

美人蕉黄斑驳病毒巢式 PCR 检测方法的建立

陈细红¹, 杨小龙², 廖富荣³, 高芳銮², 沈建国^{1*}

(1. 福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福州 350001; 2. 福建农林大学植物病毒研究所, 福州 350002; 3. 厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 厦门 361026)

摘要 本文以我国台湾进境美人蕉病株为材料, 根据已报道的美人蕉黄斑驳病毒 *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) 基因序列设计 2 对特异性引物(外侧引物 1 对、内侧引物 1 对), 建立了巢式 PCR 快速检测 CaYMV 的方法, 并对进境的 50 份美人蕉样品进行了检测。结果显示, 该方法特异性强, 且灵敏度高于常规 PCR, 是常规 PCR 的 1 000 倍, 表明该方法能够实现对 CaYMV 的快速、准确、灵敏检测, 适用于口岸快速检测 CaYMV。

关键词 美人蕉黄斑驳病毒; 巢式 PCR; 检测

中图分类号: Q 503, S 41-30 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018283

Development of nested PCR assay for detection of *Canna yellow mottle virus*

CHEN Xihong¹, YANG Xiaolong², LIAO Furong³, GAO Fangluan², SHEN Jianguo¹

(1. *Inspection and Quarantine Technology Center, Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China*; 2. *Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China*; 3. *Inspection and Quarantine Technology Center, Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China*)

Abstract Two pairs of specific primers were designed and synthesized based on the published nucleotide sequence of *Canna yellow mottle virus* (CaYMV), and then the detection method of nested PCR was established using the total DNA as template, which was extracted from infected canna from Taiwan. The results showed that the nested PCR assay had high specificity and sensitivity. The sensitivity of the nested-PCR assay was higher than that of conventional PCR by 1 000 times. The nested PCR assay established in this study is a rapid, accurate and sensitive detection method for CaYMV, and can be used for rapid detection of CaYMV.

Key words *Canna yellow mottle virus*; nested PCR; detection

美人蕉 *Canna indica* L. 是美人蕉科 Cannaceae 美人蕉属 *Canna* 的一种多年生草本花卉, 主要分布于热带和亚热带地区, 具有一定的观赏价值和药用价值, 在我国常作为一种园林观赏植物进行引种栽培^[1-4]。美人蕉在生长过程中易受病毒侵染, 国内外关于美人蕉病毒病的研究较少, 目前已报道的美人蕉病毒有菜豆黄花叶病毒 *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)^[5]、黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV)、美人蕉矮化类病毒 *Canna stunt viroid*^[6-7]、美人蕉黄斑驳病毒 *Canna yellow mottle virus* (CaYMV)^[8]、美人蕉黄条病毒 *Canna yellow streak virus* (CaYSV)^[9]等。

美人蕉黄斑驳病毒(CaYMV)是美人蕉上的一种

重要病毒, 属于花椰菜花叶病毒科 *Caulimoviridae* 杆状 DNA 病毒属 *Badnavirus* 成员。其病毒粒体呈杆状, 长约 120~130 nm, 直径约 28 nm^[10], 基因组为不完全环状双链 DNA, 含 3 个开放阅读框(open reading frame, ORF)。该病毒最早出现在日本和美国中北部^[11-13], 随后在意大利、荷兰^[14]、印度^[2]、肯尼亚^[15]、中国^[16]等国家陆续出现报道。CaYMV 的寄主范围较窄, 已报道的自然寄主为美人蕉。受侵染的美人蕉生长出现异常, 典型症状为叶脉黄化, 叶片、茎秆和花上出现条斑, 组织逐渐坏死、变褐等, 其观赏价值和经济价值均受到影响^[10-11]。CaYMV 主要通过无性繁殖材料传播, 可随美人蕉种苗的运输进行远

收稿日期: 2018-07-03 修订日期: 2018-09-03

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFF0203203)

* 通信作者 E-mail: shenjg_agri@163.com

距离传播,其传播介体尚未明确,且目前尚缺乏有效的防治该病的方法。

为有效降低 CaYMV 的传播和扩散,急需建立针对该病毒快速、灵敏的检测方法。国内外针对 CaYMV 检测方法的研究较少,沈建国等^[10]报道了常规 PCR 检测该病毒的方法。与常规 PCR 相比,巢式 PCR 方法检测植物病毒具有更强的特异性和更高的灵敏度。张巧萍等^[17]设计了凤仙花坏死斑病毒的特异性引物,建立了巢式 PCR 检测方法,提高了检测的灵敏度。闻伟刚等^[18]通过建立烟草环斑病毒和番茄环斑病毒的半巢式 RT-PCR 检测方法,灵敏度较常规 RT-PCR 方法提高了 10 000 倍以上。本文以我国台湾进境美人蕉病株为材料,根据已报道的 CaYMV 基因序列设计了 2 对特异性引物(外侧引物 1 对、内侧引物 1 对),建立了巢式 PCR 快速检测 CaYMV 的方法,以期进一步提高检测灵敏度和准确性,以满足口岸快速、准确检测 CaYMV 的需要。

