

辣椒种质资源 PMMoV 抗性基因检测与抗性鉴定

陈建分^{1,2}, 曹振木¹, 秦于玲¹, 申龙斌¹, 刘维侠¹, 朱 丹¹, 吴怡婷¹, 刘子记^{1*},
王 旭^{2*}

1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101; 2. 海南大学园艺学院, 海南海口 570208

摘 要: 辣椒轻斑驳病毒 (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) 是世界范围内最严重的病原体之一, 目前已报道的 PMMoV 包括 P₀、P₁、P_{1,2}、P_{1,2,3}、P_{1,2,3,4} 五种致病型。辣椒轻斑驳病毒寄主范围广、致病力强, 严重影响辣椒的产量和品质, 开展抗病育种是防治该病毒最为经济有效的手段。本课题组前期研究已明确了感染海南儋州辣椒种质资源圃的 PMMoV 为 P_{1,2} 致病型, 为了筛选抗 PMMoV 的辣椒种质资源, 以 110 份种质为材料, 利用已报道的与 L³ 连锁的分子标记对辣椒种质进行检测。结果表明: 在 110 份材料中共检测到 46 份辣椒种质含有与 L³ 连锁的分子标记。采用苗期人工接种鉴定方法, 对含有抗性分子标记的 46 份辣椒种质接种 PMMoV P_{1,2} 致病型进行抗性鉴定。接种 5 d 后调查局部症状, 接种 20 d 后调查系统症状, 计算病情指数。结果表明: 不同的辣椒种质在抗病性上存在显著差异, 各种质的病情指数在 8.86~60.00 之间, 对 PMMoV P_{1,2} 致病型表现高抗 (HR) 的种质为 CF19-34m 和 19FB6-1; 表现抗病 (R) 的种质为 CCJ93-1; 表现中抗 (MR) 的种质包括 17YB32、17SCa28m、15SM39-2、14SM555 × 14SM1、14SM567-2、14SM526-1、14SM565-1、14SM502-1、14SM519-1、14SM504m、14SM503m、14SM519-3、14SM518-2、14SM519-2、CCJ52-1 等 34 份; 表现感病 (S) 的种质包括 14SM514m、CCJ22-1、CCJ113-2、CCJ135-1、CCJ157-1、L537-1m、L545、CCJ87-2、CCJ133-1, 获得的高抗、抗病、中抗种质占总鉴定材料的 80.43%。本研究结果为创制抗辣椒轻斑驳病毒种质资源和培育抗性品种奠定基础。

关键词: 辣椒; 种质资源; PMMoV; 分子标记; 抗病性鉴定

中图分类号: S436.418 文献标志码: A

Resistance Gene Detection and Resistance Identification of PMMoV in Pepper Germplasm

CHEN Jianfen^{1,2}, CAO Zhenmu¹, QIN Yuling¹, SHEN Longbin¹, LIU Weixia¹, ZHU Dan¹, WU Yiting¹,
LIU Ziji^{1*}, WANG Xu^{2*}

1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China;
2. School of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 570208, China

Abstract: *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) is one of the most serious pathogens worldwide. Currently, five pathogenic types of PMMoV have been reported, including P₀, P₁, P_{1,2}, P_{1,2,3} and P_{1,2,3,4}. The wide host range and strong pathogenicity of PMMoV seriously affect the yield and quality of pepper, and breeding for disease resistance is the most economical and effective means to control this virus. Our previous study determined that PMMoV infected with Danzhou pepper germplasm nursery in Hainan is the P_{1,2} pathogenic type. In order to screen PMMoV-resistant pepper germplasm resources, 110 germplasms were tested for PMMoV resistance using the reported L³-linked molecular markers. 46 pepper germplasms containing molecular markers of resistance were inoculated with PMMoV P_{1,2} pathogenic type by inoculation at seeding stage. Local symptoms were investigated 5 d after inoculation, and systemic symptoms were investigated 20 d after inoculation, and disease indices were calculated. The results showed that there were sig-

收稿日期 2022-12-07; 修回日期 2023-01-04

基金项目 海南省自然科学基金面上项目 (No. 322MS132); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630032022009)。

作者简介 陈建分 (1992—), 女, 硕士, 研究方向: 蔬菜抗病育种。*通信作者 (Corresponding author): 刘子记 (LIU Ziji),
E-mail: liuziji1982@163.com; 王 旭 (WANG Xu), E-mail: wangxu@hainanu.edu.cn。

nificant differences in disease resistance among different pepper germplasms, and the disease indexes of various germplasms ranged from 8.86–60.00. The germplasms showing high resistance (HR) to PMMoV P_{1,2} pathogenic type were CF19-34m and 19FB6-1. The germplasms showing resistance (R) was CCJ93-1. The germplasms showing medium-resistance (MR) included 17YB32, 17SCa28m, 15SM39-2, 14SM555×14SM1, 14SM567-2, 14SM526-1, 14SM565-1, 14SM502-1, 14SM519-1, 14SM504m, 14SM503m, 14SM519-3, 14SM518-2, 14SM519-2, CCJ52-1, etc. The presenting susceptible (S) germplasms were 14SM514m, CCJ22-1, CCJ113-2, CCJ135-1, CCJ157-1, L537-1m, L545, CCJ87-2 and CCJ133-1, and the obtained disease-resistant germplasms accounted for 80.43% of the total identified materials. The results of this study would lay the foundation for creating germplasm resources resistant to pepper mild mottle virus and breeding resistant varieties.

