

网络出版时间:2020-08-13 16:07 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.02.009
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200812.1408.016.html

内蒙古籽用西葫芦病毒病原鉴定

岳建英, 韦学锋, 郑红丽, 李正男, 赵明敏

(内蒙古农业大学 园艺与植物保护学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

[摘要] 【目的】对内蒙古自治区籽用西葫芦病毒病进行病原鉴定,并确定其分类地位,为该地区籽用西葫芦病毒病的防治提供理论依据。【方法】以采自内蒙古土默特左旗具有典型花叶症状的籽用西葫芦叶片为材料,对其进行 sRNA 深度测序和 RT-PCR 检测,并对所得序列进行一致性分析和构建系统发育进化树。【结果】对具有典型花叶症状的籽用西葫芦叶片的 sRNA 测序结果进行拼接,在数据库中比对共注释到 14 种病毒,其中西瓜花叶病毒(*Watermelon mosaic virus*, WMV)、小西葫芦黄化花叶病毒(*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)和黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV) 所占比例较高,分别为 59.48%, 20.70% 和 13.70%,这说明内蒙古自治区籽用西葫芦病毒病为多种病毒混合侵染引起。RT-PCR 扩增除了检测到 WMV、ZYMV 和 CMV 外,还检测到马蹄莲潜隐病毒(*Calla lily latent virus*, CLLV)的外壳蛋白特异性条带。系统进化树分析显示,2 个籽用西葫芦 ZYMV 分离物(MK002236 和 MK002237)与伊朗蚜虫 ZYMV 分离物(KU528623)聚合在同一支;籽用西葫芦 Z1 样品 WMV 分离物(MK015646)与意大利柑橘 WMV 分离物(FJ823122)亲缘关系最近,而 Z2 样品 WMV 分离物(MK015645)则与法国甜瓜 WMV 分离物、法国未知作物 WMV 分离物、法国西葫芦 WMV 分离物以及 Z1 样品 WMV 分离物(MK015646)和意大利柑橘 WMV 分离物形成一个大分支。【结论】内蒙古籽用西葫芦病毒病主要病原为 WMV、ZYMV 和 CMV,自然条件下常发生复合侵染。籽用西葫芦上最初的 WMV 和 ZYMV 可能由媒介昆虫或人从其他作物上传播而来,也可能是通过籽用西葫芦种子进口、国内调运而传播到本地的。

[关键词] 籽用西葫芦;西葫芦病毒病;病原鉴定;sRNA 深度测序;内蒙古

[中图分类号] S642.6;S432.4⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2021)02-0061-07

Identification of viral pathogen of zucchini in Inner Mongolia

YUE Jianying, WEI Xuefeng, ZHENG Hongli, LI Zhengnan, ZHAO Mingmin

(College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, Inner Mongolia 010019, China)

Abstract: 【Objective】 This study identified the pathogen of zucchini virus disease in Inner Mongolia and determined its taxonomic status to provide basis for the prevention of zucchini virus disease. 【Method】 Samples with typical symptoms collected from Tumote Zuoqi, Inner Mongolia were subjected to deep sRNA sequencing and RT-PCR detection. The obtained sequences were analyzed for consistency and a phylogenetic tree was constructed. 【Result】 After splicing the sRNA sequencing results of samples with typical symptoms, a total of 14 viruses were annotated in the database, including *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) with high proportions of 59.48%, 20.70% and 13.70%, respectively. In addition, the coat protein-specific band of *Calla lily latent virus* (CLLV) was detected. Phylogenetic tree analysis showed that two isolates of zucchini ZYMV (MK002236 and MK002237) were clustered with the Iranian ZYMV isolate (KU528623). The sample Z1

[收稿日期] 2019-11-28

[基金项目] 内蒙古农业大学高层次人才引进科研启动项目(NDGCC2016-23)

[作者简介] 岳建英(1996—),女,内蒙古呼和浩特人,在读硕士,主要从事植物病毒学研究。E-mail: yuejianying2018@163.com

[通信作者] 赵明敏(1975—),女,内蒙古巴彦淖尔人,教授,博士,主要从事植物病毒学研究。E-mail: mingminzh@163.com

of the zucchini WMV isolates (MK015646) was closest to the Italian citrus WMV isolates (FJ823122). The sample Z2 of zucchini WMV isolates (MK015645) formed a large branch with the French WMV melon isolates, the French unknown crop WMV isolates, the French zucchini WMV isolates, sample Z1 WMV isolates (MK015646) and Italian citrus WMV isolates. 【Conclusion】 The main pathogens of zucchini virus disease in Inner Mongolia were WMV, ZYMV and CMV, and mixed infections often occurred under natural conditions. WMV and ZYMV on zucchini may be initially transmitted by insect vector or man-made from other crops or due to zucchini seeds imports and domestic transport.

