番木瓜环斑病毒西瓜株系弱毒突变体的筛选与应用

黄显德 王 玉 闫志勇 耿 超 田延平 李向东*

(山东农业大学植物保护学院,植物病毒研究室,泰安 271018)

摘要:为防治番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus, PRSV)在我国葫芦科作物上引起的病毒病 害,以PRSV 西瓜株系山东分离物(PRSV-SD)侵染性cDNA 克隆为基础,采用定点突变方法将辅助 成分-蛋白酶保守氨基酸137位和346位的天冬酰胺(N)和417位的缬氨酸(V)突变为丙氨酸(A), 应用农杆菌浸润法接种西葫芦叶片并分析突变对PRSV-SD 致病力的影响,筛选弱毒突变体,进而 评价其交叉保护效果。结果表明,与野生型PRSV-SD 相比,获得的3个突变体N137A、N346A 和 V417A,接种后在西葫芦植株上的症状明显减轻,衣壳蛋白在叶片中的积累水平分别为野生型 PRSV-SD 的24.0%、13.0%和4.0%,均为弱毒突变体。当保护间隔期为10 d时,弱毒突变体N137A 具有完全的交叉保护效果,N346A 可延迟发病15 d,而V417A 无交叉保护效果。当间隔保护期为 15 d时,弱毒突变体N137A和N346A 的保护效率分别为100.0%和26.7%,而V417A 无交叉保护效果。 关键词:番木瓜环斑病毒;辅助成分-蛋白酶;弱毒突变体;葫芦科作物;交叉保护

Screening and application of attenuated mutants of *Papaya ringspot virus*-watermelon strain

Huang Xiande Wang Yu Yan Zhiyong Geng Chao Tian Yanping Li Xiangdong* (Laboratory of Plant Virology, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China)

Abstract: To control the diseases caused by *Papaya ringspot virus* (PRSV) in cucurbit crops, the asparagine (N) at positions 137 and 346 and valine (V) at position 417 of the helper component-protease (HC-Pro) of a PRSV isolate of watermelon strain from Shandong Province (PRSV-SD) were mutated to alanine (A) in an infectious cDNA clone via site-directed mutagenesis. The virulence of the resultant mutants on *Cucurbita pepo* plants were analyzed by agroinfiltration, and the cross protection efficiency of attenuated mutants were evaluated. The results indicated that, compared with those of the wild type PRSV-SD, the symptoms of mutants N137A, N346A and V417A on *C. pepo* plants were significantly attenuated, and their accumulative levels were significantly reduced to 24.0%, 13.0% and 4.0% of the wild type virus, indicating that all of them were attenuated mutants of PRSV-SD. When the protective interval was ten days, the attenuated mutant N137A provided complete cross protection effect, and N346A delayed the appearance of viral symptom by 15 days, while V417A showed no cross-protective effect. When the protective interval was 15 days, the protective efficiencies of attenuated mutants N137A and N346A on *C. pepo* plants were 100.0% and 26.7%, respectively, while V417A had no cross-protective effect.

Key words: *Papaya ringspot virus*; helper component-protease (HC-Pro); attenuated mutant; cucurbitaceous crops; cross protection

基金项目:国家自然科学基金(31801704),国家重点研发计划(2017YFD0200900),河南省果树瓜类生物学重点实验室开放基金课题(HNS201705-2) * 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xdongli@sdau.edu.cn 收稿日期: 2018-06-27

番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus, PRSV) 属于马铃薯Y病毒属,可通过蚜虫以非持久性方式 传播,根据寄主范围不同可分为番木瓜(papaya, P) 株系和西瓜(watermelon, W)株系,其中PRSV-W株 系只侵染葫芦科作物(Tripathi et al., 2008),引起植 株矮化、叶片褪绿和畸形等症状。PRSV于20世纪 40年代末在美国首次被报道(Holmes et al., 1948), 目前在巴西、印度、波兰、苏丹等国均有发生(Mantri et al., 2005; Jadão et al., 2010; Shen et al., 2015),给当 地葫芦科作物生产造成严重损失。PRSV 自1964年 在我国华南地区开始流行后(任佩喻和范怀忠, 1964),目前已在广西、山东、四川等省区的罗汉果、 西葫芦、苦瓜等作物上检测到PRSV(Liao et al., 2005; Zhu et al., 2016; Cheng et al., 2017)。

