

不同寄主植物的烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 内共生菌 传毒相关 GroEL 蛋白的一致性

谭周进¹, 谢丙炎^{2,*}, 杨宇红², 郭建英³, 肖启明¹, 万方浩³

(¹. 湖南农业大学, 湖南 长沙 410128 ². 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081 ³. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100081)

摘要 通过对 7 种寄主植物上 B 型烟粉虱北京种群的内共生菌传毒相关 *groEL* 基因进行 PCR 扩增和测序, 结合已有的相关序列, 构建了 *groEL* 基因及其编码的 GroEL 蛋白的分子系统树。结果表明 烟粉虱内共生菌产生的 *groEL* 基因是一个非常保守的基因, 北京不同寄主植物的烟粉虱内共生菌与 Israel B 型烟粉虱内共生菌的 *groEL* 基因亲源关系非常近, 位于同一进化分支, 其编码的 GroEL 蛋白的分子系统树也基本上是一致的。不同物种的 *groEL* 基因及其编码的 GroEL 蛋白分别位于不同的分支, 说明 *groEL* 基因及其编码的 GroEL 蛋白的分子系统树可以用于分析物种间的进化关系。氨基酸序列比较表明 烟粉虱内共生菌 GroEL 具有原核 GroEL 的保守氨基酸、ATP 酶活性位点、多肽结合位点和 GroES 连接位点, 为典型的 *hsp60*。不同来源烟粉虱内共生菌 GroEL 有少数几个保守氨基酸发生了置换, 可能不是 GroEL 功能的重要位点。说明在容易变异的细菌基因组中, *groEL* 基因为了维持其正常重要的生理功能, 会通过保持功能位点的稳定性来应对不同生态因素的影响。

关键词 内共生菌 烟粉虱; GroEL 蛋白 生态功能 蛋白质一级结构

文章编号 1000-0933 (2007)06-2490-08 **中图分类号** Q968 **文献标识码** A

Similarity of GroEL sequences from endosymbionts of *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae) in different host plants

TAN Zhou-Jin¹, XIE Bing-Yan^{2,*}, YANG Yu-Hong², GUO Jian-Ying³, XIAO Qi-Ming¹, WAN Fang-Hao³

¹ Hunan Agricultural University, Changsha Hunan 410128, China

² Institute of Vegetable and Flower, China Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China

³ Institute of Plant Protection, China Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China

Acta Ecologica Sinica, 2007, 27 (6) 2490 ~ 2497.

Abstract : Endosymbionts included primary endosymbionts and secondary endosymbionts, accreting with insects. Endosymbionts evolved with insects and benefit from each other. Endosymbiont affected the insects' growth, insects' fertilizing and viral disease transmission of plants. GroEL, a 63 kDa protein encoded by the *groEL* gene of endosymbionts in *Bemisia tabaci*, played an important role in viral disease transmission by *Bemisia tabaci*. The product of the *groEL* gene was a type of viral binding protein. Viral particles that had reached the hemolymph interact with GroEL produced by endosymbionts on their way to the salivary glands and form a complex that protected virions from rapid proteolysis. Begomoviruses were transmitted solely by the whitefly *Bemisia tabaci*. Several whitefly species, such as *Trialeurodes*

基金项目 国家重点基础研究发展规划项目 (2002CB111400)

收稿日期 2006-05-23 ; **修订日期** 2006-11-28

作者简介 谭周进 (1969 ~), 男, 湖南省涟源市人, 博士, 副教授, 主要从事微生物生态学与资源微生物利用研究. E-mail : tanzhjin@yahoo.com.cn

*** 通讯作者** Corresponding author. E-mail : xiebingyan2003@yahoo.com.cn

Foundation item The project was financially supported by Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (No. 2002CB111400)

Received date 2006-05-23 ; **Accepted date** 2006-11-28

Biography TAN Zhou-Jin, Ph. D., mainly engaged in microbial ecology and resource microbes development. E-mail : tanzhjin@yahoo.com.cn

