植物保护学报 Journal of Plant Protection，2023，50(5)：1318-1326 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2023.2022080

苹果茎沟病毒柑橘碎叶株系的分布与序列分析

高海馨[1,2] 陈香玲[3] 乔兴华[4] 廖慧红[3] 周常勇[1,2*] 周 彦[1,2*]

（1. 西部(重庆)科学城种质创制大科学中心，重庆 400000；2. 西南大学柑桔研究所国家柑桔工程技术研究中心，重庆 400712；3. 广西农业科学院园艺研究所，南宁 530007；4. 重庆市万州区植物保护与果树技术推广站，万州 404199）

摘要：为明确苹果茎沟病毒(apple stem grooving virus，ASGV)柑橘碎叶株系(citrus tatter leaf virus，CTLV)在中国柑橘产区的发生分布及其分子特性，于2017—2021年对我国12个柑橘主产区开展系统调查，并采用多重比对以及系统发育分析法对CTLV的全序列进行分析。结果表明，从12个柑橘主产区采集的2 012份疑似样品中检测出413份感CTLV阳性样品。除陕西省外，其余11个柑橘主产区样品中均检测出CTLV，并且柚类样品中CTLV的检出率最高，达到32.31%。对分离获得的22株CTLV毒株和已知的7株CTLV以及5株ASGV毒株进行全序列分析，发现所有34株毒株的核苷酸序列相似性为78.6%~99.8%，且CTLV序列的保守性较高。此外，与其他4株ASGV毒株相比，本研究中22株CTLV毒株与ASGV-MK毒株(GenBank登录号为MZ127820.1)具有更近的亲缘关系。推测CTLV中国毒株间的亲缘关系可能与其采样地和寄主品种有关。

关键词：苹果茎沟病毒；柑橘碎叶株系；检测；序列分析；系统进化分析

Distribution and molecular characterization of citrus tatter leaf virus in China

Gao Haixin[1,2] Chen Xiangling[3] Qiao Xinghua[4] Liao Huihong[3] Zhou Changyong[1,2*] Zhou Yan[1,2*]

（1. Integrative Science Center of Germplasm Creation in Western China (Chongqing) Science City, Chongqing 400000, China; 2. National Citrus Engineering Research Center, Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China; 3. Horticultural Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 4. Plant Protection and Fruit Tree Technology Popularization Station in Wanzhou District of Chongqing City, Wanzhou 404199, Chongqing, China）

Abstract: To better understand the distribution and molecular characteristics of citrus tatter leaf virus (CTLV) in China, a field survey was conducted from 2017 to 2021, and a total of 2 012 citrus samples were collected from 12 Chinese major citrus-growing provinces. Among these, 413 citrus samples were tested positive for CTLV, and this virus was present in all of the Chinese major citrus-growing provinces, except Shaanxi Province. In surveyed citrus genotypes, the most frequently infected genotype was pummelo, with an infection rate of 32.31%. CTLV is a strain of apple stem grooving virus (ASGV, *Capillovirus*). In this study, the complete genome sequences of 22 CTLV isolates from different provinces and hosts were sequenced. Comparisons of the whole-genome sequences of these 22 CTLV isolates as well as seven CTLV and five ASGV isolates previously reported from around the world revealed that the sequence identity ranged from 78.6% to 99.8%, indicating that there was a very low level of sequence heterogeneity among CTLV isolates of different geographic origins and hosts. Phylogenetic analyses of these 34 genomic sequences suggest that ASGV-MK (GenBank accession no.: MZ127820.1) has a closer relationship with CTLV than other four ASGV isolates. These results indicate that the evolutionary

基金项目：财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-26-05B)

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：zhoucy@cric.cn，zhouyan@cric.cn

收稿日期：2022-07-28

relationships of Chinese CTLV isolates may be associated with geographic origin and host species.

Key word: apple stem grooving virus; citrus tatter leaf virus; detection; sequence alignment; phylogenetic analysis

中国是柑橘主要原产地之一，种质资源丰富，产量和栽培面积均居世界首位。作为多年生作物，柑橘在田间易受多种病毒侵染，造成树势减弱、产量降低、品质变劣，甚至死亡。由苹果茎沟病毒（apple stem grooving virus，ASGV）柑橘碎叶株系（citrus tatter leaf virus，CTLV）引起的柑橘碎叶病是一种影响柑橘产量和品质的重要病害。虽然大多数柑橘品种是隐症带毒，但枳及其杂种感染CTLV后，其砧穗嫁接口肿大、木质部间有一圈缢缩线且易断裂，叶脉黄化，叶片易脱落，植株衰退甚至死亡（Tan et al.，2019）。自1962年CTLV首次在美国加州被发现以来（Wallace & Drake，1962），目前广泛分布在美国、南非、澳大利亚及亚洲的多个柑橘主产国（Marais & Lee，1986；Broadbent et al.，1994），其中以中国、澳大利亚和日本等采用枳及其杂种为主要砧木的柑橘生产国受害最严重（孙现超等，2009；Tatineni et al.，2009）。

