

# 泰国进口玉米种子玉米褪绿斑驳病毒的检测

雷屈文<sup>1,2</sup> 李旻<sup>1</sup> 丁元明<sup>1</sup> 王云月<sup>2</sup>

1. 云南出入境检验检疫局, 昆明 650228; 2. 云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201

**摘要** 采用 DAS-ELISA 对从泰国进口的 6 个玉米品种的种子进行玉米褪绿斑驳病毒 (*Maize chlorotic mottle virus*, MCMV) 检测, 结果显示其中 1 个样品为 MCMV 阳性, 其他品种为阴性。RT-PCR 检测结果进一步证实该样品为阳性。对 PCR 产物进行测序, 将分离物序列与已发布的 23 条 MCMV 序列进行比对和系统进化分析, 结果表明该分离物的序列与中国分离物和泰国分离物的遗传距离较近, 同分化在进化树的同一个簇。取 5 号样品的 100 粒种子进行 DAS-ELISA 检测, 结果仅有 2 粒种子为阳性, 即 MCMV 的检出率为 2%。

**关键词** 玉米种子; 玉米褪绿斑驳病毒 (MCMV); 序列分析; 检测

**中图分类号** S 41-31; S 432.4<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0051-04

玉米褪绿斑驳病毒 (*Maize chlorotic mottle virus*, MCMV) 是中国检疫性植物病毒。MCMV 为番茄丛矮病毒科 (*Tombusviridae*) 玉米褪绿斑驳病毒属 (*Machlomovirus*) 的模式种, 可通过昆虫介体和种子传播。1974 年, MCMV 首次在秘鲁被发现, 因感病植株症状表现为叶片逐渐失绿、变黄, 整片叶表现呈黄绿相间的斑驳条斑, 故命名为玉米褪绿斑驳病毒<sup>[1]</sup>。MCMV 与小麦线条花叶病毒 (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV)、甘蔗花叶病毒 (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) 或玉米矮花叶病毒 (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) 复合侵染, 形成玉米致死性坏死病 (maize lethal necrosis, MLN), 可造成平均高达 75% 的产量损失, 给玉米生产带来毁灭性灾害<sup>[2]</sup>。在美国, MLN 最早于 1976 年在堪萨斯州、内布拉斯加州和迪凯特县发现, 最高损失可超过 90%<sup>[3]</sup>。

玉米致死性坏死病 (MLN) 主要分布在秘鲁、美国的堪萨斯州和内布拉斯加州及夏威夷、墨西哥、阿根廷、泰国、肯尼亚和中国云南<sup>[1,4-6]</sup>。Wangai 等<sup>[6]</sup>调查发现, 2011 年 9 月至 2012 年 3 月在肯尼亚 MLN 的病区从海拔 1 900 m 扩展到海拔 2 100 m 地区, 是由玉米褪绿斑驳病毒 (MCMV) 和小麦线条花叶病毒 (WSMV) 引起的。这是该病害首次在非洲发生的报道。

目前, 在中国 MLN 仅云南省有报道, 并未见扩散<sup>[7]</sup>。MCMV 与其他病毒混合侵染发生 MLN 的症状会比单独侵染的症状严重<sup>[8]</sup>, SCMV 和 MCDV 在中国多数玉米产区都有发生<sup>[3]</sup>, 若发生面积不断增加, 将会给玉米产业带来严重影响, 因此, 对进口玉米实行检疫, 严防该病毒入侵, 对中国玉米生产十分重要。笔者采用 ELISA 和 RT-PCR 两种方法从泰国进口的玉米种子中检测到 MCMV。这是中国首次从泰国进口玉米种子中检出该病毒。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

