

福建省六种草莓病毒的分子检测

Molecular detection of six viruses infecting strawberry in Fujian Province

陈道 丁新伦* 张洁 谢荔岩 吴祖建

(福建农林大学植物病毒研究所, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室,
福建省植物病毒重点实验室, 福州 350002)

Chen Dao Ding Xinlun* Zhang Jie Xie Liyan Wu Zujian

(State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, Key Laboratory of Plant Virology in Fujian Province, Institute of Plant Virology, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China)

我国是世界上草莓栽培面积最大、产量最多的国家,草莓病毒病是影响草莓生产的重要因素之一。在我国,草莓斑驳病毒(*Strawberry mottle virus*, SMoV)、草莓皱缩病毒(*Strawberry crinkle virus*, SCV)、草莓镶脉病毒(*Strawberry vein banding virus*, SVBV)和草莓轻型黄边病毒(*Strawberry mild yellow edge virus*, SMYEV)分布广、危害重(王国平等, 1991);近年来草莓坏死休克病毒(*Strawberry necrotic shock virus*, SNSV)(Li & Yang, 2011)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)(Chen et al., 2014)和草莓白化病毒(*Strawberry pallidosis-associated virus*, SPaV)(Ding et al., 2017)也相继被报道。福建省各地均有草莓种植,但对于草莓病毒病的种类和地理分布尚缺乏系统性研究,本研究选取在我国广泛发生的4种草莓病毒(SMoV、SMYEV、SVBV和SCV),及未报道的甜菜假黄化病毒(*Beet pseudo-yellows virus*, BPYV)、草莓马铃薯卷叶病毒1(*Strawberry polerovirus 1*, SPV1)作为研究对象,利用RT-PCR技术检测其在福建省的发生情况,以期草莓病毒病防控策略的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:2017年3月在福建省各地包括福州市(13株)、厦门市(10株)、莆田市(10株)、漳州市(10株)、宁德市(20株)、三明市(10株)、龙岩市(10株)和南平(10株)8市采集93株疑似表现病毒病症状和少数症状不明显的草莓植株,于-80℃保存备用。

试剂及仪器:植物总RNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;GoScript Reverse 1st Strand cDNA合成试剂盒,美国Promega公司;2×Es Taq MasterMix,康为世纪生物科技有限公司;pEasy-

T1Simple克隆系统,Trans1-T1 Phage Resistant感受态细胞,北京全式金生物技术有限公司。T3000 PCR仪,德国Biometra公司;DYY-6C电泳仪,北京六一仪器厂;G:BOX F3凝胶成像系统,英国Syngene公司。

1.2 方法

在93株草莓植株上各取草莓叶片0.1 g,按照植物总RNA试剂盒操作说明提取总RNA。以随机引物为起始引物,参照GoScript Reverse 1st Strand cDNA试剂盒操作说明合成第一链cDNA。分别采用特异性引物对SMoV、SMYEV、SVBV、SCV、BYPV和SPV1六种病毒进行RT-PCR检测(表1),引物均由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。25 μL反应体系:2×Es Taq Master Mix 12.5 μL、10 μmol/L正反向引物各2 μL、cDNA 1 μL、ddH₂O 7.5 μL。反应程序:94℃变性30 s;53~60℃退火30 s;72℃延伸60 s,37个循环。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳、割胶和纯化后待用。纯化的PCR产物经连接、转化后克隆至pEasy-T1 Simple载体,委托铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序。所得序列利用NCBI上的BLAST在DNA数据库中进行核酸序列相似性比对分析。

利用已建立的RT-PCR方法,检测所有草莓样品中的带毒情况,计算病毒检出率,分析待检病毒在福建省各地的分布情况;并对病毒的复合侵染进行检测。观察记录带毒草莓样品的症状表现。

2 结果与分析

2.1 福建省6种草莓病毒的PCR检测

对从福建省采集到的感病草莓样品进行SMoV、SMYEV、SVBV、SCV、BYPV和SPV1的PCR检测,分别扩增得到SMoV(1 210 bp)、SMYEV(861 bp)和SVBV(1 175 bp)的特异产物。经测序后BLAST比对,SMoV扩增产物与SMoV NB926分

离物 (GenBank 登录号 KU200453) 具有 97% 的核苷酸同源性; SMYEV 扩增产物与 SMYEV D74 分离物 (GenBank 登录号 AJ577359) 具有 98% 的核苷酸同源性; SVBV 扩增产物与 SVBV Shenyang 分离物

(GenBank 登录号 KP311681) 具有 99% 的核苷酸同源性, 表明扩增到的产物分别为 SMoV、SMYEV 和 SVBV 序列。在所有检测的草莓样品中均未扩增到 SCV、BYPV 和 SPV1 的目的条带。

