

黄瓜花叶病毒在香蕉不同品种组培过程中的 症状和传递规律

孙 洁 王 婉 饶雪琴 李华平

华南农业大学植物病毒研究室/广东省微生物信号与作物病害重点实验室, 广州 510642

摘要 以感染黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)的不同基因型香蕉分化芽为研究对象,利用肉眼观察、RT-PCR 和实时定量荧光 PCR 方法研究 CMV 在不同感病香蕉分化芽中的症状及传递规律。结果表明,感染 CMV 的‘粤优抗一号’、‘威廉斯’、‘大蕉’和‘皇帝蕉’在组培过程的第 1 代至第 12 代病害症状均不明显。随着组培继代数增加,不同品种的组培苗中 CMV 含量变化虽然不同,但均在顶部第 1~2 叶中含量最高。因此,检测香蕉分化芽中 CMV 最佳材料为顶部叶片。

关键词 黄瓜花叶病毒; 香蕉分化芽; 实时荧光 PCR; 症状; 传递

中图分类号 S 436.421 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)06-0058-05

香蕉(*Musa spp.*)是我国热带和亚热带地区的一种重要经济作物,而黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)是影响香蕉产量和品质及种质资源交流的重要因素之一。感病香蕉植株矮化,叶片表现浓绿镶嵌的斑驳、花叶状条纹或褪绿的梭状斑^[1],部分病株嫩叶出现严重黄化或斑驳,甚至变褐腐烂^[2-4]。目前香蕉种苗主要是通过组织培养技术进行快速繁殖,在繁殖过程中,若种芽携带病毒,病毒则可通过种芽繁殖传递给后代。常用的检测香蕉种芽和组培苗病毒的方法有 ELISA 法^[5]和 RT-PCR 法^[6]。随着研究技术的不断发展,植物病毒的检测方法不断改进。目前,基于 PCR 技术、荧光标记技术和激光技术的 *TaqMan* 荧光定量 PCR 法,由于具有很高的敏感性、重复性和特异性,因此,在植物病毒检测中已得到广泛运用^[7-8]。

曾有学者对香蕉组培中相关病毒含量与症状关系进行研究,发现在感病香蕉组培分化芽中 CMV 分布不均匀,组培分化芽症状与其体内的 CMV 浓度之间没有直接关系^[5,9],但是带毒香蕉组培分化芽不同品种与其症状特征和传递规律之间的关系鲜见报道,为探明 CMV 在我国不同品种香蕉组培分化芽中的传递规律,本研究选择了我国生产上主要的 3 类香蕉 4 个不同栽培品种:AAA 基因型(粤优

抗 1 号,威廉斯 B6)、ABB 基因型(大蕉)和 AA 基因型(皇帝蕉),利用已建立的 RT-PCR^[6]、实时荧光定量 PCR 技术^[10],研究在感染 CMV 的不同品种不同继代数香蕉组培分化芽的症状表现、CMV 含量变化,以及 CMV 在分化芽中的分布,以期全面了解 CMV 在我国不同香蕉品种中的含量变化和传递规律、不同品种香蕉种芽的病毒检测和解决生产上 CMV 的发生和危害奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

感染 CMV 的供试香蕉品种‘粤优抗一号’(*Musa* AAA Cavendish cv. Yueyoukang No.1),‘威廉斯 B6’(*Musa* AAA Cavendish cv. Williams),‘大蕉’(*Musa* ABB Pisang cv. Dajiao)和‘皇帝蕉’(*Musa* AA Pisang Mas cv. Huangdijiao)植株均采自华南农业大学农场。这些香蕉植株经过血清学和 RT-PCR 验证均为感染 CMV 的病株。

1.2 仪器与试剂

Ex *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、pMD18-T 载体、实时荧光定量 PCR 仪(Thermal Cycler Dice)、质粒纯化试剂盒、反转录酶、Premix Ex *Taq*TM均购于 TaKaRa 公司。大肠杆菌 JM109 由华南农业大

收稿日期:2015-12-23

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201203076-07)

孙 洁,硕士研究生. 研究方向:植物病毒. E-mail: sj721230@sina.com.

