

評估使用定量 PCR 技術鑑定香蕉萎縮病毒

關政平^{1*} 張溢麟² 曾清山³ 楊佐琦⁴

摘要

關政平、張溢麟、曾清山、楊佐琦。2019。評估使用定量 PCR 技術鑑定香蕉萎縮病毒。
台灣農業研究 68(1):59–68。

香蕉萎縮病毒 (*Banana bunchy top virus*; BBTV) 為一種危害香蕉之病原，它的偵測與確認已是台灣香蕉產區及世界重要課題。本研究使用即時螢光定量 polymerase chain reaction (PCR) 技術，應用於鑑定香蕉感染 BBTV 與否之檢測。本技術發展之即時螢光定量 PCR 技術，同時利用含有 BBTV-CP 基因之引子和探針，以 real-time PCR (qPCR) 法與 TaqMan[®] 螢光探針鑑定 BBTV 外，並區分香蕉其他病毒(香蕉條斑病毒及胡瓜嵌紋病毒)，且不與健康組織有反應。本技術將可應用在植株感染病毒早期檢測、篩選抗 BBTV 之香蕉品系、田間植株病害檢測之判定，以及作為健康香蕉種苗生產與驗證。

關鍵詞：香蕉萎縮病、BBTV、偵測。

前言

香蕉萎縮病 (Bunchy top disease of banana) 為目前全球最嚴重的香蕉病毒病害，此病也是台灣普遍具破壞性之香蕉病毒病害，並曾在中部造成數度大流行，幾乎造成台蕉主要栽培品種「北蕉」的滅絕，對台灣香蕉產業形成相當的威脅 (Sun 1961; Tsai *et al.* 1986)。香蕉萎縮病毒 (*Banana bunchy top virus*; BBTV) 之病毒顆粒外觀為二十面體的球形，含多粒病毒體 (6–8)，攜帶有環型 ssDNA (circular single-stranded DNA)，直徑 18–20 nm (Burns *et al.* 1994; Harding *et al.* 1991; Vetten *et al.* 2005)。最早發現香蕉萎縮病發生在 1889 年的斐濟，國際上目前已知香蕉萎縮病分布有非洲、大洋洲，亞洲包括台灣、日本琉球、中國大陸、菲律賓等 (Wardlaw 1961; Manser 1982; Dale 1987; Kawano & Su 1993; Kenyon *et al.* 1997)，香蕉萎縮病常造成栽種國嚴重的經濟損失。台灣中部曾發生大流行，平均園區發病

率達 16.4%，嚴重罹病地區有超過 50% 以上發病率 (Sun 1961)。香蕉萎縮病主要的傳播媒介為蕉蚜 (*Pentalonia nigronervosa*) (Hu *et al.* 1996)。

為了鑑別植株健康狀況，目前香蕉萎縮病植株的檢測常見方法有 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法 (Wu & Su 1990)、polymerase chain reaction (PCR) 及即時螢光定量 PCR (real-time PCR; qPCR) 法 (Xie & Hu 1995; Chen & Hu 2013) 等。本研究目的在於發展檢測萎縮病毒之定量核酸擴增技術，分析植株中萎縮病毒含量，並利用香蕉 UBQ 基因檢測作為內控，未來將應用在香蕉不同品系抗病之鑑定工具。

材料與方法

香蕉材料、病毒來源及接種

本研究使用香蕉品種為「新北蕉」，蕉苗

投稿日期：2018 年 2 月 13 日；接受日期：2018 年 10 月 1 日。

* 通訊作者：pcl123@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組替代役。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組研究員兼組長。台灣 台中市。

購自台灣香蕉研究所，小苗或吸芽經無菌處理與組織培養繼代繁殖後。挑選苗齡約 1 mo，瓶苗大小一致，培養於 B3 固態培養基 (1/2 MS salt, 340 mg L⁻¹ NaH₂PO₄•O₂O, 160 mg L⁻¹ adenine sulfate, 3% sucrose, pH 5.5, 0.7% agar)，於 25°C、12 h 光照環境下培養。待小植株發根後出瓶，定植於 3 吋盆放置溫室馴化。至 5 wk 後，蕉苗生長至株高約 10 cm 左右，4–5 片幼葉時，選取株高一致且葉數接近的小苗進行接種試驗。

BBTV、香蕉條斑病毒 (*Banana streak virus*; BSV) 及胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV)，病毒分離株採自霧峰地區香蕉園。其中，BBTV 以健康蕉蚜餵食病株香蕉後，接種至「新北蕉」幼苗至發病，各病毒株皆經 PCR 分析鑑定，PCR 產物皆經由核酸定序確認是否感染病毒，並鑑別病毒種類。植物基因體 DNA 的萃取，是使用 Plant Genomic DNA Purification Kit (Protech, Taipei, Taiwan)，萃取方法依原廠手冊建議。將香蕉幼苗移植至栽培介質中，培養於溫室 (溫度 25–28°C)。本試驗作為接種使用之蕉蚜 (*P. nigronevosa*) 取自行政院農委會農業試驗所生物技術組隔離田間，首先利用 PCR 檢測蕉蚜體內的帶毒情況，將蕉蚜移置健康的香蕉幼苗飼養繁殖。確認飼養的蕉蚜族群為無帶毒個體，飼養在生物技術組之半密閉溫室網室中，保持族群數量以供接種試驗使用。本研究使用「新北蕉」進行接種條件試驗，首先將繁殖無帶毒的蕉蚜放置帶有 BBTV 罹病植株，讓蕉蚜吸取病毒 48 h，再經 PCR 檢測蕉蚜體內帶毒情形，將成熟蕉蚜接種到健康蕉苗。分別試驗條件有接種蕉蚜數量、接種傳毒時間及接種蕉苗株高。進行接種後定期觀察 2 mo 植株病徵，並以 PCR 法及 real-time PCR 法檢測。

