

# 植物组织和单头蚜虫中柑橘衰退病毒的快速分子检测技术

刘永清<sup>1, 2, 3</sup>, 曹孟籍<sup>1, 2</sup>, 王雪峰<sup>2</sup>, 李中安<sup>2</sup>, 唐科志<sup>2</sup>, 周常勇<sup>1, 2</sup>

(<sup>1</sup>西南大学植物保护学院, 重庆 400716; <sup>2</sup>中国农业科学院柑橘研究所, 重庆 400712; <sup>3</sup>湖北民族学院, 湖北恩施 445000)

**摘要:**【目的】探寻一种快速、简便、灵敏而可靠的检测植物组织和单头蚜虫中柑橘衰退病毒的方法。【方法】运用反转录多聚酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)、反转录巢式多聚酶链式反应(reverse transcription nested polymerase chain reaction, RT-nested-PCR)、印记捕获反转录巢式多聚酶链式反应(print capture reverse transcription nested polymerase chain reaction, PC-RT-nested-PCR)方法检测接种 *Citrus tristeza virus* (CTV) 四年以上的柚以及采用挤压捕获反转录巢式多聚酶链式反应(squash capture reverse transcription nested polymerase chain reaction, SC-RT-nested-PCR)检测单头蚜虫中 CTV, 并比较几种方法的检出率、灵敏度以及 SC-RT-nested-PCR 方法的有效性。【结果】对染病柚的总核酸或印迹稀释后检测, RT-PCR、RT-nested-PCR、PC-RT-nested-PCR 的检测限分别为  $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-1}$  倍。用质粒梯度稀释后模板进行 nested-PCR 检测, 灵敏度达到 13—14 拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ 。饲毒一周后的蚜虫经 SC-RT-nested-PCR 检测, 除在健康琯溪蜜柚上饲喂的蚜虫未检测到目标条带外, 其余在感病琯溪蜜柚上饲喂的蚜虫体内都获得 132 bp 的目标片段。【结论】PC-RT-nested-PCR 和 RT-nested-PCR 方法具有相同的检出率, SC-RT-nested-PCR 检测单头蚜虫非常有效, PC-RT-nested-PCR 和 SC-RT-nested-PCR 都无需提取核酸, 适用于柑橘苗木和接穗的无毒认证以及柑橘衰退病的流行监测和蚜传机理研究。

**关键词:** 柑橘衰退病毒; 分子检测; 植物组织; 单头蚜虫

## Rapid Molecular Detection Technologies of *Citrus tristeza virus* in Plant Tissues and Single Aphid

LIU Yong-qing<sup>1,2,3</sup>, CAO Meng-ji<sup>1,2</sup>, WANG Xue-feng<sup>2</sup>, LI Zhong-an<sup>2</sup>, TANG Ke-zhi<sup>2</sup>, ZHOU Chang-yong<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716; <sup>2</sup>Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712; <sup>3</sup>Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, Hubei)

**Abstract:** 【Objective】 The objective of this study was to explore a kind of quick, simple, sensitive and reliable method to detect *Citrus tristeza virus* in plant tissue and single aphid. 【Method】 RT-PCR, RT-nested-PCR and PC-RT-nested-PCR methods were used to detect CTV in pummelo inoculated CTV for at least 4 years and the positive rate and sensitivity of samples detected by these 3 methods were compared and the validity in detection of CTV in aphids was made by SC-RT-nested-PCR. 【Result】 Templates were used and total nucleic acid or virus RNA obtained from imprinting after various dilutions were detected by the methods of RT-PCR, RT-nested-PCR and PC-RT-nested-PCR, and the thresholds of detection were found to be  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  and  $10^{-1}$  folds, respectively. The sensitivity of detection of CTV by nested-PCR was up to 13-14 copies· $\mu\text{L}^{-1}$ . Fresh viviparity (parthenogenetic) brown citrus aphids were fed on CTV infected and virus-free plants of Guanxi pummelo for a week and squashed onto Whaterman filter paper and then detected by SC-RT-nested-PCR. The 132 bp expected target PCR products were obtained in all the brown citrus aphids fed on the infected plants of Guanxi pummelo besides those fed on the virus-free plants of Guanxi pummelo. 【Conclusion】 The methods of PC-RT-nested-PCR and RT-nested-PCR showed the same positive rate of detected samples. It is efficient to detect CTV in single aphid using SC-RT-nested-PCR and there is no need to extract nucleic acid employing PC-RT-nested-PCR and SC-RT-nested-PCR methods, which are applicable to certification of virus-free citrus plants or scion as well as to the studies on

收稿日期: 2009-10-28; 接受日期: 2010-01-08

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD47B03)、重庆市重大专项(CSTC, 2007AA1024)、重庆市自然科学基金项目(CSTC, 2007BB1342)

作者简介: 刘永清, 副教授, 博士。Tel: 023-68349338; E-mail: lyq1025@hotmail.com。通信作者周常勇, 教授, 博士。Tel: 023-68349007; E-mail: changyong@hotmail.com

monitoring and epidemiology of CTV.

