

广佛手黄龙病的鉴定

袁蒙, 潘利明, 周良云, 罗碧, 王浩, 杨全*

(广东药科大学 中药学院, 国家中医药管理局 岭南药材生产与开发重点研究室, 国家中药材产业技术体系 广州综合试验站, 广东省南药规范化种植与综合开发工程技术研究中心, 广州 510006)

[摘要] **目的:** 该文从多方面进行分析、比较,及时、准确地鉴别广佛手黄龙病,以便于及时确定病害、防控病情。**方法:** 通过性状分析,逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR),酶切反应及实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测多种手段相结合,对广佛手黄龙病进行鉴定。**结果:** 从性状上来看,感病广佛手有典型的叶片斑驳型黄化、果相对较小,甚至畸形的特征,但并没有发现“红鼻子果”现象,这些均可以作为田间初步判别广佛手黄龙病的依据;RT-PCR 检测及酶切反应结果表明,引物为 OI1/OI2c 时,广佛手病株有特异性条带 1 160 bp,且能被 Xba I 酶切成 520 bp 和 640 bp,这与其他被黄龙病侵染的柑橘属植物的检测结果一致;Real-time PCR 检测结果显示,被黄龙病侵染的广佛手叶片有扩增曲线和熔解曲线,熔链温度为 82 ℃,且 C_t 值在 24.6 ~ 28.2,而广佛手正常株没有扩增现象出现。**结论:** 性状分析可以在田间初步判别黄龙病,但是具有一定的主观性,RT-PCR 及 Real-time PCR 检测能进一步确定广佛手黄龙病,且 qPCR 检测更加灵敏,还可以定量。通过性状分析以及分子鉴定的结合,能够更加及时、准确地确定广佛手黄龙病。

[关键词] 广佛手; 黄龙病; 叶片; 性状分析; 田间判别

[中图分类号] R289;R284.1;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)05-0117-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192413

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190904.1151.003.html>

[网络出版时间] 2019-09-04 13:26

Identification of *Citrus medica* var. *sarcodactylis* Infected with Citrus Huanglongbing

YUAN Meng, PAN Li-ming, ZHOU Liang-yun, LUO Bi, WANG Hao, YANG Quan*

(Guangdong Provincial Research Center on Good Agricultural Practice & Comprehensive Agricultural Development Engineering Technology of Cantonese Medicinal Materials, Guangzhou Comprehensive Experimental Station of China Chinese Materia Medica Industry Technology System, Key Laboratory for Production & Development of Cantonese Medicinal Materials Under State Administration of Traditional Chinese Medicine (TCM), School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze and compare different samples in many aspects to identify *Citrus medica* var. *sarcodactylis* infected with Huanglongbing (HLB) timely and accurately, in order to prevent and control the disease in time. **Method:** HLB was identified through character analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), enzyme digestion reaction and Real-time PCR. **Result:** In terms of characters, there were typically variegated yellow leaves and relatively small fruit, even with deformity but without "red nose fruit" among *C. medica* var. *sarcodactylis* infected with HLB. All of these can be used as the basis for the preliminary identification of HLB in the fields. According to the RT-PCR test results and enzyme digestion reaction, when the primer was OI1/OI2c, there was specific band of 1 160 bp, which could be cut into 520 bp

[收稿日期] 20190222(011)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1700704);广东省中医药局中药资源普查专项(20163008);2017年广东省岭南中药材保护资金专项(粤财社[2017]60号)

[第一作者] 袁蒙,在读硕士,从事中药资源开发与品质评价研究,Tel:020-39252353,E-mail:964485970@qq.com

[通信作者] *杨全,博士,教授,从事中药资源开发与品质评价研究,Tel:020-39252353,E-mail:yangquan7208@vip.163.com

and 640 bp by Xba I enzyme. These results were consistent with the characters of other citrus plants infected with HLB. According to the Real-time PCR detection results, *C. medica* var. *sarcodactylis* infected with HLB had amplification curves and dissolved peaks, with the melting temperature was 82 °C and C_t between 24.6 to 28.2, while the normal plants were not amplified. **Conclusion:** Character analysis can be used to roughly distinguish HLB in the fields, but with a certain subjectivity. RT-PCR or Real-time PCR can be used to identify *C. medica* var. *sarcodactylis* infected with HLB in a timely and accurate manner, and qPCR detection is more sensitive and quantitative. Through the combination of character analysis and molecular identification, *C. medica* var. *sarcodactylis* infected with HLB can be determined more timely and accurately.

