

西瓜花叶病毒西葫芦分离物的基因组及其侵染性克隆

刘莉铭^{1,2}, 彭 斌¹, 康保珊^{1,2}, 吴会杰^{1,2}, 刘 茜^{1,2}, 古勤生^{1,2}

(1. 河南省果树瓜类生物学重点实验室·中国农业科学院郑州果树研究所 郑州 450009;

2. 中国农业科学院中原研究中心 郑州 450009)

摘要: 西瓜花叶病毒(watermelon mosaic virus, WMV)是危害瓜类作物的一种主要病毒,笔者分析了西葫芦分离物CH99/69的基因组序列和分子变异,构建了具有侵染性的全长cDNA克隆。结果显示,CH99/69分离物基因组全长为10 047 nt,与其他分离物的全基因组核苷酸、多聚蛋白核苷酸和多聚蛋白氨基酸的序列一致性分别为81.40%~94.80%、81.40%~94.70%、88.40%~97.20%。基于全基因组序列的系统进化分析显示,CH99/69与中国的Urumqi火参果分离物、WMV-WS西葫芦分离物和法国的WMV-Fr西葫芦分离物亲缘关系较近,它们均聚于I组中,而与中国的WMV-Pg人参分离物、WMV-GZca臭椿分离物、hollyhock蜀葵分离物亲缘关系最远。接种试验显示,CH99/69分离物的克隆具有侵染性,能系统侵染甜瓜、西瓜、西葫芦和瓠瓜,经接种产生的病毒后代能够通过摩擦接种进行侵染。

关键词: 西瓜花叶病毒;西葫芦分离物;基因组;侵染性克隆

中图分类号:S651

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2023)10-016-07

The genome and infectious clone of watermelon mosaic virus zucchini isolate

LIU Liming^{1,2}, PENG Bin¹, KANG Baoshan^{1,2}, WU Huijie^{1,2}, LIU Qian^{1,2}, GU Qinsheng^{1,2}

(1. Henan Key Laboratory of Fruit and Cucurbit Biology/Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China; 2. Zhongyuan Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: Watermelon mosaic virus (WMV) is one of the most important viruses in cucurbits crops. In this study, the genome sequence of isolate CH99/69 was cloned and analyzed, and its full-length cDNA clone was constructed. The results showed that the genome of isolate CH99/69 was 10 047 nt in length, and the identities of the genome nucleotide sequence, the polyprotein nucleotide and amino acid sequence between CH99/69 and other isolates were 81.40%-94.80%, 81.40%-94.70% and 88.40%-97.20%. Phylogenetic analysis based on genome sequences showed that CH99/69 was most closely related to isolate Urumqi and WMV-WS from China and WMV-Fr from France, those of which clustered in group I, but isolates WMV-Pg, WMV-GZca and hollyhock from China were the farthest related. The inoculation showed that the infectious clone was successfully constructed, and it could systematically infect melon, watermelon, zucchini, and bottle gourd. The progeny produced from the clone was infectious by mechanical inoculation.

Key words: Watermelon mosaic virus; Zucchini isolate; Genome; Infectious clone

西瓜花叶病毒(watermelon mosaic virus, WMV)属于马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*),主要分布在温带和地中海地区,自然条件下通过蚜虫以非持久性方式进行传播,也可通过机械方式进行传播。该病毒寄主范围广泛,可侵染西瓜、甜瓜等多种葫芦科作物,也可侵染胡萝卜^[1]、刺槐^[2]、芝麻^[3]、甜椒^[4]、

兰花^[5]、百香果^[5]、人参^[6]、臭椿^[7]、紫薇^[8]、蜀葵^[9]等作物,主要引起植株矮化、叶片花叶和畸形,影响作物的商品性。

WMV是一种单链正义RNA病毒,基因组全长约为10 kb,编码一个多聚蛋白,该蛋白可被自身编码的蛋白酶识别,切割成10个成熟蛋白P1、

收稿日期:2023-08-15;修回日期:2023-09-13

基金项目:河南省科技攻关项目(202102110075);国家现代农业产业技术体系(CARS-25-2023-G20);中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2022-ZFRI-09)

