



广东梅州柑橘黄龙病和病毒病的发生调查及其黄龙病菌原噬菌体多样性

崔一平, 彭埃天, 宋晓兵, 程保平, 凌金锋, 陈霞

(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)

摘要: 【目的】调查柑橘黄龙病(Huanglongbing, HLB)和病毒病在广东省梅州市柑橘主产区的危害情况, 分析该地区柑橘黄龙病菌(CLAs)的原噬菌体多样性。【方法】以16S rDNA为模板设计引物, 利用实时荧光定量PCR(qPCR)检测梅州市不同抽检地在2017—2019年3年间柑橘黄龙病的发病情况; 同时分别采用已报道的柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)、柑橘裂皮病毒(*Citrus exocortis viroid*, CEVd)、柑橘褪绿矮缩病毒(*Citrus chlorotic dwarf-associated virus*, CCDaV)、柑橘碎叶病毒(*Citrus tatter leaf virus*, CTLV)和柑橘黄脉病毒(*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV)的特异性检测引物, 提取样品的RNA, 反转后以样品的cDNA为模板, 通过普通PCR的方法分析梅州市抽检地区柑橘病毒病的发生情况。此外, 以基于2种原噬菌体类型(SC1和SC2)对应的超变异基因区域设计的2对引物(Lap-TJ-F/Lap-TJ-R1和Lap-TJ-F/Lap-TJ-R2), 运用普通PCR方法分析该地区CLAs菌株原噬菌体的遗传多样性。【结果】除2018年9月梅州大埔顺兴公司蜜柚基地的抽检样品外, 梅州市其他被检地区均发现CLAs。总体来说, 梅州市的脐橙CLAs检出率为55.3%, 蜜柚为61.5%, 沙田柚为61.7%。其中2017年采集自平原县大拓镇的蜜柚和沙田柚样品CLAs检出率为100%, 兴宁市白马镇的蜜柚为100%, 沙田柚为80%; 其他抽检地区的样品CLAs检出率在16.7%—83.3%。虽然梅州市部分地区的检出率较高, 但其病原菌的含量并不高, 大部分处于柑橘黄龙病发病初、中期, 属可防可控阶段; 此外, 梅州市柑橘病毒病的总检出率不高, CTV、CTLV和CYVCV为梅州的主要病毒, CEVd和CCDaV没有检测到。CTV、CTLV和CYVCV在脐橙上的检出率依次为78.9%、7.9%和21.1%, 蜜柚为15.4%、25.0%和9.6%, 沙田柚为6.4%、2.1%和4.3%。基于Lap-TJ-F/Lap-TJ-R1和Lap-TJ-F/Lap-TJ-R2来研究CLAs原噬菌体多样性的PCR扩增条带共有4种类型(SC1-1、SC1-2、SC2-1和SC2-2), 经过PCR电泳和测序得出, 来自梅州市脐橙和沙田柚的CLAs菌株以SC2-1型为主, 蜜柚上以SC1-1型为主。【结论】梅州柑橘产区的柑橘黄龙病目前属于可防可控阶段, 其病原菌菌株的原噬菌体在不同品种上具有其独特性; 由于在抽检时发现柑橘病毒病存在, 因此在种植过程中需加强种苗监管, 同时应采取有效措施对柑橘黄龙病和柑橘木虱(*Diaphorina citri*)进行绿色防控。

关键词: 柑橘黄龙病; 韧皮部杆菌亚洲种; 柑橘病毒病; 原噬菌体; 遗传多样性

Investigation on Occurrence of Citrus Huanglongbing and Virus Diseases, and Prophage Genetic Diversity of Huanglongbing Pathogen in Meizhou, Guangdong

CUI YiPing, PENG AiTian, SONG XiaoBing, CHENG BaoPing, LING JinFeng, CHEN Xia

(Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640)

收稿日期: 2019-09-16; 接受日期: 2019-11-18

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201500, 2017YFD0202000)、科技创新战略专项资金(高水平农科院建设, R2018QD-059)、广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目(2019KJ108, 2018LM1077)、植物疫病防控省级项目(0835-190Z22803281)、梅州市政府购买服务合同项目(2018063001)

联系方式: 崔一平, E-mail: kktracy@163.com. 通信作者彭埃天, E-mail: pengait@163.com

Abstract: 【Objective】 The objective of this study is to investigate the impacts of citrus Huanglongbing (HLB) and virus diseases on citrus production in Meizhou City of Guangdong Province, and to reveal the local '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas, the pathogen of HLB in China) strains genetic diversity based on the prophage region. 【Method】 The primers were designed with 16S rDNA as the template, and the incidence of HLB in different sampling sites in Meizhou City in the 3 years from 2017 to 2019 was detected by qPCR. After RNA extraction, RT-PCR followed by ordinary PCR were applied to detect *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus chlorotic dwarf-associated virus* (CCDaV), Citrus tatter leaf virus (CTLV) and *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV) using their own reported primers, separately. Two pairs of primers (Lap-TJ-F/Lap-TJ-R1 and Lap-TJ-F/Lap-TJ-R2) were designed based on the supervariant gene regions corresponding to two prophage types (SC1 and SC2), and the genetic diversity of CLas prophage regions was analyzed using ordinary PCR method. 【Result】 The results of CLas detection showed that only the sample from one orchard (Honey pummelo base in Shunxing Company in Dapu County) in September, 2018 was free, other inspected areas in Meizhou all had CLas. Overall, the CLas detection rate of navel orange in Meizhou was 55.3%, the honey pummelo was 61.5%, and the Shatian pummelo was 61.7%. Among them, the CLas detection rate of honey pummelo and Shatian pummelo collected from Datuo Town, Pingyuan County in 2017 was 100%, the detection rate of honey pummelo and Shatian pummelo in Baima Town, Xingning City was 100% and 80%, respectively. The detection rate of samples in other sampling areas was 16.7%-83.3%. Although the detection rate in some areas of Meizhou was high, the content of pathogenic bacteria was not high, most of them were at the early and middle stages of HLB, which belonged to a preventable and controllable stage. In the same region, the total detection rate of citrus viruses in Meizhou City was not high. CTV, CTLV and CYVCV were the main viruses in Meizhou, CEVd and CCDaV were not detected. The detection rate of CTV, CTLV and CYVCV on navel orange was 78.9%, 7.9% and 21.1%, on honey pummelo was 15.4%, 25.0%, and 9.6%, on Shatian pummelo was 6.4%, 2.1%, and 4.3%, respectively. Through prophage genetic diversity analysis of CLas strains in Meizhou City, four CLas prophage amplicon types (SC1-1, SC1-2, SC2-1 and SC2-2) were observed in the CLas from all the tested samples, SC2-1 represented the predominant CLas type in navel orange and Shatian pummelo in Meizhou City, and SC1-1 was predominant in honey pummelo. 【Conclusion】 The citrus HLB in Meizhou citrus producing area is currently at a controllable stage. The prophage of its pathogenic CLas strain is unique in different varieties. Due to the existence of citrus virus diseases during spot inspection, seedling supervision needs to be strengthened during the planting process and effective measures should be taken to prevent and control HLB and *Diaphorina citri*.