CTLV是长线病毒科 *Closteroviridae* 发样病毒属 *Capillovirus* 的正义单链RNA病毒，其基因组约6.5 kb，含2个开放读码框（open reading frame，ORF）（Ohira et al.，1994）。由于CTLV在形态学、血清学及分子生物学特性上与ASGV的关系密切，被认为是ASGV的一个株系（Magome et al.，1997）。ASGV主要通过嫁接和机械方式传播，还可通过苹果和本生烟的花粉进行传播（Isogai et al.，2022）。ASGV的寄主范围广泛，除柑橘外，还可侵染苹果、梨、杏、樱桃和猕猴桃等果树（怀晓等，2010；项周等，2017），以及豆科、茄科、藜科和蔷薇科的多种草本植物（Cook et al.，2020；张秀琪等，2021）。目前，ASGV在我国苹果、梨和猕猴桃等果树上的发生率较高（郑银英等，2005；Zhao et al.，2019）。此外，ASGV的外壳蛋白（coat protein，CP）基因在不同寄主来源的分离物间的变异性差异较大，且ASGV的系统演化与寄主种类和地理来源没有明显关联（Liu et al.，2013；马强等，2020）。

20世纪80—90年代，我国浙江、广西和广东等省区历史比较悠久的地方品种如湖南冰糖橙（Zhang et al.，1988；何新华等，1991），以及从日本引进的宫川温州蜜柑普遍感染CTLV（邱柱石，1990；周常勇等，2013）。自2000年，无病毒苗木在中国逐渐普及，CTLV的发生明显减轻。但近年来，我国柑橘产业效益显著，优质无病毒良种苗木供不应求，果农自主育苗和无认证苗圃育苗规模增加，且缺乏规范化管理，这导致柑橘碎叶病在多个产区重新暴发，产量损失严重（周常勇等，2013；黄其椿等，2020）。本研究通过对柑橘碎叶病进行连续多年的系统调查，明确该病在中国柑橘产区的发生、分布及其病原的分子特性，以期为防治柑橘碎叶病以及研究CTLV的系统演化提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样：于2017—2021年在重庆、云南、广西、广东、四川、湖南、湖北、浙江、江西、福建、陕西和贵州共12个省（自治区、直辖市）的柑橘主产区从新梢期表现黄化、花叶、嫁接口肿大/不亲和以及植株矮缩等疑似感染柑橘碎叶病症状的柑橘植株上采集样品，每个植株从5个不同方向共取30 mg老熟或展平的叶片组织为1份样品，共采集2 012份，其中包括了甜橙、宽皮柑橘、杂柑、柚、枸橼、葡萄柚和枳共7个类型55个品种。

LB（Luria-Bertani）固体培养基：酵母提取物5 g、胰蛋白胨10 g、氯化钠10 g、琼脂粉15 g，无菌水定容至1 L。

试剂：RT/*Taq* 酶，美国Invitrogen公司；RNAiso Plus试剂、DNA Marker、pMD19-T载体、随机引物、RNA酶抑制剂（RNase）、*Taq* DNA聚合酶、3′ RACE试剂盒和5′ RACE试剂盒，宝生物工程（大连）有限公司；普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒，美国Omega生物工程公司；异丙基硫代半乳糖苷（isopropyl *β*-d-thiogalactoside，IPTG）、5-溴-4-氯-3-吲哚-*β*-D-半乳糖苷（5-bromo-4-chloro-3-indolyl *β*-d-galactopyranoside，X-Gal）、氨苄青霉素，美国Sigma公司；反转录酶M-MLV，美国Promega公司；大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5*α* 菌株，北京全式金生物技术有限公司；其余试剂均为国产分析纯。

仪器：Tprofessional Thermocyocycler型PCR仪，德国Biometra公司；POWER 3000型电泳系统，美国Bio-Rad公司；ChemStudio型凝胶成像系统，德国Analytik Jena公司。

1.2 方法

1.2.1 疑似感染柑橘碎叶病植株中病毒的检测

为明确植株症状与CTLV的相关性，使用RNAiso Plus试剂分别从获得的2 012份柑橘样品中提取总RNA，于−80 ℃保存备用。将获得的总RNA按照宋震等(2011)方法，以CTLV的*CP*基因序列为靶标设计特异性引物TL-B/TL-C(表1)进行反转录PCR(reverse transcription-PCR，RT-PCR)检测。10 μL反应体系：ddH_2O和总RNA各1 μL，变性后混入ddH_2O 1.5 μL、2×Buffer 5 μL、50 mmo1/L $MgSO_4$ 0.3 μL、10 μmol/L引物TL-B/TL-C各0.5 μL、RT/*Taq*酶0.2 μL。扩增条件：42 ℃反转录60 min；94 ℃预变性2 min；94 ℃变性20 s，54.5 ℃退火20 s，72 ℃延伸45 s，共40个循环；72 ℃终延伸5 min。取5 μL RT-PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳，依据条带大小判断是否感染CTLV，分析该病毒在不同柑橘主产区的分布情况。同时采用RT-PCR检测采集样品是否还感染常见柑橘病毒如柑橘衰退病毒(citrus tristeza virus，CTV)(Gilings et al.，1993)、柑橘黄脉病毒(citrus yellow vein clearing virus，CYVCV)(陈洪明等，2015)和柑橘裂皮病类病毒(citrus exocortis viroid，CEVd)(Wang et al.，2009)，引物序列如表1所示。CTV和CYVCV的检测靶标均为*CP*基因序列，CEVd的检测靶标为中央核心区(central conserve region，CCR)序列(Gilings et al.，1993；Wang et al.，2009;陈洪明等,2015)。除退火温度外，CTV、CYVCV和CEVd的检测体系和程序与CTLV相同。本试验所有引物均由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2.2 CTLV在不同柑橘品种上所致症状的调查

于2017—2021年在重庆、云南、广西、广东、四川、湖南、湖北、浙江、江西、福建、陕西和贵州共12个省(自治区、直辖市)的柑橘主产区调查柑橘碎叶病的发生情况，并记录相应的植株症状，结合1.2.1对CTLV的检测结果进行所致症状表型分析。