Key words: *Cucurbita pepo*; zucchini virus disease; identification of pathogen; sRNA deep sequencing; Inner Mongolia

籽用西葫芦(*Cucurbita pepo* L.)属葫芦科南瓜属作物^[1],是一种以取食籽粒为主的内蒙古特色经济作物^[2]。由于其籽粒含有丰富的维生素、蛋白质、胡萝卜素和矿物质等营养成分,因而在我国广泛种植^[3]。随着种植面积不断增加,籽用西葫芦病害发生日趋严重^[4],尤其是病毒引起的花叶病,已成为制约籽用西葫芦种植产业发展的主要因素^[5]。

据报道,目前国内外能侵染葫芦科作物的病毒有 89 种^[6],其中马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)所占比例最多,为 18.6%^[7]。马铃薯 Y 病毒属中最常见、危害最为严重的有小西葫芦黄化花叶病毒(*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)、西瓜花叶病毒(*Watermelon mosaic virus*, WMV)和番木瓜环斑病毒西瓜株系(*Papaya ringspot virus watermelon strain*, PRSV-W)^[8]。不同病毒复合侵染是引起西葫芦花叶病的主要原因^[9],常造成严重的经济损失^[10]。在法国和黎巴嫩地区侵染西葫芦的病毒主要有小西葫芦黄化花叶病毒(ZYMV)、南瓜蚜传黄化病毒(*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV)、南瓜花叶病毒(*Squash mosaic virus*, SqMV)和黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)^[11]。在美国俄克拉荷马州葫芦种植区,主要检测到番木瓜环斑病毒(*Papaya ringspot virus*, PRSV)、西瓜花叶病毒(WMV)和小西葫芦黄化花叶病毒(ZYMV)^[12]。在我国山东地区葫芦科蔬菜上主要检测到烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)和 CMV 等^[13],在新疆石河子及新湖籽用西葫芦上主要检测到 CMV、ZYMV、WMV、PRSV-W 的侵染^[14],在重庆地区黄瓜上检测到 CMV、SqMV、芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)、WMV、ZYMV 5 种病毒^[15],在云南建水西葫芦上检测到 ZYMV^[16],在甘肃河西地区瓜类作物上检测到 WMV、CMV、ZYMV、PRSV-W 和 SqMV-W^[17]。

近年来,籽用西葫芦花叶病在内蒙古自治区西

部地区大面积发生,减产达 80%以上,部分田块甚至全田绝收,引起严重的经济损失。籽用西葫芦花叶病在田间的症状为系统性花叶和斑驳,叶脉深绿;西葫芦畸形,表面色泽不均一,呈深绿斑驳和突起,有深绿花斑。本研究通过 sRNA 深度测序技术和 RT-PCR 技术,对内蒙古土默特左旗侵染西葫芦的花叶病病原进行鉴定,为籽用西葫芦花叶病的有效防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

在内蒙古土默特左旗籽用西葫芦田间采集 7 份具有典型花叶症状的叶片和健康西葫芦叶片,分别装在干净的自封袋中,经液氮速冻后于 -80 ℃ 保存。选择花叶症状严重的 2 份样品用于本研究,并分别命名为 Z1 和 Z2。

1.2 籽用西葫芦样品总 RNA 的提取

将 Z1、Z2 样品和健康西葫芦叶片分别在液氮中充分研磨,取 100 mg 样品装于 1.5 mL 无酶离心管,用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)提取籽用西葫芦样品的总 RNA,操作步骤参照 TRIzol 试剂使用说明书进行。经检测总 RNA 质量达到了建库要求。

