

长沙地区南瓜的小西葫芦黄花叶病毒检测及其分子进化分析

刘嘉裕^{1a,2}, 戴良英^{1a,2}, 刘勇³, 张德咏³, 谭新球³, 李迅^{1a,4}, 唐前君^{1a,1b,2*}

(1.湖南农业大学 a.植物保护学院; b.病毒研究所, 湖南 长沙 410128; 2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 3.湖南省植物保护研究所, 湖南 长沙 410125; 4.爱荷华州立大学植物病理与微生物系, 美国 艾奥瓦州 50010)

摘要: 对长沙地区 160 份南瓜疑似病毒病样品进行小西葫芦黄花叶病毒(*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)检测, 检出率达 46.9%。为进一步明确长沙地区 ZYMV 分离物的分类地位和分子进化特征, 克隆获得了 1 个长沙地区 ZYMV 外壳蛋白基因, 与 GenBank 已报道的 ZYMV 外壳蛋白基因比对, 并进行基因重组、系统发生、遗传差异、选择压力、种群结构和基因漂变分析。结果显示: 长沙地区 ZYMV 外壳蛋白基因没有发生明显的重组, 突变与负选择作用是其进化的主要驱动力, 种群结构相对稳定, 但正处于扩张的趋势中; ZYMV 不同分离物外壳蛋白基因形成 3 个有明显地理相关性的美洲、欧洲和亚洲种群, 美洲和欧洲种群与亚洲种群之间基因交流不频繁, 可能受到遗传漂变的影响, 而欧洲种群与亚洲种群之间基因交流较频繁。

关键词: 南瓜; 小西葫芦黄花叶病毒; 外壳蛋白; 分子进化; 长沙地区

中图分类号: S436.429

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2017)03-0274-08

Detection of *Zucchini yellow mosaic virus* of pumpkin in Changsha and molecular evolution

LIU Jiayu^{1a,2}, DAI Liangying^{1a,2}, LIU Yong³, ZHANG Deyong³, TAN Xinqiu³, LI Xun^{1a,4}, TANG Qianjun^{1a,1b,2*}

(1.a.College of Plant Protection; b.Virus Research Institute, Changsha 410128; 2.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Hunan Agricultural University, Changsha 410128; 3.Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China; 4.Department of Plant Pathology & Microbiology, Iowa State University, Ames, Iowa 50010, The United States of America)

Abstract: *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) was detected in 160 suspected pumpkin virus samples in Changsha area, and the detection rate was 46.9%. To further clarify the classification and molecular evolution of ZYMV Changsha isolates, the coat protein gene was cloned and compared with the ZYMV coat protein gene reported in GenBank. And these sequences were analyzed for genetic recombination, phylogenetic, genetic differences, selection pressure, population structure and gene drift analysis. The results showed that no significant recombination of ZYMV coat protein gene was found. Mutation and negative selection are the main driving forces of its evolution, the population structure is relatively stable but is in the trend of expansion. The different isolates of ZYMV coat protein gene form 3 geographically relevant populations: America population, Europe population and Asia population. There is no frequent gene exchange between America and Europe and Asia, and each group may be affected by genetic drift, and gene exchange between Europe and Asia is more frequent.

Keywords: *Zucchini yellow mosaic virus*; coat protein; phylogenetic; molecular evolution; Changsha area

小西葫芦黄花叶病毒属于马铃薯 Y 病毒科 (Potyviridae) 马铃薯 Y 病毒属 (Potyvirus), 该病毒 1981 年由 LISA^[1] 和 LECOQ^[2] 分别在意大利和法国的小西葫芦上首次发现并报道, 后在美国^[3]、欧洲^[4]、中东^[5] 和中国台湾^[6] 迅速蔓延。1991 年, 郑光宇等^[7] 首次报道在中国新疆发现小西葫芦黄花叶病毒。小西葫芦黄花叶病毒现已成为侵染葫芦科植物的主要病毒之一。ZYMV 侵染的寄主主要有葫芦科、豆科、藜科、苋科植物。近年 ZYMV 的发生有加重的趋势, 湖南省葫芦科种植区是该病毒侵染发病的重灾区。

