

感染黄龙病菌亚洲柑橘木虱基因表达的转录组学分析*

曾丽霞^{1,2**} 田明义¹ 吴丰年¹ 王妍晶¹ 邓晓玲¹ 岑伊静^{1***}

(1. 华南农业大学农学院, 广州 510642; 2. 广东岭南职业技术学院, 广州 510663)

摘要 【目的】了解亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 与黄龙病菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* 的分子互作机制。【方法】利用转录组 (RNA-Seq) 方法分别对携带和未携带黄龙病菌的柑橘木虱成虫进行转录组测序, 根据获得的转录信息分析木虱携带黄龙病菌后基因表达的差异。【结果】获得了 1 502 个差异表达的 unigenes, 在带菌木虱中上调和下调的基因分别有 746 和 756 个。共有 1 099 个 unigenes 比对上 NCBI 蛋白数据库并获得功能注释; 852 个被聚类到 GO 的三大功能中; 931 个被注释到 KEGG 的 239 个代谢通路中。根据差异表达基因的 GO 分析, 木虱代谢过程和催化活性的相关基因明显上调。此外, 筛选出 53 个免疫相关的 unigenes 中, 28 个与细胞免疫、25 个与免疫信号路径相关, 分别有 64% 和 32% 表达上调。【结论】黄龙病菌和媒介昆虫柑橘木虱存在互作关系, 病菌入侵后可能通过代谢活动相关基因的上调和免疫相关基因的差异表达而影响木虱的代谢活动和免疫反应过程。

关键词 亚洲柑橘木虱, 黄龙病, 转录组, 差异表达, 互作

Transcriptomic analyses of *Diaphorina citri* Kuwayama in response to the infection by *Candidatus Liberibacter asiaticus*

ZENG Li-Xia^{1,2**} TIAN Ming-Yi¹ WU Feng-Nian¹ WANG Yan-Jing¹
DENG Xiao-Ling¹ CEN Yi-Jing^{1***}

(1. College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. Guangdong Lingnan Vocational and Technical College, Guangzhou 510663, China)

Abstract 【Objectives】Understanding of the molecular mechanism of interaction between Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama and huanglongbing which is associated with *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). 【Methods】RNA-Seq technology was used to analyze the transcriptome of CLAs infected and uninfected *D. citri* adults. The differentially expression genes after CLAs-infection were obtained, and their functions were analyzed. 【Results】There were 1 502 unigenes that were differentially expressed between the infected and uninfected *D. citri*, with 764 up-regulated and 752 down-regulated in the infected psyllids. These unigenes were assigned to NCBI NR, KEGG and GO database, 1 099 unigenes had significant BlastX hit with NCBI protein database and their annotations of predicted protien were obtained. Among them, 852 unigenes were categorized into GO function categories; 931 unigenes were categorized into 239 KEGG pathways. According to the GO analysis, the unigenes which involved in metabolic process and catalytic activity function were significantly up-regulated. Among the 53 immune-related genes which showed different express, 28 were related to the cellular immunity, 25 to the immune signaling pathway, and the up-regulated genes of these 2 groups was 64% and 32% respectively. 【Conclusion】Interaction is present between CLAs and it's vector *D. citri*. The metabolic activity and the immunoreaction might be affected as the related genes of these activity differently express in the CLAs-infected psyllid.

Key words *Diaphorina citri* Kuwayama, huanglongbing, transcriptome, differential expression, interaction

*资助项目 Supported projects: 现代农业 (柑桔) 产业技术体系项目 (CARS-27); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201003067-01); 国家重点研发计划项目 (SQ2018YFD020103)

**第一作者 First author, E-mail: 857847365@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: cenyj@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-07-02, 接受日期 Accepted: 2018-07-29

亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama (半翅目 Hemiptera, 木虱科 Psyllidae) 是柑橘类果树新梢期的主要害虫, 我国原称为柑橘木虱, 为害柑橘、月橘、枸橼、黄皮、九里香等芸香科植物 (黄邦侃, 1953), 同时它还是柑橘上最严重的病害——黄龙病 (Huanglongbing, HLB) 的主要媒介昆虫 (Bové, 2006)。目前黄龙病已成为了影响全球柑橘产业发展最严重的病害, 我国黄龙病的病原菌为“*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLas), 该病害最早在广东潮汕地区发现 (Reinking, 1919), 目前在亚洲、非洲和南北美洲等柑橘主产区都有发生 (Grace, 1991; Texeira *et al.*, 2005; Bové, 2006; Martínez *et al.*, 2009)。

柑橘木虱成虫和 2-5 若虫都能获菌, 获菌率为 13%-100%, 若虫期获菌的柑橘木虱在羽化后仍具传菌能力, 且在健康柑橘苗上取食 5 h 以上就能成功传菌 (许长藩等, 1988; Hung *et al.*, 2004; Bonani *et al.*, 2008; Pelz-Stelinski *et al.*, 2010)。健康木虱成虫在病树成熟叶、嫩叶、嫩芽取食 8 h 后获菌率分别达 55%、40%、35%, 带菌成虫在健康树取食 24 h 后成功传病率达 23%, 说明其传病效率很高 (Luo *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016)。黄龙病菌在木虱体内系统性分布, 获菌木虱的唾液腺、血淋巴、消化道、马氏管、滤腔、脂肪和肌肉组织、卵巢都能检测出病菌的存在 (Ammar *et al.*, 2011; Grafton-Cardwell *et al.*, 2013)。

黄龙病菌对木虱的行为、生殖和发育都有影响。木虱在取食时趋向于黄龙病感染的植株, 在病树上取食一段时间后趋向于转移至健康植株上 (Mann *et al.*, 2012; 吴丰年等, 2013)。在病树上饲养的木虱繁殖力增高, 若虫的发育时间缩短, 存活率降低 (Pelz-Stelinski, 2011)。用刺吸电位图谱技术 (EPG) 监测木虱在病苗和健康苗的取食行为发现, 在病苗上取食的木虱成虫分泌唾液时间显著延长 (Cen *et al.*, 2012)。获菌的木虱比健康木虱迁徙更早, 且距离更远, 而且雌木虱对雄木虱的吸引力会随着体内含菌量的增

加而增大 (Martini *et al.*, 2015)。这些结果表明, 黄龙病菌与木虱存在互作关系, 病菌能够影响木虱的取食、运动和交配行为, 从而促进黄龙病的传播与扩散。

