

黄瓜绿斑驳花叶病毒辽宁营口分离物基因组测定及分段基因克隆

李立梅^{1#}, 毛 赫^{1#}, 左彤彤¹, 赵秀香², 刘庆珍¹, 吴元华^{2*}

(1. 吉林省林业科学研究院, 长春 130033; 2. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110886)

摘要 黄瓜绿斑驳花叶病毒 *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) 是葫芦科作物的重要检疫性病毒。本研究以田间自然感病的西瓜叶片为试材, 采用 RT-PCR 获得该病毒 (CGMMV-LNYK) 基因组全长 (登录号 MG745849), 以 pBluescript II SK(-) 为载体, 分别克隆其所编码的 4 段基因, 并采用人工接种验证它们的体外侵染活性。结果表明: 该病毒与韩国分离物 KW (登录号 AF417242) 亲缘关系最近, 相似度达 99.8%, 并成功克隆了 CGMMV-LNYK 编码的 4 段基因, 分别记为 RNA1~RNA4。经人工接种, 发现 RNA1 和 RNA4 能侵染葫芦, 表现明显花叶症状, 与该病毒接种葫芦症状一致, 且接种 RNA1 后的症状较 RNA4 明显, 4 种 RNA 混合接种症状最为明显, 经 RT-PCR 检测, 发病植株可扩增到与接种的 RNA 大小相等的片段。

关键词 黄瓜绿斑驳花叶病毒; 基因组全长; 克隆

中图分类号: S 436.421 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2018222

Genome sequencing and segmental gene cloning of *Cucumber green mottle mosaic virus* isolate from Yingkou city, Liaoning province

LI Limei¹, MAO He¹, ZUO Tongtong¹, ZHAO Xiuxiang², LIU Qingzhen¹, WU Yuanhua²

(1. Jilin Provincial Academy of Forestry Science, Changchun 130033, China;

2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110886, China)

Abstract *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) is an important quarantine virus of cucurbits. In this study, the complete nucleotide sequence of the virus (GenBank accession no. MG745849) was obtained by RT-PCR in the naturally infected watermelon leaves. The four gene fragments encoded by the CGMMV were cloned into pBluescript II SK(-) containing T7 promoter, respectively, and the invasive activity *in vitro* was verified by artificial inoculation. The results showed that the CGMMV was most closely related to the KW (GenBank accession no. AF417242) isolated from Korea, with an identity of 99.8%. The 4 infectious gene fragments of the CGMMV were successfully constructed and the segments RNA1 and RNA4 could infect cucurbits and cause obvious systemic mosaic in leaves. Moreover, the symptoms caused by the segment RNA1 were more severe than those by RNA4 after artificial inoculation. The symptoms were most obvious when the four segments of RNA inoculated at the same time. The RNA fragment amplified in diseased plants was equal in length to the inoculated viral RNA by RT-PCR.

Key words *Cucumber green mottle mosaic virus*; full length of genome; clone

黄瓜绿斑驳花叶病毒 *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) 是葫芦科作物的重要病毒, 西瓜感染该病毒后植株生长缓慢, 果实内部严重变色或腐烂, 果肉纤维化、水渍状, 严重时丧失食用价

值, 俗称西瓜倒瓢病或血瓢病^[1]。CGMMV 给葫芦科作物生产带来严重影响, 1998 年在韩国大面积暴发, 造成 463 hm² 绝收^[2]; 2004 年在巴基斯坦部分地区葫芦科作物发病率达 46.9%^[3]; 2005 年中国辽

收稿日期: 2018-05-25 修订日期: 2018-11-28

基金项目: 辽宁省科技攻关项目 (2006215003)

* 通信作者 E-mail: wyh@vip.sina.com

为并列第一作者

宁省盖州市由于种子带毒而导致西瓜大面积感染 CGMMV,发生面积 333 hm²,其中 13 hm² 绝收^[4],引起农业部、质检总局等相关部门的高度重视。根据我国农业部公布的《全国农业植物检疫性有害生物分布行政区名录(2014)》,辽宁、上海、江苏、浙江、安徽、山东、湖北、湖南、广东、广西、海南等 11 个省市 74 个县市区均有 CGMMV 分布。迄今对于该病毒的致病机理研究多集中在生理生化水平,Adzhemyan 等研究认为黄瓜感染该病毒后可导致植株体内可溶性糖和游离氨基酸含量的积累^[5];Srivastava 等研究表明该病毒可通过影响磷酸戊糖途径,导致多酚氧化酶活性发生改变,进而导致酚类物质积累^[6]。本研究首先测定了 CGMMV 国内首发区的基因组全长序列,然后依据全基因组序列分别克隆了该病毒编码的 4 段基因,旨在找到可侵染寄主植物的基因,为今后该病科学有效的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试毒原及载体

