调 查 研 究
Investigations

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

王 佳[1#]， 白莹雪[1#]， 祝 宁[2]， 齐长红[2]， 任俊达[1]， 韩成贵[3]， 尚巧霞[1*]

（1. 北京农学院，农业农村部华北都市农业重点实验室，北京 102206；2. 北京市昌平区农业技术推广站，北京 102200；3. 中国农业大学植物病理学系，农业生物技术国家重点实验室，北京 100193）

摘要 随着草莓保护地栽培面积的增加和无性繁殖种苗的繁殖与调运，草莓病毒病的发生与流行日益严重。为明确侵染我国部分省市草莓种苗的病毒种类，应用小 RNA 深度测序技术进行检测，并利用 RT-PCR 技术对结果进行验证及序列分析。结果表明，从来自我国 7 省市的 41 株具有典型病毒病症状的草莓种苗样品中检测到草莓斑驳病毒 strawberry mottle virus（SMoV）、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）3 种。SMoV、SVBV 和 SMYEV 的检出率分别为 34.1%、24.4%和 2.4%。选取不同产地草莓种苗上检出的不同病毒进行部分序列测定和分析，获得了 3 个 SMoV 分离物（四川分离物 schhy13、辽宁分离物 lnhy23 和河北分离物 hbhy28）的部分 RNA1 3′端非编码区 606 bp 核苷酸序列，其一致性为 98.12%～99.34%。测定并获得了 5 个 SVBV 分离物（辽宁分离物 lnhy15、lnhy17、lnhy24、河北分离物 hbhy28 和陕西分离物 shaxhy35）的 ORF6 的部分基因及其 5′端非编码区的核苷酸序列，其中部分 ORF6 基因序列的一致性为 97.98%～99.8%。仅 1 个辽宁样品中检测到 SMYEV，获得了辽宁分离物 lnhy26，其 *CP* 基因序列与中国甘肃分离物 sy02 的一致性为 99.02%。病毒侵染草莓植株产生的典型症状有叶片畸形、变色和植株矮化。存在 2 种病毒和 3 种病毒复合侵染的情况，占所有阳性样品的 41.2%。辽宁和河北的‘红颜’种苗中检出 SMoV 和 SVBV 或 SMoV、SVBV 和 SMYEV 的复合侵染情况；四川和陕西的‘红颜’种苗仅检出 SMoV 或 SVBV，而其他省市和品种均未检出病毒。研究结果可以为草莓病毒的检测以及草莓病毒病的科学防治提供依据。

关键词 草莓病毒病； 小 RNA 深度测序技术； RT-PCR； 病毒检测

中图分类号： S436.639 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2021079

Identification of viruses infecting strawberry seedlings in some provinces of China by small RNA deep sequencing technology

WANG Jia[1#]， BAI Yingxue[1#]， ZHU Ning[2]， QI Changhong[2]， REN Junda[1]， HAN Chenggui[3]， SHANG Qiaoxia[1*]

（1. *Key Laboratory for Northern Urban Agriculture of Ministry of Agriculture and Rural Affairs*，*Beijing University of Agriculture*，*Beijing* 102206，*China*；2. *Agricultural Technology Extension Station of Changping District in Beijing*，*Beijing* 102200，*China*；3. *Department of Plant Pathology*，*State Key Laboratory for Agro-Biotechnology*，*China Agricultural University*，*Beijing* 100193，*China*）

Abstract With the increase of protected cultivation area，propagation and transportation of strawberry asexual reproductive seedlings between different regions are increasingly frequent，and the occurrence and prevalence of strawberry viral disease are also becoming more and more serious. To identify the viruses infecting strawberry plants from different provinces of China，small RNA deep sequencing assay was used to detect the viruses in strawberry seedling samples，and then the detected viruses were further verified by RT-PCR and sequence analysis. The results showed that strawberry mottle virus（SMoV），strawberry vein banding virus（SVBV）and

收稿日期： 2021－02－08 **修订日期：** 2021－03－11
基金项目： 北京市粮经作物产业创新团队项目（BAIC09-2021）
* 通信作者 E-mail：shangqiaoxia@bua.edu.cn
# 为并列第一作者

strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) were detected in 41 strawberry seedlings with typical symptoms from seven provinces of China. The positive rates of SMoV, SVBV and SMYEV detection were 34.1%, 24.4% and 2.4%, respectively. Strawberry seedling samples infected by different viruses from different regions were selected, from which the partial viral nucleotide sequences of the detected viruses were sequenced and analyzed. The partial 3′ UTR nucleotide sequences of RNA1 of three samples infected by SMoV from Sichuan, Liaoning and Hebei were sequenced, which was 606 bp in length. The partial SMoV nucleotide sequences among Sichuan isolate schhy13, Liaoning isolate lnhy23 and Hebei isolate hbhy28 shared identity from 98.12% to 99.34%. The sequences of partial ORF6 gene and its 5′ UTR of SVBV Liaoning isolates lnhy15, lnhy17, lnhy24, Hebei isolate hbhy28 and Shaanxi isolate shaxhy35 were obtained. The partial ORF6 gene nucleotide sequences of five SVBV samples shared identity from 97.98% to 99.8%. Only one sample with SMYEV was detected from Liaoning, and the *CP* gene sequence of Liaoning isolate lnhy26 shared identity of 99.02% with that of Gansu isolate sy02. Symptoms of strawberry plants infected by virus included leaf deformity, leaf discoloration and dwarf. The detection results showed that combined infection by two or three viruses existed, and the detection rate accounted for 41.2% of virus-positive samples. 'Benihoppe' seedlings from Liaoning and Hebei were simultaneously infected by SMoV and SVBV or SMoV, SVBV and SMYEV. 'Benihoppe' seedlings from Sichuan and Shaanxi were only infected by SMoV or SVBV, but no virus was detected in strawberry seedlings sampled from other provinces or in other varieties. This study provided important information and techniques for virus detection and strawberry viral disease management.

