

柑橘胼胝质合成酶基因家族的表达分析

彭 蕴, 范海芳, 雷天刚, 何永睿, 陈善春*, 姚利晓*

(西南大学/中国农业科学院柑桔研究所, 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712)

摘 要: 胼胝质由胼胝质合成酶合成, 胼胝质沉积是植物对入侵病原的防御反应。为了探索胼胝质合成酶 (Callose synthase, CalS) 基因在柑橘中对黄龙病的应答情况, 从甜橙基因组中筛选并利用生物信息学分析了柑橘胼胝质合成酶 (CsCalS) 家族的 12 个基因。这些基因编码的氨基酸序列与拟南芥中的胼胝质合成酶具有较高的同源性。荧光实时定量 PCR 结果显示, *CsCalS5* 和 *CsCalS12* 在柑橘健康叶片中的表达量高于其他胼胝质合成酶基因。比较黄龙病感病材料和健康对照材料, 发现 *CsCalS5*、*CsCalS7* 和 *CsCalS8* 在感病的‘砂糖橘’和‘强德勒’柚中均上调表达, 可能参与柑橘对黄龙病病原的应答反应。

关键词: 柑橘; 黄龙病; 胼胝质合成酶; 基因; 表达分析

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 02-0330-07

Expression Analysis of Callose Synthase Gene Family in Citrus

PENG Yun, FAN Haifang, LEI Tiangang, HE Yongrui, CHEN Shanchun*, and YAO Lixiao*

(Citrus Research Institute, Southwest University/Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Citrus Engineering and Technology Research Center, Chongqing 400712, China)

Abstract: Callose deposition is a common plant defense response to invasive pathogens and involved in plant innate immunity. In order to explore the expression of callose synthase (CalS) in citrus and the response to Huanglongbing (HLB), 12 members of callose synthase genes (*CsCalSs*) were screened from the sweet orange (*Citrus sinensis*) genome and analyzed with bioinformatic tools. The coding amino acid sequences of these *CsCalS* genes showed high homology with callose synthase gene in *Arabidopsis thaliana*. The results produced by real time PCR revealed that the expression of *CsCalS5* and *CsCalS12* in citrus leaves were higher than that of other callose synthase genes. On the other hand, *CsCalS5*, *CsCalS7* and *CsCalS8* were all up-regulated in HLB-affected ‘Shatangju’ (*C. reticulata*) and ‘Chandler’ pummelo (*C. grandis*) comparing with the healthy control, indicated they may be involved in the response of citrus to the HLB pathogen.

Keywords: citrus; Huanglongbing; callose synthase; gene; expression analysis

胼胝质是以 β -1,3 糖苷键结合的线性葡聚多糖, 属于细胞壁的特殊组分或是与细胞壁结合的物质, 在植物中并非普遍存在, 仅占细胞壁总质量的 0.3%~5.0% (Schneider et al., 2016)。胼胝质在细胞分裂时会在细胞板积累, 并可沉积在胞间连丝周围调控胞间运输能力, 也可出现在韧皮部筛孔

收稿日期: 2018-09-12; **修回日期:** 2019-01-08

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-26); 重庆市基础研究与前沿探索项目 (cstc2018jcyjAX0247); 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项 (现代农业) (cstc2017shms-xdny80051)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenshanchun@cric.cn, yaolixiao@cric.cn)

板孔处 (Gindro et al., 2003; Brown et al., 2010; Gomez-Gomez et al., 2010)。筛孔是营养物质和信号分子长距离运输的主要通道, 因此, 胼胝质的合成、积累和降解受到严格的调控以保障整株植物中物质的运输 (Donofrio & Delaney, 2001; Yang et al., 2015; Zhai et al., 2017; Kulich et al., 2018)。

