

我国部分地区鲜食辣椒及其加工品中辣椒轻斑驳病毒的调查

张蔚, 张志想, 李世访*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 本研究利用 RT-PCR 技术对我国部分地区鲜食辣椒和辣椒加工品中的辣椒轻斑驳病毒 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) 进行了调查。其中, 鲜食辣椒样品(249 份)中 PMMoV 检出率为 75.5%; 147 份辣椒加工品中有 97 份检测到 PMMoV, 且所采集的每一类别的辣椒制品中都有阳性样品。调查结果表明: PMMoV 不仅广泛分布于我国辣椒种植区, 而且在多种辣椒加工品中的检出率也较高。该研究进一步明确了 PMMoV 的来源及可能的传播途径, 为该病毒的防控提供了理论依据。

关键词 辣椒轻斑驳病毒; RT-PCR; 鲜食辣椒; 辣椒加工品

中图分类号: S436.418.12 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.01.027

The survey of *Pepper mild mottle virus* in pepper and processed products in China

Zhang Wei, Zhang Zhixiang, Li Shifang

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract The survey of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) in pepper and processed products in China was conducted using RT-PCR. The results showed that the occurrence of PMMoV was 75.5% in 249 pepper fruits, and there were 97 positive samples in 147 pepper processed products. Moreover, positive samples were able to be found in each kind of collected pepper processed product. These results suggested that PMMoV was widely distributed in pepper production areas in China, and its detection rate was relatively high in many pepper processed products. Therefore, this study further clarifies the origin and possible routes of transmission of PMMoV, and provides a theoretical basis for the effective control of this virus.

Key words *Pepper mild mottle virus* (PMMoV); RT-PCR; pepper fruit; pepper processed products

辣椒轻斑驳病毒 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) 属于烟草花叶病毒属 *Tobamovirus*, 能够侵染茄科植物, 可引起辣椒果实褪绿斑驳、畸形, 造成产量和品质的下降。该病毒最早在美国发现, 现在已在世界范围内广泛存在^[1]。PMMoV 可以种传和汁液摩擦传毒, 在干燥的植物病残体上病毒可以存活 25 年, 介体不易传毒, 带毒种子、感病植株和病土是重要的传染源^[2]。值得注意的是, PMMoV 可能会危及人类的健康, 因为它在人体内的存在可能与发烧、腹痛及瘙痒等临床病症有关^[3]。因此, 有必要查清 PMMoV 的来

源及进入人体的途径。目前, 已经从辣椒酱中检测到了 PMMoV^[3-4], 这暗示 PMMoV 可能存在于各种辣椒加工品中。为此, 本试验对我国部分辣椒主产区的鲜食辣椒及辣椒丝、辣椒粉、酱菜等加工品进行了 PMMoV 的检测, 进一步明确了 PMMoV 的来源及可能的新的传播途径, 为该病毒的有效防控提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

鲜食辣椒采自山东、湖南、四川、山西、河南以及

收稿日期: 2016-03-04 修订日期: 2016-03-15

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估项目(GJFP2015014); 公益性行业(农业)科研专项(201303028)

* 通信作者 E-mail: sfli@ippcaas.cn

贵州的辣椒种植区及集贸市场,部分样品表现变色、斑驳、畸形、或出现褐色坏死条纹。辣椒加工品购自大型超市,包括酱菜类、剁辣椒、精制辣椒、辣椒酱、辣椒粉、辣椒丝、泡菜。

TRIzol 试剂购自天根生物技术(北京)有限公司;dNTPs、RNase 抑制剂、 $2\times Taq$ Mix 购自宝生物工程(大连)有限公司;M-MLV RTase 购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司。

引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成;测序由金唯智生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

鲜食辣椒总 RNA 提取采用 TRIzol 法,详见产品使用说明书;辣椒加工品总 RNA 提取参考 Callahan 等^[5]和 Morgens 等^[6]有关果实中 RNA 的提取方法。

