

# 柑桔碎叶病的检测及其防治\*

刘科宏<sup>1,2</sup> 周常勇<sup>1,2</sup> 卢志红<sup>2</sup>

(1 西南大学植物保护学院 重庆 400712; 2 中国农业科学院柑桔研究所)

**摘要:** 阐述了柑桔碎叶病在田间的表现症状以及利用生物学、血清学和分子生物学技术检测该病的方法; 简要介绍了该病的防治措施。

**关键词:** 柑桔碎叶病; 检测; 防治

**中图分类号:** S 436. 661. 1<sup>+</sup> 2; S 432. 4<sup>+</sup> 1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-1431(2009)03-0049-02

柑桔碎叶病毒(Citrus tatter leaf virus, CTLV)引起的柑桔碎叶病主要危害以枳及其杂种砧木的柑桔树, 引起植株黄化、衰弱, 甚至整株枯死, 是威胁柑桔生产的重要病害之一。现已报道发生柑桔碎叶病的国家有美国、日本、南非、澳大利亚和中国, 尤以日本和中国发生最为普遍<sup>[1]</sup>。枳及枳橙砧的柑桔树受害后, 接口附近的接穗部肿大, 叶脉黄化, 类似环状剥皮引起的黄化。植株矮化, 剥开接合部树皮可见木质部间有一圈缢缩线, 受强风等外力推动, 病树砧穗接合处易断裂, 断裂面光滑。病毒是绝对寄生物, 在生产实践中缺少有效的防治药剂, 种植无病毒苗木是防治柑桔碎叶病的一种非常重要的措施。因此, 对无性繁殖材料及在发病早期进行快速准确的检测诊断十分重要。

## 1 检测方法

**1.1 生物学检测** 生物学检测法又叫指示植物检测法, 通常在隔离温室或网室进行。该方法简单、易行, 不需要昂贵的设备, 且结果直观, 鉴定结果可靠, 能准确地反映病毒的生物学特性。到目前为止, 指

示植物鉴定仍是 CTLV 鉴定的重要依据和手段之一。常用的木本指示植物有腊斯克枳橙、特洛亚枳橙、卡里佐枳橙和厚皮来檬等, 主要症状为叶片变小, 产生黄白色斑点, 叶缘破碎和扭曲畸形; 常用的草本指示植物有豇豆、昆诺藜、苋色藜和克里夫兰烟等, 豇豆上表现为红褐色枯斑, 昆诺藜和苋色藜上为系统性坏死和花叶, 克里夫兰烟则为系统斑驳和轻花叶。张天森等用木本指示植物和草本指示植物检测出浙江黄岩栽培的本地早、少核本地早、椪桔、早桔、朱红、乳桔、椪柑、北京柠檬、兴津温州蜜柑和柳橙等 10 个品种都感染了 CTLV<sup>[2]</sup>。谢佩华等用指示植物检测显示柑桔碎叶病在浙江省南部的瓯海、瑞安、平阳、苍南、永嘉和鹿城等地的一些柑桔园中已有发生, 并造成危害柑桔区的发生情况<sup>[3]</sup>。何新华等用指示植物鉴定了中国农业科学院柑桔研究所

\* 国家支撑计划(2007BAD61B04); 重庆市自然科学基金项目(2007BBB44); 重庆市科技攻关, CSTC(2007AA1024)资助。

## 3 讨论

试验结果表明, 分离柑桔溃疡病菌时, 用酒精消毒处理的时间控制在 9 秒钟左右较合适, 能够较快得到目标菌株。另外, 用 70% 酒精擦拭病斑后, 用镊子夹住叶片, 经酒精火焰消毒也可以分离到柑桔溃疡病菌, 但也容易得到较多杂菌。考虑到升汞对人体有害, 因此, 在以后的研究过程中, 建议用 70% 酒精消毒 9 秒钟左右来分离柑桔溃疡病菌。溃疡病离体接种时, 要注意保湿处理, 这样有利于接种部位迅速产生病斑。在试验过程中, 笔者在室内用针刺接种的方法, 尝试将病菌接种给柑桔植株, 但植株未产生病斑, 可能是由于湿度不适所致, 具体原因还需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 方毅敏, 张宜绪. 柑桔溃疡病综合防治研究[J]. 植物保护学报, 1992, 19(2): 101-105
- [2] 方中达. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1982
- [3] 吴文川, 洪敬敏, 王丽媛, 等. 适合柑桔溃疡病菌生长的一种固体培养基[J]. 植物保护学会会刊, 1986, 28(2): 225-228
- [4] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1999
- [5] 唐科志, 周常勇, 王雪峰, 等. 应用 PCR 技术快速检测柑桔溃疡病的研究[J]. 中国南方果树, 2005, 34(2): 1-4

收稿日期: 2009-03-17; 修回日期: 2009-04-15

作者简介: 姚廷山(1980-), 男, 助理研究员, 在读硕士生, 主要从事植物保护研究。 (责任编辑: 鲁玉洋)

从国外引进的 27 个柑桔品种,发现其均不带 CTLV<sup>[4]</sup>。

1.2 血清学检测 血清学方法是检测植物病毒最为常用和有效的手段之一。王小凤等从草本寄主昆诺藜中提纯了 ASGV,制备了抗血清,采用 ELISA 法检测该病毒<sup>[5]</sup>。

1.3 分子生物学检测 通过 PCR 检测病毒核酸来证实病毒的存在,比血清学方法的灵敏度更高,检测病毒的范围更广,可以检测各种病毒、类病毒,并且可进行大批量的样本检测。PCR 检测方法是 20 世纪 80 年代中期发展起来的体外核酸扩增技术,具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化等突出优点。Magome、Osvaldo、黄训才等成功地扩增出 CTLV 的特异性片段<sup>[6-8]</sup>。

