



ISSN 0513-353X

CN11-1924/S

CODEN YUHPAA

# ACTA HORTICULTURAE SINICA

# 园艺学报

第45卷 | 第11期

Vol. 45 | No. 11

# 2018

中国园艺学会 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 主办

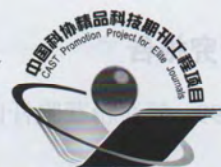
Sponsored by the Chinese Society for Horticultural Science and  
Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences





# 园艺学报

## YUANYI XUEBAO



2018年11月 第45卷 第11期

### 目次

#### 研究论文

- |   |  |
|---|--|
| 2073 微管骨架和 PP1/PP2A 蛋白磷酸酶在 ALA-ABA 调控苹果叶片气孔运动中的作用 | 熊丽君 安玉艳 汪良驹                              |
| 2089 梨花芽休眠相关 miRNA 的鉴定和差异表达分析                     | 马鑫瑞 李亮 刘瑾航 杨梦洁 陈洁<br>梁沁 吴少华 李永裕          |
| 2106 葡萄伤流液中内生菌分离鉴定与抗病功能分析                         | 郑婷 张培安 张克坤 纠松涛 朱旭东<br>宋长年 贾海锋 房经贵        |
| 2121 柑橘黄龙病病原菌 Las 在叶圆片嫁接接种的‘锦橙’中早期扩散研究            | 吴柳 白晓晶 文庆利 谢竹 何永睿<br>王丽娟 陈善春 邹修平         |
| 2129 结球甘蓝 CML 家族基因及其在授粉后柱头中的表达                    | 蒲敏 罗绍兰 廉小平 曾静 张贺翠<br>刘倩莹 左同鸿 朱利泉         |
| 2141 黄瓜/酸黄瓜渐渗系 ‘IL77’ 抗蔓枯病主效 QTL 定位及候选基因鉴定        | 张旭 徐建 李季 娄群峰 陈劲枫                         |
| 2153 大花紫薇与紫薇杂交 F <sub>1</sub> 群体表型评价及分子标记连锁分析     | 吴际洋 焦垚 叶远俊 鞠易倩 刘婷婷<br>梁晓涵 程堂仁 王佳 张启翔 潘会堂 |
| 2164 文心兰 RFNR 的克隆、亚细胞定位及其与 LFNR 不同的胁迫响应机制研究       | 李蓉 吴晓佩 王雪晶 陈裕坤 郭容芳<br>林玉玲 赖钟雄 徐涵         |
| 2177 蜡梅小 GTP 结合蛋白基因 CpRAC1 的克隆及表达分析               | 马婧 门维婷 陈信立 睦顺照 李名扬                       |
| 2188 拟南芥异源表达紫斑牡丹 PrLPAAT1 对种子脂肪酸含量的影响             | 于蕊 赵永青 张庆雨 白章振 孙道阳<br>胡佳媛 牛立新 张延龙        |



## 研究报告

- 2199 解淀粉芽胞杆菌 K103 对黄瓜穴盘苗的促生作用 董春娟 王玲玲 李 亮 秦宇轩 李平兰 尚庆茂
- 2209 侵染广东辣椒的辣椒脉斑驳病毒的分子特征 汤亚飞 裴 凡 于 琳 何自福 余小漫 蓝国兵 邓铭光
- 2217 丹参细胞分裂素调控因子序列特征分析 周昌浩 林彩彩 冯园园 金 花 王建华 宋振巧

## 综述

- 2228 园艺植物性别决定机制研究进展 赵玉洁 张太奎 刘翠玉 黄贤斌 苑兆和

## 新方法

- 2243 葡萄病毒 A 实时荧光定量 RT-PCR 检测技术的建立及应用 任 芳 董雅凤 张尊平 范旭东 胡国君
- 2254 番茄细菌性斑点病菌、溃疡病菌、青枯病菌和疮痂病菌的四重 PCR 检测方法 康华军 柴阿丽 石延霞 谢学文 袁军海 李宝聚

## 新品种

- 2265 晚熟桃新品种‘秋恋’ 王召元 常瑞丰 李永红 陈 湖 韩继成 刘国俭
- 2267 火龙果新品种‘莞华红’ 叶耀雄 胡桂兵 李加强 秦永华 古文强 翟 欣 刘志贤 李炯祥
- 2269 观赏用文冠果新品种‘妍华’ 敖 妍 马履一 苏淑钗 张 宁 刘觉非
- 2271 馥郁滇丁香新品种‘香妃’ 万友名 马 宏 刘秀贤 赵振刚 李正红
- 2273 报春苣苔属杂交新品种‘花苹果’、‘猫的花环’、‘小喇叭’ 赖碧丹 邓征宇 崔忠吉 刘 震

