

文章编号: 1674-7054(2015)03-0261-08

野油菜黄单胞菌的 *XopR* 基因功能

张巧玲 戎 伟 李慧萍 林道哲 何朝族

(海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室 海口 570228)

摘 要: 野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 是一种能够引起十字花科植物产生黑腐病的重要病原菌。笔者以野油菜黄单胞菌 *Xcc*8004 菌株 *XopR* 基因为研究对象,通过 qRT-PCR 发现 *XopR* 基因的表达受Ⅲ型调控基因 *hrpG* 和 *hrpX* 的调控,并且 *XopR* 蛋白的分泌依赖于Ⅲ型分泌系统结构基因 *hrcV*,这表明 *XopR* 是 *Xcc*8004 的一个Ⅲ型分泌效应蛋白。利用同源重组的方法,笔者获得了 *XopR* 基因的缺失突变体 $\Delta XopR$ 。将野生型 *Xcc*8004 和 $\Delta XopR$ 突变体分别接种甘蓝品种中甘 15、中甘 21 和大白菜品种中白 83,发现 $\Delta XopR$ 突变体菌株致病性下降,表明 *XopR* 对于 *Xcc*8004 在甘蓝上的完整毒性是必须的。GFP 融合蛋白分析发现 *XopR* 定位于拟南芥原生质体的细胞膜上,可以在拟南芥原生质体中抑制细菌鞭毛蛋白诱导的 *FRK1* 基因表达。

关键词: *Xcc*8004; Ⅲ型分泌系统; *XopR*

中图分类号: S 432.42

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2015.03.007

自然界中,植物对大多数微生物表现出抗病性。植物的抗病性主要由 2 个层次的先天免疫反应完成,第 1 个层次的先天免疫反应是病原物相关分子模式或微生物相关因子(Pathogen-associated or Microbe-associated Molecular Patterns)激活的先天免疫(PAMP-or Pattern-Triggered Immunity, PTI),这类免疫反应主要包括植物细胞内各种离子的交换、活性氧的爆发、一氧化氮的生成、MAPK(Mitogen-activated protein kinase)和 CDPK(calcium-dependent protein kinase)的激活、蛋白的磷酸化以及大量与防卫反应相关基因(如 *FRK1*)的表达。第 2 个层次的免疫反应是一种更为强大的免疫反应,又称为超敏反应(Hypersensitive response),它是由植物的抗病基因(Resistance gene)识别病原菌的效应蛋白后所介导的免疫反应(Effector-Triggered Immunity, ETI),这类免疫反应通常伴随着侵染部位的细胞程序化死亡^[1-2]。野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, *Xcc*) 是一种能够引起包括甘蓝、萝卜、花椰菜以及模式植物拟南芥在内的所有十字花科植物产生黑腐病的重要病原菌。在温暖、湿润的气候中, *Xcc* 生长迅速,因此 *Xcc* 引起的黑腐病在热带、亚热带以及湿润的大陆地区非常严重^[3]。在 *Xcc* 与宿主植物的相互作用过程中, *Xcc* 可以通过Ⅲ型分泌系统(Type III Secretion System, TTSS)将效应蛋白分泌到宿主细胞内,抑制宿主的 PTI 和 ETI,从而完成 *Xcc* 在宿主植物体内的侵染和繁殖。目前, *Xcc* 菌株中 *Xcc*8004, *Xcc*33913 和 *Xcc*B100 基因组测序工作已完成,并且通过生物信息学预测发现 *Xcc* 中含有 27 个效应蛋白。在这些效应蛋白中,功能了解比较清楚的主要有 *AvrXccC*, *AvrAC*, *XopN* 和 *XopD* 等,其余效应蛋白的功能及在植物体内的靶标还有待进一步研究^[4-7]。

在黄单胞菌属中, *XopR* 是一个保守的蛋白,并预测是一个Ⅲ型分泌效应蛋白。在水稻白叶枯病菌 *Xoo*13951(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) 和 *Xoo*MAFF311018 中, *XopR* 被证明是 *Xoo* 的一个Ⅲ型分泌效应因子, *XopR* 基因的缺失导致 *Xoo* 在水稻上的致病能力下降^[8-9]。研究发现,在 *XopR*_{*Xoo*MAFF311018} 转基

收稿日期: 2015-01-30

基金项目: 海南大学青年基金资助项目(qnjj1204); 海南省自然科学基金资助项目(314043)

