

黄龙病病菌在柑橘木虱体内的分布及感染动态*

任素丽^{1,2**} 郭长飞^{2,3} 欧达^{2,3} 桑文^{2,4} 吉前华⁵ 邱宝利^{2,3,4***}

(1. 广州民航职业技术学院航空港管理学院, 广州 510403; 2. 广东省生物农药创制与应用重点实验室, 广州 510640; 3. 生物防治教育部工程研究中心, 广州 510640; 4. 华南农业大学昆虫学系, 广州 510640; 5. 肇庆学院果树研究所, 肇庆 526061)

摘要 【目的】柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 是传播黄龙病病菌唯一的自然媒介昆虫, 本文研究了黄龙病病菌在柑橘木虱各个发育阶段体内的分布以及感染动态, 为有效防控柑橘木虱提供科学数据。

【方法】利用常规 PCR 检测柑橘木虱若虫体内的黄龙病病菌, 利用 qRT-PCR 和荧光原位杂交技术分别检测黄龙病病菌在柑橘木虱不同发育虫态体内的含量与分布形式。【结果】常规 PCR 可以在 3-5 龄若虫以及成虫体内检测到黄龙病病菌, 而 qRT-PCR 除了 3-5 龄若虫外, 还可以在 2 龄若虫体内检测到黄龙病病菌。卵和各龄期若虫中黄龙病病菌的含量是随着龄期的变大而不断增多。产卵盛期的成虫木虱体内黄龙病病菌的含量最高, 显著高于产卵前期以及产卵后期。荧光原位杂交技术可以检测到 4 龄、5 龄若虫及成虫体内的黄龙病病菌分布形态, 病菌在若虫主要分布在 U 型含菌体内, 而在雌雄成虫体内均是散布型分布。【结论】柑橘黄龙病在柑橘木虱的 2-5 龄若虫及成虫中都有感染, 但其含量与分布形式因发育阶段不同而有显著差异。

关键词 柑橘木虱, 黄龙病病菌, 分布形式, 感染动态

Localization and infection dynamics of HLB bacteria in the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*

REN Su-Li^{1,2**} GUO Chang-Fei^{2,3} OU Da^{2,3} SANG Wen^{2,4} JI Qian-Hua⁵ QIU Bao-Li^{2,3,4***}

(1. Airport Management College, Guangzhou Civil Aviation College, Guangzhou 510403, China; 2. Key Laboratory of Bio-Pesticide Creation and Application, Guangdong Province, Guangzhou 510640, China; 3. Engineering Research Center of Biological Control, Ministry of Education, Guangzhou 510640, China; 4. Department of Entomology, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China; 5. Institute of Fruit Science, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

Abstract 【Objectives】To provide additional scientific information for the management of Asian citrus psyllid (ACP) *Diaphorina citri* Kuwayama, the most important vector of the Huanglongbing (HLB) bacteria. 【Methods】The infection dynamics and distribution of HLB bacteria in different developmental stages of ACP were investigated using PCR, qRT-PCR and Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). 【Results】HLB bacteria can be detected by normal PCR in 3rd to 5th instar nymphs and adults but can only be detected in 2nd instar nymphs with qRT-PCR. The titer of HLB bacteria increased with nymph instar, and the titer of HLB bacteria in female adults in peak reproductive condition was significantly higher than that in pre-oviposition and post-oviposition females. In 4th to 5th instar nymphs, the distribution of HLB bacteria was scattered but mostly in the U-shaped bacteriome in the nymphs' abdomen. The distribution of HLB bacteria in male and female adults was similar to that in nymphs, scattered rather than concentrated in the reproductive system. 【Conclusion】HLB bacteria infected 2-5 instar ACP nymphs and adults but its titer and distribution patterns varied among these different development stages.

