

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.07.009

# 高通量测序技术在植物病毒分类中的应用

刘青<sup>1,2</sup>, 周书玉<sup>1,3</sup>, 崔冬丽<sup>1,3</sup>, HESLOP HARRISON John Seymour<sup>1,4</sup>

1. 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室/中国科学院华南植物园, 广州 510650;
2. 中国科学院核心植物园, 广州 510650; 3. 中国科学院大学, 北京 100049;
4. 莱斯特大学遗传学和基因组生物学系, 英国莱斯特 LE1 7RH

**摘要:** 植物病毒寄生可引起植物病毒病, 甚至对植物造成毁灭性伤害. 高通量测序技术 (high-throughput sequencing, HTS) 提供了一种快速、低成本、深度测序的解决方案, 在病毒鉴定、新病毒检测和病毒基因组多样性等研究中具有优势, 促进了植物病毒分类的研究. 本文概述了 HTS 技术检测病毒的进展、在植物病毒学领域应用案例和该方法检测病毒的优缺点, 旨在说明 HTS 技术对病毒鉴定、新病毒发现和病毒分类的重要贡献, 提出新病毒检测和鉴定是亟待解决的问题, 为植物病毒病的预防提供参考.

**关键词:** 高通量测序; 植物病毒分类; 新病毒鉴定

**中图分类号:** Q939.46 **文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2022)07-0087-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## High-Throughput Sequencing Technology and Its Application in Plant Virus Detection

LIU Qing<sup>1,2</sup>, ZHOU Shuyu<sup>1,3</sup>, CUI Dongli<sup>1,3</sup>,  
HESLOP HARRISON John Seymour<sup>1,4</sup>

1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization / South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;
2. Center for Conservation Biology, Core Botanical Gardens, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
4. Department of Genetics and Genome Biology, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, UK

**Abstract:** Plant virus parasitism causes plant virus diseases, some of which can cause devastating damage to plants. High-throughput sequencing (HTS) technology provides a fast, low-cost, deep sequencing solution, which has advantages in virus identification, new virus detection and virus genome diversity research. So far, the HTS technology had begun to be applied in the field of plant virology, including the de-

收稿日期: 2021-08-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(32070359); 中国科学院大学生创新实践训练计划项目(KCJH-80107-2020-004 No. 97); 国家留学基金项目(202004910143); 广东省自然科学基金面上项目(2021A1515012410).

作者简介: 刘青, 博士, 副研究员, 主要从事多倍体作物基因组起源研究.

通信作者: HESLOP HARRISON John Seymour, 博士, 教授.

tection of known viruses, new viruses, and the study of viral genome diversity. In this paper, the development of HTS technology, virus detection methods, application cases in the field of plant virology, and the advantages and disadvantages of HTS technology utilization in virus detection are summarized. It aims to illustrate the contributions of HTS technology in the fields of virus identification, new virus discovery, and virus classification. It is proposed that the detection and identification of new viruses is an urgent unsolved problem, the investigation lays a foundation for the prevention of plant virus diseases.

**Key words:** high-throughput sequencing; plant virus classification; new virus identification

病毒粒子是一种由核酸和蛋白质外壳组成的细胞内寄生病原体,具有生长、遗传和变异等生物特性和侵染活性<sup>[1]</sup>.植物病毒寄生引起植物病毒病,被人们称为“植物癌症”.国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)第 10 次病毒分类报告(2017 年第 10 版)中,病毒分类系统包括 9 目、131 科、46 亚科、802 属和 4 853 种,其中侵染植物的病毒有 5 目、28 科、5 亚科、121 属、1 440 种,与 ICTV 第 9 次病毒分类报告相比,病毒种类增加了 3 目、44 科、27 亚科、453 属、2 569 种<sup>[2]</sup>.通过宏基因组测序获得丰富的基因组信息,并运用到病毒分类和命名,该技术获得 ICTV 的认可.2017 版病毒分类系统中病毒数量倍增的根本原因,在于大范围取样和宏基因组测序的应用<sup>[3]</sup>.宏基因组测序则是利用 HTS 技术直接对环境中的所有微生物进行测序,真实客观地检测环境中存在的病毒,因此,HTS 技术的发展在病毒检测和分类中发挥关键作用.近年来,蔬菜、粮食、果树等均有被新病毒侵染的报道,2020 年,农业农村部公布的《一类农作物病虫害名录》中包括 7 种病害,其中南方水稻黑条矮缩病的病原体为南方水稻黑条矮缩病毒(southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV)<sup>[4]</sup>,病害严重影响着作物的产量和品质.农药和化肥的过度使用、全球变暖以及环境的恶化,加剧了植物病毒的传播和发展,而治理植物病毒病的前提是建立有效的植物病毒检测方法.

