

抗菌肽 MaSAMP 的生信分析、基因克隆及遗传转化

廖名静^{1,2}, 李向阳^{2*}, 吕远达^{2,3}, 姜波^{2,3}, 李娟^{1**}, 钟云^{2,3**}, 王婷^{2,3}, 郑蓝艳^{2,3}

1. 仲恺农业工程学院园艺园林学院, 广东广州 510225; 2. 广东省农业科学院果树研究所, 广东广州 510640; 3. 农业农村部亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室/广东省果树科学与技术研究重点实验室, 广东广州 510640

摘要: 来源于澳指檬 (*Microcitrus australasica*) 的一种抗菌肽 (stable antimicrobial peptide, SAMP), 不仅可以降低已感染柑橘黄龙病的病树体内的黄龙病菌 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLas) 浓度、减轻病树症状, 而且还可以诱导未感染黄龙病的健康树先天免疫、阻止感染黄龙病。本研究对 MaSAMP 的功能结构、亚细胞定位、系统发育等进行分析, 结果表明, MaSAMP 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 全长为 201 bp, 编码 67 个氨基酸, 编码的蛋白质分子量为 7.59959 kDa, 理论等电点为 5.38, 不稳定性指数 [instability index (II)] 为 33.22, 脂肪族氨基酸系数 (aliphatic index) 为 87.16%, 平均亲水系数 (grand average of hydropathicity) 为 -0.091, 属于亲水性蛋白, 含有 1 个 Dabb 结构域, MaSAMP 蛋白结构以 α -螺旋、无规则卷曲为主。MaSAMP 与甜橙胁迫响应 A/B 桶状结构域蛋白 CISIN_1g033887mg、克里曼丁橘 A/B 桶状结构域蛋白 HS1 亲缘关系较近, 蛋白相似度分别为 97.01%、91.04%。亚细胞定位结果显示, MaSAMP 定位于叶绿体。进一步通过同源重组成功构建了融合 EGFP 荧光标签的 pCAMBIA1300-35S::MaSAMP-EGFP 过表达载体, 并借助农杆菌介导的原位转化技术获得柑橘转基因植株。本研究为后续 MaSAMP 的生物学功能研究提供材料基础。

关键词: 抗菌肽; 澳指檬; 生物信息学分析; 载体构建; 转基因

中图分类号: S666 文献标志码: A

Bioinformatics Analysis, Gene Cloning and Genetic Transformation of Antimicrobial Peptide MaSAMP

LIAO Mingjing^{1,2}, LI Xiangyang^{2*}, LYU Yuanda^{2,3}, JIANG Bo^{2,3}, LI Juan^{1**}, ZHONG Yun^{2,3**}, WANG Ting^{2,3}, ZHENG Lanyan^{2,3}

1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China; 2. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 3. Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Guangdong Provincial Key Laboratory of Science and Technology Research on Fruit Trees, Guangzhou, Guangdong 510640, China

Abstract: An antimicrobial peptide (SAMP) derived from *Microcitrus australasica* can not only reduce the concentration of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) in the infected trees and reduce the symptoms of the diseased trees, but also induce innate immunity and prevent the infection of Huanglongbing in healthy trees that are not infected with Huanglongbing. MaSAMP was analyzed by functional structure, subcellular localization and phylogeny. The results

收稿日期 2025-02-12; 接受日期 2025-03-12

基金项目 国家外专局个人类项目 (No. Y20240127); “十四五”广东省农业科技创新九大主攻方向“揭榜挂帅”项目 (No. 2024KJ29); 2024 年度广东乡村振兴战略专项—广东省级现代农业产业技术体系创新团队建设项目 (No. 2024CXTD10)。

作者简介 廖名静 (1998—) 女, 硕士研究生, 研究方向: 果树遗传育种; *同等贡献作者: 李向阳 (1988—) 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 果树遗传育种。 **通信作者 (Corresponding author): 李娟 (LI Juan), E-mail: 13751774213@139.com; 钟云 (ZHONG Yun), E-mail: zhongyun99cn@163.com。

showed that the open reading frame (ORF) of MaSAMP was 201 bp in length, encoding 67 amino acids. The molecular weight of the corresponding protein was 7.59959 kDa, the theoretical isoelectric point was 5.38, and the instability index (Instability index (II)) was 33.22. The aliphatic index was 87.16%, and the grand average of hydropathicity was -0.09 , indicating that the protein was a hydrophilic one. The protein contained one Dab domain and was predominantly structured by α -helices and random coils. In terms of evolution, MaSAMP was phylogenetically close to the stress-response A/B barrel domain-containing protein CISIN_1g033887mg from *Citrus sinensis* and the A/B barrel domain protein HS1 from *Citrus × clementina*, with protein similarity of 97.01% and 91.04%, respectively. Subcellular localization results indicated that MaSAMP was localized in chloroplasts. Furthermore, through homologous recombination, a pCambia1300-35S::MaSAMP-EGFP overexpression vector fused with an EGFP fluorescent tag was successfully constructed, and transgenic citrus plants were obtained using agrobacterium-mediated *in planta* transformation technology. This study would provide a material basis for subsequent research on the biological functions of MaSAMP.

