

# 工厂化组培香蕉分化芽中病毒的检测

饶雪琴, 张曙光, 高乔婉

(华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 采用间接 ELISA 法和 PCR 方法对组织培养的香蕉分化芽中黄瓜花叶病毒(CMV)、香蕉线条病毒(BSV)和香蕉束顶病毒(BBTv)分别进行了检测, 用间接 ELISA 法抽检香蕉分化芽中的 CMV, 带毒率为 2.5%左右; PCR 法检测香蕉分化芽中 BSV 和 BBTv, 40 个送检样品中带 BSV 的为 12.5%, 22 个送检样品中未检测到带 BBTv 的香蕉分化芽。

**关键词:** 黄瓜花叶病毒; 香蕉线条病毒; 香蕉束顶病毒; 间接 ELISA; PCR

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)01-0064-03

## Detecting viruses in banana differentiated shoots from tissue culture

RAO Xue-qin, ZHANG Shu-guang, GAO Qiao-wan

(College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Indirect ELISA and PCR methods were used to detect the existence of cucumber mosaic virus (CMV), banana streak virus (BSV) and banana bunchy top virus (BBTV) respectively in cultured differentiated banana shoots, the results showed that the rate of CMV-carriers was about 2.5% by indirect ELISA, the rate of BSV-carriers was 12.5% of 40 samples by PCR, and no BBTV-carrier was found in 22 samples by PCR.

**Key words:** cucumber mosaic virus; banana streak virus; banana bunchy top virus; indirect ELISA; PCR

香蕉 *Musa acuplate* 是我国南方重要的经济作物之一, 在广东省的种植面积和经济产值居全国第二。但病毒病却成为阻碍香蕉生产的重要病害之一。由黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)引起的香蕉花叶病和由香蕉线条病毒(banana streak virus, BSV)引起的香蕉线条病, 症状极其相似, 两者在叶片上都出现断续的或连续的褪绿条纹及梭形斑, 但香蕉线条病害后期症状可发展为坏死条斑<sup>[1]</sup>。由香蕉束顶病毒(banana bunchy top virus, BBTv)引起的香蕉束顶病, 顶部叶片越出越小, 直立, 呈束状, 易辨认<sup>[2]</sup>。这 3 种病毒病害在广东省普遍发生, 严重者不得不重种或改种其他作物。在香蕉生产中, 广东省以推广种植试管苗为主, 由于病毒可通过香蕉分化芽的继代繁殖传递, 因此有必要对组织培养的香蕉分化芽进行检测, 以确保香蕉试管苗不携带病毒, 阻止病害的扩散蔓延, 从而控制香蕉病毒病的发生。目前常用的植物病毒的检测方法有血清学和 PCR 等方法。血清学方法中 ELISA 是常用方法, 因其操

作简便, 适于大量样品的检测<sup>[3]</sup>。PCR 法具有灵敏、准确及特异性高等优点<sup>[4]</sup>。2001~2003 年采用间接 ELISA 法和 PCR 法对广东省香蕉试管苗厂的香蕉分化芽随机抽样进行了病毒检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 检测样品

样品来源于广东省各香蕉试管苗厂的香蕉分化芽, CMV 的阳性对照分别是受 CMV 侵染的心叶烟和香蕉, BSV 和 BBTv 的阳性对照分别是 BSV 和 BBTv 侵染的香蕉, 阴性对照都是健康香蕉苗。

### 1.2 试剂及引物

CMV 兔抗血清由华南农业大学植物病毒研究室提供, 工作浓度为 1:2 000 倍, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (HRP-羊抗兔 IgG) 购于华美生物工程公司, 工作浓度为 1:1 000 倍。

BSV 的引物根据 Harper<sup>[5]</sup>报道的序列合成, 由华南农业大学植物病毒研究室费继锋惠赠, PCR 扩

增片段长约 644 bp, 引物如下:  
P<sub>1</sub> 5' GGA ATG AAA GAG CAG GCC 3',  
P<sub>2</sub> 5' AGT CAT TGG GTC AAC CTC TGT CCC 3'.  
BBTV 的引物根据 Harding 等<sup>[6]</sup>报道的序列合成, 由华南农业大学植物病毒研究室李海辉惠赠, PCR 扩增片段长约 1.1 kb, 引物如下:

P<sub>11</sub> 5' GGC GAA TTC TAT AAA TAG ACC TCC C 3',  
P<sub>12</sub> 5' GGC AAG CTT GCA AAT GTC CCG TCC CG 3'.

