

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

柴阿丽, 陈利达, 曹金强, 康华军, 石延霞, 谢学文, 李宝聚*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 为了明确引起茄子斑驳紫花病的病毒种类, 利用小干扰 RNA (siRNA) 高通量测序技术, 结合生物信息学方法寻找茄子样本中的病毒序列, 发现存在烟草轻型绿花叶病毒 (*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV) 和番茄斑驳花叶病毒 (*Tomato mottle mosaic virus*, ToMMV)。为了验证该结果, 对待测样品中 TMGMV 和 ToMMV 的外壳蛋白 (coat protein, CP) 全长基因进行 RT-PCR 扩增和系统进化分析, 分别得到 500 bp 的 TMGMV-CP 和 482 bp 的 ToMMV-CP 特异性条带, 与 GenBank 中 TMGMV 和 ToMMV 序列相似性分别达到 98% ~ 100% 和 100%, 说明待测样品中确实存在 TMGMV 和 ToMMV。对采自山东、河南、辽宁、河北等地的 23 份疑似斑驳紫花病茄子样品, 分别采用特异性引物 524-F/R 和 ToMMV-F/R 进行检测。结果显示, 所有样品中均含有 TMGMV, 20 份样品中含有 ToMMV, 复合侵染检出率为 86.96%。对茄子、番茄和辣椒幼苗的致病性检测显示, 接种后茄子花表现出与田间相同的症状, 茄子、番茄和辣椒的叶片表现典型的病毒侵染症状, 在接种发病组织中检测到病毒 ToMMV 和 TMGMV。结果表明, 茄子斑驳紫花病样中鉴定出 TMGMV 和 ToMMV 两种病毒。

关键词: 茄子斑驳紫花病; siRNA 高通量测序; 分子鉴定; 烟草轻型绿花叶病毒; 番茄斑驳花叶病毒

中图分类号: S 641.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 03-508-11

Identification of Viruses Causing Eggplant Purple Mottle Flower Disease by siRNA High-throughput Sequencing and RT-PCR detection

CHAI Ali, CHEN Lida, CAO Jinqiang, KANG Huajun, SHI Yanxia, XIE Xuwen, and LI Baoju*

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: To identify the virus causing eggplant purple mottle flower disease, high-throughput sequencing of small interfering RNA (siRNA) was performed with eggplant samples, and then the RNA virus was screened with bioinformatics methods. Results showed that genomic information of *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) and *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) were detected in eggplant samples. To confirm the results, total RNAs were analyzed by reverse transcription (RT)-PCR to amplify the full-length coat protein (CP) gene of 500 bp TMGMV and 482 bp ToMMV. Blast analysis confirmed

收稿日期: 2018-10-09; 修回日期: 2019-02-28

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0201000); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: libaoju@caas.cn)

the identity of the virus, showing 98% - 100% and 100% similarity to TMGMV-CP and ToMMV-CP sequence, respectively. Twenty-three suspected mottled eggplant samples from Shandong, Henan, Liaoning, and Hebei provinces were tested with specific primers 524-F/R and ToMMV-F/R. The expected 500 bp TMGMV-CP fragment was amplified from all 23 samples, and 289 bp ToMMV-CP fragment was amplified from 20 samples. In pathogenicity test, all leaves of inoculated eggplant, tomato and pepper, and flowers of eggplant showed the same symptoms as the field. The results showed that TMGMV and ToMMV were identified in the eggplant mottled purple flower disease.

Keywords: eggplant purple mottle virus disease; siRNA high-throughput sequencing; molecular identification; *Tobacco mild green mosaic virus*; *Tomato mottle mosaic virus*

近年来, 茄子 (*Solanum melongena* L.) 病毒病发生严重, 成为制约产业发展的主要因素之一。据报道, 侵染茄子的病毒有 20 余种, 其中 RNA 病毒主要有苜蓿花叶病毒 (*Alfalfa mosaic virus*, AMV)、蚕豆萎蔫病毒 (*Broad bean wilt virus*, BBWV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、茄子斑驳皱缩病毒 (*Eggplant mottled crinkle virus*, EMCV)、茄子斑驳矮化病毒 (*Eggplant mottle dwarf virus*, EMDV)、茄子轻叶斑点病毒 (*Eggplant mild leaf mottle virus*, EMLMV)、茄子泡斑驳病毒 (*Eggplant blister mottled virus*, EBMV)、马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX)、马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY)、番茄褪绿病毒 (*Tomato chlorosis virus*, ToCV)、烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)、番茄花叶病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV)、芜菁花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV)、番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、番茄灼烧病毒 (*Tomato torrado virus*, ToTV)、辣椒脉斑驳病毒 (*Pepper veinal mottle virus*, PVMV)、辣椒轻斑驳病毒 (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV)、南美红辣椒脉斑驳病毒 (*Chilli veinal mottle virus*, CVMV)、南瓜蚜传黄化病毒 (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) 等; DNA 病毒有番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)、新德里番茄曲叶病毒 (*Tomato leaf curl new delhi virus*, ToLCNDV) 等; 此外, 还有茄子潜类病毒 (*Eggplant latent viroid*, ELVd) 等类病毒可以侵染茄子 (Martelli & Hamadi, 1986; Marchoux et al., 1991; Sadeghi et al., 2008; Zhang et al., 2015; 周莹 等, 2016)。然而, 本研究中鉴定到的烟草轻型绿花叶病毒 (*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV) 和番茄斑驳花叶病毒 (*Tomato mottle mosaic virus*, ToMMV) 侵染茄子并造成的危害, 在国际上尚未见报道。

