

浙江柑橘产区柑橘黄脉病毒的发生、分布与分子特性研究

张艳慧¹, 刘莹洁¹, 王 琴¹, 李雪燕², 胡文召³, 戴祥生⁴, 周 彦^{1,*}

(¹西南大学柑桔研究所, 重庆 400712; ²重庆市农业信息中心, 重庆 400015; ³重庆市植物保护植物检疫站, 重庆 401147; ⁴井冈山农业科技园管委会, 江西井冈山 343600)

摘 要: 运用 RT-PCR 技术对采自浙江 12 个柑橘产地的 181 份柑橘样品进行检测, 首次从浙江的‘佛手’柑 (*Citrus bergamia*) 和‘红美人’橘 (*C. reticulata*) 上检测出柑橘黄脉病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV), 其检出率分别为 68.0% 和 47.2%。选取 4 个 CYVCV 毒株与 11 个已知 CYVCV 毒株进行全序列分析, 结果显示 CYVCV 序列保守性较高, 所有 15 个 CYVCV 毒株的核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 96.9%~99.8% 和 97.9%~99.4%。虽然采自浙江的 4 个 CYVCV 毒株在进化树中聚成单独的簇, 但 CYVCV 毒株间的亲缘关系可能不与其采样地的存在相关性。

关键词: 柑橘; 柑橘黄脉病毒; 检测; 序列分析; 进化树

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 10-1978-07

Distribution and Molecular Characterization of *Citrus yellow vein clearing virus* in Zhejiang Province

ZHANG Yanhui¹, LIU Yingjie¹, WANG Qin¹, LI Xueyan², HU Wenzhao³, DAI Xiangsheng⁴, and ZHOU Yan^{1,*}

(¹Citrus Research Institute of Southwest University, Chongqing 400712, China; ²Chongqing Agricultural Information Center, Chongqing 400015, China; ³Chongqing Plant Protection Plant Quarantine Station, Chongqing 401147, China; ⁴Jinggangshan Agricultural Science and Technology Park Management Committee, Jinggangshan, Jiangxi 343600, China)

Abstract: In this study, 181 citrus samples collected from 12 districts and counties in Zhejiang Province were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV) was first detected in Bergamot (*Citrus bergamia*) and Ehime Kashi 38 (*C. reticulata*) from Zhejiang Province with an incidence of 68.0% and 47.2%, respectively. The complete genome sequences of 4 CYVCV isolates from Zhejiang Province were sequenced and characterized. Comparisons of the whole genome sequences of these 4 CYVCV isolates as well as 11 isolates previously reported from around the world revealed the sequence identity ranged from 96.9% – 99.8% at nucleotide level and 97.9% – 99.4% at amino acid level, respectively, indicating that there is a very low level of sequence heterogeneity among CYVCV isolates of different geographic origins and hosts.

收稿日期: 2017-07-24; **修回日期:** 2017-09-20

基金项目: 重庆市两江学者项目; 重庆市科委社会事业与民生保障科技创新专项 (cstc2016shms-ztx80003); 中央高校基本科研业务费项目 (XDJK2015A009); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-26-05B)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zybook1@163.com; 13896052609)

Although CYVCV isolates from Zhejiang Province were clustered in the same clade in the phylogenetic tree, other isolates from China did not show a relationship with the geographic origin of the sampled trees.

Keywords: citrus; *Citrus yellow vein clearing virus*; detection; sequence alignments; phylogenetic tree analysis

柑橘黄化脉明病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV) 引起的黄脉病是一种新近发生的柑橘病害。该病最早发现于巴基斯坦 (Catara et al., 1993), 随后在印度、土耳其等地也有报道 (Önelge et al., 2011)。CYVCV 能够危害大多数柑橘种类, 以柠檬 (*Citrus limon*) 和酸橙 (*C. aurantium*) 最为敏感, 植株发病后叶脉黄化、透明, 叶片脱落, 产量降低, 甚至绝收 (Alshami et al., 2003)。

