

引文格式: 赵兴能, 张未, 张丽芳, 等. 津巴布韦烟草丛顶病病原物的分子鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(2): 237–242. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202012027

津巴布韦烟草丛顶病病原物的分子鉴定*

赵兴能^{1,2,3}, 张未^{2,4}, 张丽芳^{1,2,5}, 徐萍^{1,2}, 李艳琼^{1,2,6},
张谊寒², 陈海如^{1**}, 莫笑晗^{2**}

(1. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省烟草农业科学研究院, 云南 昆明 650021;
3. 云南省烟草公司文山州公司, 云南 文山 663099; 4. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650500;
5. 曲靖师范学院 生物资源与食品工程学院, 云南 曲靖 655011; 6. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214)

摘要:【目的】鉴定津巴布韦烟草丛顶病病原复合体组成。【方法】采集津巴布韦烟草丛顶病样品, 对其病原复合体进行分子鉴定。【结果】烟草丛顶病毒津巴布韦分离物(tobacco bushy top virus-Zimbabwe, TBTv-Zimbabwe)在基因组 RNA 核苷酸序列水平上与幽影病毒属(*Umbravirus*)其他成员的一致性为 47.8%~94.6%, 其中与埃塞俄比亚烟草丛顶病毒(Ethiopian tobacco bushy top virus, ETBTv)序列的一致性最高, 为 94.6%; 与中国烟草丛顶病毒(tobacco bushy top virus, TBTv)序列的一致性仅为 56.9%。分子系统进化分析表明: 该病毒分离物与 ETBTv 同源性最高, 为 ETBTv 的分离物, 与 TBTv 为不同的病毒种。TBTv-Zimbabwe 卫星 RNA 与 ETBTv 卫星 RNA 在基因组全长核苷酸序列水平上的一致性为 93.9%, 与 GenBank 数据库中除 ETBTv 卫星 RNA 之外的其他序列无同源性。研究还获得了津巴布韦烟草丛顶病病原复合体中马铃薯卷叶病毒(potato leafroll virus, PLRV)外壳蛋白基因部分核苷酸序列。【结论】津巴布韦烟草丛顶病病原复合体包含 3 种病毒组分, 它们分别与埃塞俄比亚烟草丛顶病病原复合体的 3 种组分在病毒种的分类水平上一致。津巴布韦与中国烟草丛顶病病原物差异较大。

关键词: 津巴布韦; 烟草丛顶病; 病原复合体; 卫星 RNA; 马铃薯卷叶病毒

中图分类号: S435.72 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X(2022)02-0237-06

Molecular Identification of the Causative Agents of Tobacco Bushy Top Disease in Zimbabwe

ZHAO Xingneng^{1,2,3}, ZHANG Wei^{2,4}, ZHANG Lifang^{1,2,5}, XU Ping^{1,2}, LI Yanqiong^{1,2,6},
ZHANG Yihan², CHEN Hairu¹, MO Xiaohan²

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Science, Kunming 650021, China; 3. Wenshan Branch of Yunnan Tobacco Company, Wenshan 663099, China; 4. College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, China; 5. College of Bioresources and Food Engineering, Qujing Normal University, Qujing 655011, China; 6. College of Agronomy and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214, China)

收稿日期: 2020-12-10 修回日期: 2021-12-29 网络首发日期: 2022-03-24

*基金项目: 宁波大学农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室项目(KF20190107); 中国烟草总公司云南省公司科技计划(2021530000242031, 2021YKYZY03)。

作者简介: 赵兴能(1987—), 男, 云南文山山人, 在读博士研究生, 主要从事植物病毒学研究。

E-mail: 455753605@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 陈海如(1944—), 男, 云南昆明人, 博士, 教授, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: 13908854041@126.com; 莫笑晗(1973—), 男, 河南洛阳人, 硕士, 研究员, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: 1744167230@qq.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20220323.1657.004.html>



