甘肃省制种基地茄科作物种子中番茄褐色皱果病毒的检测

Detection of tomato brown rugose fruit virus in solanaceous seeds from seed-production bases in Gansu Province

陈永攀[1] 张子夏[1] 孟思侗[1] 刘伊然[1] 封林林[2] 于 翠[2] 闫 哲[1] 尚巧霞[1*]

（1. 北京农学院生物与资源环境学院，农业农村部华北都市农业重点实验室，北京 102206；
2. 北京瀚林丰益农业科技有限公司，北京 102200）

Chen Yongpan[1] Zhang Zixia[1] Meng Sitong[1] Liu Yiran[1] Feng Linlin[2] Yu Cui[2] Yan Zhe[1] Shang Qiaoxia[1*]

（1. Key Laboratory of Urban Agriculture (North China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs; College of Bioscience and Resource Environment, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;
2. Beijing Hanlin Fengyi Agricultural Technology Co., Ltd., Beijing 102200, China）

番茄褐色皱果病毒(tomato brown rugose fruit virus，ToBRFV)是烟草花叶病毒属 *Tobamovirus* 的新发病毒，严重为害番茄和辣椒，可致70%~100%的产量损失(韦建明等，2024)。带毒种子是其远距离扩散并造成产区疫情暴发的主要原因(刘美等，2022)。大批量种子检测仍是海关检疫和种子企业质量控制的难题。为明确国内商业种子生产端ToBRFV阳性率及发生风险的系统数据，本研究于2023—2025年自甘肃省制种基地采集729份茄科作物种子样品，筛选特异性强、稳定性高的种子ToBRFV检测引物，采用反转录PCR技术对种子样品进行系统性检测，以期为制定更精准的种子检疫标准及ToBRFV病防控策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品：2023—2025年从甘肃省张掖市甘州区制种基地共收集729份茄科作物种子，涵盖番茄、辣椒及茄子3种作物。2023年共采集334份样品，其中番茄种子230份、辣椒种子88份、茄子种子16份；2024年共采262份样品，其中番茄种子159份、辣椒种子103份；2025年共采集133份样品，全部为番茄种子。

试剂和仪器：EASYspin植物RNA提取试剂盒、2×*Taq* PCR Master Mix、多功能DNA纯化回收试剂盒，北京博迈德基因技术有限公司；PrimeScript II反转录试剂盒，日本TaKaRa公司；其他试剂均为国产分析纯。NanoDrop 2000超微量核酸蛋白测定仪，美国赛默飞世尔科技公司；S1000 Thermal Cycler PCR仪、Gel Doc EZ Imager凝胶成像系统，美国Bio-Rad公司；Mupid-exU凝胶电泳仪，日本TaKaRa公司。

1.2 方法

ToBRV检测引物的筛选：参考国内外文献报道的ToBRFV检测引物序列，设计ToBRFV-5506-F/ToBRFV-6186-R(李献锋等，2022)、ToBRFV-733-F/ToBRFV-1293-R (Alkowni et al.，2019)、ToBRFV-5503-F/ToBRFV-6344-R(Ling et al.，2019)、ToBRFV-5722-F/ToBRFV-6179-R (Panno et al.，2019)、ToBRFV-5557-F/ToBRFV-6167-R(Klap et al.，2020) 5对特异性引物，引物均委托北京擎科生物科技股份有限公司合成。使用上述引物对本实验室保存的ToBRFV阳性种子的cDNA样品进行反转录PCR扩增。25 μL PCR反应体系：2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL、上下游引物各1.0 μL、cDNA模板1.0 μL，ddH_2O补足至25 μL。反应程序：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，于各引物对最适退火温度退火30 s，72 ℃延伸45 s，共35个循环；72 ℃终延伸10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，回收目的片段DNA，送至北京擎科生物科技股份有限公司进行Sanger测序。将获得的测序结果在GenBank数据库中进行BLAST比对。

种子中ToBRV的反转录PCR检测及测序：每份样品随机选取30粒种子，参照EASYspin植物RNA

基金项目：北京市昌平区“科技副总”专项课题(202305005024)

* 通信作者 (Author for correspondence)，E-mail：shangqiaoxia@bua.edu.cn；收稿日期：2026-01-30

提取试剂盒说明书提取种子的总RNA，使用超微量核酸蛋白测定仪测定提取产物的浓度。每个样品取1 μg总RNA，按照反转录试剂盒说明书反转录合成cDNA。以ToBRFV-F-5506/ToBRFV-R-6186为引物，以合成的cDNA为模板进行PCR反应。25 μL PCR反应体系及程序同1.2.1。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，并使用凝胶成像系统观察并拍照，确定阳性样品，并计算病毒检出率。

