



生物实验室

北京地区设施草莓 8 种病毒的酶联免疫吸附测定检测

王佳¹ 崔高峰² 祝宁³ 任俊达¹ 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 华南农业大学农学院 广东 广州 510640

3 北京市昌平区农业技术推广站 北京 102200

摘要:【背景】病毒可以随同草莓无性繁殖材料传播扩散,导致产量和品质下降。选育无病毒种苗是草莓病毒病防治的主要措施,高效、灵敏的检测技术可为草莓病毒病防治提供技术保障。【目的】为明确 8 种能够侵染草莓的病毒在北京地区设施草莓上的发生情况,应用酶联免疫吸附测定(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)进行检测。【方法】将待检病毒的阳性对照样品分别进行间接法和双抗夹心法(Double-Antibody Sandwich, DAS) ELISA 检测,以空白对照和阴性对照作参照比较,确定应用 DAS-ELISA 检测体系结合田间症状对北京地区采集的草莓样品进行病毒检测,并利用逆转录-聚合酶链式反应和序列测定方法对阳性样品进一步验证,确定检测结果的可靠性。【结果】侵染北京地区设施草莓的病毒为草莓轻型黄边病毒(Strawberry Mild Yellow Edge Virus, SMYEV)。“红颜”品种的病毒检出率为 8.1%,“天香”品种的检出率为 2.7%,其他品种均未检出病毒。【结论】研究结果为北京地区设施草莓病毒的检测以及草莓病毒病的科学防治提供理论依据。

关键词: 草莓病毒, 双抗夹心酶联免疫吸附测定, 逆转录-聚合酶链式反应, 田间症状, 病毒检测

Detection of eight viruses infecting greenhouse strawberry in Beijing by enzyme-linked immunosorbent assay

WANG Jia¹ CUI Gaofeng² ZHU Ning³ REN Junda¹ 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 College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510640, China

3 Agricultural Technology Extension Station of Changping District in Beijing, Beijing 102200, China

Abstract: [Background] Viruses could be disseminated through asexual reproductive materials and severely affect the output and quality of strawberry. The production of virus-free seedling is one of the main methods to control strawberry viral diseases. Therefore, the efficient and sensitive detection of viruses is important for viral disease control. [Objective] To investigate the occurrence of eight important viruses commonly infect greenhouse strawberry in Beijing, the different strawberry plants collected from different districts were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). [Methods] We established

Foundation item: Beijing Grain and Economic Crop Industry Innovation Team Project (BAIC09-2020)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-80794280; E-mail: shangqiaoxia@bua.edu.cn

Received: 02-04-2020; **Accepted:** 07-05-2020; **Published online:** 10-08-2020

基金项目: 北京市粮经作物产业创新团队项目(BAIC09-2020)

***通信作者:** Tel: 010-80794280; E-mail: shangqiaoxia@bua.edu.cn

收稿日期: 2020-04-02; **接受日期:** 2020-05-07; **网络首发日期:** 2020-08-10

a double-antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) method to detect eight viruses. Compared with the negative control, the positive control samples showed expected results in indirect ELISA and double-antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) analyses. Combined with the symptom observation in the field, DAS-ELISA was used to detect viruses in the greenhouse strawberry samples. Virus infected samples were further verified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequence analysis. **[Results]** The results showed that only strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) was detected in strawberry plants collected in Beijing. 8.1% of ‘Benihoppe’ and 2.7% of ‘Tianxiang’ cultivar plants tested could detect the infection by SMYEV, whereas there were no virus detected in other varieties. **[Conclusion]** This study presents important information and techniques for virus detection and strawberry viral disease management in Beijing area.

Keywords: strawberry viruses, DAS-ELISA, RT-PCR, field symptoms, virus detection

草莓是全球性广泛种植的重要经济作物,以栽培凤梨草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)为主,具有营养丰富、适应性广、结果早、生长周期短等优点^[1-2]。近年来,草莓栽培在北京地区迅猛发展,以其易繁殖、高效益的优势,成为观光采摘和设施果品发展中的主导产业。草莓生产主要依靠匍匐茎进行无性繁殖,虽可保持草莓品种的优良性状,但在长期的无性繁殖过程中,容易受到病毒的侵染并在体内不断积累,使草莓出现叶片黄化、畸形、植株矮化等症状,造成产量减少、果实品质变劣,严重时减产 30%–80%,而且危害逐年增加,影响规模化生产需求^[3-5]。

