柑橘黄龙病菌过氧化物还原酶基因 CLasPrx 的 克隆及功能分析

左溪如 王 淘 陈 烨 闫亚娜 黄桂艳* 李瑞民*

(赣南师范大学生命科学学院,江西赣州 341000)

摘要:为解析柑橘黄龙病菌亚洲种 Candidatus Liberibacter asiaticus(CLas)逃逸活性氧伤害的机理, 通过克隆其过氧化物还原酶(peroxiredoxin, Prx)编码基因的全长序列,对CLasPrx蛋白序列进行生 物信息学分析、多重比对及系统发育分析,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 CLasPrx 基因在柑橘不 同组织中的表达模式,并在本氏烟 Nicotiana benthamiana 叶肉细胞瞬时表达 CLasPrx 分析其编码蛋 白的 亚细胞定位,利用碘化钾法测定 CLasPrx 蛋白清除 H₂O₂的活性。结果显示,克隆得到的 *CLasPrx* 基因序列全长为 534 bp,编码 177 个氨基酸;CLasPrx 蛋白包含 1 个 Redoxin 保守结构域;多 重比对分析发现 CLasPrx 蛋白活性位点含有保守基序 PGAFTPTC;系统发育分析表明 CLasPrx 蛋 白与近缘物种的同源蛋白聚为一类;CLasPrx 基因在感染黄龙病柑橘树秋梢中的表达水平显著高 于在春梢中的表达水平;CLasPrx定位于本氏烟叶肉细胞的细胞质基质中;过表达 CLasPrx 蛋白能 够显著降低本氏烟叶肉细胞内 H₂O₂的含量。表明 CLasPrx 可能参与柑橘黄龙病菌清除 H₂O₂的过程。 关键词:柑橘黄龙病菌; 过氧化物还原酶; 表达分析; 亚细胞定位; 序列分析

Cloning and functional analysis of a peroxiredoxin gene, *CLasPrx*, from huanglongbing pathogen *Candidatus* Liberibacter asiaticus

Zuo Xiru Wang Tao Chen Ye Yan Yana Huang Guiyan^{*} Li Ruimin^{*} (College of Life Sciences, Gannan Normal University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China)

Abstract: To gain insights into the process of the huanglongbing pathogen *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLas) avoiding oxidative damage, the full-length sequence of the peroxiredoxin (Prx) gene *CLasPrx* was cloned and the encoded protein of the *CLasPrx* gene was analyzed through sequence analysis, multiple sequence alignment, and phylogenetic analysis. Additionally, the expression of the *CLasPrx* gene in various tissues was observed by real-time quantitative PCR, and its subcellular localization was determined by transient expression in mesophyll cells of *Nicotiana benthamiana*; the activity of CLasPrx gene was 534 bp in length and could encode a protein of 177 amino acids. A Redoxin domain was observed to be conserved in the CLasPrx protein, and multiple sequence alignment analysis indicated that the CLasPrx was clustered with the orthologous proteins of closely related species. The expression level of *CLasPrx* in the autumn shoots was significantly higher than in the spring shoots. Subcellular localization analysis indicated that CLasPrx was clustered that CLasPrx was clustered with the cytoplasm of me-

基金项目:国家自然科学基金(32260659),赣南师范大学2023年大学生创新创业训练计划项目(CX230074) * 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: huangguiyan@gnnu.edu.cn, liruimin@gnnu.edu.cn 收稿日期: 2023-11-20

sophyll cells of *N. benthamiana*. The level of H_2O_2 was significantly decreased due to the overexpression of the CLasPrx in *N. benthamiana*. This study revealed that CLasPrx might play an important role in the H_2O_2 scavenging process in CLas.

Key words: *Candidatus* Liberibacter asiaticus; peroxiredoxin; expression analysis; subcellular localization; sequence analysis

柑橘黄龙病是柑橘产业中最具毁灭性的病害之 一,其病原菌为柑橘黄龙病菌亚洲种 Candidatus Liberibacter asiaticus(CLas),属于韧皮部专性寄生细 菌,目前尚无法离体培养(Bové,2006)。该病害主 要通过柑橘木虱 Diaphorina citri 进行田间传播, CLas能够在柑橘木虱体内扩繁,柑橘木虱取食嫩梢 时 CLas 随唾液传递到植株的韧皮部筛管细胞内 (Hall et al., 2013; 杜一民等, 2023)。CLas 能够侵染 柑橘植株的茎、叶、果实和根部等组织,引起韧皮部 阻塞,导致植株生长迟缓、果实变小、果汁变酸甚至 树木死亡(Gottwald, 2010;姚廷山等, 2020)。由于 CLas无法离体培养,柑橘黄龙病的致病机理研究进 展缓慢, Ma et al. (2022)研究表明 CLas 侵染导致柑 橘韧皮部组织内活性氧含量迸发,使组织处于持续 的高浓度活性氧水平,最终引发细胞死亡。那么, CLas 如何躲避高浓度活性氧的伤害,进而实现多组 织的侵染是解析黄龙病的致病机理关键之一。

