

黄瓜绿斑驳花叶病毒病防治研究进展

刘华威^{1,2}, 罗来鑫^{1,2}, 朱春雨³, 梁超琼^{1,2}, 刘鹏飞^{1,2}, 李健强^{1,2*}

(1. 中国农业大学植物病理学系, 种子病害检验与防控北京市重点实验室, 北京 100193; 2. 种苗健康北京市工程研究中心, 农业部植物病理学重点实验室, 北京 100193; 3. 农业部农药检定所, 北京 100026)

摘要 黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)主要危害葫芦科作物,已被世界上许多国家和地区列为检疫性有害生物。CGMMV 目前在我国 23 个省、市、区已有报道发生和危害,严重影响葫芦科作物的生产;近年来该病害在国内外呈现迅猛扩展的趋势并对生产造成危害。本文综述了防治该病害的种子处理、化学及生物防治、嫁接以及转基因等分子生物学方法;分析了 CGMMV 与寄主黄瓜互作研究的最新进展,对小分子 RNA 参与调控寄主对 CGMMV 病毒的防控策略提出了展望,并概述了下一代测序技术、基因编辑技术在植物新病毒的检测、鉴定以及培育抗病新品种等方面的应用。

关键词 黄瓜绿斑驳花叶病毒; 防治方法; 研究进展

中图分类号: S 436.42 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.06.004

Research progress in management of *Cucumber green mottle mosaic virus*

Liu Huawei^{1,2}, Luo Laixin^{1,2}, Zhu Chunyu³, Liang Chaoqiong^{1,2}, Liu Pengfei^{1,2}, Li Jianqiang^{1,2}

(1. Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing Key Laboratory of Seed Disease Testing and Control (BKL-SDTC), Beijing 100193, China; 2. Beijing Engineering Research Center of Seed and Plant Health (BERC-SPH), Key Laboratory of Plant Pathology, Ministry of Agriculture of P. R China, Beijing 100193, China; 3. Institute for the Control of Agrochemicals, Beijing 100026, China)

Abstract *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) causes devastating disease on cucurbits, and it has been listed as quarantine pathogen in many countries in the world. It was reported in at least 23 provinces in China, causing substantial yield losses and lower market value of cucurbits. This review summarized the current control methods of CGMMV and tried to explore the novel control strategies, including next-generation sequencing (NGS) and gene-editing technology for viral diagnostics and identification, and miRNA mediated-resistance to CGMMV infection.

Key words *Cucumber green mottle mosaic virus*; management method; research progress

中国是世界上最大的蔬菜生产国,其中 2013 年的黄瓜产量为 5 431.59 万 t,占世界总产量的 76%^[1]。黄瓜作为重要的蔬菜之一,提高其产量和生产效益一直受到世界各国研究人员的重视。近年来,随着黄瓜栽培面积的增加和栽培品种的多样化,黄瓜上病害种类也随之增加,其中黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)由于传播迅速且目前无法彻底根除,已逐渐成为严重危害葫芦科作物生产的病毒病害之一。目前,物理方法、化学药剂、生物防治、农事操作以及生物学技术

已被广泛用于防治 CGMMV,并取得了一定的防治效果。2014 年,农业部颁布了该病毒病的防控技术规程^[2]。但由于 CGMMV 在种子等传播材料中存在方式的隐秘性、持久性,以及其传播途径的多样性,使得如何有效防治黄瓜绿斑驳病毒、探索合理而稳定的防治措施来控制该病害成为各国农业研究人员亟待解决的问题。

1 CGMMV 病原生物学研究

CGMMV 属于烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)成

收稿日期: 2016-03-24 修订日期: 2016-05-27

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303028);国家自然科学基金(31371910)

* 通信作者 E-mail: lij231@cau.edu.cn

员,为正单链线状 RNA 病毒,粒子大小约为 18 nm×300 nm 的螺旋状结构,每 3 周含有 49 个亚基,螺距 2.3 nm。位于核中心的 RNA 基因组长度 6.4 kb 左右^[3],其编码的 17.3、29、129、186 kDa 4 个蛋白,分别与 CGMMV 在寄主植株体内的复制、移动相关^[4]。另外,基因组 5' 和 3' 端分别含有帽子结构和 poly(A) 尾巴及类似 tRNA 的结构。5' 端的帽子结构可提高 mRNA 的稳定性及增加翻译效率,并保护 RNA 不受降解^[5]。而 3' 端结构可提供复制酶、核糖核酸结合蛋白识别和结合的位点,与寄主细胞蛋白进行竞争性结合^[6]。研究表明,CGMMV 的钝化温度在 90~100℃ 之间,稀释限点为 10⁻⁶~10⁻⁷,病毒粒子在 -20℃ 下仍可以存活^[3]。

CGMMV 自 1935 年首次被报道以来^[7],目前在亚洲^[8-18]、欧洲^[19-29]、南美洲^[30]、北美洲^[31-32] 和大洋洲^[33] 均有发生且造成不同程度的危害(表 1),其中在中国境内的 23 个省、市、自治区报道有发生且造成危害(表 2)^[10, 34-52]。CGMMV 主要寄生于葫芦科作物,如:黄瓜(*Cucumis sativus*)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、甜瓜(*Cucumis melo*)等,另外也可侵染苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)、曼陀罗(*Datura stramonium*)、菟丝子(*Cuscuta chinensis*)、本生烟(*Nicotiana*

benthamiana) 和 珊 西 烟 (*Nicotiana tabacum*) 等^[3]。已有研究表明,CGMMV 是典型的种传病毒,主要寄生于种子的胚。根据对感病西瓜种子不同部位的检测,其结果显示子叶、外种皮以及内种皮均被侵染,且其对应部位带毒量依次降低^[53]。CGMMV 侵染黄瓜后,病毒粒子可通过韧皮部对黄瓜植株体进行系统性侵染^[54]。因此,禁止感染 CGMMV 的带毒种子在不同种植区运输是控制该病害长距离传播的关键^[55]。另外,农事操作,如嫁接、汁液接触、人工授粉、土壤带毒、灌溉水以及菟丝子等也可造成 CGMMV 直接或间接地传播^[3, 56-57]。随着检测技术的发展,包括生物学、血清学和电镜技术等已广泛应用于 CGMMV 检测中,尤其是 RT-PCR 方法及其衍生技术包括荧光 RT-PCR 法、免疫捕获 RT-PCR 和免疫磁珠 RT-PCR 方法均成熟应用于 CGMMV 的检测,并可成功检测到黄瓜种子中含量为 2 ng 的 CGMMV 病毒粒子^[58]。鉴于当前的防治措施对处理存在于各种传播材料中的 CGMMV 仍留有死角、并不足以彻底截止其传播。因此在生产中除了将各种手段应用于 CGMMV 的检测、尽量降低其传播的风险外^[59],研究具有实效的防治措施、杜绝 CGMMV 的发生与传播,是病害管理的重中之重,亦可以间接减少种植者的投入并增加收益。

