

小 RNA 深度测序鉴定昭通市烟草脉斑病病毒

陶永萍², 尹跃艳¹, 陈旭², 卢训¹,
李婷婷¹, 赵声春², 游堂贵², 丁铭^{1*}

(1. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室, 农业部西南农业
基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650223; 2. 云南省烟草公司昭通市公司, 昭通 657000)

摘要 烟草脉斑病在云南昭通市的烟草上发生危害严重, 为明确昭通市烟草脉斑病的病毒种类, 本研究采集昭通市的 4 个烟草种植区症状表现为疑似烟草脉斑病的烟草样品, 采用小 RNA 深度测序技术对不同来源的混合样品进行小 RNA 测序分析。结果显示混合样品中的病毒分别属于烟草花叶病毒属 *Tobamovirus*、马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus* 和马铃薯卷叶病毒属 *Polerovirus*。根据不同病毒属设计通用引物, 分别对不同地区的烟草样品进行 RT-PCR 验证, 结果表明, 烟草样品中病毒种类有烟草花叶病毒、烟草脉带花叶病毒、烟草脉扭病毒和马铃薯 Y 病毒的 PVY^N、PVY^N-Wi 和 PVY^{NTN} 株系。

关键词 烟草脉斑病; 烟草病毒; 小 RNA 深度测序

中图分类号: S 432.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017211

Identification of the viruses from flue-cured tobacco in Zhaotong City by small RNA deep sequencing

TAO Yongping², YIN Yueyan¹, CHEN Xu², LU Xun¹, LI Tingting¹,
ZHAO Shengchun², YOU Tanggui², DING Ming¹

(1. *Institute of Biotechnology and Germplasm Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Key Laboratory of the Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Kunming 650223, China*;
2. *Yunnan Tobacco Company Zhaotong Branch, Zhaotong 657000, China*)

Abstract Flue-cured tobacco vein spot disease causes severe damage to tobacco production in Zhaotong City, Yunnan Province of China. In this study, siRNA deep sequencing was used to analyze the viruses in tobacco samples with necrotic and mosaic symptoms on tobacco leaves. The samples were collected from four different areas in Zhaotong City and mixed into one sample for siRNA sequencing analysis. The results showed that the identified viruses belonged to three genera, including *Tobamovirus*, *Potyvirus* and *Polerovirus*. RT-PCR and sequencing were used to identify the species of the viruses. Four viruses were detected in the samples, including TMV, TVB-MV, TVDV and three strains of PVY (PVY^N, PVY^N-Wi, PVY^{NTN}).

Key words tobacco vein spot disease; tobacco virus; siRNA sequencing

烟草是云南省的重要农业产业, 在全省范围内常年种植面积保持在 35 万 hm² 左右。由于烟草病毒病害常年发生, 加之寄主植物和传毒介体周年分布, 导致了病毒病原大量积累, 烟草病毒病发生危害日益严重。烟草脉斑病在云南昭通烟区发生危害较为普遍, 该病自 2007 年在昭通市小面积发生, 2008 年发病面积及危害程度大幅增加, 目前已成为影响

该地区烟草生产最重要的病害之一。烟草脉斑病最早在山东、辽宁、安徽北部和河南西部等地发生危害严重, 发病率高达 50%~80%, 部分田块甚至绝收^[1-4]。该病主要由马铃薯 Y 病毒 *Potato virus Y* (PVY) 侵染引起, 常与黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV)、烟草蚀纹病毒 *Tobacco etch virus* (TEV)、烟草脉斑驳病毒 *Tobacco vein mottle virus*

(TVMV)、烟草坏死病毒 *Tobacco necrosis virus* (TNV)等病毒中的1个或多个复合侵染烟株^[5]。由于该病主要由PVY引起,其症状与病毒种类具有密切的关系,根据侵染烟草的PVY株系可大致将症状分为花叶、脉坏死、条斑及茎坏死^[1]。