Key words Asian citrus psyllid, Huanglongbing bacteria, localization pattern, infection dynamic

*资助项目 Supported projects: NSFC-广东联合基金 (U1701231); 国家现代农业 (柑橘) 产业技术体系建设项目 (CARS-27); 广东现代农业产业技术体系创新团队项目 (2018LM1106)

**第一作者 First author, E-mail: rensuli0320@163.com

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

收稿日期 Received: 2018-07-03, 接受日期 Accepted: 2018-07-20

柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama, 属半翅目 (Hemiptera) 木虱科 (Psyllidae), 是热带亚热带地区柑橘生产中的重大害虫。柑橘木虱可以为害近 20 种芸香科植物 (Alves *et al.*, 2014), 但以柑橘类受害最为严重。柑橘木虱成虫和若虫均能取食寄主植物嫩芽汁液, 引起嫩芽嫩梢逐步萎蔫, 卷曲畸形最后凋落; 木虱若虫排泄出的粘性白色蜜露会引起寄主植物的煤污病 (谢佩华和苏朝安, 1989), 然而, 柑橘木虱最大的危害还在于其是自然界中柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing) 的重要传播媒介昆虫 (Bove, 2006)。

柑橘黄龙病是一种由韧皮部细菌引起的植物病害, 柑橘植株感染黄龙病病菌后, 逐渐会造成嫩枝嫩梢枯萎、生长缓慢、叶片斑驳黄化、果实品质变劣乃至果实脱落, 严重影响着柑橘产量和果实品质。近 20 年来, 黄龙病已成为全球柑橘产业威胁最为严重的病害, 且一旦感染就无法治愈。据统计报道, 截止 2010 年世界上大约有 1 亿棵柑橘感染黄龙病 (National Research Council, 2010), 在中国广东、广西和福建等地, 2003 年前因感染黄龙病被砍除的柑橘树达到 4 000 余万株 (柏自琴和周常勇, 2012); 柑橘黄龙病造成了世界上大约 30%-100% 的柑橘产量损失 (Iftikhar *et al.*, 2016), 世界主要柑橘产业国投入了大量资金对其进行防控研究, 仅美国在 2005 年发现黄龙病后就投入了 6 000 多万美元的研究经费 (程春振等, 2013)。

在长期的协同进化过程中, 媒介植物、病原和昆虫之间形成了复杂的互作关系, 然而至今为止, 对寄主植物-黄龙病病菌-柑橘木虱之间的相互作用研究仍然相对较少, 在一定程度上限制了黄龙病防控技术的研究。本文运用荧光原位杂交 (FISH) 及 qRT-PCR 技术, 研究了黄龙病病菌在柑橘木虱体内的分布形式及感染动态, 以期对柑橘木虱传播黄龙病病菌的生理机制、柑橘黄龙病的可持续有效防控研究提供理论与技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试植物: 健康砂糖橘 *Citrus flamea* Hort. ex

Tseng shiyueju 与感病砂糖橘, 由肇庆学院果树研究所提供, 之后移植于生物防治教育部工程中心 (华南农业大学) 网室内。

供试昆虫: 感病砂糖橘上继代饲养的携带黄龙病病菌的柑橘木虱; 健康砂糖橘上继代饲养的没有携带黄龙病病菌的柑橘木虱。

1.2 实验方法

1.2.1 不同处理柑橘种群的获得 在网室内, 任意选取 50 对柑橘木虱成虫, 接种到带有较多嫩梢并且已感染黄龙病病菌的砂糖橘寄主上, 待其产卵 1 周后, 赶走所有柑橘木虱成虫。收集柑橘木虱不同龄期的若虫木虱雌雄各 20 头, 一部分用于黄龙病病菌定量检测, 一部分用于荧光原位杂交检测。收集在健康砂糖橘上发育的不同龄期的柑橘木虱若虫与成虫做阴性对照, 实验重复 3 次。

1.2.2 柑橘木虱体内黄龙病病菌的 PCR 检测

1.2.2.1 柑橘木虱 DNA 提取 挑取不同发育阶段的木虱 (卵, 1-5 龄若虫, 雌雄成虫), 经双蒸水充分漂洗至除去木虱样本上残留的酒精待用。对于 5 粒卵、5 头 1 龄若虫, 单头 2-5 龄若虫和雌雄成虫作为一个单位, 利用天根 DNA 试剂盒提取各自虫态的 DNA, 经 NanoDrop 2000 分光光度计检测确保其 DNA 提取纯度后保存于 -20 冰箱中备用。

1.2.2.2 不同发育阶段柑橘木虱体内黄龙病病菌的 PCR 定性检测 以 OI1 和 OI2c 作为柑橘黄龙病病菌检测的引物, 序列为: OI1: 5'-GCGCGTATGCAATA CGAGCGGCA-3', OI2c: 5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCC AT-3' (Jagoueix *et al.*, 1994)。扩增条件为: 94 变性 5 min, 94 变性 30 s, 58 退火 30 s, 72 延伸 60 s, 共 35 个循环。反应体系参考表 1。反应完成后, 取 5 μ L PCR 产物在 1% 的琼脂糖上进行凝胶电泳检测, 拍照保存。实验重复 3 次。

