

柑橘黄龙病研究进展

程春振^{1,2}, 曾继吾¹, 钟云¹, 闫化学¹, 姜波¹, 钟广炎^{1,*}

(¹广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640; ²西南大学园艺园林学院, 重庆 400715)

摘要: 柑橘黄龙病是柑橘生产中重大病害, 其病原菌能够侵染几乎所有的柑橘及其近缘属植物, 但目前尚无该病的有效防治方法。随着其在全球范围内的传播, 该病已是近年来柑橘生产和研究受到普遍关注的热点。本文试图就近年来围绕柑橘黄龙病病原及其对宿主柑橘的影响、黄龙病的防治以及柑橘抗病育种等方面的最新研究进展作一概述。

关键词: 柑橘黄龙病; 黄龙病病原菌; 宿主-病原互作; 抗病育种

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 09-1656-13

Research Progress on Citrus Huanglongbing Disease

CHENG Chun-zhen^{1,2}, ZENG Ji-wu¹, ZHONG Yun¹, YAN Hua-xue¹, JIANG Bo¹, and ZHONG Guang-yan^{1,*}

(¹Fruit Tree Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; ²College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Citrus Huanglongbing (HLB), caused by *Candidatus liberibacter*, is the most devastating disease of citrus for which no cure has been found. Almost all known citrus varieties including those from their closely related genera can be infected by the bacteria. HLB has been a hot topic of citrus researches since the disease was discovered in America. In this paper, we are trying to summarize generally the recent advances in the researches of HLB pathogen and pathogen-host interactions. Topics on HLB control and breeding for HLB-resistant/tolerant citrus materials were also touched.

Key words: Huanglongbing; *Candidatus liberibacter*; host-pathogen interaction; disease resistance breeding

疑似柑橘黄龙病症状早在 18 世纪的印度就有记载, 特征是生长缓慢、低产、顶梢枯死、慢慢死亡或速衰, 当时认为是“梢枯病”(dieback) (Asana, 1958)。中国最早于 1919 年报道在广东的潮汕地区有类似病害, 当地称之为“黄龙病”, 是因为染病柑橘新梢及叶片黄化。林孔湘教授用试验证明该病可以通过嫁接传播 (Lin, 1956)。1995 年第 13 届国际柑橘病毒病学家会议决定以柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing, HLB) 作为该病的正式名称 (Bové, 2006)。

随着全球柑橘业的发展, 柑橘黄龙病也已经传播到亚、非、美等柑橘主产区, 并成为危害全球柑橘产业发展最严重的病害。据估计该病已经造成上亿株柑橘树染病或死亡 (Bové, 2006;

收稿日期: 2013-05-02; **修回日期:** 2013-08-20

基金项目: 科技部国际合作重点项目(2012DFA30610); 广东省对外合作项目(2012B050700006); 广东省科技计划项目(2012A020200016, 2012B091100169)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gy_zhong@163.com)

Grafton-Cardwell et al., 2013)。故美国、巴西、中国等柑橘主产国对该病的防控十分重视, 投入了巨资进行研究。仅美国在 2005 年发现黄龙病后就已经投入了 6 000 多万美元研究经费, 组织全球柑橘育种、栽培、植保等领域的科学家联合攻关。这些努力使人们对柑橘黄龙病有了比较深入的了解和比较新的认识。本文试图就黄龙病病原、致病机理、黄龙病的防治等几个方面的进展作一概述。

1 黄龙病病原研究及其进展

1967 年以前, 黄龙病病原菌被认为是病毒。后来又一度被认为是一种类似支原体的原核生物 (Mycoplasma Like Organisms, MLOs)。直到电镜下观察到病原菌 25 nm 厚的细胞壁之后, 其为细菌的本质才被最终确认 (Garnier & Bové, 1977)。目前的认知表明, 黄龙病病原体是革兰氏阴性菌, 其 16S rDNA 序列属于薄壁菌门 α 亚纲 (Jagoueix et al., 1994; Bové, 2006)。Duan 等 (2009) 利用宏基因组学测序方法, 完成了黄龙病病原菌亚洲种基因组序列的测定, 根据序列进一步确认其为根瘤菌科的一个早期分支。Sagaram 等 (2009) 发现在未显症的柑橘叶片中脉中有大量的内生细菌, 而黄龙病菌丰度很低, 显症后黄龙病菌丰度升高 200 倍以上, 细菌种类芯片分析和测序分析结果均证明显症叶片中脉中的优势菌种是黄龙病菌亚洲种 (Las), 因此认为 Las 是黄龙病病原。Tyler 等 (2009) 用宏基因组测序证明在黄龙病树的筛管分子中只检出了 Las, 未检出其他病原体。但 Teixeira 等 (2008) 通过电镜观察发现具有黄龙病典型症状的样品感染了某种限筛管病原体, 16S rDNA 序列分析表明, 其与木豆丛枝病植原体的相似性达到 99%。Chen 等 (2009) 在广东亦发现有黄龙病症状的柑橘上存在植原体。不过, 从佛罗里达的黄龙病传播媒介亚洲柑橘木虱体内也没有发现植原体 (Duan et al., 2009; Tyler et al., 2009)。因此, 学界目前普遍认为黄龙病的病原体是 *Candidatus Liberibacter* spp.。

已知黄龙病病原可分为亚洲种 Las、非洲种 Laf 和美洲种 Lam (Bové, 2006)。根据 Duan 等 (2009) 发表的结果, Las 基因组大小为 1 227 204 bp, 与 Wulff 等 (2009) 通过脉冲场凝胶电泳得到的 Lam 基因组 (约 1.26 Mb) 结果相近, 这比大多数同类细菌的基因组都要小。Las 基因组 GC 含量约 36.5%, 较小的基因组和较低的 GC 含量可能是稳定的、营养丰富的环境和较弱的净化选择作用的结果 (Moran et al., 2008; Moya et al., 2008; Wang & Trivedi, 2013)。在 Las 基因组中共预测到 1 136 个编码序列, 其中 74% 能找到具有已知功能或推测功能的同源序列, 余下 26% 是可能的开放阅读框。Las 基因中有 44 个 tRNA 基因, 32 个假基因, 生物合成相关基因占比少, 而与细胞流动性相关的基因如 IV 型菌毛和鞭毛基因所占比例却高达 4.5%, 另外与主动运输有关的基因有 92 个 (8%), 其中有 40 个是 ABC (ATP-binding cassette, ATP-结合盒) 转运基因。在 Las 基因组中还发现了 12 个噬菌体相关基因, 说明 Las 基因组中可能存在噬菌体或原噬菌体。依据多蛋白进化分析结果, Las 属于根瘤菌科的早期分支。Lin 等 (2013) 从感染 Lam 的长春花中测得了 Lam 的基因组, 以 *Ca. Liberibacter solanacearum* 基因组作为参考基因组共得到长约 1 176 071 bp 的 22 个 contigs, 分析表明: Lam 的 GC 含量为 31.6%, 预测得到 948 个编码序列, 38 个 tRNA, 包含 3 个 rRNA 操纵子和 213 个推测的基因; Lam 基因组序列与 *Ca. Liberibacter solanacearum* 的最为相近, 与 Las 的次之; 利用 52 个直系同源基因与根瘤菌以及 α -变形细菌亚纲的成员进行进化分析发现 Lam 更靠近根瘤菌科的基部节点, 其次是 *Ca. Liberibacter solanacearum* 和 Las, 说明 Lam 分支较早。