表 1 黄瓜绿斑驳花叶病毒病在世界范围内的发生与危害

Table 1 Occurrence and damage of Cucumber green mottle mosaic virus in the world

地理分布 Distribution	国家 Country	发病率(或面积)/产量损失 Disease incidence (or area of disease occurrence)/Yield loss	引用文献 Cited reference
亚洲 Asian	日本 Japan	1 250 hm ² /9 亿日元	[8]
	印度 India	70%~80%/—	[9]
	中国 China	333 hm ² /13 hm ²	[10]
	韩国 South Korea	463 hm ² /—	[11]
	巴基斯坦 Pakistan	46.9%/—	[12]
	伊朗 Iran, 以色列 Israel, 沙特阿拉伯 Saudi Arabia, 斯里兰卡 Sri Lanka, 叙利亚共和国 Syria, 缅甸 Myanmar	—/—	[13-18]
欧洲 Europe	英国 United Kingdom	15%/—	[19]
	芬兰 Finland	0.92%/—	[20]
	俄罗斯 Russia	80%~100%/30%	[21]
	乌克兰 Ukraine	—/50%	[22]
	丹麦 Denmark, 挪威 Norway, 瑞典 Sweden, 德国 Germany, 罗马尼亚 Romania, 希腊 Greece, 西班牙 Spain, 匈牙利 Hungary, 保加利亚 Bulgaria, 捷克斯洛伐克 Czechoslovakia, 波兰 Poland	—/—	[23-29]
南美洲 South America	巴西 Brazil	—/—	[30]
北美洲 North America	美国 United States	—/25%	[31]
	加拿大 Canada	—/10%~15%	[32]
大洋洲 Oceania	澳大利亚 Australia	—/—	[33]

表 2 黄瓜绿斑驳花叶病毒病在中国范围内的发生与危害

Table 2 Occurrence and damage of *Cucumber green mottle mosaic virus* in China

省份及地区 Province and region	发病率(或面积)/产量损失 Disease incidence (or Area of disease occurrence)/Yield loss	引用文献 Cited reference
辽宁 Liaoning	333 hm ² /13 hm ²	[10]
吉林 Jilin	100%/56.49%	[34]
湖北 Hubei	13.2 hm ² /—	[35]
浙江 Zhejiang	70.3 hm ² /30%	[36]
山东 Shandong	87.5%/—	[37]
上海 Shanghai	>50%/—	[38]
江苏 Jiangsu	40 hm ² /0.67 hm ²	[39]
安徽 Anhui	20 hm ² /50%	[40]
台湾 Taiwan, 广西 Guangxi, 江西 Jiangxi, 北京 Beijing, 四川 Sichuan, 云南 Yunnan, 河南 Henan, 广东 Guangdong, 湖南 Hunan, 新疆 Xinjiang, 甘肃 Gansu, 陕西 Shaanxi, 山西 Shanxi, 海南 Hainan, 河北 Hebei	—/—	[41-52]

2 CGMMV 侵染症状及危害

CGMMV 侵染寄主后,造成植物组织内的酚类物质、碳水化合物浓度降低,叶绿体数量及叶绿素含量减少^[60]。寄主叶部、果实表面通常会产花叶、斑驳症状,随着病情的发展进一步形成浓绿色的褪绿斑或突起。严重时,造成植株矮化、开花延时,并最终导致作物减产至绝收。同时,西瓜被侵染后,感病植株的果实会形成瓢状空洞、种子周围的果肉呈纤维状而失去食用价值^[3]。

CGMMV 的侵染对作物生产造成了巨大的经济损失。1968 年日本关东地区西瓜由于 CGMMV 的侵染危害,造成约 9 亿日元的损失^[8];1969 年 Fletcher 报道英格兰 Lea Valley 地区的黄瓜由于早期受到 CGMMV 侵染产量损失 15%,但后期侵染对产量影响不大^[19];1978 年印度德里地区甜瓜的受侵染率为 70%~80%^[9];1998 年韩国被侵染作物达到 463 hm²^[11];2004 年巴基斯坦部分地区葫芦芦作物 CGMMV 发病率达 46.9%^[12]。2005 年中国辽宁盖州由于种子带毒而导致大面积西瓜感染 CGMMV,失去食用价值^[10]。2011—2013 年中国山东、江苏、浙江均有报道 CGMMV 在西瓜上大面积发生^[36-37, 39]。

3 CGMMV 防治措施

根据以往研究报道,目前已有包括种子处理、化学防治、生物防治、嫁接以及分子育种技术等在内的多种方法和手段被实际应用于防治 CGMMV。

3.1 种子处理

Kim 报道,通过 75℃ 处理 72 h 的方法,可以使

种子中的 CGMMV 彻底失活,而 85℃ 处理 24 h 的种子仍存在 45.8% 的带毒率^[61]。随后,他又通过电镜观察和 RT-PCR 的方法得知 CGMMV 基因组对温度的敏感区域位于 2~2.5 kb 和 4~4.8 kb,该区域易受温度破坏而造成 CGMMV 失活^[62]。然而,由于 CGMMV 寄藏部位的特殊性以及种壳的保护,Reingold 发现温度(72℃ 处理 72 h)处理、磷酸三钠(10%)处理,或者同时采用两种方法处理种子后,结合 ELISA 和 PCR 检测,结果显示种子仍可能带有病毒,这些处理措施效率不高且不稳定^[63]。

