重庆市萝卜芜菁花叶病毒的检测与序列分析

熊 艳[1] 孙 淼[2] 向华丰[1] 王鹤冰[1] 张洪成[1*] 青 玲[2*]

（1. 重庆市农业科学院蔬菜花卉所，重庆 401329；2. 西南大学植物保护学院，
植物病害生物学重庆市高校级重点实验室，重庆 400716）

摘要：为明确重庆市萝卜感染芜菁花叶病毒（*Turnip mosaic virus*，TuMV）的情况，在重庆市巴南区、九龙坡区、北碚区等14个区县共采集了146份萝卜病毒病样品，采用酶联免疫吸附试验法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）对病样进行TuMV检测，并通过PCR、克隆和测序等技术获得13个TuMV分离物CP核苷酸序列，利用软件分析重庆市TuMV *CP*基因序列的相似性，利用系统进化树分析*CP*基因遗传变异与系统进化。结果表明，共有105份样品的TuMV检测为阳性，检出率为71.9%；所得13个分离物*CP*基因均为864 bp，测序的13个分离物CP核苷酸相似性为89.1%~99.2%，与国内已报道的TuMV各分离物CP核苷酸相似性在88.3%~99.4%之间；所得的13个分离物均分布在basal-BR和world-B组中，在Asian-BR和basal-B组中均无分布，进一步分析发现有9个分离物属于word-B组，仅4个分离物属于basal-BR组。研究表明，TuMV在重庆市萝卜各种植区普遍发生，且word-B组为重庆市萝卜的优势毒源。

关键词：重庆市；萝卜；TuMV；*CP*基因；系统进化分析

Detection and sequence analysis of *CP* gene of *Turnip mosaic virus* (TuMV) infecting radish plants in Chongqing City

Xiong Yan[1] Sun Miao[2] Xiang Huafeng[1] Wang Hebing[1] Zhang Hongcheng[1*] Qing Ling[2*]

（1. Institute of Vegetables and Flowers, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China;
2. Chongqing Key Laboratory of Plant Disease Biology, College of Plant Protection, Southwest University,
Chongqing 400716, China）

Abstract: One hundred and forty-six diseased radish plants with typical viral symptoms were collected from 14 counties in Chongqing City. They were tested by ELISA to observe the disease occurrence of *Turnip mosaic virus* (TuMV) on radish in Chongqing City. The *CP* genes of 13 TuMV isolates were cloned and sequenced, and the sequence similarities were analyzed by using software, and phylogenetic trees were constructed. The detection results showed that 105 samples were infected by TuMV, accounting for 71.9% of total samples. Sequencing results showed that the full-length of TuMV-cp of these 13 isolates was 864 bp. Alignment analysis indicated that these isolates shared 89.1%−99.2% sequence similarity, while their similarity with reported sequences of different geographic origins was 88.3%−99.4% at nucleotide level. Chongqing isolates clustered in the basal-BR and world-B, while no isolates were present in Asian-BR or basal-B. Nine isolates belonged to world-B and only four isolates belonged to basal-BR. These results revealed that TuMV is a common pathogen of radish and world-B is the dominant group of TuMV infecting radish crops in Chongqing City.

Key words: Chongqing City; radish; *Turnip mosaic virus* (TuMV); *CP* gene; phylogenetic analysis

---

基金项目：重庆市科技支撑示范工程项目（cstc2012jcsf-jfzhx0009），中央高校基本科研业务费专项资金（XDJK2017A006）

* 通信作者（Authors for correspondences），E-mail：qling@swu.edu.cn，531254993@qq.com

收稿日期：2016-10-28

萝卜隶属十字花科萝卜属，是一种广泛种植的蔬菜，因其营养价值高、耐储运、宜加工而深受广大人民群众的喜爱，被誉为“草根人参”。在我国，萝卜是栽培面积仅次于大白菜的第二大蔬菜作物，是重要的蔬菜品种（付娟娟，2008）。病毒病是危害萝卜生产的重要病害，萝卜品种选育常以提高产量和品质为目标，导致生产上栽培品种单一，长期的连作生产和生态条件多变等原因使得近年来萝卜病毒病日趋严重，危害性日趋加大。目前已发现蚕豆萎蔫病毒（*Broad bean wilt virus*，BBWV）、黄瓜花叶病毒（*Cucumber mosaic virus*，CMV）、萝卜花叶病毒（*Radish mosaic virus*，RMV）和芜菁花叶病毒（*Turnip mosaic virus*，TuMV）等多种病毒可侵染萝卜引起病毒病（韦石泉等，1987；陈集双等，2001；袁伟玲等，2015）。韩素中等（1988）对南京市郊连续3年的研究表明，TuMV是造成该地区萝卜病毒病的主要病原，TuMV单独侵染率接近60%，复合侵染中均存在TuMV。因此，开展TuMV检测及序列分析对进一步掌握我国萝卜病毒病发生危害情况及遗传变异特点具有重要意义。

