

海南省柑橘主产区黄龙病和病毒病的 发生危害情况调研初报

崔一平¹, 彭埃天^{1*}, 李子力¹, 凌金峰¹, 宋晓兵¹,
郭泽成², 陈霞¹, 程保平¹, 殷瑜¹

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640;

2. 海南省海口市农业技术推广中心, 海口 570206)

摘要 柑橘是我国南方重要的水果之一, 柑橘黄龙病和柑橘病毒病已经对我国柑橘的安全生产造成了严重威胁。为了解柑橘黄龙病和病毒病对海南柑橘产业的危害情况, 本研究通过荧光定量 PCR (Quantitative PCR) 和反转录 PCR (RT-PCR) 分别对随机采集自海南柑橘主产区澄迈县 3 个福橙种植园和琼中县 4 个绿橙种植园共计 109 个样品进行了柑橘黄龙病和柑橘 5 种主要病毒病的检测。结果表明: 澄迈县福橙标准化种植示范基地和琼中县营根镇绿橙种植园 2 个新植橘园的柑橘黄龙病发病较轻, 检出率仅为 8% 和 11%, 而其他 5 个橘园的柑橘黄龙病检出率均在 75% 以上, 严重的达 100%。除此之外, 7 个橘园均未检测到柑橘褪绿矮缩病毒; 澄迈县和琼中县的衰退病毒病检出率分别在 52.9% 和 77.8% 以上, 黄脉病毒病在 83.3% 和 90% 以上。澄迈县还检测到碎叶病毒病的存在, 检出率在 38.1% 以上, 除红湖农场外还存在裂皮病毒病, 检出率在 11.8% 以上。琼中县的绿橙种植园 3 还存在裂皮病毒病, 检出率为 43.8%。综上所述, 柑橘黄龙病和病毒病已经严重威胁到海南省福橙和绿橙主产区的柑橘生产安全。加强对海南柑橘苗木安全生产的同时, 亟需采取有效的田间综合防控措施, 以促进海南柑橘产业的健康发展。

关键词 柑橘黄龙病; 柑橘病毒病; 海南省; 柑橘

中图分类号: S 412 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018359

Survey on HLB and virus disease in main citrus production area in Hainan province

CUI Yiping¹, PENG Aitian¹, LI Zili¹, LING Jinfeng¹, SONG Xiaobing¹,
GUO Zecheng², CHEN Xia¹, CHENG Baoping¹, YIN Yu¹

(1. Research Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences; Guangdong
Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China;

2. Haikou Agricultural Technology Extension Center, Hainan Province, Haikou 570206, China)

Abstract Citrus is an important fruit in south China, but its production has been seriously threatened by Huanglongbing (HLB) and several virus diseases in recent years. To reveal the influence of citrus diseases on citrus industry in Hainan province, a total of 109 samples collected from three *Citrus reticulata* var. ‘Fuju’ orchards in Chengmai county and four *Citrus sinensis* var. ‘Lvcheng’ orchards in Qiongzong county were subjected to detection of HLB and virus pathogens using Quantitative PCR and RT-PCR. The results showed that among the seven analyzed orchards, the two new orchards (1/2-year-old) were only slightly affected by HLB, with an incidence of 8% and 11%, respectively, while in the rest five relatively old orchards 75% to 100% trees were affected by HLB. Among the analyzed virus diseases, the pathogen of *Citrus chlorotic dwarf associated virus* (CCDaV) was not detected. In Chengmai orchards, *Citrus tristeza virus* (CTV), Citrus tatter leaf virus (CTLV) and *Citrus*

收稿日期: 2018-08-16 修订日期: 2018-11-13

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0202000); 广东省科技计划公益研究与建设项目(2014B020203003); 广东省现代农业产业技术体系建设项目(2017LM1077); 广东省现代农业柑橘黄龙病检测与综合防控产业技术研发中心建设项目(粤农[2017]68号)

* 通信作者 E-mail: Pengait@163.com

yellow vein clearing virus (CYVCV) were all detected, with an average incidence of 52.9%, 38.1% and 83.3%, respectively. *Citrus exocortis viroid* (CEVd) was also detected in two of the three ‘Fuju’ orchards, with an incidence of 11.8% and 71.4%, respectively. In the four ‘Lvcheng’ orchards in Qiongzong, CTV and CYVCV were both detected, affecting more than 77.8% and 90% plants, respectively. CEVd was only detected in one ‘Lvcheng’ orchard (43.8% detection rate). According to our investigation, both HLB and several virus diseases have been pervasive in Hainan province and become a great threat to the citrus production. To promote the healthy development of citrus industry in Hainan, besides guaranteeing the use of pathogen-free citrus seedlings, combined strategies to prevent the spread of citrus diseases in the field are urgently required.

