

广东三个柑橘品种不同生育期的黄龙病菌含量动态变化研究

程保平, 彭埃天*, 宋晓兵, 凌金锋, 崔一平, 陈霞

(广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

摘要 采用实时荧光定量 PCR 检测了广东省 3 个柑橘品种在不同生育期的黄龙病菌含量, 探索其动态变化规律, 为病害防控提供依据。结果表明, 第一年, 3 个品种春梢期的黄龙病菌平均含量分别为 3.52×10^5 、 4.76×10^5 、 1.03×10^5 拷贝/g, 显著低于相应夏梢期 (5.50×10^5 、 9.48×10^5 、 2.50×10^5 拷贝/g) 和秋梢期 (5.32×10^5 、 9.84×10^5 、 2.59×10^5 拷贝/g); 夏梢期与秋梢期含量又显著低于相应冬梢期 (21.60×10^5 、 17.65×10^5 、 6.86×10^5 拷贝/g) 及果实成熟期 (14.57×10^5 、 16.45×10^5 、 7.96×10^5 拷贝/g); 砂糖橘全年黄龙病菌含量与贡柑无显著差异, 但均显著高于柠檬; 第二年的数据与第一年类似, 但砂糖橘和贡柑在多个生育期的含菌量比上年均显著升高, 而柠檬所有生育期菌量均无显著变化。结果显示: 柑橘病树内的黄龙病菌含量在春梢期最低, 夏梢、秋梢期次之, 冬梢期及果实成熟期最高; ‘柠檬’相对耐病, 体现为含菌量相对较低、增速较慢。

关键词 柑橘黄龙病; 病原菌含量; 动态变化规律; 不同柑橘品种

中图分类号: S 412 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.04.037

Dynamic variation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* titer in three citrus cultivars at different growth periods in Guangdong Province

Cheng Baoping, Peng Aitian, Song Xiaobing, Ling Jinfeng, Cui Yiping, Chen Xia

(Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China)

Abstract In order to provide references for synthetically preventing Huanglongbing disease, the dynamic variation of Huanglongbing pathogen was investigated in different growth periods of three citrus cultivars with real-time quantitative PCR detection method. The results showed that in the first year, average pathogen titers on the three citrus cultivars in spring shoots period were 3.52×10^5 , 4.76×10^5 , and 1.03×10^5 copy/g, respectively, significantly lower than titers in summer shoots periods (5.50×10^5 , 9.48×10^5 , and 2.50×10^5 copy/g) and autumn shoots period (5.32×10^5 , 9.84×10^5 and 2.59×10^5 copy/g). Furthermore, the pathogen titers in summer shoots and autumn shoots periods were significantly lower than titers in winter shoots period (21.60×10^5 , 17.65×10^5 , 6.86×10^5 copy/g) and fruit maturation period (14.57×10^5 , 16.45×10^5 and 7.96×10^5 copy/g). Average pathogen titers in the Shatangju cultivars had no difference with titers in the Gonggan cultivars, but both were significantly higher than those in lemon. The data of the second year was similar to those of the first year, but the pathogen titers in the four growth periods of citrus Shatangju and Gonggan cultivars were significantly higher than those in the same period of the first year. The pathogen titers in all the 5 growth periods of lemon in the second year were similar to that in the first year. The results showed that dynamic variation of Huanglongbing pathogen had a certain relationship to the different growth periods of citrus, lemon had higher disease tolerance, which mainly reflected in the lower titers and multiplication rate of the pathogen in the tree.

Key words *Candidatus Liberibacter asiaticus*; bacteria titer; dynamic variation; different citrus cultivars

收稿日期: 2016-10-09 修订日期: 2016-11-11

基金项目: 广东省重大科技计划专项(2014B020203003); 广东省自然科学基金(2014A030310198); 广东省现代农业产业技术体系建设专项(2016LM1077)

* 通信作者 E-mail: pengait@163.com

柑橘黄龙病是世界柑橘产业中危害最大的病害^[1],在亚洲、非洲和美洲的近 50 个国家(地区)均有发生。其中,美国佛罗里达州 80%以上柑橘树近年发现感染此病^[2-3]。我国是柑橘主产国,柑橘产业在我国农村社会和经济中具有重要的地位和作用,但目前我国多数柑橘主产区都受到了该病的严重威胁。据调查,广东省有 24 万 hm^2 橘园,年产值约 300 亿,目前有超过 1/3 的橘园感染柑橘黄龙病,年损失达上百亿元^[4-7]。

