolates were conserved and had little molecular variation. This study determined the infection situation and genetic variation of coat protein gene of ZYMV isolates in Guangdong Province, and laid foundation for further pathogenicity research and antiviral genetic engineering.

Key words: wax gourd; *Zucchini yellow mosaic virus*; coat protein gene; genetic variation

小西葫芦黄花叶病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) 是侵染葫芦科作物的常见病毒, 田间经常与其他病毒复合侵染加重病情。在中国北方和浙江、广东、广西等地大面积危害(陈洁云 等, 2003a; 古勤生 等, 2003; 宋丽敏 等, 2005)。1981 年最早在意大利小西葫芦上发现 (Lisa et al., 1981), 在中国 1991 年首次报道在新疆发生 (郑光宇和董涛, 1991), 迄今已成为世界范围的葫芦科作物重要病毒, 分布于温带、亚热带、热带广大地区 (Coutts et al., 2011a)。ZYMV 由蚜虫非持久性传播, 侵染寄主初期表现均匀褪绿小斑点, 后期出现不规则花叶、黄脉、叶片皱缩疱斑, 果实畸形僵硬味苦涩, 种子发芽率下降, 产量品质严重降低。

ZYMV 为马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 成员, 病毒粒体为弯曲线状, 基因组为 (+) ssRNA (Diana et al., 2011)。*Potyvirus* 属病毒基因组全长约 10 kb, 编码 1 个多聚蛋白, 通过其内部 3 种病毒蛋白酶加工形成 10 个功能蛋白。国内外学者在 ZYMV 病毒检测方法 (Ting et al., 2009; Luo et al., 2012)、发生起源与传播 (Coutts et al., 2011b; Neha et al., 2012)、基因组序列 (Azarfr et al., 2012) 及侵染性克隆等方面开展了较多研究。通过不同生物学性状分离物的序列差异及对保守结构域构建的突变体表型, 研究了 ZYMV CP、P3 及 HC-Pro 的功能 (Arizi et al., 2001; Desbiez et al., 2003; Clara et al., 2008)。*cp* 基因编码 ZYMV 病毒的外壳蛋白, 不但参与外壳的组装, 为病毒转录所必需, 还与病毒胞间及长距离移动以及病毒蚜传有关, 其 N 端为高度变异区与病毒特异性反应或寄主—传播途径—病毒的相互作用有关, DAG 序列为蚜传病毒的特征序列 (Harrison & Robinson, 1988; Atreva et al., 1990)。ZYMV 存在明显的株系分化现象。许多生物学功能, 如侵染寄主症状及蚜传效率不同的各种株系均有报道, 弱症株系 ZYMV-WK 是从非蚜传分离物 E15-PAT 分离的变异株, 在不同地区的田间成功阻碍了 ZYMV 几个致病株系的侵染 (Kosaka et al., 2006); 多数弱毒株系是从田间分离、高温或低温处理、硝酸及紫外线辐射获得, 如 ZYMV-2002 是通过低温处理黄瓜寄主分离得到 (Lecoq et al., 1991)。

目前对冬瓜病毒病很少有系统地研究报道。本研究中通过对 ZYMV 外壳蛋白基因的 RT-PCR 检

测, 了解广东省冬瓜主产区的 ZYMV 发生情况及病毒 *cp* 基因序列变异, 为后续病毒致病性分析和冬瓜抗病毒分子育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

采集典型或疑似病毒病症状的冬瓜叶片材料 76 份 (表 1), 分别采自广东省主要冬瓜产区, 包括三水 (7 份)、台山 (5 份)、徐闻 (8 份)、英德 (4 份)、清远 (9 份)、花都 (8 份)、广州市白云区 (18 份)、柯木朗 (9 份) 及番禺 (8 份), 保存于 -80°C 超低温冰箱备用。ZYMV 毒源由中国农业科学院郑州果树研究所古勤生研究员惠赠, 作为阳性对照。

1.2 冬瓜冻存叶片总RNA提取方法比较

由于冬瓜叶片冰冻后易瘫软褐化, 影响总 RNA 的抽提及后续的 RT-PCR 检测, 故对 4 种提取方法的提取效率及质量进行了比较。

a. 过柱型试剂盒法: 取 50 ~ 100 mg 冬瓜叶片, 在液氮中迅速研磨成粉末状, 参照天根公司 RNApure pure 植物总 RNA 提取试剂盒 (离心柱型, 北京天根生物工程有限公司) 操作说明书提取总 RNA。

b. TRNzol 提取法: 参照天根公司 TRNzol Total RNA reagent 总 RNA 提取试剂 (北京天根生物工程有限公司) 操作说明书, 取约 100 mg 冬瓜叶片提取总 RNA。

