

草莓轻型黄边病毒的 RT-PCR检测及其 3' 端序列分析

杨洪一 张志宏* 高秀岩 杜国栋 代红艳 李贺

(沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161)

摘要: 利用 RT-PCR 技术对草莓植株中草莓轻型黄边病毒 (SMYEV) 的外壳蛋白基因片段进行特异扩增, 扩增产物经测序证明为 SMYEV 的特异片段。建立了稳定的 SMYEV 的 RT-PCR 检测体系, 并对 19 个草莓品种和 2 种野生草莓进行检测, 其中 12 个品种和五叶草莓带有 SMYEV。从 SMYEV 的沈阳分离物 SY01 上扩增出了 932 bp 的基因组 3' 末端区域, 其核酸序列与国外分离物的序列同源性为 86% ~ 96%。系统进化树显示 SMYEV 分为 3 个组群, 沈阳分离物 SY01 与欧美分离物位于同一组群内, 但独立形成 1 个小的分支。RNA 二级结构分析显示 SMYEV 基因组 3' 末端形成 3 个茎环结构, 不同分离物的序列变化并未引起茎环结构的明显变化。

关键词: 草莓; 病毒; 草莓轻型黄边病毒 (SMYEV); 序列分析

中图分类号: S 668.4; S 432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 03-0403-05

Detection of Strawberry mild yellow edge virus with RT-PCR and Analysis of the Sequences of 3' Terminal Region

Yang Hongyi, Zhang Zhihong*, Gao Xiuyan, Du Guodong, Dai Hongyan, and Li He

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Coat protein gene segment of *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV) was amplified with some special primers by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from strawberries plants, and testified by sequencing. A stable system for detection of SMYEV with RT-PCR was established, and among nineteen strawberries cultivars and two wild strawberries species checked, twelve cultivars and *Fragaria pentaphylla* were infected. The 932 bp segment in 3' terminal region of SMYEV genome was amplified from Shenyang isolate SY01. Comparison showed it shared 86% ~ 96% nucleotide acid identity with the published sequences. Phylogenetic analysis shows that all isolates of SMYEV fell into three clades. The Shenyang isolate SY01 lay in the same clade with the Europe and America isolates, but formed a small separate branch. Analysis of RNA secondary structure showed that three stem-loop structures were formed in 3' terminal region, and sequence differences in all isolates impacted little on the stem-loop structures.

Key words: Strawberry; Virus; *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV); Sequence analysis

草莓轻型黄边病最早于 1922 年由 Hom 在美国加州发现, 北美、欧洲、澳大利亚、日本等相继有报道^[1]。草莓轻型黄边病病原可能为两种病毒, 早期研究表明草莓轻型黄边病毒为球形粒子, 属于大麦黄矮病毒属, 但 1990 年 Jelkmann 等从感病组织中分离出了线形病毒粒子, 后通过构建侵染性克隆证明线形病毒为草莓轻型黄边病的主要病原^[2,3], 并定名为草莓轻型黄边病毒 (*Strawberry mild yellow edge virus*, SMYEV), 归属于马铃薯 X 病毒属 (*Potexvirus*), 该定名及分类结果已被国际病毒分类委员会 (The International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 接受。

SMYEV 单独侵染对草莓栽培的影响还不确切, 但与其它草莓病毒混合侵染则危害较严重。早期

收稿日期: 2004 - 10 - 21; 修回日期: 2005 - 03 - 14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30200187); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目 (教外司留 (2002) 247 号)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhangz@syau.edu.cn)

用指示植物小叶嫁接法检测该病毒, 周期长, 效率较低^[1]。Jelkmann等^[2]和 Jawee等^[4]分别以病毒外壳蛋白基因原核表达产物和纯化病毒粒子为抗原制备了抗血清, 由于 SMYEV 在草莓体内含量较低, 检测主要利用免疫电镜进行, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 只在一定时期 (1~5月) 内效果较好。

聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 技术能够在核酸水平上对病毒分子进行检测, 具有快速、灵敏度高等优点, 而优质核酸难以分离, 影响 PCR 在病毒检测中大量应用^[5,6]。Kaden-Kreuziger等^[7]曾报道利用反转录 PCR (Reverse transcription PCR, RT-PCR) 检测 SMYEV, 由于研究中未能筛选出有效的提取草莓总 RNA 的方法, 只有应用免疫捕获 PCR (Immuno-capture PCR, IC-PCR) 才能检测出草莓植株中的 SMYEV。Thompson等^[6]报道利用改进的硅捕获法提取草莓总 RNA, 可以稳定检测草莓斑驳病毒 (Strawberry mottle virus, SMoV), 但研磨溶液中含有剧毒的叠氮钠, 不适合作为常规的 RNA 提取方法。本研究在成功分离草莓优质核酸的基础上, 探索建立利用 RT-PCR 检测草莓植株中 SMYEV 的技术体系, 同时对沈阳分离物的特异序列进行分析。

1 材料与方法

1.1 植物材料与试剂

草莓病毒指示植物 UC5 (*Fragaria vesca*) 生长于温室。草莓品种 (*F. ×ananassa*) 宝交早生 (Hokowase)、绿色种子 (Lüe Zhongzi)、上海 2 号 (Shanghai 2)、安特拉斯 (Antelasi)、长虹 2 号 (Changhong 2)、诺宾卡 (Nuobinka)、甜心 (Sweetheart)、春香 (Harunoka)、明磊 (Minglei)、芳玉 (Hogyoku)、高斯克 (Gousinco)、布兰登堡 (Blandenber)、全明星 (Allstar)、上海 1 号 (Shanghai 1)、爱尔桑塔 (El-santa)、绯峰 (Hinomine)、安娜 (Anna)、爱美 (Ai Berry)、威斯塔尔 (Veestar) 及草莓野生资源五叶草莓 (*F. pentaphylla*) 和黄毛草莓 (*F. nilgerrensis*) 均露地保存于沈阳农业大学草莓园。

反转录酶 M-MLV 为 Invitrogen 公司产品, Taq DNA 聚合酶购于 Promega 公司, dNTP 购于上海生工公司, RNA 酶抑制剂、DNA Marker pMD 18-T 载体购自 TaKaRa 公司, 其它药品为国产分析纯。

1.2 引物

根据 GenBank 中 SMYEV 序列和研究报道^[6-9]设计引物 (表 1), 引物委托 TaKaRa 公司合成。

表 1 扩增 SMYEV 基因组特异片段的 PCR 引物对

Table 1 Tested primer pairs for amplifying segments of SMYEV genome

引物对 Primer pairs	序列 (5' 3') Sequence (5' 3')	目的片段大小 Target fragment (bp)
SM2/SM1	TGCACTCTGTGTGACCTTC (正义引物 Sense primer) GCCAACAGCAA GAA TCCTAT (反义引物 Antisense primer)	883
SM3/SM1	GATACTCGTCTACGAAGGCT (正义引物 Sense primer) GCCAACAGCAA GAA TCCTAT (反义引物 Antisense primer)	406
Y1/Y2	GTGTGCTCAA TCCA GCCAG (正义引物 Sense primer) CATGGCACTCA TTGGA GCTGGG (反义引物 Antisense primer) CCGCTGCA GTTGTA GGGTA (正义引物 Sense primer)	271
YT1/YT2	TTTTTTTTTTTTTTTAAAGGAAAAAGAAAACAAAC (反义引物 Antisense primer)	932

1.3 指示植物小叶嫁接

参考 Frazier^[10]改进的小叶嫁接法进行。

1.4 RNA 提取、RT-PCR 及 PCR 产物的克隆和测序与序列分析

草莓叶片总 RNA 提取参照杨洪一等^[11]的方法进行。

RT-PCR 在美国 MJ 公司的 PTC-150 型 PCR 仪上进行。反转录反应体积为 20 μL , 其中包括模板 1 μL , 引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL (引物对 YT1/YT2 的反转录引物为反义引物, 其它引物对的反转录引物为正义引物), 反转录酶 M-MLV 60 U, 其它反应成分与操作步骤参考 Invitrogen 反转录酶说明书, 37 反转录 2.5 h。反转录结束后取 1 μL 进行 PCR 反应, 反应体系中含 1 \times Buffer, 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