小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 深度测序技术是发掘新病毒的强有力工具 (Hagen et al., 2011; 钱亚娟 等, 2014)。利用该技术, 研究者发现了多种新病毒, 如在墨西哥番茄样本中发现了长度 10 057 nt 的新马铃薯病毒科病毒 (Li et al., 2012), 在葡萄叶片中发现了葡萄脉明病毒 (*Grapevine vein clearing virus*, GVCV)、葡萄灰比诺病毒 (*Grapevine pinot gris virus*, GPGV) 和葡萄红叶伴随病毒 (*Grapevine redleaf-associated virus*, GRLaV) 等新病毒 (Zhang et al., 2011; Giampetruzzi et al., 2012; Poojari et al., 2013), 在烟草中发现疑似新病毒 Mint virus 1 和 Potato leafroll virus (王浩军 等, 2015)。

本课题组成员于 2015 年 3 月至 2017 年 6 月, 在山东寿光、河南濮阳、辽宁瓦房店、河北饶阳等地温室大棚, 陆续发现茄子斑驳紫花病, 其症状表现与以往常见茄子病毒病症状有所不同, 且危害严重。针对这些疑似茄子斑驳紫花病样本, 采用高通量测序技术对病毒所产生的 siRNA 进行测序, 通过生物信息学方法进行病毒序列比对分析, 然后采用 RT-PCR 技术进一步对 siRNA 检测结果进行验证, 旨在明确引起茄子斑驳紫花病的病毒种类, 为针对性地预警和防控该病害发生提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

2015年3月—2017年6月,从山东、河南、辽宁、河北等地温室大棚采集了23份疑似感染病毒的茄子花瓣和上部叶片样本,其中山东寿光10份,河南濮阳5份,辽宁瓦房店5份,河北饶阳3份。健康对照样本采自中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室,所有样本均保存于-80℃冰箱中备用。

Trizol Reagent 购自英潍捷基(上海)贸易有限公司;反转录试剂盒 FastQuant RT Kit 购自天根生物科技(北京)有限公司;2×TaqMix (MT201), 购自博迈德科技(北京)有限公司。

1.2 茄子样本总 RNA 的提取

采用 TRIzol 法提取茄子样本总 RNA。取 0.2 g 茄子样本于液氮中研磨,将粉末转入 1.5 mL 离心管,迅速加入 1 mL TRIzol 试剂,震荡混匀,室温静止 5 min;4℃下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min;将上清液转入 1.5 mL 离心管,加入 0.2 mL 氯仿震荡混匀,室温放置 5 min;4℃下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min;取上清液(约 400 μL)加入等体积的异丙醇,室内静置 10 min;4℃下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min;弃上清液,加入 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀 2 次,4℃下 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min;自然干燥,加入 50 μL RNase-Free ddH₂O 溶解。同时,提取健康茄子样本总 RNA 作为阴性对照,-80℃保存备用。

1.3 siRNA 文库构建及高通量测序

茄子样本 siRNA 分离、文库构建及高通量测序,均由北京博云华康基因科技有限公司完成,测序平台为 Illumina HiSeq 2000。

1.4 病毒序列分析

对 siRNA 测序得到的原始 reads,去除低质量、无 3'接头和 5'接头、polyA/T/G/C 的 reads,选取长度 18~26 bp 的有效 siRNA。然后同时进行病毒种类初步筛选和 siRNA 拼接、注释。

病毒种类初步筛选:用 Bowtie 软件将得到的有效 siRNA 与宿主基因组比对,分析其在宿主基因组上的分布情况;其余未匹配的 siRNA,与 GenBank Virus RefSeq 核酸数据库比对,初步鉴定样本感染病毒的情况。

siRNA 拼接和注释:用 Vevet 软件对得到的有效 siRNA 进行序列组装拼接,将拼接获得的 contigs 利用 Host Genome、NCBI Nr (non-redundant protein sequences)、NCBI Nt (non-redundant nucleotide sequences)、GenBank Virus RefSeq Nucleotide、GenBank Virus RefSeq Protein 等数据库进行比对和分类注释,筛选和鉴定引起茄子斑驳紫花病的病毒种类。采用 Blast 算法比对,设定阈值 $evalue = 1e-5$ 。

1.5 RT-PCR 扩增和系统进化分析

siRNA 高通量测序结果显示茄子病样中存在 TMGMV 和 ToMMV 两种病毒。为了对该结果进行验证,采用引物 524-F/524-R 和 ToMMV-4F/ToMMV-4R(表 1)对两种病毒的外壳蛋白(Coat Protein, CP)全长基因进行扩增。所用引物均由博迈德科技(北京)有限公司合成。

以提取的总 RNA 为模板,用 FastQuant RT Kit 试剂盒反转录合成病毒的 cDNA 第一条链。PCR 扩增体系为 20 μL,含 2×Taq PCR Master Mix 10 μL,上、下游引物各 0.5 μL,cDNA 模板 1 μL,ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 扩增条件为:94℃预变性 4 min;94℃变性 30 s,53℃退火 30 s,72℃

延伸 45 s, 共 34 个循环; 72 °C 补充延伸 10 min。扩增结束后, 取 5 μL PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (110 V, 45 min) 检测, 并用 Jel Doc 2001 型全自动凝胶成像系统记录结果。PCR 产物送至博迈德科技 (北京) 有限公司进行测序。