1.3 文库的构建和测序

按照 small RNA Sample Pre Kit (Illumina)说明进行文库构建。文库构建后使用 Illumina HiSeq4000 平台测序获取原始数据。利用生物信息学分析法去除带接头和低质量、短于 18 或长于 35 个核苷酸序列的 reads 以及不能确定的碱基数大于 10% 的 reads,获得 Clean reads。采用 Bowtie 软件^[18]对 sRNA 进行分类注释,过滤掉 rRNA、tRNA 及重复序列;利用 Velvet 软件对 sRNA 进行拼接,然后在数据库(GenBank Virus RefSeq、GenBank Virus RefSeq、NCBI NR、NCBI NT)中比对以获得

病毒信息。

1.4 籽用西葫芦花叶病病毒的 RT-PCR 鉴定

根据 NCBI 发表的 WMV 和 ZYMV 外壳蛋白 (coat protein,CP) 基因序列设计引物 (表 1),用于 RT-PCR 检测和验证 sRNA 测序结果,以健康的西葫芦植株作为阴性对照。以总 RNA 为模板,按照 GoScript™ Reverse Transcription System 试剂盒 (Promega) 的操作说明进行逆转录生成 cDNA 第一链。用合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:上下游引物各 1 μL,cDNA 1 μL,dNTP 2

μL,10×PCR buffer 2.5 μL,Taq 酶 0.3 μL,用 ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应程序:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,58 ℃(CMV)、50 ℃(ZYMV)、50 ℃(WMV)或 58 ℃(CLLV)退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。将 PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,并用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技有限公司)回收并纯化目标产物。根据试剂盒说明将产物连接到 pTOPO-T 载体(北京艾德莱生物技术有限责任公司)上,挑取阳性克隆进行测序。

表 1 RT-PCR 检测所用引物
Table 1 Primers for detection of viruses by RT-PCR assay

引物名称 Name of primer	引物序列(5′-3′) Sequence of primer (5′-3′)	退火温度/℃ T _m	GenBank 登录号 GenBank No.
CMV-F	TTTGATAAGAAGCTTGTTCGCG	58	JX993913
CMV-R	AGACGTGGGAATGCGTTGGTGCT		
ZYMV-F	ATGCAGAGGCACCATACAT	50	AF127932
ZYMV-R	TGCTGCGTCTGAGAAATG		
WMV-F	CCAGTGGCAAAGGTGATA	50	DQ399708
WMV-R	TGCTGCGTCTGAGAAATG		
CLLV-F	AATACTCGGGCA ACGAAGACAC	58	EF101347
CLLV-R	TAATCCGTACCTAGGCATATACGG		

1.5 数据处理与分析

将 1.4 节测序结果与已发表的侵染西葫芦的 WMV 和 ZYMV 外壳蛋白序列用 SDTv2.1 软件进行 Blast 比对,采用 Vector NTI 11 软件进行碱基序列拼接处理,应用 SDTv2.1 软件进行碱基序列一致性分析,利用 MEGA 6.0 软件中的 N-J 法^[19]构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 内蒙古籽用西葫芦花叶病的田间症状

内蒙古土默特左旗籽用西葫芦花叶病的田间症状表现为系统性花叶和斑驳,叶脉深绿;西葫芦畸形,表面色泽不均一,呈深绿斑驳和突起,有深绿花斑(图 1);发病瓜后期变软,不结籽或结籽率非常低。



图 1 内蒙古籽用西葫芦花叶病的田间症状

Fig.1 Mosaic symptoms in leaves and zucchini in field in Inner Mongolia

2.2 籽用西葫芦花叶病的 sRNA 深度测序结果

籽用西葫芦 sRNA 深度测序后共获得 15 800 209条 reads 原始数据,去除带接头和低质量、短于 18 或长于 35 个核苷酸序列的 reads 以及不能确定碱基数大于 10% 的 reads 后,得到

15 241 618条 Clean reads(占总 reads 的 96.46%)。利用 Velvet 软件对 sRNA 进行拼接后在数据库中共比对共注释到 14 种病毒(表 2),其中 WMV 拼接到 204 条 contigs,含有 708 908 条 reads(28.21%);ZYMV 拼接到 71 个 contigs,含有 1 731 846 条

reads(68.92%);CMV 共拼接到 47 个 contigs,含 5 235条 reads(0.21%);SMV 拼接到 6 个 contigs,含有 27 246 条 reads(1.08%);CLLV 拼接到 4 个 contigs,共有 17 991 条 reads(0.72%);WVMV 拼

