果 树 学 报 2020,37(9):1384-1393
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20200051

柑橘黄龙病菌分泌蛋白05150的筛选、原核表达及抗血清制备

晏建红[1],关 巍[2],宾 羽[1],黄 洋[2],周常勇[1*],赵廷昌[2*]

([1]西南大学柑桔研究所·国家柑桔工程技术研究中心,重庆 400712;[2]中国农业科学院植物保护研究所·植物病虫害生物学国家重点实验室,北京 100193)

摘 要:【目的】柑橘黄龙病(Citrus Huanglongbing,HLB)是柑橘产业的头号杀手,其病原主要是韧皮部杆菌属亚洲种(*Candidatus* Liberibacter asiaticus,*C*Las),为革兰氏阴性菌,田间主要经亚洲柑橘木虱(*Diaphorina citri*)传播,为深入研究该病菌分泌蛋白的功能,笔者筛选其中1个分泌蛋白,进行原核表达并制备抗体。**【方法】**设定4点条件从Prasad等预测的166个分泌蛋白基因中筛选,与pET-28a构建重组表达载体,以原核表达的融合蛋白作为抗原,用于注射兔子,制备多克隆抗体。**【结果】**从预测的166个分泌蛋白基因中筛选出*05150*基因,成功构建表达载体pET-28a-05150,表达菌株pET-28a-05150在18 ℃、0.1 mmol·L^{-1} IPTG浓度条件下诱导的目的蛋白为包涵体。获得的pET-28a-05150抗血清通过ELISA效价为1∶4 000,通过dot ELISA检测手段可与田间感病样品发生显色反应,通过Western blot能与融合蛋白杂交出特异性条带。**【结论】**该研究筛选了*C*Las的分泌蛋白基因*05150*,以其体外表达蛋白制备了pET-28a-05150抗血清,为研究*05150*基因功能奠定前期基础,也为建立HLB的血清学检测手段及探究柑橘黄龙病菌分泌蛋白基因的筛选方法提供参考。

关键词:柑橘黄龙病;分泌蛋白基因;原核表达;抗血清制备

中图分类号:S666 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2020)09-1384-10

Screening and prokaryotic expression of secreted protein 05150 from *Candidatus* Liberibacter asiaticus and preparation of its antiserum

YAN Jianhong[1], GUAN Wei[2], BIN Yu[1], HUANG Yang[2], ZHOU Changyong[1*], ZHAO Tingchang[2*]

([1]*Citrus Research Institute, Southwest University/National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China;* [2]*Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Beijing 100193, China*)

Abstract:【Objective】Citrus Huanglongbing (HLB) is the most destructive disease of citrus worldwide. In China, HLB is caused by *Candidatus* Liberibacter asiaticus (*C*Las), a gram-negative, phloem-restricted and psyllid-transmitted bacterium. The citrus industry is facing an unprecedented challenge. At present, the world's difficult problem of pure cultivation of *C*Las has not been overcome. The in-depth study on its physical and chemical characteristics and the development of disease management technologies are facing great challenges, and the research on the interaction between secreted proteins and citrus is not clear completely. In order to research the function of secreted proteins of *C*Las, one secreted protein was screened, expressed *in vitro*, and its polyclonal antibodies were made.【Methods】Based on the 166 predicted secreted protein genes of Prasad et al., four-point screening conditions were set: 1) the genes can be analyzed by using all the four softwares: Phbius, SigP4.1, LipoP, and SigP3.0; 2) the predicted signal peptide of genes has secretory function that has been verified by alkaline phos-

收稿日期:2020-03-03 接受日期:2020-06-03

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD0201500);中央本级重大增减支项目(2060302);中国农业科学院科技创新工程协同创新任务(CAAS-STCX2016013);国家自然科学基金(31701754)

作者简介:晏建红,女,硕士,研究方向:柑橘黄龙病。Tel:18875099040,E-mail:jianhong0903@163.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:zhoucy@cri.cn;E-mail:zhaotgcg@163.com

phatase (PhoA); 3) the protein size is between 10 ku and 25 ku; 4) the expression of potential *C*Las secreted proteins in infected citrus can be determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). We amplified the secreted protein gene screened from infected samples collected from Jiangxi province by PCR. The expression vector with *Nde* Ⅰ (F) and *Xho* Ⅰ (R) restriction sites was successfully constructed for the screened secreted protein gene based on vector pET-28a, and the expression vector was transferred into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The expression strain was induced to express by the IPTG concentrations, which were set to 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1.0 mmol·L^{-1}. Then the optimal induction IPTG concentration was selected to induce the expressed protein, and Western blot was addressed to verify whether the target protein was expressed using Anti-his-tag mAb and Anti-IgG (H+L chain) (Mouse) pAb-HRP. The purified fusion protein was approached as an antigen to immunize rabbits intraperitoneally to prepare polyclonal antibodies. Then direct binding of the antibody with the purified fusion protein was evaluated using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), ELISA plates were coated with 100 μL of the purified fusion protein (1:4 dilutions in carbonate coating buffer), the concentrations of the polyclonal antibodies were set to 1∶500, 1∶1 000, 1∶2 000 …… 1∶8 192 000 and 1∶16 384 000, respectively, and Anti-IgG (H+L chain)（Rabbit）pAb-HRP was diluted to 1∶8 000 with 1 × PBS buffer. Then dot ELISA and Western blot detection methods were addressed to verify the effectiveness of the polyclonal antibodies with the field samples. The concentrations of the polyclonal antibodies were set to 1∶1 000, 1∶3 000, 1∶5 000, 1∶7 000, and 1∶10 000, respectively. Anti-rabbit IgG (whole molecule)-AP or Anti-IgG (H+L chain) (Rabbit) pAb-HRP was diluted to 1∶8 000 with 1 × PBS buffer. Total protein was extracted by 1×PBS buffer from field samples collected in May, September, and November from Jiangxi, Sichuan, and Fujian provinces, respectively.【Results】In this study, six secreted protein genes were screened preliminarily from the 166 predicted secreted protein genes, and indirect verification of six secreted proteins expression was conducted in infected citrus from Jiangxi province by RT-PCR. We only amplified the 05150 sequence in infected citrus, which was highly conserved among six *C*Las strains whose genome sequences were available with 100% identity in nucleotide sequences. CLIBASIIA_05150 was screened, and the protein size was approximately 22 ku (i.e., excluding the predicted N-terminal signal peptide, 1-33 aa). The 05150 sequence was ligated to the vector pET-28a, and the expression vector pET-28a-05150 was successfully constructed, and pET-28a-05150 was transferred into *E. coli* BL21 (DE3) successfully. The optimized induction for final IPTG concentration of the expression strain pET-28a-05150 was 0.1 mmol·L^{-1}, and fusion protein was insoluble in the mixed solution instead of the supernatant, indicating the formation of inclusion bodies. The pET-28a-05150 polyclonal antibody was evaluated for binding affinity to the pET-28a-05150 antigen by indirect ELISA. The binding affinity was tested using different concentrations of the polyclonal antibody, confirming the optimal concentration of pET-28a-05150 polyclonal antibody for indirect ELISA 1∶4 000 and the sensitivity 1∶32 000. Dot ELISA assured its color reaction with infected samples from the field. The positive dot ELISA detections accounted for 38.9% of the positive PCR detections, of which 4 and 2 samples were collected from Jiangxi province in September and May, respectively, 1 from Sichuan province in September. Western blot assured that pET-28a-05150 polyclonal antibody hybridized with the fusion protein but not with infected citrus.【Conclusion】In this study, secreted protein gene *05150* of *C*Las was screened, and pET-28a-05150 antiserum was prepared with its expressed protein *in vitro*, which laid a preliminary foundation for studying the function of *05150*, and also provided a reference for establishing serological detection and screening methods for secreted protein gene of HLB.