Key words: citrus Huanglongbing; '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas); citrus virus disease; prophage; genetic diversity

0 引言

【研究意义】柑橘黄龙病 (Huanglongbing, HLB) 是世界性的柑橘病害, 有柑橘“癌症”之称, 目前没有发现有效的防治措施^[1-2]。HLB 可在柑橘上形成典型症状, 如叶片斑驳、褪绿均匀黄化或胶质化、叶脉粗大等, 这些发病症状极易与柑橘田间缺素症、病毒病及药/肥害等症状相混淆。HLB 主要由柑橘韧皮部细菌属 (*Candidatus Liberibacter*) 的 3 个种引起, 分别为亚洲种 ('*Ca. L. asiaticus*', CLas)、非洲种 ('*Ca. L. africanus*', CLaf) 和美洲种 ('*Ca. L. americanus*', CLam)^[3-4]。我国的 HLB 主要由 CLas 引起, 通过木虱或带病植物材料进行传播。目前该病原菌还不能被人工培养, 对研究该病原菌的形态和生理生化等方面造成了很大的障碍。梅州是广东省重要的柑橘产区, 柑橘 (包括柚、橙、柑、橘) 产业是其农业的支柱产业, 明确目前 HLB 在梅州市的危害情况并分析该地区 CLas 的原噬菌体多样性, 对于该病害的防控具有重要

意义。【前人研究进展】黄龙病菌基因组主要由染色体区域和原噬菌体区域两部分组成。染色体区域具有高度保守性, 但原噬菌体区域变化较大, 可以用于区分黄龙病菌的多样性^[5-6]。随着不同地区柑橘黄龙病菌基因组的揭示, 越来越多的研究者通过研究病原菌的遗传多样性对黄龙病菌的种群遗传结构及病害流行病学进行解析。过去对黄龙病菌遗传多样性的研究主要集中在 16S rDNA、16S/23S rDNA 基因间隔区、 β -操纵子以及外膜基因 *omp* 等区域, 但基于 16S rDNA、16S/23S rDNA 基因间隔区的 PCR-SSCP、PCR-RFLP 或 PCR-RFLP-SSCP 等分子标记技术均未发现黄龙病菌种内的明显分化现象^[7-9]。VILLECHANOUX 等首次利用黄龙病菌的 β -操纵子区域对日本、中国以及东南亚各国不同来源的 CLas 遗传多样性进行研究, 发现不同菌株间的同源性很高, 只存在少量核苷酸的变异^[10-13]; 黄永辉等^[14]利用黄龙病菌外膜蛋白 (outer membrane protein, OMP) 基因对来自广东省 7 个不同地区的 7 个菌株遗传多样性进行研究, 发现广东地区

黄龙病菌在 *omp* 水平上未见显著差异;董俊等^[15]利用 *M94319* 对采自湖南、江西、福建等地的黄龙病菌菌株进行遗传多样性分析,发现该基因也不能很好地反映不同菌株间的遗传多样性,仅能够反映黄龙病菌菌株的分化除了地域差异外还有寄主作物的不同;谭锦等^[16]利用黄龙病菌体内 2 种原噬菌体对应的超变异基因区域设计的 2 对引物,对中国不同柑橘产区的 224 个 CLas 菌株进行 PCR 检测和序列分析,发现 PCR 扩增的条带类型呈多态性,说明中国不同地理来源 CLas 菌株在原噬菌体区域具有较丰富的多态性,揭示了中国 CLas 种群的遗传多样性;XU 等^[17]利用 CLas 基因组中全套串联重复基因(short tandem repeat, STR)对中国福建、广西、云南、广东、江西、浙江的 32 个样品进行 PCR 扩增,PCR 产物表现出良好的多态性,同时发现广东省 CLas 具有一定的遗传特异性;黄爱军等^[18]利用对已知 23 个 SSR (simple sequence repeat) 位点筛选获得的 5 个 SSR 位点对中国境内 8 个不同地理来源的样品进行分析,获得很好的 CLas 遗传多态性;卢占军等^[19]利用筛选获得的 3 个位点(LasSSR-C、LasSSR-D、CWB44)对赣南 CLas 遗传多样性及各地种群结构进行分析获得了很好的结果。【本研究切入点】2017 年梅州市柑橘产业面积 4.83 万公顷, 占全省 1/6。梅州盛产沙田柚(金柚)和蜜柚,是著名的“金柚之乡”, 全国最大的柚类商品生产基地^[20], 主产区在梅县区和大

埔县。近年来,脐橙的种植面积也在逐年递加,全市橙子面积 0.35 万公顷,产量 7.41 万吨,主产区在平远县。2018 年梅县区金柚、大埔县蜜柚、平远县脐橙成功入选广东省现代农业产业园项目(材料来自梅州市农业局)^[21-22]。但近年来不断有关于梅州市柑橘主产区柑橘 HLB 发生的报道。【拟解决的关键问题】对梅州柑橘主产区 HLB 的发病情况进行调查和分析,同时对柑橘病毒病在该地区的危害程度进行抽检;并进一步对来自梅州市的不同柑橘 CLas 菌株原噬菌体超变异基因的遗传多样性进行研究,明确梅州市 CLas 的遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试植物材料分别于 2017—2019 年采自广东省梅州市平远县仁居镇和大拓镇,梅县区石扇镇、城东镇、雁洋镇和人民广场森林公园,大埔县大东镇、湖寮镇和百侯镇,兴宁市石马镇,均采用多点随机采样法。其中脐橙采自平远县仁居镇;沙田柚采自梅县区石扇镇和城东镇,梅州大浦顺兴公司蜜柚基地,平远县大拓镇和兴宁市白马镇;蜜柚采自梅县区石扇镇、雁洋镇和人民广场森林公园,大埔县湖寮镇、百侯镇和梅州大浦顺兴公司蜜柚基地,平远县大拓镇和兴宁市白马镇。采集地的种植年限不一,管理水平也不同,部分采集地信息见表 1。