作者简介:刘莉铭,女,助理研究员,主要从事西甜瓜病害研究。E-mail:liuliming@caas.cn

通信作者:古勤生,男,研究员,主要从事西甜瓜病害绿色防控研究。E-mail:guqinsheng@caas.cn

HC-Pro、P3、6K1、CI、6K2、NIa-VPg、NIa-Pro、NIb 和 CP,在 P3 编码区由转录滑动机制产生第 11 个蛋白 P3N-PIPO^[10]。基于 P1、NIb-CP 和 CP 的 N 端核苷酸序列,WMV 分成经典组(CL)、组 2(G2)和新兴组(EM)。CL 组包含法国流行的经典分离物,EM 组包含法国东南部新发生的在西葫芦上引起严重症状的分离物,G2 组分离物无特殊生物学性状,来自世界不同地区^[11-12]。研究显示,该病毒基因组不同区域的分子变异性有所差异,且基因组内存在大量的重组断裂点^[4,13-17],进行系统进化分析时有必要获得病毒的全基因组序列。

病毒侵染性克隆的获得使得研究 RNA 病毒实现了在 DNA 水平上进行各种分子操作,近年来,病毒侵染性克隆应用越来越广泛^[18-21]。前期中国农业科学院郑州果树研究所西瓜甜瓜病虫害防控课题组(本团队)从西葫芦发病植株上分离得到 WMV 分离物 CH99/69^[22],在此基础上,笔者拟通过扩增获得该分离物的全基因组序列,并进行全基因组序列分析,同时通过构建它的全长 cDNA 克隆,分析其在不同瓜类作物上的侵染性,为在瓜类作物上开展该病毒的致病和抗病相关的工作奠定基础。考虑到目前已有 WMV 其他分离物侵染性克隆成功构

建的报道^[23-25],该克隆的获得也将有助于开展不同分离物之间分子变异性、致病性和适应性的联合分析,以更好地揭示 WMV 分子进化机制,为控制该病毒导致的病害探索新的策略。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2021 年 4—9 月在中国农业科学院郑州果树研究所进行。供试 WMV 分离物 CH99/69 来源于西葫芦发病植株,由中国农业科学院郑州果树研究所西瓜甜瓜病虫害防控课题组鉴定和保存。植物表达载体 pXT1 由南京农业大学陶小荣教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 载体构建 取约 0.1 g 西葫芦发病叶片,利用 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒和 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 提取叶片总 RNA 和合成 cDNA,具体操作参照试剂盒说明书。从 GenBank 数据库中下载并比对分析 WMV 的全基因组序列,根据序列的保守性,设计 5 对引物 HF-W-1F/W-1R、W-2F/W-2R、W-3F/W-3R、W-4F/W-4R、W-5F/HF-W-5R(表 1),以合成的 cDNA 为模

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物名称	序列(5'-3')	用途
HF-W-1F	GTTCATTTTCATTTGGAGAGGAAATTAACWACTCATAAAGACATCA	构建 pWMV-CH99
W-1R	CAACTGATTATCRCARAGYAAAC	
W-2F	GTTTRCTYTGYGATAATCAGTTG	
W-2R	CAACTGCCTRTGCCACCA	
W-3F	TGGTGGCAYAGGCAGTTG	
W-3R	CCAACCACCACCAATCAAAG	
W-4F	CTTTGATTGGTGGTGGTTGG	
W-4R	ATGCCAACTGTCCATGGACA	
W-5F	TGTCCATGGACAGTTGGCAT	
HF-W-5R	TGGAGATGCCATGCCGACCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGACAACAAACATTACCGTA	
W-8674F	ATGCACCGCACTGAGGCAA	RT-PCR 检测
W-10047R	AGGACAACAAACATTACCGTA	
W-9399F	GGAAGAGCAAGTTGAGTACC	探针合成
W-T7-9782R	TAATACGACTCACTATAGGGCCCATACCAACAAAGTATGC	

板,将分离物 CH99/69 的全基因组分成 5 段进行扩增,随后利用 NEBuilder 高保真 DNA 组装预混液将扩增获得的 5 个 PCR 产物与经 *Stu* I 和 *Sma* I 双酶切处理的植物表达载体 pXT1 进行同源重组、转化、菌液 PCR 筛选、测序验证,最终获得含有 CH99/69 全基因组的 cDNA 克隆 pWMV-CH99。

1.2.2 序列分析 对 pWMV-CH99 进行测序、拼接,获得 CH99/69 分离物的全基因组序列。从 GenBank 数据库中下载 38 条来自不同国家的 WMV 分离物全基因组序列,利用 ClustalW 软件将它们与 CH99/69 分离物进行序列比对,再用 BioEdit 软件对它们进行全基因组核苷酸和氨基酸序列一致性

分析^[26]。以大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV, NC_002634)为外组,基于以上 WMV 分离物的全基因组核苷酸序列,利用 Mega X 软件中的邻接法(neighbor-joining, NJ)进行系统进化分析^[27],1000 次重复。