新一代转录组测序技术具有快速、高效、经济等优点, 为发现并了解病原微生物与媒介昆虫互作的基因提供了一种方便有效的方法。目前已有不少研究人员利用转录组测序技术研究病原微生物对宿主的基因表达的影响。Xue 等 (2012) 利用 Illumina 对经家蚕核型多角体病毒感染后 8 个时间点上的家蚕细胞系进行转录组测序, 发现该病毒感染家蚕组织细胞后, 细胞骨架、转录物、翻译相关蛋白、能量代谢、铁离子代谢和泛素蛋白等的代谢通路发生改变。Xu 等 (2012) 采用 Roche 454 获得了携带南方水稻黑条纹病毒 (Southern rice black-streaked dwarfvirus, SRBSDV) 的白背飞虱 *Sogatella furcifera* 和未携带此病毒白背飞虱的转录组数据, 从转录组水平上解析了白背飞虱对病毒感染响应的基因表达情况。

2009 年, 国际木虱基因组协会 (International Psyllid Genome Consortium) 利用 Illumina HiSeq 和 PacBio 测序技术对柑橘木虱基因组测序; 2014 年, Reese 等 (2014) 对柑橘木虱成虫、若虫和卵分别进行转录组测序, 这些数据为感染黄龙病菌柑橘木虱基因表达的转录组学分析提供了基础。在 2015 年, Vyas 等 (2015) 利用转录组测序技术比较了获菌与未获菌木虱成虫与若虫的基因表达差异。然而 Vyas 并未测序多个重复样本, 因此仍需进一步验证病菌对木虱蛋白表达的影响。黄龙病最早是在中国发现, 和柑橘木虱已有近百年共同发生的历史, 因此利用转录组测序技术研究中国的柑橘木虱种群感染黄龙病菌后基因表达差异的情况具有独特的研究意义。

本研究使用高通量测序的方法对感染黄龙病菌后柑橘木虱的基因表达进行研究, 对得到差异表达基因的功能进行分类, 并进一步探讨免疫相关基因的表达差异, 为研究黄龙病菌与柑橘木虱的互作机制提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

从华南农业大学校园内九里香 *Murraya exotica* L. 上采集刚羽化的柑橘木虱雌雄虫一对, 转移至防虫网室内栽培的健康九里香上, 自然条件下饲养繁殖多代, 采用荧光定量 PCR 方法进行检测, 确保该木虱群体不携带黄龙病菌。

选取 3-4 龄的木虱若虫转移至人工气候箱 (宁波江南 RXZ-380A) 内的健康砂糖橘和携带柑橘黄龙病菌的砂糖橘嫩梢上饲养, 两周后采集成虫, 分别获得未带菌和带菌的木虱成虫。饲养条件为 $(28 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 光周期为 L:D=14:10, 相对湿度为 50%-60%。

1.2 黄龙病菌的检测

采集的柑橘木虱成虫在 $-20 ^\circ\text{C}$ 条件下冷冻 1 min, 然后置于解剖镜下将每头木虱成虫分成两部分: 头胸部和腹部。每头木虱的其中一部分用于提取 DNA, 并采用荧光定量 PCR 的方法检测其是否携带柑橘黄龙病菌; 另一部分马上转移至样本保存液 (Invitrogen RNAlater) 并置于 $-75 ^\circ\text{C}$ 的冰箱中保存, 用于 RNA 的提取。

定量 PCR 检测黄龙病菌的检测方法采用 SYBRGreen I 荧光染料 (DBI® Bio science), 引物参考 Li (2006) 报道设计的 HLBasf/HLB asr 引物对, 并由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。以黄龙病菌的 16SrRNA 片段的重组质粒 DNA 的 7 个 10 倍梯度稀释制作标准曲线, 以未携带病菌的柑橘木虱 DNA 为阴性对照, 灭菌离子水为空白对照。PCR 的反应体系为 20 μL , 包含 10 μL SYBR Green qPCR master mix、各 0.5 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的引物对、1 μL DNA 模板、8 μL 的 ddH₂O。在 BioRad (Rotor-Gene RG-3000) 荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 反应条件为: 预变性 95 $^\circ\text{C}$ 2 min, 然后 95 $^\circ\text{C}$ 10 s、55 $^\circ\text{C}$ 30 s、72 $^\circ\text{C}$ 30 s, 40 个循环。溶解曲线: 95 $^\circ\text{C}$ 1 min, 55 $^\circ\text{C}$ 1 min, 55-98 $^\circ\text{C}$ (10 s/循环 0.5 $^\circ\text{C}$ /循环) 86 个循环。

1.3 总 RNA 提取和转录组测序

采用 Trizol 提取方法, 选取通过荧光定量 PCR 方法检测确定携带黄龙病菌的木虱对应的头胸部和腹部 (各 20 头) 提取总 RNA。对照组的处理方法相同。1.5% 琼脂糖凝胶电泳及 Agilent 2200 TapeStation analysis 检测总 RNA 的完整性及浓度。

委托广州瑞博生物技术公司采用 Illumina HiSeq™ 2500 测序平台对携带黄龙病菌和未携带病菌的柑橘木虱样本进行转录组测序。

1.4 测序数据分析

经数据过滤去除接头序列、多 N 序列和低质量序列后得到的干净测序数据 (Clean data), 应用 Trinity 软件进行 *de novo* 拼接组装成 unigenes, 并与 NCBI 的 nr 数据库进行 Standalone Blast 比对 (E 值 $< 10^{-5}$), 获得注释信息。在此注释信息的基础上, 将 unigenes 与 KOG (EuKaryotic orthologous groups)、GO (Gene ontology) 和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库比对, 获得 unigene 的功能分类信息。

使用 MicroSatellite (MISA) 软件找出 unigene 中所有的 SSR, 并对 SSR 重复单元在 unigene 上前序列的长度进行筛选, 保留前后序列均不小于 150 bp 的 SSR。

利用 edgeR (Robinson *et al.*, 2010) 计算表达差异, 然后对差异检验的 P -value 作多重假设检验校正, 通过控制 FDR (False discovery rate) 来决定 P -value 的阈值, 在得到差异检验的 FDR 值同时, 根据基因的表达量计算该基因在不同样本间的差异表达倍数。以 $|\log\text{FC}| \geq 2$, 且 FDR 值 < 0.05 为阈值筛选差异基因。对筛选获得的差异表达的基因进行 KEGG 路径和 GO 功能聚类分析。

1.5 荧光定量 PCR 验证

采用 NCBI 的 Primer-blast 对筛选的 18 个差异表达的基因进行引物设计。以柑橘木虱的 *NADH-dh* 基因 (Tiwari *et al.*, 2011) 为参考基

