

广东省番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定及序列分析

汤亚飞^{1,2}, 余小漫^{1,2}, 李正刚¹, 于琳¹, 蓝国兵¹, 邓铭光¹, 何自福^{1,2*}

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广州 510640; 2. 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

摘要 番茄黄化曲叶病毒病是世界番茄生产上一种毁灭性病害, 番茄黄化曲叶病毒 *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) 是引起该病害的主要病原病毒之一。本文采用滚环扩增及基因克隆方法, 获得了侵染广东佛山和肇庆番茄的 TYLCV 4 个分离物全基因组; 它们均为 2 781 nt, 编码 6 个 ORF, 其中病毒链上编码 AV1 和 AV2, 互补链上编码 AC1、AC2、AC3 和 AC4。同源性比较结果表明, 4 个广东分离物基因组序列两两间同源性为 99% 以上; 与已报道的 TYLCV 各分离物同源性在 90% 以上, 而与来自中国不同地区的 TYLCV 分离物的同源率均在 98% 以上。系统进化分析显示, 广东分离物与来自中国不同地区的 TYLCV 分离物亲缘关系较近, 并聚类在一个分支。因此, 侵染引起广东佛山和肇庆番茄黄化曲叶病的病毒应来自国内其他地区。本研究是对 TYLCV 广东分离物分子特征的首次报道。

关键词 番茄黄化曲叶病毒; 分子鉴定; 序列分析

中图分类号: S 432.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018333

Molecular identification and sequence analysis of *Tomato yellow leaf curl virus* in Guangdong province

TANG Yafei^{1,2}, SHE Xiaoman^{1,2}, LI Zhenggang¹, YU Lin¹, LAN Guobing¹, DENG Mingguang¹, HE Zifu^{1,2}

(1. *Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China*;

2. *Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China*)

Abstract Tomato yellow leaf curl disease is a destructive disease in tomato production. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) is one of the main pathogens causing TYLCD. Four whole genome sequences of TYLCV from infected tomato in Foshan and Zhaoqing, Guangdong province were obtained by rolling circle amplification and gene cloning methods. The four genome sequences were 2 781 nucleotides (nt) in length and encoded six potential ORFs. The AV1 and AV2 were located on the virion sense DNA strand, whereas the AC1, AC2, AC3, AC4 were located on the complementary sense strand. The results of homology comparison showed that the genomic sequences of four isolates from Guangdong shared >99.0% nt identities with each other, and shared > 90% nt identities with all isolates of TYLCV in the database, > 98% nt identities with all TYLCV isolates from China. Phylogenetic analysis of the four Guangdong isolates and the other isolates of TYLCV indicated that they clustered with all TYLCV isolates from China to form a unique clade. Therefore, the viruses infecting tomato in Foshan and Zhaoqing, Guangdong likely come from other areas of China. This is the first molecular characterization of TYLCV infecting tomato in Guangdong province, China.

Key words *Tomato yellow leaf curl virus*; molecular identification; sequence analysis

番茄黄化曲叶病是世界范围内严重影响番茄生产的一种重要病害, 已给热带和亚热带地区的番茄生产造成严重损失^[1]。在我国, 蔡健和等 1994 年首次在广西报道了该病害的发生^[2]。2006 年以来, 番茄黄化曲叶病在全国范围大面积暴发和流行。在广

东, 何自福等 2003 年率先报道番茄黄化曲叶病危害番茄^[3], 到目前为止, 广东省几乎所有番茄产区均有该病害的发生。番茄植株感染该病害后主要表现为植株矮化, 叶缘黄化, 叶片皱缩、卷曲。早期感病时, 植株无法正常开花结果; 后期感病, 植株上部新叶表

收稿日期: 2018-07-26

修订日期: 2018-11-05

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201209); 国家自然科学基金青年基金(31501606)

