

甘蔗杆状病毒绝对荧光定量检测方法的建立与应用

夏宝山^{1,2#}, 王文治^{2,3}, 张树珍^{2,3}, 袁潜华^{1*}, 沈林波^{2,3*}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国; 2. 中国热带农业科学院 热带生物研究技术所/热带作物生物育种国家重点实验室, 海南 海口 571101 中国; 3. 中国热带农业科学院 三亚研究院, 海南 三亚 572024 中国)

摘要: 为建立甘蔗杆状病毒(sugarcane bacilliform virus, SCBV)的绝对荧光定量 PCR 检测方法, 并测定甘蔗不同组织部位中 SCBV 载量, 本研究从 SCBV 基因组保守区(SCBV-ORF1)设计特异性扩增引物, 构建重组质粒 pMD19T-SCBV-P1 作为阳性质粒标准品, 以其为模板建立 SCBV 绝对荧光定量 PCR 检测方法。测试该方法的灵敏性、特异性和稳定性, 并用该方法测定甘蔗种质不同组织中 SCBV 载量。结果表明, 将含有 SCBV 基因组序列的重组质粒 10 倍稀释成标准品, 以其为模板进行荧光定量 PCR, 获得标准曲线 $y = -3.3397 \times \log(x) + 32.05$, 相关系数 $r^2=0.999$; 表明 C_q 值与标准品浓度拷贝数的对数呈线性关系。研究建立的绝对荧光定量 PCR 方法展现出高灵敏度特征, 其检测下限可达到 $7 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 相较于常规 PCR 检测法, 该方法的灵敏度提高了近 100 倍。该方法特异性高, 可特异检测 SCBV; 重复性良好, 批内和批间的变异系数均在 0.11% ~ 0.90%。甘蔗不同组织部位 SCBV 累积水平存在显著差异, 其中正 4 叶 SCBV 载量显著高于其他组织部位 ($P<0.05$)。本研究建立了能灵敏特异检测 SCBV 的绝对荧光定量 PCR 方法, 为 SCBV 的诊断提供一种高效的定量检测方法, 明确了甘蔗中 SCBV 检测的最佳采样部位是正 4 叶。

关键词: 甘蔗杆状病毒; 绝对荧光定量 PCR; 病毒载量; 检测

中图分类号: S435.661 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054(2026)01-0108-09
夏宝山, 王文治, 张树珍, 等. 甘蔗杆状病毒绝对荧光定量检测方法的建立与应用[J]. 热带生物学报(中英文), 2026, 17(1): 108–116. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250060 CSTR: 32425.14.j.cnki.rdswwb.20250060



甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)是世界范围内热带、亚热带地区栽培的核心糖料和生物燃料作物, 被广泛用于制糖工业、乙醇生产和生物能源开发^[1]。然而, 甘蔗在生长发育阶段易受系统性病原病毒感染^[2], 造成显著的经济损失和甘蔗产业安全隐患, 严重威胁蔗糖产业链的稳定性^[3]。在中国甘蔗主产区, 甘蔗病毒病害由多种病原体引发, 主要包括甘蔗杆状病毒(sugarcane bacilliform virus, SCBV)^[4]、甘蔗花叶病毒(sugarcane mosaic virus, SCMV)^[5]、高粱花叶病毒(sorghum mosaic virus, SrMV)^[6]、甘蔗线条花叶病毒(sugarcane streak mosaic disease virus, SCSMV)^[7]和甘蔗黄叶病毒(sugarcane yellow leaf virus, SCYLV)^[8]等。此外, SCBV 是甘

蔗杆状病毒病和甘蔗叶斑病的核心致病因子^[9-10]。

SCBV 隶属于花椰菜病毒科(*Caulimoviridae*)杆状 DNA 病毒属(*Badnavirus*)^[11], SCBV 基因组为环状双链 DNA, 大小为 7.3 ~ 8.0 kb。感染甘蔗后, 导致甘蔗叶片出现特征性叶部病变, 初期表现为不规则的斑驳, 后期发展为褪绿条纹等典型症状; 同时, 造成甘蔗的单茎质量下降、出汁率降低及蔗糖分损失, 使得甘蔗的产量降低(受 SCBV 侵染的蔗株茎秆细弱, 节间缩短, 单株质量减少导致亩产降幅达 25% ~ 37.5%)和品质下降^[12]。近年来, 随着国内外甘蔗种质的频繁交流, SCBV 在全球甘蔗种质中的传播蔓延极为迅速, 在甘蔗种苗中的隐性传播率高达 68%, 已成为制约甘蔗产业



收稿日期: 2025-04-18

修回日期: 2025-08-23

基金项目: 海南省自然科学基金面上项目(323MS103); 海南省自然科学基金青年基金项目(321QN313); 国家糖料产业技术体系项目(CARS-17)

*第一作者: 夏宝山(1997—), 男, 海南大学热带农林学院 2020 级硕士研究生。E-mail: 1376782253@qq.com

*通信作者: 袁潜华(1963—), 男, 硕士, 研究员。研究方向: 作物遗传育种与栽培。E-mail: qhyuan@163.com

沈林波(1986—), 男, 硕士, 助理研究员。研究方向: 甘蔗抗病分子育种。E-mail: shenlinbo@itbb.org.cn

可持续发展的重要生物灾害因子。甘蔗产业正面临着由 DNA 病毒引起的甘蔗杆状病毒的严峻挑战,造成了巨大的经济损失^[1]。此外,SCBV 主要通过种苗调运进行远距离传播,SCBV 近距离传播主要通过甘蔗红粉蚧(*Saccharicoccus sacchari*)和灰粉蚧(*Dysmicoccus boninsis kuwana*)^[13]传播,在田间条件下其自然侵染具有显著广泛性和普遍性;该病毒可突破甘蔗属(*Saccharum*)种间遗传屏障,完成对热带种(*S. officinarum*)、大茎野生种(*S. robustum*)、中国种(*S. sinense*)、印度种(*S. barberi*)及割手密种(*S. spontaneum*)的系统性侵染;同时可感染禾本科高粱属(*Sorghum*)等非甘蔗近缘植物。快速、准确地检测 SCBV,明确其在甘蔗植株中的分布规律,对病害防治、抗病育种等方面意义重大。

