

# 新疆、甘肃和河南部分地区甜瓜瓜类蚜传黄化病毒分子变异初步分析

吴 洋, 刘莉铭, 彭 斌, 古勤生\*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

**摘 要:** 从新疆鄯善县、甘肃瓜州县和河南通许县采集表现瓜类蚜传黄化病毒 (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) 症状的甜瓜叶片样品 63 份, 利用反转录 PCR (RT-PCR) 检测, 从阳性样品中选取 25 个分离物扩增出 1.4 kb 的片段, 并对其序列进行分析。结果表明: 63 份样品中, 36 份为 CABYV 阳性; 获得的序列包括部分 3'端的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 基因、非编码区 (NCR) 和全长外壳蛋白 (CP) 基因。随机选取 25 个分离物的 CP 基因与 GenBank 中的序列进行比对, 其序列相似性为 93.2% ~ 100%。通许分离物间序列相似性为 98.8% ~ 99.8%, 瓜州分离物间序列相似性为 98.2% ~ 100%, 鄯善分离物间序列相似性为 99.2% ~ 100%, 组内表现出极高的同源性。基于其部分 RdRp 基因、NCR 及 CP 基因序列构建的系统进化树表明: 25 个 CABYV 分离物与中国及周边地区 (泰国、韩国等) 的分离物聚为一簇, 而与欧洲地区分离物距离较远, 说明了该病毒分子变异与分离物的地理分布有关。

**关键词:** 甜瓜; 瓜类蚜传黄化病毒; 分子多样性; 序列比对分析

**中图分类号:** S 652

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 04-0777-07

## Preliminary Studies on Molecular Variation of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* from Xinjiang, Gansu and Henan

WU Yang, LIU Liming, PENG Bin, and GU Qinsheng\*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China)

**Abstract:** *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) causes yellowing symptom in cucurbit crops and distributes widely in China. Sixty-three samples exhibiting yellowing symptom were collected from Shanshan of Xinjiang, Guazhou of Gansu, and Tongxu of Henan in China. Among them, 36 were positive to CABYV detected by RT-PCR. A 1.4 kb fragment consisting of partial RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), intergenic NCR and complete coat protein (CP) gene was amplified by RT-PCR from 25 positive samples. Blast analysis showed that the fragments have high similarities of 93.2% - 100% with other CABYV isolates from GenBank. The nucleotide sequence identities of CP gene were 99.2% - 100% for Shanshan isolates, 98.2% - 100% for Guazhou isolates, 98.8% - 99.8% for Tongxu isolates. Phylogenetic trees based on partial RdRp, NCR and CP genes showed that the 25 isolates had a very close relationship with other isolates from China and other countries neighboring China including Thailand, South Korea etc,

收稿日期: 2017-02-15; 修回日期: 2017-04-12

基金项目: 中国农业科学院创新团队项目 (CAAS-ASTIP-2016-ZFRI); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-26-13)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: guqinsheng@caas.cn)

but a distant relationship with European isolates, suggesting that CABYV variation appeared to be associated with its geographical distribution.

**Keywords:** cucurbit; *Cucurbit aphid-borne yellows virus*; molecular diversity; sequence alignment

瓜类蚜传黄化病毒 (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) 属于黄症病毒科 (*Luteoviridae*) 马铃薯卷叶病毒属 (*Polerovirus*), 1992 年在法国首次报道 (Lecoq et al., 1992), 目前在全球主要的瓜类种植地区均有发现。瓜类蚜传黄化病毒不能通过机械传播, 但可以通过蚜虫和嫁接传播, 主要引起叶片黄化和增厚, 在老叶上症状尤其明显。由于其症状与缺素及植株老化引起的症状相似, 易被混淆。中国在 2001 年首次通过血清学的方法检测到该病毒 (Gu et al., 2001), 2008 年在国内 10 个省份再次被证实存在 (Xiang et al., 2008a, 2008b), 之后在中国大部分地区都检测到该病毒 (Shang et al., 2009; Knierim et al., 2010)。尚巧霞等 (2012) 构建了包括 CABYV 在内的该属 3 种病毒的多重 PCR 检测技术; 陈小慧等 (2010) 用酵母双杂交筛选与南瓜蚜传黄化病毒 MP 互作的寄主因子, 有 48 个候选阳性克隆与 MP 在酵母中互作。齐洪华等 (2012) 构建南瓜蚜传黄化病毒 P0 蛋白基因 ihpRNA 载体, 并转化烟草, 得到了 4 株阳性转基因植株, 为设计出更广谱特异有效的抗病毒策略及研究病毒蛋白的功能及其侵染机制提供试验材料。

