

柑橘麻风病毒 RT-PCR 检测技术研究*

王雪峰 李中安 周彦 唐科志 周常勇**

(西南大学柑桔研究所/中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

Detection of *Citrus leprosis virus* by RT-PCR

WANG Xue-feng, LI Zhong-an, ZHOU Yan, TANG Ke-zhi, ZHOU Chang-yong

(*Citrus Research Institute, Southwest University / Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China*)

Abstract: Citrus leprosis is one of the important viral diseases in Brazil. It is caused by *Citrus leprosis virus* (CiLV), which is a tentative member of the *Rhabdoviridae* family. In this study RT-PCR for the detection of CiLV was established with the primer pair MPR and MPF, and the sensitivity and specificity of the RT-PCR were also evaluated. The results suggested that the expected PCR fragments were observed until dilution 10^{-3} of the original nucleotide acids. No target fragments were observed when *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) and *Citrus tristeza virus* (CTV) positive samples were detected by the RT-PCR.

Key words: *Citrus Leprosis virus*; RT-PCR; Brazil

柑橘麻风病是由柑橘麻风病毒 (*Citrus leprosis virus*, CiLV) 引起的一类重要柑橘病毒病害, 于 20 世纪 20 年代首次在巴拉圭发现, 主要由短须螨 (*Brevipalpus* spp.) 传播^[1]。感病叶片、果实和枝干上表现典型褪绿斑症状, 严重时落叶落果, 病树产量下降, 进而枯萎; 当很多病斑出现时可相互接合, 最后导致嫩枝死亡, 严重时导致植株死亡^[2,3]。CiLV 属棒状病毒科 (*Rhabdoviridae*) 暂定成员, CiLV 颗粒可分为两种类型: 核型 (CiLV-N) 和细胞质型 (CiLV-C), 绝大部分发生的 CiLV 属于细胞质型^[4]。

目前该病主要分布于巴西、阿根廷、巴拿马、委内瑞拉等南美洲国家, 严重威胁到北美和加勒比地区的柑橘产业, 最近在美国佛罗里达州已检测到该病。在亚洲和非洲也曾报道发现有类似柑橘麻风病症状的植株, 但实验证实均不是 CiLV 引起的。近年来由于各国柑橘种质资源交流日益频繁, 加大了 CiLV 传入我国的可能性。建立快速、准确的 CiLV 分子检测体系, 对确保我国柑橘的安全生产具有重要意义。本研究在国内首次建立了检测 CiLV 的 RT-PCR 技术体系, 以期 CiLV 快速诊断提供依据。

*基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD08A14)

**通讯作者: 周常勇, 研究员, 主要从事柑桔病毒学研究; Tel: 023-68349007, E-mail: zhouchangyong@vip.sina.com

1 材料与方法

1.1 供试核酸抽提物

CiLV 病原核酸提取物由巴西圣保罗州柑橘基金会 (Fundecitrus) Nelson Arno Wulff 博士惠赠。

1.2 引物设计

参照 Locali 等^[5]设计的扩增 CiLV 假定运动蛋白区段的引物:

MPR: 5'-TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT-3'

MPF: 5'-GCGTATTGGCGTTGGATTCT GAC-3'.

1.3 RT-PCR 扩增

反转录体系: 模板 1 μl ; 超纯水 1 μl , 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5min, 立即冰浴, 再加入 5 \times AMV buffer 1.25 μl ; 10mmol/L dNTP 0.5 μl ; MPR 0.25 μl ; RNA 抑制剂 0.15 μl ; AMV 0.15 μl ; 超纯水 0.7 μl , 总体积 5 μl 。混合后 42 $^{\circ}\text{C}$ 30min, 合成 cDNA。PCR 反应体系为: 10 \times buffer 2.5 μl ; 25 mmol/L MgCl_2 1 μl ; MPR 0.75 μl ; MPF 1 μl ; Taq 酶 0.35 μl ; cDNA 5 μl , 加水 14.4 μl 至 25 μl 后进行 PCR 反应: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7min。取 5 μl 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖电泳检测。

