

卢咏思,刘润沛,饶雪琴.香蕉线条病毒多重免疫捕获PCR方法的建立及应用[J].华中农业大学学报,2025,44(1):168-173.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.01.018

## 香蕉线条病毒多重免疫捕获PCR方法的建立及应用

卢咏思,刘润沛,饶雪琴

华南农业大学植物保护学院/广东省微生物信号与病害防治重点实验室,广州510642

**摘要** 为提高复合感染香蕉的香蕉线条病毒(banana streak virus,BSV)的诊断效率,保障香蕉产业的健康发展,设计基于香蕉线条病毒OL(banana streak OL virus,BSOLV)、香蕉线条病毒GF(banana streak GF virus,BSGFV)的外壳蛋白(coat protein,CP)基因和香蕉线条病毒IM(banana streak IM virus,BSIMV)的RNase H基因保守序列的特异引物,利用BSV多克隆抗血清捕获病毒为模板,通过对引物浓度、退火温度等条件的优化,建立能够同步检测BSOLV、BSGFV、BSIMV的多重免疫捕获PCR方法。研究结果显示,建成的最优体系为BSOLV、BSGFV、BSIMV上下游引物终浓度( $\mu\text{mol/L}$ )比例0.5:0.5:0.5,退火温度为63℃。利用该多重免疫捕获PCR方法可以从1 mg/mL的香蕉粗提液中分别检测出BSOLV、BSGFV和BSIMV。所建立的多重免疫捕获PCR方法与引起相似症状的黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus,CMV)无交叉反应。对15份田间香蕉样品进行检测,能够明显区分出复合侵染的样品,经测序验证,BSOLV、BSGFV和BSIMV的扩增产物与GenBank相应病毒同源率分别在94%以上。表明该多重免疫捕获PCR方法具有较高的敏感性和特异性,可应用于香蕉种苗以及田间香蕉样品中3种BSV的检测。

**关键词** 香蕉;香蕉线条病毒;多重免疫捕获PCR;复合感染

**中图分类号** S432.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)01-0168-06

香蕉(*Musa* spp.)广泛种植于热带亚热带地区<sup>[1]</sup>,主要分布于我国广西、云南、海南、广东、福建及台湾。因无性繁殖能保持香蕉良好的遗传性状,目前市场上香蕉种苗主要来源于组织培养繁殖的试管苗。然而,在生产中香蕉容易受到香蕉束顶病毒(banana bunchy top virus,BBTV)、香蕉线条病毒(banana streak virus,BSV)等病毒侵染,BSV侵染香蕉后在叶片上产生断裂或连续的褪绿条纹,有时出现坏死症状<sup>[2]</sup>,初期的褪绿症状与黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus,CMV)在香蕉上产生的症状类似<sup>[3]</sup>。感染了香蕉线条病会导致香蕉植株生长缓慢、减产15%~90%<sup>[4]</sup>。经调查发现,广东有些蕉地香蕉线条病发病率高达40%以上,同时存在CMV与BSV复合感染的情况<sup>[5]</sup>,严重损害香蕉产业的健康发展。

香蕉线条病毒是花椰菜花叶病毒科(Caulimoviridae)杆状病毒属(*Badnavirus*)的双链环状DNA病毒,可以通过粉蚧传播,也可以通过组培在香蕉试管

苗中传递。已报道的BSV有11个种,BSV在香蕉中有游离态和整合态,香蕉线条病毒OL(banana streak OL virus,BSOLV)、香蕉线条病毒IM(banana streak IM virus,BSIMV)以及香蕉线条病毒GF(banana streak GF virus,BSGFV)以整合态存在于香蕉基因组中,这3种BSV游离态结构相似,但核苷酸序列差异较大,BSOLV与BSIMV的基因序列同源率较高,BSGFV基因序列与其他BSV差异较大<sup>[6]</sup>。这3种BSV的活性整合态在外界胁迫下(如组培切割)能从香蕉基因组中游离出来而侵染香蕉<sup>[7]</sup>,这加重了BSV对香蕉生产的危害。而市场上的香蕉种苗大部分来源于无性繁殖的试管苗,无毒的香蕉试管苗可能在组培过程中感染病毒。由于目前对香蕉病毒病的防控没有特效药,因此,病毒检测对香蕉试管苗生产和香蕉种苗病毒诊断非常重要。

