

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

彭 军^{1,2}, 周常勇^{1,2*}, 唐科志¹, 谭万忠²

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

摘 要: 柑橘裂皮病是由柑橘裂皮病类病毒(*Citrus exocortis viroid*, CEVd)引起的一种重要的柑橘病害。分别采用快速微量核酸提取法和 SDS-KAc 抽提法在表现症状的 Etrog 香橼中提取核酸, 采用一步 RT-PCR 法对 CEVd 进行检测, 结果显示 SDS-KAc 法可以消除带毒样品中非特异性条带。从嫁接接毒的铜水 72-1 锦橙植株的接穗部取嫩叶、老叶、皮, 从砧木部茎杆上取老皮以及根皮分别提取总核酸进行 RT-PCR 检测, 分析 CEVd 在甜橙体内的分布情况。初步检测结果表明在接穗的嫩叶、老叶、皮, 砧木部茎杆的老皮和根皮上都可以检测到 CEVd, 以接穗部叶和皮检出稳定性高。

关键词: 柑橘裂皮病类病毒; 分布; 甜橙; RT-PCR 检测

中图分类号: S666 文献标识码: A 文章编号: 1009-9980(2005)06-744-04

Preliminary study on One-step RT-PCR detection of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and its distribution in different parts of sweet orange

PENG Jun^{1,2}, ZHOU Chang-yong^{1,2*}, TANG Ke-zhi¹, TAN Wan-zhong²

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

Abstract: Citrus exocortis is an important viroid disease. Preliminary study on comparison of Fast Micro-extraction method and SDS-KAc method, detecting CEVd in Etrog citron with symptoms by One-step RT-PCR, revealed that SDS-KAc method was preferable for eliminating non-specific band. Distribution of CEVd in the young leaf, mature leaf, bark and rootlet was monitored by One-step RT-PCR. The results indicated that CEVd could be detected in all parts monitored by One-step RT-PCR. Considering stability, leaf and bark of scion are more suitable to be used for detection of CEVd by One-step RT-PCR.

Key Words: *Citrus exocortis viroid*; Distribution; Sweet orange; RT-PCR detection

柑橘裂皮病是由柑橘裂皮病类病毒(*Citrus exocortis viroid*, CEVd)引起的一种世界范围的重要柑橘病害^[1], 在我国分布广泛, 可以通过嫁接或修剪用的工具机械传播, 主要危害以枳、枳橙和兰普来檬作砧木的柑橘, 引起砧木部树皮纵裂, 导致树势衰弱、植株矮化和严重减产^[2,3]。

目前, 无毒化生产是防治柑橘裂皮病的主要措施, 无毒化生产要求一种准确、灵敏、简便、快速的检测方法。虽然已有应用 RT-PCR 方法检测 CEVd 的报道^[4,5], 但是仍然存在操作繁琐, 取样量大, 灵敏度不高等问题。本文对嫁接接毒后的毒源保存苗铜水 72-1 锦橙不同部位采样分别提取总核酸进行一步 RT-PCR 法检测, 分析 CEVd 在寄主体内的分布情况, 明确应用一步 RT-PCR 法检测技术的最佳检测

部位和时期。

1 材料和方法

1.1 毒源

感病的柑橘材料(CEVd 毒源)由中国农业科学院柑橘研究所(保存于网室)提供, 寄主品种是 4 号脐橙、眉山 9 号脐橙、锦橙、脐血橙、宽皮柑橘, 无毒品种亦由柑橘研究所提供。

2002 年 9 月 2 日毒源植株上的单芽和无芽枝段腹接于枸头橙砧木主干的下部, 再在砧木的较上方接铜水 72-1 锦橙芽形成耐病的砧穗组合来繁殖毒源, 每个毒源繁殖 3 株毒源保存苗, 以不接种的甜橙作为负对照。

1.2 生物学鉴定

收稿日期: 2004-04-20 接受日期: 2005-08-12

作者简介: 彭军, 男, 硕士, 研究方向为柑橘类病毒病害, 现工作单位: 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所。E-mail: pengjun8@yahoo.com.cn

* 通讯作者。Author for correspondence. E-mail: zhouchangyong@vip.sina.com

2003 年 4 月 5 日在不同毒源保存苗上采接穗分别嫁接到 Etrog 香橼 861-S-1 选系上进行生物学鉴定,每个毒源材料接 10 株指示植物,置网室内观察症状表现。

