

## カンキツグリーンング病菌検出のための nested-PCR

川合崇之・菊川華織・佐々木智基<sup>1)</sup>・河津裕一・横山 亨・渡久地章男

那覇植物防疫事務所・<sup>1)</sup> 琉球大学農学部

Technique for Detection of Huanglongbing Using nested-PCR. Takashi Kawai, Kaori Kikukawa, Tomonori Sasaki<sup>1)</sup>, Yuichi Kawazu, Toru Yokoyama and Akio Toguchi (Naha Plant Protection Station, 2-11-1, Minatomachi, Naha, Okinawa 900-0001, Japan. kawait@pps.go.jp, <sup>1)</sup> Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 43: 27-32 (2007)

**Abstract:** PCR is commonly used in the detection of the citrus greening “Huanglongbing (HLB)” pathogen. However, PCR testing may not detect the HLB pathogen from infected trees without HLB symptoms. A more sensitive detection method for the HLB pathogen of latent infected trees is required to be developed. For this purpose, we designed a new primer set for nested-PCR. Results of the studies showed that our nested-PCR had a higher sensitivity than conventional PCR. Moreover, it could detect the HLB pathogen from HLB infected trees not showing symptoms, which had negative results by conventional PCR tests. Therefore, we concluded that the nested-PCR technique is an effective method for the detection of the HLB pathogen at low concentrations in infected trees.

**Key words:** HLB, PCR, nested-PCR

### 緒 言

カンキツグリーンング病（正式英名：Huanglongbing; 以下 HLB）は、カンキツ類の最重要病害のひとつであり、アフリカ大陸の多くの国、アラビア半島南西部、南アジア、東南アジア、中国などのカンキツ生産地で発生し（da Graca 1991; EPPO, 2005）、現在も発生地域を拡大しつつある。最近では、ブラジルおよびアメリカ合衆国フロリダ州でも発生が確認されている（Texeira ら, 2005; 芦原, 2006）。日本での発生は、西表島で 1988 年、沖縄本島で 1994 年に確認されている（Miyakawa *et al.*, 1989; 河野ら, 1997）。HLB 菌は、師部局在性の難培養性細菌であり、アジア型、アフリカ型、アメリカ型と呼ばれる 3 系統に類別され、それぞれ ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Candidatus L. africanus*’, ‘*Candidatus L. americanus*’ の仮の学名がつけられている（Subandiyah *et al.*, 2000; Garnier, *et al.*, 2000）。本病は接木伝染とキジラミ類による虫媒伝染により伝播されるが、アジア型ではミカンキジラミ (*Diaphorina citri* Kuwayama) が媒介昆虫である（da Graca, 1991）。ミカンキジラミは、日本では奄美大島以南の南西諸島の広範に生息しているが、その生息域が北上した場合、HLB の分布地域も拡大するのではないかと懸念されている（渡久地ら, 1997; 河野, 2001）。我が国では、本病菌の宿主植物であるカンキツ類の穂木・苗木が海外から輸入された場合、HLB 菌を含むウイルス等の感染を検査するため隔離栽培により厳重な輸入検疫が実施されている。また、国内における HLB のまん延防止のために、HLB の発生地域から未発生地域に持ち出すカンキツの穂木・苗木類の移動は植物防疫法により制限されて

おり、植物防疫所の検査により、当該苗木類にミカンキジラミが付着していないことおよび HLB 菌に感染していないことの確認が必要である。HLB 菌検出のための PCR はこれらの検査や HLB 既発生地域での防除のための感染樹の診断にしばしば用いられているが、病徴の発現していない潜在感染や発病初期のように樹体内の HLB 菌濃度が低い場合、確実に検出できないことがある。

このため、本試験では HLB 検査や防除のための診断を的確に行うために、現行の PCR よりさらに高感度な検出方法とされる nested-PCR (Llop ら, 2000) が導入可能であるか調査した。

### 材料および方法

#### 供試試料

##### ・HLB 菌の接種源

1994 年に沖縄県糸満市で発見された HLB 自然発病樹（シークワサー: *Citrus depressa* Hayata）から採取した罹病枝を鉢植えラフレモン (*Citrus jambhiri* Lush) 実生苗木に 1995 年 9 月に接種し、HLB 菌感染を確認したものを HLB 菌保存樹として、以下の各試験に供試した。