Keywords: pepper (*Capsicum annuum* L.); germplasm; PMMoV; molecular markers; disease resistance identification

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.04.004

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 为茄科辣椒属一年生或多年生二倍体作物, 是全球重要的蔬菜作物之一。辣椒果实富含类胡萝卜素、蛋白质、维生素 C 等多种营养物质, 既可直接食用又可用作调味品, 辣椒提取物在医药和化工领域也具有广泛应用。据联合国粮食及农业组织 (FAO) 统计, 2019 年全球鲜食辣椒和加工辣椒总种植面积约为 $3.7190 \times 10^6 \text{ hm}^2$, 总产量约为 $4.2283 \times 10^7 \text{ t}$; 我国 2019 年辣椒种植面积约为 $8.4700 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 总产量达 $1.9333 \times 10^7 \text{ t}$, 居全球首位^[1]。

长期以来, 病毒病一直是威胁辣椒生产的重要因素。目前, 我国报道的病毒种类有 30 余种, 近年来辣椒轻斑驳病毒 (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) 已逐渐成为海南^[2]、广西^[3]、广东^[4]、四川^[5]、安徽^[6]、黑龙江^[7]、山东^[8-9]、西藏^[10]等多个辣椒产区普遍发生的病害。PMMoV 属于烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*), 主要通过种传、汁液传播^[11-12]。辣椒感染 PMMoV 后叶片症状表现轻微皱缩、褪绿斑驳和花叶症状, 果实被侵染后表现为扁平、变小、褪绿斑驳、凹凸斑点、畸形与坏死等现象。

L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 系列等位基因是辣 (甜) 椒抗烟草花叶病毒属病毒的主要抗性基因^[13-15], 这些基因被引入辣椒栽培种中保护植株免受烟草花叶病毒的侵染。目前我国辣椒生产上的 PMMoV 致病型多以 P_{1,2} 株系为主^[16-17], P_{1,2} 致病型病毒株系能够系统侵染带有 L^1 、 L^2 抗性基因的辣 (甜) 椒, 而带有 L^3 抗性基因的辣 (甜) 椒对该病毒株系表现为抗性, L^3 基因能够应对我国辣椒生产上的主要问题。张宝玺等^[18]通过常规育种技术和分子标记相结合, 创制出含有抗 PMMoV (P_{0,1,2})

L^3 基因新品种中椒 105 号、中椒 106 号、中椒 107 号、中椒 108 号。TOMITA 等^[15]通过图位克隆获得 L^3 基因, 并利用同位克隆的方法获得了 L 的 6 个等位基因: L^1 、 L^{1a} 、 L^{1c} 、 L^2 、 L^b 和 L^4 。鉴定抗性种质是选育抗病品种不可缺少的步骤, 目前, 高抗 PMMoV 的辣椒种质鲜有报道。由于辣椒的栽培种遗传多样性比较丰富、 L 基因组结构较为复杂, 目前尚未利用基因序列开发功能标记。因此, 本研究利用已报道的 L^3 连锁标记, 遗传距离为 0.00015 cM, 以 110 份辣椒种质资源为研究对象, 结合抗病基因检测和苗期抗性鉴定, 精准筛选抗辣椒轻斑驳病毒的种质资源, 以期选育抗 PMMoV 辣椒品种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

参试辣椒种质资源共 110 份, 材料名称和来源地详见表 1。PMMoV 鉴定毒原 P_{1,2} 株系由本课题组从田间发病植株上分离提纯保存。

1.2 方法

1.2.1 毒原扩繁及检测 将 PMMoV 毒源人工接种在本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 上进行扩繁, 待发病后选取感病叶片, 利用 RT-PCR 方法进行分子检测, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列见表 2。

1.2.2 L^3 抗性基因检测 与 L^3 连锁的分子标记参照 TOMITA 等^[22]的方法。根据 Bioteke DNA 试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司) 提取 gDNA, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定 DNA 的质量和浓度, 并将浓度稀释至 100 ng/μL, 保存于 -20 °C 冰箱备用。PCR 反应体

