

DOI: 10.16861/j.cnki.zggc.202423.0524

番木瓜环斑病毒甜瓜分离物的基因组及其侵染性克隆

刘莉铭¹, 彭斌¹, 康保珊^{1,2}, 吴会杰¹, 刘茜¹, 古勤生¹

(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 河南新乡 453500)

摘要: 番木瓜环斑病毒(papaya ringspot virus, PRSV)是瓜类作物主要病毒之一,分析了甜瓜分离物 HaN HK10 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,HaN HK10 分离物基因组全长为 10 332 nt,与其他分离物的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 74.60%~97.80%和 85.30%~98.50%。基于全基因组序列的系统进化分析显示,HaN HK10 与来自中国的所有分离物均聚集于 II 组中,并与中国山东的西葫芦分离物 PRSV-SD 亲缘关系最近。接种试验显示,HaN HK10 分离物的全长 cDNA 克隆具有侵染性,它能系统侵染甜瓜、黄瓜、西瓜、南瓜、西葫芦和瓠瓜 6 种作物,经接种产生的病毒后代也能够通过摩擦接种侵染植株。

关键词: 番木瓜环斑病毒;甜瓜分离物;基因组;侵染性克隆

中图分类号:S652

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2024)02-008-07

The genome and infectious clone of papaya ringspot virus melon isolate

LIU Liming¹, PENG Bin¹, KANG Baoshan^{1,2}, WU Huijie¹, LIU Xi¹, GU Qinsheng¹

(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, Xinxiang 453500, Henan, China)

Abstract: Papaya ringspot virus (PRSV) is one of the most important viruses in cucurbits crops. In this study, the genome sequence of melon isolate HaN HK10 was cloned and analyzed, and its full-length cDNA infectious clone was constructed. The results showed that the genome of isolate HaN HK10 was 10 332 nt in length, and the identities of the genome nucleotide sequence and amino acid sequence between HaN HK10 and other isolates were 74.60%-97.80% and 85.30%-98.50%, respectively. Phylogenetic analysis based on genome sequences showed that HaN HK10 and all the isolates from China were clustered in group II, and zucchini isolate PRSV-SD from Shandong province was most closely related to HaN HK10. The inoculation showed that the infectious clone was successfully constructed, and it could systematically infect melon, cucumber, watermelon, pumpkin, zucchini and bottle gourd. The progeny produced from the clone was infectious by mechanical inoculation.

Key words: Papaya ringspot virus; Melon isolate; Genome; Infectious clone

番木瓜环斑病毒(papaya ringspot virus, PRSV)是一种单链正义 RNA 病毒,属于马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus),病毒粒子呈弯曲线状,长度为 700~900 nm,直径约为 12.5 nm,在自然条件下,主要通过蚜虫以非持久性方式进行传播,也可通过农事操作进行传播。根据寄主范围不同,PRSV 可分为番木瓜(papaya, P)株系和西瓜(watermelon, W)株系,

其中, P 株系侵染番木瓜和葫芦科作物, W 株系侵染葫芦科作物,不能侵染番木瓜。PRSV 侵染番木瓜后引起叶片花叶、畸形,茎秆和果实表面出现环斑,严重时叶片脱落、植株死亡;感染葫芦科作物后会引引起叶片花叶、卷曲和畸形,植株矮化,果实畸形,严重影响作物的产量和果实的商品性。PRSV 自 20 世纪 40 年代末在美国首次报道以来,目前在

收稿日期: 2023-08-15; 修回日期: 2023-12-26

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

法国、巴西、哥伦比亚、厄瓜多尔、墨西哥、中国、澳大利亚、东帝汶、韩国、泰国、越南和印度等国均有发生^[1-9]。在我国,自1964年PRSV在华南地区开始流行成灾后^[10],目前已在海南、台湾、广东、广西、福建、山东、河南、云南、四川等地发生^[11-16],给番木瓜和葫芦科作物的生产造成严重损失。