胼胝质由胼胝质合成酶 (callose synthase, CalS) 以 UDP - 葡聚糖为底物催化合成。CalS 是一种分子量较大的蛋白, 具有多个跨膜结构域, 含有 3 个保守的功能域 Vta1 (Vps twenty associated 1)、FKS1 (FK506 sensitivity 1) 和 glucan synthase。拟南芥中含有 12 个 *CalS* 基因 (Richmond & Somerville, 2000), 这些基因在细胞板形成、胞间连丝调节、花粉发育、筛孔及纤维形成、韧皮部运输、配子发育、气孔形成及抗生物学和非生物学逆境等过程中具有不同的调节功能 (Ellinger & Voigt, 2014; Cui & Lee, 2016)。

柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing, HLB) 是影响柑橘产业的一种非常严重的系统性侵染病害 (程春振 等, 2013; 胡燕 等, 2016)。该病主要由韧皮部专性寄生的难培养的革兰氏阴性菌 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLas) 引起 (谭锦, 2013)。感染黄龙病的柑橘出现叶片斑驳状黄化, 果实着色不均匀 (许美容, 2016), 使得产量降低, 品质劣变, 甚至树体死亡 (Bové, 2014)。柑橘感染黄龙病后在筛板的筛孔中伴随有胼胝质和韧皮部蛋白沉积的现象, 推测是因为胼胝质的过度积累导致韧皮部堵塞, 光合产物运输受阻, 叶肉中淀粉过度积累, 叶绿素被破坏, 最终导致叶片出现失绿症状 (Achor et al., 2010; Koh et al., 2012; Mafra et al., 2013; Masaoka et al., 2014)。最近研究发现, 柑橘感染黄龙病后胼胝质合成酶基因表达上调 (钟晰, 2018)。

为了进一步了解柑橘中胼胝质合成酶基因在柑橘中的表达情况和对黄龙病病原的应答机制, 从甜橙基因组中筛选出 12 个胼胝质合成酶基因, 分析其生物信息, 并利用荧光定量 PCR 方法, 比较了胼胝质合成酶 12 个家族基因在健康和感病的‘砂糖橘’和‘强德勒柚’中的相对表达量, 以期筛选出参与黄龙病应答的胼胝质合成酶基因。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验于 2017 年 10 月—2018 年 4 月在西南大学柑桔研究所国家柑桔品种改良中心完成。试材为易感黄龙病的‘砂糖橘’ (*Citrus reticulata*) 和较耐黄龙病的‘强德勒柚’ (*C. grandis*)。健康叶片取自中国农业科学院柑桔研究所改良中心苗圃, 感染黄龙病的显症叶片取自广西感病果园。植物 RNA 和 DNA 提取试剂盒购自北京艾德莱公司, 引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成, 反转录试剂盒及实时荧光染料购于 BIO-RAD 公司。

1.2 *CsCalS* 基因生物信息学分析

从甜橙基因组数据库 (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>) 中查找并下载胼胝质合成酶家族基因 (*CsCalS*) 的核苷酸序列。并根据基因序列, 利用 VectorNTI 软件寻找开放阅读框, 翻译出氨基酸序列; 用在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对氨基酸序列的分子量、理论等电点进行预测。在线 (<http://citrus.hzau.edu.cn/cgi-bin/orange/blast>) 分析基因内含子、外显子数及其开放阅读框的 (ORF) 的范围。使用 smart 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线预测 *CsCalS* 蛋白的保守结构域。使用 MEG7.0 与拟南芥胼胝质合成酶家族基因进行比对和系统发育树的构建。

1.3 黄龙病病原检测

用 DNA 提取试剂盒(购自北京艾德莱公司)分别提取感病和健康砂糖橘、强德勒柚的叶脉 DNA, 并利用分光光度计检测提取的 DNA 浓度, 利用引物 OI1: 5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3', OI2C: 5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3' (Jagoueix et al., 1994) 进行黄龙病菌常规 PCR 检测。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 63 °C 20 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