通过前期调查发现,烟草脉斑病样品中存在多种病毒复合侵染的现象,且在不同地区的复合侵染类型不同,采用传统的血清学、PCR等方法对症状表现明显的烟草病毒病原进行鉴定不能完整地反映样品中的病毒种类,尤其不能检测到可能存在的不同病毒病原。利用基于小RNA深度测序的病毒鉴定技术,不仅能检测到寄主中不同病毒病原,同时具有更高的灵敏度和信噪比。因此本研究在昭通烟区4个不同烟草脉斑病重病区采集典型症状样品,采用小RNA深度测序技术对烟草脉斑病样进行检测和分析,为病害的防控提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草样品采自云南省昭通市苏家院、布嘎、北闸、守望等4个病毒病发生较重的烟区,样品症状主要表现为脉坏死、植株矮化、叶片坏死斑点并伴随有顶部花叶症状,同时提取不同采集地点的烟草样品RNA用于测序结果的验证分析。

1.2 方法

1.2.1 小RNA测序与分析

将4个地点采集的烟草样品按相同质量比例进行混合,混合样品送于华大基因公司进行小RNA测序分析。提取样品总RNA,测定总RNA的浓度及纯度,将质量合格的RNA样品使用NEB针对Illumina测序平台研发的Small RNA建库试剂盒(NEB Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina)及配套的试剂进行小RNA文库构建。文库构建完成后,使用Agilent2100对文库的insert size进行检测,insert size符合预期后,使用Qubit2.0和荧光定量PCR对文库的浓度进行定量,以保证文库质量。对检测合格的小RNA文库在HiSeq 2000测序平台进行测序。使用CLC Genomics Workbench 5软件对获得的小RNA序列数据进行组装和比对分析。

1.2.2 小RNA测序结果验证

根据小RNA测序结果与GenBank中序列比对分析结果,设计合成用于检测烟草脉带花叶病毒 *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV)的特

异性引物 TVBMV-8059F/TVBMV-9382R。根据文献报道分别合成用于扩增烟草花叶病毒属 *Tobamovirus*^[6]和马铃薯卷叶病毒属 *Polerovirus*^[7]的通用引物,以及辣椒环斑病毒 *Chilli ringspot virus* (ChiRSV)特异性引物^[8],以及用于鉴定PVY不同株系的引物对小RNA测序结果进行验证^[9](表1)。

采用Promega公司的Access RT-PCR System一步法试剂盒进行反转录和PCR扩增,反应体系为50 μ L,其中AMV/Tfl 5 $\times$ Reaction Buffer 10 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 10 μ mol/L上游和下游引物各5 μ L, 25 mmol/L MgSO₄ 2 μ L, AMV Reverse Transcriptase 1 μ L, Tfl DNA Polymerase 1 μ L, 总RNA 1 μ g, 补加RNA free水至50 μ L。反应条件为45 $^{\circ}$ C反转录45 min; 94 $^{\circ}$ C预变性2 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 根据不同引物设定退火温度1 min, 68 $^{\circ}$ C延伸2 min, 40个循环; 68 $^{\circ}$ C延伸7 min。将RT-PCR扩增产物回收并克隆到pEGM-T easy载体上, 筛选阳性克隆进行测序。利用DNAMAN Version 7.0进行序列拼接及分析。进化树构建采用了MEGA 6.0软件^[10], 以NJ(neighbor-joining)方法构建, 进化树各分支的可信度用Bootstrap检测(1 000次重复)。

2 结果与分析

2.1 小RNA测序结果

测序结果显示样品中小RNA序列有35 094 242条, 分别与GenBank中报道的序列进行对比, 结果表明得到的小RNA序列与13种植物病毒核苷酸相似性较高, 在93%~100%之间。这13种植物病毒分属烟草花叶病毒属 *Tobamovirus*、马铃薯Y病毒属 *Potyvirus* 和马铃薯卷叶病毒属 *Polerovirus*, 烟草花叶病毒属包括烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV)、番茄花叶病毒 *Tomato mosaic virus* (ToMV)、辣椒轻斑驳病毒 *Pepper mild mottle virus* (PMMV)、地黄花叶病毒 *Rehmannia mosaic virus* (ReMV); 马铃薯Y病毒属包括马铃薯Y病毒 *Potato virus Y* (PVY)、烟草脉带花叶病毒 *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV)、辣椒环斑病毒 *Chilli ringspot virus* (ChiRSV), 其中PVY还有PVY^O、PVY^N、PVY^{NTN}、PVY^{N-Wi} 4个株系; 黄症病毒科的马铃薯卷叶病毒属包括甜菜轻型黄化病毒 *Beet mild yellowing virus* (BMVY)、甜菜黄萎病毒 *Beet chlorosis virus* (BChV)、甜菜西黄病毒 *Beet*

western yellows virus (BWYV)、芸薹属植物黄化病毒 *Brassica yellows virus* (BrYV)、芜菁黄化病毒 *Turnip yellows virus* (TuYV)、烟草脉扭病毒 *Tobacco vein distorting virus* (TVDV)(表 2)。