vaporariorum, were able to ingest *Bemisia tabaci*-transmissible begomoviruses but did not transmit them to plants. In order to probe into the invaded mechanism of *Bemisia tabaci*, cloning and sequencing of *groEL* of endosymbionts in *Bemisia tabaci* long-term living on different host plants in Beijing were conducted. Molecular phylogenetic trees, including *groEL* genes and GroEL proteins of endosymbionts in *Bemisia tabaci* and other bacteria, were reconstructed. The results showed that *groEL* was a very conservative gene and evolved very slowly. There was little difference among *groEL* genes from endosymbionts in different eco-types *Bemisia tabaci*. *GroEL* gene and GroEL protein from endosymbionts in different eco-types *Bemisia tabaci* belonged to the same branch. Molecular phylogenetic trees based on *groEL* and GroEL could explain phylogenetic relationships of different bacteria, but not for different eco-type species. There were identical molecular phylogenetic trees for *groEL* and GroEL. Comparison of GroEL sequences showed that : There were identical conservative amino acids, ATPase activity sites, polypeptide binding sites and GroES binding sites between GroEL of endosymbionts in *Bemisia tabaci* and other prokaryotic GroEL. GroEL of *Bemisia tabaci* endosymbionts belonged to typical *hsp60*. There were a few replacement sites in conservative amino acids of GroEL of endosymbionts in different ecological *Bemisia tabaci*. These amino acids might be unimportant functional sites. Those results explained that *groEL* varied in unimportant sites in order to fit into different ecological environment, and kept consistent in necessary functional sites in order to have necessary physiological functions. Further investigation into GroEL would provide insights into valuable ways of controlling plant viral diseases transmitted by *Bemisia tabaci*. To understand the damage mechanism of pests, it was also very important to investigate the role of the endosymbionts and GroEL.

Key words :endosymbiont ;*Bemisia tabaci* ;GroEL Protein ;ecological function ;protein primary structure

烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) (Hemiptera :Aleyrodidae) 传播的病害所造成的危害要比直接取食造成的危害大得多,除能传播 WFT 联体病毒等多种植物病毒外,还能够传播植物细菌病和真菌病^[1],且双联体病毒属的病毒只能够由烟粉虱传播^[2]。由内共生菌产生的 GroEL 蛋白属于分子伴侣,是一类保守性相当高的蛋白,主要作用是保护病毒进入血液腔的过程中免遭降解,同时也与昆虫携毒的专一性有关^[3,4]。蚜虫 *Buchnera* GroEL 帮助病毒经过蚜虫血液腔并在专一性植物间进行传播^[5]。*Buchnera* GroEL 与 *Escherichia coli* GroEL 的 2 个特征性区别区域是 *Buchnera* 有一个位于 C 端 526 ~ 538 位和一个位于顶尖结构域 339 ~ 347 位的富丝氨酸高变区^[6]。*Buchnera* GroEL 与宿主通过正向选择共同进化,支配 GroEL 正向选择的变化区主要位于对 GroES 与多肽的连接都很重要的顶端结构域^[7]。不同种类、生物型、地理型的昆虫中内共生菌的 16S rDNA 及 *groEL* 基因具有很高的同源性,但是产生了适应性差异^[8]。研究 *groEL* 及 GroEL 的演化机制,对于探索烟粉虱寄主多样性、分布广泛性、GroE 功能区的发现、传播病毒多样性的原因及其防治方法、某些生命现象的解释,都可能产生重大的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试烟粉虱为 B 型成虫,分别采自长期饲养在中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室的黄瓜 (*Cucumis sativus*)、番茄 (*tomato, Lycopersicon esculentum*)、烟草 (*obacco, Nicotiana tabacum*)、一品红 (*poinsettia, Euphorbia pulcherrima*)、牵牛花 (*morning glory, Ipomoea purpurea*)、辣椒 (*apsicum, Capsicum annuum*)、甘蓝 (*abbage, Brassica oleracea*) 等植物上。PCR 扩增试剂 (dNTPs, Taq 酶)、DNA 快速回收试剂盒、克隆试剂盒 (VT304)、限制性内切酶等主要购自清华大学天为时代科技有限公司、Bebco 等公司。

1.2 烟粉虱内共生菌模板 DNA 的提取

DNA 的提取采用改进的 SDS 裂解法^[9]。将 100 头冰冻的烟粉虱用无菌双蒸水快速洗涤 2 次,于 200μl TE buffer 中匀浆,5000r/min 离心 3min 后,收集沉淀,加入 500μl 裂解 buffer (0.1mol/L NaCl、0.1mol/L EDTA、1% SDS、0.1% 蛋白酶 K) 于 65℃ 水浴中裂解 60min,冰上放置 5min 后,5000r/min 短时离心,上清液分别用等

