

邵宇纯, 仲健新, 路云爽, 等. 茄子斑驳皱缩病毒病原物的鉴定及分子进化分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(3): 674-682.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.03.007

## 茄子斑驳皱缩病毒病原物的鉴定及分子进化分析

邵宇纯, 仲健新, 路云爽, 宋美娜, 陈雅寒

(甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 为了鉴定引起茄子斑驳皱缩病毒病的病原物, 利用 siRNA 高通量测序技术 (Small interfering RNA, siRNA), 结合生物信息学的方法发现 2 个表现斑驳和皱缩的茄子样品中存在蚕豆萎蔫病毒 2 号 (Broad bean wilt virus, BBWV2)、葡萄 A 病毒 (Grapevine virus A, GVA) 和烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV)。采用 RT-PCR 技术对该结果进行验证, 2 个样品中均检测到 BBWV2 和 TMV, 未检测到 GVA。通过对 BBWV2 外壳蛋白 (Large coat protein, LCP) 大亚基基因进行测序和分子进化分析, 获得了 2 条 1 126 bp 的 BBWV2 *LCP* 基因片段, 2 条 BBWV2 *LCP* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列一致性分别为 99.6% 和 99.3%; 与 NCBI 中已发表的 23 个 BBWV2 *LCP* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列一致性分别为 79.9%~95.2% 和 80.5%~97.2%。基于 *LCP* 基因核苷酸序列进行种群结构和遗传多样性分析, 结果表明在系统发育进化树中, BBWV2 可分为两大支。不同寄主 BBWV2 *LCP* 基因的遗传距离在 0.049~0.332。

**关键词:** 茄子; 斑驳皱缩病毒病; 蚕豆萎蔫病毒 2 号; 烟草花叶病毒; *LCP* 基因

**中图分类号:** S641.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)03-0674-09

## Identification and molecular evolutionary analysis of viruses causing eggplant mottle crinkle disease

SHAO Yu-chun, ZHONG Jian-xin, LU Yun-shuang, SONG Mei-na, CHEN Ya-han

(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** To identify the viruses causing eggplant mottle crinkle disease, the high-throughput sequencing of small interfering RNA (siRNA) and the bioinformatics methods were used to detect the potential viral pathogens, including the broad bean wilt virus 2 (BBWV2), grapevine virus A (GVA) and tobacco mosaic virus (TMV). The results were validated by RT-PCR. BBWV2 and TWV were detected in the samples, and GVA was not detected. Through sequencing and molecular evolutionary analysis of the large subunit gene of BBWV2 coat protein (LCP), two 1 126 bp BBWV2 *LCP* gene fragments were obtained. The nucleotide and coding amino acid sequences identities of the two BBWV2 *LCP* genes were 99.6% and 99.3%, respectively. The nucleotide and amino acid sequences identities of the 23 BBWV2 *LCP* genes published in NCBI were 79.9%~95.2% and 80.5%~97.2%, respectively. The analysis of population structure and genetic diversity based on *LCP* gene nucleotide sequence showed

that BBWV2 could be divided into two branches in the phylogenetic tree. The genetic distance of BBWV2 *LCP* gene between different hosts ranged from 0.049 to 0.332.

**Key words:** eggplant; mottle crinkle disease; broad bean wilt virus 2; tobacco mosaic virus; *LCP* gene

收稿日期: 2022-08-15

基金项目: 甘肃农业大学省级大学生创新创业训练计划项目 (S202210733027); 国家自然科学基金项目 (32160628); 甘肃省自然科学基金项目 (21JR7RA820); 甘肃省高等学校创新基金项目 (2021B-117); 甘肃农业大学人才启动资金项目 (GAU-KYQD-2019-22)

作者简介: 邵宇纯 (2001-), 女, 山西太原人, 本科生, 研究方向为植物病理学。 (E-mail) 1054030947@qq.com

通讯作者: 陈雅寒, (E-mail) yhchen1018@nwfau.edu.cn

茄子 (*Solanum melongena* L.) 为茄科 (Solanaceae Juss.), 茄属 (*Solanum* L.) 植物<sup>[1]</sup>。据统计, 近年来中国茄子种植面积约占  $7.4 \times 10^5$   $\text{hm}^2$ , 产量约为  $2.0 \times 10^8$

t<sup>[2]</sup>,所带来的经济效益十分可观。随着种植面积的不断增加,病毒病严重影响了茄子的产量和品质。蚕豆萎蔫病毒 2 号(Broad bean wilt virus 2, BBWV2)属于豇豆花叶病毒科(Comoviridae)蚕豆病毒属(*Fabavirus*),在自然界主要通过多种蚜虫非持续性传播,可侵染 44 科 186 属 328 种植物,被侵染后植物多表现为不同程度的变色、畸形、萎蔫且叶片多附有黑褐色坏死斑点,严重影响了植物的正常生长<sup>[3-9]</sup>。BBWV2 基因组由 2 段单链 RNA 分子组成, RNA1 (5 800 nt) 表达蛋白酶辅因子(Co-Pro)、解旋酶(*Helicase*)、NTP 结合基序(NTBM)、蛋白酶(*Pro*)和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(*RT*)等 5 种功能蛋白质,主要参与基因组的复制和表达; RNA2 (3 300 nt) 表达运动蛋白(Movement protein, MP)、外壳蛋白大亚基(Large coat protein, LCP)和外壳蛋白小亚基(Small coat protein, SCP)等 3 种功能蛋白质<sup>[10-12]</sup>。