接到 3 个 contigs,含有 10 285 个 reads(0.41%);sRNA 测序所检测到的其余 8 种病毒仅匹配上 1 个 contig,因此认为可能是假阳性。

表 2 籽用西葫芦花叶病的 sRNA 深度测序结果

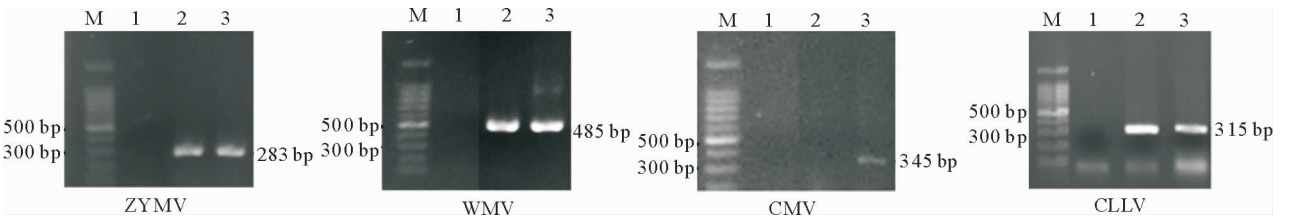
Table 2 sRNA deep sequencing results of zucchini mosaic disease

病毒名称 Name of virus	Contigs		Reads	
	数量 Number	比例/% Percentage	数量 Number	比例/% Percentage
西瓜花叶病毒 <i>Watermelon mosaic virus</i> (WMV)	204	59.48	708 908	28.21
小西葫芦黄化花叶病毒 <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV)	71	20.70	1 731 846	68.92
南瓜花叶病毒 <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	47	13.70	5 235	0.21
大豆花叶病毒 <i>Soybean mosaic virus</i> (SMV)	6	1.75	27 246	1.08
马蹄莲潜隐病毒 <i>Calla lily latent virus</i> (CLV)	4	1.17	17 991	0.72
紫藤脉花叶病毒 <i>Wisteria vein mosaic virus</i> (WVMV)	3	0.87	10 285	0.41
芋头花叶病毒 <i>Dasheen mosaic virus</i> (DMV)	1	0.29	1 010	0.04
东亚西番莲病毒 <i>East asian passiflora virus</i> (EAPV)	1	0.29	2 246	0.09
辣椒斑驳病毒 <i>Pepper mottle virus</i> (PMV)	1	0.29	6 920	0.28
马铃薯 Y 病毒 <i>Potato virus Y</i> (PVY)	1	0.29	58	0.00
云杉枞色卷蛾颗粒体病毒 <i>Choristoneura occidentalis granulo virus</i> (WOGV)	1	0.29	2	0.00
豚草潜隐病毒 <i>Ambrosia asymptomatic virus</i> (AAV)	1	0.29	317	0.01
巴西马赛病毒 <i>Brazilian marseille virus</i> (BMV)	1	0.29	155	0.01
豆薯花叶病毒 <i>Yambean mosaic virus</i> (YMV)	1	0.29	677	0.03

2.3 籽用西葫芦花叶病病毒的 RT-PCR 检测

为验证 sRNA 测序分析结果,根据 Genbank 已发表的侵染西葫芦的病毒外壳蛋白基因序列设计相应引物,分别以 Z1 和 Z2 总 RNA 合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。结果表明,在 Z1 和 Z2 2 个样品中均扩增到 ZYMV(283 bp)和 WMV(485 bp)特

异性条带(图 2),同时,也扩增到了 CMV(345 bp)和 CLLV(315 bp)的特异性条带。扩增获得的 SMV 和 WVMV 片段经测序后发现,其序列与 WMV 完全一致。可能是 SMV 和 WVMV 这 2 个病毒与 WMV 序列相似度较高,且在样品中含量较低,导致引物优先结合到 WMV 模板上。



M, DNA Marker;1. 健康植物;2. Z1 样品;3. Z2 样品
M, DNA Marker;1. Healthy plant;2. Sample Z1;3. Sample Z2

图 2 籽用西葫芦花叶病病毒的 RT-PCR 检测

Fig. 2 RT-PCR detection of main virus in zucchini mosaic disease

2.4 籽用西葫芦花叶病病毒 WMV 和 ZYMV 的序列一致性和系统发育树分析

用 SDT v1. 2 软件对扩增产物序列与 GenBank 已发表的 ZYMV、WMV 序列分别进行一致性分析,结果如图 3 和图 4 所示。由图 3 和图 4 可知,2 个籽用西葫芦样品中 ZYMV 分离物 MK002236 和

