

# 贵州辣椒叶脉黄化病毒分离物检测及其 P0、CP、MP 基因进化分析

王莉爽<sup>1,2</sup>, 李 淳<sup>2</sup>, 杨学辉<sup>2</sup>, 张松柏<sup>3</sup>, 刘 勇<sup>1,3,\*</sup>

(<sup>1</sup>湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128; <sup>2</sup>贵州省农业科学院植物保护研究所, 贵阳 550006; <sup>3</sup>湖南省农业科学院植物保护研究所, 长沙 410125)

**摘 要:** 为明确辣椒叶脉黄化病毒 (Pepper vein yellows virus, PeVYV) 在贵州辣椒上的发生分布及其分子变异情况。用 RT-PCR 法对采自贵州省 25 个采样地点的 548 份辣椒疑似病毒病样品进行检测。结果表明: 129 份为阳性样品, 检出率为 23.54%。将获得的 14 个不同采样点 PeVYV 分离物和已报道的中国和其他国家 PeVYV 分离物进行序列比对, P0 基因核苷酸同源率为 90.9%~100.0%, 氨基酸相似性为 97.7%~100.0%; CP 基因核苷酸同源率为 93.7%~100.0%, 氨基酸相似性为 97.9%~100.0%; MP 基因核苷酸同源率为 94.7%~100.0%, 氨基酸相似性均为 100.0%。在系统进化树中, 有 13 个采样点 PeVYV 分离物 P0 基因聚在一起, 与中国分离物 (KP326573) 的亲缘关系较近, 而遵义播州 PeVYV 分离物与澳大利亚分离物的亲缘关系较近。贵州所有 PeVYV 分离物 CP 基因与中国、澳大利亚、美国 and 西班牙分离物聚为一支, 但不同采样点的 PeVYV 分离物又聚为两个不同的分支。而不同采样点 MP 基因全部聚在一起, 且与其他地区 PeVYV 分离物的差异不明显。研究结果表明贵州辣椒上不同地区 PeVYV 分离物具有一定的分子差异, 存在遗传分化现象。

**关键词:** 辣椒; 辣椒叶脉黄化病毒; P0 基因; CP 基因; MP 基因

**中图分类号:** S 641.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2020) 12-2415-12

## Identification of Pepper Vein Yellows Virus and Evolution Analysis of P0, CP and MP Genes

WANG Lishuang<sup>1,2</sup>, LI Chun<sup>2</sup>, YANG Xuehui<sup>2</sup>, ZHANG Songbai<sup>3</sup>, and LIU Yong<sup>1,3,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; <sup>2</sup>Plant Protection Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China; <sup>3</sup>Plant Protection Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

**Abstract:** In order to find out the occurrence and distribution of pepper vein yellows virus (PeVYV) and its molecular variation on pepper in Guizhou. 548 suspected samples from 25 sampling location in Guizhou Province were analyzed using RT-PCR. The results showed that 129 samples were positive and the detection rate was 23.54%. The sequence alignment of the PeVYV isolates from 14 different locations with the reported PeVYV isolates from China and other countries was performed, the nucleotide and

**收稿日期:** 2020-07-15; **修回日期:** 2020-09-01

**基金项目:** 贵州省基础科学研究计划项目 (黔科合基础[2017]1183); 国家重点实验室开放基金项目 (SKLOF201817)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: haoasliu@163.com)

amino acid homology of P0 gene was 90.9% – 100.0%, amino acid similarity was 97.7% – 100.0%, the nucleotide and amino acid homology of CP gene was 93.7% – 100.0%, amino acid similarity was 97.9% – 100.0%, the nucleotide and amino acid homology of MP gene was 94.7% – 100.0%, amino acid similarity was 100.0%. In the phylogenetic tree, the results indicated that P0 of PeVYV from 13 locations were clustered and closely related to the isolates(KP326573), isolates from Bozhou, Zunyi, were closely related to the isolates from Australia. All PeVYV isolates CP gene in Guizhou were clustered with isolates from China, Australia, the United States and Spain. But the PeVYV isolates from different locations were clustered into two different branches. All MP genes from different locations were clustered together, and there was no significant difference in comparing with isolates from the other regions. The research results show that PeVYV isolates from different regions had molecular variation and genetic differentiation.

**Keywords:** pepper; pepper vein yellow virus; P0 gene; CP gene; MP gene

贵州省是辣椒种植大省, 种植面积和产量均位居全国前列。辣椒病毒病是辣椒产业健康发展的限制因子之一。目前, 中国已报道侵染辣椒病毒病种类有 33 种(刘勇, 2019), 在贵州地区已鉴定出 13 种侵染辣椒的病毒(王莉爽 等, 2015; Zhang et al., 2015; 冯耿 等, 2017)。辣椒叶脉黄化病毒(Pepper vein yellow virus, PeVYV)是近年来新发现的病毒, 为黄症病毒科(*Luteoviridae*)马铃薯卷叶病毒属(*Polerovirus*)的新成员(Yonaha et al., 1995), 基因组为 6 244 nt 的正义单链 RNA (Positive single strand RNA + ssRNA), 含 6 个开放阅读框(Open reading frame, ORF), 主要编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)、P0 蛋白、P1 蛋白、外壳蛋白( Coat protein, CP)、运动蛋白(Movement protein, MP)和通读域(Read-through domain, RTD)等(Dombrovsky et al., 2010; Murakami et al., 2011)。PeVYV 在 20 世纪 90 年代在日本、荷兰被报道, 随后在欧洲、亚洲和非洲多国发生危害(Knierim et al., 2013; Villanueva et al., 2013; Alfaro et al., 2014)。2015 年以来在中国湖南、山东、贵州和广州等地陆续发现了 PeVYV 的危害(Tan et al., 2015; Zhang et al., 2015; Liu et al., 2016; Wang et al., 2017; 汤亚飞 等, 2019)。这表明 PeVYV 危害范围正逐步扩大, 对中国的辣椒生产具有非常大的潜在威胁。