ZYMV 病毒粒体为弯曲线状, 是一种 (+)ssRNA 病毒, 基因组全长约 9.6 kb, 编码 1 个多聚蛋白, 通过其内部 3 种病毒蛋白酶加工形成 10 个功能蛋白^[8]。ZYMV 病毒的检测方法^[9-10]、发生起源与传播^[11-12]、基因组序列^[13] 已有较多研究。ZYMV 基因组 ORF 编码的最后 1 个蛋白是由 837 个核苷酸编码的外壳蛋白 (coat protein, CP), CP 包裹病毒 RNA 形成弯曲线状病毒粒子^[1], CP 亚基在没有病毒 RNA 的情况下可以通过聚集形成类似的结构。

CHEN 等^[14] 将 ZYMV 的 CP 基因的氨基酸核心区 and C 端序列分成 5 个种群; GU 等^[15] 将所有的 ZYMV 分成 5 个或者 6 个种群, 个别中国分离物单独 1 个群组; LIN 等^[16] 以相对保守的 CP 基因核苷酸序列进行分类, 将 11 个不同来源的 ZYMV 分成 4 个种群; BANANEJ^[17] 将 ZYMV 分离物分成 2 个种群 (A 和 B), 种群 A 在全球都有分布, 种群 B 主要来源于中国; 赵芹等^[18] 对广东地区冬瓜的 ZYMV 进行检测, 克隆 CP 基因, 并进行同源性比对和系统发育分析, 将 ZYMV 病毒划分为 7 个基因型, 广东分离物均属于同一基因型 I, 包含 3 个株系, 16 个分离物分成 3 组, 无明显地域选择性。

笔者对湖南长沙地区疑似感染病毒病的南瓜进行 ZYMV 检测, 病毒检出率高, 可能已成为长沙地区南瓜的主要病毒病之一, 克隆了其中 1 个 ZYMV 长沙分离物 CP 基因, 与其他分离物 CP 基因进行比对和进化分析, 发现 ZYMV 长沙分离物

与韩国分离物 (登录号 AB369279) 亲缘关系最近; ZYMV CP 基因区域没有发现明显重组, 比较保守; 突变和负选择作用是其进化的主要驱动力, 欧亚种群间基因交流较频繁。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

2016 年 9 月, 在长沙地区随机采集具有叶片花叶、畸形、皱缩、扭曲、斑驳的典型病毒病症状的南瓜样品 160 份, 保存于 -80 °C 冰箱。

1.2 方法

1.2.1 样品总 RNA 提取及 cDNA 合成

称量 0.5 g 南瓜样品置于预冷好的研钵, 加入适量液氮充分研磨至粉末, 采用 easyPure Plant RNA Kit 试剂盒提取南瓜总 RNA, 再使用 TransScript™ One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒合成 cDNA, -20 °C 保存。

1.2.2 南瓜样品 ZYMV 的鉴定

参考 GenBank 上登录的 ZYMV CP 基因序列, 使用 Premier 5.0 设计特异性检测引物 (上游引物 5'-TCAGGCACTCAGCCAACTGCG-3'; 下游引物: 5'-TTACTGCATTGTTGTTTCACACCTAAC-3'), 对南瓜样品进行 ZYMV 检测, 阳性 PCR 产物送湖南擎科生物技术有限公司测序, 测序结果经 NCBI 比对鉴定。

1.2.3 南瓜 ZYMV 长沙分离物 CP 基因的克隆

参考 KT598222 基因全序列, 使用 Premier 5.0 设计 2 对引物 (表 1), 由湖南擎科生物技术有限公司合成引物。对 PCR 产物作纯化处理后, 与 T1 载体连接, 转入 Trans5α 感受态细胞, 于 50 μg/mL Amp^r 的平板过夜培养, 筛选阳性克隆并提取质粒, 将质粒 DNA 送湖南擎科生物技术有限公司测序, 测序结果经 NCBI 比对鉴定。最后使用 DNASTAR 软件对上述 2 段序列作序列拼接。