$MgCl_2$, $0.2 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ dNTP, $0.2 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 引物, 0.5 U Taq 酶, 用水补足至 $20 \mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序分别为: (1) SM2/SM1 引物对: $94 \text{ } 2 \text{ min}$; $94 \text{ } 30 \text{ s}$, $52 \text{ } 40 \text{ s}$, $72 \text{ } 40 \text{ s}$, 35 个循环; 最后 $72 \text{ } 5 \text{ min}$ 。 (2) SM3/SM1、Y1/Y2 引物对的退火温度分别为 $54 \text{ } ^\circ\text{C}$, $56 \text{ } ^\circ\text{C}$, 其它同 SM2/SM1。 (3) Y1/Y2 引物对: $94 \text{ } 2 \text{ min}$; $94 \text{ } 30 \text{ s}$, $50 \text{ } 60 \text{ s}$, $72 \text{ } 90 \text{ s}$, 35 个循环; 最后 $72 \text{ } 5 \text{ min}$ 。

用含 EB (溴化乙锭) 的 1.6% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

利用上海生工公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段, 与 pMD 18-T 载体连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞。经蓝白斑筛选, 挑取白色菌落培养, 提取质粒, 通过 PCR 鉴定阳性克隆。测序工作委托上海生工公司进行, 双向测序。

测序结果用 BLAST 在 GenBank 中进行检索分析。利用软件 RNA Structure 4.1 进行 RNA 二级结构分析。利用软件 CLUSTAL 1.83 进行多序列比对, 利用 DNA Star 软件生成系统进化树。

2 结果与分析

2.1 SMYEV 的 RT-PCR 检测

以小叶嫁接后表现出轻型黄边症状的 UC5 为试材, 在所进行的 RT-PCR 反应中, 所有的引物对都可以扩增出预期大小的目的片段, 其中引物对 SM2/SM1 和 SM3/SM1 扩增出的目的片段的电泳条带比较弱, 弥散的碎片较多且经常出现非特异带, 而引物对 Y1/Y2 扩增出的目的片段的电泳条带比较强, 无弥散也无非特异带。引物对 Y1/Y2 从一些草莓品种上也能扩增出清晰的特异带。将引物对 Y1/Y2 从宝交早生和绿色种子上扩增出的产物进行测序, 结果表明, 目的片段大小均为 271 bp , 与预期大小完全一致, 两品种扩增出的序列仅存在一个碱基的差异。BLAST 结果显示绿色种子上扩增出的 271 bp 片段与 GenBank 中各个 SMYEV 分离物的核酸序列同源性为 $89\% \sim 98\%$, 这表明该片段为 SMYEV 的特异片段。同一植株在不同季节均能扩增出该特异片段, 而且同一反转录产物的 PCR 重复试验结果一致, 这表明我们建立了稳定的利用 RT-PCR 检测草莓植株中 SMYEV 的技术体系。以此为基础, 对 19 个草莓品种和 2 个草莓野生资源进行了 SMYEV 检测, 结果发现宝交早生、绿色种子、上海 2 号、安特拉斯、长虹 2 号、诺宾卡、甜心、春香、明磊、芳玉、高斯克、布兰登堡 12 个品种和野生资源五叶草莓带有 SMYEV; 在全明星、上海 1 号、爱尔桑塔、绯峰、安娜、爱美、威斯塔和草莓野生资源黄毛草莓中未检测到 SMYEV (部分检测结果见图 1)。

2.2 3' 末端序列同源性分析

绿色种子是我国育出的第 1 个草莓品种, 我们将保存在绿色种子上的 SMYEV 分离物命名为 SY01。利用引物对 Y1/Y2 扩增出了 932 bp 的 SY01 3' 末端序列 (GenBank 登录号: AY955375), 包括外壳蛋白基因、非编码区及部分三联基因模块 3 基因 (Triple gene block 3, TGB3)。SY01 的 3' 末端序列与 GenBank 中各个 SMYEV 分离物的序列同源性为 $86\% \sim 96\%$, 同源性最低和最高的分离物分别为 3CH (智利) 和 D74 (德国)。

依据测序结果推导出的部分 TGB3 基因的氨基酸序列与 GenBank 中 SMYEV 其它分离物的同源性为 $85\% \sim 98\%$, 其中同源性最低的为智利分离物 6CH, 与分离物 D74 (德国)、D/L. 13 (德国)、D/

