

感染黄龙病茶枝柑的症状表现及其病原在枝条与果实橘络中的分布规律

邓云双, 李桃, 邓晓玲, 郑正*

华南农业大学柑橘黄龙病研究室, 广东广州 510642

摘要: 茶枝柑 (*Citrus reticulata* cv. *chachiensis*) 在广东新会地区有悠久的栽培历史, 其果皮可制作陈皮, 具有一定的药用价值。茶枝柑黄龙病 (Citrus Huanglongbing, HLB) 发生历史悠久, 危害严重, 而目前尚无对感染黄龙病的茶枝柑症状描述及病菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) 分布的相关研究。本研究通过采集广东新会感染 CLas 茶枝柑枝条和果实, 对感病的茶枝柑叶片及果实的典型症状进行观察, 同时通过实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 分析 CLas 在茶枝柑枝条不同部位及果实橘络中的分布规律, 为筛选高浓度 CLas 材料提供依据。观察发现感染 CLas 的茶枝柑叶片呈现斑驳黄化症状, 新叶尤为严重; 感染 CLas 的茶枝柑果实表现出典型的“红鼻子”果症状, 果实畸形形状不对称, 种子败育。病原定量分析表明, CLas 在同一染病茶枝柑枝条中呈不均匀分布: 果实中轴组织中的 CLas 含量最高, 为(2 770 162.87±544 972.11)个, 其次为橘络(2 721 335.84±528 771.21)个, 二者均显著高于其他部位。进一步对同一橘络不同片段中的 CLas 进行定量分析发现, CLas 在同一橘络中亦呈不均匀分布, 其中位于 1~3 cm 的片段组织中的 CLas 含量显著高于其他部位 ($P<0.05$), CLas 在橘络及果实中轴中的浓度显著高于其他部位。研究结果可为茶枝柑黄龙病的鉴定、CLas 在柑橘枝条及果实中的转运规律探究及后续筛选高浓度 CLas 材料提供参考依据。

关键词: 柑橘黄龙病; 症状; 茶枝柑; 橘络; 病原分布

中图分类号: S436.66 文献标识码: A

Symptoms of *Citrus reticulata* cv. *chachiensis* Infected with Huanglongbing and *Candidatus liberibacter asiaticus* Distribution in Branches and Fruit Pith

DENG Yunshuang, LI Tao, DENG Xiaoling, ZHENG Zheng*

Citrus Huanglongbing Research Laboratory, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

Abstract: *Citrus reticulata* cv. *chachiensis*, also known as Xinhui Mandarin Orange, has a long history of cultivation in Guangdong (Xinhui) and is a local agricultural product in Guangdong. There are no relevant studies on the symptoms description and distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) in *C. reticulata* cv. *chachiensis* infected with Citrus Huanglongbing (HLB). Through this study, it can provide a basis for the study of the movement of CLAs in citrus plant branches and fruit pith and can also provide ideal plant materials for the subsequent acquisition of high concentration of CLAs. In this study, *C. reticulata* cv. *chachiensis* branches and fruit pith infected with CLAs were used as plant material to identify symptoms and analyze the distribution of CLAs in different parts of citrus branches and different length fragments of the fruit pith based on real-time quantitative PCR (qPCR). Through the observation of the leaves and fruits from the infected citrus plants, the upper leaves of the branches infected with CLAs showed mottled and element-deficient yellowing, especially the symptoms of the new leaves of the branches were more obvious, while the color

收稿日期 2022-08-02; 修回日期 2022-11-28

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2021YFD1400800); 国家现代农业产业技术体系项目 (No. CARS-26); 国家自然科学基金项目 (No. 31901844)。