体积的酚 氯仿 (1:1) 抽提 3 次、氯仿抽提 1 次,冷无水乙醇沉淀 DNA,70% 乙醇洗涤,晾干或风干,加无菌双蒸水在 4℃ 溶解,紫外法测定 DNA 的浓度与质量。

1.3 PCR 克隆引物的设计与合成

参照 GenBank 发表的序列 (F130421) [10],采用 Primer Designer 引物设计软件自行设计引物,其序列为: fwd:5'-atggcagctaaagacttaaaatttgg-3',rev:5'-ttacatcataccattcattccgccc-3'。引物委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 PCR 扩增

烟粉虱内共生菌 *groEL* PCR 在 50μL 体系中进行,含引物 fwd 和 rev 各 0.6μmol/L、模板 200ng、dNTPs 2.5mmol/L、10 × PCR buffer 5μL、Mg²⁺ 2.5 ~ 3.0mmol/L、*Taq* 酶 1U,加消毒双蒸水至 50μL。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5min,94℃ 1min,52℃ 1min,72℃ 2min,共 35 个循环,72℃ 10min,保存于 4℃ 冰箱中。

1.5 PCR 产物序列的测定

将 *groEL* PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后,按 DNA 快速回收试剂盒将 PCR 扩增产物纯化,按清华大学天为时代科技有限公司的方法进行 PCR 纯化产物与 pGM-T easy 载体的连接、转化与阳性克隆的筛选,双酶切和 PCR 鉴定插入片段的大小。将鉴定为阳性的含重组质粒的细菌送上海博亚生物技术有限责任公司分别进行自动测序。测序仪为 ABIPRSM37 全自动测序仪。测序结果直接送 GenBank 进行登记。

1.6 DNA 序列及氨基酸序列分析

从 GenBank 中下载相关序列,与所测序列一起进行分析。氨基酸序列推导借助于 Blast 软件进行。分子系统树的建立所用序列的基本情况如表 1。用 Clustal W 排列 DNA 与氨基酸同源序列 (alignment),用 MEGA2.1 (2001) (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version2.1) 软件计算遗传距离,并用 Minimum evolution (ME) 法聚类分析构建核苷酸分子系统树;用 Neighbor Joining (NJ) 法聚类分析构建 *GroEL* 氨基酸分子系统树。自举法 (bootstrap) 为 1 025 次检测 (Replication)。

表 1 *groEL* 基因的基本情况

Table 1 Basic information of <i>groEL</i> sequences deposited in GenBank			
烟粉虱和蚜虫的寄主植物 Host plant of <i>B. tabaci</i> or aphids	细菌 Bacteria	<i>groEL</i> 的登录号 Accession numbers of <i>groEL</i> sequences	采集地点 Site of whitefly collection
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i> cucumber	烟粉虱内共生菌 <i>Endosymbiont in B. tabaci</i>	AY462929	中国北京 Beijing, China
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> tomato	烟粉虱内共生菌 <i>Endosymbiont in B. tabaci</i>	AY462930	中国北京
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> tobacco	烟粉虱内共生菌 <i>Endosymbiont in B. tabaci</i>	AY462931	中国北京
一品红 <i>Euphorbia pulcherrima</i> poinsettia	烟粉虱内共生菌 <i>Endosymbiont in B. tabaci</i>	AY462932	中国北京
牵牛花 <i>Ipomoea purpurea</i> morning glory	烟粉虱内共生菌 <i>Endosymbiont in B. tabaci</i>	AY445872	中国北京
辣椒 <i>Capsicum annuum</i> capsicum	烟粉虱内共生菌 <i>Endosymbiont in B. tabaci</i>	AY445873	中国北京
甘蓝 <i>Brassica oleracea</i> cabbage	烟粉虱内共生菌 <i>Endosymbiont in B. tabaci</i>	AY445874	中国北京
-	烟粉虱内共生菌 <i>Endosymbiont in B. tabaci</i>	AF130421 [10]	以色列 Israel
桃树 <i>Prunus persica</i> peach	桃蚜内共生菌 <i>Buchnera aphidicola</i> in <i>Myzus persica</i>	AF367248 [11]	中国陕西 Shanxi, China
Free living	沙门氏菌 <i>Salmonella typhi</i>	U01039 [1]	-
小麦 <i>Triticum aestivum</i> wheat	禾谷缢管蚜内共生菌 <i>endosymbiont in Rhopalosiphum padi</i>	U77380 [1]	-
Free living	淋病细菌 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Z23008 [1]	-
小麦 <i>Triticum aestivum</i> wheat	麦长管蚜内共生菌 <i>endosymbiont in Sitobion avenae</i>	U77379 [1]	-