目前,国内外已报道了许多不同地理来源的PRSV分离物,并获得了许多分离物的全基因组序列信息^[1,5,7,9,17-21],通过分析发现PRSV不同分离株与其地理来源有显著的相关性^[13,15,20-22],但与其株系划分并不显著相关。通过分析NCBI数据库公布的PRSV全基因组序列信息,发现澳大利亚、巴西和东帝汶等国报道的均为W株系,分离物数量分别为13、3、4个,墨西哥和孟加拉国报道的均有2个分离物,且均为P株系,而我国报道的21个分离物中仅有4个为W株系,若要进一步分析不同株系间的进化关系,仍需更多的全基因组序列数据支撑^[21]。对于我国报道的4个W株系,从寄主来源上来看,它们分别分离自南瓜、西葫芦和丝瓜,目前尚无甜瓜分离物及其全基因组序列信息。为了深入研究病毒与寄主之间的相互关系,获得病毒侵染性克隆至关重要。在PRSV侵染性克隆构建方面,目前已有成功构建PRSV-P株系HN-1、HN-2和YK分离物以及PRSV-W株系SD和CI分离物的侵染性克隆的报道^[23-27]。从寄主来源看,PRSV-P株系均分离自番木瓜,PRSV-W株系SD分离物分离自西葫芦,W-CI分离自丝瓜,目前尚无PRSV-W甜瓜分离物侵染性克隆构建的相关报道。

笔者在2017年的葫芦科作物病毒病调查时从海南省海口市采集到一株PRSV-W甜瓜分离物,将其命名为HaNHK10^[28]。以此为基础,笔者通过

RT-PCR扩增获得该分离物的全基因组序列,并对其序列比对和系统进化分析,同时利用同源重组策略构建该分离物的全长cDNA克隆,通过接种试验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进化机制和分子致病性研究提供依据。

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,PRSV-W分离物HaNHK10采集于海南省海口市露地甜瓜发病植株。植物表达载体pXT1由南京农业大学陶小荣教授馈赠。

1.2 载体构建

取约0.1g甜瓜发病叶片进行总RNA的提取和cDNA的合成,具体操作参照RNAsimple总RNA提取试剂盒和PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒说明书。从GenBank数据库中下载PRSV的全基因组序列,通过比对分析序列的保守性,设计3对引物P-1F/P-1R、P-2F/P-2R、P-3F/P-3R(表1),以合成的cDNA为模板,将分离物HaNHK10的全基因组分成3段进行扩增,利用NEBuilder高保真DNA组装预混液将获得的3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、筛选和测序验证,获得含有HaNHK10全基因组的cDNA克隆pPRSV-HaNHK10。

1.3 序列分析

对pPRSV-HaNHK10进行测序分析和拼接,获得HaNHK10分离物的全基因组序列。从GenBank数据库中下载76条来自不同国家的PRSV分离物的全基因组序列,利用ClustalW软件将它们与

表1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称	序列(5'-3')	用途
Primer name	Sequence(5'-3')	Usage
P-1F	GTTCATTTTCATTTGGAGAGGAAATAAAACATCTCAACACAACACA	构建 pPRSV-HaNHK10
P-1R	CACGCCAYTCTTCCTGCAA	Construction of pPRSV-HaNHK10
P-2F	TTGACGGAAGARTGGCGTG	HaNHK10
P-2R	CAAACCACRGAAGCTATRCC	
P-3F	GGYATAGCTTCYGTGGTTTG	
P-3R	TGGAGATGCCATGCCGACCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCTCATTCCAAGAGGCTCG	
P-5480F	GTATGGCTTGCTGTCAATG	RT-PCR 检测
P-6980R	CAAACCACAGAAGCTATGCC	RT-PCR detection
P-9673F	GGTTTGGTGTATCGAAAATGG	探针合成
P-T7-10045R	TAATACGACTCACTATAGGGACTGACACTGCCGTCCATTC	Probe synthesis

