

# 侵染四川辣椒的番茄斑萎病毒和辣椒轻斑驳病毒的小 RNA 测序检测及鉴定

韩帅,张河庆,吴婕,李洪浩,席亚东\*

(四川省农业科学院植物保护研究所,蔬菜种质与品种创新四川省重点实验室,成都 610066)

**摘要:**调查发现四川省汶川县当地辣椒的病毒病严重且症状多样,病样粗提液摩擦接种辣椒、矮牵牛和三生烟,出现辣椒系统性花叶焦枯和茎尖坏死,指示植物表现局部枯斑。对3个不同症状的病果进行 sRNA 深度测序鉴定,发现均含有番茄斑萎病毒(Tomato spotted wilt virus, TSWV)和辣椒轻斑驳病毒(Pepper mild mottle virus, PMMoV)。通过 RT-PCR 技术进行验证,结果显示所有病样的果皮和部分新鲜种子以及回接寄主的病叶均检测到 TSWV 和 PMMoV,表明该地辣椒病毒病是由 TSWV 和 PMMoV 复合侵染引起。这是 TSWV 侵染四川辣椒的首次报道。分别基于 TSWV *N* 基因序列和 PMMoV *CP* 基因序列构建系统发育树,汶川分离物 TSWV-WC(MK468469)与贵州分离物(KP684518)亲缘关系最近, PMMoV-WC(MK408614)与北京分离物(AY859497)亲缘关系最近。推测该地辣椒病毒病可能与品种引进有关。

**关键词:**番茄斑萎病毒;辣椒轻斑驳病毒;复合侵染;深度测序

**Identification and detection of Tomato spotted wilt virus and Pepper mild mottle virus infecting peppers in Sichuan using small RNA sequencing** HAN Shuai, ZHANG He-qing, WU Jie, LI Hong-hao, XI Ya-dong\* (Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agriculture Sciences, Vegetable Germplasm Innovation and Variety Improvement Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610066, China)

**Abstract:** Pepper virus disease showing severe and multiple symptoms broken out in Wenchuan county of Sichuan province. Systemic mosaic, withered leaves and stem tip necrosis were observed in pepper and partial necrosis in *Petunia hybrida* and *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN through the method of mechanical inoculation. We found that Tomato spotted wilt virus and Pepper mild mottle virus were presented in all samples tested by small RNA deep sequencing. The two viruses were detected in all peels and some seeds of the tested samples and re-inoculation of the host followed by RT-PCR further verified that viral disease in this area was caused by co-infection of these two viruses. Pepper-infecting TSWV was reported for the first time from Sichuan region. The phylogenetic tree constructed based on TSWV *N* gene and PMMoV *CP* gene sequence respectively indicated that TSWV-WC(MK468469) was more closely related to Guizhou isolate (KP684518), whereas PMMoV-WC(MK408614) remained closest to Beijing isolate(AY859497). We supposed that outbreak of pepper virus disease in the region was related to seeds imported from other regions.

**Key words:** Tomato spotted wilt virus (TSWV); Pepper mild mottle virus (PMMoV); co-infection; deep sequencing

收稿日期: 2019-04-12; 修回日期: 2019-06-24; 网络出版时间: 2019-06-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20190625.1545.001.html>

基金项目: 四川蔬菜花卉种质创新与产业提升关键技术研发专项(2017CYTS-018); 四川省科技计划项目(2016NYZ0053); 四川省科技支撑计划(2016-XT00-00003-NC); 国家重点研发计划(2018YFD0201200)

通讯作者: 席亚东, 副研究员, 主要从事植物病理学研究; E-mail: Xiyadong2002@126.com

第一作者: 韩帅, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事植物病理学研究; E-mail: Shuaihan24@163.com。