表 1 部分采集地的详细信息
Table 1 The detailed message of part of sample locations

采集地 Location	品种 Variety	种植年限 Crop years (a)	面积 Area (hm ²)
平远县 Pingyuan County	仁居镇飞龙村 Feilong Village, Renju Town	脐橙 Navel orange	>2 100
	仁居镇六吉村 Liuji Village, Renju Town		>1 100
梅县区 Meixian District	石扇镇西南村 Xi'nan Village, Shishan Town	蜜柚 Honey pummelo	>20 100
	人民广场森林公园 People's Square Forest Park		>5 >10
	石扇镇西南村 Xi'nan Village, Shishan Town	沙田柚 Shatian pummelo	>2 300
	城东镇玉水村 Yushui Village, Chengdong Town		>25 >10
大埔县 Dapu County	大东镇东光村 Dongguang Village, Dadong Town		>9 1000

1.2 方法

1.2.1 植物 DNA 和 RNA 的提取、质量检测及 RNA 的反转录 植物 DNA 和 RNA 的提取:每份 DNA 和 RNA 样品均采集 3 个柑橘叶片的中脉或柑橘果实的果皮;先用刀片把材料切碎,而后用液氮快速将样品磨成粉

末,依次类推。每个样品单独用一副手套、一个研钵和研磨棒(使用前需对研钵和研磨棒进行高温灭菌处理)。DNA 的提取严格按照试剂盒(爱思进动植物基因组 DNA 制备试剂盒,AXYGEN,美国)说明书进行,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 (DP441, RNAprep Pure Plant Plus Kit), 具体操作详见试剂盒说明书。

DNA 和 RNA 的质量检测: 取 2 μL 样品在超微量紫外/可见分光光度计 (Nano-100) 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 CLas 的分子检测 采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法对柑橘叶片和果实中的 CLas 进行检测, 检测仪器为 ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。同时以 CLas 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^[23]。HLBas: 5'-TCGAGCGCGTATGCAATACG-3', HLBBr: 5'-GCG TTATCCCGTAGA AA AAGGTAG-3', 利用探针 HLBp: 5-6-carboxy-fluorescein (FAM)- AGAC GGGTGAGTA ACGCG-Black Hole Quencher (BHQ) -1-3 对样品进行检测。所用试剂为购自 TaKaRa 公司的 Premix Ex Taq (Probe qPCR) (宝日医生物技术有限公司, 大连), 所用引物和探针均合成于上海生工生物工程股份有限公司。qPCR 体系 (25 μL): 12 μL Premix Ex Taq (Probe qPCR), 0.5 μL HLBas/HLBr, 1 μL HLBp, 1 μL DNA (50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 10 μL ddH₂O。具体程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ /30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ /5 s - 60 $^{\circ}\text{C}$ /30 s, 40 个循环。程序运行结束后, 读取 Ct 值, 以备后续分析。利用标准品制作的 Ct 值与菌含量的关系式为: $y=-0.286x+11.924$, 其中 x 为 Ct 值, y 为拷贝数, 每克中含有的病原菌个数为 10^y 。

普通 PCR: 根据 CLas 的 16S rDNA 设计引物 OI1 (5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3'), OI2c (3'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-5') 扩增目的 DNA 样品^[24]。PCR 体系: 10 μL Premix Ex Taq, 0.5 μL OI1/0.5 μL OI2c, 1 μL gDNA, 8 μL ddH₂O; 具体程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ /45 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ /5 s - 52 $^{\circ}\text{C}$ /45 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ /10 min; 16 $^{\circ}\text{C}$ forever。程序结束后进行电泳检测, DNA Marker 为购自北京全式金生物技术有限公司的 Trans2K DNA Marker, 通过条带的大小确认样品中是否存在 CLas。

1.2.3 柑橘病毒的检测 采用普通 PCR 方法对柑橘样品中的柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV)、柑橘裂皮病毒 (*Citrus exocortis viroid*, CEVd)、柑橘褪绿矮缩病毒 (*Citrus chlorotic dwarf-associated virus*, CCDaV)、柑橘碎叶病毒 (*Citrus tatter leaf virus*,

CTLV) 和柑橘黄脉病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV) 进行检测。所用引物主要选用已报道的检测引物, 模板为已反转的 cDNA。PCR 体系: 10 μL Premix Ex Taq, 0.5 μL primer F/R, 1—2 μL cDNA, ddH₂O 补足 20 μL ; 具体程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ /45 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ /5 s - 54 $^{\circ}\text{C}$ /45 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ /10 min; 16 $^{\circ}\text{C}$ forever。程序结束进行电泳检测, 通过扩增片段的大小确认材料中是否含有被检的柑橘病毒。

1.2.4 CLas 菌株原噬菌体超变异基因遗传多样性的检测 主要基于 2 种原噬菌体类型 (SC1 和 SC2) 对应的超变异基因区域设计 2 对引物 (Lap-TJ-F/Lap-TJ-R1 和 Lap-TJ-F/Lap-TJ-R2), 通过 PCR 方法, 对采自梅州的 14 个代表菌株进行 CLas 原噬菌体超变异基因遗传多样性的研究^[14]。PCR 扩增体系: 10 μL Premix Ex Taq, 0.5 μL primer F/R, 1—2 μL cDNA, ddH₂O 补足 20 μL ; 具体程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ /45 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ /5 s - 55 $^{\circ}\text{C}$ /2 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ /10 min; 16 $^{\circ}\text{C}$ forever。程序结束进行电泳检测, 并对检测到的条带进行测序和比对分析。

1.2.5 CLas 菌株原噬菌体超变异基因遗传多样性的序列分析 利用 DNSTAR Lasergene EditSeq 读取所有的测序序列, 并分别在 NCBI 进行 BLAST, 选取亲缘关系较近的序列; 然后利用 MEGA7.0.18 对所有序列进行序列比对和系统进化分析。进化分析 Joining method 做 Bootstrap 验证 (重复 1 000 次) 构建系统发育进化树^[25]。

