

柑橘褪绿矮缩病毒实时荧光定量PCR检测体系的建立与应用

Establishment and application of a quantitative PCR assay for the detection of Citrus chlorotic dwarf-associated virus

王瑛丽¹ 王 琴¹ 刘莹洁¹ 杨 真¹ 李雪燕² 周 彦^{1*}

(1. 西南大学柑桔研究所, 重庆 400712; 2. 重庆市农业信息中心, 重庆 400015)

Wang Yingli¹ Wang Qin¹ Liu Yingjie¹ Yang Zhen¹ Li Xueyan² Zhou Yan^{1*}

(1. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China; 2. Chongqing Agricultural Information Center, Chongqing 400015, China)

柑橘褪绿矮缩病是一种新发生的危险性病害,自20世纪80年代在土耳其被发现以来,已成为该地区柑橘上最严重的病害(Loconsole et al., 2012)。近年来该病在我国云南省也有发生(Guo et al., 2015; Zhou et al., 2017)。该病可危害大多数柑橘种类,仅甜橙有一定抗病性,在敏感品种上可引起植株叶片变形、扭曲、花叶、节间变短等症状,造成果实变小,产量降低,其病原为柑橘褪绿矮缩病毒(Citrus chlorotic dwarf-associated virus, CCDaV),主要通过嫁接和杨梅类伯粉虱 *Parabemisia myricae* 传播(Loconsole et al., 2012)。目前尚无能有效防治柑橘褪绿矮化病的药剂,使用无病毒苗木和加强病毒检测是防治该病的关键。因此,本研究拟建立CCDaV的实时荧光定量PCR(qPCR)检测体系,以期在生产中快速、灵敏、特异地检测CCDaV。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:感染CCDaV、柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)、柑橘黄化脉明病毒(*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV)、柑橘碎叶病毒(*Citrus tatter leaf virus*, CTLV)、柑橘裂皮病类病毒(*Citrus exocortis viroid*, CEVd)、柑橘鳞皮病毒(*Citrus psorosis virus*, CPV)、温州蜜柑萎缩病毒(*Satsuma dwarf virus*, SDV)的柑橘病株和2年生西蒙斯甜橙、墨西哥莱檬、强德勒柚、红橘、粗柠檬和邓肯葡萄柚实生苗健康植株,均由西南大学柑桔研究所脱毒中心提供,保存于20~25℃温室中。此外,在四川、重庆、贵州、广西、浙江、云南6个省(自治区、市)采集了83份柑橘属疑似发病叶片供试。

试剂及仪器:Go Taq qPCR Master Mix、pGEM-T

Easy Vector, 美国Promega公司; 2×Taq Master Mix, 中国Novoprotein公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞JM109, 日本TaKaRa公司。i-Cycler iQ qPCR仪, 美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

qPCR体系的建立:根据CCDaV分离株YN-EL4(KX840470)外壳蛋白的保守序列,使用Primer Explorer 5.0设计5对特异性引物EL4-F1(5'-GGAG-AAAGTCGAGCAAAG-3')/EL4-R1(5'-CTCATCA-CCTCGGTCAATA-3')、EL4-F2(5'-AAAGAAGCC-CAAGATTGC-3')/EL4-R2(5'-CTCATCACCTCG-GTCAATA-3')、EL4-F3(5'-CTACAGGGACAGGT-TTATTG-3')/EL4-R3(5'-TCCAAGTCAAGCTCG-TCA-3')、EL4-F4(5'-CTACAGGGACAGGTTTAT-TG-3')/EL4-R4(5'-ACAGACCCACCGTCCTCA-3')以及EL4-F5(5'-CAGGAGAAAGTCGAGCAA-3')/EL4-R5(5'-CGCCCATCGTGATAAATAG-3')用于引物筛选,引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。以CTAB法提取CCDaV阳性样品的总DNA为模板(Zhou et al., 2017)。20 μL qPCR反应体系:模板2 μL、Go Taq qPCR Master Mix 10 μL、10 μmol/L上下游引物每次使用1对(分别设置0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μL共5个引物浓度),超纯水补足至20 μL。扩增条件:95℃预变性5 min; 95℃变性15 s, 退火30 s(分别设60.0、59.5、58.3、56.4、53.9、52.1、50.8、50.0℃共8个退火温度), 72℃延伸30 s, 40个循环。以溶解曲线峰单一且C_t值小为标准,筛选最佳引物浓度及最佳退火温度。

qPCR体系的评价:分别从感染CCDaV、CTV、CYVCV、CTLV、CEVd、CPV、SDV的病株中提取总

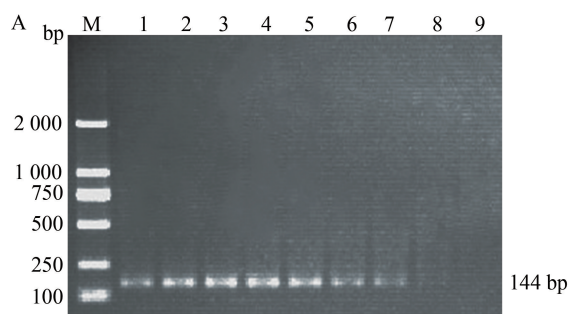
DNA 或总 RNA 为模板,利用建立的 CCDaV qPCR 体系进行检测,评估其特异性。CCDaV 的扩增产物纯化后插入 pMD-19T 载体,并转化感受态细胞 JM109,测得获得的质粒浓度为 4×10^{10} 拷贝/ μL 。以 10 倍梯度稀释后的 $4 \times 10^1 \sim 4 \times 10^9$ 拷贝/ μL 质粒为模板,运用常规 PCR 法和所建 qPCR 法平行进行 CCDaV 检测,评价其灵敏度。20 μL 常规 PCR 反应体系:模板 2 μL 、2 $\times$ Taq Master Mix 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物 EL4-F4/EL4-R4 各 0.4 μL 、超纯水补足至 20 μL 。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。同时,以 $4 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$ 拷贝/ μL 的质粒作模板,在同一批次的 3 个重复内以及 3 个不同批次间进行 qPCR 重复检测,评价其重复性。