##### ・HLB 菌検出試験への供試植物

Jagoueix, *et al.* (1994) のプライマーと新たに設計したプライマー（以後、nested-プライマーと称する）による PCR および検出限界:

上記の HLB 菌接種源の休眠芽を 2006 年 2 月に 2 年生のシークワサー実生苗木に接種したところ、約 7 か月後の 2006 年 9 月に病徴が発現した。4 株の苗木から病徴の現れた展開葉およびその上位葉 10 枚を採取し

てHLB菌感染葉として供試した。

接木接種した樹からの検出試験:

HLB菌接種源の休眠芽を2年生シークワサー実生苗木に2005年4月に腹接ぎし、接種後経時的に成葉または樹皮を採取して供試した (Fig. 2)。

#### DNA抽出法

DNAの抽出法は、Hung, *et al.* (1999)によるCTAB法を改変した以下の方法で行った。試料(中肋を含む葉片または樹皮)50mgに磨砕用緩衝液(100mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM EDTA pH 8.0, 1M NaCl, 20mg/ml プロテナーゼK)1.4mlを加え磨砕した後、磨砕液1.0mlに10%サルコシル160 $\mu$ lを加えて55 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。これを遠心分離(6,000g, 10分)し、上清800 $\mu$ lに5M NaCl, CTAB-NaClをそれぞれ100 $\mu$ l加え、65 $^{\circ}$ Cで10分間静置した。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1)を500 $\mu$ l加え攪拌した後、遠心し(12,000g, 10分)、上清800 $\mu$ lを同様にフェノール処理した。上清500 $\mu$ lにイソプロパノールを加えて核酸を沈殿後、70%エタノールで洗浄した。沈殿をTE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0)100 $\mu$ lに溶解し、以下の試験に供試した。

#### nested-プライマーの設計

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (NCBI)の塩基配列データベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で公開されている沖縄産HLB菌の塩基配列情報(DDBJ; AB008366)から、Jagoueix, *et al.* (1994)のプライマーで増幅される領域1,160bpを確認し、その内側部分の620bpを増幅する以下のプライマーを設計した (Fig. 1)。

forward primer: Nest-1 F [5'-GTT CGG AAT AAC TGG GCG TA-3']

reverse primer; Nest-1 R [5'-TCC CTA TAA AGT ACC CAA CA-3']

Table 1. Reaction mixture for PCR

Distilled water	17.875 $\mu$ l
Ex Taq buffer	2.5 $\mu$ l
dNTPs(2.5 mM each NTP)	2.0 $\mu$ l
Ex Taq (5 units/ $\mu$ l)	0.125 $\mu$ l
Forward primer (OI1 : 3.0 $\mu$ g/ml or Nest 1F: 3.1 $\mu$ g/ml)	0.75 $\mu$ l
Reverse primer (OI2c : 3.4 $\mu$ g/ml or Nest 1R: 3.0 $\mu$ g/ml)	0.75 $\mu$ l
Template DNA	1 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

#### PCRの反応液組成

反応液の組成はTable 1に示した。なお、DNAポリメラーゼはタカラ社製のEx Taq polymeraseを使用した。

#### PCRの反応条件

Jagoueix, *et al.* (1994)のプライマーを用いたPCRは、変性94 $^{\circ}$ C, 1分間、アニーリング60 $^{\circ}$ C, 1分間、伸長72 $^{\circ}$ C, 2分間を1サイクルとし、このサイクルを30回繰り返した。nested-PCRでは、このPCR後、この増幅産物を鋳型として、nested-プライマーにより同じ反応サイクルで25サイクル行った。後述のJagoueix, *et al.* (1994)のプライマーによるPCRとnested-プライマー単独によるPCRの検出感度比較試験では共に30サイクルでPCRを行った。

#### PCR産物の塩基配列の確認

nested-PCRのために設計したプライマーによるPCRが目的の領域を確実に増幅しているかを確認するため、そのPCR産物の塩基配列を決定し、HLB菌の16S-rDNAの塩基配列およびJagoueix, *et al.* (1994)のプライマーによるPCR増幅産物の塩基配列と比較した。

#### 各プライマーによるPCRの比較試験

シークワサー罹病葉10枚を供試して、Jagoueix, *et al.* (1994)のプライマーとnested-プライマーによりそれぞれ単独でのPCRを行った。また、Jagoueix, *et*

