

# 重庆辣椒上番茄斑萎病毒的血清学检测及分子鉴定

孙 淼<sup>1</sup>, 荆陈沉<sup>1</sup>, 楚成茹<sup>1</sup>, 吴根土<sup>1</sup>, 孙现超<sup>1</sup>, 谢 艳<sup>2</sup>, 刘 勇<sup>3</sup>,  
青 玲<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>西南大学植物保护学院, 重庆 400716; <sup>2</sup>浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310058; <sup>3</sup>湖南省植物保护研究所, 长沙 410125)

**摘 要:** 为明确重庆地区辣椒上番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 的发生情况及其外壳蛋白基因 (*cp*) 序列变异特征, 采用斑点免疫杂交法 (Dot-ELISA) 和反转录 PCR (RT-PCR) 技术对采自重庆的 298 份辣椒病毒病样品进行了检测和分子鉴定。Dot-ELISA 检测结果表明, 有 40 份辣椒样品检测到 TSWV, 检出率为 13.42%。通过电子显微镜在 TSWV 检测呈阳性的样品中观察到具包膜的球状病毒颗粒。设计扩增 TSWV *cp* 的引物, 选取 6 个 TSWV 阳性样品进行 RT-PCR 扩增, 均扩增到大小约 750 bp 的目的片段。序列分析表明, 重庆辣椒分离物 TSWV-CQ (KX611497) 与已报道的 22 个 TSWV 分离物 *cp* 基因的核苷酸相似性为 96.1% ~ 99.4%, 与已报道的 TSWV 中国分离物亲缘关系较近, 表现出明显的地理相关性。

**关键词:** 辣椒; 番茄斑萎病毒; Dot-ELISA; RT-PCR

**中图分类号:** S 641.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 03-0487-08

## Serological Detection and Molecular Identification of *Tomato spotted wilt virus* in Pepper in Chongqing

SUN Miao<sup>1</sup>, JING Chenchen<sup>1</sup>, CHU Chengru<sup>1</sup>, WU Gentu<sup>1</sup>, SUN Xianchao<sup>1</sup>, XIE Yan<sup>2</sup>, LIU Yong<sup>3</sup>,  
and QING Ling<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China; <sup>2</sup>College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; <sup>3</sup>Institute of Plant Protection, Hunan Province, Changsha 410125, China)

**Abstract:** To identify the occurrence and variation of the coat protein gene (*cp*) of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in pepper in Chongqing, a total of 298 diseased pepper samples were collected and subjected to the detection of Dot-ELISA with specific antiserum of TSWV and RT-PCR with specific primers. Results of Dot-ELISA detection revealed that 40 samples were positive with a detection ratio of 13.42%. Typical enveloped spherical particles were observed in the TSWV-positive samples through electron microscopy. Six positive samples were randomly selected and amplified by RT-PCR with primers specific

**收稿日期:** 2016 - 12 - 12; **修回日期:** 2017 - 02 - 16

**基金项目:** 重庆市社会民生科技创新专项 (cstc2016shmszx0420); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303028)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: qling@swu.edu.cn)

致谢: 感谢云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所张仲凯研究员和丁铭研究员在病毒颗粒电镜观察中给予的指导和帮助。

for the *cp* gene of TSWV, and results revealed that an approximate 750 bp fragment was obtained in each sample. Sequencing showed that *cp* gene of the isolate TSWV-CQ (KX611497) shared 96.1% to 99.4% identities with those of the other 22 previously reported TSWV isolates. Phylogenetic analysis showed that the isolate TSWV-CQ was most closely related to TSWV isolates of China and suggested that geographical selection force played a role in virus evolution.

**Keywords:** pepper; *Tomato spotted wilt virus*; Dot-ELISA; RT-PCR

番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 是布尼亚病毒科 (*Bunyaviridae*) 番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 典型成员 (Adkins, 2000; Margaria et al., 2014)。由于其危害严重, 位居世界十大重要植物病毒排名第 2 位 (Scholthof et al., 2011)。TSWV 通过蓟马传播, 可在蓟马体内复制增殖 (Ullman et al., 2005)。TSWV 的寄主范围广泛, 可侵染包括烟草、大豆、番茄、花生、辣椒、莴苣、菊花和凤仙花等 82 科 1 000 多种植物 (Parrella & Marchoux, 2003; Timmerman-Vaughan et al., 2014), 已在亚洲、美洲、非洲和欧洲等多个国家和地区造成不同程度的危害 (Soler et al., 2003; Massumi et al., 2007; Sivparsad & Gubba, 2011; Lian et al., 2013; French et al., 2016; Zhang et al., 2016)。