植物病毒的检测主要以血清学和分子生物学技术为主,且以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)为代表的分子生物学检测技术更具优

收稿日期:2024-01-04

基金项目:国家现代农业产业技术体系项目(CARS-31)

卢咏思,E-mail:1436859820@qq.com

通信作者:饶雪琴,E-mail:raoxq@hotmail.com

势<sup>[8-9]</sup>。目前常通过 ELISA 法以及多重 PCR 检测 BBTv、CMV 和 BSV<sup>[10]</sup>,如孙洁等<sup>[11]</sup>利用 TaqMan real-time 研究 BSV 在带毒香蕉组培苗中传递,也有学者利用滚环扩增 (rolling-circle amplification, RCA)和透射电子显微镜观察 BSV<sup>[12]</sup>,或利用多重 PCR 结合 LiquiChip 分析 BSV、BBTV 和 CMV<sup>[13]</sup>。但这些方法中 ELISA 灵敏度较低,普通 PCR 需要提取核酸,荧光定量 PCR 具有成本较高等缺点<sup>[14]</sup>,RCA 方法价格昂贵且不适用于大量样品的检测。此外,普通 PCR 检测 BSV 很容易从香蕉基因组中扩增出整合态 BSV 而导致假阳性,增加了 BSV 检测难度。多重免疫捕获 PCR 能将血清学检测的方便性和 PCR 检测技术的高准确率等优点结合起来<sup>[15]</sup>,不需提取核酸即可准确地检测出病毒。因此,本研究建立不同 BSV 的多重免疫捕获 PCR 检测方法,以期能进行大量香蕉样品的检测,保障香蕉产业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DNA 酶 I 购自天根生化科技(北京)有限公司。2×Surper Taq PCR StarMix 和 pMD18T 载体购自北京康润诚业生物科技有限公司(Genstar)。多克隆兔抗血清为笔者所在实验室保存。牛血清蛋白购自广州华奇盛生物科技有限公司。

1.2 引物设计与合成

参考 Li 等<sup>[6]</sup>对 BSV 保守区域的预测,根据 NCBI GenBank 数据库中 BSOLV (GenBank 登录号: KJ013506)、BSGFV (GenBank 登录号: KJ013507)、BSIMV (GenBank 登录号: KJ013508)全长基因,利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计上述 3 种 BSV 的特异性引物。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。具体引物序列见表 1。

表 1 3 种香蕉线条病毒的特异性引物

Table 1 Specific primers for three species of banana streak virus		
引物 Primers	序列 5'-3' Sequence (5'-3')	产物大小/bp Product size
BSOLV-F	GAAGAGCATGGGCTCAGAA	744
BSOLV-R	CGCATGCCTTGCAGATAGTC	
BSGFV-F	GCCTTCATGACCTGGCGAAT	480
BSGFV-R	ATGTACGGGTGTATTGCCGC	
BSIMV-F	TCTTAGACACAGGAGCTGCCA	256
BSIMV-R	ATTCCTCCTTCCATTGCACG	

1.3 免疫捕获 PCR 反应体系的建立

取 0.1 g 叶片加入 1 mL 研磨缓冲液,充分研磨后离心 1 min (12 000 r/min, 4 ℃),得到叶片粗提液。用 1:1 000 稀释的多克隆兔抗血清包被八连管,每管 30 μL,37 ℃ 孵育 2 h (或 4 ℃ 过夜),PBST 洗涤 3 次。吸取 30 μL 粗提液至八连管中,空白对照用灭菌 ddH<sub>2</sub>O,室温下孵育 2 h (或 4 ℃ 过夜);PBST 洗涤 3 次,ddH<sub>2</sub>O 洗涤 1 次。加入 30 μL DNase mix (3 μL 10×buffer RDD, 3 μL DNase I, 补足水至 30 μL),37 ℃ 处理 1 h 消解残余植物基因组 DNA。DNase I 在 95 ℃ 下灭活 10 min<sup>[16]</sup>。ddH<sub>2</sub>O 洗涤 1 次后,直接用于 PCR 扩增。免疫捕获 PCR 反应体系为 20 μL: 2×Surper Taq PCR StarMix 10 μL,上下游引物终浓度均为 0.5 μmol/L,ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。反应条件为 94 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 变性 15 s,58 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 15 s,循环数为 40;72 ℃ 最终延伸 5 min。

