番茄褐色皱果病毒蒙自分离物的全基因组序列分析及侵染性克隆构建

杨 洁[1] 曹喜舟[1] 杨桂香[1] 杨薏卉[1] 陈 鹏[1] 谭冠林[2]
兰平秀[1] 李 凡[1*]

（1. 云南农业大学植物保护学院，昆明 650201；2. 云南农业大学现代教育技术中心，昆明 650201）

摘要：为解析云南省蒙自市番茄褐色皱果病毒（tomato brown rugose fruit virus，ToBRFV）番茄分离物的基因组特征及系统进化关系，并建立其反向遗传学体系，通过反转录聚合酶链式反应（reverse transcription polymerase chain reaction，RT-PCR）扩增获得ToBRFV蒙自分离物ToBRFV-MZ的全基因组序列，分析其序列特征及系统发育关系，利用酵母*Saccharomyces cerevisiae*同源重组技术构建其全长cDNA克隆，并通过农杆菌*Agrobacterium*介导的浸润法在本氏烟、番茄和辣椒中验证其侵染性。结果表明：ToBRFV-MZ分离物基因组全长为6 396 nt（GenBank登录号为PV832075），编码4个功能蛋白。全基因组核苷酸序列一致性分析显示，该分离物与其他已报道ToBRFV分离物的一致性均高于99%，其中与中国Yinchuan分离物（GenBank登录号为OR500698）的一致性最高，为99.73%。系统发育分析显示，ToBRFV-MZ分离物与中国Yinchuan分离物和JS-2022分离物（GenBank登录号为OR593752）的亲缘关系最近，聚为同一亚支。侵染性测试结果显示，所构建的pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA克隆能够系统侵染本氏烟，诱导叶片产生黄化、皱缩、向外卷曲和萎蔫等典型症状；电镜观察结果表明，该克隆产生的病毒粒体在形态和大小上均与野生型ToBRFV-MZ一致。该侵染性克隆在番茄上引起叶片卷曲、褪绿和畸形症状，在辣椒上引起系统叶坏死且植株矮缩，致病力与野生型ToBRFV-MZ相当，且系统叶中病毒RNA和外壳蛋白积累水平无显著差异。本研究获得了ToBRFV-MZ分离物的全基因组序列，构建的pCB301-2μ-ToBRFV-MZ全长cDNA克隆对寄主植物具有系统侵染能力。

关键词：番茄褐色皱果病毒；基因组结构；系统进化分析；侵染性克隆；致病性

Genome sequence analysis and infectious clone construction of the ToBRFV-MZ isolate

Yang Jie[1] Cao Xizhou[1] Yang Guixiang[1] Yang Yihui[1] Chen Peng[1] Tan Guanlin[2]
Lan Pingxiu[1] Li Fan[1*]

（1. School of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan Province, China;
2. Modern Educational Technology Center, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan Province, China）

Abstract: This study aimed to clarify the genomic features and phylogenetic relationships of a tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) isolate responsible for field outbreaks in Mengzi City, Yunnan Province, and to establish its reverse genetics system. The complete genome sequence of the ToBRFV-MZ isolate was obtained via reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), followed by sys-

基金项目：国家重点研发计划项目（2022YFD1400700，2022YFD1401200）
* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：fanli@ynau.edu.cn
收稿日期：2025-12-08

tematic analysis of its sequence characteristics and phylogenetic affinity . Furthermore, a full-length cDNA clone of ToBRFV-MZ was constructed through homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Its infectivity was tested in *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum*, and *Capsicum annuum* with *Agrobacterium*-mediated infiltration. The results showed that the complete genome of ToBRFV-MZ was 6 396 nt in length (GenBank accession no. PV832075), encoding four functional proteins. Whole-genome nucleotide sequence alignment revealed that ToBRFV-MZ shared over 99% identity with other reported ToBRFV isolates, with the highest identity of 99.73% to the Yinchuan isolate from China (GenBank accession no. OR500698). Phylogenetic analysis further demonstrated that ToBRFV-MZ was most closely related to the Yinchuan and the JS-2022 isolate (GenBank accession no. OR593752), and these isolates clustered in the same subclade. Infectivity assays indicated that the pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA clone systemically infected *N. benthamiana*, inducing typical symptoms such as yellowing, leaf crinkling, outward curling, and wilting. Transmission electron microscopy showed that the virions produced by this clone were similar in morphology and size to those of wild-type ToBRFV-MZ. The ToBRFV-MZ infectious clone induced leaf curling, chlorosis, and deformation symptoms in tomato plants, and it caused leaf necrosis along with plant stunting in pepper plants. Its pathogenicity was comparable to that of the wild-type ToBRFV-MZ, with no significant differences in viral RNA and coat protein accumulation in systemically infected leaves. In conclusion, this study acquired the complete genome sequence of the ToBRFV-MZ isolate, and the constructed full-length cDNA clone pCB301-2μ-ToBRFV-MZ could establish systemic infection in host plants.

Key words: tomato brown rugose fruit virus; genome structure; phylogenetic analysis; infectious clone; pathogenicity

番茄褐色皱果病毒(tomato brown rugose fruit virus,ToBRFV)属于杆状病毒科烟草花叶病毒属*Tobamovirus*,其基因组结构与其他烟草花叶病毒属病毒相似。ToBRFV病毒粒体呈杆状,大小约为长300 nm×宽18 nm;基因组为一条正义单链RNA,长约6 400 bp(Zhang et al.,2022),含4个开放阅读框(open reading frame,ORF),其中ORF1编码126 kD复制相关蛋白,具有甲基转移酶和解旋酶结构域;ORF2通过ORF1通读翻译,编码183 kD的RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase,RdRp);ORF3和ORF4分别编码30 kD的移动蛋白(movement protein,MP)和17.5 kD的外壳蛋白(coat protein,CP)(Ishibashi & Ishikawa,2016)。ToBRFV于2014年首次在以色列番茄上被发现(Luria et al.,2017),随后迅速扩散,目前已传播至欧洲、美洲、亚洲和非洲的40余个国家的番茄和辣椒主产区(Salem et al.,2020;Yan et al.,2021;石钰杰等,2022),并被欧洲和地中海植物保护组织(European and Mediterranean Plant Protection Organization,EPPO)列入警戒名单。自2019年首次在我国山东省番茄上发现ToBRFV后,全国多个省份的番茄生产区相继发现该病毒,对我国番茄生产已造成严重威胁(闫志勇等,2020;Caruso et al.,2022;马菲等,2022)。ToBRFV主要侵染番茄和辣椒,可引起番茄叶片花叶、皱缩,果实褐色斑块和着色不均等症状(Caruso et al.,2022),也可导致辣椒植株矮化、叶片斑驳和果实畸形(Salem et al.,2020;张宇等,2022)。其暴发流行与病毒稳定性强、传播途径多样密切相关。尤为重要的是,ToBRFV可突破番茄*Tm-2*^{2}和辣椒*L*基因介导的抗性(Jewehan et al.,2022;Salem et al.,2023),目前尚缺乏对ToBRFV具有稳定抗性的商业化栽培品种。

针对ToBRFV传播迅速、寄主范围扩大且缺乏稳定抗性栽培品种等问题,开展ToBRFV遗传变异、致病机制的研究及抗病资源的评价尤为重要。植物病毒全基因组序列分析可系统揭示病毒的基因组结构、遗传变异和系统发育关系,是病毒分离物鉴定、传播溯源、致病相关位点分析及抗性突破机制研究的重要基础。近年来,黄瓜绿斑驳花叶病毒(cucumber green mottle mosaic virus,CGMMV)(肖彩利等,2016)和ToBRFV等烟草花叶病毒属病毒不同分离物的全基因组序列陆续被解析(范真真等,2025;Rothman & Whiteson,2022),并用于遗传多样性比较、系统发育分析及寄主范围研究。植物病毒全长

cDNA侵染性克隆是反向遗传学研究的重要工具，已广泛应用于病毒复制、运动、致病性、寄主适应性及病毒-寄主互作机制研究。番茄花叶病毒（tomato mosaic virus，ToMV）（Kuroiwa et al.，2022）和CGMMV（Shi et al.，2023）等烟草花叶病毒属病毒的侵染性克隆已被成功构建，为相关病毒基因功能解析和抗性突破机制研究提供了重要材料。除基础功能研究外，马铃薯X病毒（potato virus X，PVX）（Jung et al.，2025）、烟草脆裂病毒（tobacco rattle virus，TRV）（李文辰等，2023）和大麦条纹花叶病毒（barley stripe mosaic virus，BSMV）（Qiao et al.，2025）等病毒侵染性克隆还被开发为病毒表达载体或病毒诱导基因沉默载体，用于外源蛋白表达和植物基因功能鉴定。然而，目前我国不同地理来源ToBRFV分离物的全基因组信息和侵染性克隆资源仍相对有限，限制了其遗传变异分析、致病力差异评价及抗病种质筛选等相关研究的深入开展。

本研究以云南省蒙自市疑似感染ToBRFV的番茄为对象，进行ToBRFV的检测，测定其全基因组序列并进行系统发育分析，利用酵母*Saccharomyces cerevisiae*同源重组技术构建ToBRFV分离物全长cDNA侵染性克隆，并进一步评价该克隆的侵染性及对番茄和辣椒的致病能力，以期为解析ToBRFV遗传特性、开展病毒基因功能和致病机制研究，以及建立番茄和辣椒抗ToBRFV种质资源评价体系提供基础材料和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株、质粒、病毒与植物材料：2023年6月在云南省红河州蒙自市番茄大棚中从1株番茄上采集疑似感染ToBRFV的果实5个，并采集邻株健康番茄果实1个作为健康对照，于−80 ℃下保存。本氏烟*Nicotiana benthamiana*由云南生物资源保护与利用国家重点实验室保存并提供。番茄品种为毛粉，辣椒品种为甜椒，均购自山东省寿光市知秋农业公司。本氏烟、番茄和辣椒种子催芽至2片子叶期进行移栽，培养至4~5片真叶时用于接种试验，培养条件为温度（24±2）℃、相对湿度50%~60%，光周期16 L∶8 D。酵母穿梭载体pCB301-2μ-HDV和酵母菌株Y2H由浙江大学李正和教授惠赠；农杆菌*Agrobacterium*感受态细胞GV3101和大肠杆菌*Escherichia coli* DH5*α*感受态细胞购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