Key words strawberry viral disease; small RNA deep sequencing technology; RT-PCR; virus detection

草莓因具有种植周期短、投资少、经济收益高等优点成为重要的经济作物，在全球范围内广泛种植[1]。我国的草莓产业经过近40年的迅猛发展，生产面积和产量已跃居世界首位[2]。

在我国，草莓以冬春保护地栽培和依赖匍匐茎无性繁殖种苗为主，高温高湿的生长环境和无性繁殖的种植方式导致草莓斑驳病毒 strawberry mottle virus (SMoV)、草莓镶脉病毒 strawberry vein banding virus (SVBV)、草莓轻型黄边病毒 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV)和草莓皱缩病毒 strawberry crinkle virus(SCV)引起的病毒病发生日益严重，同时伴有这些病毒的新株系和病毒种类产生，严重影响草莓的品质和产量，对草莓产业构成威胁[1,3-5]。2008年杨洪一等[6]从起源自我国甘肃的'五叶草莓'和自育的'长虹2号'中分离到1个SMYEV的新株系类型。2014年Chen等[7]首次报道黄瓜花叶病毒 cucumber mosaic virus (CMV)对我国的草莓产业构成威胁，2017年Ding等[8]首次发现福建的草莓感染草莓白化病毒 strawberry pallidosis-associated virus (SPaV)。

小RNA深度测序技术相对于ELISA和RT-PCR等检测方法，其结果更全面，也更易发现未知的病毒[9]。我国学者已利用该技术从福建和湖南等地的草莓上发现了一些新的病毒种类[8,10]。因此，笔者采用小RNA深度测序技术对来自北京、河北、辽宁、内蒙古、陕西、四川和云南的草莓种苗进行检测，并利用RT-PCR对检测结果进行验证，对所得序列进行比对分析，以明确我国不同省市草莓种苗病毒病的发生情况和病毒种类，为进一步繁育草莓脱毒种苗和病毒病的科学防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2019年11月27日，从北京市昌平区南邵镇草莓种植园采集41株具有明显畸形、矮化、斑驳和皱缩等典型病毒病症状的草莓种苗叶片样品，种苗的来源和品种包括产自北京的'白雪公主'(1株)和'隋珠'(4株)，河北的'光点'(2株)、'红颜'(4株)和'圣诞红'(2株)，辽宁的'红颜'(10株)，内蒙古的'红颜'(2株)，陕西的'红颜'(2株)，四川的'红颜'(10株)和云南的'圣诞红'(4株)。

1.2 主要试剂

EASYspin植物RNA快速提取试剂盒、2×*Taq* PCR Mix购自北京爱博森生物科技有限公司；dNTPs、5×M-MLV逆转录反应缓冲液、M-MLV反转录酶、RNase抑制剂购自TaKaRa公司；DEPC水购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 具有典型病毒病症状的草莓种苗叶片样品的小RNA深度测序

文库构建、测序及原始数据整理：由北京优吉科技有限公司完成。提取41株具有典型病毒病症状

的草莓种苗叶片样品的总 RNA,并使用 Agilent 2100 和 NanoDrop 测定总 RNA 的浓度、完整性和纯度。质量合格的 RNA 样品采用 NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina 构建小 RNA 文库。先后在 3′端和 5′端加上接头,再反转录合成 cDNA。然后用 Qubit 2.0 和实时荧光定量 PCR 对文库的浓度进行定量,并用 Agilent 2100 对文库的插入片段长度(insert size)进行检测。最后,使用 Illumina Hiseq 2000 测序平台对检测合格的小 RNA 文库进行测序。从获得的序列中筛除低质量、长度小于 18 nt 或大于 40 nt、带 polyA 或 polyN 等条件的小 RNA 序列,获得有效数据(clean reads)[11]。使用 PFOR 软件和 Velvet 软件对 clean reads 中的序列进行拼接得到重叠群(contigs),与 NCBI 中的病毒数据库进行 BLASTn 和 BLASTx 比对分析并注释,获得可能存在的病毒序列信息。

对获得的病毒序列信息进行整理分析,初步确定感染病毒的草莓叶片样品,以及可能存在的病毒种类。

1.3.2　RT-PCR 验证小 RNA 深度测序结果

1.3.2.1　草莓组织总 RNA 的提取

参照陈柳等[12]的方法从初步确定感染病毒的草莓叶片样品中提取总 RNA。

1.3.2.2　RT-PCR

上述提取的总 RNA 进行反转录合成 cDNA。以 1.5 μL 的总 RNA 为模板,加入随机引物 (9mer)(50 μmol/L)和 Oligo$(dT)_{18}$ Primer(50 μmol/L)各 0.5 μL,dNTPs(10 mmol/L)2 μL,DEPC 水将体系补至 15.5 μL。65℃水浴 5 min,冰浴 5 min。向体系中加入 5×M-MLV 逆转录反应缓冲液 4 μL,M-MLV 反转录酶(100 U/μL)和 RNase 抑制剂(40 U/μL)各 0.5 μL。42℃ 1 h,70℃ 15 min。合成的 cDNA 于−20℃保存。

根据小 RNA 深度测序确定的病毒种类,利用病毒的特异性引物(表 1)对 cDNA 进行 PCR 扩增。扩增体系:cDNA 模板 2 μL,正向和反向引物(10 mmol/L)各 1 μL,2×*Taq* PCR mix 12.5 μL,DEPC 水将体系补至 25 μL。PCR 扩增程序:94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s,退火 40 s(退火温度见表 1),72℃延伸 60 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 5 min。取 5 μL PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

