瓜类褪绿黄化病毒山东分离物全基因组序列扩增及分析

臧连毅[1] 孙晓辉[1] 苏文敏[2] 张先平[1] 刘晓莹[1] 竺晓平[1*]

（1. 山东农业大学植物保护学院，山东省蔬菜病虫生物学重点实验室，泰安 271018；
2. 上海市浦东新区高东镇城镇建设管理中心，上海 200120）

摘要：为明确分离自山东省寿光市甜瓜上的瓜类褪绿黄化病毒（cucurbit chlorotic yellows virus，CCYV）分离物的全基因组序列信息和遗传变异情况，利用毛形病毒属 *Crinivirus* 简并引物进行RT-PCR检测，利用RACE技术结合RT-PCR方法克隆CCYV山东分离物2条RNA链的全基因组序列，通过与GenBank中其它地区CCYV分离物的全长序列进行比对分析其同源性，并基于 *CP* 基因序列构建系统进化树分析其遗传变异情况。结果表明，山东分离物经RT-PCR检测和测序后确定为CCYV。CCYV山东分离物与其它CCYV分离物的RNA1链和RNA2链的全基因组序列一致性的平均值分别为99.82%和99.88%，且2条链的5′末端均比较保守，没有碱基突变的情况发生；RNA1链3′末端存在2个碱基变异，RNA2链3′末端存在1个碱基变异。CCYV不同地区分离物主要分为3个簇群，其中山东分离物和中国其它地区分离物、日本分离物、苏丹分离物、黎巴嫩分离物和塞浦路斯分离物聚类在一起。研究表明CCYV基因组序列比较保守，该病毒的分化可能与地理来源存在一定的相关性。

关键词：瓜类褪绿黄化病毒；全基因组；系统进化树

Amplification and analysis of whole genome sequence of cucurbit chlorotic yellows virus from Shandong Province, China

Zang Lianyi[1] Sun Xiaohui[1] Su Wenmin[2] Zhang Xianping[1] Liu Xiaoying[1] Zhu Xiaoping[1*]

（1. Shandong Provincial Key Laboratory for Biology of Vegetable Diseases and Insect Pests, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China; 2. Gaodong Urban Construction Management Center, Pudong New Area, Shanghai 200120, China）

Abstract: To clarify the whole-genome sequence and genetic variation of cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV) isolated from melon in Shouguang City, Shandong Province, degenerate primers of the genus *Crinivirus* were used for RT-PCR detection, and the whole-genome sequences of two RNA strands of CCYV Shandong isolate were obtained by RACE and RT-PCR cloning. The similarity of the whole-genome sequence between Shandong isolate and isolates of CCYV from other regions in GenBank was compared. The genetic variation was analyzed by constructing the phylogenetic tree based on the coat protein (*CP*) gene sequences. The results showed that the isolate from Shandong was identified as CCYV by RT-PCR detection and sequencing, and the average sequence identity of RNA1 and RNA2 among Shandong isolate and other isolates were 99.82% and 99.88%, respectively. The 5′ ends of the two strands of Shandong isolate were both conservative and no base mutation occurred. Furthermore, there were two base variations at the 3′ end of the RNA1 strand, and one base variation at the 3′ end of

基金项目：山东省自然科学基金（ZR2017CM058），山东省科技发展计划项目（2014GGB01911），山东省重大科技创新工程（2017CXGC0207）
* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：zhuxp@sdau.edu.cn
收稿日期：2018-10-29

the RNA2 strand. The isolates from different geographical origins of CCYV were mainly divided into three clusters. The isolate from Shandong was clustered with isolates from other areas of China, Japanese isolates, Sudan isolate, Lebanese isolates and Cyprus isolates. This study indicated that the genomic sequence of CCYV was relatively conserved and that differentiation of the virus might be related to geographical occurrence.

Key words: cucurbit chlorotic yellows virus; whole-genome sequences; phylogenetic tree

瓜类褪绿黄化病毒(cucurbit chlorotic yellows virus,CCYV)最早于2004年被日本学者在温室的甜瓜上发现,但是其基因组结构直到2010年才被揭示(Okuda et al.,2010)。目前,该病毒已在中国(古勤生等,2011;Gu et al.,2011)、苏丹(Hamed et al.,2011)、黎巴嫩(Abrahamian et al.,2012)、伊朗(Bananej et al.,2013)、希腊(Orfanidou et al.,2014)、埃及(Amer,2015)、沙特阿拉伯(Al-Saleh et al.,2015)等国家陆续被检测到。2011年,在我国上海市、浙江省、山东省检测到CCYV,随后河南、海南(刘珊珊等,2013)、新疆(彭斌等,2017)、湖南(唐鑫等,2017)、广西(杨世安等,2017)等省区也陆续发现该病毒,蔓延迅速。CCYV主要侵染甜瓜、黄瓜、西瓜等作物(Okuda et al.,2010;Gu et al.,2011),引起的病害症状为叶片褪绿、黄化,但是叶脉仍然保持绿色,严重时整株叶片变黄,已经成为制约瓜类作物产量和品质的重要病毒。

