

李廷芳, 吴淑华, 赵文浩, 等. 青海海东设施辣椒轻斑驳病毒的分子检测[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 958-960.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.036

## 青海海东设施辣椒轻斑驳病毒的分子检测

李廷芳<sup>1,2</sup>, 吴淑华<sup>2</sup>, 赵文浩<sup>2,3</sup>, 季英华<sup>2</sup>, 周益军<sup>2</sup>, 郭青云<sup>1,4</sup>

(1. 青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所/江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 江苏 南京 210014; 3. 南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 210095; 4. 青海省农林科学院植物保护研究所, 青海 西宁 810016)

关键词: 辣椒; 轻斑驳病毒; RT-PCR

中图分类号: S436.418

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)04-0958-03

## Molecular detection of mild mottle virus isolated from pepper in Haidong, Qinghai province

LI Ting-fang<sup>1,2</sup>, WU Shu-hua<sup>2</sup>, ZHAO Wen-hao<sup>2,3</sup>, JI Ying-hua<sup>2</sup>, ZHOU Yi-jun<sup>2</sup>, GUO Qing-yun<sup>1,4</sup>

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base, Nanjing 210014, China; 3. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 4. Institute of Plant Protection, Qinghai Academy of Agricultural Sciences, Xining 810016, China)

Key words: pepper; mild mottle virus; reverse transcription PCR(RT-PCR)

辣(甜)椒分布在全世界 60 多个国家和地区, 是重要的经济作物<sup>[1]</sup>。由于辣椒栽培面积大且品种多, 所以辣椒上病毒的种类多。有报道指出, 至少有 45 种病毒侵染辣椒, 其中中国有 15 种<sup>[2]</sup>, 常见的有烟草花叶病毒(TMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、辣椒轻斑驳病毒(PMMoV)等。PMMoV 是烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)的重要成员, 受其侵染的辣椒叶片皱缩、斑驳, 果实变小、畸形, 辣椒的光合作用、呼吸作用等受

到影响, 进而影响辣椒的品质和产量<sup>[3-4]</sup>。

海东市位于青海中部, 随着设施栽培技术的普及, 各种蔬菜产业都得到了良好的发展, 如乐都的长辣椒产业已成为当地的一个特色产业<sup>[5]</sup>。2014 年, 对青海省海东市乐都、互助等地的设施蔬菜病毒病进行调查时发现辣椒叶片出现皱缩、斑驳症状, 个别棚室的发病率超过 60%, 对生产影响较大。本研究拟采集病样, 对其进行分子诊断, 以期明确青海辣椒上病毒病的种类提供依据。

收稿日期: 2017-02-17

基金项目: 江苏省农业科技自主创新重点基金项目[ CX(12)1004 ]; 江苏省 333 高层次人才培养工程科研项目( BRA2013262 ); 特色蔬菜产业技术体系( CARS-24 ); 江苏省农科院基金项目( 6111614 ); 省部共建国家重点实验室培育基地-江苏省食品质量安全重点实验室自主研发课题( 611717 ); 江苏省自主创新基金项目[ CX(15)1053 ]

作者简介: 李廷芳( 1989- ), 女, 青海民和人, 硕士研究生, 主要从事植物病毒方面的研究。( E-mail ) 916716296@qq.com。吴淑华为共同第一作者。

通讯作者: 郭青云, ( E-mail ) guoqingyunqh@163.com。周益军, ( E-mail ) yjzhou@jaas.ac.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

于 2014 年 6 月底, 采集青海省海东市表现出典型病症的辣椒叶片, 所有样品均保存于 -70 ℃ 冰箱中备用。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 利用已报道的扩增烟草花叶病毒属的简并引物( Tob-Uni1 和 Tob-Uni2 )<sup>[6]</sup> 和扩增辣椒轻斑驳病毒的特异引物( PMMoVF 和 PMMoVR )<sup>[7]</sup> 分别进行烟草花叶病毒属成员检测和 PMMoV 的特异性检测, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 反应引物

