

· 研究报告 ·

银川番茄斑萎病毒的分子鉴定

王晓敏^{1, 2, 3, 4*}, 李洪磊¹, 王林¹, 周鹏泽¹, 白圣懿¹, 李国花¹, 郑福顺¹
陶小荣⁵, 程国新^{1, 2, 3, 4}, 高艳明^{1, 2, 3, 4}, 李建设^{1, 2, 3, 4}

¹宁夏大学农学院, 银川 750021; ²宁夏现代设施园艺工程技术研究中心, 银川 750021; ³宁夏优势特色作物
现代分子育种重点实验室, 银川 750021; ⁴宁夏设施园艺(宁夏大学)技术创新中心, 银川 750021

⁵南京农业大学植物保护学院, 南京 210095

摘要 为明确银川番茄(*Lycopersicon esculentum*)是否遭受了番茄斑萎病毒(TSWV)的危害, 采用国家标准TSWV RT-PCR检测技术对银川番茄上采集的14份疑似感染TSWV病叶样本进行分子鉴定, 对克隆得到的核衣壳蛋白基因*N* (*Nucleocapsid*)序列进行多序列比对和系统进化树分析, 随后对PCR阳性样本进行蛋白检测。结果表明, 14份病叶样本中有8份扩增出长度为394 bp的TSWV *N*基因序列, 且8条序列完全一致; 获得的银川番茄TSWV分离物与云南番茄、中国莴苣(*Lactuca sativa*)、中国鸢尾(*Iris tectorum*)和重庆辣椒(*Capsicum annuum*) TSWV分离物相对近缘, 与山东、黑龙江和北京等地及国外TSWV分离物相对远缘; 利用TSWV的抗体通过Western blot对8个PCR阳性样本进一步检测, 结果也证实8个阳性样本中存在TSWV感染。该研究首次通过分子鉴定及蛋白检测证明银川番茄上存在TSWV感染, 需要加快抗TSWV番茄品种的选育工作。

关键词 银川, 番茄斑萎病毒, RT-PCR, Western blot

王晓敏, 李洪磊, 王林, 周鹏泽, 白圣懿, 李国花, 郑福顺, 陶小荣, 程国新, 高艳明, 李建设 (2021). 银川番茄斑萎病毒的分子鉴定. 植物学报 56, 715–721.

番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)隶属布尼亚病毒目(Bunyavirales)番茄斑萎病毒科(Tospoviridae)正番茄斑萎病毒属(*Orthotospovirus*) (Peiró et al., 2014)。TSWV分子基因组由3条RNA单链构成, 分别为L RNA、M RNA和S RNA (Adkins, 2000)。L RNA是反义RNA链, 长约8.9 kb, 包含1个开放阅读框(ORF), 编码331 kDa的RNA依赖性聚合分子蛋白(De Haan et al., 1991); M RNA含2个ORF, 长约4.8 kb, 是双义RNA链, 分别编码34和127.4 kDa的运输蛋白和糖蛋白(Kormelink et al., 1992); S RNA含2个ORF, 长约2.9 kb, 是双义RNA链, 分别编码54和29 kDa的沉默抑制子和核衣壳蛋白N (*Nucleocapsid*) (De Haan et al., 1990)。

番茄斑萎病毒因第1次在番茄(*Lycopersicon esculentum*)上致病被人类发现得以正式命名。TSWV

寄主范围广, 目前已有100多个科1 090多种植物遭受该病毒侵染(吴鑫本, 2008)。TSWV在蓟马幼虫体内完成复制增殖后, 以蓟马成虫为媒介进行病毒传播。西花蓟马(*Frankliniella occidentalis*)是所有蓟马中病毒传播效率最高的种类(邱树亮等, 2012)。在不同生育期番茄受TSWV侵染后表现出的发病症状不同。苗期会引起生长点和幼嫩叶片颜色变为铜色并使叶片呈上卷状, 随后出现黑色环状病点和黑褐色斑块, 叶背面沿叶脉部位逐渐变紫, 茎端出现一些看似黑褐色的坏死条斑, 番茄植株矮化, 生长速度变缓, 并出现萎蔫等不良病症; 坐果期果实表面会出现淡绿色环形斑块, 表面伴有轻微凸起, 并有一些细微轮纹出现; 如在青果期发病, 果实表面则会出现褐色坏死斑块, 并似瘤状突起, 导致果实极易脱落; 果实成熟期轮纹更加明显, 出现许多红白相间或红黄相间的轮

