

四川省眉山市六个柑橘品种上衰退病毒分离株的组群构成、基因型及遗传特征

钟可¹ 易龙^{1*} 周俊¹ 陈波² 黄爱军¹

(1. 赣南师范大学生命科学学院, 江西 赣州 341000; 2. 赣南师范大学地理与环境工程学院, 江西 赣州 341000)

摘要: 为有效利用弱毒株系交叉保护(mild strain cross protection, MSCP)防控柑橘衰退病, 分别采用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、双向逆转录-聚合酶链式反应(bi-directional reverse transcription polymerase chain reaction, BD-PCR)及多重分子标记对四川省眉山市6个柑橘品种30个样品上的柑橘衰退病毒(citrus tristeza virus, CTV)分离株进行组群构成、基因型、遗传特征和系统发育树分析。结果表明, 在30个柑橘样品中, 70.0%的样品为多种CTV组群混合侵染, 且多为强毒和弱毒株系混合侵染; 6个柑橘品种上CTV组群构成存在差异, 温州蜜柑品种主要为组群1和组群3混合侵染, 纽荷尔脐橙品种均为组群3和组群5混合侵染, 其他4个品种主要为组群3和组群5混合侵染和组群3单一侵染。6个柑橘品种上CTV分离株均由3~5种基因型构成, 构成较相似, 均包括T3、T30、T36三种基因型, 而不知火品种上未检出B165基因型。6个柑橘品种上CTV分离株的核苷酸序列相似性较高, 介于92.4%~99.8%之间; 遗传分化系数介于-0.114~0.467, 基因流介于-35.89~52.92之间, 其中纽荷尔脐橙CTV种群与除沃柑外其他品种的CTV种群的分化系数均大于0.281, 基因流均小于1.00, 表明这6个柑橘品种CTV种群之间存在基因交流, 但纽荷尔脐橙CTV种群与其他品种交流不频繁; 所有CTV分离株均被聚为3个不同的类群, 其中春见、蜜柑、爱媛品种上大部分CTV分离株被聚为类群I, 纽荷尔脐橙品种上所有CTV分离株被聚为类群II, 而沃柑、不知火品种上大部分CTV分离株被聚为类群III; CTV种群间变异百分比为80.86%, 表明寄主品种是CTV分离株*p25*基因遗传分化的重要因素。

关键词: 柑橘衰退病毒; *p25*基因; 组群构成; 基因型; 序列分析

Group composition, genotype and genetic characteristics of citrus tristeza virus isolates from six citrus cultivars in Meishan, Sichuan Province

Zhong Ke¹ Yi Long^{1*} Zhou Jun¹ Chen Bo² Huang Aijun¹

(1. School of Life Science, Gannan Normal University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China; 2. School of Geography and Environmental Engineering, Gannan Normal University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China)

Abstract: In order to effectively use the mild strain cross protection (MSCP) to prevent and control the citrus tristeza virus (CTV) disease, and to understand the differences in the group composition, genotype and genetic characteristics of CTV isolates from different citrus varieties in the same area, the *p25* gene of 30 CTV isolates from six citrus varieties in Meishan, Sichuan were analyzed with restriction fragment length polymorphism, multiple molecular markers, genetic diversity, and phylogenetic analysis in this study. Group composition analysis showed that 70.0% of CTV isolates in 30 citrus samples were infected by multiple CTV groups, showing mixed infection of virulent and mild strains. There

基金项目: 国家自然科学基金(31860488)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: yilongswu@163.com

收稿日期: 2020-06-01

were differences in the CTV group composition among the six citrus varieties. Satsuma mandarin varieties were mainly mixedly infected with Groups 1 and 3, and Newhall navel orange varieties were mixedly infected with Groups 3 and 5, while the other four varieties were mainly mixedly infected with Groups 3 and 5 or singly infected with Group 3. Genotyping analysis showed that 30 CTV isolates from six citrus varieties were composed of 3–5 genotypes, all of which included T3, T30 and T36 genotypes, while no virulent strain B165 was detected in Shiranui varieties. The genetic diversity analysis of CTV *p25* gene showed that the nucleotide sequence similarity among the six varieties was 92.4%–99.8%. The genetic differentiation coefficient was -0.114 – 0.467 and the gene flow was -35.89 – 52.92 . The genetic differentiation coefficients of Newhall navel orange CTV populations with other varieties (except Orah CTV population) were greater than 0.281, with the gene flows less than 1.00, indicating that there was gene exchange between CTV isolate populations of the six varieties, but the gene exchange between Newhall navel orange CTV populations and other varieties was not frequent. Phylogenetic analysis showed that the all isolates were clustered into three different groups. Most of the CTV isolates from the varieties Harumi, Satsuma mandarin, and Aiyuan and five representative stem pitting virulent strains were clustered in group I, and all CTV isolates from Newhall navel orange and T3 virulent strains were clustered in group II, while most CTV isolates from the varieties Orah and Shiranui and virulent and mild strains were clustered in group III. The variation between CTV populations on different varieties accounted for 80.86%, indicating that the differentiation of CTV populations in the same area was mainly affected by the different host varieties.

Key words: citrus tristeza virus; *p25* gene; the group composition; genotype; sequence analysis

柑橘衰退病是柑橘产业中最严重的病害之一,由柑橘衰退病毒(citrus tristeza virus, CTV)引起(Bar-Joseph et al., 1989; Ghosh et al., 2014; Read & Pietersen, 2015),严重威胁着世界各地柑橘产业的发展(Folimonova, 2020)。芸香科植物韧皮部组织被CTV感染后,感染植株可能无症状或表现速衰型、茎陷点型和幼苗黄化型等症状,甚者可导致其衰退和死亡(Hančević et al., 2018)。CTV危害症状和严重程度主要取决于被感染的物种或品种、嫁接穗的砧木品种及CTV分离株的株系构成(Moreno et al., 2008; Biswas et al., 2012; Scott et al., 2013)。

