

邓晓玲, 郑永钦, 郑正, 等. 柑橘黄龙病菌基因组学的研究进展 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 137-148.  
DENG Xiaoling, ZHENG Yongqin, ZHENG Zheng, et al. Current research on genomic analysis of “*Candidatus Liberibacter spp.*” [J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(5): 137-148.

# 柑橘黄龙病菌基因组学的研究进展

邓晓玲, 郑永钦, 郑正, 许美容

(华南农业大学农学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing, HLB) 是柑橘生产上最具毁灭性的病害, 严重威胁着世界柑橘产业的发展。该病害由难培养细菌——候选韧皮部杆菌 (*Candidatus Liberibacter spp.*) 所引起, 通过带病苗木和媒介昆虫进行传播蔓延。近年来, 随着 DNA 测序技术和生物信息学的发展, 基因组学被广泛应用于柑橘黄龙病的研究, 并为克服黄龙病菌难培养所造成的研究瓶颈提供了新的方法和思路。柑橘黄龙病菌基因组学的研究, 不仅有助于探究黄龙病菌与寄主植物的互作关系, 而且可为抗病栽培和病害早期检测提供重要的理论基础。本文结合当前柑橘黄龙病的研究概况、病原全基因组的测序策略及基因组的特征描述, 重点综述基因组学在黄龙病致病机理、病原遗传多样性与分子检测等方面的研究进展。

**关键词:** 柑橘黄龙病; 候选韧皮部杆菌; 基因组学; 致病机制; 遗传多样性; 分子检测

中图分类号: S436.66

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)05-0137-12

## Current research on genomic analysis of “*Candidatus Liberibacter spp.*”

DENG Xiaoling, ZHENG Yongqin, ZHENG Zheng, XU Meirong

(College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Citrus Huanglongbing (HLB), the highly destructive disease which has been threatening citrus production worldwide, is caused by the yet unculturable bacteria, “*Candidatus Liberibacter spp.*”. HLB can be spread with insect vector and contaminated seedlings. In recent years, with the rapid development of DNA sequencing technology and bioinformatics, genomic analysis had become widely used for HLB research, and had provided the new strategies to overcome the research bottleneck caused by difficulties in bacterial culture. The genomic analysis of “*Candidatus Liberibacter spp.*” not only helps to explore the interaction between “*Candidatus Liberibacter spp.*” and host plant, but also provides an important theoretical basis for resistance cultivation and early detection of HLB. This review summarizes the research progress in citrus HLB and describes the current sequencing strategy and genomic characterization of “*Candidatus Liberibacter spp.*”, with an emphasis on the research progress in genomic analysis of pathogenic mechanism, genetic diversity and molecular detection of “*Candidatus Liberibacter spp.*”.

**Key words:** citrus Huanglongbing; “*Candidatus Liberibacter spp.*”; genomics; pathogenic mechanism; genetic diversity; molecular detection

柑橘黄龙病是柑橘生产上最具毁灭性的病害, 在柑橘生长的各个时期均可造成危害, 引起柑橘植

株新梢黄化、叶片斑驳、果实无法正常成熟、树势逐渐衰弱直至死亡等症<sup>[1-2]</sup>。柑橘黄龙病主要通过带

收稿日期: 2019-05-31 网络首发时间: 2019-07-24 14:34:51

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20190724.1046.008.html>

作者简介: 邓晓玲 (1966—), 女, 教授, 博士, E-mail: [xldeng@scau.edu.cn](mailto:xldeng@scau.edu.cn)

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0201506); 现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-26)

病苗木和柑橘木虱 *Diaphorina citri* 进行传播蔓延。目前柑橘黄龙病已经在 50 多个国家和地区发生危害,并造成了巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。在我国随着柑橘产业的不断扩大,黄龙病呈现出老病区为害日益加重,新病区不断蔓延的态势。虽然黄龙病病原目前还无法人工培养,不能进一步完成柯赫式法则,但目前的大量研究表明,柑橘黄龙病是由候选韧皮部杆菌“*Candidatus Liberibacter spp.*”引起的<sup>[4-5]</sup>。由于黄龙病菌尚未能进行人工培养,很难从形态学、生物学、病原学等方面对黄龙病菌进行深入研究。随着 DNA 测序技术的不断发展,尤其是新一代测序技术的逐渐成熟,基因组学为柑橘黄龙病菌的研究提供了新的方法和思路。全基因组提供了一些与病原生物学特性、致病性等方面相关的基因信息,为研究植物病原细菌的新陈代谢、基因功能等提供依据。前期研究表明,黄龙病菌在感病植株体内浓度较低且分布不均匀,导致较难获得高质量的病原 DNA<sup>[6]</sup>。因此,高浓度病原材料的获取成为得到高质量黄龙病基因组序列的前提。本文将从柑橘黄龙病的研究概况、黄龙病菌全基因组测序策略、基因组的特征描述以及病原基因组学的应用等方面进行系统综述。

## 1 柑橘黄龙病的研究概况

早在 19 世纪初,Reinking<sup>[7]</sup> 在调查广东珠三角作物病虫害时就发现了柑橘上类似黄龙病典型的斑驳、黄化症状,人们普遍以此作为柑橘黄龙病在我国最早记录的证据。此外,在东南亚的部分国家(如:菲律宾、印度、泰国、印度尼西亚等)以及南非等国先后发现了柑橘黄龙病<sup>[2]</sup>,但是不同地区对该病的命名并不一致,如在我国大陆称为黄龙病或黄梢病 (Yellow shoot disease)<sup>[1,8]</sup>,在台湾称为立枯病 (Likubing),在印度尼西亚称之为叶脉韧皮部恶化病 (Vein phloem degeneration),在菲律宾称之为叶斑病 (Leaf mottle),在印度称之为梢枯病 (Dieback),在南非则称之为青果病 (Citrus greening)。鉴于我国林孔湘教授在柑橘黄龙病研究所做的卓越贡献,1995 年在第 13 届国际柑橘病毒学家会议上,与会学者一致同意将其提出的柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing, HLB) 作为该病害的正式学名。

柑橘黄龙病菌可侵染几乎所有柑橘属的栽培品种,在柑橘生长的各个时期,从几个月的苗木至数十年的老树均能感染。黄龙病典型症状包括新梢黄化、叶片斑驳、“红鼻子果”等,其症状受寄主的树龄、品种及环境因素影响,而且容易与缺素症状

相混淆<sup>[9]</sup>。PCR 检测结果表明,斑驳型黄化、“红鼻子果”等症状的黄龙病菌阳性检测率较高<sup>[10]</sup>。另外,利用草地菟丝子 *Cuscuta campestris* 可将黄龙病菌从柑橘植株传至草本寄主长春花 *Catharanthus roseus*,并在菟丝子和长春花植株体内进行大量增殖<sup>[11-12]</sup>。因此,菟丝子及长春花适宜作为黄龙病菌的研究材料。

柑橘黄龙病病原的认识经历了非常曲折复杂的过程,曾被认为是由水害、缺素或镰刀菌引起<sup>[1-2]</sup>。直到 1956 年林孔湘<sup>[1]</sup> 通过病芽嫁接试验,证明了该病可通过接种传染,确定柑橘黄龙病是一种传染性病害。但由于当时认识水平有限,曾认为该病原是由病毒引起<sup>[2]</sup>。随着电子显微技术的发展,多个国家的研究者在感染黄龙病植株的筛管组织内观察到类菌原体 (Mycoplasma-like organism, MLOs),并认为类菌原体与黄龙病相关<sup>[2,13]</sup>。Bové 等<sup>[14]</sup> 通过青霉素处理能够抑制病树发病,推测该病原为细菌。Garnier 等<sup>[15]</sup> 发现该病原不能通过 25 nm 口径的滤膜,并发现在细胞质膜外可能还存在有一层细胞壁,提出该病原可能属于革兰阴性菌。

