

## 河南省草莓病毒病原的鉴定及5种草莓病毒多重PCR体系的建立

## Identification of the pathogens causing strawberry virus disease in Henan Province and establishment of a multiplex PCR assay for five strawberry viruses

韩晓玉<sup>1</sup> 陈思宇<sup>1</sup> 李刚<sup>2</sup> 李洪连<sup>1</sup> 施艳<sup>1\*</sup>

(1. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002; 2. 中国农业科学院郑州果树所, 河南 郑州 450009)

HAN Xiaoyu<sup>1</sup> CHEN Siyu<sup>1</sup> LI Gang<sup>2</sup> LI Honglian<sup>1</sup> SHI Yan<sup>1\*</sup>

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China; 2. Zhengzhou Research Institute of Fruits, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan Province, China)

草莓是一种经济价值较高的园艺植物,已在世界各地广泛种植,由于草莓栽培主要依靠匍匐茎及分株进行无性繁殖,很容易感染由多种病毒引起的草莓衰退病。已报道的侵染草莓的病毒种类大约有30种,如草莓斑驳病毒(strawberry mottle virus, SMoV)、草莓镶脉病毒(strawberry vein banding virus, SVBV)和草莓皱缩病毒(strawberry crinkle virus, SCV)等(Tzanetakis et al., 2010),其中大多数仅在局部地区发生(尚巧霞, 2015),关于河南省引起草莓病毒病的病原尚未见相关报道。本研究采集河南省不同地区的草莓病样,鉴定引起草莓病毒病的病原,并针对检测到的病毒建立多重PCR检测体系,以期对河南省草莓病毒病的病原鉴定及其快速检测奠定基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

供试病株及质粒:2017年5月于河南省郑州、洛阳、新乡、平顶山和焦作市分别采集48、33、34、32和20株表现花叶和黄化皱缩症状的草莓病株。供试质粒为本实验室保存的pSPaVCP、pSNSVCP、pSVBVCP、pSMoVRNA2和pSMYEV共5种质粒。

试剂及仪器:Trizol试剂,美国Invitrogen公司;M-MLV反转录酶,美国Promega公司;pMD™19-T载体,日本TaKaRa公司;质粒提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司,其它试剂均为国产分析纯;Mastercycler pro梯度PCR仪,德国Eppendorf公司;Gel-2000凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司;DYY-6C型电泳仪,北京六一仪器厂。

## 1.2 方法

反转录PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)分析、序列测定与分析:甜菜假黄化病毒(beet pseu-

do-yellows virus, BPYV)、苹果花叶病毒(apple mosaic virus, ApMV)、智利草莓潜隐病毒(fragaria chiloensis latent virus, FCILV)、草莓褪绿斑点病毒(strawberry chlorotic fleck-associated virus, SCFV)、草莓潜隐环斑病毒(strawberry latent ring spot virus, SLRSV)、草莓坏死休克病毒(strawberry necrotic shock virus, SNSV)、草莓白化病毒(strawberry pallidosis associated virus, SPaV)、SVBV和SCV九种草莓病毒引物参照Martin & Tzanetakis(2013)方法合成;本研究设计SMYEV和SMoV引物,以及SVBV *cp*基因扩增引物SVBV1854F/SVBV3374R(表1),引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。按照CTAB法进行草莓病样总RNA提取;以提取的总RNA为模板,利用M-MLV反转录酶进行反转录合成第一链cDNA,进行RT-PCR扩增。25 μL RT-PCR反应体系:ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL、cDNA 1 μL、10 μmol/L正、反向引物各0.5 μL、Ex Taq mix 12.5 μL。反应条件:94℃预变性3 min, 94℃变性30 s,不同温度退火30 s(表1), 72℃延伸30~60 s,共35个循环。PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳进行分析,将正确的PCR产物纯化后连接到pMD™19-T载体上,PCR验证阳性克隆。阳性克隆送南京金斯瑞生物科技有限公司测序,用DNAMAN软件进行序列比对分析,将获得的SVBV *cp*基因全长序列与GenBank上的SVBV分离物的核苷酸序列进行同源性比较分析,经Clustal W进行多重比对,运行MEGA 7.0软件采用邻接法进行系统进化分析。

多重PCR:根据获得的病毒序列设计特异性引物(表1),利用质粒提取试剂盒提取5种质粒DNA,将其均稀释为20 ng/μL,分别将浓度20 μmol/L的5对检

测序引物 SPaVmtF/SPaVmtR、SNSVCPmtF/SNSVCPmtR、SVBVmtF/SVBVmtR、SMYEVmtF/SMYEVmtR 和 SMOVmtF/SMOVmtR (表 1) 等量混合备用, 反应体系为: ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L、10 $\times$ Primer Mix 2.5  $\mu$ L、2 $\times$ Multiplex Buffer 12.5  $\mu$ L、Mutiplex DNA Polymerase 0.5  $\mu$ L、

