园 艺 学 报 2006, 33 (4): 845～848
Acta Horticulturae Sinica

香蕉两种主要病毒多重 PCR检测方法的建立

彭 军[1] 王国芬[1] 黄俊生[1,2*] 代 鹏[1] 谢玉萍[1] 李伟东[3]
([1]中国热带农业科学院环境与植物保护研究所,海南儋州 571737; [2]中国热带农业科学院热带生物技术研究所热带作物生物技术国家重点实验室,海南海口 571101; [3]中华人民共和国海南出入境检验检疫局,海南海口 570311)

摘 要: 根据香蕉束顶病 (*Banana bunchy top virus*, BBTV) 和香蕉花叶心腐病 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 的复制酶基因、外壳蛋白基因序列分别设计特异性引物对,在 BBTV单一 PCR和 CMV RT-PCR优化体系的基础上,建立了可同时检测 BBTV、CMV的多重 PCR检测方法。此方法可以特异地从感染 BBTV和 CMV的样品中扩增出 2条带,BBTV (748 bp) 和 CMV (557 bp)。扩增产物序列测定结果表明,BBTV扩增产物与 GenBank中其他分离物的核苷酸序列同源性为 91%～99%,CMV扩增产物与 GenBank中其他分离物的核苷酸序列同源性为 93%～98%。

关键词: 香蕉; 香蕉束顶病毒; 黄瓜花叶病毒; 病毒检测; RT-PCR
中图分类号: S 668.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-353X (2006) 04-0845-04

Development of a Multiplex PCR Protocol for the Detection of Two Viruses of Banana

Peng Jun[1], Wang Guofen[1], Huang Junsheng[1,2*], Dai Peng[1], Xie Yuping[1], and Li Weidong[3]
([1] *Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan* 571737, *China;* [2] *State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan* 571101, *China;* [3] *Hainan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of Peoples Republic of China, Haikou, Hainan* 570311, *China*)

Abstract: A multiplex RT-PCR was developed for the simultaneous detection of two viruses of banana and plantain (*Musa* spp.). Two sets of specific primer pairs were designed according to the gene sequence of *Banana bunchy top virus* (BBTV) replicase region and *Cucumber mosaic virus* (CMV) coat protein region, respectively. Based upon the establishment of the optimized PCR and RT-PCR detection of BBTV and CMV, the multiplex RT-PCR which can simultaneously detect the two banana viruses was developed. It was shown that all samples infected with BBT and CMV could be amplified simultaneously by multiplex RT-PCR, and yield two specific bands of BBTV (748 bp) and CMV (557 bp) visualized by agarose gel electrophoresis. Sequence analysis of the amplified products showed high homology of BBTV (91% - 99%) and CMV (93% - 98%) with the sequences of BBTV and CMV in GenBank.

Key words: Banana; *Banana bunchy top virus* (BBTV); *Cucumber mosaic virus* (CMV); Virus detection; RT-PCR

1 目的、材料与方法

香蕉束顶病 (*Banana bunchy top virus*, BBTV) 和香蕉花叶心腐病 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 是危害我国香蕉的两种重要病毒病,染病后植株矮缩甚至死亡,造成果实品质和产量严重下降。香蕉主要通过组培技术进行无性繁殖,种苗一旦带毒,将加剧香蕉病毒的传播和危害。应用无毒香蕉苗是控制病毒病的主要措施之一,而快速稳定的检测技术是香蕉种苗无毒化生产的根本保障。目前,国内

收稿日期: 2005 - 08 - 16; **修回日期**: 2005 - 12 - 01
基金项目: 海南省自然科学基金项目 (200580503); 农业部南亚热作专项 (2004LY07); 中国热带农业科学院院校基金项目 (Rky0442)
* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: H888111@126.com)

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

检测香蕉病毒的方法主要有酶联免疫（ELISA）法、PCR及免疫 PCR等[1~7]，国外有利用多重免疫捕捉 PCR检测香蕉病毒病的报道[8~10]。

通过田间调查及分子检测发现在云南、海南、广东等地区普遍存在 BBTV、CMV混合感染的现象，以单一 PCR检测需要多次操作，检测成本高。为提高香蕉病毒检测效率和降低成本，建立了可同时检测 BBTV、CMV的多重 PCR技术，为香蕉种苗生产提供理论参考和技术保障，也为其他感染多种病毒的植物检测开辟了一条思路。