近年来在对重庆辣椒病毒病开展调查时发现部分辣椒产区有疑似受 TSWV 侵染的症状。为确定重庆辣椒产区是否受 TSWV 危害, 本研究利用 TSWV 的特异性血清和引物, 采用斑点免疫杂交法 (Dot-ELISA) 和反转录 PCR (RT-PCR) 技术, 对采自重庆市 14 个区县的 298 份辣椒病毒病样品进行了检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2013—2015 年分别从重庆市北碚、巫山、巫溪、万州、彭水、武隆、永川、合川、涪陵、秀山、铜梁、石柱、九龙坡和丰都等 14 个区县采集了共 298 份辣椒病毒病叶片样本, 于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

TSWV 的单克隆抗体由浙江大学生物技术研究所周雪平教授惠赠。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  菌株为西南大学植物病毒实验室保存。

根据 GenBank 中已登录的 TSWV 分离物 Pujol1TL3 的核苷酸序列 (KP008131), 利用 DNAMAN 软件设计扩增 *cp* 基因的引物 TSWV-CPo-F: 5'-ATGTCTAAGGTTAAGCTCACTA-3' 和 TSWV-CPo-R: 5'-AGCAAGTTCTGCGAGTTTTGC-3'。扩增目的片段大小 777 bp。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

### 1.2 Dot-ELISA 检测及病毒粒体电子显微镜观察

Dot-ELISA 检测参考郭思瑶等 (2015) 报道的方法。以健康的辣椒叶片作为阴性对照, 以云南省农业科学院生物技术研究所丁铭研究员提供的受 TSWV 侵染的辣椒叶片作为阳性对照。参照郑宽瑜等 (2015) 报道的方法, 对 Dot-ELISA 检测呈阳性的样品叶片组织进行电镜观察。

### 1.3 病毒总 RNA 的提取与 RT-PCR 扩增

参照郭思瑶等 (2015) 报道的方法提取总 RNA, 于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

参照郭思瑶等 (2015) 报道的方法对提取的总 RNA 进行反转录, 以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为:  $2\times$  Taq PCR MasterMIX (含 Taq DNA Polymerase  $0.05\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , dNTPs  $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $12.5\ \mu\text{L}$ , 上游引物 ( $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $1\ \mu\text{L}$ , 下游引物 ( $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $1\ \mu\text{L}$ , cDNA  $1\ \mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至  $25\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序:  $94\ ^\circ\text{C}$  预变性 3 min,  $94\ ^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $50\ ^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72\ ^\circ\text{C}$  延伸 1 min, 循环 35 次,  $72\ ^\circ\text{C}$  延伸 10 min。取  $5\ \mu\text{L}$  PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.4 克隆、测序与序列分析

上述 PCR 产物纯化后克隆至 pGEM-T 载体, 经菌液鉴定后委托华大基因科技有限公司进行序列测定。利用 DNASTar 软件 (Burland, 2000) 对所获得的基因序列进行处理, 利用 BLAST 程序进行序列相似性搜索, 并用 DNASTar MegAlign 程序的 Clustal W 方法与 GenBank 已登录的病毒核苷酸序列进行多序列比较分析, 采用 MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011) 的邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建进化树, 重复次数设置为 1 000 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 Dot-ELISA 检测及电镜观察结果

利用 TSWV 的特异性血清对 298 份辣椒病毒病样品进行了 Dot-ELISA 检测, 结果显示有 40 份样品检测呈阳性 (表 1, 图 1), 检出率为 13.42%。阳性样品表现皱缩、黄化、褪绿环斑、同心环纹和枯斑等症状 (图 2), 将 Dot-ELISA 检测呈阳性的辣椒样品进行电镜观察, 在病样叶片组织汁液中发现具有包膜的球形病毒颗粒 (图 3)。