c. 异硫氰酸胍两次精提法: 参考杨雷亮 (2007) 的方法略有改动。取 0.1 ~ 0.2 g 冬瓜叶片, 液氮研磨, 加入预冷 RNA 抽提液匀浆 ($4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异硫氰酸胍, $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠, 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 巯基乙醇, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc, pH 3.5 水饱和酚, 配制该溶液必须使用经过灭菌的 DEPC 处理水, 巯基乙醇现用现加), 再加入乙酸钠 (pH 4.0)、水饱和酚及等体积 (氯仿: 异戊醇) 剧烈振荡, 离心后的上清液 RNA 相, 加入等体积异丙醇沉淀。上述步骤重复 1 次, 最终所得沉淀洗涤风干、溶解, -70°C 保存备用。

d. 异硫氰酸胍一次快提法: 参考改良杨雷亮 (2007) 的方法。取 0.2 ~ 0.3 g 冬瓜叶片, 液氮充分研磨, 加入预冷 RNA 抽提液匀浆 (同上), 加入乙酸钠 (pH 4.0)、等体积水饱和酚及氯仿: 异戊醇剧烈振荡, 离心, 上清液加入等体积异丙醇沉淀, 适量 DEPC 处理 ddH_2O 溶解, -70°C 保存备用。

利用 1% 琼脂糖凝胶电泳及纳米紫外分光光度计 (GENEQUANT, Eppendorf) 检测不同方法提取的冬瓜叶片总 RNA 的浓度与质量, 从而选择简便有效的抽提方法, 为后续 RT-PCR 检测奠定基础。

1.3 冬瓜ZYMV病原RT-PCR检测

根据 GenBank 网站公布的中国台湾分离物 ZYMV 病毒基因组序列 (AM422386), 利用 Primer 5.0 软件设计覆盖完整外壳蛋白基因的特异引物, 扩增片段大小为 840 bp (8 543 ~ 9 382 nt), 送与广州英骏生物技术有限公司合成。ZYMV-CPF: 5'-TCAGGCACTCAGCCA ACTGTG-3' (8 543 ~ 8 563 nt); ZYMV-CPR: 5'-TTACTGCATTGTATTACACCTAGC-3' (与 9 358 ~ 9 382 nt 反义互补)。

取抽提的总 RNA 1 μL 进行 RT 反应, 依次加入病毒下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , dNTPs ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , RNase 抑制剂 ($20\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , MMLV 反转录酶 (Promega 公司) 0.5

μL , $5\times$ RT 缓冲液 $2\mu\text{L}$, DEPC 处理 ddH_2O $3.5\mu\text{L}$, 总体系为 $10\mu\text{L}$ 。反应条件为 42°C 60 min , 99°C 5 min , 5°C 5 min 。

取反转录反应液 $2\mu\text{L}$ 作为 PCR 反应模板, 加入 dNTPs ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.5\mu\text{L}$, rTaq (5 U) $0.2\mu\text{L}$, $10\times$ PCR 缓冲液 $2.5\mu\text{L}$, 总体系 $25\mu\text{L}$ 。反应程序为 94°C 预变性 3 min , 94°C 变性 30 s , 50°C 退火 30 s , 72°C 延伸 1 min , 35 个循环; 72°C 延伸 10 min 。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应结果。

1.4 ZYMV病毒cp基因扩增产物的克隆与测序

检测结果呈阳性的材料, 各地区按症状差异至少选取一个样品 PCR 产物, 利用凝胶回收试剂盒回收纯化, 与 pMD 18-T 载体 (TaKaRa 公司) 连接, 转化至 DH5 α 感受态, 涂布于 LB 平板过夜, 利用 Amp 抗生素、IPTG 与 X-gal 进行蓝白斑筛选, 挑取白斑进行菌落 PCR 鉴定, 每个样品选取 3 个阳性克隆菌液送与广州英骏生物技术有限公司双向测序。

1.5 ZYMV分离物cp基因序列遗传多样性分析

在 GenBank 中对所得序列进行 BLAST 检索; 选取 1 个测序序列作为分离物代表序列, 利用 DNASTar MegAlign 软件 Clustal W 程序对不同地区分离物进行核苷酸序列及氨基酸序列比对和同源性分析, 构建系统发育进化树分析氨基酸水平上的分子遗传进化关系; 利用 Vector NTI 11.5 软件比较分析各地区分离物 CP 蛋白氨基酸序列基序。为确定广东各地区分离物的基因型, 从 GenBank 选取部分分离物进行同源比对与聚类分析。

