

黄桢辉, 王娟, 高洁, 等. 黄龙病菌在 4 个品种柑橘果枝内的时空分布 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(5): 35-42.
HUANG Zhenhui, WANG Juan, GAO Jie, et al. Distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in the fruit branches of four citrus cultivars[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(5): 35-42.

黄龙病菌在 4 个品种柑橘果枝内的时空分布

黄桢辉¹, 王娟^{1,2}, 高洁¹, 郑正¹, 邓晓玲¹, 许美容¹

(1 广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室/华南农业大学 植物保护学院, 广东 广州 510642;

2 衡阳市农业科学院 农业资源与环境研究所, 湖南 衡阳 421101)

摘要:【目的】亚洲种韧皮部杆菌 (‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, CLas) 是引起柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing, HLB) 的优势种, 也是引发我国柑橘 HLB 的唯一病原菌。探索 CLas 在柑橘果枝内的时空分布规律, 有利于及时准确地对其进行检测, 对 HLB 的防控具有重要意义。【方法】以砂糖橘、W-默科特、红心蜜柚和沙田柚不同生长期的果枝为材料, 利用实时荧光定量 PCR 检测果枝 CLas 含量, 研究其时空分布规律。【结果】CLas 在病枝中分布不均匀, 在果实处 (橘络、果中轴或种皮) 富集。对于宽皮柑橘的砂糖橘和杂柑的 W-默科特, 成熟期果实橘络中的 CLas 含量最高; 而对于柚类的红心蜜柚和沙田柚, 成熟期果轴中的 CLas 含量最高。砂糖橘果实膨大与成熟过程中, CLas 随着营养物质的流动从源器官 (叶片) 向库器官 (果实) 分流并聚集; 果轴和橘络中的 CLas 含量不断增加, 且橘络中的 CLas 含量显著上升。【结论】CLas 随着柑橘果实生长和成熟而汇集, 结合源库理论可解析 CLas 在果枝上的运转和分布规律。

关键词: 柑橘; 黄龙病; 韧皮部杆菌; 时空分布

中图分类号: S436.66

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2022)05-0035-08

Distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in the fruit branches of four citrus cultivars

HUANG Zhenhui¹, WANG Juan^{1,2}, GAO Jie¹, ZHENG Zheng¹, DENG Xiaoling¹, XU Meirong¹

(1 Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control/College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Institute of Agricultural Resources and Environment, Hengyang Academy of Agricultural Science, Hengyang 421101, China)

Abstract: 【Objective】‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (CLas), the main species causing Citrus Huanglongbing (HLB), is also the sole pathogen causing agent of HLB in China. Exploring the temporal and spatial distribution of CLas in citrus fruit branch would help timely and accurate detection of CLas, and is of great significance to the prevention and control of HLB. 【Method】The titers of CLas were measured in HLB-affected fruit branches of four traditional citrus cultivars namely *Citrus reticulata* Blanco cv. Shatangju, (*C. reticulata* × *C. sinensis*) cv. W-Murcott, *C. maxima* cv. Hongxinmi Yu and *C. maxima* cv. Shatian Yu using real time PCR method. The temporal and spatial distribution of CLas in citrus fruit branches were studied. 【Result】CLas was unevenly distributed in fruit branches with enrichment in the fruits (Fruit pith, centrol axis

or seed coat). For the mandarin of Shatangju and W-Murcott, CLas titers were the highest in the piths at the fruit mature stage. For the pomelos of Hongxinmi Yu and Shatian Yu, CLas titers were the highest in the fruit central axes at ripe stage. CLas transferred from the source organs (leaves) to the sink organs (fruits) along with the flow of nutrients in the processes of fruit swelling and ripening. CLas titers kept increasing in central axes and fruit pith, especially significantly increased in fruit pith. 【Conclusion】CLas is enriched with the fruit developmental stages, and such transfer and distribution pattern of CLas in fruit branches can be explained by the theory of plant source-sink relationship.

Key words: Citrus; Huanglongbing; ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’; Spatial and temporal distribution

柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing, HLB) 是柑橘生产上最具毁灭性的病害之一。截至 2020 年 9 月, 该病害分布于亚洲、非洲、美洲和大洋洲的 67 个国家和地区^[1]。黄龙病是由限制于韧皮部的 α -变形菌纲 (α -Proteobacterium) 的候选韧皮部杆菌属细菌 (*Candidatus Liberibacter* spp.) 引起的^[2-3]。候选韧皮部杆菌又分为耐热型亚洲种 (‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, CLas)、热敏型非洲种 (‘*C. L. africanus*’, CLaf) 和美洲种 (‘*C. L. americanus*’, CLam)^[4]。其中, CLas 的分布最广, 在 51 个国家/地区被检测到^[5], 且是中国柑橘上检测到的唯一小种^[6]。黄龙病引起柑橘枝梢黄化, 包括成熟老叶呈斑驳、成熟新叶呈花叶或均匀黄化等症状, 导致柑橘果实无法正常成熟或成色不佳; 形成“青果”或“红鼻子果”, 使久病的植株局部或整体衰弱^[7-9]。从宏观上看, 黄龙病一方面影响柑橘种植面积, 另一方面调控着柑橘价格, 对柑橘产业造成巨大的影响。从微观上看, 在有柑橘木虱共存的疫区, 黄龙病菌一旦流行就难以根除, 是柑橘生产的重大隐患。目前, 主要通过种植无病苗木、清理病树、防治木虱等方法进行黄龙病综合防控^[10]。病原菌的定量分析是病害流行病学研究中分析病原增殖和分布的重要手段^[4]。在田间的黄龙病柑橘树常局部显症, 且其病原菌 CLas 在植株中的分布通常不均匀^[11-14]。染病柑橘中 CLas 的含量可随着季节或柑橘生长阶段的不同而变化^[13, 15-17]。Li 等^[12]的研究发现, 田间同一黄龙病植株的不同组织中的病菌数量差异明显; 根部和地上部的病菌含量相差很大。Tatinen 等^[11]发现黄龙病菌在树皮、叶中脉、根、花、果实中每 μg 总 DNA 中的 CLas 细胞数在 14~137 031 范围内不等, 且在果柄处的 CLas 含量最高。华南农业大学柑橘黄龙病研究室对砂糖橘果枝的 CLas 含量分布进行了测定, 结果显示不同组织中的 CLas 含量存在较大差异, 其中橘络的 CLas 含量最高^[18-19]。

对不同季节的黄龙病树中 CLas 的分布规律研究通常以叶中脉为材料。李智鹏等^[16]以江西寻乌县吉谭镇果园的脐橙病树为材料, 发现叶脉中的 CLas 含量在 4—5 月和 7—8 月呈现 2 个低谷, 在 5—7 月、8—11 月呈现 2 个高峰; 陈传武等^[20]对广西地区染病夏橙和沙田柚叶脉中的 CLas 含量进行检测, 结果显示这 2 个品种 9—12 月的 CLas 含量明显高于其他时期的; 而 Munir 等^[17]分析云南的黄龙病树, 发现病树叶脉中的 CLas 含量在 7 月最低, 于 12—1 月出现高峰。柑橘树体上 CLas 的季节分布规律也因寄主品种而异^[20-21]。感染黄龙病的乌柑 *Severinia buxifolia* 和瓦伦西亚甜橙 *Citrus sinensis* ‘Valencia’ 叶片中 CLas 活菌含量均在 12 月至来年 2 月期间最高^[15]; 而对巴西染病的橙类和柠檬 3 个品种的样品进行检测, 发现秋季时叶脉中的 CLas 含量最高^[13]; 在中国, 夏橙和沙田柚叶脉中的 CLas 含量在 9—12 月份明显高于其他时期^[20]。李敏等^[21]研究柑橘根系中 CLas 消长规律, 指出红心蜜柚根部的菌含量高于砂糖橘根部的 CLas 含量。

柑橘黄龙病的症状发展与 CLas 含量和运转相关。叶片斑驳是柑橘黄龙病的典型症状, 然而斑驳症状叶片中的 CLas 含量并非最高^[22]; 砂糖橘的“红鼻子果”中 CLas 检出率高达 100%^[23]。Johnson 等^[5]发现, 经带菌柑橘木虱刺吸的柑橘植株在叶片未显症之前即可从根部检测到高含量的 CLas, 提出“病菌由传菌木虱取食位点流向根部, 在根部增殖为害, 于抽梢期再由根部流向树冠”的黄龙病菌流动模型; 并推断根部的衰弱与病菌的侵染直接相关, 而非树体内韧皮部堵塞造成的碳水化合物饥饿引致。Ibanez 等^[24]通过追踪成熟叶片中 CLas 含量的动态变化, 发现植株的营养生长对 CLas 在病树体内的流动起重要作用: 碳水化合物等随着植物生长的需要在植株体内周年转运, 而病原菌随之在韧皮部中被动运输。

探清 CLas 在染病柑橘带果枝条上的运转规律

具有重要的意义: 首先, 之前的研究主要聚焦于叶片营养生长阶段与 CLas 的分布和流动的关系, 本研究则解析生殖生长对 CLas 增殖和流向的影响, 是之前理论的验证和补充。其次, 未有研究横向地比较不同类别柑橘果枝中的 CLas 分布情况。再次, 病害的早期检测依赖于对病原分布和流向的准确把握, 及时准确地隔离带 CLas 的树体, 阻断黄龙病在果园中蔓延是该病害防控的关键。为此, 本研究利用 TaqMan 实时荧光定量检测技术, 追踪了染病砂糖橘、W-默科特、红心蜜柚和沙田柚的带果枝条各个部位的 CLas 含量, 系统分析 CLas 在寄主体内的时间和空间运转规律。

