

# 芜菁花叶病毒萝卜与甘蓝 分离物 P3 基因的克隆与序列分析

叶艳英<sup>1,2</sup>, 曾 钢<sup>2,3</sup>, 闫晓红<sup>2,4</sup>, 马荣才<sup>5</sup>, 吴才君<sup>1\*</sup>, 姚 磊<sup>2\*</sup>

(1. 江西农业大学 农学院 江西 南昌 330045; 2. 北京市农林科学院 农业生物技术研究中心 北京 100097; 3. 福建农林大学 植物保护学院 福建 福州 350002; 4. 内蒙古农业大学 生态环境学院 内蒙古 呼和浩特 010018; 5. 北京市农业局 北京 100029)

**摘要:** 芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV) 危害范围广, 变异快, 对其序列进行分析, 能对病毒的演变与进化有深入的了解, 为抗病育种打下基础。P3 蛋白是 TuMV 高度容易变异的蛋白之一, 包含一个对 *Brassica* 属和 *Raphanus* 属不同宿主侵染能力的决定因子, 决定了宿主范围。笔者分别从北京感病的萝卜和甘蓝上分离得到 4 个 TuMV 分离物 BJ-R01 和 BJ-B01、BJ-B02、BJB03。利用 RT-PCR 克隆了这 4 个分离物的 P3 基因, 测定了它们的核苷酸序列, 并进行了序列分析。结果表明 4 个分离物的 P3 基因均为 1 065 个碱基, 编码 355 个氨基酸。4 个分离物 P3 基因的同源性较高, 核苷酸序列同源性在 92.6%~99.3%, 氨基酸同源性在 93.5%~99.7%。根据系统进化树分析 4 个 TuMV 分离物均属于 world-B 组。经对宿主的致病性鉴定 4 个 TuMV 分离物均为 BR 致病型。4 个 TuMV 分离物对 *Brassica* 属植物均表现出强致病性, 但对 *Raphanus* 属植物致病性显现出明显的差异。

**关键词:** 芜菁花叶病毒; P3 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S436.3; Q785 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)02-0264-06

## Cloning and Sequence Analysis of P3 Gene of *Turnip mosaic virus* Isolates from *Brassica* and *Raphanus*

YE Yan-ying<sup>1,2</sup>, ZENG Gang<sup>2,3</sup>, YAN Xiao-hong<sup>2,4</sup>,  
MA Rong-cai<sup>5</sup>, WU Cai-jun<sup>1\*</sup>, YAO Lei<sup>2\*</sup>

(1. College of Agronomy, JAU, Nanchang 330045, China; 2. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 3. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 4. College of Ecology and Environmental Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhehaote 010018, China; 5. Beijing Municipal Bureau of Agriculture, Beijing 100029, China)

**Abstract:** *Turnip mosaic virus* (TuMV) is a widely harmful and variable potyvirus. Analysis on the sequence of the virus is helpful to understand its evolution, and is the foundation for the virus resistance breeding. P3 protein is one of the most highly variable proteins of TuMV, which contains a key determinant of its ability to infect hosts in different genera, *Brassica* (B) and/or not *Raphanus* (R). Four TuMV isolates (BJ-R01, BJ-B01, BJ-B02 and BJB03) were collected from the *Raphanus* and *Brassica* crops in Beijing, and

收稿日期: 2012-01-06 修回日期: 2012-02-14

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2008AA10Z154)和北京市自然科学基金(6092010)

作者简介: 叶艳英(1986—)女, 硕士生, 主要从事蔬菜种质资源与分子育种, E-mail: yyy860925@126.com; \* 通讯

作者: 姚磊 副研究员 博士 E-mail: yaolei@baafs.net.cn; 吴才君 教授 博士 E-mail: wuej12@126.com。

the P3 gene were cloned from these isolates respectively. All the four P3 genes are 1 065 bp long, encoding 355 amino acids, and highly homologous. They share identities of 92.6% ~ 99.3% and 93.5% ~ 99.7% at nucleotide and amino acid respectively. The result of phylogenetic analysis shows that these four isolates belong to TuMV world - B group. The pathogenic analysis reveals that all the four isolates belong to BR pathogenic type. They all have strong symptomatology to the *Brassica*, but show apparent difference to the *Raphanus*.