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2020)02-0147-08

辣椒是四川省的重要经济作物。随着种植面积的不扩大,受田间管理水平限制,连作栽培模式和引种不当的影响,四川辣椒病毒病发生严重,直接威胁四川辣椒产业的健康发展。

据报道,世界范围内有 68 种病毒能侵染辣椒,其中约 20 种病毒可引起严重症状,主要包括烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)、马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)、黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*)、番茄斑萎病毒属(*Orthospovirus*)等 RNA 病毒和菜豆金黄花叶病毒属(*Begomovirus*) DNA 病毒<sup>[1]</sup>。侵染我国辣椒的病毒有 24 种,主要有黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus, CMV*)和烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus, TMV*)<sup>[2,3]</sup>。研究发现辣椒轻斑驳病毒(*Pepper mild mottle virus, PMMoV*)、烟草轻绿花叶病毒(*Tobacco mild green mosaic virus, TMGMV*)逐渐成为我国部分辣椒主产区的重要病毒毒源,Zheng 等<sup>[4]</sup>对贵州辣椒主产区病样进行血清学检测,Yao 等<sup>[5]</sup>对广东、海南北运辣椒生产基地的病样进行分子检测,均发现 PMMoV 的检出率仅次于 CMV;Peng 等<sup>[6]</sup>采集 10 省疑似病毒病的辣椒病样,发现 PMMoV 检出率最高(100%),其次为 TMGMV(61.90%),TMV 和 CMV 的检出率仅为 23.81%和 30.95%。番茄斑萎病毒(*Tomato spotted wilt virus, TSWV*)是农业生产中极为重要的植物病毒,能侵染番茄、莴苣、烟草、辣椒等重要经济作物,危害十分严重<sup>[7]</sup>。番茄斑萎病毒最早在我国四川和广东发现且蔓延迅速,主要为害番茄和莴笋<sup>[8-15]</sup>。该病毒侵染辣椒的情况在云南、重庆和广东也有陆续报道<sup>[16-18]</sup>。

2017 年 9 月,对四川省汶川县进行辣椒病害调查,发现辣椒病毒病发生严重,病害症状多样。本文通过小 RNA 测序技术和 RT-PCR 方法对侵染四川辣椒的主要病毒种类进行鉴定,以期对四川省辣椒病毒病的综合防控提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病害调查和病样采集

2017 年 9 月在四川省汶川县绵虎镇进行辣椒病毒病调查,采集辣椒果实病样。

### 1.2 病毒分离物的摩擦接种

将病样混合后放入预冷的研钵中,加入适量的 PBS 缓冲液,充分研磨至糊状;将石英砂均匀撒在辣椒(香辣二荆条)、矮牵牛及三生烟的叶片上,蘸取适量研磨汁液采用机械摩擦的方式进行人工接种,每株接种两片叶,以接种 PBS 缓冲液为对照,将接种植株放置 25℃~28℃ 的防虫温室中培养。

### 1.3 辣椒病果 sRNA 深度测序与分析

将 3 个不同症状类型的病样送北京百迈克生物科技有限公司进行小 RNA 测序分析。采用 EASYspin 植物 microRNA 提取试剂盒提取辣椒病果的总 RNA,测定其浓度、纯度和完整性。使用 small RNA Sample Pre Kit 构建文库,使用 Qubit2.0 进行初步定量,利用 Agilent 2100 对文库的 insert size 进行检测,最后使用 Q PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量。库检合格的小 RNA 文库进行 Illumina HiSeq 高通量测序。获得的 raw reads 经低质量过滤、接头过滤及去除冗余序列,获得 clean reads;利用 Bowtie 软件,将 clean reads 与 Silva、GtRNAdb、Rfam 和 Rепbase 数据库进行序列比对,除去无用序列获得 sRNA 注释信息,使用 velvet 软件进行组装,获得有效 contigs,与 GenBank Virus RefSeq 核酸数据库和 GenBank Virus RefSeq 蛋白数据库比对,鉴定病毒种类。

### 1.4 病毒分离物的 RT-PCR 验证

为了进一步验证序列拼接和注释的准确性以及回接植株带毒情况,根据 sRNA 深度测序获得的 contigs 设计两对特异性引物(表 1),分别扩增 TSWV 的核壳体蛋白基因(nucleocapsid protein gene, *N*)和 PMMoV 的外壳蛋白基因(coat protein gene, *CP*)。使用索莱宝 RNA 提取试剂盒提取辣椒病果果皮(编号为 P1、P2 和 P3)、种子(编号为 S1、S2 和 S3)和回接植株病叶的总 RNA,以总 RNA 为模板合成 cDNA,方法参照擎科反转录试剂盒说明书。以合成的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,25 μL PCR 反应体系:2×T5 Super PCR Mix 12.5 μL、正向引物和反向引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 1 μL、模板 DNA(约 30~50 ng·μL<sup>-1</sup>)0.5 μL、ddH<sub>2</sub>O 10 μL。PCR 扩增条件为:95℃预变性 5 min;