表 1 本研究的植物材料基本信息
Table 1 Basic information of the plant materials in this study

柑橘品种 Citrus cultivar	采集时间 Sampling time	采集地点 Sampling location	重复 Replications	试验 ¹⁾ Experiment
砂糖橘	2016-11、	广东博罗	10	1、2
<i>Citrus reticulata</i> Blanco cv. Shatangju	2017-04/06/10	Boluo in Guangdong	10	2
红心蜜柚	2017-06/09、	广东博罗	12	1、2
<i>C. maxima</i> cv. Hongxinmi Yu	2020-03	Boluo in Guangdong	12	1
W-默科特	2017-06、2021-06	云南瑞丽	12	1
(<i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>) cv. W-Murcott		Ruili in Yunnan		
沙田柚	2016-11、2020-01	广东梅州	12	1
<i>C. maxima</i> cv. Shatian Yu		Meizhou in Guangdong		

1) 1: CLas在不同品种柑橘枝条中的分布情况; 2: CLas在不同季节柑橘枝条上的分布规律
1) 1: The distrubution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLas) in the fruit branches of different citrus cultivars; 2: The distrubution of CLas in the citrus fruit branches of different seasons

1.2 田间症状观察

分别在采样时观察所采集的柑橘枝条的黄龙病症状, 并对症状进行描述和记录。用数码相机依次拍摄所采集样品的整体及局部。拍摄枝条整体时用双面胶将枝条的主干及主要叶片固定在黑色吸光摄影布上; 拍摄枝条局部的叶片时则用双面胶将叶片背面固定在摄影布上。用最小刻度单位为 mm 的尺子测量所采集的每个枝条上果实的横径, 并用分析天平测定单果质量。

1.3 DNA 提取

所采集果枝分为老梢、新梢和果实 3 部分; 分别剪取老梢上成熟叶片的中脉, 选取新梢上完全展开的近成熟新叶并切取中脉, 将果实分为果梗、果皮、橘络、果轴和种皮 5 部分。以上样品依次切碎后用分析天平称取 0.1 g 至 2 mL 离心管中。选用 OMEGA 公司的植物 DNA 提取试剂盒 (D2485-02, OMEGA bio-tek), 按说明书的步骤提取 DNA。所提取的每份 DNA 溶于 200 μL 无核酸酶的纯净水中。

1 材料与方法

1.1 植物材料

带黄龙病的植物材料品种分别为广东博罗的砂糖橘和红心蜜柚、云南瑞丽的 W-默科特及广东梅州的沙田柚。采集的样品分别用于开展以下 2 个试验: 不同品种柑橘的枝条中 CLas 分布研究和不同季节的柑橘枝条中 CLas 分布研究。所有样品均为田间具有典型黄龙病症状的柑橘树的枝条, 所有枝条均来自不同植株且都生长有果实 (称为“果枝”)。样品信息见表 1。

取 3 μL DNA 溶液在室温下进行琼脂糖凝胶电泳, 利用凝胶成像系统对 DNA 纯度和含量进行定性分析; 用 NanoDrop ONE(Thermo Scientific,上海) 进一步对 DNA 的含量和纯度进行定量分析。经检测合格的 DNA 样品置于-20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.4 实时荧光定量 PCR

以提取的植物样品总 DNA 为模板, 以 HLBasf-4G/HLBasr 和 HLBp^[25] 为引物和探针, 用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测每个样品中的 CLas 含量。以灭菌 ddH₂O 为空白对照, 非黄龙病柑橘叶中脉提取的 DNA 为阴性对照。20 μL 的荧光定量 PCR 扩增体系包含: 1 μL DNA(质量浓度为 50 ng/μL)、10 μL Bestar qPCR Master Mix(Taqman Pro, DBI Bioscience)、8 μL ddH₂O、0.4 μL HLBasf-4G(10 μmol/L)、0.4 μL HLBasr(10 μmol/L) 及 0.2 μL HLBp (5 μmol/L)。选用 Bio-Rad Real-Time PCR 仪 (Bio-Rad Laboratories Inc., 美国) 进行 PCR。反应条件为 40 个循环的以下程序: 95 ℃, 2 min; 95 ℃, 10 s;

60 ℃, 30 s。

1.5 数据处理

以 OI1/OI2C 引物^[2] 的扩增产物与载体 pEASY-T1(TRANS, 北京) 重组质粒的 10 倍梯度稀释液为模板扩增所获得的 Ct 值作标准曲线, 对每个样品中 CLas 拷贝数进行定量。用 Thermo NanoDrop One 超微量紫外分光光度计测得上述质粒的质量浓度 (ng/μL)。质粒中含有的 CLas 目的基因拷贝数按 Harakava 等^[26] 的方法计算。通过 Real-time PCR 仪自带软件 Bio-Rad CFX Manager 3.0 得出标准化方程, 计算每个反应中的 CLas 拷贝数。每个样品中 CLas 含量则以每 ng 样品总 DNA 含有的 CLas 拷贝数表示。

采用 SPSS 软件 (Version 20.0, SPSS Inc., 美国) 和 Microsoft Excel 2016 对果实横径、质量和 CLas 含量数据进行统计学分析。采用邓肯氏新复极差 (Duncan’s multiple range test, DMRT) 法分析果实表观差异及不同品种的柑橘带病枝条不同时

