

刘 健,张德咏,张松柏,等. 湖南和福建辣椒上辣椒脉斑驳病毒的检测及系统发育分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):184-185.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.051

湖南和福建辣椒上辣椒脉斑驳病毒的检测及系统发育分析

刘 健¹, 张德咏^{1,2}, 张松柏², 刘 勇^{1,2}

(1. 中南大学研究生院隆平分院, 湖南长沙 410125; 2. 湖南省植物保护研究所, 湖南长沙 410125)

摘要:辣椒脉斑驳病毒(*Chilli veinal mottle virus*, ChiVMV), 目前我国仅有在海南黄灯笼辣椒上严重危害的报道。利用湖南省和福建省采集的辣椒样本, 检测辣椒 ChiVMV 的检出率, 并克隆 ChiVMV 的 CP 基因序列, 用邻近法构建了系统进化树, 分析其遗传进化情况。结果表明, 辣椒的 ChiVMV 省检出率湖南省为 25%, 福建省为 20%; 克隆了湖南省和福建省 ChiVMV CP 基因各 1 个, 系统发育表明, 湖南省和福建的 ChiVMV 株系与源于韩国 ChiVMV 株系聚在一个亚簇, 而与我国其他地区 ChiVMV 亲缘关系较远, 表明侵染辣椒的 ChiVMV 在我国进一步扩展, 且存在遗传分化趋势。

关键词:辣椒脉斑驳病毒; 检测; CP 基因; 系统发育分析

中图分类号: S436.418.1⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0184-02

辣椒, 一种茄科辣椒属植物, 原产于中南美洲热带地区, 在全世界都有广泛栽培, 是世界上消费量最大的蔬菜之一。我国辣椒种植面积高达 140 万 hm^2 以上, 占据我国所有蔬菜作物种植面积的 10%^[1]。辣椒病毒病是威胁辣椒安全生产的重要病害, 目前能够侵染辣椒的病毒有 40 多种^[2-3], 其中辣椒脉斑驳病毒(*Chilli veinal mottle virus*, ChiVMV) 是危害辣椒作物的最主要病毒之一; 该病毒于 1979 年首次在马来半岛的辣椒作物上被发现^[4], 随后在世界上许多国家的辣椒作物上陆续被报道^[5-7]。ChiVMV 主要依靠蚜虫进行非持久性传播^[4], 还能通过病株汁液和机械接触等方式传播, 不能通过种子传播, 因此, 其传播扩散速度非常快。

在我国, ChiVMV 首先在海南省被报道, 严重危害海南的

黄灯笼椒^[8], 随后在陕西、云南等地区相继发生^[8-10]。然而, 到目前为止, 尚未见 ChiVMV 在湖南以及福建等地区的报道。鉴于 ChiVMV 对辣椒生产的威胁, 本研究检测了湖南和福建等地辣椒上 ChiVMV 的发生情况, 克隆了湖南和福建等地 ChiVMV 株系的 CP 基因, 并分析了其系统发育关系, 以期明确我国 ChiVMV 的分布及遗传进化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

辣椒样品: 2013 年 8 月, 在湖南省和福建省进行辣椒病毒病调查, 发现部分地块辣椒病毒病的发病症状与 ChiVMV 类似, 表现为植株矮小, 叶片畸形(包括叶片黄化、叶卷曲、叶面枯斑、叶沿皱缩等)。采集湖南省辣椒样本 16 个、福建省辣椒样本 8 个。

ChiVMV ELISA 检测试剂盒购自美国 RB 公司; cDNA 试剂盒、DNTP、氨基青霉素、EASY Taq DNA 聚合酶和 DNA 回收试剂盒均购自北京全氏金生物技术有限公司, Trizol 试剂盒购自 Ambion 公司, Elisa 试剂盒购自 RP 公司; 供试引物由华大基因公司合成, DNA 测序测定由生物工程(上海)有限公司完成。

收稿日期: 2016-03-24

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(编号: 201303038); 国家大宗蔬菜产业技术体系(编号: CARS-25-B-05)。

作者简介: 刘 健(1989—), 男, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: lj46311688@163.com。

通信作者: 刘 勇, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物病毒研究。Tel: (0731) 84691176; E-mail: haoasliu@163.com。

[3] Gonçalves O, Pereira R, Gonçalves F, et al. Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and their influence on the susceptibility towards antibiotics of two clinically relevant bacterial strains [J]. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2011, 723(1): 18-25.

