



秦艳红 文 艺 刘玉霞 高素霞 王 飞* 鲁传涛*

(河南省农业科学院植物保护研究所,河南省农作物病虫害防治重点实验室, 农业农村部华北南部作物有害生物综合治理重点实验室,郑州 450002)

摘要:为地黄脱毒及防控瓜类褪绿黄化病毒(cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV),从河南省温 县、武陟县和禹州市3个主产区采集60份具有花叶、黄化和褪绿等典型症状的地黄病叶样品,利用 高通量测序技术对混合病样进行测定,利用CCYV-CPF/CPR和CCYV-P22F/P22R引物对60份样品 进行反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测,并利用9对 引物对侵染地黄的CCYV全基因组序列进行扩增和克隆,用DNAMAN 6.0软件对CCYV的分子变 异进行分析,利用MEGAX10.0软件构建系统发育树。结果显示,60份地黄病叶样品中检测出了 蚕豆萎蔫病毒2(broad bean wilt virus 2, BBWV2)、地黄花叶病毒(Rehmannia mosaic virus, ReMV)、 油菜花叶病毒(youcai mosaic virus, YoMV)和CCYV等病毒;在60份样品中,有22份样品中检测到 CCYV,检出率为36.7%;21个地黄分离物之间的CP基因核苷酸和氨基酸序列一致率分别为 99.3%~100.0%和98.4%~100.0%,与其他分离物之间的CP基因核苷酸和氨基酸序列一致率分别为 94.6%~100.0%和96.8%~100.0%,17个地黄分离物之间的P22基因核苷酸和氨基酸序列一致率分 别为98.4%~100.0%和96.3%~100.0%,与其他分离物之间的P22基因核苷酸和氨基酸序列一致率 分别为96.1%~100.0%和94.1%~100.0%;基于CP和P22基因核苷酸序列的系统发育树结果显示, CCYV不同分离物形成2个分支。CCYV地黄分离物的基因组包含RNA1和RNA2两个组分,全长 分别为8607nt和8041nt,共编码12个蛋白;CCYV地黄分离物基因组高度保守,与其他分离物基 因组RNA1和RNA2的核苷酸一致率均为99.7%~100.0%,基于基因组的系统发育树结果显示, CCYV地黄分离物的核苷酸序列与其他寄主上CCYV分离物的核苷酸序列聚为一个分支,而与毛 形病毒属Crinivirus的其他病毒分开。

关键词:地黄;瓜类褪绿黄化病毒;全基因组序列;系统进化分析;外壳蛋白

Complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis of the cucurbit chlorotic yellows virus infecting Chinese foxglove *Rehmannia glutinosa*

Qin Yanhong Wen Yi Liu Yuxia Gao Suxia Wang Fei* Lu Chuantao*

(Key Laboratory in Southern part of North China for Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Henan Key Laboratory of Crop Pest Control Integrated Pest Management, Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

Abstract: To develop virus-free Chinese foxglove *Rehmannia glutinosa* and control the cucurbit chlorotic yellows virus, 60 leaf samples with typical symptoms of mosaic, yellowing and chlorotic were collected from the main production region including Wenxian, Wuzhi and Yuzhou City of Henan Province.

基金项目:财政部和农业农村部国家中药材产业技术体系(CARS-B21),河南省中药材产业技术体系(Z2019-13-01) * 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: yunfeiren@163.com, chuantaolu@qq.com 收稿日期: 2022-08-27

Mixed samples were further analyzed with high-throughput sequencing (HTS). Sixty samples were detected by using RT-PCR with primer pairs CCYV-CPF/CPR and CCYV-P22F/P22R. The genomic nucleotide sequences of CCYV infecting R. glutinosa were amplified and cloned by using nine primer pairs. Molecular variability was analyzed by using DNAMAN 6.0 software and phylogenetic trees were constructed using MEGA X 10.0. The result of HTS showed that BBWV2, ReMV, YoMV and CCYV were detected from the 60 leaf samples of R. glutinosa from Henan Province. CCYV was detected from 22 of the 60 samples with a detection rate of 36.7%. The nucleotide and amino acid identities of CP gene were respectively 99.3%-100.0% and 98.4%-100.0% in 21 CCYV-Rg isolates, 94.6%-100.0% and 96.8%-100.0% between CCYV-Rg isolates and other isolates. The nucleotide and amino acid identities of P22 gene were respectively 98.4%-100.0% and 96.3%-100.0% in 17 CCYV-Rg isolates, 96.1%-100.0% and 94.1%-100.0% between CCYV-Rg isolates and other isolates. Phylogenetic analysis based on nucleotide sequences of CP and P22 genes demonstrated that these isolates were grouped into two clades. The genome of CCYV R. glutinosa isolate (CCYV-Rg) consist of two segments and the length of RNA1 and RNA2 segments are 8 607 and 8 041 nt, respectively. The genome encode 12 proteins and their nucleotide sequences are highly conserved. The CCYV-Rg isolate had 99.7%-100.0% (RNA1 and RNA2 segments) nucleotide identities with other isolates deposited in GenBank. Phylogenetic analysis based on genome showed that the nucleotide sequences of CCYV-Rg isolate was grouped into one cluster together with CCYV isolates from other hosts but not with other virus species in crinivirus.