1.4 多重免疫捕获 PCR 检测方法的建立和优化

在免疫捕获 PCR 的基础上建立多重免疫捕获 PCR,对其反应条件进行优化。将引物 BSOLV-F/R、BSGFV-F/R、BSIMV-F/R 的终浓度设置 5 个处理进行引物浓度优化,分别为 (μmol/L): 0.5:0.5:0.5、0.5:0.5:0.25:0.5、0.25:0.5:0.5、0.5:0.5:0.25、0.25:0.25。对多重免疫捕获 PCR 退火温度进行优化,退火温度分别为 55~65 ℃。PCR 产物用 1.5% 的凝胶进行电泳检测。

1.5 特异性分析

为检测多重免疫捕获 PCR 检测体系的特异性,感染 CMV 的香蕉叶片粗提液孵育后,利用最优体系进行多重免疫捕获 PCR 反应,健康的巴西蕉叶片粗提液为阴性对照。

1.6 灵敏性分析

为分析多重免疫捕获 PCR 检测体系的灵敏性,对复合感染 3 种 BSV 的香蕉叶片进行粗提,10 倍梯度稀释的粗提液孵育后分别进行多重免疫捕获 PCR。将 0.1 g/mL 粗提液进行不同梯度稀释:100 mg/mL、10 mg/mL、1 mg/mL、100 μg/mL、10 μg/mL、1 μg/mL,取梯度稀释的粗提液分别进行八连管孵育,抗体包被、DNase I 处理和 PCR 步骤参考本文材料与方法“1.3”,以优化的多重免疫捕获 PCR 反应体系进行扩增。

1.7 多重免疫捕获 PCR 的应用

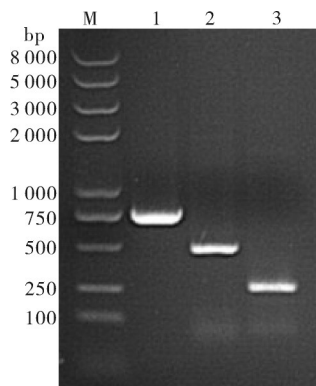
从田间采集具有花叶症状的香蕉嫩叶作为检测样品,利用优化后的多重免疫捕获 PCR 进行不同

BSV检测。PCR产物进行凝胶电泳,对部分目的片段进行切胶回收,并将回收产物送生工生物有限公司(上海)进行测序。对测序结果进行分析比对,以验证是否为所检测的BSV。

## 2 结果与分析

### 2.1 多重免疫捕获PCR反应体系的优化和确定

以感染BSV的香蕉粗提液孵育八连管后,分别利用BSOLV、BSGFV和BSIMV 3种病毒的特异性引物进行免疫捕获PCR扩增,能扩增出744、480、256 bp符合预期大小的特异性条带(图1)。在免疫捕获PCR检测体系的基础上,建立多重免疫捕获PCR反应体系,对引物终浓度、退火温度进行优化。结果显示,3对特异性引物不同比例对扩增产物有较大影响,当引物BSOLV-F/R、BSGFV-F/R、BSIMV-F/R终浓度分别为0.5、0.5、0.5  $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增的3种病毒的目的条带均比较明亮(图2)。退火温度为55~65  $^{\circ}\text{C}$ 时,均可扩增出目的条带,在61和63  $^{\circ}\text{C}$ 时,各目的条带扩增有效性接近且条带亮度比较均匀,而提高退火温度可能有助于提高特异性并减少非特异性扩增,因此选择63  $^{\circ}\text{C}$ 作为多重免疫捕获PCR的最佳退火温度(图3)。



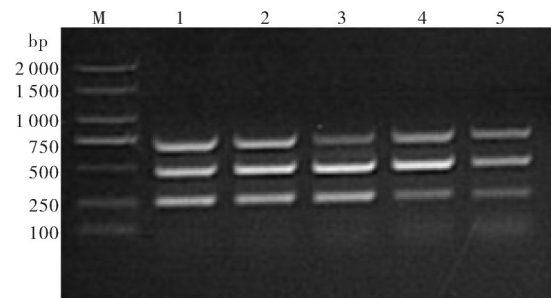
M: DNA 分子质量标准 DL 8 000 DNA marker; 1~3: 分别感染 BSOLV、BSGFV、BSIMV 的香蕉样品 Banana samples infected by BSOLV, BSGFV, and BSIMV, respectively.

