

湖南省永州地区柑橘慢衰病与黄龙病病原鉴定及分布调查

宋志强^{1,2}, 成飞雪², 程菊娥², 张德咏^{1,2}, 何代进³, 刘勇^{1,2*}

(1. 湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128; 2. 湖南省农业科学院植物保护研究所, 园艺作物病虫害综合治理湖南省重点实验室, 长沙 410125; 3. 湖南生物机电职业技术学院, 长沙 410127)

摘要 为明确湖南省柑橘黄化症状与柑橘慢衰病和柑橘黄龙病的相关性,应用形态学和分子生物学方法对湖南省永州地区表现黄化症状的柑橘进行了两种病原的鉴定及分布调查。结果表明,造成该地区柑橘黄化现象的主要原因为柑橘半穿刺线虫和黄龙病菌对柑橘的侵染。所检样本中,柑橘慢衰病平均发生率为82.1%,土壤中的半穿刺线虫群体密度最高达到3 077条/100 mL。永州地区柑橘黄龙病病菌属于韧皮部杆菌属类细菌亚洲种,平均检出率为64.3%。柑橘半穿刺线虫和黄龙病菌在柑橘园存在混合侵染现象,混合侵染率为53.6%。柑橘半穿刺线虫在永州地区柑橘产区分布广泛,是造成柑橘黄化症状的重要病因,重视并有效防控柑橘半穿刺线虫已迫在眉睫。

关键词 柑橘慢衰病; 柑橘黄龙病; 柑橘半穿刺线虫; 病原鉴定; 分布调查

中图分类号: S 436.66 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.04.032

Identification and distribution survey of the pathogens of citrus slow decline disease and citrus Huanglongbing in Yongzhou City, Hunan Province

Song Zhiqiang^{1,2}, Cheng Feixue², Cheng Ju'e², Zhang Deyong^{1,2}, He Daijin³, Liu Yong^{1,2}

(1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Key Laboratory of Integrated Management of the Pests and Diseases on Horticultural Crops, Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China; 3. Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha 410127, China)

Abstract In order to determinate the correlation between etiolation symptoms of citrus in Hunan Province and citrus slow decline disease and citrus Huanglongbing (HLB), leaf, root and soil samples were collected from citrus with etiolation symptoms in Yongzhou City, Hunan Province and the identification and distribution survey of two pathogens were carried out based on morphological characteristics and molecular biology techniques. The results showed that the infection of *Tylenchulus semipenetrans* and HLB pathogen were the main cause of etiolation phenomenon of citrus in this area. The average incidence rate of *T. semipenetrans* in collected samples was 82.1%. The highest population density of juveniles in samples was reached to 3 077 nematodes per 100 mL soil. The HLB pathogen is *Candidatus Liberibacter asiaticus* and the average detection rate was 64.3% in Yongzhou City. There were mixed infection of *T. semipenetrans* and HLB pathogen in citrus orchards and mixed infection rate was 53.6%. *T. semipenetrans* is widely distributed in citrus growing regions of Yongzhou City, and it is the important cause of large range of etiolation symptoms of citrus. There is extremely urgent for paying attention to and effectively controlling *T. semipenetrans*.

Key words citrus slow decline disease; citrus Huanglongbing; *Tylenchulus semipenetrans*; pathogen identification; distribution survey

柑橘半穿刺线虫(*Tylenchulus semipenetrans*)引起的柑橘慢衰病(citrus slow decline disease)是柑橘上最重要的病害之一,广泛分布于全世界柑橘

产区,造成极大的经济损失^[1]。柑橘半穿刺线虫是一种专化性强的定居型半内寄生线虫,能够寄生50多种柑橘品种及其杂交种,也可在葡萄、草莓、荔枝、

收稿日期: 2016-01-27

修订日期: 2016-02-29

基金项目: 湖南省研究生科研创新项目(CX2015B249);国家自然科学基金(31171826)

