

## 安徽和县地区辣椒病株辣椒轻斑驳病毒的鉴定

严丹侃<sup>1</sup>, 郑红英<sup>2</sup>, 张海珊<sup>1</sup>, 沈艳<sup>1</sup>, 顾江涛<sup>1</sup>, 刘勇<sup>3</sup>, 章东方<sup>1\*</sup>, 燕飞<sup>2\*</sup> (1.安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 安徽合肥 230031; 2.浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所, 浙江杭州 310021; 3.湖南省植物保护研究所, 湖南长沙 410125)

**摘要** [目的]鉴定安徽和县地区辣椒病株辣椒轻斑驳病毒(pepper mild mottle virus, PMMoV) (PMMoV-AH)。[方法]采用胶体金免疫层析试纸条和 RT-PCR 检测和县辣椒病样辣椒轻斑驳病毒, 并将其外壳蛋白基因序列与已报道的国内外 12 个 PMMoV 分离物进行同源性分析。[结果]PMMoV-AH 与已报道的 12 个分离物核苷酸同源性介于 94.5%~100.0%, 氨基酸同源性介于 96.8%~100.0%。基于外壳蛋白基因序列进行系统发育分析发现, PMMoV-AH 与亚洲分离物亲缘关系密切, 与其他区域分离物亲缘关系较远。[结论]PMMoV 危害性强, 对于其在安徽地区的发生和防治还需进一步研究。

**关键词** 辣椒轻斑驳病毒; 外壳基因; 和县

**中图分类号** S436.418.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)32-0082-03

## Identification of Pepper Mild Mottle Virus in Hexian, Anhui Province

YAN Dan-kan<sup>1</sup>, ZHENG Hong-ying<sup>2</sup>, ZHANG Hai-shan<sup>1</sup> et al (1. Institute of Plant Protection and Agro-Products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Heifei, Anhui 230031; 2. Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021)

**Abstract** [Objective] To identify the pepper mild mottle virus in Hexian, Anhui Province. [Method] The PMMoV-AH was identified in the sample of diseased fruits of pepper which collected in Hexian by using immunochromatography colloidal gold strip and RT-PCR method. The pair of universal primers was used to amplify the coat protein gene sequence of PMMoV-AH. [Result] Sequence analysis and phylogenetic analysis showed that PMMoV-AH was closely related to 12 PMMoV isolates reported in China and abroad with nucleotide sequence identity between 94.5%~100.0% and amino acid sequence identity between 96.8%~100.0%. Phylogenetic tree showed that PMMoV-AH was closely related to Asian isolates but not with other isolates. [Conclusion] Due to the significant losses caused by PMMoV, further research is required to control and prevent the prevailing of the disease caused by PMMoV in Anhui Province.

**Key words** Pepper mild mottle virus; Coat protein gene; Hexian

辣椒病毒病是辣椒生产中的重要病害, 目前已发现近 40 种病毒可以感染辣椒<sup>[1-2]</sup>, 包括烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)、马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)、蚕豆萎蔫病毒(broad bean wilt virus, BBWV)和辣椒轻斑驳病毒(pepper mild mottle virus, PMMoV)等。安徽省和县是全国著名的蔬菜生产基地, 截至 2016 年底, 该县种植蔬菜面积 2.87 万 hm<sup>2</sup>, 年产蔬菜 110 万 t。和县蔬菜生产以秋延辣椒生产闻名, 常年种植面积 0.67 万 hm<sup>2</sup> 以上, 鲜产红辣椒 20 多万 t, 是全国绿色食品原料(辣椒)标准化生产基地, “和县辣椒”品牌获得地理标志商标。近年来, 和县辣椒生产上辣椒病毒病危害加重, 特别是当地主栽辣椒品种“好农 11”发病严重。染病辣椒叶片症状较轻, 而果实症状明显, 呈现斑驳、凹陷和坏死等病毒病症状, 后期辣椒果实外观和内在品质均显著变差, 严重影响当地辣椒生产。为明确该病毒病种类, 笔者采用血清学和 RT-PCR 等方法对该病毒进行了鉴定, 并对其所感染病毒的系统发育关系进行了分析, 从而为和县辣椒病毒病防治提供理论基础。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 2016 年 10 月—2017 年 4 月在安徽省和县温室