图1 单对引物的免疫捕获PCR检测

Fig. 1 Immunocapture PCR detection with a single primer pair

### 2.2 多重免疫捕获PCR体系的特异性

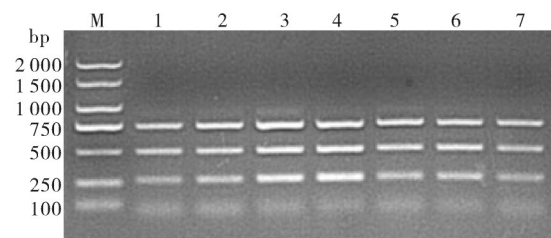
特异性试验结果显示,利用优化的体系对CMV侵染的香蕉以及健康的巴西蕉进行多重免疫捕获PCR扩增,不能扩增出目的条带,而BSV阳性样品能扩增出相应的目的条带(图4),说明建立的多重免疫捕获PCR体系具有较好的特异性。



M: DNA 分子质量标准 DL 2 000 DNA marker; 1~5: BSOLV-F/R: BSGFV-F/R: BSIMV-F/R 引物终浓度( $\mu\text{mol/L}$ )比分别为 0.5:0.5:0.5, 0.5:0.25:0.5, 0.25:0.5:0.5, 0.5:0.5:0.25, 0.25:0.25:0.25. Final concentration ratios of primer BSOLV-F/R: BSGFV-F/R: BSIMV-F/R were 0.5:0.5:0.5, 0.5:0.25:0.5, 0.25:0.5:0.5, 0.5:0.5:0.25, 0.25:0.25:0.25, respectively.

图2 不同引物浓度的多重免疫捕获PCR结果

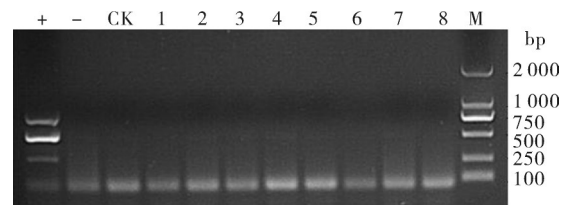
Fig. 2 Multiplex immunocapture PCR results with final concentration ratios of different primers



M: DNA 分子质量标准 DL 2 000 DNA marker; 1: 65  $^{\circ}\text{C}$ ; 2: 64  $^{\circ}\text{C}$ ; 3: 63  $^{\circ}\text{C}$ ; 4: 61  $^{\circ}\text{C}$ ; 5: 58  $^{\circ}\text{C}$ ; 6: 56  $^{\circ}\text{C}$ ; 7: 55  $^{\circ}\text{C}$ .

图3 不同退火温度的多重免疫捕获PCR结果

Fig. 3 Multiplex immunocapture PCR results at different annealing temperatures



M: DNA 分子质量标准 DL 2 000 DNA marker; +: 复合感染3种BSV的香蕉样品 Banana sample co-infected with three BSV; -: 健康的巴西蕉 Healthy Brazilian banana; CK: ddH<sub>2</sub>O control; 1~8: 感染CMV的巴西蕉 Banana samples infected by CMV.

图4 多重免疫捕获PCR特异性检测

Fig. 4 Specific detection of multiplex immunocapture PCR

### 2.3 多重免疫捕获PCR的灵敏性

灵敏性试验结果显示,建立的多重免疫捕获PCR方法从1、10和100 mg/mL香蕉粗提液中都能扩增出目的条带(图5),表明该多重免疫捕获PCR体系可以检测的灵敏度为1 mg/mL的香蕉粗提液。



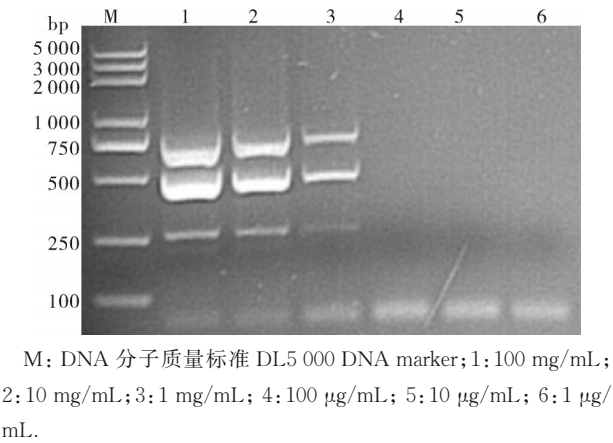


图 5 多重免疫捕获 PCR 的灵敏性检测  
Fig. 5 Sensitivity detection of multiplex immunocapture PCR

