

TaqMan-MGB 荧光定量 IC/TC-RT-PCR 检测菜豆荚斑驳病毒

蔡伟^{1,2}, 金晶^{1,2}, 沈建国¹, 高芳奎², 廖富荣³, 吴祖建²

(1. 福清出入境检验检疫局/福建省检验检疫技术重点实验室 福建 福州 350300; 2. 福建农林大学 植物病毒研究所 福建 福州 350002; 3. 厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心 福建 厦门 361012)

摘要: 菜豆荚斑驳病毒(*Bean pod mottle virus*, BPMV) 是我国重要的检疫性有害生物, BPMV 传入的风险随大豆进境数量增多而加大。本文针对菜豆荚斑驳病毒, 以大豆种子提取液为材料, 分别建立了 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR 和 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 快速检测方法。根据 GenBank 公布的 BPMV 外壳蛋白基因序列, 选择其保守区域, 设计 1 对特异性引物和 1 条 TaqMan-MGB 探针, 测定了 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR 和 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 方法的特异性和灵敏度, 并将 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR、TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR、IC-RT-PCR 和 TC-RT-PCR 4 种检测方法的灵敏度进行比较。结果表明: 所建立的两种检测方法特异性良好; TC-RT-PCR 的灵敏度为 10^{-1} 倍病毒提取液原液; IC-RT-PCR 和 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 灵敏度相当, 为 10^{-3} 倍病毒提取液原液; TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR 灵敏度最高, 为 10^{-5} 倍病毒提取液原液, 是 IC-RT-PCR 和 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 检测方法的 10^2 倍, 是 TC-RT-PCR 检测方法的 10^4 倍; 两种检测方法均能较好应用于实际大豆样品的检测。本文所建立的 TaqMan-MGB 荧光定量 IC/TC-RT-PCR 检测方法利用抗原特异性或试管非特异性捕捉病毒粒子, 无需提取 RNA, 为进境大豆种子上 BPMV 的检测提供了稳定、快速、简便的技术依据, 其较高的灵敏度和特异性具有较好的应用价值。

关键词: TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR; TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR; 菜豆荚斑驳病毒; 检测

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.03.0489

Detection of *Bean Pod Mottle Virus* by TaqMan-MGB Real-time IC/TC-RT-PCR

CAI Wei^{1,2}, JIN Jing^{1,2}, SHEN Jian-guo¹, GAO Fang-luan², LIAO Fu-rong³, WU Zu-jian²

(1. Fuqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau/Fujian Key Laboratory for Technology Research of Inspection and Quaranting, Fuzhou 350300, China; 2. Institution of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Xiamen Key Laboratory for Technology Research of Inspection and Quarantine, Xiamen 361012, China)

Abstract: *Bean pod mottle virus* (BPMV) is regarded as an important quarantine plant pathogen in our country, the risk of BPMV spread from outside increases under the huge soybean import. TaqMan-MGB real-time IC-RT-PCR and TaqMan-MGB real-time TC-RT-PCR methods were developed to detect BPMV by using soybean seed extracts as materials. Based on the conserved region of coat protein sequences of BPMV in GenBank, primers and TaqMan-MGB probe were designed. The specificity and sensitivity of these two methods were measured and the comparison of sensitivity of TaqMan-MGB real-time IC-RT-PCR, TaqMan-MGB real-time TC-RT-PCR, IC-RT-PCR and TC-RT-PCR were operated. Two established methods had a high specificity, the comparison results indicated that TC-RT-PCR shared 10^{-1} crude extracts, IC-RT-PCR and TaqMan-MGB real-time TC-RT-PCR possessed the same sensitivity reaching 10^{-3} crude extracts while TaqMan-MGB real-time IC-RT-PCR had the highest sensitivity about 10^{-5} crude extracts. The sensitivity of TaqMan-MGB real-time IC-RT-PCR was 10^2 times more than TC-RT-PCR, 10^4 times more than TC-RT-PCR. It was practical to use the two established methods in sample detection. So the established TaqMan-MGB real-time IC/TC-RT-PCR method could meet the need of detection with specific capture of antibody or nonspecific capture of tube to catch virion and no need to isolate RNA. It provides the basic approach to detect BPMV in imported soybean seeds with required specificity and sensitivity characteristics.