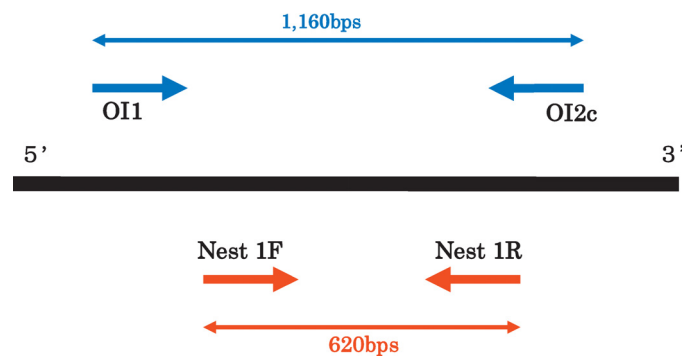
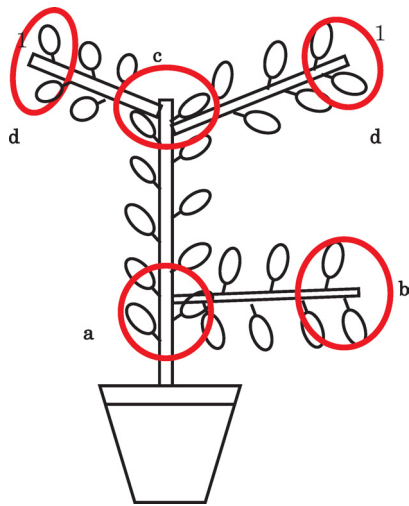


Fig. 1. Amplified region of 16S ribosomal DNA by PCR (OI1 & OI2c) and nested-PCR (Nest 1F & 1R). The middle thick line indicates 16S rDNA of the HLB pathogen. The inside arrows show primers, and the outside arrows are amplified regions by conventional PCR (The upper (blue) arrows: conventional PCR primers set, The lower (red) arrows: nested-PCR primers set).



**Fig. 2.** Distribution of sampling sites on *Citrus depressa* inoculated with the HLB pathogen. a: leaves or bark tissues around inoculation site. b: newly developed leaves on the shoot from an inoculated region. c: leaves on the trunk 15-30 cm above inoculated site. d: newly developed leaves on the shoot emerging from trunk 15-40 cm above inoculation site.

al. (1994) のプライマーによる PCR 産物を鋳型として、今回、設計した nested-プライマーを用いた nested-PCR を行い、供試 10 葉からそれぞれの PCR による増幅の有無を調査した。

#### PCR と nested-PCR の検出限界の比較

HLB 菌感染植物組織からの DNA 抽出試料を健全なシークワサー実生苗木の葉組織から抽出した DNA 試料で  $10^{-1}$  ~  $10^{-6}$  倍に希釈し、Jagoueix, *et al.* (1994) のプライマーによる PCR と前述の nested-PCR を行い、両者の検出可能な希釈倍率を調査した。

#### 接木接種した樹からの検出

HLB 菌保存樹から得た接種源 (接芽) を採取し、那覇植物防疫事務所豊見城圃場ガラス温室内で育成したシークワサー実生苗木 (2 年生) 8 株にそれぞれ腹接ぎ接種し、また対照区として健全接芽を同様に実生苗木に接種し、これらを同圃場で管理 (2005 年 4 月から 6 月まで  $25^{\circ}\text{C}$  に加温し、その他の時期は無加温) した。接種後の苗木から試料を定期的に採取、DNA を抽出し、Jagoueix, *et al.* (1994) のプライマーによる PCR で HLB 菌検出を試みた。この検定で陰性であった試料についてはさらに nested-PCR を行い、陽性反応を示す事例があるか調査した。試料の採取部位は、Fig. 2 に示すとおり接芽付近の葉または樹皮 (a)、接芽から伸長した枝の新葉 (b)、接芽部分から 15~30 cm 上部の茎頂付近の葉 (c)、上部新梢から展開した新葉 (d) の 4 部位とした (Fig. 2)。

## 結 果

### 新たに設計した nested-プライマー

本試験で設計した nested-プライマーによる PCR 産物は HLB 菌の 16S-rDNA の塩基配列および Jagoueix *et al.* (1994) のプライマーによる PCR 増幅産物の該当部分と完全に一致した。

