

蓝莓休克病毒的 RT-PCR 快速检测方法建立

谢丽雪¹, 蔡伟², 郑姍¹, 张立杰¹, 张小艳¹, 李韬¹

(1. 福建省农业科学院 果树研究所, 福建 福州 350013; 2. 福清出入境检验检疫局, 福建 福清 350001)

摘要:以蓝莓叶片为试材, 提取病毒 RNA, 根据已报道的蓝莓休克病毒(Blueberry shock virus, BShV)外壳蛋白基因序列设计特异性引物, 建立 RT-PCR 快速检测方法, 并对采集的 20 份疑似病例进行检测。结果表明:建立的 RT-PCR 方法具有良好的特异性和较高的灵敏度。仅从感染 BShV 的样品中扩增出与预期大小相符的特异性目的片段, 而从其它蓝莓病毒及健康样品中未扩增到目的片段;该方法能检测到 RNA 原液的 10^{-4} 倍稀释液, 灵敏度较高。疑似病例检测结果与 ELISA 验证结果完全相符。试验表明, 建立的 RT-PCR 方法能够用于 BShV 的现地检测。

关键词:蓝莓休克病毒; RT-PCR; 快速检测

中图分类号:S 432.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)20-0098-04

病毒病是蓝莓生产上的主要病害之一, 目前已报道的病毒主要包括蓝莓休克病毒(Blueberry shock virus, BShV)、蓝莓焦枯病毒(Blueberry scorch virus, BScV)、蓝莓带化病毒(Blueberry shoestring virus, BSSV)、蓝莓叶斑驳病毒(Blueberry leaf mottle virus, BLMoV)、蓝莓红环斑病毒(Blueberry red ringspot virus, BRRV)、烟草环斑病毒(Tobacco ringspot virus, TRSV)、番茄环斑病毒(Tomato ringspot virus, ToRSV)等^[1-7]。其中, 蓝莓休克病毒(BShV)属雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)等轴不稳环斑病毒属(*Ilarvirus*)成员, 最早于 1987 年在美国的 Highbush blueberry(*Vaccinium corymbosum* L.) 上被发

现^[1]。BShV 现主要分布于美国的加利福尼亚、宾夕法尼亚州、纽约州、密歇根州和加拿大的新斯科舍省^[8-9], 该病毒基因组为 +ssRNA, 全长 9 650 bp, 病毒粒子呈等轴对称球状, 直径约 27 nm。已报道的 BShV 的自然寄主为蓝莓, 人工侵染寄主有本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)、克利夫兰烟(*Nicotiana clelandii*)、林烟草(*Nicotiana sylvestris*)和普通烟草(*Nicotiana tabacum*)。BShV 侵染蓝莓后引起的主要症状是开花期时花和叶片的突然完全坏死, 但之后除引起不结果外叶片仍会长出。受 BShV 侵染的蓝莓通常在 1~4 年内表现症状, 随之逐渐恢复并隐症。BShV 几乎侵染所有的蓝莓品种, 并表现相似的症状。据统计, BShV 侵染蓝莓造成的损失达 34%~90%, 损失大小与症状严重程度直接相关, 且不同年份之间存在差异^[9-10]。BShV 可通过蜜蜂携带感染的花粉传播, 因此在田间扩散速度相对较快^[11]。

我国从 1983 年由吉林农业大学引种蓝莓栽培, 至 2000 年建立基地开始蓝莓产业化种植^[12-13]。由于我国蓝莓产业处于起步阶段, 蓝莓病虫害的相关报道较少, 仅辽宁、山东、上海等地已对蓝莓的病虫害做了相关的调查^[14-17], 但未见休克病的相关研究报道。课题组在

第一作者简介:谢丽雪(1981-), 女, 福建厦门人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为果树遗传育种及病害。E-mail: sarah614510@126.com

责任作者:李韬(1969-), 男, 本科, 副研究员, 研究方向为果树遗传育种及病害。E-mail: leetao06@163.com

基金项目:福建省公益类科研院所专项资助项目(2015R1101018-13); 福建省种业创新与产业化工程资助项目(2014S1477-22); 福州市科技计划资助项目(2013-N-54); 福建省农业科学院导师制基金资助项目(2013DQB-9)。