柑橘黄龙病的病原为原核生物 α -薄壁菌门变形菌纲的候选韧皮部杆菌属,有亚洲种、非洲种和美洲种 3 个种^[8]。目前我国传播的是亚洲种。该病菌主要由携菌的接穗、苗木和木虱传播^[1,9]。黄龙病菌可侵染柑橘属、金柑属、枳属、酒饼筋属、九里香属、黄皮属等属植物,寄主广泛,目前所有商业柑橘品种对黄龙病菌均不表现抗病,但不同的柑橘品种接种柑橘黄龙病菌后,出现症状的时间有所不同,目前原因尚不清楚^[10-13]。

有研究认为,柑橘内的黄龙病菌菌量呈现出明显波动变化可能与寄主营养状况和外界温湿度变化等条件相关^[14-16],但柑橘内的黄龙病菌菌量变化与春、夏、秋、冬梢期及果实成熟期之间的关系尚无人报道。

本研究利用实时荧光定量 PCR 对同一地理区域内的 3 个柑橘栽培品种在 4 个梢期和果实成熟期内的黄龙病菌含量进行了检测,探索病树内黄龙病菌在 4 个柑橘梢期和果实成熟期内的动态变化规律,为黄龙病的综合防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 Real-time PCR 定量标准曲线的建立

插入黄龙病菌亚洲种 16S rDNA 的重组质粒来自于本研究室,使用 TaKaRa 公司的质粒提取试剂盒提取质粒,然后将重组质粒 DNA 原液按 10 倍梯度稀释,使每个反应管内的质粒拷贝数为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 个,分别以每个稀释度的 DNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 检测,3 个重复。记录仪器的 C_t 值。根据标准曲线获得的线性回归方程为: $Y = -0.286X + 11.924$ 。Y 为反应管中柑橘黄龙病菌 16S rDNA 靶标拷贝数的对数值,X 为仪器 C_t 值。根据线性回归方程计算每克病样组织内黄龙病菌量^[17] $= 33.33 \times 10^{-0.286X + 11.924}$

1.2 荧光定量 PCR 检测的引物与步骤

20 μL 的反应体系中引物终浓度为 250 nmol/L,探针终浓度为 150 nmol/L^[18],缓冲液参照 TaKaRa 探针法实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书。PCR 反应程序:95℃ 预变性 20 s;然后 95℃ 5 s,58℃ 40 s,40 个循环。所有的 PCR 试验均以本研究室保存于防虫网室内的健康柑橘叶脉 DNA 为阴性对照,以保存于防虫网内的感染黄龙病的柑橘叶片为阳性对照,柑橘定期以喷粉法施用多菌灵、吡虫啉等农药防控病虫害。试验使用仪器为 Roche, LightCycler® 480 II 型实时荧光定量 PCR。

1.3 柑橘不同梢期及果实成熟期内含菌量变化测定

于第一年(2014 年度)春梢期(2 月 14 日、3 月 14 日、4 月 15 日),夏梢期(5 月 15 日、6 月 16 日、7 月 15 日),秋梢期(8 月 15 日、9 月 15 日、10 月 15 日),冬梢期(11 月 14 日、12 月 15 日)及果实成熟期(1 月 15 日),在广东省广州市大丰柑橘基地内,在相似侵染环境中感染柑橘黄龙病的砂糖橘、贡柑和柠檬各 8 株 3 年生树的成熟梢上采集病样。每株树采样时先把树冠分为东南西北四个方位,每个方位分别随机采集两片老熟叶片,每株树采集 8 片叶片置于塑封袋,再保存于冰盒。制样时清洗并晾干柑橘叶片,然后剪取叶片中脉放入灭菌研钵,加入液氮研磨成粉状,从中取 200 mg 作为一个样品,按 Axygen 基因组提取试剂盒(爱思进公司)说明书提取样品的总基因组,最后进行实时荧光定量 PCR 检测。每次采样,每个栽培品种选择 8 株树,对每株树分别采集样品并检测 1 次,第二年(2015 年度)重复以上试验,数据用 SPSS statistics 19.0 和 T-test 进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同梢期及果实成熟期内砂糖橘、贡柑、柠檬内含菌量 C_t 值变化

