

# 寄主凤凰柚对柑橘衰退病毒甜橙分离株构成的影响

王志刚<sup>1</sup>, 周常勇<sup>1,2\*</sup>, 周彦<sup>2</sup>

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

**摘要:** 为研究不同柑橘类型对柑橘衰退病毒构成的影响, 将9个保存在新会橙上的引起甜橙茎陷点症状的柑橘衰退病毒强毒分离株嫁接到凤凰柚后, 比较了接种前后 *p25* 基因的 *Hinf* I RFLP 和 SSCP 变化情况。分离株 CT90 与 CT20 接种前后的 RFLP 组群没有发生变化; RFLP 组群发生变化的分离株中有6个由混合组群变为单一组群。此外, 除分离株 CT90 接种前后的 SSCP 谱带保持不变外, 其余8个分离株从新会橙接种到凤凰柚后, SSCP 谱带数均呈减少趋势。试验结果倾向于表明某些能在甜橙上增殖的 CTV 株系在凤凰柚上的增殖受到了抑制。

**关键词:** 柑橘; 柑橘衰退病毒; 株系构成; 寄主

中图分类号: S 666 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 05-1098-05

## Influence of Fenghuang Pummelo on the Composition of *Citrus tristeza virus* Isolates Collected from Sweet Orange

WANG Zhi-gang<sup>1</sup>, ZHOU Chang-yong<sup>1,2\*</sup>, and ZHOU Yan<sup>2</sup>

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

**Abstract:** For the preliminary study on influence of different citrus cultivars on the composition of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates, the *Hinf* I RFLP and SSCP of *p25* gene of 9 CTV isolates collected from sweet orange shown stem-pitting symptom were comparatively analysed as those isolates were graft inoculated from Xinhui sweet orange to Fenghuang pummelo. The results of RFLP revealed that the *Hinf* I RFLP group of the isolates CT90 and CT20 were kept the same as in Xinhui sweet orange and in Fenghuang pummelo; RFLP groups of other 6 isolates shown mixed groups in Xinhui sweet orange and single group in Fenghuang pummelo. DNA bands of *p25*/SSCP of the isolate CT90 kept the same as in Xinhui sweet orange and in Fenghuang pummelo but DNA bands of other 8 isolates maintained in Fenghuang pummelo were less than that of which maintained in Xinhui sweet orange. It seems that the replication of some composition of above 8 CTV isolates collected from sweet orange were inhibited in Fenghuang pummelo.

**Key words:** Citrus; *Citrus tristeza virus*; Composition of isolate; Host

柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV) 引起的柑橘衰退病是世界性的柑橘病害之一, 严重影响我国柚类与甜橙生产 (Bar-Joseph et al., 1989; Roistacher & Moreno, 1991; 周常勇, 1997)。CTV 为线形病毒属 (*Closterovirus*) 成员, 基因组为正义单链 RNA, 存在复杂的株系分化现象。Gillings 等 (1993) 发现用 *Hinf* I 消化 CTV 的 *p25* 基因的 RT-PCR 产物经琼脂糖电泳所形成的限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, *p25*/*Hinf* I RFLP) 图谱可鉴别致病性不同的 CTV 株

收稿日期: 2007-05-08; 修回日期: 2007-08-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471205); 重庆市科委攻关专项 (2005AB1010)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: changyong@hotmail.com)

系。采用这一分子鉴别系统,周彦等(2005)发现重庆地区田间 CTV 以多株系混合侵染为主,其中甜橙品种的 CTV *p25/Hinf I* RFLP 组群构成较柚类品种的复杂; Xu 等(2006)调查发现我国田间甜橙品种 CTV 以多组群混合侵染为主;宋震等(2006)对我国柚类品种 CTV 分离株的分子鉴定表明,田间柚类 CTV 优势株系为 *p25/Hinf I* RFLP 第 VI 组群。这些研究表明我国田间侵染柚类的 CTV *p25/Hinf I* RFLP 组群构成比侵染甜橙的 CTV *p25/Hinf I* RFLP 组群构成单一。这种现象是否与 CTV 不同株系对柚类和甜橙类的寄生适合度的差异有关,有待进一步的研究。