随着 PCR 与 DNA 测序技术的发展,分子检测技术逐渐应用于黄龙病的研究。Jagoueix 等<sup>[4]</sup> 通过细菌的 16S rRNA 基因通用引物扩增柑橘黄龙病菌亚洲种和非洲种的 16S rRNA 基因片段,对克隆片段进行测序,并与 GenBank 数据库进行比对,证实了黄龙病菌归属于原核生物门 Proteobacter  $\alpha$  变形菌纲 Alphaproteobacteriaceae 根瘤菌目 Rhizobiales 根瘤菌科 Rhizobiaceae 的候选韧皮部杆菌属 *Candidatus Liberibacter spp.*。根据病原菌的分布、对热的敏感性、传播媒介的种类以及 16S rDNA 序列的特异性,将柑橘黄龙病菌分为 3 个种,包括:亚洲种 (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, CLAs)、非洲种 (“*Candidatus Liberibacter africanus*”, CLaf) 以及美洲种 (“*Candidatus Liberibacter americanus*”, CLam)<sup>[3]</sup>。亚洲种目前分布最广、为害最严重,分布的范围包括了亚洲、南美洲以及北美洲的国家和地区,非洲种主要分布在南非等一些非洲国家,美洲种则主要在巴西<sup>[3]</sup>。邓晓玲等<sup>[16]</sup> 和田亚南等<sup>[17]</sup> 通过对我国柑橘黄龙病样品进行 16S rRNA 基因的扩增以及测序分析,证实了我国柑橘黄龙病菌均属于亚洲种。

## 2 柑橘黄龙病菌全基因组的测序策略

与可分离培养的微生物不同,黄龙病菌在进行基因组测序时所用的 DNA 样本混杂大量寄主

DNA, 导致测序得到的数据中含有大量的寄主序列, 增加了序列拼接和获得高质量黄龙病菌基因组的难度。综合目前已发表黄龙病菌基因组的测序策略, 主要可分为以下 3 步: 高浓度黄龙病菌材料的获取; 高通量测序; 黄龙病菌全基因组的拼接。

### 2.1 高浓度黄龙病菌材料的获取

根据 NCBI Genome 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>), 截至 2019 年 4 月已完成测序的黄龙病菌株共有 18 个 (表 1), 其中 8 个为完整基因组水平, 10 个为不完整的 Contig 水平。

表 1 柑橘黄龙病菌基因组的基本信息<sup>1)</sup>

Table 1 Basic information of sequenced *Candidatus Liberibacter* genomes

编号 <sup>2)</sup> No.	年份 Year	菌株 Strain	寄主 Host	来源地区 Original region	基因组大小/Mb Genome size	基因组完整性 genome	GC含量/% GC content	预测基因数 <sup>3)</sup> Number of predicted genes	测序深度 Coverage
1	2009	psy62 <sup>[18]</sup>	柑橘木虱	美国佛罗里达州	1.23	完整	36.5	1 186	16 x
2	2013	Gxpsy <sup>[19]</sup>	柑橘木虱	中国广西	1.27	完整	36.5	1 141	50~80 x
3	2014	A4 <sup>[20]</sup>	柑橘	中国广东	1.21	完整	36.4	1 122	138 x
4	2014	HHCA <sup>[21]</sup>	柠檬	美国加州	1.15	不完整	36.5	1 131	6 x
5	2014	Ishi-1 <sup>[22]</sup>	未确定	日本	1.19	完整	36.3	1 078	300 x
6	2015	FL17 <sup>[23]</sup>	未确定	美国佛罗里达州	1.23	不完整	36.5	1 116	50 x
7	2015	YCPsy <sup>[24]</sup>	柑橘木虱	中国广东	1.23	不完整	36.5	1 125	1 120 x
8	2015	SGCA5 <sup>[25]</sup>	橘树	美国加州	1.20	不完整	36.4	1 114	12 x
9	2017	TX2351 <sup>[26]</sup>	柑橘木虱	美国德克萨斯州	1.25	不完整	36.5	1 184	7 x
10	2017	JXGC <sup>[27]</sup>	未确定	中国江西	1.23	完整	36.4	1 120	95 x
11	2018	AHCA1 <sup>[28]</sup>	柑橘木虱	美国加州	1.23	完整	36.6	1 112	69 x
12	2018	SGCA1 <sup>[28]</sup>	橘树	美国加州	0.23	不完整	36.3	506	1 x
13	2018	TX1712 <sup>[29]</sup>	橙	美国德克萨斯州	1.20	不完整	36.4	NF	10 x
14	2018	SGpsy <sup>[28]</sup>	柑橘木虱	美国加州	0.77	不完整	36.3	NF	2 x
15	2018	YNJS7C <sup>[30]</sup>	未确定	中国云南	1.26	不完整	36.6	1 158	15 x
16	2013	PW_SP <sup>[31]</sup>	长春花	巴西圣保罗	1.18	不完整	31.1	1 006	18.6 x
17	2014	São Paulo <sup>[32]</sup>	长春花	巴西圣保罗	1.20	完整	31.1	1 028	>100 x
18	2015	PTSAPSY <sup>[33]</sup>	南非木虱	南非比勒陀利亚	1.19	完整	34.5	1 103	60~80 x

1) 信息收集时间为2019-04-11; 2) 1~15为亚洲种, 16、17为美洲种, 18为非洲种; 3) NF表示NCBI基因组数据库未提供

1) Information was collected at 11th, April 2019; 2) 1-15: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, 16, 17: “*Candidatus Liberibacter americanus*”, 18: “*Candidatus Liberibacter africanus*”, 3) NF represents none information found in NCBI genome database

用于测序的样本材料按寄主类型可分为植物材料和柑橘木虱材料, 其中最早完成测序的是来自佛罗里达柑橘木虱的 Psy62 菌株<sup>[18]</sup>, 同样为柑橘木虱来源的菌株有 gxpsy、PTSAPSY、Ishi-1、TX2351 和 SGpsy。而植物寄主来源包括来源于长春花寄主的 A4、São Paulo 和 PW\_SP 菌株及来源于柑橘寄主的 HHCA、FL17、SGCA5、JXGC、AHCA1、SGCA1、TX1712 和 YNJS7C 菌株。目前已发表基因组中黄龙病菌的测序深度 (Coverage) 最高的为柑橘木虱来源的 YCPsy 菌株 (1 120 x), 且第 1 个完成测序的 Psy62 菌株同样来源于含有高浓度病原的柑橘木虱样品, 说明黄龙病菌能在柑橘木虱体内大量富集, 因此可得到含有较高病菌浓度的总 DNA。但大量的田间数据表明, 相比于感病柑橘植株, 田间柑

橘木虱的带菌率普遍较低<sup>[34]</sup>。因此, 在适宜条件下, 可采取人工饲养柑橘木虱若虫以获取含有高浓度黄龙病菌的柑橘木虱作为基因组测序材料<sup>[35]</sup>。

植物寄主材料方面, 田间感染黄龙病的柑橘植株体内黄龙病菌分布不均匀, 且病菌浓度随季节性变化较大。通常 DNA 提取后得到的样品包含寄主植物 DNA、线粒体 DNA 以及叶绿体 DNA, 而柑橘黄龙病菌 DNA 所占的比例较低<sup>[6]</sup>。因此, 为获得含有高浓度黄龙病菌的植物寄主材料, 可通过适当的方法对黄龙病菌进行富集。草地菟丝子和长春花是黄龙病菌富集最常用的 2 种寄主材料。早期的研究发现通过草地菟丝子可成功将柑橘黄龙病菌从柑橘传至长春花<sup>[11-12]</sup>, 且黄龙病菌能在长春花上进行一定程度的富集<sup>[11]</sup>。目前已发表的基因组中, 亚洲

种 A4 菌株、美洲种 São Paulo 和 PW\_SP 菌株均为经长春花富集后测序得到。此外, Zhang 等<sup>[36]</sup> 通过从含有 CLas 的菟丝子材料进行测序得到了 CLas UF506 菌株, 并报道了和 CLas 相关的 2 种噬菌体: SC1 和 SC2。