2012 年云南出入境检验检疫局从泰国进口玉米种子中抽检一批 6 个品种, 编号 1~6 号。

### 1.2 DAS-ELISA 检测

将玉米种子进行催芽, 待长出 2~3 片真叶时, 取第 2 片真叶进行研磨, 并按照试剂盒 (美国 Agdia 公司) 说明书完成操作。品种检测时随机选择 20 粒种子进行催芽, 所有植株都取样并混合研磨。种子带毒检测时取 100 粒种子进行催芽, 按单株取样研磨。阴性对照和阳性对照购于美国 Agdia 公司。

### 1.3 总 RNA 提取

取第 2 片真叶, 用液氮研磨成粉末后移入 2.0 mL 灭菌离心管中, 加入 1 mL Trizol 试剂, 剧烈

收稿日期: 2013-05-16

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2011IK179)

雷屈文, 硕士研究生。研究方向: 植物病毒病害及检验检疫。E-mail: leiminhui1997@163.com

通讯作者: 丁元明, 硕士, 研究员。研究方向: 植物病毒病害及检验检疫。E-mail: 13808735816@163.com

振荡摇匀; 4℃、12 000 r/min 离心 10 min 后, 将上清液转移到新的 2.0 mL 离心管中; 加 0.5 mL 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 然后在室温下静置 10 min, 4℃、12 000 r/min 离心 15 min; 将上层水相转移到新的 2.0 mL 离心管中, 加等体积异丙醇, 颠倒混匀, 室温下静置 15 min; 4℃、12 000 r/min 离心 10 min 后倒掉上清液, 加入 75% 的乙醇洗涤沉淀后, 4℃、12 000 r/min 离心 5 min, 弃去乙醇; 再加入无水乙醇洗涤沉淀后, 4℃、12 000 r/min 离心 5 min, 弃去乙醇; 将沉淀置于真空浓缩仪中干燥后, 溶于 50  $\mu$ L DEPC 处理的水中, 总 RNA 直接用于反转录或置于 -80℃ 保存备用。

#### 1.4 RT-PCR 反应

取 3  $\mu$ L 总 RNA, 分别加入 20 mmol/L 随机引物和 20 mmol/L Oligod(T) 各 1  $\mu$ L 和 DEPC 处理的水 13  $\mu$ L, 70℃ 热变性 5 min 后迅速置于冰上, 再加入 5 $\times$ RT buffer 5  $\mu$ L, 5 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 40 U/ $\mu$ L PRI 0.5  $\mu$ L, 200 U/ $\mu$ L M-MLV 反转录酶 0.5  $\mu$ L, 混匀后进行反应。反应条件为 30℃ 30 min, 42℃ 1 h, 70℃ 10 min。完成后直接用于 PCR 检测或置于 -20℃ 保存备用。

根据 MCMV 外壳蛋白(cp)保守序列设计引物 CP194F(5'-TTCTCGAGATTCCAGTGTGYG-3') 和 CP615R(5'-CGCTTGTGTTGCACTAGCTTTR-3') 进行 PCR 检测, 扩增产物大小为 422 bp。反应体系: cDNA 0.5  $\mu$ L、10 $\times$  PCR Buffer 2  $\mu$ L、5 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ L、10 mmol/L CP194F 0.5  $\mu$ L、10 mmol/L CP615R 0.5  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L Taq 酶 0.2  $\mu$ L 和灭菌水 16  $\mu$ L。反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物于 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

#### 1.5 序列测定

PCR 产物序列测定由 Invitrogen 公司完成。采用 MEGA 5.04 软件对测序结果进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 DAS-ELISA 检测

对进口玉米种子的 6 个样品进行针对 MCMV 的 DAS-ELISA 检测, 结果显示: 1、2、3、4、6 号样品的 P/N 值都小于 2.0, 均为阴性; 5 号样品的 P/N 值大于 2.0, 为阳性(表 1)。这表明 5 号样品中检测出 MCMV。

