

# 基于 *p23* 基因的野生柑橘和栽培柑橘上 衰退病毒分离株间的遗传特征分析

易 龙<sup>1,2</sup>, 周常勇<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>赣南师范大学生命与环境科学学院, 江西赣州 341000; <sup>2</sup>中国农业科学院/西南大学柑桔研究所, 重庆 400712)

**摘要:**【目的】比较分析野生柑橘与栽培柑橘上衰退病毒(CTV)分离株间的分子遗传特征,为深入解析CTV的遗传进化提供相关依据。【方法】运用RT-PCR对我国云南、广西、四川、湖南、江西等省(区)的11个野生柑橘上的CTV分离株和4个国内栽培甜橙及柚上的CTV强弱毒代表株分离株的*p23*基因进行扩增、测序,所获序列与GenBank收录的具有代表性的国外CTV分离株的相应基因序列进行比对分析。【结果】野生柑橘与国内外栽培柑橘上CTV分离株的*p23*基因序列相似率为87.7%~99.3%;密码子中碱基含量GC%<AT%,密码子转换数多于颠换数,第3位的碱基替换数最多,其次为第1位,最少是第2位;非同义突变与同义突变的比值( $d_n/d_s$ )小于1,表明*p23*基因在进化过程中承受着净化选择。系统聚类分析表明,来自于野生柑橘上的11个CTV分离株在构建的系统发育树中分属不同的簇支,与不同来源地具有较高相似性和较低遗传距离的栽培柑橘上的CTV分离株构成同一组群。【结论】野生柑橘与栽培柑橘上的CTV分离株在碱基含量、密码子转换和颠换率及非同义突变与同义突变比值( $d_n/d_s$ )等遗传特征方面均表现出一致性,系统发育分析表明,野生柑橘上CTV分离株基于*p23*基因序列的聚类关系与其地理来源之间无明显相关性。

**关键词:** 野生柑橘;栽培柑橘;柑橘衰退病毒;*p23*基因;遗传特征

中图分类号: S666

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)07-0828-07

## Genetic characterization between the *Citrus tristeza virus* isolates in wild and cultivated citrus on the basis of *p23* gene sequences

YI Long<sup>1,2</sup>, ZHOU Changyong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life and Environmental Sciences, Gannan Normal University, Ganzhou 341000, Jiangxi, China; <sup>2</sup>Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Southwest University, Chongqing 400712, China)

**Abstract:** 【Objective】This study focused on comparative analysis of the genetic evolution characteristics of the *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates between wild citrus and cultivated citrus, which provided the theoretical basis for further study on the genetic evolution of CTV. 【Methods】A total of 11 CTV isolates in this study were collected from naturally wild citrus in Yunnan (isolates CT-W1, CT-W2, CT-W3, CT-W4, CT-W5), Sichuan (isolates CT-W6, CT-W7), Hunan (isolates CT-W8, CT-W9), Jiangxi (isolate CT-W10), Guangxi (isolate CT-W11) provinces of China. The severe isolate CT3 and the mild isolate CT9 from cultivated pummelos, together with the severe isolate CT4 and the mild isolate CT21 from cultivated sweet oranges were kindly provided by the Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences as being representative of CTV isolates from cultivated citrus in China. The nucleic acids of the samples with 11 CTV isolates from wild citrus and 4 CTV isolates from cultivated citrus in China were each extracted. The primer pairs of p23f and p23r were used as a specific primer for amplifying the *p23* gene, the sense primer was p23f: 5'-ATGGATAATACTAGCGGACA-3', and the anti-sense primer was p23r: 5'-TCAGATGAAGTGGTGTTCAC-3'. The cDNA of CTV was amplified and performed in a 25  $\mu$ L

收稿日期: 2017-02-15 接受日期: 2017-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(30900977);江西省自然科学基金(20142BAB204010);江西省高等学校科技落地项目(KJLD13079);江西省重点研发项目(20161BBF60070)