Key words Huanglongbing; virus disease; Hainan province; citrus

柑橘是我国南方一种重要水果,柑橘黄龙病(citrus Huanglongbing)是目前世界柑橘生产上最具有毁灭性的病害之一^[1]。该病害已广泛分布于中国、印度、南非、美国和巴西等世界上 50 多个柑橘种植国家。我国的柑橘黄龙病主要分布在广东、广西、福建、海南、江西等主要柑橘种植区域,此外湖南、浙江、四川、云南、贵州和台湾等省市柑橘种植区域也有发生。引起我国柑橘黄龙病的病原为 α 变形菌纲韧皮部杆菌属亚洲种 *Candidatus Liberibacter asiaticus*, (Las)^[2-4]。该种为耐热型(28~32℃),传播媒介为柑橘木虱 *Diaphorina citri*^[5]。黄龙病菌主要通过柑橘木虱、带病苗木、嫁接等进行传播,但不能通过汁液摩擦及土壤传播;同时在柑橘树体内的繁殖扩展受到柑橘维管束的限制。目前引起柑橘黄龙病的病原菌还不能人工培养,同时也没有发现防治柑橘黄龙病的有效药剂。

柑橘黄龙病可在柑橘上形成典型症状:如叶片褪绿均匀黄化或斑驳、革质化,叶脉粗大,果实出现“红鼻子果”等。田间柑橘黄龙病发病症状有时极易与柑橘田间缺素症、病毒病及药肥害等症状相混淆,肉眼进行鉴别诊断,准确率不高,易误判。因此,利用现代科技手段,采用合适的方法对柑橘黄龙病进行准确的诊断就显得尤为重要。目前较多采用 PCR(polymerase chain reaction)对柑橘黄龙病进行分子诊断^[6-8](<http://www.rec.ri.cmu.edu/usda>)。常见的 PCR 检测法有常规 PCR、巢式 PCR 和实时荧光 PCR。2014 年,程保平等通过试验比较了以上 3 种方法检测柑橘黄龙病的灵敏度,发现荧光定量 PCR 方法明显优于其他 2 种方法,且具有操作简便、检测灵敏度高、结果数字化可读性强及可以量化等优点,是目前公认的较为准确的一种柑橘黄龙病检测方法^[9]。

在田间,柑橘病毒病能够在柑橘上造成与柑橘黄龙病相类似的症状。柑橘病毒病的发生严重影响

柑橘植株的生长和柑橘的品质,同时威胁柑橘的苗木安全。本文选取我国已报道过的 5 种病毒病(柑橘衰退病毒病、柑橘裂皮病毒病、柑橘碎叶病毒病、柑橘褪绿矮缩病毒病及柑橘黄脉病毒病)的引物,采用 RT-PCR 方法对来自海南的样品进行检测。其中,柑橘衰退病毒 *Citrus tristeza virus* (CTV)、柑橘裂皮病毒 *Citrus exocortis viroid* (CEVd)、柑橘碎叶病毒 *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) 是 3 种严重威胁柑橘生产的病毒,在世界范围内广泛分布^[12];柑橘褪绿矮缩病毒 *Citrus chlorotic dwarf associated virus* (CCDaV) 为 2012 年 Loconsole 等在柑橘上鉴定出来的一种单链 DNA 类病毒,该病毒主要危害柠檬、葡萄柚、橘橙等柑橘品种,在我国少数地区存在^[13];柑橘黄脉病毒 *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV) 为陈洪明等于 2015 年在‘尤力克’柠檬上新发现的病毒,所引起的病害为嫁接传染性病害^[14]。

海南省‘绿橙’和‘福橙’是 20 世纪 80 年代从广东廉江引进的‘红江橙’*Citrus tangerine* Hort. Et Tanaka × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 经过多年培育而来。琼中县和澄迈县分别是海南柑橘‘绿橙’、‘福橙’的主产区。‘琼中绿橙’是海南省的名牌产品,获国家农业部无公害农产品认证和国家绿色食品认证。2006 年 1 月,“琼中绿橙”商标被国家商标局批准注册,是海南省第 1 个有地理标志证明的商标^[10]。澄迈‘福橙’在 2008 年被定为国宴果品,同年申请注册了“澄迈福橙”商标。调查表明,由于柑橘黄龙病的危害,琼中县‘绿橙’的种植面积从 1998 年以来到 2015 年呈现抛物线式发展(图 1)。自 2006 年首次在海南省发现柑橘黄龙病以来,琼中县几乎所有的柑橘产地都有发生^[16]。2008 年琼中县‘绿橙’的种植面积达到最高点,约 2 800 hm²。此后,2008 年—2013 年期间,柑橘种植面积锐减;至 2015 年—2016 年,柑橘种植面

