

## 引起重庆主栽柑桔品种衰退病的病毒株系组群分析

王雪峰<sup>1</sup>, 周彦<sup>1,2</sup>, 刘科宏<sup>1</sup>, 唐科志<sup>1</sup>, 周常勇<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712; <sup>2</sup>西南大学植物保护学院, 重庆 400716)

**摘要:** 柑桔衰退病毒 (CTV) 存在着许多生物学特性不同的株系。通过铲除感染强毒株植株或利用弱毒株交叉保护的方式来防治柑桔衰退病都需要对 CTV 株系进行准确、可靠的鉴定。本文根据对 CTV 衣壳蛋白基因 (CPG) 的限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析, 发现在重庆主栽柑桔品种的衰退病毒主要以 CP/*Hinf* I RFLP 第 1、3 和 6 组群为主, 并且在田间以多株系混合感染为主。

**关键词:** 柑桔衰退病毒; 限制性片段长度多态性; 交叉保护

### Analysis on CP/*Hinf* I RFLP groups of *Citrus tristeza virus* in major citrus cultivars in Chongqing

WANG Xue-feng<sup>1</sup>, ZHOU Yan<sup>1,2</sup>, LIU Ke-hong<sup>1</sup>, TANG Ke-zhi<sup>1</sup>, ZHOU Chang-yong<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Chongqing 400712, China; <sup>2</sup>College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** *Citrus tristeza virus* (CTV) has a number of distinct strains differing in biological characteristics in citrus fields. Strategies such as eradication of severe strains-infected trees or using mild strains cross protection require accurate identification on virus strains. In the study, restriction fragment length polymorphism (RFLP) was used to examine the coat protein gene of CTV, and it was found that CP/*Hinf* I RFLP group 1, 3 and 6 were dominant in Chongqing. The results obtained by RFLP analysis revealed that mixture of CTV strains often occurred in field trees.

**Key words:** CTV; RFLP assay; cross protection

中图分类号: S436.661.19 文献标识码: A 文章编号: 0412-0914(2005)06-0010-04

柑桔衰退病是由柑桔衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV) 引起的一种具有经济重要性的病害, 广泛分布于世界各柑桔产区。CTV 在我国分布普遍, 由于使用抗病砧木, 且主要种植宽皮柑桔, 因此没有显著的为害<sup>[1]</sup>。随着我国柑桔产业结构的不断调整, CTV 茎陷点型强毒株对柚类和某些甜橙的为害变得日益明显<sup>[2]</sup>。

在 CTV 强毒株和强力传媒桔蚜并存的地区, 弱毒株交叉保护 (mild strain cross protection,

MSCP) 是最有效的防治方法。CTV 存在着复杂的株系分化现象, 而且 MSCP 具有寄主专化性和地域专化性的特点, 因此在进行 MSCP 时, 应根据不同地区 CTV 株系的组成来选用保护株系<sup>[3]</sup>。对 CTV 衣壳蛋白基因 (coat protein gene, CPG) 进行限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析能够对 CTV 株系进行快速、准确的区分, 并能预测其生物学特性<sup>[4]</sup>, 本文运用该方法从重庆市不同地区的主栽柑桔品种中筛选到 241 个感染 CTV 的样品进行分

收稿日期: 2005-03-20; 修回日期: 2005-11-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471205)

通讯作者: 周常勇, 研究员, 主要从事柑桔病毒病和类似病毒病研究; Tel: 023-68349007, E-mail: changyong@hotmail.com

第一作者: 王雪峰 (1979-), 男, 浙江安吉县人, 硕士研究生, 研究方向为柑桔病毒病防治。

析,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 CTV 分离株

检测样品分别来自重庆市的合川、江津、长寿、涪陵、忠县、铜梁、丰都、九龙坡、北碚等地以及中国农业科学院柑桔研究所。根据 Garnsey 等<sup>[5]</sup>的方法对样品进行直接组织点免疫(DTBIA)初筛。