2 结果

2.1 梅州市 CLas 的检测

2017—2019 年在梅州市进行柑橘病害的调研和取样共 5 次。采集的柑橘品种包括脐橙、沙田柚和蜜柚; 采集地区包括平原县、梅县区、大埔县和兴宁市, 共计 4 个市 (县) 11 个村镇 137 个样品。通过 qPCR 方法对这些地区的柑橘黄龙病发生情况进行检测, 结果显示除 2018 年 9 月份采集自大埔顺兴公司蜜柚基地的 10 个样品没有检测到 CLas 外, 其他地区均能够检测到 CLas。其中平远县仁居镇六吉村 (采样时间: 2019 年, 检出率: 30.0%)、大埔县大东镇东光村 (2019 年, 60.0%)、平远县仁居镇李氏家庭农场 (2018 年, 83.3%)、梅县区雁洋镇南福村 (2018 年, 16.7%)、大埔县湖寮镇双髻山 (2018 年, 80.0%)、大埔县百侯镇新乐村 (2018 年, 60.0%)、兴宁市白马镇沙田柚 (2017 年, 80.0%) 的 CLas 虽然在检出率上存在很

大差异,但都仍处于发病初期,含菌量为 42—1 700 copies/g。而采集自其他地区和果园的样品中,如平远县仁居镇飞龙村、梅县区石扇镇西南村、梅县城区东镇玉水村、梅县区人民广场森林公园和平远县仁居镇李氏家庭农场脐橙中也仅各有 1 个样品的 Ct 值在 21—22,说明这些果园整体也处于发病的初期;但个别树体的柑橘黄龙病已经发展到了很严重的阶段,对树体的正常发育和产量已经形成了严重的影响,为了整

个果园的安全生产,需要进行彻底的挖树和消毒处理。2017 年采集自兴宁市白马镇的蜜柚、平远县大拓镇的蜜柚和沙田柚样品,CLas 的检出率都达到了 100%,且多个树体的含菌量达到了 1×10^6 copies/g 以上,说明在这些地区被检果园中单个树体柑橘黄龙病已经到了发病后期。另外,在梅州市,CLas 在脐橙、蜜柚和沙田柚的检出率几乎相同,说明这 3 个品种对柑橘黄龙病的抗(耐)性无明显差异(表 2)。

表 2 梅州市柑橘主产区黄龙病菌的检测

Table 2 Detection of CLas in main citrus producing areas in Meizhou City

采样时间 Sampling time	采集地 Location (Village/Town/County)	品种 Variety	样品数(个) Number	检出率 Detection rate (%)	含菌量 HLB content ($\times 10^3$ copies/g)	Ct 范围 Ct range
2019-06	平远县仁居镇飞龙村 Feilong/Renju/Pingyuan	脐橙 Navel orange	11	63.6	0.069-735	21.18-35.27
	平远县仁居镇六吉村 Liuji/Renju/Pingyuan		10	30.0	0.078-0.123	34.39-35.08
	梅县区石扇镇西南村 Xi'nan/Shishan/Meixian	蜜柚 Honey pummelo	10	70.0	0.14-393	22.13-34.19
	梅县区人民广场森林公园 People's Square Forest Park in Meixian District		12	66.7	0.073-277	22.66-35.17
	梅县区石扇镇西南村 Xi'nan/Shishan/Meixian	沙田柚 Shatian pummelo	10	60.0	0.073-576	21.55-35.18
	梅县城区东镇玉水村 Yushui/Chengdong/Meixian		10	80.0	0.072-856	20.95-35.20
	大埔县大东镇东光村 Dongguang/Dadong/Dapu		15	60.0	0.069-1.02	31.18-35.27
	平远县仁居镇李氏家庭农场 Family Farm of Li/Renju Town/Pingyuan County	脐橙* Navel orange	11	54.5	0.072-49.7	25.27-35.19
	梅县区雁洋镇南福村 Nanfu/ Yanyang/Meixian	蜜柚 Honey pummelo	6	83.3	0.071-0.76	31.62-35.22
	大埔县湖寮镇双髻山 Shuangji/Huliao/Dapu		6	16.7	0.059	35.50
2018-01	大埔县百侯镇新乐村 Xinle/Baihou/Dapu		5	80.0	0.042-0.31	32.98-36.02
	大埔县百侯镇新乐村 Xinle/Baihou/Dapu		5	60.0	0.135-1.7	30.43-34.24
	大埔顺兴公司蜜柚基地 Honey pummelo base in Shunxing Company in Dapu County	沙田柚 Shatian pummelo	5	0	0	0
	兴宁市白马镇 Baima/Xingning	蜜柚 Honey pummelo	6	100.0	0.199-1036	20.66-32.26
2017-07		沙田柚 Shatianpummelo	5	80.0	0.052-0.683	31.78-35.68
	平远县大拓镇 Datuo/Pingyuan	蜜柚 Honey pummelo	3	100.0	0.232-1106	20.56-33.42
2017-08		沙田柚 Shatian pummelo	2	100.0	0.18-1742	19.87-33.81
	梅州市 Meizhou City	脐橙 Navel orange	38	55.3	0.069-735	21.18-35.27
2017-2019		蜜柚 Honey pummelo	52	61.5	0.042-1106	20.56-36.02
		沙田柚 Shatian pummelo	47	61.7	0.052-1742	19.87-35.68

*: 田间已结果的大树 A big tree that has borne fruit in the field; *: 复种一年内的无毒柑橘树苗 Non-toxic citrus seedling within one year after replanting。
表 3 同 The same as Table 3

2.2 梅州市柑橘病毒的检测

由于在田间症状上柑橘黄龙病极易于柑橘病毒病混淆，本研究特别对我国已报道的 5 种常见柑橘病毒病在梅州市柑橘主产区的发生情况进行了调研和检测，主要包括柑橘衰退病、柑橘裂皮病、柑橘褪绿矮缩病、柑橘碎叶病和柑橘黄脉病^[26-28]。结果显示，在采集自梅州市的柑橘样品中没有发现 CEVd 和 CCDaV 的存在，同时 CTV 的检出率最高（脐橙 78.9%，蜜柚 15.4%，沙田柚 6.4%），其次是 CTLV（脐橙 7.9%，