Jagoueix, *et al.* (1994) のプライマーと新たに設計した nested-プライマーをそれぞれ単独で PCR した結果、Fig. 3-A および 3-B で示すように Jagoueix *et al.* (1994) のプライマーによる PCR では 10 試料中 3 試料で、nested-プライマーでは 10 試料中 1 試料で予想される大きさの DNA 断片が増幅された (Fig. 3-A, 3-B)。さらに、Jagoueix, *et al.* (1994) のプライマーによる PCR を行った後に nested-プライマーで PCR した結果、10 試料中 8 試料で予想される大きさの DNA 断片が増幅された (Fig. 3-C)。

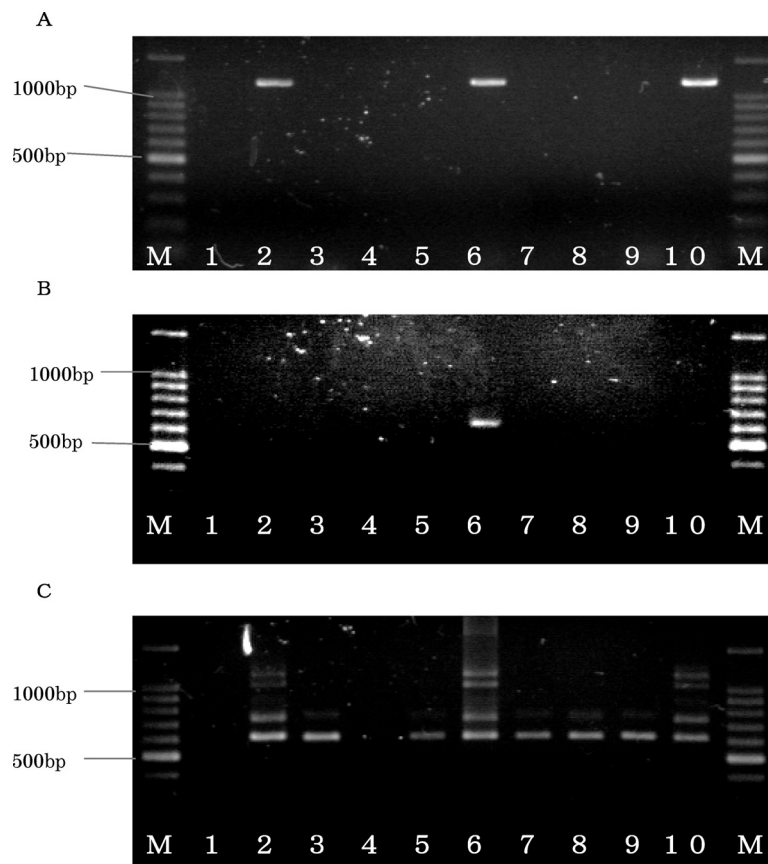
Jagoueix, *et al.* (1994) のプライマーによる PCR での検出限界試験では、抽出した HLB 菌の DNA 抽出試料の  $10^{-2}$  倍希釈濃度まで検出可能であったが、その PCR 後に nested-プライマーにより PCR を行った結果  $10^{-4}$  倍希釈濃度まで検出可能であった (Fig. 4)。

