

# 辣椒轻斑驳病毒凤城分离物的鉴定、全基因组测序及系统进化分析

竹怀婷, 李晓冬, 侯慧慧, 徐千惠, 安梦楠\*

(沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866)

**摘要** 辣椒轻斑驳病毒 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) 属于烟草花叶病毒属, 是辣椒上重要的病原病毒之一, 近年来 PMMoV 对辽宁部分辣椒产区造成严重危害。本文采用 DAS-ELISA 检测以及 RT-PCR 的方法首次从辽宁省凤城市蔬菜产区辣椒病叶中检测出 PMMoV, 暂命名为 PMMoV-FC。设计 3 对特异性引物对其进行扩增并测序后得到该病毒分离物全基因组序列。将 PMMoV-FC 的全基因组序列与已报道的国内外 9 个 PMMoV 分离物进行同源性分析, 结果表明, 其同源性介于 94.3%~99.7% 之间。基于全基因组序列的系统发育进化分析表明, PMMoV-FC 与国内分离物、日本分离物以及美洲分离物亲缘关系密切, 而与韩国和西班牙分离物亲缘关系稍远。鉴于该病毒在辣椒上造成的严重危害, 对于 PMMoV-FC 在辽宁地区的发生以及防治仍需进行更为详细的研究。

**关键词** 辣椒轻斑驳病毒; RT-PCR; 全基因组测序; 系统进化分析

中图分类号: S 436.418 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.009

## Identification, whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of *Pepper mild mottle virus* Fengcheng isolate

Zhu Huaiting, Li Xiaodong, Hou Huihui, Xu Qianhui, An Mengnan

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract** *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), a member of *Tobamovirus*, is a major viral pathogen of pepper. In recent years, PMMoV has caused great loss to pepper production in Liaoning Province. In this study, PMMoV was first identified in Fengcheng City by using DAS-ELISA and RT-PCR method, and named as PMMoV Fengcheng isolate (PMMoV-FC). Three pairs of specific primers were used to amplify the complete genome sequence of PMMoV-FC, and the results of sequence analysis and phylogenetic analysis showed that PMMoV-FC was closely related with 9 PMMoV isolates reported in China or abroad with a sequence identity of between 94.3%–99.7%. Phylogenetic tree was constructed, showing that PMMoV-FC was closely related with Chinese domestic isolate, Japanese isolate and southern American isolate but not with South Korean isolate or Spanish isolate. Due to the significant losses caused by PMMoV to pepper, further research is required to control and prevent the prevailing of the diseases caused by PMMoV-FC in Liaoning Province.

**Key words** PMMoV; RT-PCR; whole-genome sequencing; phylogenetic analysis

我国近年来辣椒 *Capsicum frutescens* 产业发展迅速, 已成为世界上辣椒栽培面积最大的国家<sup>[1]</sup>, 种植面积基本稳定在 150 万~160 万 hm<sup>2</sup>, 约占我国蔬菜种植面积的 10%<sup>[1-2]</sup>。辣椒也是我国辽宁省重要的蔬菜作物之一, 辣椒病毒病是危害辣椒生产的重要病害, 常导致辣椒落叶、落花、落果, 可造成减产 30%~50%, 甚至绝收, 成为影响辣椒产量的主

要因素之一<sup>[3]</sup>。辣椒轻斑驳病毒 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) 属于烟草花叶病毒属 *Tobamovirus* 的正义链 RNA 病毒, 基因组 RNA 由 6 356 或 6 357 个碱基组成, 编码病毒复制酶蛋白 p126 和 p183、运动蛋白 (movement protein, MP) 和外壳蛋白 (17 kDa) 等至少 4 种蛋白<sup>[4-5]</sup>, 是世界范围内造成辣椒经济损失的重要病原之一。PMMoV 可以通过

收稿日期: 2016-05-09 修订日期: 2016-06-15

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303028); 沈阳农业大学 2016 大学生创新训练计划项目