交叉保护是指当寄主植物受到病毒弱毒株侵染 之后,能够免受强毒株侵染的现象(Zhou & Zhou, 2012)。该现象最早报道于1929年(McKinney, 1929),随后应用于烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)(Rast, 1972; Oshima, 1975)、柑橘衰退 病毒(Citrus tristeza virus, CTV)(Müller & Costa, 1977)、辣椒轻斑驳病毒(Pepper mild mottle virus, PMMoV)(Yoon et al., 2006)和凤果花叶病毒(Pepino moaic virus, PepMV)(Chewachong et al., 2015)等 引起的病毒病防治。交叉保护在葫芦科作物上的应 用也较多,如Rezende & Pacheco(1998)利用弱毒株 PRSV-W-1和PRSV-W-2防治西葫芦上的PRSV取 得了良好效果; You et al. (2005)发现携带台湾分离 物 PRSV W-CI的 3'-端基因组片段的重组弱毒株 HA5-1在葫芦科作物上具有较好的防治效果;Lin et al.(2007)通过定点突变小西葫芦黄花叶病毒(Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)辅助成分-蛋白酶 (helper component-protease, HC-Pro)基因中的保守 基序 FRNK 及 PE 获得弱毒株 ZYMV-GAC, 能够交 叉保护西葫芦免受ZYMV强毒株系危害。

目前,限制交叉保护技术推广应用的一个问题 是可用弱毒株系少。本研究拟通过定点突变技术分析 PRSV-W 株系山东分离物 PRSV-SD 的 HC-Pro 中 调控病毒致病力的保守氨基酸位点,筛选出对 PRSV-W 株系有良好交叉保护效果的弱毒突变体,以期为通 过交叉保护防治 PRSV-W 提供物质基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物、菌株、抗血清和载体:西葫芦品种为

早青,种子购自泰安市种子公司;大肠杆菌 Escherichia coli感受态细胞 DH5a 和农杆菌 Agrobacterium tumefaciens 感受态细胞 GV3101 由本实验室保 存; PRSV-W株系衣壳蛋白(coat protein, CP)抗血清 由本实验室制备(黄显德等, 2017a); PRSV-SD(Gen-Bank 登录号 MF085000)全长侵染性 cDNA 克隆 pCamPRSV-W及携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标签的 PRSV-SD 侵染性克隆均由 本实验室构建(黄显德等, 2017b)。

试剂及仪器:M-MLV反转录酶、RNA 酶抑制剂、无RNA 酶水、dNTP、LA Taq DNA聚合酶,目本TaKaRa公司;Phusion DNA聚合酶,美国Thermo公司;质粒小提试剂盒、TransZol,北京全式金生物技术有限公司;限制性核酸酶 Dpn I,美国 New England Biolabs公司;其它试剂均为国产分析纯。2720Thermal Cycler PCR仪,美国Bio-Rad公司;DYY-8C型电泳仪,北京市六一仪器厂;Champ Gel 5000凝胶成像仪,北京赛智创业科技有限公司;UVP model B100A手持式长波紫外灯,美国UVP公司。

1.2 方法

1.2.1 突变体的构建

在NCBI中选取350条马铃薯Y病毒属病毒 HC-Pro的氨基酸序列进行比对,发现该属病毒HC-Pro第137位(根据PRSV的HC-Pro氨基酸序列编 号)天冬酰胺(N¹³⁷)、第346位天冬酰胺(N³⁴⁶)和第 417位的缬氨酸(V⁴¹⁷)高度保守。通过定点突变技 术在PRSV-SD的侵染性克隆pCamPRSV-W(产生的 病毒称为野生型PRSV-SD)中引入突变,使其产生 的子代病毒编码的HC-Pro中上述3个位点分别突变 为丙氨酸(A),获得相应的病毒突变体。根据Liu & Naismith(2008)的方法设计突变引物(表1),所有引 物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,以 自主构建的PRSV-SD全长侵染性cDNA克隆pCam-PRSV-W为模板进行突变。