生物体内存在复杂的清除活性氧的酶系统,包 括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、过 氧化氢酶(catalase,CAT)、硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)、过氧化物还原酶(peroxiredoxin,Prx)、谷胱甘 肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GPX)、抗坏 血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase,APX)和谷胱 甘肽还原酶(glutathione reductase,GR)等(Zhang et al.,2020;Yang et al.,2021;Zhang et al.,2023)。Prx 是一种巯基过氧化物酶,参与过氧化物清除及信号 转导,在细胞内行使分子伴侣、酶激活剂、蛋白质结 合伴侣和氧化还原传感器等功能(Sevilla et al., 2015)。Prx 在多种亚细胞中存在,如细胞质基质、 线粒体、叶绿体和细胞核等(Dietz,2011)。

CLas 基因组大小约1.23 Mb,有1136个基因 (Duan et al.,2009),含多个与活性氧清除相关的蛋 白编码基因,如*Lasprx5*为Prx 基因,*Lasbcp*为Trx依 赖的硫醇过氧化物酶基因(Jain et al.,2018)。然而, 这些基因的功能目前仍不清楚。为探究 CLas 中清 除活性氧相关酶的功能,本研究从 CLas 基因组克隆 获得 *CLasPrx* 基因,对其进行序列测定及生物信息 学分析,使用实时荧光定量 PCR 技术分析其在感染 CLas不同时期的柑橘样品中的表达模式,利用亚细胞定位技术分析 CLasPrx 在植物细胞内的定位,通过瞬时表达法分析 CLasPrx 清除 H₂O₂的活性,以期为深入解析 CLas 的致病机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料及质粒:2年生纽荷尔脐橙Citrus sinensis cv. Newhall 植株购自江西友华农业科技发 展有限公司,种植于赣南师范大学柑橘种质资源圃 隔离温室内,从感染黄龙病植株上采集斑驳黄化的 成熟叶片,同时从健康植株上采集健康成熟叶片,带 回实验室于-80 ℃保存供试。本氏烟 Nicotiana benthamiana 种子由本实验室保存并提供,种植于人工 气候培养室内,培养温度为(22±2)℃、相对湿度为 (60±10)%、光周期为16 L/8 D、光照强度为5 000 lx, 培养25d后供试。根据柑橘黄龙病树的"红鼻子"果 及斑驳黄化叶片症状,在2022年11月于江西省赣州 市信丰县果园采集感染黄龙病的纽荷尔脐橙春梢和 秋梢样品,带回实验室在-80℃保存供试。含绿色 荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的植物表 达质粒pCAMBIA2300-GFP由赣南师范大学国家脐 橙工程研究中心提供。

供试培养基:LB(Luria-Bertani)液体培养基配 方为胰蛋白胨10g、氯化钠10g、酵母提取物5g, ddH₂O定容至1L;在LB液体培养基配方中加入琼 脂粉18g即制得LB固体培养基。

试剂: EasyPure[®]植物基因组DNA提取试剂盒、 EasyPure[®]植物总RNA提取试剂盒、PerfectStart[®] Green qPCR SuperMix实时荧光定量PCR预混液、 EasyScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix反转录试剂盒、pEASY[®]-T1克隆 试剂盒、pEASY[®]-Basic SeamLess同源重组试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; Marker III DNA Ladder,上海源叶生物科技有限公司; 2×Easy Taq PCR SuperMix PCR预混液、凝胶清洁回收试剂盒、 质粒小提试剂盒,浙江易思得生物科技有限公司; PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 高保真扩增酶, 日本 TaKaRa 公司; Xba I、Sac I限制性内切酶,美国 NEB公司;大肠杆菌 Escherichia coli Top10感受态细胞、根癌农杆菌 Agrobacterium tumefaciens GV3101 感受态细胞,上海唯地生物技术有限公司;硫酸卡那 霉素、利福平、庆大霉素,北京酷来搏科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

仪器:DYCP-44P型快速凝胶电泳仪,北京六一 生物科技有限公司;TL2010S组织研磨仪,北京吴诺 斯科技有限公司;C1000 PCR仪,美国Bio-Rad公 司;ABI StepOne™荧光定量PCR仪,美国ABI公司; NanoDrop One超微量紫外分光光度计,美国ThermoFisher公司;ProteinSimple AlphaImager Mini凝胶 成像系统,美国ProteinSimple公司;Leica TCS SP8 X共聚焦显微镜,德国徕卡公司;UV-6100S紫外可 见分光光度计,上海元析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 脐橙叶片中脉基因组DNA提取及CLas检测