表 1 参试辣椒种质来源
Tab. 1 Origin of pepper germplasm

编号 No.	名称 Name	来源 Source	编号 No.	名称 Name	来源 Source	编号 No.	名称 Name	来源 Source
1	17YB32	中国山西	38	14SM531S×L538m	选育材料	75	CCJ135-1	选育材料
2	17YB5	选育材料	39	14SM528×14SM526	选育材料	76	CCJ157-1	英国伦敦
3	17SCa28m	选育材料	40	14SM526-1	选育材料	77	CCJ110-1	法国
4	17YB82m	中国广西贵港	41	14SM557-1	选育材料	78	L505m	选育材料
5	CF19-13-1	网络购买	42	14SM515m	选育材料	79	L506m	选育材料
6	CF19-14-1	网络购买	43	14SM520-1	选育材料	80	L502-6-1m	选育材料
7	CF19-15-1	网络购买	44	14SM527-1	选育材料	81	L528m	美国
8	CF19-15-2	网络购买	45	15SM8m	选育材料	82	L542-1-1	刚果
9	CF19-16-1	网络购买	46	14SM565-1	选育材料	83	L531	美国
10	CF19-16-2	网络购买	47	14SM514m	选育材料	84	L533m	美国
11	CF19-19-1	网络购买	48	14SM520m	选育材料	85	L535-1	美国
12	19FB-2	网络购买	49	14SM525×L501-1-1	选育材料	86	L534m	美国
13	CF19-22-1	网络购买	50	14SM502-1	选育材料	87	L539	美国
14	CF19-22-2	网络购买	51	14SM517m	选育材料	88	L517m	选育材料
15	CF19-34m	网络购买	52	14SM519-1	选育材料	89	L537-1m	非洲
16	CF19-20-1	网络购买	53	14SM504m	选育材料	90	CCJ117-1	选育材料
17	19FB6-1	泰国	54	14SM510-2	选育材料	91	L518-1	选育材料
18	19FB-17-1	泰国	55	14SM517-1	选育材料	92	17YB14×17YB27	杂交组合
19	19FB8-2	泰国	56	14SM510-1	选育材料	93	L532-2	美国
20	19FB9-1	泰国	57	14SM503m	选育材料	94	L538m	美国
21	19FB11	泰国	58	14SM519-3	选育材料	95	L509	选育材料
22	19FB4m	泰国	59	14SM518-2	选育材料	96	L545	墨西哥
23	CF19-20-2	网络购买	60	14SM519-2	选育材料	97	L507-1-1m	选育材料
24	CCJ74-2	中国台湾与法国材料杂交后代	61	14SM561×L502-7-1	选育材料	98	L525-1m	哥伦比亚
25	CCJ121-1	中国台湾与法国材料杂交后代	62	14SM562×L512-1-1	选育材料	99	望都	中国河北望都
26	CCJ105-1	中国台湾与法国材料杂交后代	63	CCJ52-1	选育材料	100	CCJ64m	中国台湾
27	15SM39-2	圭亚那	64	CCJ148-1	英国伦敦	101	CCJ87-2	泰国
28	CCJ93-1	种间杂交材料	65	CCJ149-1	英国伦敦与中国琼海材料杂交后代	102	CCJ88-1	泰国
29	19FB9m	泰国	66	CCJ158-1	英国伦敦	103	CCJ126-1	中国琼海
30	樟树港	中国湖南樟树港	67	CCJ1-1	选育材料	104	CCJ137-1	选育材料
31	L522-1m-1	巴西	68	CCJ2-1	选育材料	105	CCJ133-1	选育材料
32	14SM508m	选育材料	69	CCJ20-1	选育材料	106	CCJ145m	泰国
33	14SM530×14SM549S	选育材料	70	CCJ22-1	选育材料	107	CCJ152-1	英国伦敦
34	14SM555×14SM1	选育材料	71	CCJ112-1	选育材料	108	热辣 2 号	选育品种
35	14SM521-1	选育材料	72	CCJ113-2	选育材料	109	热辣 6 号	选育品种
36	14SM521m	选育材料	73	CCJ127-1	选育材料	110	5 × 32	选育杂交组合
37	14SM567-2	选育材料	74	CCJ122-1	英国伦敦			

系为 20 μL: PCR-mix (2×Es Taq Master Mix) 10 μL, 模板 DNA 1.0 μL, 正向引物和反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, ddH₂O 补齐至 20 μL。PCR

扩增程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s, 60 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

表 2 病毒检测引物序列
Tab. 2 Primer sequence for detection virus

病毒名称 Virus name	引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	片段大小 Fragment size/bp
PMMoV ^[19]	PMMoV-F	GCCGTGCTAGATTCTCTAGTGTC	220
	PMMoV-R	CGCTCTCGAACAGAGCTTG	
CMV ^[20]	CMV-F	CGTTTAGTGACTTCAGACAG	735
	CMV-R	ATGGACAAATCTGAATCAAC	
TSWV ^[21]	TSWV-F	ATGTYTAAGGTAAAGCTCACTAAG	750
	TSWV-R	TTAAGCAAGTTCTGTGAGTTTGGCC	

1.2.3 PMMoV 苗期人工接种抗性鉴定 将筛选出含有抗性基因分子标记的辣椒种质进行苗期人工接种鉴定，以 14SM517m 材料为感病对照（CK⁻），中椒 107 为抗病对照（CK⁺）。2022 年 8 月 3 日，将所有辣椒种子经 10%磷酸三钠溶液浸种 35 min，用蒸馏水清洗除去辣味，在 55 ℃ 下温汤浸种 4 h，置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养。出芽后播种于 50 孔塑料穴盘内育苗，每份参试材料 3 次重复，每重复 15 株。幼苗长至两叶一心期时，移栽至 15.2 cm× 15.6 cm 塑料盆中，育苗基质为高温灭菌基质（蛭石：营养土=1：2）。

待辣椒幼苗长至 4~5 叶期时，取感染 PMMoV 的烟草新叶，加入 10 倍于鲜叶质量的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液（PBS, pH 7.0）中，在冰上研磨匀浆，离心去渣取上清液，接种液现配现用。在叶面抹薄层 600 目金刚砂，用手指蘸取少量接种液轻轻摩擦叶面。接种 30 min 后用清水冲去叶面多余汁液，为避免病毒接不上的情况，3 d 后再接种 1 次。将幼苗置于 28 ℃ 光照培养箱中培养，接种后 5 d 调查局部症状，20 d 调查系统症状，计算病情指数，并进行抗性分级。

1.2.4 病情调查与统计 PMMoV 抗性调查的病情指数计算及抗性级别的划分均参考《辣椒种质资源描述规范和数据标准》^[23]。

按上述标准划分单株病情级别。0：无任何症状；1：心叶明脉，或接种叶少量急性小枯斑；3：少数叶片呈花叶，或接种叶脱落，茎部产生坏死斑；5：多数叶片花叶，少数叶片畸形，皱缩，或茎部产生坏死条斑；7：多数叶片畸形，皱缩，植株矮化，或茎、枝和叶脉系统坏死；9：植株严重矮化，停止生长；或植株严重系统坏死，甚至死亡。病情指数计算公式为：

$$\text{病情指数(DI)} = \frac{\sum (\text{病级数值} \times \text{该病级株数})}{(\text{病级最高值} \times \text{调查总株数})} \times 100。$$