作者简介 邓云双 (2001—), 女, 本科生, 研究方向: 柑橘黄龙病病原。*通信作者 (Corresponding author): 郑正 (ZHENG zheng), E-mail: zzheng@scau.edu.cn。

of the lower old leaves was dark green and the texture was hard. Compared with the healthy fruit, the fruit infected with CLAs showed uneven coloring, showing typical symptoms of “red nose fruit”. Meanwhile, compared with the healthy fruit, the fruit infected with CLAs showed uneven size, abnormal body and asymmetrical shape, the seed was small and the seed aborted. The concentration of CLAs in the central axis of the fruit was close to that in the fruit pith, and significantly higher than that in other parts of the branches ($P < 0.05$). CLAs was also unevenly distributed in different length segments of the same fruit pith, and the concentration of CLAs was the highest in the middle of fruit pith (1–3 cm fragment), the concentration of CLAs in the central axis and fruit pith of HLB-infected *C. reticulata* cv. *chachiensis* fruits is significantly higher than that of other parts. The study could be a reference for the identification of HLB, a basis for the study of the movement of CLAs in citrus plant branches and fruit pith, and used to select ideal plant materials for the subsequent acquisition of high concentration of CLAs.

Keywords: Citrus Huanglongbing; symptoms; *Citrus reticulata* cv. *chachiensis*; fruit pith; bacterial distribution

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.09.013

柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing, HLB) 是世界柑橘生产中最具毁灭性的病害之一, 对全球的柑橘产业造成巨大的经济损失。黄龙病病原为 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria), 根瘤菌科 (Rhizobiaceae), 候选韧皮部杆菌属细菌 (*Candidatus liberibacter* spp.)^[1]。根据病原 16S rDNA 和 β -操纵子基因的序列特征, 以及传病媒介和病原性质, 可分为亚洲种 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLAs)、非洲种 (*Candidatus Liberibacter africanus*, CLaf) 和美洲种 (*Candidatus Liberibacter americanus*, CLam), 其中 CLAs 的分布范围最广, 危害最大^[2]。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发现, 我国柑橘黄龙病均为 CLAs^[3-4]。柑橘感染黄龙病后叶片会出现均匀黄化、斑驳黄化以及缺素状黄化等症状, 同时植株不定期抽稍, 开花多而早, 座果率低, 果实小而畸形, 果实成熟期出现“红鼻子”果、“青果”等典型症状^[5]。

黄龙病作为系统性侵染病害, 其病原在染病植株内分布并不均匀^[3, 6-16]。郭亨玉等^[7]发现染病贡柑橘橘络中的 CLAs 浓度最高且显著高于其他部位 (果实中轴、新叶等)。陈燕玲等^[8]发现同一病枝的“红鼻子果”中 CLAs 浓度高于叶片的, 而斑驳老叶的 CLAs 浓度低于新叶。健康植株在染病后, 体内的病原菌浓度分布并不均匀, 不同组织间也存在差异^[9]。娄兵海等^[11]发现柑橘花器和种子中的 CLAs 分布不均, 其中种皮组织浓度最高, 花粉浓度最低。FANG 等^[13]发现 CLAs 在染病沙糖桔的果皮内分布不均匀, 倾向于定植于果皮的中间或远端 (茎端) 区域。KUNTA 等^[14]发现葡萄柚和甜橙的花梗、果轴、叶中脉的 CLAs 浓度明显高于其他部位。LOUZADA 等^[15]发现在树的北侧

CLAs 浓度显著高于南、西两侧; 而对于树的根部, 土壤表层及水平生长根中的 CLAs 浓度高于深层垂直生长的根。TATINENI 等^[16]发现在染病柑橘果柄处的 CLAs 浓度最高, 且显著高于其他部位。