期或不同部位上的黄龙病菌含量的差异。

2 结果与分析

2.1 果实成熟期不同品种柑橘果实的外形和黄龙病症状

感染了黄龙病的果实成熟期的砂糖橘 (橘类)、红心蜜柚 (柚类)、沙田柚 (柚类) 和 W-默科特 (杂柑类) 枝条的叶片和果实上均可见异常 (图 1A)。砂糖橘、红心蜜柚和沙田柚的叶片均可见较明显的斑驳黄化; 而 W-默科特叶片的斑驳症状较轻。砂糖橘的果实为着色异常的“红鼻子果”和“小果”, 其中, 病果和健康果的单果质量分别为 45.35 和 28.76 g, 横向果径分别为 47.05 和 32.49 mm, 差异均极显著。W-默科特的果实为“红鼻子果”, 其中, 病果和健康果的横径均值分别为 50.65 和 55.26 mm, 两者无显著差异。而柚类的果实则主要为“畸形果”和“小果”, 其中, 病果和健康果的横向果径分别为 167.65 和 114.67 mm, 差异极显著。

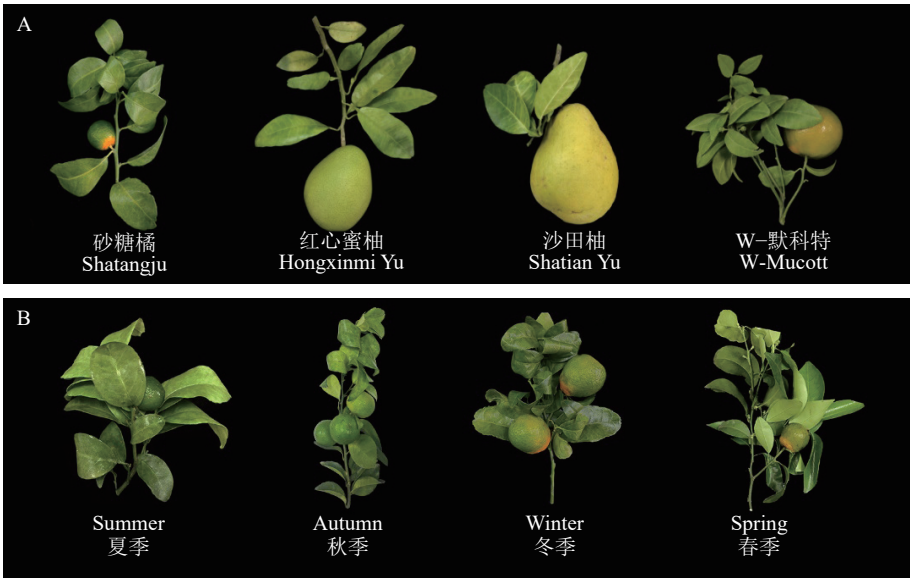


图 1 不同品种柑橘的果实成熟期果枝的黄龙病症状 (A) 及砂糖橘枝条的黄龙病四季症状 (B)

Fig. 1 Typical symptoms of Huanglongbing-affected citrus fruit branches at fruit maturity stage of different cultivars (A) and typical symptoms of Huanglongbing-affected fruit branches of *Citrus reticulata* cv. Shatangju in different seasons (B)

进一步跟踪果期较长的砂糖橘的黄龙病症状 (图 1B) 可见, 夏季时, 染病的砂糖橘枝条主要表现为新梢叶片不转绿, 叶片黄化或稍斑驳, 果实症状不明显, 田间偶见畸形的果实。秋季时, 砂糖橘病梢基部的老叶开始出现斑驳, 新叶稍黄化, 果实的症状不明显。冬季时病叶黄化加重, 病梢基部的老叶斑驳黄化、卷曲; 部分新梢叶片症状与老叶类似, 或新梢可见短小细弱、呈“缺素状”花叶的叶片;