国外的试验表明,在 CTV 强毒株流行地区,弱毒株交叉保护(mild strain cross protection, MSCP)是防治茎陷点型衰退病的有效方法(Lin et al., 2002),而在应用 MSCP 防治 CTV 时保护株系与强毒株的同源性决定了保护效果(Williams et al., 2002)。如果寄主—CTV 的互作导致柚类和甜橙品种中流行的 CTV 强毒株以及可以复制增殖的弱毒株系有所差异,将增加应用 MSCP 防治 CTV 的难度,因此在应用 MSCP 防治 CTV 时应考虑寄主种类对田间 CTV 构成的影响。作者利用采自田间甜橙的 9 个 CTV 分离株进行了寄主种类影响 CTV 株系构成的初步研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

采用的 9 个 CTV 分离株采自田间表现严重茎陷点症状的甜橙,并通过嫁接保存在新会橙实生苗上。从保存毒源的新会橙取芽和皮嫁接到 1 年生无毒凤凰柚嫁接苗上,每一分离株嫁接 3 株凤凰柚,每一株凤凰柚嫁接 2 个芽 3 块皮。嫁接后将凤凰柚苗木保存于国家柑橘苗木脱毒中心温室,温度控制在 21~25℃。所嫁接的皮和芽均成活。接种 3 个月后,按 Garnsey 等(1993)的方法对所有接种 CTV 的凤凰柚苗进行直接组织点免疫(DTBIA)检测,表明均接种成功。

### 1.2 总核酸的提取及 *p25* 基因的 RT-PCR

参照周常勇等(2001)的方法对保存毒源的新会橙和接种 CTV 的凤凰柚进行总核酸提取。每株苗从三个方向分别采样提取总核酸,然后混合为一个样本。根据 Gillings 等(1993)的方法合成 *p25* 基因特异引物 CP1 (5'-ATggACgACgAAACAAAg-3') 和 CP3 (5'-TCAACgTgTgTTgAATTT-3'),以已知含有 CTV 核酸的抽提液作正对照,分别以未接种 CTV 的新会橙实生苗和凤凰柚嫁接苗总核酸抽提液作负对照,并设置清水为对照,在 TGRADIENT 型 PCR 仪(WhatMan)上进行 RT-PCR(Gillings et al., 1993)。将 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖电泳,经溴乙锭染色后用 UVI 凝胶成像系统观察结果。

### 1.3 RFLP 分析

参照 Gillings 等(1993)的方法将 *p25* 基因 RT-PCR 产物与限制性内切酶 *Hinf I* (Promega) 反应体系混合,37℃ 消化 1 h,随后进行 3% 超纯琼脂糖电泳,溴乙锭染色,用 UVI 凝胶成像系统观察记录酶切图谱。

### 1.4 SSCP 分析

将 1 μL *p25* 基因 RT-PCR 产物与变性缓冲液混合后,经 99℃ 变性 15 min,立即置于冰水中,随后进行 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染后用 UVI 凝胶成像系统观察并记录结果(Ayllón et al., 1999; Rubio et al., 2001)。

## 2 结果与分析

### 2.1 *p25* 基因 RT-PCR

保存于新会橙的 9 个分离株及其接种的凤凰柚的总核酸抽提物和正对照经 RT-PCR 均扩增出一个大约 672 bp 的 DNA 片段,与已知的 CTV *p25* 基因大小相符。负对照和水对照均不能扩增出该产物。

2.2 RFLP 分析

根据 Gillings 等 (1993) 对 CTV *p25/Hinf* I RFLP 划分组群的标准, 9 个 CTV 分离株中, 分离株 CT90、CT20 从新会橙接种到凤凰柚后, *p25/Hinf* I RFLP 组群无变化, 分别是第 VI 组群和 I、III、V 混合组群。其余 7 个分离株从新会橙接种到凤凰柚后, *p25/Hinf* I RFLP 组群都发生了变化, 其中分离株 CT24 在新会橙上是 III 组群, 接种在 3 株凤凰柚上分别是 I 组群, I、III 混合组群和 I 组群, 另外 6 个分离株均由混合组群变为单一组群。如图 1, 表 1 所示。