基于病毒基因组进行遗传演化研究是理解病毒进化机制、推定病毒起源、明确其发生流行规律和制定防治策略的基础。目前除了葡萄叶卷病毒III (grapevine leafroll associated virus 3, GLRaV-3)外,CTV是长线型病毒科长线型病毒属唯一具有多种系统发育模式的病毒(Moreno et al., 2008)。为明确CTV基因与柑橘衰退病表现症状之间的关系,Gillings et al. (1993)根据CTV *p25* 基因的酶切图谱将其分离株分成7个组群,其中组群4和组群5为弱毒株系,其他5个组群均为强毒株系,该检测方法大大缩短了CTV分离株的株系鉴定时间和成本(Atta et al., 2011; 唐萌等, 2016); Harper (2013)和 Harper et

al. (2010)通过基因组测序先后将CTV株系鉴定为速衰型强毒株系T36、茎陷点强毒株系VT、弱毒株系T30、强毒株系T3和茎陷点强毒株系B165五种; Hilf et al. (1999)、Roy et al. (2010)和Roy & Brlansky (2010)通过对CTV不同株系基因组的差异区域进行多重分子标记来区分基因型; Harper (2013)根据全基因组系统发育分析将CTV分离株划分为T36、VT、T30、T3、B165、RB和HA七个株系,建立了CTV基因型的区分标准; Yokomi et al. (2018)根据此标准鉴定出了S1株系; Wang et al. (2020)鉴定出了L1和M1株系。CTV株系复杂的分化现象导致筛选防治柑橘衰退病毒强毒株系的特异弱毒株系变得非常困难(Lee & Keremane, 2013),并且弱毒株系交叉保护(mild strain cross protection, MSCP)的防治效果又取决于当地寄主品种中CTV基因型组成信息和CTV强、弱毒株系的遗传特性(Scott et al., 2013)。因此明确同一地区不同柑橘品种中CTV分离株的组群构成、基因型组成和遗传演化特性等分子特征,对于深入研究CTV以及利用MSCP来防控柑橘衰退病具有重要意义。CTV *p25* 基因编码的主要外壳蛋白是RNA沉默抑制因子之一(Benítez-Galeano et al., 2015),其通过抑制寄主的基因沉默来影响病毒在寄主体内的复制和表达(Burgyán & Havelda,

2011)。Wu et al. (2015)对*p25*基因进行系统发育树和重组分析,结果发现我国CTV种群结构与地理位置无关,主要受基因长距离流动、负选择和频繁重组的影响。目前我国主要集中在不同地理区域之间CTV种群的比较(Wu et al., 2015; Xiao et al., 2017),而关于同一区域不同寄主品种上CTV分子特征分析的报道较少。

四川省眉山市是我国晚熟柑橘的主产区之一,也是晚熟杂柑品种最丰富的产区。截至到2019年底,眉山市柑橘面积已超过7万 hm^2 ,其中晚熟柑橘面积超过4万 hm^2 ,品种主要包括脐橙、不知火、春见、春见、沃柑、爱媛等。为明确同一地区不同柑橘品种上CTV分离株的分子特性,本研究对四川省眉山市6个柑橘品种上CTV分离株*p25*基因的组群构成、基因型以及遗传特征进行分析,以期CTV流行以及利用MSCP防控柑橘衰退病提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:2019年从四川省眉山市爱媛28号、不知火、春见、沃柑4个杂柑品种,纽荷尔1个脐橙品种和温州蜜柑1个蜜柑品种上共采集具有柑橘衰退病症状的叶片样品123个。

试剂及仪器:CTV单克隆抗体,美国Agdia公司;碱性磷酸酯酶显色试剂、TRIzol Reagent,北京索莱宝科技有限公司;RNA酶抑制剂RRI、RNA反转录酶M-MLV、5 \times 反转录Buffer、10 \times PCR Buffer(含 Mg^{2+})、2.5 mmol/L dNTP Mixture、*Taq* DNA聚合酶、*Hinf* I限制性内切酶、100 bp DNA Marker、2000 bp DNA Marker,日本TaKaRa公司;M5 Gelred核酸染料,北京聚合美有限公司;AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒,美国Axygen公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。Centrifuge 5254R台式高速冷冻离心机,德国艾本德股份公司;NANODROP 2000c超微量核酸蛋白测定仪,美国赛默飞世尔科技公司;S1000TM Thermal cycler PCR仪、Universal Hood II凝胶成像仪,美国Bio-Rad公司;DYY-8C型电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 柑橘样品总RNA提取及CTV*p25*基因的扩增

采取直接组织印记免疫法(宋震等,2005)对123个样品进行检测,分别从每个柑橘品种中选取检测呈阳性的样品5个,编号分别为爱媛28号1~5 (AY1~AY5)、纽荷尔脐橙1~5(QC1~QC5)、不知火

1~5(BZH1~BZH5)、温州蜜柑1~5(MG1~MG5)、春见1~5(CJ1~CJ5)、沃柑1~5(WG1~WG5),液氮处理后于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

每个样品取0.2 g新鲜供试叶片,采取TRIzol法(苏华楠等,2014)提取30个样品的总RNA。提取的总RNA置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取1 μg 总RNA,用随机六聚体引物6N和M-MLV反转录酶按说明书操作步骤在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应60 min合成cDNA。以cDNA为模板,参照CTV的*p25*基因引物CP1(5'-ATGGACGACGAAACAAAG-3')/CP3(5'-TCAACGTGTGTTGAATT-3')(Gillings et al., 1993)进行PCR扩增,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL PCR反应体系:cDNA模板1 μL 、10 \times PCR Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μL 、2.5 mmol/L dNTPs 1 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各0.5 μL 、5 U/ μL *Taq*酶0.25 μL ,加ddH₂O定容至25 μL 。PCR反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸10 min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳分离,M5 Gelred核酸染料染色后在Universal Hood II凝胶成像系统上成像。