CYVCV 为柑橘病毒属 *Mandarinivirus* 成员, 其基因组含有 7 529 个核苷酸, 可能包含有 6 个开放阅读框 (Loconsole et al., 2012)。除通过嫁接传播外, CYVCV 还能通过汁液接种感染菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 和藜麦 (*Chenopodium quinoa*) 等草本寄主 (Önelge et al., 2011), 以及酸橙等多个柑橘品种 (Zhou et al., 2016)。虽然豆蚜 (*Aphis craccivora*) 和绣线菊蚜 (*A. spiraecola*) 可在柠檬和菜豆间进行传播 (Önelge et al., 2011), 但尚不清楚 CYVCV 通过何种媒介昆虫在柑橘间进行传播。

自 2009 年首次在中国云南瑞丽发现柑橘黄脉病以来 (Chen et al., 2014), 已陆续在四川、重庆、江西、湖南等多个柑橘主产区检测出了柑橘黄脉病 (陈洪明 等, 2016), 但浙江柑橘产区尚未有该病发生的报道 (Zhou et al., 2017)。浙江作为中国重要的柑橘产区, 到 2013 年时柑橘栽培面积达 $1.12 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 产量 $1.94 \times 10^6 \text{ t}$ (张林 等, 2014), 主要栽培类型为对黄脉病较为敏感的温州蜜柑 (*C. unshiu*) 等。本研究中通过开展柑橘黄脉病调查, 以期明确该病在浙江柑橘产区的发生、分布及其分子特性, 为防治柑橘黄脉病以及研究 CYVCV 的系统演化提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 柑橘黄化脉明病毒的 RT-PCR 检测

2016 年 1 月—2017 年 3 月从浙江 12 个柑橘产地采集了 181 份柑橘样品。取样时从每个植株的 5 个不同方向上总共选取 30 mg 老熟或展平的叶片组织。混合后使用 RNAiso plus (TaKaRa, 日本) 提取总 RNA。获得的总 RNA 溶解于经 DEPC 处理的灭菌超纯水中, -80°C 保存备用。

用于 CYVCV RT-PCR 检测参照陈洪明等 (2015) 的方法, 采用特异性引物 YF1 (5'-TACCGCAGC TATCCATTTC-3') 和 YF2 (5'-GCAGAAATCCCGAACCCTA-3'), 预期扩增片段为 614 bp, 扩增区域为部分外壳蛋白基因。所用引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。一步法 RT-PCR 反应体系为: 以 1 μL RNA 和 1 μL 超纯水为模板, 变性后加入 8 μL 的混合液 (2 \times One step buffer 5 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正反向引物各 0.2 μL , PrimeScript One step Enzyme Mix 0.3 μL (TaKaRa 公司, PrimeScript[®] One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒), RNase Free dH₂O 2.3 μL)。扩增条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 解链 3 min; 50 $^\circ\text{C}$ 30 min; 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 55 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 40 s, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。取 5 μL PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2 基因组测序与序列分析

根据田间样品的检测结果, 分别以来源于 '佛手' 柑 (ZJ-1, ZJ-2) 和 '红美人' 橘 (ZJ-3, ZJ-4) 的 4 个 CYVCV 毒株的总 RNA 为模板, 参照 Loconsole 等 (2012) 的方法, 用覆盖 CYVCV

基因组序列的 7 对引物进行 PCR 扩增 (表 1)。一步法 RT-PCR 反应体系为: 1 μL 总 RNA 模板, 2 \times reaction buffer 5 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正反向引物各 0.2 μL , 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgSO_4 1.6 μL , SuperScriptTM III RT/Platinum[®] *Taq* High Fidelity Enzyme Mix (Invitrogen 公司) 0.2 μL , RNase Free dH_2O 1.8 μL 。扩增体系为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 解链 3 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸的速度大约是 1 $\text{kb} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 延伸。PCR 产物经胶回收、纯化后, 分别与 pGEM-T 载体连接、转化大肠杆菌 JM109。每个片段选取 10 个阳性克隆送英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行测序鉴定。测序结果经 Bioedit 7.0 软件拼接后得到 CYVCV 的全基因组序列。