2 结果与分析

2.1 冬瓜叶片总RNA不同提取方法效果比较

由图 1 可看出, 与其他方法相比, 过柱型试剂盒法提取的总 RNA, 28S 和 18S 条带清晰完整, 亮度高, 5S 条带较弱, 降解最少, 未见蛋白残留; 并可除去冬瓜叶片中一些色素及杂质, 提取 RNA 溶液呈无色透明状, 所提取 RNA $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值在 $1.8\sim 2.0$ 之间, 质量较好, 且提取所用时间最快, 20 min 即可完成单个样品提取。因此过柱型试剂盒法为最优提取冻存冬瓜叶片总 RNA 方法。

2.2 冬瓜病样ZYMV病毒的RT-PCR检测

利用建立的 RT-PCR 有效检测体系, 对广东 9 个冬瓜主产区的 76 份病样进行检测, 结果如表 1 所示。除英德与三水样品未检出病毒外, 其他 7 个地区均检测到 ZYMV 病毒。所检 76 份样品中, 24 株为阳性, 平均带毒率为 31.59% , 其中天河区柯木朗病毒检测率最高, 达 66.67% , 其次花都区, 为 62.50% 。由于部分地区采集样品数略少, 后续检测中将扩大采集范围及数量以使数据更具代表性。

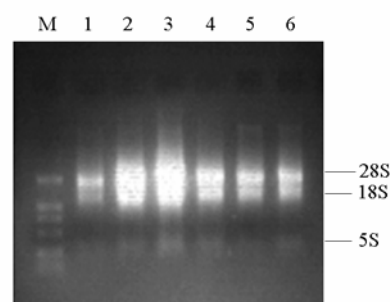


图 1 过柱型试剂盒法提取冬瓜叶片总 RNA 凝胶电泳结果

M: DL2000 marker; 1~6: 冬瓜叶片样本总 RNA。

Fig. 1 The agarose electrophoresis analysis of extracted total RNA by column protocols method

M: DL2000 marker; 1 - 6: Total RNA of wax gourd samples.

表 1 广东省不同冬瓜主产区 ZYMV 病毒检出率
Table 1 Detection ratio of ZYMV on wax gourd samples from main production areas in Guangdong Province

编号 No.	采集地区 Collection site	采样数量 Sample quantity	ZYMV 检测阳性数 Positive number of ZYMV sample	ZYMV 阳性检出率% Detection ratio of ZYMV sample	测序样品 Sequenced sample
1	白云区钟落潭 Zhongluotan in Baiyun region	18	7	38.89	GD11, GD12-1, GD60-1, GD49-3
2	天河区柯木朗 Kemulang in Tianhe region	9	6	66.67	JN559383
3	番禺区 Paiyu region	8	1	12.50	GD31-2
4	花都区 Huadu region	8	5	62.50	GD121-9, GD122-7, GD125-2, GD126-4, GD127-6
5	清远 Qingyuan	9	3	33.33	GD44-1, GD116-9, GD117-6
6	三水 Sanshui	7	0	0	
7	台山 Taishan	5	1	20.00	GD13-5
8	徐闻 Xuwen	8	1	12.50	GD25-3
9	英德 Yingde	4	0	0	

2.3 ZYMV分离物cp基因的变异分析

提取病毒样品总 RNA 经 RT-PCR 扩增(图 2), 24 个样品扩增得到 840 bp 左右的 DNA 条带, 与预期片段大小一致。根据不同地区及样品症状差异, 选取 16 个分离物扩增产物进行克隆, 每个分离物挑取 3 个克隆进行双向测序, 选取 1 个作为分离物代表序列。结果表明, 扩增片段全长均为 840 bp, 覆盖整个 *cp* 基因序列, 编码 279 个氨基酸的多肽。所有分离物 CP 编码蛋白均包含保守的 potyv_CP 功能域及病毒蚜传相关的结构域 DAG 三联盒 “Asp-Ala-Gly”; 各分离物 *cp* 基因编码外壳蛋白基序比较保守, 除分离物 GD121-9 在 191 与 198 氨基酸位置增加了 2 个人类白细胞抗原外, 其他分离物均具有完全相同的基序序列, 分别在 66、113、144、235 及 242 氨基酸位置具有 5 个人类白细胞抗原 (Human Leukocyte Antigen, HLA), 在 238 氨基酸位置具有 1 个 N 糖基化位点 (Motif Site of N-glycosylation)。

利用 DNASTar 软件对 16 分离物的 *cp* 基因核苷酸序列和推导的氨基酸序列同源性进行比较分析, 各分离物间核苷酸序列相似性为 98.1% ~ 100%, 存在 64 个核苷酸变异位点; 氨基酸序列相似性为 96.1% ~ 100%, 存在 14 个氨基酸变异位点, 其中分离物 GD121-9 与其他分离物的遗传差异最大, 相似性在 96.1% ~ 97.5% 之间, GD121-9 与 GD44-1 相似性最低, 其次最低的是 GD121-9 与 GD122-7,

