

北京地区侵染茄子的番茄斑萎病毒分子鉴定与分析

田文^{1,2}, 邱艳红^{1*}, 秦文韬³, 张海军¹, 王德欣¹, 李龙飞⁴,
贾志杨⁴, 徐秀兰^{1*}

(1. 北京市农林科学院蔬菜研究所, 北京 100097; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101;

3. 北京市农林科学院植物保护研究所, 北京 100097; 4. 京研益农(北京)种业科技有限公司, 北京 100097)

摘要 调查发现北京地区一温室栽培茄子 *Solanum melongena* L. 出现严重病毒病。利用基于小 RNA 的高通量测序技术和 RT-PCR 方法, 明确了引起茄子病害的病毒种类为番茄斑萎病毒, 将其命名为 TSWV-eggplant 分离物。进一步克隆了该病毒的基因组全长(S RNA、M RNA、L RNA), 并构建其系统发育树。结果表明, 该分离物的 S RNA 与美国分离物亲缘关系较近, M RNA 与中国分离物亲缘关系较近, 而 L RNA 与韩国分离物亲缘关系较近。因此, 本研究发现的 TSWV 分离物与国内已发生报道的分离物不同, 该分离物是否存在不同分离物之间基因组的重组需要进一步研究。

关键词 番茄斑萎病毒; 茄子; 高通量测序

中图分类号: S 436.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2023040

Molecular identification and analysis of tomato spotted wilt virus on eggplant in Beijing

TIAN Wen^{1,2}, QIU Yanhong^{1*}, QIN Wentao³, ZHANG Haijun¹, WANG Dexin¹, LI Longfei⁴,
JIA Zhiyang⁴, XU Xiulan^{1*}

(1. Vegetable Research Institute, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China;

2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Institute of Plant

Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 4. Jingyan

Yinong (Beijing) Seed Sci-Tech Co. Ltd., Beijing 100097, China)

Abstract In this study, serious viral disease was found on *Solanum melongena* L. in a greenhouse in Beijing. With high-throughput sequencing technology based on small RNAs and RT-PCR methods, it was confirmed that the eggplants were infected by tomato spotted wilt virus and named as TSWV-eggplant isolate. Complete genome sequence of the TSWV S RNA, M RNA, L RNA was further cloned and the phylogenetic tree was also constructed. The results showed that the S RNA of TSWV-eggplant was closely related with isolates from America, M RNA was closely related with isolates from China, while L RNA was closely related with isolates from Korea. So the TSWV isolate in this study was different from isolates reported in China and whether the genome of the isolate was recombined from different isolates was needed to be further studied.

Key words tomato spotted wilt virus; eggplant; high-throughput sequencing

茄子 *Solanum melongena* L. 属茄科 Solanaceae, 是我国重要的蔬菜作物, 在全国各地区均有种植, 也是我国北方设施栽培的主要蔬菜之一^[1]。近来, 茄子病毒病发生严重, 多种病毒可侵染茄子^[2], 如番茄褪绿病毒(tomato chlorosis virus, ToCV), 可

引起茄子叶片出现褪绿黄化症状^[3], 烟草轻型绿花叶病毒(tobacco mild green mosaic virus, TMGMV)和番茄斑駁花叶病毒(tomato mottle mosaic virus, ToM-MV)共同侵染引起茄子花瓣深紫色斑驳症状^[4]。

番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus,

收稿日期: 2023-02-02 修订日期: 2023-03-29

基金项目: 北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX20230214, GYJC-202403); 北京市农林科学院青年科研基金(QNJJ202131)