香蕉總量 DNA 之純化

將植物組織以 MasterPure DNA 純化套組 (Epicentre, Madison, WI, USA) 萃取總體 DNA，參照純化套組所附萃取步驟。先秤取 1 mg 植物組織，使用液態氮急速冷凍並研磨成粉末狀，研磨完的均質組織粉末與 300 µL Tissue and Cell Lysis Solution 在 1.5 mL 微量離

心管中均勻混合。置於 65°C 下放置 15 min，每 5 min 震盪 1 次。接著放置室溫冷卻後，加入 1 µL 5 µg µL⁻¹ RNase A 於 37°C 反應 30 min。將均質樣品加入 150 µL MPC Protein Precipitation Reagent 震盪 10 s，接著以 ≥ 10,000× g 離心 10 min，吸取上層澄清液至新的微量離心管中。加入 500 µL Isopropanol，上下倒置混合 40 次後，於 4°C 下 ≥ 10,000× g 離心 10 min。移除上清液，加入 75% 酒精，以震盪器震盪 DNA 沉澱物。再於 4°C 下 ≥ 10,000× g 離心，移除上清液後，重複 1 次。確認完全移除酒精後，加入 35 µL TE buffer 回溶沉澱物。

引子設計

由 GenBank 資料庫中搜尋台灣地區的 BBTV 分離株，經由 ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) 比對序列之高保留區域，設計引子藉由 Primer Express™ (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) 軟體設計，核酸引子合成則是委託 Bio Basic 公司 (Bio Basic Inc, Markham, Canada) 所合成 (序列詳如表 1)。即時螢光定量所使用的螢光探針，來自 Biosearch Technologies (Petaluma, CA, USA)。螢光探針序列可專一性結合於 BBTV DNA-S 的 coat protein 基因序列，探針的 5' 端標定 TAMRA (Carboxytetramethylrhodamine)，其 3' 端標定 BHQ-2 (Black hole quencher-2)，藉由 PCR 每循環一次就有 1 次螢光信號釋放，利用儀器偵測反應後產物總量。

PCR

根據上述設計之引子進行 PCR，PCR 反應試劑為 ProTaq™ Plus 反應套組 (Protech, Taipei, Taiwan)，以 BBTV-M-526F 和 BBTV-M-526R 引子進行 PCR 反應，反應條件為：95°C 3 min、40 個循環，95°C 30 s、55°C 30 s 和 72°C 30 s。之後，72°C 5 min 和 16°C 定溫，將所擴增的片段選殖於載體 pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA)，並轉型於 *Escherichia coli* JM 109 (Promega, Madison, WI, USA)，以構築 BBTV DNA-S 之 plasmid DNA 當作模板。以 5 ng plasmid DNA 或植物 DNA 為模板，在

表 1. 本試驗所使用之引子與核酸探針。

Table 1. The primers and probes used in these study.

Target	Accession number	Name (primer probe ¹)	Sequence 5' to 3'	Nucleotide position	Amplicon size (bp)	Modification
BBTV DNA-S	EU366171	BBTV-M-526F	gaaatcaaccagccgactaca	497–517	526	
		BBTV-M-526R	ctgcccaccactaaagtgtgg	1023–1035	526	
		BBTV-Q-82F	ggcaacaagccacgacta	310–327	82	
		BBTV-Q-82R	cagtaggctcaatcctaaatacc	370–392	82	
		BBTV probe	tcgtcgttagatcaatattgttcc	329–354		5'-TAMRA ^z ; 3'-BHQ2 ^y
Musa acuminata UBQ2	HQ853254				316	
					316	
		UBQ2-Q-84F	gctccgacgcatgtatgaaac	1298–1319	84	
		UBQ2-Q-84R	ggaaccacattaccacctaagtct	1358–1383	84	
		UBQ2 probe	tcaggagccattcttaatgcagca	1323–1347		5'-FAM; 3'-BHQ1

^z TAMRA: The 5-end of probe was labeled with 6-carboxytetramethyl-rhodamine.

^y BHQ2: The 3-end of probe was labeled with Black Hole-2 quencher dye.

