

# 普通菜豆种传病毒的分子鉴定

李 畅<sup>1</sup>, 付雅莉<sup>1</sup>, 谭 颖<sup>1</sup>, 卢 宏<sup>1</sup>, 冯国军<sup>2</sup>, 徐启江<sup>1</sup>

(1. 东北林业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江大学 农作物研究院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘 要:**菜豆普通花叶病毒(BCMV)、菜豆黄花叶病毒(BYMV)和南方菜豆花叶病毒(SBMV)是黑龙江省菜豆主要的种子传播病毒。为分析菜豆种质资源携带病毒的状况,以 6 份普通菜豆种子的胚根、胚芽和子叶为试材,采用 CTAB 法提取总 RNA 和基因组 DNA,根据 BCMV、BYMV 和 SBMV 的衣壳蛋白基因序列设计特异引物,通过 PCR 和 RT-PCR 对 180 份菜豆资源进行病毒检测。结果表明:RT-PCR 对 BCMV、BYMV 和 SBMV 的检出率分别为 12.78%、9.44%和 1.67%;PCR 的检出率分别为 12.78%、8.33%和 1.67%。所收集的 6 种菜豆种质资源均检出 1~3 种病毒,其中 BCMV 和 BYMV 是主要的病毒种类。

**关键词:**菜豆;菜豆普通花叶病毒;菜豆黄花叶病毒;南方菜豆花叶病毒;PCR;RT-PCR

**中图分类号:**S 632 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)10-0107-05

普通菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)是一种重要的植物性营养源,在亚洲、欧洲和美洲广泛种植<sup>[1]</sup>,含有丰富的蛋白质、碳水化合物、纤维素、矿物质及维生素<sup>[2-3]</sup>以及大量的生物活性成分,例如黄酮醇、异黄酮、酚酸和鞣酸等<sup>[4]</sup>。因此,普通菜豆及其产品被归类为功能性食品,食疗价值很高,具有免疫调节、抗增殖、抗肿瘤、杀真菌、抗 HIV-1 逆转录酶活性等功效<sup>[5-10]</sup>。

菜豆病毒病作为一种系统性病害在我国各地普遍发生,是影响产量的重要因素<sup>[11]</sup>。迄今,已知自然侵染菜豆属植物的病毒达 34 种<sup>[12]</sup>,包括菜豆普通花叶病毒

(bean common mosaic virus, BCMV)、菜豆黄花叶病毒(bean yellow mosaic virus, BYMV)、南方菜豆花叶病毒(southern bean mosaic virus, SBMV)。其中, BCMV 的发生最为广泛,且具有极强的破坏性<sup>[12]</sup>。这些病毒可以在菜豆种子中长期存活、传播而造成危害, BCMV 可在宿存 30 年后仍具有侵染力<sup>[13]</sup>。开展生产用种的带毒检测,保障无病毒携带的种子是菜豆生产的基础。该研究以 6 份菜豆品种种子的胚根、胚芽、子叶为试材,采用 PCR/RT-PCR 方法对菜豆的主要种传病毒 BCMV、BYMV 和 SBMV 进行检测,以期建立一套快速、特异的病毒分子检测技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

6 份普通菜豆种子“太空将军”、“哈优一号”、“哈优三号”、“哈菜豆 9 号”、“哈菜豆 15 号”和“哈菜豆 16 号”

**第一作者简介:**李畅(1990-),女,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail:344264993@qq.com.

**责任作者:**徐启江(1969-),男,博士,教授,现主要从事植物发育分子生物学等研究工作。E-mail:qijiangxu@126.com.

**收稿日期:**2016-02-26

## Development and Verification of Molecular Markers for the Gene *rin* of Tomato Mature Mutant

LI Xiang, LIU Lei, WANG Fu, WANG Hui

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract:** Taking ‘Ruixing No. 5’ tomato as test materials, using molecular marker method, a gene-specific scar molecular mark Prin for *rin* was developed. The results showed that this mark could amplify 580 bp of DNA sequence in normal mature tomato materials, but not in genome of mature mutant *rin*. Then, the marker was used in known phenotypic offsprings of ‘Ruixing No. 5’, and the result suggested Prin could effectively identify ripening mutant.