收稿日期: 2021-07-09; 接受日期: 2021-11-20

基金项目: 宁夏回族自治区农业特色优势产业育种专项(No.NXNYZZ20200101)、宁夏回族自治区重点研发计划(No.2021BBF02002)和宁夏回族自治区重点研发计划(重大)重点项目(No.2019BBF02022)

* 通讯作者。E-mail: wangxiaomin_1981@163.com

纹斑块,严重时整个果实呈褐色坏死状,且果实脐部的症状类似脐腐病。果实完全成熟时,上述环状病点和黑褐斑块的环状轮纹会更加明显,发病的果实表皮最终会变成黑褐色,并坏死(Chiemsoombat and Adkins, 2006)。TSWV最早在20世纪初被澳大利亚研究者发现(Brittlebank, 1919),后来在美国夏威夷、西班牙、阿根廷、南非和巴西等地流行并对当地番茄生产造成严重的经济损失(Soler et al., 2003)。2003年,在我国北京首次检测出TSWV(张友军等, 2003),随后在云南等地的多种园艺作物上发现了TSWV,同时发现蓟马的危害范围也在进一步扩大(丁铭等, 2004; 饶雪琴等, 2010)。2012年,在山东寿光、云南昆明和北京顺义等地相继出现TSWV危害(邱树亮等, 2012),一些大棚和温室的番茄生产受损严重,损失量约为80%,有的甚至出现绝收。

由于TSWV的危害日趋严重,2011年该病毒被列入危害性强的十大重要植物病毒清单(Scholthof et al., 2011)。至今,银川地区还没有该病毒鉴定的相关报道。我们在对银川番茄病毒病进行调查时,发现一些番茄植株可能遭受了TSWV侵染,在大部分温室中发病率约5%,露地发病率约3%;严重时发病率高达60%–70%。为明确银川市番茄是否已遭受TSWV危害,本研究利用TSWV的国家标准检测引物,通过RT-PCR和Western blot对银川市宁夏大学实验农场的14份番茄病毒病疑似样本进行检测,以期为宁夏设施番茄抗番茄斑萎病种质鉴定和品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2020年7–9月,从宁夏回族自治区银川市永宁县宁夏大学实验农场6号日光温室内,采集番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)材料62386-7-0疑似感染TSWV病毒病叶片样本14份,于–80℃冰箱保存。TSWV抗体由南京农业大学陶小荣教授惠赠(兔多抗,效价1:10 000)。

1.2 病叶样本总RNA的提取及反转录

从–80℃超低温冰箱中取出保存的14份病叶样本,放入研钵中并加入液氮,快速研磨至呈粉末状,使用

Trizol法提取样本总RNA(程国新, 2019),然后检测总RNA质量,最后利用试剂盒进行反转录。反应结束后,将产物放入–20℃冰箱,备用。

1.3 TSWV检测

根据已报道的番茄斑萎病毒病RT-PCR检测方法(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局和中国国家标准化管理委员会, 2013)国家标准,合成引物TSWVN-F: 3'-GCTTTGTTGACACAAGGCAAAGAC C-5'; TSWVN-R: 3'-GGCAAGCCTCACAGACTTTG CATC-5'(退火温度58℃,片段长度约390 bp)。检测14份病叶样本的cDNA浓度。PCR反应体系(25 μL)及反应程序详见番茄斑萎病毒病RT-PCR检测方法(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局和中国国家标准化管理委员会, 2013)。用通用型TSWV基因试剂盒检测的确定受TSWV侵染的番茄叶片作为阳性对照,以生长势强且健康的番茄叶片为阴性对照。将扩增得到的PCR产物进行电泳检测。