SMoV[13]、SVBV[14] 和 SMYEV[15] 的特异性引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,分别能扩增出 SMoV RNA1 的 3′端部分非编码区核苷酸序列、SVBV ORF6 部分基因及其 5′ 端非编码区核苷酸序列和 SMYEV 完整的外壳蛋白(coat protein, CP)基因及该基因两端部分非编码区核苷酸序列。

表 1　RT-PCR 检测侵染草莓的 3 种病毒的引物

Table 1　Primers used to detect three viruses infecting strawberry plants by RT-PCR

病毒 Virus	引物 Primer	序列(5′-3′) Sequence	目的片段/bp Product	退火温度/℃ Annealing temperature
草莓斑驳病毒 Strawberry mottle virus	SM6126F1	GGTTTGAAGGAATAGGGTTGTTGG	606	58
	SM6732R1	CAGGTTACTCTAGTACGTCACCAC		
草莓镶脉病毒 Strawberry vein banding virus	SV5508F	TCGGGAAYTTGCAGGWAAAACATAG	1 098	56
	SV6606R	TACTCGTGATTCTCAGGTAGATTGG		
草莓轻型黄边病毒 Strawberry mild yellow edge virus	YT1	CCGCTGCAGTTGTAGGGTA	861	60
	Y2	CATGGCACTCATTGGAGCTGGG		

1.3.3　序列测定和分析比较

取目的条带明亮的 PCR 产物送交北京博迈德基因技术有限公司进行序列测定。测序结果在 NCBI 上与国内外已报道的相关序列进行同源性比对,并利用 MEGA 7.0 的邻接法构建系统发育树。

1.4　病毒检出率计算

统计检测样品中各种病毒的阳性样品数,并计算病毒检出率。病毒检出率=阳性样品数/总检测样品数×100%[16]。

2　结果与分析

2.1　小 RNA 深度测序检测结果

对 41 株具有典型病毒病症状的草莓种苗样品进行小 RNA 深度测序,经质量控制获得 142 945 074 条 clean reads,其中长度为 21、22 nt 和 24 nt 的小 RNA 序列最多,分别占 clean reads 数量的 50.35%、14.17%和 12.13%。与 NCBI 中的病毒数据库比对

结果显示，共有 488 276 条 reads 来自病毒，占 clean reads 数量的 0.34%。

将长度为 18～40 nt 的序列拼接后获得 16 202 个 contigs，经 BLASTn 比对分析表明，有 261 个 contigs 与 SMoV、SVBV 或 SMYEV 的核苷酸序列的一致性较高，未比对到其他植物病毒。其中 51 个 contigs 与 SMoV 核苷酸序列的一致性为 92.59%～100%，184 个 contigs 与 SVBV 核苷酸序列的一致性为 96.67%～100%，26 个 contigs 与 SMYEV 核苷酸序列的一致性为 84.08%～100%。还有 31 个 contigs利用 BLASTn 比对不到结果，使用 BLASTx 比对后显示，31 个 contigs 与 SMoV、SVBV 或 SMYEV 的氨基酸序列具有较高的一致性，也未比对到其他的植物病毒。其中 4 个 contigs 与 SMoV 氨基酸序列的一致性为 95%～100%，1 个 contigs 与 SVBV 氨基酸序列的一致性为 100%，26 个 contigs 与 SMYEV 氨基酸序列的一致性为 90%～100%（表 2）。

表 2　小 RNA 深度测序获得的 contigs 的比对结果

Table 2　Comparison results of contigs obtained by small RNA deep sequencing

病毒种类 Virus	BLASTn 比对到的 contigs 数量/个 Number of contigs received by BLASTn	核苷酸序列一致性 Identity of nucleotide sequences	BLASTx 比对到的 contigs 数量/个 Number of contigs received by BLASTx	氨基酸序列一致性 Identity of amino acid sequences
草莓斑驳病毒　strawberry mottle virus	51	92.59%～100%	4	95%～100%
草莓镶脉病毒　strawberry vein banding virus	184	96.67%～100%	1	100%
草莓轻型黄边病毒　strawberry mild yellow edge virus	26	84.08%～100%	26	90%～100%
合计 Total	261		31	

2.2　RT-PCR 检测结果

利用 SMoV、SVBV 和 SMYEV 的特异性引物对 41 株草莓种苗样品进行 RT-PCR 检测，并用 DNAMAN 和 MEGA 7.0 对获得的 3 种病毒分离物进一步分析，以验证小 RNA 深度测序结果的可靠性。结果表明，17 份样品中检测到这 3 种病毒，总检出率为 41.5%，SMoV、SVBV 和 SMYEV 的检出率分别为 34.1%、24.4%和 2.4%（表 3）。

表 3　不同省市草莓种苗 3 种病毒的 RT-PCR 检测[1)]

Table 3　Detection results of three viruses in strawberry seedlings from some provinces of China by RT-PCR

产地 Origin	品种 Cultivar	样品数 Sample number	阴性样品数 Number of negative samples	病毒种类 Virus			病毒检出率/% Positive rate of virus
				SMoV	SVBV	SMYEV	
北京　Beijing	白雪公主	1	1	—	—	—	0.0
北京　Beijing	隋珠	4	4	—	—	—	0.0
河北　Hebei	光点	2	2	—	—	—	0.0
河北　Hebei	红颜	4	2	2	1	—	50.0
河北　Hebei	圣诞红	2	2	—	—	—	0.0
辽宁　Liaoning	红颜	10	0	8	8	1	100.0
内蒙古　Inner Mongolia	红颜	2	2	—	—	—	0.0
陕西　Shaanxi	红颜	2	1	—	1	—	50.0
四川　Sichuan	红颜	10	6	4	—	—	40.0
云南　Yunnan	圣诞红	4	4	—	—	—	0.0
总计　Total		41	24	14	10	1	41.5