MK002237 的一致性为 99.601%,与其他地区的 ZYMV 分离物序列一致性为 98.601%~99.601%;2 个籽用西葫芦样品中 WMV 的分离物 MK015646 和 MK015645 的一致性为 94.401%,与其他地区 WMV 的分离物序列一致性为 93.001%~96.101%。

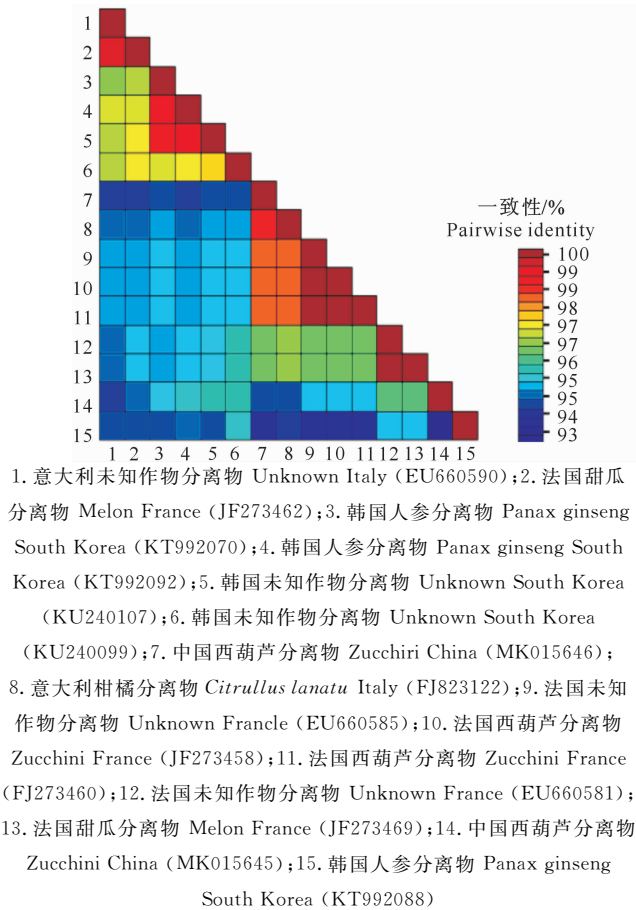


图 3 籽用西葫芦花叶病 WMV 序列一致性分析

Fig. 3 Consistency analysis of WMV sequences in zucchini mosaic disease

为了进一步明确 2 个籽用西葫芦样品中 ZYMV 和 WMV 分离物与 GenBank 库中已发表病毒分离物的亲缘关系,采用 MEGA 6.0 分别构建了 WMV 和 ZYMV 的系统发育进化树,结果(图 5 和图 6)发现,2 个籽用西葫芦 ZYMV 分离物(MK002236 和 MK002237)均与伊朗蚜虫 ZYMV 分离物(KU528623)聚合在同一支;籽用西葫芦 Z1

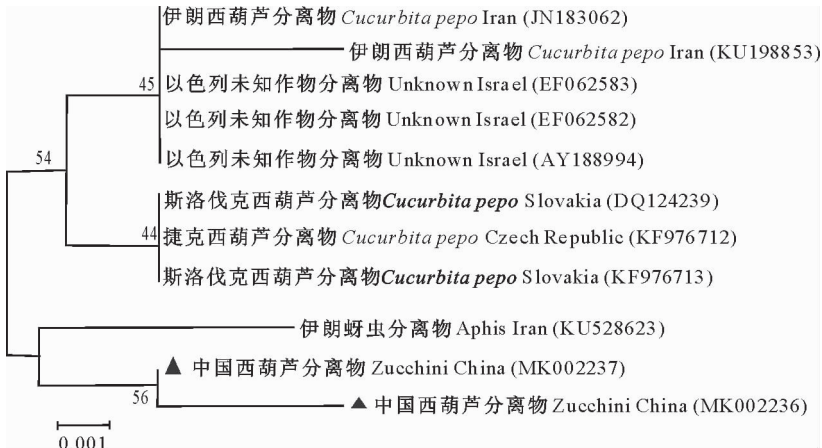


图 5 11 种 ZYMV 分离物 CP 蛋白的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of nucleic acids of CP for 11 ZYMV isolates