1.2.2.3 不同发育阶段柑橘木虱体内黄龙病病菌的 qRT-PCR 定量检测 黄龙病病菌定量 PCR 检测引物为 LJ900f 和 LJ900r (表 1), 以柑橘木虱的肌动蛋白 β 为内参基因, 以 ddH₂O 为阴性对照 (NTC), 原生共生菌 *Carsonella* 为

表 1 荧光定量 PCR 所用的引物序列
Table 1 Specific primers used in real time PCR

目的基因 Target gene	引物序列 (5'-3') Primers sequences (5'-3')	参考文献 References
<i>β-actin</i>	F: 5'-CCCTGGACTTTGAACAGGAA-3'	Tiwari <i>et al.</i> , 2011
	R: 5'-CTCGTGGATAACCGCAAGATT-3'	
<i>HLB-LJ900</i>	F: 5'-GCCGTTTTTAACACAAAAGATGAATATC-3'	Morgan <i>et al.</i> , 2012
	R: 5'-ATAAATCAATTTGTTCTAGTTTACGAC-3'	

阳性对照。荧光定量 PCR 的反应体系为: SYBR Premix Ex Taq II 5 μL, 上下游引物各 0.5 μL 和模板 DNA 2 μL, 补充 ddH₂O 至 10 μL。反应程序为: 95 °C 变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 40 个循环。每个实验设置 3 个生物学重复。利用比较阈值法计算目的基因的相对表达量为: 2^{-Ct} ; $2^{-Ct} = 2^{-(Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因})}$ (Livak and Schmittgen, 2001)。

1.2.3 柑橘木虱体内黄龙病病菌的荧光原位杂交检测 荧光原位杂交技术(Fluorescence in situ hybridization, FISH) 的探针参照 (Mitsuhashi *et al.*, 2002 ; Fujikawa *et al.*, 2013) 的方法, 利用 Cy3 染料对 LSS 序列的 5'端进行修饰并合成为黄龙病病菌的探针序列: LSS-Cy3-CCCAA-CATCTAGGTAAAAACCTAAACTTGA-3'。

在荧光原位杂交之前, 将柑橘木虱成虫或若虫置于卡诺固定液中 4 °C 固定 48 h, 然后用 50% 的乙醇溶液漂洗 3 次 (每次 5 min), 再用无水乙醇充分漂洗, 确保洗净残留卡诺固定液。此后将样本转移至 6% 的过氧化氢乙醇脱色液中, 常温避光脱色若干天 (每 2 d 换一次脱色液), 直至脱色成功, 脱色后将样本用 PBST 漂洗 3 次 (每次 10 min), 并将样本转移至未加荧光探针的杂交缓冲液中预杂交 3 次 (每次 5 min)。预杂交后将样本转移至含有 10 pmol/mL 荧光探针的杂交缓冲液中, 常温避光过夜杂交 12 h; 杂交完成后小心取出柑橘木虱样本, 用 PBST 漂洗 4 次 (每次 10 min), 洗脱后装片, 调整好虫体姿势, 在荧光倒置显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 柑橘木虱不同发育阶段黄龙病病菌的感染动态

柑橘木虱各个龄期体内黄龙病病菌的结果

见图 1。常规 PCR 结果显示, 在柑橘木虱卵、1 龄和 2 龄若虫体内无法检测到黄龙病病菌, 但在 3-5 龄若虫以及雌雄成虫体内黄龙病病菌的存在比较明显。

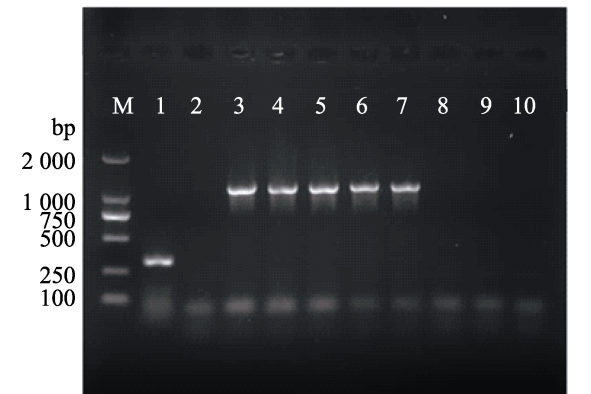


图 1 柑橘木虱不同发育阶段黄龙病病菌的 PCR 检测
Fig. 1 HLB bacteria PCR detection in different *Diaphorina citri* developmental stages