表 1 泰国进口玉米种子 DAS-ELISA 检测

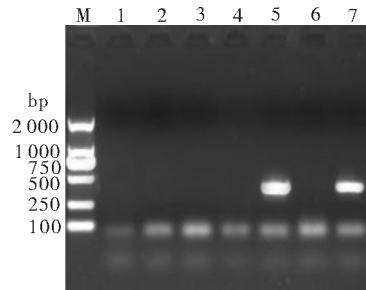
Table 1 Result of DAS-ELISA for the detection MCMV from maize seeds imported from Thailand

项目 Items	样品编号 Samples No.						阴性对照 Negative control
	1	2	3	4	5	6	
$D_{405}$	0.186	0.060	0.143	0.100	0.903	0.180	0.117
P/N <sup>1)</sup>	1.586	0.513	1.225	0.856	7.718	1.536	/
结果 Result	-	-	-	-	+	-	/

$$1) P/N = \frac{D_{405}(\text{样品 sample})}{D_{405}(\text{阴性对照 negative control})}$$

### 2.2 RT-PCR 检测

利用引物 CP194F/CP615R 对 6 个样品进行 RT-PCR 扩增, 其扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 结果只有 5 号样品得到 422 bp 的目标条带, 与阳性对照的片段大小一致(图 1)。这也表明 5 号样品中携带 MCMV。



M: DL 2 000 Marker (TaKaRa); 1~6: 1~6 号样品 Sample No. 1-6; 7: 阳性对照 Positive control.

图 1 RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

### 2.3 PCR 产物测序及序列分析

对 5 号样品的 PCR 产物进行测序, 并进行序列分析。测序结果表明, 从 5 号样品获得的扩增片段为 422 bp, 用软件 MEGA 将该序列与 GenBank 公布的 23 条 MCMV cp 序列进行比对和系统进化分析。用 Kimura 2-parameter model 计算这些序列的遗传距离, 结果显示, 来源于泰国玉米种子的 MCMV 分离物的序列与中国分离物(登录号 JQ943668、JQ943675 和 JQ982470)的遗传距离最小, 为 0.007, 与其他中国分离物的遗传距离为 0.014~0.037; 与美国内布拉斯加分离物 EU58605 的遗传距离最大, 为 0.109; 与泰国分离物的遗传距离为 0.022。

用 Neighbor-Joining 方法建立这 24 条 MCM-

V<sub>cp</sub> 序列的系统进化树(图 2)。结果表明,这 24 条序列聚为 2 个簇,本试验所测定的来源于泰国种子的分离物与其他 20 条亚洲分离物和 1 条美国分离物序列聚为同一簇,序列 X14736 和美国内布拉加斯分离物(EU58605)聚为另一簇。

### 2.4 种子带毒率检测

抽取 5 号品种的 100 粒种子,采用 DAS-ELISA 法分别进行 MCMV 检测,其中 2 粒种子的检测结果为阳性, P/N 值分别为 9.869 和 9.596,其他样品的 P/N 值均小于 2, MCMV 检出率为 2%。