1.2.2 柑橘品种上CTV分离株的组群构成分析

采用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)(Gillings et al., 1993)和双向逆转录-聚合酶链式反应(bi-directional reverse transcription polymerase chain reaction, BD-PCR)2种方法(Cevik et al., 1996)分析每个样品上CTV分离株的组群构成。RFLP法:以限制性内切酶*Hinf* I在37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切*p25*基因1 h,产物经3%超纯琼脂糖凝胶电泳3~4 h后再经M5 Gelred核酸染料染色后在凝胶成像系统上成像,根据酶切后条带的大小和数量确定其组群类型,组群1、2、3、6和7为强毒株系,组群4和5为弱强毒株系(Gillings et al., 1993)。BD-PCR法:以1.2.1反转录获得的cDNA为模板、以*p25*基因的末端引物CP1/CP3以及内部引物CN218(5'-TTTGGACTGACGTCGTGTT-3')/CN219(5'-TTACCAATACCCTTAGAATTAT-3')同时进行PCR扩增,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL 反应体系:cDNA模板1 μL 、10 \times PCR Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μL 、2.5 mmol/L dNTPs 1 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物CP1、CP3、CN218和CN219各0.5 μL 、5 U/ μL *Taq*酶0.25 μL ,加ddH₂O定容至25 μL 。PCR反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸10 min。扩增产物经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶于4 $^{\circ}\text{C}$ 、200 V

下电泳3 h, 银染后观察条带的大小和数量, 确定强毒株系和弱毒株系。*p25* 基因完整片段、强毒株系和弱毒株系相关片段大小分别为 672、320 和 392 bp, 计算每个组群 CTV 阳性的检出率。

1.2.3 多重分子标记分析CTV分离株的基因型

采用多重分子标记方法对 6 个柑橘品种上 CTV 分离株的基因型进行分析。以 cDNA 为模板、分别以 5 对引物 VT-F (5'-TTTAAAATGGTATGATTTC-GCCGTC-3')/VT-R (GACACCGGAAGTGCYTGAACAGAAT-3')、T3-F (5'-GTTATCACGCCTAAA-GTTTGGTACCACT-3')/T3-R (5'-CATGACATCGA-AGATAGCCGAAGC-3')、T30-F (5'-TGTTGCGAA-ACTAGTTGACCCTACTG-3')/T30-R (5'-TAGTGG-GCAGAGTGCCAAAAGAGAT-3')、T36-F (5'-TTC-CCTAGGTCGGATCCCGAGTATA-3')/T36-R (5'-CAAACCGGAAGTGACACACTTGTGA-3') 和 B165-F (5'-GTAAAGAAGGATCACCATCTTGACGTTGA-3')/B165-R (5'-AAAATGCACTGTAACAAGACCCGACTC-3') 对 VT、T3、T30、T36、B165 基因型鉴定, VT、T3、T30、T36 和 B165 基因型 PCR 扩增产物大小依次为 302、409、206、836 和 510 bp (Roy et al., 2010; Roy & Brlansky, 2010), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μ L 反应体系: cDNA 模板 1 μ L、10 \times PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 1 μ L、10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L、5 U/ μ L *Taq* 酶 0.25 μ L, 加 ddH₂O 定容至 25 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离、M5 Gelred 核酸染料染色后在 Universal Hood II 凝胶成像系统上成像。若各待测样品的 PCR 扩增产物能检测到 VT、T3、T30、T36 或 B165 基因型特异性目的片段, 则说明该待测样品中含有其对应基因型, 反之则不含该基因型。

1.2.4 柑橘上CTV分离株序列测定及遗传特征分析

以 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化 CTV *p25* 基因的 PCR 产物, 将纯化后 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司双向测序。应用 CExpress 6.0 软件对测序序列进行拼接, 并计算基因序列的碱基组成, 利用 MEGA 10 软件计算 30 个 CTV 分离株的核苷酸遗传距离及核苷酸序列相似性。采用 DnaSP 5.0 软件计算 30 个样品上 CTV 分离株群体内的基因流 N_m , 当 $N_m > 1.00$ 时存在较频繁的基因交流, 当 $N_m \leq 1.00$ 则交流不频繁 (López-Farfan

et al., 2007)。用 DnaSP 5.0 软件计算 6 个柑橘品种种群间的核苷酸差异数 K_{xy} 以及非同义突变率和同义突变率比 d_N/d_S , $d_N/d_S = 1$ 表示基因在中性选择下进化, $d_N/d_S < 1$ 表示基因在纯化选择下进化, $d_N/d_S > 1$ 则表示基因在正向选择下进化 (Cheng et al., 2014)。用 DnaSP 5.0 软件计算 6 个柑橘品种上 CTV 分离株序列遗传分化系数 F_{st} 、遗传多样性分析 P_i 、核苷酸平均差异数 K 和中性检验 Tajima's D 、Fu and Li's D 及 Fu and Li's F , 当 3 种中性检验结果均为正值时, 表明其正处于收缩或平衡状态; 当 3 种检测结果均为显著负值时, 表明其处在扩张状态, 当 3 种检测结果均为不显著负值时, 表明其可能处在扩张状态; 当 1~2 种检测结果为显著负值时, 表明其处于扩张的趋势中 (Wu et al., 2015)。利用软件 Arlequin 3.1 进行分子变异分析 (analysis of molecular variance, AMOVA)。利用 RPD 5.0 软件中 RDP、Chimaera、Maxchi、Bootscan、SiScan、GENECONV 和 3Seq 七种重组检测方法对 *p25* 基因核苷酸序列间的重组事件进行检测, 至少 4 种方法检测均显著 ($P < 1.0 \times 10^{-6}$) 的则重组事件有效。

1.2.5 柑橘品种上CTV分离株系统发育分析

对本研究获得的 30 个 CTV 分离株和从 NCBI 数据库中下载的印度茎陷点强毒株系 B165 (GenBank 登录号为 EU076703)、中国强毒株系 CT11A (GenBank 登录号为 JQ911664)、埃及强毒株系 Qaha (GenBank 登录号为 AY340974)、日本苗黄茎陷点强毒株系 NUagA (GenBank 登录号为 AB046398)、以色列茎陷点强毒株系 VT (GenBank 登录号为 U56902)、澳大利亚弱毒株系 PB61 (GenBank 登录号为 AJ297702)、美国苗黄茎陷点强毒株系 SY568 (GenBank 登录号为 AF001623)、强毒株系 T3 (GenBank 登录号为 KC525952)、弱毒株系 T30 (GenBank 登录号为 AF260651) 和速衰型强毒株系 T36 (GenBank 登录号为 U16304) 10 个 CTV 代表性分离株的 *p25* 基因运用 MEGA 10 软件以邻接法构建系统发育树, 自展值检验重复 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 柑橘品种上CTV分离株的组群构成

