

大樱桃病毒潜在过渡寄主和昆虫介体的检测

张雅雯¹ 窦宝存¹ 陈珍珍¹ 曹欣然^{2*} 原雪峰^{1*}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271000; 2. 青岛农业大学植物医学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 为分析大樱桃病毒潜在的过渡寄主和昆虫介体, 利用反转录PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)对采集自大樱桃园内的杂草、昆虫及园区周边的常绿植物进行大樱桃8种病毒的检测, 通过蛋白质印迹法(Western blot)对RT-PCR检测结果进行验证, 并经过BLAST比对和系统发育树构建分析大樱桃病毒分离株的亲缘关系。结果显示, 分别从大樱桃园内4种杂草商陆 *Phytolacca acinosa*、鸭趾草 *Commelina communis*、马齿苋 *Portulaca oleracea* 和一年蓬 *Erigeron annuus*, 园区周边3种植物山枣 *Ziziphus montana*、石楠 *Photinia serrulata* 和板栗 *Castanea mollissima*, 2种害虫绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 和赤须盲蝽 *Trigonotylus ruficornis* 中检测到黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV); 而未检测到其它7种大樱桃病毒; 且Western blot 验证结果显示RT-PCR检测结果可靠。4种杂草、3种周边植物和2种昆虫的CMV RNA3序列均与大樱桃CMV分离株YT-CH(登录号KY646104)的RNA3序列相似度较高, 为97.08%~99.54%; 系统发育树显示, 商陆CMV-PA分离株与大樱桃分离株YT-CH的亲缘性较高, 赤须盲蝽分离株CMV-CX与马齿苋分离株CMV-PO、山枣分离株CMV-ZM及石楠分离株CMV-PS的亲缘性较高。表明上述7种植物和2种盲蝽是大樱桃病毒的潜在过渡寄主和昆虫介体, 在大樱桃病毒病防治中应给予一定的关注。

关键词: 大樱桃病毒; 昆虫介体; 过渡寄主; 黄瓜花叶病毒(CMV)

Detection of potential transitional hosts and insect vectors of cherry viruses

ZHANG Yawen¹ DOU Baocun¹ CHEN Zhenzhen¹ CAO Xinran^{2*} YUAN Xuefeng^{1*}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, Shandong Province, China; 2. College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China)

Abstract: To analyze the potential transition hosts and vectors for cherry viruses, RT-PCR and Western blot were used to detect the existence of eight types of cherry viruses from weeds and insects in cherry orchards, and peripheral woody plants of cherry orchards. The results showed that cucumber mosaic virus (CMV) could be detected from four species of weeds (*Phytolacca acinosa*, *Commelina communis*, *Portulaca oleracea* and *Erigeron annuus*), three species of woody plants (*Ziziphus montana*, *Photinia serrulata* and *Castanea mollissima*), and two species of agricultural pests (*Apolygus lucorum* and *Trigonotylus ruficornis*), while other seven types of cherry viruses failed to be detected. The similarity of CMV RNA3 sequences between the four weeds, three plants, two insect species and cherry CMV isolates YT-CH (KY646104) was high, up to 97.08%–99.54%. The results of phylogenetic analysis showed that the affinity between CMV-PA isolates of *P. acinosa* and cherry isolates YT-CH was high, and the affinity between CMV-CX isolate of *T. ruficornis* and CMV-PO isolate of *P. oleracea*, CMV-ZM isolate of *Z. montana*, CMV-PS isolate of *P. serrulata* were also high. These plants and agricultural pests were potential transitional hosts and vectors of CMV, providing basic data for control of the dis-

基金项目: 国家自然科学基金(31872638, 31670147), 山东省农业微生物重点实验室开放课题(SDKL2017015)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: xinran1001@163.com, snowpeak77@163.com

收稿日期: 2019-03-29

ease caused by CMV.

Key words: cherry virus; insect vector; transitional host; cucumber mosaic virus (CMV)

大樱桃因其口味独特、营养价值高而备受消费者青睐,在2008—2017年其种植面积年增长速率为5.6%,产量年增长速率达6.3% (<http://www.fao.org/faostat/zh/#data/QC>)。大樱桃在我国的分布主要集中在渤海湾沿岸,其中山东省是大樱桃栽培面积最大的省,占全国大樱桃总种植面积的50.5% (董薇等,2005;崔建潮等,2017)。病毒病是限制大樱桃产业发展的重要病害,且大樱桃为多年生木本植物,植株一旦感染病毒则终生带毒,造成持久危害,严重影响其产量和品质,甚至导致树体死亡 (Bernardy et al.,2002)。目前,樱桃病毒病发生普遍,对樱桃生产造成严重威胁,已成为樱桃产业发展的主要制约因素之一 (Jelkmann,1995;Keim-Konrad & Jelkmann,1996;Jelkmann et al.,1997)。如王文文等 (2015) 在山东省泰安市大樱桃花叶病病样中就检测出5种樱桃病毒。