Abstract: [Purpose] To identify the components of the causative agents of tobacco bushy top disease in Zimbabwe. [Method] A tobacco bushy top diseased plant was collected from Zimbabwe, and molecular identification of the virus complex was conducted. [Results] The genomic nucleotide identities of TBTv-Zimbabwe with other umbraviruses were 47.8%-94.6%. TBTv-Zimbabwe had the highest identity of 94.6% with Ethiopian tobacco bushy top virus (ETBTv). TBTv-Zimbabwe had 56.9% identity with a Chinese isolate of tobacco bushy top virus (TBTv). Molecular phylogenetic analyses showed that TBTv-Zimbabwe was an isolate of ETBTv and it was distantly related to TBTv, which was a distinct virus species. The genomic nucleotide sequence identity between TBTv-Zimbabwe satellite RNA and ETBTv satellite RNA was 93.9%, and TBTv-Zimbabwe satellite RNA showed no homology with other sequences in the GenBank except ETBTv satellite RNA. Nucleotide sequence encoding partial coat protein of potato leafroll virus (PLRV) was determined in tobacco bushy top complex in Zimbabwe. [Conclusion] Three viral components were identified in tobacco bushy top disease complex in Zimbabwe. Each of them was identical to the components of tobacco bushy top disease complex in Ethiopia at the virus species level. The causative agents of Zimbabwean and Chinese tobacco bushy top disease were not the same.

Keywords: Zimbabwe; tobacco bushy top disease; virus complex; satellite RNA; potato leafroll virus

烟草丛顶病 (tobacco bushy top disease, TBTD) 是一种严重危害烟草的病毒病害, 该病最早于 1958 年在津巴布韦北部烟区报道, 随后在南非和马拉维等撒哈拉以南非洲多个地区广泛发生, 造成巨大的经济损失^[1-2]。早期通过对津巴布韦烟草丛顶病症状、寄主范围和传播途径等研究认为: 烟草丛顶病毒 (tobacco bushy top virus, TBTv) 和烟草脉扭病毒 (tobacco vein distorting virus, TVDV) 为该病的病原物^[1,3]。NDOWORA^[4]对 1 个津巴布韦 TBTv 分离物 (TBTv-A2) 进行了初步的分子生物学研究, 分析了感病烟株的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 组成。

自 1993 年以来, 烟草丛顶病在中国云南烟区大面积发生, 造成了严重的经济损失^[5]。对中国烟草丛顶病病原复合体的分子鉴定表明: 该病原复合体的组分包括幽影病毒属 (*Umbravirus*) 的 TBTv 及其卫星 RNA^[6]以及马铃薯卷叶病毒属 (*Polerovirus*) 的 TVDV 及其伴随 RNA^[7-8]。

埃塞俄比亚近年来暴发了烟草丛顶病, 对当地烟叶生产造成了严重的影响。ABRAHAM 等^[9]研究表明: 埃塞俄比亚烟草丛顶病由 1 个病原复合体引起, 该复合体由 1 个幽影病毒属成员——埃塞俄比亚烟草丛顶病毒 (Ethiopian tobacco bushy top virus, ETBTv) 及其卫星 RNA 以及马铃薯卷叶病毒 (potato leafroll virus, PLRV) 组成。分子系统进化分析表明: ETBTv 与幽影病毒属花生

丛簇病毒 (groundnut rosette virus, GRV) 亲缘关系最近, 两者基因组全长核苷酸序列的一致性为 70.7%, 而与中国 TBTv 基因组全长核苷酸序列的一致性仅为 59.3%, 故 ETBTv 与 TBTv 是 2 种不同的病毒。