成年病树出现小的“畸形果”“青果”“红鼻子果”。而春季的带果病梢上叶片的症状消失, “红鼻子果”的橘红色部分变淡, 但“畸形果”的特征更加明显。

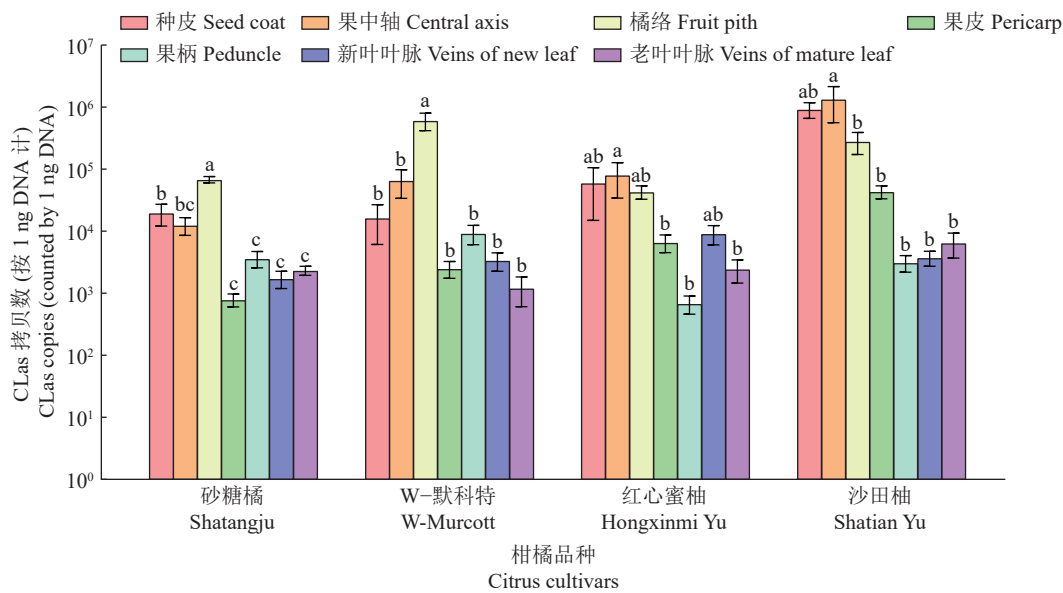
2.2 果实成熟期不同品种柑橘果枝的 CLas 分布

对感染黄龙病的 4 种柑橘果实枝条中的 CLas 含量进行定量分析, 结果 (图 2) 显示 CLas 在不同品种柑橘枝条上不同部位的含量差异明显。砂

糖橘枝条不同部位每 ng 样品 DNA 中所含的 CLas 拷贝数范围为 53.27~113 381.01, 在 W-默科特、红心蜜柚和沙田柚枝条中拷贝数范围依次为 39.42~1 847 528.92、129.29~259 160.56 和 208.42~5 897 051.07。

对 4 个品种的枝条 7 个部位 (老叶叶脉、新叶叶脉、果柄、果皮、橘络、果中轴和种皮) 的 CLas 含量进行分析表明, 砂糖橘和 W-默科特枝条中的 CLas 含量分布规律类似: 砂糖橘橘络中的 CLas 含量显著高于其余 6 个部位; 种皮中的 CLas 含量又显著高于橘络和果中轴外的其余 4 个部位; 果中轴

和种皮中的 CLas 含量无显著差异。对于 W-默科特, 橘络中的 CLas 含量显著高于其余部位; 除橘络外的 6 个部位中的 CLas 含量无显著差异。柚类的红心蜜柚和沙田柚枝条中的 CLas 含量分布规律也类似: 沙田柚的果中轴海绵状组织中的 CLas 含量显著高于种皮以外的其余 5 个部位, 而这 5 个部位之间及与种皮的 CLas 含量差异不显著; 红心蜜柚的果中轴中的 CLas 含量显著高于果柄、果皮和老叶叶脉中的, 种皮、橘络和新叶叶脉中的 CLas 含量较果中轴的低, 但是差异不显著; 果柄、果皮和老叶叶脉的 CLas 含量差异也不显著。



相同品种柱子上的不同字母表示不同部位间差异显著 ($P<0.05$, DMRT 法)
Different lowercase letters on bars of the same cultivar indicate significant differences among different parts ($P<0.05$, DMRT method)

图 2 果实成熟期的不同品种柑橘果枝中的 ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ 含量分布

Fig. 2 Distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in Huanglongbing-affected fruit branches of different cultivars at fruit maturity stage

2.3 不同季节的砂糖橘带果枝条中的 CLas 分布

砂糖橘的果期长, 每年 4—5 月时果实形成, 可部分留树挂果至来年 2—3 月。CLas 在不同季节的染病砂糖橘果枝上的分布都不均匀, 在果实处富集 (图 3)。在果实的橘络部位, CLas 的含量在夏季外的其余 3 个季节都显著高于其他部位。夏季时橘络和果皮处的病菌含量最高, 每 ng DNA 中 CLas 平均拷贝数分别为 5 226.58 和 5 207.66, 与果柄和老叶叶脉处相比有显著性差异 ($P<0.05$); 由于此时果实发育不完全, 种子的分化不明显, 该季节未取种皮作检测。

夏季的砂糖橘枝条 (果实形成期) 中 CLas 含量显著低于其他季节的 ($P<0.05$); 而在冬季 (果实成熟期) 和春季 (果实成熟后期) 时, 枝条中 CLas 含量

最高。自夏季至秋季 (果实膨大期), 枝条中除果皮外的其他部位中的 CLas 含量均增高; 而自夏季至春季, 橘络和果中轴中的 CLas 含量逐步递增, 橘络中的 CLas 含量上升趋势尤为明显: 第 2 年 4 月留树病果的每 ng 橘络总 DNA 所含 CLas 的平均拷贝数为 237 044.89, 是前一年 6 月幼果相应部位的 45 倍 (图 3)。

2.4 不同季节的红心蜜柚带果枝条中的 CLas 分布

因红心蜜柚植株带果期较短, 果实在夏季形成与膨大, 秋季采摘, 病果可留树至第 2 年春季后掉落。红心蜜柚枝条中, CLas 含量最高的部位是果中轴, 其次是种皮和橘络 (图 4)。夏季时, 枝条上不同部位每 ng 样品总 DNA 中所含的 CLas 拷贝数范