培养基、试剂与仪器：LB（Luria-Bertani）液体培养基、2×*Taq* Master Mix、HyperMB快速逆转录试剂盒、2×Universal SYBR qPCR Master Mix预混液、PCR产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒，生工生物工程（上海）股份有限公司；植物总RNA提取试剂Trizol和5′ RACE试剂盒，湖南艾科瑞生物工程有限公司；反转录酶Reverse Transcriptase M-MLV（RNase H^-）、病毒基因组3′末端加Ploy（A）Polymerase试剂盒、pMD19-T克隆载体、T4 DNA连接酶和高保真酶2×PrimeSTAR Max Premix，北京宝日医生物技术（北京）有限公司；鲑鱼精DNA、吗啉乙磺酸（2-（N-morpholino）ethanesulfonic acid，MES）、乙酰丁香酮（acetosyringone，AS）、单缺色氨酸的酵母培养基和酵母质粒提取试剂盒，北京酷来搏科技有限公司；蛋白提取裂解液、2×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）蛋白上样缓冲液，上海碧云天生物技术有限公司；FuturePAGE™ HP蛋白预制胶和化学发光试剂盒ECL Enhanced，常州伯仪生物科技有限公司；HRP标记的二抗Goat anti-Rabbit IgG（H+L），赛默飞世尔科技；ToBRFV CP兔源多克隆一抗委托湖北普罗金科技有限公司制备；其他试剂均为国产分析纯。DYY-III2电泳仪，北京市六一仪器厂；CLINX凝胶成像仪，上海勤翔科学仪器有限公司；LightCycler 480荧光定量PCR仪，美国罗氏Roche公司；T100™ PCR仪、ChemiDoc成像系统、Mini Trans-Blot蛋白电泳及转印系统，美国Bio-Rad公司；FEI Tecnai G2 Spirit Twin透射电子显微镜，美国FEI公司。

1.2 方法

1.2.1 番茄样品RNA提取、cDNA合成、PCR扩增

按照植物总RNA提取试剂Trizol操作说明书提取1个感病番茄果实的总RNA，同时提取健康番茄果实的RNA作为阴性对照，保存于−80℃。利用Reverse Transcriptase M-MLV（RNase H^-）试剂盒反转录合成cDNA，以cDNA为模板，利用引物ToBRFV-dF/ToBRFV-dR（表1）检测该番茄样品是否感染ToBRFV。基于GenBank中登录号OM892688、OQ674194、OM892687和OM892690所对应的ToBRFV序列保守区设计ToBRFV检测引物，试验中所用的引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。10 μL PCR扩增体系：2×*Taq* Master Mix 5 μL、cDNA模板1 μL、上下游引物各0.4 μL，ddH_2O补足至10 μL。PCR扩增程序：94 ℃预变性2 min；

94 ℃变性30 s,退火30 s(退火温度根据引物T_m值设置),72 ℃延伸1 min,共35个循环;72 ℃终延伸10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶于150 V电压下电泳25 min,观察目标条带大小,将目标的扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。将测序获得的序列提交至NCBI数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)并进行BLASTn比对分析。

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence (5′-3′)	退火温度 T_m/℃	用途 Purpose
ToBRFV-dF	ACATGTCATGTGTACATCGTCG	57	ToBRFV检测 Detection of ToBRFV
ToBRFV-dR	TCCAATAGTCCAGTCTGGCG		
ToBRFV-F1	GGTATTTTTTACAACAACATATAC	47	扩增ToBRFV-MZ片段1 Amplification of ToBRFV-MZ fragment 1
ToBRFV-R1	ATCTGTTTCCGAATTAACG		
ToBRFV-F2	TAGTTCGTTAATTCGGAAACAGATG	60	扩增ToBRFV-MZ片段2 Amplification of ToBRFV-MZ fragment 2
ToBRFV-R2	TGAGCTCACTGAACAAAGGAC		
ToBRFV-F3	ACGCAATCTTCGGTCCTTTGTTCAGTG	65	扩增ToBRFV-MZ片段3 Amplification of ToBRFV-MZ fragment 3
ToBRFV-R3	GGGCCCCTACCGGGGGTTCC		
pCB301-tF	*ACCCCCGGTAGGGGCCC*GGGTCGGCATGGCATCTCCA	60	扩增载体pCB301-2μ-HDV Amplification of the pCB301-2μ-HDV vector
pCB301-tR	*GTTGTAAAAAATACC*GCCTCTCCAAATGAAATGAA		
pCB301-HDVR	GAGCTCTCCCTTAGCCATC	55	筛选阳性克隆 Screening of positive clones
ToBRFV-R178	TGTGTCATAAAGACGCCGCTTCGCAAG	64	扩增ToBRFV基因组5′末端 Amplification of the 5′ end of the ToBRFV genome
Vial8	CGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTT-TTTTV(V=A, C or G)	55	
ToBRFV-F5666	TGAATTGGAGACTCACATCGCCGGACCA	59	扩增ToBRFV基因组3′末端 Amplification of the 3′ end of the ToBRFV genome
Vial9	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	55	
ToBRFV-qF	AGTCACTGTTAGGTTTCCTGAC	55	ToBRFV检测 Detection of ToBRFV
ToBRFV-qR	TCATCTACTCTACGAGTAGCG		
Caactin-qF	CAGGACATGATAAACGAGGTGG	55	辣椒内参基因检测 Detection of the pepper internal reference gene
Caactin-qR	GAGATGAAGCCATTTTGATCCTT		
SlActin-qF	GGAAAAGCTTGCCTATGTGG	55	番茄内参基因检测 Detection of the tomato internal reference gene
SlActin-qR	CCTGCAGCTTCCATACCAAT		

下划线标出的序列是pCB301-2μ-HDV载体序列,斜体标出的序列为同源臂(病毒)序列。The sequence underlined is the pCB301-2μ-HDV vector, and the italicized underline in italics is the homologous arm (viral) sequence.

1.2.2 ToBRFV基因组5′和3′末端序列扩增

为获得ToBRFV完整基因组序列,选取ToBRFV阳性样品RNA进行基因组5′和3′末端序列扩增。根据1.2.1中ToBRFV检测片段测序结果及已报道ToBRFV基因组保守区域设计末端扩增引物,其中引物ToBRFV-R178用于5′末端扩增,ToBRFV-F5666用于3′末端扩增(表1)。参照5′ RACE试剂盒说明书对RNA进行反转录,之后加入引物ToBRFV-R178扩增ToBRFV基因组5′末端。参考Lan et al.(2022)方法用Ploy(A)Polymerase试剂盒为ToBRFV基因组RNA进行加Ploy(A)尾反应,以引物Via18(表1)代替随机引物对RNA进行反转录合成cDNA,反转录方法同1.2.1,用引物ToBRFV-F5666和Via19进行PCR扩增,获得ToBRFV基因组3′末端片段。50 μL PCR反应体系:2×PrimeSTAR Max Premix 25 μL、cDNA 5 μL、上下游引物各1 μL,ddH_2O补足至50 μL。PCR反应程序:98 ℃预变性3 min;98 ℃变性10 s,55 ℃复性5 s/15 s(引物T_m值为55 ℃以上设定复性时间为5 s;T_m值55 ℃以下复性时间为15 s),72 ℃延伸1 min,35个循环后;72 ℃终延伸10 min。经1%琼脂糖凝胶电泳检测回收纯化目标产物。由于高保真DNA聚合酶扩增产物多

为平末端，纯化产物经DNA A-Tailing Kit进行3′端加A处理后，连接至pMD19-T克隆载体，转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。挑选单克隆，采用引物ToBRFV-F5666和Via19进行重组克隆PCR鉴定，PCR体系和程序同1.2.1。将验证结果为阳性的重组克隆送生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。使用Lasergene 7.1软件包的Seqman程序对序列进行比对分析。

1.2.3　ToBRFV全长基因组序列扩增

根据1.2.2中获得的ToBRFV-MZ基因组5′和3′末端序列，结合GenBank中已报道的ToBRFV全基因组序列（登录号OM892688、OQ674194、OM892687和OM892690），用Clustal Omega进行多重序列比对，设计ToBRFV全基因组分段扩增引物。ToBRFV全基因组采用3个重叠片段扩增获得，分别覆盖基因组nt 1~2 150、nt 2 118~4 120和nt 4 100~6 396的区域，对应扩增引物分别为ToBRFV-F1/ToBRFV-R1、ToBRFV-F2/ToBRFV-R2和ToBRFV-F3/ToBRFV-R3（表1）。以1.2.1中ToBRFV检测为阳性的cDNA为模板进行PCR扩增，扩增体系、程序、克隆和测序方法同1.2.2。扩增产物经DNA A-Tailing Kit进行3′端加A处理后分别连接至pMD19-T载体，片段A1、A2和A3分别覆盖ToBRFV-MZ基因组nt 1~2 150、nt 2 118~4 120和nt 4 100~6 396区域，对应重组质粒分别命名为pMD19-A1、pMD19-A2和pMD19-A3。阳性克隆经测序后，使用Lasergene 7.1软件包的Seqman程序进行序列拼接和校正，组装获得完整的ToBRFV基因组序列。