## 动态与信息

- 2227 《Horticultural Plant Journal》(《园艺学报》英文版) 征稿
- 2253 欢迎订阅 2019 年《园艺学报》
- 2216, 2264 征订

# 柑橘黄龙病病原菌 Las 在叶圆片嫁接接种的‘锦橙’中早期扩散研究

吴柳<sup>\*</sup>, 白晓晶<sup>\*</sup>, 文庆利, 谢竹, 何永睿, 王丽娟, 陈善春, 邹修平<sup>\*\*</sup>

(西南大学柑桔研究所, 中国农业科学院柑桔研究所, 国家柑桔品种改良中心, 重庆 400712)

**摘要:** 为了探究黄龙病 (Citrus Huanglongbing, HLB) 病原菌在柑橘韧皮部的早期运动情况, 以柑橘黄龙病亚洲致病种 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) 为毒源, 黄龙病高感品种‘锦橙’实生苗为受体材料进行叶圆片嫁接传毒。利用定量 PCR 技术对嫁接口处近端主脉、远端主脉、叶柄以及缘周叶组织进行了为期 84 d 的菌量测定。结果发现, 病原菌在近端主脉中积累最快, 其次是远端主脉、叶柄和缘周叶组织。以近端主脉为原初侵染部位, Las 在嫁接叶片中 1~84 d 的早期运动可分为潜伏期 (1~42 d)、指数期 (43~70 d) 和稳定期 (71~84 d)。在早期侵染过程中, Las 病原菌主要沿叶主脉从原初侵染部位由近向远扩散, 其扩散趋势与症状从原初侵染部位向外扩散紧密相关。证实叶圆片嫁接法可作为柑橘 HLB 一种有效的传毒方式。

**关键词:** 柑橘黄龙病; 早期运动; 叶片传毒; qPCR

**中图分类号:** S 666.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 11-2121-08

## Early Spread Characteristics of *Candidatus Liberibacter Asiaticus* in Jincheng Orange (*Citrus sinensis* Osbeck) by Leafdisc Grafting

WU Liu<sup>\*</sup>, BAI Xiaojing<sup>\*</sup>, WEN Qingli, XIE Zhu, HE Yongrui, WANG Lijuan, CHEN Shanchun, and ZOU Xiuping<sup>\*\*</sup>

(Citrus Research Institute, Southwest University, Chinese Academy of Agricultural Sciences; National Center for Citrus Varieties Improvement, Chongqing 400712, China)

**Abstract:** To understand the spread characteristics of HLB pathogen in citrus at early infection stage, the populations of the *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) pathogen, the symptom development in the susceptible ‘Jincheng’ Orange (*Citrus sinensis* Osbeck) were investigated using leafdisc grafting during the first eighty-four days of infection. Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis showed that the presence of Las was firstly detected in the proximal midrib 49 days after grafting, and until 77 days after grafting, the pathogen was found in the distal midrib, petiole and the marginal tissue around the leafdisc. Using the proximal midrib as the primary infection tissue, the early spread of Las pathogen in the leafdisc-grafted leaf can be grouped into three phases from one to eighty-four days after Las inoculation: lag phase (1–42

**收稿日期:** 2018-07-30; **修回日期:** 2018-10-24

**基金项目:** 科技部国家重点研发计划专项 (2018YFD0201500); 重庆市基础科学与前沿技术研究项目 (cstc2017jcyjBX0020); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-26); 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项项目 (cstc2016shms-ztxx80001)

<sup>\*</sup> 共同第一作者

<sup>\*\*</sup> 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zouxiuping@cric.cn)

days), logarithmic phase (43 – 70 days) and stationary phase (71 – 84 days). The results showed that the pathogen spreads mainly along the midrib from the proximal tissue to the distal tissue in the grafted leaves, which was in accordance with HLB symptoms spread out from the proximal midrib. The study also displayed that leaf-disc grafting was a powerful tool for the transmission of HLB pathogen in citrus.

**Keywords:** citrus HLB; early spread; leafdisc grafting; qPCR

柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing, HLB) 是柑橘生产中危害最严重的检疫性病害之一 (Bové, 2014), 黄龙病病原属于韧皮部杆菌属 (Jagoueix et al., 1994; Garnier et al., 2000) 的一种革兰氏阴性菌, 其中亚洲种 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) 是全世界柑橘的主要致病菌种。