* 通信作者 E-mail: hezf@gdppri.com

现症状,结果量减少,果实变小^[4]。

番茄黄化曲叶病是由烟粉虱传双生病毒感染所导致的。全世界已报道可感染番茄的双生病毒至少有 88 种^[5],在我国,已报道的引起番茄黄化曲叶病的双生病毒至少有 16 种^[6-16],其中 TYLCV 分布最广,是引起全球各地番茄黄化曲叶病的主要病原之一。该病毒最先在以色列发现,之后随着传播介体烟粉虱在全球范围暴发而蔓延至中东、地中海沿岸、非洲、美洲、澳洲和亚洲等多个国家和地区^[17]。在我国,Wu 等 2006 年首次在上海番茄上发现 TYLCV^[6],之后在北京^[18]、河北^[19]、吉林^[20]、陕西^[21]、天津^[22]、河南^[23]、浙江^[24]、江苏^[25]、新疆^[26]、山东^[27]、安徽^[28]、福建^[29]、湖北^[4]、湖南^[30]、云南^[31]、山西^[32]、辽宁^[33]、宁夏^[34]、甘肃^[35]等 20 个省市番茄产区均有检测到该病毒,并造成严重损失的报道。在广东,2004 年即有番茄黄化曲叶病的发生,但直到 2011 年 9 月才在佛山市三水区的番茄产区检测到 TYLCV。本文对危害广东番茄的 TYLCV 全基因组进行了克隆及序列分析,明确了 TYLCV 广东分离物的分子特征,为该病毒病监测与防控提供了依据。

1 材料与方法

1.1 供试样品

罹患番茄黄化曲叶病的番茄叶片样品采自广东省佛山市三水区、肇庆市高要市等番茄产区;以 TYLCV 侵染性克隆注射接种发病的番茄植株叶片作为阳性对照,以健康番茄植株叶片作为阴性对照。

1.2 供试番茄样品总 DNA 提取

取番茄病叶组织 100 mg,用北京全式金生物技术有限公司的植物 DNA 提取试剂盒(Easy Pure Plant Genomic DNA Kit)抽提其总 DNA。具体操作按照试剂盒说明书进行。DNA 沉淀溶解于 50 μ L TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 溶液中。

1.3 PCR 检测

利用菜豆金色花叶病毒属病毒通用简并引物 AV494/CoPR^[36-37],对疑似病样进行 PCR 检测。反应体系为:番茄病样总 DNA 1 μ L(约 20 ng),灭菌水 9.5 μ L,PCR Mixer 12.5 μ L(TaKaRa 公司),10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L,总体积为 25 μ L。反应程序:94℃ 4 min;94℃ 45 s,52℃ 45 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 全基因组序列的扩增

取 PCR 检测为阳性的病样总 DNA,分别取 1.0 μ L(约 20 ng)为模板,利用 TempliPhi™ RCA Kit (GE Healthcare)进行滚环扩增(rolling circle amplification, RCA),以获得病毒的全基因组。具体方法按照试剂盒说明书上的步骤进行。RCA 反应结束后,扩增产物分别用 *Bam*H I 限制性内切酶进行酶切。酶切反应体系为:RCA 产物 2 μ L、内切酶 1 μ L、10 $\times$ 内切酶缓冲液 1 μ L,总酶切反应体系为 10 μ L。在 37℃ 条件下酶切 2 h 以上,然后进行电泳分析。若酶切产物为 2.5~3.0 kb,或同时还产生 1.3 kb 左右的条带,则克隆这些特异性条带。

1.5 基因克隆与序列分析

应用琼脂糖凝胶回收试剂盒(Thermo 公司)回收 RCA 酶切产物,纯化后连接到相应酶切的 pGEM-3Z 载体,并转化大肠杆菌菌株 DH5 α ,每个平板随机挑取 3 个阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。利用 DNASTar 软件(DNASTAR Inc, Madison, USA)的 SeqMan 对所获得的基因序列进行拼接,利用 BLAST 程序进行序列相似性搜索,进一步用 DNASTar 的 MegAlign 进行序列比较分析,ORF 预测使用 NCBI 网站的 ORF Finder,采用 MEGA 5.05 的邻接法(neighbor joining, NJ),设置 Bootstrapping 值为 1 000,构建进化树。