自然感病的西瓜植株采自辽宁省营口市,田间表现症状为叶片斑驳、花叶、叶脉绿带状、浓绿凹凸斑,经 RT-PCR 检测,定名为 CGMMV-LNYK,采用汁液摩擦法繁殖保存在防虫温室的葫芦上;侵染性克隆载体为 pBluescript II SK(-)载体。

1.1.2 试剂

TRIzol 试剂购自 Invitrogen;LA Taq Polymerase、pMD18-T simple vector、感受态细胞 DH5 α 、限制性内切酶 *Not* I 和 *Xho* I、TaKaRa PrimeScript[®] 1st strand cDNA synthesis kit (Code No. D6110A)、TaKaRa High Fidelity PrimeScript[™] RT-PCR Kit (Code No. DR027A)、TaKaRa PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Code No. DR010S)、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (Code No. DV805A)、TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0、TaKaRa *in vitro* Transcription T7 Kit (Code No. D6140)、TaKaRa DNA Ligation Kit<Mighty Mix>(Code No. D6023)等购自宝生物工程(大连)有限公司;Ribo m7G Cap Analog (Promega Code: P171B)购自 Promega 生物技术有限公司。

1.1.3 引物的设计与合成

引物序列参考陈红运等^[7],委托宝生物工程(大连)有限公司合成(表 1)。

表 1 CGMMV-LYNK 基因组序列测定的引物
Table 1 Primers for determination of CGMMV-LNYK genomic sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence
CGMMV-P1	GTTTTAATTTTATAATTAACAAA-CAACAACAACA
CGMMV-1116r	GCTTCGCTTCAGGAAACCACACAG
CGMMV-1096f	AAAGCCACGTTTTCTGTGTGGT
CGMMV-3488r	GTTCTGCATTAATTGCTATTTGG
CGMMV-3382f	GCGGATGTGGAAAAGGTCGATCA
CGMMV-5935r	GCGGTACCTTGTGAAGCAACTAG
CGMMV-cpf	ATGGCTTACAATCCGATCAC
CGMMV-3'NCR	TGGGCCCTACCCGGGA

获得全长基因后,依据该病毒的基因组结构设计引物(表 2),并采用巢氏 PCR 分别扩增并克隆病毒所编码的 4 段基因。

表 2 CGMMV 编码的 4 段基因的引物
Table 2 Primers for determination of four gene fragments encoded by the CGMMV

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence
ORF1-F1	CAACAACAACAACAACATT
ORF1-F2	CGACTCGAGATGGCAAACATTAATGAACA
ORF1-R1	TCATTCTTAATCAAAGCGGG
ORF1-R2	TATGCGGCCGCTATTTGGTAGGCACAGTGG
ORF1-F528	CTGTGCGGTACCTGTTTCAG
ORF1-F1447	GGTGATTGCGTCTATGATGC
ORF1-F2022	CTGGGCAGAGAAAGGTAAGG
ORF1-F2588	GAGTGCCGGGTTGTGGAAAG
ORF1-R1614	CGAACAAATCATCACCGGAA
ORF4-R1	ATTACTGCCATAGAAACTT
ORF2-F1	AGGTTTGATTGCCGTGATT
ORF2-F2	GTACTCGAGATGAATTCGCTGTATGTCCA
ORF2-R1	ACACCACGCGACAACTTGAC
ORF2-R2	TTAGCGGCCGCTTACTTAGAGACATCTATGT
ORF2-F446	GGGCTAGTTCCATTCAAAGT
ORF3-F1	ACGGCTGTATTGTTTACCCT
ORF3-F2	ACTCTCGAGATGCTCTAAGTAAGGTGTCAG
ORF3-R1	CCTGACGGGAACATAAGAAG
ORF3-R2	TAAGCGCCGCCTAGGTGTGATCGGATTGTAAG
ORF4-F1	CGCGATCCTTGGTCTTTATT
ORF4-F2	CATCTCGAGATGGCTTACAATCCGATCACAC
ORF4-R1	ATTACTGCCATAGAAACTT
ORF4-R2	AATGCGGCCGCTAAGCTTTTCGAGGTGGTAG

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 扩增

参照 Invitrogen 公司的 TRIzol 法提取植物总

RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性后, 以提取的植物总 RNA 为模板, 使用 TaKaRa PrimeScript® 1st strand cDNA synthesis kit 合成 cDNA, 采用 LA Taq Polymerase 进行扩增, 预计扩增片段分别为 1.1、2.4、2.5、0.7 kb, PCR 产物经 DNA 回收试剂盒纯化后克隆于 pMD 18-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后经蓝白斑筛选阳性克隆, 送宝生物工程(大连)有限公司进行双向测序, 以确定正确的碱基序列。