PeVYV 在贵州辣椒上普遍发生。由于贵州拥有特殊的喀斯特地形地貌, 气候复杂多变, 易造成植物病毒基因组重组突变, 病毒大规模扩散现象日益加重。为了能有效控制 PeVYV 的发生危害, 对 PeVYV 在贵州的发生、分布及分子变异研究显得尤为重要。试验中采用分子生物学方法对贵州辣椒主产区的疑似辣椒病毒病样品进行 PeVYV 鉴定、分析, 明确贵州 PeVYV 不同地区分离物的 P0、CP 和 MP 分子变异, 以期为该病毒的诊断、致病机理及病害防控研究提供理论依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2018—2019 年, 在贵州省 9 个地区 25 个县区共采集具有叶片黄化、花叶等典型病毒病症状的辣椒样品 548 份, 并用液氮速冻后保存于 - 80 °C 冰箱。

植物总 RNA 提取试剂盒, EasyTaq® DNA, pEASY®-T1 和 cDNA 试剂盒等试剂购自北京全式金生物技术有限公司。引物合成和核酸测序送至重庆擎科生物有限公司。

1.2 引物与设计合成

根据 GenBank 中 PeVYV 中国湖南分离物 PeVYV-HN (登录号: KP326573) 的基因序列设计 P0、CP 和 MP 的全长序列引物。

表 1 PeVYV 基因扩增所用引物  
Table 1 Primers for PeVYV gene amplification

引物名称 Primers	序列 (5' - 3') Sequence	片段大小/bp Fragment size	T <sub>m</sub> /℃
P0	F: ATGAAC TTTGAATTGATCAACGGA R: TCACTGTAGTTCCTTCTGAATCTG	750	52
CP	F: ATGAATACGGGAGGAATTAGGAG R: CTATTGGGGTTATGCAATTGCAC	620	52
MP	F: ATGGAAATGGTGGATCACGTAAC R: CTACCCCGTTAATCTGCGAAG	470	52

1.3 总植物 RNA 提取

用 TransZol Up Plus RNA Kit 提取辣椒病毒病叶片的植物总 RNA。取 50 ~ 100 mg 疑似病毒病的辣椒叶片在液氮中迅速研磨成粉末状后, 加入 1 mL TransZol Up, 振荡混匀, 加 200 μL 氯仿或 50 μL 4-Bromoanisole, 剧烈振荡 30 s, 室温孵育 3 min。10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 小心吸取上清液至 RNase-free 离心管, 加入等体积的无水乙醇, 混匀。将得到的溶液和沉淀一起转入离心柱中, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 室温离心 30 s, 加入 500 μL Clean Buffer, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 30 s, 弃掉废液, 重复 1 次。加入 500 μL Wash Buffer, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 30 s, 弃掉废液, 重复 1 次。12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 2 min, 倒掉废液, 将离心柱置于室温放置数分钟, 以彻底晾干残留物质。将离心柱放入新的 1.5 mL RNase-free 离心管, 向吸附膜的中间部位悬空加入 30 ~ 100 μL RNase-free Water, 室温放置 2 min, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 2 min, 得到 RNA 溶液并置于 - 80 °C 保存。

1.4 cDNA 反转录及 RT-PCR

以提取的 RNA 为模板进行 cDNA 反转录, 总体系为 20 μL。总 RNA 2 μL, 5× TransScript® II All-in-One SuperMix for PCR 4 μL, RNase-free Water 14 μL; 轻轻混匀, 25 °C 孵育 10 min 后, 50 °C 孵育 30 min, 85 °C 加热 5 s 失活; 然后用 EasyTaq® DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。扩增体系 50 μL: Forward Primer (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 1 μL, Reverse Primer (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 1 μL, 10× EasyTaq® Buffer 5 μL, 2.5 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs 4 μL, EasyTaq® DNA Polymerase 1 μL, Nuclease-free Water 38 μL。扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

1.5 目的片段克隆及序列分析

PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖胶电泳后切下目的片段回收, 连接至 pEASY®-T1 Simple Cloning Kit 进行克隆, 待长出阳性菌落后挑取 3 个菌落进行测序验证。

参考相关文献, 从 GenBank 中选取 11 个具有 PeVYV 全长基因的分离物, 包括中国 (KP326573、MK931185), 日本 (AB594828、LC528383、NC015050)、美国 (NC036803)、西班牙 (KY523072)、巴西 (NK184554)、以色列 (HM439608)、马来西亚 (MN337276) 和澳大利亚 (KU999109) 等国家的分离物和马铃薯卷叶病毒 (Potato leaf roll virus, PLRV) (NC001747), 采用 BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 DNAMAN 8.0 对贵州 14 个采样点 PeVYV 分离物进行序列分析, 用 Mega 7.0 软件中的邻接算法 (Neighbor-Joining, NJ) 1 000 次构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒疑似病毒病样品田间症状

调查发现,田间感染辣椒叶脉黄化病毒的辣椒叶片呈现黄化,花叶,扭曲或皱缩,发病后期枝条顶部叶片较小,不生长;整个植株比正常植株矮小(图1)。



图1 田间辣椒病毒病叶片症状

Fig. 1 Field symptoms on pepper leaves caused by pepper vein yellows virus

### 2.2 PeVYV RT-PCR 扩增结果

用引物 P0-F/R、CP-F/R 和 MP-F/R 进行 RT-PCR 扩增,分别能扩增出长度为 750、620 和 470 bp 的单一 PCR 产物片段(图2)。