在 30 个柑橘样品中, 除 BZH2 和 BZH4 样品上 CTV 外, 其他样品上 CTV 分别属于 7 个分类组群 (表 1)。其中被 2 个以上 CTV 组群混合侵染的样品有 21 个, 被 CTV 单一组群侵染的样品仅 7 个, 所占比例分别为 70.0% 和 23.3%, 表明四川省眉山市 6 个

柑橘品种上CTV以多种组群混合侵染为主;在被CTV组群混合侵染的21个样品中,2个组群混合侵染的样品有19个,其中以组群3和组群5混合侵染为主;在被CTV单一组群侵染的7个样品中,仅包括

组群3和组群5,其中以组群3为主;而BZH2和BZH4样品上CTV无法与组群1~7中任一个组群对应(表1)。

表1 基于 $p25$ 基因的30个柑橘样品中CTV组群构成和基因型
Table 1 CTV group composition and genotypes in 30 citrus samples based on $p25$ gene

样品 Sample	组群构成 Group composition	株系 Strain	基因型鉴定结果 Genotyping result					基因型 Genotype
			VT	T3	T30	T36	B165	
AY1	3	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
AY2	3, 5	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
AY3	3, 5	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
AY4	3, 5	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
AY5	3	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
QC1	3, 5	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
QC2	3, 5	强, 弱 Virulent, mild	+	+	+	+	-	VT, T3, T30, T36
QC3	3, 5	强, 弱 Virulent, mild	+	+	+	+	-	VT, T3, T30, T36
QC4	3, 5	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
QC5	3, 5	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
BZH1	3, 5	强 Virulent	-	+	+	+	-	T3, T30, T36
BZH2	未知 Unknown	强 Virulent	+	+	+	+	-	VT, T3, T30, T36
BZH3	3, 4	强, 弱 Virulent, mild	-	+	+	+	-	T3, T30, T36
BZH4	未知 Unknown	强 Virulent	+	+	+	+	-	VT, T3, T30, T36
BZH5	1, 3	强 Virulent	+	+	+	+	-	VT, T3, T30, T36
MG1	1, 3	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
MG2	1, 3	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
MG3	1, 3	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
MG4	1, 3	强 Virulent	-	+	+	+	+	T3, T30, T36, B165
MG5	1, 3, 6, 7	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
CJ1	3, 5	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
CJ2	2, 3, 7	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
CJ3	3, 5	强, 弱 Virulent, mild	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
CJ4	3	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
CJ5	3	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
WG1	3	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
WG2	3	强 Virulent	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
WG3	5	强, 弱 Virulent, mild	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
WG4	3, 5	强, 弱 Virulent, mild	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165
WG5	3, 5	强, 弱 Virulent, mild	+	+	+	+	+	VT, T3, T30, T36, B165

+, -: PCR扩增到和未扩增到目的片段。+/-: Target fragments amplified or not amplified by PCR.

在7个分类组群中,组群3、组群5和组群1的CTV阳性检出率分别为90%、47%和20%,其他组群的检出率均低于7%,表明四川省眉山市6个柑橘品种上CTV种群以组群3为主(表1)。另外,不同柑橘品种上CTV组群组成存在差异,在纽荷尔脐橙QC1~QC5样品上CTV均为组群3和组群5混合侵染,呈现强、弱毒株系混合侵染;在温州蜜柑

MG1~MG5样品上CTV均为2种以上组群混合侵染,其中以组群1和组群3混合侵染为主,其流行株系均为强毒株系;在爱媛28号AY1~AY5、春见CJ1~CJ5和沃柑WG1~WG5样品上CTV单一组群和混合组群侵染均存在,且单一组群以组群3为主,混合组群以组群3和组群5混合侵染为主;在不知火品种上,除BZH2和BZH4样品外,其他3个样品均

为2种组群混合侵染。

30个柑橘样品均能扩增出大小为672 bp的完整*p25*基因片段,同时也扩增出与强毒株系相关的320 bp片段,表明所有样品中均存在CTV强毒株系;另外仅QC2、QC3、BZH3、CJ3、WG3、WG4和WG5样品能扩增出与弱毒株系相关的392 bp片段,综上所述表明纽荷尔脐橙、不知火、春见、沃柑品种上存在CTV强毒株系和弱毒株系混合侵染的现象(表1)。

2.2 柑橘品种上CTV分离株的基因型

30个柑橘样品上CTV分离株均包含T3、T30和T36这3种基因型,其中22个柑橘样品上CTV分离株包含全部5种基因型,表明四川省眉山市6个柑橘品种均混合感染了多种CTV基因型,且大部分样品上CTV分离株基因型组成较相似。此外,5个不知火BCH1~BCH5样品和2个纽荷尔脐橙QC2和QC3样品上的CTV分离株中未检出B165基因型,而且2个不知火BCH1、BCH2样品及1个温州蜜柑MG4样品上CTV分离株中未检出VT基因型,表明部分品种上CTV分离株基因型组成和同一品种内部分样品上CTV分离株基因型组成之间均存在差异(表1)。

2.3 柑橘品种上CTV分离株*p25*基因遗传特征

2.3.1 碱基组成和遗传相似性分析

6个柑橘品种上CTV分离株*p25*基因序列长度均为672 bp,A、T、C和G平均含量分别为28.74%、26.88%、18.78%和25.60%,各品种碱基含量相差不大,且所有CTV分离株*p25*基因序列的A+T平均含量高于G+C平均含量,均无碱基插入和缺失,共含

