

# 辣椒上烟草轻型绿花叶病毒的鉴定

陈青<sup>1</sup>, 廖富荣<sup>1</sup>, 陈红运<sup>1\*</sup>, 谢毅璇<sup>2</sup>, 陈加福<sup>2</sup>, 蔡金镭<sup>2</sup>, 林石明<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>厦门出入境检验检疫局, 厦门 361026; <sup>2</sup>厦门市植保植检站, 厦门 361003)

Identification of *Tobacco mild green mosaic virus* infecting pepper CHEN Qing<sup>1</sup>, LIAO Fu-rong<sup>1</sup>, CHEN Hong-yun<sup>1</sup>, XIE Yi-xuan<sup>2</sup>, CHEN Jia-fu<sup>2</sup>, CAI Jin-lei<sup>2</sup>, LIN Shi-ming<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China; <sup>2</sup> Xiamen Plant Protection Station, Xiamen 361003, China)

**Abstract:** In December 2011, bubbling, mosaic leaves and noticeable chlorosis of fruits were observed on field-grown pepper plants in Xiang'an district of Xiamen city. To identify the pathogen, six symptomatic plants were tested by ELISA using specific antibodies of *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) and other viruses infecting pepper. Extracts from all these plants tested positive for TMGMV and PMMoV. To confirm positive results, total RNAs from six symptomatic plants were analyzed by reverse transcription (RT)-PCR with primers designed to specifically amplify the coat protein (CP) gene of TMGMV and PMMoV. The 524 bp TMGMV-CP specific DNA fragment was amplified from all samples and expected PMMoV-CP fragment was amplified from three samples. RT-PCR products of TMGMV-CP were purified and directly sequenced. The obtained CP gene consisted of 480 nucleotides and encodes a putative protein of 159 amino acid residues, sharing identities of 97.9% to 99.8% and 97.5% to 100% at the nucleotide and amino acid level with other TMGMV isolates, respectively. Phylogenetic analysis based on CP nucleotide sequence showed no apparent host or region relationship existed in TMGMV isolates. To our knowledge, this is the first report of TMGMV identified in China.

**Key words:** Pepper; virus; *Tobacco mild green mosaic virus*; coat protein (CP)

文章编号: 0412-0914(2013)06-0651-04

辣椒源自南美洲,属于茄科辣椒属(*Capsicum* L.),为重要经济作物。病毒病是影响辣椒生产的主要病害,侵染辣椒的病毒有40余种<sup>[1]</sup>,烟草轻型绿花叶病毒(*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV)是近年来在辣椒上发生和危害报道较多的病毒之一。TMGMV是McKinney<sup>[2]</sup>于1935年在烟草属植物(*Nicotiana glauca*)上首次发现的,为烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)成员。除辣椒外,番茄<sup>[3]</sup>、凤仙花、蓝眼菊和矮牵牛也是TMG-

MV的自然寄主。

2011年12月,厦门市农业局植保站会同厦门检验检疫局技术中心进行病害调查,在厦门市翔安区的2个地块发现辣椒病毒病十分严重,病株率高于80%。病株呈花叶症状,病果上有明显的褪绿条纹,未见矮化、卷叶和曲叶等症状。应用ELISA和RT-PCR从辣椒病株上检测到TMGMV和PMMoV,并测定TMGMV外壳蛋白(coat protein, CP)基因序列,这是TMGMV在我国发生的首次

收稿日期: 2012-10-20; 修回日期: 2013-10-08

基金项目: 国家质检总局项目(2013IK286)

通讯作者: 陈红运, 研究员, 主要从事植物病毒检测技术研究; E-mail: tobamovirus@163.com。

报道。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

6 株辣椒病样(编号 XMS1-XMS6)采自厦门市翔安区,于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、马铃薯 X 病毒(*Potato virus X*, PVX)、马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)、烟草蚀纹病毒(*Tobacco etch virus*, TEV)、烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、番茄花叶病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)、烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot virus*, TRSV)、番茄斑萎病毒(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、苜蓿花叶病毒(*Alfalfa mosaic virus*, AMV)、辣椒轻斑驳病毒(*Pepper mild mottle virus*, PMMoV)和 Potyvirus group 抗体及阳性对照购自 Agdia 公司,蚕豆萎蔫病毒(*Broad bean wilt virus*, BBWV)和番茄黑环病毒(*Tomato blackring virus*, TBRV)抗体及阳性对照购自安德珍公司, TMGMV 抗体及阳性对照购自 DSMZ 公司; Transcriptor First Strand cDNA 合成试剂盒购自 Roche 公司; Ex Taq DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司; Trizol (Invitrogen) 购自英韦创津公司。