病原菌致病机理的研究是有效开展病害防治和基因工程育种的基础和关键。近年来科学家们从分子进化学、生理生化、生物学、病理学、组学等不同角度对柑橘黄龙病菌致病和寄主感病机理进行了广泛的研究 (许美容 等, 2015)。然而, (1) 柑橘黄龙病病原 *Candidatus Liberibacter* 培养困难, 无法进行人工接种; (2) 木虱或人工嫁接传毒无法控制病原菌的含量和纯度, 且潜育期和发病周期长, 接种成功率低; (3) *Candidatus Liberibacter* 在植株体内分布极不均匀, 且受到其他植原体的影响 (Lopes et al., 2009)。这些因素制约了柑橘黄龙病菌与寄主互作分子机理的研究, 也是目前柑橘抗黄龙病育种和防控研究进展十分缓慢的一个主要原因。

黄龙病病原菌通过柑橘木虱、嫁接等传播方式进入柑橘植物体, 特异性驻留在韧皮部组织并通过韧皮部在植物体内扩散, 引起柑橘系统性病害 (Vojnov et al., 2010; Hershkovitz et al., 2012)。解析这种系统性扩散机制是阐明病原菌致病机理的重要内容。有研究认为黄龙病菌可能从入侵部位 (如叶片、新梢) 优先向根部扩散, 并定殖在根中, 然后迅速向其他叶片等组织扩散, 根部病症先于叶片出现 (Johnson et al., 2014)。植物碳水化合物的分配是碳同化物从源 (叶) 向库 (如茎、根和种子) 运输的过程; 黄龙病病原 Las 为营养缺陷型细菌, 需从宿主获取营养才能生存, 并偏好韧皮部筛管中的特定糖类 (Duan et al., 2009; 樊晶, 2010)。这种对糖的偏好性可能影响病原的扩散趋势, 比如病原菌可能沿着韧皮部中糖的运输方向扩散 (Wang et al., 2017)。然而, 目前人们仍然无法确认黄龙病病原是优先向根中扩散还是随光合产物从源到库随机扩散, 或者两种机制同时存在。

病原菌从木虱叮咬、嫁接部位的韧皮部 (即原初侵染部位) 在植株中的早期扩散行为是形成系统扩散和危害的关键 (Martinelli et al., 2013)。基于此, 运用叶圆片嫁接的方式 (Flavia et al., 2017), 以柑橘黄龙病亚洲致病种 Las 为毒源, 采用实时荧光定量 PCR 法追踪病原菌侵染早期在叶片主脉中的扩散特征, 探讨其早期的运动规律, 为深入研究黄龙病病原韧皮部运动机制和早期黄龙病的防治提供理论依据和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

试验于 2016 年 10 月—2017 年 3 月在中国农业科学院柑桔研究所国家柑桔品种改良中心完成。黄龙病高感品种 ‘锦橙’ 实生苗取自中国农业科学院柑桔研究所改良中心温室; 感染黄龙病亚洲种 ‘锦橙’ 病株取自广西感病果园。

新型植物 DNA 快速提取试剂盒购自 Adela 公司, iQ SYBR Green Supermix 试剂盒购自 BIO-RAD 公司, 引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。



## 1.2 病原材料的鉴定

取疑似黄龙病病株的成熟叶片, 分离靠近叶柄的部分中脉, 提取总 DNA, 利用 Las 病原 *16S* 基因特异鉴定引物 OI1/OI2C 引物 (白晓晶 等, 2017), PCR 鉴定毒源, 确保用于试验的材料带有黄龙病病原菌。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存; 预期扩增产物为 1 160 bp。

## 1.3 叶片病原嫁接传毒及嫁接叶片表型观察

选 2 年生‘锦橙’健康实生苗叶片和已验证感染 Las 的相同成熟度叶片, 均用无菌水冲洗数遍后自然晾干, 在距离叶尖端约 1.5 cm 处打孔, 孔径大小为 7 mm。将带 Las 的叶圆片嫁接到健康实生苗叶片圆孔处, 使叶圆片的中脉与实生苗叶片的中脉对齐, 且侧脉保持一致的生长趋势, 用透明胶带将正反面粘贴固定。对照的嫁接圆片为健康叶圆片, 其余处理同上。

嫁接黄龙病和对照实生苗分别 12 株, 每株嫁接 12 片叶, 于 22 °C 玻璃温室中光照培养, 水肥施用周期为 14 d, 表型观察周期为 7 d。每 7 d 对植株拍照记录 1 次, 对比不同时期叶片和嫁接口表型变化。

## 1.4 黄龙病病原菌菌量测定

叶圆片嫁接传毒后, 每隔 7 d, 从 12 株植株中各取 1 片嫁接叶, 随机分成 3 份, 作为 3 次生物学重复。根据距嫁接接口的位置, 用手术刀片将叶片分为近端主脉 (离叶圆片 3 cm)、远端主脉、叶柄、缘周叶组织 (离叶圆片 1 cm 左右) 4 个样本, 分别提取 DNA, 稀释到相同浓度, 进行实时荧光定量 PCR (qPCR)。植物基因组 18S DNA 和柑橘黄龙病病原 16S rDNA 定量用引物、PCR 反应体系和程序参见 Zou 等 (2017) 的报道进行。参见 Li 等 (2006) 的方法, 采用本实验室前期建立的公式 (Zou et al., 2017) 计算叶片组织中 Las 病原菌的含量, 以每  $\mu\text{g}$  柑橘 DNA 中的病原菌拷贝数表示 ( $\text{copies} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ )。采用 Excel 软件进行数据统计作图。