Key words: *Rehmannia glutinosa*; cucurbit chlorotic yellows virus; complete genomic sequence; phylogenetic analysis; coat protein

地黄Rehmannia glutinosa为玄参科地黄属多年 生草本植物,以块根入药,具有滋阴补肾、清热凉血、 通血脉消瘀血的功效(陈君等,2018),为我国主要大 宗中药材之一。河南省焦作市(古怀庆府一带)是我 国重要的道地产区(黄璐琦和王永炎,2008),所产地 黄称为"怀地黄",药用成分含量高于其他地区,以质 优、效佳闻名于世。地黄主要靠无性繁殖方式进行 种植,病毒病危害非常严重,目前国内外地黄生成中 已报道的病毒有10种,包括蚕豆萎蔫病毒2(broad been wild virus 2, BBWV2)、地黄花叶病毒(Rehmannia mosaic virus, ReMV)(Zhang et al., 2008)、烟草 花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、黄瓜花叶病 毒(cucumber mosaic virus, CMV)、番茄花叶病毒 (tomato mosaic virus, ToMV)(刘舟等, 2018)、油菜 花叶病毒(youcai mosaic virus, YoMV)(张西梅, 2013; Kwon et al., 2018a)、车前草亚洲花叶病毒 (Plantago asiatica mosaic virus, PlAMV) (Kwak et al., 2018)、地黄病毒1(Rehmannia virus 1, ReV1) (Kwon et al., 2018b)、长叶车前草花叶病毒(ribgrass mosaic virus, RMV)(Kwak et al., 2020)和瓜类 褪绿黄化病毒 (cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV)(Zhang et al., 2021)等, 我国已报道了其中 的7种。病毒侵染后地黄地上部出现花叶、皱缩、褪绿、黄化和畸形等多种症状,地下部块根不生长、不膨大,造成地黄产量降低、品质下降和种性退化,严重影响地黄的生产和种植。张振臣等(2004)和 Zhang et al.(2008)研究表明侵染河南省地黄的主要病毒为TMV,通过对其全基因组序列分析确定该分离物为烟草花叶病毒属 Tobamovirus 的一个新种,将其命名为ReMV,该病毒在我国人工栽培地黄和野生地黄中普遍存在(杨玲等,2009)。河南省和山东省产区的地黄普遍感染了TMV和CMV(王敏等, 2006),北京市地黄被CMV和BBWV2复合侵染(周颖等,2010),山西省地黄中同时检测到了ReMV和 YoMV(张西梅,2013)。

2021年庄新建等(2021)首次发现在自然条件 下 CCYV 能侵染地黄,该病毒属于长线形病毒科 *Closteroviridae* 毛形病毒属 *Crinivirus* 的暂定种,靠 烟粉虱 *Bemisia tabaci* 以半持久方式传播(Okuda et al.,2010)。该病毒寄主范围较窄,主要侵染甜瓜、黄 瓜、西瓜、南瓜、丝瓜和西葫芦等多种葫芦科作物 (Gu et al.,2011;Bananej et al.,2013;刘放等,2021)。 CCYV 基因组由 RNA1和 RNA2 两条正义单链 RNA 组成,RNA1长度约为 8.6 kb,共有4个开放阅读框

(open reading frame, ORF), ORF1a 编码甲基转移酶 和RNA解旋酶, ORF1a通过移码策略得到 ORF1b, ORF1b 编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp), ORF2和ORF3分别编 码6kD蛋白(P6)和22kD蛋白(P22);RNA2长度约 为 8.0 kb, 共有 8 个 ORF, 依次编码 4.9 kD 蛋白 (P4.9)、70 kD 热激蛋白(heat shock 70 kD-like protein, Hsp70h)、P6、59 kD 蛋白(P59)、9 kD 蛋白 (P9)、外壳蛋白(coat protein, CP)、小外壳蛋白(minor coat protein, CPm)和26 kD蛋白(P26)这8个蛋 白。2010年,日本首次获得了CCYV甜瓜分离物的 全基因组序列(Okuda et al., 2010),随后中国(张汝 楠等,2012)、以色列(Luria et al.,2019)、美国(Kavalappara et al., 2021)等国家学者分别从甜瓜、黄瓜、 西瓜和西葫芦上得到了CCYV的全基因组序列(刘 珊珊,2013;干射香等,2019)。2021年,庄新建等 (2021)对CCYV地黄分离物的CP基因进行了克隆 和序列分析,但对该病毒在地黄田间的发生情况和 分布及其基因组特征和分子变异等未进行深入 研究。