与大多数植物病毒一样, CABYV 有着线性的正义单链 RNA 基因组, 大小约为 5.7 kb, 包含 6 个开放阅读框 (ORF), 5'端有一个基因组连锁蛋白 (VPg), 3'端既无 Poly (A) 结构, 也无类似 tRNA 结构。5'端的 3 个开放阅读框 (ORF0 ~ ORF2) 和 3'端的 3 个开放阅读框 (ORF3 ~ ORF5) 被一个大约 200 nt 的基因间区域 (IR) 隔开, 该区域被认为是黄症病毒属内成员重组的热点区域。P0 是一个转录后基因沉默 (PTGS) 的抑制子, 通过靶标并降解 Argonaute 1 蛋白发挥作用; P1 编码基因组连锁蛋白 (VPg) 并具有蛋白酶活性; P1 和 P2 是 ORF1 和 ORF2 通过 -1 核糖体移码形成的融合蛋白, 具有依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 活性。以上 3 种蛋白均是从病毒 RNA (genome RNA) 翻译而来。P3 编码外壳蛋白 (CP); P4 通过渗漏扫描编码病毒的移动蛋白 (MP); P3 ~ P5 的融合蛋白通过核糖体通读产生, 可能是病毒粒子的次要成分, 和蚜虫传播有关。这 3 种蛋白都是从亚基因组 RNA (subgenome RNA) 翻译而来 (D'Arcy & Domier, 2005)。

新疆、甘肃和河南都是西甜瓜的重要种植区域。在以往的病害调查中发现这 3 个地区的西瓜和甜瓜曾发生严重的黄化症状, 检测鉴定为 CABYV。本研究中对从新疆鄯善县、甘肃瓜州县、河南通许县采集的表现黄化症状的甜瓜叶片进行 RT-PCR 检测, 并扩增其中 25 份 CABYV 分离物的部分基因组序列, 与已报道的序列进行了比对分析, 探讨目前中国存在的 CABYV 的分子变异情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒样品采集与总 RNA 提取

2015 年从新疆鄯善县、甘肃瓜州县、河南通许县共采集 63 份疑似 CABYV 侵染症状的甜瓜叶片样品, 保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。称取表现症状的叶片 0.1 g, 使用液氮迅速彻底研磨, 然后按照 RNA 提取试剂盒的说明书提取植物总 RNA。

### 1.2 RT-PCR 扩增及序列测定

以提取的总 RNA 为模板, Random 6 mers 为引物进行反转录, 以 Robertson 等 (1991) 报道的

*Pocon F/Pococp R* 为引物进行 PCR 扩增。纯化后的 PCR 产物连接到 pTOPO 载体, 转化大肠杆菌 TOP 10 (本实验室自制) 感受态细胞; 通过菌液 PCR 筛选阳性克隆。每个分离物至少选取 2 个克隆送到生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。采用 DNASTAR 软件 (Burland, 2000) 进行序列拼接。

1.3 序列分析

在 GenBank 中利用 Blast 搜索已发表的其他国家及中国其他地区分离物, 用 DNASTAR 软件将这些序列与本研究获得的 25 条序列进行比对, 分析序列相似性; 用 Mega 6.0 软件中的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树, 重复次数为 1 000。

2 结果与分析

2.1 CABYV 分离物序列扩增与克隆

从典型黄化症状 (图 1) 甜瓜叶片中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增得到大小约 1 400 bp 的片段 (图 2), 纯化后连接到 pTOPO 载体, 通过菌液 PCR 和测序检测, 证实得到含有该片段的重组质粒。



图 1 瓜类蚜传黄化病毒 (CABYV) 典型症状及在甜瓜田间发生情况 (甘肃省瓜州县)  
Fig. 1 Typical symptom and occurrence of CABYV in melon field of Guazhou, Gansu

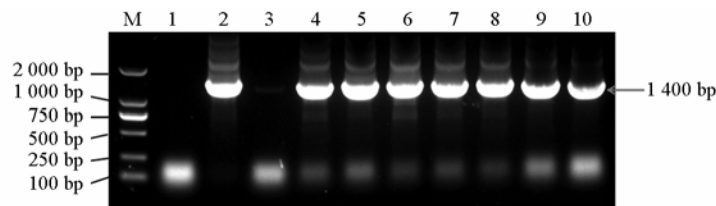


图 2 RT-PCR 检测结果  
1 ~ 10 为检测样品。  
Fig. 2 Detection result of CABYV by RT-PCR  
1 - 10: Samples that tested by RT-PCR.