表 1 本研究所用引物 (Loconsole et al., 2012)

Table 1 Information of primers in this study (Loconsole et al., 2012)

引物 Primer	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	片段长度/bp PCR product size	扩增区域/bp Amplification
1fw	GAAAAGCAAACAKWAHCAWACACACC	921	1 ~ 921
921rev	GGGCAAGAGCACTTGGGTATCT		
668fw	GCCGCTACCCAGAGATATACCAGATT	916	668 ~ 1 584
1 584rev	GCGCTTGTCTTCTGAAGCTTGGTGA		
1 338fw	GCTCCCCCTCCCAGACATCTCAGA	1 314	1 338 ~ 2 652
2 652rev	GTAATGCGTGATGGGCCATATGAGA		
2 515fw	GCTACCTCGCTGAAGGTCTCGGTA	1 022	2 515 ~ 3 537
3 537rev	GGTGTACATCACCTTGTCTCAGAGCATA		
3 377fw	GGTTGGCCAACACTTGTCCCAT	1 120	3 377 ~ 4 497
4 497rev	GGGATGGAGTGGTATTTGGCCTT		
4 323fw	GATCAACTGCGAGACCAACCCA	1 087	4 323 ~ 5 410
5 410rev	GAATCGATGGGAAGACGCGCAGATGT		
4 914fw	CATTGCCTATCAACTTAAAGACGAGCT	2 646	4 914 ~ 7 560
7 560rev	CAGAAAATGGAACTGAAAGCCTG		

将 CYVCV 毒株 ZJ-1、ZJ-2、ZJ-3 和 ZJ-4 的全序列与从 GenBank 中获得的 11 个 CYVCV 毒株的基因组序列、印度柑橘环斑病毒 (*Indian citrus ringspot virus*, ICRSV, AF406744, HQ324250) 以及马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX, M72416) 序列用 Vector NTI 10.0 软件中的 Align 方法进行各开放阅读框及非编码区序列比对分析; 利用 DNAMAN 6.0.40 进行核苷酸及编码氨基酸序列多重比对; 然后针对全基因组, 及其相应的氨基酸序列, 采用 Mega 6.0 软件进行系统发育树分析, 用 1 000 次重复的自展检验评价系统发育树拓扑结构的可靠性 (Tamura et al., 2013), 利用邻位相接聚类分析法构建系统发育树。所用 CYVCV 参照毒株的来源及序列登录号见表 2。

表 2 本研究中用于分子序列分析的柑橘黄脉病毒毒株的登录号、寄主和来源

Table 2 Accession numbers, host, and collection area of *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV) isolates used in this study for molecular variability analysis

毒株 Isolate	寄主 Host	来源 Geographic origin	登录号 Accession number	参考文献 Reference
CYVCV-JX	温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i>	江西 Jiangxi	KX378154	Li et al. 2017
CYVCV-HU	甜橙 <i>C. sinensis</i>	湖南 Hunan	KT124646	GenBank
CYVCV-Y1	柠檬 <i>C. limon</i>	土耳其 Turkey	JX040635	Song et al.2015
CYVCV-PK	脐橙 <i>C. sinensis</i>	巴基斯坦 Pakistan	KP313241	Cao et al. 2016
CYVCV-CQ	尤力克柠檬 <i>C. limon</i>	重庆 Chongqing	KP313240	Cao et al. 2016
CYVCV-YN	尤力克柠檬 <i>C. limon</i>	云南 Yunnan	KP313242	Cao et al. 2016
GD-JG	蕉柑 <i>C. tankan</i>	广东 Guangdong	KX156738	Zhou et al.2017
SC-EL	尤力克柠檬 <i>C. limon</i>	四川 Sichuan	KX156748	Zhou et al. 2017
HN-STJ	砂糖橘 <i>C. reticulata</i>	湖南 Hunan	KX156745	Zhou et al. 2017
GX-STJ	砂糖橘 <i>C. reticulata</i>	广西 Guangxi	KX156742	Zhou et al. 2017
FJ-PK	椪柑 <i>C. reticulata</i>	福建 Fujian	KX156737	Zhou et al. 2017
ZJ-1	佛手 <i>C. bergamia</i>	浙江 Zhejiang	KY933794	
ZJ-2	佛手 <i>C. bergamia</i>	浙江 Zhejiang	KY933795	
ZJ-3	红美人 <i>C. reticulata</i>	浙江 Zhejiang	KY933796	
ZJ-4	红美人 <i>C. reticulata</i>	浙江 Zhejiang	KY933797	