Keywords: antimicrobial peptides; *Microcitrus australasica*; bioinformatics analysis; vector construction; transgene

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.07.003

我国柑橘产量和栽培面积均居世界首位^[1], 柑橘产业在水果贸易、乡村振兴中发挥着重要的作用。我国有 19 个柑橘种植省(市), 其中有 11 个省遭受柑橘黄龙病(*Citrus Huanglongbing*, HLB)的危害, 损失巨大, 仅广东年损失达 50 亿元^[2]。柑橘黄龙病是一种由寄生于韧皮部的革兰氏阴性细菌(*Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLAs)引起的系统性病害, 表现为叶片斑驳黄化, 植株枯萎, 果实小, 结果率低, 产量锐减, 并具有传播快的特征, 故被称为柑橘中的癌症。该病害严重影响了我国柑橘产业的发展^[3-6]。近百年来的农业实践和研究表明, 尽管柑橘黄龙病可防可控, 但不可根治^[7], 而其根本有效的解决途径仍有赖于抗性育种。

澳指檬(*Microcitrus australasica*)是一种原产于澳大利亚的澳指檬属的柑橘资源, 最近因其对柑橘黄龙病有极高的耐受性而受到广泛关注^[8-11]。有研究者对澳指檬及其杂交种进行不同组合的嫁接接毒实验, 经过 2 a 的接毒评价, 发现嫁接后, 在砧木发病的情况下, 澳指檬及后代叶片中均未检测到黄龙病菌^[8]。通过体细胞融合技术, 将 OLL8 甜橙或 Page 橘子愈伤组织来源的原生质体与澳指檬叶肉分离的原生质体进行细胞融合, 培育的细胞融合植株在黄龙病的环境中生长 6 a 仍保持黄龙病阴性^[9]。

抗菌肽可替代抗生素, 靶向细胞膜或特定的细胞内成分, 通过多种特殊机制抑制多种微生物, 是作为前瞻性抗真菌和抗细菌疗法的新兴候选药物^[12], 并且其产生耐药性的可能很小^[13]。植物中具有许多独特的防御机制, 抗菌肽是植物免疫系统最突出的部分, 对病原体具有直接和持久的抗

性, 且抗菌肽是植物天然合成, 对植物和哺乳动物细胞无毒害^[14]。抗菌肽在整个植物体内的表达可用于增强抗病性或作物改良。MOULIN 等^[15]研究表明, 富含胰蛋白酶抑制剂(10~14 kDa)的叶提取物通过抑制病原来源蛋白酶的酶活性, 实现对辣椒黄花叶病毒(*Pepper yellow mosaic virus*, Pep YMV)的抗病毒活性。刘琦琦等^[16]发现转入抗菌肽 CecropinB 能提高锦橙对柑橘溃疡病的抗性。随后有学者通过组学分析从澳指檬中鉴定出 1 种热稳定蛋白 MaSAMP, 体外实验表明该蛋白可有效降低黄龙病菌浓度及黄龙病阳性树的发病症状, 同时, 喷施和注射后亦可激活植株的先天免疫系统, 抑制黄龙病感染^[10], 但关于该功能蛋白对柑橘属植株的具体生物学功能未见报道。本研究通过生物信息学分析进一步明确 MaSAMP 的生化功能及系统发育关系, 同时借助农杆菌介导的原位转化, 构建柑橘过表达遗传材料, 为后续探究 MaSAMP 在黄龙病抗性中的生理功能及抗性育种等提供遗传材料基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2023 年 12 月于广东省农业科学院果树研究所经评价具高黄龙病耐受性的澳指檬为材料, 使用天根(TIANGEN)多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取澳指檬成熟叶片 RNA, 再通过 TaKaRa 反转录试剂盒合成 cDNA。遗传转化所用柑橘种子由广东省农业科学院果树研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 MaSAMP 基因克隆 以澳指檬 cDNA 为模板, 参考 HUANG 等^[10]的方法设计引物 MaSAMP-

F/R (表 1), 通过 PCR 扩增获得 *MaSAMP* 基因。PCR 反应体系为: 无菌水 20 μ L、cDNA 2 μ L、上/下游引物各 1.5 μ L、PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$) 25 μ L。反应程序为: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 12 s; 72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增后进行凝胶电泳检测产物, 使用美基 (Magen) 试剂盒回收目的条带。利用全式金 Blunt Simple Cloning Kit 进行 TA 克隆, 胶回收产物 2 μ L, 无菌水 2 μ L, pEASY Blunt Simple Cloning Vector 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 将连接产物转入 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态后再超净工作台上加入 250 μ L 无抗 LB 液体到上述产物中, 200 r/min、37 $^{\circ}$ C 培养 1 h。将菌液涂于 50 μ g/mL 氨苄青霉素的平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12 h。挑取单菌落进行菌液 PCR, 体系为 Premix Taq 10 μ L、M13F/R 各 1 μ L、模板 2 μ L、无菌水 6 μ L, 通过电泳检测后挑选阳性菌液测序。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
MaSAMP-F	ATGTGCTGCAACAGGGGCAAGA	基因克隆
MaSAMP-R	CTACTAGTACAACCTCAGACACG	
MaSAMP-SacI-Sall-F	gagaacacgggggacGAGCTCATGTGC	载体构建
MaSAMP-SacI-Sall-R	gctcaccatctgcagGTCGACGACACG	
pcambia1300-GFP-F	ATTGTGGAGAGAACACGGGGGAC	测序引物
pcambia1300-GFP-R	AACTTCAGGGTCAGCTTG	

注: 引物序列中小写字母表示同源臂。
Note: The lowercase letters of the primer sequence represent the homologous arm.