1.4 TSWV基因克隆、测序与多序列比对分析

回收纯化目的片段,连接载体后转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态,然后将菌液均匀涂布于含有氨苄的LB培养基上,37℃倒置过夜培养。随机挑取平板上的单克隆进行菌落RT-PCR检测,筛选阳性克隆进行测序。得到测序结果之后,利用NCBI网站对基因序列进行载体序列去除,然后利用BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行序列相似性分析,参考Burland (2000)的方法,使用DNA Star软件进行多序列比对,参考Mahmood和Yang (2012)及Hayes等(2014)的方法,采用MEGA 5.0软件完成系统进化树构建。

1.5 TSWV的Western blot检测

对RT-PCR检测结果为阳性的样本进一步进行Western blot检测(Tamura et al., 2011)。取约0.1 g新鲜组织样本,液氮速冻研磨呈粉末状,将蛋白质提取液加入提前预冷的2 mL离心管中与粉末样本混匀,沸水浴5分钟,离心机15 294 ×g离心5分钟后取上清(即蛋白质)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳;在甲醇中激活PVDF膜;随后取出PVDF膜,用去离子水洗涤后浸入封闭液中,于摇床上封闭90分钟,缓慢摇动;取出膜,浸

入TBST稀释的TSWV抗体中孵育(25°C, 1.5小时); 洗涤后转入含二抗的玻璃皿中, 在摇床上孵育1–1.5小时; 取出后再洗涤3次。然后, 将其浸入缓冲液中平衡5分钟, 置于保鲜膜上, 取适量ECL发光试剂混匀后加在膜表面, 移入凝胶成像分析仪, 观察结果。

2 结果与讨论

2.1 田间病株症状

2020年, 我们对银川番茄上的病毒病进行调查, 发现宁夏大学实验农场6号日光温室内栽培的番茄材料62386-7-0植株上疑似感染病毒。感染病毒的番茄幼叶颜色变为青铜色且上卷, 随后出现黑色斑块(图1A), 叶片背面沿叶脉变紫, 叶柄、茎和茎尖有黑褐色条纹, 严重时番茄植株生长点和叶片坏死。发病后期, 果实上有环状病点和斑块, 并伴有黄化和畸形等症状(图1B)。与正常植株相比, 感病番茄出现萎蔫症状(图1C)。同时还发现番茄上有蓟马活动, 肉眼观察发现番茄花上的蓟马数量为平均每朵2–3只, 推测蓟马可能作为该病害的介体参与病毒传播。

2.2 RT-PCR鉴定结果

对采集的样本进行总RNA提取, 利用引物TSWVN-F和TSWVN-R进行RT-PCR检测, 14份番茄病样中有8份样本检测出与预期N基因序列目的条带大小(约390 bp)相近的片段, 阴性对照则未扩增出任何条带(图1D), 表明这8份样本中伴有TSWV感染。

2.3 TSWV基因克隆、多序列比对及系统进化分析

利用试剂盒回收扩增到的8个目的片段, 通过菌落PCR筛选阳性克隆, 并送公司测序, 结果显示8条序列完全一致。

本研究克隆到的N基因序列全长为394 bp, 编码131个氨基酸残基。BLAST分析结果显示, 其与番茄TSWV的N基因核苷酸序列相似性达99.49%。利用MEGA 5.0软件将本研究所得的TSWV N基因序列与已报到的6个国外和10个国内TSWV的N基因序列进行多序列比对(图2A), 发现其与美国辣椒(*Capsicum annuum*) (KR080273)、中国黑龙江番茄(MG-878875)、中国云南番茄(UK528736)和中国云南花生(*Arachis hypogaea*) (MN365037)中的TSWV分离物

