

毒源和寄主对褐色桔蚜传播柑桔 衰退病毒效率的影响

周 彦 周常勇* 王雪峰 刘科宏 宋 震 李中安

(西南大学柑桔研究所/中国农业科学院柑桔研究所,重庆 400712)

摘要: 褐色桔蚜是柑桔衰退病毒(*Citrus tristeza virus* CTV)最有效的传播媒介,为了解不同柑桔寄主种类和毒源对褐色桔蚜传播 CTV 效率的影响,检测在以锦橙、凤凰柚和墨西哥来檬作毒源植株时,褐色桔蚜对 10 个 CTV 分离株的单蚜传毒率,以及蚜传前后 CTV 分离株 *p25 Hinfl* RFLP 组群构成的变化,并对其中 5 个分离株与 2 个国外分离株进行了 *p20* 和 *p25* 基因相应氨基酸序列的比对分析。结果表明:褐色桔蚜传播 CTV 的能力受柑桔寄主种类的影响较大,以锦橙作毒源植株可以获得最高的传毒率;CTV 毒株强弱以及褐色桔蚜虫态(有翅或无翅蚜)对单蚜传毒率影响不明显;褐色桔蚜传播具有 *p25 Hinfl* RFLP 第 3 组群构成的 CTV 分离株的能力较强。

关键词: 柑桔衰退病毒; 柑桔种类; 单蚜传毒率

Effect of virus sources and host plants on the transmissibility of *Citrus tristeza virus* by single aphid of *Toxoptera citricida*

Zhou Yan Zhou Changyong* Wang Xuefeng Liu Kehong Song Zhen Li Zhong'an

(Citrus Research Institute, Southwest University/Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract *Toxoptera citricida* is the most efficient vector of *Citrus tristeza virus* (CTV). For better understand of the effect of CTV isolates and host plants on the transmissibility of CTV by single aphid of *T. citricida*, the transmission rates of 4 severe CTV isolates and 6 mild ones were evaluated as Jincheng Feng-huang pummelo and Mexican lime were used as host plants. And *p20* and *p25* proteins of 7 CTV isolates were compared, and *p25 Hinfl* restriction fragment length polymorphism (RFLP) groups assay was used to analyze for 10 CTV isolates and 161 aphid transmission sub-isolates which obtained by transmitted from Jincheng to Jincheng. The results indicated that Jincheng was a better host for CTV transmission by *T. citricida* than that of Feng-huang pummelo and Mexican lime. The transmission rate of severe CTV isolates and mild ones were similar. In this study, CTV isolates with *p25 Hinfl* RFLP group 3 had higher transmissibility by *T. citricida* than the others.

Key words *Citrus tristeza virus* (CTV); virus resource host; transmissibility

柑桔衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)引起的柑桔衰退病,是一种威胁世界柑桔生产的重要病害,引起用酸橙 *Citrus aurantium* 作砧木的柑桔衰退型死亡,以及抗病或耐病砧木上葡萄柚 *C. paradisi* 柚

*C. grandis*和某些甜橙 *C. sinensis*的茎陷点型危害^[1]。随着柑桔产业结构的调整,CTV 对我国柑桔生产的危害更趋严重^[2]。目前国外的防治经验表明,弱毒株交叉保护(mild strain cross protection, MSCP)技术

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471205),重庆市科委攻关专项(CSTC, 2005AB1010)

作者简介:周彦,男,1979年生,博士,从事柑桔衰退病研究, email: zybook1@163.com

* 通讯作者(Author for correspondence), email: changyong@hotmail.com, 收稿日期:2007-09-05

是防治茎陷点型衰退病最有效的方法^[3]。

CTV主要通过蚜虫和嫁接进行传播,其中褐色桔蚜 *Toxoptera citricida* 是最有效的传播媒介,能够传播 CTV 的大多数株系^[1,3]。以往的研究表明,蚜虫在病株上取食 30 min 后具有传毒能力,取食 24 h 时达到最大传毒能力^[1]。在以墨西哥来檬作为毒源植株时,有翅成蚜的传毒率最高;此外毒源植株的种类、CTV 的不同分离株等因素都能影响蚜虫的传毒能力^[1,4-5]。直至今日,蚜虫传播 CTV 的机制仍不清楚,CTV 编码的 p25 和 p20 蛋白可能参与蚜虫传毒过程^[6]。由于先前的研究主要针对棉蚜 *Aphis gossypii* 而我国田间以褐色桔蚜发生为主,立足于国内株系资源,了解不同柑桔种类和 CTV 分离株对褐色桔蚜传毒能力的影响,可以为建立 MSCP 技术提供重要依据。本研究比较了田间 10 个 CTV 强弱毒株在不同柑桔种类间的单蚜传毒率,分析了单蚜传毒前后 CTV 分离株 p25 *H in fl* RFLP 组群构成的变化,并对其中 5 个单一的 CTV 分离株与 2 个已知传毒率的国外 CTV 分离株 T30 和 T36 进行 p20 和 p25 基因对应氨基酸序列的比较,以期找寻影响褐色桔蚜传毒能力的主要因素,为今后运用 MSCP 技术防治柑桔衰退病奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒源植株 田间 CTV 分离株参考 Gamsey 等^[7]的方法进行指示植物鉴定后,嫁接接种到锦橙 *C. sinensis*, 凤凰柚 *C. grandis* 和墨西哥来檬 *C. aurantifolia* 进行保存。