**Key words:** TuMV; P3 gene; cloning; sequence analysis

芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV) 属马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae)、马铃薯 Y 病毒属(*Poty-virus*)。TuMV 寄主范围十分广泛,能够侵染 43 科 156 属 318 种植物<sup>[1-2]</sup>。在田间主要危害十字花科等作物,为仅次于黄瓜花叶病毒(CMV)侵染大田蔬菜作物最重要的病毒<sup>[3]</sup>。受 TuMV 侵染的植株初期表现花叶、明脉、皱缩,后期出现畸形、矮化、生育期推迟等现象<sup>[4]</sup>。植株感染 TuMV 后体内会出现一系列生理生化及细胞超微结构的变化,对叶绿素含量、光合速率、希尔反应(Hill reaction)活性均有影响,引起代谢紊乱,进而影响植物生长<sup>[5-7]</sup>。

TuMV 具有广泛的变异类型,国内外在 TuMV 株系化分和致病型鉴定方面进行了大量的研究。最初是根据寄主受害症状或寄主范围等生物学性状进行的划分<sup>[8]</sup>。随着现代分子生物技术的高速发展,核酸序列分析和同源性比较已大量应用于 TuMV 株系划分的研究。Ohshima 等<sup>[9-14]</sup>先将 TuMV 依对宿主的侵染性划分为两个致病型,即只侵染芸薹属(*Brassica*)的 B 型及同时侵染芸薹和萝卜属(*Raphanus*)的 BR 型。然后依据分子进化分析又细分为四个亚型:basal - B 组、basal - BR 组、Asia - BR 组和 World - B 组<sup>[9-10]</sup>。basal - B 组都易变异,不是单起源的,并且都是来自欧亚大陆的西南和中部的芸苔分离物或非芸苔属分离物;basal - BR 组也易变异,是单起源的;Asia - BR 组分离物变异少,其中大多数来自东亚,特别是日本,寄主大多是萝卜;World - B 组来自各大陆,大部分是来自芸苔属的 B 致病型。Ohshima 等<sup>[9]</sup>认为 TuMV 可能就象其芸薹属宿主一样起源于欧洲,然后传播到世界各地,近来在东亚进化出 BR 致病型。但随着 TuMV 基因组序列的不断发现,最近在日本和中国也发现了 TuMV 的 basal - BR 株系<sup>[15-16]</sup>。

TuMV 核酸为单链正义 RNA,约 10 kb。TuMV 基因组 RNA 的 5'末端相连一个帽状病毒编码的 VPg 蛋白,3'末端由不同长度的 polyA 的尾巴组成,编码区为单一开放阅读框(ORF)。ORF 可表达产生一个多聚蛋白前体,包含 10 种蛋白,其中 P3 蛋白序列高度易变异。P3 蛋白是 TuMV 侵染过程的一个重要决定因子,不仅影响病毒的积累,而且影响病毒在细胞内的长距离移动,其对寄主范围起决定性作用,即决定对芸薹属和(或)萝卜属的侵染<sup>[17]</sup>。TuMV P3 蛋白的 C 端与病毒的致病性和侵染力有关<sup>[18]</sup>。最近 Chung 等<sup>[19]</sup>利用生物信息学技术,在 P3 蛋白的编码区发现一个本质的重叠基因 *pipo*。*pipo* 蛋白以 +2 阅读框翻译,并被发现在马铃薯 Y 病毒家族中普遍存在;在不改变 TuMV 氨基酸序列的情况下,*pipo* 基因的碱基置换突变将导致 TuMV 失活。

对 TuMV 序列进行分析,能对其演变与进化有深入的了解,为抗病育种打下基础。GenBank 中登录的 TuMV 序列多数集中在 CP 基因,TuMV 中国分离物序列相对缺乏,尤其是中国分离物含 P3 基因的序列更少。为了能够对地方 TuMV 株系进行系统分析,本研究对北京地区来源于萝卜和甘蓝的 4 个 TuMV 分离物的 P3 基因进行了克隆,并对其序列和分离物对宿主的侵染性进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒分离物

2010 年 10 月,在北京西郊田间呈现花叶症状的萝卜上采得 TuMV 分离物 1 份,命名 BJ - R01;甘蓝分离物 3 份,命名 BJ - B01、BJ - B02 和 BJ - B03。

### 1.2 酶与试剂

Trizol 和 superscript<sup>TM</sup> III RT 购自 invitrogen 公司,TransStart Fastpfu DNA Polymerase 购自 Transgen Biotech 公司。Gel Extraction Kit 和 Plasmid Mini Kit 购自 CWBI 公司,dATP、T<sub>4</sub> DNA Ligase 和 pGEM - T Easy 载体均为 Promega 公司产品,DH<sub>5α</sub> 为本实验室保存。