半巢式 PCR: 利用两套 PCR 巢式引物进行了两轮 PCR 扩增反应,半巢式 PCR 降低了扩增多个靶位点的可能性,增加了检测的灵敏性和可靠性。Hailstones 等建立的 CTLV 半巢式 RT-PCR 体系的灵敏度比 ELISA 至少高 500 倍,可直接检测田间样品<sup>[9]</sup>。唐科志等结合周常勇等建立的微量快速核酸抽提法并对 Hailstones 等的方法加以改进,进行了感病植株的周年检测,证明利用半巢式 RT-PCR 全年均可检测出 CTLV<sup>[10]</sup>。

多重 PCR: 可同时检测多种病原微生物,大大节约了检测时间,提高了检测效率。Ito 等建立的多重 RT-PCR 技术可同时检测 6 种柑桔类病毒和 CTLV<sup>[11]</sup>。Kakao 等应用该技术调查了柑桔类病毒病害和柑桔碎叶病在日本的分布,发现 CTLV 在日本只有零星分布<sup>[12]</sup>。Menzel 等及肖远辉等分别建立了检测 CTLV 和其他果树病毒的多重 RT-PCR<sup>[13,14]</sup>。

免疫捕捉 PCR: 是将 RT-PCR 与 ELISA 相结合的检测方法,在进行 RT-PCR 扩增反应前,利用病毒转化性抗体与病毒抗原相结合的原理,将目标病毒固定在微管或微板等固相上,而不需要提取核酸。Kusano Nario 等建立了可用于检测 CTLV 的一步法 IG-RT-PCR 技术<sup>[15]</sup>。

## 2 防治

柑桔碎叶病为病毒性病害,目前尚无有效的防治药物,选择与培育无病毒母株、定植无病毒苗木等方法防止该病害发生的有效途径。在苗圃,为避免人为造成汁液传播,应注意工具消毒和免用手指抹芽(梢)。对修枝剪和嫁接刀等工具可用 20% 家用漂白粉溶液(含 1.05% 次氯酸钠)或 1% 次氯酸钠溶液(即安替福民)浸渍消毒,并立即用清水冲洗后

擦干,然后应用。对于已受柑桔碎叶病侵染且表现嫁接部障碍的枳砧柑桔树,采用靠接耐病砧木(如红桔)的办法,可在一定程度上恢复树势。

## 参 考 文 献

- [1] 刘干生,刘震,刘尚泉,等. 柑桔碎叶病危害的调查[J]. 中国南方果树, 2003, 32(2): 22
- [2] 张天森,梁仙友,龚祖限,等. 柑桔碎叶病的发生与初步鉴定[J]. 植物病理学报, 1988, 18(2): 79-84
- [3] 谢佩华,金显忠,何献武. 浙江南部柑桔碎叶病的调查和鉴定[J]. 植物病理学报, 1992, 22(3): 195-196
- [4] 何新华,蒋元晖,赵学源,等. 部分引进柑桔品种的裂皮病和碎叶病鉴定[J]. 四川果树, 1993(2): 4-5
- [5] 王小凤,李秋波,王荣. 苹果褪绿叶斑病毒和茎沟病毒的鉴定提纯和酶联法检测[J]. 微生物学报, 1992, 32(2): 137-144
- [6] Magome H, Yoshikawa N, Takahashi T, et al. Molecular Variability of the Genomes of Capilloviruses from Apple, Japanese Pear, European Pear, and Citrus Trees[J]. Mol Plant Pathology, 1997, 87(4): 389-396
- [7] Osvaldo Lovisolo, Gian Paolo Accotto, Vera Masenga, et al. An isolate of Apple stem grooving virus associated with Cleopatra mandarin fruit intumescence[J]. Fitopatol bras, 2003, 28(1): 54-58
- [8] 黄训才,邓子牛,胡春华,等. 柑桔主要病毒病的 RT-PCR 法鉴定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(3): 273-276
- [9] Hailstones D L, Bryant K L, Broadbent P, et al. Detection of citrus tatter leaf virus with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. Australasian Plant Pathology, 2000, 29: 240-248
- [10] 唐科志,周常勇,王雪峰,等. 利用 RT-PCR 检测柑桔碎叶病病毒的研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(增刊): 118-119
- [11] Ito T, Ieki H, Ozaki K. Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction[J]. Virol Methods, 2002, 106(2): 235-239
- [12] Takao Ito, Nobuyuki Namba, Tsutae Ito. Distribution of citrus viroids and Apple stem grooving virus on citrus trees in Japan using Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction [J]. J Gen Plant Pathol, 2003, 69: 205-207
- [13] Menzel W, Zahn V, Maiss E. Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses[J]. J Virol Meth, 2003, 110(2): 153-157
- [14] 肖远辉,曾继吾,张秋明,等. 柑桔衰退病、裂皮病和碎叶病的多重 RT-PCR 检测方法研究. 植物病理学报[J]. 2007, 37(1): 31-35
- [15] Kusano Nario, Ibi Akihiro. Detection of Apple stem grooving virus from citrus plants by one step immunocapture transcription polymerase chain reaction (one-step IG-RT-PCR) [J]. Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu, 2003, 49: 50-55

收稿日期: 2009-03-02; 修回日期: 2009-05-10

作者简介: 刘科宏(1978-),女,助理研究员,在读硕士生,主要从事柑桔病毒病害研究。(责任编辑:鲁玉洋)