目前已报道能够侵染草莓的病毒有 20 余种,其中草莓轻型黄边病毒(Strawberry Mild Yellow Edge Virus, SMYEV)在世界各地广为分布,可造成较为严重的危害,能应用血清学方法-酶联免疫吸附(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)进行测定^[3-11]。大多数病毒只在局部地区发生,番茄环斑病毒(Tomato Ringspot Virus, ToRSV)、烟草条纹病毒(Tobacco Streak Virus, TSV)和草莓潜隐环斑病毒(Strawberry Latent Ringspot Virus, SLRSV)对美国草莓的危害最为严重,且在欧美地区普遍发生^[12-14];番茄黑环病毒(Tomato Black Ring Virus, TBRV)、树莓环斑病毒(Raspberry Ringspot Virus, RpRSV)、烟草坏死病毒(Tobacco Necrosis Virus, TNV)和南芥菜花叶病毒(Arabis Mosaic Virus, ArMV)对欧洲的草莓产业构成威胁,降低果实的品

质和产量, TBRV 和 RpRSV 也是波兰和新西兰草莓的检疫性病原^[15-18]。ELISA 检测具有检测速度快、灵敏度高、操作简单等优点,成本及工作量均较少,适用于大量样品检测,但我国未见应用 ELISA 检测草莓样品中上述 8 种病毒的相关报道^[4,19]。

本文对 SMYEV、ArMV、RpRSV、ToRSV、SLRSV、TBRV、TNV 和 TSV 等 8 种能够侵染草莓的病毒进行 ELISA 检测,并利用 RT-PCR 对检测出的病毒阳性样品进行鉴定和序列比对分析。通过比较分析北京市不同地区和不同草莓品种受病毒的侵染情况,明确以上 8 种病毒在北京地区设施草莓上的发生情况,研究结果可以为进一步检测侵染草莓的主要病毒种类提供依据,为该地区设施草莓病毒病制订科学防治策略和草莓无毒化栽培提供理论依据,保障草莓健康生产,从而促进草莓产业的可持续发展。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在北京市设施草莓栽培区进行草莓病毒病害调查,采集 37 份具有典型病毒症状的草莓叶片样品。

1.2 主要试剂和仪器

SMYEV、ArMV、RpRSV、ToRSV、SLRSV、TBRV、TNV 和 TSV 抗血清、阳性对照及 96 孔酶联板, AC Diagnostics 公司;辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG, 北京博奥森生物技术有限公司;其他化学

试剂均为国产分析纯; EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒、2×*Taq* PCR Mix, 北京艾德莱生物科技有限公司; dNTPs、5×M-MLV 逆转录反应缓冲液、M-MLV 反转录酶、RNase 抑制剂, 宝日医生物技术(北京)有限公司; DEPC 水, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

酶标仪、PCR 仪和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 台式离心机, KUBOTA 公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

1.3 SMYEV 引物

参照 Thompson 等设计的 SMYEV 特异性引物 YT1 (5'-CCGCTGCAGTTGTAGGGTA-3') 和 Y2 (5'-CATGGCACTCATTGGAGCTGGG-3')^[20], 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 检测方法

1.4.1 间接 ELISA

参照尚巧霞等的间接 ELISA 方法对草莓叶片样品进行检测^[19]。将草莓叶片样品经液氮研磨后, 加 10 倍体积的包被缓冲液, 4 °C、3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加在酶联板上, 37 °C 培养 3 h 后, PBS-T 洗板。接着, 加入稀释 1 000 倍的抗血清, 37 °C 培养 3 h, 洗板。然后, 加稀释 5 000 倍的酶标羊抗兔 IgG 缓冲液, 37 °C 培养 3 h, 洗板。最后, 在酶联板中加入底物溶液室温培养 30 min 后, 采用酶标仪测定法测定 490 nm 下的紫外吸光度值 (OD_{490} 值), 设空白、阴性和阳性对照, 每份样品重复 3 次取平均值, 被测样品 OD_{490} 值/阴性对照 OD_{490} 值 ≥ 2 即判断为阳性反应^[21]。

