

赵小慧, 刘 冲, 郁 凯, 等. 利用小 RNA 深度测序技术鉴定江苏盐城辣椒病毒种类[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 37-43.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.01.005

利用小 RNA 深度测序技术鉴定江苏盐城辣椒病毒种类

赵小慧¹, 刘 冲¹, 郁 凯¹, 钟明娟², 郑佳秋¹, 邢锦城¹

(1. 江苏沿海地区农业科学研究所, 江苏 盐城 224002; 2. 诸城市农业农村局, 山东 诸城 262200)

摘要: 2019 年 6 月江苏省盐城市发生了较为严重的辣椒病毒病, 危害症状表现为植株重度矮化、叶片黄化、蕨叶甚至畸形。将采集的 11 株疑似感染病毒的辣椒植株叶片研磨成浆液, 再用其摩擦接种本氏烟植株, 发现用其中 3 株辣椒的叶片浆液摩擦接种本氏烟植株后, 本氏烟植株出现病毒感染的典型症状, 初步判断这些辣椒被病毒感染, 但不能确定其种类和归属。为了进一步明确辣椒感染的病毒类型, 将 3 株辣椒样品混成 2 份样品利用小 RNA 深度测序技术和生物信息学分析法进行检测, 结果发现样品 1 被蚕豆萎蔫病毒 2 号 (Broad bean wilt virus 2, BBWV2)、苜蓿花叶病毒 (Alfalfa mosaic virus, AMV) 和辣椒脉斑驳病毒 (Chilli veinal mottle virus, ChiVMV) 3 种病毒复合感染, 从样品 2 中检测到 BBWV2 1 种病毒, 通过 RT-PCR 检测验证了这一结果的可靠性。最后利用 RT-PCR 方法对田间采集的 11 份辣椒样品和接种的本氏烟植株进行毒源鉴定, 其中 2 株辣椒样品及其接种的本氏烟叶片上鉴定出了 BBWV2、ChiVMV 和 AMV, 这 3 种病毒感染辣椒在江苏省均为首次发现。研究结果为对江苏省辣椒构成潜在严重威胁的病毒的早期诊断和及时防控提供了参考。

关键词: 辣椒; 小 RNA 深度测序; 病毒病

中图分类号: S436.418.1⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2023)01-0037-07

Identification of viruses from peppers in Yancheng, Jiangsu province by small RNA deep sequencing

ZHAO Xiao-hui¹, LIU Chong¹, YU Kai¹, ZHONG Ming-juan², ZHENG Jia-qiu¹, XING Jin-cheng¹

(1. Institute of Agricultural Sciences in the Coastal District of Jiangsu Province, Yancheng 224002, China; 2. Zhucheng Agricultural and Rural Bureau, Zhucheng 262200, China)

Abstract: In June 2019, an incidence of relatively serious pepper virus disease was reported in Yancheng City, Jiangsu province. The symptoms included plant dwarf stature, yellowing and deformities of pepper leaves. Eleven strains collected from pepper leaves infected with suspected virus were inoculated into *Nicotiana benthamiana* leaves by surface rubbing and it was found that three strains of peppers had typical symptoms of virus infection after surface inoculation of *N. benthamiana*. It was preliminarily suggested that these peppers were infected by a virus with unknown identity. In order to further clarify the virus type, two samples obtained by mixing three pepper standard samples were detected by small RNA deep sequencing technology and bioinformatics analysis. It was found that sample 1 was co-infected by broad bean wilt virus 2 (BBWV2), alfalfa

mosaic virus (AMV) and chilli veinal mottle virus (ChiVMV). One virus of BBWV2 was detected in sample 2, and RT-PCR detection verified the reliability of the results. Finally, 11 pepper samples collected from the field and inoculated *N. benthamiana* were identified by RT-PCR. This is the first report of BBWV2, ChiVMV and AMV viruses infecting peppers in Jiangsu. The current study acts as a base line for early diagnosis and timely prevention and con-

收稿日期: 2022-06-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31901856); 江苏省农业重大新品种创制项目 (PZCZ201715)

作者简介: 赵小慧 (1989-), 女, 山东莱阳人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物病毒的检验和检疫研究。 (E-mail) zhaoxiaohui_g@163.com

通讯作者: 邢锦城, (E-mail) sdauxxx@163.com

trol of novel viral strains that pose a potential threat to peppers in Jiangsu province.