利用实时荧光定量 PCR 每月对病样内含菌量变化进行连续定量检测。结果表明,所有被检测样品均显阳性;黄龙病菌 C_t 值在不同梢期及果实成熟期内有明显的变化,第一年砂糖橘树体含菌量平均 C_t 值的趋势:春梢期 > 秋梢期 > 夏梢期 > 果实成熟期 > 冬梢期;贡柑:春梢期 > 夏梢期 > 秋梢期 > 果实成熟期 > 冬梢期;柠檬:春梢期 > 秋梢期 > 夏梢期 > 冬梢期 > 果实成熟期。表明砂糖橘、贡柑和柠檬春梢期含菌量 C_t 值均显著高于夏梢期和秋梢期;夏梢期和秋梢期的含菌

量 C_t 值又显著高于冬梢期及果实成熟期 ($P < 0.05$); 同一品种中, 夏梢期与秋梢期的含菌量 C_t 值之间无显著差异, 冬梢期与果实成熟期含菌量 C_t 值之间无

显著差异 ($P > 0.05$) (图 1, 表 1)。第二年, 同一品种的不同梢期及果实成熟期之间病原菌 C_t 值的对比分析结果与第一年类似 (图 1, 表 1)。

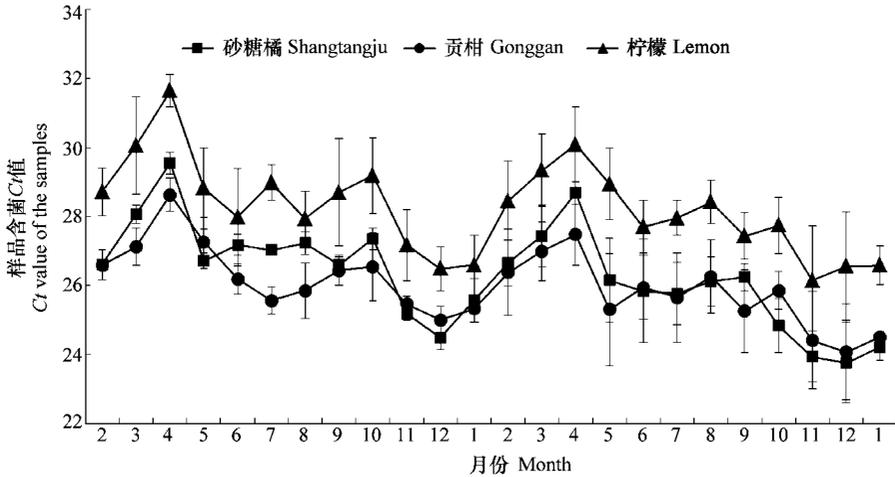


图 1 柑橘含菌量 C_t 值在两年内的动态变化

Fig. 1 Dynamic variation of pathogen C_t value in different diseased citrus plants in two years

表 1 不同梢期及果实成熟期的柑橘含菌量 C_t 值变化¹⁾

Table 1 Dynamic variation of pathogen C_t value in different growth period of diseased citrus plants

栽培品种 Cultivar	第一年病菌含量 C_t 值 Pathogen C_t value in the first year				
	春梢期 Spring shoots period	夏梢期 Summer shoots period	秋梢期 Autumn shoots period	冬梢期 Winter shoots period	果实成熟期 Fruit maturation period
砂糖橘 Shatangju	(28.07±1.25)aA	(26.97±0.29)bB	(27.06±0.44)bB	(24.83±0.44)cC	(25.57±0.64)cC
贡柑 Gonggan	(27.45±1.00)aA	(26.34±0.88)bB	(26.27±0.8)bB	(25.23±0.39)cC	(25.33±0.39)cC
柠檬 Lemon	(30.14±1.52)aA	(28.59±1.15)bB	(28.61±1.26)bB	(26.83±0.90)cC	(26.59±0.87)cC
栽培品种 Cultivar	第二年病菌含量 C_t 值 Pathogen C_t value in the second year				
	春梢期 Spring shoots period	夏梢期 Summer shoots period	秋梢期 Autumn shoots period	冬梢期 Winter shoots period	果实成熟期 Fruit maturation period
砂糖橘 Shatangju	(27.59±1.28)aA	(25.92±1.19)bB	(25.73±0.90)bB	(23.85±0.95)cC	(24.21±0.39)cC
贡柑 Gonggan	(26.95±1.03)aA	(25.63±1.28)bB	(25.78±1.03)bB	(24.24±1.37)cC	(24.50±0.15)cC
柠檬 Lemon	(29.29±1.25)aA	(28.20±0.94)aB	(27.86±0.80)bBC	(26.35±1.54)cC	(26.58±0.56)cC