50 µL 突变 PCR 反应体系: 10 µmol/L 上下游引 物各 1.0 µL、10 mmol/L dNTP 1.0 µL、5×Phusion HF 缓冲液 10.0 µL、5 U/µL Phusion DNA 聚合酶 0.3 µL、 50 ng/µL 模板 pCamPRSV-W 0.3 µL, 加 ddH₂O 至 50 µL。突变 PCR 反应程序: 98℃预变性 30 s; 98℃ 变性 10 s, 非重叠序列熔解温度(melting temperature, T_m)+3℃下退火 20 s, 72℃延伸 9 min, 15 个循环; 98℃变性 10 s, 重叠序列 T_m +3℃下退火 20 s, 72℃延 伸 30 min, 4℃保存。反应结束后,取 PCR 产物 10 µL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测其大小是否正确。 在 PCR 管中加入 1 μL Dpn I, 混匀后于 37℃沙浴4 h 消解模板 DNA, 然后加入 2.5 倍体积的无水乙醇 100 μL、3 mol/L的NaAc(pH 8.0)5 μL, 混匀后过夜 沉淀。于4℃下以 10 000 g 离心 10 min, 弃去上清 液, 用 75% 乙醇洗涤后干燥沉淀, 再加入 10 μL ddH₂O溶解。然后将突变产物转化大肠杆菌感受态 细胞 DH5α,挑取单菌落进行摇菌,参照质粒小提试 剂盒说明书提取质粒后送博尚生物技术(上海)有限 公司进行检测,确认突变是否成功。

引物	核苷酸序列(5'-3')	重叠序列 T _m T _m for	非重叠序列 T _m T _m for non-	
Primer	Nucleotide sequence $(5'-3')$	overlapping	overlapping	
		sequence ($^{\circ}$ C)	sequence (°C)	
PRSV-HC-N137A-F	GCCATCGCTAATACGCTTATCAAAGGTTCATTAGCAACT	51.9	58.5	
PRSV-HC-N137A-R	CGTATTAGCGATGGCTGTCATGTGCGTCCAAG		59.2	
PRSV-HC-N346A-F	TTACATGGCCATTTTCCTTGCGATGCTCATAAACAT	51.0	59.3	
PRSV-HC-N346A-R	<u>GAAAATGGCCATGTAA</u> CAGTAGCCCTTCTTAGCTATGTAC		58.3	
PRSV-HC-V417A-F	TGCACGCGATTGATTCATTTGGATCTGTAGACTCTG	50.8	59.2	
PRSV-HC-V417A-R	CAATCGCGTGCATTGTTTTCTGTCGGTGATC		57.6	

表1 本研究中 PRSV-SD 的 HC-Pro 突变所用引物 Table 1 Primers used for mutating HC-Pro of PRSV-SD in this study

*T*_m: 熔解温度。下划线所示为引物之间的重叠序列。*T*_m: Melting temperature. Primer-primer overlapping sequences are underlined.

1.2.2 突变体接种症状观察及CP积累水平测定

将1.2.1中成功构建的3个突变体以及侵染性克 隆 pCamPRSV-W 通过液氮冻融法转化农杆菌感受 态细胞 GV3101,农杆菌菌液经诱导后调整 OD_{600 m} 值为0.5~0.6,28℃静置3h,备用。用1 mL无针头的 医用注射器吸取制备好的菌液浸润西葫芦植株的子 叶。接种植株放在温度为25±2℃、相对湿度为 80%、光照条件为16h光照/8h黑暗的温室中培养。 接种后第15天,观察接种突变体和野生型 PRSV-SD 的西葫芦植株症状;同时采集植株最上部展开叶,分 别称取0.3~0.5g,加液氮研磨成粉状,按体积比1:2 加入蛋白提取液,振荡混勾,于4℃下以10 000 g离 心15 min,取上清液,按体积比1:1加入2×SDS上样 缓冲液,沸煮5 min,-20℃冷却5 min,利用 Western blot法检测病毒CP的积累水平。

接种后 30 d采集西葫芦植株最上部展开叶,利 用TransZol提取植物总RNA进行反转录获得cDNA。 反转录反应体系及程序为:100 ng/µL RNA 5 µL、 25 µmol/L随机引物 1 µL,混匀后 70℃孵育 10 min, 迅速放置冰上 1 min;加入以下反转录混合物:5×M-MLV反转录酶缓冲液 2 µL、10 mmol/L dNTP 1 µL、 40 U/µL RNA 酶抑制剂 0.25 µL、200 U/µL M-MLV 反转录酶 0.5 µL、不含 RNA 酶水 6.25 µL,混匀后 30℃反应 10 min,42℃延伸 1 h,70℃钝化反转录酶 15 min,4℃保存。以 cDNA 为模板、PRSV-HC-F(5′-AATGACGTCGCTGAAAAAT-3′)及 PRSV-HC-R (5'-GCCAACAATGTAGTGCTTCA-3')为检测引 物进行 PCR 扩增,引物合成公司同 1.2.1。25 μ L反 应体系:10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L、2.5 mmol/L dNTP 1 μ L、10×LA PCR 缓冲液 2.5 μ L、5 U/ μ L LA *Taq* DNA聚合酶 0.2 μ L、cDNA 1 μ L、ddH₂O 19.3 μ L。 扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸85 s,25个循环;72℃最终延伸10 min, 4℃保存。PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳分离, 切取目的 DNA 条带测序检测突变体是否发生回复 突变。