因, 采用 SYBRGreen 染料法对所选的差异基因进行 qPCR 扩增, 每个基因 3 次重复, 每个重复 20 头木虱。

计算平均 Ct 值。根据获得的 Ct 值, 利用 Microsoft Excel 软件, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001) 统计所选基因在带菌木虱样本中的相对表达水平。qPCR 验证所使用的样本处理方法与测序用样本相同。

2 结果与分析

2.1 转录组数据概况

经数据过滤得到的总的干净测序数据为 7.35×10^7 对 reads (带菌木虱样本为 3.48×10^7 对,

未带菌木虱样本为 3.87×10^7 对)。表 1 为序列组装后的结果, 共获得 54 480 条非冗余的 unigenes, 最长序列的核苷酸数为 3.52×10^4 nt (Nucleotide), 最短为 301 nt, 序列的平均长度为 1 282 nt, GC 含量为 40.93%, N50 达到 2 244 nt。unigenes 的长度分布如图 1 所示。

分别与 NCBI NR、KEGG 和 GO 数据库比对分析结果中, 有 23 464 条 unigenes 比对上 NCBI NR 数据库并获得了预测功能; 22 161 条 unigenes 注释到 KEGG 的 344 个代谢通路上; 19 182 条 unigenes 比对上 KOG 数据库, 并被分为 25 个功能类别; 10 932 条 unigenes 被聚类到 GO 数据库的生物过程、细胞过程和分子功能这三大功能中 (表 2)。

表 1 序列组装结果
Table 1 The result of sequence assembly

总 unigenes (条) Total number of unigenes	总长度 (nt) Total length	平均长度 (nt) Average length	最长序列 (nt) Longest unigenes	最短序列 (nt) Shortest unigenes	GC 含量 (%) GC content	N50
54 480	69 825 656	1 282	35 227	301	40.93	2 244

nt :核苷酸数 ;N50 :将所有 unigenes 从长到短排列, 从最长序列开始累计相加, 达到总长的二分之一时对应的 unigenes 的长度。
nt: Nucleotide; N50: All unigenes are arranged from long to short, then adding up from the longest unigenes to the shortest, one half of the total length is N50.

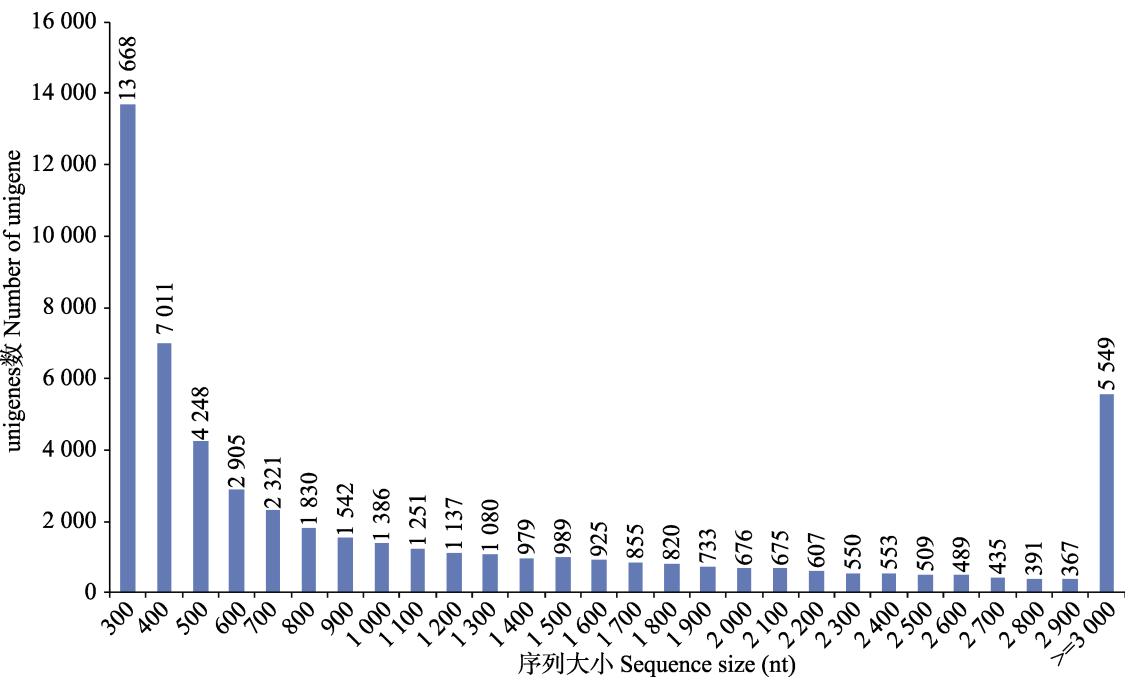


图 1 unigenes 长度分布
Fig. 1 Distribution of the unigenes length

表 2 NCBI NR、KEGG 和 GO 数据库比对分析
Table 2 Matching unigenes to the NCBI NR,
KEGG and GO database

数据库 Database	比对上的 unigenes 数 (条) The number of matched unigenes	占总 unigenes 百分 (%) Percentage of unigenes
NCBI NR	23 464	43.07
KEGG	22 161	40.68
GO	19 182	35.21
KOG	10 932	20.07

2.2 差异表达分析结果

采用 $|\log FC| \geq 2$, 并且 FDR (False discovery rate) 值小于 0.05 为阈值筛选带菌木虱和未带菌木虱两个转录本之间的差异表达的基因, 共筛选到 1 502 个差异表达 unigenes, 746 个表达上调, 752 个表达下调, 部分差异表达的基因如表 3 所示。在筛选到的差异表达 unigenes 基因中, 1 099 (73.1%) 个 unigenes 能与 NCBI 的非冗余蛋白数据库比对并获得注释, 其余的 402 个 unigenes 可能是一些非编码基因。

