

柑桔衰退病毒分离株分子特征初步研究

周彦^{1,2}, 周常勇^{1,2*}, 王雪峰¹, 刘科宏¹, 刘金香¹, 唐科志¹

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

Preliminary study on molecular characterization of 11 isolates of *Citrus tristeza virus*

ZHOU Yan^{1,2}, ZHOU Chang-yong^{1,2}, WANG Xue-feng¹, LIU Ke-hong¹, LIU Jin-xiang¹, TANG Ke-zhi¹

(¹Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China; ²College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

文章编号: 0412-0914(2005)06-0147-04

柑桔衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)广泛分布于世界各柑桔产区,迄今已经摧毁了一亿株柑桔,目前仍然严重威胁着以酸橙作砧木的柑桔产区和对茎陷点型 CTV 敏感的葡萄柚、柚类和某些甜橙的安全^[1]。我国广泛分布着 CTV 的多种强毒株,随着近年来柑桔产业结构调整深入,茎陷点型 CTV 对柚类和某些甜橙的危害正变得日益严峻^[2]。国外的经验表明,弱毒株交叉保护(MSCP)是目前防治茎陷点型 CTV 最有效手段^[3]。

CTV 属于长线形病毒属(*Closterovirus*),基因组为 19 296 个核苷酸组成的正义单链 RNA,具有 12 个开放读码框(ORF),可以编码 17 种蛋白质,其中 25 kDa 和 27 kDa 外壳蛋白分别包裹着约 95% 和 5% 的病毒区域^[4,5]。CTV 存在着复杂的株系分化现象,不同的 CTV 分离株能够引起包括茎陷点、酸橙砧木的快速死亡在内的多种症状^[6]。在弱毒株筛选时,除传统的指示植物鉴定外^[7],还有单克隆抗体检测^[8]、反转录-多聚酶链式反应(RT-PCR)分析^[9]、限制性片段长度多态性(RFLP)分析^[10]、单链构象多态性(SSCP)分析^[11]和序列分析^[12]等快速检测方法。国外广泛运用 CTV 的 p25/*Hinf* I RFLP 组群分析,以及对位于 3' 端比较保守的如决定寄主范围的 p23、与内含体形成有关的 p20 以及与移动相关的 p18 等致病相关

基因进行序列分析,从而加快对 CTV 弱毒株的筛选速度^[11~14]。由于目前尚未建立适合我国国情的 CTV 致病力快速检测体系,因此在本研究中对 11 个国内外 CTV 分离株进行了 p25/*Hinf* I 组群分析,并结合 4 个国外代表性分离株进行了 p23 和 p18 基因序列比对。

1 材料与方法

1.1 实验材料

CT3、CT9 采自四川,CT4、CT10 和 CT14 采自重庆,CT15 采自湖北,Jan1、Jan2 和 Jan3(暂命名)来自日本,PeraIAC 由巴西 Centro de Citricultrua Sylvio Moreira 研究院的 Marcos A. Machado 教授赠送,PB61 由澳大利亚 SMAT 实验室的 Patricia Barkley 赠送。CT9、CT10 在指示植物上不表现症状,Jan1、Jan2、PeraIAC 和 PB61 为国外保护株,其余 5 个分离株在指示植物上都表现严重症状。以上毒源保存在中国农科院柑桔研究所病毒组。

1.2 p25、p23 和 p18 基因的合成和扩增

按照周常勇等^[15]的方法提取样品总核酸,并分别依据 Gillings 等^[10]和周常勇等^[16]的方法合成特异性引物 CP1(ATGGACGACGAAACAAAG)、CP3(TCAACGTGTGTTGAATTT)、p23f(ATG-

收稿日期: 2005-04-12; 修回日期: 2005-11-14

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)

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; E-mail: changyong@hotmail.com。

GATAATACTAGCGGACA)、p23r (TCAGATGAAGTGGTGTTCAC)、p18f(ATGTCAGGCAGCTTGGGAAA)和p18r(CTAAGTCACGCTAAA-CAAAG),在 T_{GRADIENT} 型PCR仪(WhatMan)上进行扩增。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后,用Gel Doc™ EQ型凝胶成像系统(Bio-Rad)观察结果。