植物病毒病的流行依赖于媒介的传播,其中近80%依赖于特定的媒介昆虫传播 (Power,2000;Andret-Link & Fuchs,2005;Hohn,2007),这些媒介昆虫大部分为半翅目的刺吸式口器昆虫,如蚜虫、粉虱、飞虱、木虱、叶蝉、介壳虫等 (史晓斌等,2012)。另外,随着全球气候的变暖,外来生物入侵加剧 (Wan et al.,2009),植物病毒病的发生也日趋严重,植物病毒的扩散和发生程度与媒介昆虫的活动密切相关 (赵锐等,2013)。我国目前已经报导的大樱桃病毒有13种,分别为樱桃锉叶病毒 (cherry rasp leaf virus, CRLV)、樱桃病毒A (cherry virus A, CVA)、樱桃绿环斑驳病毒 (cherry green ring mottle virus, CGRMV)、樱桃坏死锈斑驳病毒 (cherry necrotic rusty mottle virus, CNRMV)、苹果褪绿叶斑病毒 (apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、柑橘叶斑点病毒 (citrus leaf blotch virus, CLBv)、樱桃小果病毒1号 (little cherry virus 1, LChV-1)、樱桃小果病毒2号 (little cherry virus 2, LChV-2)、李树皮坏死伴随茎痘病毒 (plum bark necrosis stem pitting-associated virus, PBNPaV)、李属坏死环斑病毒 (*Prunus* necrotic ringspot virus, PNRSV) 和李矮缩病毒 (prune dwarf virus, PDV)、黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV)、苹果花叶病毒 (apple mosaic virus, ApMV) (Rao et al.,2009;Zhou et al.,2011;Wang et al.,2016)。这些大樱桃病毒病的传播媒介主要有花粉、

昆虫、线虫等,其中昆虫介体有蚜虫和粉蚧 (Raine et al.,1986;Ziebell et al.,2011),目前尚未见其它昆虫介体的报道;且有些病毒的寄主广泛,包括杂草及常绿草本植物。因此,明确樱桃种植环境中樱桃病毒的潜在寄主和传播媒介对于樱桃病毒病的防控具有重要的实践意义。

目前,常用的病毒检测技术有生物学鉴定 (指示植物法)、血清学检测和分子生物学检测等。生物学鉴定是早期的鉴定手段,如将疑似感染PNRSV的植株汁液用摩擦接种法接种到木本指示植物桃砧木GF305上,若叶片呈现褪绿斑等典型症状,证明病毒存在 (覃兰英等,1997);但该方法检测灵敏度低,重复性差。血清学方法即酶联免疫吸附法,其原理是通过抗体和抗原的特异性识别结合,催化底物产生有色物质从而进行检测,该方法已成功应用于樱桃病毒的鉴定 (Edwards & Cooper,1985;Mekuria et al.,2003)。但该方法由于病毒株系复制及变异较快,导致出现株系的漏检现象 (Uyemoto & Scott,1992);同时也会由于病毒浓度随季节变化的差异性较大而导致假阳性。分子生物学检测已经逐渐成为病毒检测鉴定的主要手段之一,如反转录PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 已经成为樱桃病毒检测的重要手段 (Li & Mock,2005);蛋白质印迹法 (Western blot) 是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的样品进行着色,通过分析着色位置和深度获得特异蛋白质在所分析组织中的表达情况。本研究拟通过RT-PCR和Western blot检测山东省烟台市和泰安市大樱桃园中具疑似病毒病症状的杂草和周边常绿植物以及常见昆虫携带大樱桃病毒的情况,确定是否存在潜在过度寄主和昆虫传播介体,以期更加全面地掌握山东省大樱桃病毒病的发生情况以及病原种类,为大樱桃病毒病的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:于2017年3月至2018年12月,在烟台市和泰安市大樱桃园中采集有典型病毒病症状的杂草以及周边常绿植物叶片样品53份,经鉴定其中包括15种杂草和6种周边常绿植物;用扑虫网捕捉园内昆虫成虫样品26份,在实验室内逐一进行形态学鉴定,共10种昆虫;具典型病毒病症状的大樱桃

叶片样品采集于烟台市大樱桃园。阴性对照样品为健康荠菜 *Capsella bursa-pastoris* 和健康灰飞虱 *Laelidaphax striatellus*, 采集自山东农业大学南校区实验田, 经PCR检测不含CMV; 用CMV_{Fny} 侵染性克隆注射接种本氏烟, 获得阳性对照样品; CMV_{Fny} 侵染性克隆由南京农业大学陶小荣教授提供, 本氏烟种子由山东农业大学分子植物病毒学实验室提供, 生长至6叶期进行接种。

试剂: 2×Taq Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; T4 DNA连接酶、pMD18-T载体、Recombinant RNase Inhibitor、M-MLV反转录酶, 日本TaKaRa公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、TransZol试剂, 北京全式金生物技术有限公司; 抗CMV CP血清, 中国检验检疫科学研究院; 羊抗兔IgG血清, 北京康为世纪生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、Skim Milk脱脂奶粉, 北京索莱宝科技有限公司; PALL BioTrace™ NT硝酸纤维素转印膜, 北京金欧亚科技发展有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