1 材料与方法

1.1 材料

CaYMV 毒源为我国台湾进境的美人蕉病株。菜豆黄花叶病毒(BYMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)以及番茄不孕病毒 *Tomato aspermy virus* (TAV) 的毒源(叶片)由本实验室保存。所有毒源均保存于-80℃冰箱中。

1.2 主要试剂

Plant Genomic DNA kit 购自天根生化科技(北京)有限公司,2×Easy Taq PCR Supermix、TRIzol 试剂购自北京全式金生物技术有限公司,随机引物、5×RT buffer、M-MuLV 反转录酶、RNasin、10 mmol/L dNTPs 购自 Promega 公司,10×PCR Buffer、2.5 mmol/L dNTPs、MgCl₂、Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。

1.3 引物设计与合成

杆状 DNA 病毒属通用引物 BadnaFP/BadnaRP: ATGCCITTYGGIAARAAYGCICC/CCAYTTTRC-AIACISCICCCCAICC,目的片段 576 bp^[19]。

根据已报道的 CaYMV 基因序列设计 2 对特异性引物,外侧引物为:上游引物 CaYMF1:5'-TAG-GGCAGTCAAGGATTAAGC-3';下游引物 CaYMR1:5'-CAATCTTGCGGTAGAACGAG-3',预期扩增

片段大小为 540 bp。内侧引物为:上游引物 CaYM-VF2:5'-ACTGCGTCAGTTTCTCGG-3';下游引物 CaYMR2:5'-GGCCTGGATCTCAGCATCTA-3',预期扩增片段大小 352 bp。引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 总核酸的提取

利用 Plant Genomic DNA kit 提取样品总 DNA,方法参照试剂盒说明书。

1.5 PCR 鉴定

以提取的 DNA 为模板,PCR 反应体系(25 μL)为:2×Easy Taq PCR Supermix 12.5 μL,无菌水 8.5 μL,BadnaFP(10 μmol/L)1 μL,BadnaRP(10 μmol/L)1 μL,DNA 2 μL。扩增条件为:94℃预变性 7 min;94℃变性 30 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环;最后 72℃延伸 7 min。PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

1.6 巢式 PCR 检测

第一轮 PCR 以提取的 DNA 为模板,PCR 反应体系(25 μL)为:10×PCR Buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μL,MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL,dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL,CaYMF1(10 μmol/L)1 μL,CaYMR1(10 μmol/L)1 μL,无菌水 13.8 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,DNA 2 μL。扩增条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,53℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。第二轮 PCR 扩增以第一轮 PCR 产物为模板,反应体系为:10×PCR Buffer(Mg²⁺ free)2.5 μL,MgCl₂ (25 mmol/L)2.5 μL,dNTPs(2.5 mmol/L)2 μL,CaYMF2(10 μmol/L)1 μL,CaYMR2(10 μmol/L)1 μL,无菌水 15.6 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,第一轮 PCR 产物 0.2 μL。扩增条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,54℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

1.7 序列测定及分析

PCR 产物经回收纯化后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测得的核苷酸序列在 NCBI 中运用 BLAST 程序进行同源性比较分析。

1.8 巢式 PCR 的特异性验证

菜豆黄花叶病毒(BYMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、番茄不孕病毒(TAV)提取总 RNA 后,反转录为 cDNA,同携带 CaYMV 的样品 DNA 一起进行巢式

PCR 扩增,同时以健康美人蕉植株的 DNA 为模板设阴性对照,以无菌水为模板设空白对照,反应体系及扩增条件同 1. 6。

1. 9 巢式 PCR 的灵敏度测定

将 CaYMV 的 DNA 原液进行 10 倍梯度稀释,分别以 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 不同稀释度的 DNA 为模板,利用建立的巢式 PCR 方法进行扩增,同时设阴性对照,测定其灵敏度。