Key words: pepper; small RNA deep sequencing; viral disease

辣椒(*Capsicum annuum* L.)是中国极为重要的一种蔬菜作物,其种植面积和产值在各类蔬菜中位列第一,是中国第一大蔬菜作物^[1]。辣椒病毒病是辣椒上常发生的灾害性病害之一,其发病症状主要表现为辣椒植株整体矮化以及花叶、蕨叶、黄化、顶枯、坏死和畸形等,对辣椒生产造成了严重影响,通常情况下使产量损失30%~70%,严重时可致绝收^[2]。截至2022年4月,中国报道的自然侵染辣椒的植物病毒已有37种,包括黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)、烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)、辣椒轻斑驳病毒(Pepper mild mottle virus, PMMoV)、蚕豆萎蔫病毒2号(Broad bean wilt virus 2, BBWV2)在内的33种病毒^[3]以及烟草蚀纹病毒(Tobacco etch virus, TEV)^[4]、瓜类褪绿黄化病毒(Cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV)^[5]、西瓜银色斑驳病毒(Watermelon silver mottle virus, WSMoV)^[6]、小米椒内源RNA病毒1(*Capsicum frutescens* endornavirus 1, CFEV1)^[7]。总体而言,虽然中国不同地区侵染辣椒的病毒种类各有差异,但CMV和TMV仍是目前全国范围内辣椒上分布最广且危害最重的病毒^[3,8]。近年来,随着江苏省辣椒种植面积的不断扩大,病毒病的发生也愈发严重。目前,已有关于危害江苏省辣椒的主要病毒种类、分布和复合侵染类型等的报道。吴淑华等^[9]采用RT-PCR检测技术首次在江苏南京的辣椒植株上发现了PMMoV;乔俊卿等^[10]在江苏淮安的设施辣椒病样上检测到PMMoV和辣椒隐症病毒(Pepper cryptic virus, PCV);刘勇等^[3]采用血清学、分子生物学等检测方法对中国31个省(市、自治区)主要蔬菜作物的病毒病样品进行鉴定,发现PMMoV是危害江苏辣椒生产的主要病毒;吴贺等^[5]采用RT-PCR方法在苏南五地(市)的辣椒样品上检测出9种病毒,其中PMMoV的检出率最高,番茄黄化曲叶病病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)的检出率次之,两者均是危害这些地区辣椒的主要病毒;于海龙等^[4]对中国16个省(市、自治区)的辣椒病样进行血清学检测,结果在江苏省采集的1个辣椒样品中鉴定出PMMoV、TMV和番茄花叶病毒(Tomato mosaic virus, ToMV)3种病毒。由此可见,PMMoV为侵染江苏省辣椒的优势种,发生最为普遍,但在省内各地区,因耕作制度、

种植品种及气候环境等因素不同,辣椒上发现的病毒种类和危害程度也不同,这为江苏省辣椒的安全生产带来不少挑战。

盐城市地处苏北沿海,光温资源丰富,是江苏省优质辣椒的生产基地。近年来,当地因辣椒连作导致病毒病频发,严重损害了苏北辣椒的产量、外观品质和产业健康发展。因此,迫切需要对危害盐城地区辣椒的病毒种类进行调查,为当地病毒病的防控和抗病育种提供指导。本研究采用生物学方法及小RNA深度测序结合RT-PCR验证方法对侵染盐城辣椒的病毒进行鉴定,以期对江苏省辣椒病毒病的预防和综合防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

于2019年6月从盐城南洋试验场的设施辣椒大棚中采集叶片表现为黄化、蕨叶、畸形等症状的疑似感染病毒病的辣椒样品11株,在田间记录品种编号和发病症状,采集病株后装入自封袋中带回实验室,集中拍照后保存于-80℃冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 病毒分离物的摩擦接种 将辣椒叶片放入预冷消毒的研钵中,加入适量磷酸盐缓冲溶液(0.01 mol/L, pH7.5),用研棒充分研磨叶片成浆液;在待接种的5~6叶期本氏烟叶片上均匀喷洒600目的金刚砂,用研棒蘸取适量叶片浆液轻轻摩擦叶片,每株摩擦接种3张叶片(植株顶端叶不摩擦接种),以接种缓冲液作为对照;接种的本氏烟用喷壶在其叶片上喷水后置于光照培养箱中培养,3 d后开始观察系统叶的发病症状。

1.2.2 小RNA深度测序 将在本氏烟上症状表现严重且复杂的3株辣椒样品混成2份样品后送至青岛百迈客生物公司进行小RNA测序。参照TRIzol试剂盒(Invitrogen)的说明书提取2份样品总RNA,用Nanodrop 2000对提取的RNA进行质量浓度和纯度的测定,用Agilent 2100对RNA样本进行完整性分析。当测定质量浓度 ≥ 250 ng/ μ l, 体积 ≥ 10 μ l, $OD_{260/280} \geq 1.8$, $OD_{260/230} \geq 1.0$, RIN 值 ≥ 8.0 时,认为样品检测合格,将检测