82个变异位点,占总长度的12.20%,其中爱媛28号、不知火、春见、温州蜜柑、纽荷尔脐橙和沃柑品种上CTV分离株*p25*基因序列变异位点分别为43、43、38、51、28和56个;6个柑橘样品上CTV分离株的 d_N/d_S 介于0.021~0.041之间,表明CTV分离株均处在纯化选择进化;核苷酸序列相似性介于92.4%~99.8%之间,平均遗传距离介于0.033~0.054之间。

2.3.2 遗传分化与基因流分析

遗传分化与变异分析结果显示,6个柑橘品种CTV种群遗传分化系数 F_{st} 在-0.114~0.476之间,其中纽荷尔脐橙品种上CTV种群与其他品种上CTV种群之间的遗传分化系数偏大,除与沃柑品种上CTV种群的遗传分化系数为0.199外,与其他品种上CTV种群的遗传分化系数均大于0.281,表明纽荷尔脐橙品种上CTV种群发生了明显的种群分化;不知火和春见品种上CTV种群之间的遗传分化系数为0.365,表明这2个品种上CTV种群之间分化较明显(表2)。6个柑橘品种CTV种群的基因流 N_m 在-35.89~52.92之间(表2),表明品种之间存在基因交流现象,其中纽荷尔脐橙品种CTV种群除了与沃柑的 N_m 略大于1以外,与其他品种间的 N_m 均小于1,表明纽荷尔品种中CTV与其他品种交流不频繁(表2)。AMOVA分析结果显示,6个柑橘品种上CTV种群内变异百分比为19.14%,种群间变异百分比为80.86%,表明寄主品种是CTV分离株*p25*基因遗传分化的重要因素(表3)。

表2 6个柑橘品种上CTV组群*p25*基因序列的遗传分化系数与基因流

Table 2 Genetic differentiation coefficients and gene flow of *p25* in CTV populations on six citrus varieties

品种 Variety	爱媛28号 Aiyuan 28	不知火 Shiranui	春见 Harumi	温州蜜柑 Satsuma mandarin	纽荷尔脐橙 Newhall navel orange	沃柑 Orah
爱媛28号 Aiyuan 28	-	0.111	-0.046	-0.114	0.281	0.079
不知火 Shiranui	2.00	-	0.365	0.133	0.476	0.092
春见 Harumi	-5.71	0.44	-	-0.007	0.461	0.257
温州蜜柑 Satsuma mandarin	-2.45	1.63	-35.89	-	0.303	0.005
纽荷尔脐橙 Newhall navel orange	0.64	0.28	0.29	0.57	-	0.199
沃柑 Orah	2.92	2.47	0.72	52.92	1.01	-

对角线以上为遗传分化系数,对角线以下为基因流。Genetic differentiation coefficients are shown above the diagonal, while gene flow values are shown below the diagonal.

表3 6个柑橘品种上CTV种群的分子变异分析

Table 3 AMOVA of CTV populations on six citrus varieties

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of square	变异组分 Variance component	变异百分比 Percentage of variation/%
种群内 Within population	5	111.533	2.418	19.14
种群间 Among population	24	245.200	10.217	80.86
总数 Total	29	356.733	12.635	100.00

2.3.3 遗传多样性、选择压力及重组分析

6个柑橘品种上CTV分离株的核苷酸多样性介于0.021~0.038之间,核苷酸平均差异数介于13.8~25.8之间,其中在沃柑品种上核苷酸多样性和核苷酸差异数最高,分别为0.038和25.8,在纽荷尔脐橙品种上的最低,分别0.021和13.8(表4)。爱媛28号、温州蜜柑和纽荷尔脐橙品种上CTV分离株的Tajima's *D*、Fu and Li's *D*及Fu and Li's *F*均大于0,表明这3个品种上CTV分离株处于平衡或收缩状态;不知火和沃柑品种上的CTV种群分离株*p25*基

因的Tajima's *D*、Fu and Li's *D*及Fu and Li's *F*均小于0,但*P*值不显著,表明这2个品种上CTV分离株可能处于扩张状态;春见品种上CTV种群分离株*p25*基因的Fu and Li's *D*和Fu and Li's *F*检测结果为显著负值,而Tajima's *D*为不显著负值,表明该品种上CTV分离株处于扩张趋势中(表4)。RDP、Chimaera、Maxchi、Bootscan、SiScan、GENECONV和3Seq七种检测方法在样品上CTV均未检测到*p25*基因发生重组事件。

表4 6个柑橘品种上CTV分离株*p25*基因序列核苷酸多样性分析及中性检验

Table 4 Nucleotide diversity of *p25* gene and neutrality test in CTV populations on six citrus varieties

寄主品种 Host variety	核苷酸多样性 Nucleotide diversity	核苷酸平均差异数 Average number of nucleotide difference	Tajima's <i>D</i>	Fu and Li's <i>D</i>	Fu and Li's <i>F</i>
爱媛28号 Aiyuan 28	0.035	23.2	0.742(<i>P</i> >0.10)	0.813(<i>P</i> >0.10)	0.864(<i>P</i> >0.10)
不知火 Shiranui	0.029	19.6	-0.379(<i>P</i> >0.10)	-0.379(<i>P</i> >0.10)	-0.410(<i>P</i> >0.10)
春见 Harumi	0.023	15.2	-1.252(<i>P</i> >0.10)	-1.252(<i>P</i> <0.05)	-1.352(<i>P</i> <0.05)
温州蜜柑 Satsuma mandarin	0.037	25.0	0.012(<i>P</i> >0.10)	0.072(<i>P</i> >0.10)	0.066(<i>P</i> >0.10)
纽荷尔脐橙 Newhall navel orange	0.021	13.8	0.200(<i>P</i> >0.10)	0.200(<i>P</i> >0.10)	0.215(<i>P</i> >0.10)
沃柑 Orah	0.038	25.8	-0.554(<i>P</i> >0.10)	-0.445(<i>P</i> >0.10)	-0.506(<i>P</i> >0.10)