### 1.2 ELISA 检测

详细检测步骤依据说明书进行。阴性对照为温室内健康辣椒植株的叶片研磨液。

### 1.3 RT-PCR 扩增

应用 TrizoL 提取感病叶片的总 RNA。TMGMV

CP 基因扩增引物<sup>[4]</sup>为 524-F(5'-CGTCATCGAG-TACGTTTTAA-3')和 524-R(5'-AGGAAATCTCA-CAACAATAG-3')。PMMoV 的检测采用 Xia 等<sup>[5]</sup>的方法。

取  $6\ \mu\text{L}$  总 RNA 和  $1\ \mu\text{L}$  下游引物( $20\ \mu\text{mol/L}$ )进行反转录。取  $1\ \mu\text{L}$  cDNA 进行 PCR 扩增。TMGMV CP 基因扩增条件为: $94^{\circ}\text{C}$  3 min; $94^{\circ}\text{C}$  30 s, $50^{\circ}\text{C}$  45 s, $72^{\circ}\text{C}$  45 s,35 个循环; $72^{\circ}\text{C}$  7 min。PCR 产物寄送宝生物工程(大连)有限公司测序。序列分析软件为 DNAMAN 5.2.2 和 MEGA 5.1。

## 2 结果与分析

### 2.1 ELISA 结果

ELISA 检测结果显示:6 份辣椒病样与 TMGMV 和 PMMoV 抗体均呈阳性反应,与 CMV、PVX、PVY、TEV、TMV、ToMV、TRSV、TSWV、AMV、Potyvirus group、BBWV 和 TBRV 抗体反应为阴性。根据 ELISA 检测结果分析,6 份病样可能为 TMGMV 和 PMMoV 复合侵染,也可能是血清学交叉反应所致,需要经过 RT-PCR 确认。

### 2.2 RT-PCR 结果

使用 TMGMV CP 基因引物 524-F 和 524-R 从 6 份病样中均扩增到约 500 bp 的片段,与预期大小相符(图 1)。使用 PMMoV 引物可从病样 XMS1、XMS3 和 XMS5 中扩增到预期片段(576 bp)。RT-PCR 结果证实 XMS1、XMS3、XMS5 中同时存在 TMGMV 和 PMMoV,也说明 TMGMV 和 PMMoV 存在血清学上的交叉反应。鉴于 PMMoV 在我国发生十分普遍,仅对 TMGMV 产物进行测序和分析。

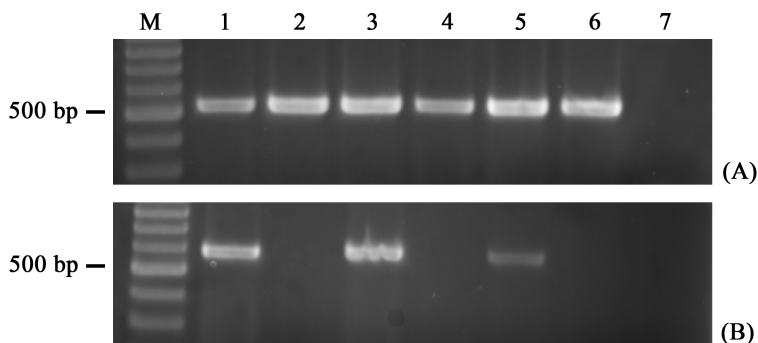


Fig. 1 RT-PCR amplification of TMGMV (A) and PMMoV (B) from diseased pepper plants

M: 100 bp DNA ladder; Lane 1-6: XMS1, XMS2, XMS3, XMS4, XMS5, XMS6; Lane 7: Negative control.

### 2.3 序列分析

测序结果显示:6份辣椒病样中均扩增到完整的CP基因,该基因由480个碱基组成,编码159个氨基酸,大小与已报道的分离物相同;XMS1、XMS3、XMS4和XMS6的核苷酸序列相同,XMS2和XMS5的核苷酸序列一致,二者仅1个核苷酸有差异,但编码相同的氨基酸序列。为便于表述,选择XMS6(GenBank登录号JX534224)与其他TMGMV分离物进行分析比较。

XMS6与西班牙辣椒分离物P87/15的核苷酸序列同源性最高(99.8%,二者仅1个核苷酸不同),与另1个西班牙辣椒分离物P98/12的核苷酸序列同源性最低(97.9%),与其他分离物的核苷酸序列同源性在98.1%(P01/16, P96/49, P96/52, PV-120)和99.6%(PV-0113, PV-112)之间。

XMS6与P87/15、P99/22、PV-228、U2、R-22、P85/2、P98/11、P99/21的CP氨基酸序列相同,与其他分离物的氨基酸序列同源性为97.5%~99.5%。

