

重庆辣椒上烟草轻型绿花叶病毒的分子检测及全基因组克隆分析^①

吴根土¹, 徐霞², 陈思敏¹, 孙森¹,
楚成茹¹, 李明骏¹, 青玲¹

1. 西南大学植物保护学院/植物病害生物学重庆市高校级重点实验室, 重庆 400716;
2. 宁夏回族自治区吴忠市利通区农业技术推广服务中心, 宁夏 吴忠 751100

摘要: 辣椒是重庆重要的经济作物, 烟草轻型绿花叶病毒(*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV)引起的病毒病对辣椒生产造成了严重影响. 为明确 TMGMV 在重庆辣椒上的发生、分布情况及其基因组特征, 从重庆北碚、石柱、潼南和九龙坡 4 个区县采集 29 份疑似病毒病样品进行了 RT-PCR 鉴定, 通过分段扩增测序的方法拼接获得病毒基因组全序列并进行了系统进化分析. 检测结果表明: 29 份样品中有 9 份检测到 TMGMV, 检出率为 31.03%, 其中石柱县的检出率最高, 为 60.00%. 序列分析发现, 重庆辣椒分离物 TMGMV-TN29 基因组全序列具有烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)病毒典型基因组结构特征, 由 6 356 nt 构成. 系统进化分析得出, 该分离物与 TMGMV 厦门分离物 Xiamen (JX534224) 具有较近的亲缘关系, 核苷酸序列相似性达到 99.75%.

关键词: 辣椒; 烟草轻型绿花叶病毒; RT-PCR 检测; 全序列; 系统进化分析

中图分类号: S436.418.1⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)05-0001-07

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属于茄科(Solanaceae)辣椒属(*Capsicum*)植物, 是一类重要的蔬菜作物和经济作物. 病毒病是影响辣椒生产的一类重要病害, 感病植株表现出叶片畸形、斑驳、花叶和植株矮化等症状, 造成辣椒产量下降, 品质降低, 严重制约辣椒产业发展^[1-2]. 目前, 世界上已有 60 多种植物病毒可侵染辣椒^[3], 在我国辣椒上检测到的病毒有 33 种, 归属于 10 个科 12 个属^[4]. 其中, 已报道有 6 种烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)病毒侵染辣椒, 分别为烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、番茄花叶病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)^[1]、辣椒轻斑驳病毒(*Pepper mild mottle virus*, PMMoV)^[5]、烟草轻型绿花叶病毒(*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV)^[6]、番茄斑驳花叶病毒(*Tomato mottle mosaic virus*, ToMMV)^[7-8]和油菜花叶病毒(*Youcai mosaic virus*, YoMV)^[9].

烟草轻型绿花叶病毒(*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV), 属于烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)成员, 最早在烟草(*Nicotiana glauca*)上发现. TMGMV 除危害烟草外, 还可以侵染辣椒^[6]、番茄^[10]和南瓜^[11]等多种作物及杂草, 其在辣椒上发生和危害较为严重. TMGMV 侵染辣椒后引起叶片褪绿、黄化及坏死, 且在病果上有明显的褪绿条纹等症状. 在我国, TMGMV 危害辣椒的报道最早于 2005 年出现在台湾地区; 2013 年在厦门出现^[6]; 2015 年在江苏出现; 2016 年在山东大面积发生, 严重影响了辣椒的产量^[12]. 这些报道表明该病在我国呈现扩散态势, 是当前我国辣椒生产上的潜在危害病毒之一.

① 收稿日期: 2018-03-07

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31601607); 重庆市基础科学与前沿技术研究专项(cstc2017jcyjx0129).

作者简介: 吴根土(1983-), 男, 博士, 讲师, 主要从事植物病毒学研究.

通信作者: 青玲, 教授.