1) 同行数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著, 不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著。

Different lowercase letters and capital letters in the same row indicate significant difference at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.2 不同梢期及果实成熟期内砂糖橘、贡柑、柠檬内含菌量变化

根据柑橘黄龙病菌 16S rDNA 基因的 Real-time PCR 标准曲线线性回归方程, 把获得的黄龙病菌菌量 C_t 值按 1.1 小节的方法转化为每克植物组织内的含菌量。第一年的平均黄龙病菌含量, 砂糖橘: 春梢期 < 秋梢期 < 夏梢期 < 果实成熟期 < 冬梢期; 贡柑: 春梢期 < 夏梢期 < 秋梢期 < 果实成熟期 < 冬梢期; 柠檬: 春梢期 < 夏梢期 < 秋梢期 < 冬梢期 < 果实成熟期。统计分析显示: 砂糖橘、贡柑和柠檬春梢期黄龙病菌含量均显著低于夏梢期和秋梢期; 夏梢期与秋梢期的黄龙病菌含量又显著低于冬梢期及果实成熟期 ($P < 0.05$); 但同一品种中, 夏梢期与秋梢期的含菌量

之间无显著差异, 冬梢期与果实成熟期样品的含菌量之间也无显著差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

第一年全年砂糖橘每克组织黄龙病菌平均含量在 $3.52 \times 10^5 \sim 21.60 \times 10^5$ 拷贝之间, 与贡柑每克组织平均含量 $4.76 \times 10^5 \sim 17.65 \times 10^5$ 拷贝之间无显著差异, 但均显著高于柠檬每克组织平均含菌量 $1.03 \times 10^5 \sim 7.96 \times 10^5$ 拷贝 (图 2, 表 2)。

第二年, 每个品种不同梢期及果实成熟期之间及 3 个品种之间的含菌量对比分析结果与第一年的类似, 但与第一年相比, 3 个品种中的黄龙病菌含量均有所升高, 其中砂糖橘和贡柑春梢期的含菌量升高不明显, 其余生育期均明显升高; 柠檬不同梢期及果实成熟期的平均含菌量升高均不明显。

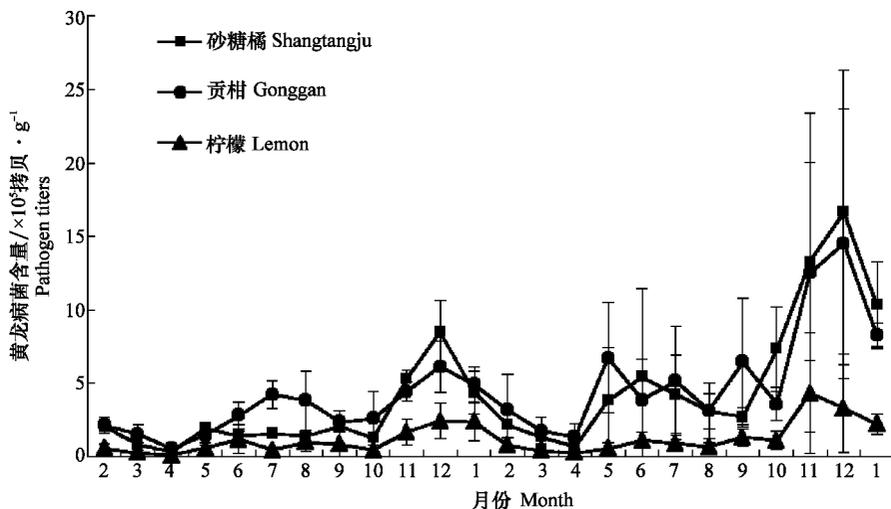


图 2 砂糖橘、贡柑、柠檬样品内黄龙病菌含量在两年内的动态变化

Fig. 2 Dynamic variation of pathogen titers in different diseased citrus plants in two years

表 2 不同梢期及果实成熟期内砂糖橘、贡柑、柠檬内黄龙病菌含量变化¹⁾

Table 2 Dynamic variation of pathogen titers in different growth periods of diseased citrus plants