Keywords: TaqMan-MGB real-time IC-RT-PCR; TaqMan-MGB real-time TC-RT-PCR; *Bean pod mottle virus* (BPMV); Detection

菜豆荚斑驳病毒(*Bean pod mottle virus*, BPMV) 是一种种传病毒, 在加拿大、美国、巴西、秘鲁等国均有发生^[1-4], 是我国禁止进境植物检疫性有害生物。BPMV 属于豇豆花叶病毒科(*Comoviridae*) 豇豆花叶病毒属(*Comovirus*) , 病毒粒体为球状, 正二十

面体, 直径约 28 nm, 为二分体正单链 RNA, 基因组由两部分构成, RNA1(约 6 kb) 编码基因组复制所需的蛋白质, RNA2(约 3.6 kb) 主要编码病毒粒子的组装和胞间运输所需的蛋白质^[5-6], BPMV 中亚组 I 和亚组 II 的重组几率高^[7]。Thomas 和 Zaumey-

收稿日期: 2015-10-21

基金项目: 福州市科技计划项目(2013-N-54); 福建出入境检验检疫局科技项目(FK2011-07); 福建省杰出青年科学基金资助项目(2014J06008); 质检公益性行业科研专项项目(201410076)。

第一作者简介: 蔡伟(1983-), 男, 硕士, 农艺师, 主要从事植物病毒学及分子生物学研究。E-mail: caiweifcjq@126.com。

通讯作者: 沈建国(1978-), 男, 博士, 高级农艺师, 主要从事植物病毒检测及防治研究。E-mail: shenjg_agri@163.com;

吴祖建(1967-), 男, 博士, 研究员, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: wuzujian@126.com。

er^[8]首次在美国查尔斯顿的菜豆品种 *Tendergreen* 上发现 BPMV, 该病毒主要侵染大豆、菜豆和豇豆等豆科植物, 为害种子和叶片, 在大豆种皮中的病毒含量高, 引起的症状为种子表皮斑驳、条斑, 叶片斑驳、畸形和皱缩。BPMV 单独侵染对大豆产量造成严重危害, 侵染时间越早, 其造成的损失越严重, 而与大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV) 复合侵染时, 造成的损失大大提高^[9-10]。

BPMV 检测方法包括生物学检测、血清学检测、电镜观察、PCR 技术等, 近年来多重 RT-PCR、免疫捕获巢式 RT-PCR、胶体金免疫层析(GICA) RT-PCR、环介导等温扩增等分子检测技术已被用于 BPMV 的检测^[11-15]。免疫捕获 RT-PCR(IC-RT-PCR) 是将抗原抗体结合的特异性和 RT-PCR 的灵敏性相结合的一种快速病毒检测方法, 无需 RNA 提取, 整个反应过程单管完成。Kumar 等^[16]利用 IC-RT-PCR 解决了葡萄中 GLRaV-3 病毒粒子分布不均, RNA 不易提取的问题。Chikh-Ali 等^[17]利用免疫捕获多重 RT-PCR 同时检测和确定不同的植物病毒以及 PVY 中的不同株系。IC-RT-PCR 检测 BPMV 不仅简化操作过程, 减少交叉污染, 而且节约检测时间^[18]。试管捕捉 RT-PCR(TC-RT-PCR) 利用试管非特异性捕捉病毒粒体, 无需 RNA 提取, 目前已成功应用于 BPMV 的检测^[19]。TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 的 MGB(minor groove binder) 探针利用非荧光猝灭基团, 其本身不产生荧光, 降低了本底信号的强度, 探针上连接 MGB 修饰基因后将其熔解温度 T_m 值提高了 10°C , MGB 探针的长度比普通 TaqMan 探针更短, 单碱基错配率降低, 增加了检测的特异性、灵敏度和稳定性^[20]。本文将免疫捕获、试管捕捉和 TaqMan-MGB 荧光定量技术相结合, 并直接以大豆种子提取液作为模板, 分别建立了 BPMV 的 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR、TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 单管检测方法, 旨在为 BPMV 的快速检测提供良好的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以携带有菜豆荚斑驳病毒(BPMV)、大豆花叶病毒(SMV)、烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot virus*, TRSV)、番茄环斑病毒(*Tomato ringspot virus*, ToRSV)、南芥菜花叶病毒(*Arabis mosaic virus*, ArMV) 和南方菜豆花叶病毒(*Southern bean mosaic virus*, SBMV) 6 种大豆种传病毒的大豆种子用于 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 特异性测定。

