

进境美国大豆幼苗中菜豆荚斑驳病毒的检测与鉴定

李彬¹, 吴新华¹, 粟寒¹, 吴翠萍¹, 安榆林¹, 许志刚²

(1. 江苏出入境检验检疫局, 江苏 南京 210001; 2. 南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 从进口美国大豆中挑选具有典型斑驳症状的种子, 在隔离温室内种植。出苗后, 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法 (DAS-ELISA) 进行菜豆荚斑驳病毒 (bean pod mottle virus, BPMV) 的血清学检测。对 BPMV 血清学反应阳性的幼苗进一步采用反转录 (RT) PCR 方法和测序方法进行鉴定。结果从大豆幼苗中筛选并鉴定出菜豆荚斑驳病毒。

关键词: 菜豆荚斑驳病毒; 大豆幼苗; 双抗体夹心 ELISA; RT-PCR; 序列测定

中图分类号: S41-32; S435.651 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 02-0139-03

Identification of bean pod mottle virus (BPMV) on the soybean seedling from America

LI Bin¹, WU Xin-hua¹, SU Han¹, WU Cui-ping¹, AN Yu-lin¹, XU Zhi-gang²

(1. Jiangsu Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China;

2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The soybean seeds imported from USA and showing typical mottle symptom were selected and sowed in isolated greenhouse. Some seedlings were tested serological reaction by using bean pod mottle virus (BPMV) double antibody sandwich (DAS) ELISA kit. The seedlings showing BPMV positive in serological test were further detected by reverse transcript (RT) PCR and sequencing. Therefore, BPMV was screened and identified from the soybean seedlings.

Key words: BPMV; soybean seedling; DAS-ELISA; RT-PCR; sequencing

菜豆荚斑驳病毒 (bean pod mottle virus, BPMV) 属于豇豆花叶病毒科 (Comoviridae), 豇豆花叶病毒属 (*Comovirus*)。该病毒可侵染豆科植物, 主要是菜豆和大豆, 在田间可由菜豆蚜叶甲 (*Cerotoma trifurcata*)、葡萄鞘叶甲 (*Colaspis brunnea*)、带斑黄瓜叶甲 (*Diabrotica balteata*)、北美豆芫菁 (*Ficauta vittata*)、墨西哥豆瓢虫 (*Epilachna varivestis*) 等传播^[1]; 也可种传, 大豆的种传率约 0.1%^[2-3]。该病毒分布于美国^[4]、加拿大^[5]、巴西^[6]和秘鲁^[1]等美洲国家, 在北美地区发生严重, 目前中国还没有发生及分布报道。据报道^[7], 受 BPMV 侵染的大豆, 产量损失在 3.0% ~ 52.4%, 但与大豆花叶病毒 (SMV) 复合侵染大豆后, 产量损失可高达 66%。目前中国每年大量从美国等疫区进口大豆, BPMV 通过种子携带并远距离进入中国的可能性很大, 加强对进口大豆是否携带 BPMV 的快速精确的检测, 无疑具有十分重要的意义。菜豆荚斑驳病毒已列入我国新修订的检疫性植物病毒名录。

由于 BPMV 在大豆中的低种传率, 目前国内还未有从大豆幼苗中检出该病毒报道。笔者通过挑选具有典型斑驳症状的种子, 种植出幼苗后, 用双抗体夹心酶联免疫吸附法 (DAS-ELISA) 进行初筛, 进而设计引物, 利用两步法 RT-PCR 和一步法 RT-PCR 及序列测定的方法, 对 BPMV 进行了鉴定。

1 材料与方 法

1.1 疑似带毒大豆种子的选择与种植

材料来自南京口岸进境的美国大豆。根据症状特点, 挑选具有斑驳症状种皮的大豆种子, 经 3% 次氯酸钠表面消毒后, 将种子播种于隔离温室内, 所使用的盆钵和器具均经过消毒处理, 所用的土壤需经灭菌处理。种植期间, 温室按隔离检疫要求进行管理。

1.2 DAS-ELISA 血清学方法检测

1.2.1 样品制备 大豆出苗至第 1 对真叶展平后, 对表现可疑症状植株每个单株制备 1 个样品, 对于无症状的, 每 10 株叶片制备 1 个样品, 并按试剂盒说明制备样品提取液。