CCYV属长线形病毒科*Closteroviridae*毛形病毒属*Crinivirus*,主要通过烟粉虱*Bemisia tabaci*以半持久性方式进行传播(Okuda et al.,2010;Li et al.,2016),不能通过机械摩擦的方式进行人工接种。CCYV是一种双分体正义单链RNA病毒,包含RNA1和RNA2两条链,RNA1编码的蛋白主要参与病毒RNA的复制,RNA2编码的蛋白主要参与病毒粒子组装、移动和传播(Shi et al.,2016;彭斌等,2017;Wei et al.,2018)。CCYV侵染黄瓜和甜瓜后产生的褪绿症状并不与该病毒的积累量呈正相关,而是病毒与寄主互作产生的结果(袁媛等,2012)。

目前,仅见彭斌等(2017)关于CCYV中国分离物全基因组序列扩增及分析的报道,有关其系统分类和进化的研究比较少。近年来,CCYV在山东省寿光市普遍发生(孙晓辉等,2016),并有扩大蔓延的趋势。本研究通过RACE技术(Scotto-Lavino et al.,2006)和RT-PCR技术对山东省寿光市蔬菜主产区采集的CCYV分离物进行全基因组扩增,并与其它地区的CCYV分离物进行序列一致性分析、RNA重组分析和*CP*基因序列进化树分析,明确CCYV山东分离物的遗传与变异情况,以期为CCYV的进化机制研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:2017年在山东省寿光市北洛镇和化龙镇甜瓜种植区采集黄化、褪绿的疑似感染CCYV的甜瓜叶片各5份,于−20℃保存备用。

试剂:大肠杆菌*Escherichia coli*菌株DH5α由山东农业大学山东省蔬菜病虫生物学重点实验室保存并提供;植物总RNA提取试剂盒TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit、反转录试剂盒PrimeScript™ RT-PCR Kit、Recombinant Rnase Inhibitor、末端转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase,TdT)、dCTP、Rnase H、Rnase A、pMD 18-T、DL500 DNA Marker、DL2000 DNA Marker及DL5000 DNA Marker,宝生物工程(大连)有限公司;*Taq* DNA聚合酶、dNTPs和凝胶回收试剂盒,北京全式金生物技术有限公司;T4 RNA连接酶和10 mmol/L ATP,美国New England Biolabs公司;其它试剂均为进口或国产分析纯。

仪器:A200 PCR仪,杭州朗基科学仪器有限公司;JY200C电泳仪、JY04S-3E凝胶成像仪,北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CCYV山东分离物全基因组序列的扩增

首先参照植物总RNA提取试剂盒TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit说明书进行甜瓜病叶总RNA的提取。然后根据GenBank中CCYV所有分离物全基因组序列的比对结果,选取保守区域设计3′RACE引物、5′RACE引物和6对序列扩增引物(表1),重叠区域在15 bp以上。引物均由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。

使用随机引物N15作为下游引物,参照反转录试剂盒PrimeScript™ RT-PCR Kit说明书进行反转录。利用毛形病毒属的通用引物Crini-Pol-F/Crini-Pol-R(Martin et al.,2004)进行RT-PCR扩增,确定是否有CCYV的存在。然后进行RACE扩增,根据RACE结果和GenBank中CCYV已上传序列设计特

异性引物，最后将获得的RACE结果和特异性片段扩增结果进行拼接，获得RNA1和RNA2两条链的全基因组序列。5′RACE利用RNA1-5′-500R和RNA2-5′-539R引物分别对提取的总RNA进行反转录合成cDNA，cDNA经RNaseH、RNaseA处理去除多余的RNA，用TdT对cDNA进行加(C)尾，然后使用引物对RNA1-5′-397R/Oligo d(G)和RNA1-5′-304R/Oligo d(G)、RNA2-5′-454R/Oligo d(G)和RNA2-5′-322R/Oligo d(G)分别对RNA1链和RNA2链进行巢式PCR，对5′末端实现扩增。扩增体系：10×Easy*Taq* Buffer 2.5 μL、dNTP 1.0 μL、上下游引物各1.0 μL、cDNA模板1.0 μL、*Taq* DNA聚合酶0.5 μL，RNase-free H_2O补充至25.0 μL。扩增条件：94℃预变性5 min；94℃变性30 s，50℃退火30 s，72℃延伸30 s，30个循环；72℃延伸10 min。3′RACE利用T4 RNA连接酶、ATP和引物3′RACE-1为RNA加尾，以Q0为引物进行反转录合成cDNA，使用引物对RNA1-3′-8019F/Q0和RNA1-3′-8423F/Q1、RNA2-3′-7467F/Q0和RNA2-3′-7857F/Q1分别对RNA1链和RNA2链进行巢式PCR，实现3′末端的扩增，扩增体系和条件同上。同时利用设计的特异性引物(1-1F/1-1R、1-2F/1-2R、1-3F/1-3R、2-1F/2-1R、2-2F/2-2R、2-3F/2-3R)进行RT-PCR扩增，体系同上，扩增条件：94℃预变性5 min；94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸3 min，30个循环；72℃延伸10 min。

