黑龙江地区番茄斑萎病毒的鉴定及其部分生物学特征分析

王凯娜， 战斌慧*， 周雪平*

（中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要 近年来，番茄斑萎病毒 Tomato spotted wilt tospovirus（TSWV）在我国多个地区发生严重危害。本研究采用小 RNA 深度测序和 RT-PCR 相结合的方法对采自黑龙江的番茄病毒病样品中的病毒进行了鉴定。提取番茄样品的 RNA 并构建小 RNA 文库进行测序，数据分析发现比对至 TSWV 基因组的 reads 数占比对到病毒核酸总 reads 数的 92.64%，表明侵染此番茄样品的病原物可能是 TSWV。利用 RT-PCR 方法进一步确定侵染此番茄样品的病毒为 TSWV，将其命名为 TSWV-HLJ1。对 TSWV-HLJ1 的核苷酸序列进行分析并构建系统进化树，结果表明 TSWV-HLJ1 与 TSWV 云南甜椒分离物（TSWV-YNgp）的亲缘关系最近。介体传毒试验表明，西花蓟马可将 TSWV-HLJ1 传播感染健康寄主植物。摩擦接种试验表明，TSWV 黑龙江分离物能够侵染本氏烟、辣椒和番茄。这是我国首次报道在黑龙江地区发现 TSWV 的危害。

关键词 番茄斑萎病毒； 小 RNA 深度测序； RT-PCR 检测

中图分类号： S 436.412.1 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2018117

Detection and partial biological characterization of Tomato spotted wilt tospovirus in Heilongjiang Province

WANG Kaina， ZHAN Binhui， ZHOU Xueping

（*State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests*，*Institute of Plant Protection*，*Chinese Academy of Agricultural Sciences*，*Beijing* 100193，*China*）

Abstract Recently，Tomato spotted wilt tospovirus（TSWV）has been reported in several areas of China causing serious damage. To identify the viruses in tomato samples exhibiting virus-like symptoms from Heilongjiang Province，small RNA deep sequencing and RT-PCR were adopted. Total RNA of tomato samples was extracted and the siRNA library was constructed and sequenced. Data analysis showed that the siRNA reads aligned to TSWV accounted for 92.64 % of the total siRNA reads to the virus sequences deposited in GenBank，indicating that the pathogen infecting the tomato samples might be TSWV. The RT-PCR further confirmed the presence of TSWV，which was named TSWV Heilongjiang isolate（TSWV-HLJ1）. The phylogenetic tree based on the whole nucleotide sequence of TSWV isolates indicated that the TSWV-HLJ1 was more closely related to TSWV Yunnan isolate（TSWV-YNgp）. Vector transmission experiment showed that *Frankliniella occidentalis* could acquire TSWV-HLJ1 and transmit it to the healthy plants successfully. Mechanical inoculation experiment showed that TSWV-HLJ1 could infect *Nicotiana benthamiana*，*Capsicum annuum* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. This was the first report of TSWV infecting tomato in Heilongjiang Province.

Key words *Tomato spotted wilt tospovirus*； small RNA deep sequencing； RT-PCR

番茄斑萎病毒 Tomato spotted wilt tospovirus（TSWV）是番茄斑萎病毒科 *Tospoviridae* 番茄斑萎病毒属 *Orthotospovirus* 的代表种[1]，最早于 1919 年在澳大利亚被发现[2]，现已在多个国家和地区发生危害。据报道，TSWV 能侵染 84 科 1 090 种植物[3]，如番茄、辣椒、茄子、马铃薯、花生、莴苣等，其引起的典型症状为植株矮小，顶芽下垂，幼嫩叶片扭曲，叶片黄化并出现坏死斑，直至整株枯死[4]。2011

收稿日期： 2018－03－18 **修订日期：** 2018－05－02
基金项目： 国家自然科学基金青年基金（31701768）
* 通信作者 E-mail：binhuizhan@126.com；zzhou@zju.edu.cn

年 TSWV 被列为世界上危害最大的十大植物病毒之一[5]。

TSWV 的基因组由 S(2.9 kb)、M(4.8 kb)和 L(8.9 kb)三条负义单链 RNA 组成[6]，S RNA 编码非结构蛋白 NSs，其互补链编码核衣壳蛋白 N[7]；M RNA 编码非结构蛋白 NSm，其互补链编码两个重要的病毒膜糖蛋白 G_N 和 G_C；L RNA 的互补链编码依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 RdRp[8]。蓟马是 TSWV 的传播介体，传播 TSWV 的蓟马种类主要有西花蓟马 *Frankliniella occidentalis*、烟蓟马 *Thrips tabaci* 和棕榈蓟马 *Thrips palmi* 等[9]，其中，西花蓟马传毒效率最高[10]。