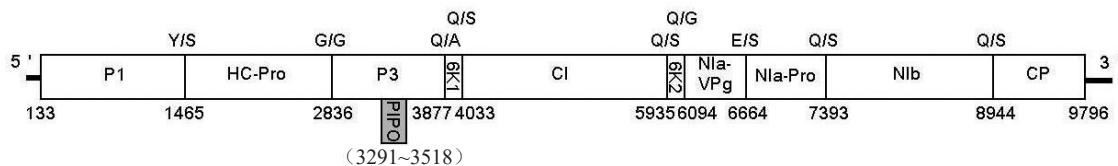
1.2.3 接种试验 试验于 2021 年 6—8 月在中国农业科学院郑州果树研究所西瓜甜瓜病虫害防控课题组温室进行。其中,甜瓜品种为白玫,由新疆农业科学院哈密瓜研究中心提供;西瓜品种为红和平,种子购自浙江浙农种业有限公司;西葫芦品种为珍玉 358,种子购自河南豫艺种业科技发展有限公司;瓠瓜品种为亲抗水瓜,种子购自湖南雪峰种业有限公司。将 pWMV-CH99 转入农杆菌菌株 GV3101 中,随后进行培养、接种,将 pWMV-CH99 转入农杆菌菌株 GV3101 中,随后进行培养、接种,将 pWMV-CH99 利用农杆菌介导的方法接种甜瓜、西瓜、西葫芦和瓠瓜植株,并将发病叶片进行摩擦接种分析,具体方法参照刘莉铭等^[28]的报道。采集

系统发病叶片,以 W-8674F/W-10047R 为引物(扩增的目的片段为 1374 bp),利用 HiScript® II One Step RT-PCR Kit (Dye Plus)对病毒的侵染情况进行检测分析。另外,以 W-9399F/W-T7-9782R 为引物,对 CH99/69 基因组 9399~9782 nt 区域进行扩增,经体外转录合成地高辛标记的 RNA 探针,利用 dot blot 方法检测植株叶片中 WMV 的侵染情况。

2 结果与分析

2.1 WMV 分离物 CH99/69 基因组结构分析

CH99/69 分离物基因组全长为 10 047 nt,它的 5'UTR 和 3'UTR 分别对应基因组的 1~132 nt 和 9796~10 047 nt,全基因组编码 1 个由 3220 个氨基酸组成的多聚蛋白(133~9795 nt),经蛋白酶切割,形成 10 个成熟的蛋白质,同时 P3 编码区内部通过+2 移码产生 PIPO,它可与 P3 的 N 端融合表达形成 P3N-PIPO 蛋白,其基因组结构如图 1 所示,GenBank 登录号为 MN296125。



注:方框下面的数字代表不同区域的第一个核苷酸位置,方框上方的大写字母表示预测的裂解位点。

图 1 WMV 分离物 CH99/69 的基因组结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of WMV isolate CH99/69 genome organization

2.2 分离物 CH99/69 序列分析

序列一致性分析结果(表 2)显示,不同 WMV 分离物之间的全基因组核苷酸、多聚蛋白核苷酸和多聚蛋白氨基酸序列一致性分别为 81.10%~99.70%、81.10%~99.80%、87.20%~99.80%,分离物 CH99/69 与这些分离物的序列一致性分别为 81.40%~94.80%、81.40%~94.70%、88.40%~97.20%。其中,CH99/69 与中国乌鲁木齐的火参果分离物 Urumqi(MW345911)的序列一致性最高,分别为 94.80%、94.70%、97.20%,与中国陕西的西葫芦分离物 WMV-WS (KX664483)一致性次之,与中国辽宁的臭椿分离物 WMV-GZca(MF418043)一致性最低。

基于 WMV 全基因组序列的系统进化分析结果显示,供试 39 个 WMV 分离物可以分为 4 组,本研究获得的 CH99/69 分离物与来自中国乌鲁木齐的火参果分离物 Urumqi(MW345911)、中国陕西的

西葫芦分离物 WMV-WS (KX664483)和法国的西葫芦分离物 WMV-Fr (AY437609)亲缘关系较近,它们均聚于 I 组中,而与中国的人参分离物 WMV-Pg (KX926428)、臭椿分离物 WMV-GZca (MF418043)、蜀葵分离物 hollyhock (MK217416)亲缘关系最远(图 2)。