\* 通信作者 E-mail: anmengnan1984@163.com

种子和汁液摩擦传播,带毒种子、发病植株和病土是重要的侵染来源<sup>[6]</sup>。PMMoV 最早报道于美国辣椒<sup>[7]</sup>,1994 年在中国新疆辣椒上首次发现<sup>[8]</sup>。2014 年 6 月辽宁省葫芦岛地区温室大棚辣椒上暴发辣椒轻斑驳病毒病,50% 的辣椒受到侵染,受害总面积达 15 hm<sup>2</sup>,直接造成三分之一的经济损失<sup>[9]</sup>。感病辣椒叶片呈现斑驳、花叶、扭曲或皱缩,茎秆上出现褐色坏死斑,果实变小畸形、果面斑驳或出现凹陷坏死等明显病毒病症状,后期辣椒果实外观和内在品质均显著变差<sup>[10]</sup>。迄今有关辽宁地区辣椒轻斑驳病毒的基因序列的详细研究十分缺乏,本研究采用反转录 PCR(RT-PCR)和双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA)检测等技术对 PMMoV 凤城辣椒分离物(PMMoV-FC)的基因全序列进行克隆和序列分析,明确了该分离物与国内外分离物的亲缘关系,从分子水平鉴定该病毒分离物,为后续在该病毒的预防和控制方面提供依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

毒源的采集与保存:本研究于 2015 年 9 月在辽宁省凤城市凤山区大梨树村辣椒生产区调查采样,采集的辣椒(品种为‘津福 15 号’)病叶具有明显花叶和斑驳症状。将上述症状病样汁液摩擦接种于温室培养辣椒‘津福 15 号’上繁殖并保存。

生化及分子生物学试剂:供试 PMMoV 的 DAS-ELISA 检测试剂盒购自美国 Agdia 公司;植物总 RNA 提取所用 TRIzol Reagent 试剂购自北京康为世纪公司;反转录 TIANScriptcDNA 第一链合成试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,PCR 扩增酶 Ex Taq 购自大连宝生物公司;引物由上海生工合成,质粒核酸测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 DAS-ELISA 血清学检测

取田间采集到的辣椒疑似感染病毒病叶,加入 PBS 缓冲液进行研磨裂解后,采用 DAS-ELISA 法进行检测。按照 DAS-ELISA 试剂盒说明书进行操作,终止液终止反应后用酶标仪于 405 nm 波长下读取每孔的吸光度。

#### 1.2.2 辣椒叶片总 RNA 提取及反转录

选取 2 份发病症状明显的辣椒病叶,以一份温室培育的健康辣椒叶片作为对照,提取叶片总 RNA,每份样品称取 0.1 g。提取方法按照 TRIzol Reagent 试剂说明书步骤进行,将得到的叶片总 RNA 存于 -80℃ 下备用。以提取的总 RNA 为模板,采用随机引物,参照 TIANScriptcDNA 第一链合成试剂盒说明书方法获取反转录产物 cDNA。

#### 1.2.3 基因全序列的克隆与测序

根据 GenBank 中 PMMoV 中国分离物 PMMoV-CN(登录号:AY859497)的基因序列设计 3 对特异性引物(表 1)。引物由上海生工合成。

表 1 PMMoV 特异性扩增引物

Table 1 Specific primer sequences for PMMoV amplification

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence	起始位点 Initiation site
PMMoV1F	GTAAATTTTTTCACAATTTAA- CAACAACAAC	1
PMMoV1R	ACACCAAAGATTCGGAGCTC	2 482
PMMoV2F	GTAGAGTCGCAGTGAGCTCC	2 450
PMMoV2R	TAGCATAGAGGACAGACATGC	4 466
PMMoV3F	GAGGAAAAGCGGTGATGTCAC	4 395
PMMoV3R	TGGGCCGCTACCCGCGGTTC	6 356