RNA 沉默(RNA silencing)是植物抵抗病毒侵染的一种适应性防御机制[11]，植物被病毒侵染后会产生大量病毒衍生的小 RNA，这些小 RNA 能特异性降解与其同源的病毒的 RNA。利用小 RNA 深度测序技术能获得这些小 RNA 序列，通过组装这些序列可以获得植物中病毒全基因组的序列信息，2009 年，Kreuze 等通过此种方法鉴定和发现了甘薯中的新病毒[12]。目前，小 RNA 深度测序技术已广泛应用于植物病毒的检测和鉴定。如宋静静等利用小 RNA 深度测序并结合血清学 ELISA 技术对广西冬种马铃薯病毒进行了鉴定[13]；仇心钰等利用小 RNA 深度测序调查了我国北方地区甜菜病毒病[14]；苏秀等利用小 RNA 深度测序和组装技术鉴定紫藤花叶病病原[15]；王芳等利用小 RNA 高通量测序技术检测玉米中的病毒[16]。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2017 年 7 月于黑龙江省农业科学院试验田中采集到两株疑似感病的番茄植株，番茄叶片表现褪绿、斑驳、黄化、坏死等症状(图 1)，番茄样品采集后 4℃运输，拍照后，保存于－80℃冰箱。

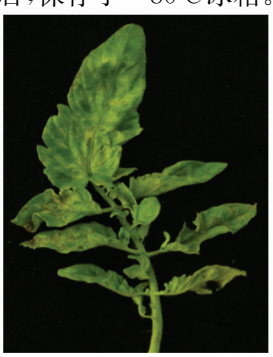


图 1 疑似感病的番茄样品症状

Fig. 1 Symptoms of an infected tomato sample

1.2 小 RNA 深度测序及生物信息分析

将番茄样品送到北京诺禾致源生物公司进行小 RNA 深度测序。试验流程可分为四步：第一，样品总 RNA 的提取和质量检测。第二，cDNA 文库构建，将样品中小 RNA 的 3′端和 5′端加接头，经 RT-PCR、cDNA 合成、PCR 富集，回收得到 cDNA 文库；第三，文库检测，使用生物信息软件 Qubit 2.0 对文库进行初步定量，使用 Agilent 2100 检测文库的插入片段大小，利用 Q-PCR 准确定量；第四，HiSeq/MiSeq 测序及分析，用 Velvet 软件对文库中大小为 18～26 nt 的小 RNA 进行拼接，拼接结果在 NCBI 进行 BLAST 比对分析。

1.3 番茄样品总 RNA 提取

采用 TRIzol 法提取番茄样品总 RNA。将 0.1 g 番茄样品放入研钵中，加液氮研磨至粉状，装入 2 mL离心管，加 1 mL TRIzol 充分振荡混匀，室温静置 5 min；取上清，加 300 μL 三氯甲烷，涡旋振荡 15 s，室温静置 3 min，4℃，12 000 r/min 离心 15 min；取上清于 1.5 mL 离心管，加 500 μL 异丙醇，充分混匀，4℃，12 000 r/min 离心 15 min，弃上清；加 1 mL 75%乙醇清洗沉淀两次，4℃，7 500 r/min 离心 5 min，弃上清后室温干燥，加 30 μL RNase-Free water 溶解 RNA，置于－80℃保存。

1.4 番茄样品全基因组的 RT-PCR 扩增、克隆测序

以番茄样品的总 RNA 为模板，根据小 RNA 测序拼接得到的病毒核苷酸序列设计 TSWV 引物，对番茄样品全基因组序列进行 RT-PCR 扩增(TaKaRa 反转录试剂盒)。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。将条带回收连接到 *pEASY*-blunt 克隆载体(TransGen 公司)，转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5α，涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板，37℃倒置过夜培养，挑取若干单克隆，以 M13F(5′-TGTAAAACGACGGCCAGT-3′)和 M13R(5′-CAGGAAACAGCTATGAC-3′)为引物进行菌落 PCR 检测，阳性单克隆送到擎科生物公司测序。

1.5 番茄样品 TSWV 全核苷酸序列的生物信息分析

利用 TSWV 全基因组核苷酸序列与其他 NCBI 已公布的 TSWV 分离物的核苷酸序列进行比对，并从中选取 TSWV 的代表性同源序列，利用 MEGA 7.0 软件以邻接法(neighbor-joining)构建 TSWV 全基因组核苷酸序列系统进化树，用 Bootstrap 检测各分支的置信度(重复 1 000 次)，并进一步分析。