1.2 单蚜传毒 参照 Broadbent 等^[4]的方法,用无毒褐色桔蚜从上述毒源植株向无毒锦橙实生苗进行单蚜传毒试验。传毒完毕后受毒植株在温室 (26~30℃) 中保存。蚜传 3 个月和 5 个月后,根据 Gamsey 等^[8]的方法截取受毒植株的幼叶中脉进行直接组织点免疫 (direct tissue blot immuno-assay, DT-BIA) 检测,并使用 SPSS12.0 分析软件对检测结果进行显著性分析。

1.3 总核酸提取及 cDNA 的合成和扩增 对 DT-BIA 检测阳性的样品,参照周常勇等^[9]的方法提取总核酸。参照 Zhou 等^[10]的方法,合成 p25 基因的特异性引物 CP1 (5' ATGGACGACGAAACAAAG 3') 和 CP3 (5' TCAACGTGTGTGAA TTT 3'), p20 的特异性引物 p20f (5' A ATGCGAGCTTACTTTAGT 3') 和 p20r (5' CTACACGCAAGATGGAGA 3'), 并在 T_{GRADIENT} 型

PCR 仪 (W haM an) 上进行 RT-PCR 操作。扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。溴化乙锭染色后,用 GelDoc™ EQ 型凝胶成像系统 (Bio-Rad) 观察结果。

1.4 p25 *H in fl* RFLP 组群分析 将 p25 基因的扩增产物与限制性内切酶 *H in fl* (Promega) 反应体系混合,37℃ 下酶切 1 h, 随后进行 3% 超纯琼脂糖凝胶电泳^[11]。溴化乙锭染色后观察酶切图谱。

1.5 序列分析 p20 和 p25 基因的扩增产物经胶纯化试剂盒 (Promega) 纯化后,使用升级后的 BECKMAN CEQ2000 型测序仪进行测序,测序结果用 DNA star 整理测序峰值后,使用 BioEdit 7.0 进行分析。测序工作在国家柑桔苗木脱毒中心进行。

2 结果与分析

2.1 单蚜传毒

单蚜传毒 3 个月后检测发现,除 CT88 外,其余 9 个 CTV 分离株共获得 234 个蚜传分离株。与锦橙作毒源植株相比,以墨西哥来檬和凤凰柚作毒源植株的单蚜传毒率极低,有时不能获得蚜传分离株 (表 1)。以锦橙作毒源植株时,褐色桔蚜的无翅成蚜对 CTV 强毒株的平均单蚜传毒率为 28.63%, 高于对弱毒株的平均传毒率 (15.86%); 其中在强毒分离株中,以 CT32 的传毒率最高,为 50.67%; 在弱毒分离株中,以 CT16 的传毒率最高,为 48.89% (表 1)。在 $\alpha = 0.05$ 水平时进行方差分析,褐色桔蚜对弱毒株传毒率的平均值 = 0.1586 ± 0.1975 (sd); 对强毒株传毒率的平均值 = 0.2865 ± 0.1711 (sd), 经独立样本的 T 测验分析后得出 $F = 1.244$ $P = 0.297 > 0.05$ 这表明褐色桔蚜的无翅成蚜对 CTV 强弱毒株的传毒率不存在显著性差异。在相同的试验条件下,褐色桔蚜的有翅成蚜对 CT9、CT30、CT32 和 CT89 传毒率的平均值 = 0.1779 ± 0.1794 (sd); 其无翅成蚜对相同毒源传毒率的平均值 = 0.2280 ± 0.2180 (sd), 经独立样本的 T 测验分析后得出 $F = 0.478$ $P = 0.515 > 0.05$ 表明有翅成蚜和无翅成蚜的传毒率没有显著性差异 (表 1)。

单蚜传毒 5 个月后检测,结果相同。

2.2 p25 *H in fl* RFLP 组群分析

原混合组群的分离株得到了分离纯化: 从 CT16 中分离出 2 个单一第 1 组群和 32 个单一第 3 组群的株系,其余蚜传分离株中仍混有第 1 和第 3 组群的株系; 从 CT31 中分离出 4 个单一第 1 组群、12 个单一第 3 组群的株系,以及 4 个混有第 1 和第 3 组