1.3 间接 ELISA 法检测 CMV

参考 Lommel 等<sup>[7]</sup>的方法, 将香蕉分化芽的嫩叶取下 0.2 g 加 2 mL 碳酸缓冲液(pH9.6)和 10 g/L 的铜试剂磨碎, 取 100 μL 加到酶标孔中, 同时加入阳性、阴性、空白对照, 各重复 2 次, 于 4℃冰箱中保湿过夜; 洗板, 用 PBST 洗板 3~5 次, 每隔 1 min 洗 1 次; 加抗体, 每孔加 100 μL 稀释后的抗体, 于 (37±1)℃电热恒温箱中孵育 4 h 后洗板, 方法同上; 加酶标抗体, 每孔加入稀释 1 000 倍的 HRP-IgG 100 μL, 在 (37±1)℃电热恒温培养箱中孵育 4 h; 洗板同上; 加底物溶液, 每孔加 100 μL 底物溶液, 置 (37±1)℃电热恒温培养箱中蔽光显色 30 min, 于酶标仪上 490 nm 处测定吸光值(D<sub>490 nm</sub>). 当样品平均 D<sub>490 nm</sub> 与阴性对照平均 D<sub>490 nm</sub> 之比值≥2.00 时, 判断为阳性, 即该香蕉分化芽感染了 CMV.

1.4 PCR 方法检测 BSV 和 BBTV

1.4.1 香蕉分化芽总 DNA 的提取 采用 CTAB 法<sup>[8]</sup>提取. 取香蕉分化芽的嫩叶 0.2 g, 用液氮研成粉末, 未融化前加入 600 μL 预热的 CTAB 抽提缓冲液(100 mmol/L Tris-Cl, pH8.0; 1.4 mmol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA pH8.0; 20 g/L CTAB, 用前加入 φ 为 0.2% 巯基乙醇)混匀后, 转移至 1.5 mL 离心管中. 65℃孵育 30 min, 每隔 10 min 混匀 1 次. 加入等体积的苯酚+氯仿+异戊醇(体积比为 25:24:1)和氯仿+异戊醇(体积比为 24:1)各抽提 1 次取上清, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH5.2)和 2 倍体积的无水乙醇, 混匀, 冰浴 30 min, 4℃下 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, φ 为 70% 的乙醇洗涤沉淀, 干燥后溶解于 100 μL TE(10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, 含 Rnase10 μg/mL, pH8.0)中, 37℃孵育 2 h.

1.4.2 PCR 反应体系与程序 按照试剂盒(购自大连宝生物公司)说明设计 BSV 和 BBTV 的 PCR 反应体系, 包括提取的 DNA 模板 1.0 μL, 10× buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.3 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.1 μL, BSV 和 BBTV 基因的上下游引物分别各取 1 μL(5 μmol/L), 补灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL, 上面覆盖 15 μL 石蜡油.

BSV 的 PCR 扩增程序为: 94℃4 min; 94℃20 s;

55℃20 s; 72℃30 s; 72℃延伸 5 min, 其中 94℃20 s, 55℃20 s, 72℃30 s 35 个循环. 反应后用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 观察扩增结果.

BBTV 的 PCR 扩增程序为: 94℃4 min; 94℃1 min; 58℃2 min; 72℃3 min; 72℃延伸 10 min, 其中 94℃1 min, 58℃2 min, 72℃3 min 35 个循环. 反应后用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 观察扩增结果.