Table 1 Primers used in this research

引物名称	引物序列(5'→3')	片段大小 (bp)
Tob-Uni1	ATTTAAGTGGASGAAAACACT	804
Tob-Uni2	GTYGTTCATGAGTTCRTGGA	
PMMoVF	AGAACTCGGAGTCATCGGC	576
PMMoVR	GAGTTATCGTACTCGCCACG	

1.2.2 RNA 的提取及 RT-PCR 采用 Trizol 法提取植物总 RNA。用 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒合成病毒的 cDNA 第一条。RT 反应体系:5×PrimeScript™ RT Master Mix buffer 2 μl,加入含 500 ng 体积的 RNA,用 RNase Free dd H<sub>2</sub>O 补足至 10 μl,轻轻混合,37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,保存于-20 ℃冰箱中备用。

PCR 扩增体系:25.0 μl PCR 反应体系,10×Buffer 2.5 μl,MgCl<sub>2</sub>1.5 μl,dNTP 2.0 μl,cDNA 1.0 μl,上下游引物各 1.0 μl,ddH<sub>2</sub>O 15.8 μl,LA Taq 酶 0.2 μl。PCR 反应程序:95

℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 45 s,49 ℃ (Tob-Uni1/Tob-Uni2) 或 54 ℃ (PMMoVF/PMMoVR) 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环,72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。

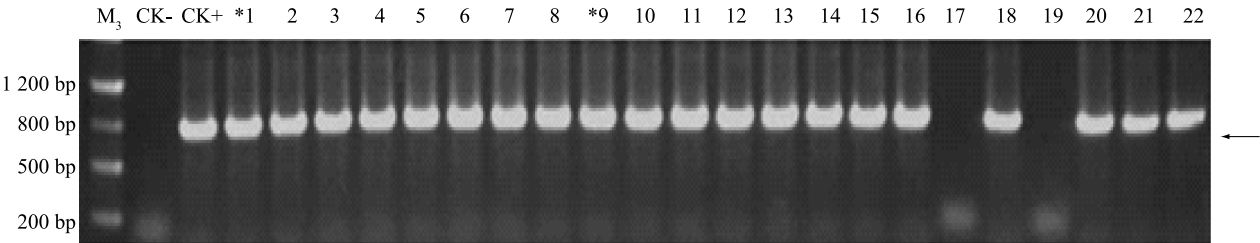
2 结果与分析

2.1 田间病株症状

2014 年 6 月底,对青海省海东市乐都县、互助县等地的辣椒大棚进行病害调查时发现,发病植株叶片表现出皱缩、褪绿和斑驳等症状。田间辣椒多呈点片状零星发病,病棚室的发病率多在 5%~20%,个别棚室发病较严重,发病率超过 60%,对辣椒产量影响较大。鉴于该病症状与烟草花叶病毒属病毒引起的病害类似,所以对采集的典型病样进行分子检测。

2.2 烟草花叶病毒属病毒检测

对采集的 50 份样品提取总 RNA,用 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录后,采用烟草花叶病毒属简并引物 Tob-Uni1 和 Tob-Uni2 进行 RT-PCR 检测,44 份样品中扩增到 804 bp 的预期目的片段,部分样品检测结果(图 1)表明,病样被烟草花叶病毒属成员感染。



M<sub>3</sub>:DL4500 DNA marker;CK-:阴性对照;CK+:阳性对照;2~8、10~22:感病辣椒的测序样品。\*1:编号为 PQL-1-Tob 的测序样品;\*9:编号为 PQL-2-Tob 的测序样品。

图 1 RT-PCR 检测结果(Tob-Uni1/Tob-Uni2)

Fig.1 Results of RT-PCR (Tob-Uni1/Tob-Uni2)

2.3 序列测定及分析

为了明确辣椒样品上 Tobamovirus 的病毒类型,随机挑选 PQL-1-Tob 和 PQL-2-Tob 进行序列测定,采用 BLAST 分析,发现该病毒与辣椒轻斑驳病毒的同源性最高,说明其可能是 PMMoV 的分离物。