1.2.2 RT-PCR、克隆与测序

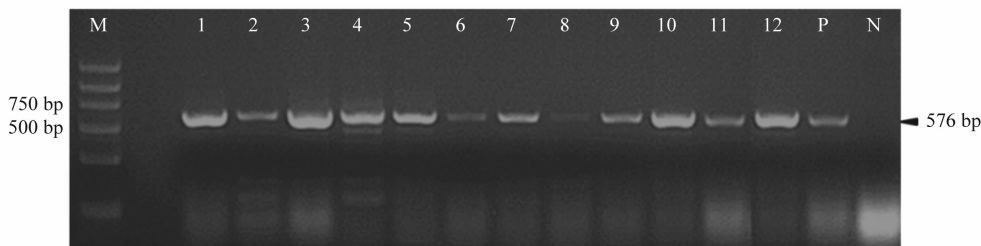
利用 PMMoV 的特异性引物 PMMoV-CP1/CP2^[7]对提取的总 RNA 进行 RT-PCR。反转录体系如下:RNA $1\ \mu\text{L}$ 、下游引物($10\ \mu\text{mol/L}$) $1\ \mu\text{L}$ 、 95°C 变性 $7\ \text{min}$,立即置于冰上冷却 $5\ \text{min}$;随后加入 M-MLV

RTase $0.5\ \mu\text{L}$ 、 $5\times\text{M-MLV buffer}$ $2.5\ \mu\text{L}$ 、dNTPs $0.5\ \mu\text{L}$ 、RNase 抑制剂($40\ \text{U}/\mu\text{L}$) $0.5\ \mu\text{L}$ 、补充 ddH_2O 至 $12.5\ \mu\text{L}$ 、 37°C 孵育 $60\ \text{min}$ 。PCR 反应体系为 $25\ \mu\text{L}$:反转录产物 $2\ \mu\text{L}$ 、上游引物($10\ \mu\text{mol/L}$)和下游引物($10\ \mu\text{mol/L}$)各 $1\ \mu\text{L}$ 、 $2\times Taq\ \text{Mix}$ $12.5\ \mu\text{L}$ 、 ddH_2O $8.5\ \mu\text{L}$ 。反应条件: 94°C 变性 $5\ \text{min}$; 94°C 变性 $30\ \text{s}$ 、 52°C 退火 $30\ \text{s}$ 、 72°C 延伸 $35\ \text{s}$ 、 30 个循环; 72°C 延伸 $10\ \text{min}$ 。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,切胶回收条带,并进行克隆测序。

2 结果与分析

2.1 鲜食辣椒中 PMMoV 的检测

本研究利用 RT-PCR 技术检测鲜食辣椒中的 PMMoV,其中阳性样品可扩增出一条大小约 $576\ \text{bp}$ 的片段(图 1)。鲜食辣椒样品中 PMMoV 的 RT-PCR 检测结果表明:249 份辣椒样品中有 188 份呈 PMMoV 阳性,检出率为 75.5% 。不同地区的 PMMoV 的检出率均高于 69.1% ,但无明显差异(表 1)。这说明 PMMoV 广泛分布于我国辣椒种植区且侵染率较高。



M: DNA marker AL2000; 1~2: 湖南衡阳样品; 3~4: 贵州六盘水样品; 5~6: 山西吕梁样品; 7~8: 四川乐山样品; 9~10: 河南商丘样品; 11~12: 山东青州样品; P: PMMoV 阳性对照; N: 水对照

M: DNA marker AL2000; 1-2: Samples from Hengyang, Hunan; 3-4: Samples from Liupanshui, Guizhou; 5-6: Samples from Lüliang, Shanxi; 7-8: Samples from Leshan, Sichuan; 9-10: Samples from Shangqiu, Henan; 11-12: Samples from Qingzhou, Shandong; P: Positive control of PMMoV; N: Water as negative control