取感病和健康新鲜‘砂糖橘’、‘强德勒柚’叶片, 将其叶肉与叶脉分离(吴柳等, 2018), 准确称量约 3 g 叶脉样品, 于液氮中研磨粉碎, 用 RNA 提取试剂盒(购自北京艾德莱公司)提取总 RNA, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测其完整度。利用 NCBI 中 PrimerBlast 在线设计 12 个 *CsCalS* 的定量引物(表 1), 保证引物的特异性并尽量跨基因内含子区。以 *actin* 基因为内参, 分别以健康的和感病的‘砂糖橘’和‘强德勒柚’叶脉的总 RNA 为模板, 使用表 1 所示的特异性引物通过实时逆转录聚合酶链式反应(PT-PCR), 反应体系: 4.4 μL H₂O, 0.3 μL 10 mmol · L⁻¹ 上、下游引物, 6 μL 2 × SYBRG 荧光染料, 1 μL cDNA。反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s; 60 °C 60 s; 共 40 个循环。每个处理进行 3 次生物学重复和 2 次平行样重复。相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 法计算, 使用 Excel 软件统计数据。

表 1 胼胝质合成酶 (Callose synthase) 基因 (*CalS*) 所用荧光定量 PCR 引物

Table 1 The real-time PCR primer pairs for *CsCalS* genes detection

目的基因 Gene name	上游引物序列 (5'-3') Upstream primer sequence	下游引物序列 (5'-3') Downstream primer sequence
<i>CsCalS1</i>	CCTCAAGGCCCCCAAGAAAT	ATGCTAACATTCCCCGCCAA
<i>CsCalS2</i>	CTACCCGGTTTGCCCTTGCTA	CAGCTCTGTTGCCTGACTGA
<i>CsCalS3</i>	AAATTTCCGGACAGCGGGAT	TCGAGCCTGTGCAATTTGCTA
<i>CsCalS4</i>	GCACAATGCTGTCTTGGTGG	CGTACCTTTGCACGCCAATC
<i>CsCalS5</i>	AACGTTCTGGTGATGCTCGT	AGCCTTCGCAAGAGCTGAAT
<i>CsCalS6</i>	AAGCCCAGAAAATGTTTGTCG	CCTATGAGCCTTCTCGAATGC
<i>CsCalS7</i>	TCTTTGCACCCATAGCCATT	TCACTTTTTTCTGTCTCAGTCTT
<i>CsCalS8</i>	TGCCCAGTGTAAACCACCAAT	TGGCCAGAAGCAGTATTAGGT
<i>CsCalS9</i>	TGCGCAAGCTCTGGTCAATA	ATCCAGGTAAGCAACACGCA
<i>CsCalS10</i>	TGGTTTGGCCCTCGTAATC	GCTATTCTGCGCCTTGCTTC
<i>CsCalS11</i>	ACGGTGATCATGGCTGGTG	TCAGTCGGAACACGAGTTGG
<i>CsCalS12</i>	GCCAGTTTATGGGCTCCAGT	GCCCGAGGAACTCCTCAAA
<i>actin</i>	CATCCCTCAGCACCTTCC	CCAACCTTAGCACTTCTCC

2 结果与分析

2.1 *CsCalS* 的生物信息学分析

根据 *CsCalS* 在柑橘染色体上的位置, 按照编号由小到大的顺序分别命名为 *CsCalS1* ~ *CsCalS12*。*CsCalS1* 定位在第 1 号染色体上, *CsCalS2* 在第 2 号染色体, *CsCalS3* 和 *CsCalS4* 在第 5 号染色体, *CsCalS5* ~ *CsCalS9* 位于第 7 号染色体, *CsCalS10* ~ *CsCalS12* 在染色体上的位置未知。除 *CsCalS10* 不含有内含子, 其他胼胝质合成酶基因都含有数十个甚至上百个内含子(表 2)。胼胝质合成酶基因的开放阅读框 (ORF) 的范围为 1 509 ~ 7 602 bp, 编码 502 ~ 2 533 aa (表 2)。柑橘胼胝质合成酶蛋白序列具有 FKS1 功能域和 10 多个跨膜区, 跨膜结构域位于蛋白质的 C - 末端和 N - 末端 (图 1)。