品系群体抗病性划分标准：免疫（I），DI=0；高抗（HR），0<DI≤10；抗病（R），10<DI≤20；中抗（MR），20<DI≤40；感病（S），40<DI≤60；高感（HS），60<DI≤100。

1.3 数据处理

试验数据通过 Excel 软件进行分析、计算平均值和标准差，使用 SPSS 25 软件进行单因素方差分析，采用 LSD 或 Duncan’s 法进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 毒原扩繁检测结果

RT-PCR 鉴定结果表明，PMMoV 特异性引物能扩增出 220 bp 左右的条带，与目的条带一致，而 CMV 和 TSWV 检测引物均未扩增出条带（图 1），初步证明此毒原为 PMMoV 单一感染毒原，可用于接种鉴定。

2.2 辣椒种质 L³ 抗性基因检测

L³ 抗性分子标记鉴定结果表明，17YB32、17SCa28m、CF19-34m、19FB6-1、15SM39-2、CCJ93-1、14SM555×14SM1、14SM567-2、14SM526-1、14SM565-1、14SM514m、14SM502-1、14SM519-1、14SM504m、14SM503m、14SM519-3、14SM518-2、14SM519-2 等 46 份种质含有与抗性基因 L³ 连锁的分子标记（图 2），其余 64 份种质均未扩增出目标条带，说明这些种质不含 L³ 抗性基因。

2.3 辣椒种质 PMMoV 抗性鉴定

辣椒种质 PMMoV 抗性鉴定结果表明（图 3、表 3），46 份供试种质存在显著性差异，未发现对 PMMoV 免疫的种质，各种质的病情指数在 8.86~60.00 之间。病情指数能够反映辣椒种质抗 PMMoV 能力的强弱，数值越高，表明抗性越低，反之，表明抗性越高。其中，高抗种质为 CF19-34m 和 19FB6-1，病情指数分别为 8.86 和 8.79，抗病