在保证测序深度和准确度的前提下, 黄龙病菌的浓度越高, 测序得到的黄龙病菌的序列也越多, 拼接得到的基因组质量越高。但部分样品由于其特殊性, 未能通过媒介植物或媒介昆虫的途径进行富集。HHCA 菌株和 SGCA5 菌株分别来自加州 2012 和 2015 年发现的黄龙病病树, 上述病树第一时间确诊为黄龙病后已被挖除, 无法通过媒介介导对其病原进行富集。针对上述类似的特殊样品, Zheng 等<sup>[20]</sup> 提出通过微生物 DNA 富集与放大相结合的策略来提高总 DNA 中黄龙病菌 DNA 的比例, 从而提高测序结果中黄龙病菌序列的比例。但该方法仅能除去部分含有甲基化的寄主 DNA, 而无法去除无甲基化的寄主 DNA 及叶绿体和线粒体 DNA<sup>[37]</sup>。

## 2.2 高通量测序

用于获得黄龙病菌基因组序列的测序方法随着该领域技术的发展而更新。最早完成测序的 CLas Psy62 菌株和 CLam São Paulo 菌株采用 454 焦磷酸测序。随着测序技术的不断发展, 测序的深度和准确性不断提高。随后黄龙病菌菌株的测序则主要以 Illumina HiSeq 和 MiSeq 测序平台为主, 包括 Illumina HiSeq 2000 (gxpsy、PW\_SP、Ishi-1、PTSAPSY、AHCA1)、Illumina Hiseq X Ten(JXGC、YNJS7C) 和 Illumina MiSeq(A4、HHCA、FL17、YCPsy、SGCA5、SGCA1、SGpsy、TX2351、TX1712)。

## 2.3 柑橘黄龙病菌全基因组的拼接与验证

柑橘黄龙病样本测序得到的数据大部分是寄主 DNA 序列, 仅有部分为黄龙病菌的 DNA 序列, 使得基因组拼接存在一定的难度和局限性。目前在黄龙病菌基因组序列拼接上最常用的 2 种方法是基于参考基因组的拼接 (Reference-based mapping assembly) 和从头拼接 (*de novo* assembly)。已发表的黄龙病菌基因组序列大部分是通过短片段文库 (150~300 bp) 的二代测序 (454/Illumina) 结合以首次发表的 Psy62 菌株基因组为参考基因组进行 Mapping 拼接得到, 如 A4、Ishi-1、gxpsy 等。但作为参考基因组的 Psy62 菌株来源于美国柑橘木虱样品, 与我国的黄龙病菌存在一定差异<sup>[38]</sup>, 会影响序列拼接的准确性, 也限制了发现新序列的可能性。

因此, 不依赖于参考基因组的从头拼接也成为了黄龙病菌基因组拼接常用的方法。通过从头拼接的方法, Zheng 等<sup>[27]</sup> 来自我国江西的 JXGC 菌株中鉴定出了 1 种与 CLas 相关的第 3 种类型 (Type III) 原噬菌体, 与先前报道的 SC1 和 SC2 原噬菌体存在一定的差异。但由于黄龙病菌目前还无法分离培养, 在从头拼接的过程中, 由于黄龙病菌与寄主叶绿体序列间或其他的内生微生物序列间存在部分相似性, 不同来源的序列由于相似性而拼接形成嵌合序列, 从而导致从头拼接得到的序列具有偏差。因此, 从头拼接得到的 Contig 需要进一步通过 Blast 和 PCR 结合 Sanger 测序进行验证, 以排除嵌合体 Contig 的干扰, 从而提高基因组的质量。此外, 对于部分病原浓度较低的样本, 从头拼接很难达到理想的拼接效果, 而基于参考基因组的拼接方法则可尽可能从低浓度病原样本中提取出相关的序列<sup>[21]</sup>。上述 2 种拼接方法各有优缺点, 实际拼接过程应当根据样本具体情况选择合适方法进行拼接, 目前针对黄龙病菌序列拼接策略更多的是结合从头拼接和基于参考基因组的拼接方法进行互补, 从而得到最终的基因组序列。

在黄龙病基因组拼接软件使用方面, 常用的从头拼接组装软件包括 Velvet(Guangxi-1、PW\_SP、PTSAPSY)、Newbler(São Paulo)、CLC Genomics Workbench(A4) 和 Bowtie(SGCA5), 菌株 HHCA reads 通过 Velvet<sup>[39]</sup> 和 CLC Genomics Workbench 软件同时分析, 菌株 YCPsy reads 采用 Velvet 和 Bowtie<sup>[40]</sup> 组装, 菌株 Ishi-1 reads 通过 BWA<sup>[41]</sup> 和 Bowtie 软件组装。针对黄龙病菌基因组的拼接, 目前暂没有系统的研究表明通过软件的选择可以进一步提高黄龙病菌基因组拼接的质量。因此, 提高黄龙病菌基因组的质量, 最重要的是要选择含有高浓度病原或含有高比例病原 DNA 的样本进行测序。

## 3 柑橘黄龙病菌基因组的特征描述

### 3.1 黄龙病菌基因组的生物学信息

黄龙病菌基因组大小约为 1.26 Mb, GC 含量约为 36.5%。Duan 等<sup>[18]</sup> 通过全基因组序列分析发现, 相比于根瘤菌目下的其他细菌, 柑橘黄龙病菌的基因组严重减小。这种短小的基因组很可能与黄龙病菌所处的细胞内生存环境有关<sup>[42]</sup>。同时, 其他植物病原细菌常见的许多致病基因 (如 Type III 分泌系统) 也还未在黄龙病菌基因组中发现。

基因组注释结果表明柑橘黄龙病菌基因组中

约含有 1 233 个蛋白,分析发现柑橘黄龙病菌缺乏编码毒素或特殊分泌系统的基因。柑橘黄龙病菌基因组中还缺乏编码某些重要氨基酸的基因,比如组氨酸、色氨酸、硫胺素、苯丙氨酸和酪氨酸等,因此必须从寄主细胞中获取,加重了寄主的负担<sup>[18]</sup>。基因组序列分析还发现柑橘黄龙病菌缺乏 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡糖酸(KDPG)裂解途径,推测糖酵解可能是柑橘黄龙病菌的主要代谢途径。柑橘黄龙病菌能够利用葡萄糖、果糖、木酮糖,但无法分解利用甘露糖、半乳糖、鼠李糖、纤维素等糖类物质<sup>[18,43]</sup>。除了葡萄糖-6-磷酸异构酶,柑橘黄龙病菌基因组含有一套相对完整的糖酵解途径相关酶,但缺乏葡萄糖磷酸转移酶系统。

基因功能预测还表明,柑橘黄龙病菌基因组含有一套完整的三羧酸循环(TCA)所需的酶,但是缺乏用于直接形成丙酮酸的酶,如丝氨酸脱水酶、丙氨酸消旋酶和丙氨酸脱氢酶。推测柑橘黄龙病菌通过葡萄糖和 TCA 中间体转化成丙酮酸,进而为柑橘黄龙病菌的生存提供绝大部分的丙酮酸。同时,基因组还缺乏乙醛酸循环所需的酶,如异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶,这表明柑橘黄龙病菌不能在乙酸盐或脂肪酸环境生长。根据柑橘黄龙病菌碳水化合物代谢循环途径可以看出柑橘黄龙病菌可以通过使用外源的延胡索酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐和天冬氨酸盐用于 TCA 循环和丙酮酸生成的碳底物和能源。同时,柑橘黄龙病菌基因组还发现了 C4 二羧酸转运蛋白基因,进一步证实了上述的推测<sup>[43]</sup>。

基因组的分析还表明,柑橘黄龙病菌存在能够在微需氧生长条件下将电子从还原底物转移至氧的呼吸链。柑橘黄龙病菌可以使用苹果酸盐、延胡索酸盐、琥珀酸盐、天冬氨酸盐和谷氨酸盐作为碳源,主要是因为利用这些化合物的酶在柑橘黄龙病菌基因组中均存在<sup>[43]</sup>。此外,在柑橘黄龙病菌基因组中还存在 1 个重要的参与有氧呼吸的化合物——NADH 脱氢酶复合物的基因,但是缺乏用于甲基萘醌类化合物和辅酶 Q 生物合成的基因。因此,柑橘黄龙病菌要实现呼吸链的功能,可能需要使用外源醌<sup>[43]</sup>。由于柑橘黄龙病菌基因组缺乏硝酸盐、硫酸盐、延胡索酸盐和三甲胺还原酶系统,柑橘黄龙病菌可能无法在厌氧条件下生存<sup>[18,43]</sup>。Duan 等<sup>[18]</sup>推测柑橘黄龙病菌可能存在厌氧呼吸的情况,因为柑橘黄龙病菌基因组存在参与氮代谢的相关酶,如 NAD<sup>+</sup>合酶、谷氨酰胺合成酶和谷氨酰胺酶。但是,在涉及氮代谢的酶和厌氧呼吸链的电子受体之间