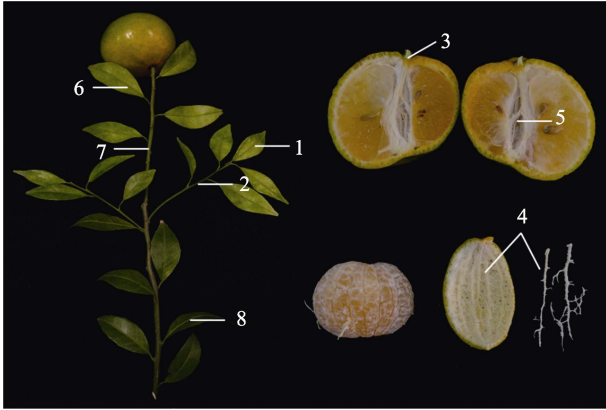
茶枝柑 (*Citrus reticulata* cv. *chachiensis*) 又称新会柑, 在广东新会栽培历史悠久, 是广东地区的特色农业产品^[17]。利用其果皮加工制成的陈皮具有一定的药用价值和经济价值^[18]。茶枝柑在感染黄龙病菌后, 会出现植株衰退, 甚至大幅度减产的情况, 严重制约了产业的发展^[19]。目前, 尚无茶枝柑感染黄龙病后的症状表现及病原在植株中分布情况的系统报道。本研究以广东新会地区感染黄龙病的茶枝柑为材料, 对茶枝柑感染黄龙病后的症状进行系统描述, 并通过实时荧光定量 PCR 对 CLAs 在茶枝柑枝条不同部位中的含量及分布情况进行分析, 为进一步探究 CLAs 在茶枝柑中的转运规律提供基础, 同时也可作为筛选高浓度的黄龙病菌材料提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 感染黄龙病的茶枝柑枝条 2021 年 11 月于广东省新会市采集具有黄龙病典型症状的茶枝柑带果枝条若干, 经 Real-time PCR 检测后挑选携带黄龙病菌的带果枝条作为试验材料。挑选来自不同植株的 25 枝具有黄龙病典型症状的茶枝柑带果枝条, 作为 25 个生物学重复。如图 1 所示, 将每个带果枝条依次分为: 新叶、新梢枝条韧皮部、果蒂、橘络、果实中轴、果实枝条叶片、果实枝条韧皮部、下部老叶 8 个部分。样品收集后置于 -80°C 保存备用。

1.1.2 感染黄龙病的茶枝柑果实橘络 挑选 14 个



1: 新叶; 2: 新梢枝条韧皮部; 3: 果蒂; 4: 橘络; 5: 果实中轴; 6: 果实枝条叶片; 7: 果实枝条韧皮部; 8: 老叶。
1: New leaves; 2: New shoots phloem; 3: Pedicel; 4: Fruit pith; 5: Fruit central axis; 6: Fruit branch leaves; 7: Fruit branch phloem; 8: Mature leaves.

图 1 感染黄龙病的茶枝柑枝条样品

Fig. 1 Sampling diagram of HLB-affected *C. reticulata* cv. *chachiensis* branches

直径较大且经过检测携带黄龙病菌的茶枝柑果实作为材料, 用工具使橘络从果实中完整分离。如图 2 所示, 每个果实挑取 3 条较长并且长度超过 5 cm 的橘络, 按从果蒂到果实底部的方向进行切段, 每 1 cm 为一段, 只保留前 5 段, 切碎置于 2 mL 收集管中, 舍弃多余橘络 (不足 1 cm), 收集的橘络用于 DNA 提取及 CLAs 定量检测。

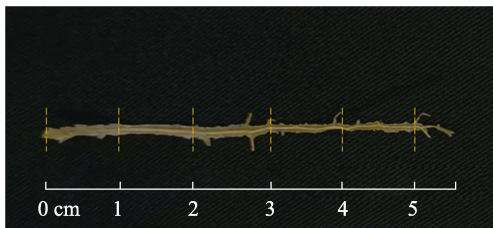


图 2 茶枝柑橘络分段取样示意图

Fig. 2 Sampling diagram of segmented of *C. reticulata* cv. *chachiensis* fruit pith

1.2 方法

1.2.1 植物 DNA 提取 所有样品分别处理切碎取 0.1 g 进行 DNA 提取, 其中柑橘叶片仅切取叶中脉。提取总 DNA 的方法选用 OMEGA BIO-TEK 公司的植物 DNA 提取试剂盒 HP Plant DNA Kit (200) (2485-02)。提取的 DNA 样品使用超微量紫外-可见分光光度计 NanoDrop one (Thermo Fisher Scientific) 进行浓度和纯度的测定, 并置于 -20°C 保存备用。

