

应用实时荧光RT-PCR检测柑橘黄化脉明病毒

陈洪明¹, 周彦¹, 王雪峰¹, 周常勇¹, 杨秀燕², 李中安^{1,*}

(¹ 西南大学/中国农业科学院柑桔研究所, 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712; ² 安岳县柠檬科学技术研究所, 四川安岳 642300)

摘要: 为更快速准确检测柑橘黄化脉明病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV), 根据病毒外壳蛋白基因的保守序列设计特异性引物, 通过体系优化得到最佳反应条件, 建立基于 SYBR Green I 的 CYVCV 实时荧光 RT-PCR 检测方法。该方法可特异性检测 CYVCV, 而测试的柑橘衰退病毒、碎叶病毒等 5 种柑橘病毒均不能检测出。灵敏度较普通 RT-PCR 提高了 100 倍, 标准曲线循环阈值与模板浓度呈良好的线性关系, 扩增效率和相关性系数分别为 102% 和 0.999。对田间样品的检测结果表明, 建立的实时荧光 RT-PCR 适用于检测不同柑橘品种中 CYVCV 的含量。

关键词: 柑橘; 柑橘黄化脉明病毒; 实时荧光 RT-PCR; 检测; 应用

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2016) 01-0168-07

Detection of *Citrus yellow vein clearing virus* Based on a Real-time RT-PCR Approach

CHEN Hong-ming¹, ZHOU Yan¹, WANG Xue-feng¹, ZHOU Chang-yong¹, YANG Xiu-yan², and LI Zhong-an^{1,*}

(¹ *Citrus Research Institute, Southwest University, Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China;* ² *Lemon Science and Technology Institute, Anyue, Sichuan 642300, China*)

Abstract: To develop a rapid and reliable detection method, a real-time RT-PCR system based on SYBR Green I was established by using a pair of specific primers designed from conserved coat protein gene of *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV). The sensitivity, specificity and applicability of the system were evaluated accordingly. The results showed that amplicons were produced from CYVCV isolates, whereas no amplicons from non-CYVCV citrus virus samples including *Citrus tristeza virus* (CTV) and *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) were obtained. The sensitivity of the real-time RT-PCR was 100-fold higher than that of conventional RT-PCR. An excellent linear correlation ($R^2 = 0.999$) obtained from two standard curves of cRNA and the amplification efficiency was 102%. The data from field citrus samples detection showed that the real-time RT-PCR system could be used to determine the concentration of CYVCV in the different citrus species.

Key words: citrus; *Citrus yellow vein clearing virus*; real-time RT-PCR; detection; application

收稿日期: 2015-10-12; 修回日期: 2016-01-21

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2015C091, 2015A009, 2014A001); 重庆市两江学者项目; 国家科技支撑项目 (2012BAD19B06)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhongan@cric.cn)

柑橘黄化脉明病是由柑橘黄化脉明病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV) 引起的一种柑橘病毒病, 该病最早于 1988 年发现于巴基斯坦的柠檬和酸橙 (Catara et al., 1988, 1993), 随后在土耳其和印度也有报道 (Ahlawat, 1997; Önelge, 2002; Alshami et al., 2003)。2009 年在中国云南瑞丽的柠檬上也发现了该病 (Chen et al., 2014)。植株发病后, 春梢和秋梢叶片脉明黄化, 并伴随皱缩、反卷, 叶背水浸状等症状, 树势减弱, 产量大幅下降。2011 年在重庆、四川安岳柠檬上调查中也发现少量带病植株。随着黄脉病的发生范围不断扩大, 给柠檬产业带来极大的损失。

CYVCV 属于 α 线性病毒科 (Alphaflexiviridae) 柑橘病毒属 (*Mandarivirus*) (Loconsole et al., 2012), 是一种嫁接传染性病害 (Grimaldi & Catara, 1996)。此外目前已知绣线菊蚜 (*Aphis spiraeicola* Patch) 和豆蚜 (*A. craccivora* Koch) 能够在柠檬和豆科作物间传播 CYVCV (Önelge et al., 2011)。尚未发现该病能通过种子传播的证据 (Zhou et al., 2015)。

