

地高辛标记探针检测 5 种葫芦科作物病毒的斑点杂交方法

孟娟¹, 古勤生¹, 林石明², 彭斌¹, 刘丽锋¹, 田延平¹, 李莉¹

(¹中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; ²厦门山入境检验检疫局, 厦门 361012)

摘要: 【目的】探索 5 种葫芦科作物病毒即小西葫芦黄花叶病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)、西瓜花叶病毒 (*Watermelon mosaic virus*, WMV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、番木瓜环斑病毒西瓜株系 (*Papaya ringspot virus watermelon strain*, PRSV-W) 和南瓜花叶病毒 (*Squash mosaic virus*, SqMV) 的斑点杂交检测技术, 为葫芦科作物种子带毒的快速准确鉴定、流行病学研究和转基因检测等提供技术和方法。

【方法】以构建的重组质粒为模板, 用 PCR 方法合成了相应的地高辛标记的 cDNA 探针。通过斑点杂交检测西葫芦病叶汁液来考察探针的灵敏性和特异性。同时设计了 3 种不同长度的 SqMV 探针 (0.55、1.6、2.7 kb) 对杂交效果进行了研究。【结果】ZYMV、WMV、CMV、PRSV-W 和 SqMV 的 5 种探针检测各自侵染西葫芦病汁液的稀释低限分别为 1:160、1:160、1:320、1:160、1:320, 而每种探针与健康西葫芦和其它 4 种病毒的反应均为阴性。不同长度的 SqMV 探针杂交结果相同。【结论】用 PCR 方法合成的地高辛标记的探针, 能够直接在植物组织中将 5 种病毒检测出来, 具有较好的灵敏性、特异性和重复性。探针的长度对杂交的灵敏性和特异性没有影响。

关键词: 聚合酶链反应 (PCR); 地高辛标记探针; 斑点杂交; ZYMV; WMV; CMV; PRSV-W; SqMV

Dot-blot Hybridization for Detection of Five Cucurbit Viruses by Digoxigenin-Labelled cDNA Probes

MENG Juan¹, GU Qin-sheng¹, LIN Shi-ming², PENG Bin¹, LIU Li-feng¹, TIAN Yan-ping¹, LI Li¹

(¹Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009; ²Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Xiamen 361012)

Abstract: 【Objective】 To provide a good alternative assay in seed health test, epidemiological and transgenic research, dot-blot hybridization was developed to detect five viruses infecting cucurbitaceous crops-*Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus- watermelon strain* (PRSV-W) and *Squash mosaic virus* (SqMV). 【Method】 Digoxigenin-labelled cDNA probes of the five viruses were synthesized by PCR with specific primers. The probes were applied in dot-blot hybridization to detect ZYMV, WMV, CMV, PRSV-W and SqMV in crude extraction of infected leaves. And three SqMV probes of different lengths (0.55, 1.6, 2.7 kb) were designed to research the effect of hybridization. 【Result】 The sensitivity for detection of the crude extraction of infected leaves by ZYMV, WMV, CMV, PRSV-W and SqMV was down to 1:160, 1:160, 1:320, 1:160, 1:320, respectively. The three SqMV probes of different lengths showed no differences. 【Conclusion】 The digoxigenin-labelled probes prepared by PCR could be used for accurate and rapid identification of five viruses infecting cucurbitaceous crops with good stability, sensitivity, specificity and reproducibility.

Key words: PCR; Digoxigenin-labelled cDNA probe; Dot-blot hybridization; ZYMV; WMV; CMV; PRSV-W; SqMV

0 引言

【研究意义】葫芦科植物包括 118 属 825 种, 其中栽培的葫芦科作物有: 西瓜、甜瓜、黄瓜、丝瓜、

冬瓜、西葫芦等, 都是人们喜欢的水果、蔬菜。中国栽培葫芦科作物的历史悠久, 随着农业产业结构的调整以及反季节蔬菜栽培的广为推广, 该科作物病害的发生和危害程度也日趋严重和广泛^[1-3]。为害葫芦科作

收稿日期: 2006-12-07; 接受日期: 2007-02-06

基金项目: 国家重大基础研究“973”前期专项 (2005CCA01700), 国家质检总局课题 (2005IK0061)