總體積 25 μ L 反應溶液中進行 PCR，其溶液中含有 2.5 μ L 10 \times PCR buffer、2 μ L 2.5 μ M dNTP、2 μ L 10 μ M 引子、0.5 μ L ProTaq DNA polymerase。反應條件為 94 $^{\circ}$ C 3 min、95 $^{\circ}$ C 30 s、56 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 40 s，共 35 個循環；最後再以 72 $^{\circ}$ C 反應 6 min。PCR 機器為 Veriti Thermal Cycle (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)，取 5 μ L PCR 產物進行 2% 膠體電泳，以 Ethidium bromide (EB) 染色後，於 Ultraviolet (UV) 光照相並分析結果。

即時螢光定量 PCR

Real-time PCR 反應試劑為 KAPA probe fast qPCR 反應套組 (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA)，使用引子對為 BBTV-Q-82F/R 與 UBQ2-Q84F/R，使用探針為 BBTV probe (BBTV-p) 和 UBQ2 probe (UBQ2-p)。於 0.2 mL 微量離心管中加入 5 ng plasmid DNA、植物 DNA 為模板，2 \times KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix 10 μ L、10 μ M 引子 1 μ L、探針 1 μ L，總體積 20 μ L，進行 PCR 反應。反應條件為 94 $^{\circ}$ C 3 min；95 $^{\circ}$ C 3 s、60 $^{\circ}$ C 0 s，共 40 個循環。Real-time PCR 機器為 ABI PRISM[®] 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)，threshold 或 baseline 參數的設定採用系統自動判讀方式。

偵測 BBTV 靈敏度試驗

為分析本偵測技術所設計之探針序列之靈敏度，以 BBTV-Q-82F/R 與 UBQ2-M316F/R 引子對，以及 BBTV probe 和 UBQ2 probe 探針進行 PCR 反應。反應條件為：95 $^{\circ}$ C 3 min、40 個循環的 95 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 5 min 和 16 $^{\circ}$ C 定溫，將 plasmid DNA 進行 10 \times 序列稀釋後，利用傳統 PCR 及 real-time PCR 進行試驗。將 BBTV DNA-S plasmid DNA 稀釋濃度從 1.14 \times 10⁹ BBTV 基因 copy 數至 1.14 \times 10⁰ BBTV 基因 copy 數之負對數值 (-log) 與 real-time PCR 反應後所測得相對應 Ct 值，製作標準曲線圖；即橫座標為總量 DNA 濃度之負對數值，縱座標為 Ct 值，點代表由 3 次獨立試驗所得的平均 Ct 值，線代表為 DNA 濃度與 Ct 值對應之線性回歸分析。

香蕉組織中 BBTV 之定量分析

測定 BBTV 在香蕉組織中分布之情形，將接種 BBTV 後確認罹病蕉苗，經持續培養 2 mo 後，取罹病之蕉苗的不同部位分別為新葉 (上位)、葉 (下位)、上假莖、下假莖及根，進行總量 DNA 萃取。調整樣品之總量 DNA 濃度為 5 ng，以 real-time PCR 進行定量分析，每反應 3 重複。

田間 BBTV 檢測

採集田間栽培之香蕉材料，取新葉組織約 10 mg 利用 MasterPure DNA 純化套組 (Epicentre, Madison, WI, USA) 萃取總量 DNA。步驟依照前述材料與方法進行，將純化得到之 DNA 進行 PCR 法及 real-time PCR 法檢測。

結果

BBTV 專一性試驗

本試驗比對台灣 BBTV 病毒株具高度保留區序列 (圖 1)，設計引子對與探針如表 1 所述。為測試本試驗發展 qPCR 對 BBTV 是否具專一性，使用 qPCR 法增幅感染 BBTV 之香蕉植株組織的核酸萃取物，同時以傳統 PCR 做比較。傳統 PCR 產生 526 bp 之 BBTV 專一性核酸片

段產物，由瓊脂凝膠電泳分析，確認其產物大小符合預期大小；經瓊脂凝膠電泳分析結果顯示，僅 BBTV 質體 DNA 及 BBTV 感染之香蕉組織 DNA 出現 526 bp 產物片段，對於 CMV cDNA、BSV 感染之香蕉及健康香蕉皆無反應 (圖 2A)。qPCR 法檢測 BBTV 感染之香蕉組織 DNA，經 qPCR 分析結果，僅 BBTV 質體 DNA 及 BBTV 感染之香蕉組織 DNA 出現訊號，對於 CMV cDNA、BSV 感染之香蕉及健康香蕉皆無反應 (圖 2B)。由上述試驗，確認本研究設計引子，在傳統 PCR 及 qPCR 法對 BBTV 具有高度專一性。