存在明显的区别,在厌氧情况下,并未发现任何电子受体使用氮,特别是硝酸盐或亚硝酸盐还原酶,在没有这些电子受体的情况下,很难使呼吸链与氮化合物的还原相结合。此外,其他 2 种同样感染植物韧皮部的微生物,螺原体 *Spiroplasma citri* 和沙雷氏菌 *Serratia marcescens*,两者都是兼性厌氧细菌,只有在有氧存在时才能通过有氧呼吸产生 ATP<sup>[44-45]</sup>。另外,有研究表明韧皮部中确实存在氧,虽然韧皮部中的氧含量低于大气中的氧含量,但足够柑橘黄龙病菌进行有氧呼吸<sup>[46]</sup>。

### 3.2 柑橘黄龙病菌相关原噬菌体的研究

柑橘黄龙病菌基因组结构的分析表明,该基因组由保守的染色体区域序列和高变异的原噬菌体序列组成,而原噬菌体区域的变异主要表现为噬菌体类型的差异<sup>[27,36]</sup>。Villechanoux 等<sup>[47]</sup>首次鉴定了柑橘黄龙病菌相关的一段噬菌体 DNA 序列,柑橘黄龙病菌全基因组序列公布后,又进一步揭示了基因组中相关噬菌体的信息。Duan 等<sup>[18]</sup>在首次报道的柑橘黄龙病菌株 Psy62 基因组鉴定了 1 个与噬菌体相关的区域,含有 12 个原噬菌体相关的基因。随后 Zhou 等<sup>[48]</sup>进一步证实了 Psy62 菌株含有 2 个柑橘黄龙病菌相关的原噬菌体 FP1 和 FP2。Zhang 等<sup>[36]</sup>通过电子显微镜观察到感染 CLas 的长春花韧皮部中的噬菌体粒子,并通过鸟枪法测序和 fosmid DNA 文库构建测序,成功获得了佛罗里达柑橘黄龙病菌株 UF506 的基因组,并在该菌株中鉴定了 2 个环状噬菌体基因组,SC1(Type I 类型)和 SC2(Type II 类型),其中 SC1 参与噬菌体的裂解循环,SC2 参与溶原转化。基因功能注释发现在 SC1 和 SC2 中含有编码多个毒力因子的基因,这些基因的存在可能增加了柑橘黄龙病菌的致病性。SC1 和 SC2 可编码过氧化物酶,用于抵御寄主植物产生的超氧游离基、过氧化氢和羟基自由基。同时,SC1 和 SC2 还可编码黏附素,黏附素可能会促进柑橘木虱对柑橘黄龙病菌的传播<sup>[36]</sup>。随后报道的来自不同地区和寄主的柑橘黄龙病菌基因组序列中也先后发现了原噬菌体区域以及相关的噬菌体基因<sup>[19-21,23-25]</sup>。

除致病相关基因外,在黄龙病菌相关原噬菌体序列上还发现多个与噬菌体互作相关的位点,如 CRISPR/Cas 系统和限制-修饰(Restriction-modification, RM)系统。Zheng 等<sup>[49]</sup>通过分析广东菌株 A4 基因组,发现在 A4 菌株的原噬菌体区域存在 CRISPR 位点。同时通过比对分析 CRISPR 位点附近基因的序列与基因注释信息,发现候选 CRISPR 位点附近具有多个与 DNA 和 RNA 进程相关功能

的 *cas* 基因, 表明 A4 菌株的原噬菌体区域携带具有结构和功能完整的 CRISPR/Cas 系统。进一步比对发现, 在不同的柑橘黄龙病菌株中都含有 CRISPR/Cas 系统, 而且 CRISPR 位点上的 Spacer1 和 Spacer3 序列基本一样, 最大的变异区域是 Spacer2 序列。携带不同原噬菌体类型的柑橘黄龙病菌株具有各自特异的 Spacer2 序列。因此, Zheng 等<sup>[49]</sup> 结合我国南方柑橘黄龙病菌株中单个类型噬菌体占优势的结果, 推测在 1 个柑橘黄龙病菌寄主细胞中, 2 种类型的噬菌体可能存在竞争关系, 已经整合至黄龙病基因组的原噬菌体可能利用该 CRISPR/Cas 系统抵御另一种类型的噬菌体。此外, Zheng 等<sup>[27]</sup> 通过测序不含有 Type I 和 Type II 类型原噬菌体的 JXGC 菌株, 发现在 JXGC 菌株中存在一段新的环形序列, 经序列比对鉴定为 1 种新的原噬菌体 P-JXGC-3 (Type III 类型), 与已报道的 2 类原噬菌体 (SC1 和 SC2) 序列存在较大的差异。Type III 类型原噬菌体 P-JXGC-3 除了和 SC1/SC2 原噬菌体约有 50% 的序列相似外, 在 P-JXGC-3 原噬菌体序列上还携带有一个完整 RM 系统。RM 系统的功能是细菌用来抵御外源噬菌体侵染, 推测 P-JXGC-3 的主要功能可能是协助黄龙病菌抵御外来噬菌体的侵染。

## 4 柑橘黄龙病菌基因组学的应用

### 4.1 黄龙病菌致病相关基因的功能分析

柑橘黄龙病菌能感染几乎所有的芸香科柑橘属植物, 引起叶片斑驳黄化、果实畸形、树势衰弱、产量下降等。相比于其他的植物病原细菌, 黄龙病菌的基因组相对较小, 而且尚未发现许多常见的在其他植物病原细菌上存在的致病基因<sup>[18]</sup>。通过对基因组 381 个可能的致病基因在感病柑橘和带菌的柑橘木虱样本进行表达, 比较分析后, 发现 182 个基因在感病柑橘中的表达水平要显著高于柑橘木虱中的表达水平, 这些基因涉及的功能有转录调控、转运系统、分泌系统、鞭毛合成、抗压等, 推测这些基因很可能和黄龙病菌对寄主植物的致病性相关<sup>[50]</sup>。

大量的研究表明, 植物病原细菌通过分泌系统产生一些致病因子, 从而使寄主发病显症<sup>[51]</sup>。有研究通过分析基因组的分泌系统和效应子试图揭示黄龙病菌的致病机制, 黄龙病菌含有 Type I 类型的分泌系统和一个完整的 Sec 分泌系统<sup>[18, 52]</sup>, 但缺少其他常见的细菌分泌系统, 如 III 型分泌系统。Prasad 等<sup>[52]</sup> 通过基因组分析发现在 CLas 的所有蛋白中共预测到 166 个分泌蛋白含有末端信号肽 (其中 86

个分泌蛋白经过验证), 表明这些蛋白可通过 Sec 分泌系统作用于寄主, 推测可能是与黄龙病菌致病相关的效应子蛋白。基于上述研究, Clark 等<sup>[53]</sup> 通过选取 CLas 基因组保守的分泌蛋白 SDE1 作为分子探针, 研究发现 SDE1 可直接与柑橘类木瓜蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶相互作用 (PLCPs) 并抑制蛋白酶活性。PLCPs 蛋白是病菌诱导型蛋白, 在黄龙病感染的柑橘植株内积累多, 表明其在柑橘防御反应中起一定作用。而黄龙病菌的 SDE1 蛋白则通过抑制柑橘防御免疫相关蛋白酶 PLCPs 的活性, 从而达到感染的目的。此外, Pitino 等<sup>[54]</sup> 通过在烟草中瞬时表达 16 个黄龙病菌效应子, 发现其中 Las5315 mp 的效应子 (与 SDE1 为同一效应子) 可定位于植物寄主的叶绿体, 诱导植株淀粉积累、叶片黄化和细胞死亡。