[4] Zeng Q, Guan B, Qin J J, et al. 2, 3 - Seco - and 3, 4 - seco - tirucallane triterpenoid derivatives from the stems of *Aphanamixis grandifolia* Blume [J]. Phytochemistry, 2012, 80: 148-155.

[5] 黄 森, 梅文莉, 蔡彩虹, 等. 大叶山楝根化学成分与细胞毒活性的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2015, 23(3): 329-333.

[6] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA [J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6): 72-73.

[7] 刘冬梅, 李 理, 杨晓泉, 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111.

[8] 檀根甲, 祝建平. 杀菌剂生物测定计算方法及应用 [J]. 安徽农学通报, 1998, 4(1): 28-29.

[9] 董世豪, 巩 婷, 朱 平. 相似蜂海绵相关真菌杂色曲霉 F62 活性代谢产物研究 [J]. 菌物学报, 2011, 30(4): 636-643.

[10] 巩 婷, 董世豪, 朱 平. 海洋真菌杂色曲霉 F62 丁内酯类化合物研究 [J]. 菌物学报, 2014, 33(3): 706-712.

[11] 赵彩桂. 山楝、棒抱拟盘多毛孢和杂色曲霉化学成分研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2014: 65-79.

[12] 王香粉. 五花血藤和海洋真菌杂色曲霉化学成分的研究 [D]. 保定: 河北大学, 2014: 55-56.

1.2 ELISA 检测

ELISA 检测具体操作步骤按说明书进行。阳性对照为试剂盒自带 ChiVMV 病毒初提纯物;阴性对照为温室内健康辣椒苗的研磨液。

1.3 RT-PCR

Trizol 法抽提辣椒叶片总 RNA,取 500 ng 总 RNA,采用 All-in-one First-Strand cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。以合成 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 扩增条件为:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,34 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增引物 ChiVMV CP 特异性引物,CPF(5′-GCGGGAGAGAGTGTGATGCTG-3′),CPR(5′-TCGCCAC-TATTGAACAGCTTAAC-3′);1.0% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物,回收符合预期大小的条带,送生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.4 序列进化分析

从 Genbank 数据库中下载了 9 个 ChiVMV 典型分离物的 CP 基因序列。利用 CLUSTAL W 对所有 CP 序列进行多序列联配,利用 Mega 5.0 采用邻接法,构建 ChiVMV CP 基因的系统发育树^[11]。

2 结果与分析

2.1 ChiVMV ELISA 检测

ELISA 检测结果表明,从湖南采集的 16 个辣椒样本中,共有 4 个样本呈现阳性;而从福建采集的 8 个样本中,检测出 2 个阳性样本。

2.2 ChiVMV CP 基因克隆与序列分析

RT-PCR 结果表明,扩增得到大小为 1 100 bp 的条带(含 ChiVMV CP 全基因序列以及部分上游基因序列),与预期大小一致。将 RT-PCR 扩增得到的条带进行序列测定,截取 ChiVMV CP 基因序列,输入 NCBI 进行比对,比对结果表明,福建和湖南等地的 ChiVMV 株系 CP 基因与来源于韩国辣椒的 ChiVMV 序列同源性最高(>97%)。

2.3 序列的系统发育分析

从 ChiVMV-hn 和 ChiVMV-fj 的系统发育树(图 1)可以看出,发育树共分成 3 个分支,分别为韩国株系分支、印度株系分支和中国株系分支,具有很强的地域性;而 ChiVMV-hn 和 ChiVMV-fj 与韩国的 2 个分离物(AJ972878.1 和 AM909717.1)构成 1 个分支,表明湖南和福建等地的 ChiVMV 株系与韩国 ChiVMV 的亲缘关系较近。系统发育分析还表明,我国辣椒上的 ChiVMV 具有遗传分化的趋势。