HaNHK10 分离物进行序列比对,用 BioEdit 软件进行全基因组核苷酸和氨基酸序列一致性分析^[29]。以西瓜花叶病毒(watermelon mosaic virus, WMV, AY437609)为外组,基于 PRSV 不同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^[30],重复 1000 次。

1.4 接种试验和病毒检测

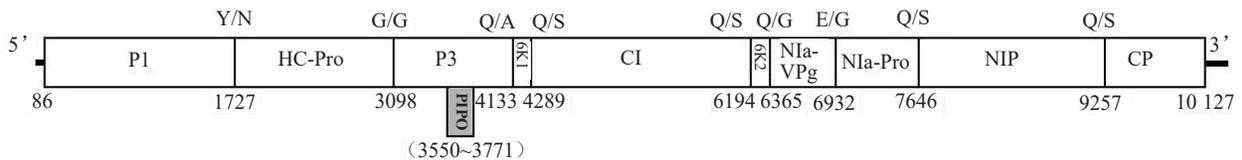
接种试验于 2021 年 6—8 月在中国农业科学院郑州果树研究所西瓜甜瓜病虫害防控课题组温室进行。其中,甜瓜品种为白玫,由新疆农业科学院哈密瓜研究中心提供;黄瓜品种为津研 4 号,购自天津科润农业科技股份有限公司;西瓜品种为红和平,购自浙江浙农种业有限公司;南瓜品种为早栗蜜本,购自河北茂华种业有限公司;西葫芦品种为欧诺,购自太谷县雨润谷禾种业有限公司;瓠瓜品种为甬砧 1 号,由宁波农业科学院提供;当植株培养至子叶完全展开时开始试验。将 pPRSV-HaNHK10 转入农杆菌菌株 GV3101 中,然后利用农杆菌介导的方式接种甜瓜、黄瓜、西瓜、南瓜、西葫芦和瓠瓜植株,以接种诱导缓冲液为阴性对照(CK),具体方法参照刘莉铭等^[31]的报道。待甜瓜发病后,采集发病叶片用 1×PBS 缓冲液按照叶片与缓冲液

1:10 的质量/体积比进行研磨,通过摩擦方式接种甜瓜和西瓜健康植株。将接种后的植株置于 25~28 °C 条件下进行培养,观察植株发病情况。在每次试验中每种作物分别接种 6 株,并设置 3 次重复。待发病后,采集接种植株的系统发病叶片,提取叶片总 RNA,利用 HiScript® II One Step RT-PCR Kit (Dye Plus)以 P-5480F/ P-6980R 为引物(目的片段长度约为 1500 bp)对病毒的侵染情况进行检测,同时以 P-9673F/P-T7-10045R 为引物,对 HaNHK10 基因组 9 673~10 045 nt 区域进行扩增,PCR 产物经体外转录获得地高辛标记的 RNA 探针,以利用 dot blot 方法进一步检测植株叶片中 PRSV 的侵染情况。

2 结果与分析

2.1 PRSV 分离物 HaNHK10 基因组结构分析

PRSV 分离物 HaNHK10 基因组全长为 10 332 nt, GenBank 登录号为 OK465456,包含 5'UTR (1~85 nt)和 3'UTR (10 127~10 332 nt),编码 1 个由 3346 个氨基酸组成的多聚蛋白(86~10 126 nt),经蛋白酶切割形成 11 个成熟的蛋白质,包括 P1、HC-Pro、P3、6K1、CI、6K2、NIa-VPg、NIa-Pro、NIb、CP 以及 P3 编码区内部通过+2 移码产生的 PIPO,具体的基因组结构如图 1 所示。



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。

Note: The numbers under the boxes represent the first nucleotide position of the different regions. The uppercase letters above the boxes indicate the predicted cleavage sites.