1.2.2 病毒的提纯和电镜观察

病毒提纯程序参考裘维蕃^[8]的方法, 病毒提纯后采用负染法观察, 将铜网在样品液滴上悬浮 3~5 min, 吸去多余的液体, 再经 2% 磷钨酸 (pH7.0) 进行负染色 3~5 min, 自然干燥后在透射电镜下观察药剂处理不同时间下病毒粒子的形态。

1.2.3 基因克隆

依据所获得的全基因组序列设计引物, 以 CGMMV 营口分离物的总 RNA 为模板, 利用 TaKaRa High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit 进行反转录, 引物使用 TaKaRa 5'-Full RACE Kit (D315) 中的 Random 9 mers; 获得 cDNA 后, 采用巢氏 PCR 分别克隆 CGMMV 编码的 4 个开放阅读框, 第一步 PCR 使用 TaKaRa PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 进行扩增, 引物为 ORF1/ORF2/ORF2/ORF4/-F1 和 ORF1/ORF2/ORF2/ORF4/-R1, 获得的 PCR 产物进行第二步 PCR 扩增, 引物为 ORF1/ORF2/ORF3/ORF4/-F2, ORF1/ORF2/ORF2/ORF4/-R2, PCR 产物使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 切胶回收; 回收产物引入酶切位点 *Not* I 和 *Xho* I, 将所得的 4 个片段分别连入 pBlue-script II SK(-) 载体, 经 *Not* I 和 *Xho* I 酶切后, 使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 载体回收, 使用 TaKaRa DNA Ligation Kit <Mighty Mix> 中的连接酶, 将回收后的目的片段与 pBlue-script II SK-/*Not* I/ *Xho* I, 16℃, 过夜连接; 感受态细胞 DH5 α 制备好后, 将产物转化至大肠杆菌, 然后使用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 提取质粒, 每个片段分别选择两个阳性克隆质粒, 命名为 ORF1-1、ORF1-2、ORF2-1、ORF2-2、ORF3-1、ORF3-2、ORF4-1、ORF4-2。先分别使用引物 BcaBEST Primer M13-20 (TaKaRa Code No. D3881) 和 M13 Reverse (TaKaRa Code No. D3830)

对所选质粒进行测序, 之后使用引物 ORF1-F528、ORF1-R1614、ORF1-F1447、ORF1-F2022、ORF1-F2588 将 ORF1-1、ORF1-2 测通, 使用引物 CTD041-F446 对 ORF2-1、ORF2-2 测通。

1.2.4 体外转录

使用 *Sac* I 进行单酶切, 将目的质粒线性化, 使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 回收酶切产物, 酶切产物进行体外转录, 反应体系如下: *Sac* I 酶切产物 3 μ L, 10 $\times$ Transcription Buffer 2 μ L, ATP Solution (50 mmol/L) 2 μ L, UTP Solution (50 mmol/L) 2 μ L, CTP Solution (50 mmol/L) 2 μ L, GTP Solution (稀释至 10 mmol/L) 2 μ L, Ribo m⁷G Cap Analog (40 mmol/L) 2 μ L, RNase 抑制剂 (40 U/ μ L) 0.5 μ L, T7 RNA 聚合酶 (50 U/ μ L) 2 μ L, RNase Free dH₂O 定容至 20 μ L, 上述体系中加入 4 μ L (即 20U) DNase I, 37℃ 反应 1 h, 然后进行纯化 (去除残留的 DNA), 纯化的操作流程为: 加入 30 μ L 3 mol/L CH₃COONa (pH5.2), 加 DEPC 水至 300 μ L, 混匀; 加入 300 μ L PCI (苯酚、氯仿、异戊醇, 比例为 25:24:1), 室温静置 15 min, 12 000 g, 离心 5 min; 加入 300 μ L CI (氯仿、异戊醇, 比例为 24:1), 室温静置 10 min, 12 000 g, 离心 5 min, 加入 3 μ L NA Carrier, 混匀, 加入 300 μ L 异丙醇, 冰浴 10 min, 12 000 g, 离心 5 min, 加入 1 mL 70% 预冷乙醇, 洗涤, 12 000 g, 离心 1 min, 室温干燥后溶于 16.5 μ L RNase Free dH₂O 中, 分别标记为 RNA1、RNA2、RNA3、RNA4。