利用 MEGA6 软件将本试验测定的样品序列与 Tobamovirus 的属代表性成员以及 PMMoV 各分离物序列比对后进行聚类分析。PMMoV 分离物分为 3 个簇:西班牙 Ia 株系单独为第一簇(Cluster I),韩国 Kr 株系和日本 Iw、L4BV 株系聚于第二个簇(Cluster II),日本 C-1421 株系、日本 J 株系、日本 TPO-2-19 株系、日本 Pa18 株系、西班牙 S 株系、中国 CN 株系、巴西 BR-DF01 株系及印度 HP1 株系聚于第三簇(Cluster III)。辣椒病样检测到的 PQL-1、PQL-2 分离物都聚类于第三簇,与巴西 PMMoV-BR-DF01、中国 PMMoV-CN 及印度 PMMoV-HP1-KJ 分离物的同源关系较近,说明青海海东辣椒上

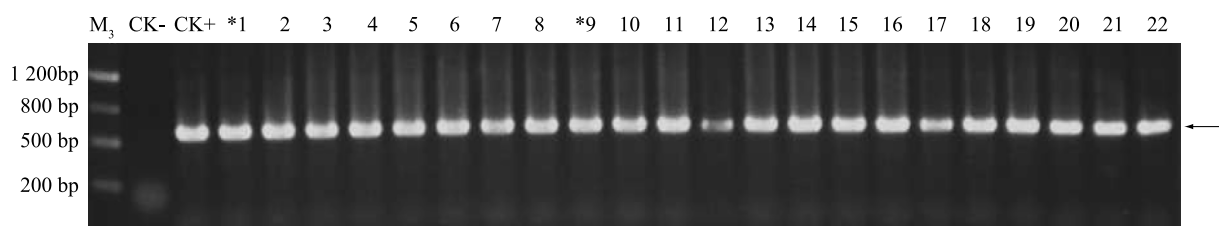
分离到的烟草花叶病毒属成员为辣椒轻斑驳病毒。

2.4 辣椒轻斑驳病毒检测

利用辣椒轻斑驳病毒的特异性引物 PMMoVF 和 PMMoVR,对 Tobamovirus 简并引物检出的 44 份辣椒病样进行 RT-PCR 特异性检测,结果(图 2)显示,其中 44 份都扩增出 576 bp 的预期目的片段。随机选取 PQL-1-PMM 和 PQL-2-PMM 样品 PCR 产物进行序列测定,BLAST 分析序列结果显示,该病毒与 PMMoV 的同源性最高。

3 讨论

辣椒轻斑驳病毒是烟草花叶病毒属的重要成员,最早在美国发现<sup>[8]</sup>,其后在德国、荷兰、英国、西班牙、保加利亚、加拿大、澳大利亚、阿根廷等国均有报道<sup>[9]</sup>。在中国,该病毒于 1994 年首次在新疆辣椒上发现,随后扩散蔓延至陕西、山东、河北、甘肃、贵州、江苏等多个地区<sup>[7,10-15]</sup>。在一些地区,辣椒



M<sub>3</sub>:DL4500 DNA maker;CK-:阴性对照;CK+:阳性对照;2~8、10~22:感病的辣椒样品;\*1:编号为PQL-1-PMM的测序样品;\*9:编号为PQL-2-PMM的测序样品。

图2 RT-PCR 检测结果(PMMoV/PMMoVR)

Fig.2 Results of RT-PCR(PMMoV/PMMoVR)

轻斑驳病毒已经成为当地辣椒的主要病毒,给辣椒生产造成了严重影响<sup>[10,15]</sup>。种子传毒是 PMMoV 远距离扩散传播的主要方式<sup>[16]</sup>。近年来,随着各地种质资源的频繁交流,该病毒在中国的扩散呈逐年扩大的趋势,在一些地区甚至上升为当地辣椒的主要危害病毒<sup>[7]</sup>。因此,应当密切关注该病害,一方面要加强种子的检测与检疫,控制侵染源头,另一方面针对发病棚室要加强田间管理,及时清除田间病株及病残体,田间农事操作时注意减少传毒几率,控制病害在田间的扩散蔓延。