1.2.4　ToBRFV全长基因组序列及系统发育分析

利用Snap Gene 4.2.4软件对1.2.3获得的ToBRFV全长基因组序列进行基因组结构特征分析，然后与GenBank中已登录的其他ToBRFV分离物的全长基因组核苷酸序列进行对比分析，利用Clustal Omega（https://www. ebi. ac. uk/Tools/msa/clustalo/）将ToBRFV全基因组核苷酸序列与NCBI中登录的27个ToBRFV分离物的全长基因组核苷酸序列进行多重序列比对，并利用MEGA 7.0软件以最大似然法对这28个ToBRFV分离物进行聚类分析以及系统发育分析，以同为烟草花叶病毒属的TMV和ToMMV为外群，自举检验值为1 000。采用在线工具iTOL（https://itol.embl.de/）对统发育树进行可视化展示和注释。

1.2.5　ToBRFV全长cDNA侵染性克隆构建

为构建ToBRFV全长cDNA侵染性克隆，以1.2.3中测序确认正确的pMD19-A1、pMD19-A2和pMD19-A3分段克隆质粒为模板，采用高保真酶扩增带有同源重组臂的片段，引物同1.2.3。以酵母穿梭载体CB301-2μ-HDV为模板，用带有病毒同源臂的引物pCB301-tF/pCB301-tR（表1）通过PCR扩增获得线性化的载体。PCR反应体系和反应程序同1.2.2。反应结束后取5 μL PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测，并用PCR产物纯化试剂盒纯化目标片段。

将扩增获得的ToBRFV的A1、A2和A3这3个片段与线性化的酵母穿梭载体pCB301-2μ-HDV通过酵母进行重组。参照Sun et al.（2017）醋酸锂转化法转化酵母细胞。取过夜培养的酵母Y2H菌液700 μL，2 500 r/min离心5 min收集菌体；然后在酵母菌体中分别加入1 mol/L醋酸锂40 μL、50%质量体积比的PEG4000 132 μL、1 mol/L DTT 20 μL、10 mg/mL鲑鱼精DNA 10 μL、线性化pCB301-2μ-HDV载体1 μg、3个ToBRFV基因组片段各0.5 μg；振荡使转化体系中的组分充分混匀，于42 ℃水浴热激30 min；水浴后于5 000 r/min离心5 min，弃上清液，加入ddH_2O 200 μL重悬浮菌体，涂布于单缺色氨酸的酵母培养基上，28 ℃培养2~3 d。用引物ToBRFV-F5666/pCB301-HDVR（表1）筛选酵母阳性重组克隆，以ddH_2O为阴性对照，PCR反应体系和程序同1.2.1。用酵母质粒提取试剂盒分别从阳性酵母中提取质粒。将至少3个pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA阳性克隆质粒送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行KBSeq全质粒测序，确定pCB301-2μ-ToBRFV-MZ重组质粒的准确性。

1.2.6　pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA克隆的侵染性测试

利用农杆菌介导的浸润法测试pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA克隆的侵染性。利用冻融法将测序准确的重组阳性质粒转入农杆菌GV3101感受态细胞，筛选阳性克隆。将含有pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA克隆的农杆菌接种至含50 mg/L卡那霉素、25 mg/L利福平的LB液体培养基中，28 ℃、220 r/min条件下振荡培养至$OD_{600\,nm}$为0.8。于6 000 r/min下离心5 min收集菌体，用农杆菌浸润缓冲液（含10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L MES和150 μmol/L AS）悬浮菌体，温室避光孵育2 h，用无菌注射器将200 μL菌液从背面接种于4~5叶期的本氏烟叶片中。取1.2.1中含野生型ToBRFV的番茄果实1 g，加入0.01 mol/L PBS缓冲液10 mL充分研磨后取上清进行接种作为阳性对照，以接种含有空载体pCB301-2μ-HDV的农杆菌作为阴性对照。接

种后将植株置于24 ℃、光周期16 L∶8 D条件下进行培养，观察接种植株的发病情况。接种后8 d，采集接种植物的系统叶并使用植物总RNA提取试剂Trizol提取总的RNA并反转录合成cDNA，随后使用引物ToBRFV-dF/ToBRFV-dR（表1）通过PCR检测接种植株是否感染ToBRFV。cDNA合成及PCR反应体系和程序同1.2.1。

1.2.7 ToBRFV cDNA克隆的病毒粒体形态观察

利用透射电子显微镜比较pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA侵染性克隆与野生型ToBRFV侵染本氏烟后产生的病毒粒体形态。分别选取1.2.5中接种成功pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA克隆和野生型ToBRFV并已出现症状的本氏烟系统叶100 mg，加入0.01 mol/L、pH 7 PBS缓冲液200 μL进行研磨，匀浆液于4 ℃下以6 000 *g*离心5 min后取上清液使用铜网吸附。铜网经2%磷钨酸负染色后置于透射电子显微镜下观察病毒粒子的形态特征，每个铜网观察5个视野，并测量病毒粒子的大小。

1.2.8 cDNA克隆对番茄和辣椒的致病力分析

分别取pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA克隆成功侵染的本氏烟，以及野生型ToBRFV侵染的本氏烟系统叶各5 g，加入0.01 mol/L PBS缓冲液30 mL，冰浴研磨成匀浆。匀浆液于4 ℃下以6 000 *g*离心5 min后去除残渣，收集上清液作为接种毒源。该方法可确保不同毒源中病毒粒子含量的均一性，减少接种剂量差异对试验结果的影响。

为明确野生型ToBRFV与pCB301-2μ-ToBRFV-MZ侵染性克隆在番茄和辣椒上的致病力差异，分别用上述制备的2种毒源采用注射接种法对4片真叶期的番茄和辣椒幼苗进行接种，同时以接种等量PBS缓冲液作为阴性对照。每种毒源各接种番茄和辣椒20株，每株植株注射2片下部叶，每片叶子注射0.3 mL毒源。接种后将植株置于（24±2）℃、光周期16 L∶8 D条件下进行培养，观察接种植株的发病情况。接种后21 d采集植株系统叶提取RNA检测植株带毒情况，计算检出率。RNA提取和检测方法同1.2.1。病毒检出率=ToBRFV阳性株数/接种总株数×100%。使用实时荧光定量PCR（reverse transcription quantitative polymerase chain reaction，qPCR）技术分别检测番茄和辣椒系统叶中ToBRFV RNA积累量，分别采集3株不同接种处理的番茄和辣椒系统叶，按照1.2.1的方法提取总RNA。利用HyperMB快速反转录试剂盒消化残留DNA并进行反转录反应。利用cDNA为模板，检测ToBRFV RNA积累量。ToBRFV RNA积累量检测引物ToBRFV-qF/ToBRFV-qR（表1）根据ToBRFV-MZ *cp*基因设计，番茄和辣椒的内参基因检测引物Caactin-qF/Caactin-qR和SlActin-qF/SlActin-qR（表1）分别根据番茄*Actin*（GenBank登录号为NM_001321306.1）和辣椒*Actin*（GenBank登录号为XM_016688120.2）设计。20 μL qPCR反应体系：10 μmol/L上下游引物各0.4 μL、2×Universal SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL、模板cDNA 2 μL、RNase-Free ddH_2O 7.2 μL。反应程序：95 ℃预变性2 min；95 ℃变性10 s，60 ℃退火30 s，40个循环；熔解曲线程序：95 ℃ 5 s，65 ℃ 60 s，95 ℃ 1 s。

采用Western blot技术检测番茄和辣椒接种植株中ToBRFV CP蛋白的积累量。分别采集感染ToBRFV的番茄和辣椒系统叶0.1 g，液氮速冻，用组织研磨仪将样品打碎，加入100 μL蛋白提取裂解液充分振荡混匀，冰上静置10 min，于12 000 r/min条件下离心10 min，转移上清液于1.5 mL离心管中，加入等体积的2×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液，98 ℃孵育8 min，冰上冷却2 min，于12 000 r/min条件下离心1 min完成总蛋白提取。取等量蛋白经SDS-PAGE分离后转移至PVDF膜，随后用含有5%脱脂奶粉的PBST封闭处理，经ToBRFV CP兔源多克隆一抗和HRP标记的二抗Goat anti-Rabbit IgG（H+L）孵育后，用PBST充分洗膜。参照化学发光试剂盒ECL Enhanced操作方法使HRP催化底物产生化学发光信号，最后使用ChemiDoc成像系统进行曝光成像，检测ToBRFV CP蛋白的特异性信号。

1.3 数据分析

采用GraphPad Prism 10.1软件对数据进行统计分析，应用*t*检验法对数据进行差异显著性检验。

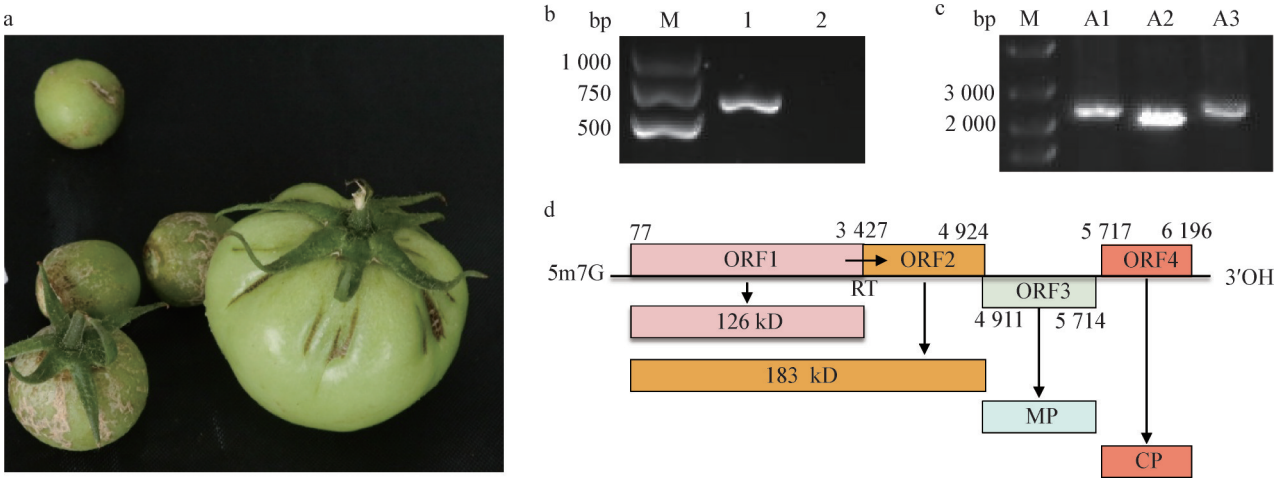
2 结果与分析

2.1 ToBRFV全基因组序列特征

从云南省红河州蒙自市番茄大棚中采集的表现为果实褐色坏死、畸形皱缩和条纹症状的番茄（图1-a）中检测到ToBRFV（图1-b）。利用5′ RACE技术和基因组3′末端加Ploy（A）技术，获得了ToBRFV基因组5′末端（5′-GGTATTTTTTACAACAACA-TATACCAACAACAACAAA-3′）和3′末端（5′-AG-GGATTCGAATTCCCCCGGAACCCCCGGTAGGG-GCCC-3′）的准确序列。由于ToBRFV基因组约为6.4 kb，一次性扩增全序列较困难，故采用分段策略