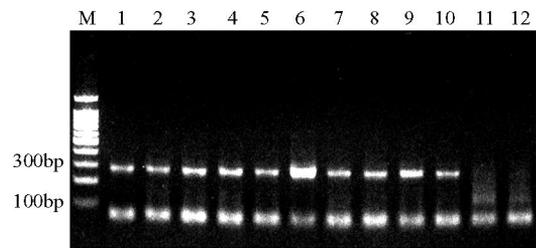


图 1 草莓植株中 SMYEV 的 RT-PCR 检测

M: 100 bp DNA Ladder; 1: 感染病毒的指示植物 UC5; 2~10: 草莓品种, 依次为宝交早生、绿色种子、甜心、春香、明磊、芳玉、高斯克、布兰登堡、诺宾卡; 11: 未加反转录酶对照 (宝交早生); 12: 健康的指示植物 UC5。

Fig 1 Detection of SMYEV in the strawberry plants by RT-PCR
M: 100 bp DNA Ladder; 1: Strawberry virus indicator UC5 infected with SMYEV; 2-10: Strawberry cultivars, Hokowase, L ũe Zhongzi, Sweetheart, Hanunoka, Minglei, Hogyoku, Gousimco, Blandenberg and Nuobinka, respectively; 11: Control of lack of reverse transcriptase (Hokowase); 12: Healthy strawberry virus indicator UC5.

L.14 (德国)、D/L.19 (德国)、D/M.110 (德国)、D/K.159 (德国) D/V.180 (德国)、7CH (智利)、69N (比利时)、314CP2cav (意大利) 的同源性较高。引起差异的重要因素是分离物 SY01 与其它所有分离物的一个碱基差异 (T-C, D74 的 5203 位点) 引起氨基酸序列的差异 (P-S)。

外壳蛋白氨基酸序列与其它分离物的同源性为 93% ~ 100%，同源性最低和最高的分离物分别为 5CH (智利) 和 D74。SMYEV 外壳蛋白的一段 96 个氨基酸的区域与马铃薯病毒 X (*Potato virus X*, PVX) 有 54% 的同源性，这在不同病毒外壳蛋白同源性比较中是较高的。

2.3 系统进化分析

基于 SMYEV 不同分离物 3' 末端核酸序列的系统进化树显示 SMYEV 分为三大组群 (图 2)，MY18 与 3 个智利分离物 (2CH、3CH、5CH) 位于 1 个组群内，澳大利亚分离物 9Redland 与另 4 个智利分离物 (6CH、4CH、10CH、7CH) 位于 1 个组群内，而我们所得到的沈阳分离物 SY01 与其它 15 个分离物亲缘关系较近，位于同一组群内，但独立形成 1 个小的分支。利用氨基酸序列所作的进化树也有相似的规律，这是否与株系分化直接相关还缺少更多的实验证据。

2.4 RNA 二级结构分析

RNA Structure 4.1 软件是根据最小自由能原理来分析 RNA 二级结构。马铃薯 X 病毒属的 3' 末端有一段非编码序列区，这段序列的二级结构将对病毒的复制产生重要的影响，3' U 富集区是负链 RNA 合成的重要功能区域。利用 RNA Structure 4.1 软件显示分离物 SY01 3' 末端非编码区形成 3 个茎环结构 (图 3)，ACUAGU 区域是不同分离物核酸序列变化较大的区域，但并未引起茎环结构的明显

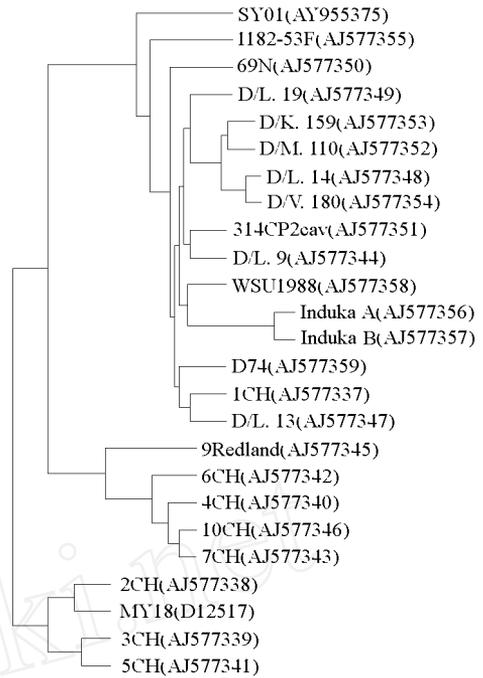


图 2 SMYEV 不同分离物 3' 末端核酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the 3' nucleotide sequence of SMYEV isolates