### 1.3 目的基因扩增

根据 GenBank 登录的 TuMV 全基因组序列, 分别于 *Hc-Pro*、*P3*、*6K1* 中选取保守区段设计 2 对引物, 扩增出 A (1.8 kb) 和 B (1.2 kb) 两片段, *P3* 位于其中, 两片段叠加部分为 211 bp。A 片段引物为: AF 5′-GCGAAAGATAACCTGCCCTGACT-3′和 AR 5′-CGCTGTATCTGCCGCCTAAATC-3′。B 片段引物为: BF 5′-TCGGAGCTTGCGGATGCTGGAT-3′和 BR 5′-CGGCGCCTGCGACAACCTGCT-3′。

用 Trizol 法从萝卜、甘蓝的病叶上直接提取其总 RNA。以提取的总 RNA 为模板, 用 superscript™ III RT 反转录成 cDNA, -20 °C 保存备用。以反转录产物为模板, 用高保真酶 TransStart Fastpfu DNA Polymerase 进行 PCR 扩增。扩增条件为: 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 20 s, 46 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 循环, 最后 72 °C 延伸 7 min。

### 1.4 扩增产物的克隆和序列测定

PCR 产物经电泳、凝胶回收, 并未尾加 A。PCR 产物加 A 步骤如下: PCR 产物 16.6 μL, dATP 0.4 μL, 10 × Easy Taq DNA polymerase buffer 2 μL, Easy Taq DNA polymerase 1 μL, 总体积 20 μL, 72 °C 30 min。PCR 产物加 A 后, 分别连接到 pGEM-T easy 载体上。连接产物转化大肠杆菌菌株 DH5α。提取重组质粒, 通过 PCR 扩增和酶切验证筛选阳性克隆。重组质粒序列测定由上海生工公司完成。为了避免 PCR 扩增和序列分析过程中产生的差异, 每个分离物选 3 个重组子进行序列测定, 比较后确定其核苷酸序列。

### 1.5 TuMV P3 基因序列的确定和分析

利用 DNASTAR 软件将测序所得片段拼接, 与 GenBank 已知 *P3* 基因序列相比较, 确定本研究所获得的 *P3* 基因。在所获得序列的基础上, 进行核苷酸序列和氨基酸序列比较分析, 用 MEGA4 软件构建系统进化树。

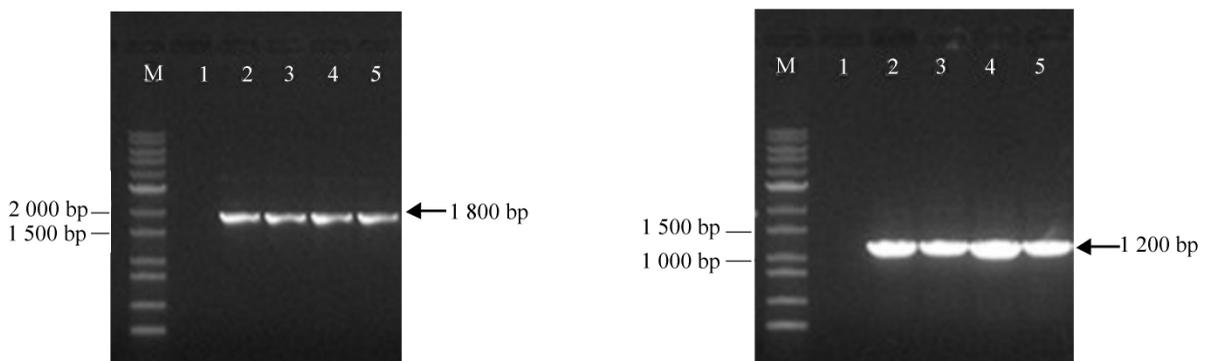
### 1.6 宿主致病性鉴定

采用常规摩擦接种方法, 将所获得的 TuMV 分离物分别接种于芸薹属四月慢油菜和萝卜属汉白王萝卜上。网罩隔离, 接种约 20 d 后调查发病情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 P3 基因的扩增与确定

