

侵染牡丹的烟草脆裂病毒的检测鉴定及序列分析

贺 振 陈春峰 罗云建 陈夕军*

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为明确江苏省牡丹上烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)的发生情况,利用ELISA和RT-PCR方法对采集自扬州市的40份牡丹叶片样品进行了检测鉴定,测定了其中一个分离物Peony-11中TRV RNA1分子的部分蛋白编码区序列,并结合GenBank中已报道的相关序列对其进行了多样性和系统发生分析。结果显示,江苏省扬州市牡丹上TRV的检出率高达62.5%;序列分析表明本研究获得的TRV牡丹分离物Peony-11与GenBank中其它63个分离物的核苷酸序列一致率为90.5%~99.7%;系统发生和遗传距离分析表明TRV可以分成2个组10个亚组,组间、亚组间具有较为清晰的地理和寄主特异性,其中Peony-11分离物位于亚组I-1。

关键词: 牡丹;烟草脆裂病毒;序列分析;系统发生分析

Molecular detection, identification and genetic diversity of *Tobacco rattle virus* on peony

He Zhen Chen Chunfeng Luo Yunjian Chen Xijun*

(School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China)

Abstract: In order to investigate the occurrence of *Tobacco rattle virus* (TRV) in peony in Jiangsu Province, 40 leaf samples collected from Yangzhou were detected by ELISA and RT-PCR. Partial ORF1 coding region of TRV RNA1 (Peony-11) was sequenced and analyzed with related sequences on GenBank. According to the results, the detection rate of TRV in peony was 62.5% in Yangzhou. Sequence analysis indicated that the TRV peony isolate determined in the present study shared nucleotide identities of 90.5%–99.7% with 63 TRV isolates downloaded from GenBank. Phylogenetic and genetic distance analysis demonstrated that TRVs were clustered into two groups, ten subgroups with clear geography and host specificity, while the TRV Peony-11 isolate determined here belonged to subgroup I-1.

Key words: peony; *Tobacco rattle virus*; sequence analysis; phylogenetic analysis

牡丹 *Paeonia suffruticosa* 隶属于毛茛科芍药属,落叶小灌木,生长缓慢,株型小,是我国特有的木本名贵花卉,素有“国色天香”之美誉,“百花之王”之美称。牡丹在我国栽植历史悠久,据史料记载,已有1 600多年(关云霄等,2014)。国际上,日本、法国、英国、美国、意大利、澳大利亚、新加坡、朝鲜、荷兰、加拿大等20多个国家均有牡丹栽培。牡丹病害是制约牡丹栽培的重要原因之一。常见的牡丹病害有20多种,病毒病是其中一种重要的类型。牡丹病毒病的典型症状包括在叶片上产生大小不一的环斑、

轮斑、不规则病斑,部分病株还可能出现黄化、花叶和斑驳等症状。目前,已发现的牡丹病毒病原物主要有3种,包括烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)、苜蓿花叶病毒(*Alfalfa mosaic virus*, AMV)和番茄斑萎病毒(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)(Bellardi et al., 2003)。

TRV属于植物杆状病毒科烟草脆裂病毒属,其基因组具有2个正单链RNA分子——RNA1和RNA2(Macfarlane, 1999),分别包被在2种不同类型的杆状病毒粒子中。RNA1约有6 800个核苷酸(nt),

基金项目: 国家自然科学基金(31601604, 31500388), 江苏省高校自然科学基金(16KJB210015)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xjchen@yzu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-01

且基因组结构保守(Macfarlane, 2010)。RNA1 的近 5' 端开放阅读框(open reading frame, ORF)编码 1 个具有甲基转移酶(methyltransferase)和解旋酶(helicase)基序的蛋白质,分子量约 134 kD(Urban et al., 1996)。通读终止密码子 UGA,可翻译产生一个具有典型 RdRp 基序的 194 kD 的蛋白质。RNA1 下游的 1a ORF 编码约 29 kD 运动蛋白(movement protein, MP), 1b ORF 编码大小约为 16 kD 富含半胱氨酸的沉默抑制蛋白。RNA2 编码病毒外壳蛋白(coat protein, CP)以及一个或多个另外的蛋白(2b 和 2c)(Yin et al., 2014)。因为 2b 和 2c 基因可能 1 个或 2 个同时缺失(Macfarlane, 2003), TRV 不同分离物 RNA2 的基因组结构和长度(1 900~3 900 nt)有显著变化。