Key words: Citrus Huanglongbing; Secreted protein gene; Prokaryotic expression; Preparation of antiserum

柑橘黄龙病（Citrus Huanglongbing，HLB）是柑橘生产上的毁灭性病害，广泛分布于亚洲、非洲和美洲，现在50多个国家和地区发生[1-3]，中国11省300余个县遭受HLB的危害[3-4]。到目前为止，该病尚无有效防控药剂，已造成巨大经济损失。国际上普遍认为该病的病原为韧皮部杆菌属的革兰氏阴性细菌[1,5-6]，分为亚洲种（*Candidatus* Liberibacter asiaticus，*C*Las）、非洲种（*Ca*. L. africanus，*C*Laf）和美洲种（*Ca*. L. americanus，*C*Lam）[1]，我国发生的黄龙病病原均为亚洲种。

目前柑橘黄龙病菌纯培养这一世界性难题尚未攻克，对其理化性状的深入研究及病害治理技术的研发存在巨大挑战。近年来，通过生物信息学、分子生物学等技术方法，测定了病原菌全基因序列，预测、分析了该菌的分泌系统及分泌蛋白，表明病菌具有完整的Sec分泌系统和分泌能力，且分泌蛋白在病原菌致病过程中发挥重要作用[7-10]。虽基于组学技术的寄主响应病原机制解析等方面取得一定进展[11-12]，但对分泌蛋白与柑橘互作的研究还不够深入。

制备抗体用于探究病原物与寄主植物的互作是一种较为常用的手段，也有助于明确某些病原物在寄主植物中的定殖与分布[13-16]。近年来，柑橘黄龙病菌的多克隆抗体也相续报道，如Ding等[16]制备的OmpA（Outer membrane protein）多克隆抗体用于明确*C*Las在柑橘和长春花中的定位与分布，可能有助于*C*Las与宿主植物相互作用的研究。Pitino等[15]和Pagliaccia等[17]研究的SDE1（Sec-delivered effector 1）是*C*Las的特有分泌蛋白，SDE1多克隆抗体能成功检出感染*C*Las的病树，以此建立的血清学检测方法为后期深入研究SDE1在柑橘中的功能提供了快速、有效的检测手段。因此筛选有效的分泌蛋白，制备多克隆抗体，为深入研究其功能提供物质基础。

本研究拟在Prasad等[18]预测的166个分泌蛋白基因的基础上进行筛选，并以原核表达经纯化后的融合蛋白作为抗原，制备多克隆抗体，通过斑点酶联免疫吸附试验（dot enzyme-linked immunosorbent assay，dot ELISA）和Western blot方法检测与鉴定，以期为其基因功能研究奠定前期基础，并为建立HLB血清学检测方法提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

赣南脐橙、‘三红蜜柚’等带病样品于2018年10月采自江西省赣州柑橘科学研究所基地，田间带病样品分别于2019年5月、9月和11月采自江西、四川、福建，取叶片主脉于−80 ℃保存；pET-28a表达载体由本实验室保存提供，*Escherichia coli* BL21（DE3）菌株购自北京博迈德基因技术有限公司。

1.2 引物设计及HLB的检测

根据NCBI中已报道的*C*Las-psy62全基因组（GenBank登录号为CP001677），利用Primer 5.0软件设计筛选基因序列的特异性引物，OI1/OI2c参照Jagoueix等[5]报道的检测柑橘黄龙病特异性引物，引物均由深圳华大基因股份有限公司（BGI）合成，具体引物序列见表1。

表1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence（5’-3’）
OI1	GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA
OI2c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT
1259F	TCGTATGCCTTTTCTCGG
1259R	ATTACGGCTACGCCCTGT
5115F	TATAATAATAGAGCTGCATTCGA
5115R	CAATGAGAGAATAGATATAGCGG
2250F	AGCTCCCCGCTCATCTCA
2250R	TATTAGGGGCGATGGAGA
0420F	ATATTGGGAAGATGATAATGG
0420R	TGCGAATTAAAGAGGTGAGC
5150F	TCATCAGTCGCCTGTTCG
5150R	TTCCCGCTACCTTATCCC
2425F	ATCCTGTGCGTCGTGCTC
2425R	TCTTCGCCAAACGACCCA
9F	GCACATATGGACTATGGGTATTCTCCC
9R	AAGCTCGAGTTAAAAGCGTAAAACCAC

注：9F和9R引物下划线处分别为限制性内切酶*Nde* Ⅰ和*Xho* Ⅰ的识别序列。

Note: The underlined parts of primers 9F and 9R are the recognition sequences of restriction enzymes *Nde* Ⅰ and *Xho* Ⅰ, respectively.

参照苏华楠[19]改进的CTAB-Triton方法提取健康和感病柑橘的总核酸，利用引物OI1/OI2c对采自田间的赣南脐橙、‘三红蜜柚’的总核酸样品进行聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）检测。PCR检测体系为：DNA模板1.0 μL，正反向引物各0.3 μL（10 μmol·L^{-1}），Go *Taq* Mix 6.0 μL，加ddH_2O 4.4 μL。运行程序：95 ℃ 3 min；95 ℃ 30 s，58 ℃ 35 s，72 ℃ 30 s，35个循环；72 ℃ 5 min，4 ℃保存。

1.3 分泌蛋白基因的筛选

1.3.1 分泌蛋白基因的生物信息学分析 Prasad等[18]通过LipoP、SigalP 3.0、SignalP 4.1和Phobius预

测出166个分泌蛋白基因，4种预测方法都存在假阳性和假阴性，但4种方法同时进行预测可提高预测准确率；同时他们通过大肠杆菌碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，PhoA）验证基因中预测的信号肽（signal peptide，SP）是否具有分泌特性。此外，蛋白较小时可能有助于蛋白沿着光合产物的转运在染病植物中移动[17]，且目前已深入研究的SDE1、Clsp33分泌蛋白均小于25 ku[9,15,17,20]，而蛋白小于10 ku时难以进行Westren blot检测。因此设定以下3点条件对候选外泌蛋白基因进行筛选：1）均可用Phbius、SigP 4.1、LipoP、SigP 3.0分析，2）PhoA验证基因的SP具有分泌性功能，3）蛋白大小在10 ku和25 ku之间。