表1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列(5′−3′) Sequence (5′−3′)	参考文献 Reference
N15	NNNNNNNNNNNNNNN	本研究 This study
Crini-Pol-F	GCYCCSAGRGTKAATGA	Martin et al.，2004
Crini-Pol-R	ACCTTGRGAYTTRTCAAA	
Qt	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC$(T)_{17}$	Scotto-Lavino et al.，2006
Q0	CCAGTGAGCAGAGTGACG	Scotto-Lavino et al.，2006
Q1	GAGGACTCGAGCTCAAGC	Scotto-Lavino et al.，2006
3′RACE-1	$(A)_{17}$GCTTGAGCTCGAGTCCTCGTCACTCTGCTCACTGG	本研究 This study
Oligo d(G)	GGCCACGCGTCGACTAGTAC$(G)_{15}$	Scotto-Lavino et al.，2006
RNA1-5′-500R	ACCCAAATTTCGAAATGACAGCTT	本研究 This study
RNA1-5′-397R	TTGAGGAATAAGGAGAGCATTACCGT	本研究 This study
RNA1-5′-304R	TTTGTAGACTGAAGTTGGTGGTGC	本研究 This study
RNA2-5′-539R	ACTTGATCATGTTCTTAGAAACGACA	本研究 This study
RNA2-5′-454R	AGGAAAATGACAAACGGATAAACAAACC	本研究 This study
RNA2-5′-322R	CAGAGGCGGTGGTGACTAAC	本研究 This study
RNA1-3′-8019F	ACAGAGTATGATGTGTGTGCTT	本研究 This study
RNA1-3′-8423F	TTAGGTTGTTTCGGTAATAGCATC	本研究 This study
RNA2-3′-7467F	GAATCTGTGTTATGGTTTGTCA	本研究 This study
RNA2-3′-7857F	TTAGGTTGTTTCGGTAATAGCATC	本研究 This study
1-1F	GGAAATCAACACTCCTTCGTACG	本研究 This study
1-1R	CACACCACATTGATTAGCAGTCACTTCACTATAAATGT	
1-2F	CTGCTAATCAATGTGGTGTGTATGAATATATAGGTGAATATA	本研究 This study
1-2R	ACAGACATGTCTACCTCCTCTCTCTCT	
1-3F	GAGGAGGTAGACATGTCTGTTCAGAAGAGTGGCATTAATGGAAT	本研究 This study
1-3R	GGCCTAGCTATACTAATAACTAGTCCTTCA	
2-1F	GGAAATTATCCACGGTTTCCC	本研究 This study
2-1R	GATAACTGAGTCAAATTGAGATTCAATTTCTTAA	
2-2F	CTCAATTTGACTCAGTTATCTAATGTTGATGAAACAGCTACG	本研究 This study
2-2R	GATTTCCCTTCACAAAATCAATGA	
2-3F	TGATTTTGTGAAGGGAAATCTACCACATGTTCCGAACCCTTT	本研究 This study
2-3R	GGCCTAGCTATGCTACTAACTAGTCCT	

N=A/G/C/T；Y=C/T；S=G/C；R=A/G；K=G/T.

PCR产物在1%琼脂糖凝胶上进行电泳分离，将与目的片段大小一致的条带切下，按照凝胶回收试剂盒说明书进行DNA回收，将纯化的DNA连接到pMD 18-T载体上，转化至大肠杆菌DH5α中，挑选经菌液PCR验证后的阳性样品送至铂尚生物技术（上海）有限公司进行测序，对获得的序列进行拼接得到CCYV全基因组序列。

1.2.2 CCYV山东分离物全序列的一致性及重组分析

基于1.2.1中获得的CCYV山东分离物的全基因组序列，通过DNAMAN软件对基因组的RNA1链和RNA2链中蛋白质编码情况进行分析，以明确RNA1链和RNA2链中各个基因组结构的遗传变异情况。利用DNAMAN软件（张林等，2011）对拼接的山东分离物全长序列和GenBank中登录号分别为AB523788、JN641883、JQ904628、KU507601、KY400635、KY400636、KY400637、KY618798、NC018173的RNA1链序列和登录号分别为AB523789、JN126045、JN126046、JQ904629、KU507602、KY400632、KY400633、KY400634、KY618799、NC018174的RNA2链序列的全基因组、各个开放阅读框（open reading frame，ORF）的核苷酸/氨基酸和基因组末端非翻译区（untranslated region，UTR）序列进行一致性分析。

为确定CCYV山东分离物在传播过程中是否与其它地区CCYV分离物发生重组的现象，使用RDP 4软件（Martin et al.，2010）中的RDP、GENECONY、BootScan、MaxChi、Chimaera和Seq六种重组计算方法对获得的CCYV山东分离物和其它地区的CCYV分离物序列进行重组检测和分析。当其中有4种算法显示支持重组且该软件计算出的*P*值小于1.0×10^{-6}时认为存在潜在重组的现象。