2004年从广东、广西、海南等省（区）香蕉产地采集带有 BBTV、CMV典型症状的病株及两种病毒混合感染的香蕉病株，盆栽保存。BBTV病株矮化、束叶，叶柄和叶脉可见深绿色条斑；CMV病株叶片上出现褪绿的黄色不连续条纹且生长矮小。

根据 GenBank数据库中已报道的 BBTV复制酶基因和 CMV外壳蛋白基因序列（表 1），比较多个株系之间的保守序列设计引物对并由赛百盛公司合成。

表 1 BBTV和 CMV引物序列

Table 1 Sequences of BBTV and CMV primers

病毒 Virus	上游引物 Up primer (5′-3′)	下游引物 Down primer (5′-3′)	产物大小 Product size (bp)
BBTV	RP_1: ATGTGG TATGCTGGATGTTC	RP_{2r}: GTTCATATTTCCCGCTTTGA	748
CMV	CMV-L: CACCCAACCTTTGTGGGTAG	CMV-R: CAACACTGCCAACTCAGCTC	557

取 0.1 g香蕉叶脉，参考文献〔11～13〕的方法提取病毒总核酸。

反转录反应采用 Invitrogen公司 SuperScript™ III反转录体系进行，PCR反应按 TaKaRa公司 Taq DNA聚合酶操作说明进行。PCR扩增程序为：94℃变性 3 min；95℃ 30 s，60℃ 1 min，72℃ 1 min 30 s，循环 35次；最后 72℃延伸 5 min。

对多重 PCR的各引物浓度及反应的退火温度进行优化，筛选出多重 PCR反应体系的最佳反应模式。

PCR产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳，以 DL2000 Marker为标准分子量，根据目的条带判断病毒的有无及种类。切胶后用 PCR产物回收试剂盒（上海华舜生物工程有限公司）回收目的 DNA片段，克隆于 pMD18-T载体（TaKaRa），送大连 TaKaRa公司测序。

2 结果与分析

2.1 BBTV、CMV多重 PCR体系的建立

将 BBTV单一感染样品、CMV单一感染样品、BBTV/CMV混合感染样品分别进行双重 PCR，电泳结果表明，2对引物均能扩增得到预期大小片段的产物，电泳呈单一明亮条带，适合于病毒检测；而在混合感染样品中，扩增的产物呈两条明亮的电泳条带，也可以根据扩增条带片段分别判断检出的病毒种类（图 1）。

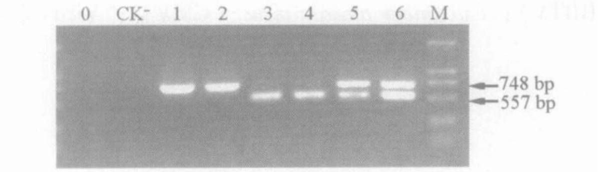

图 1 多重 PCR同时检测香蕉 BBTV和 CMV产物电泳结果

0: ddH_2O; CK^-: 阴性对照; M: DNA标准分子量; 1, 2: BBTV感染样品; 3, 4: CMV感染样品; 5, 6: BBTV及 CMV感染样品。

Fig. 1 Results of simultaneous amplified of BBTV and CMV by multiplex PCR

0: Water control; CK^-: Negative sample; M: DNA marker; 1, 2: BBTV infected; 3, 4: CMV infected; 5, 6: BBTV and CMV mixed infected

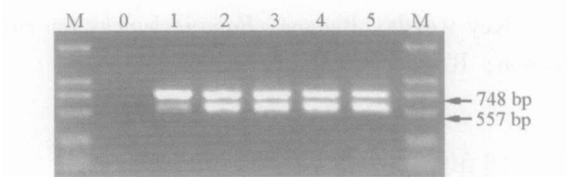

图 2 香蕉 BBTV/CMV混合感染植株不同部位取样多重 PCR检测结果

0: ddH_2O; M: DNA标准分子量; 1: 根; 2: 吸芽; 3: 假茎; 4: 叶柄; 5: 叶片。

Fig. 2 Detection results of BBTV and CMV mixed infection in different parts by multiplex RT-PCR

0: Water control; M: DNA Marker; 1: Root; 2: Suker; 3: Pseudostem; 4: Petiole; 5: Leaf

