

Pathway and Molecular Mechanism of Bacterial Blight Infection in Rice

Yujie Gu, Wei Feng, Le Mei

College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang
Email: 1317283170@qq.com

Received: Apr. 6th, 2020; accepted: Apr. 17th, 2020; published: Apr. 24th, 2020

Abstract

In order to prevent the adverse effects of rice bacterial blight, the worldwide bacterial disease on rice breeding, the exploitation of different disease resistance genes in rice plays a vital role in the genetic breeding. *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae* (Xoo) has also evolved in response to this pressure. Therefore, studying the pathogenic mechanism of Xoo is also important for the control of rice blight. This article summarizes the infection pathways and molecular mechanisms of Xoo, which can provide reference for other researches on the control of Xoo.

Keywords

Xanthomonas campestris pv. *Oryzae*, Pathogenic Mechanism, Infection Pathway

白叶枯病菌侵染水稻的途径及其分子机理

顾宇杰, 冯 巍, 梅 乐

浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华
Email: 1317283170@qq.com

收稿日期: 2020年4月6日; 录用日期: 2020年4月17日; 发布日期: 2020年4月24日

摘 要

为了防治水稻白叶枯病菌这种世界性细菌病害对水稻育种的不利影响, 水稻中的不同的抗病基因的挖掘对水稻的遗传育种起着至关重要的作用。而白叶枯病菌为了应对这种压力也在不断的进化。因此, 研究白叶枯病菌的致病机理对防治水稻白叶枯病同样重要。本文通过对白叶枯病菌的侵染途径及其分子机理进行概述, 为其他治理白叶枯病的研究提供借鉴。

关键词

白叶枯病菌, 致病机理, 侵染途径

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

水稻白叶枯病(Bacterail blight)是由水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae*)所引发的一种世界性细菌病害, 是稻黄单胞杆菌的白叶枯致病变种。它发生范围广、流行速度快、危害大、突变性高, 给世界各地水稻种植生产造成了巨大损失, 现今除在亚洲等地流行外, 在非洲、美洲也都有发生。白叶枯病发生于水稻的各个生育期, 通过侵染植物的维管组织, 在整个植物中繁殖传播。其病原菌的形态特征主要表现为两端钝圆, 并呈短杆状(如图 1 所示)。经革兰氏染色结果显示为阴性, 且在菌体外部存在一层呈黏胶质的多糖, 此多糖的作用是为了保护病菌细胞能在外界胁迫等不良条件下生存。病菌产生的胞外多糖黄原胶还能够堵塞受感染的维管组织, 从而导致快速萎蔫[1]。

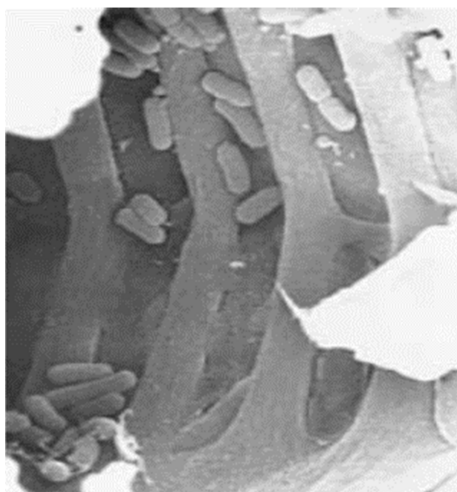


Figure 1. *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae* in Rice

图 1. 水稻白叶枯病菌

2. 白叶枯病菌的侵染途径

白叶枯病菌对水稻的侵染是一个逐渐蔓延的过程, 首先白叶枯病菌可以利用水稻的气孔或者是当水稻发生创伤而产生伤口时入侵到水稻组织中, 在进行大量增值的时候是发生在维管束中。由于在维管束中大量增值, 导致维管束发生堵塞, 植物的营养无法得到供给, 就会使得水稻叶片的枯萎, 最终由于叶片的枯萎导致水稻产量的严重下降。同时为了抵抗植物的先天免疫系统, 白叶枯病菌还会合成很多有毒、致病的因子如酶、毒素、激素等来抑制水稻的先天免疫以便自己的生殖。另一方面, 黄原胶和脂多糖这两种物质也是在白叶枯病菌侵染的过程中合成的, 为了有利于病原菌的侵染和扩散, 通过分泌产生的黄原胶这种物质便可以促进胍胍质在水稻细胞壁表面积累, 这样更有助于病原菌在水稻细胞表面的吸附[2] [3]。

