

# 黄瓜绿斑驳花叶病毒安徽分离物全基因组序列测定及分析

严丹侃<sup>1</sup>, 张海珊<sup>1</sup>, 郑红英<sup>2</sup>, 燕飞<sup>2</sup>, 章东方<sup>1\*</sup>

(1. 安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 合肥 230031;  
2. 浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所, 杭州 310021)

**摘要** 通过胶体金免疫层析试纸条和 RT-PCR 等手段对采自安徽和县的西瓜病株进行检测, 确定其病原为黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)。为明确 CGMMV 安徽分离物 CGMMV-Anhui 的分类地位, 进一步克隆了该病毒的全基因组序列, 分析了其基因组结构特征。结果表明, CGMMV-Anhui 基因组全长为 6 423 bp (GenBank 登录号 KT236095), 与已报道的 CGMMV 的编码区的基因结构一致, 仅 5' 和 3' 端非编码区核苷酸数目略有差异。将 CGMMV-Anhui 与已报道的分离物的全基因组序列和外壳蛋白基因序列进行系统发育分析, 显示 CGMMV 不同分离物可分为亚洲和欧洲两个组, 安徽分离物 CGMMV-Anhui 与亚洲分离物亲缘关系较近, 可能具有共同的侵染源。

**关键词** 黄瓜绿斑驳病毒; 安徽分离物; 基因组; 序列分析

**中图分类号:** S 436.5 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.04.025

## Cloning and sequence analysis of the genome of *Cucumber green mottle mosaic virus* Anhui isolate

Yan Dankan<sup>1</sup>, Zhang Haishan<sup>1</sup>, Zheng Hongying<sup>2</sup>, Yan Fei<sup>2</sup>, Zhang Dongfang<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant Protection and Agro-Products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China; 2. Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

**Abstract** Based on gold immunochromatographic assay and RT-PCR methods, the pathogen infecting watermelon in He County of Anhui Province was identified as *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV). In order to clarify the genome characteristics of *Cucumber green mottle mosaic virus* isolate from Anhui (CGMMV-Anhui), the complete genomic sequence of CGMMV-Anhui was determined by molecular cloning. The results showed that the genome of CGMMV-Anhui contained 6 423 nucleotides (GenBank accession no. KT236095) and its genomic structure was the same as that of the CGMMV isolates previously reported, except for the nucleotide numbers of 5'-noncoding region (NCR) and 3'-NCR. The phylogenetic relationship of CGMMV-Anhui with other reported isolates was analyzed based on the genomic sequence and coat protein gene sequence. The analysis of phylogenetic tree showed that CGMMV could be separated into Asian isolates and European isolates. CGMMV-Anhui showed the closest relationship with Asian isolates and they might share the same infection source.

**Key words** *Cucumber green mottle mosaic virus*; Anhui isolate; genome; sequence analysis

黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV), 为烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)成员, 主要侵染葫芦科作物, 致使植株生长缓慢、矮化, 叶片出现色斑、水疱及变形; 结果延迟, 甚至不育。西瓜感染该病毒后, 种子周围的果肉

呈紫红色或暗红色的水渍状, 西瓜成熟后, 变为暗褐色且出现空洞, 失去经济价值, 给农民带来巨大的经济损失。常温下, 该病毒的侵染力可保持数月, 极易通过汁液传播。种子带毒是其远距离传播的主要方式<sup>[1-2]</sup>。该病毒自 Ainsworth 首次在黄瓜上发现并

报道以来<sup>[3]</sup>, 在世界上许多国家被相继发现。在我国, 该病毒于 1986 年在台湾首次被报道<sup>[4]</sup>, 随后, 2004 年从日本进口的南瓜种子中被截获, 之后 2005 年在广西某农业展示中心的观赏南瓜叶片上分离得到<sup>[5]</sup>。根据我国农业部公布的《全国农业植物检疫性有害生物分布行政区名录(2014)》, 辽宁、上海、江苏、浙江、安徽、山东、湖北、湖南、广东、广西、海南等 11 个省区市 74 个县市区均有 CGMMV 分布。