通信作者:饶雪琴,博士,副教授. 研究方向:植物病毒. E-mail: snow26@sina.com

学植物病毒室保存。微量核酸蛋白分析仪 (IM-PLIN) 购于德国 Implen 公司。

1.3 引物与探针的设计

根据 GenBank 上已登录的 CMV CP 基因序列 (登录号: AY965892) 设计 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 引物和探针, 上游引物 CMV-F: CGATA-AGAAGCTTGTTCGCG, CMV-R: CGGCG-TACTTTCTCATGTCAC, CMV-Probe: ROX-CGT-TACCGCCATCTCTG CTATGTTTCG-BHQ2, 引物和探针均由 TaKaRa 公司合成。RT-PCR 检测 CMV 的 2 对引物 CMV-F/CMV-R 扩增片段长度为 259 bp。

1.4 感染 CMV 香蕉吸芽的组培及观察

感染 CMV 的各品种香蕉吸芽, 消毒后接种在以 MS 培养基^[11] 为基本培养基的诱导培养基 (MS + 5 mg/L 6-BA + 1 mg/L IBA + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂) 中培养。前期暗培养, 待分化后弱光照培养约 30 d, 再进行增殖培养 (MS + 3 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IBA + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂), 第 10 到 12 代进行生根培养 (MS + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂), 培养基 pH 值为 5.8~6.0, 培养温度为 (26±2) °C, 光照强度 100~1 000 lx, 光照时间 10 h/d, 每天观察组培分化芽的症状。

1.5 CMV 在不同品种香蕉组培分化芽中的传递规律

1) RT-PCR 检测各代组培分化芽中 CMV。分别取各品种香蕉吸芽叶片及组培过程中第 3、6、9、12 代组培分化芽叶片各 0.16 g, 其中由同株吸芽繁殖所得的组培分化芽均选取 3 瓶, 称取每瓶组培分化芽叶片的混合样, 分别进行 RNA 抽提, 并用 CMV-F/R 引物进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。重复 3 次。

2) 实时荧光定量 PCR 检测 CMV 在各代组培分化芽中的含量变化。实时荧光定量 PCR 检测 CMV 参考孙洁等^[10] 方法。以抽提 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR 扩增, 其中每株吸芽繁殖所得各代组培分化芽均进行 3 次生物学重复, 2 次技术重复, 以梯度稀释的质粒 DNA 标准品建立标准曲线。RNA 反转录体系为: 5× PrimeScript RT Master Mix 2 μL, Total RNA 2 μL, RNase-Free dH₂O 8 μL。RNA 反转录程序为: 37 °C 30 min, 85 °C 5 s, 4 °C 暂时保存。

1.6 CMV 在不同品种香蕉组培分化芽中的分布

1) RT-PCR 检测各代组培分化芽各叶片中 CMV。将经过生根培养的各香蕉品种的第 10 代至第 12 代生根苗作为研究材料, 其中由同一吸芽繁殖的生根苗均选 2 瓶, 并从中选取大小一致、叶片数相近 (本研究中所取叶片数在 4~6 片) 的生根苗各 1 株, 叶片数从顶部开始计数, 即顶部叶片为第 1 片叶, 依次往下计数, 每片叶称取 0.03 g 进行 RNA 抽提, 并以所抽提的 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。重复 3 次。

2) 实时荧光定量 PCR 检测 CMV 在各代组培分化芽中的分布。以所抽提的 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR, 每个样品 3 次重复, 以梯度稀释的质粒 DNA 标准品建立标准曲线。实时荧光定量 PCR 检测 CMV 参考孙洁等^[10] 方法。

2 结果与分析

2.1 CMV 感染的组培分化芽症状观察

对田间采集的感染 CMV ‘粤优抗一号’、‘威廉斯’、‘大蕉’、‘皇帝蕉’吸芽分别进行组织培养, 建立培养体系后, 按常规方法进行继代培养。每个品种在田间都表现明显的花叶症状, 但在培养第 1 代开始, 一直到第 12 代, 各个品种的分化芽与健康香蕉吸芽组培分化芽相比, 生长无明显差异。同时, 在不同品种不同代数香蕉分化芽的不同生长阶段, 都未观察到任何肉眼可见的明显症状。