传统的植物病毒检测方法有:生物学检测法、电子显微镜观察法、血清学检测法和分子生物学方法<sup>[5]</sup>.生物学检测法借助对病毒敏感的植物来检测病毒,检测速度慢,目前应用较少;电镜观察法根据病毒形态、大小和染病组织超微结构等检测病毒,在研究病毒对寄主和环境的影响<sup>[6]</sup>、观察病毒形态等方面十分重要,缺点是检测设备昂贵;血清学检测法在植物和昆虫病毒检测中被广泛应用,可同时检测大量样品,缺点是实验技术要求高,如酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA);分子生物学方法采用核酸杂交来检测病毒,如核酸杂交技术、反转录 PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、荧光定量 PCR 及 DNA 微阵列技术等,灵敏度高,成本也高.

HTS 技术可以快速获得植物病毒基因组序列,结合生物信息学分析,用于已知病毒、新病毒和仅有裸露 RNA 分子的一类病毒鉴定.新病毒可以是全新的病毒种类,也可以是已知病毒种类在新寄主、新介体和地理范围的新兴病毒.自 2009 年 Rwahni 等<sup>[7]</sup>提取葡萄总 RNA 作为测序模板发现了 7 个已知病毒和 1 个新病毒——西拉葡萄病毒 1 号(grapevine Syrah virus-1, GSyV-1)以来,高通量测序被广泛应用于植物病毒检测,截至 2016 年已发现 100 多种新的病毒和类病毒<sup>[8]</sup>,现已成为植物病毒检测的主要手段.本文总结了高通量测序技术的发展及其在植物病毒检测中的应用案例,旨在为植物病毒病防治提供依据.

## 1 高通量测序技术的发展

DNA 测序技术经历了里程碑式进展,包括以 Sanger 电泳法为代表的第一代测序技术、以短读长高通量测序为代表的第二代测序技术和以长读长测序为代表的单分子实时合成测序技术<sup>[9]</sup>.

20 世纪 70 年代, Sanger 和 Coulson 开发的双脱氧终止法标志着第一代测序技术的问世.双脱氧终止法因避免使用有毒化学物质和放射性同位素,成为其后 30 年里的主流 DNA 测序方法,并通过该方法获得了第一个人类基因组序列<sup>[10]</sup>.

第二代测序技术相比一代测序技术有质的飞跃,包括杂交测序和合成测序.杂交测序依赖特定探针序列来检测目标序列,例如鉴定特定基因序列中与疾病相关的单核苷酸多态性或鉴定总体染色体异

常<sup>[11]</sup>;合成测序如 Roche 公司 454 焦磷酸测序技术和美国 Illumina 公司 Solexa 测序技术.二代测序常用 Illumina 平台的 MiniSeq, MiSeq, NextSeq, NovaSeq 和 HiSeq 等测序仪,其中 HiSeqX 效率较高,每年可生产 1 800 个 30 倍覆盖度的人类基因组<sup>[12]</sup>. Illumina 测序平台具有快速、灵敏和成本低等优势,是目前植物病毒检测的主要测序平台. Wang 等<sup>[13]</sup>应用 Illumina 技术检测 25 个笋瓜 (*Cucurbita maxima*) 样品,经序列分析发现 24 种植物病毒,通过 RT-PCR 发现存在西葫芦黄花叶病毒 (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)、西瓜花叶病毒 (watermelon mosaic virus, WMV) 和黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 混合侵染现象.

第三代测序技术的代表有太平洋生物科学公司 (Pacific Biosciences, PacBio) 的单分子实时测序和牛津纳米孔技术公司 (Oxford Nanopore Technologies, ONT) 的单分子纳米孔测序. PacBio 测序基于边合成边测序的原理,设备实时捕获并记录荧光信号,转化为单碱基信息,获得具有单碱基分辨率的高精度序列<sup>[14]</sup>; PacBio 使用的是光信号,可通过多次测序来提高准确度,但酶的活性决定了测序长度不会特别长<sup>[15]</sup>. ONT 测序基于电信号,挑战是电信号的持续稳定性,且对于一条 DNA 分子最多测序两次,无法像 PacBio 测序一样对同一条链进行多次测序,因此相对前者 ONT 测序准确度低.这两种方法都可以捕获 DNA 甲基化修饰<sup>[16]</sup>、直接测序 RNA<sup>[17]</sup>, ONT 测序理论上也可以测序蛋白质,但蛋白的氨基酸类型多、形成多肽后构象复杂并且蛋白的修饰多,因此目前还没有重大突破<sup>[18]</sup>. 2018 年, Bronzato 等<sup>[19]</sup>首次报道了使用 Oxford MinION 测序仪检测植物和昆虫样品中的植物病原体.由于第三代测序技术对样品核酸质量要求高,测序的错误率和成本远高于第二代测序,加之病毒基因组远小于动植物基因组,所以目前病毒基因组的测序工作主要采用第二代测序技术.