取2~3片纽荷尔脐橙斑驳黄化成熟叶片,用手 术刀切除叶片叶肉组织,保留叶片中脉,随后将其切 成长1~2mm的碎块,放入2mL离心管中,放入研磨 钢珠,液氮速冻后利用组织研磨仪研磨均匀,使用 EasyPure®植物基因组 DNA 提取试剂盒参照说明书 提取中脉基因组 DNA,经1.5% 琼脂糖凝胶电泳检 测基因组 DNA 的质量,用超微量紫外分光光度计测 定基因组DNA的浓度,取合格的DNA供试。以提 取的叶片中脉基因组 DNA 为模板,用 CLas 检测引 物CQULA03-F(5'-CAAGGAAAGAGCGTAGAA-3') 和CQULA03-R(5'-CCTCAAGATCGGGTAAAG-3') 进行实时荧光定量 PCR 检测(Wang et al., 2006),本 研究所有引物均由北京擎科生物科技股份有限公司 合成。25 µL反应体系: PerfectStart[®] Green qPCR SuperMix 12.5 µL、基因组 DNA 100 ng、CQULA03-F/ CQULA03-R各0.8 µL, ddH, O补齐至25 µL; 反应条 件:98 ℃反应10 min;98 ℃变性15 s,60 ℃退火15 s, 72 ℃延伸15 s,40个循环;98 ℃变性1 min,降温至 60 ℃, 以 0.15 ℃/s 梯度升温至 98 ℃。根据本课题 组前期构建的CLas浓度标准曲线(Liu et al., 2024) 计算纽荷尔脐橙叶片中脉CLas浓度。

1.2.2 CLasPrx基因扩增及序列分析

以1.2.1制备的感染 CLas 纽荷尔脐橙叶片中脉 DNA 为模板,以健康脐橙叶片中脉 DNA 为阴性 对照(提取方法同1.2.1),使用特异扩增引物 T-CLasPrx-F(5'-ATGATCCGATTTCAAATACCTCAA-G-3')和 T-CLasPrx-R(5'-CTATTTTTTACTTTCTC- GAATAACTTTTTAAAAC-3′)采用PCR技术扩增 CLasPrx 基因全长。25 μL反应体系:PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 高保真酶预混液 12.5 μL、T-CLasPrx-F/T-CLasPrx-R各1 μL、基因组DNA 100 ng, ddH₂O补齐至25 μL;反应条件:95 ℃预变性5 min; 95 ℃变性30 s,60 ℃退火45 s,72 ℃延伸45 s,30 个 循环。获得的PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳 检测,利用凝胶清洁回收试剂盒回收扩增产物,连接 到*pEASY*-T1载体上,转化至大肠杆菌Top10感受态 细胞中,涂布于含50 μg/mL硫酸卡那霉素的LB固 体平板上,于37 ℃恒温过夜培养后挑取单克隆菌落 进行PCR检测,反应体系和反应程序同上述基因克 隆方法,检测正确的阳性单克隆送北京擎科生物科 技股份有限公司测序。

基于测序所得序列,通过Compute pI/Mw 在线 工具(Bjellqvist et al., 1994)预测其编码的CLasPrx 蛋白的分子量和等电点,使用SignalP 6.0软件 (Teufel et al., 2022)和DeepTMHMM 1.0.24软件 (Hallgren et al., 2022)分别预测CLasPrx蛋白是否具 有信号肽和跨膜结构,使用SMART在线工具(Letunic et al., 2021)预测CLasPrx蛋白序列的保守结构 域,并利用IBS 1.0.3软件(Liu et al., 2015)绘制 CLasPrx蛋白保守结构域模式图。另外,通过SOP-MA在线工具(Geourjon & Deleage, 1995)和Phyre2 在线工具(Kelley et al., 2015)分别预测CLasPrx蛋 白的二级和三级结构,参数设置均为默认,并通过 Swiss-PDB Viewer 4.0.1软件对三级结构进行展示, 参数设置为默认。

1.2.3 CLasPrx 蛋白序列比对及系统发育分析

利用在线 BLAST 程序获得 CLasPrx 在其他物种基因组中的同源蛋白,下载相应蛋白序列,使用CLC Sequence Viewer 8.0.0 软件进行多序列比对,分析 CLasPrx 与其他物种同源蛋白的系统发育关系,比对参数 Gap open cost 设为 10.0, Gap extension cost 设为 1.0, Alignment 选择 Very accurate(slow)模式。利用 MEGA 11 软件(Tamura et al., 2021)进行系统发育分析,使用邻接法构建系统发育树,Bootstrap 值设为 1000 次。

1.2.4 CLasPrx基因表达模式分析

为探究脐橙感染黄龙病后不同时期的 CLasPrx 基因的时序表达模式,使用 EasyPure[®]植物总 RNA 提取试剂盒参照说明书提取采集的脐橙春梢和秋梢 叶片的总 RNA,经1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 用超微量紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度,随后 通过 *EasyScript*[®] One-Step gDNA Removal and cD-NA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒反转录获得 cDNA备用。使用 PrimerQuest[™] Tool 在线工具设计 *CLasPrx* 基因的定量引物 CLasPrx-q-F(5'-GGTTTA-CGTTCTTGGCGTTATG-3')和 CLasPrx-q-R(5'-TC-ATAAGGATCTGTAGCGCAATTA-3'),以 CLas 的 16S rRNA 作为内参基因(Yan et al., 2013),引物为 CLas16srRNA-q-F(5'-GGATAACGCATGGAAACG-TGTGCT-3')和 CLas16srRNA-q-R(5'-AATCCAAC-GCAGGCTCATCTCTCT-3'),PCR 反应体系和扩增 及荧光检测反应条件同1.2.1,使用 2^{-MCT}法(Livak & Schmittgen, 2001)分析 *CLasPrx*的时空表达模式,每 个时期样品各3个生物学重复。