Table 1 Specific primers used for RT-PCR

Primer name	Sequence(5'-3')	Amplificon length/bp
TSWV-NF	TTAAGCAAGTTCTGCAAGTT	777
TSWV-NR	CATGTCTAAGGTTAAGCTCAC	
PMMoV-CPF	CGCCGAGTCTTCTTCGTTTTA	509
PMMoV-CPR	TGCCATCATGTTTAAGGAGTTG	

95℃变性 10 s, 55℃退火 10 s, 72℃延伸 10 s, 共 30 个循环;最后 72℃延伸 5 min, 4℃保存。

### 1.5 基因序列分析

将 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化和测序。将测序结果与 GenBank 中已知相关病毒的序列进行 Blast 比对,选取国内外 23 个具有代表性的 TSWV 分离物的核苷酸序列和 21 个 PMMoV 分离物的核苷酸序列,使用 MEGA 7.0 软件以邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树,经 Bootstrap 1 000 次循环检验进化树的可靠性。

## 2 结果与分析

### 2.1 田间发病情况和病害症状

对 5 块辣椒田进行病毒病的调查,其中 3 块地

全田发病,种植的辣椒品种为“京硕中国龙”,类型为牛角椒,病叶的典型症状为褪绿明脉、皱缩畸形,叶缘向上卷曲,有的叶片脉间叶肉向下凹陷(图 1-A)。病果有 3 种症状类型,编号为 PV1 的成熟红果表生近圆形黄色环斑(图 1-B);PV2 的症状表现为病果不均匀成熟,呈红黄绿三色斑驳(图 1-C);PV3 的症状类型主要表现在青果上,其表面产生近圆形褪绿环斑(图 1-D)。另外两块地种植的是其他品种的线椒和牛角椒,病毒病的发病率低于 20%,且症状主要表现在叶片上。

### 2.2 病毒分离物的摩擦接种

病毒分离物接种辣椒 7~9 d 后,植株系统性发病,叶片不均匀褪绿变褐,心叶畸形、焦枯(图 2-A);有的植株茎尖变黑坏死(图 2-B)。接种矮牵



Fig. 1 The field symptoms of pepper virus disease in Wenchuan

A:Leaves symptom; B:PV1 fruit symptom; C:PV2 fruit symptom; D:PV3 fruit symptom.

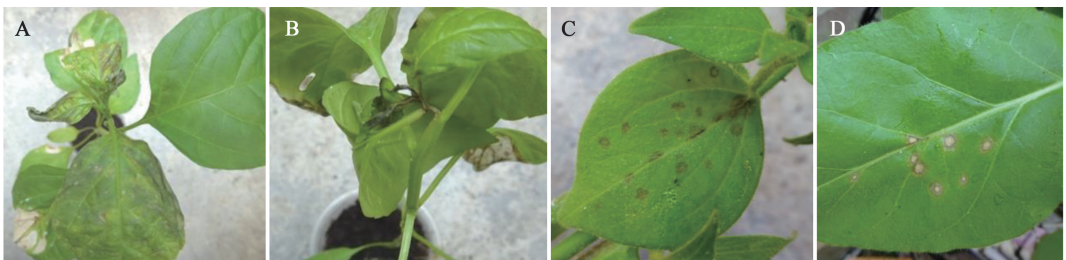


Fig. 2 The symptoms on pepper(A, B), *Petunia hybrida*(C) and *N. tabacum* cv. Samsun NN(D) after mechanical inoculation

Table 2 Sequencing data statistics and results of BLAST search against the virus reference database

Sample name	Raw reads count	Clean reads count	Contigs count	Virus contigs count
PV1	68 661 519	67 112 652	655	106
PV2	98 022 838	96 135 094	1 315	176
PV3	49 746 641	48 839 116	880	143