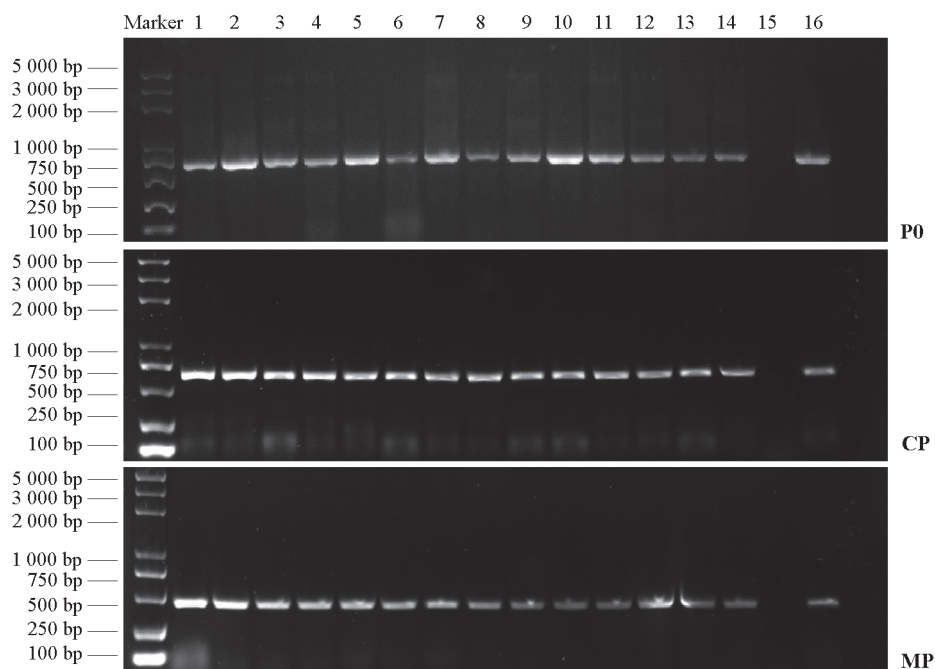


图2 PeVYV 的 P0、CP 和 MP 基因扩增产物图

1 ~ 14: 14 个辣椒病毒病样品; 15: 阴性对照; 16: 阳性对照。

Fig. 2 P0, CP and MP amplification products of PeVYV

1 - 14: 14 samples; 15: Negative control; 16: Positive control.

2.3 PeVYV 在贵州辣椒主产区的发生情况

2018—2019 年在贵州省 9 个地区 25 个采样地点采集的辣椒疑似病毒病样品进行 RT-PCR 检测，结果可知：548 份疑似 PeVYV 辣椒样品，检测出 129 份阳性样品，病毒阳性检出率为 23.54%(表 2)。

9 个地区除毕节和六盘水的辣椒疑似病毒病样品未检测出 PeVYV 外，其他 7 个地区均检测出该病毒。25 个采样地点有 14 个检测出 PeVYV，11 个没有检测到该病毒。其中，关岭、西秀、花溪、长顺和惠水辣椒 PeVYV 阳性检出率在 40%以上；修文、平坝、罗甸和思南 PeVYV 检出率在 30% ~ 40%之间，播州、绥阳、兴仁、安龙和榕江 PeVYV 检出率在 16% ~ 30%之间。PeVYV 在贵州发生分布的范围广泛，但主要集中在北部、中部和南部地区，形成一条直线；并逐渐向东部和西部蔓延。

表 2 贵州不同地区辣椒病毒病 RT-PCR 检测结果  
Table 2 RT-PCR detection results of pepper virus in different regions of Guizhou

采样地区 Sampling area	采样地点 Sampling location	样品数 Number of samples	阳性样品数 Number of positive samples	检出率/% Detection rate
贵阳 Guiyang	花溪区久安乡 Jiuan Township, Huaxi District	26	11	42.31
	修文县久长镇 Jiuchang Town, Xiuwen County	20	6	30.00
	清镇市红枫湖镇 Hongfenghu Town, Qingzhen City	27	0	0
安顺 Anshun	西秀区大西桥镇 Daxiqiao Town, Xixiu District	39	16	41.03
	平坝区天龙镇 Tianlong Town, Pingba District	41	13	31.71
	关岭县断桥镇 Duanqiao Town, Guanling County	50	25	50.00
铜仁 Tongren	思南县塘头镇 Tangtou Town, Sinan County	14	5	35.71
	德江县煎茶镇 Jiancha Town, Dejiang County	15	0	0.00
	石阡县枫香镇 Fengxiang Town, Shiqian County	21	0	0.00
遵义 Zunyi	播州区三合镇 Sanhe Town, Bozhou District	21	4	19.05
	湄潭县兴隆镇 Xinglong Town, Meitan County	12	0	0
	绥阳县风华镇 Fenghua Town, Suiyang County	17	5	29.41
黔南布依族苗族自治州 Buyi and Miao Autonomous Prefecture of Qiannan	长顺县广顺镇 Guangshun Town, Changshun County	25	10	40.00
	惠水县涟江街道 Lianjiang street, Huishui County	32	13	40.63
	罗甸县沫阳镇 Moyang Town, Luodian County	24	9	37.50
黔西南布依族苗族自治州 Buyi and Miao Autonomous Prefecture of Qianxinan	兴义市万屯镇 Wantun Town, Xingyi City	21	0	0
	兴仁县雨樟镇 Yuzhang Town, Xingren County	16	4	25.00
	安龙县龙广镇 Longguang Town, Anlong county	12	3	25.00
黔东南苗族侗族自治州 Miao and Dong Autonomous Prefecture of Qiangdongnan	麻江县宣威镇 Xuanwei Town, Majiang County	16	0	0
	凯里市三棵树镇 Sankeshu Town, Kaili City	18	0	0
	榕江县古州镇 Guzhou Town, Rongjiang County	30	5	16.67
六盘水 Liupanshui	六枝特区郎岱镇 Langdai Town, Liuzhi special district	14	0	0
毕节 Bijie	七星关区洪山社区 Hongshan community, qixingguan District	12	0	0
	大方县黄泥塘镇 Huangnitang Town, Dafang County	10	0	0
	黔西县素朴镇 PusuTown, Qianxi County	15	0	0

2.4 不同地区 PeVYV 分离物 P0、CP 和 MP 基因的系统进化树分析

2.4.1 贵州不同采样地区 PeVYV 的 P0、CP 和 MP 基因的一致性比对

将贵州 PeVYV 的 P0、CP 和 MP 基因与已报道的基因进行序列一致性比较，贵州 14 个不同地点 PeVYV 分离物与中国分离物(KP326573)、日本分离物(AB594828)和西班牙分离物(KY523072)的 P0 基因的核苷酸同源性在 90.9% ~ 100.0%之间(表 3)，氨基酸相似性在 97.7% ~ 100.0%之间(表 4)，PeVYV 的 P0 基因与中国分离物(KP326573)在核苷酸同源性 94% ~ 100.0%，而氨基酸相似性为 100.0%。