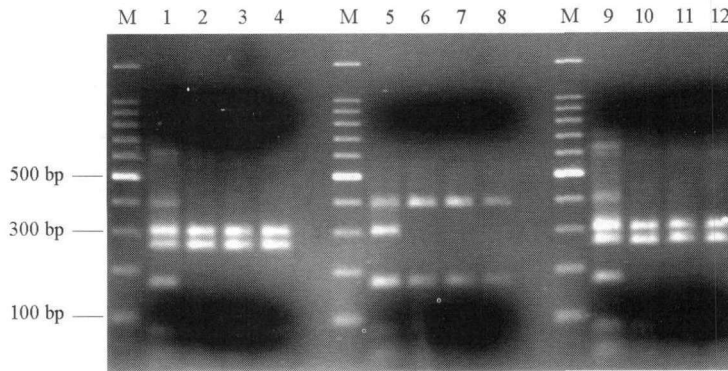


图 1 3 个 CTV 分离株的 *p25/Hinf* I RFLP 图谱

M. 100 bp 梯度 DNA marker; 1. 保存于新会橙的分离株 CT21, I、VI 混合组群;  
2-4. 接种到凤凰柚后的分离株 CT21, VI 组群; 5. 保存于新会橙的分离株 CT33, I、III 混合组群;  
6-8. 接种到凤凰柚后的分离株 CT33, I 组群; 9. 保存于新会橙的分离株 CT28,  
I、VI 混合组群; 10-12. 接种到凤凰柚后的分离株 CT28, VI 组群。

Fig. 1 The *p25/Hinf* I RFLP profiles of 3 CTV isolates

M: DNA marker with 100 bp ladder; 1: CTV isolate CT21 maintained in Xinhui sweet orange, group I and VI; 2-4: CTV isolate CT21 inoculated in Fenghuang pummelo, group VI; 5: CTV isolate CT33 maintained in Xinhui sweet orange, group I and III; 6-8: CTV isolate CT33 inoculated in Fenghuang pummelo, group I; 9: CTV isolate CT28 maintained in Xinhui sweet orange, group I and VI; 10-12: CTV isolate CT28 inoculated in Fenghuang pummelo, group VI.

表 1 CTV 从新会橙接种到凤凰柚后的 *p25/Hinf* I RFLP 组群和 *p25*/SSCP 变化

Table 1 Summary of *p25/Hinf* I RFLP group and DNA bands number of SSCP with the CTV-inoculation from Xinhui sweet orange to Fenghuang pummelo

CTV 分离株 CTV isolate	<i>p25/Hinf</i> I RFLP 组群 <i>p25/Hinf</i> I RFLP group				<i>p25</i> /SSCP 特征性谱带数 DNA bands number of <i>p25</i> /SSCP			
	A	B1	B2	B3	A	B1	B2	B3
CT90	VI	VI	VI	VI	4	4	4	4
CT19	I, III	III	III	III	8	6	6	6
CT20	I, III, V	I, III, V	I, III, V	I, III, V	6	4	4	4
CT4	I, III	I	III	I	8	4	4	4
CT24	III	I	I, III	I	6	6	4	4
CT15	III, VI	VI	VI	VI	8	4	4	4
CT21	I, VI	VI	VI	VI	6	4	4	4
CT33	I, III	I	I	I	6	4	4	4
CT28	I, VI	VI	VI	VI	8	4	4	4

注: A. 保存在新会橙上的 CTV 分离株; B1, B2, B3. 接种到凤凰柚后的 CTV 分离株。

Note: A. CTV isolates maintained in Xinhui sweet orange; B1, B2, B3. CTV isolates inoculated in Fenghuang pummelo.

### 2.3 SSCP 分析

9 个 CTV 分离株中, 分离株 CT90 从新会橙接种到凤凰柚后的 *p25*/SSCP 谱带无变化, 其余 8 个分离株接种到凤凰柚后的 *p25*/SSCP 特征性谱带数均呈减少趋势。如表 1, 图 2 所示。