1.3.2　*分泌蛋白基因的*RT-PCR*扩增*　通过逆转录-聚合酶链反应（reverse transcription- polymerase chain reaction，RT-PCR）检测感病柑橘中潜在*C*Las分泌蛋白的表达[17]。按照Trizol试剂说明书提取经PCR检测为黄龙病阳性样品的总RNA，根据FastQuant RT Kit（with gDNase）试剂盒说明书获得cDNA，−20 ℃保存。cDNA使用引物OI1/OI2c验证为阳性后，PCR扩增筛选的分泌蛋白基因，PCR检测体系：cDNA模板1.0 μL，正反向引物各0.3 μL（10 μmol·L^{-1}），Go *Taq* Mix 6.0 μL，加ddH_2O 4.4 μL。运行程序：95 ℃ 3 min；95 ℃ 30 s，53 ℃ 35 s，72 ℃ 30 s，35个循环；72 ℃ 5 min，4 ℃停止。

1.4　分泌蛋白基因的克隆与重组表达载体的构建

根据*C*Las-psy62基因组的CLIBASIA_05150序列及转录分析，除去该基因的SP序列后设计原核表达引物，上、下游引物9F/9R分别引入*Nde*Ⅰ、*Xho*Ⅰ的酶切位点以及3个保护碱基（表1），以1.2中提取感染HLB植株总核酸为模板，采用引物9F/9R进行扩增，PCR扩增程序和体系同1.2，使用E.Z.N.A Gel Extraction Kit试剂盒从琼脂糖凝胶中回收目的DNA片段，具体操作步骤参照说明书进行。

使用限制性内切酶*Nde*Ⅰ、*Xho*Ⅰ对回收的目的DNA片段和pET-28a质粒进行双酶切，双酶切体系：目的片段/载体质粒1 μg，*Nde*Ⅰ、*Xho*Ⅰ各1 μL，10×Cutsmart缓冲液5 μL，ddH_2O补充至50 μL；37 ℃温育至少4 h。使用E.Z.N.A Gel Extraction Kit试剂盒从琼脂糖凝胶中回收目的DNA片段。

目的片段与线性pET-28a载体连接，连接体系：酶切后的目的片段3 μL，线性pET-28a载体1 μL，Ligation solution 5 μL，ddH_2O 1 μL；轻轻混匀后于16 ℃连接至少12 h。获得的重组表达质粒转化至*E. coli* DH5α，于LB固体培养基平板（含50 μg·mL^{-1} Kanamycin）37 ℃正置培养1 h后倒置培养12~16 h。待菌落平均直径为2 mm左右，枪头挑取单个菌斑混于1 mL LB液体培养基（含50 μg·mL^{-1} Kanamycin）中，37 ℃条件下200 r·min^{-1}摇至混浊状态，菌液PCR检测。菌液PCR反应体系：模板2 μL，2×*Taq* Mix 6.25 μL，引物10F/10R各0.50 μL，ddH_2O 4.75 μL。运行程序：94 ℃ 3 min；94 ℃ 30 s，53 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，35个循环；72 ℃ 5 min，4 ℃停止。菌液筛选出阳性克隆后，提取阳性克隆质粒进行双酶切及测序验证。

1.5　分泌蛋白原核表达及Western blot验证

提取的重组表达质粒pET-28a-05150转化表达菌株*E.coli* BL21（DE3），选取经PCR鉴定为阳性的表达菌株pET-28a-05150以体积比1∶100接种于10 mL（含50 μg·mL^{-1} Kanamycin）新鲜液体LB中，37 ℃继续振荡培养至OD_{600}值约0.6时，加入终浓度为0.3 mmol·L^{-1}的IPTG，在18 ℃条件下过夜培养，并设置pET-28a空载对照和不加IPTG对照。7 830 r·min^{-1}，4 ℃离心20 min，收集菌体，加入2 mL His结合缓冲液悬浮；冰水浴中超声波破碎6~7 min（连续循环工作3 s，停止4 s），取混液20 μL；7 830 r·min^{-1}，4 ℃离心15 min，取上清20 μL；混液和上清均加入10 μL 4× Laemmlin样品缓冲液（含10% β-巯基乙醇），100 ℃沸水浴5 min，进行15% SDS-PAGE凝胶电泳（80 V，30 min；120 V，1 h），考马斯亮蓝染色1 h，考马斯亮蓝脱色液脱色2~3次，每次脱色1 h后观察结果。再按照上述步骤进行最适IPTG浓度（0~1 mmoL·L^{-1}浓度梯度）优化。

为鉴定上述诱导的蛋白是否为目的蛋白，进行Western blot试验，15% SDS-PAGE凝胶电泳后使用0.45 μm PVDF转膜，Anti-his-tag mAb以1×PBS按1∶2 000稀释，Anti-IgG（H+L chain）（Mouse）pAb-HRP以1×PBS按1∶10 000稀释，使用Super ECL Puls超敏发光显色液显色后，在Tanon 5200 Multi仪器上观察拍照。

1.6　抗血清制备及抗体效价

由本实验室和浙江大学生物技术研究所吴建祥教授联合研制pET-28a-05150多克隆抗体。ELISA测定抗体效价，纯化的pET-28a-05150融合蛋白用碳酸包被缓冲液稀释后，酶标板每孔加100 μL，4 ℃孵

育12 h以上，PBST洗涤4次；每孔加入250 μL封闭液（含3%脱脂奶粉的PBST），37 ℃孵育1 h，PBST洗涤4次；抗血清按1∶500、1∶1 000、1∶2 000、1∶4 000、1∶8 000、1∶16 000、1∶25 600、1∶512 000……1∶16 384 000稀释，设置阴性、空白对照，每孔加100 μL 37 ℃孵育1 h，PBST洗涤4次；Anti-IgG（H+L chain）（Rabbit）pAb-HRP按1∶10 000稀释，每孔加100 μL室温孵育1 h，PBST洗涤4次；每孔加100 μL TMB显色液，置室温待其充分显色后在Flexstion 3酶标仪上测定每孔OD_{370}值，以P/N>2.1作为阳性判断标准。