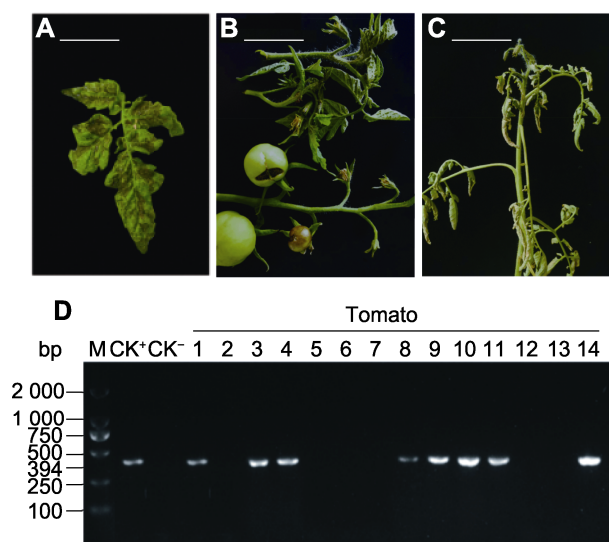


图1 番茄田间采集病样症状及TSWV的RT-PCR检测
(A) 叶片出现黑斑; (B) 果实伴有黄化和畸形; (C) 植株萎蔫; (D) 病样TSWV的RT-PCR检测(M: DL2000 marker; CK⁺: 阳性对照; CK⁻: 阴性对照; 1–14: 番茄病叶样本)。Bars=10 cm

Figure 1 RT-PCR detection of TSWV and disease symptoms in tomato field

(A) Black spots appeared on the leaves; (B) The fruits showing yellowing and deformity; (C) Wilted plant; (D) Detection of TSWV in disease samples by RT-PCR (M: DL2000 marker; CK⁺: Positive control; CK⁻: Negative control; 1–14: Tomato diseased leaf samples). Bars=10 cm

N基因序列完全一致。

系统进化分析(图2B)发现, TSWV在N基因序列的系统进化树上分为5个簇, 其中中国分离物主要聚集在第1个簇(Cluster I)和第5个簇(Cluster V), 澳大利亚、美国、意大利和巴西等分离物构成第4个簇(Cluster IV), 中国贵州番茄分离物和韩国辣椒分离物则分别构成第2个簇(Cluster II)和第3个簇(Cluster III)。

本研究采集的银川分离物聚集在第1个簇, 与云南番茄(MK628735和MK628736)、中国莴苣(*Lactuca sativa*) (KP330473)、中国鸢尾(*Iris tectorum*) (KC-294570)和重庆辣椒(KX611497)的TSWV分离物相对近缘, 与山东、黑龙江和北京等地及国外的分离物相对远缘, 上述结果表明, 本研究从银川番茄病样上检测到的病毒为TSWV。