除效应子外, 黄龙病菌细胞上的鞭毛蛋白和肽聚糖相关蛋白等也可能具有一定的致病性。Zou 等<sup>[55]</sup> 通过 Psy62 基因组与其他近缘细菌进行全基因组比较发现, Psy62 菌株的基因组含有一套完整的鞭毛合成基因系统。随后 Zou 等<sup>[55]</sup> 筛选了其中一个鞭毛蛋白 (*fla*) 进行功能验证, 发现 *fla* 鞭毛蛋白具有类似病原体相关模式分子 (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 活性, 能诱导本生烟草 *Nicotiana benthamiana* 产生过敏性坏死反应。然而形态学研究并未观察到 CLas 细胞携带有鞭毛结构<sup>[56]</sup>。通过 Gateway 技术发现黄龙病菌细胞外膜的肽聚糖相关脂蛋白 (*Pal*) 基因可引起植物寄主的过敏性坏死反应, 而外膜蛋白 *Mot* 基因及溶血素 *Hly* 基因无明显致病效应<sup>[57]</sup>。除细菌外膜直接与寄主接触外, 黄龙病菌可编码多个 ATP-binding cassette (ABC) 转运体, 其中 Zn 转运体与 Zn 高度亲和并将其摄入细胞内, 与植物缺“锌”症状有关, 且研究表明 Zn 转运体基因在感病叶片和根中均表达上调<sup>[58]</sup>。

此外, 噬菌体可通过将自身 DNA 注射入细菌细胞, 并整合至细菌基因组成为原噬菌体, 从而使细菌获得噬菌体基因组上的致病基因。Fleites 等<sup>[59]</sup> 通过将黄龙病菌原噬菌体上的 *Holin* 基因 (*SCI\_gp110*) 和 2 个细胞内溶素基因 (*SCI\_gp035* 和 *CLIBASIA\_04790*) 分别在大肠埃希菌和 *Liberibacter crescens* 菌株 BT-1 上表达分析, 发现上述 3 个基因在一定程度上抑制了大肠埃希菌和 *L. crescens* 的生长和媒介昆虫的取食等, 进一步推测出柑橘黄龙病菌基因组原噬菌体可能具有限制柑橘黄龙病菌生长和寄主范围的潜在功能。Jain 等<sup>[60]</sup> 通过分析黄龙病菌原噬菌体上 1 个超氧化物

酶基因 *SC2\_gp095* 在不同寄主中的表达情况发现,在长春花中其表达量高于柑橘寄主,而在柑橘木虱中却被抑制表达。通过在大肠埃希菌和 *L. crescens* 系统中研究该基因功能发现含有基因 *SC2\_gp095* 的细菌对过氧化氢的抗性能提高 20%~25%。同时通过在植物中进行瞬时表达发现该基因严重抑制了寄主植物介导过氧化氢防御信号中关键基因的表达,进而引起症状的延缓表现,进一步解释了柑橘黄龙病菌从侵染柑橘到出现症状有时存在很长潜伏期的原因。

#### 4.2 黄龙病菌基因组遗传多样性的研究

早期柑橘黄龙病菌多样性的研究通过使用单克隆抗体来进行,通过制备用于直接检测柑橘黄龙病菌的单克隆抗体,对采自不同地区的样品进行检测,结果发现,并不是所有的样品都能被检测到,说明部分柑橘黄龙病菌样品发生了变异<sup>[61-62]</sup>。

分子生物学的发展与应用推动了柑橘黄龙病菌遗传多样性的研究。早期用于黄龙病菌多样性分析的基因主要是基于保守的基因序列,如 *rrs*、*rpl*、*omp*、*rpoB* 以及 16S rDNA 序列等<sup>[63-72]</sup>,分析保守基因在不同来源菌株内的序列变异。基于 16S rDNA 序列和 *omp* 基因的 SNPs 分析,相比于印度西部地区的柑橘黄龙病菌株,来自印度东北地区的柑橘黄龙病菌株和来自日本、台湾以及越南的柑橘黄龙病菌株更相近<sup>[72]</sup>。Tomimura 等<sup>[69]</sup>对来自日本的 65 个柑橘黄龙病菌株通过双重 PCR 同时扩增柑橘黄龙病菌基因组的 DNA pol 和 *nus-rplL* 操纵子区域,结果发现这些日本菌株至少含有 2 种不同的基因型。

自柑橘黄龙病菌全基因组发表之后,越来越多的变异位点被用于柑橘黄龙病菌的种群多样性分析,其中包括短串联重复序列、转座子位点以及高变异的噬菌体/原噬菌体区域。Chen 等<sup>[38]</sup>鉴定了柑橘黄龙病菌基因组的一个含有短串联重复序列的噬菌体阻遏蛋白,并通过分析重复数量的变化,区分了中国柑橘黄龙病菌和佛罗里达柑橘黄龙病菌种群。该位点还进一步被用于分析中国南方种群<sup>[73]</sup>、印度种群<sup>[74]</sup>、佛罗里达种群<sup>[75]</sup>以及巴西种群<sup>[76]</sup>的多样性。Kato 等<sup>[77-78]</sup>通过分析柑橘黄龙病菌株 Psy62 的全基因组,鉴定了 27 个简单重复位点 (Simple single repeats, SSRs),并分析了这 27 个位点在不同菌株间的多样性,发现不同地区的菌株分组和它们各自的来源区域相关。许美容等<sup>[79]</sup>通过对黄龙病全基因组的短串联重复序列进行系统分析,结合中国的黄龙病样本筛选了 33 个高变异的 SSR 位点,其中 20 个变异较大的位点可作为分析不同地区黄

龙病菌株间遗传多样性的候选位点。Wang 等<sup>[80]</sup>分析了柑橘黄龙病菌基因组 1 个高变异的位点,并分析了该位点在 262 个柑橘黄龙病菌样品间的变异情况,总共得到 8 种 PCR 扩增电泳结果,其中来自中国的菌株主要是 E-types A 和 B,而 E-type G 则主要在佛罗里达发现。

原噬菌体作为细菌基因组一个高变异的区域,主要是因其能通过溶原和溶菌循环将自身 DNA 序列不断整合到宿主细菌基因组,并随着寄主 DNA 复制而复制<sup>[81]</sup>。由于噬菌体序列的高度变异性,不同地区的柑橘黄龙病菌株中含有的噬菌体区域也会存在较大的变异。Zhou 等<sup>[48]</sup>利用原噬菌体区域中一个高度变异的串联重复序列分析了来自不同国家柑橘黄龙病菌株的多样性,不同菌株间在该位点上的每个重复单元序列具有一定的保守性但是重复数量却有着很大的变异。通过该高变异的位点的多样性分析不仅能区分不同地区来源的柑橘黄龙病菌株,而且也可区分同一地区的不同样品。同时,Puttamuk 等<sup>[82]</sup>利用同一个高变异位点对采自泰国的柑橘黄龙病菌种群进行了多样性分析,区分了泰国不同地区的菌株。Liu 等<sup>[83]</sup>通过分析原噬菌体的末端酶基因的遗传变异,发现与广东柑橘黄龙病菌种群相比,我国云南柑橘黄龙病菌种群具有更高的基因频率,推测这 2 个不同海拔的柑橘黄龙病菌种群产生变异可能是遗传漂移的结果。此外,根据 3 种类型原噬菌体及其相应的组合对我国南方地区的柑橘黄龙病样品进行分类,可将我国柑橘黄龙病菌株分为 3 组 I 组 (广东、江西、广西、福建)、II 组 (浙江和湖南) 以及 III 组 (云南和海南)<sup>[84]</sup>。同时,基于黄龙病菌原噬菌体类型的分析发现美国加州 2012 和 2015 年发现的黄龙病菌携带有不同类型的原噬菌体,推测这 2 个菌株可能来源不同<sup>[85]</sup>。此外,Dai 等<sup>[28]</sup>通过结合原噬菌体类型、短串联重复、微型反向重复转座元件等位点进一步分析了美国加州黄龙病菌种群的遗传多样性规律。