**Keywords:** tomato (*Solanum esculentum* Mill.); ripening mutant; molecular marker

由哈尔滨市农业科学院提供,每种资源 30 份样品。将菜豆种子在实验室环境中用蒸馏水萌发,取萌发期的胚根、胚芽和子叶,液氮冷冻后-80℃冰箱中保存。

## 1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 第一链合成 参照 KIM 等<sup>[14]</sup> 操作程序,采用 CTAB 法结合植物 RNA 提取试剂盒即 RNeasy Plant Mini Kit (50) (Cat. no. 74904, Qiagen) 提取胚根、胚芽和子叶的总 RNA,利用 NanoDrop1000 微量紫外分光光度计和甲醛琼脂糖凝胶检测总 RNA 的质量和浓度。利用 oligo(dT)<sub>17</sub>、反转录酶 III (Invitrogen)、以 500 ng 总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链。

1.2.2 DNA 提取 利用 CTAB 法<sup>[15]</sup> 提取菜豆胚根、胚芽和子叶的基因组 DNA。DNA 浓度约为 283 ng·μL<sup>-1</sup>。

1.2.3 病毒的 RT-PCR 检测 以 cDNA 或基因组 DNA 为模板进行基因特异性 PCR。25 μL PCR 扩增体系中 5×KAPA HiFi 缓冲液(加 Mg<sup>2+</sup>) 5.0 μL, 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 0.75 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 的上下游特异引物各 0.75 μL, 50 ng 的模板 cDNA 或基因组 DNA, KAPA HiFi 高保真酶(1 U·μL<sup>-1</sup>, KK2501, KAPA Biosystems) 0.5 μL, 加灭菌蒸馏水至总体积 25 μL。扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶进行检测。特异引物分别是 BCMV-F (5'-TGGAATCTGGGAAGGACA-3') 和 BCMV-R (5'-CAAACAACCTGCTGCTAACG-3')、

BYMV-F (5'-ACCATAGCGACACAAGCACA-3') 和 BYMV-R (5'-GTTCTCCTCGTCTGTTCCAAC-3')、SBMV-F (5'-GAATACTCCATCGCCCCAC-3') 和 SBMV-R (5'-TCAGTTGTTCAAGGCC-3')。

## 2 结果与分析

### 2.1 RT-PCR 检测

以“太空将军”、“哈优一号”、“哈优三号”、“哈菜豆 9 号”、“哈菜豆 15 号”和“哈菜豆 16 号”菜豆的胚根、胚芽、子叶 RNA 的 cDNA 为模板,根据 NCBI 查询结果,BCMV、BYMV、SBMV 衣壳蛋白基因序列设计特异引物进行病毒的 RT-PCR 检测。3 种病毒的 PCR 产物大小分别为 714、492、851 bp。

RT-PCR 病毒检测结果表明,在 6 种菜豆资源的 180 份样品中,23 份样品携带 BYMV,17 份样品携带 BCMV,3 份样品携带 SBMV,病毒检出频率分别为 12.78%、9.44%、1.67%(表 1)。“太空将军”的种子携带 BCMV、BYMV、SBMV 的几率分别为 16.67%、13.33%、10.00%。“哈优一号”与“哈菜豆 15 号”只携带 BYMV,检出率分别为 6.67% 和 13.33%。而 BCMV、BYMV 在其它资源中均有检出。这 2 种病毒在“哈优三号”、“哈菜豆 9 号”和“哈菜豆 16 号”同时检出率分别为 10.00%、10.00%、6.67%。

表 1 菜豆种质资源 BCMV、BYMV、SBMV 的 RT-PCR 检测结果分析

Table 1 Anglysis RT-PCR detection results of BCMV, BYMV and SBMV in common bean germplasm resources