表 2 胼胝质合成酶基因的序列分析
Table 2 Sequence analysis of callose synthase genes

基因名称 Gene name	外显子数 Exon number	内含子数 Intron number	开放阅读框/bp Open reading frame	编码氨基酸数/aa Amino acid number	相对分子质量/kD Relative molecular weight	等电点 Isoelectric point
<i>CsCalS1</i>	36	35	5 037	1 618	186.53	9.15
<i>CsCalS2</i>	10	9	7 602	2 533	290.39	8.58
<i>CsCalS3</i>	51	50	5 703	1 900	218.19	8.87
<i>CsCalS4</i>	41	40	5 976	1 991	230.53	8.82
<i>CsCalS5</i>	42	41	5 859	1 952	224.84	9.16
<i>CsCalS6</i>	110	109	5 733	1 910	221.37	8.81
<i>CsCalS7</i>	17	16	1 509	502	581.38	9.67
<i>CsCalS8</i>	80	79	3 877	3 711	306.69	4.84
<i>CsCalS9</i>	105	104	5 715	1 904	221.13	8.42
<i>CsCalS10</i>	1	0	5 316	1 771	260.45	9.14
<i>CsCalS11</i>	42	41	5 841	1 946	225.33	9.20
<i>CsCalS12</i>	50	49	5 724	1 907	219.63	7.76

CsCalS 基因之间的序列相似性在 24%~98%之间, 其中 *CsCalS6*、*CsCalS8*、*CsCalS9* 同源性较高 (90%以上)。与拟南芥中 12 个胼胝质合成酶氨基酸序列相比较, 除 *AtCalS1* 外, 柑橘中都能找到同源性高度匹配的胼胝质合成酶 (图 2)。

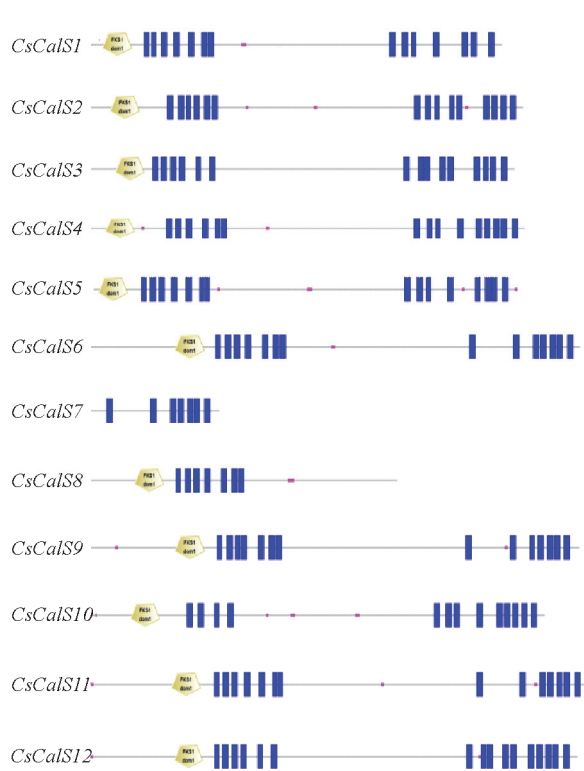


图 1 *CsCalS* 家族中功能域和跨膜区
蓝色部分代表跨膜区, 红色代表低复杂性区域,
FKS1-dom1 代表 FK506 sensitivity 1。
Fig. 1 Functional domains and transmembrane
regions in the *CsCalS* family
Blue represents transmembrane regions, red represents low
complexity regions, FKS1-dom1 represents FK506 sensitivity 1.