#### 4.3 基因组学研究提高黄龙病菌分子检测的灵敏性

黄龙病菌的基因组学研究推动了病原分子检测的发展,尤其是筛选检测靶标与早期检测优化。由于目前还没有针对黄龙病的有效药剂和抗病品种,主要的防控措施还是以严格检疫、及时处理病树、种植无病苗木及防治传播媒介昆虫为主。因而,快速准确地对柑橘黄龙病进行早期诊断和检测是尽早采取防控措施的前提。目前柑橘黄龙病常用的分子检测方法包括常规 PCR、巢式 PCR 以及实时荧光定量 PCR,而实时荧光定量 PCR 因快速、简

便、灵敏等优点成为近年来广泛用于柑橘黄龙病检测的分子技术。早期用于柑橘黄龙病分子检测的目的基因主要是一些保守的看家基因,如 16S rRNA 基因、 $\beta$ -操纵子 (*rplKAJL-rpoBC*) 和外膜蛋白基因 (*omp*)<sup>[6, 16, 86-88]</sup>。Li 等<sup>[6]</sup>通过比对亚洲种、非洲种和美洲种 16S rRNA 基因序列差异,分别设计了几种特异的实时荧光引物和探针,该系列引物目前广泛应用于柑橘黄龙病的检疫检测。

随着全基因组序列的发布,越来越多的基因位点被用作检测的靶标。Kogenaru 等<sup>[89]</sup>通过分析亚洲种全基因组序列,鉴定亚洲种特有的基因,并设计特异引物,得到 18 对可用于特异检测亚洲种的实时荧光定量 PCR 引物。

为了提高检测的灵敏性,在基因组的高拷贝基因位点设计引物也成为近年来黄龙病检测的一大研究方向。Morgan 等<sup>[90]</sup>在柑橘黄龙病菌基因组原噬菌体区域上的一段高拷贝的短串联重复序列设计实时荧光 PCR 引物 (LJ900f/LJ900r),并通过 SYBR Green I 和 TaqMan 进行病原检测,采自美国佛罗里达州的大部分样品里都表现出很高的灵敏性。但是该方法存在一定的缺陷,柑橘黄龙病菌基因组的原噬菌体存在较大变异<sup>[48]</sup>,而且有报道了不存在原噬菌体区域的柑橘黄龙病菌株<sup>[31]</sup>。Zheng 等<sup>[91]</sup>通过基于基因组高拷贝的 5 个保守基因 (*nrdB*) 设计的 RNRf/RNRr 引物,能比目前常用的其他检测引物的灵敏性高约 3 倍左右,该引物为目前黄龙病检测较为常用的引物。

## 5 展望

基因组学研究突破了黄龙病菌难培养造成的研究瓶颈,极大地推动了柑橘黄龙病的研究。近年来,柑橘黄龙病菌基因组学在病原描述、病原遗传多样性、致病机制、病原-寄主互作及分子检测靶标筛选等研究方面取得了一定的进展,但黄龙病菌不能培养的现状在一定程度上阻碍了基因组学的研究,含有高浓度的柑橘黄龙病菌 DNA 的样品依然是获得高质量基因组序列的前提。虽然有报道成功培养了黄龙病菌<sup>[92]</sup>,但试验无法重复。因此,今后在黄龙病菌基因组测序材料选择上除了要突破黄龙病菌培养的困难外,仍需要探索高浓度的病原材料,如高效的黄龙病菌富集方法。同时,也可通过选用合适的植物寄主材料进行黄龙病菌的培养,尽可能提高黄龙病菌的浓度以获取高质量的基因组序列。

纵观已报道的黄龙病菌基因组序列,均是采用

基于短片段测序文库的二代测序完成,而且绝大部分菌株基因组序列是通过以已发表的基因组(如 Psy62 等)为参考进行拼接得到,极大地限制了新序列获取的可能。短片段测序得到的 reads 长度通常为 150~300 bp,在序列拼接(从头拼接)过程中如遇到基因组的重复区域超过测序读长就很难继续,需要借助参考基因组来完成,因此很难对黄龙病菌的基因组结构进行研究。同时由于黄龙病菌基因组的 16 S rRNA 基因区域和寄主植物的叶绿体相应序列相似性较高,原本属于黄龙病菌的短片段 reads 在一定比对参数下,也可 map 到叶绿体上,反之亦然。黄龙病菌的测序可通过提高测序 reads 的长度来解决上述问题。例如,使用 Pacbio 或 Nanopore 测序平台进行长片段测序以获取黄龙病菌较长序列片段来实现重复区域的测序与基因组结构的分析。但无论选用何种测序平台,最重要的前提仍是要获取高浓度黄龙病菌材料。

从已发表的柑橘黄龙病菌基因组数量来看,远无法反映当前我国乃至世界黄龙病菌种群的特征。通过对我国不同发病地区及世界上其他黄龙病流行地区的菌株进行测序,不仅能更全面地描述不同地区黄龙病菌的基因组信息,而且通过基因组间的比较分析可进一步明确不同地区菌株的差异与共性,为研究黄龙病菌的起源、进化、变异等提供重要依据。针对不同菌株间基因组的比较分析可进一步筛选出关键的靶标基因(如与致病性和细菌生存相关的基因),用于进一步筛选药剂防治靶标及分析黄龙病菌的致病机理,为柑橘黄龙病的防控提供理论基础。