作者简介: 易龙,男,教授,博士,主要从事果树病毒病害防控研究。Tel: 0797-8397768, E-mail: yilongswu@163.com

reaction volume. PCR products were separated by electrophoresis in a 1.2% agarose gel and detected by ethidium bromide staining, and the amplified products of approximately 630 bp for the complete  $p23$  gene were gel purified and the nucleotide sequences were determined in both directions by means of an ABI Prism DNA sequencer 377 (Sangon Biological Engineering & Technology and Service, Shanghai, China). Other CTV nucleotide sequences used in this study were obtained from the indicated GenBank entries: American isolates T36, T30 and SY568, Israel isolate VT, Spain isolates T385 and T318A, Japanese isolate NuagA, Egypt isolate Qaha, Mexico isolate Mexic-ctv. Multiple alignments of the nucleotide sequences were realized using the BioEdit program. The version 6.0 of the MEGA program was used to estimate the base content, the transition and transversion, and their ratio (Ts/Tv), the rates of non-synonymous( $d_n$ ) and synonymous( $d_s$ ) substitutions and their ratios were determined by the Nei & Gojobori methods, the statistic for differentiation using the Z-test ( $P < 0.05$ ). Based on the neighbor-joining method, phylogenetic relationships were inferred taking the homologous sequences of *Beet yellow virus* (BYV) as the outgroup, and the reliability of the clusters was evaluated by using the bootstrap analysis base on 1 000 repetitions.【Results】The sequences of  $p23$  genes of the 11 wild CTV isolates were found having a similarity ranging from 88.1 to 99.8%, the identity of the sequence ranged from 87.7 to 97.9% and 88.0 to 99.3% when compared with 4 Chinese CTV isolates of cultivated citrus and 9 exotic cultivated citrus, respectively. In this investigation, the GC base contents of the  $p23$  gene were less than the AT base contents, the base A content was the highest and the base C was the lowest among the four bases in the  $p23$  genes in the 11 CTV isolates from wild type citrus, which was the same as that from cultivated citrus. More transitions were found in the  $p23$  genes than transversions with the transitions/transversions ratio ranging from 3.4 to 5.3 among the species; the substitution frequency was the highest at the third codon, followed by the first and the second codon. The significant difference was found among the rates of non-synonymous mutations( $d_n$ ) and of synonymous mutations( $d_s$ ) in the  $p23$  genes ( $P = 0.000 < 0.05$ ). The ratio of non-synonymous ( $d_n$ ) to synonymous( $d_s$ ) substitutions is far lower than 1, suggesting that the  $p23$  gene might have experienced a purifying selection in the CTV evolution process. Phylogenetic analysis revealed that the 11 CTV isolates from wild citrus belonged to different phylogenetic clusters regardless of their geographic origins, and shared higher homology and lower genetic distance with other CTV isolates of cultivated citrus from different geographic origins, for example, isolates CT-W1, CT-W2, CT-W3, CT-W4, CT-W5 were from Yunnan province in China, but dropped into different clusters, the same as the isolates CT-W6, CT-W7 from Sichuan province and the isolates CT-W8, CT-W9 from Hunan province.【Conclusion】Comparative analysis found that the genetic characteristics of the base content, transition and transversion, non-synonymous and synonymous substitutions of CTV isolates from wild citrus were similar to those of CTV isolates from cultivated citrus. Phylogenetic analysis showed that there was no significant correlation between the geographical origins of *Citrus tristeza virus* isolates from wild citrus and its clustering relationship of  $p23$  gene sequences.

**Key words:** Wild citrus; Cultivated citrus; *Citrus tristeza virus*;  $p23$  gene; Genetic characterization

柑橘衰退病是由柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)引起的一种严重危害柑橘产业的病毒病害,广泛分布于世界各柑橘产区,主要通过接穗和蚜虫进行传播,对全世界的柑橘产业造成严重威胁<sup>[1-2]</sup>。据研究CTV不仅在栽培柑橘上发生普遍<sup>[3-5]</sup>,随着研究领域的扩展,近年发现在与外界相对隔绝

的野生生境中生存的野生柑橘也携带CTV,并且其上的CTV分离株主要以CP/Hinf I RFLP单一菌群构成<sup>[6]</sup>。

CTV属于长线形病毒属(*Closterovirus*),为正义单链RNA病毒,其基因组大小约20 kb,具有12个开放阅读框(ORF),可以编码17种以上蛋白质<sup>[7]</sup>,其中

*p23* 基因处于 CTV 基因组的 3' 端,在保持病毒的致病性、寄主范围等方面具有重要功能。前人对其进行了大量的研究,发现 *p23* 是 RNA 沉默抑制和致病性决定因子,诱导寄主产生衰退病症状,增强对寄主的系统感染,对保持病毒的致病性及遗传特性等功能发挥着重要作用<sup>[8-9]</sup>;而且 *p23* 是 CTV 侵染寄主植物必不可少的基因,一旦敲除掉后即失去侵染能力<sup>[10]</sup>;同时 *p23* 蛋白控制着 CTV 非对称性的 RNA 积累<sup>[11]</sup>;另外从进化的角度分析发现 *p23* 基因可能是 CTV 与柑橘寄主相互作用共同进化的产物,在长线形病毒属中为 CTV 所特有<sup>[12-13]</sup>。因此分析 CTV 的 *p23* 基因对于解析柑橘衰退病毒种群间的遗传进化特征具有重要意义。

笔者通过对收集自我国野生柑橘和国内外栽培柑橘上 CTV 分离株的 *p23* 基因进行分子遗传特征及系统发育比对分析,明确野生柑橘和栽培柑橘上 CTV 分离株间的遗传特征及聚类关系,为解析 CTV 的遗传进化和生产中制定柑橘衰退病综合防控策略提供相关依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 CTV 分离株

从云南、四川、广西、湖南、江西等野生柑橘主要分布地区采集到的野生柑橘上的 11 个 CTV 分离株<sup>[6]</sup>,以及由中国农业科学院柑桔研究所国家柑桔苗木脱毒中心提供的我国栽培品种上的 CTV 分离株:甜橙上的强毒分离株 CT4、弱毒分离株 CT21,柚上

