

文章编号: 1001-1498(1999) 06-0606-06

茶翅蝽对植原体的传播能力*

孙志强¹, 傅建敏¹, 乔杰¹, 闫正升², 杜奎宇², 董溯权²

(1. 国家林业局郑州泡桐研究开发中心, 河南郑州 450003; 2. 河南省兰考县林业局, 河南兰考 475300)

摘要: 经1996年至1998年室内接种试验, 分别比较了人工饲养带毒和自然带毒的茶翅蝽成虫和若虫的传病特点。结果显示: 室内人工饲养带毒的3龄、4龄若虫接种泡桐发病率分别达61.7%和46.5%, 高于自然带毒的若虫16%的传病率。室内饲养带毒成虫的接种发病率为14.1%, 高于自然带毒成虫4.5%的传病率。寄主体内病原的最短潜育期(MIP)室内饲毒3龄若虫为34 d, 4龄为45 d, 成虫处理为219 d; 自然带毒若虫为243 d, 成虫处理为257 d。6月接种苗多在当年表现病状, 7月接种苗均在次年发病。3龄、4龄若虫接种后病原潜育期(IP)与泡桐苗累计发病率的关系分别为 $y = 0.8472x + 23.044$ ($R^2 = 0.8743$), $y = 0.759x + 29.022$ ($R^2 = 0.8019$); 由此得到相应的3龄潜育期中值 $LP50 = 65.40$ d和4龄 $LP50 = 66.472$ d。室内3龄、4龄若虫在充分吸食病组织后, 其传病力差异不大, 且传毒后病原在寄主体内的潜育期中值没有明显的差异。

关键词: 茶翅蝽; 植原体; 泡桐丛枝病; 潜育期; 最短潜育期; 潜育期中值

中图分类号: S763.350.1

文献标识码: A

植原体(phytoplasma)病害由于其对植物造成的毁灭性危害而越来越受到人们的重视, 如泡桐丛枝病(翠菊黄化种 *Aster Yellow* *Phytoplasma asteri*)、枣疯病(白蜡树黄化种 *Ash Yellow* *P. fraxini*)、桑萎缩病(翠菊黄化种 *Aster Yellow* *P. asteri*)等; 同时由于该病原特殊的生物学特性, 如目前尚不能进行体外培养, 很难进行有效治疗药物的筛选, 因而不能有效控制这一类植物病害的危害和蔓延。植原体在自然界主要通过媒介昆虫的传播而扩散蔓延。开展植原体病害传病媒介昆虫种类的调查及其传病特性的研究, 可为进一步开展这类病害的防治提供理论依据, 同时也可对相关研究, 如抗病品种选育提供一种技术保障。有研究报道了能够携带并传播泡桐丛枝病原植原体的媒介昆虫种类, 如半翅目的茶翅蝽(*Halyomorpha picus* Fabricius)、烟草盲蝽(*Cyrtopeltis tenius* Reuter)^[1,2], 同翅目的小绿叶蝉(*Empoasca flavescens* (Fabricius))^[3]、中国拟菱纹叶蝉(*Hishimonoides chinensis* Anutrier)^[4]等; 但是针对这些媒介昆虫传病特点的系统研究未见报道。作者从1996年开始, 采用室内生物测定技术, 比较和分析了人为控制以及自然条件下茶翅蝽成虫和若虫的传染泡桐丛枝病的特点和能力以及病原在寄主体内的潜育期。这些研究为进一步提出防治媒介昆虫的措施、切断传毒途径提供科学依据, 同时为泡桐无毒苗的推广和配套措施的研究打下基础^[5]。本文还讨论了这种生物测定技术用于泡桐抗丛枝病选育的早期评价的可行性。

收稿日期: 1998-12-08

基金项目: 国家“九五”攻关项目“泡桐丛枝病媒介昆虫调查”和河南省1998年重点攻关项目“泡桐丛枝病媒介昆虫检测及防治技术研究”的部分内容。

* 北京林业大学李镇宇教授审阅并指正, 谨此深表感谢。

第一作者简介: 孙志强(1965-), 男, 河北内邱人, 副研究员, 北京林业大学在读硕士。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试泡桐为中林1号(*Paulownia fortunei* cl. C001)脱毒组培苗(中国林科院生态环境与森林保护研究所提供),白花泡桐(*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.)为在网室内培育的当年生实生苗,当苗木生长至5、6片真叶期时可用于接种。兰考泡桐(*Paulownia elongata* S. Y. Hu)病菌是由田间采集的病根经由室内催芽获得,供试虫吸毒的病苗须是从枝症状明显,并经过DAPI染色、荧光显微镜检测^[6]证实有植原体存在。供试茶翅蜻成虫采自河南省兰考县城关乡自然发病严重的农桐间作林,并通过室内饲养获得卵块和若虫。