图 1 鲜食辣椒中部分阳性样品 RT-PCR 检测结果

Fig. 1 RT-PCR result of PMMoV in some positive pepper fruits

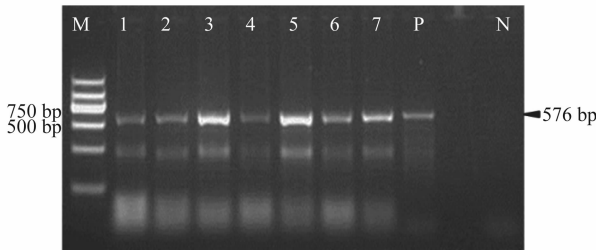
2.2 辣椒加工品中 PMMoV 的检测

除鲜食辣椒外,本研究还利用 RT-PCR 技术对辣椒加工品进行了检测, PMMoV 阳性样品可以扩增到 $576\ \text{bp}$ 大小的目的条带(图 2),检测结果表明,辣椒加工品中 PMMoV 的检出率也较高。147 份样品中有 97 份检测到 PMMoV,检出率为 66.0% 。所采集的每一类别的辣椒制品中均有阳性样品。其中,辣椒粉和辣椒丝中 PMMoV 的阳性率甚至高于 80% 。即使经过传统的发酵、腌制等加工过程后,含有辣椒的泡菜和酱菜中 PMMoV 的检出率仍大于 41.7% (表 2)。

3 讨论

我国于 1994 年首次在新疆辣椒上发现 PMMoV^[8],后来山东青岛、河北保定、北京、广东、海南等地区先后有该病毒发生的报道,其发生分布范围在不断地发展蔓延^[7-11]。本研究从湖南、贵州、山西、四川、河南及山东 6 个省份的鲜食辣椒中检测到 PMMoV,进一步明确了该病毒在我国的发生分布情况。除此之外,我们从 7 份辣椒酱中检测到 PMMoV,这一结果与 Peng 等^[3]和 Colson 等^[4]的发现相一致;另外,还从

初级加工品辣椒丝、辣椒粉、手工精制辣椒以及辣椒深加工制品酱菜和泡菜中检测到 PMMoV,且具有较高的检出率。这表明 PMMoV 通过食用辣椒制品进入人体的几率很高。考虑到 PMMoV 可能与一些临床病症的发生有关^[3],需对此足够重视,以保障食品安全及人类健康。



M: DNA marker AL2000; 1: 辣椒粉样品; 2: 辣椒丝样品; 3: 剁辣椒样品; 4: 酱菜样品; 5: 手工精制辣椒样品; 6: 辣椒酱样品; 7: 泡菜样品; P: PMMoV阳性对照; N: 水对照
M: DNA marker AL2000; 1: Chili powder; 2: Sliced chili; 3: Chopped hot pepper; 4: Pickle; 5: Handmade pepper; 6: Pepper sauce; 7: Pickled cabbage; P: Positive control of PMMoV; N: Water as negative control

图 2 辣椒加工品中部分阳性样品 RT-PCR 检测结果

Fig. 2 RT-PCR result of PMMoV in some positive pepper processed products

表 1 鲜食辣椒样品 PMMoV 检测结果

Table 1 Detection of PMMoV in pepper fruits

采集地点 Place	样品数量/个 Number of samples	阳性样品数/个 Number of positive samples	阳性率/% Positive ratio
贵州六盘水 Liupanshui, Guizhou	30	25	83.3
湖南衡阳 Hengyang, Hunan	48	39	81.3
山西吕梁 Lüliang, Shanxi	24	19	79.2
四川乐山 Leshan, Sichuan	48	37	77.1
河南商丘 Shangqiu, Henan	30	21	70.0
山东青州 Qingzhou, Shandong	68	47	69.1
总计 Total	249	188	75.5

一般认为, PMMoV 的主要侵染源为带毒种子、感病植株和病土,但随着科学研究的不断深入,一些新的侵染源和传播途径被人们所认识。近些年有研究发现在人体排泄物中也能够检测到 PMMoV,且具有侵染活性^[12],由此可以推测出 PMMoV 通过人体进行传播的新途径。农家肥、灌溉水等可能是 PMMoV 的新侵染源,在农事操作的过程中,再次侵染寄主植物。