表 1 不同柑桔种类间褐色桔蚜的单蚜传毒率情况

Table 1 Transmission rates of CTV isolates by the single aphid of *T. citricida* from different host plants to Jincheng

致病力 Pathogenicity	毒源 Original isolate	毒源植株 Vial source plant	虫态 Aphid status	阳性植株数/检测植株数 No positive/No inoculated	传毒率(%) Transmission rate
弱毒株 Mild isolate	CT9	墨西哥来檬 Mexican lime	无翅蚜 Apter	2/79	2.53
		凤凰柚 Feng-huang pumello	无翅蚜 Apter	1/80	1.25
		锦橙 Jincheng	无翅蚜 Apter	7/82	8.54
	CT89	墨西哥来檬 Mexican lime	有翅蚜 Apta	6/80	7.50
			无翅蚜 Apter	0/72	0.00
		凤凰柚 Feng-huang pumello	无翅蚜 Apter	0/75	0.00
		锦橙 Jincheng	无翅蚜 Apter	2/73	2.74
		有翅蚜 Apta	3/84	3.57	
	CT11	锦橙 Jincheng	无翅蚜 Apter	25/80	31.25
	CT16	锦橙 Jincheng	无翅蚜 Apter	44/90	48.89
	CT77	锦橙 Jincheng	无翅蚜 Apter	3/80	3.75
CT88	锦橙 Jincheng	无翅蚜 Apter	0/75	0.00	
强毒株 Severe isolate	CT30	墨西哥来檬 Mexican lime	无翅蚜 Apter	2/70	2.84
		凤凰柚 Feng-huang pumello	无翅蚜 Apter	1/77	1.30
		锦橙 Jincheng	无翅蚜 Apter	26/89	29.21
	CT32	墨西哥来檬 Mexican lime	有翅蚜 Apta	12/72	16.67
			无翅蚜 Apter	1/69	1.45
		凤凰柚 Feng-huang pumello	无翅蚜 Apter	0/57	0.00
		锦橙 Jincheng	无翅蚜 Apter	38/75	50.67
	CT31	锦橙 Jincheng	有翅蚜 Apta	33/76	43.42
			无翅蚜 Apter	20/78	25.64
		CT76	锦橙 Jincheng	无翅蚜 Apter	8/88

表 2 10个 CTV 分离株单蚜传毒前后 *p25 HinfI* RFLP 组群分析Table 2 *p25 HinfI* RFLP groups analysis of 10 CTV isolates and their sub-isolates by single aphid transmission

毒源 Isolate	<i>p25 HinfI</i> RFLP group		数量 Amount	毒源 Isolate	<i>p25 HinfI</i> RFLP group		数量 Amount
	母株 Original	亚分离株 Aphid sub-isolate			母株 Original	亚分离株 Aphid sub-isolate	
CT9	6	6	7	CT11	3	3	25
CT76	4	4	8	CT16	1+3	1	2
CT89	5	3	1			3	32
		5	1			1+3	10
CT31	1+3	1	4	CT88	6	0	0
		3	12	CT30	3+6	3	26
		1+3	4	CT32	1+3+5	3	29
CT77	4	4	3			3+5	7
						1+3+5	2

群株系的蚜传分离株;从 CT30中只分离出单一第 3 组群的株系;从 CT32中分离出 29个单一第 3 组群的株系、9个混合组群的蚜传分离株。CT89获得了 2个分别属于单一第 3 和第 5 组群的蚜传分离株(表 2)。单一 *p25 HinfI* RFLP 组群构成的 CTV 分离株在单蚜传毒前后组群构成没有发生明显变化。

2.3 序列分析

将 5 个单一 *p25 HinfI* RFLP 组群的 CTV 分离

株与 2 个国外已知为低传毒能力的 CTV 分离株 T36 和 T30^[6] 进行 *p25* 和 *p20* 基因序列分析。结果表明, 7 个 CTV 分离株的 *p25* 基因对应氨基酸序列的相似性为 92.8% ~ 98.2%。具有高传毒率的 CT11 与其它传毒能力低的 CTV 分离株相比, 分别在第 72、117、136、149、150、151 和 213 位的氨基酸发生了变化; *p20* 基因对应氨基酸序列的相似性为 91.7% ~ 98.3%。CTV 分离株传毒能力与其 *p20* 基