目前,检测植物病毒的方法有传统病毒血清学鉴定法(Serological methods)、透射电镜法(Transmission electron microscopy, TEM)、酶联免疫吸附测定法(Enzyme linked immunosorbent assays, ELISA)、逆转录环介导等温扩增技术(Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)和聚合酶链式反应法(Polymerase chain reaction, PCR)等<sup>[13-15]</sup>。这些方法仅适用于对已知病原物的病毒检测,而对未知病原物的检测则受到了极大的限制。siRNA 高通量测序技术(Small interfering RNA, siRNA)与传统的病原检测方法不同,是利用高通量测序技术检测病毒产生的 siRNA 序列,并对测序结果进行拼接,与数据库进行比对从而筛选和鉴定病毒种类<sup>[16-20]</sup>,其灵活性高,适用性强。本研究利用 siRNA 高通量测序技术对 2020 年 7 月在甘肃省临洮市采集到的 2 株表现斑驳和皱缩等疑似病毒病症状的茄子样品进行深度测序,采用 RT-PCR 技术对测序结果进行验证,旨在明确引起茄子斑驳皱缩病毒病的病毒种类,为茄子斑驳皱缩病毒病的快速诊断和防控提供科学的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2020 年 7 月在甘肃省临洮县采集到 2 株表现斑驳和皱缩等疑似病毒病症状的茄子叶片(图 1),液氮速冻,保存于-80℃超低温冰箱备用。

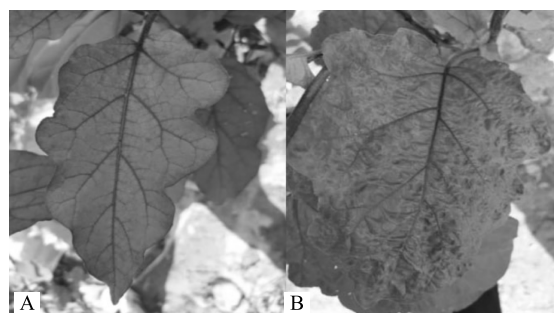


图 1 健康茄子叶片(A)和染病茄子叶片(B)

Fig.1 The healthy eggplant leaf (A) and infected eggplant leaf (B)

### 1.2 样品总 RNA 的提取及 siRNA 测序

按照 Invitrogen TRIzol™ 说明书提取样品总 RNA,利用 Unano-2000 微量核酸分析仪(UMI,美国)测定 RNA 浓度,提取的 RNA 送至北京百迈客生物科技有限公司完成 siRNA 的分离、高通量测序以及 cDNA 文库的构建,测序平台为 Illumina HiSeq 2500。

### 1.3 病毒种类筛选

对测序得到的粗序列 raw read 进行过滤,去除质量值低、无 3'接头序列和插入片段的 read,筛选长度在 18~35 nt 的 siRNA。使用 velvet 软件对所得 siRNA 进行拼接,将拼接所得 contig 进行分类注释。具体方法如下:(1)将获得的 contig 与茄子基因组序列进行比对,去除寄主基因组序列。(2)用 BLASTN 将剩余的 contig 与 NCBI Nt (NCBI non-redundant nucleotide sequences) 进行比对,获得高度同源的序列。(3)用 BLASTX 将 2 中未注释到的 contig 与 NCBI Nr (NCBI non-redundant protein sequences) 进行比对,获得部分同源的序列。(4)选出高度同源和部分同源序列中 e 值最小的 contig,分别与 GenBank Virus RefSeq 核酸数据库(Virus RefSeq Nucleotide)和 GenBank Virus RefSeq 蛋白质数据库(Virus RefSeq Protein)进行比对,筛选和鉴定病毒种类。

### 1.4 RT-PCR 的检测及克隆测序

siRNA 高通量测序结果显示样品中存在 BBWV2、葡萄 A 病毒(GVA)和烟草花叶病毒(TMV) 3 种病毒。根据 NCBI 中收录的 BBWV2 和 GVA 基因组全序列,使用 Vector NTI 软件设计 2 对简并引物。TMV 的特异性引物(表 1)参考已报道文献,引物委托西安擎科生物科技有限责任公司合成。

按照 TaKaRa Prime Script™ RT reagent Kit 说明书将总 RNA 反转录成 cDNA,反应体系 (20  $\mu$ l): 取 1  $\mu$ g RNA 为模板,加入 5 $\times$ Prime Script Buffer 4  $\mu$ l、Prime Script RT Enzyme Mix I 1  $\mu$ l、Oligo dT Prime 1  $\mu$ l、Random 6mers 1  $\mu$ l、RNase Free ddH<sub>2</sub>O 补全至 20  $\mu$ l;反应程序:37  $^{\circ}$ C 15 min,85  $^{\circ}$ C 4 s。合成的 cDNA 保存于-20  $^{\circ}$ C 冰箱备用。