## 2 利用高通量测序技术检测植物病毒的流程

### 2.1 病毒鉴定方法

植物病毒的遗传保守性使某些病毒物种相对稳定,而变异性使得一些病毒物种高度进化.植物病毒基因组中核苷酸突变、基因重组、基因重排等导致的新分离物或新病毒种类,又引起毒力、寄主、传播方式等特性的变化,从而造成新的植物病毒病害流行<sup>[20]</sup>.目前针对植物病毒病害防治还缺乏有效药剂,因此病害早期的检测和鉴定尤其重要,HTS 技术已被证明是植物病毒检测和鉴定的有效方法,该技术不需要预知病原物的染病特征、靶向扩增序列及病原基因组序列,短时间内以低成本测定样品基因组或转录组,获得细菌、真菌、病毒、寄生虫等的病原特征. Wang 等<sup>[21]</sup>利用 HTS 技术发现一种新的侵染烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 的重组芸薹黄化病毒 (brassica yellows virus, BrYV) 分离物,命名为 BrYV-NtabQJ.

HTS 技术分为全基因组测序、宏基因组测序、转录组测序和小 RNA 测序,基于病毒序列的生物信息学分析,可将病毒鉴定到种甚至株系. 2017 年, ICTV 已允许根据基因组序列证据鉴定新病毒<sup>[3]</sup>,根据基因组测序方法鉴定出的病毒种类,已远超过传统方法鉴定的病毒数量. ICTV 于 2019 年 2 月启用域、亚域、界、亚界、门、亚门、纲、亚纲、目、亚目、科、亚科、属、亚属和种的 15 个分类阶元,其中域、界、门、纲、目、科、属、种为主要等级,其余为衍生等级<sup>[22]</sup>.同时公布了不同分类阶元病毒的界定标准 (<https://talk.ictvonline.org/>),以病毒全基因组核苷酸序列的同源性为依据,进行病毒株系或种的划分已成为分类的一个常规手段.在 Potyviridae 中,属的界定标准是完整开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的核苷酸同源序列小于 46%,种的界定标准为完整 ORF 核苷酸同源序列小于 76% 或氨基酸同源序列小于 82%,单个蛋白编码区域从第一蛋白 (the first protein, P1) 编码区域的 58% 到其他区域的 74%~78%,对于外壳蛋白 (coat protein, CP) 基因,最优的物种划分标准是 76%~77% 的核苷酸和 80% 的氨基酸同源性<sup>[23]</sup>;同科不同属的物种界定标准不同,在 Geminiviridae 中 Begomovirus 的物种界定标准是全基因组核苷酸同源序列小于 91%<sup>[24]</sup>,而 Mastrevirus 属的物种界定标准是全基因组核苷酸同源序列小于 78%.周俊<sup>[25]</sup>根据 Betaflexiviridae 下 Trichovirus 的物种划分标准,即相关蛋白或 CP 之间核苷酸同源序列低于 72%、氨基酸同源序列低于 80%<sup>[26]</sup>,将分离物 RP19-1, RP19-2, Ta Tao 5 与苹果褪绿叶斑病毒 (apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV) 的核苷酸、氨基酸序列比对,进行系统发育分析,鉴定了桃褪绿叶斑病毒 (peach chlorotic leaf spot virus, PCLSV) 为 Trichovirus 的新种.目前 ICTV 可以仅根据序列信息对病毒进行分类,在缺乏

表型数据的情况下,可以从病毒编码序列数据中推断出基因组结构、同源基因的存在以及可能的寄主范围等病毒特征,用来鉴定病毒。

## 2.2 病毒检测流程

应用 HTS 技术检测植物病毒的流程包括:样品制备、文库构建、平台测序、数据分析和结果验证<sup>[27]</sup>。首先,测序样品有总 RNA、总 DNA、双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)、病毒粒子相关核酸(virion-associated nucleic acids, VANA)、小 RNA(small RNA, sRNA)等<sup>[28]</sup>。提取总 RNA 和 VANA 可检测到 ssRNA、dsRNA、ssDNA、dsDNA 等核酸类型的病毒;提取总 DNA 可检测到 ssDNA 和 dsDNA 核酸类型的病毒;dsRNA 测序能获得病毒的特异序列<sup>[29]</sup>;sRNA 测序可同时检测 DNA、RNA 病毒和内源性病毒元件(endogenous viral elements, EVEs),病毒来源的 sRNA 在序列上是重叠的,可组装 sRNA 获得病毒基因组。常提取总 RNA 作为测序模板,使用聚腺苷化 RNA 转录本去除核糖体 RNA,可获得更高的覆盖率<sup>[30]</sup>。其次,文库构建包括核酸片段化, RNA 反转录,添加接头、引物和样品序列标签,PCR 富集和文库质检<sup>[31]</sup>。再次,应选择合适的测序平台。Illumina 测序平台优势有高通量、低成本;Ion Torrent 平台适用于微量 DNA 测序,可能有同聚物区域测序错误;PacBio 平台优势是长读长、覆盖均匀,但成本高;Nanopore 平台优势是超长读长,缺点是错误率高<sup>[32]</sup>(表 1)。Illumina 测序平台在高通量测序检测植物病毒方面得到广泛应用。Illumina 测序仪采用边合成边测序的方法,主要流程有:① 文库构建;② 桥式扩增成簇反应;③ 边合成边测序过程:将不同荧光标记的 dNTP、聚合酶、引物等加入到测序通道中,伴随碱基加入会激发荧光,由光学采集系统记录荧光,直到合成全部双链 DNA<sup>[33-35]</sup>。生物信息学分析则基于 Illumina 测序平台<sup>[36]</sup>获得原始数据,用 Geneious<sup>[33]</sup>软件去除寄主基因组序列,如线粒体、叶绿体和核糖体 RNA 序列等,筛除不能比对到病毒参考基因组(非目标大类基因组)序列,获得干净读长<sup>[37]</sup>;采用装配工具从头组装,用 NCBI-BLASTn 搜索同源病毒核酸序列,参考 NCBI 序列来组装病毒基因组;BLASTx 搜索同源蛋白序列,采用 Find ORF 工具鉴定开放阅读框,在 BLASTp 中鉴定同源序列和保守区域,序列比对采用 ClustalW<sup>[38]</sup>,基于 MEGA v. 7. 0. 26<sup>[39]</sup>构建系统发育树,揭示病毒亲缘关系。最后,结合测序结果和参考病毒序列设计病毒的特异引物,开展 RT-PCR 扩增,检测病毒种类。如能扩增到特异条带,说明样品染毒,对阳性条带克隆测序,通过 NCBI-BLASTn 搜索鉴定病毒。刘雪建<sup>[40]</sup>使用此方法鉴定了采自浙江省和江西省蔬菜样品中的辣椒斑驳病毒(pepper mottle virus, PepMoV)、辣椒隐症病毒(pepper cryptic virus, PCV)、大豆褪绿斑驳病毒(soybean chlorotic mottle virus, SoyCMV)等 6 种病毒。

