

网络出版时间:2018-09-06 17:30

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.03.006

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180906.1723.012.html

番木瓜环斑病毒海南南瓜分离物全基因组序列分析

车海彦,曹学仁,罗大全

(中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所,海南 海口 571101)

【摘要】 【目的】研究海南南瓜上番木瓜环斑病毒(*Papaya ringspot virus*, PRSV)的全基因组特征及系统进化情况,为南瓜病毒病的综合防控提供依据。【方法】通过 DAS-ELISA 和 RT-PCR 等方法,检测采自海南澄迈桥头镇疑似感染 PRSV 的南瓜叶片中是否存在 PRSV,采用分段扩增测序方法拼接获得 PRSV-HnPumpkin 基因组,利用 NCBI 中的 BLAST 工具、DNASar 和 MEGA 6.06 软件进行序列分析及系统关系树构建。【结果】DAS-ELISA 和 RT-PCR 检测结果表明,采自海南澄迈桥头镇疑似感染 PRSV 的南瓜叶片中存在 PRSV (PRSV-HnPumpkin)。PRSV-HnPumpkin 基因组全长为 10 327 nt,具有典型的 PRSV 基因组结构特征,含有 1 个开放阅读框,编码 1 个含有 3 345 个氨基酸的多聚蛋白。PRSV-HnPumpkin 与已报道的其他 PRSV 分离物核苷酸和氨基酸之间的相似性分别为 80.6%~95.1%和 90.7%~97.9%。系统关系分析表明,PRSV-HnPumpkin 与亚洲分离物处于同一组中,且与我国台湾分离物亲缘关系较近。【结论】获得了 PRSV-HnPumpkin 全序列,但其进化来源有待进一步探讨。

【关键词】 番木瓜环斑病毒;南瓜病毒病;基因序列分析

【中图分类号】 S432.4⁺.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)03-0038-06

Complete genomic sequence of an *Papaya ringspot virus* isolate from pumpkin in Hainan

CHE Haiyan, CAO Xueren, LUO Daquan

(Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: 【Objective】 The study clarified the genome characteristics of *Papaya ringspot virus* (PRSV) infecting pumpkin in Hainan and its phylogenetic relationship with reported PRSV isolates to provide basis for the comprehensive prevention of pumpkin virus disease. 【Method】 PRSV was detected from suspected virus-infected pumpkin leaf samples by DAS-ELISA and RT-PCR methods. The complete genomic sequence of PRSV-Hnpumpkin isolate was determined by assembling six fragments amplified from the sample by RT-PCR. Sequence was analyzed by BLAST and DNASar. Neighbor-joining phylogram was constructed by MEGA 6.06. 【Result】 DAS-ELISA and RT-PCR confirmed the presence of PRSV (PRSV-HnPumpkin) in the suspected virus-infected pumpkin leaf samples from Qiaotou, Chengmai county in Hainan. Its genome contained 10 327 nt with typical characteristics of previously reported PRSV isolates. The genome contained one ORFs, coding for one polyprotein with 3 345 amino acids. The identities of nucleotide and amino acids with other isolates in GenBank were 80.6%~95.1% and 90.7%~97.9%, respectively. Phylogram analysis revealed that PRSV-HnPumpkin and Asian isolates were in the same group, and it shared closer relationship with the isolates from Taiwan, China. 【Conclusion】 The complete sequence of

【收稿日期】 2018-01-16

【基金项目】 国家公益性行业(农业)科研专项(201303028);2018年海南省重大科技计划项目(zdkj201813)

【作者简介】 车海彦(1976—),女,吉林镇赉人,副研究员,博士,主要从事植物病毒与植原体病害研究。

E-mail: chehaiyan2012@126.com

【通信作者】 罗大全(1968—),男,广西合浦人,研究员,主要从事热带作物病害研究。E-mail: luodaquan@163.com

PRSV-HnPumpkin was obtained,and further investigation is needed to identify its evolution source.