1.2.3 分离CTLV毒株的全序列测定

为掌握中国CTLV毒株的分子特性，根据样品的采样地和品种类型，选择22株CTLV毒株进行全序列测定。参照卜振中(2013)的方法，基于1.2.1提取的总RNA，使用随机引物合成第一链cDNA，并以2 μL第一链cDNA为模板分4段(F2~F5片段)进行全序列的PCR扩增。25 μL反应体系：10×PCR Buffer(含$MgCl_2$)2.5 μL、10 mmoI/L dNTPs 1 μL、10 μmo1/L正反向引物(表1)各0.5 μL、5 U/μL *Taq* DNA聚合酶0.25 μL，ddH_2O补足至25 μL。扩增条件：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s；不同引物在相应退火温度(50~54 ℃)下退火30 s；72 ℃延伸2 min，共35个循环；72 ℃终延伸10 min。PCR产物经切胶回收、纯化后分别与pMD19-T载体连接，转化至大肠杆菌DH5*α*菌株后在LB固体平板上于37 ℃过夜培养，通过蓝白斑筛选阳性克隆，并进行菌液PCR鉴定，反应体系和程序同上。每个片段选取5个阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定。利用3′ RACE试剂盒和5′ RACE试剂盒参照说明书合成3′-RACE和5′-RACE扩增模板cDNA，用于CTLV 3′端(F1片段)和5′端(F6片段)的PCR扩增。50 μL反应体系：cDNA 5 μL、1×cDNA Dilution Buffer II 5 μL、10 μmol/L 394R/3′ RACE Outer Primer(或5723F/5′ RACE Outer Primer)2 μL、10×LA PCR Buffer II (Mg^{2+} Free)4 μL、25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μL、5 U/μL LA *Taq* 0.25 μL，用ddH_2O补足至50 μL。反应条件：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，50 ℃退火30 s，72 ℃延伸50 s，共20个循环；72 ℃终延伸10 min。CTLV 3′端和5′端序列的测序方法同上，利用SnapGene 3.2.1软件对上述6段测序所得序列进行拼接后得到CTLV基因组的全序列。

1.2.4 CTLV基因组序列分析及系统发育分析

为研究CTLV的遗传演化规律，将获得的22株CTLV毒株全序列与从GenBank中下载的7株分别来源于黄金蜜柚、满头红、新会橙、椪柑、北京柠檬、橘橙和百合的CTLV毒株，以及5株分别来源于苹果和梨的ASGV毒株全序列用SDT 1.2软件进行序列一致性分析；利用DNAMAN 7.0.2.176软件进行核苷酸及编码氨基酸序列多重比对；然后针对基因组全序列及其相应的氨基酸序列，使用Mega 11.0软件以贝叶斯信息准则(Bayesian information criterion)推断CTLV序列的最佳替换模型GTR+G+I，利用邻接法进行系统发育分析，对拓扑支持度进行1 000次重复评估。

2 结果与分析

2.1 CTLV在我国不同柑橘主产区的发生分布

在2 012份柑橘样品中共检测出感CTLV阳性样品413份，检出率为20.53%。重庆、云南、广西、四川、湖南、浙江、江西、湖北、广东、福建和贵州共11个省(自治区、直辖市)的柑橘主产区的CTLV检出率分别为13.70%(93/679)、10.64%(20/188)、24.84%(119/479)、32.09%(43/134)、31.90%(52/163)、36.96%(17/46)、9.26%(10/108)、54.84%(17/31)、26.17%(39/149)、10.00%(1/10)和100.00%(2/2)。仅陕西省样品中未检出CTLV(0/23)。

表1 本研究所用引物信息

Table 1 Information of primers in this study

病毒 Virus	扩增片段 Amplicon	引物序列（5′–3′） Primer sequence (5′–3′)	引物名称 Primer name	长度 Product size/bp	引物位置 Primer position/nt	退火温度 Annealing tempera-ture/℃	参考文献 Reference
柑橘碎叶株系 CTLV	F1	CCATGAGAAAGACTGAATGC	394R	430	394–374	50	卜振中，2013
		TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	3′RACE outer primer				Bu, 2013
	F2	TTGACCAAACATGGTCTGACACTT	1909F	1 909	198–221	53	
		GATTACCTTTGATTGTGCAGTAC	1909R		2 106–2 084		
	F3	TCAGGGCCAGAAGATTTAGATTG	1492F	1 492	1 543–1 565	54	
		GTCATCCCTTGAGATTCACTGACTGT	1492R		3 034–3 009		
	F4	CACTGCAACTAAGGTACTATTCTGC	1570F	1 570	2 725–2 750	54	
		GTCGTCCCTGTAAATCTCATTATGGC	1570R		4 294–4 269		
	F5	CCGACTATACAGCTTTTGATTCATCTC	1921F	1 921	4 105–4 125	54	
		GTAGCAGCAAAGGTT'TTCAACTCAGG	1921R		5 767–5 749		
	F6	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	5′RACE outer primer	785	5 723–5 742	54	
		GGAACTTCTGACGGTTCCTC	5723F				
	CP	AGAGTGGACAAACTCTAGAC	TL-B	888	6 496–6 477	53	宋震等，2011
		CCCTCTCAGCTAGAATTGAA	TL-C		5 607–6 407		Song et al., 2011
柑橘衰退病毒CTV	CP	ATGGACGACGAAACAAAG	CTV-CP 1	672	1–18	40	Gilings et al., 1993
		TCAACGTGTGTTGAATTT	CTV-CP 3		654–672		
柑橘黄脉病毒 CYVCV	CP	TACCGCAGCTATCCATTTCC	VF-1	614	6 175–6 194	55	陈洪明等，2015
		GCAGAAATCCCGAACCACTA	VF-3		6 767–6 786		Chen et al., 2015
柑橘裂皮病类病毒 CEVd	CCR	CCGGGGATCCCTGAAGGACTT	CEV-R	371	78–98	58	Wang et al., 2009
		GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG	CEV-F		99–119		