目前普遍认为黄龙病病原菌 *Candidatus Liberibacter* 是一种革兰氏阴性菌, 属于变形细菌门 (Proteobacteria), α -变形细菌亚纲 (Alpha-Proteobacteria), 根瘤菌目 (Rhizobiales), 根瘤菌科 (Rhizobiaceae)。

2 黄龙病病原的传播方式及宿主范围

柑橘黄龙病人为传播主要通过带病接穗嫁接和带病苗木调运,自然传播是由取食病树后的带菌柑橘木虱再取食健康树来完成 (Grafton-Cardwell et al., 2013)。

已知 Las 和 Lam 属于耐热型, Laf 属于热敏感型。自然条件下 Las 和 Lam 由柑橘木虱 *Diaphorina citri* 传播, Laf 由非洲木虱 *Trioza erythrae* 传播 (Halbert & Manjunanth, 2004; Grafton-Cardwell et al., 2013)。柑橘黄龙病病原菌除了柑橘木虱和非洲木虱这两个昆虫寄主外,还能在果蝇、伊蚊细胞中存活 (Fontaine-Bodin et al., 2011)。

柑橘黄龙病的植物寄主主要是柑橘属及其芸香科柑橘亚科近缘属植物。除柑橘属植物外,枳、金柑、黄皮、九里香、澳指檬、木苹果、酒饼筋等近缘属植物上均有检出黄龙病菌的报道 (Ding et al., 2005; Bové, 2006; Shokrollah et al., 2009; Folimonova & Achor, 2010)。柑橘亚科中的九里香由于能连续抽发新梢,因而是柑橘不抽梢期间木虱种群得以维持的重要原因 (Tsai et al., 2002)。但九里香中的黄龙病细菌似乎繁殖不良,只能维持 2 个月,3~5 个月后的滴度就低到检测不到 (Damsteegt et al., 2010; Walter et al., 2012)。

除芸香科植物外,柑橘黄龙病细菌还可以通过菟丝子传播给长春花、烟草和番茄等非芸香科植物 (Garnier & Bove, 1983, 1993; Duan et al., 2008; Brown et al., 2011; Wang & Trivedi, 2013)。长春花染病后的症状比柑橘更明显,病菌滴度更高,因此,常被用作黄龙病草本指示植物 (Bové, 2006)。感染 Las 后的烟草,即便在病菌滴度很低的情况下症状也很严重 (Garnier & Bové, 1993; Duan et al., 2008)。Brown 等 (2011) 在牙买加的 3 种草本植物中检测到 Las。Fan 等 (2011a) 在福建的亮叶猴耳环上也检出了低滴度的 Las。

3 黄龙病对柑橘的影响

3.1 柑橘黄龙病症状

柑橘类植物感染黄龙病菌后并不立即显症,存在潜伏期。潜伏期的长短因品种、树龄、健康状况、种植环境等而异 (Gottwald, 2010),但相比其他病原体,黄龙病菌的潜伏期较长。

果实的典型症状是着色异常、果小、畸形。染病沙糖橘等宽皮柑橘的果实常表现为果蒂和果肩周围先褪绿转色,其它部位仍然为青绿色,且因蜡质形成受阻而无光泽。果农称之为“红鼻子果”或“红肩果”。染病甜橙树的果实常表现为青果,病果的果汁味酸、淡,果实中心柱不正 (钟云, 2012)。另外感染黄龙病的柑橘种子质量减轻,多败育且萌发率降低 (Dagulo et al., 2010)。

叶片的典型症状是黄化、变小。据病程长短,叶片黄化有两种主要类型,一种是斑驳型黄化,一种是均匀黄化。染病早期,叶片常显现为斑驳型黄化,待病菌散播到全树后,新梢抽生的叶片一般为均匀黄化 (Bové, 2006)。

病根表皮易脱离、腐烂 (蔡明段 等, 2011)。Johnson 等 (2013) 指出,黄龙病菌优先定殖在根中且分布较为均匀,这也是为什么仅仅砍除病枝并不能有效控制黄龙病的原因所在。

苗期染病的幼树表现为全株黄化,肥水条件差时最为明显。成年树染病后,常在感染部位出现有斑驳黄化叶的枝梢,此种枝条和附近正常枝梢色差明显,肉眼明确可辨。病树新梢细弱。

黄龙病的症状及严重与否依柑橘种类和品种而异。Folimonova 和 Achor (2010) 观察了 30 个柑橘基因型接种黄龙病后的反应,发现有些基因型对黄龙病很敏感,如苏坦柠檬出现黄化、叶脉爆裂并很快死树,克里曼丁橘 (Nules) 枝梢先端叶片黄化、生长受阻直至死树,明尼奥拉橘柚表现出梢

端叶片黄化和生长受阻, 对黄龙病极其敏感的甜橙和葡萄柚表现出严重的幼叶黄化和生长受阻现象并最终死亡; 有些则中度耐病, 如孙楚沙橘、沃尔卡姆柠檬、阿力檬、墨西哥来檬等只有散发性的成团黄化病叶, 酸橙只在连续高光照条件下发生叶片黄化, 施文格枳柚、巴勒斯坦甜来檬只在老叶上有黄化, 枸橼在老叶上有明显的黄化, 四季橘和小花大翼橙在老叶上有比较温和的症状; 有些品种耐病, 如尤力克柠檬在观察期内没有出现症状 (只在 24 h 连续光照条件下才出现黄化), 波斯来檬无症状或症状轻微, 卡里佐枳橙少有或没有黄化, 酒饼筋没有症状。枳和卡西大翼橙在观察期内有时显症有时不显症。他们还观察到症状严重与否与黄龙病细菌的滴度并无相关性。Shokrollah 等 (2009) 通过嫁接试验证明, 在 18 个参试品种中有 15 个在接种 6 个月后检出细菌, 依据症状可以将它们分为 5 组: 重症组, 包括宽皮柑橘、甜橙、印度酸橘; 中症组, 包括金柑、阿力檬、小花大翼橙; 轻症组, 包括枸橼、部分来檬、粗柠檬等; 耐病组 (无黄龙病症状, 但有黄龙病菌检出), 包括酸橙、和某些来檬; 抗病组 (无症状且黄龙病菌检测阴性), 包括 Limau Bali 柚、马蜂柑和 'Limau Tembikai'。不过由于接种时间不长, 可能这些所谓的抗病基因型只是耐病而已。枳橘 US-897 (枳 × 印度酸橘) 在自然接种时只有很小比例的树上有少量斑驳黄化叶, 感病树上的果实生长并未受阻; US-897 在嫁接传毒后尽管可用 PCR 检出黄龙病菌, 但与亲本印度酸橘接毒后很快表现严重症状相比, 除少数在后期有轻微难辨别的症状外, 大多数树苗无典型的黄龙病症状, 干径生长未受影响或影响甚微 (Albrecht & Bowman, 2011)。