2 结果与分析

2.1 浙江柑橘黄脉病的发生与分布

对采集的 181 份柑橘样品进行检测, 结果发现有 42 份样品感染了 CYVCV, 检出率为 23.9%。病样分别来自金华金东、宁波象山、台州临海、黄岩和衢州柯城, CYVCV 检出率分别为 68.0%、72.7%、18.8%、14.9%和 43.8%。在检测的 11 种柑橘品种中, 只有‘佛手’柑和‘红美人’橘检测出 CYVCV, 检出率分别为 68.0%和 47.2%。宫川、本地早、温州蜜柑、玉环柚 (*C. grandis*)、温岭高橙 (*C. sinensis*)、胡柚 (*C. paradisi*)、椪柑、瓯柑 (*C. suavissima*) 和早香柚上没有检测出 CYVCV (表 3)。

表 3 浙江柑橘黄脉病毒发生情况
Table 3 Incidence of Citrus yellow vein clearing virus (CYVCV) in citrus from Zhejiang Province

采样地 Source	品种 Cultivar	检测样品数 Sample number	阳性样品数 Positive number	检出率% Detection rate
金华金东 Jindong, Jinhua	佛手 <i>Citrus bergamia</i>	25	17	68.0
宁波象山 Xiangshan, Ningbo	红美人 <i>C. reticulata</i>	11	8	72.7
台州临海 Linhai, Taizhou	红美人 <i>C. reticulata</i>	4	3	75.0
台州黄岩 Huangan, Taizhou	宫川 <i>C. unshiu</i>	12	0	0
	红美人 <i>C. reticulata</i>	22	7	31.8
	本地早 <i>C. unshiu</i>	15	0	0
	温州蜜柑 <i>C. unshiu</i>	7	0	0
台州玉环 Yuhuan, Taizhou	玉环柚 <i>C. grandis</i>	21	0	0
台州温岭 Wenling, Taizhou	温岭高橙 <i>C. sinensis</i>	14	0	0
衢州柯城 Kecheng, Quzhou	红美人 <i>C. reticulata</i>	16	7	43.8
衢州常山 Changshan, Quzhou	胡柚 <i>C. paradisi</i>	16	0	0
丽水莲都 Liandu, Lishui	椪柑 <i>C. reticulata</i>	6	0	0
温州瓯海 Ouhai, Wenzhou	瓯柑 <i>C. suavissima</i>	5	0	0
	瓯柑 <i>C. suavissima</i>	14	0	0
	早香柚 <i>C. paradisi</i>	5	0	0
温州乐清 Leqing, Wenzhou	温州蜜柑 <i>C. unshiu</i>	31	0	0

