

加拿大进口大麦中小麦线条花叶病毒检疫鉴定

柳吉芹¹, 王立杉^{1,2}, 吴曦¹, 钱云开¹, 高飞¹, 王海洋^{1*}

(1. 秦皇岛海关, 秦皇岛 066004; 2. 河北科技师范学院, 秦皇岛 066004)

摘要 小麦线条花叶病毒(WSMV)是我国进境植物检疫性有害生物。2018年5月秦皇岛海关利用反转录PCR(RT-PCR)和双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA),从加拿大进口的大麦中检出WSMV。同时利用实时荧光定量PCR(Real time RT-qPCR)和序列比对分析方法进行了验证。这是我国首次在进境加拿大大麦中截获WSMV。

关键词 小麦线条花叶病毒; 大麦; PCR; ELISA; 序列比对分析

中图分类号: S 435.121 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018409

Identification of *Wheat streak mottle virus* on imported barley from Canada

LIU Jiqin¹, WANG Lishan^{1,2}, WU Xi¹, QIAN Yunkai¹, GAO Fei¹, WANG Haiyang¹

(1. Qinhuangdao Custom, Qinhuangdao 066004, China; 2. Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066004, China)

Abstract *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) was one of the most important quarantine pests in China, which had caused significant economic losses in USA. WSMV was detected in the samples of imported barley from Canada using reverse transcription PCR (RT-PCR) and double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) methods by Qinhuangdao custom in May 2018, which was further confirmed by real time RT-qPCR and sequence alignment analysis. This was the first report on interception of WSMV on imported barley from Canada.

Key words *Wheat streak mosaic virus*; barley; PCR; ELISA; sequence alignment analysis

小麦线条花叶病毒 *Wheat streak mosaic virus* (WSMV)是马铃薯Y病毒科 *Potyviridae*, 小麦花叶病毒属 *Tritimovirus* 成员^[1],是我国进境植物检疫性有害生物。20世纪20年代,该病毒首次发生于美国中部平原地区^[2],后蔓延至澳大利亚、加拿大、乌克兰等国家或地区^[3]。小麦线条花叶病毒可侵染小麦、燕麦、大麦及部分玉米品种^[4],引起寄主植物严重花叶和矮化,最高可引起减产100%。该病毒容易通过汁液摩擦方式近距离扩散,并能通过带病种子的调运远距离传播,传毒介体为小麦卷叶螨 *Aceria tosichella*^[5]。1982年该病毒曾在我国新疆、甘肃局部地区发生过,之后未见报道^[6-7]。由于该病毒的自然寄主小麦为我国的主要粮食作物,一旦扩散,必将会对我国的农业生产和生态环境安全造成巨大威胁,因此需加强该病毒的检疫。2018年5月,我们通过血清学、分子生物学检测法,从一批

加拿大进口的大麦中检出小麦线条花叶病毒。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

小麦线条花叶病毒的阳性标准物质和WSMV的双抗体夹心酶联(DAS-ELISA)检测试剂盒购自美国Agdia公司。荧光探针与引物、One Step RT-PCR Kit(Perfect Real Time, RR064A)、One Step RT-PCR Kit(RR055A)购自TaKaRa公司。实时荧光PCR仪为ABI Steponeplus。普通PCR仪为ABI 9700。PCR产物送至北京擎科新业生物技术公司进行测序。病毒RNA提取试剂盒(RN53)购自艾德莱公司。Model 4001P电泳仪购自Life Technologies公司, Nu Genius凝胶成像系统购自Syngene公司。Multiskan Ascent酶标仪购自Thermo Scientific公司。

1.2 DAS-ELISA 检测

将大麦种子研磨成粉,取 100 mg 用于 DAS-ELISA 检测,测试方法参照试剂盒说明书。每个样品设两个平行。在酶标仪上直接读取 OD₄₀₅,当样品 OD₄₀₅≥2×阴性 OD₄₀₅时,样品被判定为阳性,即携带有病毒,否则判为阴性。