TuMV隶属马铃薯Y病毒科马铃薯Y病毒属，是马铃薯Y病毒科中寄主范围最广、危害最大的病毒（Ohshima et al.，2002）。该病毒已在我国浙江、山东、河北、四川、陕西、重庆和福建等省市的大白菜（Chen et al.，2002）、萝卜（李向东等，2005；Tian et al.，2007）、花菜（Jiang et al.，2010）、油菜（Zhao et al.，2013）、辣椒（郭思瑶等，2015）及太子参（黄颖桢等，2016）上发生危害，造成严重损失。病毒基因组进化分析表明，病毒的变异与寄主密切相关（Ohshima et al.，2010），TuMV寄主范围很广，推测可能与TuMV易产生变异有关。目前已有研究对TuMV全基因组（Tomimura et al.，2003；Nguyen et al.，2013；Nyalugwe et al.，2015）、*CP*基因（宋云枝等，2005；蒋彧等，2010；张成玲等，2014）、*Hc-Pro*基因（施曼玲，2007）、*P3*基因（叶艳英等，2012）以及3′-UTR区段（田延平等，2005）等核苷酸序列进行了变异分析和分组研究。因病毒*CP*基因变异小，相对保守，其核苷酸序列常常被用于病毒基因分组研究（朱红娟等，2014）。经核苷酸序列分析，世界范围内TuMV分离物可被划分为4个组，即Asian-BR、basal-B、basal-BR和world-B组（Tomimura et al.，2003；2004；Tomitaka & Ohshima，2006）。最初中国仅有Asian-BR和world-B组TuMV分离物（Ohshima et al.，2002），2007年Tian et al.（2007）首次在中国发现了basal-BR组TuMV分离物，而后basal-BR组分离物数量迅速增加，但各地区优势株系存在差异，如四川省仅发现有world-B组TuMV分离物（Jiang et al.，2010），而Asian-BR、basal-BR和world-B组TuMV分离物在山东省均有分布（张成玲，2010），新出现的TuMV分离物以basal-BR组最多，且进一步分化为3个亚组。开展TuMV遗传变异分析研究，将有助于了解TuMV种群结构特点，从而有针对性的培育抗TuMV蔬菜品种或制定相应TuMV防控措施。

萝卜在重庆市种植历史悠久，也是该地区高山特色农作物之一，每年有千万吨的赶水萝卜被运往全国各地。此前针对重庆市萝卜病毒病的报道很少，2014年本课题组对重庆市冬季蔬菜病害调查时发现，萝卜病毒病发生率为5%~20%，但详细危害情况、病原种类及病毒变异特点等尚不清楚。因此，本研究采用酶联免疫吸附测定方法（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）拟检测采自重庆市萝卜种植区的146份萝卜样品，明确TuMV在各萝卜种植区的分布情况，并对各种植区萝卜中TuMV分离物*CP*基因序列进行分析，以期探明TuMV重庆市萝卜分离物的株系归类及病毒变异程度，为抗病育种打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植株：2014—2015年分别从重庆市巴南区、九龙坡区、万盛区、南川区、璧山区、永川区、江津区、大足区、铜梁区、合川区、北碚区、綦江区、石柱土家族自治县和丰都县共14个区县的萝卜种植区田间采集具有明脉，花叶斑驳，浓绿部分呈疱疹状及植株矮化等病毒病典型症状的萝卜植株146份，保存于−80℃冰箱备用。选取课题组保存且经鉴定受TuMV侵染的烟草叶片为阳性对照；重庆市农业科学院蔬菜花卉研究所十字花科研究室保存的未表现病毒病症状且TuMV检测为阴性的健康萝卜植株为阴性对照。

试剂：TuMV的相应抗原及单克隆抗体，浙江大学生物技术研究所周雪平教授惠赠；辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG、克隆载体pGEM-T Easy Vector Systems，美国Promega公司；植物总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒PrimeScript RT reagent Kit及Premix Ex *Taq* Version 2.0，宝生物工程（大连）有限公司；DNA分子量标准BM2000+1.5K，北京博迈德基因技术有限公司；琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒，