- 具体信息不清楚 The real information couldn't be known

2 结果与分析

2.1 烟粉虱内共生菌 GroEL 蛋白系统进化树的建立与分析

GroEL 蛋白的聚类结果与 *groEL* 基因序列的聚类结果基本上是一致的。GroEL 蛋白的分子进化树如图 1, Bootstrap (自举法) 1025 次检测可信度大于 60%, 说明聚类的结果比较稳定可靠。由图 1 可知, 不同来源烟粉虱内共生菌 GroEL 蛋白的亲缘关系非常接近, 位于同一进化分支, 其它 3 种植食性蚜虫 (禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*、桃蚜 *Myzus persicae*、麦长管蚜 *Sitobion avenae*) 内共生菌 GroEL 蛋白位于不同分支, 即这 3 种蚜虫的内共生菌 *groEL* 基因及 GroEL 蛋白与烟粉虱的相应基因及蛋白的亲缘关系较远, 但上述昆虫内共生菌 *groEL* 基因及 GroEL 蛋白与人类的两种病原细菌 (沙门氏菌 *Salmonella typhi* 和淋病细菌 *Neisseria gonorrhoeae*) 的 *groEL* 基因及 GroEL 蛋白的亲缘关系更远一些。

2.2 烟粉虱内共生菌 GroEL 蛋白的功能位点分析

在报道的 50 个原核 GroEL/Hsp60 分子中, 有 133 个位点的氨基酸是保守氨基酸 [1,11]。有关 GroEL/Hsp60 的保守氨基酸、ATPase 活性部位、多肽结合部位、GroES 结合部位如图 2。由图 2 可知, 烟粉虱内共生菌 GroEL 具有同样的 ATPase 活性部位、多肽结合部位及 GroES 结合部位。与大肠杆菌 GroEL 比较, 烟粉虱内共生菌 GroEL 除了 170 位与 388 位两处的保守氨基酸发生了置换之外, 其余的都是一致的, 而这种置换现象在 P48212 和 P31294 两序列中也存在。不同来源烟粉虱内共生菌 GroEL 保守氨基酸的置换主要发生在 51 位、95 位、169 位、367 位、395 位等 5 处, 可以说明这些位点的氨基酸对烟粉虱内共生菌 GroEL 的功能影响很小。而大肠杆菌 GroEL 与 *Buchnera* GroEL 氨基酸的保守序列仅在 293 处不同。烟粉虱内共生菌 GroEL 与 *Buchnera* GroEL 在 PLRV (potato leaf roll virus) 结合区域不管保守氨基酸, 还是其它的氨基酸, 发生置换的几率都相对要少, 这些区域可能也是烟粉虱内共生菌 GroEL 的主要病毒结合区域。

3 讨论

相对于自由生活的细菌来说, 昆虫内共生菌受群体重组因素的影响较小, 主要是受群体遗传漂移的影响 [2,13]。系统进化树分析结果表明, 内共生菌的 *groEL* 进化缓慢, 这对于利用内共生菌进行突变累积的遗传漂移对基因组的影响研究, 以及解释无性方式是怎样使这些有害突变不能积累的, 都是一个非常有用的模式 [4-16]。

Morin 等对烟粉虱内共生菌 GroEL N-末端 30 个氨基酸的研究发现, 其基本结构与禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*、桃蚜 *Myzus persicae*、麦长管蚜 *Sitobion avenae* 的内共生菌 GroEL 的相似 [7]。聚类分析与序列比较说明, 北京地区不同植物来源烟粉虱的内共生菌与 Israel 烟粉虱的内共生菌 *groEL* 基因亲缘关系非常接近。并且, 烟粉虱内共生菌 GroEL 除了少数位点之外, 与其它原核 GroEL 一样, 具有相同的保守氨基酸位点, 不同生态型来源烟粉虱内共生菌 GroEL 的部分保守氨基酸也发生了置换, 这对寻找其重要功能区可以提供一定的证据。也正是由遗传漂移引起的只有极少数氨基酸的置换, 才使得 GroEL 维持着其应有的功能。用 *Buchnera* GroEL 抗血清在携毒之前饲喂烟粉虱, 烟粉虱传 TYLCV-Is (tomato yellow leaf curl virus from Israel) 的几率下降 80% 以上, 病毒在烟粉虱血体腔内的数量大大减少 [7]。这进一步证实了烟粉虱内共生菌 GroEL 与 *Buchnera* GroEL 的同源性。烟粉虱内共生菌 GroEL 与 *Buchnera* GroEL 的比较发现, 二者在 PLRV 结合位点的