3. 白叶枯病菌的主要分泌系统

蛋白质分泌在细菌与环境及其他生物的相互作用中起着关键作用。为了抑制植物的免疫反应，病原菌会分泌很多与植物免疫反应相关的蛋白质。当植物的免疫被抑制的同时，病原菌的毒性也能够得到提高。然而，由于植物细胞表面存在细胞壁，要实现蛋白质从细菌体内转运到植物细胞内的跨膜转运是比较困难的，为了实现蛋白质的跨膜转运，细菌已经进化出复杂的分泌系统。而白叶枯病原细菌是一种黄单胞杆菌，黄单胞杆菌可以利用自身的多种分泌机制进行侵染，而其中的 III 型分泌系统(T3SS)是和致病性密切相关的，很多已经确定功能的基因都和分泌系统密切相关。T3SS 自 25 年前被发现以来，由于其在致病力中的中心作用而备受关注。研究发现 T3SSs 跨越了三层细胞膜，即细菌内膜、细菌外膜和真核宿主细胞膜，使细菌能够将效应蛋白传递到宿主细胞中，它们能够影响宿主细胞的细胞功能从而有助于细菌的存活和定植。分泌的效应蛋白在数量和功能上各不相同，这反映了与特定宿主的共生或致病性相互作用时需要不同的效应蛋白。尽管存在这种多样性，T3SSs 的结构和分泌机制仍然非常保守[4] [5] [6]。

T3SSs 存在于革兰氏阴性细菌病原体和共生体中，主要作用是负责蛋白质的转运，类似于一种分子注射器。T3SSs 能够形成穿过细菌细胞膜和宿主细胞膜的通道，使细菌能够将许多效应蛋白注入宿主细胞胞质，并与多种宿主建立相互作用。

T3SSs 在进化上与鞭毛有关，许多与鞭毛组装有关的重要的结构和部件都是高度保守的。这些高达数百万道尔顿的复合体结构的组装和功能需要 20 多种蛋白质[4]，但是这些蛋白在不同的细菌中被赋予了特有的名称，这使得跨物种的比较变得更加困难。分泌和细胞移位(Sct)前缀被认为是 T3SSs 保守组分的统一命名，并已被广泛采用[6]。T3SSs 横跨细菌内外膜和宿主细胞膜，包括胞浆 ATP 酶复合物、胞质环(C 环)、内膜出口装置、基底(位于细菌内外膜内，包围内杆和针)等亚结构，以及位于宿主细胞膜中的易位孔。基底是一系列的环状结构，嵌在细菌的内外膜中[6] [7]。SctJ 和 SctD 在内膜形成同心环，分泌素 SctC 在一些 T3SSs 中由一种叫做前导蛋白的小脂蛋白引导形成外膜环。出口装置位于基底部，由 SctR、SctS、SctT、SctU 和 SctV 五种膜蛋白组装而成。出口装置的正下方是由 SctQ 形成的 C-环和由 ATP 酶-SctN、茎秆蛋白 SctO、定子蛋白 SctL 和辅因子 SctK 组成的 ATP 酶复合物，这些组成部分构成了底物募集和分泌的分选平台[8] [9]。内杆通过“套筒”结构连接到内膜环，有助于将针固定到基体上。针头从细菌表面伸出，在一些 T3SSs 中被 SctA 针尖复合体覆盖。尖端复合物有助于转运子 SctE 和 SctB 在宿主细胞膜上组装易位孔；这在细菌胞质和宿主细胞胞质之间建立了一个管道，从而实现效应蛋白的直接传递。针头的长度由 SctP 蛋白控制，SctU 和 SctW 调节分泌层次，这是蛋白质底物分泌的时间顺序[10] [11] [12] [13]。此外，许多分泌蛋白质需要同源伴侣来分泌[14] [15]。一种有功能性的 T3SS，包含基底体和针，也被称为“针复合体”，相当于鞭毛的弯钩基体复合物(HBB)。整个 T3SS 装置也被称为“注射体”。而效应蛋白最终将通过这个注射体侵染进入植物细胞，从而扰乱植物的防御系统。

4. 白叶枯病菌的相关效应子

根据结构和产物的不同，目前细菌的无毒基因可以分 *avrBs3/pthA* 家族和 *avrRxv/yopJ* 家族这两个家族，而发现的大部分无毒基因都是属于 *avrBs3/pthA* 家族，因此也把 *avrBs3/pthA* 家族统称为 *avr/pth* 家族或 *avrBs3* 家族。同时研究发现 *pthA* 基因家族的结构与 *avrBs3* 基因家族的结构存在着很高的相似性，正是由于存在这种相似度，显示 *avrBs3/pthA* 家族成员中无毒基因和有毒性基因是并存的。

avrBs3 基因是第一个从黄单胞菌中分离的 III 型分泌系统效应蛋白家族成员。研究人员对 *avrBs3* 进行了基因鉴定，他们将不同的 *Xcv* 菌株接种在易感品种(ECW)和抗性品种(*Capsicum annuum*)辣椒上。抗病品种 ECW-10R 和 ECW-30R 分别携带显性抗病基因 *Bs1* 和 *Bs3*，它们都是被引入到 ECW 背景中产生的近等基因系[16]。*Xcv* 菌株 71-21 和 82-8 特异性地诱导了 ECW-30R 品种产生一种阻止细菌进入的快速、