* 通信作者 E-mail: haoasliu@163.com

苹果、柿、杉木等植物上繁殖^[2-3]。柑橘被侵染后活力减退,叶片褪绿黄化,长势衰弱似缺肥、缺水、生长不良症状,严重时叶片脱落,果实变小,甚至枯死^[4]。此外,柑橘半穿刺线虫侵染柑橘根部造成的伤口有利于真菌、细菌等病原物的入侵,加重对柑橘的危害^[5]。柑橘受害后一般减产 30%~50%,严重时达 100%^[6];福建省 5 个重要柑橘产区柑橘半穿刺线虫果园发病率为 74.6%,果园株发病率为 5%~100%^[7]。

柑橘黄龙病(citrus Huanglongbing, HLB)是世界柑橘生产中的一种极具毁灭性的病害,其病原为韧皮部杆菌属类细菌(*Candidatus Liberibacter* spp.),根据病原对热的敏感性、传播媒介和地理分布,可分为亚洲种(*Ca. L. asiaticus*)、非洲种(*Ca. L. africanus*)和美洲种(*Ca. L. americanus*)^[8-9]。目前我国仅发现亚洲种,在田间主要通过柑橘木虱(*Diaphorina citri*)传播,还可借助嫁接、菟丝子传播。田间典型症状为叶片斑驳型黄化、均匀型黄化及缺素性黄化,果实呈“红鼻果”或“斜肩果”,一般会造成 30%~100%的产量损失^[10];我国广西柑橘黄龙病年发生率超过 5%,每年造成的直接经济损失超过 8.05 亿~9.62 亿元^[11]。

湖南省是全国柑橘主产区之一,面积、产量、产值均稳居全国第一。近年来,湖南省特别是永州地区柑橘黄化衰退现象日趋严重,极大地威胁了柑橘产业的发展。由于柑橘慢衰病及黄龙病都会引起柑橘出现黄化症状,在多数情况下,柑橘慢衰病所表现的黄化症状常被基层误诊为柑橘黄龙病,造成防控措施不当,防治效果低下,而进行抛荒、砍伐或挖除,给柑橘产业造成了巨大的经济损失。福建省长泰县因将柑橘慢衰病误诊为黄龙病,每年挖除的病树约占果树总数的 10%^[12]。因此,准确了解造成柑橘黄化现象的病因,对其防控具有极其重要的意义。本研究团队于 2014—2015 年对湖南省永州地区表现黄化症状的柑橘进行了柑橘半穿刺线虫和黄龙病病原鉴定及分布调查,以期对柑橘慢衰病和黄龙病的有效防控提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2014 年 6 月—2015 年 11 月对湖南省永州市冷水滩区、零陵区、道县和江永县柑橘园中表现黄化症状的柑橘进行了取样调查。采用五点取样法分别采集柑橘植株的叶片、根系及根际土壤,进行柑橘慢衰

病和柑橘黄龙病病原检测。

1.2 柑橘半穿刺线虫形态学鉴定

柑橘慢衰病最主要的诊断方法是鉴定柑橘根系及根际土壤中是否存在柑橘半穿刺线虫。柑橘根组织中的雌虫在体视显微镜下用细解剖针直接剥离;土壤中 2 龄幼虫和雄虫采用浅盘法分离。将雌虫以及分离获得的 2 龄幼虫和雄虫经缓慢加热杀死后用 TAF 固定液固定,制成临时玻片,于光学显微镜下进行形态观察、拍照。采用 de Man 公式进行形态测计,其中: n = 样本数; L = 体长; $Stylet$ = 口针长; $Tail$ = 尾长; $Spicule$ = 交合刺长度; a = 体长/最大体宽; b = 体长/头端至食道与肠连接处的距离; c = 体长/尾长; c' = 尾长/肛门或泄殖腔处体宽; V = 阴门至头端的距离/体长 $\times 100$; DGO = 背食道腺开口至口针基部球的距离。

1.3 柑橘半穿刺线虫分子生物学鉴定

1.3.1 柑橘半穿刺线虫 DNA 提取

单条线虫 DNA 的提取参照王江岭等的方法并稍作修改^[13]。挑取单条线虫放入含有 8 μ L ddH₂O 和 1 μ L 10 $\times$ PCR buffer (Mg^{2+} free)的 200 μ L PCR 管中,放入液氮中冷冻 1 min,置于 95 $^{\circ}$ C 下 2 min,重复 5 次;向 PCR 管中加入 1 μ L 1 mg/mL 蛋白酶 K,65 $^{\circ}$ C 温育 15 min,95 $^{\circ}$ C 反应 10 min,获得的 DNA 提取液直接进行 PCR 扩增。