牛 3 d 后,发病叶片产生近圆形褐色枯斑,为局部侵染(图 2-C)。接种三生烟 3~5 d 后,接种部位产生圆形浅褐色枯斑,之后病斑边缘颜色加深,出现同心轮纹(图 2-D)。

### 2.3 sRNA 深度测序结果

sRNA 深度测序结果表明,病样经总 RNA 提取、文库构建和 Illumina HiSeq 测序获得 raw reads,得到 18-35nt 的 clean reads,使用 velvet 软件,参数 k-mer 设置为 17,对所得到的 sRNA 进行组装拼接,病样 PV1、PV2 和 PV3 分别得到 655、1 315 和 880 个 contigs(表 2)。与病毒核酸数据库比对结果显示,3 个病样中共有 425 个 contigs 能对上 7 种病毒序列,TSWV(338 contigs)最多,占比 79.53%,序列一致性为 90.62%~100.00%;其次为 PMMoV(71 contigs),占比 16.71%,序列一致性为 96.92%~100.00%,其余为 CMV(10 contigs)、番茄褪绿斑病毒(Tomato chlorotic spot virus, TCSV)(1 contig)、蛇鞭菊轻斑驳病毒(Gayfeather mild mottle virus, GMMV)(1 contig)、菊花茎部坏死病毒(Chrysanthemum stem necrosis virus, CSNV)(1 contig)和辣椒褪绿斑点病毒(Pepper chlorotic spot virus, PCSV)(1 contig)(图 3)。所有病样均含有能对上 TSWV 和 PMMoV 的 contigs, PV1 分别有 103 和 2 个, PV2 为 111 和 55 个, PV3 为 124 和 14 个(图 4)。

### 2.4 病毒分离物的 RT-PCR 验证

根据拼接序列设计 3 对特异性引物,使用 RT-PCR 方法分别检测辣椒病果果皮、种子以及病毒回接植株中的 TSWV 和 PMMoV,以验证 sRNA 深度测序的准确性、辣椒种子和回接植株携带病毒情况。使用引物 TSWV-NF/TSWV-NR 进行 PCR 检测,病样 PV1、PV2 和 PV3 的果皮和种子均能扩增到大小约为 770 bp 的片段(图 5),经测序和 Blast 比对后,汶川分离物(TSWV-WC)与 TSWV-

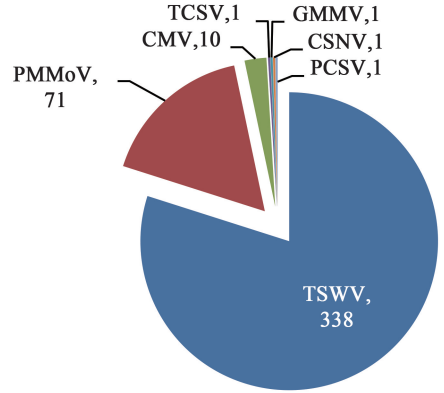


Fig. 3 Numbers of contigs assigned to respective virus identified from three different datasets

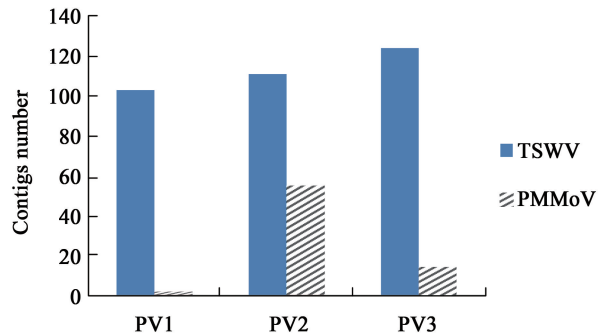


Fig. 4 Quantitative distribution of TSWV and PMMoV associated contigs from three different datasets

14YV677(KP684518)的序列一致性为 99.1%。使用引物 PMMoV-CPF/ PMMoV-CPR 进行 PCR 检测,3 个病样的果皮以及 PV2 的种子均扩增到大小约为 500 bp 片段(图 5),经测序和 Blast 比对后,汶川分离物(PMMoV-WC)与 PMMoV-AH(MG437273)的序列一致性为 99.8%。这与 sRNA 深度测序获得的相应 contigs 序列完全一致,表明该技术准确可靠。将序列提交至 GenBank,获得登