表 1 克隆 ZYMV CP 基因所用的引物序列

Table 1 Primers for cloning coat protein gene of ZYMV				
扩增片段	引物名称	引物序列(5'-3')	引物位置	片段长度/bp
P1	P1-F	ACCTACAAGCCCTTCACC	8476~8493	501
	P1-R	CGTCCATCATAACCCACA	8976~8959	
P2	P2-F	TAAGGATGTGAATGCTGGTT	8663~8682	867
	P2-R	CTTCCGACAGGACTACGC	9529~9512	

1. 2. 4 ZYMV CP 基因 DNA 序列数据处理

从 GenBank 下载所有已报道的 ZYMV CP 的全基因核酸序列(截至 2017 年 2 月 18 日,共 46 条 CP 基因,表 2),并且将测序所得 ZYMV 的 CP 基因组序列进行 BLAST 检索,选取与其具有最近的亲缘关系物种 *Watermelon mosaic virus* 分离物作为外群。利用 BioEdit^[19]对下载序列和克隆的 CP 基因序列进

行处理,将全部序列翻译之后存在的瑕疵修正并删除终止密码子。将整理后的数据用 ClustalX2^[20]比对,为了保证经过序列比对后得到的核苷酸序列能够正确地编译出氨基酸序列,使用 Trans Align^[21]软件对 ClustalX2 比对后的核苷酸序列数据进行再处理。

表 2 涉及的 ZYMV 分离物的寄主和来源

Table 2 ZYMV isolates involved in this study					
登录号	寄主	报道来源	登录号	寄主	报道来源
DQ124239	<i>Cucurbita pepo</i>	斯洛伐克	JN192420	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
KT598222	<i>Cucurbita maxima</i>	阿根廷	JN192419	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
KT778297	<i>Cucumis anguria</i>	印度	JN192418	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
NC003224	<i>Luffa cylindrica</i>	中国台湾	JN192417	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
KF976713	<i>Cucurbita pepo</i>	斯洛伐克	JN192416	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
KF976712	<i>Cucurbita pepo</i>	捷克	JN192415	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
AF127929	<i>Luffa cylindrica</i>	中国台湾	JN192414	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
KX499498	<i>Cucurbita pepo</i>	西班牙	JN192413	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
KU528623	<i>Aphis</i>	伊朗	JN192412	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
KU198853	<i>Cucurbita pepo</i>	伊朗	JN192411	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
JQ716413	<i>Cucurbita pepo</i>	美国	JN192410	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
JN183062	<i>Cucurbita pepo</i>	伊朗	JN192409	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
JN192428	<i>Cucurbita pepo</i>	美国	JN192408	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
JN192427	<i>Cucurbita pepo</i>	美国	JN192407	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
JN192426	<i>Cucurbita pepo</i>	美国	JN192406	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
JN192425	<i>Cucurbita pepo</i>	美国	JN192405	<i>Cucurbita pepo</i>	美国
JN192424	<i>Cucurbita pepo</i>	美国	AY188994	<i>Cucurbita pepo</i>	以色列
JN192423	<i>Cucurbita pepo</i>	美国	AY279000	<i>Cucurbita moschata</i>	韩国
JN192422	<i>Cucurbita pepo</i>	美国	AY278999	<i>Cucurbita moschata</i>	韩国
JN192421	<i>Cucurbita pepo</i>	美国	AY278998	<i>Cucurbita moschata</i>	韩国
AB369279	<i>Cucurbita pepo</i>	韩国	AB188116	<i>Cucurbita pepo</i>	日本
EF062583	<i>Cucurbita pepo</i>	以色列	AB188115	<i>Cucurbita pepo</i>	日本
EF062582	<i>Cucurbita pepo</i>	以色列	KT992083	<i>Panax ginseng</i>	韩国

1.2.5 ZYMV CP 基因的分子进化分析

利用 RDP 4.0^[22]软件包中的 RDP、Geneconv、Bootscan、Maxchi、Chimaera、Siscan 和 3Seq 对上述比对所得的序列进行重组分析,检测可能存在的重组位点。当某分离物有 3 个或 3 个以上软件的检测结果 $P < 1.0 \times 10^{-6}$ 时,则该分离物存在可能的重组位点,否则不存在重组位点^[23]。