合格的样品通过 VAHTSTM small RNA Library Prep Kit for Illumina (诺唯赞, NR801-02) 构建文库, 构建好的文库再用 Illumina novaseq 6000 进行小 RNA 测序分析。

1.2.3 原始数据的处理与分析 除去含有接头序列、低质量序列、短于 18 个或长于 35 个核苷酸的序列, 获得有效测序序列 (Clean reads); 用 Bowtie 软件将 Clean reads 分别与各数据库中的序列进行比对, 过滤核糖体 RNA (rRNA)、转运 RNA (tRNA)、核内小 RNA (snRNA)、核仁小 RNA (snoRNA) 等 ncRNA 及重复序列, 剩余未比对到的小 RNA (sRNA) 通过 velvet 软件进行拼接, 获得能组装病毒 RNA 的较长重叠群 (Contigs); 通过与病毒核苷酸数据库、蛋白质数据库进行 BLAST 比对, 对获得的 Contigs 进行分类注释, 以明确感染病毒的信息。

1.2.4 PCR/RT-PCR 验证 为了验证小 RNA 深度测序结果的准确性, 对于每种注释的病毒, 分别根据小 RNA 深度测序得到的拼接序列和 GenBank 中与拼接序列同源性最高的病毒基因序列的保守区域设计 2 对特异性引物。所有引物通过 DNAMAN 7.0 和 DNASTAR 5.01 软件设计, 引物由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成。另外参考文献 [3] 和 [11] 分别合成辣椒上常见的 2 种病毒 (CMV 和 TMV) 的 2 对特异性引物 (表 1)。分别按照植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen) 和植物总 RNA 提取试剂盒 (Foregene) 的说明书提取用于小 RNA 深度测序的 2 份病样叶片的总 DNA、总 RNA, 以总 RNA 为模板, XT176 (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTT-TTTTTTTTTTTTTTTT-3') 和 XT269 (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGNNNNNN-3', N = A/G/C/T) 为引物, 参照反转录酶 *M-MLV* (Promega, USA) 的说明书合成 cDNA, 以合成的 cDNA 和提取的 DNA 为模板, 用上述设计的引物和 *Taq* Plus DNA 聚合酶 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 进行 PCR 扩增。扩增结束后, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳扩增产物, 在紫外灯下发现目的条带后割胶回收, 将回收的扩增片段连接到 pMD19-T simple 载体 (TaKaRa) 上, 并用该载体转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 之后选取 3 个经菌落 PCR 筛选到的阳性克隆, 送至苏州金唯智生物科技有限公司测序。获得的序列用 DNASTAR 5.0 软件的 Seqman 程序进行拼接处理, 得到的扩增片段序列在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站

中利用 BLASTn 检索进行在线比对分析。最后依据 RT-PCR 扩增效果和序列比对结果验证小 RNA 深度测序的准确性并筛选出用于检测后续样品中病毒的引物, 进一步应用筛选出的引物对采集的所有辣椒病样和接种的本氏烟进行 RT-PCR 检测, 根据检测结果明确侵染江苏盐城辣椒的病毒类型。

表 1 本研究中用于检测病毒的引物

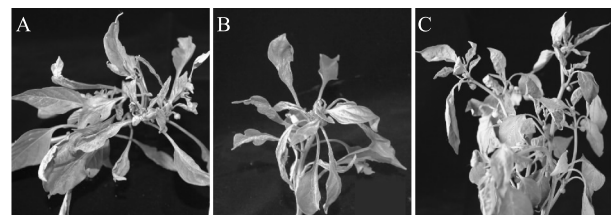
Table 1 Primers used for detecting viruses in this study

引物名称	序列 (5'→3')	长度 (bp)	参考文献
BBWV2-F	TCGGATGCAATAAGCTCAAA	875	
BBWV2-R	CAAGTTTGCATTGCTTGTGT		
AMV-F	ATGAGTTCTTCACAAAAGAAAGC	660	
AMV-R	TCAATGACGATCAAGATCGT		
ChiVMV-F	TCGGGAGAGAGTGTGATG	860	
ChiVMV-R	CAATCCACGAACACCCAG		
CMV-F	GGGGTACCTAGTACGCGCTGTAAACCTGGAT	260	[11]
CMV-R	GCTCTAGAAAATTGTGTGTTGGCTTGAACGC		
TMV-F	TCGAATTCACCATGTCTTACAGTATCAC	500	[11]
TMV-R	TGGGATCCTCAAGTTGACAGGACAGAGG		
CMVCPuF	TCTCATGGATGCTTCTCCGCG	760	[3]
CMVCPuR	CCGTAAGCTGGATGGACAACC		
TMVdF	GATTGCTTTTAAATATGTCTTAC	600	[3]
TMVdR	CTTCGATTAACTGGAGGGA		