在解剖学上, 感染黄龙病病原后的植株筛管分子细胞壁胞间层肿大, 这被认为是植株开始衰退的一个重要表征 (Folimonova & Achor, 2010)。Fan 等 (2013) 比较了黄龙病敏感的甜橙和不敏感 (较耐病) 粗柠檬在感病后的解剖学差异, 发现这两个品种的发病叶柄中均有韧皮部细胞塌陷、筛管阻塞、淀粉积累现象; 比较无症状的叶片, 发现甜橙出现明显的韧皮部细胞塌陷和淀粉积累, 但粗柠檬无此现象; 此外, 只在发病甜橙的根中观察到淀粉缺失、韧皮部细胞塌陷和纤维消失现象。如此看来, 根系的解剖结构稳定与否与黄龙病的耐受性有很大的关系。

3.2 黄龙病对柑橘生化代谢的影响

淀粉代谢异常是柑橘感染黄龙病后发生的最主要的生化变化 (Etxeberria et al., 2009; Kim et al., 2009)。甜橙染病后, 地上部出现淀粉积累, 地下部则发生淀粉欠缺问题, 这可能是因为感病植株中碳水化合物下运受阻, 根中原有淀粉耗尽后, 根系发生饥饿, 致病根表皮脱离、腐烂 (Etxeberria et al., 2009; Kim et al., 2009)。淀粉代谢异常可能和黄化症状相关, 因为在生产中常用来促进成花和坐果的重度环割会导致柑橘叶片黄化 (Li et al., 2003; Rivas et al., 2006; Cimò et al., 2013)。环割的作用是切断韧皮部, 在环割部位愈合前起到暂时阻止地上部碳水化合物下运, 这与黄龙病菌阻断碳水化合物下运极其相似。但 Johnson 等 (2013) 的研究表明, 黄龙病细菌在根中的定殖早于叶中, 认为根系受害并不是由于韧皮部堵塞导致的碳水化合物缺乏, 而是由于根中黄龙病细菌的破坏。

感染黄龙病后柑橘果实品质发生改变。首先是和人类味觉相关的物质发生改变。通过对比感病和未感病的哈姆林甜橙、Midsweet 甜橙和伏令夏橙的果实, 发现未表现症状的感病果实除了柠檬苦素和诺米林等苦味物质含量较高外, 其他指标差异不明显 (Baldwin et al., 2009)。Dagulo 等 (2010) 分析发现有症状的病果果汁中香味物质有改变, 酯类、醛类、倍半萜烯、丁酸乙酯的含量分别减少至正常果实果汁的 40%、48%、33%和 45%, 但萜烯类物质如 γ -萜品烯和 α -萜品油烯的含量比正常果汁各高 1320% 和 62%, 芳樟醇含量高 356%。此外, 病果质量减轻、体积变小, 果汁中糖酸比下降 62%, 果皮中淀粉和糖含量也下降。

病树中的激素代谢异常。花后 7 个月和 12 个月的病果产生的乙烯减少, 但在有症状果实花柱端、中部或茎端果皮中 IAA 和 ABA 含量比无症状感病果实和正常果实高 (Rosales & Burns, 2011),

染病柑橘易落果与乙烯与 IAA 平衡变化有关 (Sexton & Roberts, 1982)。

感病柑橘树中矿质元素含量有明显的变化。叶片中含量减少的矿质元素有 N、Ca、Mg、Zn、Fe、B 等 (Pustika et al., 2008; Razi et al., 2011), 这似乎可以解释黄龙病的黄化现象, 因为矿质元素如 N、Fe、Mg、Zn 与叶绿素合成相关, 任一元素减少后都会导致黄化症状。因此, 黄龙病导致的黄化很可能是一种复合缺素症状。

3.3 感病后柑橘宿主中转录组学、蛋白组学及 sRNA 变化

利用芯片检测感染黄龙病的伏令夏橙叶片, 发现大量的基因表达水平发生改变。这些基因涉及细胞防御、物质运输、细胞形成、光合作用及糖类代谢等过程, 其中编码韧皮部特异性凝集素 PP2 类似蛋白积累显著 (Albrecht & Bowman, 2008)。Kim 等 (2009) 通过基因芯片发现 624 个甜橙感染黄龙病后的特异性表达基因, 其中淀粉代谢关键酶 ADP - 葡萄糖焦磷酸酶、淀粉合成酶、淀粉粒结合淀粉合成酶及支链淀粉酶基因的特异性表达可能与叶片淀粉积累有关。樊晶 (2010) 以粗柠檬和甜橙为材料, 通过基因芯片分析发现, 光合作用、细胞壁、转录因子、激素代谢、胁迫应答和糖代谢等受黄龙病影响明显。另外在感染黄龙病的甜橙中, 与淀粉分解代谢相关的 DPE2 和 MEX1 基因表达下调, 蔗糖、果糖、葡萄糖和麦芽糖含量在感病后显症/不显症叶片中差异显著 (Fan et al., 2010)。钟云等 (2012) 利用抑制性差减杂交 (SSH) 技术构建了黄龙病菌亚洲种 Las 诱导的椪柑早期叶片差减文库, 发现了一些抗逆防御、运输、能量代谢等相关的差异表达基因。利用数字表达谱技术 (DGE) 分析椪柑接种黄龙病菌亚洲种 Las 后 13 周和 26 周的基因差异表达情况, 发现椪柑感染黄龙病后在较短时间内受到的生物胁迫压力持续上升, 抗逆反应增强, 但防御能力却在下降, 光合作用受到抑制, 同时, 植物与病原菌互作途径负调控因子 RIN4 差异表达明显 (钟云, 2012)。Martinelli 等 (2012) 通过转录组测序发现伏令夏橙被黄龙病菌侵染后, 果实中很多与光反应和 ATP 合成相关的基因表达上调, 蛋白降解和折叠错误增多, 宿主的原库交流受到影响, 与细胞分裂素和赤霉素相关的基因表达受抑制, 而水杨酸和茉莉酸途径被激发, WRKY 转录因子家族基因表达增加。Zheng 和 Zhao (2013) 通过比较分析前人感染黄龙病的柑橘基因芯片结果, 绘制了染病柑橘中基因表达网络, 发现植物体内与碳水化合物代谢和氮代谢、运输、防御、信号传导和激素应答相关基因的表达显著上调, 进一步分析韧皮部蛋白 (PP2) 的亚网络, 发现 PP2、锌转运子/锌结合蛋白可能与柑橘黄龙病防御相关。这些被黄龙病显著诱导的基因和蛋白质, 有开发为黄龙病诊断指标的潜力。Valente 和 Wang (2011) 利用基因芯片比较分析了感染黄龙病后的伏令夏橙的根、茎、叶中的基因表达变化, 在根、茎、叶中, 分别有 58、580 和 1 008 个基因上调表达, 有 58、350、1 109 个基因下调表达; 还发现 PR 基因在茎和叶中上调而在根中下调; JA 相关基因在茎中上调, 在根中下调, 在叶中则有的上调有的下调; 富含亮氨酸重复序列和 DUF26 受体类似激酶在所有组织中均有变化; 编码主要的嵌入蛋白、锌和 Fe(II)转运子的基因在茎和叶中有变化, 在根中则不受影响; 编码 ADP - 葡萄糖磷酸化酶、淀粉合成酶和支链淀粉酶的基因在茎和叶中上调表达, 在根中却下调或不受影响, 而编码淀粉酶的基因在茎和叶中有升有降; 编码蔗糖转运子 4 的基因在叶中上调表达, 编码蔗糖合成酶的基因在茎中下调表达而转化酶基因在茎和叶中有升有降。这说明柑橘感染黄龙病后, 各组织器官中的基因表达变化大。