2.4 多重免疫捕获 PCR 的田间应用

从田间采集花叶症状的香蕉样品,利用优化后的多重免疫捕获 PCR 体系检测香蕉样品中 3 种

BSV,对 PCR 产物进一步测序验证。结果(图 6)表明,样品 12 没有扩增出目的条带,说明样品 12 没有被这 3 种病毒感染。样品 5、10、13 和 15 扩增出单一条带,样品 5 单独感染 BSOLV,样品 10、13 和 15 均单独感染 BSGFV。样品 2、3 和 6 能扩增出 2 条目的条带,样品 2 和 3 为 BSGFV 和 BSIMV 复合感染,样品 6 为 BSOLV 和 BSGFV 复合感染。样品 1、4、7、8、9、11 和 14 为 BSOLV、BSGFV 和 BSIMV 复合感染。PCR 产物测序比对结果显示,所扩增 BSOLV 与 GenBank 中 BSOLV 核苷酸序列同源率为 94.08%~99.87%;BSGFV 与 GenBank 中 BSGFV 核苷酸序列同源率为 99.76%~100%;BSIMV 与 GenBank 中 BSIMV 核苷酸序列同源率为 95.87%~97.71%。检测结果表明,建立的多重免疫捕获 PCR 方法能够清晰地分辨出不同香蕉样品中的 BSOLV、BSGFV 和 BSIMV 病毒,田间香蕉样品多为不同 BSV 复合感染。

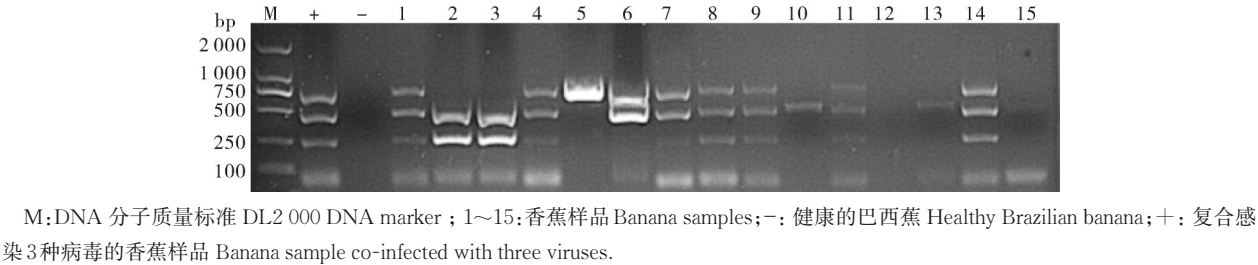


图 6 利用多重免疫捕获 PCR 的检测香蕉样品  
Fig. 6 Detection of banana samples by multiplex immunocapture PCR

3 讨 论

多重 PCR 技术已广泛应用于多种植物病毒的检测,但应用血清学结合多重 PCR 技术检测香蕉病毒报道不多。一个理想的 PCR 反应体系需要针对引物序列、模板量、引物浓度和退火温度等条件进行综合优化,建立适宜的扩增条件<sup>[17]</sup>。Le Provost 等<sup>[18]</sup>建立了多重免疫捕获 PCR 检测游离态 BSOLV、BSGFV 和 BSMYV,并利用 *Musa* 序列标记的微卫星位点来判断结果是否出现假阳性,而本研究通过 DNA 酶处理消除香蕉基因组产生的假阳性。罗金燕等<sup>[19]</sup>对免疫捕获 PCR 和直接 PCR 方法检测水稻细菌性谷枯病菌灵敏度进行比较,发现免疫捕获 PCR 方法比直接 PCR 方法检测灵敏度高,其主要原因是免疫捕获 PCR 的模板和 PCR 模板不同,免疫捕获 PCR 的模板针对性更强。Kim 等<sup>[20]</sup>利用多重免疫捕获 RT-PCR 检测辣椒轻斑驳病毒,能检测出 10 mg/mL 样品中的病毒,而本研究建立的方法可检测