天根生化科技(北京)有限公司;大肠杆菌*Escherichia coli* DH5α,西南大学植物病毒实验室保存;其它试剂为国产分析纯。PCR检测引物由华大基因工程有限公司合成。

仪器:Model 680酶标仪、T100™ PCR仪和ChemiDOC™ XRS凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司;DYY-6C电泳仪,北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 TuMV血清检测

称取0.2 g样品放入研钵内,加入2 mL碳酸盐缓冲液研磨,4 000 r/min离心10 min后取100 μL上清液加入酶联板孔内,每个样品设3次重复,4℃过夜;磷酸盐吐温缓冲液洗涤3次,每次间隔5 min;拍干后每孔加入5%脱脂奶粉封闭液200 μL,37℃保温30 min;洗涤3次,拍干后加入TuMV单克隆抗体,37℃保温2 h;洗涤3次,拍干后加入1∶5 000倍稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG,37℃保温2 h;洗涤3次,拍干后加底物邻苯二胺显色,37℃静置15~20 min;最后,每孔加入2 mol/L浓硫酸50 μL终止反应。反应完全后在Model 680型酶标仪上检测各孔在492 nm波长处的OD值,以TuMV标准抗原为阳性对照,以样品OD值大于0.5且样品OD值与健康植株OD值的比值大于2.1作为阳性判断标准。

1.2.2 TuMV *CP*基因的RT-PCR扩增

依据GenBank上已登录的TuMV(KF463322)全序列,设计扩增TuMV外壳蛋白序列的引物对TuMV-F(5′-GCAGGTGAAACGCTTGATGC-3′)和TuMV-R(5′-TAACCCCTTAACGCCAAGTA-3′)。从ELISA检测的样品中选取BB2、BN9、BS1、FD1、SZ4、JL5、WS9、JJ4、HC16、NC4、QJ1、TL1和YC5共13份阳性样品和1份未检测出病毒的样品DZ2,使用植物RNA提取试剂盒,参照说明书提取植物总RNA,以植物总RNA为模板合成cDNA,置于−20℃保存备用。逆转录反应体系:5×PrimeScript Buffer 2 μL、Oligo dT Primer 0.5 μL、Random 6 mers 0.5 μL、PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL、RNase Free ddH_2O 4 μL、总RNA 2.5 μL。反应程序:37℃,15 min,85℃变性20 s,合成的cDNA用于PCR扩增。PCR反应体系:2×Premix Ex *Taq* 12.5 μL、10 μmol/L上游引物1 μL、10 μmol/L下游引物1 μL、cDNA 1 μL,加ddH_2O至25 μL。PCR反应程序:94℃预变性3 min;94℃变性45 s,退火温度为55℃,延伸时间1 min;35个循环后,72℃延伸10 min。反应结束后取PCR产物5 μL用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 TuMV *CP*基因的克隆、测序和分析

PCR产物纯化后克隆至pGEM-T Easy载体,经菌液鉴定后委托华大基因工程有限公司进行序列测定。将测序结果与GenBank已登录的病毒核苷酸序列进行比对,采用DNAStar 5.01对所得序列进行相似性比较,并用RDP 3软件包进行重组情况分析;为进一步明确这13个TuMV分离物的分类地位及进化关系,根据已发表的分组文献,从GenBank中选取26个我国的分离物及2个意大利分离物的*CP*基因核苷酸序列,采用邻接法使用MEGA 6.0软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 TuMV的血清检测结果

在146份样品中有105份样品TuMV检测为阳性,检出率为71.9%,表明TuMV在重庆市各萝卜种植区普遍发生。TuMV在不同地区分布存在差异,其中在大足区未检测出,在北碚、石柱和万盛等区县发生较严重,检出率均在90.0%以上,分别为93.3%、92.9%和90.9%;在南川区发生最轻,检出率为25.0%,在九龙坡、铜梁、綦江、合川、璧山、丰都、江津、永川和巴南9个区县的检出率分别为88.9%、80.0%、71.4%、68.8%、66.7%、66.7%、66.7%、57.1%和54.5%(表1)。

2.2 TuMV *CP* 基因的RT-PCR扩增

RT-PCR扩增结果表明,ELISA检测为阳性的13份样品均扩增到约800 bp的特异条带,未检测出病毒的样品则未扩增到任何条带(图1)。所得序列经BLAST检索,获得864 bp的TuMV *CP*基因,证实采自北碚、巴南和石柱等13个区县的萝卜均受到TuMV的侵染,采自大足区的萝卜样品未受到TuMV侵染,检测结果与ELISA结果吻合。