1. 10 样品检测

利用建立的巢式 PCR 方法对口岸送检的一批美人蕉样品(共 50 份)进行检测。检测方法同 1. 4~1. 7。

2 结果与分析

2. 1 PCR 鉴定

以提取的 DNA 为模板,以引物 BadnaFP/BadnaRP 进行扩增,结果从美人蕉病株中扩增出与预期大小一致的条带,约 576 bp,而空白对照和阴性对照均未扩增出相应的特异性条带(图 1)。将所得的目的片段进行克隆和测序,测得的序列进行 BLAST 比对,与已报道的 CaYMV 序列一致性达 97% 以上,证实样品携带有 CaYMV。

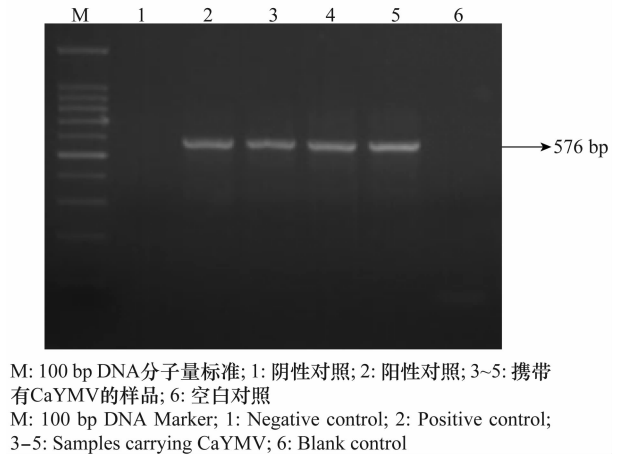


图 1 美人蕉黄斑驳病毒 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR amplification of *Canna yellow mottle virus*

2. 2 巢式 PCR 检测

以第一轮 PCR 产物为模板,利用设计的内侧引物进行第二轮 PCR,结果从带毒样品中扩增出与预期大小一致的条带,约 352 bp,而空白对照和阴性对照均未扩增出相应的特异性条带(图 2)。将所得的目的片段进行克隆和测序,测得的序列进行 BLAST 比对,与已报道的 CaYMV 序列(GenBank 登录号: KT447042)一致性达 99%。

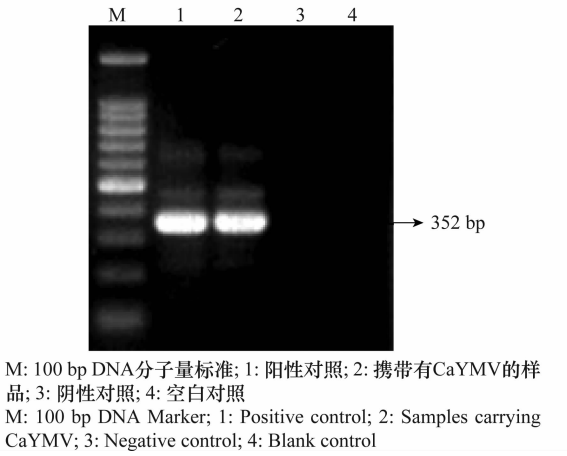


图 2 美人蕉黄斑驳病毒巢式 PCR 结果

Fig. 2 Nested PCR amplification of *Canna yellow mottle virus*

2. 3 巢式 PCR 的特异性验证

分别以 BYMV、CMV、TAV 的 cDNA 以及携带 CaYMV 的样品 DNA 为模板,在相同条件下进行巢式 PCR,同时设阴性对照,结果从图 3 可见,仅携带 CaYMV 的样品在 352 bp 处出现明亮的 DNA 条带,其他病毒样品和健康样品均无条带,表明建立的巢式 PCR 方法具有较强的特异性。