* 通信作者 E-mail: 邱艳红 qiuyan hong@nervc.org; 徐秀兰 xuxiulan@nervc.org

TSWV)属于番茄斑萎病毒科 *Tospoviridae*,正番茄斑萎病毒属 *Orthotospovirus*,基因组由 3 条单链 RNA 组成,包含 L RNA(8.9 kb)、M RNA(4.8 kb)、S RNA(2.9 kb)^[5-6]。其中,L RNA 的互补链编码依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 RdRP;M RNA 编码非结构蛋白 NSm,其互补链编码两个重要的糖蛋白 Gn 和 Gc;S RNA 编码非结构蛋白 NSs,其互补链编码核衣壳蛋白 N^[7]。其中,核衣壳蛋白 N 的氨基酸序列是正番茄斑萎病毒属的重要分类依据,通常氨基酸同源性在 90%以上为同种病毒^[5-6]。TSWV 寄主范围广泛,可侵染 1 090 多种植物^[8],是危害农业生产的一种全球性重要病毒,也是世界十大严重危害性植物病毒之一^[9]。

近几年,北京地区番茄斑萎病毒发生严重,在番茄^[10]、辣椒^[10-11]、茼蒿^[12]、水芹^[13]以及菊花^[14]上均有发生。2021 年,北京市海淀区一温室内的茄子上出现疑似病毒感染症状。本研究利用基于小 RNA 的高通量测序技术以及 RT-PCR 方法鉴定了危害茄子的病毒种类;并进一步对该病毒的基因组序列进行了分析。本研究为有效防控茄子病害提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2021 年,从北京海淀区一温室大棚采集了 8 份疑似感染病毒的茄子样品,拍照后保存于一 80℃冰

箱备用。阳性对照样本由北京市农林科学院蔬菜研究所实验室保存。

Trizol Reagent 购自英潍捷基(上海)贸易有限公司;一步法 RT-PCR 试剂盒 [HiScript® II One Step RT-PCR Kit(Dye Plus)]和 5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Prime Script™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit 购于宝日医生物技术(北京)有限公司;琼脂糖凝胶快速回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 高通量测序与小 RNA 分析

利用 Trizol 法对所采集的 8 份茄子病样进行植物总 RNA 提取。利用 NanoDrop 2000C 紫外分光光度计(赛默飞世尔科技公司)测定 RNA 浓度,并选取 3 个浓度较高的 RNA 样品混合后作为一个模板,委托华大基因进行文库构建和高通量测序。测序平台为 Illumina Hiseq 2000。将测序数据(raw data)经过过滤、组装所获得的 contigs 与 NCBI 数据库进行比对分析;短序列采用 Velvet 软件(k-mer 值设为 17)^[15]进行组装拼接。

1.3 RT-PCR 检测

以提取的叶片总 RNA 为模板,利用 TSWV 特异性检测引物,采用 HiScript® II One Step RT-PCR Kit(Dye Plus)对所采集的样品进行 RT-PCR 检测。具体引物信息见表 1。

表 1 番茄斑萎病毒的引物信息
Table 1 Information of primers of tomato spotted wilt virus

引物名称 Primer name	基因 Gene	序列(5'-3') Sequence	长度/bp Length	参考文献 Reference
TSWV-861-F	N	TCACTGTAATGTTCCATAGCAA	861	[16]
TSWV-861-R		AGAGCAATYGTGTCAATTTTATTC		
TSWV-S-F	S	AGAGCAATTGTGTCANAATTTTKTTCBTAATC	2 958	本研究
TSWV-M-F	M	AGAGCAATCAGTGCKTCAGAAATATAACC	1 560	
TSWV-M1560-R		TGATTCTCAGCATGGGGCTTCTGG	3 216	
TSWV-M1560-F		TCCCAGAAGCCCCATGCTG		
TSWV-M-R		AGAGCAATCAGTGCAAACAAAAACC		
TSWV-L-F	L	AGAGCAATCTGGTAACAACGATTTTAAGC	4 600	
TSWV-L4600-R		AACAACATTTCTGGCAGAGATGAGC		
TSWV-L4600-F		TGTTGTTTAGAAGCATTGAAGCTC	4 313	
TSWV-L-R		AGAGCAATCAGGTACAACATAAATATAAT		

1.4 全长克隆及测序

以茄子样品的总 RNA 为模板,根据小 RNA 测序拼接得到的病毒核苷酸序列设计 TSWV 引物,利

用 Prime Script™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit 对 TSWV 的 S RNA、M RNA 和 L RNA 进行扩增,具体引物信息见表 1。其中,S RNA 采用