目前,牡丹病毒病的相关研究较少。1976 年,Chang et al. (1976)首次在日本牡丹上发现 TRV,随后在新西兰和立陶宛的牡丹上也发现 TRV(Jones & Young, 1978; Samuitienė et al., 2009)。而国内有关牡丹病毒病的研究较少(杨瑞先等, 2010),目前尚未有 TRV 的发生报道。因此,为了解江苏省牡丹感染 TRV 的情况,本研究于 2016 年在扬州市采集 40 份具有典型病毒病症状的牡丹叶片样品,拟通过 ELISA 和 RT-PCR 方法进行检测,并构建 TRV 牡丹分离物与其它分离物的系统进化树,明确其亲缘关系,分析不同地区和寄主对 TRV 侵染的影响,以期对牡丹病毒病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:2016 年 3—4 月在扬州市瘦西湖、西园曲水等地牡丹叶片上观察到黄化、花叶和斑驳等病毒病症状,采集代表性典型样品 40 个(表 1),保存在 -80°C 冰箱备用。

培养基:LB 培养基(Luria-Bertani):10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L NaCl,使用前加入氨苄青霉素(ampicillin),使其终浓度为 50 mg/mL。

试剂:TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit、5×M-MLV Buffer、dNTPs、RNA 酶抑制剂、反转录酶 M-MLV、Marker、pMD19-T 载体,宝生物工程(大连)有限公司;AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒,康宁生命科学(吴江)有限公司;植物烟草脆裂病毒 ELISA 试剂盒,上海桥杜生物科技有限公司;2×Taq Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:Eppendorf AG 22331 PCR 仪,德国 Eppen-

dorf 公司;培清 JS-680B 凝胶成像系统,上海培清公司;XW-80A 型漩涡振荡器,上海青浦沪西仪器厂;DYCP-28A、DYCP-31A 型电泳槽,北京市六一仪器厂;Thermo Scientific MicroCL 17 微量离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 叶片总 RNA 提取及 ELISA 检测

叶片总 RNA 的提取参照 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒说明书进行。

采用植物烟草脆裂病毒 ELISA 试剂盒进行 TRV 检测,具体步骤如下:从室温放置 20 min 的铝箔袋中取出所需板条,剩余板条用自封袋密封放回 4°C 冰箱。设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL 。先在样本孔加 5 μL 总 RNA,再加 45 μL 样品稀释液;空白孔不加。除空白孔外,标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)标记的检测抗体 100 μL ,用封板膜封住反应孔,于 37°C 或恒温箱温育 60 min。弃去液体,在吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置 1 min,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干,如此重复洗板 5 次(也可用洗板机洗板)。每孔加入底物 A、B(试剂盒提供)各 50 μL , 37°C 避光孵育 15 min。每孔加入 50 μL 终止液,15 min 内在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

1.2.2 cDNA 合成及 PCR 扩增、克隆和序列测定

利用反转录酶 M-MLV 和特异性引物 TRVR1439(5'-GCHGCCCCGTTWATGAAYARGA-C-3')(Fisher, 2012)将总 RNA 反转录成第 1 链 cDNA。在 PCR 管中依次加入下列试剂:20 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 TRVR1439 1 μL 、700 ng/ μL 总 RNA 1 μL 、无核酸酶水 4 μL 。混匀离心后,于 70°C 孵育 10 min,然后迅速置于冰上冷却 2 min。PCR 管离心 5 s 后再加入下列试剂:5×M-MLV Buffer 2 μL 、dNTPs(各 10 mmol/L)0.5 μL 、40 U/ μL RNA 酶抑制剂 0.25 μL 、200 U/ μL 反转录酶 M-MLV 0.25 μL 、无核酸酶水 1 μL 。混匀后离心 5 s,于 42°C 孵育 1 h, 70°C 孵育 15 min,冰上冷却 2 min。得到的 cDNA 溶液保存于 -20°C 待用。