BBTV 靈敏度試驗

利用 BBTV 質體 DNA 作為試驗用之核酸模板，核酸濃度由 5 ng 起始經系列 10× 稀釋後，利用 PCR 及 qPCR 法進行分析，比較兩

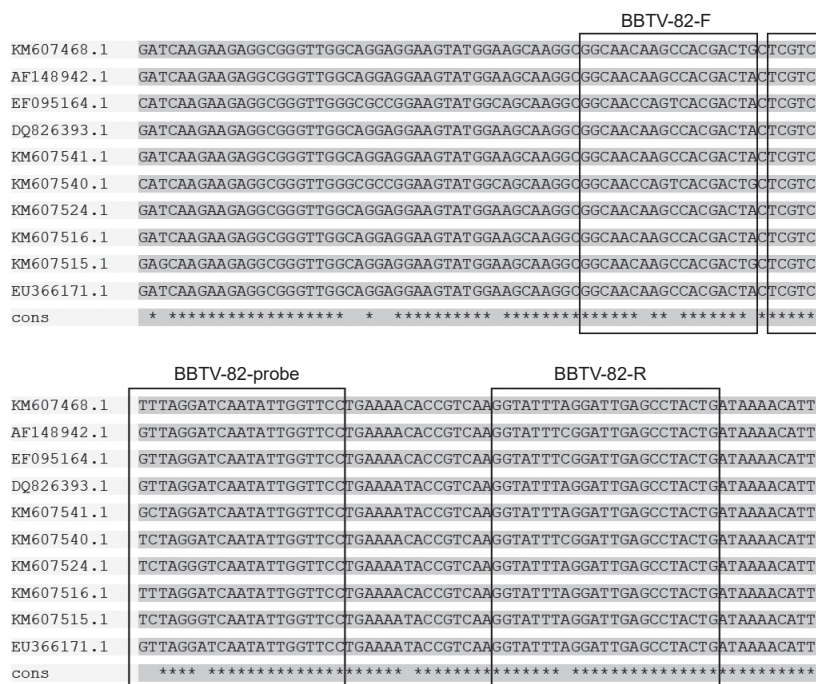


圖 1. 本試驗使用於 real-time PCR 之引子與探針，BBTV 序列比對由上至下分別為 Accession no. KM607468.1、AF148942.1、EU366171.1、EF095164.1、DQ826393.1、KM607541.1、KM607540.1、KM607524.1、KM607516.1、KM607515.1。

Fig. 1. Sequence alignment of the BBTV CP partial protein gene regions showing the locations of the primers and probes used for qPCR amplification. Accession numbers for the aligned isolates (top to bottom) are KM607468.1, AF148942.1, EU366171.1, EF095164.1, DQ826393.1, KM607541.1, KM607540.1, KM607524.1, KM607516.1, and KM607515.1.

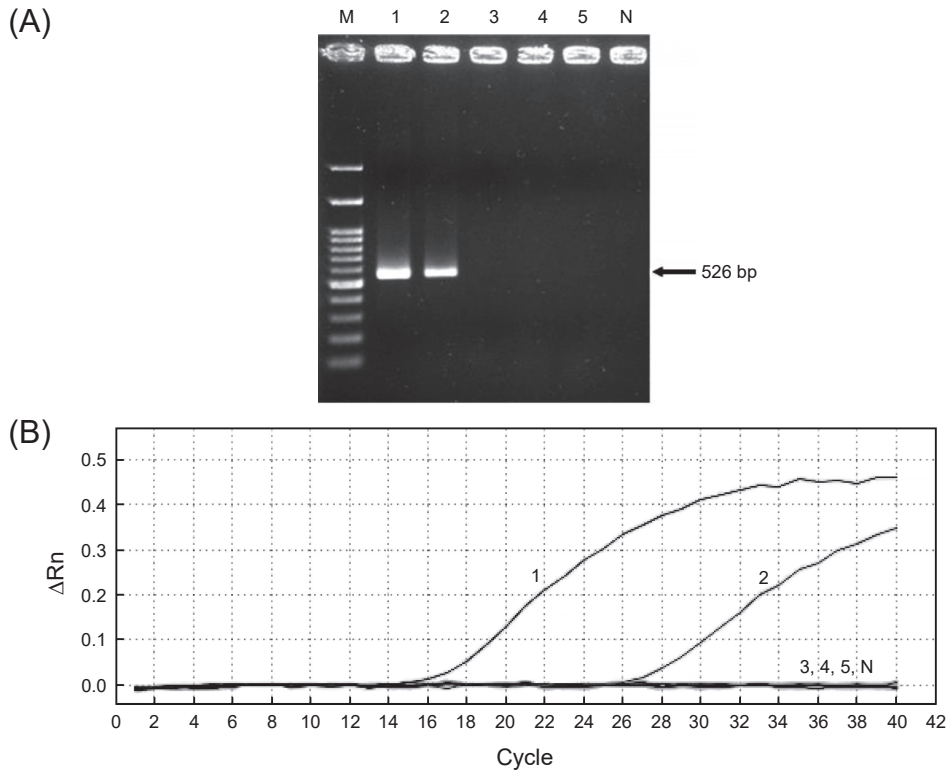


圖 2. 使用 polymerase chain reaction (PCR) (A) 和 real-time PCR (B) 偵測 *Banana bunchy top virus* (BBTV) 之專一性試驗。1: BBTV 質體 DNA; 2: 感染 BBTV 香蕉葉組織; 3: 感染 *Banana streak virus* (BSV) 香蕉葉組織; 4: Cytomegalovirus (CMV) cDNA; 5: 健康香蕉; N: 無核酸模板對照組 (no template control; NTC); M: 100 bp DNA ladder。

Fig. 2. Specificity test of polymerase chain reaction (PCR) (A) and real-time PCR (B) for detection of *Banana bunchy top virus* (BBTV). Lane M: 100 bp DNA ladder; lane 1: cloned BBTV DNA-S plasmid DNA; lane 2: BBTV-infected banana leaf tissue; lane 3: BSV-infected banana leaf tissue; lane 4: Cytomegalovirus (CMV) cDNA; and lane 5: healthy banana; and lane N: no template control.