TSWV-S-F/TSWV-861-R 进行全长扩增;M RNA 采用 2 对引物分段进行扩增,分别为 TSWV-M-F/TSWV-M1560-R 和 TSWV-M1560-F/TSWV-M-R,L RNA 同样也采用 2 对引物分段进行扩增,分别为 TSWV-L-F/TSWV-L4600-R 和 TSWV-L4600-F/TSWV-L-R,扩增后进行序列拼接。扩增产物用琼脂糖凝胶快速回收试剂盒纯化,并克隆至载体 pCE2 TA/Blunt-Zero 上,转化至感受态细胞 Fast-T1 competent cell(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)中;将菌液 PCR 鉴定为阳性的样品送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

1.5 序列分析

利用 DNAMAN 8 软件对序列进行分析和拼接。利用 BLAST 进行同源序列检索。采用 Clustal W 算法进行多序列比对,并利用 MEGA 7.0 软件基于邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,

Bootstrap 值设为 1 000。

2 结果与分析

2.1 田间病株症状以及高通量测序结果

2021 年 3 月,在北京海淀区的一个温室内发现很多茄子植株出现矮化症状,叶片上伴随着褪绿、斑驳和花叶等症状,且一些发病植株的茄子果实表面凹凸不平(图 1a)。随机采集发病的茄子植株 8 份,带回实验室进行检测。

通过高通量测序后,获得原始数据 13 515 309 条;经过过滤接头以及去除低质量序列等,共获得长度介于 18~30 nt 的小 RNA 12 583 651 条。其中,24 nt 的小 RNA 最多(4 523 787 条),其次为 21 nt 的小 RNA(2 008 507 条)(图 1b)。经过序列组装以及比对分析发现有 93 条拼接序列(contigs)与 TSWV 的基因组具有同源性。

