



黄金萍, 黄建邦, 高 娃, 等. 柑橘木虱取食黄龙病柑橘部位与获菌效率的关系[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(1): 71-74.

柑橘木虱取食黄龙病柑橘部位与获菌效率的关系

黄金萍^{1†}, 黄建邦^{1†}, 高 娃^{1,2}, 曾丽霞¹, 黄有明¹, 宋银平¹, 岑伊静¹

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 包头市农业科学研究所, 内蒙古 包头 014060)

摘要:【目的】明确柑橘木虱 *Diaphorina citri* 获毒的最佳取食部位和最短吸食时间, 为生产实践中防治柑橘黄龙病提供依据。【方法】通过 PCR 测定了健康的柑橘木虱取食感染黄龙病的马水橘 *Citrus reticulata* Blanco. cv. Mashuiju 和酸橘 *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka 的嫩梢、成熟叶和老叶 24 h 后的获菌效率。【结果和结论】取食马水橘 3 个部位的获菌效率差异显著: 成熟叶 > 嫩梢 > 老叶。取食酸橘 3 个部位的获菌效率也有差异: 老叶 > 成熟叶 > 嫩梢, 其中老叶和成熟叶的获菌效率均显著高于嫩叶, 但前两者差异不显著。对柑橘木虱取食 2 个品种的 3 个部位进行比较, 取食马水橘嫩梢的获菌效率显著高于酸橘, 而取食酸橘老叶的获菌效率则显著高于马水橘, 取食 2 个品种成熟叶片的获菌效率差异不显著, 2 个品种整株总的获菌效率相同, 均为 36.67%。

关键词: 柑橘木虱; 黄龙病; 取食部位; 获菌效率

中图分类号: Q968.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2015)01-0071-04

Studies on the relationship between feeding sites and bacterium acquisition efficiency of *Diaphorina citri* on Huanglongbing-infected citrus

HUANG Jinping^{1†}, HUANG Jianbang^{1†}, GAO Wa^{1,2}, ZENG Lixia¹,
HUANG Youming¹, SONG Yinping¹, CEN Yijing¹

(1 College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Baotou Institute of Agricultural Science, Baotou 014060, China)

Abstract:【Objective】To clarify the best feeding sites and the shortest time of *Diaphorina citri* Kuwayama in spreading Huanglongbing (HLB) and to provide guidance for the prevention and control of HLB.【Method】The bacterium acquisition efficiency of *D. citri* was tested by PCR, which had been fed on three different parts: tender shoots, mature leaves and old leaves of infected *Citrus reticulata* Blanco. cv. Mashuiju and *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka for 24 h.【Result and conclusion】The results showed that the infected rates of *D. citri* were significantly different among the three parts of *C. reticulata*. The infected rate on mature leaves was the highest and old leaves was the lowest. The bacterium acquisition efficiencies were also different among the three parts of *C. sunki*. The infected rates of old and mature leaves were both significantly higher than those of tender shoots. There was no significant difference between the old and mature leaves. The bacterium acquisition efficiency of *D. citri* feeding on tender shoots of *C. reticulata* was significantly higher than that on *C. sunki*, while on old leaves of *C. sunki* were significantly higher than that on *C. reticulata*, and there was no significant difference between the 2 species when

收稿日期: 2014-03-25 优先出版时间: 2014-12-02

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7671/j.issn.1001-411X.2015.01.013.html>

作者简介: 黄金萍 (1991—), 女, 硕士研究生, E-mail: 954585463@qq.com; 黄建邦 (1990—), 男, E-mail: 570205563@qq.com;

† 对本文贡献相同; 通信作者: 岑伊静 (1966—), 女, 副教授, 博士, E-mail: cenyj@scau.edu.cn

基金项目: 广东省教育厅 2012 年“广东省质量工程项目创新训练项目”; 公益性行业(农业)科研专项 (201003067-01)

feeding on mature leaves. The two hosts had the same infected rate of 36.67% when compared feeding on the whole plants.