目前,SCBV 的检测方法主要有电子显微镜观察法^[14]、血清学检测法^[15]、PCR 检测法^[4]和实时荧光定量 PCR 法,然而,这些方法均只能进行定性检测,不能对 SCBV 进行定量测定。同时,SCBV 在甘蔗不同组织部位中的分布与含量仍缺乏系统性研究。

甘蔗作为多年生 C4 糖料作物,其生长阶段和器官的不同功能分化可能导致不同组织部位的病毒感染和复制的差异^[16]。此外,SCBV 的致病性与病毒载量阈值密切相关,明确病毒在关键组织(如叶片和输导组织)中的累积规律,可为精准防控策略优化提供理论基础。本研究拟建立一种基于实时荧光定量 PCR 技术的 SCBV 绝对定量检测方法,实现病毒载量的精确测定,分析 SCBV 在甘蔗不同组织(叶片、茎秆、根系和芽)中的病毒载量,揭示 SCBV 病毒在甘蔗组织中的分布规律,为田间精准采样和 SCBV 防控提供技术支撑和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 植物材料 于海南文昌基地选取经过鉴定感染 SCBV 的 10 份甘蔗种质(‘ROC22’‘中糖 3 号’‘海蔗 28 号’‘桂糖 47 号’‘柳城 05-136’‘柳城 031-182’‘云蔗 05-51’和‘云蔗 08-1609’‘桂糖 51 号’和‘粤甘 55’),对每个甘蔗种质材料,采集三株生长状态一致的植株作为混合样本,并实施三个生物学重复测定,分别采集其负 1 叶、正 1 叶、正 2 叶、

正 4 叶、根、茎、芽等组织样品。本实验中所用到的单一感染甘蔗条点病毒、甘蔗花叶病毒、甘蔗线条花叶病毒、高粱花叶病毒、甘蔗黄叶病毒的 5 种甘蔗材料由本实验室鉴定保存。

1.1.2 药品试剂 提取 DNA 所用试剂(CTAB、异丙醇和乙醇等)、2 x Taq plus Master Mix(由北京全式金生物技术股份有限公司提供)、PowerUp-Scientific 荧光定量 PCR 试剂盒、Omega Plasmid Mini Kit I 质粒小提取试剂盒、ToloBio 的 DH5 α 感受态细胞、Aidlab 琼脂糖凝胶回收试剂盒(AidQuick Gel Extraction Kit)、东胜生物的 DNA Marker, Biowest Agarose 琼脂糖、宝日医生生物技术(北京)有限公司的 pMD19-T 载体试剂盒、博迈德生物的 DNA Marker 等。

1.1.3 仪器设备 冷冻离心机(Centrifuge 5 430R, Eppendorf)、电泳仪(PowerStation 300, Labnet)、凝胶成像系统(Tanon 500)、德国耶拿梯度 PCR 仪、高压蒸汽灭菌锅(HVE-50, HIRAYAMA)、Roche 罗氏 LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪、恒温摇床、恒温水浴锅(N.JG-27EKISO)等。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 在 NCBI 网站上以关键词 SCBV 在 Genome 数据库搜索进入核酸序列 KM214 358.1 页面并下载其基因组序列,选取 SCBV-ORF 1 DNA 序列在 SCBV 上层分类单元 Badnavirus 中进行 blastn,选取 MEGA BLAST 的所有比对结果并下载其 aligned region。利用 MultAlin 对 8 组 SCBV 基因组序列进行序列比较,选取较为保守区域进行引物设计。使用软件 Primer Premier 5 设计引物。用 primer-blast 进行引物特异性比对检测。根据比对结果选取引物对 SCBV-qF: 5'-GAAGGTGTGGAATACCTGAA-3'和 SCBV-qR: 5'-TCACCATGTGGTGAACCGT-3'进行合成,目的片段长度为 171 bp。引物由上海生工有限公司合成。

1.2.2 重组质粒标准品的制备 取甘蔗叶片剪碎放入研钵中,加入液氮磨成粉末,取约 0.1 g 的粉末装入 2.0 mL 离心管中,采用改良版 CTAB 法提取甘蔗叶片总 DNA^[14]。以 SCBV 阳性甘蔗样品总 DNA 为模板,利用设计的特异性引物对 SCBV-qF/qR 为特异引物进行 SCBV 基因的 PCR 扩增,使用无菌双蒸水作为阴性对照,扩增目的片段大小为 171 bp。

反应总体系构建采用 25 μL 标准体系: 主反应混合物 2 \times Taq plus Master Mix 为 12.5 μL , 分别加入特异性正向引物与反向引物各 1 μL , 加入 2 μL 模板 DNA, 用无菌双蒸水补足至 25 μL 。PCR 扩增程序: 初始变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 维持 5 min; 变性阶段 95 $^{\circ}\text{C}$ 维持 30 s, 退火阶段 58 $^{\circ}\text{C}$ 维持 30 s, 延伸阶段 72 $^{\circ}\text{C}$ 维持 1 min, (35 cycles), 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 完成扩增产物。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳验证: 质量分数 1% 琼脂糖凝胶 (含 Maker 染色) 在 120 V 电压下电泳 20 min, 紫外成像系统检测显示单一目的条带 (片段大小 171 bp)。随后采用 Aidlab 琼脂糖凝胶回收试剂盒进行纯化。回收 DNA 片段经 T4 DNA 连接酶催化与 pMD19-T 载体构建重组质粒, 热激法转化 DH5 α 感受态细胞 (预冷 LB 培养基, 42 $^{\circ}\text{C}$ 维持 45 s) 后, 挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定, PCR 鉴定为阳性的菌株提取获得重组质粒 pMD19T-SCBV-P1; 将 PCR 检测为阳性的菌株抽提重组质粒 pMD19T-SCBV-ORF1 进行测序, 将测序验证正确的质粒作为阳性质粒标准品, 采用紫外光谱分析法对质粒 DNA 样品进行质量评估, 计算得出质粒浓度及纯度参数。利用公式 (1) 计算质粒 DNA 拷贝数^[17]。

$$\text{病毒载量}(\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}) = (6.02 \times 10^{23}) \times \frac{\text{质粒质量浓度}(\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}) \times 10^{-19}}{\text{重组质粒DNA长度} \times 660} \quad (1)$$