1.6 介体传毒

将感染 TSWV 的番茄和辣椒植株分别置于养

虫瓶中,健康西花蓟马由中国农业科学院植物保护研究所蔬菜害虫组高玉林老师馈赠,挑取健康的西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 1 龄若虫约 200 头放入上述养虫瓶中,饲养 48 h,再用健康豆角饲养至成虫[17]。分别将 6 株健康的番茄和辣椒植株与 30 头上述西花蓟马成虫一同置于网笼中。两周后观察番茄和辣椒植株的症状,并单株提取植物样品 RNA,利用 TSWV 的特异性引物 TSWV-M-5F(5′-ACAAGAGATTGTGTTCACCATC-3′)与 TSWV-M-3R(5′-ATTCTTGATCTTCAGAGCCACA-3′)对番茄和辣椒样品进行 RT-PCR 检测。同时,利用 TSWV 的单克隆抗体对网笼中的西花蓟马进行 Dot-ELISA 检测,确定西花蓟马是否带毒。

1.7　汁液摩擦接种

将西花蓟马传毒成功的番茄和辣椒叶片用液氮冷冻研磨成粉末,加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(60 mL 1 mol/L Na_2HPO_4、40 mL 1 mol/L NaH_2PO_4)混匀,4℃,8 000 r/min 离心 3 min,取上清于 1.5 mL 离心管中,置于冰上。摩擦接种 3～5 片真叶的本氏烟 *Nicotiana benthamiana*、番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill. 和辣椒 *Capsicum annuum* L.,摩擦接种磷酸缓冲液的一组为阴性对照,试验植株在温度为 25℃,光照 16 h,黑暗 8 h 条件的温室中培养。

2　结果与分析

2.1　番茄样品小 RNA 高通量测序结果及数据分析

感病番茄样品经小 RNA 深度测序共得到 14 800 277条 reads,经质量控制后获得 14 419 893 条 clean reads,clean reads 占总 reads 数量的 97.43%,其中 unique reads 3 258 792 条,与 GenBank Virus RefSeq 核酸数据库比对,比对上 TSWV 三条链的 reads 数占比对到病毒数据库的总 reads 数的 92.64%。

通过分析不同长度的小 RNA 序列的百分比(图 2),结果显示番茄样品的小 RNA 的长度主要集中在 20～24 nt,其中 21 nt 和 22 nt 大小的小 RNA 为主要部分,分别占小 RNA 总数的 30.34%和 25.43%。

2.2　番茄样品全基因组序列的扩增及序列相似性分析

以感病番茄样品的 cDNA 为模板,根据小 RNA 测序拼接得到的序列设计 TSWV 引物,对番茄样品全基因组进行 RT-PCR 扩增,将扩增到的特异条带割胶回收,进行克隆测序。测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对,利用软件 DNAMAN 8 拼接,获得 TSWV 番茄分离物的完整基因组序列。序列分析表明,TSWV-HLJ1 中 RNA L、M、S 三条链的大小分别为 8 913 bp、4 772 bp 和 2 970 bp。TSWV-HLJ1 RNA L 编码病毒的 RdRp,分子量为 331.5 kD;TSWV-HLJ1 RNA M 编码病毒的非结构蛋白 NSm,分子量为 33.6 kD,其互补链编码两个糖蛋白 G_N 和 G_C,分子量分别为 78.0 kD 和 58.0 kD;TSWV-HLJ1 RNA S 编码非结构蛋白 NSs,分子量为 52.4 kD,其互补链编码病毒的外壳蛋白 N,分子量为 28.8 kD。

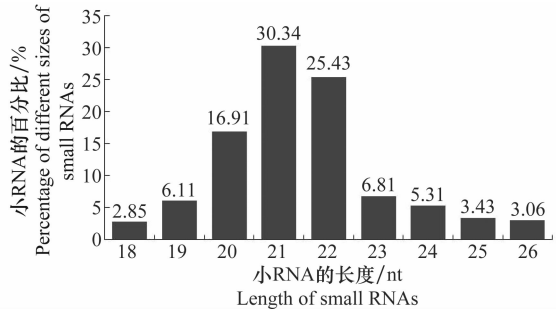


图 2　小 RNA 序列的长度分布

Fig. 2　Size distribution of small RNA sequences

分别就 TSWV-HLJ1 中的 RNA L、M 和 S 核苷酸序列进行序列相似性分析,NCBI BLAST 比对结果显示,TSWV-HLJ1 RNA L(GenBank 登录号 MG878873)、RNA M(GenBank 登录号 MG878874)和 RNA S 分离物(GenBank 登录号 MG878875)分别与 TSWV 云南甜椒分离物(TSWV-YNgp)的 RNA L(GenBank 登录号 KM657122)、RNA M(GenBank 登录号 KM657119)和 RNA S(GenBank 登录号 KM657116)的核苷酸相似性最高,为 99.63%、99.52%和 99.73%。