1.7 Dot ELISA及Western blot检测

田间柑橘样品使用1×PBS（pH 7.2~7.4）提取总蛋白，滤网过滤后，立即取滤液2.5 μL点到硝酸纤维素膜（Nitrocellulose filter membrane，NC膜）上，同时将已鉴定的健康滤汁液作为阴性对照，NC膜浸入到1×PBST（含5%的脱脂奶粉）中室温封闭1 h，pET-28a-05150多抗以1×PBST（含3%的脱脂奶粉）进行梯度倍比稀释（1∶1 000、1∶3 000、1∶5 000、1∶7 000、1∶10 000），室温孵育1 h，Anti-rabbit IgG (whole molecule)-AP以1×PBS按1∶8 000稀释，室温孵育1 h，最后在AP显色液中显色20~30 min后，去离子水漂洗干净终止反应，记录显色结果。

以pET-28a-05150融合蛋白为阳性对照，对上述提取的感病柑橘总蛋白进行Western blot检测，15% SDS-PAGE凝胶电泳后使用0.45 μm聚偏二氟乙烯膜（Polyvinylidene fluoride，PVDF膜）进行转膜，pET-28a-05150多抗以1×PBS进行梯度倍比稀释（1∶1 000、1∶3 000、1∶5 000、1∶7 000、1∶10 000），Anti-IgG（H+L chain）（rabbit）pAb-HRP以1×PBS按1∶8 000稀释，使用Super ECL Puls超敏发光显色液显色后，在Tanon 5200 Multi仪器上观察拍照。

2 结果与分析

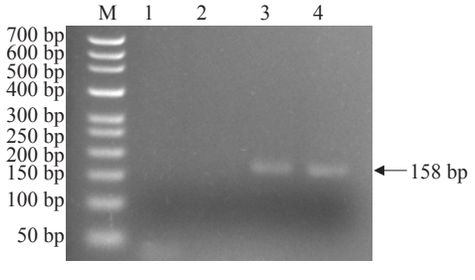
2.1 分泌蛋白基因筛选

通过设定筛选分泌蛋白基因的3点条件，在预测的166个蛋白基因中筛选出以下6个分泌蛋白基因（表2）。RT-PCR间接验证染病柑橘中*C*Las分泌蛋白是否表达。通过RT-PCR扩增，从初筛的6个分泌蛋白基因中扩增出*05150*的序列（158 bp）（图1），选取此基因进行原核表达。

表2 *C*Las-psy62中预测的分泌蛋白

Table 2 Predicted secreted proteins in *C*Las-psy62

基因 Gene	蛋白分子质量 Protein weight/ku	预测功能 Predicted function	切割位点 Cleavage site
CLIBASIA_01295	25	假定蛋白 Hypothetical protein	17~18
CLIBASIA_05115	17	假定蛋白 Hypothetical protein	32~33
CLIBASIA_02250	20	胞外溶质结合蛋白；K02012铁（III）转运系统底物结合蛋白 Extracellular solute-binding protein; K02012 iron(III) transport system substrate-binding protein	21~22
CLIBASIA_00420	15	外膜脂蛋白 Outer membrane lipoprotein	28~29
CLIBASIA_05150	22	假定蛋白 Hypothetical protein	33~34
CLIBASIA_02425	21	外膜蛋白;K16079外膜免疫原性蛋白 Outer membrane protein; K16079 outer membrane immunogenic protein	23~24



M. DNA 分子质量标记；1. ddH_2O；2. 未感病柑橘；3~4. 感病柑橘。

M. DNA molecular weight markers; 1. ddH_2O; 2. Uninfected citrus; 3-4. Infected citrus.

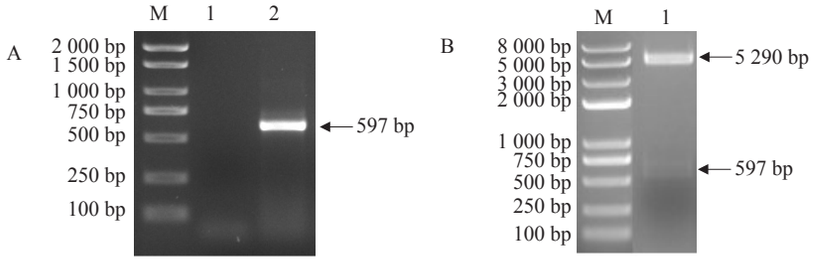
图1 RT-PCR间接验证感病柑橘中分泌蛋白05150的表达

Fig. 1 Indirect verification of the expression of the secreted protein 05150 in infected citrus by RT-PCR

2.2 *05150*的克隆及其表达载体的构建

除去SP（1~33 aa）基因序列后，设计*05150*的引物，以提取的感病柑橘总核酸为模板，PCR扩增得到大小为597 bp的片段，扩增条带与目的条带大小一致（图2-A）。测序结果经NCBI BLASTn分析表明，该序列与CLIBASIA_05150（*C*Las-psy62）及其他柑橘黄龙病亚洲种的相似性为100%（图3）。

获得的阳性单克隆经测序结果表明，阳性单克隆的05150片段大小正确，碱基无缺失、无突变发生，且编码框方向正确、无移位。*Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶



M. DNA 分子质量标记；A1. 未感病柑橘；A2. 感病柑橘；B1. pET-28a-05150 双酶切。

M. DNA molecular weight markers; A1. Uninfected citrus; A2. Infected citrus; B1. Double digestion of pET-28a-05150.

图 2　*05150* 基因的扩增(A)及 pET-28a-05150 的双酶切(B)