2.2 基因组分析

对来自浙江地区的 4 个 CYVCV 毒株进行全序列测定的结果显示, 4 个毒株都含有 7 529 个碱基, 在 5'UTR 的第 28 和 29 位核苷酸之间没有“-CA-”碱基的插入。这 4 个 CYVCV 毒株间基因组的核苷酸和氨基酸全序列相似性分别 99.2%~99.5%和 99.1%~99.6%, 5'UTR 和 3'UTR 的相似性分别为 96.2%~100%和 100%。4 个 CYVCV 毒株与 NCBI 中 CYVCV-JX、CYVCV-HU、CYVCV-Y1、CYVCV-PK、CYVCV-CQ、CYVCV-YN、GD-JG、SC-EL、HN-STJ、GX-STJ 和 FJ-PK 进行全序列比较发现, 这 15 个 CYVCV 毒株间核苷酸序列, 以及相应氨基酸的相似性较高, 分别达 96.9%~99.8%和 97.9%~99.4%。本研究获得的 4 个浙江 CYVCV 毒株与上述 11 个 CYVCV 毒株进行氨基酸序列比对显示, 4 个浙江 CYVCV 毒株与 11 个 CYVCV 毒株的氨基酸序列之间有 4 个氨基酸位点发生了变异, 分别对应于氨基酸序列的第 1 346 位 (S→F、H、D、N)、1 585 位 (A→P、T)、2 814 位 (Y→A、H) 和 2 858 位 (S→L、R) 氨基酸。此外, 这 15 个 CYVCV 不同毒株与同属的 ICRSV-K1, ICRSV-Pune 的核苷酸序列相似性较低, 分别为 72.2%~72.5%和 72%~72.3% (表 4)。

在基于基因组序列, 以及相应氨基酸序列构建的进化树中, 所有的 CYVCV 毒株聚在一起, 与 ICRSV-K1、ICRSV-Pune、PVX 位于不同的分支。此外, 本研究获得的 4 个浙江 CYVCV 毒株单独聚成一簇, 显示出一定的地域性差异 (图 1)。

表 4 柑橘黄脉病毒不同毒株基因组全长的核苷酸序列同源性比对

Table 4 Pairwise identity of nucleotide alignment of <i>Citrus yellow vein clearing virus</i> (CYVCV) genome nucleotide sequences %									
Ref	ZJ-4	ZJ-3	ZJ-2	ZJ-1	CYVCV-CQ	CYVCV-HU	CYVCV-YN	CYVCV-PK	CYVCV-Y1
ZJ-4	***	0.7	0.8	0.6	1.6	1.6	1.8	2.7	3.1
ZJ-3	99.3	***	0.6	0.5	1.5	1.5	1.6	2.7	3.1
ZJ-2	99.2	99.4	***	0.6	1.6	1.6	1.8	2.8	3.2
ZJ-1	99.4	99.5	99.4	***	1.4	1.4	1.5	2.7	3.0
CYVCV-CQ	99.4	98.5	98.4	98.6	***	0.3	1.2	2.4	2.8
CYVCV-HU	99.4	98.5	98.4	98.6	99.7	***	1.3	2.4	2.7
CYVCV-YN	98.3	98.4	98.3	98.5	98.8	98.7	***	2.5	2.9
CYVCV-PK	97.4	97.3	97.3	97.4	97.6	97.6	97.5	***	2.9
CYVCV-Y1	97.0	97.0	96.9	97.0	97.3	97.3	97.2	97.2	***
CYVCV-JX	98.1	98.2	98.1	98.2	98.6	98.6	99.1	98.0	97.4
SC-EL	98.3	98.4	98.3	98.4	98.8	98.8	98.5	97.4	97.2
FJ-PK	98.5	98.6	98.5	98.7	99.8	99.6	98.9	97.6	97.4
GD-JG	98.5	98.5	98.4	98.5	99.7	99.5	98.7	97.6	97.5
GX-STJ	98.5	98.5	98.4	98.5	99.1	99.0	98.7	97.6	97.3
HN-STJ	98.4	98.5	98.3	98.5	99.7	99.4	98.8	97.6	97.4
ICRSV-K1	72.2	72.2	72.2	72.2	72.4	72.3	72.3	72.4	72.3
ICRSV-Pune	72.0	72.0	72.1	72.0	72.2	72.1	72.1	72.2	72.2
PVX	52.2	52.2	52.1	52.2	52.3	52.3	52.2	52.3	52.2