**Key words:** *Citrus tristeza virus*; molecular detection; plant tissues; single aphid

## 0 引言

【研究意义】柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV) 引起的衰退病是危害柑橘最重要的病害之一, 柑橘衰退病毒能被多种不同蚜虫, 如褐色橘蚜 *Toxoptera citricida* (Kirkaldy)、棉蚜 *Aphis gossypii* (Glover)、绣线菊蚜 *Aphis spiraeicola* (Patch)、橘二叉蚜 *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe)、桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer)、豆蚜 *Aphid craccivora* (Koch) 和指管蚜 *Dactynotus jacea* (L.) 以非增殖半持久方式传播<sup>[1-13]</sup>, 导致柑橘衰退病流行, 造成巨大的经济损失。褐色橘蚜是柑橘衰退病发生流行的最有效传播介体, 其在甜橙上传播 CTV 的效率高于棉蚜、橘二叉蚜和绣线菊蚜, 且对强毒株系的传毒率较弱毒株系高。橘蚜与酸橙砧甜橙 *Citrus aurantium* 衰退病的发生与流行, 特别是与衰退病毒强毒株系的发生与流行密切相关, 它是甜橙衰退病发生与流行的最主要传播介体<sup>[14]</sup>。选用无毒材料和监控柑橘衰退病毒在田间的流行是控制柑橘衰退病毒扩大为害的两大策略。各国普遍采取的防治措施是使用无病毒接穗和采用抗病或耐病砧木。澳大利亚、巴西和南非等国利用弱毒株系交叉保护 (mild strain cross protection, MSCP) 控制该病效果良好<sup>[15-17]</sup>。病毒检测是无病毒种质培育和弱毒株系筛选过程中一个重要环节。我国既是柑橘的发源地, 也是衰退病毒及其主要虫媒褐色橘蚜的发源地, 随着我国柑橘品种结构改革, 大力发展优质甜橙、柚类和杂柑, 以及无病毒苗木采用等高新技术的运用, 生产上急需一种快速、简便、灵敏而可靠地检测植物组织和单头蚜虫中柑橘衰退病毒的方法, 对更好控制 CTV 危害以及更深入研究 CTV 及其媒介关系至关重要。【前人研究进展】酶联免疫吸附分析虽成功检测出植物材料和媒介昆虫中 CTV, 但在检测媒介昆虫中 CTV 时, 灵敏度非常有限, 蚜虫数量超过二十头时才能获得阳性试验结果, 由于 CTV 在单头蚜虫体内的浓度低, 故血清学检测单头蚜虫非常困难<sup>[18]</sup>。近年来, 采用常规反转录多聚酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)<sup>[19]</sup>和印迹捕获或挤压捕获反转录聚合酶链式反应 (print capture/squash capture reverse transcription polymerase chain reaction, PC/SC-RT-

PCR) 已对单头蚜虫体内的 CTV 靶标成功检出<sup>[20]</sup>, 后一方法在 PCR 扩增之前, 勿需提取 RNA, 只需将植物材料或蚜虫挤压印迹到 3MM 滤纸上, 再经 Triton X-100 简单处理即可。【本研究切入点】中国尚无采用 PC/SC 结合巢式 PCR 对感病植物材料和单头带毒蚜虫中 CTV 进行简便、可靠的检测方法, 因此采用印迹或挤压捕获感病植物材料和单头带毒蚜虫中 CTV, 并结合巢式 PCR 是当前柑橘衰退病流行和防治研究的主要内容之一。【拟解决的关键问题】本研究采用 3MM 滤纸而非硝酸纤维素膜或尼龙膜印迹或挤压捕获感病植物材料和单头带毒蚜虫中 CTV, 并借助枪头尖端在 PCR 管中的物理分隔和巢式 PCR 内外引物退火温度之间的巨大差异, 以期进一步降低检测成本, 简化检测程序, 减少受污染的机率和提高灵敏度, 实现印迹或挤压捕获 CTV 病毒粒子的单管 RT-巢式-PCR 扩增, 为柑橘衰退病流行监测和综合防治提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试毒源和蚜虫

嫁接接种 CTV 的琯溪蜜柚植株保存在网室中备用。参照 Broadbent 等<sup>[21]</sup>的方法, 将获得的无毒褐色橘蚜在 CTV 感染的琯溪蜜柚上和健康的琯溪蜜柚上饲养一周后挤压印迹到 3MM Whaterman 滤纸上, 4℃ 保存备用。