表 2 辣椒加工品中 PMMoV 的检测结果

Table 2 Detection of PMMoV in pepper processed products

样品类别 Sample types	样品数量/个 Number of samples	阳性样品数/个 Number of positive samples	阳性率/% Positive ratio
辣椒粉 Chili powder	30	26	86.7
辣椒丝 Sliced chili	35	29	82.9
剁辣椒 Chopped hot pepper	23	13	56.5
酱菜 Pickle	15	8	53.3
手工精制辣椒 Handmade pepper	17	9	52.9
辣椒酱 Pepper sauce	15	7	46.7
泡菜 Pickled cabbage	12	5	41.7
总计 Total	147	97	66.0

参考文献

[1] Antignus Y, Lachman O, Pearlsman M, et al. A new pathotype of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) overcomes the *L*⁴ resistance genotype of pepper cultivars [J]. *Plant Disease*, 2008, 92(7): 1033 - 1037.

[2] 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.

[3] Colson P, Herve R, Christelle D, et al. *Pepper mild mottle virus*, a plant virus associated with specific immune responses, fever, abdominal pains, and pruritus in humans [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(4): e10041.

[4] Peng Jiejun, Shi Bingbin, Zheng Hongying, et al. Detection of *Pepper mild mottle virus* in pepper sauce in China [J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(8): 2079 - 2082.

[5] Callahan A M, Morgens P H, Walton E. Isolation and *in vitro* translation of RNAs from developing peach fruit [J]. *HortScience*, 1989, 24: 356 - 358.

[6] Morgens P H, Callahan A M, Dunn L J, et al. Isolation and sequencing of cDNA clones encoding ethylene-induced putative peroxidases from cucumber cotyledons [J]. *Plant Molecular Biology*, 1990, 14(5): 715 - 725.

[7] 夏惠娟, 李志勇, 郭京泽. 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] 向本春, 谢浩, 崔星明, 等. 新疆辣椒轻微斑驳病毒病的分离鉴定 [J]. *病毒学报*, 1994, 10(3): 240 - 245.

[9] 姚玉荣, 陈国华, 冯兰香, 等. 北运蔬菜基地辣椒病毒病病原种类的分子检测 [J]. *中国蔬菜*, 2013(10): 84 - 89.

3 讨论

已有研究表明,寄主品种对于病菌毒性有较强的选择作用^[4-7]。本研究利用4套鉴别寄主对来自黑龙江3个感病品种的25个菌株进行生理小种和致病型测定,均发现不同品种来源其菌株致病性具有较大差异,其中‘垦稻10’上分离的菌株其致病性明显弱于‘龙粳17’、‘吉特639’上分离的菌株,‘龙粳17’上分离的菌株致病性相似系数与其他两个品种上分离菌株有较大差异。因此,研究和监测稻瘟病菌群体毒性的变化动态,必须考虑不同品种上抽样数量的影响,最好是采用‘丽江新团黑谷’等普感品种作为菌株来源。

虽然本研究所用菌株较少,但毒性测定结果表明,‘四丰43’、‘Pi-9’等5个品种或抗稻瘟基因对黑龙江稻瘟病菌株抗性较好,值得进一步研究。在本研究基础上,进一步利用不同致病性和强致病性的稻瘟病菌菌株筛选具有广谱抗性的水稻抗稻瘟病资源和育种材料,将有利于黑龙江抗稻瘟病品种的选育和布局。

参考文献

- [1] 宋成艳. 黑龙江省水稻新品种(系)抗稻瘟病性鉴定及利用[J]. 植物保护, 2011, 37(4): 142-145.
- [2] 支庚银, 张国民, 雷材林, 等. 黑龙江省2007年水稻稻瘟病生产调研及建议[J]. 黑龙江农业科学, 2010(4): 68-70.
- [3] 雷财林, 张国民, 程治军, 等. 黑龙江省稻瘟病菌生理小种毒力基因分析及抗病育种策略[J]. 作物学报, 2011, 37(1): 18-27.
- [4] 肖丹凤, 王玲, 刘连盟, 等. 黑浙桂稻瘟病菌生理小种鉴定与遗传多样性分析[J]. 西南农业学报, 2014, 27(1): 121-126.
- [5] 王延锋, 时新瑞, 梁嘉陵, 等. 黑龙江省稻瘟病菌生理小种的鉴定[J]. 黑龙江农业科学, 2011(3): 15-17.
- [6] 刘志恒, 王世维, 魏松红, 等. 2011-2012年辽宁省稻瘟病菌种群动态分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2014, 45(4): 393-397.
- [7] 马军韬, 张国民, 辛爱华, 等. 黑龙江省稻瘟病菌生理小种鉴定与分析[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 97-99.