1.2.3 甘蔗杆状病毒绝对荧光定量检测法的建立

绝对荧光定量 PCR 反应条件的优化: 退火温度优化 (55 ~ 62 $^{\circ}\text{C}$ 梯度实验, 最终选定 58 $^{\circ}\text{C}$); 反应体系引物优化 (0.2 ~ 1.2 μL 梯度实验, 最终选定 0.4 μL)。扩增总体系 20 μL : 预混体系 2 \times Q3 SYBR qPCR Master Mix 为 10 μL 、特异性引物 SCBV-QF/QR 各添加 0.4 μL 、基因组 DNA 模板 2 μL 、用无菌双蒸水补充反应终体系。标准曲线的建立: 重组质粒标准品按照十倍递增系列稀释法制备 7 个浓度梯度 (2.41 ~ 2.41 $\times 10^{-6}$ copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 作为模板, 实验采用四孔复测法处理不同浓度模板, 使用设计的特异性引物 SCBV-qF/qR, 通过 qPCR 检测体系完成核酸扩增后生成标准曲线。敏感性实验: 制备重组质粒标准品检测范围为 7.14 $\times 10^8$ ~ 7.00 copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (10 倍比梯度稀释), 采用本实验构建的 qPCR

方法与传统 PCR 方法实施扩增实验, 比较两者的检测灵敏度差异。绝对荧光 qPCR 特异性检测: 本研究以 SCBV 及 5 种其他主要甘蔗病毒 (SCSMV、SrMV、SCMV、SStrV、SCYLV) 为检测对象, 通过开展 qPCR 扩增实验并同步设立阴性对照, 系统评估分析该方法的特异性表现。重复性检测: 以 10 倍递增系列稀释法得到的重组质粒标准品为模板, 分别进行实时荧光定量 PCR 的批内和批间检测, 基于反应获得的荧光信号阈值循环数 (C_q 值) 计算批次内及批次间变异系数 (CV), 公式为: $CV = SD / \text{均值} \times 100\%$ (SD : 标准差; mean : 几何均值), 以此验证方法的批内重复性与批间精密密度。此外, 取定量的高值质粒 (7.14 $\times 10^8$ copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 进行 10 倍比梯度稀释至 (7.14 copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)。提取稀释产物作为待测样本开展重复性检测, 每个稀释浓度设置 4 次重复检测, 实验分 2 批次完成, 全面评估该方法在不同浓度水平下的稳定性^[18]。

分别提取 SCBV 常规 PCR 检测呈阳性的 10 份甘蔗种质的负 1 叶、正 1 叶、正 2 叶、正 4 叶、根、茎和芽的 DNA 作为模板, 基于前期建立的 qPCR 绝对定量技术, 通过构建标准曲线对甘蔗不同组织器官样本 (叶、茎、芽、根) 中的 SCBV 核酸拷贝数进行精准检测。

2 结果与分析

2.1 重组质粒标准品的构建 基于 SCBV 基因组 DNA 模板, 使用 SCBV-qF/SCBV-qR 特异性引物对进行 PCR 扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳检测, 观察到与预期大小 (171 bp) 一致的单一特异性条带如 (图 1)。通过 Aidlab 琼脂糖凝胶回收试剂盒

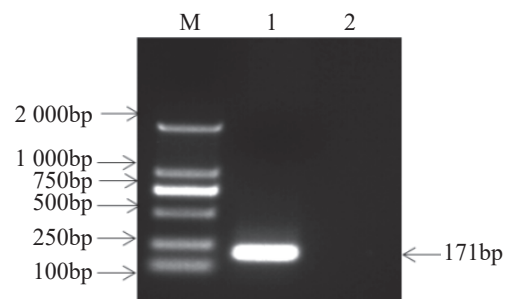


图 1 SCBV 目的基因扩增结果

Fig. 1 Amplification of the SCBV target gene

注: M, Marker DS 2 000; 1, 重组质粒标准品; 2, 阴性对照 (无菌双蒸水)。

Note: M, DS 2 000 DNA marker; 1, PCR product of SCBV; 2, Negative control (dd water).

盒将该条带回收纯化, 随后与 pMD19-T 载体进行连接反应构建重组质粒, 经测序验证序列正确的重组质粒命名为 pMD19T-SCBV-P1, 作为 qPCR 检测阳性质粒标准参照物。采用紫外可见分光光度法评估质粒的纯度和浓度, OD_{260}/OD_{280} 的比值为 1.88, 纯度符合要求 ($OD_{260}/OD_{280} > 1.8$)。测得质粒质量浓度为 $241.7 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 通过公式(1)计算出质粒 DNA 拷贝数为 $7.14 \times 10^{10} \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.2 绝对定量标准曲线的建立 使用重组质粒标准品按照 10 倍递增系列稀释法制备 7 个质量浓度梯度 ($2.41 \sim 2.41 \times 10^{-6} \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 作为模板, 实验采用四孔复测法处理不同浓度模板, 使用设计