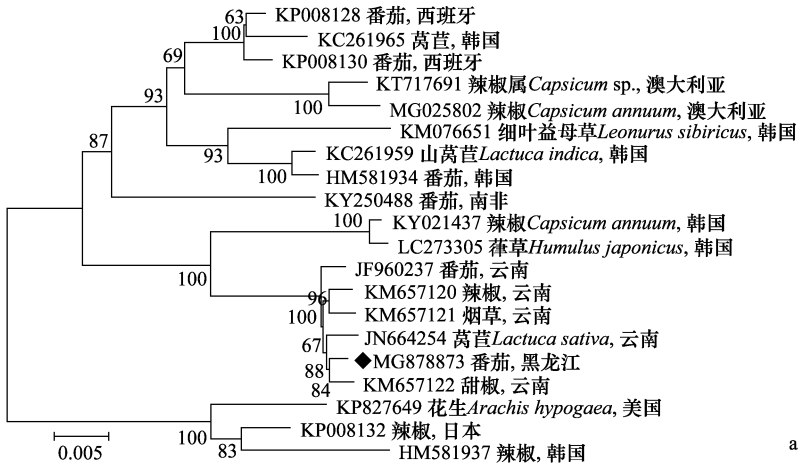
2.3　番茄样品全基因组序列的系统进化树分析

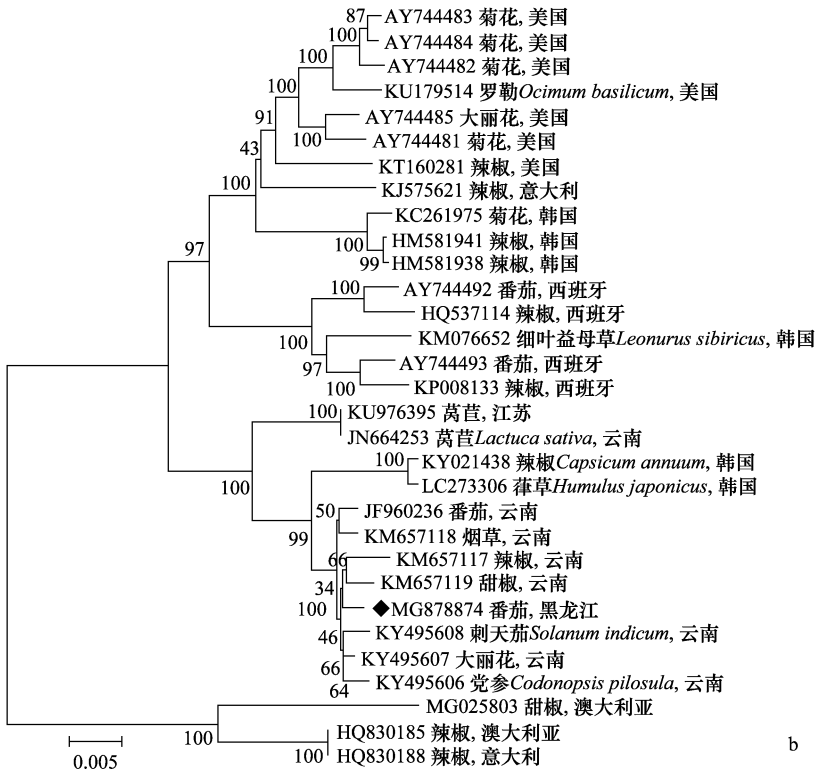
对 TSWV-HLJ1 全基因组核苷酸序列与世界各地多种 TSWV 分离物的核苷酸序列进行比对,利用 MEGA 7.0 软件以邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树(图 3)。结果表明,TSWV-HLJ1 RNA L 与我国云南的 TSWV-YNgp(KM657122)亲缘关系最近,与 TSWV 云南番茄分离物(JF960237)、辣椒分离物(KM657120)、莴苣分离物(JN664254)和烟草分离物(KM657121)在进化树中归于一支,亲缘关系较近(图 3a)。此外,TSWV-HLJ1 RNA L 与韩国报道的 TSWV 甜椒分离物(KY021437)和葎草分离物(LC273305)系统进化关系也较近(图 3a)。TSWV-HLJ1 RNA M 与多种云南地区报道的分离物,如甜椒分离物(KM657119)、辣椒分离物(KM657117)、番茄分离物(JF960236)、烟草分离物(KM657118)等在进化树中归于一支,亲缘关系较近(图 3b)。另