1.2 方法

室内传病力测定:茶翅蜻若虫孵化后直接放在室内病苗上饲养,待若虫生长至3龄第1 d、4龄第1 d开始室内接种测定不同龄期若虫的传病性。具体方法是:采用单虫单苗处理,接种取食时间为24 h,即每头若虫每天取食1株泡桐苗,连续接种5株,该5株苗为1组。每龄期参试15~20头若虫。室内成虫吸毒时间为10 d,单虫单苗处理,24 h后移去试虫;由于供试苗木的不足,未作重复接种。共处理30头。

自然传病力测定:从泡桐丛枝病发病区采集茶翅蜻成虫及若虫,不经室内吸毒,直接放在健苗上饲养,单虫单苗,48 h后移去。成虫和若虫(不分龄期)各处理30头,未作重复。将所有接种苗木按树种分别编号,每天检查生长状况,记录接种苗开始表现症状的时间,由此得到病原在泡桐体内的潜育期(IP)及最短潜育期(MIP),根据各IP的泡桐累计发病率计算使50%苗木发病的病原潜育期中值(LP50)^[7]。用室内在无毒苗上饲养的若虫取食健苗作对照。以上操作和观察均在网室内进行,所有苗木移入室内越冬。

病原检测:病原DNA提取方法参照Lees及参考文献[8, 9],采用CTAB法直接提取病组织皮层的DNA,以健苗作对照;聚合酶链反应(PCR)引物设计为5'-ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG-3 (152~168)和5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAA CCC CG-3 (1372~1397);PCR产物在1%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察扩增产物。

2 结果与分析

2.1 症状

通过连续3 a的室内观察,发现供试泡桐苗从接种至表现病状其外部形态的变化具有明显的特征:(1)病状表现一般从叶片开始。在老叶片上,早期病变表现为叶缘变浅黄,随即叶面开始皱缩,并较健康植株的同龄叶片提早脱落;新生叶片叶面浅黄色、皱缩严重,较同龄健康叶片小。(2)植株矮小、节间缩短、分支少;发病20~30 d后,开始由顶芽逐渐枯死;这一症状变化可与接种苗因试虫取食致死相区别。一般地,苗木经试虫取食后2~3 d即开始由顶芽枯萎,6~7 d后主干枯死。

根据上述病害症状特点,笔者认为可以将叶缘变黄视为开始发病,因而病原在寄主体内的最短潜育期即为接种日至发病日的期限。

2.2 传病率与潜育期

接种苗木发病及病原潜育期IP/d结果见表1,对照接种苗木发病率为0。室内人工饲养带

毒的3龄若虫接种16组, 共计80株, 其中因取食致死33株、发病29株, 其余未表现病状; 4龄若虫接种14组, 计70株, 其中试虫取食致死12株, 发病27株; 发病率分别达到61.7%和46.5%。该两组处理为重复接种, 从苗木发病的分布分析, 3龄若虫接种的16组苗木中有15组出现病苗, 因此3龄若虫接种的传病率为93.7%; 相应地, 4龄接种的14组中有12组苗木表现病状, 因此4龄若虫的传病率为85.6%。将由泡桐丛枝病疫区林间采集的茶翅蝽若虫(2~5龄)直接接种在室内无毒苗和当年生实生苗上, 共接种32株, 其中因若虫取食致死7株、发病4株, 未表现病状计21株, 因此自然带毒的若虫的1次接种发病率为16%。室内饲毒成虫的1次接种发病率为12.5%, 高于自然带毒成虫1次接种4.5%的传病率。上述结果表明: 室内在泡桐丛枝病苗上饲养的若虫表现了较为稳定的传病能力。同时可以看出, 无论是人工饲养带毒还是自然带毒, 若虫较成虫表现出了较强的传病力。从表1中还可看到, 由于供试苗木木质化程度不够, 试虫取食造成了较高的死亡率, 从17.2%至41.25%, 尤其是6月上旬的接种苗的死亡率更高一些, 成为影响结果的一个因素。