1.3 RFLP 分析

将p25扩增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后进行3%超纯琼脂糖凝胶电泳^[10]。溴乙锭染色后观察酶切图谱。

1.4 序列分析

p23和p18基因的扩增产物经PCR产物纯化试剂盒(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DNASTAR整理测序峰值后,经CLUSTAL W处理,最后分别利用BioEdit 7.0中Sequence Identity Matrix进行最大相似性分析;MEGA 3.0中Neighbor-Joining Tree进行系统进化树分析,Treeview 1.6.6生成进化树。测序工作在中国农科院柑桔研究所脱毒中心进行。

2 结果与分析

2.1 RFLP 分析

根据Gillings等^[10]对CTV的RFLP分群标准,CT3、CT9和PeraIAC为p25/Hinf I RFLP第6组群;CT14和3个日本分离株为p25/Hinf I RFLP第3组群;CT4、CT15为p25/Hinf I RFLP第1和3组群;CT10与PB61分别为p25/Hinf I RFLP第4、5组群。

2.2 序列分析

测序结果与从NCBI数据库中下载的苗黄型CTV NuagA (AB046398)、茎陷点型CTV VT (U56902)和SY568 (AF001623)以及速衰型CTV T36 (U16034)这4个国外代表性CTV分离株的p23和p18序列进行最大相似性分析发现,这15个CTV分离株p23、p18的最大相似性分别约为0.883~0.995和0.888~0.990。来源于日本的3个CTV分离株都为p25/Hinf I RFLP第6组群,并

且p23序列之间的最大相似性都高于0.991;CT3与来源四川的另一CTV分离株CT9最大相似性最高,达0.987,与来源于重庆的CT4和CT14的最大相似性也为0.911和0.918,三者都为强毒株,而CT3与来源于湖北的强毒株CT15的最大相似性仅为0.890,可见,来源相同的CTV分离株基因序列同源性最高,生物学性状相似的CTV分离株基因序列具有较高的同源性;并且在进行了p25/Hinf I RFLP组群分析的11个CTV分离株中,具有相同p25/Hinf I RFLP组群的CTV分离株之间比不同的p25/Hinf I RFLP组群也具有更高的最大相似性;在对p18进行最大相似性分析时也得出类似的结果(表1)。

在使用Neighbor-Joining Tree绘制的p23进化树中,15个CTV分离株分为了3个类群,CT3和CT9为第1类群,CT10、T36、CT15和PB61为第2类群,其余9个为第3类群;在根据p18绘制的进化树中也有3个类群,T36、CT10和PB61为第1类群,CT15、CT9和CT3为第2类群,其余为第3类群。从2个进化树中可以发现,来源相同的CTV分离株在同一簇上,具有更为紧密的亲缘关系(图1)。

3 讨论

CTV具有复杂的株系分化现象,传统的指示植物筛选方法周期长,工作量大,因此需要运用分子生物学方法对CTV进行快速筛选。由于CTV的核酸序列在3'端具有较高的保守性,而5'端的保守性不足40%,因此3'端p25、p23等基因往往成为进行株系分析的对象^[17]。Gillings等^[10]运用p25/Hinf I RFLP组群分析将CTV分为了7个组群,其中p25/Hinf I RFLP第4和5组群中存在潜在保护株。Kong等^[11]利用不同CTV株系中p18和p20基因上的差异从中筛选出弱毒株。Sambade等^[12]对15个CTV分离株的p23进行了系统发育树分析,从而对CTV的生物学特性进行初步评估。

本研究通过对11个CTV分离株进行p25/Hinf I RFLP组群分析,以及与4个国外CTV分离株进行p23、p18序列分析,结果表明,来源相同或具有相同p25/Hinf I RFLP组群的CTV分离株具有较高的最大相似性。在本研究中序列分析的分

Table 1 Sequence identity matrix of p23 (left) and p18 (right) gene of 15 CTV isolates