仪器: GloMax® 荧光素酶检测仪、T960智能梯度PCR仪, 杭州晶格科学仪器有限公司; DYY-6C型电泳仪, 北京六一仪器厂; Sage-SD半干转印仪、ChamphChem™ 500化学发光检测仪, 北京赛智创业科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 供试样品中大樱桃病毒的RT-PCR检测

采用TransZol试剂分别提取表现典型症状的植物叶片及昆虫样品的总RNA, 具体步骤参考试剂说明。依据本课题组前期在山东省大樱桃上检测到的8种病毒CVA、CGRMV、LChV-1、LChV-2、PBNPaV、PNRSV、PDV和CMV, 在其相对保守区域分别设计特异性引物(表1)。其中检测CVA和CGRM时, 在进行反转录时使用的反向引物为Qt(5'-CCAGT-GAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCT-TTTTTTTTTTTTTTTT-3'), 进行PCR扩增时使用的反向引物为Q₀(5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3')。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。对获得的总RNA分别进行RT-PCR检测。25 μL反转录反应体系: 植物总RNA 5 μL、对应反向引物5 μL、10 mmol/L dNTP 2 μL、M-MLV反转录酶1 μL、5×Reverse Transcriptase M-MLV Buffer 5 μL、Recombinant RNase Inhibitor 0.5 μL、ddH₂O 6.5 μL、42℃水浴1.5 h后置冰上5 min; 20 μL PCR反应体

系: 反转录产物2 μL、正反向引物各1 μL、2×Taq Master Mix 10 μL、ddH₂O 6 μL。PCR反应条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性40 s, 50℃退火40 s, 72℃延伸30 s, 30个循环; 最后72℃延伸10 min。将获得的PCR产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收后, 将回收片段克隆到pMD18-T载体上, 经T4 DNA连接酶连接过夜, 筛选阳性克隆送上海博尚生物技术有限公司进行测序。利用NCBI对测序所得序列进行BLAST比对分析, 以明确样品中是否携带相关大樱桃病毒。

1.2.2 阳性样品中大樱桃病毒的Western blot检测

将1.2.1中经RT-PCR检测含有大樱桃病毒的样品, 采用Western blot进行蛋白水平的检测, 以验证RT-PCR检测结果的准确性。使用液氮对RT-PCR检测阳性样品进行研磨, 分别称取0.3 g样品加入2×SDS蛋白上样缓冲液(SDS 500 mg、巯基乙醇1 mL、甘油3 mL、溴酚蓝4 mg、pH 6.8的1 mol/L Tris-HCl 2 mL, 蒸馏水溶解定容至10 mL), 充分混匀后进行沸水浴处理5 min, 然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将硝酸纤维素膜提前浸泡于TBST缓冲液(pH 7.5的20 mmol/L Tris-HCl 2.423 g、150 mmol/L NaCl 8.766 g、0.05% Tween-20, 蒸馏水溶解定容至1 L)中40 min, 然后采用半干转方法将供试样品蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶转移到固相支持物硝酸纤维素转印膜上, 然后在20 mL TBST缓冲液中加入1 g脱脂奶粉制成封闭液, 将硝酸纤维素转印膜放入封闭液中, 室温下置于水平摇床上进行过夜封闭, 封闭完成后按体积比1:5 000加入抗CMV CP血清后将硝酸纤维素转印膜放置于TBST缓冲液中猛烈漂洗6次, 然后按体积比1:8 000再加入二抗羊抗兔IgG血清进行洗脱, 最后采用全自动化学发光仪自显影拍摄, 检测病毒CP的表达量, 从而确定供试样品体内存在该病毒。

1.2.3 病毒分离株的同源性和系统发育分析

将1.2.1中测序所得序列上传至GenBank获得相应的登录号, 并从GenBank中下载已登录的本实验室前期获得的大樱桃CMV分离株YT-CH(登录号KY646104)相关序列信息, 用DNAMAN软件对各病毒分离株相关序列的同源性进行分析, 明确其亲缘关系。同时, 将测序所得序列与在GenBank中已登录的本实验室前期在其它寄主樱桃、白菜、萝卜、烟草上检测到的CMV分离株的相关序列用Clustal X软件截齐后, 采用邻接法构建单基因系统