1.4.2 DAS-ELISA

参照史利雪等的 DAS-ELISA 方法对草莓叶片样品进行检测^[21]。取包被缓冲液与抗血清混匀, 加在酶联板上, 37 °C 培养 3 h, PBS-T 洗板。接着, 将草莓叶片样品经液氮研磨后, 加入 10 倍体积的 SB1 缓冲液, 4 °C、3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加在酶联板上; 在酶联板中分别加入待测样品、阳性对照、阴性对照、空白对照(SB1 缓冲液), 37 °C 培养 3 h, 洗板。然后, 加入按 1:200 混合的 ECB1

缓冲液和酶标抗体, 37 °C 培养 3 h, 洗板。最后, 加入 1 mg/mL 的 PNP 溶液室温培养 30 min 后, 采用酶标仪测定法测定 405 nm 下的 OD_{405} 值, 设空白、阴性和阳性对照, 每份样品重复 3 次取平均值, 被测样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 ≥ 2 即判断为阳性反应, 检测的阳性样品重复检测一次。

1.4.3 RT-PCR

参照陈柳等的方法从 DAS-ELISA 检测呈 SMYEV 阳性的草莓叶片样品中提取总 RNA, 并进行 RT-PCR 检测^[22]。

反转录体系: 以 1.5 μ L 提取的总 RNA 为模板, 加入引物 Random Primer (9mer) (50 μ mol/L) 和 Oligo (dT)₁₈ Primer (50 μ mol/L) 各 0.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 2.0 μ L, DEPC 水补至 15.5 μ L。65 °C 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 4.0 μ L, M-MLV 反转录酶 (100 U/L) 和 RNase 抑制剂 (40 U/L) 各 0.5 μ L。42 °C 1 h, 70 °C 15 min。合成的 cDNA 于 -20 °C 保存。

PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Mix 12.5 μ L, 引物 YT1 (10 mmol/L) 和 Y2 (10 mmol/L) 各 1.0 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L, DEPC 水补至 25.0 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 60 °C 40 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.4 序列测定与分析

将目的条带明亮的 RT-PCR 扩增产物回收后, 送交生工生物工程(上海)股份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 SMYEV 序列进行一致性比对, 使用 MEGA 7.0 软件的邻接法 (Neighbor-Joining Method) 构建系统进化发育树^[23]。

1.5 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 \times 100%^[24]。

2 结果与分析

2.1 ELISA 检测体系的确定

应用每种待检病毒的阳性对照样品分别进行间接 ELISA 和 DAS-ELISA 的检测, 并以空白对照和阴性对照作参照比较。采用间接 ELISA 检测病毒时, 阴性对照和空白对照均有不同程度的显色, 与阳性对照相比差异不显著, 导致检测结果难以确定。然而 DAS-ELISA 中的阳性对照显色明显, 与阴性对照相比具有显著差异, 在本研究中确定应用 DAS-ELISA 进行草莓叶片样品中 8 种病毒的检测。

2.2 DAS-ELISA 检测结果

对 37 株供试草莓叶片进行 DAS-ELISA 检测, 其中 4 份样品检测出 SMYEV (表 1, 其他样品检测数据未提供), 分别是采集于昌平、平谷和房山的‘红颜’以及海淀的‘天香’草莓品种。

所有样品的主要信息和检测结果见表 2。根据检测结果可知, 在待检的 8 种病毒中北京地区设施草莓仅受 SMYEV 的危害, 病毒阳性样品的检出率为 10.8%, 而 SLRSV、ArMV、ToRSV、RpRSV、TBRV、TNV 和 TSV 均未检出。

2.3 RT-PCR 检测结果

利用 SMYEV 的特异性引物 YT1/Y2 对经 DAS-ELISA 检测为阳性的样品进行 RT-PCR 检测, 结果显示, 从这些样品中均能 PCR 扩增出 851 bp

片段, 与预期目的片段大小一致。PCR 扩增的目的片段包含完整的外壳蛋白(Coat Protein, CP)基因及该基因两端的部分非编码区基因序列^[22]。

利用 DNAMAN、Clustal 1.81 和 MEGA 7.0 将获得的 SMYEV 北京草莓分离物部分序列和不同国家或地区分离物的 *cp* 基因核苷酸序列进行分析比较(表 3), 并用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树进行分析(图 1)^[22,25]。结果显示, 获得的北京分离物 Smyev4 (GenBank 登录号为 MT126786)的部分序列与中国沈阳分离物 sy04 (GenBank 登录号为 EU107086.1)序列的一致性为 97.99%, 且亲缘关系较近, 归属于同一组群。