2 结果与分析

2.1 田间辣椒发病情况

于 2019 年 6 月对江苏盐城南洋试验场设施大棚内的辣椒进行病害调查, 发现部分辣椒植株疑似感染病毒病, 主要表现为植株整体矮小、上部叶轻度花叶或蕨叶, 同时还有不同程度的黄化症状混发 (图 1), 采集的样品信息见表 2。



A~B: 发病的辣椒植株; C: 健康的辣椒植株。

图 1 盐城地区辣椒疑似病毒病的发病症状

Fig.1 Symptoms on peppers caused by viruses in Yancheng

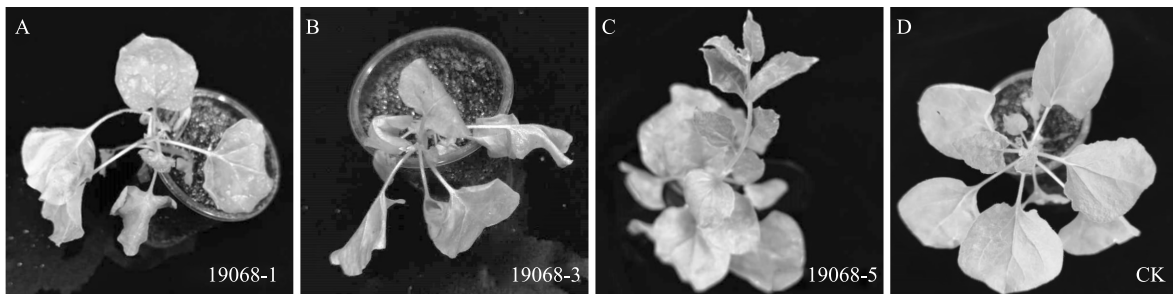
表 2 盐城地区疑似感染病毒的辣椒样本信息

Table 2 Suspected virus infection samples of pepper in Yancheng

序号	辣椒品系编号	发病症状
1	19068-1	植株矮小,上部叶片细长扭曲,呈蕨叶状
2	19068-2	植株矮小,上部叶片细长扭曲,呈蕨叶状,叶片不规则增厚
3	19068-3	植株矮小,上部叶片细长扭曲,呈蕨叶状
4	19068-4	植株矮小,上部叶片细长扭曲,呈蕨叶状
5	19068-5	植株矮小,上部叶片呈花叶状
6	19031	系统叶轻微皱缩
7	19044	植株矮小,部分叶片黄化
8	19033	叶片轻微黄化
9	19015	系统叶蕨叶
10	19016	系统叶蕨叶
11	19035	系统叶轻微皱缩

2.2 病毒分离物的摩擦接种

分别用采集的 11 株辣椒叶片浆液摩擦接种 5~6 叶期的指示植物本氏烟植株,对照用磷酸缓冲液接种,对接种后的本氏烟植株进行观察并记录症状。如图 2 所示,3 株辣椒叶片浆液接种后,本氏烟植株出现病毒侵染的典型症状,其中用辣椒品系 19068-1、19068-3 的叶片浆液接种本氏烟植株 6 d 后,叶片表现出轻微卷曲、花叶等症状,随后出现黄绿相间的花叶、扭曲,严重的产生畸形,整个植株矮缩、黄化直至坏死;用辣椒品系 19068-5 的叶片浆液接种本氏烟植株 6 d 后,出现蕨叶、花叶等症状,之后症状加重,但是植株长势良好;用其余样品叶片浆液接种的本氏烟植株发病症状不明显,而对照植株则生长正常。上述感病本氏烟植株的症状均由病毒病侵染造成,说明辣椒品系 19068-1、19068-3 和 19068-5 疑似被病毒感染,但是需要进一步分析来明确病毒的种类和来源。



A~C: 分别用辣椒品系 19068-1、19068-3 和 19068-5 叶片浆液接种 8 d 后的本氏烟植株状态; D: 用磷酸缓冲液接种的本氏烟植株。

图 2 辣椒叶片浆液接种 8 d 后本氏烟植株的症状

Fig.2 Symptoms of *Nicotiana benthamiana* plants inoculated by sampled pepper leaf extracts at eight days post inoculation