2 结果与分析

2.1 PCR 检测结果

利用菜豆金色花叶病毒属病毒特异简并引物 AV494 和 CoPR 进行 PCR 检测,从采集的疑似番茄黄化曲叶病样品的总 DNA 中均扩增到 1 条与阳性对照大小一致的特异片段,长度为 570 bp,而健康植株样品总 DNA 中未扩增出任何片段(图 1)。表明疑似病样中均含有菜豆金色花叶病毒属病毒。

2.2 病毒分离物基因组的克隆与序列分析

选取 PCR 检测为阳性的病样总 DNA,分别进行 RCA 和酶切反应,RCA 产物均能被 *Bam*H I 切出 1 条约 2.7 kb 大小的单一条带,将 2.7 kb 大小的条带进行分子克隆和序列测定,结果表明,来自广东番茄的 SS11、SS12、SS13、GY01 4 个分离物(GenBank 登录号为:JQ867092、JX128099、KC810892、KF356163)全长大小均为 2 781 nt,且两两间序列同源率均为 99.0%以上。

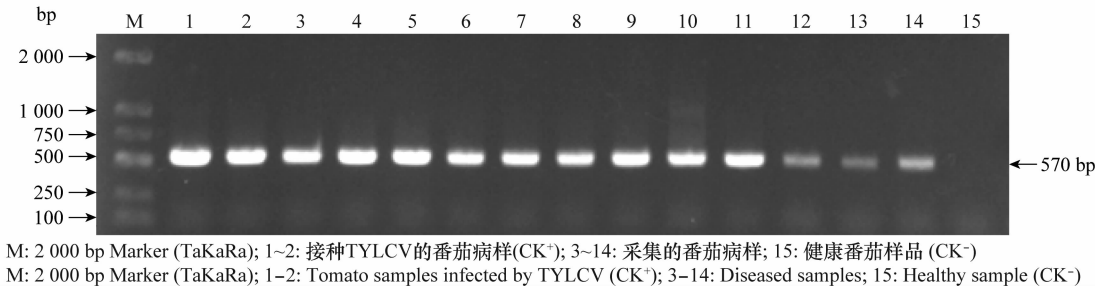


图 1 采集的疑似番茄样品 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR detection of diseased tomato samples

进一步分析发现,侵染广东番茄的 4 个菜豆金色花叶病毒属病毒分离物基因组 DNA-A 结构特征完全一致,为单链闭合环状,编码 6 个 ORFs。基因组病毒链含 AV1 基因 (308—1 084 nt,编码 CP)和 AV2 基因 (148—498 nt,编码与病毒移动相关蛋白),互补链含有 AC1 基因 (1 542—2 615 nt,编码复制酶)、AC2 基因 (1 226—1 633 nt,转录激活蛋白)和 AC3 基因 (1 081—1 485 nt,编码复制增强蛋白)和 AC4 基因 (2 171—2 464 nt,编码复制或转录调控因子)。在 AV2 与 AC1 之间有 1 个 313 nt 的非编码区

(位于 2 616—147 nt),其中含有与双生病毒复制起始有关的保守序列 TAATATTAC (位于 2 775—2 nt)^[38]。

BLAST 结果显示,与广东分离物 DNA-A 序列有较高相似性的序列均为 TYLCV 分离物。进一步比较发现(图 2),广东分离物与来自我国不同地区的 TYLCV 13 个分离物以及国外不同国家来源的 TYLCV 19 个分离物的相似性均为 90%以上;其中与来自中国不同地区的 TYLCV 13 个分离物的相似性均在 98%以上,而与阿曼 Tom-48 分离物(登录号:KF229725)相似性最低,为 90.2%。