表 3 贵州 14 个分离物的 P0 核苷酸序列同源性鉴定分析

Table 3 Identification of P0 nucleotide sequences of 14 isolates in Guizhou

%

分离物 Isolate	PeVYV-Sinan	Chang-shun	Hui-shui	Lou-dian	An-long	Xing-ren	Rong-jiang	Bo-zhou	Sui-yang	Xiu-wen	Ping-ba	Gui-yang	An-shun	Guan-ling	AB594828_Japan	HN_KP326573_China	KY523072_Spain
PeVYV-Sinan	100.0																
PeVYV-Changshun	100.0	100.0															
PeVYV-Huishui	98.7	98.7	100.0														
PeVYV-Loudian	98.7	98.7	98.9	100.0													
PeVYV-Anlong	98.7	98.7	99.2	99.2	100.0												
PeVYV-Xingren	98.9	98.9	99.2	99.5	99.5	100.0											
PeVYV-Rongjiang	98.9	98.9	99.2	99.5	99.5	100.0	100.0										
PeVYV-Bozhou	93.9	93.9	93.6	93.3	93.3	93.6	93.6	100.0									
PeVYV-Suiyang	96.0	96.0	95.9	95.6	95.6	95.9	95.9	92.8	100.0								
PeVYV-Xiuwen	99.9	99.9	98.8	98.8	98.8	99.1	99.1	94.0	95.9	100.0							
PeVYV-Pingba	96.4	96.4	95.9	96.1	95.9	96.1	96.1	92.8	94.9	96.3	100.0						
PeVYV-Guiyang	97.1	97.1	96.3	96.4	96.3	96.5	96.5	94.3	95.5	97.2	94.8	100.0					
PeVYV-Anshun	96.9	96.9	96.4	96.3	96.1	96.4	96.4	94.4	95.3	97.1	94.7	99.9	100.0				
PeVYV-Guanling	97.1	97.1	96.3	96.4	96.3	96.5	96.5	94.3	95.5	97.2	94.8	100.0	99.9	100.0			
PeVYV-AB594828_Japan	90.9	90.9	90.4	90.5	90.4	90.7	90.7	87.9	90.3	91.1	90.0	90.0	89.9	90.0	100.0		
PeVYV-HN_KP326573_China	95.2	95.2	94.4	94.4	94.4	94.8	94.8	94.7	96.5	95.1	94.9	94.1	94.0	94.1	100.0	100.0	
PeVYV-KY523072_Spain	92.1	92.1	92.0	91.5	91.5	91.7	91.7	92.0	91.1	92.0	90.7	90.8	90.9	90.8	87.3	90.3	100.0

表 4 贵州 14 个分离物的 P0 氨基酸序列相似性鉴定分析

Table 4 Identification of P0 amino acid sequences of 14 isolates in Guizhou

%

分离物 Isolate	PeVYV-Sinan	Chang-shun	Hui-shui	Lou-dian	An-long	Xing-ren	Rong-jiang	Bo-zhou	Sui-yang	Xiu-wen	Ping-ba	Gui-yang	An-shun	Guan-ling	AB594828_Japan	HN_KP326573_China	KY523072_Spain
PeVYV-Sinan	100.0																
PeVYV-Changshun	100.0	100.0															
PeVYV-Huishui	100.0	100.0	100.0														
PeVYV-Loudian	100.0	100.0	100.0	100.0													
PeVYV-Anlong	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0												
PeVYV-Xingren	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0											
PeVYV-Rongjiang	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0										
PeVYV-Bozhou	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0									
PeVYV-Suiyang	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0								
PeVYV-Xiuwen	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0							
PeVYV-Pingba	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0						
PeVYV-Guiyang	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0					
PeVYV-Anshun	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0				
PeVYV-Guanling	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0			
PeVYV-AB594828_Japan	97.7	97.7	100.0	97.7	97.7	97.7	97.7	97.7	97.7	97.7	97.7	97.6	97.6	97.6	100.0		
PeVYV-HN_KP326573_China	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.6	100.0	
PeVYV-KY523072_Spain	97.9	97.9	97.8	97.9	97.9	97.9	97.9	100.0	95.8	97.9	97.9	97.8	97.8	97.8	95.7	97.8	100.0

贵州不同地区分离物与中国分离物 (KP326573, MK931185) 和日本分离物 (LC528383) PeVYV 的 CP 基因比较得知核苷酸同源性在 93.7%~100.0% 之间 (表 5), 氨基酸相似性在 97.9%~100.0%

之间（表 6）；其中，平坝、贵阳、安顺和关岭的核苷酸同源性和氨基酸相似性低于其他地区，表明 CP 基因贵州存在进化重组。

表 5 贵州 14 个分离物的 CP 核苷酸序列同源性鉴定分析  
Table 5 Identification of CP nucleotide sequences of 14 isolates in Guizhou