为进一步明确 CCYV 在河南省地黄主产区的 分布情况,进而明确 CCYV 地黄分离物的基因组特 征和分子变异情况,本研究拟对河南省主产区感病 毒病地黄样品中 CCYV 进行高通量测序分析和反 转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测,拟克隆 CCYV 地黄分离物的全基因组序列,并对该病毒的基因组、 *CP*和*P22*基因进行分子变异和系统进化树分析,以 期为地黄脱毒及该病毒的防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料:2020年6—7月自河南省温县武 德镇(18份)和祥云镇(5份)、武陟县西陶镇(5份)和 大丰镇(15份)、禹州市张得镇(17份)共采集具有花 叶、黄化和褪绿等典型症状的地黄病叶样品60份, 分别命名为样品1~样品60,于-70℃冰箱中保存, 备用。以茎尖培养的脱毒地黄试管苗叶片为阴性对 照,脱毒地黄材料由温县天香农业科技有限公司 提供。

LB培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母提取物5g、氯 化钠 10 g,用NaOH 调pH至7.0,用去离子水定容至 1 L,于120 ℃高压蒸汽灭菌 25 min。

试剂及仪器:植物总RNA提取试剂盒、DNA胶

回收试剂盒和质粒小量抽提试剂盒,生工生物工程 (上海)股份有限公司; PrimeScript[™] 1st strand cDNA Synthesis Kit、LA *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、pMD19-T载体和DL5000分子量标准,宝生 物工程(大连)有限公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞TG1,本实验室制备;其他试剂均为进口 或国产分析纯。96-Well Thermal Cycler PCR 扩增 仪,美国 Thermo Fisher 公司;1-16K 离心机,德国 Sigma 公司;Tanon1600型凝胶成像系统,上海天能 科技有限公司;DYY-6D型电泳仪,北京六一生物科 技有限公司;NovaSeq 6000测序平台,美国 Illumina 公司。

1.2 方法

1.2.1 感染CCYV地黄病叶的高通量测序和分析

以60份地黄病叶片为样品,每份样品取少量叶 片进行混合,委托美因基因公司进行总RNA提取和 转录组文库构建。使用NovaSeq 6000测序平台对 混合样品进行高通量测序,对测序数据进行处理和 拼接,对拼接得到的 contigs 进行 BLAST 比对分析 和注释。

1.2.2 地黄病叶中CCYV的RT-PCR检测

为明确河南省主产区地黄上CCYV发生和分 布情况,分别利用CCYV-CPF/CCYV-CPR和CCYV-P22F/CCYV-P22R 两对引物(表1)对采集的每份地 黄病叶样品进行 RT-PCR 检测,引物均由生工生物 工程(上海)股份有限公司合成。每份称取地黄病叶 样品约0.1g,在液氮中研磨成粉末,按照植物总 RNA提取试剂盒说明书提取总RNA,于-70℃冰箱 中保存,备用。利用 PrimeScript[™] 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录, 10 µL 反转录体 系:5×PrimeScript Buffer 2 µL、10 mmol/L dNTP Mixture 1 µL , PrimeScript RTase 0.5 µL , RNase Inhibitor 0.25 µL、RNA模板1 µL、下游引物1 µL(分别 为 CCYV-CPR 或 CCYV-P22R),用 ddH,O 补足至 10 µL; 42 ℃保温 60 min, 16 ℃保温 5 min, 将 cDNA 于-20 ℃冰箱中保存,备用。以cDNA为模板进行 PCR 检测。20 µL PCR 反应体系: 2×Premix LA Taq DNA聚合酶10 µL、cDNA1 µL、上下游引物各0.5 µL, ddH,O补足至20 μL。PCR扩增条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性30 s,53 ℃退火30 s, CP和P22基 因均72 ℃延伸1 min,30个循环;72 ℃再延伸10 min, 4℃保存。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,利 用胶回收试剂盒对目的条带进行割胶纯化。按照 pMD19-T载体说明书将纯化的目的片段分别与

pMD19-T载体连接,连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞TG1中。挑取单菌落接种到LB培养基中,于37℃、220 r/min下摇培10~12 h,利用PCR筛选阳

性克隆,每个片段随机选取3~5个阳性克隆送至生 工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

	表1 用于扩增CCYV基因组、CP和P22基因序列的引物序列
Table 1	Primer sequences used to amplify CCYV genome, CP and P22 fragments

扩播上码	己物夕称	己物 定利(5′→3′)	日的世界十小
Amplified fragment	Primer name	Primer sequence $(5' \rightarrow 3')$	Expected size/bp
R1-1	R1-1F	GGAAATCAACACTCCTTCGTACG	2 660
	R1-2660R	CTGCCACAGCTTTCGGATGCATGTC	
R1-2	R1-2470F	GTTGTCGAGCACATGAAGATAAAG	2 510
	R1-4980R	GTCCATTAAGTCATTGTCAATAGTG	
R1-3	R1-4750F	GAAGTTACATGATGAGTTAGGAAGAG	2 540
	R1-7290R	CATCCTCTGCGCGTCTGGTGTCACTC	
R1-4	R1-6950F	GTTCACAGAGTACTTCACTAGATAC	1 660
	R1-8610R	GGCCTAGCTATACTAATAACTAGTC	
R2-1	R2-1F	GGAAATTATCCACGGTTTCCCCGAG	400
	R2-400R	GACAACAATGCAGGTACGTAGTAG	
R2-2	R2-240F	CGCCTGCCACTAAACAAGGCTTTAGTC	2 290
	R2-2530R	CAGACTGGACTGCATACGTGCAC	
R2-3	R2-2070F	GAGTTGGATTCGTGCATTGAGCCG	2 290
	R2-4360R	GTTACCTCTCAAATTAGCCCACTGTC	
R2-4	R2-4040F	CCAGTGATATACCACCACCACTGAG	2 430
	R2-6470R	CGGTTTAGGGACTGGTGGTACTGG	
R2-5	R2-5900F	ACAAGTTCAATAACACACACTCAC	2 140
	R2-8040R	GGCCTAGCTATGCTACTAACTAGTC	
СР	CCYV-CPF	CTCGATCTACATTAAATATGGAG	795
	CCYV-CPR	TCTTCATAAAAATCTTTGCTCTC	
P22	CCYV-P22F	CAACTACAGGAATATAGAAATAG	690
	CCYV-P22R	TGGATGCTATTACCGAAACAAC	