收稿日期:2015-06-04

Abstract: To ensure the stability of ISSR for *Prunus mira koehne* Kov et. Kpst, total genomic DNA was extracted by improved CTAB method, the factors including template DNA concentration, $MgCl_2$ concentration, dNTPs concentration, *Taq* polymorphism dose and primer concentration were studied to establish optimized ISSR reaction system. The result showed that template concentration 40 ng/ μ L, primer concentration 0.4 μ mol/L, Mg^{2+} concentration 2.5 mmol/L, enzyme concentration 0.5 U, dNTPs concentration 0.5 mmol/L were the optimized reaction system. The study would provide the foundation for the genetic diversity on germplasm resources of *Prunus mira koehne* Kov et. Kpst.

Keywords: *Prunus mira koehne* Kov et. Kpst; ISSR; system optimization

2012—2013 年间对福建省蓝莓病害调查中发现蓝莓休克病疑似病例,为此,根据 GenBank 上已报道的 BLSHV 外壳蛋白基因序列,设计特异性引物,研究并建立快速、有效的 RT-PCR 检测方法,对福建蓝莓休克病发生情况进行分析,旨在该病毒的防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试毒源蓝莓休克病毒(BLSHV)、蓝莓焦枯病毒(BLScV)、蓝莓带化病毒(BSSV)、蓝莓叶斑驳病毒(BLMoV)、烟草环斑病毒(TRSV)、番茄环斑病毒(ToRSV)由果树所生理分子生物学实验室保存,蓝莓样品采集于福建福州。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;RT 试剂购自 Promega 公司;PCR 试剂购自 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计与合成 根据已报道的蓝莓休克病毒(BLSHV)外壳蛋白基因序列设计 1 对特异性引物,其中正向引物 BLSHV-f:5'-CCCCAAAGGATAAACAGGTCCA-3',反向引物 BLSHV-r:5'-TCACCACGTACAAATCCCT-3',预期扩增的片段大小为 450 bp。

1.2.2 总 RNA 提取 取 0.1 g 蓝莓叶片,液氮研磨成粉末状后置于 1.5 mL 离心管,加入 1 mL Trizol 试剂,剧烈振荡后室温下静置 5 min;4℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清;加入氯仿 300 μ L,猛烈震荡 15 s,室温下静置 5 min;4℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min,小心吸取上层水相;加入等体积异丙醇,颠倒混匀后室温下静置 15 min;4℃ 下 1 2000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入 1 mL 75%冷乙醇洗涤沉淀,4℃ 下 7 500 r/min 离心 3 min,弃上清,重复 2 次;沉淀充分干燥后,DEPC-H₂O 溶解沉淀。

1.2.3 RT-PCR 取 3 μ L RNA,加入反向引物 BLSHV-r 1 μ L、ddH₂O 7 μ L,70℃ 水浴 10 min 后迅速冰浴 5 min,再加入 5 \times M-MuLV 反转录酶缓冲液 5 μ L、dNTPs (10 mmol/L)2 μ L、RNasin(40 U/ μ L)1 μ L、M-MuLV 反转录酶(200 U/ μ L)1 μ L。经 42℃ 1 h、70℃ 10 min 合成 cDNA。PCR 扩增采用 25 μ L 反应体系:10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ free)2.5 μ L, BLSHV-f(10 μ mol/L)1 μ L, BLSHV-r (10 μ mol/L)1 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L)2 μ L, dNTPs (10 mmol/L)0.5 μ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 15.5 μ L。PCR 反应程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 45 s,72℃ 1 min,35 个循环,最后一轮循环后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统记录结果。

1.2.4 序列测定及分析 PCR 扩增产物纯化后,连接到 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 后,挑取阳性克隆进行测序。所测序列应用 BLAST 程序进行同源性比

较分析。序列测定由上海生物工程技术服务有限公司完成。

1.2.5 特异性测定 分别提取 BLSHV、BLScV、BSSV、BLMoV、TRSV、ToRSV 样品 RNA,按照建立的 RT-PCR 方法进行特异性测定。