Ref	CYVCV-JX	SC-EL	FJ-PK	GD-JG	GX-STJ	HN-STJ	ICRSV-K1	ICRSV-Pune	PVX
ZJ-4	1.9	1.7	1.5	1.5	1.6	1.6	34.9	35.3	78.0
ZJ-3	1.8	1.7	1.4	1.5	1.6	1.5	35.0	35.3	78.0
ZJ-2	1.9	1.8	1.5	1.6	1.6	1.7	34.9	35.2	78.2
ZJ-1	1.8	1.6	1.3	1.5	1.5	1.5	35.0	35.3	78.1
CYVCV-CQ	1.4	1.2	0.2	0.3	0.9	0.3	34.7	35.0	77.6
CYVCV-HU	1.4	1.2	0.4	0.5	1.0	0.6	34.9	35.1	77.6
CYVCV-YN	1.0	1.5	1.1	1.3	1.3	1.2	34.8	35.1	78.1
CYVCV-PK	2.1	2.6	2.4	2.5	2.5	2.5	34.7	35.0	77.7
CYVCV-Y1	2.7	2.9	2.7	2.6	2.8	2.6	34.8	34.9	78.1
CYVCV-JX	***	1.6	1.3	1.4	1.5	1.4	34.7	35	77.4
SC-EL	98.4	***	1.1	1.2	0.7	1.2	34.6	34.9	77.7
FJ-PK	98.7	98.9	***	0.3	0.8	0.3	34.6	34.9	77.6
GD-JG	98.6	98.9	99.7	***	0.7	0.2	34.7	34.9	77.6
GX-STJ	98.6	99.3	99.2	99.3	***	0.8	34.5	34.8	77.7
HN-STJ	98.6	98.8	99.7	99.8	99.2	***	34.7	35.0	77.6
ICRSV-K1	72.4	72.4	72.4	72.4	72.5	72.4	***	2.3	83.9
ICRSV-Pune	72.1	72.3	72.3	72.2	72.3	72.2	97.7	***	84.3
PVX	52.4	52.3	52.3	52.3	52.3	52.3	50.1	50.0	***

注：柑橘黄脉病毒（CYVCV）不同毒株的序列信息参照表 2。右上数值代表核苷酸序列差异值；左下数值代表核苷酸序列相似值。
Note: Sequences information of *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV) isolates are listed in Table 2. The upper right value is nucleotide sequence difference data values. The value on the left is nucleotide sequence similarity data values.

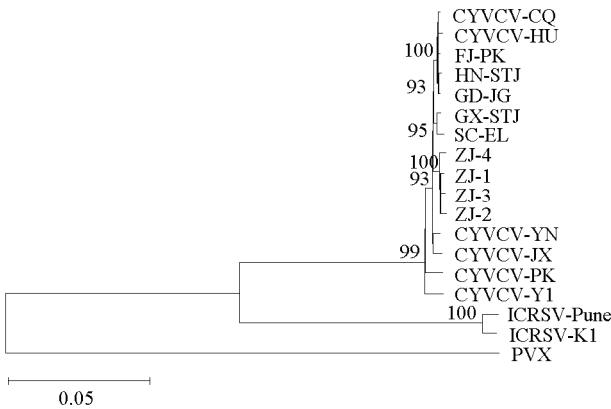


图 1 柑橘黄脉病毒（CYVCV）全基因核苷酸遗传进化分析

Bootstrap value $\geq 90\%$ 。参照毒株的地理来源见表 1；分支长度代表遗传距离。

Fig. 1 Phylogenetic analysis of CYVCV isolates basing on nucleotide sequences of its complete gene

Bootstrap value $\geq 90\%$. Geographic origin of referred isolates are listed in Table 1; Branch length represents the genetic distance.

