

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240058



主持人: 缪卫国, 吴少英

Ⅲ型效应蛋白 XopG 调控水稻白叶枯病菌的致病力 及其在植物细胞中的定位分析

余 曦[#], 李春霞^{*}, 陶 均^{*}

(海南大学 热带农林学院, 海南海口 570228 中国)

摘 要: 稻属黄单胞菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)是引起水稻白叶枯病的病原菌。Ⅲ型效应蛋白(Type Ⅲ Secretion Effectors, T3SEs)在 *Xoo* 致病过程中发挥重要作用。本研究以 *Xoo* T7174 中预测的Ⅲ型效应蛋白 XopG 为研究对象, 通过生物信息学分析、基因敲除和表达调控分析、致病力分析及蛋白亚细胞定位分析, 初步明确 XopG 对 *Xoo* 致病力的影响及 XopG 在植物细胞中的定位。结果显示, *xopG* 启动子序列含有非典型的植物诱导启动子盒 PIP-box, 预测 *xopG* 表达受 HrpX 调控; 启动子活力测定结果显示 *xopG* 在 *hrpX* 突变体中的表达水平显著低于野生型菌株 T7174, 表明 HrpX 正调控 *xopG* 的表达; 缺失 *xopG* 会显著降低 T7174 对水稻的致病力, 表明 XopG 是 *Xoo* 侵染水稻所必需的细胞组分; 亚细胞定位显示, XopG 定位于植物的细胞核、细胞膜和细胞质中。本研究为探讨 XopG 调控水稻白叶枯病菌致病力的分子机制奠定了基础。

关键词: *Xoo*; Ⅲ型效应因子; XopG; 致病性

中图分类号: S432.4

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)04-0543-10

余曦, 李春霞, 陶均. Ⅲ型效应蛋白 XopG 调控水稻白叶枯病菌的致病力及其在植物细胞中的定位分析[J]. 热带生物学报, 2025, 16(4): 543-552. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240058

水稻(*Oryza sativa* L.)作为全球重要的粮食作物之一, 具有种植历史悠久、栽培范围广的特点^[1]。水稻栽培过程中受非生物胁迫和生物胁迫等许多因素的干扰, 其中病害是导致水稻严重减产的重要因素之一^[2-3]。由稻属黄单胞菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)引起的水稻白叶枯病是中国水稻生产中的三大病害之一^[4-5]。水稻白叶枯病侵染范围极为广泛, 会造成高达20%至30%的大量减产, 严重时减产可能达到50%, 甚至颗粒无收^[6-8]。

分泌系统对于黄单胞菌侵染植物至关重要, 众多效应蛋白和致病因子通过分泌系统传送至宿主体内, 达到侵染的目的。目前已发现的分泌系统共有9类, 包括Ⅰ型至Ⅸ型, 其中Ⅲ型分泌系统

(Type Ⅲ Secretion System, T3SS)的相关研究最为深入^[9]。HrpX 和 HrpG 是 T3SS 表达的关键因子, HrpG 激活 HrpX 的表达, 然后 HrpX 结合到 PIP-box 位点, 进而调控效应蛋白基因的转录。T3SEs 由 T3SS 分泌到宿主植物中, 影响细胞信息传递和调控网络, 改变宿主细胞的生理生化过程^[10-12]。例如, XopD 在植物体内展现出类泛素化修饰蛋白蛋白酶活性抑制宿主转录, 参与调控蛋白质的稳定性^[13]; XopL 具有 E3 泛素连接酶活性, 可以通过抑制植物细胞死亡及防卫基因表达从而抑制 PTI (PRR-Triggered Immunity)过程^[14-15]; 在本氏烟草中 XopQ 的表达会引发依赖于识别 XopQ1 (ROQ1 抗原体)的效应子触发 ETI (Effector-Triggered Immunity)免疫反应, 并伴随质体在细胞核周围的

收稿日期: 2024-04-09

修回日期: 2024-05-21

基金项目: 国家自然科学基金(31960567)

[#]第一作者: 余曦(1998—), 男, 海南大学热带农林学院 2021 级硕士研究生。E-mail: 714304645@qq.com

^{*}通信作者: 李春霞(1980—), 女, 教授。研究方向: 植物与病原互作机制。E-mail: chun_xia_li@126.com;

陶均(1976—), 男, 教授。研究方向: 植物与病原微生物互作。E-mail: taoj@hainanu.edu.cn

积累以及叶绿体嵴突的形成^[16-18]。因此,解析 T3SEs 的功能及其调控途径对于研究病原菌与植物相互作用至关重要。

xopG 基因全长 468 bp, 编码 155 个氨基酸。XopG 可抑制 XopQ-XopX 诱导的水稻免疫应答, Deb 等研究表明 XopG 与 XopQ、XopX 均存在相互作用^[19-20]。但到目前为止, XopG 在水稻中的互作靶标蛋白仍然不清楚。

本研究对 XopG 进行了生物信息学分析, 同时通过启动子活力测定对该基因的表达进行评估,

对水稻应用剪叶法进行接种实验分析 *xopG* 突变体的致病力。实验结果初步说明 *xopG* 表达受 HrpX 正调控, 且缺失 *xopG* 后 *Xoo* 致病力显著降低, 为解析 XopG 与水稻互作机制提供了重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物、菌株和质粒 供试水稻 TP309、本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)由本实验室保存, 本实验所用的菌株和质粒如表 1 所示。

