

草莓斑驳病毒分子变异及 PCR 检测技术研究

杨洪一¹, 李丽丽², 代红艳², 张志宏²

(¹东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; ²沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161)

摘要: 【目的】明确草莓斑驳病毒 (*Strawberry mottle virus*, SMoV) 的分子变异特点; 探索利用嵌套 PCR 和转录增强技术检测 SMoV 的方法。【方法】利用 RT-PCR 扩增 SMoV 3' 非编码区 (non-coding region, NCR) 和大外壳蛋白 (large coat protein, LCP) 基因特异片段, 并对扩增产物进行克隆测序。利用生物信息学软件分析不同地区分离物变异特点及系统发育关系。参考测序结果, 在 SMoV 基因组保守区设计引物, 利用嵌套 PCR 和转录增强技术检测 SMoV。【结果】获得了 SMoV 中国分离物的 NCR 区和部分 LCP 基因核苷酸序列, 不同分离物部分 LCP 基因核苷酸序列同源性为 76.8%~99.7%。系统进化分析显示不同分离物呈现轻微的地理相关性。3 个波兰分离物, 4 个中国分离物中的 3 个, 7 个荷兰分离物中的 4 个分别聚集成一簇; 2 个德国分离物与其它分离物亲缘关系较远, 形成一个独立的分支。建立了利用半嵌套 PCR 和转录增强技术检测 SMoV 的技术体系, 灵敏度高于常规 PCR。【结论】SMoV 不同分离物变异复杂, 德国分离物可能是一个代表特殊株系的群体; 基于定位基因组保守区引物, 利用嵌套 PCR 和转录增强技术可有效检测 SMoV。

关键词: 草莓斑驳病毒; RT-PCR; 嵌套 PCR; 变异; 系统进化分析

Studies on Molecular Variations and PCR Detection of Strawberry Mottle Virus

YANG Hong-yi¹, LI Li-li², DAI Hong-yan², ZHANG Zhi-hong²

(¹College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040; ²College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract: 【Objective】The study was conducted to analyze the characterization of molecular variation of *Strawberry mottle virus* (SMoV) and develop SMoV detection methods by nested PCR and transcriptional enhancement techniques. 【Method】The 3' non-coding region (NCR) and large coat protein (LCP) gene of SMoV were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The specific segments were cloned and sequenced. The characterization of molecular variation for some isolates of SMoV and phylogenetic analysis were studied by using some bioinformatics softwares. The primers were designed in conserved region of genome of SMoV by analyzing the nucleotide acid sequences. SMoV was detected by nested PCR and transcriptional enhancement techniques. 【Result】The nucleotide sequences of NCR and partial LCP gene of Chinese isolates were obtained. Sequence analysis of the partial LCP gene of various SMoV isolates showed nucleotide acid identities ranged from 76.8 to 99.7%. There was a slight tendency for isolates to group according to their geographical origin. All of three Polish isolates, four isolates among seven Dutch isolates, three isolates among four Chinese isolates formed a small separate branch, respectively. Two Germanic isolates had the far relationship with other isolates, formed a separate clade. The detection protocol for SMoV by semi-nested PCR and transcriptional enhancement techniques were developed, respectively. Both semi-nested PCR and transcriptional enhancement techniques were rather more sensitive than standard RT-PCR. 【Conclusion】It had the enormous genetic variation for SMoV isolates. The Germanic isolates could be a group for representing of a specific strain. Based on the primers located in the conserved region of genome of SMoV, SMoV could be steadily detected by semi-nested PCR and transcriptional enhancement techniques.