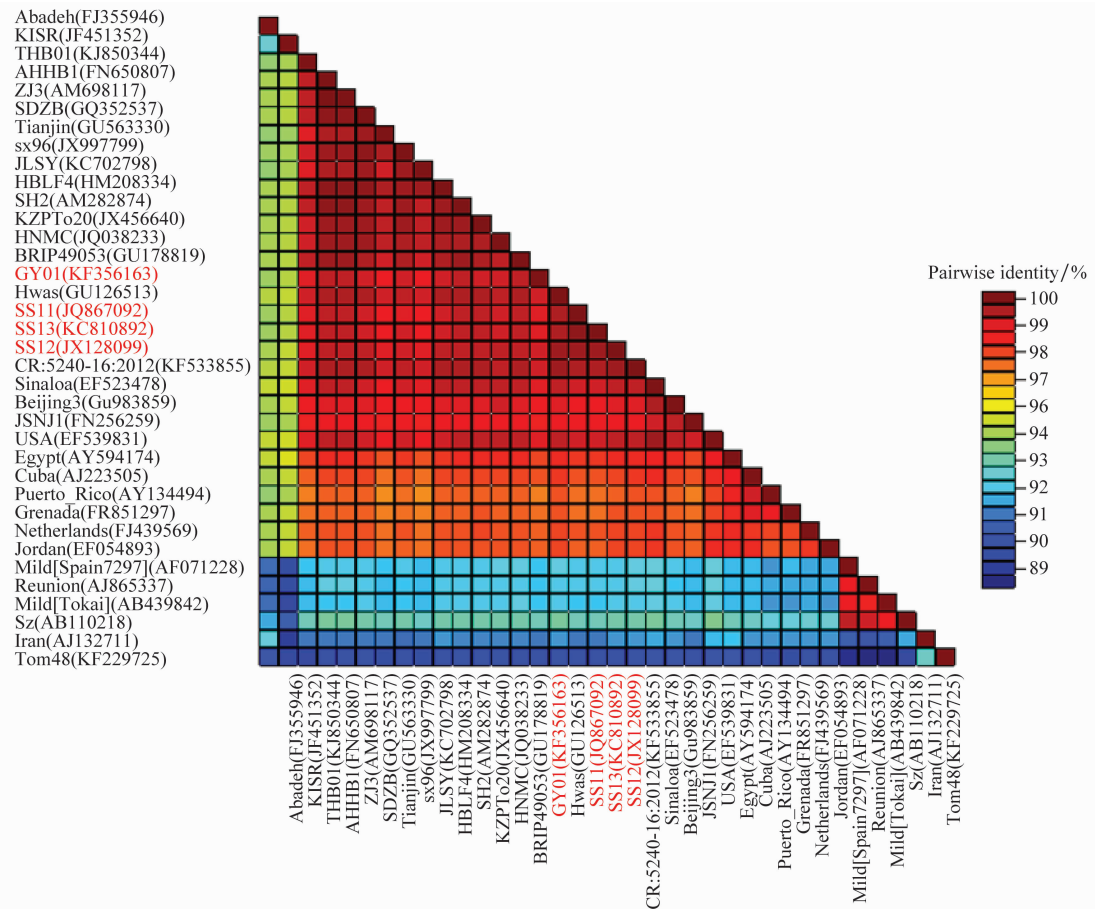


图 2 广东分离物与 TYLCV 的其他 32 个分离物的相似性分析结果

Fig. 2 Sequence identity comparison of Guangdong isolates and 32 isolates of TYLCV

2.3 亲缘关系分析

为了分析 TYLCV 广东分离物与已报道的各 TYLCV 分离物的亲缘关系,将 TYLCV 广东分离物及上述 32 个分离物构建系统进化树,以侵染广东番茄的台湾番茄曲叶病毒 *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) 白沙分离物 (DQ237918) 为外组。结果显示(图 3),TYLCV 广东分离物与来自

中国不同地区的 13 个分离物及国外的 11 个分离物亲缘关系较近,聚在一个分支,进一步与科威特 KISR 分离物形成一个大的分支;与日本 Mild[Tokai]分离物、西班牙 Mild[Spain7297]分离物、留尼汪岛分离物、日本 Sz 分离物 4 个分离物的亲缘关系较近,而与阿巴代分离物、伊朗分离物及阿曼 Tom-48 分离物 3 个分离物亲缘关系较远。