Key words: *Papaya ringspot virus*; pumpkin virus disease; gene sequence analysis

番木瓜环斑病毒 (*Papaya ringspot virus*, PRSV)是马铃薯 Y 病毒科 (Potyviridae) 马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 成员之一,根据寄主范围 PRSV 被分为两个株系:番木瓜环斑病毒番木瓜株系 (*Papaya ringspot virus* type-P, PRSV-P) 和番木瓜环斑病毒西瓜株系 (*Papaya ringspot virus* type-W, PRSV-W)。其中 PRSV-P 主要侵染番木瓜,也可侵染葫芦科作物,在我国海南、广东、广西等番木瓜主产区普遍发生,研究人员从生物学、基因组学、转基因等方面对其进行了深入研究^[1-7];PRSV-W 主要侵染葫芦科作物,仅在广东、广西、云南、山东、海南等地的冬瓜、罗汉果、南瓜、西葫芦上发现该病毒,我国对 PRSV-W 株系的研究相对较少,目前仅有 1 个 PRSV-W 株系(番木瓜环斑病毒山东分离物 (PRSV-SD)) 的全基因组序列公布^[8-14]。海南 PRSV-W 株系的全基因组序列尚未见报道,为了研究其基因组信息及系统进化情况,为南瓜病毒病的防控提供依据,本试验克隆了番木瓜环斑病毒海南南瓜分离物的全基因组序列,并与国内外已报道的 PRSV 分离物全基因组序列进行比对和系统进化分析,以期 为南瓜病毒病的综合防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

疑似感染 PRSV 的南瓜(*Cucurbita moschata*)叶

片样品于 2016 年 1 月采自海南澄迈桥头镇,田间表现为不规则的褪绿斑驳、叶肉组织退化,叶片变小,畸形皱缩等症状,保存于-70 ℃超低温冰箱备用。



图 1 疑似感染 PRSV 的南瓜叶片田间症状
Fig. 1 Field symptoms of the suspected PRSV-infected pumpkin leaf

1.2 方 法

1.2.1 PRSV 的 DAS-ELISA 检测 利用番木瓜环斑病毒检测试剂盒 (SRA 53500,购自美国 Agdia 公司),根据显色情况确定植株是否感染 PRSV,具体方法参考该试剂盒使用说明。

1.2.2 引物设计 PRSV 检测引物 PRSV-F 和 PRSV-R 由浙江大学生物技术研究所谢艳老师提供。根据 NCBI 上已公布的 PRSV 基因组序列,选择保守区域进行引物设计,利用 OLIGO 7 软件设计 6 对 PRSV 基因组扩增引物(表 1),引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成。

表 1 PRSV 基因组扩增引物序列

Table 1 Primers used for amplification of the complete genome of PRSV-Hn							
引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	引物起始位点 Primer location	引物长度/nt Length of primer	产物大小/bp Product size	退火温度/℃ T _m	用途 Application	
PRSV-F	ACCTACAAGCGTGACTTTAC	5 822—5 841	21	703	62	PRSV 检测 PRSV detection	
PRSV-R	CACCCATGCCATGCATCTTTC	6 524—6 504	21		64	PRSV 检测 PRSV detection	
PRSV1	CTGGGATACGACTTTGAAAAGTG	356—377	22	2 809	64	PRSV 基因组扩增 PRSV genome amplification	
PRSV2	GTTCATGAGGCTTGTAATGAC	3 164—3 143	22		62	PRSV 基因组扩增 PRSV genome amplification	
PRSV3	TCGATAGTGAAATGAAACACTAC	3 066—3 088	23	2 980	60	PRSV 基因组扩增 PRSV genome amplification	
PRSV4	CTCTGAATGGTGTTTATGACAC	6 045—6 024	22		60	PRSV 基因组扩增 PRSV genome amplification	
PRSV5	GTATTCAATCCCGAACTCTC	5 902—5 923	23	3 033	62	PRSV 基因组扩增 PRSV genome amplification	
PRSV6	CGATGTTCTGGAAGCTTAGATT	8 934—8 913	22		62	PRSV 基因组扩增 PRSV genome amplification	
PRSV7	GTGGTTCATGTCACATCGAGGT	8 821—8 842	22	1 115	66	PRSV 基因组扩增 PRSV genome amplification	
PRSV8	CCTCATAGAAATCGAAAGCATAT	9 935—9 913	23		62	PRSV 基因组扩增 PRSV genome amplification	
PRSV9	CGCAGTCGCATTTCTTGAAG	440—421	20	485	60	PRSV 5'RACE 第一轮扩增 PRSV 5'RACE first PCR	
PRSV10	TTGCCCTCCAGGAAGGCCCT	300—281	20	345	66	PRSV 5'RACE 巢式 PCR 扩增 PRSV 5'RACE nest PCR	
PRSV11	TGGCTCACTTCAGTAACGCG	9 801—9 820	20	572	62	PRSV 3'RACE 第一轮 PCR 扩增 PRSV 3'RACE first PCR	
PRSV12	GCAGAATGTTTGAATGGAC	10 011—10 030	20	362	58	PRSV 3'RACE 巢式 PCR 扩增 PRSV 3'RACE nest PCR	
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG-CAGTGGTATCAACGCAGAGT		45	—		PRSV 5'和 3'RACE PCR 扩增(试剂盒提供) PRSV 5'and 3'RACE PCR(provided in the kit)	