表 1 第二代和第三代测序技术对比<sup>[32]</sup>

列项	Illumina	Ion Torrent	PacBio	Nanopore
主要测序平台	MiniSeq, MiSeq, Next-Seq, NovaSeq, HiSeq	Ion S5, Ion Proton, Ion PGM	Sequel, RSII	MinION, GridION, PromethION
Reads 长度	HiSeq: 100~150 bp MiSeq: 400~500 bp	Ion S5: 200~600 bp Ion Proton: 200 bp Ion PGM: 200~500 bp	平均 2 000~5 000 bp	高达 900 kbp
测序时间	1~6 d	2~4 h	0.5~4 h	1 min~72 h
输出量	500~1 000 GB	高达 10 GB	0.1~1 GB	15 GB~8.6 TB
测序错误率	低	较 Illumina 测序要高	较 Illumina 测序要高	较 Illumina 测序要高
测序成本	低	低	偏高	偏高
优点	高通量, 测序低成本	5~10 ng DNA 可进行测序	长读长, 一致性序列准确, 均匀覆盖	超长读长, 可直接测序, 低能耗
缺点	依赖 PCR, 短读长	遇到同聚物区域时, 可能会出现测序错误	与第二代测序相比, 通量低、错误率高、成本高	利用电流变化来确定核苷酸序列的错误率高

### 3 高通量测序技术在植物病毒检测中的应用

迄今已知的植物病毒种类超过 1 000 种<sup>[2]</sup>,一种病毒可侵染多种植物,而同种植物又可被多种病毒侵染.采用 HTS 技术,在蔬菜、粮食、水果等作物中均检测到多种病毒<sup>[41]</sup>,研究案例总结如下.

#### 3.1 蔬菜作物中植物病毒的检测

我国广泛种植豆科、十字花科、茄科和葫芦科等常见蔬菜,病毒病已经成为危害我国蔬菜生产的第一类病害<sup>[42]</sup>.严重危害蔬菜作物病毒主要有:烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)、CMV、马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)、马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX)、花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus, CaMV)等<sup>[42]</sup>.TMV 可侵染茄科、十字花科等 30 多科 300 多种植物<sup>[43]</sup>;TSWV 的染病特征是成熟果实上有亮黄色环纹或古铜色斑点<sup>[44]</sup>;马铃薯 Y 病毒侵染后可引起马铃薯植株叶脉坏死、叶面黄化褪绿、块茎环斑坏死等症状,复合侵染危害较大<sup>[45]</sup>.

Wei 等<sup>[46]</sup>采集了 11 个大豆(*Glycine max*)样本,提取总 RNA 进行 Illumina 测序,鉴定 3 个样品存在豇豆轻度斑驳病毒(cowpea mild mottle virus, CPMMV)单独侵染,8 个样品存在 CPMMV 和大豆花叶病毒(Soybean mosaic virus, SMV)复合侵染.Tang 等<sup>[47]</sup>首次报道了感染小白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*)的一种新病毒,并将其命名为 *brassica campestris chinensis cryptic virus 1* (BCCV1),通过对 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)和 CP 进行同源性分析和系统发育分析,确定 BCCV1 为 *Partitiviridae* 下 *Deltapartivirus* 新成员.Beris 等<sup>[48]</sup>采用 Illumina 测序技术,首次报道侵染茄子(*Solanum melongena*)的茄斑驳皱纹病毒(eggplant mottled crinkle virus, EMCV).Pecman 等<sup>[49]</sup>采用 Illumina 测序技术测序样品小 RNA,发现一种番茄新病毒——天仙子花叶病毒(chenbane mosaic virus, HMV).HTS 技术可以快速鉴定样品中存在的病毒,结合分子生物学实验技术可以验证病毒的致病性和样品是否存在多种病毒复合侵染;结合生物信息学数据确定病毒的同源性和系统进化关系,为新病毒鉴定提供证据,对明确研究病毒的生物学特征和确定其分类地位具有十分重要的作用.