[Key words] *Citrus medica* var. *sarcodactylis*; Huanglongbing (HLB); leaves; character analysis; distinguish in field

佛手 (*Citrus medica* var. *sarcodactylis*) 为芸香科柑橘属植物, 其干燥成熟果实入药, 具有疏肝理气、和胃止痛、燥湿化痰等功效^[1]。除药用外, 还可用于提取香精^[2], 制作盆栽, 制得果脯^[3]、佛手酥^[4], 加工成佛手茶^[5]、佛手酒^[6]、佛手酸奶^[7]等保健型产品。产于广东、广西的佛手称为“广佛手”, 为广东省道地药材^[8], 与其他产地的佛手相比, 广佛手具有生长快、果形大、品质好、产量高的特点^[9]。本课题组前期调查广东省 5 个市 22 个县的广佛手分布情况发现^[10], 近年来广佛手的栽培面积逐年下降, 这种现象的产生最直接的原因就是黄龙病严重降低了广佛手的产量及质量, 重者致树木死亡^[11]。因此及时、准确地鉴定广佛手黄龙病并进行防控对于广佛手产业的发展具有重要意义。

柑橘黄龙病 (Huanglongbing, HLB) 是世界柑橘属生产上最具毁灭性的病害, 严重制约了其产业的发展^[12]。其是一种由韧皮杆菌导致的, 由柑橘木虱传播的柑橘类疾病。病树主要表现为叶片斑驳型黄化、均匀型黄化、缺素型黄化和“红鼻子”果等症^[13-14], 其中斑驳型黄化是黄龙病最典型的症状。早期通过观察植株典型症状, 进行黄龙病田间形态学鉴定, 但此方法有一定主观性。随着生物技术的发展, 目前主要采用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术进一步检测黄龙病。JAGOUEIX 等^[15]基于黄龙病 16S rDNA 的序列设计出引物 OI1 OA1/OI2c, 扩增出大小为 1 160 bp 的特异性条带, 并用酶切法区分亚洲种和非洲种, 其中亚洲种的扩增条带会被 Xba I 酶切为 520 bp 和 640 bp。TEIXEIRA 等^[16]也根据黄龙病美洲种的 16S rDNA 序列设计出引物 GB1/GB3, 扩增片段大小为 1 027 bp, 能特异性检出 HLB 美洲种。HARAKAVA 等^[17]研究表明巢式 PCR 比常规 PCR 更灵敏。为了克服常规 PCR 和巢式 PCR 不能准确定量及易污染等问题, 出现了实时荧光定

量 PCR (Real-time PCR) 技术, 使 PCR 检测黄龙病实现了从定性到定量的飞跃, 很快得到了广泛应用^[18-20]。虽然各国研究者对黄龙病研究多年, 但研究材料多为柑橘、甜橙等, 对从性状, 逆转录 (RT)-PCR 及 Real-time PCR 多方面结合检测中药佛手的黄龙病尚未有报道。

本实验以相同树龄的正常广佛手和感染黄龙病广佛手为材料, 从性状, RT-PCR, 产物酶切, Real-time PCR 多个方面进行检测与分析, 为广佛手黄龙病的鉴定提供理论依据, 进而为广佛手黄龙病的防控提供一定的借鉴意义。

1 材料

在肇庆市德庆县武垄镇云楼村 (N23°20'2", E112°14'16", 海拔 60 m), 由华南农业大学邓晓玲教授鉴定的 6 株正常株树龄为 4 年的广佛手 (N1 ~ N6) 与 6 株感染黄龙病树龄为 4 年的广佛手 (B1 ~ B6)。采集部位为叶片与果实, 叶片用硅胶保存备用, 果实用脱脂棉保湿处理备用。