以叶片的总 RNA 为模板,采用 3 步 RT-PCR 法扩增 PMMoV-FC 的全基因序列。分别以特异性引物 PMMoV1F 和 PMMoV1R, PMMoV2F 和 PMMoV2R 以及 PMMoV3F 和 PMMoV3R 扩增 PMMoV-FC(图 1),并进行测序,将测序结果通过拼接得到 PMMoV-FC 全基因序列。PCR 反应体系按照反转录试剂盒进行操作,总体积为 25 μL,反应条件为 94℃ 1 min;94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 3 min,35 个循环;72℃ 8 min。PCR 产物分别进行电泳并切胶回收后与 pMD19-T 载体(宝生物公司)进行连接,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α(北京康为世纪生物科技有限公司),于含 50 ng/μL 氨苄青霉素的平板上培养过夜,经蓝白斑筛选挑取白色菌落进行培养,提取质粒。将筛选出的含重组质粒的阳性克隆送至金唯智生物科技(北京)有限公司进行测序。采用 DNAMAN V8.0(Lynnon Corporation)软件及 BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行序列分析,利用 Clustalx v1.81 和 Mega v6.06 软件构建系统进化树。

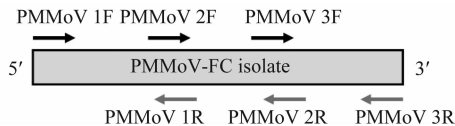


图 1 RT-PCR 扩增过程

Fig. 1 Amplification process of RT-PCR

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒疑似病毒病样品田间症状

调查发现,发病辣椒叶片呈现斑驳、花叶、扭曲或皱缩,茎秆上出现褐色坏死斑,果实变小畸形、果面斑驳或出现凹陷坏死等明显病毒病症状,果实外观和内在品质均显著下降(图 2)。



图 2 田间辣椒病叶症状

Fig. 2 Symptoms of diseased pepper leaves in the field

### 2.2 PMMoV 的 DAS-ELISA 血清学检测

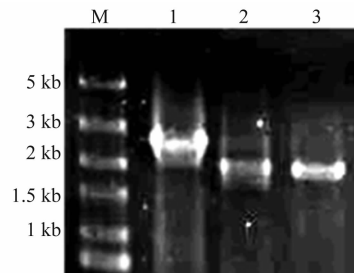
对采集到的 3 个病样进行 DAS-ELISA 检测结果表明辣椒病叶均呈 PMMoV 阳性,其中辣椒病叶 PMMoV 检测 OD 平均值=1.06;阴性对照 OD 平均值=0.095;PMMoV 阳性质控物 OD 平均值=0.81,表明采集到的样品中携带 PMMoV。

### 2.3 PMMoV-FC RT-PCR 扩增结果

分别采用 PMMoV1F 和 PMMoV1R, PMMoV2F 和 PMMoV2R 以及 PMMoV3F 和 PMMoV3R 3 对特异性引物(表 1),以反转录的 cDNA 为模板进行了 PCR(RT-PCR)扩增(图 1)。琼脂糖凝胶电泳结果表明:泳带从左到右分别扩增出长度约为 2.5、2 和 2 kb 的单一 PCR 产物片段(图 3)。

### 2.4 PMMoV-FC 的全基因测序

通过 DNAMAN V8.0 软件对 3 段克隆到 pMD19-T 载体的 PCR 扩增产物进行测序和拼接,每段产物至少测通 3 个克隆以上,确保序列结果的准确性。将拼接后的 PMMoV-FC 全基因序列上传至 NCBI 数据库并获得临时登记号(KU646837)。



M: Marker; 1-3: PMMoV1F/ PMMoV1R、PMMoV2F/ PMMoV2R 和 PMMoV3F/ PMMoV3R 的 RT-PCR 扩增产物

M: Marker; Lane1-3: RT-PCR amplified products of PMMoV1F/ PMMoV1R, PMMoV2F/ PMMoV2R and PMMoV3F/ PMMoV3R, respectively