2.4 草莓病毒病典型症状

对北京地区种植的草莓植株进行田间调查, 并经 DAS-ELISA 和 RT-PCR 检测表明, SMYEV 侵染的草莓植株表现出不同程度的花叶症状, 主要为叶片黄化(图 2B)、叶缘变黄(图 2C、2D)和镶脉(图 2D)等症状。

2.5 不同地区的病毒检测结果比较

通过调查昌平、密云、怀柔、平谷、房山、顺义和海淀共 7 个区县种植的草莓样品, 结果表明, SMYEV 对昌平、平谷、房山和海淀的草莓植株造成危害, 病毒检出率均为 2.7%, 而怀柔、密云和顺义的草莓植株中未检出病毒(表 2)。

表 1 草莓病毒阳性样品的 DAS-ELISA 检测 OD_{405} 值
Table 1 OD_{405} value of virus infected strawberry samples by DAS-ELISA

采集地点	品种	OD_{405} 值	阴性对照	阳性对照	空白对照
Collecting place	Cultivar	OD_{405} value	Negative control	Positive control	Blank control
昌平	红颜	0.290	0.091	1.104	0.000
Changping	Benihoppe				
平谷	红颜	0.361	0.146	1.369	0.000
Pinggu	Benihoppe				
房山	红颜	0.402	0.146	1.369	0.000
Fangshan	Benihoppe				
海淀	天香	0.439	0.146	1.369	0.000
Haidian	Tianxiang				

注: 表中数值为酶标仪波长 405 nm 处所测 OD_{405} 值的平均值。酶标仪的阈值为 0.000–3.500
Note: The values in the table are the average OD_{405} values measured at the wavelength of 405 nm of the enzyme scale. The threshold value of the enzyme scale was 0.000–3.500

表 2 北京地区设施草莓 8 种病毒的 DAS-ELISA 检测

Table 2 Results of eight viruses detection in greenhouse strawberry plants in Beijing by DAS-ELISA

序号 No.	采集地点 Collecting place	品种 Cultivar	样品数 Sample number	SMYEV	SLRSV	ArMV	ToRSV	RpRSV	TBRV	TNV	TSV
1	昌平 Changping	红颜	6	1	—	—	—	—	—	—	—
2		Benihoppe	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		梨木	1	—	—	—	—	—	—	—	—
3		Limu	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		天皇御用	1	—	—	—	—	—	—	—	—
4		Tochiotome	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		甜查理	1	—	—	—	—	—	—	—	—
5		Sweet Charlie	3	—	—	—	—	—	—	—	—
		章姬	3	—	—	—	—	—	—	—	—
6	房山 Fangshan	Akihime	1	1	—	—	—	—	—	—	—
		红颜	1	—	—	—	—	—	—	—	—
7		Benihoppe	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		甜查理	1	—	—	—	—	—	—	—	—
8		Sweet Charlie	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		章姬	1	—	—	—	—	—	—	—	—
9	海淀 Haidian	Akihime	4	—	—	—	—	—	—	—	—
		红颜	4	—	—	—	—	—	—	—	—
10		Benihoppe	3	1	—	—	—	—	—	—	—
		天香	3	—	—	—	—	—	—	—	—
11		Tianxiang	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		燕香	1	—	—	—	—	—	—	—	—
12		Yanxiang	3	—	—	—	—	—	—	—	—
		章姬	3	—	—	—	—	—	—	—	—
13	怀柔 Huairou	Akihime	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		红颜	1	—	—	—	—	—	—	—	—
14	密云 Miyun	Benihoppe	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		红颜	1	—	—	—	—	—	—	—	—
15		Benihoppe	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		甜查理	1	—	—	—	—	—	—	—	—
16		Sweet Charlie	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		章姬	1	—	—	—	—	—	—	—	—
17	平谷 Pinggu	Akihime	1	1	—	—	—	—	—	—	—
		红颜	1	—	—	—	—	—	—	—	—
18		Benihoppe	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		甜查理	1	—	—	—	—	—	—	—	—
19	顺义 Shunyi	Sweet Charlie	3	—	—	—	—	—	—	—	—
		红颜	3	—	—	—	—	—	—	—	—
20		Benihoppe	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		童子一号	1	—	—	—	—	—	—	—	—
21		Tongzi No.1	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		伊利美女	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		Yilimeinv	1	—	—	—	—	—	—	—	—
总计 Total			37	4	0	0	0	0	0	0	0