2 结果

2.1 不同香蕉样品及主要品种带 CMV 的检测

用间接 ELISA 法抽样检测香蕉分化芽中携带 CMV 的情况, 结果表明, 香蕉分化芽的带毒率在 0~5.0%, 广州地区和湛江地区的香蕉样品检测数量占总抽样量的 60% 以上. 2001 年, 共抽检香蕉分化芽 177 瓶, 总带毒率为 2.82%; 其中广州地区 90 瓶, 带毒率为 3.33%, 湛江地区 32 瓶, 带毒率为 3.13%. 2002 年, 抽检香蕉分化芽 156 瓶, 总带毒率为 2.56%; 其中广州地区 79 瓶, 带毒率为 2.53%; 湛江地区为 21 瓶, 带毒率为 4.76%. 2003 年, 抽检香蕉分化芽 183 瓶, 总带毒率为 2.73%, 广州地区 95 瓶, 带毒率为 3.16%, 湛江地区 50 瓶, 带毒率为 0. 不同年份香蕉分化芽的总带毒率以及相同地区不同年份香蕉分化芽苗的带毒率经 χ<sup>2</sup> 检测, 在 5% 水平上差异不显著.

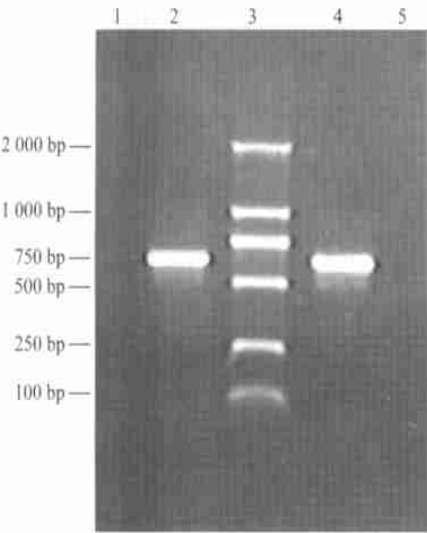
香蕉试管苗主要品种有巴西和威廉斯. 在 2001~2003 年抽检的香蕉分化芽中, 巴西香蕉分化芽带毒率在 2%~5% 之间, 威廉斯香蕉分化芽带毒率在 3%~6% 之间(表 1). 不同年份同一品种的香蕉分化芽的带毒率经 χ<sup>2</sup> 检测, 在 5% 水平上差异不显著.

表 1 2001~2003 年抽检主要香蕉品种带 CMV 的情况  
Tab. 1 Rate of CMV-carriers of differentiated shoots of main banana varieties from 2001 to 2003

| 年份   | 巴西香蕉 Baxi banana  |                      | 威廉斯香蕉 William s banana |                      |
|------|-------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
|      | 抽检量               | 带毒率                  | 抽检量                    | 带毒率                  |
| year | detection samples | rate of CMV-carriers | detection samples      | rate of CMV-carriers |
|      | /瓶                | / %                  | /瓶                     | / %                  |
| 2001 | 85                | 3.53                 | 28                     | 3.57                 |
| 2002 | 68                | 2.94                 | 32                     | 3.13                 |
| 2003 | 74                | 4.05                 | 19                     | 5.26                 |

2.2 香蕉分化芽中 BSV 的检测情况

对要求检测 BSV 的香蕉分化芽分别抽提总 DNA, 以此为模板进行 PCR 扩增, 结果显示在 644 bp 处有一条特异的扩增带(图 1), 而阴性对照无此特异性扩增带, 表明香蕉分化芽被 BSV 侵染. 送检的香蕉分化芽通过 PCR 检测带 BSV 的样品数为 5 瓶, 检测总样数为 40 瓶, 带毒率为 12.5%.



1: 阴性对照; 2: BSV 阳性对照; 3: marker; 4, 5: 香蕉分化芽样品

1: negative control; 2: positive control; 3: marker; 4, 5: banana differentiated shoots

图 1 PCR 鉴定部分香蕉分化芽中 BSV 的电泳图谱

Fig. 1 Detection of BSV of banana differentiated shoots by PCR

2.3 香蕉分化芽中 CMV 和 BSV 复合侵染的情况

要求检测 BSV 的 40 瓶送检香蕉分化芽中, 通过间接 ELISA 法检测 CMV 并同时用 PCR 法检测 BSV, 复合侵染的样品数有 2 瓶, 复合带毒率为 5%.

2.4 香蕉试管苗中 BBTV 的检测情况

要求检测 BBTV 的香蕉分化芽总数为 22 瓶, 但用 PCR 法未检测到带毒分化芽.