Key words: *Diaphorina citri* Kuwayama; Huanglongbing; feeding site; bacterium acquisition efficiency

柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 也称亚洲柑橘木虱,属半翅目 Hemiptera 木虱科 Psyllidae,为害柑橘 *Citrus reticulata* Blanco、枸橼 *Citrus medica* L.、黄皮 *Clausena lansium* (Lour) Skeels、九里香 *Murraya exotica* (L.) Jacks 等芸香科植物,是柑橘类新梢期的主要害虫,若虫排泄一种白色分泌物粘附于叶上,会引致煤烟病发生^[1]。柑橘木虱喜通风透光处,果园暴露、树冠稀疏为害常较重。苗圃和幼年树经常抽发嫩芽新梢,也易发生木虱为害,严重时引起新梢生长不良,畸形扭曲,甚至慢慢干枯萎缩^[2]。柑橘黄龙病病原菌属于变形菌门 Proteobacteria, α -变形菌纲 α -proteobacterial,根瘤菌目 Rhizobiales,根瘤菌科 Rhizobiaceae,候选的韧皮部杆菌属 *Candidatus Liberibacter*^[3]。根据病原 16S rDNA 和 β -操纵子基因的序列特征,以及传病媒介和病原性质,该属分为亚洲种 "*Candidatus Liberibacter asiaticus*"、美洲种 "*Ca. L. americanus*" 和非洲种 "*Ca. L. africanus*"^[4] 3 种。前 2 种的媒介昆虫主要为柑橘木虱^[5],非洲种由非洲柑橘木虱 *Trioza erythrae* Del Guercio 传播^[6]。在我国发生的黄龙病为亚洲种。由于该病原菌属于难纯培养细菌^[7],其营养需求、胞壁成分和基因组成等方面的资讯甚为缺乏,造成分类研究上的困难。

尽管云南发现为害柑橘的柚喀木虱 *Cacopsylla citrisuga* (Yang & Li) 也携带和传播黄龙病菌^[8-11],柑橘木虱仍然为我国柑橘黄龙病主要的媒介昆虫。柑橘木虱获取黄龙病菌的时间很短,在病树韧皮部取食 1 h 就能检测出病原的存在^[12]。带菌成虫在柑橘苗上取食 5 h 以上会传病^[13]。获菌饲育成虫和从带毒若虫羽化的成虫均能在短时间内获菌传病,说明木虱成虫在田间自然传播黄龙病病原的效率相当高^[14]。柑橘木虱具有趋嫩性,无嫩梢时则在成熟叶片或老叶的叶背取食。本文比较了柑橘木虱取食感染黄龙病柑橘植株的嫩梢、成熟叶片和老叶后的获菌效率,以期为黄龙病防治提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及仪器

华南农业大学校园的九里香 *Murraya exotica*
<http://xuebao.scau.edu.cn>

(L.) Jacks 上采集柑橘木虱成虫,转饲到网室内栽培的健康九里香上繁殖多代。

从华南农业大学黄龙病研究室繁育的沙糖橘 *Citrus reticulata* Blanco. cv. Shatangju 黄龙病盆栽苗上采集病芽,嫁接到健康酸橘上使其感染黄龙病。1 年后将沙糖橘病芽摘除,表现典型黄龙病症状的酸橘通过 Nested-PCR 检测呈黄龙病亚洲种阳性。