作者简介: 张巧玲(1989-),女,海南大学农学院 2012 级硕士研究生. E-mail: 123557859@qq.com

通信作者: 戎伟(1978-),男,讲师,研究方向: 植物与病原微生物相互作用. E-mail: rongwei13@126.com

因拟南芥植株中, $XopR_{Xcc8004}$ 能够抑制 MAMP 诱导的早期防卫基因(*At1g51890*, *At2g17740*, *FRK1* 和 *At5g57220*) 的表达以及细菌鞭毛蛋白 N 端 22 个氨基酸组成的多肽 flg22(flagellin 22) 诱导的胼胝体沉积^[10]。 *Xcc* 小种 8004 中含 *XopR* 基因, 但 *XopR* 基因是否作为 III 型分泌效应因子发挥功能尚不清楚。笔者以野油菜黄单胞菌 *Xcc8004* 菌株候选 III 型效应蛋白 *XopR* 为研究对象, 利用 qRT-PCR 检测了 *XopR* 基因的转录表达, Western Blot 检测了 *XopR* 蛋白的分泌, 证实了 *XopR* 蛋白是 *Xcc8004* 的一个 III 型分泌效应因子。通过同源重组方法获得 *Xcc8004* 的 *XopR* 基因缺失突变体, 并对 *XopR* 蛋白的毒性功能及植物亚细胞定位进行了分析, 表明 *XopR* 蛋白定位在植物细胞膜上及在甘蓝、大白菜中发挥毒性功能。进一步在拟南芥原生质体中瞬时表达 *XopR* 蛋白, 出现 2 条特异的条带, 这为进一步研究 *XopR* 蛋白的功能提供了很好的线索。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、植物材料、试剂 *Xcc8004* *hrpG* Tn5gusA5 转座子插入突变体 $\Delta hrpG$ *hrpX* Tn5gusA5 转座子插入突变体 $\Delta hrpX$ *hrpV* 基因敲除突变体 $\Delta hrpV$, 拟南芥 Col-0 生态型由海南省热带生物资源可持续利用重点实验室保存。甘蓝品种(京丰一号、中甘 15、中甘 16、中甘 21) 和大白菜(中白 83) 购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所。限制性内切酶购自 NEB 公司, T₄ DNA 连接酶、反转录试剂盒购自 Fermentas 公司, Taq DNA 聚合酶、荧光定量试剂购自 Takara 公司。实验中所用引物信息见表 1。

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequence of Primers(5'→3')	引物用途 Function
XopR-QF	CCA GAA CAT GCT TGC GT	qRT-PCR
XopR-QR	GTT GTC GAT TGC CTC TTG AT	qRT-PCR
gyrB-F	GCGACGATTTCCACTACG	qRT-PCR
gyrB-R	CCTTCTGCGGGATGTTATTG	qRT-PCR
268-FF	GCA CAT CCG CAC GCC GTA CT	<i>XopR</i> gene knockout
268-FR	GCA GGT GAT TCG CAG CAA GGG A	<i>XopR</i> gene knockout
268-RF	CGC CTG TCG CTC CTG CTC TC	<i>XopR</i> gene knockout
268-RR	CC AGC AAC AGC CCC AAC CAG	<i>XopR</i> gene knockout
268-F	ATG CGC CTG AGT CAG TTG TT	Amplification of <i>XopR</i>
268-R	GTAGTAGCCGTTGTCGATTGCC	Amplification of <i>XopR</i>

1.2 基因操作 质粒 DNA 用碱裂解法提取、限制性内切酶酶切、DNA 的连接转化、Western 杂交、细菌总 DNA 的快速提取、细菌总 RNA 提取等均按 Sambrook 方法^[11] 或参照产品说明书进行。

1.3 RNA 提取、反转录 PCR 及荧光定量 PCR *Xcc8004* *hrpG* 插入突变菌株 *hrpX* 插入突变菌株 *hrpG* 突变体互补菌株 *hrpGC* 于 *hrp* 诱导培养基 MMXC(10.5 g · L⁻¹ K₂HPO₄, 4.5 g · L⁻¹ KH₂PO₄, 10 mmol · L⁻¹ 葡萄糖, 10 mmol · L⁻¹ 果糖, 4 mmol · L⁻¹ 谷氨酸钠, 0.03% Casamino Acid) 中 28 °C 培养至 OD₆₀₀ = 0.5 后, 各菌株总 RNA 提取采用 TRIzol(Gibco BRL) 一步法提取, 用 DNaseI(Invitrogen) 处理以消除 RNA 样本中的 DNA 污染。反转录采用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas) 进行反转录, 具体操作规程参照试剂盒说明书进行, 得到的 cDNA 样本于 -20 °C 保存, 用于荧光定量 PCR。

采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) (Takara) 和 ABI 7 500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) 进行实时荧光定量 PCR。反转录后的 cDNA 样品经 10 倍稀释作为实时定量 PCR 工作液。反应体系参照产品说明书。

反应条件采用2步法,条件如下:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火延伸34 s,在延伸阶段检测荧光强度,收集信号40个循环。熔解曲线:加热样品从60℃到95℃,每隔0.5℃停留1 s,检测1次荧光强度变化。