1.3 病毒 RNA 提取及 RT-PCR 检测

取 100 mg 磨碎的大麦粉,按照病毒 RNA 提取试剂盒操作说明书提取病毒 RNA。RT-PCR 扩增体系参照 One Step RT-PCR Kit 说明书,反应体系为:2×One Step Buffer 25 μL;RNase free ddH₂O 20 μL;上下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL;PrimeScript One Step Enzyme Mix 2 μL;最后加入 2 μL RNA 模板,总体积 50 μL。每个样品设 3 个平行,并设置阴性对照与空白对照。反应程序为:50℃ 30 min;94℃ 2 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 20 s,共 36 个循环;72℃ 5 min;4℃保存。PCR 产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 实时荧光 RT-qPCR 检测

实时荧光 RT-qPCR 扩增体系参照 One Step RT-PCR Kit (Perfect Real Time)说明书,反应体系为:2×One Step RT-PCR Buffer III 10 μL;RNase

free ddH₂O 5 μL;上、下游引物(20 μmol/L)各 0.6 μL;荧光 MGB 探针(20 μmol/L) 0.6 μL;ROX reference dye (50×) 0.4 μL;TaKaRa EX Taq™ HS (5U/μL) 0.4 μL;PrimeScript™ RT Enzyme Mix II 0.4 μL;最后加入 2 μL RNA 模板,总体积20 μL。每个样品设 3 个平行,并设置阴性对照与空白对照。反应程序为:42℃ 15 min,95℃ 10 s;然后 95℃ 5 s,60℃ 20 s,共 45 个循环。实时荧光 RT-qPCR 利用荧光定量 PCR 仪自带的软件进行结果分析,根据阴性对照结果设定阈值线,扩增曲线及样品 Ct 值由软件自动生成。

1.5 序列分析

利用 DNASTar 分析软件对测定的 PCR 序列进行装配;序列同源性比较分析采用 BLAST(Basic Local Alignment Search Tools)工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>);序列多重比对采用 Cluster X;系统进化树分析采用 MEGA 5.0 软件,通过邻接法(NJ)构建系统发育树作聚类分析,Bootstrap 自展检验重复 1 000 次。

1.6 引物与探针序列

引物与探针序列见表 1。

表 1 检测 WSMV 的引物与探针
Table 1 Primers and probes for detection of WSMV

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增产物/bp Amplicon	用途 Usage
WSMV-CP-F571	AACACCTGGATAAAAAGAGGCAT	700 ^[8]	CP gene fragment cloning
SMV-CP-1267R	AACCCACACATAGCTACCAAG		
WSMV-F2	CGACAATCAGCAAGAGACCA	190 ^[9]	RT-PCR
WSMV-R2	TGAGGATCGCTGTGTTTCAG		
WSMV-F	GGCCGGTGTGCTAAGCAT	60 ^[10]	实时荧光 RT-qPCR
WSMV-R	GCACCGCGCATGATGAA		
WSMV-P	FAM-CAATATTGTGGCAGCGTGT-MGB		

2 结果与分析

2.1 DAS-ELISA 检测结果

经 DAS-ELISA 分析发现,大麦两个平行样品 OD₄₀₅均值为 0.393,阳性对照 OD₄₀₅为 0.663,阴性对照 OD₄₀₅为 0.113,空白对照 OD₄₀₅为 0.095(表 2)。大麦样品 OD₄₀₅>2×阴性对照 OD₄₀₅,因此大麦样品检测为阳性,即携带小麦线条花叶病毒。