1.2.3 叶片总 RNA 提取、RT-PCR 扩增及克隆

将南瓜叶片样品在液氮中研磨,采用 RNeasy Plant

Mini Kit(Qiagen)提取总 RNA,提取方法按试剂盒说明进行。以总 RNA 为模板,采用 TransGen TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(北京全式金生物技术有限公司)将总 RNA 反转录成 cDNA;使用 SMARTer® RACE 5'/3' Kit(大连宝生物工程有限公司)扩增 PRSV 的 3'和 5'末端;PCR 扩增产物经纯化后,与 pMD18-T Simple Vector 进行连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,经过蓝白斑筛选,挑取白色菌落,PCR 鉴定阳性克隆。

1.2.4 分离物的全基因组测序及分析 阳性克隆委托北京六合华大基因科技有限公司进行测序,序列拼接采用 DNASTar 的 Editseq 和 ContigExpress 软件。

采用 NCBI 中 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)工具进行相似性查找,采用 DNASTar 软件中的 MegAlign 进行序列比较。通过 MEGA 6.06 软件的 Neighbor-joining 法构建亲缘关系树,bootstrap replications 值为 1 000,西葫芦虎纹花叶病毒(*Zucchini tigre mosaic virus*, KC345608)为外组。

2 结果与分析

2.1 PRSV 的 DAS-ELISA 和 RT-PCR 检测

为了鉴定采集的疑似感染 PRSV 的南瓜叶片样品中是否含有 PRSV,使用番木瓜环斑病毒检测试剂盒对采自海南澄迈的感病和健康南瓜叶片样品进行 DAS-ELISA 检测,发现病株样品显黄色,而健康样品未显色,表明采集的感病样品中含有番木瓜环斑病毒(PRSV)。

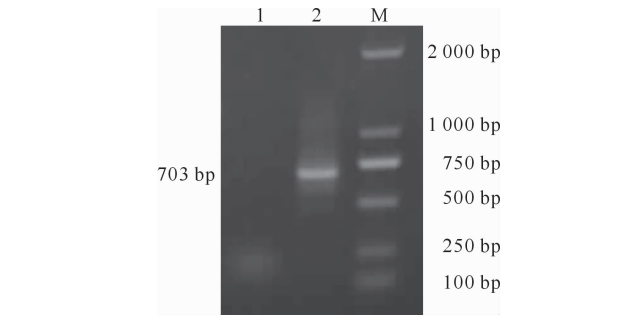
为进一步验证 DAS-ELISA 检测结果的可靠性,利用 PRSV 特异性引物 PRSV-F/PRSV-R 对采集的样品进行 RT-PCR 检测,结果(图 2)表明,病株样品可扩增出长度约 703 bp 的目标条带,而健康样品无目标条带,将目标条带纯化回收,克隆测序结果表明,目标条带为 PRSV 序列,进一步证明采集感病样品中存在 PRSV。

2.2 PRSV 的基因组序列分析

分离自海南南瓜叶片上的 PRSV (PRSV-HnPumpkin)基因组序列全长为 10 327 nt,包含 5'和 3'非编码区,基因登录号为 MF074214,含有 1 个开放阅读框,编码 1 个含有 3 345 个氨基酸的多聚蛋白,5'和 3'非编码区长度分别为 85,203 bp,基因组中 A、G、T、C 的含量分别为 31.12%,23.8%,

26.53%和 18.54%。PRSV-HnPumpkin 分离物基因组结构及其编码的多聚蛋白与马铃薯 Y 病毒属的其他病毒基本一致。

经比对,PRSV-HnPumpkin 与已报道的其他 PRSV 分离物核苷酸和氨基酸之间的相似性在 80.6%~95.1%和 90.7%~97.9%,其中与台湾分离物核苷酸和氨基酸的相似性分别为 92.6%~95.1%和 95.7%~97.9%,与海南分离物核苷酸和氨基酸的相似性在 88.8%~89.6%和 93.4%~94.1%,与山东分离物核苷酸和氨基酸的相似性分别为 90%和 95%。已报道的 PRSV 各分离物之间的核苷酸和氨基酸相似性分别为 79.5%~100%和 88.8%~100%。在这些分离物中,以 PRSV-HnPumpkin 分离物与我国台湾 PRSV-YK 分离物(X97251)的相似性最高,核苷酸和氨基酸相似性分别达到 95.1 和 97.9%。