#### 3.2 粮食作物中植物病毒的检测

由于昆虫群体等传毒介体的作用,以及作物品种抗病性较低,使得我国粮食作物如水稻、玉米等的多种病毒病危害严重,发生面积扩大及危害程度迅速上升.通过 HTS 技术对病毒来源 sRNA 测序,是检测作物病毒的重要方法.

当病毒入侵寄主细胞后, RNA 病毒的基因组复制中间物或 DNA 病毒的 mRNA 转录产物间会形成双链 dsRNA 中间体,这些病毒的 dsRNA 会被细胞内核酸内切酶 Dicer 识别并产生大量病毒来源长度为 21~24 nt 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)<sup>[50]</sup>.Kreuze 等<sup>[51]</sup>提出通过深度测序获得 sRNA 序列,用来鉴定新病毒.Xu 等<sup>[52]</sup>通过 sRNA 测序和生物信息学方法,分析 SRBSDV 的 siRNA 序列,证实了 SRBSDV 可以调控水稻 RNA 沉默通路相关基因的表达,使寄主染病.我国玉米的主要侵染病毒有:水稻黑条矮缩病毒(rice black-streaked dwarf virus, RBSDV)、甘蔗花叶病毒(sugarcane mosaic virus, SCMV)、玉米褪绿斑驳病毒(maize chlorotic mottle virus, MCMV)等 12 种病毒<sup>[53]</sup>.陈莎<sup>[54]</sup>采用 sRNA 深度测序技术,鉴定了云南省和贵州省玉米病毒病的病原种类,通过重叠群拼接和比对共筛选了 7 种病毒,其中 3 种新病毒是玉米黄化花叶病毒(maize yellowing mosaic virus, MYMV)、玉米相关的形影病毒(maize-associated umbravirus, MAUV)以及玉米相关的整体病毒 1(maize-associated totivirus 1, MATV1).利用 sRNA 测序可同时检测 RNA 病毒、DNA 病毒和类病毒,是一种高通量检测病毒的方法.在植物未出现明显症状的感染早期,小 RNA 的高通量测序可对病毒进行快速准确的检测,为后续的病毒病防治争取时间.

#### 3.3 果树中植物病毒的检测

高通量测序技术已在柑橘<sup>[55]</sup>、苹果和梨<sup>[56]</sup>等果树上应用.果树被病毒侵染之后树体周身带毒且终生受害,建立高灵敏度的病毒检测技术对果树病毒病预警和预防有重要意义.

Matsumura 等<sup>[57]</sup>使用 Illumina 平台对柑橘突然死亡和无症状植物的转录组和小 RNA 测序分析,发现柑橘衰退病毒(citrus tristeza virus, CTV)是引起柑橘突然死亡的主要病毒,其次还有柑橘突然死亡相关病毒(citrus sudden death-associated virus, CSDaV)以及柑橘内源性逆转录病毒(citrus endogenous pararetrovirus, CitPRV),还发现 citrus jingmen-like virus(CJLV)和 citrus virga-like virus(CVLV)两种新病毒. 根据侵染特点,引起苹果病毒病的病毒可分为非潜隐性病毒和潜隐性病毒两大类,非潜隐性病毒在苹果上的症状易于识别,特征明显,潜隐性病毒对苹果生长结实无明显影响,但易引起果实个小晚熟,产量品质下降. Lim 等<sup>[58]</sup>通过 Illumina 测序技术检测到了非潜隐病毒苹果绿皱相关病毒(apple green crinkle associated virus, AGCaV),以及苹果茎痘病毒(apple stem pitting virus, ASPV)、苹果茎沟病毒(apple stem grooving virus, ASGV)两种潜隐病毒,并首次发现 apple hammerhead viroid(AHVd)病毒感染苹果树. 杨洁萍等<sup>[59]</sup>利用 Illumina 测序技术检测出梨树已知病毒 ASPV、ASGV 和 ACLSV,以及梨树中新发现的 BrYV; Read 等<sup>[60]</sup>通过 Illumina 测序和生物信息学分析,发现了葡萄柚病毒分离物,为单基因水平的重组事件和种群精确定位提供证据. 因此,高通量测序技术也为病毒遗传变异研究提供证据<sup>[61]</sup>.

高通量测序技术鉴定植物病毒的核心工作是测序数据分析,公共数据库中大量的病毒基因组序列是病毒检测的关键,构建完善的病毒基因组序列资源库,对于精准防控植物病毒或类病毒是十分迫切的需求.