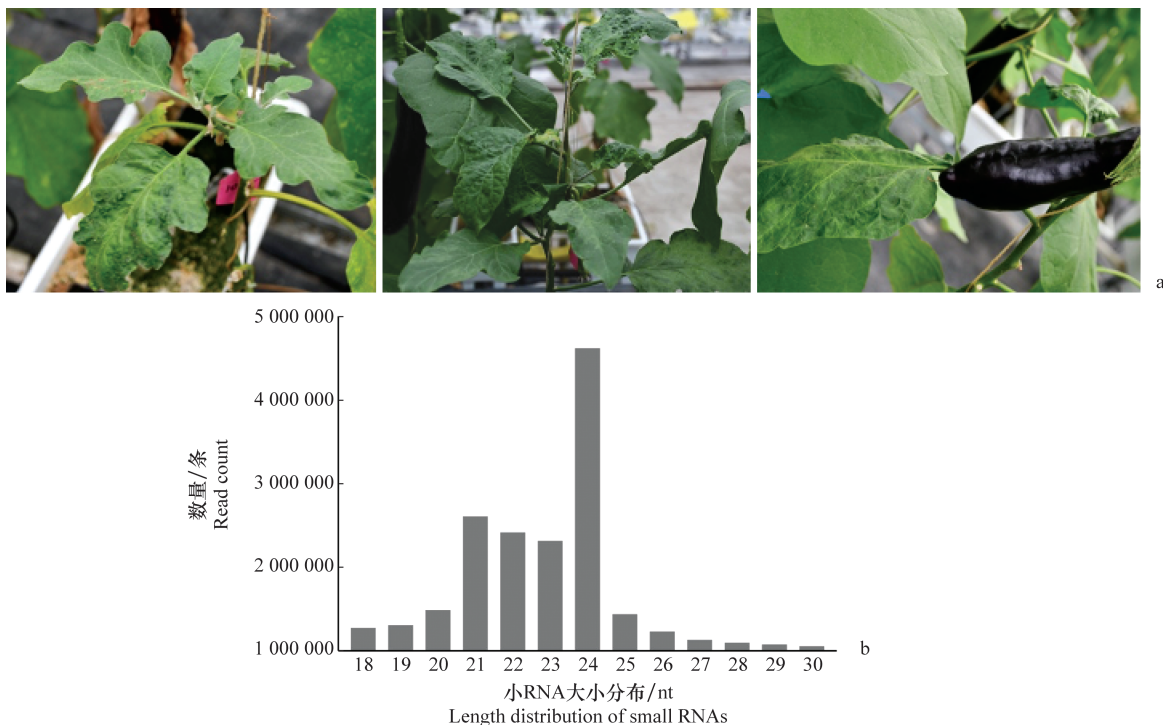


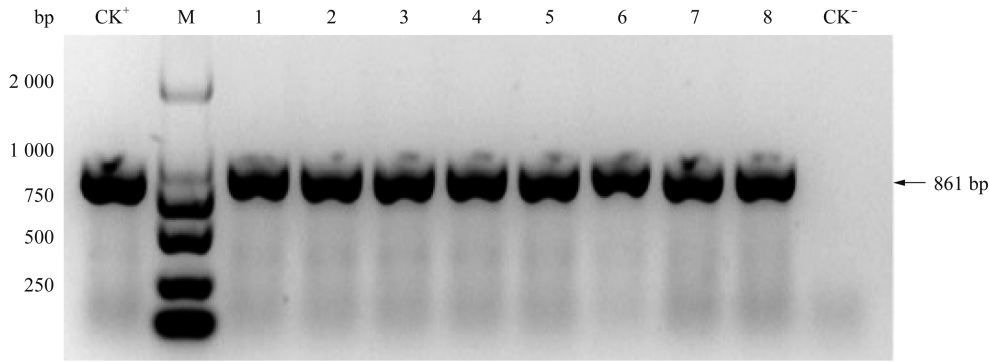
图 1 感病茄子症状(a)以及高通量测序结果(b)

Fig. 1 Symptoms of infected eggplant (a) and the results of high-throughput sequencing (b)

2.2 RT-PCR 检测结果

为进一步明确高通量测序结果,采用 TSWV 的特异性引物 TSWV-861-F/R 对 8 个茄子样品进行 RT-PCR 检测。结果表明,所采集的 8 个茄子样品均扩出预期大小条带(图 2)。通过对 PCR 产物测序

分析,发现所扩增的 PCR 产物与已报道的 TSWV 分离物序列的相似性在 98.7%以上,进一步证明了引起茄子相关症状的为番茄斑萎病毒,且该病毒为 TSWV 的一个新的分离物,命名为 TSWV-eggplant。



M: DL2000 DNA Marker; CK⁺: 阳性对照; 1~8: 感病茄子样品; CK⁻: 阴性对照。
M: DL2000 DNA Marker; CK⁺: Positive control; 1~8: Diseased eggplant samples; CK⁻: Negative control.

图 2 茄子样品中番茄斑萎病毒的 RT-PCR 检测结果

Fig. 2 RT-PCR detection of tomato spotted wilt virus in eggplant samples

2.3 基因组克隆与分析

根据表 1 中的引物进一步克隆了 TSWV 全长序列,并向 NCBI 提交了该分离物的 S RNA, M RNA 和 L RNA 序列 (GenBank 序列登录号分别为 OM154966、OM154967 和 OM154968)。其中,TSWV 的 S RNA 大小为 2 958 bp,编码的非结构蛋白 NSs 基因大小为 1 404 bp,其互补链编码的外壳蛋白 N 基因大小为 777 bp; TSWV 的 M RNA 大小为 4 776 bp,编码的非结构蛋白 NSm 基因大小为 909 bp,其互补链具有一个大的开放阅读框,基因大小为 3 408 bp,编码 2 个糖蛋白 G_N 和 G_C。TSWV 的 L RNA 大小为 8 913 bp,编码的 RdRp 基因大小为 8 640 bp。

进一步对 TSWV-eggplant 分离物与其他已知 TSWV 分离物的序列同源性进行分析,BLAST 比对结果显示 TSWV-eggplant 的 S RNA 序列与其他 TSWV 分离物序列一致性在 98.6% 以上, M RNA 序列一致性在 98.8% 以上, L RNA 序列一致性在 97.3% 以上。其中, S RNA 与菊苣 *Cichorium intybus* 分离物 (GenBank No. MG593199) 的序列一致性最高 (99.6%), M RNA 与番茄分离物 (GenBank No. KU179570) 的序列一致性最高 (99.1%), L RNA 与菊苣分离物 (GenBank No. MG593197) 的序列一致性最高 (98.8%)。

