

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.12.002

柑橘种质对柑橘轮斑病菌的抗性评价

刘凤娇¹, 乔兴华², 胡军华¹, 周慧珍¹,
张嘉¹, 陈娜¹, 陈力², 江东¹, 周彦¹

1. 西南大学 柑桔研究所, 重庆 400712; 2. 重庆市万州区植物保护与果树技术推广站, 重庆 万州 404020

摘要: 柑橘轮斑病是柑橘上的一种新型真菌性病害, 挖掘和培育柑橘抗病品种是防控病害最经济、有效的方法。本研究采用柑橘离体枝条室内人工接种柑橘轮斑病菌的方式建立了柑橘种质抗柑橘轮斑病菌的评价方法, 对不同柑橘种质进行抗性评价, 并采用病情指数、病斑平均直径和聚类分析等方法对柑橘种质进行抗性分级。3 种评价方法均将 83 个柑橘种质划分为 5 类: 高抗、抗病、中抗、感病和高感, 未发现免疫种质; 其中有野生金豆、北京柠檬等 16 个高抗种质, 金橘、金堂绿袖等 10 个感病种质, 新会甜橘、立花橘 2 个高感种质。3 种评价方法结果一致性较高。

关键词: 柑橘轮斑病菌; 抗性; 柑橘种质

中图分类号: S666; S432.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2022)12-0009-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Resistance Evaluation of Citrus Germplasms Against *Pseudofabrea citricarpa*

LIU Fengjiao¹, QIAO Xinghua², HU Junhua¹,
ZHOU Huizhen¹, ZHANG Jia¹, CHEN Na¹,
CHEN Li², JIANG Dong¹, ZHOU Yan¹

1. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China;

2. Plant Protection and Fruit Tree Technology Extension Station in Wanzhou District of Chongqing City,
Wanzhou Chongqing 404020, China

Abstract: Citrus target spot is a newly observed disease in citrus. Developing disease resistant varieties is

收稿日期: 2022-07-30

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0202006-04); 国家现代农业柑橘产业技术体系(CARS-26-05B)项目; 重庆市万州区农业农村委员会科技项目。

作者简介: 刘凤娇, 硕士研究生, 主要从事柑橘轮斑病研究。

通信作者: 胡军华, 博士, 副研究员。

the most economical, effective, and environment-friendly strategy for prevention of the disease. In this study, we established an identification method for resistance to citrus target spot by inoculating *Pseudofabreaa citricarpa* on the detached branches of citrus. Subsequently, we used this method to evaluate the disease resistance of different citrus varieties. The resistance of citrus varieties was categorized with disease index method, AD method and clustering analysis. The 83 citrus varieties were divided into five groups: high resistance, resistance, medium resistance, susceptible and high susceptible, and no immune variety was found. 16 highly resistant varieties such as wild Jindou and Meyer lemon, 10 susceptible varieties such as Jinju and Lvyou, and 2 highly susceptible varieties of Xinhui sweet orange and Tachibana were identified. The results of three analysis methods were consistent.

Key words: *Pseudofabreaa citricarpa*; resistance; citrus germplasm

柑橘轮斑病(*Pseudofabreaa citricarpa*)是一种由柑橘假叶埋盘菌引起的低温诱导性真菌病害^[1-3], 该病对柑橘的叶片、叶柄、嫩梢、枝干、茎、果实等均具有侵染性. 植株染病后在初期呈针尖大小水浸状暗褐色斑点, 随后病斑迅速扩大呈轮纹状, 病情进一步发展, 叶片干枯、木质部变色, 甚至扩展至韧皮部, 从而出现大量枯枝、落叶及落果, 病害发生严重的果园大面积被毁, 造成巨大的经济损失^[4-5].

柑橘轮斑病于 2012 年在陕西城固的温州蜜柑和金柑上首次被发现^[1], 2018 年又突然在重庆万州尤力克柠檬果园暴发^[4], 2019 年在湖北宜昌的温州蜜柑和湖南吉首的椪柑上也观察到了柑橘轮斑病的发病症状^[6], 呈现出由北向南扩散的趋势. 徐永红等^[7]对柑橘轮斑病适生区域的预测发现, 柑橘轮斑病对长江上中游柑橘优势区及鄂西—湘西两大柑橘产区具有重大威胁; 占爽等^[4]研究发现柑橘轮斑病菌对苹果和梨也具有侵染性, 表明柑橘轮斑病对我国果树产业具有较大的潜在威胁.

Yang 等^[8]基于 SCAR 标记开发了 *P. citricarpa* 的快速鉴定法为病害监测提供了有效方法. 占爽等^[4]、朱丽^[5]通过室内毒力测定的方法筛选了部分药剂, 为田间病害防控提供保障. 但是, 柑橘轮斑病传染力极强, 发病速度快, 目前尚未准确掌握柑橘轮斑病的最佳防治方法^[9], 一旦病害暴发, 防控难度较大. 抗病品种的选育和利用是控制植物病害的有效措施, 评价柑橘品种(种质)的抗病性对于种质资源抗病性鉴定与评价有重要意义, 可为我国对柑橘轮斑病实施预防和防控措施提供科学依据. 本试验建立了一套柑橘轮斑病菌的抗性鉴定体系, 并在此基础上对 83 份柑橘种质开展抗性鉴定, 以期筛选对柑橘轮斑病有较强抗性的种质资源, 挑选优良柑橘抗病品种, 继而挖掘抗柑橘轮斑病相关基因, 为柑橘轮斑病的防治和优良柑橘品种选育提供科学的理论依据.