1.2.2 *MaSAMP* 基因生物信息学分析 利用在线网站 NCBI 的 Conserved Domain (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 在线工具查找目的基因的保守结构域。使用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件中的 ProtParam 工具分析 *MaSAMP* 蛋白理化性质。使用 SOPMA (<http://npsa-prabi.ibcp.fr>) 在线软件预测其二级结构。使用 SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) 在线软件预测该蛋白的信号肽, 使用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 在线软件预测蛋白质跨膜序列。在 NCBI 数据库中进行 BLAST, 选取一致性较高的序列通过 DNAMAN 9.0 软件进

行蛋白多重序列比对。使用 MEGA 11 软件, 采用最大简约法构建系统发育树。

1.2.3 植物过表达载体的构建和遗传转化 选择 *Sac* I、*Sal* I 酶对 pCAMBIA1300-EGFP 质粒进行双酶切, 条件为金属浴 37 $^{\circ}$ C 1.5 h。以测序验证成功的 pEASY-T1-*MaSAMP* 质粒为模板进行目的片段扩增, 体系为: 无菌水 21 μ L、质粒 DNA 1 μ L、上/下游引物各 1.5 μ L、PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$) 25 μ L, 反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 12 s; 72 $^{\circ}$ C 5 min。通过凝胶电泳回收目的片段。利用同源重组反应, 将目的片段和酶切产物进行连接, 通过热激法将连接产物转入 DH5 α 大肠杆菌, 均匀涂布在含卡那霉素的 LB 固体平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单菌落后进行菌液 PCR 验证, 挑取阳性菌液测序。

于 2024 年 8 月选取饱满完好的种子播种于塑料花盆, 于 26 $^{\circ}$ C 种植室培养 4~6 周, 取幼苗用于原位转化, 转化方法参照谢幸男等^[17]的方法。待切口长出新芽后, 通过 LUYOR-3415 激发光源进行检测。

1.2.4 亚细胞定位 选择培养 60 d 左右的柑橘实生苗嫩叶, 参照酶解分离法^[18-19]对柑橘原生质体进行分离, 运用 PEG 介导法^[19]将质粒 pCAMBIA 1300-35S::*MaSAMP*-EGFP 转化到柑橘原生质体中, 培养 12 h 后于荧光显微镜下观察荧光。

2 结果与分析

2.1 *MaSAMP* 蛋白理化性质及结构分析

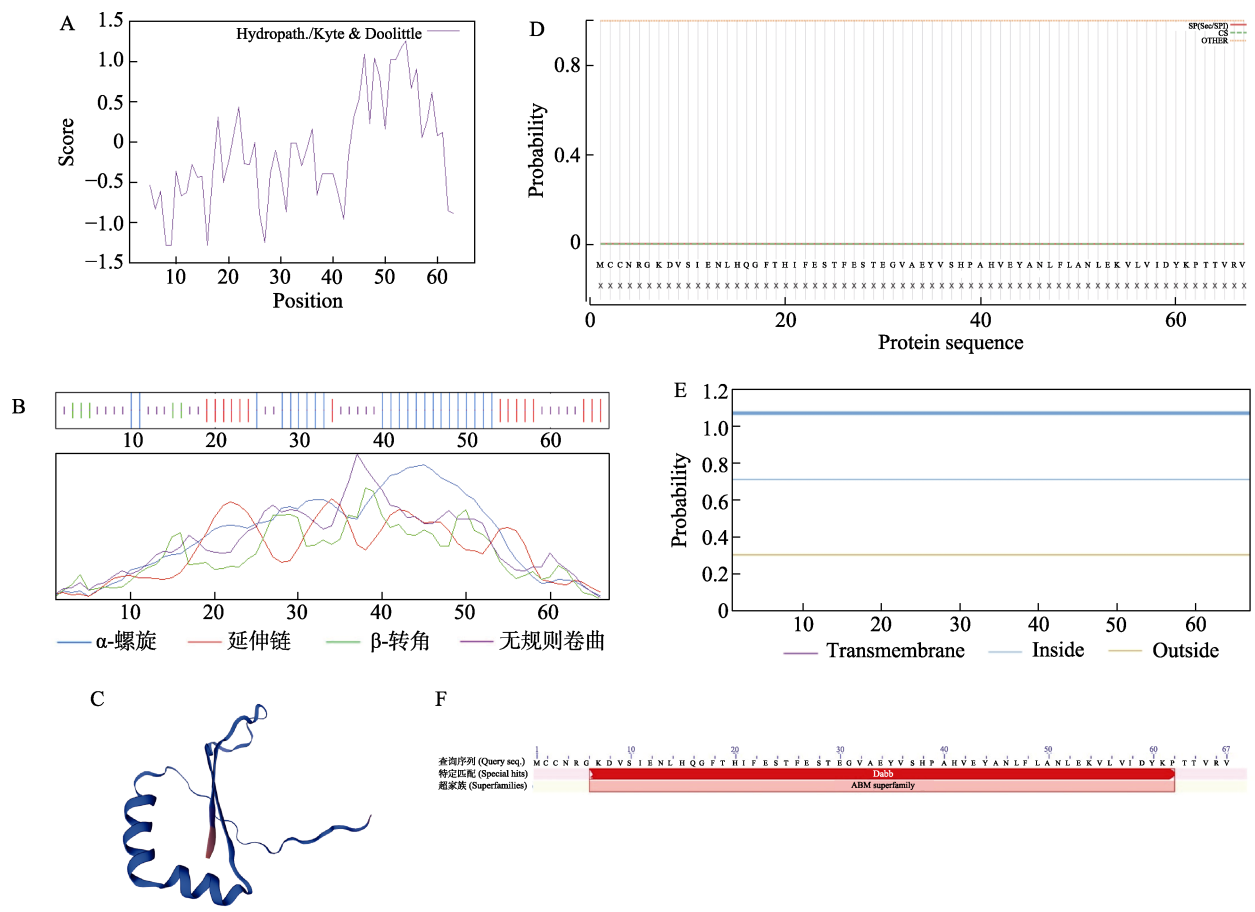
通过 ExPASy 在线软件中的 ProtParam 工具对 *MaSAMP* 蛋白理化性质分析, 结果显示, *MaSAMP* 蛋白由 67 个氨基酸组成, 其相对分子量为 7.59959 kDa, 理论等电点为 5.38; 其不稳定指数 (instability index (II)) 为 33.22, GASTEIGER 等^[20]将不稳定指数小于 40 的蛋白预测为稳定, 反之则可能是不稳定蛋白, 表明 *MaSAMP* 为稳定蛋白; 脂肪族氨基酸系数 (aliphatic index) 为 87.16%, 表明该蛋白脂肪族氨基酸含量高; 平均亲水系数 (grand average of hydropathicity) 为 -0.091, 说明该蛋白具有一定的亲水性。使用 ExPASy 在线软件中的 ProtScale 工具对其疏水性进行分析 (图 1A) 发现, 第 8、9 位氨基酸均为最低分值 -1.267, 第 54 位氨基酸具有最高分值 1.267, 且整体分布偏于负值, 故预