马拉维位于津巴布韦南部, 烟草丛顶病对当地烤烟生产造成严重的危害^[1]。UDAGAWA 等^[10]应用深度测序技术获得了 TBTv 马拉维分离物 (TBTv-MW) 基因组全长核苷酸序列, 其与 ETBTv 基因组全长核苷酸序列一致性为 87.7%, 而与中国 TBTv 基因组全长核苷酸序列一致性为 51.6%, 表明 TBTv-MW 为 ETBTv 的分离物 (ETBTv-Malawi)。

除了 TBTv-A2 复制酶基因片段 (549 nt) 序列 (GenBank 登录号: AJ704818) 被测定外, 津巴布韦烟草丛顶病研究局限于病害的普通生物学特征, 未完成病原物的分子鉴定工作, 它与其他国家烟草丛顶病病原物之间的区别也未见报道。本研究采集了 1 个津巴布韦烟草丛顶病样品, 开展其病原物分子鉴定。研究结果将明确津巴布韦烟草丛顶病病原复合体的组分及分类地位, 明确不同国家发生的烟草丛顶病病原物之间的关系。

1 材料与方法

1.1 样品来源

津巴布韦烟草丛顶病烟株样品采集自津巴布

韦哈拉雷市郊区农场,经过蚜虫连续传播接种烤烟(品种K326),活体隔离保存于云南省烟草农业科学研究院研和试验基地。病株表现褪绿黄化、侧枝丛生和节间缩短等烟草丛顶病典型症状。

1.2 烟草丛顶病毒津巴布韦分离物基因组全长核苷酸序列分析

应用 VALVERDE 等^[11]的方法提取感染津巴布韦烟草丛顶病烟株中的 dsRNA,总 dsRNA 经过琼脂糖电泳分离后,纯化长度约为 4 kbp 的烟草丛顶病毒津巴布韦分离物(TBTV-Zimbabwe) dsRNA 复制中间型。参考 ATTOUI 等^[12]的方法对病毒的 5'和 3'端进行扩增,所用特异引物根据 ETBTB 基因组序列设计,分别为 ZTBTBVR281(5'-CCTCATTGGGTGGTGTGGTG-3')和 ZTBTBVF3861(5'-TAAGCTCGGGTGTGTGAACC-3');扩增产物经过切胶纯化(QIAquick Gel Extraction Kit)后,连接 PMD-19T 载体(TaKaRa),转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(TaKaRa);经过菌落 PCR 筛选,提取重组质粒进行插入片段序列测定(Invitrogen)。根据获得的基因组两端序列设计引物 ZTBTB5(5'-GGGTTTCAACATGGCAATTCGAGCAATAAC-3')和 ZTBTB3(5'-GGGCGCGCGGGGGTGAAATCCC GCCGCTA-3'),然后进行病毒基因组全长序列扩增;扩增产物经过切胶纯化,插入双元载体 PCB301-CH(数据未发表)中,应用基因组步移法对插入片段进行序列测定(Invitrogen)。

基因组片段序列应用 DNASTAR 软件组装,获得 TBTV-Zimbabwe 基因组全长序列。应用 NCBI 在线分析软件 ORF Finder,结合 BLAST 等生物信息学分析工具对 TBTV-Zimbabwe 基因组进行注释。应用 DNASTAR 软件进行 TBTV-Zimbabwe 与幽影病毒属其他成员基因组核苷酸序列以及基因组编码的推测蛋白质氨基酸序列对比,应用 MEGA X 软件的 NJ 法构建分子系统进化树,进化树节间的数值为 1 000 次自展法检验的结果^[13]。参加比较的病毒及其基因组序列 GenBank 登录号为:胡萝卜拟斑驳病毒(carrot mottle mimic virus, CMoMV, U57305)、胡萝卜斑驳病毒(carrot mottle virus, CMoV, FJ188473.1)、ETBTB(KJ918748.1)、花生丛簇病毒(groundnut rosette virus, GRV, Z69910.1)、罂粟花叶病毒(opium poppies mosaic virus, OPMV, EU151723.4)、豌豆