钟云等 (2012) 通过转录组测序和蛋白质组学分析发现, 柑橘在黄龙病菌侵染后产生筛管阻塞蛋白进行阻塞防御, 同时阻塞了蔗糖等营养分子的运输, 导致根系有机营养不足, 根系吸收矿质元素能力下降, 进而造成植株地上部缺乏部分矿质元素, 影响叶绿体光合作用。与此同时, 蔗糖等运输受阻使光合产物以淀粉形式积累, 对叶绿体光合作用产生反馈抑制。如此恶性循环, 最终引起罹病树死亡。

Fan 等 (2011b) 利用 iTRAQ 技术分析感病后显症/不显症甜橙叶中蛋白表达情况, 鉴定出 20 和 10 个涉及胁迫和防御过程的差异表达蛋白质, 其中几丁质酶、Cu/Zn 超氧化物歧化酶、脂氧合酶和 4 个 miraculin-like 蛋白在感病无/有症状甜橙叶片样品中被显著诱导增加了 3.6~13.7 倍。

Zhao 等 (2013) 通过小 RNA 测序和靶基因分析发现, 缺磷可能是导致黄龙病症状的主要原因。

Albrecht 和 Bowman (2012) 用基因芯片分析了耐病枳橘 US-897 和敏感印度酸橘的叶片的转录组, 发现嫁接接种了黄龙病后, 在印度酸橘中有 326 个基因上调表达了 4 倍以上, 而在 US-897 中只有 17 个基因上调, 其中参与过氧化氢介导的细胞程序性死亡与次生代谢产物合成的 2-酮戊二酸 (2OG) 和 Fe(II) 依赖加氧酶基因表达大幅上调, 而该基因在印度酸橘中只有小幅上调。此外, 在对照未接种植株中, 800 多个基因在 US-897 中的表达水平比在印度酸橘中明显提高, 其中组成型表达抗病蛋白 (CDR1) 基因的表达水平提高尤为突出。这表明, US-897 的耐病性有遗传基础, 有比较高的基础抗病水平, 因此在感染后能够稳定全基因组范围的基因表达。而印度酸橘则相反, 可能由于基础抗性差, 感染后基因表达紊乱。

3.4 黄龙病细菌致病机理

黄龙病菌亚洲种 (Las) 基因组中, 除 4.5% 的基因与细胞流动性相关外, 还有多达 8% 的基因与主动运输相关, 这可能关乎黄龙病病菌的致病性。同时, Las 只具有有限的有氧呼吸能力, 还缺少至少 5 种氨基酸, 说明 Las 为营养缺陷型细菌, 需从宿主获取营养才能生存 (Duan et al., 2009)。这种寄生性可能会导致宿主的营养供给负担加重。

Las 不含 III 型和 IV 型分泌系统相关基因以及典型的自主生存、植物定植胞外降解酶等, 只含有 I 型分泌系统基因, 故推测还有其它未知的致病机制 (Duan et al., 2009)。樊晶 (2010) 指出在 Las 中也可能存在一些未知的不属于第 3 类分泌系统的毒力因子, 如类似植原体 TENGU 蛋白。

宿主糖代谢改变可能与黄龙病细菌对不同糖分子的偏好有关, 特别是对果糖偏好性有关, 即黄龙病病菌偏好韧皮部筛管中的果糖, 可能会使伴胞中果糖水平降低, 而低水平的果糖解除了果糖对宿主蔗糖转化酶活性的反馈抑制, 蔗糖转化酶进而水解更多的蔗糖成葡萄糖和果糖, 导致大量积累的葡萄糖对光合作用产生反馈抑制 (Andre et al., 2005; 樊晶, 2010)。

黄龙病会引起柑橘韧皮部组织坏死和筛管堵塞 (Kim et al., 2009; Achor et al., 2010), 导致光合产物从源器官 (主要为成熟叶) 到库器官 (如嫩叶, 幼果和根等) 的运输受阻, 造成植株代谢紊乱、衰退直至死亡 (Etxeberria et al., 2009)。

Trivedi 等 (2010, 2011) 通过芯片分析, 发现黄龙病菌侵染会改变柑橘根际微生物的多样性, 致使根际涉及氮循环、碳固定、磷吸收、离子平衡和抗性等方面的基因的的总体水平降低。

4 黄龙病的防治

中国学者林孔湘教授曾提出控制黄龙病要用“三步法” (Lin, 1956), 即使用无毒繁殖材料, 铲除病原 (树) 和防控木虱。该方法至今仍然是柑橘黄龙病防控的不二方法, 已为世界各国普遍采用。

4.1 使用无毒柑橘材料繁殖苗木

作者在广东的调查表明, 柑橘黄龙病猖獗的原因有很大部分是苗木带毒。苗木带毒的原因首先是繁殖用的柑橘接穗有相当一部分来自黄龙病病树, 其次也有一部分在苗圃发生感染。所以, 建立无病毒苗木繁育体系, 广泛推广使用无毒苗木对黄龙病的综合防控至关重要。

4.2 防治木虱

木虱是柑橘黄龙病传播的主要媒介昆虫,减少木虱数量是防控黄龙病的重要手段(Manjunath et al., 2008)。

目前主要的木虱控制方法是化学防治。喷施矿物油(Leong et al., 2012),亲水颗粒薄膜悬浮液(Hall et al., 2007)、吡虫啉、涕灭威等可以较好地扑杀木虱(Qureshi & Stansly, 2008; Boina et al., 2009);喷施保幼激素类似物吡丙醚(Boina et al., 2010)、喷施牧荆、菖蒲等植物的萃取物(Shivankar & Rao, 2010)可以防治亚洲木虱。

木虱具有趋黄性,据此可用黄色粘虫板来捕捉木虱(邓明学等, 2010)。

生物防治可能有较大的潜力。捕食性和寄生性的天敌对柑橘木虱种群的限制作用明显。常见的木虱天敌有瓢虫、食蚜蝇、草蛉和蜘蛛等,可以有效减少木虱数量(Qureshi & Stansly, 2009; Shivankar & Rao, 2010)。亮腹釉小蜂和柑橘木虱跳小蜂是最广为人知的木虱的拟寄生昆虫(McFarland & Hoy, 2001)。另外,还有报道称昆虫致病真菌可引起木虱死亡(Hoy et al., 2010)。