1.3.2 柑橘半穿刺线虫 PCR 检测

分别以柑橘半穿刺线虫的雌虫、雄虫和 2 龄幼虫的 DNA 为模板,采用 Liu 等报道的特异性引物 Ts-SF (5'-TACCAGGTTGAGCAGAGTTCTT-3') 和 Ts-SR (5'-TCCTACCCTTCCA CAGCG-3') 进行 PCR 扩增^[14],片段大小为 297 bp。PCR 反应体系为 25 μ L: 10 $\times$ EasyTaq buffer 3 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 10 μ mol/L 正反向引物各 1 μ L, 5 U/ μ L EasyTaq DNA polymerase 0.5 μ L, 模板 DNA 5 μ L, 补足 ddH₂O 至 25 μ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增结束后,取 5 μ L 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳。

1.4 土壤中柑橘半穿刺线虫群体密度调查

将采集的柑橘土壤样品充分混匀后,分别取 100 mL,采用浅盘法分离土壤样品中的 2 龄幼虫,在倒置显微镜下统计柑橘半穿刺线虫 2 龄幼虫的数量。每样品重复 3 次,计算每 100 mL 土壤样品中的柑橘半穿刺线虫群体密度。

1.5 柑橘黄龙病分子生物学检测

以黄梢或叶片黄化作为田间诊断柑橘黄龙病依

据的同时,采用分子生物学技术对其进行准确诊断。采用 CTAB 法提取柑橘叶脉总 DNA。参照 Hoc-quellet 等报道的柑橘黄龙病菌特异性引物 A2(5'-TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3') 和 J5 (5'-ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3') 进行 PCR 扩增^[15],亚洲种和非洲种片段大小分别为 703 bp 和 669 bp。PCR 反应体系为 25 μ L:10 $\times$ EasyTaq buffer 3 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L,10 μ mol/L 正反向引物各 1 μ L,5 U/ μ L EasyTaq DNA polymerase 0.5 μ L,DNA 模板 1 μ L,补足 ddH₂O 至 25 μ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;

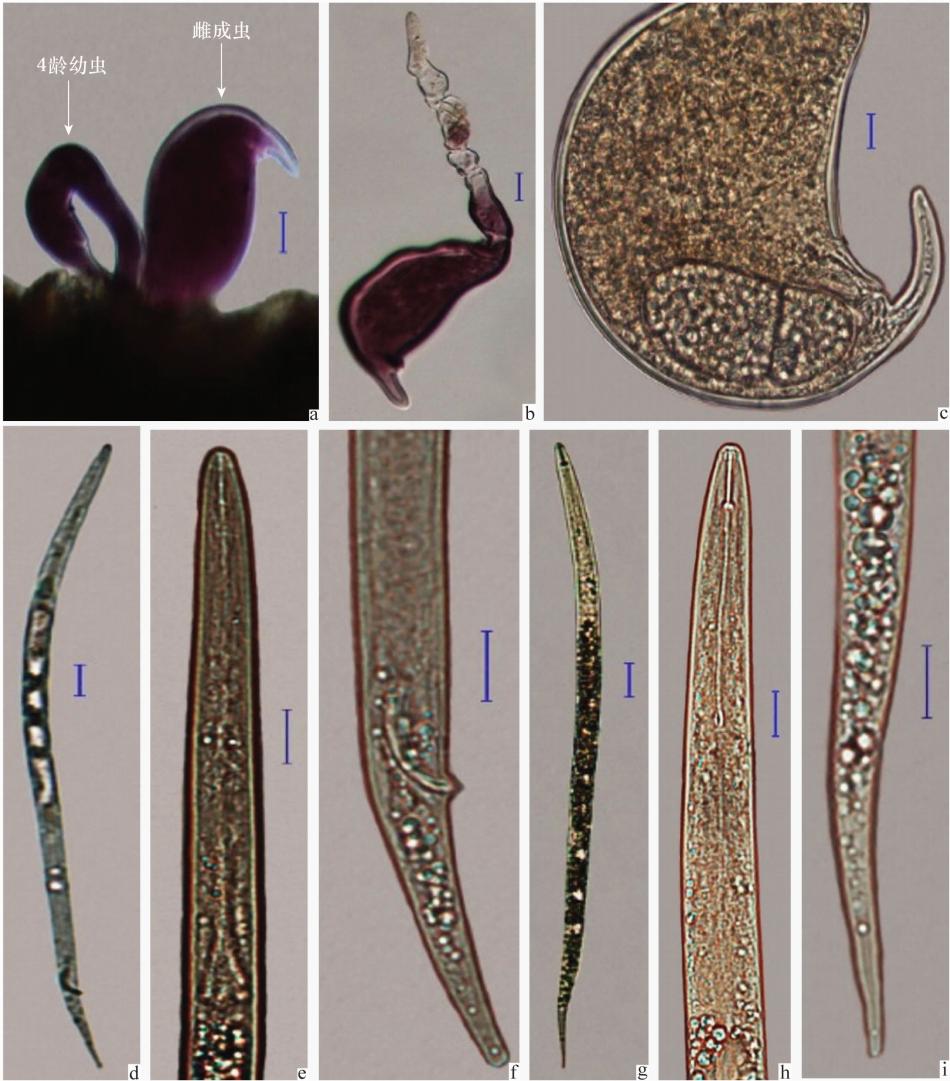
72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳分析,然后将 PCR 产物回收、转化、克隆并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将获得的序列与 GenBank 核酸数据库中已知序列进行同源性比较。