测其具有亲水性。

MaSAMP 的二级结构预测 (图 1B) 显示, 该序列含有 34.33% α -螺旋 (alpha helix)、32.84% 无规则卷曲 (random coil)、25.37% 延伸链 (extended strand)、7.46% β -转角 (beta turn)。MaSAMP 蛋白三级结构预测 (图 1C) 显示, 其 QMQE 值为 0.67, QMQEN 值为 0.61 ± 0.07 , 一致性为 77.42%, 该模型准确度较高, 为 α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲和延伸链构成空间构象。

SignalP-5.0 软件预测结果显示该蛋白不存在信号肽 (图 1D), 表明其不是分泌蛋白。TMHMM 软件进行蛋白质跨膜序列预测显示该蛋白是非跨膜蛋白 (图 1E)。

利用 NCBI 的 CDD 数据库对 MaSAMP 蛋白保守结构域进行查找 (图 1F), 发现其具有 1 个 Dabb (stress responsive A/B Barrel Domain) 保守结构域, 属于 ABM (antibiotic biosynthesis monooxygenase) 超家族。



A: 亲水性预测; B: 二级结构预测; C: 三级结构预测; D: 信号肽预测; E: 跨膜预测; F: 保守结构域预测。
A: Hydroplicity prediction; B: Secondary structure prediction; C: Tertiary structure prediction; D: Signal peptide prediction;
E: Transmembrane prediction; F: Conserved domain prediction.

图 1 MaSAMP 蛋白理化性质及蛋白结构分析

Fig. 1 Analysis of physicochemical properties and protein structure of MaSAMP

2.2 MaSAMP 蛋白系统发育分析

蛋白序列比对 (图 2) 发现, MaSAMP 与甜橙 (*Citrus sinensis*) 胁迫响应 A/B 桶状结构域蛋白 CISIN_1g033887mg (KDO72075.1)、克里曼丁橘 (*Citrus × clementina*) A/B 桶状结构域蛋白 HS1 (XP_006419297.1)、甜橙胁迫响应 A/B 桶状结构域蛋白 HS1 (KAH9683996.1)、酸橙 (*Citrus*

× *changshan-huyou*) WN943_028324 (KAK9179 126.1)、苦楝 (*Melia azedarach*) 胁迫响应 A/B 桶状结构域蛋白 (KAJ4721944.1)、欧洲桤木 (*Alnus glutinosa*) 胁迫响应 A/B 桶状结构域蛋白 HS1 (XP_062178246.1)、藜麦 (*Chenopodium quinoa*) 胁迫响应 A/B 桶状结构域 HS1 样蛋白 (XP_021762050.1) 相似度分别为 97.01%、

91.04%、89.55%、86.57%、85.07%、82.09%、82.09%。系统发育分析（图 3）表明多个品种的柑橘以及楝科、桦木科、苋科中均含有 MaSAMP