1.2.3 CCYV山东分离物的系统进化分析

以毛形病毒属的莴苣褪绿病毒（lettuce chlorosis virus，LCV）的*CP*基因作为外组，利用MEGA 6.06软件（杨海燕等，2017）以邻接法基于*CP*基因对获得的CCYV山东分离物和GenBank中1个苏丹分离物、2个日本分离物、3个塞浦路斯分离物、3个伊朗分离物、7个黎巴嫩分离物、7个沙特阿拉伯分离物、13个中国其它地区分离物构建系统进化树，对系统进化树各分支置信度进行1 000次重复分析。

2 结果与分析

2.1 CCYV山东分离物全基因组序列扩增结果

通过对扩增的RACE产物进行序列比对，发现RNA1和RNA2两条链中5′末端序列没有发生变异，比较保守。RNA1链3′末端的第8 592位和第8 596位碱基位置发生变异，RNA2链中第8 040位碱基位置发生变异。

通过DNAMAN软件对RACE和RT-PCR扩增结果进行拼接、校正后获得CCYV全基因组核苷酸序列，RNA1链全长为8 607 nt（GenBank登录号MH819190），包含4个ORF；5′UTR和3′UTR的长度分别为70 nt和250 nt；RNA2链全长为8 041 nt（GenBank登录号MH819191），包含8个ORF，5′UTR和3′UTR的长度分别为1 034 nt和221 nt。

2.2 CCYV山东分离物序列一致性及重组分析

CCYV山东分离物和GenBank中已有CCYV分离物的全基因组一致性分析结果显示，CCYV山东分离物RNA1链和RNA2链的全基因组序列和其它地区分离物的一致性平均分别为99.82%和99.88%，相似性较高。CCYV山东分离物的RNA1链序列与CCYV-Beijing（JQ904628）和CCYV-TW（JN641883）分离物的RNA1链序列一致性最高（表2），RNA2链序列与CCYV-Shanghai（KY400633）和CCYV-Yilan（JN126046）分离物的RNA2链序列一致性最高（表3）。进一步将3′UTR区、5′UTR区和各编码区进行比对，RNA1链中的5′UTR、*RdRp*（RNA-dependent RNA polymerase）、*p22*和RNA2链中的*Hsp70h*（70 kD heat-shock protein）、*p6*、*CP*（coat protein）、*CPm*（minor coat protein）及*p26*基因的序列一致性高于全基因组序列一致性的平均值，变异程度最低。氨基酸比对分析发现，各基因编码氨基酸序列相似性均在99.36%以上，其中RNA1链中的*RdRp*基因以及RNA2链中的*Hsp70h*、*p6*、*CP*基因编码的氨基酸更为保守。

2.3 CCYV山东分离物的系统进化分析

基于*CP*基因构建的CCVY不同分离物的系统发育树中，所有分离物聚成3个簇群，CCYV的山东分离物*CP*基因和1个苏丹分离物（JF807053）、2个日本分离物（AB523789和NC018174）、3个塞浦路斯分离物（LT992909、LT992910、LT992911）、7个黎巴嫩分离物（KC990504、JX014262、KC990505、KC990506、KC990507、KC990508、KC990503）和14个中国其它地区分离物（KJ735450、HM581658、KX118632、KP896506、JF502222、KY400632、KY400633、KY400634、JQ904629、JN126046、JN126045、KU507602、KJ149806、KY618799）的*CP*基因聚类在同一个簇群内；CCYV的3个伊朗分离

物（KC577203、KC577202、KC577201）聚在1个簇群内，7个沙特阿拉伯分离物（KT946811、KT946809、KT946816、KX120124、KX120123、KX120122、KX120121）聚在1个簇群内，说明该病毒在进化上可能与地理来源存在一定的相关性（图1）。

表2 CCYV山东分离物与GenBank中其它CCYV分离物全基因组RNA1链核苷酸/氨基酸序列一致性分析

Table 2 The consistency analysis of nucleotide/amino acid sequences of whole genome RNA1 chain between CCYV Shandong isolate and other CCYV isolates in GenBank %

分离物 Isolate	登录号 Accession no.	基因组 Genome	5′UTR	ORF1a	*RdRp*	*p6*	*p22*	3′UTR
CCYV-Japan	AB523788	99.72	100.00	99.71/99.65	99.93/100.00	98.74/98.08	99.65/99.47	99.20
CCYV-Taiwan	JN641883	99.90	100.00	99.90/99.80	100.00/100.00	99.37/100.00	100.00/100.00	99.20
CCYV-Beijing	JQ904628	99.90	100.00	99.90/99.80	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.20
CCYV-Henan	KU507601	99.62	100.00	99.61/99.19	99.74/99.21	98.74/98.08	99.65/99.47	99.20
CCYV-Xinjiang	KY400635	99.88	100.00	99.88/99.85	100.00/100.00	99.37/100.00	100.00/100.00	99.20
CCYV-Shanghai	KY400636	99.88	100.00	99.88/99.75	100.00/100.00	99.37/100.00	100.00/100.00	99.20
CCYV-Henan	KY400637	99.84	100.00	99.83/99.60	100.00/100.00	99.37/100.00	99.82/100.00	99.20
CCYV-Taiwan	KY618798	99.88	100.00	99.88/99.80	100.00/100.00	99.37/100.00	100.00/100.00	99.20
CCYV-Japan	NC018173	99.72	100.00	99.71/99.65	99.93/100.00	98.74/98.08	99.65/99.47	99.20
平均值 Average		99.82	100.00	99.81/99.68	99.96/99.91	99.23/99.36	99.86/99.82	99.20