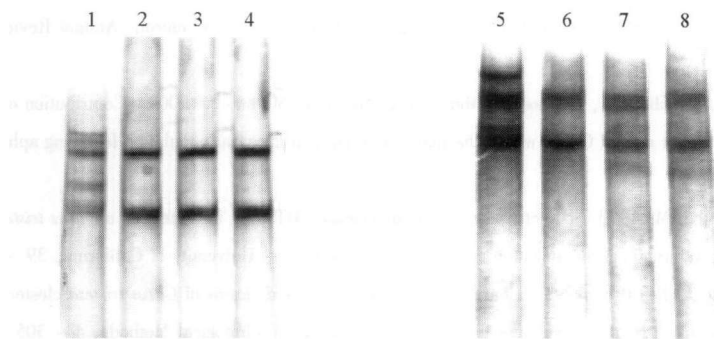


图 2 两个 CTV 分离株从新会橙接种到凤凰柚后的 *p25*/SSCP 结果

1: 保存在新会橙上的 CTV 分离株 CT21; 2~4: 接种到凤凰柚后的 CTV 分离株 CT21;  
5: 保存在新会橙上的 CTV 分离株 CT28; 6~8: 接种到凤凰柚后的 CTV 分离株 CT28。

Fig. 2 *p25*/SSCP patterns of two CTV isolates

1: CTV isolate CT21 maintained in Xinhui sweet orange; 2-4: CTV isolate CT21 inoculated in Fenghuang pummelo; 5: CTV isolate CT28 maintained in Xinhui sweet orange; 6-8: CTV isolate CT28 inoculated in Fenghuang pummelo.

### 3 讨论

在新会橙上除分离株 CT90 是 VI 组群、分离株 CT24 是 III 组群外其余分离株均是混合组群; 而比 RFLP 更加灵敏的 SSCP 的结果表明这 9 个分离株均有 4 条以上的 DNA 条带 (表 1)。这说明本试验所采用的毒源都是混合株系。

Tsai 等 (1993) 通过血清学方法研究, 认为甜橙茎陷点株系、宽皮柑橘茎陷点株系和普通苗黄株系在柚类上不能复制增殖。本试验也表明某些存在于甜橙上的株系在凤凰柚上可能受到了抑制。当然, 本试验中在凤凰柚上“被抑制”的 CTV 株系是否在凤凰柚上已经被清除, 还需要作进一步的试验。

分离株 CT90 接种前后均是 VI 组群, SSCP 谱带亦无变化; 同时, 混合组群中含有 VI 组群的分离株 (CT15、CT21、CT28) 在接种到凤凰柚后都是单一的 VI 组群, 这表明凤凰柚对 VI 组群的 CTV 株系的复制增殖没有抑制。这也许是 *p25*/*Hinf* I RFLP VI 组群是田间柚类 CTV 主要流行组群的原因。

分离株 CT24, 保存在新会橙上是 *p25*/*Hinf* I RFLP III 组群, 接种到凤凰柚上后改变为 I 组群, I、III 混合组群和 I 组群, 其 SSCP 谱带变化也较为特别 (表 1)。该现象可能由于该分离株在新会橙上原本含有 I、III 混合组群的株系, 但是 I 组群的株系含量低, 以至表现为单纯的 *p25*/*Hinf* I RFLP III 组群; 而该分离株当中属于 III 组群的株系在凤凰柚上的增殖复制受到了抑制, 属于 I 组群的株系得以较多地增殖, 所以在 3 个凤凰柚样本中分别表现为 I 组群, I、III 混合组群和 I 组群。当然, 也可能由于 CTV 在寄主上的分布不均 (d'Urso et al., 2000), 该分离株在嫁接接种用的新会橙芽和皮上就存在株系的分离现象, 进而导致该分离株如此特别的表现。这一现象与徐小峰等 (2005) 单蚜传毒分离 *p25*/*Hinf* I RFLP III 组群 CTV 分离株获得 I 组群, I、III 混合组群和 I 组群分离株的现象类似。

