

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.05.004

江西赣州柑橘衰退病毒种群构成变化研究

张兴铠, 赵金发, 王莹, 周常勇, 周彦

西南大学 柑桔研究所/国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712

摘要: 通过研究柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)的种群构成, 探究江西赣州纽荷尔脐橙上茎陷点型衰退病暴发的原因。从赣州的10个区县采集了199份疑似感染了CTV的纽荷尔脐橙样品, 对阳性样品进行了8种基因型的检测, 结果发现, 有112份样品感染了CTV, 且均含有2种及2种以上的基因型。最常见的基因型组合为T36+VT+T3+T30+S1+RB和T36+VT+T3+T68, 分别占总数的13.4%和9.8%。与2004—2007年采集的CTV样品相比, 2019—2020年采集的样品中新出现了RB, T30和HA16-5基因型, 且T36和RB基因型的检出率显著上升。赣州CTV的种群结构发生了改变, RB和HA16-5基因型可能是引起赣州纽荷尔脐橙上茎陷点型衰退病暴发的原因。

关键词: 柑橘衰退病毒; 基因型; 种群构成

中图分类号: S436.661

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2022)05-0035-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Dramatic Change in *Citrus tristeza virus* Population in Ganzhou, Jiangxi Province

ZHANG Xingkai, ZHAO Jinfa, WANG Ying,
ZHOU Changyong, ZHOU Yan*Citrus Research Institute, Southwest University/National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China*

Abstract: Severe stem pitting isolates of *Citrus tristeza virus* (CTV) are of economic importance to global citrus industry. The aim of this study was to apply genotype detection to investigate the cause of an outbreak of severe stem pitting in navel orange occurred recently in Ganzhou, Jiangxi province, which is one of the most famous navel orange production areas in the world. A total of 199 navel orange samples were collected from 10 counties in Ganzhou and tested for CTV by RT-PCR. The genotypes of CTV in infected samples were assessed. Among these, 112 tested positive for CTV, and most of CTV isolates were the mixture of two or more genotypes. The most common mix of genotypes were T36+VT+T3+T30+S1+

收稿日期: 2021-09-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1001802); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-26-05B); 重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxmX0557)。

作者简介: 张兴铠, 硕士研究生, 主要从事柑橘衰退病毒研究。

通信作者: 周常勇, 研究员; 周彦, 研究员。

RB and T36+VT+T3+T68 with occurrences of 13.4% and 9.8%, respectively. These results demonstrated a dramatic change in CTV populations, with the presence of three emerging genotypes (RB, T30 and HA16-5). Furthermore, the detection rates of T36 and RB genotypes have significantly increased. The population structure of CTV have changed. The outbreak of stem pitting in Ganzhou may be due to the emerging of RB and HA16-5 genotypes.

Key words: *Citrus tristeza virus*; genotype; population composition

柑橘作为世界第一大水果,具有重要的经济价值.自加入世贸组织以来,中国柑橘种植面积和产量增长迅速.截至 2019 年,中国柑橘栽培面积为 277 万 hm^2 ,产量达 4 584 万 t(2020 年国家统计局数据),均位列世界首位,柑橘已成为全面实现乡村振兴的重要支柱产业.柑橘在生产过程中受到多种因素的影响,其中由柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)引起的柑橘衰退病是制约世界柑橘产业发展的一个重要因素.

CTV 为长线形病毒科(Closteroviridae)长线形病毒属(*Closterovirus*)成员,主要通过嫁接和蚜虫进行传播. CTV 基因组为一条约 19 260 nt 的正义单链 RNA,包含两个非编码区和 12 个开放阅读框(ORFs),是已知最大的植物病毒^[1]. CTV 在田间具有复杂的株系分化现象,根据其症状差异,分为苗黄、速衰和茎陷点 3 种主要类型^[2-4]. 同时,根据其基因组序列的变异被分为 T36,VT,T30,T3,RB,T68,HA16-5 和 S1 等多个基因型^[1,5-8]. 其中,T36 与 VT 基因型通常与速衰症状相关,T3,VT,RB 和 T68 基因型与茎陷点症状相关联^[9-14],而 S1 和 T30 基因型通常不引起明显的症状^[6,15]. 由于 CTV 全序列测定的难度较大,因此 ORF1a,5'UTR,RdRp 等区域常被作为 CTV 分型的重要靶标,其中因 ORF1a 的多样性最为丰富,是目前使用较多的 CTV 分型依据^[5,16-18].