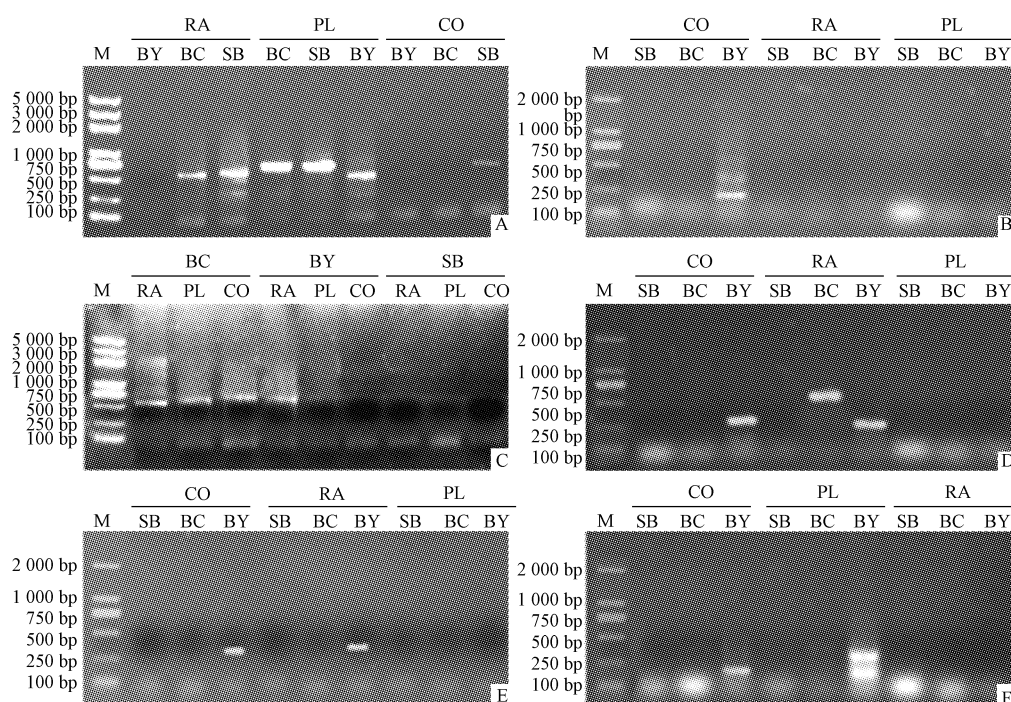
品种 Varieties	样本数 Number of detected samples	感染病毒样品数 Number of positive samples			感染病毒频率 Frequency/%		
		BYMV	BCMV	SBMV	BYMV	BCMV	SBMV
“太空将军” ‘Taikong Jiangjun’	30	5	4	3	16.67	13.33	10.00
“哈优一号” ‘Hayou 1’	30	2	0	0	6.67	0	0
“哈优三号” ‘Hayou 3’	30	5	6	0	16.67	20.00	0
“哈菜豆 9 号” ‘Ha Caidou 9’	30	4	5	0	13.33	16.67	0
“哈菜豆 15 号” ‘Ha Caidou 15’	30	4	0	0	13.33	0	0
“哈菜豆 16 号” ‘Ha Caidou 16’	30	3	2	0	10.00	6.67	0
总计 Total	180	23	17	3	12.78	9.44	1.67

胚根、胚芽、子叶的 RT-PCR 病毒检测结果(图 1)表明,“太空将军”的胚根被 BCMV 和 SBMV 复合侵染,未被 BYMV 侵染;胚芽受 BCMV、BYMV 和 SBMV 复合侵染;而子叶则被 BYMV 和 SBMV 复合侵染。“哈优一号”菜豆胚根及胚芽未被 3 种病毒侵染,而子叶则受到 BYMV 侵染。“哈优三号”种子被 BCMV 和 BYMV 复合侵染,未受到 SBMV 的侵染。BYMV 主要侵染胚根。而胚根、胚芽和子叶均受到 BCMV 侵染。“哈菜豆 9 号”的胚根被 BYMV 和 BCMV 复合侵染,子叶被 BYMV 侵染,胚芽未被病毒侵染。“哈菜豆 15 号”的胚根和子叶均受到 BYMV 病毒的侵染,胚芽没有被 3 种病毒侵染,胚根和子叶也未受到 BCMV 和 SBMV 的侵染。“哈菜豆 16 号”胚根未被病毒侵染,胚芽被 BCMV 和 BYMV 复合侵染,子叶被 BYMV 侵染。