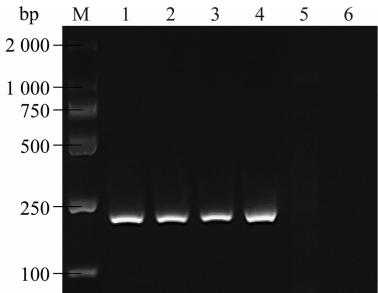
2.2 RT-PCR 检测结果

大麦 3 个平行样品的总 RNA 用 WSMV-F2/R2 引物扩增均得到约 190 bp 的特异性片段,片段大小与阳

性对照一致,而阴性对照和空白对照均未出现特异性条带(图 1)。我们将此毒株命名为 WSMV-Can01。

表 2 大麦样品中 WSMV 的 DAS-ELISA 检测结果
Table 2 Detection results of DAS-ELISA for WSMV in barley samples

样品 Sample	OD ₄₀₅
大麦-1 Barley-1	0.342
大麦-2 Barley-2	0.444
阳性对照 Positive control	0.663
阴性对照 Negative control	0.113
提取缓冲液 Extraction buffer	0.095



M: DL2000 DNA Marker; 1~3: 大麦样品; 4: 阳性对照; 5: 阴性对照; 6 :空白对照(水)
M: DL2000 DNA Marker; 1~3: Barley samples; 4: Positive control; 5: Negative control; 6: Water control

图 1 进口大麦样品中 WSMV 的 RT-PCR 电泳图
Fig. 1 Electropherogram of RT-PCR amplification products of WSMV from imported barley

2.3 实时荧光 RT-qPCR 检测结果

实时荧光 RT-qPCR 分析发现,大麦 3 个平行样品均有典型的扩增曲线,*C_t* 均值为 32. 41,阳性对照 *C_t* 值为 28. 01,阴性对照和空白对照均无扩增(图 2),该结果进一步证实该批大麦样品含有小麦线条花叶病毒。

2.4 CP 基因克隆

利用特异性引物 WSMV-CP-F571/WSMV-CP-1267R 对 CP 基因片段进行 PCR 扩增,得到约 700 bp 的特异性条带,而阴性对照和空白对照均无扩增(图 3)。

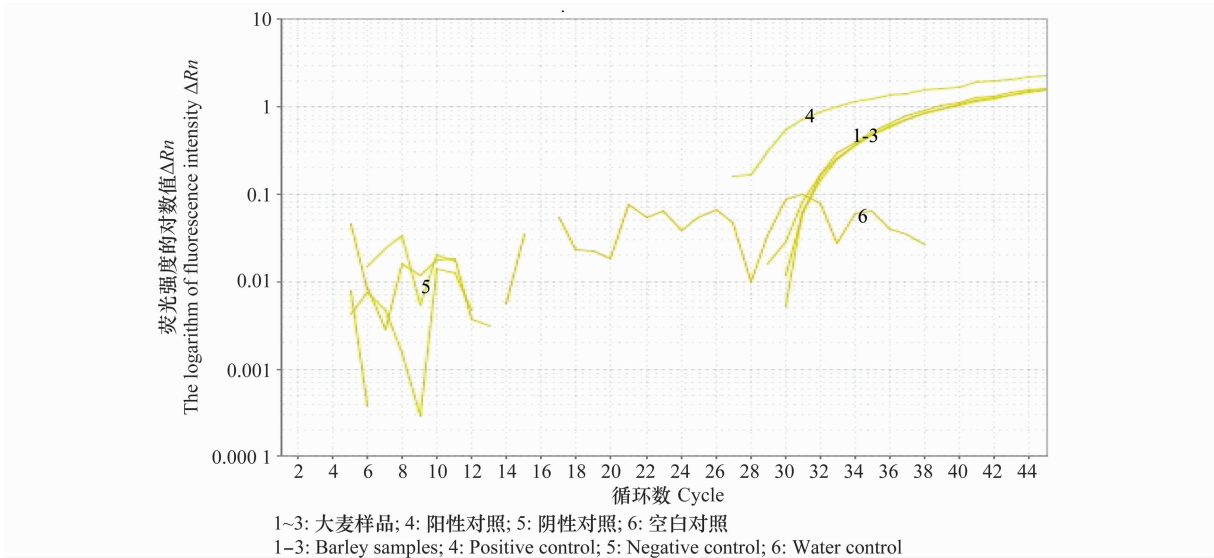
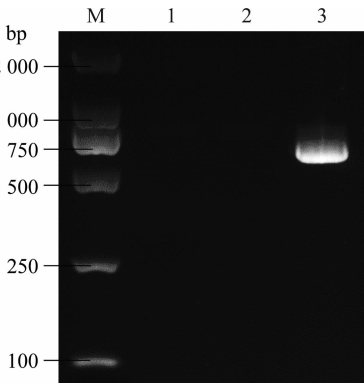