积锐减为 800 hm²,几乎恢复到了 2002 年前的水平^[17]。近年来,柑橘黄龙病对海南省柑橘产业危害的报道不断出现,特别是对海南的主栽品种‘福橙’和‘绿橙’。过去主要是通过肉眼判别和普通 PCR 的方法对海南地区的柑橘黄龙病进行鉴定,本文通过 Quantitative PCR 和 RT-PCR 的方法对随机采集的海南‘福橙’和‘绿橙’样品进行柑橘黄龙病及柑橘病毒病的检测,同时结合相应的田间调研,对目前海南柑橘产业面临的问题进行综合分析和阐述,旨在为政府部门或相关生产单位柑橘生产安全和病害综合防控提供参考,以利于海南柑橘产业的健康发展。

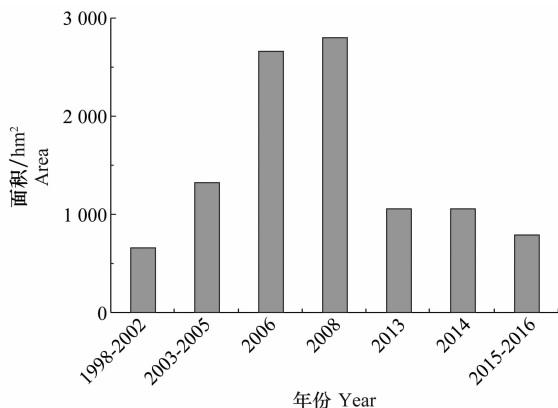


图1 琼中县‘绿橙’种植面积(1998年—2016年)

Fig. 1 Planting area of ‘Lvcheng’ in Qiongzong county (1998—2016)

1 材料与方法

1.1 试验材料和果园基本情况

柑橘样品采集时间分别为 2017 年 3 月、12 月。采自海南‘福橙’、‘绿橙’的主要种植区域。

澄迈县福山镇澄迈‘福橙’标准化种植示范基地:种植当地繁育的无病种苗,2015 年 10 月种植,种植时间约 2 年,共 28.67 hm²,2 万多株,田间管理中上水平,有水肥滴灌系统,水肥中上,长势正常,株高 0.8~1.5 m,未挂果,未见黄龙病症状或黄化症状树。

澄迈县福山镇东义‘福橙’种植园:2015 年初种植,来自外地繁育的无病种苗,种植约 3 年,面积约 0.8 hm²,700 株左右,田间管理优良,有水肥滴灌系统,水肥充足,长势优良,枝梢生长旺盛,开花挂果优良,已是第二年挂果,株高 1.5~2.5 m,个别植株生长明显变差,果实变小且可见黄龙病症状或黄化症状树。

澄迈县福山镇红湖农场‘福橙’种植园:2013 年 10 月种植,种植约 5 年,原种植约 5 000 株,因黄龙

病危害目前仅剩约 2 000 株,田间管理中下,水肥中下,长势较差,株高 1.5~2 m,开花中等,挂果不多,多见黄龙病症状或黄化症状树。

琼中县和平镇‘绿橙’种植基地的 3 个果园:种植约为 10 年,由政府统一规划种植后分别由不同农户管理。果园 1 和果园 3,黄龙病发生较为严重,且田间管理差,水肥差,果树长势差,枝梢较纤细,落叶较多,树冠较低、稀疏,株高 2~3 m,开花不良,挂果极少,多见黄龙病症状或黄化症状;果园 2,黄龙病发生较为严重,但逐年清除病树,田间管理中上,水肥中上,果树长势正常,株高 2~3 m,开花挂果正常,株产正常,但果园仍可见黄龙病症状或黄化症状树。

琼中县营根镇‘绿橙’种植园:该园为‘绿橙’新植园,2017 年初种植,种植约 1 年,田间管理中上,水肥中等,长势正常,株高约 0.5~0.8 m,未挂果,未见黄龙病症状或黄化症状。

采用五点采样法随机采集 109 个样品。

1.2 试验方法

1.2.1 柑橘 DNA 和 RNA 的提取、检测及 RNA 的反转录

DNA 和 RNA 的提取:每份 DNA 和 RNA 样品均采集 2~3 个柑橘叶片中脉(或者取柑橘果实)0.5 g 左右,用刀片切碎,而后用液氮快速将样品磨碎,依次类推。每个样品单独用一副手套、一个研钵和研磨棒。本文中 DNA 的提取严格按照试剂盒说明书进行提取,试剂盒为(AXYGEN)爱思进动植物基因组 DNA 制备试剂盒,具体提取方法详见试剂盒说明书。RNA 的提取主要采用天根生化科技有限公司的 RNA 提取试剂盒(货号 DP441, RNAprep Pure Plant Plus Kit),具体操作详见试剂盒说明书。