以所提取的 4 个 TuMV 分离物的总 RNA 为模板, 反转录成 cDNA。分别用 A 和 B 两对引物, 以高保真 DNA 聚合酶扩增。取 5 μL 扩增后的产物在 10 g/L 的凝胶上进行电泳检测, 电泳结果如图所示 (图 1)。在凝胶中扩增产物 A 和 B 分别呈现分子量约为 1.8 kb 和 1.2 kb 的条带, 没有其它非特异性条带产生, 符合预期结果。A、B 片段经纯化, 末端加 A, 与 pGEM-T Easy 载体连接后测序。测序结果经 GenBank 的 BLAST 分析, 确认为 TuMV。经 DNASTAR 软件拼接, 拼接后为 2 824 bp。序列对比显示



a: A 片段 PCR 扩增结果 b: B 片段 PCR 扩增结果; M: 1 kbPlus DNA Marker; 1: 空白对照; 2-5: 依次为 TuMV 分离物 BJ-R01, BJ-B01, BJ-B02, BJ-B03。

a: PCR results of A fragments. b: PCR results of B fragments; M: 1 kbPlus DNA Marker; 1. Negative control; 2-5: BJ-R01, BJ-B01, BJ-B02, BJ-B03.

图 1 RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

所扩增的 4 个 TuMV 分离物的 A + B 片段间存在差异,为 4 个独立的 TuMV 毒株。经与 GenBank 已知 P3 基因序列相比较 确定所测 TuMV 毒株的 P3 基因 P3 位于 A + B 片段的 1 223 ~2 287 之间。BLAST 的结果显示所获得的 4 个 TuMV 为新毒株。

2.2 所获 TuMV P3 基因的同源性比较

经分析,4 个 TuMV 分离物的 P3 基因均为 1 065 bp,编码 355 个氨基酸。经 DNASTAR 软件分析 4 个 P3 基因的核苷酸同源性为 92.6% ~99.3% 氨基酸同源性为 93.5% ~99.7% (表 1)。3 个甘蓝上得到的分离物同源性非常高。推测可能是来自同一毒源的不同变异株。而从萝卜上得到的分离物与 3 个从甘蓝上的分

表 1 P3 基因同源性比较

Tab.1 The identities of P3 genes

	分离物 Isolate	BJ - R01	BJ - B03	BJ - B01	BJ - B02
核苷酸 Nucleotide	BJ - R01		92.6	92.9	92.8
	BJ - B03			99.2	99.2
	BJ - B01				99.3
	BJ - B02				
氨基酸 Amino Acide	BJ - R01		93.5	93.5	93.8
	BJ - B03			99.4	99.7
	BJ - B01				99.7
	BJ - B02				

离物无论是核酸水平还是氨基酸水平上同源性都存在一定差异,可能来自稍远的分枝。

2.3 系统进化树分析

根据已发表的 TuMV 分型文献 [11, 15, 17],从 GenBank 中选取 19 个有代表性,分别来源于不同国

表 2 构建系统进化树的分离物

Tab.2 Turnip mosaic virus isolates used for phylogenetic analysis

分离物 Isolate	宿主 Original host	国家 Country	采集年份 Year of collection	致病型 Strain	文献与 GenBank 登录号 Reference accession no.
A1	<i>Alliaria officinalis</i>	意大利	1968	B	[11]; AB093598
A64	<i>Anemone coronaria</i>	意大利	1991	B	[11]; AB093599
St48	<i>Limonium sinuatum</i>	意大利	1993	B	[11]; AB093596
CP845J	<i>Calendula officinalis</i>	日本	1997	BR	[11]; AB093614
TANX2	<i>Raphanus sativus</i>	中国山东	2007	BR	[15]; EU734433
WFLB06	<i>Raphanus sativus</i>	中国山东	2006	BR	[15]; EU734434
59J	<i>Raphanus sativus</i>	日本	1996	BR	[11]; AB093620
HRD	<i>Raphanus sativus</i>	中国浙江	1998	BR	[11]; AB093627
KD32J	<i>Raphanus sativus</i>	日本	1998	BR	[11]; AB093621
SGD311J	<i>Raphanus sativus</i>	日本	1998	BR	[11]; AB093619
2J	<i>Brassica pekinensis</i>	日本	1994	BR	[11]; AB093622
Bj - B01	<i>Brassica oleracea</i>	中国北京	2010	BR	本文
Bj - B02	<i>Brassica oleracea</i>	中国北京	2010	BR	本文
Bj - B03	<i>Brassica oleracea</i>	中国北京	2010	BR	本文
Bj - R01	<i>Raphanus sativus</i>	中国北京	2010	BR	本文
CZE1	<i>Brassica oleracea</i>	捷克	1994	B	[11]; AB093608
DMJ	<i>Raphanus sativus</i>	日本	1996	BR	[11]; AB093623
Ka1J	<i>Brassica pekinensis</i>	日本	1994	BR	[11]; AB093624
NZ290	<i>Brassica pekinensis</i>	新西兰	1998	B	[11]; AB093612
PV376 - Br	<i>Brassica napus</i>	德国	1970	B	[11]; AB093604
RUS2	<i>Brassica napus</i>	俄罗斯	Not known	B	[11]; AB093607
TU - 2R1	<i>Raphanus sativus</i>	日本	Not known	BR	[17]; AB105135
USA1	<i>Brassica oleracea</i>	美国	1993	B	[11]; AB093609