本实验室在前期工作中,从重庆北碚、石柱和潼南等地区采集了表现出花叶、卷曲、斑驳、黄化的辣椒样品,通过高通量测序方法检测到了黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、蚕豆萎蔫病毒 2 号(*Broad bean wilt virus 2*, BBWV-2)、辣椒潜隐病毒 2 号(*Pepper cryptic virus 2*, PCV-2)、辣椒脉斑驳病毒(*Chilli veinal mottle virus*, ChiVMV)、甜椒脉斑驳病毒(*Pepper veinal mottle virus*, PVMV)、TMV、PMMoV 和 TMGMV 等 8 种病毒。虽然在我国已经报道了 TMGMV 在辣椒上发生危害,但在重庆地区还未见报道。因此,本研究在前期工作的基础上,利用 RT-PCR 方法对重庆辣椒上的 TMGMV 进行测定,分析其检出率;通过分段扩增方法获得其基因组全序列,并与国内外报道的 TMGMV 全序列进行同源性比较,以期明确重庆不同地区 TMGMV 的发生情况及其与国内外其他分离物间的进化关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒源

疑似感染病毒的辣椒样品于 2016 年 6 月采自重庆北碚、潼南、石柱和九龙坡 4 个区县,共 29 份,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.1.2 载体和菌株

克隆载体 pGEM-T Easy Vector, 美国 Promega 公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans5 α , 北京全式金生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂

Trizol, Invitrogen 公司; 反转录试剂盒、连接酶, TaKaRa 公司; HiFi Taq DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司; DNA 回收试剂盒和质料提取试剂盒, 北京天根生化科技公司。

1.1.4 引物

用于检测 TMGMV 的引物依据文献[6]报道的序列; 根据 GenBank 中 TMGMV 的基因组全长序列, 比对分析后设计分段扩增 TMGMV 全基因组引物(表 1)。

表 1 用于 TMGMV RT-PCR 扩增的特异性引物

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增区域	扩增片段大小/bp
TMG-CP F	ATGCCTTATACAATCAACTC	CP	480
TMG-CP R	CTAAGTAGCCGGAGTTGTGG		
TMG-1F	GTATGTTTTAATAGTTTTTCGACAAC	P1	1 588
TMG-1588R	CTGCTCACCAATCTCTCCTT		
TMG-1418F	ACCCTTGTC AATGGCTTTCT	P2	1 648
TMV-3065R	CTTACCGCCTATCATCTCAG		
TMG-2705F	CAATGTGAGAACGGTAGA	P3	1 852
TMG-4556R	GAGATTGGCACATGACTG		
TMG-4442F	GGGTTCAATGTTACCGATGG	P4	1 915
TMG-6356R	TGGGCCGCTACCCGCGGTTA		

1.2 方法

1.2.1 植物总 RNA 提取及 cDNA 合成

总 RNA 的提取参考 Trizol RNA (TaKaRa) 取说明书, 最后每份 RNA 加入 30 μL 的 RNase-free ddH₂O 溶解 RNA, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

以提取样品总 RNA 为模板, 利用反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit, TaKaRa)合成 cDNA。反应体系为: 5 \times PrimeScript Buffer 2 μL , Oligo dT Primer 0.5 μL , Random 6 mers 0.5 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL , 总 RNA 2 μL , 加 RNase-free ddH₂O 至 10 μL 。反应程序为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 20 s。cDNA 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 备用。

1.2.2 RT-PCR 及 DNA 纯化

以合成的 cDNA 为模版进行 PCR 扩增, 反应体系为: 10 \times HiFi buffer (Mg²⁺) 2.5 μL , dNTPs

(2.5 mM) 2.0 μL , primer F(10 μM) 0.3 μL , primer R(10 μM) 0.3 μL , cDNA 1 μL , HiFi Taq (500 U) 0.2 μL 加 ddH₂O 至 25 μL . PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 000 bp/min, 循环 35 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 取 5 μL PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

PCR 产物纯化参考天根 DNA 纯化回收试剂盒 (Universal DNA Purification Kit, TIANGEN) 进行 PCR 产物回收, 最后用 30 μL ddH₂O 溶解 DNA, 12 000 r/min 离心 2 min, 收集 DNA 溶液. DNA 回收产物保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$, 备用.

1.2.3 T 载体连接、转化及检测

参考 T 载体快速连接试剂盒 (pGEM-T Easy Vector System I, Promega) 和本实验室体系^[13] 进行回收的 DNA 片段连接. 反应体系为: 2 \times Ligation Buffer 5 μL , pGEM-T 载体 1 μL , DNA 片段 3 μL , T4 DNA Ligase(3 U/ μL)1 μL . 置室温反应 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 8 h. 将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 培养后经蓝白斑筛选, 挑选白色单克隆菌落至 LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp) 中培养 4~6 h 后 PCR 检测阳性克隆用于测序.