1. 健康南瓜叶片;2. 感病南瓜叶片;M. D2000 Marker
1. Healthy pumpkin leaves;2. Diseased pumpkin leaves;
M. D2000 Marker

图 2 PRSV 的 RT-PCR 检测结果
Fig. 2 Detection of PRSV by RT-PCR

2.3 PRSV-HnPumpkin 的系统进化分析

目前 NCBI 中已报道 54 个 PRSV 分离物的全序列,其中 32 个来自亚洲、9 个来自美洲、12 个来自大洋洲、1 个来自欧洲。为进一步明确 PRSV-HnPumpkin 与其他 PRSV 分离物的进化关系,分别构建了基于全长基因组序列和多聚蛋白氨基酸序列的系统进化树(图 3 和图 4)。由图 3 和图 4 可以看出,两个进化树除各分支上存在差异外,结果基本一致。即 PRSV 明显分为 3 个进化相关群体,I 组主要来自亚洲,包括中国(台湾、山东和海南)、泰国、东帝汶、印度、韩国的 28 个分离物,其中 18 个分离物采自番木瓜,10 个分离物采自葫芦科植物,且我国海南、台湾和东帝汶的分离物明显聚集在 3 个不同簇,PRSV-HnPumpkin 与我国台湾分离物亲缘关系较近。II 组分离物主要来自北美洲、南美洲、大洋

洲、欧洲和亚洲,包括来自印度、巴西、哥伦比亚、夏威夷、法国、墨西哥、美国、澳大利亚的 25 个分离物,其中 8 个分离物采自番木瓜,17 个分离物采自葫芦科植物。Ⅲ组仅有 1 个韩国分离物。