3.2 化学防治

目前,实际生产中已开发出对多种作物病毒病有防治效果的化学制剂,其抗性机制主要是钝化病毒外壳蛋白,影响病毒在寄主体内的定殖或诱导寄主产生抗病性,尽管已进行商业化生产、用于防治作物病毒病的药物已有 170 个,但是却仍未有针对 CGMMV 有防治效果的药剂被开发出来(表 3)。其中,盐酸吗啉胍(moroxydine hydrochloride)作为最重要、最常用的化学成分之一,可以经植物气孔进入植物体内活细胞中,通过抑制或破坏核酸和外壳蛋白的形成,阻止病毒在植株体内的复制,从而达到防治病毒病的目的^[64]。盐酸吗啉胍除了单独使用外(占防治作物病毒病害药剂的 10.28%),也可与乙酸铜复配使用,目前已成为防治作物病毒病害的主要药剂(占防治作物病毒病害药剂的 40%)。另一种被广泛应用的药剂是氨基寡糖素,它参与调节植物生长、发育的分子信号^[65],并被证实有增强植物抗病能力的作用^[66]。香菇多糖从藻类掌状海带(*Laminaria digitata*)中提取、纯化得到,作为一个

非特异性的激发子,通过预处理植物而引起寄主体内 PR 蛋白积累、调节寄主免疫功能、刺激植物自身产生干扰素,从而使得寄主对病原微生物产生抗

性^[67-68]。混合脂肪酸可通过诱导寄主体内的抗病基因表达、提高病原相关蛋白、酶和细胞分裂素等含量,从而使得植物产生抗病能力^[69]。

表 3 我国目前应用于蔬菜和作物病毒病害防治的登记药剂目录

Table 3 Chemicals for the prevention and treatment of virus diseases on vegetables and crops in China

农药名称 Pesticide name or main ingredient	防治作物种类 Protected plant	防治对象 Target	登记产品数/个 Registration number	占登记产品比例/% Ratio of registration number
盐酸吗啉胍 Moroxydine hydrochloride	番茄,烟草	病毒病	18	10.28
吗啉胍·乙酸铜 Copper acetate·moroxydine hydrochloride	番茄,烟草,辣椒	病毒病	70	40.00
氨基寡糖素 Oligosaccharins	番茄,烟草,玉米	病毒病,花叶病毒病	20	11.42
香菇多糖 Fungous proteoglycan	番茄,水稻,西葫芦, 辣椒,烟草,西瓜	病毒病,黑条矮缩病	25	14.28
琥铜·吗啉胍 Moroxydine hydrochloride·copper (succinate+glutarate+adipate)	番茄	病毒病	3	1.71
羟烯·吗啉胍 Oxyadenine·moroxydine hydrochloride	番茄,烟草,番茄,水稻	病毒病,黑条矮缩病	4	2.28
烷醇·硫酸铜 Copper sulfate·triacontanol	番茄	病毒病	5	2.85
混脂·硫酸铜 Copper sulfate	番茄,烟草,西瓜,辣椒	病毒病,花叶病毒病	4	2.28
辛菌胺醋酸盐(暂无英文)	辣椒,番茄	病毒病	4	2.28
辛菌·吗啉胍	番茄,水稻	病毒病,黑条矮缩病	7	4.00
氯溴异氰尿酸 Chloroisobromine cyanuric acid	辣椒,烟草	病毒病	2	1.14
葡聚烯糖(暂无英文)	番茄	病毒病	2	1.14
宁南霉素 Ningnanmycin	辣椒,番茄,烟草	病毒病	2	1.14
烷醇·辛菌胺	番茄	病毒病	1	0.57
烯·羟·硫酸铜 Enadenine·oxyadenine·copper sulfate	辣椒,烟草	病毒病	1	0.57
几丁聚糖 Chitosan	水稻,番茄	病毒病,黑条矮缩病	2	1.14
低聚糖素 Oligosaccharins	胡椒,番茄,玉米	病毒病,粗缩病	2	1.14
混合脂肪酸 Mixed fatty acids	烟草	病毒病,花叶病毒病	1	0.57
丙唑·吗啉胍 Moroxydine hydrochloride·albendazole	烟草	病毒病	1	0.57
苦参·硫黄 Matrine·sulfur	辣椒	病毒病	1	0.57

3.3 生物防治

在 CGMMV 的生物防治策略中,Verma 发现狭叶钩草草(*Pseuderanthemum bicolor*)叶子的提取物含有内吸性的抗性诱导因子(systemic resistance inducer, SRIs),在温室条件下,通过喷洒其提取物,可以提高黄瓜植株对 CGMMV 的抗病性^[64]。随后, Tewari 采用 13 种蕨类植物提取物进行防治 CGMMV 的试验,结果发现 *Adiantum caudatum*, *Dryopteris filix-mas* 和 *Polypodium parasiticum* 的提取物可有效抑制 CGMMV 在寄主体内的复制^[69]。最近, Ali 利用弱毒株系 CGMMV-SH33b 预接种的方式开发出一种保护香瓜免受野生 CGMMV 进一步侵染的防治方法^[70-71]。另外,嫁接技术

一直以来是葫芦科作物在生产中普遍应用的农事操作技术,也是防治病虫害的有力措施之一^[72-73]。然而,赵慧茹试验证明 CGMMV 可从西瓜砧木中运输到其接穗中,从而使得 CGMMV 通过嫁接传播而潜在地成为田间的初侵染来源^[49]。

3.4 抗病分子育种防治

由于 CGMMV 传播途径的多样性,已采取的防治措施仍不足以彻底杜绝 CGMMV 的传播,或者防治效率不高需要投入较多的防治费用,因此,培育抗病性强、抗性稳定的新品种是大势所趋,而基于分子水平的抗病育种成为相对稳定、长期、经济的有效策略。目前,已尝试在一些重要的经济作物上培育转基因抗病性植株,尽管不同寄主的抗性信号以及病