采自北碚、巫山、彭水、永川、涪陵、铜梁、石柱、九龙坡和丰都共 9 个区县的辣椒样品检测到 TSWV, 其中彭水、铜梁、丰都和石柱的检出率较高, 均高于 20.0%。铜梁检出率最高, 为 27.27%; 巫山、北碚、永川、涪陵和九龙坡的检出率在 11.11% ~ 15.0% 之间。武隆、万州、巫溪、秀山和合川 5 个区县未检测到 TSWV。检测结果表明 TSWV 在重庆地区辣椒作物上发生已经较为普遍。

表 1 重庆各地区辣椒样品 TSWV 的 Dot-ELISA 检测结果  
Table 1 Detection of TSWV in peppers from different districts in Chongqing by Dot-ELISA

地区 District	样本数 Number of sample	阳性样本数 Number of positive sample	阳性检出率/% Percentages of positive sample
北碚 Beibei	44	5	11.36
巫溪 Wuxi	21	0	0
巫山 Wushan	9	1	11.11
万州 Wanzhou	11	0	0
彭水 Pengshui	25	5	20.00
武隆 Wulong	7	0	0
永川 Yongchuan	22	3	13.64
合川 Hechuan	10	0	0
涪陵 Fuling	20	3	15.00
秀山 Xiushan	7	0	0
铜梁 Tongliang	11	3	27.27
九龙坡 Jiulongpo	50	6	12.00
丰都 Fengdu	16	4	25.00
石柱 Shizhu	45	10	22.22
合计 Total	298	40	13.42

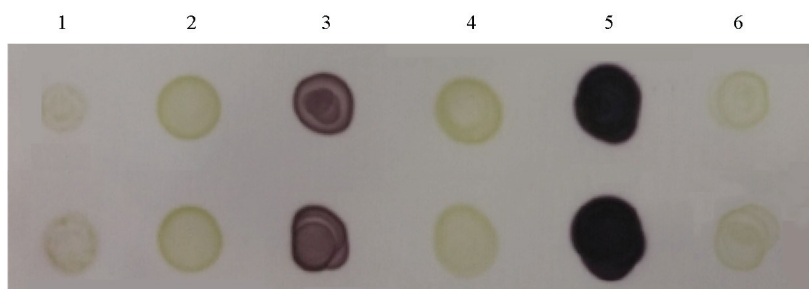


图1 部分辣椒样品 TSWV 的 Dot-ELISA 检测

1~4: 辣椒样品; 5: 阳性对照; 6: 阴性对照。

Fig. 1 Detection of TSWV in pepper by Dot-ELISA

1 - 4: Diseased pepper samples; 5: Positive control; 6: Negative control.



图2 辣椒叶片症状

Fig. 2 Symptoms of the infected pepper leaves

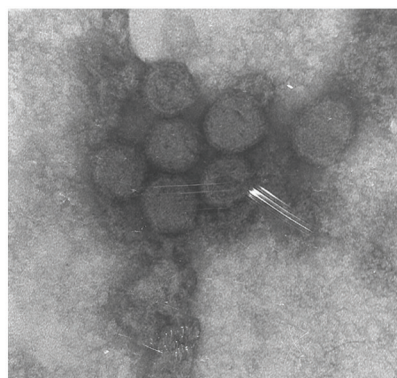


图3 辣椒病叶中的病毒粒子电镜照片

Fig. 3 The viral particles observed in the leaves of infected pepper by electron microscope

## 2.2 RT-PCR 鉴定结果

挑选了 6 份 Dot-ELISA 检测呈阳性的辣椒样品进行了针对 TSWV 的 RT-PCR 鉴定, 结果显示, 2 份采自丰都 (编号 FD8、FD11)、1 份采自石柱 (SZ3)、2 份采自铜梁 (TL3、TL8) 和 1 份采自北碚 (DY9) 的共 6 份辣椒样品均能扩增出大小约 750 bp 的特异性片段, 而阴性对照没有扩增出任何条带 (图 4)。