目前尚缺乏防治柑橘黄化脉明病的有效药剂, 种植无病毒苗木和加强病毒检测是防治该病的重要途径, 因此建立快速、灵敏的病毒检测技术是当前柑橘黄化脉明病防治的首要任务。近年来, 陈洪明等 (2015) 和宾羽等 (2015) 相继建立的 RT-PCR 和 DTBIA 检测方法, 缩短了 CYVCV 的检测时间, 但是在对大量 CYVCV 疑似样品进行检测时发现, 上述检测方法在灵敏度和检测范围上还存在不足。实时荧光 RT-PCR 技术因具有快速、灵敏度高、特异性强、适用范围广等优点, 特别可以进行病毒的定量检测, 近年来被广泛运用于植物病毒的检测。为此, 本研究建立了一种以 SYBR Green I 为基础的 CYVCV 实时荧光 RT-PCR 检测方法, 以期满足当前生产中 CYVCV 检测的需要。

1 材料与方法

1.1 供试材料及核酸提取

CYVCV 毒源植株由云南瑞丽具有柑橘黄化脉明病典型症状的尤里克柠檬枝条嫁接繁殖而成, 阴性对照为脱毒尤里克柠檬, 鳞皮病毒 (*Citrus psorosis virus*, CPV)、柑橘裂皮病类病毒 (*Citrus exocortis viroid*, CEVd)、柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV)、温州蜜柑萎缩病毒 (*Satsuma dwarf virus*, SDV) 和柑橘碎叶病毒 (*Citrus tatter leaf virus*, CTLV) 的阳性样品和健康对照样品均由西南大学柑桔研究所国家柑橘苗木脱毒中心提供。

2014 年 4—10 月采集 CYVCV 毒源植株和健康植株叶片, 取 50 ~ 100 mg 待测样品的叶片, 按照 RNAiso plus 试剂 (TaKaRa, 中国) 说明书的方法提取毒源植株的总 RNA, 2% 琼脂凝胶电泳检测 RNA 完整性, 用 SmartSpecTM Plus 分光光度计 (Bio-Rad, 美国) 测定浓度和纯度, 以 $A_{260}/A_{280} = 1.9 \sim 2.1$ 的总 RNA 作为实时荧光 RT-PCR 的模板, 并在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用材料及其处理。

1.2 RT-PCR 扩增与克隆鉴定

根据 NCBI 中 CYVCV (JX040635.1) 保守的外壳蛋白基因为靶标, 利用 Oligo 7 软件设计实时特异性引物, 上游引物 CY4 (5'-TCCAACCTCACAAACCCAGTG-3') 和下游引物 CY5 (5'-ATGGGCTC TTGGTTTTCCTT-3')。预期扩增片段长度为 174 bp。并用 NCBI 的 Primer-BLAST 进行比对, 保证引物的特异性。

5 μL 反转录体系中包含总 RNA 1 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 0.4 μL , 5 \times RT buffer 1 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.1 μL , RNasin 0.1 μL , RTase 0.1 μL , ddH₂O 2.3 μL 。反转录条件为: 42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 20 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。

反转录结束后以 5 μL cDNA 为模板进行 25 μL 的 PCR 反应,反应体系: ddH₂O 17.4 μL , 10 \times buffer (Mg²⁺) 2.5 μL , 下游引物 0.4 μL , 上游引物 0.5 μL , Ex-*Taq* 酶 (5 U \cdot μL^{-1}) 0.2 μL 。扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 35 个循环; 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

PCR 产物纯化后与 pGEM-T EASY 载体 (Promega, 美国) 连接, 转化感受态细胞 JM-109, 并接种于含有氨苄西林的 LB 培养基平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 挑取阳性单斑送广州英骏公司测序。

1.3 标准品cRNA的制备

采用上述反应条件, 将 T7 启动子修饰后的 CY4/5 用于扩增总 RNA。扩增产物纯化后, 用 T7 体外转录试剂盒 (TOYOBO, 日本) 转录合成 cRNA。获得的 cRNA 经 RNase-Free DNase I (Promega, 美国) 纯化后, 用分光光度计测定其纯度和浓度, 同时参考 Fronhoffs 等 (2002) 的方法计算获得的 cRNA 的拷贝数为 $5 \times 10^{13} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.4 实时荧光RT-PCR条件的优化及体系的确定

1.4.1 退火温度的优化

将标准品 cRNA 用 EASY Dilution (TaKaRa, 中国) 按 10 倍梯度稀释成拷贝 $1 \times 10^5 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 后为模板, 引物终浓度为 $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别检测退火温度从 52 ~ 62 $^{\circ}\text{C}$ 时荧光信号的变化, 选取 Ct 值最小且扩增曲线最好时的退火温度。