蜜柚 25.0%，沙田柚 2.1%）和 CYVCV（脐橙 21.1%，蜜柚 9.6%，沙田柚 4.3%），被检病毒在沙田柚上的检出率最低。

在被抽检的地区中，采集自梅县区人民广场森林公园、梅县区石扇镇西南村、梅县城区东镇玉水村、大埔县大东镇东光村、大浦顺兴公司蜜柚基地沙田柚的样品中没有发现 5 种被检病毒的存在；采集自平远县大拓镇的沙田柚样品和平远县仁居镇李氏家庭农场的脐橙样品中，均能够检测到 CTV、CTLV 和 CYVCV。

表 3 梅州市柑橘主产区柑橘病毒检测

Table 3 Detection of citrus viruses in main citrus producing areas in Meizhou City

采集地 Location (Village/Town/County)	品种 Variety	样品数（个） Number	检出率 Detection rate (%)				
			CTV	CEVd	CCDaV	CTLV	CYVCV
平远县仁居镇飞龙村 Feilong/Renju/Pingyuan	脐橙 Navel orange	11	100.0	0	0	0	0
平远县仁居镇六吉村 Liuji/Renju/Pingyuan		10	50.0	0	0	0	0
梅县区石扇镇西南村 Xi'nan/Shishan/Meixian	蜜柚 Honey pummelo	10	50.0	0	0	0	0
梅县区人民广场森林公园 People's Square Forest Park in Meixian County		10	0	0	0	0	0
梅县区石扇镇西南村 Xi'nan/Shishan/Meixian	沙田柚 Shatian pummelo	12	0	0	0	0	0
梅县城区东镇玉水村 Yushui/Chengdong/Meixian		10	0	0	0	0	0
大埔县大东镇东光村 Dongguang/Dadong/Dapu		15	0	0	0	0	0
平远县仁居镇李氏家庭农场 Family Farm of LI, Renju Town, Pingyuan County	脐橙× Navel orange 脐橙* Navel orange	11 6	81.8 83.3	0 0	0 0	9.1 33.3	72.7 0
梅县区雁洋镇南福村 Nanfu/Yanyang/Meixian	蜜柚 Honey pummelo	6	0	0	0	50	0
大埔县湖寮镇双髻山 Shuangji/Huliao/Dapu		5	0	0	0	100	0
大埔县百侯镇新乐村 Xinle/Baihou/Dapu		5	0	0	0	60	0
大浦顺兴公司蜜柚基地 Honey pummelo base in Shunxing Company in Dapu County		5	0	0	0	20	40
	沙田柚 Shatian pummelo	5	0	0	0	0	0
平远县大拓镇 Datuo/Pingyuan	蜜柚 Honey pummelo	3	100.0	0	0	0	100.0
	沙田柚 Shatian pummelo	2	100.0	0	0	50.0	100.0
兴宁市白马镇 Baima/Xingning	蜜柚 Honey pummelo	6	0	0	0	20.0	0
	沙田柚 Shatian pummelo	5	10.0	0	0	0	0
梅州市 Meizhou City	脐橙 Navel orange	38	78.9	0	0	7.9	21.1
	蜜柚 Honey pummelo	52	15.4	0	0	25.0	9.6
	沙田柚 Shatian pummelo	47	6.4	0	0	2.1	4.3

2.3 梅州市 CLas 菌株原噬菌体超变异基因遗传多样性

对随机抽取来自梅州市的 14 个样品和来自广州市白云区的 3 个样品,通过 qPCR 和普通 PCR 分别进行 CLas 检测,结果显示 qPCR 的结果较普通 PCR 的结果更准确,当被检测样品的 Ct 值>31.18 时,普通 PCR 已经不能检测出样品中含有 CLas (表 4、图 1);同时发现来自平远县仁居镇的脐橙 R4 不含 CLas,为健康的柑橘材料。采用谭锦等^[16]报道的研究中国 CLas 2 个原噬菌体超变异基因遗传多样性的引物 (Lap-TJ-F/Lap-TJ-R1、Lap-TJ-F/Lap-TJ-R2) 进行 PCR 扩增,并对其中随机抽取的 5 个菌株 (Z3、R1、SM1、S1、G1) 进行测序,具体结果见表 4。Lap-TJ-F/Lap-TJ-R1

扩增梅州地区的 CLas 菌株得到的条带较多,且都集中在 2 kb 以下;根据文献[17],1 677 bp 左右的条带为其主要条带,命名为 SC1-1;1 149—1 812 bp 的条带命名为 SC1-2。结果显示仅 SM1 和 SM2 具有 SC1-1, C2 具有 SC1-2。

Lap-TJ-F/Lap-TJ -R2 扩增获得的 1 456 和 846 bp 2 种大小不同的基因序列,分别对应的电泳条带被命名为 SC2-1 和 SC2-2。结果表明,D2 没有扩增出有效条带;除 SM1、SM2 和 C2 外,被抽查的梅州地区的 CLas 菌株均具有 SC2-1;来自广州市白云区的蜜柚品种也具有 SC2-1;在被抽检的梅州地区样品中未检测到含有 SC2-2 (图 1)。没有发现 CLas 菌株同时具有 SC1 和 SC2。

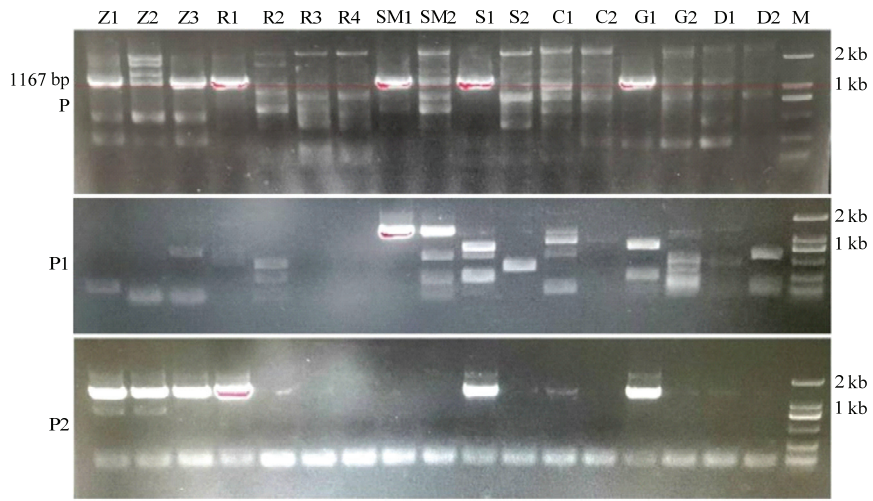
表 4 部分来自梅州的 CLas 菌株信息及扩增类型
Table 4 Sample information and amplicon types of partial CLas strains from Meizhou City