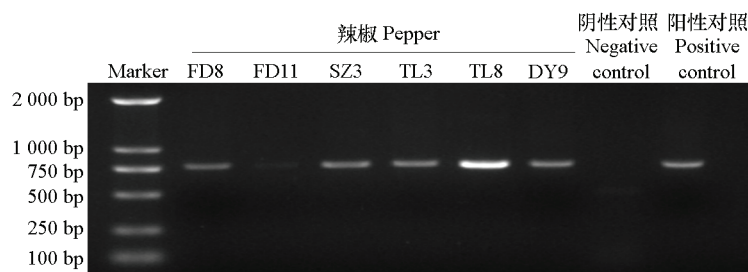


图4 辣椒样品 TSWV 的 RT-PCR 检测

Fig. 4 Detection of TSWV in pepper by RT-PCR

## 2.3 TSWV-CQ 的 cp 基因序列比对及分析

随机挑选了 RT-PCR 扩增呈阳性的样品 (TSWV-CQ) 进行基因克隆与测序, 结果显示, 扩增到

的序列片段全长 777 bp (KX611497), 可编码 258 个氨基酸。BLAST 结果表明, 该序列与 TSWV 核苷酸序列有较高的相似性。将 TSWV-CQ 与 GenBank 中 9 个 TSWV 中国分离物和 13 个 TSWV 国外分离物的 *cp* 基因进行了核苷酸序列和其编码氨基酸序列比较, 核苷酸相似性在 99.4% (与中国莴苣分离物 XP-Lettuce, KP330473) ~ 96.1% (与巴西辣椒分离物 Br20RB, DQ915947); 编码的氨基酸相似性在 99.2% (与中国番茄分离物 CX1, KP637174) ~ 96.9% (与巴西辣椒分离物 Br20RB, DQ915947)。

## 2.4 TSWV-CQ 的 *cp* 基因系统进化树分析

将 TSWV-CQ 的 *cp* 基因序列与其他 22 个 TSWV 分离物 *cp* 基因序列构建系统进化树 (图 5)。结果表明, TSWV 各分离物聚为 3 个不同分支, 7 个欧洲国家分离物和新西兰分离物聚为一支 (Group I); 3 个美国分离物和巴西分离物聚为一支 (Group II); TSWV-CQ 与 9 个中国分离物和韩国分离物聚为一支 (Group III), 表现出明显的地理相关性。