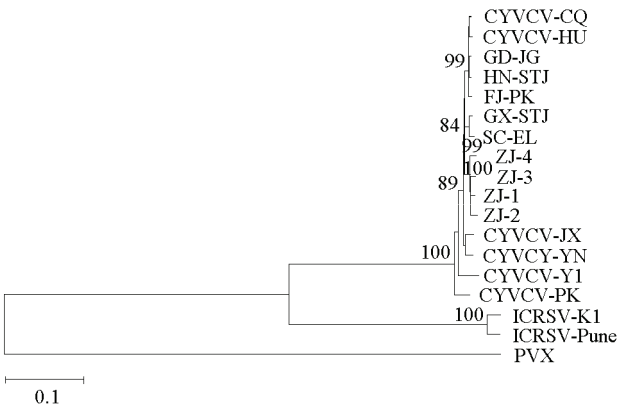


图 2 柑橘黄脉病毒 (CYVCV) 氨基酸序列的遗传进化分析

Bootstrap value $\geq 80\%$ 。参照毒株的地理来源见表 1；分支长度代表遗传距离。

Fig. 2 Phylogenetic analysis of CYVCV isolates basing on amino acid sequences of its complete gene

Bootstrap value $\geq 80\%$. Geographic origin of referred isolates are listed in Table 1; Branch length represents the genetic distance.

3 讨论

浙江作为中国重要的柑橘产区，主要种植温州蜜柑等宽皮柑橘。前期研究（赵恒燕 等，2017；Zhou et al., 2017）显示，除柠檬、酸橙外，柑橘黄脉病也可受害砂糖橘等宽皮柑橘品种。因此掌握 CYVCV 在浙江柑橘产区的发生分布，对于防治该病具有重要的意义。本研究首次在浙江柑橘产区检测出 CYVCV，其检出率为 23.9%。采样的 12 个区县中 5 个区县有 CYVCV 发生。调查结果表明，柑橘品种间感染 CYVCV 的差异较大，柑橘黄脉病在浙江柑橘产区已分布较广，对当地柑橘生产造成了潜在威胁。在调查的 11 个柑橘品种中，只有‘佛手’柑和‘红美人’橘感染了 CYVCV，其余 9 个品种上都未检测出 CYVCV，由此推测，该病在浙江可能主要是通过苗木进行传播。因此今后进一步规范苗木市场，使用无病毒苗木，是防治柑橘黄脉病的重要措施。

本研究中有‘红美人’橘植株表现出叶片皱缩、扭曲的症状，并且在这些植株中只检测到 CYVCV，未检测出柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV)、柑橘碎叶病毒 (*Citrus tatter leaf virus*, CTLV)、柑橘裂皮病类病毒 (*Citrus exocortis viroid*, CEVd)、温州蜜柑萎缩病毒 (*Satsuma dwarf virus*, SDV)、柑橘鳞皮病病毒 (*Citrus psorosis virus*, CPV)、柑橘褪绿矮缩病毒 (*Citrus chlorotic dwarf-associated virus*, CCDaV) 以及其他柑橘类病毒（数据未显示）。因此 CYVCV 可能是造成‘红美人’橘植株出现叶片皱缩、扭曲的原因，但还需要进一步验证。

前期研究显示，不同地理来源植株上的 CYVCV 毒株分子变异较小（Zhou et al., 2017）。本研究对采自浙江的 4 个 CYVCV 毒株进行全序列分析的结果进一步显示，CYVCV 毒株间的相似性很高，达 99.5%。造成 CYVCV 基因组变异较小的原因可能是其基因组较为稳定，不易因地理或寄主差异而发生明显的变异（Song et al., 2015）。Zhou 等（2017）认为 CYVCV 侵入中国的时间较短，病毒还来不及发生明显的变异就已扩播至中国大多数的柑橘产区。

References

Alshami A A A, Ahlawat Y S, Pant R P. 2003. A hitherto unreported yellow vein clearing disease of citrus in India and its viral etiology. Indian Phytopathology, 56 (4): 422 - 427.