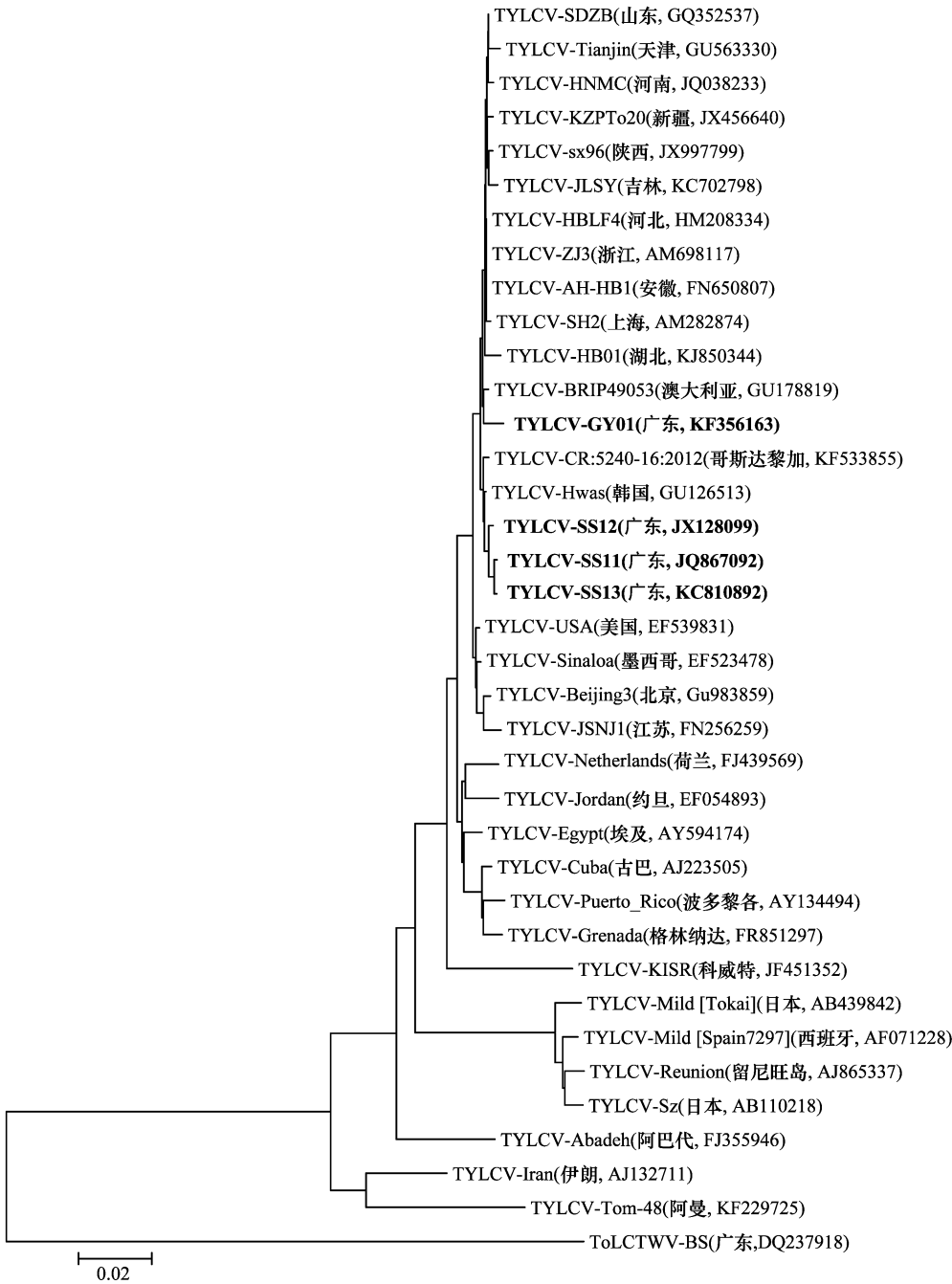


图3 广东分离物与其他 32 个 TYLCV 分离物的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of Guangdong isolates and 31 isolates of TYLCV