## 4 高通量测序技术优势与缺陷

高通量测序技术的优点有:① 灵敏性高,快速,高通量. 可以在一天内得到全部病毒样品的序列信息,能够快速诊断某些暴发性病害及疑难杂症的病原,为病害防治提供依据;② 通过公共数据库资源比对来鉴定新病毒,通过重叠 siRNA 方法也能鉴定新病毒,如葡萄藤新类病毒的发现<sup>[62]</sup>;③ 检测不同类型核酸,提高病毒检测的广泛性<sup>[63]</sup>,例如提取总 RNA 可检测到 ssRNA, dsRNA, ssDNA, dsDNA 等核酸病毒,在实际应用中根据需求构建不同的测序文库;④ 可同时检测来自于不同地区不同寄主中的病毒,为研究病毒变异和进化研究提供线索;⑤ 可鉴定无明显症状的潜隐性病毒,例如 Darko 等<sup>[64]</sup>首次报道马其顿共和国北部地区柿子潜隐病毒(persimmon cryptic virus, PeCV),丰富了病毒公共数据库资源.

目前,利用 HTS 技术检测病毒的主要困难有:① 难以获取高质量病毒核酸库,需要构建小 RNA 文库来富集病毒序列,提高测序灵敏度;② 某些病毒基因组含量极低,不易获得,使用 Trizol 法提取植物总 RNA 制备测序文库、制备小 RNA 文库和去除核糖体 RNA 建库来降低寄主基因组含量;③ 难以获得低丰度病毒的完整基因组序列,一方面读长拼接时会产生缺口,需要借助常规 PCR 补平,另一方面病毒 5' 或 3' 端序列缺失,需要根据已知病毒序列设计特异性引物,用 RACE 扩增和 Sanger 测序补平;④ 目前被列入检疫名录实施管理的致病病原种类有限,需要将病株接种到健康植物上验证是否致病,加强对新病毒和类病毒的管理;⑤ 研究者的知识积累与辨别能力,影响病毒鉴定结果的准确性与可靠性,HTS 技术检测植物病毒产生大量的遗传信息数据,而测序结果的组装、比对等是鉴定病毒的关键,科研工作者应该积累遗传学、生物信息学等基础知识和掌握先进技能,以提高检测结果的准确性.

病毒病导致作物品质下降,减产甚至绝收,制约了蔬菜、粮食、水果等产业发展. 然而目前对病毒病种类、分布、危害等缺乏系统研究,对某些病毒及新病毒防治甚至缺乏研究,另外病毒变异速度快,增加了病毒病防治的研究难度. 高通量测序技术可一次性鉴定出样品携带的多个病毒,快速实现植物样品中所有转录组的具体分析,为植物病毒普查和防治提供一定的理论依据.

## 参考文献:

- [1] 王端,叶健. 植物病毒资源属性和应用基础研究进展 [J]. 生物资源, 2020, 42(1): 1-8.
- [2] 原雪峰,于成明. 国际病毒分类委员会(ICTV)2017 分类系统与第九次分类报告的比较及数据分析 [J]. 植物病理学报, 2019, 49(2): 145-150.