2.4 系统进化树分析

对 TSWV-eggplant 全基因组核苷酸序列与其他 TSWV 序列进行比对分析,利用 MEGA 7.0 软件基于邻接法构建系统进化树。结果表明,TSWV-eggplant 的 S RNA 进化树可分为 3 个组,其中

TSWV-eggplant 的 S RNA 与美国菊苣分离物 (GenBank No. MG593199) 亲缘关系最近,聚合为一个分支,形成组 3 (图 3a); M RNA 进化树形成 2 个组,其中 TSWV-eggplant 的 M RNA 与中国番茄分离物 (GenBank No. JF960236) 关系最近,与中国的其他分离物形成组 1,而国外的很多分离物形成组 2 (图 3b); L RNA 与韩国的枸杞 *Lycium chinense* 分离物 (GenBank No. MT643234) 关系最近,形成组 1,而中国分离物形成组 2 (图 3c)。说明,该分离物与国内报道的分离物有所不同。

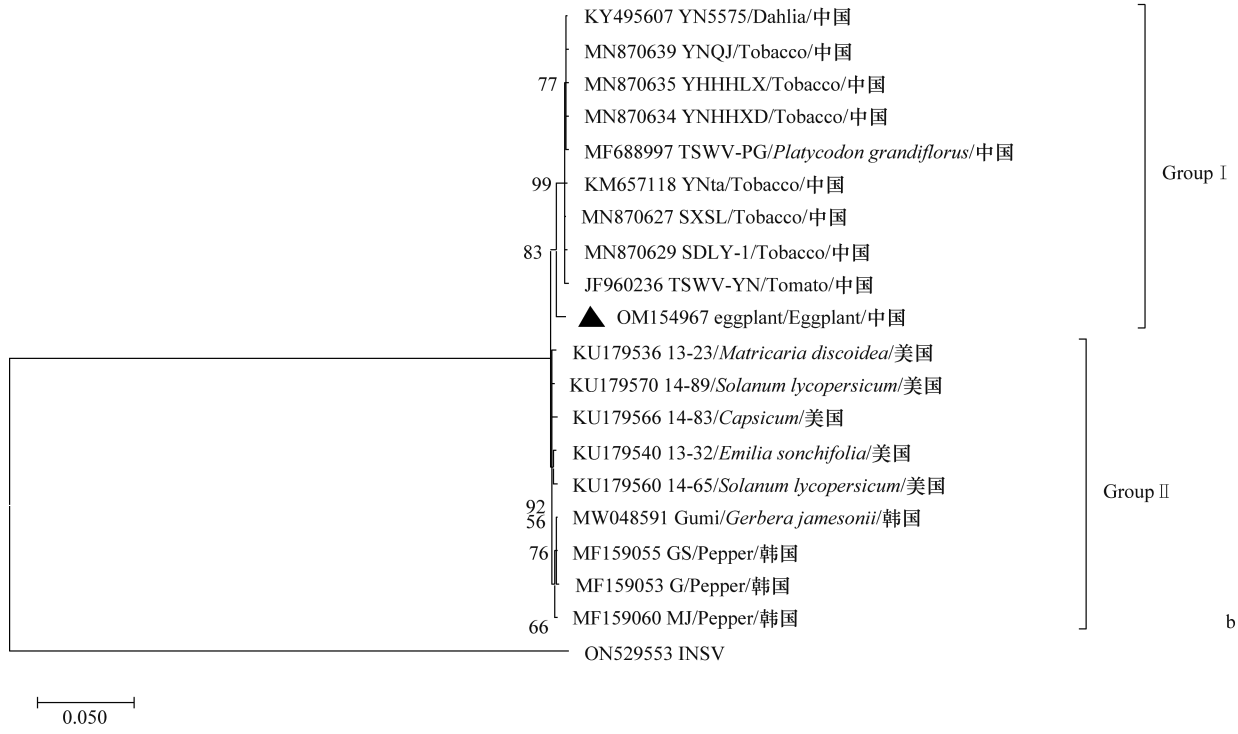
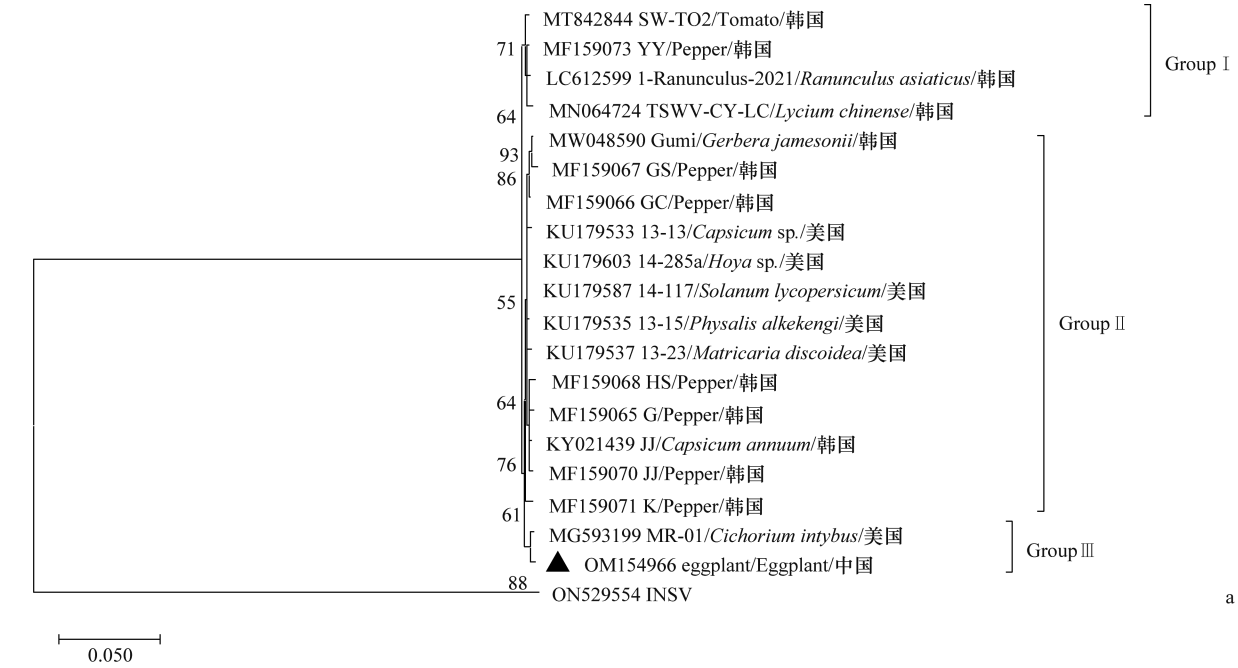
3 结论与讨论

