

安徽省太和县瓜类褪绿黄化病毒自然侵染南瓜的检测分析

陈莹¹, 韩科雷¹, 章东方¹, 顾江涛¹, 高正良², 郭志³, 严丹侃^{1*}, 王芳^{4*}

(1. 安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 安徽合肥 230031; 2. 安徽省农业科学院院北研究院, 安徽太和 236600; 3. 安徽果致农业发展有限公司, 安徽太和 236600; 4. 安徽省农业科学院烟草研究所, 安徽合肥 230031)

摘要 采集安徽省太和县南瓜具有典型症状的病叶样品进行 RT-PCR 检测鉴定, 并结合测序结果确定为 CCYV。为了更加明确安徽太和地区 CCYV 的来源和序列的变异情况, 测定了该病毒的外壳蛋白 (coat protein, CP) 序列进行系统发育分析, 结果表明, 此次安徽太和所检测到的分离物与我国其他地区的分离物以及以色列、日本和希腊等国家存在较小的地域差异性, 亲缘关系较近, 而与伊朗地区的分离物亲缘关系相对较远。该研究是安徽省 CCYV 侵染南瓜的首次报道, 以期为该病害的预警和防控提供理论基础和科学对策。

关键词 南瓜; 瓜类褪绿黄化病毒; 系统发育分析

中图分类号 S436.42 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)16-0159-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.16.042



开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

Detection and Analysis of Cucurbit Chlorotic Yellow Virus Naturally Infecting Pumpkin in Taihe, Anhui Province

CHEN Ying, HAN Ke-lei, ZHANG Dong-fang et al (Institute of Plant Protection and Agro-Products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

Abstract We collected samples of diseased leaves with typical symptoms for RT-PCR detection and identification, and combined the sequencing results to determine that it was CCYV. In order to more clarify the source and sequence variation of CCYV in Taihe, Anhui Province, the coat protein (CP) sequence of the virus was determined for phylogenetic analysis. The results showed that the isolates detected in Taihe, Anhui Province were relatively close to isolates from other areas of China, Israel, Japan, and Greece. The relationship with the isolates in Iran was relatively distant. This study was the first report of CCYV infestation of pumpkins in Anhui Province, in order to provide a theoretical basis and scientific countermeasures for the early warning and prevention of the disease.

Key words Pumpkin; Cucurbit chlorotic yellows virus; Phylogenetic analysis

瓜类褪绿黄化病毒 (cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV) 属于长线性病毒科 (Closteroviridae) 毛形病毒属 (*Crinivirus*), 由 2 种类型的烟粉虱 (B 型和 Q 型) 半持久性传播^[1-2], 不能够通过摩擦接种传播。CCYV 在自然条件下可侵染多种瓜类作物, 如西瓜、甜瓜、黄瓜和南瓜等^[3-6]。CCYV 最早是 2004 年日本学者在一个甜瓜的温室大棚中发现, 但其基因组序列是 2010 年才被鉴定出来^[5]。我国 2019 年被首次报道 (湖南省) CCYV 在自然条件下侵染南瓜。虽然该病毒是毛形病毒属近几年新加入的成员, 但其危害范围较广, 蔓延速度较快, 在伊朗^[7]、黎巴嫩^[8]、希腊^[9]和苏丹^[10]等国家均有发生危害, 此外在我国如上海^[11]、台湾^[12]、山东^[13]、新疆^[4]、河南和海南^[14]等地也均有报道。CCYV 主要危害瓜类作物的叶片, 症状表现为花叶、黄化和卷曲等, 严重时导致整株坏死, 颗粒无收^[15]。

目前关于 CCYV 可以侵染南瓜的报道不多, 调查发现在安徽太和县温室内发生在南瓜上的 CCYV 侵染十分严重, 该病毒侵染南瓜后植株叶片表现出褪绿畸形, 无法结出果实, 严重影响了该地南瓜的产量和品质, 造成大量的经济损失。因此, 为了明确安徽省太和县 CCYV 侵染南瓜的发生情况和遗传变异等问题, 笔者利用 RT-PCR 的方法对其 CP 序列进