在 GenBank 选择不同地区不同寄主上烟草花叶病毒属病毒的 CP 基因共 14 个, 将本研究中扩增得到的 TMGMV、ToMMV 与下载的 CP 基因序列进行同源性比较, 利用软件 MEGA4.1 的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树, 确定引起茄子斑驳紫花病毒种类。系统发育树中各分支置信度 (Bootstrap) 进行 1 000 次重复分析。

表 1 RT-PCR 引物序列信息
Table 1 Primer sequences for RT-PCR detection

病毒 Virus	基因 Gene name	引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence	扩增子长度/bp Amplicon size	参考文献 Reference
TMGMV	CP 全长 CP full-length	524-F 524-R	CGTCATCGAGTACGTTTAA CGTCATCGAGTACGTTTAA	500	Cohen et al., 2001
	ToMMV	CP 部分 CP fragment	ToMMV-F ToMMV-R		
ToMMV	CP 全长 CP full-length	ToMMV-4F ToMMV-4R	ATGTCTACGCTATTAC TTAGGACGCTGGCGC	482	本研究 This research

1.6 田间茄子斑驳紫花病检测

分别以采自山东、河南、辽宁、河北等地的 23 份疑似病毒病茄子样本总 RNA 为模板, 利用特异性引物 524-F/524-R 和 ToMMV-F/ToMMV-R (Cohen et al., 2001; Sui et al., 2017) 进行 RT-PCR 分子检测, 确定引起茄子斑驳紫花病的病毒种类。

1.7 致病性测定

取采自山东寿光感染病毒病的茄子病样 (经 RT-PCR 检测, 确定含有 TMGMV 和 ToMMV), 按照质量体积比 (W/V) 1:40 加入 0.01 mol · L⁻¹ 的 PBS 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2), 在研钵中加入少量的石英砂进行研磨, 之后用 4 层纱布过滤, 收集滤液, 获得病毒汁液 (李娜 等, 2014) 备用。

采用摩擦接种法, 分别选择茄子 ‘特选九叶茄’、番茄 ‘中杂 9 号’ 和辣椒 ‘中椒 0812 号’ 进行致病性检测。在幼苗 1 ~ 2 片真叶期进行接种, 用脱脂棉蘸取病毒汁液和少量石英砂, 均匀涂抹整个叶片, 使病毒通过摩擦产生的伤口侵染植株; 对照蘸取的是无毒 PBS 磷酸盐缓冲液和石英砂混合物。致病性试验重复 3 次, 每次重复 10 株苗。接种后的植株置于温室中正常管理, 白天温度 22 ~ 28 °C, 夜间温度 20 ~ 22 °C。接种后, 观察叶片和花瓣是否表现病毒症状。

待接种植株发病后, 取发病叶片和花瓣组织, 进行总 RNA 提取和 RT-PCR 扩增, 以无毒 PBS 磷酸盐缓冲液接种的健康组织为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 田间病株症状

茄子斑驳紫花病田间症状主要表现在花瓣上。发病初期, 茄子花瓣上显现深紫色斑驳 (图 1, A、B), 随着病情发展花瓣畸形 (图 1, C)。叶片症状不明显, 偶有轻微的褪绿斑驳 (图 1, E、F)。果

实表面也无明显症状, 危害严重时果实长不大, 易脱落。健康茄子花瓣浅紫色, 颜色均匀 (图 1, D), 叶片颜色翠绿。该病症状与已报道的茄子病毒病症状不同。

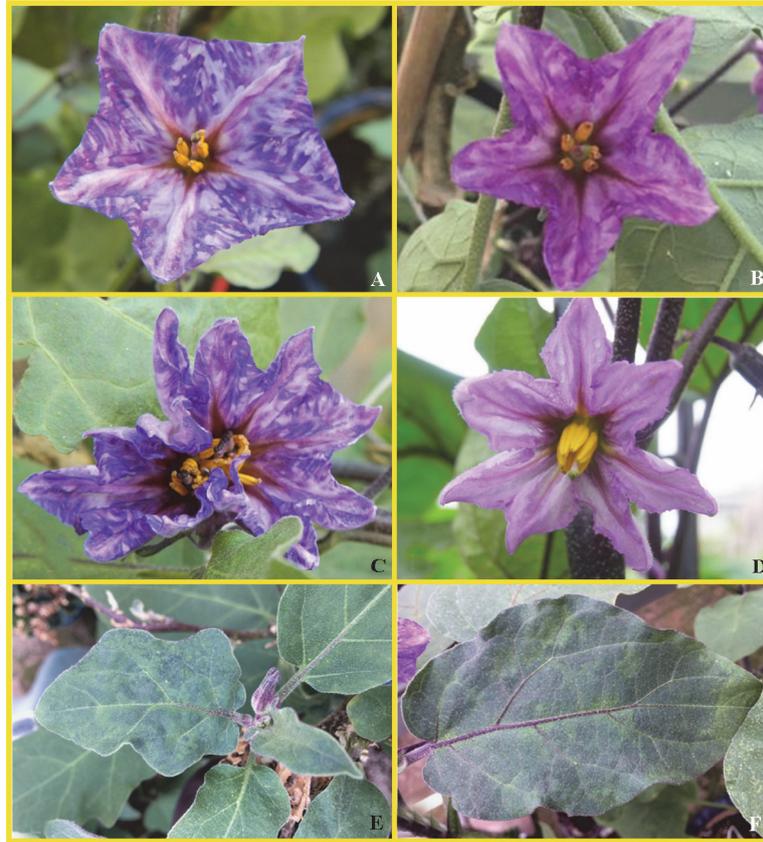


图 1 茄子斑驳紫花病毒病症状

A~C: 染病花瓣; D: 健康花瓣; E、F: 染病叶片。

Fig. 1 Symptoms of eggplant purple mottle flower diseases

A - C: Infected flowers; D: Healthy flowers; E, F: Infected leaves.