的特异性引物 SCBV-qF/qR, 并在优化后的反应条件和体系下完成核酸扩增后生成标准曲线。结果显示: 其扩增曲线良好如(图 2-A), DNA 标准品 qPCR 解链曲线分析采用 Roche 罗氏 LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪进行实时监测, 目标产物 T_m 值 (84.1 ± 0.1) $^{\circ}\text{C}$ 时, 单峰特征符合特异性扩增标准, 实验未检测到非特异性扩增产物及引物二聚体(图 2-B), 反应结束后生成绝对定量标准曲线。该方法在模板量为 $7.14 \times 10^8 \sim 7.14 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时, 表现出显著的线性相关性, 相关系数 (R^2) 达到 0.999, 斜率为 -3.3397 。绝对定量方程曲线: $y = -3.3397 \times \log(x) + 32.05$ (图 2-C)。

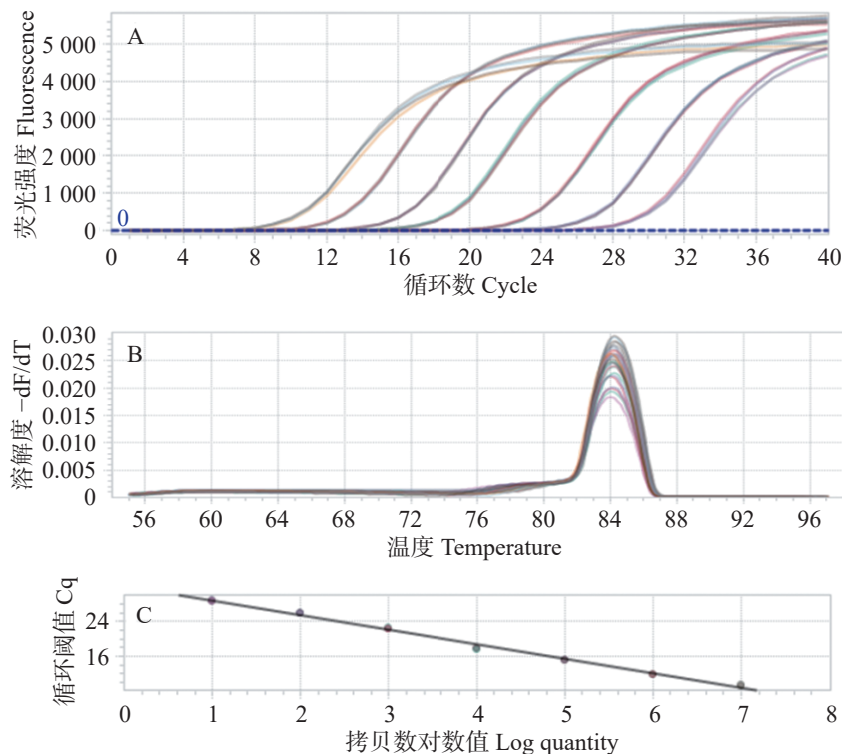


图 2 实时荧光定量 PCR 检测 SCBV 标准品的荧光扩增曲线(A)、DNA 标准品解链曲线(B)和绝对定量方程曲线(C)
Fig. 2 Quantitative real-time PCR was used to detect the fluorescence amplification curve of SCBV standards (A), DNA standard unwinding curve (B) and absolute quantitative equation curve (C)

2.3 特异性试验 实验整合 SCSMV/SrMV/SCMV/SCYLV 的 cDNA 模板与 SCBV/SSTrV (sugarcane striate virus, SSTrV) 的 DNA 模板, 采用特异性引物进行 qPCR 扩增反应, 检测该方法特异性。结果显示, 除了 SCBV 外, SCSMV、SrMV、SCMV、SCYLV 和 SSTrV 的均未得到有效扩增(图 3), 表明建立的绝对荧光定量检测法的特异性好。

2.4 敏感性试验 将重组质粒标准品以 $7.14 \times 10^7 \sim$

$7.14 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 梯度稀释作为模板, 同时利用建立的绝对荧光定量 PCR 法和常规 PCR 方法进行扩增, 比较分析两种方法的灵敏度。结果显示: 绝对荧光定量 PCR 法可以检测 SCBV 模板最低限度为 $7 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (图 4), 常规 PCR 可以检测 SCBV 模板最低限度为 $7.14 \times 10^2 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 与传统的常规 PCR 法相比, 绝对荧光定量 PCR 法的灵敏度提高了近 100 倍。

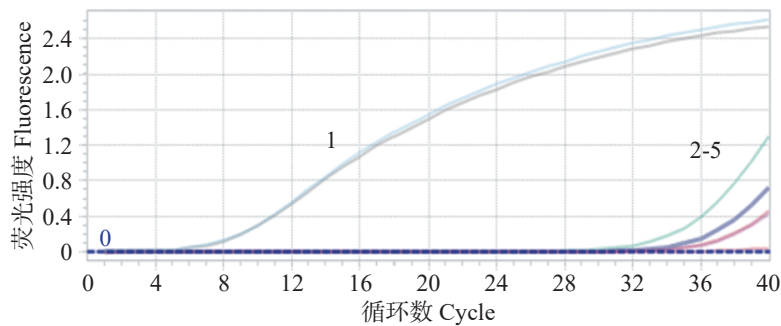


图3 SCBV 绝对荧光定量 PCR 特异性试验

Fig. 3 The specificity test of SCBV absolute quantitative PCR

注: 1, SCBV 的 DNA 模板; 2~6, SCSMV/SrMV/SCMV/SCYLV 的 cDNA 模板与 SStrV 的 DNA 模板。

Note: 1, DNA templates of SCBV; 2~6, cDNA templates of SCSMV/SrMV/SCMV/SCYLV and DNA templates of SStrV.