Fig. 2　Amplification of *05150* gene and double digestion of pET-28a-05150

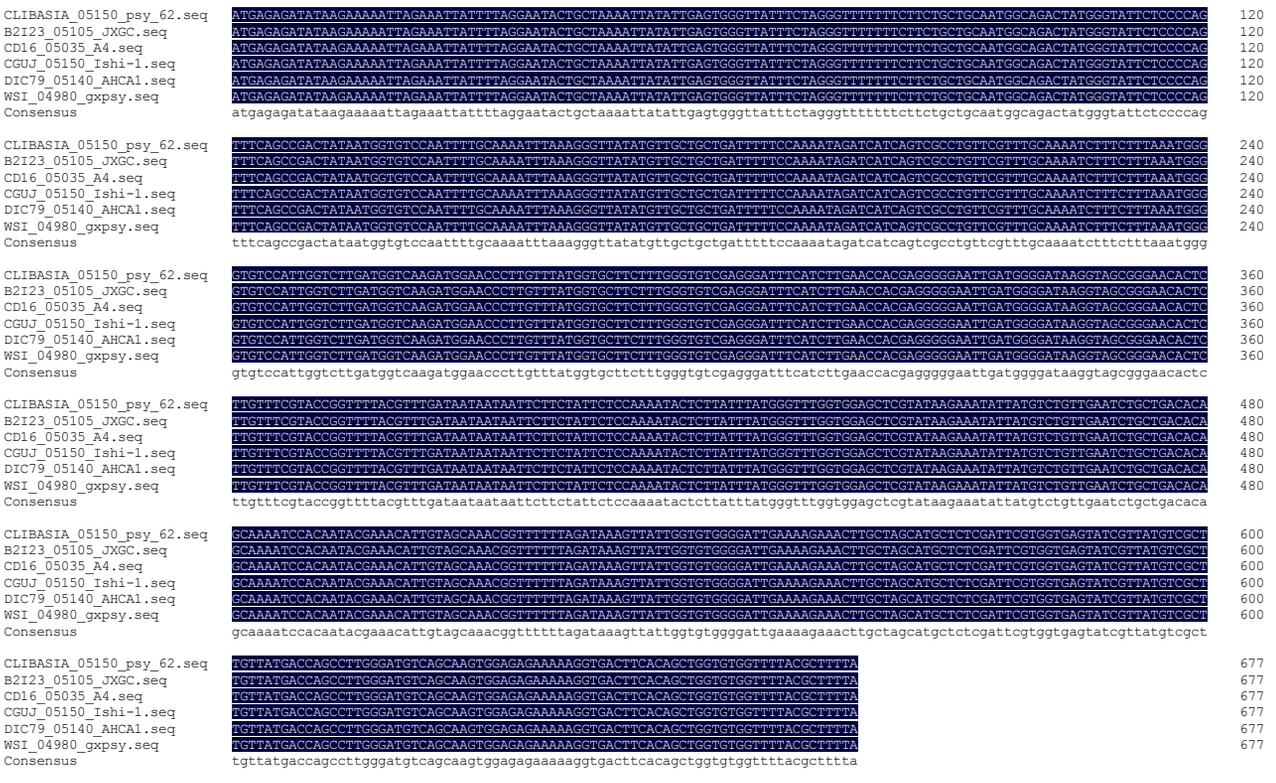


图 3　来自 6 个 *C*Las 分离株的 *05150* 核苷酸序列的 DNAMAN 比对

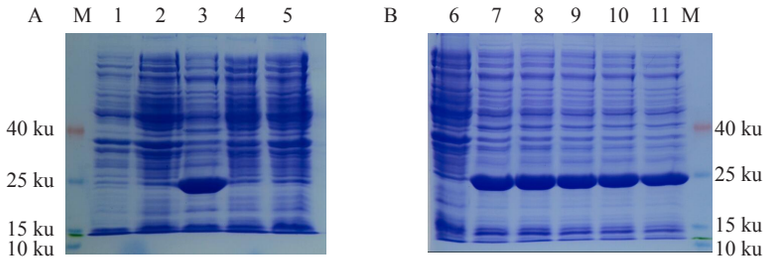
Fig. 3　DNAMAN alignment of the nucleotide sequences of *05150* from six *C*Las strains

切如图2-B所示，获得大小符合预期的2条目的条带，因此将测序和酶切验证正确的重组载体命名为pET-28a-05150，作为原核表达的重组质粒。

2.3　05150蛋白原核表达及其Western blot验证

基因*05150*（除去SP序列）大小为579 bp，预计编码192个氨基酸，蛋白大小约为22 ku，由于表达载体标记His标签、保护碱基及酶切位点，预计原核表达目标蛋白大小为24 ku左右。诱导阳性表达菌株pET-28a-05150，超声波破碎后SDS-PAGE电泳检测，如图4-A所示，表达的重组蛋白与预计的目的蛋白大小一致，经Western blot验证，pET-28a-05150诱导的融合蛋白杂交出特异性条带，大小符合预期（图5），表明05150蛋白原核表达成功。对表达的蛋白进行可溶性分析，目的蛋白只存在于诱导的混液中，表明重组蛋白不可溶，以包涵体的形式存在（图4-A）。

再将表达菌株pET-28a-05150进行IPTG梯度浓度（0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mmol · L^{-1}）诱导，进行SDS-PAGE电泳分析（图4-B），结果显示，0.1 mmol·L^{-1} IPTG条件下，融合蛋白05150表达水平最高，因此确定表达菌株pET-28a-05150的最适IPTG浓度为0.1 mmol·L^{-1}。



M. 蛋白分子质量标记；1. IPTG 诱导的 pET-28a；2. 未经 IPTG 诱导的 pET-28a；3. IPTG 诱导的 pET-28a-05150 混液；4. IPTG 诱导的 pET-28a-05150 上清；5. 未经 IPTG 诱导的 pET-28a-05150；6~11. 0~1.0 mmol·L^{-1} IPTG 诱导的 pET-28a-05150。

M. Protein molecular weight markers; 1. pET-28a induction by IPTG; 2. pET-28a without IPTG induction; 3. The mixed solution from pET-28a-05150 induction by IPTG; 4. Supernatant from pET-28a-05150 induction by IPTG; 5. pET-28a-05150 without IPTG induction; 6-11. pET-28a-05150 induction by 0-1.0 mmol·L^{-1} IPTG.

图 4 05150 蛋白的原核表达(A)和 IPTG 梯度浓度对表达菌株 pET-28a-05150 的诱导（B）

Fig. 4 Prokaryotic expression of protein 05150 (A) and induction of expression strain pET-28a-05150 by gradient concentration of IPTG (B)

1. 未经 IPTG 诱导的 pET-28a；2. IPTG 诱导的 pET-28a；3. 未经 IPTG 诱导的 pET-28a-05150；4. IPTG 诱导的 pET-28a-05150。

1. pET-28a without IPTG induction; pET-28a induction by IPTG; 3. pET-28a-05150 without IPTG induction; 4. pET-28a-05150 induction by IPTG.

图 5 05150 蛋白的 Western Blot 检测

Fig. 5 The detection of protein 05150 by Western blot

2.4 pET-28a-05150抗体效价

已纯化的05150融合蛋白为抗原，对pET-28a-05150多抗进行梯度稀释，通过间接ELISA对pET-28a-05150抗血清进行效价测定，当血清稀释到32 000倍时，pET-28a-05150阳性血清的OD_{370}为0.437 8，与阴性血清OD_{370}的比值大于2.1（表3）；当血清稀释到4 000倍时，阳性血清显示蓝色，阴性血清不显色（图6）；表明pET-28a-05150多克隆抗体检测灵敏度可达1∶32 000，最适稀释为1∶4 000，即pET-28a-05150抗血清的ELISA效价为1∶4 000。