图 3 3 对特异性引物的 PMMoV-FC RT-PCR 扩增产物

Fig. 3 RT-PCR products of PMMoV-FC using three pairs of specific primers

### 2.5 PMMoV-FC 与其他分离物的基因同源性比对

从 GenBank 中选取 9 个 PMMoV 分离物(其中包括 2 个中国分离物、4 个来自亚洲其他国家的分离物、2 个美洲分离物和 1 个欧洲分离物)和烟草花叶病毒属其他 2 种病毒分离物基因全序列,采用 DNAMAN 软件对 PMMoV-FC 的基因全序列与上述基因的序列同源性进行了比较,结果(表 2)表明: PMMoV-FC 与选取的 9 个 PMMoV 分离物核苷酸的序列同源性介于 94.4%~99.7%之间,同源性很高,其中与中国分离物 PMMoV-CN (AY859497)、PMMoV-HN1 (KP345899)和日本分离物 PMMoV-J (AB000709)、PMMoV-Jp(AB069853)以及美洲分离物 PMMoV BR-DF01(AB550911)、PMMoV-A (NC003630)同源性均在 99%以上;与分离物 PMMoV-Kr(AB126003)、PMMoV-Ia(AJ308228)、PMMoV-P3 (LC082100)的亲缘关系相对较远,同源性介于 94.3%~97.3%之间,与 TMV (NC001367)相似度为 69.5%,与 CGMMV (NC001801)的相似度为 51.1%(表 2)。

### 2.6 基于全基因序列的 PMMoV 系统进化树分析

将 PMMoV-FC 基因全序列与上述分离物(表 2)进行比对后,通过 Clustalx V1.81 和 Mega V6.06 构建系统进化树(图 4)。结果表明:采用 Neighbor-Joining 聚类分析方法将所有 PMMoV 分离物聚类在一起,形成两大支系群体, PMMoV-FC 与来自中国、日本、韩国和美洲的 6 个 PMMoV 分离物聚为一个支系,与西班牙分离物(PMMoV-Ia)和来自韩国的另一种分离物(PMMoV-P3)分属不同支系,但亲缘关系仍相对较近,与 TMV 以及 CGMMV 亲缘关系很远(图 4)。

表 2 PMMoV-FC 核苷酸序列同源性比较

Table 2 Homology analysis of PMMoV-FC genome sequence with other PMMoV isolates and other virus of *Tobamovirus*

分离物 Isolate	GenBank 登录号 GenBank accession no.	来源 Origin	核苷酸序列 同源性/% Identity
PMMoV-J	AB000709	日本	99.7
PMMoV-Jp	AB069583	日本	99.7
PMMoV-CN	AY859497	中国	99.6
PMMoV-HN1	KP345899	湖南	99.6
PMMoV-A	NC003630	美国	99.6
PMMoV-BR-DF01	AB550911	南美	99.3
PMMoV-Kr	AB126003	韩国	97.3
PMMoV-Ia	AJ308228	西班牙	94.4
PMMoV-P3	LC082100	韩国	94.3
TMV	NC001367	俄罗斯	69.5
CGMMV	NC001801	日本	51.1

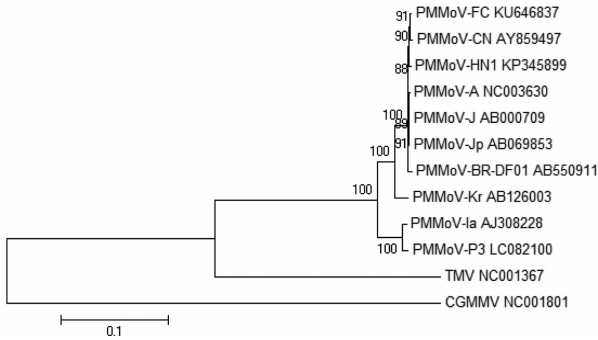


图 4 基于 PMMoV 基因核酸全序列的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of PMMoV complete genome sequences

### 3 结论与讨论

自向本春等<sup>[8]</sup>首次将新疆石河子地区辣椒上危害的病毒鉴定为辣椒轻斑驳病毒以来,近些年在我国华北地区、山东青岛、西南贵州、西北宁夏、陕西乃至台湾地区的辣椒上均发现该病毒<sup>[11-13]</sup>,可见其危害地区越来越广、危害面积也在逐步增加。辽宁省辣椒主栽品种有‘丹椒 4 号’、‘超级金塔 2 号 F1’、‘西星牛角椒 1 号’、‘津福 15 号’、‘益都红’、‘辣优 8 号’、‘鞍椒 1 号’、‘猛椒 3 号’等。本研究通过 RT-PCR 检测,可确定辽宁省丹东市凤城大梨树村采集到辣椒病叶为 PMMoV 所致,带毒样品为‘津福 15 号’,在辽宁地区属于主栽品种之一,具有代表性。本研究通过同源性分析以及系统进化树分析明确 PMMoV-FC 与 GenBank 中 9 个国内和其他国家 PMMoV 分离物同源性很高,核苷酸同源性介于