原侵染机制存在多样性和复杂性,但基于内源基因和外源基因介导培育抗性植株仍是常用的途径之一^[74]。Rajamony 通过对大量不同香瓜品种的抗病性测定,成功地筛选到 7 个抗 CGMMV 的香瓜野生品种,并进一步通过嫁接、杂交等手段将抗性基因转移到其他葫芦科栽培品种上,以此达到抗病、防病目的^[75],而基于转基因途径防治 CGMMV 技术的应用则进一步拓展了对该病害的防治方法。1986 年 Abel 试验验证了烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)外壳蛋白介导植株的抗性,结果表明由于外壳蛋白的介导作用,接种 TMV 的转基因烟草植株发病时间延迟,且 10%~60%接种植株上没有产生症状^[76]。随后,Provvidenti 发现由外壳蛋白介导产生的抗性在南瓜植株中也存在一定的广谱性和遗传性^[77]。在已有的研究基础上,De 发表了由 CGMMV 复制酶基因介导产生抗性植株的专利方法^[78];Park 克隆了 CGMMV 外壳蛋白,并通过重组载体获得了抗 CGMMV 的西瓜植株,并且在获得的 140 株第一代转基因植株中有 10 株具有抗性^[79];2012 年 Ali 克隆 CGMMV 移动蛋白后,通过基因重组和农杆菌介导的方法获得抗 CGMMV 的甜瓜植株,进一步由 PCR 和 Southern blot 的方法证明移动蛋白基因可稳定遗传至第三代植株体内^[80]。然而,植物病毒在自然条件下通常都是以复合侵染的形式存在^[81],而基于外源基因产生的抗性植株往往存在抗病谱窄、仅抵抗同种病毒侵染等缺陷。因此,在田间条件下,随着转基因植株抗性压力的不断选择和抗性的丧失,亟须培育多病毒基因片段介导的抗性植株^[82-83]。2013 年 Lin 通过农杆菌介导,将融合了西瓜银斑病毒(*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV) N 基因和黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、西瓜花叶病毒(*Watermelon mosaic virus*, WMV)和 CGMMV 的外壳蛋白基因的重组载体转入西瓜栽培种‘Feeling’,并由 Southern blot 证明单个或多个基因拷贝被成功插入到西瓜基因组中,且在 R₀ 植株中存在对 CGMMV 的抗性^[84]。Liu 利用 iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation)技术在感染 CGMMV 的黄瓜植株体内成功鉴定到 38 个差异表达蛋白,GO (Gene Ontology)和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)分析发现这些蛋白注释有不同的功能,其中 18 个蛋白分别参与 13 个代谢通路中,

这些代谢通路进一步可融合形成 3 个相对独立的网络关系调控图,从而根据其相互调控关系,有目的地筛选合适的内源病程相关基因来培育抗病植株防治 CGMMV 病害^[85]。

4 防治策略展望

结合该病害的当前防治现状,作者对基于小分子 RNA 介导寄主抗病的途径进行了展望,并介绍了下一代测序技术、基因编辑技术在植物病毒病害防治措施中的应用。

4.1 小 RNA 介导调控防治 CGMMV

RNA 沉默是真核生物通过核酸序列特异性的相互作用、在 RNA 水平抑制基因表达、抵抗外来核酸入侵的一种防御机制,这种机制被称之为转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)^[86]。

1928 年 Wingard 记录了感染烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot virus*)的烟草植株呈现坏死斑症状,而其上部新叶在第二次接种后对该病毒侵染呈免疫现象、且无坏死斑产生,从而开始最早的 RNA 沉默(RNA silencing)报道^[87]。近年来,由 siRNA (small interfering RNA)和 miRNA(microRNA)介导调控的 RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)已经成为改善作物生产的重要途径。基于 siRNA 的 RNAi 技术已被广泛应用于作物增产,增强对细菌、真菌、病毒、线虫等有害微生物的抗性,以及改善作物的营养成分组成^[88]。2007 年, Kamachi 发现获得的 7 株转 CGMMV 外壳蛋白拟南芥植株中的 5 株对 CGMMV 产生高抗,植株接种后无系统扩展症状, RNA 杂交表明转基因植株体内含有 CP 的特异干扰 RNA,对 CGMMV 的复制具有较高的抑制率并对 CGMMV 的侵染有较强抗性,其抗性可稳定遗传至 T₂ 代^[89]。但 siRNA 介导的转基因植株易受寄主、环境影响以及存在外源基因与寄主基因组易发生重组等潜在风险。相对于 siRNA 的 RNAi 策略,由于 miRNA 具有更高的特异性和更可观的预见性,以及其在调节植株生长、发育和应答外界压力时的优异表现而日益受到重视^[90]。尤其最近几年,由于作物品种差异以及外界不同因子对寄主造成的压力因素,大量的 miRNA 得到鉴定并挖掘出其调控的靶基因,为进一步研究 miRNA 所调控的,远比自身数量更多的靶基因与生物物种或生物学多样性之间的关联性奠定基础^[91]。2011 年,

Martínez 利用深度测序技术在感染啤酒花类病毒 (*Hop stunt viroid*, HSVd) 的黄瓜 (*Cucumis sativus*) 植株内获得 19 个保守的 miRNAs 和 7 个新的特异性 miRNAs, 并通过 Northern 杂交进一步得到验证, 其所调控的靶基因分别参与寄主蛋白-蛋白/RNA 互作、组织发育、调节次生代谢等生物过程^[92]。Mao 结合高通量测序和降解组测序的方法从黄瓜 (*C. sativus* ‘Jinchun No. 2’) 叶和根组织中鉴定出 64 个 miRNA, 发现部分 miRNA 只在特定组织中表达。其中, 21 个首次在黄瓜中鉴定到的已知 miRNA 调控的靶基因分别参与黄瓜发育、抗氧化、信号转导、转录调控等功能^[93]。Li 通过黄瓜 (*Cucumis sativus* ‘9930’) 和南瓜 (*C. moschata* ‘Jinxin No. 5’) 之间的嫁接, 在其叶和根部组织中鉴定出 112 个已知的和 48 个新的 miRNAs, 并由生物学分析明确嫁接操作可直接导致 miRNA 及其靶基因的表达变化, 反之, 也间接证明 miRNA 可以通过介导靶基因而显著影响嫁接苗的生理过程^[94]。Liu 从感染 CGMMV 的黄瓜植株 (*C. sativus* ‘中农 16’) 体内获得 8 个新的 miRNA, 其调控的多个靶基因分别参与黄瓜的细胞分化、生长发育、次级代谢、生物或非生物应答、光合作用以及作物产量相关的生物过程^[95]。鉴于 miRNA 在植物的抗逆生理和生长发育过程中出众的调控能力, 尤其在基因调控网络关键点所起的作用, 以及所调控靶基因之间的相互关系, 极其有助于在基因转录水平挖掘更多的病程相关基因, 从而使得利用 miRNA 介导的转基因植株或利用其所调控的病程相关基因培育抗病品种的研究具有较大的发展潜力^[90]。