2.2 RT-PCR 检测各代组培分化芽中 CMV

采集所培养的第 3、6、9、12 代各品种组培分化芽进行 RT-PCR 检测, 发现不同品种的香蕉分化芽, 都能扩增出特异目的条带, 表明这些香蕉分化芽中都含有 CMV, 即本研究中 4 个品种的第 3、6、9、12 代组培分化芽均含 CMV。

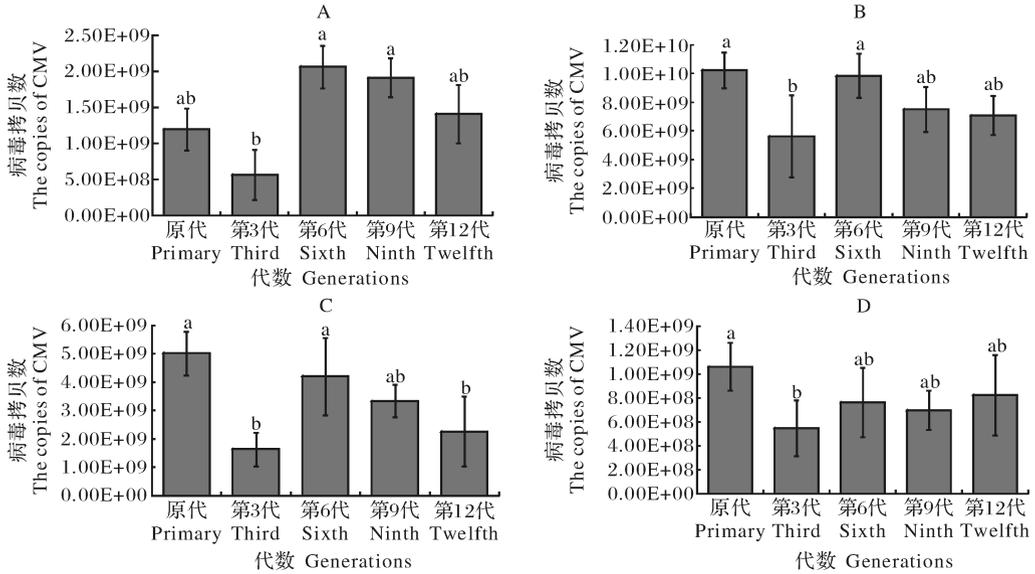
2.3 实时荧光定量 PCR 检测 CMV 在各代组培分化芽中的含量变化

分别抽提感染 CMV 各品种不同代数的香蕉组培分化芽的总 RNA, 经反转录成 cDNA 后再进行实时荧光定量 PCR 检测, 结果表明, 随着继代数的增加, CMV 含量在 ‘粤优抗一号’、‘威廉斯’、‘皇帝蕉’、‘大蕉’ 中不同。

在 ‘粤优抗一号’ 香蕉组培 (图 1A) 中各代 CMV 含量较原代均无显著变化, 而各代间 CMV 含量变

化显著,第 6 代、第 9 代病毒含量较第 3 代显著增加。在‘威廉斯’组培过程中 CMV 病毒含量变化见图 1B,各代 CMV 含量与原代相比,只有第 3 代 CMV 含量显著减少;各代间病毒含量相比较,第 3 代 CMV 含量较第 6 代显著减少,但第 3 代与第 9 代和第 12 代相比病毒含量无显著差异。在‘皇帝

蕉’各代组培分化芽中的 CMV 含量变化如图 1C 所示,各代 CMV 含量与原代相比,第 3 代、第 12 代 CMV 含量比原代少,且差异显著;各代之间 CMV 含量相比,发现第 6 代 CMV 含量较第 3 代、第 12 代均显著增加。在‘大蕉’各代组培分化芽中 CMV 含量变化趋势如图 1D 所示,各代 CMV 含量与原代