表 1 用于 RT-PCR 扩增的引物
Table 1 The primers for RT-PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	片段大小/kb Fragment length
Tobamo6F6	GGAAAAGYGGTGATGTRACWAC	0.2 ^[6]
Tobamo6R6	GAACAGTTTKGCCTCAAAATTCCA	
Lu1	CCAGTGGTTRTGGTC	0.54 ^[7]
Lu4	GTCTACCTATTGG	
TVBMV-8059F	ACTGCGCTTTCGTTGCAAAT	1.323
TVBMV-9382R	ACGCCACTCACACCAAGTAG	
ChiRSV1f	TGGGATAGAGCATCTGAGC	0.65 ^[8]
ChiRSV1r	GAGTCATTTAGGTCATAATCAGTTT	
PVYc3	CAACGCAAAAACACTCA(CT)AAA(AC)GC	0.66 ^[9]
PVYf	TAAGTG(AG)ACAGACCCTCT(CT)TTCTC	
PVY3+	TGTAACGAAAGGGACTAGTGCAAAG	1.11 ^[9]
PVY3—	CCGCTATGAGTAAGTCCTGCACA	
CP2+	CCAGTCAAACCCGAACAAAG	0.53 ^[9]
CP1—	GGCATAGCGTGCTAAACCCA	

表 2 小 RNA 测序结果
Table 2 Results of small RNA sequencing analysis

属 Genus	病毒种 Virus species	核苷酸相似性/% Nucleotide similarity
烟草花叶病毒属 <i>Tobamovirus</i>	烟草花叶病毒 <i>Tobacco mosaic virus</i>	100
	番茄花叶病毒 <i>Tomato mosaic virus</i>	95
	辣椒轻斑驳病毒 <i>Pepper mild mottle virus</i>	100
	地黄花叶病毒 <i>Rehmannia mosaic virus</i>	100
	马铃薯 Y 病毒 NTN 株系 <i>Potato virus Y strain NTN</i>	100
马铃薯 Y 病毒属 <i>Potyvirus</i>	马铃薯 Y 病毒 N 株系 <i>Potato virus Y strain N</i>	100
	马铃薯 Y 病毒 N-Wi 株系 <i>Potato virus Y strain N-Wi</i>	100
	马铃薯 Y 病毒 O 株系 <i>Potato virus Y strain O</i>	100
	烟草脉带花叶病毒 <i>Tobacco vein banding mosaic virus</i>	100
	辣椒环斑病毒 <i>Chilli ringspot virus</i>	100
马铃薯卷叶病毒属 <i>Polerovirus</i>	甜菜轻型黄化病毒 <i>Beet mild yellowing virus</i>	95
	甜菜黄萎病毒 <i>Beet chlorosis virus</i>	93
	甜菜西黄病毒 <i>Beet western yellows virus</i>	95
	芸薹属植物黄化病毒 <i>Brassica yellows virus</i>	95
	芜菁黄化病毒 <i>Turnip yellows virus</i>	95
	烟草脉扭病毒 <i>Tobacco vein distorting virus</i>	100

2.2 烟草花叶病毒属病毒验证

根据张永江等^[6]的报道,应用引物 Tobamo6F6 和 Tobamo6R6 对样品进行 PT-PCR 扩增,得到约 0.25 kb 大小的目的条带(图 1a),回收目的条带进行克隆,挑取 5 个克隆进行测序分析。测序结果表明扩增片段大小为 0.2 kb,经 Blast 比对分析与 TMV 核苷酸序列相似性最高,与已报道的四川徐永分离物(No. HE818454)相似性为 100%。构建该序列与 TMV 不同病毒分离物的系统进化树,结果显示

昭通烟草上 TMV 与四川叙永分离物(No. HE818454)关系最近,与云南鲁甸分离物关系次之(图 2a)。结果表明,小 RNA 深度测序检测到的烟草花叶病毒属病毒为 TMV。用于构建系统进化树的序列来自 GenBank,序列号分别为:TMV 烟草分离物(No. HE818435, HE818454),ToMV 番茄分离物(No. FN985165),ToMV 人参果分离物(No. KJ207374),辣椒轻斑驳病毒益母草分离物(No. KR108207),辣椒轻斑驳病毒甜椒分离物(No. KP345899),地黄花叶病毒