### 接木接種した樹からの HLB 菌検出

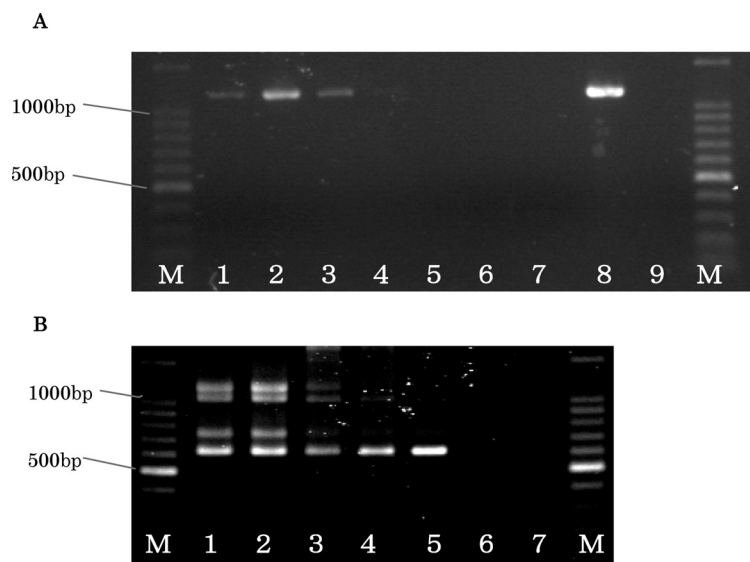
腹接ぎ接種した樹は、接種後 4 週間で接種部の上位から出芽し、新葉が展開した。また、接種後 6 週間には接種した全ての接芽が出芽し、新葉が展開した。これらの供試植物から採取した試料の PCR および nested-PCR の結果を Table 2 に示した。接芽から伸長した枝の新葉を PCR または nested-PCR 検定した結果、N-5 を除く 7 株は 6~8 週間後に陽性になった。接芽から伸長した枝の新葉以外の部位で HLB 菌が最初に検出されたのは、6 週目に N-1 の接芽付近の葉、N-3 および N-5 の上部新梢から展開した新葉、14 週目に N-2 の上部新梢から展開した新葉、18 週目に N-8 の接芽付近の葉および樹皮、22 週目に N-7 の上部新梢から展開した新葉および接芽付近の樹皮からであった。なお、検出された葉はいずれも無病徴葉であった。また 26 週目に N-4, N-6 でともに接芽付近の樹皮から検出された。N-1, N-2, N-5, N-7, N-8 の 5 株では、nested-PCR の方が PCR よりも 4~20 週間早く検出できた。試料 N-3 では PCR で先に検出された。試料 N-4, N-6 では、26 週間以内には nested-PCR でのみ HLB 菌が検出され、PCR では検出されなかった。

## 考 察

新たに設計したプライマーによる nested-PCR で増幅された DNA 断片の塩基配列は、Jagoueix, *et al.* (1994) のプライマーを用いた PCR により増幅された DNA 断片および HLB 菌の 16S-rDNA の塩基配列の該当部分と完全に一致したことから、Jagoueix, *et al.*



**Fig. 3.** Conventional PCR or nested-PCR amplification for each single primer set or two primers sets: A: conventional PCR with OI1/OI2c. B: conventional PCR with Nest 1F/Nest 1R. C: nested-PCR with OI1/OI2c and Nest 1F/Nest 1R, Lanes 1-10: Sample from inoculated *Citrus depressa*, Lane M: DNA size marker (containing 100 bp ladder).



**Fig. 4.** Comparison of sensitivity of PCR detection of the HLB pathogen in different DNA concentrations of citrus plant extracts. A: conventional PCR. B: nested-PCR. Lane 1: DNA extract, Lanes 2-7: diluted DNA extract,  $10^{-1}$ - $10^{-6}$ . Lane M: DNA size marker (containing 100 bp ladder). Lane 8: positive control. Lane 9: negative control.

**Table 2.** Comparison of conventional PCR and nested-PCR detection method for HLB pathogen in the various regions of the artificially inoculated Citrus depressa.

Seedling No.	Sampling region <sup>1)</sup>	Sampling period after inoculation and PCR method																							
		2 week		4 week		6 week		8 week		10 week		12 week		14 week		16 week		18 week		22 week		26 week			
		C <sup>2)</sup>	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N		
N-1	a	- <sup>3)</sup>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nt	
	b	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	d	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nt	
N-2	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nt	+	nt	-	-		
	b	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nt	-	-	-	+		
	d	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	nt	+	nt	+	nt	nt	
N-3	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	
	b	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	d	nt	nt	-	-	+	nt	+	nt	+	nt	+	nt	-	-	+	nt	-	-	-	+	+	nt	nt	
N-4	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	b	nt	nt	nt	nt	-	+	nt	nt	+	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	d	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N-5	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nt	-	-	+	nt	
	b	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	d	nt	nt	-	-	-	+	-	-	+	nt	+	nt	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt	
N-6	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	b	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	d	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N-7	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	nt	
	b	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	d	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
N-8	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	nt	
	b	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	d	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nt	
control	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	b	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	d	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

<sup>1)</sup> Sampling region; see Fig. 2.<sup>2)</sup> C; conventional PCR, N; nested-PCR<sup>3)</sup> +; positive, -; negative, nt; not tested