2.3 分离物 CH99/69 全长 cDNA 克隆的侵染性

将 CH99/69 的 cDNA 克隆 pWMV-CH99 利用农杆菌介导的方法接种甜瓜、西瓜、西葫芦和瓠瓜植株。接种后 1 周左右,甜瓜、西葫芦和瓠瓜接种植株开始产生脉带、花叶或褪绿斑点,接种后 2 周左右,西瓜接种植株开始产生花叶、卷叶症状(图 3-A)。随着接种时间的延长,甜瓜和西瓜发病植株症状逐渐加重,叶片严重花叶、卷叶或畸形,植株矮化。PCR 检测和 dot blot 检测证实发病植株确实被 WMV 所侵染(图 3-B~C)。将甜瓜发病叶片通过摩擦方式接种以上 4 种瓜类作物,发现在接种 1~2 周

表2 WMV分离物CH99/69与其他分离物全基因组核苷酸和氨基酸的序列一致性
Table 2 The identity of nucleotide sequences and amino acid sequences of complete genome between WMV isolate CH99/69 and other isolates

GenBank 登录号	分离物	分离地	寄主	全基因组	多聚蛋白	
					核苷酸	氨基酸
DQ399708	WMV-CHN	中国陕西	西瓜	90.80	90.60	96.00
JX079685	WMV-ShanXi	中国陕西	西瓜	91.60	91.50	96.40
KX664483	WMV-WS	中国山西	西葫芦	93.60	93.60	96.30
KX926428	WMV-Pg	中国	人参	83.50	84.00	91.10
MF418043	WMV-GZca	中国辽宁	臭椿	81.40	81.40	88.40
MG194418	WMV-Li	中国浙江	紫薇	89.50	89.50	94.80
MK217416	hollyhock	中国山西	蜀葵	82.80	83.30	90.90
MW345911	Urumqi	中国乌鲁木齐	火参果	94.80	94.70	97.20
KP164988	WMV 1 SDE FF	阿根廷	-	90.30	90.10	95.40
EU660580	CHI87-620	智利	西葫芦	89.50	89.40	95.30
EU660582	CHI02-481	智利	-	91.80	91.90	95.80
AY437609	WMV-Fr	法国	西葫芦	92.50	92.50	96.30
EU660581	FMF00-LL1	法国	西葫芦	90.30	90.20	95.40
EU660583	FMF03-141	法国	西葫芦	90.40	90.20	95.30
EU660585	C05-270	法国	甜瓜	91.60	91.50	96.90
EU660586	FBR04-37	法国	西葫芦	91.80	91.60	97.10
EU660587	C06-188	法国	黄瓜	91.30	91.40	96.00
EU660589	C05-337	法国	西葫芦	91.80	91.80	95.90
JF273459	C05-464	法国	西葫芦	91.80	91.80	95.80
JF273460	C05-465	法国	西葫芦	91.60	91.40	96.80
JF273462	C06-526	法国	甜瓜	91.80	91.80	96.10
JF273463	C06-257	法国	甜瓜	91.70	91.50	97.10
KM597070	RKG	印度	西瓜	90.90	90.70	95.30
KM597071	RKG2	印度	西瓜	90.70	90.60	95.30
EU660584	IR02-54	伊朗	西葫芦	92.10	92.20	96.60
EU660590	ITA00-G	意大利	西葫芦	91.70	91.90	96.10
FJ823122	Lecce	意大利	西瓜	91.60	91.50	96.70
AB369278	KOREA	韩国	甜瓜	90.50	90.30	95.70
LC412927	Sa	韩国	刺果瓜	90.60	90.40	95.30
AB218280	WMV-Pk	巴基斯坦	甜瓜	91.90	91.90	96.30
MH469650	Vera	西班牙	甜瓜	90.30	90.10	95.40
MW147356	MeWM7	西班牙	甜瓜	90.40	90.30	95.20
EU660579	TURK91	土耳其	-	92.40	92.50	96.50
KU246036	TX29	美国	西瓜	89.60	89.50	94.30
KX512320	passiflora	美国	百香果	88.30	88.30	93.10
MN686524	TX113	美国	西瓜	91.30	91.10	96.30
MN686525	BL-16	美国	西瓜	91.50	91.30	96.60
KC292915	VE10-099	委内瑞拉	小刺黄瓜	89.10	89.10	94.90

注:-表示未公开寄主信息。

内所有接种植株也均可发病。以上研究说明分离物CH99/69的侵染性克隆构建成功,该克隆在4种供试瓜类作物上均可系统侵染并引起典型的花叶症状。

3 讨论与结论

本团队前期基于WMV CP基因的序列对分离

物CH99/69进行了初步的系统进化分析,发现该病毒不同分离物之间具有一定的地理特异性,且CH99/69与中国分离物WMV-CHN亲缘关系较近^[22]。笔者的研究基于WMV的全基因组序列对其进一步进行了进化分析,发现在中国分离物中,