種檢測法之靈敏度差異。結果顯示，傳統 PCR 法經瓊脂凝膠電泳分析，增幅出 526 bp 之 BBTV 專一性核酸片段，可被偵測的最低濃度為 1.14×10^3 BBTV CP 基因 copy 數。而根據 qPCR 分析結果，可被偵測的最低濃度為 1.14 copy 數 (圖 3A–3B)。經由上述結果顯示，在檢測 BBTV 靈敏度上，real-time RT-PCR 可檢測最低病毒濃度到 1.14 BBTV CP 基因 copy 數，使用 PCR 則可檢測之最低病毒 DNA 濃度為 1.14×10^3 BBTV CP 基因 copy 數。由上述結果顯示，利用 qPCR 法檢測 BBTV 質體 DNA 之靈敏度，高於傳統 PCR 法達 1,000 倍。將 qPCR 法所測得之結果繪製標準曲線，縱座標為 Ct 值，橫座標為 BBTV 質體 DNA 濃度

的負對數值 (-log)，得到標準曲線方程式為 $Y = -3.1097X + 39.424$ ， $R^2 = 0.9959$ (圖 3C)， $E = 95.9\%$ 。上述試驗結果，可應用於定量病毒含量。

香蕉不同組織帶毒量試驗

本研究接種時間及接種植株高度試驗，皆使用約 2 mo 大的組織蕉苗，高度在 10 cm 左右，據此同樣接種 5 隻蚜蟲之罹病率達 80% (未列於結果)。後續試驗，也以此香蕉植株大小作為接種測試帶病毒情形。為瞭解香蕉感染 BBTV 時病毒在植株體內的分布狀況，本試驗將罹病之香蕉植株的根、上位及下位假莖、新葉帶有病徵葉及無病徵葉個別採樣，