图 2 进口大麦样品中 WSMV 的实时荧光 RT-qPCR 扩增结果

Fig. 2 Result of real time fluorescence RT-qPCR amplification of WSMV from imported barley



M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照; 2:空白对照; 3: 大麦样品
M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2: Water control; 3: Barley sample

图 3 WSMV CP 基因片段电泳图

Fig. 3 Electropherogram of CP gene of WSMV fragment amplification

2.5 序列比对与系统进化分析

将上述约 700 bp 的扩增产物测序并进行 NCBI BLAST 比对分析,发现 WSMV-Can01 与美国已发生的小麦线条花叶病毒相似度最高。从数据库中下载与其相似度较高的 WSMV 序列,以燕麦坏死斑驳病毒 *Oat necrotic mottle virus* (ONMV)作为外群,构建系统发育树(图 4)。系统发育图显示:本次从加拿大进口大麦中检出的 WSMV-Can01 与美国分离株 CO87、PV57 聚为 1 支,其相似度达 99%;与美国分离株 Sindexy 81、加拿大分离株 IHC 聚为第 2 支,相似度为 98%;与美国分离株 MON96、WA 99、阿根廷分离株 Arg2 聚为第 3 支,相似度为 97%;与伊朗分离株 Iran 聚为第 4 支,相似度为 95%;与捷克分离株 Czech、德国分离株 Hoym、法国分离株 Marmagne 聚为第 5 支,相似度为 93%~94%;

与墨西哥分离株 EI Batan 3 亲缘关系较远,后者独自聚为一个分支。此外,ONMV(AY377938)作为外群与 WSMV-Can01 的亲缘关系更远。2002 年 Stenger

等基于 WSMV CP 全长基因(1 267 bp)构建系统进化树,发现 WSMV 可分为 A、B、C、D 4 个不同的簇^[11], WSMV-Can01 属于 D 簇。

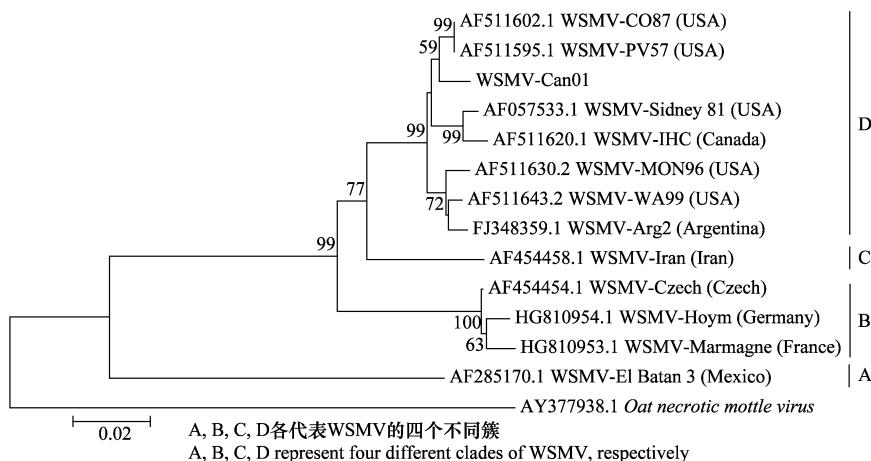


图 4 基于 WSMV CP 基因序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of WSMV based on coat protein gene using the neighbor-joining method