1.4 *XopR* 分泌检测 利用PCR的方法将6×His tag融合到*XopR*的C端,使用*Kpn*I和*Eco*R I连接到pHM1载体上,并通过三亲结合方法将其导入野生型Xcc8004以及Δ*hrcV*(*hrcV*缺失突变体)中,获得Xcc8004-RC及*hrcV*-RC。各菌株中*XopR*蛋白诱导分泌方法参照王立峰方法^[4]进行。蛋白利用SDS-PAGE电泳分离,用Anti-His抗体和Anti-GroEL进行Western Blot检测。

1.5 基因缺失突变体构建 根据Xcc8004基因组序列设计引物268-FF、268-FR以及268-RF、268-RR(引物序列见表1),以Xcc8004基因组DNA为模板分别扩增*XopR*基因(XC_0268)上游554 bp片段以及下游611 bp片段,在两个片段上分别添加限制性酶切位点*Eco*RI、*Bam*HI以及*Bam*HI、*Hind*III。通过*Eco*RI、*Bam*HI以及*Bam*HI、*Hind*III将这两个片段连接到重组Knockout载体自杀质粒pK18mobSacB上,热激转化大肠杆菌DH5α,获得重组载体pK18R,测序正确后保存。通过三亲结合法获得敲除突变体参照文献[12],突变体利用268-FF和268-RR引物能够扩增出1 165 bp大小片段,但野生型Xcc8004无法扩增得到相对应片段大小。

1.6 互补菌株的构建 PCR扩增*XopR*全长序列(1 236 bp),通过*Kpn*I和*Eco*RI连接到互补载体pHM1上。将其热激转化大肠杆菌DH5α后,通过三亲结合的方法导入突变体当中,获得突变体互补菌株。

1.7 致病性检测及细菌生长 采用剪叶法^[12]进行致病性检测。供试植物为甘蓝京丰一号、中甘15、中甘16、中甘21以及大白菜中白83。将菌液浓度调整至 $OD_{600}=0.1$ 。用灭菌剪刀蘸取菌液剪掉四周大完全展开叶片尖端,加盖保湿24 h。1周左右可出现明显病症,10 d拍照记录。细菌生长实验,在接种后2 h,取伤口处组织(0.5 cm×2 cm),研磨稀释相应倍数后涂于NYG平板上,2 h后统计平板菌落数目作为0 d样品,5 d后再次取样统计生长差异。

1.8 拟南芥原生质体制备与转化 拟南芥原生质体提取方法参照文献[13]。取4~5周大拟南芥叶片快速切成细丝于酶解液中酶解完全。室温,100 g离心2 min,用W5溶液洗涤后,冰上放置30 min。离心弃上清加入MMg溶液重悬。吸取适量原生质体加入质粒以及等体积PEG溶液室温转化8 min。加入4倍体积的W5溶液终止反应,离心弃上清,W5洗原生质体2次后于W5溶液中弱光下过夜。

1.9 荧光素酶双报告系统分析^[13] 提取拟南芥原生质体,将携带有*XopR*基因的*XopR*-FLAG质粒10 μg,FRK1::LUC质粒5 μg,35S::RLUC质粒100 ng一起转化进入拟南芥原生质体中,弱光培养过夜。加入 1×10^{-6} mol·L⁻¹的flg22室温诱导3 h。收集原生质体,加入passive Lysis Buffer提取蛋白。按照Daul-Luciferase Reporter Assay System(Promega)使用手册进行LUC活性测定。

1.10 GFP细胞定位 将构建好的pUC-R-GFP质粒转化拟南芥原生质体,室温弱光过夜培养。吸取适量原生质体到单凹载玻片上,在激光共聚焦显微镜(Leica TCS sp8)上,用488 nm发射波长525 nm激发波长观察绿色荧光在植物细胞内的分布情况。

2 结果与分析

2.1 *XopR* 基因转录受HrpG和HrpX的调控 在黄单胞菌中,Ⅲ型分泌效应因子的转录受HrpG和HrpX的调控。HrpX可以结合Ⅲ型效应因子启动子区域的PIP box(plant-inducible-promoter box)和-10 box来启动基因的转录^[14]。在*XopR*基因的启动子区域也发现了完美的PIP box和-10 box(TTCGCGccg-gcgcgacgccggTTCGC-N30-TACTAT),这就说明*XopR*很有可能受到HrpX的调控。为了检测*XopR*转录是否受到HrpG和HrpX的调控,笔者以*gyrB*为内参基因进行了荧光定量PCR检测*XopR*基因在野生型、*hrpG*突变体/互补、*hrpX*突变体的基因表达情况。结果表明,*XopR*在*hrpG*和*hrpX*的突变体中,它的转录表达会比在野生型中显著的下降,当*hrpG*突变得互补时,其转录表达又会恢复到正常的水平(图1)。这说明*XopR*的转录是受HrpG和HrpX调控的。