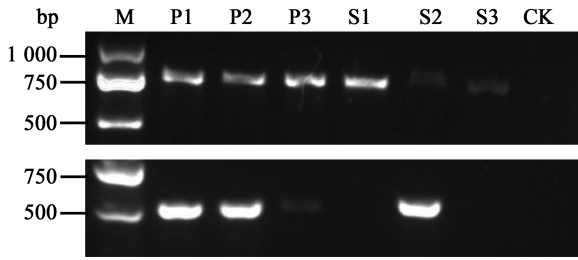


Fig. 5 RT-PCR detection results of TSWV and PMMoV in diseased pepper from Wenchuan

M: 2 000 bp marker; P1-P3: Peel of diseased pepper; S1-S3: Seed of diseased pepper; CK: Negative control.

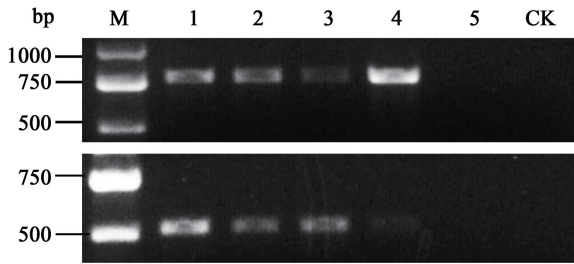


Fig. 6 RT-PCR detection results of TSWV and PMMoV in three hosts after mechanical inoculation

M: 2 000 bp marker; 1: Peel of diseased pepper (P1); 2: Diseased pepper after mechanical inoculation; 3: Diseased *Petunia hybrid* after mechanical inoculation; 4: Diseased *N. tahacum* cv. Samsun NN after mechanical inoculation; 5: Healthy pepper; CK: Negative control.

录号分别为 MK468469 和 MK408614。以上结果证明病样 PV1、PV2 和 PV3 由 TSWV 和 PMMoV 复合侵染所致。同时,回接辣椒、矮牵牛和三生烟的病叶均扩增到相应片段(图 6),表明接种辣椒病样粗提液的植株均被这 2 种病毒侵染。

## 2.5 TSWV *N* 基因和 PMMoV *CP* 基因的系统进化分析

使用 MEGA7.0 软件,采用 NJ 法构建 24 种 TSWV 分离物 *N* 基因(包括 TSWV-WC)的系统进化树显示(图 7),国外和我国台湾分离物(GU222651)聚为一簇,国内和韩国分离物(EF195230)另成一簇,其中汶川分离物 TSWV-WC 和贵州分离物(KP684518)在国内群体中自成

一支,进化关系最近。构建 22 种 PMMoV 分离物 *CP* 基因(包括 PMMoV-WC)的系统进化树结果显示(图 8),PMMoV-WC 和北京分离物(AY859497)单独聚为一簇,进化关系最近,与其他 3 个四川分离物(KP877436、KP877423 和 KP877435)亲缘关系相对较远。

## 3 讨论

PMMoV 属于烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*),受侵染辣椒叶片症状不明显或呈轻度褪绿,在果实上表现为黄绿斑驳或凹凸斑点,病果扁平、畸形;TSWV 属于番茄斑萎病毒属,受侵染辣椒叶片症状表现为变形、脉间褪绿,有黄色的同心环斑,病果的典型症状为不均匀成熟形成的环斑。在汶川采集的病果 PV1 和 PV3 症状与 TSWV 在辣椒果实上引起的症状相似,果皮上均有环斑,由于二者成熟程度不同环斑颜色也不同;而病果 PV2 的症状截然不同,呈红黄绿三色斑驳,各病样间症状差异明显,利用传统方法鉴定病毒种类难度较大。小 RNA 深度测序技术已成为检测和鉴定已知或未知病毒的重要手段。本文利用该技术对汶川辣椒病样进行测序,结果均检测到 TSWV 和 PMMoV;采用病样粗提液摩擦接种辣椒和指示植物矮牵牛、三生烟,辣椒系统性发病,矮牵牛和三生烟产生局部枯斑;通过 RT-PCR 对采集的病样以及发病植株进行检测,均扩增出相应片段,证明四川省汶川县辣椒病毒病是由 TSWV 和 PMMoV 复合侵染引起,这是 TSWV 为害四川辣椒的首次报道。