家,收集自不同寄主,并已经确认致病型的 TuMV 分离物(表 2)。从中选出 P3 基因序列,利用 MEGA4 软件,与新获得的 4 个 TuMV 分离物的 P3 基因共同构建系统进化树比较。系统进化树表明(图 2)根据 P3 基因核苷酸序列的差异,23 个 TuMV 分离物可划分为 4 个组;本次收集的 4 个分离物属于 World - B 组。本研究所选择用于建树参考的 19 个 TuMV 分离物,之前曾有根据全基因组序列以及部分基因序列进行分组结果的报道<sup>[10-11]</sup>。这次笔者依据 P3 基因进行分组的结果与以前的结果一致。可见依据 P3 基因对 TuMV 分离物进行分组也是可行的。

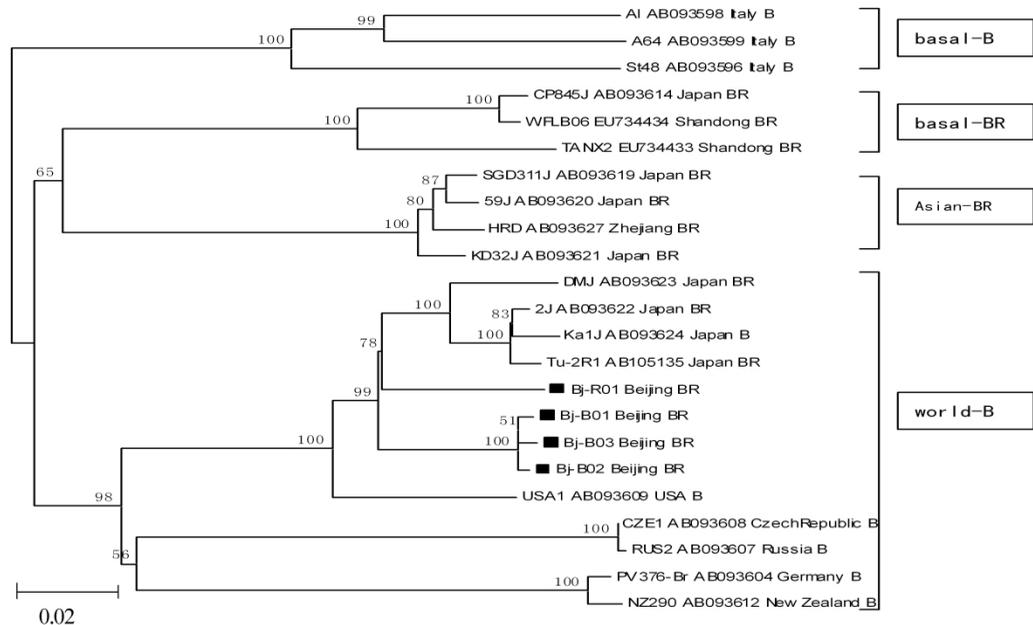


图 2 根据 P3 基因核苷酸序列所得的亲缘关系树

Fig. 2 The phylogenetic tree of TuMV isolates based on P3 gene sequences

### 2.4 分离物的致病型分析

温室人工摩擦接种后 20 d 4 个分离物均对四月慢有较强的侵染性,表现出叶片皱缩、花叶;而对汉白王萝卜则表现出不同的致病力。源自萝卜的分离物 BJ - R01 对汉白王萝卜的侵染最为明显,表现出十分明显的花叶症状。而 3 个源自甘蓝的分离物对汉白王萝卜的侵染能力有限,前期表现出极轻微的明脉,与没接种的对照几乎无法区分;到约 50 d 后花叶逐渐明显,但症状与 BJ - R01 仍有显著的差距。为了确定病毒是否存在,笔者选取非接种叶提取总 RNA。经 PT - PCR 检测,4 个分离物接种的汉白王萝卜上均能检测到 TuMV 的存在,只是在量上存在差异。由此可以确定,这次所分离到的 4 个 TuMV 分离物均为 BR 致病型。

