

柑桔衰退病毒在 3 种寄主不同组织中分布的研究初报*

刘科宏, 周彦, 王雪峰, 唐科志, 周常勇

(中国农业科学院 柑桔研究所, 重庆 北碚 400712)

[摘要] 应用直接组织点免疫(DTBIA)和反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR), 对接种了柑桔衰退病毒(CTV)的 3 组共 45 株锦橙、凤凰柚和枳柑进行了检测, 结果表明, CTV 在嫩枝中的检出率最高, 其次依次是嫩叶、老枝和老叶。

[关键词] 柑桔衰退病毒; 寄主; 组织分布; 直接组织点免疫; 反转录-聚合酶链式反应

[中图分类号] S436.661.1⁺9 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2005)S0-0109-02

柑桔衰退病毒(Citrus tristeza virus, CTV)引起的柑桔衰退病是一种重要的柑桔病害, 其广泛分布于世界各柑桔产区, 严重威胁着以酸橙作砧木的柑桔品种和对 CTV 茎陷点株系敏感的葡萄、柚类和甜橙的安全。从上世纪 30 年代以来, 在巴西、西班牙、加利福尼亚、佛罗里达等国家和地区有超过 1 亿株的柑桔因感染 CTV 而死亡^[1]。柑桔衰退病在我国也广泛分布, 在川渝、湖广、江浙等地均有发生的报道, 并且随着柑桔产业结构调整的深入, CTV 在我国危害日益严重^[2]。国外的防治经验表明, 弱毒株交叉保护(MSCP)技术是目前最有效的防治手段^[3]。为了提高 MSCP 的效果, 需要了解 CTV 在田间和植株中的分布, 本研究运用直接组织点免疫(DTBIA)和反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术来了解 CTV 在不同寄主中的分布, 以期为今后进行田间普查和应用 MSCP 防治柑桔衰退病提供参考。

1 材料与方法

将 CTV 毒源 CT4 分别接种在 1 年生锦橙、凤凰柚和枳柑的嫁接苗上, 每种寄主进行 15 个重复, 在每株植株上接种 3 块带毒源的接穗, 接种后在网室中保存。接种 1 个月后, 按植株的 4 个方向, 参照 Garnsey 等^[4]的方法分别对植株的嫩枝、嫩叶、老枝、老叶进行 DTBIA 检测, 检测为阴性的样品, 参照周常勇等^[5]的方法提取总核酸, 并按 Gillings 等^[6]的方法进行 RT-PCR 检测。每月检测 1 次, 连续检测 3 个月。

2 结果与分析

从表 1 可以看出, 在 3 类检测样品中, 凤凰柚的检出率最低, 在接种后 1 个月和 2 个月分别只有 4 株和 11 株检测出有 CTV 感染; 锦橙的检出率最高, 在接种后 1 个月有 14 株检测为阳性。接种 3 个月所有样品均能检测出 CTV。

表 1 接种 CTV 1~3 个月时 DTBIA 与 RT-PCR 的检测结果

Table 1 Results of examination by DTBIA and RT-PCR

株

品种 Variety	组织部位 Part	1 个月检出率/ % Tested ratio by the 1st month					2 个月检出率/ % Tested ratio by the 2nd month					3 个月检出率/ % Tested ratio by the 3rd month				
		100	75	50	25	0	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0
		锦橙 Jingcheng	嫩枝 Yongstem	10	3		1	1	123				15			
	嫩叶 Yongstem	8	4	1		2	10	5				15				
	老枝 Oldstem	3	5	1	1	5	5	8	11		7	8				
	老叶 Oldleaf				1				14		1		14		1 1 13	