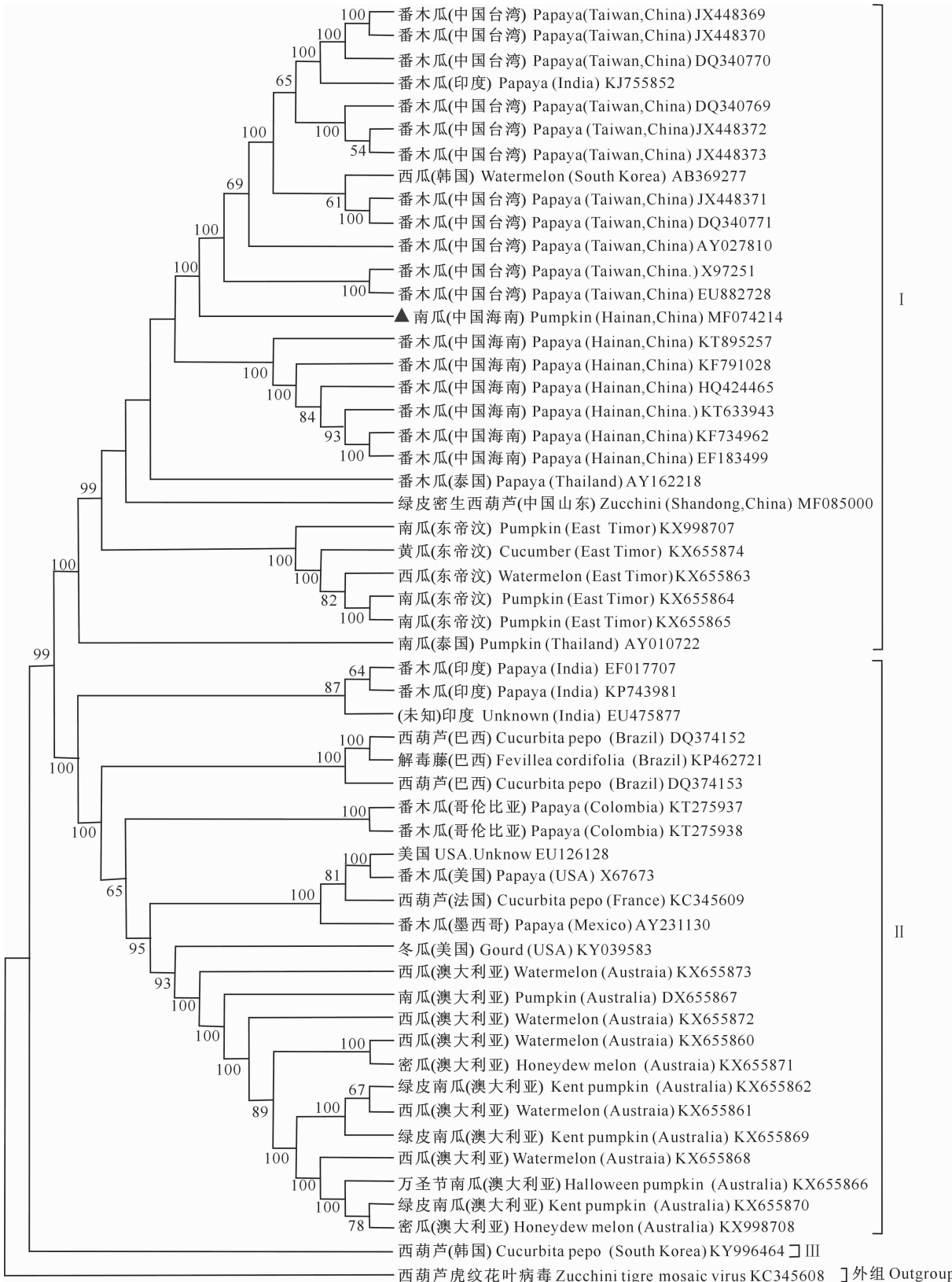


图 3 基于全长基因组序列构建的 PRSV-HnPumpkin 与其他 PRSV 分离物的系统进化树
Fig. 3 Neighbor-joining phylogram obtained from alignment of nucleotide sequences of the PRSV-HnPumpkin and 53 PRSV genomes in GenBank