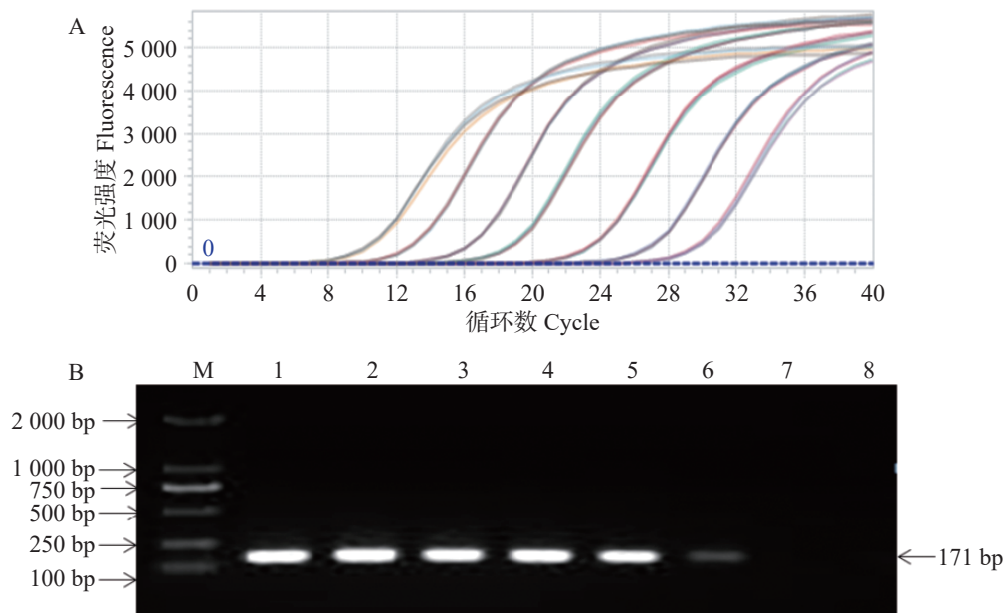


图4 灵敏度检测分析(A); 常规 PCR 敏感性检测(B)

Fig. 4 Sensitivity detection and analysis (A); Conventional PCR sensitivity detection (B)

注: 从左到右分别是 SCBV 质粒 DNA 标准品的拷贝数为 $7.14 \times 10^7 \sim 7.14 \times 10^9$ copies· μL^{-1} 的扩增曲线; M, Marker DS 2 000; 1~8, $7.14 \times 10^7 \sim 7.14 \times 10^9$ copies· μL^{-1} 。

Note: From left to right are the amplification curves of the SCBV plasmid DNA standard with copy numbers ranging from 7.14×10^7 to 7.14×10^9 copies· μL^{-1} ; B. M, Marker DS 2 000; 1~8, 7.14×10^7 to 7.14×10^9 copies· μL^{-1} .

2.5 重复性试验 采用 10 倍递增系列稀释法得到重组质粒标准品构建绝对荧光定量检测体系, 进行批内重复性验证和批间重复性实验。通过反应得到的 C_q 值(循环阈值)计算批内和批间的变异系数(CV), 对该方法进行批内重复性验证和批间精密度评估。计算批内变异系数(0.37%~0.90%)与批间变异系数(0.11%~0.90%), 所有参数均满足<1%的精度要求(表 1), 表明本研究所建立的 SCBV 绝对荧光 qPCR 检测方法具有优异的实验重复性。

2.6 甘蔗种质不同组织样品中的 SCBV 病毒载量的测定 使用本实验建立的 SCBV 绝对荧光定量 PCR 法对感染 SCBV 的 10 份甘蔗种质(‘ROC22’

‘桂糖 51 号’‘海蔗 28 号’‘桂糖 47 号’‘柳城 05-136’‘柳城 031-182’‘云蔗 05-51’‘云蔗 08-1609’‘中糖 3 号’和‘粤甘 55 号’)成熟期植株的 7 个不同组织部位(负 1 叶、正 1 叶、正 2 叶、正 4 叶、根、茎和芽)SCBV 病毒载量进行测定。结果显示, 在甘蔗叶、茎、根和芽 4 个部位中均能检测到 SCBV 病毒, 其中叶片中载量高于根、茎和芽三个部位; 在大多数甘蔗种质中, 正 4 叶中 SCBV 载量显著高于负 1 叶、正 1 叶和正 2 叶三个位置叶片(图 5)。

3 讨论

甘蔗杆状病毒病是近年来新发的一种甘蔗病毒性病害^[17], 其病原 SCBV 被认为是世界范围内

表 1 SCBV 绝对荧光定量 PCR 法重复性结果

Tab. 1 The repeatability results of absolute quantitative real-time PCR for SCBV

标准质粒/(copies· μL^{-1}) Concentration of standard plasmid	批内重复性(<i>Ct</i> 值) Intra-assay (<i>Ct</i> value)		批间重复性(<i>Ct</i> 值) Inter-assay (<i>Ct</i> value)	
	均值($\bar{x} \pm s$) Mean value	变异系数(<i>CV</i>)/% Coefficient of variation	均值($\bar{x} \pm s$) Mean value	变异系数(<i>CV</i>)/% Coefficient of variation
1×10^8	9.94±0.08	0.85	9.96±0.09	0.90
1×10^7	12.76±0.07	0.59	12.78±0.10	0.65
1×10^6	16.39±0.06	0.37	16.39±0.18	0.34
1×10^5	19.37±0.17	0.90	19.30±0.11	0.31
1×10^4	23.02±0.16	0.73	23.18±0.04	0.11
1×10^3	25.97±0.10	0.42	26.09±0.16	0.38
1×10^2	29.16±0.16	0.54	28.91±0.10	0.71