# 2 结果与分析

## 2.1 Las 病原叶片的鉴定

为了确保用于嫁接的每一片叶均带有 Las 病原, 嫁接前对每一片叶进行 PCR 检测, 扩增靶标基因为 Las 病原菌的 *16S* 基因, 片段大小为 1 160 bp。如图 1 所示, 检测出 *16S* 基因特异片段的叶片为 Las 病原叶片, 将用于叶圆片嫁接传毒。

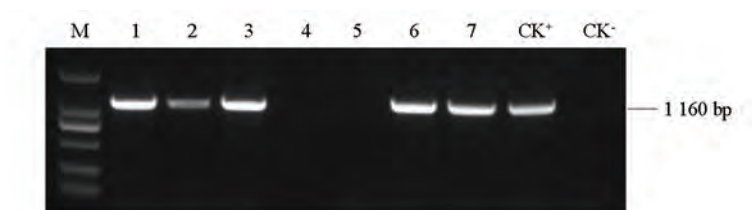


图 1 Las 病原叶片的 PCR 检测

M: DL2000 DNA marker; CK<sup>+</sup>: 阳性对照; CK<sup>-</sup>: 阴性对照; 1~7: 待测叶片。

Fig. 1 PCR determination results of the Las pathogens in leaf

M: DL2000 DNA marker; CK<sup>+</sup>: Positive control; CK<sup>-</sup>: Negative control; 1~7: Leaf tested.

## 2.2 嫁接传毒 28 ~ 84 d 后叶片表型变化

嫁接后 28 d, 大部分嫁接的叶圆片与周围的叶片组织结合紧密 (图 2), 在接口可见一圈较厚的愈伤组织, 说明 28 d 时叶圆片与叶片已完全融合。

嫁接后 84 d, 愈伤组织逐渐木质化, 叶圆片在整个试验期间保持绿色, 说明叶圆片通过形成愈伤组织促进维管束的连接, 基本恢复圆片与叶片之间的物质相互供应, 但是嫁接毒源的叶片并未表现出患黄龙病的症状。

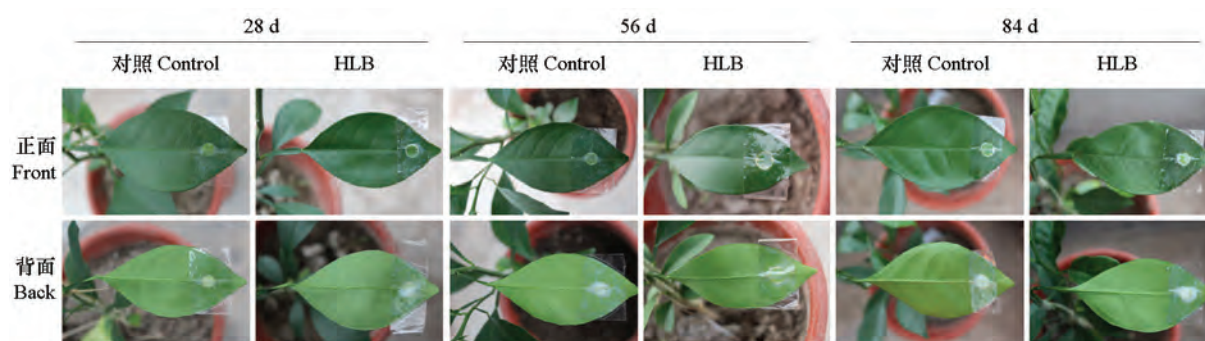


图 2 接种 Las 后 28、56 和 84 d 的叶片表型变化

Fig. 2 Phenotypic observation of leaves with Las after 28, 56 and 84 days

## 2.3 嫁接传毒 49 ~ 84 d 后叶片各部位菌量变化

前期研究表明, 荧光定量 PCR 对甜橙中 Las 的检测阈值循环数  $C_t$  为 31.3 (Zou et al., 2017)。据此, 当  $C_t$  大于 31.3, 被认为无病原菌被检测到, 其病原菌含量为 0。

对如图 3 所示的嫁接口近端主脉、远端主脉和叶柄、缘周叶组织等 4 个部位取样进行分析, qPCR 分析表明, 接种 Las 后 7 ~ 42 d, 4 个检测部位的  $C_t$  值与对照没有显著差异 ( $C_t$  值均在 33 左右), 无明显的病原菌扩散发生。