表 1 本研究用到的引物信息

Table 1 Primers used in this research

检测病毒	引物名称	引物序列(5'→3')	长度(bp)	TM( $^{\circ}$ C)	参考文献
BBWV2	BBWV2-LCP-F	CACTGGTGAACAGTTTGTCTAG	1 126	55	
	BBWV2-LCP-R	CTATCAAAGGGATGCGGTGTCG			
GVA	GVA-CP-1	TCCATGGSSWWCASSTWWCGCMMARRG	600	52	
	GVA-CP-2	CTATATCTCRRACAGCYTGYTTC			
TMV	TMVd F	GATTCGTTTTAAATATGTCTTAC	600	46	[21]
	TMVd R	CTTCGATTAAAGTGGAGGGA			

BBWV2:蚕豆萎蔫病毒 2 号;GVA:葡萄 A 病毒;TMV:烟草花叶病毒。

### 1.5 序列一致性分析和系统进化分析

将获得的两段序列用 DNAMAN 6.0 软件进行校正和拼接,将得到的 BBWV2 LCP 基因序列提交 NCBI 核酸数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行 BLAST 序列比对分析,采用 SDT v1.2 软件中的 Clustal W 算法进行核苷酸序列及其编码的氨基酸序列一致性分析<sup>[22]</sup>。以南芥菜花叶病毒(Arabis mosaic virus, ArMV)为外群,采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树,选择邻近法(Neighbor-joining, NJ)进行系统进化分析,自展校正值设定为 1 000。

### 1.6 遗传距离分析和基因交流分析

使用 MEGA 7.0 软件中 Maximum Composite Likelihood 模型计算 BBWV2 分离物不同分组之间的遗传距离,Gamma 参数默认为 1。使用 DnaSP v5 软件分析 BBWV2 分离物不同分组之间的基因交流,以种群基因差异  $F_{st}$  值和基因流  $N_m$  值为参考来衡量种群间的遗传分化程度和基因交流。一般  $|F_{st}|$  介于 0 至 1,当  $0 \leq |F_{st}| \leq 0.33$ ,表明这两个分组之间存在频繁的基因交流;当  $0.33 \leq |F_{st}| \leq 1$ ,表明这两个分组之间

以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,观察结果并拍照。用胶回收试剂盒(TaKaRa)将目标产物切胶回收,纯化产物经连接转化、单克隆挑选和摇菌后,PCR 筛选阳性克隆,鉴定为阳性的菌液提取质粒。质粒送至西安擎科生物科技有限责任公司测序。

基因交流的频率很低。当  $N_m < 1$ ,表明这两个分组之间很容易发生遗传漂变;当  $N_m > 1$ ,表明这两个分组之间存在可以基因交流的渠道<sup>[23-26]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品 siRNA 高通量测序分析

经测序得到的粗序列 raw read 进行筛选后获得的总 RNA 数为 12 568 877(表 2),其中,siRNA 长度分布结果如图 2,本研究中 siRNA 序列长度主要集中于 18~24 nt,表明样本 siRNA 文库质量较高。使用 velvet 软件将 siRNA 进行拼接后,所组装的 contig 数为 3 624。将拼接所得的 contig 进行分类注释,筛选出与病毒同源的 contig 数目结果见表 3,包括 BBWV2、GVA 和 TMV 3 种病毒,与 BBWV2 同源的 contig 数目最高,为 64;与 GVA 和 TMV 同源的 contig 数目依次为 2 和 3;其中,BBWV2、GVA 和 TMV 的 e-value 值分别为  $8 \times 10^{-51}$ 、 $7 \times 10^{-13}$ 、 $2 \times 10^{-28}$ ,表明 BBWV2 出现假阳的概率最小,但还需进一步验证才能明确引起茄子斑驳皱缩病毒病的病毒种类。

表 2 测序数据质量统计

Table 2 Quality statistics of sequencing data

项目	粗序列	长度小于 18 nt 读段	长度大于 35 nt 读段	低质量	干净的读段
个数	16 891 611	3 217 592	1 105 142	0	12 568 877
占比(%)	100.00	19.05	6.54	0	74.41

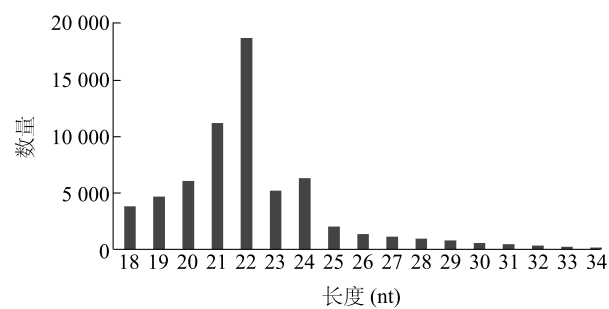


图2 siRNA 长度分布  
Fig.2 Distribution of siRNA length

表3 样品 siRNA 文库与已知病毒同源的 contig 检测结果  
Table 3 Homologous contig detection results of virus in siRNA library