2.2 *XopR* 蛋白分泌依赖于Xcc8004 Ⅲ型分泌系统 为了分析*XopR*蛋白是否通过Ⅲ型分泌系统分泌,

将 6 × His tag 融合到 *XopR* 的 C 端, 连接到 pHM1 载体上, 并通过三亲结合方法将其导入野生型 *Xcc8004* 以及 III 型分泌系统结构基因 *hrcV* 缺失突变体 $\Delta hrcV$ 中, 获得 *Xcc8004*-RC 及 *hrcV*-RC。菌株首先于丰富培养基 NYG 中培养后转接于 *hrp* 分泌诱导培养基 SMMXC 中培养, 利用 Anti-his 抗体免疫印迹检测细胞裂解液中全蛋白以及细胞培养液中分泌蛋白的表达情况。结果显示在全蛋白中均能发现 *XopR* 的表达, 对于胞外分泌, 笔者在 *Xcc8004*-RC 中能够检测到 *XopR* 的正常分泌, 但是在 *hrcV* 突变体中不能够检测到。这意味着 *XopR* 蛋白是通过 *Xcc8004* III 型分泌系统分泌的(图 2)。

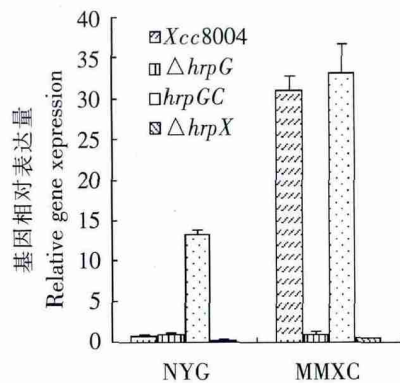


图 1 *XopR* 转录受 III 型调控因子 *hrpG* 和 *hrpX* 调控
荧光定量 PCR 分析 *XopR* 基因在诱导培养基及丰富培养基中 *Xcc8004*, $\Delta hrpG$ (*hrpG* 突变体), *hrpGC* (*hrpG* 突变体互补菌株) 以及 $\Delta hrpX$ (*hrpX* 突变体) 菌株中的转录情况
Fig.1 Transcription of *XopR* is regulated by *hrpG* and *hrpX*
Real time PCR analysis of *XopR* transcription in *Xcc8004*, $\Delta hrpG$ (*hrpG* mutant), *hrpGC* (*hrpG* mutant complementary strain), and $\Delta hrpX$ (*hrpX* mutant) strains in *hrp*-inducing medium MMXC and rich medium NYG

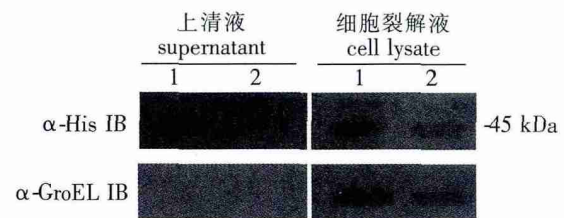


图 2 *XopR* 蛋白的分泌依赖于 *Xcc8004* III 型分泌系统

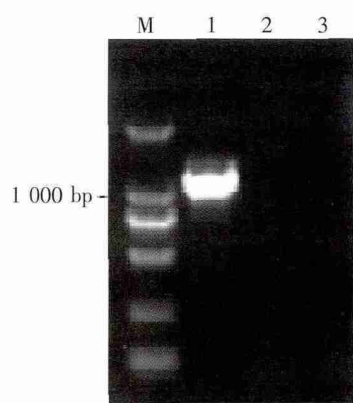
1: *Xcc8004*-RC; 2: *hrcV*-RC; anti-GroEL 抗体用于检测在蛋白提取过程中细菌细胞有无渗漏

Fig.2 The secretion of *XopR* is type III secretion system dependent

1: *Xcc8004*-RC; 2: *hrcV*-RC; anti-GroEL antibody to show that bacterial lysis had not occurred

2.3 *XopR* 基因缺失突变体以及互补菌株的构建 为了获得 *XopR* 基因缺失突变体, 笔者将 *XopR* 基因上游 554 bp 以及下游 611 bp 片段分别引入酶切位点 *EcoRI*, *BamHI* 及 *BamHI* 和 *HindIII* 进行扩增, 通过 *EcoRI*, *BamHI* 和 *HindIII* 将这两个片段连接到重组 Knockout 载体 pK18mobSacB 上, 获得重组载体 pK18R。然后将 pK18R 载体通过三亲结合的方法导入 *Xcc8004* 中, 利用 pK18R 与 *Xcc8004* 中的同源序列进行基因重组, 在同源重组中由于同源双交换获得 *XopR* 基因缺失突变体。利用 268-FF 和 268-RR 引物进行 PCR 验证, 阳性克隆应为 1 165 bp(图 3)。回收 PCR 产物片段送样测序, 验证正确。确认得到突变体 $\Delta XopR$ 。