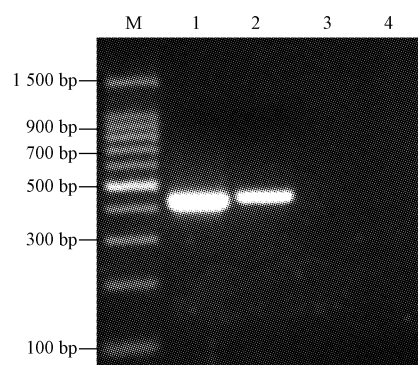
1.2.6 灵敏度测定 选取 BLSHV 阳性样品,提取 RNA 后进行 10 倍系列稀释,对建立的 RT-PCR 方法进行灵敏度测定。

1.2.7 蓝莓样品的检测 利用建立的 RT-PCR 方法对田间采集的样品(10 份为国外进口的蓝莓品种,10 份为国内蓝莓品种)进行检测,检测结果同时用 ELISA(Agdia)方法验证。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增

利用设计的特异性引物对(BLSHV-f/BLSHV-r),以蓝莓样品中提取的总 RNA 为模板,根据优化后的反应体系和程序进行 RT-PCR。由图 1 可知,从感染 BLSHV 的样品上扩增到预期大小的目的片段(450 bp),而从健康样品和空白对照中均未扩增出特异性目的片段。



注:M,DL 1 500 Marker;1,阳性对照;2,感病样品;3,阴性对照;4,空白对照。

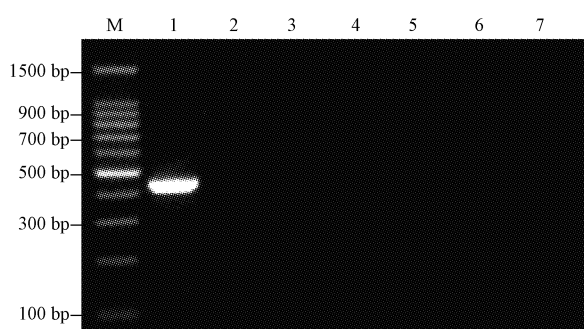
Note:M,DL 1 500 Marker;1, positive control;2, infected sample;3, negative control;4, blank control.

图 1 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification result of RT-PCR

2.2 特异性测定结果

由图 2 可知,建立的 RT-PCR 方法仅能从感染 BLSHV 的蓝莓样品上扩增出特异性目的片段,而从 BLScV、BSSV、BLMoV、TRSV 和 ToRSV 5 个病毒样品及健康样品上未扩增出特异性目的片段。为进一步验证检测结果的准确性,将 BLSHV 的 RT-PCR 产物回收后进行克隆、测序。序列测定和比对结果发现,该特异性目的片段长度为 450 bp(图 3),与预期大小相符,与 GenBank 上已报道的 BLSHV 序列一致性达 97%。上述结果证实设计的引物可特异性检测 BLSHV,该 RT-PCR



注: M, DL 1 500 Marker; 1. BlShV; 2. BLScV; 3. BSSV; 4. BLMoV; 5. TRSV; 6. ToRSV; 7. 阴性对照。

Note: M, DL 1 500 Marker; 1. BlShV; 2. BLScV; 3. BSSV; 4. BLMoV; 5. TRSV; 6. ToRSV; 7. Negative control.

图2 RT-PCR 特异性测定结果

Fig. 2 Specificity result of RT-PCR

```

CCCCAAAGGATAAAACAGGTCGAAAAGAGGACCGATTGGACCGTGATAGGTCCGAACG
TCCAACCTGTGAACCATCCATATGGGTTACCTTGAGGTCGTGTGCGGATGTTCAAGCG
ACGGATGCAGGGAAATTCCTGCACATCAACTTCAAGACCGCCTTCCCACAACCTCCTGA
ATGAGGAGTTGAAGATTTATTTCTTTTGGCGTCAGATGTAGTACATCGATCGGTAATGGTT
GGGTGGGGTTGGTTAGAGGATTTAATCCCTGGAGCCCGACTGGTCCTGCTGTCCTTACC
GGAATAGGGTTTCTTAAGGATCAGGCCAGACGATGGCAGTGGCTTGCGCCATCCGATT
TCGAGTACGATAAGTTCTCCGAAGAATACGATTTAGTATTTCGAATTTAAGTCTGACTACC
CGATACCGGTCGTCATGACTAGGGATTTGTACGTGGTGA