M: DL2000 分子量标记; 泳道 1: *Carsonella*; 2: 阴性对照; 3: 雄虫; 4: 雌虫; 5: 5 龄; 6: 4 龄; 7: 3 龄; 8: 2 龄; 9: 1 龄; 10: 卵。
M: DL2000 marker; Lane 1: *Carsonella*; Lane 2: Negative control; Lane 3: Male; Lane 4: Female; Lane 5: 5th instar nymph; Lane 6: 4th instar nymph; Lane 7: 3rd instar nymph; Lane 8: 2nd instar nymph; Lane 9: 1st instar nymph; Lane 10: Egg.

通过实时荧光定量 PCR 对木虱的卵以及各龄期若虫 DNA 样本进行检测, 结果表明, qRT-PCR 可以检测到 2 龄若虫体内黄龙病病菌的存在, 但是卵以及 1 龄若虫体内未检测到黄龙病病菌。在木虱 3-5 龄若虫体内黄龙病病菌的含量较高, 且 4 龄若虫体内黄龙病病菌的含量显著高于 2 龄和 3 龄若虫的含量, 5 龄若虫中黄龙病病菌的含量显著高于其它若虫期的含量 (图 2)。

对产卵前期, 产卵盛期以及产卵后期柑橘木虱成虫体内的黄龙病病菌含量进行定量 PCR 检测。结果表明, 产卵前期和产卵后期的柑橘木虱

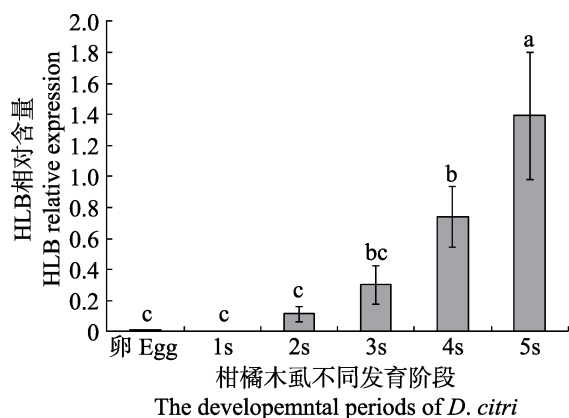


图2 柑橘木虱不同发育阶段黄龙病病菌的相对含量
Fig. 2 Relative expressions for HLB bacteria during immature *Diaphorina citri* developmental stages

1s: 1龄若虫; 2s: 2龄若虫; 3s: 3龄若虫;
4s: 4龄若虫; 5s: 5龄若虫。

1s: First instar nymphs of *D. citri*; 2s: Second instar nymphs of *D. citri*; 3s: Third instar nymphs of *D. citri*;
4s: Fourth instar nymphs of *D. citri*; 5s: Fifth instar nymphs of *D. citri*.

柱上标有不同字母表示在 0.05 水平上差异显著
(Duncan's 多重检验) ($P < 0.05$)。下图同。

Histograms with the different letters indicate significantly different to each host stage by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). The same below.

成虫体内黄龙病病菌含量,显著少于产卵盛期的柑橘木虱(图3)。从相对含量来讲,产卵盛期的柑橘木虱体内黄龙病病菌的含量约是产卵后期柑橘木虱体内含量的 4.5 倍,是产卵前期柑橘木虱体内含量的 9 倍。

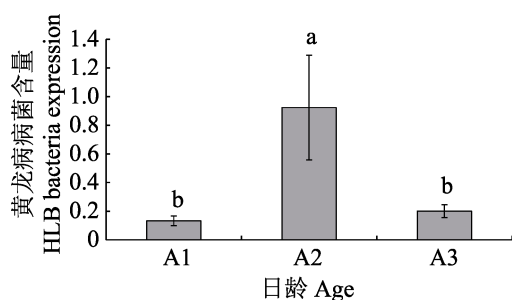


图3 柑橘木虱不同日龄成虫体内黄龙病病菌的相对含量

Fig. 3 Relative expressions for HLB bacteria during adult *Diaphorina citri* different reproductive stages

A1: 产卵前期; A2: 产卵盛期; A3: 产卵后期。

A1: The pre-oviposition period of *D. citri*;

A2: The heyday-oviposition period of *D. citri*;

A3: The post-period of *D. citri*.