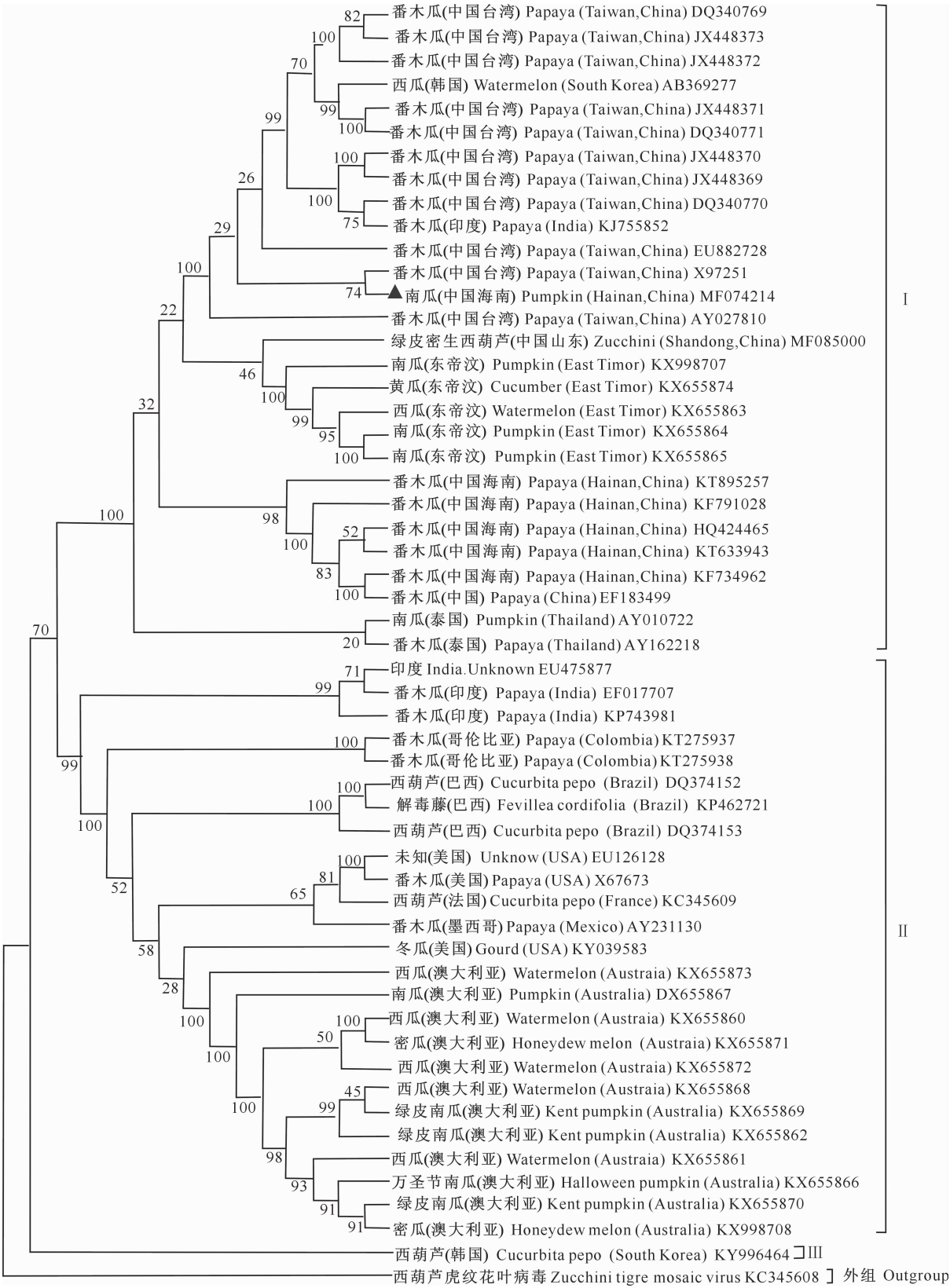


图 4 基于多聚蛋白氨基酸序列构建的 PRSV-HnPumpkin 与其他 PRSV 分离物的系统进化关系树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogram obtained from alignment of amino acid sequences of the PRSV-HnPumpkin and 53 PRSV polyproteins in GenBank

3 讨 论

南瓜是海南重要的北运蔬菜之一,本研究利用 DAS-ELISA 和 RT-PCR 技术在海南澄迈南瓜叶片样品上检测到 PRSV,并克隆了其全基因组序列,分析了其基因组结构特征及与其他 PRSV 分离物的系统发育关系。

目前 NCBI 中已公布的 PRSV 分离物全序列共有 54 个,这些分离物主要来自番木瓜和葫芦科的西葫芦、葫芦、西瓜、丝瓜、南瓜、解毒藤等^[15-20] 植物。本研究中系统进化分析结果显示,PRSV 进化与其地理来源有明显的相关性,同一国家的分离物大多聚集在同一簇,这与前人研究结果^[5,7,14] 基本一致。根据目前 NCBI 公布的数据,PRSV 全基因组数据量在国家及其株系 (PRSV-P 和 PRSV-W) 方面分布都不均衡,韩国、东帝汶、法国、墨西哥、澳大利亚、巴西、哥伦比亚等国报道的均为 PRSV-W 株系,印度报道的均为 PRSV-P 株系,我国已公布的 19 个 PRSV 全基因组序列中,17 个为 PRSV-P 株系,仅有 2 个 PRSV-W 株系 (PRSV-SD 和本研究的 PRSV-HnPumpkin),因此,若要从分子水平分析同一地区 PRSV-W 株系与 PRSV-P 株系的进化关系,还需要更多的全基因组序列数据支撑。

相对而言,PRSV-HnPumpkin 与台湾分离物核苷酸和氨基酸的相似性分别为 92.6%~95.1%和 95.7%~97.9%,而与海南分离物核苷酸和氨基酸的相似性在 88.8%~89.6%和 93.4%~94.1%,前者高于后者。已知番木瓜环斑病毒可以通过种子传播^[21],但因不清楚 PRSV-HnPumpkin 分离物的种子来源,因此尚无法判断其是否来源于台湾,下一步工作将重点研究海南南瓜上 PRSV 的多样性及其与番木瓜上 PRSV 的系统进化关系。

[参考文献]

[1] 肖火根,范怀忠. 植物组织粗汁液中的番木瓜环斑病毒的 ELISA 检测技术 [J]. 中国病毒学,1994(3):249-255.
Xiao H G, Fan H Z. Studies on the detection of *Papaya ringspot virus* in infected tissue of plant by ELISA [J]. *Virologica Sinica*, 1994(3):249-255.

[2] 蔡建和,范怀忠. 华南番木瓜病毒及环斑病毒株系的调查鉴定 [J]. 华南农业大学学报,1994,15(4):13-17.
Cai J H, Fan H Z. Investigation of papaya virus disease and identification of *Papaya ringspot virus* strains in south China [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 1994, 15 (4):13-17.

[3] 卢雅薇,沈文涛,唐清杰,等. 番木瓜环斑病毒海南分离株全基

因组序列分析 [J]. 病毒学报,2008,24(2):152-154.