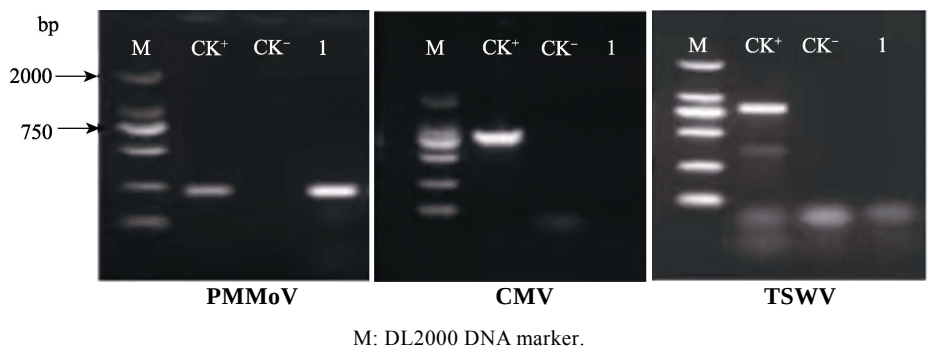


图 1 PMMoV、CMV、TSWV RT-PCR 检测
Fig. 1 Detection of PMMoV, CMV and TSWV by RT-PCR

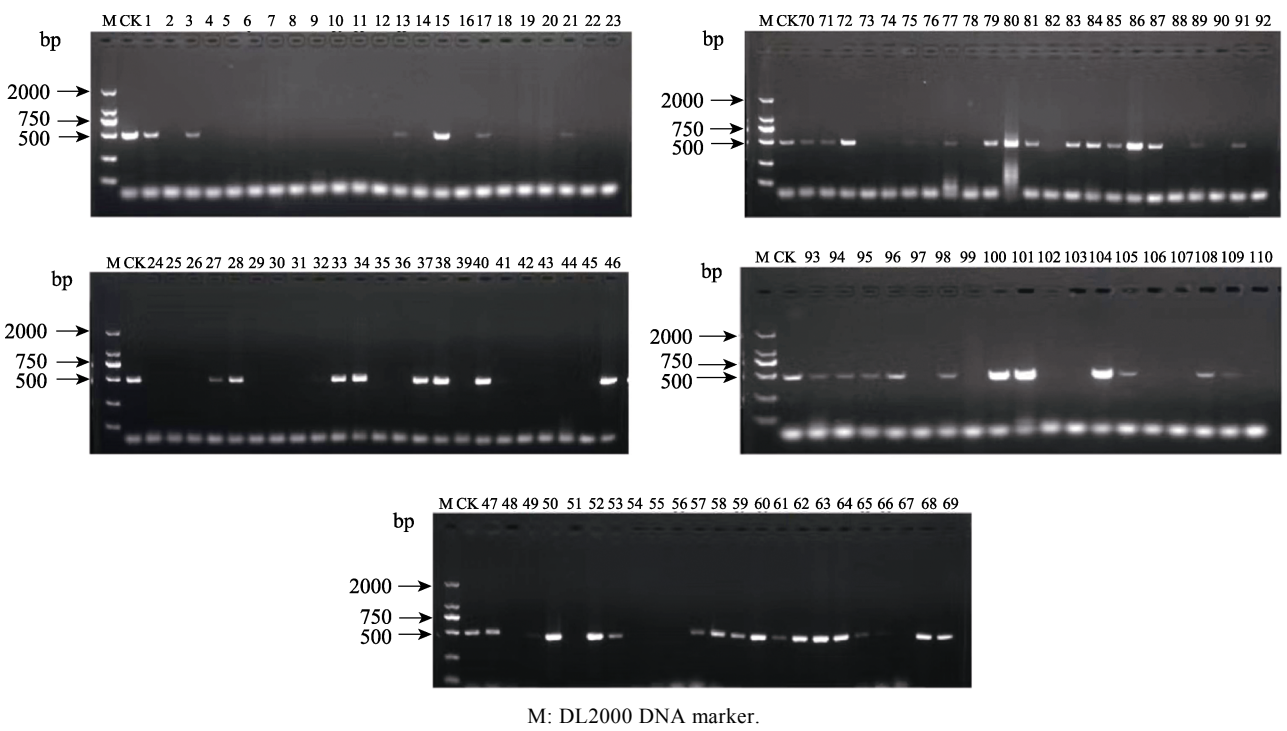


图 2 辣椒种质 L^3 抗性基因检测
Fig. 2 The detection of L^3 resistance gene in pepper germplasm

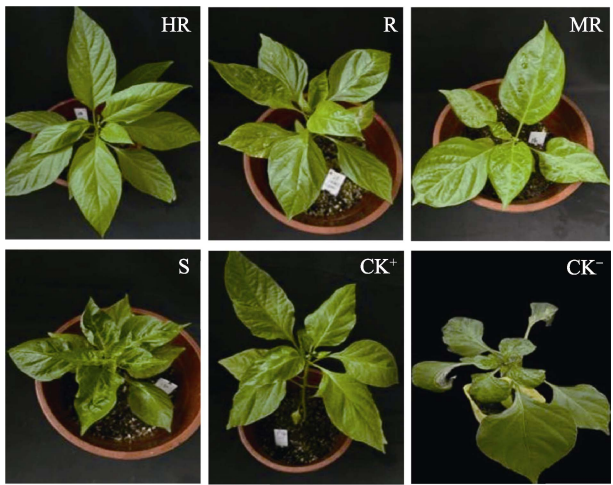


图 3 部分辣椒种质在苗期鉴定中的抗性表现
Fig. 3 Resistance performance of some pepper germ-plasms to PMMoV

性显著强于感病种质，叶片几乎无感染症状；抗病种质 CCJ93-1 次之，叶片仅有轻微的花叶症状；中抗材料 17YB32、17SCa28m、15SM39-2、14SM555×14SM1、14SM567-2、14SM526-1、14SM565-1、14SM502-1、14SM519-1、14SM504m、14SM503m、14SM519-3、14SM518-2、14SM519-2、CCJ52-1 等 34 份，植株少数叶片出现花叶、皱缩；感病种质 14SM514m、CCJ22-1、CCJ113-2、CCJ135-1、CCJ157-1、CCJ537-1m、L545、CCJ87-2、CCJ133-1，这 9 份材料中 CCJ113-2 和 CCJ135-1 的病情指数最大，病情指数为 60.00。感病种质的抗性能力弱，植株叶片多数皱缩和心叶畸形，植株矮化。总体来看，高抗、抗病和中抗材料占总鉴定材料的 80.43%。

表 3 辣椒种质 PMMoV 抗性鉴定结果
Tab. 3 Identification results of PMMoV resistance in pepper germplasms

编号 No.	种质名称 Germplasms name	栽培种 Cultivar	病情指数 Disease index	抗性级别 Resistance level	编号 No.	种质名称 Germplasms name	栽培种 Cultivar	病情指数 Disease index	抗性级别 Resistance level
1	17YB32	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.78±1.11 ^{nm1}	MR	25	CCJ22-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	55.56±2.63 ^d	S
2	17SCa28m	<i>C. annuum</i> L.	39.26±1.74 ^{ljk1}	MR	26	CCJ112-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	38.94±2.55 ^{ef}	MR
3	CF19-22-1	<i>C. annuum</i> L.	38.52±2.20 ^{nm1k}	MR	27	CCJ113-2	<i>C. chinense</i> Jacquin	60.00±1.39 ^a	S
4	CF19-34m	<i>C. annuum</i> L.	8.86±1.35 ^u	HR	28	CCJ135-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	60.00±2.12 ^a	S
5	19FB6-1	<i>C. annuum</i> L.	8.79±2.31 ^u	HR	29	CCJ157-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	58.52±1.96 ^b	S
6	19FB11	<i>C. annuum</i> L.	37.04±1.51 ^o	MR	30	CCJ110-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	36.74±2.28 ^{ef}	MR
7	15SM39-2	<i>C. chinense</i> Jacquin	36.30±2.04 ^p	MR	31	L506m	<i>C. chinense</i> Jacquin	38.58±2.33 ^{ihg}	MR
8	CCJ93-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	17.78±1.99 ^s	R	32	L502-6-1m	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.04±1.59 ^{nm1}	MR
9	14SM555× 14SM1	<i>C. chinense</i> Jacquin	29.63±2.65 ^r	MR	33	L528m	<i>C. chinense</i> Jacquin	39.44±2.18 ^f	MR
10	14SM567-2	<i>C. chinense</i> Jacquin	39.26±2.60 ^q	MR	34	L531	<i>C. chinense</i> Jacquin	38.95±2.53 ^{ihg}	MR
11	14SM526-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.04±2.14 ^{nm1}	MR	35	L533m	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.04±1.66 ^o	MR
12	14SM565-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	40.00±1.50 ^{ihg}	MR	36	L535-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	39.93±1.35 ^{ef}	MR
13	14SM514m	<i>C. chinense</i> Jacquin	58.52±2.77 ^b	S	37	L539	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.04±1.13 ^{onm}	MR
14	14SM502-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	39.74±1.49 ^{ef}	MR	38	L537-1m	<i>C. chinense</i> Jacquin	54.81±1.04 ^d	S
15	14SM519-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	39.06±1.61 ^{m1k}	MR	39	L532-2	<i>C. chinense</i> Jacquin	38.14±1.66 ^{ef}	MR
16	14SM504m	<i>C. chinense</i> Jacquin	39.37±2.47 ^{m1kj}	MR	40	L545	<i>C. chinense</i> Jacquin	57.04±1.54 ^c	S
17	14SM503m	<i>C. chinense</i> Jacquin	39.26±1.46 ^{ihg}	MR	41	CCJ64m	<i>C. chinense</i> Jacquin	38.79±2.77 ^{hegf}	MR
18	14SM519-3	<i>C. chinense</i> Jacquin	35.22±2.08 ^{ef}	MR	42	CCJ87-2	<i>C. chinense</i> Jacquin	40.74±2.29 ^{ihg}	S
19	14SM518-2	<i>C. chinense</i> Jacquin	39.26±1.40 ^{kj1h}	MR	43	CCJ137-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.04±1.60 ^{onm}	MR
20	14SM519-2	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.78±1.77 ^{nm1}	MR	44	CCJ133-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	58.52±2.53 ^b	S
21	CCJ52-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	34.30±1.49 ^{nm1}	MR	45	热辣 2 号	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.04±1.76 ^{on}	MR
22	CCJ148-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.75±2.00 ^{fe}	MR	46	热辣 6 号	<i>C. chinense</i> Jacquin	38.52±1.35 ^{m1k}	MR
23	CCJ2-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	38.15±1.46 ^c	MR	47	14SM517 (CK ⁻)	<i>C. chinense</i> Jacquin	55.56±1.65 ^d	S
24	CCJ20-1	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.44±1.35 ^{ef}	MR	48	中椒 107 (CK ⁺)	<i>C. annuum</i> L.	11.11±0.82 ⁱ	R