1.2.3 弱毒突变体交叉保护效果的测定

首先通过农杆菌浸润法将1.2.2制备的弱毒突 变体菌液接种到西葫芦植株的子叶上,经过5、10和 15 d保护间隔期后,通过汁液摩擦法将携带GFP标 签的野生型PRSV-SD菌液接种至西葫芦植株的最 上部展开叶进行挑战。以单独接种携带GFP的野 生型PRSV-SD菌液作为阳性对照,接种农杆菌菌液 作为阴性对照。植株接种后在温度为25±1℃、相对 湿度为80%、光照条件为16h光照/8h黑暗的温室 进行常规培养。挑战接种后每天观察西葫芦植株系 统叶片的症状及在紫外灯下的绿色荧光强度,记录 发病情况,对保护效果好的处理一直观察到60 d。 同时计算保护效率,保护效率=(对照病株率-处理 病株率)/对照病株率×100%。挑战接种后15 d和 30 d采集植株最上部展开叶提取蛋白,通过Western blot法检测病毒CP积累水平,方法同1.2.2。

2 结果与分析

2.1 突变位点的选择和突变体命名

从所有序列保守氨基酸中选择 PRSV-SD HC-Pro第137位天冬酰胺(N¹³⁷)、346位天冬酰胺(N³⁴⁶)、 417位缬氨酸(V⁴¹⁷)突变为丙氨酸,获得相应的病毒 突变体,并命名为N137A、N346A和V417A。

2.2 HC-Pro突变对PRSV-SD致病力的影响

接种15d后,接种野生型PRSV-SD的西葫芦植 株叶片表现出明显的褪绿和脉明等症状,而接种突 变体N137A和V417A的西葫芦植株叶片与健康植 株叶片无明显差别,接种突变体N346A的西葫芦植 株叶片仅表现轻微脉明症状(图1-A),说明3个突变体N137A、N346A和V417A的致病力显著下降。

提取接种的西葫芦植株叶片总蛋白,Western blot检测结果显示,突变体的CP在西葫芦植株最上 部展开叶中的积累水平分别为野生型PRSV-SD的 24.0%、13.0%和4.0%(图1-B),表明HC-Pro中第 137位、第346位和第417位氨基酸的突变不仅减轻 了PRSV-SD的致病力,还降低了病毒CP在寄主中 的积累水平,为弱毒突变体。接种后30d的测序结 果表明,3个突变体均没有发生回复突变,说明这 3个突变体非常稳定。





Fig. 1 Symptoms (A) and CP accumulative levels (B) of wild-type and mutant PRSV-SD on *Cucurbita pepo* plants at 15 days post agro-infiltration

2.3 弱毒突变体的交叉保护效果

保护接种5d后,用携带GFP标签的野生型 PRSV-SD接种。挑战接种15d后,预先接种弱毒突 变体的西葫芦植株和只摩擦接种携带GFP的野生 型 PRSV-SD 的植株系统叶片均表现轻微褪绿和脉明症状,在紫外灯下观察到绿色荧光布满整个叶片(图 2)。表明在保护间隔期为5 d时,弱毒突变体N137A、N346A和V417A对西葫芦植株没有保护效果。



图2 保护间隔期为5d时弱毒突变体在西葫芦植株上的交叉保护效果

Fig. 2 Cross-protective effects of attenuated mutants against the GFP-tagged wild-type PRSV-SD on *Cucurbita pepo* plants with a protective interval of five days