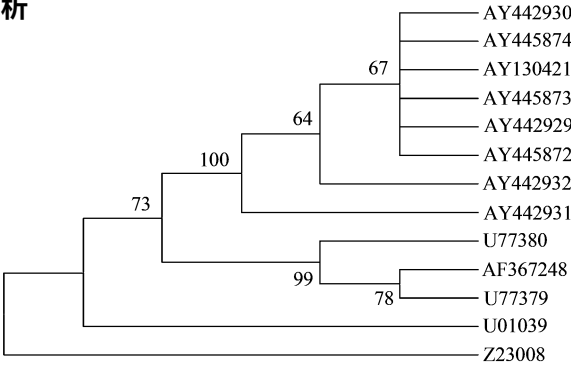
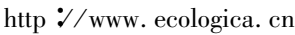


图 1 烟粉虱内共生菌 GroEL 序列的分子系统树

Fig. 1 Phylogenetic evolution tree of endosymbionts from *Bemisia tabaci* based on GroEL complete amino acid sequences
分子系统树运用 MEGA2.1 (2001) 软件的邻近连接法构建, 鞋带可信度在分支的上下进行标注 The tree was constructed by Neighbor Joint (NJ) procedure in the software package MEGA2.1 (2001). The length and bootstrap confidence values of each branch are indicated above and below the branch, respectively



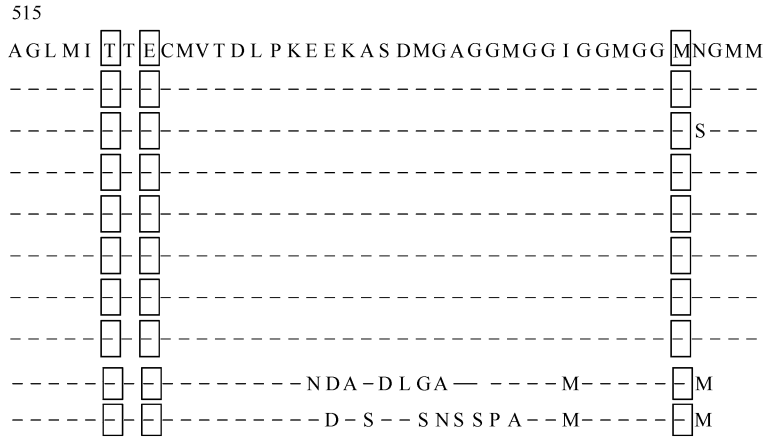


图2 烟粉虱内共生菌与大肠杆菌及 *Buchnera* GroEL 氨基酸序列的比较

Fig. 2 Amino acid sequence of *B. tabaci* GroEL and comparison with GroEL from *E. coli* (free living bacterium) and *Buchnera aphidicola* (endosymbiont of *M. persicae*)

* :ATPase 活性部位 ;\$ GroES 联结部位 ;↓ 多肽联结部位 方框 GroEL/Hsp60 保守氨基酸 ;- 相同的氨基酸 阴影部位为 PLRV 结合区
Those involved in ATPase activity are indicated by * ;Those involved in GroES binding are indicated by \$;Amino acids reported to be involved in polypeptide binding are indicated by arrows ;Amino acids at positions conserved in other GroEL/Hsp60 chaperonins are boxed ;Identical amino acids are indicated by bars ;The PLRV binding domains are indicated by gray shading

X07850 : *E. coli* ; AF003957 : *Buchnera aphidicola* (endosymbiont of *Myzus persica*)

保守氨基酸没有差异,有关烟粉虱与蚜虫传播 PLRV 的差异原因有待进一步研究。烟粉虱是联体病毒的特异介体,有关烟粉虱特异传播联体病毒的原因及其相关功能位点还有待于进一步研究。