发育树,并根据 Kimura 双参数模型计算其进化距离,Bootstrap值设置为1 000次。

表1 本研究中所用的病毒检测引物

Table 1 Primers for virus detection in this study

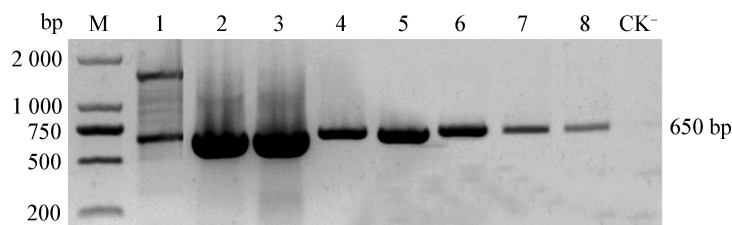
引物 Primer	序列 Sequence	目的片段大小 Expected size/bp
CVA-6677-F	5'-CGAGACCAGTGATAGAGAATCAGG-3'	750
CVA-5838-F	5'-CCAATGTCCACACATGATCC-3'	1 600
CGRM-7474-F	5'-CGGACCCTAAGTCCTCCAAC-3'	900
CGRM-7831-F	5'-TTAGGAGCTACTGTTCTCTTCG-3'	550
LCh1-15849-F	5'-TGTTTCATGTATAACAAAGGACGTAG-3'	1 000
LCh1-16827-R	5'-GTTTATGACTAGAGAAGGTAAGCGG-3'	
LCh2-5670-F	5'-ACTCTGAAAGTGGATCGAGG-3'	470
LCh2-6141-R	5'-GATGTGTGAGAACAAAGGCATTC-3'	
PBN-13568-F	5'-GGATTAGGTGAGGTGTGGTTGAC-3'	540
PBN-14139-R	5'-GTGCATTGCCGATTCCCGGAC-3'	
PNRS-R3-115-F	5'-GGTTTAGAGATTGTTGGTTGTCTATTC-3'	1 100
PNRS-R3-1152-R	5'-CAAGAACGGCATCCACCAGC-3'	
PN-R2-184-F	5'-TGTTTGAAGCGTACATGGTGAC-3'	900
PN-R2-1096-R	5'-GCTTCGCGGAAAGTCGGTAC-3'	
PD-CP-135-F	5'-TTCCGAGTGGATGCTTCACG-3'	430
PD-CP-564-R	5'-CATCGAGTGTGGAGGTACTGAG-3'	
CM-R3-119-F	5'-AGGCATGGCTTTCCAAGGTAC-3'	650
CM-R3-768-R	5'-CTGACGGTTTCGTTTGCTCAGC-3'	
CM-R2-233-F	5'-GTGGATGTCAGCGAGAGTGTC-3'	960
CM-R2-1197-R	5'-GAATCACCTAGCTCTGGAACGTC-3'	

2 结果与分析

2.1 供试样品中大樱桃病毒的携带情况

RT-PCR 检测结果显示,供试大樱桃园内杂草、昆虫及园区周边植物中只检测到了CMV,未检测到其它7种大樱桃病毒。其中,在园内4种杂草商陆 *Phytolacca acinosa*、鸭趾草 *Commelina communis*、马齿苋 *Portulaca oleracea*、一年蓬 *Erigeron annuus* 和

园区3种周边植物山枣 *Ziziphus montana*、石楠 *Photinia serrulata*、板栗 *Castanea mollissima* 中均检测到了CMV的RNA3片段,长度为650 bp(图1);在园内害虫绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 和赤须盲蝽 *Trigonotylus ruficornis* 中检测到了CMV的RNA2和RNA3片段,长度分别为960 bp(图2)和650 bp。经过克隆和DNA测序后,BLAST 比对结果表明均为CMV的相关序列。



M: DL2000 marker; 1: 商陆; 2: 鸭趾草; 3: 马齿苋; 4: 一年蓬; 5: 山枣; 6: 石楠; 7: 板栗; 8: 樱桃; CK⁻: 健康荠菜。M: DL2000 marker; 1: *Phytolacca acinosa*; 2: *Commelina communis*; 3: *Portulaca oleracea*; 4: *Erigeron annuus*; 5: *Ziziphus montana*; 6: *Photinia serrulata*; 7: *Castanea mollissima*; 8: cherry; CK⁻: healthy *Capsella bursa-pastoris*.

图1 大樱桃园杂草及周边植物中大樱桃病毒CMV RNA3片段的RT-PCR检测结果

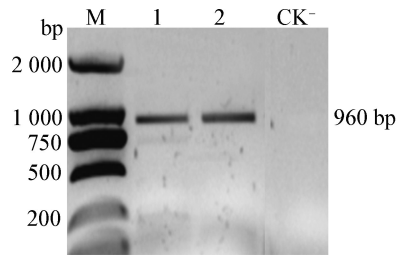
Fig. 1 RT-PCR detection results of cherry virus CMV RNA3 fragments in weeds and surrounding plants in cherry orchards

2.2 从蛋白水平检测供试样品中CMV携带情况

Western blot 检测结果显示,大樱桃园内及园区周边7种植物商陆、鸭趾草、马齿苋、一年蓬、山枣、石楠、

板栗(图3-A)和2种昆虫绿盲蝽、赤须盲蝽(图3-B)中均可检测到CMV的CP。7种植物中CMV的CP表达水平差距不大,说明CMV在这7种植物体内的复制表

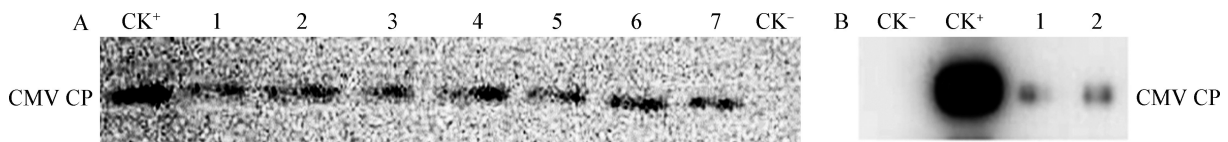
达量相似,但CMV的CP在2种昆虫中的表达水平较低,暗示CMV在这2种蚜类体内不复制,只是被携带。