在不同柑橘类型中，以柚类中CTLV的检出率最高，为32.31%（74/229），其次依次为枸橼、杂柑、宽皮柑橘、葡萄柚、甜橙和枳，检出率分别为31.58%（18/57）、24.45%（243/994）、14.64%（41/280）、10.71%（3/28）、8.25%（33/400）和4.17%（1/24）。此外，在不同柑橘品种中，金橙柚、三红柚、垫江白柚、暗柳橙、早熟温州蜜柑、宜昌蜜橘、由良、佛手、北京柠檬和香橼中CTLV的检出率均高于50.00%。此外，黄肉琯溪、红肉琯溪、不知火、金秋砂糖橘、大雅、W·默科特、沃柑、红美人、无核沃柑、伦晚、清秋脐橙、甘平、春香、胡柚和莱檬中CTLV的检出率也较高，均高于20.00%。龙回红、赣南早、卡拉卡拉和尤力克柠檬等13个品种中均未检出CTLV（表2）。

2.2 不同柑橘品种感染CTLV后的症状

基于采集样品中CTLV的检测结果，结合调查取样时的症状观察，发现在湖南省永兴县以及广西壮族自治区南宁市和桂林市的枳砧沃柑发病后，在受到强风等外力推动时，其砧穗结合处较其他枳砧柑橘组合更易发生断裂。在重庆市丰都县及綦江区、广东省增城区和湖北省荆州市调查时发现，以酸柚作砧木的三红柚、红肉琯溪蜜柚、黄肉琯溪蜜柚和金橙柚感染CTLV后，其新梢黄化严重，且部分幼叶展平后呈红色，叶片老熟后出现斑驳黄化症状。此外，在四川省丹棱县和重庆市忠县调查时发现，不知火和大雅等杂柑病株的新梢嫩叶有轻微的脉明症状，但叶片老熟后脉明症状消失。

2.3 CTLV基因组同源性分析

通过测序获得22株CTLV毒株的全序列，上传GenBank后获得登录号为ON820668~ON820689。所有22株CTLV毒株都含有6 496个碱基，毒株间基因组的核苷酸和氨基酸全序列相似性分别为94.4%~99.8%和95.6%~99.9%。这22株毒株与已报道的12株ASGV或CTLV毒株基因组在核苷酸和氨基酸水平上的相似性分别为78.6%~99.8%和17.0%~99.9%，5′非翻译区（5′ untranslated region，5′ UTR）、ORF1、ORF2、CP和3′ UTR的核苷酸相似性分别为