1.2.5 体外侵染

将获得体外转录物 RNA1、RNA2、RNA3、RNA4 排列组合, 进行体外侵染, 以期确定是哪段基因, 或者哪几段基因共同完成该病毒的侵染。接种方法: 体外转录物与等体积的 2 $\times$ GKP pH9.2 缓冲液 (50 mmol/L 甘氨酸, 30 mmol/L K₂HPO₄, 1% 膨润土, 1% 硅藻土) 混合为接种液, 取生长良好, 一叶一心的葫芦 *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl (品种: ‘不死鸟’), 将灭菌的石英砂均匀撒于待接种叶片上, 每叶用 10~20 μ L 接种液 (内含 0.2 μ g 病毒), 轻轻涂抹叶片, 5 min 后用无菌水冲洗。接种后的植株生长于防虫的生长箱中, 温度为 25℃, 保持 12 h 光照, 观察症状, 于接种 21 d 后取样, 进行 RT-PCR 检测, 以接种 CGMMV 为阳性对照, 以接种 2 $\times$ GKP pH9.2 缓冲液为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 CGMMV 全基因序列的测定

2.1.1 RNA 的提取与检测

取产自辽宁省营口盖州地区的西瓜叶片样品 5 份,提取总 RNA,取 1 μ L 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1:图中所示 3 条带,分别为 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA,所提的 RNA 完整性很好,没有发生降解,可以用于下一步的试验。

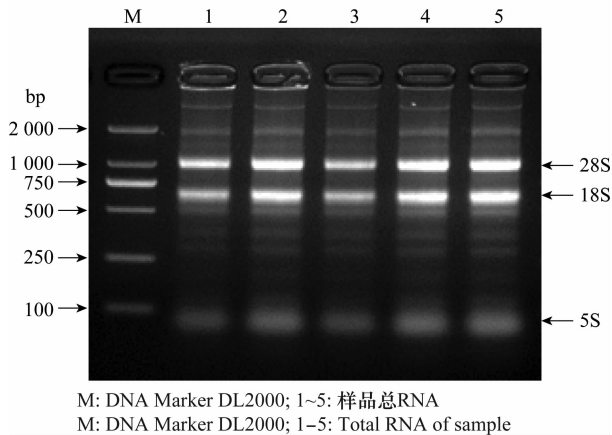


图 1 西瓜叶片总 RNA 的电泳分析结果
Fig. 1 Electrophoresis results of total RNA from the leaves of watermelon

2.1.2 RT-PCR 检测及全基因组序列测定

以植物总 RNA 为模板,利用 4 对引物通过 RT-PCR 扩增得到 4 条特异 DNA 片段,大小约为 1.1、2.4、2.5 和 0.7 kb,与预期扩增结果相符,且扩增得到 4 个特异片段相互重叠,覆盖了 CGMMV 的完整基因组。产物克隆后经蓝白斑筛选,进行双向测序。经比对,该分离物与韩国分离物(登录号 AF417242)亲缘关系最近,相似度达 99.8%,与日本的 SH 株系、韩国的甜瓜分离物及印度 Delhi 地区的分离物的亲缘关系亦较近,但与俄罗斯 CGM-MV-MC 及西班牙 CGMMC-SP 分离物亲缘关系稍远,同源性仅为 90%。

2.2 CGMMV-LNYK 分段基因克隆

2.2.1 CGMMV 的提取及病毒总 RNA 的提取

经磷钨酸负染色后在电镜下观察发现,病毒粒子直棒状,长约 300 nm,宽约 18 nm (图 2)。取病毒的 RNA 1 μ L,进行 3% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 3,检测结果表明,所提的 RNA 完整性很好,没有发生降解,可用于下一步的克隆试验。

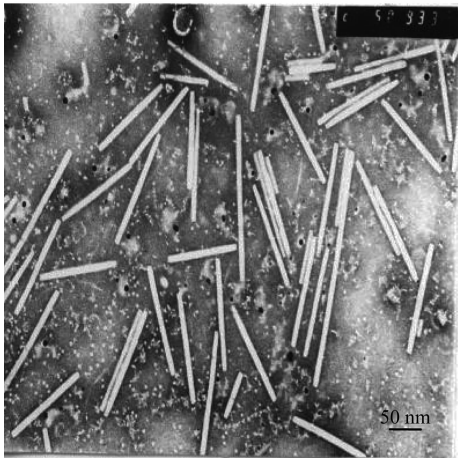


图 2 CGMMV 病毒粒子透射电镜照片
Fig. 2 Transmission electron microscope photograph of CGMMV virions