将反转录获得的 cDNA 溶液用作 PCR 反应的模板。50 μL PCR 反应体系:cDNA 2 μL 、上游引物 TRVF683(5'-GCTATTGGTGATCAAGCTAGAAG-3')2 μL 、下游引物 TRVR1439 2 μL 、5 U/ μL 2×Taq Master Mix 25 μL 、ddH₂O 19 μL 。PCR 反应条件: 94°C 变性 1 min,按下列条件进行 30 个循环: 94°C 变

性 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 最后 72℃延伸 10 min。全部 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 切取 780 bp 左右的目的条带, 用凝胶回收试剂盒回收纯化后, 克隆到 pMD19-T 载体, 转化大肠杆

菌 *Escherichia coli* DH5α。阳性克隆经菌液 PCR 验证后, 随机选取 3 个克隆由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 所得序列利用 BLAST 和 BioEdit 软件进行序列比对和分析。

表 1 江苏省扬州市牡丹样品采集信息表

Table 1 Sample collection list of peony in Yangzhou City in Jiangsu Province

编号 Number	采样时间 Collection time	采样地点 Collection location	症状 Symptom	检测结果 Testing result	
				ELISA	RT-PCR
1	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	+	+
2	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	花叶 Mosaic	+	+
3	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	+	+
4	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	+	+
5	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	+	+
6	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	+	+
7	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	-	-
8	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	-	-
9	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	花叶 Mosaic	-	-
10	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	-	-
11	2016-3-29	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	-	+
12	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	+	+
13	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	黄化 Yellowing	+	+
14	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	黄化 Yellowing	+	+
15	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	花叶 Mosaic	+	+
16	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	+	+
17	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	黄化 Yellowing	-	-
18	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	花叶 Mosaic	-	-
19	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	-	-
20	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	-	-
21	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	-	+
22	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	斑驳 Mottled	-	-
23	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	花叶 Mosaic	+	+
24	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	花叶 Mosaic	+	+
25	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	花叶 Mosaic	+	+
26	2016-4-09	瘦西湖 Slender Western Lake	花叶 Mosaic	+	+
27	2016-4-09	西园曲水 Western Music Water Park	斑驳 Mottled	+	+
28	2016-4-09	西园曲水 Western Music Water Park	斑驳 Mottled	+	+
29	2016-4-09	西园曲水 Western Music Water Park	斑驳 Mottled	+	+
30	2016-4-09	西园曲水 Western Music Water Park	斑驳 Mottled	-	-
31	2016-4-09	西园曲水 Western Music Water Park	斑驳 Mottled	-	+
32	2016-4-09	西园曲水 Western Music Water Park	斑驳 Mottled	-	-
33	2016-4-09	西园曲水 Western Music Water Park	斑驳 Mottled	-	-
34	2016-4-09	西园曲水 Western Music Water Park	斑驳 Mottled	-	-
35	2016-4-09	西园曲水 Western Music Water Park	斑驳 Mottled	-	-
36	2016-4-09	史可法纪念馆 Shi Kefa Memorial	斑驳 Mottled	+	+
37	2016-4-09	史可法纪念馆 Shi Kefa Memorial	斑驳 Mottled	+	+
38	2016-4-09	史可法纪念馆 Shi Kefa Memorial	斑驳 Mottled	+	+
39	2016-4-09	便益门广场 Bianyimen Square	斑驳 Mottled	+	+
40	2016-4-09	便益门广场 Bianyimen Square	斑驳 Mottled	+	+

+: 阳性; -: 阴性。+: Positive; -: negative.

1.2.3 多样性比对和系统发育分析

以辣椒环斑病毒(*Pepper ringspot virus*, PeRSV)(NC003669)作为比对分析的外组,将GenBank中已登录的63个TRV分离物与本研究获得的序列进行分析。通过CLUSTAL X2和TRANSALIGN(由Georg Weiller教授惠赠)进行核苷酸序列和氨基酸序列的比对,以确定比对后的核苷酸序列能正确编译出氨基酸。

使用软件Mega 7.0对上述序列通过邻接法(neighbor-joining, NJ)进行系统发生分析,支长用自举法(bootstrap)进行1 000次模拟复制计算检验。