亚洲分离物中,XMS6与日本辣椒分离物J、台湾辣椒分离物HP、韩国分离物(TOB, TOM)的核苷酸序列同源性分别为98.1%、98.3%和98.5%。氨基酸序列比较结果显示,XMS与HP、J的氨基酸序列同源性最高(99.4%),仅第59位氨基酸不同(M/I);XMS与烟草分离物TOB的氨基酸序列同源性最低(97.5%),二者在第77位(L/I)、98位(D/H)、116位(D/G)和144位(G/S)氨基酸存在差异;XMS与番茄分离物TOM的氨基酸序列同源性居中(98.1%),二者在第27位(L/P)、78位(D/A)和144位(G/S)氨基酸存在差异(图2)。

XMS6	MPYTTINSPSQFVYLLSSAYADPVQLINLCTNALGNQFQTQQ	40
HP	-----	40
J	-----	40
TOB	-----	40
TOM	-----P-----	40
XMS6	ARTTVQQQFADAWKPVPSMTVRFPASDFYVYRYNSTLDPL	80
HP	-----I-----	80
J	-----I-----	80
TOB	-----I---	80
TOM	-----A--	80
XMS6	ITALLNSFDTRNRIIEVDNQAPANTTEIVNATQRVDDATV	120
HP	-----	120
J	-----	120
TOB	-----H-----G---	120
TOM	-----	120
XMS6	AIRASINNLANELVRGTGMFNQAGFETASGLVWTTTPAT	159
HP	-----	159
J	-----	159
TOB	-----S-----	159
TOM	-----S-----	159

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of CP of XMS6 (JX534224) with TMGMV-HP (DQ821941), TMGMV-J (AB078435), TMGMV-TOB (AF103782) and TMGMV-TOM (AF103783)

Amino acid changes are shown by letters and identity by bars.

### 3 讨论

大多数 *Tobamovirus* 病毒具有种传特性,国际种子贸易是病毒远距离传播的重要途径。近年来, TMGMV 扩散速度很快,发生地包括以色列、韩国、日本、中国台湾、委内瑞拉、法国、巴拿马、突尼斯、英国、伊朗和美国。本次辣椒病害调查中,从 6 份辣椒病样中检测到 TMGMV,并测定其 CP 基因序列。引物 524-F 和 524-R 位于 CP 基因之外,直接对 PCR 产物进行两端测序即可获得完整 CP 基因序列。本研究中分离物 XMS6 与已报道分离物的核苷酸序列同源率为 97.9%~99.8%,聚类分析显示各分离物之间不具有明显的寄主相关性或地域相关性。病毒复合侵染现象在田间较为普遍,发现 3 份病样为 TMGMV 和 PMMoV 复合侵染,但症状与 TMGMV 单独侵染无区别。TMGMV 和 PMMoV 在血清学上有交叉反应,检测大量的田间样品时应在进行 ELISA 初筛后再使用 RT-PCR 进行确认,避免出现假阳性结果。

我国是辣椒种植和消费大国,种植面积 365 900 hm<sup>2</sup>。番茄是我国的重要经济作物,我国已成为世界三大番茄种植区之一。我国每年进口大量辣椒种子和番茄种子,最近本实验室从一批进境辣椒种子中检测到 TMGMV,说明该病毒有很高的传入风险。为保护辣椒与番茄产业安全,有必要加强辣椒、番茄种子的进境检疫和省间种子调运检

疫,并在辣椒、番茄的主产区和种子繁育基地进行病毒监测,防止病害大范围流行。

### 参考文献

- [1] Watterson J C. Development and breeding of resistance to pepper and tomato viruses [A]. Resistance to viral diseases of vegetables [M]. New York: Timber, 1993. 80-101.
- [2] McKinney H H. Evidence of virus mutation in the common mosaic of virus [J]. J. Agric. Res., 1935, 39: 557.
- [3] Alishiri A, Rakhshandehroo F, Zamanizadeh H R. First report of *Tobacco mild green mosaic virus* infecting tomato in Iran [J]. New Disease Reports, 2011, 23: 30.
- [4] Cohen J, Rosner A, Kagan S, *et al.* A new disease in Tabernaemontana associated with *Tobacco mild green mosaic virus* [J]. Annals of Applied Biology, 2001, 138: 153-159.
- [5] Xia H J, Li Z Y, Guo J Z, *et al.* Identification of a new virus on sweet pepper in Baoding district of Hebei province (in Chinese) [J]. Journal of Agricultural University of Hebei (河北农业大学学报), 2006, 29 (6): 65-67.

责任编辑:于金枝