表3 CCYV山东分离物与GenBank中其它CCYV分离物全基因组RNA2链核苷酸/氨基酸序列一致性分析

Table 3 The consistency analysis of nucleotide/amino acid sequences of whole genome RNA2 chain between CCYV Shandong isolate and other CCYV isolates in GenBank %

分离物 Isolate	登录号 Accession no.	基因组 Genome	5′UTR	*p4.9*	*Hsp70h*	*p6*	*p59*	*p9*	*CP*	*CPm*	*p26*	3′UTR
CCYV-Japan	AB523789	99.88	99.61	100.00/100.00	99.94/100.00	100.00/100.00	99.94/100.00	100.00/100.00	99.87/100.00	99.93/99.79	99.84/99.53	99.55
CCYV-Taiwan	JN126045	99.94	99.90	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.94/100.00	100.00/100.00	99.87/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.10
CCYV-Taiwan	JN126046	99.95	99.90	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.94/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.93/99.79	100.00/100.00	99.55
CCYV-Beijing	JQ904629	99.89	99.90	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.79/99.58	99.53/99.06	99.10
CCYV-Henan	KU507602	99.74	99.90	100.00/100.00	99.88/99.82	100.00/100.00	99.68/99.23	99.58/98.73	99.73/100.00	99.44/98.73	99.84/99.53	99.10
CCYV-Xinjiang	KY400632	99.91	99.81	98.48/95.35	100.00/100.00	100.00/100.00	99.94/100.00	100.00/100.00	99.87/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.55
CCYV-Shanghai	KY400633	99.95	100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.81/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.55
CCYV-Henan	KY400634	99.80	99.81	100.00/100.00	99.88/100.00	100.00/100.00	99.61/99.23	99.17/98.73	99.87/99.60	99.93/100.00	100.00/100.00	98.64
CCYV-Taiwan	KY618799	99.90	99.61	100.00/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.94/100.00	100.00/100.00	99.87/100.00	100.00/100.00	100.00/100.00	99.55
CCYV-Japan	NC018174	99.88	99.61	100.00/100.00	99.94/100.00	100.00/100.00	99.94/100.00	100.00/100.00	99.87/100.00	99.93/99.79	99.84/99.53	99.55
平均数 Average		99.88	99.81	99.85/99.54	99.96/99.98	100.00/100.00	99.87/99.85	99.88/99.75	99.90/99.96	99.90/99.77	99.91/99.77	99.32

通过RDP 4重组计算软件对所有的CCYV全基因组序列进行重组分析，发现该软件中计算重组的6种算法没有一种支持，表明CCYV山东分离物和其它地区CCYV分离物间没有发生重组现象。