表 3 部分差异表达基因
Table 3 Part of differential expression gene

序号 No.	unigene	带菌木虱 Infected psyllid	未带菌木虱 Uninfected psyllid	logFC	FDR	功能注释 Putative annotation
1	Test.comp28312_c0_seq14	2 821.59	0	20.52	5.59×10^{-40}	Cell wall-associated hydrolase
2	CL2Contig5	0	843.32	-18.16	4.75×10^{-35}	Cell wall-associated hydrolase
3	test.comp28312_c0_seq1	698.87	0	18.57	1.45×10^{-34}	Cell wall-associated hydrolase
4	test.comp32944_c1_seq1	23.75	0	13.97	5.92×10^{-21}	PREDICTED: nose resistant to fluoxetine protein 6-like
5	test.comp13069_c0_seq1	871.39	1.18	9.52	4.37×10^{-20}	Nonstructural protein
6	test.comp33081_c0_seq15	36.34	0	13.56	6.27×10^{-20}	PREDICTED: neprilysin-2-like
7	test.comp27403_c0_seq2	4.41	0	12.34	1.60×10^{-16}	PREDICTED: bifunctional heparan sulfate N-Deacetylase/N-sulfotransferase-like
8	test.comp32865_c1_seq7	0	12.82	-12.37	1.63×10^{-16}	无 No
9	test.comp28312_c0_seq13	8.1	0	12.08	9.96×10^{-16}	Cell wall-associated hydrolase
10	control.comp37701_c1_seq6	8.89	0	11.97	1.94×10^{-15}	Trehalose 6-phosphate synthase
11	test.comp32523_c0_seq1	0	8.44	-11.95	1.94×10^{-15}	Sugar transporter 1
12	test.comp31700_c0_seq6	12.31	0	11.88	2.96×10^{-15}	Dorsal 1C
13	control.comp38007_c2_seq5	4.07	0	11.87	2.98×10^{-15}	Hypothetical protein TcasGA2_TC000971
14	test.comp31373_c0_seq13	0	9.95	-11.81	4.30×10^{-15}	PREDICTED: hypothetical Protein LOC100161216 isoform 2
15	test.comp27403_c0_seq9	3.97	0	11.56	2.12×10^{-14}	PREDICTED: bifunctional heparan sulfate N-Deacetylase/N-sulfotransferase-like
16	test.comp31486_c1_seq12	9.5	0	11.54	2.43×10^{-14}	PREDICTED: membrane-bound alkaline phosphatase-like
17	control.comp36465_c0_seq19	0	8.53	-11.48	3.41×10^{-14}	Cell wall-associated hydrolase
18	CL313Contig2	7.18	0	11.44	4.20×10^{-14}	Hypothetical protein AaeL_AAEL001760
19	control.comp36015_c0_seq5	0	5.08	-11.39	5.41×10^{-14}	PREDICTED: hypothetical Protein LOC100123194 isoform 1
20	control.comp37596_c0_seq18	0	5.22	-11.37	6.04×10^{-14}	PREDICTED: hypothetical Protein LOC100161216 isoform 2

logFC 是指 $\log_2$ (Fold change)。logFC ≥ 2 表示基因表达上调; logFC ≤ -2 表示基因表达下调。

logFC is $\log_2$ (Fold change), if logFC is greater than or equal to 2, it means the expression of gene is up-regulation; if logFC is less than or equal to -2, it means the expression of gene is down-regulation.

2.3 荧光定量 PCR 验证结果

以 NADH-dh 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对差异表达基因进行表达水平的验证。所选的 18 个差异表达的基因中, 17 个基因表达趋势与转录组测序结果一致 (表 4), 说明转录组测序的可靠性达到 94.4 %。

2.4 表达差异基因功能分析

对差异表达的 unigene 进行 GO 和 KEGG 分

析, 852 个差异表达的 unigenes 被聚类到 GO 的三大功能中的, 生物过程、分子功能和细胞成分中分别有 395、452 和 289 个 unigenes (图 2), 并且主要聚类在生物过程的代谢过程、生物调节、发育和细胞过程; 分子功能的结合和催化活性; 细胞成分的细胞部分、细胞器、大分子复合物和生物膜。差异表达分析发现代谢过程和催化活性的相关的基因明显上调, 说明柑橘木虱感染黄龙病菌后的代谢活动增强。有 931 个差异表

表 4 差异基因验证结果
Table 4 Verification of differential expression

序号 No.	unigenes	预测功能 Putative annotation	logFC	平均 Ct 值 Average Ct		$2^{-\Delta\Delta Ct}$
				未带菌木虱 Uninfected psyllid	带菌木虱 Infected psyllid	
1	test.comp28312_c0_seq14	Cell wall-associated hydrolase	20.52	12.00	9.43	15.24
2	test.comp32944_c1_seq1	Nose resistant to fluoxetine protein 6-like	13.97	32.39	32.48	3.16
3	test.comp33081_c0_seq15	Neprilysin-2-like	13.56	26.51	22.15	1.17
4	Test.comp30271_c1_seq1	Heat shock 70kDa protein 1/8	10.31	21.59	20.78	2.41
5	control.comp33039_c0_seq9	Rap guanine nucleotide Exchange factor 2-like	10.22	24.47	24.66	57.67
6	CL1Contig474	AMP dea minase 2-like isoform 1	9.08	21.95	22.57	5.24
7	Control.comp37352_c0_seq7	Adenosine monophosphate-protein transferase FICD homolog	7.66	34.68	32.55	2.37
8	test.comp28164_c0_seq2	Peroxisomal membrane protein PMP34	7.05	23.21	22.96	1.67
9	test.comp32523_c0_seq1	Sugar transporter 1	4.58	22.54	22.69	0.60
10	test.comp13415_c0_seq1	Type I collagen alpha 1 chain	4.32	23.01	22.34	11.30
11	control.comp38297_c0_seq5	Nuclear receptor coactivator 7 isoform X3	4.16	21.39	18.64	3.06
12	CL381Contig2	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	4.10	22.58	20.90	2.31
13	test.comp32380_c0_seq1	Diaphorina citri cytochrome c-type heme lyase	2.58	21.85	23.58	4.12
14	test.comp28510_c1_seq1	Cathepsin B-like protease	2.47	20.41	22.10	17.32
15	CL1Contig476	AMP dea minase 2	2.23	20.06	22.24	8.38
16	control.comp37658_c2_seq16	Ras GTPase-activating protein 1-like isoform X3	- 7.74	22.32	22.47	0.80
17	test.comp31373_c0_seq13	Hypothetical protein LOC100161216 isoform 2	- 11.81	22.09	21.78	0.57
18	test.comp32523_c0_seq1	Sugar transporter 1	- 11.95	21.68	22.84	0.85
19	NADH-dh		—	18.05	19.40	—

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示在携带 CLAs 的木虱中基因的表达水平, $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ 表示携带 CLAs 的木虱基因表达水平比对照组高, $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ 则相反; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ 表示没有差异。

The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ represents gene expression level; if it is greater than 1, the gene expression level of CLAs- infected psyllid is higher than the control; if it is less than 1, the gene expression level is lower than control; equal to 1 means no difference.

