刘思佳,曾祥国,肖桂林,等. 基于高通量测序技术鉴定栽培草莓资源携带的病毒种类[J]. 江苏农业科学,2023,51(19):18 - 23.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2023.19.003

基于高通量测序技术鉴定栽培草莓资源携带的病毒种类

刘思佳[1,2], 曾祥国[1], 肖桂林[1], 王　涌[1], 韩永超[1]
(1. 湖北省农业科学院经济作物研究所,湖北武汉 430072; 2. 华中农业大学园艺林学学院,湖北武汉 430070)

摘要:分析草莓种质资源的病毒携带情况,为草莓脱毒种苗的繁育和病毒病的防治提供依据。针对保存的 86 份栽培草莓材料,分别提取每份材料的叶片总 RNA,将待测草莓总 RNA 混样,然后采用高通量测序技术进行测序。根据每种病毒的序列保守区设计引物,采用 RT - PCR 对高通量测序的结果进行验证。利用设计的引物分别对每份草莓品种材料进行 RT - PCR 检测,明确每份材料的带毒情况。测序结果表明,从 86 份草莓资源中检测出 3 种病毒,分别为草莓斑驳病毒(strawberry mottle virus,简称 SMoV)、草莓镶脉病毒(strawberry vein banding virus,简称 SVBV)和草莓白化病毒(strawberry pallidosis - associated virus,简称 SPaV),该结果与 RT - PCR 验证的结果相符。在所有 86 份供试样品中,28 份材料带有病毒,病毒感染率为 32.56%;其中,23 份材料带有 SVBV;11 份材料带有 SMoV;5 份材料带有 SPaV。单一病毒侵染样品 18 份,复合侵染材料共 10 份,草莓种苗带毒率高,草莓病毒病危害严重。

关键词:草莓;病毒病;高通量测序;RT - PCR;草莓白化病毒
中图分类号:S436.68⁺4　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1002 - 1302(2023)19 - 0018 - 06

草莓(*Fragaria* × *ananassa* Duch.)是蔷薇科草莓属多年生草本植物。草莓果实味道酸甜可口,含有丰富的无机和有机营养物质和花青素,香味浓郁,被誉为“水果皇后”[1]。草莓对栽培环境的适应性较强,有着结果快、成熟早、繁殖快、周期短、经济效益高的特点,在全国各地广泛种植,目前我国已成为世界第一草莓生产和消费大国[2]。由于草莓在生产中以匍匐茎无性繁殖为主,病毒病较为严重,感染一种病毒时植株往往没有明显症状,但是病毒侵染会导致植株的抗病性下降,产量降低,畸形果率增加。病毒病是草莓生产中的主要病害之一,对产业健康发展造成严重影响,草莓病毒病的防治是保障草莓生产,提升产量与品质的关键。

据不完全统计,目前全球已报道的草莓病毒有 20 余种,关于草莓病毒检测,在我国各地区也都有过不少相关研究[3]。杨波等在新疆地区检测出草莓镶脉病毒(strawberry vein banding virus,简称 SVBV)、草莓斑驳病毒(strawberry mottle virus,简称 SMoV)和草莓轻型黄边病毒(strawberry mild yellow edge virus,简称 SMYEV)并建立了三重 PCR 体系[4];韩晓玉等在河南地区检测出 SVBV、SMoV、SMYEV、草莓白化病毒(strawberry pallidosis - associated virus 简称,SPaV)和草莓坏死休克病毒(strawberry necrotic shock virus,简称 SNSV),并建立了多重 PCR 体系,一次检测 5 种病毒[5];陈道在福建地区检测出 SVBV、SMoV、SMYEV、草莓毛形病毒 3(strawberry crinivirus 3,SCrV3)、草莓毛形病毒 4(strawberry crinivirus 4,简称 SCrV4)和 SPaV,并获得了 SPaV 的全基因组序列[6];冉策在北京地区检测出 SVBV、SMoV、草莓皱缩病毒(strawberry crinkle virus,简称 SCV)、烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus,简称 TMV)和黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus,简称 CMV)并建立了 SCV 的 RT - LAMP 病毒检测体系,提高了检测效率和灵敏度[7];刘雅等在上海地区检测出 SVBV、SMoV、SMYEV[8];黄倩茹等在陕西地区检测出 SVBV、SMoV、SMYEV、菠菜潜隐病毒(spinach latent virus,简称 SpLV)和番茄线虫传多面体病毒(lycopersicon esculentum nepovirus,简称 LENV),首次报道在草莓上检测到 SpLV 和 LENV[9-10];王佳等在辽宁地区检测出 SVBV、