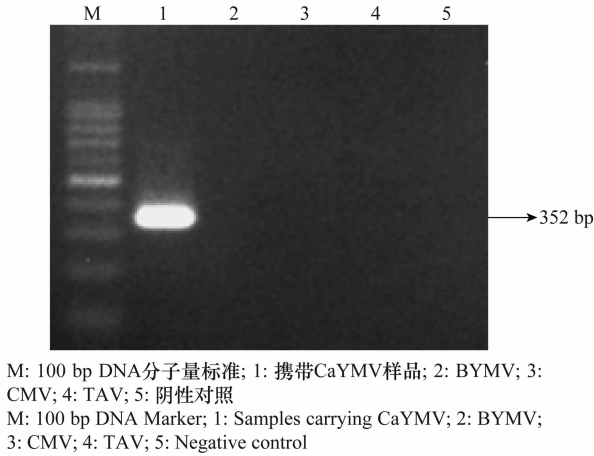


图 3 巢式 PCR 检测美人蕉黄斑驳病毒的特异性验证

Fig. 3 Specificity test of nested PCR for *Canna yellow mottle virus*

2. 4 巢式 PCR 的灵敏度测定结果

将携带 CaYMV 样品的 DNA 按 10 倍梯度稀释后,分别作为模板,单独使用 CaYMVF1/CaYMVR1 进行扩增,在 1~3 泳道均能扩增出 540 bp 的单一一条带(图 4a),而使用 CaYMVF2/R2 进行第二轮 PCR 扩增,在泳道 1~6 均能扩增出 352 bp 的条带(图 4b)。第二轮 PCR 的检测灵敏度比第一轮 PCR 高 10^3 倍,即巢式 PCR 使检测灵敏度提高了 10^3 倍,

由此表明,该病毒的巢式 PCR 的灵敏度明显高于常规 PCR,前者的灵敏度是后者的 10^3 倍。

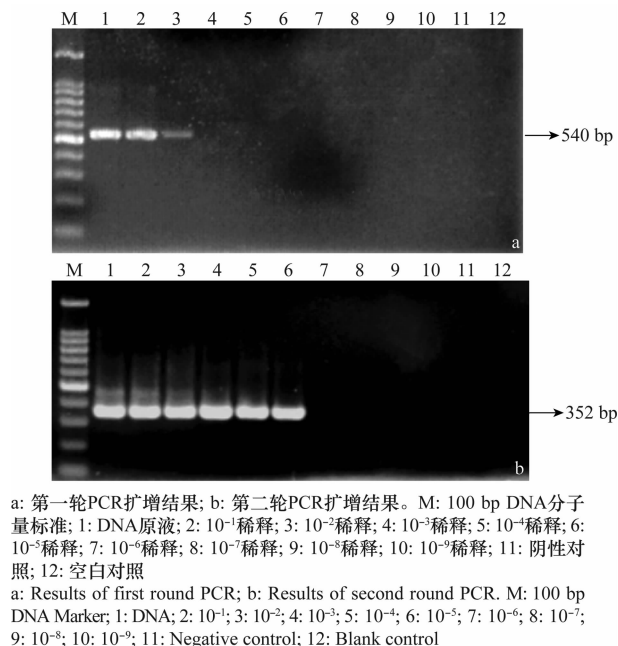


图 4 巢式 PCR 检测美人蕉黄斑驳病毒灵敏度试验结果

Fig. 4 Sensitivity test of nested PCR for *Canna yellow mottle virus*

2.5 样品检测

检测结果表明,采用巢式 PCR 法能够从 50 份美人蕉样品中检测出 CaYMV 9 份(检出率为 18%),比常规 PCR 检出率(8%)高 10 个百分点,表明本文建立的巢式 PCR 方法具有更高的灵敏度。

3 讨论

美人蕉黄斑驳病毒(CaYMV)是美人蕉上发生率较高的病毒之一,在美国、日本等美人蕉大面积种植的地区发生较为普遍,导致美人蕉的观赏价值和经济价值下降。目前尚未有针对 CaYMV 有效的防治方法,在美国曾被迫采取销毁病株的方式来防止其进一步扩散,给当地带来较大的经济损失^[10]。因此,加强病毒检测,建立针对 CaYMV 快速、准确的检测方法,对有效防止该病毒随带病植株的远距离运输而扩散,保护我国观赏作物的生产安全意义重大。本文根据已报道的 CaYMV 序列设计了内、外侧 2 对特异性引物,在常规 PCR 的基础上,建立了可用于 CaYMV 快速检测的巢式 PCR 方法。

本文建立的巢式 PCR 方法仅能够从感染 CaYMV 的样品中扩增到特异性目的片段,而从其他病毒样品及健康样品中均未扩增到相应的目的片段,提高了 PCR 扩增的特异性,有效避免了非目的

片段的扩增。与常规 PCR 相比,本文建立的巢式 PCR 方法经过 2 轮 PCR 反应,检测灵敏度得到显著提高,使整个 PCR 检测灵敏度提高了 1 000 倍(第一轮、第二轮的检测下限分别为 10^{-2} 和 10^{-5} 倍稀释的 DNA)。应用本文建立的巢式 PCR 方法对进境的美人蕉样品进行 CaYMV 检测,检出率为 18%,明显高于常规 PCR 的检出率,因此当 CaYMV 含量较低时,该方法能弥补常规 PCR 方法可能存在的漏检问题,使检测结果更为准确可靠。本文建立的巢式 PCR 检测 CaYMV 的方法具有快速、简便、特异和灵敏的优点,能够有效应用于 CaYMV 检测。