1.2.4 多样性分析和遗传距离分析

使用DnaSP 5.0软件计算不同种群分离物的核苷酸多样性(nucleotide diversity)和单体型多样性(haplotype diversity)。通常来说,植物RNA病毒种群的单体型多样性值较高,核苷酸多样性值较低。采用软件Mega 7.0通过最大组成似然模型(maximum composite likelihood)计算分离物在不同分组、寄主、地理间的遗传距离,支长用自举法进行1 000次模拟复制计算检验。

2 结果与分析

2.1 供试牡丹样品ELISA及RT-PCR检测结果

2016年,江苏省扬州市牡丹样品TRV检测结果显示,在ELISA检测中,40个牡丹感病样品中有22个样品显阳性,检出率为55.0%;在RT-PCR检测中,利用引物TRVF683和TRVR1439在25个样品扩增获得约780 bp片段,检出率为62.5%。其中,采自瘦西湖牡丹样品的TRV检出率为65.4%(17/26),西园曲水样品的TRV检出率为44.4%(4/9)。

2.2 TRV的序列多样性及系统进化分析

随机选择1个TRV阳性样品(Peony-11)进行克隆测序,测定的3个克隆序列完全一致,选择其中1个序列经BLASTn比对,结果显示其与GenBank中TRV马铃薯分离物(KT033407)具有99.0%的一致率,确定在感病牡丹中鉴定到TRV,并将该分离物序列提交到GenBank,其登录号为KX345120。采用DNAMAN对TRV-Peony-11和GenBank中下载的63个TRV分离物进行多序列比对,核苷酸序列一致率均在90.0%以上。其中Peony-11与某分离物(AF406990)的一致率最高,为99.7%;与美国牡丹分离物(JX912715)的一致率最低,为90.5%。

在系统进化树中,64个TRV分离物形成2个分

组,其中第I组中43个分离物又可分成6个亚组,分别为I-1、I-2、I-3、I-4、I-5和I-6;第II组中21个分离物可分成4个亚组,分别为II-1、II-2、II-3和II-4;本研究测定的Peony-11属于亚组I-1(图1)。各组或者亚组间具有较清晰的地理特异性,例如亚组I-2、I-3、I-5、I-6、II-3、II-4中的分离物都来自于美国,II-1、II-2中分离物主要来自于德国和波兰;此外,I-6亚组包含的TRV都分离自牡丹,II-4亚组TRV都分离自玉簪,II-1亚组TRV大部分分离自马铃薯,这表明TRV在不同寄主间也表现出较明显的特异性。

2.3 多样性分析和遗传距离分析结果

比较TRV分离物在不同分组内的单体型和核苷酸多样性发现TRV在2个系统发育分组内都具有较高的单体型多样性(>0.971)和较低的核苷酸多样性(<0.0411);在不同寄主种群中,TRV马铃薯分离物种群具有最低的单体型多样性(0.933)和最高的核苷酸多样性(0.0554);不同地理种群中,TRV美国和德国种群的单体型多样性都趋近于1.000,而核苷酸多样性相对较高(表2)。

组间遗传差异分析中,组I和组II间的遗传距离为0.095,遗传差异显著。在寄主方面,TRV牡丹和淫羊藿间的遗传距离最低,为0.0376,牡丹和马铃薯间的遗传距离最高,为0.0811(表3);在不同国家间,TRV美国和波兰间的遗传距离最高,为0.0878,德国与波兰间也有较明显的差异,遗传距离为0.0527(表4)。

3 讨论

本研究通过ELISA和RT-PCR法对牡丹样品的检测结果存在差异,ELISA结果显示有22个样品为阳性,检出率为55.0%;RT-PCR结果显示有25个样品为阳性,检出率为62.5%。究其原因,可能是由于样品浓度过低导致ELISA无法检测出;另外牡丹中多糖多酚物质含量较高,对RNA抽提结果影响较大,可能也是影响检测结果的原因之一。尽管2种方法检测结果存在轻微差异,但均可表明TRV在江苏省扬州市牡丹上发生广泛,应该是牡丹病毒病的一个重要病原物之一。与本研究的結果相类似,He & Chen(2016)发现,TRV在江苏省扬州市芍药上的检出率达65.4%以上,这表明TRV是芍药属2种主要花卉—牡丹和芍药病毒病害的主要病原物之一。在表现花叶和斑驳症状的牡丹样品中,检出率都较高,分别达75.0%和58.6%,表明TRV可能会引起牡丹表现不同的症状类型。