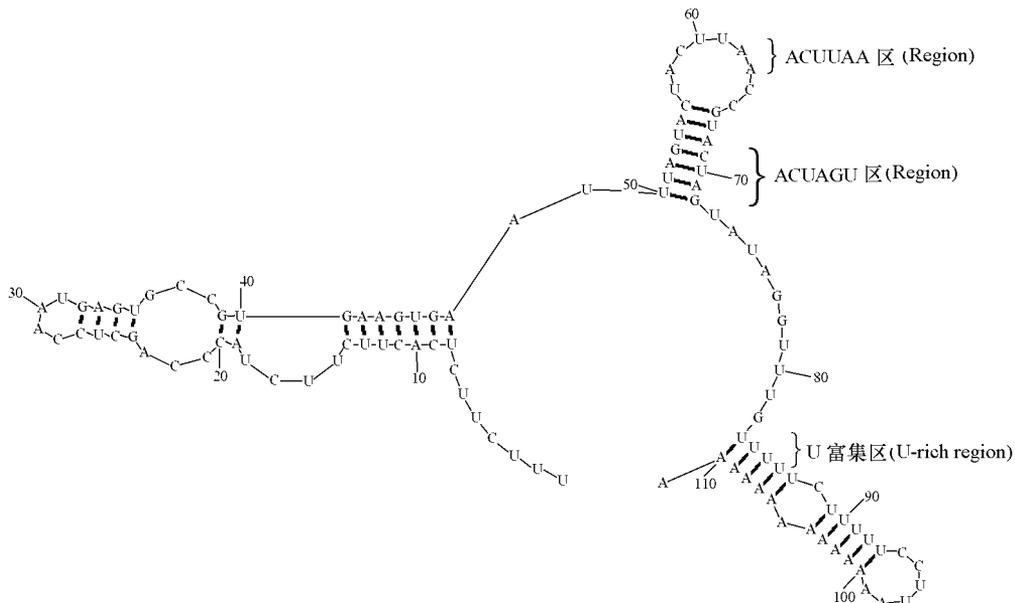


图 3 SMYEV 分离物 SY01 3' 端的 RNA 二级结构

Fig. 3 The RNA secondary structure of SMYEV isolate SY01 3' terminal region

变化, 这与 PVX 的研究结果^[12]相一致。ACUAAA 区域是最保守的区域, 在马铃薯 X 病毒属和花椰菜花叶病毒属中都有相应的区域, 但其功能还未知。

3 讨论

Hadidi 等^[13]最早报道了利用 PCR 检测草莓轻型黄边病毒 (当时认为病原为球形病毒, 属大麦黄矮病毒属), 引物与检测马铃薯卷叶病毒 (大麦黄矮病毒属) 的引物相同, 此后再无相关报道。我们也曾尝试这对引物, 但未能成功。从理论上推测利用对应其它病毒核酸序列的非简并引物来进行病毒检测的成功率应该比较低。在 Kaden-Kreuziger 等^[7]检测 SMYEV 的研究中, 普通 PCR 只可以在草本寄主中检测到 SMYEV, 而应用免疫捕获 IC-PCR 可以检测草莓植株中的 SMYEV。尽管 SMYEV 的抗血清已经商业化, 但价格较昂贵, 其对 SMYEV 不同株系的有效性也有待于进一步验证, 而且借助 SMYEV 的抗血清提取的草莓总 RNA 只能用以检测 SMYEV 这种病毒。

王国平等^[14]和韦石泉等^[15]曾经利用指示植物对草莓轻型黄边病进行了鉴定, 我们所鉴定的带有病毒的品种多于他们的结果, 其原因可能在于 PCR 技术灵敏度较高。目前, 通过组织培养繁殖出的草莓苗在生产上已经占有一定比例, 本研究建立的检测体系对草莓病毒指示植物、草莓栽培品种、野生草莓等都可以进行稳定的检测, 因而, 可以直接应用于脱毒苗生产。