- [3] SIMMONDS P, ADAMS M J, BENKÖ M, et al. Consensus Statement: Virus Taxonomy in the Age of Metagenomics [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(3): 161-168.
- [4] 中华人民共和国农业农村部. 一类农作物病虫害名录: 07B100271202000559 [S/OL]. [2020-09-15]. [http://www.moa.gov.cn/nybg/2020/202010/202011/t20201130\\_6357326.htm](http://www.moa.gov.cn/nybg/2020/202010/202011/t20201130_6357326.htm).
- [5] 薛超. 植物病毒检测技术研究进展分析 [J]. *农业与技术*, 2020, 40(16): 48-50.
- [6] RICHERT-PÖGGELER K R, FRANZKE K, HIPPE K, et al. Electron Microscopy Methods for Virus Diagnosis and High Resolution Analysis of Viruses [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9: 3255.
- [7] RWAHNIH M A, DAUBERT S, GOLINO D, et al. Deep Sequencing Analysis of RNAs from a Grapevine Showing Syrah Decline Symptoms Reveals a Multiple Virus Infection that Includes a Novel Virus [J]. *Virology*, 2009, 387(2): 395-401.
- [8] HADIDI A, FLORES R, CANDRESSE T, et al. Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1325.
- [9] SHENDURE J, BALASUBRAMANIAN S, CHURCH G M, et al. DNA Sequencing at 40: Past, Present and Future [J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 345-353.
- [10] CONSORTIUM I H G S. Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome [J]. *Nature*, 2004, 431(7011): 931-945.
- [11] SLATKO B E, GARDNER A F, AUSUBEL F M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies [J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2018, 122(1): e59.
- [12] GOODWIN S, MCPHERSON J D, MCCOMBIE W R. Coming of Age: Ten Years of Next-Generation Sequencing Technologies [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17(6): 333-351.
- [13] WANG Y, ZHU P, ZHOU Q, et al. Detection of Disease in *Cucurbita maxima* Duch. Ex Lam. Caused by a Mixed Infection of Zucchini Yellow Mosaic Virus, Watermelon Mosaic Virus, and Cucumber Mosaic Virus in Southeast China Using a Novel Small RNA Sequencing Method [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7930.
- [14] 张子敬, 刘燕蓉, 张顺进, 等. 第三代测序技术的方法原理及其在生物领域的应用 [J]. *中国畜牧杂志*, 2020, 56(6): 11-15.
- [15] WENGER A M, PELUSO P, ROWELL W J, et al. Accurate Circular Consensus Long-Read Sequencing Improves Variant Detection and Assembly of a Human Genome [J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(10): 1155-1162.
- [16] JAIN M, KOREN S, MIGA K H, et al. Nanopore Sequencing and Assembly of a Human Genome with Ultra-Long Reads [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(4): 338-345.
- [17] SMITH A M, JAIN M, MULRONEY L, et al. Reading Canonical and Modified Nucleobases in 16S Ribosomal RNA Using Nanopore Native RNA Sequencing [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216709.
- [18] HU Z L, HUO M Z, YING Y L, et al. Biological Nanopore Approach for Single-Molecule Protein Sequencing [J]. *Angewandte Chemie*, 2021, 133(27): 14862-14873.
- [19] BRONZATO BADIAL A, SHERMAN D, STONE A, et al. Nanopore Sequencing as a Surveillance Tool for Plant Pathogens in Plant and Insect Tissues [J]. *Plant Disease*, 2018, 102(8): 1648-1652.
- [20] 隋雪莲. 美国三种新兴蔬菜病毒病特性研究及其检测方法的建立 [D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [21] WANG Q, XU F Z, AN L L, et al. Molecular Characterization of a New Recombinant Brassica Yellow Virus Infecting Tobacco in China [J]. *Virus Genes*, 2019, 55(2): 253-256.
- [22] 洪健, 谢礼, 张仲凯, 等. ICTV 最新十五级分类阶元病毒分类系统中的植物病毒 [J]. *植物病理学报*, 2021, 51(2): 143-162.
- [23] ADAMS M J, ANTONIW J F, FAUQUET C M. Molecular Criteria for Genus and Species Discrimination within the Family Potyviridae [J]. *Archives of Virology*, 2005, 150(3): 459-479.
- [24] BROWN J K, ZERBINI F M, NAVAS-CASTILLO J, et al. Revision of *Begomovirus* Taxonomy Based on Pairwise Sequence Comparisons [J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(6): 1593-1619.

- [25] 周俊. 桃及其野生近缘种中病毒组研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [26] KING A M Q, ADAMS M J, CARSTENS E B, et al. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. London: Elsevier Academic Press, 2012.
- [27] MINICKA J, ZARZYŃSKA-NOWAK A, BUDZYŃSKA D, et al. High-Throughput Sequencing Facilitates Discovery of New Plant Viruses in Poland [J]. Plants (Basel, Switzerland), 2020, 9(7): 820.
- [28] 马宇欣, 李世访. 高通量测序技术在鉴定木本植物双生病毒中的应用 [J]. 植物保护, 2016, 42(6): 1-10, 50.
- [29] 战斌慧, 周雪平. 高通量测序技术在植物及昆虫病毒检测中的应用 [J]. 植物保护, 2018, 44(5): 120-126, 167.
- [30] GAAFAR Y Z A, RICHERT-PÖGGELER K R, МААВ С, et al. Characterisation of a Novel Nucleorhabdovirus Infecting Alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Virology Journal, 2019, 16(1): 55.
- [31] PODNAR J, DEIDERICK H, HUERTA G, et al. Next-Generation Sequencing RNA-Seq Library Construction [J]. Current Protocols in Molecular Biology, 2014, 106: 4-21.
- [32] LO Y T, SHAW P C. Application of Next-Generation Sequencing for the Identification of Herbal Products [J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(8): 107450.
- [33] 陈科. 二代测序平台进行核酸检测的新技术研究 [D]. 上海: 东华大学, 2018.
- [34] 王文静. 高通量测序技术在中草药研究中的应用 [D]. 长沙: 湖南大学, 2019.
- [35] 韩九强, 吴思佳, 刘瑞玲, 等. 第二代基因测序仪的硬件设计 [J]. 生命科学仪器, 2017, 15(1): 43-45, 42.
- [36] IBABA J D, GUBBA A. High-Throughput Sequencing Application in the Diagnosis and Discovery of Plant-Infecting Viruses in Africa, a Decade Later [J]. Plants (Basel, Switzerland), 2020, 9(10): 1376.
- [37] BEJERMAN N, ROUMAGNAC P, NEMCHINOV L G. High-Throughput Sequencing for Deciphering the Virome of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 553109.
- [38] SELVA PANDIYAN A, SIVA GANESA KARTHIKEYAN R, RAMESHKUMAR G, et al. Identification of Bacterial and Fungal Pathogens by rDNA Gene Barcoding in Vitreous Fluids of Endophthalmitis Patients [J]. Seminars in Ophthalmology, 2020, 35(7/8): 358-364.
- [39] GAAFAR Y Z A, RICHERT-PÖGGELER K R, SIEG-MÜLLER A, et al. Caraway Yellows Virus, a Novel Nepovirus from *Carum Carvi* [J]. Virology Journal, 2019, 16(1): 70.
- [40] 刘雪建. 浙江省和江西省蔬菜病毒鉴定与变异研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [41] VILLAMOR D E V, HO T, AL RWAHNIH M, et al. High Throughput Sequencing for Plant Virus Detection and Discovery [J]. Phytopathology, 2019, 109(5): 716-725.
- [42] 张治军, 陈奇章, 李雪生, 等. 昆虫内共生菌沃尔巴克氏体抗病毒研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43(3): 576-583.
- [43] 裴凡. 侵染广东辣椒的病毒种类鉴定及病毒病药剂防控效果评价 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [44] 董莉, 欧勇, 孟庆林. 番茄斑萎病毒病的发生与防治 [J]. 园艺与种苗, 2020, 40(7): 12-13.
- [45] 范国权, 高艳玲, 张威, 等. 马铃薯主要病毒侵染不同品种症状及对产量的影响 [J]. 中国马铃薯, 2019, 33(1): 34-42.
- [46] WEI Z Y, MAO C Y, JIANG C, et al. Identification of a New Genetic Clade of Cowpea Mild Mottle Virus and Characterization of Its Interaction with Soybean Mosaic Virus in Co-Infected Soybean [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 650773.
- [47] TANG L G, SONG L P, LIN C F, et al. Complete Nucleotide Sequence of a Novel Partitivirus from *Brassica campestris* L. SSP. *Chinensis* [J]. Archives of Virology, 2021, 166(6): 1775-1778.
- [48] BERIS D, MALANDRAKI I, KEKTSIDOU O, et al. First Report of Eggplant Mottled Crinkle Virus Infecting Eggplant in Greece [J]. Plant Disease, 2021, 2: 3-21.
- [49] PECMAN A, KUTNJAK D, MEHLE N, et al. High-Throughput Sequencing Facilitates Characterization of a “Forgotten” Plant Virus: The Case of a Henbane Mosaic Virus Infecting Tomato [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2739.