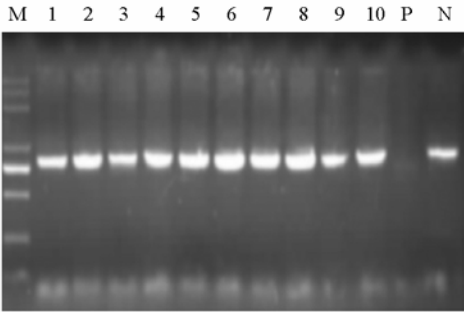


图 2 广东不同冬瓜产区病样 ZYMV 病毒检测结果
M: 2 000 bp DNA marker; 1 ~ 10: 发病样品; P: 阳性对照, ZYMV 病叶; N: 阴性对照, 健康叶片。

Fig. 2 ZYMV Detection of wax gourd in main production areas from Guangdong Province based on amplification of coat protein

M: 2 000 bp DNA marker; 1 - 10: Diseased samples; P: Positive control - ZYMV infected leaves; N: Negative control - healthy leaves.

相似性为 96.4%。由此可见，广东各地区 ZYMV 分离物 *cp* 基因序列高度相似，遗传变异较小。

结合 GenBank 中 ZYMV 其他病毒分离物的 CP 基因序列构建系统发育进化树，分析表明 ZYMV 可划分为 7 个基因型（图 3），基因型 I 包括所有广东分离物与浙江分离物 WG（AJ316229）、美国