注：—：草莓样品中未检测到病毒

Note: —: There were no virus detected in strawberry samples

表 3 来源于不同国家或地区的 SMYEV 不同分离物序列信息

Table 3 Gene sequence of SMYEV isolates from different countries or areas

序号 No.	分离物名称 Name of isolate	GenBank Accession number	长度 Length (bp)	国家 Country	参考文献 References
1	Smyev4	MT126786	851	中国北京 Beijing, China	本研究 This study
2	Sy04	EU107086.1	878	中国沈阳 Shenyang, China	[25]
3	Sy02	EU107084.1	878	中国沈阳 Shenyang, China	[25]
4	KNS1	EU284709.1	729	韩国 Korea	未发表 Not available
5	D74	AJ577359.1	5 970	德国 Germany	未发表 Not available
6	9Redland	AJ577345.1	878	澳大利亚 Australia	未发表 Not available
7	7CH	AJ577343.1	878	智利 Chile	未发表 Not available
8	10CH	AJ577346.1	878	智利 Chile	未发表 Not available
9	MY-18	D12515.1	854	德国 Germany	未发表 Not available
10	5CH	AJ577341.1	878	智利 Chile	未发表 Not available

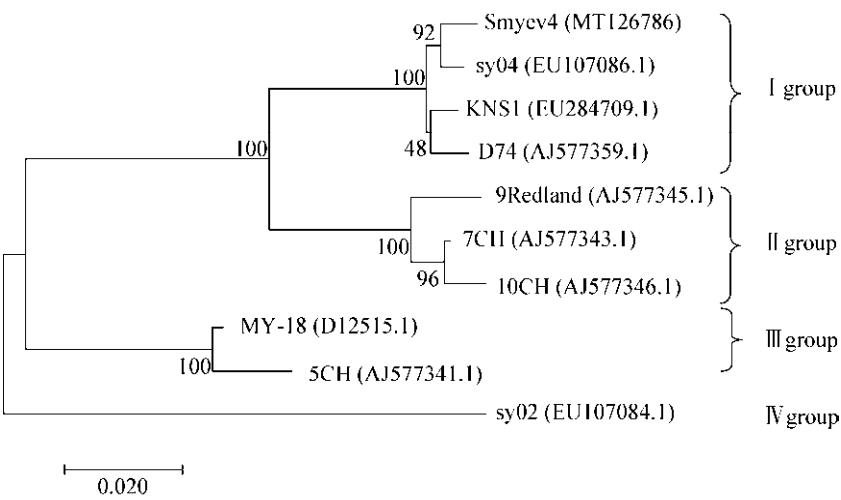


图 1 SMYEV 不同国家或地区分离物 *cp* 基因核苷酸序列的系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of SMYEV isolates from different countries or areas based on the available coat protein gene nucleotide sequences

注：括号内的序号为序列的 GenBank 登录号；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 2% 的序列进化差异

Note: GenBank accession number are shown in the parentheses. Values on branches indicate percentage of support out of 1 000 bootstrap replications. The numbers in each branch point denote the percentages supported by bootstrap. The scale bar presents 2% sequence variance

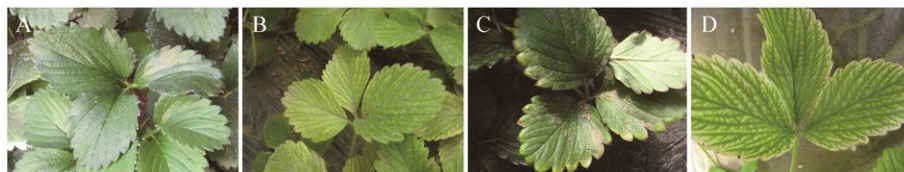


图 2 田间草莓植株感染 SMYEV 的症状

Figure 2 Symptoms of SMYEV infected strawberry plants in the field

注: A: 健康叶片; B: 房山‘红颜’叶片黄化; C: 海淀‘天香’叶缘变黄; D: 昌平‘红颜’叶缘变黄、镶脉

Note: A: Healthy leaves; B: Leaf yellowing on Benihoppe in Fangshan; C: Yellowing of leaf margin on Tianxiang in Haidian; D: Yellowing of leaf margin and vein banding on Benihoppe in Changping