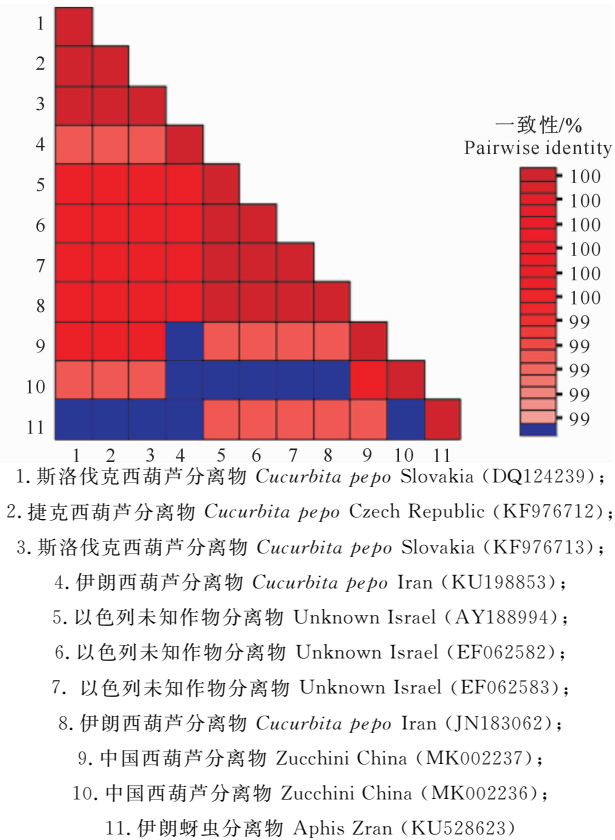


图 4 籽用西葫芦花叶病 ZYMV 序列一致性分析

Fig. 4 Consistency analysis of ZYMV sequences in zucchini mosaic disease

样品 WMV 分离物(MK015646)与意大利柑橘 WMV 分离物(FJ823122)距离最近,而 Z2 样品 WMV 分离物(MK015645)则与法国甜瓜 WMV 分离物、法国未知作物 WMV 分离物、法国西葫芦 WMV 分离物以及 Z1 样品(MK015646)WMV 分离物和意大利柑橘 WMV 分离物形成一个大分支。



图 6 15 种 WMV 分离物 CP 蛋白的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of nucleic acids of CP for 15 WMV isolates

3 讨 论

病毒病是葫芦科蔬菜的重要病害,常引起西葫芦产量降低、品质变劣,严重时甚至导致绝产。本研究通过对内蒙古土默特左旗采集的具有典型花叶症状的籽用西葫芦样品进行分子鉴定,明确了其病原是以 WMV、ZYMV、CMV 和 CLLV 为主的多种病毒复合侵染。这与我国各地报道的西葫芦病毒病复合侵染的情况类似,其中 CMV^[20-21]、WMV^[22] 和 ZYMV^[23] 在各地均有检测到。

sRNA 深度测序是近年来常用的植物病毒检测技术,可通过直接分析寄主中 sRNA,拼接出样品中的单一病毒或复合侵染病毒序列^[24],该技术已在许多植物未知病原鉴定中发挥了重要作用^[25]。本研究中,籽用西葫芦 sRNA 经拼接和比对共注释到 14 种病毒,其中 WMV、ZYMV、CMV 3 种病毒所占比例较高。RT-PCR 扩增也检测到了相应病毒外壳蛋白的特异性条带。对于 CLLV 来说,尽管 contig 数目仅为 4 个,但 RT-PCR 检测到了其特异性条带。可能是在 sRNA 建库时,CLLV 的 sRNA 数量较少,导致拼接获得的 contig 数目较少,但该病毒仍然存在样品中,这也是 sRNA 测序技术的优势,即能够检测到较低含量的病毒。但也不排除假阳性的可能,如样品中也注释到的其他 8 种仅含有 1 个 contig 的病毒,笔者认为这些病毒的 contig 可能是 s-RNA 测序技术中的非特异性扩增导致。