收稿日期:2023 - 02 - 21
基金项目:湖北省重点研发计划(编号:2021BBA099、2020BBB136);乡村振兴科技支撑项目(编号:2022BBA085);湖北省农业科技创新中心资助项目(编号:2021 - 620 - 000 - 001 - 008)。
作者简介:刘思佳(1998—),女,河北沧州人,硕士研究生,从事草莓病毒检测、草莓脱毒技术研究。E - mail:609383136@qq.com。
通信作者:韩永超,博士,研究员,从事草莓抗病育种、草莓病害防治技术研究。E - mail:hyc660@126.com。

SMoV、SMYEV 和 SNSV[10-11]；朱海生等在四川地区检测出 SMoV，并且对 7 个省份的红颜、白雪公主、隋珠、光点和圣诞红 5 个草莓品种调查发现，感染病毒的品种均为红颜，而其他品种并未检测出病毒[12]。

我国草莓产区内常见病毒有 3 种，分别为草莓斑驳病毒 SMoV、SVBV、SMYEV[12]。SPaV 最早于 20 世纪 50 年代在美国和澳大利亚被报道，2017 年 Ding 等在福建首次发现 SPaV[13]，次年 Shi 等在河南发现 SPaV[14]。目前关于草莓病毒病的相关报道中，病毒检测时较少说明感染病毒的草莓品种。采用高通量测序技术对草莓苗进行检测，并利用 RT－PCR 技术进行验证，为草莓病毒病的防治以及选育抗病毒品种提供依据。

1　材料与方法

本研究于 2021 年 3 月至 2022 年 5 月在湖北省农业科学院经济作物研究所完成。

1.1　材料

用于本研究的草莓品种材料为历年来从各地收集的栽培草莓品种，共 86 份，保存于湖北省农科院经济作物研究所草莓种质资源圃（避雨网室）。

1.2　试验方法

1.2.1　混合样品中病毒的高通量检测　对 86 份草莓品种材料分别采样，每份样品采集 100 mg 新鲜叶片，采用 RNA 提取试剂盒（HiPure Plant RNA Mini Kit，Magen 生物）提取草莓叶片总 RNA，每管加入 30 μL RNA free 水溶解。样品检测合格后，将提取的 86 份草莓 RNA 进行混样处理，此样品命名为 PZM01。剩余样品 RNA 置于－80 ℃保存备用。同时采集脱毒苗叶片并提取总 RNA，命名为 TDM01，重复上述提取步骤，并将 2 个样品的 Small RNA 建库，测序分析委托北京百迈客生物科技有限公司完成[15-19]。总 RNA 的 RIN 值≥8.0，28S/18S≥1.5。

1.2.2　草莓样品的 RT－PCR 检测　首先采用 RT－PCR 对高通量测序结果进行验证，然后再分别对每份供试草莓品种样品的详细带毒情况进行检测。针对每种 Small RNA 测序检测到的病毒均采用 2 对特异性引物进行检测，根据 Small RNA 测序拼接结果中的相应病毒基因片段序列，应用引物在线设计网站（https://www.genscript.com/）进行引物设计，引物设计目的片段大小为 400～800 bp。另从已发表文献中分别选取 3 种病毒的特异性检测引物各 1 对（表 1）。采用反转录试剂盒（RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit，Thermo 科技有限公司），以混样总 RNA 为模板，用随机引物反转录合成 cDNA，然后采用所设计的特异性引物分别进行 PCR 扩增反应。PCR 反应体系：cDNA 1 μL，2 × *Taq* Master Mix 13 μL，10 μmol/L 引物各 1 μL，加 ddH_2O 至终体积 25 μL。反应程序：94 ℃变性 4 min；94 ℃变性 30 s，退火 35 s（退火温度因引物而异），72 ℃延伸 60 s，35 个循环；72 ℃延伸反应 10 min；反应结束后采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测。取 PCR 产物交至武汉奥科鼎盛生物科技有限公司进行序列测定。