2.4 *XopR* 对于 *Xcc8004* 在甘蓝和中白 83 上的完整毒性是必须的 研究报道 *Xoo* 中的 *XopR* 基因在寄主植物上发挥毒性功能^[8-9], 为了确定该效应蛋白对于 *Xcc8004* 在寄主植物的致病性是否产生影响, 笔者将野生型 *Xcc8004* $\Delta XopR$ 菌株和互补菌株 *XopRC* 分别在甘蓝品种京丰一号、中甘 15、中甘 16 以及中甘 21 这 4 个品种上进行剪接接种实验, 同时也在大白菜品种中白 83 中进行实验。结果显示, 接种 10 d 后, 中甘 15 和中甘 21 接种野生型 *Xcc8004* 能够导致甘蓝的严重致病, 出现典型的 V 字型病斑, 而接种 *XopR* 基因缺失突变体 $\Delta XopR$ 致病性显著下降, 互补后致病性能力得到恢复。然而在京丰一号以及中甘 16 的接种实验中, 接种突变体 $\Delta XopR$ 致病性能力下降并不明显(图 4)。说明 *XopR* 对 *Xcc8004* 在甘蓝上毒性是必须的, 但同时也表明该毒性贡献是有品种选择性的。在中白 83 致病性实验中, 接种了 $\Delta XopR$ 后其致病性显著下降, 接种 *XopRC* 后该致病性得到恢复, 说明 *XopR* 对 *Xcc8004* 在中白 83 上毒性是必须。细菌生长实验也得到相同结果(图 5)。

图3 *XopR* 基因缺失突变体 PCR 鉴定

1: *XopR* 基因缺失突变体; 2: *Xcc8004*;
3: H_2O ; M: DL2 000 DNA marker

Fig.3 PCR verification of *XopR* gene deletion mutant

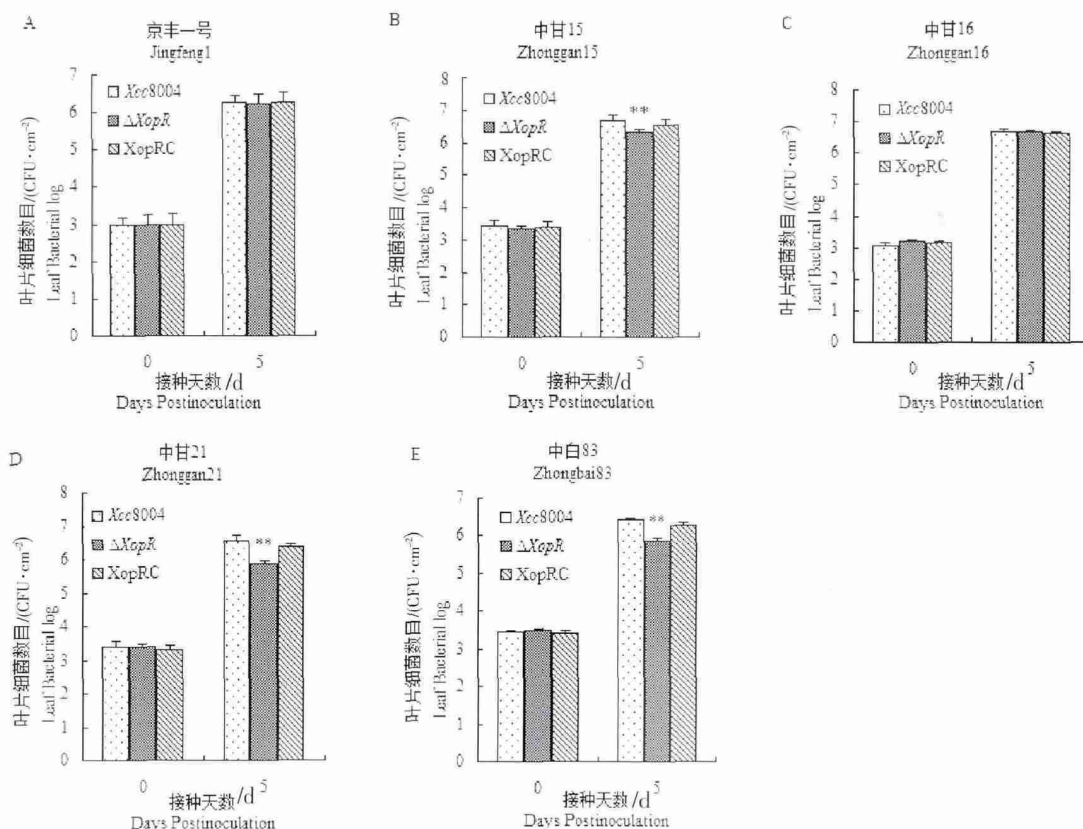
1: *XopR* gene deletion mutant; 2: *Xcc8004*;
3: H_2O ; M: DL2 000 DNA marker