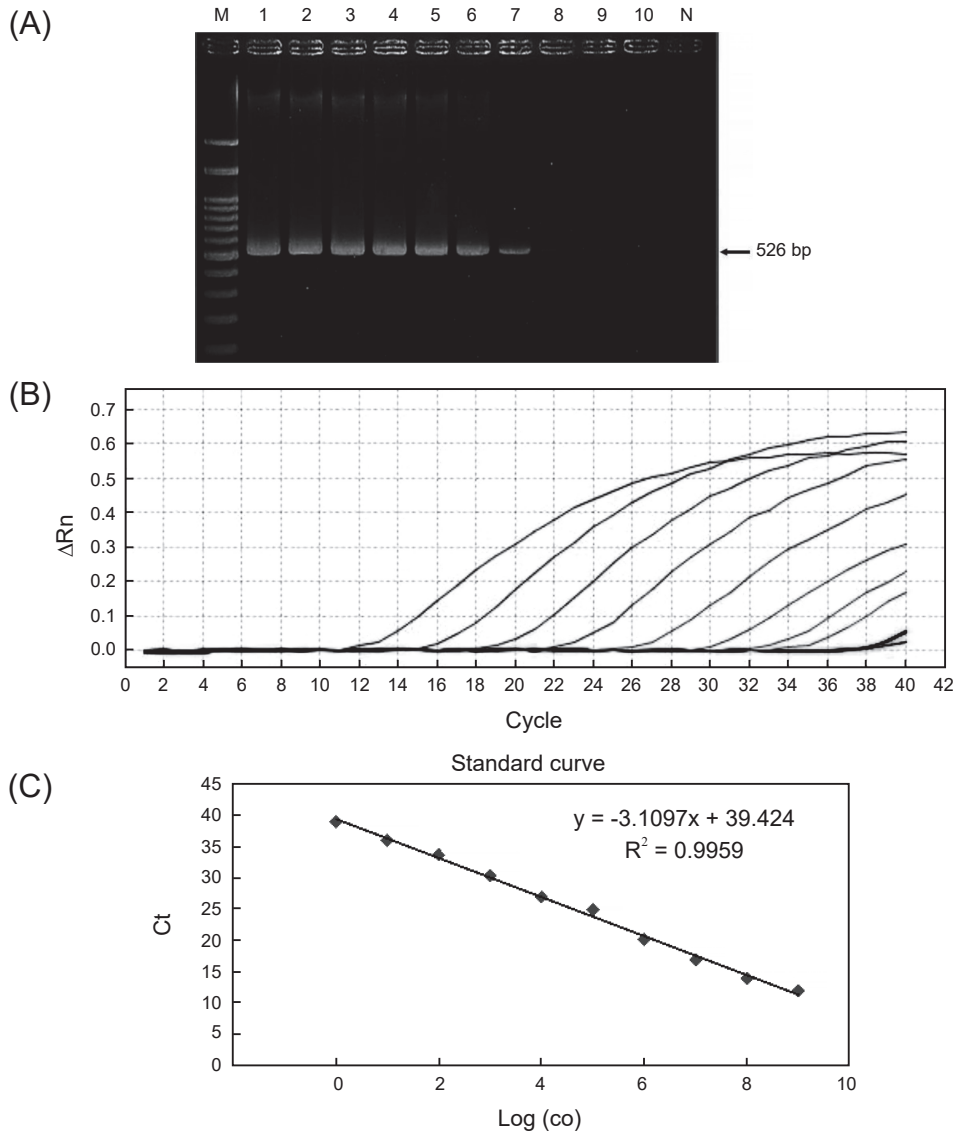


圖3. 利用polymerase chain reaction (PCR) (A) 和 real-time PCR (B, C) 方法檢測 *Banana bunchy top virus* (BBTV) 的靈敏度試驗。(A) PCR 的試驗結果，1-10 為 BBTV DNA-S 質體 DNA 連續 10× 系列稀釋 (1.14×10^9 – 1.14×10^0 copy no.)；N：無核酸模板對照組 (no template control; NTC)，M：100 bp DNA ladder；(B) real-time PCR 的試驗結果，為 BBTV DNA-3 質體 DNA 連續 10× 系列稀釋 (1.14×10^9 copy no– 1.14×10^0 copy no.)；(C) real-time PCR 試驗結果的標準曲線；縱軸：Ct 值；水平軸：BBTV 質體 DNA 序列稀釋 log copy number 值。

Fig. 3. Sensitivity test of polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR for detection of *Banana bunchy top virus* (BBTV). (A) Amplification of 10-fold serial dilutions of BBTV plasmid DNA (1.14×10^9 to 1.14×10^0 copy no.) by the PCR and analyzed by gel. Lane M: 100 bp DNA ladder; lane N: no template control. (B) Amplification plot of 10-fold serial dilutions of BBTV plasmid DNA (1.14×10^9 to 1.14×10^0 copy no.) by the real-time PCR. (C) The standard curve of 10-fold serial dilutions of BBTV DNA. The regression equation is $Ct = -3.1097 \times \log(\text{no. of virus copy}) + 39.424$.

萃取其總核酸後做為模板。以 qPCR 法進行分析，將分析所測到的 Ct 數據，帶入由靈敏度試

驗繪製而成的標準曲線公式，演算得知各部位之 BBTV copy number (copy no.)，分別為葉 1.63 ×

10^5 copy no.、根 1.00×10^1 copy no.、上假莖 2.20×10^5 copy no.、下假莖 1.72×10^6 copy no. (表 2)。使用 PCR 檢測，葉、下位假莖及上位假莖皆可測出，但根無法檢測到 BBTV (表 2)。

田間病毒檢測試驗

利用傳統 PCR 及 qPCR 法檢測田間疑似感染 BBTV 之香蕉樣品，採樣共採得 20 株田間香蕉葉片，萃取總核酸後進行 PCR 分析。分析結果，傳統 PCR 法測得 7 株具有 BBTV，而 qPCR 法亦測得 9 株具有 BBTV 感染，使用 PCR 檢出率為 35%；使用 qPCR 檢出率為 45% 檢出 BBTV (表 3)。顯示 PCR 及 qPCR 法，皆可用於檢測田間受 BBTV 感染之香蕉植株，但 qPCR 較為靈敏。

討論

香蕉屬於熱帶果樹，幾乎所有種植香蕉的國家都有發生香蕉萎縮病 (Burns 1994)。香蕉萎縮病毒屬於系統性病害，亦為台灣常見的香蕉病毒之一，早期曾發生過大規模感染，導致產量與經濟之損失。此病之傳播方式，主要經由罹病香蕉母株之無性繁殖體之吸芽或經由組織培養苗傳播。另一方式是經由媒介昆蟲蔗蚜在田間做短、長距離的傳播，因而造成 BBTV 蔓延擴散流行於田間。目前防治方法，主要為保持香蕉田間衛生，避免病毒媒介蚜蟲大量滋生，利用組織培養繁殖無病毒的健康香蕉種苗，得以暫時控制病害蔓延。為了生產健康種苗及發展篩選抗 BBTV 香蕉之相關研究，本試驗開發一套 BBTV 接種流程及 BBTV 專

一性且靈敏度高的檢測技術，作為協助往後抗 BBTV 香蕉品系之篩選及培育無病毒之健康香蕉組培苗。

現今 BBTV 常用之檢測技術除血清學法外，多應用核酸方式鑑定，早在 1995 年傳統 PCR 法已被發展 (Xie & Hu 1995)。而近期即時螢光定量 PCR 法，亦被報導於檢測此病毒 (Chen & Hu 2013)。Chen & Hu (2013) 開發之即時螢光定量 PCR 法，所選擇的 BBTV 序列為 CP 基因，所設計的產物預期大小為 155 bp。為能正確鑑定台灣 BBTV 感染香蕉，本研究設計的基因序列皆來自台灣，同樣選擇 CP 基因具高度保留序列，所設計的產物預期大小為 82 bp，二者所選用的檢測基因標的區域近似相關。由結果顯示，本法即時螢光定量 PCR 法可正確檢測感染之 BBTV，包括本研究室之 3 個 BBTV 分離株 (結果未呈現)，而不與健康香蕉植株反應。Chen & Hu (2013) 檢測 BBTV 最低需要的病葉，萃取香蕉組織需要 1 mg-1 ng 量，本試驗所需要的萃取香蕉組織量則約 1 mg，二者相當。由本研究顯示，即時螢光定量的靈敏度較一般 PCR 靈敏度提高約 1,000 \times 。但 Chen & Hu (2013) 的試驗顯示，PCR 與即時螢光定量的稀釋終點靈敏度皆達 10^7 稀釋倍率，認為其 PCR 試劑有添加 bovine serum albumin (BSA, 1%) 與 polyvinylpyrrolidone-40 (PVP-40, 20%)，可減少 PCR 干擾物的產生，故能有效提升 PCR 的反應效率，與 real-time PCR 的靈敏度相當。推測對於粗萃核酸之香蕉樣本，可能含有植物細胞中的多酚等物質，PVP-40 的添加極有可能抑制 PCR 之干擾作用，幫助提升 PCR 及 qPCR 反應的效率。同時 ELISA 法的靈敏度稀釋終點為 10^2