图 1 PRSV 分离物 HaNHK10 的基因组结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of the genome organization of PRSV isolate HaNHK10

2.2 PRSV 分离物 HaNHK10 序列分析

序列一致性分析结果显示,分离物 HaNHK10 与其他 PRSV 分离物之间的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 74.60%~97.80%、85.30%~98.50%。在这些分离物中,HaNHK10 与中国山东的西葫芦分离物 PRSV-SD(MF085000)一致性最高,核苷酸和氨基酸序列一致性分别达到 97.80%、98.50%,与孟加拉国的番木瓜分离物(MH444652)一致性最低,核苷酸和氨基酸序列一致性分别仅为 74.60%、85.30%。

基于 PRSV 全基因组核苷酸序列的系统进化分析结果显示(图 2),供试的 77 个 PRSV 分离物可以分为 2 组,其中,来自巴西、哥伦比亚、厄瓜多尔、法国和墨西哥的所有分离物均聚集于 I 组,来自中国、东帝汶、韩国、泰国和越南的所有分离物均聚集于 II 组,来自澳大利亚的 13 个分离物中有 12 个聚集于 I 组,来自印度的 13 个分离物中有 12 个聚集于 I 组,说明 PRSV 分离物与其地理来源有显著的相关性。另外,在 I 组和 II 组中,分离自番木瓜的分离物分别聚集在一起,分