Key words: *Strawberry mottle virus*; RT-PCR; Semi-nested PCR; Variation; Phylogenetic analysis

收稿日期: 2007-05-21; 接受日期: 2007-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30200187)

作者简介: 杨洪一 (1978-), 男, 吉林九台人, 博士, 研究方向为植物病毒学。Tel: 0451-82192072; E-mail: hyi01@tom.com。通讯作者张志宏 (1968-), 教授, 博士, 研究方向为果树分子生物学。Tel: 024-88487143; E-mail: zhangz@syau.edu.cn

0 引言

【研究意义】草莓斑驳病毒 (*Strawberry mottle virus*, SMoV) 是严重危害草莓生产的一种病毒, 单独侵染可导致植株衰弱、果实变小、品质变劣, 减产 30% 左右^[1]。SMoV 在世界各地广泛分布, 株系分化复杂^[2,3], 在分子水平上明确其变异特点并建立有效检测技术对控制病毒危害具有重要意义。【前人研究进展】SMoV 病毒粒子为球形, 直径 28~30 nm^[4]。病毒基因组包含 2 条单链 RNA 分子 RNA1 和 RNA2, 其基因组大小分别为 7 036 和 5 619 nt^[1,5]。SMoV 早期分类地位不明确, 基于基因组结构特点, 目前与温州蜜柑矮缩病毒 (*Satsuma dwarf virus*, SDV)、草莓潜隐型环斑病毒 (*Strawberry latent ringspot virus*, SLRSV) 组成新的病毒属—温州蜜柑矮缩病毒属 (*Sadwa virus*)^[6]。早期主要通过指示植物法来鉴定 SMoV^[7], 由于 SMoV 株系分化复杂, 不同株系在寄主植物上症状变化较大。在敏感的指示植物 EMC (East Malling clone of *F. vesca*) 上, 弱株仅表现轻微褪绿斑驳, 而强株则引起 EMC 长势明显下降, 叶片变小、畸形、叶柄缩短变细等症^[5,8]。多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术是检测植物病毒的重要方法, 目前已有成功检测 SMoV 的报道^[3,9,10]。草莓组织中富含多糖、多酚、丹宁等物质^[3], 在分离核酸时不易去除, 容易影响 PCR 反应中 DNA 聚合酶的功效, 因而造成检测结果的不稳定^[11,12]。为了提高病毒检测的灵敏度和稳定性, 转录增强 (transcriptional enhancement)、嵌套 PCR (nested PCR) 等一些基于 PCR 的新技术被应用到病毒检测研究中, 其灵敏度比常规 PCR 高 10~200 倍^[13-15]。【本研究切入点】基于病毒基因组核酸序列的分子变异研究刚刚兴起, Thompson 等在核酸水平上对 SMoV 的变异进行了研究, 发现 SMoV 不同分离物变异复杂^[3], 获得可扩增 SMoV 多个分离物基因组特定区域的引物较困难。分子变异的基础在于获得多个不同地理起源的分离物, 目前 GenBank 中仅 Thompson 等^[3]公布了几个 SMoV 欧美分离物的部分基因组核酸序列, 还未见 SMoV 亚洲分离物的报道。此外, 也未见利用基于 PCR 新技术检测 SMoV 的报道。【拟解决的关键问题】本研究通过获得 SMoV 中国分离物基因组特定区域核酸序列, 分析 SMoV 分子变异特点, 了解 SMoV 中国分离物的分子变异特征; 同时结合分子变异特点, 探索利用转录增强技术和嵌套 PCR 技术检测 SMoV。

1 材料与方法

1.1 植物材料

病毒分离物 CN1 取自辽宁大连农村草莓田, CN2、CN3 和 CN4 取自沈阳农业大学草莓资源圃, CN1、CN2、CN3、CN4 分别保存于草莓栽培品种宝交早生 (Hokowase)、天 5 (Tian 5)、高斯克 (Governor Simcoe)、SA18 上, 所有分离物分别进行温室保存及离体保存。

1.2 试剂及菌株

大肠杆菌 DH5 α 菌株保存于沈阳农业大学果树分子生物学实验室保存。反转录酶 M-MLV 为 Invitrogen 公司产品, PCR 产物纯化试剂盒、dNTPs 购于上海生工, NTP 购于 Promega 公司, T7 RNA 聚合酶购于 MIT 公司, La Taq DNA 聚合酶、RNasin、pMD 18-T 载体、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司, 其它药品为国产分析纯。