的强毒分离株 CT3、弱毒分离株 CT9。

### 1.2 总核酸提取及 *p23* 基因扩增

参照周常勇等<sup>[14]</sup>的方法提取总核酸,*p23* 基因特异性引物<sup>[15]</sup>由上海生工公司合成。在 T<sub>GRADIENT</sub> 型 PCR 仪 (Biometra) 上进行 RT-PCR 逆转录和扩增,PCR 产物用 1.2% ( $\omega$ ) 琼脂糖凝胶进行电泳,在溴乙锭染色后,置于 Gel Doc™EQ 型凝胶成像系统 (Bio-Rad) 中观测、拍照。

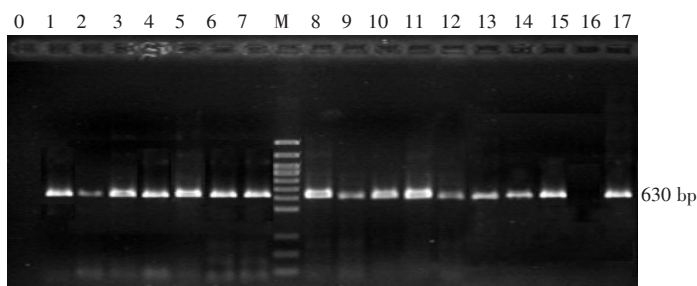
### 1.3 序列测定及遗传特征分析

将扩增产物纯化并交由上海生工公司进行序列测定,测序结果与 GenBank 中 9 个国外具有代表性的 CTV 分离株 *p23* 基因序列用 BioEdit 软件进行比对,MEGA6.0 软件计算碱基组成、转换与颠换比率 ( $T_s/T_v$ )、以 Nei & Gojobori 法计算序列中的同义 ( $d_s$ ) 和非同义 ( $d_n$ ) 突变率,用 Z-检验法进行显著性检验 ( $P < 0.05$ ),以 Kimura 双参数模型计算序列间的遗传距离,以同属的甜菜黄化病毒 (*Beet yellows virus*, BYV) 相应基因序列作为外群,自展检验重复 1 000 次的邻近法 (neighbor-joining, NJ) 构建 *p23* 基因的系统发育树<sup>[16]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 *p23* 基因扩增

野生柑橘上 11 个 CTV 分离株、国内栽培品种上 4 个 CTV 分离株和阳性对照经 RT-PCR 扩增,均能扩增出一个大小约 630 bp 的 DNA 片段 (图 1),与已知 CTV 的 *p23* 基因大小一致。阴性对照和水对照均



0. 水对照;1~11. CT-W1~11;12. CT4;13. CT21;14. CT3;15. CT9;16. 阴性对照;17. 阳性对照;M. 100 bp 梯度 DNA marker (无 400, 1 100, 1 300 bp)。  
Lane 0. Water control; Lanes 1-11. CT-W1 - 11; Lane 12. CT4; Lane 13. CT21; Lane 14. CT3; Lane 15. CT9; Lane 16. Negative control; Lane 17. Positive control; M. DNA marker with 100 bp ladder (without 400, 1 100, 1 300 bp).

图 1 15 个 CTV 分离株 *p23* 基因 RT-PCR 扩增

Fig. 1 RT-PCR detection of *p23* gene of 15 CTV isolates

不能检测到该扩增产物。

### 2.2 *p23* 基因遗传进化分析

测序结果与 GenBank 数据库收录的具有代表性

的 9 个国外 CTV 分离株 (包括美国茎陷点型强毒株 SY568、速衰型强毒株 T36、弱毒株 T30、西班牙茎陷点型强毒株 T318A 和弱毒株 T385、以色列茎陷点型

强毒株 VT、埃及的强毒株 Qaha、墨西哥茎陷点型和速衰型强毒株 Mexico-ctv、日本苗黄型强毒株 Nua-gA)的 p23 基因序列进行比对分析,发现 11 个野生柑橘上 CTV 分离株 p23 基因序列的相似率为 88.1%~99.8%,与国内栽培品种上 4 个 CTV 分离株和国外 9 个 CTV 分离株序列相似率分别为 87.7%~97.9%、88.0%~99.3%。

2.2.1 碱基组成 从表 1 可见 11 个野生柑橘上 CTV 分离株 p23 基因序列中碱基 A 含量最高,为 30.2%,最低为 C(19.4%),GC%<AT%;栽培柑橘的 4 个国内 CTV 分离株和 9 个国外 CTV 分离株也发现同样的结果,碱基 A 含量最高,碱基 C 含量最低,GC 含量均低于 AT 含量;4 种碱基在密码子第 1、2、3 位含量不同,以 T 或 G 结尾的密码子使用频率较高。

