

北京地区辣椒上黄瓜花叶病毒和甜菜西方黄化病毒复合侵染的分子鉴定

左琳或[#], 雍容婧[#], 袁雯, 杜开通, 周涛^{*}

(中国农业大学植物病理学系, 北京 100193)

摘要 辣椒是我国重要的蔬菜和经济作物,受多种病毒危害。2014年在北京市顺义区调查时发现部分种植的辣椒植株上叶片大面积黄化,边缘症状明显,个别植株叶片轻微上卷。提取典型症状样品的总RNA,反转录得到cDNA,分别用黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)特异引物和马铃薯卷叶病毒属(*Polerovirus*)通用引物进行PCR检测,CMV特异引物和马铃薯卷叶病毒属通用引物分别扩增得到约650 bp和1 400 bp的特异条带。测序和核苷酸序列比对表明,其分别与CMV和甜菜西方黄化病毒(*Beet western yellows virus*, BWYV)序列同源性最高为99%和96%。这是对我国种植的辣椒上发生的CMV和BWYV复合侵染的首次报道。

关键词 蚜传病毒; 黄瓜花叶病毒; 甜菜西方黄化病毒; 复合侵染; RT-PCR

中图分类号: S 436.418.12 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.03.033

Molecular identification of co-infection of *Cucumber mosaic virus* and *Beet western yellows virus* on pepper in Beijing

Zuo Linyu, Yong Rongjing, Yuan Wen, Du Kaitong, Zhou Tao

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Pepper, an important vegetable and economic crop, is susceptible to many viruses. In a survey of virus diseases on vegetables in 2014, some pepper plants showing typical yellow leaf symptom were found in Shunyi District, Beijing, China. Total RNA was isolated from the sample with typical symptom, and reverse transcript-PCR assays were performed with specific primers for *Cucumber mosaic virus* (CMV) and degenerate primers for *Polerovirus*. Two specific DNA fragments, one about 650 bp and another 1 400 bp, were obtained using primers for CMV and *Polerovirus*, respectively. Nucleotide sequence analysis showed that they had the highest identity of 99% and 96% with that of CMV and *Beet western yellows virus* (BWYV), separately. To our knowledge, this is the first report of co-infection of CMV and BWYV on pepper plants.

Key words aphid-borne virus; *Cucumber mosaic virus*; *Beet western yellows virus*; co-infection; RT-PCR

辣椒(*Capsicum annuum* Linn.)属茄科,为一年生或有限多年生草本植物,是世界上广泛种植的蔬菜之一,尤其在我国的日常饮食中扮演着重要的角色。辣椒病毒病是我国辣椒生产中的主要病害之一,常造成花叶、黄化、畸形等症状,对辣椒产量造成严重影响。据报道,至少有45种病毒可侵染辣椒,以烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)和黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)发

生最为普遍,马铃薯Y病毒(*Potato virus Y*, PVY)、马铃薯X病毒(*Potato virus X*, PVX)、番茄褪绿病毒(*Tomato chlorosis virus*, ToCV)、番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)、烟草蚀纹病毒(*Tobacco etch virus*, TEV)、苜蓿花叶病毒(*Alfalfa mosaic virus*, AMV)、烟草曲茎病毒(*Tobacco curly shoot virus*, TbCSV)等也是常见的侵染辣椒的病毒^[1-6]。2014年夏我们在对河北唐山

收稿日期: 2015-05-23

修订日期: 2015-07-23

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303028); 国家大学生科技创新项目

* 通信作者 E-mail: taozhoucau@cau.edu.cn

为并列第一作者

辣椒病毒病进行调查和检测过程中,首次检测到了甜菜西方黄化病毒(*Beet western yellows virus*, BWYV)^[7]。

黄瓜花叶病毒(CMV)是危害辣椒的主要病毒之一,主要通过蚜虫传播,引起辣椒系统花叶、皱缩和矮化,导致果实畸形,严重减产^[8]。我国长江流域辣椒种植区受害最重,一般年份可造成减产20%~30%,严重时损失可达50%~60%,个别地区甚至绝收^[9]。在所有侵染辣椒的病毒中,CMV检出率最高,是辣椒抗病育种的主攻目标^[10]。BWYV属于马铃薯卷叶病毒属(*Polerovirus*),危害世界许多地区的甜菜生产,是我国甜菜黄化病的致病因子之一,在内蒙古和甘肃的甜菜产区均有发生。自然界中,BWYV主要通过蚜虫以持久循环非增殖方式传播,主要危害藜科植物如甜菜等,还危害十字花科、茄科、葫芦科、豆科、马齿苋科植物^[11]。