1.3 引物

根据已发表的序列和参考文献^[1,3]设计引物。引物序列为 D1: 5'-TAAGCGACCACGACTGTGACAAAG-3', D2: 5'-ATTTCGGTTCACGTCCTAGTCTCAC-3', D3: 5'-TCTTGGGCTTGGATCGTCACCTG-3', C1: 5'-GGACCTACGGA TCTTGGAAAGT-3', C2: 5'-ACCCGCACAACCTGTGCGG AGG-3', TD1: 5'-aattctaatacgaactactatagggag TAAGCG ACCACGACTGTGACAAAG-3' (小写字母为 T7 RNA 聚合酶启动子序列), TD3: 5'-aattctaatacgaactactatag ggagTCTTGGGCTTGGATCGTCACCTG -3', 引物由 TaKaRa 公司合成。

1.4 RNA 提取

取 0.05 g 草莓叶片, 利用改进 CTAB 法^[16]提取总 RNA, 最后溶解于 50 μ l 水中。

1.5 RT-PCR

在 0.2 ml Eppendorf 管中加入随机引物 (9 mer) (0.25 μ mol·L⁻¹)、dNTPs (1 mmol·L⁻¹)、1 μ l 总 RNA 及 9 μ l 超纯水, 65 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 立即置于冰上; 再加入 RNasin 0.3 μ l、反转录 Buffer 4 μ l、2 μ l DTT、0.3 μ l M-MLV 反转录酶 (200 U· μ l⁻¹), 终体积 20 μ l, 混匀。反转录程序为 37 $^{\circ}$ C 2.5 h, 70 $^{\circ}$ C 15 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保温。

反转录结束后取 1 μ l 进行 PCR 反应, 反应体系中含 2 μ l 10 \times Buffer, 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol·L⁻¹ dNTPs, 0.2 μ mol·L⁻¹ 引物, 0.5 U Taq 酶, 用水补足至 20 μ l。

引物 D1D2 反应程序为: 94°C 2 min; 94°C 30 s, 50°C 60 s, 72°C 60 s, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min; 引物 C1C2 退火温度为 55°C, 其它与引物 D1D2 相同。

1.6 嵌套 PCR

以 D1D2 为引物进行第 1 次扩增, 20 个循环, 退火温度为 48°C, 其它条件与 D1D2 单独扩增时相同。取 0.3 μl 扩增产物进行第 2 次扩增, 引物为 D1D3 (0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 58°C 退火, 35 个循环, 其它反应条件与第 1 次相同。用含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.7 转录增强

按上述操作进行反转录反应后, 以引物 TD1/D3 (或 TD3/D1) 进行 PCR 反应, 反应程序为: 94°C 2 min; 94°C 30 s, 55°C 60 s, 72°C 60 s, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min。PCR 反应结束后, 向 PCR 产物中加入 14 μl 转录增强反应溶液 (含 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NTP 2 μl 、T7 RNA 聚合酶 Buffer 7 μl 、0.3 μl RNasin 和 20 U T7 RNA 聚合酶)。37°C 反应 100 min, 用含 EB 的 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.8 灵敏度检测

取 1 μl 总 RNA (约 0.6 μg), 分别加水稀释 10、50、200、800、3 200、12 800 倍 (浓度分别为 60、12、3、0.75、0.19、0.05 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 再分别利用常规 PCR (引物 D1D3)、嵌套 PCR 和转录增强技术检测 SMoV。

1.9 克隆、测序及序列分析

以 PCR 产物纯化试剂盒回收 DNA 片段, 与 pMD 18-T 载体连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 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进行, 双向测序。

利用软件 CLUSTAL X (1.83) 进行多序列比对 (multiple sequence alignment), 利用 DNASTar 软件计算分离物间核酸、氨基酸同源性并生成系统进化树。

本研究中所应用国外分离物名称及 GenBank 登录号如下:

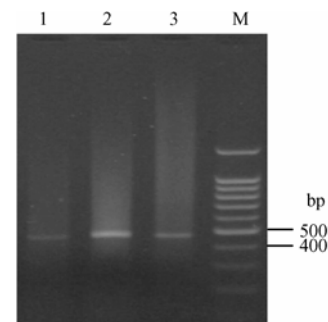
荷兰分离物: 1134(AJ311876)、1141(AJ496140)、1166(AJ496141)、1265(AJ496143)、1266(AJ496144)、1278(AJ496145)、1280(AJ496146); 波兰分离物: 1509/4(AJ496147)、1248(AJ496142)、167(496148); 捷克分离物: 197/3A(AJ496149)、197/3B(AJ496150); 德国分离物: HD(AJ496153)、ST(AJ496154); 智利分离物: 3CH(AJ496151); 美国分离物: 9032.001M7(AJ496152)。

2 结果与分析

2.1 SMoV 特异片段的 RT-PCR 扩增、克隆、测序

引物 D1D2、C1C2 分别扩增的是 SMoV 的 3' 非编码区 (non-coding region, NCR) 和大外壳蛋白 (large coat protein, LCP) 区。引物 C1、C2 的 3' 末端分别定位在保守 Motif LGS 和 PPT。SDV、脐橙侵染性斑驳病毒 (*Navel orange infectious mottling virus*, NIMV)、柑桔花叶病毒 (*Citrus mosaic virus*, CiMV) 中也存在这 2 个保守 Motif^[3]。由于 D1D2 定位于 SMoV RNA1 和 RNA2 3' 端 NCR 中的高度保守区域, 因而理论上可以同时扩增 RNA1 和 RNA2。

以引物 D1D2、C1C2 分别在栽培品种宝交早生、天 5、高斯克、SA18 中扩增出了预期的 461 bp 的片段引物 C1C2 扩增结果见图 1, 并经测序证明其为 SMoV 的特异片段。



1: 宝交早生; 2: 天 5; 3: 高斯克; M: 100 bp DNA ladder
1: Hokowase; 2: Tian 5; 3: Governor Simcoe; M: 100 bp DNA ladder

图 1 利用引物 C1C2 扩增 SMoV LCP 基因特异片段

Fig. 1 LCP gene of SMoV was amplified by primer C1C2 by RT-PCR

通过测序, 获得了 CN1 的部分 NCR 序列, CN1、CN2、CN3、CN4 的部分 LCP 序列, 将 CN1 的部分 NCR 和 LCP 序列提交至 GenBank, 登录号分别为 AY919307、AY937262。

2.2 序列分析

对 20 个 SMoV 分离物 (16 个为 GenBank 中分离物) 的部分 LCP 基因序列 (327 nt)、部分 NCR 序列 (413 nt) 分别进行多序列比对, SMoV 的 NCR 区比对后存在空位, 通过手工比对来对空位区域进行调整。还分别对不同分离物 LCP 基因推导的氨基酸序列进行比对, 比对结果输入 DNASTar 软件, 计算不同分离物的核酸、氨基酸同源性。

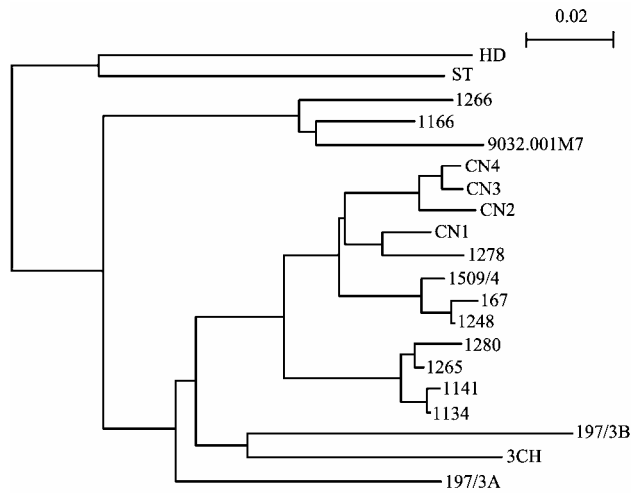
SMoV 不同分离物的部分 LCP 区核酸序列差异较大, 同源性最高为 99.7% (分离物 1134 与 1141), 最低为 76.8% (分离物 ST 与 3CH)。其中德国分离物 ST、HD 与其它所有分离物的同源性都较低, 为 76.8%~83.2%。SMoV 不同分离物的部分 LCP 基因推导的氨基酸序列差异相对较小, 一些分离物的氨基酸序列完全相同, 而分离物 ST、HD、9032.001M7 与其它分离物的序列差异较大 (89.8%~97.2%)。中国分离物的核酸序列和推导的氨基酸序列与其它分离物的同源性分别在 78.9%~96.9%和 89.8%~100%, 中国分离物同分离物 ST、HD、1166、1266、9032.001M7 氨基酸序列同源性较低 (89.8%~92.6%), 而同其它分离物的氨基酸序列同源性都在 95%以上。