大棚采集辣椒样本(PMMoV-AH), 采集样本为具有明显扭曲或斑驳等症的辣椒病果, 将其保存于 -70 °C 冰箱中备用。

供试 PMMoV 胶体金免疫层析试纸条购自美国 Agdia 公司; 植物总 RNA 提取试剂盒 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 购自 TaKaRa 公司; PCR 扩增采用的 Premix Taq<sup>TM</sup> 购自 TaKaRa 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 辣椒果实总 RNA 提取和 cDNA 合成。** 选取 2 份经 DAS-ELISA 检测为阳性的辣椒病叶, 提取病叶总 RNA, 以 2 份温室培育的健康辣椒叶片作为阴性对照, 每份样品称取 0.1 g。按照 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 说明书提取 RNA, 以 M4-T[5'-GTTTTCCAGTCACGAC(T)<sub>15</sub>-3'] 为起始引物<sup>[3]</sup>, M-MLV 逆转录酶(Toyobo 公司)合成病毒基因组 RNA 的第一链 cDNA, 具体方法参照说明书。

**1.2.2 外壳蛋白基因序列的克隆与测序。** 通用引物 Tob Uni1; 5'-ATTTAAGTGGAGGAAAACCACT-3' 和 Tob Uni2; 5'-CTYGTGATGAGTTCGTGGA-3' 用于扩增烟草花叶病毒属病毒<sup>[4]</sup>, 引物的合成由上海生工生物工程股份有限公司完成。PCR 酶采用 Premix Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa 公司), 反应体系和反应条件参照产品说明书。取 PCR 产物 5 μL 在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 然后于凝胶成像仪上观察、拍照。PCR 产物经回收后, 送至上海生工生物工程股份有限公司进行克隆测序。

## 2 结果与分析

**2.1 辣椒果实采集与胶体金免疫层析试纸条检测** 安徽和

**基金项目** 国家公益性行业(农业)科研专项(201303028); 安徽省农业科学院学科建设项目(17A1125); 安徽省蔬菜产业技术体系。

**作者简介** 严丹侃(1986—), 男, 安徽滁州人, 助理研究员, 硕士, 从事植物病毒与媒介昆虫研究。\* 通讯作者, 章东方, 研究员, 从事植物病毒与媒介昆虫研究; 燕飞, 研究员, 博士, 从事植物病毒学研究。

**收稿日期** 2017-11-28; **修回日期** 2018-05-30

县辣椒种植区辣椒果实呈现明显的斑驳症状,其中辣椒呈现青绿色时出现黄色斑块,果实在成熟时不能转变为红色,出现黄色斑块;辣椒植株和叶片症状不明显(图1)。对采集到

的辣椒病果进行 PMMoV 胶体金免疫层析试纸条检测,辣椒病果呈阳性,表明采集到的样品中携带 PMMoV,而健康的辣椒果实中未检测到 PMMoV 存在。



注:A,D 为辣椒病果;B,C,E 为健康辣椒果实

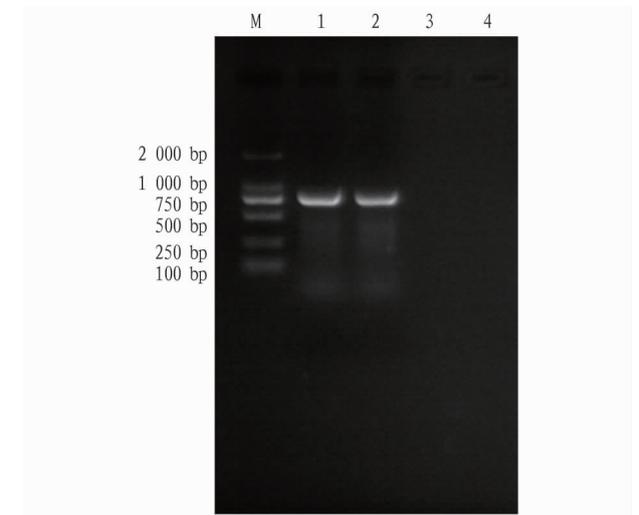
Note:A,D.Diseased fruits of pepper;B,C,E.Healthy fruits of pepper