行扩增检测, 并将本地的分离物与其他地区已报道的分离物进行系统发育分析, 为安徽省太和县 CCYV 发生情况和病害防控提供了数据支撑。这是继我国湖南省报道的 CCYV 可以在自然条件下侵染南瓜后的第二次报道, 同时这是安徽省 CCYV 可以在自然条件下侵染南瓜的首次报道。

1 材料与方法

1.1 样品采集 2020 年 10 月, 在安徽省太和县旧县镇精准扶贫就业基地的南瓜温室中, 南瓜表现出大面积的叶片褪绿、黄化、坏死及植株矮化等症状, 造成整个温室的南瓜颗粒无收, 采集具有典型病毒病症状的带毒样品, 对其样品进行编号后置于液氮中速冻, 并保存于 -80 °C 超低温冰箱, 待进行后续实验室内检测鉴定。

1.2 检测方法

1.2.1 RT-PCR 检测。根据该基地温室中南瓜叶片的发病症状以及温室大棚中出现烟粉虱等传毒介体, 推测其可能受 CCYV 的侵染, 因此根据 NCBI 中所报道的 CCYV CP 序列设计特异性引物, 进行 RT-PCR 检测。将采集的带毒样品进行充分研磨后, 参照 TIANGEN 植物总 RNA 提取试剂盒 RNAPrep Pure Plant Kit 进行植物总 RNA 提取, 然后根据 Evo M-MLV 反转录试剂盒 II 说明书操作 (购于艾科瑞生物有限公司), 对所提取的 RNA 样品进行反转录。以反转录合成的 cDNA 为模板, 利用 2×Mix (购于北京艾德莱生物有限公司) 进行 RT-PCR 扩增检测。上游引物 CCYV-CP-F: 5'-CGTAAGTGATCGCAATCAAT-3'; 下游引物 CCYV-CP-R: 5'-AGTGATCACTTGACCATCTCC-3'。扩增片段长度为 876 bp。反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个

基金项目 安徽省蔬菜产业体系 (AHCYJSTX-09-12); 安徽省农业科学院科研团队 (2020YL058, 2020YL070)。

作者简介 陈莹 (1994—), 女, 辽宁辽阳人, 研究实习员, 硕士, 从事植物病毒学研究。* 通信作者: 严丹侃, 助理研究员, 硕士, 从事植物病毒与媒介昆虫研究; 王芳, 副研究员, 博士, 从事植物病毒学研究。

收稿日期 2020-11-30

循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物送至南京生工生物技术有限公司测序,测序结果通过 BLAST 进行比对。

1.2.2 系统发育分析。采用 MEGA 7.0 软件进行系统发育分析,使用邻接法 (neighbor-joining) 建树,Bootstrap replications 中输入 1 000,序列比对时选择氨基酸 (amino acid),由此完成建树^[16]。



图1 安徽省太和县 CCYV 侵染南瓜的典型症状

Fig.1 Typical symptoms of pumpkin infected by CCYV in Taihe, Anhui Province

2.2 CCYV 的 RT-PCR 检测鉴定 将采集的 4 组表现病毒病症状的样品进行病毒检测,根据合成的 CCYV 特异性引物进行 RT-PCR 验证,检测结果发现,采集的 4 组样品中,有一组样品检测出相应条带,条带大小为 876 bp(图 2)。PCR 产物通过测序后,确定为瓜类褪绿黄化病毒。通过 Blast 比对后,CCYV CP 序列全长 753 bp,编码 250 个氨基酸,且发现该次检测到的 CCYV CP 序列与登录号为 KY400633.1、KX118632.1、LT716000.1、JQ904629.1、MH819191.1 和 JN126046.1 的 CP 序列完全一致。该分离物 CP 核苷酸序列与其他地区已报道的分离物核苷酸序列同源性在 94.82%~99.87%,这是安徽省 CCYV 自然侵染南瓜的首次报道,后续对于该基地南瓜的发病情况也会持续调查和研究。