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试菌株: 柑橘轮斑病菌(*Pseudofabreaa citricarpa*) WZ1 菌株分离自重庆市万州区尤力克柠檬叶片, 对菌株进行鉴定并保存^[4]; DS3 菌株分离自陕西省城固县斗山基地本地早橘叶片, 由西南大学植物保护学院杨宇衡老师赠送^[8]. 菌种活化后在 PDA 培养基上 20 °C 恒温培养 7 d, 保存备用.

植物材料: 83 份柑橘种质均采自西南大学柑桔研究所国家柑橘种质资源圃. 2021 年 11—12 月期间选取当年抽发的健康、粗细均匀、成熟度一致的秋梢, 清水冲洗后用 75%乙醇表面消毒 15 s, 无菌水漂洗 3 次, 置于托盘中保湿备用.

1.2 试验方法

1.2.1 室内接种方法

采用离体枝条烫伤接种法^[10], 略有改动. 枝条两端用石蜡封口. 电烙笔(0.3 cm×0.3 cm)400 °C 提前预热 1 min, 间隔一定的距离烫伤树皮 2 s, 在烫伤部位接种直径 5 mm 菌饼, 以接种无菌 PDA 作为空白对照. 接种后的枝条置于托盘内 20 °C 保湿培养. 每个处理接种 15 根枝条, 每根枝条上 2 个接种点, 4 次重复. 于接种后 3 d, 5 d 和 8 d 观察枝条的发病情况, 采用十字交叉法测量病斑直径.

数据分析: 运用 SPSS 25.0 软件对各重复进行统计分析, 采用 Tukey HSD 和邓肯氏新复极差法对不同处理病斑平均直径及病情指数进行数据统计学分析.

1.2.2 抗病性评价方法

参考《农药田间药效试验准则(二)第 98 部分: 杀菌剂防治芒果炭疽病》(GB/T 17980.98—2004)中对芒果炭疽病的划分标准^[11], 根据病斑面积占枝条面积的比例进行发病级别划分: 0 级, 无病斑; 1 级, 病斑面积占枝条面积的 5% 以下; 3 级, 病斑面积占枝条面积的 6%~15%; 5 级, 病斑面积占枝条面积的 16%~25%; 7 级, 病斑面积占枝条面积的 26%~50%; 9 级, 病斑面积占枝条面积的 51% 以上. 根据病斑占枝条面积的比例分级, 统计各个级别的病斑数, 计算病情指数(DI)和抗性分级.

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{相对病级数值} \times \text{各级病斑数})}{(\text{最高发病级数} \times \text{调查总病斑数})} \times 100$$

病情指数法: 抗性分级标准参照《柑橘种质资源描述规范》(NY/T2930—2016)中柑橘炭疽病抗性标准并进行调整^[12], 依据病情指数划分为: 高抗($DI < 15.0$), 抗病($15.0 \leq DI < 30.0$), 中抗($30.0 \leq DI < 40.0$), 感病($40.0 \leq DI < 60.0$), 高感($DI \geq 60.0$).

系统聚类分析法: 参考周娜等^[13]对柑橘蒂腐病菌的评价方法, 依据病情指数, 采用 SPSS 25.0 软件对不同处理方法、聚类距离和聚类方法的组合进行数据分析, 筛选出最合适的系统聚类分析方法.

病斑平均直径法(简称 AD 法): 参考周娜等^[14]对柑橘蒂腐病菌的评价方法并调整:

$$AD = \frac{\sum \text{发病点病斑直径}}{\text{接种点数}}$$

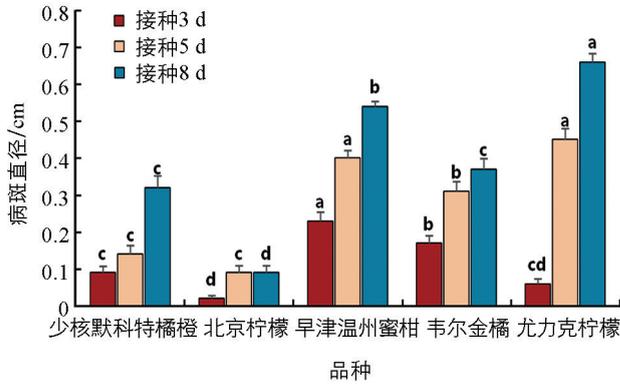
抗性分级标准: 免疫(I)为 $AD = 0$ mm, 高抗(HR)为 $0 \text{ mm} < AD \leq 3.0$ mm, 抗病(R)为 $3.0 \text{ mm} < AD \leq 5.0$ mm, 中抗(MR)为 $5.0 \text{ mm} < AD \leq 6.5$ mm, 感病(S)为 $6.5 \text{ mm} < AD \leq 8.0$ mm, 高感(HS)为 $AD > 8.0$ mm.