采用 MEGA 5.0 中的 Clustal W^[24]软件进行序列比对,利用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统进化树,重复 1 000 次。在 ML 法分析中,用 jModeltest^[25]软件确定数据最适合的核苷酸代替模型,结果显示 TRN+G 为最适的核苷酸替代模型;在 ML 分析中采用自举法,进行 1 000 倍模拟复制计算支长。

运用 DnaSP 5.0^[26]软件,通过计算其 Ks^* 、 Z 和 Snn ^[27-28],衡量种群之间的遗传差异,如果 Ks^* 和 Z 统计值很小, $P < 0.05$,则认为种群间存在遗传差异。 Snn 值接近 1,则支持种群的出现频率。通过计算 Fst 和 Nm 值来衡量基因交流的程度, Fst 的绝对值小于 0.33 时,说明 2 个种群之间存在基因交流,反之,交流不频繁^[29-30]。若 $Nm < 1$,则说明在种群间很容易发生基因漂变,是群体发生遗传差异的主要原因;若 $Nm > 1$,则说明种群间存在可以发生基因交流的渠道或者地缘关系较近。

应用 MEGA5.2,将 ZYMV 分离物按照地理来源分组,采用 Pamilo-Bianchi-Li method 法计算密码子的选择压力(非同义突变和同义突变的比值 dN/dS)^[31]。若 $dN/dS = 1$,说明该组分离物存在中性选择;若 $dN/dS < 1$,说明该组分离物存在负选择或净化;若 $dN/dS > 1$,说明该组分离物存在正向选择或多样化选择。

利用 DnaSP 5.0 软件,对 ZYMVCP 序列 837 个位点进行突变位点和保守区域分析。

DnaSP 5.0 软件能计算不同种群分离物的核苷酸多样性与单体型多样性,基于 Tajima's D 值、Fu & Li's D 值和 Fu & Li's F 值进行中性检验分析。Tajima's D 值和 Fu & Li's D 值和 Fu & Li's F 均为负值,说明该种群多样性较低,种群呈扩张趋势;相反,种群稳定选择,种群数量正在减少^[32-33]。