采用反转录试剂盒（RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit，Thermo 科技有限公司），分别以 86 份待测草莓品种样品的总 RNA 为模板，用随机引物反转录合成 cDNA，然后采用所设计的特异性引物（表 1）分别进行 PCR 扩增反应。检测每份样品中的病毒感染情况。PCR 体系及反应程序同“1.2.2”节。

1.2.3　病毒序列的系统进化分析　将测序所得序

表 1　引物序列

病毒种类	引物	序列（5′→3′）	产物大小（bp）	参考文献	退火温度（℃）
草莓斑驳病毒	1SMoVF 1SMoVR	CCCACCGTCATTTCTCCAAC TGGGAGTGGCCGTATCAAAT	712	本研究	58
	2SMoVF 2SMoVR	TAAGCGACCACGACTGTGACAAAG TCTTGGGCTTGGATCGTCACCTG	219	[20]	58
草莓镶脉病毒	1SVBVF 1SVBVR	ACTCACCATGACAGCTATGA TACCAGATCGTTGTCTATCT	639	本研究	58
	2SVBVF 2SVBVR	GAATGGGACAATGAAATGAG GTGAGGAGAACTTAGGACA	574	[21]	58
草莓白化病毒	1SPaVF 1SPaVR	AAGGGATGACGTCGCAAATG TCCCATGTTTCGCTGCTAGA	443	本研究	60
	2SPaVF 2SPaVR	GTGTCCAGTTATGCTAGGTC TAGCTGACTCATCAATAGTG	517	[22]	58

列在 BLAST（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）进行序列比对，从 NCBI 中下载相关病毒序列，利用 MEGA6.0 中的 Clustal W 进行序列比对，以邻位法（neighbor joining，NJ）进行系统进化分析，构建系统进化树（表 2）。

表 2　用于 3 种病毒系统发生树的 GenBank 登录号和来源

病毒种类	登录序列号	来源
草莓斑驳病毒	MT991095.1	中国
	MT991097.1	中国
	MT070751.1	中国
	MW383501.1	中国
	MZ328086.1	加拿大
	KU200456.1	加拿大
	KU200458.1	加拿大
	KU200453.1	加拿大
	KU177218.1	加拿大
	LC550287.1	日本
	LC550285.1	日本
	ON013915.1	德国
	MZ326673.1	美国
	MH013324.1	捷克
草莓镶脉病毒	LC315804.1	日本
	KP311681.1	中国
	MH894295.1	中国
	KX249735.1	中国
	KX249738.1	中国
	MT731326.1	中国
	KT250632.1	中国
	KR080547.1	中国
	HE681085.1	中国
	MF197916.1	中国
	MW387997.1	捷克
	X97304.1	捷克
	KX950836.1	加拿大
	MZ328100.1	加拿大
	MZ351174.1	美国
草莓白化病毒	MF000684.1	中国
	MZ328109.1	加拿大
	MZ328106.1	加拿大
	OK042927.1	伊朗
	NC005896.2	美国
	AY488138.2	美国
	MZ351164.1	美国

2　结果与分析

2.1　混合样品中病毒的高通量检测

研究表明，测序共获得 29 556 977 个原始测序量，经过滤共得到 26 581 703 个高质量序列。此次样品测序数据可作为后续转录本拼接的参考序列。测序结果显示：从草莓资源混合样品中共检测出 3 种病毒，分别为 SMoV、SVBV 和 SPaV。脱毒苗中并未检测出病毒。

2.2　草莓品种样品的 RT－PCR 检测

应用“1.2”节设计的每种病毒 2 对特异引物，以草莓混样 cDNA 为模板，进行 RT－PCR 扩增。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测，得到目的片段，大小与预期相符（图 1）。PCR 产物测序结果通过 DNAMAN 与目标序列比对，一致率符合要求。所有高通量测序分析出的病毒均能得到 2 对特异性引物的验证。