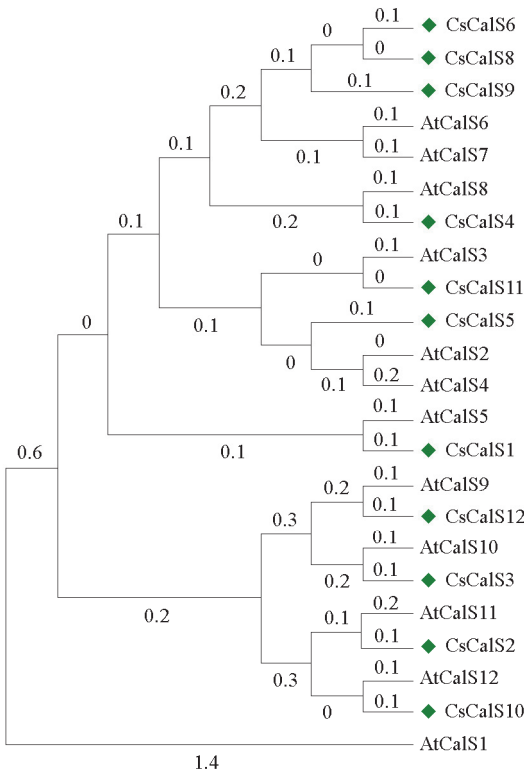


图 2 柑橘与拟南芥中 *CalS* 基因编码氨基酸
序列系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acid sequence of
CalS genes in citrus and *Arabidopsis thaliana*

2.2 *CsCalS* 受黄龙病菌影响的表达分析

黄龙病菌是一种韧皮部专性寄生的细菌。因叶脉富含韧皮部，在本次试验中分别提取‘砂糖橘’和‘强德勒柚’健康和感病叶片的叶脉的DNA进行黄龙病常规PCR检测，健康植株的叶片中未检测到黄龙病病原，而来自疫区植株的叶片扩增出明显的目的条带（图3）。

定量PCR分析胼胝质合成酶基因的表达，12个胼胝质合成酶基因在健康的‘砂糖橘’和‘强德勒柚’叶脉中的表达量存在差异。在健康‘砂糖橘’中*CsCalS5*和*CsCalS12*的表达量最高，在健康‘强德勒柚’中*CsCalS12*表达量最高（图4）。

黄龙病菌入侵柑橘后，在感病‘砂糖橘’中*CsCalS4*、*CsCalS5*、*CsCalS7*和*CsCalS8*表达上调，分别是健康对照的2.5倍、3.3倍、5.0倍和3.9倍；在感病‘强德勒柚’中*CsCals5*、*CsCalS7*和*CsCalS8*也分别上调表达3.3倍、5.1倍和5.0倍；其他胼胝质合成酶基因的表达量上调小于对照的2倍或未发现明显变化（图4）。

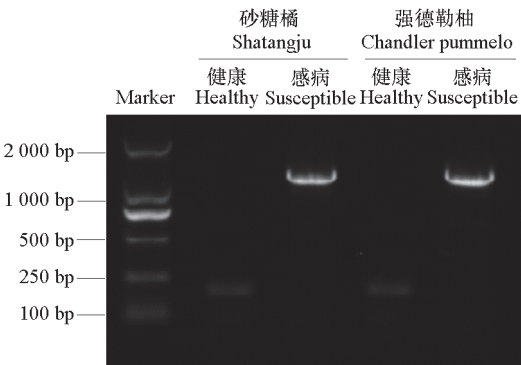


图3 砂糖橘和强德勒柚黄龙病菌检测电泳图
Fig. 3 Huanglongbing pathogen was detected in the leaves of Shatangju (*Citrus reticulata*) and Chandler pummelo (*C. grandis*)