### 1.2 总核酸提取及 cDNA 的合成和扩增

对 DTBIA 检测阳性的样品,参照周常勇等<sup>[6]</sup>的方法提取总核酸,并参照 Gillings 等<sup>[4]</sup>的方法,使用 CPG 特异性引物 CP1 (5'-ATG GACGACGAAACAAAG-3')和 CP3 (5'-TCAACG-TGTGTIGAATTT-3'),在 T<sub>GRADIENT</sub> 型 PCR 仪 (Biometra) 上进行 RT-PCR 操作。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶成像系统 (BIO-RAD) 观察结果。

### 1.3 RFLP 分析

将 PCR 产物与限制性内切酶 *Hinf* I (Promega) 反应体系相混合,37℃ 下酶切 1 h,产物进行 3% 超纯琼脂糖凝胶电泳<sup>[4]</sup>,溴乙锭染色后观察酶切图谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 DTBIA 分析及 RT-PCR 检测

肉眼观察染色后的硝酸纤维素膜,病株和正对照在其韧皮部的印迹周围有黑褐色小点,健康植株和负对照则没有该特征。结果获得 241 个 CTV 样品。这些 CTV 样品和正对照经 RT-PCR 扩增,均能产生大小为 672 bp 的 DNA 片段,与已知 CTV 的 CPG 大小相一致。阴性对照和水对照中不能检测到该扩增产物。

### 2.2 RFLP 分析

根据 Gillings 等<sup>[4]</sup>对 CTV 的 RFLP 分群标准,在 241 个带毒样品中,38.2% 的样品出现单一 CP/*Hinf* I RFLP 谱型,其中以 CP/*Hinf* I RFLP 第 3、6 组群为主,分别占总数的 20.7% 和 12%。其余样品表现出混合谱型,表明受多个株系混合感染,以 CP/*Hinf* I RFLP 第 1、3 组群,CP/*Hinf* I RFLP 第 1、6 组群和 CP/*Hinf* I RFLP 第 3、6 组群构成为

主,分别占总数的 23.2%、18.2% 和 7.5%。另外有 3% 的样品含有 CP/*Hinf* I RFLP 第 4 组群,2.6% 的样品含有 CP/*Hinf* I RFLP 第 5 组群,这些样品可能携带有 CTV 弱毒株<sup>[4]</sup>。甜橙中的 CTV 分离株包含有 CP/*Hinf* I RFLP 所有 7 个组群,柚类上有 5 个 CP/*Hinf* I RFLP 组群,杂柑和宽皮柑桔均携带有 4 个 CP/*Hinf* I RFLP 组群(表 1)。图 1 显示了来源于重庆北碚的 CP/*Hinf* I RFLP 谱型结果,表明 1、4、7 属于第 1 组群;2、3、5、6、8~13 属于第 6 组群;14、15、16 属于第 3 组群。

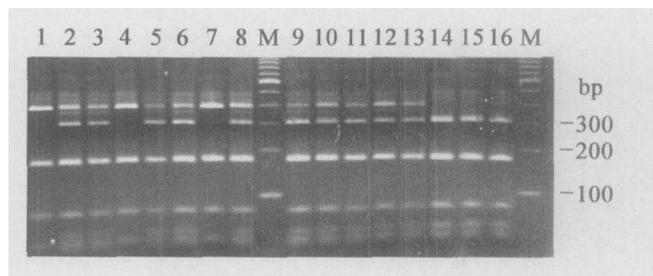


Fig. 1 CP/*Hinf* I RFLP detection of CTV-infected sweet oranges collected from Beibei, Chongqing

M: 100 bp DNA marker; lane 1-16: CTV-infected sweet oranges.

## 3 讨论

CTV 存在着许多不同的株系,即使在田间或指示植物上没有表现明显症状,仍然可能是由多个株系所组成的<sup>[3]</sup>,这就需要运用准确、快速的方法对 CTV 的各个株系进行区分,而应用 CP/*Hinf* I 对 CTV 的 CPG 进行限制性酶切,在不同分离株中表现出了丰富的多态性,据此,CTV 被分成了 7 个 CP/*Hinf* I RFLP 组群,同一组群中的 CTV 株系具有相似的生物学特性,其中组群 4 和 5 中的株系在指示植物上为弱反应,因此可能与弱毒株相关联,从中可以获得具有潜在保护作用的弱毒株;而其余组群中的株系在指示植物上会引起严重症状,与强毒株相关联<sup>[4]</sup>。