参考文献:

- 1 Converse R H, Martin R R, Spiegel S. Strawberry mild yellow edge. In: Converse R H ed. Virus diseases of small fruits. Washington: US Department of Agriculture, Agriculture Research Service, 1987. 25 ~ 29
- 2 Jelkmann W, Martin R R, Lesemann D E, Vetten H J, Skelton F. A new potyvirus associated with strawberry mild yellow edge disease. Journal of General Virology, 1990, 71: 1251 ~ 1258
- 3 Lamprecht S, Jelkmann W. Infectious cDNA clone used to identify strawberry mild yellow edge associated potyvirus as causal agent of the disease. Journal of General Virology, 1997, 78: 2347 ~ 2353
- 4 Jawee A, Adams A N. Serological detection of strawberry mild yellow edge associated virus. Acta Horticulturae, 1995, 385: 98 ~ 104
- 5 Thompson J R, Jelkmann W. The detection and variation of Strawberry mottle virus. Plant Disease, 2003, 87: 385 ~ 390
- 6 Thompson J R, Wetzel S, Klerks M M, Vařkov ĀD, Schoen C D, Špak J. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. Journal of Virological Methods, 2003, 111: 85 ~ 93
- 7 Kaden-Kreuziger D, Lamprecht S, Martin R R, Jelkmann W. Immunocapture polymerase chain reaction assay and ELISA for the detection of strawberry mild yellow edge associated potyvirus. Acta Horticulturae, 1995, 385: 33 ~ 40
- 8 Jelkmann W, Maiss E, Martin R R. The nucleotide sequence and genome organization of strawberry mild yellow edge-associated potyvirus. Journal of General Virology, 1992, 73: 475 ~ 479
- 9 Thompson J R, Jelkmann W. Strain diversity and conserved genome elements in *Strawberry mild yellow edge virus*. Archives of Virology, 2004, 149: 1897 ~ 1909
- 10 Frazier N W. Detection of graft-transmissible diseases in strawberry by a modified leaf grafting technique. Plant Disease Reporter, 1974, 58: 203 ~ 207
- 11 杨洪一, 张志宏, 杜国栋, 代红艳, 高秀岩. 利用内标为基础的 RT-PCR 技术检测草莓斑驳病毒. 植物病理学报, 2005, 35 (2): 116 ~ 122
Yang H Y, Zhang Z H, Du G D, Dai H Y, Gao X Y. RT-PCR detection Strawberry mottle virus based internal control. ACTA Phytopathologica Sinica, 2005, 35 (2): 116 ~ 122 (in Chinese)
- 12 Pillai-Nair N, Kim K H, Hemenway C. Cis-acting regulatory elements in the Potato virus X 3' non-translated region differentially affect minus-strand and plus-strand RNA accumulation. Journal of Molecular Biology, 2003, 326: 701 ~ 720
- 13 Hadidi A, Montasser M S, Levy L, Goth R W, Converse R H, Madkour M A, Skrzeczkows L J. Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. Plant Disease, 1993, 77: 595 ~ 600
- 14 王国平, 刘福昌, 薛光荣, 朱秋英, 杨振英, 王焕玉. 草莓病毒种类鉴定及培育无病毒种苗的技术研究. 中国农业科学, 1990, 23 (4): 43 ~ 49
Wang G P, Liu F C, Xue G R, Zhu Q Y, Yang Z Y, Wang H Y. Research on identification of strawberry viruses in China and techniques of obtaining virus-free strawberries. Scientia Agricultura Sinica, 1990, 23 (4): 43 ~ 49 (in Chinese)
- 15 韦石泉, 吴元华. 草莓温和黄边病毒的蚜传特性、提纯及病毒粒体形态观察. 沈阳农业大学学报, 1992, 23 (3): 163 ~ 167
Wei S Q, Wu Y H. Studies on the aphid transmission, purification and morphology of strawberry mild yellow edge virus. Journal of Shenyang Agricultural University, 1992, 23 (3): 163 ~ 167 (in Chinese)