2.3 CCYV 的 CP 序列系统发育分析 为明确安徽省太和南瓜 CCYV 的分类地位以及与各地区所报道的同种病毒不同寄主之间的亲缘进化关系,将检测到的 CCYV CP 序列结合已报道的 29 个 CCYV CP 序列进行系统发育分析,并将 bean yellow disorder virus 分离物(登录号:EU191905.1)作为外群一起构建系统发育树(图 3)。结果发现,CCYV 的不同分离物在不同地区具有一定的地理特征。中国各地区的分离物与日本、塞浦路斯、以色列和希腊地区的分离物差异较

2 结果与分析

2.1 CCYV 发生情况 对安徽省太和县旧县镇精准扶贫就业基地的南瓜温室进行了调查分析。温室内南瓜产区病毒病发生十分严重,并出现烟粉虱等传毒介体,受病毒病侵染的南瓜叶片表现为褪绿黄化、皱缩、畸形、坏死,且植株矮化,不结果实。典型症状见图 1。

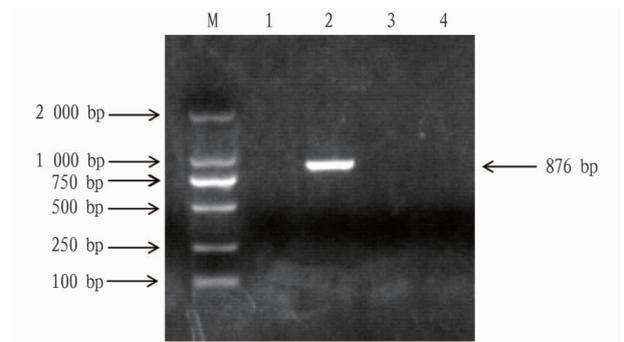


图2 安徽省太和县 CCYV CP 序列电泳检测结果

Fig.2 Electrophoresis results of CCYV CP in Taihe, Anhui Province

小,亲缘关系较近,而与伊朗地区的分离物亲缘关系较远,分别属于 2 个不同的分支。此外有些 CCYV 分离物虽然来源于同一地区,但由于发生的寄主植物不同,在分类地位上也存在一定的差异,如山东省在西瓜和丝瓜上所报道的 CCYV 分离物处于不同的分支。

