

关。这些机能对于黄绿绿僵菌的防虫效果会有不利的影 响。因此,应该在马铃薯瓢虫体内的免疫和抵抗菌丝体侵入的机能方面作进一步研究,从而为克服其体内的免疫机能,更好地用真菌防治和调节其种群水平奠定基础。

参考文献

[1] 蒲蛰龙,李增智.昆虫真菌学[M].合肥:安徽科学技术出版

社,1996.

[2] 方中达.植病研究方法[M].第3版.北京:中国农业出版社,1998:91-108.
[3] 张志勇,刘绍友.马铃薯瓢虫实验种群的生命表[J].南京农业大学学报,1994,17(2):33-38.
[4] 陈长琨.昆虫生理生化实验[M].北京:农业出版社,1993.
[5] 姚剑,李增智,樊美珍.虫生真菌入侵过程中酶的研究[J].安徽农业大学学报,1996,23(3):303-308.
[6] 张国珍.食品生物化学[M].北京:中国农业出版社,1990.

运用一步法 RT-PCR 检测柑橘鳞皮病毒及其在橘橙不同部位中的全年分布

吕婵娟¹, 周常勇^{1,2*}, 周彦^{1,2}, 唐科志²

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400716; 2. 中国农业科学院柑橘研究所, 重庆 400712)

摘要 2005年5月到2006年4月逐月采样,运用一步法RT-PCR检测 *Citrus psorosis virus* (CPV) 在 Dweet 橘橙苗木叶片和枝皮中的分布。保存在控温温室中的 Dweet 橘橙病株中老叶、老皮、嫩叶和嫩皮全年都可以检测出 CPV; 保存在网室中的 Dweet 橘橙病株中老叶、老皮全年均能检测到 CPV, 而夏梢的嫩叶、嫩皮不能稳定地检测出 CPV, 春、秋梢的嫩叶、嫩皮均可检测到 CPV, 表明一步法 RT-PCR 检测 CPV 最佳取样部位为老叶和老皮。

关键词 柑橘鳞皮病毒; 一步法 RT-PCR; 全年分布检测
中图分类号 S 432.41

Detection of *Citrus psorosis virus* by one-step RT-PCR and its annual distribution in different parts of Dweet tangor

Lü Chanjuan¹, Zhou Changyong^{1,2}, Zhou Yan^{1,2}, Tang Kezhi²

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China;
2. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract From May 2005 to April 2006, annual distribution of *Citrus psorosis virus* (CPV) on the leaves and shoots of Dweet tangor seedlings was detected by using one-step RT-PCR once a month. CPV was constantly detected in all leaves and barks of the infected plants in greenhouses and in old leaves and barks of the infected plants in screenhouses all the year round. Young leaves and barks of both summer and autumn shoots except some summer shoots in screenhouses were consistently detected positive for CPV. These results suggested that the most suitable parts of citrus plant for sampling for diagnosis by one-step RT-PCR are old leaves and barks.

Key words *Citrus psorosis virus* (CPV); one-step RT-PCR; annual distribution

柑橘鳞皮病毒(*Citrus psorosis virus*, CPV)属蛇形病毒属(*Ophiovirus*),是一种多分体单链 RNA 病毒,主要危害甜橙、宽皮柑橘和葡萄柚,尚未发现抗病品种^[1-2],引起寄主主干和大枝典型的树皮鳞

收稿日期: 2006-11-01 修订日期: 2006-12-04
基金项目: 农业部“948”后续项目(2004-C16-1); 科技部社会公益专项(2005DIA4J053)
* 通讯作者 Tel: 023-68349007; E-mail: changyoung@hotmail.com

片状开裂症状,并常伴随春秋梢嫩叶呈现橡形叶症状以及沿叶脉褪绿斑纹,少数春梢会表现较轻的休克症状等^[3-7],主要分布于美国、西班牙、意大利、巴西以及阿根廷等国家,对柑橘产业造成严重危害^[8-9]。该病害主要通过柑橘种子、苗木等繁殖材料进行传播。鉴于目前我国大量引种,增大了该病传入我国的可能,所以建立一种快速、准确的 CPV 检测方法,对加强检疫、保证我国柑橘产业免受 CPV 的危害,保持我国柑橘产业的可持续发展显得尤为重要。