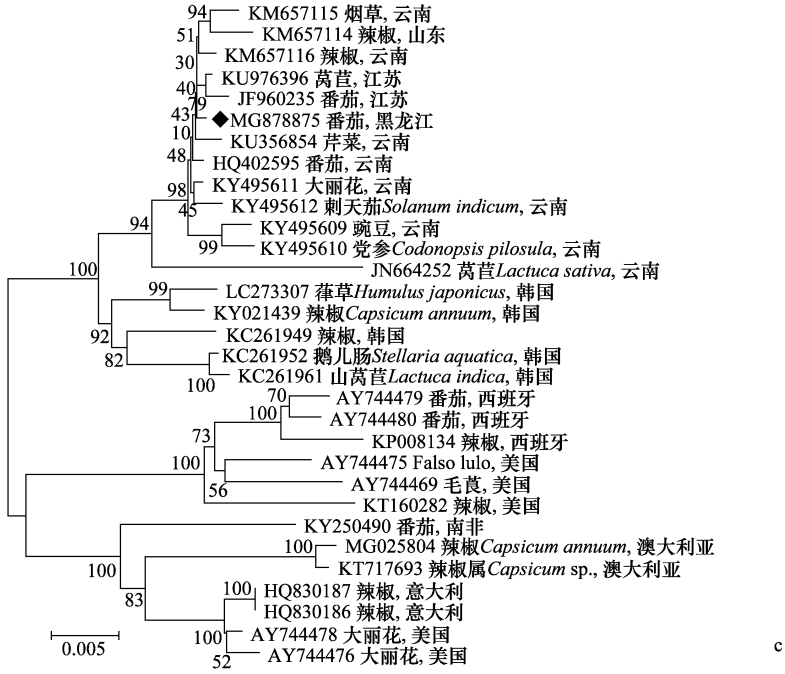
外，TSWV-HLJ1 RNA M 还与韩国报道的甜椒分离物(KY021438)和葎草分离物(LC273306)亲缘关系也较近(图 3b)。TSWV-HLJ1 RNA S 与 TSWV-YNgp(KM657116)亲缘关系最近，与云南地区的番茄分离物(JF960235)和芹菜分离物(KU356854)等、江苏地区的番茄分离物(JF960235)和莴笋分离物(KU976396)及山东的烟草分离物(KM657115)在进化树中归于一支，亲缘关系较近(图 3c)。综上，TSWV-HLJ1 与我国云南的分离物具有最近的亲缘关系。

2.4 西花蓟马对 TSWV-HLJ1 的传播

为了探究西花蓟马能否传播 TSWV-HLJ1，将 6 株健康的番茄和辣椒植株分别与 30 头饲毒的西花蓟马成虫一同置于网笼中，以健康蓟马取食的植株作为对照，2 周后发现，饲毒蓟马取食的番茄和辣椒植株呈现黄化、坏死等明显的病毒侵染症状(图 4a)。单株提取番茄和辣椒样品的 RNA，利用 TSWV-HLJ1 的特异性引物 TSWV-M-5F/TSWV-M-3R 对番茄和辣椒植株进行 RT-PCR 检测，结果显示 12 株植株均扩增到约为 750 bp 的目的条带，而阴性对照中未检测得到任何条带(图 4b)。网笼中西花蓟马的 Dot-ELISA 检测结果表明，西花蓟马体内存在 TSWV(图 4c)。以上结果证明，西花蓟马能成功获取 TSWV-HLJ1 并能传播至健康植株。



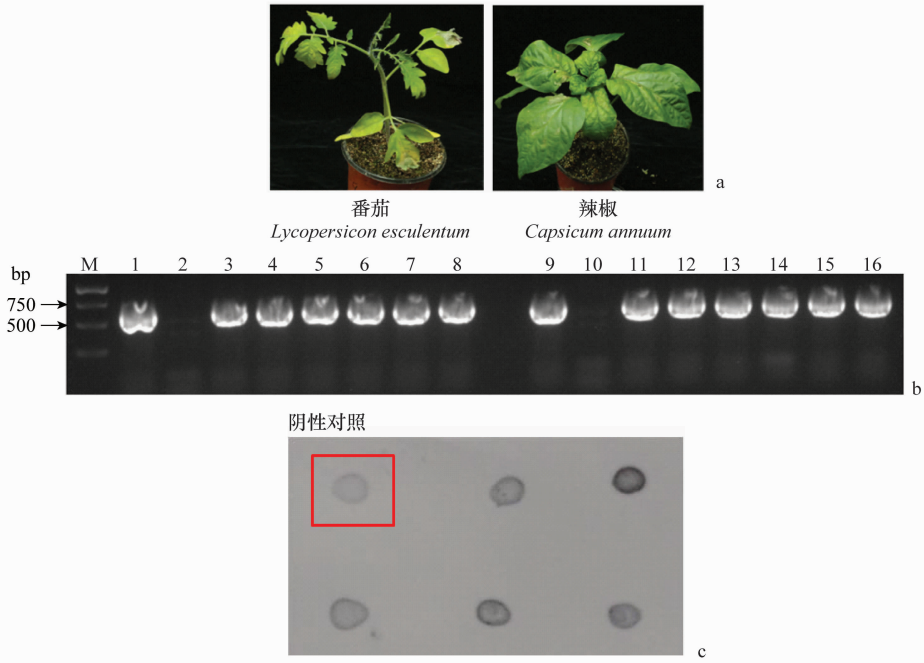




a, b和c分别为TSWV RNA L、RNA M、RNA S全核苷酸序列的系统进化树
a, b and c are the phylogenetic trees based on TSWV RNA L, RNA M and RNA S nucleotide sequences, respectively