2.2 siRNA 高通量测序分析

待测茄子样本经 RNA 提取, siRNA 分离、纯化、测序后, 对原始数据进行去接头、去污染和去除低质量的序列, 共获得 27 071 223 条 sRNA, 长度介于 18~26 bp, 主要集中在 20~23 bp。

病毒种类初筛: 与宿主基因组比对发现, 20 077 100 条 sRNA (74.16%) 分布在寄主基因组上。将未匹配 sRNA 与 GenBank Virus RefSeq 核酸数据库比对, 初步鉴定茄子样本病毒种类主要为 ToMMV 和 TMGMV 两种。其中, 匹配为 TMGMV 的 sRNA 数为 1 081 607 条, 占匹配病毒总 sRNA 数的 52.14%; 匹配为 ToMMV 的 sRNA 数为 984 654 条, 占匹配病毒总 sRNA 数的 47.46% (表 2); 其余病毒仅占匹配病毒总 sRNA 数的 0.4%。初步筛选结果表明, 茄子斑驳紫花病样本感染的病毒种类主要为 ToMMV 和 TMGMV。

sRNA 拼接和注释: 用 Velvet 进行拼接组装, 得到 30 251 条 contigs。利用 5 个数据库进行分类注释, 结果显示, 注释到 Host Genome 茄子寄主数据库的 contigs 数为 27 105 条, 注释到 NCBI Nr、

NCBI Nt、GenBank Virus RefSeq Nucleotide 和 Protein 等 4 个病毒数据库的 contigs 分别为 103、99、75 和 99 条。综合分析 4 个病毒库的比对结果, 茄子样本中主要存在 ToMMV 和 TMGMV 两种病毒, 其中注释为 ToMMV 的 contigs 有 131 条, 注释为 TMGMV 的 contigs 有 111 条。该结果与 sRNA 病毒种类初步筛选结果一致。

表 2 sRNA 与 GenBank Virus RefSeq 比对结果
Table 2 comparison of sRNA with GenBank Virus RefSeq

病毒 Virus	匹配数 Mapped	占病毒数百分比/% Mapped/Total virus	占样本总数百分比/% Mapped/Total sample
TMGMV	1081607	52.14	15.46
ToMMV	984654	47.46	14.08

2.3 RT-PCR 检测和系统发育分析

对 ToMMV 和 TMGMV 的 CP 基因全长进行扩增, 得到的序列片段分别为 482 bp 和 500 bp。将其与 GenBank 下载的 14 个相应序列进行比对, 构建系统发育树 (图 2)。结果表明: 本研究得到的 ToMMV 序列 (MH636301) 与美国 ToMMV 分离物 (KX898033.1) 相似性为 100%; 而 TMGMV 序列 (MG807477) 与委内瑞拉 (DQ460731.1)、突尼斯 (EU770626.1)、西班牙 (HG514449.1) 和巴拿马 (EU934035.1) 的 TMGMV 分离物亲缘关系较近, 同源性的为 98%~100%。

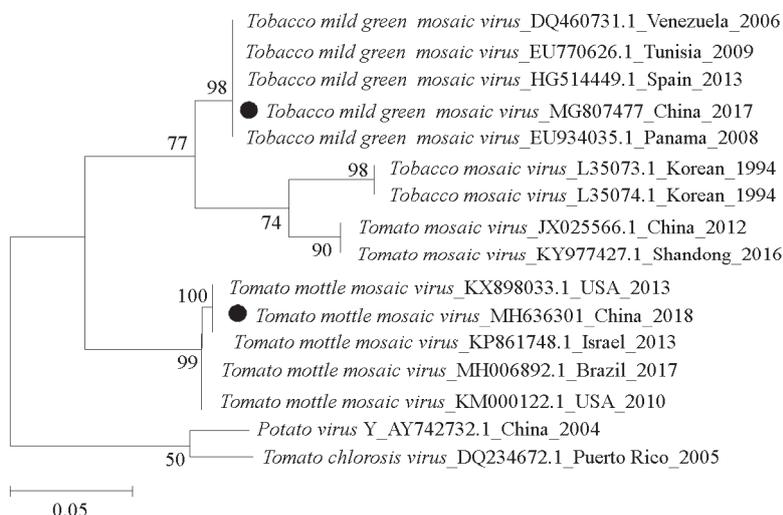


图 2 TMGMV 和 ToMMV 的 CP 序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic relationships based on CP sequences of the TMGMV and ToMMV

2.4 田间茄子斑驳紫花病毒检测

以采自田间的 23 份茄子疑似病毒病样本总 RNA 为模板, 分别利用特异性引物 ToMMV-F/ToMMV-R 和 524-F/524-R 进行 RT-PCR 分子检测。结果显示, 使用引物 ToMMV-F/ToMMV-R 扩增, 23 份样本中有 20 份得到约 289 bp 的特异性条带 (图 3, A), 检出率为 86.96%, BLAST 比对显示, 与 Genbank 中 ToMMV (登录号: KX898033.1) 的同源性为 100%。使用引物 524-F/524-R 扩增, 23

份样本均在 500 bp 处扩增出特异性条带 (图 3, B), 检出率为 100%, BLAST 比对显示, 与 Genbank 中 TMGMV (登录号: JX534224.2) 的同源性为 99%。对照健康茄子样本使用引物 ToMMV-F/ToMMV-R 和 524-F/524-R 均没有扩增出条带。