2 结果与分析

2.1 抗病性评价方法的建立

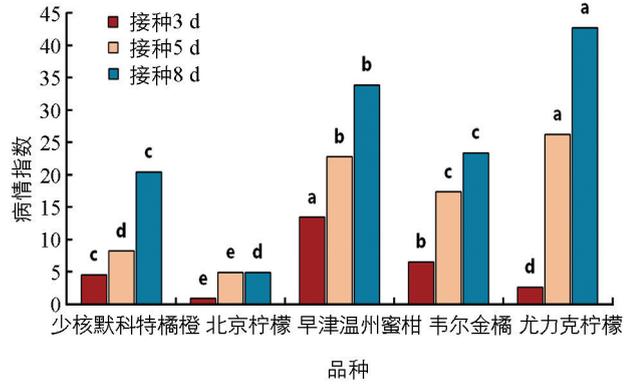
2.1.1 WZ1 菌株接种后病斑直径及病情指数

采用烫伤法在少核默科特橘橙、北京柠檬、早津温州蜜柑、韦尔金橘、尤力克柠檬 5 个品种上接种 WZ1 菌株, 观察 3 d, 5 d, 8 d 并记录病斑直径. 结果发现, 整个观察期对照均不发病, WZ1 菌株接种处理 3 d 时, 接种部位均出现褐色梭形病斑, 病斑直径与病情指数从大到小依次为早津温州蜜柑、韦尔金橘、少核默科特橘橙、尤力克柠檬、北京柠檬. 接种 5 d 和 8 d 时, 病斑直径与病情指数从大到小依次为尤力克柠檬、早津温州蜜柑、韦尔金橘、少核默科特橘橙、北京柠檬. WZ1 菌株接种 5~8 d, 5 个柑橘品种的病斑直径逐渐增大, 病斑直径和病情指数差异有统计学意义(图 1、图 2).



小写字母不同代表不同品种间差异有统计学意义($p < 0.05$).

图 1 WZ1 菌株接种 5 个柑橘品种的病斑直径



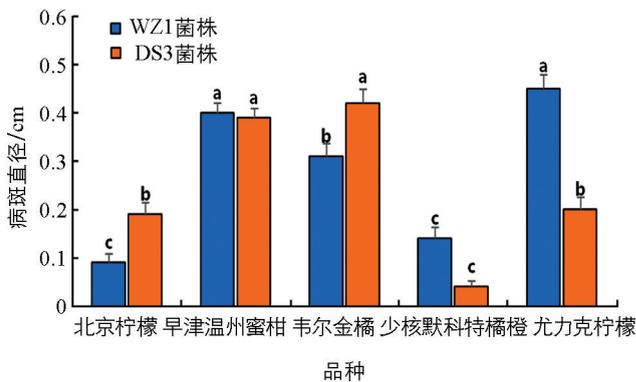
小写字母不同代表不同品种间差异有统计学意义($p < 0.05$).

图 2 WZ1 菌株接种 5 个柑橘品种的病情指数

2.1.2 WZ1 菌株和 DS3 菌株接种 5 d 病斑直径及病情指数

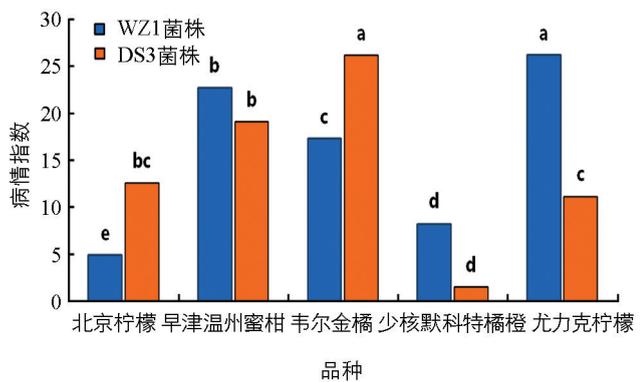
接种 WZ1 菌株、DS3 菌株于少核默科特橘橙、北京柠檬、早津温州蜜柑、韦尔金橘、尤力克柠檬枝条上。结果发现,对照在整个观察期均不发病。接种 5 d 时,2 个菌株在供试品种枝条上均可产生褐色梭形病斑。接种 WZ1 菌株病斑直径及病情指数从大到小依次为尤力克柠檬、早津温州蜜柑、韦尔金橘、少核默科特橘橙、北京柠檬,接种 DS3 菌株平均病斑直径及病情指数从大到小依次为韦尔金橘、早津温州蜜柑、尤力克柠檬、北京柠檬、少核默科特橘橙。5 个品种接种 WZ1 菌株和 DS3 菌株 5 d 时病斑直径及病情指数差异均有统计学意义(图 3、图 4)。

据此,采用离体柑橘当年生成熟秋梢枝条烫伤法接种,20 °C 保湿培养 5 d 时的病斑大小及病情指数,可作为抗柑橘轮斑病菌评价标准方法。



小写字母不同代表不同品种间差异有统计学意义($p < 0.05$).

图 3 WZ1 菌株和 DS3 菌株接种 5 d 病斑直径比较



小写字母不同代表不同品种间差异有统计学意义($p < 0.05$).