图 3　不同 TSWV 分离物全基因组核苷酸序列的系统进化树

Fig. 3　Phylogenetic trees based on full-length genome nucleotide sequences of different isolates of TSWV



a: 饲毒的西花蓟马取食的番茄和辣椒样品的症状; b: 饲毒的西花蓟马取食的番茄和辣椒样品的RT-PCR检测。M: DNA Marker; 1: 番茄阳性对照; 2: 番茄阴性对照; 3~8: 番茄样品; 9: 辣椒阳性对照; 10: 辣椒阴性对照; 11~16: 辣椒样品; c: dot-ELISA检测西花蓟马带有TSWV
a: Symptoms of tomato and pepper samples infected by *F. occidentalis* with TSWV-HLJ1; b: Detection of tomato and pepper samples infected by *F. occidentalis* with TSWV-HLJ1 by RT-PCR. M: DNA Marker; 1: Tomato positive control; 2: Tomato negative control; 3-8: Tomato samples; 9: Pepper positive control; 10: Pepper negative control; 11-16: Pepper samples; c: Detection of TSWV in *F. occidentalis* by dot-ELISA

图 4　西花蓟马对 TSWV-HLJ1 的传播试验

Fig. 4　Transmission experiment of TSWV-HLJ1 by *Frankliniella occidentalis*

2.5　TSWV-HLJ1 的生物学接种试验

取蓟马传毒发病的番茄样品的汁液摩擦接种本氏烟、番茄和辣椒。结果表明:本氏烟系统叶片在接种后第 9 天出现明显的卷曲,第 13 天叶片呈黄化、

坏死症状；番茄在第 14 天呈植株矮小、黄化、坏死斑症状，最后整株枯死；辣椒在接种后 10 d 出现明显的卷曲，接种后 15 d 呈黄化、花叶、斑驳症状(图 5)。

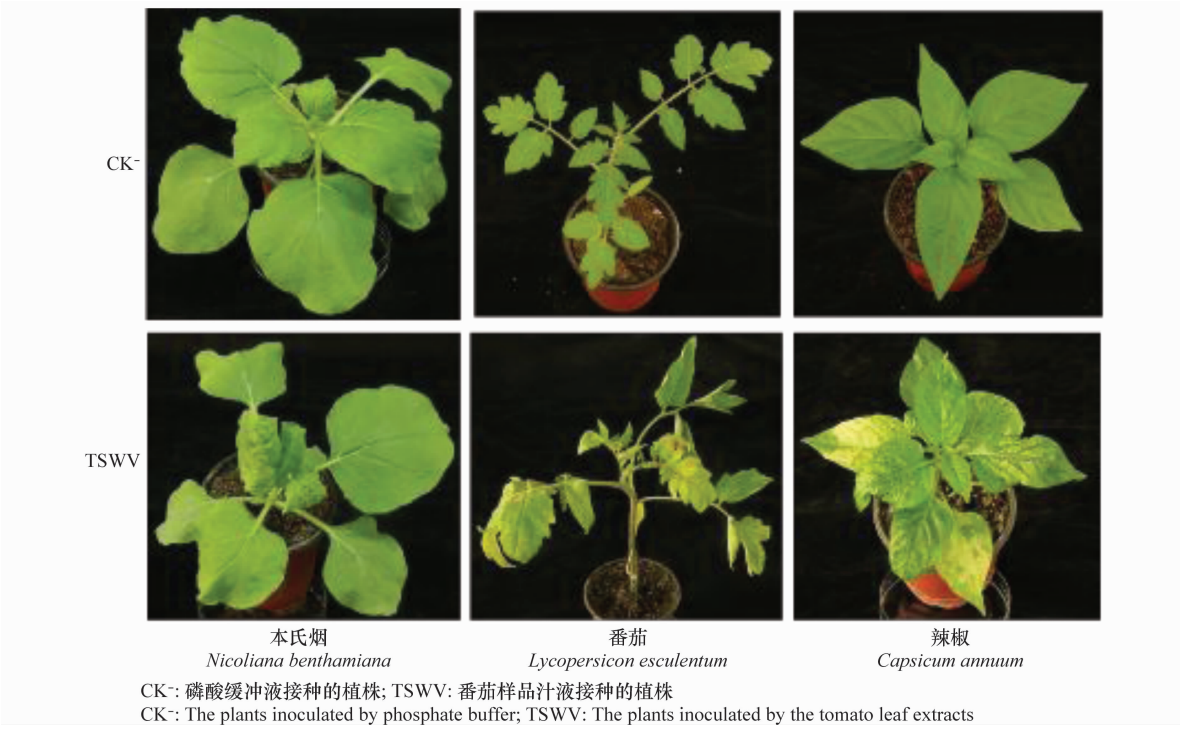


图 5　蓟马传毒番茄叶片汁液摩擦接种本氏烟、番茄和辣椒的症状

Fig. 5　Symptoms of *Nicotiana benthamiana*, *Lycopersicon esculentum* and *Capsicum annuum* inoculated with the extracts of tomato leaf fed by *Frankliniella occidentalis* with TSWV-HLJ1