表 1 实验所用菌株与质粒
Tab. 1 Experimental strains and plasmids

菌株/质粒 Strain/plasmid	相关特征 Relevant characteristics	来源 Source
DH5α	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	上海唯地生物 Shanghai Weidi Biotechnology
	F- <i>φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)u169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+)phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	
GV3101	农杆菌 <i>Agrobacterium</i>	上海唯地生物 Shanghai Weidi Biotechnology
	C58(rif ^R)TipMP90(pTiC58DT-DNA) (gentR)Nopaline	
T7174	黄单胞菌 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	本实验室 This Study
	<i>Xoo</i> strain	
Δ <i>xopG</i>	Full length deletion mutant of <i>xopG</i>	本实验室 This Study
C-Δ <i>xopG</i>	The complementation strain of Δ <i>xopG</i>	本实验室 This Study
Δ <i>hrpX</i>	Full length deletion mutant of <i>hrpX</i> (<i>PXO_01953</i>)	本实验室 This Study
质粒 Plasmids		
pK18 <i>mobsacB</i>	Suicide plasmid in <i>Xanthomonas</i> , Kan ^R	Schäfe et al., 1994 ^[21]
pK18- <i>xopG</i>	pK18 <i>mobsacB</i> based plasmid for <i>xopG</i> deletion	本实验室 This Study
pHM1	broad-host range vector, Sp ^R	Huynh et al., 1989 ^[22]
pHM1- <i>xopG</i>	Complementary vector containing full length <i>xopG</i> gene, Sp ^R	本实验室 This Study
pRTV _C GFP	Transient over-expression, Ubi promoter, N terminal EGFP Tag, Kan ^R	He et al., 2018 ^[23]
pRTV _C - <i>xopG</i> -GFP	Subcellular localization in rice	本实验室 This Study
pCambia-1300-eGFP	Stable over-expression, Hygromycin, 35S promoter, C terminal GFP tag, Kan ^R	本实验室 This Study
pCambia-1300- <i>xopG</i> -eGFP	Subcellular localization in tobacco	本实验室 This Study

注: Kan^R、rif^R和Sp^R分别表示对卡那霉素、利福平和壮观霉素的抗性。

Note: Kan^R, rif^R, and Sp^R respectively represent resistance to kanamycin, rifampicin, and spectinomycin.

1.2 实验所用引物 从 KEGG 数据库下载 *xopG* 基因 CDs 序列, 使用 Primer 5.0 分别设计引物。本实验引物见表 2。

1.3 生物信息学分析 根据 KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) 网站查询到的 XopG 的基因序列, 采用 SMART 在线网站 (<https://smart.embl.de/>)

表 2 实验所用引物

Tab. 2 Primers used in the experiment

引物 Primer	核苷酸序列 Nucleotide sequences(5'-3')	用途 Usage
<i>xopG</i> ddFF	GCTCAAGCTTCTGCACGGCAAGGAAGACAG	
<i>xopG</i> ddFR	ACAAGGATCCCTATCTCTGCTATGGTCACT	<i>xopG</i> 敲除
<i>xopG</i> ddRF	ACAAGGATCCCAAGGTGAGGCTGCATATCGA	<i>xopG</i> deletion
<i>xopG</i> ddRR	GCTCGAATTCTGGGTCAACGTGGTGTGTC	
<i>xopG</i> hmF	GACCAAGCTTGGTGACCATAGCAGAGATAGGC	<i>xopG</i> 回补
<i>xopG</i> hmR	GACCGGTACCACTGCCGTGAGGCTTATATTT	<i>xopG</i> complement
<i>hrpX</i> ddFF	CAGCAAGCTTTCACGCTTGCGAACGCTTCT	
<i>hrpX</i> ddFR	CAGCGGATCCCTCACTCTGTTCTCAAACG	<i>hrpX</i> 敲除
<i>hrpX</i> ddRF	CAGCGGATCCACCTTGCAACGGTAATCTCT	<i>hrpX</i> deletion
<i>hrpX</i> ddRR	CAGCGAATTCGATTTCTGCTGGGTGTCAGTC	
pCambia-1300- <i>xopG</i> -eGFPF	GCAATGTCTTCACTGTTGATAATGACCATAGCA GAGATAGGC	XopG烟草亚细胞定位
pCambia-1300- <i>xopG</i> -eGFPR	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATCCTGCCGTGAG GCTTATATTT	Subcellular localization of XopG in tobacco
pK18 <i>gusA</i> - <i>xopG</i> F	TGTAACGACGCGCCAGTGCCCTGCACGGCA AGGAAGACAG	<i>xopG</i> 启动子活力测定
pK18 <i>gusA</i> - <i>xopG</i> R	CATAAGGGACTGACCACCCGGGCCTATCTCTG CTATGGTCA	Analysis of <i>xopG</i> promoter activity
pRTVc- <i>xopG</i> -GFPF	GCGCGGATCCGTGACCATAGCAGAGATAGGC	XopG水稻亚细胞定位
pRTVc- <i>xopG</i> -GFPR	CCCAAGCTTCCTGCCGTGAGGCTTATATTT	Subcellular mapping of XopG in rice

注: 下划线表示酶切位点。

Note: The underline indicates the enzyme digestion site.

进行 XopG 蛋白结构域分析;应用 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)在线网站预测 XopG 蛋白二级结构;利用 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)在线网站分析 XopG 有无跨膜结构域,基于 SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)在线网站预测 XopG 有无信号肽;通过在线网站 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和黄单胞菌数据库 (<https://www.xanthomonas.org/t3e>)获取 10 个 XopG 同源蛋白,采用 MEGA11.0 软件的 NJ 法 (Neighbor-Joining)构建系统发育树,通过 DNAMAN 8.0 进行蛋白多序列比对;通过比对基因上游 500 bp 的核苷酸序列,预测 *xopG* 启动子区是否具有 PIP-box 特征区。

1.4 细菌基因敲除 利用同源重组的方法,敲除 *xopG* 和 *hrpX* 基因,详细实验步骤见参考文献 [24–25]。

1.5 启动子活性分析 应用酶切连接法构建

pK18*gusA*-*xopG* 表达载体^[26–27],将 pK18*gusA*-*xopG* 分别转化野生型菌株 T7174 及 Δ *hrpX* 后,挑取单克隆进行 GUS 染色和 GUS 活力测定,以分析 *xopG* 表达情况,实验步骤如参考文献 [28–29]。

1.6 致病力检测 应用剪叶法^[30–31]进行水稻叶片接种实验,将 T7174、*xopG* 和 C- Δ *xopG* 菌株分别划线于 PSA 和 PSSP (PSA+100 mg·L⁻¹ Sp)固体培养基上,28 ℃ 培养 2 d 后,用 ddH₂O 洗脱菌体,调至 OD₆₀₀ 约为 0.6。接种生长 60 d 左右的 TP309 水稻,每天观察水稻发病情况,14 d 后记录病斑长度。

1.7 水稻亚细胞定位 选择培养 12 d 左右的水稻黄化苗,取其茎秆切碎,参考酶解分离法进行水稻原生质体分离^[32–33],获得水稻原生质体。运用 PEG 转化法^[34]将构建好的重组载体 pRTVc-*xopG*-GFP 转化到水稻原生质体中,培养 12 h 后于共聚焦显微镜下观察荧光。