2.4 柑橘品种上CTV分离株的系统发育分析

30个柑橘样品上CTV分离株被聚为3个类群,其中爱媛AY1、AY2、AY3、不知火BZH1、春见CJ1、CJ2、CJ3、CJ5和蜜柑MG1、MG2、MG4样品上的CTV分离株与茎陷点强毒株系B165、茎陷点强毒株系CT11A、苗黄茎陷点强毒株系NUagA、苗黄茎陷点强毒株系SY568及茎陷点强毒株系VT被聚为类群I,该类群为CTV茎陷点强毒株系类群;纽荷尔脐橙QC1~QC5和沃柑WG1样品上的CTV分离株与强毒株系T3被聚为类群II;爱媛AY4、AY5、不知火BZH2~BZH5、春见CJ4、蜜柑MG3、MG5和沃柑WG2~WG5样品上的CTV分离株与强毒株系Qaha、强毒株系T36、弱毒株系PB61和弱毒株系T30被聚为类群III,不知火和沃柑样品上的CTV分离株多聚为类群III(图1),进一步表明纽荷尔脐橙上CTV分离株与其他品种上CTV分离株关系相对较远。

3 讨论

Atta et al.(2011)通过对85个CTV分离株进行CTV *p25*/Hinf I RFLP 组群分析发现,组群3、组群1和组群6是巴基斯坦田间柑橘CTV流行组群,且多个组群混合侵染的现象在田间比较普遍;Jiang et al.(2008)对中国南方3个柑橘产区30个样品上CTV

分离株的组群构成进行分析,发现9个样品为CTV组群单一侵染,21个样品为多种CTV组群混合侵染,也表明CTV组群的混合侵染较普遍。本研究对四川省眉山市6个柑橘品种上CTV组群构成进行分析,结果显示在30个柑橘样品中,70.0%的柑橘样品为多种CTV组群混合侵染,且多为强、弱毒株系混合侵染,且6个柑橘品种上CTV分离株的组群构成存在差异,温州蜜柑品种主要为组群1和组群3混合侵染,纽荷尔脐橙品种均为组群3和组群5混合侵染,而其他4个品种主要为组群3和组群5混合侵染及组群3单一侵染,其差异的来源及其对症状的影响需要进一步研究。Jiang et al.(2008)通过对中国分离株S4的*p25*基因分析发现1个新的酶切位点,该酶切位点将299 bp片段进一步酶切成184 bp和115 bp两个片段,成为组群1~7外的新组群;本研究同样发现不知火品种2个样品上的CTV分离株不能归类到组群1~7中,而这2个样品上CTV分离株的*p25*基因是否也存在特殊酶切位点,进而将其形成新组群,这还有待进一步探究。此外4个样品经BD-PCR扩增后同时出现强毒株系和弱毒株系对应的条带,与RFLP分析结果相符,但除温州蜜柑外的其他寄主样品上BD-PCR技术均未检出弱毒株系对应的条带,与RFLP分析结果不一致,究其原因可能是BD-