3 结论与讨论

瓜类褪绿黄化病毒作为长线形病毒科 (Closteroviridae) 毛形病毒属 (*Crinivirus*) 的新成员,近几年对瓜类等葫芦科作

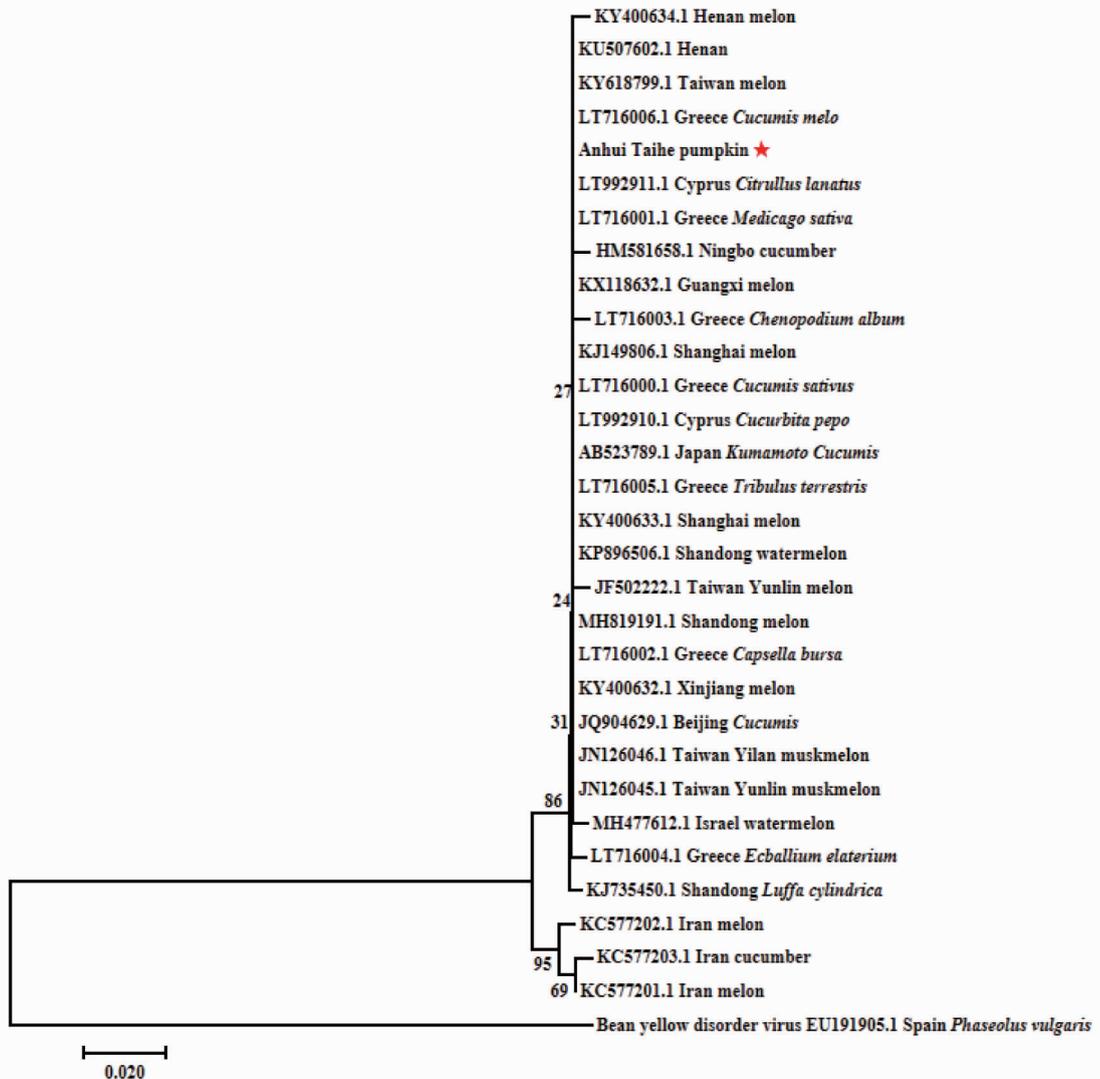


图3 基于 CCYV CP 序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on CCYV CP sequences

物造成较严重的侵害和损失^[15]。自 2010 年 CCYV 被日本首次报道^[5], 同年在我国台湾地区也检测到该病毒^[12], 随后在 2011 年我国山东省、浙江省和上海市的西瓜、甜瓜和黄瓜上均检测到 CCYV, 且病害发生率在 50%~100%^[17-18], 给农业生产造成了严重损失。该研究通过 RT-PCR 检测, 确定安徽省太和县南瓜上暴发的病毒为 CCYV, 这是安徽省 CCYV 侵染南瓜的首次报道。通过对 CCYV CP 序列与其他地区的分离物同源性进行比对分析, 结果表明此次检测到的 CCYV 分离物与已报道的 6 个其他分离物核苷酸同源性为 100%, 登录号分别为 KY400633.1、KX118632.1、LT716000.1、JQ904629.1、MH819191.1 和 JN126046.1。核苷酸序列与伊朗地区的分离物同源性较差, 为 94.82%~95.09%, 与其他地区已报道的分离物核苷酸同源性为 97.79%~99.87%。构建系统进化树发现, 该地区所检测的分离物与我国其他地区的分离物亲缘关系密切, 与伊朗地区分离物亲缘关系较远。太和县旧县镇精准扶贫就业基地作为安徽省重要的农产品扶贫产业区, 南瓜生产遭受 CCYV 危害十分严重, 主要表现为南瓜叶片褪绿黄化皱缩畸形, 影响果实生长, 造成严重的经济

损失。2014 年苏丹地区报道了 CCYV 能够自然侵染南瓜^[19], 但在 2019 年湖南省首次发现并报道了 CCYV 能够自然侵染南瓜^[6]。因此, 结合近几年各地 CCYV 的发生蔓延情况和基于该次调查的结果, 应引起 CCYV 对南瓜生产方面的重视, 积极有效地采用防治措施加以防治。同时安徽 CCYV 与已报道的 CCYV 基因组核苷酸和氨基酸序列变异较小, 表明未来在抗性品种的选育方面可能较容易找到适合各地的抗病性设计靶标, 该试验结果旨在为 CCYV 的防控和抗性育种等方面提供理论参考。