1.8 烟草亚细胞定位 将构建好的烟草定位载体 pCambia-1300-*xopG*-eGFP 转入农杆菌感受态 GV3101 中,于 LB (含 kana, Rif)液体培养基 28 ℃ 培养 16~18 h。培养好后,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃培养液,向管中加入 2 mL 农杆菌重悬 Buffer,调至 OD₆₀₀ 约为 0.2,注射烟草叶片背面^[35],保湿培养 36 h 于共聚焦显微镜下观察荧光。

2 结果与分析

2.1 XopG 预测蛋白的生物信息学分析 *xopG* 基因全长 468 bp,预测编码 155 个氨基酸。采用 SMART 在线网站进行 XopG 蛋白结构域分析,发现 XopG 蛋白 1~150 位氨基酸存在典型的锌金属

肽酶结构域,42~95 位氨基酸存在 SCOP 结构域(图 1-A),预测为典型锌金属肽酶。应用 PSIPRED 在线网站预测 XopG 蛋白二级结构,发现其有 6 处 α-螺旋结构,2 处 β-折叠结构(图 1-B)。应用 TMHMM 在线网站分析发现 XopG 蛋白无跨膜结构(图 1-C),可能为非膜定位蛋白。SignalP 在线网站预测结果表明,XopG 蛋白无信号肽(图 1-D)。

2.2 XopG 同源蛋白的氨基酸序列比对和系统发育树分析 为了研究 XopG,从 NCBI 网站和黄单胞菌数据库中获得了与 XopG (Xoo 4258)蛋白同源性较高的 10 条同源蛋白的序列数据(表 3),并使用 DNAMEN8.0 软件对其同源蛋白进行多序列

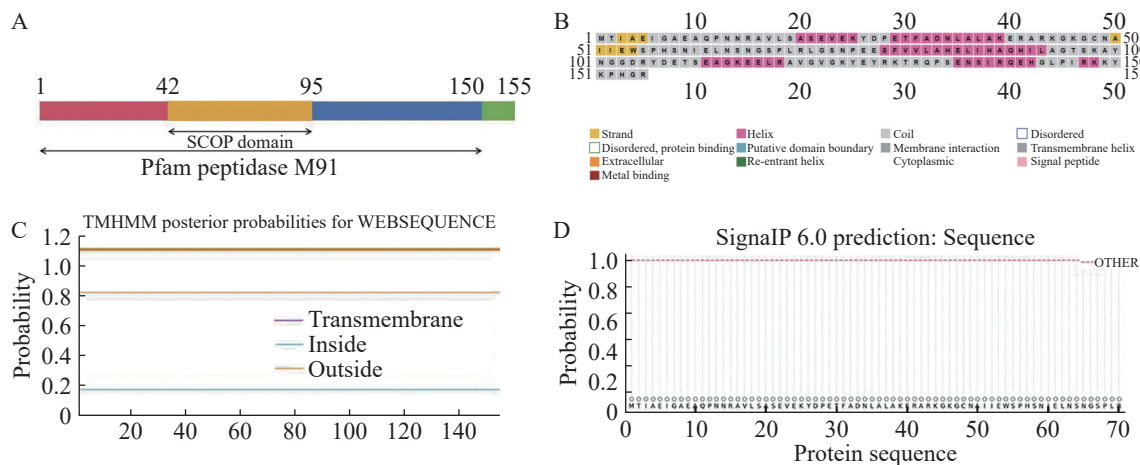


图 1 XopG 的生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of XopG

注: A. XopG 结构域分析; B. XopG 蛋白二级结构预测; C. XopG 跨膜结构域分析; D. XopG 信号肽预测。

Note: A. Analysis of XopG structural domain; B. Prediction of XopG protein secondary structure; C. Analysis of transmembrane domain of XopG; D. Prediction of signal peptide of XopG.

表 3 本研究中用于 XopG 进化分析的 11 个菌原

Tab. 3 Eleven bacterial strains used in this study for the evolutionary analysis of XopG

病原菌Pathogens	简称 Abbreviation
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	柑橘黄单胞菌柑橘致病变种 <i>Xff4834R chr10930</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> B100	野油菜黄单胞菌油菜致病变种 <i>Xcc-b100 2655</i>
<i>Xanthomonas phaseoli</i>	菜豆黄单胞菌 <i>XppCFBP6546 17770</i>
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	番茄黄单胞菌 <i>BJD12 21680</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	野油菜黄单胞菌疮痂致病变种 <i>Xcv1298</i>
<i>Xanthomonas</i> sp. <i>ISO98C4</i>	黄单胞菌 <i>ISO98C4 AC801 22900</i>
<i>Pseudomonas avellanae</i>	黄单胞菌铜绿假单胞菌 <i>BKM03-05050</i>
<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> RS	青枯菌 <i>RS G0999 12160</i>
<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> GMI1000	青枯菌 <i>GMI1000 Rsp0572</i>
<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> RS 476	青枯菌 <i>RS 476 CDC45 20470</i>
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> 4258	黄单胞菌水稻致病变种 <i>Xoo 4258</i>

比对图 2-A), 发现 XopG 蛋白在不同细菌中具有较高的序列保守性, 其中与柑橘黄单胞菌柑橘致病变种同源性最高。应用 MEGA11.0 软件的 NJ 法对这 11 个蛋白进行系统进化树的构建

(图 2-B), 发现 XopG 共有 6 个分支, Xoo 中 XopG 与柑橘黄单胞菌柑橘致病变种同源性最高, 与野油菜致病变种、菜豆黄单胞菌和番茄黄单胞菌同源性也较高。