1.2.2 DAS-ELISA 检测 BPMV 双抗夹心 (DAS) ELISA 检测试剂盒为美国 Agdia 公司检测产品, DAS-ELISA 操作程序按试剂盒说明进行。阳性对照为试剂盒的阳性质控物, 阴性对照为大豆合丰 25 品种健康植株叶片。2 次重复。

1.2.3 酶标仪读数与结果判定 反应结束后, 先用肉眼观察判断酶标板颜色反应结果, 再在全自动酶联免疫分析系统 (Triturus, Diagnostic GRF Fols, S. A) 检测 405 nm 的光密度值 (D)。

1.3 RT-PCR 分子方法检测

1.3.1 病毒 RNA 提取 (Trizol 法) 取 BPMV 血清学阳性样品的上清液, 加入 Trizol 试剂, 经氯仿抽提, 异丙醇沉淀后, 将沉淀溶于经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理过的双蒸水中。阴性对照为大豆合丰 25 品种健康植株叶片。

1.3.2 RT-PCR 扩增 通过 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 检索, 根据 BPMV 外壳蛋白编码基因 (登录号: AF330207) 中的保守序列设计 1 对寡核苷酸引物: 5'-GTGCCAGTCTGATATTTACACC-3' (BP3) 和 5'-GTCAGTTTTCCATCCACCTATTT-3' (BP4), 其预期的扩增产物大小为 307 bp。PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

(1) 两步法 RT-PCR。MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自上海生工生物工程服务有限公司。cDNA 合成及反应体系参照试剂盒说明书。第一链 cDNA 合成的引物选用 Oligo (dT)₁₈, 37 °C 1 h。PCR 反应体系为: 1 × PCR 缓冲液 (Mg^{2+} -free)、 $MgCl_2$ ($2.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$)、dNTP ($0.25 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$)、上下游引物 ($0.4 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$), 反应总体积 30 μL 。反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 8 min。

(2) 一步法 RT-PCR。试剂盒来源同上。反应体系参照试剂盒说明书。反应条件为: 40 °C 30 min, 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 8 min。

1.3.3 RT-PCR 产物电泳检测 RT-PCR 反应结束后, 取扩增产物进行电泳, 并在全自动凝胶成像系统上观察、拍照、记录结果。

1.4 RT-PCR 产物的测序

RT-PCR 产物经纯化回收, 由上海英骏生物技术有限公司进行双向序列测定, 并进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 DAS-ELISA 检测结果

DAS-ELISA 结果 (表 1) 显示, 阴性对照的 D_{405} 值小于 0.15, 阳性对照 D_{405} 和阴性对照 D_{405} 的比值大于 10; 在检测的 6 个样品中, 只有样品 1 的 D_{405} 与阴性对照 D_{405} 的比值明显大于 2, 判为阳性。

2.2 RT-PCR 检测结果

BPMV 阳性样品 RT-PCR 扩增结束后, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示 (图 1), 一步法和两步法均扩增出大小为 307 bp 的特异性条带, 与预期结果一致; 阴性对照无任何条带, 说明这对引物能很好地扩增出目标片段。

2.3 RT-PCR 产物的序列测定

RT-PCR 产物经测序和同源性比较后发现 (图 2), 产物核苷酸序列与 BPMV 外壳蛋白基因 (AF330207) 的目标序列之间只存在 2 个碱基的差异, 同源性为 99.3%。测序结果进一步验证 RT-PCR 产物是 BPMV 的特异性产物。

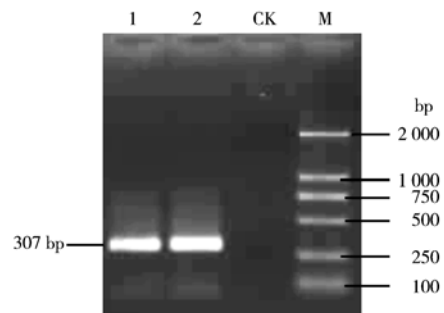


图 1 BPMV 的 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR of BPMV

M. Marker (DL2000, TaKaRa); CK. 阴性对照 Negative control; 1. 一步法 RT-PCR One-step RT-PCR; 2. 两步法 RT-PCR Two-step RT-PCR

表 1 DAS-ELISA 检测大豆幼苗中 BPMV
Table 1 Detection of BPMV of soybean seedling by DAS-ELISA