耳突花叶病毒 2 号(pea enation mosaic virus-2, PEMV-2, U03563.1)、TBTV (AF402620.2)、烟草斑驳病毒(tobacco mottle virus, TMoV, AY007231)、小苦蕒黄斑驳病毒 2 号(ixeridium yellow mottle virus 2, IxYMV2, KT946712.1)和 ETBTB-Malawi (LC494673.1)。

1.3 烟草丛顶病毒津巴布韦分离物卫星 RNA 基因组全长核苷酸序列分析

提取感染津巴布韦烟草丛顶病烟株中的 dsRNA,纯化长度约为 0.5 kbp 的 TBTV-Zimbabwe 卫星 RNA 的 dsRNA 复制中间型,参考已有方法^[6,12]对该病毒卫星 RNA 全长基因组进行扩增。扩增产物序列测定和分析方法同 1.2 节。

1.4 津巴布韦烟草丛顶病样品中马铃薯卷叶病毒属成员的分子鉴定

采用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取感染津巴布韦烟草丛顶病烟株中的总 RNA,以此为模板,应用黄症病毒科(Luteoviridae)的通用引物^[14],采用一步法 RT-PCR(TaKaRa)对样品中可能存在的黄症病毒科马铃薯卷叶病毒属成员的外壳蛋白(coat protein, CP)基因片段进行扩增。扩增产物序列测定和分析方法同 1.2 节。

2 结果与分析

2.1 烟草丛顶病毒津巴布韦分离物分子鉴定

TBTV-Zimbabwe 基因组全长核苷酸序列为 4 185 nt(GenBank 登录号: MW113249)。编码 4 个开放阅读框架(open reading frame, ORF),其基因组结构具有幽影病毒属的典型特征^[15]。ORF1(11~886 nt)编码推测的 P1 蛋白与病毒复制有关;在 ORF1 终止密码子(884~886 nt)上游发现开放阅读框架-1 移码信号(877~883 nt, GAATTTT),通过在该位置的移码翻译产生 ORF1-2 的翻译产物 P1-2, ORF1-2(11~2 547 nt)编码推测的病毒复制酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp); ORF3(2 679~3 467 nt)编码的 P3 蛋白为推测的病毒多功能蛋白; ORF4(2 773~3 549 nt)编码的 P4 蛋白为推测的病毒细胞间运动蛋白。TBTV-Zimbabwe 基因组有 3 个非编码区,分别是 5'端非编码区(1~10 nt)、基因间非编码区(2 548~2 678 nt)和 3'端非编码区(3 550~4 185 nt)(图 1)。

TBTV-Zimbabwe 与幽影病毒属其他成员在基因组全长核苷酸序列水平上的一致性为 47.8%~

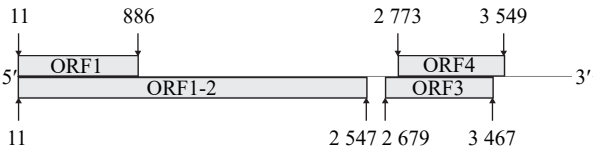


图 1 TBTV-Zimbabwe 基因组结构

Fig. 1 Genomic organization of TBTV-Zimbabwe

94.6%，其中与 ETBTV 和 ETBTV-Malawi 序列的一致性最高，分别为 94.6% 和 87.5%；与在非洲发生流行的 GRV 序列一致性为 71.6%；与 TBTV 序列一致性仅为 56.9% (表 1)。根据幽影病毒属各成员基因组全长序列构建的分子系统进化树 (图 2a) 显示：TBTV-Zimbabwe 与 ETBTV 和 ETBTV-Malawi 位于一个进化分支，它们与 GRV 亲缘关系较近，TBTV 则与 OPMV 位于另一个进化分支。

由表 1 还可知：TBTV-Zimbabwe 与幽影病毒属其他成员 P1 蛋白在氨基酸序列水平上的一致性为 29.2%~91.1%，其中与 ETBTV 和 ETB-