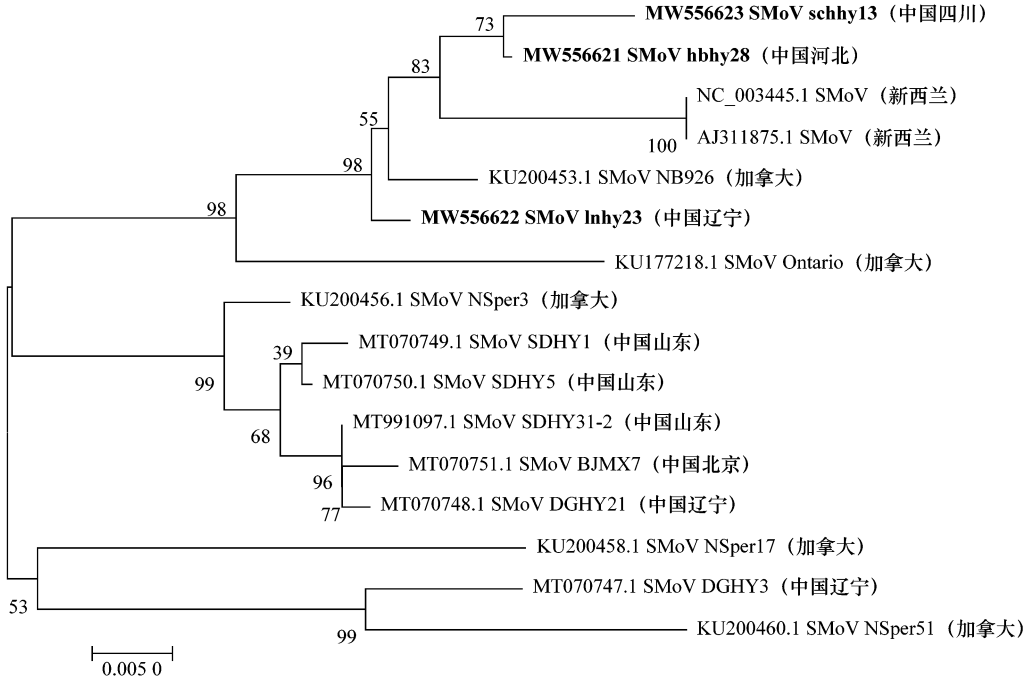
1）—代表未检测到病毒。

— indicates no virus detected in strawberry samples.

2.2.1　SMoV 不同分离物的序列分析

利用 SMoV 特异性引物 SM6126F1/SM6732R1 进行 RT-PCR 检测，可以扩增出约 606 bp 的目的片段，包含 RNA1 3′端非编码区部分核苷酸序列。根据草莓种苗产地不同，选取不同阳性样品进行序列测定，获得 SMoV 四川分离物 schhy13、辽宁分离物 lnhy23 和河北分离物 hbhy28 的序列，GenBank 登录号分别为 MW556623、MW556622 和 MW556621。利用 DNAMAN 进行序列比对分析，3 个 SMoV 分离物的核苷酸序列一致性为 98.12%～99.34%。与

GenBank 上已报道的核苷酸序列进行比对和系统进化分析表明,四川分离物 schhy13、辽宁分离物 lnhy23 和河北分离物 hbhy28 与加拿大分离物 NB926 序列(GenBank 登录号:KU200453.1)的一致性较高,分别为 97.68%、99.14%和 98.19%;四川分离物 schhy13 和河北分离物 hbhy28 亲缘关系较近,与辽宁分离物 lnhy23 亲缘关系较远,形成两个独立的小分支(图 1)。



进化树中分支点上的数字为bootstrap检验的支持百分率; 标尺表示0.5%的序列进化差异。粗体字为本研究获得的分离物。下同
Values on branches indicate percentage of support out of 1 000 bootstrap replications. The scale bar represents 0.5% sequence variance. The isolates obtained in this study are bolded. The same applies below

图 1　SMoV 不同国家或地区分离物部分 RNA1 3′端非编码区核苷酸序列系统进化树

Fig. 1　Phylogenetic tree of SMoV isolates from different countries or areas based on the available partial 3′UTR nucleotide sequences of RNA1

2.2.2　SVBV 不同分离物的序列分析

利用 SVBV 特异性引物 SV5508F/SV6606R 进行 RT-PCR 检测,可以扩增出 SVBV 约 1 098 bp 的目的片段,包含 ORF6 部分基因及其 5′端非编码区的核苷酸序列。根据草莓种苗产地不同,选取不同地区草莓种苗阳性样品进行序列扩增,获得 SVBV 辽宁分离物 lnhy15、lnhy17、lnhy24、河北分离物 hbhy28 和陕西分离物 shaxhy35,GenBank 登录号分别为 MW556618、MW556617、MW556616、MW556619 和 MW556615。利用 DNAMAN 进行序列比对分析,5 个 SVBV 分离物的部分 ORF6 基因序列一致性为 97.98%～99.8%。与 GenBank 上已报道的基因序列比对分析,辽宁分离物 lnhy15 和 lnhy17 与北京分离物 BJ1(GenBank 登录号:KT250632.1)的核苷酸序列一致性分别为 99.01%和 99.42%;辽宁分离物 lnhy24 和河北分离物 hbhy28 与北京分离物 BJHXTX1(GenBank 登录号:MF197916.1)的核苷酸序列一致性分别为 99.36%和 99.44%;陕西分离物 shaxhy35 与贵州分离物 GZ(GenBank 登录号:MH894295.1)的核苷酸序列一致性为 99.52%。系统进化树分析结果如图 2 所示,辽宁分离物 lnhy15、lnhy17、lnhy24 和河北分离物 hbhy28 亲缘关系较近,与陕西分离物 shaxhy35 亲缘关系较远,均与中国不同省市的分离物有较近的亲缘关系,而与美国和加拿大分离物亲缘关系较远。