2014 年对青海海东设施辣椒上的病毒病进行调查时,发现一种使辣椒皱缩的辣椒病毒,对其进行分离鉴定发现它是一种属于烟草花叶病毒属的病毒分离物,该分离物与巴西 PMMoV-BR-DF01、中国 PMMoV-CN 及印度 PMMoV-HP1-KJ 分离物的同源关系较近,共同聚类于第三簇,表明该分离物也是一个 PMMoV 分离物。鉴于辣椒上病毒病的种类较多,除了 *Tobamovirus* 外,本研究也对其他一些常见的辣椒病毒进行了检测,结果显示,在个别样品中存在复合侵染的现象。因此,要明确青海辣椒上病毒病的种类,还需要进行更系统的调查和研究。

## 参考文献:

- [1] 杨永林,闫淑珍,田茹燕,等.中国六省、市辣(甜)椒病毒种群及其分布的研究[J].中国病毒学,1995,10(4):332-339.
- [2] 郭思瑶,童艳,黄娅,等.重庆辣椒病毒病原初步鉴定和分析[J].园艺学报,2015,42(2):263-270.
- [3] 郭京泽,刘鹏,崔铁军,等.辣椒种子种辣椒轻斑驳病毒的检测[J].检验检疫科学,2007,17(6):32-34.
- [4] HAKMAOUI A, PEREZ-BUENO M L, GARCIA-FONTANA B, et al. Analysis of the antioxidant response of *Nicotiana benthamiana* to infection with two strains of Pepper mild mottle virus[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(15):5487-5496.
- [5] 余国兰.高寒地区温室栽培品种乐都长辣椒[J].蔬菜,2013(7):49-51.
- [6] LETSCHIERT B, ADMA G, LESEMAN 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.
- [7] 夏惠娟,李志勇,郭京泽,等.保定地区一种新辣椒病毒病的鉴定[J].河北农业大学学报,2006,29(6):65-67.
- [8] GREENLEAF W H, COOK A A, HEYN A N J. Resistance to tobacco mosaic virus in capsicum with reference to the Sansun latent strain[J]. Phytopathology, 1964(54):1367-1371.
- [9] 王亚楠,赵绪生,袁文龙,等.辣椒轻斑驳病毒研究现状[J].安徽农业科学,2010,38(14):7401-7402.
- [10] 向本春,谢浩,崔星明,等.新疆辣椒轻斑驳病毒的分离鉴定[J].病毒学报,1994,10(3):240-244.
- [11] 赵尊练,史联联,谭根堂,等.陕西省辣椒主产区辣椒病毒病原种类鉴定及其分布研究[J].中国农业科学,2004,37(11):1738-1742.
- [12] 黄粤,马荣群,岳文辉.应用 RT-PCR 方法检测辣椒轻斑驳病毒[J].山东农业科学,2004(5):56-57.
- [13] 文朝慧,刘志杰,张丽萍,等.甘肃省河西地区辣(甜)椒病毒病原鉴定[J].中国蔬菜,2010(16):74-78.
- [14] 郑兴华,洪鲲,杨立昌,等.贵州辣椒轻斑驳病毒分离物的分子鉴定[J].贵州农业科学,2013,41(5):30-32.
- [15] 吴淑华,赵文浩,李廷芳,等.南京辣椒上一种斑驳类型病毒病的分子鉴定[J].江苏农业学报,2015,31(6):1284-1290.
- [16] IKEGASHIRA Y, OHKI T, ICHIKI U T, et al. An immunological system for the detection of pepper mild mottle virus in soil from green pepper fields[J]. Plant Disease, 2004, 88(6):650-656.

(责任编辑:王妮)