血液/组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒、蛋白酶 K (广州天根生物工程有限公司); *rTaq*、dNTPs、10 × Buffer、DL2000 DNA Marker (Takara 公司); 绿如蓝核酸染料 (广州蓝泽生物科技有限公司)。PCR 引物由上海英捷生物技术公司合成; RTC-0200 DNA Engine Cycles (Bio-RAD 公司)、PAC 300 型恒压恒流电泳仪 (Bio-RAD 公司)、LabworksTM 凝胶成像系统 (UVP 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 柑橘木虱的饲菌方法 每个品种分别选用 3 株带有嫩梢、成熟叶、老叶且发病程度和长势一致的病苗进行饲菌试验。其中最顶端叶片未完全展开的为嫩梢,嫩梢下一级枝梢上为成熟叶,成熟梢下一级枝条上为老叶。每个植株成熟叶和老叶均带有典型的黄龙病斑驳黄化症状。1 株苗为 1 个重复。在每 1 株黄龙病植株的嫩梢、成熟叶、老叶 3 个部位上,分别用 1 个透明带封口的塑料袋套袋后接 10 头健康的柑橘木虱成虫,每株共接 30 头,让柑橘木虱在各个部位上取食 24 h 后取下,单头提取 DNA,通过 PCR 分别检测木虱的获菌效率。塑料袋使用前用针扎适当数量的小孔以利于透气。

1.2.2 柑橘木虱 DNA 的提取及 Nested-PCR 检测 用天根试剂盒提取单头柑橘木虱的 DNA (方法参照天根试剂盒说明书)。

获得的单头木虱 DNA 采用 Nested-PCR 法检测黄龙病亚洲种病菌。使用未经饲毒木虱的 DNA 做为阴性对照组模板。第 1 轮扩增采用的引物^[15]为 27F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 和 1500R: 5'-AAG-GAGGTGATCCAGCCGC-3'; 第 2 轮采用黄龙病亚洲种病菌特异引物^[16] OII: 5'-GCCGGTATGCAAT-ACGAGCGGCA-3' 和 OI2c: 5'-GCCTCGCGACTTCG-

CAACCCAT-3'. 扩增体系与反应条件同 Cen 等^[11]. 扩增后电泳检测.

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS19.0 进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 柑橘木虱取食马水橘病苗的获菌效率

柑橘木虱在马水橘病苗的嫩梢、成熟叶和老叶 3 个部位取食 24 h 后,单头提取 DNA 并进行 PCR 检测,结果表明,取食成熟叶片的木虱获菌率最高,平均为 66.67%,嫩梢次之,平均为 33.33%,老叶部位的获菌效率最低,平均仅为 10.00%. 病树 3 个部位饲菌后柑橘木虱平均获菌率相互之间差异显著 ($P < 0.05$),表明吸食部位与获菌效率有关(表 1).

2.2 柑橘木虱取食酸橘病苗的获菌效率

木虱取食酸橘病苗的嫩梢、成熟叶和老叶 3 个部位的获菌效率比较结果表明,取食老叶获菌率最

高,平均为 60.00%,成熟叶片次之,平均为 43.33%,嫩梢部位的获菌效率最低,平均仅为 6.67%. 取食老叶和成熟叶片的获菌效率差异不显著 ($P > 0.05$),但两者都显著高于嫩梢 ($P < 0.05$),表明吸食部位与获菌率相关(表 1).

2.3 柑橘木虱取食马水橘、酸橘病苗获菌效率的比较

柑橘木虱在马水橘病苗上的获菌效率由高到低的顺序为:成熟叶片 > 嫩梢 > 老叶,而在酸橘上为:老叶 > 成熟叶片 > 嫩梢. 说明饲菌部位与获菌效率有关,但在 2 个品种上的结果不一致. 2 个品种在相同部位的比较结果,在马水橘嫩梢上的获菌效率显著高于酸橘,而在马水橘老叶上的获菌效率则显著低于酸橘(表 1). 在 2 个品种成熟叶片上的差异不显著,在全部 3 个部位上取食后平均每株获菌率差异也不显著,均为 36.67%. 2 个品种不同部位饲菌结果的差异可能与病原在不同部位的浓度以及木虱对该部位的取食行为有关.