植物 DNA 提取试剂盒: Takara MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit (批号 AI71066A); PCR 试剂: Takara Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0 plus dye) (批号 AI60204A); 切胶回收试剂盒: Takara MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 (批号 AI51865A); 酶切试剂: Xba I 酶切体系 (批号 AHG0212A); qPCR 试剂: Takara SYBR^R Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (批号 AHF1421A); DL2000 DNA Marker (批号 AI21246A); 以上试剂均购自宝日生物技术 (北京) 有限公司。

ExRed 染料 (批号 87128DY), 6 × DNA loading buffer (批号 70G10C) 均购自庄盟生物; 琼脂糖 (批号 111860, 西班牙索莱公司); Tris, Na₂EDTA·2H₂O, 乙酸, 无水乙醇 (分析纯, 天津致远公司)。

C1000 Touch™ Thermal Cycler 型 PCR 仪,

CFX96™ Optics Module 型 Real-time PCR 仪, PowerPac™ Basic 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Nano-100 型微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司);Tocan240 型凝胶成像仪(上海领成生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 症状区分 观察感病广佛手、正常广佛手的叶片、果实的外观性状,进行对比、分析。

2.2 引物设计 参照文献[19-20]设计引物,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物名称	序列(5'-3')
OI1/OI2c	F:GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA
	R:GCCTGCGACTTCGCAACCCAT
rpILAs	F:CGCCCGTTCCCGTTGT
	R:AGCCTCTTTAAGCCCTAAATCAG

2.3 核酸的制备 用清水将植物组织冲洗干净,称取组织(主叶脉)100 mg,按照 Takara MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit 说明书提取总 DNA,最后用 65 ℃ 的 Elution Buffer 50 μL 将 DNA 洗脱下来。取得到的 DNA 样品 5 μL 于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,并在凝胶成像系统中进行拍照观察。同时,取得到的 DNA 样品 1 μL 用微量分光光度计测定其浓度和纯度,其余样品保存于 -20 ℃。

2.4 RT-PCR 检测 以提取的 DNA 为模板,按照 Takara Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0 plus dye) 试剂盒,PCR 总体系为 50 μL,具体成分为 Premix Taq(Ex Taq Version 2.0 plus dye) 25 μL, DNA 模板 2 μL, OI1/OI2c (F, 20 μm) 1 μL, OI1/OI2c (R, 20 μm) 1 μL, 灭菌水 21 μL。扩增程序:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,64 ℃ 45 s,72 ℃ 70 s,35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 结束后取产物 6 μL,在室温下点样于 1% 琼脂糖凝胶(Exred 染色)中,以 2 000 bp Marker 作为标准,电压 150 V,1 × TAE 缓冲液中电泳 15 min,采用凝胶成像系统观察结果。

2.5 酶切 将感病组的 PCR 产物 1 160 bp 条带按照试剂盒(Takara MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0)说明书从琼脂糖凝胶中回收纯化 DNA。

将纯化产物酶切,体系为 20 μL,具体成分: Xba I 1 μL,10 × M Buffer 2 μL,0.1% BSA 2 μL,纯

化后的 DNA 5 μL,灭菌水 10 μL。37 ℃ 反应 4 h。结束后取产物 0.6 μL,与 10 × loading buffer 5.4 μL 相混合,在室温下点样于 1% 琼脂糖凝胶(Exred 染色)中,以 2 000 bp Marker 作为标准,电压 150 V,1 × TAE 缓冲液中电泳 15 min,采用凝胶成像系统观察结果。

2.6 Real-time PCR 检测 以提取的 DNA 为模板,按照 Takara SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书,qPCR 总体系为 25 μL,具体成分为 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (2 ×) 12.5 μL, DNA 模板 2 μL, rpILAs (F, 10 μm) 1 μL, rpILAs (R, 10 μm) 1 μL, 灭菌水 8.5 μL。扩增程序:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s;60 ℃ 30 s,39 个循环;然后进行熔解曲线分析:95 ℃ 10 s 0.5 ℃ · s⁻¹ 升温至 95 ℃。每个样品 3 个重复。