病毒名称	同源 contig 数目	e 期望值	与比对参考序列的相似度	得分
BBWV2	64	$8 \times 10^{-51}$	216/269(80.30)	202.0
GVA	2	$7 \times 10^{-13}$	48/52(92.31)	73.1
TMV	3	$2 \times 10^{-28}$	80/86(93.02)	126.0

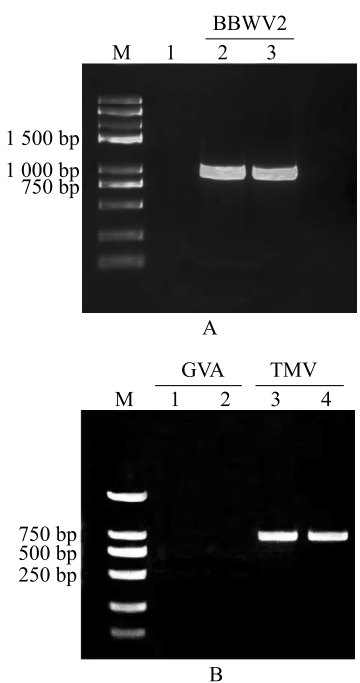
BBWV2、GVA、TMV 见表1注。

2.2 样品病毒检测结果

以 cDNA 为模板,利用特异性引物进行 RT-PCR 检测,结果显示 2 份疑似病毒病的茄子样品中,扩增出 2 条大小约为1 100 bp 和 600 bp 的目标条带(图 3),表明茄子样品中含有 BBWV2 和 TMV 2 种病毒,并未检测到 GVA。

2.3 序列一致性分析和系统进化分析

将测序后所获得的 BBWV2 LCP 原始序列采用 DNAMAN 6.0 软件进行了校正和拼接,获得 2 条1 126 bp 的序列,并将其命名为 BBWV2-Q11、BBWV2-Q14 后进行序列一致性分析。结果表明本研究中所获得的 2 条 BBWV2 分离物 LCP 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列一致性分别为 99.6%和 99.3%。与 NCBI 中已发表的 23 个 BBWV2 分离物 LCP 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列一致性分别为79.9%~ 95.2%和80.5%~ 97.2%(表 4、表 5)。其中,BBWV2-Q11、BBWV2-Q14 与 BBWV2 新加坡分离物(GenBank 登录号 NC003004)的核苷酸序列一致性最低,为 79.9%;与中国分离物(GenBank 登录号 KY606993)的核苷酸序列一致性最高,为 95.2%;与 BBWV2 新加坡分离物(GenBank 登录号 NC003004)的氨基酸序列一致性最低,为 80.5%;与中国分离物(GenBank 登录号 KY606993)的氨基酸序列一致性最高,为 97.2%。说明本研究所获得的 BBWV2 LCP 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列与 NCBI



A;M 为5 000 marker;1 为阴性对照;2 和 3 为 BBWV2。B:M 为 2 000 marker;1 和 2 为 GVA;3 和 4 为 TMV。BBWV2、GVA、TMV 见表1注。

图3 样品中病毒的 RT-PCR 检测结果

Fig.3 Detection of virus in samples by RT-PCR

中已收录的 BBWV2 LCP 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列有较高的一致性。

将获得的 BBWV2-Q11、BBWV2-Q14 LCP 核苷酸序列与 NCBI 中已发表的 23 个 BBWV2 LCP 核苷酸序列进行系统进化分析,以 ArMV 为外群,使用 MEGA 7.0 构建系统发育进化树。系统发育进化树(图 4)表明,BBWV2 LCP 核苷酸序列可分为两大支,以来自中国的 BBWV2-KY606993 和 BBWV2-AJ132844,韩国的 BBWV2-JX183222、BBWV2-KT380023、BBWV2-JX183224、BBWV2-JX183230、BBWV2-KC625509、BBWV2-KC625510、BBWV2-KC625516、BBWV2-KC625517、BBWV2-KC625515、BBWV2-KC625514、BBWV2-KC625512 和 BBWV2-KC625518 等为I 组,其他序列聚为II组。BBWV2-Q11、BBWV2-Q14 与 BBWV2-KY606993 亲缘关系较近。

2.4 遗传差异分析

不同寄主间 BBWV2 LCP 基因的遗传距离介于 0.049~0.332(表 6),其中,寄主为红辣椒(*Chilli*)和赤苞花(*Megaskepasma erythrochlamys*)的 BBWV2 LCP 遗传距离最高为 0.332,遗传差异显著;寄主为辣椒(*Capsicum annuum*)和菠菜(*Pisum sativum*)的 BBWV2 LCP 遗传距离最低为 0.049,遗传差异不显著。但由于本研究



采集到的样本数量较少,无法判断不同的寄主是否会 对鉴定到的 BBMV 遗传有影响,还需进一步研究。

表 4 BBWV2-Q11 与其他 BBWV2 分离物的 LCP 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列相似性

Table 4 Nucleotide sequence and amino acid sequence similarities between BBWV2-Q11 and other BBWV2 isolates