表 1 柑橘木虱取食黄龙病酸橘与马水橘的不同部位获菌效率比较¹⁾

Tab. 1 Comparisons of bacterium acquisition efficiency of Asian citrus psyllid feeding on different parts of huanglongbing-infected *Citrus reticulata* and *Citrus sunki*

品种	获菌率/%			
	嫩梢	成熟叶	老叶	全株
马水橘	33.33 ± 3.33** b	66.67 ± 6.67c	10.00 ± 5.77a	36.67 ± 3.85
酸橘	6.67 ± 3.33a	43.33 ± 8.82b	60.00 ± 15.28* b	36.67 ± 1.93

1) 表中数据为平均值 ± 标准误,“*”、“**”分别表示不同品种同一部位在 0.05、0.01 水平上差异显著(t 检验);同行数据凡具有一个相同字母者表示差异不显著 ($P > 0.05$, DMRT 法检验).

3 讨论与结论

柑橘黄龙病病原菌是一种韧皮部杆菌属革兰氏阴性菌,在韧皮部内分布不均匀,同一株树各枝各梢发病症状、时间呈现也不同^[17]. 本试验结果证明了柑橘木虱吸食病树的老叶、成熟叶、嫩梢其获菌率有显著差异,说明吸食部位与获菌效率密切相关.

但是吸食部位与获菌效率在马水橘、酸橘这 2 个品种上的表现不一致. 吸食马水橘 3 个部位的获菌效率由高到低的顺序为:成熟叶 > 嫩梢 > 老叶,而酸橘为:老叶 > 成熟叶 > 嫩梢. 这种差异可能与病原在 2 个品种各个部位的浓度差异有关. Li 等^[18]的研究结果表明,黄龙病病原菌的浓度在不同染病柑橘品种上、同一品种不同植株、同一染病植株的不同部位上差异很大,在自然染病的植株地上部分组织(包括叶中脉、叶片和树皮)中每 1 g 样本平均有 10^{10} 个病菌基因组,部分取自相同植株的根部样本中也检

测到相似的病原浓度水平,其中植株中下部的叶片病原浓度高于顶部嫩叶. Kunta 等^[19]比较了德克萨斯州感染黄龙病的葡萄柚 *Citrus paradisi* Macf 和甜橙 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 果柄、果轴、种子、叶片中脉、叶片(除去中脉)、叶边缘、嫩叶、嫩梢、花蕾、花、树干的病原浓度,发现果柄、果轴、叶片中脉上的浓度显著高于其他部位,嫩梢上的浓度最低. 这 2 个研究结果均显示成熟的叶片比嫩梢或嫩叶病原浓度高,与本试验结果中取食成熟叶片的获菌效率高于嫩梢相吻合.

柑橘木虱吸食黄龙病马水橘老叶的获菌效率则显著低于嫩梢和成熟叶片,而吸食酸橘老叶获菌率则显著高于嫩梢,除了可能与病原在 2 个品种的分布不同有关之外,还可能与两者老叶的成熟度、木虱的趋性、叶片的营养和吸食时间有关. 木虱具有趋嫩性,在有嫩梢的条件下一般不选择老叶取食,尽管本试验中 2 个品种各部位的饲毒时间均为 24 h,但在

此期间木虱在各部位的取食时间可能不同. 杨成良等^[20]用刺吸电位图谱技术测定了柑橘木虱在健康柑橘上吸食嫩叶的过程,在记录的8 h中木虱口针有74%的时间均在韧皮部吸食,但是如果在感染黄龙病的柑橘上取食,木虱口针的路径波和分泌唾液波时间会显著延长,而在韧皮部的吸食时间显著减少^[21],说明柑橘感染黄龙病后增加了木虱取食的障碍.2个品种老叶上获菌效率的差异有待于进一步用EPG进行验证.

柑橘木虱取食马水橘、酸橘病苗的嫩梢和老叶2个部位时,2个品种之间获菌效率差异达到显著水平,在成熟叶片之间的获菌效率则比较稳定,2个品种之间差异不显著,但均显著高于嫩梢.因此,在柑橘上取样检测黄龙病时建议采集成熟叶片.