DNA 和 RNA 的检测:取 2 μL 样品在超微量紫外/可见分光光度计(Nano-100)仪器上进行检测,读取并记录 DNA 和 RNA 的含量和质量数值。

RNA 的反转录:具体操作见天根生化科技有限公司反转录试剂盒说明书[货号:KR116-02, FastKing RT Kit (with gDNAase)]。

1.2.2 柑橘黄龙病菌的检测

本研究采用实时荧光定量 PCR(Quantitative PCR)的方法对柑橘叶片及柑橘果实中的黄龙病菌进行检测。所有检测试验均在 ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)上进行。同时以柑橘黄龙病亚洲种的部分 16S rDNA 序

列为模板设计引物,引物的设计主要参照 Li 等的文章^[11]:HLBas: 5'-TCGAGCGCGTATGCAATACG-3',HLBr: 5'-GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG-3',利用探针 HLBp: 5'-6-carboxy-fluorescein (FAM)-AGACGGGTGAGTAACGCG-Black Hole Quencher(BHQ)-1-3'对样品进行检测。所用试剂为 TaKaRa 公司的 Premix Ex Taq (Probe qPCR),所用引物和探针均由上海生工生物工程股份有限公司合成。实时荧光定量 PCR 所用试剂如下(25 μL): 12 μL Premix Ex Taq (Probe qPCR),0.5 μL HLBas/HLBr,1 μL HLBp,1 μL DNA(50 ng/μL),10 μL dd H₂O。具体程序为:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s 40 个循环。程序运行结束后,读取 Ct 值。本团队利用标准品得到的 Ct 值与菌含量的关系为: $Y=-0.286X+11.924$,其

中 X 为 Ct 值,Y 为拷贝数,每克植物组织中含有的病原菌拷贝数为 10^Y。

1.2.3 柑橘病毒病的检测

为了对海南省主要‘福橙’和‘绿橙’产区橘园内的主要柑橘病毒病进行分析,根据已有参考文献中的检测引物,重点对柑橘衰退病、裂皮病、褪绿矮缩病、碎叶病和黄脉病进行检测^[12-14],具体引物序列见表 1。以反转录获得的 cDNA 为模板,进行 PCR 反应,具体体系如下(20 μL): Premix Ex Taq 10 μL,上/下游引物各 0.5 μL, cDNA(50 ng/μL) 1 μL, ddH₂O 8 μL;具体程序如下:95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 5 min。16℃ 保持。PCR 结束后进行电泳,根据条带的有无对结果进行总结和分析。

表 1 检测柑橘病毒病所用到的引物
Table 1 Primers for detecting citrus virus disease

检测的病毒 Detected virus	引物名称 Primer name	碱基序列 (5' to 3') Sequence
柑橘褪绿矮缩病毒 ^[13] <i>Citrus chlorotic dwarf associated virus</i>	CCDaV-T1	GTTCTGTGTTTCGACCCGTT
	CCDaV-T2	GGGATTTCGATGGATAGCTCATCCAA
柑橘碎叶病毒 ^[12] <i>Citrus tatter leaf virus</i>	CTLV-T1	TAGAAAAACCACTAACC CGGAAATGC
	CTLV-T2	CCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTT
柑橘衰退病毒 ^[12] <i>Citrus tristeza virus</i>	CTV-C1	TCAAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC
	CTV-C2	AACGCCCTTGGAGTCTGGGGTAGGA
柑橘裂皮病毒 ^[12] <i>Citrus exocortis viroid</i>	CEVd-E1	CCGGGGATCCCTGAAGGACTT
	CEVd-E2	GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG
柑橘黄脉病毒 ^[14] <i>Citrus yellow vein clearing virus</i>	CYVCV-F	TACCGCAGCTATCCATTTC
	CYVCV-R	GCAGAAATCCCGAACC ACTA

2 结果与分析

2.1 海南‘福橙’、‘绿橙’主要产区柑橘黄龙病检测结果及发病情况

本研究采用荧光定量 PCR(QPCR)方法分别在 2017 年春冬季对随机采自澄迈县和琼中县 7 个果园共 109 个柑橘样品进行柑橘黄龙病含量检测:其中‘福橙’果园 3 个,样品共计 56 个;‘绿橙’果园 4 个,样品共计 53 个,具体结果见表 2。从表 2 中可以看出,澄迈县‘福橙’标准化种植示范基地的柑橘黄龙病处于感病初期,2017 年 3 月抽检样品的检出率为 100%,平均菌含量很低,仅为 $(1.14\pm 1.79)\times 10^3$ 拷贝/g,2017 年 12 月的检出率仅为 8.3%;红湖农场种植园在 2017 年 3 月和 12 月的 2 次抽检中,叶片和果实样品的检出率均为 100%;东义‘福橙’示范基地 2017 年 3 月抽检叶片样品的检出率为