M: DL2000 marker; 1: 绿盲蚜; 2: 赤须盲蚜; CK⁻: 健康灰飞虱。M: DL2000 marker;
1: *Apolygus lucorum*; 2: *Trigonotylus ruficorni*; CK⁻: healthy *Laodelphax striatellus*.

图2 大樱桃园昆虫样品中大樱桃病毒CMV RNA2片段的RT-PCR检测结果

Fig. 2 RT-PCR detection results of cherry virus CMV RNA2 fragments from insects in cherry orchards



A: CK⁺: CMV_{Fny} 侵染植物样品; 1: 商陆; 2: 鸭趾草; 3: 马齿苋; 4: 一年蓬; 5: 山枣; 6: 石楠; 7: 板栗; CK⁻: 健康荠菜。B: CK⁺: CMV_{Fny} 侵染植物样品; 1: 绿盲蚜; 2: 赤须盲蚜; CK⁻: 健康灰飞虱。A: CK⁺: CMV_{Fny}-infected plant samples; 1: *Phytolacca acinosa*; 2: *Commelina communis*; 3: *Portulaca oleracea*; 4: *Erigeron annuus*; 5: *Ziziphus montana*; 6: *Photinia serrulata*; 7: *Castanea mollissima*; CK⁻: healthy *Capsella bursa-pastoris*. B: CK⁺: CMV_{Fny}-infected plant samples; 1: *Apolygus lucorum*; 2: *Trigonotylus ruficornis*; CK⁻: healthy *Laodelphax striatellus*.

图3 大樱桃园内杂草、周边植物和昆虫中CMV CP的Western blot检测结果

Fig. 3 Western blot detection results of cherry virus CMV CP in weeds, surrounding plants and insects in cherry orchards

2.3 昆虫与周边杂草中CMV序列的同源性分析

将克隆到位于119~769 nt的CMV的RNA3部分序列片段提交NCBI获得相应登录号,商陆分离株CMV-PA、鸭趾草分离株CMV-CC、马齿苋分离株CMV-PO、一年蓬分离株CMV-EA、山枣分离株CMV-ZM、石楠分离株CMV-PS、板栗分离株CMV-CM、绿盲蚜分离株CMV-LM和赤须盲蚜分离株CMV-CX对应的GenBank登录号分别为MG009215、MG009214、MG009212、MG009213、MG009210、MG009211、MG009209、MH883806、MH883807。

供试样品CMV的RNA3序列之间具有一定的相似度,其中商陆、鸭趾草、马齿苋、一年蓬、山枣、石楠、板栗、绿盲蚜和赤须盲蚜中CMV的RNA3序列与大樱桃CMV分离株YT-CH(KY646104)的RNA3序列相似度为97.08%~99.54%,4种杂草和3种周边植物中CMV的RNA3序列相似度为97.36%~99.69%,绿盲蚜和赤须盲蚜中CMV的RNA3序列相似度为96.31%,4种杂草、3种周边植物中CMV的RNA3序列与绿盲蚜、赤须盲蚜中CMV的RNA3序列相似度为95.23%~99.69%(表2)。

将检测到的植物和昆虫中的CMV序列与本试

验室在其它寄主上检测到的CMV序列构建系统发育树,结果表明系统发育树分为3组,其中绿盲蚜分离株CMV-LM与赤须盲蚜分离株CMV-CX和其它植物CMV分离株的亲缘关系较远,单独为一组,表明这2种昆虫的CMV分离株亲缘性并不高;第2组包括商陆、樱桃、白菜、萝卜和烟草中的CMV分离株,其中商陆分离株CMV-PA与大樱桃分离株YT-CH的亲缘性较高,与白菜分离株TA-Ca(KY646102)、萝卜分离株TA-Ra(KY646100)、烟草分离株TA-Tb(KY646103)的亲缘性较远;第3组包括赤须盲蚜、山枣、石楠、马齿苋、一年蓬、板栗和鸭趾草,其中山枣、石楠和马齿苋的CMV分离株与赤须盲蚜分离株CMV-CX的亲缘性较高(图4)。

3 讨论

本试验在大樱桃园内4种杂草、园区周边3种植物和2种昆虫中只检测到CMV,其它7种已报导的大樱桃病毒均未检测到,且CMV是首次在山东省大樱桃园中植物和昆虫中被检测到。其中4种园内杂草商陆、鸭趾草、马齿苋、一年蓬和3种园区周边植物山枣、石楠、板栗均携带CMV,是CMV的潜在