图1 和县辣椒病毒病症状

Fig.1 Symptoms of pepper virus disease in Hexian County

**2.2 RT-PCR 检测结果** 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,2份辣椒病果样品 RNA 经通用引物扩增大小约为 750 bp 的预期目的片段,经克隆测序后比对,发现为 PMMoV 的外壳蛋白基因序列,阴性对照的健康辣椒叶片中未出现扩增条带(图2)。

**2.3 序列测定与分析** 将 PCR 产物经回收后进行克隆测序,并将所获得的序列结果提交至 GenBank(登录号为 MG437273)。从 GenBank 中获得 PMMoV 其他 12 个分离物全基因组序列,以同属的 TMV 和番茄花叶病毒(tomato mosaic virus, ToMV)为外群,根据外壳蛋白基因序列,使用 DNAs-tar 软件中的 MegAlign 进行开放阅读框及非编码区序列比对分析,结果表明(表1)PMMoV-AH 与选取的 12 个 PMMoV 分离物核苷酸序列同源性为 94.5%~100.0%;与亚洲分离物同源性均为 97.9% 以上;与中国保定和日本茨城分离物 XJ-01 同源性达 100.0%;而与欧洲的 3 个分离物 PMMoV-Is、PMMoV-I 和 PMMoV-Ia 的同源性相对较低(94.5%~94.9%);与外群 ToMV 同源性仅为 67.7%,与 TMV 同源性仅为 65.8%。氨基酸序列比对结果显示,PMMoV-AH 与 12 个 PMMoV 分离物氨基酸的序列同源性为 96.8%~100.0%;除中国贵州分离物 PMMoV-Guizhou 外,与其他亚洲分离物同源性均达 100.0%;而与欧洲分离物同源性稍低,为 96.8%~98.1%;与外群 ToMV 和 TMV 的同源性仅为 73.7%和 71.8%。



注:M.DL2000 DNA Marker; 1,2 为辣椒病果; 3,4 为健康辣椒果实

Note:M.DL2000 DNA Marker; 1,2.Pepper infected by PMMoV; 3,4.

Healthy fruits of pepper

图2 RT-PCR 检测 PMMoV

Fig.2 Detection of PMMoV by RT-PCR

**2.4 基于外壳蛋白基因序列的进化关系分析** 将 PMMoV-AH 外壳蛋白基因序列与已知的 12 个 PMMoV 分离物和外群 ToMV 和 TMV 的外壳蛋白基因序列构建系统发育进化树(图3),使用 Mega6.0 软件<sup>[5]</sup>进行系统发育树分析,采用邻位

相接聚类分析法分别构建系统发育树,用1 000次重复的自展检验评价系统发育树拓扑结构的可靠性。所有PMMoV分离物形成两大支系群体,来自亚洲(中国、日本、韩国和印度)