A: ‘粤优抗一号’; B: ‘威廉斯’; C: ‘皇帝蕉’; D: ‘大蕉’。竖线表示每个样品的标准误,不同小写字母表示在 5% 水平时差异显著。下图同。A: ‘*Musa* AAA Cavendish cv. Yueyoukang No.1’; B: ‘*Musa* AAA Cavendish cv. Williams’; C: ‘*Musa* AA Pisang Mas cv. Huangdijiao’; D: ‘*Musa* ABB Pisang cv. Dajiao’。The standard deviations are shown. Different small letters mean significant at 5% level. The same as below.

图 1 CMV 在 4 个香蕉品种各代组培分化芽中含量变化

Fig.1 The concentration of CMV in the differentiated banana shoots of different varieties

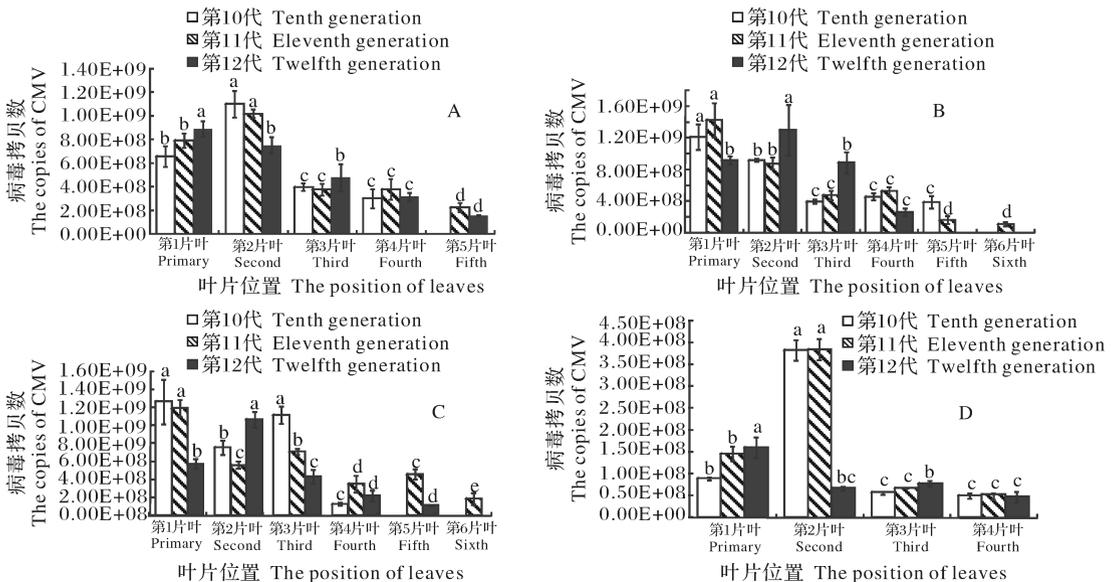


图 2 4 个香蕉品种第 10 代至第 12 代组培苗叶片中 CMV 含量变化

Fig.2 The concentrations of CMV in the differentiated banana in the 10th, 11th and 12th generations of 4 banana varieties

相比,仅第3代显著减少,且各代间CMV含量差异不显著。

香蕉品种‘粤优抗一号’、‘威廉斯’、‘皇帝蕉’和‘大蕉’原代CMV含量较高,第3代香蕉分化芽内CMV含量下降,到第6代CMV含量又恢复到一个较高水平,一直到第12代香蕉分化芽内CMV含量都维持在一定浓度。

2.4 CMV在不同品种香蕉组培苗中的分布变化

1) RT-PCR检测各代组培苗叶片中CMV。利用引物CMV-F/CMV-R对各品种第10代至第12代组培苗叶片分别进行RT-PCR检测,结果表明,除阴性对照外,各代组培苗均能扩增出目的条带,表明各品种第10、11、12代组培苗均含有CMV。