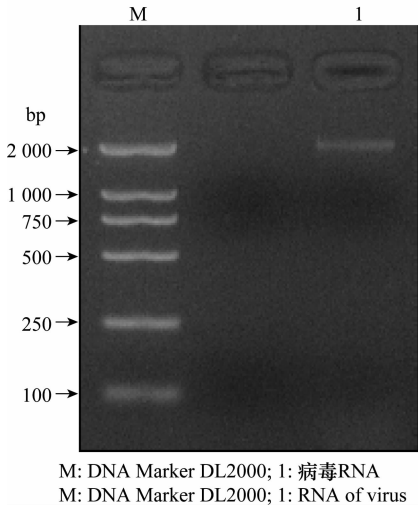


图 3 病毒 RNA 的电泳分析结果
Fig. 3 Electrophoresis of total RNA

2.2.2 RT-PCR 扩增结果

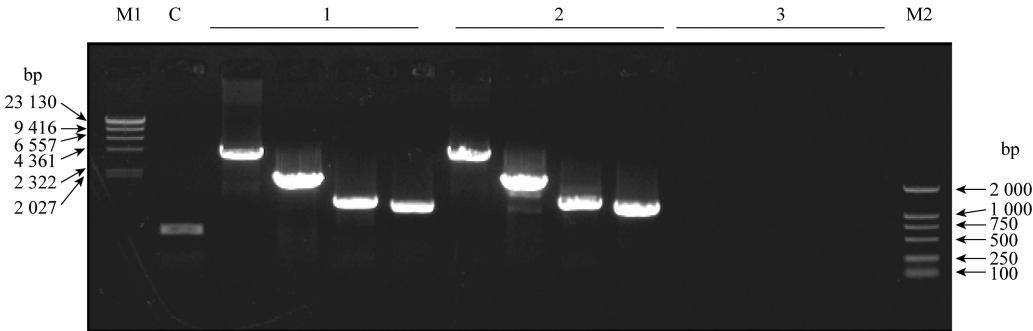
第一步 RT-PCR 扩增后,取 5 μ L PCR 产物,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 4,将第一步 PCR 产物采用相同的反应体系和反应条件,进行第二步 PCR 扩增,取 5 μ L 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 5,分别得到了大小约为 3.5、1.5、0.8、0.5 kb 的片段,与预期的大小相符,纯化后克隆,上述各 PCR 产物经 *Not* I / *Xho* I 双酶切后,切胶回收得到相应大小的目的片段。

2.2.3 重组载体的构建

通过 PCR 扩增分别得到片段 D1(3.5 kb)、D2(1.5 kb)、D3(0.8 kb)、D4(0.5 kb),与预期的大小相符,片段 D1、D2、D3、D4 PCR 产物回收酶切后分

别连接至 pBluescript II SK (-)载体,筛选出质粒重组子,并测序以验证插入序列的正确性,使用 DAN-

MAN 软件进行比对,克隆得到的序列与原分离物一致,并未发现突变,可以用于下一步的体外转录。



M1: DNA Marker λ -Hind III digest; M2: DNA Marker DL2000; C: 对照; 1: PCR产物(引物为Random 9 mers); 2: PCR产物(引物为Random 9 mers+ORF4-R1); 3: 阴性对照(Random 9 mers+ORF4-R1, 未加入RTase)。下同
M1: DNA Marker λ -Hind III digest; M2: DNA Marker DL2000; C: Control; 1: Product of PCR (Random 9 mers); 2: Product of PCR (Random 9 mers+ORF4-R1); 3: Negative control (Random 9 mers+ORF4-R1, RTase-). The same below