1 mg/mL 香蕉样品中的病毒,比检测辣椒轻斑驳病毒灵敏度高,检测灵敏度的差异可能与样品中病毒浓度有关。

本研究结合血清学技术,以免疫捕获的病毒粒子为模板,能准确快速地从香蕉样品中检测出 BSOLV、BSGFV 和 BSIMV 3 种病毒。通过优化多重免疫捕获 PCR 反应的主要条件,本研究建立的这种简单而准确的多重免疫捕获 PCR 方法,可以对田间香蕉样品进行检测,具有良好的特异性和适用性,可为香蕉病毒的检测和防控提供技术支持。

参考文献 References

[1] BARANWAL V K, SHARMA S K, KHURANA D, et al. Sequence analysis of shorter than genome length episomal banana streak OL virus like sequences isolated from banana in India[J]. Virus genes, 2014, 48(1):120-127.  
[2] 何云蔚,陈秀,阮小蕾,等.香蕉线条病毒 ORF I 基因的原核表达及抗体制备[J].华南农业大学学报, 2009, 30(3):18-21.

- HE Y W, CHEN X, RUAN X L, et al. Prokaryotic expression of banana streak virus ORF I gene and preparation of its antisera[J]. Journal of South China Agricultural University, 2009, 30(3): 18-21 (in Chinese with English abstract).
- [3] DAHAL G, HUGHES J D, THOTTAPPILLY G, et al. Effect of temperature on symptom expression and reliability of banana streak badnavirus detection in naturally infected plantain and banana (*Musa* spp.)[J]. Plant disease, 1998, 82(1): 16-21.
- [4] DALLOT S, ACUÑA P, RIVERA C, et al. Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of banana streak virus integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB)[J]. Archives of virology, 2001, 146(11): 2179-2190.
- [5] 费继锋. 香蕉线条病毒(BSV)鉴定及检测体系的建立[D]. 广州: 华南农业大学, 2001. FEI J F. Establishment of banana streak virus (BSV) identification and detection system [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2001 (in Chinese with English abstract).
- [6] LI W L, YU N T, WANG J H, et al. The complete genome of banana streak GF virus Yunnan isolate infecting Cavendish *Musa* AAA group in China [J/OL]. Peer J, 2020, 8: e8459 [2024-01-04]. <https://doi.org/10.7717/peerj.8459>.
- [7] GAYRAL P, NOA-CARRAZANA J C, LESCOT M, et al. A single banana streak virus integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus[J]. Journal of virology, 2008, 82(13): 6697-6710.
- [8] 田欣. 宏转录组学技术快速鉴定两种果树负链RNA新病毒[D]. 重庆: 西南大学, 2018. TIAN X. The identification of two novel negative viruses infecting fruits by metatranscriptomics [D]. Chongqing: Southwest University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [9] 费继锋, 肖火根, 李华平, 等. 香蕉线条病毒病研究进展[J]. 病毒学报, 2001, 17(4): 381-385. FEI J F, XIAO H G, LI H P, et al. Research progress of banana streak virus disease[J]. Chinese journal of virology, 2001, 17(4): 381-385 (in Chinese with English abstract).
- [10] 李媛媛, 吴竹妍, 黎园, 等. 香蕉3种主要病毒的多重PCR检测[J]. 植物检疫, 2011, 25(4): 39-41. LI Y Y, WU Z Y, LI Y, et al. Detection of three main banana viruses by multiplex PCR [J]. Plant quarantine, 2011, 25(4): 39-41 (in Chinese with English abstract).
- [11] 孙洁, 王婉, 饶雪琴, 等. 应用 TaqMan real-time PCR 研究 BSV 在带毒香蕉组培苗中传递[J]. 植物病理学报, 2017, 47(2): 187-196. SUN J, WANG W, RAO X Q, et al. Transmission of BSV in banana tissue culture plantlets was studied by TaqMan real-time PCR [J]. Acta phytopathologica sinica, 2017, 47(2): 187-196 (in Chinese with English abstract).
- [12] JAMES A P, GEIJSKES R J, DALE J L, et al. Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect banana streak virus that also discriminates between integrated and episomal virus sequences[J]. Plant disease, 2011, 95(1): 57-62.
- [13] KUANG C P, TSAI C H, TSENG C S, et al. Development of a bead-based assay for detection of three banana-infecting viruses[J/OL]. Peer J, 2022, 10: e13409 [2024-01-04]. <https://doi.org/10.7717/peerj.13409>.
- [14] 苗春, 刘伟, 杨思成, 等. 非洲猪瘟诊断技术研究进展[J]. 中国动物检疫, 2022, 39(1): 82-89. MIAO C, LIU W, YANG S C, et al. Advances in the diagnostic techniques for African swine fever[J]. China animal health inspection, 2022, 39(1): 82-89 (in Chinese with English abstract).
- [15] CHIKH-ALI M, KARASEV A V. Immunocapture-multiplex RT-PCR for the simultaneous detection and identification of plant viruses and their strains: study case, potato virus Y (PVY) [J]. Methods in molecular biology, 2015, 1302: 177-186.
- [16] HARPER G, HART D, MOULT S, et al. The diversity of banana streak virus isolates in Uganda[J]. Archives of virology, 2005, 150(12): 2407-2420.
- [17] 蒋素华, 牛苏燕, 梁芳, 等. 甘薯病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 分子植物育种, 2020, 18(9): 2957-2962. JIANG S H, NIU S Y, LIANG F, et al. Establishment of multiplex RT-PCR detection method of sweet potato virus [J]. Molecular plant breeding, 2020, 18(9): 2957-2962 (in Chinese with English abstract).
- [18] LE PROVOST G, ISKRA-CARUANA M L, ACINA I, et al. Improved detection of episomal banana streak viruses by multiplex immunocapture PCR[J]. Journal of virological methods, 2006, 137(1): 7-13.
- [19] 罗金燕, 陈磊, 秦萌, 等. 免疫捕获 PCR 和经典 PCR 方法检测水稻细菌性谷枯病菌灵敏度比较[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(2): 371-377. LUO J Y, CHEN L, QIN M, et al. Sensitivity comparison of the ISE method and classical PCR to detect *Burkholderia glumae* [J]. Acta agriculturae Zhejiangensis, 2014, 26(2): 371-377 (in Chinese with English abstract).
- [20] KIM J H, CHOI G S, KIM J S, et al. Development of single-tube multiplex immunocapture RT-PCR assay for simultaneous detection of two pepper tobamoviruses[J]. The plant pathology journal, 2006, 22(2): 164-167.