利用趋避物质可能是控制木虱发生和减少黄龙病扩散的有效方法。番石榴和柑橘间作能够降低黄龙病的发病率(Onagbola et al., 2011)。Zaka等(2010)通过Cage试验和Y-tube嗅觉测定器试验发现,番石榴叶片及其挥发物对柑橘木虱有驱除作用。分析表明番石榴叶片中有多种含硫挥发物,其中二甲基二硫醚(DMDS)可能是驱避木虱的主要物质(Rouseff et al., 2008),添加番石榴叶片挥发物和DMDS均能减少柑橘挥发物对木虱的吸引(Onagbola et al., 2011)。Patt和Sétamou(2010)发现,九里香和尤力克柠檬对雌雄木虱都有吸引力,甜橙则更吸引雄木虱,而葡萄柚对两种木虱都无吸引,并发现(E)- β -罗勒烯、芳樟醇、乙酸芳樟酯和 β -石竹烯可能与木虱喜好新梢有关。胡荽、薰衣草和细香葱油对木虱有毒性,胡荽、薰衣草、玫瑰、茶树和芸香精油主要成分2-甲基硅基丙酮对木虱有驱避作用,胡荽、薰衣草、玫瑰和百里香精油还可以抑制木虱对柑橘的反应(Mann et al., 2010, 2011, 2012a)。黄龙病菌可改变柑橘挥发物、营养成分,可进而改变木虱对宿主的选择,使木虱更易受到病树的吸引,其中起重要作用的可能是病树产生的水杨酸甲酯(Mann et al., 2012b)。

4.3 挖除病树

给病树注射四环素曾经被多个国家用于防治黄龙病(Bové, 2006),但是由于四环素只能抑制细菌生长而不能彻底清除细菌,且成本过高,目前该方法已鲜有使用。

国内外实践证明,及时挖除病株是有效防控黄龙病的关键手段(Lin, 1956; Bové, 2006)。仅剪除病枝对防治黄龙病是无效的(Lopes et al., 2007)。由于该病潜伏期较长,染病植株初期不出现症状或症状不明显,因此,如何及早发现病树就具有挑战性。目前国内外比较有效的方法是人工巡查果园,找到疑似病树后取样经实验室检测才能确认。当然,经过培训的有经验的植保人员可以肉眼甄别显症的病树。目前,实验室检测黄龙病菌的方法主要是PCR(Manjunath, 2008; Gottwald, 2010; Fujikawa et al., 2013),田间初检也可以用碘蓝染色法鉴别病树叶片中异常积累的淀粉(Taba et al., 2006),指示植物鉴定费时长,难以满足生产实际之用。

病树一旦确认后,就应当立即予以挖除。挖除前要喷药扑杀木虱,以防病树上的木虱飞到邻近健康树上。对锯断的病树桩要用大剂量除草剂灌注处理,之后加盖黑色薄膜,防止其再生(Futch et al., 2009; Belasque et al., 2010)。

中国广东、广西等地的经验表明,正确采用上述方法防治柑橘黄龙病能取得很好的效果。在巴西圣保罗,通过清除病株和使用杀虫剂控制木虱也取得了一定成效(Bové, 2006; Belasque et al., 2010)。结合使用抗病品种、推广无毒苗、间种趋避木虱植株、合理密植等,应可有效减少黄龙病发

病率 (Morgan et al., 2009)。但易感病接穗嫁接在抗病砧木上却无抗病效果 (Bové, 2006; Wang & Trivedi, 2013)。

5 抗黄龙病柑橘育种

5.1 抗病种质资源的筛选与利用

常规杂交育种需要有抗性基因资源。普遍认为柚子、粗柠檬等抗病 (Bové, 2006; Fan et al., 2013), 枳及其杂种比较抗病 (Albrecht & Bowman, 2011), 枸橼、柠檬等也比较抗病, 九里香 (Damsteegt et al., 2010; Walter et al., 2012)、黄皮 (Ding et al., 2005)、酒饼筋 (Shokrollah et al., 2009) 等高度抗病, 但令人遗憾的是到目前为止尚未发现任何抗黄龙病的基因型。九里香、黄皮、酒饼筋和柑橘之间有生殖隔离, 因此无法通过杂交利用相关基因。而柑橘属中已知相对抗病材料的利用价值似乎不大, 但聚合这些基因也许有价值。

值得注意的是中国是柑橘起源地, 柑橘资源极其丰富, 由于大多数资源材料还没有进行系统的评价, 尚不能完全断定一定没有抗病或高度抗病资源。

有学者尝试使用体细胞杂交技术将甜橙、橘柚和很耐病的九里香这两者的细胞融合在一起, 培育新型抗病或抗病材料, 但发现甜橙和九里香体细胞融合后的再生苗叶片出现畸形 (Shinozaki et al., 1992; Grosser et al., 2000), 橘柚与九里香体细胞融合后的再生能力好于甜橙与九里香的融合材料 (刘继红 等, 2004)。

5.2 转基因抗黄龙病育种

抗菌肽是生物防御系统产生的一类对抗外源病原体的肽类物质。Grosser 等 (2009) 将抗菌肽基因转入甜橙和柚子中, 发现转基因植株接种黄龙病菌后 16 个月仍未表现症状。陈善春等 (1997) 将抗菌肽 D 基因转入锦橙、新会橙和沙田柚, 郑启发等 (1999) 也将柞蚕抗菌肽基因成功转入沙田柚, Hartung (2005) 对柑橘衰退病毒的 T36 株系进行了改良使其可编码并表达多个抗菌肽, 感染柑橘后取接穗嫁接到柑橘植株上, 再嫁接黄龙病接穗。但这些研究的后续结果报道还未见到。

Stover 等 (2013) 以黄龙病病原菌近缘种苜蓿中华根瘤菌和根癌农杆菌作为替代, 研究抗菌肽对这两种菌的抑制作用, 发现抗菌肽在浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甚至更低时对这两种菌的生长均起到抑制作用。

另外, 有人将几个菠菜防御素基因转到柑橘中获得了抗黄龙病的柑橘新种质 (<http://www.growingproduce.com/article/26494/spinach-genes-used-in-the-fight-against-hlb>)。

6 展望

如何防治柑橘黄龙病是目前乃至今后相当长时期内柑橘研究者和种植者必须面对的难题。种植无病毒种苗、及时挖除病树、及时杀灭柑橘木虱和加强树体管理等措施仍然是目前不可替代的防治柑橘黄龙病的有效方法。

虽然近年来在黄龙病细菌基因组学、柑橘病理学研究上已经取得了不小的进步, 对病原和宿主的相互作用有了相当的了解, 但讨论根治柑橘黄龙病的话题为时尚早, 要在育种、植保、栽培等学科取得突破性进展后才有可能, 特别是要取得如下几个方面的突破:

(1) 尽快获得柑橘黄龙病病原菌的纯培养。尽管有报道利用含有柑橘叶脉提取物的培养基能成功培养出亚洲种黄龙病病原菌, 并完成其柯赫氏法则验证的报道 (Sechler et al., 2009), 但该试

验为孤例, 尚无重复成功的报道。不能纯培养对该病菌的研究和防治造成了严重的阻碍。

(2) 利用基因组学手段充分研究柑橘的发病机理, 明确黄龙病菌对柑橘基因表达的关键影响, 用分子生物学等手段稳定柑橘正常的基因表达和生理生化过程, 对抗病栽培具有重要的意义。