作者简介: 孟娟 (1982-), 女, 河北海兴人, 硕士研究生, 研究方向为植物病毒。Tel: 0371-65330956; E-mail: mengjuan22@126.com。通讯作者古勤生 (1965-), 男, 江西寻乌人, 副研究员, 博士, 研究方向为植物病理与分子生物学。Tel: 0371-65330997; E-mail: guqsh@126.com

物的病毒多达46种,但ZYMV、WMV、CMV、PRSV-W和SqMV是发生普遍、危害严重的五种重要病毒^[4]。因此,在葫芦科作物栽培生产中,快速、准确地对其种子或幼苗进行带毒检测,对控制病害在田间的发生、减少经济损失具有十分重要的意义,同时抗病筛选和病害流行预测也需要快速准确的检测方法。【前人研究进展】葫芦科作物病毒没有表现特异生物学反应的指示植物,病毒形态也难以区分种,因此生物学方法和电镜观察在葫芦科作物病毒检测中存在很大局限性。血清学方法得到了广泛应用^[5~8],虽然方法简便快速,但商品化的抗血清价格昂贵,还具有一定的假阳性反应等问题。RT-PCR方法灵敏度极高,可在属、种和株系水平上鉴别病毒,Thomson^[9]、Singh^[10]和王惠哲^[11]等分别利用RT-PCR检测了ZYMV、CMV和WMV,该方法需要专门的仪器设备,技术相对较难,不适合基层应用。核酸分子杂交方法灵敏性和特异性都较强,其中斑点杂交方法在尼龙膜上进行,只要具备探针,检测操作简单方便,适合基层应用,能够一次检测大量样品。陈洁云等^[12]以³²P标记的ZYMV和CMV基因组cDNA作为探针,用点杂交方法检测了浙江地区自然感病的葫芦科作物中以上两种病毒的发生情况,但³²P标记存在放射性污染对人体有害、只有具备同位素的实验室才能够应用等局限。近年来得到迅速发展的地高辛标记的探针灵敏性高,不危害人体,也不污染环境,在植物的核酸杂交检测上得到了越来越广泛的应用^[13~16]。【本研究切入点】生产上主要通过控制病毒传播介体和种植抗病毒品种来防治病毒。通过研究病毒田间消长动态结合栽培措施来控制葫芦科作物病毒病可在一定程度上控制病毒病。由此,葫芦科作物病毒病的检测技术亟待开发。【拟解决的关键问题】本研究拟通过PCR法制备高灵敏性和高特异性的地高辛标记的探针,组装成此5种葫芦科作物

病毒的检测试剂盒,为葫芦科作物种子带毒的快速准确鉴定、流行病学研究和转基因检测等提供技术和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及毒原 ZYMV、WMV、CMV、PRSV-W和SqMV5种毒原由本实验室保存,5种病毒的外壳蛋白基因克隆由本实验室完成并保存。

1.1.2 主要生化试剂和溶液 TaqDNA聚合酶购自宝生物工程(上海)有限公司(TaKaRa)。尼龙膜为Hybond产品,DIG探针标记和检测试剂盒为Roche公司产品。其它常用试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 ZYMV和CMV引物参照^[17,18],WMV、PRSV-W和SqMV引物设计根据GenBank上已发表的相关序列(表),由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2.2 探针的制备 以合成的重组质粒为模板,用PCR合成DIG探针试剂盒PCR法标记地高辛。所用dNTP底物中,DIG-11-dUTP与普通dTTP的比例CMV(<1 kb)为1:3,ZYMV、WMV、PRSV和SqMV(>1 kb)为1:6。25 μl的PCR反应体系为:10×PCR缓冲液2.5 μl,PCR地高辛标记混合物CMV为2.5 μl,另外4种为1.25 μl,再加入dNTP 1.25 μl,5'引物和3'引物ZYMV、CMV、SqMV分别为0.8 μmol·L⁻¹,WMV、PRSV为0.4 μmol·L⁻¹,Taq酶1.3 U,质粒模板ZYMV、SqMV为1 μl,WMV为0.5 μl,CMV为2 μl,PRSV为0.25 μl,加ddH₂O至25 μl。同时每一种探针都以各自未标记的PCR产物作对照。反应程序为:94℃预变性3 min,94℃变性20 s,退火温度见下表,72℃延伸90 s,35个循环,72℃延伸10