图4 $\Delta XopR$ 在甘蓝和大白菜上的致病性检测

利用剪刀剪切接种方法,分别在甘蓝京丰一号、中甘 15、中甘 16、中甘 21 及大白菜中白 83 上接种,野生型 *Xcc8004*, $\Delta XopR$ 菌株和互补菌株 *XopRC*,接种 10 d 后,拍照观察发病情况

Fig.4 Pathogenicity analysis of $\Delta XopR$ on cabbage and Chinese cabbage cultivars

WT *Xcc8004*, $\Delta XopR$ and *XopRC* strains were inoculated respectively on Cabbage of Jingfeng1, zhonggan15, zhonggan16, Zhonggan21 and Zhongbai83. The photographs were taken on 10 days postinoculation

图5 接种 *Xcc* 植物叶片的细菌生长

在京丰一号(A)、中甘 15(B)、中甘 16(C)、中甘 21(D)、中白 83(E)接种 $\Delta XopR$ 、*Xcc8004*、*XopRC*, 5 天后取样检测细菌数目 (mean + s. d.; $n > 6$; * * $P < 0.01$, Students t-TEST)

Fig. 5 Growth of bacteria in inoculated leaves of *Xcc*

Xcc8004, $\Delta XopR$, *XopRC* were inoculated on Jingfeng1 (A), Zhonggan15 (B), Zhonggan16 (C), Zhonggan21 (D) and Zhongbai83 (E). Bacterial CFU was counted after 5 days incubation. (mean + s. d.; $n > 6$; * * $P < 0.01$, Students t-TEST)

2.5 效应蛋白 XopR 在拟南芥原生质体中抑制 flg22 诱导的 *FRK1* 基因表达 为了进一步研究 XopR 在 Xcc8004 侵染植物过程中的功能,笔者对 XopR 是否抑制 PTI 通路进行了分析。拟南芥 PTI 通路的标志基因 *FRK1* (Flagellin receptor kinase1) 能够被 flg22 激活表达^[15]。利用 *FRK1* 启动子驱动的 *FRK1::LUC* 荧光素酶报告系统可以检测 XopR 是否影响 PTI 下游的信号通路。为了检测 XopR 是否对鞭毛蛋白诱导的 *FRK1* 基因的表达有抑制作用,笔者将 *FRK1::LUC* 和 XopR-FLAG 共转化拟南芥原生质体,表达过夜后,分别用 H₂O 和 flg22 进行处理。利用双荧光素酶报告系统检测 LUC 活性来分析 *FRK1* 基因的表达变化。结果表明,flg22 可以有效诱导拟南芥原生质体 *FRK1::LUC* 的表达,但是将 35S 启动子驱动的 XopR-FLAG 质粒转入细胞中后抑制了 *FRK1::LUC* 的表达,说明 XopR 的组成型表达可以抑制 PTI 下游基因表达(图 6)。

2.6 XopR 定位在植物细胞膜上 为了验证 XopR 在植物细胞中的亚细胞定位,笔者构建了绿色荧光蛋白(GFP)表达载体:pUC-GFP(表达 GFP 蛋白),pUC-R-GFP(表达 XopR-GFP 融合蛋白)。将载体 pUC-GFP 和 pUC-R-GFP 分别转化拟南芥原生质体细胞,过夜表达后通过激光共聚焦显微镜观察融合蛋白的定位。从图 7 中可以看出,转化有 XopR 的处理中,绿色荧光特异性的分布于拟南芥细胞膜上,而对照组中整个拟南芥的细胞都充满了绿色荧光,说明 XopR 定位于拟南芥细胞膜。

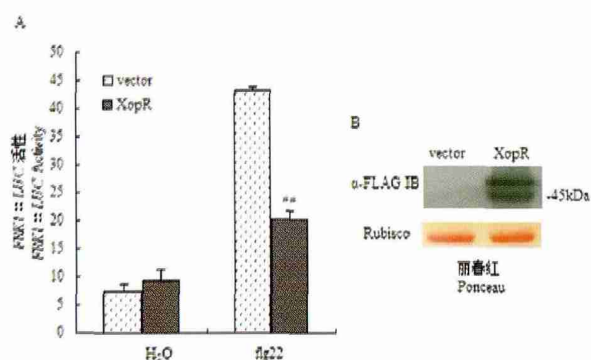


图 6 拟南芥原生质体中瞬时表达 XopR 蛋白抑制 flg22 诱导的 *FRK1::LUC* 报告基因的表达

A:在拟南芥原生质体中分别转入空的表达载体和 XopR-FLAG,用 flg22 和 H₂O 诱导处理 3 h 后荧光素酶双报告系统观察 *FRK1::LUC* 基因的表达