2 结果与分析

2.1 南瓜样品中 ZYMV 的检测结果

对采自长沙地区的 160 份南瓜病毒病疑似样品进行 RT-PCR 检测,发现 ZYMV 的检出率为 40.0%~54.1%(表 1),平均检出率达 46.9%。

表 2 长沙地区南瓜样品 ZYMV 的检出率

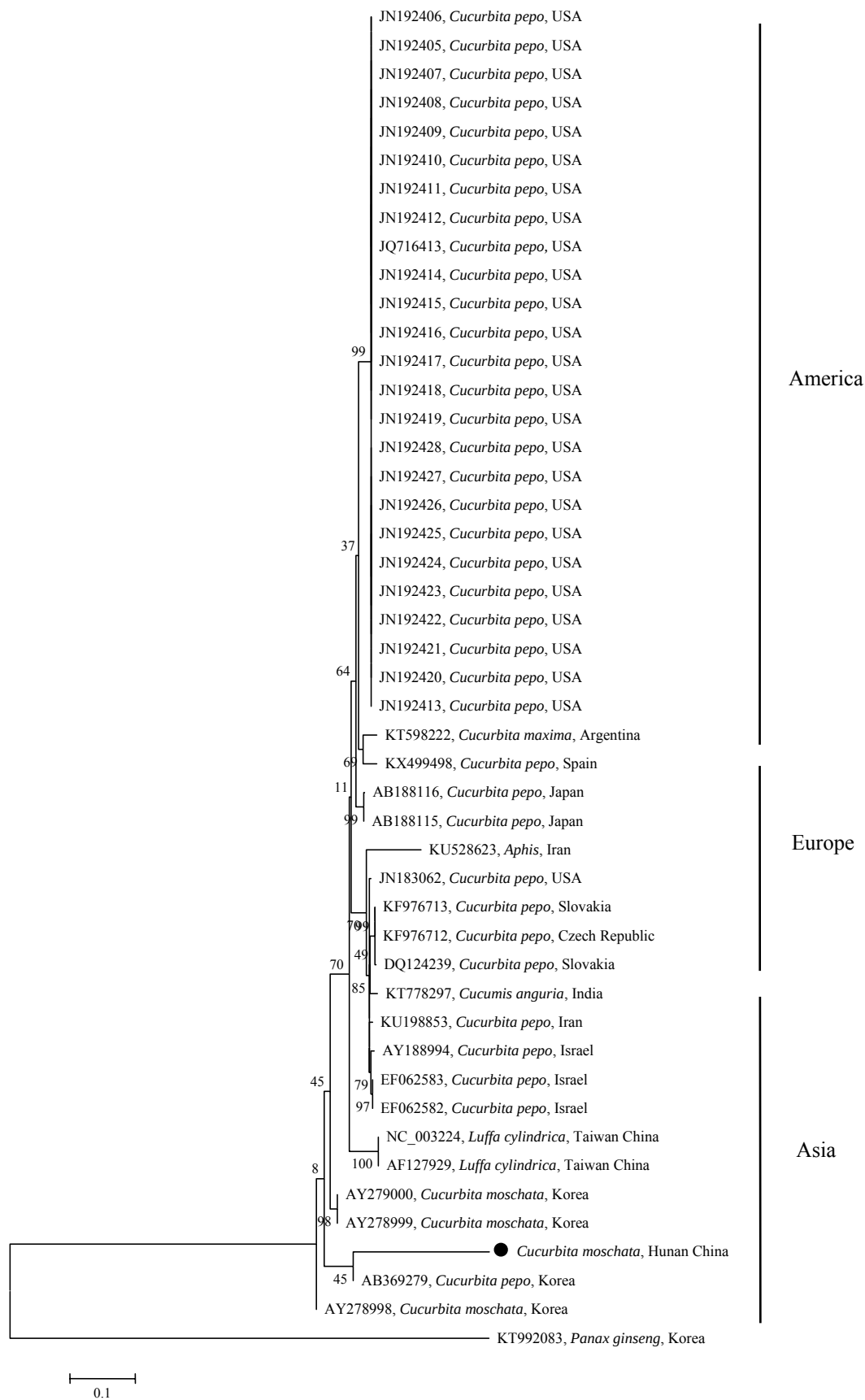
Table 2 Positive rate of ZYMV in pumpkin samples collected in Changsha

采集地	采集数量	阳性数	检出率/%
长沙高桥镇	37	20	54.1
长沙春华镇	38	17	44.7
宁乡喻家坳乡	20	8	40.0
湖南省农科院	42	19	45.2
浏阳南桥镇	23	11	47.8

2.2 ZYMV CP 基因分子进化分析

对数据处理后的 ZYMV CP 基因序列进行重组分析,结果发现,分离物的 P 值都大于 1.0×10^{-6} ,没有发现明显的重组位点。为了进一步确认这一结果,运用 SimPlot 再次检测,仍未发现明显的重组位点,因而确认在 ZYMV 分离物不存在重组体或者不明显。

对数据处理后的 ZYMV CP 基因序列进行分子发育分析,ZYMV 不同分离物形成 3 个种群,分别为美洲、欧洲和亚洲种群,不同组间的分离物地理特征明显,如图 1 所示。



水平分支的长度参照 0.1 的标尺按比例绘制; 以西瓜花叶病毒分离物(登录号 KT992083)作为外群。

图 1 ZYMV CP 基因序列系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree constructed based on the CP gene sequences of ZYMV

利用 K_s^* 、 Z 和 Snn 对 ZYMV CP 序列的美洲、欧洲和亚洲种群间的遗传变异进行分析,结果表明, K_s^* 和 Z 统计值都比较小, $P<0.001$ (表 3),美洲和欧洲、美洲和亚洲种群间的遗传变异十分明显。欧洲和亚洲 ZYMV 种群间的 $F_{st} < 0.33$ 表明 ZYMV

在近距离种群间基因交流的频率较高。美洲和欧洲、美洲和亚洲 ZYMV 种群间的 $N_m < 1$,表明种群可能受到遗传漂变影响,欧洲和亚洲 ZYMV 种群间的 $N_m > 1$,表明种群间存在可以发生基因交流的渠道。