参考文献

- [1] 古勤生, 彭斌, 刘珊珊, 等. 瓜类新病毒病害(一): 瓜类褪绿黄化病[J]. 中国瓜菜, 2011, 24(3): 32-33.
- [2] LI J J, LIANG X Z, WANG X L, et al. Direct evidence for the semipersistent transmission of *Cucurbit chlorotic yellows virus* by a whitefly vector[J]. Scientific reports, 2016, 6: 1-8.
- [3] WINTERMANTEL W M, JENKINS HLADKY L L, FASHING P, et al. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting melon in the new world [J]. Plant disease, 2019, 103(4): 778.
- [4] 潘卫萍, 张以和, 吉艳玲. 吐鲁番首次发生甜瓜褪绿黄化病毒病[J]. 蔬菜, 2017(2): 60-61.

表 3 实际样品比对测试结果

Table 3 Actual sample comparison test results

编号 No.	本底值 Background value//mg/L	加标量 Standard addition mg/L	测定值 Measured value//mg/L			相对标准偏差 RSD//%
			硅酸镁提纯的显色剂 Chromogenic reagent for purification of magnesium silicate//mg/L	丙酮溶剂体系标液 Acetone solvent system standard solution//mg/L	标准方法 Standard method mg/L	
1	未检出	0.20	0.23	0.22	0.21	3.7
2	未检出	0.20	0.22	0.21	0.22	2.2
3	未检出	0.20	0.22	0.22	0.22	0
4	0.04	0.20	0.26	0.26	0.26	0
5	0.03	0.20	0.24	0.23	0.25	3.4

注:部分实际样品未检出三氯乙醛,为比对不同方法的结果一致程度,加标 5 μg 后测定

Note:No trichloroacetaldehyde was detected in some actual sample.To compare the results of different methods,the standard was added 5 μg for determination

3 结论与讨论

用硅酸镁替代四氯化碳作为吡唑啉酮显色剂的提纯剂,有较好的提纯效果且基本不影响显色能力。新配制的显色剂则具有更低的空白值和更佳的显色能力。二者在测试实际样品时结果无显著差异。鉴于此,建议实验室在条件允许的情况下,优先选用新配制的显色剂。若环境、试剂、成本等条件不允许,可用硅酸镁吸附剂对久置不超过 30 d 的显色剂进行过滤提纯,也可明显降低空白值,从而提高测定的灵敏度,满足分析测试的要求。

用丙酮溶剂中的三氯乙醛标准溶液成品代替手工配制水系三氯乙醛标准溶液,有效避免了因三氯乙醛试剂挥发或聚合对准确度带来的影响,且提高了分析工作的便利程度。用该标准溶液绘制校准曲线,验证方法的检出限、精密度和准确度均与标准方法相当,测试实际样品结果与标准方法一致性高。朱连华等^[12]在三氯乙醛待测液中加入丙酮作为共存物,当加入量为 7 898 μg (折算成体积为 10 mL)时,对测定结果无明显影响。该研究中使用的丙酮溶剂体系的三氯乙醛标准溶液成品体积为 1 mL,稀释 100 倍配制成标准使用液后丙酮含量极低,各项方法指标和实际样品测试结果表明其对测定确无明显影响,满足分析测试要求。

上述 2 个测试环节的改进,找到了四氯化碳禁用后进行显色剂提纯的替代方案,简化了三氯乙醛标准溶液的准备过

程,提升了监测工作的便利性。方法灵敏度、精密度、准确度与标准方法相当,环保、可操作性强,符合基层工作实际,易于推广,可满足农田灌溉水的监测需求,适合各级监测机构了解水质状况和开展监督监测。