2.2.3　SMYEV 不同分离物的序列分析

利用 SMYEV 特异性引物 YT1/Y2 进行 RT-PCR 检测,可以扩增出 SMYEV 约 861 bp 的目的片段,包含完整的 *CP* 基因及该基因两端部分非编码区核苷酸序列[17]。仅获得 1 个辽宁分离物 lnhy26 的序列(GenBank 登录号:MW556620),与 Gen-

Bank 的 SMYEV *CP* 基因进行序列比对和系统进化树分析，该分离物与中国甘肃分离物 sy02（GenBank 登录号：EU107084.1）的核苷酸序列一致性为 99.02%，且亲缘关系较近（图 3）。

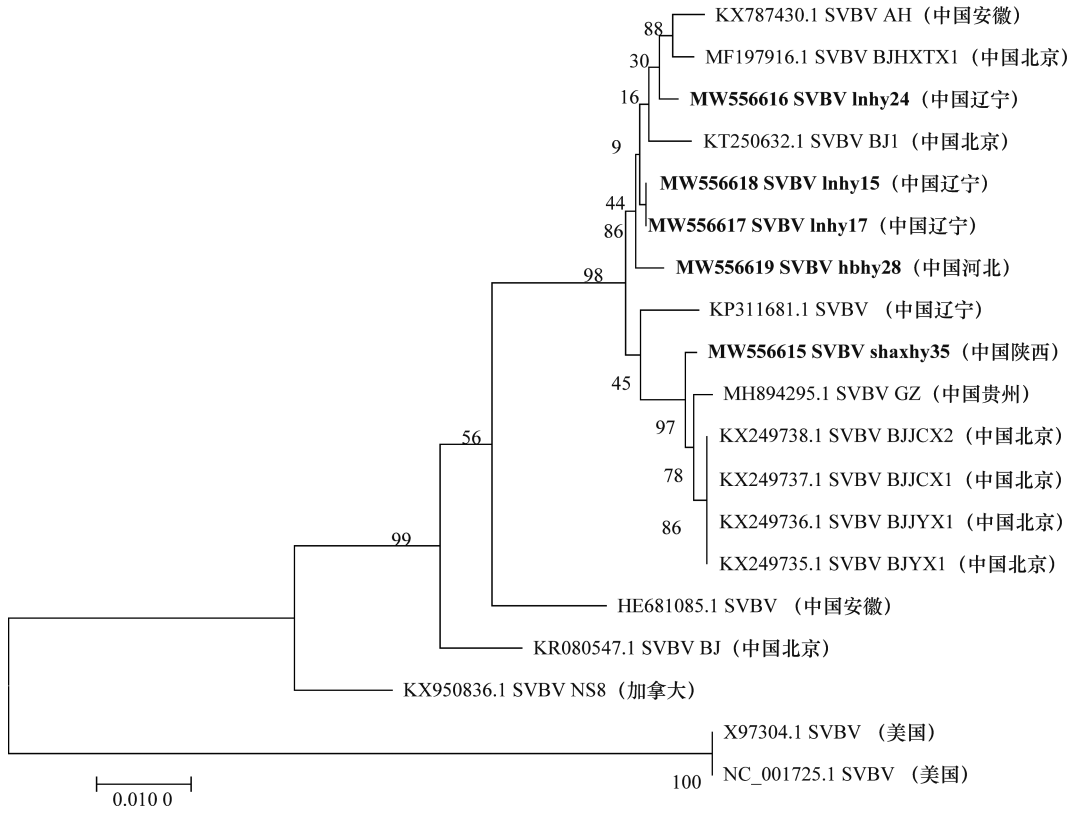


图 2　SVBV 不同国家或地区分离物部分 ORF6 基因序列系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of SVBV isolates from different countries or areas based on the available partial ORF6 gene nucleotide sequences