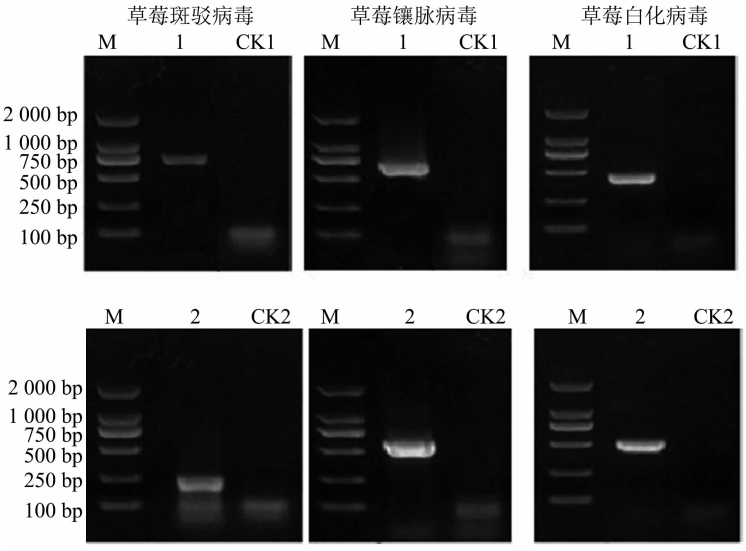
应用本研究设计的引物，对 86 份草莓样品分别进行 RT－PCR 检测，结果表明，在 86 份草莓样品中，有 28 份样品检测到病毒，单一病毒侵染样品 18 份，复合侵染样品 10 份。其中，11 份样品带有 SMoV 病毒，23 份样品带有 SVBV 病毒，5 份样品带有 SPaV 病毒（表 3）。

2.3　病毒序列的系统进化树分析

本次测序得到的草莓斑驳病毒的部分片段（TRINITY DN691，6 745 bp），与我国分离物（GenBank NO. MT991095.1、GenBank NO. MT991097.1 和 GenBank NO. MT070751.1）亲缘关系最近。本次测序得到的草莓镶脉病毒的部分片段（TRINITY DN25710，6 571 bp）与加拿大分离物（GenBank NO. MZ328100.1）亲缘关系最近，与其他分离物亲缘关系相对较远，单独形成一个小支。G431 是本次测序得到的草莓白化病毒的部分片段（1 559 bp），单独形成一个小支，但其与美国分离物（GenBank NO. AY488138.2）聚为一个大支。

3　讨论与结论

我国草莓产业发展迅速，草莓栽培面积与产量位居世界第一[23-24]。湖北省是我国草莓重要产区之一，产业规模居全国第 5，年产值超 48 亿元，产区分布于武汉、荆州、襄阳等市县城郊。湖北省作为农业大省，草莓产业是农村种植结构调整的主要选择之一[25]。本研究利用高通量测序和 RT－PCR 方法，对 86 份栽培草莓品种进行了较为全面的检测与分析，检测出危害 3 种草莓的病毒，分别为 SMoV、SVBV、SPaV。运用高通量测序技术可以快速确定感病植株所带病毒的种类，根据高通量测序结果所



M—DL2000 DNA marker；1、2—表 1 中的引物；CK—空白对照

图1　草莓 3 种病毒 RT–PCR 的凝胶电泳结果

表 3　草莓病毒的 RT－PCR 检测结果

品种或编号	病毒种类		
	草莓镶脉病毒	草莓斑驳病毒	草莓白化病毒
佐贺清香 1	－	＋	－
京桃香	－	－	－
九天红韵	－	－	－
森加森加拉	－	－	－
京凝香	－	－	－
特里拉	＋	＋	－
3 公主	＋	－	－
白雪小町	－	－	－
红玉	－	－	－
京郊小白	＋	－	－
京藏香	－	－	－
蒙特瑞	－	－	－
圣安德瑞斯	－	－	－
波特拉	－	－	－
卡姆罗莎	－	－	－
阿尔比	－	－	－
章姬 1	－	－	－
哈尼 1	＋	－	－
卡尔特	＋	＋	－
晶硕	－	－	－
鬼努甘	－	－	－
天香	－	－	－
京怡香	＋	－	－
甘露	－	－	－
宁丰	－	－	－
艳丽	－	－	－