1.3 取样

2003 年 10 月 8 日和 2004 年 4 月 8 日 2 次在毒源保存苗上取样,在接穗部分取嫩叶、老叶、嫩皮,在砧木茎杆取老皮及根皮分别提取总核酸。

1.4 核酸的提取

参照周常勇等^[6]的微量快速提取法。参照 Garnsey 等^[7]的 SDS-KAc 法。

1.5 试剂

一步法 RT-PCR 所用的酶和缓冲液采用 Invitrogen 公司的 SuperScript™ 带 Platinum^R Taq 酶的一步法试剂盒,其余所用的化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.6 引物

参考 Sieburth 等^[8]的 CEVd 同源引物 D5/D7, D5 与 164-185 nt 互补, D7 与 329-348 nt 同源,上海生物工程。

D5 5'— ACGAGCTCCTGTTTCTCCGCTG — 3'

D7 5'— CCGGGCGAGGGTGAAAGCCC — 3'

1.7 一步法 RT-PCR

RT-PCR 反应在 Biometra PCR 仪 (德国 Whatman 公司)上进行。

一步法 RT-PCR 总反应体积 10 μL: 抽提样品 1 μL, 超纯水 1 μL 混合, 94℃ 变性 3 min 后立即置冰浴中, 4℃ 冷冻离心后加入 8 μL 的反应混合液, 其组分为: 0.8 μL 超纯水, 5 μL 2 倍缓冲液 (dNTPs 10

mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L), 1.6 μL MgSO₄ (0.8 mmol/L), 引物各 0.2 μL (0.2 μmol/L), 0.2 μL RT/Taq 酶 (Invitrogen 公司)。

反应程序: 42℃ 反转录 30 min; 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 10 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.8 PCR 产物分析

PCR 反应结束后, 取上述 PCR 扩增产物 5 μL, 加入 3.0 μL 上样缓冲液, 在 2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳, 150 V 预电泳 10 min, 100 V 电泳 1 h 后在 1 μg/mL 的溴化乙锭 (EB) 中染色 20 min, 用凝胶成像仪 (UVI Photo) 观察结果。

2 结果和分析

2.1 生物鉴定

将不同毒源保存苗的新梢分别嫁接到 Etrog 香橼 861-S-1 选系 3 个月后, 大多数植株发病, 症状表现为嫩叶反卷和老叶叶背主脉局部变成褐色坏死枯斑, 说明毒源苗都带有柑橘裂皮病类病毒。

2.2 2 种抽提方法的比较

以生物学鉴定中表现症状的 Etrog 香橼叶片为正对照 (+CK), 未接毒的 Etrog 香橼为负对照 (-CK), 分别采用微量快速提取法^[6]和 SDS-KAc 提取法^[7]提取总核酸, 一步 RT-PCR 法扩增 +CK 样品都可以检测到预期的 228 bp 特征条带 (图 1)。

微量快速提取法提取的样品扩增后均有 300 bp 的非特异性条带 (图 1 样孔 1-5), 用 SDS-KAc 法抽提核酸后, 基本上可以消除 +CK 样品中的非特异性条带, 但是 -CK 中的 300 bp 的非特异性条带没有得

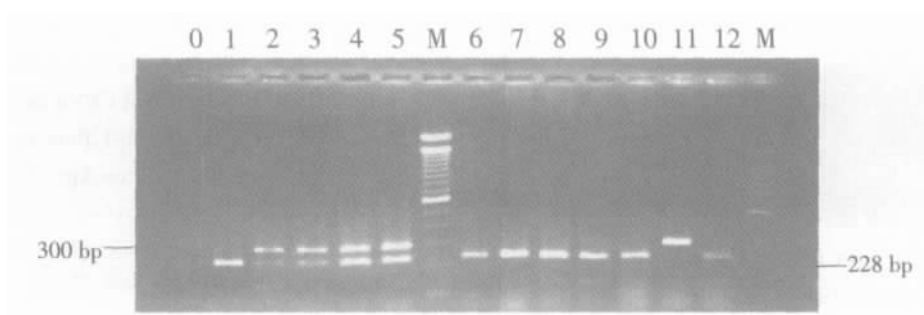


图 1 CEVd 不同提取方法的 RT-PCR 扩增结果

样品 1-5 采用微量快速法提取, 样品 6-12 采用 SDS-KAc 法提取

0: 水对照; M: DNA 标准分子量 (100 bp 梯度, 中部最浓带为 600 bp); 1, 6: Etrog 香橼/4 号脐橙毒源; 2, 7: Etrog 香橼/眉山 9 号脐橙毒源; 3, 8: Etrog 香橼/锦橙毒源; 4, 9: Etrog 香橼/脐血橙毒源; 5, 10: Etrog 香橼/柑橘毒源; 11: -CK; 12: +CK