图 4 第一步 PCR 产物电泳图谱

Fig. 4 Analysis of first-step PCR products by electrophoresis

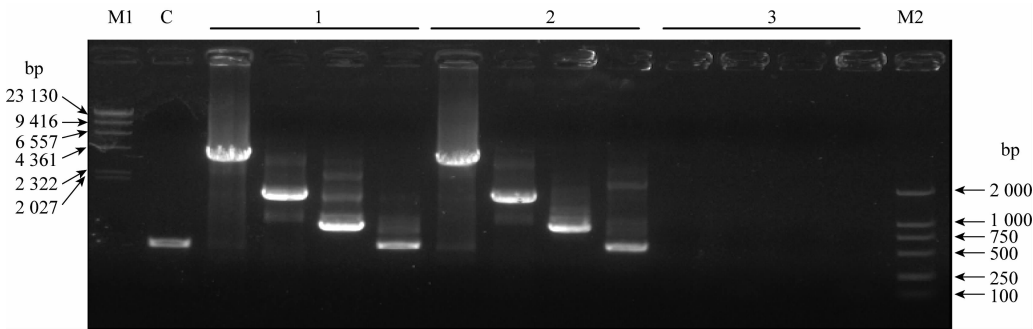


图 5 第二步 PCR 产物电泳图谱

Fig. 5 Analysis of second-step PCR products by electrophoresis

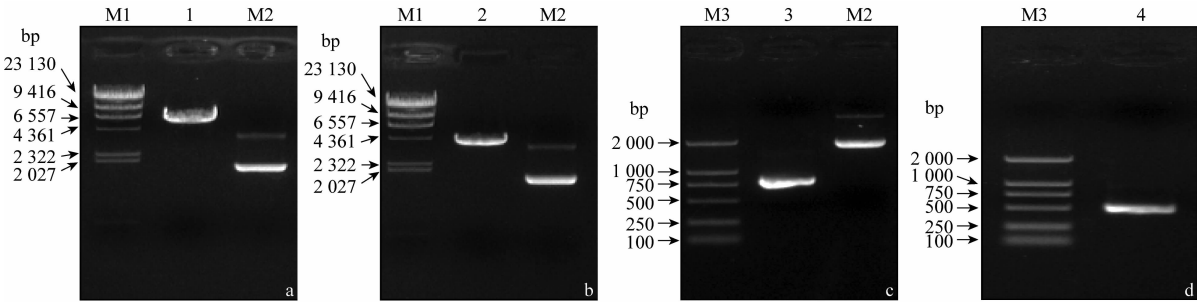
2.3 体外转录

2.3.1 酶切产物回收

克隆得到的目的片段用 *Sac* I 酶切后,用电泳

检测确已切开。分别命名为 pCGMMV-1、pCGM-

MV-2、pCGMMV-3、pCGMMV-4(图 6a~d)。



M1: DNA Marker λ -Hind III digest; M2: Marker 200 ng; M3: DNA Marker DL2000; 1: pCGMMV-1; 2: pCGMMV-2; 3: pCGMMV-3; 4: pCGMMV-4

图 6 P1~P4 酶切线性化后电泳检测结果

Fig. 6 Analysis of P1-P4 after linearized with *Sac* I by electrophoresis

2.3.2 体外转录产物电泳检测

以线性化的 pCGMMV 为模板,采用加帽的方法进行体外转录,电泳发现,条带不唯一,这其中有可能还在线性化的模板,也有可能是 RNA 体外转录时出现了二级结构,但均得到了目的大小的条

带,可以用于体外侵染。分别命名为 RNA1、RNA2、RNA3、RNA4。(图 7a~d),同时使用 Nanodrop 超微量可见紫外分光光度计进行浓度检测,浓度分别为 1 105、1 380、1 320、1 190 ng/ μ L。