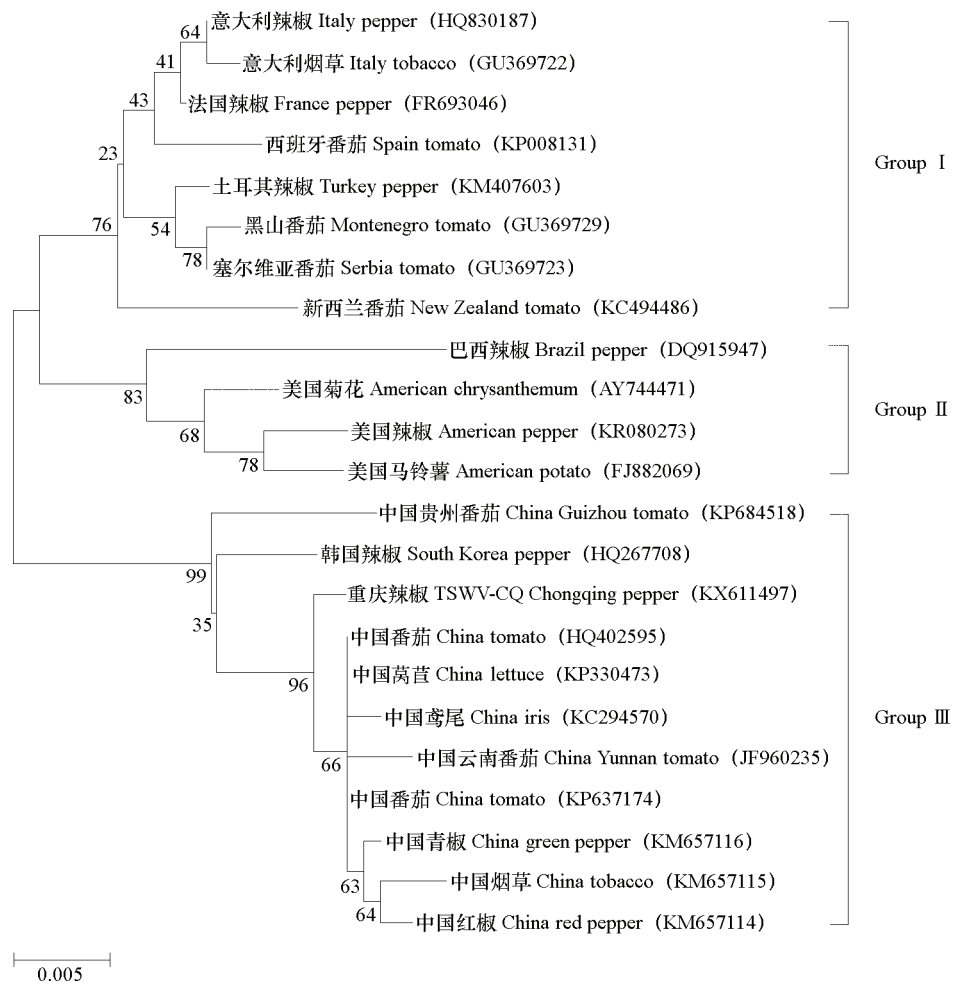


图 5 基于 TSWV-CQ 与其他 TSWV 分离物 *cp* 基因的系统进化树  
Fig. 5 Phylogenetic tree based on the *cp* gene of TSWV-CQ and other isolates of TSWV

### 3 讨论

近年来, TSWV 已在多个国家的经济作物上引起重大损失 (Adkins, 2000; Riley et al., 2011; Scholthof et al., 2011)。1989 年中国首次报道 TSWV 危害花生 (许泽永 等, 1989), 因其具有广泛的寄主范围和地理分布, 现已在四川、贵州、云南、广西、广东、北京、宁夏和天津等地区相继发生, 对烟草、莴苣、番茄、马铃薯和辣椒等多种作物造成危害, 并呈进一步扩散的趋势 (姚革, 1992; 张仲凯 等, 2000, 2004; 丁铭 等, 2004; 刘勇 等, 2010; 李飞 等, 2012; 蒙姣荣 等, 2012; 任锡毅 等, 2014; 郑宽瑜 等, 2015; 曹金强 等, 2016; 高苇 等, 2016)。重庆是中国辣椒的主产区和消费区, 近年来辣椒病毒病危害严重。已报道危害重庆辣椒的主要病毒包括黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)、番茄花叶病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV)、芜菁花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV) 和蚕豆萎蔫病毒 2 号 (*Broad bean wilt virus 2*, BBWV-2) (雷蕾 等, 2001; 林清 等, 2001; 郭思瑶 等, 2015), 目前还未见 TSWV 侵染重庆辣椒的报道。但本实验室在开展重庆烟草病毒病普查的过程中, 在丰都烟草上已发现 TSWV 的危害 (刘陈晨 等, 2013)。为明确重庆辣椒是否受 TSWV 侵染, 对采自重庆 14 个区县的 298 份样品进行了针对 TSWV 的血清学检测, 并随机挑选了 6 份 Dot-ELISA 检测呈阳性的辣椒样品进行了针对 TSWV 的 RT-PCR 检测, 两种检测方法一致证实 TSWV 已经在重庆辣椒作物上引起危害。值得关注的是, 石柱县是重庆市最重要的辣椒种植区, 年种植面积达 2 万  $\text{hm}^2$  (黄任中 等, 2015)。本研究在采自石柱的样品中已检出 TSWV, 一旦 TSWV 在该地区暴发成灾, 后果严重。由于 TSWV 主要通过蓟马传播, 包括西花蓟马 (*Frankliniella occidentalis*)、花蓟马 (*F. bispinosa*) 和棕榈蓟马 (*Thrips palmi*) 等 9 种蓟马, 且以西花蓟马为主 (Riley et al., 2011)。重庆地区辣椒上虽暂无蓟马发生危害的报道, 但有报道桑蓟马 (*Pseudocden drothripsmori*) 和茶黄蓟马 (*Scirtothrips dorsalis*) 对桑树和何首乌等植物造成危害 (张应 等, 2011; 余茂德和赵爱春, 2016)。因此加强对传毒介体蓟马的监测与控制是有效防控 TSWV 发生流行的关键措施, 对保障重庆辣椒产业健康发展具有重要意义。