3 讨论

为确保检测结果的准确性,我们采用了 RT-PCR、实时荧光 RT-qPCR 和 DAS-ELISA 三种方法进行鉴定,并通过对 WSMV CP 基因片段的测序与比对分析,最终证实加拿大进境的大麦中含有小麦线条花叶病毒。本研究基于 CP 基因片段构建的系统进化树与 Stenger 等基于 CP 全长基因构建的系统树基本一致^[11],表明该片段具有足够的多态性和进化特征。加拿大进境的大麦中检测到的小麦线条花叶病毒与美国分离株相似度最高,而与加拿大分离株相似度略低,这可能与两个国家之间的种子调运密切相关。该批疫麦 19 994 t,拟作啤酒原料。目前世界上还没有有效的化学药剂以及种子处理技术来防治小麦线条花叶病毒和小麦卷叶螨。为防止疫情扩散,秦皇岛海关加强监管,对该批大麦储存场所,卸货、运输过程,加工工艺、下脚料处理等环节进行风险评估;制定专项监管方案,防止接卸、储存、加工过程中疫情扩散;监督货物存放,避免交叉污染;及时对下脚料、成品及生产用水实施无害化处理。

参考文献

[1] STENGER D C, HALL J S, CHOI I R, et al. Phylogenetic relationships within the family *Potyviridae*: wheat streak mosaic virus and brome streak mosaic virus are not members of the genus *Rymovirus* [J]. *Phytopathology*, 1998, 88(8): 782 - 787.
[2] MCKINNEY H H. Mosaic diseases of wheat and related cereals [R]. Circular No 442. US Department of Agriculture, Washington

DC, 1937: 1 - 23.
[3] XU Ying. Establishment of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Wheat streak mosaic virus* [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2014, 15 (11): 1857 - 1859.
[4] LEHNHOFF E A, MILLER Z, MENALLED F, et al. Wheat and barley susceptibility and tolerance to multiple isolates of *Wheat streak mosaic virus* [J]. *Plant Disease*, 2015, 99 (10): 1383 - 1389.
[5] LI Hongjie, CONNER R L, CHEN Qin, et al. Promising genetic resources for resistance to *Wheat streak mosaic virus* and the wheat curl mite in wheat-*Thinopyrum*, partial amphiploids and their derivatives [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2005, 51(8): 827 - 835.
[6] 谢浩, 王志民, 李维琪, 等. 新疆小麦线条花叶病毒 (WSMV) 的研究 [J]. *植物病理学报*, 1982, 12(1): 5 - 10.
[7] 谢浩. 小麦线条花叶病毒的发生与防治 [J]. *新疆农垦科技*, 1983(3): 7 - 12.
[8] STENGER D C, FRENCH R. *Wheat streak mosaic virus* genotypes introduced to Argentina are closely related to isolates from the American Pacific Northwest and Australia [J]. *Archives of Virology*, 2009, 154(2): 331 - 336.
[9] DEB M, ANDERSON J M. Development of a multiplexed PCR detection method for Barley and *Cereal yellow dwarf viruses*, *Wheat spindle streak virus*, *Wheat streak mosaic virus* and *Soil-borne wheat mosaic virus* [J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 148: 17 - 24.
[10] 闻伟刚, 谭钟, 张吉红, 等. 检测小麦线条花叶病毒的 Taqman MGB 探针技术 [J]. *麦类作物学报*, 2009, 29(2): 351 - 355.
[11] STENGER D C, SEIFERS D L, FRENCH R. Patterns of polymorphism in *Wheat streak mosaic virus*: sequence space explored by a clade of closely related viral genotypes rivals that between the most divergent strains [J]. *Virology*, 2002, 302(1): 58 - 70.

(责任编辑: 杨明丽)