待检测的带病与健康大豆种子均为福建口岸进境截获的 18 份样品, 其中美国大豆 6 份, 巴西大豆 6 份, 阿根廷大豆 6 份。

1.2 引物、探针设计与合成

根据已报道的菜豆荚斑驳病毒外壳蛋白 CP 基

因序列的保守区域, 采用 ABI Primer Express 2.0 software 设计一对用于荧光定量 RT-PCR 的特异性引物和一条 TaqMan-MGB 探针(BPMV-Probe), 上游引物 BPMV-FP: 5'-ATCAGCCAAATTTCCAAATGC-TA-3', 下游引物 BPMV-RP: 5'-CTATTCTCAT-GAATATGCCAAATGC-3', 探针 BPMV-Probe: 5'-FAM-CTCCACATTGAAAGAAC-MGB-3', 引物扩增片段预计大小为 143 bp。引物和探针由上海基康生物技术有限公司合成。探针 5' 端标记的荧光报告基团是 FAM, 3' 端标记荧光淬灭基团 Non-Fluorescent Quencher 和 MGB。

1.3 样品制备

选取具有典型斑驳症状的带病大豆种子, 剥取种皮置于研钵中, 加少许液氮研碎后按 1:20(W/V) 比例加入 PBST, 充分研磨, 4°C , $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清即为病毒侵染的大豆提取液。同样, 选取健康的大豆种子, 剥取种皮后, 采用相同的方法, 制备健康大豆种子提取液。

1.4 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR

1.4.1 免疫捕获病毒粒体 在 1.5 mL PCR 管中加入 100 μL 用包被缓冲液稀释的病毒抗体, 37°C 下孵育 2 h; 倒去抗体溶液, PBST 洗板 3 次, 每次 3 min, 加入 100 μL 大豆种子提取液, 4°C 包被过夜或 37°C 孵育 2 h, PBST 洗板 3 次, 每次 3 min。

1.4.2 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 在上述 PCR 管中, 直接进行 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR。建立以下 50 μL 反应体系: 25 μL 2 \times One Step RT-PCR Buffer III, 1 μL TaKaRa Ex TaqHS ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 1 μL PrimeScript RT Enzyme Mix II, 1 μL BPMV-FP ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL BPMV-RP ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 2 μL BPMV-Probe ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL ROX Reference Dye II ($50\times$), 18 μL ddH₂O。反应程序为: 42°C 5 min; 95°C 10 s 后进入循环, 95°C 5 s, 60°C 34 s, 共 40 个循环。

1.5 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR

1.5.1 试管非特异性捕捉病毒粒体 在 1.5 mL PCR 管中加入 100 μL 大豆种子提取液, 4°C 包被过夜或 37°C 孵育 2 h, PBST 洗板 3 次, 每次 3 min。