3 讨论

病毒可随着组培中香蕉分化芽的繁殖而逐代传递, 因此对香蕉分化芽的检测是防治香蕉病毒病害的重要途径之一. 通过对香蕉分化芽中 CMV 的检测, 初步控制了香蕉生产中发生严重的由 CMV 引起的香蕉花叶心腐病. 本研究中, 虽然不同年份中同一品种和相同地区间的香蕉分化芽中 CMV 的带毒率不高, 但如果不进行病毒检测, 由于香蕉分化芽繁殖速度快, 带毒香蕉分化芽将呈指数增长, 带毒的香蕉试管苗种到田间, 会成为 CMV 的初侵染源, 随着带毒试管苗的大面积推广, 将会给香蕉的生产带来严重危害. 因此, 有必要对香蕉分化芽进行病毒检测. 由于香蕉无性繁殖体系一般多在春季或秋季建立, 所以应把检测的重点放在春季或秋季已建立无性繁殖体系的 35 代内的香蕉分化芽上.

目前常用的病毒检测方法主要有 ELISA 和 PCR 法, 两者在香蕉分化芽的检测上各有优势. 当所检病毒是 CMV 时, 由于检测样品数量较多, 应用间接 ELISA 法样品制备简单, 快速; 而检测 BSV 和

BBTV 时, 我们一般采用 PCR 法, 因其灵敏度高和特异性强, 同时由于香蕉组织中的单宁、酚类及多糖类物质多, 使得这两种病毒较难从香蕉中分离提纯, 故用 PCR 法相对简便些.

尽管对香蕉分化芽中 BBTV 和 BSV 检测的样品少, 但由于 BBTV 侵染香蕉后潜伏期较长<sup>[9]</sup>; BSV 是近年来才在国内报道的一种与 CMV 在香蕉上引起的症状相似的香蕉病毒<sup>[10]</sup>, 若只检测 CMV, 即使香蕉分化芽中不带 CMV, 香蕉试管苗还有可能出现花叶心腐症状. 因此, 香蕉分化芽不但要检测 CMV, 也要检测 BSV 和 BBTV, 以减少带毒分化芽. 但检测数量应加大. 在检测过程中, 虽然应用灵敏度高的 PCR 法, 但未检测到带 BBTV 的香蕉分化芽. 因此对组培香蕉分化芽除了增加检测数量外, 还应加大检测范围, 尽可能保证扩繁的试管苗不带以上 3 种病毒, 从而减少香蕉生产中因病毒所造成的损失.

参考文献:

[ 1 ] LOCKHART B E L. Purification and serology of a bacilli-form virus associated with banana streak disease[ J ]. Phytopathology, 1986, 76(10): 995—999.

[ 2 ] 吕超锦, 叶家琛. 香蕉束顶病的发生与防治简报[ J ]. 植物保护, 1988, 14 (6): 25.

[ 3 ] 梁训生. 植物病毒血清学技术[ M ]. 北京: 农业出版社, 1985. 52—66.

[ 4 ] THOMSON K G, DIETZIGEN R G, THOMAS J E, et al. Detection of pineapple bacilliform virus using the polymerase chain reaction [ J ]. Annals of Applied Biology, 1996, 129: 57—69.

[ 5 ] HARPER G, HULL R. Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA[ 7 ]. Virus Genes, 1998, 17(3): 271—278.

[ 6 ] HARDING R M, BURNS T M, HAFNER G, et al. Nucleotide sequence of one component of banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene[ J ]. J Gen Virol, 1994, 74(3): 323—328.

[ 7 ] LOMMEL S A, MCCAIN A H, MORRIS T J. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses[ J ]. Phytopathology, 1982, 72: 1 018—1 022.

[ 8 ] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[ J ]. Focus, 1990, 12: 13—15.

[ 9 ] ALLEN R N. Epidemiological factors influencing the success of rouging for control of bunchy top disease of banana in New South Wales[ J ]. Australian Journal of Agricultural Research, 1978, 29(3): 535—544.

[ 10 ] 费继锋, 李华平, 肖火根, 等. 香蕉线条病毒的研究进展[ J ]. 病毒学报, 2001, (4): 381—385.

[ 11 ] DANIELLS J, GEERING A, THOMAS J. Banana streak virus investigations in Australia[ J ]. Infomusa, 1998, 7(2): 20—21.

【责任编辑 周志红】