### 2.2 PCR 检测

PCR 病毒检测结果表明,在 6 种菜豆资源的 180 份样品中,23 份样品携带 BYMV,15 份样品携带 BCMV,3 份样品携带 SBMV,病毒检出频率分别为 12.78%、8.33%、1.67%(表 2)。“太空将军”的种子携带 BYMV、BCMV、SBMV 的几率分别为 16.67%、13.33%、10.00%。“哈优一号”与“哈菜豆 15 号”只携带 BYMV,检出率分别为 6.67% 和 13.33%。而 BCMV、BYMV 在其它资源中均有检出。这 2 种病毒在“哈优三号”、“哈菜豆 9 号”和“哈菜豆 16 号”同时检出率分别为 10.00%、10.00%、6.67%。除了“哈优三号”外,其它资源的 PCR 病毒检测结果与 RT-PCR 病毒检测结果完全一致。

以“太空将军”、“哈优一号”、“哈优三号”、“哈菜豆 9 号”、“哈菜豆 15 号”和“哈菜豆 16 号”菜豆的胚根、胚芽、



注:A.“太空将军”,B.“哈优一号”,C.“哈优三号”,D.“哈菜豆9号”,E.“哈菜豆15号”,F.“哈菜豆16号”,M.DNA分子量标准DL 2 000或DL 2 000 Plus;RA.胚根,PL.胚芽,CO.子叶,BC.BCMV,BY.BYMV,SB.SBMV.下同。

Note:A.‘Taikong Jiangjun’,B.‘Hayou 1’,C.‘Hayou 3’,D.‘Ha Caidou 9’,E.‘Ha Caidou 15’,F.‘Ha Caidou 16’,M.DNA DL 2 000 or DL 2 000 Plus DNA marker;RA. radicle,PL. plumule,CO. cotyledon,BC. BCMV,BY. BYMV,SB. SBMV. The same as below.