2.3 小 RNA 深度测序结果分析

为了进一步确定危害盐城地区辣椒的病毒类型,将上述 3 株疑似被病毒侵染的田间辣椒样品混成 2 份样品用于小 RNA 深度序列测定,其中 19068-1、19068-3 混为 1 份,编号为 Pe-1,19068-5 单独为 1 份,编号为 Pe-2。测序后从 Pe-1 中获得 14 032 995 条原始测序序列 (Raw read),去除冗余测序序列 (Read),得到 12 298 498 条 Clean read,再过滤后剩余 11 139 129 条 Read,对过滤后获得的序列进行拼接,共得到 1 829 个 Contig,对获得的 Contig 进行分类注释,结果发现 Pe-1 中包含 BBWV2、苜蓿花叶病毒 (Alfalfa mosaic virus, AMV)、辣椒脉斑驳病毒 (Chilli veinal mottle virus, ChiVMV) 和烟草脉明病毒 (Tobacco vein clearing virus, TVCV) 等 4 种病毒。测序后从 Pe-2 中获得 18 076 432 条 Raw read,去除冗余

Read 后得到 12 994 439 条 Clean read,再过滤后剩余 10 713 241 条 Read,对过滤后获得的序列进行拼接,共得到 2 847 个 Contig,对获得的 Contig 进行分类注释,结果发现 Pe-2 中包含 BBWV2、蚕豆萎蔫病毒 1 号 (Broad bean wilt virus 1, BBWV1)、甘薯明脉病毒 (Sweet potato vein clearing virus, SPVCV) 等 3 种病毒。上述注释的病毒中,SPVCV 为环状 DNA 病毒,其余病毒为 RNA 病毒。测序的具体结果见表 3。

2.4 PCR/RT-PCR 验证和检测

为了验证小 RNA 深度测序结果的准确性,以用于小 RNA 深度测序的 2 份辣椒病样叶片 DNA/RNA 为模板,用方法 1.2.4 设计的引物分别对注释到的 SPVCV 病毒进行 PCR 验证,对其余病毒进行 RT-PCR 验证。结果显示,3 种注释到的病毒 (BBWV2、ChiVMV 和 AMV) 均筛选到 1 对特异性较好的引物 (表 1),且在相

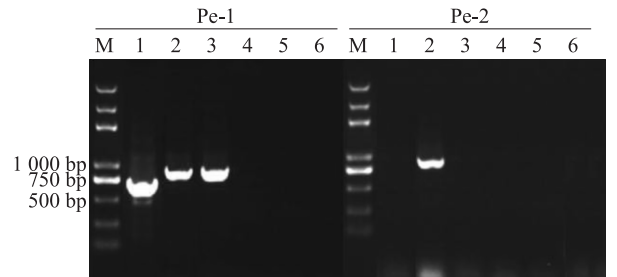
应的辣椒样品中扩增到了预期大小的条带(图 3)。将得到的目的条带回收纯化、克隆测序后进行序列比对分析,发现从样品 Pe-1、Pe-2 中扩增的 BBWV2 片段的核苷酸序列完全一致,两者与 NCBI 中 BBWV2 分离物 XJ14-3(登录号:FN985164.1)的核苷酸序列一致性最高,为 94.49%;从样品 Pe-1 中扩增的 ChiVMV 核苷酸序列与 NCBI 中 ChiVMV 分离物 Korea(登录号:AM909717.1)具有最高的核苷酸序列相似度(97.39%);而从 Pe-1 样品中扩增得到的 AMV 核苷酸序列与 AMV 分离物 ER1(登录号:KX579896.2)的核苷酸序列相似度也高达 98.32%。以上结果说明,Pe-1 样品中存在

BBWV2、ChiVMV 和 AMV 3 种病毒,Pe-2 样品中存在 BBWV2 1 种病毒,BBWV2、ChiVMV 和 AMV 侵染辣椒均为江苏省首次报道。在小 RNA 深度测序注释到的病毒中,有 3 种病毒 TVCV、BBWV1 和 SPVCV 未通过 PCR/RT-PCR 验证,推测由于病样中这些病毒的丰度过低或是在处理数据过程中因缺少相关信息而造成结果匹配度差,从而影响检测效果。另外,在 2 份辣椒病样中也未检测到辣椒上常见的 TMV、CMV 2 种病毒,此结果进一步说明 RT-PCR 验证结果与小 RNA 深度测序结果存在一致性。

表 3 小 RNA 的深度测序数据统计与分析
Table 3 Statistics and analysis of small RNA deep sequencing data

病毒	Pe-1		Pe-2	
	Contig 数目 (个)	核苷酸序列相似度 (%)	Contig 数目 (个)	核苷酸序列相似度 (%)
BBWV2	11	95.52~100.00	40	93.65~100.00
AMV	20	91.60~100.00		
ChiVMV	21	92.53~100.00		
TVCV	5	82.15~88.35		
BBWV1			1	86.46
SPVCV			1	83.33