表 3（续）

品种或编号	病毒种类		
	草莓镶脉病毒	草莓斑驳病毒	草莓白化病毒
丰香	－	－	－
白雪公主	－	－	－
里瓦	＋	－	＋
黔莓 1 号	－	－	－
粉红佳人	－	－	－
雪里香	－	－	－
俏佳人	＋	－	－
宁玉 1	－	－	－
圣雪	－	－	－
硕丽	－	－	－
甜宝	－	－	－
小白	＋	－	－
白草莓	－	－	＋
章姬 2	＋	－	－
晶玉	－	－	－
晶瑶	－	－	－
弗杰利亚	＋	＋	－
佐贺清香 2	＋	－	－
达赛莱克特	＋	－	－
威斯塔尔	－	－	－
红颜 1	－	－	－
章姬 3	－	－	－
香野 1	－	－	－
佐贺清香 3	－	－	－
HBCM051	－	－	－
图得拉	＋	＋	－

表 3(续)

品种或编号	病毒种类		
	草莓镶脉病毒	草莓斑驳病毒	草莓白化病毒
秀丽 1	+	−	−
越心	−	−	−
秀丽 2	−	−	−
粉公主	−	−	−
粉佳人	−	−	−
全明星	+	−	−
晶瑶 1	−	−	−
晶瑶 2	−	−	−
点雪	−	−	−
桃薰 1	−	+	−
红颜 2	+	+	−
圣诞红	−	−	−
桃薰 2	−	−	+
幸香	−	+	−
京泉香	+	+	−
派特罗	+	+	+
香野 2	−	−	−
宁玉 2	−	−	−
HBCM071	−	−	−
HBCM072	−	−	−
红手套	+	−	+
甜查理	−	−	−
佐贺清香 4	−	−	−
哈尼 2	−	−	−
HBCM077	−	−	−
栃乙女	−	−	−
美 13	+	−	−
宝交早生	−	−	−
HBCM081	+	+	−
妙香 7 号	−	−	−
丹莓 2 号	+	−	−
太空 2008	−	−	−
玉兔	−	−	−
越秀	−	−	−

注:“+”表示阳性;“−”表示阴性。

测得的病毒序列设计引物,大大提高了病毒检测的效率。另一方面是高通量测序方法可检测到未在本地发现的病毒,可较全面地检测与鉴定草莓病毒种类。

本研究是首次在湖北地区发现 SPaV,此前已在我国福建、河南相继被报道,并已获得 SPaV 的全基因组序列[26]。系统进化分析结果显示,本研究中检测出的 SPaV 与我国福建的 SPaV 亲缘关系较远,而与美国 SPaV 相对较近,说明 SPaV 病毒间的变异较大,本研究检出的 SPaV 与国内其他已报道的来源可能不同。草莓镶脉病毒与草莓斑驳病毒是我国常见的草莓病毒,本次检测出的 SVBV 与加拿大分离物(GenBank NO. MZ328100.1)亲缘关系最近,而与我国的分离物亲缘关系较远,说明本研究检出的 SVBV 可能来源于加拿大。SMoV 与北京、辽宁和山东地区的亲缘关系较近[27],可能是由国内相关地区传播而来。

前人多应用指示植物鉴定、血清学及 RT-PCR 等检测鉴定方法,这些方法局限于只能检测已知病毒,无法发现未知病毒,而高通量测序分析可在样本没有病毒信息的情况下检测出样品中含有的病毒,并可检测到未知病毒,但是检测成本相对较高,也会由于样品中不同病毒含量的差异,导致未能检测出含量低的病毒[28-30]。

利用高通量测序及 RT-PCR 方法鉴定出本次湖北省草莓资源中的病毒包括 3 种,分别为草莓镶脉病毒、草莓斑驳病毒以及草莓白化病毒。其中带有草莓镶脉病毒最多,共有 23 株,其次为草莓斑驳病毒,共 10 株,复合侵染样品共 10 份。

参考文献:

[1]赵彦华. 草莓品种栽培类型及主要优良品种[J]. 山西果树,2019(6):50-53.

[2]张运涛,雷家军,赵密珍,等. 新中国果树科学研究 70 年——草莓[J]. 果树学报,2019,36(10):1441-1452.

[3]李文琦,付崇毅,孙平平,等. 四种主要草莓病毒研究进展[J]. 北方园艺,2022(9):122-129.

[4]杨　波,赵宝龙,郝小军,等. 新疆地区四种草莓病毒病原的检测[J]. 新疆农业科学,2018,55(9):1689-1697.