2) 实时荧光定量PCR检测CMV在各代组培苗叶片中的分布。CMV在各代组培苗叶片中的分布变化见图2,图2A为CMV在‘粤优抗一号’第10代至第12代生根苗叶片分布,在第12代生根苗各叶片中第1片叶和第2片叶片CMV含量比第3、4、5片叶高,第10代和第11代的CMV含量也是第1、2片叶CMV含量显著高于其他叶片。同样,‘威廉斯’、‘皇帝蕉’、‘大蕉’在第10代至第12代生根苗中第1片叶或(及)第2片叶CMV含量也高于其他叶片(图2B、C、D)。在‘粤优抗一号’、‘威廉斯’、‘皇帝蕉’、‘大蕉’第10代至第12代生根苗中CMV含量分布结果表明,第1片叶或(及)第2片叶中CMV含量最高,即在不同品种第10代至第12代组培苗顶部叶片CMV含量最高。

3 讨论

过去CMV在香蕉种芽的研究虽有报道^[5,9],但未提及香蕉品种及基因型,本研究对常规香蕉品种AAA基因型以及其他2类基因型(ABB, AA)的品种开展了感染CMV的香蕉组培分化芽的症状特征和病毒含量及分布研究。

在组织培养过程中,3类基因型感染CMV的4个不同香蕉品种从第1代到第12代都未观察到任何明显的肉眼可见的症状。秦碧霞等^[9]研究发现感染CMV的香蕉外植体形成的不定芽在组培过程(观察到第8代)中不饱满、不规则,叶鞘多而散,比健康外植体培育出的不定芽长势弱。这可能与侵染香蕉的CMV不同致病力有关。CMV浓度与其在香蕉上引起的症状严重度无相关性,症状很明显的香蕉植株,ELISA检测却为阴性^[5],而无症状的香

蕉植株,ELISA检测却为阳性^[1],检测结果可能与检测方法的灵敏度有一定关系。本研究采用灵敏度比ELISA高的RT-PCR法和实时荧光定量PCR法,对肉眼观察不到症状的香蕉分化芽进行检测,结果均为阳性,说明无症状的香蕉分化芽内存在CMV,表明香蕉组培分化芽症状表现与其体内CMV含量没有直接关系,这与肖火根等^[5]和秦碧霞等^[9]研究结果一致。在香蕉组培过程中,肉眼无法剔除感染CMV的香蕉分化芽,必须结合其他检测方法才能剔除。因此,对香蕉种芽的检测很重要,尤其是第3代前进行病毒检测,既可节约繁殖成本,又能保证香蕉种芽健康组培。

在不同品种和不同基因型香蕉组培分化芽中都能检测到CMV,表明CMV在不同品种和不同基因型香蕉组培分化芽中能逐代传递,但在不同品种和不同基因型的香蕉中传递规律有所不同。CMV在‘粤优抗一号’、‘威廉斯’、‘大蕉’中传递规律相同,即第6、9、12代组培分化芽所含CMV含量无显著变化,且这3代组培分化芽中病毒含量与原代相比无显著差异,而在‘皇帝蕉’第12代组培苗中CMV含量较组培前显著减少,这可能与CMV在不同品种和不同基因型香蕉中的适应能力有关^[12]。CMV在不同品种和不同基因型香蕉各代组培分化芽传递规律中有一个共同点,即第3代组培分化芽中病毒含量都最低,这可能是由于寄主生长环境的变化导致病毒浓度降低^[13],亦或是因为组培过程中切割、消毒等处理对种芽产生了损伤而导致病毒浓度降低。

虽然不同基因型香蕉中CMV传递规律不同,但是CMV在第10代至第12代组培苗顶部叶片中(如第1片叶或(及)第2片叶)含量均较其他叶片含量高,底部叶片CMV含量都比较低,这说明香蕉组培分化芽中CMV含量从基部至顶部呈增加趋势,这与甘薯组培中病毒分布相反^[14]。病毒在不同作物组培中的分布可能与病毒种类、寄主品种、检测方法灵敏度等有关。