表 PCR反应中用来制备探针的引物

Table Primers used for probe preparation by PCR

病毒	5'端引物	3'端引物	退火温度	探针长度
Viruses	5' primer	3' primer	T _m (°C)	Probe length (kb)
ZYMV	GGATCCAGCTCCATACATAGCTGAGACAG	TGTCGACAGGCTTGCAAACGGAGTC	62	1.2
WMV	TGGATCCGACAGCATTGAGAA	TGTCGACGCTTTACTGCG	54	1.2
CMV	CCGGATCCATGGACAAATC	TGTCGACTCAGACTGGTGACC	55	0.7
PRSV-W	GGATCCGCAATGATAGAGTC	TGTCGACAATAGAAGCGGTGGC	52	1.2
SqMV	TGGATCCGCGTGGTTTGAT	TGTCGACAACCTGGGAAAGAAGC	50	2.7
	AGGCCATGGCTATGAACTAGATCTTGCGC	GTGCTCGAGTAGAAAGTAAAATAGGTGGGT	58	1.6
	AAAAGGGGGCCATTGTCA	ATCTATCGCGGCCCTCTCATTG	54	0.55

min。取 5 μl 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 其余置于 -20°C 保存备用。

1.2.3 探针最佳杂交反应时间的选择 SqMV 的探针以 $25\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的探针量与感染 SqMV 的西葫芦病汁液进行杂交, 在 0.5、1.5、3、4.5、6 h 和过夜分别显色看杂交结果。

1.2.4 斑点杂交检测探针的灵敏性和特异性

(1) 样品准备与点样^[16] 取分别感染 5 种不同病毒的西葫芦病叶, 用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 ($\text{pH}=7$) 研磨, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用等体积氯仿抽提 2 次, 取上清, 用 RNA 稀释液 ($\text{H}_2\text{O} : 20\times\text{SSC} : \text{甲醛}=5 : 3 : 2$) 进行 10、20、40、80、160、320、640 倍稀释进行灵敏度测定, 每一种都取健康的西葫芦叶片与其它 4 种病毒的作对照, 进行特异性测定。每种样品取 $5\mu\text{l}$ 点于尼龙膜上。用铅笔在膜右下角做标记。

(2) 斑点杂交^[15,16] 将膜放入烘箱中 120°C 烘烤 30 min 进行固定。将固定好的膜放入杂交管中, 加入杂交液 (0.02% SDS、 $5\times\text{SSC}$ 、50% 去离子甲酰胺、0.1% N-laurysarosine、 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠、 $\text{pH} 7.0$ 、2% 封闭剂) 于杂交炉中 42°C 预杂交 20 min, 弃预杂交液, 将 DIG 标记的探针于沸水浴中变性 5 min, 迅速移至冰上, 加入杂交液中, 42°C 杂交 1.5 h 后, 用大量 $2\times\text{SSC}$ 、0.1% SDS 室温洗膜 2 次, 每次 5 min, 再用 $0.5\times\text{SSC}$ 、0.1% SDS 于 68°C 洗膜 2 次, 每次 5 min。

(3) 检测 洗膜后把膜加入洗涤液 ($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 马来酸、 $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $\text{pH} 7.5$ 、0.3% 吐温) 中洗膜 1 min, 弃去, 用封闭液 (1% 封闭剂、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 马来酸、 $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $\text{pH} 7.5$) 封闭 20 min 后, 加入用封闭液稀释了 5 000 倍的抗地高辛抗体—碱性磷酸酶复合物, 轻摇 30 min。最后, 将结合完抗体的膜用洗涤液洗膜 2 次, 每次 10 min, 加入检测液 ($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 $\text{pH} 9.5$) 平衡 2 min, 再加入 NBT/BCIP 溶液, 黑暗中静止显色, 待观察到理想的显色后, 用无菌水浸泡 5 min 终止反应, 进行拍照。