2.2 柑橘木虱若虫以及成虫体内黄龙病病菌的分布形式

荧光原位杂交的结果表明, FISH 技术不能检测到黄龙病病菌在木虱卵、1-3 龄若虫体内的分布,但可以检测到 4 龄和 5 龄木虱若虫体内的黄龙病病菌。柑橘木虱 4 龄若虫体内的黄龙病病菌分布在身体各个部位,包括胸部(图 4:A, B)和腹部 U 型含菌体内(图 4:C, D)等;在 5 龄木虱若虫体内黄龙病病菌的分布与 4 龄若虫相似,包括在胸部和腹部的 U 型含菌体内(图 4:E, F)。

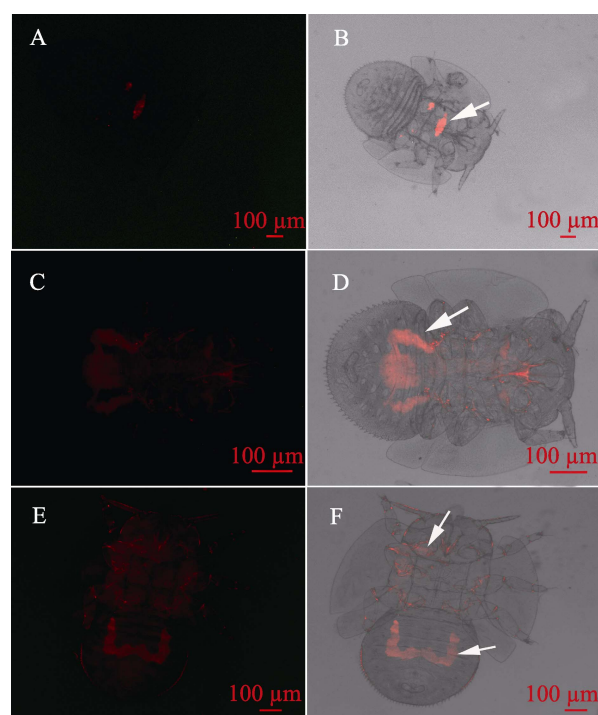


图4 黄龙病病菌在柑橘木虱高龄若虫体内的分布
Fig. 4 FISH visualization of HLB bacteria *Diaphorina citri* in 4th and 5th instar nymphs

A, B. 4 龄若虫分布胸部; C, D. 4 龄若虫腹部 U 型含菌体内; E, F. 5 龄若虫胸部与腹部 U 型含菌体内(左排: 荧光视场通道; 右排: 亮视场通道)。

A, B. HLB bacteria in the thorax of 4th instar nymphs; C, D. HLB bacteria in the U-shaped bacteriome located in the abdomen of 4th instar nymphs; E, F. HLB bacteria in the thorax and U-shaped bacteriome of 5th instar nymphs. Left panels: Fluorescence in dark field; Right panels: Fluorescence in bright field.

2.3 柑橘木虱雌雄成虫体内黄龙病病菌的分布形式

FISH 检测结果表明, 黄龙病病菌在柑橘木

虱成虫体内的分布形式属于散布型分布,并未局限在虫体的生殖器官内,而是以点状形式散布在雄虫和雌虫全身各个组织(图 5:A-D),甚至在木虱的足上也有黄龙病病菌的分布(图 5:E-F)。