3 结果与分析

3.1 性状对比 正常广佛手叶片均为深绿色;感病广佛手叶片最典型的症状是斑驳型黄化,发病初期在叶片近叶柄处的叶肉先表现出褪绿,一般从叶脉(主脉、侧脉)附近开始褪绿,这种褪绿往往扩散成黄绿相间的斑驳,以叶下基部、下部边缘和主脉附近最为明显(图 1A)。正常广佛手果实普遍较大;感病植株的结果量一般要比正常植株结果量要少,并且果偏小,甚至有的畸形(图 1B)。感病广佛手外观性状与感病柑橘、甜橙等的性状相似,但感病广佛手无“红鼻”果。

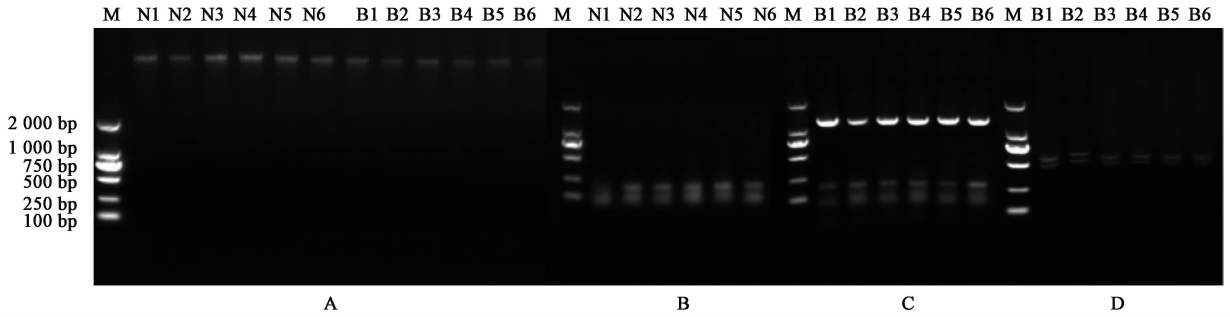


图 1 感病广佛手与正常广佛手叶片(A),果实(B)性状对比

Fig.1 Comparing with leaves (A) and fruits (B) of infected and normal *Citrus medica* var. *sarcodactylis*

3.2 RT-PCR 与产物酶切 所有样品的 DNA 均被提出,且未降解(图 2A);正常组(N1 ~ N6)广佛手叶片 PCR 后无 1 160 bp 条带(图 2B),染病组(B1 ~ B6)广佛手叶片 PCR 后有 1 160 bp 条带(图 2C),并且此条带经过切胶回收之后能被 Xba I 酶切为 520 bp 和 640 bp(图 2D)。

3.3 Real-time PCR 分析 每个样品 3 个技术平行都表明,染病组(B1 ~ B6)才有 C_t 值(表 2),特异性



A. N1 ~ N6 与 B1 ~ B6 DNA 电泳; B. N1 ~ N6 PCR; C. B1 ~ B6 PCR; D. B1 ~ B6 PCR 产物酶切

图 2 感病广佛手与正常广佛手 DNA 和 PCR 电泳

Fig. 2 DNA and PCR electrophoretogram of infected and normal *Citrus medica* var. *sarcodactylis*

扩增(图 3A), 熔解曲线(图 3B)和熔解峰(图 3C), 正常组(N1 ~ N6)没有扩增曲线、熔解曲线和熔解峰, 且 C_t 值为 0, 说明该方法有较高的特异性, 可以及时、准确地检测出黄龙病菌。从 Real-time PCR 熔解曲线的分布图可以看出, 熔解曲线的特征峰比较单一, 没有其他杂峰, 并且扩增产物的熔链温度在 82 °C, 说明引物设计、用量合理, Real-time PCR 的扩增没有形成引物二聚体, 也没有出现非特异性产物。