3 讨论

本研究采用 RCA 扩增及基因克隆方法,获得了侵染广东佛山和肇庆番茄的双生病毒 4 个广东分离物基因组全序列,大小均为 2 781 nt,序列间相似性为 99%;这些分离物与 TYLCV 13 个中国分离物及 19 个不同国家来源分离物的相似性均大于 90%,且与 TYLCV 13 个中国分离物的相似性均在 98% 以上。根据目前国际双生病毒分类方案^[5],侵染引起广东佛山和肇庆番茄黄化曲叶病的病毒应该属于 TYLCV 分离物。

TYLCV 最早发现于以色列,之后迅速扩散,现已在全球范围发生。国内最早于 2006 年在上海番茄上检测到,随后成为我国番茄黄化曲叶病的主要病原病毒之一。2003 年在广东首次发现了番茄黄化曲叶病^[3]。自从该病害发生以来,本团队一直对广东省该病害的发生和病原病毒种类进行鉴定和监测,2011 年以前,引起广东省番茄黄化曲叶病的病毒种类为广东番茄曲叶病毒 *Tomato leaf curl Guangdong virus* (ToLCGdV)、广东番茄黄化曲叶病毒 *Tomato yellow leaf curl Guangdong virus* (TYLCGdV) 和 ToLCTWV 3 种病毒^[11-13]。2011 年 9 月,首次在佛山市三水区的番茄产区上检测到 TYLCV,随后 2013 年在肇庆市高要市蚬岗镇番茄也检测到该病毒。可见, TYLCV 也入侵广东危害番茄,正在成为引起广东番茄黄化曲叶病的病原病毒之一。更进一步的序列分析发现其与侵染中国其他地区番茄的 TYLCV 相似性高,亲缘关系近。因此,推测侵染广东番茄的 TYLCV 病毒是从国内其他发生 TYLCV 的地区通过蔬菜、种苗运输以及烟粉虱的扩散等途径传入、定殖。

本文首次对侵染广东省番茄的 TYLCV 进行分子鉴定和序列分析,明确 TYLCV 广东分离物的分子特征,对开展 TYLCV 在我国的扩散、序列变异与进化等方面研究提供了基础,同时也为广东省番茄抗病新品种的选育及番茄黄化曲叶病的防控提供了科学依据。

参考文献

- [1] HANSEN I M, LAPIDOT M, THOMMA B P H J. Emerging viral diseases of tomato crops [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23: 539–548.
- [2] 蔡健和,王苏燕,王小凤,等. 番茄曲叶病及其血清学和 PCR 测定[J]. *微生物学报*, 1995, 35(5): 394–396.

- [3] 何自福,虞皓. 警惕广东番茄烟粉虱传双生病毒病的发生[J]. *广东农业科学*, 2003(4): 41–43.
- [4] 汤亚飞,何自福,杜振国,等. 番茄黄化曲叶病毒在湖北首次报道[J]. *植物保护*, 2015, 41(5): 233–236.
- [5] BROWN J K, ZERBINI F M, NAVAS-CASTILLO J, et al. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons [J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(6): 1593–1619.
- [6] WU J B, DAI F M, ZHOU X P. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in China [J]. *Plant Disease*, 2006, 90(10): 1359.
- [7] LI Z H, ZHOU X P, ZHANG X, et al. Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Yunnan, China [J]. *Archives of Virology*, 2004, 149(9): 1721–1732.
- [8] 刘玉乐,蔡健和,李冬玲,等. 中国番茄黄化曲叶病毒——双生病毒的一个新种[J]. *中国科学(C辑)*, 1998, 28(2): 145–153.
- [9] YANG Xiuling, GUO Wei, MA Xinying, et al. Molecular characterization of *Tomato leaf curl China virus*, infecting tomato plants in China, and functional analyses of its associated betasatellite [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2011, 77(9): 3092–3101.
- [10] ZHANG Hui, HU Gaojie, ZHOU Xueping. Molecular characterization of *Tomato leaf curl Hainan virus*, a new *Begomovirus*, and evidence for recombination [J]. *Journal of Phytopathology*, 2010, 158(11/12): 829–832.
- [11] 何自福,虞皓,毛明杰,等. 中国台湾番茄曲叶病毒侵染引起广东番茄黄化曲叶病[J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(1): 119–123.
- [12] 何自福,虞皓,罗方芳. 广东番茄曲叶病毒 G3 分离物基因组 DNA-A 的分子特征[J]. *植物病理学报*, 2005, 35(3): 208–213.
- [13] 何自福,虞皓,罗方芳. 广东番茄曲叶病毒 G2 分离物基因组 DNA-A 的分子特征[J]. *微生物学报*, 2005, 45(1): 48–52.
- [14] XU Youping, CAI Xinzong, ZHOU Xueping. *Tomato leaf curl Guangxi virus* is a distinct monopartite *Begomovirus* species [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 118(3): 287–294.
- [15] ZHANG Hui, MA Xinying, QIAN Yajun, et al. Molecular characterization and infectivity of *Papaya leaf curl China virus* infecting tomato in China [J]. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2010, 11(2): 109–114.
- [16] DING M, LI T, FANG Q, et al. *Tomato yellow leaf curl Yunan virus*, a new *Begomovirus* species associated with tomato yellow leaf curl disease in China [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2016, 98(2): 337–340.
- [17] MORIONES E, NAVAS-CASTILLO J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide [J]. *Virus Research*, 2000, 71: 123–134.
- [18] 宋晰,师迎春,张世晨,等. 北京地区番茄黄化曲叶病病毒分离物测定及株系的初步鉴定[J]. *植物病理学报*, 2013, 43(2): 113–119.
- [19] 周莹,李兴红,刘建华,等. 河北省番茄黄化曲叶病毒病的分子鉴定初报[J]. *植物保护*, 2010, 36(1): 60–64.
- [20] 王祥,李刚,赵黎明,等. 吉林番茄黄化曲叶病毒分离物的检测及其