2.4 TSWV的Western blot检测

基于RT-PCR检测结果, 将8份阳性样本1、3、4、8、

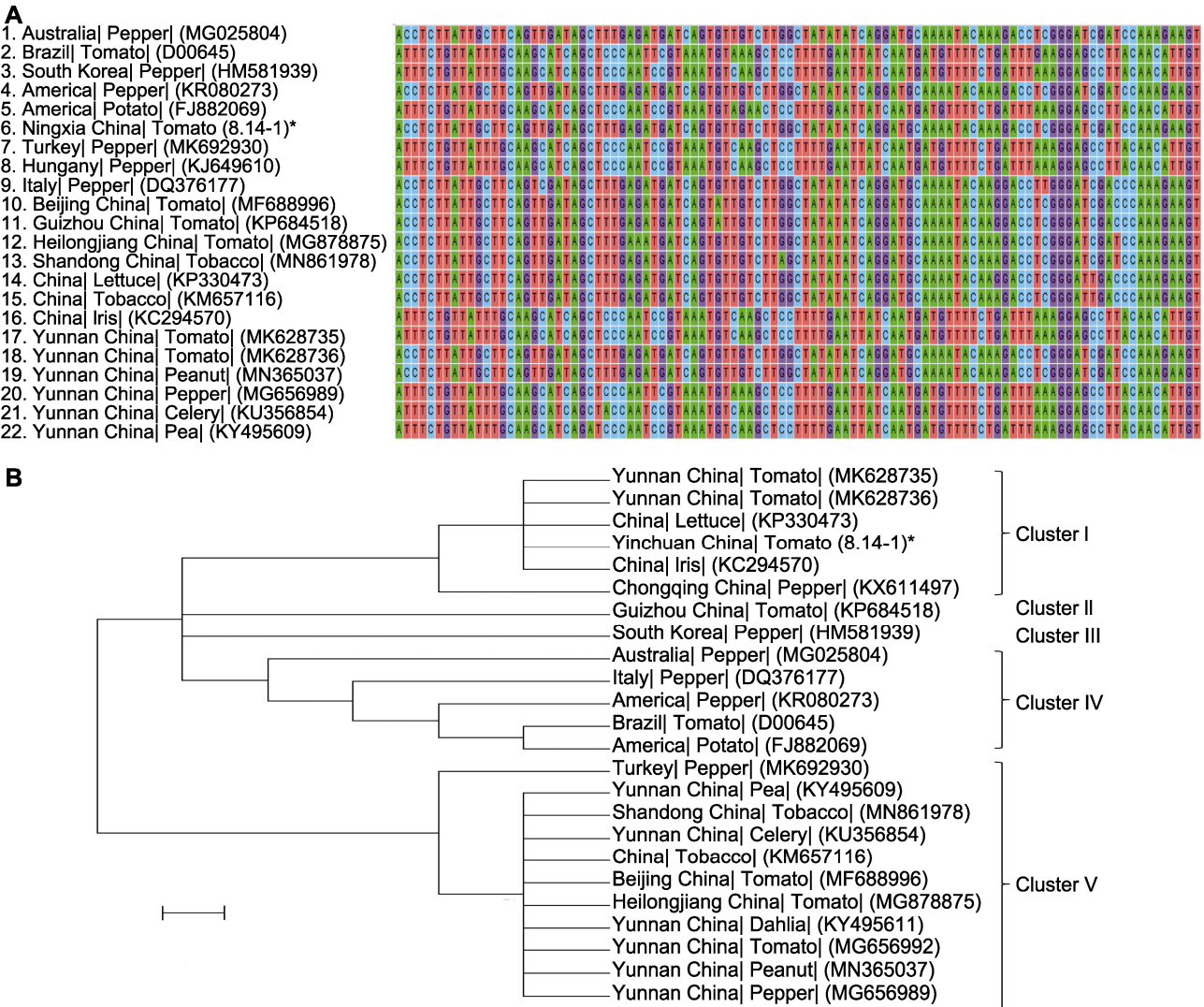


图2 基于*N*基因序列一致性的片段多序列比对(A)和系统进化树分析(B)

*: 本研究*N*基因序列。Bar=0.005

Figure 2 Multiple sequence alignment (A) and phylogenetic tree analysis (B) based on sequence consistency of *N* gene

*: *N* gene sequence of this study. Bar=0.005

9、10、11和14进行总蛋白提取，进一步通过Western blot检测验证。结果显示，8份病样中检测到的条带与预期TSWV *N*基因蛋白大小(29 kDa)相近(图3)。综上，本研究的血清学检测结果也表明田间采集的番茄病样中存在TSWV侵染。

2.5 讨论

TSWV是全世界范围内频繁发生且对植物危害非常严重的一种病毒，2011年被国际组织列为世界上对植物危害最大的十大病毒之一，仅次于烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)，位居第二(Scholthof