虽然 CTV 在中国的分布极为广泛,但由于长期以来大量使用枳、酸橙、红橘等抗耐砧木,速衰型衰退病仅在云南的宾川、建水等地有过少量发生^[19]. 茎陷点型衰退病对中国柑橘产业为害较为严重,曾对四川、重庆等地的甜橙品种造成了严重损失^[20]. 近年来茎陷点型衰退病在我国最重要的脐橙产区——江西赣州暴发,导致脐橙生长缓慢、树势减弱、产量和品质降低,损失严重. 前期研究显示,赣州 CTV 发生较为普遍,虽多为 VT 和 T36 基因型混合发生,但未曾对脐橙产业造成严重危害^[21-23]. 因此,本研究拟通过研究赣州 CTV 种群的基因型构成及变化,以期为进一步探明江西赣州茎陷点型衰退病暴发的原因提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 样品采集

2019—2020 年,在江西赣州大余、寻乌、章贡、南康等 10 个县(区)的脐橙园采集了 199 个疑似感染 CTV 的纽荷尔脐橙样品. 此外,于 2004—2007 年从赣州寻乌、信丰、南康纽荷尔脐橙上采集的 9 个 CTV 毒株由西南大学柑桔研究所提供.

1.2 方法

1.2.1 CTV 检测

从每棵植株的 3 个不同方向上共选取 100 mg 嫩叶,混合后使用 RNAisoplus(TaKaRa,日本)抽提总 RNA. 利用引物 CP1:5'-ATGGACGACGAAACAAAG-3',CP3:5'-TCAACGTGTGTTGAATTT-3',进行 PCR 检测.

1.2.2 基因型鉴定

样品有试验获得的 112 份阳性样品及 9 份课题组前期保存的试验样品,使用前期报道的特异性引物对样品进行基因型鉴定^[5,16-18].

1.2.3 症状观察

将 CTV 阳性样品剥皮后观察茎陷点症状, 并参考 Garnsey 等^[2]的标准对茎陷点症状的严重程度进行分级. 其中, 0 代表无症状, 1 代表轻微症状, 2 代表中度症状, 3 代表严重症状.

1.2.4 指示植物鉴定

选取 39 个代表性的 CTV 阳性样品, 使用墨西哥莱檬、symons 甜橙、代代酸橙和琯溪蜜柚作为指示植物进行鉴定, 接种 1 年后观察症状.

2 结果与分析

2.1 CTV 检测结果

采集的 199 份柑橘样品中, 有 112 份感染了 CTV. 所调查的区县均有 CTV 发生, CTV 在各区县的发生率为 22.2%~86.0%, 平均发生率为 56.3%, 其中发生率最高的地区为会昌(86.0%), 其次为章贡(75.0%), 最低是崇义(22.2%), 表明 CTV 在赣州脐橙果园普遍发生(表 1).