Seq	CT3	CT4	CT9	CT10	CT14	CT15	Jan1	Jan2	Jan3	PeraIAC	NuagA	PB61	SY568	T36	VT
CT3	ID	0.933	0.990	0.903	0.919	0.932	0.901	0.906	0.905	0.974	0.904	0.895	0.906	0.900	0.903
CT4	0.911	ID	0.927	0.923	0.969	0.988	0.952	0.952	0.955	0.963	0.963	0.906	0.957	0.923	0.957
CT9	0.987	0.905	ID	0.900	0.916	0.925	0.898	0.903	0.901	0.961	0.901	0.896	0.903	0.896	0.900
CT10	0.905	0.943	0.900	ID	0.906	0.921	0.908	0.911	0.905	0.912	0.904	0.946	0.907	0.904	0.904
CT14	0.918	0.956	0.911	0.948	ID	0.952	0.943	0.946	0.946	0.952	0.946	0.898	0.947	0.916	0.955
CT15	0.890	0.976	0.883	0.918	0.943	ID	0.943	0.943	0.943	0.952	0.943	0.913	0.943	0.913	0.938
Jan1	0.909	0.950	0.903	0.941	0.971	0.933	ID	0.985	0.987	0.960	0.984	0.901	0.960	0.909	0.944
Jan2	0.909	0.950	0.903	0.941	0.971	0.935	0.995	ID	0.964	0.960	0.960	0.908	0.977	0.912	0.944
Jan3	0.905	0.946	0.896	0.937	0.976	0.928	0.991	0.991	ID	0.960	0.984	0.901	0.981	0.912	0.947
PeraIAC	0.971	0.941	0.975	0.937	0.976	0.937	0.976	0.976	0.980	ID	0.960	0.912	0.958	0.920	0.942
NuagA	0.911	0.948	0.905	0.939	0.978	0.926	0.984	0.984	0.989	0.989	ID	0.901	0.967	0.914	0.950
PB61	0.900	0.937	0.894	0.946	0.941	0.941	0.931	0.931	0.926	0.939	0.920	ID	0.901	0.888	0.890
SY568	0.896	0.941	0.890	0.933	0.963	0.918	0.974	0.974	0.976	0.959	0.976	0.922	ID	0.912	0.952
T36	0.903	0.933	0.896	0.954	0.950	0.918	0.926	0.931	0.926	0.939	0.928	0.943	0.926	ID	0.903
VT	0.900	0.933	0.892	0.933	0.950	0.905	0.956	0.956	0.961	0.946	0.959	0.918	0.946	0.931	ID

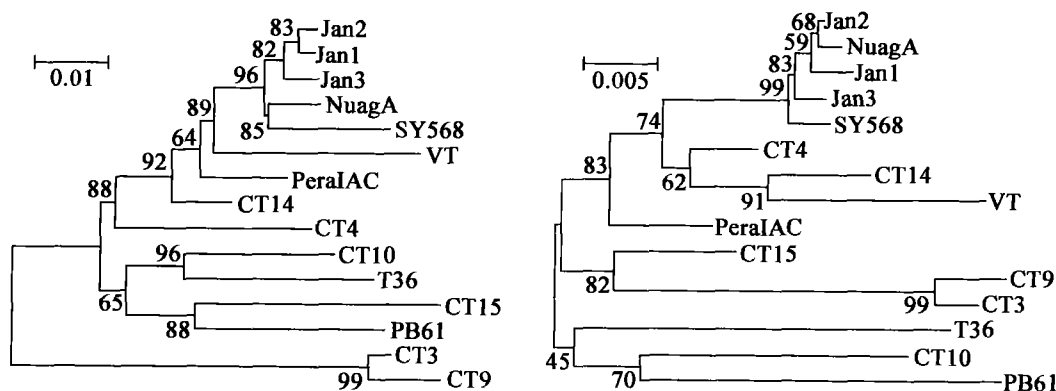


Fig. 1 Phylogenetic tree of p23 (left) and p18 (right) gene sequence of 15 CTV isolates using MEGA 3.0

The trees unrooted were constructed by the neighbor-joining method with bootstrap 1000 repetitions.