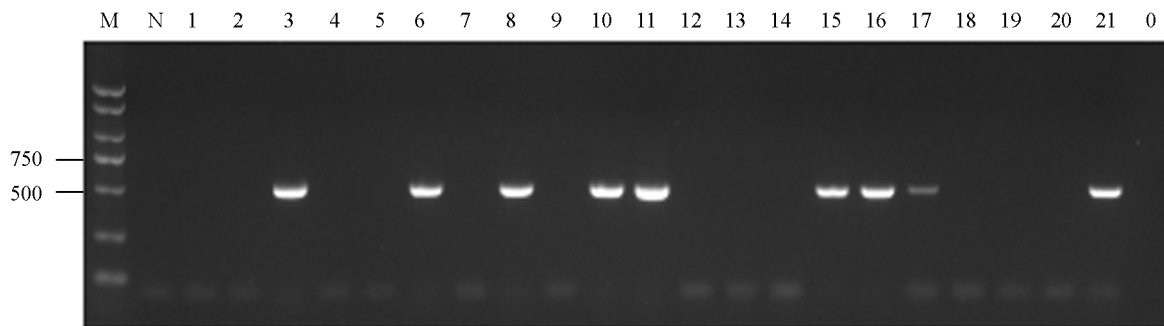
1.2.4 序列测定与分析

菌液经过 PCR 鉴定为阳性克隆后委托华大基因科技有限公司进行序列测定. 利用 DNASTar^[14] 软件对所获得的基因序列进行处理, 利用 BLAST 程序进行序列相似性搜索, 并用 DNASTar MegAlign 程序的 Clustal W 方法与 GenBank 已登录的病毒核苷酸序列进行多序列比较分析, 采用 MEGA 5.0^[15-16] 的邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建进化树, 重复次数设置为 1 000 次.

2 结果与分析

2.1 TMGMV 在重庆辣椒上的发生情况

对采集自重庆 4 个区县的 29 份辣椒疑似病毒病害样品进行总 RNA 抽提, 反转录合成 cDNA, 利用 TMGMV CP 基因特异性引物进行 PCR 扩增, 获得目的大小的 PCR 产物 (图 1). 阳性结果分析发现共有 9 个样品检测到 TMGMV, 检出率为 31.03%, 表明 TMGMV 在重庆北碚、九龙坡、潼南和石柱均有发生 (表 2). 进一步分析发现, 从石柱采集的 5 份样品中检测到 TMGMV 的样品有 3 份, 检出率高达 60.00%; 潼南 TMGMV 检出率为 40.00%; 九龙坡 TMGMV 检出率为 30.00%; 而北碚 9 份样品中仅有 1 份样品检测到 TMGMV, 检出率最低, 为 11.11% (表 2).



M-marker, N 为阴性对照, 1-21 为样品, 0 为空白对照.

图 1 重庆辣椒样品 TMGMV 的 RT-PCR 检测

表 2 重庆 4 个区县辣椒样品 TMGMV 的 RT-PCR 检测结果

地区	样品数	阳性样品数	阳性检出率/%
北碚	9	1	11.11
潼南	5	2	40.00
石柱	5	3	60.00
九龙坡	10	3	30.00
合计	29	9	31.03

2.2 重庆辣椒上 TMGMV CP 克隆及序列分析

采用 RT-PCR 方法成功克隆重庆辣椒上 TMGMV CP 基因, 通过连接 pGEM-T 载体, 转化大肠杆菌、菌液 PCR 检测, DNA 测序等过程, 获得重庆地区分离物 TMGMV CP 基因全序列, 命名为 TMGMV-CQ. 对已获得的分离物与 GenBank 中 19 个 TMGMV 分离物的 CP 基因进行系统进化树分析(图 2). 结果表明, 这 20 个 TMGMV 分离物主要聚为 3 支. 其中, 巴拿马辣椒分离物(EU934035)与西班牙等欧洲分离物聚为一支(group I); TMGMV-CQ 与 2 个韩国分离物(AF103782 和 AF103783)、美国烟草分离物(AF131908)、美国鲸鱼花分离物(EF469769)和 2 个中国辣椒分离物(KM596785、JX534224)聚为一支(group II); 韩国矮牵牛分离物(AM262165)、美国烟草分离物(AF132907)、中国台湾辣椒分离物(DQ821941)和日本烟草分离物(AB078435)聚为一支(group III), 系统进化分析结果表明 TMGMV 分离物间的亲缘关系具有一定的地理相关性. TMGMV-CQ 与厦门辣椒分离物(JX534224)聚集在同一个小分支, 表明两者的亲缘关系最近.