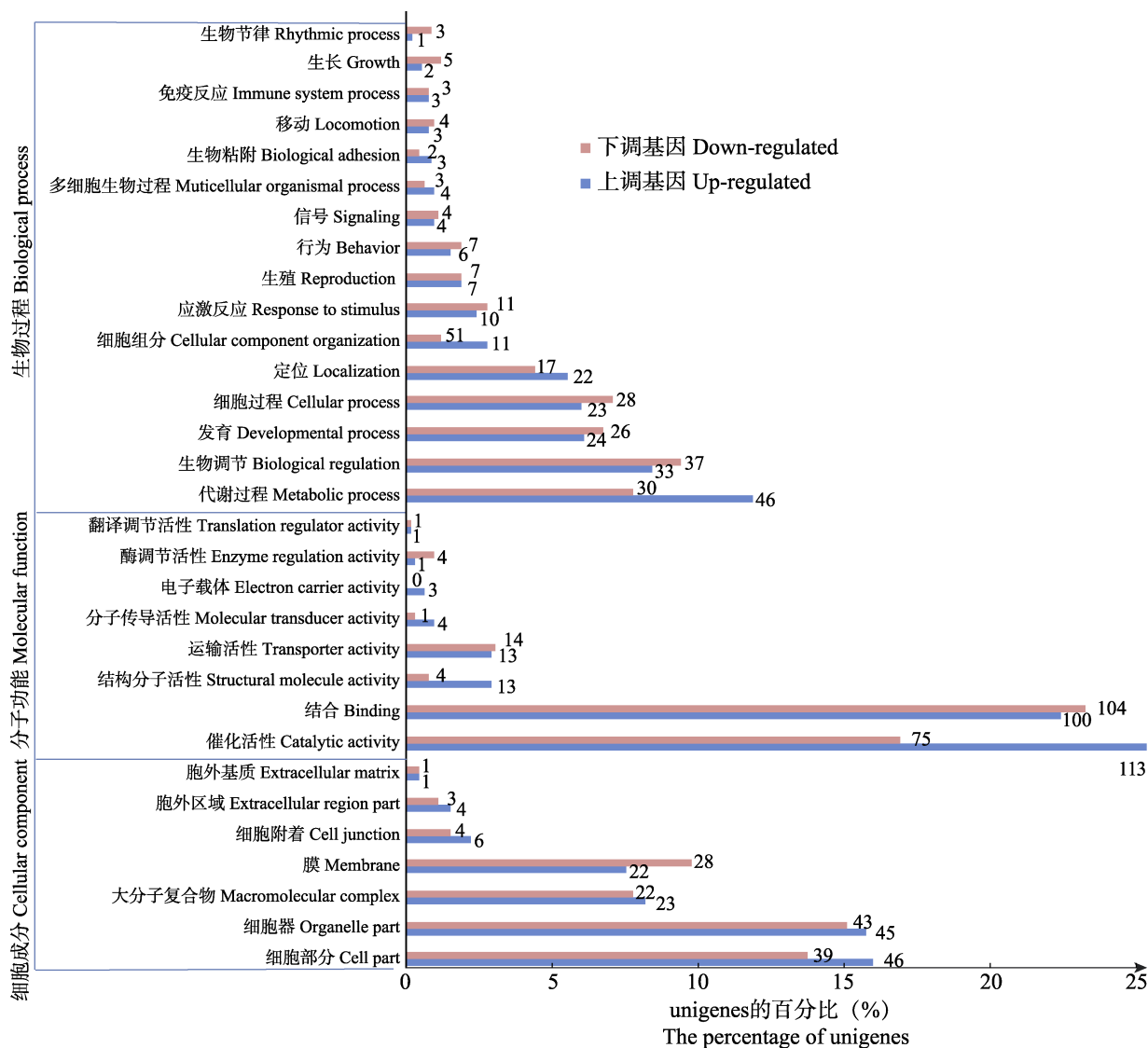


图 2 差异表达的 unigenes 的 GO 分析

Fig. 2 GO functional categories of differentially expressed unigenes

柱形图上的数字为 unigenes 数量。

The number on the column chart is the number of unigenes.

达的 unigene 被注释到 KEGG 的 239 个代谢通路中, 其中 unigene 含量最多的路径是氧化磷酸化路径, 其次是核糖体路径。氧化磷酸化路径是为生物体的各种生命活动提供能量的一个过程, 核糖体是基因翻译的场所, 这两个路径的 unigene 含量最高, 说明木虱的生命活动比较旺盛。

2.5 差异表达的免疫相关基因

根据差异表达基因的 GO 和 KEGG 分析结果, 筛选出 53 个免疫相关的 unigenes, 结果如

表 5 所示。与细胞免疫相关的吞噬体 (Phagosome) 途径、溶酶体 (Lysosome) 途径、内吞作用 (Endocytosis) 途径和自噬作用的 unigenes 共有 28 个, 其中 18 个 (64.3%) unigenes 的表达量上调。此外, 共有 24 个 unigenes 与 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 途径、JNK (c-Jun N-terminal kinase) 途径、Toll-like 受体信号、Jak-STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) 信号和 TGF-beta (Transforming growth factor beta) 信号

表 5 差异表达的免疫相关 unigenes
Table 5 The differential expression unigenes which are associated with immunity