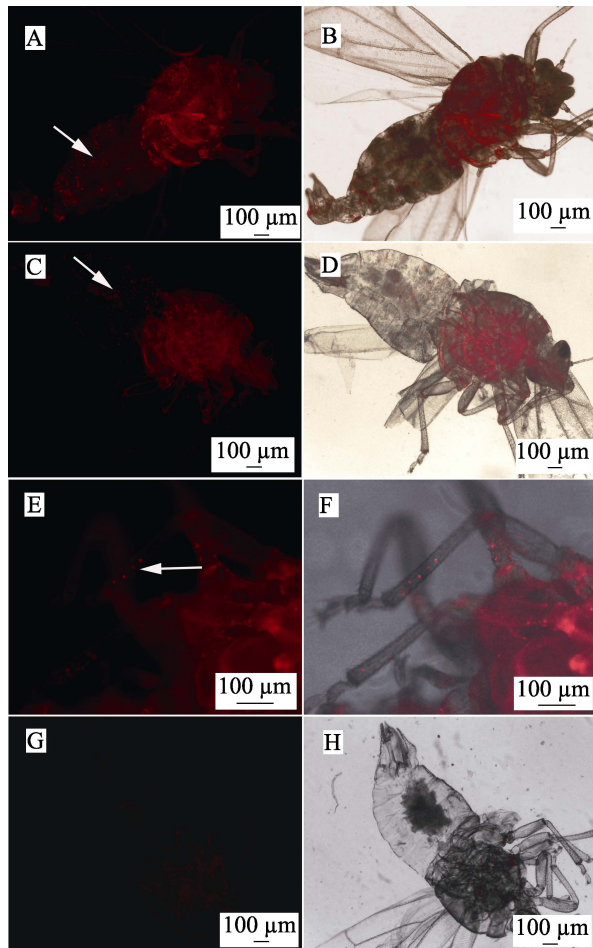


图 5 黄龙病病菌在柑橘木虱成虫体内的分布

Fig. 5 FISH visualization of HLB bacteria in *Diaphorina citri* adults

A, B. 黄龙病病菌柑橘木虱雄虫的分布; C, D. 黄龙病病菌柑橘木虱雌虫的分布; E, F. 黄龙病病菌柑橘木虱成虫腿部的分布; G, H. 阴性对照。左排: 荧光视场通道; 右排: 亮视场通道。

A, B. HLB bacteria in male *D. citri*; C, D. HLB bacteria in female *D. citri*; E, F. HLB bacteria in the leg of *D. citri* adults; G, H. Negative control. Left panel: Fluorescence in dark field; Right panel: Fluorescence in bright field.

3 讨论

近 20 年来, 柑橘黄龙病已成为在亚洲、非

洲、北美洲以及南美洲许多国家柑橘生产上的毁灭性病害(Graca, 1991; Bove, 2006; Gottwald, 2010)。柑橘黄龙病病菌主要有带病接穗、带病苗木的人工调运传播和通过带菌柑橘木虱取食传播两种方式(程春振等, 2013), 目前尚未明确种子是否能够传菌(Hartung *et al.*, 2010)。

对于黄龙病的检测, 目前还主要是利用 PCR 技术对黄龙病寄主植物以及媒介昆虫中的病菌进行检测(Bove, 2006; Inoue *et al.*, 2009)。Hung 等(2004)对柑橘木虱体内黄龙病病菌检测发现在柑橘木虱卵和 1 龄若虫体内不能检测到黄龙病病菌, 2-5 龄及成虫体内可以检测到黄龙病病菌。本研究用常规 PCR 不能检测到 3 龄若虫中黄龙病病菌的存在, 可能由于检测的种群数量不同造成的。利用 qRT-PCR 技术则可以检测到 2 龄若虫体内的黄龙病病菌。由此可见, 相对于常规 PCR, qRT-PCR 技术对黄龙病病菌的检测准确度和灵敏度更高。近年来宏基因组 DNA 技术异军突起, 预期今后可以更准更早地检测黄龙病的发生(Tyler *et al.*, 2009)。

在柑橘木虱传播黄龙病效率方面, 已有研究表明, 黄龙病病菌在柑橘木虱体内的循环期和其传染时间显著影响木虱传菌效率(范围成等, 2009), 柑橘木虱在黄龙病植株上取食, 其口器吸取病叶汁液后 3 d 内病菌即可完成黄龙病病原菌在木虱体内的循环(许长藩等, 1990; Grafton-Cardwell *et al.*, 2013)研究表明柑橘木虱的获菌时间范围是 15 min 到 24 h, 传菌时间是 15 min 到 7 h; 然而, 黄龙病病菌在柑橘中的不均匀分布和叶龄会影响柑橘木虱的获菌时间。