PMMoV 是典型的种传病毒,在辣椒上的种传率高达 22%~29%<sup>[19]</sup>,也可通过感病植株、病土或汁液摩擦等方式传毒<sup>[20]</sup>。该病毒的种传类型为非胚胎侵染,病毒只侵染种子表皮细胞和薄壁组织,或存在于种子表面,这使得 PMMoV 的传播效率比同属病毒 TMV 和 ToMV 更高,防治难度更大<sup>[21]</sup>。在厦门、天津等检验检疫部门使用电镜负染观察、血清学技术和 RT-PCR 技术在韩国、我国台湾的进境辣椒种子中均检测出 PMMoV<sup>[22~24]</sup>。实地调查发现病毒病发生严重的辣椒类型均为牛角椒,且种子来自于同一批次商品。本研究通过 RT-PCR,在病样果皮和新鲜种子中均检测到 PMMoV,对 PMMoV *CP* 基因进行系统发育分析,发现汶川分离物和北京分离物单独聚为一簇,进化关系最近,与四川

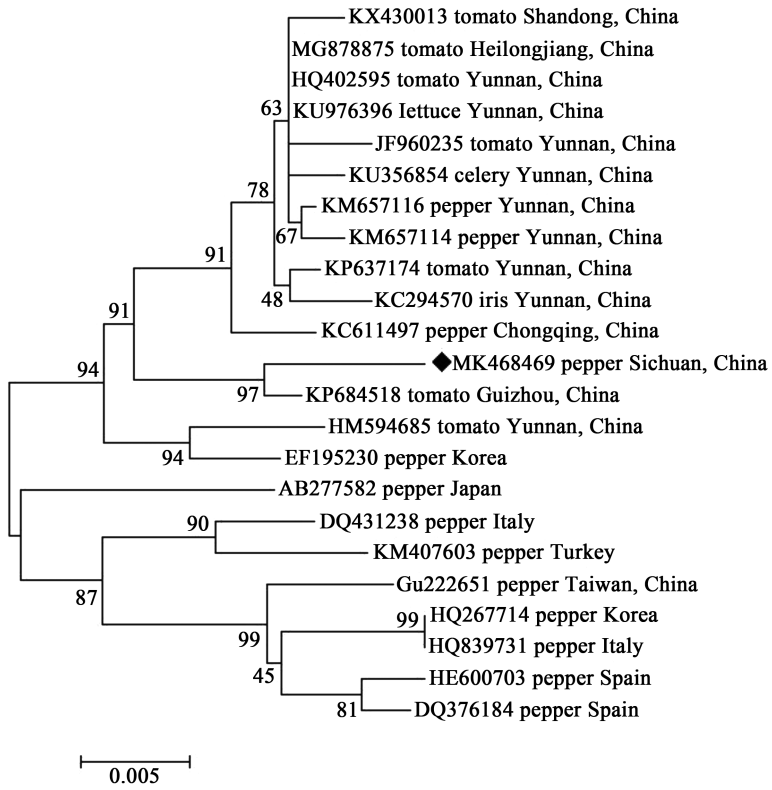


Fig. 7 Phylogenetic tree based on nucleocapsid gene sequences of TSWV

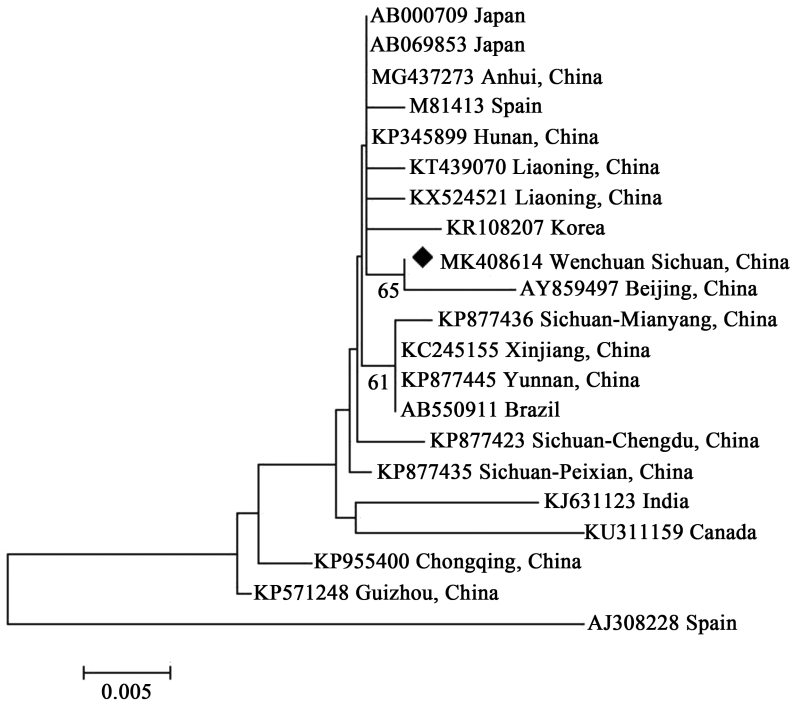


Fig. 8 Phylogenetic tree based on coat protein gene sequences of PMMoV

的 3 个分离物进化关系相对较远, 推测 PMMoV 在汶川的传播途径可能与种子引进有关。

TSWV 的传播介体主要为蓟马, 其中西花蓟马 (*Frankliniella occidentalis*) 是最主要的传播媒介<sup>[25]</sup>。TSWV 能否通过种子传播尚不清楚<sup>[7]</sup>, Pappu 等<sup>[26]</sup>认为 TSWV 在花生上不能进行种传。也有报道称, 瓜叶菊和番茄可通过种子传播, 其种子中 TSWV 的携带率高达 96%, 但种传率较低<sup>[27]</sup>。我国检验检疫部门通过 DAS-ELISA 方法和 RT-PCR 检测技术在美国进境的生菜种子<sup>[28]</sup>、土耳其进境的番茄种子<sup>[29]</sup>中截获 TSWV。本研究中, 发病植株上未发现蓟马, 通过 RT-PCR 在病果的新鲜种子中均能检测到 TSWV, 证明种子中病毒携带率较高, 但带毒种子能否传毒尚需进一步研究。

## 参考文献

- [1] Kenyon L, Kumar S, Tsai W S, *et al.* Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control [J]. *Advances in Virus Research*, 2014, 90:297-354.
- [2] Zhou X M, Wang M. Population identification of the pepper virus diseases in Guangzhong region (in Chinese) [J]. *Shaanxi Agricultural Sciences*(陕西农业科学), 1989, (3): 32-34.
- [3] Yang Y L, Yan S Z, Tian R Y, *et al.* Population and distribution research on pepper virus diseases in six provinces in China (in Chinese) [J]. *Virologica Sinica*(中国病毒学), 1995, 10(4): 332-339.
- [4] Zhen X H, Hong K, Yang L C, *et al.* Molecular identification of *Pepper mild mottle virus* isolate in Guizhou (in Chinese) [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*(贵州农业科学), 2013, 41(5): 30-32.
- [5] Yao Y R, Chen G H, Feng L X, *et al.* Molecular detection of pepper viruses in southern vegetable production bases (in Chinese) [J]. *China Vegetables*(中国蔬菜), 2013, 1(10): 84-89.
- [6] Peng J J, Shi B B, Zheng H Y, *et al.* Detection of *Pepper mild mottle virus* in pepper sauce in China [J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(8): 2079-2082.