Lu Y W, Shen W T, Tang Q J, et al. Sequence analysis of the complete genome of *Papaya ringspot virus* Hainan isolate [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2008, 24(2):152-154.

[4] 阮小蕾,王加峰,李华平. VIGS 介导的转复制酶基因番木瓜对 PRSV 的抗性 [J]. 华中农业大学学报,2009,28(4):418-422.
Ruan X L, Wang J F, Li H P. Virus-induced gene silencing-mediated viral resistance of transgenic papaya to *Papaya ringspot virus* (PRSV) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2009, 28(4):418-422.

[5] Zhang Y, Yu N, Huang Q, et al. Complete genome of Hainan *Papaya ringspot virus* using small RNA deep sequencing [J]. *Virus Genes*, 2014, 48(3):502.

[6] 韩 杰,郑继平,言 普,等. 原核表达番木瓜环斑病毒 NIa-Pro 及其双重酶活鉴定 [J]. 热带作物学报,2016,37(4):722-727.
Han J, Zheng J P, Yan P, et al. Prokaryotic expression and biological activity of NIa-Pro protein from *Papaya ringspot virus* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2016, 37(4):722-727.

[7] Zhao H, Jia R Z, Zhang Y L, et al. Geographical and genetic divergence among *Papaya ringspot virus* populations within Hainan province, China [J]. *Phytopathology*, 2016, 106(8):937.

[8] 古勤生, Piero Roggero, Marina Ciuffo, 等. 我国北方地区葫芦科作物病毒病的调查与病原鉴定 [J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(4):88-89.
Gu Q S, Piero R, Marina C, et al. The occurrence of cucurbit viruses in northern China [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2003, 18(4):88-89.

[9] Liao Y M, Gan X J, Chen B, et al. First report of *Papaya ringspot virus* and *Zucchini yellow mosaic virus* in Luohanguo (*Siraitia grosvenorii*) in China [J]. *Plant Disease*, 2005, 89(5):530.

[10] 尤 毅,李华平,谢大森. 侵染冬瓜的病毒病原种类鉴定 [J]. 植物保护, 2016, 42(2):182-186.
You Y, Li H P, Xie D S. Identification of pathogenic viruses infecting wax gourd [J]. *Plant Protection*, 2016, 42(2):182-186.

[11] 杨国慧,张仲凯,崔崇士. 番木瓜环斑病毒南瓜分离物外壳蛋白基因的克隆及序列分析 [J]. 植物保护学报, 2007, 34(3):273-276.
Yang G H, Zhang Z K, Cui C S. Cloning and sequence analysis of CP genes of PRSV from pumpkin [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2007, 34(3):273-276.

[12] 朱 静,谭冠林,包改丽,等. 云南番木瓜环斑病毒的发生及遗传多样性 [J]. 微生物学通报, 2014, 41(6):1142-1151.
Zhu J, Tan G L, Bao G L, et al. Occurrence and genetic biodiversity of *Papaya ringspot virus* in Yunnan [J]. *Microbiology China*, 2014, 41(6):1142-1151.

[13] Cheng D J, Huang X D, Zhang J W, et al. First report of *Papaya ringspot virus* associated with a ringspot disease of zucchini in northern China [J]. *Plant Disease*, 2017, 101(5):847.