2.5 pET-28a-05150多抗的dot ELISA及Western blot检测

通过dot ELISA检测已通过PCR鉴定的21份田

表 3 间接 ELISA 测定 pET-28a-05150 抗血清效价

Table 3 The determination of pET-28a-05150 antiserum titer by indirect ELISA

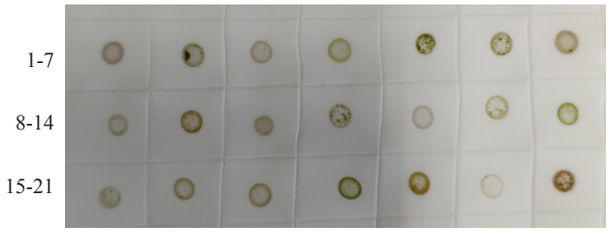
370 nm 处吸光度 OD_{370}	效价 Potency							
	1:500	1:1 000	1:2 000	1:4 000	1:8 000	1:16 000	1:32 000	1:64 000
阳性抗血清 Positive antiserum	1.868 0	1.641 3	1.454 8	1.202 4	0.914 2	0.652 2	0.437 8	0.310 0
阴性血清 Negative antiserum	0.450 3	0.340 8	0.276 9	0.232 1	0.209 0	0.174 7	0.163 8	0.178 0
双蒸水 ddH_2O	0.103 3	0.114 7	0.124 0	0.134 9	0.123 0	0.117 7	0.105 7	0.096 9
阳性/阴性 P/N	4.15	4.82	5.25	5.18	4.37	3.73	2.67	1.74
370 nm 处吸光度 OD_{370}	效价 Potency							
	1:128 000	1:256 000	1:512 000	1:1 024 000	1:2 048 000	1:4 096 000	1:8 192 000	1:16 384 000
阳性抗血清 Positive antiserum	0.237 8	0.179 3	0.167 0	0.162 6	0.160 4	0.144 6	0.145 2	0.126 3
阴性血清 Negative antiserum	0.154 7	0.136 9	0.156 8	0.168 8	0.165 1	0.152 3	0.136 9	0.116 5
双蒸水 ddH_2O	0.100 9	0.120 5	0.120 7	0.118 7	0.103 2	0.102 3	0.107 7	0.103 4
阳性/阴性 P/N	1.54	1.31	1.07	0.96	0.97	0.95	1.06	1.08

1A~1H. 阳性抗血清 1∶500~1∶6 400；2A~2H. 阳性抗血清 1∶128 000~1∶16 384 000；3A~3H. 阴性抗血清 1∶500~1∶6 400；4A~4H. 阴性抗血清 1∶128 000~1∶16 384 000；5A~6H. ddH_2O。

1A-1H. Positive antiserum 1∶:500-1∶6 400; 2A-2H. Positive antiserum 1∶128 000-1∶16 384 000; 3A-3H. Negative antiserum 1∶500-1∶6 400; 4A-4H. Negative antiserum 1∶128 000-1∶16 384 000; 5A-6H. ddH_2O.

图 6　间接 ELISA 测定 pET-28a-05150 抗血清效价

Fig. 6　The determination of pET-28a-05150 antiserum titer by indirect ELISA



1~12. PCR 检测为阳性样品；13~14. PCR 检测为阴性样品；15~19. PCR 检测为阳性样品；20. PCR 检测为阴性样品；21. PCR 检测为阳性样品。

1-12. The detection of samples were positive by PCR; 13-14. The detection of samples were negative by PCR; 15-19. The detection of samples were positive by PCR; 20. The detection of sample was negative by PCR; 21. The detection of sample was positive by PCR.

图 7　田间样品的 dot ELISA 检测

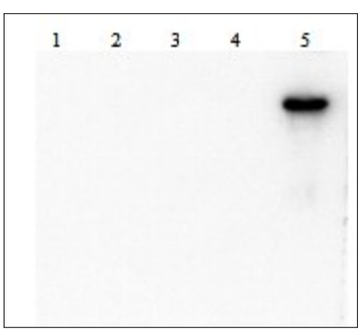
Fig. 7　The detection of field samples by dot ELISA

间样品，pET-28a-05150抗血清可与田间样品发生显色反应，呈紫红色（图7）。如表4所示，PCR检测为阳性的18份样品中有7份发生显色反应，dot ELISA检测的阳性率为38.9%，在采样时间上，其中9月份样品检测为阳性有5份，5月份样品检测为阳性有2份；在采样地区上，检测为阳性样品6份来自江西省，1份来自四川省。再对田间样品进行Western blot检测，结果表明pET-28a-05150抗血清与纯化后的蛋白可杂交出的特异性条带，与感病柑橘提取的总蛋白无阳性反应（图8）。

表 4　Dot ELISA 和 PCR 检测田间样品结果比对

Table 4　Comparison of dot ELISA and PCR detection results among field samples

样品编号 Sample number	采样地点 Sampling location	采样日期 Sampling date	PCR检测 PCR detection	Dot ELISA检测 Dot ELISA detection
1	江西 Jiangxi	2019-09-02	+	+
2	江西 Jiangxi	2019-09-02	+	+
3	江西 Jiangxi	2019-09-02	+	+
4	江西 Jiangxi	2019-09-02	+	-
5	江西 Jiangxi	2019-05-31	+	-
6	江西 Jiangxi	2019-09-02	+	-
7	江西 Jiangxi	2019-05-31	+	+
8	江西 Jiangxi	2019-09-02	+	+
9	四川 Sichuan	2019-05-31	+	-
10	四川 Sichuan	2019-09-30	+	+
11	四川 Sichuan	2019-05-31	+	-
12	江西 Jiangxi	2019-05-31	+	+
13	四川 Sichuan	2019-11-11	-	-
14	四川 Sichuan	2019-09-02	-	-
15	四川 Sichuan	2019-09-30	+	-
16	四川 Sichuan	2019-09-30	+	-
17	四川 Sichuan	2019-09-30	+	-
18	四川 Sichuan	2019-05-31	+	-
19	福建 Fujian	2019-11-11	+	-
20	福建 Fujian	2019-11-11	-	-
21	福建 Fujian	2019-11-11	+	-



1~4. 田间感病样品总蛋白；5. 纯化的 05150 融合蛋白。

1-4. Total protein of fieldsamples infected; 5. Purified 05150 fusion protein.