危害甘蔗生产最严重的病原之一^[19]。目前,在中国广西、云南、广东、海南、福建和江西等都有 SCBV 的报道^[20],建立一种早期、高效、灵敏、定量的检测方法对甘蔗杆状病毒病的防治至关重要^[21]。当前 SCBV 的检测方法主要有电子显微镜观察、血清学检测、常规 PCR 检测和实时荧光定量 PCR 检测。电子显微镜观察法耗时耗力,灵敏度低,不宜大范围使用。血清学法的检测虽然操作简单,但要求有特异性抗体,不能检测全部株系。常规 PCR 检测法是最常用的分子检测方法,但常规 PCR 灵敏度低,难以满足低含量样本检测需求。且上述方法均只能定性检测,不能对 SCBV 进行定量检测,对于病毒含量较低的样品检测效果欠佳。近年来,绝对实时荧光定量 PCR 技术能够对待测样品中的病原进行定量分析,具有快速、准确、灵敏度高等特点,目前已被应用于多种甘蔗病毒的检测,如条纹花叶病毒^[17]、甘蔗条点病毒^[22]和高粱花叶病毒^[23]等。本研究建立了 SCBV 的绝对荧光定量 PCR 检测法,对反应条件进行优化,并进行了特异性试验、灵敏性试验和重复性试验验证。研究结果表明该检测法特异性好,能特异性扩增检测 SCBV^[24];灵敏度高,可检测低至 7 copies· μL^{-1} 的病毒基因组,是常规 PCR 方法的 100 倍;同时具有良好的重复性,批内和批间重复性的变异系数均小于 1%;标准曲线线性关系良好($R^2 > 0.999$),适用于 SCBV 载量的精确评估。

甘蔗的一生可以分为萌芽期、幼苗期、分蘖期、伸长期和成熟期 5 个时期。萌芽期、幼苗期甘

蔗的叶片为 1~5 片,分蘖期甘蔗的叶片通常为 5~7 片,伸长期和成熟期甘蔗的叶片通常为 7~15 片。在甘蔗上,通常将完全伸展开的第一片叶子定义为正 1 叶,紧挨着正 1 叶未完全伸展开的叶子为负 1 叶,紧挨着负 1 叶伸展开一部分的叶子为负 2 叶,通常负 2 叶前面的叶子还未伸展开,紧紧包裹在一起。正 1 叶后面完全伸展开的叶子依次为正 2、正 3、正 4、正 5、正 6、正 7、正 8 等。负 2 叶大多数时候仅伸展开一部分的,取样不方便,因此选择从负 1 叶开始取样。负 1 叶至正 4 叶(第 2~6 片叶子)通常为甘蔗新鲜的叶片,生命力旺盛,伸长期和成熟期甘蔗普遍都能取到。从正 5 叶(甘蔗第 7 片叶子)开始,许多甘蔗的叶片已经进入衰老期,开始干枯发黄,甚至完全干枯脱落。这样的叶片中病毒核酸的提取困难,实验误差大。因此本研究对甘蔗叶部组织中 SCBV 病毒载量进行分析时,选择甘蔗的负 1 叶、正 1 叶、正 2 叶、正 4 叶进行定量分析。基于本研究建立的 SCBV 绝对荧光定量 PCR 检测体系,对中国不同蔗区 10 份被 SCBV 侵染的甘蔗种质成熟期植株 7 个不同组织部位(包括负 1 叶、正 1 叶、正 2 叶、正 4 叶、根、茎及芽)中的病毒载量进行定量测定。结果显示,在甘蔗叶、茎秆、根系和芽 4 个部位中均存在 SCBV,且病毒载量在不同组织中存在显著差异,其中叶片 SCBV 载量显著高于根系、茎秆和芽三个部位。在大多数甘蔗种质中,正 4 叶中 SCBV 载量显著高于负 1 叶、正 1 叶和正 2 叶。