获得该病毒的基因组全长序列。经RT-PCR扩增获得3个目标片段A1、A2和A3，长度分别约为2 200、2 000和2 300 bp（图1-c）。扩增产物经纯化后，分别克隆至pMD19-T载体上获得重组质粒pMD19-A1、pMD19-A2和pMD19-A3。将获得的序列用Seqman软件进行拼接，成功获得完整的番茄分离物的全长基因组序列，命名为ToBRFV-MZ。

ToBRFV-MZ全长为6 396 nt（GenBank登录号为PV832075），GC含量为41%，5′和3′非编码区（untranslated region，UTR）分别为76 nt和200 nt。ToBRFV-MZ基因组包含4个ORF（图1-d）。其中ORF1（nt 77~3 427）编码126 kD的复制酶；与病毒复制相关的ORF2（nt 77~4 924）由ORF1通读得到，编码183 kD的RdRp；ORF3（nt 4 911~5 714）编码30 kD的MP，通过结合病毒RNA并靶向胞间连丝来实现病毒的细胞间运动；ORF4（nt 5 717~6 196）编码CP；此外在ORF2和ORF3之间有14 nt基因重叠区，在ORF3~ORF4之间有2 nt基因间隔区。



a：感染ToBRFV的番茄果实症状。b：疑似感病毒病的番茄样品ToBRFV检测结果；1：约700 bp的ToBRFV扩增条带；2：阴性对照健康的番茄果实；M：2 000 bp DNA marker。c：ToBRFV基因组3个片段的扩增结果；A1、A2、A3：长度分别为2 200、2 000、2 300 bp左右的目标片段；M：5 000 bp DNA marker。d：ToBRFV-MZ基因组结构。a: Symptoms of tomato fruits infected with ToBRFV. b: ToBRFV detection results from the infected tomato sample; 1: ToBRFV amplified fragment with about 700 bp; 2: negative control, healthy tomato fruit; M: 2 000 bp DNA marker. c: Three fragments of the ToBRFV genome, A1, A2, A3: the aim amplicons with about 2 200, 2 000 and 2 300 bp, respectively; M: 5 000 bp DNA marker. d: genomic organization of ToBRFV-MZ.

图1　ToBRFV云南蒙自分离物全长基因组序列扩增结果及基因组结构

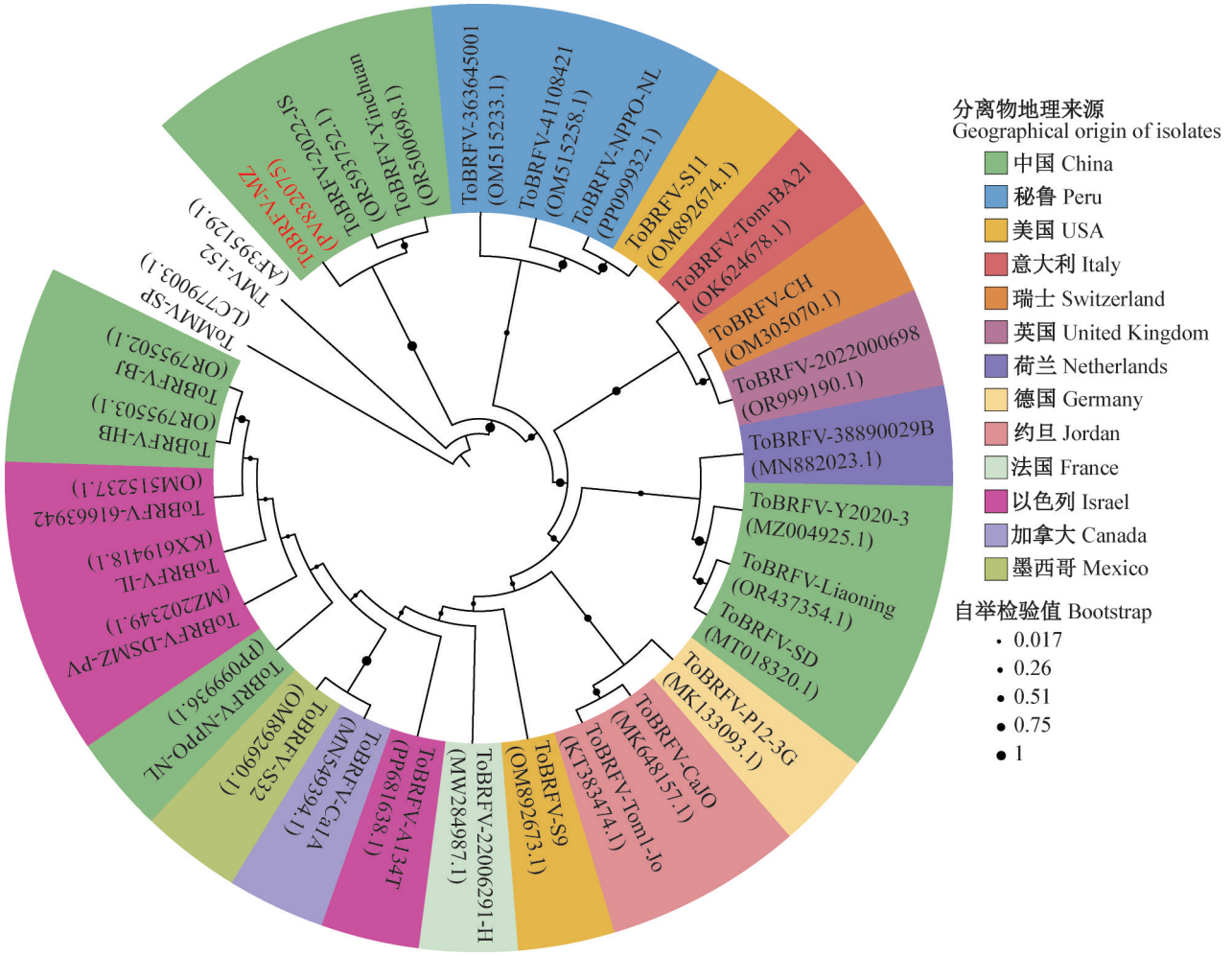
Fig. 1　Amplification results and genomic organization of the complete genome sequence of ToBRFV-MZ isolate

2.2　ToBRFV-MZ分离物系统发育分析结果

ToBRFV-MZ分离物与NCBI中登录的其他ToBRFV分离物基因组核苷酸序列一致性均高于99%，其中与中国Yinchuan分离物（GenBank登录号为OR500698）的一致性度最高为99.73%，其次为中国JS-2022分离物（GenBank登录号为OR593752），一致性为99.66%。ToBRFV-MZ与来自秘鲁的41108421、41834183和NPPO-NL这3个分离物（GenBank登录号为OM515258、PP099932和PP099910）的序列一致性分别达到99.62%、99.59%和99.51%，与来自美国S11分离物（GenBank登录号为OM892674）序列一致性达到99.51%。此外，序列比对显示ToBRFV-MZ分离物与同属的TMV（GenBank登录号为AF395129）和ToMMV（GenBank登录号为LC779003）的全基因组核苷酸序列一致性分别为81.72%和80.65%。

基于ToBRFV不同分离物的基因组核苷酸序列构建的系统发育树显示，来自同一国家或地区的ToBRFV分离物大都聚集在一起，与同属的ToMMV、TMV归入不同分支（图2）。其中ToBRFV-MZ与来自中国的Yinchuan分离物（GenBank登录号为OR500698）、JS-2022分离物（GenBank登录号为OR593752）共同聚在一个小分支上（图2），且该分支的ToBRFV分离物与秘鲁41108421、41834183和NPPO-NL分离物（GenBank登录号分别为OM515258、PP099932和PP099910）和美国S11分离物（GenBank登录号为OM892674）聚在同一个大分支。综上，ToBRFV-MZ与已报道ToBRFV分离物

的全基因组序列高度一致，并与中国 Yinchuan 和 JS-2022 分离物聚为同一亚支，表明 ToBRFV-MZ 属于 ToBRFV 近缘分离物。



红色字体为本研究获得的 ToBRFV-MZ 分离物。在圆形系统发育树中，来自同一地理来源的 ToBRFV 分离物以彩色环表示。
The ToBRFV MZ isolate obtained in this study is highlighted in red font. ToBRFV isolates from the same geographical origin were represented by colored rings in the circular phylogenetic tree.