图 8　田间样品的 Western blot 检测

Fig. 8　The detection of field samples by Western blot

3　讨　论

细菌与植物互作过程中，为了避免或抑制植物的病原相关分子模式触发的免疫反应（PAMP-triggered immunity，PTI）而产生效应因子[21]。细菌通过分泌系统将效应因子分泌到植物细胞中，而这种效应因子称为分泌蛋白。Pitino等[9]通过生物信息学鉴定了16种假定的*C*Las效应因子，并瞬时表达了本氏烟草，其中*C*Las 5315mp（成熟蛋白）定位于叶绿体中，在接种3 d后导致细胞死亡。此外，后续试

验证明Las5315mp诱导植物细胞胼胝质和淀粉大量沉积，也证明*C*Las5315mp是引发HLB症状显著的一个效应物，对*C*Las发病机制至关重要[9,15]。因此以病原物的分泌蛋白作为研究对象具有可行性。本试验在Prasad等[19]预测的166个分泌蛋白基因中筛选出CLIBASIA_01295、CLIBASIA_05115、CLIBASIA_02250、CLIBASIA_00420、CLIBASIA_05150、CLIBASIA_02425，通过RT-PCR仅扩增出CLIBASIA_05150，再次设计引物、优化扩增条件仍无法扩增出另外5个分泌蛋白基因，这可能与试验样品的品种、感病阶段有关。不同柑橘品种对HLB耐感程度、显症程度以及不同时期的病原菌含量均存在很大差异[22-26]，因此可能影响柑橘黄龙病菌分泌蛋白的表达。

效应因子是促进病原物定殖和病害发展的关键毒力因子[27-29]，选择效应因子制备抗体用于检测是一种有效的策略。熊叶辉[13]和史学涛[14]均使用效应因子的抗体通过pull-down和免疫共沉淀（Co-IP）试验进行体内、体外稻瘟菌效应蛋白与寄主植物内蛋白的互作验证[13-14]。此外，制备的SDE1多克隆抗体也为探究*C*Las 5315mp功能提供了便利的检测手段[15,17]。因此笔者筛选柑橘黄龙病菌其他效应因子为研究其功能而制备多克隆抗体。本试验筛选的*05150*在*C*Las中高度保守，在感病柑橘中的含量比在柑橘木虱中高1.7倍[30]，已有研究表明CLIBASIA_05150预测的信号肽序列通过PhoA验证具有分泌功能[9]，且通过RT-PCR可测定到感病柑橘中潜在05150分泌蛋白的表达。此外CLIBASIA_05150定位于高尔基体中，在接种本氏烟（*N. benthamiana*）叶片第5天导致细胞死亡，与植物病害抗性相关的基因XM- 006474664、XM- 025096339、XM-006492080互作[31]。XM_006474664编码半胱氨酸蛋白酶，SDE1通过抑制半胱氨酸蛋白酶来抑制柑橘的防御反应[32]；XM_025096339编码核糖-5-磷酸异构酶3，参与拟南芥对细菌的应答反应[33]；XM-006492080参与木质素合成[34]。因此笔者选择*05150*作为研究对象，制备多克隆抗体。

有研究表明，包括江西赣州、广西柳州在内染病柑橘的*C*Las含量在10月份达到最高值[24-26]。此外李智鹏等[26]研究表明，江西柑橘果园内病树的*C*Las含量在6月也呈现出1个高峰，该时段的*C*Las含量较10月份的*C*Las含量稍低，但仍是低谷时期*C*Las含量的10倍以上。本试验制备的pET-28a-05150多抗通过dot ELISA主要与9月份的样品发生显色反应，另外发生显色反应的样品均来自江西5月份的样品，均是在*C*Las含量达到高峰前可发生阳性反应，这也由此侧面印证05150分泌蛋白与*C*Las关联，是否抑制柑橘的防御反应还需要更大田间样本量来加以证实。此外dot ELISA检测呈阳性的样品占PCR阳性样品的38.9%，而且Western blot检测表明，pET-28a-05150抗血清无法与感病柑橘杂交出特异性条带，可能与05150分泌蛋白在感病柑橘中含量低、提取后易降解等原因有关。本试验中提取的柑橘总蛋白在−80 ℃冻融后或4 ℃放置1~2 d后，再通过dot ELISA检测均存在不发生显色反应或显色不明显情况。而且dot ELISA以活性蛋白为检测对象，Western blot以变性蛋白为检测对象，这也可能是无法与田间样品发生阳性反应的原因。而通过Western blot手段pET-28a-05150抗血清与融合蛋白反应良好，这可为进一步研究*05150*分泌蛋白基因在柑橘中的功能奠定前期基础。

4 结 论

本研究制备的pET-28a-05150多克隆抗体通过dot ELISA检测手段可与田间感病样品发生显色反应，通过Western blot手段与融合蛋白反应良好，为研究*05150*基因在柑橘中的功能奠定前期基础，同时为建立HLB的血清学检测手段及探究柑橘黄龙病菌分泌蛋白基因的筛选方法提供参考，但仍需再优化检测方法的试验条件，建立更有效的检测手段。

致谢：浙江大学生物技术研究所吴建祥教授研制pET-28a-05150多克隆抗体，在此表示感谢！

参考文献 References：

[1] BOVÉ J M. Huanglongbing: a destructive，newly-emerging，century-old disease of citrus[J]. Journal Plant Pathology，2006，88(1): 7-37.

[2] 娄兵海 . 柑橘黄龙病菌亚洲种全基因组测序及遗传多样性研究[D]. 重庆：西南大学，2018.
LOU Binghai. Whole-genome sequencing and genetic di-versity of ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’[D]. Chongqing: Southwest University，2018.

[3] 周常勇 . 对柑橘黄龙病防控对策的再思考[J]. 植物保护，2018，44(5)：35-38.
ZHOU Changyong. Reconsideraton on the control strategy of Citrus Huanglongbing[J]. Plant Protection，2018，44(5): 35-38.

[4] 谭锦 . 中国柑橘黄龙病病原菌原噬菌体遗传多样性研究[D]. 重庆：西南大学，2013.
TAN Jin. Genetic diversity of propnage region from *Candidatus* Liberibacter asiaticus in China[D]. Chongqing: Southwest University，2013.

[5] JAGOUEIX S，BOVE J M，GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α sub-