1.4.2 引物浓度的优化

以 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 拷贝浓度的 cRNA 为模板, 设定不同引物浓度 (500、400、300、200、100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行实时荧光 RT-PCR, 观察扩增效率和溶解曲线。

1.4.3 标准曲线的建立

将标准品 cRNA 按 10 倍梯度稀释为 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^9 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 拷贝 10 个梯度后作模板, 在优化条件下进行荧光 PCR 检测, 每一浓度设定 3 个技术重复, 同时设定阴性对照、空白对照和阳性对照。反应体系含 SYBR Green I 的 GoTaq qPCR Master Mix (Promega, 美国) 12.5 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下游引物 0.4 μL , 上游引物 0.5 μL , CXR Reference Dye 0.25 μL , 加 ddH₂O 配至 25 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 40 个循环。iCycler IQTM 实时 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国) 自动生成标准曲线。

1.5 实时荧光RT-PCR反应体系的验证

1.5.1 特异性试验

分别提取感染了 CTV、CTLV、CEVd、SDV 和 CPV 阳性柑桔叶片样品的总 RNA, 用于实时 RT-PCR 的特异性检测。

1.5.2 灵敏度比较

以 10 倍梯度稀释获得的 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 拷贝 cRNA 为模板分别进行常规 RT-PCR 和实时荧光定量 RT-PCR, 比较其灵敏度。

1.5.3 重复性试验

以 10 倍梯度的 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ 系列浓度的标准品 DNA 为模板, 每个稀释度 3 次重复, 进行实时荧光 RT-PCR, 计算 Ct 值、标准差 (SD) 和变异系数 (CV)。

1.6 田间样品检测

2015 年 5—7 月, 随机采集来自云南、四川和重庆的柠檬、甜橙、杂柑、椪柑、温州蜜柑等叶片样品各 10 个, 共计 50 个。其中 5 个柠檬样品, 1 个温州蜜柑样品和 1 个杂柑样品表现出典型的柑橘黄化脉明病症状, 其余均未现症。按照 1.1 的方法提取总 RNA, 每个样品设 3 个技术重复和 3 个生物学重复。采用上述建立的实时 RT-PCR 进行检测, 并以柑橘 FBOX 基因作为内参基因 (Mafra et al., 2012) 对检测结果进行校正。

仪器附带软件根据设定参数自动计算出 Ct 值, 设 Ct 值最高样品中 CYVCV 的含量为 1, 实时 RT-PCR 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对含量计算。获得的总 RNA 同时也用 Chen 等 (2014) 的方法进行常规 RT-PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增与克隆鉴定

以感染 CYVCV 植株的总 RNA 为模板, 用 CY4/5 引物进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 阳性对照均能扩增出 1 条大小为 174 bp 的特异性条带, 阴性对照无特异性扩增 (图 1)。

将检测阳性的 PCR 产物克隆后送英骏公司测序, 序列在 NCBI 经 Blast 分析, 与 CYVCV 云南分离株 (KJ859679) 相应序列的同源性为 100%, 由此确定扩增片段的正确性。

2.2 实时荧光 RT-PCR 条件的优化和反应体系的确定

2.2.1 退火温度

以 $1 \times 10^5 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 拷贝的 cRNA 为模板, 退火温度从 52 ~ 62 °C 进行实时荧光温度梯度 RT-PCR。结果显示, 当退火温度在 60 °C 时, 相对荧光强度最高, 且 Ct 值最小, 此温度时的熔解曲线为单一峰。

因此, 选择 60 °C 作为该体系的退火温度。

2.2.2 引物浓度

用 500、400、300、200、100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的引物进行实时荧光 RT-PCR, 比较相对荧光强度和 Ct 值大小。

当引物浓度为 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 相对荧光强度最高, Ct 值最小, 且在反应条件下的扩增效率为 102%, $R^2 = 0.999$ (图 2)。

因此, 选择 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为本体系引物浓度。

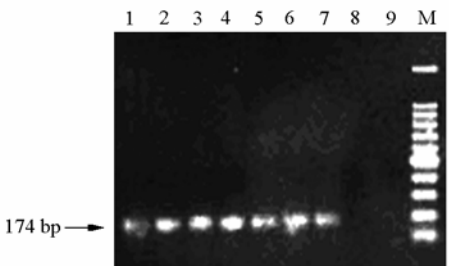


图 1 目标片段 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳图
M: 100 bp marker; 1~7: 阳性对照; 8: 阴性对照; 9: 水对照。
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product
M: 100 bp marker. 1 - 7: Positive control;
8: Negative control; 9: Water control.