## 参考文献:

- [1] 林孔湘. 柑桔黄梢(黄龙)病研究: 病情调查[J]. 植物病理学报, 1956, 2(1): 13-42.
- [2] BOVÉ J M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus[J]. J Plant Pathol, 2006, 88(1): 7-37.
- [3] BOVÉ J M. Heat-tolerant Asian HLB meets heat-sensitive African HLB in the Arabian Peninsula! Why?[J]. J Citrus Pathol, 2014, 1(1): 1-78.
- [4] JAGOUEIX S, BOVÉ J M, GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(3): 379-386.
- [5] CHEN J C, 邓晓玲, CIVEROLO E L, 等. 柑橘黄龙病的鉴定和柯赫氏定理(英文)[J]. 植物病理学报, 2011, 41(2): 113-117.
- [6] 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 Microbiol Meth*, 2006, 66(1): 104-115.
- [7] REINKING O A. Diseases of economic plants in southern China[J]. *Philipp Agric*, 1919, 8: 109-135.
- [8] 陈其倬. 潮汕黄龙病研究报告[J]. *新农季刊*, 1943, 3(3/4): 142-177.
- [9] LEE J A, HALBERT S E, DAWSON W O, et al. Asymptomatic spread of Huanglongbing and implications for disease control[J]. *Proc Nati Acad Sci*, 2015, 112(24): 7605-7610.
- [10] 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(1): 367-373.
- [11] GARNIER M. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder[J]. *Phytopathology*, 1983, 73(10): 1358-1363.
- [12] 唐伟文, 范怀忠. 柑桔黄龙病原侵染长春花和回接成功[J]. *华南农业大学学报*, 1987, 8(4): 15-19.
- [13] 柯冲, 林先沾, 陈辉, 等. 柑桔黄龙病与类立克次体及线状病毒的研究初报[J]. *科学通报*, 1979, 24(10): 463-466.
- [14] BOVÉ J M, BONNER P, GARNIER M, et al. Penicillin and tetracycline treatments of greening disease-affected citrus plants in the glasshouse, and the bacterial nature of the prokaryote associated with greening[C]//University of California. Proceedings of 8th conference IOCV. Riverside: University of California, 1980: 91-102.
- [15] GARNIER M, DANIEL N, BOVÉ J M. The greening organism is a Gram negative bacterium[C]//University of California. Proceedings of 9th conference IOCV. Riverside: University of California, 1984: 115-124.
- [16] 邓晓玲, 唐伟文. 应用 PCR 技术检测柑桔黄龙病原的研究[J]. *华南农业大学学报*, 1996, 17(3): 119-120.
- [17] 田亚南, 柯穗, 柯冲. 应用多聚酶链式反应 (PCR) 技术检测和定量分析柑桔黄龙病病原[J]. *植物病理学报*, 1996, 26(3): 243-250.
- [18] DUAN Y, ZHOU L, HALL D G, et al. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics[J]. *Mol Plant Microbe In*, 2009, 22(8): 1011-1020.
- [19] LIN H, HAN C S, LIU B, et al. Complete genome sequence of a Chinese strain of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”[J]. *Genome Announc*, 2013, 1(2): e113-e184.
- [20] ZHENG Z, DENG X, CHEN J. Whole-genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from Guangdong, China[J]. *Genome Announc*, 2014, 2(2): e214-e273.
- [21] ZHENG Z, DENG X, CHEN J. Draft genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from California[J]. *Genome Anounc*, 2014, 2(5): e914-e999.
- [22] KATO H, MIYATA S, INOUE H, et al. Unique features of a Japanese ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ strain revealed by whole genome sequencing[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106109.
- [23] ZHENG Z, SUN X, DENG X, et al. Whole-genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from a Huanglongbing-affected citrus tree in central Florida[J]. *Genome Announc*, 2015, 3: e00169-15.
- [24] WU F, ZHENG Z, DENG X, et al. Draft genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from *Diaphorina citri* in Guangdong, China[J]. *Genome Announc*, 2015, 3(6): e1315-e1316.
- [25] WU F, KUMAGAI L, LIANG G, et al. Draft genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from a citrus tree in San Gabriel, California[J]. *Genome Announc*, 2015, 3(6): e1508-e1515.
- [26] KUNTA M, ZHENG Z, WU F, et al. Draft whole-genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strain TX2351 isolated from Asian citrus psyllids in Texas, USA[J]. *Genome Announc*, 2017, 5(15): e00170-17.
- [27] ZHENG Z, BAO M, WU F, et al. A type 3 prophage of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ carrying a restriction-modification system[J]. *Phytopathology*, 2018, 108(4): 454-461.
- [28] DAI Z, WU F, ZHENG Z, et al. Prophage diversity of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ strains in California[J]. *Phytopathology*, 2019: PHYTO-06-18-0185-R.
- [29] CAI W, YAN Z, RASCOE J, et al. Draft whole-genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” Strain TX1712 from citrus in Texas[J]. *Genome Announc*, 2018, 6(25): e00554-18.
- [30] CHEN Y, LI T, ZHENG Z, et al. Draft whole-genome sequence of a “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strain from Yunnan, China[J]. *Microbiol Resour Anounc*, 2019, 8(3): e01413-18.
- [31] LIN H, COLETTA-FILHO H D, HAN C S, et al. Draft genome sequence of “*Candidatus Liberibacter americanus*” bacterium associated with citrus Huanglongbing in Brazil[J]. *Genome Announc*, 2013, 1(3): e213-e275.
- [32] WULFF N A, ZHANG S, SETUBAL J C, et al. The complete genome sequence of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, associated with citrus Huanglongbing[J]. *Mol Plant Microbe In*, 2014, 27(2): 163-176.
- [33] LIN H, PIETERSEN G, HAN C, et al. Complete genome sequence of “*Candidatus Liberibacter africanus*”, a bacterium associated with citrus Huanglongbing[J]. *Genome Announc*, 2015, 3(4): e715-e733.
- [34] HALL D G, ALBRECHT U, BOWMAN K D. Transmission rates of ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ by Asian citrus psyllid are enhanced by the presence and developmental stage of citrus flush[J]. *J Econ Entomol*, 2016, 109(2): 558-563.
- [35] WU F, HUANG J, XU M, et al. Host and environmental factors influencing ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ acquisition in *Diaphorina citri*[J]. *Pest Manag Sci*, 2018, 74(12): 2738-2746.
- [36] ZHANG S, FLORESCRUZ Z, ZHOU L, et al. “*Ca. Liberibacter asiaticus*” carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that be-

- comes lytic in plant infections[J]. *Mol Plant Microbe In*, 2011, 24(4): 735-737.
- [37] YIGHT E, HERNANDEZ D I, TRUJILLO J T, et al. Genome and metagenome sequencing: Using the human methyl-binding domain to partition genomic DNA derived from plant tissues[J]. *Appl Plant Sci*, 2014, 2(11): 1400064.
- [38] CHEN J, DENG X, SUN X, et al. Guangdong and Florida populations of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” distinguished by a genomic locus with short tandem repeats[J]. *Phytopathology*, 2010, 100(6): 567-572.
- [39] ZERBINO D R, BIRNEY E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs[J]. *Genome Res*, 2008, 18: 821-829.
- [40] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nat methods*, 2012, 9(4): 357.
- [41] LI H, DURBIN R. Fast and accurate long-read alignment with burrows-wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26: 589-595.
- [42] HARTUNG J S, SHAO J, KUYKENDALL L D. Comparison of the “*Ca. Liberibacter asiaticus*” genome adapted for an intracellular lifestyle with other members of the Rhizobiales[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e23289.
- [43] WANG N, TRIVEDI P. Citrus Huanglongbing: A newly relevant disease presents unprecedented challenges[J]. *Phytopathology*, 2013, 103(7): 652-665.
- [44] ADAMS L, BOOPATHY R. Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of Formosan termite[J]. *Bioresour Technol*, 2005, 96(14): 1592-1598.
- [45] WILLIAMSON D L, WHITCOMB R F, TULLY J G, et al. Revised group classification of the genus *Spiroplasma*[J]. *Int J Syst Evol Micr*, 1998, 481: 1033-1039.
- [46] DONGEN J T V, SCHURR U, PFISTER M, et al. Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen[J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(4): 1529-1543.
- [47] 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-rplKAL-rpoBC* gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase[J]. *Curr Microbiol*, 1993, 26(3): 161-166.
- [48] ZHOU L, POWELL C A, HOFFMAN M T, et al. Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen and insect symbiont “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” as revealed by hypervariable prophage genes with intragenic tandem repeats[J]. *Appl Environ Microb*, 2011, 77(18): 6663-6673.
- [49] ZHENG Z, BAO M, WU F, et al. Predominance of single prophage carrying a CRISPR/Cas system in “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains in southern China[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146422.
- [50] YAN Q, SREEDHARAN A, WEI S, et al. Global gene expression changes in *Candidatus Liberibacter asiaticus* during the transmission in distinct hosts between plant and insect[J]. *Mol Plant Pathol*, 2013, 14(4): 391-404.
- [51] DODDS P N, RATHJEN J P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(8): 539.
- [52] PRASAD S, XU J, ZHANG Y, et al. SEC-translocon dependent extracytoplasmic proteins of *Candidatus Liberibacter asiaticus*[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1989.
- [53] CLARK K, FRANCO J Y, SCHWIZER S, et al. An effector from the Huanglongbing-associated pathogen targets citrus proteases[J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 1718.
- [54] PITINO M, ARMSTRONG C M, CANO L M, et al. Transient expression of *Candidatus Liberibacter asiaticus* effector induces cell death in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Front Plant Sci*, 2016(7): 982.
- [55] ZOU H, GOWDA S, ZHOU L, et al. The destructive citrus pathogen, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ encodes a functional flagellin characteristic of a pathogen-associated molecular pattern[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46447.
- [56] HARTUNG J S, PAUL C, ACHOR D, et al. Colonization of dodder, *Cuscuta indecora*, by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and ‘*Ca. L. americanus*’[J]. *Phytopathology*, 2010, 100(8): 756-762.
- [57] 钱艳杰, 刘敏, 欧阳立力, 等. 利用 Gateway 技术筛选 *Candidatus Liberibacter asiaticus* 致病相关基因研究[J]. *植物病理学报*, 2017, 47(6): 816-823.
- [58] ZHONG Y, CHENG C, JIANG N, et al. Comparative transcriptome and iTRAQ proteome analyses of citrus root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e126973.
- [59] FLEITES L A, JAIN M, ZHANG S, et al. “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” prophage late genes may limit host range and culturability[J]. *Appl Environ Microb*, 2014, 80(19): 6023-6030.
- [60] JAIN M, FLEITES L A, GABRIEL D W. Prophage-encoded peroxidase in “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” is a secreted effector that suppresses plant defenses[J]. *Mol Plant Microbe In*, 2015, 28(12): 1330-1337.
- [61] GAO S, GARNIER M, BOVC J M. Production of monoclonal antibodies recognizing most asian strains of the greening BLO by in vitro immunization with an antigenic protein purified from the BLO[C]//University of California. Proceedings of 12th conference IOCV. Riverside: University of California, 1993: 244-249.
- [62] GARNIER M, MARTINGROS G, BOVÉ J M. Monoclonal antibodies against the bacterial-like organism associated with citrus greening disease[J]. *Microbiologie*, 1987, 138(6): 639-650.
- [63] 廖晓兰, 朱水芳, 赵文军, 等. 柑橘黄龙病病原 16S rDNA 克隆、测序及实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(1): 80-85.
- [64] 冯震, 周根, 邓晓玲. 沙田柚黄龙病病原 16S rDNA 片段的克隆与序列分析[J]. *广西农业生物科学*, 2006, 25(2): 107-110.