表 3 ZYMV 的基因流动和遗传差异

Table 3 Gene flow and genetic differentiation of ZYMV					
种群及序列数	K_s^* (P 值)	Z (P 值)	Snn (P 值)	F_{st}	N_m
美洲(26)与亚洲(12)	1.301 48(0.000 0***)	268.329 80(0.000 0***)	1.000 00(0.000 0***)	0.468 60	0.28
美洲(26)与欧洲(8)	0.872 35(0.000 0***)	218.037 36(0.000 0***)	0.941 18(0.000 0***)	0.523 61	0.23
亚洲(12)与欧洲(8)	3.574 35(0.031 0*)	93.250 54(0.241 0ns)	0.850 00(0.003 0**)	0.061 91	3.79

*, 0.01<P<0.05; **, 0.001<P<0.01; ***, P<0.001。

选择压力分析结果显示,ZYMV 所有分离物的 dN/dS 均远小于 1(表 4),突变为非同义突变,表明 ZVMY 不同种群都处于较强的负选择压力下。

表 4 ZYMV 的选择压力

Table 4 Selection pressure analysis of ZYMV				
种群	序列数	dN	dS	dN/dS
美洲	26	0.000 63±0.000 26	0.009 63±0.001 87	0.065 42
欧洲	8	0.022 16±0.003 89	0.130 09±0.017 00	0.170 34
亚洲	12	0.025 18±0.004 12	0.260 36±0.025 23	0.085 11
全部	46	0.013 57±0.002 03	0.150 85±0.014 97	0.089 96

种群结构分析发现,不同的 ZYMV 分离物种群的核苷酸序列多样性和单体型多样性存在差异,其中亚洲种群的核苷酸序列多样性值差异最大,欧洲种群单体型多样性差异最大(表 5)。

表 5 ZYMV 的核苷酸和单体型多样性

Table 5 Nucleotide and haplotype diversity of ZYMV			
种群	序列数	核苷酸多样性	单体型多样性
美洲	26	0.003 34±0.131 86	0.077±0.070
欧洲	8	0.049 39±0.055 92	0.964±0.077
亚洲	12	0.075 31±0.086 17	0.955±0.047
全部	46	0.059 01±0.131 86	0.719±0.074

突变位点分析发现,有可变位点 245 个,单突变位点 102 个,其中 2 个变异型位点 93 个,3 个变异型位点 9 个;简约信息位点 143 个,其中 2 个变异型位点 119 个,3 个变异型位点 22 个,4 个变异型位点 2 个。

保守区域分析发现,ZYMV 编码区的保守性(sequence conservation)达到 0.61,仅有欧洲种群基因编码的氨基酸保守值(conservation threshold)高于 0.85(表 6),由此可见,ZYMV 基因编码区突变率较低,比较保守。

表 6 ZYMV 基因编码区的保守区域

Fig.6 Conservation regions of the coding regions of ZYMV				
种群	起始位点	保守性	一致性	P 值
美洲	327~837	0.624	0.998	0.000 0
欧洲	327~837	0.869	0.966	0.000 0
亚洲	327~837	0.624	0.941	0.000 0
全部	327~837	0.624	0.955	0.000 0

中性检测分析发现,ZYMV 不同种群的中性检测统计值均为负值(表 7),说明 ZYMV 处于扩张趋势,种群多态性较低。总体而言,在独特的地理分组中进行 3 个中性平衡模型偏差分析,连同其高单体型多样性及低核苷酸多样性,提示 ZYMV 种群在扩张。

表 7 ZYMV 的中性检测

Table 7 Neutrality tests of ZYMV				
种群	序列数	Fu & Li's D	Fu & Li's F	Tajima's D
美洲	26	-4.622 30	-4.696 95	-2.649 06
欧洲	8	-0.693 62	-0.759 65	-0.636 28
亚洲	12	-0.425 64	-0.536 05	-0.592 53
全部	46	-3.806 97	-3.753 63	-2.027 62