根据获得的籽用西葫芦 WMV 和 ZYMV 分离物的 CP 序列,构建了系统发育进化树。结果发现 2 个籽用西葫芦 ZYMV 分离物 (MK002236, MK002237) 均与伊朗蚜虫 ZYMV 分离物 (KU528623) 聚合在同一支;Z1 样品 WMV 分离物

(MK015646) 与意大利柑橘 WMV 分离物 (FJ823122) 距离最近,而 Z2 样品 WMV 分离物 (MK015645) 则与意大利、法国 WMV 分离物形成一个大分支。因此推测籽用西葫芦上的 WMV 和 ZYMV 最初可能是由媒介昆虫或人从其他作物上传播而来的,也可能是籽用西葫芦种子进口、国内调运而传播到本地的。

〔参考文献〕

[1] 牛二波. 丝瓜和西葫芦病毒病原检测及病毒全基因组序列测定与分析 [D]. 山西太谷: 山西农业大学, 2016.
Niu E B. Identification and analysis of complete genomic sequence of virus isolates infecting *Luffa cylindrica* and *Cucurbita pepo* L. [D]. Taigu, Shanxi: Shanxi Agricultural University, 2016.

[2] 菅彩媛, 苏文斌, 任霄云, 等. 不同种植密度对籽用西葫芦经济性状及产量的影响 [J]. 黑龙江农业科学, 2019(9): 44-47.
Jian C Y, Su W B, Ren X Y, et al. Effects of different planting densities on economic characters and yield of seed zucchini [J]. Heilongjing Agricultural Sciences, 2019(9): 44-47.

[3] 罗伯祥, 孙玉东, 朱明超, 等. 西葫芦育种现状与发展趋势 [J]. 种子, 2002(4): 44-45.
Luo B X, Sun Y D, Zhu M C, et al. Current status and development trend of zucchini breeding [J]. Seed, 2002(4): 44-45.

[4] 王 娟, 邓建新, 宫国义, 等. 甜瓜抗白粉病育种研究进展 [J]. 中国瓜菜, 2006(1): 33-36.
Wang J, Deng J X, Gong G Y, et al. Breeding advances in powdery mildew of melon [J]. China Cucurbits and Vegetables, 2006(1): 33-36.

[5] Xu Z H, Shou W L, Huang K M, et al. Determination of physiological race of powdery mildew and its virulence to different melon genotypes [J]. Acta Agriculturae Zhejinagensis, 1999(5): 29-32.

[6] 王 健. 小西葫芦黄花叶病毒遗传多样性及致病力分析 [D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2019.
Wang J. Genetic diversity and pathogenicity analysis of Zucchi-