2 结果与分析

2.1 CiLV 的 RT-PCR 扩增

利用引物 MPR 和 MPF, 对来源于巴西的 CiLV 阳性样品进行扩增, 检测到 339bp 的特异性条带, 负对照无扩增条带 (图 1)。

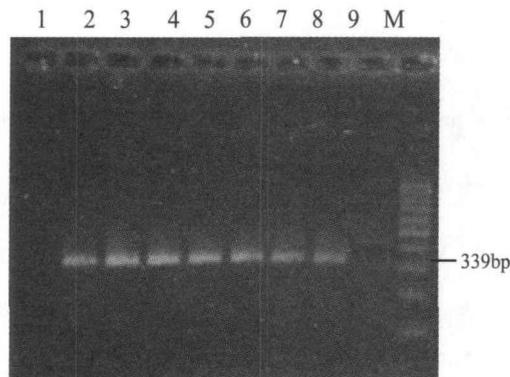


Fig. 1 Results of RT-PCR of CiLV MP gene

1. water control; 2-8. infected samples from Brazil; 9. healthy control; M. 100 bp ladder DNA Marker

2.2 CiLV 扩增体系的灵敏度与特异性

对所提取的 CiLV 总核酸进行 10 倍梯度稀释, RT-PCR 扩增结果表明稀释到 10^{-3} 仍有较明显的扩增条带 (图 2)。

利用该引物和反应体系, 扩增 CTLV 和 CTV 阳性对照, 均无靶标条带, 而 CiLV 阳性样品均有非特异条带 (图 3)。

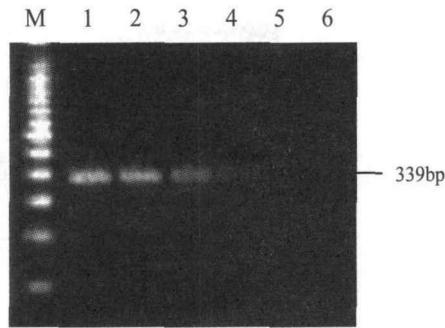


Fig. 2 Sensitivity test of RT-PCR for CiLV

1-5. Ten-fold serial dilutions of a CiLV positive sample, respectively; 6. water control; M. 100 bp ladder DNA Marker

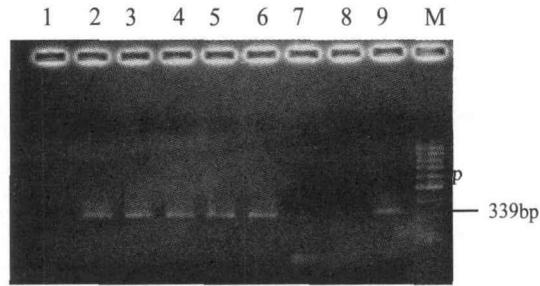


Fig. 3 Specificity test of RT-PCR for CiLV

1. water control; 2-6. CiLV positive samples; 7. CTLV positive sample; 8. CTV positive sample; 9. healthy control; M. 100 bp ladder DNA Marker

3 讨论

柑橘麻风病是一种危险性病害，目前该病主要在南美和北美的部分地区发生，对巴西柑橘产业构成巨大威胁。据统计，巴西每年投入用于防治短须螨的杀螨剂经费达到 7500 万美元，约占其柑橘产业总产出的 21%。我国尚未见柑橘麻风病发生的相关报道，但国内存在其传播媒介，一旦病原传入，存在扩散流行的巨大风险，因此有必要建立针对 CiLV 的快速检测体系。

本研究在国内首次建立了检测 CiLV 的 RT-PCR 技术体系，并对该体系的灵敏度和特异性进行了评估，表明该方法快速、稳定、可靠，为监控和防止该病传入我国提供技术支撑。

参考文献

- [1] Fawcett H S, Lee H A. Citrus diseases and their control. New York, USA: McGraw-Hill (1926)
- [2] Childers C C, Rodrigues J C, Kitajima E W, Derrick K S, Rivera C, Welbourn W C. A control strategy for breaking the virus-vector cycle of *Brevipalpus spp.* and the Rhabdovirus disease, citrus leprosis. *Manejo Integrado de Plagas*, 2001, 60, 76-79
- [3] Lovisolo O. Citrus leprosis virus: Properties, diagnosis, agro-ecology and phytosanitary importance. *Bulletin OEPP*, 2001, 31, 79-89
- [4] Kitajima E W, Muller G W, Costa A S, Yuki W. Short, rod-like particles associated with Citrus leprosis. *Virology*, 1972, 50, 254-258
- [5] Locali E C, Freitas-Astua J, Alves de Souza A, Takita M A, Astua-Monge G, Antonioli R, Kitajima E W, Machado M A. Development of a Molecular Tool for the Diagnosis of Leprosis, a Major Threat to Citrus Production in the Americas. *Plant Dis*, 2003, 87, 1317-1321