表 1 福建省 6 种草莓病毒的检测引物

Table 1 Primers used in detection of six viruses from Fujian Province

待检测病毒 Virus	引物 Primer	退火温度 Temperature (°C)	条带大小 Size (bp)
SMoV	F: AGTTCATCGCTCTCACTGAGGTG R: GTGAAAGGACACATGCGCGTGCC	61	1 210
SMYEV	F: CCGCTGCAGTTGTAGGGTA R: CATGGCACTCATTGGAGCTGGG	53	861
SVBV	F: GCAGGTACAAATTGCAGATGAAACAT R: AATCTTTGTAAGGCATTCCTATC	53	1 175
SCV	F: ACTGTAATGTCACCAGAGAAG R: TTCTGACACTAGTAGATCTCC	55	613
BYPV	F: TTCATATTAAGGATGCGCAGA R: TGAAAGATGTCCACTAATGATA	51	334
SPV1	F: CAAACCTCGACTCCACAGTGCG R: TCGGGAGACTCAAGACCATCATC	53	905

2.2 福建省 6 种草莓病毒的发生和地理分布

在待测草莓样品中共检出 SMoV、SMYEV 和 SVBV 这 3 种病毒, SMoV 的总检出率为 19.3%, 带毒样品来自福州、漳州、三明和南平市, 其中在福州市的检出率最高, 为 69.2%; SVBV 的总检出率为 31.1%, 带毒样品来自福州、厦门、莆田、漳州、宁德和南平市; SMYEV 仅在来自宁德市的样品上被检出 (表 2)。

SCV、BYPV 和 SPV1 在所有待测样品中均未检测到。

2.3 草莓病毒病的复合侵染和症状表现

在采集的草莓样品中检测到 SMoV 和 SVBV 的复合侵染, 复合侵染率为 12.9%。草莓病株表现为生长势弱, 植株矮小, 叶片症状表现不一, 如褪绿、斑驳、皱缩、红化和叶脉褪绿等, 少数带毒草莓样品不具明显症状。

表 2 福建省各地区 SMoV、SMYEV 和 SVBV 的检出率

Table 2 Detection rates of SMoV, SMYEV and SVBV in Fujian Province

病毒 Virus	福州 Fuzhou	厦门 Xiamen	莆田 Putian	漳州 Zhangzhou	宁德 Ningde	三明 Sanming	龙岩 Longyan	南平 Nanping
SMoV	69.2	0.0	0.0	40.0	0.0	20.0	0.0	30.0
SMYEV	0.0	0.0	0.0	0.0	15.0	0.0	0.0	0.0
SVBV	92.3	10.0	50.0	90.0	5.0	0.0	0.0	10.0

3 讨论

朱海生等 (2013) 在采自福建省农业科学院试验基地的草莓样品中检测到 SMoV、SVBV、SMYEV 和 SCV 等病毒, 本研究也检测到 SMoV、SVBV 和 SMYEV 共 3 种病毒, 而 SCV 在福建省各地的样品中均未检测到, 推测 SCV 在福建省的发生率低或不发生。SPV1 和 BYPV 在我国尚未有发生的报道, 本课题组在采集的样品中也未检测到这 2 个病毒, 推测 BYPV 和 SPV1 尚未传入福建省。本研究结果为福建省草莓病毒病的防治提供基础依据。

参考文献 (References)

Chen L, Shang QX, Chen XY, Xing DM, Yang R, Han CG, Ran C, Wei YM, Zhao XY, Liu ZP. 2014. First report on the occurrence of *Cucumber mosaic virus* on *Fragaria ananassa* in China. *Plant Dis-*

ease, 98(7): 1015

Ding XL, Chen D, Wang A, Zhang J, Wu ZJ. 2017. First report of *Strawberry pallidosis-associated virus* on strawberry in China. *Plant Disease*, 101(12): 2154

Li L, Yang H. 2011. First report of *Strawberry necrotic shock virus* in China. *Plant Disease*, 95(9): 1198

Wang GP, Liu FC, Guo JX. 1991. Identification of strawberry viruses in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 21(1): 9-14 (in Chinese) [王国平, 刘福昌, 国际翔. 1991. 我国草莓主栽区病毒种类的鉴定. *植物病理学报*, 21(1): 9-14]

Zhu HS, Hua XF, Chen MD, Wen QF. 2013. Detection of four viruses (SMoV, SVBV, SMYEV and SCV) infecting strawberry by multiplex RT-PCR. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 27(11): 1630-1635 (in Chinese) [朱海生, 花秀凤, 陈敏敏, 温庆放. 2013. 四种草莓病毒 SMoV、SVBV、SCV、SMYEV 多重 RT-PCR 检测. *核农学报*, 27(11): 1630-1635]

(责任编辑: 王璇)