本研究表明黄龙病病菌在其昆虫宿主内的滴度随柑橘木虱龄期增加而增大, 该结果与 Hung 等(2004)的研究结果一致, Hung 等(2004)的研究还表明柑橘木虱 2-5 龄均可获菌, 但仅仅 4 龄和 5 龄才可以传菌, 然而柑橘木虱成虫阶段获得黄龙病病菌时, 柑橘木虱体内黄龙病病菌不能终身携带(Inoue *et al.*, 2009; Pelz-Stelinski *et al.*, 2010)。有研究表明柑橘木虱体内黄龙病病菌滴度达到一定阈值(1×10^6)后才可以传播

(Ukuda-Hosokawa *et al.*, 2015), 这或许可以解释为何 1-2 龄木虱若虫带菌但不传菌的现象, 但随着黄龙病病菌在媒介昆虫体内的自我增殖, 3 龄及以上若虫具备了传播黄龙病病菌的能力 (Aubert, 1987; 许长藩和夏雨华, 1988; Manjunath *et al.*, 2008)。

在黄龙病病菌在木虱宿主体内的分布研究方面, 20 世纪 80 年代, 国内学者证明了黄龙病病菌存在柑橘木虱的唾液腺及腹室中 (戴月明等, 1982; 黄炳超等, 1985)。许长藩和夏雨华 (1988) 通过扫描电镜发现柑橘木虱的唾液腺和消化道内有黄龙病病菌的分布。胡浩 (2007) 报道黄龙病病菌在柑橘木虱的胸部含量最高, 腹部次之, 在头部几乎没有。Ammar 等 (2011a, 2011b) 利用 qRT-PCR 和 FISH 技术对柑橘木虱体内黄龙病病菌的分布进行检测, 柑橘木虱的多种组织器官中均有黄龙病病菌的分布。在我们的研究中通过 FISH 检测技术发现, 黄龙病病菌在柑橘木虱体内是散布型分布, 甚至在足中都有存在, 这与 Ammar 等 (2011a, 2011b) 的研究结果也非常一致。此外, 黄龙病病菌不集中在生殖系统, 而是在木虱成虫体内呈散布型, 这样解释了黄龙病病菌在柑橘木虱体内卵传率非常低的原因 (Mann *et al.*, 2011), 至于为什么散布型分布有利于黄龙病病菌的水平传播, 其传播的生理机制和过程是什么, 有待于进一步深入研究。

参考文献 (References)

- Alves GR, Diniz AJF, Parra JRP, 2014. Biology of the Huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different host plants. *Journal of Economic Entomology*, 107(2): 691–696.
- Ammar EJ, Shatters RG, Hall DG, 2011a. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus Huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence in situ hybridization. *Journal of Phytopathology*, 159(11/12): 726–734.
- Ammar EJ, Shatters RG, Lynch C, Hall DG, 2011b. Detection and relative titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the salivary glands and alimentary canal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of citrus Huanglongbing disease. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(3): 526–533.
- Aubert B, 1987. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. *Fruits*, 42: 149–162.
- Bove JM, 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1): 7–37.
- Bo ZQ, Zhou CX, 2012. The research progress of citrus Huanglongbing on pathogen diversity and epidemiology. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 28(1): 133–137. [柏自琴, 周常勇, 2012. 柑橘黄龙病病原分化及发生规律研究进展. 中国农学通报, 28(1): 133–137.]
- Chen CZ, Zeng JW, Zhong Y, Yan HX, Jiang B, Zhong GY, 2013. Research progress on citrus Huanglongbing. *Acta Horticulturae Sinica*, 40(9): 1656–1668. [程春振, 曾继吾, 钟云, 闫化学, 姜波, 钟广炎. 2013. 柑橘黄龙病研究进展. 园艺学报, 40(9): 1656–1668.]
- Dai YM, Chen NR, Chen XY, Liao CQ, Cai MD, Shen JY, Chen ZY, 1982. Research on the entomophily of citrus Huanglongbing, *Diaphorina citri* Kuwayama. *South China Fruits*, (3): 1–2. [戴月明, 陈乃荣, 陈循渊, 廖长青, 蔡明段, 沈菊英, 陈作义, 1982. 柑桔黄龙病传病昆虫木虱的研究. 中国南方果树, (3): 1–2.]
- Fan GC, Liu B, Wu RJ, Li D, Cai ZJ, Ke C, 2009. Thirty years of research on citrus Huanglongbing in China. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 24(2): 183–190. [范国成, 刘波, 吴如健, 李韬, 蔡子坚, 柯冲, 2009. 中国柑橘黄龙病研究 30 年. 福建农业学报, 24(2): 183–190.]
- Fujikawa T, Miyata S, Iwanami T, 2013. Convenient detection of the citrus greening (huanglongbing) bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' by direct PCR from the midrib extract. *PLoS ONE*, 8(2): e57011.
- Gottwald TR, 2010. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1): 119–139.
- Graca JV, 1991. Citrus greening disease. *Annual Review of Phytopathology*, 29(1): 109–136.
- 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.
- Huang BC, Liu XQ, Chen XY, 1985. Research on *Diaphorina citri* Kuwayama transmits citrus Huanglongbing. *Journal of South China Agricultural University*, 6(4): 46–50. [黄炳超, 刘秀琼,