CGMMV 是一种正单链 RNA 病毒, 直杆状, 大小为 300 nm×18 nm。该病毒基因组大小约 6 423 bp, 编码至少 4 个蛋白, 2 个复制酶蛋白 (186 kD 和 129 kD)、运动蛋白 (30 kD) 和外壳蛋白 (17.5 kD)<sup>[6]</sup>。目前, 日本<sup>[7]</sup>、西班牙<sup>[8]</sup>、印度<sup>[9]</sup>、以色列<sup>[1]</sup>、韩国<sup>[10]</sup> 和加拿大<sup>[11]</sup> 等国家已报道了该病毒多个分离物的基因组信息。在我国, 辽宁分离物<sup>[12]</sup>、北京分离物、山东分离物<sup>[13-14]</sup>、河北分离物<sup>[15]</sup> 和海南分离物<sup>[16]</sup> 等的全基因组或近全基因组序列都已测定并报道。

2015 年笔者在安徽和县发现个别西瓜种植大棚出现疫情, 病株叶片出现浅绿色的斑纹, 上端叶片皱缩, 植株矮小、生长缓慢。运用胶体金免疫层析试纸条检测, 发现阳性样本后, 将病样采回, 运用分子生物学的方法, 进一步检测和鉴定, 确定为 CGMMV 侵染。本文克隆了该病毒分离物的全基因组序列并分析了其基因组结构特征, 与已报道分离物进行系统进化相关性分析, 以期揭示 CGMMV 安徽分离物(CGMMV-Anhui)的基因组信息及系统进化情况, 为研究该病毒的传播途径提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

病毒病样: 2015 年 5 月 10 日采集于安徽和县历阳镇西瓜大棚中, 干燥保存于 -70℃ 冰箱中备用。

主要试剂: MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 和 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司, 克隆载体 pUCm-T 和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒等购自上海生工生物工程股份有限公司, 黄瓜绿斑驳花叶病毒胶体金免疫层析试纸条购自美国 Agdia 公司。

引物: CGMMV 鉴定所用引物 CGMMV-F 和 CGMMV-R 由浙江大学生物技术研究所以谢艳老师提供, 扩增片段大小约 850 bp; 4 对用于 CGMMV-Anhui 全基因组序列扩增的引物参考钟敏等<sup>[15]</sup> 的报道。引

物序列列表 1, 所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

病毒 RNA: 称取 100 mg 西瓜病株叶片, 在液氮中磨碎, 使用 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 提取叶片总 RNA, 溶解于经 DEPC 处理的灭菌超纯水中, -80℃ 保存备用。

表 1 CGMMV-Anhui 基因组序列扩增引物

Table 1 Primers for determination of CGMMV-Anhui genomic sequence

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence
prHBCG1-F	GTTTTAATTTTTATAATTAAAC
prHBCG1-R	CTCCATATCTTCAGTTACATCCA
prHBCG2-F	CATGTGAAGATATGGATGTAAGTGAAG
prHBCG2-R	GCAAACATGGTCAAGATCGACTG
prHBCG3-F	GATGCAGTTACAAGTATAATAGCGGATG
prHBCG3-R	CGAGTTCTCGACTGACACCTTAC
prHBCG4-F	GAGTGATAAGCGCCTTTTCCGTAG
prHBCG4-R	TGGGCCCTACCCGGGG
CGMMV-F	CCACGAGTTGTTTCTAATGCTG
CGMMV-R	TTTGCTAGGCGTGATCGGATTGT