94.3%~99.7%之间。采用聚类分析法构建系统发育进化树并明确了该分离物与国内分离物、日本分离物以及美洲分离物亲缘关系密切,而与韩国和西班牙分离物亲缘关系稍远。通过上述结果揭示 PMMoV-FC 可能与中国已报道的几种分离物,日本以及美洲分离物具有相同的进化祖先。

近年,随着国际间种子、苗木贸易往来日益频繁,各口岸出入境检疫部门不仅在引种植的辣椒上检测到 PMMoV,也从我国台湾及韩国等进境辣椒种子中检测到 PMMoV 的存在。Peng 等<sup>[14]</sup>通过对不同省份的 42 份市场上销售的辣椒酱进行检测,结果表明:辣椒酱中的 PMMoV 仍具有侵染活性, PMMoV 也会随着辣椒酱等辣椒制品的贸易进行传播。同时,Colson 等<sup>[15]</sup>的研究表明食用含有 PMMoV 的辣椒产品可导致腹泻,发热等症状。因此,应重视 PMMoV 对于辣椒生产上的危害以及对人们健康方面的潜在威胁。但 PMMoV 尚不属于我国禁止进境的检疫性有害生物,无法通过植物检疫措施阻止该病毒进入我国。PMMoV 在辽宁的发生尚不普遍,除葫芦岛市和凤城市以外,暂未在其他地区检测到 PMMoV,鉴于其潜在的危害性,对于该病毒的发生以及防控仍需进行更加深入的研究。

### 参考文献

- [1] 陈文超,戴雄泽,马艳青,等. 辣椒新品种“福湘秀丽”的选育[J]. 湖南农业科学, 2012, 32(13): 19-20.
- [2] 耿三省,陈斌,张晓芬,等. 我国辣椒品种市场需求变化趋势及育种对策[J]. 中国蔬菜, 2015(3): 1-5.
- [3] 林燕春,罗明云,林江,等. 辣椒病毒病发生规律与防治技术研究[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(9): 2142-2144.
- [4] Alonso E, Garcia-Luque I, De La Cruz A, et al. Nucleotide sequence of the genomic RNA of *Pepper mild mottle virus*, a resistance-breaking *Tobamovirus* in pepper [J]. Journal of General Virology, 1991(72): 2875-2884.
- [5] Velaseo L, Janssen D, Ruiz-Garcia L, et al. The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) isolate that overcome L3 resistance in pepper[J]. Journal of Virological Methods, 2002, 106(1): 135-140.
- [6] Ikegashira Y, Ohki T, Ichiki U, et al. An immunological system for the detection of *Pepper mild mottle virus* in soil from green pepper fields [J]. Plant Disease, 2004, 88(6): 650-656.
- [7] Greenleaf W H, Cook A A, Heyn A N J. Resistance to *Tobacco mosaic virus* in capsicum, with reference to the samsun latent strain [J]. Phytopathology, 1964, 54(11): 1367-1371.