同源蛋白，该蛋白与甜橙胁迫响应 A/B 桶状结构域蛋白 CISIN_1g033887mg（KDO72075.1）的亲缘关系最近。

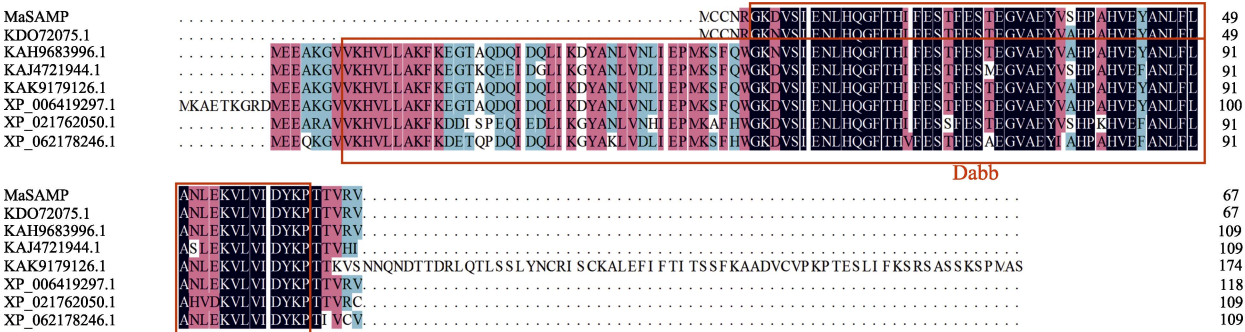


图 2 MaSAMP 蛋白的多序列比对
Fig. 2 Multiple sequence alignment of MaSAMP protein

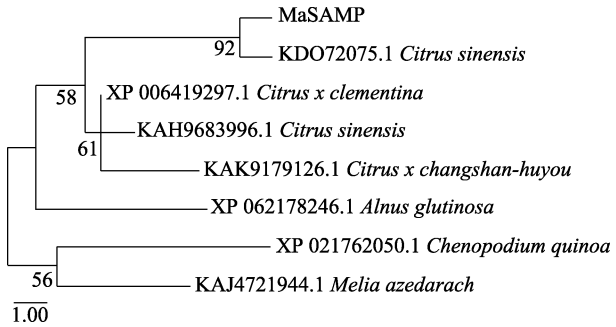
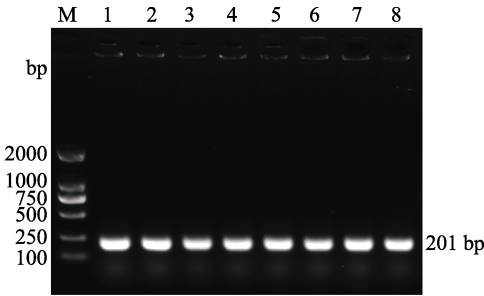


图 3 MaSAMP 蛋白的系统发育分析
Fig. 3 Phylogenetic analysis of MaSAMP

2.3 MaSAMP 基因克隆

以澳指檬叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，获得一条 201 bp 的条带（图 4）。通过菌液 PCR、

测序验证，测序结果显示获得一段长度为 201 bp，编码 67 个氨基酸的目的序列（图 5），表明基因克隆成功。



M: DL2000 DNA marker.
图 4 MaSAMP 基因克隆
Fig. 4 Cloning of MaSAMP

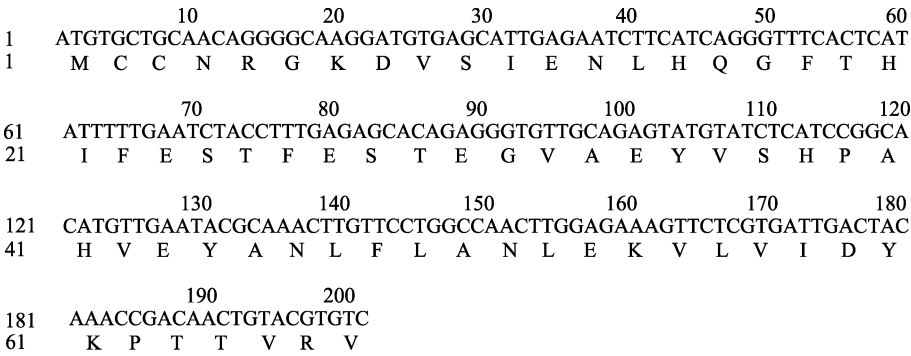


图 5 MaSAMP 基因序列及其编码的氨基酸
Fig. 5 MaSAMP sequence and its encoded amino acid

2.4 MaSAMP 过表达载体构建及柑橘遗传转化材料的获得

用 Sal I 和 Sac I 酶对 pCAMBIA1300-EGFP 进行双酶切，获得 1 条酶切后的线性条带（图 6A）。

目的基因与载体进行连接后转入大肠杆菌 DH5α，利用载体上的引物（1300-35S-F/1300-GFP-R）进行菌液 PCR 获得 1 条 402 bp 的条带（图 6B），再对菌液进行测序验证，结果显示载体中插入了 1