表 2 感病广佛手与正常广佛手 qPCR C_t 值

Table 2 qPCR C_t of infected and normal *Citrus medica* var. *sarcodactylis*

名称	C_t1	C_t2	C_t3	C_t 均值
N1	0	0	0	0
N2	0	0	0	0
N3	0	0	0	0
N4	0	0	0	0
N6	0	0	0	0
B1	27.61	27.40	27.76	27.59
B2	28.16	28.06	28.25	28.16
B3	26.79	26.52	26.99	26.77
B4	24.66	24.76	24.48	24.63
B5	24.74	24.61	24.88	24.74
B6	25.09	24.86	25.07	25.00

4 讨论

柑橘黄龙病最早在 1919 年由 REINKING^[21] 发现, 他认为该病是水害引起的。林孔湘等^[22-23] 通过大量的实验推翻了水害、线虫、镰刀菌等引起柑橘黄龙病的结论, 并且通过接种实验证明病毒是此病的病原。随着科技的发展, 人们越来越认清这种病症。GARNIER 等^[24] 在 1984 年通过电子显微镜观察到

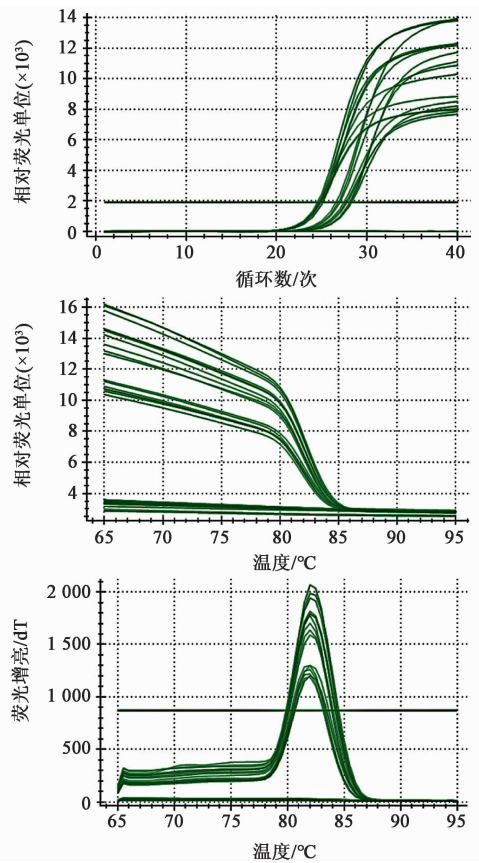


图 3 染病广佛手扩增曲线(A), 熔解曲线(B)和熔解峰(C)

Fig. 3 Amplification curve (A), melting curve (B) and melting peak (C) of infected *Citrus medica* var. *sarcodactylis*

该病原存在于筛管细胞中, 并且有两层外膜, 证实其为一种革兰氏阴性菌。目前黄龙病被认为有 3 个种, 亚洲种 (Candidatus Liberibacter asiaticus, Las), 非洲种 (Candidatus Liberibacter africanus, Laf), 美洲种 (Candidatus Liberibacter americanus, Lam), 在我国主要是亚洲种^[25]。

最常用的鉴别黄龙病的方法为田间诊断, RT-PCR 检测, Real-time PCR 检测。田间诊断法是大概

鉴别黄龙病的第一步。由于其简单、易行,无需任何设备,在大多数情况下,凭借植株性状特征,就可以立刻鉴别,是目前最迅速的鉴定方法^[26],也是大多数生产者和研究者常采用的初步鉴定方法。该病其最典型的症状就是斑驳型黄化和“红鼻子果”,本实验发现在田间采摘的斑驳型黄化的叶片(B1~B6)均通过 PCR 检测显示阳性。虽然样本量有限,但依然能看出,田间通过斑驳型黄化叶片判断黄龙病有效、可行。但是还未见广佛手有“红鼻子果”现象,只是果实相对较小、产量较低。此法有一定的主观性,如若准确判断,还必须进行 Real-time PCR 类检测。