	PeVYV-															HN_ KP326 573_ China	KY5230 72_ Spain
分离物 Isolate	Sinan	Chang-shun	Hui-shui	Lou-dian	An-long	Xing-ren	Rong-jiang	Bo-zhou	Sui-yang	Xiu-wen	Ping-ba	Gui-yang	An-shun	Guan-ling	AB59 4828_ Japan		
PeVYV-Sinan	100.0																
PeVYV-Changshun	97.7	100.0															
PeVYV-Huishui	98.7	98.1	100.0														
PeVYV-Loudian	98.7	97.4	99.0	100.0													
PeVYV-Anlong	98.6	97.9	99.5	98.9	100.0												
PeVYV-Xingren	98.6	97.9	99.5	98.9	100.0	100.0											
PeVYV-Rongjiang	98.6	97.9	99.5	98.9	100.0	100.0	100.0										
PeVYV-Bozhou	98.6	97.9	99.5	98.9	100.0	100.0	100.0	100.0									
PeVYV-Suiyang	97.9	99.5	98.6	97.9	98.4	98.4	98.4	98.4	100.0								
PeVYV-Xiuwen	96.3	96.8	96.5	96.5	96.3	96.3	96.3	96.3	96.6	100.0							
PeVYV-Pingba	93.7	93.9	93.2	93.6	93.4	93.4	93.4	93.4	93.7	96.8	100.0						
PeVYV-Guiyang	93.7	93.9	93.2	93.6	93.4	93.4	93.4	93.4	93.7	96.8	100.0	100.0					
PeVYV-Anshun	93.7	93.9	93.2	93.6	93.4	93.4	93.4	93.4	93.7	96.8	100.0	100.0	100.0				
PeVYV-Guanling	93.7	93.9	93.2	93.6	93.4	93.4	93.4	93.4	93.7	96.8	100.0	100.0	100.0	100.0			
PeVYV-AB594828_Japan	97.6	97.7	97.9	97.6	97.7	97.7	97.7	97.7	97.6	96.8	93.6	93.6	93.6	93.6	100.0		
PeVYV-HN_KP326573_China	98.6	97.6	98.9	98.6	98.7	98.7	98.7	98.7	98.1	96.3	93.4	93.4	93.4	93.4	98.1	100.0	
PeVYV-KY523072_Spain	98.2	97.6	99.2	98.6	99.0	99.0	99.0	99.0	98.1	96.3	93.1	93.1	93.1	93.1	98.1	99.4	100.0

表 6 贵州 14 个分离物的 CP 氨基酸序列相似性鉴定分析  
Table 6 Identification of CP amino acid sequences of 14 isolates in Guizhou

	PeVYV-															HN_ KP326 573_ China	KY5230 72_ Spain
分离物 Isolate	Sinan	Chang-shun	Hui-shui	Lou-dian	An-long	Xing-ren	Rong-jiang	Bo-zhou	Sui-yang	Xiu-wen	Ping-ba	Gui-yang	An-shun	Guan-ling	AB59 4828_ Japan		
PeVYV-Sinan	100.0																
PeVYV-Changshun	100.0	100.0															
PeVYV-Huishui	100.0	100.0	100.0														
PeVYV-Loudian	100.0	100.0	100.0	100.0													
PeVYV-Anlong	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0												
PeVYV-Xingren	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0											
PeVYV-Rongjiang	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100										
PeVYV-Bozhou	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0									
PeVYV-Suiyang	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0								
PeVYV-Xiuwen	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0							
PeVYV-Pingba	97.9	98.0	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	98.0	98.0	100.0						
PeVYV-Guiyang	97.9	98.0	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	98.0	98.0	100.0	100					
PeVYV-Anshun	97.9	98.0	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	98.0	98.0	100.0	100.0	100.0				
PeVYV-Guanling	97.9	98.0	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	98.0	98.0	100.0	100.0	100.0	100.0			
PeVYV-AB594828_Japan	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.8	97.8	97.8	97.8	100.0		
PeVYV-HN_KP326573_China	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.8	97.8	97.8	97.8	100.0	100.0	
PeVYV-KY523072_Spain	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.8	97.8	97.8	97.8	100.0	100.0

表 7 贵州 14 个分离物的 MP 核苷酸序列同源性鉴定分析

Table 7 Identification of MP nucleotide sequences of 14 isolates in Guizhou

[illegible]

表 8 贵州 14 个分离物的 MP 氨基酸序列相似性鉴定分析  
Table 8 Identification of MP amino acid sequences of 14 isolates in Guizhou

[illegible]



## 2.4.2 基于 P0、CP 和 MP 基因的 PeVYV 分离物的系统进化树分析

将贵州 14 个不同采样地检出的 PeVYV 分离物与已报道世界各地的 11 个 PeVYV 分离物的 P0、CP 和 MP 基因构建系统进化树, 以马铃薯卷叶病毒 (Potato leaf roll virus, PLRV) 作为外群。结果表明: 采用 Neighbor-Joining 聚类分析方法将所有 PeVYV 分离物聚类在一起 (图 3)。其中, PeVYV 分离物 P0 基因聚为 2 个大支系群体。第 1 簇群由马来西亚分离物 (MN337276) 和日本分离物 (NC015050) 组成。第 2 簇群是由贵州不同地区 PeVYV 分离物和其他国家 PeVYV 分离物组成。可进一步分为两个亚群, 其中一个亚群包括来自美国 (NC036803)、日本 (LC528383)、以色列 (HM439608), 巴西 (NK184554) 和中国 (MK931185) 的 PeVYV 分离物; 而另一个亚群有来自贵州不同地区的 PeVYV 分离物和中国 (KP326573)、日本 (AB594828)、澳大利亚 (KU999109) 和西班牙 (KY523072) 的 PeVYV 分离物。贵州除遵义播州区分离物没有聚在一起外, 其他 13 个地区的分离物聚在一起, 且与中国 (KP326573) 的亲缘关系较近, 而 PeVYV-Bozhou 与澳大利亚的亲缘关系较近, 说明不同地区间 PeVYV 分离物的 P0 基因具有一定的地域差异。