80.6%~100.0%、78.5%~99.8%、81.8%~99.9%、87.4%~100.0%和79.4%~100.0%。

表2 我国不同柑橘主产区苹果茎沟病毒柑橘碎叶株系的发生情况

Table 2 Incidence of citrus tatter leaf virus in citrus in China

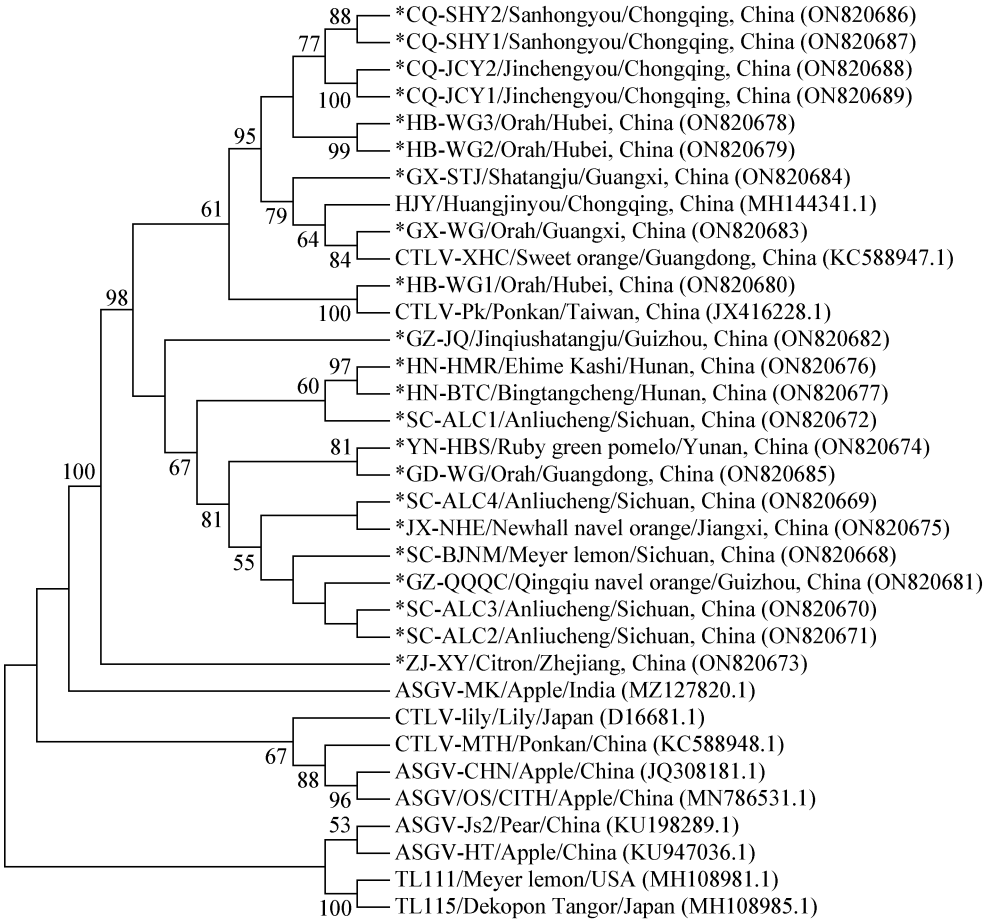
类型 Type	品种 Cultivar	阳性样品数量/总样品数 Number of positive samples/total number of tested samples												检出率 Detection rate/%
		重庆 Chongqing	云南 Yunnan	广西 Guangxi	四川 Sichuan	湖南 Hunan	浙江 Zhejiang	江西 Jiangxi	湖北 Hubei	广东 Guangdong	福建 Fujian	陕西 Shaani	贵州 Guizhou	
甜橙 Sweet orange	龙回红 Longhuihong	0/7												0.00
	赣南早 Gannanzao	0/21												0.00
	纽荷尔 Newhall navel orange	0/38	0/22	3/8		7/20		5/97						8.11
	卡拉卡拉 Cara Cara	0/18												0.00
	伦晚 Lane Late	1/11							5/13					25.00
	早红 Zaohong	1/19												5.26
	冰糖橙 Bingtangcheng	0/5	1/33			1/1								5.13
	云贵橙 Yunguicheng	2/17												11.76
	长叶橙 Changyecheng	0/3		0/2										0.00
	洪江橙 Hongjiangcheng									0/6				0.00
	塔罗科新系 Tarocco	1/36			0/6									2.38
	暗柳橙 Anliucheng				4/4									100.00
	青秋脐橙 Qingqiu navel orange	0/1			0/1								1/1	33.33
	早熟血橙 Early-maturing blood orange	1/10												10.00
杂柑 Citrus hybrid	红美人 Ehime Kashi 38	7/63	3/4	3/10	8/18	2/7	3/27		2/7					20.59
	茂谷柑 Murcott	2/2	0/18	14/67				0/5						17.39
	沃柑 Orah	14/124	8/44	45/140	0/3	14/42		5/5	3/3	2/8				24.66
	无核沃柑 Orah 091	2/16	2/3	0/1										20.00
	W·默科特 W·Murcott	1/5	0/13	17/44										29.03
	金秋砂糖橘 Jinqiushatangju	8/19	0/1	1/24		28/82		0/1		2/6		0/1	1/1	29.63
	甘平 Kanpei	1/9			1/1									20.00
	春见 Harum	1/11			0/1									8.33
	大雅 Daya	9/22	1/4		6/29									29.09
	明日见 Asumi	3/16			0/1									17.65
	春香 Haruka	0/3					2/2							40.00
	不知火 Shiranuhi	1/2			17/47									36.73
	香橙 Xiangcheng	3/23			0/4									11.11
	胡柚 Huyou						1/5							20.00

续表2 Continued

类型 Type	品种 Cultivar	阳性样品数量/总样品数 Number of positive samples/total number of tested samples												检出率 Detection rate/%
		重庆 Chongqing	云南 Yunnan	广西 Guangxi	四川 Sichuan	湖南 Hunan	浙江 Zhejiang	江西 Jiangxi	湖北 Hubei	广东 Guangdong	福建 Fujian	陕西 Shaani	贵州 Guizhou	
宽皮橘 Mandarin	砂糖橘 Shatangju	0/3	0/15	21/77						1/36				16.79
	金葵蜜橘 Jinkuimiju	0/7												0.00
	大分 Dafen	0/8				0/1						0/9		0.00
	椪柑 Ponkan	0/10	0/8									0/7		0.00
	由良 Yura	2/2				0/1						0/1		50.00
	贡柑 Gonggan	0/2		9/62		0/2				0/5				12.68
	特早熟温州蜜柑 Early-ripening Satsuma		0/5								0/5			0.00
	早熟温州蜜柑 Early-maturing Satsuma			3/3										100.00
	宜昌蜜橘 Yichangmiju								5/6					83.33
	日南1号 Nichinan 1											0/5		0.00
柚 Pomelo	琯溪蜜柚 Guanximiyou	0/11		0/5	0/2					0/9				0.00
	三红柚 Sanhongyou	11/22	1/3	2/2					2/2	6/14				51.16
	红肉琯溪 Hongrouguanxi	0/7								4/11				22.22
	黄肉琯溪 Huangrouguanxi									3/9	0/3			25.00
	金橙柚 Jinchengyou	12/27			6/12					16/17				60.71
	垫江白柚 Dianjiangbaiyou	2/4												50.00
	红宝石 Ruby green pomelo	1/3	3/12	0/11										15.38
	青柚 Green pomelo	1/6		0/9							1/2			11.76
	沙田柚 Shatianyou	0/3		0/2						3/14				15.79
	江永香柚 Jiangyongxiangyou					0/7								0.00
枸橼 Citron	尤力克柠檬 Eureka lemon	0/27			0/4									0.00
	香橼 Citron						1/1							100.00
	北京柠檬 Meyer lemon				1/1									100.00
	莱檬 Lime		1/3											33.33
	佛手 Bergamot	5/11					10/10							71.43
葡萄柚 Grapefruit	鸡尾葡萄柚 Cocktail grapefruit	0/1		1/12			0/1			2/14				10.71
枳 Trifoliate orange	枳 Trifoliate orange	1/24												4.17
总计 Total		93/679	20/188	119/479	43/134	52/163	17/46	10/108	17/31	39/149	1/10	0/23	2/2	