PCR 是通过设计一定的引物,在体外高效合成 DNA 的一项技术。应用该技术可以实现对柑橘黄龙病特异性检测。最常用的有常规 RT-PCR, Real-time PCR 2 种。VILLECHANOUX 等^[27]首先分析了柑桔黄龙病病原的部分 DNA 序列。此后,人们采用 PCR 技术成功地检测出柑桔属多种植物的黄龙病病原^[28-29]。虽然常规 PCR 检测速度快,成本低,但只限于定性检测,对低含菌量的样品还容易出现假阴性结果,可用于样品初步检测^[30]。Real-time PCR 是目前检测黄龙病比较常用和可靠的方法,灵敏度高,可快速、早期检测,但考虑成本较高,最好配合其他低成本 PCR 技术运用,重点用于无症状、假阴性样品的检测,提高黄龙病的检出率^[20,31-32]。

本实验通过对比正常组与感病组广佛手叶片的 RT-PCR 产物的电泳图,可以很明显地看出染病组的 RT-PCR 产物有 1 160 bp 的条带,并且此特异性条带可以被 Xba I 酶切成 520 bp 和 640 bp,进而可以判断此次实验的病菌与在柑橘、甜橙等其他柑橘属植物中发现的黄龙病菌一致,均为黄龙病菌亚洲种。而正常组的 RT-PCR 产物无此特异性条带。说明引物为 OI1/OI2c 的 RT-PCR 反应可以快速、准确地鉴定广佛手黄龙病。染病组的 Real-time PCR 图谱既有扩增曲线、溶解曲线跟溶解峰,并且有一定的 C_t 值,而正常组没有扩增。可以看出 Real-time PCR 更为灵敏, C_t 值的大小能反应植株含菌量的不同, C_t 值越小,植株含菌量越高, C_t 值越大,植株含菌量越低。而在一定范围内,PCR 反应只能看出有无染病,病菌量差异很大时,才能通过条带亮度得出结论。总之,田间诊断能较准确鉴别广佛手黄龙病,结合 RT-PCR 或 Real-time PCR 能更准确判断黄龙病,并且 Real-time PCR 能够定量。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:178.

[2] 金雯芳,沈丽红,任加惠,等. 佛手精油及相关产品开 发的研究进展[J]. 中草药,2016,47(5):857-861.

[3] 郭晓强,颜军,邹晓勇,等. 低糖佛手果脯加工工艺研 究[J]. 食品科学,2006,27(12):953-955.

[4] 陈跃文,顾振宇,刘辉,等. 佛手酥加工工艺研究[J]. 食品研究与开发,2015,36(21):109-113.

[5] 黄有霖,郭素华,陈达炜. 佛手茶的保健功效及其保 健开发前景[J]. 海峡药学,2007,92(9):71-72.

[6] 杨国伟,马越,王晓杰,等. 佛手发酵酒生产工艺研究 [J]. 酿酒科技,2009,176(2):84-86.

[7] 刘春娜,姜竹茂. 低热量佛手酸奶的研制[J]. 中国乳 业,2010,102(6):58-61.

[8] 祁龙凯,林励,汪金玉,等. 广东英德引种广佛手与道 地产地广佛手质量的比较研究[J]. 中药新药与临床 药理,2014,25(1):67-70.

[9] 张爵玉,蒋林,王琴. 广佛手的研究现状及进展[J]. 中国调味品,2008,349(3):20-23.

[10] 岳玲,程轩轩,杨全. 广佛手的资源调查研究[J]. 广 东化工,2018,45(11):34-36.

[11] QURESHI J A, STANSLY P A. Exclusion techniques reveal significant biotic mortality suffered by Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations in Florida citrus [J]. Biological Control, 2009,50(2):129-136.

[12] GOTTWALD T R. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing [J]. Annual Review Phytopathol,2010,48:119-139.

[13] 苏华楠. 中国柑橘黄龙病病原调查、种群遗传分化及 其原噬菌体溶菌酶蛋白原核表达[D]. 重庆:西南大 学,2013.

[14] 许美容,陈燕玲,邓晓玲. 柑橘黄龙病症状与 “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”PCR 检测结果的相关性分析[J]. 植物病理学报,2016,46(3):367-373.