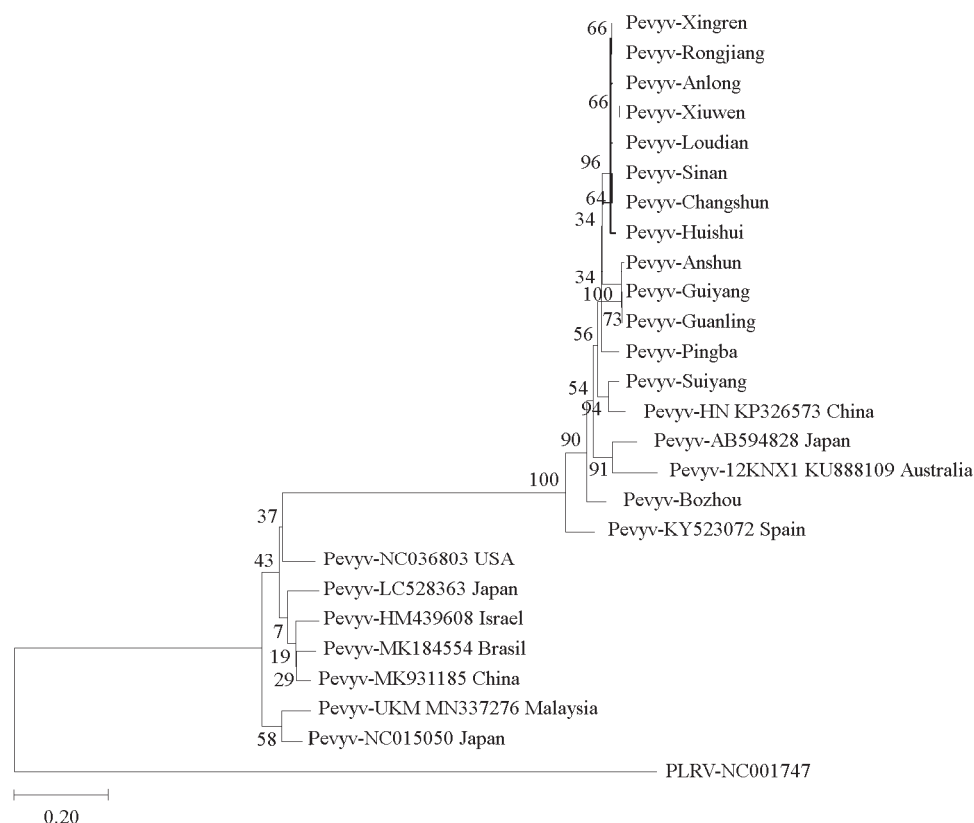


图 3 基于 PeVYV 的 P0 基因的系统进化分析  
 Fig. 3 Phylogenetic analysis based on PeVYV P0 gene

从 PeVYV 分离物 CP 基因的系统进化树 (图 4) 可知: 贵州不同采样地点的 PeVYV 分离物与中国、澳大利亚、美国和西班牙分离物聚为一簇群, 其中, 长顺、惠水、罗甸、安龙、兴仁、播州和榕江的 PeVYV 分离物 CP 基因聚为一亚群, 与中国亲缘关系较近。思南、绥阳、贵阳、修文、安顺、平坝和关岭的 PeVYV 分离物 CP 基因聚为另一亚群, 与澳大利亚、美国和西班牙的亲缘关系较近。表明贵州不同地区的 PeVYV 分离物 CP 基因差异不明显。

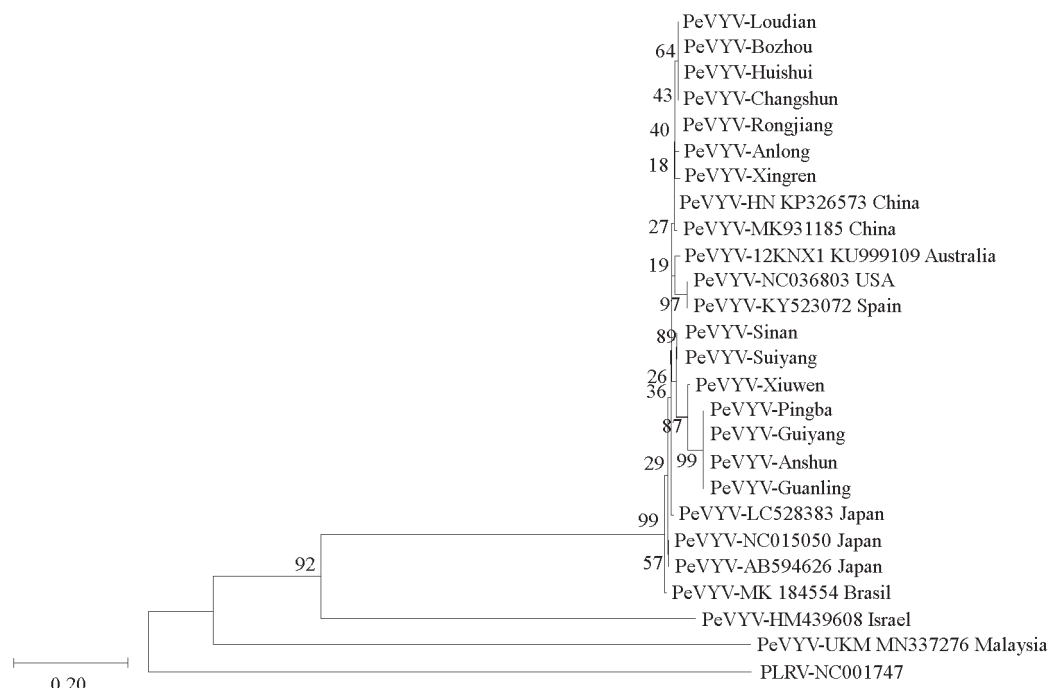


图 4 基于 PeVYV 的 CP 基因的系统进化分析  
 Fig. 4 Phylogenetic analysis based on PeVYV CP gene

从 PeVYV 分离物 MP 基因的系统进化树（图 5）可知：除以色列、美国和西班牙分离物外，贵州 14 个地区 PeVYV 分离物与其他地区分离物聚为一簇群，其中，安龙、兴仁、榕江和遵义播州分