参考文献

- [1] 刘晓俊,周婵虹. 深圳地区美人蕉病虫害调查及综合防治[J]. 生物灾害科学, 2005, 28(4): 180-184.
- [2] KUMARI A, KUMAR S, RAJ S K. First report of *Canna yellow mottle virus* on canna from India [J]. Gastroenterologia Japonica, 2014, 29(3): 9.
- [3] 张立红,王海燕,杜志游,等. 侵染美人蕉的 CMV 基因组全序列及其致病性分析[J]. 植物病理学报, 2011, 41(2): 178-187.
- [4] 傅本重,王政又,伍建榕,等. 美人蕉叶斑病病原菌的生物学特性及其抑菌药剂筛选[J]. 中国农学通报, 2011, 27(31): 105-108.
- [5] 陈集双,吴林福,周雪平,等. 美人蕉黄斑叶花病毒研究[J]. 浙江农业学报, 1994, 6(3): 272-275.
- [6] 陈集双,李德葆. 侵染半夏的两种病毒的分离纯化和初步鉴定[J]. 生物技术, 1994(4): 24-28.
- [7] 陈炜,田波,朱王香,等. 美人蕉矮化病植株中发现的一种类似类病毒的 RNA[J]. 病毒学报, 1985(3): 75-79.
- [8] BRUNT A, CRABTREE K. Viruses of tropical plants[M]. Wallingford, UK: CAB International, 1990.
- [9] MONGER W A, HARJU V, SKELTON A, et al. *Canna yellow streak virus*: a new potyvirus associated with severe streaking symptoms in canna [J]. Archives of Virology, 2007, 152(8): 1527-1530.
- [10] 沈建国,王念武,张东斌,等. PCR 方法检测美人蕉黄斑驳病毒[J]. 植物检疫, 2008, 22(5): 287-289.
- [11] YAMASHITA S, NATSUAKI T, DOI Y, et al. *Canna yellow mottle virus*, a non-enveloped small bacilliform virus in *Canna* sp. [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1985, 51(5): 642-646.
- [12] MOMOL M T, LOCKHART B E L, DANKERS H, et al. *Canna yellow mottle virus* detected in canna in Florida [J]. Plant Health Progress, 2004, 5(1): 7001-7008.
- [13] LOCKHART B E L. Occurrence of *Canna yellow mottle virus* in North America [J]. Acta Horticulturae, 1988, 234: 69-72.
- [14] MARINO M T, RAGOZZINO E, LOCKHART B E L, et al. First report of *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) in Italy and in the Netherlands [J]. Plant Pathology, 2008, 57(2): 394.

6 瘿蚊科芒果害虫的经济影响

本文所述的 4 属芒果瘿蚊均为瘿蚊科重要的芒果害虫,其中普瘿蚊属幼虫通过为害芒果的叶、花和果实均可造成果实减产;两种为害芒果的桥瘿蚊幼虫通过为害芒果花芽影响坐果从而造成果实减产;芒果花叶瘿蚊幼虫通过为害芒果花芽内部的子房和蜜腺从而导致坐果失败;芒果毛瘿蚊幼虫通过为害芒果花序可导致芒果坐果失败。由于芒果瘿蚊害虫可直接影响芒果果实和植株的质量和产量,因此都可造成不同程度的经济影响,所以这类芒果害虫的鉴定和检疫必须受到重视。

在我国,芒果广泛栽种于我国福建、广东、广西和台湾地区^[2],且各地芒果园分布相对集中,所以上述 4 属 20 种芒果瘿蚊种类一旦经由这些害虫的国外虫源地侵入我国或由国内虫源地侵入其他省份并成功建立种群和扩散将对我国芒果产业造成严重影响。