注：同列不同小写字母表示处理间差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference among different treatments ($P<0.05$).

3 讨论

本研究结合 L^3 抗性基因检测和苗期人工接种抗性鉴定方法，在 110 份辣椒种质中筛选出抗 PMMoV P_{1,2} 种质 37 份，这些抗病种质可为辣椒的抗病育种提供优良的种质资源。近年来，辣椒轻斑驳病毒在国内快速蔓延，研究者正加快筛选对其具较大抗性的辣椒种质。秦蕾等^[24]对 51 份辣椒种质资源进行了 TMV 抗性鉴定，获得抗病材料 15 份，其中高抗材料 2 份，占总鉴定材料的 3.92%；姚明华等^[25]对引进的 42 份非洲辣椒材料进行了 TMV 抗性鉴定，获得抗性材料 9 份；王飞等^[26]在 74 份泰国辣椒种质中筛选出 7 份 TMV 抗性材料。已有研究筛选到的抗性材料相对较少，

本研究鉴定结果表明，不同的辣椒种质表现的抗性有所不同，其中多数抗病材料表现为中抗，仅获得 2 份高抗材料和 1 份抗病材料。这可能是由于抗病性受到多种因素的影响，包括外在的环境因子、内在基因表达及辣椒与病毒的相互作用等。其次，可能高效 L 基因主要存在于辣椒野生种当中。

目前，辣椒抗 PMMoV 的 L 基因已被克隆。本研究利用已报道的与 L^3 连锁的分子标记对 110 份辣椒种质进行分子鉴定，结果显示有 46 份种质含有抗性分子标记，包括一年生辣椒栽培种（*C. annuum* L）和中国辣椒栽培种（*C. chinense* Jacquin）。在接种 PMMoV P_{1,2} 菌株后，其中有 9 份

含有抗性分子标记的种质表现为感病, 这种现象可能与品种的遗传背景有关。本研究采用的是与 L^3 连锁的标记而不是功能标记, 因此存在假阳性的可能, 为了准确鉴定辣椒种质对 PMMoV 的抗性, 需要结合抗性鉴定结果进行综合判断。

病毒病一直是威胁辣椒生产的主要病害, 对辣椒生产造成严重的经济损失^[27]。由于 PMMoV 具有种传的特性, 使用化学杀菌剂和传统的农业防治措施无法控制病毒病的为害。与传统育种方式相比, 利用分子标记技术可以快速对已知抗性基因进行检测, 缩短了育种年限, 有利于寻找新抗源, 拓宽辣椒品种抗性遗传多样性, 对 PMMoV 抗病品种的选育尤为重要。

本课题组前期研究已经明确了海南儋州辣椒种质资源圃感染的 PMMoV 为 $P_{1,2}$ 致病型, 应用 L^3 抗性基因可以有效克服 PMMoV $P_{1,2}$ 致病型的为害。然而, 病毒毒株会克服抗性基因而变异, L^3 基因对 PMMoV $P_{1,2,3,4}$ 致病型不具有抗性^[28]。因此, 未来的工作需要挖掘鉴定其他 PMMoV 抗性基因用于辣椒抗性种质资源的创制, 为辣椒抗 PMMoV 育种提供更高效率的抗源材料。