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

将 BBTV/CMV混合感染的香蕉植株的根、吸芽、假茎、叶柄和叶片等部位分别取样进行多重 PCR检测，均检测出混合感染的两种病毒，其特异性和稳定性较好 (图 2)。

2.2　多重 PCR反应条件的优化

在有效 RT-PCR检测体系基础上对多重 PCR反应体系中的主要影响因子进行优化分析得出最佳反应模式。多重 PCR反应采用“5 + 20”反应模式，即反转录 5 μL + PCR反应试剂 20 μL，在同一个 PCR管内反转录和多重 PCR。

反转录反应体系是 5 ×Buffer 2 μL，0.1 mol/L DTT 0.5 μL，20 μmol/L下游引物 CMV-R 0.5 μL，10 mmol/L dNTPs 1 μL，提取样品 1 μL，40 U/μL RNase 0.125 μL，200 U/μL SuperScript Ⅲ反转录酶 0.075 μL，用 ddH_2O补足 5 μL。反应结束后即在同一 PCR管中加入 20 μL PCR反应试剂：10 ×PCR Buffer 2.5 μL，10 mmol/L dNTPs 4 μL，20 μmol/L BBTV上下游引物各 0.5 μL，20 μmol/L CMV上下游引物各 0.5 μL，5 U/μL Taq DNA聚合酶 0.3 μL，用 ddH_2O补足使 PCR管内总反应体积为 25 μL。

2.3　检测灵敏度比较

对提取样品进行梯度稀释试验，结果显示可以从稀释至 10^7提取液 (相当于 10^{-10} g总 DNA)中扩增检测出 BBTV (图 3，A)；可以从稀释至 10^5提取液 (相当于 10^{-12} g总 RNA)中检测出 CMV (图 3，B)。多重 PCR与单一 PCR具有相同的检测灵敏度 (图 3，C)。

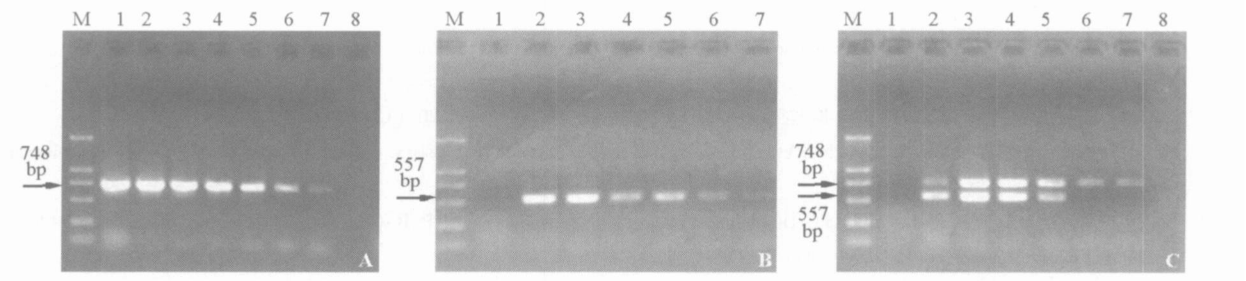

图 3　多重 PCR与单重 PCR检测灵敏度比较

M：DNA标准分子量；1～8：样品稀释度依次 10～10^8。

Fig. 3　Detection sensitivity comparison multiplex PCR between PCR

M：DNA marker；1 - 8：Sample dilution from 10 - 10^8.

2.4　PCR产物序列分析

测序结果显示：BBTV扩增片段为 748 bp，与预期的 PCR产物大小相同，是 BBTV *Repilicase*基因部分序列，与 GenBank中其他分离物核苷酸序列同源性为 91%～99%，其中与印度、斐济、汤加、V1及夏威夷分离物同源性最低为 91%，与其他地区分离物的同源性较高。CMV的扩增片段为 557 bp，与预期的 PCR产物大小相同，是 CMV CP基因的部分序列，与海南分离物的核苷酸同源性最高为 98%，与台湾分离物的核苷酸同源性为 94%，与印度等其他地区分离物的核苷酸同源性大于 93%。