- [7] Pappu H R, Jones R A C, Jain R K. Global status of *Tospovirus* epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead [J]. *Virus research*, 2009, 141(2): 219-236.
- [8] Su D K, Yuan X Z, Xie Y H, *et al.* *Tomato spotted wild virus* in tomato in Chengdu and Dukou (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*(植物病理学报), 1978, 17(4): 255-256.
- [9] Yao G. *Tomato spotted wild virus* (TSWV) on cigar tobacco in Sichuan (in Chinese) [J]. *Tobacco Science & Technology* (烟草科技), 1992, (6):2-4.
- [10] Xu Z Y, Zhang Z Y, Chen J X. Biological properties of a Guangzhou isolate of *Tomato spotted wild virus* (TSWV) (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*(植物病理学报), 1989, 19(4): 198.
- [11] Zhang Z K, Ting M, Fang Q, *et al.* The preliminary of the occurrence and distribution of *Tospovirus* in Yunnan (in Chinese) [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*(西南农业学报), 2004, 17(S1): 163-168.
- [12] Li F, Wu Q J, Xu B Y, *et al.* *Tomato spotted wild virus* was identified in Beijing (in Chinese) [J]. *Plant Protection*(植物保护), 2012, 38(6): 186-188.
- [13] Cao J Q, Xie X W, Cai A L, *et al.* Detection and control of *Tomato spotted wild virus* in Ningxia (in Chinese) [J]. *China Vegetables* (中国蔬菜), 2016, (4): 87-89.
- [14] Li J, Chi S Q, Yang Q M, *et al.* Identification of *Tomato spotted wild virus* disease in Shandong, China (in Chinese) [J]. *Plant Protection* (植物保护), 2017, 43(1): 228-232.
- [15] Chen D L, Li M Y, Li X M. Identification of *Tomato spotted wilt virus* from lettuce in Beijing (in Chinese) [J]. *China Vegetables*(中国蔬菜), 2018, (1): 65-69.
- [16] Zhen X, Chen Y D, Wu K, *et al.* Occurrence characteristics of *Tospoviruses* and thrips vectors on tomato and pepper of Yunnan in 2014 (in Chinese)[J]. *Journal of Southern Agriculture*(南方农业学报), 2015, 46(3): 428-432.
- [17] Sun M, Jing C C, Chu C R, *et al.* Serological detection and molecular identification of *Tomato spotted wilt virus* in pepper in Chongqing (in Chinese) [J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2017, 44(3): 487-494.