2 结果与分析

2.1 ToBRV检测引物的筛选

引物ToBRFV-F-5506/ToBRFV-R-6186的扩增效果最佳，特异性强且在预期片段680 bp左右出现清晰条带。BLAST比对分析结果显示，该片段与GenBank中收录的ToBRFV分离物Y2020-3（登录号为MZ004925.1）基因组的第5 506~6 186位的核苷酸序列具有同源性，相似度高达98.77%。表明该引物对能特异性扩增ToBRFV的目的片段，可用于后续大规模种子筛选。

2.2 种子中ToBRFV的反转录PCR检测

经反转录PCR检测，729份茄科作物种子样品共检出阳性样品299份，阳性率为41.01%。2023年10月20日自辣椒种子中检出第1例阳性样品，全年辣椒、番茄和茄子种子检出率分别为30.68%、9.13%和6.25%。2024年，番茄和辣椒种子检出率大幅上升，番茄种子检出率56.60%，已略高于同期辣椒种子的检出率49.51%。至2025年，番茄种子检出率进一步攀升至81.95%（表1）。表明在ToBRFV侵染初期，病毒首先感染辣椒且其阳性率在短期内迅速攀升，随后进一步蔓延至番茄，并导致番茄中ToBRFV的检出率持续增加。

表1 2023—2025年729份茄科种子样品的ToBRFV检测结果

Table 1 Detection results of ToBRFV in 729 solanaceae seed samples from 2023 to 2025

采集时间 Collection time	种子类别 Seed species	样品数 No. of samples	阳性样品数 No. of positive samples	检出率 Detection rate/%
2023	番茄 Tomato	230	21	9.13
	辣椒 Pepper	88	27	30.68
	茄子 Eggplant	16	1	6.25
2024	番茄 Tomato	159	90	56.60
	辣椒 Pepper	103	51	49.51
2025	番茄 Tomato	133	109	81.95
总计 Total		729	299	41.02

3 讨论

本研究通过检测发现ToBRFV传入制种基地后呈爆发式增长，这种爆发式增长趋势与Yan et al.（2019）关于ToBRFV在中国部分产区快速扩散的报道一致。本研究发现辣椒种子在ToBRFV传入初期起到了重要作用，不仅首例ToBRFV阳性样品自于辣椒种子，且发生初期辣椒种子的检出率（30.68%）显著高于番茄（9.13%），易成为被忽视的隐蔽传染源。因此，在ToBRFV检测检疫过程中，应加强对辣椒种子的检测，防止因忽视次要寄主而造成防疫漏洞。

参 考 文 献（References）

Alkowni R, Alabdallah O, Fadda Z, 2019. Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine[J]. Journal of Plant Pathology, 101(3): 719−723

Klap C, Luria N, Smith E, Hadad L, Bakelman E, Sela N, Belausov E, Lachman O, Leibman D, Dombrovsky A, 2020. Tomato brown rugose fruit virus contributes to enhanced pepino mosaic virus titers in tomato plants[J]. Viruses, 12(8): 879

Li XF, Liu MH, Wei S, Ding T, Wu MT, Feng LX, 2022. Development and evaluation of a RT-PCR assay for detection tomato brown rugose fruit virus[J]. Chinese Journal of Virology, 38(4): 905−914 (in Chinese) [李献锋, 刘明航, 魏霜, 丁钿, 武目涛, 冯黎霞, 2022. 番茄褐色皱果病毒RT-PCR检测方法的建立与评价[J]. 病毒学报, 38(4): 905−914]

Ling KS, Tian T, Gurung S, Salati R, Gilliard A, 2019. First report of tomato brown rugose fruit virus infecting greenhouse tomato in the United States[J]. Plant Disease, 103(6): 1439

Liu M, Wang YH, Peng B, Wu HJ, Han YG, Gu QS, 2022. Detection of cucumber green mottle mosaic virus by using real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Journal of Plant Protection, 49(4): 1063−1070 (in Chinese) [刘美, 王毓洪, 彭斌, 吴会杰, 韩亚阁, 古勤生, 2022. 黄瓜绿斑驳花叶病毒实时荧光定量PCR检测体系的建立[J]. 植物保护学报, 49(4): 1063−1070]

Panno S, Caruso AG, Davino S, 2019. First report of tomato brown rugose fruit virus on tomato crops in Italy[J]. Plant Disease, 103(6): 1443

Wei JM, Huang X, Li YZ, Liang Y, 2024. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) research progress[J]. Acta Horticulturae Sinica, 51(2): 439−452 (in Chinese) [韦建明, 黄鑫, 李云洲, 梁燕, 2024. 番茄褐色皱纹果病毒(ToBRFV)研究进展[J]. 园艺学报, 51(2): 439−452]

Yan ZY, Ma HY, Han SL, Geng C, Tian YP, Li XD, 2019. First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in China[J]. Plant Disease, 103(11): 2973

（责任编辑：张俊芳）