段长度为 201 bp 的序列，表明 pCambia1300-35S::MaSAMP-EGFP 过表达载体构建成功。

利用农杆菌介导的原位转化法，通过农杆菌 EHA105，将构建成功的重组载体转化至柑橘幼苗。农杆菌侵染后培养 4~6 周对新芽进行检测。利用表达载体上携带的 EGFP 绿色荧光蛋白表达元件，在 440~460 nm 激发光源下筛选到转化成功的植株（图 7）。

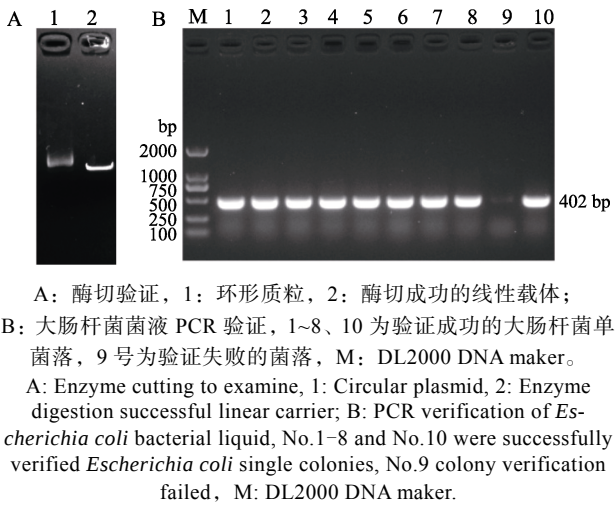


图 6 载体构建
Fig. 6 Vector construction



图 7 转基因植株检测结果
Fig. 7 Detection results of transgenic plants

2.5 MaSAMP 亚细胞定位分析

将融合绿色荧光蛋白（EGFP）的 pCambia 1300-35S::MaSAMP-EGFP 质粒导入柑橘原生质体进行亚细胞定位分析，利用荧光显微镜观察。结果显示，MaSAMP-EGFP 在原生质体中成功表达，原生质体的叶绿体中检测到了清晰的 EGFP 荧光信号（图 8），表明 MaSAMP 蛋白定位于叶绿体中。

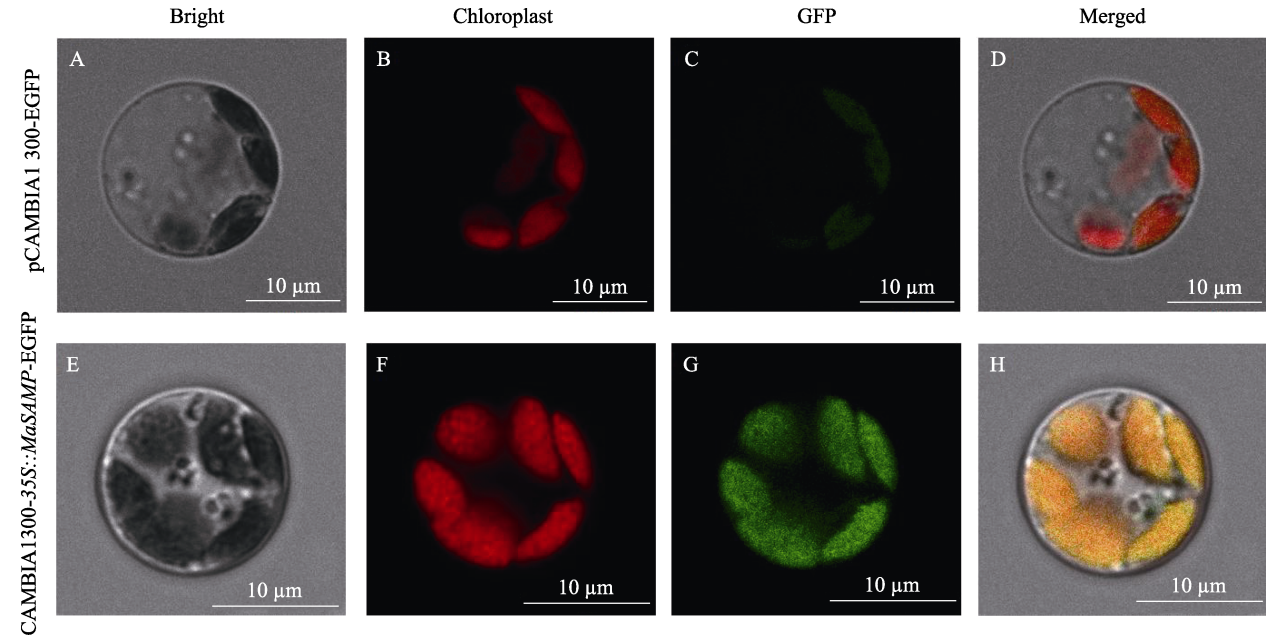


图 8 亚细胞定位分析
Fig. 8 Subcellular localization analysis

3 讨论

HUANG 等^[10]通过组学分析在澳指檬中获得

抗菌肽基因 *MaSAMP*，并通过原核表达获得 MaSAMP。在对感染黄龙病柑橘的喷洒和注射实验中，长达 14 个月的黄龙病菌浓度检测结果表

明, MaSAMP 对黄龙病菌具有极好的灭杀能力。罗澍^[21]进一步克隆出 Long-SAMP 不同特异转录本类型, 并对其氨基酸序列进行分析比较。Long-SAMP 是一段含有 109 个氨基酸的长肽, 而根据 HUANG 等^[10]的报道, 抗菌肽的功能区段仅存在于 Long-SAMP 的后 67 个氨基酸中。因此, 本研究从 HUANG 等的研究中获取引物, 克隆出 MaSAMP 基因, 并对该序列进行分析。