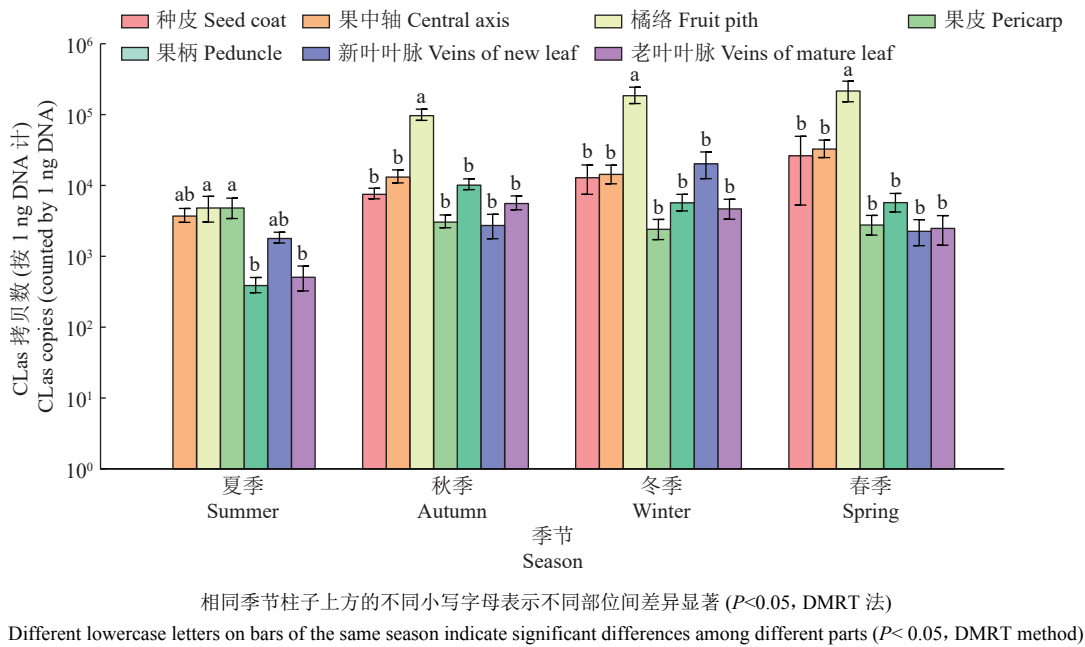


图 3 砂糖橘果枝各部位的 ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ 含量随季节变化

Fig. 3 Quantification of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in different parts of Huanglongbing-affected fruit branches of *Citrus reticulata* cv. Shatangju in different seasons

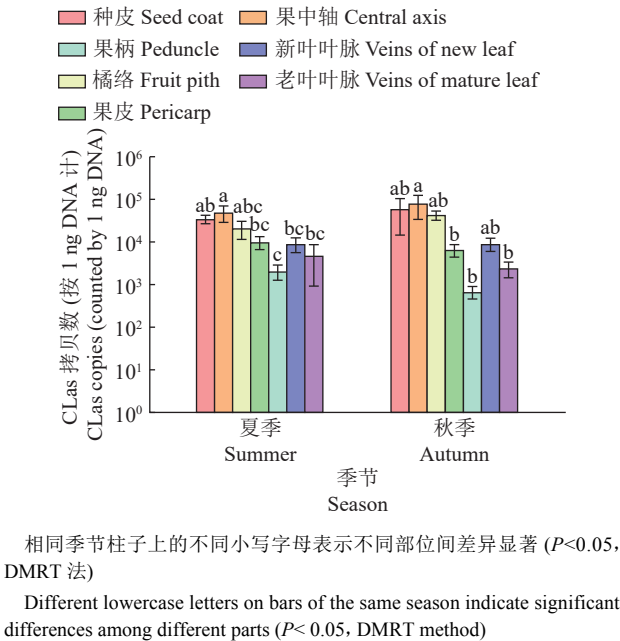


图 4 红心蜜柚果枝各部位的 ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ 含量随季节变化

Fig. 4 Quantification of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in different parts of Huanglongbing-affected fruit branches of Hongxinmi Yu pumelo in different seasons

围为 77.91~207 849.73。果中轴中的 CLAs 含量显著高于果皮、叶片叶脉和果柄中的,但与种皮和橘络中的 CLAs 含量无显著差异。秋季时,每 ng 样品总 DNA 中所含的 CLAs 拷贝数范围为 129.29~259 160.59;类似地,果中轴的 CLAs 含量显著高于果皮、老叶叶脉和果柄中的 CLAs 含量,而与种皮、