## Establishment of multiplex immunocapture PCR for detection of banana streak virus

LU Yongsu, LIU Runpei, RAO Xueqin

*College of Plant Protection, South China Agricultural University/ Guangdong Province  
Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510642, China*

**Abstract** To improve the diagnostic efficiency of banana streak virus (BSV) and promote the healthy development of the banana industry, a multiplex immunocapture PCR method was established for the simultaneous detection of BSOLV, BSGFV, and BSIMV by optimizing primer concentration, annealing temperature, and other parameters. The specific primers were designed based on the conserved sequences of the coat protein (CP) gene from the banana streak OL virus (BSOLV) and banana streak GF virus (BSGFV), and the RNase H gene of banana streak IM virus (BSIMV). The viruses captured by the BSV polyclonal antisera served as templates. The results indicated that the optimal multiplex immunocapture PCR used to detect BSOLV, BSGFV, and BSIMV was achieved with final concentration ratios of 0.5  $\mu\text{mol/L}$ : 0.5  $\mu\text{mol/L}$ : 0.5  $\mu\text{mol/L}$  for the upstream and downstream primers of BSOLV, BSGFV, and BSIMV, respectively, with an annealing temperature of 63 °C. BSOLV, BSGFV, and BSIMV could be detected from a crude banana extract of 1 mg/mL by the multiplex immunocapture PCR method. There was no cross-reaction with the cucumber mosaic virus (CMV), which causes symptoms similar to those caused by BSV. Fifteen field samples were analyzed using the multiplex immunocapture PCR method. The results showed that the banana samples co-infected with BSV were distinguishable, and the amplification products of BSOLV, BSGFV, and BSIMV were confirmed through sequencing. The nucleotide sequence identities of BSOLV, BSGFV, and BSIMV exceeded 94% when compared with the corresponding nucleotide sequences of these BSVs available in GenBank. The study demonstrates that the multiplex immunocapture PCR method exhibits high sensitivity and specificity, enabling the detection of the three BSVs in banana seedlings and field samples.

**Keywords** banana; banana streak virus; multiplex immunocapture PCR; co-infection

(责任编辑:边书京)