- DNA-A 全基因组序列分析[J]. 植物保护, 2014, 40(2): 76-80.
- [21] 阮涛, 杨会房, 杨水英, 等. 分离自陕西泾阳番茄的番茄黄化曲叶病毒(TYLCD)的分子特征[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(1): 97-105.
- [22] 金凤媚, 薛俊, 郝艳红, 等. 天津地区番茄黄化曲叶病毒 DNA-A 的克隆和序列分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(1): 58-62.
- [23] 于云奇, 阮涛, 杨水英, 等. 河南省番茄黄化曲叶病原分子鉴定及全基因组序列分析[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(1): 13-17.
- [24] 袁伟, 万红建, 王荣青, 等. 浙江省番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定及序列分析[J]. 分子植物育种, 2013, 11(2): 185-192.
- [25] 季英华, 熊如意, 程兆榜, 等. 江苏省番茄黄化曲叶病的病原分子诊断[J]. 园艺学报, 2008, 35(12): 1815-1818.
- [26] 王喜刚, 黄家凤, 都业娟. 南疆温室番茄黄化曲叶病毒种类的分子鉴定[J]. 植物保护学报, 2013, 40(3): 237-242.
- [27] 褚栋, 侯丽霞, 刘国霞, 等. 山东省局部地区番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定[J]. 山东农业科学, 2010(2): 13-15.
- [28] 余文贵, 赵统敏, 杨玛丽, 等. 山东、安徽两省栽培番茄烟粉虱传双生病毒的 PCR 检测及序列分析[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(4): 747-751.
- [29] 张洁, 林文武, 宛柏杰, 等. 福州番茄黄化曲叶病毒的全基因组结构特征[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2016, 45(5): 501-504.
- [30] 班一云, 丁波, 周雪平. 湖南省番茄和牵牛花上双生病毒的分子鉴定[J]. 植物保护, 2017, 43(4): 134-138.
- [31] 刘微, 史晓斌, 唐鑫, 等. 云南番茄褪绿病毒和番茄黄化曲叶病毒复合侵染的分子鉴定[J]. 园艺学报, 2018, 45(3): 552-560.
- [32] 郝浩永, 滕红梅, 关正君, 等. 山西运城番茄黄化曲叶病毒的初步鉴定[J]. 分子植物育种, 2018, 16(5): 1558-1565.
- [33] 杨彩霞, 张帅宗, 孙蓬蓬, 等. 番茄黄化曲叶病毒辽宁葫芦岛分离物的检测和序列分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2016, 45(4): 376-380.
- [34] 沙龙, 高艳明, 李建设. 宁夏番茄黄化曲叶病毒分子鉴定及防控措施[J]. 北方园艺, 2013(12): 119-121.
- [35] 胡志峰, 邵景成. 甘肃省设施番茄黄化曲叶病毒病的发生与防治[J]. 甘肃农业科技, 2014(1): 54-56.
- [36] WYATT S D, BROWN J K. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction [J]. Phytopathology, 1996, 86(12): 1288-1293.
- [37] 何自福, 虞皓, 罗芳芳. 番茄烟粉虱传双生病毒 PCR 检测[J]. 中国病毒学, 2004, 19(1): 67-69.
- [38] HANLEY-BOWDOIN L, SETTLAGE S B, OROZCO B M, et al. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1999, 18(1): 71-106.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 136 页)