橘络、新叶叶脉中的 CLAs 含量差异不显著。随着果实逐渐成熟,果轴、种皮等果实部位的 CLAs 含量升高,而果柄、叶片等部位的 CLAs 含量降低。

3 讨论与结论

黄龙病菌 CLAs 在枝条中的分布因寄主品种而异。本试验的 4 种柑橘枝条中,CLAs 均在果实处呈现富集趋势,但砂糖橘、W-默科特的 CLAs 含量最高部位是橘络,柚类的则是果中轴。柚类常被认为是较抗病的品种^[7],但本研究从红心蜜柚和沙田柚中检测到的 CLAs 细菌数最大值均高于砂糖橘的相应值,即柚类的韧皮部适合 CLAs 大量繁殖,说明其不属于抗病品种;而柚类由于其树冠较大及受“大肥大水”(肥水施用量较大)和“重修剪”(枝条修整的力度较大)等栽培管理措施的影响,局部感染黄龙病后对整个树体的产量影响不大,因此在生产上被认为是较耐病的品种。本研究还发现感染黄龙病的 W-默科特枝条各部位的 CLAs 含量普遍高于砂糖橘的,但黄龙病对 W-默科特果实大小的影响不大,这之前对砂糖橘的报道不同^[23];由结果可推测,W-默科特可能是较耐黄龙病的品种,后期应辅以果实产量和品质测定数据来验证。

随着季节变换,CLAs 在柑橘枝条中的分布及含量发生显著变化^[16-18, 20-21, 24, 27]。本研究显示各季节成熟柑橘叶片中脉中的 CLAs 含量排序为秋季>冬季>春季>夏季,这与之前的诸多研究报道基本相符。本试验对柑橘果枝上 7 个部位的黄龙病菌数量

进行跟踪检测,更全面地展示了 CLas 在寄主枝条中的动态分布规律。黄龙病的传播媒介柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 喜食嫩梢,带菌木虱中的 CLas 首先在嫩叶中定殖并积累^[28]。吴柳等^[29]通过叶圆片嫁接试验,也提出 CLas 在柑橘原初侵染部位的早期扩散与叶片上表现出的黄龙病症状向外扩散趋势一致。这也能够解释为什么本试验的新叶中脉中的 CLas 含量通常略高于老叶中脉的。

与叶片中 CLas 含量的变化规律不同,本研究结果显示随着果实生长,CLas 逐渐向果实处富集,这与褚丽萍等^[18]的研究结果相似:CLas 含量排序为夏季<秋季<冬季<次年春季。有研究提出 CLas 的含量与树体在 15℃ 以下的时长以及雨累积量呈正相关,而与树体在 30℃ 以上的时长呈负相关^[27]。本试验材料取自广东和云南地区,这两地属于亚热带季风气候区,夏季高温,冬季及初春温暖湿润,柑橘树体中的 CLas 含量与环境有一定的联系。一方面,推测冬季树体营养生长渐弱、抵抗能力下降,病原菌得以在枝条中大量繁殖并积累。另一方面,CLas 的基因组简单,是营养缺陷型细菌,需要从寄主韧皮部中获取糖类等营养物质才能生存^[30-31];在果实成熟的过程中,柑橘叶片的光合作用产物是从源(叶)向库(如果实、茎、根和种子)分配,CLas 则随之流动。CLas 对寄主营养的需求和偏好性与寄主本身物质流的方向有关^[6]。本研究证实了植物体内黄龙病病原菌移动与源-库营养流动的关联性。

我们已对橘络含高含量 CLas 的情况和原因进行了探析和讨论^[19]。本研究还从病果种子的种皮组织中检测到较高含量的 CLas。在黄龙病树中,嫩梢和根部等处的筛孔被胼胝质或其他物质堵塞而缩小;而种皮中却未发现筛孔被堵塞现象,开放的筛孔使细胞间的 CLas 得以自由移动^[8]。由于种皮和发育中的胚或胚乳之间没有直接的维管束相连,所以对黄龙病菌来说,种皮内的韧皮部是没有出口的“陷阱”。Tatineni 等^[11]未在柑橘种子的胚和胚乳中检测到 CLas,也同样说明 CLas 从种皮到胚转移被截断。种皮通常在种子萌发过程中脱落,其所带的 CLas 不会使胚芽萌发出的砧木实生苗带病。

掌握黄龙病菌在柑橘体内的运转规律对有效地控制黄龙病至关重要。本研究探索了 CLas 在不同寄主果枝不同部位的分布规律和随季节的变化动态,推测该规律也适用于未显症的果枝。因此,研究结果可为黄龙病的早期检测和田间管理策略的制定提供参考。

参考文献:

[1] Center for Agriculture and Bioscience International. Citrus huanglongbing (greening) disease(citrus greening) [EB/OL]. [2021-11-11]. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16567>.

[2] JAGOUEIX S, BOVÉ 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.

[3] SAGARAM U S, DEANGELIS K M, TRIVEDI P, et al. Bacterial diversity analysis of Huanglongbing pathogen-infected citrus, using PhyloChip arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(6): 1566-1574.

[4] LOPES S A, FRARE G F, BERTOLINI E, et al. Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is heat tolerant, ‘*Ca. L. americanus*’ is heat sensitive[J]. *Plant Disease*, 2009, 93(3): 257-262.

[5] JOHNSON E G, WU J, BRIGHT D B, et al. Association of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms[J]. *Plant Pathology*, 2014, 63(2): 290-298.