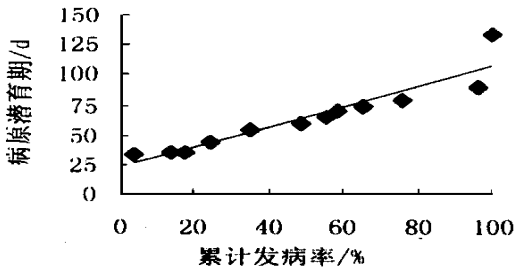
表1 接种后泡桐苗发病率、病原 IP 及 MIP

项 目	人工饲养带毒			自然带毒		
	3龄若虫	4龄若虫	成虫	若虫	成虫	对照
接种时间(年-月-日)	1997-06-09	1997-06-23	1997-07-23	1997-07-14	1996-07-14	1996-06-10
接种苗数/株	80	70	29	32	30	42
死亡苗数 ^① /株	33	12	7	7	8	17
死亡率/%	41.25	17.2	24.1	21.8	26.7	40.4
未发病苗数/株	18	31	19	21	21	25
发病苗数/株	29	27	3	4	1	0
发病率/%	61.7	46.5	14.1	16	4.5	0
IP/d	34~135	45~120	219~307	243~282	257	-
MIP/d	34	45	219	243	257	-

①因试虫取食致苗木死亡的株数。

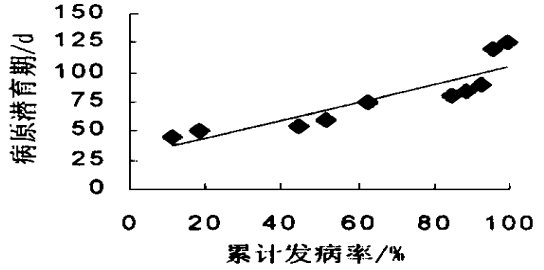
室内饲毒的3龄若虫接种时间始于1997年6月9日, 相应的病原 MIP 为34 d, 除因取食造成的死亡外, 大部分接种苗均在当年发病; 4龄若虫接种时间始于6月23日, MI 为45d, 苗木也是当年发病; 成虫的接种时间为1997年7月23日, MIP 为219 d, 即发病时间为次年2月。值得说明的是因苗木在具暖气的室内越冬, 相应缩短了泡桐的越冬期。自然带毒的若虫和成虫的接种日期均为1996年7月14日, 若虫 MIP 为243 d, 即第2年4月发病; 成虫接种的泡桐 MIP 为257 d。可以看出, 6月接种的苗木多在当年表现病状, 7月接种苗均在第2年发病。

对3龄、4龄若虫接种处理后发病苗木的累计发病率与病原 IP 的关系进行分析, 结果如图1、图2所示。3龄若虫接种后病原 IP 与发病率的关系为 $y = 0.8472x + 23.044$ ($R^2 = 0.8743$), 由此得到 LP50 = 65.40 d; 相应地, 4龄若虫接种后病原 IP 与发病率的关系为: $y = 0.759x + 29.022$ ($R^2 = 0.8019$), 4龄若虫处理后病原的 LP50 = 66.472 d。从以上及前面的数据可以看到, 3龄、4龄若虫在充分吸食病组织后, 其传病力差异不大, 且传毒后病原在寄主体内的潜育期没有明显的差异。