4.2 下一代测序技术和基因编辑技术在防治 CGMMV 中的应用

在实际生产中, 防治病害的前提是准确发现、鉴定该病害, 并通过进一步分析病害与寄主植物的互作关系及其各自基因组的特点, 从而根据其特性去制定相应的防治策略。

CGMMV 作为一种系统侵染的典型种传病害, 缺乏准确、高效的检测手段是其近年来快速传播的重要因素。2009 年, 随着下一代测序技术 (next generation sequencing, NGS) 在病毒、类病毒基因组测序、病害检测、诊断、病害流行病学以及抗性基因挖掘中的普及应用^[96], 基于其高通量测序数据的结果、且不需提供特异性病毒检测试剂的特点, 再结

合 CLC Genomics Workbench (QIAGEN, USA, <http://www.clcbio.com/products/clc-genomics-workbench/#>) 软件在病原物鉴定及其生物信息学中的强大分析能力, 从而使得 NGS 逐渐成为病害诊断的常规方法, 也进一步使得各种侵染或隐藏于传播材料或寄主体内的病毒越来越易于被发现^[97]。目前, 基于 NGS 技术鉴定病害的方法, 已从植物体内成功鉴定出 49 个新的 RNA、DNA 病毒和 4 个类病毒/类病毒 RNAs^[98]。随后, Witek 等^[99] 通过研究野生马铃薯近缘种少花龙葵 (*Solanum americanum*) 携带的抗性基因, 结合 SMRT (单分子实时测序) 和 RenSeq (抗性基因 ENrichment SEQuencing) 的新一代测序技术 SMRT RenSeq 成功分离出对枯萎病有广泛抗性的 Rpi-amr3 基因。这些新测序技术的应用最大可能地快速发现并鉴定植物材料中携带的病毒, 并且极大地缩短了分离抗性基因的时间, 间接地减少了作物因病害造成的损失。最近几年, 相对于 ZEN^[100] (zinc-finger nuclease) 和 TALEN^[101] (transcription activator-like effector nuclease) 基因编辑技术的繁琐费时, 高效稳定的第三代基因编辑技术 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated genes) 逐渐受到研究人员的青睐^[102]。CRISPR 是最初在 *E. coli* 体内被发现, 形成于细菌与病毒的互作过程中、由病毒的部分 DNA 片段嵌入细菌基因组而形成的 DNA (脱氧核糖核酸) 片段区域^[103]。因此, 当病毒再次侵染时, 由于 Cas 蛋白酶对病毒基因组的识别、切割而使得寄主产生免疫应答, 从而达到保护寄主的目的^[104]。目前, 该技术已经被成功地应用于改善植物的生物学性状, 或利用其特性来增加植物抵御病虫害的能力^[105]。例如: Feng 通过利用 CRISPR/Cas 系统定点突变双子叶植物拟南芥的 BRI1、JAZ1、GAI 基因, 结果表明该系统可以准确地造成特定位点 DNA 双链断裂, 且获得效率较高的 T₁ 代纯合突变体^[106]。Ali 证明在本生烟 (*N. benthamiana*) 中表达 CRISPR/Cas9 可有效地推迟或减少番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) 的积累, 从而消除或减轻寄主植物被感染的症状^[107]。不同于 CRISPR/Cas 系统中 RNA 引导的 DNA 剪切, 最近由 Gao 刚发现的 NgAgo-gDNA 基因编辑技术中 DNA 引导的 DNA 剪切, 由于其更加高效精确以及具有更大的灵活性而更加有潜

力地具有广泛的应用前景^[108]。随着基因编辑技术越来越成熟地成功应用于精准农业生产, 侵染双子叶葫芦科作物的 CGMMV 病毒病害将有望得到有效、彻底的控制。