表 1 3 个 CTV 种群中 p23 基因碱基组成百分含量

Table 1 Percentages of the base composition in the p23 gene of 3 CTV species

| 种群<br>Species | 密码子位点 Location of codon |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|               | T                       | C    | A    | G    | T1   | C1   | A1   | G1   | T2   | C2   | A2   | G2   | T3   | C3   | A3   | G3   |
| I             | 24.7                    | 19.4 | 30.2 | 25.6 | 17.4 | 14.5 | 33.7 | 34.4 | 26.2 | 23.4 | 34.1 | 16.3 | 30.7 | 20.4 | 22.8 | 26.2 |
| II            | 24.9                    | 19.5 | 29.8 | 25.8 | 17.5 | 14.5 | 33.2 | 34.8 | 26.4 | 23.6 | 34.2 | 15.8 | 30.9 | 20.4 | 22.1 | 26.7 |
| III           | 24.9                    | 19.3 | 30.0 | 25.9 | 17.4 | 14.4 | 34.0 | 34.2 | 26.2 | 23.2 | 34.3 | 16.3 | 31.0 | 20.2 | 21.8 | 27.1 |

I. 野生柑橘上 11 个 CTV 分离株; II. 国内栽培品种上 4 个 CTV 分离株; III. 国外栽培品种上 9 个 CTV 分离株; T1、C1、A1、G1. 密码子第 1 位碱基; T2、C2、A2、G2. 密码子第 2 位碱基; T3、C3、A3、G3. 密码子第 3 位碱基。下同。

I. 11 CTV isolates from wild citrus; II. 4 CTV isolates from Chinese cultivated citrus; III. 9 CTV isolates from foreign cultivated citrus; T1, C1, A1, G1. Codon first base; T2, C2, A2, G2. Codon second base; T3, C3, A3, G3. Codon third base. The same below.

2.2.2 转换和颠换 从分析的 24 个 CTV 分离株密码子第 1、2、3 位的碱基替换情况看,具有编码序列的共同特点,密码子第 3 位的碱基替换数最多,其次为第 1 位,最少是第 2 位。转换数多于颠换数,其中野生柑橘上 CTV 分离株的转换与颠换比值为 5.0,国内栽培品种上 4 个 CTV 分离株的转换与颠换比值为 5.3,国外 9 个 CTV 分离株的转换与颠换比值为 3.4 (表 2)。

表 2 3 个 CTV 种群 p23 基因的转换和颠换、同义突变和非同义突变率

Table 2 Transition and tranversion, non-synonymous and synonymous substitutions in the p23 gene of 3 CTV species

| 种群<br>Species | 密码子位点<br>Location of codon | Ts |    | Tv          |             | $d_n$ | $d_s$ | P |
|---------------|----------------------------|----|----|-------------|-------------|-------|-------|---|
|               |                            | Ts | Tv | $d_n$       | $d_s$       |       |       |   |
| I             |                            | 35 | 7  | 0.040±0.007 | 0.174±0.021 | 0.000 |       |   |
|               | P1                         | 6  | 1  |             |             |       |       |   |
|               | P2                         | 5  | 2  |             |             |       |       |   |
| II            |                            | 42 | 8  | 0.051±0.010 | 0.190±0.026 | 0.000 |       |   |
|               | P1                         | 8  | 1  |             |             |       |       |   |
|               | P2                         | 7  | 3  |             |             |       |       |   |
| III           |                            | 34 | 10 | 0.041±0.007 | 0.179±0.021 | 0.000 |       |   |
|               | P1                         | 7  | 2  |             |             |       |       |   |
|               | P2                         | 3  | 3  |             |             |       |       |   |

Ts. 转换; Tv. 颠换;  $d_n$ . 非同义突变;  $d_s$ . 同义突变; P1、P2、P3. 第 1、2、3 位密码子。

Ts. Transition; Tv. Transversion;  $d_n$ . Non-synonymous substitutions;  $d_s$ . Synonymous substitutions; P1, P2, P3. The first, second and third codon.

2.2.3 同义突变与非同义突变 野生柑橘 11 个 CTV 分离株,国内栽培品种 4 个 CTV 分离株、国外栽培品种上 9 个 CTV 分离株的非同义突变远低于同义突变,其  $d_n/d_s$  值分别为 0.230、0.268、0.229, 3 个 CTV 种群非同义突变均显著低于同义突变 ( $P = 0.000 < 0.05$ ),表明同义突变和非同义突变之间存在明显的差异(表 2)。

2.3 p23 基因系统发育树构建

使用 MEGA 6.0 以甜菜黄化病毒(BYV)的相应基因序列为外群构建的 p23 基因序列的邻近树见图 2。在系统发育树的拓扑结构中,野生柑橘上的 11 个 CTV 分离株分聚在不同的分支上,分离株 CT-

2.2.4 遗传距离 野生柑橘 11 个 CTV 分离株间 p23 基因遗传距离为 0.002~0.133,与国内和国外栽培柑橘 CTV 分离株间的遗传距离分别为 0.017~0.137 和 0.007~0.133;序列两两间遗传距离最小的是美国的速衰分离株 T36、埃及的强毒分离株 Qaha 和墨西哥的强毒分离株 Mexico-ctv(遗传距离为 0.000),遗传距离最远的是来自于四川野生宜昌橙上的 CTV 分离株 CT-W6 和我国栽培柚上的 CTV 强毒分离株 CT3(遗传距离为 0.137)(表 3)。