局部的植物细胞死亡的超敏反应(HR)。这表明这两个菌株中存在一个相应的无毒(*avr*)基因,称为 *avrBs3*。病原菌 *avr* 基因导致与携带匹配 R 基因的植物的互作不相容,而对易感植物仍然具有毒力的原因是存在互作相容[6] [17]。在大多数情况下,对病原体的特异性识别都会导致 HR 的产生。

由于 *avrBs3* 序列含有较高的 G + C 含量,这使得对其 DNA 序列进行分析变的非常困难。首先,使用 DNaseI 产生交错删除克隆并利用 Sanger 和 Maxam-Gilbert 的方法进行测序。奇怪的是,不同缺失克隆的序列看起来是相同的。事实上, *avrBs3* 基因的中心部分是由多个串联重复序列组成,每个重复序列含有几乎相同的 102 个碱基,存在 17.5 倍差异。利用 *avrBs3* 启动子融合表达分析和 Western blot 分析的方法表明,该基因是组成性表达的,产生了一个 122 kDa 蛋白(1164 aa),并且可以用特异性的多克隆抗体检测到[18]。

在第一个 *avrBs3* 基因发现后不久,研究人员利用 *avrBs3* 作为探针,从水稻白叶枯病菌 PXO99^A 中克隆了三个同源物(*avrXa5*、*avrXa7* 和 *avrXa10*) [19]。这些预测蛋白与 *avrBs3* 高度保守,它们包含相似的串联重复序列;但是重复序列的数量、顺序和长度均不同。且对 *avrBs3* 和 *avrXa10* 重复序列的比较首次表明,变异主要发生在 12 和 13 位[19]。研究还发现 *avrBs3* 家族 C 末端区域的核定位序列(NLSs)对其活性非常重要。此外,含有 NLS 的 *avrBs3* 家族的效应蛋白的 C-末端还含有一个酸性激活域(AD) [20]。

研究发现存在于 *avrBs3* 中的 NLSs 和 AD 这两个特征都是典型的真核基序,这表明 *avrBs3* 在植物细胞中有活性。对其它黄单胞菌的 *avrBs3* 同源序列分析发现这些序列是高度保守的。而将 *avrBs3* 通过农杆菌介导的基因转移表达到感病和抗性辣椒的叶片细胞中发现只有在耐药的 ECW-30R 中 HR 才被诱导,这至少依赖一个功能性 NLS [20]。并应用免疫细胞化学的方法,通过检测 Xcv T3S 系统在辣椒叶片组织中的传递,表明 *avrBs3* 确实定位于植物细胞核[21]。而 NLSs 对于 *avrBs3* 同系物的重要性也得到了证实,例如白叶枯病菌中的 *avrXa7*。事实上,AD 的突变和缺失都会使蛋白质失去活性,并且 AD 部分地功能可以被单纯疱疹病毒 VP16 的异源 AD 所取代,这也证明了该结构域的功能重要性[22] [23]。

5. 结论与展望

植物在与白叶枯病菌斗争的过程中往往会形成一种类似于“军备竞赛”协同进化的一个矛盾统一体。随着白叶枯病菌的不断进化,植物原有的对白叶枯病菌的免疫防御往往会失去功能,植物只有进化出新的免疫效应子才能对抗不断进化的白叶枯病菌。因此研究白叶枯病菌的致病机理及其侵染途径对防治水稻白叶枯病至关重要,也为植物与病原菌的相互作用提供借鉴。

参考文献

- [1] Bonas, U. and Boch, J. (2010) *Xanthomonas avrBs3* Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology*, **48**, 419-436. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>
- [2] Aslam, S.N., Newman, M.-A., Erbs, G., *et al.* (2008) Bacterial Polysaccharides Suppress Induced Innate Immunity by Calcium Chelation. *Current Biology*, **18**, 1078-1083. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.061>
- [3] Gross, A., Kapp, D., Nielsen, T., *et al.* (2005) Endocytosis of *Xanthomonas Campestris* Pathovar *Campestris* Lipopolysaccharides in Non-Host Plant Cells of *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist*, **165**, 215-226. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01245.x>
- [4] Büttner, D. (2012) Protein Export According to Schedule: Architecture, Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant and Animal-Pathogenic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **76**, 262-310. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05017-11>
- [5] Notti, R.Q. and Stebbins, C.E. (2016) The Structure and Function of Type III Secretion Systems. *Microbiology Spectrum*, **4**, VMBF-0004-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0004-2015>
- [6] Portaliou, A.G., Tsolis, K.C., Loos, M.S., *et al.* (2015) Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. *Trends in Biochemical Sciences*, **41**, 175-189. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.09.005>
- [7] Schraidt, O., Lefebvre, M.D., Brunner, M.J., *et al.* (2010) Topology and Organization of the Salmonella Typhimurium