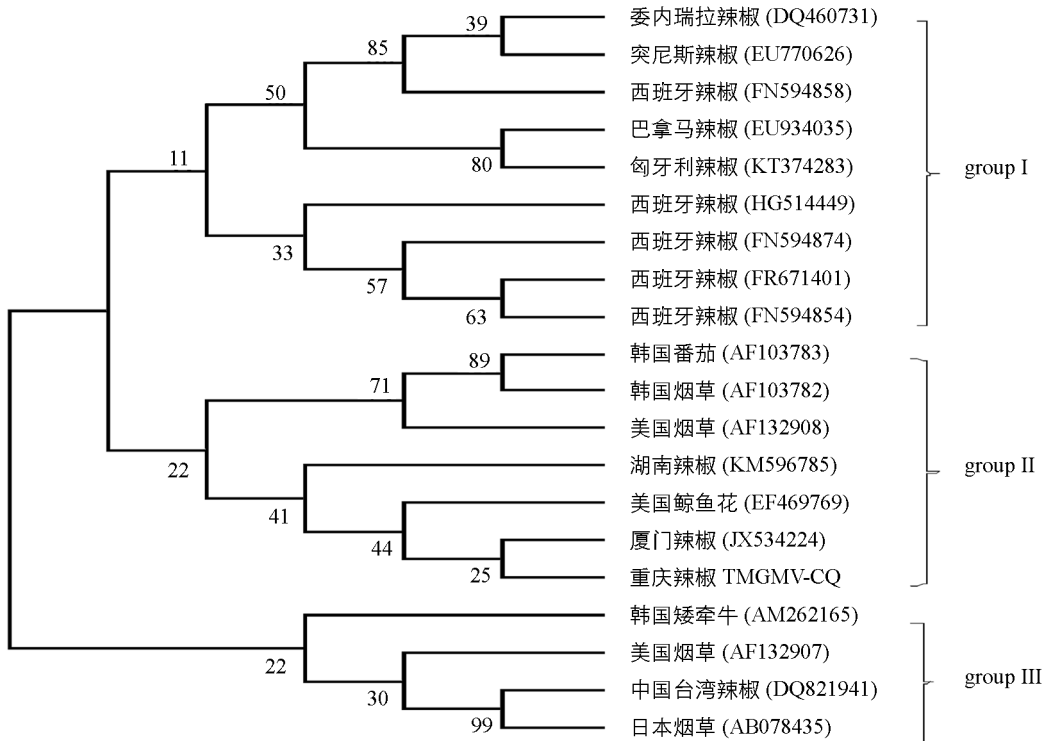
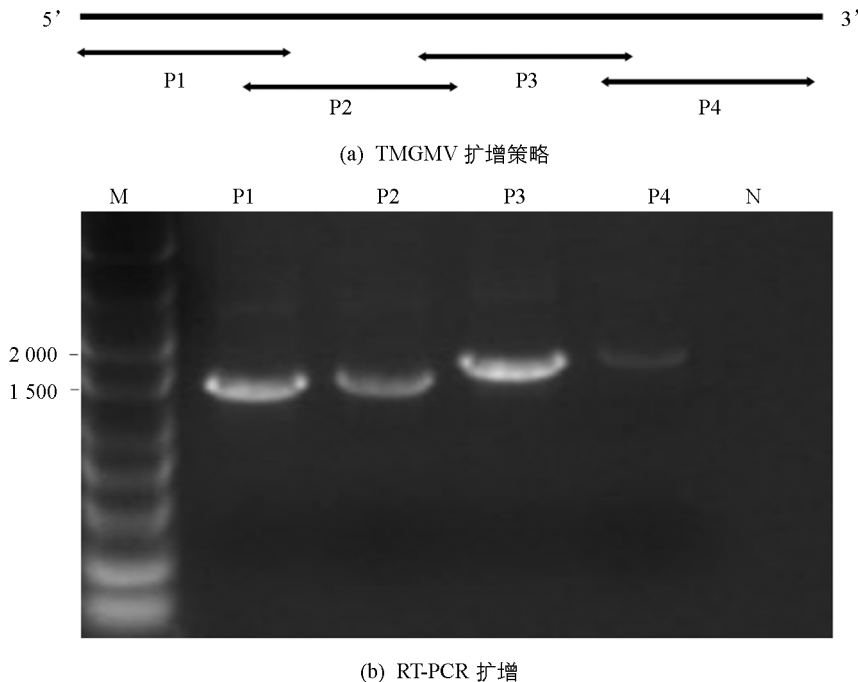