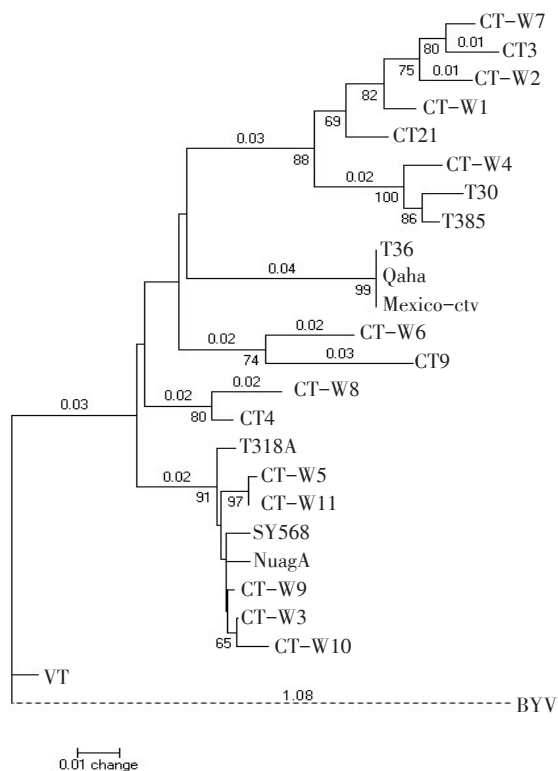


表3 24个CTV分离株 *p23* 基因序列的遗传距离(对角线以下)及其标准误差(对角线以上)

Table 3 Genetic distances (below the diagonal) and their standard errors (above the diagonal) of the *p23* gene among 24 CTV isolates