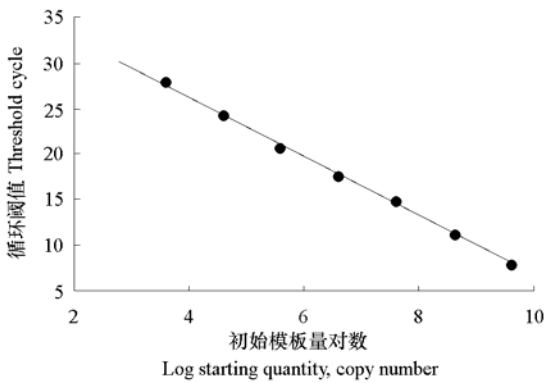


图 2 引物浓度为 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的标准曲线
Fig. 2 The standard curve at primer concentration of 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 实时荧光RT-PCR反应体系的验证

2.3.1 特异性

用本研究建立的实时 RT-PCR 方法检测感染了 CTV、CTLV、SDV、CEVd、CPV 和 CYVCV 的样品时只有 CYVCV 样品的荧光信号有增加, 其他样品均无增加 (图 3), 表明该体系可特异检测 CYVCV。

2.3.2 灵敏度比较

以 10 倍梯度稀释获得的 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 拷贝 cRNA 为模板分别进行实时荧光 RT-PCR 和常规 RT-PCR 检测发现, 实时荧光 RT-PCR 能检测到 $1 \times 10^1 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 拷贝的 cRNA (图 4), 而普通 PCR 只能检测到 $1 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 拷贝的 cRNA, 表明实时 RT-PCR 检测灵敏度较 RT-PCR 提高了 100 倍。

2.3.3 重复性检测结果

据扩增曲线及统计学分析结果各梯度组内重复检测的变异系数最大为 0.62%, 表明该方法具有较好的组内重复性; 组间重复性试验各梯度的变异系数最大为 3.16%, 表明该方法具有较好的组间重复性。

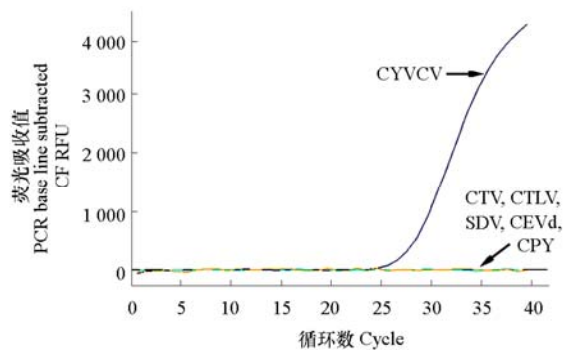


图 3 实时荧光 RT-PCR 方法特异性检测
Fig. 3 The specificity test of real-time RT-PCR

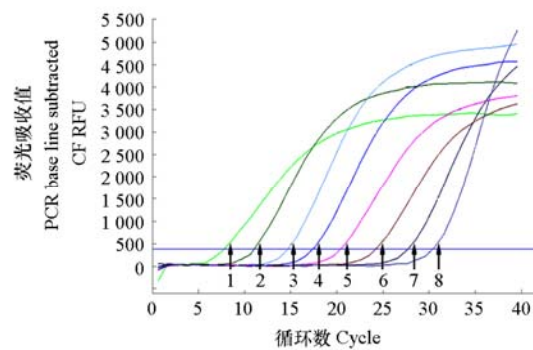


图 4 不同浓度 cRNA 的实时荧光 RT-PCR 扩增曲线
Fig. 4 Amplification plots of real-time RT-PCR using cRNA samples at different diluted concentrations
1 - 8: $1.0 \times 10^8 - 1.0 \times 10^1 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

2.4 田间样品检测

运用实时 RT-PCR 对来自云南、四川和重庆的 50 个样品进行检测, 结果显示除 7 个表现典型黄脉病症状的样品均检测出 CYVCV 外, 还从 5 个未现症的样品 (1 个温州蜜柑、1 个甜橙、1 个椪柑和 2 个柠檬样品) 中也检测出了 CYVCV。普通 RT-PCR 的检测方法与实时 RT-PCR 一致。此外以柑橘 *FBOX* 基因作为内参, 以 Ct 值最小的 CYVCV 样品的含量为 1 进行校正后发现, 上述 12 个阳性样品中 CYVCV 的含量存在差异, 显症的柠檬中 CYVCV 的相对含量最高, 来自未显症的温州蜜柑 CYVCV 的相对含量较低。