表 1 江西赣州脐橙上柑橘衰退病毒检出率

采集地	阳性数/总数	检出率/%	采集地	阳性数/总数	检出率/%
崇义	2/9	22.2	安远	3/6	50.0
南康	3/12	25.0	大余	14/31	45.2
寻乌	19/29	65.5	赣县	5/11	45.5
章贡	9/12	75.0	龙南	13/36	36.1
会昌	43/50	86.0	信丰	1/3	33.3

2.2 基因型鉴定

2019—2020 年采集的 112 份阳性样品中能检测到 T36, VT, T3, T68, T30, RB, HA16-5 和 S1 等 8 个基因型, 其中 T36 基因型检出率最高(99.1%), 其次是 T3(95.5%)和 VT(94.6%)基因型, HA16-5 基因型检出率最低(18.8%). 课题组前期保存的赣州 CTV 样品中, 只能检测到 T36, VT, T3, T68 和 S1 等 5 个基因型. 所有样品中均能检测出 T3 和 VT 基因型, 此外, T68, S1 和 T36 基因型的检出率分别为 33.3%, 22.2%和 11.1%. 相比于 2004—2007 年采集的样品, 2019—2020 年采集的样品中除了 VT 与 T3 基因型外, 其余 6 个基因型检出率均有所上升, 其中 T36 和 RB 基因型增涨最为显著(表 2).

表 2 江西赣州脐橙上柑橘衰退病毒基因型种类

CTV 基因型	2004—2007 年采集		2019—2020 年采集	
	采集样品数	对应基因型样品比例/%	采集样品数	对应基因型样品比例/%
T36	1	11.1	111	99.1
VT	9	100.0	106	94.6
T3	9	100.0	107	95.5
T68	3	33.3	65	58.0
T30	0	0.0	34	30.4
S1	2	22.2	50	44.6
RB	0	0.0	75	67.0
HA16-5	0	0.0	21	18.8

2019—2020 年采集的 112 份样品中均为多基因型混合发生. 以 6 种基因型混合发生最为常见, 其次为 4 种基因型混合侵染, 分别占总数的 31.3%和 26.8%. 最常见的基因型组合为 T36+VT+T3+T30+S1+RB, 有 15 个, 占总数的 13.4%; 其次依次为 T36+VT+T3+T68, T36+VT+T3+RB 基因型, 分别占总数的 9.8%和 8.0%. 2004—2007 年采集的 CTV 样品中, 也以多基因型混合发生. 其中, 以 VT+

T3+T68 和 VT+T3 基因型混合感染最为常见, 均占其总数的 33.3%, 其次是 VT+T3+S1 基因型(22.2%), T36+VT+T3 基因型混合发生的情况最少(11.1%)(表 3)。

表 3 江西赣州脐橙上柑橘衰退病毒基因型构成情况

茎陷点 症状分级	2004—2007 年 基因型组合(样品数)	2019 年 基因型组合(样品数)	2020 年 基因型组合(样品数)	2020 年 基因型组合(样品数)	
0~1	T36+VT+T3(1)	T36+VT+T3(2)	T36+VT+T3(1)	T36+VT+T3+T30+T68+RB+HA16-5(2)	
	VT+T3(3)	VT+T3+T68+T30+RB(1)	T36+T3+T30+S1+RB(1)	T36+VT+T3+T30+T68+S1(3)	
	VT+T3+S1(2)	T36+VT+T3+RB(1)	T36+VT+T3+HA16-5(1)	T36+VT+T3+T30+T68+S1+RB(1)	
	VT+T3+T68(3)	T36+VT+T30+RB(1)	T36+VT+T3+S1(1)	T36+VT+T3+T68(8)	
			T36+VT+T3+T30+RB(2)	T36+VT+T3+T68+HA16-5(2)	
			T36+VT+T3+T30+S1(3)	T36+VT+T3+T68+HA16-5+RB(1)	
			T36+VT+T3+T30+S1+RB(10)	T36+VT+T3+T68+RB(1)	
			T36+VT+T3+T30+T68+RB(3)	T36+VT+T3+T68+S1(3)	
			T36+VT+T68+HA16-5(1)	T36+VT+T3+T68+S1+RB(1)	
			T36+VT+T3+T68+T30+S1+RB(7)		
	2			T36+VT+T3+T68+T30(1)	
				T36+VT+T3+T30+S1+RB(4)	
				T36+T3+T30+S1(1)	
				T36+VT+T3+T68+S1+RB+HA16-5(1)	
3		T36+RB(1)	T36+VT+T3+T68+RB+HA16-5(4)		
		T36+T3+T30+RB(1)	T36+VT+T3+T68+S1+RB+HA16-5(3)		
		T36+T30+VT+RB(1)	T36+VT+T3+T68(2)		
		T36+VT+RB+T3+S1(1)	T36+VT+T3+S1+RB(1)		
		T36+VT+T3(2)			
		T36+VT+T3+RB(8)			
		T36+VT+T3+RB+HA16-5(2)			
		T36+VT+T3+S1(1)			
		T36+VT+T3+S1+RB(4)			
		T36+VT+T3+T30+S1(1)			
		T36+VT+T3+T30+S1+RB(1)			
		T36+VT+T3+T68(1)			
		T36+VT+T3+T68+RB(2)			
		T36+VT+T3+T68+RB+HA16-5(1)			
		T36+VT+T3+T68+S1+RB(4)			
	T36+VT+T30+RB(1)				
	T36+VT+T68+RB+HA16-5(1)				
	VT+T3(1)				