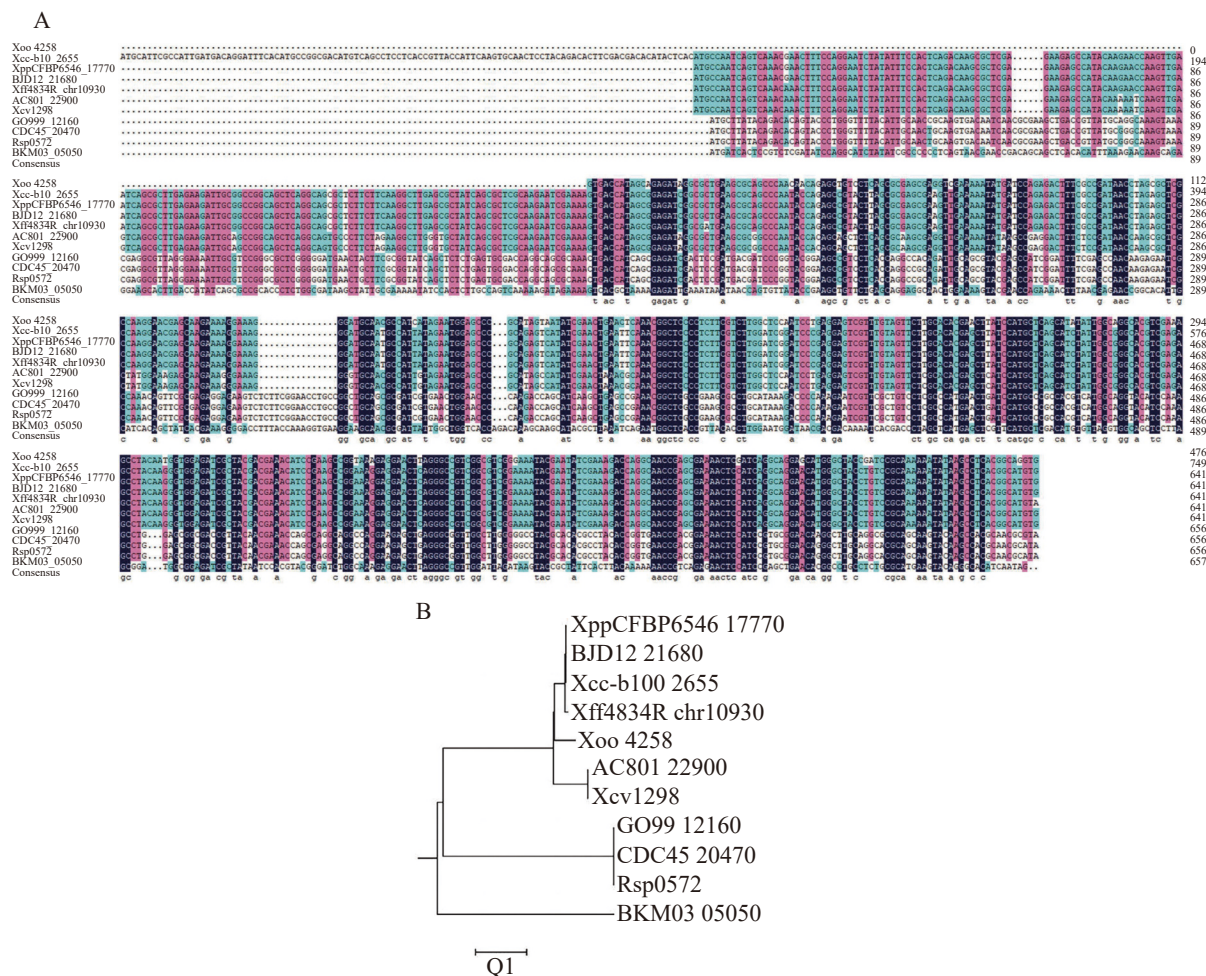


图 2 不同病原菌中 XopG 蛋白多序列比对以及系统发育树分析

Fig. 2 Multi-sequence alignment and phylogenetic tree analysis of XopG protein in different pathogenic bacteria

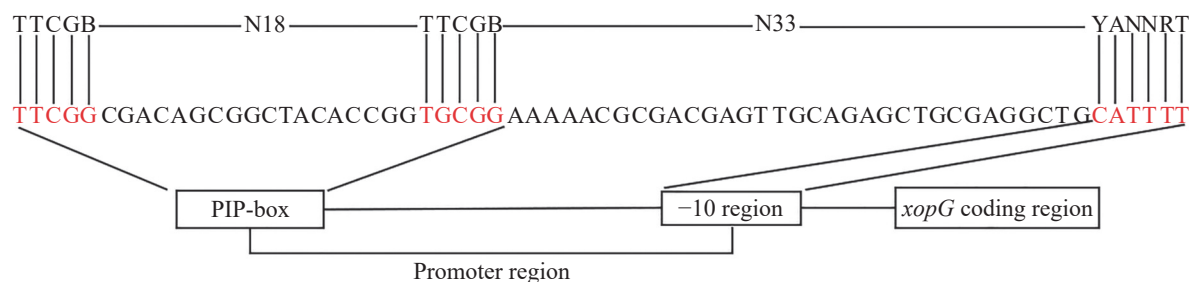
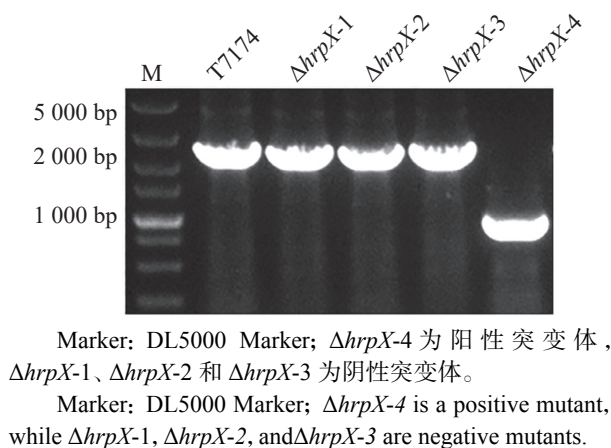
注: A.不同病原菌中 XopG 蛋白的多序列比对; B.不同病原菌中 XopG 的系统发育树分析。

Note: A. Multiple sequence alignment of XopG protein in different pathogenic bacteria; B. Phylogenetic tree analysis of XopG in different pathogenic bacteria.