利用 CLUSAL X 软件, 基于 SMoV 不同分离物部分 LCP 核酸序列构建了系统进化树 (图 2), 不同分离物呈现轻微的地理相关性, 利用氨基酸序列所作的进化树与之相近。在 20 个分离物中, 7 个荷兰分离物中的 4 个 (1134、1141、1265、1280) 形成了一个小的独立分支。中国分离物 CN1 与荷兰分离物 1278 及另外的 3 个中国分离物 (CN2、CN3、CN4) 形成了一个小的分支, 此分支与 3 个波兰分离物 (1509/4、1248、167) 组成的分支亲缘关系较近。德国分离物 ST 和 HD 与其它分离物的核酸 (75.8%~83.2%)、氨基酸 (89.8%~94.4%) 的同源性都较低, 二者形成了一个独立分支。2 个捷克分离物 197/3A、197/3B 的亲缘关系较远, 可能与寄主差异有关 (197/3A、197/3B 的寄主分别为 *F. ananassa* 和 UC4)。

2.3 嵌套 PCR 引物设计及检测

由于 SMoV 的 NCR 区较保守, PCR 扩增时可同时扩增 2 个 RNA 分子, 因而在 NCR 区设计嵌套引物。多序列比对显示, SMoV 不同分离物部分 NCR 序列同源性较高, 有 4 个超过 20 个核苷酸的大的保守区域, 主要分布于前半部分, 结尾部分有空位存在且序列变化较大, 但受不同分离物的 NCR 区核酸序列变异和引物设计原理的限制, 在 NCR 未能找到合适的嵌套引物, 只设计了半嵌套引物 D3, 即先利用引物 D1D2 进行第 1 次扩增, 再用引物 D1D3 进行第 2 次扩增, 半嵌套 PCR 扩增产物为 219 bp。

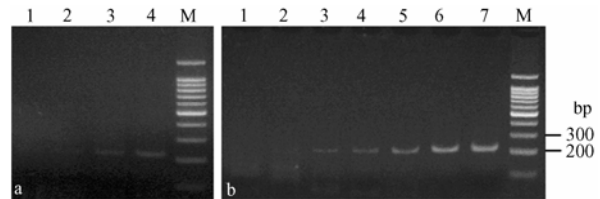
利用半嵌套 PCR, 在草莓栽培品种宝交早生、天 5、高斯克、SA18 中都检测出了 SMoV, 而且结果稳定。半嵌套 PCR 提高了检测 SMoV 的灵敏度, 可检测到的核酸稀释倍数最高为 3 200 倍 (总 RNA 浓度为 0.75 ng·μl⁻¹), 灵敏度高于常规 PCR (图 3)。



CN1、CN2、CN3、CN4 为中国分离物; 197/3A、197/3B 为捷克分离物; 1509/4、1248、167 为波兰分离物; HD、ST 为德国分离物; 1134、1141、1166、1265、1266、1278、1280 为荷兰分离物; 9032.001M7 为美国分离物; 3CH 为智利分离物
Chinese isolates: CN1, CN2, CN3 and CN4; Czech isolates: 197/3A and 197/3B; Polish isolates: 1509/4, 1248 and 167; Germanic isolates: HD and ST; Dutch isolates: 1134, 1141, 1166, 1265, 1266, 1278 and 1280; American isolate: 9032.001M7; 3CH came from Chile

图 2 基于 SMoV LCP 核酸序列的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the nucleic acids sequences of LCP of SMoV