2.3 症状与基因型的相关性

2004—2007 年采集的 9 份样品茎陷点症状不明显或症状轻微。2019—2020 年采集的 112 份阳性样品中, 有 58 份样品无明显的茎陷点症状或症状轻微, 10 份样品出现中等强度的茎陷点症状, 其余 44 份样品均有严重的茎陷点症状。在 2019 年调查时发现, 茎陷点症状严重的植株较症状轻微的植株, 其感染 CTV

的基因型构成更为复杂。此外,植株感染 HA16-5 基因型后,多表现出严重的茎陷点症状,而一旦检测出 T30 基因型,植株的茎陷点症状多为轻微。

2.4 指示植物鉴定

在进行指示植物鉴定的 39 个 CTV 毒株中,有 34 个 CTV 毒株在墨西哥莱檬上产生了严重的脉明和茎陷点症状,在 symons 甜橙上表现出严重的茎陷点症状,在代代酸橙上没有观察到明显症状,在琯溪蜜柚上出现了轻度至中等的茎陷点症状。其余 5 个 CTV 毒株只在墨西哥来檬上产生了轻微脉明和茎陷点症状。结果再次表明,赣州纽荷尔脐橙上流行的 CTV 毒株以甜橙茎陷点毒株为主。

3 讨论

近年来,由于我国柑橘产业发展迅猛,优质无病毒苗木供应不足,部分地区无序繁育、调运苗木,造成多种危险性柑橘病毒病随苗木扩散,并在部分柑橘产区的发生为害日益严重^[19]。江西赣州作为世界上著名的脐橙产区之一,截至 2019 年,脐橙种植面积约 11 万 hm^2 ,产量 125 万 t,其主要栽培品种为纽荷尔脐橙。虽然 CTV 长期以来在赣州分布广泛,但均未引起严重损失,但是近年来,茎陷点型衰退病在赣州多地陆续暴发,损失严重。因此掌握赣州 CTV 种群构成变化,将有助于阐明茎陷点型衰退病在赣州暴发的原因。

CTV 存在复杂的株系分化现象,在不同柑橘品种上的症状差异较大。前期研究发现茎陷点症状的产生与 *p33*, *p13*, *p18* 基因的表达比例有关^[24], *p23* 基因可诱导酸橙和葡萄柚幼苗出现苗黄症状^[25-26],但决定症状强弱的关键序列区域仍不清楚。为快速鉴定不同的 CTV 类型,国内外学者建立了多种分别基于血清学、单链构象多态性(SSCP)、限制性片段长度多态性法(RFLP)、基因型和全序列差异的检测方法。其中,基因型检测因其具备快捷、且与毒株生物学性状符合度较高的特点而被广泛运用。最初根据 5'UTR, ORF1, RdRp 区域的序列差异,将 CTV 分为了 VT, T3, T30 和 T36 等 4 个基因型,其中 T36 与 VT 基因型通常与速衰症状相关, T3 和 VT 基因型与茎陷点症状相关联,而 T30 基因型通常不引起明显的症状^[9-14]。随后又鉴定出 RB, HA16-5, S1 等多个基因型^[6-8]。