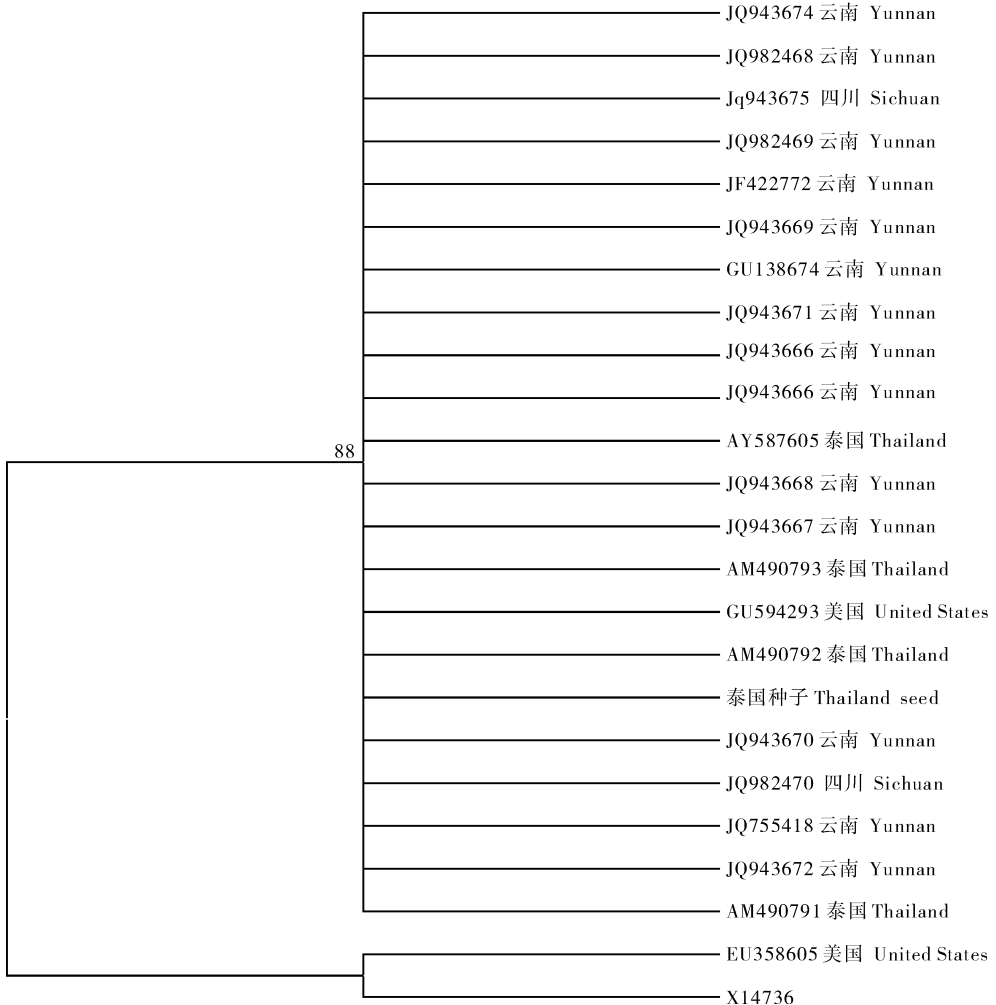


图 2 MCMV cp 基因核酸序列的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of nucleic acid sequences of cp gene of MCMV

## 3 讨 论

遗传距离分析说明,供试进口泰国玉米种子分离物与已发布的中国分离物有非常近的亲缘关系,表明该分离物与中国分离物可能有相同的来源,但还不足以说明中国的 MCMV 来源于泰国。中国和泰国分离物间的遗传距离为 0.007~0.044,说明亚洲分离物的亲缘关系较近。美国内布拉加斯分离物 EU58605 与所有中国分离物和泰国分离物的遗传距离均大于 0.100,与 X14736 的遗传距离较近(0.014),而美国分离物 GU594293 却与亚洲分离物

的遗传距离较近(0.007~0.022),说明美国存在 2 个来源的分离物,其中一个与亚洲分离物有着很近的亲缘关系,表明有可能亚洲分离物也是来源于美国。

MCMV 可与 WSMV、SCMV 或 MDMV 感染而引发的 MLN,对玉米生产造成巨大的损失,而且 MDMV 和 SCMV 是中国玉米产区常见的病毒,所以要防止 MLN 在我国发生和危害的根本措施之一就是要加强 MCMV 的检疫。MCMV 发生的报道长期都局限于美洲,近年在肯尼亚也有发生的报道。泰国分离物仅见序列发布,笔者首次从泰国种