参考文献:

- [1] 陈冰,戈丽清,袁亦文.温州地区柑橘木虱田间预测办法研究[J].温州农业科技,2008(2):22-24.
- [2] 兰景华.柑橘叶片主要害虫的防治[J].四川农业科技,2007(3):47-49.
- [3] JAGOUEIX S, BOVÉ J M, GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the proteobacteria[J]. Int J Syst Evol Micr,1994,44(3):379-386.
- [4] TEIXEIRA D D, DANET J L, EVEILLARD S, et al. Citrus Huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus Liberibacter' species associated with the disease[J]. Mol Cell Probe,2005,19(3):173-179.
- [5] COLETTA-FILHO H D, TAKITA M A, TARGON M L P N, et al. Analysis of 16S rDNA sequences from citrus Huanglongbing bacteria reveal a different "Ca. Liberibacter" strain associated with citrus disease in Sao Paulo[J]. Plant Dis,2005,89(8):848-852.
- [6] MCCLEAN A P D, OBERHOLZER P C J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange[J]. S Afr J Sci,1965,8:197-298.
- [7] HOCQUELLET A, TOORAWA P, BOVE J M, et al. Detection and identification of the two *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the beta operon [J]. Mol Cell Probe,1999,13(5):373-379.
- [8] CEN Y J, ZHANG L N, XIA Y L, et al. Detection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in *Cacopsylla (Psylla) citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae) [J]. Fla Entomol, 2012,95(2):303-309.
- [9] 郭俊,岑伊静,王自然,等.柚喀木虱的形态、生物学特性及发生规律研究[J].华南农业大学学报,2012,33(4):475-479.
- [10] 周文静,蒲雪莲,张丽娜,等.柚木虱体内韧皮部杆菌亚洲种多基因位点的分子鉴定[J].中国南方果树,2012,41(3):1-5.
- [11] CEN Y J, GAO J, DENG X L, et al. A new insect vector of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Cacopsylla (Psylla) citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae) [C]. // Anon. XII International Citrus Congress, Valencia:Springer,2012:194.
- [12] BONANI J P, APPEZZATO-DA-GLORIA B, FERERES A, et al. Leaf age influencing acquisition of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by the psyllid vector *Diaphorina citri* [C]. // Anon. International Research Conference on Huanglongbing, Orlando:Springer,2008:249.
- [13] 许长藩,夏雨华,李开本,等.柑橘木虱传播黄龙病的规律及病原在虫体内分布的研究[J].福建省农科院学报,1988(2):57-62.
- [14] 许长藩,夏雨华,李开本,等.柑橘黄龙病的病原在木虱体内循环期的研究[J].植物病理学报,1990,(1):27-33.
- [15] BRITSCHGI T B, GIOVANNONI S J. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton by rRNA gene cloning and sequencing[J]. Appl Environ Micro,1991,57:1313-1318.
- [16] JAGOUEIX S, BOVE J M, GARNIER M. PCR detection of two 'Candidatus Liberibacter' species associated with greening disease of citrus[J]. Mol Cell Probe,1996,10:43-50.
- [17] 陈传武,白先进,赵小龙,等.柑橘黄龙病 nested-PCR 检测技术在柑橘苗木生产中的应用[J].植物保护,2009,35(3):91-93.
- [18] LI W, LEVY L, HARTUNG J S. Quantitative distribution of "Candidatus Liberibacter asiaticus" in citrus plants with citrus Huanglongbing[J]. J Phytopathol,2009,99(2):139-144.
- [19] KUNTA M, DAGRAÇA J V, MALIK N S, et al. Quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the aerial parts of the Huanglongbing-infected citrus trees in Texas[J]. J Hort Sci,2014,49(1):65-68.
- [20] 杨成良,岑伊静,梁广文,等.亚洲柑橘木虱的刺吸电位图谱研究[J].华南农业大学学报,2011,32(1):49-52.
- [21] CEN Y J, YANG C L, HOLFORD P, et al. Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and Huanglongbing-infected citrus [J]. Entomol Exp Appl,2012,143(1):13-22.

【责任编辑 霍欢】