2.3 *xopG* 的启动子区具有非典型 PIP-box T3SEs 的表达依赖于两个重要的调控因子 HrpX 和 HrpG。HrpG 调控 *hrpX* 表达, 而 HrpX 可以直接结合到 T3SEs 和 T3SS 基因启动子的 PIP-box 基序上, 促进效应因子基因及 T3SS 结构基因的转录。PIP-box 的保守结合序列是 TTCGB-N15-TTCGB-N32-YANNRT(B 和 Y 代表 C、G、T; R 代表 A、G、T)。但不是所有的 T3SEs 编码基因都具有典型的 PIP-box 保守结构域, 部分 PIP-box 的 TTCGB 中个别碱基可以发生变化, 称之为非典型的 PIP-box^[36]。通过序列比对, 发现 *xopG* 启动子区域的

PIP 保守结合序列与典型的 PIP-box 的保守结合序列不完全一致。如图 3 所示, *xopG* 启动子区域 TTCGB 与 TTCGB 之间含有 18 个碱基, TTCGB 与 YANNRT 之间含有 33 个碱基, 与 PIP-box 结构相比, 其第 25 位的 T 突变为 G, 因此 *xopG* 启动子区域含有非典型的 PIP-box 结构, 表明 *xopG* 表达受 HrpX 调控。

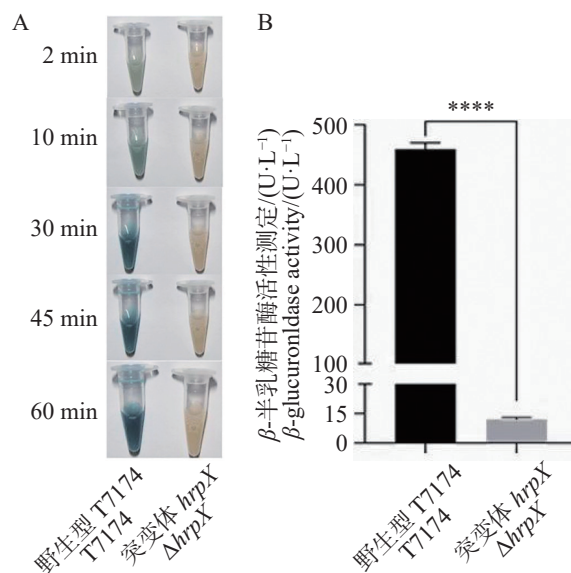
2.4 *hrpX* 突变体构建 为了验证 *xopG* 表达是否确实受 HrpX 调控, 构建了 pK18-*hrpX* 载体用于 *hrpX* 的敲除, 将其通过电击转化法转入 T7174 中, 使用载体引物进行菌落 PCR 验证。结果如图 4 所

图 3 *xopG* 上游启动子区 PIP-box 分析Fig. 3 Analysis of the PIP-box in the upstream promoter region of *xopG*图 4 突变体 *hrpX* 的 PCR 鉴定Fig. 4 PCR identification of mutant *hrpX*

示,野生型条带大小应为 2 000 bp 左右,而 $\Delta hrpX$ 的扩增条带为 1 000 bp 左右,表明 *hrpX* 基因发生了缺失突变($\Delta hrpX$)。其中 1-3 个克隆为未突变菌株,而第 4 个克隆为突变菌株。

2.5 GUS 染色和活力测定 为了评估 *xopG* 的表达,将 pK18*gusA-xopG* 表达载体分别转化野生型菌株 T7174、突变体菌株 $\Delta hrpX$ 后进行 GUS 染色及活力测定。结果发现在 T7174 的转化株中,加入 GUS 底物 2 min 后出现蓝色且随着染色时间的延长蓝色变深,而在 $\Delta hrpX$ 转化株中,加入 GUS 底物 60 min 还没有呈现蓝色(图 5-A)。本研究团队也对 *gusA* 表达水平进行了定量检测。以 $\Delta hrpX$ 作为实验组,以 T7174 作为正对照,应用荧光法对其进行启动子活性测定。结果发现 *hrpX* 基因敲除后,GUS 活性极显著低于 T7174 菌株(图 5-B)。

2.6 XopG 正调控 Xoo 致病力 为了检测 XopG 是否调控 Xoo 的致病力,构建了 *xopG* 突变体菌株,野生型条带大小约为 1 500 bp,突变体条带大小约为 1 000 bp,二者片段大小之差正好符合预期敲除基因大小,表明突变体构建成功(图 6-A);

图 5 *xopG* 表达受 HrpX 正调控Fig. 5 The expression of *xopG* is positively regulated by HrpX

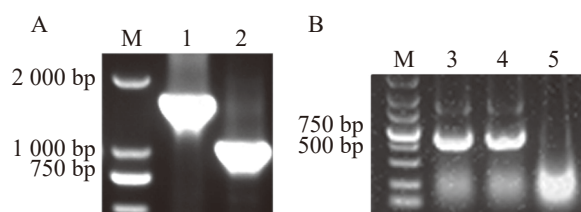
注: A. 组织染色法分析启动子活力; B. 荧光定量法分析启动子活力。****, $P < 0.001$ 。 *xopG* 的启动子连上 *gusA* 报告基因,分别转入 $\Delta hrpX$ 和 T7174,以 $\Delta hrpX$ 为实验组,T7174 作为对照。

Note: A. Analysis of promoter activity using tissue staining method; B. Analysis of promoter activity using fluorescence quantitative method. ****, $P < 0.001$. The promoter of *xopG* was fused with the *gusA* reporter gene and then transformed into $\Delta hrpX$ and T7174 separately, with $\Delta hrpX$ as the experimental group and T7174 as the control group.

将回补载体 pHM1-*xopG* 应用电击转化法转入 $\Delta xopG$,使用 pHM1 载体引物进行 PCR 检测,以 pHM1 空载为模板作为实验负对照,结果如图 6-B 所示,1~3 号泳道均能扩增出条带,1~2 号泳道条带大小为 500 bp 至 750 bp 之间符合预期,3 号泳道为负对照组,结果显示回补菌株 C- $\Delta xopG$ 构建成功。

将构建的突变体菌株、回补菌株及野生型菌株应用剪叶法对水稻叶片进行接种实验,接种 14 d

调查病斑长度并拍照记录(图 7-A)。T7174 野生型菌株病斑长度为 12 cm 左右、突变体菌株 $\Delta xopG$ 病斑长度为 6 cm 左右、回补菌株 C- $\Delta xopG$ 病斑长度为 10 cm 左右, 突变体 $\Delta xopG$ 的病斑长度显著低于野生型 T7174 及回补菌株 C- $\Delta xopG$, 野生型 T7174 及回补菌株 C- $\Delta xopG$ 病斑长度没有显著差异(图 7-B)。以上结果表明 XopG 正调控 *Xoo* 致



Marker: DL2000 Marker; 1: 野生型 T7174 为模板 PCR 检测, 作为正对照; 2: 以 *xopG* 缺失突变体基因组为模板 PCR 检测; 3~4: 以 C- $\Delta xopG$ 菌株基因组为模板 PCR 检测; 5: 以 pHM1 空载作为模板进行 PCR 检测。

Marker: DL2000 Marker; T7174: PCR detection using the wild-type T7174 as a template, serving as a positive control; 2: PCR detection using the *xopG* deletion mutant genome as a template. 3~4: PCR detection using the C- $\Delta xopG$ strain genome as a template; 5: PCR detection using the pHM1 empty vector as a template.