的分离物聚为1个分支,而来自以色列和欧洲(西班牙和意大利)的3个分离物形成另1个分支。

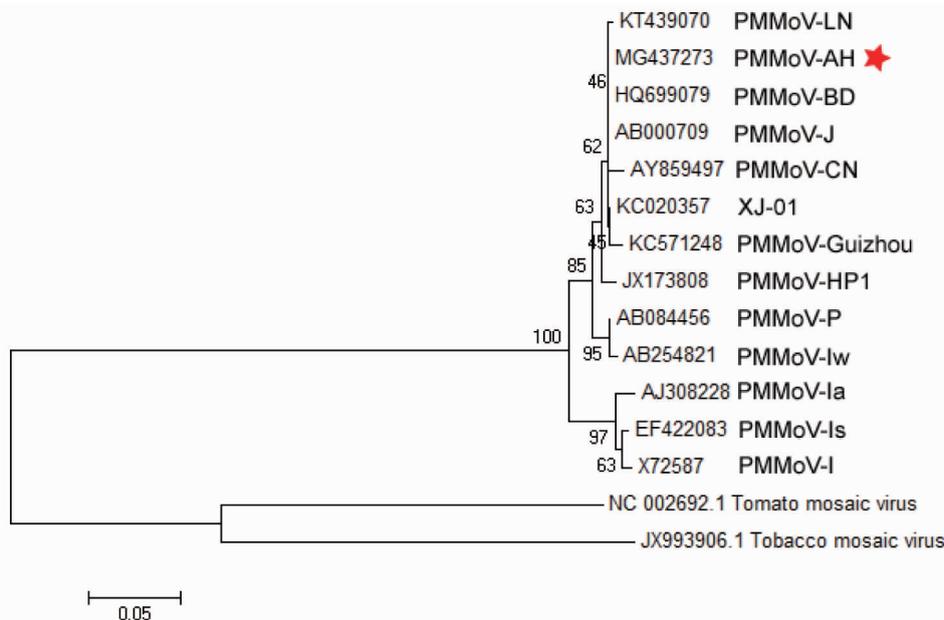


图3 基于外壳蛋白基因序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on coat protein gene sequences

### 3 讨论与结论

PMMoV 自从在新疆被首次报道以来<sup>[6]</sup>,陆续在陕西、山东、河北、北京、宁夏、贵州、台湾、甘肃、青海、辽宁和湖南等地被发现,其危害面积逐步增加。该研究通过胶体金免疫层析试纸条和 RT-PCR 检测,确定安徽和县地区辣椒上暴发的病毒为辣椒轻斑驳病毒,这是该病毒在安徽地区的首次报道。通过对 PMMoV 外壳蛋白基因序列与其他地区的分离物同源性进行比对分析,结果表明 PMMoV-AH 与已报道的 12 个其他分离物同源性较高,核苷酸同源性介于 94.5%~100.0%,氨基酸同源性介于 96.8%~100.0%。构建系统进化树发现, PMMoV-AH 与亚洲分离物亲缘关系密切。和县作为安徽省重要的蔬菜生产区,辣椒生产遭受 PMMoV 危害十分严重,主要表现为辣椒果实变小畸形、果面斑驳,影响果实的外观和品质,造成严重的经济损失。同时,该病毒在辣椒种子、加工辣椒和人类粪便中均可检出,且具有侵染性<sup>[7-8]</sup>。因此,重视 PMMoV 对辣椒生产的威胁,加强优质辣椒抗性品种的选育,建立高效简便、快捷灵敏的检测和防治方法已十分紧迫。

### 参考文献

- [1] KAZINCZI G, HORVÁTH J, GÁBORJÁNYI R. Some aspects of pepper virus research[J]. Acta phytopathologica et entomologica hungarica, 2001, 36(3/4): 329-347.
- [2] MIJATOVIC M, IVANOVIC M, OBRADOVIC A, et al. Potato virus Y (PVY) on pepper in Serbia[J]. Acta horticulturae, 2002, 579: 545-549.
- [3] CHEN J, CHEN J, ADAMS M J A. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae, and its use to examine the taxonomic status of several members of the family[J]. Archives of virology, 2001, 146(4): 757-766.
- [4] LETSCHERT B, ADAM G, LESEMANN D E, et al. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP[J]. Journal of virological methods, 2002, 106(1): 1-10.
- [5] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular biology and evolution, 2003, 30(12): 2725-2729.
- [6] 向本春, 谢浩, 崔星明, 等. 新疆辣椒轻微斑驳病毒的分离鉴定[J]. 病毒学报, 1994, 10(3): 240-245.
- [7] ZHANG T, BREITBART M, LEE W H, et al. RNA viral community in human feces: Prevalence of plant pathogenic viruses[J]. PLoS Biology, 2005, 4(1): 108-118.
- [8] PENG J J, SHI B B, ZHENG H Y, et al. Detection of pepper mild mottle virus in pepper sauce in China[J]. Archives of virology, 2015, 160(8): 2079-2080.

## 科技论文写作规范——数字

公历世纪、年代、年、月、日、时刻和各种计数和计量,均用阿拉伯数字。年份不能简写,如1990年不能写成90年,文中避免出现“去年”“今年”等写法。小于1的小数点前的零不能省略,如0.2456不能写成.2456。小数点前或后超过4位数(含4位数),从小数点向左每3位空半格,不用“,”隔开。如18 072.235 71。尾数多的数字(5位以上)和小数点后位数多的小数,宜采用 $\times 10^n$ ( $n$ 为正负整数)的写法。数字应正确地写出有效数字,任何一个数字,只允许最后一位存在误差。