类鉴定效果不如国外的报道原因可能是,本研究中使用的CTV分离株不具备国外典型CTV分离株的特点;或者是国内样品混合感染CTV的程度比国外样品复杂,而在测序中只有主要株系被检测出来所造成的。由于MSCP的防治效果与免疫株系和强毒株的亲缘关系有关,因此在本研究中CTV分离株表现出的地域差异可能是造成MSCP存在地域专化性的原因;而强毒分离株CT3与弱毒分离株CT9具有很高的同源性,这意味着CT9可能

对CT3流行地区的柑桔衰退病具有一定的防治作用^[16]。

随着我国柑桔产业的迅猛发展,CTV茎陷点型强毒株对柚类和某些甜橙的危害已日益严重,本研究结果将有助于建立我国自己的标准CTV检测体系,从而为加快筛选具有潜在保护作用的CTV弱毒株,以及引进国外保护株提供技术支持,进而最终运用MSCP防治茎陷点型柑桔衰退病,为我国柑桔产业健康、持续的发展提供保障。

参考文献

- [1] Roistacher C N. Should we introduce protective isolates of *Citrus tristeza virus* [J]. *Citrograph*, 1992, 77:5-9.
- [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]. 15th Conference of the International Organization of Citrus Virus [C]. California: University of California Riverside, 2002. 172-175.
- [3] Youjian L, Rundell P A, Powell C A. In situ immunoassay (ISIA) of field grapefruit trees inoculated with mild isolates of *Citrus tristeza virus* indicates mixed infections with severe isolates [J]. *Plant Disease*, 2002, 86:458-461.
- [4] Karasev A V, Boyko V P, Gowda S, *et al.* Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome [J]. *Virology*, 1995, 208: 511-520.
- [5] Febres V J, Ashoulin M, Mawassi A, *et al.* The p27 protein is present at one end of *citrus tristeza virus* particles [J]. *Phytopathology*, 1996, 86: 1331-1335.
- [6] Bar-Joseph M, Marcus R, Lee R F. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control [J]. *Annual Review Phytopathology*, 1989, 27: 291-316.
- [7] Garnsey S M, Civerolo E L, Gumpf D J, *et al.* Development of a worldwide collection of *Citrus tristeza virus* isolates [A]. 11th Conference of the International Organization of Citrus Virus [C]. California: University of California Riverside, 1991. 113-120.
- [8] Permar T A, Garnsey S M, Gumpf D J, *et al.* A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus* [J]. *Phytopathology*, 1990, 80(3): 224-228.
- [9] Hilf M E, Karasev A V, Albiach-Marti M R, *et al.* Two paths of sequence divergence in the *Citrus Tristeza virus* complex [J]. *Phytopathology*, 1999, 89: 336-342.
- [10] 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.
- [11] Kong P, Rubio L, Polek M, *et al.* Population structure and genetic diversity within California *Citrus Tristeza Virus* isolates [J]. *Virus Genes*, 2000, 21:139-145.
- [12] Sambade M, Lopez C, Rubio L, *et al.* Polymorphism of a specific region in gene p23 of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates [J]. *Archives of Virology*, 2003, 148: 2325-2340.
- [13] Fagoaga C, Lopez C, Moreno P, *et al.* Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(5): 435-445.
- [14] Gowda S, Satyanarayana T, Davis T, *et al.* The p20 gene product of citrus *tristeza* closterovirus accumulates in the amorphous inclusion bodies [J]. *Virology*, 2000, 274: 246-254.
- [15] 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): 200.
- [16] Zhou CY, Broadbent P, Hailstones D, *et al.* Studies on mild strain cross protection (MSCP) against stem-pitting *Citrus tristeza virus* [A]. 15th Conference of the International Organization of Citrus Virus, IOCV [C]. California: University of California Riverside, 2002. 151-157.
- [17] Lopez C, Ayllon M A, Navas-Castillo J, *et al.* Molecular variability of the 5'-and 3'-terminal regions of *Citrus tristeza virus* RNA [J]. *Virology*, 1998, 88(7): 685-691.