2.3 TuMV *CP*基因序列比较

13个分离物CP核苷酸序列比对结果表明,其核苷酸相似性为89.1%~99.2%,可分为2组,其中BB2、FD1、SZ4和WS9为一组,核苷酸相似性为98.8%~99.2%,BN9、BS1、JJ4、JL5、HC16、NC4、QJ1、TL1和YC5为另外一组,核苷酸相似性为97.0%~99.0%,而这2组分离物之间核苷酸相似性较低,为89.1%~91.0%。BLAST检索结果表明,这13个分离物与国内已报道的TuMV分离物CP核苷酸相似性在88.3%~99.4%之间。重组分析结果表明,在13条TuMV CP序列中仅检测到1个潜在重组事件,即分离物TL1可能为YC5和BB2的重组产物,结果表明

重庆市的13个TuMV萝卜分离物*CP*基因中无明显　　重组。

表1 重庆市146份萝卜植株样品的TuMV检测结果

Table 1 Detection results of TuMV in 146 radish plants collected from Chongqing City

地点 Location	样品数 No. of samples	阳性样品数 No. of positive samples	检出率（%） Detection rate
北碚区 Beibei District	15	14	93.3
巴南区 Banan District	11	6	54.5
九龙坡区 Jiulongpo District	9	8	88.9
綦江区 Qijiang District	14	10	71.4
万盛区 Wansheng District	11	10	90.9
南川区 Nanchuan District	4	1	25.0
石柱土家族自治县 Shizhu Tujia Autonomous County	14	13	92.9
璧山区 Bishan District	9	6	66.7
永川区 Yongchuan District	7	4	57.1
江津区 Jiangjin District	6	4	66.7
大足区 Dazu District	6	0	0.0
铜梁区 Tongliang District	15	12	80.0
合川区 Hechuan District	16	11	68.8
丰都县 Fengdu County	9	6	66.7

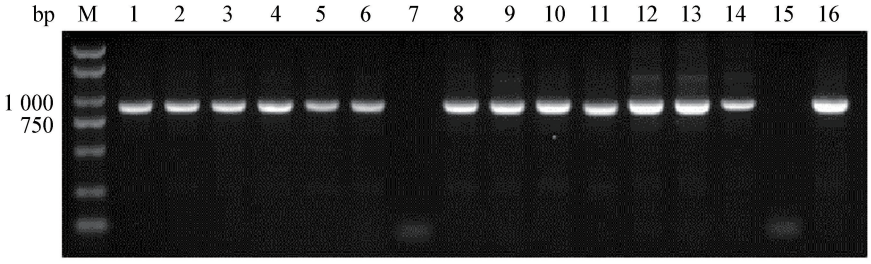


图1 部分萝卜样品中TuMV *CP*基因的PCR扩增

Fig. 1 Amplification of TuMV *CP* gene in some radish plants

M：Marker BM2000+1.5K；1~14：样品BB2、BN9、BS1、FD1、SZ4、JL5、DZ2、WS9、JJ4、HC16、NC4、QJ1、TL1和YC5；15：阴性对照；16：阳性对照。M：Marker BM2000+1.5K；1−14：samples of BB2，BN9，BS1，FD1，SZ4，JL5，DZ2，WS9，JJ4，HC16，NC4，QJ1，TL1 and YC5；15：negative control；16：positive control.

2.4 TuMV *CP*基因序列系统进化分析

系统进化树表明，重庆市的13个TuMV萝卜分离物*CP*基因序列形成2个独立的分支，即BB2、FD1、SZ4和WS9为一个分支，BN9、BS1、JJ4、JL5、HC16、NC4、QJ1、TL1和YC5为另一个独立的分支（图2-A）。根据*CP*基因核苷酸序列的差异，可将41个TuMV分离物划分为4个组，即Asian-BR、basal-B、basal-BR和world-B组（图2-B）。重庆市的13个TuMV分离物分布在basal-BR和world-B组中，在Asian-BR和basal-B组中均无分布，其中BN9、BS1、JJ4、JL5、HC16、NC4、QJ1、TL1和YC5分离物属于word-B组，BB2、FD1、SZ4和WS9分离物属于basal-BR组。综上所述，重庆市TuMV萝卜分离物存在word-B组和basal-B组2个株系，且word-B组为优势株系。