$$y = 0.8472x + 23.044 (R^2 = 0.8743)$$

图1 3龄若虫接种苗发病率与 IP 的关系



$$y = 0.759x + 29.022 (R^2 = 0.8019)$$

图2 4龄若虫接种苗发病率与 IP 的关系

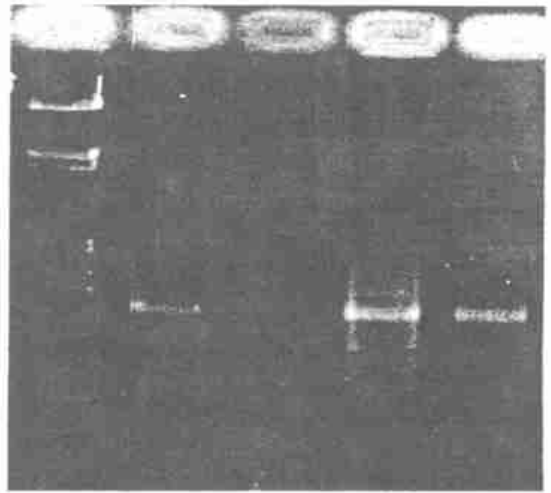
2.3 病原检测

随机抽取了未表现症状的接种苗的叶柄进行切片, 经 DAPI 染色、荧光显微镜镜检未见到筛管部具特异荧光(未摄影); 选取试虫取食的病苗、接种后发病苗木的病组织经病原提取、PCR 扩增, 从所有病苗提取物中均扩增得到了 1.26 kp 长的病原特异 DNA 片断; 对照接种健苗未表现这种特异性, 如图3所示。说明接种发病苗的病原与媒介昆虫取食的病苗的病原是同一种病原。

3 结论与讨论

(1) 植原体进入虫体后可随血淋巴在体内循环并增殖, 属于可持续性传播的病原。媒介昆虫传播病原成功与否受多种因素影响, 如虫态、取食寄主时间以及寄主的树龄及长势等情况; 同时受到温度、湿度及光照等环境因素的影响。经过持续2 a 的观察, 一部分接种苗未表现症状; 对其中一些苗木的荧光检测也未发现病原存在, 但由于未对这些苗木作 PCR 检测, 因而不能肯定其体内不含病原。因为镜检效果受到取样部位、病原含量的限制。

(2) 无论是人工饲养带毒还是自然带毒, 若虫均表现了较强的传病力。室内人工饲养带毒的3龄、4龄若虫的接种发病率分别达到61.7%和46.5%; 从苗木发病的分布看, 3龄若虫接种的传病成功率为93.7%, 4龄若虫传病成功率为85.6%; 从采自田间的自然带毒的若虫1次接种16%的传病率来看, 自然界发病疫区若虫的带毒率是相当高的, 由于没有重复, 因而不能肯定自然带毒若虫的持续传病能力。上述结果说明人工饲养带毒的若虫传病能力是较为稳定的, 24 h 的取食时间也满足了病原由虫体进入泡桐组织的需要。室内饲养带毒成虫的接种发病率为14.4%, 高于自然带毒成虫4.5%的传病率。有调查显示, 泡桐丛枝病发病率大小因其栽植方式的不同而依次表现为片林、行道树、农桐间作林、散生泡桐^[10], 这种结果看来与媒介昆虫的传



1 2 3 4 5
列1 Marker, 列2 病苗,
列3 对照健苗,
列4 饲养带毒若虫接种苗,
列5 自然带毒接种苗

图3 PCR 产物电泳分析

病特性密不可分。茶翅蟥成虫虽然有效活动范围可达2 km,但其传病力相对较弱,因而长距离的有效传毒就会降低;若虫传病力强,但其有效活动范围有限,因而容易在泡桐片林重复传毒,造成很高的发病率。

(3) 病原在寄主体内的潜育期可能与接种时间、泡桐苗的大小有一定的关系。室内饲毒的3龄若虫接种时间始于6月9日,4龄若虫接种时间始于6月23日,这时的当年生实生苗枝干的木质化程度很低;成虫的接种时间为7月23日,自然带毒的若虫和成虫的接种日期均为7月14日,这时泡桐苗的木质化程度和苗高均较6月的苗木有较大的提高,因试虫取食造成的苗木死亡率也相应较低。从苗木表现病状的时间看,6月接种的苗木多在当年表现病状,7月若虫接种后寄主体内病原的MIP为34 d,4龄为45 d;成虫处理的MIP为219 d。自然带毒的若虫和成虫处理的病原MIP分别为243 d和257 d。3龄、4龄若虫接种后病原IP与泡桐苗累计发病率的关系分别为 $y = 0.8472x + 23.044 (R^2 = 0.8743)$ 和 $y = 0.759x + 29.022 (R^2 = 0.8019)$;由此得到相应的3龄处理后病原的LP50=65.40 d和4龄的LP50=66.472 d。3龄、4龄若虫在充分吸食寄主组织后,其传病力差异不大,且传毒后病原在寄主体内的潜育期中值LP50没有明显的差异。