图 6 *xopG* 缺失突变体以及 C- $\Delta xopG$ 菌株构建

Fig. 6 Construction of *xopG* deletion mutant and C- $\Delta xopG$ strain

注: A. *xopG* 缺失突变体菌株构建; B. *xopG* 回补菌株 C- $\Delta xopG$ 构建。

Note: A. Construction of the *xopG* deletion mutant strain; B. Construction of the *xopG* complemented strain C- $\Delta xopG$.

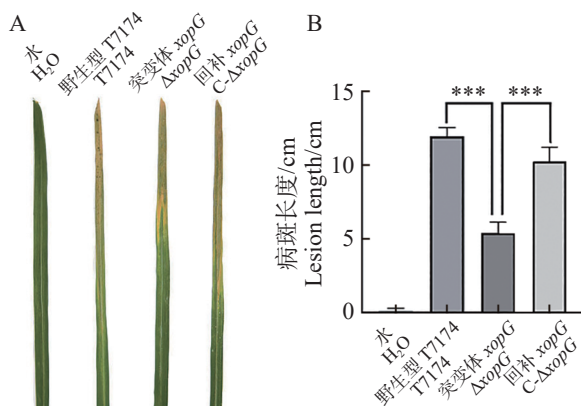


图 7 XopG 正调控 *Xoo* 在水稻上的致病力

Fig. 7 XopG positively regulates the pathogenicity of *Xoo* on rice

注: A. 剪叶法接种 14 d 后发病情况 ($OD_{600}=1.0$); B. 接种 14 d 后病斑长度。 $P < 0.01$ (t 检验), 表示突变体与野生型之间的致病力存在极显著性差异, ***: $P < 0.001$ 。

Note: A. The disease incidence after 14 days of leaf clipping inoculation ($OD_{600}=1.0$); B. The lesion length after 14 days of inoculation, $P < 0.01$ (t-test), indicating a significant difference in pathogenicity between the mutant and the wild type, ***: $P < 0.001$.

病力。

2.7 XopG 蛋白定位于细胞核、细胞膜和细胞质
将 pCambia-1300-*xopG*-eGFP 重组载体和 pCambia-1300-eGFP 空质粒分别转入农杆菌, 所得农杆菌注射烟草下表皮, 避光保湿培养 24 h 后, 继续保湿培养 16 h, 制成玻片在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光。结果显示: 注射携带 pCambia-1300-*xopG*-eGFP 重组载体的烟草叶片细胞在细胞核、细胞质、细胞膜中均具有绿色荧光。由此, 可以得出 XopG 蛋白可能定位于烟草细胞细胞核、细胞质和细胞膜(图 8-A)。为明确 XopG 的亚细胞定

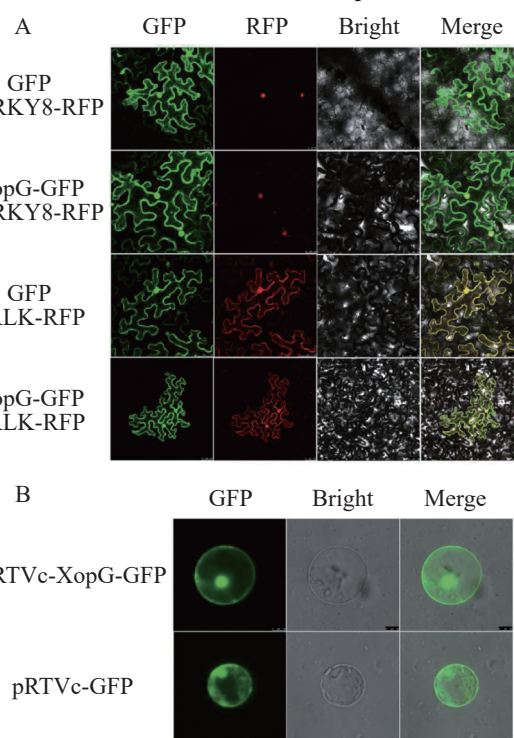


图 8 XopG 在烟草叶肉细胞和水稻原生质体中的亚细胞定位

Fig. 8 Subcellular localization of XopG in tobacco leaf cells and rice protoplasts

注 A. XopG 在烟草中的亚细胞定位 (bar=50 μ m)。WRKY8-RFP 为细胞核共定位 Marker, 以 GFP 与 WRKY8-RFP 共同注射作为对照, PLK-RFP 为细胞核膜质共定位 Marker, 以 GFP 与 PLK-RFP 共同注射作为对照; B. XopG 在水稻原生质体中的定位 (bar=50 μ m)。pRTVc-GFP 空载质粒为对照组, pRTVc-*xopG*-GFP 为实验组。

Note: A. Tobacco subcellular colocalization (bar=50 μ m), using WRKY8-RFP as the nuclear colocalization marker, with GFP and WRKY8-RFP co-injection as the control group, and PLK-RFP as the nuclear membrane colocalization marker, with GFP and PLK-RFP co-injection as the control group. B. Rice protoplast subcellular localization (bar=50 μ m), using pRTVc-GFP empty plasmid as the control group, and pRTVc-*xopG*-GFP as the experimental group.