2014年秋,在北京市顺义地区对蔬菜常见病害进行调查时,在大田露地种植的辣椒上发现叶片出现明显的黄化症状,有些植株叶片大部分黄化,边缘症状明显;个别植株叶片轻微上卷。作者采集具有典型发病症状的辣椒样品,提取叶片总RNA后进行反转录,利用特异引物或通用引物进行PCR检测,并经序列测定和比对分析,对其病原进行了鉴定,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2014年6月在北京顺义杨镇中国农业科学院蔬菜花卉研究所基地大田中采集表现典型叶片黄化,叶脉间组织失绿并带有褐色小斑的辣椒叶片,整理后取一部分用于总RNA的提取。

1.2 叶片总RNA的提取

利用TRIzol法提取辣椒叶片总RNA。取症状典型的叶片于液氮中研磨,将0.1g粉末转入1.5mL离心管中,迅速加入1mL TRIzol试剂,振荡混匀,室温静置5min后,4℃下12 000 r/min离心10min。将上清液转入1.5mL离心管,加入0.2mL氯仿混匀,室温放置5min后,4℃下12 000 r/min离心10min,取上清液540μL至1.5mL离心管,加入等体积异丙醇并混匀。室温放置30min,4℃下12 000 r/min离心10min,用75%乙醇洗涤沉淀。最后用无核酶的去离子水

溶解。

1.3 反转录PCR和序列测定

在RNA专用离心管中加入总RNA 2μg、10μmol/L random primer 0.5μL和10mmol/L dNTPs 0.5μL,用无核酶的超纯水补充体积至25μL;混匀后于离心机中短暂离心,放入65℃金属浴中变性5min;冰浴3min后,依次向管中加入5×M-MLV buffer 5μL、Ribonuclease Inhibitor 0.5μL、M-MLV反转录酶1.0μL,混匀后短暂离心;42℃水浴1h。

将反转录得到的cDNA分别用CMV特异检测引物CMVCPf(5'-ATGGACAAATCTGAAT-CAACAA-3')、CMVCPr(5'-TCAGACTGGGAG-CACCCCAGACGT-3')^[12],以及*Polerovirus*属通用检测引物PoconF(5'-GAYTGYTCYGGTTTT-GACTGG-3')、PocoCPR(5'-CGTCTACCTATTTSG-GRTTN-3')^[13]进行PCR,扩增CMV外壳蛋白的部分保守序列以及BWYV中编码ORF2和ORF3之间的部分保守序列。20μL的PCR反应体系如下:cDNA 1μL、10mmol/L dNTPs 1μL、10mmol/L上游引物和下游引物各1μL、10×反应缓冲液2μL、5U/μL Taq DNA聚合酶0.25μL、ddH₂O 13.8μL。PCR反应条件为:95℃变性3min;按下列条件进行35个循环:95℃变性30s,55℃复性45s,72℃延伸2min;循环结束后在72℃延伸10min。全部PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳分离。PCR产物送至华大基因公司进行测序获得序列。

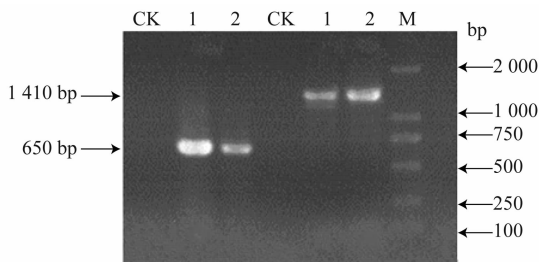
1.4 序列比对分析

利用NCBI序列比对工具BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)程序nucleotide blast比对分析克隆获得的序列,根据同源性确定病毒种类。

2 结果与分析

2.1 样品检测

以反转录得到的cDNA为模板,利用CMV特异引物(CMVCPf和CMVCPr)和*Polerovirus*通用检测引物(PoconF和PococpR)进行PCR,得到约650bp和1410bp的片段(图1),与CMV和*Polerovirus*检测引物的目标片段长度相符,表明采集的辣椒样品可能被CMV和*Polerovirus*属的病毒复合侵染危害。



M: DNA marker 2000; CK: 健康辣椒样品对照; 1-2: 表现黄化症状的辣椒叶片样品

M: DNA marker 2000; CK: Healthy pepper as negative control; 1-2: Pepper samples with symptom of yellowing leaves