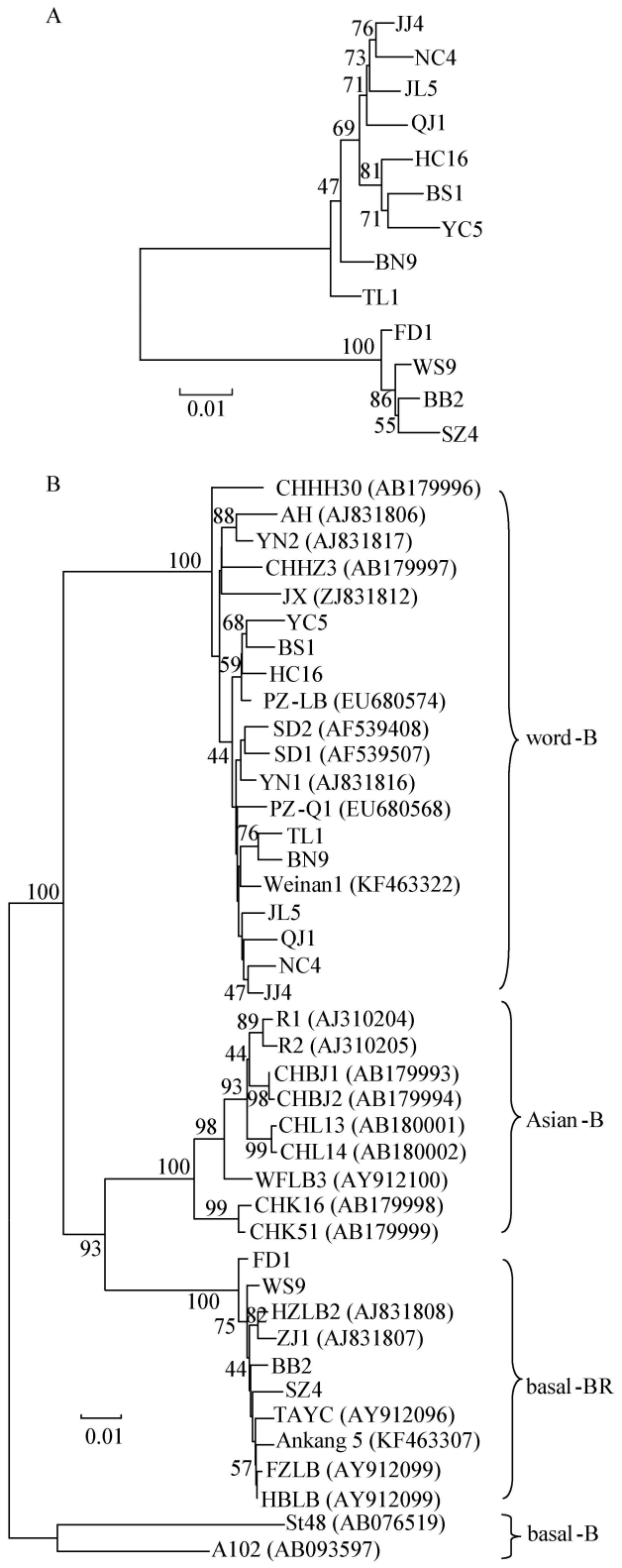


图2 基于重庆市TuMV萝卜分离物（A）和TuMV萝卜分离物与其相似分离物（B）CP构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic dendrograms of TuMV *CP* gene sequences of Chongqing isolates (A) and Chongqing isolates with the other 28 isolates (B)

3 讨论

目前ELISA法和PCR法已广泛用于植物病毒的检测，本试验同时采用了这2种方法对部分样品进行TuMV检测，检测结果一致，从检测的准确性、可操作性及成本等方面考虑，认为ELISA方法适用于田间大规模普查检测。对本试验中存在的31份病毒病症状明显但检测呈阴性的样品，可能是宿主植株内病毒含量较低或病毒*CP*基因某些位点发生了变异，还需要通过电镜切片或实时荧光定量PCR等方法进一步验证。此外，国内已报道侵染萝卜的病毒有BBWV、CMV、RMV和TuMV等（韦石泉等，1987；陈集双等，2001；袁伟玲等，2015），本研究仅针对TuMV进行了检测，因此样品中是否还存在其它病毒种类还需进一步鉴定。