参考文献

- [1] United Nation Food and Agricultural Organization (FAOSTAT). The production of cucumber and gherkins in mainland, China [R/OL]. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>, 2014.
- [2] 中华人民共和国农业部. 黄瓜绿斑驳花叶病毒防控技术规程 [S]. 2014, NY/T 2630-2014.
- [3] Hollings M, Komuro Y, Tochihara H. *Cucumber green mottle mosaic virus* [M]// Description of plant viruses. Kew, UK; CMI/AAB, 1975, 154: 4.
- [4] 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.
- [5] Culver J N, Lindbeck A G C, Dawson W O. Virus-host interactions: induction of chlorotic and necrotic responses in plants by tobamoviruses [J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29: 193-217.
- [6] Sleat D E, Gallie D R, Watts J W, et al. The 5-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and *in vivo* [J]. Nucleic Acids Research, 1992, 15(8): 3257-3273.
- [7] Ainsworth G C. Mosaic disease of the cucumber [J]. Annals of Applied Biology, 1935, 22(1): 55-67.
- [8] Yoshida K, Goto T, Nemoto M, et al. *Squash mosaic virus* isolated from melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1980, 46(3): 349-356.
- [9] Raychaudhuri M, Varma A. Mosaic disease of muskmelon caused by minor variant of *Cucumber green mottle mosaic virus* [J]. Journal of Phytopathology, 1978, 93(2): 120-125.
- [10] 陈红远, 赵文军, 程毅, 等. 辽中地区西瓜花叶病原的分子鉴定 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(4): 306-309.
- [11] Choi G S. Occurrence of two tobamovirus diseases in cucurbits and control measures in Korea [J]. Plant Pathology Journal, 2001, 17(5): 243-248.
- [12] Ali A, Natsuaki T, Okuda S. Identification and molecular characterization of viruses infecting cucurbits in Pakistan [J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152(11): 677-682.
- [13] Rahimian H, Izadpanah K. A new strain of *Cucumber green mottle mosaic virus* from Iran [J]. Iranian Journal of Agricultural Research, 1977, 5(1): 25-34.
- [14] Antignus Y, Pearlsman M, Ben-Yoseph R, et al. Occurrence of a new variant of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Israel [J]. Phytoparasitica, 1990, 18(1): 50-56.
- [15] Al-Shahwan I M, Abdalla O A. A strain of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) from bottlegourd in Saudi Arabia [J]. Journal of Phytopathology, 1992, 134(2): 152-156.
- [16] Ariyaratne I, Weeraratne W A P G, Ranatunge R K R. Identification of a new mosaic virus diseases of snake gourd in Sri Lanka [J]. Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture, 2005, 7: 13-21.
- [17] Kassem A A H, Halim K A, Rifai O E G, et al. The most important of viruses affecting cucurbits in Syria [J]. Arab Journal of Plant Protection, 2005, 23(1): 1-6.
- [18] 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: 572-575.
- [19] Fletcher J T, George A J, Green D E. *Cucumber green mottle mosaic virus*, its effect on yield and its control in the Lea Valley [J]. Plant Pathology, 1969, 18(1): 16-22.
- [20] Linnasalmi A. Virus diseases of cucumber in Finland and characteristics of the causal agents cucumber mosaic and *Cucumber green mottle mosaic viruses* [J]. Annales Agriculturae Fennicae, 1966, 5: 305-323.
- [21] Medvedskaya I G. Virus diseases of glasshouse cucumber [J]. Zashchita Rastenii, 1981, 5: 44-45.
- [22] Budzanivska I G, Rudneva T O, Shevchenko T P, et al. Investigation of Ukrainian isolates of *Cucumber green mottle mosaic virus* [J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2007, 40(5): 376-380.
- [23] Rydén K. Grönmosaik hos gurkar [J]. Växtskyddsnotiser, 1965, 29: 62-63.
- [24] Kristensen H R. Virussygdomme hos vaeksthuskultur i Norden [J]. Nordisk Jordbruksforskning, 1977, 59(3): 482-486.
- [25] Hentschel G. Virus disease on greenhouse cucumber results from 1974 and the outlook for 1975 [J]. Gemuse, 1975, 11(4): 108-111.
- [26] Pop I, Jilaveanu A. Identification of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Romania [J]. Analele Institutului de Cercetari Pentru Protectia Plantelor (Romania), 1985, 18: 43-47.
- [27] Aveglis A D, Vovlas C. Occurrence of *Cucumber green mottle mosaic virus* in the island of Crete (Greece) [J]. Phytopathologia Mediterranea, 1986, 25(13): 166-168.
- [28] Celix A, Luis-Arteaga M, Rodriguez-Cerezo E. First report of *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus* infecting greenhouse-grown cucumber in Spain [J]. Plant Disease, 1996, 80: 1303.
- [29] Macias W. Methods of disinfecting cucumber seeds that originate from plants infected by *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus* (CGMMV) [J]. Vegetable Crops Research Bulletin, 2000, 53: 75-82.
- [30] Choudhury M M, Lin M T. Occurrence of virus disease of melon and squash in the Sao Francisco region [M]. EMBRAPA Pesquisa em Andamento; CABI's Life Sciences Databases,

- 1982; 2.
- [31] Baker C. *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) found in the United States (California) in melon [R]. Pest Alert, 2013.
- [32] Lin K S, Li R, Zhang W. First report of *Cucumber green mottle mosaic virus* infecting greenhouse cucumber in Canada [J]. Plant Disease, 2014, 98(5): 701.
- [33] Tesoriero L A, Chambers G, Srivastava M, et al. First report of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Australia [J]. Australian Plant Disease Notes, 2016, 11: 1.
- [34] 李立梅, 吴元华, 赵秀香, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒对西瓜产量、品质及种子带毒的影响[J]. 植物保护, 2010, 36(6): 82-86.
- [35] 汤少云, 刘万里, 张凯, 等. 武汉地区黄瓜绿斑驳花叶病毒的监测及防控[J]. 长江蔬菜, 2011(3): 41-42.
- [36] 林燚, 杨瑜斌, 王驰, 等. 温台地区西瓜发生黄瓜绿斑驳花叶病毒调查初报[J]. 浙江农业科学, 2012(1): 83-85.
- [37] 刘颖, 彭斌, 杨晓红, 等. 济南地区倒瓢西瓜 CGMMV 的检测[J]. 中国蔬菜, 2012(10): 75-79.
- [38] 胡亚萍, 董萍, 赵旭浩, 等. 上海郊区黄瓜绿斑驳花叶病毒的鉴定和防治对策[J]. 上海农业学报, 2013, 29(1): 55-58.
- [39] 褚姝频, 龚伟荣, 胡婕, 等. 江苏地区黄瓜绿斑驳花叶病毒病的发生概况与防控技术[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 183-184.
- [40] 黄超, 苗广飞. 黄瓜绿斑驳花叶病毒病的发生及危害防控措施[J]. 安徽农学通报, 2013(8): 76-77.
- [41] 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, 1987, 29(3): 233-244.
- [42] 秦碧霞, 蔡建和, 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.
- [43] 张永江. 黄瓜绿斑驳花叶病毒研究进展[J]. 河南农业科学, 2006(8): 9-11.
- [44] 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.
- [45] 席亚冬, 向运佳, 彭化贤, 等. 四川省蔬菜病虫害发生特点及防控对策[J]. 中国蔬菜, 2014(6): 78-81.
- [46] 吴鑫, 丁元明, 何月秋, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒的分子检测及云南分离物的序列分析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2010(3): 75-80.
- [47] 河南省植物病理学会. 河南省植物病害研究进展-河南省植物病理学与现代农业学术讨论会论文集[C]. 郑州: [出版者不详], 2011.
- [48] 张卫东, 权永兵, 廖力, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒广东分离物的分子鉴定[J]. 广东农业科学, 2011, 38(20): 73-76.
- [49] 赵慧茹. 西瓜上黄瓜绿斑驳花叶病毒检测及分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [50] 杜江, 成媛媛, 牛二波, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒山西西瓜分离物外壳蛋白基因序列分析[J]. 植物保护, 2015, 41(2): 142-145.
- [51] 王锋, 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.
- [52] 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.
- [53] 张珣. 六种植物病毒 Real Time PCR 定量方法的建立及其应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [54] Simón-Buela L, García-Afrenal F. Virus particles of *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus* move systemically in the phloem of infected cucumber plants [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 1999, 12(2): 112-118.
- [55] 彭友良, 朱有勇. 中国植物病理学会 2009 年学术年会论文集 [C]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009.
- [56] 李俊香, 古勤生. 黄瓜绿斑驳花叶病毒传播方式的研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2015(1): 13-18.
- [57] Vani S, Varma A. Properties of *Cucumber green mottle mosaic virus* isolated from water of river Yamuna [J]. Indian Phytopathology, 1993, 46: 118-122.
- [58] 阚春月. 重要蔬菜种传检疫性病害监测技术研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- [59] 罗梅, 王琳, 宾淑英, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒检测技术的研究进展 [J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 392-396.
- [60] Kurisu M, Ohno T, Okada Y, et al. Biochemical characterization of *Cucumber green mottle mosaic virus* ribonucleic acid [J]. Virology, 1976, 70(1): 214-216.
- [61] Kim D H, Lee J M. Seed treatment for *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) in gourd (*Lagenaria siceraria*) seeds and its detection [J]. Journal of Korea Society for Horticultural Science, 2000, 41: 1-6.
- [62] Kim S M, Nam S H, Lee J M, et al. Destruction of *Cucumber green mottle mosaic virus* by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR [J]. Molecules and Cells, 2003, 16(3): 338-342.
- [63] Reingold V, Lachman O, Blaosov E, et al. Seed disinfection treatments do not sufficiently eliminate the infectivity of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) on cucurbit seeds [J]. Plant Pathology, 2015, 64(2): 245-255.
- [64] Verma H N, Khan M M, Abid A. Management of plant virus diseases by *Pseuderanthemum* bicolor leaf extract [J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 1984, 91(3): 266-272.
- [65] Shibuya N, Minami E. Oligosaccharide signaling for defence responses in plant [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2001, 59: 223-233.
- [66] Joubert J M, Yvin J C, Barchietto T, et al. A β -1, 3 glucan, specific to a marine alga, stimulates plant defence reactions and induces broad range resistance against pathogens [M]. Farnham, UK: British Crop Protection Council, 1998: 441-448.
- [67] Klarzynski O, Plesse B, Joubert J M, et al. Linear β -1, 3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco [J]. Plant Physiology, 2000, 124(3): 1027-1038.
- [68] Ménard R, Alban S, de Ruffray P, et al. β -1, 3 glucan sulfate, but not β -1, 3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathways in tobacco and *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2004, 16: 3020-3032.