采集地 Location	品种 Variety	样品 Sample	Ct-value	CLas		扩增类型 Amplified type
				qPCR	Ordinary PCR	
广州市白云区钟落潭镇 Zhongluotan Town, Baiyun District, Guangzhou City	砂糖橘 Sugar orange	Z1	22.08	A+	A+	SC2-1 (2)
	默克特 Murcott	Z2	25.89	A+	A+	SC2-1(2)
	蜜柚 Honey pummelo	Z3	22.08	A+	A+	SC2-1
平远县仁居镇 Renju Town, Pingyuan County	脐橙 Navel orange	R1	21.18	A+	A+	SC2-1
		R2	35.20	A+	A-	SC2-1
		R3	34.80	A+	A-	SC2-1
		R4	N	A-	A-	-
梅县区石扇镇 Shishan Town, Meixian District	蜜柚 Honey pummelo	SM1	22.13	A+	A+	SC1-1
		SM2	32.69	A+	A-	SC1-1
	沙田柚 Shatian pummelo	S1	21.55	A+	A+	SC2-1
		S2	33.96	A+	A-	SC2-1
梅县区城城镇 Chengdong Town, Meixian District	沙田柚 Shatian pummelo	C1	31.68	A+	A-	SC2-1
		C2	34.06	A+	A-	SC1-2
梅县区人民广场森林公园 People's Square Forest Park in Meixian District	蜜柚 Honey pummelo	G1	22.66	A+	A+	SC2-1
		G2	34.60	A+	A-	SC2-1
大埔县大东镇 Dadong Town, Dapu County	蜜柚 Honey pummelo	D1	31.18	A+	A-	SC2-1
		D2	34.92	A+	A-	-

2.4 系统进化分析

来自 Z3、R1、S1 和 G1 的 SC2-1, SM1 的 SC1-1 经过测序以及在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上进行 Blast 后,通过 MEGA7 软件进行多序列比对 (图 2)。结果显示这些序列的结构与谭锦等^[16]报道的大致相同,但在不同菌株的同一片段上存在个

别碱基的不同或缺失;进化树结果显示,不同菌株间同源性差异较大,且与已报道的来自福建、广西、江西、云南等地菌株中的相关原噬菌体序列 SC1 和 SC2 的同源性较差,独立成为一簇。由图 2 可以看出,这些菌株间的同源性不仅与品种无关,与小范围的地理位置也无关。



P: OI1/OI2c; P1: Lap-TJ-F/Lap-TJ-R1; P2: Lap-TJ-F/Lap-TJ-R2; M: Trans2K DNA Marker; Z1-D2: 不同菌株 Different strains

图 1 选取的典型梅州 CLas 菌株 3 个基因区域的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis profile of representative Meizhou citrus CLas strains from PCR amplification with three primer sets targeting three gene regions

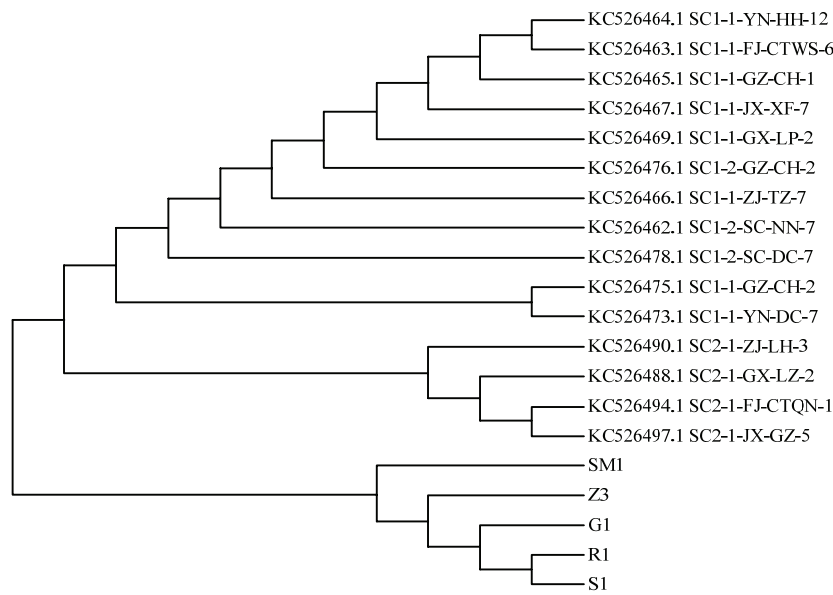


图 2 邻接法构建原噬菌体基因序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of prophage gene sequences constructed by neighbor-joining method

3 讨论

梅州市是广东省重要的柑橘生产基地，本研究通过 qPCR 方法更精确地反映了梅州市不同柑橘产区的黄龙病发病（潜伏）情况，结果表明柑橘不同品种间

黄龙病发病率无明显差异。以 16S rDNA 为模板设计的引物，通过 qPCR 方法进行 CLas 检测的结果，同时结合田间柑橘树的生长状况和产量，笔者研究室把 Ct 值 ≥ 37 划分为健康苗木，Ct 值介于 30—37 为柑橘黄龙病的发病初期（轻病期），Ct 值介于 25—30 为柑

橘黄龙病发病的中病期, Ct 值 <25 为柑橘黄龙病发病的后期(待发表)。从 2017—2019 年对梅州市不同地区、不同果园的检测情况来看, 除大浦顺兴公司的柑橘种植基地没有检出 CLas 外, 其他果园均不同程度地检出了 CLas, 平远县大拓镇、兴宁市白马镇和梅县区城东镇玉水村的橘园已经发展到了柑橘黄龙病的后期, 需要进行挖树, 彻底消毒和复种无毒种苗或改种其他作物; 其他果园除个别果树比较严重, 需要做特殊的处理(挖除)外, 加强果园的防虫和栽培管理, 可维持树体的健康和产量, 具体措施参见崔一平等^[29]。近年来对柑橘木虱(*Diaphorina citri*)的绿色防控研究取得了较大进展, 如以天敌(亮腹釉小蜂、阿里食虱跳小蜂、瓢虫、草蛉、蜘蛛和蚂蚁)、昆虫病原真菌(球孢白僵菌、绿僵菌和玫烟色棒束孢等)和来自印楝的印楝素等植物源农药为主的生物防治技术和以灯光、色板诱捕、反光膜驱避、防虫网阻隔为主的物理防治技术等取得了很好的防治效果^[30]。但在实际生产中柑橘木虱绿色防控技术的集成应用却很少, 主要是上述措施在都存在一定的技术瓶颈有待突破。