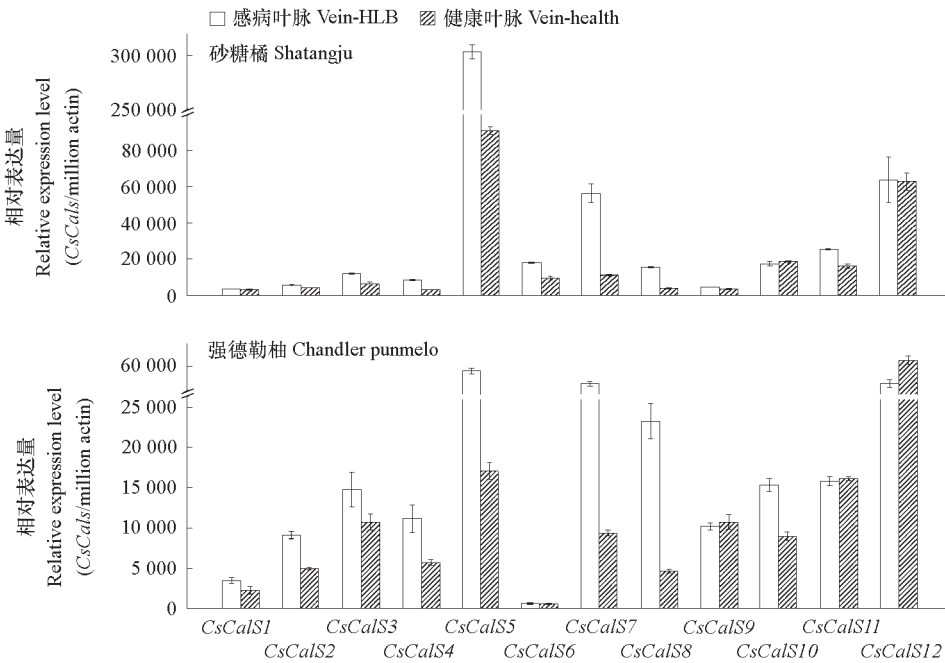


图4 胼胝质合成酶（Callose synthase）基因（*CalS*）在‘砂糖橘’和‘强德勒柚’健康和感病叶脉中相对表达量
Fig. 4 Relative expression of callose synthase gene (*CalS*) in healthy and diseased veins of *Citrus reticulata* and *C. grandis*

3 讨论

据文献报道, 拟南芥基因组中有 12 个 *CalS* 基因, 玉米中 12 个, 水稻中 10 个, 葡萄中 7 个 (Schneider et al., 2016; Song et al., 2016)。本研究中通过搜索柑橘基因组中注释的功能基因, 获得 12 个 *CsCalS*。这些 *CsCalS* 的编码氨基酸序列与拟南芥中的胼胝质合成酶具有较高的同源性, 具有 FKS1 功能域和多个跨膜区。在分子进化分析中, *CsCalS6*、*CsCalS8* 和 *CsCalS9* 聚在一起, 具有很高的同源性, 编码氨基酸序列一致性达 90% 以上。*CsCalS7* 序列较短, 仅编码 502 个氨基酸残基, 不具有 FKS1 功能域, *CsCalS8* 蛋白具有 FKS1 功能域和 N 端跨膜区, 但缺失 C 端的跨膜区。并且 *CsCalS7* 可与 GenBank 数据库中胼胝质合成酶基因 XM006484824 的 4 669 ~ 6 177 bp 比对上, *CsCalS8* 可与 XM006484824 的 840 ~ 4 554 bp 比对上, 而两者长度分别为 1 509 和 3 877 bp, 据此推测 *CsCalS7* 和 *CsCalS8* 为同一基因。