100%,2017 年 12 月叶片和果实样品的检出率均为 88%。2017 年 3 月对琼中县和平镇 3 个‘绿橙’种植园的叶片抽检结果显示,3 个果园柑橘黄龙病的检出率均为 100%;2017 年 12 月‘绿橙’种植园 1 和 3 黄龙病的检出率为 100%,‘绿橙’种植园 2 为 75%。2017 年 12 月新增抽检果园营根镇‘绿橙’种植园的检出率仅为 11%。从表 2 中我们可以看出,来自澄迈县‘福橙’标准化种植示范基地 $[(1.14\pm 1.79)\times 10^3$ 拷贝/g]和琼中县营根镇‘绿橙’种植园 $[(0.03\pm 0.05)\times 10^3$ 拷贝/g]的样品含菌量远远低于其他被检果园样品的含菌量。究其原因,黄龙病不同发病程度可能与种植年限相关,从表中可以看出澄迈县‘福橙’标准化种植示范基地为种植当地种苗 2 年左右的新植园,琼中县营根镇‘绿橙’种植园为种植不足 1 年的新植园。值得注意的是,同为种植 2 年左右的果园,东义种植园柑橘黄龙病的检出

率为 88% 以上, 远远高于‘福橙’标准化种植示范基地; 同时前者的平均菌含量为后者的 100 倍以上。

这些现象提示我们, 黄龙病的发病程度除与种植年限有关外还与果园的田间栽培管理水平相关。

表 2 海南‘福橙’、‘绿橙’主产区柑橘黄龙病的检测结果及发病情况¹⁾

Table 2 Occurrence and detection result of HLB in main production area of ‘Fuju’ and ‘Lvcheng’ in Hainan province						
采集地 Location	种植时间/年 Planting time	采样时间/ 年-月 Sampling time	检测阳性数/ 样品数 Positive sample/ total sample	检出率/% Positive detection	菌含量范围/ ×10 ³ 拷贝·g ⁻¹ The range of HLB content	
澄迈县福山镇 Fushan town, Chengmai county	‘福橙’标准化种植示范基地 The ‘Fuju’ standardization planting demonstration base	2015	2017-03	5/5 ^y	100	0.14~4.27
			2017-12	2/12 ^y	8	0.00~0.07
	红湖农场‘福橙’种植园 Honghu ‘Fuju’ orchard	2013	2017-03	8/8 ^y	100	0.17~765.03
			2017-12	5/5 ^y	100	11.46~159.59
	东义‘福橙’示范种植园 Dongyi ‘Fuju’ demonstration orchard	2015	2017-12	5/5 ^f	100	170.45~1 824.74
			2017-03	5/5 ^y	100	0.09~629.96
琼中县和平镇 Heping town, Qiongzong county	‘绿橙’种植园(3 个果园样品混合) ‘Lvcheng’ orchard 1+orchard 2+orchard 3	2007	2017-12	7/8 ^y	88	0.00~351.72
			2017-03	7/8 ^f	88	0.00~25 421.43
	种植园 1 ‘Lvcheng’ orchard 1	2007	2017-12	9/9 ^y	100	0.25~1 253.66
			2017-03	2/2 ^f	100	368.32~371.97
	种植园 2 ‘Lvcheng’ orchard 2	2007	2017-12	5/5 ^y	100	522.16~4 741.33
			2017-03	5/5 ^f	100	67.80~595.66
	种植园 3 ‘Lvcheng’ orchard 3	2007	2017-12	6/8 ^y	75	0.00~520.95
			2017-03	6/8 ^f	75	0.00~1 402.17
琼中县营根镇 Yinggen town, Qiongzong county	‘绿橙’种植园 ‘Lvcheng’ orchard	2007	2017-12	8/8 ^y	100	18.16~2 223.31
			2017-03	8/8 ^f	100	18.16~8 298.51
琼中县营根镇 Yinggen town, Qiongzong county	‘绿橙’种植园 ‘Lvcheng’ orchard	2017	2017-12	1/9 ^y	11	0.00~0.16
			2017-03			

1) 表中“y”代表样品为柑橘叶片,“f”代表样品为柑橘果实。
In this table, “y” indicates the detected sample is citrus leaf, “f” indicates the detected sample is citrus fruit.