3 讨论

鉴于目前还缺乏对 CYVCV 序列保守性的系统研究, 因此本研究中选择在植物病毒中均比较保守的外壳蛋白基因作为靶标来设计引物, 由此建立的实时荧光 RT-PCR 检测方法可特异性检测

CYVCV。该检测方法在以 cRNA 作为标准品时相关性系数为 0.999, 扩增相率为 102%, 且 Ct 值与其拷贝数显示出良好的线性关系, 这表明该体系具有较好的检测效率, 真实可靠。此外, 经以梯度稀释标准样品重复检测, 结果表明该实时 PCR 方法的灵敏度较 RT-PCR 提高了 100 倍。实时 RT-PCR 在本研究中所表现出的灵敏度与其在检测其他柑橘病毒病时相似, 如目前已建立的 CTV、CTLV 和 SDV 实时 RT-PCR 方法其灵敏度均较普通 RT-PCR 提高了 100 倍 (Ruiz-Ruiz et al., 2007; 刘科宏 等 2009, 2013)。

在对 50 份田间样品进行重复检测时发现, 本试验建立的实时荧光 RT-PCR 检测体系与普通 PCR 检测结果具有一致性, 都能检测出 CYVCV。但前者能准确检测植株中 CYVCV 的含量, 且更适用于对极微量病毒的检测。此外, 运用实时荧光 RT-PCR 方法对 5—7 月采集的田间样品检测结果表明, 该方法检测的样品采集不受高温季节的限制, 因此实时 PCR 检测方法对于不同来源柑橘样品检测结果具有更高的准确性。该技术的建立为柑橘黄脉病的早期监测、预警以及有效防控提供了重要的技术保障。

本研究中有 5 个未显症样品均被检出为阳性, 一方面可能与柑橘品种的敏感性有关, 如椪柑常带毒但不显症 (陈洪明 等, 2015); 另外也可能与采集样品时的温度有关, 如柠檬对 CYVCV 非常敏感, 尤其在 18 ~ 24 °C 时会表现明显的症状。此外, 本研究中显症柠檬中 CYVCV 的含量高于不显症温州蜜柑阳性样品中的含量, 这是否是造成植株表现症状的原因还有待进行进一步的研究。

References

- Ahlawat Y S. 1997. Virus, greening bacterium and viroids associated with citrus (*Citrus species*) decline in India. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 67 (2): 51 - 57.
- Alshami A A, Ahlawat Y S, Pant R P. 2003. A hitherto unreported yellow vein clearing disease of citrus in India and its viral etiology. *Indian Phytopathology*, 56 (4): 422 - 427.
- Bin Yu, Song Zhen, Li Zhong-an, Zhou Chang-yong. 2015. Direct tissue blot immunoassay for detection of *Citrus yellow vein clearing virus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (9): 1843 - 1850. (in Chinese)
- 宾羽, 宋震, 李中安, 周常勇. 2015. 柑橘黄化脉明病毒 DTBIA 检测方法的建立. *园艺学报*, 42 (9): 1843 - 1850.
- Catara A, Azzaro A, Davino M, Polizzi G. 1993. Yellow vein clearing of lemon in Pakistan//Moreno P, da Graça J V, Timmer L W. *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. California: Riverside: 364 - 367.
- Catara A, Azzaro A, Mughal S M, Khan D A. 1988. Virus, viroids and prokaryotic diseases of citrus in Pakistan//Goren R, Mendel K. *Proceedings of the 6th international citrus congress*. Rehovot, Israel: Balaban Publishers: 957 - 962.
- Chen H M, Li Z A, Wang X F, Zhou Y, Tang K Z, Zhou C Y, Zhao X Y, Yue J Q. 2014. First report of *Citrus yellow vein clearing virus* on lemon in Yunnan, China. *Plant Disease*, 98 (12): 1747.
- Chen Hong-ming, Wang Xue-feng, Zhou Yan, Zhou Chang-yong, Guo Jun, Li Zhong-an. 2015. Biological characterization and RT-PCR detection of a new disease in Eureka lemon. *Journal of Plant Protection*, 43 (4): 557 - 563. (in Chinese)
- 陈洪明, 王雪峰, 周彦, 周常勇, 郭俊, 李中安. 2015. 尤力克柠檬上一种新病害的生物学特性及 RT-PCR 检测技术. *植物保护学报*, 43 (4): 557 - 563.
- Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Bruning T, Koch B, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y. 2002. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 16 (2): 99 - 110.
- Grimaldi V, Catara A. 1996. Association of a filamentous virus with yellow vein clearing of lemon//Moreno P, da Graça J V, Timmer L W. *Proceedings of the 13th conference of the international organization of citrus virologists*. California: Riverside: 343 - 345.