图 2 基于 TMGMV 各分离物 CP 基因序列的系统进化树

2.3 重庆辣椒上 TMGMV 全基因组序列分析

将 GenBank 中 TMGMV 的基因组全长序列经过序列比对, 根据其保守序列设计分段扩增 TMGMV 基因组全长的引物(表 1), 采用分段扩增再拼接的方法, 分成 4 个片段进行扩增(图 3a). 对采自重庆潼南的辣椒样品(编号 TN29)进行 TMGMV 基因组分段扩增, 获得大小约为 1.6 kb, 1.6 kb, 1.8 kb 和 1.9 kb 的 4 个片段(图 3b), 分别连接 pGEM-T 载体, 转化大肠杆菌、菌液 PCR 检测, DNA 测序等过程. 测序结果获得了 TMGMV-TN29 基因组片段分别为 1 588 nt, 1 648 nt, 1 852 nt 和 1 915 nt. 这 4 个片段经过 DNASTar 的 Segman 程序拼接, 最终得到 TMGMV-TN29 基因组全长序列为 6 356 nt, 其 5' 和 3' 末端分别有 71 nt 和 210 nt 的非编码区(Untranslated Regions, UTR), 包括 4 个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF), 分别编码 $1.83 \times 10^5 / 1.26 \times 10^5$ 的复制相关蛋白, 2.8×10^4 的移动蛋白(Movement protein, MP)和 1.7×10^4 的外壳蛋白(Coat protein, CP)(图 4).

将 TMGMV-TN29 分离物与已报道的其他 TMGMV 全基因组序列进行同源性分析表明, TMGMV 各分离物之间的同源性在 97.00%~99.7% 之间. 序列分析结果表明, TMGMV-TN29 与厦门辣椒分离物 Xiamen(JX534224)基因组核苷酸序列及其编码的氨基酸序列的相似性都为最高(表 3). 系统进化树显示 TMGMV-CQ 分离物与厦门辣椒分离物 Xiamen(JX534224)聚为一组, 表明这两者的亲缘关系最近(图 5).



M: marker, P1-P4 为 TMGMV 扩增片段, N 为阴性对照.

图 3 重庆辣椒上 TMGMV 基因组全长分段扩增



图 4 TMGMV 重庆分离物基因组的结构图

表 3 TMGMV-TN29 与其他 TMGMV 分离物的核苷酸/氨基酸序列相似性比较

分离物	登录号	Genome	5'UTR	P183	P126	MP	CP	3'UTR
Japanese	AB078435	97.0	100	96.7/98.3	96.6/97.8	97.5/97.3	98.1/99.4	99.0
HP	DQ821941	97.0	100	96.7/98.1	96.4/97.5	97.5/96.5	98.3/99.4	99.0
DSMZPV	EF469769	99.0	97.1	98.9/99.5	98.9/99.4	99.5/100	99.6/100	99.5
Xiamen	JX534224	99.7	100	99.6/98.5	99.6/99.5	99.7/100	100/100	100
HN	KM596785	98.4	92.9	98.6/98.0	98.4/97.3	97.7/97.3	99.0/100	99.5