Garcia 等首次利用 RT-PCR 方法检测 CPV^[8],随后 Barthe、Legarreta 和 Martin 等也有类似报道^[10-12],但尚未有 CPV 在寄主体内全年分布的报道。本研究对中国农业科学院柑橘研究所保存的 CPV 毒源进行 RT-PCR 检测,并利用一步法 RT-PCR 对 2005 年 5 月到 2006 年 4 月逐月采集的样品进行检测,以期明确检测 CPV 的适宜采样时间与采样部位。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验所用苗木 Dweet 橘橙是以卡里佐枳橙为砧木,于 2004 年 11 月将中国农业科学院柑橘研究所保存的来自澳大利亚的柑橘鳞皮病毒源澳鳞 A 嫁接到卡里佐枳橙砧木上,嫁接成活且经一步法 RT-PCR 检测带 CPV 的 Dweet 橘橙病苗共有 6 株,其中 2 株保存于中国农业科学院柑橘研究所脱毒中心温室(17~27 °C),4 株保存在网室中;负对照无病材料来自脱毒中心网室保存的 Dweet 橘橙无病苗;正对照材料来自脱毒中心温室保存的 Dweet 橘橙病苗。

1.2 试验试剂

按照 Susana Martin 等^[6]的方法合成引物 PS66 (5' - TCGAAGCTGTATGATGGTGA - 3') 和 PS65 (5' - TGCCATCTGGAGTGAGGCT - 3'),引物在上海生工合成,其余试剂均为 Promega 公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 取样方法

从 2005 年 5 月至 2006 年 4 月,每月中旬使用无菌刀片从 Dweet 橘橙苗木取样,取样部位分别为

老叶、嫩叶、老皮、嫩皮,每份取样量 5~15 mg,样品经一步法 RT-PCR 检测。

1.3.2 总核酸提取

参考周常勇的微量核酸提取方法提取总核酸^[13]。使用 SmartSpec3000 型核酸蛋白分析仪 (Bio-Rad) 分析提取液中核酸的浓度。

1.3.3 RT-PCR 反应体系

经优化后建立的一步法 RT-PCR 反应体系为:10 μL 体系包括 RNA 样品 1.0 μL, 2 × buffer 5.0 μL, Mg²⁺ 1.6 μL, Primer 10.1 μL, Primer 20.1 μL, RT/Taq 1.0 μL。PCR 反应条件如下:42 °C 反转录 45 min, 94 °C 变性 15 s, 45 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环;最后,72 °C 延伸 5 min。扩增产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,经溴乙锭染色后观察结果。

1.3.4 RT-PCR 体系特异性检测

取 CPV、温州蜜柑萎缩病毒(SDV)、柑橘碎叶病毒(CTLV)、柑橘裂皮病类病毒(CEVd)、柑橘衰退病毒(CTV)的总核酸提取液各 1 μL 进行一步法 RT-PCR 扩增,产物经琼脂糖电泳 EB 染色后分析结果。

1.3.5 PCR 体系灵敏度检测

取核酸提取液 1 μL,分别用超纯水稀释至 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷ 倍,各设一个重复,取稀释产物按 1.3.3 的方法进行一步法 RT-PCR 扩增,产物经琼脂糖电泳 EB 染色后分析结果。

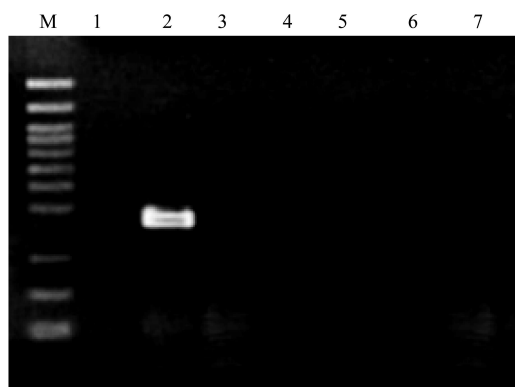
2 结果与分析

2.1 一步法 RT-PCR 体系特异性检测

5 种柑橘病毒和类病毒 CPV、SDV、CTLV、CEVd 和 CTV 的核酸提取液经本研究室建立的一步法 RT-PCR 反应体系扩增后,只有 CPV 能扩增出明显条带,其余病毒 RNA 无扩增,说明该体系具有很好的特异性,结果如图 1。