1.2.2 柑橘黄龙病菌的检测与定量 使用实时荧光定量 PCR 对 CLAs 进行检测与定量。检测方法

参考 BAO 等^[20]的 CLAs 定量 PCR 检测方法, 对所有 DNA 样品进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测。以已知含有 CLAs 的茶枝柑 DNA 样本为阳性对照, 健康茶枝柑 DNA 样本为阴性对照, ddH₂O 为空白对照, 以提取的所有 DNA 样品为模板, 进行荧光定量 PCR 扩增。根据反应后得到的 CT 值来判断样品中是否含有柑橘黄龙病菌 (CT 值 < 32)。

qPCR 使用含有引物目的片段 pEASY-T1 (TransGen Biotech, 全式金生物) 重组质粒制作标准曲线, 共设置 8 个梯度 (10 倍稀释), 得到标准方程以量化在总 DNA 中的 CLAs 含量。同一枝条不同部位中的 CLAs 含量以每 1 ng DNA 含有的 CLAs 拷贝数来表示。同一橘络不同片段中的 CLAs 含量=每 1 μL DNA 的 CLAs 拷贝数 \times 提取的总 DNA 体积。

1.3 数据处理

使用 SPSS 26 和 Microsoft Excel 2019 软件进行试验数据的统计学分析。运用 SPSS 26 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA) 单因素方差分析 (ANOVA) 中的邓肯式复极差检验法 (DMRT) 进行多重比较, 利用 Origin 2018 (OriginLab Corp., Northampton, MA 01060, USA) 对所得数据进行可视化。

2 结果与分析

2.1 感染黄龙病茶枝柑的症状观察

茶枝柑植株在感染黄龙病后, 枝条上部叶片表现为斑驳型、缺素状黄化, 尤其是枝条新叶症状较为明显, 而下部老叶颜色深绿无黄化, 质地较硬 (图 1); 而感染柑橘黄龙病的茶枝柑果实 (图 3A~图 3C) 与健康茶枝柑果实 (图 3D~图 3F) 相比, 果实着色不均匀, 由果蒂向下呈橘红色, 接近果



A~C: 健康果实; D~F: 染病果实。

A~C: Healthy fruits; D~F: Infected fruits.

图 3 健康果实和感染黄龙病的茶枝柑果实

Fig. 3 Healthy and HLB-infected *C. reticulata* cv. *chachiensis* fruits

实底部颜色接近青绿色，为典型的“红鼻子”果症状，同时感染黄龙病的果实与健康果实相比，大小不均匀，果身不正，呈不对称畸形；切开果实可见种子极小，种子呈败育症状。

2.2 黄龙病菌在茶枝柑枝条不同部位的分布

通过对感染黄龙病茶枝柑枝条的 8 个部位样品进行 CLAs 检测发现，在 25 个染病枝条中，除果实橘络、中轴及老叶能稳定检测到 CLAs 外，其他部位均有部分样本未检测到 CLAs，尤其是新梢部位（包括新叶中脉和新梢韧皮部）的阴性样本比其他部位多（表 1）。定量结果表明，CLAs 在染病茶枝柑枝条中的分布并不均匀（图 4），其中果实中轴的 CLAs 含量最高，橘络次之，2 种组织中的 CLAs 含量接近均显著高于其他部位 ($P<0.05$)。染病茶枝柑枝条不同部位的 CLAs 含量从高到低依次为：果实中

轴 ($2\ 770\ 162.87\pm 544\ 972.11$)>橘络 ($2\ 721\ 335.84\pm 528\ 771.21$)>果实枝条叶片 ($530\ 145.21\pm 382\ 295.05$)>果蒂 ($339\ 704.79\pm 67\ 481.43$)>新叶 ($168\ 229.39\pm 30\ 035.39$)>果实枝条韧皮部 ($150\ 789.13\pm 26\ 500.31$)>新梢韧皮部 ($131\ 369.40\pm 20\ 451.80$)>老叶 ($51\ 952.04\pm 6987.41$)。