通过物理、化学方法消除或抑制内共生菌、分子生物学方法改造内共生菌等手段,都有可能防治病虫害。通过病毒特异结合的 GroEL 位点研究,对于虫传植物病毒病害的防治,将有重大的意义。根据昆虫体内大量存在的内共生菌的特性,通过内共生菌的转基因研究,可望建立起植物病害防治的新生物控制系统。病毒的 CP 基因已经在植物的抗病育种中得以应用,有关内共生菌 *groEL* 基因在植物抗病育种中的应用研究还有待进一步进行。在目前体外培养尚未解决的情况下,利用分子生物学技术及日益积累的基因组信息,对内共生菌进行鉴定和系统发生研究,将为进一步深入研究打下基础。因此,研究内共生菌的起源及系统进化,特别是相关功能基因的系统进化,对于解决这方面存在的问题无疑具有重大的理论意义和实践意义。

References :

- [1] Zeidan M, Czosnek H. Acquisition and transmission of *Agrobacterium* by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1994, 7 (6) :792 – 798.
- [2] Feng L X, Yang Y H, Xie B Y, *et al.* Be careful of new virus vegetable diseases with *Bemisia tabaci* appearing. *China Vegetables*, 2001, 2 :34 – 35.
- [3] Van den Heuvel J F J M, Verbeek M, Bruyere A, *et al.* Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J Gen Virol*, 1994, 75 :2559 – 2565.
- [4] Llorca O, Galan A, Carrascosa J L, *et al.* GroEL under heat-shock switching from a folding to a storing function. *J Biol Chem*, 1996, 273 :32587 – 32594.
- [5] Li C, Cox-Foster D, Gray S M, *et al.* Vector specificity of barley yellow dwarf virus (BYDV) transmission : identification of potential cellular receptors binding BYDV-MAV in the aphid, *Sitobion avenae*. *Virology*, 2001, 286 :125 – 133.
- [6] Fenton W A, Kashi Y, Frutak K, *et al.* Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature*, 1994, 371 :614 – 619.
- [7] Fares M A, Barrio E, Sabater-Munoz B, *et al.* The evolution of the heat-shock protein GroEL from *Buchnera*, the primary endosymbiont of aphids, is governed by positive selection. *Mol Biol Evol*, 2002, 19 (1) :1162 – 1170.

[8] Zehori-fein E, Brown J K. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera : Aleyrodidae). *Annals of Entomological Society of America*, 2002, 95 (6) :711 — 718.

[9] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Beijing Science Press,2nd ed, 2002,25 — 26.

[0] Morin S, Ghanim M, Sobol I, *et al.* The GroEL Protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomovirus in the yeast two-hybrid system. *Virology*, 2000, 276 :404 — 416.

[1] Cui X F, Wu Y F, Lin L, *et al.* Cloning and Sequence analysis of Buchnera groEL Gene from Endosymbiotic Bacteria of *Myzus persicae*. *Virologica Sinica*, 2002, 17 (1) :69 — 72.

[2] Maynard S J, Dowson C G,Spratt B G . Localised sex in bacteria. *Nature*, 1991, 349 :29 — 31.

[3] Funk D J, Wernegreen J J, Moran N A. Intraspecific variation in symbiont genomes :Bottlenecks and the aphid-*Buchnera* association. *Genetics*, 2001, 157 :477 — 489.

[4] Lynch M. Mutation accumulation in transfer RNAs :molecular evidence for Muller’s ratchet in mitochondrial genomes. *Mol Biol Evol*, 1996,13 209 — 220.

[5] Schultz S T, Lynch M. Deleterious mutation and extinction :effects of variable mutational effects, synergistic epistasis, beneficial mutations, and degree of outcrossing. *Evolution*, 1997, 51 :1363 — 1371.

[6] Lynch M. Mutation accumulation in nuclear, organelle, and prokaryotic genomes :transfer RNA genes. *Mol Biol Evol*, 1997, 14 :914 — 925.

[7] Morin S, Ghanim M, Zeidan M, *et al.* A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 1999, 256 (1) :75 — 84.

参考文献：

[2] 冯兰香, 杨宇红, 谢丙炎, 等. 警惕烟粉虱大暴发导致新的蔬菜病毒病. *中国蔬菜*, 2001, 2 :34 ~ 35.

[9] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. *分子克隆实验指南*. 第 2 版. 北京 科学出版社,2002. 25 ~ 26.

[1] 崔晓峰, 吴云锋, 林林, 等. 桃蚜体内与病毒结合的共生菌 *Buchnera groEL* 基因的克隆和序列分析. *中国病毒学*, 2002, 17 (1) 69 ~ 72.