图 2 基于全基因组核苷酸序列采用最大似然法构建的 ToBRFV-MZ 与其他分离物的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ToBRFV-MZ and other isolates based on whole-genome nucleotide sequences constructed by maximum-likelihood method

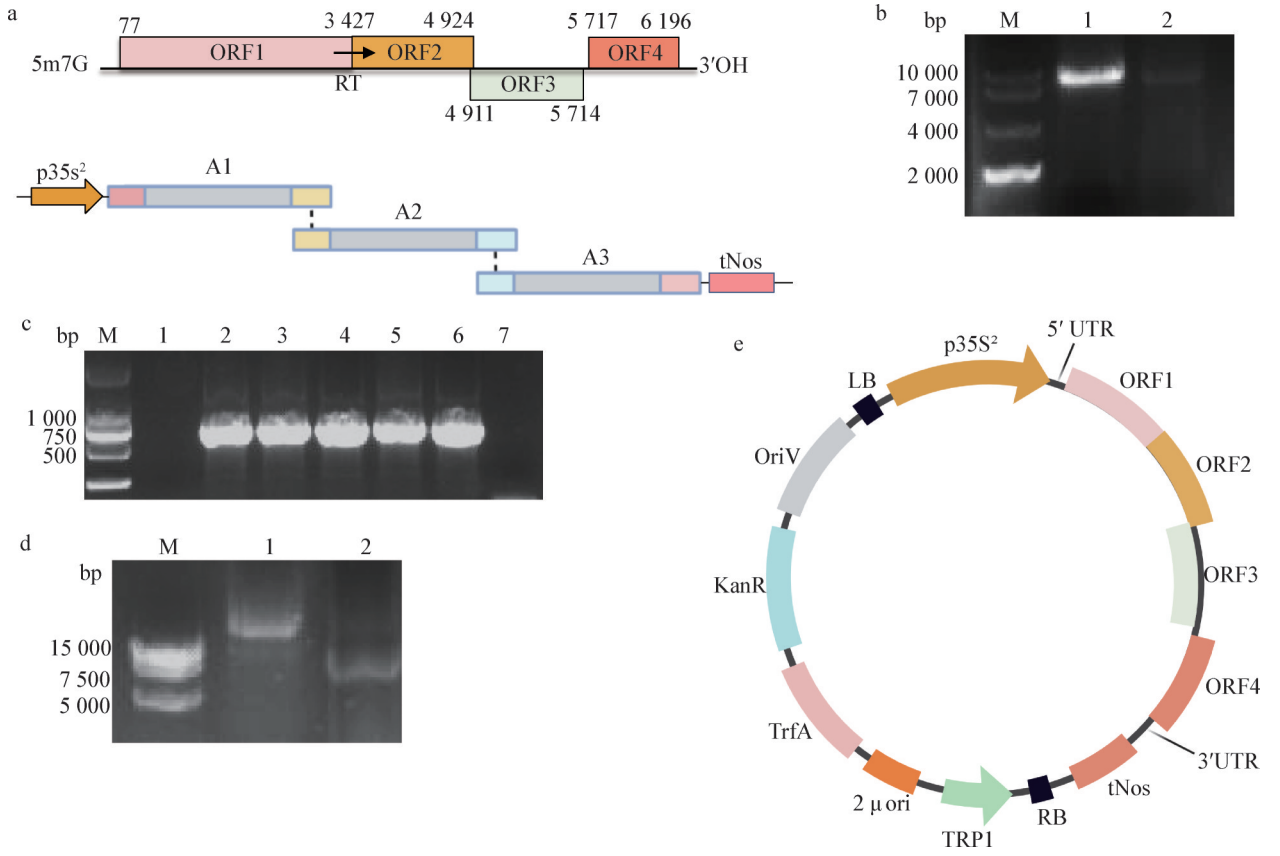
2.3 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ 全长 cDNA 重组质粒构建

经 PCR 扩增获得用于构建 ToBRFV-MZ 全长 cDNA 重组质粒的 3 个目标片段 A1、A2 和 A3，片段大小与预期一致，且各片段两端均含有用于酵母同源重组的同源臂（图 3-a）。同时，以 pCB301-2μ-HDV 为模板扩增获得线性化载体片段，电泳结果显示其大小与预期一致（图 3-b）。随后用醋酸锂转化法将 3 个 ToBRFV-MZ 重叠片段和线性化的含 35S 启动子的双元表达载体 pCB301-2μ-HDV 在酵母细胞中进行重组，获得重组候选质粒。在挑取的 6 个酵母阳性克隆中，5 个检测到 ToBRFV 阳性条带（图 3-c）。从 5 个阳性克隆中提取质粒并进行 KBseq 全质粒测序，经序列比对分析筛选获得 1 个序列正确的重组质粒。该重组质粒经电泳检测显示大小约为 13 000 bp（图 3-d），进一步分析确认 ToBRFV-MZ 序列已准确且成功插入到载体 pCB301-2μ-HDV 的目标位置（图 3-e）。表明含 ToBRFV-MZ 全长基因组的 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA 重组质粒构建成功。

2.4 ToBRFV-MZ cDNA 克隆的侵染性验证

为验证 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA 克隆的侵染性，将其转化农杆菌后接种本氏烟，观察发现

接种pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA侵染性克隆的本氏烟第8天系统叶出现黄化、皱缩、向外卷曲和萎蔫的症状(图4-a)，与野生型ToBRFV-MZ毒源接种本氏烟8 d出现的症状无明显差别(图4-b)，而接种pCB301-2μ-HDV空载体的本氏烟无明显症状(图4-c)。在接种pCB301-2μ- ToBRFV-MZ及野生型ToBRFV-MZ毒源接种的本氏烟系统叶中，均能检测到ToBRFV的目标基因(图4-d)。



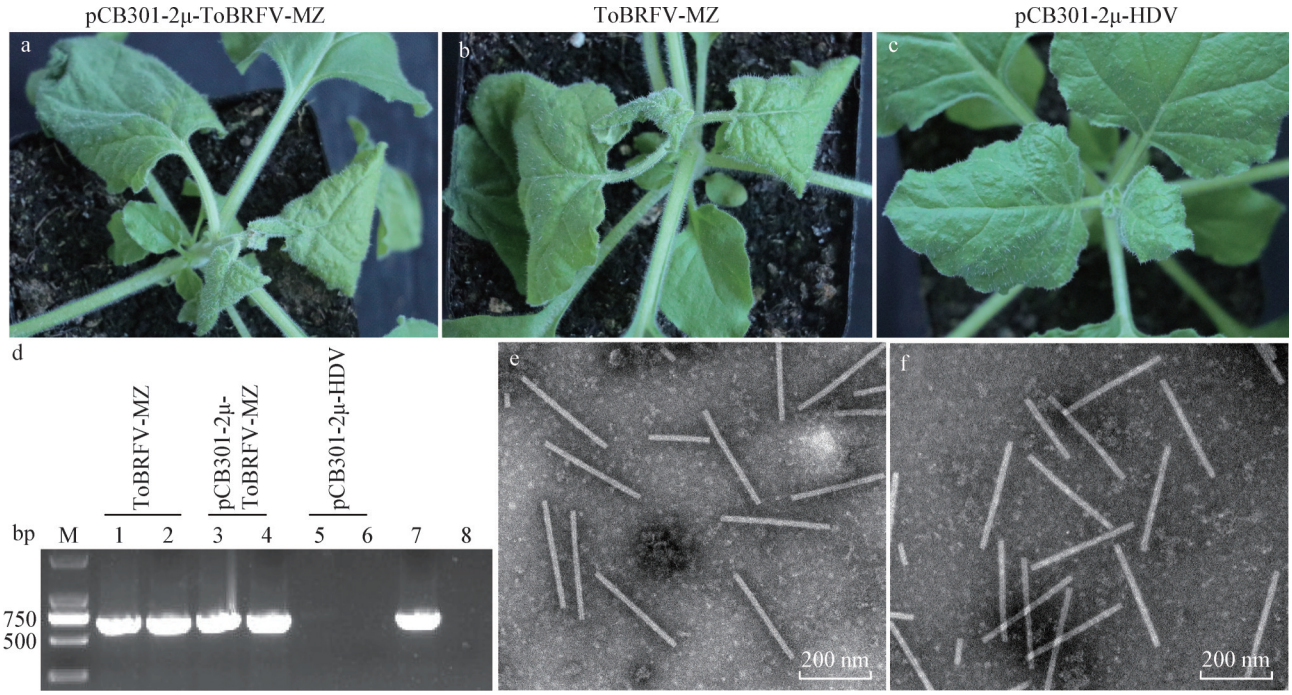
a：ToBRFV-MZ基因组3个片段的扩增策略。b：pCB301-2μ-HDV载体片段的电泳检测；1：pCB301-2μ-HDV载体；2：线性化的pCB301-2μ-HDV载体；M：10 kb DNA marker。c：pCB301-2μ-ToBRFV-MZ阳性克隆菌落筛选；1~6：同源重组后获得的酵母转化子；7：阴性对照ddH$_2$O；M：2 000 bp DNA marker。d：阳性pCB301-2μ-ToBRFV-MZ质粒电泳鉴定；1：pCB301-2μ-ToBRFV-MZ质粒鉴定；2：pCB301-2μ-HDV空载质粒；M：15 kb DNA marker。e：pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA重组质粒示意图；p35S^2：双增强型花椰菜花叶病毒35S启动子；5′ UTR：ToBRFV 5′非编码区；ORF1~ORF4：ToBRFV开放阅读框1~4；3′ UTR：ToBRFV 3′非编码区；tNOS：NOS终止子；RB：T-DNA右边界；LB：T-DNA左边界；TRP1：色氨酸筛选标记基因；2 μ ori：2 μ复制起点；TrfA：复制起始蛋白基因；KanR：卡那霉素抗性基因；OriV：复制起点。a: Strategy for amplification of three fragments of ToBRFV-MZ genome. b: Electrophoresis detection of the pCB301-2μ-HDV fragment; 1: pCB301-2μ-HDV plasmid; 2: linearized pCB301-2μ-HDV plasmid; M: 10 kb DNA marker. c: Screening of positive clones of pCB301-2μ-ToBRFV-MZ; 1−6: yeast transformants obtained after homologous recombinant; 7: negative control ddH$_2$O; M: 2 000 bp DNA marker. d: Electrophoresis detection of the positive pCB301-2μ-ToBRFV-MZ plasmid; 1: positive pCB301-2μ-ToBRFV-MZ plasmid; 2: pCB301-2μ-HDV plasmid; M: 15 kb DNA marker. e: Schematic diagram of the pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA recombinant plasmid; p35S^2: double cauliflower mosaic virus 35S promoter; 5′ UTR: ToBRFV 5′ untranslated region; ORF1−ORF4: ToBRFV open reading frames 1−4; 3′ UTR: ToBRFV 3′ untranslated region; tNOS: NOS terminator; RB: T-DNA right border; LB: T-DNA left border; TRP1: tryptophan selection marker gene; 2 μ ori: 2 μ origin of replication; TrfA: replication initiation protein gene; KanR: kanamycin resistance gene; OriV: origin of replication.