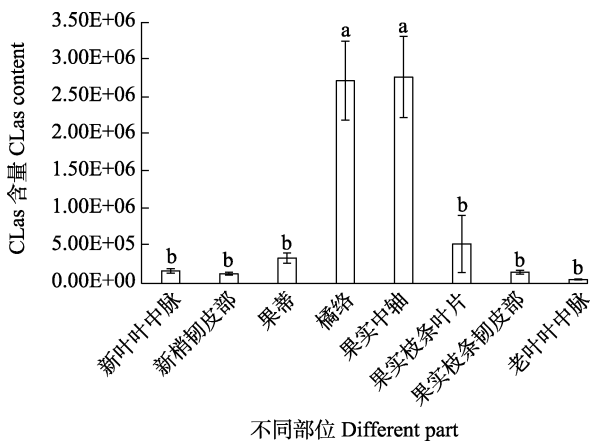
2.3 黄龙病菌在同一果实同一橘络中的分布

基于染病果实中轴和橘络中具有较高的 CLAs 含量，本研究进一步以易剥离的橘络组织为材料，探究 CLAs 在橘络组织中的分布规律。如图 5 所示，通过对同一橘络不同长度片段（每 1 cm）中的 CLAs 含量进行比较分析，发现 CLAs 在同一条茶枝柑橘络中呈不均匀的分布规律，其中位于 1~2 cm 位置的橘络片段组织中所含有的 CLAs 含量 ($670\ 933\ 419.18\pm 133\ 913\ 902.91$) 最高，其次为位于 2-3 cm 处的橘络组织片段 ($595\ 644\ 317.71\pm 121\ 200\ 818.51$)。统计分析表明，位于 1~2 cm 和 2~3 cm 位置的橘络片段组织中的 CLAs 含量显著高于位于前端 (0~1 cm) 和后端 (4~5 cm) 中的 CLAs 含量 ($P<0.05$)。

表 1 染病茶枝柑枝条不同部位样品的检测结果

Tab. 1 Detection results of different parts of HLB-affected *C. reticulata* cv. *chachiensis* branches

部位 Part	样品总数 No. of samples	阳性样品数 No. of positive samples
新叶叶中脉	24	18
新梢韧皮部	25	20
果蒂	25	24
橘络	25	25
果实中轴	23	23
果实枝条叶片	15	14
果实枝条韧皮部	25	23
老叶叶中脉	25	25
总计	187	172

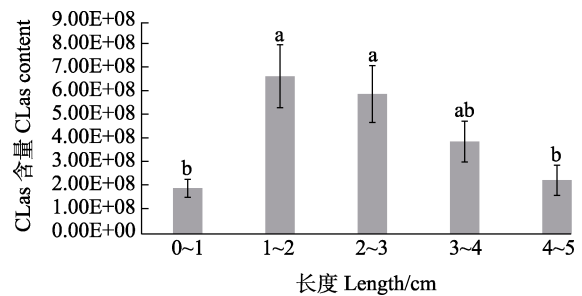


不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 4 染病茶枝柑枝条不同部位的 CLAs 含量

Fig. 4 Content of CLAs in different parts of HLB-infected *C. reticulata* cv. *chachiensis* branches



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 5 同一病果同一橘络中的 CLAs 分布

Fig. 5 Distribution of CLAs in the individual fruit pith from the same HLB-infected fruit

3 讨论

本研究中观察发现茶枝柑在感染黄龙病后，叶片会出现斑驳黄化及花叶症状，果实呈现典型“红鼻子”果，果实畸形不对称，种子败育等症，这些症状与砂糖橘感染黄龙病后的症状表现极为相似^[8, 21]。由于 CLAs 在果实中分布不均匀，采取更为灵敏的 qPCR 方法对柑橘黄龙病菌的检测和定量分析至关重要，而本研究中所采取的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 特异性好，较普通 qPCR 更为灵敏^[20]，也被广泛使用于 CLAs 的检测分析中。本研究通过分析感染黄龙病的茶枝柑带

果枝条不同部位的 CLas 含量,发现 CLas 在茶枝柑枝条各部分分布不均匀,主要富集于果实及附近部位(库器官),这一结果与其他品种^[7-10, 12]的研究结果类似,本研究中果实中轴的 CLas 含量最高,而作为源器官的老叶部分 CLas 则最低。TATINENI 等^[16]通过电镜观察发现 CLas 可通过筛孔在植株中移动,并推测 CLas 在植株体内的移动方向与营养流动方向一致,可以从制造营养的源器官(如成熟老叶)转向储存或消耗营养的库器官(如果实、新叶、花等),这可以进一步解释众多研究中 CLas 均富集于果实的原因。大多数对柑橘类 CLas 分布规律的研究结果表明,橘络上的病菌浓度最高且显著高于其他部位^[7-8, 12],而柚类则是果实中轴的 CLas 含量远高于其他部位^[12];本研究中则是在茶枝柑果实中轴上的 CLas 含量最高,橘络次之,二者差异虽然不显著,但均显著高于其他部位,与上述 2 个品种中的 CLas 分布规律有所不同,这可能与果实品种、成熟度、采样时间等因素有关。