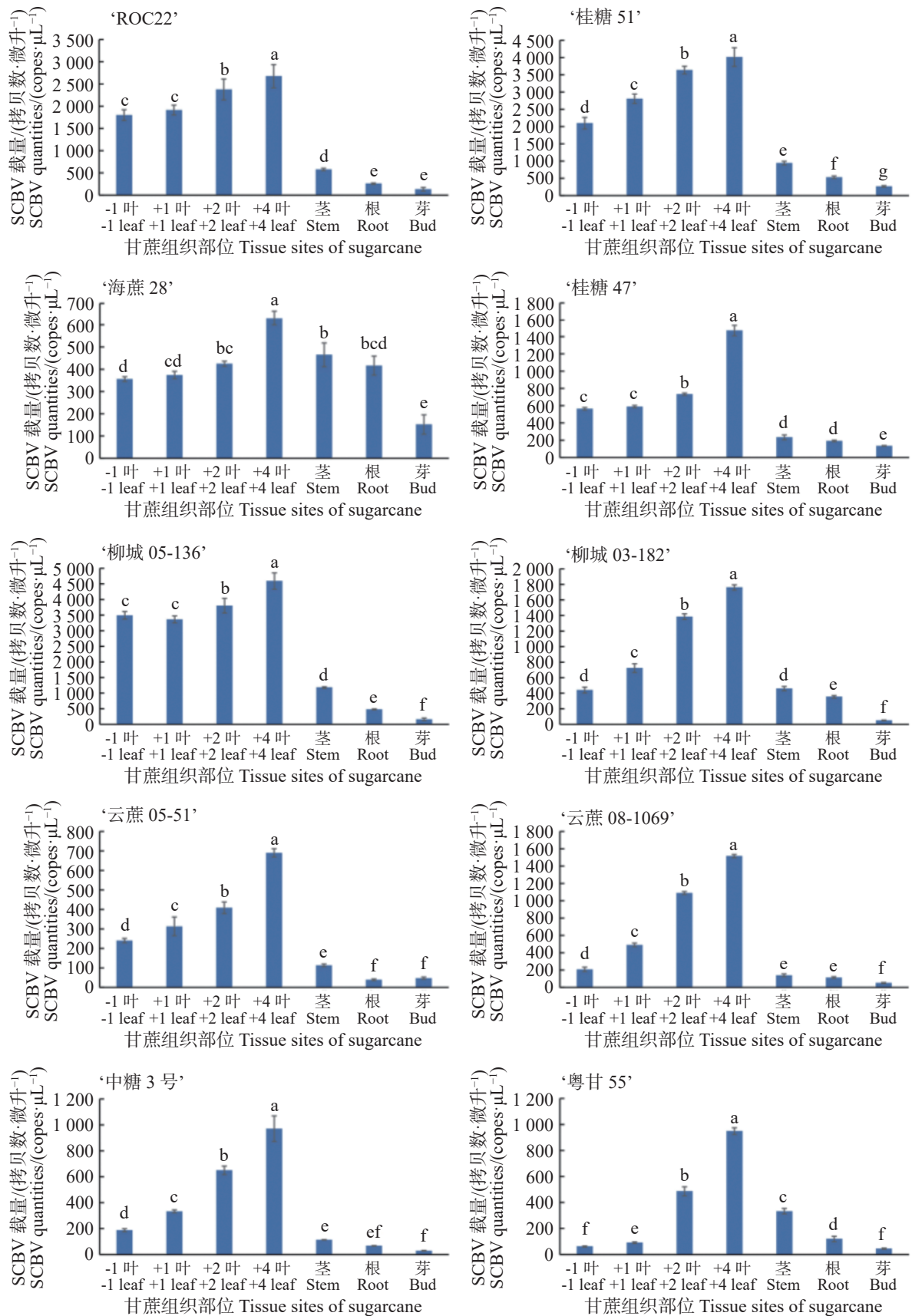


图 5 10 个甘蔗品种不同组织部位中 SCBV 的载量

Fig. 5 The load of SCBV in different tissue parts of 10 sugarcane varieties

已有研究指出, 利用绝对荧光定量 PCR 技术对多种植物病原病毒进行快速、准确的检测^[25]; 为开展植物病毒研究奠定了良好的基础, 已成为甘蔗病毒病害研究的核心工具。本研究建立的 SCBV 绝对荧光定量检测方法有助于甘蔗杆状病毒病早期诊断; 对病害综合防治具有实际应用价值。未来可通过引物设计优化、设备便携化及多技术整合, 突破应用瓶颈, 为甘蔗抗病育种和病害绿色防控提供更强支撑。

4 结 论

本研究成功构建了甘蔗杆状病毒高灵敏度绝对荧光定量 PCR 检测体系, 实现 SCBV 核酸的精准定量检测。该方法灵敏度达到 $7 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 显著高于传统 PCR 方法的 $714 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 特异性和重复性较好。使用该方法对感染 SCBV 的 10 份甘蔗种质成熟期植株的 7 个不同组织部位(负 1 叶、正 1 叶、正 2 叶、正 4 叶、根、茎和芽)中的 SCBV 病毒的载量进行测定。结果显示, 在甘蔗叶、茎、根和芽 4 个部位中均存在 SCBV, 叶片中 SCBV 病毒的载量高于根、茎和芽三个部位, 在大多数甘蔗种质中, 正 4 叶中 SCBV 病毒的载量要高于负 1 叶、正 1 叶和正 2 叶。王超敏等^[22] 基于绝对荧光定量 PCR 检测技术, 对 8 个甘蔗品种 7 个组织部位(包括负 1 叶、正 1 叶、正 2 叶、正 4 叶、根、茎和芽)的 SStrV 病毒核酸载量进行系统检测, 实验数据显示该病毒在正 4 叶中的含量显著高于其他组织部位, 与其他组织存在极显著差异。因此, 建议采集 SCBV 检测样品时, 优先采集甘蔗植株的正 4 叶, 或者对甘蔗正 1 叶、正 2 叶、正 4 叶进行混合取样。

参考文献:

- [1] Sun S R, Wu X B, Chen J S, et al. Identification of a sugarcane bacilliform virus promoter that is activated by drought stress in plants [J]. *Communications Biology*, 2024, 7(1): 368. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-0607-5-y>
- [2] 沈林波, 吴楠楠, 冯小艳, 等. 52 个甘蔗品种在广西受病毒侵染情况 [J]. *热带作物学报*, 2020, 41(1): 116–126. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2020.01.017>
- [3] 姜义念, 梁凯莉, 刘婧颖, 等. 甘蔗杆状病毒 P2 蛋白核酸结合活性分析及关键结构域鉴定 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2023, 42(12): 1353–1363. <https://doi.org/10.13417/j.gab.042.001353>
- [4] 胡筱璇. 甘蔗杆状病毒的溯源、整合片段遗传多样性及转录组分析 [D]. 南宁: 广西大学, 2020. <https://doi.org/10.27034/d.cnki.ggxju.2020.002640>
- [5] Tran N T, Teo A C, McTaggart A R, et al. Origins and distribution of Panicum mosaic virus and sugarcane mosaic virus on *Stenotaphrum secundatum* in Australia [J]. *Phytopathology*, 2025, 115(4): 431–440. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-24-0363-R>
- [6] Mollov D, Grinstead S, Warnke K, et al. Evidence for an Asian origin of Sorghum mosaic virus infecting sugarcane in Louisiana and the western hemisphere [J]. *Plant Disease*, 2025, 109(9): 1944–1949. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-24-2359-RE>
- [7] Anandakumar L, Bagyalakshmi K, Raja Muthuramalingam T, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification based rapid detection of *Sugarcane mosaic virus* and *Sugarcane streak mosaic virus* associated with mosaic disease of sugarcane [J]. *Indian Phytopathology*, 2020, 73(2): 349–358. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00219-w>
- [8] Srivastava N, Prajapati M R, Kumar R, et al. Comprehensive virome profiling of sugarcane and simplified duplex OneStep RT-PCR assay reveals the prevalence of sugarcane streak mosaic virus along with sugarcane yellow leaf virus in India [J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2024, 22(4): 100442. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2024.100442>
- [9] Sun S R, Damaj M B, Alabi O J, et al. Molecular characterization of two divergent variants of sugarcane bacilliform viruses infecting sugarcane in China [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2016, 145(2): 375–384. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0851-0>
- [10] Janiga P K, Nithya K, Viswanathan R. Dynamics of genetic diversity among Indian sugarcane bacilliform virus species and implications of associated recombination events in the virus [J]. *Sugar Tech*, 2023, 25(3): 705–716. <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01224-1>
- [11] Haregu S, Kidanemariam D, Abraham A. Molecular identification and characterization of badnaviruses infecting sugarcane in Ethiopia [J]. *Acta Virologica*, 2022, 66(1): 3–10. https://doi.org/10.4149/av_2022_101
- [12] Xu X B, Lou Y N, Liang K L, et al. The P2 nucleic acid binding protein of *Sugarcane bacilliform virus* is a viral pathogenic factor [J]. *PeerJ*, 2024, 12: 16982. <https://doi.org/10.7717/peerj.16982>
- [13] Abide M, Kidanemariam D, Kebede M, et al. Sugarcane bacilliform viruses in Ethiopia: genetic diversity and transmission by pink sugarcane mealybug [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2023, 52(6): 613–624. <https://doi.org/10.1007/s13313-023-00950-8>
- [14] 吴楠楠. 中国主要蔗区甘蔗杆状病毒的分子检测及其基因型的鉴定 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019. <https://doi.org/10.27244/d.cnki.gnjnu.2019.002262>
- [15] 孙生仁, 张慧丽, 吴小斌, 等. 甘蔗杆状病毒及其启动子功能的研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2018, 54(6): 943–950. <https://doi.org/10.13592/j.cnki.ppj.2018.0131>
- [16] 李文凤, 王晓燕, 黄应昆, 等. 甘蔗种苗传播病害病原检测与分子鉴定 [C]//中国植物病理学会 2016 年学术年会论文集. 南京: 中国植物病理学会, 2016: 99–100.
- [17] 王会敏. 甘蔗抗甘蔗条纹花叶病毒精准评价体系的建立与应用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2022. <https://doi.org/10.27244/d.cnki.gnjnu.2022.001142>
- [18] 李文凤, 黄应昆, 姜冬梅, 等. 云南甘蔗杆状病毒的分子