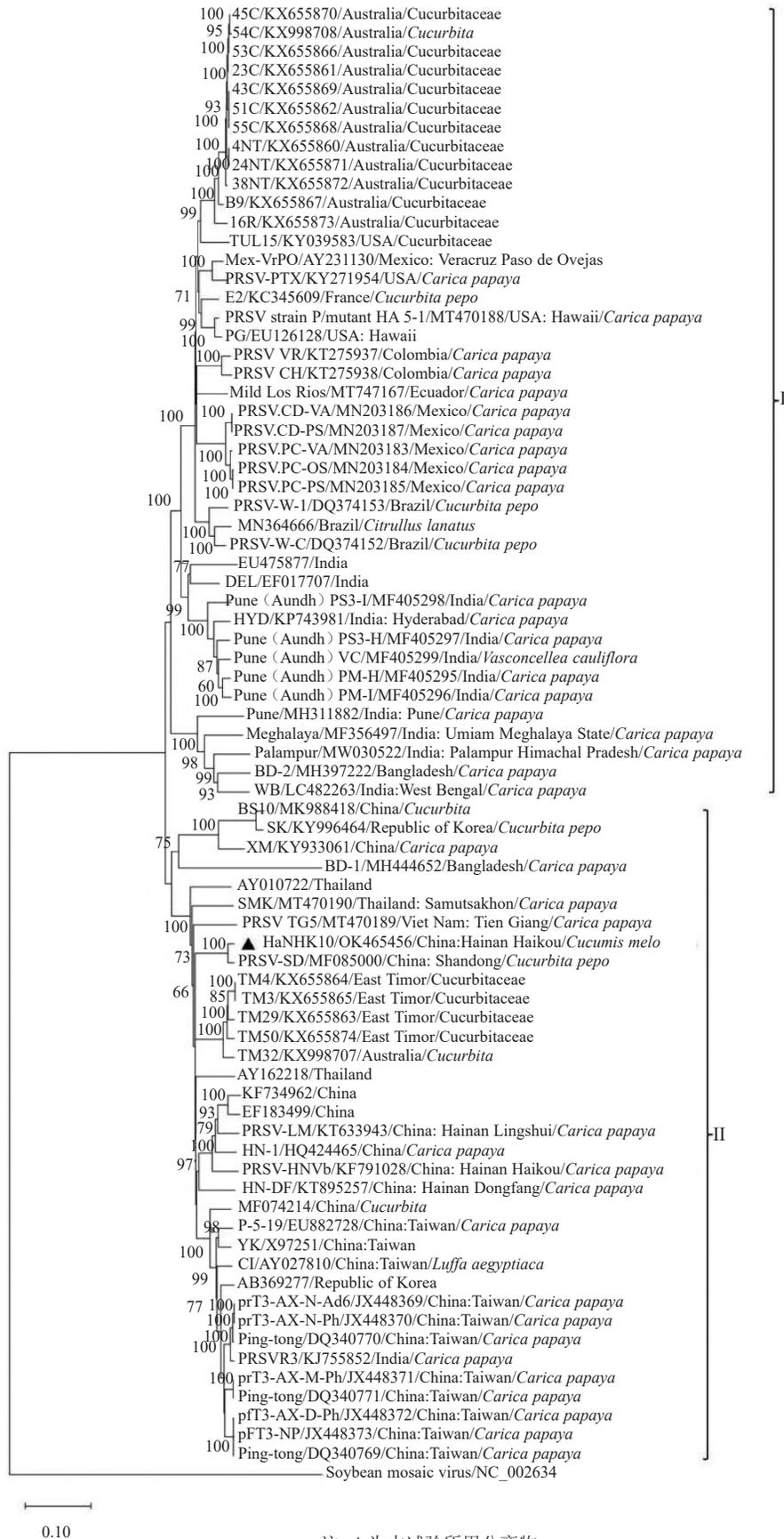


图2 基于全基因组序列的 PRSV 分离物系统发育分析

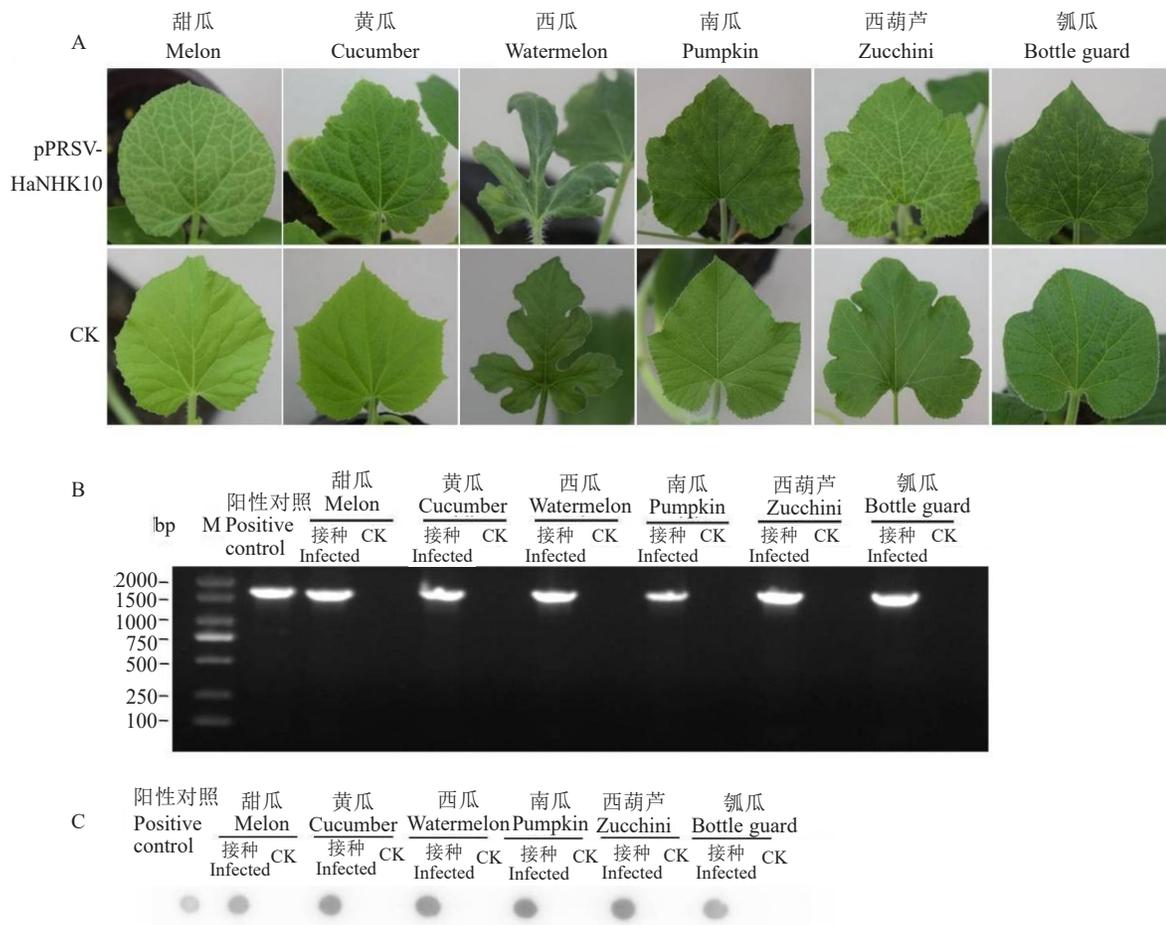
Fig. 2 Phylogenetic analysis of PRSV isolates based on complete genome sequence