地黄分离物(No. EF375551, JX575184)。

2.3 马铃薯 Y 病毒属病毒验证

用 TVBMV 特异性引物(TVBMV-9382R/TVBMV-8059F)和 ChiRSV 特异性引物(ChiRSV1f/ChiRSV 1r)验证样品中是否带有 TVBMV 和 ChiRSV。结果显示,前者扩增得到约 1.2 kb 的目的条带,而后者未扩增到目的条带(图 1b、c)。回收该目的片段进行克隆和测序,测序结果表明目的片段大小为 1.324 kb,与 TVBMV YN9.1 分离物(No. KF444434)的核苷酸相似性为 99%。结果表明小 RNA 测序结果中的马铃薯 Y 病毒属病毒为 TVBMV。

2.4 马铃薯 Y 病毒不同株系验证

根据 Rigotti 和 Gugerli^[9] 的报道,应用 3 对引物 PVYc3/PVYf, PVY3+/PVY3-, CP2+/CP1-, 严格按照报道中所述的引物浓度比例,采用 Access RT-PCR System 反应条件及体系进行反转录和 PCR 扩增,分别得到约 1.1、0.51 kb 及 0.48 kb 的条带(图 1e),回收各条带进行克隆和测序。测序结果显示,片段大小为 1.114 kb 的目的条带与已报道的新西兰分离物(No. AM268435)相似性为 98%,为 PVY^N 株系的部分序列。片段大小为 0.532 kb 的目的片段与已报道的南非 TT138E-102-96 分离物(No. GQ853641)序列相似性为 99%,为 PVY^N-Wi 株系的外壳蛋白碱基序列。片段大小为 0.438 kb 的目的条带与已报道的中国 HN2 分离物(No. GQ200836)相似性为 99%,为马铃薯 Y 病毒全基因的部分序列。根据 Hu^[7] 等对 HN2 分离物的报道,HN2 分离物占有 PVY^O 血清型,致病型表现多样,在烟草上表现为 PVY^N,在马铃薯上表现为 PVY^{NTN} 型。

根据报道,引物 CP2+/CP1- 特异性检测 PVY^N-Wi 株系,因此判断供试样品中存在 PVY^N-Wi

株系。引物 PVYc3 和 PVYf 检测 PVY^N、PVY^{NTN}、PVY^O 及 PVY^C 株系, PVY^O 和 PVY^C 应扩增出 0.66 kb 片段, PVY^N 和 PVY^{NTN} 应扩增出 0.44 kb 片段,结合株系验证结果,供试样品扩增出的条带大小为 0.438 bp,表明为重组 PVY^{NTN} 株系,因此判断供试样品中存在重组 PVY^{NTN} 株系,没有 PVY^O 和 PVY^C 株系。引物 PVY3+和 PVY3-能检测 PVY^N 和非重组 PVY^{NTN} 株系,结合株系验证结果,供试样品扩增出的条带大小为 1.114 kb,表明为重组 PVY^N 株系,因此判断供试样品中存在重组 PVY^N 株系。综上所述,供试样品中存在 PVY^N-Wi、重组 PVY^{NTN} 和 PVY^N 株系。

2.5 马铃薯卷叶病毒属病毒验证

用黄症病毒科通用引物 Lu1 和 Lu4^[7],进行反转录和 PCR 扩增,在约 0.8、0.7 kb 和 0.650 kb 处各有一条明显的条带(图 1d),回收各条带进行克隆和测序。测序结果表明 0.8 kb 条带为烟草线粒体基因组 DNA 碱基序列;0.7 kb 条带为 TVDV 核苷酸序列,具体为 0.572 kb,与已报道的云南龙陵分离物(No. EF529624)序列相似性为 100%;0.65 kb 条带也为 TVDV 核苷酸序列,具体为 0.54 kb,与已报道的云南保山分离物(No. AF402621)序列相似性为 99%,结果显示烟草样品中的马铃薯卷叶病毒属病毒是 TVDV。用 0.572 kb 条带和 0.54 kb 条带序列与 GenBank 中的相关序列构建进化树(见图 1b),与云南的所有分离物都聚在一起。用于构建系统进化树的序列来自 GenBank,病毒名称及序列号分别为: BMYV(No. EF107543), BChV(No. EU022510), BW-YV(No. X13062), BrYV(No. KP178197), TuYV(No. KR706247) TVDV(No. EF529624, KP772232, KP772233)。