1.2.3 CCYV地黄分离物全基因组序列克隆

根据高通量测序拼接结果及GenBank中登录的CCYV其他分离物的全基因组序列设计了9对特异性引物(表1),引物均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。根据CCYV检测结果,选取样品60为材料,分别以R1-8610R或R2-8040R为引物进行反转录反应,反应体系及条件同1.2.2,分别利用R1-1F/R1-2660R、R1-2470F/R1-4980R、R1-4750F/R1-7290R、R1-6950F/R1-8610R、R2-1F/R2-400R、R2-240F/R2-2530R、R2-2070F/R2-4360R、R2-4040F/R2-6470R和R2-5900F/R2-8040R九对引物(表1)扩增CCYV地黄分离物的不同基因组片段,其中分4段克隆CCYV地黄分离物RNA1的全基因组序列,RT-PCR反应体系和条件同1.2.2。测序完成后,拼接获得CCYV地黄分离物的基因组全序

列,将序列提交至GenBank中。

1.2.4 地黄病叶中CCYV CP和P22基因序列分析

利用 DNAMAN 6.0 软件分别对地黄病叶中获 得的21个 CP 基因和17个 P22 基因与 GenBank 中登 录的其他寄主分离物进行核苷酸和氨基酸一致性比 对分析;利用 MEGA X 10.0 软件 (Kumar et al., 2018)以最大似然法分别构建基于 CP 和 P22 核苷酸 序列的系统发育树,进行 1 000 次 Bootstrap 重复 检验。

1.2.5 CCYV地黄分离物全基因组序列分析

利用 DNAMAN 6.0 软件对 CCYV 地黄分离物 与 GenBank 中登录的其他寄主分离物及同属其他 种病毒之间的全基因组序列核苷酸和氨基酸一致性 进行比对分析;利用 MEGA X 10.0 软件(Kumar et al., 2018)采用最大似然法分别构建基于基因组 RNA1 和 RNA2 核苷酸序列的系统发育树,进行 1000次Bootstrap 重复检验。

2 结果与分析

2.1 感染CCYV的地黄病叶转录组测序和分析

感染 CCYV 的地黄病叶经转录组测序,共获得 了 27 664 949 个 clean reads,组装获得了长度大于 200 bp 的 contigs 共 109 180 条,筛选到与病毒同源 的 contigs 共 53 条。BLAST 比对分析结果显示,与 BBWV2-RNA1 — 致性较高的 contigs 有 2条, — 致率 范围为 78.52%~95.28%,与 BBWV2-RNA2 — 致性 较高的 contigs 有 7条, — 致率范围为 84.35%~ 95.28%;与 ReMV — 致性较高的 contigs 有 6条, — 致 率范围为 97.10%~98.48%;与 YoMV — 致性较高的 contigs 有 3 条, 一致率范围为 95.34%~99.36%; 与 CCYV-RNA1和CCYV-RNA2一致性较高的contigs各 有2条, 一致率范围为 99.62%~100.00%, 表明河南省 地黄样品感染了 ReMV、BBWV2、YoMV 和 CCYV 等病毒, 同时还存在其他一些未确定分类地位的病 毒序列(未发表)。

2.2 地黄病叶中CCYV的检测

在60份样品中,有22份样品均扩增出了CCYV的CP基因(大小约为795 bp)和P22基因(大小约为690 bp)的目的条带,检出率为36.7%,且在温县、武陟县和禹州市3个主产区均有分布(表2)。随机选取条带较亮的21份样品的CP基因和17份样品的P22基因目的条带进行克隆测序。

表2	河南省地黄中	CCYV的RT-PCR检测结果

采样地点 Sampling location	采样时间 Sampling time	数量 Number	阳性样品数 No. of positive sample	检出率 Detectable rate/%
温县武德镇Wude Town, Wen County	2020-6-10	18	6	33.3
武陟县大丰镇Dafeng Town, Wuzhi County	2020-6-10	15	2	13.3
武陟县西陶镇Xitao Town, Wuzhi County	2020-6-10	5	0	0.0
温县祥云镇Xiangyun Town, Wen County	2020-7-08	5	4	80.0
禹州市张得镇Zhangde Town, Yuzhou County	2020-7-14	17	10	58.8