## 3 讨论

TuMV 分组研究以前所利用的核酸序列除了用全基因组序列外<sup>[10-11]</sup>、还曾用 R12 区<sup>[11]</sup>、CP 基因<sup>[20-21]</sup>、3'-UTR 区段<sup>[22]</sup>、Hc - Pro 基因<sup>[23]</sup>、P1 + CP<sup>[19]</sup>、P1 + Ct - CI + 6K2 + VPg + Na - Pro + CP<sup>[14]</sup>等。因 TuMV 的 CP 基因变异少,相对保守,在实际分组应用中使用次数最多。在马铃薯 Y 病毒的蛋白中,P3 蛋白是高度容易变异的蛋白之一,P3 蛋白还对寄主范围起决定性作用<sup>[24]</sup>。P3 核酸序是否适用于 TuMV 分组研究,以前未见报道。本研究利用 P3 核酸序进行 TuMV 分组结果与以前的结果一致,说明利用 P3 核酸序进行 TuMV 分组也是切实可行的。由此可以推测 TuMV 从远古到现在的进化过程中,一些关键性位点的变异在分组所用过的基因中普遍存在,且很早就发生了突变。这些位点对 TuMV 的分组起到了决定性的作用。尽管 P1 和 P3 蛋白容易变异,但后期的这些突变对分组的影响不大。之前的文献关于北京 TuMV 株系的报道,只有采自萝卜分离物的 Asian - BR 型<sup>[11,16]</sup>。在河北、山东、浙江 TuMV 除了有的 world - B 和 Asian - BR 型外,还发现有 basal - BR 型<sup>[15-16]</sup>。Ohshima 等<sup>[9]</sup>最初将 TuMV 分组时,World - B 组来自各大陆,大部分是芸苔属的 B 致病型,少数为 BR 致病型;推测 BR 型是由 B 型进化的结果。笔者这次在北京从甘蓝和萝卜上所获得的 4 个 TuMV 分离物均属于 world - B 组,

BR 致病型, 是对北京地区所发现 TuMV 类型的补充。

这次所获得的 4 个从甘蓝和萝卜上分离物对 *Brassica* 属的四月慢均表现出强致病性, 而对 *Raphanus* 属的汉白王萝卜致病性显现出明显的差异。源自甘蓝的 3 个分离物采于同一片地块中, 虽然同源性非常高, 但仍存在差异。这 3 个分离物可能来自同一毒株, 在适应环境过程中, 个别位点发生不同的突变。这点更证明了 TuMV 是高度容易变异的病毒。

据文献报道<sup>[17]</sup>, P3 蛋白在 TuMV 生活史中扮演重要的角色, 包含一个侵染不同属宿主能力的决定因子, 决定了宿主范围。TuMV 的 P3 区还与病毒对宿主的系统性侵染有关。P3 不但影响病毒的积累, 还影响病毒的扩散效率, 特别是长距离的移动。P3 的 C 端在系统性侵染或症状表型上扮有重要的角色, 影响被侵染植物病症的强弱。P3 的突变还能改变侵染宿主的范围<sup>[25]</sup>。TuMV 原始的 UK1 株系为 B 致病型, 当其基因组个别位点发生突变后就以侵染萝卜, 其中 P3 的 C 端的 280 位的氨基酸 Met 突变成 Ile, 为适应萝卜突变的重要位点。此外, TuMV P3 基因还被报告是自然界中的 TuMV 抗性材料某些抗性基因抗性丢失的决定因子, 影响病毒在显性抗 TuMV 甘蓝型油菜上的致病性<sup>[17]</sup>。P3 的 153 和 312 氨基酸残基与恢复对抗性基因 *TuRB03* 和 *TuRB04* 的致病性有关<sup>[18, 26]</sup>。高抗 TuMV 的甘蓝型油菜 165 株系, P3 蛋白的单点突变能诱发接种叶的超敏性反应(坏疽)<sup>[26]</sup>。P3 蛋白在病毒和宿主间扮演着双重角色: 致病性和被宿主抗性机制所识别<sup>[18]</sup>。