### 1.2 RT-PCR

选取感病柚类植株叶片, 分别于 2008 年 7 月、10 月和 2009 年 1 月、3 月采用微量快速抽提总核酸的方法提取叶片总核酸<sup>[22]</sup>, 采用特异性引物 PEX1 和 PEX2 反转录 (引物序列见表)。反转录及 PCR 扩增方法在参照 Cambra 等<sup>[18]</sup>报道的基础上略作改进, 即在 5 μL 反转录体系中加入 1 μL RNA 模板, 分别加入 0.25 μL PEX1 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 PEX2 (10 μmol·L<sup>-1</sup>), 0.5 μL dNTPs (10 μmol·L<sup>-1</sup>), 0.15 μL RNA 酶抑制剂 (30 U·μL<sup>-1</sup>) 和 0.15 μL ReverTran Ace (10 U·μL<sup>-1</sup>), 1.7 μL ddH<sub>2</sub>O, 42℃ 反转录 30 min。后加入 2.5 μL 10×PCR buffer, 1 μL MgCl<sub>2</sub> (25 mmol·L<sup>-1</sup>), 分别加入 0.25 μL PEX1 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 PEX2 (10 μmol·L<sup>-1</sup>), 16.15 μL ddH<sub>2</sub>O, 0.35 μL Taq polymerase (5 U·μL<sup>-1</sup>)。PCR 反应条件: 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 1 min,

表 巢式聚合酶链式反应所用引物序列

Table The primers used in RT-nested -PCR to detect CTV

| 引物名称                 | 极性       | 引物序列                        | 结合位点         | 产物大小              |
|----------------------|----------|-----------------------------|--------------|-------------------|
| Name of primers      | Polarity | Primer sequence 5'-3'       | Binding site | Product size (bp) |
| PEX1 <sup>[18]</sup> | Reverse  | TAAACA ACA CACTCTA AGG      | 19190-19210  | 241               |
| PEX2 <sup>[18]</sup> | Forward  | CATCTGATTGAAGTGGAC          | 18970-18987  | 241               |
| PIN1 <sup>[18]</sup> | Reverse  | GGTTCACGCATACGTTAAGCCTCACTT | 19152-19178  | 132               |
| PIN2 <sup>[18]</sup> | Forward  | TATCACTAGACAATAACCGGATGGGTA | 19047-19073  | 132               |

完成 39 个循环，最后延伸 5 min。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳，在 1×缓冲液中 150 V 预电泳 10 min 后，100 V 电泳 40 min，EB (0.5 μg·mL<sup>-1</sup>) 染色后凝胶成像。

1.3 双管 RT 巢式 PCR

取 1 μL 核酸模板按 1.2 进行首轮 PCR 扩增，取其 1 μL 产物为第二轮巢式 PCR 扩增的模板，第二轮 PCR 扩增体系在参照 Cambra 等<sup>[10]</sup>报道的基础上进行改进。即 2.5 μL 10×PCR buffer，1 μL MgCl<sub>2</sub> (25 mmol·L<sup>-1</sup>)，分别加入 0.5 μL PEX1 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 PEX2 (10 μmol·L<sup>-1</sup>)，0.35 μL Taq polymerase (5 U·μL<sup>-1</sup>)，16.15 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应条件参照 Cambra 等<sup>[10]</sup>报道的进行，PCR 产物的电泳、染色及成像同 1.2。

1.4 单管 RT 巢式 PCR

选用相同 RNA 模板，经 1.2 所述反转录，向其中分别加反应混合物 I 到 PCR 管底部，加反应混合物 II 到内嵌的 200 μL 枪头尖端。94℃预变性 2 min，94℃变性 30 s，45℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，完成 16 个循环，最后延伸 5 min，取出 PCR 管 5 000 r/min 离心 20 s。接着完成 35 个循环的巢式 PCR 第二轮扩增。混合物 I 为 2.5 μL 10×PCR buffer，1 μL MgCl<sub>2</sub> (25 mmol·L<sup>-1</sup>)，0.25 μL PEX1 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 PEX2 (10 μmol·L<sup>-1</sup>)，0.35 μL Taq polymerase (5 U·μL<sup>-1</sup>)，16.65 μL ddH<sub>2</sub>O，混合物 II 为：10×PCR buffer 2.5 μL，1 μL MgCl<sub>2</sub> (25 mmol·L<sup>-1</sup>)，各 2 μL PIN1 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 PIN2 (10 μmol·L<sup>-1</sup>)，0.5 μL dNTPs (10 μmol·L<sup>-1</sup>)，0.4 μL Taq polymerase (5 U·μL<sup>-1</sup>)。PCR 条件除引物退火温度比 Cambra 等<sup>[18]</sup>报道的退火温度高 4℃以外，其余反应条件均与 Cambra 等报道的相同<sup>[18]</sup>。电泳、EB 染色和凝胶成像同前。

1.5 印迹捕获或挤压捕获巢式 PCR (PC/SC-RT 巢式 PCR)

以 CTV 感染的柚类植株叶片为材料，用一次性刀片横切叶柄，组织印迹捕获按 Olmos 等<sup>[23]</sup>和 Rowhani 等<sup>[24]</sup>报道的方法进行。在 CTV 感染的琯溪蜜柚上饲喂一周后的蚜虫处理参照 Olmos 等<sup>[23]</sup>中的方法进行。

印迹捕获或挤压捕获的 CTV 作为巢式模板之前，需将带有印迹的大小为 1 cm<sup>2</sup> 的滤纸剪下放入 0.5 mL 的 PCR 管中，向其中加入 ddH<sub>2</sub>O 和 0.5%的 Triton X-100，充分涡旋，冷冻离心，取 1 μL 变性，向其中加入 4 μL 反转录混合物，42℃反转录 30 min<sup>[25]</sup>，第一、二轮扩增及电泳、染色均与单管 RT 巢式 PCR 相同。