Fig.1 Comparison on RT-PCR products using different extraction methods

Samples No.1-5 extracted by Fast Micro-extraction method, and No.6-12 by SDS-KAc method

0: Water control; M: DNA Marker with 100 bp ladders (the middle intensive band is 600 bp); 1, 6: Etrog citron/navel orange No.4 with CEVd; 2, 7: Etrog citron / Meishan No.9 navel orange with CEVd; 3, 8: Etrog citron / Jincheng sweet orange with CEVd; 4, 9: Etrog citron / Washington Sanguine with CEVd; 5, 10: Etrog citron / mandarin with CEVd; 11: -CK; 12: +CK

到消除(图 1 样孔 6-12)。

2.3 毒源保存苗的 RT-PCR 检测

在 4 号脐橙、眉山 9 号脐橙、锦橙、脐血橙、宽皮柑橘毒源保存苗的新梢上采样, SDS-KAc 法提取总核酸进行一步 RT-PCR 法检测, 均可以扩增得到特异性条带, 检测结果与其生物鉴定结果相一致(图 2), 说明一步 RT-PCR 法可以特异性检出感病植株中的 CEVd。

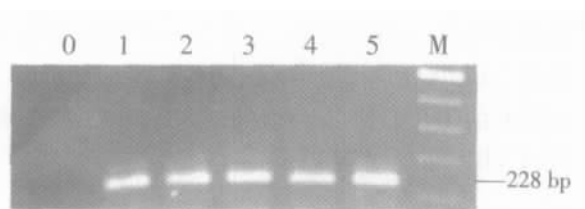


图 2 5 种 CEVd 毒源繁殖于铜水 72-1 锦橙中的一步 RT-PCR 法检测结果

0: 水对照; M: DNA 标准分子量(100 bp 梯度, 最浓带为 600 bp);
1: 4 号脐橙毒源; 2: 眉山 9 号脐橙毒源; 3: 锦橙毒源; 4: 脐血橙毒源; 5: 宽皮柑橘毒源

Fig. 2 Detection results of 5 CEVd resources in Tongshui 72-1 Jingchen sweet oranges by One-step RT-PCR

0: Water control; M: DNA Marker with 100 bp ladders (the intensive band is 600 bp); 1: CEVd resource from Navel orange No. 4; 2: CEVd resource from Meishan No.9 navel orange; 3: CEVd resource from Jingchen sweet orange; 4: CEVd resource from Washington Sanguine; 5: CEVd resource from Mandarin

2.4 RT-PCR 检测的灵敏度

通过检测提取液的 OD_{260} , 估算总核酸量并按 10 倍系列稀释抽提的样品为模板进行一步 RT-PCR 法扩增, 电泳后分析显示, 在本实验条件下核酸提取液稀释到 10^6 倍 (即 3 μ g) 后仍可以检测到 CEVd 特征性条带(图 3)。

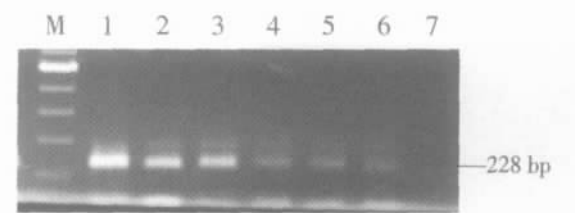


图 3 一步 RT-PCR 法检测的灵敏度

M: DNA 标准分子量(100 bp 梯度, 最浓带为 600 bp);
样孔 1-7 稀释比例为 $10^1 \times, 10^2 \times, 10^3 \times, 10^4 \times, 10^5 \times, 10^6 \times, 10^7 \times$

Fig. 3 Detection sensitivity by One-step RT-PCR

M: DNA Marker with 100 bp ladders (the intensive band is 600 bp);
1-7 (dilutions): $10^1 \times, 10^2 \times, 10^3 \times, 10^4 \times, 10^5 \times, 10^6 \times, 10^7 \times$

2.5 CEVd 在甜橙体内分布的检测

在柑橘生长季节, 分别于 2003 年 10 月 8 日和 2004 年 4 月 8 日对毒源保存苗不同部位的核酸提取液进行一步 RT-PCR 法检测, 每个取样部位重复