子中检出 MCMV。刘洪义等<sup>[9]</sup>也在从德国进口的玉米中检出 MCMV。这说明在目前国际种子贸易发达的情况下,能传带 MCMV 的种子来源不仅仅是美洲,故必须重视对其他国家进口种子的检疫。中国除了 2009 年报道云南省发生了 MLN 以外,尚无其他发生区的报道<sup>[7]</sup>。在 GenBank 中已有云南省元江和元谋分离物以及四川攀枝花分离物的序列,表明在中国西南 MCMV 有零星发生。MCMV 除可以随种子传播外,还可以通过西花蓟马(*Frankliniella williamsi*)传播。西花蓟马在中国云南省和北京市部分地区广泛分布,在山东、浙江等地也有少量分布,因此,MCMV 在云南省具备扩散的条件<sup>[10]</sup>。玉米是云南省的重要作物之一,对云南省的农业意义重大。同时,云南省的热带和亚热带地区作为中国南繁基地之一,种子调运频繁。为了阻止 MCMV 进一步扩散,还必须加强对国内调运种子的健康检测,一旦造成 MCMV 的扩散,将对玉米生产带来严重影响。

### 参 考 文 献

[1] CASTILLO J, HEBERT T T. A new virus disease of maize in Peru [J]. *Fitopatologia*, 1974(9): 79-84.

- [2] JENSEN S G. Laboratory transmission of maize chlorotic mottle virus by three species of corn root worms [J]. *Plant Disease*, 1985, 69(10): 864-868.
- [3] 于洋, 何月秋, 李旻, 等. 玉米致死性坏死病研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(20): 12192-12194, 12266.
- [4] NIBLETT C L, CLAFLIN L E. Corn lethal necrosis: a new virus disease of corn in Kansas [J]. *Plant Disease*, 1978, 62(1): 15-19.
- [5] UYMEOTO J K, BOCKELMAN D L, CLAFLIN L E. Severe outbreak of corn lethal necrosis disease in Kansas [J]. *Plant Disease*, 1980, 64(1): 99-100.
- [6] WANGAI A W, REDINBAUGH M G, KINYUA Z M, et al. First report of *Maize chlorotic mottle virus* and maize lethal necrosis in Kenya [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(10): 1582.
- [7] XIE L, ZHANG J Z, WANG Q, et al. Characterization of *Maize chlorotic mottle virus* associated with maize lethal necrosis disease in China [J]. *Phytopathol*, 2010, 159: 191-193.
- [8] SCHEETS K. Maize chlorotic mottle *Machlomovirus* and wheat streak mosaic removers concentrations increase in the synergistic disease corn lethal necrosis [J]. *Virology*, 1998, 242: 28-38.
- [9] 刘洪义, 刘忠梅, 张金兰, 等. 进境玉米种子中玉米褪绿斑驳病毒的检测鉴定 [J]. *东北农业大学学报*, 2011, 42(10): 36-40.
- [10] JIANG X Q, MEINKE L J, WRIGHT R J, et al. Maize chlorotic mottle virus in Hawaiian-grown maize: vector relations, host range and associated viruses [J]. *Crop Protection*, 1992, 11(3): 248-254.

## Detection of *Maize chlorotic mottle virus* in maize seeds imported from Thailand

LEI Qu-wen<sup>1,2</sup> LI Min<sup>1</sup> DING Yuan-ming<sup>1</sup> WANG Yun-yue<sup>2</sup>

1. Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Kunming 650228, China;

2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

**Abstract** Maize seeds imported from Thailand were tested for *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) with DAS-ELISA. Among 6 varieties, Sample 5 was positive and others were negative. The result of RT-PCR also showed that Sample 5 was positive. The sequence of the RT-PCR product was determined. This sequence was aligned with 23 sequences of other MCMV isolates and a phylogenetic analysis was completed. The result illustrated that this isolate had short genetic distance to Chinese or Thai isolates and clustered in the same group. 100 seeds of sample 5 were detected for MCMV with DAS-ELISA method and 2 seeds were positive, so the detection rate of MCMV was 2%.

**Key words** maize seeds; *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV); sequence analysis; detection