栽培品种 Cultivar	第一年病菌拷贝/10 ⁵ ·g ⁻¹ Target gene copy numbers in the first year				
	春梢期 Spring shoots period	夏梢期 Summer shoots period	秋梢期 Autumn shoots period	冬梢期 Winter shoots period	果实成熟期 Fruit maturation period
砂糖橘 Shatangju	(3.52±2.55)dA	(5.50±1.02)cA	(5.32±1.57)cA	(21.60±5.62)aA	(14.57±4.85)bA
贡柑 Gonggan	(4.76±2.74)cA	(9.48±4.71)bA	(9.84±5.57)bA	(17.65±5.16)aA	(16.45±3.96)aA
柠檬 Lemon	(1.03±0.95)cB	(2.50±2.23)bB	(2.59±2.42)bB	(6.86±3.62)aB	(7.96±4.21)aB
栽培品种 Cultivar	第二年病菌拷贝/10 ⁵ ·g ⁻¹ Target gene copy numbers in the second year				
	春梢期 Spring shoots period	夏梢期 Summer shoots period	秋梢期 Autumn shoots period	冬梢期 Winter shoots period	果实成熟期 Fruit maturation period
砂糖橘 Shatangju	(4.70±2.98)cA	(15.04±13.97)bA	(14.59±9.22)bA	(49.91±27.45)aA	(34.38±9.90)aA
贡柑 Gonggan	(7.03±5.71)cA	(17.49±11.70)bA	(14.69±10.20)bA	(45.06±32.58)aA	(27.61±2.70)aA
柠檬 Lemon	(1.61±1.32)cB	(2.84±1.57)bB	(3.44±1.90)bB	(12.71±11.72)aB	(7.40±2.31)aB

1) 同行数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著, 同列数据后不同大写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Different lowercase letters in the same row and different capital letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level.

3 讨论

本研究对柑橘不同梢期及果实成熟期内的黄龙病菌含菌量动态检测显示: 3 个广东柑橘栽培品种春梢期的黄龙病菌含量显著低于夏梢期与秋梢期; 夏梢期与秋梢期的含菌量又显著低于冬梢期及果实成熟期, 这说明柑橘病样内的黄龙病菌含量变化与不同的柑橘生育期可能存在特定的关系。可能是因为春、夏、秋梢期内, 气候适宜, 柑橘营养吸收传导能力强, 树势旺盛, 树体强健, 抑制延缓了黄龙病菌的危害; 而冬梢及柑橘果实成熟的生育期内, 气候适宜度降低, 树体营养集中流向果实, 加之冬季根系吸收能力减弱, 导致病树营养失衡、树势转弱, 从而难以抑制黄龙病的危害。检测结果显示, 连续两年树体菌量波动趋势总体相似, 但不同年度同月份的菌

量波动趋势并不完全一致, 反映了不同栽培及气候条件对菌量的影响。因此, 根据黄龙病菌在不同季节梢期的自然消长规律, 做好梢期栽培管理、培养健壮发达根系、提高柑橘营养吸收传导、保证病树的营养平衡、提高柑橘树势、促进树体强健可能是延缓黄龙病危害的田间实用方法, 值得探索。本试验结果可为黄龙病最佳防控时期的选择提供一定参考依据, 对柑橘黄龙病的防控具有一定指导意义^[19-21]。

有研究认为, 目前所有的商业柑橘品种对黄龙病菌均不抗病, 但不同品种柑橘感染黄龙病后出现病症的时间不同, 症状严重程度也有所区别, 其中柠檬接种黄龙病菌后病症较轻^[10-13, 22-23]。本研究使用荧光定量 PCR 对黄龙病菌进行定量检测, 探索了在相似侵染环境中感染柑橘黄龙病的 3 个柑橘品种贡

柑、砂糖橘、柠檬的抗病性,结果表明:第一年砂糖橘的黄龙病菌全年平均含量与贡柑的全年平均含菌量无显著差异,但均显著高于柠檬的全年平均含菌量。第二年,3个品种之间的平均含菌量对比也有相似结果,但与第一年相比,3个品种的黄龙病菌含量均有所升高,其中砂糖橘和贡柑多个生育期的含菌量均显著升高;而柠檬的含菌量升高均不显著。这说明贡柑、砂糖橘、柠檬均不是抗黄龙病品种,但柠檬相对耐病,表现为植株内的黄龙病菌菌量相对较低,病菌增速相对较慢。