因对应氨基酸序列的关系不明显。

3 讨论

本研究通过比较褐色桔蚜在不同条件下传播 CTV 的效率表明, 毒源植株的种类对蚜虫传毒率的影响明显, 有翅或无翅成蚜以及 CTV 的强弱毒株对蚜虫传毒率的影响并不显著。先前的研究表明, 以墨西哥来檬或甜橙作毒源植株时可以获得较高的传毒率, 并由此推测蚜虫传播 CTV 的能力与 CTV 在寄主中的含量可能存在一定的联系^[1, 3-5]。但进一步的研究表明, CTV 在墨西哥来檬和甜橙中含量与其它品种的差异并不明显^[12]。本研究中仅在以锦橙作毒源植株时获得较高的传毒率。造成不同寄主间蚜传效率差异的原因是否与蚜虫的取食行为或寄主-褐色桔蚜-CTV 三者间的互作有关, 还有待进一步研究。本研究中褐色桔蚜在凤凰柚上所表现的低传毒率也许能够解释田间柚类植株柑桔衰退病发生率低于其它柑桔类型的现象^[4, 13]; 同时也暗示在柚类植株中可能存在一种抑制蚜虫在柚类植株间传播 CTV 的机制^[14]。本研究中褐色桔蚜传播不同 CTV 分离株的能力差异较大, 其中 CT32 的单蚜传毒率最高为 50.67%, 而 CT88 单蚜传毒没有成功, 这可能是由于 CT88 的蚜传能力弱, 且采用的样本数还不够多, 不足以反映其蚜传能力。

目前对于蚜虫传播 CTV 的机制仍不清楚。Heron 等^[6]通过比较饲喂褐色桔蚜 CTV 粗提物和 CTV 部分纯化物后的传毒率发现, CTV 的 p20 蛋白抗体可以极大提高褐色桔蚜在体外传播 T661H-3 分离株的能力, 由此推测 p20 蛋白可能在蚜传中发挥作用。本研究中蚜传能力强的 CT11 与 6 个蚜传能力弱的 CTV 分离株在 p20 基因对应氨基酸序列上的差异并不明显; 而 CT11 与这 6 个分离株相比存在一些独有的位点, 并且本研究中具有 p25 *Hinf*I RFLP 第 3 组群的 CTV 分离株往往具有较高的单蚜传毒率, 而所获得的蚜传分离株也大多属于第 3 组群, 表明 p25 基因可能与蚜虫传播 CTV 的能力有关。由于 CTV 具有 12 个开放读码框, 至少可以编码 17 种蛋白质^[15], 因此蚜虫传播 CTV 的过程是否还有其它因子的参与均有待进一步研究。

参考文献 (References)

1 Bar-Joseph M, Marcus R, Lee R F. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. Annual Review of Phytopathology,

1989, 27: 291-316

- 2 周常勇. 我国柑桔衰退病的发生概况与展望. 第一次全国植物病毒与病毒病防治研究学术讨论会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1997: 182-187
- 3 Powell C A, Pelsi R R, Rundell P A, et al. 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 Broadbent P, Brlansky R H, Indsto J. Biological characterization of Australian isolates of *Citrus tristeza closterovirus* and separation of subisolates by single aphid transmissions. Plant Disease, 1996, 80(3): 329-333
- 5 Lin Y, Brlansky R H, Powell C A. Inefficient transmission of *Citrus tristeza virus* from grapefruit by single brown citrus aphids. HortScience, 2002, 37(6): 936-939
- 6 Heron C M, Mikov T E, Graca J V, et al. *Citrus tristeza virus* transmission by the *Toxoptera citricida* vector. In vitro acquisition and transmission and infectivity immunoneutralization experiments. Journal of Virological Methods, 2006, 134(1/2): 205-211
- 7 Gamsey S M, Gumpf D J, Roistacher C N, et al. Toward a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. Phytophylactica, 1987, 19(2): 151-157
- 8 Gamsey S M, Pemar T A, Camber M, et al. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). // Proceedings 12th Conference of the International Organization of Citrus Virus DCV, Riverside, 1993: 39-50
- 9 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. 福建农业大学学报, 2001, 30(增): 200
- 10 Zhou C Y, Hailstones D, Broadbent P, et al. Studies on mild strain cross protection (MSCP) against stem-pitting *tristeza virus*. // Proceedings 15th Conference of the International Organization of Citrus Virus DCV, Riverside, 2002: 151-157
- 11 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. Journal of Virological Methods, 1993, 44(2/3): 305-317
- 12 Ruiz-Ruiz S, Moreno P, Gueri J, et al. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. Journal of Virological Methods, 2007, 145(2): 96-105
- 13 宋震, 周常勇, 周彦, 等. 柑桔衰退病毒柚类分离株的分子鉴定. 病毒学报, 2006, 22(4): 314-319
- 14 Marroqu C, Omos A, Gorris M T, et al. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. Virus Research, 2004, 100(1): 101-108
- 15 Karasev A V, Boyko V P, Gowda S, et al. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. Virology, 1995, 208(2): 511-520