### 1.2 方法

#### 1.2.1 黄瓜绿斑驳花叶病毒胶体金免疫层析试纸条检测

参照说明书进行。

#### 1.2.2 CGMMV-Anhui 全基因组序列测定与分析

以 CGMMV-Anhui 侵染发病的西瓜叶片组织总 RNA 为模板, 按照 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit 说明书, 以 RT-PCR 特异性引物和覆盖 CGMMV 全基因组序列的 4 对引物进行 PCR 扩增, PCR 产物在 1×TAE 电泳缓冲液中, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离。PCR 产物使用 UNIQ-10 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]回收纯化后, 分别与 pUCm-T 载体连接并转化大肠杆菌 DH5α, 每个片段选取多个鉴定为阳性的克隆委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 通过比对选择 3 个测序结果相同的序列作为最终测序结果, 拼接序列获得 CGMMV-Anhui 全基因组序列, 从 GenBank 中获得 20 个 CGMMV 分离物全基因组序列, 根据全基因组序列及外壳蛋白(coat protein, CP) 基因序列, 分析 CGMMV-Anhui 与其他分离物的系统进化关系, 以 KGMMV(NC\_003610)为外群。使用 DNASTAR 软件中的 MegAlign 进行开放阅读框及非编码区序列比对分析。针对全基因组序列和外壳蛋白基因序列, 采

用 Mega 6.0 软件进行系统发育树分析,采用邻位相接聚类分析法构建系统发育树,用 1 000 次重复的自展检验评价系统发育树拓扑结构的可靠性<sup>[15]</sup>。

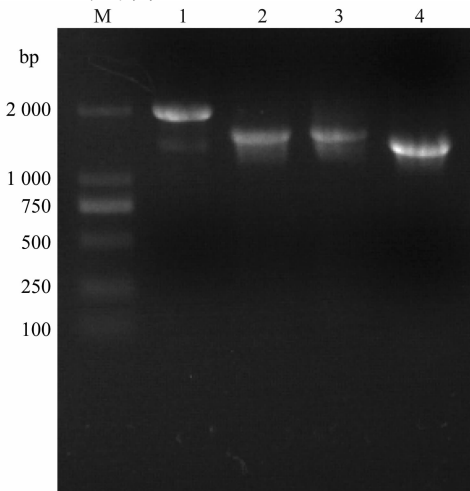
## 2 结果与分析

### 2.1 CGMMV 的胶体金免疫层析试纸条和 RT-PCR 检测

使用黄瓜绿斑驳花叶病毒胶体金免疫层析试纸条对安徽和县西瓜病株和健康叶片进行检测,病株叶片在质控线和测试线均出现紫红色条带,结果为阳性,表明该病株中含有黄瓜绿斑驳花叶病毒;而健康叶片在质控线呈紫红色而测试线未显色,结果为阴性,表明不含黄瓜绿斑驳花叶病毒。使用 CGMMV 特异性引物(CGMMV-F/CGMMV-R)对检测结果进行验证,结果显示病株叶片可扩增出约 850 bp 条带,而健康叶片未扩增出条带,对条带进行克隆后测序,结果显示为黄瓜绿斑驳花叶病毒。

### 2.2 CGMMV-Anhui 的全基因组 RT-PCR 扩增与序列测定

通过 4 对引物扩增 CGMMV-Anhui 全基因组序列,获得 4 段 DNA 片段,大小与预期一致,分别为 1 944、1 564、1 618 和 1 466 bp (图 1)。将得到的 CGMMV 基因组各 DNA 片段进行拼接,得到 CGMMV-Anhui 全基因组序列,全长 6 423 bp,将该序列提交 GenBank,登录号为 KT236095。



M: DL2000 DNA marker; 1-4: prHBCG1-F/prHBCG1-R, prHBCG2-F/prHBCG2-R, prHBCG3-F/prHBCG3-R, prHBCG4-F/prHBCG4-R

图 1 CGMMV-Anhui 全基因组序列 4 个片段的扩增

Fig. 1 Amplification of four fragments of CGMMV-Anhui genomic sequence

### 2.3 CGMMV-Anhui 基因组序列分析

对 CGMMV-Anhui 的全基因组序列进行分析表明,其包含 5'非编码区(60 bp)、复制酶蛋白(3 435 bp 和 4 947 bp)、运动蛋白(795 bp)、外壳蛋白(486 bp)和 3'非编码区(175 bp)。将 CGMMV-Anhui 各部分序列与已报道的其他 20 个 CGMMV 分离物进行核苷酸比对(表 2),基因组核苷酸相似性在 90.1%~99.8%,其中与 4 株欧洲分离物差异最大,与亚洲分离物和北美分离物相似性较高,而与以色列的 4 个分离物的相似性在 94.1%~98.3%,各分离物间的差异较大。将 CGMMV-Anhui 非编码区序列与其他地区分离物比对发现,5'非编码区的相似性在 95.0%~100%,而 3'非编码区的相似性在 93.3%~99.4%。相对而言,4 个蛋白质编码区的核苷酸序列变化较大,其中复制酶蛋白编码区与 4 株欧洲分离物的相似性小于 90%。