田间样品检测:将 CCDaV 通过嫁接的方法接种于西蒙斯甜橙、墨西哥莱檬、强德勒柚、红橘、粗柠檬、邓肯葡萄柚,接种后 1、2、3 个月分别应用常规 PCR 法和所建 qPCR 法进行检测,并检测采集的 83 份田间样品是否携带 CCDaV,以验证所建 qPCR 体系的实际应用效果。常规 PCR 反应体系及程序同上。

2 结果与分析

2.1 qPCR 检测体系的建立

当特异性引物 EL4-F4/EL4-R4 各为 0.4 μL 、退



火温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,熔解曲线呈单峰,且扩增效果最佳。此时的扩增效率为 98.9%,相关系数为 0.994,扩增产物为 144 bp,与 YN-EL4(KX840470)相应序列的同源性为 100%,确定扩增片段来自于 CCDaV。

2.2 qPCR 检测体系的评价

只有 CCDaV 样品有明显的扩增曲线,且熔解曲线为单一峰,其它病毒样品的荧光信号均无增加,说明建立的 qPCR 方法特异性强,只能检测出 CCDaV。灵敏度比较显示,qPCR 法和常规 PCR 法可检测质粒的最低浓度分别为 4×10^1 拷贝/ μL 和 4×10^3 拷贝/ μL ,qPCR 法较常规 PCR 法灵敏度提高了 100 倍(图 1)。此外,qPCR 法检测的组内重复的最大变异系数为 2.26%,组间重复的最大变异系数为 2.13%,表明建立的 qPCR 体系具有较好的重复性。

2.3 田间样品检测结果

嫁接接种 1 个月后,常规 PCR 法在西蒙斯甜橙、墨西哥莱檬、强德勒柚、红橘、粗柠檬和邓肯葡萄柚中均未检测到 CCDaV,qPCR 法在所有接种植株上均检测出了 CCDaV。嫁接接种 3 个月后,常规 PCR 法和 qPCR 法在上述品种中均可检测到 CCDaV。此外,检测的田间样品中仅有 2 份采自云南省的柠檬样品检测到 CCDaV。qPCR 法检测结果与常规 PCR 法一致,表明该体系具有良好的适用性。

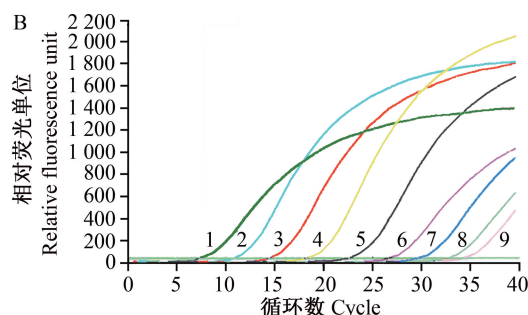


图 1 常规 PCR 法(A)和 qPCR 法(B)对柑橘褪绿矮缩病毒的检测灵敏度比较

Fig. 1 Comparison of the sensitivity of common PCR (A) and qPCR (B) for CCDaV detection

M: DNA marker. 1~9: $4 \times 10^9 \sim 4 \times 10^1$ 拷贝/ μL 的质粒。1~9: The plasmid of $4 \times 10^9 \sim 4 \times 10^1$ copies/ μL .

3 讨论

本试验针对 CCDaV 建立的 qPCR 检测方法操作简便、特异性强且重复性好,与常规 PCR 法相比,其灵敏度提高了 100 倍,检测的“窗口期”缩短了 2 个月,更适用于低浓度 CCDaV 样品的检测。虽然目前 CCDaV 在田间的发生率不高,但是杨梅类伯粉虱在我国分布广泛(Zhou et al., 2017),因此加强 CCDaV 的监测十分重要。本试验所建立的 CCDaV 的 qPCR 检测方法将为柑橘褪绿矮化病的大规模检测、流行监控,以及无病毒苗木生产提供重要的技术支撑。

参考文献 (References)

- Guo J, Lai XP, Li JX, Yue JQ, Zhang SY, Li YY, Gao JY, Wang ZR, Duan HF, Yang JD. 2015. First report on citrus chlorotic dwarf associated virus on lemon in Dehong Prefecture, Yunnan, China. *Plant Disease*, 99(9): 1287
- Loconsole G, Saldarelli P, Doddapaneni H, Savino V, Martelli GP, Saponari M. 2012. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family *Geminiviridae*. *Virology*, 432(1): 162-172
- Zhou Y, Zhang YH, Liu YJ, Chen HM, Li TS, Zhou CY. 2017. Distribution and molecular characterization of citrus chlorotic dwarf-associated virus in China. *Australasian Plant Pathology*, 46(3): 227-229

(责任编辑:李美娟)