3 次。经反复检测, 2003 年 10 月 8 日在保存苗铜水 72-1 锦橙新梢上的嫩叶、老叶、皮以及根部取样均可检测到 CEVd, 在砧木皮上取样检测不到 CEVd(图 4), 2004 年 4 月 8 日在接穗部和砧木部的皮和根都可以检测到 CEVd(图 5), 2 次对砧木部主干上皮的检测结果不一致。

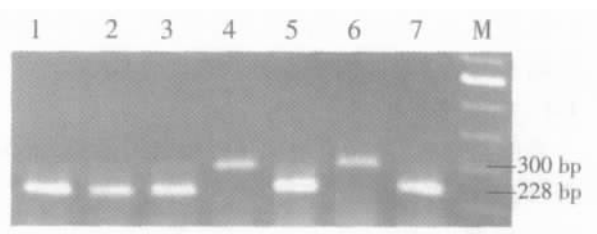


图 4 2003 年 10 月 8 日对 CEVd 在铜水 72-1 锦橙不同部位分布的检测结果

M: DNA 标准分子量; 1: 嫩叶; 2: 老叶; 3: 嫩皮; 4: 砧木皮; 5: 根皮

Fig. 4 Detection results of CEVd distribution in different parts of Tongshui 72-1 Jingchen sweet orange by One-step RT-PCR on Oct. 8th, 2003

M: DNA Marker with 100 bp ladders; 1: Young leaf; 2: Mature leaf; 3: Young bark; 4: Bark of rootstock; 5: Bark of root; 6: -CK; 7: +CK

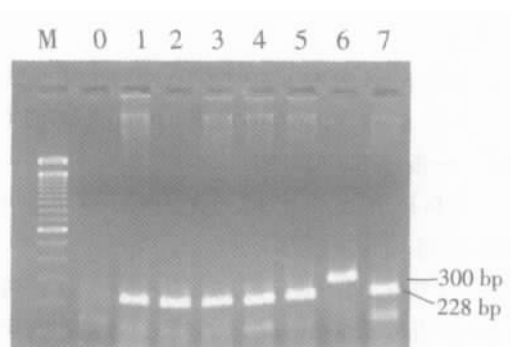


图 5 2004 年 4 月 8 日对 CEVd 在铜水 72-1 锦橙不同部位分布的检测结果

M: DNA 标准分子量; 0: 水对照; 1: 嫩叶; 2: 老叶; 3: 嫩皮; 4: 砧木皮; 5: 根皮; 6: -CK; 7: +CK

Fig. 5 Detection results of CEVd distribution in different parts of Tongshui 72-1 Jingchen sweet orange by One-step RT-PCR on Apr. 8th, 2004

0: Water control; M: DNA Marker with 100 bp ladders;
1: Young leaf; 2: Mature leaf; 3: Young bark; 4: Bark of rootstock;
5: Bark of root; 6: -CK; 7: +CK

3 讨 论

RT-PCR 方法较多地被应用于柑橘类病毒的检测。本研究采用灵敏度高的一步 RT-PCR 法^[8]检测 CEVd, 适合于直接对田间甜橙类品种的带毒情况进行检测, 克服了早期 RT-PCR 检测灵敏度不高的问题(0.1 ng)。

田间 CEVd 侵染常常是多种变异株的混合感

染,目前报道的株系有 44 种^[9]。胡勤学^[4]参考国外的 CEVd-A 株系设计 5 个引物对我国的 CEVd 进行检测,由于国外的株系与我国的株系存在一定的差异,只有 3 个引物可以检测到作者选用的克拉斯特脐橙样品上的 CEVd,由于提取是用柑橘和香橼叶片混合后提取的,在本实验条件下未能重复出胡勤学等^[4]的结果。

Sieburth 等^[8]采用引物 D5/D7,可以从感病的组织中扩增出 228 bp 的特异性条带,负对照没有扩增条带。本研究采用 Sieburth 的 2 个引物,先采用快速微量提取法^[6]提取核酸,经一步 RT-PCR 法既可扩增出特征性 228 bp 条带,同时均带有 300 bp 的非特异性条带,改用 SDS-KAc 方法^[7]抽提后,基本上可以消除非特异性条带,专化性提高,可以稳定进行田间品种的直接检测,但-CK 仍有 300 bp 的非特异性条带,原因不明。2 种抽提方法提取的核酸,应用于一步 RT-PCR 法均可稳定快速检出田间甜橙植株中的 CEVd。

张奇亚等^[10]研究表明 CEVd 在瓜哇三七植株体内是周身分布,但是分布是不均一的;Gillings 等^[11]研究 CEVd 在 Etrog 香橼上的分布是周身性的。本研究的结果表明 CEVd 在甜橙上的分布也是周身性的,但是含量与季节相关,在秋季,砧木部分类病毒的含量较低。由于接穗部分样品易采集且检测结果稳定,建议使用接穗部分的叶和皮进行检测。

参考文献:

[1] Semancik JS, Weathers LG. Exocortis disease: evidence for a new species of infectious low molecular weight RNA in plants[J]. Nature

New Biology, 1972, (237):242-244.