2.6 不同品种的病毒检测结果比较

调查了‘红颜’‘天香’‘甜查理’‘童子一号’‘燕香’‘伊利美女’‘章姬’‘梨木’和‘天皇御用’共 9 个草莓品种, 结果显示, 不同草莓品种受病毒感染程度也存在差异, ‘红颜’的病毒检出率为 8.1%, ‘天香’的检出率为 2.7%, ‘甜查理’‘童子一号’‘燕香’‘伊利美女’‘章姬’‘梨木’和‘天皇御用’等品种未检出病毒(表 2)。

3 讨论与结论

ELISA 是植物病毒检测中最常用的方法之一, 该方法是以酶催化的颜色反应来指示植物病毒中抗原抗体的结合^[26-27]。因其具有特异性强、准确、简便、直观及高灵敏度等的优点, 主要用于快速测定植物病毒病的发生及其在田间的分布情况^[1,19,28]。

比较了 SMYEV、ArMV、RpRSV、ToRSV、SLRSV、TBRV、TNV 和 TSV 共 8 种病毒的间接 ELISA 和 DAS-ELISA 检测方法。采用间接 ELISA 检测时, 洗涤次数较少、操作步骤简洁, 但加样量多、处理时间长, 反应结束后阳性对照、阴性对照和空白对照均有不同程度的显色, 影响检测标准的确立和检测结果的准确性。DAS-ELISA 中的阳性对照与阴性对照颜色差异显著, 可进行重复试验。DAS-ELISA 具有检测时间短、可重复、更高的灵敏度和准确性等优点, 适用于检测本研究中的草莓病毒。

对北京 7 个区县共 9 个品种的草莓样品进行 DAS-ELISA 检测, 并对阳性样品进一步进行 RT-PCR 鉴定。结果表明, 对于本文检测的 8 种病

毒, 北京地区设施草莓上仅检测到 SMYEV, 而其他 7 种病毒均未检出。田间感染 SMYEV 的草莓植株表现出叶片黄化、叶缘变黄和镶脉等多种症状, 可能是由其他未检测的病毒与 SMYEV 复合侵染导致, 也可能是由水肥、药害、机械损伤等非病毒因素危害造成, SMYEV 引起的草莓植株典型症状有待于进一步研究^[7]。

采自昌平、平谷、房山和海淀的草莓植株均检出病毒, 但密云、怀柔 and 顺义草莓植株未检出。在不同草莓品种的病毒检测中, ‘红颜’的带毒率最高。这可能与‘红颜’种植年限长有关^[2], 也可能由于不同地区草莓品种检测的种类和数量不同导致。今后应增加待测样品的种类和数量, 进一步明确不同地区不同品种草莓植株上病毒的发生危害情况。

利用 ELISA 检测植物病毒时易出现假阳性反应或是很难准确检测较低含量的病毒, 因此 ELISA 检测结果只能进行初步的判断, 还需通过电镜观察、分子生物学等病毒检测方法对检测结果进一步验证^[19,29-31]。此外, ELISA 存在一定的局限性, 至今多数草莓病毒不能应用该法检测, 主要是未研制出能用于稳定检测病毒的抗血清, 如 SCV 的多克隆抗体只能检测毛酸浆(*Physalis pubescens*)中的病毒, 不能用于检测草莓中的 SCV^[1,32]。目前, RT-PCR 等分子生物学手段广泛用于草莓病毒的检测, 与 ELISA 相比能检测更多的病毒种类, 检测结果也更加准确、可靠, 但是需要特殊的检测仪器和试剂, 导致检测成本和技术难度较高, 很难在基层技术部门推广应用^[7,33]。因此, ELISA 仍可广泛用于草莓

病毒的初步检测和田间检测, 再结合分子生物学检测方法对其结果进行验证, 能够提高检测效率以及检测结果的准确性和可靠性, 为草莓病毒病的防治提供理论依据, 为实现草莓栽培的高产和优产奠定基础, 为北京地区草莓产业的可持续发展保驾护航。