将 CGMMV-Anhui 的 4 个蛋白质的氨基酸序列与其他 20 个 CGMMV 分离物进行比对,结果表明,2 个复制酶蛋白的氨基酸相似性分别为 97.6%~100% 和 97.7%~100%,运动蛋白的相似性为 97.7%~99.6%,外壳蛋白的相似性为 95.7%~100%。其中与西班牙分离物差异较大,4 个蛋白质的氨基酸序列相似性为 95.7%~97.8%。

### 2.4 CGMMV-Anhui 与其他分离物系统进化分析

基于 CGMMV 基因组序列构建系统发育树,结果(图 2)表明 21 个 CGMMV 分离物可分为两个亚组,其中欧洲 4 个分离物与以色列分离物 CGMMV-Ec 在同一亚组中。CGMMV-Anhui 分离物与其他以色列分离物、亚洲分离物和北美分离物在一个亚组中,其中 CGMMV-Anhui 与中国河南郑州 CGMMV-hn、浙江海宁分离物 CGMMV-ZJ、河北分离物 CGMMV-chb 在同一分支上,而中国山东泰安分离物 CGMMV-CCMV-TANG 和韩国分离物 CGMMV-KW 处于同一分支中,辽宁分离物 CGMMV-Liaoning 与台湾台中分离物 CGMMV11 单独形成分支。日本、韩国、印度和中国分离物处于同一较大分支中,而北美分离物和以色列 CGMMV-Rd 和 CGMMV-TY 分离物处于同一分支中(图 2)。相对而言,安徽分离物 CGMMV-Anhui 与亚洲分离物亲缘关系较近,与欧洲分离物的亲缘关系较远,这与基于外壳蛋白基因序列的系统进化关系分析结果基本一致,但是在各分支上存在差异(图 3)。