图 4 WZ1 菌株和 DS3 菌株接种 5 d 病情指数

2.2 抗病性评价

试验结果看出,83 个种质枝条接种 WZ1 菌株 5 d 时,病斑直径范围为 0.07~1.02 cm。宽皮橘中立花橘、新会甜橘发病严重,病斑直径超过 0.8 cm;金乐柑、聂都野橘 No. 1、莽山野橘(尖叶)发病较轻,病斑直径小于 0.3 cm。甜橙中发病最重的是塔罗科血橙,病斑直径 0.68 cm;枸头橙、红河大翼橙、刘金刚甜橙发病轻,病斑直径小于 0.3 cm。柚子中发病最重的是绿柚,病斑直径 0.66 cm;古巴柚、楚门文旦病斑直径小于 0.3 cm。柠檬类发病最重的是尤力克柠檬,病斑直径 0.45 cm;北京柠檬发病较轻,病斑直径 0.09 cm。金柑类中四季橘发病较重,平均病斑直径 0.68 cm。其余品种平均病斑直径均小于 0.3 cm。3 种评价方法均可将 83 个柑橘属种质划分为高抗、抗病、中抗、感病和高感 5 类(表 1)。

表 1 柑橘种质对柑橘轮斑病菌 WZ1 菌株的抗病性反应

品种	种质	病斑直径/ cm	病情指数	抗病性反应		
				AD 法	病情指数法	聚类分析法
金柑(<i>Fortunellahindsii</i>)	野生金豆	0.07±0.019	3.17	HR	HR	HR
柠檬(<i>Citrus limon</i>)	北京柠檬	0.09±0.019	4.89	HR	HR	HR
金柑(<i>F. classifalia</i>)	金弹(宁波)	0.11±0.019	5.51	HR	HR	HR
金柑(<i>F. classifalia</i>)	金弹(温州)	0.12±0.024	5.93	HR	HR	HR
大翼橙(<i>C. hongheensis</i>)	红河大翼橙	0.12±0.021	6.02	HR	HR	HR
金柑(<i>F. margarit</i>)	罗浮(温州)	0.13±0.02	6.44	HR	HR	HR
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	金乐柑	0.13±0.023	6.64	HR	HR	HR
橘橙(<i>C. tangor</i>)	少核默科特橘橙	0.14±0.024	8.20	HR	HR	HR
柚(<i>C. grandis</i>)	古巴柚	0.22±0.021	8.67	HR	HR	HR
金柑(<i>F. margarit</i>)	罗浮(宁波)	0.14±0.029	9.98	HR	HR	HR
柚(<i>C. grandis</i>)	楚门文旦	0.28±0.02	10.82	HR	HR	HR
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	聂都野橘 No. 1	0.20±0.021	11.21	HR	HR	HR
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	莽山野橘(尖叶)	0.24±0.022	11.74	HR	HR	HR
柚(<i>C. grandis</i>)	玉环文旦柚	0.30±0.022	12.41	HR	HR	HR
香橼(<i>C. medica</i>)	小香橼	0.25±0.025	12.67	HR	HR	HR
橘橙(<i>Kiyomi tangor</i>)	清见橘橙	0.30±0.021	13.23	HR	HR	HR
柠檬(<i>C. limon</i>)	澳指檬一号	0.31±0.027	14.49	R	HR	HR
酸橙(<i>C. aurantium</i>)	枸头橙	0.28±0.029	15.84	HR	R	R
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	晚锦橙	0.31±0.027	16.02	R	R	R
香橼(<i>C. medica</i>)	大香橼	0.27±0.029	16.32	HR	R	R
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	脐血橙 2 号	0.32±0.029	17.06	R	R	R
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	韦尔金橘	0.31±0.027	17.33	R	R	R
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	刘金刚甜橙	0.25±0.036	17.41	HR	R	R
宽皮橘(<i>C. glaberrima</i>)	瓯柑	0.30±0.025	17.42	HR	R	R
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	莽山野橘(圆叶)	0.35±0.033	17.71	R	R	R
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	旺昌皱皮柑	0.33±0.022	17.78	R	R	R
柚(<i>C. grandis</i>)	蓬溪柚	0.39±0.018	18.49	R	R	R
柚(<i>C. grandis</i>)	舒化柚	0.40±0.017	18.63	R	R	R
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	大丰黄皮橘	0.33±0.031	18.71	R	R	R
柚(<i>C. grandis</i>)	瑄溪蜜柚	0.36±0.02	18.80	R	R	R
柠檬(<i>C. limon</i>)	澳指檬二号	0.40±0.027	19.73	R	R	R
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	红肉暗柳橙	0.40±0.024	19.93	R	R	R
柠檬(<i>C. limon</i>)	扁红柠檬	0.35±0.028	20.72	R	R	R
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	大香柑	0.38±0.021	22.01	R	R	R
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	新会橙(实生)	0.36±0.03	22.02	R	R	R
柚(<i>C. grandis</i>)	古老钱沙田柚	0.44±0.018	22.41	R	R	R
柚(<i>C. grandis</i>)	龙安柚	0.40±0.021	22.63	R	R	R
温州蜜柑(<i>C. unshiu</i>)	早津温州蜜柑	0.40±0.021	22.76	R	R	R
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	香水橙	0.37±0.029	22.87	R	R	R
柚(<i>C. grandis</i>)	凤凰柚	0.42±0.027	23.00	R	R	R
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	阿尔及尔夏橙	0.36±0.035	23.24	R	R	R
宽皮橘(<i>C. clementina</i>)	克里迈丁	0.41±0.021	23.45	R	R	R