- ni yellow mosaic virus* [D]. Taian, Shandong: Shandong Agriculture University, 2019.
- [7] 郑棚峻,张宇,张松柏,等. 葫芦科作物重要种传病毒研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 5-9.
Zheng P J, Zhang Y, Zhang S B, et al. Research progress on important seed-borne viruses in Cucurbitaceae [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(3): 5-9.
- [8] 古勤生. 葫芦科作物主要病毒病防治研究进展[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(4): 32-35.
Gu Q S. Research progress on the control of major viral diseases in Cucurbitaceae [J]. China Cucurbits and Vegetables, 2002(4): 32-35.
- [9] 林石明,廖富荣,陈青,等. 葫芦科作物种传病毒及其检疫重要性[J]. 植物检疫, 2012, 26(1): 52-61.
Lin S M, Liao F R, Chen Q, et al. The seed-transmitted viruses in cucurbit (Cucurbitaceae) and their phytosanitary significance [J]. Plant Quarantine, 2012, 26(1): 52-61.
- [10] 任琛荣. 北疆籽用西葫芦病毒病害调查及病毒种类鉴定和检测[D]. 新疆石河子: 石河子大学, 2016.
Ren C R. The investigation of seed zucchini virus disease and identification and detection of its viruses in northern Xinjiang [D]. Shihezi, Xinjiang: Shihezi University, 2016.
- [11] Abou-Jawdaah Y, Sobh H, El-Zammar S, et al. Incidence and management of virus diseases of cucurbits in Lebanon [J]. Crop Protection, 2000, 19(4): 217-224.
- [12] Ali A, Mohammad O, Khatatb A. Distribution of viruses infecting cucurbit crops and isolation of potential new virus-like sequences from weeds in Oklahoma [J]. Plant Disease, 2012, 96(2): 243-248.
- [13] 孙晓辉,王树森,高利利,等. 山东葫芦科蔬菜上病毒病种类检测及黄瓜花叶病毒分离物的亚组鉴定[J]. 华北农学报, 2016, 31(2): 211-217.
Sun X H, Wang S S, Gao L L, et al. Detection of viruses infecting cucurbit vegetables in Shandong and identification of subgroup of the *Cucumber mosaic virus* isolates [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2016, 31(2): 211-217.
- [14] 任琛荣,郝小军,都业娟,等. 新疆石河子及新湖籽用西葫芦病毒病分子检测[J]. 北方园艺, 2016(1): 102-106.
Ren C R, Hao X J, Du Y J, et al. Molecular detection of seed zucchini virus diseases in Shihezi and Xinhui region in Xinjiang [J]. Northern Horticulture, 2016(1): 102-106.
- [15] 熊艳,孙森,王鹤冰,等. 重庆黄瓜病毒病病原分子鉴定及序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(4): 650-658.
Xiong Y, Sun M, Wang H B, et al. Molecular identification and sequence analysis of the pathogen causing cucumber (*Cucumis sativus*) virus disease in Chongqing [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(4): 650-658.
- [16] 董家红. 云南建水西葫芦花叶病的病原鉴定[C]//中国植物保护学会. 科技创新与绿色植保—中国植物保护学会2006学术年会论文集. 北京: 中国植物保护学会, 2006: 752.
Dong J H. Identification of the pathogen of zucchini mosaic disease in Jianshui, Yunnan [C]//China Plant Protection Society. Science and technology innovation and green plant protection, proceedings of the 2006 annual conference of the Chinese Plant Protection Society. Beijing: China Plant Protection Society, 2006: 752.
- [17] 文朝慧,南志标. 甘肃省河西地区瓜类作物病毒病的病原鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(12): 131-137.
Wen Z H, Nan Z B. Detection of cucurbit virus diseases in Hexi region of Gansu province [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2013, 41(12): 131-137.
- [18] 康明明. 玉米小分子RNA及其靶基因的鉴定与功能分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
Kang M M. Identification and functional analysis of small RNAs and their targets in maize [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [19] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30: 2725-2729.
- [20] Singh Z, Jones R A C, Jones M G K. Identification of *Cucumber mosaic virus* subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR [J]. Plant Disease, 1995, 46(7): 633-643.
- [21] 王德富,时晓丽,寇丽莎,等. 山西西葫芦花叶病病原鉴定与部分序列分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2016, 36(5): 310-314, 363.
Wang D F, Shi X L, Kou L S, et al. Identification and partial sequence analysis of the pathogen causing *Cucurbit aepo* L. mosaic disease in Shanxi province [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2016, 36(5): 310-314, 363.
- [22] 王威麟,张昊,于祥泉,等. 侵染西瓜的5种病毒 ZYMV、WMV、TMV、SqMV 和 CMV 的多重 RT-PCR 检测体系的建立与检测应用[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 27-32.
Wang W L, Zhang H, Yu X Q, et al. Establishment and application of multiplex RT-PCR for simultaneous detection of five watermelon viruses ZYMV, WMV, TMV, SqMV and CMV [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(1): 27-32.
- [23] 张永江. 一步法 RT-PCR 检测小西葫芦黄花叶病毒[J]. 植物检疫, 2005, 19(3): 141-142.
Zhang Y J. Detection of *Zucchini yellow mosaic virus* by One-step RT-PCR [J]. Plant Quarantine, 2005, 19(3): 141-142.
- [24] 李洋,王昊,张晨,等. 基于小RNA(sRNA)深度测序技术进行病毒鉴定和发现的研究进展[J]. 病毒学报, 2015, 31(4): 457-462.
Li Y, Wang H, Zhang C, et al. Advance in deep sequencing of small RNAs for virus identification and discovery [J]. Chinese Journal Virology, 2015, 31(4): 457-462.
- [25] 苏秀,徐毅,陈莎,等. 利用小RNA深度测序和组装技术鉴定紫藤花叶病病原[J]. 植物病理学报, 2015, 45(1): 88-92.
Su X, Xu Y, Chen S, et al. Detection of viruses infecting *Wisteria sinensis* by deep sequencing and assembly of small RNA [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2015, 45(1): 88-92.