位情况,将 pRTVc-*xopG*-GFP 及 pRTV-cGFP 空载体分别转化水稻原生质体,12 h 后在共聚焦显微镜下观察水稻原生质体的荧光发光情况。如图 8-B 所示,转化 pRTV-cGFP 和 pRTVc-*xopG*-GFP 的水稻细胞在细胞核、细胞质、细胞膜中均具有绿色荧光,表明 XopG 在水稻细胞中也定位于细胞核、细胞质、细胞膜,与在烟草细胞中的定位相同。

3 讨论

在革兰氏阴性菌中,T3SS 对病原菌与宿主的相互作用起着重要的调控作用。T3SEs 的表达依赖于两个重要的调控因子 HrpX 和 HrpG。HrpG 调控 *hrpX* 表达,而 HrpX 可以直接结合到 T3SEs 和 T3SS 基因启动子的 PIP-box 基序上,促进效应因子基因的转录。其中,HrpX 通过结合到植物诱导启动子盒 PIP-box 上促进相关基因转录^[9-12]。本研究预测 *xopG* 基因启动子区含有一个非典型的 PIP-box 结构,通过启动子活力测定实验发现 *xopG* 表达受 HrpX 调控,因而推测 XopG 为Ⅲ型效应蛋白,后续将继续进行 XopG 蛋白外排实验,进一步验证 XopG 确为Ⅲ型效应蛋白。

通过 XopG 在不同病原菌中直系同源基因多序列比对及系统进化树分析,推测 XopG 在稻属黄单胞菌水稻致病变种和柑橘黄单胞菌柑橘致病变种中可能执行相似的功能。Deb 等^[16-17]将 *Xoo* BXO43 菌株对易感型水稻 TN-1 进行接种实验发现,*xopG* 突变体的病斑长度显著短于野生型菌株的病斑长度。本研究在稻属黄单胞菌水稻致病变种 T7174 小种中敲除 *xopG* 基因,接种水稻 14 d 后发现野生型菌株病斑长度约为 12 cm、突变体菌株 $\Delta xopG$ 病斑长度约为 6 cm 而 C- $\Delta xopG$ 回补菌株病斑长度约为 10 cm,突变体菌株病斑长度显著短于野生型菌株,与 Deb 等实验结果一致,说明 XopG 正调控 *Xoo* 致病力。有研究人员发现 XopU、XopV、XopP、XopG 和 AvrBs2 蛋白可以抑制 XopQ-XopX 介导的水稻免疫应答^[18-19]。XopQ-XopX 相互作用显示发生在细胞核中。XopG 与 XopQ 或 XopX 的相互作用发生在细胞质中,表明 XopG 将 XopQ 和 XopX 蛋白隔离在细胞质中,从而阻止了它们在细胞核中的共定位和相互作用。同时,研究人员在黄单胞菌中发现五种效应子(XopK、XopG、XopQ、XopL 和 XopX)抑制 flg22

诱导基因 WRKY33 的表达^[20]。但至今为止 XopG 在水稻细胞中的互相作用靶标及其调控机制仍不清楚。

XopG 没有可预测的跨膜结构和信号肽,在水稻原生质体的细胞核、细胞膜以及细胞质中均有 XopG-GFP 荧光信号,在烟草细胞中也定位于细胞核、细胞质、细胞膜。亚细胞定位结果显示 XopG 没有一个明显的定位情况,在细胞的核、膜及质中均存在,推测其定位可能受到其水稻中靶标蛋白的影响。

综上,本研究验证了 *xopG* 的表达受 HrpX 调控,明确了 XopG 正调控 *Xoo* 的致病力及在植物细胞中的亚细胞定位情况,为后续筛选 XopG 在水稻内的互作靶标蛋白,进一步揭示在 *Xoo* 侵染过程中 XopG 通过何种途径影响水稻的抗病性从而调控植物免疫的方式提供了实验支撑,为水稻抵抗白叶枯病提供新策略。

4 结论

本研究通过对 XopG 蛋白结构的生物信息学分析、基因启动子活力测定,证明 *xopG* 受 HrpX 的正调控;通过病原菌致病力检测实验,发现 *xopG* 缺失导致 *Xoo* 侵染所致的水稻病斑长度显著低于野生型菌株 T7174, C- $\Delta xopG$ 菌株接种水稻的病斑长度与野生型菌株接种水稻的病斑长度无显著关系,这表明 XopG 正调控 *Xoo* 致病力;水稻原生质体及烟草亚细胞定位实验结果表明 XopG 在植物细胞内定位于细胞核、细胞膜和细胞质。

参考文献:

- [1] 朱荣松,邓九胜,李勇.水稻产量与氮肥利用率对不同配方肥料的响应[J]. *现代农业*, 2008(10): 17-21.
- [2] 李初军,刘建萍,贾丽颖,等.我国水稻育种的现状与展望[J]. *中国种业*, 2007(1): 11-12.
- [3] 高明君,何祖华.水稻免疫机制研究进展[J]. *中国科学:生命科学*, 2013, 43(12): 1016-1029.
- [4] TENG K P, LIU Q, ZHANG M, et al. Design and enantioselective synthesis of chiral pyranone fused indole derivatives with antibacterial activities against *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* for protection of rice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(9): 4622-4629.
- [5] AHAMMAD I, JAMAL T B, LAMISA A B, et al. Subtractive genomics study of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals repurposable drug candidate for the treatment of bacterial leaf blight in rice[J]. *Journal of Genetic En-*