unigenes	功能预测 Putative annotation	注释物种 Annotation species	数据库编号 Database No.	logFC
吞噬体途径 Phagosome				
control.comp37549_c2_seq4	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	切叶蚁 <i>Acromyrmex echinator</i>	EGI65931.1	2.53
test.comp28659_c0_seq1	Tubulin beta-4 chain -like	安乐蜥 <i>Anolis carolinensis</i>	XP_003216796.1	2.22
control.comp32022_c1_seq1	Putative alpha-tubulin, partial	亚洲柑橘木虱 <i>Diaphorina citri</i>	ABG74716.1	2.16
CL4716Contig1	Actin	条蜂缘蝽 <i>Riptortus pedestris</i>	BAN20100.1	2.62
test.comp26334_c0_seq1	Actin, cytoplasmic 2	鼠兔 <i>Ochotona princeps</i>	XP_004592907.1	2.93
test.comp27842_c0_seq2	V-type proton ATPase subunit E	牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	EKC18664.1	2.65
test.comp29150_c2_seq3	V-type proton ATP-ase subunit B-like	地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	XP_004523388.1	- 2.74
control.comp36292_c6_seq11	Cathepsin L-like	蜜蜂 <i>Apis florea</i>	XP_003691169.1	3.40
溶酶体途径 Lysosome				
control.comp37335_c0_seq3	CD63 antigen-like isoform 2	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	XP_003242650.1	5.97
test.comp721_c1_seq1	Beta-galactosidase	致乏库蚊 <i>Culex quinquefasciatus</i>	XP_001845062.1	3.71
control.comp36292_c6_seq11	Cathepsin L-like	蜜蜂 <i>Apis florea</i>	XP_003691169.1	3.40
control.comp36335_c1_seq1	Sphingomyelin Phosphodiesterase-like isoform 4	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	XP_003241903.1	2.52
test.comp28510_c1_seq1	Cathepsin B-like protease	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	CAC87118.1	2.47
test.comp32736_c0_seq1	Sialin-like	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	XP_001943734.1	2.43
control.comp37608_c0_seq3	Cathepsin O-like	熊蜂 <i>Bombus impatiens</i>	XP_003490694.1	- 3.07
control.comp37086_c1_seq34	Beta-N-acetylglucosaminidase	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	AFZ76982.1	- 6.00
control.comp16602_c0_seq1	Niemann-Pick C1protein-like	苜蓿切叶蜂 <i>Megachile rotundata</i>	XP_003699264.1	- 9.20
control.comp37086_c1_seq1	Beta-N-acetylglucosaminidase	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	AFZ76982.1	- 10.55
内吞作用 Endocytosis				
control.comp36105_c1_seq3	Rab GTPase-binding effector protein 1-like	苜蓿切叶蜂 <i>Megachile rotundata</i>	XP_003700560.1	7.69
test.comp33293_c0_seq3	E3 ubiquitin-protein ligase NRDP1-like isoform 1	苜蓿切叶蜂 <i>Megachile rotundata</i>	XP_003708524.1	6.28
test.comp30119_c1_seq6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8-like	安乐蜥 <i>Anolis carolinensis</i>	XP_003228928.1	3.84
test.comp32218_c0_seq8	Partitioning defective 3 homolog isoform 1	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	XP_001943183.2	2.92
test.comp31176_c0_seq3	Phosrestin ii	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	XP_001663732.1	2.43
control.comp36105_c1_seq14	Rab GTPase-binding effector protein 1-like	熊蜂 <i>Bombus terrestris</i>	XP_003399109.1	- 6.88
control.comp34799_c0_seq2	Smad2/3 transcription factor	囊舌虫 <i>Saccoglossus kowalevskii</i>	NP_001161658.1	- 8.79
自噬作用 Autophagy				
CL49Contig1	Autophagy-related protein 13 homolog	熊蜂 <i>Bombus impatiens</i>	XP_003486107.1	- 2.27
自噬作用调节 Regulation of autophagy				
control.comp38078_c1_seq1	Putative delta-9 desaturase	叶蝉 <i>Oncometopia nigricans</i>	AAU95195.1	- 3.02
control.comp38078_c1_seq9	Putative delta-9 desaturase	叶蝉 <i>Oncometopia nigricans</i>	AAU95195.2	- 2.21

续表 5 (Table 5 continued)

unigenes	功能预测 Putative annotation	注释物种 Annotation species	数据库编号 Database No.	logFC
MAPK 信号途径 MAPK signaling pathway				
control.comp33039_c0_seq9	Rap guanine nucleotide exchange factor 2-like	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	XP_001952587.1	10.22
control.comp33626_c0_seq3	Similar to voltage-gated calcium channel beta subunit	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XP_974958.2	4.49
test.comp31176_c0_seq3	Phosrestin ii (arrestin a) (arrestin 1)	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	XP_001663732.1	2.43
control.comp33453_c0_seq1	Death domain-associated protein 6	牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	EKC37012.1	- 2.98
CL943Contig1	Adapter molecule Crk, putative	体虱 <i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002427598.1	- 3.98
control.comp35129_c1_seq3	Serum response factor homolog isoform 1	熊蜂 <i>Bombus terrestris</i>	XP_003398950.1	- 4.40
control.comp32651_c1_seq3	Phospholipase A2-like	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	XP_001948432.1	- 6.27
control.comp38103_c0_seq45	C-Jun-a mino-ter minal kinase-interacting protein 4 isoform 1	弓背蚁 <i>Camponotus floridanus</i>	EFN66291.1	- 7.06
control.comp32651_c1_seq2	Phospholipase A2-like	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	XP_001948432.1	- 7.54
control.comp36468_c0_seq3	Similar to interleukin 1 receptor accessory protein-like 2	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XP_971339.2	- 7.61
control.comp37658_c2_seq16	Ras GTPase-activating protein 1-like isoform X3	地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	XP_004519224.1	- 7.74
MAPK 信号途径的调节 Regulation of MAPK signaling pathwa				
control.comp37987_c0_seq1	Similar to leukocyte receptor tyrosine protein kinase	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XP_968998.2	9.34
control.comp37987_c0_seq3	Similar to leukocyte receptor tyrosine protein kinase	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XP_968998.2	10.62
JNK 途径 JNK pathway				
test.comp33070_c0_seq1	Tight junction protein tama, putative	体虱 <i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002427998.1	8.40
control.comp37352_c0_seq7	Adenosine monophosphate-protein transferase FICD homolog, partial	亚洲柑橘木虱 <i>Diaphorina citri</i>	XP_008478506.1	7.66
CL259Contig2	Misshapen-like kinase 1 isoform 2	金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i>	XP_003426313.1	- 7.50
Toll-like 受体信号途径 Toll like receptor signaling pathway				
test.comp30958_c0_seq3	TAK1-associated binding protein 2, isoform C	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	XP_003702779.1	8.20
control.comp36530_c1_seq1	TAK1-associated binding protein 2 isoform A	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	NP_001164316.1	- 2.88
control.comp32731_c0_seq2	p38 mitogen JNK	烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>	AEI27292.1	- 6.95
Jak-STAT 信号途径 Jak-STAT signaling pathway				
control.comp36457_c1_seq1	Tyrosine-protein phosphatase corkscrew, putative	体虱 <i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002430772.1	- 9.05
control.comp36457_c1_seq5	Tyrosine-protein phosphatase corkscrew, putative	体虱 <i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002430772.1	- 9.01
TGF-beta 信号路径 TGF-beta signaling pathway				
control.comp34720_c0_seq3	Protein 60A	金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001603876.1	- 6.60
control.comp37448_c1_seq18	Similar to rho- associated protein kinase 1	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XP_974666.2	- 2.74
control.comp34799_c0_seq2	Smad2/3 transcription factor	囊舌虫 <i>Saccoglossus kowalevskii</i>	NP_001161658.1	- 8.79

途径相关的蛋白功能同源,其中有 17 个(68.0%) unigenes 的表达下调,包括 13 个 MAPK 信号途径相关基因中的 8 个下调基因;3 个 JNK 途径中的 1 个下调基因;3 个 Toll-like 受体信号途径中的 2 个下调基因、2 个 Jak-STAT 信号途径和 3 个 TGF-beta 信号途径的下调基因。