[6] WANG N, PIERSON E A, SETUBAL J C, et al. The *Candidatus Liberibacter*-host interface: Insights into pathogenesis mechanisms and disease control[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2017, 55(1): 451-482.

[7] 林孔湘. 柑桔黄梢(黄龙)病研究: I: 病情调查[J]. *植物病理学报*, 1956, 2(1): 1-11.

[8] ACHOR D, WELKER S, BEN-MAHMOUD S, et al. Dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* movement and sieve-pore plugging in citrus sink cells[J]. *Plant Physiology*, 2020, 182(2): 882-891.

[9] BOVÉ J M. Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: Will it destroy citrus worldwide?[J]. *Phytoparasitica*, 2014, 42(5): 579-583.

[10] ZHENG Z, CHEN J, DENG X. Historical perspectives, management and current research of citrus HLB in Guangdong province of China, where the disease has been endemic for over a hundred years[J]. *Phytopathology*, 2018, 108(11): 1224-1236.

[11] TATINENI S, SAGARAM U S, GOWDA S, et al. In planta distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR[J]. *Phytopathology*, 2008, 98(5): 592-599.

[12] LI W, LEVY L, HARTUNG J S. Quantitative distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants with citrus huanglongbing[J]. *Phytopathology*, 2009, 99(2): 139-144.

[13] SAUER A V, ZANUTTO C A, NOCCHI P T R, et al. Seasonal variation in populations of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus trees in Paraná State,

- Brazil[J]. *Plant Disease*, 2015, 99(8): 1125-1132.
- [14] LOUZADA E S, VAZQUEZ O E, BRASWELL W E, et al. Distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ above and below ground in Texas citrus[J]. *Phytopathology*, 2016, 106(7): 702-709.
- [15] HU H, ROY A, BRLANSKY R H. Live population dynamics of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, the bacterial agent associated with citrus huanglongbing, in citrus and non-citrus hosts[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(7): 876-884.
- [16] 李智鹏, 关巍, 黄洋, 等. 柑橘黄龙病菌在寄主体内含量动态变化研究[J]. *果树学报*, 2019, 36(11): 1540-1548.
- [17] MUNIR S, LI Y, HE P, et al. Seasonal variation and detection frequency of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Binchuan, Yunnan province China[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2019, 106: 137-144.
- [18] 褚丽萍, 郑正, 邓晓玲. 定量分析柑桔黄龙病菌在沙糖桔中的分布[J]. *中国南方果树*, 2016, 45(6): 42-43.
- [19] FANG F, GUO H, ZHAO A, et al. A significantly high abundance of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in citrus fruit pith: In planta transcriptome and anatomical analyses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 1412.
- [20] 陈传武, 付慧敏, 邓崇岭, 等. 柑橘和黄皮中黄龙病菌含量动态变化[J]. *南方农业学报*, 2015, 46(6): 1024-1028.
- [21] 李敏, 鲍敏丽, 黄家权, 等. 柑橘黄龙病菌在寄主根部的消长规律研究[C]//彭友良, 李向东. 中国植物病理学会 2017 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2017: 296.
- [22] 陈燕玲, 唐瑞, 刘洋, 等. 黄龙病菌在柑橘枝条上的分布和多样性分析[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(6): 728-737.
- [23] 张培, 关磊, 刘蕤, 等. 砂糖橘红鼻子果与韧皮部杆菌感染相关性研究[J]. *热带作物学报*, 2011, 32(4): 738-742.
- [24] IBANEZ F, STELINSKI L L. Temporal dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* titer in mature leaves from *Citrus sinensis* cv Valencia are associated with vegetative growth[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2019, 113(2): 589-595.
- [25] BAO M, ZHENG Z, SUN X, et al. Enhancing PCR capacity to detect ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ utilizing whole genome sequence information[J]. *Plant Disease*, 2019, 104(2): 527-532.
- [26] HAKAKA R, MARAIS L J, OCHASAN J, et al. Improved sensitivity in the detection and differentiation of citrus huanglongbing bacteria from South Africa and the Philippines[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2000, 7(11): 1712-1716.
- [27] LOPES S A, LUIZ F Q B F, OLIVEIRA H T, et al. Seasonal variation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ titers in new shoots of citrus in distinct environments[J]. *Plant Disease*, 2017, 101(4): 583-590.
- [28] ANDRADE M O, PANG Z, ACHOR D S, et al. The flagella of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and its movement in planta[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(1): 109-123.
- [29] 吴柳, 白晓晶, 文庆利, 等. 柑橘黄龙病病原菌 CLas 在叶圆片嫁接接种的 ‘锦橙’ 中早期扩散研究[J]. *园艺学报*, 2018, 45(11): 2121-2128.
- [30] DUAN Y, ZHOU L, HALL D G, et al. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ obtained through metagenomics[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(8): 1011-1020.
- [31] 樊晶. 柑橘宿主对黄龙病病原菌侵染的应答机制[D]. 重庆: 重庆大学, 2010.

【责任编辑 霍 欢】