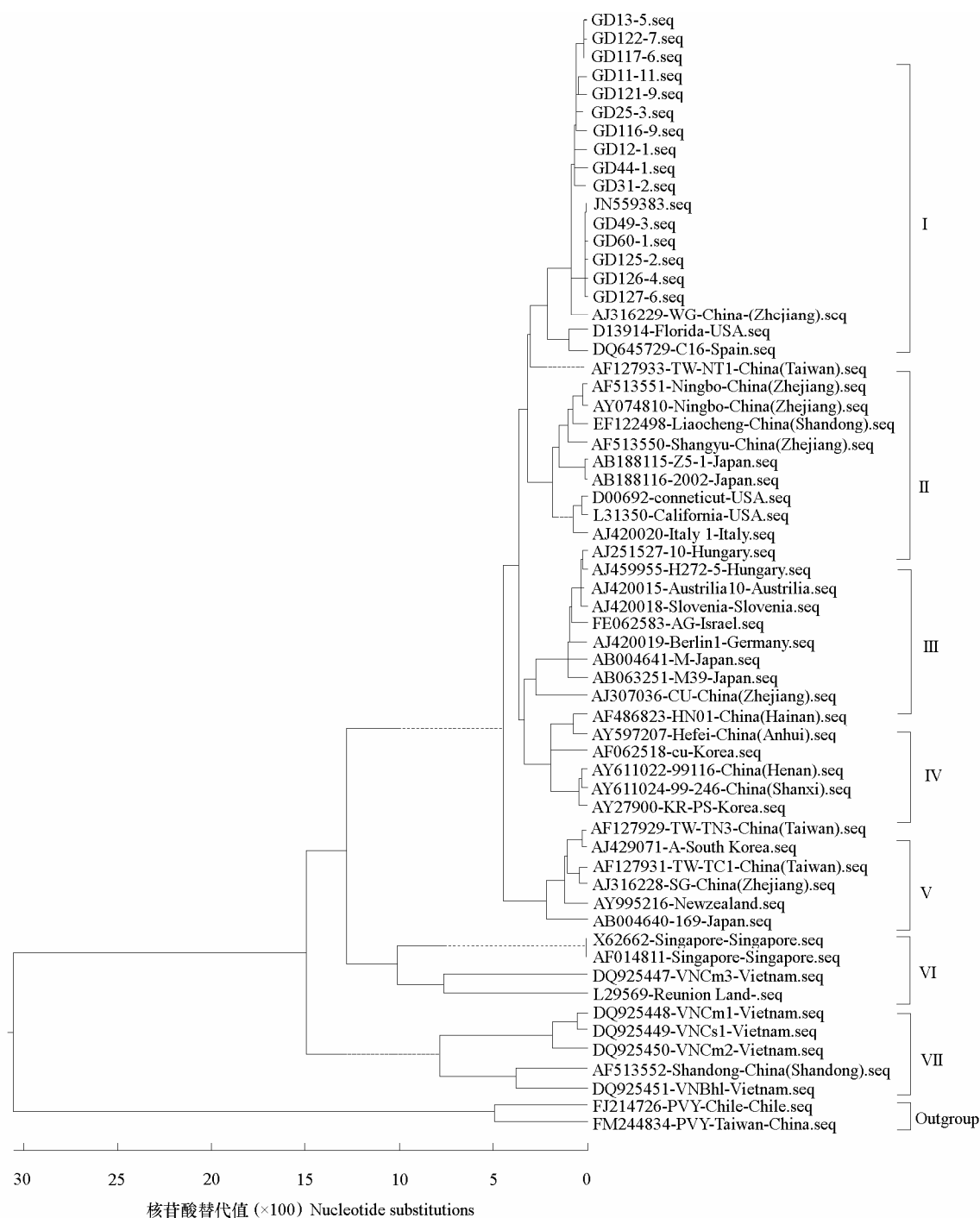


图 3 ZYMV 各分离物 *cp* 基因核苷酸序列聚类分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *cp* gene nucleotide acid sequences of ZYMV isolates

分离物 Florida (D13914)、西班牙分离物 C-16 (DQ645729) 与中国台湾分离物 TW-NT1 (AF127933), 核苷酸序列相似性在 95.1% ~ 100% 之间; 基因型 II 包括 4 个中国分离物 (浙江、山东)、2 个日本分离物、2 个美国分离物及 1 个意大利分离物; 基因型 III 以欧洲分离物为主 (匈牙利、奥地利、斯洛文尼亚、德国), 还包括 1 个中国分离物、2 个日本分离物及 1 个以色列分离物; 基因型 IV 由 4 个中国分离物及 2 个朝鲜分离物组成; 基因型 V 除 1 个新西兰分离物外, 主要包括东亚地区的 3 个中国分离物、1 个韩国分离物及 1 个日本分离物; 基因型 VI 包括新加坡 (2)、越南 (1) 及留尼汪岛 (1) 分离物; 基因型 VII 由 4 个越南分离物及 1 个中国分离物组成。基因型 I、II 与 III 包含分离物较多, 包括地域范围较广不同大洲的分离物; 而基因型 II、V 与 VI 以东亚分离物为主, 基因型 III 以欧洲分离物为主; 基因型 IV 与 VII 所有分离物均来自东亚地区, 说明 ZYMV 不同分离物的基因组变异表现出一定的地域相关性。所有广东分离物与 1 个浙江分离物聚在基因型 I 的一个小分支中, 说明广东分离物的遗传变异较小。

根据 Shukla 等 (1994) 建立的马铃薯 Y 病毒属分类标准, CP 蛋白氨基酸序列相似性在 38% ~ 71% (平均为 54%) 之间为不同种, 在 90% ~ 99% 之间为不同株系, 高于 99% 以上确定为同一株系不同分离物。故本研究中测定的 16 份样品中, GD121-9 与 GD44-1 确立为病毒不同株系 (ZYMV-GD121 与 ZYMV-GD44), 其他均为同一株系 (ZYMV-GD11) 的不同分离物, 可见 ZYMV-GD11 为优势株系, 该株系的分离物占总分离物数量的 87.5%。

利用 DNASTar 软件 MegAlign 程序对 16 个分离物 *cp* 基因推导氨基酸序列构建系统发育进化树 (图 4), 发现所有序列分为 3 个分支, 其中来自花都地区的 GD121-9 与其他分离物遗传距离最远, 单独列为一个分支, 白云区钟落潭分离物 GD11-11 为第 2 分支, 其他序列为第 3 分支, 该分支内氨基酸序列相似性在 98.3% ~ 100% 之间。由此可见广东省各地区分离物并未表现明显地域相关性。总体而言, 广东省 ZYMV-*cp* 基因比较保守, 分子变异比较小。