2.4 CTLV基因组系统发育分析结果

基于CTLV和ASGV基因组构建的系统发育进化树显示，本研究获得的22株CTLV毒株与来自台湾省椪柑、重庆市黄金柚和广东省新会橙上的CTLV毒株（JX416228.1、MH144341.1和KC588947.1）在系统发育树上聚在一个大分支。与其他4株ASGV毒株相比，分离自印度苹果上的ASGV-MK毒株（MZ127820.1）与本研究22株CTLV毒株的亲缘关系更近。此外，来自同一省的CTLV毒株和采自柚类的CTLV毒株多聚在相同的分支（图1）。



图中内容表述形式为毒株名称/寄主/地理来源（GenBank登录号）。Bootstrap值≥90%。分支长度代表遗传距离。*所示毒株为本研究分离获得。The description is represented as the isolate/host/origin (GenBank accession number). Bootstrap value≥90%. Branch length represents the genetic distance. * indicates the isolates are separated in this study.

图1 基于全基因组核苷酸序列采用邻接法构建苹果茎沟病毒柑橘碎叶株系的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of citrus tatter leaf virus isolates basing on nucleotide sequences of its complete gene by using neighbor joining method

3 讨论

柑橘碎叶病作为一种起源于中国的重要病害，在国内主要分布于台湾、浙江、广西、湖南、湖北和四川等省区，在国外则主要分布于日本、韩国、美国和澳大利亚等国家（Tan et al.，2019）。由于我国长期以来以枳作为主要砧木，随着近年来柑橘产业快速发展，柑橘碎叶病的发生日趋严重。通过田间调查发现湖北、江西、四川和广西等省区的部分柑橘样品感染了CTLV，感染率为7.3%~20.0%（项周等，2017；张金珠等，2021）。此外，鉴于ASGV在我国苹果（姚润东等，2019）、猕猴桃（Zhao et al.，2019）和梨（胡国君等，2010）等果树上的发生率较高，且极易通过污染的工具进行传播（Tan et al.，2019），因此柑橘也存在被感染的风险。本研究于2017—2021年在中国12个柑橘主产区进行系统调查，发现CTLV在我国分布广泛，20.53%的柑橘样品（共7类55个品种）感染了该病毒，因此今后出现进一步暴发流行的风险较高。近年来，以沃柑、金秋砂糖橘和红美人为代表的晚熟杂柑由于经济价值高、效益显著，在我国多个柑橘产区广泛种植。但是本研究发现上述柑橘品种

以及金橙柚、红宝石柚、由良等新/热销品种中CTLV的检出率较高。因此，为保障中国柑橘产业健康、可持续发展，今后需进一步规范柑橘苗木市场，通过使用无病毒苗木来有效阻止柑橘碎叶病在中国的流行，减少产量损失。

Tan et al.（2019）研究结果显示，CTLV在大多数柑橘品种上为隐症带毒，只在枳及其杂种作砧木上症状明显。近年来的研究表明，CTLV的某些株系可在金橙柚上引起新梢黄化症状（Xuan et al.，2022）。本研究发现CTLV在酸柚砧三红柚、红肉琯溪蜜柚和黄肉琯溪蜜柚上也可引起新梢黄化症状，并在不知火等杂柑上造成新叶脉明症状。此外，在广西壮族自治区桂林和南宁等市调查时还发现，出现果实变小、僵硬、不转色症状的W·默科特、沃柑、茂谷柑和砂糖橘植株也都感染了CTLV。鉴于CTLV在柑橘品种上引发的新症状，今后需要进一步明确CTLV对当前中国主要柑橘栽培品种的危害特点。

目前，关于侵染苹果和梨的ASGV的分子特性研究较多（姬盼等，2013；刘华珍等，2017），而对侵染柑橘的CTLV的研究相对较少。有研究表明，不同地理来源植株上的CTLV毒株分子变异较小（Park et al.，2018；Tan et al.，2019）。本研究对采自12个省（自治区、直辖市）的22株CTLV毒株的全序列分析结果也进一步证实CTLV毒株间的核苷酸相似性较高，为94.4%~99.8%，并且*CP*基因序列最保守。推测造成CTLV基因组变异较小的原因可能是其基因组较稳定，不易因地理或寄主差异而发生明显变异。此外，项周等（2017）对分离自湖北省的15株CTLV毒株的*CP*基因序列进行分析，发现CTLV的系统进化与其寄主来源或地域无明显相关性。但随后基于基因组分析的结果显示CTLV的演化与其地理起源有关（Tan et al.，2019；张金珠等，2021）。本研究对29株CTLV和5株ASGV的全序列进行进化分析，发现基于寄主类型和采样地的差异，中国CTLV毒株主要被分为2个不同的类群，其中来源于柚类或重庆市和湖南省的CTLV毒株位于独立的分支，由此推测中国CTLV毒株间的亲缘关系可能与其采样地和寄主品种存在相关性。上述研究结果还暗示CTLV在中国可能存在多个起源中心。

参 考 文 献（References）

Broadbent P, Dephoff CM, Gilkeson C. 1994. Detection of citrus tatter leaf virus in Australia. Australasian Plant Pathology, 23(1): 20–24