TSWV-CQ 与中国 TSWV 分离物和国外 TSWV 分离物的同源性比较结果表明, TSWV-CQ 与 GenBank 已报道的 9 个中国 TSWV 分离物 *cp* 基因核苷酸序列相似性介于 98.5% ~ 99.4% 之间, 编码的氨基酸序列相似性在 97.7% ~ 99.2% 之间, 均高于与国外 TSWV 分离物的相似性。系统进化树分析结果表明, TSWV-CQ 与中国 TSWV 各分离物亲缘关系较近, 与国外 TSWV 分离物亲缘关系较远, 具有明显的地理相关性, 这与 French 等 (2016) 的报道相一致, 表明 TSWV-CQ 与各亚洲分离物可能具有相同的进化来源。

### References

- Adkins S. 2000. Tomato spotted wilt virus - positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology*, 1 (3): 151 - 157.
- Burland T G. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology*, 132: 71 - 91.
- Cao Jin-qiang, Xie Xue-wen, Chai A-li, Li Bao-ju. 2016. Identification and control of *Tomato spotted wilt virus* in Ningxia. *China Vegetables*, (4): 87 - 89. (in Chinese)
- 曹金强, 谢学文, 柴阿丽, 李宝聚. 2016. 番茄斑萎病毒病在宁夏的发现与防治. *中国蔬菜*, (4): 87 - 89.
- Ding Ming, Zhang Li-zhen, Fang Qi, Li Ting-ting, Su Xiao-xia, Li Zhan. 2004. Identification, purification and antiserum preparation of *Tospovirus* isolate affecting potato. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 17 (Supplement): 160 - 162. (in Chinese)
- 丁 铭, 张丽珍, 方 琦, 李婷婷, 苏晓霞, 李 展. 2004. 侵染马铃薯的一个 *Tospovirus* 混合分离物的鉴定、纯化及多抗血清制备. 西