- Liu Ke-hong, Song Zhen, Li Zhong-an, Zhou Chang-yong. 2013. Detection of *Satsuma dwarf virus* by real-time RT-PCR. *Journal of Plant Protection*, 40 (1): 93 - 94. (in Chinese)
- 刘科宏, 宋震, 李中安, 周常勇. 2013. 温州蜜柑萎缩病毒实时荧光 RT-PCR 检测. *植物保护学报*, 40 (1): 93 - 94.
- Liu Ke-hong, Zhou Chang-yong, Song Zhen, Zhou Yan, Li Zhong-an, Tang Ke-zhi. 2009. Detection of *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) by real-time RT-PCR. *Journal of Fruit Science*, 26 (5): 748 - 751. (in Chinese)
- 刘科宏, 周常勇, 宋震, 周彦, 李中安, 唐科志. 2009. 运用实时荧光 RT-PCR 技术检测柑橘碎叶病毒. *果树学报*, 26 (5): 748 - 751.
- Loconsole G, Önelge N, Potere O, Giampetruzzi A, Bozan O, Satar S, de Stradis A, Savino V, Yokomi P K, Saponari M. 2012. Identification and characterization of *Citrus yellow vein clearing virus*, a putative new member of the genus *Mandarivirus*. *Phytopathology*, 102 (12): 1168 - 1175.
- Mafra V, Kubo K S, Alves-Ferreira M, Reinero-Alves M, Stuart R M, Boava L P, Rodriques C M, Machado M A. 2012. Reference genes for accurate transcript normalization I citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS ONE*, 7 (2): e31263.
- Önelge N. 2002. First report of yellow vein clearing of lemons in Turkey. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 32: 53 - 55.
- Önelge N, Satar S, Elibüyük Ö, Bozan O, Kameroğlu M. 2011. Transmission studies on *Citrus yellow vein clearing virus*//Proceedings 18th Conference IOCV. Rolling Meadows: Riverside.
- Ruiz-Ruiz S, Moreno P, Guerri J, Ambrós S. 2007. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. *Journal of Virological Methods*, 145: 96 - 105.
- Zhou Y, Chen H M, Wang X F, Li Z A, Tang M, Zhou C Y. 2015. Lack of evidence for seed transmission of *Citrus yellow vein clearing virus* despite its frequent detection in seed tissues. *Journal of Plant Pathology*, 97 (3): 1 - 3.

征 稿

《Horticultural Plant Journal》 (《园艺学报》英文版) 征稿启事

《园艺学报》英文版《*Horticultural Plant Journal*》由中国科学技术协会主管, 中国园艺学会、中国农业科学院蔬菜花卉研究所和中国农业科学技术出版社共同主办, CN10-1305/S, ISSN 2095-9885, Online ISSN 2468-0141, 双月刊, 大 16 开, 于 2015 年正式出版。

办刊宗旨: 准确、全面、及时地报道园艺学科领域重大研究成果和科研进展, 反映学科研究水平和发展动向, 为学术交流服务, 为促进学科发展作贡献。

刊载范围: 有关园艺作物遗传学、基因组学、育种学、栽培学、园艺作物的起源及驯化、生物技术、生物化学、生理学和细胞与分子生物学等原创性学术论文、研究报告、简报及专题综述等。

论文主要结构:

Title; Name(s) of author(s); Affiliations; Abstract; Keywords; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Conclusions (optional); Acknowledgments; References

投稿方式:

电子稿暂发送至邮箱hortjournal@caas.cn, 纸质稿件(连同作者授权协议)挂号信寄至: 北京中关村南大街12号, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部(邮编100081)。联系电话: 010-82109523; 010-62192388。

编辑部与国际知名出版商Elsevier合作, 建设了数字出版平台, 已经开始试运行, 预计2016年2月正式上线, 实现全世界范围的在线投稿和在线审稿, 并实现全文开放获取(Open Access)和在线预出版(Online First)。