图1 以TRV RNA1部分ORF1序列构建牡丹及其近似植物的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic trees of peony and related plants constructed with partial ORF1 region sequences of TRV RNA1

分离物在进化树中以登录号-分离物名称/寄主/采集地点的形式表示。辣椒环斑病的核酸序列(NC003669)作为外组。加粗的是本研究所分离物。 Isolates are indicated in the tree by accession number-isolate name/host/geographical origin of collection. The nucleotide sequence of pepper ringspot virus (NC003669) is used as outgroup. The bold isolate is obtained in this research.

表2 TRV RNA1 部分ORF1序列的单体型和核苷酸多样性分析
Table 2 Haplotype and nucleotide diversity analysis of partial ORF1 region sequences of TRV RNA1

分组 Group		数目 No.	单体型多样性 Hd	核苷酸多样性 Pi
系统发育	I	43	0.993±0.007	0.0320±0.0008
Phylogenetic group	II	21	0.971±0.030	0.0411±0.0045
寄主种群	牡丹 Peony	24	0.996±0.013	0.0359±0.0075
Host population	马铃薯 Potato	10	0.933±0.077	0.0554±0.0090
	烟草 Tobacco	4	1.000±0.177	0.0451±0.0199
	玉簪 Hostas	15	1.000±0.024	0.0435±0.0085
	淫羊藿 Barrenwort	2	1.000±0.500	0.0090±0.0068
地理种群	美国 USA	42	0.999±0.006	0.0526±0.0039
Geography population	德国 Germany	7	1.000±0.076	0.0618±0.0081
	波兰 Poland	4	0.500±0.265	0.0019±0.0010

表中数据为平均数±标准差。Data in the table are mean±SE.

表3 TRV RNA1 部分ORF1区不同寄主间的遗传距离分析
Table 3 Genetic distances among the different host groups based on the partial ORF1 region of TRV RNA1

	牡丹 Peony	淫羊藿 Barrebwort	马铃薯 Potato	玉簪 Hostas	烟草 Tobacco
牡丹 Peony		0.0376(0.0050)	0.0811(0.0079)	0.07364(0.0078)	0.0586(0.0059)
淫羊藿 Barrebwort			0.0758(0.0083)	0.06358(0.0077)	0.0528(0.0062)
马铃薯 Potato				0.07224(0.0071)	0.0689(0.0071)
玉簪 Hostas					0.0714(0.0076)
烟草 Tobacco					

表4 TRV RNA1 部分ORF1区不同国家间的遗传距离分析
Table 4 Genetic distances among the different location groups based on the partial ORF1 region of TRV RNA1

	美国 USA	德国 Germany	波兰 Poland
美国 USA		0.0761(0.0071)	0.0878(0.0094)
德国 Germany			0.0527(0.0060)
波兰 Poland			

TRV 具有较高的遗传多样性, Koenig et al. (2011)发现 TRV AL(HM195288)RNA1 与其它 TRV 分离物有约 92%~93% 的一致率, 类似的, 本研究发现 TRV Peony-11 分离物与其它分离物间一致率为 90.5%~99.7%。Sudarshana & Berger(1998)根据 CP 氨基酸序列将烟草脆裂病毒组的 8 个分离物分为 2 组; Koenig et al.(2011)根据 RNA1 基因组序列将烟草脆裂病毒组 8 个分离物也分为 2 组, 而 Koenig et al.(2016)根据 RNA1 编码的 16 K 蛋白将 21 个分离物分为 3 组, 本研究的结果进一步支持 TRV 依据 RNA1 可分为 2 个组, 多个亚组, 且组间的遗传距离显著。TRV 不同分离物在系统进化树中的分布受到地理和寄主的双重影响, TRV 在不同区域、不同寄主种群内的核苷酸多样性水平较高, 而种群间的遗传距离明显, 说明在 TRV 的进化过程中, 受到较