参考文献

[1] MIN T, BARFOD A. Anacardiaceae [M/OL]// Flora of China. Vol. 11(2008 - 03 - 12)[2018 - 03 - 27]. <http://www.eflora.cn/foc/pdf/Anacardiaceae.pdf>.
[2] MIN T. Anacardiaceae [M]// ZHENG M, MIN T. Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Vol. 45(1). 2ed. Beijing: Science Press, 1980; 66 - 74.
[3] GAGNÉ R J, JASCHHOF M. A catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world [EB/OL]. (2017 - 05 - 24)[2017 - 11 - 30]. https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80420580/Gagne_2017_World_Cat_4th_ed.pdf.
[4] 施达三. 危害芒果的瘿蚊科新种[J]. 昆虫分类学报, 1980, 2(2): 131 - 134.
[5] HARRIS K M, SCHREINER I H. A new species of gall midge (Diptera: Cecidomyiidae) attacking mango foliage in Guam, with observations on its pest status and biology [J]. Bulletin of

Entomological Research, 1992, 82: 41 - 48.
[6] LI Jun, BU Wenjun, ZHANG Qingyuan. A new species of gall midge (Diptera: Cecidomyiidae) attacking mango leaves from China [J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2003, 28(1): 148 - 151.
[7] JIAO Kelong, WANG Hao, WEI Dewei, et al. A new species of *Procontarinia* (Diptera: Cecidomyiidae) damaging fruit of mango, *Mangifera indica* (Anacardiaceae), in China [J]. Zootaxa, 2018, 4413(2): 368 - 376.
[8] 罗启浩, 杨集昆, 苏雷, 等. 危害芒果叶片的瘿蚊新种——阳茎载瘿蚊[J]. 中国南方果树, 1999, 28(6): 24 - 27.
[9] GAGNÉ R J, MEDINA C D. A new species of *Procontarinia* (Diptera: Cecidomyiidae), an important new pest of mango in the Philippines [J]. Proceedings of the Entomological Society of Washington, 2004, 106(1): 19 - 25.
[10] KOLESIK P, RICE A D, BELLIS G A, et al. *Procontarinia pustulata*, a new gall midge species (Diptera: Cecidomyiidae) feeding on mango, *Mangifera indica* (Anacardiaceae), northern Australia and Papua New Guinea [J]. Australian Journal of Entomology, 2009, 48: 310 - 316.
[11] FELT E P. A generic synopsis of the Itonidae [J]. Journal of the New York Entomological Society, 1911, 19(1): 31 - 62.
[12] 张清源, 林振基, 阮丽玉, 等. 一种新的危害芒果树叶的瘿蚊害虫[J]. 华东昆虫学报, 2003, 12(2): 107 - 109.
[13] 王伟新, 王宏毅. 芒果壮龄普瘿蚊生物学特性初报[J]. 福建农业学报, 2005, 20(2): 74 - 76.
[14] GROVER P, PRASAD S N. Studies on Indian gall midges XVI: Four species of gall midges (Cecidomyiidae: Diptera) affecting inflorescence of mango [J]. Cecidologia Indica, 1966, 1(1): 1 - 19.
[15] GAGNÉ R J, ETIENNE J. *Gephyraulus mangiferae* (Felt), N. comb. (Diptera: Cecidomyiidae): A mango pest from India newly recorded from the western hemisphere [J]. Proceedings of the Entomological Society of Washington, 2006, 108(4): 930 - 937.
[16] GROVER P. Studies on Indian gall midges (Diptera: Cecidomyiidae). XII. The mango blossom midge, *Dasyneura amaramanjarae*, n. sp. [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1965, 58(2): 202 - 206.
[17] GROVER P. Studies on gall-midges of India XXIV: A new species of *Meunieriella* from blossoms of mango [J]. Cecidologia Indica, 1968, 3: 17 - 24.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 165 页)

[15] AGNEROH T A, BRATSCH S A, LOCKHART B E. First report of *Canna yellow mottle virus* in Kenya [J]. Plant Health Progress, 2015, 16(1): 34 - 35.
[16] SHEN Jianguo, GAO Fangluan, CHEN Xihong, et al. First report of *Canna yellow mottle virus* in China [J/OL]. Journal of Plant Pathology, 2018; doi:10.1007/s42161-018-0144-5.
[17] 张巧萍, 丁元明, 王云月, 等. 凤仙花坏死斑病毒的 RT-PCR 和巢

式 PCR 检测[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(1): 23 - 26.
[18] 闻伟刚, 崔俊霞, 盛蕾. 烟草环斑病毒和番茄环斑病毒的巢式 RT-PCR 检测[J]. 植物保护学报, 2007, 34(1): 61 - 66.
[19] YANG I C, HAFNER G J, DALE J L, et al. Genomic characterisation of *Tarobacilliform virus* [J]. Archives of Virology, 2003, 148(5): 937 - 949.

(责任编辑: 田 喆)