过渡寄主,可以通过昆虫介体传播病毒到樱桃上,加重樱桃病毒病的发生。近年来,果园生草技术被大力提倡(焦润安等,2017),但该措施的提出可能加速了病毒的传播,导致果园产量下降、效益减少,因此有必要在搭配果园草种时综合考虑草种作为病毒病过渡寄主的潜在危险。在明确病毒病害的传播媒介与气候等环境因素的基础上,可以适当进行施肥、灌

溉以改善植物的生长状态,提高植株对病毒的抵抗力(娄虎等,2017);在适当的防治时期通过化学防治手段可以将寄主植物携带的病毒杀死,消除病毒病的传染源,减轻病毒病对植物的影响(欧宇馨和孙颖,2015)。总之,应在保护生态环境的前提下,采取科学合理的防治方法来及时防控植物病毒病的传播蔓延。

表2 大樱桃园4种杂草、3种周边植物和2种昆虫中CMV RNA3片段的序列相似度

Table 2 Nucleotide identities of CMV RNA3 fragments from four weeds, three plants and two insects

GenBank 登录号 GenBank accession no.	MH883806	MH883807	MG009209	MG009210	MG009211	MG009212	MG009213	MG009214	MG009215
MH883807	96.31								
MG009209	95.23	98.15							
MG009210	96.31	99.69	98.15						
MG009211	96.31	98.69	97.36	99.69					
MG009212	96.31	96.69	98.15	98.69	99.69				
MG009213	95.85	99.08	98.15	97.69	99.08	99.08			
MG009214	95.23	98.15	98.53	98.15	98.15	98.15	98.15		
MG009215	97.54	98.77	97.69	98.77	98.77	98.77	98.31	97.69	
KY646104	97.08	98.62	97.69	98.62	98.62	98.62	98.00	97.69	99.54

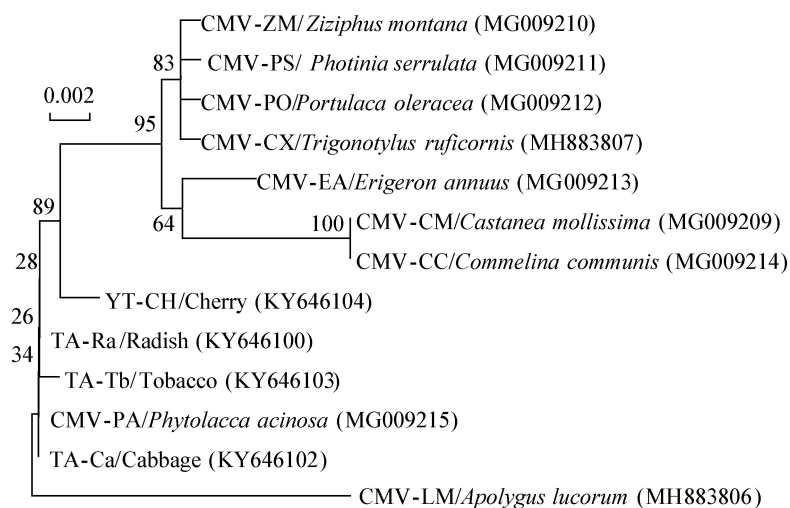


图4 基于邻接法构建7种植物和2种昆虫CMV分离株与其它寄主上CMV分离株的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of seven plant and two insect CMV isolates and the CMV isolates from other hosts by using neighbor-joining method

CMV可以通过80多种蚜虫进行传播(Webster & Looney, 1996; Ziebell et al., 2011),并未有其它昆虫介体传播CMV的报道。本试验首次检测到2种蜡类绿盲蝽和赤须盲蝽可以携带CMV,并且通过核酸水平和蛋白水平2种方式进行了验证,表明绿盲蝽和赤须盲蝽可能是CMV的潜在昆虫传播介体。绿盲蝽属半翅目盲蝽科,寄主范围广泛(戴维健等,

2018; 张未仲等, 2018),是樱桃园的主要害虫之一(公义等, 2018),因其飞翔能力比蚜虫等强,传播病毒的范围广;且其寄主范围广泛,可以从其它携带病毒的植株上将病毒传播到樱桃树上,加重樱桃园的病毒侵染率。赤须盲蝽同属半翅目盲蝽科,寄主为禾本科植物(郑乐怡, 1985),樱桃园中存在多种禾本科杂草,若赤须盲蝽携带病毒传播到樱桃园中的杂

草上,可通过农事操作再传播到樱桃树上,同样会加重樱桃园的病毒侵染率。因此,今后在防治该樱桃园中CMV病毒传播时需对这2种昆虫给予相应的重视。蚜虫传毒属于非持久性传播,是指昆虫传播介体在病株上取食获毒后,病毒依附于口针里,在未发病植株上取食时随同排出的唾液进入寄主植物体内,由于病毒在介体内没有循环期,获毒后即可进行传毒,如对CMV的传播(朱春晖和郑井元,2017)。但本试验采集的蚜虫中并未检测到CMV,推测大樱桃园中CMV的主要传播途径可能不是依靠蚜虫传播。