2.2 CABYV 部分片段的序列分析

从检测阳性的样品中, 随机选取 25 个分离物进行测序, 经 Blast 与 GenBank 中的序列进行比对, 均为目的片段的序列, 序列相似性为 93.2% ~ 100%, 每个分离物的 2 个克隆序列一致。RT-PCR 产

部分 RdRp 基因：鄯善分离物间序列相似性为 96.2% ~ 100%，瓜州分离物间序列相似性为 95.7% ~ 100%，通许分离物间序列相似性为 95.8% ~ 100%；与已报道的部分序列进行比对，鄯善分离物为 84%~ 98.8%，瓜州分离物相似性为 83.5%~ 98.4%，通许分离物为 83.5%~ 98.8%。

CP 基因: 鄯善分离物间序列相似性为 99.2%~100%, 瓜州分离物间序列相似性为 98.2%~100%, 通许分离物间序列相似性为 98.8%~99.8%; 与已报道的序列进行比对, 鄯善分离物为 93.8%~99.5%, 瓜州分离物相似性为 93%~99.5%, 通许分离物为 93.5%~99.5%。对 25 个分离物的 CP 基因核苷酸碱基替代分析表明, 共发生了 31 处核苷酸变异, 但仅有 8 处导致了氨基酸突变。即大部分的核酸突变多为同义突变, 表明 CP 基因的 ORF 遗传稳定性高。

a) CP gene

▲ 鄯善 Shanshan    ■ 瓜州 Guazhou    ● 通许 Tongxu

82 KF815681.1 泰国 Thailand  
99 KF427704.1 泰国 Thailand  
EF488997.1 云南 Yunnan

95

71 ● CABYV-TX8  
64 ● CABYV-TX6  
■ CABYV-GZ44  
51 ● CABYV-TX2  
92 ● CABYV-TX7  
■ CABYV-GZ43

32

77 KR231950.1 韩国 South Korea  
73 EU000535.1 中国 China  
FJ460214.1 安徽 Anhui  
83 EF488996.1 湖北 Hubei

67 GQ221224.1 日本 Japan  
81 FJ425879.1 北京 Beijing  
62 KR231958.1 韩国 South Korea  
KR231945.1 韩国 South Korea

38

25 ● CABYV-TX1  
80 ■ CABYV-GZ29  
39 ● CABYV-TX5  
95 ■ CABYV-GZ26

5

● CABYV-TX16  
58 KF427706.1 乌兹别克斯坦 Uzbekistan  
31 HQ700823.1 菲律宾 Philippines  
22 KF427705.1 乌兹别克斯坦 Uzbekistan  
8 EU536992.1 新疆 Xinjiang  
12 EU063707.1 上海 Shanghai  
20 ▲ CABYV-SS13  
GQ221223.1 福建 Fujian

67

52

100

65

69

▲ CABYV-SS9  
▲ CABYV-SS8  
▲ CABYV-SS3  
▲ CABYV-SS1  
■ CABYV-GZ19  
▲ CABYV-SS7  
▲ CABYV-SS12  
▲ CABYV-SS11  
■ CABYV-GZ4  
■ CABYV-GZ20  
▲ CABYV-SS10  
▲ CABYV-SS5  
■ CABYV-GZ5  
GQ700305.1 中国台湾 Taiwan, China

52

100

67

69

49

74

37

30

52

JF939814.1 西班牙 Spain  
JF939812.1 西班牙 Spain  
EF029114.1 意大利 Italy  
EF029115.1 意大利 Italy  
X76931.1 法国 France  
HM771271.1 捷克 Czech Republic  
HM771269.1 捷克 Czech Republic

0.005

IA

IB



图 3 基于 CABYV 3 个片段构建的系统发育树  
Fig. 3 Phylogenetic tree based on fragments of CABYV