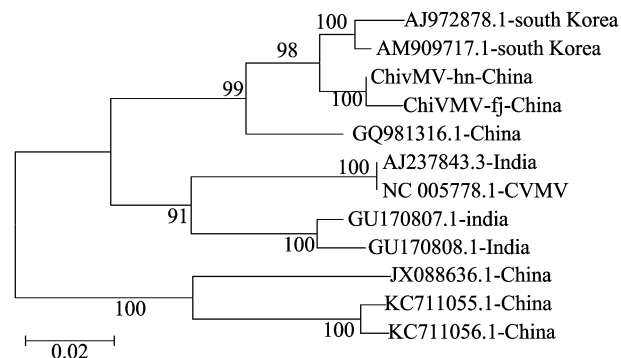


图1 ChiVMV CP 基因系统发育分析

3 结论

ChiVMV 是一种(+)ssRNA 病毒,是 Potyvirus Y 病毒属的确定种,该病毒的存在严重制约着韩国、印度、泰国等国和我国台湾等地的辣椒生产,是造成这些地方辣椒减产的最主要原因之一^[4,12]。本研究采用 ELISA 以及 RT-PCR 方法在湖南省和福建省等地的辣椒病样检测到 ChiVMV,表明 ChiVMV 在我国的侵染范围正逐步扩展,对我国辣椒的生产具有潜在的威胁。

ChiVMV 湖南和福建等地的 CP 基因序列的系统发育分析显示,我国的 ChiVMV 存在遗传分化的趋势;由于 ChiVMV 不同株系对辣椒的致病性存在差异,因此,我国 ChiVMV 的株系分化情况,急需开展进一步的研究,为分析 ChiVMV 对辣椒的危害提供科学依据,同时为该病毒的科学防控提供科学参考。

参考文献:

- [1] 孙国胜,马志虎,孙春青,等. 早春辣椒连作免耕栽培技术[J]. 中国蔬菜,2015,28(1):55-56.
- [2] Watterson J C. Development and breeding of resistance to pepper and tomato viruses[M]//Kyle M M. Resistance to viral diseases of vegetables:genetics and breeding. New York:Timber,1993:80-101.
- [3] Green S K, Kim J S. Characteristics and control of viruses infecting peppers;a literature review[R]. Taiwan:Asian Vegetable Research and Development Center,1991.
- [4] Ong C A, Varghese G, Ting W P. Aetiological investigations on a veinal mottle virus of chill (*Capsicum annuum* L.) newly recorded from peninsula Malaysia[J]. Mardi Res Bull,1979,7:78-88.
- [5] Chiemsombat P, Sac-Ung N, Attathom S, et al. Molecular taxonomy of a new potyvirus isolated from chilli pepper in Thailand [J]. Archive of Virology,1998,143(10):1855-1863.
- [6] Nono-Womdim R, Swai I S, Chadha M L, et al. Occurrence of *Chilli veinal mottle virus* in *Solanum aethiopicum* in Tanzania [J]. Plant Disease,2001,85(7):801-801.
- [7] Anindya R, Joseph J, Gowri T D S, et al. Complete genomic sequence of pepper vein banding virus (PVBV):a distinct member of the genus *Potyvirus* [J]. Arch Virol,2004,149:625-632.
- [8] Wang J, Liu Z, Niu S, et al. Natural occurrence of Chilli veinal mottle virus on *Capsicum chinense* in China [J]. Plant Disease,2006,90(3):377.
- [9] Tan G T, Shi L L, Shang H L, et al. Diagnosis of viruses in chili pepper in Shanxi Province[J]. China Capsicum,2003,3:32.
- [10] Ding M, Yang C, Zhang L, et al. Occurrence of *Chilli veinal mottle virus* in *Nicotiana tabacum* in Yunnan, China [J]. Plant Disease,2011,95(3):357.
- [11] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution,2011,28:2731-2739.
- [12] Nono-Womdim R. An overview of major virus diseases of vegetable crops in Africa and some aspects of their control[M]//Hughes J, Odu B. Plant virology in sub-Saharan Africa. Ibadan:International Institute for Tropical Agriculture,2004:211-232.