3　讨论

采用多重 PCR检测植物病毒，在国内少有报道，多重 PCR技术的关键是要选择合适的引物，避免引物之间、引物与其他模板之间的非特异性互作干扰，从试验结果可以看出我们设计的两对引物均能获得较好的扩增效果，且两个扩增片段之间相差约 200 bp，有利于区分产物和每对引物的扩增。

本研究对多重 PCR检测体系及扩增程序进行优化，在单个 PCR管内反转录和多重 PCR，即将所有反转录的 cDNA全部用做后续 PCR反应的模板，与常规 RT-PCR相比，降低了成本，简化了操作程序，与前人报道的单重 PCR具有相当的检测灵敏度，目前已经应用于香蕉种苗的病毒检测。

目前，对广东、广西、海南等省 (区)的田间样品检测结果表明 CMV的感染率为 5%左右，

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

BBTV的感染率为 15%，两种病毒混合感染率为 0.1%左右。采用多重 PCR检测体系对海南省香蕉组培种苗基地约 2 000份样品检测中发现 CMV的感染率为 2%～5%，BBTV的感染率较低，为 0.05%，目前尚未在组培苗中检测到混合感染现象。

参考文献：

1 Xie W S, Hu J S. Molecular cloning, sequence analysis, and detection of banana bunchy top virus in Hawaii. Phytopathology, 1995, 85: 339～347

2 Hu J S, Li H P, Barry K, Wang W. Comparison of Dot Blot, ELISA, and RT-PCR assay for detection of two cucumber mosaic virus isolate infecting banana in Hawaii. Plant Disease, 1995, 79 (9): 902～906

3 Su H J, Tsao L Y, Wu M L, Huang T H. Biological and molecular categorization of strains of banana bunchy top virus. Journal of Phytopathology, 2003, 151: 290～296

4 **周莉娟，郑伟文．PCR法检测香蕉束顶病毒．福建农业学报**，2001，16 (4): 45～48
Zhou L J, Zheng W W. Detection of banana bunchy top virus (BBTV) by PCR. Fujian Journal of Agricultural Science, 2001, 16 (4): 45～48 (in Chinese)

5 **周莉娟，郑伟文．香蕉花叶心腐病检测的两步法及一步法 RT-PCR比较研究．江西农业大学学报**，2003，25 (5): 776～779
Zhou L J, Zheng W W. Comparative studies on two-step and one-step RT-PCR for detection of banana mosaic disease. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2003, 25 (5): 776～779 (in Chinese)

6 **李华平，胡晋生，范怀忠．香蕉花叶病检测技术的比较．病毒学报**，1997，13 (3): 273～277
Li H P, Hu J S, Fan H Z. Detection techniques of banana mosaic disease. Chinese Journal of Virology, 1997, 13 (3): 273～277 (in Chinese)

7 **肖火根，胡晋生．香蕉束顶病毒 PCR检测技术研究．华南农业大学学报**，1999，20 (1): 5～8
Xiao H G, Hu J S. Detection of banana bunchy top virus by polymerase chain reaction assays. Journal of South China Agricultural University, 1999, 20 (1): 5～8 (in Chinese)

8 Sharman M, Thomas E J, Dietzgen G Ralf. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. Journal of Virological Methods, 2000, 89: 75～88

9 Thomas D, Ralf G D. Detection of DNA and RNA virus by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. Journal of Virological Methods, 1995, 54, 85～95

10 Thompon J R, Wetzel S, Klerks M M, Vaskova D, Schoen C D, Spak J, Jelkmann W. Multiplex RT-PCR detction of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. In combination with a plant mRNA specific internal control. Journal of Virological Method, 2003, 111 (2): 85～93

11 Bekesiova I, Nap J P, Mlynaroval L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the *Carnivorous* plant *Drosera rotundifolia*. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17 (3): 269～277

12 Avijit Roy, Amer Fayad, Barthe G, Brlansky R H. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. Journal of Virological Methods, 2005, 129: 47～55

13 **唐科志，彭 军，王雪峰，周 彦，周常勇，刘科宏，刘 英，杨方云．利用一步法 RT-PCR检测柑橘裂皮病类病毒．园艺学报**，2005，32 (3): 408～413
Tang K Z, Peng J, Wang X F, Zhou Y, Zhou C Y, Liu K H, Liu Y, Yang F Y. Quick detection of citrus exocortis viroid (CEVd) by one-step RT-PCR. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (3): 408～413 (in Chinese)

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net