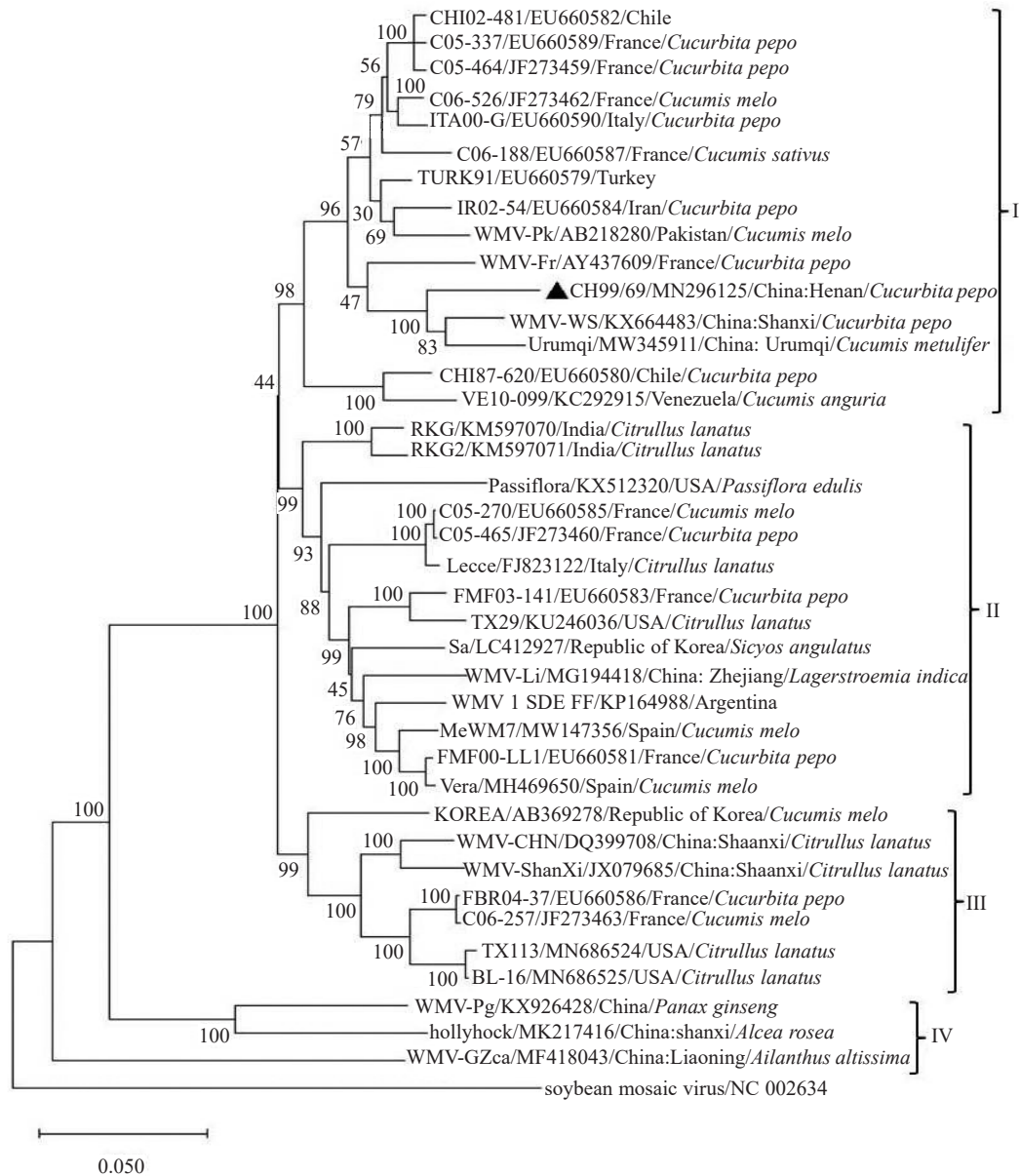


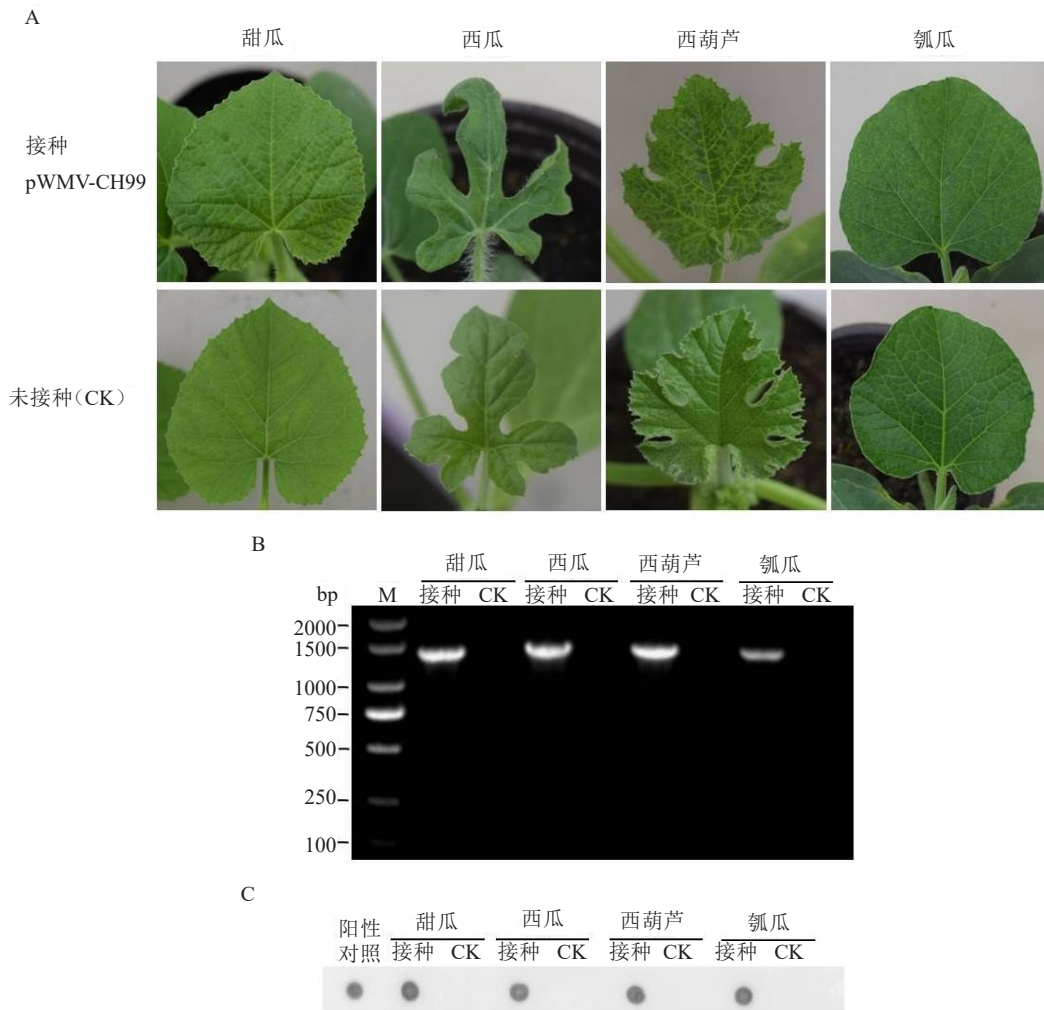
图2 基于全基因组序列的WMV分离物系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of WMV isolates based on complete genome sequence

CH99/69 与 Urumqi 和 WMV-WS 亲缘关系较近, 与 WMV-CHN 亲缘关系稍远, 与 WMV-Pg、hollyhock 和 WMV-GZca 亲缘关系更远, 且来自其他国家(如法国、意大利、韩国和美国)的不同分离物在进化上也有一定的分化, 说明 WMV 分离物与地域差异不完全相关, 该结果与前期结果^[22]有所不同, 而与 Pozzi 等、韩盛等^[15, 29]的报道一致。