Bu ZZ. 2013. Construction of infectious clone of citrus tatter leaf virus. Master thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [卜振中. 2013. 柑橘碎叶病毒侵染性克隆的构建. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学]

Chen HM, Wang XF, Zhou Y, Zhou CY, Guo J, Li ZA. 2015. Biological characterization and RT-PCR detection of a new disease of Eureka lemon. Journal of Plant Protection, 42(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. 植物保护学报, 42(4): 557–563]

Cook G, Steyn C, Breytenbach JHJ, Bruyn R, Fourie PH. 2020. No detection of seed transmission of citrus tatter leaf virus in 'Meyer' lemon. Journal of Plant Diseases and Protection, 127(6): 895–898

Gillings M, Broadbent P, Indsto J, Lee R. 1993. Characterisation 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, 44(2/3): 305–317

He XH, Jiang YH, Zhao XY, Zhou CY, Huang TY. 1991. Distribution and identification of citrus tatter leaf disease. Plant Protection, 17(1): 6–7 (in Chinese) [何新华, 蒋元晖, 赵学源, 周常勇, 黄通意. 1991. 柑桔碎叶病的分布鉴定. 植物保护, 17(1): 6–7]

Hu GJ, Wang LP, Hong N, Hu HJ, Wang GP. 2010. Detection and molecular variation of apple stem groove virus on pear tree in China.//Peng YL, Wang ZH. Proceedings of the Annual Conference of the Chinese Society of Plant Pathology (2010). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 423 (in Chinese) [胡国君, 王利平, 洪霓, 胡红菊, 王国平. 2010. 我国梨树上的苹果茎沟病毒检测及分子变异研究.//彭友良, 王宗华. 中国植物病理学会2010年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, pp. 423]

Huai X, Zhou Y, Zhang R, Fan ZF, Zhou T. 2010. Cloning, prokaryotic expression of the coat protein gene of apple stem grooving virus and antiserum preparation. Journal of Plant Protection, 37(5): 436–440 (in Chinese) [怀晓, 周颖, 张瑞, 范在丰, 周涛. 2010. 苹果茎沟病毒外壳蛋白基因的克隆、原核表达及抗血清制备. 植物保护学报, 37(5): 436–440]

Huang QC, Li GG, Chen DK, Liu JM, Chen XL, Wang X, Liu YX, Hu CX. 2020. Current status and development strategies of orah industry in Guangxi. South China Fruits, 49(5): 135–141, 149 (in Chinese) [黄其椿, 李果果, 陈东奎, 刘吉敏, 陈香玲, 王茜, 刘要鑫, 胡承孝. 2020. 广西沃柑产业发展现状与对策建议. 中国南方果树, 49(5): 135–141, 149]

Isogai M, Shimoda R, Nishimura H, Yaegashi H. 2022. Pollen grains infected with apple stem grooving virus serve as a vector for horizontal transmission of the virus. Journal of General Plant Pathology, 88(1): 81–87

Ji P, Wang LC, Kong BH, Li XP, Cao KQ, Ma J. 2013. Identification and molecular variation of apple stem grooving virus (ASGV) infecting apple from Yunnan. Journal of Fruit Science, 30(3): 397–403 (in Chinese) [姬盼, 王连春, 孔宝华, 李晓鹏, 曹克强, 马钧. 2013. 云南苹果产区苹果茎沟病毒(ASGV)的发现及其分

子变异. 果树学报, 30(3): 397−403]

Liu HZ, Yang ZK, Zhou YB, Wang GP, Hong N. 2017. Study on genome sequence and small RNA of apple stem pitting virus infecting a pear plant. Acta Phytopathologica Sinica, 47(5): 584−590 (in Chinese) [刘华珍, 杨作坤, 周友斌, 王国平, 洪霓. 2017. 侵染梨的苹果茎痘病毒基因组序列及小RNA分析. 植物病理学报, 47(5): 584−590]

Liu P, Zhang L, Zhang HW, Jiao HH, Wu YF. 2013. Detection and molecular variability of apple stem grooving virus in Shaanxi, China. Journal of Phytopathology, 161(6): 445−449

Magome H, Yoshikawa N, Takahashi T, Ito T, Miyakawa T. 1997. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. Phytopathology, 87(4): 389−396

Ma Q, Sun PP, Ju MX, Zhang L, Li XY, Li ZN. 2020. Genome and biology of an isolate of apple stem grooving virus in Shaanxi, China. Journal of Arid Land Resources and Environment, 34(9): 151−156 (in Chinese) [马强, 孙平平, 鞠明岫, 张磊, 李小燕, 李正男. 2020. 苹果茎沟病毒陕西分离物基因组序列与生物学研究. 干旱区资源与环境, 34(9): 151−156]

Marais LJ, Lee RF. 1986. Citrange stunt virus associated with decline of Shamouti on Swingle citrumelo rootstock in South Africa. Plant Disease, 70(9): 892

Ohira K, Ito T, Kawai A, Namba S, Kusumi T, Tsuchizaki T. 1994. Nucleotide sequence of the 3′-terminal region of citrus tatter leaf virus RNA. Virus Genes, 8(2): 169−172

Park JW, Kunta M, McCollum G, Gonzalez M, Vedasharan P, da Graça J. 2018. Development of a sensitive real-time PCR detection method for citrus tatter leaf virus. Journal of Plant Pathology, 100(1): 67−73