Table 2 RT-PCR detection of CCYV on Rehmannia glutinosa in Henan Province

2.3 地黄病叶中CCYV CP和P22基因序列分析

CP蛋白序列比对分析结果显示,21个CCYV 地黄分离物之间的核苷酸和氨基酸一致率分别为 99.3%~100.0%和98.4%~100.0%,与其他分离物之 间的核苷酸和氨基酸序列一致率分别为94.6%~ 100.0%和96.8%~100.0%;P22蛋白序列比对分析结 果显示,17个地黄分离物之间的核苷酸和氨基酸序 列一致率分别为98.4%~100.0%和96.3%~100.0%, 与其他分离物之间的核苷酸和氨基酸序列一致率分 别为96.1%~100.0%和94.1%~100.0%;综上所述,地 黄中CCYV的CP和P22基因高度保守,核苷酸一致 率在98.0%以上。

基于 CP 蛋白核苷酸序列的系统发育树分析结 果显示,CCYV 不同分离物形成2个分支,本研究的 21 个地黄分离物与来自美国、日本、以色列以及我 国其他地区甜瓜、西瓜、南瓜和西葫芦上的分离物聚 为一个分支,亲缘关系较近;来自伊朗的甜瓜和黄瓜 分离物聚为另一个分支(图1)。基于P22蛋白核苷 酸序列的系统发育树分析结果显示,CCYV 不同分 离物形成2个分支,本研究获得的17个地黄分离物 与来自美国、日本、以色列以及我国其他地区甜瓜、 西瓜、南瓜和西葫芦上的分离物聚为一个分支,亲缘 关系较近;来自沙特阿拉伯黄瓜和甜瓜上的3分离物形成另一个小分支(图2)。

2.4 CCYV地黄分离物全基因组序列克隆

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,获得了条带大小分别约为2660(RNA1-1)、2510(RNA1-2)、2540(RNA1-3)、1660(RNA1-4)、400(RNA2-1)、2290(RNA2-2)、2290(RNA2-3)、2430(RNA2-4)和2140 bp(RNA2-5)的目的条带(图3)。通过克隆、测序和拼接获得了CCYV地黄分离物的全基因组序列,该分离物RNA1和RNA2全长分别为8607 nt和8041 nt(GenBank登录号分别为MW768903和MW768903),编码的蛋白与CCYV其他分离物一致,RNA1分别编码ORF1a(5961 bp)、ORF1b(1518 bp)、P6(159 bp)和P22(567)4个蛋白,RNA2依次编码P4.9(132 bp)、Hsp70h(1671 bp)、P6(165 bp)、P59(1554 bp)、P9(240 bp)、CP(753 bp)、CPm(1425 bp)和P26(642 bp)8个蛋白。

2.5 CCYV地黄分离物全基因组序列及系统发育树

基于基因组 RNA1 的 BLAST 分析结果显示, CCYV地黄分离物(GenBank登录号为MW768903) 与来自北京黄瓜上的分离物(GenBank登录号为 JQ904628)和来自台湾甜瓜上的分离物(GenBank 登录号为JN641883)的一致率最高,均为99.98%。 基于基因组RNA2的BLAST分析结果显示,CCYV 地黄分离物(GenBank登录号为MW768904)与来自 山东甜瓜上的分离物(GenBank登录号为 MH819191)的一致率最高,为99.99%。CCYV地黄 分离物的全基因组序列与GenBank中登录的其他 寄主上12个分离物的全基因组序列的比对结果显示,CCYV地黄分离物与其他分离物之间RNA1和RNA2的核苷酸一致率均为99.70%~100.00%,表明不同寄主来源和不同地理分布的CCYV在基因组水平上高度保守。



— BYDV/NC010561/Phaseolus vulgaris/Spain

图中所列内容顺序为分离物名称/登录号/寄主/来源。

The order listed in figure is isolate name/accession no. /host/source.

图1 基于CP蛋白核苷酸序列采用最大似然法构建CCYV分离物的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of CCYV isolates constructed using maximum likelihood method based on the nucleotide sequences of CP



图中所列内容顺序为分离物名称/登录号/寄主/来源。The order listed in figure is isolate name/accession no. /host/source.

图2 基于P22蛋白核苷酸序列采用最大似然法构建CCYV分离物的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of CCYV isolates constructed using maximum likelihood method based on nucleotide sequences of P22



M: DL5000 marker; 1~9: 分别为RNA1-1~RNA1-4、RNA2-1~RNA2-5 扩增片段。 M: DL5000 marker; 1-9: amplified fragments of RNA1-1-RNA1-4 and RNA2-1-RNA2-5, respectively.