- [18] Liu Y, Li Y Y, Wu Z Y, *et al.* Identification of *Tospovirus on pepper in Guangzhou (in Chinese)* [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*(植物保护学报), 2010, 37(4): 383-384.
- [19] Zhang Z Q. The research on *Capsicum annuum* L. virus diseases (in Chinese) [D]. Changsha: Hunan Agricultural University(长沙:湖南农业大学), 2009.
- [20] Lewandowski D J. Virus taxonomy: Seventh report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses [R]. San Diego: Elsevier Academic Press, 1999: 889 - 894.
- [21] Yoshikatsu Genda, Kyoko Sato, Osamu Nunomura, *et al.* Immunolocalization of *Pepper mild mottle virus* in *Capsicum annuum* seeds [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2005, 71: 238-242.
- [22] Chen Q, Yu F P, Lin S M, *et al.* *Pepper mild mottle virus* was detected in import pepper seeds (in Chinese) [J]. *Plant Quarantine*(植物检疫), 2005, 19(5): 295-296.
- [23] Guo J Z, Liu P, Cui T J, *et al.* Identification of PM-MoV in pepper seed (in Chinese) [J]. *Inspection and Quarantine Science*(检验检疫科学), 2007, 17(6): 32-34.
- [24] Liao F R, Shen J G, Wu Y, *et al.* Detection and pathotype identification of *Pepper mild mottle virus* in sweet pepper seeds from Taiwan (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*(热带作物学报), 2011, 32(6): 1128-1135.
- [25] Mound L A. The thysanoptera vector species of tospoviruses [J]. *Acta Horticulturae*, 1996, 431: 299-309.
- [26] Pappu S S, Pappu H R, Culbreath A K, *et al.* Localization of *Tomato spotted wilt tospovirus* in peanut pod [J]. *Peanut Science*, 1999, 26(2): 98-100.
- [27] Crowley N C. Studies on the seed transmission of plant virus diseases [J]. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1957, 10(4): 449-464.
- [28] Feng L X, Wu M T, Yu C, *et al.* Detection and identification of *Tomato spotted wilt virus* in lettuce seeds from American (in Chinese) [J]. *China Plant Protection*(中国植保导刊), 2017, 37(1): 9-12.
- [29] Yu X, Feng L X, Zhang Z, *et al.* *Tomato spotted wilt virus* were first intercepted on imported tomato seeds from Turkey (in Chinese) [J]. *China Vegetables*(中国蔬菜), 2018, (11): 18-21.

责任编辑:于金枝