- tative PCR assays [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 4117 - 4120.
- [27] Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(8): 4238 - 4246.
- [28] Zoetendal E G, Akkermans A D L, De Vos W M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3854 - 3859.
- [29] Nübel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(19): 5636 - 5643.
- [30] Heal O W, Anderson J M, Swift M J. Plant litter quality and decomposition: an historical overview [C] // Cadisch G, Giller K E. Driven by nature: plant litter quality and decomposition, 1997; 3 - 30.
- [31] Puget P, Drinkwater L. Short-term dynamics of root-and shoot-derived carbon from a Leguminous green manure [J]. Soil Science Society of America Journal, 2001, 65(3): 771 - 779.
- [32] Huang Xinqi, Liu Liangliang, Wen Teng, et al. Illumina MiSeq investigations on the changes of microbial community in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* infected soil during and after reductive soil disinfection [J]. Microbiological Research, 2015, 181: 33 - 42.
- [33] Rui Junpeng, Peng Jingjing, Lu Yahai. Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(14): 4879 - 4886.
- [34] Rodriguez-Kabana R, Morgan-Jones G, Chet I. Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists [J]. Plant and Soil, 1987, 100(1/3): 237 - 247.
- [35] Oka Y, Shapira N, Fine P. Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization [J]. Crop Protection, 2007, 26(10): 1556 - 1565.
- [36] Tenuta M, Lazarovits G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology, 2002, 92: 255 - 264.
- [37] Shrestha U, Ownley B H, Roskopf E N, et al. Optimization of amendment C:N ratio in anaerobic soil disinfection for control of *Sclerotium rolfsii* [C] // Proceedings of the international research conference on methyl bromide alternatives and emissions reductions. San Diego, California, 2013: 4 - 6.
- [38] Rousk J, Bååth E. Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 62(3): 258 - 267.
- [39] 朱同彬, 孟天竹, 张金波, 等. 强还原方法对退化设施蔬菜地土壤的修复 [J]. 应用生态学报, 2013, 24(9): 2619 - 2624.
- [40] Zhu Tongbin, Zhang Jinbo, Yang Wenyan, et al. Effects of organic material amendment and water content on NO, N<sub>2</sub>O, and N<sub>2</sub> emissions in a nitrate-rich vegetable soil [J]. Biology and Fertility of Soils, 2013, 49(2): 153 - 163.
- [41] Meng Tianzhu, Zhu Tongbin, Zhang Jinbo, et al. Effect of liming on sulfate transformation and sulfur gas emissions in degraded vegetable soil treated by reductive soil disinfection [J]. Journal of Environmental Sciences, 2015, 36: 112 - 120.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 58 页)

- [8] 向本春, 谢浩, 崔星明, 等. 新疆辣椒轻斑驳病毒的分离鉴定 [J]. 病毒学报, 1994, 10(3): 240 - 245.
- [9] Li Xiaodong, An Mengnan, Wu Yuanhua. First report of pepper mild mottle virus in Northeast China [J]. Plant Disease, 2016, 100(2): 541.
- [10] 李晓冬, 安梦楠, 王冠中, 等. 辣椒轻斑驳病毒辽宁分离物的鉴定及序列分析 [J]. 沈阳农业大学学报, 2016, 47(1): 29 - 34.
- [11] 谭根堂, 史联联, 尚慧兰, 等. 陕西线辣椒病毒病原检测简报 [J]. 辣椒杂志, 2003(3): 32 - 33.
- [12] 黄粤, 马荣群, 岳文辉. 应用 RT-PCR 方法检测辣椒轻斑驳病毒 [J]. 山东农业科学, 2004(5): 56 - 57.
- [13] 李兴红, 严红, 郭京泽, 等. 种传辣椒轻斑驳病毒病 DAS-ELISA 的检测 [J]. 植物保护, 2005, 31(3): 66 - 68.
- [14] Peng Jiejun, Shi Bingbin, Zheng Hongying, et al. Detection of pepper mild mottle virus in pepper sauce in China [J]. Archives of Virology, 2015, 160: 2079 - 2082.
- [15] Colson P, Richet H, Desnues C, et al. Pepper mild mottle virus, a plant virus associated with specific immune responses, fever, abdominal pains, and pruritus in humans [J]. PLoS ONE, 2010, 5(4): 1 - 12.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 63 页)

- [28] Coviella C E, Morgan D J W, Trumble J T. Interactions of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen fertilization: Effects on production of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic plants [J]. Environmental Entomology, 2000, 29(4): 781 - 787.
- [29] Coviella C E, Stipanovic R D, Trumble J T. Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen in transgenic cotton plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(367): 323 - 331.
- [30] 白树雄. 转基因抗虫玉米次生代谢物质的变化及对亚洲玉米螟寄生性天敌腰带长体茧蜂的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [31] 陆宴辉, 刘芳, 杨益众, 等. 转基因棉棉株体内主要营养物质和次生物质含量分析 [J]. 江苏农业学报, 2005, 21(2): 92 - 97.

(责任编辑: 田 喆)