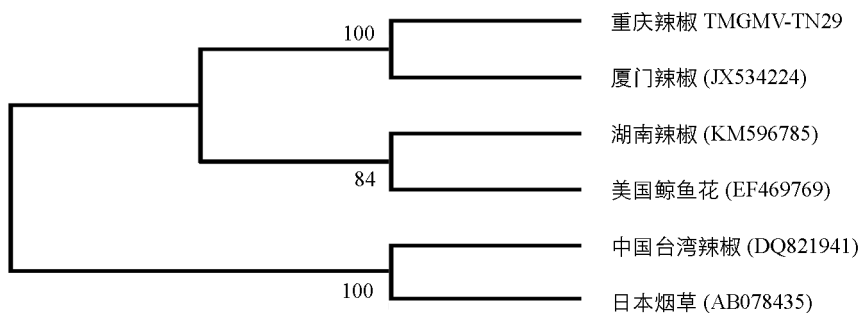


图 5 基于 TMGMV 全基因组序列的系统进化树

3 结 论

虽然在重庆辣椒上检测到了 CMV, TMV, TuMV, ToMV, BBWV-2, PCV-2 和 TSWV 等病毒^[17-21], 但

还未见 TMGMV 侵染重庆辣椒的报道. 近年来, TMGMV 在我国各地报道不断增多, 为明确重庆辣椒是否受 TMGMV 侵染, 本研究从重庆 4 个不同辣椒种植区采集了 29 份疑似病毒病样品, 经 RT-PCR 及克隆测序发现, 这 4 个地区均有 TMGMV 发生, 且发病率介于 11.11%~60.00%之间. 石柱是重庆重要的辣椒生产地^[22], TMGMV 检出率高达 60.00%, 值得植保工作者注意. 本文首次在重庆辣椒上检测到 TMGMV, 说明 TMGMV 在重庆辣椒上也存在, 可能是其早就侵入重庆而未被发现, 或近几年来才扩散到重庆. 鉴于 TMGMV 在我国辣椒上流行的风险, 有必要对 TMGMV 发生情况加以监测.

TMGMV 最早在烟草上发现, 属 *Tobamovirus* 成员. 本研究首次从重庆辣椒上检测并克隆了 TMGMV 的全基因组序列, 共包含 6 356 nt, 由 4 个开放阅读框组成, ORF1 和 ORF2 分别编码 1.83×10^5 , 1.2×10^5 复制酶相关蛋白, ORF3 编码运动相关蛋白, ORF4 编码外壳蛋白, 具有 *Tobamovirus* 病毒特征. 大多数的 *Tobamovirus* 病毒能通过种子传播, 近年来随着贸易的发展, 我国各地辣椒种植地区对辣椒种子的引进和交换也越来越频繁. 2013 年厦门出入境检验检疫局从进境辣椒种子中检测到 TMGMV, 说明该病毒有较高的传入风险. 根据以往的报道结果显示 *Tobamovirus* 病毒进化缓慢, 基因组通常比较保守^[23-24], 而目前对 TMGMV 亲缘关系的研究集中在 CP ORF 水平, 为更全面地了解 TMGMV 遗传结构, 本研究对重庆地区侵染辣椒的 TMGMV 测定了其全基因组序列, 进一步发现 TMGMV 重庆辣椒分离物 TMGMV-TN29 与厦门辣椒分离物 Xiamen(JX534224)的基因组核苷酸序列相似性高达 99.75%, 基于基因组全长的进化树分析也表明, TMGMV-TN29 与 Xiamen(JX534224)的亲缘关系较近, 由此推测它们可能来源于同一个进化祖先.