表 2. 感病香蕉植株不同部位之 *Banana bunchy top virus* (BBTV) 檢測。

Table 2. Detection and quantification of *Banana bunchy top virus* (BBTV) using PCR and qPCR from tissues of different part of BBTV-infected bananas.

Various part	PCR	qPCR	Number of copy BBTV ^z
Leaf	+	+	1.63×10^6
Root	-	+	1.00×10^2
Pseudostem (upper)	+	+	2.20×10^6
Pseudostem (lower)	+	+	1.72×10^7

^z BBTV copy number was estimated from the dilution curve. qPCR: real-time PCR. PCR: polymerase chain reaction.

表 3. 比較 real-time polymerase chain reaction (PCR) 和 PCR 檢測田間香蕉「北蕉」的 *Banana bunchy top virus* (BBTV) 感染結果。

Table 3. Detection of *Banana bunchy top virus* (BBTV) by real-time polymerase chain reaction (PCR) and PCR for naturally infected field banana plants.

Field sample ^z	PCR ^y	Real-time PCR (Ct) ^x
A1	—	—
A2	—	—
A3	—	—
A4	—	—
A5	—	—
P1	+	+ (24.56)
P2	+	+ (21.74)
P3	—	+ (35.92)
P4	—	—
P5	—	—
R1	—	+ (34.01)
R2	—	—
R3	+	+ (26.98)
R4	—	—
X1	—	—
X2	—	—
X3	+	+ (20.26)
X4	+	+ (21.55)
X5	+	+ (22.00)
X6	+	+ (19.74)
BBTV	+	+
HE	—	—
NTC	—	—

^z HE: healthy banana; NTC: no template control; BBTV: BBTV cloned plasmid.

^y PCR results: + indicates a clearly visible band in gel electrophoresis; — indicates a negative reaction.

^x Ct threshold values represent the mean Ct obtained after running samples in triplicate. Ct values below 35 are considered to be clearly positive results.

稀釋倍數，Chen & Hu (2013) 之即時螢光定量 PCR 法可檢測出感染植物樣品，較 ELISA 法靈敏度高 10,000×，因此也確認 real-time PCR 檢測 BBTV 之靈敏度較 ELISA 為高。由 qPCR 之靈敏度試驗顯示，本試驗的最低病毒 DNA 量可檢測達 1.14 copy no.，而 Chen & Hu (2013) 的試驗結果為 2.76 copy no.，可偵測的最低值相近，而本試驗結果較優。

本研究試驗 BBTV 接種流程，開發 BBTV 接種方法之建立。首先試驗蚜蟲之接種數量，蚜蟲使用數量條件分別為 5 隻及 10 隻，接

種後之植株萃取總核酸進行 BBTV 檢測。經 PCR 與瓊脂凝膠電泳分析結果顯示，發現利用 5 隻蚜蟲傳遞病毒並無法達到 100% 罹病率。雖然起初蚜蟲隻數試驗得知 5 隻蚜蟲即可順利傳毒，但此試驗受測植株高度小於 5 cm。另有研究指出，接種 1 mo 大的組織培養蕉苗，5 隻蚜蟲即可達到 100% (Wu 1987)，此與本試驗結果相符。然而本研究接種時間及接種植株高度試驗皆使用約 2 mo，大的組織蕉苗，高度在 10 cm 左右，因此同樣接種 5 隻蚜蟲之罹病率達 80%，並無法達到 100% (未列於結果)。

此外，在試驗接種條件過程，利用傳統 PCR 及 qPCR 法一併檢測接種後不同時期 BBTV 核酸含量，結果發現傳統 PCR 及 qPCR 法皆比外觀病徵觀察更早得知感染 BBTV。此提早檢測出 BBTV 病毒之優點，可應用在早期偵測抗病組織培養蕉苗之篩選。田間檢測部分，由感病香蕉之不同部位進行檢測，顯示除根部外、假莖包含上位與下位部、有病徵新葉、無病徵葉皆可由 qPCR 檢測出，但使用 PCR 法則無法測出根部及下位老葉之 BBTV。