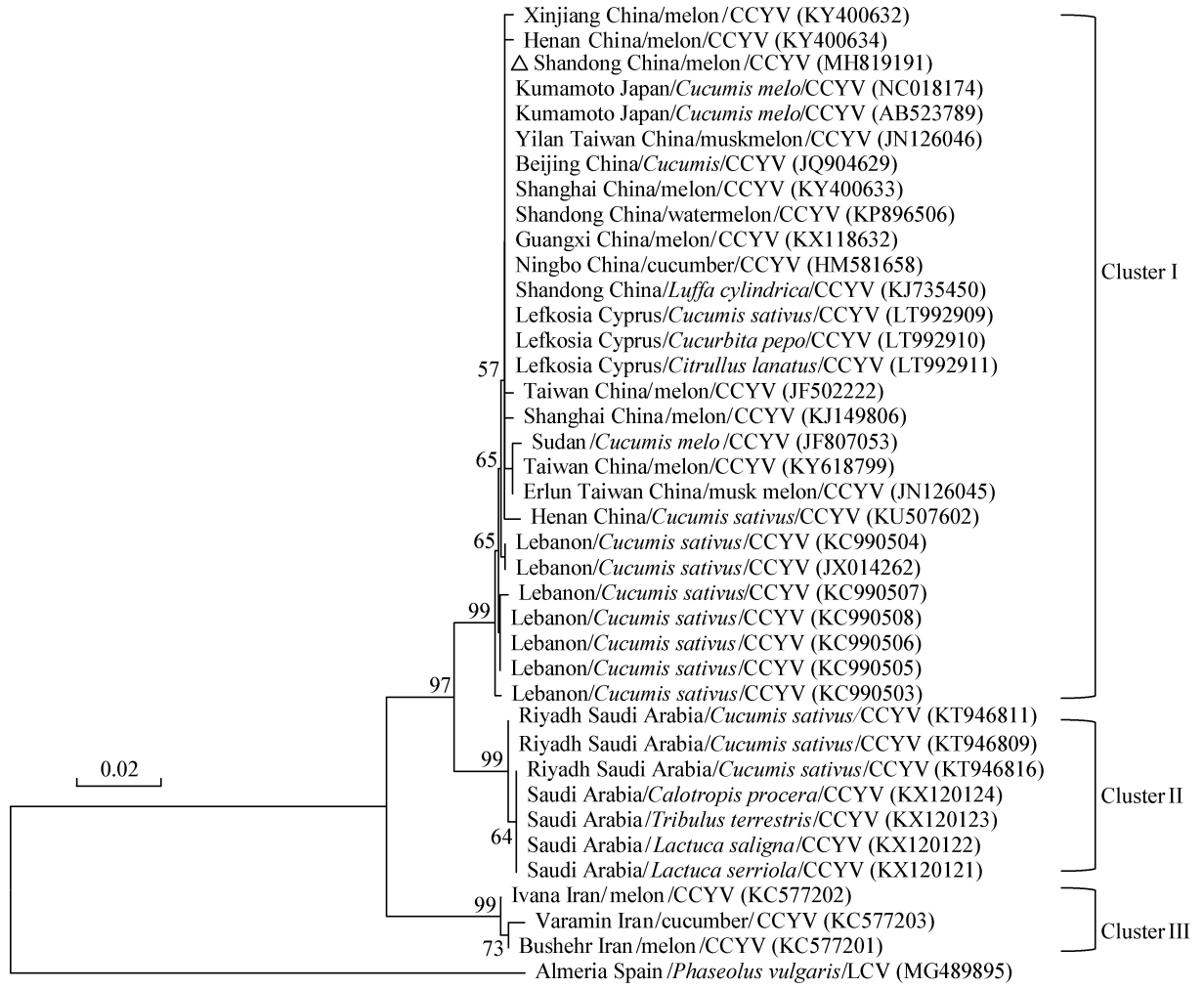

图1 基于*CP*基因核苷酸序列构建CCYV山东分离物及其它CCYV分离物的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of CCYV Shandong isolate and other CCYV isolates based on *CP* gene nucleotide sequences

图中所列内容顺序为来源/寄主/病毒(GenBank登录号)。The order listed in the figure is source/host/virus (Accession no. in GenBank).

3 讨论

近年来,瓜类褪绿黄化病毒在世界上许多国家的甜瓜上均有发生,但关于其全基因组信息和进化分类的研究较少(Okuda et al., 2010; Keshavarz et al., 2014; 彭斌等, 2017)。目前,GenBank中登录的CCYV完整全基因组序列仅有9条。本研究测定了CCYV山东省分离物的全基因组信息,分析了该基因组的结构,研究结果丰富了CCYV全基因组序列信息,有助于进一步了解该病毒的遗传进化关系。

已有研究报道表明,不同寄主来源和不同种类的毛形病毒属病毒的基因组核苷酸序列表现出高度的相似性,总体上遗传变异小,甚至地理来源很远的分离物之间也是如此(Rubio et al., 2013; Orfanidou et al., 2017)。本试验通过对CCYV山东分离物全基因组序列相似性进行分析,发现该病毒基因组末端序列非常保守,该分离物的遗传变异较小,RNA1链中*RdRp*和*p22*基因变异更是低于全基因组变异的平均水平。Ahlquist(2002)研究结果表明,*RdRp*的主要功能是使聚合酶靶定模板,调节病毒RNA合成,此外*RdRp*在合成过程中有较高的错配率,通常在10^{-4}左右。但是本研究克隆的山东分离物的*RdRp*基因突变较小,表明CCYV在传播蔓延过程中遇到的选择压力较小,在RNA2链中变异较小的是*Hsp70h*、*p6*、*CP*、*CPm*及*p26*等基因,这些基因编码的蛋白主要功能是与病毒RNA的包壳和胞间移动相关(洪雪玉和陈剑平, 2004),外壳蛋白相关基因的保守性有助于病毒稳定侵染寄主(张林等, 2011)。Orfanidou et al.(2017)对来源于13种杂草CCYV希腊分离物基因组序列的分析也表明*RdRp*、*CP*、*CPm*这3个基因的核苷酸序列和氨基酸序列均高度保守,变异很

小，与本研究结果一致。

在*CP*基因序列进化树中，CCYV不同地区分离物被分为3个簇群，不同分离物的分化与地理来源有关，可能是由于地理隔离而使不同的分离物具有不同的特点。本研究获得的*CP*基因系统进化树分为3个簇群，西亚地区的伊朗分离物、沙特阿拉伯分离物和黎巴嫩分离物分别聚类在3个簇群中，其中来自伊朗的分离物单独处在Cluster III中，并且3个分离物间存在一定的变异，这与Keshavarz et al.（2014）的研究结果一致，沙特阿拉伯分离物单独处在Cluster II中并且分为2个小分支，黎巴嫩分离物聚在Cluster I中，可能是由于地理原因这3个地区的分离物没有和其它地区的分离物进行基因交流。本实验室前期克隆的山东丝瓜分离物（KJ735450）和西瓜分离物（KP896506）与本研究克隆的山东甜瓜分离物聚类在一个分支上，表明CCYV的分化与寄主间关系较小。彭斌等（2017）发现丝瓜分离物（KJ735450）单独处在一个分支，但是本研究中在加入新登录的一组沙特分离物（KT946811、KT946809、KT946816、KX120124、KX120123、KX120122、KX120121）后，发现该丝瓜分离物与中国分离物（KY400634、MH819191、JN126046、JQ904629、KY400633、KP896506、KX118632、HM581658）、日本分离物（NC018174、AB523789）和塞浦路斯分离物（LT992909、LT992910、LT992911）处在一个分支中，表明它们的亲缘关系较近。