本研究结果显示, MaSAMP 蛋白的相对分子量为 7.59959 kDa, 理论等电点为 5.38, 不稳定指数为 33.22, 根据 GASTEIGER 等^[20]的注释判定 MaSAMP 为稳定蛋白。脂肪族氨基酸系数为 87.16%, 说明该蛋白属于脂肪族氨基酸。平均亲水系数为负数, 表明该蛋白具一定的亲水性, 同时 Kyte and Doolittle 算法亦表明其具有亲水性。该蛋白二级结构中有 34.33% 为 α -螺旋结构, 32.84% 为无规则卷曲, 25.37% 为延伸链, 7.46% 为 β -转角, 该蛋白三级结构与二级结构预测结果一致。天然抗菌肽长约 10~100 个氨基酸, 且大多两端均含有亲水和疏水残基, 其 α -螺旋- β -折叠等结构有重要功能特征^[22]。该蛋白不存在信号肽, 说明该蛋白为非分泌蛋白, 且与 TMHMM 软件的预测结果一致, 即为非跨膜蛋白。MaSAMP 蛋白保守结构域为 Dabb (stress responsive A/B barrel domain), GU 等^[23]从胡杨 (*Populus euphratica*) 的热休克蛋白 (heatshock protein 90, Hsp90) 和羟脯氨酸糖蛋白 (hydroxyproline-rich glycoprotein, HRGP) 中发现 Dabb 结构域, 2 个蛋白均参与了植物耐盐胁迫反应。Dabb 类蛋白被发现显著抑制各种病原真菌的细胞生长, 参与诱导植物对多种病原真菌的防御^[24-25]。MaSAMP 含有 Dabb 结构域, 推测该蛋白可能参与植物耐盐胁迫反应和诱导植物对病原菌的防御过程。Blast 发现, 甜橙、克里曼丁橘、酸橙、苦楝、欧洲桉木、藜麦存在与 MaSAMP 相似度大于 80% 的序列, 系统发育分析表明澳洲指檬 MaSAMP 与上述物种相似序列蛋白有一定亲缘关系, 与甜橙胁迫响应 A/B 桶状结构域蛋白 CISIN_1g033887mg 的亲缘关系更近。根据亚细胞定位结果, MaSAMP 蛋白定位于叶绿体中。腾海艳^[26]研究发现水稻 *Ossp1* 基因定位于叶绿体, 且其表达具有干旱响应性, 推测其功能可能与叶绿体内相关代谢过程或植物的逆境响应有关。

参考文献

- [1] 邓秀新. 中国柑橘育种 60 年回顾与展望[J]. 园艺学报, 2022, 49(10): 2063-2074.
DENG X X. A review and perspective for citrus breeding in China during the last six decades[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(10): 2063-2074. (in Chinese)
- [2] 杜美霞, 庞淑玮, 董丽婷, 莫凯琴, 候梦圆, 王帅, 邹修平. 柑橘黄龙病菌与寄主互作的分子机制研究进展[J]. 园艺学报, 2024, 51(7): 1623-1638.
DU M X, PANG S W, DONG L T, MO K Q, HOU M Y, WANG S, ZOU X P. Research progress on the molecular mechanisms of interactions between *Candidatus Liberibacter* and Citrus[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2024, 51(7): 1623-1638. (in Chinese)
- [3] 程春振, 曾继吾, 钟云, 闫化学, 姜波, 钟广炎. 柑橘黄龙病研究进展[J]. 园艺学报, 2013, 40(9): 1656-1668.
CHENG C Z, ZENG J W, ZHONG Y, YAN H X, JIANG B, ZHONG G Y. Research progress on citrus Huanglongbing disease[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(9): 1656-1668. (in Chinese)
- [4] 范国成, 刘波, 吴如健, 李韬, 蔡子坚, 柯冲. 中国柑橘黄龙病研究 30 年[J]. 福建农业学报, 2009, 24(2): 183-190.
FAN G C, LIU B, WU R J, LI T, CAI Z J, KE C. Thirty years of research on citrus Huanglongbing in China[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2009, 24(2): 183-190. (in Chinese)
- [5] 胡文召, 周常勇. 柑橘黄龙病病原研究进展[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 30-33.
HU W Z, ZHOU C Y. Advances in the pathogen of citrus Huanglongbing[J]. Plant Protection, 2010, 36(3): 30-33. (in Chinese)
- [6] WANG N. The citrus Huanglongbing crisis and potential solutions[J]. Molecular Plant, 2019, 12(5): 607-609.
- [7] 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): 30-33.
ZHOU C Y. Reconsideration on the control strategy of citrus Huanglongbing[J]. Plant Protection, 2018, 44(5): 30-33. (in Chinese)
- [8] ALVES M N, RAIOL-JUNIOR L L, GIRARDI E A, MIRANDA M, WULFF N A, CARVALHO E V, LOPES S A, FERRO J A, OLLITRAULT P, PENA L. Insight into resistance to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', associated with Huanglongbing, in Oceanian citrus genotypes[J]. Front Plant Science, 2022, 13: 1009350.
- [9] DUTT M, MAHMOUD L M, CHAMUSCO K, STANTON D, CHASE C D, NIELSEN E, QUIRICO M, YU Q, GMITTER F J, GROSSER J W. Utilization of somatic fusion techniques for the development of HLB tolerant breed-