分离物 CH99/69 与 WMV-CHN、Urumqi 和 WMV-WS 之间的序列比对结果显示, CH99/69 与 WMV-CHN 的 CP 蛋白氨基酸序列一致性(98.90%)介于 CH99/69 与 WMV-WS 和 Urumqi 的一致性(96.80%、99.20%)之间, 而 CH99/69 和 WMV-CHN 的全基因组核苷酸、多聚蛋白核苷酸和

多聚蛋白氨基酸的序列一致性均低于与 WMV-WS 和 Urumqi CH99/69 的一致性, 而这与 CH99/69 和 WMV-CHN 之间其他区域如 P3、CI、NIa-VPg、NIa-Pro 和 NIB 的差异有关, 该差异将导致基于 CP 部分序列和全基因组序列进行的系统进化分析结果会有所不同。因此, 为了弥补基于病毒部分序列进行分析的局限性, 有必要获得 WMV 不同分离物的全基因组序列, 并基于全基因组序列进行系统序列分析。

WMV 寄主范围较为广泛, 既可侵染葫芦科作物, 也可侵染多种非葫芦科作物^[1-9]。任春梅等^[30]分析了江苏省葫芦科作物 WMV 的分子变异特征, 发现各分离物与寄主之间的相关性不明显, 而 Niu