1.5.2 实时荧光定量 RT-PCR 在上述 PCR 管中, 直接进行 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR。反应体系和反应程序同 1.4.2。

1.6 应用试验

1.6.1 特异性测定 分别以菜豆荚斑驳病毒(BPMV)、大豆花叶病毒(SMV)、烟草环斑病毒(TRSV)、番茄环斑病毒(ToRSV)、南芥菜花叶病毒(ArMV) 和南方菜豆花叶病毒(SBMV) 6 种大豆种传病毒的大豆种子为样品, 进行 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 进行特异性测定。

1.6.2 灵敏度比较 利用健康大豆种子提取液, 将

感染 BPMV 大豆种子提取液按 10 倍梯度稀释,依次稀释为原液的 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 和 10^{-8} 倍,并以健康大豆种子提取液作为阴性对照,分别比较 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR 与 IC-RT-PCR、TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 与 TC-RT-PCR 的灵敏度。

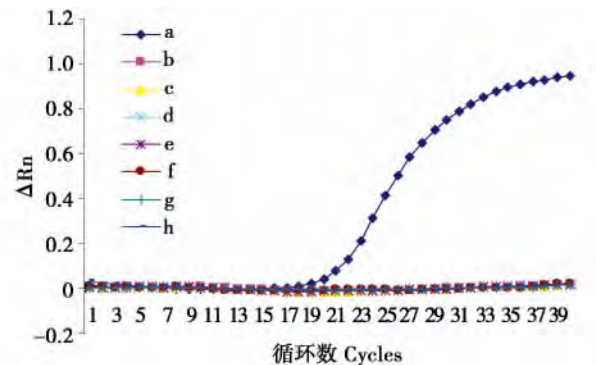
1.6.3 大豆样品的实际检测 应用建立的 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR 和 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 检测方法,对福建口岸进境的 18 份大豆样品进行检测。

2 结果与分析

2.1 引物和 MGB 探针的特异性

为验证引物和 MGB 探针的特异性,采用 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 方法对感染菜豆荚斑驳病毒(BPMV)、大豆花叶病毒(SMV)、烟草环斑病毒(TRSV)、番茄环斑病毒(ToRSV)、南芥菜花叶病毒(ArMV)、南方菜豆花叶病毒(SBMV)的样品及健康大豆进行检测。结果表明:仅菜豆荚斑驳病毒样品产生特异性扩增曲线,而其它 5 种病毒样品及健康大豆均未出现特异性扩增(图 1)。此外,利用特异性引物进行 RT-PCR 验证,结果仅菜豆荚斑驳病

毒样品有特异性条带,而其它 5 种病毒样品及健康大豆均无特异性条带。RT-PCR 产物序列测定结果显示,目的片段序列与已报道的 BPMV 序列高度一致(图 2)。上述结果表明设计的引物和 MGB 探针具有良好的特异性。



M: DNA 分子量标准(100 bp); a: BPMV; b: SMV; c: TRSV; d: ToRSV; e: ArMV; f: SBMV; g: Negative control(healthy soybean); h: 空白对照。

M: DNA Marker (100 bp); a: BPMV; b: SMV; c: TRSV; d: ToRSV; e: ArMV; f: SBMV; g: Negative control (healthy soybean); h: Blank control.