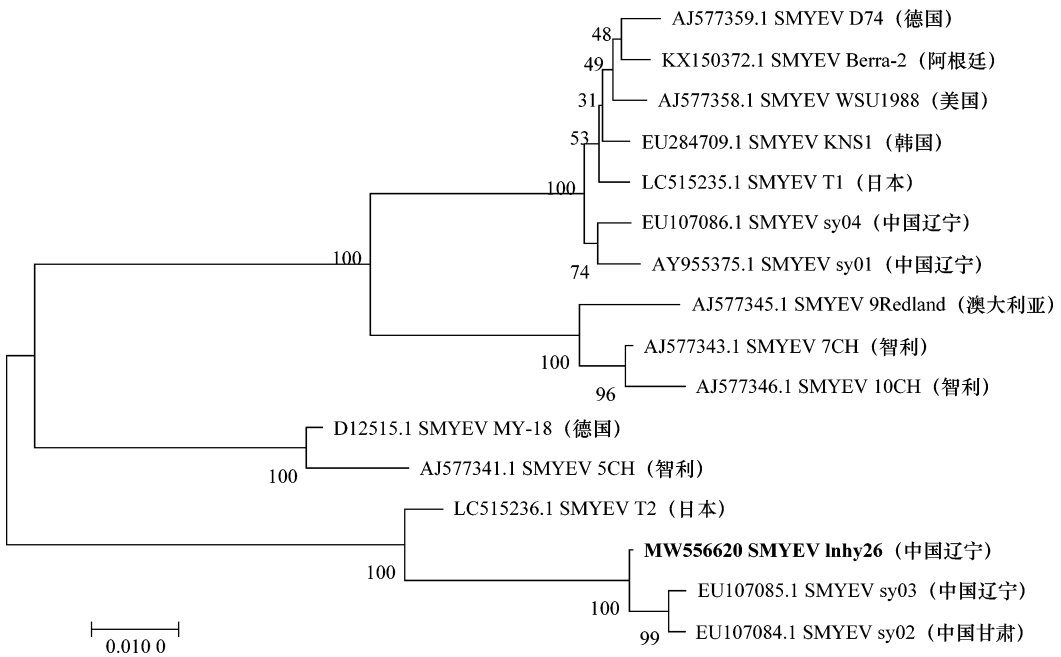


图 3　SMYEV 不同国家或地区分离物 *CP* 基因序列的系统进化树

Fig. 3　Phylogenetic tree of SMYEV isolates from different countries or areas based on the available coat protein gene nucleotide sequences

2.3　草莓病毒病典型症状

经小 RNA 深度测序和 RT-PCR 检测不同地区草莓种苗的病毒侵染情况,结合表 4 中的田间症状调查结果表明,病毒单独侵染或 2～3 种病毒复合侵染时,草莓植株可表现出单一症状,也可同时表现出多种症状。被同一种病毒单独侵染的草莓植株表现出的症状也略有不同。主要症状如下:

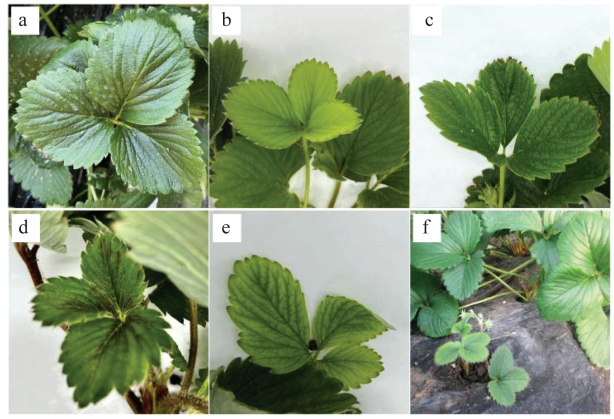
叶片畸形:叶片皱缩;三出复叶的 1～2 片小叶生长较小(图 4b-d)。

叶片变色:叶片呈不同程度的斑驳、镶脉或褪绿;叶脉变黑(图 4b-f)。

植株矮化:株高较矮、叶片较小;叶柄细;长势弱(图 4f)。

2.4　不同产地草莓种苗感染病毒的情况

对北京、河北、内蒙古、四川、辽宁、云南和陕西共 7 个省(市、自治区)生产的草莓种苗病毒病进行调查和检测,结果如表 3 所示。辽宁草莓种苗受病毒危害最为严重,病毒检出率高达 100.0%,陕西、四川和河北种苗的检出率分别为 50.0%、40.0%和 25.0%,而北京、内蒙古和云南的草莓种苗未检测到病毒。



a: 叶片正常; b: 叶片畸形、斑驳; c: 叶片畸形、褪绿; d: 叶片畸形、镶脉; e: 叶脉变黑; f: 植株矮化、叶片斑驳
a: Healthy leaves; b: Leaf shrinkage and mottle; c: Leaf shrinkage and chlorosis; d: Leaf shrinkage and vein banding; e: Vein blacking; f: Dwarf and leaf mottle

图 4　田间草莓种苗感染病毒的症状

Fig. 4　Symptoms on strawberry seedlings infected by viruses in the field

表 4　不同省市草莓种苗病毒阳性样品的田间症状

Table 4　Symptoms on strawberry seedlings infected by viruses from different provinces of China in the field

小 RNA 深度测序样品编号 Sample No. for small RNA deep sequencing	产地 Origin	品种 Cultivar	症状 Symptom	病毒种类 Virus
11	四川	红颜	矮化	SMoV
12	四川	红颜	斑驳、矮化	SMoV
13	四川	红颜	斑驳、矮化	SMoV
14	四川	红颜	褪绿、矮化、长势弱	SMoV
15	辽宁	红颜	镶脉、矮化、三出复叶的 1 片侧叶生长较小	SMoV、SVBV
16	辽宁	红颜	褪绿、皱缩、长势弱	SMoV
17	辽宁	红颜	斑驳、皱缩、矮化	SMoV、SVBV
18	辽宁	红颜	斑驳	SMoV、SVBV
19	辽宁	红颜	斑驳、皱缩	SMoV、SVBV
20	河北	红颜	矮化	SMoV
22	辽宁	红颜	矮化	SVBV
23	辽宁	红颜	褪绿、斑驳、矮化	SMoV、SVBV
24	辽宁	红颜	矮化	SVBV
25	辽宁	红颜	矮化、叶柄细	SMoV
26	辽宁	红颜	斑驳、矮化	SMoV、SVBV、SMYEV
28	河北	红颜	矮化	SMoV、SVBV
35	陕西	红颜	褪绿、三出复叶的 1～2 片叶生长较小	SVBV

不同省市的草莓种苗检出病毒的种类也略有不同。调查结果显示,四川、辽宁和河北的草莓种苗中检出 SMoV,辽宁、河北和陕西的种苗中检出 SVBV,仅辽宁的种苗中检出 SMYEV。病毒复合侵染发生较为严重,占总检出率的 41.2%。辽宁和河北的草莓种苗中检出 SMoV 和 SVBV 两种病毒复合侵染,仅在 1 株辽宁草莓种苗中检出 3 种病毒复合侵染。