1.6 RT-PCR、单管 RT-巢式-PCR、单管巢式-PCR 和 PC-RT-巢式-PCR 检测灵敏度比较

采用健康柚叶片总核酸对 CTV 感染柚叶片总核酸按 1 : 10 的比例进行梯度稀释，后按照前面所述 RT-PCR 和单管 RT-巢式-PCR 方法进行检测。为进一步确定巢式-PCR 的检测灵敏度，将以外引物 PEX1 和 PEX2 扩增获得的 241 bp 片段，经 Biospin Gel Extraction Kit 试剂盒回收，并将其连接到 pMD18-T 载体上，转化 *Escherichia coli* DH5α 获得阳性克隆，测序并按照 E.Z.N.A.TM Plasmid Min Kit I 说明书提取质粒，稀释 100 倍后测其浓度，取其三次重复的均值作为起始质粒模板浓度，再用灭菌的超纯水按 1 : 10 的比例梯度稀释起始质粒模板 (CTV 质粒浓度为 44 μg·mL<sup>-1</sup>，A260 为 0.0087，稀释 100 倍后作为梯度稀释的起始模板，其拷贝数计算方法为： $6.02 \times 10^{23} \times 0.044 \times 10^{-6} / [(2692 + 241) \times 330 \times 2] = 1.37 \times 10^8$  copies·μL<sup>-1</sup>，巢式 PCR 的检测限为起始拷贝数×最大稀释倍数)。选用 CTV 感染的柚叶叶柄在 1 cm<sup>2</sup> 大小的 3MM 滤纸上轻轻挤压 1 个印迹，并用健康柚叶叶柄在同一大小的滤纸上按序数次印迹稀释，直至稀释到 17 倍。并用健康柚叶叶柄在 1 cm<sup>2</sup> 大小的 3MM 滤纸上印迹作为阴性对照。

2 结果

2.1 RT-PCR、RT-巢式-PCR 和 PC-RT-巢式-PCR 检测感染 CTV 四年以上柚的带毒情况

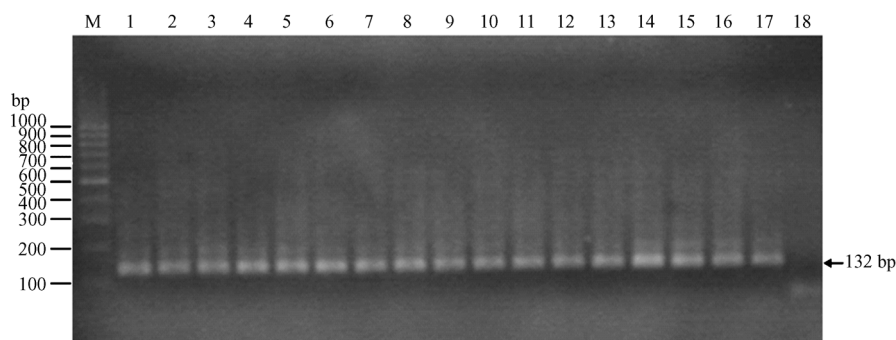
不同生长季节采集 2004 年嫁接保存在中国农科院柑橘研究所网室内的 CTV 染病柚 59 份，经 RT-PCR、RT-巢式-PCR 和 PC-RT-巢式-PCR 检测，结

果表明,除 2008 年 7 月经 RT-PCR 检测的 12 株菊花心沙田柚中,有一株没检测到外,其余全为 100%检出率。三种方法在检测同一批样品时,其结果基本一致。若选用 CTV 高度保守的 3'UTR 作为靶标,采用 RT-巢式-PCR 和 PC-RT-巢式-PCR 检测,无论春夏秋冬检出率均为 100%,检出率比普通 RT-PCR 高,而且不受采样季节的限制,结果非常可靠;若采用 PC-RT-巢式-PCR 检测,样品制备更为简单、可以有效降低植物源抑制 PCR 扩增的抑制剂的释放,成本也

低廉,适合于不同季节大量田间样品的检测。

## 2.2 挤压捕获巢式聚合酶链式反应检测饲喂蚜虫体内 CTV 的带毒情况

用 PCR 管底部将单头获毒无翅褐色橘蚜挤压到 1 cm<sup>2</sup> 的 3MM 滤纸上,并以健康植株上饲喂的无翅胎生蚜虫作阴性对照,进行 SC-RT-巢式-PCR 检测,结果除在健康琯溪蜜柚上饲喂的蚜虫未检测到目标条带外,其余在感病琯溪蜜柚上饲喂的蚜虫体内都获得 132 bp 的目标片段(图 1)。



1: 选用 CTV 感染的琯溪蜜柚叶柄印迹作为阳性对照; 18: 健康琯溪蜜柚上饲喂一周的蚜虫印迹作为阴性对照; 2—17: CTV 感染的琯溪蜜柚上饲喂一周的蚜虫印迹样品; M 为 100 bp 梯度分子量标准