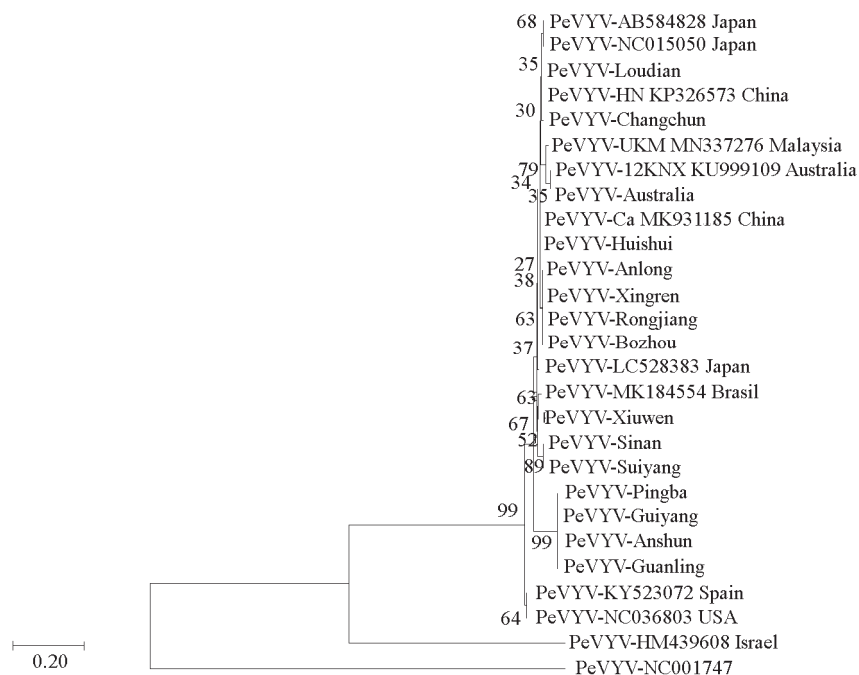


图 5 基于 PeVYV 的 MP 基因的系统进化分析  
 Fig. 5 Phylogenetic analysis based on PeVYV MP gene

离物聚为一小亚群, 贵阳、平坝、安顺和关岭聚为另一小亚群, 罗甸、长顺与已报道的日本和中国的分离物聚为一亚群; 说明贵州 PeVYV 分离物的 MP 基因在贵州省内之间及其他地区间的地域差异不明显。

### 3 讨论

PeVYV 在辣椒叶片上呈现叶脉间黄化、卷曲、变形、皱褶和节间缩短等症状, 其常与辣椒轻斑驳病毒 (Pepper mild mottle virus, PMMoV) 和辣椒脉斑驳病毒 (Chilli veinal mottle virus, ChiVMV) 复合侵染 (汤亚飞 等, 2018), 伴随有褪绿或者斑驳症状, 且 PeVYV 症状严重程度随着季节及环境因素而产生变化, 难以通过发病症状对 PeVYV 进行鉴别。目前 PeVYV 的研究主要集中在病毒鉴定上, 而 PeVYV 对贵州辣椒的侵染及其不同基因的系统进化分析未见报道。PeVYV 的 P0、CP 和 MP 基因功能不同, 选择进化压力不同, 根据不同基因的系统进化分析, 可以探究 PeVYV 的分子变异发生位点, 分析对 PeVYV 致病性影响的分子机制。

鉴于此, 于 2018—2019 年从贵州省 9 个地区 25 个采样地点的 548 份疑似辣椒病毒病样品用 RT-PCR 法进行 PeVYV 检测, 并测序确定 PeVYV 对贵州辣椒的侵染。经鉴定得, PeVYV 检测出的阳性样品数占总样本数的 23.54%, PeVYV 检出采样地点占总采样地点的 56%, 表明 PeVYV 在贵州的发生危害较重, 分布地区较广。选取贵州 14 个检测出 PeVYV 采样点的辣椒分离物基于 P0、CP 和 MP 基因构建系统进化树, 分析结果表明: P0 基因除遵义分离物与澳大利亚亲缘关系较近, 其他 13 个地区的分离物与中国湖南分离物聚在一起。CP 基因黔南、黔西南、黔东南和遵义分离物的聚为一支, 铜仁、安顺、贵阳和遵义绥阳聚为一支。说明不同地区间 PeVYV 分离物的 P0 和 CP 基因与地理来源有一定的相关性; 这与山东 PeVYV 的全基因组序列以及部分基因组核苷酸序列的系统进化树分析结果 (谭玮萍, 2016) 一致。而贵州 PeVYV 分离物的 MP 基因和其他地区 PeVYV 分离物聚为一大支, 地域差异不显著。因此, 研究结果表明贵州辣椒上不同地区 PeVYV 分离物具有一定的分子差异, 存在遗传分化现象。

PeVYV 寄主范围较窄, 目前报道有辣椒、烟草、番茄、龙秋葵和黑茄 (Murakami et al., 2011; Knierim et al., 2013; Zhang et al., 2015; Wang et al., 2017; Liu et al., 2019)。PeVYV 不能通过种子传播和机械接种, 只能通过嫁接或者蚜虫持久性传播 (Yonaha et al., 1995), 其中以棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 和桃蚜 (*Myzus persicae* Sulz) 为主。PeVYV 在日本、印度、印度尼西亚、马里、菲律宾、西班牙、中国、西班牙和苏丹等多地的辣椒中分离出来, 这表明 PeVYV 对全世界辣椒都存在潜在威胁, 并且与其他辣椒病毒存在复合侵染辣椒的情况, 加重辣椒的发病症状, 降低辣椒的产量。本研究中通过对 PeVYV 的 P0、CP 和 MP 基因序列分析, 可以为 PeVYV 的分布、传播、变异与进化分析, 以及科学防控提供理论依据, 对辣椒产业具有重要意义。

### References

- Alfaro Fernández A, ElShafie E E, Ali M A, El Bashir O O A, Córdoba-Sellés M C, Font San Ambrosio M I. 2014. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting hot pepper in Sudan. *Plant Disease*, 98 (10): 446 - 1446.
- Afouda L, Kone D, Zinsou V, Dossou L, Kenyon L, Winter S, Knierim D. 2017. Virus surveys of *Capsicum* spp. in the Republic of Benin reveal the prevalence of pepper vein yellows virus and the identification of a previously uncharacterised *Polerovirus* species. *Arch Virol*, 162: 1599 - 1607.
- Dombrovsky A, Glanz E, Pearlsman M, Antignus Y. 2010. Characterization of *Pepper yellow leaf curl virus*, a tentative new *Polerovirus* species causing a yellowing disease of pepper. *Phytoparasitica*, 38 (5): 477 - 486.