1.2.5 CLasPrx蛋白亚细胞定位分析

为分析CLasPrx蛋白的亚细胞定位,使用同源 重组法将 CLasPrx 基因构建到 pCAMBIA2300-GFP 质粒上,扩增引物为2300-CLasPrx-F(5'-AGAACA-CGGGGGACGAGCTCATGATCCGATTTCAAATAC-CTCAAG-3')和2300-CLasPrx-R(5'-ACCATGGTG-TCGACTCTAGATTTTTTACTTTCTCGAATAACT-TTTAAAAC-3′),下划线标注序列分别为限制性酶 Xba I和 Sac I酶切位点序列, PCR 反应体系和扩增 条件同1.2.2, 通过 pEASY®-Basic SeamLess 同源重组 试剂盒参照说明书进行重组反应,重组产物转化至 大肠杆菌 Top10 感受态细胞中,涂布于含 50 µg/mL 硫酸卡那霉素的LB固体平板上,于37℃恒温过夜培 养后挑取单克隆菌落进行 PCR 检测, PCR 反应体系 和扩增条件同1.2.2,检测正确的阳性单克隆送北京 擎科生物科技股份有限公司测序。使用质粒小提试 剂盒提取正确阳性单克隆菌液的重组质粒,转入根 癌农杆菌GV3101感受态细胞中,涂布于含50 µg/mL 硫酸卡那霉素、20 µg/mL利福平和 40 µg/mL 庆大 霉素的LB固体平板上,于28℃恒温培养2~3d后挑 取单克隆菌落进行 PCR 检测, PCR 反应体系和扩 增条件同1.2.2,对PCR检测正确的阳性单克隆进行 扩繁,即将单克隆挑取至含50 µg/mL 硫酸卡那霉 素、20 μg/mL利福平和40 μg/mL 庆大霉素的LB液 体培养基中,于28 ℃恒温过夜后以200 r/min振荡 培养8h,再以5000 r/min离心5 min收集菌体,加入 0.04 mol/L MES(4-morpholineethanesulfonic acid)重 悬液重悬,使用紫外可见分光光度计测定重悬液的 OD_{600 m}值,随后稀释至OD_{600 m}值为0.8,室温静置1h 备用。利用一次性无菌注射器将500 µL 重悬液注 射入生长25d的1片活体本氏烟叶片中,每次注射 3片叶片,试验设3次生物学重复,注射2d后取样并 使用共聚焦显微镜观察荧光,在激发光波长488 nm 下观察细胞内绿色荧光蛋白(UV场)和叶绿体(叶 绿体自发光场),在激发光波长405 nm下观察细胞 轮廓(明场),利用共聚焦显微镜软件叠加UV场、叶 绿体自发光场和明场组成叠加场。

1.2.6 CLasPrx 蛋白清除H₂O₂活性分析

取生长25 d的本氏烟烟叶片,在叶片左右两侧 分别注射500 μL包含 pCAMBIA2300-GFP 空载体和 1.2.5 制备的 pCAMBIA2300-GFP-CLasPrx 的根癌农 杆菌重悬液,试验设6次重复,注射2 d后取样测定 叶片中H₂O₂含量。使用碘化钾法(Ma et al.,2022)测 定H₂O₂含量,将采集的本氏烟叶片迅速切成0.5 cm× 0.5 cm大小,置于1.5 mL预冷0.1% 三氯乙酸溶液中, 使用组织研磨仪研磨成匀浆,于4 ℃以12 000 r/min 离心10 min 后收集上清液,取0.3 mL上清液,加入 K₃PO₄缓冲液1.7 mL和碘化钾溶液1.0 mL,室温孵育 5 min 后在390 nm 处测定反应液的吸光度,通过标 准曲线计算叶片中H₂O₂的含量。

1.3 数据分析

使用 SPSS 25.0 软件对试验数据进行统计分析, 应用 *t* 测验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 CLasPrx基因序列的克隆及生物信息学分析

克隆得到的 CLasPrx 基因序列全长为 534 bp, 编码 177 个氨基酸(图1),将该序列上传到 NCBI 数 据库,获得登录号为 OQ024188。CLasPrx 蛋白分子 量为 20.19 kD,等电点为 5.76,N 端不含典型的信号 肽结构;DeepTMHMM 预测结果显示 CLasPrx 蛋白 位于细胞内,无跨膜结构域。



M: Marker III DNA ladder; 1: *CLasPrx* 基因克隆产物; 2: 阴 性对照。M: Marker III DNA ladder; 1: amplification products of the *CLasPrx* gene; 2: negative control.