Lane 1 is imprint of petiole of CTV-infected Guanxi pummelo as positive control; lane 18 is imprint of aphid fed on CTV-uninfected Guanxi pummelo as negative control; lane 2 to 17 are the imprints of aphids fed on CTV-infected Guanxi pummelo; M is 100 bp ladder marker

图 1 挤压印迹反转录巢式多聚酶链式反应检测结果

Fig. 1 The detection results of SC-RT-nested-PCR

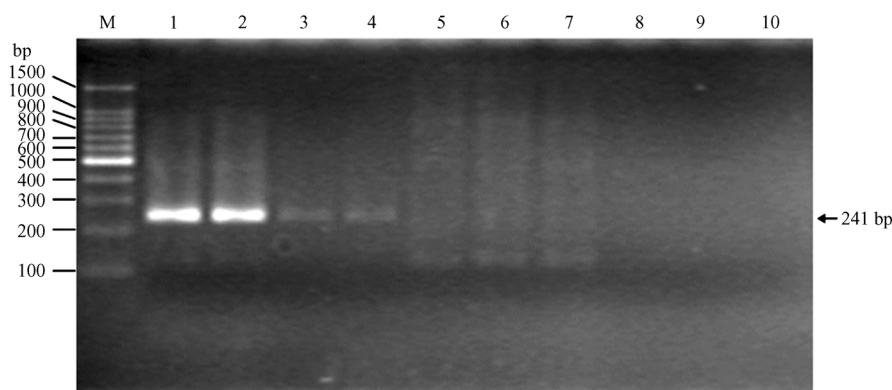
## 2.3 RT-PCR、单管 RT-巢式-PCR、单管巢式-PCR 和 PC-RT-巢式-PCR 检测灵敏度比较

对感染 CTV 的柚植株叶片总核酸用健康柚植株叶片总核酸按 1 : 10 比例进行等比稀释后,进行 RT-PCR 检测,结果表明,当病株总核酸稀释到 10<sup>3</sup> 倍以上时,检测不到 241 bp 目标带(图 2)。对模板采用相同处理后进行单管 RT-巢式-PCR 检测,结果病株总核酸稀释到 10<sup>5</sup> 倍时仍能检测出 132 bp 目标片段(图 3)。选用巢式 PCR 的外引物进行 RT-PCR 扩增,回收克隆该片段,选其阳性克隆抽其质粒用作巢式 PCR 扩增的标准模板,用灭菌超纯水按 1 : 10 的比例等比稀释后,进行单管巢式 PCR 检测,结果表明,单管巢式-PCR 的检测灵敏度为 10<sup>-7</sup> (图 4),达到 13—14 拷贝·μL<sup>-1</sup>。选用 CTV 感染的琯溪蜜柚叶柄在 1 cm<sup>2</sup> 大小的 3MM 滤纸上轻轻按下 1 个印迹,并用健康琯溪蜜柚叶柄在同一滤纸片上按序数次印迹稀释,直至稀释到 17 倍。用健康柚叶柄在 1 cm<sup>2</sup> 大小的 3MM 滤纸上印迹作为阴性对照。结果印迹稀释到 10 倍以上

时没有得到 132 bp 目标片段(图 5),这与 Cambra 等<sup>[18]</sup>研究甜橙的结果稍有出入。

## 3 讨论

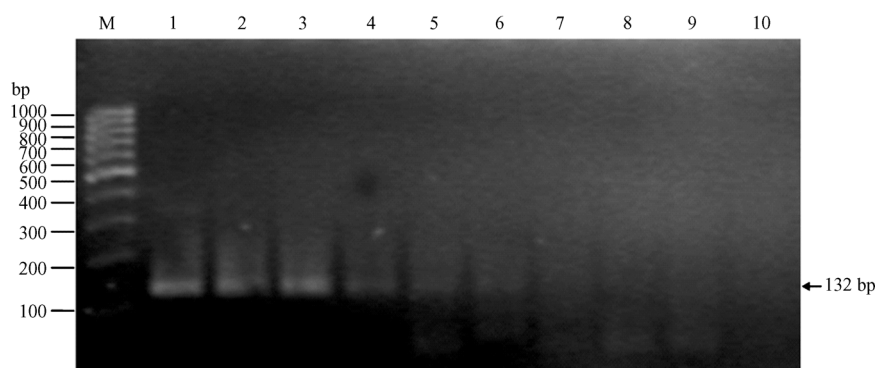
本研究采用三种方法检测柚株 CTV 感染状态,采用 RT-巢式-PCR 和 PC-RT-巢式-PCR 检测,无论采样季节和品种如何,检出率均为 100%;在夏天采用 RT-PCR 检测 CTV 感染的 12 株菊花心沙田柚时,却有一株未曾检出,这可能缘于 CTV 在个别柚株中含量相对较低和普通 RT-PCR 不够灵敏。采用单管 RT-巢式-PCR 和印迹捕获单管 RT-巢式-PCR 检测 59 株不同品种的柚株,两者检测结果高度一致,均为 100%检出率。单管 RT-巢式-PCR 检测方法简便,能一次性将巢式 PCR 反应的两轮试剂,加入到一个内嵌 2 cm 长的枪头尖端的 PCR 管中,减少了被污染的机率。借助短暂的低速离心,使第一轮 PCR 扩增的产物能够与第二轮扩增的试剂接触。充分利用内外引物退火温度的巨大差异,使单管 RT-巢式-PCR 在第二轮 PCR 产物