2.2 海南‘福橙’、‘绿橙’主要产区柑橘病毒病的检测结果及发病情况

研究表明,除柑橘黄龙病外,柑橘病毒病也严重影响柑橘生长和产量。本研究采用 RT-PCR 方法对柑橘样品中 5 种柑橘病毒病(柑橘衰退病、柑橘裂皮病、柑橘褪绿矮缩病、柑橘碎叶病及柑橘黄脉病)进行检测。结果表明,7 个橘园均未检测到柑橘褪绿矮缩

病毒;澄迈县 3 个‘福橙’橘园都检出了柑橘衰退病毒(检出率分别为 52.9%、100%、95.2%)、柑橘碎叶病毒检出率分别为 41.2%、55.6%、38.1%)和柑橘黄脉病毒(检出率分别为 100%、83.3%、85.7%);除此之外,‘福橙’标准化种植示范基地和东义‘福橙’示范种植园还检出了柑橘裂皮病毒(检出率分别为 11.8%和 71.4%),而红湖农场‘福橙’种植园未检出(表 3)。

表 3 海南‘福橙’、‘绿橙’主产区柑橘主要病毒的检测结果及发病情况¹⁾

Table 3 Occurrence and detection result of citrus virus in main production area of ‘Fuju’ and ‘Lvcheng’ in Hainan province		检出率/% (阳性样本数/样本总数) Detection rate (positive samples/total samples)				
采集地 Location		柑橘 衰退病毒 CTV	柑橘 裂皮病毒 CEVd	柑橘褪绿 矮缩病毒 CCDaV	柑橘 碎叶病毒 CTLV	柑橘 黄脉病毒 CYVCV
澄迈县福山镇 Fushan town, Chengmai county	‘福橙’标准化种植示范基地 The ‘Fuju’ standardization planting demonstration base	52.9(9/17)	11.8(2/17)	0(0/17)	41.2(7/17)	100(17/17)
	红湖农场‘福橙’种植园 Honghu ‘Fuju’ orchard	100(18/18)	0(0/18)	0(0/18)	55.6(10/18)	83.3(15/18)
	东义‘福橙’示范种植园 Dongyi ‘Fuju’ orchard	95.2(20/21)	71.4(15/21)	0(0/21)	38.1(8/21)	85.7(18/21)
琼中县和平镇 Heping town, Qiongzong county	‘绿橙’种植园(混样) ‘Lvcheng’ orchard 1+orchard 2+orchard 3	+	—	—	—	+
	‘绿橙’种植园 1 ‘Lvcheng’ orchard 1	100(10/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	90(9/10)
	‘绿橙’种植园 2 ‘Lvcheng’ orchard 2	93.8(15/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	93.8(15/16)
	‘绿橙’种植园 3 ‘Lvcheng’ orchard 3	87.5(14/16)	43.8(7/16)	0(0/16)	0(0/16)	93.8(15/16)
琼中县营根镇 Yinggen town, Qiongzong county	‘绿橙’种植园 ‘Lvcheng’ orchard	77.8(7/9)	0(0/9)	0(0/9)	0(0/9)	100(9/9)

1) “+”为有,“—”为无。
“+” indicates the pathogen can be detected, “—” indicates the pathogen cannot be detected.

2017 年 12 月采自琼中县 4 个‘绿橙’橘园的柑橘叶片和果实均未检测到柑橘褪绿矮缩病毒和柑橘碎叶病毒;但都检出了柑橘衰退病毒(检出率分别为 100%、93.8%、87.5%、77.8%)和柑橘黄脉病毒(检出率分别为 90%、93.8%、93.8%、100%)。此外,和平镇‘绿橙’橘园果园 3 的叶片和果实样品中还检出了柑橘裂皮病毒(检出率为 43.8%)。具体结果见表 2。

3 讨论

海南省是我国重要的亚热带水果产区之一,终年雨水充沛、长夏无冬、光热丰富,有利于亚热带作物的生长。除此之外,海南省全境属热带地区,占全国热带面积的 42.5%,其中种植热带作物的面积占全省的 23.9%,非常适合发展热带特色作物^[15]。澄迈县位于海南北部丘陵台地,琼中县位于海南中部山地丘陵,都非常适合发展热带水果产业,两地均为海南省主要的柑橘产区。