图 1 利用 RT-PCR 检测辣椒样品的 BWYV 和 CMV

Fig. 1 Detection of BWYV and CMV on pepper samples using RT-PCR

2.2 CMV 和 BWYV 北京分离物部分序列分析

将 2.1 获得的 PCR 产物切胶回收纯化后,利用检测引物进行目标片段序列测定,获得的有效序列大小分别为 620 bp 和 1 240 bp。经 BLAST 程序中的 nucleotide blast 进行序列同源性检索和分析,结果表明,经 RT-PCR 检测为 CMV 和 BWYV 的阳性辣椒样品,其扩增序列分别与 GenBank 中报道的 CMV 和 BWYV 序列有很高的同源性。其中,长度为 620 bp 的序列与登录号为 EF088683. 1、EF424784. 1、AY600989. 1、EF424782. 1、EF424778. 1、AF127977. 1、KJ467817. 1、EF122499. 1 的部分序列均有 99% 的同源性;长度为 1 240 bp 的序列与韩国的 BWYV 分离物序列 (KM076647. 1) 同源性最高,同源性高达 96%,与 BWYV 北京分离物 HM804471. 1 和 HM804472. 1 的同源性分别为 94% 和 93%;与 BWYV 美国分离物 AF473561. 1 的同源性为 90%。以上序列分析结果表明,在北京顺义采集的辣椒样品被 CMV 和 BWYV 复合感染。

3 讨论

通过对在北京市顺义区采集的表现病毒病症状的辣椒样品进行 RNA 提取、RT-PCR、测序和分析,经在 NCBI 上进行 BLAST 序列比对,结果表明辣椒样品被 CMV 和 BWYV 复合侵染,这是在我国首次发现 CMV 和 BWYV 复合侵染辣椒。CMV 是我国辣椒上发生的一种常见病毒,而 BWYV 目前仅在我国河北的辣椒上发生,是我国辣椒上发生的一种新病毒^[7]。鉴于辣椒的重要性和辣椒上发生病毒的多样性,有必要对 BWYV 在我国辣椒上的发生、危害情况等详细调查研究,便于尽早制定有效的防治策略和措施,减少生产损失。

CMV 和 BWYV 的自然传播介体均是蚜虫。蚜虫种类多,分布广,繁殖能力强,是传播植物病毒病的主要介体。许多蚜虫种类有长距离迁飞的行为,迁飞多发生在晴朗的白天,温度、光照和风是影响迁飞的主要因素,条件适合时,蚜虫可上升到逆温层并随气流迁飞到上百公里以外的地方^[14]。这些特点使蚜传病毒病的发生具有突发性,且一旦发生危害严重。

病毒病是辣椒上的常见病害,且多种病毒复合侵染时有发生,田间症状复杂,对生产危害大。实际生产中,为降低病毒病的发生和危害,应在选择抗病病毒品种的基础上,加强对传毒介体(如蚜虫等)的监测和控制,发现传毒介体大发生时,及时采取化学和物理等防治措施进行有效防治。

参考文献

- [1] 杨永林, 闫淑珍, 田如燕, 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] 雷蕾, 林清, 吕中华, 等. 重庆市辣椒病毒病原种类鉴定及株系确认[J]. 西南园艺, 2001, 29(2):28-29.
- [3] 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.
- [4] 奚庆, 赵尊练, 巩振辉, 等. 病毒病对线辣椒果实品质和生理指标的影响[J]. 西北农业学报, 2007, 16(3):132-135.
- [5] 赵汝娜, 王蓉, 师迎春, 等. 侵染甜椒的番茄褪绿病毒的分子鉴定[J]. 植物保护, 2014, 40(1):128-130.
- [6] 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.
- [7] Yuan W, Yong R J, Zuo L Y, et al. First report of *Beet western yellows virus* on pepper in China [J]. Journal of Plant Pathology, 2015, 97(2):400.
- [8] 吴小丽, 王述彬, 曹磊生. 辣(甜)椒抗黄瓜花叶病毒(CMV)研究进展[J]. 辣椒杂志, 2006(4):4-9.
- [9] 吴小丽. 辣椒抗黄瓜花叶病毒(CMV)遗传分析及 ISSR 分子标记筛选[D]. 扬州:扬州大学, 2007.
- [10] 郭广君, 刁卫平, 刘金兵, 等. 辣椒抗黄瓜花叶病毒病研究进展[J]. 华北农学报, 2014(29):77-84.
- [11] 向海英. 马铃薯卷叶病毒属新病毒的分子鉴定及其 P0 蛋白功能分析[D]. 北京:中国农业大学, 2011.
- [12] Wang Rong, Wang Nian, Ye Ting, et al. Natural infection of maize by *Cucumber mosaic virus* in China [J]. Journal of Phytopathology, 2013, 161:880-883.
- [13] Zhou Cuiji, Xiang Haiying, Zhou Tao, et al. A novel strain of Beet western yellows virus infecting sugar beet with two distinct genotypes differing in the 5'-terminal half of genome [J]. Virus Genes, 2011, 42:141-149.
- [14] 刘向东, 翟保平, 张孝羲. 蚜虫迁飞的研究进展[J]. 昆虫知识, 2004, 41(4):301-307.

(责任编辑:杨明丽)