图1 柑橘黄龙病菌过氧化物还原酶基因 CLasPrx 的克隆 Fig. 1 Cloning of the peroxiredoxin CLasPrx gene from Candidatus Liberibacter asiaticus

2.2 CLasPrx蛋白保守结构域及二级结构分析

SMART 预测结果表明 CLasPrx 蛋白包含1个 Redoxin保守结构域,由第14~158位氨基酸组成,属 于典型的 Prx(图 2-A)。CLasPrx 蛋白的二级结构由 $\alpha 螺旋、\beta 折叠、\beta 转角和不规则卷曲组成,其中不规$ 则卷曲覆盖 85个氨基酸,占 CLasPrx 蛋白全长序列 $的48.02%;<math>\alpha$ 螺旋覆盖 42个氨基酸,占 CLasPrx 蛋白 全长序列的 23.73%; β 折叠覆盖 40个氨基酸,占 CLasPrx 蛋白全长序列的22.60%; β 转角覆盖 10个氨 基酸,占 CLasPrx 蛋白全长序列的5.65%(图 2-B、C)。



图2 柑橘黄龙病菌过氧化物还原酶CLasPrx蛋白保守 结构域(A)及二级结构(B~C)分析

Fig. 2 Analysis of the conserved domain (A) and secondary structure (B–C) of the peroxiredoxin CLasPrx from *Candidatus* Liberibacter asiaticus

2.3 CLasPrx蛋白的三级结构分析

基于同源建模法预测的 CLasPrx 蛋白的三级结构由 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和不规则卷曲构成,四者相间排列,在保守结构域中活性位点区域形成一个空穴结构(图3)。

2.4 CLasPrx蛋白的多重序列比对结果

CLasPrx蛋白与近缘物种同源蛋白序列的多重 比对结果显示,Prx蛋白在不同物种中高度保守,Prx 蛋白特有保守基序为PXXXTXXC,在本研究多重 序列比对结果中,保守基序序列为PGAFTPTC(图 4),该基序是Prx的活性中心。

2.5 CLasPrx蛋白系统发育分析

系统发育分析结果表明, CLasPrx 蛋白与柑橘 黄龙病菌非洲种C. Liberibacter africanus、欧洲种C. Liberibacter europaeus、美洲种C. Liberibacter americanus、马铃薯斑纹片病菌C. Liberibacter solanacearum及桉梳木虱相关韧皮部菌C. Liberibacter ctenarytainae的Prx蛋白聚为一类,而韧皮部杆菌属细菌*Liberibacter crescens*与不同巴尔通体菌*Bar-tonella* spp.的Prx蛋白聚为一类(图5)。



螺旋状结构为 α 螺旋,箭头状结构为 β 折叠, β 转角位于2个 β 折叠结构之间,其他部分为不规则卷曲。 The helical structures are α -helix, the arrow-shaped structures are β -fold, the β turns are located between two β -fold structures, and the remaining parts are irregularly coiled.

图3 柑橘黄龙病菌过氧化物还原酶CLasPrx蛋白的 三级结构预测

Fig. 3 Tertiary structure prediction of the peroxiredoxin CLasPrx from *Candidatus* Liberibacter asiaticus

2.6 CLasPrx 基因表达分析

CLasPrx 基因定量分析结果表明,CLasPrx 在感 染 CLas 脐橙树秋梢中的相对表达量显著高于在春梢中的相对表达量(图 6),说明 CLasPrx 在感染 CLas 脐橙树的不同发育时期叶片中的表达量存在 差异,可能与其生物学功能有关。

2.7 CLasPrx蛋白亚细胞定位分析

利用本氏烟叶片瞬时表达CLasPrx蛋白,荧光 检测结果显示CLasPrx定位于细胞质基质,由于本 氏烟叶肉细胞有很大的中央液泡,所以CLasPrx蛋 白荧光信号被挤压到细胞膜附近(图7)。

2.8 CLasPrx蛋白清除H₂O₂活性分析

通过在本氏烟叶片中瞬时表达空载体和CLasPrx 蛋白,分析发现过表达CLasPrx的本氏烟叶片中H₂O₂ 含量显著下降(图8),表明CLasPrx参与本氏烟叶片 中H₂O₂的清除过程。

3 讨论

植物与病原菌互作机制的解析可以为病原菌防 控提供理论支持(Dodds & Rathjen, 2010)。由于不 同病原菌生存策略迥异(Velásquez et al., 2018),在 研究植物与病原菌互作机制过程中,需要深入分析 植物细胞与病原菌在特定微环境下的应答方式 (Busby et al., 2014)。柑橘黄龙病是制约柑橘产业 发展的毁灭性病害,而CLas无法离体培养则为阐明 柑橘与CLas互作的分子基础带来了较大难度,因此防治柑橘黄龙病的策略研究进展缓慢。