- 南农业学报, 17 (增刊): 160 - 162.
- French J M, Goldberg N P, Randall J J, Hanson S F. 2016. New Mexico and the southwestern US are affected by a unique population of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) strains. *Archives of Virology*, 161: 993 - 998.
- Gao Wei, Wang Yong, Zhang Chun-xiang, Zhang An-sheng, Zhu Xiao-ping. 2016. Investigation and pathogen preliminary identification of pepper virus disease in Tianjin. *Shandong Agricultural Sciences*, 48 (3): 91 - 94. (in Chinese)
- 高 苇, 王 勇, 张春祥, 张安盛, 竺晓平. 2016. 天津地区辣椒病毒病调查及毒源种类初步鉴定. *山东农业科学*, 48 (3): 91 - 94.
- Guo Si-yao, Tong Yan, Huang Ya, Luo Xin-fu, Qing Ling. 2015. Preliminary identification and analyses of viruses causing pepper virus disease in Chongqing, China. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (2): 263 - 270. (in Chinese)
- 郭思瑶, 童 艳, 黄 娅, 罗信福, 青 玲. 2015. 重庆辣椒病毒病原初步鉴定和分析. *园艺学报*, 42 (2): 263 - 270.
- Huang Ren-zhong, Ge Wen-dong, He Ye, Huang Qi-zhong, Zhe Wen-jun, Liu Xiao-bo, Wu Zhao-long. 2015. The effectiveness of planting disaster insurance in Chongqing Shizhu. *China Vegetables*, 1 (10): 10 - 12. (in Chinese)
- 黄任中, 葛文东, 何 叶, 黄启中, 柘文君, 刘晓波, 吴朝龙. 2015. 重庆石柱辣椒种植灾害保险的实施效果. *中国蔬菜*, 1 (10): 10 - 12.
- Lei Lei, Lin Qing, Lü Zhong-hua, Huang Ren-zhong, Huang Qi-zhong, Shi Si-ru. 2001. The species identification and strain ascertainment of pepper virus in Chongqing. *Southwest Gardening*, 29 (2): 28 - 29. (in Chinese)
- 雷 蕾, 林 清, 吕中华, 黄任中, 黄启中, 史思茹. 2001. 重庆市辣椒病毒原种类鉴定及株系确认. *西南园艺*, 29 (2): 28 - 29.
- Li Fei, Wu Qing-jun, Xu Bao-yun, Xie Wen, Wang Shao-li, Zhang You-jun. 2012. *Tomato spotted wilt virus* was identified in Beijing. *Plant Protection*, 38 (6): 186 - 188. (in Chinese)
- 李 飞, 吴青君, 徐宝云, 谢 文, 王少丽, 张友军. 2012. 北京地区发现番茄斑萎病毒. *植物保护*, 38 (6): 186 - 188.
- Lian S, Lee J S, Cho W K, Yu J, Kim M K, Choi H S, Kim K H. 2013. Phylogenetic and recombination analysis of *Tomato spotted wilt virus*. *PLoS ONE*, 8 (5): e63380.
- Lin Qing, Lü Zhong-hua, Huang Ren-zhong, Huang Qi-zhong, Lei Lei, Shi Si-ru. 2001. The identification of TMV and CMV in pepper of Chongqing. *China Vegetables*, (3): 13 - 15. (in Chinese)
- 林 清, 吕中华, 黄任中, 黄启中, 雷 蕾, 史思茹. 2001. 重庆市辣椒 TMV 和 CMV 的鉴定. *中国蔬菜*, (3): 13 - 15.
- Liu Chen-chen, Sun Miao, Yu Guan-hua, Qing Ling. 2013. The ELISA detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) infecting tobacco in Chongqing//Proceedings of the Eleventh National Congress and the 2013 Academic Annual Meeting of China Society of Plant Protection. Beijing: China Agricultural Science and Technology Publishing House: 401. (in Chinese)
- 刘陈晨, 孙 淼, 余冠华, 青 玲. 2013. 侵染重庆烟草的番茄斑萎病毒的 ELISA 检测//中国植物保护学会第十一次全国会员代表大会暨 2013 年学术年会论文集, 北京: 中国农业科学技术出版社: 401.
- Liu Yong, Li Yuan-yuan, Wu Zhu-yan, Rao Xue-qin. 2010. Identification of *Tospovirus* on pepper in Guangzhou. *Acta Phytopythologica Sinica*, 37 (4): 383 - 384. (in Chinese)
- 刘 勇, 李媛媛, 吴竹妍, 饶雪琴. 2010. 广州辣椒上番茄斑萎病毒属病毒的鉴定. *植物保护学报*, 37 (4): 383 - 384.
- Margaria P, Bosco L, Vallino M, Ciuffo M, Mautino G C, Tavella L, Turina M. 2014. The NSs protein of *Tomato spotted wilt virus* is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Virology*, 88 (10): 5788 - 5802.
- Massumi H, Samei A, Pour A H, Shaabani M, Rahimian H. 2007. Occurrence, distribution and relative incidence of seven viruses infecting greenhouse-grown cucurbits in Iran. *Plant Disease*, 91 (2): 159 - 163.
- Meng Jiao-rong, Zhao Jia-xin, Cai Qi, Zou Cheng-wu, Li Zhan-biao, Liao Yong-mei, Chen Bao-shan. 2012. The investigation of virus affecting occurrence and pathogen identification in tobacco in Guangxi. *Guangxi Plant Protection*, 25 (4): 1 - 2. (in Chinese)
- 蒙皎荣, 赵家新, 蔡 琦, 邹承武, 李战彪, 廖咏梅, 陈保善. 2012. 广西烟草病毒病发生情况调查和病原病毒的鉴定. *广西植保*, 25 (4): 1 - 2.
- Parrella G, Marchoux G. 2003. An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Plant Pathology*, 85 (4): 227 - 264.
- Ren Xi-yi, Liu Yong-xiang, Tan Yu-mei, Sun Cheng-long, Huang Yong-hui, Liu Zuo-yi. 2014. Distribution characteristics of main tobacco virus disease in Guizhou. *Guizhou Agricultural Sciences*, 42 (5): 117 - 120. (in Chinese)
- 任锡毅, 刘永翔, 谭玉梅, 孙成龙, 黄永会, 刘作易. 2014. 贵州烟草病毒病的主要种类及分布特点. *贵州农业科学*, 42 (5): 117 - 120.