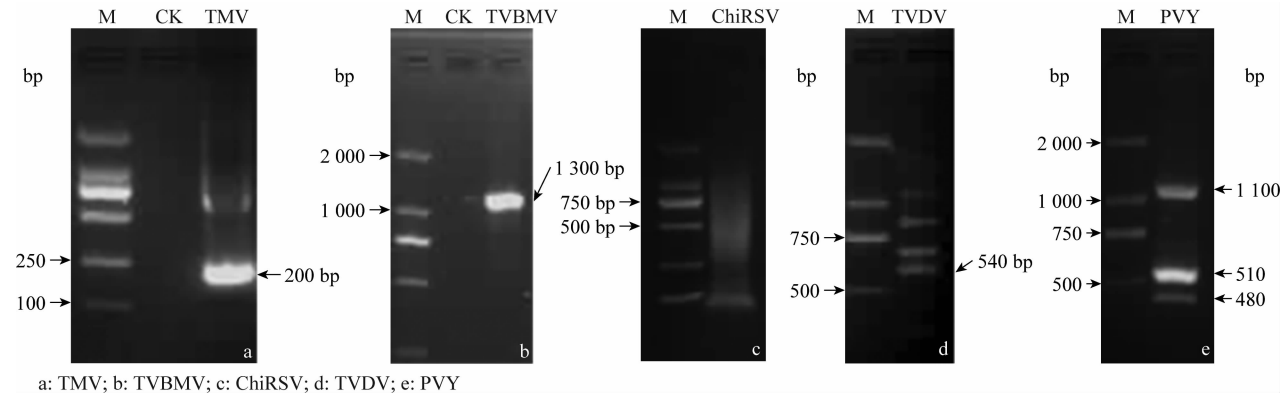


图1 TMV、TVBMV、ChiRSV、TVDV 和 PVY 的 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR for TMV, TVBMV, ChiRSV, TVDV and PVY

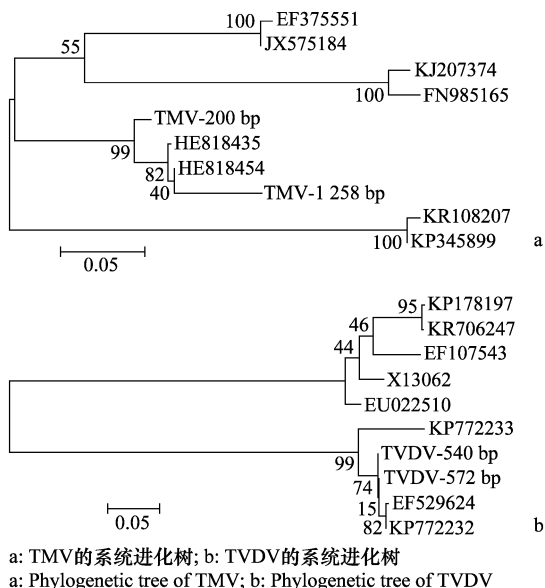


图 2 TMV 和 TVDV 与已报道的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of TMV and TVDV isolates based on nucleotide sequences

3 讨论

云南地处我国西南边陲,西部与缅甸唇齿相依,南部和东南部分别与老挝、越南接壤。该区域地处低纬高原,地理位置特殊,地形地貌复杂。全省气候类型丰富多样,有热带、亚热带、中温带和高原气候类型,其气候类型的多样化,造就了繁多的生物种类。云南烟草病毒种类多样,目前已报道的病毒种类多达 30 多种,其中 TMV^[11]、黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV)^[12]、TVBMV^[13]、番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)^[14]、双生病毒 *begomoviruses*^[15]、PVY^[16]、烟草丛顶病毒 *Tobacco bushy top virus* (TBTv)^[17] 是长期、多区域危害云南省烟草并造成重大损失的病毒病原。