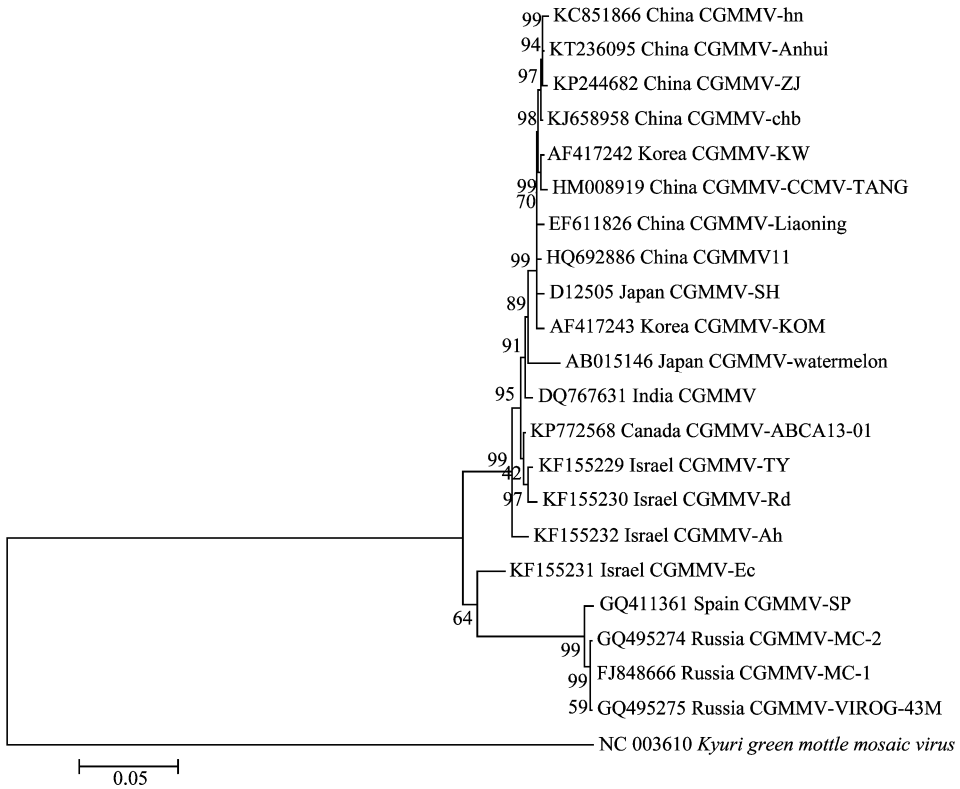


图 2 基于 CGMMV-Anhui 全长基因组序列的 CGMMV 分离物系统进化关系

Fig. 2 Phylogenetic relationships of CGMMV-Anhui with other reported isolates based on genomic sequences

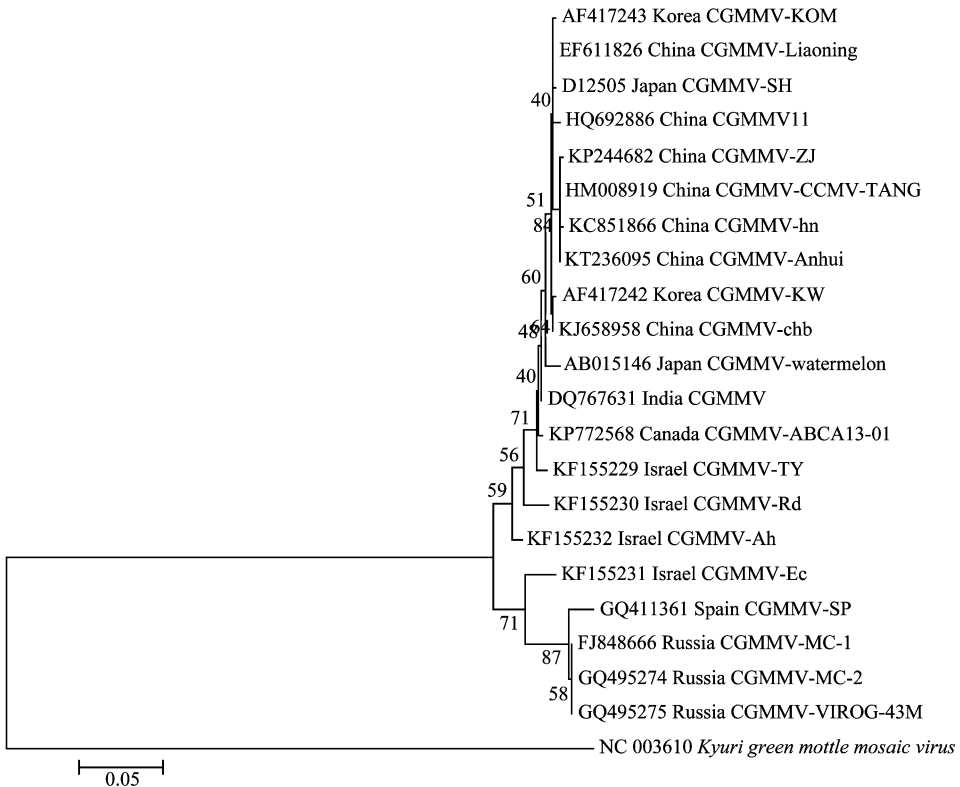


图 3 基于外壳蛋白基因序列的 CGMMV-Anhui 与其他分离物的系统进化关系

Fig. 3 Phylogenetic relationships of CGMMV-Anhui with other reported isolates based on the gene sequences of coat protein

表 2 CGMMV-Anhui 与其他分离物核苷酸和氨基酸序列相似性比对

Table 2 Nucleotide and amino acid sequence identities between CGMMV-Anhui and other reported isolates