正、反向引物各 0.5  $\mu$ L、模板 DNA 2.5  $\mu$ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 120 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 35 个循环。在以上反应条件的基础上设 56 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C 退火温度和 150 s 退火时间。筛选 PCR 的最佳反应条件。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

| 引物<br>Primer        | 引物序列<br>Primer sequence (5'-3')             | 退火温度/ $^{\circ}$ C<br>Annealing temperature |
|---------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| SMoVf/SMoVR         | AACCATCCAGTAAGCGACCAC/TTCAAGGCACCACAGAACCTA | 54                                          |
| SMYEVf/SMYEVr       | CCGCTGCAGTTGTAGGGTA/CATGGCACTCATTGGAGCTGGG  | 54                                          |
| SVBV1854F/SVBV3374R | AGAAAACTGGCACCCTCAAG/GCTCTGGACTGTAATCTTCT   | 50                                          |
| SPaVmtF/SPaVmtR     | ACCGCTGACAGGGGAGACA/TCACGCCAGTAAAATGAGGAG   | 60                                          |
| SNSVCPmtF/SNSVCPmtR | GATGCCGCTGCGTCTAAT/GGTAGGAGCCGAAACTGGA      | 60                                          |
| SVBVmtF/SVBVmtR     | AAGTTTGGATCTGGATTGCG/CTTCTTCGGATGGCTGA      | 60                                          |
| SMYEVmtF/SMYEVmtR   | CACCCCGAATCCGAATGTGA/GAGCACGCCATCGAAGAAAT   | 60                                          |
| SMOVmtF/SMOVmtR     | GCGTGAACAGTCATGTGGTT/TCGTGGTCGCTTACTGGATG   | 60                                          |

## 2 结果与分析

### 2.1 河南省不同地区草莓病毒病的分子检测

供试病样中检测到了 SNSV (800 bp)、SVBV (472 bp)、SMoV (390 bp)、SPaV (517 bp) 和 SMYEV (861 bp), 其中郑州市检测到 SVBV、SPaV 和 SNSV, 新乡市检测到 SVBV、SPaV 和 SMOV, 洛阳市检测到 SVBV、SMoV 和 SMYEV, 平顶山市检测到 SVBV 和 SMYEV, 焦作市仅检测到 SVBV。

### 2.2 SVBVcp 基因全长阅读框的扩增及进化分析

RT-PCR 扩增获得 1 520 bp 的 SVBV 片段, 包含 1 416 bp 的全长 cp 基因, 序列比对发现, 焦作和新乡的分离物 cp 基因同源性最高, 达到 99.7%, 在进化关系上聚为一支, 平顶山分离物与其它 4 个市的分离物同源性相对较低, 单独形成一个小支, 国内的分离物和加拿大分离物分别形成 2 个大分支, 说明 SVBV 的分子进化与地理区域有一定的相关性。

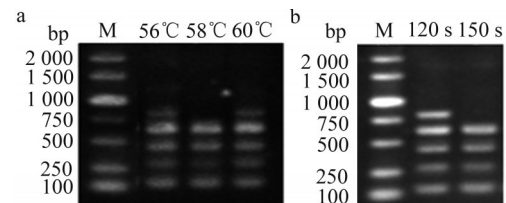
### 2.3 多重 PCR 体系的建立

多重 PCR 扩增显示, SVBV、SMoV、SMYEV、SPaV 和 SNSV 的扩增片段长度分别为 816、620、444、276 和 134 bp, 56 $^{\circ}$ C 和 60 $^{\circ}$ C 均能扩增获得 5 种病毒的扩增片段 (图 1-a), 以 60 $^{\circ}$ C 作为退火温度、退火时间为 120 s 时, 5 种片段均能高效扩增 (图 1-b), 因此, 最佳条件选择退火温度 60 $^{\circ}$ C, 退火时间 120 s。

## 3 讨论

草莓衰退病是由于多种草莓病毒复合侵染造成的, 使草莓产量和品质显著降低, 本研究发现在不同地区的样品中, 绝大部分是单一侵染, 原因可能为草莓大棚选育的大多是脱毒的草莓苗并且重茬苗相对较少, 从而减少了病毒的复合侵染。朱海生等 (2013) 认为 SMOV、SVBV、SCV、SMYEV 是侵染我国草莓的 4 种主要病毒, 本试验也获得类似结论, 即从河南

地区采集的病样中检测到了 SMOV、SVBV 和 SMYEV。本研究所建立的多重 PCR 体系为河南省草莓病毒病的防控提供了一个快速、准确的检测方法。



M: DL2000 ladder.

图 1 不同退火温度 (a) 和退火时间 (b) 下多重 PCR 扩增效果

Fig. 1 Effects of annealing temperature (a) and time (b) on the multiplex PCR amplification

## 参考文献 (References)

- MARTIN RR, TZANETAKIS IE. 2013. High risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: implications for certification, nurseries, and fruit production. *Plant Disease*, 97(10): 1358–1362
- SHANG QX. 2015. Advances in the researches on straeberry viruses transmitters by different vectors. *Journal of Plant Protection*, 42(4): 488–496 (in Chinese) [尚巧霞. 2015. 介体传播的草莓病毒研究进展. *植物保护学报*, 42(4): 488–496]
- TZANETAKIS IE, MARTIN RR, SCOTT SW. 2010. Genomic sequences of *Blackberry chlorotic ringspot virus* and *Strawberry necrotic shock virus* and the phylogeny of viruses in subgroup 1 of the genus *Ilarvirus*. *Archive of Virology*, 155(4): 557–561
- 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、SMYEV、SCV 多重 RT-PCR 检测. *核农学报*, 27(11): 1630–1635]

(责任编辑: 王 璇)