B:用 FLAG 抗体 Western 检测样品中 XopR-FLAG 蛋白的表达情况,丽春红染色显示样品的上样量

Fig.6 Transient expression of XopR in protoplasts inhibits flg22-induced *FRK1::LUC* transcription

A:The expression of PTI marker gene *FRK1* was measured by dual luciferase reporter system in *Arabidopsis* protoplasts with empty vector or XopR-FLAG, induced by H₂O and flg22 respectively for 3 hours. *FRK1::LUC* activity was determined

B:The expression of XopR was detected by anti-FLAG immunoblot. Ponceau staining of Rubisco protein is shown for equal loading

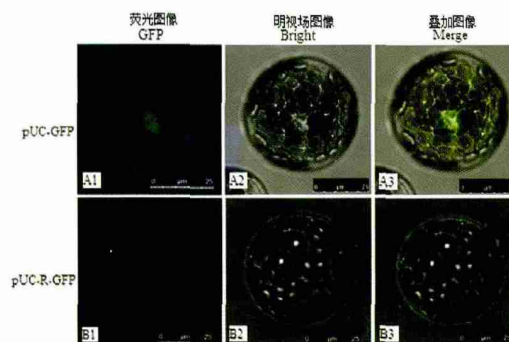


图 7 拟南芥原生质体中 XopR 的亚细胞定位

将自由表达 GFP 的 pUC-GFP(A1-A3)质粒和融合表达 XopR-GFP 的 pUC-R-GFP(B1-B3)转化拟南芥原生质体,通过激光共聚焦显微镜观察荧光的分布情况。左边图像是荧光图像,中间图像是明视场图像,右边图像是明场和荧光图像的叠加

Fig.7 Subcellular localization of XopR in *Arabidopsis* protoplasts

pUC-GFP(expressing free GFP, A1-A3)and pUC-R-GFP (expressing XopR-GFP fusion protein, B1-B3) were transformed into *Arabidopsis* protoplasts and the fluorescence images were taken under a confocal laser microscopy in dark field for green fluorescence (left panel), in white field for the cell (middle panel), and merged view of left and middle panels (right panel), respectively

3 讨论

本研究通过荧光定量 PCR 分析野油菜黄单胞菌 XopR 基因在基础培养基及诱导培养基中的表达情况,发现 XopR 的转录受 Xcc8004 III 型调控蛋白 HrpG、HrpX 正向调控,并且 XopR 的分泌依赖于 III 型分泌系统结构基因 *hrcV*。结果表明, XopR 是作为 Xcc8004 III 型分泌效应蛋白来发挥功能的。笔者进一步利用 Knockout 载体 pK18mobSacB 进行同源重组获得野油菜黄单胞菌 Xcc8004 XopR 基因缺失突变体,通过致病性分析,表明在甘蓝品种中甘 15 和中甘 21 上 Δ XopR 致病性显著下降,互补后致病性能力得到恢复,但在京丰一号以及中甘 16 上接种 Δ XopR 与野生型相比无明显差异,这说明 XopR 对 Xcc8004 在甘蓝上毒性是必须的,但同时也表明该毒性贡献是有品种选择性的,推测有可能在京丰一号以及中甘 16 上没有

XopR 基因的毒性靶标。同时 $\Delta XopR$ 接种中白 83 致病性显著下降,接种 *XopRC* 后该致病性得到恢复,说明 *XopR* 对 *Xcc8004* 在中白 83 上毒性也是必须的。