氨基酸背景颜色使用 RasMol 配色方案,不同颜色代表氨基酸极性不同(https://webmail.life.nthu.edu.tw/~fmhsu/rasframe/SHAPELY.HTM); 柱状图纵轴代表每个氨基酸比对位点的一致性, 横轴代表氨基酸比对位点的位置; WP_012778530、WP_047263944、WP_076969053、WP_007557004、MBY7649289、WP_015273470、WP_004861151、WP_082251047、WP_241437460、WP_183228982、WP_183194594、WP_208431573、WP_006924290和MBL0848521序列分别来自柑橘黄龙病菌亚洲种、柑橘黄龙病菌非洲种、马铃薯斑纹片病菌、柑橘黄龙病菌美洲种、C. Liberibacter ctenarytainae、*Liberibacter crescens、Bartonella taylorii、B. henselae、B. machadoae、B. callosciuri、B. figuanensis、B. doshiae、B. washoeensis*和柑橘黄龙病菌欧洲种; PXXXTXXC 所示为 Prx 蛋白特有基序。The amino acid background color uses the RasMol color scheme, different colors represent different amino acid polarities (https://webmail.life.nthu.edu.tw/~fmhsu/rasframe/SHAPELY.HTM). The vertical axis of the bar chart represents the identity of each amino acid alignment position, and the horizontal axis represents the position of the amino acid alignment position, and the horizontal axis represents the position of the amino acid alignment position, wP_004861151, WP_208431573, WP_006924290, and MBL0848521 are from C. Liberibacter asiaticus, C. Liberibacter africanus, C. Liberibacter solanacearum, C. Liberibacter americanus, C. Liberibacter ctenarytainae, *Liberibacter crescens, Bartonella taylorii, B. henselae, B. machadoae, B. callosciuri, B. figuanensis*, *B. Advisio*, WP_183228982, WP_183194594, WP_208431573, WP_006924290, and MBL0848521 are from C. Liberibacter asiaticus, C. Liberibacter africanus, C. Liberibacter solanacearum, C. Liberibacter americanus, *C. Liberibacter crescens, Bartonella taylorii, B. henselae, B. machadoae, B. callosciuri, B. figuanensis*, *B. doshiae*, *B. machadoae*, *B. callosciuri*, *B. figuanensis*, *B. doshiae*, *B. washoeensis*, and *C. Liberibacter crescens*, *Bartonella taylorii*, *B. henselae*, *B. machadoae*, *B. callosciuri*, *B. figuanensis*, *B. doshiae*, *B. washoeensis*, and *C. Liberibacter crescens*, *Bartonella*, *B. protei*, *B. machadoae*, *B. callosciuri*, *B. figuanensis*, *B. doshiae*, *B. washoeensis*, and *C. Liberibact*

图4 柑橘黄龙病菌过氧化物还原酶CLasPrx蛋白多重序列比对

Fig. 4 Multiple sequences alignment analysis of the peroxiredoxin CLasPrx from Candidatus Liberibacter asiaticus

柑橘基因组中存在多条编码SOD、CAT、Trx、 Prx、GPX、APX和GR等清除活性氧相关酶的基因 (Liu et al., 2022; Ma et al., 2022),而成熟的植物筛 管细胞没有细胞核,无法独立完成转录调控过程,所 需养分由伴胞提供(Matilla, 2023)。在CLas侵染植 物筛管细胞后,筛管细胞内活性氧迸发,清除活性氧 的相关酶依赖于伴胞提供,考虑到SOD、CAT、Trx、 Prx、GPX、APX和GR等蛋白亚细胞定位情况,推测 以上清除活性氧的相关酶依赖于非经典分泌途径从 伴胞进入筛管细胞(Rabouille,2017)。而CLas定殖 于筛管细胞内,CLas从筛管细胞获取繁殖所需原料 和能量,进一步增强了筛管细胞活性氧的积累。本 研究结果表明,CLasPrx 基因在脐橙春梢和秋梢中 的表达水平存在显著差异,秋梢为新生组织,CLas 侵染后处于前期增殖阶段,会导致CLas与柑橘筛管 细胞所处环境活性氧含量激增,因而高表达CLasPrx



图5 基于Prx蛋白序列采用邻接法构建的柑橘黄龙病菌及其他病原菌的系统发育树







图中数据为平均数±标准差。**表示经t测验法检验差 异显著(P<0.01)。Data are mean±SD. ** indicates significant differences by t test (P<0.01).

Prx 含有保守的半胱氨酸残基,介导细胞内过 氧化物的清除(Dietz,2011)。CLasPrx 蛋白活性中 心具有保守基序 PXXXTXXC,包含1个半胱氨酸残 基,与棉花的 Prx 序列(Feng et al.,2021)和烟曲霉菌 Aspergillus fumigatus 的 Prx 序列(Hillmann et al., 2016)一致,说明 Prx 在不同生物中的功能相对保 守。Prx 在细胞中定位差别较大,比如拟南芥 Arabidopsis thaliana 的 AtSrx 定位于叶绿体和线粒体中 (Liu et al., 2006; Rey et al., 2007),智人 Homo sapiens 的 hPrx V定位于过氧化物酶体、细胞质基质、线 粒体和细胞核中(Woo et al., 2005)。本研究发现 CLasPrx 定位于细胞质基质中,可能是由于 CLas属 于原核生物,而原核生物进行催化反应的区室化程 度远低于真核生物,CLasPrx 游离在细胞质基质中 可参与活性氧的清除。