当保护间隔期为10 d时,挑战接种15 d后,预先 接种弱毒突变体 V417A 的西葫芦植株系统叶片表 现脉明症状,与只接种野生型 PRSV-SD 的植株系统 叶片症状一致,紫外灯下可看到明显的绿色荧光;预 先接种弱毒突变体 N137A 和 N346A 的西葫芦植株 系统叶片无明显症状,在紫外灯下观察到预先接种 N346A 的西葫芦植株系统叶片有微弱绿色荧光,预 先接种 N137A 的西葫芦植株系统叶片无绿色荧光 (图 3-A)。挑战接种 30 d后,预先接种弱毒突变体 N137A的西葫芦植株系统叶片与健康对照仍无明显 差别,紫外灯下看不到绿色荧光;预先接种N346A 的西葫芦植株系统叶片有明显的脉明、泡斑症状,紫 外灯下可看到明显的绿色荧光;预先接种V417A的 西葫芦植株系统叶片症状与单独接种野生型PRSV-SD的植株系统叶片症状相似,均出现明显的褪绿、 泡斑和畸形等症状,且二者均在紫外灯下可观察到 绿色荧光(图3-B)。



图3 保护间隔期为10d时弱毒突变体在西葫芦植株上的交叉保护效果

Fig. 3 Cross-protective effects of attenuated mutants against the GFP-tagged wild-type PRSV-SD on *Cucurbita pepo* plants when protective interval was ten days

A~B:分别为挑战接种第15天和30天西葫芦植株系统叶片的症状; C~D:分别为挑战接种第15天和30天系统叶片中的 病毒CP积累量。A-B: Symptoms developed on the systemic leaves of *Cucurbita pepo* plants at 15 days and 30 days after the challenge inoculation, respectively; C-D: CP accumulative levels of virus in the systemic leaves as determined by Western blotting at 15 days and 30 days after the challenge inoculation, respectively. Western blot 检测结果显示,挑战接种30d后, 预先接种N137A的西葫芦植株系统叶片中病毒CP 积累量最低,预先接种N346A和V417A的西葫芦植 株系统叶片中病毒CP积累量与单独接种野生型 PRSV-SD的植株系统叶片相似(图3-C)。表明弱毒 突变体N137A在挑战接种30d后仍然具有完全的 交叉保护效果,接种弱毒突变体N346A能够推迟发 病15d,而弱毒突变体V417A无交叉保护效果。

当保护间隔期为15d时,挑战接种15d后调查 发现弱毒突变体N137A的保护效率为100.0%, N346A的保护效率为26.7%,V417A的保护效率为 0。这进一步说明弱毒突变体N137A对西葫芦植株 具有完全的交叉保护效果,N346A表现不完全的交 叉保护效果,而V417A无交叉保护效果。进一步对 产生交叉保护的植株进行跟踪观察,发现弱毒突变 体N137A保护植株的抗性可以持续60d以上,表明 弱毒突变体N137A的交叉保护效果非常稳定。

3 讨论

关于HC-Pro 氨基酸突变影响马铃薯 Y 病毒属 病毒致病力的研究较多。马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)坏死株系HC-Pro的C末端第400位赖 氨酸(K400)与谷氨酸(E419)2个氨基酸突变为精氨酸 和天冬氨酸后,该株系失去了引起烟草叶脉坏死的 能力(Tribodet et al., 2005); ZYMV的HC-Pro的第 180位精氨酸(R¹⁸⁰)及第396位谷氨酸(E³⁹⁶)分别突 变为异亮氨酸和天冬酰胺后,致病力显著下降(Lin et al., 2007); 烟草脉带花叶病毒(Tobacco vein banding mosaic virus, TVBMV)的HC-Pro的第180位精 氨酸(R¹⁸⁰)和天冬氨酸(D¹⁹⁸)分别突变为异亮氨酸和 赖氨酸后,病毒的积累量和致病力明显降低(Gao et al., 2012)。本研究证明 PRSV 的 HC-Pro 保守氨基 酸N¹³⁷、N³⁴⁶和V⁴¹⁷突变为丙氨酸后,突变体病毒引起 的症状明显减轻,CP积累水平显著下降,且这3个 氨基酸位点是新发现的马铃薯Y病毒属病毒的致病 力决定簇。