图 1 特异性测定结果

Fig. 1 Specificity of Real-time RT-PCR

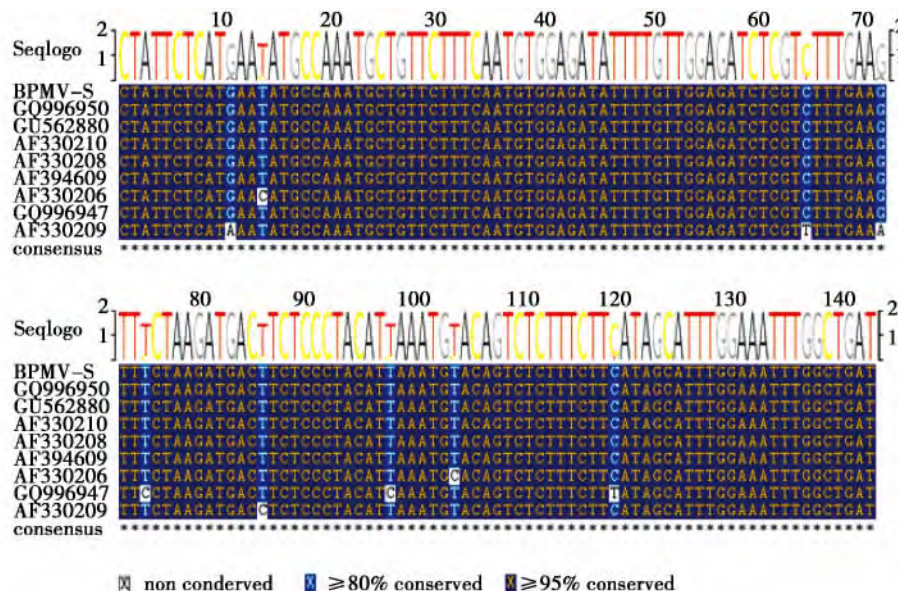


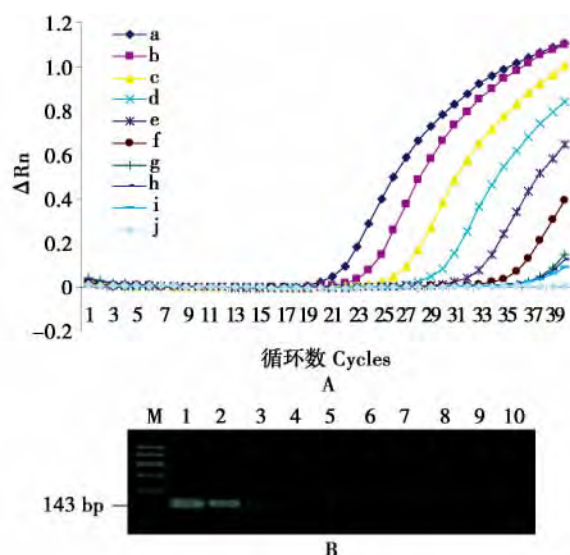
图 2 序列比对结果

Fig. 2 Result of multiple alignment of sequences

2.2 灵敏度的比较

将感染菜豆荚斑驳病毒的大豆种子提取液用健康大豆种子提取液 10 倍梯度稀释后,分别进行 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR、IC-RT-PCR、TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 和 TC-RT-PCR 检测,比较 4 种 PCR 检测方法的灵敏度。结果表明: TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR 比 IC-RT-PCR 检测灵敏度高 10^2 倍, TaqMan-MGB 荧光定量

IC-RT-PCR 可以检测到稀释 10^{-5} 倍的感病种子提取液,而 IC-RT-PCR 可以检测到稀释 10^{-3} 倍的感病种子提取液; TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 也较 TC-RT-PCR 检测灵敏度高 10^2 倍, TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 可以检测到稀释 10^{-3} 倍的感病种子提取液,而 TC-RT-PCR 可以检测到稀释 10^{-1} 倍的感病种子提取液(图 3 和图 4)。



M: DNA 分子量标准(100 bp DNA Ladder); a 和 1: BPMV 提取液(原液); b 和 2: 稀释 10^{-1} 倍; c 和 3: 稀释 10^{-2} 倍; d 和 4: 稀释 10^{-3} 倍; e 和 5: 稀释 10^{-4} 倍; f 和 6: 稀释 10^{-5} 倍; g 和 7: 稀释 10^{-6} 倍; h 和 8: 稀释 10^{-7} 倍; i 和 9: 稀释 10^{-8} 倍; j 和 10: 阴性对照(健康大豆)。下同。

M: DNA Marker(100 bp); a and 1: Crude extract of BPMV; b and 2: 10^{-1} dilution; c and 3: 10^{-2} dilution; d and 4: 10^{-3} dilution; e and 5: 10^{-4} dilution; f and 6: 10^{-5} dilution; g and 7: 10^{-6} dilution; h and 8: 10^{-7} dilution; i and 9: 10^{-8} dilution; j and 10: Negative control(healthy soybean). The same below.