图1 菜豆种质资源 BCMV、BYMV、SBMV 的 RT-PCR 检测结果

Fig. 1 Result of BCMV, BYMV and SBMV by RT-PCR detection

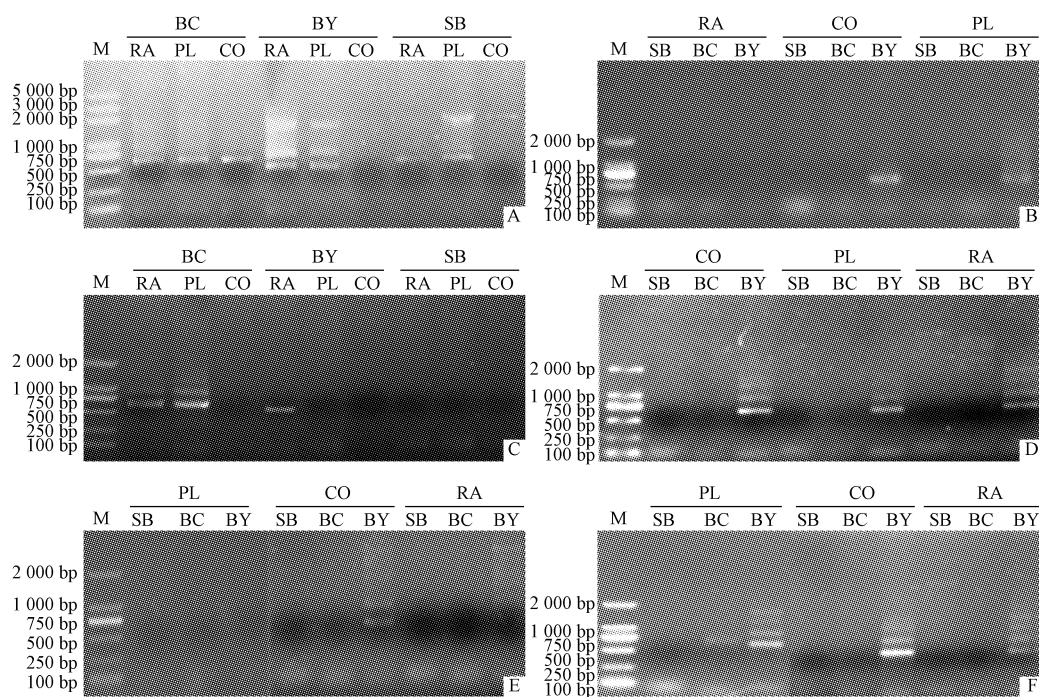


图2 菜豆种质资源 BCMV、BYMV、SBMV 的 PCR 检测结果

Fig. 2 Result of BCMV, BYMV and SBMV in common bean germplasm resources by PCR detection

子叶的基因组 DNA 为模板,检测菜豆种质资源的种传病毒感染情况。由图 2 可以看出,“太空将军”种子的胚根、胚芽均携带 BCMV、BYMV 和 SBMV,其中携带 SBMV 的量较少;而子叶只携带 BYMV 和 SBMV。“哈优一号”菜豆种子的胚根未被 3 种病毒感染,而子叶及胚芽受 BYMV 侵染。即“哈优一号”菜豆种子仅感染了 BYMV 病毒。“哈优三号”种子被 BCMV 和 BYMV 复

合侵染,未受到 SBMV 的侵染。BYMV 主要侵染胚根。而胚根和胚芽均受到 BCMV 侵染。“哈菜豆 9 号”种子胚根、胚芽和子叶均受 BYMV 侵染,而且胚根还受到 BCMV 侵染。“哈菜豆 15 号”的胚根和子叶均受到 BYMV 病毒的侵染,但是,未受到 BCMV 和 SBMV 的侵染。胚芽没有被 3 种病毒感染。“哈菜豆 16 号”的胚芽被 BCMV 和 BYMV 复合侵染,子叶和胚根被 BYMV 侵染。

表 2 菜豆种质资源 BCMV、BYMV、SBMV 的 PCR 检测结果分析

Table 2 Analysis of PCR detection results of BCMV, BYMV and SBMV in common bean germplasm resources

品种 Varieties	样本数 Number of detected samples	感染病毒样品数 Number of positive samples			感染病毒频率 Frequency/ %		
		BYMV	BCMV	SBMV	BYMV	BCMV	SBMV
“太空将军”“Taikong Jiangjun”	30	5	4	3	16.67	13.33	10.00
“哈优一号”“Hayou 1”	30	2	0	0	6.67	0	0
“哈优三号”“Hayou 3”	30	5	4	0	16.67	13.33	0
“哈菜豆 9 号”“Ha Caidou 9”	30	4	5	0	13.33	16.67	0
“哈菜豆 15 号”“Ha Caidou 15”	30	4	0	0	13.33	0	0
“哈菜豆 16 号”“Ha Caidou 16”	30	3	2	0	10.00	6.67	0
总计 Total	180	23	15	3	12.78	8.33	1.67

表 3 PCR 与 RT-PCR 检测结果比较

Table 3 Comparison of RT-PCR and general PCR in detecting viruses

品种 Varieties	胚根 RA						胚芽 PL						子叶 CO					
	BYMV		BCMV		SBMV		BYMV		BCMV		SBMV		BYMV		BCMV		SBMV	
	PCR	RT	PCR	RT	PCR	RT	PCR	RT	PCR	RT	PCR	RT	PCR	RT	PCR	RT	PCR	RT
“太空将军”“Taikong Jiangjun”	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+
“哈优一号”“Hayou 1”	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
“哈优三号”“Hayou 3”	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—
“哈菜豆 9 号”“Ha Caidou 9”	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
“哈菜豆 15 号”“Ha Caidou 15”	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
“哈菜豆 16 号”“Ha Caidou 16”	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—