注:A. 甜瓜、西瓜、西葫芦和瓠瓜接种 pWMV-CH99 后 7、15、7、7 d 所产生的症状;B. 甜瓜、西瓜、西葫芦、瓠瓜发病叶片的 PCR 检测; C. 甜瓜、西瓜、西葫芦、瓠瓜发病叶片的斑点杂交结果。

图 3 WMV 分离物 CH99/69 cDNA 克隆的侵染性
Fig. 3 Infectivity of WMV isolate CH99/69 cDNA clone

等^[31]对来自世界各地的 WMV 分离物进行了分析,发现不同分离物与其寄主有一定的相关性。笔者的研究对来自 6 种葫芦科作物(西葫芦、甜瓜、西瓜、黄瓜、火参果、刺果瓜)、5 种非葫芦科作物(紫薇、百香果、人参、臭椿、蜀葵)的 39 个 WMV 分离物进行了分析,发现来自同一寄主的不同分离物虽然可能分布在不同分支上,但来自葫芦科作物的所有分离物均聚集于 I~III 组中,来自非葫芦科作物的分离物均聚集于 II 组和 IV 组中,且西葫芦分离物主要分布在 I 组中,西瓜分离物仅分布在 II、III 组中,说明 WMV 分离物与寄主之间具有一定的相关性,与 Niu 等^[31]的结果一致。

在 WMV 侵染性克隆构建方面,目前已有较多报道,Desbiez 等^[23]通过酵母重组、添加内含子的方法获得了 WMV-FMF00-LL1 和 WMV-FMF00-LL2

两个分离物的侵染性克隆,该克隆经基因枪接种,成功侵染西葫芦。Aragonés 等^[24]构建了弱毒株分离物 Vera 的侵染性克隆,并通过农杆菌接种使其成功侵染甜瓜,引起较弱的症状。Moya-Ruiz 等^[25]利用同源重组方法构建了 MeWM7 分离物的侵染性克隆,经农杆菌接种,成功侵染甜瓜、西瓜、黄瓜、南瓜和西葫芦。笔者则利用同源重组方法构建了 CH99/69 分离物的侵染性克隆,经农杆菌接种,成功侵染甜瓜、西瓜、西葫芦和瓠瓜。从系统进化分析结果来看,WMV-FMF00-LL1、Vera 和 MeWM7 亲缘关系较近,均属于 II 组成员,CH99/69 属于 I 组成员,与它们亲缘关系较远。已知 Vera 为弱毒株,在甜瓜上致病性较弱,通过序列分析发现,与其他分离物相比,该分离物存在 3 个氨基酸差异位点(aa173、aa1231 和 aa2226),分别位于 P1、P3 和 NIa-Pro 区

域,推测这3个位点与该分离物的弱致病性有关。在此基础上,可以进一步开展分子变异性、致病性和适应性的联合分析,以揭示WMV分子致病机制和进化机制,为该病毒病的防控提供指导。