图3 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR(A) 和 IC-RT-PCR(B) 检测灵敏度的比较

Fig. 3 Sensitivity comparison between TaqMan-MGB real-time IC-RT-PCR(A) and IC-RT-PCR(B)

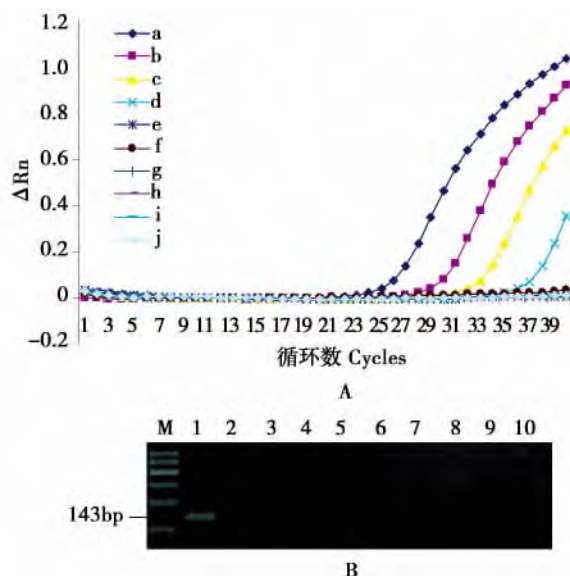


图4 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR(A) 和 TC-RT-PCR(B) 检测灵敏度的比较

Fig. 4 Sensitivity comparison between TaqMan-MGB real-time TC-RT-PCR(A) and TC-RT-PCR(B)

2.3 大豆样品检测结果

采用建立的 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR

和 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 的方法,对来自美国、巴西和阿根廷 3 个国家的大豆种子样品进行检测。结果发现,6 份美国大豆种子样品中有 5 份检测到菜豆荚斑驳病毒,检出率为 83.3%,巴西、阿根廷大豆种子样品均未检测到该病毒,且两种检测方法的结果一致。为验证检测结果,对所有样品用 IC-RT-PCR 进行检测,结果从 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR 和 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 检测为阳性的样品中均扩增出特异性条带,而阴性样品中则未扩增出特异性条带,阳性符合率达 100%,说明建立的两种荧光定量 RT-PCR 方法可以应用于进境大豆种子样品的实际检测。

3 结论与讨论

菜豆荚斑驳病毒通过汁液接触、介体昆虫菜豆萤叶甲(*Cerotoma trifurcate* Forster) 及种子传播,侵染大豆后的产量损失巨大,该病毒在美国等地发生严重^[2],我国尚未分布,但随着进出口贸易和大豆产业的迅速发展,尤其是美国大豆进境数量增加,菜豆荚斑驳病毒随进境大豆传入的风险加大。近几年,我国检疫部门多次从美国、加拿大大豆中检出菜豆荚斑驳病毒^[21-22],因此控制防范该病毒的传入,建立快速、灵敏、简便、有效的 BPMV 检测技术,对于高效的口岸检疫及控制预防该病毒的传入传播具有重要意义。