结合本次收集到的 7 个果园的田间信息和分子检测结果发现,除种植年限较短的橘园,如澄迈县‘福橙’标准化种植示范基地和琼中县营根镇‘绿橙’柑橘黄龙病检出率和发病程度较轻外,其他橘园的柑橘黄龙病发病均较严重。值得注意的是,澄迈县福山镇东义‘福橙’种植园同为种植年限较短的橘园,柑橘黄龙病的检出率已经达到了 88%,发病程度也很严重(表 2);经查,该橘园的种苗来自外地繁育的无病种苗。同时对 7 个橘园柑橘病毒病的检测发现,新植园与老橘园在病毒病的发生种类上不存在差异,仅在检出率上有少许差距(表 3)。这些现象暗示我们除了加强对橘园的水肥、除虫除草等田间管理外,加强种苗的检测,减少柑橘黄龙病和病毒病对柑橘苗木的污染源头也非常重要。

以往的调研报道表明,琼中地区样品柑橘黄龙病的检出率均小于 100%,约为 60%左右^[16];在本次调研中采自琼中县和平镇 3 个种植园的样品柑橘黄龙病检出率均超过了 75%,虽然在随机采样中会有一些的不确定因素存在,但也从侧面说明柑橘黄龙病在这些地区的危害程度正在进一步加重。从表 2 可以看出,澄迈县福山镇的 3 个果园,3 月采集的柑橘叶片含菌量平均高出 12 月叶片样品的 2 倍以上,但是 12 月采集的果实样品中的含菌量远超同期

叶片中的含菌量。由于 3 月采自琼中和平镇果园的样品为种植园 1、种植园 2 和种植园 3 的混样,因此无法比较不同季节单一果园的含菌量。但是 12 月采自种植园 2 和种植园 3 的果实样品含菌量远超同果园叶片的含菌量。种植园 1 由于年久失管,果实小而且量极少,因此大量黄龙病菌仍存在于叶片中。这些现象暗示我们柑橘果园中 12 月(冬季)的黄龙病菌浓度远高于 3 月(春天)的黄龙病菌浓度;同时当柑橘植株挂果后,随着果实接近成熟存在柑橘黄龙病从叶片向果实转移的现象。以上这些结论仍需要进一步的试验进行验证。

基于本次调研中 7 个果园的具体情况,本文建议采取分类防控措施:1)澄迈县福山镇红湖农场‘福橙’种植园和琼中县和平镇‘绿橙’果园 1 和果园 3 不但柑橘黄龙病发生严重,而且处于失管状态或管理不善,需进行彻底挖除清园,并火烧处理被挖树体,进行整体重新规划重新种植或改种;2)澄迈县福山镇东义‘福橙’示范基地和琼中县和平镇‘绿橙’果园,虽然柑橘黄龙病发病严重,但果园管理优良也有良好经济产量和产值,需对果园加强监测,并对园中的病树采取彻底挖除,火烧处理被挖树体,同时可补种无病柑橘大苗(这样可以缩短柑橘结果前暴露在田间的时间,同时能够让果农尽快获得收益)^[18];3)对于一些发病较轻、种植年限较短的橘园,如澄迈县‘福橙’标准化种植示范基地和琼中县营根镇‘绿橙’种植园,侧重于采取防病与防虫相结合、化学药剂与生物防治相结合的方法,在柑橘树抽梢期等特殊时期进行药剂喷洒,减少木虱数量;将四环素等抗生素通过输液的方式输送到柑橘树体内,可有效遏制柑橘黄龙病的发展,减少树体内病原菌的数量;增强树势,增加新梢,增加挂果等;4)对于需种植柑橘苗木的新植园,严格把控柑橘种苗的质量,加强对种苗柑橘黄龙病和病毒病的检测检疫,同时对果园不定期喷施杀虫杀菌药剂,加强柑橘不同生长时期木虱的防控力度,减少柑橘黄龙病的传播媒介;科学进行水肥管理,增强树势,提高树体的营养水平和自身抗病虫能力等。

综上所述,柑橘黄龙病和病毒病已经对海南省柑橘主产区澄迈县和琼中县的柑橘造成了严重的危害,发展和建立规范的无病种苗生产基地并加强柑橘种苗的检测检疫以及田间柑橘果园的栽培管理,

有助于海南省减轻柑橘黄龙病和柑橘病毒病的发生和危害。

参考文献

- [1] HALBERT S E, MANJUNATH K L. Asian citrus psyllid (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida [J]. Florida Entomologist, 2004, 87(3): 330–353.
- [2] GOTTFWALD T R. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing [J]. Annual Review of Phytopathology, 2010, 48: 119–139.
- [3] TEIXEIRA D C, AYRES J, KITAJIMA E W, et al. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State Brazil, and association of a new *Liberibacter* species, *Candidatus Liberibacter americanus*, with the disease [J]. Plant Disease, 2005, 89(1): 107.
- [4] COLETTA-FILHO H D, TARGON M L P N, TAKITA M A, et al. First report of the causal agent of Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil [J]. Plant Disease, 2004, 88: 1382.
- [5] HALL D G, RICHARDSON M L, AMMAR E D, et al. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus Huanglongbing disease [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2012, 146: 207–223.
- [6] 黄伟锋, 洪添胜, 吴伟斌, 等. 柑橘黄龙病检测方法研究进展 [J]. 广东农业科学, 2012, 39(16): 60–64.
- [7] 宋晓兵, 彭埃天, 陈霞, 等. 柑橘黄龙病病原培养及分子检测技术研究进展 [J]. 广东农业科学, 2013, 40(23): 65–69.