1: 未经稀释的 CTV 感染琯溪蜜柚叶片的总核酸的 RT-PCR 模板; 2—10 分别为 CTV 感染琯溪蜜柚叶片总核酸经  $10^1$ 、 $10^2$ ... $10^9$  倍的健康琯溪蜜柚叶片总核酸稀释后作为 RT-PCR 模板; M 为 100 bp 梯度分子量标准

Lane 1 is the total RNA of leaf CTV-infected Guanxi pummelo as templates of RT-PCR; lane 2 to 10 are the total RNA of leaves CTV-infected Guanxi pummelo diluted with the total RNA of leaves CTV-uninfected Guanxi pummelo by  $10^1$ ,  $10^2$ ... $10^9$  folds as the templates of RT-PCR; M is 100 bp ladder marker

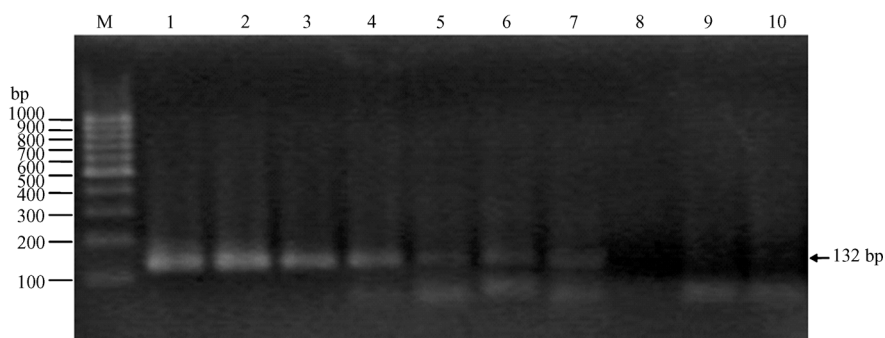
图 2 反转录多聚酶链式反应检测的检测灵敏度  
Fig. 2 The sensitivity of CTV detection by RT-PCR



1: 未经稀释的 CTV 感染琯溪蜜柚叶片总核酸的 RT-nested-PCR 模板; 2—10: 分别为 CTV 感染琯溪蜜柚叶片的总核酸经  $10^1$ 、 $10^2$ ... $10^9$  倍的健康琯溪蜜柚叶片总核酸稀释后分别作为 RT-nested-PCR 模板; M 为 100 bp 梯度分子量标准

Lane 1 is the total RNA of leaf CTV-nested-infected Guanxi pummelo as templates of RT-PCR; lane 2 to 10 are the total RNA of leaves CTV-infected Guanxi pummelo diluted with the total RNA of leaves CTV-uninfected Guanxi pummelo by  $10^1$ ,  $10^2$ ... $10^9$  folds respectively as the templates of RT-nested-PCR; M is 100 bp ladder marker

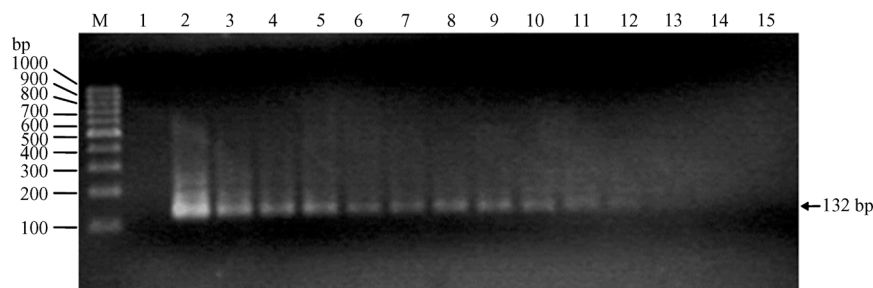
图 3 反转录巢式多聚酶链式反应检测检测灵敏度  
Fig. 3 The sensitivity of CTV detection by RT-nested-PCR



1—10: 分别为起始浓度为  $0.044 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 CTV 阳性克隆质粒经  $10^1$ 、 $10^2$ ... $10^{10}$  倍的灭菌超纯水稀释后分别作为巢式 PCR 反应的模板; M 为 100 bp 梯度分子量标准

Lane 1 to 10 are the plasmids of CTV partial fragment inserted clone with  $0.044 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  initially diluted with autoclave distilled water by  $10^1$ ,  $10^2$ ... $10^{10}$  folds respectively as the templates of nested-PCR; M is 100 bp ladder marker

图 4 单管巢式多聚酶链式反应检测检测灵敏度  
Fig. 4 The sensitivity of CTV detection by nested-PCR in one Eppendorf tube