CCYV基因组遗传背景单一，有利于通过抗病品种培育的策略来防控该病害，Okuda et al.（2013）通过抗病性筛选，获得了5个抗CCYV的抗病品种。但在生产上对于CCYV的防治主要通过防控烟粉虱来实现。也有研究者从免疫诱抗途径寻找防控方法，如Takeshita et al.（2013）发现通过苯丙噻重氮（acibenzolar-*S*-methyl，ASM）诱导的抗病毒反应可以有效抑制CCYV在甜瓜上的侵染，减轻系统侵染的发病程度，这为CCYV的防治提供了新方法。

参 考 文 献（References）

Abrahamian PE, Sobh H, Abou-Jawdah Y. 2012. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* on cucumber in Lebanon. Plant Disease, 96(11): 1704

Ahlquist P. 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. Science, 296(5571): 1270−1273

Al-Saleh MA, Al-Shahwan IM, Amer MA, Shakeel MT, Abdalla OA, Orfanidou CG, Katis NI. 2015. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber in Saudi Arabia. Plant Disease, 99(5): 734

Amer MA. 2015. Serological and molecular characterization of *Cucurbit chlorotic yellows virus* affecting cucumber plants in Egypt. International Journal of Virology, 11(1): 1−11

Bananej K, Menzel W, Kianfar N, Vahdat A, Winter S. 2013. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucumber, melon, and squash in Iran. Plant Disease, 97(7): 1005

Gu QS, Liu YH, Wang YH, Huangfu WG, Gu HF, Xu L, Song FM, Brown JK. 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in China. Plant Disease, 95 (1): 73

Gu QS, Peng B, Liu SS, Liu YH, Wu HJ, Liu LF. 2011. New diseases of cucurbits: *Cucurbit chlorotic yellows virus*. China Cucurbits and Vegetables, 24(3): 32−33 (in Chinese) [古勤生, 彭斌, 刘珊珊, 刘英华, 吴会杰, 刘丽峰. 2011. 瓜类新病毒病害(一): 瓜类褪绿黄化病. 中国瓜菜, 24(3): 32−33]

Hamed K, Menzel W, Dafalla G, Gadelseed AMA, Winter S. 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting muskmelon and cucumber in Sudan. Plant Disease, 95(10): 1321

Hong XY, Chen JP. 2004. Function of some proteins encoded by members of family *Closteroviridae*. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 16(1): 47−52 (in Chinese) [洪雪玉, 陈剑平. 2004. 长线型病毒科成员编码蛋白的功能. 浙江农业学报, 16(1): 47−52]

Keshavarz T, Shams-Bakhsh M, Izadpanah K, Malboobi MA. 2014. Occurrence and genome analysis of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in Iran. Journal of Phytopathology, 162(7/8): 523−526

Li J, Liang X, Wang X, Shi Y, Gu Q, Kuo YW, Falk BW, Yan F. 2016. Direct evidence for the semipersistent transmission of *Cucurbit chlorotic yellows virus* by a whitefly vector. Scientific Reports, 6: 36604

Liu SS, Peng B, Wu HJ, Liu TJ, Kong XY, Shi Y, Gu QS. 2013. Molecular identification of *Cucurbit chlorotic yellow virus* in Hainan and Henan provinces. Journal of Fruit Science, 30(2): 291−293 (in Chinese) [刘珊珊, 彭斌, 吴会杰, 柳唐镜, 孔祥义, 施艳, 古勤生. 2013. 海南省和河南省发生甜瓜褪绿黄化病的分子鉴定. 果树学报, 30(2): 291−293]

Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuvre P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics, 26(19): 2462−2463

Martin RR, Tzanetakis IE, Gergerich R, Fernandez G, Pesic Z. 2004. *Blackberry yellow vein associated virus*: a new *Crinivirus* found in blackberry. Acta Horticulturae, 656: 137−142

Okuda M, Okazaki S, Yamasaki S, Okuda S, Sugiyama M. 2010. Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus *Crinivirus*. Phytopathology, 100(6): 560−566

Okuda S, Okuda M, Sugiyama M, Sakata Y, Takeshita M, Iwai H. 2013. Resistance in melon to *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a whitefly-transmitted *Crinivirus*. European Journal of Plant Pathology, 135(2): 313−321

Orfanidou C, Maliogka VI, Katis NI. 2014. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in Greece. Plant Disease, 98(10): 1446