强的地理隔离和寄主选择作用。

综上, 本研究调查了 TRV 在江苏省扬州市牡丹上的发生分布状况, 明确 TRV 是扬州市牡丹病毒病的重要病原之一, 在分子水平上分析了 TRV 在不同国家、不同寄主上的遗传多样性差异, 为牡丹病毒病有效防控提供了理论依据。由于本研究中采样地点较为单一, 样本量较少, 在后续试验中要增加江苏省不同地区的采样地点和采样量, 进一步确认 TRV 以及另外 2 种病毒 AMV 和 TSWV 在江苏省牡丹上的发生分布情况, 以明确江苏牡丹病毒病的主要致病病原。

参 考 文 献 (References)

Bellardi MG, Rubies-Autonell C, Bianchi A. 2003. First report of a disease of peony caused by *Alfalfa mosaic virus*. Plant Disease, 87

- (1): 99
- Chang MU, Doi Y, Yora K. 1976. A rod-shaped virus found in the peony ringspot. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 42(3): 325–328
- Fisher JR. 2012. First report of *Tobacco rattle virus* associated with ring spot and line pattern disease of peony in Ohio. *Plant Health Progress*, DOI: 10.1094/PHP-2012-0711-01-BR
- Guan YX, Hu K, He CL, Hou XG, Dong ML, He TT, Wang Z, Liu GX. 2014. Research on the field identification characteristics of peony major diseases. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 42(11): 3265–3267 (in Chinese) [关云霄, 胡柯, 贺春玲, 侯小改, 董梦琳, 何童童, 王桢, 刘改秀. 2014. 牡丹主要病害的田间识别特征. *安徽农业科学*, 42(11): 3265–3267]
- He Z, Chen C. 2016. First report of *Tobacco rattle virus* infecting Chinese herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) in China. *Plant Disease*, 100(12): 2543
- Jones AT, Young BR. 1978. Some properties of two isolates of *Tobacco rattle virus* obtained from peony and narcissus plants in New Zealand. *Plant Disease Reporter*, 62(11): 925–928
- Koenig R, Hilbrich I, Lindner K. 2016. Molecular characterization of a new *Tobacco rattle virus* (TRV) RNA2 and identification of different TRV RNA1/RNA2 pairings in various potato-growing areas in Germany. *Archives of Virology*, 161(3): 693–697
- Koenig R, Lesemann DE, Pfeilstetter E, Winter S, Pleij CW. 2011. Deletions and recombinations with the RNA1 3' ends of different tobamoviruses have created a multitude of *Tobacco rattle virus* TCM-related RNA2 species in *Alstroemeria* and tulip. *Journal of General Virology*, 92(4): 988–996
- Macfarlane SA. 1999. Molecular biology of the tobamoviruses. *Journal of General Virology*, 80(11): 2799–2807
- Macfarlane SA. 2003. Molecular determinants of the transmission of plant viruses by nematodes. *Molecular Plant Pathology*, 4(3): 211–215
- Macfarlane SA. 2010. Tobamoviruses – plant pathogens and tools for biotechnology. *Molecular Plant Pathology*, 11(4): 577–583
- Samuitienė M, Navalinskienė M, Dapkūnienė S. 2009. Investigation of *Tobacco rattle virus* infection in peonies (*Paeonia* L.). *Sodininkystė ir Daržininkystė*, 28(3): 199–208
- Sudarshana MR, Berger PH. 1998. Nucleotide sequence of both genomic RNAs of a North American *Tobacco rattle virus* isolate. *Archives of Virology*, 143(8): 1535–1544
- Urban C, Zerfass K, Fingerhut C, Beier H. 1996. UGA suppression by tRNA^{Met} occurs in diverse virus RNAs due to a limited influence of the codon context. *Nucleic Acids Research*, 24(17): 3424–3430
- Yang RX, Liu P, Fang ZM, Li JH. 2010. Current situation and prospect of peony disease research. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 39(11): 138–143 (in Chinese) [杨瑞先, 刘萍, 方站民, 李建恒. 2010. 牡丹病害研究现状及展望. *河南农业科学*, 39(11): 138–143]
- Yin Z, Pawelkiewicz M, Michalak K, Chrzanowska M, Zimnoch-Guzowska E. 2014. The genomic RNA1 and RNA2 sequences of the *Tobacco rattle virus* isolates found in Polish potato fields. *Virus Research*, 185(7): 110–113

(责任编辑:高 峰)