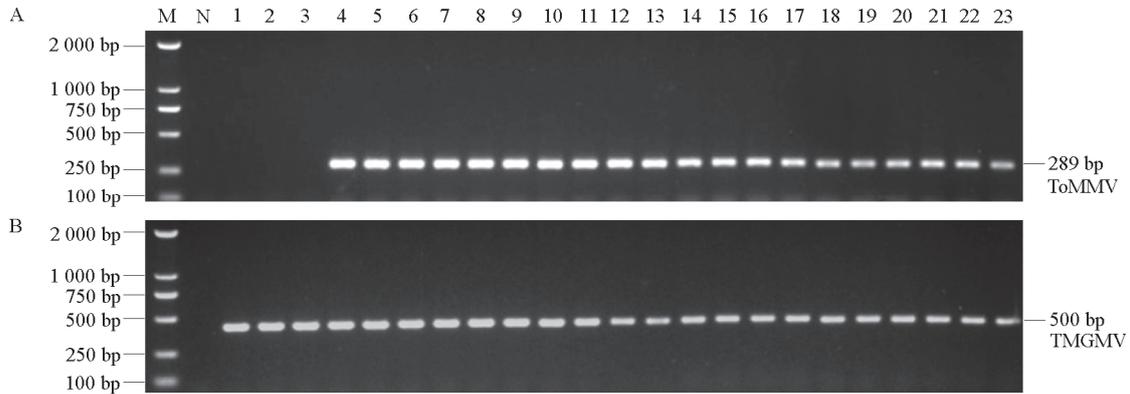


图 3 不同地区茄子样本 ToMMV (A) 和 TMGMV (B) CP 基因的 RT-PCR 扩增结果

M: Marker; N: 健康对照样本; 1~3: 河北茄子样本; 4~13: 山东茄子样本;
 14~18: 河南茄子样本; 19~23: 辽宁茄子样本。

Fig. 3 RT-PCR amplification of CP gene of ToMMV (A) and TMGMV (B) in eggplant samples from different regions

M: Marker; N: Healthy eggplant samples; 1 - 3: Eggplant samples from Hebei; 4 - 13: Eggplant samples from Shandong; 14 - 18: Eggplant samples from Henan;
 19 - 23: Eggplant samples from Liaoning.

采自山东省、河南省和辽宁省茄子样本的 ToMMV 检出率最高, 均为 100%; 而河北省的未检测出 ToMMV。采自山东省、河南省、辽宁省和河北省 23 份样本均检测出了 TMGMV。此外, 在山东省、河南省及辽宁省 20 份茄子病样中检测到 TMGMV 和 ToMMV 复合侵染现象, 复合侵染率占总样本的 86.96% (表 3)。

表 3 茄子斑驳紫花病样本中 TMGMV 和 ToMMV 的 RT-PCR 检测结果

Table 3 RT-PCR detection result of TMGMV and ToMMV in eggplant purple mottle flower disease samples

来源 Site	样本数 Sample number	ToMMV		TMGMV		ToMMV + TMGMV	
		检出数 Positive number	检出率/% Positive rate	检出数 Positive number	检出率/% Positive rate	检出数 Positive number	检出率/% Positive rate
山东 Shandong	10	10	100	10	100	10	100
河南 Henan	5	5	100	5	100	5	100
辽宁 Liaoning	5	5	100	5	100	5	100
河北 Hebei	3	0	0	3	100	0	0
总计 Total	23	20	86.96	23	100	20	86.96

2.5 致病性测定结果

利用采自山东寿光感染斑驳紫花病毒的茄子病样作为毒源, 摩擦接种到茄子、番茄和辣椒叶片上, 3 种作物均表现发病症状 (图 4)。接种茄子叶片皱褶卷曲, 局部有不规则状突起, 后期花瓣呈

现紫色斑驳和畸形症状; 辣椒发病初期叶片出现褪绿斑点, 随着症状的发展, 斑点呈坏死、透明的典型病毒病症状, 严重时病斑互相重叠形成大斑; 番茄叶片出现褪绿斑点, 病斑分布均匀。对照植株生长正常, 无典型的病毒症状出现。

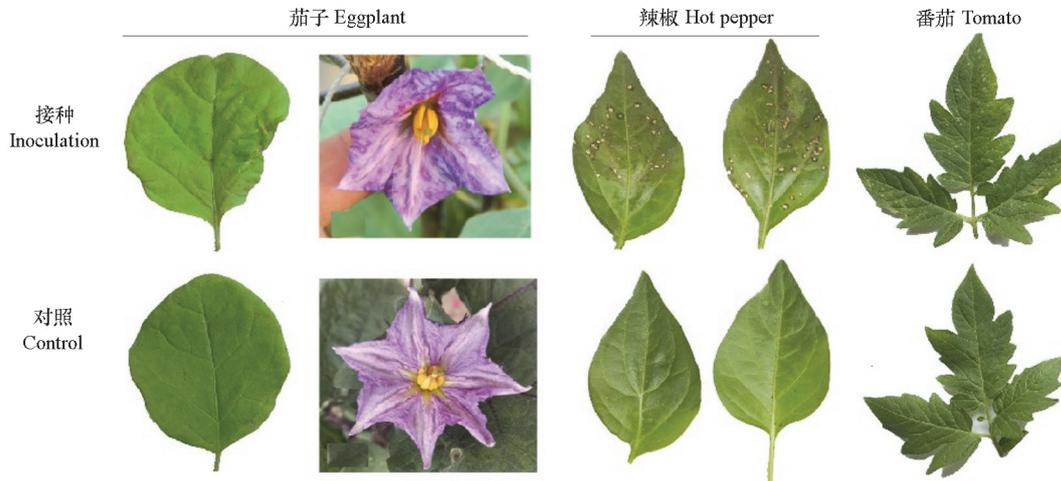


图 4 茄子、辣椒、番茄接种后的症状
Fig. 4 Symptoms of eggplant, pepper and tomato inoculated with TMGMV and ToMMV