图3　利用酵母同源重组系统构建ToBRFV-MZ全长基因组cDNA克隆

Fig. 3　Construction of the full-length ToBRFV-MZ cDNA clone using the yeast homologous recombination system

接种pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA克隆及野生型ToBRFV-MZ毒源的本氏烟样品负染色后，经透射电子显微镜观察均发现大量具有烟草花叶病毒属典型形态特征的杆状病毒粒体，大小约长

300 nm×宽 18 nm(图 4-e~f),二者在粒体形态和大小方面无明显差异。这进一步证明 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ 侵染性克隆构建成功,在本氏烟上产生的症状及形成的病毒粒子与野生型 ToBRFV-MZ 没有明显差异,可用于后续研究。



a 和 e:分别为接种野生型 ToBRFV-MZ 本氏烟 8 d 的症状及病毒粒子形态。b 和 f:分别为接种 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA 克隆本氏烟 8 d 的症状及病毒粒子形态。c:接种 pCB301-2μ-HDV 空载本氏烟 8 d 后的表型。d:ToBRFV 的检测结果,1 和 2 为接种野生型 ToBRFV-MZ 的本氏烟,3 和 4 为接种 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ 的本氏烟,5 和 6 为接种 pCB301-2μ-HDV 空载体的本氏烟,7:阳性对照感染 ToBRFV 的番茄果实,8 为阴性对照健康的本氏烟,M 为 2 000 bp DNA marker。a and e: Symptoms and virus particles morphology in *N. benthamiana* inoculated with wild-type ToBRFV-MZ, eight days post-inoculation (dpi). b and f: Symptoms and virus particles morphology in *N. benthamiana* inoculated with pCB301-2μ- ToBRFV-MZ cDNA clone, 8 dpi. c: *N. benthamiana* phenotype inoculated by pCB301-2μ -HDV, 8dpi. d: ToBRFV detection results; 1 and 2: *N. benthamiana* plants inoculated with wild-type ToBRFV; 3 and 4: *N. benthamiana* plants inoculated with pCB301-2μ -ToBRFV-MZ; 5 and 6: *N. benthamiana* plants inoculated with pCB301-2μ -HDV empty vector; 7: positive controlToBRFV-infected tomato fruit; 8: negative control healthy *N. benthamiana* plants.

图 4 ToBRFV-MZ 全长 cDNA 克隆侵染性测试及病毒粒体形态观察

Fig. 4 Infectivity test and virion morphology observation results of the ToBRFV-MZ full-length cDNA clone

2.5 ToBRFV-MZ cDNA 克隆对番茄和辣椒的致病力

2.5.1 cDNA 克隆可重现野生型病毒致病表型

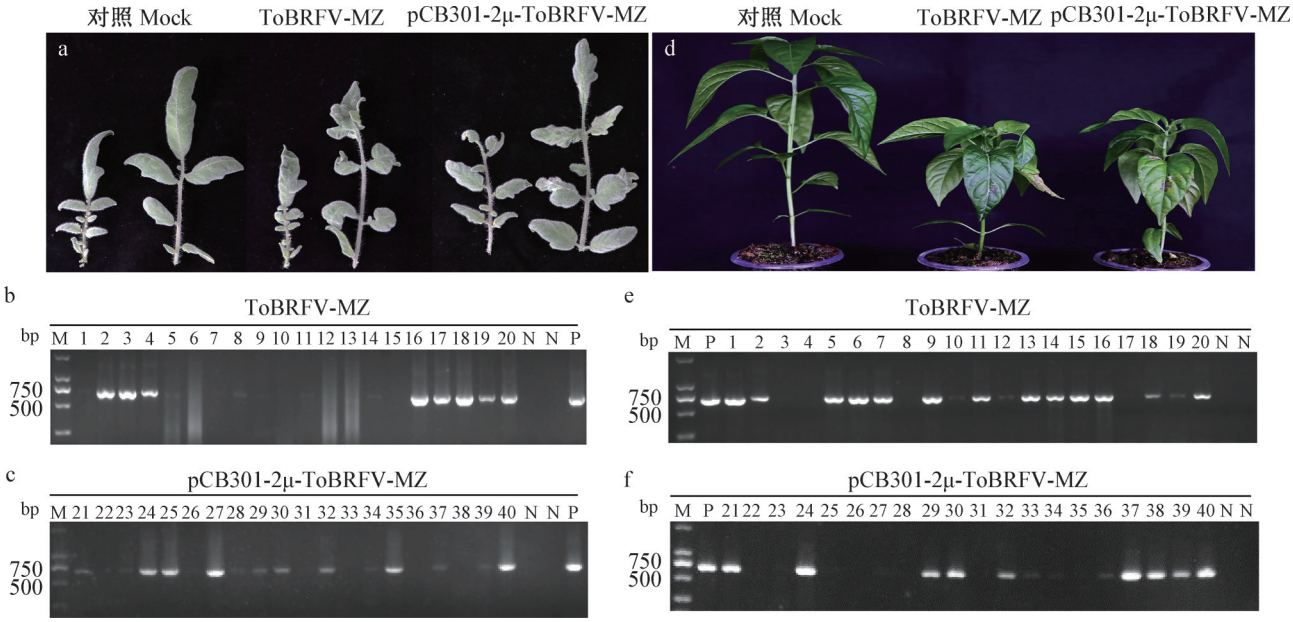
接种后 21 d,野生型 ToBRFV-MZ 与 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA 侵染性克隆均可在番茄和辣椒上产生明显的病毒病症状(图 5)。番茄植株主要表现为叶片卷曲、褪绿和畸形症状,两种毒源处理的番茄症状无明显差别;辣椒植株均出现了系统叶坏死且植株矮缩的症状,二者引起的症状亦基本一致。表明本研究所构建的 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ 侵染性克隆能够高效系统侵染番茄和辣椒,并在两种寄主上重现野生型 ToBRFV-MZ 的致病表型。

病毒检测结果显示,接种野生型 ToBRFV-MZ 与侵染性克隆 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ 后,番茄(图 5-b~c)和辣椒(图 5-e~f)植株中均可检测到 ToBRFV。在番茄中,接种野生型 ToBRFV-MZ 和 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA 克隆植株的病毒检出率分别为 60% 和 70%;在辣椒中,二者的病毒检出率分别为 80% 和 60%。总体来看,pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA 克隆在番茄和辣椒中的检出率与野生型 ToBRFV-MZ 相近,表明该 cDNA 克隆能够有效侵染番茄和辣椒。

2.5.2 ToBRFV-MZ cDNA 克隆的积累量

RT-qPCR 检测结果显示,在接种 pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA 侵染性克隆番茄和辣椒植株中,

ToBRFV RNA积累量与接种野生型ToBRFV-MZ植株之间均无显著差异（图6-a~b）。Western blot检测结果进一步显示，两种处理下ToBRFV CP蛋白均可被检测到，且其积累水平总体一致（图6-c~d）。表明侵染性克隆pCB301-2μ-ToBRFV-MZ在番茄和辣椒中的复制与积累能力与野生型ToBRFV-MZ相当。