分离物 Isolate	登录号 Accession no.	国家 Country	基因组 Genome	5'非编码区 5'-noncoding region	相似性/% Identity									
					129 kD 复制酶 129 kD viral replicase		186 kD 复制酶 186 kD viral replicase		运动蛋白 Movement protein		外壳蛋白 Coat protein		3'非编码区 3'-noncoding region	
					nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa		
CGMMV-hn	KC851866	中国	99.7	100.0	99.6	99.2	99.7	99.3	99.9	99.6	99.8	99.4	99.4	
CGMMV-ZJ	KP244682	中国	99.7	100.0	99.7	100.0	99.7	99.9	99.7	99.6	99.8	99.4	97.8	
CGMMV11	HQ692886	中国	99.4	100.0	99.3	99.8	99.4	99.9	99.9	99.6	99.2	100.0	98.9	
CGMMV-Liaoning	EF611826	中国	99.2	98.3	99.1	99.5	99.2	99.5	99.5	98.5	99.6	100.0	98.9	
CGMMV-CCMV-TANG	HM008919	中国	99.3	98.3	99.0	99.6	99.2	99.7	99.6	99.2	100.0	100.0	98.9	
CGMMV-chb	KJ658958	中国	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.9	99.6	99.4	100.0	98.3	
CGMMV-KW	AF417242	韩国	99.3	98.3	99.2	99.7	99.3	99.7	99.9	99.6	99.2	100.0	98.3	
CGMMV-KOM	AF417243	韩国	99.2	100.0	99.1	99.8	99.2	99.8	99.6	99.6	99.4	100.0	97.2	
CGMMV-SH	D12505	日本	99.3	100.0	99.2	99.8	99.3	99.9	99.6	99.2	99.4	100.0	98.3	
CGMMV-watermelon	AB015146	日本	97.7	100.0	97.1	99.1	97.4	99.3	98.4	98.9	98.4	100.0	98.9	
CGMMV-ABCA13-01	KP772568	加拿大	98.7	98.3	98.5	99.5	98.6	99.6	99.4	98.9	98.6	99.4	98.9	
CGMMV	DQ767631	印度	98.7	98.3	98.4	99.5	98.6	99.6	99.6	99.6	99.0	100.0	97.2	
CGMMV-TY	KF155229	以色列	98.3	96.7	98.2	99.3	98.2	99.3	99.1	99.2	98.1	98.8	97.2	
CGMMV-Rd	KF155230	以色列	98.1	95.0	98.0	99.5	98.1	99.5	99.0	98.5	96.7	98.8	97.2	
CGMMV-Ah	KF155232	以色列	97.5	98.3	97.2	99.0	97.5	99.2	98.7	99.2	97.1	99.4	96.1	
CGMMV-Ec	KF155231	以色列	94.1	98.3	93.7	98.6	93.9	98.8	95.7	98.1	92.8	98.1	96.1	
CGMMV-MC-2	GQ495274	俄罗斯	90.3	96.7	89.0	97.8	89.4	97.9	93.5	98.5	92.6	99.4	93.3	
CGMMV-VIROG-43M	GQ495275	俄罗斯	90.2	96.7	88.9	97.6	89.3	97.7	93.5	98.5	92.6	99.4	93.3	
CGMMV-MC-1	FJ848666	俄罗斯	90.3	96.7	88.9	97.9	89.4	97.9	93.6	98.5	92.6	99.4	93.3	
CGMMV-SP	GQ411361	西班牙	90.1	96.7	88.9	97.8	89.4	97.8	93.2	97.7	91.6	95.7	93.3	

### 3 讨论

黄瓜绿斑驳花叶病毒病是我国葫芦科作物上的主要病毒病之一,严重危害西瓜、葫芦等作物<sup>[17]</sup>。本研究利用胶体金免疫层析试纸条技术在安徽和县西瓜大棚中检测到黄瓜绿斑驳花叶病毒,并利用黄瓜绿斑驳花叶病毒特异性引物对病样进行 RT-PCR 检测,确定为黄瓜绿斑驳花叶病毒。本研究首次克隆了 CGMMV 安徽分离物全基因组序列,分析了其基因组结构特征以及与其他分离物的系统发育关系,为揭示我国 CGMMV 分类地位及该病毒的传播途径奠定了基础。