- [50] 王芳,高正良,周本国,等. 利用小RNA高通量测序技术检测玉米病毒[J]. 植物病理学报, 2017, 47(3): 422-427.
- [51] 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): 1-7.
- [52] XU D L, ZHOU G H. Characteristics of siRNAs Derived from Southern Rice Black-Streaked Dwarf Virus in Infected Rice and Their Potential Role in Host Gene Regulation [J]. Virology Journal, 2017, 14(1): 27.
- [53] 张超,战斌慧,周雪平. 我国玉米病毒病分布及危害 [J]. 植物保护, 2017, 43(1): 1-8.
- [54] 陈莎. 深度测序鉴定玉米病毒及感病玉米组织中小RNA分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [55] JARUGULA S, CHINGANDU N, ADIPUTRA J, et al. First Report of Grapevine Red Globe Virus in Grapevines in Washington State [J]. Plant Disease, 2021, 105(3): 7-17. .
- [56] JO Y, CHOI H, KIM S M, et al. Integrated Analyses Using RNA-Seq Data Reveal Viral Genomes, Single Nucleotide Variations, the Phylogenetic Relationship, and Recombination for Apple Stem Grooving Virus [J]. BMC Genomics, 2016, 17: 579.
- [57] MATSUMURA E E, COLETTA-FILHO H D, NOURI S, et al. Deep Sequencing Analysis of RNAs from Citrus Plants Grown in a Citrus Sudden Death-Affected Area Reveals Diverse Known and Putative Novel Viruses [J]. Viruses, 2017, 9(4): 92.
- [58] LIM S, MOON J S, CHO I S, et al. First Report of Apple Hammerhead Viroid Infecting Apple Trees in South Korea [J]. Plant Disease, 2019, 103(10): 2700.
- [59] 杨洁萍,周丽,马丽,等. 基于高通量测序的技术检测梨树病毒 [J]. 新疆农业科学, 2020, 57(8): 1503-1513.
- [60] READ D A, PIETERSEN G. Diversity of Citrus *Tristeza* Virus Populations in Commercial Grapefruit Orchards in Southern Africa, Determined Using Illumina MiSeq Technology [J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 148(2): 379-391.
- [61] MALIOGKA V I, MINAFRA A, SALDARELLI P, et al. Recent Advances on Detection and Characterization of Fruit Tree Viruses Using High-Throughput Sequencing Technologies [J]. Viruses, 2018, 10(8): 436.
- [62] WU Q F, WANG Y, CAO M J, et al. Homology-Independent Discovery of Replicating Pathogenic Circular RNAs by Deep Sequencing and a New Computational Algorithm [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(10): 3938-3943.
- [63] ROOSSINCK M J. Deep Sequencing for Discovery and Evolutionary Analysis of Plant Viruses [J]. Virus Research, 2017, 239: 82-86.
- [64] DARKO J, SVETLANA A P. First Report of Persimmon Cryptic Virus in Persimmon in North Macedonia [J]. Journal of Plant Pathology, 2019, 101(4): 1285.