- 子检测及其对甘蔗品质和产量的影响[J]. 植物病理学报, 2010, 40(6): 651–654. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.2010.06.007>
- [19] Ashraf M A, Feng X Y, Hu X W, et al. *In silico* identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genome encoded microRNAs targeting sugarcane bacilliform virus [J]. PLoS One, 2022, 17(1): 0261807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261807>
- [20] Karuppaiah R, Viswanathan R, Ganesh Kumar V. Genetic diversity of *Sugarcane bacilliform virus* isolates infecting *Saccharum* spp. in India [J]. Virus Genes, 2013, 46(3): 505–516. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0890-6>
- [21] Vamsi Krishna G, Manoj Kumar V, Kishore Varma P, et al. Detection of *Sugarcane bacilliform virus* in diseased sugarcane plants in Andhra Pradesh, India by serological and molecular methods [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2023, 54(3): 1399–1409. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01094-z>
- [22] 王超敏, 何美丹, 王文治, 等. 甘蔗条点病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 生物技术通报, 2024, 40(6): 126–133. <https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2024-0129>
- [23] 王洪星, 张雨良, 王健华, 等. 应用多重 SYBR Green-I 实时荧光定量 PCR 检测甘蔗黄叶病毒和高粱花叶病毒[J]. 热带农业科学, 2012, 32(7): 52–56.
- [24] 王坤, 陈开闯, 胡筱璇, 等. 甘蔗秆状病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(4): 1779–1784. <https://doi.org/10.13417/j.gab.039.001779>
- [25] 黄境珊, 王国芬, 时涛, 等. 斯里兰卡木薯花叶病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 热带作物学报, 2025, 46(9): 2056–2062. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2025.09.003>

Development and application of an absolute quantitative real-time PCR assay for *Saccharum bacilliform virus*

Xia Baoshan^{1,2#}, Wang Wenzhi^{2,3}, Zhang Shuzhen^{2,3}, Yuan Qianhua^{1*}, Shen Linbo^{2,3*}

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops / Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572024, China)

Abstract: An attempt was made to establish an absolute quantitative real-time PCR method for the detection of sugarcane baculovirus (SCBV) to determine the load of SCBV in different tissue parts of sugarcane. Specific amplification primers were designed from the conserved region of the SCBV genome (SCBV-ORF1), and the recombinant plasmid pMD19T-SCBV-P1 was constructed as a positive plasmid standard and used as a template to establish an absolute quantitative real-time PCR detection method for SCBV. This established detection method was tested in sensitivity, specificity and stability and then used to determine the SCBV load in different tissues of sugarcane germplasm. The recombinant plasmid containing the SCBV genomic sequence was diluted 10 times into a standard, and it was used as a template for quantitative real-time PCR. The standard curve $y = 3.3397 \times \text{LOG}(x) + 32.05$ was obtained, and the correlation coefficient $r^2 = 0.999$. The Cq value was linearly related to the logarithm of the copy number of the standard concentration. The absolute quantitative real-time PCR method established shows high sensitivity, and its lower limit of detection can reach 7 copies of recombinant plasmid $\cdot \mu\text{L}^{-1}$. Compared with conventional PCR detection methods, this method is about 100 times higher in sensitivity. The method is highly specific and can specifically detect SCBV, and the method has good repeatability with the coefficient of variation within and between batches being between 0.11% and 0.90%. There were significant differences in SCBV accumulation levels in different tissue parts of sugarcane, with the SCBV load in the fourth leaf significantly higher than that in other tissue parts ($P < 0.05$). The study established an absolute quantitative real-time PCR method that can detect SCBV sensitively and specifically, providing an efficient quantitative detection method for the diagnosis of SCBV, and clarified that the best sampling site for SCBV detection in sugarcane is the fourth leaf.

Keywords: sugarcane bacilliform virus; absolute quantitative real-time PCR; viral load distribution; detection

(责任编辑: 邹游兴)