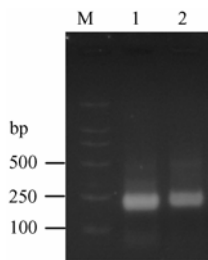
a: 常规 PCR 的检测灵敏度。1: 未受 SMoV 感染的宝交早生; 2~4: 宝交早生核酸稀释倍数, 分别为 200、50、10 倍; M: 100 bp DNA ladder; b: 半嵌套 PCR 的检测灵敏度。1: 未受 SMoV 感染的宝交早生; 2~7: 宝交早生的核酸稀释倍数, 分别为 12 800、3 200、800、200、50、10 倍; M: 100 bp DNA ladder
a: Limits of detection of SMoV by RT-PCR. 1: Healthy Hokowase. 2-4: Dilution was done of Hokowase at 1/200, 1/50, 1/10. M: 100 bp DNA ladder. b: Limits of detection of SMoV by semi-nested PCR. 1: Healthy Hokowase. 2-7: Dilution was done of Hokowase at 1/12800, 1/3200, 1/800, 1/200, 1/50, 1/10. M: 100 bp DNA ladder

图 3 常规 PCR (a) 和半嵌套 PCR (b) 的检测灵敏度

Fig. 3 Limits of detection of SMoV by RT-PCR and semi-nested PCR

2.4 利用转录增强技术检测 SMoV

以宝交早生为试材, 分别以引物 TD3/D1、TD1/D3 对 SMoV 的 3'NCR 区进行 RT-PCR 扩增, 然后进行转录增强反应, 结果表明引物 TD3/D1 和 TD1/D3 都可以得到较好的扩增结果 (图 4), 这说明 T7 启动子序



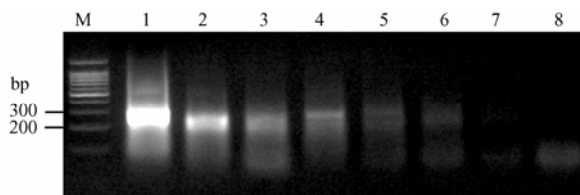
M: DL2000 marker; 1: 引物 TD3/D1; 2: 引物 TD1/D3
M: DL2000 marker; 1: Primer TD3/D1; 2: Primer TD1/D3

图 4 利用转录增强检测 SMoV

Fig. 4 Results of transcriptional enhancement techniques for detecting SMoV

列无论是加在正义引物上还是加在反义引物上, 都是有效的。同一植株在不同季节均能扩增出该特异片段。

以宝交早生为试材, 利用引物 TD1/D3 进行转录增强的检测灵敏度实验, 结果表明所能检测到的总 RNA 稀释倍数约 3 200 倍(总 RNA 浓度为 $0.75 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) (图 5), 灵敏度高于常规 PCR。



M: 100 bp DNA ladder marker; 1~7: 总 RNA 稀释倍数, 分别为 10、50、200、800、3 200、12 800、51 200 倍; 8: 健康宝交早生
M: 100 bp DNA ladder Marker; 1-7: The total RNA from infected Hokowase plants were diluted at 10, 50, 200, 800, 3 200, 12 800, 51 200 times, respectively; 8: Healthy Hokowase plants

图 5 利用转录增强检测 SMoV 的灵敏度

Fig. 5 Sensitivity of transcriptional enhancement for detecting SMoV

3 讨论

本研究中的 4 个中国分离物皆取自辽宁, 采样地理距离较近, 其 LCP 核酸序列同源性较高 (95.4%~99.1%)。在系统进化树上, 4 个中国分离物分为 2 组, 3 个沈阳分离物 (CN2、CN3、CN4) 分为一组, 大连分离物 (CN1) 分为一组, 其分组差异可能与地理起源有关。中国是世界上野生草莓资源最丰富的国家之一, 约占世界草莓属 20 个常见种的 1/2 以上^[17], 辽阔的地域、复杂的地形及多样的生态条件为在长期的自