2 结果与分析

2.1 柑橘半穿刺线虫形态鉴定

2.1.1 测计值

雌虫: $n=20$; $L=379.2(350.1\sim410.5)\mu\text{m}$; $a=4.7(4.0\sim5.3)$; $b=3.0(2.7\sim3.4)$; $V=90.1(87.3\sim93.0)$; $Sty\text{let}=12.1(10.5\sim13.3)\mu\text{m}$ 。



a: 侵染柑橘根系的4龄幼虫和雌成虫; b: 雌虫整体; c: 雌虫体后部; d: 雄虫整体; e: 雄虫体前部; f: 雄虫尾部; g: 2龄幼虫整体; h: 2龄幼虫体前部; i: 2龄幼虫体尾部(a、b、d和g图标尺=20 μ m, 其余图标尺=10 μ m)
a: Fourth-stage juvenile and female inserted in root of citrus; b: Entire body of female; c: Posterior body of female; d: Entire body of male; e: Anterior body of male; f: Tail of male; g: Entire body of second-stage juvenile; h: Anterior body of second-stage juvenile; i: Tail of second-stage juvenile (Scar bar in figures is 20 μ m for a, b, d and g and 10 μ m for others)

图 1 柑橘半穿刺线虫的形态特征图

Fig. 1 Morphological characters of *Tylenchulus semipenetrans*

雄虫: $n = 20$; $L = 360.0(317.9 \sim 410.1) \mu\text{m}$;
 $a = 33.9(29.2 \sim 45.6)$; $b = 3.2(2.9 \sim 3.5)$; $c = 8.7$
 $(7.7 \sim 10.1)$; $c' = 4.9(4.0 \sim 5.6)$; $Sty\text{let} = 10.2(9.4 \sim$
 $11.1) \mu\text{m}$; $Spic\text{ule} = 19.1(16.8 \sim 21.5) \mu\text{m}$; $DGO =$
 $6.0(5.2 \sim 6.9) \mu\text{m}$ 。

2 龄幼虫: $n = 20$; $L = 379.6(337.1 \sim 414.5)$
 μm ; $b = 3.4(3.1 \sim 3.7)$; $Sty\text{let} = 13.8(13.0 \sim 14.7) \mu\text{m}$ 。

2.1.2 形态描述

雌虫:成熟雌虫与雄虫异型,虫体前部潜入根组织内,后部外露于根表面,膨大呈囊状(图 1a)。头部骨化弱,口针中等发达,基部球大而圆(图 1b)。具两个弯曲的卵巢,阴门向腹面斜裂,近尾端,产卵于胶质卵囊中。排泄孔位于阴门前,无直肠和肛门。尾端有一指形突起(图 1c)。