图3 CCYV地黄分离物基因组不同片段的RT-PCR产物

Fig. 3 RT-PCR products of different genomic segments of CCYV isolates from Rehmannia glutinosa

基于CCYV基因组RNA1核苷酸序列构建的系统发育树分析结果显示,CCYV地黄分离物与已报道的其他寄主上的12个CCYV分离物形成一个小分支,与毛形病毒属的其他12种病毒聚在不同分

支,各CCYV分离物与莴苣褪绿病毒(lettuce chlorosis virus, LCV)的亲缘关系较近(图 4-A)。基于 CCYV基因组RNA2核苷酸序列的系统发育树分析 也得到了相同的结果(图 4-B)。



图中所列内容顺序为分离物名称/登录号/寄主/来源。The order listed in figure is isolate name/accession no. /host/source.

图4 基于基因组RNA1(A)和RNA2(B)核苷酸序列采用最大似然法构建CCYV分离物的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic trees of CCYV isolates constructed using maximum likelihood method based on

nucleotide sequences of RNA1 (A) and RNA2 (B)

3 讨论

我国已报道地黄上存在BBWV2、ReMV、 TMV、CMV、ToMV、YoMV和CCYV等7种病毒(杨 玲等,2009;刘舟等,2018;庄新建等,2021),这些病 毒在田间常发生复合侵染,对地黄造成严重危害。 本研究利用高通量测序技术从河南省3个主产区的 地黄上检测到了ReMV、BBWV2、YoMV和CCYV 等多种病毒,进一步说明河南省地黄上普遍存在多 种病毒复合侵染的现象。近年来高通量测序技术已 被用于多种作物上的病毒检测(Maclot et al.,2020; Fitzpatrick et al.,2021)。与传统的血清学和PCR等 方法相比,该技术在对样品中病毒信息未评估的情 况下可对病组织内多种病毒和类病毒进行一次性检 测,还可检测出未知的新病毒(宋爽等,2021),具有 很大的优势和广泛的应用前景。

Zhang et al. (2021)利用高通量测序技术、RT-PCR 和酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等方法首次证明了在自然状 态下CCYV可侵染地黄,与其相比,本研究采样地 区更广,样品采集数量更多,首次获得了CCYV地 黄分离物的基因组序列,从基因组水平上探讨了其 分子变异和系统发育情况,明确了CCYV在河南省 地黄主产区的发生及分布情况。该病毒在河南省地 黄主产区发生较普遍,而CCYV的传播介体为烟粉 虱,随着全球气候变暖以及保护地大棚蔬菜的广泛 种植,该病毒的传播、发生和危害会逐年加重,且分 布越来越广泛,目前已在我国台湾(Huang et al., 2010)、北京(张汝楠等,2012)、湖南(唐鑫等,2017)、 河南和海南(刘珊珊,2013)、新疆(潘卫萍等,2017)、 上海(曾蓉等,2014)、山东(臧连毅等,2019)以及广 西(杨世安等,2017)等地的多种作物上检测到 CCYV。CCYV为地黄上新发现的病毒,应引起高 度重视,需对其进行持续的关注和监测。

目前我国已经从北京、河南、海南、山东、新疆等 省(区、市)黄瓜(干射香等,2019)、甜瓜(刘珊珊, 2013;臧连毅等,2019)、哈密瓜(彭斌等,2017)和西 葫芦上获得了CCYV的全基因组序列,通过对不同 寄主和地理来源的CCYV分离物全基因组进行比 对分析发现这些分离物的基因组大小均相同,全基 因组在核苷酸水平上高度保守,遗传变异很小,核苷 酸一致率均在99.00%以上。本研究首次从地黄上 获得了CCYV分离物的全基因组序列,比对分析结 果与彭斌等(2017)和臧连毅等(2019)等报道一致, 均表明CCYV群体遗传变异很小,这有利于抗性材 料的筛选和抗病毒品种的培育。

本课题组对河南省地黄上病毒病害进行调查时 发现地黄上存在花叶、褪绿、明脉、黄化和叶片扭曲 畸形等多种症状,且症状表现和病害严重度各不相 同,由于地黄存在多种病毒复合侵染的现象,这些症 状的产生是由哪些病毒引起的,CCYV单独侵染地 黄可造成什么症状,这些问题都有待进一步研究证 明。本研究从地黄上检测到多种已报道病毒和疑似 病毒新种的存在(未报道),下一步需增加样品采集 地区和采集数量,对采集样品进行分子检测,明确这 些病毒在地黄上病毒的发生、分布和危害情况,进而 明确不同产区地黄上的混合侵染情况和优势病毒; 对检测到的疑似病毒新种进行滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)、PCR等以获得其基因组 全序列,明确其基因组结构特征和分类地位等。

参考文献(References)