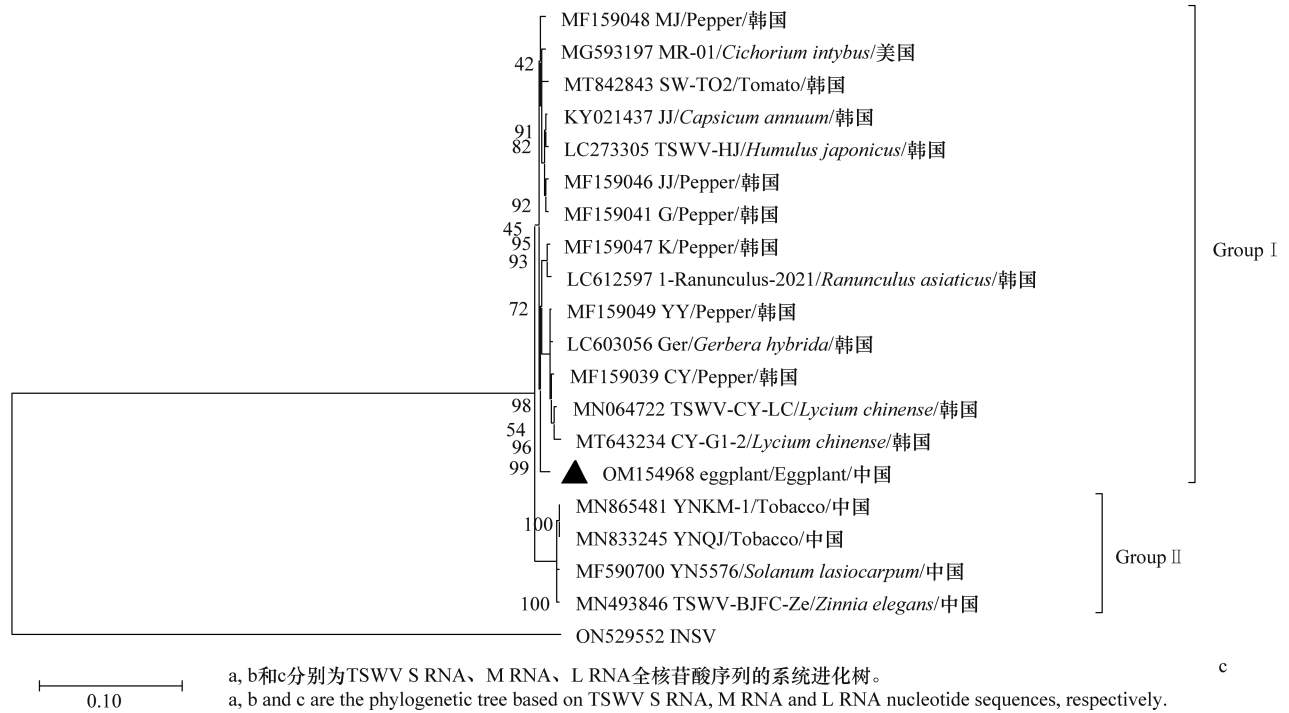
TSWV 是世界十大植物病毒之一,寄主范围非常广泛,给世界上许多国家和地区造成了严重的经济损失。自 1989 年在中国广州首次发现以来,已在我国多个省市发生,部分地区发生非常严重^[2, 17],尤其是番茄和辣椒上^[10, 18],如在四川^[19]和云南^[20]的辣椒上,黑龙江^[18]、北京^[10]的番茄上均有检出 TSWV。由于 TSWV 的传播介体蓟马繁殖速度快,长期的化学药剂防控导致蓟马抗药性增强,致使 TSWV 的防治越来越困难。

茄子是我国重要的蔬菜作物,也是我国北方设施栽培的主要蔬菜之一,而近几年,病毒病害时有发生。已报道的可侵染茄子的病毒约 44 种,新的病毒种类还在不断增加。本研究通过高通量测序技术和 PCR 方法,明确了侵染茄子的病毒为 TSWV。研究发现,TSWV 在侵染茄子后,会导致茄子植株发育不良,叶片出现严重花叶、褪绿、斑驳等症状,且发病植株上的茄子果实表皮出现凹凸

不平的症状,严重影响了茄子的产量和质量。进一步利用分子生物学方法,克隆了侵染茄子的 TSWV 分离物的全基因组序列。通过进化树分析发现本研究在茄子上分离的 TSWV S、M 和 L RNA 亲缘关系表现出不同的地域性,S RNA 和与美国分离物亲缘关系较近,M RNA 与中国分离物

亲缘关系较近,而 L RNA 与韩国分离物亲缘关系较近,说明该分离物与国内其他分离物有所不同,可能是随着品种的交流以及蓟马的扩散,与不同国家的株系间发生了基因重组。因此,本研究发现的 TSWV 分离物是否存在不同株系之间的重组需要进一步的研究。





a, b和c分别为 TSWV S RNA、M RNA、L RNA 全核苷酸序列的系统进化树。
a, b and c are the phylogenetic tree based on TSWV S RNA, M RNA and L RNA nucleotide sequences, respectively.