病原体攻击后, 胼胝质可以沉积在质膜和细胞壁之间或气孔周围 (McIntosh et al., 2005), 作为物理屏障阻止微生物进入宿主细胞或阻止其获得宿主细胞的营养, 从而抑制其生长 (Jacobs et al., 2003; Blümke & Voigt, 2014)。拟南芥胼胝质合成酶基因 *AtCalS1*、*AtCalS5*、*AtCalS9*、*AtCalS10*、*AtCalS12* 和葡萄胼胝质合成酶基因 *VvCalS1*、*VvCalS10* 在霜霉病 (downy mildew) 病菌侵染时显著上调表达 (Dong et al., 2008; Yu et al., 2016); 瞬时表达 *AtCalS12*, 可增强拟南芥对白粉病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) 的抗性 (Blümke et al., 2013)。另外, 在柠檬中沉默胼胝质合成酶基因 CX305437, 可以有效提高植物对柑橘黄单胞菌亚种 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) 的敏感性 (Enrique et al., 2011)。序列比对显示 CX305437 与甜橙的 *CsCalS5* 高度同源。黄龙病感染耐性品种马蜂柑 (*C. hystrix*) 后有 3 个胼胝质合成酶基因上调表达 (钟晰, 2018)。本试验中, *CsCalS5*、*CsCalS7* 和 *CsCalS8* 在感染黄龙病的砂糖橘和强德勒柚中均显著上调表达, 推测可能参与柑橘对黄龙病病原的应答反应。

References

- Achor D S, Etxeberria E, Wang N, Folimonova S Y, Chung K R, Albrigo L G. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal*, 9 (2): 56 – 64.
- Blümke A, Somerville S C, Voigt C A. 2013. Transient expression of the *Arabidopsis thaliana* callose synthase PMR4 increases penetration resistance to powdery mildew in barley. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4: 810 – 813.
- Blümke A, Voigt C A. 2014. Secreted fungal effector lipase releases free fatty acids to inhibit innate immunity-related callose formation during wheat head infection. *Plant Physiology*, 165 (1): 346 – 358.
- Bové J M. 2014. Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica*, 42 (5): 579 – 583.
- Brown I, Trethowan J, Kerry M, Mansfield J, Bolwell G P. 2010. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant Journal*, 15 (3): 333 – 343.
- Cui W, Lee J Y. 2016. *Arabidopsis* callose synthases *CalS1/8* regulate plasmodesmal permeability during stress. *Nature Plants*, 2 (5): 16034.
- Cheng Chunzhen, Zeng Jiwu, Zhong Yun, Yan Huaxue, Jiang Bo, Zhong Guangyan. 2013. Research progress on citrus Huanglongbing disease. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (9): 1656 – 1668. (in Chinese)
- 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.
- Dong X, Hong Z, Chatterjee J, Kim S. 2008. Expression of callose synthase genes and its connection with Npr1 signaling pathway during pathogen infection. *Planta*, 229 (1): 87 – 98.
- Donofrio N M, Delaney T P. 2001. Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised *Arabidopsis nim1-1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Mol Plant Microbe Interact*, 14 (4): 439 – 450.
- Ellinger D, Voigt C A. 2014. Callose biosynthesis in *Arabidopsis* with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade.