- Sun X G, Zhou C G, Liu Y M, et al. Studies on bionomics and effective accumulated temperature of *Eotetranychus populi* (Koch) (Acariformes: Tetranychidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 1996, 39(2): 166-172.
- [23] 张国安, 赵惠燕. 昆虫生态学和害虫预测预报 [M]. 北京: 科学出版社, 2012: 29-33.
- Zhang G A, Zhao H Y. Insect ecology and forecast of insect pests [M]. Beijing: Science Press, 2012: 29-33.
- [24] 胡英华, 苏加岱, 左秀峰. 刺足根螨发育起点温度及有效积温探讨 [J]. 中国植保导刊, 2007, 27(12): 30-31.
- Hu Y H, Su J D, Zuo X F. Inquiring into threshold temperature and thermal constant of *Rhizoglyphus echinopus* [J]. China Plant Protection, 2007, 27(12): 30-31.
- [25] 李全平, 白慧强, 罗佑珍. 罗宾根螨发育起点温度和有效积温的研究 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2008, 29(2): 91-94.
- Li Q P, Bai H Q, Luo Y Z. Threshold of developmental and effective thermal sum of *Rhizoglyphus robini* Clapareda [J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2008, 29(2): 91-94.
- [26] Helle W, Sabelis M W. World crop pests spider mites: their biology, natural enemies and control [M]. Amsterdam: Elsevier, 1985, v. 1B: 119-120.
- [27] 赵利敏, 高旭刚, 罗纪虎. 6 种杀螨剂对石榴小爪螨的毒力测定 [J]. 农药, 2012, 51(8): 605-607, 610.
- Zhao L M, Gao X G, Luo J H. Evaluation of toxicity of six acaricides on the avocado brown mite [J]. Agrochemicals, 2012, 51(8): 605-607, 610.
- [28] 赵利敏. 螨虫样本变异系数、均值及由此组建的幂函数关系和抽样模型 [J]. 四川动物, 2012, 31(3): 411-415.
- Zhao L M. Coefficient of variation and mean of mite samples, and the power relation and sampling model established wherefrom [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2012, 31(3): 411-415.
- [29] Little T M, Hills F J. Agricultural experimentation: design and analysis [M]. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1978.
- [30] 李春喜, 邵云, 姜丽娜. 生物统计学 [M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2008.
- Li C X, Shao Y, Jiang L N. Biostatistics [M]. 4th ed. Beijing: Science Press, 2008.
- [31] Elkinton J S. Insect population ecology: an African perspective [M]. Nairobi: The International Center of Insect Physiology and Ecology Science Press, 1993: 33-40.
- [32] Dent D. Insect pest management [M]. 2nd ed. Ascot: CABI Bioscience, 2000.
- [33] 赵利敏, 贾豪, 杨荣科. 灰翅麦茎蜂(膜翅目: 茎蜂科)成虫发生期及其机率值模型 [J]. 应用昆虫学报, 2013, 50(5): 1397-1404.
- Zhao L M, Jia H, Yang R K. Occurrence periods and probit models of adult *Cephus fumipennis* (Hymenoptera: Cephidae) [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2013, 50(5): 1397-1404.
- [34] 赵利敏, 张斌. 陕西留坝西洋参种植棚内的温度特征 [J]. 中国农业气象, 2015, 36(5): 544-552.
- Zhao L M, Zhang B. Temperature properties within plastic greenhouses for American ginseng growth in Liuba County, Shaanxi, China [J]. Chinese Journal of Agrometeorology, 2015, 36(5): 544-552.

(上接第 43 页)

- [14] 黄显德, 王玉, 闫志勇, 等. 番木瓜环斑病毒山东分离物的全基因组序列分析 [J]. 植物病理学报, 2018, 48(2): 285-288.
- Huang X D, Wang Y, Yan Z Y, et al. Complete genomic sequence analysis of a *Papaya ringspot virus* isolate from Shandong province of China [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2018, 48(2): 285-288.
- [15] Inoue-Nagata A K, Franco C D M, Martin D P, et al. Genome analysis of a severe and a mild isolate of *Papaya ringspot virus*-type W found in Brazil [J]. Virus Genes, 2007, 35(1): 119-127.
- [16] Maina S, Coutts B A, Edwards O, et al. *Papaya ringspot virus* populations from East Timorese and northern Australian cucurbit crops: biological and molecular properties, and absence of genetic connectivity [J]. Plant Disease, 2017, 101(6): 985-993.
- [17] Ali A. First complete genome sequence of *Papaya ringspot virus*-W isolated from a gourd in the United States [J]. Genome Announcements, 2017, 5(2): e01434-16.
- [18] Noa-Carrazana J C, González-De-León D, Silva-Rosales L. Molecular characterization of a severe isolate of *Papaya ringspot virus* in Mexico and its relationship with other isolates [J]. Virus Genes, 2007, 35(1): 109.
- [19] Romay G, Lecoq H, Desbiez C. *Zucchini tigre mosaic virus* is a distinct potyvirus in the *Papaya ringspot virus* cluster: molecular and biological insights. [J]. Archives of Virology, 2014, 159(2): 277-289.
- [20] Ortiz-Rojas L Y, Chaves-Bedoya G. Molecular characterization of two *Papaya ringspot virus* isolates that cause devastating symptoms in Norte de Santander, Colombia [J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 148(4): 1-12.
- [21] 陈涵. 葫芦科作物种子中番木瓜环斑病毒的分子检测 [D]. 福州: 福建农林大学, 2006.
- Chen H. Molecular detection of *Papaya ringspot virus* in seeds of cucurbitaceae plant [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2006.