- [69] Tewari J P, Kalpana S, Pragati S. Inhibition of *Cucumber green mottle mosaic virus* by extract of some ferns [J]. *Journal of Living World*, 2001, 8(1): 28 - 32.
- [70] Ali M E, Kobayashi K, Yamaoka N, et al. Graft transmission of RNA silencing to non-transgenic scions for conferring virus resistance in tobacco [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e63257.
- [71] Ali M E, Waliullah S, Nishiguchi M. Molecular analysis of an attenuated strain of *Cucumber green mottle mosaic virus* using *in vitro* infectious cDNA clone: pathogenicity and suppression of RNA silencing [J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 25(1): 79 - 86.
- [72] King S R, Davis A R, Liu Wenge, et al. Grafting for disease resistance [J]. *HortScience*, 2008, 43(6): 1673 - 1676.
- [73] EI-Eslamboly A A S A, Deabas A A A. Grafting cucumber onto some rootstocks for controlling root-knot nematodes [J]. *Minufiya Journal Agricultural Research*, 2014, 39(3): 1109 - 1129.
- [74] Stuiver M H, Custers J H H V. Engineering disease resistance in plants [J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 865 - 868.
- [75] Rajamony L, More T A, Seshadri V S, et al. Resistance to *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) in muskmelon [R]//Cucurbit Genetics Cooperative. Cucurbit Genetics Cooperative Report, 1987(10): 58 - 59.
- [76] Abel P P, Nelson R S, De B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene [J]. *Science*, 1986, 232(4751): 738 - 743.
- [77] Provvidenti R, Tricoli D M. Inheritance of resistance to *Squash mosaic virus* in a squash transformed with the coat protein gene of pathotype 1 [J]. *HortScience*, 2002, 37(2): 575 - 577.
- [78] De B M T J, Fierens-Onstenk B G J. Method for generating CGMMV resistant plants, genetic constructs, and obtained CGMMV-resistant plants [P]. Europe: WO 2001009300 A2, 2000 - 07 - 27.
- [79] Park S M, Lee J S, Jegal S, et al. Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*) infection [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 24(6): 350 - 356.
- [80] Ali M E, Tabei Y, Kobayashi K, et al. Molecular analysis of transgenic melon plants showing virus resistance conferred by direct repeat of movement gene of *Cucumber green mottle mosaic virus* [J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(8): 1371 - 1377.
- [81] Syller J. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(2): 204 - 216.
- [82] Prins M, de Haan P, Luyten R, et al. Broad resistance to topoviruses in transgenic tobacco plants expressing three topoviral gene sequences [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1995, 8(1): 85 - 91.
- [83] Jan F J, Fagoaga C, Pang Shengzhi, et al. A single chimeric transgene derived in transgenic plants through homology-dependent gene silencing [J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 2103 - 2109.
- [84] Lin Chingyi, Ku Hsinmei, Chiang Yihua, et al. Development of transgenic watermelon resistant to *Cucumber mosaic virus* and *Watermelon mosaic virus* by using a single chimeric transgene construct [J]. *Transgenic Research*, 2012, 21(5): 983 - 993.
- [85] Liu Huawei, Liang Chaoqiong, Liu Pengfei, et al. Quantitative proteomics identifies 38 proteins that are differentially expressed in cucumber in response to *Cucumber green mottle mosaic virus* infection [J]. *Virology Journal*, 2015, 12(1): 216.
- [86] Fire A. RNA-triggered gene silencing [J]. *Trends in Genetics*, 1999, 15(9): 358 - 363.
- [87] Wingard S A. Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants [J]. *Journal of Agricultural Research*, 1928, 37: 127 - 153.
- [88] Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M, et al. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 208.
- [89] Kamachi S, Mochizuki A, Nishiguchi M, et al. Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants resistant to *Cucumber green mottle mosaic virus* based on RNA silencing [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(8): 1283 - 1288.
- [90] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants [J]. *Annual Review Plant Biology*, 2006, 57: 19 - 53.
- [91] 徐云刚. miRNA 和基因功能网络构建与分析方法 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.
- [92] Martínez G, Forment J, Liave C, et al. High-throughput sequencing, characterization and detection of new and conserved cucumber miRNAs [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e19523.
- [93] Mao Weihua, Li Zeyun, Xia Xiaojian, et al. A combined approach of high-throughput sequencing and degradome analysis reveals tissue specific expression of microRNAs and their targets in cucumber [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e33040.
- [94] Li Chaohan, Li Yansu, Bai Longqiang, et al. Grafting-responsive miRNAs in cucumber and pumpkin seedlings identified by high-throughput sequencing at whole genome level [J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, 151(4): 406 - 422.
- [95] Liu Huawei, Luo Laixin, Liang Chaoqiong, et al. High-throughput sequencing identifies novel and conserved cucumber (*Cucumis sativus* L.) microRNAs in response to *Cucumber green mottle mosaic virus* infection [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(6): e0129002.
- [96] Barba M, Czosnek H, Hadidi A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology [J]. *Viruses*, 2014, 6(1): 106 - 136.
- [97] Boonham M, Kreuze J, Winter S, et al. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing [J]. *Virus Research*, 2014, 186: 20 - 31.
- [98] Wu Qingfa, Ding Shouwei, Zhang Yongjiang, et al. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2015, 53: 425 - 444.