通过定位分析发现 *XopR* 定位于植物细胞膜上,并且可以抑制 flg22 诱导的 *FRK1* 基因表达,表明 *XopR* 可以抑制 PTI 信号通路的下游基因表达,这与 *Xoo* 中 *XopR* 的功能一致。然而 *XopR* 是否抑制 PTI 通路上游的信号转导、MAPK 激酶活性以及活性氧爆发等尚还需进一步研究。*XopR* 定位在植物细胞膜上,很可能是通过与 PTI 通路上游的元件发生相互作用来发挥其功能的。研究发现一个现象 *XopR* 蛋白的表达在 *Xcc* 中表现出 1 条 45 kD 左右的带,而在植物细胞内表现出 2 条带,这一现象与 *Xcc8004* 的效应蛋白 *AvrAC* 非常相似。*AvrAC* 在植物细胞内可以发生 UMP 修饰^[16],也表现出 2 条带,因此推测 *XopR* 效应蛋白在植物体内很有可能是被修饰了,然而,这种修饰是什么修饰,以及该修饰是否对 *XopR* 在植物体内的功能是必须的尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈英,谭碧玥,黄敏仁. 植物天然免疫系统研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2012,36(1):129-36.
- [2] JONES J D, DANGL J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117):323-329.
- [3] WILLIAMS PH. Black rot: a continuing threat to world crucifers[J]. Plant Disease, 1980, 64(8):736-42.
- [4] WANG L, TANG X, HE C. The bifunctional effector *AvrXccC* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires plasma membrane-anchoring for host recognition[J]. Molecular plant pathology, 2007, 8(4):491-501.
- [5] JIANG B L, HE Y Q, CEN W J et al. The type III secretion effector *XopXccN* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for full virulence[J]. Research in microbiology, 2008, 159(3):216-20.
- [6] XU R Q, BLANVILLAIN S, FENG J X et al. *AvrAC* (*Xcc8004*), a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0[J]. Journal of bacteriology, 2008, 190(1):343-55.
- [7] TAN L, RONG W, LUO H et al. The *Xanthomonas campestris* effector protein *XopD_{Xcc8004}* triggers plant disease tolerance by targeting DELLA proteins[J]. The New phytologist, 2014, 204(3):595-608.
- [8] ZHAO S, MO WL, WU F et al. Identification of non-TAL effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Chinese strain 13751 and analysis of their role in the bacterial virulence[J]. World journal of microbiology & biotechnology, 2013, 29(4):733-44.
- [9] FURUTANI A, TAKAOKA M, SANADA H et al. Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. Molecular plant-microbe interactions: MPMI, 2009, 22(1):96-106.
- [10] AKIMOTO-TOMIYAMA C, FURUTANI A, TSUGE S et al. *XopR*, a type III effector secreted by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, suppresses microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular plant-microbe interactions: MPMI, 2012, 25(4):505-14.
- [11] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- [12] 李伟兰,戎伟,何朝族. 一个推测的野油菜黄单胞菌Ⅲ型分泌效应子基因 *XopXccP* 对寄主植物的致病性分析[J]. 植物病理学报, 2014(2):173-9.
- [13] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. Nature protocols, 2007, 2(7):1565-72.
- [14] WENGELNIK K, VAN DEN ACKERVEKEN G, BONAS U. HrpG, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators[J]. Molecular plant-microbe interactions: MPMI, 1996, 9(8):704-12.
- [15] DANGL JL, JONES JD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection[J]. Nature, 2001, 411(6839):826-33.
- [16] FENG F, YANG F, RONG W et al. A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases [J]. Nature, 2012, 485(7396):114-8.

The Functional Study of a Type III Effector Protein *XopR* in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

ZHANG Qiaoling , RONG Wei , LI Huiping , LIN Daozhe , HE Chaozu

(Hainan Key Laboratory of Sustainable Utilization of Tropical bioresources , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*(*Xcc*) is the causal agent of black rot disease on cruciferous plants. *Xcc* deliver many effector proteins into host plant cells via the type III secretion system to help its infection and multiplication. In this study , the expression and regulation of *XopR* gene were analyzed through qRT-PCR. The results showed that the *XopR* gene transcription was regulated by the type III regulator of HrpG and HrpX , and the *XopR* protein secretion was type III secretion system dependent , indicating that *XopR* was a type III effector protein of *Xcc*8004. In addition , a *XopR* gene deletion mutant (*Xcc*8004 Δ *XopR*) was generated , and the disease symptoms caused by Δ *XopR* strain were decreased on Zhonggan15 , Zhonggan21 , Zhongbai83 in contrast with WT *Xcc*8004 , suggesting that *XopR* was required for the full virulence of *Xcc*8004 on Cabbage host plants. Furthermore , *XopR* was proved to located in plant plasma membrane in Arabidopsis protoplasts cells by *XopR*-GFP fusion assay. The expression of PTI marker gene *FRK1 :: LUC* was inhibited by *XopR* protein , which was consistent with the *XopR* function in *Xoo* strains.

Key words: *Xcc*8004; type III secretion system; *XopR* gene

(上接第 249 页)

Chromosomal Localization and FISH Analysis of 45S rDNA on *Hevea* Clone Reyan 7-33-97

TANG Bingxia^{1,2} , WANG Ying¹ , GAO Heqiong¹ , ZHUANG Nansheng¹

(1. College of Agronomy , Hainan University / Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresource , Haikou 570228 , China;

2. Rubber Research Institute , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , Danzhou 571737 , China)

Abstract: The position and number of 45S rDNA on mitotic chromosomes of the young leaf collected from the rubber tree of Clone Reyan7-33-97 (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) at the bronze leaf stage were detected by using fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis with 45S rDNA from wheat as a probe. Four hybridization signals with different sizes and strength were found in different mitotic phases. According to the karyotype analysis , the loci of 4 signals were found on chromosomes pairs 6 and 7. A small faint signal was detected at the secondary constriction of one member of chromosome pair 6 , and a large strong signal was detected at the secondary constriction and satellite of another member of chromosome pair 6. The other two signals with their sizes and strength between those of the members of chromosome pair 6 were all detected at the secondary constriction and satellite of chromosome pair 7.

Key words: *Hevea brasiliensis*; Reyan7-33-97; fluorescence in situ hybridization; 45S rDNA