续表 1

品种	种质	病斑直径/ cm	病情指数	抗病性反应		
				AD 法	病情指数法	聚类分析法
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	汕头酸橘	0.41±0.021	23.52	R	R	R
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	皱皮柑 2	0.42±0.027	23.86	R	R	R
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	锦橙 447 号	0.39±0.024	23.98	R	R	R
柚(<i>C. grandis</i>)	金香柚	0.43±0.022	23.99	R	R	R
地中海橘(<i>C. deliciosa</i>)	茶枝柑	0.42±0.026	24.23	R	R	R
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	梨橙 2 号	0.41±0.026	24.43	R	R	R
柚(<i>C. grandis</i>)	岭南沙田柚	0.49±0.014	25.00	R	R	R
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	皱皮柑 1	0.42±0.020	25.46	R	R	R
柠檬(<i>C. limon</i>)	尤力克柠檬	0.45±0.030	26.23	R	R	R
柚(<i>C. grandis</i>)	东试早	0.47±0.016	26.35	R	R	R
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	兴义大红袍	0.49±0.022	27.01	R	R	R
柚(<i>C. grandis</i>)	暹罗柚	0.47±0.021	28.91	R	R	MR
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	红江橙	0.49±0.014	29.60	R	R	MR
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	S26-锦橙	0.53±0.015	30.51	MR	MR	MR
宽皮橘(<i>C. manshanensis</i>)	莽山野橘	0.49±0.023	30.82	R	MR	MR
柚(<i>C. grandis</i>)	五步红心柚	0.52±0.013	31.92	MR	MR	MR
柚(<i>C. grandis</i>)	垫江白心柚	0.52±0.017	32.06	MR	MR	MR
宽皮橘(<i>C. daoixianensis</i>)	大坑野橘	0.51±0.037	32.38	MR	MR	MR
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	印度酸橘	0.55±0.015	33.33	MR	MR	MR
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	冰糖橙	0.56±0.026	34.30	MR	MR	MR
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	无核扁平橘	0.59±0.029	34.42	MR	MR	MR
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	锦橙(铜水 72-1)	0.55±0.029	34.75	MR	MR	MR
柚(<i>C. grandis</i>)	梁平柚	0.57±0.008	35.34	MR	MR	MR
柚(<i>C. grandis</i>)	通贤柚	0.59±0.013	35.36	MR	MR	MR
柚(<i>C. grandis</i>)	强德勒柚	0.59±0.008	35.94	MR	MR	MR
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	粗皮狗屎柑	0.62±0.014	37.62	MR	MR	MR
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	早金	0.62±0.037	38.18	MR	MR	MR
柚(<i>C. grandis</i>)	四季抛	0.62±0.022	38.45	MR	MR	MR
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	奉节 95-1 脐橙	0.64±0.017	39.10	MR	MR	MR
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	金橘	0.67±0.016	42.66	S	S	S
柚(<i>C. grandis</i>)	金堂绿柚	0.66±0.013	42.86	S	S	S
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	伏令夏橙	0.67±0.018	43.19	S	S	S
金柑(<i>C. fortunella</i>)	四季橘	0.68±0.028	43.51	S	S	S
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	纽荷尔脐橙	0.69±0.019	43.77	S	S	S
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	哈姆林甜橙	0.69±0.023	44.06	S	S	S
甜橙(<i>C. sinensis</i>)	塔罗科血橙	0.68±0.011	44.54	S	S	S
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	十月橘	0.72±0.016	46.99	S	S	S
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	细皮狗屎柑	0.71±0.010	48.89	S	S	S
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	宫内伊予柑	0.80±0.045	51.78	S	S	S
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	新会甜橘	0.95±0.020	62.12	HS	HS	HS
宽皮橘(<i>C. reticulata</i>)	立花橘	1.02±0.026	63.95	HS	HS	HS

注: HR 表示高抗, R 表示抗病, MR 表示中抗, S 表示感病, HS 表示高感.

当聚类分析法采用病情指数原始数值不转换、聚类距离采用欧式距离、聚类方法采用质心聚类法时聚类效果与发病情况吻合度最好。以欧式距离 5 作为最佳聚类分割点, 将 83 个柑橘种质分为 5 类(图 5)。第 1 类包括野生金豆、北京柠檬、楚门文旦、聂都野橘 No. 1 等 17 个品种, 病情指数范围为 3.17~14.49; 第 2 类包括枸头橙、晚锦橙、大香橼等 36 个品种, 病情指数范围为 15.84~27.01; 第 3 类包括暹罗柚、红江橙、S-26 锦橙等 18 个品种, 病情指数范围为 28.91~39.10; 第 4 类包括金橘、金堂绿柚、伏令夏橙等 10 个品种, 病情指数范围为 42.66~51.78; 第 5 类包括新会甜橘和立花橘, 病情指数范围为 62.12~63.95 及以上。AD 法将供试种质划分为高抗品种 20 个, 抗病品种 36 个、中抗品种 15 个、感病品种 10 个、高感品种 2 个。病情指数法将供试种质划分为高抗品种 17 个, 抗病品种 38 个、中抗品种 16 个、感病品种 10 个、高感品种 2 个。

与病情指数法和聚类分析法对澳指檬一号(高抗)、枸头橙(抗病)、大香橼(抗病)、刘金刚甜橙(抗病)、瓯柑(抗病)、莽山野橘(中抗)的划分结果不同, AD 法划分为: 澳指檬一号(抗病)、枸头橙(高抗)、大香橼(高抗)、刘金刚甜橙(高抗)、瓯柑(高抗)、莽山野橘(抗病)。病情指数法和 AD 法将暹罗柚和红江橙划分为抗病, 而聚类分析将暹罗柚和红江橙划分为中抗。3 种评价方法将野生金豆、北京柠檬等 16 个品种划分为高抗品种, 将金橘、金堂绿柚等 10 个品种划分为感病品种, 将新会甜橘、立花橘 2 个品种划分为高感, 3 种评价方法结果一致性较高。