综上所述,本试验首次在未曾报导的大樱桃园杂草、农业害虫以及园区周边植物上检测到CMV,各CMV分离株序列与大樱桃CMV分离株序列相似度高,并且赤须盲蝽中CMV分离株与山枣、石楠和马齿苋中CMV分离株亲缘关系较近,证明其是大樱桃病毒潜在的昆虫传播介体和过渡寄主,在防治病毒病时应从切断病毒传播途径入手,降低病毒的传播速度;及时杀灭昆虫传播介体并清除樱桃园内杂草,减轻园中植物病毒病的发生和蔓延。本研究结果将为制定适用于大樱桃病毒病的综合防控措施提供参考依据。

参 考 文 献 (References)

- ANDRET-LINK P, FUCHS M. 2005. Transmission specificity of plant viruses by vectors. *Journal of Plant Pathology*, 87(3): 153–165
- BERNARDY MG, FRENCH CJ, MILKS M, JESPERSON G. 2002. New variant of *Little cherry virus* associated with little cherry disease of sweet cherry in British Columbia, Canada. *Plant Disease*, 86(12): 1406
- CUI JC, WANG WH, JIA XH, WANG ZH, TONG W. 2017. The domestic industry problems from the sweet cherry import situation and its development countermeasure for the future. *Journal of Fruit Science*, 34(5): 620–631 (in Chinese) [崔建潮, 王文辉, 贾晓辉, 王志华, 佟伟. 2017. 从国内外甜樱桃生产现状看国内甜樱桃产业存在的问题及发展对策. *果树学报*, 34(5): 620–631]
- DAI WJ, PAN HS, XIU CL, LUO SP, YANG YZ, LU YH. 2018. Behavioral selection of endoparasitoid *Peristenus spretus* to green mirid bug *Apolygus lucorum* and its damaged host plants. *Journal of Plant Protection*, 45(2): 194–200 (in Chinese) [戴维健, 潘洪生, 修春丽, 罗淑萍, 杨益众, 陆宴辉. 2018. 红颈常室茧蜂对绿盲蝽及其为害寄主植物的选择行为. *植物保护学报*, 45(2): 194–200]
- DONG W, SONG YK, WU MQ, WANG L, WU YH. 2005. Advances in research of cherry virus diseases. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 21(5): 332–336 (in Chinese) [董薇, 宋雅坤, 吴明勤, 王林, 吴元华. 2005. 大樱桃病毒病研究进展. *中国农学通报*, 21(5): 332–336]
- EDWARDS ML, COOPER JI. 1985. Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. *Journal of Virological Methods*, 11(4): 309–319
- GONG Y, XIAO YL, ZHAO ZH, WU HB, WANG LP, YANG QM. 2018. The control effect of sex traps on the green bug in cherry orchard. *China Plant Protection*, 38(6): 59–61 (in Chinese) [公义, 肖云丽, 赵中华, 武海斌, 王利平, 杨勤民. 2018. 性诱捕器对樱桃园绿盲蝽的控制作用. *中国植保导刊*, 38(6): 59–61]
- HOHN T. 2007. Plant virus transmission from the insect point of view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46): 17905–17906
- JELKMANN W, FECHTNER B, AGRANOVSKY AA. 1997. Complete genome structure and phylogenetic analysis of *Little cherry virus*, a mealybug-transmissible closterovirus. *Journal of General Virology*, 78(8): 2067–2071
- JELKMANN W. 1995. *Cherry virus A*: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *Journal of General Virology*, 76(8): 2015–2024
- JIAO RA, ZHANG SH, LI Y, LI CZ, WANG JP, JIAO J. 2017. Advances in the research on the influence of raw grass on the growth and development of fruit trees and orchard environment. *Journal of Fruit Science*, 34(12): 1610–1623 (in Chinese) [焦润安, 张舒涵, 李毅, 李朝周, 王建平, 焦健. 2017. 生草影响果树生长发育及果园环境的研究进展. *果树学报*, 34(12): 1610–1623]
- KEIM-KONRAD R, JELKMANN W. 1996. Genome analysis of the 3'-terminal part of the little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite clostero-like virus. *Archives of Virology*, 141(8): 1437–1451
- LI R, MOCK R. 2005. An improved reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of two cherry flexiviruses in *Prunus* spp. *Journal of Virological Methods*, 129(2): 162–169
- LOU H, XU R, WANG HZ, XU QJ. 2017. Advances in the detection and control of plant viral diseases. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 45(24): 25–31 (in Chinese) [娄虎, 徐熔, 王海竹, 徐启江. 2017. 植物病毒病检测及防治的研究进展. *江苏农业科学*, 45(24): 25–31]
- MEKURIA G, RAMESH SA, ALBERTS E, BERTOZZI T, WIRTH-ENSOHN M, COLLINS G, SEDGLEY M. 2003. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus* in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods*, 114(1): 65–69
- OU YX, SUN Y. 2015. The study on the diagnosis and control of garden plant virus diseases. *Fujian Agriculture*, (3): 105 (in Chinese) [欧宇馨, 孙颖. 2015. 探究园林植物病毒病的诊断与防治. *福建农业*, (3): 105]
- POWER AG. 2000. Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4): 336–340
- QIN LY, LI Q, DENG SX, HUANG Y, LI MF, ZHANG CL, LI GF, HE