- [8] ADHIKARI T B, HODGES C S, LOUWS F J. First report of *Cylindrocarpum* sp. associated with root rot disease of strawberry in North Carolina [J]. Plant Disease, 2013, 97(9): 1251.
- [9] 朱杰华, 樊慕贞, 蔺成武. 草莓根腐病病原初步研究[J]. 河北农业大学学报, 1994, 17(2): 45-48.
- [10] CHAMORRO M, AGUADO A, SANTOS B D L. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain [J]. Plant Disease, 2016, 100(7): 1495.
- [11] SHARON M, FREEMAN S, KUNINAGA S, et al. Genetic diversity, anastomosis groups and virulence of *Rhizoctonia* spp. from strawberry [J]. European Journal of Plant Pathology, 2007, 117(3): 247-265.
- [12] MANICI L M, BONORA P. Molecular genetic variability of Italian Binucleate *Rhizoctonia* spp. isolates from strawberry [J]. European Journal of Plant Pathology, 2007, 118(1): 31-42.
- [13] 胡彦江, 张茹琴. 烟台地区草莓根腐病病原鉴定及致病性测定[J]. 北方园艺, 2012, 10: 141-144.
- [14] 王中武, 臧慧明. 草莓根腐病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 广东农业科学, 2011(8): 63-64.
- [15] ZHONG S, ZHANG G Z. First Report of root rot on strawberry caused by binucleate *Rhizoctonia* AG-A in China [J]. Plant Disease, 2016, 100(1): 225.
- [16] 邓之亮, 杨新东, 蒋莉莉. 8 种杀菌剂对棉花立枯丝核菌的室内毒力测[J]. 世界农药, 2015, 37(3): 58-61.
- [17] 曾向萍, 王三勇, 王会芳, 等. 红麻立枯丝核病菌生物学特性[J]. 中国植保导刊, 2013, 33(5): 12-15.
- [18] 王中武, 邹致强, 胡延生. 草莓根腐病的药剂筛选[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17): 8046.
- [19] 方中达. 植病研究方法[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [20] XU J R, HAMER J E. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. Genes and Development, 1996, 10: 2696-2706.
- [21] 陈延熙, 张敦华, 段霞瑜, 等. 关于 *Rhizoctonia solani* 菌丝融合分类和有性世代的研究[J]. 植物病理学报, 1985(3): 139-143.
- [22] 张敦华, 陈延熙. 双核丝核菌的菌丝融合分类[J]. 植物病理学报, 1986(3): 13-18.
- [23] MARTIN F N. *Rhizoctonia* spp. recovered from strawberry roots in central coastal California [J]. Phytopathology, 2000, 90: 345-353.
- [24] BOTH A, DENMAN S, LAMPRECHT S C, et al. Characterisation and pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates associated with black root rot of strawberries in the Western Cape Province, South Africa [J]. Australasian Plant Pathology, 2003, 32: 195-201.
- [25] FANG X L, FINNEGAN P M, BARBETTI M J. Wide variation in virulence and genetic diversity of binucleate *Rhizoctonia* isolates associated with root rot of strawberry in Western Australia [J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8, 2: e55877.

(责任编辑: 田 喆)