图 3 TSWV-eggplant 和其他 TSWV 分离株的全基因组核苷酸序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of TSWV-eggplant and other TSWV isolates based on full-length genome nucleotide sequences

参考文献

[1] 刘富中, 舒金帅, 张映, 等. “十三五”我国茄子遗传育种研究进展[J]. 中国蔬菜, 2021(3): 17-27.

[2] 刘勇, 李凡, 李月月, 等. 侵染我国主要蔬菜作物的病毒种类、分布与发生趋势[J]. 中国农业科学, 2019, 52(2): 239-261.

[3] 周莹, 黄金宝, 乔广行, 等. 北京地区茄子感染番茄褪绿病毒的分子鉴定[J]. 植物保护学报, 2016, 43(1): 168-172.

[4] 柴阿丽, 陈利达, 曹金强, 等. 利用 siRNA 高通量测序和 RT-PCR 技术鉴定引起茄子斑驳紫花病的病毒种类[J]. 园艺学报, 2019, 46(3): 508-518.

[5] KORMELINK R, VERCHOT J, TAO Xiaorong, et al. The Bunyavirales: the plant-infecting counterparts [J/OL]. Viruses, 2021, 13: 842. DOI: 10.3390/v13050842.

[6] OLIVER J E, WHITFIELD A E. The genus *Tospovirus*: e-merging bunyaviruses that threaten food security [J]. Annual Review of Virology, 2016, 3(1): 101-124.

[7] ROSELLO S, DIEZ M J, NUEZ F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The tomato spotted wilt virus-a review [J]. Scientia Horticulturae, 1996, 67(3/4): 117-150.

[8] QI Shiming, ZHANG Shijie, ISLAM M M, et al. Natural resources resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J/OL]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(20): 10978. DOI: 10.3390/ijms222010978.

[9] RYBICKI E P. A top ten list for economically important plant viruses [J]. Archives of Virology, 2015, 160(1): 17-20.

[10] 刘佳, 陈东亮, 梁玉镯, 等. 北京辣椒和番茄上番茄斑萎病毒的鉴定[J]. 植物检疫, 2021, 35(2): 44-48.

[11] 李飞, 吴青君, 徐宝云, 等. 北京地区发现番茄斑萎病毒[J]. 植物保护, 2012, 38(6): 186-188.

[12] 陈东亮, 李明远, 李雪梅, 等. 北京地区莴苣中番茄斑萎病毒的鉴定[J]. 中国蔬菜, 2018(1): 65-69.

[13] QIU Yanhong, TONG Jing, JI Yanhai, et al. First report of tomato spotted wilt virus infecting water dropwort in china [J]. Plant Disease, 2023, 107(1): 237.

[14] 金凤媚, 宋建, 薛俊, 等. 北京地区侵染菊花的番茄斑萎病毒分子检测与基因组部分序列分析[J]. 华北农学报, 2020, 35(1): 175-184.

[15] ZERBINO D R, BIRNEY E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs [J]. Genome Research, 2008, 18(5): 821-829.

[16] 湖南省质量技术监督局. 蔬菜番茄斑萎病毒检测技术规程: DB 43/T1368-2017 [S]. 湖南: 湖南省质量和标准化研究院, 2018.

[17] 李云洲, 默宁, 闫见敏, 等. 番茄斑萎病毒病研究进展[J]. 园艺学报, 2018, 45(9): 1750-1760.

[18] 王凯娜, 战斌慧, 周雪平. 黑龙江地区番茄斑萎病毒的鉴定及其部分生物学特征分析[J]. 植物保护, 2019, 45(1): 37-43.

[19] 韩帅, 张河庆, 吴婕, 等. 侵染四川辣椒的番茄斑萎病毒和辣椒轻斑驳病毒的小 RNA 测序检测及鉴定[J]. 植物病理学报, 2020, 50(2): 147-154.

[20] 桂敏, 高雪, 贾志强, 等. 云南辣椒正番茄斑萎病毒属病毒的分子鉴定[J]. 植物保护, 2022, 48(4): 286-292.

(责任编辑: 田 喆)