参考文献

- [1] 王德荣,赵静,米长虹,等.灌溉水中三氯乙醛的标准分析方法——吡唑啉酮分光光度法[J].农业环境与发展,1998(2):25-26.
- [2] 窦争霞,王安康.我国农业环境的污染及其研究进展[J].中国农学通报,1988,4(1):19-22.
- [3] 生态环境部,国家市场监督管理总局.农田灌溉水质标准:GB 5084—2021[S].北京:生态环境部环境标准研究所,2021.
- [4] 马庆岩,张亨.三氯乙醛的分析检测研究进展[J].氯碱工业,2012,48(10):36-39.
- [5] 金人海,朱敏,武振国,等.萃取法脱除废硫酸中三氯乙醛的研究[J].郑州工学院学报,1988,9(1):34-37.
- [6] 国家环境保护总局,《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法[M].4版.北京:中国环境科学出版社,2002:609-610.
- [7] 李迎芳,袁明浩,王静,等.气相色谱-质谱法测定水中三氯乙醛[J].河南科学,2011,29(10):1175-1177.
- [8] 国家环境保护总局.水质 三氯乙醛的测定 吡唑啉酮分光光度法:HJ/T 50—1999[S].北京:中国环境科学出版社,1999.
- [9] 解慧欣.光度法测定水中三氯乙醛的改进[J].环境监测管理与技术,1999,11(5):34.
- [10] 程洁,邢书才,徐琳.三氯乙醛环境标准样品的稳定性研究[J].干旱环境监测,2003,17(4):193-194.
- [11] 陈绍华.吡唑啉酮分光光度法测定水中三氯乙醛的方法研究[J].安徽农业科学,2013,41(17):7533-7534.
- [12] 朱连华,袁倩.地面水中水合三氯乙醛的比色分析[J].中国环境监测,1987,3(1):232-235.
- [12] HUANG L H, TSENG H H, LI J T, et al. First Report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucurbits in Taiwan [J]. *Plant disease*, 2010, 94(9):1168.
- [13] 臧连毅,孙晓辉,苏文敏,等.瓜类褪绿黄化病毒山东分离物全基因组序列扩增及分析[J].植物保护学报,2019,46(6):1195-1202.
- [14] 刘珊珊,彭斌,吴会杰,等.海南省和河南省发生甜瓜褪绿黄化病的分子鉴定[J].果树学报,2013,30(2):291-293.
- [15] ABRAHAMIAN P, SOBH H, SEBLANI R, et al. Co-infection of two criniviruses and a begomovirus enhances the disease severity in cucumber [J]. *European journal of plant pathology*, 2015, 142(3):521-530.
- [16] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 bigger datasets [J]. *Molecular biology and evolution*, 2016, 33(7):1870-1874.
- [17] ZENG R, DAI F M, CHEN W J, et al. First Report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting melon in China [J]. *Plant disease*, 2011, 95(3):354.
- [18] GU Q S, LIU Y H, WANG Y H, et al. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in China [J]. *Plant disease*, 2011, 95(1):73.
- [19] MOHAMMED H S, ZICCA S, MANGLI A, et al. Identification and phylogenetic analysis of common pumpkin viruses in Sudan [J]. *Journal of plant pathology*, 2014, 96(1):77-84.

(上接第 161 页)

- [5] OKUDA M, OKAZAKI S, YAMASAKI S, et al. Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus *Crinivirus* [J]. *Phytopathology*, 2010, 100(6):560-566.
- [6] 刘放,刘勇,张德咏,等.瓜类褪绿黄化病毒自然侵染南瓜及分子进化分析[J].植物病理学报,2021,51(1):1-10.
- [7] BANANEJ K, MENZEL W, KIANFAR N, et al. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucumber, melon, and squash in Iran [J]. *Plant disease*, 2013, 97(7):1005.
- [8] ABRAHAMIAN P E, SOBH H, ABU-JAWDAH Y. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* on cucumber in Lebanon [J]. *Plant disease*, 2012, 96(11):1704.
- [9] ORFANIDOU C, MALIOGKA V I, KATIS N I. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in Greece [J]. *Plant disease*, 2014, 98(10):1446-1447.
- [10] HAMED K, MENZEL W, DAFALLA G, et al. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting muskmelon and cucumber in Sudan [J]. *Plant disease*, 2011, 95(10):1321.
- [11] 曾蓉,徐丽慧,顾海峰,等.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[J].中国农学通报,2014,30(22):276-281.