(4) 根据国内外进行病害防治所取得的经验,开展抗病育种、选育抗病品种,是从根本上解决病害危害的重要途径。而抗病育种早期鉴定技术对于抗病育种成效、缩短育种周期具有重要作用。泡桐丛枝病属系统侵染性病害,从寄主植物带菌到发病有一个较长的潜伏期。目前泡桐抗病选育还没有有效的人工诱发鉴定方法,对早期评价和选择工作带来不少困难^[11,12]。从本研所得到的结论,笔者认为通过室内人工饲养使茶翅蟥3龄、4龄若虫充分获取病原用于泡桐幼苗接种,当年即可获得泡桐苗的染病情况,并可通过比较发病率与LP50评价抗病育种成效,因此可大大缩短育种周期。

参考文献:

- [1] 金开璇,傅苍生,李振兰.泡桐丛枝病原及传染途径研究[J].林业科学,1987,14(4):1~3.
- [2] 金开璇,傅苍生,李振兰.泡桐丛枝病传毒昆虫研究[J].林业科技通讯,1981,(12):23~24.
- [3] 郑文锋,宋晓斌,任锁堂,等.泡桐丛枝病原及其传病途径的研究[J].陕西林业科技,1990,(1):23~25.
- [4] 金开璇,高志和.吸食枣疯病的中国拟菱纹叶蝉传播泡桐丛枝病[J].林业科技通讯,1980,(9):22~24.
- [5] 张锡津,田国忠,黄钦才.温度处理结合茎尖培养脱除泡桐丛枝病菌质体[J].林业科学,1994,30(1):34~38.
- [6] 金开璇,田国忠,汪跃.组织化学技术快速检测泡桐丛枝病研究[J].植物病理学报,1989,19(3):185~189.
- [7] James H T. 9/ Vector transmission of mycoplasmal agents of plant disease[M]. Academic Press, Inc. The Mycoplasmas. VOL. . 1979. 265~307.
- [8] Lee I M, Hammond R W, Davis R E, et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms[J]. Phytopathology, 1993, 83(8): 834~843.
- [9] 王克日,庞辉.泡桐组培苗丛枝病原PCR检测[J].林业科学研究,1995,8(2):215~218.
- [10] 田国忠,熊耀国,汪跃,等.泡桐对丛枝病原MLO的抗性研究[J].林业科学研究,1994,7(2):155~161.
- [11] 李荣幸,程绍荣,刘延志,等.泡桐对丛枝病的抗性差异及其自然鉴定[J].河南农业大学学报,1987,24(2):170~176.
- [12] 熊耀国,赵丹宁.泡桐遗传改良[M].北京:中国科学出版社,1995.269~276.

Capacity of *Halyomorpha picus* Transmitting Phytoplasma Associated with Paulownia Witches Broom

SUN Zhi-qiang¹, FU Jian-min¹, QIAO Jie¹,
YAN Zheng-sheng², DU Kui-yu², DONG Su-quan²

(1. Paulownia Research Center of China, Zhengzhou 450003, Henan, China;

2. Forest Bureau of Lankao County, Henan Province, Lankao 475300, Henan, China)

Abstract: Based on the indoor inoculation test conducted from 1996 to 1998, the characteristics of transmitting phytoplasma by *Halyomorpha picus* associated with paulownia witches broom were compared between insect groups (adults and nymphae) of reared pathogen acquisition (RA) and naturally pathogen acquisition (NA). The results showed that the rate of pathogen transmission to paulownia seedlings by third and fourth instar nymphae of RA was 61.7% and 41.4%, which were much higher than that by nymphae of NA (16%). For adults, the transmission rate was 14.1% of RA which was also higher than that of NA (4.5%). The minimum incubation period (MIP) of pathogen *in vivo* were 34 days and 45 days for third and fourth instar nymphae and 219 days for adults (RA), that for nymphae and adults (NA) were 243 days and 257 days respectively. The seedlings inoculated in June showed symptom of disease in the same year, while that inoculated in July showed symptom of disease in the next year. The incubation period (IP) had a positive relation with successive disease rate. For third instar nymphae, the equation of relation was $y = 0.8472x + 23.044$ ($R^2 = 0.8743$) and relevant LP50 = 65.40 days, that for fourth instar nymphae was $y = 0.759x + 29.022$ ($R^2 = 0.8019$) and LP50 = 66.472 days. The feasibility of using RA nymphae for early assessment of paulownia genetic breeding against witches broom was discussed.

Key words: *Halyomorpha picus*; phytoplasma; paulownia witches broom; incubation period; minimum incubation period; median latent period