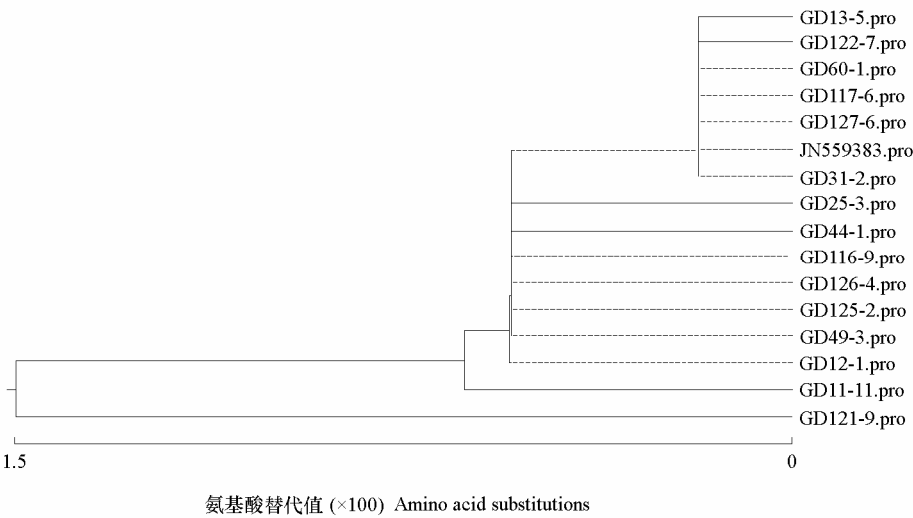


图 4 广东各地区 ZYMV 各分离物 *cp* 基因编码蛋白氨基酸序列系统进化树分析
Fig. 4 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of ZYMV *cp* gene encoding protein in Guangdong different areas

3 讨论

目前国内外对葫芦科病毒研究主要集中于黄瓜、甜瓜与西瓜等作物上,对冬瓜研究较少。本研究针对冬瓜主产区的广东省,对 ZYMV 病毒的发病情况与遗传多样性进行了分析。由于采样地点限制,试验中更多使用保存时间较长的冰冻样品。冬瓜材料保存时间越长,则越易瘫软褐化,降低 RNA 提取质量及抑制后续 RT-PCR 反应,增加实验假阴性的可能。因此比较了 4 种提取冬瓜总 RNA 方法,发现过柱型试剂盒效果最佳,虽然过柱型试剂盒的价格会比其他方法高出许多,但可除去材料中的色素等物质对实验的影响获得可靠结果。

广东省 ZYMV 病毒发病率总体上达到 31.59%,部分地区甚至达到 60%以上,而有些地区未检测到病毒发生,分析其原因可能是采样主要依据冬瓜叶片症状,易导致漏采重采,以及采样量偏少所致。因此后续研究中将加大样品采集范围及数量,进一步验证本试验结果。

病毒 *cp* 基因测序的目的是确定病毒的基因分型,以期找到不同分离物间的地域相关性、寄主相关性以及分离物本身的遗传变异规律,从而为抗病育种打下基础(朱红娟等,2014)。遗传进化分析表明,大多数分离物遗传距离较近,聚为 1 个分支,各分离物间无明显的地域差异,因此推测 ZYMV 普遍发生可能与繁殖材料及品种的地区性交流有关。目前在分子水平上比较核苷酸序列或氨基酸序列之间的差异已成为病毒及其直系划分的主要手段,尤其对 *Potyvirus* 病毒,CP 蛋白是划分其株系的有力证据(Shukla et al., 1994)。广东省 ZYMV 分离物高度相似,核苷酸序列与氨基酸序列相似性均达到 96%以上,包含 3 个不同株系,株系 ZYMV-GD11 为优势株系,占总分离物的 87.5%,这有助于 ZYMV 病害的防治,从而也为冬瓜抗病毒育种提供方向参考。根据 *cp* 基因核苷酸序列聚类分析将 ZYMV 分为 7 个基因型,广东省各地区分离物聚为基因型 I 的 1 个小分支中,遗传变异较小。以此标准,秦碧霞等(2005)将 ZYMV 病毒划分为 3 大群体,其中 Group 6 为中国特有群体。刘金亮等(2009)则将 ZYMV 划分为 6 个基因型,中国 ZYMV 分离物广泛分布于基因型 I 至基因型 V 中,其遗传变异非常大。除此以外为标准划分基因型外,Lin 等(2000)将 ZYMV 分离物 3'端 760 bp 核苷酸序列同源性 95%作为标准,划分 4 个基因型,而古勤生等(2003)以此划分为 5 个或 6 个基因型。陈洁云等(2003b)根据 ZYMV 3'末端序列的同源性作为标准划分为 5 个基因型,结果与上述研究报道相似。Coutts 等(2011b)基于 3'端 489 bp [(C-ter) NIb-(N-ter) CP]序列聚类分结果,建议把 ZYMV 分为 A 和 B 2 个组,其中 A 组又分为 3 个亚组, B 组实际上包括 2 个组。后续研究中可继续扩大样品数量以验证结论。

自 ZYMV 在中国发现开始,到目前已在许多地区的葫芦科作物上引起了很大的经济损失,因此能及时对其进行检测鉴定就显得尤为重要。病毒的外壳蛋白在蚜传、远距离传播以及保护其 RNA 不受 RNA 酶分解等中起着重要作用,同时因其 N 端区域免疫原性较强,在不同病毒间变异程度较大,作为抗原进行免疫反应制备抗体,有助于检测 *Potyvirus* 不同的种。由于广东省各分离物 *cp* 基因序列的高度相似性,且 ZYMV-GD11 为优势株系,设计特异引物建立病毒检测体系以及制备高效价抗体检测便十分简单容易。ZYMV 近年来在华南冬瓜主产区流行,从广东分离物 *cp* 基因变异较小特点来看,与流行相关的决定因素并不是 ZYMV 的变异,而可能是与病毒传播相关的介体因素或环境因素或繁殖材料的频繁交流相关。