值得注意的是, 平远县仁居镇李氏脐橙家庭农场复种的脐橙小苗, 在种植不到一年的时候进行抽检发现, CLas 检出率为 83.3%, 含菌量为 71—760 copies/g, CTLV 检出率为 33.3%。种植者在购买无毒种苗时应从正规厂家购买, 确保种植的种苗确实是健康的。而像大浦顺兴公司蜜柚基地这种没有检出 CLas, 但有 CTLV 和 CYVCV 的果园, 则应继续加强栽培管理, 做好防虫防病工作。梅州市总的柑橘病毒检出率并不高, 仅脐橙的 CTV 检出率较高, 为 78.9%, 说明梅州市在过去种苗质量的控制上把关较严。同时发现沙田柚比脐橙和蜜柚对衰退病、碎叶病和黄脉病有更好的耐病性, 检出率均低于 10%。

通过对 CLas 两个噬菌体超变异基因多样性的研究, 梅州柑橘主产区的 CLas 虽然大部分都含有 SC2-1, 但它们在核酸序列的多个碱基位点上都存在变异或缺失。梅县区石扇镇的蜜柚 SM1、SM2 和梅县区城东镇的沙田柚 C2 则分别含有 SC1-1 和 SC1-2。广东省梅州市柑橘主产区的 CLas 菌株自成一簇且相对单一和保守, 与已报道的其他地区的 CLas 菌株同源性较差。

谭锦等^[16]研究表明, 来自广东四会的砂糖橘含有 SC2-1 和 SC1-2。为了进一步研究地域是否影响 CLas 菌株的进化, 本研究对来自广州市白云区钟落潭镇的砂糖橘、默克特与蜜柚的 CLas 菌株进行了分析, 发

现来自砂糖橘和默科特的 CLas 菌株都含有 SC2-1 和 SC2-2, 而来自蜜柚的菌株仅含有 SC2-1。通过对来自梅州主产区和广州市白云区的 CLas 菌株进行分析, 发现在这些地区 CLas 的进化与柑橘品种、小范围内的地域关系都不大; 同时发现 CLas 菌株的进化速度很快, 在同一地域的同一果园内存在不同的 CLas 株系, CLas 具体的进化机制仍需要进一步的研究。

4 结论

广东省梅州市主要柑橘产区的柑橘黄龙病目前属于发病初、中期, 为可防可控阶段, 应采取有效措施对柑橘黄龙病和柑橘木虱进行绿色防控。同时梅州市 CLas 菌株的原噬菌体在不同品种上具有其独特性, 其进化与柑橘品种、小范围内的地域关系都不大。该地区柑橘病毒的检出率并不高, 但病毒病的存在仍然能够对树体的生长发育造成严重的影响, 因此建议在种植过程中加强种苗监管, 从源头上减少柑橘病毒对树苗的侵染。

References

- [1] BLAUSTEIN R A, LORCA G L, TEPLITSKI M. Challenges for managing *Candidatus Liberibacter* spp. (Huanglongbing disease pathogen): Current control measures and future directions. *Phytopathology*, 2018, 108(4): 424-435.
- [2] DA GRACA J V, DOUHAN G W, HALBERT S E, KEREMANE M L, LEE R F, VIDALAKIS G, ZHAO H W. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(4): 373-387.
- [3] JAGOUEIX S, BOVE J M, GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(3): 379-386.
- [4] DO CARMO TEIXEIRA D, SAILLARD C, EVEILLARD S, DANET J L, DA COSTA P I, AYRES A J, BOVÉ J. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus Huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(5): 1857-1862.
- [5] DUAN Y P, ZHOU L J, HALL D G, LI W, DODDAPANENI H, LIN H, LIU L, VAHLING C M, GABRIEL D W, WILLIAMS K P, DICKERMAN A, SUN Y, GOTTFWALD T. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(8): 1011-1020.