田間病毒檢測試驗顯示，田間香蕉葉片使用 PCR 檢出率為 35%；使用 qPCR 檢出率為 45%。顯示 PCR 及 qPCR 法皆可用於檢測田間受 BBTV 感染之香蕉植株，但傳統 PCR 法測得 7 株具有 BBTV，而 qPCR 法亦測得 9 株具有 BBTV 感染，故 qPCR 較為靈敏。此結果與 Kumar *et al.* (2011) 的研究報告稱香蕉萎縮病在田間感染率一般在 20–100% 的發生相當，但有 2 株僅由 qPCR 被檢出，一般 PCR 無法測出可能與感染香蕉病毒含量有關，顯示 qPCR 較 PCR 的靈敏度為高。

引用文獻

- Burns, T. M., R. M. Harding, and J. L. Dale. 1994. Evidence that *banana bunchy top virus* has a multiple component genome. *Arch. Virol.* 137:371–380.
- Chen, Y. and X. Hu. 2013. High-throughput detection of *banana bunchy top virus* in banana plants and aphids using real-time TaqMan® PCR. *J. Virol. Methods* 193:177–183.
- Dale, J. L. 1987. Banana bunchy top: An economically important tropical plant virus disease. *Adv. Virus Res.* 33:301–325.
- Harding, R. M., T. M. Burns, and J. L. Dale. 1991. Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA. *J. Gen. Virol.* 72:225–230.
- Hu, J. S., M. Wang, D. Sether, W. Xie, and K. W. Leonardt. 1996. Use of polymerase chain reaction (PCR) to study transmission of *banana bunchy top virus* by the banana aphid (*Pentalonia nigronervosa*). *Ann. Appl. Biol.* 128:55–64.
- Kawano, S. and H. J. Su. 1993. Occurrence of *banana bunchy top virus* in Okinawa. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59:53. (in Japanese)
- Kenyon, L., M. Brown, and P. Khonje. 1997. First report of *banana bunchy top virus* in Malawi. *Plant Dis.* 81:1096.
- Kumar, P. L., R. Hanna, O. J. Alabi, M. M. Soko, T. T. Oben, G. H. P. Vangu, and R. A. Naidu. 2011. *Banana bunchy top virus* in sub-Saharan Africa: Investigations on virus distribution and diversity. *Virus Res.* 159:171–182.
- Manser, P. D. 1982. Bunchy top disease of plantain. *FAO/Plant Protection Bulletin* 30:78–79.
- Sun, S. K. 1961. Study on the bunchy top diseases of banana. *Special Publ. Coll. Agri. Taiwan Univ.* 10: 82–109.
- Tsai, W. P., M. D. Huang, S. P. Chen, and S. S. Liu. 1986. Study on transmission of *banana bunchy top virus* by the banana aphid. *Plant Prot. Bull.* 28:147–153. (in Chinese with English abstract)
- Vetten, H. J., P. W. G. Chu, J. L. Dale, R. Harding, J. Hu, L. Katul, M. Kojima, J. W. Randles, Y. Sano, and J. E. Thomas. 2005. The single stranded DNA viruses: Family *Nanoviridae*. p.343–352. *in: Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* (Fauquet C. M. ed.) Elsevier. London. 1259 pp.
- Wardlaw, C. W. 1961. *Banana Diseases: Including Plantains and Abaca.* Longman, London. 684 pp.
- Wu, R. Y. 1987. Characterization and Monoclonal Antibodies of the Virus Causing Banana Bunchy-top. Ph.D. Dissertation, National Taiwan University, Taipei, Taiwan. 176 pp.
- Wu, R. Y. and H. J. Su. 1990. Production of monoclonal antibodies against *banana bunchy top virus* and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Phytopathol.* 128:203–208.
- Xie, W. S. and J. S. Hu. 1995. Molecular cloning, sequence analysis, and detection of *banana bunchy top virus* in Hawaii. *Phytopathology* 85:339–347.

Evaluation of Real-Time PCR Methods for the Detection of *Banana bunchy top virus*

Cheng- Ping Kuan^{1,*}, Yi-Lin Chang², Ching-Shan Tseng³, and Tso-Chi Yang⁴

Abstract

Kuan, C. P., Y. L. Chang, C. S. Tseng, and T. C. Yang. 2019. Evaluation of real-time PCR methods for the detection of *Banana bunchy top virus*. *J. Taiwan Agric. Res.* 68(1):59–68.

Banana bunchy top virus (BBTV) is a damaging pathogen for banana, its detection being of critical importance to certification programs for Taiwan and worldwide. Here we report a quantitative real-time polymerase chain reaction assay (qPCR) based on TaqMan[®] chemistry to improve the diagnosis of this pathogen. Real-time PCR, targeting the amplification of CP gene fragment, was highly specific and capable of distinguishing BBTV from non-target banana viruses, *Cucumber mosaic virus* and *Banana streak virus*, which are two other common virus species in banana plants. The protocol was also evaluated for its specificity using healthy banana and water controls. None of the non-target or healthy samples reacted in qPCR. The developed technique is sensitive and reliable and allows rapid detection and quantitation of BBTV in both field and experimental material used for the surveillance and specific diagnosis of BBTV.

Key words: *Banana bunchy top virus*, BBTV, Detection.

Received: February 13, 2018; Accepted: October 1, 2018.

* Corresponding author, e-mail: pcr123@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Alternative Military Serviceman, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Research Fellow and Director, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.