柑橘黄龙病菌侵染诱导柑橘韧皮部组织内活性 氧迸发,在持续高水平活性氧胁迫下柑橘代谢紊乱, 导致细胞死亡,树势衰退(Ma et al.,2022)。然而 CLas 在柑橘韧皮部筛管细胞高浓度活性氧微环境 中可以生存,预示着 CLas 存在清除活性氧的能力。 CLas 基因组编码1136个基因,本研究中的 *CLasPrx* 基因功能注释为 Prx,可能与 CLas 清除活性氧的生 物学过程密切相关。本研究发现过表达 CLasPrx 蛋 白显著降低了本氏烟叶肉细胞内 H₂O₂的含量,表明 CLasPrx 参与细胞局部环境活性氧稳态的调节,由 于 CLasPrx 属于胞内蛋白,不能分泌到胞外,因此推 测 CLasPrx 在维持 CLas 细胞内的活性氧平衡代谢 过程中发挥着重要作用。然而 *CLasPrx* 基因的分子 功能仍需利用原核表达或遗传转化技术进行深入 研究。



GFP: UV场,激发光波长488 nm; CHI: 叶绿体自发光场,激发光波长488 nm; DIC: 明场; Merge: 叠加场。Free GFP: 瞬时表达空载体; CLas-PRX-GFP: 瞬时表达 CLasPrx 融合 GFP 蛋白。GFP: UV field, the excitation wavelength is 488 nm; CHI: chloroplast auto-fluorescence field, the excitation wavelength is 488 nm; DIC: bright field; Merge: merged field. Free GFP: Transient expression of empty vector; CLas-PRX-GFP: transient expression of CLasPrx fused GFP protein.

图7 柑橘黄龙病菌过氧化物还原酶CLasPrx蛋白的亚细胞定位分析

Fig. 7 Subcellular localization analysis of the peroxiredoxin CLasPrx from Candidatus Liberibacter asiaticus





图8 柑橘黄龙病菌过氧化物还原酶CLasPrx清除H₂O₂活性

Fig. 8 Analysis of H₂O₂ scavenging activity of the peroxiredoxin CLasPrx from *Candidatus* Liberibacter asiaticus **表示经t测验法检验差异显著(P<0.01)。** indicates significant difference by t test (P<0.01).</p>

参考文献 (References)

Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE. 1994. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. Electrophoresis, 15(1): 529-539

- Bové JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology, 88(1): 7–37
- Busby PE, Newcombe G, Dirzo R, Whitham TG. 2014. Differentiating genetic and environmental drivers of plant-pathogen community interactions. Journal of Ecology, 102(5): 1300–1309
- Dietz KJ. 2011. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. Antioxidants & Redox Signaling, 15(4): 1129–1159
- Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. Nature Reviews Genetics, 11(8): 539–548
- Du YM, Chen HX, Cheng GQ, Ouyang ZG, Yu HZ, Lu ZJ. 2023. Functional response and prey preference of beautiful lacewing *Chrysopa formosa* to adult of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. Journal of Plant Protection, 50(4): 1025-1032 (in Chinese) [杜一民, 陈晗馨, 程高祺, 欧阳智刚, 余海中, 卢占军. 2023. 丽 草蛉对柑橘木虱成虫的捕食功能反应及捕食偏好. 植物保护 学报, 50(4): 1025-1032]
- Duan YP, Zhou LJ, Hall DG, Li WB, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, et al. 2009. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22(8): 1011–1020
- Feng YL, Wei RH, Liu AY, Fan SM, Che JC, Zhang Z, Tian BM, Yuan YL, Shi GY, Shang HH. 2021. Genome-wide identification, evolution, expression, and alternative splicing profiles of peroxiredoxin genes in cotton. PeerJ, 9: e10685