本研究结果显示,与 2004—2007 年采集的赣州 CTV 样品,以及夏宜林^[22]、刘志芳^[23]的前期研究结果相比,2019 和 2020 年采集的样品中新出现了 RB, T30 和 HA16-5 基因型,且 T36 和 RB 基因型的检出率显著上升。由于 RB 基因型作为强毒株可以在抗病品种枳上引起严重的茎陷点症状,这也许是赣州茎陷点型衰退病近年来发生严重的原因。本研究还发现,在引起轻微茎陷点症状的 CTV 毒株中也存在 RB 基因型。由于本研究分析的靶标仅占 CTV 基因组约 3.6% 的区域,且重组是导致 CTV 变异的重要因素^[27],因此下一步将选取代表性强弱毒株进行全序列分析,以期从分子水平上阐明赣州茎陷点型衰退病暴发的原因。此外,本研究还发现纽荷尔脐橙感染 HA16-5 基因型后,多表现出严重的茎陷点症状。前期研究暗示,HA16-5 基因型不会在葡萄柚上引起严重的茎陷点症状^[14]。由于 CTV 具有寄主专化性的特点,因此还需要进一步明确 HA16-5 基因型对甜橙、柚、杂柑等中国主要柑橘栽培类型的为害特点。

4 结论

本试验结果表明,江西赣州田间 CTV 的种群构成发生了改变,2019—2020 年在纽荷尔脐橙园采集的 CTV 毒株的种群构成较 2004—2007 年更为复杂,强毒株相关基因型的比例显著增高,近年来赣州暴发的茎陷点型衰退病可能与 RB 和 HA16-5 基因型的出现有关。

感谢江西省赣州市果业局果树植保站站长陈慈相研究员为本研究提供的帮助。

参考文献:

- [1] KARASEV A V, BOYKO V P, GOWDA S, et al. Complete Sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA Genome [J]. *Virology*, 1995, 208(2): 511-520.
- [2] GARNSEY S M, GUMPF D J, ROISTACHER C N, et al. Toward a Standardized Evaluation of the Biological Properties of *Citrus tristeza virus* [J]. *Phytophylactica*, 1987, 19(2): 151-158.
- [3] BAR-JOSEPH M, MARCUS R, LEE R F. The Continuous Challenge of *Citrus tristeza virus* Control [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1989, 27: 291-316.