参考文献

- [1] Bové J. Huanglongbing: A destructive newly-emerging century-old disease of citrus [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2006, 88(1): 7-37.
- [2] Gottwald T R. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2010, 48: 119-139.
- [3] Alvarez S, Rohrig E, Solis D, et al. Citrus greening disease (huanglongbing) in Florida: Economic impact, management and the potential for biological control [J]. *Agricultural Research*, 2016, 5(2):1-10.
- [4] 谢钟琛,李健,施清,等.福建省柑橘黄龙病危害及其流行规律研究[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(11): 3888-3897.
- [5] 熊红利,林云彪,项宇,等.柑橘黄龙病与柑橘木虱在我国发生北界调查[J]. *植物检疫*, 2011, 25(4): 79-80.
- [6] 林亚玉,殷幼平,陈世钦,等.三种分子检测体系的比较及柑橘果园黄龙病监测[J]. *植物保护学报*, 2012, 39(6): 503-507.
- [7] 程保平,赵弘巍,彭埃天,等.柑橘黄龙病的传播介体-柑橘木虱在广东果园的发生调查[J]. *植物保护*, 2016, 42(1): 189-192.
- [8] Teixeira D D, Danet J L, Eveillard S, et al. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease [J]. *Molecular & Cellular Probes*, 2005, 19(3): 173-179.
- [9] 李韬,柯冲.应用 Nested PCR 技术检测柑桔木虱及其寄主九里香的柑桔黄龙病带菌率[J]. *植物保护学报*, 2002, 29(1): 31-35.
- [10] Miyakawa T, Zhao Xueyuan. Citrus host range of greening disease [C]//FAO-UNDP. Proceedings of the 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation, 1990: 118-121.
- [11] Hung Tinghsuan, Wu Mengling, Su Hongji. Identification of the Chinese box orange (*Severinia buxi folia*) as an alternative host of the bacterium causing citrus Huanglongbing [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, 107(2): 183-189.
- [12] Halbert S, Manjunath K. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida [J]. *Florida Entomologist*, 2004, 87(3): 330-353.
- [13] 刘登全,崔朝宇,蒋军喜,等.不同柑橘品种对黄龙病的抗性鉴定[J]. *江西农业大学学报*, 2014, 36(1): 97-101.
- [14] 胡浩,殷幼平,张利平,等.柑桔黄龙病的常规 PCR 及荧光定量 PCR 检测[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(12): 2491-2497.
- [15] 周根.柑桔黄龙病菌在病株体内分布和动态消长研究[D]. *华南农业大学*, 2007.
- [16] Zhang Muqing, Powell C A, Guo Ying, et al. Characterization of the microbial community structure in *Candidatus Liberibacter asiaticus* infected citrus plants treated with antibiotics in the field [J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13(1):1-10.
- [17] Xu Meirong, Liang Meidan, Chen Jianchi, et al. Preliminary research on soil conditioner mediated citrus Huanglongbing mitigation in the field in Guangdong, China [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 137(2): 283-293.
- [18] 程保平,彭埃天,宋晓兵,等.三种 PCR 方法检测柑橘黄龙病菌的效果比较[J]. *植物保护*, 2014, 40(5): 106-110.
- [19] Yang C, Powell C, Duan Y, et al. Characterization and antibacterial activity of oil-in-water nano-emulsion formulation against *Candidatus Liberibacter asiaticus* [J]. *Plant Disease*, 2016, 100(12): 2448-2454.
- [20] Lu Lianming, Cheng Baoping, Yao Jin'ai, et al. A new diagnostic system for detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection in citrus [J]. *Plant Disease*, 2013, 97(10): 1295-1300.
- [21] Lu Lianming, Cheng Baoping, Du Danchao, et al. Morphological, molecular and virulence characterization of three *Lencanicillium* species infecting Asian citrus psyllids in Huangyan citrus groves [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 125: 45-55.
- [22] Ahlawat Y S. Viruses, greening bacterium and viroids associated with citrus (*Citrus* species) decline in India [J]. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 1997, 67(2): 51-57.
- [23] Ahmad K, Sijam K, Hashim H, et al. Assessment of Citrus susceptibility towards *Candidatus Liberibacter asiaticus*-Terengganu isolate based on vector and graft transmission tests [J]. *Journal of Agricultural Science*, 2015, 3(3): 159-166.

(责任编辑:杨明丽)