3 讨论

本研究在中国首次采用转录组测序的方法研究获菌后柑橘木虱基因表达的差异。在差异表达基因的 GO 分析中,生物调节的聚类中代谢过程(包括物质的合成与分解)的 unigenes 的含量最高,其次是生物调节类别。这结果与携带马铃薯斑病菌(*Candidatus Liberibacter solanacearum*)和未携带病菌的马铃薯木虱 *Bactericera cockerelli* 转录组的聚类结果是一致的(Nachappa *et al.*, 2012),但是在未携带病菌的柑橘木虱成虫、若虫和卵的转录组聚类中, unigenes 含量最高的类别是细胞过程(包括细胞组织结构形成、细胞分裂等),其次是代谢过程和生物调节(Reese *et al.*, 2014)。本研究结果中,与代谢过程和催化活性相关的基因在带菌木虱的表达比未带菌木虱高。由于病菌在入侵宿主过程必然需要消耗大量的营养物质和能量,而这些营养物质大部分是由其宿主提供,因此黄龙病菌可能会通过调节木虱体内的物质代谢活动,为病菌的入侵和增殖提供营养物质和能量。并且在 KEGG 的分析中,氧化磷酸化路径和核糖体路径注释的 unigenes 的数量比较多,因此这两个路径可能在病菌入侵过程或木虱抵抗病菌入侵的过程中都有非常重要的作用。

在 Pelz-Stelinski 等(2010)及 Vyas 等(2015)的研究中,比较了 GO 聚类的生物学过程、分子功能和细胞成分中上调与下调基因间的差异,若虫的表达差异比成虫更明显,成虫无差异,并且在成虫期与防御和免疫相关蛋白的表达比若虫期更显著,成虫期木虱抵抗对病菌的感染的能力更强,获菌的概率更低。基于此,本研究进一步分析黄龙病菌侵染木虱成虫所诱导的免疫相关

基因的表达,寻找黄龙病菌与木虱互作潜在的相关基因。本研究结果中,获菌后木虱成虫体内与内吞、吞噬体和溶酶体途径相关的多数基因表达上调。对感染番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV))的 MEAM1 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的转录分析结果中也发现带毒粉虱中与溶酶体相关的多数基因表达是上调的(Luan *et al.*, 2011)。细胞的吞噬作用是昆虫抵抗病原感染的先天性免疫反应(吴嫻和凌尔军, 2009),说明媒介昆虫在受到植物病原物的入侵时启动细胞吞噬作用,抵抗病原微生物的感染。

MAPK 信号途径、Toll 样受体信号途径、Jak-STAT 信号途径、JNK 级联和 TGF-beta 信号途径都参与昆虫的免疫反应(Dostert *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2011; Ragab *et al.*, 2011)。其中, Toll 途径是昆虫抵抗病原微生物感染的最终要途径之一,抗菌肽的表达依赖于 Toll 途径的激活(Lemaitre *et al.*, 1996; Lemaitre and Hoffmann, 2007)。然而在带菌木虱体内,这些信号途径基因的表达多数是下调的,说明 CLas 入侵后通过下调这些免疫信号相关的基因抑制木虱的免疫反应。此外这些信号路径还参与了细胞增殖、分化等生长发育过程(Hombria and Brown, 2002; Jiang and Edgar, 2009),病原物感染宿主媒介昆虫后抑制了这些基因的表达,这些基因表达的下调很可能是木虱存活率降低(Pelz-Stelinski, 2011)的原因。

Toll 途径和 Imd 途径被认为是昆虫主要的先天性免疫信号路径, Toll 途径是由真菌和革兰氏阳性细菌激活而 Imd 途径由革兰氏阴性细菌激活(Cherry and Silverman, 2006; Lemaitre and Hoffmann, 2007)。在本次实验中未发现 Imd 途径相关的差异表达基因。在一些半翅目昆虫中缺乏 Imd 途径某些因子,如蚜虫的基因组中缺乏关键的 Imd 途径信号传导因子基因,包括 IMD、Dredd、Relish 和激活 Imd 途径的肽聚糖识别蛋白 PGRPs 基因(Consortium, 2010), Imd 途径基因同源的 contigs 在与柑橘木虱亲缘关系很近

的马铃薯木虱的转录组中含量也很少 (Nachappa *et al.*, 2012; Fisher *et al.*, 2014)。因此柑橘木虱可能与蚜虫一样, Imd 路径并不完整, 且不参与韧皮部杆菌属的抵抗作用。

本研究获得大量的差异表达基因, 为黄龙病菌与柑橘木虱互作关系的研究奠定了基础。此外, 对差异表达的部分免疫相关基因进行了分析与讨论, 对基于本研究基础上对黄龙病菌与木虱的互作机制研究提供了方向和数据支持。所获得大量的转录组数据也为适合中国木虱地理种群的 RNA 干扰序列开发, 以及对木虱行为、发育和生殖过程相关基因的研究提供基础数据。

参考文献 (References)

- Ammar ED, Shatters RG, Hall DG, 2011. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Phytopathology*, 159: 726–734.
- Bonani JP, Appezzato-da-Gloria B, Fereres A, Engels FE, Lopes JRS, 2008. Leaf age influencing acquisition of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by the psyllid vector *Diaphorina citri*. International Research Conference on Huanglongbing, Orlando, Florida. 2008.
- Bové JM, 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1): 7–37.
- Cen YJ, Yang CL, Holford P, Beattie GAC, Spooner-Hart RN, Liang GW, Deng XL, 2012. Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and Huanglongbing infected citrus. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143(1): 13–22.
- Cherry S, Silverman N, 2006. Host-pathogen interactions in drosophila: new tricks from an old friend. *Nat. Immunol.*, 7(9): 911–917.
- Clark RI, Woodcock KJ, Geissmann F, Trouillet C, Dionne MS, 2011. Multiple TGF- β superfamily signals modulate the adult *Drosophila* immune response. *Current Biology* Cb, 21(19): 1672–1677.
- Consortium IAG, 2010. Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biology*, 8(2): e1000313.
- Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, Hetru C, Hoffmann JA, Imler JL, 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nature Immunology*, 6(9): 946–953.
- Fisher TW, Vyas M, He R, Nelson W, Cicero JM, Willer M, Kim R, Kramer R, Greg A. May, Crow JA, Soderlund CA, Gang DR, Brown JK, 2014. Comparison of potato and Asian citrus psyllid adult and nymph transcriptomes identified vector transcripts with potential involvement in circulative, propagative liberibacter transmission. *Pathogens*, 3(4): 875–907.
- Grace JV, 1991. Citrus greening disease. *Annual Review of Phytopathology*, 29: 109–139.
- Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, Stansly PA, 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*, 58 (1): 413–432.
- Hombria JCG, Brown S, 2002. The fertile field of *Drosophila* JAK/STAT signalling. *Current Biology*, 12(16): 569–575.
- Huang BK, 1953. Preliminary observation of citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Journal of Fujian Agricultural College*, 1(1): 7–20. [黄邦侃, 1953. 柑橘木虱的初步观察. 福建农学院学报, 1(1): 7–20.]
- Hung TH, Hung SC, Chen CN, Hsu MH, Su HJ, 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. *Plant Pathology*, 53(1): 96–102.
- Jiang H, Edgar BA, 2009. EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development*, 136(3): 483–493.
- Li W, Hartung JS, Levy L, 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1): 104–115.
- Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 697–743.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA, 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6): 973–983.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Luan JB, Li JM, Varela N, Wang YL, Li FF, Bao YY, Zhang CX, Liu XX, Wang XW, 2011. Global analysis of the transcriptional response of whitefly to Tomato yellow leaf curl China virus reveals the relationship of coevolved adaptations. *Journal of Virology*, 85(7): 3330–3340.
- Luo XZ, Yen AL, Powell KS, Wu FN, Wang YJ, Zeng LX, Yang YZ, Cen YJ, 2015. Feeding behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its acquisition of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, on Huanglongbing-infected citrus reticulata leaves of several maturity stages. *Florida Entomologist*, 98(1): 186–192.