1: 为阴性对照; 2: 未经稀释的 CTV 感染琯溪蜜柚叶柄印迹作为巢式 PCR 反应的模板; 3—15: CTV 感染的琯溪蜜柚叶柄印迹经 1、2、3...14 倍的 CTV 健康的琯溪蜜柚叶柄印迹稀释后的印迹作为巢式 PCR 反应模板; M 为 100 bp 梯度分子量标准

Lane 1 is negative control; lane 2 is the imprint of petiole of leaf CTV-infected Guanxi pummelo as the templates of RT-nested-PCR; lane 3 to 15 are the imprints of petioles of leaves CTV-uninfected Guanxi pummelo diluted with the imprints of petioles of leaves CTV-infected Guanxi pummelo by 1, 2, 3...14 folds as the templates of RT-nested-PCR; M is 100 bp ladder marker

图 5 组织印迹捕获反转录巢式聚合酶链式反应检测灵敏度

Fig. 5 The sensitivity of CTV detection by PC-RT-nested-PCR

扩增的同时, 第一轮 PCR 产物不能得到有效扩增。在单管 RT-巢式-PCR 检测时有意识地将第二轮 PCR 扩增的退火温度提高到 64℃, 比报道的退火温度高 4℃, 并且采取降低 PEX1 和 PEX2 的用量, 提高内引物 PIN1 和 PIN2 的用量, 把第一轮 PCR 扩增的循环数由 Cambra 等<sup>[10]</sup>报道的 20 个循环减少至 16 个循环, 有效避免第一轮 PCR 产物在电泳时对第二轮 PCR 产物的干扰, 结果经单管 RT-巢式-PCR 扩增后, 其电泳谱带为 132 bp 的单一谱带。RT-巢式-PCR 检测通过内外两对引物的两轮扩增, 大大提高了检测灵敏度, 比普通 RT-PCR 灵敏 100 倍, 检出率高, 检测结果准确可靠。单管 RT-巢式-PCR 扩增方法若结合印迹或挤压捕获植物组织或单头蚜虫体内的 CTV 病毒粒子, 然后通过 Trixton X-100 裂解释放病毒粒子中的 RNA, 即可对植物组织和单头蚜虫体内的 CTV 进行灵敏而可靠的分子检测。

普通 RT-PCR 和 RT-nested-PCR 从总 RNA 提取前准备到提取出样品的总 RNA (采用快速的微量抽提) 至少需要 6 h<sup>[22]</sup>, 而采用 PC-RT-nested-PCR 方法仅仅需要对 PCR 管进行灭菌处理和对样品短暂的印迹处理, 最多需时 2 h, 比以总 RNA 为模板的 RT-PCR 和 RT-nested-PCR 节约 4 h, 大大缩短了样品处理的时间, 而且样品制备简单, 并能有效降低植物源抑制 PCR 扩增的抑制剂的释放。普通 RT-PCR 虽说比巢式 PCR 节约 2 h, 但它存在灵敏度不够高的局限, 而且完成以总 RNA 为模板的普通 RT-PCR 所需时间依然要比 PC-RT-nested-PCR 多出约 2 h。总之本文所采用的三种方法以 PC-RT-nested-PCR 耗时最少, 其检出率与 RT-nested-PCR 高度一致。最重要的是该方法不需要额外的仪器设备, 能够做普通 PCR 的实验室均可采用

该方法进行研究, 且易于掌握, 具有普遍推广应用价值。

Cambra 等<sup>[10]</sup>于 2000 年采用 PC-RT-巢式-PCR 方法对甜橙植株中的 CTV 进行检测, 结果发现感病甜橙叶的印迹经健康甜橙叶印迹稀释 15 倍时依然能稳定检测出植物材料中的 CTV, 印迹稀释至 20 倍时检测不出 CTV。本研究采用同样的方法印迹稀释感病柚, 结果印迹稀释超过 10 倍以上就得不到阳性结果, 可能与柚类植株中 CTV 粒子浓度比甜橙类植株中 CTV 粒子浓度低有关。采用 PC-RT-巢式-PCR 或 SC-RT-巢式-PCR 方法对深入研究 CTV 与蚜虫和寄主之间的互作关系更为有效。

## 4 结论

本文报道的 PC/SC 结合单管-RT-巢式-PCR 具有制样简单, 无需核酸提取, 能有效降低植物源抑制 PCR 扩增的抑制剂的释放和灵敏度高优点, 为深入研究 CTV 蚜传机理和弱毒株系交叉保护机理奠定了方法基础。

## References

- [1] 王洪祥. 蚜虫与柑桔衰退病的流行. 江西柑桔科技, 1993(1): 16-24.  
Wang H X. The relationship of aphids to epidemics of citrus tristeza diseases. *Citrus Science and Technology in Jiangxi Province*, 1993(1): 16-24. (in Chinese)
- [2] Yokomi R K, Tang Y Q. A survey of parasitoids of brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Puerto Rico. *Biological Control*, 1996, 6: 222-225.
- [3] Powell C A, Pelosi R R, Rundell P A, Cohen M. Breakdown of cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of *Citrus tristeza virus* following introduction of the brown citrus aphid. *Plant*