*CP*基因核苷酸序列常被用于病毒基因分组研究，Tian et al.（2007）根据*CP*基因核苷酸差异，认为我国存在world-B、Asian-BR和basal-BR组TuMV分离物。根据CP核苷酸序列比较，本研究所获得13个TuMV分离物分为2组，且组间核苷酸相似性明显低于组内核苷酸相似性，表明重庆市TuMV萝卜分离物可能来自不同毒源的不同变异株。基因重组是马铃薯Y属病毒变异的重要因素，已有研究表明TuMV重组事件在*P1*、*VPg*、*HC-Pro*、*P3*、*NIa-Pro*和*CP*基因区域内均有发生（Tan et al.，2004；Ohshima et al.，2007）。本试验对13个重庆萝卜TuMV分离物CP序列进行了重组分析，仅检测到1个潜在重组事件，表明本研究所得分离物*CP*基因无明显重组，但在其它区段是否存在基因重组事件，还需进行全基因组序列分析。

目前通过比较病毒核苷酸或者氨基酸序列间的差异是划分病毒及株系最直接、最准确的手段。如Ohshima et al.（2002）对不同地理来源和不同寄主的78个TuMV分离物进行了分析，根据对寄主的侵染性将其分为2个致病型，即只侵染芸薹属的B型和同时侵染芸薹属和萝卜属的BR型，再根据P1/CP核苷酸序列的差异，将73个分离物划分为world-B、Asian-BR、basal-BR和basal-B组。Zhao et al.（2013）基于*CP*基因序列构建系统进化树，将170个不同国家不同寄主的TuMV分离物划分为4个遗传类群，分别为MB、MR、IBR和OBR。叶艳英等（2012）根据*P3*基因序列的分组结果与全基因组序列或者部分基因序列分组结果一致。以上研究者所选核苷酸序列不完全一致，但从进化树中均可看出TuMV分

组受寄主影响较大，结果比较一致。从本研究的系统进化树中可看出，来自不同地区的13个萝卜TuMV分离物并不存在特异分支，而张成玲等（2014）对不同寄主TuMV分离物*CP*基因序列分析也未发现明显寄主特异性，但山东和江苏2省分离物之间遗传分化显著。可见TuMV分组可能不仅仅与寄主、地理来源和环境条件等单因素相关，而是一个复杂的结合体。

TuMV寄主广泛，除侵染萝卜外，还能侵染油菜、白菜等作物及十字花科杂草（Ochoa Corona et al., 2007; Farzadfar et al., 2009; Sabokkhiz et al., 2012），而本研究仅对重庆市13个区县TuMV萝卜分离物CP核苷酸序列进行了分析，由于受样品数量、地域及采集年份的限制，对于Asian-BR组和basal-B组分离物是否在重庆市其它寄主上存在，word-B组是否为重庆市优势毒源，不同地区、不同寄主分离物之间是否存在差异？后续研究还需要综合考虑病毒分离物的寄主种类、时空差异，扩大采样寄主及地域范围，并对病毒全基因组序列进行分析。

参 考 文 献（References）

Chen J, Chen JP, Adams MJ. 2002. Variation between *Turnip mosaic virus* isolates in Zhejiang Province, China and evidence for recombination. Journal of Phytopathology, 150(3): 142−145

Chen JS, Feng MG, Zhang YZ. 2001. Cloning and sequencing of a *Cucumber mosaic virus* satellite RNA isolated from *Raphanus sativus* and comparison of its sequence with 12 satellite RNAs. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 27(3): 249−254 (in Chinese) [陈集双, 冯明光, 张耀洲. 2001. 黄瓜花叶病毒萝卜分离株卫星RNA的克隆及其与12个卫星RNA核苷酸序列的比较. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 27(3): 249−254]

Farzadfar S, Tomitaka Y, Ikematsu M, Golnaraghi AR, Pourrahim R, Ohshima K. 2009. Molecular characterization of *Turnip mosaic virus* isolates from Brassicaceae weeds. European Journal of Plant Pathology, 124: 45−55

Fu JJ. 2008. Biochemical changes during vernalization in Chinese radish and cloning of LFY gene related to florescence. Master Thesis. Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [付娟娟. 2008. 萝卜春化过程中的生理生化变化及开花基因 LFY 的克隆. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学]

Guo SY, Tong Y, Huang Y, Luo XF, Qing L. 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. 重庆辣椒病毒病病原初步鉴定和分析. 园艺学报, 42(2): 263−270]