TV-Malawi 的序列一致性最高，分别为 91.1% 和 85.2%；TBTV-Zimbabwe 与幽影病毒属其他成员的 P1-2 蛋白在氨基酸序列水平上的一致性为 49.0~95.9%，其中与 ETBTV 和 ETBTV-Malawi 的序列一致性最高，分别为 95.9% 和 92.0%；TBTV-Zimbabwe 与幽影病毒属其他成员 P3 蛋白在氨基酸序列水平上的一致性为 15.6%~90.1%，其中与 ETBTV 和 ETBTV-Malawi 的序列一致性最高，分别为 90.1% 和 79.0%；TBTV-Zimbabwe 与幽影病毒属其他成员 P4 蛋白在氨基酸序列水平上的一致性为 37.7%~96.1%，其中与 ETBTV 和 ETBTV-Malawi 的序列一致性最高，分别为 96.1% 和 90.3%。根据幽影病毒属成员 P1、P1-2、P3 和 P4 蛋白氨基酸序列分别构建的分子系统进化树 (图 2b~e) 显示：TBTV-Zimbabwe 与 ETBTV 和 ETBTV-Malawi 位于一个进化分支，TBTV 则与 OPMV 位于另一个进化分支。

表 1 TBTV-Zimbabwe 与幽影病毒属成员基因组序列和蛋白质氨基酸序列的一致性

Tab. 1 Genome sequence identities and amino acid sequence identities of the putative proteins between TBTV-Zimbabwe and other umbraviruses

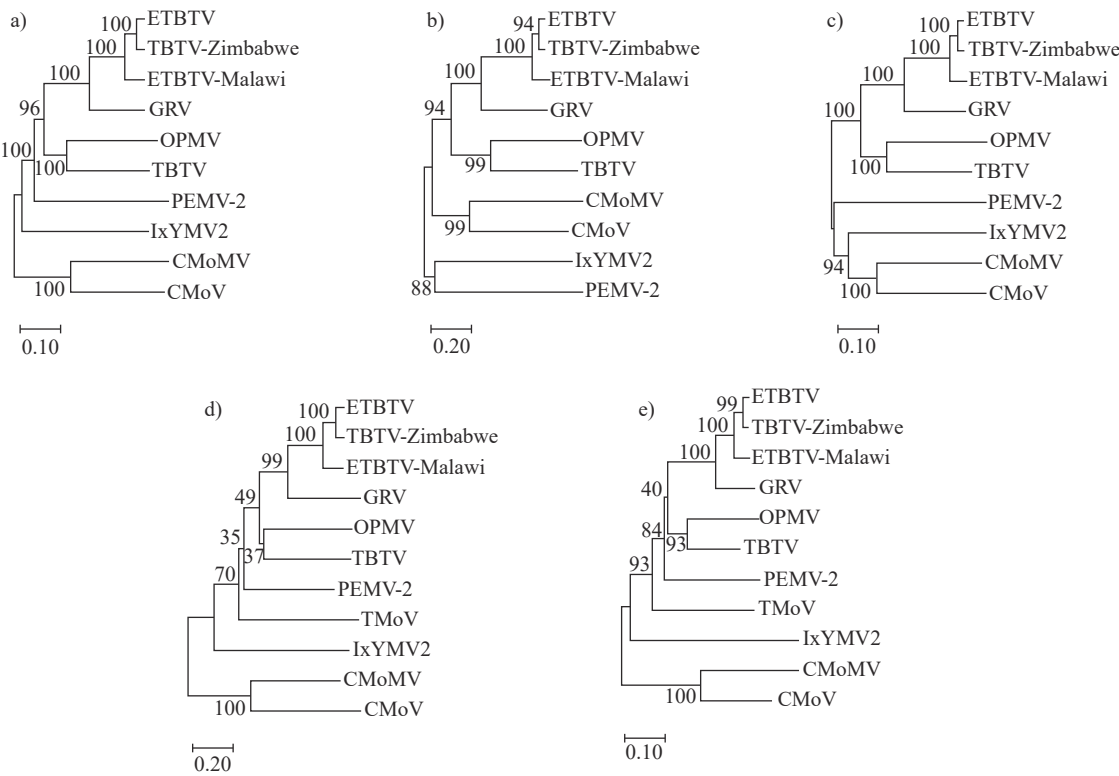
参比病毒 reference viruses	基因组核苷酸 序列一致性 genome sequence identity	P1氨基酸序列一致性 amino acid sequence identity of P1	P1-2氨基酸序列一致性 amino acid sequence identity of P1-2	P3氨基酸序列一致性 amino acid sequence identity of P3	P4氨基酸序列一致性 amino acid sequence identity of P4
CMoMV	47.8	29.2	49.2	17.6	37.7
CMoV	48.8	31.4	49.0	15.6	41.6
ETBTV	94.6	91.1	95.9	90.1	96.1
ETBTV-Malawi	87.5	85.2	92.0	79.0	90.3
GRV	71.6	54.1	73.5	51.0	77.9
IxYMV2	52.7	28.4	48.5	28.3	39.3
OPMV	56.1	35.9	56.4	39.0	56.8
PEMV-2	52.1	30.9	49.0	35.6	58.4
TBTV	56.9	33.4	57.8	38.1	64.7