参考文献

- [1] ZHU Z S, SUN B M, WEI J L, CAI W, HUANG Z B, CHEN C M, CAO B H, CHEN G J, LEI J J. Construction of a high density genetic map of an interspecific cross of *Capsicum chinense* and *Capsicum annuum* and QTL analysis of floral traits[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 1054.
- [2] 姚玉荣, 陈国华, 冯兰香, 谢丙炎. 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. YAO Y R, CHEN G H, FENG L X, XIE B Y. Molecular detection of pepper viruses in southern vegetable production bases[J]. China Vegetables, 2013(10): 84-89. (in Chinese)
- [3] 龚明霞, 赵虎, 王萌, 吴星, 赵曾菁, 黄金梅, 何志, 王日升. 广西辣椒病毒病调查及病原种类初步鉴定[J]. 中国蔬菜, 2020(4): 74-79. GONG M X, ZHAO H, WANG M, WU X, ZHAO Z J, HUANG J M, HE Z, WANG R S. Investigation and preliminary identification of pathogen species of pepper virus disease in Guangxi[J]. China Vegetables, 2020(4): 74-79. (in Chinese)
- [4] 汤亚飞, 裴凡, 李正刚, 余小漫, 于琳, 蓝国兵, 邓铭光, 何自福. 基于小 RNA 深度测序技术鉴定侵染广东辣椒的病毒种类[J]. 中国农业科学, 2019, 52(13): 2256-2267. TANG Y F, PEI F, LI Z G, SHE X M, YU L, LAN G B, DENG M G, HE Z F. Identification of viruses infecting peppers in Guangdong by Small RNA deep sequencing[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(13): 2256-2267. (in Chinese)
- [5] 韩帅, 张河庆, 吴婕, 李洪浩, 席亚东. 侵染四川辣椒的番茄斑萎病毒和辣椒轻斑驳病毒的小 RNA 测序检测及鉴定[J]. 植物病理学报, 2020, 50(2): 147-154. HAN S, ZHANG H Q, WU J, LI H H, XI Y D. Identification and detection of tomato spotted wilt virus and pepper mild mottle virus infecting peppers in Sichuan using small RNA sequencing[J]. Phytopathology Research, 2020, 50(2): 147-154. (in Chinese)
- [6] 严丹侃, 郑红英, 张海珊, 沈艳, 顾江涛, 刘勇, 章东方, 燕飞. 安徽和县地区辣椒病株辣椒轻斑驳病毒的鉴定[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(32): 82-84. YAN D K, ZHENG H Y, ZHANG H S, SHEN Y, GU J T, LIU Y, ZHANG D F, YAN F. Identification of Pepper mild mottle virus in Hexian, Anhui province[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(32): 82-84. (in Chinese)
- [7] 李丽丽, 郑敏, 杨洪一. 一个辣椒轻斑驳病毒中国分离物的基因组测序及分析[J]. 中国瓜菜, 2020, 33(6): 12-16. LI L L, ZHENG M, YANG H Y. Genome sequence and analysis of a Chinese isolate of Pepper mild mottle virus[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2020, 33(6): 12-16. (in Chinese)
- [8] 王少立, 谭玮萍, 杨园园, 代惠洁, 孙晓辉, 乔宁, 竺晓平. 山东省辣椒主要病毒种类的分子检测与鉴定[J]. 中国农业科学, 2017, 50(14): 2728-2738. WANG S L, TAN W P, YANG Y Y, DAI H J, SUN X H, QIAO N, ZHU X P. Molecular detection and identification of main viruses on pepper in Shandong province[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(14): 2728-2738. (in Chinese)
- [9] 唐玉海, 乔宁, 孙晓辉. 辣椒轻斑驳花叶病毒寿光分离物的 RT-PCR 检测及其序列分析[J]. 北方园艺, 2017(4): 94-97. TANG Y H, QIAO N, SUN X H. Identification and sequence analysis of Shouguang isolate by RT-PCR of Pepper mild mottle mosaic virus[J]. Northern Journal of Horticulture, 2017(4): 94-97. (in Chinese)
- [10] 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. 侵染我国主要蔬菜作物的病毒种类、分布与发生趋势[J]. 中国农业科学, 2019(2): 239-261. LIU Y, LI F, LI Y Y, ZHANG S B, GAO X W, XIE Y, YAN F, ZHANG A S, DAI L Y, CHENG Z B, DING M, NIU Y B, WANG S J, CHE H Y, JIANG T, SHI X B, HE Z F, WU Y F, ZHANG D Y, QING L, YAN W R, YANG X H,