[15] JAGOUEIX S,BOVÉ J M,GARNIER M. PCR detection of the two ‘*candidatus*’ liberobacter species associated with greening disease of citrus [J]. Molecular and Cellular Probes,1996,10(1):43-50.

[16] TEIXEIRA D C, SAILLARD C, JAGOUEIX EVEILLARD S, et al. A new liberibacter species, *Candidatus Liberibacter americanus*, is associated with Huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil. [J]. Int J Syst Evolut Microbiol,2005,55(5):1857-1862.

[17] HARAKAVA R,MARAIS J L,OCHASAN J. Improved sensitivity in the detection and differentiation of citrus huanglongbing bacteria from South Africa and the

- Philippines[C]//Proceedings of 14th Conference of the IOCV. Riverside: Proceedings of 14th Conference of the IOCV, 2000.
- [18] LI W, HARTUNG J S, LEVY L. Quantitative Real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing[J]. *J Microbiological Methods*, 2006, 66(1):104-115.
- [19] SUBANDIYAH S, IWANAMI T, TSUYUMU S, et al. Comparison of 16S rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among Citrus greening organisms in Asia[J]. *Plant Disease*, 2000, 84(1):15-18.
- [20] TEIXEIRA D C, SAILLARD C, COUTURE C. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in Saõ Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR[J]. *Mol Cellular Probes*, 2008, 22(3):139-150.
- [21] REINKING O A. Diseases of economic plants in southern China[J]. *Phillip Agric*, 1919, 8(4):109-135.
- [22] 林孔湘. 柑桔黄梢(黄龙)病研究 II-关于病原的探讨[J]. *植物病理学报*, 1956, 2(1):13-42, 104.
- [23] 林孔湘, 朱麦拉. 柑桔黄梢(黄龙)病研究-镰刀菌在发病上的作用[J]. *植物病理学报*, 1957, 3(2):169-176.
- [24] GARNIER M, DANIEL N, BOVÉ J M. The greening organism is a gram negative bacterium[J]. *Int Organ Citrus Virologists Conference Proceedings*, 1984:115-124.
- [25] WANG X, SU H, HUANG L, et al. Identification of a novel 1033-nucleotide deletion polymorphism in the prophage region of ‘*candidatus liberibacter asiaticus*’: potential applications for bacterial epidemiology[J]. *J Phytopathol*, 2015, 163(7/8):681-685.
- [26] 罗志达, 叶自行, 许建楷, 等. 柑桔黄龙病的田间诊断方法[J]. *广东农业科学*, 2009, 228(3):91-93.
- [27] VILLECHANOUX S, GARNIER M, LAIGRET F, et al. The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the nusG-rplKAJL-rpoBC gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase[J]. *Curr Microbiol*, 1993, 26(3):161-166.
- [28] 邓晓玲, 梁志慧, 唐伟文. 快速检测柑桔黄龙病原的研究[J]. *华南农业大学学报*, 1999, 20(1):4-7.
- [29] 田亚南, 柯穗, 李韬, 等. 应用电镜与 PCR 技术检测瑯溪蜜柚黄龙病病原[J]. *植物病理学报*, 2000, 30(1):76-81.
- [30] IFTIKHAR Y, RAUF S, SHAHZAD U, et al. Huanglongbing: pathogen detection system for integrated disease management-a review[J]. *J Saudi Soc Agr Sci*, 2016, 15(1):1-11.
- [31] WANG Z, YIN Y, HU H, et al. Development and application of molecular-based diagnosis for *Candidatus liberibacter asiaticus*, the causal pathogen of citrus Huanglongbing [J]. *Plant Pathol*, 2006, 55(5):630-638.
- [32] MORGAN J K, ZHOU L, LI W, et al. Improved Real-time PCR detection of ‘*Candidatus Liberibacter Asiaticus*’ from Citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic Tandem-repeats of its prophage genes[J]. *Mol Cell Probes*, 2012, 26(2):90-98.

[责任编辑 顾雪竹]