基于 CP 和 NCR 构建的系统发育树表明, 这些分离物可以分为 2 个亚组。来自中国、韩国等地区的分离物为 I 组, 组内又可分为 I A, 主要为中国大陆及周边国家的分离物, I B 为中国台湾分离物; 来自法国、西班牙的分离物为 II 组。基于部分 RdRp 基因构建的系统发育树则有些异常, 虽然也能分为两个亚组, 但台湾地区分离物与法国、西班牙分离物聚为一簇, 与 CP 和 NCR 的结果不同, 可能构建进化树所使用的序列不是 RdRp 的全长序列有关。根据 Shang 等 (2009) 的研究, 基于部分 RdRp 基因和 CP 基因可将 CABYV 分离物分为两个亚组: 地中海亚组和亚洲亚组, 来自中国的分离物均属于亚洲亚组。本研究中所获得的 25 个分离物与中国和韩国的分离物亲缘关系近, 属于亚洲亚组。在亚洲亚组内, 所有的鄯善分离物单独聚在一起, 通许分离物和瓜州分离物则与亚洲亚组的其他分离物聚在一起。

### 3 讨论

CABYV 自 1992 年发现以后, 已经先后在意大利、西班牙、美国等 16 个国家报道发生 (Lemaire et al., 1993; Abou-Jawdah et al., 1997; Juarez et al., 2004; Kassem et al., 2007; Yardımcı & Özgönen, 2007; Bananej et al., 2009; Omar et al., 2012)。本研究中采用 RT-PCR 方法从新疆、甘肃和河南部分地区的甜瓜样品中检测到 CABYV, 检出率为 57.1%, 略高于之前中国国内报道的 48.6% (Xiang et al., 2008a, 2008b)。该病毒在意大利、土耳其、西班牙、突尼斯的检出率也比较高, 分别为 48.8%、47%、35% 和 51% (Kassem et al., 2007; Tomassoli et al., 2007; Yardımcı & Özgönen, 2007; Mnari-Hattab et al., 2009)。如此高的检出率意味着该病毒已经在世界范围广泛发生, 对该病毒的研究更需要侧重于预防和控制病害流行。新疆、甘肃和河南是中国西瓜和甜瓜的重要产区, 种植面积大, 在适宜条件下该病毒将大范围传播, 造成经济损失。

基于 CP 和部分 RdRp 基因序列, 将 CABYV 分离物分为两个亚组: 地中海亚组和亚洲亚组 (Shang et al., 2009)。后来, Manarri-Hatta 等 (2009) 进一步将突尼斯、意大利和法国分离物与西班牙、中国分离物分开, 并且认为基因漂流在这种分布上起着重要作用, 因为突尼斯主要与意大利和法国交换蔬菜和观赏植物等农业材料, 而很少与西班牙进行交换。

对不同的序列进行分析发现, CP 基因的序列相似性大于 NCR 序列相似性和 RdRp 基因序列相似性。一般来说, 病毒基因编码的功能蛋白作用越重要, 其保守性就越高。CP 基因编码病毒的外壳蛋白, 可能在 CABYV 传播、复制和表达过程中扮演着重要角色。

基于 CP 基因和 NCR 序列构建的系统发育树发现台湾地区的 CABYV 有两个类群, 其中 2 个分离物与地中海亚组聚为一簇, 归为 II 组, 3 个分离物单独聚为一簇, 归为 I B 组; 基于部分 RdRp 基因构建的系统发育树则有些异常, 台湾地区分离物单独聚为一簇, 可能与仅用了该基因 3' 端部分, 序列不完整有关。目前 NCBI 上关于该基因的序列大都是不完整的, 仅使用这些部分序列进行遗传分析, 结果不够可信。

系统进化树分析表明本研究获得的分离物均属于亚洲亚组, 与中国之前发表的分离物及周边国家的分离物亲缘关系较近, 而与欧洲地区的分离物较远。另外, 从进化树可以看出, 中国云南分离物和泰国分离物, 中国新疆分离物和乌兹别克斯坦分离物独立归为一簇, 以上结果也说明了该病毒的分子变异与地理有关。

本研究通过 RT-PCR 技术确定了 CABYV 在新疆、甘肃和河南部分地区的发生, 有助于这些地区来年采取措施防控该病害; 对 CP 基因的分析, 确定其侵染源及优势株系的存在与否, 了解该病