3　结论与讨论

番茄斑萎病毒(TSWV)是限制番茄生产的重要因素，TSWV 最早于 1919 年在澳大利亚[3]发现，现已在巴西、阿根廷、意大利、法国、美国等[2]多个国家和地区发生危害。TSWV 于 20 世纪 90 年代在我国正式被鉴定[18]，2000 年以后，在云南很多作物上发现该病毒，其危害严重。目前，TSWV 已从国内最初被发现的云南[5]、四川[18]等地向国内其他省市快速扩展，北京[19]、山东[20]、宁夏[21]、广东[22]等多个省市地区都有发现，造成重大的经济损失。2017 年 7 月，我们在黑龙江省农业科学院试验田采集了表现褪绿、斑驳、黄化、坏死等症状的番茄叶片，采用小 RNA 深度测序和 RT-PCR 结合的方法对样品进行鉴定，表明侵染此番茄样品的病原物为 TSWV。汁液摩擦接种表明，TSWV 黑龙江分离物能够侵染本氏烟、辣椒和番茄。这是我国首次在黑龙江地区发现 TSWV 的危害。因此，加强进出口检验检疫和国内种苗交易的监管和检测，从而控制病毒的人为传播对防止番茄斑萎病毒病扩散具有重要意义。

近年来，小 RNA 深度测序技术在多种植物病原物鉴定方面发挥了重要作用，特别是对新病毒的鉴定。小 RNA 深度测序技术拥有传统检测方法无法比拟的优势，不需要事先了解病毒分子水平的情况也不需要离体培养。通过小 RNA 深度测序及拼接技术可以得到病毒的全基因组，对病毒的鉴定和分类有很大帮助，也能了解病毒的流行病学信息。利用 TSWV-HLJ1 的全基因组核苷酸序列与世界各地多种 TSWV 分离物的核苷酸序列比对并构建系统进化树，结果表明 TSWV-HLJ1 与我国报道的 TSWV 云南甜椒分离物亲缘关系最近，与 TSWV 韩国分离物 JJ 和 HJ 在进化树上处于同一大支，亲缘关系也比较近。

西花蓟马是 TSWV 最重要的传播介体，西花蓟马传播病毒造成的损失远大于其自身为害带来的损失，控制西花蓟马的种群数量对 TSWV 的防控极为重要。2003 年，西花蓟马在北京被发现后，迅速扩散并局部暴发成灾，对我国的农作物生产造成极大的危害[23]。TSWV 寄主种类多，如番茄、辣椒、茄子、南瓜、黄瓜、丝瓜、菜豆和豇豆等，防治难度大。目前，对 TSWV 的防治方法主要有[24]：一、治虫防病，控制 TSWV 的介体蓟马，定期喷施杀虫剂，如螺虫乙酯、乙基多杀菌素、苦参碱、高效氯氰菊酯

等[25];二、及时彻底清除田间杂草,严格铲除病苗并进行土壤消毒,不宜在农田周围种植感病植物,控制感染源;三、喷施抗病毒剂[26],可通过诱导植物对病毒产生抗性,抑制病毒装配,钝化病毒的侵染性等方式起作用;四、种植抗病的品种,如'Red Defender'、'Mt Glory'、'Bella Rosa'、'Quincy'等[27]。

参考文献

[1] LEFKOWITZ E J, DEMPSEY D M, HENDRICKSON R C, et al. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [J/OL]. Nucleic Acids Research, 2018, 46:D708-D717.

[2] BRITTLEBANK C C. Tomato diseases [J]. Journal of the Department of Agriculture in Victoria, 1919, 17: 1348-1352.

[3] 董家红,尹跃艳,徐兴阳,等. 番茄斑萎病毒在云南的发生为害[C]//吴孔明:公共植保与绿色防控——中国植物保护学会2010年学术年会.北京:中国农业科学技术出版社,2010:784.

[4] 佟爱仔,赵兴能,孔宝华,等. 侵染云南烟草的番茄斑萎病毒(TSWV)的RT-PCR检测[J]. 云南农业大学学报(自然科学版),2012,27(6):809-814.

[5] SCHOLTHOF K B, ADKINS S, CZOSNEK H, et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(9): 938.

[6] WHITFIELD A E, ULLMAN D E, GERMAN T L. Tospovirus-thrips interactions [J]. Annual Review of Phytopathology, 2005, 43(43): 459.