[5]韩晓玉,陈思宇,李　刚,等. 河南省草莓病毒病病原的鉴定及 5 种草莓病毒多重 PCR 体系的建立[J]. 植物保护学报,2020,47(1):219-220.

[6]陈　道. 福建地区草莓病毒的分子检测和 SPaV 全基因组序列的获得[D]. 福州:福建农林大学,2018.

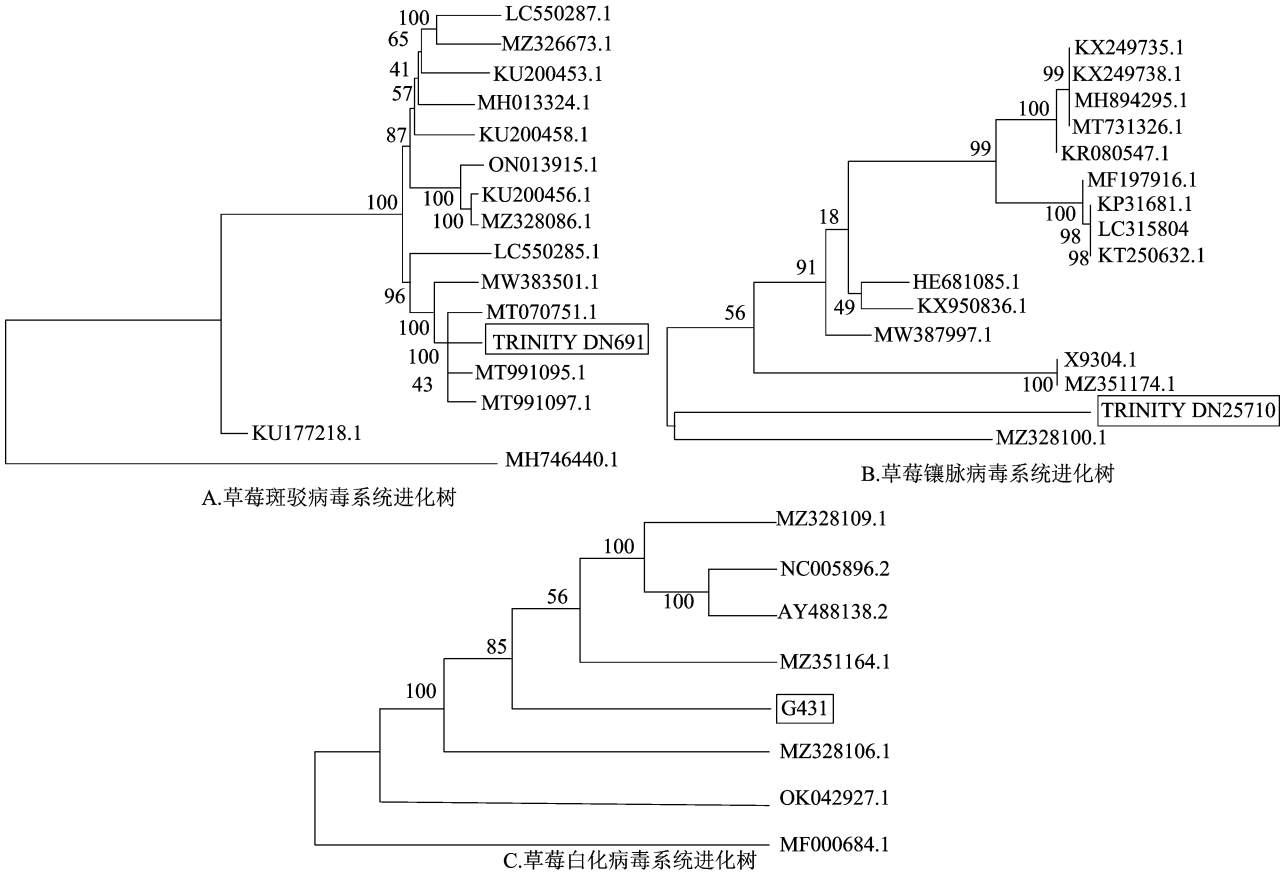
[7]冉　策. 京郊草莓病毒病调查及病毒检测技术应用[D]. 北京:北京农学院,2015.