2007—2017 年对昭通烟区烟草病害调查及病原检测研究表明,云南昭通地区烟草受马铃薯 Y 病毒属病毒的危害严重,发病率在 3%~10% 之间,重病区发病率可以达到 100%,严重影响了该地区烟草产量和质量。前期对该病害病原的鉴定采用的是传统的血清学检测及 RT-PCR 鉴定的方法,因此大部分研究结果仅局限在 potyviruses 的研究^[5,17]。本研究的小 RNA 深度测序结果表明烟草样品中小 RNA 序列与 13 种植物病毒相似性较高(93%~100%),这 13 种植物病毒分别属于烟草花叶病毒属、马铃薯 Y 病毒属和马铃薯卷叶病毒属等 3 个病

毒属。烟草花叶病毒属包括 TMV、ToMV、PM-MV、ReMV;马铃薯 Y 病毒属包括 PVY、TVBMV、ChiRSV,其中 PVY 还有 PVY^O、PVY^N、PVY^{NTN}、PVY^N-Wi 4 个株系;马铃薯卷叶病毒属包括 BMV、BChV、BWYV、BrYV、TuYV、TVDV。由于小 RNA 测序所得序列较短,在 GenBank 中进行序列对比时,如果某一段病毒序列是该病毒所在属内病毒的保守序列,就可能将同属不同种病毒都作为结果统计出来,而实际上样品中没有那么多病毒。因此我们用 RT-PCR 对 4 个属的 13 种病毒进行验证,且对 PVY 株系也进行了验证。结果证明昭通烟区症状表现为脉坏死、植株矮化、叶片坏死斑点并伴随有顶部花叶症状烟草样品中病毒种类有 4 种,分别为 TMV、TVDV、TVBMV 和 PVY,其中 PVY 包含不同株系,分别是 PVY^N-Wi、重组 PVY^{NTN} 和 PVY^N株系。根据前期研究结果,昭通烟区烟草脉斑病的主要病毒为 PVY,且有不同株系的 PVY 复合侵染烟草,本结果与前期检测结果相同^[17]。

TVDV 是引起烟草丛顶病的两种病毒之一,在发病烟草中多与烟草斑驳病毒 *Tobacco mottle virus* (TBMV)复合侵染烟草引起烟草丛枝病,自然条件及人工接种都很难得到单独感染 TVDV 的烟草植株^[18]。本研究通过小 RNA 深度测序检测到昭通烟草脉斑病样品中有 TVDV 的侵染,但未检测到 TBMV,且发病烟草田块中也未发现有疑似丛顶病症状的烟草,这是云南首次报道 TVDV 与其他病毒复合侵染烟草,而对于 TVDV 在烟草脉斑病病害流行过程中扮演的角色还有待进一步研究。

TVBMV 为马铃薯 Y 病毒科 *Potyviriidae* 马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus* 病毒。2004—2006 年 Tian 对中国四大烟草主产区的烟草病毒病进行调查,首次发现云南烟草中 TVBMV 的存在^[19]。前期研究也发现 TVBMV 是烟草脉斑病的主要病毒之一,本研究中小 RNA 深度测序结果也证明了 TVBMV 是该烟区的优势病毒。

本研究中报道的 4 种病毒,除 TMV 以外均为蚜虫传播的病毒。在昭通烟区,烟草通常与马铃薯、辣椒种植田块相邻,在日常施用化学杀虫剂进行蚜虫防治时,防虫效果不理想,主要原因在于不同作物间不能统防统治,加之该地区马铃薯种薯质量参差不齐,因此该地区烟草脉斑病发病率和危害程度持续较高,病害防控效果不显著。针对以上情况,对该

区域蚜虫病毒病害的防控要从“大农业”角度,实行统防统治;种植优质无毒种薯;以治虫防病为主,建立一个健康、少毒源的环境才能有效控制病害的持续危害。同时加强对不同时期的烟草植株、周边寄主植物的病毒和介体昆虫的监测,保持农田环境“洁净”,防止大规模病毒再侵染和病害的暴发流行。