离自葫芦科作物的分离物分别聚集在一起,说明 PRSV 分离物与其寄主来源也有显著的相关性。其中,笔者获得的分离物 HaN-HK10 与来自中国山东的西葫芦分离物 PRSV-SD (MF085000)亲缘关系最近,它们均聚于II组中。

2.3 分离物 HaNHK10 全长 cDNA 克隆的侵染性

将 HaNHK10 分离物的 cDNA 克隆 pPRSV-HaNHK10 采用农杆菌介导的方法分别接种

甜瓜、黄瓜、西瓜、南瓜、西葫芦和瓠瓜植株。在接种后 7 d 左右,甜瓜叶片叶脉开始褪绿、产生脉带,10 d 左右所有接种植株叶脉褪绿均较为明显,此时黄瓜、西瓜、南瓜、西葫芦和瓠瓜接种植株开始产生皱缩或花叶症状,14 d 时所有接种植株均出现明显症状(图 3-A)。RT-PCR 和 dot blot 检测结果进一步证实了发病植株均被 PRSV 所侵染(图 3-B~C)。通过摩擦接种方式将甜瓜发病叶片进一步接种甜瓜和西瓜植株,发现在接种后 1~2 周内所有接种植株均可发病,



注:A.甜瓜、黄瓜、西瓜、南瓜、西葫芦和瓠瓜接种 pPRSV-HaNHK 后 10、14、14、14、14、14 d 所产生的症状;B.甜瓜、黄瓜、西瓜、南瓜、西葫芦和瓠瓜发病叶片的 PCR 检测;C.甜瓜、黄瓜、西瓜、南瓜、西葫芦和瓠瓜发病叶片的斑点杂交结果。

Note: A. Symptoms induced by the inoculation of melon, cucumber, watermelon, pumpkin, zucchini and bottle gourd plants with pPRSV-HaNHK10 at 10 dpi, 14 dpi, 14 dpi, 14 dpi, 14 dpi, and 14 dpi; B. The results of PCR detection of the diseased leaves of melon, cucumber, watermelon, pumpkin, zucchini and bottle gourd plants; C. The results of dot blot of the diseased leaves of melon, cucumber, watermelon, pumpkin, zucchini and bottle gourd plants.

图 3 PRSV 分离物 HaNHK10 cDNA 克隆的侵染性
Fig. 3 Infectivity of PRSV isolate HaNHK10 cDNA clone

经 PCR 进一步证实了 PRSV 的侵染。以上结果说明,PRSV 分离物 HaNHK10 的侵染性克隆构建成功,该克隆在 6 种供试瓜类作物上均可系统侵染,并产生相应的症状。

3 讨论与结论

目前 NCBI 数据库中已公布 76 个 PRSV 分离物的全基因组序列信息,笔者以从海南海口采集到

的 PRSV 甜瓜分离物 HaNHK10 为研究对象,对其全基因组序列进行扩增和拼接,随后基于全基因组核苷酸序列对以上 77 个 PRSV 分离物进行了系统进化分析,结果显示同一国家的分离物大多聚集在一起,说明 PRSV 不同分离物与其地理来源有显著的相关性,这与已有报道^[13,15,20-22]结果一致。另外,PRSV 分离物在系统进化树中可分为 2 组,虽然 P 和 W 株系所对应的分离物分别分布在这 2 组中,但在各分组内 2 种株系之间有所分化,且同一地理来源的相同株系所对应的分离物分别聚集在一起,亲缘关系更近,说明在同一地理区域内 PRSV 分离物与其株系分化有一定的相关性。由于 PRSV-W 株系中来自不同葫芦科作物的分离物较少,无法进一步判断 PRSV-W 分化与其寄主来源之间的关系。