- [8] U. S. Department of Agriculture. Disease detection activities [EB/OL]. <http://www.rec.ri.cmu.edu/usda>, 2009–02–23/2010–11–16.
- [9] 程保平, 彭埃天, 宋晓兵, 等. 三种 PCR 方法检测柑橘黄龙病菌的效果比较 [J]. 植物保护, 2014, 40(5): 106–110.
- [10] JAGOUEIX S, BOVE J M, GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(3): 379–386.
- [11] LI Wenbin, HARTUNG J S, LEVY L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing [J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 66(1): 104–115.
- [12] 肖远辉, 曾继吾, 张秋明, 等. 柑橘衰退病、裂皮病和碎叶病的多重 RT-PCR 检测方法研究 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 31–35.
- [13] LOCONSOLE G, SALDARELLI P, DODDAPANENI H, et al. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family Geminiviridae [J]. Virology, 2012, 432(1): 162–172.
- [14] 陈洪明, 王雪峰, 周彦, 等. 尤力克柠檬上一种新病害的生物学特性及 RT-PCR 检测 [J]. 植物保护学报, 2015, 42(4): 557–563.
- [15] 钟利文. 海南的农业资源特点和热带农业发展道路选择 [J]. 农业现代化研究, 2009, 30(3): 306–309.
- [16] 刘晓妹, 张贺, 韦运谢, 等. 海南绿橙和福橙黄龙病巢式 PCR 检测分析 [J]. 中国植保导刊, 2014, 34(9): 5–8.
- [17] 吴海虹, 廖孝文, 项秋兰, 等. 海南琼中绿橙产业发展现状及对策 [J]. 中国园艺文摘, 2015, 31(3): 55–58.
- [18] 程春振, 曾继吾, 钟云, 等. 柑橘黄龙病研究进展 [J]. 园艺学报, 2013, 40(9): 1656–1668.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 215 页)

- [16] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, CHUKEATIROTE E, GUO Liangdong, et al. *Pestalotiopsis* species associated with *Camellia sinensis* (tea) [J]. Mycotaxon, 2013, 123: 47–61.
- [17] FUJIMURA M, KAMAKURA T, INOUE H. Amino-acid alterations in the β -tubulin gene of *Neurospora crassa* that confer resistance to carbendazim and diethofencarb [J]. Current Genetics, 1994, 25(5): 418–422.
- [18] SAJU K A, MECH S, DEKA T N, et al. *In vitro* evaluation of biocontrol agents, botanicals and fungicides against *Pestalotiopsis* sp. infecting large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) [J]. Journal of Spices & Aromatic Crops, 2011, 20(2), 89–92.
- [19] 杨紫红, 喻国辉, 陈远凤, 等. 棕榈科植物叶斑病病原菌的生物学特性及药剂筛选试验 [J]. 广东农业科学, 2008(6): 64–66.
- [20] 袁善奎, 周明国. 植物病原菌抗药性遗传研究 [J]. 植物病理学报, 2004, 34(4): 289–295.
- [21] OMATSU N, TOMIHAMA T, BUREAU O R P, et al. Oc-

currence of resistant strains of *Pestalotiopsis longiseta* (pathogen causing gray blight disease in tea plants) to benzimidazoles and strobilurins fungicides [J]. Japanese Journal of Phytopathology, 2012, 78(1): 3–9.

- [22] SIGLER W V, TURCO R F. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Applied Soil Ecology, 2002, 21(2): 107–118.
- [23] 毕秋艳, 马志强, 韩秀英, 等. 葡萄霜霉病菌对甲霜灵抗药性治理及其田间抗药菌株遗传稳定性分析 [J]. 植物病理学报, 2014, 44(3): 302–308.
- [24] SAILEROVA E, ZWIAZEK J J. Early effects of triadimefon on water relations, sterol composition and plasma membrane ATPase in white spruce (*Picea glauca*) seedlings [J]. Physiologia Plantarum, 1996, 97(4): 747–753.

(责任编辑: 杨明丽)