2.2 烟草丛顶病毒津巴布韦分离物卫星 RNA 分子鉴定

TBTV-Zimbabwe 卫星 RNA 基因组全长核苷酸序列为 522 nt (GenBank 登录号：MW113250)，不编码 ORF。TBTV-Zimbabwe 卫星 RNA 与 ETBTV 卫星 RNA (GenBank 登录号：KJ918747) 和 TBTV 卫星 RNA (GenBank 登录号：KU997687) 基因组全长核苷酸序列的一致性分别为 93.9% 和 42.9%。BLAST 分析表明：TBTV-Zimbabwe 卫星 RNA 与 GenBank 数据库中除 ETBTV 卫星 RNA 各个分离物外的其他序列无同源性。

2.3 津巴布韦烟草丛顶病样品中马铃薯卷叶病毒的分子鉴定

应用黄症病毒科通用引物对津巴布韦烟草丛顶病样品提取的总 RNA 进行 RT-PCR 扩增，在津巴布韦样品中获得约 550 bp 的目标片段，显示有马铃薯卷叶病毒属成员的存在。序列分析表明：该扩增片段为马铃薯卷叶病毒属马铃薯卷叶病毒 (potato leafroll virus, PLRV) 外壳蛋白的部分序列。该序列与 GenBank 登录的其他 PLRV 分离物在核苷酸水平上的一致性为 95.3%~96.1%；其编码的病毒外壳蛋白氨基酸序列与其他 PLRV



注: 系统进化树分别根据幽影病毒属成员基因组全长核苷酸序列 (a)、推测的 P1 蛋白 (b)、P1-2 蛋白 (c)、P3 蛋白 (d) 和 P4 蛋白 (e) 的氨基酸序列构建。

Note: The phylogenetic trees were inferred from genomic sequences of umbraviruses (a), amino acid sequences of putative umbraviral P1s (b), P1-2s (c), P3s (d) and P4s (e).