division of the Proteobacteria[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，1994，44(3): 379-386.
[6] TEIXEIR A D C，SAILLARD C，EVEILLARD S，DANET J L，AYRES A J，BOVÉ J M. ‘*Candidatus* Liberibacter americanus’，associated with citrus Huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State，Brazil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2005，55(5): 1857-1862.
[7] DUAN Y P，ZHOU L J，HALL D G，LI W B，DODDAPANENI H，LIN H，LIU L，VAHLING C M，GABRIEL D W，WILLIAMS K P，DICKERMAN A，SUNY J，GOTTTWALD T. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium，‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ obtained through metagenomics[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions，2009，22(8): 1011-1020.
[8] WULFF N A，ZHANG S J，SETUBAL J C，ALMEIDA N F，GABRIEL D W. The complete genome sequence of ‘*Candidatus* Liberibacter americanus’，associated with citrus Huanglongbing[J].MolecularPlant-MicrobeInteractions.2014.27(2):163-176.
[9] PITINO M，ARMSTRONG C M，CANO L M，DUAN Y. Transient expression of *Candidatus* Liberibacter asiaticus effector induces cell death in *Nicotiana benthamiana*[J]. Frontiers in Plant Science，2016，7: 982.
[10] JAIN M，FLEITES L A，GABRIEL D W. Prophage-encoded peroxidase in ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ is a secreted effector that suppresses plant defense[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions，2015，28(12): 1330-1337.
[11] MARTINELLI F，REAGAN R L，DOLAN D，FLIECCIA V，DANDEKAR A M. Proteomic analysis highlights the role of detoxification pathways in increased tolerance to Huanglongbing disease[J]. BMC Plant Biology，2016，16(1): 167.
[12] WANG N，PIERSON E A，SETUBAL J C，XU J，LEVY J G，ZHANG Y Z，LI J Y，RANGEL L T，MARTINS J. The *Candidatus* Liberibacter-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control[J]. Annual Review of Phytopathology，2017，55(1): 451-482.
[13] 熊叶辉 . 稻瘟菌效应子 AvrPi9 在水稻中互作蛋白的筛选与功能研究[D]. 北京：中国农业科学院，2016.
XIONG Yehui. Identification and characterization of interacting proteins of the fungal effector AvrPi9 in rice[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences，2016.
[14] 史学涛 . 稻瘟菌干扰水稻钾离子通道抑制免疫反应的分子机理研究[D]. 北京：中国农业科学院，2018.
SHI Xuetao. The fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* suppresses innate immunity by modulating a host potassium channel[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences，2018.
[15] PITINO M，ALLN V，DUAN Y P. Las15315 effector induces extreme starch accumulation and chlorosis as *Ca.* Liberibacter asiaticus infection in *Nicotiana benthamiana*[J]. Frontiers in Plant Science，2018，9: 113.
[16] DING F，DUAN Y P，PAUL C，BRLANSKY R H，HARTUNG J S. Localization and distribution of “*Candidatus* Liberibacter asiaticus” in citrus and periwinkle by direct tissue blot immuno assay with an Anti-OmpA polyclonal antibody[J]. PLoS One，2015，10(5): e0123939.
[17] PAGLIACCIA D，SHI J X，PANG Z Q，HAWARA E，CLARK K，THAPA S P，FRANCESCO A D D，LIU J F，TRAN T T，BODAGHI S，FOLIMIONOVA S Y F，ANCONA V，MULCHANDANI A，COAKER G，WANG N，VIDALAKIS G，MA W B. A pathogen secreted protein as a detection marker for citrus Huanglongbing[J]. Frontiers in Microbioiogy，2017，8: 2041.
[18] PRASAD S，XU J，ZHANG Y Z，WANG N. SEC-Translocon dependent extracytoplasmic proteins of *Candidatus* Liberibacter asiaticus[J]. Frontiers in Microbioiogy，2016，7: 1989.
[19] 苏华楠 . 中国柑橘黄龙病病原调查、种群遗传分化及其原噬菌体溶菌酶蛋白原核表达[D]. 重庆：西南大学，2013.
SU Huanan. HLB etiology survey，population differentiation of ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ in China and Lysozyme protein prokaryotic expression of its prophage[D]. Chongqing: Southwest University，2013.
[20] 刘雪禄 . 柑橘黄龙病菌分泌蛋白 Clsp33 致病机理初步研究[D]. 重庆：西南大学，2019.
LIU Xuelu. Preliminary study on the pathogenic mechanism of the secreted protein Clsp33 of ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ [D]. Chongqing: Southwest University，2019.
[21] DODDS P N，RATHJEN J P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions[J]. Nature Reviews Genetics，2010，11(8): 539-548.
[22] FOLIMONOVA S Y，ROBERTSON C J，GARNSEY S M，GOWDA S，DAWSON W O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions[J]. Phytopathology，2009，99(12): 1346-1354.
[23] LEE R F. Citrus greening disease and its vectors[J]. Naranja，1996，17: 258-260.
[24] 胡浩 . 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[D]. 重庆：重庆大学，2007.
HU Hao. Research on dynamic change and distribution of *Candidatus* Liberibacter asisticus in hosts with real-time PCR[D]. Chongqing: Chongqing University，2007.
[25] WANG Z K，YIN Y P，HU H，YUAN Q，PENG G L，XIA Y. Development and application of molecular-based diagnosis for ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’，the causal pathogen of citrus Huanglongbing[J]. Plant Pathology，2006，55(5): 630-638.
[26] 李智鹏，关巍，黄洋，杨玉文，赵廷昌 . 柑橘黄龙病菌在寄主体内含量动态变化研究[J]. 果树学报，2019，36(11)：1540-1548.
LI Zhipeng，GUAN Wei，HUANG Yang，YANG Yuwen，ZHAO Tingchang. Study on dynamic content change of *Candidatus* Liberibacter asiaticus in *Citrus*[J]. Journal of Fruit Science，2019，36(11): 1540-1548.
[27] BAI X，CORREA V R，TORUNO T Y，AMMAR E D，KAMOUN S，HOGENHOUT S A. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions，2009，22(1): 18-30.
[28] SUGIO A，MACLEAN A M，KINGDOM H N，GRIEVE V M，MANIMEKALAI R，HOGENHOUT S A. Diverse targets of Phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects[J]. Annual Review of Phytopathology，2011，49(1): 175-195.
[29] MACLEAN A M，SUGIO A，MAKAROVA O V，FINDLAY K C，GRIEVE V M，TÓTH R，NICOLAISEN M，HOGENHOUT S A. Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants[J]. Plant Physiology，2011，157(2): 831-841.
[30] YAN Q，SREEDHARAN A，WEI S，WANG J，PELZ-STELINSKI K，FOLIMINOVA S，WANG N. Global gene expression changes in *Candidatus* Liberibacter asiaticus during the transmission in distinct hosts between plant and insect[J]. Molecular Plant Pathology，2013，14(4): 391-404.
[31] YING X B，WAN M Y，HU L S，ZHANG J H，LI H，Lv D Q. Identifification of the virulence factors of *Candidatus* Liberibacter asiaticus via heterologous expression in *Nicotiana benthamiana* using *Tobacco Mosaic Virus*[J]. International Journal of Molecular Sciences，2019，20(22): 5575.
[32] CLARK K，FRANCO J Y，SCHWIZER S，PANG Z Q，HAWARAL E，LIEBRAND T W H，PAGLIACCIAL D，ZENG L P，GURUNG F B，WANG P C，SHI J X，WANG Y S，ANCONA V，HOORN R A L，WANG N，COAKER G，MA W B. An effector from the Huanglongbing-associated pathogen targets citrus proteases[J]. Nature Commumications，2018，9(1): 1718.
[33] JONES A M，THOMAS V，BENNETT M H，MANSFIELD J，GRANT M. Modifications to the *Arabidopsis* defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringael*[J]. Plant Physioloy，2006，142(4): 1603-1620.
[34] DENG H，ACHOR D S，ETXEBERRIA E，YU Q，DU D，STANTON D，LIANG G，GMITTER F G. Phloem regeneration is a mechanism for Huanglongbing-tolerance of “Bearss” lemon and “LB8-9” Sugar Belle (R) mandarin[J]. Frontiers in Plant Science，2019，10: 277.