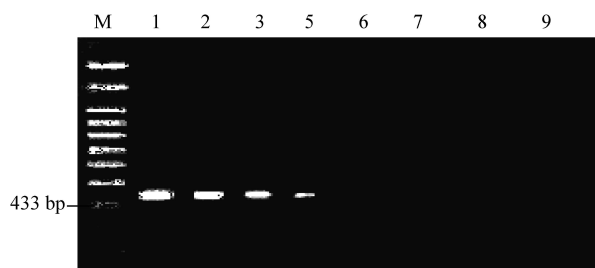
2.2 一步法 RT-PCR 体系灵敏度检测

经核酸蛋白分析仪测定分析可知核酸提取液中总核酸浓度为 92.7 μg/μL。取提取液 1 μL,分别用超纯水稀释至 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷ 倍,设 1 个重复,取各稀释液经一步法 RT-PCR 扩增,产物经电泳分析,检测结果表明该方法的灵敏度可达 3 个数量级,检测核酸浓度最低约为 92.7 pg/μL,结果如图 2。



M. Marker; 1. 水; 2. CPV; 3. 阴性对照;
4. SDV; 5. CTLV; 6. CEVd; 7. CTV

图1 一步法 RT-PCR 体系特异性检测结果



M. Marker; 1. 总RNA; 2. 10倍稀释;
3. 10²倍稀释; 4. 10³倍稀释; 5. 10⁴倍稀释;
6. 10⁵倍稀释; 7. 10⁶倍稀释; 8. 10⁷倍稀释; 9. 水

图2 一步法 RT-PCR 体系灵敏度检测结果

2.3 CPV在 Dweet 橘橙苗木不同部位的全年分布

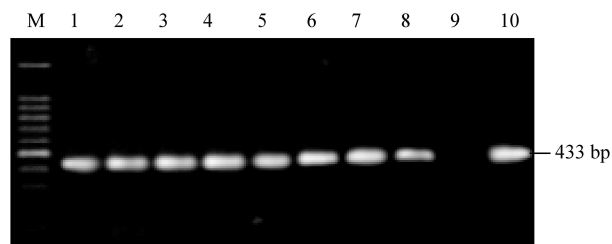
从2005年5月到2006年4月, 每月中旬用优化后的一步 RT-PCR 法检测澳鳞 A 毒源在 Dweet 橘橙苗木不同部位的分布, 结果表明: 温室中保存毒源的老叶、老皮、嫩叶、嫩皮全年均可检测到 CPV;

网室中保存毒源的老叶、老枝皮全年均可以稳定检测到 CPV, 嫩叶、嫩皮中除了 1、12 月份没有嫩梢, 7、8 月份有部分检测不到外, 其余时间也可以稳定检测到 CPV(表 1, 图 3, 图 4):