本文的结果表明在重庆地区主栽品种中 CTV 的组群构成以第 1、3、6 组群为主,并且 CTV 的发生多为混合感染,说明在重庆地区 CTV 强毒株分布广泛。本实验对重庆地区 CTV 的 CP/*Hinf* I RFLP 组群构成进行了初步分析,为后续进行 MSCP 防治柑桔衰退病提供了工作基础。

Table 1 CP/*Hinf* I RFLP groups of 241 CTV isolates collected from sweet oranges, pummelos, hybrid mandarins and mandarins in Chongqing

Host	Variety	Location	Single CP/ <i>Hinf</i> I RFLP group							Mixture of CP/ <i>Hinf</i> I RFLP groups				
			1	2	3	4	5	6	7	1,3	1,6	3,6	1,3,6	Others
Sweet orange (124)	Beibei-447	Jiangjing	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	1
		CRI	-	-	2	-	1	-	-	1	-	-	-	-
		Beibei	4	-	-	-	-	12	-	11	-	-	-	2
		Jiulongpo	1	-	-	-	-	-	-	4	5	5	-	2
		Zhongxian	-	-	8	-	-	-	-	4	-	2	-	-
	Tongshui 72-1	Tongliang	-	-	-	-	-	3	-	1	2	-	-	-
	Cara Cara	Beibei	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
		Tarocco	Changshou	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2
	Fukumoto	Jiangjing	-	-	-	-	-	-	-	3	-	2	-	-
		Beibei	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
		Jiangjing	-	-	2	-	-	-	-	2	-	4	-	-
	Yu Jincheng	Changshou	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Jiangjing	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	1	1
		Changshou	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
		Jiangjing	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3	-
	Road Red	Jiangjing	-	-	4	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Beibei		-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pummelo (42)	Guan-xi-mi-you	CRI	2	-	-	-	-	5	1	-	12	-	-	-
		Hechuan	1	-	-	-	-	2	-	-	4	-	-	1
	Wan-bai-you	Hechuan	-	-	-	-	-	4	-	-	3	-	-	1
	Hong-xin-you	Fengdu	-	-	-	-	-	1	-	-	5	-	-	-
Hybrid (69)	Riyomi	Fuling	-	-	3	-	-	1	-	11	1	-	4	-
		Zhongxian	-	-	2	-	-	-	-	2	-	1	-	-
	Shiranui	CRI	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1
		Zhongxian	-	-	3	-	-	-	-	6	-	-	-	-
	Nankou	CRI	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	Amakusa	CRI	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mandarin (6)	Murcott	Jiangjing	-	-	16	-	-	-	-	8	-	-	-	2
	Kiyomi	Jiangjing	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Satsuma	Beibei	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2	-	1
	Ueno Wase Unshu	Beibei	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 参考文献

[1] 赵学源, 蒋元晖, 张权柄, 等. 柑桔苗黄型衰退病毒的分布概况和六种酸橙类砧木对它的反应[J]. 植物

病理学报, 1979, 9(1): 61-63.

[2] Zhou C Y, Zhao X Y, Tang K Z. *et al.* Preliminary evaluation of the tolerance of 18 pummelo cultivars to stem-pitting *tristeza* [A]. Proceedings of the 15<sup>th</sup> Con-

- ference of the International Organization of Citrus Virus [C]. California: University of California, Riverside, 2002. 172-175.
- [3] Rocha-Pena M A, Lee R F, Lastra R, *et al.* *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*: threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America[J]. *Plant Disease*, 1995, 79(5): 437-445.
- [4] Gillings M, Broadbent P, Indsto J, *et al.* Characterization of isolates and strains of *Citrus tristeza closterovirus* using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction [J]. *Journal of Virological Methods*, 1993, 44: 305-317.
- [5] 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 12<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virus [C]. California: University of California, Riverside, 1993. 39-50.
- [6] 周常勇, Deborah H, Rachael C, 等. 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): 200.