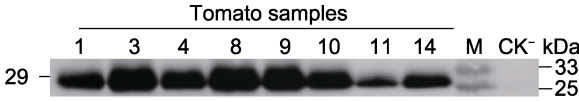


图3 番茄斑萎病毒的Western blot检测

M: 分子量蛋白marker; CK⁻: 阴性对照; 1、3、4、8、9、10、11和14: 检测样本

Figure 3 Western blot analysis of tomato spotted wilt virus
M: Protein size marker; CK⁻: Negative control; 1, 3, 4, 8, 9, 10, 11 and 14: Test samples

et al., 2011)。目前，在我国设施及露地种植作物中TSWV危害日趋严重，已蔓延至多个省、市，如黑龙

江(番茄) (王凯娜等, 2019)、重庆(辣椒) (孙淼等, 2017)、青海(辣椒) (吴淑华等, 2020)、山东(烟草(*Nicotiana tabacum*)) (张万红等, 2020)以及北京(莴苣和菊花(*Dendranthema morifolium*)) (陈东亮等, 2018; 金凤媚等, 2020), 对多种作物造成了严重的经济损失。但银川尚未见关于TSWV的报道。

本研究在对番茄病害开展调查过程中, 在温室和露地栽培的番茄上均发现疑似TSWV的症状。为明确番茄是否受TSWV侵染, 对采自宁夏大学实验农场的14份样本进行了分子鉴定, 并对分子鉴定结果呈阳性的8份样本进行Western blot检测。分子鉴定和蛋白检测结果一致, 证实银川番茄遭受了TSWV侵染。本研究中的TSWV *N*基因序列与国内16个和国外7个TSWV基因序列的同源性较高。系统进化分析结果显示, 银川TSWV分离物与云南番茄、中国莴苣、中国茼蒿和重庆辣椒的TSWV分离物相对近缘, 与山东、黑龙江和北京等地及国外的TSWV分离物相对远缘。早在20世纪70年代, 研究者发明了酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 检测植物是否受到病毒侵染。后来, 因该方法具备所需材料少、操作便捷且能同时测定多种病毒的特点被广泛应用。孙淼等(2017)利用Dot-ELISA及电镜观察法检测出阳性样品, 然后利用分子鉴定进行验证, 在辣椒上检测出TSWV。吴淑华等(2020)在分子鉴定的基础上, 利用TSWV的抗体先进行分子鉴定, 然后通过Western blot对样品进一步检测, 结果证明青海辣椒上存在TSWV感染。受实验室电镜设备等系列条件限制, 本研究首先通过分子鉴定(RT-PCR)检测出阳性样品, 然后通过Western blot鉴定TSWV, 两种鉴定结果完全吻合。PCR技术对实验环境和操作要求较低, 而TSWV属于RNA病毒, RNA提取过程对实验条件要求相对较高; Western blot不仅对实验条件要求较高, 而且出现假阳性结果概率较低。因此, 相比于孙淼等(2017)的检测方法, 本研究与吴淑华等(2020)的研究类似, 将分子鉴定放在第1步, 极大地降低了检测的工作量, 提升了检测效率, 且PCR鉴定技术与Western blot检测相结合得到的结果更加可靠(郭亚璐等, 2017)。

2018年上半年宁夏越夏茬番茄的生产总面积约为 $5.2 \times 10^3 \text{ hm}^2$, 其中平罗县的栽培面积最大, 为 $8.67 \times 10^2 \text{ hm}^2$, 上市量约达 $5.0 \times 10^5 \text{ t}$, 70%左右的番

茄远销上海、广州、四川和重庆等地(李艳莉等, 2019)。因此, 番茄对于当地农民来说不仅是食用蔬菜, 而且是提升收入水平的主要经济作物。TSWV的发生可能会对银川番茄及其它经济作物产量造成难以预估的损失, 在生产上我们要密切关注此类病害的发生, 及时防治。本研究发现, 银川已有TSWV发生, 并预示银川的TSWV可能由其它地区传入, 可对当地经济作物造成危害。此外, 在调查时还发现田间存在大量蓟马群体, 因TSWV是一种虫传植物病毒, 蓟马是重要的传播媒介, 可长期传播。为避免损失, 应树立防患意识, 选育抗病品种, 加强种苗检疫, 严格把控流通环节, 减少带有TSWV病毒种苗进入区内, 同时还要重视田间蓟马的防治, 降低传毒基数, 从而有效控制病毒大范围扩散。