害的发生发展规律, 有利于更好的预测和防治该病害。CABYV 主要通过蚜虫传播, 目前还未见种传报道, 因此, 控制蚜虫数量, 防止其扩散是健康生产的前提。

## References

- Aboujawdah Y, Sobh H, Fayyad A. 1997. First report of *Cucurbit aphid-borne yellows luteovirus* in Lebanon. *Plant Disease*, 81 (11): 1331.
- Bananej K, Vahdat A, Predajnal L, Glasa M. 2009. Molecular characterization of geographically different *Cucurbit aphid-borne yellows virus* isolates. *Acta Virologica*, 53 (1): 61 - 64.
- Burland T G. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology*, 132: 71 - 91.
- Chen Xiaohui, Fei Fei, Xiang Haiying, Han Chenggui, Cheng Yuqin. 2010. Screening host factors that interact with *Cucurbit aphid-borne yellows virus* MP using yeast two-hybrid system. *Journal of Plant Protection*, 37 (4): 331 - 335. (in Chinese)
- 陈小慧, 费 菲, 向海英, 韩成贵, 程玉琴. 2010. 用酵母双杂交筛选与南瓜蚜传黄化病毒 MP 互作的寄主因子. *植物保护学报*, 37 (4), 331 - 335.
- D'Arcy C J, Domier L L. 2005. *Luteoviridae*/Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L A. *Virus taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV. London, UK: Elsevier/Academic Press: 891 - 900.
- Gu Qinsheng. 2001. The identification of viruses infecting Cucurbits in China and variabilities of *Zucchini yellow mosaic virus* [Ph. D. dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 古勤生. 2001. 葫芦科主要作物病毒的鉴定和小西葫芦黄花叶病毒的变异性 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Juarez M, Truniger V, Aranda M A. 2004. First report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Spain. *Plant Disease*, 88 (8): 907.
- Kassem M A, Sempere R N, Juarez M, Aranda M A, Truniger V. 2007. *Cucurbit aphid-borne yellows virus* is prevalent in field-grown cucurbit crops of southeastern Spain. *Plant Disease*, 91 (3): 232 - 238.
- Knierim D, Deng T C, Tsai W S, Green S K, Kenyon L. 2010. Molecular identification of three distinct Polerovirus species and a recombinant *Cucurbit aphid-borne yellows virus* strain infecting cucurbit crops in Taiwan. *Plant Pathology*, 59 (5): 991 - 1002.
- Lecoq H, Bourdin D, Wipfscheibel C, Bon M, Lot H, Lemaire O, Herrbach E. 2010. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, *Cucurbit aphid-borne yellows virus*. *Plant Pathology*, 41 (6): 749 - 761.
- Lemaire O J, Gubler W D, Valencia J, Lecoq H, Falk B W. 1993. First report of *Cucurbit aphid-borne yellows luteovirus* in the United States. *Plant Disease*, 77 (11): 1169.
- Mnarihattab M, Gauthier N, Zouba A. 2009. Biological and molecular characterization of the *Cucurbit aphid-borne yellows virus* affecting cucurbits in Tunisia. *Plant Disease*, 93 (10): 1065 - 1072.
- Omar A F, Bagdady N A. 2012. *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Egypt. *Phytoparasitica*, 40 (2): 177 - 184.
- Qi Honghua, Li Jie, Ma Xuan, Xu Jian. 2012. Construction of ihpRNA expression vector of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* P0 protein gene and genetic transformation in tobacco. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 27 (3): 21 - 23. (in Chinese)
- 齐洪华, 李 捷, 马 萱, 徐 践. 2012. 南瓜蚜传黄化病毒 P0 蛋白基因 ihpna 载体构建及烟草转化. *北京农学院学报*, 27 (3): 21 - 23.
- Robertson N L, French R, Gray S M. 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *Journal of General Virology*, 72 (6): 1473 - 1477.
- Shang Q X, Xiang H Y, Han C G, Li D W, Yu J L. 2009. Distribution and molecular diversity of three cucurbit-infecting poleroviruses in China. *Virus Research*, 145 (2): 341 - 346.
- Tomassoli L, Meneghini M. 2007. First report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Italy. *Plant Pathology*, 56 (4): 720.
- Xiang H Y, Shang Q X, Han C G, Li D W, Yu J L. 2008a. Complete sequence analysis reveals two distinct poleroviruses infecting cucurbits in China. *Archives of Virology*, 153 (6): 1155 - 1160.
- Xiang H Y, Shang Q X, Han C G, Li D W, Yu J L. 2008b. First report on the occurrence of *Cucurbit aphid-borne yellows virus*, on nine Cucurbitaceous species in China. *Plant Pathology*, 57 (2): 390.
- Yardımcı N, Özgönen H. 2007. First report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Turkey. *Australasian Plant Disease Notes*, 2 (1): 59.