Type III Secretion Needle Complex Components. *PLOS Pathogens*, **6**, e1000824.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000824>

- [8] Hu, B., Morado, D.R., Margolin, W., *et al.* (2014) Visualization of the Type III Secretion Sorting Platform of *Shigella flexneri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 1047-1052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411610112>
- [9] Makino, F., Shen, D., Kajimura, N., *et al.* (2016) The Architecture of the Cytoplasmic Region of Type III Secretion Systems. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 33341. <https://doi.org/10.1038/srep33341>
- [10] Journet, L., Agrain, C., Broz, P. and Cornelis, G.R. (2003) The Needle Length of Bacterial Injectisomes Is Determined by a Molecular Ruler. *Science*, **302**, 1757-1760. <https://doi.org/10.1126/science.1091422>
- [11] Erhardt, M., Singer, H.M., Wee, D.H., *et al.* (2011) An Infrequent Molecular Ruler Controls Flagellar Hook Length in *Salmonella enterica*. *EMBO Journal*, **30**, 2948-2961. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.185>
- [12] Monjaras, F.J., Garcia-Gomez, E., Espinosa, N., *et al.* (2012) Role of EscP (Orf16) in Injectosome Biogenesis and Regulation of Type III Protein Secretion in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **194**, 6029-6045. <https://doi.org/10.1128/JB.01215-12>
- [13] Wee, D.H. and Hughes, K.T. (2015) Molecular Ruler Determines Needle Length for the Salmonella Spi-1 Injectosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 4098-4103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423492112>
- [14] Parsot, C., Hamiaux, C. and Page, A.L. (2003) The Various and Varying Roles of Specific Chaperones in Type III Secretion Systems. *Current Opinion in Microbiology*, **6**, 7-14. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00002-4)
- [15] Thomas, N.A., Ma, I., Prasad, M.E., *et al.* (2012) Expanded Roles for Multicargo and Class 1B Effector Chaperones in Type III Secretion. *Journal of Bacteriology*, **194**, 3767-3773. <https://doi.org/10.1128/JB.00406-12>
- [16] Minsavage, G.V. (1990) Gene-for-Gene Relationships Specifying Disease Resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*—Pepper Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **3**, 41. <https://doi.org/10.1094/MPMI-3-041>
- [17] Hogenhout, S.A., Van Der Hoorn, R.A.L., Terauchi, R., *et al.* (2009) Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**, 115-122. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-2-0115>
- [18] Knoop, V., Staskawicz, B. and Bonas, U. (1991) Expression of the Avirulence Gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Is Not under the Control of *hrp* Genes and Is Independent of Plant Factors. *Journal of Bacteriology*, **173**, 7142. <https://doi.org/10.1128/JB.173.22.7142-7150.1991>
- [19] Hopkins, C.M. (1992) Identification of a Family of Avirulence Genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **5**, 451. <https://doi.org/10.1094/MPMI-5-451>
- [20] Ackerveken, G.V.D., Marois, E. and Bonas, U. (1997) Recognition of the Bacterial Avirulence Protein *avrBs3* Occurs inside the Host Plant Cell. *Cell*, **87**, 1307-1316. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81825-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81825-5)
- [21] Szurek, B., Rossier, O., Hause, G., *et al.* (2002) Type III-Dependent Translocation of the *Xanthomonas* *avrBs3* Protein into the Plant Cell. *Molecular Microbiology*, **46**, 13-23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03139.x>
- [22] Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., *et al.* (2001) Eukaryotic Features of the *Xanthomonas* Type III Effector *avrBs3*: Protein Domains Involved in Transcriptional Activation and the Interaction with Nuclear Import Receptors from Pepper. *Plant Journal*, **26**, 523-534. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01046.x>
- [23] Yang, B., Zhu, W., Johnson, L.B., *et al.* (2000) The Virulence Factor *AvrXa7* of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Is a Type III Secretion Pathway-Dependent Nuclear-Localized Double-Stranded DNA-Binding Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 9807-9812. <https://doi.org/10.1073/pnas.170286897>