- [65] GARNIER M, JAGOUEIX S, CRONJE P R, et al. 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*” [J]. *Int J Syst Evol Micr*, 2000, 50(6): 2119-2125.
- [66] BASTIANEL C, GARNIERSEMANCIK M, RENAUDIN J, et al. Diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” based on the *omp* gene sequence[J]. *Appl Environ Microb*, 2005, 71(11): 6473-6478.
- [67] DODDAPANENI H, LIAO H, LIN H, et al. Comparative phylogenomics and multi-gene cluster analyses of the citrus Huanglongbing (HLB)-associated bacterium *Candidatus Liberibacter*[J]. *BMC Res Notes*, 2008, 1(1): 72.
- [68] SUBANDIYAH S, NIKOH N, TSUYUMU S, et al. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea)[J]. *Zoologicalence*, 2009, 17: 983-989.
- [69] TOMIMURA K, FURUYA N, MIYATA S, et al. Distribution of two distinct genotypes of citrus greening organism in the Ryukyu Islands of Japan[J]. *Jpn Agr Res Q*, 2010, 44(2): 151-158.
- [70] FURUYA N, MATSUKURA K, TOMIMURA K, et al. Sequence homogeneity of the *ψserA-trmU-tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* gene cluster and the flanking regions of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates around Okinawa main island in Japan[J]. *J General Plant Pathol*, 2010, 76(2): 122-131.
- [71] HU W Z, WANG X F, ZHOU Y, et al. Diversity of the *omp* gene in “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in China[J]. *J Plant Pathol*, 2011, 93(1): 211-214.
- [72] MIYATA S I, KATO H, DAVIS R, et al. Asian-common strains of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” are distributed in Northeast India, Papua New Guinea and Timor-Leste[J]. *J Gen Plant Pathol*, 2011, 77(1): 43-47.
- [73] MA W, LIANG M, GUAN L, et al. Population structures of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in Southern China[J]. *Phytopathology*, 2014, 104(2): 158-62.
- [74] GHOSH D K, BHOSE S, MOTGHARE M, et al. Genetic diversity of the Indian populations of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” based on the tandem repeat variability in a genomic locus[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(8): 1043-1049.
- [75] MATOS L A, HILF M E, CHEN J, et al. Validation of variable number of tandem repeat-based approach for examination of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” diversity and its applications for the analysis of the pathogen populations in the areas of recent introduction[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): 1551-1557.
- [76] DENG X, LOPES S, WANG X, et al. Characterization of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” populations by double-locus analyses[J]. *Curr Microbiol*, 2014, 69(4): 554-560.
- [77] KATO H, SUBANDIYAH S, TOMIMURA K, et al. Differentiation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” isolates by variable-number tandem-repeat analysis[J]. *Appl Environ Microb*, 2011, 77(5): 1910-1917.
- [78] KATO H, DAVIS R, SMITH M W, et al. Differentiation of Indian, East Timorese, Papuan and Floridian “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” isolates on the basis of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism profiles at 25 loci[J]. *Ann Appl Biol*, 2012, 160(3): 291-297.
- [79] 许美容, 郑正, 李昕昱, 等. 基于短串联重复和 PAGE 的柑橘黄龙病菌‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’种间遗传多样性分析[J]. *植物病理学报*, 2014, 44(6): 609-619.
- [80] WANG X, ZHOU C, DENG X, et al. Molecular characterization of a mosaic locus in the genome of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” [J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12(1): 18.
- [81] BOYD E F, BRUSSOW H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved[J]. *Trends in Microbiol*, 2002, 10(11): 521-529.
- [82] PUTTAMUK T, ZHOU L, THAVEECHAI N, et al. Genetic diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” based on two hypervariable effector genes in Thailand[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e112968-e112968.
- [83] LIU R, ZHANG P, PU X, et al. Analysis of a prophage gene frequency revealed population variation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from two citrus-growing provinces in China[J]. *Plant Dis*, 2011, 95(4): 431-435.
- [84] 李嘉慧, 郑正, 邓晓玲. 基于原噬菌体类型的我国柑橘黄龙病菌种群遗传结构分析[J]. *植物病理学报*, 2019, 49(3): 334-342.
- [85] ZHENG Z, WU F, KUMAGAI L, et al. Two ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ strains recently found in California harbor different prophages[J]. *Phytopathology*, 2017, 107(6): 662-668.
- [86] JAGOUEIX S, BOVÉ J M, GARNIER M. PCR detection of the two ‘*Candidatus*’*Liberibacter* species associated with greening disease of citrus[J]. *Mol Cell Probes*, 1996, 10(1): 43-50.
- [87] 丁芳, 易干军, 王国平. 应用 PCR 及 Nested-PCR 技术检测柑桔黄龙病病原研究[J]. *园艺学报*, 2004, 31(6): 803-806.
- [88] 胡浩, 殷幼平, 王中康, 等. 柑橘黄龙病的常规 PCR 及荧光定量 PCR 检测[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(12): 2491-2497.
- [89] KOGENARU S, YAN Q, RIERA N, et al. Repertoire of novel sequence signatures for the detection of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” by quantitative real-time PCR[J]. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 39.
- [90] 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.
- [91] ZHENG Z, XU M, BAO M, et al. Unusual five copies

and dual forms of *nrdB* in “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”: Biological implications and PCR detection application[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 1-9.

- [92] SECHLER A, SCHUENZEL E L, COOKE P, et al. Cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’, and ‘*Ca. L. americanus*’ associated with Huanglongbing[J]. *Phytopathology*, 2009, 99(5): 480-486.

### 【责任编辑 霍 欢】



邓晓玲，博士，教授，博士生导师。1988年大学毕业后留在华南农业大学植保系任教，1993年晋升为讲师，1998年晋升为副教授，2009年晋升为教授。2004年11月起担任华南农业大学柑橘黄龙病研究室主任。

2006年9月至2007年3月、2009年8月至11月先后赴美国农业部农业研究中心开展柑橘黄龙病的合作研究，并受美国佛罗里达大学、美国动植物检验检疫局等单位的邀请进

行讲学交流，2007年被美国农业部授予“柑橘黄龙病合作研究”特别贡献奖。2008年遴选为农业部现代柑橘产业体系柑橘黄龙病岗位科学家。主要从事植物病理学的教学和科研工作，在教学方面，承担的教学课程有《普通植物病理学》《果树、蔬菜病害》《植物保护学》《植物病原细菌学》《高级植物病理学专题》和《基因工程与实用技术》，教学效果优秀，深受学生喜爱。在科研方面，对柑橘黄龙病进行深入、系统的研究，在柑橘黄龙病病原的分子检测、病原DNA的分子克隆、病原基因组学的研究、无病苗木的培育及病害综合防治等方面具有丰富的经验。主持和参与与柑橘黄龙病研究相关的课题包括：农业部公益性行业项目、国家重点研发项目、国家自然科学基金、中美合作项目基金、广东省自然科学基金、广东省科技攻关项目等。担任广东省柑橘科技协会常务理事；正式发表与柑橘病害相关的学术论文50多篇，培养研究生40多名。曾被评为华南农业大学“优秀党员”，获得华南农业大学“教书育人”奖等。