笔者这次从萝卜上获得的分离物相对 3 个甘蓝分离物, 对 *Raphanus* 属的汉白王萝卜表现出更强的致病性; 但其 P3 序列与 3 个甘蓝分离物仍有较高的同源性。分析原因, 可能是之前文献所报道的北京 TuMV 株系, 均为采自萝卜的 Asian-BR 型分离物; 估计是采自萝卜种植均一的地块。笔者这次所采集的萝卜分离物地块的周围均为 *Brassica* 属作物(甘蓝、白菜等)。这有可能是 TuMV 较近的株系在选择压下, 适应寄主过程中 P3 某些重要位点发生了突变所致。比较 BJ-R01 与 3 个甘蓝分离物的 P3 氨基酸序列, 发现存在 19 个位点不同, 其中 13 个在 C 端(205-355)。可能就是这些位点的差异, 造成了对萝卜致病性的不同。但具体哪个位点为主效位点, 仍需进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Walsh J A, Rusholme R L, Hughes S L, et al. Different classes of resistance to Turnip mosaic virus in *Brassica rapa* [J]. *Plant Pathology* 2002, 108(1): 15-20.
- [2] Sanchez F, Wang X, Jenner C E, et al. Strains of Turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus [J]. *Virus Research*, 2003, 94(1): 33-43.
- [3] 蔡丽, 许泽永, 陈坤荣, 等. 芜菁花叶病毒研究进展 [J]. *中国油料作物学报* 2005, 27(1): 104-110.
- [4] 赵建平, 周钊美, 陈集双, 等. 芜菁花叶病毒(TuMV)特性的研究进展 [J]. *微生物学通报* 2004, 31(6): 100-103.
- [5] 付东亚, 洪健, 陈集双, 等. 芜菁花叶病毒外壳蛋白在寄主植物叶绿体中的积累及其对光系统 II 活性的影响 [J]. *植物生理与分子生物学报* 2004, 30(1): 34-40.
- [6] 陶月良, 杨加付, 叶利勇, 等. 温州盘菜感染芜菁花叶病毒后的生理生化性状变化 [J]. *浙江农业科学* 2001(1): 39-41.
- [7] 徐均焕, 李德葆, 盛方镜, 等. 不同抗性的榨菜在芜菁花叶病毒感染后细胞超微结构的研究 [J]. *中国病毒学*, 1996, 11(1): 61-68.
- [8] Pound G S, Walker J C. Differentiation of certain crucifer viruses by the use of temperature and host immunity reaction [J]. *Agricultural Research*, 1945, 71: 255-278.
- [9] Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R, et al. Molecular evolution of Turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombine and geographical spread [J]. *General Virology* 2002, 83(6): 1511-1521.
- [10] Ohshima K, Tomitaka Y, Wood J T, et al. Patterns of recombination in turnip mosaic genomic sequences indicate hotspots of recombination [J]. *General Virology*, 2007, 88(1): 298-315.
- [11] Tomimura K, Gibbs A J, Jenner C E, et al. The phylogeny of Turnip mosaic virus; comparisons of thirty-eight genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in east Asia [J]. *Molecular Ecology* 2003, 12(8): 2099-2111.
- [12] Tomitaka Y, Ohshima K. A phylogeographical study of the Turnip mosaic virus population in East Asia reveals an emergent lineage in Japan [J]. *Molecular Ecology*, 2006, 15(14): 4437-4457.
- [13] Tomitaka Y, Yamashita T, Ohshima K. The genetic structure of populations of Turnip mosaic virus in Kyushu and central Honshu, Japan [J]. *General Plant Pathology*, 2007, 73(3): 197-208.

(下转第 293 页)