- [8] Tsunematsu H, Yanoria M J T, Ebron L A, et al. Development of monogenic lines of rice for blast resistance [J]. Breeding Science, 2000, 50(3): 229-234.
- [9] 杨秀娟, 阮宏椿, 杜宜新, 等. 福建省稻瘟病菌致病性及其无毒基因分析[J]. 植物保护学报, 2007, 34(4): 337-342.
- [10] Flor H H. Current status of the gene for gene concept [J]. Annual Review of Phytopathology, 1971(9): 275-296.
- [11] 兰波, 杨迎青, 徐沛东, 等. 水稻主要抗瘟基因品系对江西省稻瘟病菌分离株系的抗性分析[J]. 植物保护学报, 2014, 41(2): 163-168.
- [12] 刘文德, 阮志平, 郑士琴, 等. 水稻主要抗瘟基因对福建稻瘟菌群体的抗性分析[J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 526-531.
- [13] 马军韬, 张国民, 辛爱华, 等. 哈尔滨地区抗瘟基因抗性分析及水稻品种抗性评价与利用[J]. 植物保护学报, 2015, 42(2): 160-168.
- [14] Onaga G, Wydra K, Koopmann B, et al. Population structure, pathogenicity, and mating type distribution of *Magnaporthe oryzae* isolates from East Africa [J]. Phytopathology, 2015, 105(8): 1137-1145.
- [15] Wang J C, Correll J C, Jia Y. Characterization of rice blast resistance genes in rice germplasm with monogenic lines and pathogenicity assays [J]. Crop Protection, 2015, 72: 132-138.
- [16] 杨祁云, 朱小源, 范仕容. 广东稻瘟病菌生理小种辅助鉴别寄主的筛选及应用[J]. 植物保护学报, 2001, 28(2): 189-190.
- [17] Ji Hongli, Shen Li, Xiang Yunjia, et al. Studies on the complementary differential varieties and local physiologic races of *Magnaporthe grisea* in Sichuan Province [M]//Wang G L, Valent B. Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease. The Netherlands: Springer Linker, 2009: 229-238.
- [18] 阮宏椿, 黄华康, 陈福如, 等. 稻瘟病培养基筛选试验[J]. 福建稻麦科技, 2004, 22(1): 31-32.
- [19] 周江鸿, 王久林, 蒋婉如, 等. 我国稻瘟病菌毒力基因的组成及其地理分布[J]. 作物学报, 2003, 29(5): 646-651.
- [20] Mackill D J, Bonman J M. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice [J]. Phytopathology, 1992, 82: 746-749.
- [21] 全国稻瘟病生理小种联合试验组. 我国稻瘟病菌生理小种研究[J]. 植物病理学报, 1980, 10(2): 71-82.
- [22] Atkins J G, Robert A L, Adair C R, et al. An international set of rice varieties for differentiating races of *Piricularia oryzae* [J]. Phytopathology, 1967, 57: 297-301.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接160页)

- [10] Wang X F, Liu F, Zhou G, et al. Detection and molecular characterization of *Pepper mild mottle virus* in China [J]. Journal of Phytopathology, 2006, 154(11/12): 755-757.
- [11] 黄粤, 马荣群, 翟晓灵. 辣椒温和斑点病毒PMMV外壳蛋白基因的克隆和序列测定[C]//蔬菜分子育种研讨会论文集, 2004.

- [12] Zhang Tao, Mya B, Lee W H, et al. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses [J]. PLoS Biology, 2006, 4(1): 108-118.

(责任编辑: 杨明丽)