RT-PCR 技术在病毒检测中被广泛应用,与指示植物鉴定法、电镜观察、血清学检测方法相比,具有特异性强、灵敏度高、快速简便等优点,但进口的大豆主要以种子为主,大豆种子富含蛋白质及多糖等物质,从种子中提取的 RNA 质量和纯度往往不高,影响后续检测。IC-RT-PCR 利用抗原抗体结合的特异性吸附病毒粒子,TC-RT-PCR 则利用试管非特异性捕捉病毒粒子,两者均不需提取高纯度的 RNA 和使用有机溶剂,单管内完成后续的 cDNA 合成和 PCR 反应,可以有效用于大豆种子中 BPMV 的检测与鉴定。荧光定量 RT-PCR 反应迅速,不需要扩增后处理,可实时观察扩增过程,并且扩增片段小,缩短了每次循环所需时间,TaqMan-MGB 在探针上连接 MGB 修饰基因后降低本底信号强度,提高熔解温度,减少错配率。本文根据菜豆荚斑驳病毒外壳蛋白基因 CP 的保守序列,设计特异性引物和 TaqMan-MGB 荧光探针,将 TaqMan-MGB 分别和 IC-RT-PCR、TC-RT-PCR 结合检测 BPMV,利用 PCR 产物进行克隆测序,证实该方法的特异性满足检测要求。同时对比了 4 种检测方法的灵敏度,结果表明 TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR 的灵敏度最高,

达到 10^{-5} 倍病毒提取液原液; IC-RT-PCR 和 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 检测的灵敏度都能达到 10^{-3} 倍病毒提取液原液; TC-RT-PCR 只能达到 10^{-1} 倍病毒提取液原液; TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR 的灵敏度是 IC-RT-PCR 和 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 的 10^2 倍, 是 TC-RT-PCR 的 10^4 倍。因此, TaqMan-MGB 荧光定量 IC-RT-PCR 和 TaqMan-MGB 荧光定量 TC-RT-PCR 的灵敏度都能达到检测要求而不需提取 RNA, 能够特异、灵敏、稳定的检测到 BPMV。此外, 本文还利用所建立的方法对来自美国、巴西和阿根廷有斑驳症状的大豆种子疑似样品进行检测, 美国大豆种子检出率达 83.3%, 证明该方法可以有效应用于实际检测工作中。