图 2 幽影病毒属分子系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic trees of umbraviruses

分离物的一致性为 94.3%~97.8%，而与 TVDV 的一致性仅为 58.5%。说明津巴布韦烟草丛顶病病原复合体包含 PLRV。

3 讨论

根据国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 分类报告, 幽影病毒属目前有 11 个确定成员: CMoMV、CMoV、ETBTv、GRV、IxYMV2、莴苣小斑驳病毒 (lettuce speckles mottle virus, LSMV)、OPMV、败酱草和性斑驳病毒 (patrinia mild mottle virus, PMMV)、PEMV-2、TBTV 和 TmoV; 该属的暂定成员有菜豆黄脉带病毒 (bean yellow vein-banding virus, BYVBV)、向日葵皱缩病毒 (sunflower crinkle virus, SuCV)、向日葵黄斑病毒 (sunflower yellow blotch virus, SuYBV) 和烟草黄脉病毒 (tobacco yellow vein virus, TYVV)。幽影病毒属内种的划分原则为: 天然寄主范围、

dsRNA 带型、基因组核苷酸序列一致性小于 70%、与代表大部分基因组的 cDNA 探针不能杂交或者杂交很弱^[15]。本研究表明: TBTV-Zimbabwe 具有典型的幽影病毒属成员基因组结构特征。分子系统进化分析显示: TBTV-Zimbabwe 与 ETBTv 和 ETBTv-Malawi 亲缘关系很近, 而与 TBTV 亲缘关系较远。本研究中 TBTV-Zimbabwe 与另一个津巴布韦 TBTV 分离物 TBTV-A2 复制酶基因部分序列在核苷酸水平上的一致性为 94.5%, 在氨基酸水平上的一致性为 97.3%。根据 ICTV 幽影病毒属内种的划分原则, 津巴布韦烟草丛顶病病原之一的 TBTV-Zimbabwe 应是 ETBTv 的分离物, 它与中国烟草丛顶病病原之一的 TBTV 分别属于幽影病毒属内不同的病毒种。

根据 ICTV 的分类报告, 幽影病毒属病毒的卫星 RNA 有 4 种: CMoMV 卫星 RNA、GRV 卫星 RNA、PEMV 卫星 RNA 和 TBTV 卫星 RNA^[16]。埃塞俄比亚烟草丛顶病病原复合体包含 ETB-

TV 的卫星 RNA^[9]。本研究中 TBTv-Zimbabwe 卫星 RNA 与 ETBTv 卫星 RNA 基因组全长核苷酸序列一致性为 93.9%，这 2 个病毒卫星 RNA 应归为 1 个种。

本研究在津巴布韦烟草丛顶病植株中检测到马铃薯卷叶病毒属的 PLRV，埃塞俄比亚烟草丛顶病病原复合体中除 ETBTv 及其卫星外，也含有 PLRV^[9]，表明 PLRV 为非洲发生的烟草丛顶病病原复合体的组分之一。中国烟草丛顶病病原复合体中的马铃薯卷叶病毒属成员为烟草脉扭病毒 (TVDV)^[7]。中国烟草丛顶病病原复合体中包含 TVDV 伴随 RNA，为马铃薯卷叶病毒属伴随 RNA 组成员^[8]。应用马铃薯卷叶病毒属伴随 RNA 组通用引物^[17]对津巴布韦烟草丛顶病样品总 RNA 进行 RT-PCR 扩增，未扩增出目标条带。对本研究的津巴布韦烟草丛顶病样品分别应用小 RNA 深度测序和转录组深度测序的方法进行测定并注释其中含有的病毒序列，也未发现马铃薯卷叶病毒属伴随 RNA 组成员 (数据未发表)。

4 结论

津巴布韦烟草丛顶病病原复合体的病毒组分分别为 ETBTv、ETBTv 卫星 RNA 和 PLRV，与埃塞俄比亚烟草丛顶病病原复合体的相应组分在病毒种的分类水平上一致，但与中国烟草丛顶病病原物在分子水平上差异较大。

[参考文献]