BBWV2:蚕豆萎蔫病毒 2 号;AMV:苜蓿花叶病毒;ChiVMV:辣椒脉斑驳病毒;TVCV:烟草脉明病毒;BBWV1:蚕豆萎蔫病毒 1 号;SPVCV:甘薯明脉病毒;Contig:重叠群。



M:DNA marker;1:苜蓿花叶病毒(AMV);2:蚕豆萎蔫病毒 2 号(BBWV2);3:辣椒脉斑驳病毒(ChiVMV);4:烟草花叶病毒(TMV);5:黄瓜花叶病毒(CMV);6:阴性对照。

图 3 RT-PCR 法检测辣椒 Pe-1、Pe-2 样品中的病毒
Fig.3 Detection of viruses in pepper from Pe-1, Pe-2 by RT-PCR

为确定田间采集的 11 株辣椒样品和实验室接种本氏烟上携带病毒的情况,用上述筛选得出的扩增 3 种病毒效果较好的引物及 TMV、CMV 特异性引物对上述样品进行 RT-PCR 检测。结果显示,辣椒品系 19068-5 确实被 BBWV2 单独侵染,19068-1、19068-3 均被 BBWV2、ChiVMV 和 AMV 复合侵染,

其余样品中未检测到病毒(表 4)。此外,接种的本氏烟植株病叶上均扩增到相应片段,表明接种上述辣椒病样叶片浆液后,本氏烟植株上也存在相应的病毒。

表 4 盐城地区辣椒样本中检测到的病毒类型
Table 4 Virus types detected in pepper samples in Yancheng

样品名称 (辣椒/本氏烟)	病毒种类
19068-1	BBWV2、ChiVMV、AMV
19068-2	-
19068-3	BBWV2、ChiVMV、AMV
19068-4	-
19068-5	BBWV2
19031	-
19044	-
19033	-
19015	-
19016	-
19035	-

BBWV2:蚕豆萎蔫病毒 2 号;ChiVMV:辣椒脉斑驳病毒;AMV:苜蓿花叶病毒。

3 讨论

辣椒作为中国一种重要的蔬菜作物,极易受到病毒感染。目前用于检测和鉴定辣椒病毒病的方法有很多,常规的主要包括生物学检测^[12]、电镜观察检测^[13-14]、血清学检测^[2,4,15-18]和分子生物学检测^[19-21]等,这些方法都在辣椒病毒种类鉴定方面得以成功应用,但是在发现未知病毒方面还存在一定局限性。新兴的小 RNA 深度测序技术丰富了病毒种类的鉴定方法,它可以同时检测出多种 RNA 或 DNA 病毒,还能发掘新的病毒种类,已被广泛用于辣椒病毒的鉴定^[7,22-24]。2019 年 6 月在对江苏盐城南洋试验场设施辣椒进行病害调查时,发现多株叶片表现黄化、蕨叶等疑似感染病毒病的辣椒植株,但是设施大棚内辣椒的一些生理性病害或药害可能干扰辣椒病样采集的准确性。因此,本研究首先利用生物学检测法对采集的 11 株疑似感染病毒的辣椒植株样品进行初步分析,结果发现,用其中 3 株辣椒病叶浆液摩擦接种的本氏烟植株出现了病毒病侵染的典型症状,初步判断这些辣椒被病毒感染,但还不能确定其种类和归属。为进一步明确辣椒感染的病毒类型,用小 RNA 深度测序技术和生物信息学分析方法对这 3 株辣椒样品混成的 2 份样品进行检测,结果发现,样品 1 被 BBWV2、AMV 和 ChiVMV 3 种病毒复合侵染,样品 2 只感染了 BBWV2 1 种病毒,RT-PCR 检测验证了这一结果的可靠性。最后利用 RT-PCR 法对田间采集的 11 株辣椒样品和接种的本氏烟植株进行毒源鉴定,发现从上述 3 株辣椒样品和其接种的本氏烟植株叶片上均鉴定到了相应病毒,而在其他 8 株辣椒样品中未发现任何病毒。当然,此结果并不能完全排除这 8 株辣椒样品中存在一些其他或未知病毒的可能性,这还有待进一步研究。上述结果表明,不同病毒检测方法各有特点,在实际生产过程中如将多种方法结合起来使用,或许能够建立一套快速、准确、灵敏、高效的辣椒病毒检测体系。

在自然界中,植物经常受到 2 种或多种病毒的复合侵染,这种复合侵染往往会引发病病毒的协生作用,导致寄主产生比单独一种病毒侵染更为严重的症状^[25]。本研究涉及的病毒中,ChiVMV 是马铃薯 Y 病毒科(Potyviriidae)马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus)的一个成员。据报道,ChiVMV 侵染烟草后主要引起褪绿、黄化、花叶、疱斑和叶缘下卷等典型症状^[26];而 AMV 作为雀麦花叶病毒科(Bromovirus)苜蓿花叶病