雄虫:虫体蠕虫形,纤细(图 1d)。唇区圆形。口针纤细,有基部球。食道细长,中食道球退化,食道腺呈洋梨形,与肠交界明显(图 1e)。交合刺细,无交合伞。尾圆锥形,末端稍钝(图 1f)。

2 龄幼虫:虫体蠕虫形(图 1g)。头部骨质化,口针较发达,有基部球。中食道球大,食道腺与肠基本平接或略覆盖肠(图 1h)。尾渐细,末端钝圆(图 1i)。

2.2 柑橘半穿刺线虫分子生物学鉴定

利用柑橘半穿刺线虫特异性引物分别对雌虫、雄虫和 2 龄幼虫的 DNA 进行 PCR 扩增,结果显示,雌虫、雄虫和 2 龄幼虫均扩增出 297 bp 大小的特异性片段(图 2),表明分离得到的线虫为柑橘半穿刺线虫,其结果与形态学鉴定结果一致。

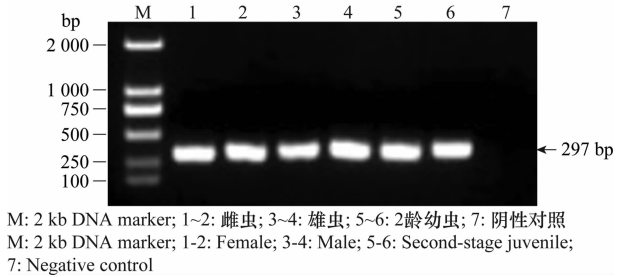


图 2 不同龄期柑橘半穿刺线虫 PCR 产物

Fig. 2 PCR products amplified from

Tylenchulus semipenetrans at different developmental stages using the species-specific primers

2.3 柑橘黄龙病病菌检测

利用柑橘黄龙病菌特异性引物 A2 和 J5 对采集的 28 份样品的叶脉 DNA 进行 PCR 扩增,结果显示,共有 18 份样品扩增出一条 703 bp 的特异性条带,而阴性对照未扩增出相应的条带(图 3)。所得序列与 GenBank 公布的柑橘黄龙病菌亚洲种序列(CP004005.1 和 CP001677.5 等)同源性为 100%。

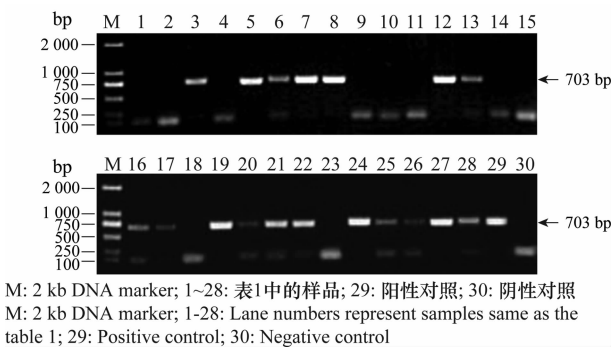


图 3 利用特异性引物 A2 和 J5 检测湖南永州地区柑橘样品中的柑橘黄龙病菌

Fig. 3 Electrophoresis of PCR products of HLB pathogen from Yongzhou City, Hunan Province, using primers A2 and J5

2.4 柑橘半穿刺线虫和柑橘黄龙病分布

在所采集的 28 份柑橘土壤样品中,有 24 份样品检出了柑橘半穿刺线虫,冷水滩区、零陵区、道县和江永县均有柑橘半穿刺线虫的分布,平均发生率为 82.1%,土壤中的线虫群体密度最高达到 3 077 条/100 mL,冷水滩区和零陵区发生率较高,均为 100%,其次是江永县,发生率为 91.7%,而道县发生率相对较低,为 20%(表 1)。

从表 1 中可以看出,永州地区所采集的柑橘叶片样品中,柑橘黄龙病的平均检出率为 64.3%,其中江永县检出率最高,为 83.3%,道县、零陵区和冷水滩区检出率分别为 60.0%、57.1%和 25.0%,所检测到的 18 个柑橘黄龙病分离物均为韧皮部杆菌属类细菌亚洲种。