序号	NCBI 序列号	寄主	国家	相似度(%)	
				核苷酸序列	氨基酸序列
1	AJ132844	蚕豆( <i>Vicia faba</i> )	中国	90.8	92.5
2	JX183222	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.7	95.1
3	JX183224	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.4	93.3
4	JX183230	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.8	95.6
5	JX183234	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	79.9	81.4
6	KC625506	蚕豆( <i>Vicia faba</i> )	韩国	81.4	82.0
7	KC625507	蚕豆( <i>Vicia faba</i> )	韩国	93.1	94.2
8	KC625509	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.6	94.8
9	KC625510	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.4	94.8
10	KC625512	豌豆( <i>Pisum sativum</i> )	中国	92.1	93.6
11	KC625514	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	91.9	93.6
12	KC625515	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	中国	92.1	93.0
13	KC625516	菠菜( <i>Spinacia oleracea</i> )	中国	94.3	93.9
14	KC625517	菠菜( <i>Spinacia oleracea</i> )	韩国	94.5	94.2
15	KC625518	菠菜( <i>Spinacia oleracea</i> )	韩国	92.1	93.6
16	KF498697	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	中国	80.5	83.0
17	KJ825857	红辣椒( <i>Chilli</i> )	中国	84.9	89.5
18	KM076649	益母草( <i>Leonurus sibiricus</i> )	韩国	79.9	82.0
19	KT380023	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.5	94.5
20	KY606993	蚕豆( <i>Vicia faba</i> )	中国	95.1	95.9
21	MW192522	太子参( <i>Pseudostellaria heterophylla</i> )	中国	80.3	80.8
22	MW192526	太子参( <i>Pseudostellaria heterophylla</i> )	中国	80.0	80.8
23	NC003004	赤苞花( <i>Megaskepasma erythrochlamys</i> )	新加坡	80.1	80.5

表 5 BBWV2-Q14 与其他 BBWV2 分离物的 LCP 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列相似性

Table 5 Nucleotide sequence and amino acid sequence similarities between BBWV2-Q14 and other BBWV2 isolates

序号	NCBI 序列号	寄主	国家	相似性(%)	
				核苷酸序列	氨基酸序列
1	AJ132844	蚕豆( <i>Vicia faba</i> )	中国	90.8	94.2
2	JX183222	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.8	96.7
3	JX183224	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.5	95.0
4	JX183230	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.9	96.7
5	JX183234	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	80.2	83.9
6	KC625506	蚕豆( <i>Vicia faba</i> )	韩国	81.1	84.2
7	KC625507	蚕豆( <i>Vicia faba</i> )	韩国	93.2	95.6
8	KC625509	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.7	95.8
9	KC625510	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.5	95.8
10	KC625512	豌豆( <i>Pisum sativum</i> )	中国	92.1	95.0
11	KC625514	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	92.0	95.0

续表5 Continued5

序号	NCBI 序列号	寄主	国家	相似性 (%)	
				核苷酸序列	氨基酸序列
12	KC625515	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	中国	92.2	94.7
13	KC625516	菠菜( <i>Spinacia oleracea</i> )	中国	94.3	95.3
14	KC625517	菠菜( <i>Spinacia oleracea</i> )	韩国	94.5	95.5
15	KC625518	菠菜( <i>Spinacia oleracea</i> )	韩国	92.1	95.0
16	KF498697	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	中国	80.6	85.4
17	KJ825857	红辣椒( <i>Chilli</i> )	中国	85.0	90.6
18	KM076649	益母草( <i>Leonurus sibiricus</i> )	韩国	80.0	84.2
19	KT380023	辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	韩国	94.6	96.1
20	KY606993	蚕豆( <i>Vicia faba</i> )	中国	95.2	97.2
21	MW192522	太子参( <i>Pseudostellaria heterophylla</i> )	中国	80.3	83.6
22	MW192526	太子参( <i>Pseudostellaria heterophylla</i> )	中国	80.0	83.3
23	NC003004	赤苞花( <i>Megaskepasma erythrochlamys</i> )	新加坡	79.9	82.5