3 结论与讨论

室内抗病性评价可选用叶片、枝条、果实、花等作为离体接种材料^[13-15], 不同的组织, 得到的鉴定结果存在一定差异^[16], 选择合适的材料, 是准确评价品种抗性的基础。占爽等^[4]采用室内离体接种的方法, 测试了柑橘轮斑病菌对重庆万州地区 8 个规模种植的柑橘品种叶、枝、果的致病力, 结果显示轮斑病菌对枝条的致病性强于叶片和果实, 发病更快速、明显。朱丽^[5]通过盆栽幼嫩枝条接种轮斑病菌孢子悬浮液发现, 病菌可侵染温州蜜柑的叶柄、嫩梢、枝干和茎。枝干上的病斑会环绕嫩梢或枝干逐渐扩大导致枝条逐渐萎蔫直至整个枝干枯死。果园发生轮斑病时, 病斑会在枝条上扩展, 进而导致整枝干枯, 造成果树大量落叶落果^[4], 据此, 认为轮斑病在柑橘枝条上造成的为害大于叶片。同时本研究在室内接种试验中发现, 采用离体叶片接种时, 在 20 °C 环境中叶片不易保存, 且随着时间的推移, 病斑大小差异显著性降低, 无法准确区分各品种的抗病性差异。因此选用离体枝条做抗病性评价组织更能反映田间真实的发病情况。目前枝条烫伤接种法已广泛应用于抗病性评价, 臧睿等^[10]测试了从陕西分离得到的 61 株苹果腐烂病菌对红富士和秦冠苹果的致病力, 刘普等^[17]完成了梨树腐烂病抗性种质筛选, 殷辉^[18]等、张楠等^[19]对苹果种质资源进行了腐烂病菌的抗病性评价。

本研究在借鉴上述研究方法上略做改进, 建立了一套柑橘轮斑病菌抗病性评价方法。该方法致伤程度一致, 条件便于控制, 评价周期短, 20 °C 保湿培养 5 d 时的病斑大小即可充分显示不同品种间的差异, 在测试同一菌株接种不同柑橘品种以及不同来源菌株对同一品种的致病力时, 病斑直径差异明显, 可提高抗性评价的准确性和可靠性。利用该评价方法对 5 大类 83 个柑橘品种进行抗病性评价, 采用 3 种分析方法对抗病性进行分级, 供试的 83 份柑橘属种质可划分为高抗、抗病、中抗、感病和高感等 5 类, 未发现免疫种质。3 种分析方法均划分为高抗的种质 16 种, 包括金柑中的野生金豆、金弹(宁波)、金弹(温州)、罗浮(温州)、罗浮(宁波)5 个品种, 柚子中的古巴柚、楚门文旦、玉环文旦柚 3 个品种, 宽皮橘类和甜橙类 4 个品种和柠檬中的北京柠檬, 以及其他类别中的 3 个品种。3 种评价方法均划分为高感的种质有 2 种, 为宽皮橘中的新会甜橘和梨花广橘。据此, 金柑类及柠檬类种质大部分为高抗品种, 柚子类相对抗病, 而部分宽皮橘和甜橙易受柑橘轮斑病菌侵染。