目前,我国已报道了浙江、河北、山东、辽宁、台湾和海南等多个地区的 CGMMV 分离物全基因组序列。本研究将获得的安徽分离物 CGMMV-Anhui 全基因组序列和 20 个已知 CGMMV 分离物进行系统发育分析,结果表明 CGMMV 分离物可以大致分为两组,第 I 组为亚洲组,主要包括中国、日本、

韩国、印度分离物,此外还包括 1 个北美分离物和 3 个以色列分离物;第 II 组为欧洲分离物,主要包括西班牙和俄罗斯分离物,以及 1 个以色列分离物。CGMMV-Anhui 与我国内陆地区(河北、浙江、河南)的分离物同源性最高,同时与亚洲国家(韩国、日本)分离物同源性也较高,而与欧洲的 4 个分离物存在非常明显的进化差异。由此可知,CGMMV-Anhui 与 CGMMV 日本和韩国分离物有共同的流行病学侵染源,但是西瓜病株采集地未从日本或韩国引种,这说明在我国多地发生 CGMMV 的情况下,该病毒已在我国定殖,并逐步扩散,新发生的病毒毒源可能来自于国内<sup>[16, 18-19]</sup>。此外,基于 CGMMV 全基因组分析发现,相比于我国其他地区,山东的分离物与韩国分离物更为接近,而基于外壳蛋白基因序列分析发现,河北、辽宁分离物与日韩分离物同处于 1 个分支中,这可能与 CGMMV 基因组不同位置的进化速度,寄主和地域差异等因素有关,但结果仍需进一步验证。