由于 ZYMV 由蚜虫非持久性传播,病毒流行除与冬瓜品种抗性有关外,环境因素影响的介体种群繁殖也具有很大作用,带毒材料地区间的频繁交流也有很大关系。鉴于广东 ZYMV 病毒的保守性,接种鉴定筛选高抗材料具有重要意义,转基因抗病毒冬瓜育种也极具潜力。因此从介体昆虫传播途

径、带毒材料的检疫、抗病毒冬瓜育种等方面综合考虑并采取适当措施可能才是控制 ZYMV 病毒危害的基础。

References

- Arizi T, Shibolileth Y M, Galon A. 2001. A nonviral peptide can replace the entire N terminus of *Zucchini yellow mosaic potyvirus* coat protein and permits viral systemic infection. *Journal of Virology*, 75 (14): 6329 – 6336.
- Atreva C D, Raccach B, Pirone T P. 1990. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology*, 178: 161 – 165.
- Azarfr A, Izadpanah K, Afsharifar A, Masumi M. 2012. Purification and the complete genome sequence of *Zucchini yellow mosaic virus* Fars isolate. *Iran J Plant Path*, 48 (3): 135 – 136.
- Chen Jie-yun, Chen Ji-shuang, Chai Li-hong, Yang Chen-jie. 2003a. Molecular detection and pathogenic testing of two viruses infecting cucurbitaceous crops. *Acta Phytopathologica Sinica*, 33 (5): 449 – 455. (in Chinese)
- 陈洁云, 陈集双, 柴立红, 王槐基, 杨陈洁. 2003a. 两种葫芦科病毒的分子检测和致病性研究. *植物病理学报*, 33 (5): 449 – 455.
- Chen Jie-yun, Chen Ji-shuang, Hong Jian. 2003b. Sequence diversity of 3' end genome for *Zucchini yellow mosaic virus*. *Acta Microbiology Sinica*, 43 (3): 388 – 394. (in Chinese)
- 陈洁云, 陈集双, 洪 健. 2003b. 小西葫芦黄花花叶病毒分离物的 3'末端序列多态性研究. *微生物学报*, 43 (3): 388 – 394.
- Clara T B, Susana M, Jose A D, Santiago F E. 2008. From hypo-to hypersuppression: Effect of amino acid substitutions on the RNA-silencing suppressor activity of the *Tobacco etch potyvirus* HC-Pro. *Genetics*, 180: 1039 – 1049.
- Coutts B A, Kehoe M A, Jones R A C. 2011a. Minimising losses caused by *Zucchini yellow mosaic virus* in vegetable cucurbit crops in tropical, sub-tropical and Mediterranean environments through cultural methods and host resistance. *Virus Research*, 159: 141 – 160.
- Coutts B A, Kehoe M A, Webster C G, Wylie S J, Jones R A C. 2011b. *Zucchini yellow mosaic virus*: Biological properties, detection procedures and comparison of coat protein gene sequences. *Arch Virol*, 156: 2119 – 2131.
- Desbiez C, Galon A, Girard M, Wipf-Scheibel C, Lecoq H. 2003. Increase in *Zucchini yellow mosaic virus* symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Virology*, 93 (12): 1478 – 1484.
- Diana L, Dalia W, Vinod S, Aaron Z, Tzahi A, Shibolet Y, Victor G and Amit G. 2011. A high level of transgenic viral small RNA is associated with broad potyvirus resistance in cucurbits. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24 (10): 1220 – 1238.
- Gu Qin-sheng, Fan Zai-feng, Piero Rogger, Chen Hong-yun, Yu Zheng-wang, Li Huai-fang. 2003. Cloning and sequence analysis of the coat protein gene of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 33 (6): 498 – 502. (in Chinese)
- 古勤生, 范在丰, Piero Rogger, 陈红运, 俞正旺, 李怀方. 2003. 小西葫芦黄花叶病毒外壳蛋白基因的克隆及序列分析. *植物病理学报*, 33 (6): 498 – 502.
- Harrison B D, Robinson D J. 1988. Molecular variations in vector-borne plant viruses: Epidemiological significance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 321: 447 – 462.
- Kosaka Y, Ryang B S, Kobori T, Shiomi H, Yasuhara H, Kataoka M. 2006. Effectiveness of an attenuated *Zucchini yellow mosaic virus* isolate for cross-protecting cucumber. *Plant Disease*, 90: 67 – 72.
- Lecoq H, Lemaire J M, Wipf-Scheibel C. 1991. Control of *Zucchini yellow mosaic virus* in squash by cross protection. *Plant Disease*, 75: 208 – 211.
- Lin S S, Hou R F, Yeh S D. 2000. Heteroduplex mobility and sequence analyses for assessment of variability of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Phytopathology*, 90: 228 – 235.
- Lisa V, Boccardo G, D'Agostino G, Dellavalle G, D'Aquillo M. 1981. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology*, 71: 667 – 672.