- [7]郭予元. 棉铃虫的研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 32.
- [8]杨燕涛, 谢宝瑜, 高增祥, 等. 棉铃虫滞育与抗逆性研究进展[J]. 昆虫知识, 2001, 38(4): 246-251.
- [9]Danks H V. Insect dormancy: an ecological perspective[M]. Ottawa: Biological Survey of Canada, 1987: 70-82.
- [10]Wu K J, Gong P Y. A new and practical artificial diet for the cotton bollworm[J]. Entomologia Sinica, 1997, 14(3): 277-282.
- [11]梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 人工饲养棉铃虫技术的改进[J]. 植物保护, 1999, 25(2): 15-17.
- [12]Cullen J M, Browning T O. The influence of photoperiod and temperature on the induction of diapause in pupae of *Heliothis punctigera* [J]. Journal of Insect Physiology, 1978, 24(8/9): 595-601.
- [13]Tauber M J, Tauber C A, Masaki S. Seasonal adaptations of insects[M]. Oxford: Oxford University Press, 1986: 411.
- [14]Xue F S, Spieth H R, Li A Q, et al. The role of photoperiod and temperature in determination of summer and winter diapause in the cabbage beetle *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. Journal of Insect Physiology, 2002, 48: 279-286.
- [15]孙莉, 何海敏, 薛芳森. 昆虫滞育的地理变异[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(6): 922-927.
- [16]Adkisson P L, Roach S H. A mechanism for seasonal discrimination in the photoperiodic induction of pupal diapause in the bollworm *Heliothis zea* (Boddie) [M]. National Academy of Science, Washington D C, 1971: 662.
- [17]Benschoter C A. Influence of light manipulation on diapause of *Heliothis zea* and *H. virescens* [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1968, 65(5): 1272-1274.
- [18]Benschoter C A. Culturing *Heliothis* species (Lepidoptera: Noctuidae) for investigation of photoperiod and diapause relationships [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1970, 63(3): 699-701.
- [19]Phillips J R, Newsom C D. Diapause in *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1966, 59(1): 154-159.
- [20]Roach S H, Adkisson P L. Role of photoperiod and temperature in the induction of pupal diapause in the bollworm, *Heliothis zea* [J]. Journal of Insect Physiology, 1970, 16(8): 1591-1597.
- [21]Wellso S G, Adkisson P L. A long-day short-day effect in the photoperiodic control of the pupal diapause of the bollworm, *Heliothis zea* (Boddie) [J]. Journal of Insect Physiology, 1966, 12(12): 1455-1465.

~~~~~

(上接第 269 页)

- [14]Tan Z Y, Wada Y, Chen J S, et al. Inter- and intralinear recombinants are common in natural populations of *Turnip mosaic virus* [J]. General Virology, 2004, 85(9): 2683-2696.
- [15]Wang H Y, Liu J L, Gao R, et al. Complete genomic sequence analyses of *Turnip mosaic virus* basal-BR isolates from China [J]. Virus Genes, 2009, 38(3): 421-428.
- [16]Tian Y P, Zhu X P, Liu J L, et al. Molecular characterization of the 3' terminal region of *Turnip mosaic virus* isolates from Eastern China [J]. Phytopathology, 2007, 155(6): 333-341.
- [17]Suehiro N, Natsuaki T, Watanabe T, et al. An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein [J]. General Virology, 2004, 85(7): 2087-2098.
- [18]Jenner C E, Wang X W, Tomimura K, et al. The dual role of the potyvirus P3 protein of turnip mosaic virus as a symptom and a virulence determinant in brassicas [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003, 16(9): 777-784.
- [19]Chung B Y, Miller W A, Atkins J F, et al. An overlapping essential gene in the Potyviridae [J]. The National Academy of Sciences, 2008, 105(15): 5897-5902.
- [20]宋云枝, 李玲玲, 朱常香, 等. 芜菁花叶病毒山东分离物外壳蛋白基因的克隆及序列分析 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(3): 504-510.
- [21]庄木, 王晓武, 李艳双, 等. 芜菁花叶病毒外壳蛋白基因的克隆与序列分析 [J]. 中国蔬菜, 2006(3): 6-8.
- [22]Petrzik K, Lehmann P. Classification of *Turnip mosaic virus* isolates according to the 3'-untranslated region [J]. Acta Virologica, 1996, 40(3): 151-155.
- [23]施曼玲. 芜菁花叶病毒欧亚分离物 HC-Pro 基因的克隆和序列分析 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 383-389.
- [24]Urcuqui-Inchima S, Haenni A L, Bernardi F. Potyvirus proteins: a wealth of functions [J]. Virus Research, 2001, 74(1): 157-175.
- [25]Tan Z Y, Gibbs A J, Tomitaka Y, et al. Mutations in *Turnip mosaic virus* genomes that have adapted to *Raphanus sativus* [J]. General Virology, 2005, 86(2): 501-510.
- [26]Jenner C E, Tomimura K, Ohshima K, et al. Mutations in *Turnip mosaic virus* P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two brassica napus resistance genes [J]. Virology, 2002, 300(1): 50-59.