3 结论与讨论

对长沙地区病毒病南瓜样品进行 ZYMV 检测,克隆其中 1 个分离物的 CP 基因全序列,对 CP 序列进行了重组、系统发育、遗传变异、基因交流和种群结构分析。结果表明,长沙地区 ZYMV 分离物没有明显的重组体,所有的分离物大致可以分为 3 个种群:美洲、欧洲和亚洲种群,种群之间有明显的地理相关性。美洲与欧洲和亚洲种群地理距离远,种群可能受到遗传漂变的影响,遗传变异十分

显著,但基因交流不频繁。而欧洲与亚洲种群相邻,种群之间遗传变异不显著,但基因交流频繁。亚洲 ZYMV 种群的核苷酸序列多样性相比其他种群差异大,欧洲种群相对其他种群的单体型多样性差异较大。3 个种群都处于较强的负选择压力下,并且处于扩张趋势中,负选择作用是驱使 ZYMV 进化的主要作用之一。

在植物 RNA 病毒病中,导致遗传多样性的主要因素是基因重组^[34],如马铃薯 Y 病毒科 Potyviridae 中重组发生特别频繁,对塑造 PVY 种群遗传结构产生重要影响^[35]。本研究针对 ZYMV CP 全序列进行重组分析,没有发现明显的重组现象,可能是因为序列的区域(长度)有限,导致了重组体的遗漏。

系统发育分析发现,ZYMV CP 序列形成 3 个相对独立的种群,种群间具有一定的地理特异性。美洲种群来源于美国 and 阿根廷,欧洲种群来源于西班牙和中东地区,但也有个别的亚洲分离物,表明 ZYMV 种群在欧洲与亚洲之间交流可能比较频繁。

病毒在寄主体内是以“突变云”或者“准种”形式存在的,突变是驱动 ZYMV 进化的主要作用力之一。选择压力分析表明,ZYMV 不同群组的 dN/dS 值都远小于 1,大部分植物病毒处于强的负选择压力下,说明 ZYMV 进化受到强的负选择压力的驱动,自然选择是其进化的主要驱动力。变异分析发现 ZYMV 的种群遗传结构相对稳定,基因组序列变异较小,比较保守。

综上,突变、负选择作用以及遗传漂变是驱动 ZYMV 进化的主要作用力,而基因重组在 ZYMV 的进化中驱动作用不明显;ZYMV 不同分离物形成 3 个种群,但尚不能明确其起源;中性检测以及核苷酸和单体型多样性分析,共同表明 ZYMV 处于种群扩张的趋势中。

参考文献:

- [1] LISA V, BOCCARDO G, DELLAVALLE G, et al. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic virus [J]. *Phytopathology*, 1981, 71: 667-672.
- [2] LECOQ H, PITRAT M, CLÉMENT M. Identification et caractérisation d'un potyvirus provoquant la maladie du rabougrissement juane du melon [J]. *Agronomie*, 1981, 1(10): 827-834.
- [3] BATESON M F, HENDERSON J, CHALEEPROM W, et al. Papaya ringspot virus: isolate variability and the origin of PRSV type P (Australis)[J]. *J General Virology*, 1994, 75: 3547-3553.
- [4] ATREYA C D, RACCAH B, PIRONE T P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a poty-virus[J]. *Virology*, 1990, 178(1): 161-165.
- [5] AREYA P L, ATEYA C D, PIRONE T P, et al. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus[J]. *Microbiology*, 1991, 88(17): 7887-7891.
- [6] CHEZZI C, SCHOU B D. Differentiation between vaccinerelated and wild-type polioviruses using a heteroduplex mobility assay [J]. *Virol Methods*, 1996, 62(2): 93-102.
- [7] 郑光宇,董涛. 在新疆发生的小西葫芦黄化花叶病毒的研究初报[J]. *植物病理学报*, 1991, 21(1): 72.
- [8] DIANA L, DALIA W, VINOD S, et al. A high level of transgenic viral small RNA is associated with broad potyvirus resistance in cucurbits[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(24): 1220-1238.
- [9] WEI Ting, MICHAEL N P, DIETNAR B, et al. Development of a short oligonucleotide microarray for the detection and identification of multiple potyviruses[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 162(1/2): 109-118.
- [10] LUO H, WYLIE S J, JONES M G K. Identification of plant viruses using one-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprints[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 165(2): 297-301.
- [11] COUTTS B A, KEHOE M A, WEBSTER C G, et al. Zucchini yellow mosaic virus: biological properties, detection procedures and comparison of coat protein gene sequences[J]. *Arch Virol*, 2011, 156(12): 2119-2131.
- [12] NEHA S, SATYA V B, ANJU S, et al. Comparative genomic and proteomic phylogenetic analysis of Indian isolate of partial coat protein gene sequence of zucchini yellow mosaic virus(ZYMV) using data mining[J]. *Proteomics Bioinform*, 2012, 5(9): 196-203.
- [13] AZARFR A, IZADPANAH K, AFSHANFARA, et al. Purification and the complete genome sequence of Zucchini Yellow Mosaic Virus Fars isolate [J]. *Iran Journal of Plant Pathology*, 2012, 48(3): 403-409.
- [14] CHEN Y K, HONG Y H. First report of Begonia chlorotic ringspot caused by Zucchini yellow mosaic virus in Taiwan[J]. *Plant Disease*, 2008, 92(8): 1247.
- [15] GU Q S, FAN Z F, ROGGERO P, et al. Cloning and sequence analysis of the coat protein gene of Zucchini yellow mosaic virus from China[J]. *Acta Phytopatholo-*