- 陈循渊. 1985. 柑桔木虱传播柑桔黄龙病的研究. 华南农业大学学报, 6(4): 46–50.]
- Hu H, 2007. Used real time PCR to study the dynamic changes and distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) in host. Master thesis. Chongqing: Chongqing University. [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. 硕士学位论文. 重庆: 重庆大学.]
- Hartung JS, Halbert SE, Pelz-Stelinski K, Brlansky RH, Chen C, Gmitter FG, 2010. Lack of evidence for transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' through citrus seed taken from affected fruit. *Plant Disease*, 94(10): 1200–1205.
- 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.
- Iftikhar Y, Rauf S, Shahzad U, Zahid MA, 2016. Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management—A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(1): 1–11.
- Inoue H, Ohnishi J, Ito T, Tomimura K, Miyata S, Iwanami T, Ashihara W, 2009. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Annals of Applied Biology*, 155(1): 29–36.
- Jagoueix S, Bove J, Garnier M, 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(3): 379–386.
- 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.
- Manjunath KL, Halbert SE, Ramadugu C, Webb S, Lee RF, 2008. Detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. *Phytopathology*, 98(4): 387–396.
- Mann RS, Pelz-Stelinski K, Hermann SL, Tiwari S, Stelinski LL, 2011. Sexual transmission of a plant pathogenic bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between conspecific insect vectors during mating. *PLoS ONE*, 6(12): e29197.
- Mitsuhashi W, Saiki T, Wei W, Kawakita H, Sato M, 2002. Two novel strains of *Wolbachia* coexisting in both species of mulberry leafhoppers. *Insect Molecular Biology*, 11(6): 577–584.
- Morgan JK, Zhou L, Li W, Shatters RG, Keremane M, Duan Y, 2012. Improved real-time PCR detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. *Molecular Cellular Probes*, 26(2): 90–98.
- 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.
- Tiwari S, Gondhalekar AD, Mann RS, Scharf ME, 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.
- Tyler HL, Roesch LF, Gowda S, Dawson WO, Triplett EW, 2009. Confirmation of the sequence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and assessment of microbial diversity in Huanglongbing-infected citrus phloem using a metagenomic approach. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 22(12): 1624–1634.
- Ukuda-Hosokawa R, Sadoyama Y, Kishaba M, Kuriwada T, Anbutsu H, Fukatsu T, 2015. Infection density dynamics of the citrus greening bacterium "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in field populations of the psyllid *Diaphorina citri* and its relevance to the efficiency of pathogen transmission to citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11): 3728–3736.
- Xu CF, Xia YH, 1990. Research on the cycle period of citrus huanglongbing in *Diaphorina citri* Kuwayama. *Acta Phytopathologica Sinica*, 20(1): 25–31. [许长藩, 夏雨华, 1990. 柑桔黄龙病的病原在木虱体内循环期研究. 植物病理学, 20(1): 25–31.]
- Xu CF, Xia YH, Li CF, Ke C, 1988. The law of *Diaphorina citri* Kuwayama spreading citrus Huanglongbing and distribution of pathogens in body. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, (3): 57–62. [许长藩, 夏雨华, 李开本, 柯冲, 1988. 柑桔木虱传播黄龙病的规律及病原在虫体内分布的研究. 福建农业学报, (3): 57–62.]
- Xie PH, Su CA, Lin ZG, 1989. The biology of citrus psyllid. *Journal of Zhejiang University*, 15(2): 198–202. [谢佩华, 苏朝安, 林自国, 1989. 柑桔木虱生物学研究. 浙江大学学报, 15(2): 198–202.]