从 49 d 开始, 在近端主脉检测到明显的病原菌扩散, 并随着时间推进病原菌含量 (图 4) 逐渐升高, 与细菌生长曲线中的指数期一致, 呈几何级数增长; 到 77 d, 在远端主脉、叶柄和缘周叶组织中开始监测到明显的病原菌扩散, 病原菌生长曲线与近端主脉中相似。49 ~ 84 d, 近端主脉病原菌含量均显著高于其他部位。

试验表明, 叶圆片嫁接处理早期 (1 ~ 84 d) 中, Las 病原菌主要沿主脉韧皮部自侵染部位由近向远扩散。

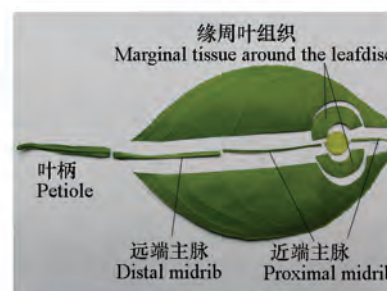


图 3 定量 PCR 检测 Las 病原菌含量取材示意图

Fig. 3 Schematic diagram of tissues used to analyze bacterial populations in leaf

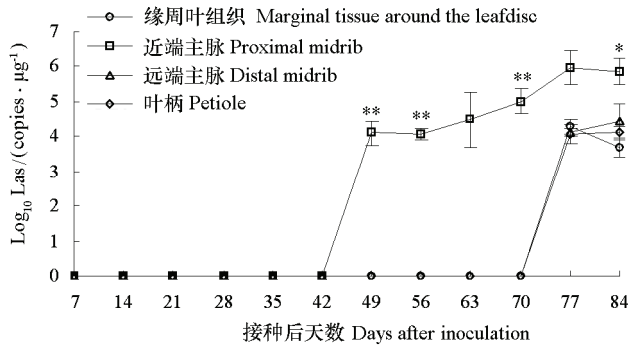


图 4 接种后 84 d 内叶片不同组织 Las 菌量变化

\* 和 \*\* 分别表示近端叶脉与其他部位相比具有显著 ( $t$ -test,  $P < 0.05$ ) 和极显著 ( $t$ -test,  $P < 0.01$ ) 差异。

Fig. 4 Las populations in different leaf tissues at 7 ~ 84 d after Las inoculation

\* and \*\* indicated significant ( $t$ -test,  $P < 0.05$ ) and extremely significant ( $t$ -test,  $P < 0.01$ ) difference between proximal midrib and other leaf tissues, respectively.

2.4 嫁接传毒 180 d 后叶片症状

叶片嫁接 180 d 后, 对照组植株健康生长并未出现黄龙病相关症状 (图 5, A), 而嫁接 Las 的植株开始出现黄龙病症状——叶片斑驳黄化、叶脉爆突木质化。有的在嫁接株的未嫁接毒源叶片出现斑驳黄化症状 (图 5, B 黄色箭头所示), 并且在嫁接植株的顶端出现黄龙病症状; 有的植株只在嫁接毒源的叶片上出现症状 (图 5, C 黄色箭头所示), 缘周叶肉部位黄化, 叶脉凸起; 而有的在嫁接毒源的叶片和未嫁接毒源叶片均出现症状 (图 5, D 黄色箭头所示)。