- gica Sinica, 2003, 33(6): 498–502.
- [16] LIN S S, WU H W, JAN F J, et al. Modifications of the helper component–protease of *Zucchini yellow mosaic* for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection [J]. *Phytopathology*, 2007, 97(3): 287–296.
- [17] BANANEJ K, KESHAVERZ T, VAHDAT A. Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran [J]. *Phytopathology*, 2008, 156(11/12): 654–659.
- [18] 赵芹, 谢大森, 何晓明, 等. 广东地区冬瓜感染的小西葫芦黄花叶病毒检测及其外壳蛋白基因多样性分析 [J]. *园艺学报*, 2016, 43(1): 151–160.
- [19] ALZOHAIY A M. BioEdit: an important software for molecular biology [J]. *Gerf Bulletin of Biosciences*, 2011, 2(1): 60–61.
- [20] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947–2948.
- [21] GOFFARD N, WEILLER G. PathExpress: a web-based tool to identify relevant pathways in gene expression data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(Web Server issue): 176–181.
- [22] MARTIN D P. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes [J]. *Virus Evolution*, 2015, 1(1): vev003.
- [23] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [24] TOMITAKA Y, OHSHIMA K. A phylogeographical study of the *Turnip mosaic virus* population in East Asia reveals an ‘emergent’ lineage in Japan [J]. *Molecular Ecology*, 2006, 15(14): 4437–4457.
- [25] POSADA D. jModelTest: phylogenetic model averaging [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25(7): 1253–1256.
- [26] FU Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 915–925.
- [27] HUDSON R R. A new statistic for detecting genetic differentiation [J]. *Genetics*, 2000, 155(4): 2011–2014.
- [28] PAMILO P, BIANCHI N O. Evolution of the *Zfx* and *Zfy* genes: rates and interdependence between the genes [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, 10(2): 271–281.
- [29] NGUYEN H D, TRAN H T N, OHSHIMA K. Genetic variation of the *Turnip mosaic virus* population of Vietnam: a case study of founder, regional and local influences [J]. *Virus Research*, 2013, 171(1): 138–149.
- [30] YIN Xiao, ZHENG Fangqiang, TANG Wei, et al. Genetic structure of *Rice black-streaked dwarf virus* populations in China [J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(12): 2505–2515.
- [31] FU Y X, LI W H. Statistical tests of neutrality of mutations [J]. *Genetics*, 1993, 133(3): 693–709.
- [32] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585–595.
- [33] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [34] ROOSSINCK M J. Mechanisms of plant virus evolution [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1997, 35: 191–209.
- [35] OGAWA T, NAKAGAWA A, HATAYA T, et al. The genetic structure of populations of *Potato virus Y*, in Japan; based on the analysis of 20 full genomic sequences [J]. *Journal of Phytopathology*, 2012, 160(11/12): 661–673.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维