病毒侵染性克隆的获得对开展和推进病毒与寄主互作研究至关重要。对 PRSV 来说,目前已有 PRSV-P 株系 HN-1、HN-2 和 YK 分离物以及 PRSV-W 株系 SD 和 CI 分离物侵染性克隆成功构建的报道^[23-27]。笔者利用同源重组策略构建了 PRSV-W 株系 HaNHK10 分离物的侵染性克隆,通过接种试验证实了该克隆在甜瓜、黄瓜、西瓜、南瓜、西葫芦和瓠瓜中的高侵染性(侵染率可达 100%)。与已报道的 PRSV 侵染性克隆相比,构建策略、接种对象及侵染率有所不同,如 HN-1 分离物侵染性克隆利用 Gibson 组装方法构建而成,通过接种番木瓜和南瓜,发现其在接种后 30 d 时侵染率分别为 66.7%和 60%^[24],利用酵母同源重组系统构建的 HN-2 分离物侵染性克隆在番木瓜中的侵染率仅为 8.33%^[25],而利用 Gibson 组装构建的 HN-2 分离物侵染性克隆在番木瓜中的侵染率可达 96%^[26],对 PRSV-W 株系 SD 分离物来说,它的侵染性克隆是通过同源重组策略构建而成的,与本试验相比,构建策略相同,且均可系统侵染甜瓜、黄瓜、西瓜和西葫芦 4 种作物,但它未用于南瓜和瓠瓜接种检测,接种寄主较少^[27]。在寄主来源方面,HN-1、HN-2 和 YK 分离物均分离自番木瓜,CI 分离自丝瓜,SD 分离自西葫芦,而 HaNHK10 分离自甜瓜。已有研究证实 NIa-Pro 的 Lys27 决定了 PRSV 侵染番木瓜的寄主特异性^[23]。通过分析以上 6 种分离物的序列,发现 PRSV-P 株系 HN-1、HN-2 和 YK 分离物 NIa-Pro 的 aa27 均为 Lys,而 PRSV-W 株系 SD、CI 和 HaNHK10 分离物 NIa-Pro 的 aa27 均为 Asp,说明各分离物 NIa-Pro 的 aa27 类型与其株系划分属性一致,株系划分结果较为可信。但对于分离自番

木瓜的 BD-2、PM-H、PM-I、PS3-I 和 Meghalaya 分离物来说,该位点分别为 Ser、Arg、Arg、Arg、Glu,而对于分离自葫芦科作物的 E2 和 16R 分离物来说,该位点分别为 Glu 和 Asn,与已有报道有所不同,说明目前尚不能仅依赖于该位点的氨基酸类型对所有 PRSV 分离物进行明确的株系划分。该位点对 PRSV 的致病性和寄主范围的具体影响及其作用机制仍需深入探讨,PRSV 侵染性克隆的获得为开展该方面的研究提供了有力工具。