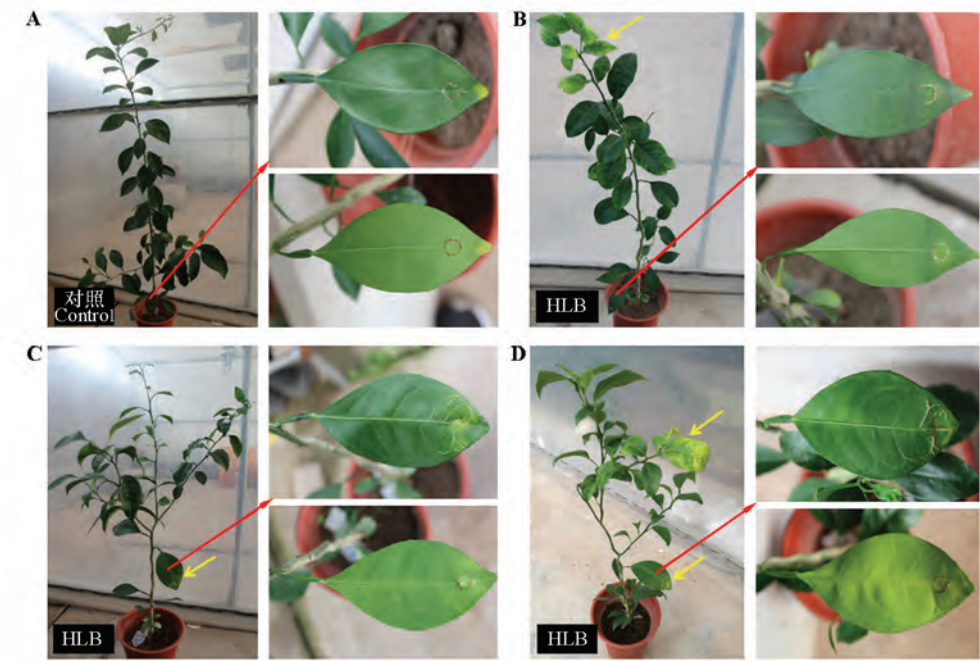


图 5 叶圆片嫁接传毒 180 d 症状

A: 对照; B: 仅在未嫁接毒源的叶片上显症; C: 仅在嫁接毒源的叶片上显症; D: 嫁接毒源和未嫁接毒源的叶片均显症。

Fig. 5 Symptom observation of plants after 180 d of leafdisc grafting infection

A: Control; B: HLB symptoms appear only in leaves without leafdisc; C: HLB symptoms appear only in leaves with leafdisc; D: HLB symptoms appear simultaneously in leaves with and without leafdisc.



### 3 讨论

植物嫁接技术已广泛用于流行病学研究,例如植物病原体(细菌或病毒)的接种和繁殖(Kasrawi et al., 1988; Nie & Singh, 2001; Damsteegt et al., 2007; Hilf & Lewis, 2016)。芽接、皮接和枝接是黄龙病传毒实验常用的方法(赵学源 等, 1982; Hilf & Lewis, 2016)。在育种试验中,这些嫁接方法也是筛选抗性/耐性品种常用的方法(White et al., 1992; Zou et al., 2017)。上述方法通常选取两年生以上较大植株作为受体,因为这样的树更易容纳带毒的侧芽、树皮或枝条,提高传毒效率(Lopes et al., 2009)。然而这种嫁接技术存在以下不足(王辉, 2011; Flavia et al., 2017): (1) 传毒的周期较长(叶片显症需要3个月以上); (2) 培养大树需要占用大量空间,难以在实验室操作; (3) 传毒植株不同叶片、不同组织病原菌含量差异巨大,难以用于寄主与病原菌互作分子机制的研究。最近, Flavia 等(2017)用带菌叶圆片对两月龄受体幼苗进行嫁接传毒,证明了幼苗能够成功传毒,其 HLB 传染率为 80%,显著高于其他嫁接法,而且可以明显缩短试验周期,展示了叶圆片嫁接传毒方法在研究黄龙病等维管束病害在寄主植物内运动趋势的试验中的应用前景。本研究进一步表明,该方法同样可以用于两年生柑橘成熟叶片嫁接传毒试验。

黄龙病病原菌从木虱叮咬或嫁接部位进入韧皮部后,在原初侵染部位筛管中复制、建立菌落生态群并通过筛管扩散等早期行为依然不清楚。黄龙病病原菌难于离体培养,因而无法采用现有细菌研究技术有效开展相关工作。如何在现有基础上创新方法探讨黄龙病侵染柑橘的早期行为一直受到科学家的关注。叶圆片传毒技术能够清楚标识病原菌原初侵染部位(即带菌叶圆片),方便开展病原菌扩散和症状发展的研究(Flavia et al., 2017)。本试验基于定量 PCR 分析发现,近端主脉病原菌含量显著高于远端叶脉、叶柄和缘周叶组织,说明黄龙病病原菌在叶片中的扩散趋势是从原初侵染部位通过韧皮部逐渐向远端组织扩散。同时,病原菌也沿原初侵染部位通过次脉进行扩散。一般而言,黄龙病侵染早期叶片几乎无任何可见症状出现(Albrecht & Bowman, 2008; Zheng & Zhao, 2013; Zhong et al., 2016)。症状观察发现,在叶圆片嫁接传毒 84 d 内,嫁接叶片无肉眼可见的症状发生,据此将 Las 在嫁接叶片中 1 ~ 84 d 内的扩散行为划为早期行为。就本试验而言,以近端主脉为原初侵染部位,参照病原菌的生长曲线,可以将 Las 的早期行为划分为 3 个阶段: 1 ~ 42 d 为第 1 阶段,即病原菌潜伏期,细菌繁殖极少,达不到 qPCR 检测水平; 43 ~ 70 d 为第 2 阶段,即病原菌指数期,病原菌只在近端主脉被检出; 71 ~ 84 d 为第 3 阶段,为病原菌稳定期,病原菌迅速向周围扩散,在远端主脉、叶柄和缘周叶组织中能检测到病原菌的存在。