- Liu Jin-liang, Shao Yun-hua, Zhang Gaung-min, Zhu Xiao-ping, Yang Guang-ling, Shi Cheng-kui, Li Xiang-dong. 2009. Molecular characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* isolate infecting pumpkin in Shandong. *Acta Phytopathologica Sinica*, 39 (5): 544 - 548. (in Chinese)
- 刘金亮, 邵云华, 张广民, 竺晓平, 杨广玲, 时呈奎, 李向东. 2009. 小西葫芦黄花叶病毒山东南瓜分离物的分子特性. *植物病理学报*, 39 (5): 544 - 548.
- Luo H, Wylie S J, Jones M G K. 2012. Identification of plant viruses using one-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprints. *Journal of Virological Methods*, 165: 297 - 301.
- Neha S, Satya V B, Anju S, Manica T, Rajinder K, Pritam D T, Anil H. 2012. Comparative genomic and proteomic phylogenetic analysis of Indian isolate of partial coat protein gene sequence of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) using data mining. *J Proteomics Bioinform*, 5 (9): 196 - 203.
- Qin Bi-xia, Zheng Hong-ying, Cai Jian-he, Chen Jiong, Liu Zhi-ming, Chen Jian-ping. 2005. Identification of a *Zucchini yellow mosaic virus* isolate from *Siraitia grosvenori* (Swingle) C. Jeffrey in Guangxi Province and preparation of coat protein antiserum. *Chinese Journal of Virology*, 21 (6): 468 - 472. (in Chinese)
- 秦碧霞, 郑红英, 蔡健和, 陈炯, 刘志明, 陈剑平. 2005. 侵染广西罗汉果的小西葫芦黄花叶病毒的鉴定及抗血清制备. *病毒学报*, 21 (6): 468 - 472.
- Shukla D D, Ward C W, Brunt A A. 1994. Genome structure, variation and function. *The Potyvirus*: 74 - 110.
- Song Li-min, Lu Cai-ge, Liang Wen-xing, Huang Jin-guang, Li Huai-fang. 2005. Cloning, expression of the CP gene and antiserum preparation of *Zucchini yellow mosaic virus* infecting *Benincasa hispida* Cogn. var. *chieh-qua* How. *Acta Microbiologica Sinica*, 25 (1): 132 - 135. (in Chinese)
- 宋丽敏, 卢彩鸽, 梁文星, 黄金光, 李怀方. 2005. 侵染节瓜的小西葫芦黄花叶病毒 CP 基因的克隆、表达及其抗血清的制备. *微生物学报*, 25 (1): 132 - 135.
- Ting Wei, Michael N P, Dietmar B, Manfred N, Karen A. 2009. Development of a short oligonucleotide microarray for the detection and identification of multiple potyviruses. *Journal of Virological Methods*, 162: 109 - 118.
- Yang Lei-liang. 2007. Identification of the main causal viruses of tobacco mosaic disease and the resistance analysis of main cultivars of tobacco in Guangdong Province [M. D. Dissertation]. Guangzhou: South China Agricultural University. (in Chinese)
- 杨雷亮. 2007. 广东烟草花叶病主要病原鉴定及其品种抗性评价 [硕士论文]. 广州: 华南农业大学.
- Zheng Guang-yu, Dong Tao. 1991. Occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in Xinjiang. *Acta Phytopathologica Sinica*, 21 (1): 72. (in Chinese)
- 郑光宇, 董涛. 1991. 在新疆发生的小西葫芦黄化花叶病毒的研究初报. *植物病理学报*, 21 (1): 72.
- Zhu Hong-juan, Hu Guo-jun, Fan Xu-dong, Zhang Zun-ping, Ren Fang, Dong Ya-feng. 2014. Genetic variation analysis of the coat protein of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* isolates from China. *Acta Phytophylacica Sinica*, 41 (2): 169 - 175. (in Chinese)
- 朱红娟, 胡国君, 范旭东, 张尊平, 任芳, 董雅凤. 2014. 我国部分地区沙地葡萄茎痘相关病毒分离物外壳蛋白序列变异分析. *植物保护学报*, 41 (2): 169 - 175.