### 3 讨论

病毒的 RT-PCR 检测结果表明,“太空将军”、“哈优一号”、“哈优三号”、“哈菜豆 9 号”、“哈菜豆 15 号”和“哈菜豆 16 号”都不同程度地受到病毒的侵染,或同时受 3 种、2 种病毒复合侵染,或仅受 1 种病毒单独侵染。例如,“太空将军”受 BCMV、BYMV 和 SBMV 复合侵染,“哈优三号”、“哈菜豆 9 号”、“哈菜豆 16 号”感染了 BCMV 和 BYMV 病毒,“哈优一号”、“哈菜豆 15 号”只受 BYMV 病毒侵染。不同种质对 3 种病毒的抗性存在差异,其具体的易感或抗感病毒的机制有待于进一步研究。

菜豆种子的胚根、胚芽和子叶 3 个组织抵御病毒侵染的能力不同。“太空将军”种子被 3 种病毒复合侵染。但是,只有胚芽同时感染 BCMV、BYMV 和 SBMV 病毒,而胚根感染 BCMV 和 SBMV 病毒,子叶感染 BYMV 和 SBMV 病毒。“哈优一号”只有子叶感染 BYMV 病毒,胚根及胚芽未受病毒侵染。荧光定量 RT-PCR 检测具有高灵敏、高特异性<sup>[16]</sup>,能够检测病毒的转录水平,并间接反映病毒的拷贝数<sup>[17]</sup>。有必要建立菜豆 BCMV、BYMV 和 SBMV 的荧光定量 RT-PCR 检测体系,深入分析菜豆种子的胚根、胚芽和子叶 3 个组织感染病毒的

程度。

有些样品的 PCR 产物中出现非特异性扩增条带而 RT-PCR 的扩增产物中未出现非特异性条带。但是,以 cDNA 为模板的 RT-PCR 检测结果与以基因组 DNA 为模板的 PCR 检测结果基本相同,即存在特异的目的条带(表 3)。然而,也存在一定的差异。PCR 检测结果表明,“太空将军”的胚根携带 BCMV,而 RT-PCR 未检测到 BCMV 的存在。PCR 检测到“哈优一号”、“哈菜豆 9 号”的胚芽携带 BYMV,而 RT-PCR 未检测到 BYMV 的存在。同样,PCR 检测到“哈菜豆 16 号”的胚根携带 BYMV,而 RT-PCR 未检测到 BYMV。而在“哈优三号”的子叶中 RT-PCR 检测到 BCMV,但是,PCR 未检测到。虽然设置了试验重复、更换了的模板,但结果相同。是否由于 BCMV 基因组为单链正义 RNA 而造成 PCR 与 RT-PCR 结果的差异有待于进一步分析。病毒的分子检测结果表明,“太空将军”易受 3 种病毒复合危害,其它种质资源主要受 BCMV 和 BYMV 的危害,对 SBMV 具有抗性。对于不同种质资源对同种病毒、同一种质资源对不同病毒的抗性原因需要从生理生化及分子机制上进行深入研究。