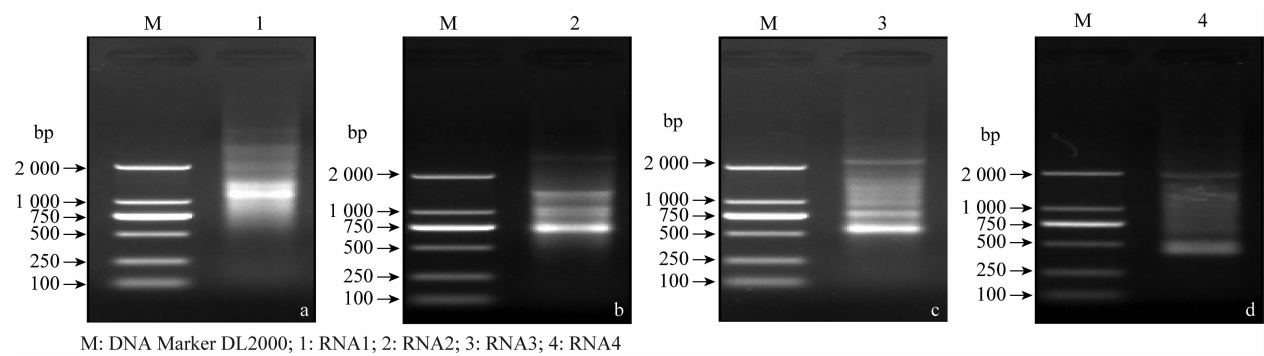


图 7 pCGMMV-1~pCGMMV-4 体外转录物电泳分析结果

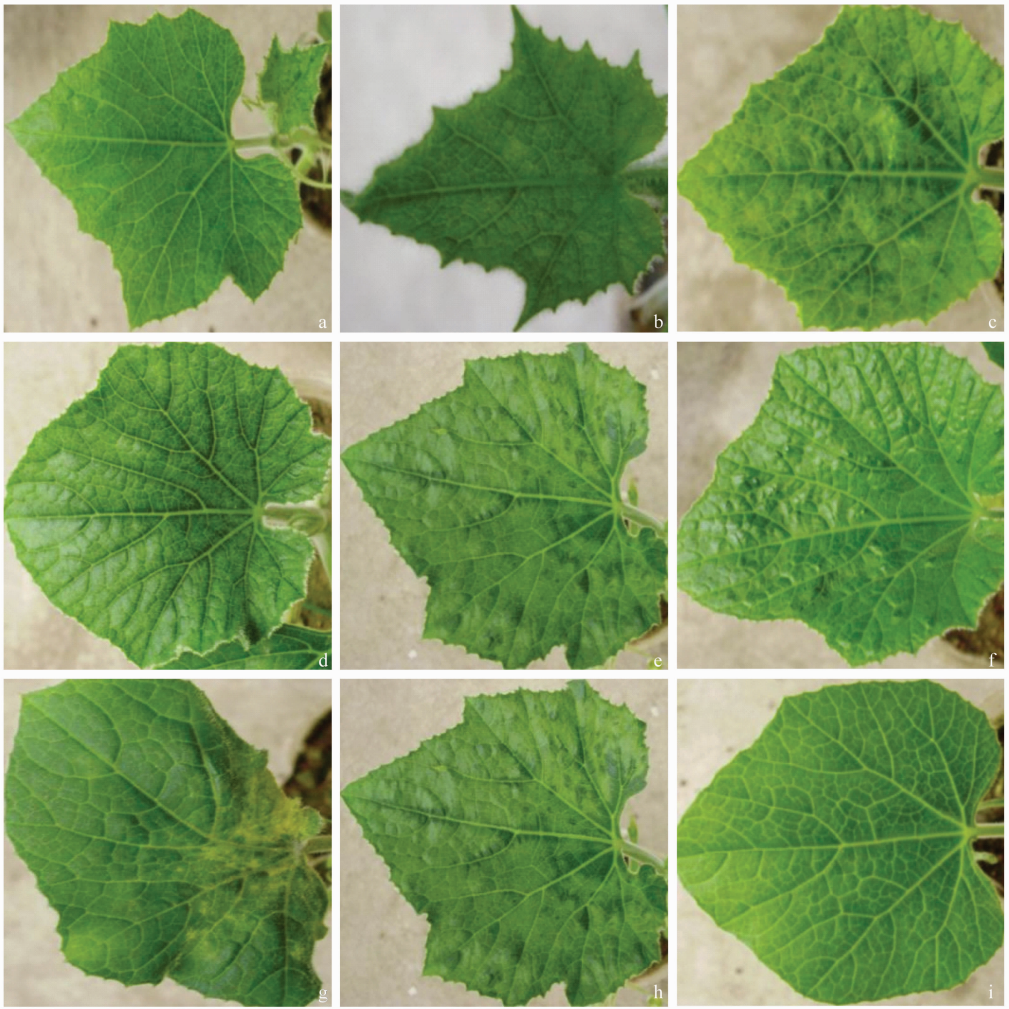
Fig. 7 Electrophoresis of transcription of pCGMMV-1—pCGMMV-4 *in vitro*

2.4 体外侵染

2.4.1 症状观察

分别接种经体外转录获得的 4 种 RNA 及 4 种 RNA 的排列组合到葫芦苗上, 接种 15 d 后, 发现接

种 RNA1、RNA4 及含有 RNA1、RNA4 组合的葫芦苗出现了不同程度的花叶症状, 接种含有 RNA1 的处理比含有 RNA4 的症状明显, 其中含有 4 种 RNA 处理的症状最明显, 叶片出现坏死斑点(图 8a~i)。



a: RNA1; b: RNA4; c: RNA1+RNA4; d: RNA2+RNA4; e: RNA1+RNA2; f: RNA1, RNA2+RNA4; g: RNA1, RNA2, RNA3+RNA4; h: CGMMV; i: CK

图 8 不同 RNA 处理葫芦叶片症状图

Fig. 8 Symptoms of cucurbit leaves under different treatments with RNA

2.4.2 RT-PCR 检测

对所有接种植株取样后进行 RT-PCR 检测,发病植株中可检测到与 RNA1 和 RNA4 大小相等的片段,而未发病植株未扩增到目的片段。

3 结论与讨论

CGMMV 是重要的种传病毒,在我国多个葫芦科作物种植区造成了不同程度的危害。辽宁省营口市盖州是我国 CGMMV 发生最早的地区,导致的经济损失巨大。核苷酸序列提供了病毒之间亲缘关系的重要信息。此前,国内对 CGMMV 亲缘关系的研究大多是基于其外壳蛋白的核酸序列,李红霞等^[9]报道的 CGMMV 的外壳蛋白序列分析显示,国内不同地区、不同寄主的 CGMMV 分离物的外壳蛋白基因序列差异较小,同源率为 97.5%~99.8%。本研究通过对辽宁省主要西瓜产区 CGMMV 西瓜分离物基因组的同源性分析显示,辽宁省营口市盖州的 CGMMV 分离物与日本、韩国报道的 CGMMV 分离物亲缘关系较近,尤其是韩国西瓜分离物,充分说明辽宁省内发生的 CGMMV 与日本、韩国等报道的 CGMMV 可能有共同的流行病学意义上的侵染源,进一步佐证了我国的 CGMMV 由日本、韩国引种传入的推断。