- [2] Zhao XueYuan, Jiang Yuanhui, He Xinghua, et al. Occurrence and distribution of citrusvirus and virus-like disease in the mainland china [C]. In Proceedings of 11th Conference of the International Organization of citrus virologists(IOC)[A]. IOC, Riverside, California, 1991.547-552.
- [3] 赵学源, 蒋元晖. 我国柑橘栽培品种的裂皮病鉴定和脱除[J]. 园艺学报, 1986, 13(2):91-94.
- [4] 胡勤学. 利用 RT-PCR 扩增和分析柑橘裂皮病类病毒[J]. 植物学报, 1997, (7):613-617.
- [5] Yang X, Hadidi A, Garnsey SM. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts[J]. Phytopathology, 1992, 82:279-285.
- [6] 周常勇, Deborah Hailstones, Rachael Connor, 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):200.
- [7] Garnsey SM, Irely M, Sieburth PJ, et al. Practical field detection of Florida citrus viroids by RT-PCR[C]. In: Proc 15th Conf IOC[A]. IOC, Riverside, CA, 2002.
- [8] Sieburth PJ, Irely M, Garnsey SM, et al. The Use of RT-PCR in the Florida Citrus Viroid Indexing Programme[C]. In Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of citrus virologists(IOC)[A]. IOC, Riverside, 2002, 230-239.
- [9] Palacio A, and Duran Vila N. Single-strand conformation polymorphism(SSCP) analysis as a tool for viroid characterization [J]. J Virol Method, 1999, (77):27-36.
- [10] 张奇亚, 葛宗民, 丁达明. 柑橘裂皮病类病毒瓜哇三七不同器官中的分布[J]. 病毒学杂志, 1988, (1):71-75.
- [11] Gillings MR, Broadbent P, Gollow BI. Biological indexing for citrus Exocortis viroid[C]. In Proceedings of 10th Conference of the International Organization of citrus virologists(IOC)[A]. IOC, Riverside, California, 1988.178-187.

欢迎订阅 2006 年《植物病理学报》

《植物病理学报》是中国植物病理学会主办的全国性学术刊物,“中国科技核心期刊”。主要刊登植物病理学各分支未经发表的专题评述、研究论文和研究简报等,以反映中国植物病理学的研究水平和发展方向,推动学术交流,促进研究成果的推广和应用。

本刊现已被英国农业与生物技术文摘(CAB)、联合国粮农组织 AGRIS 等收录。据《中国科技期刊引证报告》(2004 年版)统计结果,《植物病理学报》的影响因子达 0.560。2003 年

荣获首届《中国学术期刊检索与评价数据规范》(CAJ-CD)执行优秀期刊奖。

本刊为双月刊,每期 96 页码,定价 20.00 元,全年 6 期共 120.00 元。邮发代号:82-214。

地址:北京市海淀区圆明园西路 2 号 中国农业大学植保楼 406 室 邮编:100094

电话:010-62732364 传真:010-62813785

E-mail: journal@cspp.org.cn; ppjournal@cau.edu.cn

欢迎订阅 2006 年《中国南方果树》

《中国南方果树》是我国南方和西部唯一的全国性技术类果树期刊,直接从生产、科研、教学人员的自由来稿中,择优编发那些根据实践得到的第一手资料撰写的高新技术、应用技术原始文献。注重技术的创新性、先进性、实用性以及对生产的指导性和报道的时效性。报道树种囊括南方栽培的所有果树,对落叶果树,突出在南方温暖湿润气候条件下与北方不同的栽培管理、病虫害防治特点及适宜发展的品种。是果业从业人员的理想帮手。该刊是发行量和广告发布量最大

的果业期刊之一,订户遍布 29 个省(区、市);广告客户多而稳定,多次被授予重庆市广告行业精神文明先进单位。

全国各地邮局(所)均可订阅,邮发代号 78-13。定价 5.00 元,全年价 30.00 元。

编辑出版:中国南方果树信息中心

电话:023-68349196,68349198(兼传真)

地址:重庆市北碚区歇马镇柑桔所,邮编:400712

E-mail: citrusin@cta.cq.cn, gj@southfruit.com.cn