- 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
- Chen J, Ding WL, Cheng HZ. 2018. Medicinal plant protection. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, pp. 373 (in Chinese) [陈君, 丁万隆, 程惠珍. 2018. 药用植物保护学. 北京: 电 子工业出版社, pp. 373]
- Fitzpatrick AH, Rupnik A, O'Shea H, Crispie F, Keaveney S, Cotter P. 2021. High throughput sequencing for the detection and characterization of RNA viruses. Frontiers in Microbiology, 12: 621719
- Gan SX, Wu SH, Zhao WH, Tu LQ, Fan XY, Cheng ZB, Zhang SB, Zhu XP, Zhou YJ, Ji YH. 2019. Characterization of the genomic sequences of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucumber from Shandong Province. Acta Phytopathologica Sinica, doi: 10.13926/j.cnki.apps.000420 (in Chinese) [干射香, 吴淑华, 赵 文浩, 涂丽琴, 范小燕, 程兆榜, 章松柏, 竺晓平, 周益军, 季英 华. 2019. 瓜类褪绿黄化病毒山东黄瓜分离物基因组序列克隆 及特征分析. 植物病理学报, doi:10.13926/j.cnki.apps.000420]
- 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
- Huang LH, Tseng HH, Li JT, Chen TC. 2010. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucurbits in Taiwan. Plant Disease, 94(9): 1168
- Huang LQ, Wang YY. 2008. Research on medicinal plant germplasm resource. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, pp. 215 (in Chinese) [黄璐琦, 王永炎. 2008. 药用植物种质

资源研究.上海:上海科学技术出版社, pp. 215]

- Kavalappara SR, Milner H, Konakalla NC, Morgan K, Sparks AN, Mc-Gregor C, Culbreath AK, Wintermantel WM, Bag S. 2021. High throughput sequencing-aided survey reveals widespread mixed infections of whitefly-transmitted viruses in cucurbits in Georgia, USA. Viruses, 13(6): 988
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6): 1547–1549
- Kwak HR, Go WR, Hong SB, Kim JE, Kim M, Choi HS. 2020. Onestep multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four viruses infecting *Rehmannia glutinosa*. Journal of General Plant Pathology, 86(2): 143–148
- Kwak HR, Kim M, Kim J, Choi HS, Seo JK, Ko SJ, Kim JS. 2018. First report of *Plantago asiatica mosaic virus* in *Rehmannia glutinosa* in Korea. Plant Disease, 102(5): 1046
- Kwon SJ, Kim YB, Back CK, Chung BN. 2018a. First report of a mixed infection of *Youcai mosaic virus* and *Rehmannia mosaic* virus in *Rehmannia glutinosa* in Korea. Plant Disease, 102(2): 462
- Kwon SJ, Jin ML, Cho IS, Yoon JY, Choi GS. 2018b. Identification of *Rehmannia virus 1*, a novel putative member of the genus *Closterovirus*, from *Rehmannia glutinosa*. Archives of Virology, 163 (12): 3383–3388
- Liu F, Liu Y, Zhang DY, Liu JY, Li X, Dai LY, Tang QJ. 2021. Molecular and evolutionary analysis of cucurbit chlorotic yellows virus naturally infecting pumpkin. Acta Phytopathologica Sinica, 51 (1): 1–10 (in Chinese) [刘放, 刘勇, 张德咏, 刘嘉裕, 李迅, 戴良英, 唐前君. 2021. 瓜类褪绿黄化病毒自然侵染南瓜及分子进化分析. 植物病理学报, 51(1): 1–10]
- Liu SS. 2013. The molecular diversities analysis of melon chlorotic yellows pathogen and investigation of the disease occurrence rule. Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [刘珊珊. 2013. 甜瓜褪绿黄化病病原的分子 多样性分析及发生规律研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业 科学院]
- Liu Z, Peng QP, Xiang YY, Li LM. 2018. Damage and control of viral diseases on common medicinal plants in China. Plant Protection, 44(1): 9-19, 44 (in Chinese) [刘舟, 彭秋平, 向云亚, 李黎明. 2018. 我国常见药用植物病毒病的危害与防控. 植物保护, 44 (1): 9-19, 44]
- Luria N, Smith E, Sela N, Koren A, Lachman O, Dombrovsky A. 2019. Insights into a watermelon virome contribute to monitoring distribution of whitefly-borne viruses. Phytobiomes Journal, 3(1): 61–70
- Maclot F, Candresse T, Filloux D, Malmstrom CM, Roumagnac P, van der Vlugt R, Massart S. 2020. Illuminating an ecological blackbox: using high throughput sequencing to characterize the plant virome across scales. Frontiers in Microbiology, 11: 578064