- Riley D G, Joseph S V, Srinivasan R, Diffie S. 2011. Thrips vectors of *Tospoviruses*. *Journal of Integrated Pest Management*, 1 (2): 1 - 10.
- Scholthof K G, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster G D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12 (9): 938 - 954.
- Sivparsad B, Gubba A. 2011. Evaluation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants with natural and transgenic resistance against *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolates occurring in the Republic of South Africa (RSA). *African Journal of Agricultural Research*, 6 (13): 3013 - 3020.
- Soler S, Cebolla-Cornejo J, Nuez F. 2003. Control of diseases induced by *Tospoviruses* in tomato: an update of the genetic approach. *Phytopathologia Mediterranea*, 42 (3): 207 - 219.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731 - 2739.
- Timmerman-Vaughan G M, Lister R, Cooper R, Tang J. 2014. Phylogenetic analysis of New Zealand *Tomato spotted wilt virus* isolates suggests likely incursion history scenarios and mechanisms for population evolution. *Archives of Virology*, 159 (5): 993 - 1003.
- Ullman D E, Whitfield A E, German T L. 2005. Thrips and Tospoviruses come of age: mapping determinants of insect transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (14): 4931 - 4932.
- Xu Ze-yong, Zhang Zong-yi, Chen Jin-xiang. 1989. Biological properties of a Guangdong isolate of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Acta Phytopathologica Sinica*, (4): 198 - 198. (in Chinese)
- 许泽永, 张宗义, 陈金香. 1989. 番茄斑萎病毒 (TSWV) 广州分离物生物学特性研究. *植物病理学报*, (4): 198 - 198.
- Yao Ge. 1992. *Tomato spotted wilt virus* was identified in tobacco in Sichuan. *Tobacco Science & Technology*, (6): 2 - 4. (in Chinese)
- 姚 革. 1992. 四川晒烟上发现番茄斑萎病毒. *烟草科技*, (6): 2 - 4.
- Yu Mao-de, Zhao Ai-chun, 2016. Control of pests and diseases of mulberry in summer in Chongqing. *Newsletter of Sericultural Science*, 36 (2): 18. (in Chinese)
- 余茂德, 赵爱春. 2016. 重庆市夏季桑树主要病虫害防治技术要点. *蚕学通讯*, 36 (2): 18.
- Zhang Ying, Mo Rang-yu, Li Long-yun, Qu Xian-you. 2011. Occurrence and control of new pest of *Polygonum multiflorum* - *Scirtothrips dorsalis*. *Plant Doctor*, 24 (2): 28 - 29. (in Chinese)
- 张 应, 莫让瑜, 李隆云, 瞿显友. 2011. 何首乌新害虫——茶黄蓟马发生规律及防治方法. *植物医生*, 24 (2): 28 - 29.
- Zhang Zhen-jia, Wang De-ya, Yu Cheng-ming, Wang Zeng-hui, Dong Jia-hong, Shi Ke-rong, Yuan Xue-feng. 2016. Identification of three new isolates of *Tomato spotted wilt virus* from different hosts in China: molecular diversity, phylogenetic and recombination analyses. *Virology Journal*, 13 (1): 1 - 12.
- Zhang Zhong-kai, Ding Ming, Fang Qi, Zhang Li-zhen, Li Ting-ting, Peng Lu-bo, Su Xiao-xia, Li Zhan. 2004. The preliminary study of the occurrence and distribution of *Tospovirus* in Yunnan. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 17 (Supplement): 163 - 168. (in Chinese)
- 张仲凯, 丁 铭, 方 琦, 张丽珍, 李婷婷, 彭潞波, 苏晓霞, 李 展. 2004. 番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 病毒在云南的发生分布研究初报. *西南农业学报*, 17 (增刊): 163 - 168.
- Zhang Zhong-kai, Fang Qi, Ding Ming, Peng Lu-bo, Zhang Li-zhen. 2000. The electron microscope identification of *Tomato spotted wilt virus* in tobacco. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 19 (3): 339 - 340. (in Chinese)
- 张仲凯, 方 琦, 丁 铭, 彭潞波, 张丽珍. 2000. 侵染烟草的番茄斑萎病毒 (TSWV) 电镜诊断鉴定. *电子显微学报*, 19 (3): 339 - 340.
- Zheng Kuan-yu, Wu Kuo, Dong Jia-hong, Fang Qi, Zhang Zhong-kai. 2015. Identification and damage of *Tomato spotted wilt virus* on lettuce vegetables in Yunnan. *Plant Protection*, 41 (5): 174 - 178. (in Chinese)
- 郑宽瑜, 吴 阔, 董家红, 方 琦, 张仲凯. 2015. 番茄斑萎病毒对云南莴苣类蔬菜的侵染危害. *植物保护*, 41 (5): 174 - 178.