- TANG Y F, ZHENG H Y, TANG Q J, ZHANG S B, ZHANG D F, CAI L, TAO X R. Identification, distribution and occurrence of viruses in the main vegetables of China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019(2): 239-261. (in Chinese)
- [11] WANG Y, LI X, LIU Y, WANG X, ZHOU G. Development of a simple and effective method for specific detection of *Pepper mild mottle virus*[J]. *Acta Virologica*, 2009, 53(1): 21-27.
- [12] COLSON P, RICHEL H, DESNUES C, BALIQUE F, MOAL V, GROB J J, BERBIS P, LECOQ H, HARLÉ J R, BERLAND Y, RAOULT D. *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.
- [13] BOUKEMA I W. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum* L.[J]. *Euphytica*, 1980, 29(2): 433-439.
- [14] GENDA Y, KANDA A, HAMADA H, SATO K, OHNISHI J, TSUDA S, GENDA Y, KANDA A, HAMADA, SATO K, OHNISHI J, TSUDA H. Two amino acid substitutions in the coat protein of *Pepper mild mottle virus* are responsible for overcoming the I4 gene-mediated resistance in *Capsicum* spp.[J]. *Phytopathology*, 2007, 97(7): 787-793.
- [15] TOMITA R, SEKINE K T, MIZUMOTO H, SAKAMOTO M, MURAI J, KIBA A N, HIKICHI Y, SUZUKI K, KOBAYASHI K. Genetic basis for the hierarchical interaction between *Tobamovirus* spp. and *L* resistance gene alleles from different pepper species[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(1): 108-117.
- [16] 张强, 张春竹, 李克梅, 罗明, 楚金平. 辣椒轻斑驳病毒(PMMoV)新疆加工型辣椒分离物的鉴定和致病型分析[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(25): 296-302.
- ZHANG Q, ZHANG C Z, LI K M, LUO M, CHU J P. Identification and pathotype analysis of *Pepper mild mottle virus* in processing pepper from Xinjiang[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(25): 296-302. (in Chinese)
- [17] 李廷芳, 吴淑华, 赵文浩, 季英华, 周益军, 郭青云. 青海海东设施辣椒轻斑驳病毒的分子检测[J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(4): 958-960.
- LI T F, WU S H, ZHAO W H, JI Y H, ZHOU Y J, GUO Q Y. Molecular detection of *Pepper mild mottle virus* isolated from pepper in Haidong, Qinghai province[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 33(4): 958-960. (in Chinese)
- [18] 张宝玺, 王立浩, 张正海, 曹亚从, 于海龙. 甜椒 L^3 应对辣椒轻斑驳病毒及中椒系列新品种的选育[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(18): 3846-3855.
- ZHANG B X, WANG L H, ZHANG Z H, CAO Y C, YU H L. Development of new varieties of ZHONGJIAO pepper resistant to *Pepper mild mottle virus* using L^3 gene[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(18): 3846-3855. (in Chinese)
- [19] 丁超. 辣椒烟草花叶病毒的分子鉴定及检测技术研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2017.
- DING C. Molecular identification and the detection methods of *Tobacco mosaic virus* isolated from pepper[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2017. (in Chinese)
- [20] 柴阿丽, 陈利达, 许帅, 帕提古丽·艾斯木托拉, 王利丽, 石延霞, 谢学文, 李磊, 李宝聚. 新疆喀什辣椒轻斑驳病毒和黄瓜花叶病毒复合侵染的分子鉴定[J]. *华北农学报*, 2020, 35(增刊): 332-337.
- CHAI A L, CHEN L D, XU S, PATIGULI AISIMUTUOLA, WANG L L, SHI Y X, XIE X W, LI L, LI B J. Molecular identification of co-infection of *Pepper mild mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* on pepper in Kashgar, Xinjiang[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2020, 35(Suppl.1): 332-337. (in Chinese)
- [21] 许云玉, 贾志强, 高雪, 陈增敏, 李永忠, 刘雅婷. 番茄斑萎病毒侵染辣椒后病毒积累量动态变化[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(5): 1603-1609.
- XU Y Y, JIA Z Q, GAO X, CHEN Z M, LI Y Z, LIU Y T. Dynamic changes of virus accumulation in pepper infected by *Tomato spotted wilt virus*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(5): 1603-1609. (in Chinese)
- [22] TOMITA R, MURAI J, MIURA Y, ISHIHARA H, LIU S, KUBOTERA Y, HONDA A, HATTA R, KURODA T, HAMADA H, SAKAMOTO M, MUNEMURA I, NUNOMURA O, ISHIKAWA K, GENDA Y, KAWASAKI S, SUZUKI K, MEKSEM K, KOBAYASHI K. Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene L^3 of *Capsicum chinense* in a 400-kb region of R-like genes cluster embedded in highly repetitive sequences[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117(7): 1107-1118.
- [23] 李锡香, 张宝玺. 辣椒种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 66-75.
- LI X X, ZHANG B X. Descriptive specifications and data standards of pepper germplasm resources[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2006: 66-75. (in Chinese)
- [24] 秦蕾, 梁燕, 默宁, 张洋, 赵贵叶. 辣椒种质资源 TMV 抗性的鉴定与评价[J]. *中国蔬菜*, 2017(10): 44-50.
- QIN L, LIANG Y, MO N, ZHANG Y, ZHAO G Y. Identification and evaluation of resistance to TMV in pepper (*Capsicum annuum* L.) germplasm resources[J]. *China Vegetables*, 2017(10): 44-50. (in Chinese)
- [25] 姚明华, 焦春海, 王飞, 李宁. 非洲辣椒种质资源鉴定与评价[J]. *辣椒杂志*, 2012, 10(3): 16-19, 23.
- YAO M H, JIAO C H, WANG F, LI N. Identification and

- evaluation of hot pepper germplasm resources from Africa[J]. *Journal of China Capsicum*, 2012, 10(3): 16-19, 23. (in Chinese)
- [26] 王飞, 姚明华, 焦春海. 泰国辣椒种质资源鉴定与评价[J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(9): 2146-2148.
- WANG F, YAO M H, JIAO C H. Identification and evaluation of pepper germplasm resources from Thailand[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2010, 49(9): 2146-2148. (in Chinese)
- [27] 于海龙, 靳远, 刘婧, 张宝玺, 张正海, 曹亚从, 王立浩. 我国辣椒病毒病发生情况及发展趋势——基于 2018 年和 2019 年辣椒主产区的调查[J]. *中国蔬菜*, 2020(9): 25-30.
- YU H L, JIN Y, LIU J, ZHANG B X, ZHANG Z H, CAO Y C, WANG L H. Occurrence and development trend of pepper virus disease in China—based on main pepper producing areas investigation in 2018 and 2019[J]. *China Vegetables*, 2020(9): 25-30. (in Chinese)
- [28] 杨中周, 邓竹根, 李曼, 戴祖云. 辣椒轻斑驳病毒研究的回顾与展望[J]. *中国瓜菜*, 2021, 34(9): 1-6.
- YANG Z Z, DENG Z G, LI M, DAI Z Y. Review and prospect of research on *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2021, 34(9): 1-6. (in Chinese)