## 参考文献

- [1] JOHN K M, LUTHRIA D. Amino acid, organic acid, and sugar profiles of 3 dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Varieties[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(12): 2662-2669.
- [2] MARTINO H S D, BIGONHA S M, de MORAIS C L, et al. Nutritional and bioactive compounds of bean: Benefits to human health[J]. ACS Symposium Series, 2012, 1109: 233-258.
- [3] BALSAMO G M, VALENTIM-NETO P A, MELLO C S, et al. Comparative proteomic analysis of two varieties of genetically modified (GM) embrapa 5.1 common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their non-GM counterparts[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(48): 10569-10577.
- [4] BENINGER C W, HOSFIELD G L. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 7879-7883.
- [5] FANG E F, LIN P, WONG J H, et al. A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. extralong autumn purple bean[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 2221-2229.
- [6] LAM S K, NG T B. Apoptosis of human breast cancer cells induced by hemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* cv. Legumi secchi[J]. Food Chemistry, 2011, 126: 595-602.
- [7] CHAN Y S, NG T B. Northeast red beans produce a thermostable and pH-stable defensin-like peptide with potent antifungal activity[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2013, 66: 637-648.
- [8] CHAN Y S, WONG J H, FANG E F, et al. A hemagglutinin from northeast red beans with immunomodulatory activity and anti-proliferative and apoptosis-inducing activities toward tumor cells[J]. Protein and Peptide Letters, 2013, 20: 1159-1169.
- [9] LÓPEZ A, EL-NAGGAR T, DUEÑAS M, et al. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. Food Chemistry, 2013, 138: 547-555.
- [10] GARCÍA-LAFUENTE A, MORO C, MANCHÓN N, et al. *In vitro* anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans[J]. Food Chemistry, 2014, 161: 216-223.
- [11] 文朝慧, 王军平, 张丽萍, 等. 甘肃省河西地区菜豆病毒病分子检测[J]. 甘肃农业大学学报, 2012(6): 93-96.
- [12] LANA A F, LOHMS H, BOS L. Relationship among strains of bean common mosaic virus and blackeye cowpea mosaic virus-Members of the potyvirus group[J]. Annals of Applied Biology, 1988, 113: 493-505.
- [13] PIERCEW H, HUNGERFORD C W. A note on the longevity of the bean mosaic virus[J]. Phytopathology, 1929, 19(6): 605-606.
- [14] KIM S, YOO M-J, ALBERT V A, et al. Phylogeny and diversification of B-function MADS-box genes in angiosperms: evolutionary and functional implication of a 260-million-year-old duplication[J]. American Journal of Botany, 2004, 91: 2102-2118.
- [15] 李玉花, 刘靖华, 徐启江, 等. 现代分子生物学模块实验指南[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 8.
- [16] 李玲娣, 周常勇, 李中安, 等. 褐色橘蚜中柑橘衰退病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国农业科学, 2013, 46(3): 525-533.
- [17] ROBERTS C A, DIETZGEN R G, HEELAN L A, et al. Real-time RT-PCR fluorescent detection of Tomato spotted wilt virus[J]. Journal of Virological Methods, 2000, 88: 1-8.

Molecular Determination of Seed Borne Viruses in Common Bean(*Phaseolus vulgaris* L.)

LI Chang<sup>1</sup>, FU Yali<sup>1</sup>, TAN Ying<sup>1</sup>, LU Hong<sup>1</sup>, FENG Guojun<sup>2</sup>, XU Qijiang<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Institute for Crop Research, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080)

**Abstract:** Bean common mosaic potyvirus (BCMV), bean yellow mosaic virus (BYMV) and southern bean mosaic virus (SBMV) are the important seed borne pathogen of Heilongjiang common bean. For analyzing the status of common bean germplasm, taking the radicles, plumules, and cotyledons of six common bean seeds as materials, the genomic DNA and total RNA was extracted from different organs by CTAB method. Specific primers were designed according to published coat protein (CP) gene sequence of BCMV, BYMV and SBMV, respectively. 180 germinated seeds of common bean were tested for the presence of the three viruses by polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results of RT-PCR revealed that the average infection frequencies of BCMV, BYMV, and SBMV in common bean samples were 12.78%, 9.44% and 1.67%, respectively. Results of PCR revealed that the average infection frequencies of BCMV, BYMV and SBMV in common bean samples were 12.78%, 8.33% and 1.67%, respectively. All six common bean varieties tested were positive one, two or three viruses. The causal viruses of common bean were BCMV and BYMV.

**Keywords:** common bean (*Phaseolus vulgaris* L.); BCMV; BYMV; SBMV; PCR; RT-PCR