对 CLas 在橘络中分布规律的研究结果显示,CLas 主要聚集在橘络中部,在靠果蒂处含量最低,与郭亨玉等^[7]的研究结果一致。橘络中含有韧皮部和木质部共同组成的维管束组织,为果实运输发育所需的各类营养物质,且与汁囊即果实果肉相连,能够为 CLas 的生长提供良好的营养条件和场所^[13],推测由于橘络中部恰好对于果实膨大部位即汁囊更多,营养更丰富,CLas 则能在此处更好地繁殖生长,因此含量更高。果蒂是植株向整个果实输导营养成分的枢纽,张培等^[10]通过扫描电镜观察到感染黄龙病的果实果柄的韧皮部筛管细胞杂乱无章,有大量淀粉堆积,堵塞筛管,推测筛管堵塞会阻碍黄龙病菌的移动是造成黄龙病菌分布不均匀的原因之一。另外 FANG 等^[13]通过透射电镜观察发现 CLas 在橘络的韧皮部细胞中也呈不均匀分布,有的韧皮部细胞中充满 CLas,而相邻韧皮部细胞则含较少甚至未发现 CLas 的存在,这从解剖学上进一步解释了 CLas 在橘络中分布不均匀的原因。

综上所述,CLas 在染病茶枝柑枝条及同一橘络均呈不均匀分布,并且 CLas 在茶枝柑果实中轴及橘络中的浓度显著高于其他部位,CLas 在茶枝柑同一条橘络 1~3 cm 片段含量稍高于其他片段,本研究结果可为研究 CLas 在侵染柑橘后的转运规律提供理论基础,同时也可为今后快速获得高含量

黄龙病菌寻找理想植物材料提供参考依据。

参考文献

- [1] JAGOUEIX S, BOVE J M, GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(3): 379-86.
- [2] BOVÉ J M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2006, 88(1): 7-37.
- [3] 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(3): 122-123.
DENG X L, TANG W W. The studies on detection of Citrus Huanglongbing pathogen by polymerase chain reaction[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 1996(3): 122-123. (in Chinese)
- [4] 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原[J]. *植物病理学报*, 1996(3): 53-60.
TIAN Y N, KE S, KE C. Detection and quantitation of Citrus Huanglongbing pathogen by polymerase chain reaction[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1996(3): 53-60. (in Chinese)
- [5] 林孔湘. 柑桔黄梢(黄龙)病研究 I. 病情调查[J]. *植物病理学报*, 1956(1): 1-11.
LIN K X. Observations on yellow shoot of citrus[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1956(1): 1-11. (in Chinese)
- [6] 冯贤巧. 柑橘黄龙病菌在柑橘病树不同部位中的定量分布情况研究[J]. *农业科技通讯*, 2021(6): 220-222.
FENG X Q. The studies on quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in different parts of HLB-infected citrus trees[J]. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 2021(6): 220-222. (in Chinese)
- [7] 郭亨玉, 罗小玲, 李桃, 邓晓玲, 郑正. 柑橘黄龙病菌在染病贡柑枝条和果实橘络内的分布规律[J]. *植物病理学报*, 2020, 50(5): 543-548.
GUO H Y, LUO X L, LI T, DENG X L, ZHENG Z. Distribution of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in Huanglongbing-affected *Citrus reticulata* cv. Gongkan branches and the fruit pith[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2020, 50(5): 543-548. (in Chinese)
- [8] 陈燕玲, 唐瑞, 刘洋, 邓晓玲, 许美容. 黄龙病菌在柑橘枝条上的分布和多样性分析[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(6): 728-737.
CHEN Y L, TANG R, LIU Y, DENG X L, XU M R. Distribution and genetic diversity of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in citrus canopy shoots[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2018, 48(6): 728-737. (in Chinese)