* [收稿日期] 2005-07-08

[作者简介] 刘科宏(1978-), 女, 重庆北碚人, 主要从事柑桔病毒病害研究。

[通讯作者] 周常勇(1965-), 男, 湖南安仁人, 研究员, 博士生导师, 主要从事柑桔病毒病害研究。

续表 1 Continued Table 1

品种 Variety	组织部位 Part	1 个月检出率/ %					2 个月检出率/ %					3 个月检出率/ %				
		Tested ratio by the 1st month					Tested ratio by the 2nd month					Tested ratio by the 3rd month				
		100	75	50	25	0	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0
枳柑 Ponkan	嫩枝 Young stem	9	4		1	1	10	5				15				
	嫩叶 Young leaf	9	5			1	9	5	1		15					
	老枝 Old stem	4	3	1	2	5	4	4	6	1	6	6	2	1		
	老叶 Old leaf					3				3	12				3	12
凤凰柚 Fenghuang-you	嫩枝 Young stem	1	2		1	11	4	5	1	1	4	8	6		1	
	嫩叶 Young leaf		1	1		13		2	3	1	9	8	4	1	2	
	老枝 Old stem					3	12	1	1	3	10	3	6	2	4	
	老叶 Old leaf						15				15					15

注:对植株的嫩枝、嫩叶、老枝和老叶均从 4 个方向进行检测,在 4、3、2 和 1 个方向能检测出 CTV 的,检出率分别用 100%、75%、50% 和 25% 表示;4 个方向都不能检测出 CTV 则检测率为 0。

Note: The samples of young stem, young leaf, old stem and old leaf were collected from four directions of the three varieties. If four, three, two or one sample is presented positively, the frequency of positivity correspondingly counts 100%, 75%, 50% and 25%; If none is presented positively, the frequency of positivity counts 0%.

另外,由表 1 还可以看出,在同一柑桔品种中,嫩枝的检出率最高,其余依次是嫩叶、老枝、老叶。

3 讨论

本研究通过对 3 个柑桔品种接种 CTV 后的检测,初步表明由于存在品种差异性,柚类在接种 3 个月后才具有较高的 CTV 检出率。另外,嫩叶和嫩枝的

CTV 检出率要显著高于老叶和老枝,这可能是由于 CTV 经韧皮部传播而更容易进入幼嫩组织的缘故。在 DTBIA 结果的判断上,嫩叶和嫩枝的印迹深于老叶和老枝,这表明 CTV 在嫩叶和嫩枝中的含量要高于老叶和老枝。因此,今后在检测 CTV 时,应尽可能在嫩叶和嫩枝上进行取样。本研究结果将为今后柑桔衰退病的检测和防治工作提供参考。

[参考文献]

- [1] Bar-Joseph M, Marcus R, Lee R F. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control[J]. Annual Review Phytopathology, 1989, 27: 291-316.
- [2] Zhou Chang-yong, Zhao Xue-Yuan, Jiang Yuan-hui, et al. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates infecting pummelo and sweet orange in Sichuan province, China[A]. In Proc. 13th Conference of the International Organization of Citrus Virus[C]. Riverside: IOCV, 1996. 78-82.
- [3] Souza A A, Muller G W, Targon M L P N, et al. Stability of the mild protective 'PIAC' isolate of *Citrus tristeza virus*[A]. Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virus[C]. Riverside: IOCV, 2002. 131-135.
- [4] Garnsey S M, Permar T A, Camber M, et al. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV)[A]. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virus[C]. Riverside: IOCV, 1993. 39-50.
- [5] 周常勇, Deborah H, Rachael C, et al. 一种微量、快速抽提柑桔衰退病毒(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.
- [6] Gilling S M, Broadbent P, Indsto J, et al. Characterization of isolates and strains of *Citrus tristeza virus* using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction[J]. Journal of Virological Methods, 1993, 44: 305-317.

Distribution of *Citrus tristeza virus* among three hosts in different tissues

LIU Ke-hong, ZHOU Yan, WANG Xue-feng, TANG Ke-zhi, ZHOU Chang-yong

(Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beibei, Chongqing 400712, China)

Abstract: A comparative study was made of Jincheng, Ponkan and Fenghuang-you which were graft-inoculated with CTV. Examinations of CTV distribution in the hosts' different tissues using DTBIA and RT-PCR showed that from the highest frequency of positivity to the lowest were young stem, young leaf, old stem and old leaf.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

Key words: *Citrus tristeza virus*; host; distribution in tissue; DTBIA; RT-PCR