表 1 CPV 在网室中 Dweet 橘橙苗木不同部位的全年分布¹⁾

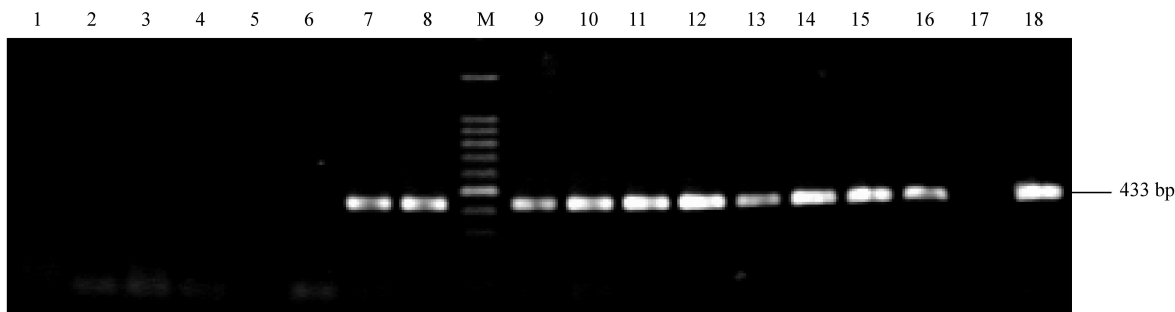
日期/ 月/日	阴性数量(检测数量)/株				月平均温度/℃
	老叶	嫩叶	老皮	嫩皮	
05-05	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	23.3
05-06	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	25.9
05-07	4(4)	3(4)	4(4)	3(4)	30.0
05-08	4(4)	3(4)	4(4)	3(4)	27.4
05-09	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	26.9
05-10	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	18.6
05-11	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	13.9
05-12	4(4)	*	4(4)	*	9.5
06-01	4(4)	*	4(4)	*	7.8
06-02	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	9.6
06-03	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	12.8
06-04	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	18.7

1) * 表示该月无嫩叶、嫩皮。



M. 100 bp DNA 分子量标准; 1、5. 嫩叶; 2、6. 嫩皮;
3、7. 老叶; 4、8. 老皮; 9. 负对照; 10. 正对照

图3 2005年8月温室中 Dweet 橘橙 CPV 的 RT-PCR 检测结果



M. 100 bp DNA 分子量标准; 1. 水对照; 2-4. 负对照; 5. H208嫩叶; 6. H208嫩皮; 7. H208老叶; 8. H208老皮; 9. H98;
10. H98; 11. C243嫩叶; 12. C243嫩皮; 13. C243老叶; 14. C243老皮; 15. H262嫩叶; 16. H262老皮; 17. 负对照; 18. 正对照

图4 2005年8月网室中 Dweet 橘橙 CPV 的 RT-PCR 检测结果

3 讨论

柑橘病毒病及其类似病毒病在寄主体内存在分布不均的情况, 周常勇^[14]等应用 ELISA 法发现在甜橙老叶中全年检测不出 SDV, 而在 3~6 月以及

9、10 月的嫩叶中 SDV 的浓度较高^[16-18]。通过比较锦橙、柚和椪柑新老枝叶中的 CTV 的检测结果, 发现 CTV 在嫩枝中检出率最高, 依次是嫩叶、老枝和老叶, CTV 在柚植株中尤其存在明显的不均匀分布现象, 并接种后 3 个月才易在各部位被检测

出^[15-16]。虽然可以利用 RT-PCR 对 CTLV 病株进行全年检测,但是在 7、8 月份的检测效果不理想^[17]。另外,有研究表明 CEVd 在寄主体内是系统分布,但存在分布不均性,且这种分布不均性与季节相关^[18]。本研究检测了保存于温室(17~27℃)和网室中的 CPV 在 Dweet 橘橙不同部位的全年分布,发现保存在温室中的 Dweet 橘橙病株中老叶、老皮、嫩叶和嫩皮全年都可以检测出 CPV,保存在网室中的 Dweet 橘橙病株中老叶和老皮全年均能检测到 CPV,夏梢嫩叶和嫩皮部分检测不到 CPV,春秋梢的嫩叶和嫩皮均能检测到 CPV,表明不同时期 CPV 在 Dweet 橘橙苗木的不同部位存在一定的分布不均性,CPV 在老叶中的分布率高于嫩叶,在老皮中的分布率高于嫩皮,说明随着 Dweet 橘橙苗木的生长,CPV 的分布和浓度有所增加,在实际检测 CPV 时,最佳取样部位为老叶和老皮,全年均适宜取老叶和老皮检测 CPV。全年温度最高的 7、8 月网室中保存的接毒苗木的嫩梢部分检测不到 CPV,可能温度对 CPV 在 Dweet 橘橙苗木的不同部位的分布有一定的影响,高温可能抑制了 CPV 在 Dweet 橘橙嫩梢中的病毒含量。