- Mann RS, Ali JG, Hermann SL, Tiwari S, Pelz-Stelinski KS, Alborn HT, Stelinski LL, 2012. Induced release of a plant-defense volatile ‘deceptively’ attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathogens*, 8(3): e1002610
- Martínez Y, Llauger R, Batista L, Luis M, Iglesia A, Collazo C, Peña I, Casín JC, Cueto J, Tablada LM, 2009. First report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with Huanglongbing in Cuba. *Plant Pathology*, 58(2): 389–389.
- Martini X, Hoffmann M, Coy MR, Stelinski LL, Pelz-Stelinski KS, 2015. Infection of an insect vector with a bacterial plant pathogen increases its propensity for dispersal. *PLoS ONE*, 10 (6): 1–16.
- Nachappa P, Levy J, Tamborineguy C, 2012. Transcriptome analyses of *Bactericera cockerelli* adults in response to “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” infection. *Molecular Genetics and Genomics*, 287(10): 803–817.
- Pelz-Stelinski KS, Brlansky RH, Ebert TA, Rogers ME, 2010. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(5): 1531–1541.
- Pelz-Stelinski KS, 2011. Vector-pathogen interactions: transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and its effect on Asian citrus psyllid life history. Second Annual Citrus Health Research Forum. 4–6 October, Denver, Colorado.
- Ragab A, Buechling T, Gesellchen V, Spirohn K, Boettcher AL, Boutros M, 2011. *Drosophila* Ras/MAPK signalling regulates innate immune responses in immune and intestinal stem cells. *The EMBO Journal*, 30(6): 1123–1136.
- Reese J, Christenson MK, Leng N, Saha S, Cantarel S, Lindeberg M, Tamborineguy C, McCarthy J, Weaver M, Trease JA, Ready SV, Davis VM, McCormick C, Haudenschild C, Han S, Johnson SL, Shelby KS, Huang H, Bextine BR, Shatters RG, Hall DG, Davis PH, Hunter WB, 2014. Characterization of the Asian citrus psyllid transcriptome. *Journal of Genomics*, 2 (s 5/7): 54–58.
- Reinking OA, 1919. Diseases of economic plants in South China. *Philippine Agriculture*, 10: 109–135.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK, 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1): 139–140.
- Teixeira DC, Ayres J, Kitajima EW, 2005. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the disease. *Plant Disease*, 89(1): 107–107.
- Tiwari S, Gondhalekar RS, Mann MES, Stelinski LL, 2011. Characterization of five *CYP4* genes from Asian citrus psyllid and their expression levels in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-infected and uninfected psyllids. *Insect Molecular Biology*, 20(6): 733–744.
- Vyas M, Fisher TW, He R, Nelson W, Yin G, Cicero JM, Willer M, Kim R, Kramer R, May GA, Crow JA, Soderlund CA, Gang DR, Brown JK, 2015. Asian citrus psyllid expression profiles suggest *Candidatus Liberibacter asiaticus* mediated alteration of adult nutrition and metabolism, and of nymphal development and immunity. *PLoS ONE*, 10 (6): e0130328.
- Wu FN, Liang GW, Huang JB, Chen JC, Huang JB, Cen YJ, 2013. The movement and spread of nymphs of *Diaphorina citri* Kuwayama on host plants. *Journal of Environmental Entomology*, 35(5): 578–584. [吴丰年, 梁广文, 黄建邦, Ghen Jian-Chi, 黄建邦, 岑伊静. 亚洲柑桔木虱若虫在寄主上的转移和扩散研究. 环境昆虫学报, 35(5): 578–584.]
- Wu S, Ling RJ, 2009. Phagocytosis, nodulation and encapsulation in cellular immune response in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 52(7): 791–798. [吴姗, 凌尔军, 2009. 昆虫细胞免疫反应中的吞噬、集结和包裹作用. 昆虫学报, 52(7): 791–798.]
- Wu TY, Luo XZ, Xu CB, Cen YJ, 2016. Feeding behavior of *Diaphorina citri* and its transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ to citrus. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 161(2): 104–111.
- Xu CP, Xia YH, Li KB, Ke C, 1988. Studies on the law of transmission of citrus huanglungbin by psyllid, *Diaphorina citri* and the distribution of pathogen in the adult. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, (2): 57–62. [许长藩, 夏雨华, 李开本, 柯冲, 1988. 柑橘木虱传播黄龙病的规律及病原在虫体内分布的研究. 福建省农科院学报, (2): 57–62.]
- Xu Y, Zhou W, Zhou Y, Wu JX, Zhou XP, 2012. Transcriptome and comparative gene expression analysis of *Sogatella furcifera* (Horvath) in response to southern rice black-streaked dwarf virus. *PLoS ONE*, 7: e36238.
- Xue J, Qiao N, Zhang W, Cheng RL, Zhang XQ, Bao YY, Xu YP, Gu LZ, Han JDJ, Zhang CX, 2012. Dynamic interactions between *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and its host cells revealed by transcriptome analysis. *Journal of Virology*, 86 (13): 7345–7359.