参考文献

- [1] 周本国,高正良,刘小平.安徽省烟草脉斑病(PVY)的发生趋势及防治措施[J].安徽农学通报,1998,4(1):34-35.
- [2] 马国胜,郭红,陈娟.浅析皖北烟草脉斑病连年发生并间歇性暴发原因及对策[J].植物保护,2000,26(4):26-28.
- [3] 程宝玉,吴娟霞,陈卫华,等.豫西烟草脉斑病发生规律及药剂防治研究[J].烟草科技,2002(7):46-48.
- [4] 陈瑞泰,朱贤朝,王智发,等.全国16个省(区)烟草侵染性病害调研报告[J].中国烟草科学,1997(4):1-7.
- [5] 张磊,丁铭,赵声春,等.昭通烟草脉斑病发病规律的研究[J].西南农业学报,2013,26(1):181-186.
- [6] 张永江,马荣群,辛言言,等.烟草花叶病毒属条形码鉴定方法的建立[J].湖北农业科学,2015,54(11):2624-2627.
- [7] 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):1473-1477.
- [8] 王健华,章绍延,龚殿,等.辣椒环斑病毒分子检测方法的建立及应用[J].热带作物学报,2012,33(2):342-345.
- [9] RIGOTTI S, GUGERLI P. Rapid identification of potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 140(1): 90-94.
- [10] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [11] 秦西云,卢训,方琦,等.云南烟草中花叶病毒株系比较分析[J].中国烟草科学,2013,19(6):106-113.
- [12] 刘勇,莫笑哈,余清,等.云南、福建、湖南烟区烟草花叶病主要病毒种类检测及黄瓜花叶病毒亚组鉴定[J].植物病理学报,2006,36(4):310-313.
- [13] 秦西云,卢训,方琦,等.烟草脉带花叶病毒云南分离物全基因序列分析[J].中国烟草科学,2015,36(5):44-46.
- [14] DONG J H, YIN Y Y, XU X Y, et al. First report of *Tomato spotted wilt virus* in tomato and tobacco in China [J]. Journal of Plant Pathology, 2010, 92(S4): 121.
- [15] 丁铭,何跃峰,杨莉,等.侵染云南烟草的粉虱传双生病毒卫星分子基因组结构特征[J].西南农业学报,2010,23(5):1515-1521.
- [16] 卢训,丁铭,方琦,等.马铃薯Y病毒云南昭通烟草分离物的检测及年度间差异比较[J].植物保护,2013,39(3):56-60.
- [17] 段玉琪,秦西云,莫笑哈,等.烟草丛顶病(TBTV)传毒特性及寄主范围研究[J].中国烟草科学,2003(4):23-26.
- [18] 莫笑哈,秦西云,杨程,等.烟草脉扭病毒基因组部分序列的克隆和分析[J].中国病毒学,2003,18(1):58-62.
- [19] TIAN Y P, LIU J L, YU X Q. Molecular diversity of tobacco vein banding mosaic virus [J]. Archives of Virology, 2007, 152(1): 1911-1915.
- (责任编辑:田喆)
- (上接46页)
- [26] SOWA H, KAJI H, YAMAGUCHI T, et al. Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor β negatively regulate smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(39): 36024-36031.
- [27] EL AZREQ M A, NACI D, AOUDJIT F. Collagen/ β 1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner [J]. Molecular Biology of the Cell, 2012, 23(17): 3473-3484.
- [28] KIM S H, BARK H, CHOI C H. Mercury induces multidrug resistance-associated protein gene through p38 mitogen-activated protein kinase [J]. Toxicology Letters, 2005, 155(1): 143-150.
- [29] SUKHAI M, PIQUETTE-MILLER M. Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals [J]. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2000, 3(2): 268-280.
- [30] 秦丹,徐存拴.非编码DNA序列的功能及其鉴定[J].遗传,2013,35(11):1253-1264.
- [31] ALEXANDER R P, FANG Gang, ROZOWSKY J, et al. Annotating non-coding regions of the genome [J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(8): 559-571.
- [32] WITTKOPP P J, KALAY G. Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence [J]. Nature Reviews Genetics, 2012, 13: 59-69.
- [33] FOLEY K P, EISENMAN R N. Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mxi1 tell us about the MYC/MAX/MAD network [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1423: M37-M47.
- [34] HURLIN P J, QUEVA C, KOSKINEN P J, et al. Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation [J]. The EMBO Journal, 1995, 14(22): 5646-5659.
- [35] YUAN J, TIRABASSI R S, BUSH A B, et al. The *C. elegans* MDL-1 and MXL-1 proteins can functionally substitute for vertebrate MAD and MAX [J]. Oncogene, 1998, 17(9): 1109-1118.
- [36] 王勇,姚勤,陈可平.动物bHLH转录因子家族成员及其功能[J].遗传,2010,32(4):307-330.
- (责任编辑:田喆)