- Cao M J, Wu Q, Atta S, Su H N, Yu Y Q, Chen H M, Zhou C Y. 2016. First molecular evidence of *Citrus yellow vein clearing virus* from citrus in Punjab, Pakistan. *Plant Disease*, 540: 1 - 4.
- Catara A, Azzaro A, Davino M. 1993. Yellow vein clearing of lemon in Pakistan//Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virus. Riverside: IOCV. http://iocv.org/proceedings/twelve/12th364_367.pdf
- Chen H M, Li Z A, Wang X F, Zhou Y, Tang K Z, Zhou C Y, Zhao X Y, Yue J Q. 2014. First report of *Citrus yellow vein clearing virus* on lemon in Yunnan, China. *Plant Disease*, 98 (12): 1747.
- Chen Hong-ming, Wang Xue-feng, Zhou Yan, Zhou Chang-yong, Guo Jun, Li Zhong-an. 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.
- Chen Hong-ming, Zhou Yan, Wang Xue-feng, Zhou Chang-yong, Yang Xiu-yan, Li Zhong-an. 2016. Detection of *Citrus yellow vein clearing virus* based on a real-time RT-PCR approach. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (1): 168 - 174. (in Chinese)
- 陈洪明, 周彦, 王雪峰, 周常勇, 杨秀燕, 李中安. 2016. 应用实时荧光 RT-PCR 检测柑橘黄化脉明病毒. *园艺学报*, 43 (1): 168 - 174.
- Li X T, Su H N, Tang K G, Tong X N, Zhong B. 2017. Fruit malformation of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) infected by *Citrus yellow vein clearing virus*. *Journal of Phytopathology*, 165 (5): 283 - 288.
- Loconsole G, Önelge N, Potere O, Giampetruzzi A, Bozan O, Satar S, De Stradis A, Savino V, Yokomi R K, Saponari M. 2012. Identification and characterization of *Citrus yellow vein clearing virus*, a putative new member of the genus *Mandarivirus*. *Phytopathology*, 102 (12): 1168 - 1175.
- Önelge N, Satar S, Elibuyuk O, Bozan O, Kamberoglu M. 2011. Transmission studies on *Citrus yellow vein clearing virus*//Proceeding of the 18th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside: IOCV. http://iocv.org/proceedings/eighteen/Önelge_et_al.pdf.
- Song Z, Kurth E G, Peremyslov V V, Zhou C Y, Dolja V V. 2015. Molecular characterization of a *Citrus yellow vein clearing virus* strain from China. *Archives of Virology*, 160 (7): 1811 - 1813.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumevar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725 - 2729.
- Zhang Lin, Ke Pu-zhi, Luo Wen-jie. 2014. Renovation and policy suggestions of canopy closure orange groves in Zhejiang Province. *Zhejiang Citrus*, 31 (3): 2 - 4. (in Chinese)
- 张林, 柯甫志, 罗文杰. 2014. 浙江省郁闭橘园更新改造情况及政策建议. *浙江柑橘*, 31 (3): 2 - 4.
- Zhao Hengyan, Guan Guijing, Zhou Changyong, Yu Yunqi, Wang Hongsu, Li Zhongan, Liu Jinxiang. 2017. Establishment and application of duplex RT-PCR for the detection of *Citrus yellow vein clearing virus* and *Citrus tristeza virus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (7): 1405 - 1414. (in Chinese)
- 赵恒燕, 关桂静, 周常勇, 于云奇, 王洪苏, 李中安, 刘金香. 2017. 柑橘黄化脉明病毒和衰退病毒的二重 RT-PCR 检测体系的建立与应用. *园艺学报*, 2017, 44 (7): 1405 - 1414.
- Zhou Y, Chen H M, Cao M J, Wang X F, Jin X, Liu K H, Zhou C Y. 2017. Occurrence, distribution and molecular characterization of *Citrus yellow vein clearing virus* in China. *Plant Disease*, 101 (1): 137 - 143.
- Zhou Y, Ma D D, Chen H M, Wang X F, He S G, Zhou C Y. 2016. A rapid and efficient purification of *Citrus yellow vein clearing virus* by sucrose cushion ultracentrifugation. *Journal of Plant Pathology*, 98 (1): 159 - 161.