- gineering and Biotechnology, 2024, 22(1): 100353.
- [6] JAITHON T, ATICHAKARO T, PHONPHOEM W, et al. Potential usage of biosynthesized zinc oxide nanoparticles from mangosteen peel ethanol extract to inhibit *Xanthomonas oryzae* and promote rice growth[J]. *Heliyon*, 2024, 10(1): e24076.
- [7] YANG Z X, ZHU Z, GUO Y L, et al. OsMKK1 is a novel element that positively regulates the *Xa21*-mediated resistance response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice[J]. *Plant Cell Reports*, 2024, 43(2): 31.
- [8] TAYI L, NATHAWAT R, KUMAR S, et al. Mutational analysis of predicted active site residues of an exoglucanase secreted by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* to determine their role in catalysis and in virulence on rice[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2024, 174: 110372.
- [9] 徐荣旗. 野油菜黄单胞菌野油菜致病变种新的依赖于 III 型分泌系统的效应物的鉴定[D]. 南宁: 广西大学, 2006.
- [10] 姜珊. 黄单胞菌 III 型分泌系统抑制剂的筛选及其作用机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2020. doi: 10.27152/d.cnki.gshanu.2020.000324.
- [11] 刘红霞. 三种 III 型蛋白影响黄单胞菌—水稻互作与植物抗病性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [12] 易杰祥, 景晓辉, 吴伦英. 黄单胞菌 III 型分泌系统效应蛋白的研究进展[J]. *热带农业科学*, 2014, 34(8): 74 – 79.
- [13] KIM J G, TAYLOR K W, HOTSON A, et al. XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *xanthomonas*-infected tomato leaves[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(7): 1915 – 1929.
- [14] ORTMANN S, MARX J, LAMPE C, et al. A conserved microtubule-binding region in *Xanthomonas* XopL is indispensable for induced plant cell death reactions[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(8): e1011263.
- [15] MA W X, XU X M, CAI L L, et al. A *Xanthomonas oryzae* type III effector XopL causes cell death through mediating ferredoxin degradation in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Phytopathology Research*, 2020, 2(1): 16.
- [16] DEB S, GOKULAN C G, NATHAWAT R, et al. Suppression of XopQ-XopX-induced immune responses of rice by the type III effector XopG[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(5): 634 – 648.
- [17] DEB S, GUPTA M K, PATEL H K, et al. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XopQ protein suppresses rice immune responses through interaction with two 14-3-3 proteins but its phospho-null mutant induces rice immune responses and interacts with another 14-3-3 protein[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(7): 976 – 989.
- [18] DEB S, GHOSH P, PATEL H K, et al. Interaction of the *Xanthomonas* effectors XopQ and XopX results in induction of rice immune responses[J]. *The Plant Journal*, 2020, 104(2): 332 – 350.
- [19] STORK W, KIM J G, MUDGETT M B. Functional analysis of plant defense suppression and activation by the *Xanthomonas* core type III effector XopX[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(2): 180 – 194.
- [20] PRAUTSCH J, LEE ERICKSON J L, ÖZYÜREK S, et al. Effector XopQ-induced stomule formation in *Nicotiana benthamiana* depends on ETI signaling components ADR1 and NRG1[J]. *Plant Physiology*, 2023, 191(1): 161 – 176.
- [21] SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Gene*, 1994, 145(1): 69 – 73.
- [22] HUYNH T V, DAHLBECK D, STASKAWICZ B J. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity[J]. *Science*, 1989, 245(4924): 1374 – 1377.
- [23] STAVRINIDES J, MCCANN H C, GUTTMAN D S. Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors[J]. *Cellular Microbiology*, 2008, 10(2): 285 – 292.
- [24] 李开怀, 刘凤权. 植物病原细菌基因敲除技术在本科开放实验中的设计与实践[J]. *科教导刊*, 2024(1): 67 – 69.
- [25] 严霞. 野油菜黄单胞菌 8004 效应蛋白在调节植物先天免疫中的功能研究[D]. 海口: 海南大学, 2016.
- [26] 于浩泉. 水稻黄单胞菌新型植物致病相关因子的发掘及作用机制探究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015. doi:10.27158/d.cnki.ghznu.2015.000184.
- [27] 景晓辉. 野油菜黄单胞菌效应蛋白 XopD_{xcc8004} 与 NAC 转录因子 ATAF2 互作干扰寄主植物的免疫反应[D]. 海口: 海南大学, 2014.
- [28] 米多. 水稻白叶枯病原菌 *Xoo* 中 RaxM 与 MutL 互作对 *raxX* 表达调控的影响[D]. 海口: 海南大学, 2022.
- [29] 冯锋. 黄单胞菌效应蛋白 AvrAC 调节植物先天免疫的分子机制[D]. 北京: 清华大学, 2012.
- [30] JOSEPH C A. 水稻基于产量的抗旱、耐冷和白叶枯病抗性遗传重叠的数量解析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [31] 于燕燕, 夏影影, 吴可建, 等. *XppI* 调控水稻白叶枯病菌致病力的潜在机制[J]. *热带生物学报*, 2023, 14(6): 642 – 650.
- [32] 马超越, 彭世清, 郭冬, 等. 植物原生质体分离及其瞬时转化的应用[J]. *热带生物学报*, 2024, 15(2): 241 – 250.
- [33] 李悦, 宋慧云, 王志, 等. 植物原生质体分离与瞬时表达体系研究进展[J]. *植物生理学报*, 2023, 59(1): 21 – 32.
- [34] 李婧瑶, 刘龙飏, 丁兵, 等. 植物原生质体分离及培养研究进展[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(2): 620 – 632.
- [35] 郭圣婷. NbRAF2 互作蛋白筛选及功能分析[D]. 沈

阳: 沈阳农业大学, 2023. doi: [10.27327/d.cnki.gshnu.2023.001338](https://doi.org/10.27327/d.cnki.gshnu.2023.001338).

- [36] FENSELAU S. Sequence and expression analysis of the *hrpB* Pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris*

pv. vesicatoria which encodes eight proteins with similarity to components of the *hrp*, *ysc*, *spa*, and *fli* secretion systems[J]. [Molecular Plant-Microbe Interactions](#), 1995, 8(6): 845 – 854.

The virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* regulated by the type III effector XopG and the localization of XopG in plant cells

YU Xi[#], LI Chunxia^{*}, TAO Jun^{*}

(School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is the pathogen that causes bacterial leaf blight in rice. Type III secretion effectors (T3SEs) play an important role in the virulence of *Xoo*. To study the function of XopG in *Xoo* virulence and the localization in plant cells, we carried out the informatics analysis, gene knockout, expression analysis, subcellular localization of XopG, and analyzed the effect of *xopG* mutation on *Xoo* virulence. The results showed that the *xopG* promoter sequence contains an atypical plant-induced motif (PIP-box), indicating that *xopG* expression is regulated by HrpX. The promoter activity of *xopG* in *hrpX* deletion mutant was significantly lower than that in the wild type strain T7174, suggesting that HrpX positively regulates the expression of *xopG*. Compared to the wild type T7174, the virulence of *xopG* mutant was significantly reduced, indicating that XopG is a key effector for *Xoo* to infect rice. Subcellular localization showed that XopG locates in the nucleus, cell membrane and cytoplasm in plant cells. This study laid a foundation for exploring the molecular mechanism of XopG-*Xoo* interaction.

Keywords: *Xoo*; type III effector; XopG; virulence

(责任编辑: 叶 静)