2.6 接种样本 RT-PCR 检测结果

采集接种后发病的茄子、辣椒和番茄发病组织, 以样本总 RNA 为模板, 分别利用特异性引物 ToMMV-F/ToMMV-R 和 524-F/524-R 进行 RT-PCR 检测。结果显示: 接种后的茄子 (图 5, A)、辣椒 (图 5, B) 和番茄组织 (图 5, C) 均扩增得到 289 bp 和 500 bp 的两条特异条带, 说明在接种后茄子、辣椒和番茄样本中检测到病毒 TMGMV 和 ToMMV。接种无毒 PBS 缓冲液的对照植株组织样本未扩增出任何条带。

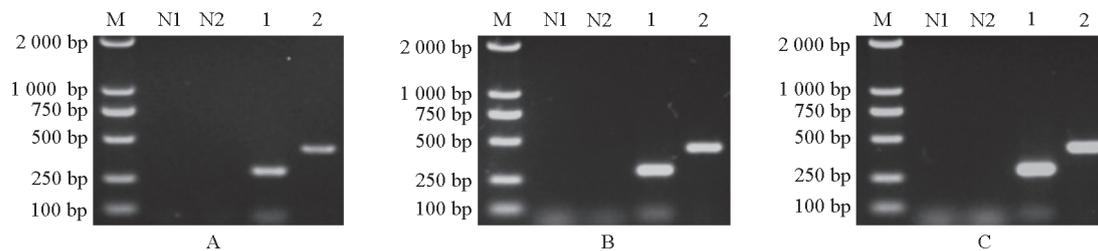


图 5 接种后茄子 (A)、辣椒 (B)、番茄 (C) 样本中 TMGMV 和 ToMMV 病毒的 RT-PCR 检测
M: Marker; N1: 接种无毒 PBS 缓冲液的对照样本 ToMMV 扩增; N2: 接种无毒 PBS 缓冲液的对照样本 TMGMV 扩增;
1: 接种病毒样本 ToMMV 扩增; 2: 接种病毒样本 TMGMV 扩增。

Fig. 5 RT-PCR detection of TMGMV and ToMMV in inoculated eggplant (A), pepper (B) and tomato (C) samples
M: Marker; N1: RT-PCR of ToMMV in control samples; N2: RT-PCR of TMGMV in control samples;
1: RT-PCR of ToMMV in inoculated samples; 2: RT-PCR of TMGMV in inoculated samples.

3 讨论

近年来茄子斑驳紫花病毒病在中国危害严重, 山东、河南、辽宁和河北等地的茄子种植区陆续发现该病侵染危害。本实验室自 2015 年来一直关注该病的发生状况, 为了鉴定引起该症状的病毒种类, 首先利用茄子上已报道的 PVY、ToMV、EMDV、ToCV 和 TSWV 等特异性引物, 对染病茄子样本进行 RT-PCR 检测, 结果显示这些病毒的特异性引物均无扩增。

为了明确引起茄子斑驳紫花病的病毒种类, 本研究中利用 siRNA 高通量测序技术, 对染病茄子样本进行 siRNA 高通量测序, 发现茄子样本中存在 TMGMV 和 ToMMV 两种病毒。进一步通过 RT-PCR 技术, 利用两种病毒的特异性引物 ToMMV-F/ToMMV-R 和 524-4F/524-4R 对待测样本中 TMGMV 和 ToMMV 的 CP 全长基因进行扩增, 分别得到 500 bp 的 TMGMV-CP 和 482 bp 的 ToMMV-CP 特异性条带, 系统进化分析显示与 GenBank 中 TMGMV 和 ToMMV 序列相似性分别达到 98%~100% 和 100%, 说明待测样本中确实存在 TMGMV 和 ToMMV。

TMGMV 和 ToMMV 均属于烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*) 成员, 主要危害茄科作物。目前侵染报道主要集中在辣椒和番茄上, 尚未见其侵染茄子的相关报道。1935 年, TMGMV 首次在烟草上发现 (McKinney, 1935), 随后在韩国、委内瑞拉和巴拿马等国家的辣椒上相继报道 (Choi et al., 2002; Córdoba et al., 2006; Herrera-Vásquez et al., 2009); 番茄、凤仙花、蓝眼菊和矮牵牛也是 TMGMV 的自然寄主 (Alishiri et al., 2011)。在中国, TMGMV 侵染辣椒分别于 2005 年在台湾、2013 年在厦门发现 (Li & Chang, 2005; 陈青 等, 2013); 2017 年, 在湖南发现 TMGMV 危害南瓜 (Tang et al., 2017)。ToMMV 于 2013 年在墨西哥的番茄上首次发现 (Li et al., 2013), 之后分别在美国佛罗里达、纽约和以色列等地相继报道 (Fillmer et al., 2015; Padmanabhan et al., 2015; Turina et al., 2016)。在中国, 目前只在西藏拉萨和云南辣椒作物上发现 ToMMV (Li et al., 2014; 李月月 等, 2015)。TMGMV 和 ToMMV 侵染茄子属于首次报道。