- SL, NIU CZ. 1997. Identification and detoxification of drupe viroids. *Beijing Agricultural Sciences*, 15(5): 23–28 (in Chinese) [覃兰英, 李青, 邓世秀, 黄宇, 李明福, 张成良, 李桂芬, 贺森林, 牛长占. 1997. 核果类病毒识别鉴定及脱毒技术. *北京农业科学*, 15(5): 23–28]
- RAINE J, MCMULLEN RD, FORBES AR. 1986. Transmission of the agent causing little cherry disease by the apple mealybug *Phenacoccus aceris* and the dodder *Cuscuta lupuliformis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8(1): 6–11
- RAO WL, ZHANG ZK, LI R. 2009. First report of *Cherry virus A* in sweet cherry trees in China. *Plant Disease*, 93(4): 425
- SHI XB, XIE W, ZHANG YJ. 2012. Advances in the characteristics and mechanisms of the transmission of plant viruses by insect vectors. *Acta Entomologica Sinica*, 55(7): 841–848 (in Chinese) [史晓斌, 谢文, 张友军. 2012. 植物病毒病媒介昆虫的传毒特性和机制研究进展. *昆虫学报*, 55(7): 841–848]
- UYEMOTO JK, SCOTT SW. 1992. Important diseases of *Prunus* caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant Disease*, 76(1): 5–11
- WAN FH, ZHANG GF, LIU SS, LUO C, CHU D, ZHANG YJ, ZANG LS, JIU M, LÜ ZC, CUI XH, et al. 2009. Invasive mechanism and management strategy of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotype B: progress report of 973 Program on invasive alien species in China. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52(1): 88–95
- WANG J, ZHU D, TAN Y, ZONG X, WEI H, LIU Q. 2016. First report of *Citrus leaf blotch virus* in sweet cherry. *Plant Disease*, 100(5): 1027
- WANG WW, ZONG XJ, WEI HR, WANG JW, ZHU DZ, TAN Y, LIU QZ. 2015. Symptom and detection of the virus causing mosaic disease in sweet cherry trees in Tai'an, Shandong. *Plant Protection*, 41(2): 97–101, 129 (in Chinese) [王文文, 宗晓娟, 魏海蓉, 王甲威, 朱东姿, 谭钺, 刘庆忠. 2015. 山东泰安甜樱桃“花叶病”树体症状观察及病毒检测. *植物保护*, 41(2): 97–101, 129].
- WEBSTER AD, LOONEY NE. 1996. *Cherries: crop physiology, production and users*. Wallingford: CAB International
- ZHANG WZ, LI J, ZHOU XL, LI QL, HU ZL, ZHAO LL, LIU ZH, HAN F. 2018. Research progress on *Apolygus lucorum*. *Journal of Agriculture*, 8(10): 13–18 (in Chinese) [张未仲, 李捷, 周旭凌, 李庆亮, 胡增丽, 赵龙, 刘朝红, 韩凤. 2018. 绿盲蝽研究进展. *农学学报*, 8(10): 13–18]
- ZHAO K, ZHANG MX, LING B. 2013. Influences of plant virus-plant interactions on biological characteristics and virus transmission mechanism of homopteran vectors. *Journal of Tianjin Normal University (Natural Science Edition)*, 33(4): 49–55 (in Chinese) [赵锟, 张茂新, 凌冰. 2013. 病毒-植物互作对同翅目媒介昆虫生物学及其传毒机制的影响. *天津师范大学学报(自然科学版)*, 33(4): 49–55]
- ZHENG LY. 1985. Notes on the genus *Trigonotylus* Fieber from China (Heteroptera: Miridae). *Entomotaxonomia*, 7(4): 281–285 (in Chinese) [郑乐怡. 1985. 中国赤须盲蝽属初志(半翅目:盲蝽科). *昆虫分类学报*, 7(4): 281–285]
- ZHOU JF, WANG GP, KUANG RF, WANG LP, HONG N. 2011. First report of *Cherry green ring mottle virus* on cherry and peach grown in China. *Plant Disease*, 95(10): 1319
- ZHU CH, ZHENG JY. 2017. The status of the research on pepper insect-borne virus disease and its intermediate insects. *Journal of China Capsicum*, 15(4): 23–26 (in Chinese) [朱春晖, 郑井元. 2017. 辣椒虫传病毒病及其介体昆虫的研究现状. *辣椒杂志*, 15(4): 23–26]
- ZIEBELL H, MURPHY AM, GROEN SC, TUNGADI T, WESTWOOD JH, LEWSEY MG, MOULIN M, KLECZKOWSKI A, SMITH AG, STEVENS M, et al. 2011. *Cucumber mosaic virus* and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. *Scientific Reports*, 1(5): 187

(责任编辑:李美娟)