- Disease*, 2003, 87(9): 1116-1118.
- [4] Brown L G, Denmark H A, Yokomi R K. *Citrus tristeza virus* and its vectors in Florida. *Plant Pathology Circular*, 1988, 311.
- [5] Herron C M, Mirkov T E, da Graca J V, Lee R F. *Citrus tristeza virus* transmission by the *Toxoptera citricida* vector: *in vitro* acquisition and transmission and infectivity immunoneutralization experiments. *Journal of Virological Methods*, 2006, 134: 205-211.
- [6] Michaud J P, Belliure B. Consequences of foundress aggregation in the brown citrus aphid *Toxoptera citricida*. *Ecological Entomology*, 2000, 25: 307-314.
- [7] Wang J J, Tsai J H. Development and functional response of *Coelophora inaequalis* (Coleoptera: Coccinellidae) feeding on brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae). *Agricultural and Forest Entomology*, 2001, 3: 65-69.
- [8] Michaud J P. Development and reproduction of ladybeetles (Coleoptera: Coccinellidae) on the citrus aphids *Aphis spiraecola* patch and *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). *Biological Control*, 2000, 18: 287-297.
- [9] Marroquín C, Olmos A, Gorris M T, Bertolini E, Martínez M C, Carbonell E A, de Mendoza A H, Cambra M. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research*, 2004, 100: 101-108.
- [10] Cambra M, Gorris M T, Marroquín C, Román M P, Olmos A, Martínez M C, de Mendoza A H, López A, Navarro L. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Research*, 2000, 71: 85-95.
- [11] Nolasco G, Fonseca F, Silva G. Occurrence of genetic bottlenecks during *Citrus tristeza virus* acquisition by *Toxoptera citricida* under field conditions. *Archives of Virology*, 2008, 153: 259-271.
- [12] Herron C M, Mirkov T E, Solís-Gracia N, Kahlke C J, Skaria M, da Graca J V. Severity of *Citrus tristeza virus* isolates from Texas. *Plant Disease*, 2005, 89: 575-580.
- [13] Moreno P, Ambrós S, Albiach-Martí M R, Guerri J, Pena L. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(2): 251-268.
- [14] 林允剑, 谢联辉, Powell C A. 橘蚜传播柑橘衰退病毒的研究进展. 福建农业大学学报, 2001, 30(1): 59-66.
- Lin Y J, Xie L H, Powell C A. Advance in *Citrus tristeza virus* transmission by brown citrus aphids. *Journal of Fujian Agricultural University*, 2001, 30(1): 59-66. (in Chinese)
- [15] Broadbent P, Bevington K B, Coote B G. Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection. Fifteenth International Organization Citrus Virologists Conference, California, America, 1991: 64-70.
- [16] Müller G W. Use of mild strain of *Citrus tristeza virus*(CTV) to reestablish commercial production of 'pera' sweet orange in Sao Paulo, Brazil. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 1980, 93: 62-64.
- [17] Van Vuurens S P, Collins R P, Da Graça J V. Evaluation of *Citrus tristeza virus* isolates for cross protection of grapefruit in South Africa, *Plant Disease*, 1993, 77(1): 24-28.
- [18] Cambra M, Olmos A, Gorris M T, Marroquín C, Esteban O, Garnsey S M, Llauger R, Batista L, Pena I, de Mendoza A H. Detection of *Citrus tristeza virus* by print capture and squash capture-PCR in plant tissues and single aphids. Fourteenth International Organization Citrus Virologists Conference, California, America, 2000: 42-49.
- [19] Mehta P, Brilansky R H, Gowda S. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of *Citrus tristeza virus* in aphids. *Plant Disease*, 1997, 81(9): 1066-1069.
- [20] Cambra M, Gorris M T, Olmos A, Martínez M C, Román M P, Bertolini E, López A, Carbonell E A. European diagnostic protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. Fifteenth International Organization Citrus Virologists Conference, California, America, 2002: 69-77.
- [21] Broadbent P, Brilansky R H, Indsto J. Biological characterization of Australia isolates of *Citrus tristeza virus* and separation of subisolates by single aphid transmission. *Plant Disease*, 1996, 80: 329-333.
- [22] 周常勇, Hailstones D, Connor R, Rarkley P, Bowyer J. 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. 福建农业大学学报, 2001, 30(增刊): 200.
- Zhou C Y, Hailstones D, Connor R, Rarkley P, Bowyer J. A method for micro and rapid extraction of *Citrus tristeza virus* (CTV) nucleic acid applied to RT-PCR amplification. *Journal of Fujian Agricultural University*, 2001, 30(Suppl.): 200. (in Chinese)
- [23] Olmos A, Dasí M A, Candresse T, Cambra M. Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of *Plum pox virus* (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(11): 2192-2193.
- [24] Rowhani A, Maningas M A, Lile L S, Daubert S D, Golino D A. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 1995, 85(3): 347-352.
- [25] Langridge U, Schwall M, Langridge A P. Squashes of plant tissue as substrate for PCR. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(24): 6954.

(责任编辑 岳梅)