- Geourjon C, Deléage G. 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. Bioinformatics, 11(6): 681–684
- Gottwald TR. 2010. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. Annual Review of Phytopathology, 48: 119–139
- Hall DG, Richardson ML, Ammar ED, Halbert SE. 2013. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. Entomologia Experimentalis et Applicata, 146(2): 207–223
- Hallgren J, Tsirigos KD, Pedersen MD, Almagro Armenteros JJ, Marcatili P, Nielsen H, Krogh A, Winther O. 2022. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. bioRxiv: doi.org/10.1101/2022.04.08.487609
- Hillmann F, Bagramyan K, Straßburger M, Heinekamp T, Hong TB, Bzymek KP, Williams JC, Brakhage AA, Kalkum M. 2016. The crystal structure of peroxiredoxin Asp f3 provides mechanistic insight into oxidative stress resistance and virulence of *Aspergillus fumigatus*. Scientific Reports, 6: 33396
- Jain M, Munoz-Bodnar A, Zhang SJ, Gabriel DW. 2018. A secreted 'Candidatus Liberibacter asiaticus' peroxiredoxin simultaneously suppresses both localized and systemic innate immune responses in planta. Molecular Plant-Microbe Interactions, 31(12): 1312–1322
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nature Protocols, 10(6): 845–858
- Letunic I, Khedkar S, Bork P. 2021. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. Nucleic Acids Research, 49(D1): 458–460
- Liu C, Chang XP, Li FX, Yan YN, Zuo XR, Huang GY, Li RM. 2024. Transcriptome analysis of *Citrus sinensis* reveals potential responsive events triggered by *Candidatus* Liberibacter asiaticus. Protoplasma, 261(3): 499–512
- Liu HMZ, Wang X, Liu SJ, Huang Y, Guo YX, Xie WZ, Liu H, Tahir ul Qamar M, Xu Q, Chen LL. 2022. Citrus Pan-Genome to Breeding Database (CPBD): a comprehensive genome database for citrus breeding. Molecular Plant, 15(10): 1503–1505
- Liu WZ, Xie YB, Ma JY, Luo XT, Nie P, Zuo ZX, Lahrmann U, Zhao Q, Zheng YY, Zhao Y, et al. 2015. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. Bioinformatics, 31(20): 3359–3361
- Liu XP, Liu XY, Zhang J, Xia ZL, Liu X, Qin HJ, Wang DW. 2006. Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. Cell Research, 16(3): 287–296
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Cr}$ method. Methods, 25(4): 402–408
- Ma WX, Pang ZQ, Huang XE, Xu J, Pandey SS, Li JY, Achor DS, Vasconcelos FNC, Hendrich C, Huang YX, et al. 2022. Citrus huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. Nature Communications, 13: 529
- Matilla AJ. 2023. The interplay between enucleated sieve elements and companion cells. Plants, 12(17): 3033

Rabouille C. 2017. Pathways of unconventional protein secretion.

Trends in Cell Biology, 27(3): 230-240

- Rey P, Bécuwe N, Barrault MB, Rumeau D, Havaux M, Biteau B, Toledano MB. 2007. The *Arabidopsis thaliana* sulfiredoxin is a plastidic cysteine-sulfinic acid reductase involved in the photooxidative stress response. The Plant Journal, 49(3): 505–514
- Sevilla F, Camejo D, Ortiz-Espín A, Calderón A, Lázaro JJ, Jiménez A. 2015. The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. Journal of Experimental Botany, 66(10): 2945–2955
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution, 38(7): 3022–3027
- Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Gíslason MH, Pihl SI, Tsirigos KD, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2022. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. Nature Biotechnology, 40(7): 1023–1025
- Velásquez AC, Castroverde CDM, He SY. 2018. Plant-pathogen warfare under changing climate conditions. Current Biology, 28(10): 619–634
- Wang Z, Yin Y, Hu H, Yuan Q, Peng G, Xia Y. 2006. Development and application of molecular-based diagnosis for '*Candidatus* Liberibacter asiaticus', the causal pathogen of citrus huanglongbing. Plant Pathology, 55(5): 630–638
- Woo HA, Jeong W, Chang TS, Park KJ, Park SJ, Yang JS, Rhee SG. 2005. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. Journal of Biological Chemistry, 280(5): 3125–3128
- Yan Q, Sreedharan A, Wei SP, Wang JH, Pelz-Stelinski K, Folimonova S, Wang N. 2013. Global gene expression changes in *Candidatus* Liberibacter asiaticus during the transmission in distinct hosts between plant and insect. Molecular Plant Pathology, 14(4): 391–404
- Yang FW, Zhang HB, Wang Y, He GQ, Wang JC, Guo DD, Li T, Sun GY, Zhang HH. 2021. The role of antioxidant mechanism in photosynthesis under heavy metals Cd or Zn exposure in tobacco leaves. Journal of Plant Interactions, 16(1): 354–366
- Yao TS, Zhou Y, Achor D, Li JY, Wang N, Zhou CY. 2020. Inhibition effect of oxytetracycline on citrus huanglongbing and its effect on citrus yield and quality. Journal of Plant Protection, 47(6): 1353–1361 (in Chinese) [姚廷山,周彦, Achor D, Li JY, Wang N,周常勇. 2020. 土霉素对柑橘黄龙病的防治效果及对柑橘 产量和品质的影响. 植物保护学报, 47(6): 1353–1361]
- Zhang HB, Yao TT, Wang Y, Wang JC, Song JQ, Cui CC, Ji GX, Cao JN, Muhammad S, Ao H, et al. 2023. Trx CDSP32-overexpressing tobacco plants improves cadmium tolerance by modulating antioxidant mechanism. Plant Physiology and Biochemistry, 194: 524–532
- Zhang HH, Li X, Guan YP, Li MB, Wang Y, An MJ, Zhang YH, Liu GJ, Xu N, Sun GY. 2020. Physiological and proteomic responses of reactive oxygen species metabolism and antioxidant machinery in mulberry (*Morus alba* L.) seedling leaves to NaCl and NaH-CO₃ stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 193: 110259

(责任编辑:李美娟)