症状观察发现,180 d 后植株开始显症,本试验中观察到 3 种显症现象: 只在嫁接叶片上显症、只在非嫁接叶片显症和两者皆有,这些症状与其他传毒技术的症状相似(赵学源 等, 1982; 胡浩, 2007; Achor et al., 2010)。令人关注的是嫁接叶片的症状发展与病原菌扩散呈现一致的趋势: 嫁接部位周围最严重,叶脉暴突黄化,沿主脉方向症状逐渐减弱,症状的这种规律性变化趋势可能与病原菌含量从原初侵染部位向叶脉递减导致筛管堵塞程度变化紧密相关。这种症状变化与病原菌扩散的关系为进一步利用叶圆片嫁接技术开展黄龙病早期致病机制的研究提供了参考。有研究表明, Las 病原特异性寄生于柑橘韧皮部筛管分子细胞中,并通过韧皮部在植物体内扩散,且 Las 病原在柑橘体内的分布极不均匀,叶片病原菌含量与其症状严重程度并无直接正相关性,比如未显症叶片病原菌含量有可能高于显症叶片(胡浩, 2007; Tatineni et al., 2008; Wang et al., 2017)。实际上,病原入侵后寄主代谢平衡、激素调节的变化程度,以及寄主防卫反应等方面均会影响叶片症状的变化(许美容 等, 2015; 胡燕 等, 2016)。Johnson 等(2014)提出一些植株只在未嫁接叶片中显症可能暗

示了根在介导病原菌扩散中起重要作用。根可以通过感知病原菌的扩散长距离调控叶片中光合产物、矿质元素（如 Zn 等）运输，从而影响叶片症状的发展。但是其确切机制还有待深入研究。

综上所述，本研究结果表明叶圆片嫁接传毒中，Las 在柑橘原初侵染部位的早期扩散中呈现与其他细菌相似的潜伏期、指数期和稳定期生长曲线变化，而且与症状从原初侵染部位向外扩散趋势一致。叶圆片嫁接传毒中 Las 侵染柑橘早期的这种运动规律和扩散的特征为进一步开展黄龙病与寄主柑橘互作机制的研究提供了有价值的参考，也为柑橘黄龙病抗性育种的早期快速筛选和高效鉴定提供了理论基础和新的评价技术。

## References

- Achor D S, Etxeberria E, Wang N, Folimomova S Y, Chung K R, Albrigo L G. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal*, 9 (2): 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: 291 – 306.
- Bai Xiaojing, Xu Lanzhen, Jia Ruirui, Zhou Pengfei, Chen Min, He Yongrui, Peng Aihong, Lei Tiangang, Li Qiang, Yao Lixiao, Chen Shanchun, Zou Xiuping. 2017. Cloning and expression analysis of HLB-associated salicylic acid carboxyl methyltransferase gene *CsSAMT-1* in citrus. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (12): 2265 – 2274. (in Chinese)
- 白晓晶, 许兰珍, 贾瑞瑞, 周鹏飞, 陈 敏, 何永睿, 彭爱红, 雷天刚, 李 强, 姚利晓, 陈善春, 邹修平. 2017. 柑橘黄龙病相关水杨酸羧基甲基转移酶基因 *CsSAMT-1* 的克隆与表达分析. *园艺学报*, 44 (12): 2265 – 2274.
- Bové J M. 2014. Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: Will it destroy citrus worldwide. *Phytoparasitica*, 42: 579 – 583.
- Damsteegt V D, Scorza R, Stone A L, Schneider W L, Webb K, Demuth M, Gildow F E. 2007. Prunus host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Dis*, 91: 18 – 23.
- Duan Y, Zhou L, Hall D G, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling C 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22 (8): 1011 – 1020.
- 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.
- Flavia T Z, Karen P, Ed E. 2017. Leaf-disc grafting for the transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus (*Citrus sinensis*: Rutaceae) seedlings. *Applications in Plant Sciences*, 5 (1): 1600085.
- Garnier M, Jagoueix S, Cronje P R, Roux H F, Bové J M. 2000. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of ‘*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*’. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2119 – 2125.
- HersHKovitz V, Ben-Dayan C, Raphael G, Pasmanik-Chor M, Liu J, Belausov E, Aly R, Wisniewski M, Droby S. 2012. Global changes in gene expression of grapefruit peel tissue in response to the yeast biocontrol agent *Metschnikowia fructicola*. *Molecular Plant Pathology*, 13 (4): 338 – 349.
- Hilf M E, Lewis R S. 2016. Transmission and propagation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ by grafting with individual citrus leaves. *Phytopathology*. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-0221-R>.
- Hu Hao. 2007. Research on dynamic change and distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in hosts with real-time PCR [Ph. D. Dissertation]. Chongqing: Chongqing University. (in Chinese)
- 胡 浩. 2007. 应用荧光定量 PCR 技术研究亚洲韧皮部杆菌在寄主体内的动态变化及分布 [博士论文]. 重庆: 重庆大学.
- Hu Yan, Wang Xue-feng, Zhou Chang-yong. 2016. Recent advances in interactions among ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, insect vector and plant host, *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (9): 1688 – 1698. (in Chinese)