(1994)のプライマーによるPCRで増幅された産物が nested-PCR の鋳型となっていることが確認された。なお、nested-PCR による増幅産物から複数の非特異的なバンドが出現したことから、今後、実用していく中でPCRの反応条件等について検討する必要がある。

PCR との検出感度の比較試験では、nested-PCR は Jagoueix, *et al.* (1994) のプライマーによるPCRの100倍高いことが示された。さらに、供試8株中6株ではPCRでもHLB菌が検出されたが、接木6週目の樹から採取しPCRでHLB菌が検出されなかった無病

徴の8試料中2試料については nested-PCR でのみ検出された。これらのことから、nested-PCR により病徴が認められない試料からも HLB 菌が検出できることが示唆された。接木接種した樹を用いた検出試験は、限られた本数の接种植物(8株)を供試したことから、樹体内での HLB 菌動向の解析はできなかった。しかし、同じ株でも HLB 菌が検出される部位とされない部位が混在することから HLB 菌の樹体内での局在性が示された。

nested-PCR は、高い検出感度から、今後 HLB 発生地における自然感染樹あるいは外観上健全な感染樹からの HLB 菌検出が期待される。このことから、本法は植物防疫法により移動が制限されているミカン属苗木類等の検査、HLB 発生地域における潜在感染樹の罹病診断、HLB 未発生地域での侵入警戒調査及びミカンキジラミの HLB 菌保毒調査への導入などその特性に基づいた利用法が考えられる。

### 摘 要

Huanglongbing (HLB) 菌の検出のために PCR 検定が行われるが、潜在感染樹からは検出が難しいため、より高感度な検定方法の開発が必要である。そこで、nested-PCR が HLB 菌検出に導入可能であるのか、プライマーを設計し調査した。

新たなプライマーを設計し nested-PCR を行った結果、PCR よりも検出感度が高く、PCR では検出できなかった潜在感染樹からも HLB 菌が検出できる可能性があることが示唆された。このことから、nested-PCR は低濃度の HLB 菌の検出のために有効な方法であり、その特性に基づいた利用法が考えられる。

### 引用文献

芦原 亘 (2006) カンキツグリーニング病と媒介昆虫ミカンキジラミの分布と研究の現状. 植物防疫 60: 291-294.  
 Da Graca, J. V. (1991) Citrus greening disease. *Ann. Rev. phytopath.* 29: 109-136.  
 EPPO (2005) Information on pests listed by EPPO and the

EU, Distribution map of *Liberobacter africanum* & *Liberibacter asiaticum*. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*.  
 <[http://www.eppo.org/QUARANTINE/QP\\_bacteria.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/QP_bacteria.htm)>  
 Garnier, M., S. Jagoueix, P. R. Cronje, H. F. L. Roux and J. M. Bove (2000) 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*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2119-2125.  
 Hung, T. H., M. L. Wu and H. J. Su (1999) Detection of fastidious bacteria causing citrus greening disease by non-radioactive DNA probes. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65: 140-146.  
 Jagoueix, S., J. M. Bove, and M. Garnier (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 379-386.  
 河野伸二・蘇 鴻基・上原勝江 (1997) 沖縄本島におけるカンキツグリーニング病の初発生. 日植病報 63: 256. (講要)  
 河野勝行 (2001) わが国におけるカンキツグリーニング病—現状と防除に向けての問題点—. 農業および園芸 76: 13-21.  
 Llop, P., A. Bonaterra, J. Penalver and M. M. Lopez (2000) Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2071-2078.  
 Miyakawa, T. and K. Tsuno (1989) Occurrence of citrus greening disease in the Southern islands of Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 55: 667-670.  
 Subandiyah, S., N. Nikoh, S. Tsuyumu, S. Somowiyarjo and T. Fukatsu (2000) Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoological Science* 17: 983-989.  
 Teixeira, D. C., J. Ayres, E. W. Kitajima, F. A. O. Tanaka, L. Danet, S. Jagoueix, C. Saillard, and J. M. Bove (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 Dis.* 89: 107. (Disease Notes)  
 渡久地章男・河野伸二 (1997) 沖縄県におけるカンキツグリーニング病の発生状況および防除対策. 植物防疫 51: 565-570.