3 结论与讨论

目前,已在我国湖南、湖北、广东、广西、福建等 15 个省(市、自治区)的柑橘产区中发现有柑橘半穿刺线虫的分布和危害^[3,16]。由于柑橘半穿刺线虫在柑橘根部侵染危害,虫体细小,无法用肉眼观察到,虽发生普遍,危害严重,但其引起的柑橘慢衰病在柑橘生产中却得不到重视,基层技术人员和种植户基本不认识或不了解该病害,所表现的黄化症状常被误诊为柑橘黄龙病,而进行抛荒、砍伐或挖除,造成重大经济损失。本研究利用形态学和分子生物学相结合的方法,明确了湖南省永州地区柑橘主要病原线虫为柑橘半穿刺线虫,平均发生率为 82.1%,其中冷水滩区、零陵区和江永县发生率比较高,土壤中的线虫群体密度最高达到 3 077 条/100 mL,表明柑橘半穿刺线虫在永州地区柑橘产区发生普遍且严重,是引起柑橘黄化症状的重要病因之一。

表 1 采集样品中柑橘半穿刺线虫 2 龄幼虫群体密度及黄龙病病菌检测¹⁾

Table 1 Population density of <i>Tylenchulus semipenetrans</i> second-stage juveniles and HLB pathogen detection of collecting samples				
编号 Number	采集地 Collection place	品种 Variety	2 龄幼虫群体密度/条·(100 mL) ⁻¹ Population density of second-stage juveniles	黄龙病病原 PCR 检测 PCR detection of HLB pathogen
1	冷水滩区柑橘园	椪柑	23	—
2	冷水滩区柑橘园	椪柑	127	—
3	冷水滩区柑橘园	蜜橘	287	+
4	冷水滩区柑橘园	蜜橘	171	—
5	零陵区柑橘园	蜜橘	80	+
6	零陵区柑橘园	蜜橘	164	+
7	零陵区柑橘园	蜜橘	380	+
8	零陵区柑橘园	蜜橘	201	+
9	零陵区柑橘园	蜜橘	151	—
10	零陵区柑橘园	蜜橘	78	—
11	零陵区柑橘园	蜜橘	364	—
12	道县富塘街道柑橘园	沙糖橘	0	+
13	道县富塘街道柑橘园	沙糖橘	0	+
14	道县富塘街道柑橘园	沙糖橘	0	—
15	道县清塘镇柑橘园	脐橙	3 077	—
16	道县清塘镇柑橘园	脐橙	4	+
17	江永县允山镇柑橘园	脐橙	0	+
18	江永县允山镇柑橘园	脐橙	190	—
19	江永县允山镇柑橘园	脐橙	1 685	+
20	江永县允山镇柑橘园	香柚	1 831	+
21	江永县允山镇柑橘园	香柚	2 985	+
22	江永县允山镇柑橘园	蜜橘	999	+
23	江永县允山镇柑橘园	夏橙	738	—
24	江永县允山镇柑橘园	夏橙	214	+
25	江永县允山镇柑橘园	蜜橘	614	+
26	江永县允山镇柑橘园	脐橙	9	+
27	江永县允山镇柑橘园	夏橙	2 084	+
28	江永县允山镇柑橘园	香柚	1 667	+

1) “+”and “—”分别代表阳性和阴性结果。
“+”and “—” represent positive and negative results, respectively.

柑橘黄龙病于 1919 年在我国广东省潮汕地区首次被发现^[17], 目前已有 11 个省(市、自治区)的柑橘产区遭受其危害, 受害面积占柑橘种植总面积的 80%以上^[18]。本研究利用分子生物学方法对永州地区疑似柑橘黄龙病植株进行了检测, 结果表明所有表现黄化症状的柑橘样品中仅有 64. 3%的样品检测结果呈现阳性, 说明表现黄化症状的柑橘植株不一定都带有黄龙病病菌。

造成柑橘黄化症状的病因有多种, 主要包括柑橘黄龙病、柑橘线虫病、柑橘病毒病和生理性病害等, 单凭柑橘的田间黄化症状不易正确诊断出其病因。所以, 正确快速地诊断出柑橘黄化症的病因是有效控制病害危害和蔓延的基础。本研究通过对表现黄化症状的柑橘调查取样和检测发现, 柑橘慢衰病和柑橘黄龙病在永州地区柑橘产区发生普遍且严

重, 并且存在着混合或复合侵染现象。因此, 在重点防控柑橘黄龙病的同时, 也应重视并有效控制柑橘半穿刺线虫的危害, 从而保障柑橘生产安全, 促进柑橘产业发展和增加农民收入。

参考文献

[1] Ardakani A S, Mafi Z T, Hesar A M, et al. Relationship between soil properties and abundance of *Tylenchulus semipenetrans* in citrus orchards, Kohgiluyeh va Boyerahmad Province [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2014, 16: 1699 - 1710.