REFERENCES

- [1] Su DF, Tong JY, Yang JY, Chen SY, Luo ZW, Shen XM, Lai YH, Arslan J, Wei SJ, Cui XL. Strawberry viruses diseases and its research advances[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2019, 41(6): 1221-1237 (in Chinese)
苏代发, 童江云, 杨俊誉, 陈杉艳, 罗志伟, 沈雪梅, 赖泳红, Arslan J, 魏世杰, 崔晓龙. 草莓病毒病及其研究进展[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2019, 41(6): 1221-1237
- [2] Chang LL, Dong J, Zhong CF, Sun J, Sun R, Shi K, Wang GX, Zhang YT. Pedigree analysis of strawberry cultivars released in China[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(2): 158-167 (in Chinese)
常琳琳, 董静, 钟传飞, 孙健, 孙瑞, 石琨, 王桂霞, 张运涛. 中国育成草莓品种的系谱分析[J]. 果树学报, 2018, 35(2): 158-167
- [3] Ding XL, Chen D, Du ZG, Zhang J, Wu ZJ. The complete genome sequence of a novel cytorhabdovirus identified in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.)[J]. Archives of Virology, 2019, 164(12): 3127-3131
- [4] Zhou HC, He ST. Advances in strawberry virus research[J]. Journal of Fruit Science, 2003, 20(5): 421-426 (in Chinese)
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
- [5] Thompson JR, Wetzel S, Klerks MM, Vašková D, Schoen CD, Špak 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[J]. Journal of Virological Methods, 2003, 111(2): 85-93
- [6] Faggioli F, Ferretti L, Pasquini G, Barba M. Detection of strawberry latent ring spot virus in leaves of olive trees in Italy using a One-Step RT-PCR[J]. Journal of Phytopathology, 2002, 150(11/12): 636-639
- [7] Martin RR, Tzanetakis IE. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses[J]. Plant Disease, 2006, 90(4): 384-396
- [8] Cieślińska M. Detection of strawberry mottle virus (SMoV) using RT-PCR-comparison of two RNA extraction methods[J]. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 2004, 12: 17-22
- [9] Chang L, Zhang Z, Yang H, Li H, Dai H. Detection of strawberry RNA and DNA viruses by RT-PCR using total nucleic acid as a template[J]. Phytopathology, 2007, 155(7/8): 431-436
- [10] Shang QX. Advances in the researches on strawberry viruses transmitted by different vectors[J]. Journal of Plant Protection, 2015, 42(4): 488-496 (in Chinese)
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
- [11] Wang GP, Liu FC, Xue GR, Zhu QY, Yang ZY, Wang HY. Research on identification of strawberry viruses in China and techniques of obtaining virus-free strawberries[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1990, 23(4): 43-49 (in Chinese)
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[J]. 中国农业科学, 1990, 23(4): 43-49
- [12] Converse RH. Infection of cultivated strawberries by tomato ringspot virus[J]. Phytopathology, 1981, 71(11): 1149-1152
- [13] Tzanetakis IE, Martin RR. Expanding field of strawberry viruses which are important in North America[J]. International Journal of Fruit Science, 2013, 13(1/2): 184-195
- [14] Tzanetakis IE, Postman JD, Gergerich RC, Martin RR. A virus between families: nucleotide sequence and evolution of Strawberry latent ringspot virus[J]. Virus Research, 2006, 121(2): 199-204
- [15] Rymelska N, Borodynko N, Pospieszny H, Hasiów-Jaroszewska B. Analysis of the biological and molecular variability of the Polish isolates of tomato black ring virus (TBRV)[J]. Virus Genes, 2013, 47(2): 338-346
- [16] Tang J, Ng F, Kanchiraopally D, Ward L. Development of TaqMan real-time RT-PCR for sensitive detection of diverse raspberry ringspot virus isolates[J]. Journal of Virological Methods, 2020, 278: 113821
- [17] Fránová-Honetslegrová J, Erbenová M, Martin RR. Isolation of tobacco necrosis virus from strawberry leaves in the Czech Republic[J]. Acta Virologica, 1998, 42(5): 325-331
- [18] Kondakova V. Studies on Nepo-Viruses in strawberry II. Isolation and identification of Arabis mosaic virus from strawberry in Bulgaria[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 1998, 12(2): 39-42
- [19] Shang QX, Han CG, Yang LL. Elisa detection of wheat yellow mosaic virus[J]. Journal of Beijing Agricultural College, 2002, 17(2): 15-17 (in Chinese)
尚巧霞, 韩成贵, 杨莉莉. 小麦黄花叶病毒的血清学检测[J]. 北京农学院学报, 2002, 17(2): 15-17