## References

- Ayllón M A, Rubio L, Moya A, Guerri J, Moreno P. 1999. The haplotype distribution of two genes of *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. *Virology*, 255 (1): 32–39.
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee R F. 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review Phytopathology*, 27: 291–316.
- d'Urso F, Ayllón M A, Rubio L, Sambade A, Hermoso de Mendoza A, Guerri J, Moreno P. 2000. Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of *Citrus tristeza virus* (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. *Plant Pathology*, 49: 288–294.
- Garnsey S M, Permar T A, Camber M. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). In: Proceedings 12th conference of the international organization of citrus virus. California: University of California, 39–50.
- Gillings M, Broadbent P, Indsto J, Lee R F. 1993. Characterization of isolates and strains of *Citrus tristeza virus* closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 44: 305–317.
- Lin Y, Rundell R A, Powell C. 2002. In situ immuno assay (ISIA) of field grapefruit trees inoculated with mild isolates of *Citrus tristeza virus* indicated mixed infection with severe isolates. *Plant Disease*, 86 (5): 458–461.
- Roistacher C N, Moreno P. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus* – a review. In: Proceeding 10th conference of the international organization of citrus virus. Riverside: IOCV: 7–19.
- Rubio L, Ayllón M A, Kong P, Fernández A, Kong P, Fernández A, Polek M, Guerri J, Moreno P, Falk B. 2001. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infection and recombination. *Journal of Virology*, 75: 8054–8062.
- Song Zhen, Zhou Chang-yong, Zhou Yan, Wang Xue-feng, Tang Ke-zhi. 2006. Molecular identification of *Citrus tristeza virus* isolates from pummelos. *Chinese Journal of Virology*, 22, 314–319. (in Chinese)
- 宋震, 周常勇, 周彦, 王雪峰, 唐科志. 2006. 柑橘衰退病毒柚类分离株的分子鉴定. *病毒学报*, 22 (4): 314–319.
- Tsai M C, Su H J, Stephen M G. 1993. Comparative study on stem-pitting strains of CTV in the Asian countries. In: Proceeding 10th conference of the international organization of citrus virus. Riverside: IOCV: 16–19.
- Williams A P, Mathews D M, Heick J A, Dodds J A. 2002. Segregation of sweet orange stem pitting types and stunting factors in subcultures from the severe SY568 strain of *Citrus tristeza virus*. In: Proceeding 15th conference of the international organization of citrus virus. Riverside: IOCV: 21–30.
- Xu Xiao-feng, Song Zhen, Zhou Yan, Zou Min, Zhou Chang-yong. 2005. CTV Subisolates obtained by single aphid transmission. *Southwest Horticulture*, 33 (Suppl.): 37–39. (in Chinese)
- 徐小峰, 宋震, 周彦, 邹敏, 周常勇. 2005. 通过单蚜传毒分离纯化柑橘衰退病毒 (CTV) 分离物. *西南园艺*, 33 (增): 37–39.
- Xu Xiao-feng, Zhou Chang-yong, Song Zhen, Yang Fang-yun. 2006. Preliminary studies on CPG/Hinf I RFLP groups of *Citrus tristeza virus* infected sweet oranges in China. *Agriculture Science in China*, 5 (1): 39–41.
- Zhou Chang-yong. 1997. Occurrence guidelines and outlook of *Citrus tristeza virus* in China. In: Liu Yi ed. Proceedings of the first Chinese symposium on plant virus and viral diseases control researches. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 182–187. (in Chinese).
- 周常勇. 1997. 我国柑桔衰退病的发生概况与展望. 见: 刘仪主编. 第一次全国植物病毒与病毒病防治研究学讨论会论文集. 北京: 中国农业科技出版社: 182–187.
- Zhou Chang-yong, Deborah H, Rachael C, Barkley P, Bowyer J. 2001. A micro and rapid nucleotide acid extraction method of *Citrus tristeza virus* for amplification by RT-PCR. *Journal of Fujian Agricultural University*, 30 (Suppl.): 200. (in Chinese)
- 周常勇, Deborah H, Rachael C, Barkley P, Bowyer J. 2001. 一种微量、快速抽提柑桔衰退病毒 (CTV) 核酸运用于 RT-PCR 扩增的方法. *福建农业大学学报*, 30 (增): 200.
- Zhou Yan, Zhou Chang-yong, Wang Xue-feng, Tang Ke-zhi. 2005. The polymorphism of *Citrus tristeza virus* in Chongqing, China. *ACTA Phytolacica Sinica*, 32 (2): 143–147. (in Chinese)
- 周彦, 周常勇, 王雪峰, 唐科志. 2005. 重庆地区柑桔衰退病毒多态性分析. *植物保护学报*, 32 (2): 143–147.