Han SZ, Wang LZ, Pu ZQ. 1988. Investigation and pathogenic identification of radish virus disease in Nanjing suburbs. Journal of Nanjing Agricultural University, 11(3): 39−43 (in Chinese) [韩素中, 王隆植, 濮祖芹. 1988. 南京市郊萝卜病毒病的调查和病原鉴定. 南京农业大学学报, 11(3): 39−43]

Huang YZ, Chen JY, Zhu JH, Liu BC, Zhao YQ. 2016. RT-PCR Detection of *Turnip mosaic virus* on *Pseudotellaria heterophylla*. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 31(6): 616−619 (in Chinese) [黄颖桢, 陈菁瑛, 朱景花, 刘保财, 赵云青. 2016. 太子参中芜菁花叶病毒的RT-PCR检测. 福建农业学报, 31(6): 616−619]

Jiang Y, Wang JH, Yang H, Xu MY, Yuan S, Sun W, Xu WL, Xi DH, Lin HH. 2010. Identification and sequence analysis of *Turnip mosaic virus* infection on cruciferous crops in southwest of China. Journal of Plant Pathology, 92(1): 241−244

Jiang Y, Xi DH, Wang JH, Yuan S, Yang H, Xu MY, Lin HH. 2010. Cloning and sequence analysis of coat protein genes of *Turnip mosaic virus* isolates obtained from Sichuan. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 47(3): 639−643 (in Chinese) [蒋彧, 席德慧, 王建辉, 袁澍, 杨辉, 许墨耘, 林宏辉. 2010. 芜菁花叶病毒四川分离物外壳蛋白基因的克隆及序列分析. 四川大学学报(自然科学版), 47(3): 639−643]

Li XD, Liu JL, Li WF, Fan ZF, Li HF, Wang HG. 2005. Identification of virus infecting radish in Weifang City. Acta Phytopathologica Sinica, 35(1): 13−18 (in Chinese) [李向东, 刘金亮, 李文法, 范在丰, 李怀方, 王洪刚. 2005. 潍坊萝卜红心病病原鉴定. 植物病理学报, 35(1): 13−18]

Nguyen HD, Tran HTN, Ohshima K. 2013. Genetic variation of the *Turnip mosaic virus* population of Vietnam: a case study of founder, regional and local influences. Virus Research, 171(1): 138−149

Nyalugwe EP, Jonesa RAC, Barbetti MJ, Kehoe MA. 2015. Biological and molecular variation amongst Australian *Turnip mosaic virus* isolates. Plant Pathology, 64(5): 1215−1223

Ochoa Corona FM, LebasA BSM, Elliott DR, Tang JZ, Alexander BJR. 2007. New host records and new host family range for *Turnip mosaic virus* in New Zealand. Australasian Plant Disease Notes, 2(1): 127−130

Ohshima K, Akaishi S, Kajiyama H, Koga R, Gibbs AJ. 2010. Evolutionary trajectory of *Turnip mosaic virus* populations adapting to a new host. Journal of General Virology, 91(3): 788−801

Ohshima K, Tomitaka Y, Wood JT, Minematsu Y, Kajiyama H, Tomimura K, Gibbs AJ. 2007. Patterns of recombination in *Turnip mosaic virus* genomic sequences indicate hotspots of recombination. Journal of General Virology, 88(1): 298−315

Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R, Hamamoto T, Tomimura K, Tan Z, Sano T, Azuhata F, Walsh JA, Fletcher J, et al. 2002. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. Journal of General Virology, 83(6): 1511−1521

Sabokkhiz MA, Jafarpour B, Shahriari Ahmadi F, Tarighi S. 2012. Identification of *Turnip mosaic virus* isolated from canola in northeast area of Iran. African Journal of Biotechnology, 11(80): 14553−14560

Shi ML. 2007. Cloning and sequence analysis of *HC-Pro* genes of *Tur-*

nip mosaic virus Eurasian isolates. Acta Phytopathologica Sinica, 37(4): 383−389 (in Chinese) [施曼玲. 2007. 芜菁花叶病毒欧亚分离物 *HC-Pro* 基因的克隆和序列分析. 植物病理学报, 37(4): 383−389]

Song YZ, Li LL, Zhu CX, Wen FJ, Wen FK. 2005. Cloning and sequence analysis of coat protein genes of *Turnip mosaic virus* isolates obtained from Shandong. Scientia Agricultura Sinica, 38 (3): 504−510 (in Chinese) [宋云枝, 李玲玲, 朱常香, 温孚江, 温孚凯. 2005. 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. 中国农业科学, 38(3): 504−510]