对CMV在不同品种和不同基因型香蕉中传递规律和分布研究可为香蕉组培分化芽检测病毒取样提供一定的参考,即检测香蕉分化芽中CMV时应取香蕉分化芽第1、2片顶叶作为检测样品,可保证检测结果更准确、更可靠。

参 考 文 献

- [1] AYO-JOHN E I, EKPO E J A, ODEDARA O O, et al. Virus symptom expressions on *Musa* landraces in 1999, 2000 and 2004 in southern Nigeria: *Cucumber mosaic virus* (CMV) disease incidence and subgroup differentiation [J]. Archives of phytopathology and plant protection, 2011, 44(6): 547-557.
- [2] FENG J, LIN R, CHEN J. Alteration of tomato microRNAs expression during fruit development upon *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus* infection [J]. Molecular biology reports, 2013, 40(5): 3713-3722.
- [3] SHIMURA H, PANTALEO V, ISHIHARA T, et al. A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery [J]. PLoS pathogens, 2011, 7(5): 202-221.
- [4] SMITH N A, EAMENS A L, WANG M B. Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants [J]. PLoS pathogens, 2011, 7(5): 1244-1250.
- [5] 肖火根, 高乔婉, 张曙光, 等. 香蕉试管苗黄瓜花叶病毒检疫检验技术研究[J]. 中国病毒学, 1995, 3(3): 254-257.
- [6] 饶雪琴. 应用 RT-PCR 检测香蕉分化芽中黄瓜花叶病毒[J]. 西北植物学报, 2005, 25(10): 2090-2092.
- [7] ABRAHAMIAN P E, ABOU-JAWDAH Y. Detection and quantitation of the new world squash leaf curl virus by TaqMan real-time PCR [J]. Journal of virological methods, 2013, 191(1): 76-81.
- [8] SCHEFE J H, LEHMANN K E, BUSCHMANN I R, et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C-T difference" formula [J]. Journal of molecular methods, 2006, 84(11): 901-910.
- [9] 秦碧霞, 蔡健, 刘志明, 等. 香蕉花叶心腐病 CMV-B 在组培繁殖中的传递规律研究[J]. 中国南方果树, 2002, 31(6): 35-39.
- [10] 孙洁, 王婉, 周翎, 等. 黄瓜花叶病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 53-56.
- [11] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures [J]. Physiologia plantarum, 1962, 15(3): 473-497.
- [12] BONNET J, FRAILE A, SACRISTAN S, et al. Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus [J]. Virology, 2005, 332(1): 359-368.
- [13] DAUGHERTY M D, MALIK H S. Rules of engagement: molecular insights from host-virus arms races [J]. Annual review of genetics, 2012, 46(6): 677-700.
- [14] 谢逸萍, 马代夫, 李洪民, 等. 甘薯病毒检测技术的改进与组培分化芽病毒分布特征研究[J]. 江苏农业科学, 2003(1): 32-34.

Transmission pattern and symptoms of *Cucumber mosaic virus* in infected differentiated banana shoots of different varieties

SUN Jie WANG Wan RAO Xueqin LI Huaping

Laboratory of Plant Virology, Department of Plant Pathology,
South China Agricultural University/Guangdong Province Key Laboratory of
Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510642, China

Abstract To study the *Cucumber mosaic virus* (CMV) transmission pattern and symptoms, quantitative real-time PCR and RT-PCR assay and visual inspection were performed in differentiated banana shoots of different varieties infected by CMV. The results showed that there were no obvious symptoms of the differentiated banana shoots in different varieties such as 'Yueyoukang No.1', 'Williams', 'Dajiao' and 'Huangdijiao'. The concentrations of CMV in the differentiated banana shoots of these varieties were not the same in different generations. However, the CMV concentrations of the top-one or (and) top-two leaves were higher than those in other leaves. Hence, the top leaves of differentiated banana shoots could be collected as samples for virus detection.

Keywords *Cucumber mosaic virus* (CMV); differentiated banana shoots; quantitative real-time PCR; symptom; transmission pattern