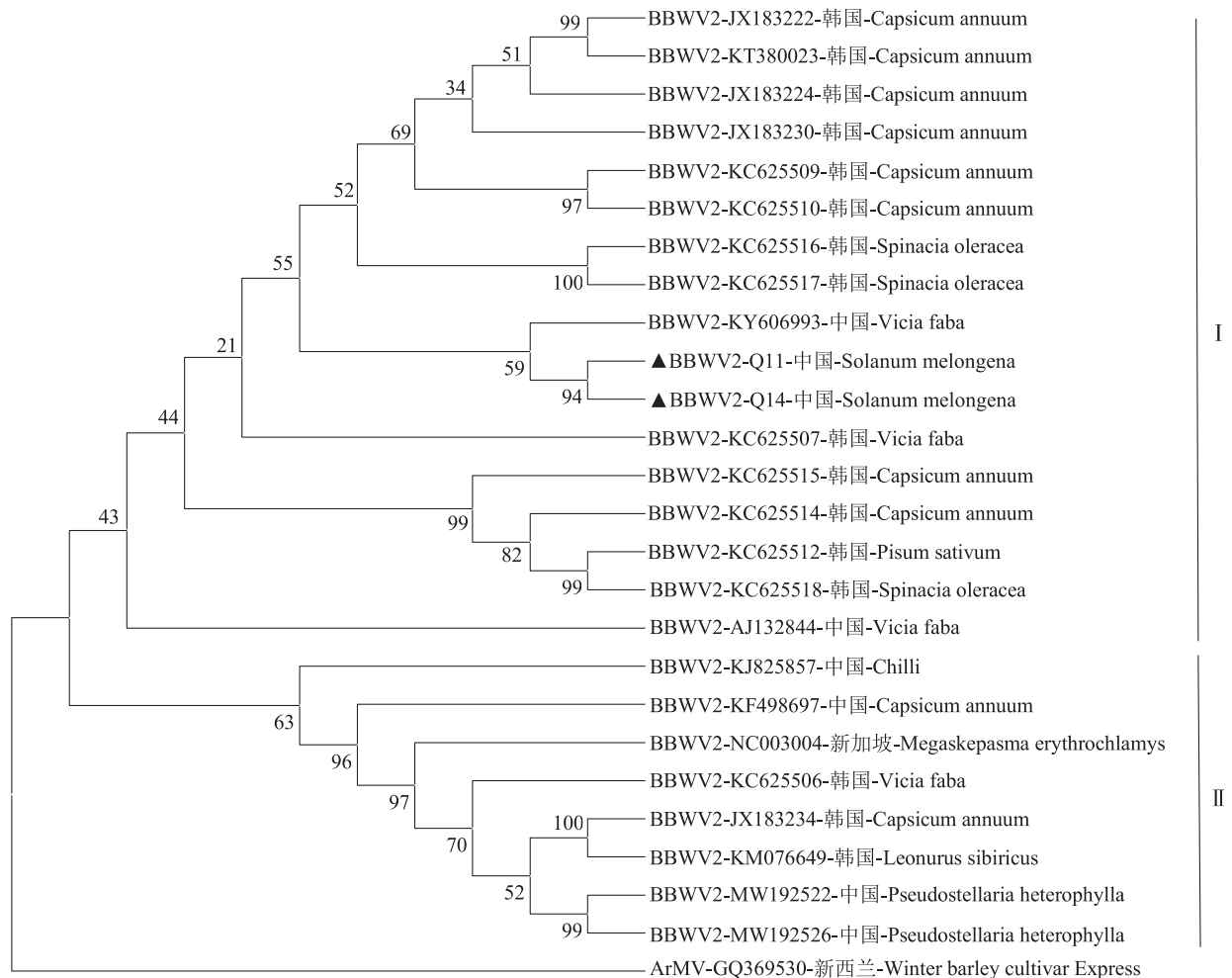


图4 BBWV2-Q11和BBWV2-Q14与NCBI已发表23个分离物LCP基因核苷酸序列的系统发育进化树

Fig.4 Phylogenetic trees of BBWV2-Q11 and BBWV2-Q14 LCP gene nucleotide sequences and 23 isolates published in NCBI database

表 6 不同寄主 BBWV2 病毒 LCP 基因间的遗传距离分析

Table 6 Genetic distance analysis of BBWV2 virus LCP gene between different hosts

组群	辣椒 ( <i>Capsicum</i> <i>annuum</i> )	豌豆 ( <i>Pisum</i> <i>sativum</i> )	菠菜 ( <i>Spinacia</i> <i>oleracea</i> )	红辣椒 ( <i>Chilli</i> )	益母草 ( <i>Leonurus</i> <i>sibiricus</i> )	蚕豆 ( <i>Vicia</i> <i>faba</i> )	太子参 ( <i>Pseudostellaria</i> <i>heterophylla</i> )	赤苞花 ( <i>Megaskepasma</i> <i>erythrochlamys</i> )	茄子 ( <i>Solanum</i> <i>melongena</i> )
辣椒 ( <i>Capsicum annuum</i> )		0.087	0.049	0.195	0.304	0.060	0.292	0.314	0.058
豌豆 ( <i>Pisum sativum</i> )			0.091	0.192	0.294	0.086	0.278	0.307	0.090
菠菜 ( <i>Spinacia oleracea</i> )				0.201	0.324	0.057	0.310	0.316	0.063
红辣椒 ( <i>Chilli</i> )					0.294	0.200	0.291	0.332	0.197
益母草 ( <i>Leonurus sibiricus</i> )						0.301	0.082	0.104	0.306
蚕豆 ( <i>Vicia faba</i> )							0.296	0.306	0.054
太子参 ( <i>Pseudostellaria heterophylla</i> )								0.106	0.305
赤苞花 ( <i>Megaskepasma erythrochlamys</i> )									0.308
茄子 ( <i>Solanum melongena</i> )									

不同寄主间 BBWV2 LCP 基因的遗传差异 ( $F_{st}$ ) 介于  $-0.019 \sim 0.920$  (表 7), 其中, 寄主辣椒 (*C. annuum*) 和蚕豆 (*Vicia faba*) BBWV2 LCP 基因的遗传差异 ( $F_{st}$ ) 最低为  $-0.019$ , 其数值介于  $0 \leq |F_{st}| \leq 0.33$ , 表明这两个寄主 BBMV2 病毒之间存在频繁的基因交流; 寄主茄子 (*S. melongena*) 和太子参 (*Pseudostellaria heterophylla*) BBWV2 LCP 基因的遗传差异 ( $F_{st}$ ) 最高为  $0.920$ , 其数值介于  $0.33 \leq |F_{st}| \leq 1$ , 表明这两个寄主 BBMV2 病毒基因交流的频率很低。