PCR 技术中弱毒株系的引物比较单一, 无法识别部分弱毒株系相关基因序列。

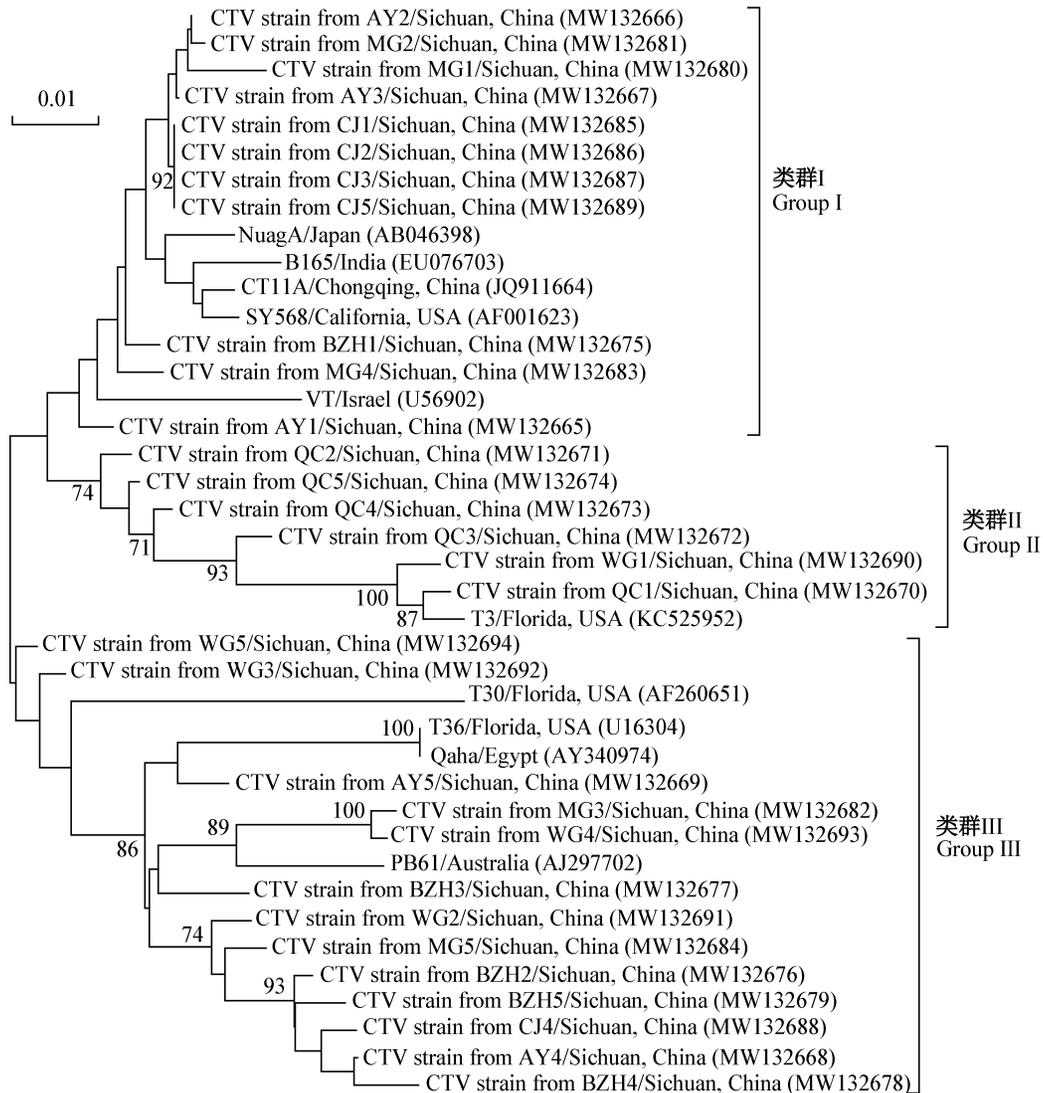


图 1 基于 *p25* 基因序列的四川省眉山市 30 个柑橘品种样品上 CTV 分离株和其他株系的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of CTV isolates from 30 citrus samples in Meishan City, Sichuan Province and other related isolates based on *p25* gene sequences

确定 CTV 预免疫源的基因型组成是利用 CTV 弱毒株系进行 MSCP 的基础 (Scott et al., 2013)。本研究结果发现 6 个柑橘品种上 CTV 分离株均包含 T3、T30、T36 三种基因型, 且包含了强、弱毒株系的基因型; 强、弱毒株系基因型在同一植株中混合侵染的现象普遍存在, 例如 Scott et al. (2013) 对墨西哥酸橙、沼泽和星红宝石葡萄柚品种中的 CTV 分离株进行基因型分析, 发现同一植株中含有强、弱毒株系混合侵染的现象; Wang et al. (2013) 对保存在加州河滨市柑橘克隆保护计划的检疫植物进行基因型分析, 也发现同一植株中含有强、弱毒株系混合侵染的现象; Xiao et al. (2017) 对中国湖南省的 19 个 CTV 样品进行的基因型分析, 也发现同一植株中含有强、

弱毒株系混合侵染的现象。而不同基因型如何在同一株系中共存, 尤其是弱毒基因型 T30 未表现 MSCP 机制, 均有待进一步研究 (Dawson et al., 2015)。此外, 不知火品种样品中均未检测到 B165 基因型, 而其他 5 个柑橘品种中大部分样品均检测到 B165 基因型, 不知火品种是否对 B165 基因型 CTV 分离株存在抗性或其他原因有待进一步分析确定。目前报道的 CTV 基因型有 T36、VT、T30、T3、B165、RB、HA、S1、L1、M1 共 10 种 (Harper, 2013; Yokomi et al., 2018; Wang et al., 2020), 本研究仅对其中的 T36、VT、T30、T3、B165 基因型进行了鉴定, 其他 5 种基因型的鉴定及其在不同柑橘品种的发生情况还有待进一步分析。

本研究结果显示除纽荷尔脐橙品种上CTV种群外,其他5个种群之间有较频繁的基因交流,并且纽荷尔脐橙品种上CTV种群发生了明显的种群分化;AMOVA分析显示寄主品种是CTV分离株 $p25$ 基因遗传分化的重要原因,所有纽荷尔脐橙样品上CTV分离株均被聚为类群II,而其他品种上CTV分离株分别被聚为类群I、类群III或类群II、III,进一步表明纽荷尔脐橙品种上CTV种群与其他品种上CTV种群存在明显的遗传差异。尽管基因重组在CTV的遗传演化中具有重要作用(Rubio et al., 2001; Benítez-Galeano et al., 2015),但6个柑橘品种上CTV种群的 $p25$ 基因均未检测到重组事件,表明纽荷尔脐橙与其他品种之间的CTV序列差异并不是由基因重组引起的,推测纽荷尔脐橙品种上CTV种群分化可能与寄主的相互作用有关(Dawson et al., 2015; 唐萌等, 2016)。

本研究对四川省眉山市6个柑橘品种30个样品上CTV分离株 $p25$ 基因进行限制性片段长度多态性、多重分子标记及基因遗传多样性和系统发育树分析,发现这6个柑橘品种上CTV分离株种群间存在基因交流现象,寄主品种是导致CTV分离株遗传分化的重要因素。MSCP是防控柑橘衰退病最有效的技术,其防控效果取决于CTV弱毒株系和强毒株系的同源性(Lee & Keremane, 2013),所以在田间应用MSCP防控衰退病时应考虑不同柑橘品种对CTV分离株遗传分化的影响。

参 考 文 献 (References)