|    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    | 22    | 23    | 24    |       |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1  |       | 0.006 | 0.014 | 0.010 | 0.014 | 0.016 | 0.008 | 0.015 | 0.013 | 0.014 | 0.014 | 0.008 | 0.015 | 0.014 | 0.008 | 0.015 | 0.011 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.011 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.014 |
| 2  | 0.021 |       | 0.015 | 0.011 | 0.015 | 0.017 | 0.007 | 0.016 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.007 | 0.016 | 0.015 | 0.009 | 0.016 | 0.013 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.012 | 0.017 | 0.016 | 0.016 | 0.015 |
| 3  | 0.094 | 0.108 |       | 0.015 | 0.004 | 0.013 | 0.015 | 0.011 | 0.003 | 0.003 | 0.004 | 0.016 | 0.015 | 0.010 | 0.013 | 0.013 | 0.016 | 0.004 | 0.003 | 0.015 | 0.010 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.004 |
| 4  | 0.055 | 0.069 | 0.110 |       | 0.015 | 0.014 | 0.011 | 0.014 | 0.015 | 0.016 | 0.015 | 0.011 | 0.015 | 0.013 | 0.010 | 0.013 | 0.006 | 0.015 | 0.015 | 0.006 | 0.015 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.015 |
| 5  | 0.100 | 0.114 | 0.010 | 0.110 |       | 0.014 | 0.016 | 0.012 | 0.005 | 0.006 | 0.002 | 0.016 | 0.015 | 0.010 | 0.014 | 0.014 | 0.016 | 0.006 | 0.005 | 0.015 | 0.011 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.005 |
| 6  | 0.118 | 0.133 | 0.090 | 0.099 | 0.094 |       | 0.017 | 0.011 | 0.013 | 0.014 | 0.014 | 0.017 | 0.011 | 0.011 | 0.015 | 0.014 | 0.015 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.014 |
| 7  | 0.033 | 0.030 | 0.114 | 0.061 | 0.120 | 0.131 |       | 0.016 | 0.015 | 0.016 | 0.016 | 0.005 | 0.016 | 0.015 | 0.006 | 0.016 | 0.011 | 0.015 | 0.016 | 0.011 | 0.017 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.015 |
| 8  | 0.110 | 0.127 | 0.069 | 0.102 | 0.073 | 0.065 | 0.122 |       | 0.011 | 0.012 | 0.012 | 0.017 | 0.014 | 0.007 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.012 | 0.012 | 0.014 | 0.013 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.012 |
| 9  | 0.092 | 0.106 | 0.005 | 0.108 | 0.012 | 0.088 | 0.112 | 0.067 |       | 0.005 | 0.004 | 0.015 | 0.015 | 0.009 | 0.013 | 0.013 | 0.015 | 0.005 | 0.004 | 0.014 | 0.010 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.004 |
| 10 | 0.102 | 0.116 | 0.007 | 0.118 | 0.017 | 0.094 | 0.122 | 0.077 | 0.012 |       | 0.005 | 0.016 | 0.015 | 0.010 | 0.014 | 0.014 | 0.016 | 0.006 | 0.005 | 0.015 | 0.010 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.005 |
| 11 | 0.098 | 0.112 | 0.009 | 0.112 | 0.002 | 0.092 | 0.118 | 0.071 | 0.010 | 0.016 |       | 0.016 | 0.015 | 0.010 | 0.014 | 0.014 | 0.016 | 0.005 | 0.005 | 0.015 | 0.010 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.005 |
| 12 | 0.033 | 0.028 | 0.118 | 0.063 | 0.120 | 0.137 | 0.017 | 0.131 | 0.116 | 0.127 | 0.118 |       | 0.016 | 0.016 | 0.008 | 0.016 | 0.012 | 0.016 | 0.016 | 0.011 | 0.017 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 |
| 13 | 0.116 | 0.128 | 0.106 | 0.106 | 0.111 | 0.061 | 0.118 | 0.099 | 0.104 | 0.111 | 0.109 | 0.122 |       | 0.013 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.014 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.015 |
| 14 | 0.094 | 0.116 | 0.050 | 0.086 | 0.057 | 0.063 | 0.114 | 0.024 | 0.048 | 0.057 | 0.055 | 0.118 | 0.082 |       | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.010 | 0.010 | 0.013 | 0.011 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.010 |
| 15 | 0.035 | 0.046 | 0.090 | 0.055 | 0.098 | 0.110 | 0.021 | 0.098 | 0.088 | 0.098 | 0.096 | 0.039 | 0.104 | 0.090 |       | 0.014 | 0.010 | 0.013 | 0.014 | 0.011 | 0.015 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.013 |
| 16 | 0.109 | 0.127 | 0.090 | 0.093 | 0.096 | 0.103 | 0.121 | 0.094 | 0.086 | 0.098 | 0.094 | 0.128 | 0.106 | 0.082 | 0.101 |       | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.015 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.013 |
| 17 | 0.065 | 0.080 | 0.116 | 0.023 | 0.116 | 0.110 | 0.065 | 0.104 | 0.114 | 0.125 | 0.119 | 0.071 | 0.108 | 0.092 | 0.057 | 0.101 |       | 0.016 | 0.016 | 0.005 | 0.016 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.016 |
| 18 | 0.098 | 0.112 | 0.010 | 0.112 | 0.017 | 0.092 | 0.114 | 0.074 | 0.012 | 0.017 | 0.016 | 0.122 | 0.108 | 0.055 | 0.090 | 0.095 | 0.118 |       | 0.005 | 0.015 | 0.010 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.005 |
| 19 | 0.098 | 0.112 | 0.007 | 0.114 | 0.014 | 0.092 | 0.118 | 0.071 | 0.009 | 0.014 | 0.012 | 0.122 | 0.111 | 0.054 | 0.094 | 0.094 | 0.121 | 0.014 |       | 0.015 | 0.010 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.005 |
| 20 | 0.059 | 0.074 | 0.106 | 0.017 | 0.106 | 0.100 | 0.067 | 0.102 | 0.104 | 0.114 | 0.108 | 0.065 | 0.102 | 0.086 | 0.059 | 0.097 | 0.012 | 0.108 | 0.110 |       | 0.015 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.015 |
| 21 | 0.114 | 0.133 | 0.052 | 0.116 | 0.059 | 0.096 | 0.131 | 0.082 | 0.050 | 0.055 | 0.057 | 0.135 | 0.112 | 0.059 | 0.106 | 0.107 | 0.118 | 0.054 | 0.055 | 0.112 |       | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.010 |
| 22 | 0.109 | 0.127 | 0.090 | 0.093 | 0.096 | 0.103 | 0.121 | 0.094 | 0.086 | 0.098 | 0.094 | 0.128 | 0.106 | 0.082 | 0.101 | 0.000 | 0.101 | 0.095 | 0.094 | 0.097 | 0.107 |       | 0.000 | 0.013 | 0.013 |
| 23 | 0.109 | 0.127 | 0.090 | 0.093 | 0.096 | 0.103 | 0.121 | 0.094 | 0.086 | 0.098 | 0.094 | 0.128 | 0.106 | 0.082 | 0.101 | 0.000 | 0.101 | 0.095 | 0.094 | 0.097 | 0.107 | 0.000 |       | 0.013 | 0.013 |
| 24 | 0.096 | 0.110 | 0.009 | 0.112 | 0.016 | 0.092 | 0.116 | 0.071 | 0.010 | 0.016 | 0.014 | 0.120 | 0.109 | 0.055 | 0.092 | 0.092 | 0.119 | 0.016 | 0.012 | 0.108 | 0.057 | 0.092 | 0.092 |       | 0.092 |

1. CT-W1; 2. CT-W2; 3. CT-W3; 4. CT-W4; 5. CT-W5; 6. CT-W6; 7. CT-W7; 8. CT-W8; 9. CT-W9; 10. CT-W10; 11. CT-W11; 12. CT3; 13. CT9; 14. CT4; 15. CT21; 16. T36; 17. T30; 18. SY568; 19. NuagA; 20. T385; 21. VT; 22. Qaha; 23. Mexico-ctv; 24. T318A.



分支上的数值代表平均距离大于 0.01, 分支下的数值代表大于 50% 的自展支持率。

Number above branches indicate the mean distance above 0.01, numbers below branches indicate bootstrap values above 50%.