- Annals of Botany, 114: 1349 – 1358.
- Enrique R, Siciliano F, Favaro M A, Gerhardt N, Roeschlin R. 2011. Novel demonstration of RNAi in citrus reveals importance of citrus callose synthase in defence against *Xanthomonas citri* subsp *citri*. *Plant Biotechnology Journal*, 9 (3): 394.
- Gindro K, Pezet R, Viret O. 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology & Biochemistry*, 41 (9): 846 – 853.
- Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T. 2010. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 18 (3): 277 – 284.
- Hu Yan, Wang Xuefeng, Zhou Changyong. 2016. Recent advances in interactions among ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, insect vector and plant host. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (9): 1688 – 1698. (in Chinese)
- 胡燕, 王雪峰, 周常勇. 2016. 柑橘黄龙病菌亚洲种、虫媒及植物寄主互作研究进展. *园艺学报*, 43 (9): 1688 – 1698.
- Jacobs A K, Lipka V, Burton R A, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, Fincher G B. 2003. An *Arabidopsis* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. *Plant Cell*, 15: 2503 – 2513.
- Jagoueix S, Bové J M, Garnier M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 (3): 379 – 386.
- Koh E J, Zhou L, Williams D S, Park J, Ding N, Duan Y P, Kang B H. 2012. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Protoplasma*, 249: 687 – 697.
- Kulich I, Vojtková Z, Sabol P, Ortmannová J, Neděla V, Tihlaříková E. 2018. Exocyst subunit *EXO70H4* has a specific role in callose synthase secretion and silica accumulation. *Plant Physiology*, 176 (3): p.01693.2017.
- Mafra V, Martins P K, Francisco C S, Ribeiroalves M, Freitasastúa J. 2013. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *Bmc Genomics*, 14 (1): 247.
- Masaoka Y, Pustika A, Subandiyah S, Okada A, Hanundin E. 2014. Lower concentrations of microelements in leaves of citrus infected with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 45 (3): 269 – 275.
- McIntosh M, Stone B A, Stanisich V A. 2005. Curdlan and other bacterial (1→3)- β -D-glucans. *Applied Microbiology & biotechnology*, 68 (2): 163 – 173.
- Richmond T A, Somerville C R. 2000. The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiology*, 124 (2): 495 – 498.
- Schneider R, Hanak T, Persson S, Voigt C A. 2016. Cellulose and callose synthesis and organization infocus, what’s new? *Current Opinion in Plant Biology*, 34: 9 – 16.
- Song L, Wang R, Zhang L, Wang Y, Yao S. 2016. CRR1 encoding callose synthase functions in ovary expansion by affecting vascular cell patterning in rice. *Plant Journal*, 88 (4): 620.
- Tan Jin. 2013. Advances in genetic diversity of citrus yellow dragon disease. *Fruit trees in South China*, 42 (3): 27 – 28. (in Chinese)
- 谭锦. 2013. 柑桔黄龙病病原遗传多样性研究进展. *中国南方果树*, 42 (3): 27 – 28.
- Wu Liu, Bai Xiaojing, Wen Qingli, Xie Zhu, He Yongrui, Wang Lijuan, Chen Shanchun, Zou Xiuping. 2018. Early spread characteristics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Jincheng orange (*Citrus sinensis* Osbeck) by leafdisc grafting. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (11): 2121 – 2128. (in Chinese)
- 吴柳, 白晓晶, 文庆利, 谢竹, 何永睿, 王丽娟, 陈善春, 邹修平. 2018. 柑橘黄龙病病原菌 Las 在叶圆片嫁接接种的‘锦橙’中早期扩散研究. *园艺学报*, 45 (11): 2121 – 2128
- Xu Mei-rong. 2016. Correlation analysis between symptoms of citrus yellow dragon and PCR results of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Phytopathology*, 46 (3): 367 – 373. (in Chinese)
- 许美容. 2016. 柑橘黄龙病症状与“*Candidatus Liberibacter asiaticus*” PCR 检测结果的相关性分析. *植物病理学报*, 46 (3): 367 – 373.
- Yang Y, Ling X, Chen T, Cai L, Liu T. 2015. A cotton *Gbvd5* gene encoding a leucine-rich-repeat receptor-like protein confers resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic *Arabidopsis* and upland cotton. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33 (4): 987 – 1001.
- Yu Y, Jiao L, Fu S, Yin L, Zhang Y. 2016. Callose synthase family genes involved in the grapevine defense response to downy mildew disease. *Phytopathology*, 106 (1): 56 – 64.
- Zhai Y, Li P, Mei Y, Chen M, Chen X, Xu H, Zhou X, Dong H, Zhang C, Jiang W. 2017. Three *MYB* genes co-regulate the phloem-based defence against English grain aphid in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 68 (15): 4153 – 4169.
- Zhong Xi. 2018. Transcriptomic and proteomic analysis of *Citrus hystrix* responses to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in early and late stage of infection[M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 钟晰. 2018. 马蜂柑响应黄龙病菌侵染前期与后期的转录组和蛋白组学研究[硕士论文]. 重庆: 西南大学.