- [6] 陈燕玲, 郑正, 许美容, 邓晓玲. 杂柑‘W·默科特’黄龙病菌分子鉴定和遗传多样性分析. 园艺学报, 2019, 46(6): 1155-1162.
- CHEN Y L, ZHENG Z, XU M R, DENG X L. Molecular identification and genetic diversity of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in W. Murcott tangerine. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(6): 1155-1162. (in Chinese)
- [7] 丁芳, 洪霓, 钟云, 易干军, 王国平. 中国柑橘黄龙病病原 16S rDNA 序列研究. 园艺学报, 2008, 35(5): 649-654.
- DING F, HONG N, ZHONG Y, YI G J, WANG G P. Studies on 16S rDNA sequence of citrus Huanglongbing bacteria in China. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(5): 649-654. (in Chinese)
- [8] TOMIMURA K, MIYATA S, FURUYA N, KUBOTA K, OKUDA M, SUBANDIYAH S, HUNG T H, SU H J, IWANAMI T. Evaluation of genetic diversity among ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates collected in Southeast Asia. *Phytopathology*, 2009, 99(9): 1062-1069.
- [9] 姚锦爱, 谢荔岩, 郑璐平, 胡奇勇. 柑桔黄龙病亚洲种病原 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) 16S rDNA 的 PCR-SSCP 分析. 福建农业学报, 2008, 23(3): 331-333.
- YAO J A, XIE L Y, ZHENG L P, HU Q Y. PCR-SSCP analysis on 16S rDNA of citrus Huanglongbing pathogen (*Candidatus Liberibacter asiaticus*). *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2008, 23(3): 331-333. (in Chinese)
- [10] VILLECHANOUX S, GARNIER M, LAIGRET F, RENAUDIN J, BOVÉ J M. The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the *nusG-rplKAL-rpoBC* gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase. *Current Microbiology*, 1993, 26(3): 161-166.
- [11] OKUDA M, MATSUMOTO M, TANAKA Y, SUBANDIYAH S, IWANAMI T. Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKAL-rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. *Plant Disease*, 2005, 89(7): 705-711.
- [12] TEIXEIRA D C, EVEILLARD S, SIRAND-PUGNET P, WULFF A, SAILLARD C, AYRES A J, BOVÉ J M. The *tufB-secE-nusG-rplKAL-rpoB* gene cluster of the liberibacters: Sequence comparisons, phylogeny and speciation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(6): 1414-1421.
- [13] PLOTTO A, BALDWIN E, MCCOLLUM G, MANTHEY J, NARCISO J, IREY M. Effect of *Liberibacter* infection (Huanglongbing or “greening” disease) of citrus on orange juice flavor quality by sensory evaluation. *Journal of Food Science*, 2010, 75(4): S220-S230.
- [14] 黄永辉, 程保平, 彭埃天, 宋晓兵, 凌金锋, 陈霞. 广东不同地区柑橘黄龙病菌的遗传多样性分析. 植物保护, 2014, 40(1): 60-64.
- HUANG Y H, CHENG B P, PENG A T, SONG X B, LING J F, CHEN X. Genetic diversity of *Candidatus liberibacter* isolates from different geographical regions of Guangdong Province. *Plant Protection*, 2014, 40(1): 60-64. (in Chinese)
- [15] 董俊, 戴良英, 易图永. 湖南省柑橘黄龙病菌 *M94319* 和 16S rDNA 序列的扩增和分析. 湖南农业科学, 2015(8): 1-3, 7.
- DONG J, DAI L Y, YI T Y. Amplification and analysis of *M94319* and 16S rDNA sequence of citrus Huanglongbing in Hunan. *Hunan Agricultural Sciences*, 2015(8): 1-3, 7. (in Chinese)
- [16] 谭锦, 王雪峰, 苏华楠, 李中安, 周常勇. 中国柑橘黄龙病病原菌两个原噬菌体超变异基因遗传多样性. 中国农业科学, 2013, 46(18): 3784-3792.
- TAN J, WANG X F, SU H N, LI Z G, ZHOU C Y. Genetic diversity of two hypervariable genes from prophage regions of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(18): 3784-3792. (in Chinese)
- [17] XU M R, ZHENG Z, LI X Y, HONG H X, DENG X L. Intraspecific genetic diversity analysis of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ by short tandem repeats and PAGE. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2014, 44(6): 609-619.
- [18] 黄爱军, 苏华楠, 王雪峰, 唐科志, 李中安, 周常勇. 基于 SSR 标记的中国亚洲韧皮杆菌种群结构研究. 中国农业科学, 2014, 47(22): 4488-4494.
- HUANG A J, SU H N, WANG X F, TANG K Z, LI Z G, ZHOU C Y. Population structure of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in China revealed by SSR markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(22): 4488-4494. (in Chinese)
- [19] 卢占军, 刘映雪, 丁鹏, 赵培娅, 黄爱军, 苏华楠, 钟八莲. 基于 SSR 标记的赣南柑桔黄龙病菌遗传多样性分析. 中国南方果树, 2016, 45(5): 1-6.
- LU Z J, LIU Y X, DING P, ZHAO P Y, HUANG A J, SU H N, ZHONG B L. Genetic diversity of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Gannan using SSR markers. *South China Fruits*, 2016, 45(5): 1-6. (in Chinese)
- [20] 李国华, 谢岳昌, 孙中兴, 徐秋明. 梅州市柑桔产业现状及发展对策. 广东农业科学, 2010(9): 244-246.
- LI G H, XIE Y C, SUN Z X, XU Q M. The present situation of citrus industry in Meizhou and its development countermeasures. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2010(9): 244-246. (in Chinese)
- [21] 沈兆敏. 2012 年我国柑橘生产现状浅析及持续发展对策. 果农之友, 2013(10): 38-39, 41.
- SHEN Z M. Analysis on the present situation of Chinese citrus production in 2012 and its sustainable development countermeasures.

- Fruit Growers' Friend*, 2013(10): 38-39, 41. (in Chinese)
- [22] 李月, 张志标, 钟进良, 黄静, 杜小珍, 张雄基, 刘蕊, 温清英, 马瑞丰. 梅州柚产业现状及发展对策. *现代农业科技*, 2019(3): 75-76, 78.
- LI Y, ZHANG Z B, ZHONG J L, HUANG J, DU X Z, ZHANG X J, LIU R, WEN Q Y, MA R F. Current status of Meizhou pummelo industry and its development countermeasures. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2019(3): 75-76, 78. (in Chinese)
- [23] LI W, HARTUNG J S, LEVY L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66(1): 104-115.
- [24] HOCQUELLET A, TOORAWA P, BOVÉ J M, GARNIER M. Detection and identification of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. *Molecular and Cellular Probes*, 1999, 13: 373-379.
- [25] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [26] 肖远辉, 曾继吾, 张秋明, 周碧容. 柑橘衰退病、裂皮病和碎叶病的多重 RT-PCR 检测方法研究. *植物病理学报*, 2007, 37(1): 31-35.
- XIAO Y H, ZENG J W, ZHANG Q M, ZHOU B R. Simultaneous detection of *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and Citrus tatter leaf virus (CTLV) by multiplex RT-PCR. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 37(1): 31-35. (in Chinese)
- [27] LOCONSOLE G, SILDARELLI P, DODDAPANENI H, SAVINO V, MARTELLI G P, SAPONARI M. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family *Geminiviridae*. *Virology*, 2012, 432(1): 162-172.
- [28] 陈洪明, 王雪峰, 周彦, 周常勇, 郭俊, 李中安. 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*, 2015, 42(4): 557-563.
- CHEN H M, WANG X F, ZHOU Y, ZHOU C Y, GUO J, LI Z G. Biological characterization and RT-PCR detection of a new disease of Eureka lemon. *Journal of Plant Protection*, 2015, 42(4): 557-563. (in Chinese)
- [29] 崔一平, 彭埃天, 李子力, 凌金峰, 宋晓兵, 郭泽成, 陈霞, 程保平, 殷瑜. 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. *植物保护*, 2019, 45(4): 236-242.
- CUI Y P, PENG A T, LI Z L, LING J F, SONG X B, GUO Z C, CHEN X, CHENG B P, YIN Y. Survey on HLB and virus disease of main citrus production area in Hainan Province. *Plant Protection*, 2019, 45(4): 236-242. (in Chinese)
- [30] 桑文, 刘燕梅, 邱宝利. 柑橘木虱绿色防控技术研究进展. *应用昆虫学报*, 2018, 55(4): 557-564.
- SANG W, LIU Y M, QIU B L. Advance in the eco-friendly management of *Diaphorina citri*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2018, 55(4): 557-564. (in Chinese)

(责任编辑 岳梅)