致病性试验中, 茄子花表现症状与田间自然发病症状一致, 而叶片表现症状与田间症状稍有差异。接种叶片表现为皱褶卷曲, 局部有不规则突起, 而田间叶片症状表现为轻微的褪绿斑驳, 可能跟植株苗龄不同有关, 致病性试验采用的是 1~2 片真叶期的幼苗, 而田间自然发病植株为成株期植株。此外, 致病性试验采用的接种体是田间发病的茄子病样, 而不是分离纯化的病毒分离物, 田间茄子病样可能含有其他病毒, 要确定茄子斑驳紫花叶病是否由 TMGMV 和 ToMMV 复合侵染引起, 还需要进一步的试验验证。

烟草花叶病毒属病毒具有种传特性, 国际种子贸易往来是病毒远距离传播的重要途径 (李兰 等, 2012; 陈青 等, 2013)。2011 年, 在韩国市售的辣椒种子上检测到 TMGMV 病毒 (Jeong & Soh, 2011), 中国也从进口的辣椒种子上检测到 TMGMV 病毒 (陈青 等, 2013)。为保护辣椒、茄子和番茄等茄科蔬菜产业的安全, 加强种子的进境检疫和省间种子调运检疫, 并在种子繁育基地进行病毒监测, 有利于防止病毒病的大范围扩散。

References

- Alishiri A, Rakhshandehroo F, Zamanizadeh H R. 2011. First report of *Tobacco mild green mosaic virus* infecting tomato in Iran. *New Disease Reports*, 23: 30.
- Chen Qing, Liao Fu-rong, Chen Hong-yun, Xie Yi-xuan, Chen Jia-fu, Cai Jin-lei, Lin Shi-ming. 2013. Identification of *Tobacco mild green mosaic virus* infecting pepper. *Acta Phytopathologica Sinica*, 43 (6): 651 - 654. (in Chinese)

- 陈 青, 廖富荣, 陈红运, 谢毅璇, 陈加福, 蔡金镭, 林石明. 2013. 辣椒上烟草轻型绿花叶病毒的鉴定. 植物病理学报, 43 (6): 651 - 654.
- Choi G S, Kim J H, Ryu K H, Choi J K, Chae S Y, Kim J S, Chung B N, Kim H R, Choi Y M. 2002. First report of *Tobacco mild green mosaic virus* infecting pepper in Korea. *Plant Pathology Journal*, 18 (6): 323 - 327.
- Cohen J, Rosner A, Kagan S, Lampel M, Maslenin L, Zeidan M, Gera A. 2001. A new disease in *Tabernaemontana* associated with *Tobacco mild green mosaic virus*. *Annals of Applied Biology*, 138 (2): 153 - 159.
- Córdoba C, Garcíarández A, Montaña N, Jordá C. 2006. First report of *Tobacco mild green mosaic virus* in *Capsicum chinense* in Venezuela. *Plant Disease*, 90 (8): 1108 - 1108
- Fillmer K, Adkins S, Pongam P, D'Elia T. 2015. Complete genome sequence of a *Tomato mottle mosaic virus* isolate from the United States. *Genome Announc*, 3 (2): e00167-15.
- Giampetruzzi A, Roumi V, Roberto R, Malossini U, Yoshikawa N, La Notte P, Terlizzi F, Credi R, Saldarelli P. 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Res*, 163: 262 - 268.
- Hagen C, Frizzi A, Kao J, Jia L, Huang M, Zhang Y, Huang S. 2011. Using small RNA sequences to diagnose, sequence, and investigate the infectivity characteristics of vegetable-infecting viruses. *Archives of Virology*, 156 (7): 1209 - 1216.
- Herrera-Vásquez J A, Córdoba-Sellés M C, Cebrián M C, Alfaro-Fernández A, Jordá C. 2009. First report of *Pepper mild mottle virus* and *Tobacco mild green mosaic virus* infecting pepper in Panama. *Plant Pathology*, 58 (4): 786 - 786.
- Jeong K, Soh E. 2011. One-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection of seed transmissible bacteria and viruses in pepper and tomato seeds. *Research in Plant Disease*, 17 (1): 44 - 51.
- Li C Y, Chang Y C. 2005. First identification of *Tobacco mild green mosaic virus* on *Capsicum annuum* in Taiwan. *Plant Pathology*, 54 (2): 258 - 258.
- Li Lan, Liang Fan, Luo Lai-xin, Li Jian-qiang. 2012. Identification of PMMOV in pepper seed//Guo ze-jian, Li Bao-du. Proceedings of the annual meeting of Chinese society for plant pathology (2012) . Beijing: China Agricultural Science and Technology Press. (in Chinese)
- 李 兰, 梁 凡, 罗来鑫, 李健强. 2012. 辣椒种子携带辣椒轻斑驳病毒的检测//郭泽建, 李宝笃. 中国植物病理学会 2012 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社.
- Li Na, Li Xi-hong, Xu Ru-bing, Xue Shou-cong, Guo Li, Ren Jia-qing, Huo Rui, Wang Xiao-li, Du Xiu-zhi, Zhao Xiu-yun. 2014. Selecting *fungi* which can induce tobacco creating systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Chinese Tobacco Science*, 35 (4): 79 - 84. (in Chinese)
- 李 娜, 李锡宏, 许汝冰, 薛守聪, 郭 利, 任加庆, 霍 瑞, 王晓丽, 杜修智, 赵秀云. 2014. 筛选诱导烟草对烟草花叶病毒产生系统抗性的真菌. *中国烟草科学*, 35 (4): 79 - 84.
- Li R, Gao S, Hernandez A G, Wechter W P, Fei Z, Ling K S. 2012. Deep sequencing of small RNAs in tomato for virus and viroid identification and strain differentiation. *PLoS One*, 7: e37127.
- Li R G, Gao S, Fei Z J, Ling K S. 2013. Complete genome sequence of a new *Tobamovirus* naturally infecting tomatoes in Mexico. *Genome Announcements*, 1 (5): e00794-13.
- Li Y Y, Wang C L, Xiang D, Li R H, Liu Y, Li F. 2014. First report of *Tomato mottle mosaic virus* infection of pepper in China. *Plant Disease*, 98 (10): 1447 - 1447.
- Li Yue-yue, Xiao Long, Tan Guan-lin, Lan Ping-xiu, Liu Yong, Li Fan. 2015. Identification of Viral Diseases of Solanaceae, Cruciferae, Cucurbitaceae and Leguminous Vegetables in Yunnan//Peng You-liang, Miao Wei-guo. Proceedings of the Chinese Society of Plant Pathology 2015 Annual Conference. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 李月月, 肖 龙, 谭冠林, 兰平秀, 刘 勇, 李 凡. 2015. 云南主要茄科、十字花科、葫芦科及豆科蔬菜病毒病原鉴定. //彭友良, 缪卫国. 中国植物病理学会 2015 年学术年会论文集. 北京: 中国农业出版社.
- Marchoux G, Gébré-Selassie K, Villeveille M. 1991. Detection of tomato spotted wilt virus and transmission by *Frankliniella occidentalis* in France. *Plant Pathology*, 40 (3): 347 - 351.
- Martelli G P, Hamadi A. 1986. Occurrence of eggplant mottled dwarf virus in Algeria. *Plant Pathology*, 35 (4): 595 - 597.