参考文献

- [1] Michelutti R, Tu J C, Hunt D W A, et al. First report of *Bean pod mottle virus* in soybean in Canada[J]. *Plant Disease*, 2002, 86(3): 330-330.
- [2] 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(12): 1280-1289.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Pflieger S, Blanchet S, Meziadi C et al. The "one-step" *Bean pod mottle virus* (BPMV)-derived vector is a functional genomics tool for efficient overexpression of heterologous protein, virus-induced gene silencing and genetic mapping of BPMV R-gene in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *BMC plant biology*, 2014, 14(1): 232.
- [6] Lin J, Guo J, Finer J, et al. The *Bean pod mottle virus* RNA2-Encoded 58-Kilodalton protein P58 is required in cis for RNA2 accumulation[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(6): 3213-3222.
- [7] Zhang C, Gu H, Ghabrial S A. Molecular characterization of naturally occurring RNA1 recombinants of the comovirus *bean pod mottle virus* [J]. *Phytopathology*, 2007, 97(10): 1255-1262.
- [8] Zaumeyer W J, Thomas H R. Pod mottle, a virus disease of beans [J]. *Journal of Agricultural Research*, 1948, 77(3): 81-96.
- [9] Ross J P. Effect of single and double infections of *Soybean mosaic* and *Bean pod mottle viruses* on soybean yield and seed characters [J]. *Plant Disease Reporter*, 1968, 52(5): 344-348.
- [10] Ross J P. Response of early- and late-planted soybeans to natural infection by *Bean pod mottle virus* [J]. *Plant Disease*, 1986, 70(3): 222-224.
- [11] Wei Q W, Yu C, Zhang S Y, et al. One-step detection of *Bean pod mottle virus* in soybean seeds by the reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *Virology Journal*, 2012, 9(1): 187.
- [12] 闻伟刚, 杨翠云, 崔俊霞, 等. RT-LAMP 技术检测菜豆荚斑驳病毒的研究 [J]. *植物保护*, 2010, 36(6): 139-141. (Wen W G, Yang C Y, Cui J X, et al. Detection of *Bean pod mottle virus* by RT-LAMP [J]. *Plant Protection*, 2010, 36(6): 139-141.)
- [13] 李孝军, 殷汉华, 陈宇, 等. 4 种大豆种传病毒多重 RT-PCR 检测 [J]. *植物检疫*, 2011, 25(6): 33-36. (Li X J, Yin H H, Chen Y, et al. Detection of four soybean seed transmitted viruses by multiplex RT-PCR [J]. *Plant Quarantine*, 2011, 25(6): 33-36.)
- [14] 于翠, 杨翠云, 宋绍祎, 等. 进口大豆上菜豆荚斑驳病毒的免疫捕获巢式 RT-PCR 检测 [J]. *植物检疫*, 2006, 20(4): 201-204. (Yu C, Yang C Y, Song S W, et al. Detection of *Bean pod mottle virus* by immuno-capture nested RT-PCR from the imported soybean [J]. *Plant Quarantine*, 2006, 20(4): 201-204.)
- [15] 张晓雷, 檀根甲, 魏梅生, 等. GICA-RT-PCR 检测菜豆荚斑驳病毒的新方法 [J]. *大豆科学*, 2008, 27(6): 1019-1023. (Zhang X L, Tan G J, Wei M S, et al. A new method for detection *Bean pod mottle virus* by GICA-RT-PCR [J]. *Soybean Science*, 2008, 27(6): 1019-1023.)
- [16] Kumar S, Rai R, Baranwal V K. Development of an immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) using modified viral RNA release protocol for the detection of *Gravipine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) [J]. *Phytoparasitica*, 2014: 1-6.
- [17] Chikh-Ali M, Karasev A V. Immunocapture-Multiplex RT-PCR for the simultaneous detection and identification of plant viruses and their strains: Study case, Potato Virus Y (PVY) [J]. *Techniques and Protocols Second Edition*, 2015: 177.
- [18] 沈建国, 王念武, 高芳奎, 等. 菜豆荚斑驳病毒免疫捕获一步 RT-PCR 检测 [J]. *中国农学通报*, 2009(1): 176-179. (Shen J G, Wang N W, Gao F L, et al. Detection of *Bean pod mottle virus* by one-step IC-RT-PCR [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009(1): 176-179.)
- [19] 沈建国, 高芳奎, 廖富荣, 等. TC-RT-PCR 检测菜豆荚斑驳病毒的研究 [J]. *激光生物学报*, 2009, 18(1): 108-111. (Shen J G, Gao F L, Liao F R, et al. Detection of *Bean pod mottle virus* by TC-RT-PCR [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2009, 18(1): 108-111.)
- [20] Mingxiao M, Jinhua L, Yingjin S, et al. TaqMan MGB probe fluorescence real-time quantitative PCR for rapid detection of Chinese sacbrood virus [J]. *PloS One*, 2013, 8(2): e52670.
- [21] 李彬, 吴新华, 栗寒, 等. 进境美国大豆幼苗中菜豆荚斑驳病毒的检测与鉴定 [J]. *南京农业大学学报*, 2007, 30(2): 139-141. (Li B, Wu X H, Su H, et al. Identification of *Bean pod mottle virus* (BPMV) on the soybean seedling from America [J]. *Journal of Nanjing Agriculture University*, 2007, 30(2): 139-141.)
- [22] 沈建国, 王念武, 翁瑞泉, 等. 加拿大进境大豆上检出菜豆荚斑驳病毒 [J]. *植物保护*, 2009(6): 127-129. (Shen J G, Wang N W, Wong R Q, et al. Detection of *Bean pod mottle virus* in soybean imported from Canada [J]. *Plant Protection*, 2009(6): 127-129.)