植物 RNA 病毒侵染性克隆由 Ahlquist 等^[10]在雀麦花叶病毒 *Brome mosaic virus* (BMV)首次报道,至今国外已有烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV)、马铃薯 X 病毒 *Potato virus X* (PVX)、烟草脆裂病毒 *Tobacco rattle virus* (TRV)等大量的植物病毒被成功地构建了全长 cDNA 侵染性克隆^[11-14]。RNA 病毒的 cDNA 侵染性克隆技术的发展,使人们可以在 DNA 水平上开展 RNA 病毒的分子生物学研究,将植物病毒侵染性克隆改造成病毒载体,可以用于外源基因在植物上的大量表达,为深入研究 RNA 病毒与寄主的相互作用机制提供了有效手段^[15]。本研究以 CGMMV-LNYK 为模板,分别将该病毒所编码的 4 段基因克隆至 pBluescript II SK(-)载体,并在体外完成转录,验证各段基因的侵染活性,通过体外侵染,自然条件下,通过伤口 RNA2 和 RNA3 不能成功侵染葫芦, RNA1 和 RNA4 可侵染葫芦,发病症状和 CGMMV 自然条件下侵染葫芦一致,从人工接种发病的葫芦中检测的基因序列和原病毒序列相似性为 100%,符合柯赫氏法则 (Koch's Rule),而关于该病毒的报道,大部分报道猜想 RNA1 参与该病毒的复制, RNA4 为该

病毒的外壳蛋白。本研究成功获得可体外侵染的 RNA1 和 RNA4,初步证实这两段基因直接导致寄主植物表现典型的花叶症状,但哪段基因与西瓜倒瓤直接相关,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] AL-SHAHWAN I M, ABDALLA O A. A strain of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) from bottlegourd in Saudi Arabia [J]. *Journal of Phytopathology*, 1992, 134(2): 152-156.
- [2] CHOI G S. Occurrence of two tobamovirus diseases in cucurbits and control measures in Korea [J]. *Plant Pathology Journal*, 2001, 17(5): 243-248.
- [3] ALI A, NATSUAKI T, OKUDS S. Identification and molecular characterization of viruses infecting cucurbits in Pakistan [J]. *Journal of Phytopathology*, 2004, 152(11): 677-682.
- [4] 陈红运,赵文军,程毅,等. 辽中地区西瓜花叶病病原的分子鉴定 [J]. *植物病理学报*, 2006, 36(4): 306-309.
- [5] ADZHEMYAN L A, GEVORKYAN Z G, AMIRKHANYAN V A. Changes in sugars and free amino acids in cucumber during infection by some virus diseases [J]. *Biologicheskii Zhurnal Armenii*, 1976, 29(1): 91-94.
- [6] SRIVASTAVA A K, TIWARI C B. Polyphenoloxidase activity as influenced by CGMMV infected cucumber [J]. *Journal of Living World*, 1998, 5(1): 7-10.
- [7] 陈红运,林石明,陈青,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒辽宁分离物全基因组序列测定 [J]. *病毒学报*, 2009, 25(1): 68-72.
- [8] 裴维蕃. 植物病毒学 (修订版) [M]. 北京: 农业出版社, 1984: 253-270.
- [9] 李红霞,白静,陈红运,等. 南瓜果实中黄瓜绿斑驳花叶病毒病的 RT-PCR 检测及 CP 基因序列分析 [J]. *植物检疫*, 2007, 21(5): 268-270.
- [10] AHLQUIST P, FRENCH R, JANDA M, et al. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81(22): 7066-7070.
- [11] RATCLIFF F, MARTIN-HERNANDEZ A M, BAULCOMBE D C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing [J]. *The Plant Journal*, 2001, 25(2): 237-245.
- [12] GOODIN M M, DIETZGEN R G, SCHICHNES D, et al. pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves [J]. *The Plant Journal*, 2002, 31(3): 375-383.
- [13] LU R, MALCUIT I, MOFFETT P, et al. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance [J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(21): 5690-5699.
- [14] LINDBO J A. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors [J]. *BMC Biotechnology*, 2007, 7: 52.
- [15] HUANG C J, QIAN Y J, LI Z H, et al. Virus-induced gene silencing and its application in plant functional genomics [J]. *Science China Life Sciences*, 2012, 55(2): 99-108.

(责任编辑: 田 喆)