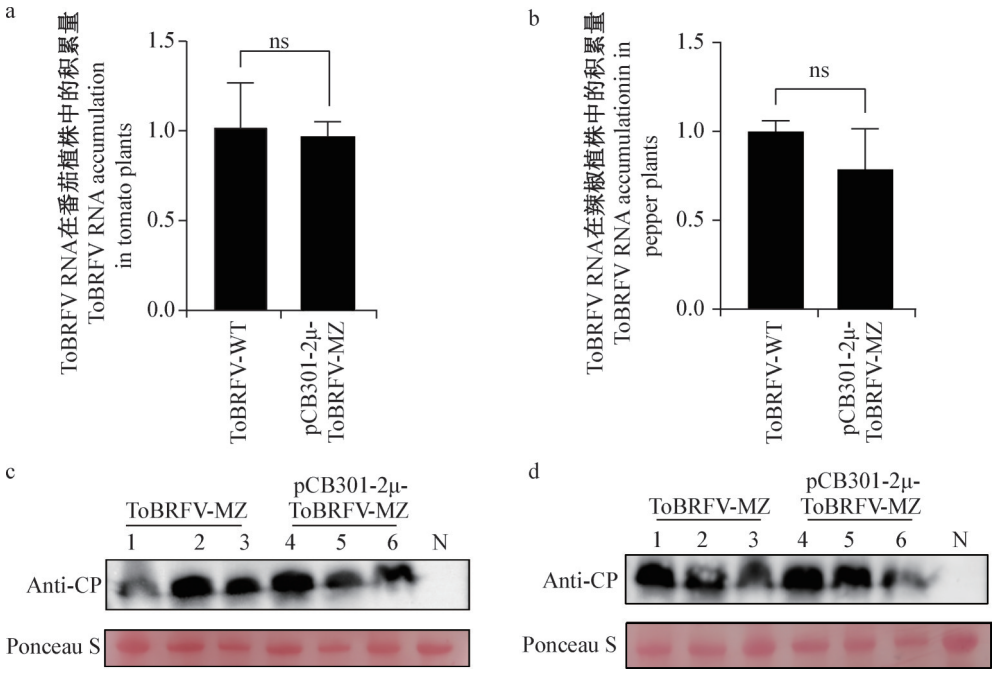
a和d：接种0.01 mol/L PBS缓冲液（对照）、野生型ToBRFV及pCB301-2μ-ToBRFV-MZ侵染性克隆番茄和辣椒21 d的症状。b和c：RT-PCR检测番茄带毒情况，样品1~20为野生型ToBRFV-MZ接种的番茄，样品21~40为pCB301-2μ-ToBRFV-MZ侵染性克隆接种的番茄。e和f：RT-PCR检测辣椒带毒情况，样品1~20为野生型ToBRFV-MZ接种的辣椒，样品21~40为pCB301-2μ-ToBRFV-MZ侵染性克隆接种的辣椒。N：阴性对照；P：阳性对照；M：2 000 bp DNA marker。a, d: Symptoms on tomato and pepper plants at 21 dpi with 0.01 mol/L PBS buffer, wild-type ToBRFV, and the infectious clone pCB301-2μ-ToBRFV-MZ. b, c: RT-PCR detection of ToBRFV in tomato plants, samples 1−20 were inoculated with wild-type ToBRFV, while samples 21−40 were inoculated with the infectious clone pCB301-2μ-ToBRFV-MZ. e, f: RT-PCR detection of ToBRFV in pepper plants, samples 1−20 were inoculated with wild-type ToBRFV, while samples 21−40 were inoculated with the infectious clone pCB301-2μ-ToBRFV-MZ. N: Negative control; P: positive control; M: 2 000 bp DNA marker.

图5 野生型ToBRFV-MZ与侵染性克隆pCB301-2μ-ToBRFV-MZ在番茄和辣椒上致病力的比较

Fig. 5 Comparison of pathogenicity between wild-type ToBRFV and the infectious clone pCB301-2μ-ToBRFV-MZ on *Solanum lycopersicum* and *Capsicum annuum*

3 讨论

云南省是我国冬季蔬菜供应的重要基地，番茄作为主要经济作物之一，在昆明、玉溪、红河、西双版纳等州市广泛种植。自2021年起，云南省多个番茄种植产区陆续报道了ToBRFV的发生，严重时可造成番茄减产30%~70%（王少骅等，2023；肖雨晴等，2025）。本课题组在云南省红河州蒙自市进行番茄病害调查时，发现病毒病普遍发生，部分番茄果实未成熟即出现褐色皱纹症状，随后从病果中检测到ToBRFV。为此，本研究对ToBRFV-MZ进行全基因组序列扩增，获得其6 396 nt的全基因组序列。序列分析结果显示，ToBRFV-MZ具有烟草花叶病毒属病毒典型的基因组结构，其基因组长度、ORF组成及编码蛋白类型均与已报道ToBRFV分离物基本一致（韦建明等，2024）。通过与国内外不同来源ToBRFV分离物进行全基因组序列比较发现，ToBRFV-MZ与其他分离物具有较高的核苷酸序列一致性，表明ToBRFV不同地理来源分离物整体遗传变异较小，基因组相对保守。已有研究亦表明，ToBRFV不同分离物间序列差异较低，但少数核苷酸变异仍可能与病毒的寄主适应性、致病力差异或抗性突破能力有关（Yan et al.，2021；肖雨晴等，2025）。因此，持续开展不同地区ToBRFV分离物的全基因组序列分析，有助于进一步明确我国ToBRFV分离物的遗传变异特征及其潜在流行来源。



a和b：接种野生型ToBRFV-MZ及侵染性克隆pCB301-2μ-ToBRFV-MZ的番茄和辣椒植株中ToBRFV RNA积累量的qPCR检测。c和d：接种野生型ToBRFV-MZ及侵染性克隆pCB301-2μ-ToBRFV-MZ的番茄和辣椒植株中ToBRFV CP表达量的Western blot检测。图c中样品1~3为接种野生型ToBRFV-MZ的番茄植株，样品4~6为接种侵染性克隆pCB301-2μ-ToBRFV-MZ的番茄植株。图d中样品1~3为接种野生型ToBRFV-MZ的辣椒植株，样品4−6为接种侵染性克隆pCB301-2μ-ToBRFV-MZ的辣椒植株。N：阴性对照；Anti-CP：ToBRFV CP抗体；Ponceau S：丽春红染色。a, b: Accumulation levels of ToBRFV RNA in tomato and pepper plants inoculated with wild-type ToBRFV-MZ and the infectious clone pCB301-2μ -ToBRFV-MZ, as determined by qPCR. c, d: Expression levels of ToBRFV CP in tomato and pepper plants inoculated with wild-type ToBRFV-MZ and the infectious clone pCB301-2μ-ToBRFV-MZ. c: Samples 1−3 were tomato plants inoculated with wild-type ToBRFV-MZ, and samples 4−6 were tomato plants inoculated with the infectious clone. d: Samples 1−3 were pepper plants inoculated with wild-type ToBRFV-MZ, and samples 4−6 were pepper plants inoculated with the infectious clone. N: Negative control; Anti-CP: ToBRFV CP antibody; Ponceau S: ponceau S staining.

图6 野生型ToBRFV-MZ与侵染性克隆pCB301-2μ-ToBRFV-MZ接种的番茄和辣椒植株中的病毒积累量分析

Fig. 6 Analysis of ToBRFV accumulation levels in tomato and pepper plants inoculated with wild-type ToBRFV-MZ and the infectious clone pCB301-2μ-ToBRFV-MZ

图中数据为平均数±标准误。ns表示不同处理经*t*检验法检验差异不显著。Data are mean±SE. ns indicates no significant difference among treatments by Student's *t* test.

基于ToBRFV全基因组核苷酸序列的系统发育树显示ToBRFV-MZ分离物与中国中国Yinchuan及JS-2022分离物聚于同一小分支，且这3个分离物与来自秘鲁和美国的分离物聚在同一分支，提示它们之间可能具有较近的亲缘关系。该结果与肖雨晴等(2025)报道相似，ToBRFV分离物整体遗传差异较小，部分分离物的聚类与地理来源存在一定关联。由于ToBRFV可通过种子、种苗及机械接触等方式传播，种子贸易和跨区域调运可能在其远距离传播中发挥着重要作用(马菲等，2022；Zhang et al.，2022)。我国不同地区番茄种植品种及种子来源较为复杂，部分地区种子或种苗可能来源于曾报道ToBRFV发生的国家或地区(张宇等，2020)，因此不同地区ToBRFV分离物可能存在不同的传入来源。然而，仅依据系统发育树尚不能直接判定ToBRFV-MZ的具体传播来源，仍需结合更多地区样品、种子来源、采集时间和流行病学调查数据进行综合分析。上述结果提示，加强我国不同番茄产区ToBRFV分离物的基因组监测和系统发育分析，对于该病毒溯源、跨区域传播预警和检疫防控具有重要意义。

在获得ToBRFV-MZ全基因组序列的基础上，本研究利用酵母同源重组技术成功构建了pCB301-2μ-ToBRFV-MZ全长cDNA重组质粒。植物RNA

病毒全长cDNA侵染性克隆是开展反向遗传学研究的重要基础，其构建的关键在于保证病毒基因组序列的完整性和准确性。本研究通过分段扩增、序列拼接及同源重组组装获得ToBRFV-MZ全长cDNA重组质粒，并经PCR等方法进行鉴定，表明该重组质粒构建正确，为后续侵染性验证和致病力分析奠定了基础。与传统限制性内切酶连接方法相比，酵母同源重组技术能够高效组装多个较大片段（Sun et al.，2017），可减少载体和病毒序列中酶切位点限制带来的影响。

pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA侵染性克隆能系统侵染本氏烟、番茄和辣椒等寄主植物，在系统叶中可检测到ToBRFV RNA和CP，表明该cDNA克隆能在植物体内启动病毒复制和系统移动。透射电镜观察结果显示，接种该侵染性克隆植株中形成的病毒粒体与野生型ToBRFV-MZ粒体均呈典型杆状，大小和形态基本一致，进一步证明该cDNA克隆能够产生结构完整的病毒粒体。关于ToBRFV及其他烟草花叶病毒属病毒侵染性克隆研究的结果表明，寄主植物中典型症状的出现、病毒RNA和蛋白的稳定积累以及正常病毒粒体的形成是评价全长cDNA克隆侵染性的重要依据（Kuroiwa et al.，2022；Shi et al.，2023）。在番茄和辣椒上的致病力分析进一步表明，pCB301-2μ-ToBRFV-MZ cDNA侵染性克隆能够在两种自然寄主上重现野生型ToBRFV-MZ的致病表型，具备稳定侵染番茄和辣椒的能力。RT-qPCR和Western blot检测结果进一步显示，接种侵染性克隆植株中的病毒RNA积累量及CP积累水平与接种野生型病毒植株相当，表明所构建克隆在复制、积累和CP表达方面能够较好地保持野生型病毒的生物学特性。上述结果共同表明，本研究构建的ToBRFV-MZ全长cDNA未破坏病毒关键功能元件，能够维持病毒的天然侵染能力和致病特性，pCB301-2μ载体体系在驱动ToBRFV基因组表达方面亦具有良好的稳定性和有效性。因此，该cDNA克隆可作为ToBRFV-MZ分离物的可靠替代材料，用于后续病毒学功能研究。