[2] Irshad U, Mukhtar T, Ashfaq M, et al. Pathogenicity of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) on *Citrus jambhiri* [J]. The Journal of Animal & Plant Sciences, 2012, 22(4): 1014 - 1018.

(下转 256 页)

生物活性,在日化等领域有广泛应用^[9]。苦参碱高效低毒、无污染、无残留、可促进作物生长^[10],且为一种传统的中药成分^[11]。因此,印楝素、苦参碱、烟碱·苦参碱在沙葱萤叶甲绿色防控上具有很高的推广价值。沙葱萤叶甲 3 龄幼虫食量最大,占幼虫期总食量的 63.45%~67.46%^[1],因此,在生产实际中,应在沙葱萤叶甲 3 龄幼虫始盛初期进行防治,建议 0.3%印楝素乳油、1.3%苦参碱水剂、1.2%烟碱·苦参碱乳油制剂用量 30 mL/667 m²,对沙葱萤叶甲聚集区域采用大型喷雾机械、对分散区域采用背负式喷雾器补充防治,效果更佳。

参考文献

- [1] 昊翔,周晓榕,庞保平,等. 寄主植物对沙葱萤叶甲幼虫生长发育及取食的影响[J]. 草地学报, 2014, 22(4): 854-858.
- [2] 李浩,周晓榕,庞保平,等. 沙葱萤叶甲的过冷却能力与抗寒性[J]. 昆虫学报, 2014, 57(2): 212-217.
- [3] 李浩. 沙葱萤叶甲耐寒性及其机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2004.
- [4] 李浩,周晓榕,庞保平,等. 低温胁迫对沙葱萤叶甲幼虫过冷却能力及生长发育的影响[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(2): 434-439.
- [5] 常静,周晓榕,李海平,等. 绿僵菌与 3 种杀虫剂混用对沙葱萤叶甲的协同作用[J]. 农药学报, 2015, 17(1): 54-59.
- [6] 能乃扎布. 内蒙古自治区昆虫[M]. 呼和浩特: 内蒙古自治区人民出版社, 1999.
- [7] 马耀,李鸿昌,康乐. 内蒙古自治区草地昆虫[M]. 西安: 天则出版社, 1991.
- [8] 杨星科,黄顶成,葛斯琴,等. 内蒙古自治区百万亩草场遭受沙葱萤叶甲暴发危害[J]. 昆虫知识, 2010, 47(4): 812.
- [9] 陈小军,杨益众,张志祥,等. 印楝素及印楝杀虫剂的安全性评价研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(6): 1478-1484.
- [10] 梁卿,徐树兰,李辉,等. 1.8%苦参碱·阿维菌素乳油防治甘蓝小菜蛾药效试验[J]. 广东农业科学, 2009(2): 58-60.
- [11] 张鸣杰,黄建. 苦参碱类抗肿瘤作用机制研究的新进展[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 115-118.
- [1] 昊翔,周晓榕,庞保平,等. 寄主植物对沙葱萤叶甲幼虫生长发育及取食的影响[J]. 草地学报, 2014, 22(4): 854-858.
- [2] 李浩,周晓榕,庞保平,等. 沙葱萤叶甲的过冷却能力与抗寒性[J]. 昆虫学报, 2014, 57(2): 212-217.
- [3] 张绍升. 植物线虫病诊断与治理[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1999: 181-183.
- [4] Verdejo-Lucas S, McKenry M V. Management of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* [J]. Journal of Nematology, 2004, 36(4): 424-432.
- [5] Safdar A, Javed N, Khan S A, et al. Synergistic effect of a fungus, *Fusarium semitectum*, and a nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, on citrus decline [J]. Pakistan Journal of Zoology, 2013, 45(3): 643-651.
- [6] 冯志新. 植物线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 158-160.
- [7] 刘国坤,张绍升,潘东明,等. 福建省柑橘半穿刺线虫的分布与为害[M]//廖金铃,彭德良,段玉玺. 中国线虫学研究(第二卷). 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 93-97.
- [8] Murray R G, Schleifer K H. Taxonomic notes; a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(1): 174-176.
- [9] Texeira D C, Ayres J, Kitajima E W, et al. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new Liberibacter species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease [J]. Plant Disease, 2005, 89(1): 107.
- [10] Iftikhar Y, Rauf S, Shahzad U, et al. Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management—A review [J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2016, 15(1): 1-11.
- [11] 邓明学. 广西柑橘黄龙病危害现状、损失评估及控制对策[C]//彭友良. 中国植物病理学会 2006 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2006: 393-397.
- [12] 刘国坤,杨再福,叶明珍,等. 柑橘慢衰病诊断及病原鉴定[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2004, 33(4): 431-433.
- [13] 王江岭,张建成,顾建锋. 单条线虫 DNA 提取方法[J]. 植物检疫, 2011, 25(2): 32-35.
- [14] Liu Guokun, Chen Juan, Xiao Shun, et al. Development of species-specific PCR primers and sensitive detection of the *Tylenchulus semipenetrans* in China [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(2): 252-258.
- [15] Hocquellet A, Toorawa P, Bové 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 β operon [J]. Molecular and Cellular Probes, 1999, 13(5): 373-379.
- [16] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 547-549.
- [17] Reinking O A. Diseases of economic plants in southern China [J]. Philippine Agriculturist, 1919, 8(4): 109-134.
- [18] 范国成,刘波,吴如健,等. 中国柑橘黄龙病研究 30 年[J]. 福建农业学报, 2009, 24(2): 183-190.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 193 页)