- [1] GATES L F. A virus causing axillary bud sprouting of tobacco in Rhodesia and Nyasaland[J]. Annals of Applied Biology, 1962, 50(1): 169. DOI: [10.1111/j.1744-7348.1962.tb05998.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1962.tb05998.x).
- [2] 杨程. 津巴布韦烟草丛顶病调查[J]. 烟草科技, 2003, 36(2): 43. DOI: [10.3969/j.issn.1002-0861.2003.02.015](https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-0861.2003.02.015).
- [3] COLE J S. Isolation of tobacco vein-distorting virus from tobacco plants infected with aphid-transmissible bushy-top[J]. Phytopathology, 1962, 52(12): 1312.
- [4] NDOWORA T. International research fellow report[J]. Microbiology Today, 2002, 29: 100.
- [5] MO X H, QIN X Y, TAN Z X, et al. First report of tobacco bushy top disease in China[J]. Plant Disease, 2002, 86(1): 74. DOI: [10.1094/PDIS.2002.86.1.74B](https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.1.74B).
- [6] MO X H, QIN X Y, WU J, et al. Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of tobacco bushy top virus[J]. Archives of Virology, 2003, 148(2): 389. DOI: [10.1007/s00705-002-0919-y](https://doi.org/10.1007/s00705-002-0919-y).
- [7] MO X H, CHEN Z B, CHEN J P. Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of tobacco vein distorting virus[J]. Virus Genes, 2010, 41(3): 425. DOI: [10.1007/s11262-010-0524-1](https://doi.org/10.1007/s11262-010-0524-1).
- [8] MO X H, CHEN Z B, CHEN J P. Molecular identification and phylogenetic analysis of virus of a viral RNA associated with the Chinese tobacco bushy top disease complex[J]. Annals of Applied Biology, 2011, 158(2): 188. DOI: [10.1111/j.1744-7348.2010.00452.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00452.x).
- [9] ABRAHAM A D, MENZEL W, BEKELE B, et al. A novel combination of a new umbravirus, a new satellite RNA and potato leafroll virus causes tobacco bushy top disease in Ethiopia[J]. Archives of Virology, 2014, 159(12): 3395. DOI: [10.1007/s00705-014-2202-4](https://doi.org/10.1007/s00705-014-2202-4).
- [10] UDAGAWA H U, KOGA K, SHINJO A, et al. Reduced susceptibility to a tobacco bushy top virus Malawi isolate by loss of function in host *eIF(iso)4E* genes[J]. Breeding Science, 2020, 70(3): 313. DOI: [10.1270/jsbbs.19135](https://doi.org/10.1270/jsbbs.19135).
- [11] VALVERDE R A, NAMETH S T, JORDAN R L. Analysis of double stranded RNA for plant virus diagnosis[J]. Plant Disease, 1990, 74(3): 255. DOI: [10.1094/PD-74-0255](https://doi.org/10.1094/PD-74-0255).
- [12] ATTOUTI H, BILLOIR F, CANTALOUPE J F, et al. Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes[J]. Journal of Virological Methods, 2000, 89(1/2): 147. DOI: [10.1016/S0166-0934\(00\)00212-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00212-3).
- [13] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547. DOI: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096).
- [14] ROBERTSON N L, FRENCH R, GRAY S M. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses[J]. Journal of General Virology, 1991, 72(6): 1473. DOI: [10.1099/0022-1317-72-6-1473](https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-6-1473).
- [15] International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV 9th Report (2011): positive sense RNA viruses: umbravirus[R/OL]. (2014-02-03) [2020-12-10]. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/293/umbravirus.
- [16] International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV 9th Report (2011): subviral agents: 3. Satellites and other virus-dependent nucleic acids[R/OL]. (2014-02-03) [2020-12-10]. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/sub-viral-agents-2011/w/sub_viruses/302/3-satellites-and-other-virus-dependent-nucleic-acids.
- [17] CAMPBELL A J, ERICKSON A, PELLERIN E, et al. Phylogenetic classification of a group of self-replicating RNAs that are common in co-infections with polioviruses[J]. Virus Research, 2020, 276: 197831. DOI: [10.1016/j.virusres.2019.197831](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197831).

责任编辑: 何承刚