获得弱毒突变体主要有4种方法:一是田间寻 找自然发病比较轻的植株,鉴定是否为弱毒株侵染, 如小西葫芦黄花叶病毒弱毒株 ZYMV WK 就是通 过这种方法发现的(Lecoq et al., 1991)。二是化学 或物理诱变,如利用亚硝酸诱导强毒株 PRSV-HA 得 到弱毒株 HA5-1(Yeh & Gonsalves, 1984)。三是将 感病植株在特定高温下处理,筛选得到弱毒疫苗 (Oshima, 1975)。四是利用定点突变技术在病毒侵 染性克隆上引入突变,然后根据症状筛选弱毒突变体,如上述 PVY、ZYMV和 TVBMV 弱毒突变体的筛选;利用该方法能够在短时间内获得弱毒突变体。因此,本研究以 PRSV-SD 侵染性 cDNA 克隆为基础,利用反向遗传学技术,通过定点突变获得了3个稳定的 PRSV-W 弱毒突变体,筛选出弱毒突变体用于交叉保护。

本研究结果证明在保护间隔期为10d以上时, 接种弱毒突变体N137A可以保护西葫芦植株免受 野生型病毒的侵染,保护效率为100.0%。影响交叉 保护效果的因素有很多,如株系专化性及保护间隔 期等。肖火根和范怀忠(1994)发现弱毒株系PRSV HA5-1 对夏威夷 PRSV 株系的保护效果高于中国台 湾株系,对中国华南地区PRSV株系的保护效果较 差,对泰国和墨西哥株系无保护效果。本研究中的 弱毒突变体是以侵染山东省西葫芦作物的PRSV cDNA 侵染性克隆为模板通过定点突变所得,对当 地葫芦科作物上的番木瓜环斑病毒病不存在株系专 化性问题。目前,关于交叉保护的机制尚无一致的 结论。有研究表明只有当弱毒突变体达到一定的积 累阈值时,植物才能够开始进行防御反应,产生交叉 保护效果,防止强毒株病毒的侵染(Lin et al., 2007)。在本研究中,当保护间隔期为5d时,3个弱 毒突变体均没有交叉保护效果,可能是突变体没有 积累到需要的浓度;保护间隔期为10d及15d时,在 西葫芦中积累浓度最高的弱毒突变体N137A对植 株具有完全的交叉保护效果,而且后期的跟踪观察 试验结果显示,其保护植株的抗性可以持续60d以 上,表明弱毒突变体N137A的交叉保护效果非常稳 定;而浓度最低的V417A没有保护效果,可能是由 于其在寄主体内的积累水平太低,达不到诱发交叉 保护所需阈值,尚待进一步研究验证。

参考文献(References)

- Cheng DJ, Huang XD, Zhang JW, Tian YP, Wang XY, Li XD. 2017. First report of *Papaya ringspot virus* associated with a ringspot disease of zucchini in northern China. Plant Disease, 101(5): 847
- Chewachong GM, Miller SA, Blakeslee JJ, Francis DM, Morris TJ, Qu F. 2015. Generation of an attenuated, cross-protective *Pepino mosaic virus* variant through alignment-guided mutagenesis of the viral capsid protein. Phytopathology, 105(1): 126–134
- Gao R, Tian YP, Wang J, Yin X, Li XD, Valkonen JPT. 2012. Construction of an infectious cDNA clone and gene expression vector of *Tobacco vein banding mosaic virus* (genus *Potyvirus*). Virus Research, 169(1): 276–281