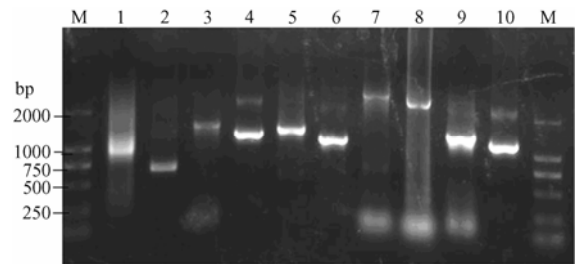
重复杂交 3 次观察杂交结果, 测试探针重复性。

1.2.5 不同长度的探针对斑点杂交影响的研究 分别设计合成了长度大小分别为 2.7、1.6、0.55 kb 的 3 种 SqMV 探针, 以 $25\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的探针量分别与感染 SqMV 的西葫芦病汁液进行杂交, 方法同 1.2.4, 观察杂交结果。

2 结果与分析

2.1 地高辛标记探针的验证

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳后, 地高辛标记的 PCR 产物均较相应的未标记扩增产物稍大, 这是由于扩增片段中掺入了 DIG-11-dUTP, 分子量较大, 泳动较慢, 说明标记成功 (图 1)。



M: Marker; 1: CMV 探针; 2: CMV 对照; 3: PRSV 探针; 4: PRSV 对照; 5: WMV 探针; 6: WMV 对照; 7: SqMV 探针; 8: SqMV 对照; 9: ZYMV 探针; 10: ZYMV 对照

M: Marker; 1: CMV probe; 2: CMV control; 3: PRSV probe; 4: PRSV control; 5: WMV probe; 6: WMV control; 7: SqMV probe; 8: SqMV control; 9: ZYMV probe; 10: ZYMV control

图 1 PCR 标记探针的电泳分析

Fig. 1 Agarose gel analysis of Dig-labeled DNA probes by PCR amplification

2.2 最短杂交反应时间的选择

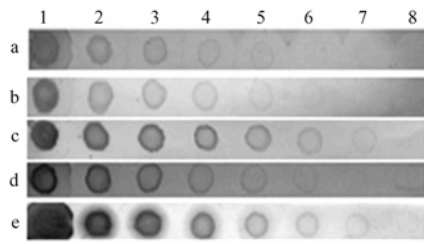
用 SqMV 的探针与感染 SqMV 的西葫芦病汁液进行杂交时, 杂交 1.5 h 就可见斑点显现, 随着杂交时间的延长, 斑点颜色越来越深, 过夜的斑点颜色最深, 但背景也明显的加深, 不利于正确判断结果。因此, 杂交反应的最佳时间为 1.5~6 h。鉴于方法的简便方面考虑, 杂交 1.5 h 已足以达到检测要求。

2.3 5 种 DIG 标记探针的灵敏度及特异性

由斑点杂交结果图 2 显示, ZYMV、WMV、CMV、PRSV 和 SqMV 的探针能检测出各自感染西葫芦病叶提取液的最大稀释倍数分别是 1 : 160、1 : 160、1 : 320、1 : 160 和 1 : 320。

图 3 显示, 每种探针与各自侵染西葫芦病叶提取液的反应均为阳性, 而与健康西葫芦、感染其它 4 种病毒的病叶提取液反应都没有显色, 均为阴性。

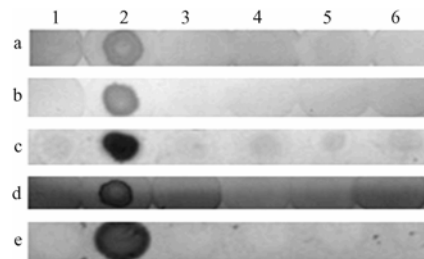
以上试验结果表明, 5 种探针均能够很好地在植物组织中将 5 种病毒检测出, 具有较好的灵敏性和特异性。



a: ZYMV; b: WMV; c: CMV; d: PRSV; e: SqMV; 1~8: 病叶提取液和其 10、20、40、80、160、320、640 倍的稀释液
a: ZYMV; b: WMV; c: CMV; d: PRSV; e: SqMV; 1-8: Extraction solution of leaves and their dilution to 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 folds respectively