- Feng Geng, Xin Min, Cao Meng-ji, Wang Li-shuang, Li Li, Wang Xi-feng. 2017. Identification of multiple viruses infecting in hot pepper in Guiyang by deep sequencing. *Acta Phytopathologica Sinica*, 47 (5): 591 – 597. (in Chinese)
- 冯耿, 辛敏, 曹孟籍, 王莉爽, 李莉, 王锡锋. 2017. 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. *植物病理学报*, 47 (5): 591 – 597.
- Knierim D, Tsai W S, Kenyon L. 2013. Analysis of sequences from field samples reveals the presence of the recently described *Pepper vein yellows virus* (genus *Polerovirus*) in six additional countries. *Archives of Virology*, 158 (6): 1337 – 1341.
- Liu M Y, Liu X N, Li X, Zhang D Y, Dai L Y, Tang Q J. 2016. Complete genome sequence of a Chinese isolate of pepper vein yellows virus and evolutionary analysis based on the CP, MP and RdRp coding regions. *Arch Virol*, 161: 677 – 683.
- Liu M Y, Liu J, Dong Z, Li L H, Zou X W, Dai L Y. 2019. First report of pepper vein yellows virus infecting tomato in China. *Plant Disease*, 103 (11): 2970.
- Liu Yong, Li Fang, Li Yue-yue, Zhang Song-bo, Gao Xi-wu, Xie Yan, Yan Fei, Zhang An-sheng, Dai Liang-ying, Cheng Zhao-bang, Ding Ming, Niu Yan-bing, Wang Sheng-ji, Che Hai-yan, Jiang Tong, Shi Xiao-bing, He Zi-fu, Wu Yun-feng, Zhang De-yong, Qing Ling, Yan Wan-rong, Yang Xue-hui, Tang Ya-fei, Zheng Hong-ying, Tang Qian-jun, Zhang Song-bo, Zhang Dong-fang, Cai Li, Tao Xiao-rong. 2019. Identification, distribution and occurrence of viruses in the main vegetables of China. *Scientia Agricultura Sinica*, 52 (2): 239 – 261. (in Chinese)
- 刘勇, 李凡, 李月月, 张松柏, 高希武, 谢艳, 燕飞, 张安盛, 戴良英, 程兆榜, 丁铭, 牛颜冰, 王升吉, 车海彦, 江彤, 史晓斌, 何自福, 吴云锋, 张德咏, 青玲, 严婉荣, 杨学辉, 汤亚飞, 郑红英, 唐前君, 章松柏, 章东方, 蔡丽, 陶小荣. 2019. 侵染我国主要蔬菜作物的病毒种类、分布与发生趋势. *中国农业科学*, 52 (2): 239 – 261.
- Murakami R, Nakashima N, Hinomoto N, Kawano S, Toyosato T. 2011. The genome sequence of *Pepper vein yellows virus* (family luteoviridae, genus *Polerovirus*). *Archives of Virology*, 156 (5): 921 – 923.
- Tan W P, Dong Y Z, Sun X H, Liang Y C, Liu H X, Zhu X P. 2015. The first identification of *Pepper vein yellows virus* in Shandong Province, China. *Plant Disease*, 99 (9): 1288.
- Tang Ya-fei, Pei Fan, Li Zheng-gang, She Xiao-man, Yu Lin, Lan Guo-bing, Deng Ming-guang, He Zi-fu. 2019. Identification of viruses infecting peppers in Guangdong by small RNA deep sequencing. *Scientia Agricultura Sinica*, 52 (13): 2256 – 267. (in Chinese)
- 汤亚飞, 裴凡, 李正刚, 余小漫, 于琳, 蓝国兵, 邓铭光, 何自福. 2019. 基于小RNA深度测序技术鉴定侵染广东辣椒的病毒种类. *中国农业科学*, 52 (13): 2256 – 2267.
- Tang Yafei, Pei Fan, Yu Lin, He Zifu, She Xiaoman, Lan Guobing, Deng Mingguang. 2018. Molecular characterization of *Chilli veinal mottle virus* infecting pepper in Guangdong Province. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (11): 2209 – 2216. (in Chinese)
- 汤亚飞, 裴凡, 于琳, 何自福, 余小漫, 蓝国兵, 邓铭光. 2018. 侵染广东辣椒的辣椒脉斑驳病毒的分子特征. *园艺学报*, 45 (11): 2209 – 2216.
- Tan Wei-ping. 2016. Molecular identification of the pathogen of pepper virus disease in Shandong and complete sequences analysis of pepper vein yellows virus [M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 谭玮萍. 2016. 山东省辣椒病毒病原分子鉴定及辣椒脉黄化病毒全基因组序列分析 [硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Villanueva F, Castillo P, Font M I, Alfaro-Fernández A, Moriones E, Navas Castillo J. 2013. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting sweet pepper in Spain. *Plant Disease*, 97 (9): 1261.
- Wang L S, He Q C, Chen X J, He H Y, Yang X H, Lu Q H, Liu Y. 2017. First report of pepper vein yellows virus infecting tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) naturally in China. *Plant Disease*, 101: 8, 1556.
- Wang Li-shuang, Chen xiao-jun, Chen wen, Tan qing-qun, Wu shi-ping, He hai-yong, Yang Xue-hui. 2015. Detection of viruses on pepper in Guizhou. *Guizhou Agricultural Sciences*, 43 (8): 99 – 101 (in Chinese)
- 王莉爽, 陈小均, 陈文, 谭清群, 吴石平, 何海永, 杨学辉. 2015. 贵州辣椒病毒病的种类检测. *贵州农业科学*, 43 (8): 99 – 101.
- Yonaha T, Toyosato T, Kawano S, Osaki T. 1995. Pepper vein yellows virus, a novel luteovirus from bell pepper plants in Japan. *Ann Phytopathol Soc Jpn*, 61: 178 – 184.
- Zhang S B, Zhao Z B, Zhang D Y, Liu Y, Luo X W, Liu J, Wu L F, Peng J. 2015. First report of pepper vein yellows virus infecting red pepper in mainland China. *Plant Disease*, 99 (8): 1190.