[8]刘　雅,杨　静,张丽勋,等. 上海地区四种草莓病毒的检测分析[J]. 上海农业学报,2021,37(4):63-67.

[9]黄倩茹,牛永浩,吴　宽,等. 陕西省草莓病毒种类的 LncRNA 测序初步鉴定[J]. 园艺学报,2021,48(8):1589-1594.

[10]王　佳,白莹雪,祝　宁,等. 基于小 RNA 深度测序技术鉴定侵染我国部分省市草莓种苗的病毒种类[J]. 植物保护,2022,48(3):225-232,241.

[11]李伟佳,张志宏,郭　巍,等. 利用高通量测序技术快速解析草莓病毒基因组序列[J]. 沈阳农业大学学报,2016,47(5):536-540.



A.草莓斑驳病毒系统进化树　　B.草莓镶脉病毒系统进化树

C.草莓白化病毒系统进化树

图2　3 种病毒的系统进化树

[12]朱海生,花秀凤,陈敏氡,等. 四种草莓病毒 SMoV、SVBV、SCV、SMYEV 多重 RT－PCR 检测[J]. 核农学报,2013,27(11):1630－1635.

[13] Ding X L, Chen D, Wang A M, et al. First report of strawbery pallidosis－associated virus on strawberry in China[J]. Plant Disease,2017,101(12):2154.

[14]Shi Y,Han X Y,Sun H,et al. First report of strawberry pallidosis associated virus infecting strawberry in China[J]. Plant Disease,2018,102(1):257.

[15]Langmead B,Trapnell C,Pop M,et al. Ultrafast and memory－efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. Genome Biology,2009,10(3):R25.

[16]Pruesse E,Quast C,Knittel K,et al. SILVA:a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB[J]. Nucleic Acids Research,2007,35(21):7188－7196.

[17]Chan P P,Lowe T M. GtRNAdb:a database of transfer RNA genes detected in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Research,2009,37(1):D93－D97.

[18]Griffiths－Jones S,Bateman A,Marshall M,et al. Rfam:an RNA family database[J]. Nucleic Acids Research,2003,31(1):439－441.

[19]Jurka J,Kapitonov V V,Pavlicek A,et al. Repbase Update,a database of eukaryotic repetitive elements[J]. Cytogenetic and Genome Research,2005,110(1/2/3/4):462－467.

[20]陈晓军,王敬东,马洪爱,等. 利用 RT－PCR 对脱毒草莓苗病毒检测研究[J]. 北方园艺,2010(23):146－148.

[21]周厚成,李思源,何水涛,等. 草莓镶脉病毒的 PCR 检测及特异片段的序列分析[J]. 果树学报,2005,22(3):286－288.

[22]何成勇,高德航,范灵姣,等. 利用小 RNA 深度测序快速鉴定草莓病毒[J]. 中国农业大学学报,2021,26(8):54－60.

[23]王建辉,刘建军,陈克玲,等. 草莓轻型黄边病毒检测研究[J]. 西南农业学报,2016,29(12):2866－2870.

[24]石光农,庞夫花,谷旭琳,等. 甘肃省临夏地区草莓种苗繁育及日光温室栽培技术[J]. 江苏农业科学,2021,49(6):120－123.

[25]向发云,张庆华,韩永超,等. 湖北省草莓栽培现状与发展对策[J]. 湖北农业科学,2017,56(23):4538－4541.

[26]陈　道,张　洁,吴祖建,等. 草莓白化相关病毒中国分离物全基因组分析[J]. 园艺学报,2021,48(1):146－152.

[27]Fan L J,He C Y,Wu M M,et al. Incidence,genomic diversity,and evolution of strawberry mottle virus in China[J]. Biocell,2021,45(4):1137－1151.

[28]周厚成,何水涛. 草莓病毒病研究进展[J]. 果树学报,2003,20(5):421－426.

[29]顾地周,朱俊义,夏广清,等. 优质多抗草莓新品种:‘通生 1 号’的选育[J]. 果树学报,2013,30(3):497－499,336.

[30]蔡斌华,张计育,黄　海,等. 结合内标的 RT－PCR 技术检测草莓轻型黄边病毒(SMYEV)[J]. 江苏农业学报,2009,25(6):1432－1434.