图 2 斑点杂交检测感染 5 种病毒的西葫芦病叶提取液的灵敏性分析

Fig. 2 Sensitivity analysis for the detection of 5-virus infected zucchini leaves extracts by NASH



a: ZYMV 探针; b: WMV 探针; c: CMV 探针; d: PRSV 探针; e: SqMV 探针; 1: CK; a2: ZYMV; b2: WMV; c2: CMV; d2: PRSV; e2: SqMV; a3~a6: 除 ZYMV 以外的另外 4 种病毒; b3~b6: 除 WMV 以外的另外 4 种病毒; c3~c6: 除 CMV 以外的另外 4 种病毒; d3~d6: 除 PRSV 以外的另外 4 种病毒; e3~e6: 除 SqMV 以外的另外 4 种病毒
a: ZYMV probe; b: WMV probe; c: CMV probe; d: PRSV probe; e: SqMV probe; 1: CK; a2: ZYMV; b2: WMV; c2: CMV; d2: PRSV; e2: SqMV; a3-a6: the other four viruses except ZYMV; b3-b6: the other four viruses except WMV; c3-c6: the other four viruses except CMV; d3-d6: the other four viruses except PRSV; e3-e6: the other four viruses except SqMV

图 3 斑点杂交检测感染 5 种病毒的西葫芦病叶提取液的特异性分析

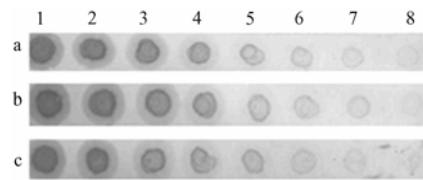
Fig. 3 Specificity analysis for the detection of 5-virus infected zucchini leaves extracts by NASH

2.4 探针的重复性

5 种探针与同一西葫芦病汁液样本的杂交分别重复 3 次, 灵敏性和特异性结果相同, 稳定性好。

2.5 不同长度探针对杂交的影响

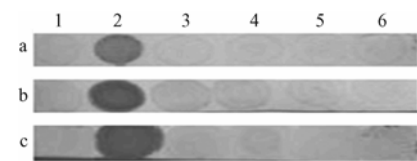
由杂交结果图 4 和图 5 可见, 3 种 SqMV 探针的灵敏性和特异性无明显差别, 对杂交结果没有影响, 即 PCR 法地高辛标记的探针长度对斑点杂交结果无影响。



a: 2.7 kb 探针; b: 1.6 kb 探针; c: 0.55 kb 探针; 1~8: 病叶提取液和其 10、20、40、80、160、320、640 倍的稀释液
a: 2.7 kb probe; b: 1.6 kb probe; c: 0.55 kb probe; 1-8: Extraction solution of leaves and their dilution to 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 folds respectively

图 4 不同长度的探针对斑点杂交的灵敏性检测

Fig. 4 Sensitivity detection for NASH with probes of different length



a: 2.7 kb 探针; b: 1.6 kb 探针; c: 0.55 kb 探针; 1: CK; 2: SqMV; 3: PRSV; 4: ZYMV; 5: CMV; 6: WMV
a: 2.7 kb probe; b: 1.6 kb probe; c: 0.55 kb probe; 1: CK; 2: SqMV; 3: PRSV; 4: ZYMV; 5: CMV; 6: WMV

图 5 不同长度的探针对斑点杂交的特异性检测

Fig. 5 Specificity detection for NASH with probes of different length

3 讨论

自 1983 年由 Leary 等发展了简便、灵敏的斑点杂交技术以来, 此项技术已越来越多地应用于实际研究中。

本研究利用地高辛标记的核酸探针斑点杂交对 5 种葫芦科作物病毒进行检测, 建立了葫芦科主要病毒的常规核酸斑点杂交检测技术, 并对此程序进行了改进, 由常规方法的 22 h 减至 5 h, 极大缩短了检测时间, 需要的设备要求不高, 价格也相对便宜。与杜国英等^[16]用病毒 RNA 和 PCR 扩增产物进行病毒特异性检测相比, 本研究全部直接采用病叶提取液进行病毒检测, 减少了操作步骤和检测时间, 又降低了检测成本, 不失为病毒快速大量检测的一个好方法。只是这样检测不能体现探针的浓度大小, 和病叶的含病毒多少有直接关系, 但也足以达到检测病毒的目的和要求。杜国英等所检测的感染 CMV 烟草病汁液的最大稀释倍数为 100 倍^[16], 而本研究检测感染 5 种病毒的西葫