(3) 加强抗性育种材料的筛选和利用, 特别是远缘植物中抗性基因资源的利用, 可能是将来突破抗黄龙病育种的关键。

(4) 研发生物防治技术在食品安全问题越发严重的今天具有很现实的意义。比如利用木虱趋避物质、木虱的天敌昆虫、细菌、病毒等。黄龙病细菌的病原, 如噬菌体等的利用也值得研究。

References

- Achor D S, Etxeberria E, Wang N, Fonmonova S Y, Chung R, Aibrigo L G. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal*, 9: 56 - 64.
- Albrecht U, Bowman K D. 2008. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant science*, 175 (3): 291 - 306.
- Albrecht U, Bowman K D. 2011. Tolerance of the Trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. *HortScience*, 46 (1): 16 - 22.
- Albrecht U, Bowman K D. 2012. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *Plant Science*, 185: 118 - 130.
- Andre A, Maucourt M, Moing A, Rolin D, Renaudin J. 2005. Sugar import and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*: Glucose and fructose play distinct roles. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18: 33 - 42.
- Asana R D. 1958. The citrus dieback problem in relation to cultivation of citrus fruits in India. *Indian Journal of Horticulture*, 15: 283 - 286.
- Baldwin E, Plotto A, Manthey J, McCollum G, Bai J, Irely M, Cameron R, Luzzio G. 2009. Effect of *Liberibacter* infection (Huanglongbing disease) of citrus on orange fruit physiology and fruit/fruit juice quality: Chemical and physical analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2): 1247 - 1262.
- Belasque Jr J, Bassanezi R B, Yamamoto P T, Ayres A J, Tachibana A, Violante A R, Tank Jr A, Giorgi D D, Tersi F E A, Menezes G M, Dragone J, Jank Jr R H, Bové J M. 2010. Lessons from huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. *Journal of Plant Pathology*, 92 (2): 285 - 302.
- Boina D R, Onagbola E O, Salyani M, Stelinski L L. 2009. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Management Science*, 65 (8): 870 - 877.
- Boina D R, Rogers M E, Wang N, Stelinski L L. 2010. Effect of pyriproxyfen, a juvenile hormone mimic, on egg hatch, nymph development, adult emergence and reproduction of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Pest Management Science*, 66 (4): 349 - 357.
- Bové J M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88: 7 - 37.
- Brown S E, Oberheim A P, Barrett A, McLaughlin W A. 2011. First Report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with huanglongbing in the weeds *Cleome rutidosperma*, *Pisonia aculeata* and *Trichostigma octandrum* in Jamaica. *New Disease Reports*, 24: 25.
- Cai Ming-duan, Yi Gan-jun, Peng Cheng-ji. 2011. Illustrated handbook of citrus diseases and insect pests. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 蔡明段, 易干军, 彭成绩. 2011. 柑橘病虫害原色图鉴. 北京: 中国农业出版社.
- Chen J, Pu X, Deng X, Liu S, Li H, Civerolo E. 2009. A phytoplasma related to *Candidatus Phytoplasma asteri* detected in citrus showing Huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, PR China. *Phytopathology*, 99: 236 - 242.
- Chen Shan-chun, Zhang Jin-ren, Huang Zi-ran, Gao Feng, Chen Feng-zhen, Long You-qing. 1997. Studies on *Agrobacterium*-mediated antibacterial peptide D gene transfer in citrus. *Scientia Agricultura Sinica*, 30 (3): 7 - 13. (in Chinese)
- 陈善春, 张进仁, 黄自然, 高峰, 陈凤珍, 隆有庆. 1997. 根癌农杆菌介导柞蚕抗菌肽 D 基因转化柑橘的研究. *中国农业科学*, 30 (3): 7 - 13.
- Cimò G, Bianco R L, Gonzalez P, Bandaranayake W, Etxeberria E, Syvertsen J P. 2013. Carbohydrate and nutritional responses to stem girdling

- and drought stress with respect to understanding symptoms of Huanglongbing in *Citrus*. *HortScience*, 48 (7): 920 - 928.
- Dagulo L, Danyluk M D, Spann T M, Valim M F, Goodrich-Schneider R, Sims C, Rouseff R. 2010. Chemical characterization of orange juice from trees infected with citrus greening (Huanglongbing). *Journal of Food Science*, 75 (2): C199 - C207.
- Damsteegt V D, Postnikova E N, Stone A L, Kuhlmann M, Wilson C, Sechler A, Schaad N W, Brlansky R H, Schneider W L. 2010. *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', causal agent of Huanglongbing. *Plant Disease*, 94 (5): 528 - 533.
- Deng Ming-xue, Chen Gui-feng, Tang Ming-li, Chen Teng-tu, Tan You-long, Li Shao-qing. 2010. Field trial preliminary of trapping adult citrus psylla with yellow trap. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 26 (12): 247 - 251. (in Chinese)
- 邓明学, 陈贵峰, 唐明丽, 陈腾土, 谭有龙, 李少清. 2010. 黄色粘胶板诱杀柑桔木虱成虫田间试验初报. *中国农学通报*, 26 (12): 247 - 251.
- Ding F, Wang G, Yi G, Zhong Y, Zeng J, Zhou B. 2005. Infection of wampee and lemon by the citrus Huanglongbing pathogen (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in China. *Journal of Plant Pathology*, 87 (3): 207 - 212.
- Duan Y, Zhou L, Hall D G, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling M, Gabriel D W, Williams K P, Dickerman A, Sun Y, Gottwald T. 2009. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, 'Candidatus Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics. *Mol Plant-Microbe Interact*, 22: 1011 - 1020.
- Duan Y P, Gottwald T, Zhou L J, Gabriel D W. 2008. First report of dodder transmission of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' to tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Disease*, 92 (5): 831.
- Etxeberria E, Gonzalez P, Achor D, Albrigo G. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74 (1): 76 - 83.
- Fan G C, Cai Z J, Weng Q Y, Ke C, Liu B, Zhou L J, Duan Y P. 2011a. First report of a new host (*Pithecellobium lucidum* Benth) of the citrus Huanglongbing bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*. 2nd Int. Conf. Huanglongbing. Orlando, FL: 137.
- Fan Jing. 2010. Response of citrus to the infection of huanglongbing-associated bacteria [Ph. D. Dissertation]. Chongqing: Chongqing University. (in Chinese)
- 樊晶. 2010. 柑橘宿主对黄龙病病原菌侵染的应答机制 [博士论文]. 重庆: 重庆大学.
- Fan J, Chen C, Brlansky R H, Gmitter Jr F G, Li Z G. 2010. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. *Plant Pathology*, 59 (6): 1037 - 1043.
- Fan J, Chen C, Yu Q, Brlansky R H, Li Z G, Gmitter F G. 2011b. Comparative iTRAQ proteome and transcriptome analyses of sweet orange infected by 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. *Physiologia Plantarum*, 143 (3): 235 - 245.
- Fan J, Chen C, Achor D S, Brlansky R H, Li Z G, Gmitter Jr F G. 2013. Differential anatomical responses of tolerant and susceptible citrus species to the infection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 83: 69 - 74.
- Folimonova S Y, Achor D S. 2010. Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology*, 100 (9): 949 - 958.
- Fontaine-Bodin L, Fabre S, Gatineau F, Dollet M. 2011. *In vitro* culture of the fastidious bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* in association with insect feeder cells. *IRCHLB Proceedings*: 32.
- Fujikawa T, Miyata S I, Iwanami T. 2013. Convenient detection of the citrus greening (Huanglongbing) bacterium 'Candidatus Liberibacter asiaticus' by direct PCR from the midrib extract. *PLoS ONE*, 8 (2): e57011.
- Futch S, Brlansky R H, Irely M, Weingarten S. 2009. Detection of greening in sprouts from citrus tree stumps. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 122: 158 - 160.
- Garnier M, Bové J M. 1977. Structure trilamellaire des delix membranes qui entourent les organismes procaryotes associes ala maladie du 'greening' des agrumes. *Fruits*, 32: 749 - 752.
- Garnier M, Bové J M. 1983. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. *Phytopathology*, 73: 1358 - 1363.
- Garnier M, Bové J M. 1993. Citrus greening disease and the greening bacterium// *Proceedings of 12th Conference IOCV*, IOCV, Riverside: 212 - 219.