不同寄主 BBWV2 LCP 基因之间基因流 ( $N_m$ ) 介于  $0.02 \sim 13.41$ , 其中, 寄主茄子 (*S. melongena*) 和太子参 (*P. heterophylla*) BBMV2 病毒的基因流 ( $N_m$ ) 最低为  $0.02$ , 其数值  $N_m < 1$ , 表明这 2 个寄主 BBMV2 病毒之间很容易发生遗传漂变; 寄主辣椒 (*C. annuum*) 和蚕豆 (*V. faba*) BBMV2 病毒的基因流 ( $N_m$ ) 最高为  $13.41$ , 其数值  $N_m > 1$ , 表明这两个寄主 BBMV2 病毒之间存在可以基因交流的通道。

表 7 不同寄主 BBWV2 病毒 LCP 基因间的遗传差异和基因流

Table 7 Gene flow and genetic differentiation of BBWV2 virus LCP gene between different hosts

寄主	统计量 ( $K_s$ )	基因分化系数 ( $G_{st}$ )	遗传差异 ( $F_{st}$ )	基因流 ( $N_m$ )
辣椒 ( <i>Capsicum annuum</i> ) 与菠菜 ( <i>Spinacia oleracea</i> )	96.453	0.003	0.100	2.25
辣椒 ( <i>Capsicum annuum</i> ) 与蚕豆 ( <i>Vicia faba</i> )	117.587	0.016	-0.019	13.41
辣椒 ( <i>Capsicum annuum</i> ) 与茄子 ( <i>Solanum melongena</i> )	90.241	0.189	0.412	0.36
辣椒 ( <i>Capsicum annuum</i> ) 与太子参 ( <i>Pseudostellaria heterophylla</i> )	95.740	0.063	0.609	0.16
菠菜 ( <i>Spinacia oleracea</i> ) 与蚕豆 ( <i>Vicia faba</i> )	104.905	0.003	0.071	3.27
菠菜 ( <i>Spinacia oleracea</i> ) 与茄子 ( <i>Solanum melongena</i> )	34.200	0.290	0.575	0.19
菠菜 ( <i>Spinacia oleracea</i> ) 与太子参 ( <i>Pseudostellaria heterophylla</i> )	47.400	0.008	0.774	0.73
蚕豆 ( <i>Vicia faba</i> ) 与茄子 ( <i>Solanum melongena</i> )	93.889	0.262	0.315	0.54
蚕豆 ( <i>Vicia faba</i> ) 与太子参 ( <i>Pseudostellaria heterophylla</i> )	104.889	0.020	0.484	0.27
茄子 ( <i>Solanum melongena</i> ) 与太子参 ( <i>Pseudostellaria heterophylla</i> )	16.500	0.333	0.920	0.02

### 3 讨论

为明确引起茄子斑驳和皱缩的病毒种类,本研究对表现出斑驳和皱缩的茄子样品进行 siRNA 高通量测序和 RT-PCR 检测,检测结果表明表现出斑驳和皱缩的茄子样品中含有 BBWV2 和 TMV,采用 2 种方法联合鉴定病毒种类显著提高了筛查的效率和准确度。这与柴阿丽等<sup>[19]</sup>通过 siRNA 进行高通量测序和 RT-PCR 技术鉴定出侵染茄子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)和陈雅寒等<sup>[27]</sup>利用 siRNA 高通量测序技术和 RT-PCR 技术鉴定出侵染杏的亚洲李属病毒 1(Asian prunus virus 1, APV 1)和亚洲李属病毒 3(Asian prunus virus 3, APV 3)的研究方法相似。虽然 siRNA 高通量测序在茄子样品中检测出 GVA,但是 RT-PCR 未检测到 GVA 的存在,原因可能是 siRNA 高通量测序过程中添加多个核苷酸时,插入和删除等测序错误造成的假阳性<sup>[28]</sup>。

本研究检测出 BBWV2 和 TMV,说明甘肃省临洮县茄子斑驳皱缩症状是由多种病毒复合侵染造成的,原因可能是由于传毒介体与病毒之间互作所致,也有可能是由于寄主感染其中一种病毒后,失去抵御另外一种病毒的能力<sup>[29]</sup>。

为明确 BBWV2 LCP 基因序列的遗传多样性和分子进化关系,将获得的 BBWV2-Q11、BBWV2-Q14 和 23 个寄主来源不同的 BBWV2 分离物 LCP 基因核苷酸序列进行一致性分析,核苷酸序列及其编码的氨基酸序列一致性分别为 79.9%~95.2% 和 80.5%~97.2%。这表明,虽然 BBWV2 的 LCP 基因有很高的保守性,但仍具一定程度的分子变异<sup>[29]</sup>。以 ArMV 为外群,构建系统发育进化树,并对不同寄主 BBWV2 分离物进行遗传距离和遗传差异分析,结果显示本研究寄主茄子(*S. melongena*)和太子参(*P. heterophylla*)BBWV2 LCP 基因之间遗传交流的频率很低,这与系统发育树中聚类结果显示一致,说明 BBWV2 的分离物之间有一定的寄主差异。

### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1993: 16.
- [2] 崔彦玲. 无公害茄子标准化生产[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 1.
- [3] EDWARDSON J R, CHRISTIE R G. CRC handbook of viruses infection legumes BocaRaton [M]. America: CRC Press, 1991: 263-274.
- [4] 周颖, 张瑞, 郭颂, 等. 北京地区地黄花叶病原的分子鉴定[J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 447-452.
- [5] 匡云波, 陈满足, 陆伊荣, 等. 太子参芜菁花叶病毒和蚕豆萎蔫病毒的双重 PT-PCR 检测[J]. 园艺学报, 2017, 44(4): 784-791.
- [6] 寇丽莎, 赵慧琪, 王德富, 等. 药用植物柴胡病毒病原物的分子鉴定[J]. 病毒学报, 2017, 33(4): 610-616.
- [7] WANG J, LI S, FANG Y, et al. Enhanced and sustainable control of Myzus persicae by repellent plants in organic pepper and eggplant greenhouses. [J]. Pest Management Science, 2021, 78(2): 428-437.
- [8] 严丹侃, 郑红英, 张海珊, 等. 蚕豆萎蔫病毒 2 号安徽分离物全基因组序列测定与分析[J]. 植物保护, 2018, 44(1): 67-73.
- [9] RUI P H, JIANG L, LI S, et al. First report of broad bean wilt virus 2 infection in eggplant in China[J]. Journal of Plant Pathology, 2019, 102(1): 1.
- [10] KING A M, ADAMS M J, LEFKOWITZ E J. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [R]. Amsterdam: Elsevier, 2011: 889-890.
- [11] THOMPSON J R, DASGUPTA I, FUCHS M, et al. ICTV virus taxonomy profile: secoviridae [J]. Journal of General Virology, 2017, 98(4): 529-531.
- [12] 李梁, 杨彩霞, 侯秋实, 等. 蚕豆萎蔫病毒 2 号辽宁黎分离物的鉴定[J]. 沈阳农业大学学报, 2020, 51(4): 446-453.
- [13] 王浩军, 王芳, 姚忠达, 等. 利用 siRNA 高通量测序技术检测烟草病毒[J]. 中国烟草学报, 2015, 21(3): 107-110.
- [14] SONG G, WU J Y, XIE Y, et al. Monoclonal antibody-based serological assays for detection of potato virus S in potato plants[J]. Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology), 2017, 18(12): 1075-1082.
- [15] XU Y, XU Y F, LIU Y F. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification for detection of maize chlorotic mottle virus [J]. Agricultural Science & Technology, 2017, 18(1): 123-126.
- [16] 牛颜冰, 时晓丽, 张西梅, 等. 侵染白术的蚕豆萎蔫病毒 2 号的分子检测与序列分析[J]. 病毒学报, 2015, 31(1): 58-64.
- [17] 丛倩倩, 兰玉菲, 崔晓, 等. 利用 siRNA 高通量测序技术检测平菇病毒[J]. 中国食用菌, 2018, 37(1): 61-64.
- [18] 王宝霞, 齐永红, 辛敏, 等. 蚕豆萎蔫病毒 2 号板蓝根分离株全基因组序列测定与分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(3): 333-340.
- [19] 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.
- [20] WANG L P. Tube-Capture (TC) RT-PCR and multiplex RT-PCR for diagnosis and characterization of viruses in fruit trees [J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2022, 2400: 263-



- 274.
- [21] 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.
- [22] MUHIRE B M, VARSANI A, MARTIN D P. SDT; a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108277.
- [23] WEI T Y, YANG J G, LIAO F R, et al. Genetic diversity and population structure of rice stripe virus in China[J]. The Journal of General Virology, 2009, 90(4): 1025-1034.
- [24] NGUYEN H D, TRAN H T N, OHSHIMA K. Genetic variation of the turnip mosaic virus population of Vietnam: a case study of-founder, regional and local influences[J], Virus Research, 2013, 171(1): 138-149.
- [25] 贺 振,李文凤,李世访. 云南蔗区甘蔗线条花叶病毒分离物 *NIa* 基因形成新簇[J]. 微生物学报, 2016, 56(11): 1802-1810.
- [26] 甘海锋,陈 雯,陈夕军,等. 水仙黄条病毒和水仙退化病毒的种群结构及遗传多样性特征[J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 187-196.
- [27] 陈雅寒,马 强,孙平平,等. 杏衰退萎黄病病毒的 siRNA 高通量测序和 RT-PCR 鉴定[J]. 园艺学报, 2020, 47(4): 725-733.
- [28] KREUZE J F, PEREZ A, UNTIVEROS M, et al. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs; a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses[J]. Virology, 2009, 388:1-7.
- [29] 马晓春,李建设,高艳明,等. 宁夏地区不同品系番茄主要病毒病种类鉴定及复合侵染研究[J]. 西南农业学报, 2022, 35(11):2536-2543.

(责任编辑:成纾寒)