ToBRFV能够突破番茄*Tm-2*^{2}等抗性基因介导的抗性，并可侵染部分携带*L*基因的辣椒材料，目前生产上仍缺乏对ToBRFV具有稳定抗性的商业化栽培品种（Luria et al.，2017；Yan et al.，2021）。在此背景下，构建稳定的ToBRFV侵染性克隆具有重要应用价值。一方面，该克隆可为病毒基因功能研究提供标准化材料，后续可通过定点突变、片段替换或嵌合克隆等方式解析复制酶、MP和CP等病毒因子在复制、运动、致病性及抗性突破中的作用。另一方面，该克隆可用于建立统一、可重复的接种体系，减少田间毒源中病毒含量不稳定、混合侵染或遗传背景复杂等因素对抗性评价结果的影响，从而为番茄和辣椒种质资源抗ToBRFV鉴定、抗病材料筛选以及抗性基因挖掘提供技术支撑。综上，本研究获得了ToBRFV-MZ分离物的全基因组序列，并成功构建了能够系统侵染本氏烟、番茄和辣椒的全长cDNA侵染性克隆，为ToBRFV遗传变异分析、致病机制解析及抗病种质资源评价提供了基础材料。

参 考 文 献（References）

Caruso AG, Bertacca S, Parrella G, Rizzo R, Davino S, Panno S, 2022. Tomato brown rugose fruit virus: a pathogen that is changing the tomato production worldwide[J]. Annals of Applied Biology, 181(3): 258–274

Fan ZZ, Xiao MX, Li SS, Zang LY, Li XX, Zhou T, 2025. Co-infection of tomato brown rugose fruit virus and pepino mosaic virus in tomato and analysis of their full genome sequences[J]. Journal of Plant Protection, 52(1): 136–143 (in Chinese) [范真真, 肖梦雪, 李树山, 臧连毅, 李新旭, 周涛, 2025. 番茄褐色皱纹果病毒与凤果花叶病毒复合侵染的检测及病毒全基因组序列分析[J]. 植物保护学报, 52(1): 136–143]

Ishibashi K, Ishikawa M, 2016. Replication of tobamovirus RNA[J]. Annual Review of Phytopathology, 54: 55–78

Jewehan A, Kiemo FW, Salem N, Tóth Z, Salamon P, Szabó Z, 2022. Isolation and molecular characterization of a tomato brown rugose fruit virus mutant breaking the tobamovirus resistance found in wild *Solanum* species[J]. Archives of Virology, 167(7): 1559–1563

Jung S, Choi HJ, Jo SH, Paek KH, Park JM, 2025. Engineering PVX vectors harboring heterologous VSRs to enhance recombinant vaccine protein expression in plants[J]. Scientific Reports, 15: 40330

Kuroiwa M, Handa S, Gyoutoku Y, Moriyama M, Neriya Y, Nishigawa H, Natsuaki T, 2022. Characterization of a ToMV isolate overcoming *Tm-2*^{2} resistance gene in tomato[J]. Virus Genes, 58(5): 478–482

Lan PX, He P, Yang J, Zhou GH, Chen XJ, Wei TY, Li CR, Gu R, Li RH, Li F, 2022. High-throughput sequencing reveals the presence of novel and known viruses in diseased *Paris yunnanensis*[J]. Frontiers in Microbiology, 13: 1045750

Li WC, Liu X, Kang Y, Li W, Qi ZZ, Yu L, Wang F, 2023. Optimization and application of tobacco rattle virus-induced gene silencing system in soybean[J]. Biotechnology Bulletin, 39(7): 143–150 (in Chinese) [李文辰, 刘鑫, 康越, 李伟, 齐泽铮, 于璐, 王芳, 2023. TRV病毒诱导大豆基因沉默体系优化及应用[J]. 生物技术通报, 39(7): 143–150]

Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I, Elad N, Tam Y, Sela N, Abu-Ras A, et al., 2017. A new Israeli tobamo-

virus isolate infects tomato plants harboring *Tm-2²* resistance genes[J]. PLoS ONE, 12(1): e0170429

Ma F, Bai J, Sun SY, Feng LX, Wang G, Zhao MG, 2022. Analysis of phytosanitary measures adopted by countries to manage the cross-border transmission of tomato brown rugose fruit virus[J]. Journal of Biosafety, 31(4): 295–299 (in Chinese) [马菲, 白娟, 孙双艳, 冯黎霞, 王刚, 赵明刚, 2022. 世界各国应对番茄褐色皱果病毒跨境传播采取的植物检疫措施分析及启示[J]. 生物安全学报, 31(4): 295–299]

Qiao JH, Zang Y, Gao Q, Liu SN, Zhang XW, Hu WY, Wang Y, Han CG, Li DW, Wang XB, 2025. Transgene- and tissue culture-free heritable genome editing using RNA virus-based delivery in wheat[J]. Nature Plants, 11(7): 1252–1259

Rothman JA, Whiteson KL, 2022. Sequencing and variant detection of eight abundant plant-infecting tobamoviruses across southern California wastewater[J]. Microbiology Spectrum, 10(6): e03050–e03022

Salem NM, Cao MJ, Odeh S, Turina M, Tahzima R, 2020. First report of tobacco mild green mosaic virus and tomato brown rugose fruit virus infecting *Capsicum annuum* in Jordan[J]. Plant Disease, 104(2): 601

Salem N, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW, Turina M, 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan[J]. Archives of Virology, 161(2): 503–506

Salem NM, Jewehan A, Aranda MA, Fox A, 2023. Tomato brown rugose fruit virus pandemic[J]. Annual Review of Phytopathology, 61: 137–164

Shi YJ, Ma ZY, Yang XL, Zhou XP, 2022. The alert for the spread and damage of tomato brown rugose fruit virus in China[J]. Plant Protection, 48(6): 42–48 (in Chinese) [石铚杰, 马子玥, 杨秀玲, 周雪平, 2022. 警惕番茄褐色皱纹果病毒在我国的传播和危害[J]. 植物保护, 48(6): 42–48]

Shi YJ, Yang X, Yang LL, Li QL, Liu XM, Han XY, Gu QS, Li HL, Chen LL, Liu YQ, et al., 2023. Interaction between cucumber green mottle mosaic virus MP and CP promotes virus systemic infection[J]. Molecular Plant Pathology, 24(3): 208–220

Sun K, Zhao DY, Liu Y, Huang CJ, Zhang W, Li ZH, 2017. Rapid construction of complex plant RNA virus infectious cDNA clones for agroinfection using a yeast-*E. coli-Agrobacterium* shuttle vector. Viruses, 9: 332

Wang SY, Chen LD, Shi YX, Xie XW, Li L, Fan TF, Li BJ, Cai AL, 2023. Molecular detection and identification of tomato brown rugose fruit virus[J]. Chinese Vegetables(6): 34–40 (in Chinese) [王少骅, 陈利达, 石延霞, 谢学文, 李磊, 范腾飞, 李宝聚, 柴阿丽, 2023. 番茄褐色皱纹果病毒分子检测与鉴定[J]. 中国蔬菜(6): 34–40]

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]

Xiao CL, Zheng HY, Wu XH, Li GJ, Yan F, Chen JP, 2016. The complete genomic sequence analysis of three isolates of cucumber green mottle mosaic virus in Zhejiang and the application of prepared antiserum[J]. Journal of Plant Protection, 43(4): 529–536 (in Chinese) [肖彩利, 郑红英, 吴晓花, 李国景, 燕飞, 陈剑平, 2016. 黄瓜绿斑驳花叶病毒基因组全序列分析及病害的田间调查[J]. 植物保护学报, 43(4): 529–536]

Xiao YQ, Lü GY, Li SJ, Chen YD, Su XX, Yang LYB, Zhou XG, Yu DZ, Wang TT, Zheng KY, 2025. Identification and genomic characterization of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) Yunnan isolates[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 55(2): 194–202 (in Chinese) [肖雨晴, 吕高莹, 李树军, 陈永对, 苏晓霞, 杨李源滨, 周晓罡, 余大朝, 王田田, 郑宽瑜, 2025. 番茄褐色皱纹果病毒(ToBRFV)云南建水分离物鉴定及全基因组序列分析[J]. 植物病理学报, 55(2): 194–202]

Yan ZY, Fang L, Tian YP, Geng C, Li XD, 2020. Be alert to the potential damage of new emerging tomato brown rugose fruit virus to Chinese tomato industry[J]. Plant Protection, 46(5): 316–320 (in Chinese) [闫志勇, 房乐, 田延平, 耿超, 李向东, 2020. 警惕新发病毒番茄褐色皱果病对我国番茄产业的危害[J]. 植物保护, 46(5): 316–320]

Yan ZY, Ma HY, Wang L, Tettey C, Zhao MS, Geng C, Tian YP, Li XD, 2021. Identification of genetic determinants of tomato brown rugose fruit virus that enable infection of plants harbouring the *Tm-2²* resistance gene[J]. Molecular Plant Pathology, 22(11): 1347–1357

Zhang SK, Griffiths JS, Marchand G, Bernards MA, Wang AM, 2022. Tomato brown rugose fruit virus: an emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide[J]. Molecular Plant Pathology, 23(9): 1262–1277

Zhang Y, Zhang SB, Zhang DY, Liu H, Zhang ZH, Zhang YJ, Liu Y, 2020. Occurrence, distribution and prevention of tomato brown rugose fruit virus[J]. Chinese Vegetables(5): 12–17 (in Chinese) [张宇, 张松柏, 张德咏, 刘慧, 张战泓, 张友军, 刘勇, 2020. 番茄褐色皱纹果病毒的发生分布及防控对策[J]. 中国蔬菜(5): 12–17]

（责任编辑：王 璇）