Tan ZY, Wada Y, Chen JS, Ohshima K. 2004. Inter- and intralineage recombinants are common in natural populations of *Turnip mosaic virus*. Journal of General Virology, 85(9): 2683−2696

Tian YP, Lan YF, Wang J, Shi CK, Zhu XP, Li XD. 2005. Cloning and sequence analysis of 3'-terminal genome of *Turnip mosaic virus* isolates. Acta Phytopathologica Sinica, 35(6): 38−42 (in Chinese) [田延平, 兰玉菲, 王洁, 时呈奎, 竺晓平, 李向东. 2005. 芜菁花叶病毒不同分离物 3′-cDNA 片段的克隆及序列分析. 植物病理学报, 35(6): 38−42]

Tian YP, Zhu XP, Liu JL, Yu XQ, Du J, Kreuze J, Li XD. 2007. Molecular characterization of the 3′-terminal region of *Turnip mosaic virus* isolates from eastern China. Journal of Phytopathology, 155 (6): 333−341

Tomimura K, Gibbs AJ, Jenner CE, Walsh JA, Ohshima K. 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic virus*: comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent ‘emergence’ in East Asia. Molecular Ecology, 12(8): 2099−2111

Tomimura K, Špak J, Katis N, Jenner CE, Walsh JA, Gibbs AJ, Ohshima K. 2004. Comparisons of the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in West and East Eurasia. Virology, 330 (2): 408−423

Tomitaka Y, Ohshima K. 2006. A phylogeographic study of the *Turnip mosaic virus* population in East Asia reveals an ‘emergent’ lineage in Japan. Molecular Ecology, 15(14): 4437−4457

Wei SQ, Wang ZD, Fang DC. 1987. Identification of *Radish mosaic virus* isolate from Shenyang. Plant Protection, 13(4): 24 (in Chinese) [韦石泉, 王振东, 房德纯. 1987. 萝卜花叶病毒沈阳分离物的鉴定. 植物保护, 13(4): 24]

Ye YY, Zeng G, Yan XH, Ma RC, Wu CJ, Yao L. 2012. Cloning and sequence analysis of *P3* genes of *Turnip mosaic virus* isolates from *Brassica* and *Raphanus*. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 34(2): 264−269 (in Chinese) [叶艳英, 曾钢, 闫晓红, 马荣才, 吴才君, 姚磊. 2012. 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. 江西农业大学学报, 34(2): 264−269]

Yuan WL, Yuan SY, Gan CX, Cui L, Deng XH. 2015. Molecular identification and prevention of radish virus disease in Guangshui of Hubei Province. Journal of Changjiang Vegetables, (8): 61−62 (in Chinese) [袁伟玲, 袁尚勇, 甘彩霞, 崔磊, 邓晓辉. 2015. 湖北广水萝卜病毒病的分子鉴定与防治. 长江蔬菜, (8): 61−62]

Zhang CL. 2010. Genetic structure of *Tobacco vein-banding mosaic virus*, *Turnip mosaic virus* and *Potato virus Y*. Ph. D Thesis. Tai’an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [张成玲. 2010. 烟草脉带花叶病毒、芜菁花叶病毒和马铃薯Y病毒的遗传结构分析. 博士学位论文. 泰安: 山东农业大学]

Zhang CL, Zhao YQ, Yang DJ, Sun HJ, Xu Z, Xie YP. 2014. Cloning and sequence analysis of coat protein genes of *Turnip mosaic virus* isolates from different hosts. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 30(1): 37−41 (in Chinese) [张成玲, 赵永强, 杨冬静, 孙厚俊, 徐振, 谢逸萍. 2014. 不同寄主植物上芜菁花叶病毒外壳蛋白基因克隆及分析. 江苏农业学报, 30(1): 37−41]

Zhao L, Feng CH, Hao XG, Wang RR, Hu LY, Wang QC, Wu YF. 2013. Detection and molecular variability of *Turnip mosaic virus* (TuMV) in Shaanxi, China. Journal of Phytopathology, 162(7/8): 519−522

Zhu HJ, Hu GJ, Fan XD, Zhang ZP, Ren F, Dong YF. 2014. Genetic variation analysis of the coat protein of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* isolates from China. Journal of Plant Protection, 41(2): 169−175 (in Chinese) [朱红娟, 胡国君, 范旭东, 张尊平, 任芳, 董雅凤. 2014. 我国部分地区沙地葡萄茎痘相关病毒分离物外壳蛋白序列变异分析. 植物保护学报, 41(2): 169−175]

（责任编辑：张俊芳）