图 2 24 个 CTV 分离株 *p23* 基因序列构建的系统发育树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of *p23* gene sequences of the 24 CTV isolates

W1、CT-W2、CT-W4、CT-W7 与 CT3、CT21、T30 和 T385 聚类为第一组群, T36、Qaha 和 Mexico-ctv 聚类为第二组群, CT-W6 与 CT9 聚类为第三组群, CT-W8 与 CT4 聚类为第四组群, CT-W3、CT-W5、CT-W9、CT-W10、CT-W11 与 T318A、SY568、NuagA 聚类为第五组群, 来自于以色列茎陷点型强毒株 VT 单处为第六组群, 位于所有组群的最外群, 所有组群均受 74% 以上的自展值支持。

### 3 讨论

通过对株系序列间的碱基含量、核苷酸替代(转换和颠换)、同义替换( $d_s$ )和非同义替换( $d_n$ )以及株系间的遗传距离等遗传特征进行分析, 以便进一步解析物种的生物进化特点。很多研究发现一段序列的 GC 含量在一定程度上会影响该区域的突变率<sup>[17]</sup>; 转换与颠换比值高, 序列变异程度大, 反之亦然; 而估计  $d_s$  和  $d_n$  之间的差异是理解分子进化的重要手

段<sup>[18]</sup>,  $d_n/d_s$  值显著大于 1, 是正选择的有力证据; 等于 1, 基因处于中性进化; 显著小于 1, 是净化选择的结果<sup>[17,19]</sup>。24 个 *p23* 基因序列中碱基含量 GC% < AT%, GC% 含量较低, 说明序列的突变率较低, 同基因片段中转换与颠换比值在 3.4 以上, 非同义突变( $d_n$ )均显著低于同义突变( $d_s$ ),  $d_n/d_s$  比值远小于 1, 说明 *p23* 基因在 CTV 的进化过程中受净化选择。对于一个编码蛋白质的基因而言, 功能越重要的区域, 其  $d_n$  值越低, 非同义突变越容易被自然选择清除。*p23* 基因是 CTV 的致病性决定因子<sup>[9]</sup>, 净化选择是影响 CTV *p23* 基因进化的一个重要因素, 对于保持其侵染性具有重要意义。

在 *p23* 基因序列构建的系统发育树上 24 个 CTV 分离株聚类为 6 个组群, 来自我国的野生柑橘上的 CTV 分离株分属不同的组群, 还发现来自同一地区, 如云南野生柑橘上的 5 个 CTV 分离株 CT-W1、CT-W2、CT-W3、CT-W4、CT-W5, 以及四川野生柑橘上的 CT-W6、CT-W7 分离株, 湖南野生柑橘上的 CT-W8、CT-W9 分离株, 均未聚类在系统发育树的同一分支上, 与前期对野生柑橘上 CTV 分离株的外壳蛋白基因的研究结果<sup>[6]</sup>相一致, 表明野生柑橘上 CTV 分离株间的亲缘关系与样品采集地之间无直接联系。来自美国的分离株 T36、T30 和 SY568, 西班牙的分离株 T385 和 T318A 都未因来自同一地区而聚在同一分支上, 表现出相同的结果。本研究野生柑橘上 11 个 CTV 分离株在 *p23* 基因构建的系统发育树中分别与不同地区的 CTV 分离株聚在同一分支, 分析结果表明野生柑橘上 CTV 分离株基于 *p23* 基因序列的聚类关系与其地理来源之间无明显相关性, 与 Martin 等<sup>[20]</sup>对栽培柑橘上 CTV 分离株的研究结果一致, 进一步表明不同地理来源 CTV 分离株间可能存在基因流和基因重组现象, 因此柑橘生产中衰退病的防控难度大, 需进一步加强 CTV 分离株变异和扩散传播监测来保障柑橘产业的健康持续发展。

### 4 结论

野生柑橘的 CTV 分离株与栽培柑橘的 CTV 分离株的遗传特征分析结果相一致, 均表明 *p23* 是 CTV 一个重要的功能基因, 净化选择是影响 CTV *p23* 基因进化的一个重要因素; 系统发育分析结果表明野生柑橘上 CTV 分离株基于 *p23* 基因序列的聚类关系与其地理来源之间无明显相关性。