	阳性对照 Positive control	阴性对照 Negative control	样品 1 Sample 1	样品 2 Sample 2	样品 3 Sample 3	样品 4 Sample 4	样品 5 Sample 5	样品 6 Sample 6
<i>D</i> ₄₀₅	3. 927	0. 067	3. 770	0. 065	0. 067	0. 068	0. 070	0. 068
与阴性对照比值 Ratio to negative control	58. 61		56. 27	0. 97	1. 00	1. 01	1. 04	1. 01
结果 Result			阳性 Positive	阴性 Negative	阴性 Negative	阴性 Negative	阴性 Negative	阴性 Negative

RT-PCR 产物 : :83
 BPMV-CP 序列 (AF330207) : GTGCCAGTTCTGATATTTACACCATCTGCTCTCAAGACTGTGAATTATGGAATCCTGCTGCACAAAAGCAATGACTATGTCA :83

RT-PCR 产物 :C..... :166
 BPMV-CP 序列 (AF330207) : TTAAATCCAAACCGTGTCTGATGCATGGAGTTGGAATTTCTGAAGCGTACTGGATTCATTGTGATATCATTGTGTGCAC :166

RT-PCR 产物 : :249
 BPMV-CP 序列 (AF330207) : TGGATGGACTGCCACCCCAATGCAGGATGTTGAGTTACAATTGATTGGTTTATTTCCTCTCAGGAATGTGTTCCAGGACCT :249

RT-PCR 产物 : .T..... : 307
 BPMV-CP 序列 (AF330207) : ACTGTGTTTTAAATCCACAAAATCCTTTGTGTAAATAGTGGATGGGAAAACCTGAC : 307

图 2 RT-PCR 产物与 BPMV 外壳蛋白基因部分序列的比较

Fig. 2 Comparison of sequence between RT-PCR and BPMV coat protein gene (AF330207)

“.”: 相同的碱基 The same base

3 讨论

BPMV 可通过种子携带并远距离传播。关于 BPMV 在大豆种子上的带毒部位，魏梅生等^[1]认为是种皮带毒，目前还没有种胚带毒的报道。笔者对 BPMV 在大豆上的带毒部位做过多次检测，在种胚和子叶上均未检测到，这也证实了 BPMV 种传率低的原因。但是，本研究通过血清学和分子生物学方法从大豆幼苗上检测到 BPMV，表明 BPMV 可以通过种子带毒或传带远距离传播，并通过种皮带毒传染到幼苗上，造成侵染，使植株发病，成为 BPMV 的初侵染源。如果 BPMV 一旦传入，与我国普遍发生的 SMV 复合侵染，将对我国的大豆生产造成严重的威胁。

大豆受 BPMV 和 SMV 等病毒侵染后，在种皮上都可以形成斑驳症状，利用这个症状特点可以从大量的种子中初步筛选出可疑的带毒种子，虽然有斑驳症状种皮的大豆并不一定都是由于 BPMV 侵染所造成的，但是可以大大提高检出 BPMV 带毒种子的概率。

参考文献:

[1] 魏梅生, 杨翠云. 菜豆荚斑驳病毒——危害大豆等豆科植物的重要病毒 [J]. 植物检疫, 2006, 20(1): 26-28

[2] Lin M T, Hill J H. Bean pod mottle virus: occurrence in Nebraska and seed transmission in soybeans [J]. Plant Disease, 1983, 67: 230-233

[3] Ross J P. Response of early-and late-planted soybeans to natural infection by bean pod mottle virus [J]. Plant Disease, 1986, 70: 222-224

[4] Giesler L J, Ghabrial S A, Hunt T E, et al. Bean pod mottle virus: a threat to U. S. soybean production [J]. Plant Disease, 2002, 86: 1280-1289

[5] Michelutti R, Tu J C, Hunt DWA, et al. First report of bean pod mottle virus soybean in Canada [J]. Plant Disease, 2002, 86: 330

[6] Anjos J R N, Brioso P S T, Charchar M J A. Partial characterization of bean pod mottle virus in soybeans in Brazil [J]. Fitopatologia Brasileira, 1999, 24(1): 85-87

[7] Fribourg C E, Perez W. Bean pod mottle virus (BPMV) affecting *Glycine max* (L.) Merr. in the Peruvian jungle [J]. Fitopatologia, 1994, 29(3): 207-210