Orfanidou CG, Baltzi A, Dimou NA, Katis NI, Maliogka VI. 2017. *Cucurbit chlorotic yellows virus*: insights into its natural host range, genetic variability, and transmission parameters. Plant Disease, 101(12): 2053−2058

Peng B, Liu LM, Liu SS, Zhang YH, Ji YL, Wu Y, Zhang XJ, Gu QS. 2017. The genome of *Cucurbit chlorotic yellows virus* from Xinjiang Autonomous Region of China. Acta Phytopathologica Sinica, 47(6): 730−737 (in Chinese) [彭斌, 刘莉铭, 刘珊珊, 张以和, 吉艳玲, 吴洋, 张学军, 古勤生. 2017. 瓜类褪绿黄化病毒新疆分离物基因组分析. 植物病理学报, 47(6): 730−737]

Rubio L, Guerri J, Moreno P. 2013. Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*. Frontiers in Microbiology, 4: 151

Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA. 2006. 5′ end cDNA amplification using classic RACE. Nature Protocols, 1(6): 2555−2562

Shi Y, Shi YJ, Gu QS, Yan FM, Sun XY, Li HL, Chen LL, Sun BJ, Wang ZY. 2016. Infectious clones of the crinivirus cucurbit chlorotic yellows virus are competent for plant systemic infection and vector transmission. Journal of General Virology, 97(6): 1458−1461

Sun XH, Wang SS, Gao LL, Qiao N, Liu YG, Zhao J, Zhu XP. 2016. Detection of viruses infecting cucurbit vegetables in Shandong and identification of subgroup of the *Cucumber mosaic virus* isolates. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 31(2): 211−217 (in Chinese) [孙晓辉, 王树森, 高利利, 乔宁, 刘永光, 赵静, 竺晓平. 2016. 山东葫芦科蔬菜上病毒病种类检测及黄瓜花叶病毒分离物的亚组鉴定. 华北农学报, 31(2): 211−217]

Takeshita M, Okuda M, Okuda S, Hyodo A, Hamano K, Furuya N, Tsuchiya K. 2013. Induction of antiviral responses by acibenzolar-*S*-methyl against *Cucurbit chlorotic yellows virus* in melon. Phytopathology, 103(9): 960−965

Tang X, Zhang DY, Li F, Yan F, Zhou XG, Zhang YJ, Shi XB, Liu Y. 2017. The first report and the epidemic of the *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) in Hunan Province. Acta Phytopathologica Sinica, 47(4): 573−576 (in Chinese) [唐鑫, 张德咏, 李凡, 燕飞, 周序国, 张友军, 史晓斌, 刘勇. 2017. 瓜类褪绿黄化病毒(*Cucurbit chlorotic yellows virus*)在湖南省的首次报道及其流行动态研究. 植物病理学报, 47(4): 573−576]

Wei Y, Han XY, Wang ZY, Gu QS, Li HL, Chen LL, Sun BJ, Shi Y. 2018. Development of a GFP expression vector for *Cucurbit chlorotic yellows virus*. Virology Journal, 15(1): 93

Yang HY, Cui BM, Zhang Q, Chen YJ, Zheng YY, Xiang BC. 2017. Detection of tomato virus in Xinjiang and analysis of complete genomic sequence and transmission characteristic of *Southern tomato virus*. Journal of Plant Protection, 44(2): 253−259 (in Chinese) [杨海燕, 崔百明, 张强, 陈英杰, 郑银英, 向本春. 2017. 新疆番茄病毒病检测及南方番茄病毒全基因组序列测定与传播特性分析. 植物保护学报, 44(2): 253−259]

Yang SA, Li ZB, Qin BX, Xie HT, Cui LX, Su Q, Deng TJ, Cai JH. 2017. Molecular detection and identification of three viuses isolated from melons in Guangxi. Plant Protection, 43(3): 83−89, 102 (in Chinese) [杨世安, 李战彪, 秦碧霞, 谢慧婷, 崔丽贤, 苏琴, 邓铁军, 蔡健和. 2017. 广西三种甜瓜病毒分离物的分子检测与鉴定. 植物保护, 43(3): 83−89, 102]

Yuan Y, Zhao T, Liang XZ, Shi Y. 2012. Study on the correlation between CCYV accumulation and symptom development in melon leaves. Journal of Henan Agricultural University, 46(6): 655−657, 709 (in Chinese) [袁媛, 赵特, 梁相志, 施艳. 2012. 甜瓜病叶CCYV积累量与叶片症状表现的相关性研究. 河南农业大学学报, 46(6): 655−657, 709]

Zhang L, Han QJ, Yuan TT, Song YZ, Zhu CX, Wen FJ. 2011. Sequence clone and conservative analysis of the genomic RNAs of *Tobacco etch virus* SD1 isolate. Journal of Plant Protection, 38(5): 401−407 (in Chinese) [张林, 韩全军, 袁彤彤, 宋云枝, 朱常香, 温孚江. 2011. 烟草蚀纹病毒山东分离物全基因组序列的克隆和保守性分析. 植物保护学报, 38(5): 401−407]

(责任编辑:李美娟)