Qiu ZS. 1990. Identification of citrus tatter leaf disease in Satsuma mandarin. China Citrus, 19(4): 41 (in Chinese) [邱柱石. 1990. 宫川温州蜜柑碎叶病鉴定. 中国柑桔, 19(4): 41]

Song Z, Zhou CY, Liu KH, Li ZA. 2011. Establishment of nested RT-PCR for detecting citrus tatter leaf virus. Journal of Fruit Science, 28(3): 458−462 (in Chinese) [宋震, 周常勇, 刘科宏, 李中安. 2011. 柑橘碎叶病毒巢式RT-PCR检测方法建立及应用. 果树学报, 28(3): 458−462]

Sun XC, Zhou CY, Qing L, Yang SY. 2009. Advances in research on citrus tatter leaf virus. Journal of Fruit Science, 26(2): 213−216 (in Chinese) [孙现超, 周常勇, 青玲, 杨水英. 2009. 柑橘碎叶病毒研究进展. 果树学报, 26(2): 213−216]

Tan SH, Osman F, Bodaghi S, Dang T, Greer G, Huang A, Hammado S, Abu-Hajar S, Campos R, Vidalakis G. 2019. Full genome characterization of 12 citrus tatter leaf virus isolates for the development of a detection assay. PLoS ONE, 14(10): e0223958

Tatineni S, Afunian MR, Hilf ME, Gowda S, Dawson WO, Garnsey SM. 2009. Molecular characterization of citrus tatter leaf virus historically associated with Meyer lemon trees: complete genome sequence and development of biologically active *in vitro* transcripts. Phytopathology, 99(4): 423−431

Wallace JM, Drake R. 1962. Tatter leaf, a previously undescribed virus effect on citrus. Plant Disease Reporter, 46(4): 211−212

Wang XF, Zhou CY, Tang KZ, Zhou Y, Li ZA. 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. European Journal of Plant Pathology, 124 (1): 175−180

Xiang Z, Cheng Q, Xie ZZ, Wang GP, Hong N. 2017. Incidence and molecular characteristics of citrus leaf blotch virus and citrus tatter leaf virus infecting citrus in China. Acta Horticulturae Sinica, 44(1): 113−119 (in Chinese) [项周, 程桥, 谢宗周, 王国平, 洪霓. 2017. 中国柑橘叶斑驳病毒和碎叶病毒发生状况及其分子特性研究. 园艺学报, 44(1): 113−119]

Xuan ZY, Zhang S, Li P, Yang FY, Chen HM, Liu KH, Zhou Y, Li ZA, Zhou CY, Cao MJ. 2022. Apple stem grooving virus is associated with leaf yellow mottle mosaic disease on *Citrus grandis* cv. Huangjinmiyou in China. Journal of Integrative Agriculture, 21(7): 2031−2041

Yao RD, Shi WS, Sun-Wu RZ, Huang K, Wang JM. 2019. The molecular identification of latent viruses in the main apple production areas in Southwest China. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 56(2): 357−362 (in Chinese) [姚润东, 史文森, 孙吴润泽, 黄奎, 王健美. 2019. 中国西南主要苹果产区潜隐性病毒分子鉴定. 四川大学学报(自然科学版), 56(2): 357−362]

Zhang JZ, Zou CW, Huang JY, Deng CL, Chen BS, Zhang MQ. 2021. Investigation and the genetic diversity analysis of the pathogenic virus causing citrus tatter leaf disease and citrus leaf spot disease in Guangxi. Chinese Journal of Tropical Crops, 42(5): 1414−1423 (in Chinese) [张金珠, 邹承武, 黄俊源, 邓崇岭, 陈保善, 张木清. 2021. 广西柑橘碎叶病和叶斑病调查及其病原的遗传多样性分析. 热带作物学报, 42(5): 1414−1423]

Zhang TM, Liang XY, Roistacher CN. 1988. Occurrence and detection of citrus tatter leaf virus (CTLV) in Huangyan, Zhejiang Province, China. Plant Disease, 72(6): 54−545

Zhang XQ, Liu SY, Yang YZ, Li ML, Hu AA, Liu C, Zhang ZY, Han CG, Wang Y. 2021. Virus identification and detection by high-throughput sequencing and RT-PCR from rose plants in Beijing. Acta Phytopathologica Sinica, 51(4): 525−535 (in Chinese) [张秀琪, 刘松誉, 杨一舟, 李梦林, 胡安安, 刘唱, 张宗英, 韩成贵, 王颖. 2021. 北京月季病原病毒的高通量测序鉴定和RT-PCR检测. 植物病理学报, 51(4): 525−535]

Zhao L, Yang W, Zhang YL, Wu ZM, Wang QC, Wu YF. 2019. Occurrence and molecular variability of kiwifruit viruses in *Actinidia deliciosa*‘Xuxiang’in the Shaanxi Province of China. Plant Disease, 103(6): 1309−1318

Zheng YY, Wang GP, Hong N. 2005. The biological characteristics and molecular identification of some apple stem grooving virus isolates. Journal of Plant Protection, 32(3): 266−270 (in Chinese) [郑银英, 王国平, 洪霓. 2005. 苹果茎沟病毒部分分离物的生物学特性与分子鉴定. 植物保护学报, 32(3): 266−270]

Zhou CY, Wang XF, Zhou Y, Liu JX. 2013. Progress on the occurrence and control of citrus virus disease in China. China Fruit News, (10): 70−72 (in Chinese) [周常勇, 王雪峰, 周彦, 刘金香. 2013. 我国柑桔病毒病发生和防控进展. 中国果业信息, (10): 70−72]

（责任编辑：李美娟）