- [4] BROADBENT P. Biological Characterization of Australian Isolates of *Citrus tristeza virus* and Separation of Subisolates by Single aphid Transmissions [J]. *Plant Disease*, 1996, 80(3): 329.
- [5] MAWASSI M, MIETKIEWSKA E, GOFMAN R, et al. Unusual Sequence Relationships between Two Isolates of *Citrus tristeza virus* [J]. *The Journal of General Virology*, 1996, 77 (9): 2359-2364.
- [6] ALBIACH-MARTÍ M R, MAWASSI M, GOWDA S, et al. Sequences of *Citrus tristeza virus* Separated in Time and Space are Essentially Identical [J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(15): 6856-6865.
- [7] HARPER S J, DAWSON T E, PEARSON M N. Isolates of *Citrus tristeza virus* that Overcome Poncirus Trifoliata Resistance Comprise a Novel Strain [J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(4): 471-480.
- [8] HARPER S J. *Citrus tristeza virus*: Evolution of Complex and Varied Genotypic Groups [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 93.
- [9] GARNSEY S M, CIVEROLO E L, GUMPF D J, et al. Biological Characterization of an International Collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) Isolates [J]. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 2005, 16(16): 75-93.
- [10] YANG Z N, MATHEWS D M, DODDS J A, et al. Molecular Characterization of an Isolate of *Citrus tristeza virus* that Causes Severe Symptoms in Sweet Orange [J]. *Virus Genes*, 1999, 19(2): 131-142.
- [11] ROISTACHER C N, MORENO P. The Worldwide Threat from Destructive Isolates of *Citrus tristeza virus* a Review [J]. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 1991, 11(11): 7-19.
- [12] DAWSON T E, MOONEY P A. Evidence for Trifoliolate Resistance Breaking Isolates of *Citrus tristeza virus* New Zealand [J]. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 2000, 14(14): 69-76.
- [13] HILF M E, MAVRODIEVA V A, GARNSEY S M. Genetic Marker Analysis of a Global Collection of Isolates of *Citrus tristeza virus*: Characterization and Distribution of CTV Genotypes and Association with Symptoms [J]. *Phytopathology*, 2005, 95(8): 909-917.
- [14] COOK G, VAN VUUREN S P, BREYTENBACH J H J, et al. Characterization of *Citrus tristeza virus* Single-Variant Sources in Grapefruit in Greenhouse and Field Trials [J]. *Plant Disease*, 2016, 100(11): 2251-2256.
- [15] YOKOMI R, SELVARAJ V, MAHESHWARI Y, et al. Molecular and Biological Characterization of a Novel Mild Strain of *Citrus tristeza virus* in California [J]. *Archives of Virology*, 2018, 163(7): 1795-1804.
- [16] ROY A, BRLANSKY R H. Genome Analysis of an Orange Stem Pitting *Citrus tristeza virus* Isolate Reveals a Novel Recombinant Genotype [J]. *Virus Research*, 2010, 151(2): 118-130.
- [17] READ D A, PIETERSEN G. PCR Bias Associated with Conserved Primer Binding Sites, Used to Determine Genotype Diversity within *Citrus tristeza virus* Populations [J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, 237: 107-113.
- [18] COOK G, VAN VUUREN S P, BREYTENBACH J H J, et al. Expanded Strain-Specific RT-PCR Assay for Differential Detection of Currently Known *Citrus tristeza virus* Strains; a Useful Screening Tool [J]. *Journal of Phytopathology*, 2016, 164(10): 847-851.
- [19] 赵学源, 蒋元晖, 张权炳, 等. 柑桔苗黄型衰退病毒的分布概况和六种酸橙类砧木对它的反应 [J]. *植物病理学报*, 1979, 9(1): 61-64.
- [20] 周常勇, 赵学源, 蒋元晖, 等. 柚矮化病调查和病原鉴定 [J]. *中国南方果树*, 1998, 27(3): 20-21.
- [21] 陶珍珍, 易龙, 卢占军, 等. 赣南脐橙主产区柑橘衰退病发病率调查研究 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(16): 297-300.
- [22] 夏宜林. 江西野生柑橘与栽培柑橘上衰退病毒种群进化特征分析 [D]. 赣州: 赣南师范大学, 2019.
- [23] 刘志芳. 赣南地区柑橘衰退病毒遗传多样性及基因型分析 [D]. 赣州: 赣南师范学院, 2015.
- [24] TATINENI S, DAWSON W O. Enhancement or Attenuation of Disease by Deletion of Genes from *Citrus tristeza virus* [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(15): 7850-7857.
- [25] ALBIACH-MARTÍ M R, ROBERTSON C, GOWDA S, et al. The Pathogenicity Determinant of *Citrus tristeza virus* Causing the Seedling Yellows Syndrome Maps at the 3'-Terminal Region of the Viral Genome [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(1): 55-67.
- [26] HARPER S, COWELL S J, DAWSON W. Changes in Host microRNA Expression during *Citrus tristeza virus* Induced Disease [J]. *Journal of Citrus Pathology*, 2019, 6(1): 15-24.
- [27] MARTÍN S, SAMBADE A, RUBIO L, et al. Contribution of Recombination and Selection to Molecular Evolution of *Citrus Tristeza virus* [J]. *The Journal of General Virology*, 2009, 90(6): 1527-1538.