- ing resources employing the Australian finger lime (*Citrus australasica*)[J]. PLoS One, 2021, 16(8): e0255842.
- [10] HUANG C Y, ARAUJO K, SANCHEZ J N, KUND G, TRUMBLE J, ROPER C, GODFREY K E, JIN H. A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2021, 118(6): e2019628118.
- [11] KILLINY N, JONES S E, NEHELA Y, HIJAZ F, DUTT M, GMITTER F G, GROSSER J W. All roads lead to Rome: towards understanding different avenues of tolerance to Huanglongbing in citrus cultivars[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 129: 1-10.
- [12] ERDEM B M, KESMEN Z. Antimicrobial peptides (AMPs): a promising class of antimicrobial compounds[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(3): 1573-1596.
- [13] MAHLAPUU M, HAKANSSON J, RINGSTAD L, BJORN C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 6: 194.
- [14] VRIENS K, CAMMUE B P, THEVISSSEN K. Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production[J]. Molecules, 2014, 19(8): 12280-12303.
- [15] MOULIN M M, RODRIGUES R, RIBEIRO S F, GONCALVES L S, BENTO CS, SUDRE C P. Trypsin inhibitors from *Capsicum baccatum* var. pendulum leaves involved in *Pepper* yellow mosaic virus resistance[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(4): 9229-9243.
- [16] 刘琦琦, 邹修平, 彭爱红, 许兰珍, 何永睿, 陈善春. 转 *Cecropin B* 基因柑桔对溃疡病的离体抗性评价[J]. 中国南方果树, 2014, 43(2): 1-4.
- LIU Q Q, ZOU X P, PENG A H, XU L Z, HE Y R, CHEN S C. *In vitro* evaluation of resistance to citrus canker by transgenic orange plants with antibacterial peptide gene *Cecropin B*[J]. South China Fruits, 2014, 43(2): 1-4. (in Chinese)
- [17] 谢幸男, 杨莉, 刘范, 田娜, 车婧如, 靳三鹏, 张永艳, 程春振. ‘伏令夏橙’原位转化体系的建立及优化[J]. 园艺学报, 2020, 47(1): 111-119.
- XIE X N, YANG L, LIU F, TIAN N, CHE J R, JIN S P, ZHANG Y Y, CHENG C Z. Establishment and optimization of Valencia sweet orange in *planta* transformation system[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(1): 111-119. (in Chinese)
- [18] 杨威. 柑橘原生质体瞬时转化体系的建立及应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- YANG W. Establishment & application of citrus protoplast transient transformation system[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [19] 杨雯惠, 刘丹, 郭文武. PEG 法介导的柑橘原生质体转化[J]. Bio-101, 2018: e1010187.
- YANG W H, LIU D, GUO W W. PEG-mediated citrus protoplast transformation[J]. Bio-101, 2018: e1010187. (in Chinese)
- [20] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, DUVAUD S, WILKINS M R, APPEL R D, BAIROCH A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server[M]//WALKER J M. The proteomics protocols handbook. Totowa: Humana Press, 2005: 571-607.
- [21] 罗澍. 柑橘砧木‘蒲江香橙’对黄龙病病菌的生理生化响应[D]. 雅安: 四川农业大学, 2022.
- LUO S. Physiological and biochemical responses of citrus rootstock ‘Pujiang Xiangcheng’ to the huanglongbing pathogen CLas[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [22] 杨晨远, 于子川, 秦迪, 高媛媛. 抗菌肽的结构分析、抗菌机制及改造应用的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2242-2259.
- YANG C Y, YU Z C, QIN D, GAO Y Y. Research progress in structures, mechanisms, and modification of antimicrobial peptides[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2242-2259. (in Chinese)
- [23] GU R, FONSECA S, PUSKAS L G, HACKLER L, ZVARA A, DUDITS D, PAIS M.S. Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*[J]. Tree Physiology, 2004, 24(3): 265-276.
- [24] LEE J R, LEE S S, PARK S, KANG J S, KIM S Y, LEE K O, LEE S Y. Functional characterization of pathogen-responsive protein AtDabb1 with an antifungal activity from *Arabidopsis thaliana*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2008, 1784(12): 1918-1923.
- [25] PARK S, LEE J R, SHIN S, PARK Y, LEE S Y, HAHM K. Characterization of a heat-stable protein with antimicrobial activity from *Arabidopsis thaliana*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 362(3): 562-567.
- [26] 腾海艳. 水稻 *Ossp1* 基因的亚细胞定位及其干旱条件下的表达[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(3): 529-534.
- TENG H Y. Subcellular localization and expression under drought conditions of rice *Ossp1* gene[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2020, 36(3): 529-534. (in Chinese)