参考文献

- [1] PARRY J N, PERSLEY D M. Carrot as a natural host of watermelon mosaic virus[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2005, 34(2):283-284.
- [2] LANEY A G, AVANZATO M V, TZANETAKIS I E. High incidence of seed transmission of papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus, two viruses newly identified in *Robinia pseudoacacia*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2012, 134(2):227-230.
- [3] SHI Y, WANG Z Y, LI H L, et al. First report of watermelon mosaic virus infecting sesame in China[J]. *Plant Disease*, 2015, 99(9):1291.
- [4] HAJIZADEH M, MOHAMMADI K. *Capsicum annuum*, a new host of watermelon mosaic virus[J]. *Virus Disease*, 2016, 27(1):107-109.
- [5] WATANABE S, RUSCHEL R, MARRERO G, et al. A distinct lineage of watermelon mosaic virus naturally infects honohono orchid (*Dendrobium anosmum*) and passionfruit (*Passiflora edulis*) in Hawaii[J]. *New Disease Reports*, 2016, 34:13.
- [6] PARK D, KIM H, HAHN Y. Genome sequence of a distinct watermelon mosaic virus identified from ginseng (*Panax ginseng*) transcriptome[J]. *Acta Virologica*, 2017, 61(4):479-482.
- [7] 付晶晶, 杨彩霞, 韩彤, 等. 西瓜花叶病毒辽宁臭椿分离物的鉴定与全序列分析[J]. *江西农业大学学报*, 2018, 40(1):96-102.
- [8] WU X, CHENG X, LI W. First report of natural infection of watermelon mosaic virus on *Lagerstroemia indica* in China[J]. *Plant Disease*, 2018, 102(5):1048.
- [9] 张丽, 于沛侠, 齐永红, 等. 小RNA深度测序技术分析西瓜花叶病毒蜀葵分离物[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(3):324-332.
- [10] CHUNG B Y W, MILLER W A, ATKINS J F, et al. An overlapping essential gene in the Potyviridae[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(15):5897-5902.
- [11] DESBIEZ C, COSTA C, WIPF-SCHEIBEL C, et al. Serological and molecular variability of watermelon mosaic virus (genus *Potyvirus*) [J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(4):775-781.
- [12] DESBIEZ C, JOANNON B, WIPF-SCHEIBEL C, et al. Emergence of new strains of watermelon mosaic virus in South-eastern France: Evidence for limited spread but rapid local population shift[J]. *Virus Research*, 2009, 141(2):201-208.
- [13] BERTIN S, MANGELLI A, MCLEISH M, et al. Genetic variability of watermelon mosaic virus isolates infecting cucurbit crops in Italy[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(4):937-946.
- [14] DESBIEZ C, LECOQ H. Evidence for multiple intraspecific recombinants in natural populations of watermelon mosaic virus (WMV, *Potyvirus*) [J]. *Archives of Virology*, 2008, 153(9):1749-1754.
- [15] POZZI E, PEROTTO M C, BERTIN S, et al. Molecular variability of watermelon mosaic virus isolates from Argentina[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 156(4):1091-1099.
- [16] GLASA M, BANANEJ K, PREDAJNA L, et al. Genetic diversity of watermelon mosaic virus in Slovakia and Iran shows distinct pattern[J]. *Plant Disease*, 2011, 95(1):38-42.
- [17] VERMA R K, MISHRA M, MARWAL A, et al. Identification, genetic diversity and recombination analysis of watermelon mosaic virus isolates[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(6):257.
- [18] CORDERO T, CERDÁN L, CARBONELL A, et al. Dicer-Like 4 is involved in restricting the systemic movement of zucchini yellow mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2017, 30(1):63-71.
- [19] BEYENE G, CHAUHAN R D, TAYLOR N J. A rapid virus-induced gene silencing (VIGS) method for assessing resistance and susceptibility to cassava mosaic disease[J]. *Virology Journal*, 2017, 14:6.
- [20] KASSEM M A, GOSALVEZ B, GARZO E, et al. Resistance to cucurbit aphid-borne yellows virus in melon accession TGR-1551[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(10):1389-1396.
- [21] KUNG Y J, LIN P C, YE H S D, et al. Genetic analyses of the FRNK motif function of turnip mosaic virus uncover multiple and potentially interactive pathways of cross-protection[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2014, 27(9):944-955.
- [22] 古勤生, 田延平, 彭斌, 等. 基于外壳蛋白基因序列对3种葫芦科作物病毒的分子分析[J]. *植物病理学报*, 2008, 38(4):357-363.
- [23] DESBIEZ C, CHANDEYSSON C, LECOQ H, et al. A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses[J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 183(1):94-97.
- [24] ARAGONÉS V, PÉREZ-DE-CASTRO A, CORDERO T, et al. A watermelon mosaic virus clone tagged with the yellow visual maker phytoene synthase facilitates scoring infectivity in melon breeding programs[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2019, 153(4):1317-1323.
- [25] MOYA-RUIZ C D, RABADÁN P, JUÁREZ M, et al. Assessment of the current status of potyviruses in watermelon and pumpkin crops in Spain: Epidemiological impact of cultivated plants and mixed infections[J]. *Plants-Basel*, 2021, 10(1):138.
- [26] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41(41):95-98.
- [27] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2018, 35(6):1547-1549.
- [28] 刘莉铭, 康保珊, 彭斌, 等. 携带eGFP的ZYMV侵染性克隆的构建及其侵染性[J]. *植物病理学报*, 2021, 51(5):734-740.
- [29] 韩盛, 韩成贵, 玉山江·麦麦提, 等. 新疆吐鲁番地区三种甜瓜病毒病的发生与分子鉴定[J]. *新疆农业科学*, 2016, 53(10):1829-1842.
- [30] 任春梅, 程兆榜, 缪倩, 等. 江苏省葫芦科作物西瓜花叶病毒的分子鉴定和序列分析[J]. *南方农业学报*, 2013, 44(9):1464-1470.
- [31] NIU Y B, PANG X J, CHENG Y Y, et al. Molecular detection of watermelon mosaic virus associated with a serious mosaic disease on *Cucurbita pepo* L. in Shanxi, China[J]. *Virus Disease*, 2017, 28(3):315-319.