- hibiting practical field resistance to a demethylation inhibitor fungicide [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(18): 6674 - 6682.
- [15] Bolton M D, Birla K, Rivera-Varas V, et al. Characterization of CbCyp51 from field isolates of *Cercospora beticola* [J]. *Phytopathology*, 2012, 102(3): 298 - 305.
- [16] Johnson R C, Cantonwine E G. Post-infection activities of fungicides against *Cercospora arachidicola* of peanut (*Arachis hypogaea*) [J]. *Pest Management Science*, 2014, 70(8): 1202 - 1206.
- [17] Chen Fengping, Lin Dong, Wang Jingyuan, et al. Heterologous expression of the *Monilinia fructicola* CYP51 (MfCYP51) gene in *Pichia pastoris* confirms the mode of action of the novel fungicide, SYP-Z048 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 457.
- [18] 范昆, 鲁宁琳, 李晓军, 等. 抗戊唑醇苹果轮纹病菌的紫外诱导及其生物学特性[J]. *农药学学报*, 2012, 14(4): 383 - 390.
- [19] Southerton S G, Deverall B J. Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf rust fungus [J]. *Plant Pathology*, 1990, 39(2): 223 - 230.
- [20] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164 - 165, 213 - 214.
- [21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248 - 254.
- [22] 夏晓明. 禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis*)对戊唑醇的抗性机制研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.
- [23] 徐晓梅, 杨曙光. 苯丙氨酸解氨酶研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(31): 15115 - 15117.
- [24] 陈彦, 刘长远, 赵奎华, 等. 葡萄白腐病菌对多菌灵不同抗性菌株生理生化特性研究[J]. *辽宁农业科学*, 2007(2): 63 - 64.
- [25] 姜莉莉, 王红艳, 夏晓明, 等. 草莓枯萎病菌抗戊唑醇突变体 ZY-W 的生理生化特性[J]. *农药学学报*, 2012, 14(1): 42 - 50.
- [26] Song Yuanyuan, Chen Dongmei, Lu Kai, et al. Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 786.
- [27] 张晓晓, 周会玲, 田蓉, 等. 短波紫外线照射对苹果采后灰霉病抗性诱导作用[J]. *食品科学*, 2015, 36(2): 242 - 249.
- [28] Papapostolou I, Georgiou C D. Superoxide radical is involved in the sclerotial differentiation of filamentous phytopathogenic fungi: identification of a fungal xanthine oxidase [J]. *Fungal Biology*, 2010, 114(5/6): 387 - 395.
- [29] Kawasaki L, Aguirre J. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(4): 1434 - 1440.
- [30] 顾雯雯, 胡亚婷, 韩英, 等. 植物过氧化物酶同工酶的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(34): 12011 - 12013.
- [31] Aremu D A, Ezomo O F, Meshitsuka S. Gene expression in primary cultured astrocytes affected by aluminum: alteration of chaperons involved in protein folding [J]. *Environment Health and Preventive Medicine*, 2011, 16(1): 16 - 24.
- [32] Vassilev A, Lidon F. Cd-induced membrane damages and changes in soluble protein and free amino acid contents in young barley plants [J]. *Emirates Journal of Food & Agriculture*, 2011, 23(2): 130 - 136.
- [33] 乔传令, 王靖, 邢建民. 不同地区小菜蛾种群的抗药性及酯酶同工酶的研究[J]. *农药学学报*, 2000, 2(4): 33 - 39.
- (责任编辑: 田 喆)
-
- (上接 37 页)
- [99] Witek K, Jupe F, Witek A I, et al. Accelerated cloning of potato late blight-resistance gene using RenSeq and SMART sequencing [J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2016, doi:10.1038/nbt.3540.
- [100] Carroll D. Genome engineering with Zinc-Finger nucleases [J]. *Genetics*, 2011, 188(4): 4773 - 4782.
- [101] Doyle E L, Booher N J, Standage D S, et al. TAL effector-nucleotide targeter (TALE-NT) 2.0: Tools for TAL effector design and target prediction [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40: 117 - 122.
- [102] Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157: 1262 - 1278.
- [103] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkine phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169: 5429 - 5433.
- [104] Sander J D, Joung J K. CRISPR-Cas system for editing, regulating and targeting genomes [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32: 347 - 355.
- [105] Voytas D F, Gao C X. Precision genome engineering and agriculture: Opportunities and regulatory challenges [J]. *PLoS Biology*, 2014, 12(6): e1001877.
- [106] Feng Zhengyan, Zhang Botao, Ding Wona, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system [J]. *Cell Research*, 2013, 23: 1229 - 1232.
- [107] Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, et al. CRISPR-Cas9-mediated viral interference in plants [J]. *Genome Biology*, 2015, 16: 238.
- [108] Gao Feng, Shen Xiao, Jiang Feng, et al. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, doi:10.1038/nbt.3547.
- (责任编辑: 田 喆)