对不同省市的‘红颜’‘白雪公主’‘隋珠’‘光点’和‘圣诞红’5 个草莓品种调查发现,17 个病毒阳性

样品的品种均为‘红颜’，而‘白雪公主’‘隋珠’‘光点’和‘圣诞红’均未检出病毒。

3 讨论

小 RNA 深度测序技术的出现提高了植物病毒病病原学的研究能力，该技术的原理是将植物被病毒侵染产生的源于病毒的特异小 RNA 分子序列进行拼接，以此来鉴定病毒种类[18]。此技术可快速、灵敏、全面检测植物体内已知和未知病毒的核酸分子，被广泛用于农作物、药用、园林和园艺植物病毒病的检测和鉴定[11,18-22]。但是，它用于单个样品的检测成本较高，也无法确定混合样品中感染病毒的具体样品，还会因较短的小 RNA 分子序列使比对结果产生一定程度的误判。因此，仍需要结合 ELISA 和 RT-PCR 等检测方法进行使用[23]。

本研究对来源于北京、河北、辽宁、内蒙古、陕西、四川和云南共 7 个省(市、自治区)的草莓种苗进行小 RNA 深度测序和生物信息学分析，并利用病毒特异性引物对检测结果进行 RT-PCR 验证。结果表明，侵染我国草莓种苗的病毒主要是 SMoV、SVBV 和 SMYEV，且存在 2 种病毒和 3 种病毒复合侵染的情况。SMoV 不同分离物的大外壳蛋白(large coat protein，CPL)基因和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase，RdRP)基因序列具有较大的差异，而 3′非编码区的核苷酸序列较保守[24]。因此，测定了 SMoV 的 RNA1 3′端非编码区部分核苷酸序列。经系统进化树分析，本文获得的 SMoV 四川分离物 schhy13 和河北分离物 hbhy28 与辽宁分离物 lnhy23 形成了两个不同的分支。SVBV 中国不同分离物的核苷酸序列保守性相对较高，且 ORF6 编码的蛋白与寄主范围和症状表现有关[5,14]。因此，测定了不同省市 SVBV 分离物 ORF6 的部分基因序列。本文获得的 5 个 SVBV 分离物与 GenBank 中已登录的中国分离物形成一个独立的组群，与美国和加拿大分离物亲缘关系较远。上述 SMoV 和 SVBV 的分组差异可能与地理起源有关[24]。另外，仅在一个来自辽宁的样品中检测到 SMYEV，通过测定其完整的 *CP* 基因及该基因两端部分非编码区核苷酸序列，SMYEV 辽宁分离物 lnhy26 的 *CP* 基因序列可能是与中国甘肃分离物 sy02 同属一个组群的新株系类型[6]。

被病毒单独侵染或 2～3 种病毒复合侵染的草莓植株可单独或同时表现出叶片畸形、叶片变色和植株矮化等症状，调查表明田间草莓植株表现出的症状与感染病毒的种类关系不明确。此现象的产生可能是病毒不同株系侵染后的症状略有不同；也可能是 RT-PCR 无法检出含量过低的病毒，使得检测结果不够准确；或是与水肥、药害、机械损伤等非病毒因素共同危害产生的[1,25]。在后续的研究中，可结合实时荧光定量 PCR 检测技术提高检测效率，使检测结果更加准确[1,26-27]。

不同省市的草莓种苗病毒检出情况差异显著，在四川、辽宁、河北和陕西种苗中检出病毒，而北京、内蒙古和云南种苗中未检出。其中，辽宁种苗的病毒检出率最高、病毒种类最多，可能与辽宁发展草莓种植业的时间早、规模大有关[28]。对不同品种进行病毒检测，仅在‘红颜’中检出病毒，而‘白雪公主’‘隋珠’‘光点’和‘圣诞红’均未检出。可能是‘红颜’作为重要的推广品种，因种植时间长、种植范围广导致病毒病发生严重[29]。本研究对不同产地草莓种苗检测的品种种类和数量不同，也可能对检测结果产生影响，今后会增加检测数量，进一步明确我国不同省市草莓种苗病毒病发生情况。

参考文献

[1] 王佳，周宇，祝宁，等. 我国部分省市草莓种苗中黄瓜花叶病毒的检测分析[J]. 植物病理学报，2020，50(6)：649－656.

[2] 联合国粮食及农业组织. 粮食和农业数据[EB/OL]. [2021－01－30] http://www.fao.org/faostat/zh/#data/QC.

[3] 杨肖芳，苗立祥，张豫超，等. 浙江省红颜草莓镶脉病毒(SVBV)的调查与茎尖脱毒技术研究[J]. 核农学报，2015，29(9)：1694－1700.

[4] 王丽红，马俊文，肖红，等. 北方保护地草莓病害防治措施[J]. 中国果菜，2019，39(12)：95－98.

[5] 尚巧霞. 介体传播的草莓病毒研究进展[J]. 植物保护学报，2015，42(4)：488－496.

[6] 杨洪一，代红艳，李丽丽，等. 草莓轻型黄边病毒 3′末端序列多态性研究[J]. 植物病理学报，2008，38(1)：96－99.

[7] CHEN Liu, SHANG Qiaoxia, CHEN Xiaoyu, et al. First report on the occurrence of cucumber mosaic virus on *Fragaria ananassa* in China [J]. Plant Disease, 2014, 98(7): 1015.

[8] DING Xinlun, CHEN Dao, WANG Aiming, et al. First report of strawberry pallidosis-associated virus on strawberry in China [J]. Plant Disease, 2017, 101(12): 2154.