- Gottwald T R. 2010. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 119 - 139.
- Grafton-Cardwell E E, Stelinski L L, Stansly P A. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*, 58: 413 - 432.
- Grosser J W, Ollitrault P, Olivares-Fuster O. 2000. Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36 (6): 434 - 449.
- Grosser J W, Dutt M, Omar A, Orbovic V, Barthe G. 2009. Progress towards the development of transgenic disease resistance in citrus. *ISHS Acta Horticulturae: II International Symposium on Citrus Biotechnology*, 892: 101 - 107.
- Halbert S E, Manjunanth K L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87: 330 - 353.
- Hall D G, Lapointe S L, Wenninger E J. 2007. Effects of a particle film on biology and behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and its infestations in citrus. *Journal of Economic Entomology*, 100 (3): 847 - 854.
- Hartung J S. 2005. Screening of anti-bacterial peptides in citrus trees for activity against *Candidatus Liberibacter asiaticus*// *Proceedings of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop*, Florida Citrus Mutual, Orlando: H-16.
- Hoy M A, Singh R, Rogers M E. 2010. Evaluations of a novel isolate of *Isaria Fumosorosea* for control of the Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: psyllidae). *Florida Entomologist*, 93: 24 - 32.
- Jagoueix S, Bove J M, Garnier M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 379 - 386.
- Johnson E G, Wu J, Bright D B, Graham J H. 2013. Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathology*, Doi: 10.1111/ppa.12109.
- Kim J S, Sagaram U S, Burns J K, Li J L, Wang N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology*, 99 (1): 50 - 57.
- Leong S C T, Abang F, Beattie A, Kueh R J H, Wong S K. 2012. Impacts of horticultural mineral oils and two insecticide practices on population fluctuation of *Diaphorina citri* and spread of Huanglongbing in a citrus orchard in Sarawak. *The Scientific World Journal*, doi: 10.1100/2012/651416.
- Li C Y, Weiss D, Goldschmidt E E. 2003. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate-bearing citrus trees. *Annals of Botany*, 92 (1): 137 - 143.
- Lin H, Coletta-Filho H D, Han C S, Lou B, Civerolo E L, Machado M A, Gupta G. 2013. Draft genome sequence of '*Candidatus Liberibacter americanus*' bacterium associated with citrus huanglongbing in Brazil. *Genome Announcements*, 1 (3): e00275 - 13.
- Lin K H. 1956. Etiological studies of yellow shoot of citrus. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2: 13 - 42.
- Liu Ji-Hong, Xu Xiao-Yong, Deng Xiu-Xin. 2004. Advances on somatic hybrids and inheritance of their nuclear and cytoplasmic components. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 12 (3): 237 - 246. (in Chinese)
- 刘继红, 徐小勇, 邓秀新. 2004. 柑橘体细胞杂种及其核质遗传研究进展. *农业生物技术学报*, 12 (3): 237 - 246.
- Lopes S A, Frare G F, Yamamoto P T, Ayres A J, Barbosa J C. 2007. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. *European Journal of Plant Pathology*, 119 (4): 463 - 468.
- Manjunath K L, Halbert S E, Ramadugu C, Webb S, Lee R F. 2008. Detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology*, 98 (4): 387 - 396.
- Mann R S, Qureshi J A, Stansly P A, Stelinski L L. 2010. Behavioral response of *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) to volatiles emanating from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) and citrus. *Journal of Insect Behavior*, 23 (6): 447 - 458.
- Mann R S, Rouseff R L, Smoot J M, Castle W S, Stelinski L L. 2011. Sulfur volatiles from *Allium* spp. affect Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. *Bulletin of Entomological Research*, 101 (1): 89 - 97.
- Mann R S, Ali J G, Hermann S L, Tiwari S, Pelz-Stelinski K S, Alborn H T, Stelinski L L. 2012b. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathogens*, 8 (3): e1002610.
- Mann R S, Tiwari S, Smoot J M, Rouseff R, Stelinski L L. 2012a. Repellency and toxicity of plant-based essential oils and their constituents against

- Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Applied Entomology*, 136: 87 - 96.
- Martinelli F, Uratsu S L, Albrecht U, Reagan R L, Phu M L, Britton M, Buffalo V, Fass J, Leicht E, Zhao W, D'Souza C, Davis C E, Bowman K D, Dandekar A M. 2012. Transcriptome profiling of citrus fruit response to Huanglongbing disease. *PLoS ONE*, 7 (5): e38039.
- McFarland C D, Hoy M A. 2001. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. *Florida Entomologist*: 227 - 233.
- Moran N A, McCutcheon J P, Nakabachi A. 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, 42: 165 - 190.
- Morgan K T, Schumann A W, Castle W S, Stover E W, Kadyampakeni D, Spyke P, Roka R, Muraro R, Morris R A. 2009. Citrus production systems to survive greening: Horticultural practices. *Proc Fla State Hort Soc*, 122: 114 - 121.
- Moya A, Peretó, J, Gil R, Latorre A. 2008. Learning how to live together: Genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature Reviews Genetics*, 9: 218 - 229.
- Onagbola E O, Rouseff R L, Smoot J M, Stelinski L L. 2011. Guava leaf volatiles and dimethyl disulphide inhibit response of *Diaphorina citri* Kuwayama to host plant volatiles. *Journal of Applied Entomology*, 135 (6): 404 - 414.
- Patt J M, Setamou M. 2010. Responses of the Asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. *Environmental Entomology*, 39 (2): 618 - 624.
- Pustaka A B, Subandiyah S, Holford P, Beattie G A C, Iwanami T, Masaoka Y. 2008. Interactions between plant nutrition and symptom expression in mandarin trees infected with the disease Huanglongbing. *Australasian Plant Disease Notes*, 3 (1): 112 - 115.
- Qureshi J A, Stansly P A. 2008. Rate, placement and timing of aldicarb applications to control Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in oranges. *Pest Management Science*, 64 (11): 1159 - 1169.
- Qureshi J A, Stansly P A. 2009. Exclusion techniques reveal significant biotic mortality suffered by Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: psyllidae) populations in Florida citrus. *Biological Control*, 50: 129 - 136.
- Razi M F D, Khan I A, Jaskani M J. 2011. Citrus plant nutritional profile in relation to Huanglongbing prevalence in Pakistan. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 48 (4): 299 - 304.
- Rivas F, Erner Y, Alós E, Juan M, Almela V, Agustí M. 2006. Girdling increases carbohydrate availability and fruit-set in citrus cultivars irrespective of parthenocarpic ability. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81 (2): 289 - 295.
- Rosales R, Burns J K. 2011. Phytohormone changes and carbohydrate status in sweet orange fruit from Huanglongbing-infected trees. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30 (3): 312 - 321.
- Rouseff R L, Onagbola E O, Smoot J M, Stelinski L L. 2008. Sulfur volatiles in guava (*Psidium guajava* L.) leaves: Possible defense mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (19): 8905 - 8910.
- Sagaram U S, DeAngelis K M, Trivedi P, Andersen G L, Lu S E, Wang N. 2009. Bacterial diversity analysis of Huanglongbing pathogen-infected citrus, using PhyloChip arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (6): 1566 - 1574.
- Sechler A, Schuenzel E L, Cooke P, Donnua S, Thaveechai N, Postnikova E, Stone A L, Schneider W L, Damsteegt V D, Schaad N W. 2009. Cultivation of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' associated with Huanglongbing. *Phytopathology*, 99 (5): 480 - 486.
- Sexton R, Roberts J A. 1982. Cell biology of abscission. *Annual Review of Plant Physiology*, 33 (1): 133 - 162.
- Shinozaki S, Fujita K, Hidaka T, Omura M. 1992. Plantlet formation of somatic hybrids of sweet orange (*Citrus sinensis*) and its wild relatives, orange jessamine (*Murraya paniculata*) by electrically-induced protoplast fusion. *Japanese Journal of Breeding*, 42: 287 - 295.
- Shivankar V J, Rao C N. 2010. Psyllids and their management. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 16 (1): 1 - 4.
- Stover E, Stange R R, McCollum T G, Jaynes J, Irely M, Mirkov E. 2013. Screening antimicrobial peptides *in vitro* for use in developing transgenic citrus resistant to Huanglongbing and citrus canker. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138 (2): 142 - 148.
- Shokrollah H, Abdullah T L, Sijam K, Abdullah S N, Abdullah N A. 2009. Differential reaction of citrus species in Malaysia to Huanglongbing (HLB) disease using grafting method. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4 (1): 32.

- Taba S, Nasu K, Takaesu K, Ooshiro A, Moromizato Z I. 2006. Detection of citrus Huanglongbing using an iodo-starch reaction. *Science Bulletin-faculty of Agriculture University of the Ryukyus*, 53: 19.
- Teixeira D C, Wulff N A, Martins E C, Kitajima E W, Bassanezi R, Ayres A J, Eveillard S, Saillard C, Bové J M. 2008. A phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches' -Broom Phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology*, 98 (9): 977 - 984.
- Trivedi P, Duan Y, Wang N. 2010. Huanglongbing, a systemic disease, restructures the bacterial community associated with citrus roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (11): 3427 - 3436.
- Trivedi P, Spann T, Wang N. 2011. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. *Microbial Ecology*, 62 (2): 324 - 336.
- Tsai J H, Wang J J, Liu Y H. 2002. Seasonal abundance of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in southern Florida. *Florida Entomologist*, 85 (3): 446 - 451.
- Tyler H L, Roesch L F, Gowda S, Dawson W O, Triplett E W. 2009. Confirmation of the sequence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and assessment of microbial diversity in huanglongbing-infected citrus phloem using a metagenomic approach. *Mol Plant-Microbe Interact*, 22: 1624 - 1634.
- Valente A A, Wang N. 2011. Comparative analysis of the host response of citrus leaf, stem and root tissues to infection by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Phytopathology*, 101 (6): S181.
- Walter A J, Hall D G, Duan Y P. 2012. Low incidence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in *Murraya paniculata* and associated *Diaphorina citri*. *Plant Disease*, 96 (6): 827 - 832.
- Wang N, Trivedi P. 2013. Citrus Huanglongbing: A newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology*, 103 (7), 652 - 665.
- Wulff N A, Eveillard S, Foissac X, Ayres A J, Bové J M. 2009. rRNA operons and genome size of '*Candidatus Liberibacter americanus*', a bacterium associated with citrus Huanglongbing in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59 (8): 1984 - 1991.
- Zaka S M, Zeng X N, Holford P, Beattie G A C. 2010. Repellent effect of guava leaf volatiles on settlement of adults of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama on citrus. *Insect Science*, 17 (1): 39 - 45.
- Zhao H, Sun R, Albrecht U, Padmanabhan C, Wang A, Coffey M D, Grike T, Wang Z, Close T J, Roose M, Yokomi R K, Folimonova S, Vidalakis G, Bowman K D, Jin H. 2013. Small RNA profiling reveals phosphorus deficiency as a contributing factor in symptom expression for citrus Huanglongbing disease. *Molecular Plant*, doi: 10.1093/mp/sst002.
- Zheng Qi-fa, Chen Da-cheng, Huang Zi-ran, Hu Gui-bing. 1999. Transformation of the Shatian pummelo (*Citrus grandis*) with the synthetic oak silkworm antibacterial peptide D gene. *Journal of South China Agricultural University*, (1): 103 - 107. (in Chinese)
- 郑启发, 陈大成, 黄自然, 胡桂兵. 1999. 人工合成柞蚕抗菌肽 D 基因转化沙田柚. *华南农业大学学报*, (1): 103 - 107.
- Zheng Z L, Zhao Y. 2013. Transcriptome comparison and gene coexpression network analysis provide a systems view of citrus response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. *BMC Genomics*, 14 (1): 27.
- Zhong Yun. 2012. Research of transcription genomics and proteomics of citrus induced by *Candidatus Liberibacter asiaticus*[Ph. D. Dissertation]. Changsha: Hu'nan Agricultural University. (in Chinese)
- 钟云. 2012. *Candidatus Liberibacter asiaticus* 诱导的柑橘转录组学及蛋白组学研究[博士学位论文].长沙: 湖南农业大学.
- Zhong Yun, Jiang Bo, Yi Gan-jun, Zeng Ji-wu, Wang Hui, Jiang Nong-hui, Zhou Bi-rong. 2012. Construction and analysis of subtractive cDNA library from ponkan (*Citrus reticulata*) leaves following infection with Honglongbing pathogen. *Journal of Fruit Science*, 29 (3): 416 - 422. (in Chinese)
- 钟云, 姜波, 易干军, 曾继吾, 王辉, 蒋依辉, 周碧容. 2012. 黄龙病诱导下椪柑 SSH 文库的构建与分析. *果树学报*, 29 (3): 416 - 422.