然选择中病毒与寄主协同进化过程中发生分子变异和株系分化提供了有利条件。中国可能包含着较多 SMoV 复杂株系类型, 对国内其它地区大量样本进行筛选可能得到更多的株系类型。

在所有的 20 个 SMoV 分离物中, 2 个德国分离物 (ST、HD) 与其它分离物的 LCP 核酸、氨基酸序列同源性最低, 其并未与其邻国 (捷克、波兰、荷兰) 分离物聚集到一簇, 而是形成了一个独立分支, 并且在氨基酸水平上也与其它分离物差异较大, 可能是代表一个特殊株系类型的群体。2 个美洲分离物 (9032.001M73、CH) 与其它分离物的 LCP 核酸序列同源性 (76.8%~93.9%)、氨基酸序列同源性 (89.8%~99.1%) 也较低, 但其在系统进化树上并未形成独立的分支, 而是与欧洲分离物聚集在一起, 原因可能在于其序列变异未低至德国分离物的变异水平, 也可能与研究中所采用的系统发育学算法有关。本研究的缺陷在于可利用的核酸序列信息较少, 有待于国内外研究人员补充更多的分离物类型, 公布更长的部分基因组序列信息。尽管国外已报道了 16 个 SMoV 分离物, 但其采样地点相对较为集中, 除来自美洲的 2 个分离物外, 其余的 14 个欧洲分离物皆来自相互邻近的 4 个欧洲国家。

在利用 PCR 检测植物病毒的研究中, 有较多检测结果不稳定的报道^[3,12,18], 其原因可能主要有两点: 一为核酸中杂质影响 DNA 聚合酶的活性, 二为病毒粒子浓度在不同季节变化较大。嵌套 PCR 的灵敏度较高, 其受病毒粒子季节变化的影响相对较小, 可在一定程度上避免因病毒浓度过低所致的假阴性; 此外, 通过吸取少量 PCR 产物进行第 2 次 PCR 反应, 可使核酸中杂质浓度降低, 利于 PCR 反应的稳定性。传统观点认为嵌套 PCR 的缺点是容易受到污染^[19], 本试验中未曾发现因外来核酸污染而明显影响实验结果。本研究的困难在于病毒核酸序列变异影响嵌套 PCR 引物设计, 由于 SMoV 序列变异较严重, 本研究在其基因组最保守的 NCR 区仅找到一个合适的引物。随着更多病毒分离物基因组序列的解析, 通过寻找保守 Motif, 在保守区设计引物或设计简并引物有可能解决此问题。

与嵌套 PCR 相比, 转录增强不需要设计第 2 对引物, 第 2 轮扩增中主要依靠 T7 启动子序列, 也就是说第 2 轮扩增与所扩增的序列没有直接的关系, 因而其受株系变异的影响相对较小。此外, T7 RNA 聚合酶受核酸中杂质影响相对较小, 利于反应的稳定性。转录增强技术的缺点在于产物不稳定、易降解、无法

进行测序等后续分析,其产物的检测技术尚不成熟。

试验中利用引物 C1C2 在栽培品种绿色种子上扩增出了预期大小的片段(约 460 bp),但经测序发现其并不是 SMoV 特异序列,而是引物自身连接而成的序列,即扩增产物中两个引物序列交替出现,中间一般间隔 3~8 个碱基,间隔碱基未见明显规律性。此种引物自连所致的 PCR 检测假阳性还未见报道,难以给出较合理的解释,这对病毒检测结果的准确性是极为不利的。

4 结 论

本研究分析了 SMoV 不同分离物的基因组特定区域的核酸序列,结果显示 SMoV 不同分离物变异复杂,不同分离物 LCP 基因核酸序列、氨基酸序列同源性分别为 76.8%~99.7%、89.8%~100%。系统进化分析显示不同分离物呈现轻微的地理相关性,中国分离物与荷兰分离物、波兰分离物亲缘关系较近;德国分离物可能是一个代表特殊株系的群体。建立了利用嵌套 PCR 和转录增强技术检测 SMoV 的技术体系,可有效检测 SMoV。