[7] ZHANG Z J, WANG D Y, YU C M, et al. Identification of three new isolates of tomato spotted wilt virus from different hosts in China: molecular diversity, phylogenetic and recombination analyses [J]. Virology Journal, 2016, 13(1): 1-12.

[8] 赫尔 R. 马修斯植物病毒学[M].北京:科学出版社,2007:377.

[9] 郑雪,刘春明,李宏光,等. 云南省红河地区传播番茄斑萎病毒属病毒的蓟马及其寄主植物种类调查[J]. 中国植保导刊,2013,33(3):41-44.

[10] ZHAO W W, WAN Y R, XIE W, et al. Effect of spinosad resistance on transmission of tomato spotted wilt virus by the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 2016, 109(1): 62-69.

[11] AHMED M S, ADEL A R, KHALID A A. Cucurbit yellow stunting disorder virus and watermelon chlorotic stunt virus induced gene silencing in tobacco plants [J]. African Journal of Biotechnology, 2018, 17(7): 189-197.

[12] KREUZE J F, PEREZ A, UNTIVEROS M, et al. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses [J]. Virology, 2009, 388(1): 1-7.

[13] 宋静静,蒙姣荣,邹承武,等. 用小RNA深度测序鉴定广西冬种马铃薯病毒[J]. 中国农业科学,2013,46(19):4075-4081.

[14] 仇心钰,郝丹丹,韩成贵,等. 利用小RNA深度测序对我国北方地区甜菜病毒病的调查[C]//吴学宏. 植物病理学研究进展——中国植物病理学会青年学术研讨会论文选编. 北京:中国农业大学出版社,2015:126.

[15] 苏秀,徐毅,陈莎,等. 利用小RNA深度测序和组装技术鉴定紫藤花叶病病原[J]. 植物病理学报,2015,45(1):88-92.

[16] 王芳,高正良,周本国,等. 利用小RNA高通量测序技术检测玉米病毒[J]. 植物病理学报,2017,47(3):422-427.

[17] 廖倩,张治军,张玉秀,等. 西花蓟马数量与番茄斑萎病毒发生流行的关系[J]. 浙江农业学报,2015,27(9):1601-1605.

[18] 姚革. 四川晒烟上发现番茄斑萎病毒(TSWV)[J]. 中国烟草科学,1992(4):2-4.

[19] 李飞,吴青君,徐宝云,等. 北京地区发现番茄斑萎病毒[J]. 植物保护,2012,38(6):186-188.

[20] 李洁,迟胜起,杨勤民,等. 山东烟台地区发生番茄斑萎病毒病危害[J]. 植物保护,2017,43(1):228-232.

[21] 曹金强,谢学文,柴阿丽,等. 番茄斑萎病毒病在宁夏的发现与防治[J]. 中国蔬菜,2016(4):87-89.

[22] 饶雪琴,刘勇,李媛媛,等. 广东番茄上检测到 Tospovirus 病毒[J]. 植物病理学报,2010,40(4):430-432.

[23] 张璐璐. 防治西花蓟马的球孢白僵菌液固双相发酵条件优化[D]. 北京:中国农业科学院,2016.

[24] 吴鑫本. 番茄斑萎病毒的防治与检疫[J]. 现代农业科学,2008,15(11):95-96.

[25] 张洁,陈永对,吴阔,等. 6种杀虫剂对烟田番茄斑萎病毒属病毒传毒蓟马的药效试验[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):95-97.

[26] 吕印谱,丁征宇,宋宝安,等. 抗植物病毒剂作用机制研究进展[J]. 中国植保导刊,2007,27(10):14-16.

[27] FUNDERBURK J, REITZ S, OLSON S, et al. Managing thrips and tospoviruses in tomato [J]. Entomology & Nematology, 2015, 18(6): 785-788.

(责任编辑:田　喆)

(上接 24 页)

[15] BARRA Y, JENTSCH S, MANN C. G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast [J]. Genes & Development, 1995, 9(4): 399-409.

[16] 喻海峰,高飞,朱小蕾,等. 稻瘟病菌 *Mofbox* 基因缺失突变体构建及生物学表型分析[J]. 安徽农业大学学报,2013,40(5):752-757.

[17] GUO M, GAO F, ZHU X, et al. MoGrr1, a novel F-box protein, is involved in conidiogenesis and cell wall integrity and is critical for the full virulence of *Magnaporthe oryzae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(19): 8075-8088.

[18] MATAR K, CHEN X, CHEN D, et al. WD40-repeat protein MoCreC is essential for carbon repression and is involved in conidiation, growth and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* [J]. Current Genetics, 2017, 63(4): 685-696.

[19] FERNÁNDEZ-ALVAREZ A, ELÍAS-VILLALOBOS A, IBEAS J I. The O-mannosyltransferase PMT4 is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis* [J]. Plant Cell, 2009, 21(10): 3397-3412.

(责任编辑:田　喆)