(下转 241 页)

and Engineering，2019，7(20)：17406－17413.

[29] 闫硕，沈杰. 纳米技术在害虫绿色防控领域的应用与展望[J]. 应用昆虫学报，2019，56(4)：617－624.

[30] YAN Shuo，CHENG Wenyu，HAN Zehua，et al. Nanometerization of thiamethoxam by a cationic star polymer nanocarrier efficiently enhances the contact and plant-uptake dependent stomach toxicity against green peach aphids [J]. Pest Management Science，2020，77(4)：1954－1962.

[31] WANG Xiaodan，ZHENG Kangkai，CHENG Wenyu，et al. Field application of star-polymer-delivered chitosan to amplify plant defense against potato late blight [J/OL]. Chemical Engineering Journal，417：129327. DOI:10.1016/j.cej.2021.129327.

[32] ZHENG Yang，HU Yiseng，YAN Shuo，et al. A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines* [J]. Pest Management Science，2019，75(7)：1993－1999.

[33] YAN Shuo，QIAN Jin，CAI Chong，et al. Spray method application of transdermal dsRNA delivery system for efficient gene silencing and pest control on soybean aphid *Aphis glycines* [J]. Journal of Pest Science，2020，93(1)：449－459.

[34] YAN Shuo，REN Binyuan，ZENG Bo，et al. Improving RNAi efficiency for pest control in crop species [J]. BioTechniques，2020，68(5)：283－290.

[35] YAN Shuo，REN Binyuan，SHEN Jie. Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system：a promising approach for sustainable pest management [J]. Insect Science，2021，28(1)：21－34.

[36] 徐红星，郑许松，田俊策，等. 我国水稻害虫绿色防控技术的研究进展与应用现状[J]. 植物保护学报，2017，44(6)：925－939.

（责任编辑：田　喆）

（上接 232 页）

[9] 汤亚飞，裴凡，李正刚，等. 基于小 RNA 深度测序技术鉴定侵染广东辣椒的病毒种类[J]. 中国农业科学，2019，52(13)：2256－2267.

[10] 谢雪花. 小 RNA 深度测序鉴定草莓病毒的研究及草莓快繁体系的优化[D]. 长沙：湖南农业大学，2016.

[11] LIU Qili，LI Yongqiang，SONG Puwen，et al. Diversity of viruses infecting sweet potato in Beijing based on small RNA deep sequencing and PCR or RT-PCR detection [J]. Journal of General Plant Pathology，2020，86：283－289.

[12] 陈柳，邢冬梅，刘正雄，等. 京郊设施蔬菜黄瓜花叶病毒的检测[J]. 中国农学通报，2015，31(20)：82－85.

[13] 褚明昕，魏然，席昕，等. 北京地区不同草莓品种 5 种主要病毒的检测[C]//彭友良，李向东. 中国植物病理学会 2017 年学术年会论文集. 北京：中国农业科技出版社，2017：217.

[14] 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.

[15] THOMPSON J R，JELKMANN W. Strain diversity and conserved genome elements in strawberry mild yellow edge virus [J]. Archives of Virology，2004，149(10)：1897－1909.

[16] 王佳，崔高峰，祝宁，等. 北京地区设施草莓 8 种病毒的酶联免疫吸附测定检测[J]. 微生物学通报，2021，48(3)：1048－1056.

[17] 陈柳，冉策，尚巧霞，等. 草莓轻型黄边病毒北京分离物的 *CP* 基因序列分析[J]. 中国农学通报，2015，31(3)：229－233.

[18] 范旭东，董雅凤，张尊平，等. ‘阳光玫瑰’葡萄病毒小 RNA 测序鉴定及 RT-PCR 检测[J]. 植物病理学报，2019，49(6)：749－755.

[19] 钱亚娟，徐毅，周琦，等. 利用深度测序技术发掘植物病毒资源[J]. 中国科学：生命科学，2014，44(4)：351－363.

[20] 崔丽艳，庞小静，齐永红，等. 利用小 RNA 深度测序技术鉴定半夏病毒病病原[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2018，34(12)：1334－1341.

[21] 苏秀，徐毅，陈莎，等. 利用小 RNA 深度测序和组装技术鉴定紫藤花叶病病原[J]. 植物病理学报，2015，45(1)：88－92.

[22] HE Yan，YANG Zuokun，HONG Ni，et al. Deep sequencing reveals a novel closterovirus associated with wild rose leaf rosette disease [J]. Molecular Plant Pathology，2015，16(5)：449－458.

[23] 刘晓璇，李威霖，张彤，等. 番茄斑驳花叶病毒海南分离物全基因组序列分析[J]. 热带作物学报，2019，40(1)：139－144.

[24] 杨洪一，李丽丽，代红艳，等. 草莓斑驳病毒分子变异及 PCR 检测技术研究[J]. 中国农业科学，2008，41(7)：1983－1988.

[25] MRAZ I，PETRZIK K，FRÁNOVÁ－HONETSLEGROVÁ J，et al. Detection of strawberry vein banding virus by polymerase chain reaction and dot blot hybridization [J]. Acta Virologica，1997，41(4)：241－242.

[26] 苗立祥，荣宁宁，张豫超，等. 实时荧光定量 PCR 法检测草莓镶脉病毒[J]. 浙江农业学报，2016，28(6)：1030－1036.

[27] 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.

[28] 王玉坤，张放，祝庭耀. 国内草莓生产现状与发展趋势[J]. 北方园艺，2003(6)：6－7.

[29] 常琳琳，董静，钟传飞，等. 中国育成草莓品种的系谱分析[J]. 果树学报，2018，35(2)：158－167.

（责任编辑：田　喆）