```

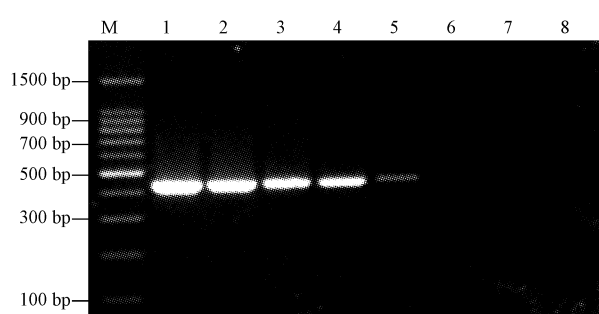
图3 RT-PCR 产物序列测定结果

Fig. 3 Result of DNA sequence analysis of BlShV RT-PCR product

方法具有良好的特异性。

2.3 灵敏度测定结果

将10倍系列稀释的BlShV阳性样品RNA反转录后,进行PCR。结果表明,建立的RT-PCR方法最低能够检测到稀释 10^{-4} 倍的RNA样品(图4)。



注: M, DL1 500 Marker; 1. RNA 原液; 2. 10^{-1} 倍; 3. 10^{-2} 倍; 4. 10^{-3} 倍; 5. 10^{-4} 倍; 6. 10^{-5} 倍; 7. 10^{-6} 倍; 8. 10^{-7} 倍。

Note: M, DL1 500 Marker; 1. Original RNA; 2. 10^{-1} dilution; 3. 10^{-2} dilution; 4. 10^{-3} dilution; 5. 10^{-4} dilution; 6. 10^{-5} dilution; 7. 10^{-6} dilution; 8. 10^{-7} dilution.

图4 RT-PCR 灵敏度测定结果

Fig. 4 Sensitivity result of RT-PCR

2.4 蓝莓样品的检测

应用建立的RT-PCR方法对采集的20份疑似感染BlShV蓝莓样品进行检测,结果从3份国外蓝莓样品上

扩增到特异性的目的片段,而从其余本地蓝莓样品上未扩增到特异性的目的片段。上述结果与ELISA验证检测结果完全相符。

3 结论与讨论

随着蓝莓栽培面积的扩大,病虫害种类及危害程度越发严重。阿根廷采用生物防治控制金龟子类地下害虫,智利利用堆肥浸出液防治银叶病^[18],均取得良好效果,为我国蓝莓的病虫害防治提供了借鉴。蓝莓休克病毒(BlShV)作为危害蓝莓较为严重的病毒,到目前为止,尚鲜见我国蓝莓种植区发生该病害的报道,仅迟福梅等^[19]在美国蓝莓病毒病介绍中有所描述。该病毒对蓝莓的产量和品质造成较大的影响,因此有效预防和控制该病毒的发生和传播,对于我国蓝莓的安全生产有着重要的意义。

目前,BlShV检测的常规方法是血清学ELISA检测技术,但ELISA方法检测BlShV灵敏度、稳定性不足,存在假阴性或假阳性的可能。国内没有BlShV商品化检测试剂盒,国外试剂昂贵及到货周期长制约了我国蓝莓休克病病原检测及相关研究。为此,该研究针对BlShV设计特异性引物,建立快速准确的RT-PCR方法。PCR扩增结果表明,设计的引物具有良好的特异性,可将该病毒与其它5种病毒区分;通过RT-PCR产物的序列测定、比对和ELISA检测,进一步验证了检测结果

的准确性。

该研究仅针对 BISHV 建立了 RT-PCR 检测方法,采集的田间样品数量少,下一步拟在福建省各主要蓝莓产区开展 BISHV 调查检测,为该病害的防控提供依据,同时是针对不同蓝莓病毒建立相关快速分子检测体系及多重 PCR 检测方法,为进出口蓝莓病毒检疫鉴定、我国蓝莓产业发展服务。