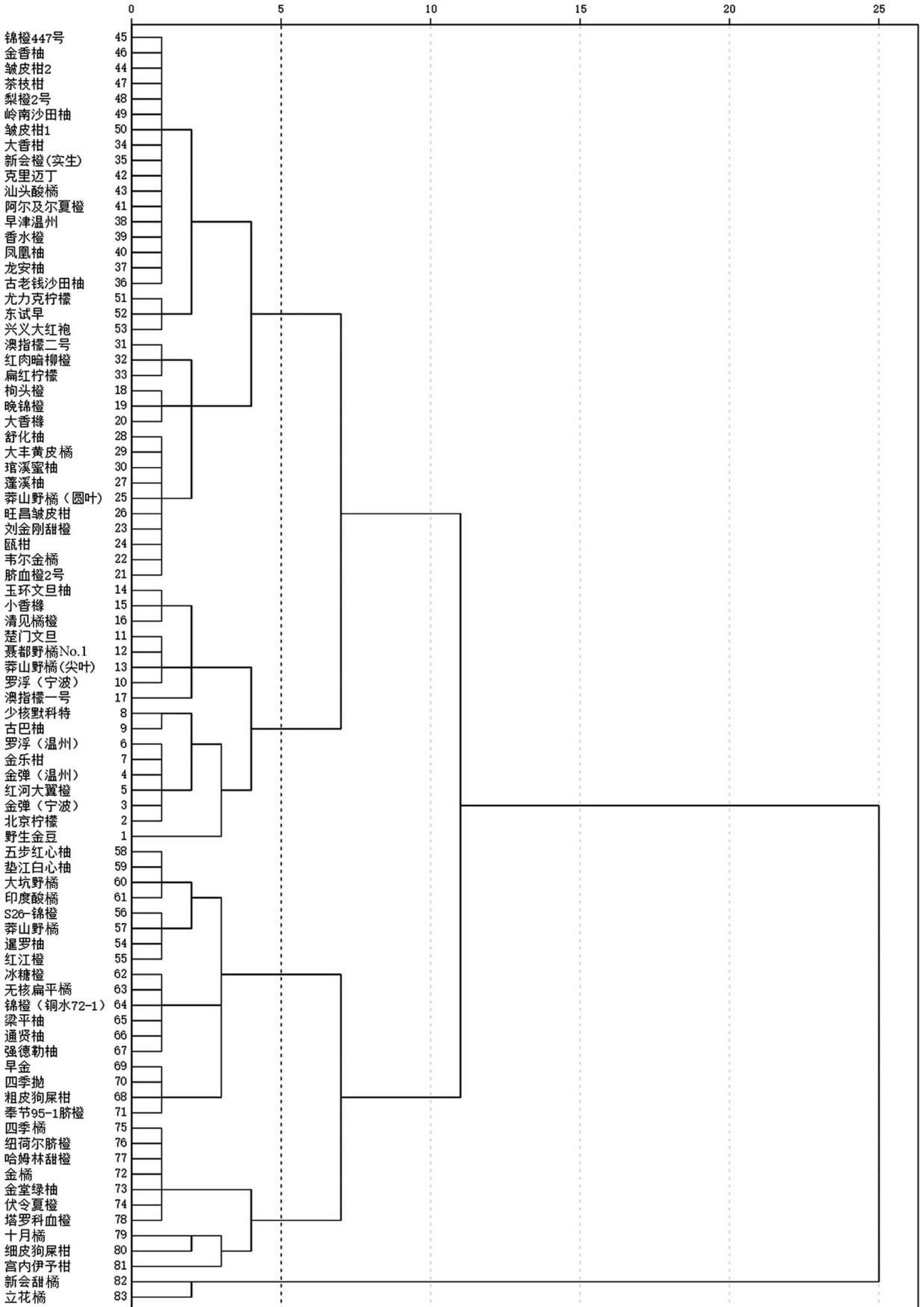


图 5 柑橘属 83 个种质对柑橘轮斑病抗性的聚类分析

柑橘轮斑病在陕西地区主要危害温州蜜柑、椪柑、金柑、冰糖橘及朱红橘。据田间调查, 柑橘感病后病情指数为 14.6~33, 按感病从强到弱依次为温州蜜柑系列品种、椪柑、金柑及本地的城固冰糖橘、朱红橘等, 而本地早、柚类等品种表现出抗病特性^[9,20]。本研究结果显示, 温州蜜柑病情指数为 22.76, 金柑中四季橘较感病, 其余为高抗品种, 柚子相对抗病, 与田间表现一致。在重庆万州地区尤力克柠檬发生严重, 病情指数为 18~30(待发表), 北京柠檬及纽荷尔脐橙零星发生^[4]。本研究结果显示, 尤力克柠檬病情指数为 26.23, 北京柠檬为 4.89, 纽荷尔脐橙为 43.77, 可能是由于纽荷尔脐橙园区管理较规范造成田间发病较轻。陈泉等^[21]采用离体叶片针刺接菌法 10 °C 保存 28 d 测量病斑直径和发病率, 对 27 个柑橘品种进行致病力测试发现, 北京柠檬较抗病, 尤力克柠檬、奉节 95-1 脐橙对轮斑病较敏感, 与本研究结果一致; 岭南沙田柚免疫, 塔罗科血橙、强德勒柚抗病, 温州蜜柑高感, 与本研究结果不一致。不同来源的菌株致病力存在差异^[22], 不同的接种方法及评价指标等也可能导致评价结果不同。可以通过室内采用同一评价方法进行多菌株、多品种评测, 并结合田间抗病性调查情况, 综合判断品种的抗病性^[22]。

柑橘轮斑病在我国局部发生, 但发生后对当地产业均造成严重威胁。2009 年至 2019 年, 柑橘轮斑病在陕西城固地区造成 1.86 万 hm^2 的受害面积^[9], 在重庆万州柑橘产区发病面积约达 100 hm^2 ^[4]。为防止其进一步扩散带来不可逆的损失, 柑橘轮斑病流行区域及高风险区域, 应合理布局种植品种, 建议种植北京柠檬、少核默科特橘橙等高抗品种代替尤力克柠檬等易感病品种, 同时减少塔罗科血橙、纽荷尔脐橙、金橘、金堂绿柚等感病品种的种植面积, 在柑橘轮斑病潜在威胁区应建立柑橘轮斑病预警和防控机制, 加强柑橘轮斑病的监测和综合防控。

根据筛选的抗性栽培品种, 分析其亲本是进行抗性育种设计的重要参考^[16]。集团分离分析法(BSA)技术已广泛用于植物抗病遗传区段定位^[23-26]。在已公布的柑橘基因组的基础上^[27-28], 对评价的 25 份宽皮柑橘材料和 20 份柚子材料进行 BSA 分析抗性差异位点分析^[29], 定位柑橘抗轮斑病菌关键遗传区段。结合接菌前后尤力克柠檬和塔罗科血橙叶片组织的转录组数据分析发现^[30], 抗性差异基因主要为 NB-ARC。本研究为柑橘抗轮斑病的遗传研究和抗病育种奠定了材料基础, 为进一步挖掘抗柑橘轮斑病基因提供了一定的思路。

参考文献:

- [1] ZHU L, WANG X H, HUANG F, et al. A Destructive New Disease of Citrus in China Caused by *Cryptosporiopsis citricarpa* Sp. Nov [J]. Plant Disease, 2012, 96(6): 804-812.
- [2] 林惠娇, 王卫芳, 胡学难, 等. 明孢盘菌属分类进展及其重要的病原菌种类 [J]. 植物检疫, 2016, 30(1): 1-8.
- [3] CHEN C, VERKLEY G J M, SUN G Y, et al. Redefining Common Endophytes and Plant Pathogens in Neofabraea, Pezizula, and Related Genera [J]. Fungal Biology, 2016, 120(11): 1291-1322.
- [4] 占爽, 吴望, 胡军华, 等. 重庆万州疑似柑桔轮斑病的病原鉴定及防治药剂筛选 [J]. 中国南方果树, 2021, 50(1): 1-7.
- [5] 朱丽. 五种柑橘真菌性病害病原鉴定 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [6] XIAO X E, ZENG Y T, WANG W, et al. First Report and New Hosts of *Pseudofabraea citricarpa* Causing Citrus Target Spot in China [J]. Plant Health Progress, 2021, 22(1): 26-30.
- [7] 徐永红, 陈力, 唐松, 等. 柑橘轮斑病的适生区预测及风险分析 [J]. 中国农业科学, 2020, 53(21): 4430-4439.
- [8] YANG Y H, HU J H, CHEN F J, et al. Development of a SCAR Marker-Based Diagnostic Method for the Detection of the Citrus Target Spot Pathogen *Pseudofabraea citricarpa* [J]. BioMed Research International, 2018, 2018: 7128903.
- [9] 敖义俊, 丁德宽, 邓家锐, 等. 柑桔轮斑病发生规律及防控对策 [J]. 中国果业信息, 2021, 38(7): 64-66.
- [10] 臧睿, 黄丽丽, 康振生, 等. 陕西苹果树腐烂病菌(*Cytospora* spp.)不同分离株的生物学特性与致病性研究 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 343-351.

- [11] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 农药田间药效试验准则: GB/T 17980.149-2009 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [12] 中国农业科学院柑橘研究所, 中国农业科学院茶叶研究所. 中华人民共和国农业行业标准: 柑橘种质资源描述规范: NY/T2930—2016 [S]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2017.
- [13] 周娜, 胡军华, 姚廷山, 等. 柑橘种质抗柑橘蒂腐病菌扩展能力的评价 [J]. 园艺学报, 2015, 42(10): 1889-1898.
- [14] 胡军华, 刘荣萍, 王雪莲, 等. 不同柑橘属种质对柑橘褐斑病菌的抗性评价 [J]. 果树学报, 2015, 32(4): 672-680, 740.
- [15] 裴艳刚, 马利, 岁立云, 等. 不同猕猴桃品种对溃疡病菌的抗性评价及其利用 [J]. 果树学报, 2021, 38(7): 1153-1162.
- [16] 王大江, 高源, 张玉刚, 等. 苹果种质资源火疫病抗性鉴定评价与筛选 [J/OL]. 植物遗传资源学报, (2022-07-28) [2022-07-30]. <https://kns.cnki.net/kns8/defaultresult/index>. DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20220629002.
- [17] 刘普, 施园园, 薛程, 等. 梨树腐烂病抗性种质筛选及相关生理生化特性研究 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(6): 1164-1172.
- [18] 殷辉, 周建波, 吕红, 等. 36 个苹果树品种对腐烂病菌的抗病性评价 [J]. 山西农业科学, 2017, 45(6): 998-1001.
- [19] 张楠, 冯浩, 宋琳琳, 等. 苹果种质资源对苹果树腐烂病的抗性评价 [J]. 中国果树, 2019(3): 74-76, 80.
- [20] 罗磊, 张波, 章彦宏, 等. 为害陕南柑桔的新病害——柑桔轮斑病 [J]. 中国果业信息, 2015, 32(7): 55-56.
- [21] 陈泉, 徐永红, 何锦辉, 等. 柑橘轮斑病抗性鉴定方法的建立 [J]. 果树学报, 2022, 39(2): 295-301.
- [22] 张园园, 王乐, 林克剑, 等. 不同紫花苜蓿种质对镰刀菌根腐病的抗病性评价 [J]. 中国草地学报, 2021, 43(10): 98-105.
- [23] 陈满静, 任艳, 彭秋, 等. 基于 BSA-seq 方法定位贵州高粱抗炭疽病害关键遗传区段 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50(5): 28-34.
- [24] 凌悦铭, 李霖华, 杨永, 等. 基于 BSA-Seq 技术的甜瓜抗霜霉病 InDel 标记开发 [J]. 新疆农业科学, 2021, 58(12): 2265-2273.
- [25] 高天一, 郝芳敏, 臧全宇, 等. 基于 SLAF-seq 及 BSA 技术的甜瓜抗蔓枯病 QTL 定位分析 [J]. 华北农学报, 2021, 36(2): 40-45.
- [26] CHEN Q Q, JIANG J B, ZHANG H X, et al. Mining Candidate Genes Associated with Resistance to TYLCV in Tomato Based on BSA-Seq and RNA-Seq Analysis [J]. European Journal of Horticultural Science, 2020, 85(3): 145-159.
- [27] 王小柯, 江东, 孙珍珠. 利用 GBS 技术研究 240 份宽皮柑橘的系统演化 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(9): 1666-1673.
- [28] LI Q, QI J J, QIN X J, et al. CitGVD: a Comprehensive Database of Citrus Genomic Variations [J]. Horticulture Research, 2020, 7: 12.
- [29] 刘梦雨, 刘小丰, 江东, 等. 利用重测序 - BSA 分析鉴定金柑油胞发育相关基因 [J]. 园艺学报, 2019, 46(5): 841-854.
- [30] 韩晓勇, 蒋璐, 殷剑美, 等. 山药品种苏蕈 8 号抗炭疽病基因的转录组测序与表达分析 [J]. 华北农学报, 2022, 37(2): 211-222.