References

- [1] Thompson J R, Leone G, Lindner J L, Jelkmann W, Schoen C D. Characterization and complete nucleotide sequence of strawberry mottle virus: a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses. *Journal of General Virology*, 2002, 83: 229-239.
- [2] 韦石泉, 吴元华. 我国草莓斑驳病毒研究鉴定. *植物病理学报*, 1994, 24(4): 293-298.
- Wei S Q, Wu Y H. Study and identification of Chinese SMoV. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1994, 24(4): 293-298. (in Chinese)
- [3] Thompson J R, Jelkmann W. The detection and variation of Strawberry mottle virus. *Plant Disease*, 2003, 87(4): 385-390.
- [4] Yoshikawa N, Converse R H. Purification and some properties of strawberry mottle virus. *Annals of Applied Biology*, 1991, 118(3): 565-576.
- [5] Martin R R, Tzanetakis I E. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant disease*, 2006, 90(4): 384-396.
- [6] Mayo M A. Changes to virus taxonomy. *Archives of Virology*, 2005, 150(1): 189-198.
- [7] Frazier N W, Thresh J M, Varney E H. *Virus Diseases of Small Fruits and Grapevines*. California: University of California Press, 1970.
- [8] Converse R H. Modern approaches to strawberry virus research. *Acta Horticulturae*, 1992, 308: 19-26.
- [9] Chang L, Zhang Z H, Yang H, Li H, Dai H. Detection of strawberry RNA and DNA viruses by RT-PCR using total nucleic acid as a template. *Journal of Phytopathology*, 2007, 155(7): 431-436.
- [10] Li H, Dai H Y, Zhang Z, Gao X, Du G, Zhang X. Isolation and identification of virus dsRNA from strawberry plants. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(1): 86-93.
- [11] Posthuma K I, Adams A N, Hong Y, Kirby M J. Detection of strawberry crinkle virus in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. *Plant Pathology*, 2002, 51: 266-274.
- [12] Thompson J R, Wetzel S, Klerks M M, Vaskova D, Schoen C D, Spak J, Jelkmann W. 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.
- [13] Blais B W. Transcriptional enhancement of the *Listeria monocytogenes* PCR and simple immunoenzymatic assay of the product using anti-RNA: DNA antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(1): 348-352.
- [14] Jean J, D'Souza D, Jaykus L A. Transcriptional enhancement of RT-PCR for rapid and sensitive detection of Noroviruses. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 226(2): 339-345.
- [15] Dovas C I, Katis N I. A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the aetiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine. *Journal of Virological Methods*, 2003, 109: 217-226.
- [16] 杨洪一. 草莓病毒分子检测及其部分基因组序列分析. 沈阳农业大学博士学位论文, 2005.
- Yang H Y. Molecular Detection Techniques of Strawberry Viruses and Analysis of Their Partial Genome Sequences. Dissertation of Ph. D. of Shenyang Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [17] 雷家军, 代汉萍, 谭昌华, 邓明琴, 赵密珍, 钱亚明. 中国草莓属 (*Fragaria*) 植物的分类研究. *园艺学报*, 2006, 33(1): 1-5.
- Lei J J, Dai H P, Tan C H, Deng M Q, Zhao M Z, Qian Y M. Studies on the taxonomy of the strawberry (*Fragaria*) species distributed in China. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(1): 1-5. (in Chinese)
- [18] 肖敏, 张志宏, 代红艳, 杨洪一, 李贺. PCR 检测草莓镶脉病毒的稳定性研究. *果树学报*, 2005, 22(5): 483-487.
- Xiao M, Zhang Z H, Dai H Y, Yang H Y, Li H. Enhancing the stability of detection of strawberry vein banding virus by PCR. *Journal of Fruit Science*, 2005, 22(5): 483-487. (in Chinese)
- [19] 迪芬巴赫, 德维克斯勒. 黄培堂, 余炜源, 陈添弥等译. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 1998.
- Dieffenbach C W, Dveksler G S. Translated by Huang P T, Yu W Y, Chen T M, et al. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Beijing: Science Press, 1998. (in Chinese)

(责任编辑 赵利辉, 毕京翠)