- Holmes FO, Hendrix JW, Ikeda W, Jensen DD, Lindner RC, Storey WB. 1948. Ringspot of papaya (*Carica papaya*) in the Hawaiian Islands. Phytopathology, 38(4): 310–312
- Huang XD, Wang Y, Cheng DJ, Liu J, Yan ZY, Tian YP, Li XD. 2017b. Construction and application of the infectious cDNA clone of *Papaya ringspot virus*-watermelon strain.//Peng YL, Li XD. Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Society for plant pathology in 2017. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 261 (in Chinese) [黄显德, 王玉, 程德杰, 刘 锦, 闫志勇, 田延平, 李向东. 2017b. 番木瓜环斑病毒西瓜株系 侵染性克隆的构建及应用.//彭友良, 李向东. 中国植物病理学 会 2017年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, pp. 261]
- Huang XD, Wang Y, Tian YP, Gu QS, Li XD. 2017a. Prokaryotic expression and antiserum preparation of *Papaya ringspot virus*-watermelon strain coat protein. Shandong Agricultural Science, 49 (12): 86-89 (in Chinese) [黄显德, 王玉, 田延平, 古勤生, 李向 东. 2017a. 番木瓜环斑病毒西瓜株系衣壳蛋白的原核表达及 抗血清制备. 山东农业科学, 49(12): 86-89]
- Jadão AS, Buriola JE, Rezende JAM. 2010. First report of *Papaya* ringspot virus-type W and Zucchini yellow mosaic virus infecting Trichosanthes cucumerina in Brazil. Plant Disease, 94(6): 789
- Lecoq H, Lemaire JM, Wipf-Scheibel C. 1991. Control of *Zucchini yellow mosaic virus* in squash by cross protection. Plant Disease, 75 (2): 208–211
- Liao YM, Gan XJ, Chen B, Cai JH. 2005. First report of *Papaya* ringspot virus and Zucchini yellow mosaic virus in Luohanguo (Siraitia grosvenorii) in China. Plant Disease, 89(5): 530
- Lin SS, Wu HW, Jan FJ, Hou RF, Yeh SD. 2007. Modifications of the helper component-protease of *Zucchini yellow mosaic virus* for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection. Phytopathology, 97(3): 287–296
- Liu H, Naismith JH. 2008. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. BMC Biotechnology, 8(1): 91
- Mantri NL, Kitkaru AS, Misal MB, Ravi KS. 2005. First report of *Papaya ringspot virus*-W in bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) from India. Plant Pathology, 54(6): 806
- McKinney HH. 1929. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. Journal of Agricultural Research, 39: 577–578
- Müller GW, Costa AS. 1977. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. Proceedings of the International Society of Citriculture, 3: 868–872
- Oshima N. 1975. Control of tomato mosaic disease with attenuated vi-

rus of tomato strain of TMV. Review of Plant Protection Research, 8: 126-135

- Rast ATB. 1972. M II-16, an artificial symptomless mutant of *Tobacco mosaic virus* for seedling inoculation of tomato crops. Netherlands Journal of Plant Pathology, 78(3): 110–112
- Ren PY, Fan HZ. 1964. A preliminary study on papaya mosaic disease. Journal of Plant Protection, 3(4): 432 (in Chinese) [任佩喻, 范怀 忠. 1964. 番木瓜花叶病毒初步调查研究. 植物保护学报, 3 (4): 432]
- Rezende JAM, Pacheco DA. 1998. Control of *Papaya ringspot virus*type W in zucchini squash by cross-protection in Brazil. Plant Disease, 82(2): 171–175
- Shen W, Tuo D, Yang Y, Yan P, Li X, Zhou P. 2015. First report of mixed infection of *Papaya ringspot virus* and *Papaya leaf distortion mosaic virus* on *Carica papaya* L. Journal of Plant Pathology, 96(S4): 121
- Tribodet M, Glais L, Kerlan C, Jacquot E. 2005. Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY^N isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. Journal of General Virology, 86(7): 2101–2105
- Tripathi S, Suzuki JY, Ferreira SA, Gonsalves D. 2008. Papaya ringspot virus-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. Molecular Plant Pathology, 9(3): 269–280
- Xiao HG, Fan HZ. 1994. Studies on the cross-protection among strains of *Papaya ringspot virus*. Chinese Journal of Virology, 10(2): 164-171 (in Chinese) [肖火根, 范怀忠. 1994. 番木瓜环斑病毒 株系间交互保护作用研究. 病毒学报, 10(2): 164-171]
- Yeh SD, Gonsalves D. 1984. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. Phytopathology, 74: 1086–1091
- Yoon JY, Ahn HI, Kim M, Tsuda S, Ryu KH. 2006. Pepper mild mottle virus pathogenicity determinants and cross protection effect of attenuated mutants in pepper. Virus Research, 118(1/2): 23–30
- You BJ, Chiang CH, Chen LF, Su WC, Yeh SD. 2005. Engineered mild strains of *Papaya ringspot virus* for broader cross protection in cucurbits. Phytopathology, 95(5): 533–540
- Zhou CY, Zhou Y. 2012. Strategies for viral cross protection in plants.// Watson J, Wang MB. Antiviral resistance in plants. Methods in molecular biology (methods and protocols), Vol. 894. Totowa: Humana Press, pp. 69–81
- Zhu L, Yang T, Chen LJ, Lin HH, Xi DH. 2016. First report of *Papaya* ringspot virus infecting bitter gourd in China. Plant Disease, 100 (11): 2338

(责任编辑:李美娟)