参考文献

- [1] MACDONALD S G, MARTIN R R, BRISTOW P R. Characterization of an ilarvirus associated with a necrotic shock reaction in blueberry[J]. *Phytopathology*, 1991, 81(2): 210-214.
- [2] CIUFFO M, PETTITI D, GALLO S, et al. First report of blueberry scorch virus in Europe[J]. *Plant Pathology*, 2005, 54(4): 565-565.
- [3] HANCOCK J F, CALLOW P W, KREBS S L, et al. Blueberry shoestring virus in eastern North American populations of native *Vaccinium* [J]. *HortScience*, 1993, 28(3): 175-176.
- [4] JASWAL A S. Occurrence of blueberry leaf mottle, blueberry shoestring, tomato ringspot and tobacco ringspot viruses in eleven halfhigh blueberry clones grown in New Brunswick, Canada[J]. *Canadian Plant Disease Survey*, 1990, 70(2): 113-117.
- [5] PLEŠKO I M, MARN M V, KORON D. Detection of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry cv. 'Coville' in Slovenia[J]. *Julius-Kühn-Archiv*, 2010(427): 204-205.
- [6] FUCHS M, ABAWI G S, MARSELLA-HERRICK P, et al. Occurrence of tomato ringspot virus and tobacco ringspot virus in highbush blueberry in New York State[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2010, 92(2): 451-459.
- [7] JASWAL A S. Occurrence of blueberry leaf mottle, blueberry shoestring, tomato ringspot and tobacco ringspot viruses in eleven halfhigh blueberry clones grown in New Brunswick, Canada[J]. *Canadian Plant Disease Survey*, 1990, 70(2): 113-117.
- [8] ROBERT R M, JAMES J P, IOANNIS E T. New and emerging viruses of blueberry and cranberry[J]. *Viruses*, 2012, 4(11): 2831-2852.
- [9] SCHILDER A. Blueberry shock virus[M]. Michigan State University Extension, East Lansing, MI, USA, 2009.
- [10] BRISTOW P R, WINDOM G E, MARTIN R R. Recovery of plants infected with blueberry shock ilarvirus (BISHV) [J]. *Acta Horticulturae*, 2002, 57: 85-90.
- [11] BRISTOW P R, MARTIN R R. Transmission and the role of honeybees in field spread of blueberry shock ilarvirus, a pollen-borne virus of highbush blueberry[J]. *Phytopathology*, 1999, 89(2): 124-130.
- [12] 李亚东, 姜惠铁, 张志东, 等. 中国蓝莓产业化发展的前景[J]. *沈阳农业大学学报(社会科学版)*, 2001, 3(1): 39-42.
- [13] 李亚东, 刘海广, 张志东, 等. 我国蓝莓产业现状和发展趋势[J]. *中国果树*, 2008(6): 67-70.
- [14] 窦连登, 张红军, 黄国辉, 等. 辽宁蓝莓病害的发生调查[J]. *中国果树*, 2009(2): 64-65.
- [15] 冯璐, 梁雨时, 范永强, 等. 越橘叶斑病原菌的鉴定[J]. *东北农业大学学报*, 2007, 38(5): 614-618.
- [16] 高海霞, 赵洪海, 姜惠铁, 等. 青岛地区蓝莓病虫害调查初报[J]. *中国园艺文摘*, 2009(12): 62-65.
- [17] 田小青, 黎春刚. 上海郊区蓝莓果园病虫害的调查及防治对策[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(4): 147-148.
- [18] 于虹, 贺善安. 世界的蓝莓产业及研究现状[J]. *落叶果树*, 2013, 45(3): 19-22.
- [19] 迟福梅, 周宗山, 张红军, 等. 美国蓝莓病毒病及病毒类似病害的发生与防治[J]. *中国果树*, 2010(1): 13-15.

Rapid Detection of Blueberry Shock Virus by RT-PCR

XIE Lixue¹, CAI Wei², ZHENG Shan¹, ZHANG Lijie¹, ZHANG Xiaoyan¹, LI Tao¹

(1. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013; 2. Fuqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuqing, Fujian 350001)

Abstract: RT-PCR method was established for rapid detection of Blueberry shock virus (BISHV). A set of specific primers were designed based on the published nucleotide sequence of BISHV coat protein gene. The viral RNA extracted from infected blueberry sample was used as template. Twenty suspected blueberry samples were detected by using the established method. The results showed that RT-PCR method had good specificity and high sensitivity. The method could amplify target fragment from BISHV-infected sample, while not from other blueberry virus infected sample and healthy sample. The sensitivity of RT-PCR method was 10^{-4} RNA. The detection result of suspected blueberry samples was consistent with ELISA, which indicated the RT-PCR method can be actually used for detection of BISHV.

Keywords: blueberry shock virus; RT-PCR; rapid detection