- McKinney H H. 1935. Evidence of virus mutation in the common mosaic of virus. *J Agric Res*, 39: 557.
- Padmanabhan C, Zheng Y, Li R, Martin G B, Fei Z, Ling K S. 2015. Complete genome sequence of a tomato-infecting *Tomato mottle mosaic virus* in New York. *Genome Announc*, 3 (6): e01523-15.
- Poojari S, Alabi O J, Fofanov V Y, Naidu R A. 2013. A leafhopper-transmissible DNA virus with novel evolutionary lineage in the family geminiviridae implicated in grapevine redleaf disease by next-generation sequencing. *PLoS One*, 8 (6): e64194.
- Qian Ya-juan, Xu Yi, Zhou Qi, Zhou Xue-ping. 2014. Application of next-generation sequencing technology for plant virus identification. *Scientia Sinica Vitae*, 44 (4): 351 - 363. (in Chinese)
- 钱亚娟, 徐毅, 周琦, 周雪平. 2014. 利用深度测序技术发掘植物病毒资源. *中国科学: 生命科学*, 44 (4): 351 - 363.
- Sadeghi M S, Behjatnia S A A, Masumi M, Izadpanah K. 2008. Characterisation of a strain of *Potato virus Y* causing eggplant mosaic in southern Iran. *Australasian Plant Pathology*, 37 (1): 79 - 86.
- Sui X L, Zheng Y, Li R G, Padmanabhan C, Tian T Y, Groth-Helms D, P.Keinath A, Fei Z J, Wu Z J, Ling K S. 2017. Molecular and biological characterization of *Tomato mottle mosaic virus* and development of RT-PCR detection. *Plant Disease*, 101 (5): 704 - 711.
- Tang Q J, Liu M Y, Li X, Zhao S Q, Dai L Y. 2017. Pumpkin: a new natural host of *Tobacco mild green mosaic virus* in China. *Plant Disease*, 101 (6): 1063 - 1063.
- Turina M, Geraats B P J, Ciuffo M. 2016. First report of *Tomato mottle mosaic virus* in tomato crops in Israel. *New Dis Rep* 33 (1): <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.033.001>.
- Wang Hao-jun, Wang Fang, Yao Zhong-da, Guo Dong-feng, Shu Jun-sheng. 2015. Detection of tobacco virus by siRNA high-throughput sequencing. *Acta Tabacaria Sinica*, 21 (3): 107 - 110. (in Chinese)
- 王浩军, 王芳, 姚忠达, 郭东锋, 舒俊生. 2015. 利用 siRNA 高通量测序技术检测烟草病毒. *中国烟草学报*, 21 (3): 107 - 110.
- Zhang S Y, Yu N T, Wang X, Liang J, Xie H M, Wang J H, Zhang Y L, Liu Z X. 2015. Natural occurrence of wild tomato mosaic virus in wild eggplant in China. *Journal of Phytopathology*, 163 (11 - 12): 1023 - 1026.
- Zhang Y, Singh K, Kaur R, Qiu W. 2011. Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology*, 101 (9): 1081 - 1090.
- Zhou Ying, Huang Jin-bao, Qiao Guang-hang, Luo Chen, Li Ming-yuan. 2016. Molecular identification of *tomato chlorosis virus* on eggplants in Beijing. *Journal of Plant Protection*, 43 (1): 168 - 172. (in Chinese)
- 周莹, 黄金宝, 乔广行, 罗晨, 李明远. 2016. 北京地区茄子感染番茄褪绿病毒的分子鉴定. *植物保护学报*, 43 (1): 168 - 172.