比较在本试验中使用的 3 种抽提方法,微量快速总核酸提取法提取的总核酸纯度较高,RT-PCR 效果好,并且提取速度快,适用于大批量样品总核酸的快速制备。

参考文献

- [1] DIAMANTE DE ZUBRZYCKI, ZUBRZYCKI H M, CORREA M. Determination of the distribution of psorosis in commercial plantings. [C] // Proceedings of 9th Conference of the International Organization of Citrus Virus. California: University of California, Riverside, 1984: 165-169.
- [2] GALIPIENSO L, NAVARRO L, BALLESTER-OLMOS J F, et al. Host range and symptomatology of a graft-transmissible pathogen causing bud union crease of citrus on trifoliaterootstocks[J]. Plant Pathology, 2000, 49: 308-314.
- [3] LEVY L, GUMPF D J. Studies on the psorosis disease of citrus and preliminary characterization of a *Flexuous virus* associated with the disease. [C] // Proceedings of 12th Conference of the International Organization of Citrus Virus. California: University of California, Riverside, 1993: 319-336.
- [4] DOIDGE E M. Scaly bark (psorosis) of citrus trees[J]. J Dept Agr Union S Afr, 1926(12): 61-67.
- [5] ROISTACHER C N. Psorosis—a review [C] // Proceedings of 12th Conference of the International Organization of Citrus Virus. California: University of California, Riverside, 1992: 139-154.
- [6] ROISTACHER C N. Psorosis complex. [M] // Graft-transmissible Diseases of Citrus. Handbook for Detection and Diagnosis, 1991: 115-126.
- [7] ALIOTO D, TROISI A, PELUSO A, et al. Occurrence of *Citrus psorosis virus* in Campania, southern Italy[J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106: 795-799.
- [8] GARCIA M E, SANCHEZ M E, DAL E, et al. Detection of *Citrus psorosis-ringspot virus* using RT-PCR and DAS-ELISA [J]. Plant Pathology, 1997, 46: 830-836.
- [9] TIMMER L W, BENATENA H N. Comparison of psorosis and other virus causing lead flecking in citrus[J]. Proc Int Soc Citric, 1977(3): 930-935.
- [10] BARTHE, CECCARDI, MANJUNATH, et al. *Citrus psorosis virus*: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR[J]. Journal of General Virology, 1998, 79: 1531-1537.
- [11] LEGARRETA G G, GARCIA M L, COSTA N, et al. Twenty-three *Citrus psorosis virus* isolates of different origin detected by RT-PCR (abstract) [C] // Proceedings of 14th Conference of the International Organization of Citrus Virus. California: University of California, Riverside, 2000: 350-352.
- [12] MARTIN S, ALIOTO, MILNE G, et al. Detection of *Citrus psorosis virus* by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease[J]. European Journal of Plant Pathology, 2004, 110: 747-757.
- [13] 周常勇, DEBORAH HAILSTONES RACHAEL CONNOR, PATRICIOA BARKLEY, et al. 一种微量快速抽提柑橘衰退病毒(CTV)核酸应用于 RT-PCR 扩增的方法[J]. 福建农业大学学报, 2001: 30(增刊).
- [14] 周常勇, 赵学源, 蒋元晖, 等. 温州蜜柑萎缩病的分布鉴定[J]. 植物保护学报, 1993, 20(2): 123-127.
- [15] 宋震, 邹敏, 徐小峰, 等. 柚新老枝叶中柑橘衰退病毒的 DT-BIA 检测[J]. 西南园艺, 2005, 33: 43-45.
- [16] 刘科宏, 周彦, 王雪峰, 等. 柑橘衰退病毒在寄主中的分布[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 33(增刊): 109-110.
- [17] 唐科志, 周常勇, 王雪峰, 等. 利用一步法 RT-PCR 检测柑橘碎叶病[J]. 植物病理学报, 2005(增刊): 118-119.
- [18] 彭军, 周常勇, 唐科志, 等. 柑橘裂皮病类病毒的一步 RT-PCR 法检测及其在甜橙体内的分布[J]. 果树学报, 2005, 22(6): 744-747.