毒属(Alfavirus)的典型成员,有研究结果证实其感染本氏烟后会出现系统性斑驳花叶、明脉症状^[27]。在本研究中,属于豇豆花叶病毒科(Comoviridae)蚕豆病毒属(Fabavirus)典型种的 BBWV2 单独侵染本氏烟后表现的症状为花叶、蕨叶,植物长势较正常,而 ChiVMV、AMV 和 BBWV2 3 种病毒复合侵染本氏烟却产生了协生作用,引起了极严重的坏死症状。在以往的研究中,作为马铃薯 X 病毒属典型种的马铃薯 X 病毒(Potato virus X,PVX)分别与马铃薯 Y 病毒属成员的马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y,PVY)或 TEV^[28]、李痘病毒(Plum pox virus,PPV)^[29]、烟草脉带花叶病毒(Tobacco vein banding mosaic virus,TVBMV)^[25]复合侵染本氏烟时均能产生类似的系统坏死症状。从本研究结果可以看出,病毒复合侵染寄主引起的协生作用在自然界普遍存在,它不仅能导致植物病害症状加重,增加病毒种类鉴定的难度,甚至能造成毁灭性损害,危害程度不容忽视。

值得注意的是,本研究测到的 BBWV2、ChiVMV、AMV 3 种病毒侵染辣椒在江苏省均为首次报道。BBWV2 的寄主范围十分广泛,可侵染包括辣椒、大豆、黄瓜、菠菜、烟草、白术在内的 44 种植物,目前 BBWV2 侵染在国内多地辣椒上均有大面积发生,且有逐年加重的趋势,对各地辣椒产业的健康发展造成重大影响^[3,30]。而 ChiVMV 也能侵染辣椒、南瓜、番茄、烟草、茄子、曼陀罗等多种农作物,是一种危害非常严重的病毒,迄今 ChiVMV 已蔓延至中国广东、陕西、四川、云南等十几个省(区),严重威胁各地辣椒的安全生产^[31]。BBWV2、ChiVMV 均可通过蚜虫以半持久性方式进行传播和汁液接触方式进行传播,因此建议要做好盐城地区辣椒相关病毒病的调查工作,发现病株后及时铲除,加强传播介体蚜虫的防控,以阻止由 2 类病毒扩散蔓延而造成的严重损失。AMV 能侵染豆科牧草、豌豆、菜豆、大豆、辣椒、烟草等多种植物,其中豆科牧草苜蓿是 AMV 最常见的寄主^[32],而 AMV 侵染辣椒的频率在中国并不高,只是偶尔发生且分布不广泛^[3]。AMV 由各种蚜虫以非持久的方式传播,还可通过汁液接触、花粉和种子进行传播,由于 AMV 随种苗进行远距离传播的风险较大,因此在辣椒引种过程中要慎重,选用优质健康种苗。此外,在田间避免创伤性农事操作,及时清除病残体,严格控制传播介体,选育抗病毒辣椒品种等方法,都可对此病毒进行有效防控。

近年来,随着江苏盐城地区设施辣椒种植面积

的逐年扩大,辣椒病毒病发生也不断加重,严重影响了当地辣椒的产量和品质。本研究对江苏盐城地区辣椒病毒进行了初步检测,研究结果为对江苏省辣椒构成威胁的病毒的早期诊断和及时防控提供了依据。后期将进一步加大感染病毒病辣椒样品的采集和鉴定力度,对辣椒上的优势病毒、分布及其危害情况进行系统且全面的调查和鉴定,为辣椒病毒病的综合防控和抗病育种方向提供更有力的指导。

参考文献:

- [1] 王立浩,马艳青,张宝玺. 我国辣椒品种市场需求与育种趋势[J]. 中国蔬菜, 2019(8): 1-4.
- [2] 龚明霞,赵虎,王萌,等. 广西辣椒病毒病调查及病原种类初步鉴定[J]. 中国蔬菜, 2020(4): 74-79.
- [3] 刘勇,李凡,李月月,等. 侵染我国主要蔬菜作物的病毒种类、分布与发生趋势[J]. 中国农业科学, 2019, 52(2): 239-261.
- [4] 于海龙,靳远,刘婧,等. 我国辣椒病毒病发生情况及发展趋势——基于 2018 年和 2019 年辣椒主产区的调查[J]. 中国蔬菜, 2020(9): 25-30.
- [5] 吴贺,荆诗韵,刘丹,等. 苏南五地(市)主要蔬菜作物的病毒种类、区域分布和发生趋势[J]. 植物病理学报, 2021, 51(3): 325-333.
- [6] 谢慧婷,崔丽贤,秦碧霞,等. 侵染广西甜椒的西瓜银斑病毒分子鉴定[J]. 植物病理学报, 2021, 51(3): 474-477.
- [7] 龚明霞,赵虎,王萌,等. 广西辣椒病毒的 sRNA 深度测序和 RT-PCR 鉴定[J]. 园艺学报, 2022, 49(5): 1060-1072.
- [8] 汪沛,汤琳菲,雷艳,等. 辣椒病毒病研究进展[J]. 湖南农业科学, 2015(7): 151-154.
- [9] 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.
- [10] 乔俊卿,罗德旭,孙玉东,等. 江苏省淮安市设施辣椒病虫害的发生及防治现状调研分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(16): 127-132.
- [11] 王少立,谭玮萍,杨园园,等. 山东省辣椒主要病毒种类的分子检测与鉴定[J]. 中国农业科学, 2017, 50(14): 2728-2738.
- [12] 陈丽,樊民周,卫军锋,等. 陕西辣椒病毒病的毒源鉴定及化学防治药剂筛选[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(1): 121-126.
- [13] 吉训聪,王健华,王运勤,等. 海南黄灯笼辣椒种传病毒的初步鉴定[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2006, 24(3): 284-288.
- [14] 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.
- [15] 李兴红,严红,郭京泽,等. 种传辣椒轻斑驳病毒病 DAS-ELISA 的检测[J]. 植物保护, 2005, 31(3): 66-68.
- [16] 高苇,王勇,张春祥,等. 天津地区辣椒病毒病调查及毒源种类初步鉴定[J]. 山东农业科学, 2016, 48(3): 91-94.
- [17] 严婉荣,赵志祥,肖彤斌,等. 海南辣椒、樱桃番茄病毒病调查及病原 dot-ELISA 鉴定[J]. 广东农业科学, 2021, 48(1): 119-125.
- [18] KUMAR S, PRAKASH H S. Detection of tobacco mosaic virus and tomato mosaic virus in pepper seeds by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2016, 49(1/2/3/4): 56-63.
- [19] 李月月,王前进,田珊,等. 黄瓜花叶病毒在洛阳地区的发生及亚组鉴定[J]. 广东农业科学, 2020, 47(7): 114-120.
- [20] 张永江,辛言言,李桂芬,等. 实时荧光 RT-PCR 方法检测马铃薯 V 病毒[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 36-38.
- [21] NEMES K, SALÁNKI K. A multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of prevalent viruses infecting pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Journal of Virological Methods, 2020, 278(78): 113838.
- [22] 韩帅,张河庆,吴婕,等. 侵染四川辣椒的番茄斑萎病毒和辣椒轻斑驳病毒的小 RNA 测序检测及鉴定[J]. 植物病理学报, 2020, 50(2): 147-154.
- [23] 汤亚飞,裴凡,李正刚,等. 基于小 RNA 深度测序技术鉴定侵染广东辣椒的病毒种类[J]. 中国农业科学, 2019, 52(13): 2256-2267.
- [24] 冯耿,辛敏,曹孟籍,等. 深度测序发现贵阳发生的辣椒病毒病由多种病毒复合侵染所致[J]. 植物病理学报, 2017, 47(5): 591-597.
- [25] 王红艳. 烟草脉带花叶病毒和马铃薯 X 病毒的共生作用及二者侵染本氏烟的转录组学分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [26] 杨华兵,刘勇,李文正,等. 烟草品种辣椒叶脉斑驳病毒病的症状与抗病性鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2014, 29(1): 22-26.
- [27] 岳阳,梁巧兰,魏列新,等. 苜蓿花叶病毒和白三叶草花叶病毒复合侵染对本氏烟中 5 种激素含量的影响[J]. 草业科学, 2021, 38(11): 2255-2265.
- [28] GONZÁLEZ-JARA P, TENLLADO F, MARTÍNEZ-GARCÍA B, et al. Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with potato virus X [J]. Molecular Plant Pathology, 2004, 5(1): 29-35.
- [29] GONZÁLEZ-JARA P, ATENCIO F A, MARTÍNEZ-GARCÍA B, et al. A single amino acid mutation in the plum pox virus helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities [J]. Phytopathology, 2005, 95(8): 894-901.
- [30] 刘湘宁. 湖南辣椒病毒病原鉴定和进化分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.
- [31] 丁亚东. 中国辣椒 ChiVMV 抗性遗传及 HSP70 基因家族分析[D]. 海口: 海南大学, 2021.
- [32] 何宛芹. 凤果花叶病毒和苜蓿花叶病毒单克隆抗体的创制及其应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.

(责任编辑:徐艳)