## 参考文献 References :

- [1] BAR-JOSEPH M, MARCUS R, LEE R F. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control[J]. Annual Review Phytopathology, 1989, 27(1): 291-316.
- [2] WANG J, BOZAN O, KWON S J, DANG T, RUCKER T, YOKOMI R Y, LEE R F, FOLIMONOVA S Y, KRUEGER R R, BASH J, GREER G, DIAZ J, SERNA R, VIDALAKIS G. Past and future of a century old *Citrus tristeza virus* collection: a California citrus germplasm tale[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4(4): 366.
- [3] DAWSON W O, GARNSEY S M, TATINENI S, FOLIMONOVA S Y, HARPER S J, GOWDA S. *Citrus tristeza virus*-host interactions [J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4(4): 88.
- [4] XU X F, ZHOU C Y, SONG Z, YANG F Y. Preliminary studies on CPG/Hinf I RFLP groups of *Citrus tristeza virus* infected sweet oranges in China[J]. Agricultural Sciences in China, 2006, 5(1): 39-44.
- [5] 唐萌, 金鑫, 周彦. 柑橘衰退病毒弱毒株筛选方法研究进展[J]. 果树学报, 2015, 32(4): 707-711.  
TANG Meng, JIN Xin, ZHOU Yan. Progress in study of screening mild strains of *Citrus tristeza virus*[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(4): 707-711.
- [6] 易龙, 周常勇, 周彦, 王志刚, 唐科志. 中国野生柑橘上衰退病毒分离株分子特征分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(5): 932-939.  
YI Long, ZHOU Changyong, ZHOU Yan, WANG Zhigang, TANG Kezhi. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates in Chinese wild type citrus[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(5): 932-939.
- [7] KARASEV A V, BOYKO V P, GOWDA S, NIKOLAEVA O V, HILF M E, KOONIN E V, NIBLETT C L, CLINE K, BUMPF D J, LEE R F, GANSEY S M, LEWANDOWSKI D J, DAWSON W O. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome[J]. Virology, 1995, 208(2): 511-520.
- [8] FAGOAGA C, PENSABENE-BELLAVIA G, MORENO P, NAVARRO L, FLORES R, PENA L. Ectopic expression of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* differentially modifies viral accumulation and tropism in two transgenic woody hosts [J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(9): 898-910.
- [9] RUIZ-RUIZ S, SOLER N, SANCHEZ-NAVARRO J, FAGOAGA C, LOPEZ C, NAVARRO L, MORENO P, PENA L, FLORES R. *Citrus tristeza virus* p23: determinants for nucleolar localization and their influence on suppression of RNA silencing and pathogenesis [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2013, 26(3): 306-318.
- [10] TATINENI S, ROBERTSON C J, GARNSEY S M, BAR-JOSEPH M, GOWDA S, DAWSON W O. Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees [J]. Virology, 2008, 376(2): 297-307.
- [11] SATYANARAYANA T, GOWDA S, AYLLON M A, ALBIACH-MARTI M R, RABINDRAN S, DAWSON W O. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation [J]. Journal of Virology, 2002, 76(2): 473-483.
- [12] FLORES R, RUIZ-RUIZ S, SOLER N, SANCHEZ-NAVARRO J, FAGOAGA C, LOPEZ C, NAVARRO L, MORENO P, PENA L. *Citrus tristeza virus* p23: a unique protein mediating key virus-host interactions[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4(1): 98.
- [13] SOLER N, FAGOAGA C, LOPEZ C, MORENO P, NAVARRO L, FLORES R, PENA L. Symptoms induced by transgenic expression of p23 from *Citrus tristeza virus* in phloem-associated cells of Mexican lime mimic virus infection without the aberrations accompanying constitutive expression [J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(4): 388-399.
- [14] 周常勇, HAILSTONES D, CONNOR R, BARKLEY P, BOWYER J. 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(增刊): 200.  
ZHOU Changyong, HAILSTONES D, CONNOR R, BARKLEY P, BOWYER J. A method for micro and rapid extraction of *Citrus tristeza virus* (CTV) nucleic acid applied to RT-PCR amplification[J]. Journal of Fujian Agricultural University, 2001, 30(Suppl.): 200.
- [15] 周彦, 周常勇, 赵学源, 蒋元晖, 王雪峰. 6 种柑桔类植物对柑桔衰退病毒分离株 TR-L514 变异的影响[J]. 植物病理学报, 2007, 37(2): 131-137.  
ZHOU Yan, ZHOU Changyong, ZHAO Xueyuan, JIANG Yuanhui, WANG Xuefeng. Influence of six citrus cultivars on the composition of *Citrus tristeza virus* isolates TR-L514 [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 37(2): 131-137.
- [16] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [17] ARENAS M. Trends in substitution models of molecular evolution [J]. Frontiers in Genetics, 2015, 6: 319.
- [18] HARDISON R C, ROSKIN K M, YANG S, DIEKHANS M, KENT W J, WEBER R, ELNITSKI L, LI J, O'CONNOR M, KOLBE D, SCHWARTZ S, FUREY T S, WHELAN S, GOLDMAN N, SMIT A, MILLER W, CHIAROMONTE F, HANNSSLER D. Covariation in frequencies of substitution, deletion, transposition, and recombination during eutherian evolution[J]. Genome Research, 2003, 13(1): 13-26.
- [19] HANADA K, GOJOBORI T, LI W H. Radical amino acid change versus positive selection in the evolution of viral envelope proteins [J]. Gene, 2006, 385(6): 83-88.
- [20] MARTIN S, SAMBADE A, RUBIO L, VIVES MC, MOYA P, GUERRI J, ELENA S F, MORENO P. Contribution of recombination and selection to molecular evolution of *Citrus tristeza virus*[J]. Journal of General Virology, 2009, 90(6): 1527-1538.