## 参考文献

- [1] Antignus Y, Pearlsman M, Ben-Yoseph R, et al. Occurrence of a variant of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Israel [J]. *Phytoparasitica*, 1990, 18(1): 50 - 56.
- [2] Antignus Y, Wang Y, Pearlsman M, et al. Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting *Tobamovirus* [J]. *Phytopathology*, 2001, 91(6): 565 - 571.
- [3] Ainsworth G C. Mosaic diseases of the cucumber [J]. *Annals of Applied Biology*, 1935, 22(1): 55 - 67.
- [4] Hseu S H, Huang C H, Chang C A, et al. The occurrence of five viruses in six cucurbits in Taiwan [J]. *Plant Protection Bulletin, Taiwan*, 1987, 29(3): 233 - 244.
- [5] 秦碧霞, 蔡健和, 刘志明, 等. 侵染观赏南瓜的黄瓜绿斑驳花叶病毒的初步鉴定[J]. *植物检疫*, 2005, 19(4): 198 - 200.
- [6] Kim O K, Mizutani T, Natsuaki K T, et al. First report and the genetic variability of *Cucumber green mottle mosaic virus* occurring on bottle gourd in Myanmar [J]. *Journal of Phytopathology*, 2010, 158(7/8): 572 - 575.
- [7] Ugaki M, Tomiyama M, Kakutani T, et al. The complete nucleotide sequence of *Cucumber green mottle mosaic virus* (SH strain) genomic RNA [J]. *Journal of General Virology*, 1991, 72(7): 1487 - 1495.
- [8] Céliz A, Luis-Arteaga M, Rodríguez-Cerezo E. First report of cucumber green mottle mosaic tobamovirus infecting greenhouse-grown cucumber in Spain [J]. *Plant Disease*, 1996, 80(11): 1303.
- [9] Vani S, Varma A. Properties of *Cucumber green mottle mosaic virus* isolated from water of river Jamuna [J]. *Indian Phytopathology*, 1993, 46(2): 118 - 122.
- [10] Kim K H, Lee J M, Kim S M, et al. Nucleotide sequences of two Korean isolates of *Cucumber green mottle mosaic virus* [J]. *Molecules and Cells*, 2003, 16(3): 407 - 412.
- [11] Li Rugang, Zheng Yi, Fei Zhangjun, et al. First complete genome sequence of an emerging *Cucumber green mottle mosaic virus* isolate in North America [J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(3): e00452 - e004515.
- [12] 陈红运, 林石明, 陈青, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒辽宁分离物全基因组序列测定[J]. *病毒学报*, 2009, 25(1): 68 - 72.
- [13] Liu Yan, Wang Yanan, Wang Xifeng, et al. Molecular characterization and distribution of *Cucumber green mottle mosaic virus* in China [J]. *Journal of Phytopathology*, 2009, 157(7/8): 393 - 399.
- [14] 田永蕾, 刘冬梅, 张永江, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒北京和山东分离物的生物学测定及其基因组比较[J]. *植物检疫*, 2009, 23(6): 1 - 6.
- [15] 钟敏, 赵绪生, 胡同乐, 等. 黄瓜绿斑驳病毒河北分离物基因组克隆及序列分析[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(2): 182 - 187.
- [16] 王峰, 任春梅, 季英华, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒海南分离物基因组测定与毒源分析[J]. *植物保护*, 2014, 40(6): 75 - 81.
- [17] 周玲玲, 吴元华, 赵秀香, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒生物学特性及对西瓜生长的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2008, 39(4): 417 - 422.
- [18] 李小妮, 任小平, 王琳, 等. 广东省黄瓜绿斑驳花叶病毒分子检测及防疫[J]. *植物保护学报*, 2009, 36(3): 283 - 284.
- [19] 赵慧茹, 林振亚, 朱俊子, 等. 湖南首次检测到黄瓜绿斑驳花叶病毒[J]. *植物病理学报*, 2013, 43(2): 219 - 221.
- (责任编辑: 杨明丽)
- 
- (上接 150 页)
- [10] Asahina E. Frost resistance in insects [J]. *Advances in Insect Physiology*, 1970, 6: 1 - 49.
- [11] Renault D, Salin C, Vannier G, et al. Survival at low temperatures in insects: What is the ecological significance of the supercooling point? [J]. *Cryo Letters*, 2002, 23(4): 217 - 228.
- [12] 景晓红, 康乐. 昆虫耐寒性的测定与评价方法[J]. *昆虫知识*, 2004, 41(1): 7 - 10.
- [13] 鹿金秋, 王振营, 何康来, 等. 桃蛀螟越冬老熟幼虫过冷却点测定[J]. *植物保护*, 2009, 35(2): 44 - 47.
- [14] 孙金如. 越冬的野外调查研究[M]//林昌善. 粘虫生理生态学. 北京: 北京大学出版社, 1990: 167 - 172.
- [15] 陈瑞鹿. 粘虫发生规律研究中几个有关问题的研讨[J]. *中国农业科学*, 1962(7): 12 - 16.
- [16] 林昌善, 张宗炳. 粘虫发生规律的研究 V——粘虫季节性远距离迁飞的一个模式[J]. *植物保护学报*, 1964, 3(2): 93 - 100.
- [17] 蒲蛰龙, 朱金亮, 陈熙雯, 等. 昆虫抗寒性研究——(一)粘虫 *Pseudaletia separata* (Wlk.) 和斜纹夜蛾 *Prodenia litura* Fabr. 的过冷却点及冻结点温度测定[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1961(1): 30 - 36.
- [18] 李绵春, 陈瑞鹿, 刘增义, 等. 吉林省粘虫猖獗世代发生虫源的研究——I. 发生虫源的探讨和越冬问题研究[J]. *昆虫学报*, 1965, 14(1): 21 - 31.
- [19] 江幸福, 罗礼智, 李克斌, 等. 甜菜夜蛾抗寒与越冬能力研究[J]. *生态学报*, 2001, 21: 1575 - 1582.
- [20] 赵琦, 张云慧, 韩二宾, 等. 旋幽夜蛾各虫态的过冷却点测定[J]. *植物保护*, 2011, 37(2): 63 - 66.
- [21] 熊立刚, 吴青君, 王少丽, 等. 小菜蛾越冬生物学特性研究[J]. *植物保护*, 2010, 36(2): 90 - 93.
- [22] 李冰祥, 陈永林, 蔡惠罗. 过冷却和昆虫的耐寒性[J]. *昆虫知识*, 1998, 35(6): 361 - 364.
- [23] 冯从经, 吕文静, 董秋安, 等. 低温处理对亚洲玉米螟幼虫抗寒性的诱导效应[J]. *昆虫学报*, 2007, 50(1): 1 - 6.
- (责任编辑: 杨明丽)