- [20] Thompson JR, Jelkmann W. Strain diversity and conserved genome elements in strawberry mild yellow edge virus[J]. Archives of Virology, 2004, 149(10): 1897-1909
- [21] Shi LX, Zhang SP, Miao H, Bo KL, Xie Q, Wang Y, Gu XF. Virus detection of cucumber produced in Beijing, Shandong and Guangdong Provinces[J]. China Vegetables, 2018(4): 48-52 (in Chinese)
史利雪, 张圣平, 苗晗, 薄凯亮, 谢庆, 王烨, 顾兴芳. 北京、山东和广东黄瓜病毒检测[J]. 中国蔬菜, 2018(4): 48-52
- [22] Chen L, Ran C, Shang QX, Chen XY, Xing DM, Li YQ, Yang R, Han CG. Sequence analysis of CP gene of different isolates of strawberry mild yellow edge virus from Beijing in China[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(3): 229-233 (in Chinese)
陈柳, 冉策, 尚巧霞, 陈笑瑜, 邢冬梅, 李永强, 杨瑞, 韩成贵. 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
- [23] Liu W, Yan LY, Wen ZH, Chen XR. Survey of virus diseases on 18 species of medical herbs in Gansu Province and identification of two virus disease[J]. Plant Protection, 2014, 40(5): 133-137, 163 (in Chinese)
刘雯, 晏立英, 文朝慧, 陈秀蓉. 甘肃省 18 种药用植物病毒病调查及 2 种病毒病的鉴定[J]. 植物保护, 2014, 40(5): 133-137, 163
- [24] Li JL, Luo J, Niu XY, Cheng JL, Chen DX, An DR. Detection and analysis of main tobacco viruses and viruliferous plants in Shaanxi Province[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2013, 41(1): 78-84 (in Chinese)
李金岭, 罗晶, 牛小义, 成巨龙, 陈德鑫, 安德荣. 陕西省烟草主要病毒病种类及植物带毒的检测[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(1): 78-84
- [25] Yang HY, Dai HY, Li LL, Zhang ZH. Diversity of the 3' terminal sequence of strawberry mild yellow edge virus genome[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2008, 38(1): 96-99 (in Chinese)
杨洪一, 代红艳, 李丽丽, 张志宏. 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
- [26] Liu XN, Dai LY, Dong Z, Tang QJ. Research progress of plant RNA virus detection technology[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2016(9): 150-152 (in Chinese)
刘湘宁, 戴良英, 董铮, 唐前君. 植物 RNA 病毒检测技术研究进展[J]. 现代农业科技, 2016(9): 150-152
- [27] Qing L, Liu YH, Ma LN. Preliminary identification of tobacco virus types in Wulong County[J]. Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science Edition), 2005, 27(3): 319-322 (in Chinese)
青玲, 刘映红, 马丽娜. 武隆烟区烟草病毒病的病原初步鉴定[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 27(3): 319-322
- [28] Zhang W, Xu S, Chen DX. Comparison of common plant viruses detection measures[J]. South China Agriculture, 2013, 7(12): 24-28 (in Chinese)
张伟, 徐硕, 陈德鑫. 常用植物病毒病检测技术比较[J]. 南方农业, 2013, 7(12): 24-28
- [29] Ran C. Investigation and application of detecting technique of strawberry viruses in suburb of Beijing[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Agriculture, 2015 (in Chinese)
冉策. 京郊草莓病毒病调查及病毒检测技术应用[D]. 北京: 北京农学院硕士学位论文, 2015
- [30] Fan GQ, Bai YJ, Gao YL, Zhang W, Zhang S, Shen Y, Liu K, Yu J. Investigation and analysis on potato viral disease in China[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(7): 74-79 (in Chinese)
范国权, 白艳菊, 高艳玲, 张威, 张抒, 申宇, 刘凯, 喻江. 中国马铃薯主要病毒病发生情况调查与分析[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(7): 74-79
- [31] Zhang LF, Ma TW, Cao HY. Study on the application of ELISA in plant detection and improvement measures[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2016(24): 137-138 (in Chinese)
张黎凤, 马天文, 曹海艳. ELISA 法在植物检测中的应用研究及改进措施[J]. 现代农业科技, 2016(24): 137-138
- [32] Schoen CD, Leone G. Towards molecular detection methods for aphid-borne strawberry viruses[J]. Acta Horticulturae, 1995(385): 55-63
- [33] Babini AR, Cieřlińska M, Kareřová R, Thompson JR, Cardoni M, Malinowski T, Paprřstein F, Jelkmann W. Occurrence and identification of strawberry viruses in five European countries[A]//Proceedings of the 10th International Symposium on Small Fruit Diseases[C]. ISHS, 2004: 39-43