芦病汁液的最大稀释倍数均在 160 倍以上, 灵敏性高, 同时特异性也很强。

本研究用 PCR 法合成了长度分别为 2.7、1.6 和 0.55 kb 的 3 种 SqMV 探针, 结果显示此方法制备的探针的长度对斑点杂交的灵敏性和特异性没有影响。这一结果和 Dhar 等^[19]研究的结果不同, Dhar 用随机引物法从 PVYⁿ 基因组的 3'端开始依次制备了 3.25、2.5、1.2、0.56 kb 4 种探针, 结果表明此方法制备的探针的长度与灵敏性呈正相关, 探针长度越长, 其灵敏性越高。以上结果说明 PCR 法合成的探针的长度比随机引物法合成的探针的长度对杂交的影响要小, 至少 PCR 法合成的探针的长度在一定范围内对杂交灵敏性和特异性无影响。

目前, 本研究制备的探针正在被组装成试剂盒, 直接应用于生产实际, 可以一次检测大量样本, 有很大的应用潜力和实用价值。

M Carmen Herranz 等^[20]制备了一种串联的多聚探针能够同时检测 6 种核果科病毒, 下一步可以考虑在已取得的结果基础上制备可检测出此 5 种病毒的多聚探针, 使检测更加简便。

4 结论

利用 PCR 法制备的地高辛标记的 5 种探针通过斑点杂交能够将 5 种葫芦科病毒在植物组织中检测出来, 方法快速简单、准确灵敏, 适合大量样本的检测, 能够应用于葫芦科 5 种病毒的常规检测。同时笔者发现 PCR 方法标记探针, 其探针长度 (0.55~2.7 kb) 的差异对检测效果没有影响。

致谢: 本研究曾得到河南工业大学吴兴泉教授的指导, 特表谢忱!

References

- [1] Fletcher J D, Wallace A R, Rogers B T. Potyviruses in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): yield and quality effects of ZYMV and WMV-2 virus infections. *Crop and Horticultural Science*, 2000, 28 (1): 17-26.
- [2] Desbiez C, Lecoq H. Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, 1997, 46: 809-829.
- [3] Abou J Y, Sobh H E, Zammar S, Fayyad A, Lecoq H. Incidence and management of virus diseases of cucurbits in Lebanon. *Crop Protection*, 2000, 19(4): 217-224.
- [4] 古勤生, 范在丰, 李怀方. 葫芦科作物病毒名录. 中国西瓜甜瓜, 2002, (1): 45-47.
- [5] Gu Q S, Fan Z F, Li H F. List of cucurbits virus name. *China Watermelon and Muskmelon*, 2002, 1: 45-47. (in Chinese)
- [5] 肖火根, 范怀忠. 植物组织粗汁液中的番木瓜环斑病毒的 ELISA 检测技术. 中国病毒学, 1994, 9(3): 249-255.
- [6] Xiao H G, Fan H Z. Studies on the detection of papaya ringspot virus in infected tissue of plant by ELISA. *Virologica Sinica*, 1994, 9(3): 249-255. (in Chinese)
- [6] 王海河, 高文臣, 魏宁生. 渭北烟区黄瓜叶病毒酶联免疫检测方法. 西北农业大学学报, 1999, 4: 7-11.
- [7] Wang H H, Gao W C, Wei N S. The establishment of ELISA for the detection of cucumber mosaic virus in Weibei tobacco-planting area of Shaanxi province. *Acta Universitatis Agriculturae Boreali-occidentalia*, 1999, 4: 7-11. (in Chinese)
- [7] 古勤生. 葫芦科主要作物病毒的鉴定和小西葫芦黄花叶病毒的变异. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2001.
- [8] Gu Q S. *The Detection of Viruses Infecting Cucurbits in China and Variabilities of Zucchini Yellow Mosaic Virus*. Beijing: Doctor Dissertation of China Agricultural University, 2001. (in Chinese)
- [8] Yu C, Wu J X, Zhou X P. Detection and subgrouping of cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2005, 123: 155-161.
- [9] Thomson K G, Dietzgen R G, Gibbs A J, Tang Y C, Liesack W, Teakle D S, Stackebrandt E. Identification of Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus by RT-PCR and analysis of sequence variability. *Journal of Virological Methods*, 1995, 55: 83-96.
- [10] Singh Z, Jones R A, Jones M G. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis diseases using RT-PCR. *Plant Disease*, 1995, 79(7): 713-716.
- [11] 王惠哲, 李淑菊, 霍振荣, 庞金安, 张桂霞. 利用 RT-PCR 检测黄瓜上的西瓜花叶病毒. 天津农学院学报, 2004, 11(4): 20-22.
- [12] Wang H Z, Li S J, Huo Z R, Pang J A, Zhang G X. Detection of watermelon mosaic viruses on cucumber by RT-PCR. *Journal of Tianjin Agricultural College*, 2004, 11(4): 20-22. (in Chinese)
- [12] 陈洁云, 陈集双, 柴立红, 王槐基, 杨陈洁. 两种葫芦科病毒的分 子检测和致病性研究. 植物病理学报, 2003, 33: 449-455.
- [13] Chen J Y, Chen J S, Chai L H, Wang H J, Yang C J. Molecular detection and pathogenic testing of two viruses infecting cucurbitaceous crops. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33: 449-455. (in Chinese)
- [13] 李尉民, Hull R, 张成良, 谢联辉. 南方菜豆花叶病毒(SBMV)两典型株系特异 cDNA 和 RNA 探针的制备和应用. 植物病理学报,