- Atta S, Liu YQ, Cao MJ, Yang FY, Zhou Y, Zhou CY. 2011. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from Pakistan based on CPG/*Hinf* I restriction fragment length polymorphism (RFLP) groups analysis. *African Journal of Biotechnology*, 10(44): 8689–8694
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF. 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1): 291–316
- Benítez-Galeano MJ, Rubio L, Bertalmío A, Maeso D, Rivas F, Colina R. 2015. Phylogenetic studies of the three RNA silencing suppressor genes of South American CTV isolates reveal the circulation of a novel genetic lineage. *Viruses*, 7(7): 4152–4168
- Biswas KK, Tarafdar A, Diwedi S, Lee RF. 2012. Distribution, genetic diversity and recombination analysis of *Citrus tristeza virus* of India. *Virus Genes*, 45(1): 139–148
- Burguán J, Havelda Z. 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science*, 16(5): 265–272
- Cevik B, Pappu SS, Pappu HR, Benschler D, Irely M, Lee RF, Niblett CL. 1996. Application of Bi-directional PCR to *Citrus tristeza virus*: detection and strain differentiation. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957–2010)*, 13(13). DOI:10.5070/c57t43c72b
- Cheng FX, Jia PL, Wang Q, Lin CC, Li WH, Zhao ZM. 2014. Studying tumorigenesis through network evolution and somatic mutational perturbations in the cancer interactome. *Molecular Biology and Evolution*, 31(8): 2156–2169
- Dawson WO, Bar-Joseph M, Garnsey SM, Moreno P. 2015. *Citrus tristeza virus*: making an ally from an enemy. *Annual Review of Phytopathology*, 53: 137–155
- Folimonova SY. 2020. *Citrus tristeza virus*: a large RNA virus with complex biology turned into a valuable tool for crop protection. *PLoS Pathogens*, 16(4): e1008416
- Ghosh A, Das A, Pun KB, Kumar R, Meena R, Baranwal VK. 2014. Present status of *Citrus tristeza virus* infecting *Citrus* spp. in Darjeeling hills and its detection in different plant parts. *Phytoparasitica*, 42(3): 381–386
- 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
- Hančević K, Radić T, Pasković I, Urlić B. 2018. Biochemical and physiological responses to long-term *Citrus tristeza virus* infection in Mexican lime plants. *Plant Pathology*, 67(4): 987–994
- Harper SJ. 2013. *Citrus tristeza virus*: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*, 4: 93
- Harper SJ, Dawson TE, Pearson MN. 2010. Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Archives of Virology*, 155(4): 471–480
- Hilf ME, Karasev AV, Albiach-Martí MR, Dawson WO, Garnsey SM. 1999. Two paths of sequence divergence in the *Citrus tristeza virus* complex. *Phytopathology*, 89(4): 336–342
- Jiang B, Hong N, Wang GP, Hu J, Zhang JK, Wang CX, Liu Y, Fan XD. 2008. Characterization of *Citrus tristeza virus* strains from southern China based on analysis of restriction patterns and sequences of their coat protein genes. *Virus Genes*, 37(2): 185–192
- Lee RF, Keremane ML. 2013. Mild strain cross protection of *tristeza*: a review of research to protect against decline on sour orange in Florida. *Frontiers in Microbiology*, 4: 259
- López-Farfan DC, Jaramillo C, Guhl F. 2007. Population structure and genetic variability of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) from different geographic areas of Colombia. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud*, 27(S1): 28–39
- Moreno P, Ambrós S, Albiach-Martí MR, Guerri J, Peña L. 2008. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 9(2): 251–268
- Read DA, Pietersen G. 2015. Genotypic diversity of *Citrus tristeza virus* within red grapefruit, in a field trial site in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 142(3): 531–545
- Roy A, Ananthkrishnan G, Hartung JS, Brlansky RH. 2010. Development and application of a multiplex reverse-transcription poly-

- merase chain reaction assay for screening a global collection of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology*, 100(10): 1077–1088
- Roy A, Brlansky RH. 2010. Genome analysis of an orange stem pitting *Citrus tristeza virus* isolate reveals a novel recombinant genotype. *Virus Research*, 151(2): 118–130
- Rubio L, Ayllón MA, Kong P, Fernández A, Polek M, Guerri J, Moreno P, Falk BW. 2001. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology*, 75(17): 8054–8062
- Scott KA, Hlela Q, Zablocki O, Read D, van Vuuren S, Pietersen G. 2013. Genotype composition of populations of grapefruit-cross-protecting *Citrus tristeza virus* strain GFMS12 in different host plants and aphid-transmitted sub-isolates. *Archives of Virology*, 158(1): 27–37
- Song Z, Zou M, Xu XF, Tang KZ, Liu Y, Zhou CY. 2005. DTBIA detection of *Citrus decay virus* in new and old branches and leaves of pomelo. *Southwest Horticulture*, 33(S1): 43–45 (in Chinese) [宋震, 邹敏, 徐小峰, 唐科志, 刘英, 周常勇. 2005. 柚新老枝叶中柑橘衰退病毒的DTBIA检测. *西南园艺*, 33(S1): 43–45]
- Su HN, Wang XF, Huang AJ, Li ZA, Tang KZ, Zhou CY. 2014. High quality total nucleic acid extraction method from citrus for disease detection. *Acta Horticulturae Sinica*, 41(11): 2342–2352 (in Chinese) [苏华楠, 王雪峰, 黄爱军, 李中安, 唐科志, 周常勇. 2014. 高质量提取柑橘样品中病原总核酸方法的建立. *园艺学报*, 41(11): 2342–2352]
- Tang M, Jin X, Zhou CY, Li ZA, Tao ZZ, Zhou Y. 2016. Suppression and sequence variation of *Citrus tristeza virus* genotypes by citrus cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 43(1): 55–60 (in Chinese) [唐萌, 金鑫, 周常勇, 李中安, 陶珍珍, 周彦. 2016. 柑橘品种对不同基因型柑橘衰退病毒的抑制及变异的影响. *园艺学报*, 43(1): 55–60]
- Wang J, Zhou T, Shen P, Zhang S, Cao MJ, Zhou Y, Li Z. 2020. Complete genome sequences of two novel genotypes of *Citrus tristeza virus* infecting *Poncirus trifoliata* in China. *Journal of Plant Pathology*, 102(3): 903–907
- Wang JB, Bozan O, Kwon SJ, Dang T, Rucker T, Yokomi RK, Lee RF, Folimonova SY, Krueger RR, Bash J, et al. 2013. Past and future of a century old *Citrus tristeza virus* collection: a California citrus germplasm tale. *Frontiers in Microbiology*, 4: 366
- Wu GW, Tang M, Wang GP, Jin FY, Yang ZK, Cheng LJ, Hong N. 2015. Genetic diversity and evolution of two capsid protein genes of *Citrus tristeza virus* isolates from China. *Archives of Virology*, 160(3): 787–794
- Xiao C, Yao RX, Li F, Dai SM, Licciardello G, Catara A, Gentile A, Deng ZN. 2017. Population structure and diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Hunan Province, China. *Archives of Virology*, 162(2): 409–423
- Yokomi R, Selvaraj V, Maheshwari Y, Chiumenti M, Saponari M, Giampetruzzi A, Weng ZM, Xiong ZG, Hajeri S. 2018. Molecular and biological characterization of a novel mild strain of *Citrus tristeza virus* in California. *Archives of Virology*, 163(7): 1795–1804

(责任编辑:张俊芳)