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

- Pan WP, Zhang YH, Ji YL. 2017. *Melon chlorotic yellow virus* disease occurred for the first time in Turpan. Vegetables, (2): 60-61 (in Chinese) [潘卫萍, 张以和, 吉艳玲. 2017. 吐鲁番首次发生甜 瓜褪绿黄化病毒病. 蔬菜, (2): 60-61]
- 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]
- Song S, Zhang L, Sun PP, Li ZN. 2021. Surveys and molecular characterization of Ligustrum virus A isolated from *Syringa oblata* in Hohhot and Harbin. Journal of Plant Protection, 48(3): 645–651 (in Chinese) [宋爽, 张磊, 孙平平, 李正男. 2021. 水蜡 A 病毒在 呼和浩特市和哈尔滨市紫丁香上的发生及其基因组分子特征 分析. 植物保护学报, 48(3): 645–651]
- Tang X, Zhang DY, Li F, Yan F, Zhou XG, Zhang YJ, Shi XB, Liu Y. 2017. The first report and the epidemical dynamic 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]
- Wang M, Li MF, Huang LQ, Chen YF, Wu ZG, Li GF, Wei MS, Fang RX. 2006. TMV and CMV widely infect cultivated *Rehmannia glutinosa* Libosch. Acta Phytopathologica Sinica, 36(2): 189– 192 (in Chinese) [王敏, 李明福, 黄璐琦, 陈燕芳, 吴志刚, 李桂 芬, 魏梅生, 方荣祥. 2006. 栽培地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)普遍感染 TMV和 CMV. 植物病理学报, 36(2): 189–192]
- Yang L, Zhang ZC, Zhang RY. 2009. Molecule detection of *Rehmannia mosaic virus*. Journal of Henan Agricultural Sciences, 38(4): 77–78 (in Chinese) [杨玲, 张振臣, 张荣意. 2009. 地黄花叶病毒的 分子检测. 河南农业科学, 38(4): 77–78]
- Yang SA, Li ZB, Qin BX, Xie HT, Cui LX, Su Q, Deng TJ, Cai JH. 2017. Molecular detection and identification of three viruses 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]
- Zang LY, Sun XH, Su WM, Zhang XP, Liu XY, Zhu XP. 2019. Amplification and analysis of whole genome sequence of cucurbit chlorotic yellows virus from Shandong Province, China. Journal of Plant Protection, 46(6): 1195–1202 (in Chinese) [臧连毅, 孙晓 辉, 苏文敏, 张先平, 刘晓莹, 竺晓平. 2019. 瓜类褪绿黄化病毒 山东分离物全基因组序列扩增及分析. 植物保护学报, 46(6): 1195–1202]

Zeng R, Xu LH, Gu HF, Lu JP, Dai FM. 2014. Prokaryotic expression

of coat protein of cucurbit chlorotic yellows virus and its antiserum preparation. Chinese Agricultural Science Bulletin, 30(22): 276-281 (in Chinese) [曾蓉, 徐丽慧, 顾海峰, 陆金萍, 戴富明. 2014. 瓜类黄化褪绿病毒上海分离物外壳蛋白的原核表达及 其抗血清的制备. 中国农学通报, 30(22): 276-281]

- Zhang K, Zhuang XJ, Guo X, Xu HM, He Z, Chen JH. 2021. Cucurbit chlorotic yellows virus infecting *Rehmannia glutinosa* was detected in China. Plant Disease, 105(10): 3310
- Zhang RN, Li YY, Li DW, Yu JL, Han CG. 2012. Characterization of the genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus* isolated from Beijing. The Annual Meeting of the Chinese Society of Plant Pathology in 2012. Beijing: China Agriculture Press, pp. 628 (in Chinese) [张汝楠, 李源源, 李大伟, 于嘉林, 韩成贵. 2012. 瓜类褪绿黄化病毒 CCYV北京分离物基因组序列分析. 中国植物病理学会 2012年学术年会论文集.北京: 中国农业 出版社, pp. 628]
- Zhang XM. 2013. Identification and analysis of complete genomic sequence of virus isolates infecting *Rehmannia glutinosa* and *Atractylodes macrocephala* Koidz. Master thesis. Taigu: Shanxi Agricultural University (in Chinese) [张西梅. 2013. 地黄和白术 病毒病病原检测及病毒全基因组序列测定与分析. 硕士学位 论文. 太谷: 山西农业大学]

- Zhang ZC, Lei CY, Zhang LF, Yang XX, Chen R, Zhang DS. 2008. The complete nucleotide sequence of a novel *Tobamovirus*, *Rehmannia mosaic virus*. Archives of Virology, 153(3): 595–599
- Zhang ZC, Zhang LF, Qiao Q, Wang YJ, Jin XL. 2004. Identification of viral pathogens of *Rehmannia glutinosa* disease in Henan Province. Acta Phytopathologica Sinica, 34(5): 395–399 (in Chinese) [张振臣, 张丽芳, 乔奇, 王永江, 靳秀兰. 2004. 河南省地 黄病毒病初步鉴定. 植物病理学报, 34(5): 395–399]
- Zhou Y, Zhang R, Guo S, Huai X, Fan ZF, Zhou T. 2010. Molecular identification of viral pathogens inducing *Rehmannia glutinosa* mosaic disease in Beijing. Journal of Plant Protection, 37(5): 447-452 (in Chinese) [周颖, 张瑞, 郭颂, 怀晓, 范在丰, 周涛. 2010. 北京地区地黄花叶病病原的分子鉴定. 植物保护学报, 37(5): 447-452]
- Zhuang XJ, Guo X, Ding SW, Dong ZZ, He Z, Zhang K. 2022. Identification and CP sequences analysis of cucurbit chlorotic yellows virus from *Rehmannia glutinosa* in Wenxian County, Henan Province. Acta Phytopathologica Sinica, 52(2): 296–300 (in Chinese) [庄新建, 郭枭, 丁诗文, 董卓倬, 贺振, 张坤. 2022. 河南 温县地黄上瓜类褪绿黄化病毒的鉴定及其CP序列分析. 植物 病理学报, 52(2): 296–300]

(责任编辑:张俊芳)