- [9] 褚丽萍, 郑正, 邓晓玲. 定量分析柑桔黄龙病菌在沙糖桔中的分布[J]. 中国南方果树, 2016, 45(6): 42-43.
CHU L P, ZHENG Z, DENG X L. Quantitative analysis of the distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Shatangju tangerine[J]. South China Fruits, 2016, 45(6): 42-43. (in Chinese)
- [10] 张培, 关磊, 刘蕤, 蒲雪莲, 邓晓玲. 砂糖橘红鼻子果与韧皮部杆菌感染相关性研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(4): 738-742.
ZHANG P, GUAN L, LIU R, PU X L, DENG X L. Relationship between the "red nose" fruit of Shatangju tangerine with *Candidatus Liberibacter asiaticus*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(4): 738-742. (in Chinese)
- [11] 娄兵海, 宋雅琴, 赵小龙, 白先进, 邓崇岭. 柑橘花器和种子中黄龙病菌的定量分布及应用[J]. 植物保护学报, 2014, 41(4): 447-452.
LOU B H, SONG Y Q, ZHAO X L, BAI X J, DENG C L. Quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in flowers and seeds of Shatian pummelo and its applications[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2014, 41(4): 447-452. (in Chinese)
- [12] 王娟. 黄龙病菌在带果柑橘枝条上的时空分布规律研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
WANG J. Temporal and spatial distribution of "*Candidatus Liberibacter Asiaticus*" on citrus branches with fruits[D]. Guanzhou: South China Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [13] FANG F, GUO H Y, ZHAO A M, LI T, LIAO H H, DENG X L, XU M R, ZHENG Z. A significantly high abundance of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in citrus fruit pith: in planta transcriptome and anatomical analyses[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 681251.
- [14] KUNTA M, GRACA J V, MALIK N S A, LOUZADA E S, SETAMOU M. Quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the aerial parts of the Huanglongbing-infected citrus trees in Texas[J]. HortScience, 2014, 49(1): 702-709.
- [15] LOUZADA E S, VAZQUEZ O E, BRASWELL W E, YANEV G, DEVANABOINA M, KUNTA M. Distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* above and below ground in Texas citrus[J]. Phytopathology, 2016, 106(7): 702-709.
- [16] TATINENI S, SAGARAM U S, GOWDA S, ROBERTSON C J, DAWSON W O. In planta distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR[J]. Phytopathology, 2008, 98(5): 592-599.
- [17] 刘玉芳, 温志佳, 邹婉霞, 吴泳莹, 梁社坚. 南药广陈皮道地性研究进展[J]. 中药材, 2019, 42(8): 1952-1956.
LIU Y F, WEN Z J, ZOU W Z, WU Y X, LIANG S J. Research progress on the genuineness of southern medicine Guangchenpi[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2019, 42(8): 1952-1956. (in Chinese)
- [18] 梅全喜, 林慧, 宋叶, 赵志敏, 杨得坡. 广陈皮的药理作用与临床研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2019, 19(8): 899-902.
MEI Q X, LIN H, SONG Y, ZHAO Z M, YANG D P. Pharmacological actions and clinical research progress of Guangchenpi[J]. Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China, 2019, 19(8): 899-902. (in Chinese)
- [19] 石莹, 刘园, 陈嘉景, 张海朋, 曾继吾, 黄宏建, 田静, 彭抒昂, 徐娟. 黄龙病病菌感染对茶枝柑果实类黄酮和挥发性物质的影响[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(1): 24-33.
SHI Y, LIU Y, CHEN J J, ZHANG H P, ZENG J W, HUANG H J, TIAN J, PENG S A, XU J. Effects of Huanglongbing infection on profiles of flavonoids and volatiles in fruits of *Citrus reticulata* cv. *chachiensis*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(1): 24-33. (in Chinese)
- [20] BAO M L, ZHENG Z, SUN X A, CHEN J C, DENG X L. Enhancing PCR capacity to detect *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizing whole genome sequence information[J]. Plant Disease, 2020, 104(2): 527-532.
- [21] 王圣通, 郑正, 鲍敏丽, 许美容, 邓晓玲. 柑橘黄龙病对砂糖橘果实品质的影响[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(1): 145-149.
WANG S T, ZHENG Z, BAO M L, XU M R, DENG X L. Effects of Huanglongbing on fruit quality of Shatangju (*Citrus reticulata* Blanco)[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2016, 28(1): 145-149. (in Chinese)