参考文献

- 陈东亮, 李明远, 李雪梅, 王玲玲, 黄丛林 (2018). 北京地区莴苣中番茄斑萎病毒的鉴定. 中国蔬菜 (1), 65–69.
- 程国新 (2019). 辣椒(*Capsicum annuum* L.)可用叶色突变体的筛选鉴定及叶色调控基因CaPAL功能的初步分析. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学. pp.19–22.
- 丁铭, 张丽珍, 方琦, 李婷婷, 苏晓霞, 李展, 张仲凯 (2004). 侵染马铃薯的一个Tospovirus混合分离物的鉴定、纯化及多抗血清制备. 西南农业学报 17(S1), 160–162.
- 郭亚璐, 马晓飞, 史佳楠, 张柳, 张剑硕, 黄腾, 武鹏程, 康昊翔, 耿广芸, 陈浩, 魏健, 窦世娟, 李莉云, 尹长城, 刘国振 (2017). 转基因水稻中CAS9蛋白质的免疫印迹检测. 中国农业科学 50, 3631–3639.
- 金凤媚, 宋建, 薛俊, 陈东亮, 王姝, 张越, 孙海波 (2020). 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. 华北农学报 35, 175–184.
- 李艳莉, 温学萍, 徐苏萌, 杨俊丽, 汪洋, 张翔, 曹瑾 (2019). 宁夏越夏番茄产销现状分析报告. 园艺与种苗 39(6), 21–23.
- 邱树亮, 王孝宣, 杜永臣, 高建昌, 国艳梅, 朱德蔚, 胡鸿, 李宝聚, 石延霞 (2012). 番茄斑萎病毒TSWV的鉴定及抗病种质的筛选. 园艺学报 39, 1107–1114.
- 饶雪琴, 刘勇, 李媛媛, 吴竹妍 (2010). 广东番茄上检测到Tospovirus病毒. 植物病理学报 40, 430–432.
- 孙淼, 荆陈沉, 楚成茹, 吴根土, 孙现超, 谢艳, 刘勇, 青玲 (2017). 重庆辣椒上番茄斑萎病毒的血清学检测及分子鉴