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 汤亚飞, 何自福. 广东辣椒上首次检测到西瓜银斑驳病毒 [J]. 园艺学报, 2015, 42(11): 2261-2266.
- [3] KENYON L, KUMAR S, TSAI W S, et al. Virus Diseases of Peppers (*Capsicum* spp.) and Their Control [J]. Advances in Virus Research, 2014, 90: 297-354.
- [4] 洪 健, 周雪平. ICTV 第九次报告以来的植物病毒分类系统 [J]. 植物病理学报, 2014, 44(6): 561-572.
- [5] 向本春, 谢 浩, 崔星明, 等. 新疆辣椒轻微斑驳病毒的分离鉴定 [J]. 病毒学报, 1994, 10(3): 240-245.
- [6] 陈 青, 廖富荣, 陈红运, 等. 辣椒上烟草轻型绿花叶病毒的鉴定 [J]. 植物病理学报, 2013, 43(6): 651-654.
- [7] ZHANG S B, ZHAO Z B, ZHANG D Y, et al. First Report of *Pepper vein yellows virus* Infecting Red Pepper in Mainland China [J]. Plant Disease, 2015, 99(8): 1190.
- [8] LI Y Y, WANG C L, XIANG D, et al. First Report of *Tomato mottle mosaic virus* Infection of Pepper in China [J]. Plant Disease, 2014, 98(10): 1447.
- [9] ZHANG S B, LIU J, ZHAO Z B, et al. First Report of Pepper (*Capsicum annuum*) as a Natural Host Plant for *Youcai mosaic virus* [J]. Plant Disease, 2016, 100(2): 541-542.
- [10] ALISHIRI A, REKHSANDEHROO F, ZAMANIZADEH H R. First Report of *Tobacco mild green mosaic virus* Infecting Tomato in Iran [J]. New Disease Reports, 2011, 23: 30.
- [11] TANG Q J, LIU M Y, LI X, et al. Pumpkin: A New Natural Host of *Tobacco mild green mosaic virus* in China [J]. Plant Disease, 2017, 101(6): 1063.
- [12] 谭玮萍. 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 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [13] 赵雪君, 张 宁, 李婷婷, 等. 重庆北碚桑树萎缩病植原体分子鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(1): 16-20.
- [14] BURLAND T G. DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis Software [J]. Methods in Molecular Biology, 2000, 132: 71-91.
- [15] 于云奇, 阮 涛, 杨水英, 等. 河南省番茄黄化曲叶病毒病原分子鉴定及全序列分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(1): 13-17.
- [16] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.

- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 林清, 吕中华, 黄任中, 等. 重庆市辣椒 TMV 和 CMV 的鉴定 [J]. 中国蔬菜, 2001(3): 13-15.
- [20] SUN M, JING C C, WU G T, et al. First Report of *Pepper cryptic virus 2* Infected Pepper in China [J]. Journal of Plant Pathology, 2017, 99(1): 298.
- [21] 孙森, 荆陈沉, 楚成茹, 等. 重庆辣椒上番茄斑萎病毒的血清学检测及分子鉴定 [J]. 园艺学报, 2017, 44(3): 487-494.
- [22] 黄任中, 葛文东, 何叶, 等. 重庆石柱辣椒种植灾害保险的实施效果 [J]. 中国蔬菜, 2015(10): 10-12.
- [23] MACKWAN R R, CARVER G T, KISSLING G E, et al. The Rate and Character of Spontaneous Mutation in *Thermus thermophilus* [J]. Genetics, 2008, 180(1): 17-25.
- [24] YOON J Y, CHOI G S, CHOI S K, et al. Molecular and Biological Diversities of *Cucumber green mottle mosaic virus* from Cucurbitaceous Crops in Korea [J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156(7/8): 408-412.

Molecular Detection and Cloning and Sequence Analysis of the Complete Genome of *Tobacco mild green mosaic virus* on Pepper Plants in Chongqing

WU Gen-tu¹, XU Xia², CHEN Si-min¹, SUN Miao¹,
CHU Cheng-ru¹, LI Ming-jun¹, QING Ling¹

1. School of Plant Protection, Southwest University/Chongqing Key Laboratory of Plant Disease Biology, Chongqing 400716, China;

2. Litong District Agricultural Technology Extension Service Center of Wuzhong, Wuzhong Ningxia 751100, China

Abstract: Pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the most important cash crops in Chongqing, *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) causes a virus disease in pepper, which brings serious damage to pepper production. To understand the distribution of TMGMV and its genomic characters in Chongqing, leaf samples with mottle, mosaic and distort symptoms were collected from Beibei, Shizhu, Tongnan and Jiulongpo Districts of Chongqing and determined by RT-PCR. The complete genomic sequence of TMGMV was obtained by assembling four fragments amplified from the positive samples by RT-PCR which overlapped the whole TMGMV genome. The results of RT-PCR showed that of the 29 samples 9 were positive, with a detection rate of 31.03%. The detection rate of TMGMV in Shizhu County was the highest, 60.00%. The complete genome sequence analysis revealed that TMGMV of Chongqing isolates consisted of 6,356 nucleotides with the typical characteristics of the genome of the genus *Tobamovirus*. Phylogenetic analysis based on TMGMV genome showed that TMGMV-TN29 had a close phylogenetic relationship with isolate Xiamen (JX534224), and they shared a sequence similarity of 99.75%.

Key words: pepper; *Tobacco mild green mosaic virus*; RT-PCR amplification; complete genomic sequence; phylogenetic analysis