- 胡 燕, 王雪峰, 周常勇. 2016. 柑橘黄龙病菌亚洲种、虫媒及植物寄主互作研究进展. 园艺学报, 43 (9): 1688 – 1698.
- Jagueix S, Bové J M, Garnier M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the a subdivision of the proteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology, 44: 379 – 386.
- Johnson E G, Wu J, Bright D B, Graham J H. 2014. 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, 63: 290 – 298.
- Kasrawi M A, Suwwan M A, Mansour A. 1988. Sources of resistance to *Tomato-yellow-leaf-curl-virus*(TYLCV) in *Lycopersicon* species. Euphytica, 37: 61 – 64.
- Li W B, Hartung J S, Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. J Microbiol Methods, 66: 104 – 115.
- Lopes S A, Bertolini E, Frare G F, Martins E C, Wilff N A, Texeira D C, Fernandes N G, Cambra M. 2009. Graft transmission efficiencies and multiplication of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ and ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants. Phytopathology, 99: 301 – 306.
- Martinelli F, Reagan R L, Uratsu S L, Phu M L, Albrecht U, Zhao W, Davis C E, Bowman K D, Dandekar A M. 2013. Gene regulatory networks elucidating huanglongbing disease mechanisms. PLoS ONE, 8 (9): e74256.
- Nie X, Singh R P. 2001. Differential accumulation of *Potato virus A* and expression of pathogenesis-related genes in resistant potato cv. Shepody upon graft inoculation. Phytopathology, 91: 197 – 203.
- Tatineni S, Sagaram U S, Gowda S, Robertson C J, Dawson W O, Iwanami T, Wang N. 2008. In planta distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. Phytopathology, 98: 592 – 599.
- Vojnov A A, do Amaral A M, Dow J M, Castagnaro A P a, Marano M R. 2010. Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. Applied Microbiology and Biotechnology, 87: 467 – 477.
- Wang Hui. 2011. Study on *Diaphorina Citri*-A vector transmits Huang Long Bing and construction of suppression subtractive library of *Murraya paniculata* induced by HLB [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 王 辉. 2011. 柑橘黄龙病昆虫媒介—柑橘木虱的研究及九里香感染黄龙病菌后的差减文库构建 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Wang N, Pierson E A, Setubal J C, Xu J, Levy J G, Zhang Y, Li J, Rangel L T, Martins Jr J. 2017. The *Candidatus Liberibacter*-Host interface: Insights into pathogenesis mechanisms and disease control. Annual Review of Phytopathology, 55: 451 – 482.
- White J W, Montes C, Mendoza L Y. 1992. Use of grafting to characterize and alleviate hybrid dwarfness in common bean. Euphytica, 59: 19 – 25.
- Xu Meirong, Dai Ze-han, Kong Wei-wen, Deng Xiao-ling. 2015. Citrus Huanglongbing research based on molecular biology techniques. Journal of Fruit Science, 32 (2): 322 – 334. (in Chinese)
- 许美容, 戴泽翰, 孔维文, 邓晓玲. 2015. 基于分子技术的柑橘黄龙病研究进展. 果树学报, 32 (2): 322 – 334.
- Zhao Xue-yuan, Jiang Yuan-hui, Qiu Zhu-shi, Su Wei-fang, Li Chao-yang. 1982. A preliminary study of grafting transmission of citrus Huanglongbing. Acta Phytopathologica Sinica, 12 (2): 53 – 56. (in Chinese)
- 赵学源, 蒋元晖, 丘柱石, 苏维芳, 李超扬. 1982. 柑橘柑橘黄龙病嫁接传播方法的初步研究. 植物病理学报, 12 (2): 53 – 56.
- 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. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/27>.
- Zhong Y, Cheng C, Jiang B, Jiang N, Zhang Y, Hu M, Zhong G. 2016. Digital gene expression analysis of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) in response to Asia Citrus Psyllid-Vectored Huanglongbing infection. International Journal of Molecular Science, 17: 1063.
- Zou X P, Jiang X Y, Xu L Z, Lei T G, Peng A H, He Y R, Yao L X an, Chen S C. 2017. Transgenic citrus expressing synthesized cecropin B genes in the phloem exhibits decreased susceptibility to Huanglongbing. Plant Molecular Biology, 93: 341 – 353.