- 定. 园艺学报 **44**, 487–494.
- 王凯娜, 战斌慧, 周雪平 (2019). 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. 植物保护 **45**, 37–43.
- 吴淑华, 涂丽琴, 咸文荣, 闫佳会, 高丹娜, 吉颖, 陶小荣, 周益军, 郭青云, 季英华 (2020). 青海辣椒上番茄斑萎病毒检测及鉴定. 园艺学报 **47**, 1391–1400.
- 吴鑫本 (2008). 番茄斑萎病毒的防治与检疫. 现代农业科学 **15**(11), 86, 96.
- 张万红, 冯佳, Ali K, 罗健达, 杨举田, 王术科, 宗浩, 申莉莉, 李莹, 王凤龙, 张石飞, 杨金广, 金轲 (2020). 山东烟区首次发现番茄斑萎病毒侵染. 中国烟草科学 **41**(5), 87–91.
- 张友军, 吴青君, 徐宝云, 朱国仁 (2003). 危险性外来入侵生物——西花蓟马在北京发生危害. 植物保护 **29**(4), 58–59.
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会 (2013). 番茄斑萎病毒PCR检测方法: GB/T 28982–2012. 北京: 中国标准出版社.
- Adkins S (2000). Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Mol Plant Pathol* **1**, 151–157.
- Brittlebank CC (1919). Tomato diseases. *J Agric* **27**, 213–235.
- Burland TG (2000). DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol* **132**, 71–91.
- Chiemsombat P, Adkins S (2006). Tospoviruses. In: Rao GP, Lava Kumar P, Holguín-Peña RJ, eds. Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses. Houston: Studium Press. pp. 1–37.
- De Haan P, Kormelink R, De Oliveira Resende R, Van Poelwijk F, Peters D, Goldbach R (1991). Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J Gen Virol* **72**, 2207–2216.
- De Haan P, Wagemakers L, Peters D, Goldbach R (1990). The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J Gen Virol* **71**, 1001–1007.
- Hayes S, Velanis CN, Jenkins GI, Franklin KA (2014). UV-B detected by the UVR-8 photoreceptor antagonizes auxin signaling and plant shade avoidance. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 11894–11899.
- Kormelink R, de Haan P, Meurs C, Peters D, Goldbach R (1992). The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J Gen Virol* **73**, 2795–2804.
- Mahmood T, Yang PC (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci* **4**, 429–434.
- Peiró A, Cañizares MC, Rubio L, López C, Moriones E, Aramburu J, Sánchez-Navarro J (2014). The movement protein (NSm) of tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the tomato Sw-5 gene-based resistance. *Mol Plant Pathol* **15**, 802–813.
- Scholthof KBG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster GD (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **12**, 938–954.
- Soler S, Cebolla-Cornejo J, Nuez F (2003). Control of disease induced by tospoviruses in tomato: an update of the genetic approach. *Phytopathol Med* **42**, 207–219.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.

Molecular Identification of Tomato Spotted Wilt Virus on Tomato in Yinchuan

Xiaomin Wang^{1, 2, 3, 4*}, Honglei Li¹, Lin Wang¹, Pengze Zhou¹, Shengyi Bai¹, Guohua Li¹, Fushun Zheng¹, Xiaorong Tao⁵, Guoxin Cheng^{1, 2, 3, 4}, Yanming Gao^{1, 2, 3, 4}, Jianshe Li^{1, 2, 3, 4}

¹School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; ²Ningxia Modern Facility Horticulture Engineering Technology Research Center, Yinchuan 750021, China; ³Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops in Ningxia, Yinchuan 750021, China; ⁴Ningxia Facility Horticulture (Ningxia University) Technology Innovation Center, Yinchuan 750021, China; ⁵College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract In order to determine whether Yinchuan tomato (*Lycopersicon esculentum*) was damaged by tomato spotted wilt virus (TSWV), 14 disease leaf samples of suspected infected TSWV collected from Yinchuan tomato were identified by the national standard TSWV RT-PCR technique. The cloned *N* gene sequences were analyzed by multi sequence alignment and phylogenetic tree analysis. Eight of the 14 disease leaf samples amplified the TSWV *N* gene sequence with a length of 394 bp, and the 8 sequences were completely consistent. The TSWV sequence was relatively close to those from Yunnan tomato, Chinese lettuce (*Lactuca sativa*), Chinese Iris (*Iris tectorum*) and Chongqing pepper (*Capsicum annuum*), while relatively distant to those from Shandong, Heilongjiang, Beijing and the abroad. Detection of TSWV in the 8 PCR positive samples by use of Western blot showed that TSWV infection existed in these samples. This study proved that there was TSWV infection in Yinchuan tomato. Therefore, it is necessary to speed up the breeding of TSWV resistant tomato varieties.

Key words Yinchuan, tomato spotted wilt virus, RT-PCR, Western blot

Wang XM, Li HL, Wang L, Zhou PZ, Bai SY, Li GH, Zheng FS, Tao XR, Cheng GX, Gao YM, Li JS (2021). Molecular identification of tomato spotted wilt virus on tomato in Yinchuan. *Chin Bull Bot* 56, 715–721.

* Author for correspondence. E-mail: wangxiaomin_1981@163.com

(责任编辑: 孙冬花)