- 1998, 28: 243-247.
- Li W M, Hull R, Zhang C L, Xie L H. The application and preparation of the strain specific cDNA and RNA probes of southern bean mosaic virus. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1998, 28: 243-247. (in Chinese)
- [14] Ruiz L, Janssen D, Velasco L, Segund E, Cuadrado I M. Quantitation of cucurbit yellow stunting disorder virus in *Bemisia tabaci* (Genn.) using digoxigenin-labelled hybridization probes. *Journal of Virological Methods*, 2002, 101: 95-103.
- [15] 吴兴泉. 福建马铃薯病毒的分子鉴定与检测技术. 福建: 福建农林大学, 2002.
- Wu X Q. *The Molecular Identification and Detection Methods of Potato Viruses in Fujian*. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University, 2002. (in Chinese)
- [16] 杜国英, 王锡锋, 周广和. 地高辛标记的 cDNA 探针检测烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒及马铃薯 Y 病毒. 植物病理学报, 2004, 34: 75-79.
- Du G Y, Wang X F, Zhou G H. Digoxigenin-labelled cDNA probes for the detection of *Tobacco Mosaic Virus*, *Cucumber Mosaic Virus* and *Potato Virus Y*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34: 75-79. (in Chinese)
- [17] 古勤生, 范在丰, Piero Roggero, 陈红运, 俞正旺, 李怀方. 小西葫芦黄花叶病毒外壳蛋白基因的克隆及序列分析. 植物病理学报, 2003, 33: 498-502.
- Gu Q S, Fan Z F, Piero Roggero, Chen H Y, Yu Z W, Li H F. Cloning and sequence analysis of the coat protein gene of *Zucchini Yellow Mosaic Virus* from China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33: 498-502. (in Chinese)
- [18] 马新艳, 古勤生, 刘丽锋, 李 宁, 杨民和, 彭 斌, 李 莉. CMV 甜瓜分离物外壳蛋白基因的克隆及植物表达载体的构建. 中国病毒学, 2005, 20(3): 307-310.
- Ma X Y, Gu Q S, Liu L F, Li N, Yang M H, Peng B, Li L. Cloning and construction of plant expression of the coat protein gene of a melon isolate of *Cucumber Mosaic Virus*. *Virologica Sinica*, 2005, 20(3): 307-310. (in Chinese)
- [19] Dhar A K, Singh R P. Improvement in the sensitivity of PVY^N detection by increasing the cDNA probe size. *Journal of Virological Methods*, 1994, 50: 197-210.
- [20] Herranz M C, Sanchez-Navarro J A, Aparicio F, Pallas V. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *Journal of Virological Methods*, 2005, 124: 49-55.

(责任编辑 赵利辉, 毕京翠)