- [3] 张绍升. 植物线虫病诊断与治理[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1999: 181-183.
- [4] Verdejo-Lucas S, McKenry M V. Management of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* [J]. Journal of Nematology, 2004, 36(4): 424-432.
- [5] Safdar A, Javed N, Khan S A, et al. Synergistic effect of a fungus, *Fusarium semitectum*, and a nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, on citrus decline [J]. Pakistan Journal of Zoology, 2013, 45(3): 643-651.
- [6] 冯志新. 植物线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 158-160.
- [7] 刘国坤,张绍升,潘东明,等. 福建省柑橘半穿刺线虫的分布与为害[M]//廖金铃,彭德良,段玉玺. 中国线虫学研究(第二卷). 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 93-97.
- [8] Murray R G, Schleifer K H. Taxonomic notes; a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(1): 174-176.
- [9] Texeira D C, Ayres J, Kitajima E W, et al. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new Liberibacter species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease [J]. Plant Disease, 2005, 89(1): 107.
- [10] Iftikhar Y, Rauf S, Shahzad U, et al. Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management—A review [J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2016, 15(1): 1-11.
- [11] 邓明学. 广西柑橘黄龙病危害现状、损失评估及控制对策[C]//彭友良. 中国植物病理学会 2006 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2006: 393-397.
- [12] 刘国坤,杨再福,叶明珍,等. 柑橘慢衰病诊断及病原鉴定[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2004, 33(4): 431-433.
- [13] 王江岭,张建成,顾建锋. 单条线虫 DNA 提取方法[J]. 植物检疫, 2011, 25(2): 32-35.
- [14] Liu Guokun, Chen Juan, Xiao Shun, et al. Development of species-specific PCR primers and sensitive detection of the *Tylenchulus semipenetrans* in China [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(2): 252-258.
- [15] Hocquellet A, Toorawa P, Bové 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 β operon [J]. Molecular and Cellular Probes, 1999, 13(5): 373-379.
- [16] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 547-549.
- [17] Reinking O A. Diseases of economic plants in southern China [J]. Philippine Agriculturist, 1919, 8(4): 109-134.
- [18] 范国成,刘波,吴如健,等. 中国柑橘黄龙病研究 30 年[J]. 福建农业学报, 2009, 24(2): 183-190.

(责任编辑: 杨明丽)