参考文献

- [1] BATESON M F, HENDERSON J, CHALEEPROM W, et al. Papaya ringspot potyvirus: Isolate variability and the origin of PRSV type P (Australia)[J]. The Journal of General Virology, 1994, 75(12):3547-3553.
- [2] REZENDE J A M. *Cyclanthera pedata* var. *edulis*: New host of papaya ringspot virus-type W in Brazil[J]. Plant Disease, 2000, 84(10):1155.
- [3] POURRAHIM R, FARZADFAR S, GOLNARAGHI A R, et al. First report of papaya ringspot virus on papaya in Iran[J]. Plant Disease, 2003, 87(9):1148.
- [4] LU Y W, SHEN W T, ZHOU P, et al. Complete genomic sequence of a papaya ringspot virus isolate from Hainan Island, China[J]. Archives of Virology, 2008, 153(5):991-993.
- [5] PARAMESWARI B, MANGRAUTHIA S K, PRAVEEN S, et al. Complete genome sequence of an isolate of papaya ringspot virus from India[J]. Archives of Virology, 2007, 152(4):843-845.
- [6] HASIÓW-JAROSZEWSKA B, BORODYNKO N, RYMELSKA N, et al. First report of papaya ringspot virus infecting zucchini plants in Poland[J]. Plant Disease, 2010, 94(5):633.
- [7] MAINA S, COUTTS B A, EDWARDS O R, 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.
- [8] BAEK D, IGORI D, LIM S, et al. Complete genome sequence of a papaya ringspot virus isolate from South Korea that infects *Cucurbita pepo*[J]. Genome Announcements, 2017, 5(48):e01289-17.
- [9] 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.
- [10] 任佩瑜, 范怀忠. 番木瓜花叶病初步调查研究[J]. 植物保护学报, 1964(4):423.
- [11] 肖火根, 真冈哲夫, 骆学海. 华南地区番木瓜环斑病毒和畸形花叶病毒调查鉴定研究[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(4):52-53.
- [12] 魏军亚, 刘德兵, 蔡群芳, 等. 7 种番木瓜环斑病毒分离株外壳蛋白基因的克隆与序列比较[J]. 华南热带农业大学学报, 2006, 12(4):1-5.

- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 林晓敏,彭梅芳,范晓丽,等.四川成都地区复合侵染南瓜4种病毒的分子鉴定分析[J].园艺学报,2021,48(11):2299-2310.
- [17] ZHANG Y L, YU N Y, HUANG Q X, et al. Complete genome of Hainan papaya ringspot virus using small RNA deep sequencing[J]. Virus Genes, 2014, 48(3):502-508.
- [18] ZHAO G Y, YAN P, SHEN W T, et al. Complete genome sequence of papaya ringspot virus isolated from genetically modified papaya in Hainan island, China[J]. Genome Announcements, 2015, 3(5):e01056-15.
- [19] MISHRA R, PATIL B L. First complete genome sequence of a distinct papaya ringspot virus isolate from the northeastern region of india[J]. Genome Announcements, 2018, 6(22):e00437-18.
- [20] 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.
- [21] 车海彦,曹学仁,罗大全.番木瓜环斑病毒海南南瓜分离物全基因组序列分析[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2019,47(3):38-43.
- [22] MANGRAUTHIA S K, PARAMESWARI B, PRAVEEN S, et al. Comparative genomics of papaya ringspot virus pathotypes P and W from India[J]. Archives of Virology, 2009, 154(4):727-730.
- [23] CHEN K C, CHIANG C H, RAJA J A J, et al. A single amino acid of NIaPro of papaya ringspot virus determines host specificity for infection of papaya[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(8):1046-1057.
- [24] 赵光远,庾德财,沈文涛,等.海南番木瓜环斑病毒全长 cDNA 克隆及其侵染性克隆构建[J].热带作物学报,2015,36(5):911-917.
- [25] 赵光远,庾德财,沈文涛,等.利用酵母同源重组系统快速构建 Potyvirus 病毒侵染性克隆方法[J].生命科学研究,2015,19(6):491-496.
- [26] TUO D C, FU L L, SHEN W T, et al. Generation of stable infectious clones of plant viruses by using *Rhizobium radiobacter* for both cloning and inoculation[J]. Virology, 2017, 510:99-103.
- [27] HUANG X D, FANG L, GU Q S, et al. Cross protection against the watermelon strain of papaya ringspot virus through modification of viral RNA silencing suppressor[J]. Virus Research, 2019, 265:166-171.
- [28] 彭斌.中国葫芦科作物病毒的分布、多样性及进化研究[D].武汉:华中农业大学,2019.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.