

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2025.32006

疣粒野生稻中 *OgXa13* 的克隆和功能研究

张正康^{1,**} 苏延红^{1,**} 阮孙美¹ 张 敏¹ 张 攀¹ 张 慧² 曾千春²
罗 琼^{1,*}

¹ 云南农业大学云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南昆明 650201; ² 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201

摘 要: 白叶枯病是水稻生产中最严重的细菌性病害。优良抗病基因的挖掘和育种利用是防治该病害最经济有效的方法。疣粒野生稻(*Oryza meyeriana*)具有对白叶枯病高抗甚至免疫的特性, 是白叶枯病抗性基因资源的天然宝库。课题组在疣粒野生稻转录组和基因组测序的基础上, 从疣粒野生稻中克隆了水稻白叶枯抗性基因 *OsXa13* 的同源基因 *OgXa13* 的 cDNA 和含 UTR 区域的 8908 bp 基因组序列。序列分析结果显示, *OgXa13* 基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 与水稻中感病基因 *OsXa13* 的基因组结构和核心启动子序列均一致。*OgXa13* 与水稻 *OsXa13* 的蛋白序列有 21 个氨基酸的差异, 其中 4 个氨基酸的替换差异位于 MtN3.1 结构域。过表达 *OgXa13* 的感病水稻 TP309 植株白叶枯病的抗性显著增强, 推测氨基酸序列差异导致了 *OgXa13* 与 *OsXa13* 蛋白功能的不同, *OgXa13* 可作为一个显性白叶枯病抗性基因在育种中利用。利用 CRISPR/Cas9 敲除日本晴中感病基因 *OsXa13* 的 T₁ 代纯合株系对白叶枯病的抗性也明显增强, 表明通过 CRISPR/Cas9 编辑感病基因 *OsXa13* 是改良水稻对白叶枯病抗性的有效途径。该研究为水稻白叶枯病抗性育种提供了有价值的新基因资源和新信息。

关键词: 水稻; 疣粒野生稻; 白叶枯病抗性; 基因克隆; *OgXa13*

Cloning and functional study of *OgXa13* in *Oryza meyeriana*

ZHANG Zheng-Kang^{1,**}, SU Yan-Hong^{1,**}, RUAN Sun-Mei¹, ZHANG Min¹, ZHANG Pan¹, ZHANG Hui², ZENG Qian-Chun², and LUO Qiong^{1,*}

¹ Yunnan State Key Laboratory of Biological Resources Conservation and Utilization, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China; ² College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China

Abstract: Bacterial blight is one of the most devastating bacterial diseases in rice production. The identification and utilization of resistance genes in rice breeding is the most economical and effective method for controlling this disease. *Oryza meyeriana* represents a valuable genetic resource due to its high resistance, and even immunity, to bacterial blight. In this study, we cloned the full-length cDNA and an 8908 bp genomic sequence of *OgXa13*, a homolog of *OsXa13*, from *Oryza meyeriana* using transcriptome and genome sequencing. Sequence analysis revealed that the gene structure of *OgXa13* consists of five exons and four introns, mirroring the structure of rice *OsXa13*, and its core promoter sequence is identical to that of the rice susceptibility gene *OsXa13*. A total of 21 amino acid differences were observed between *OgXa13* and *OsXa13*, with four key substitutions located in the MtN3.1 domain. Overexpression of *OgXa13* and its introduction into TP309 plants via genetic transformation significantly enhanced resistance to bacterial blight. It is hypothesized that the amino acid sequence differences contribute to the distinct functions of the *OgXa13* and *OsXa13* proteins, suggesting that *OgXa13* could be utilized as a dominant resistance gene in rice breeding. Furthermore, knockout of the *OsXa13* gene using CRISPR/Cas9 in Nipponbare T₁ homozygous lines also significantly enhanced resistance to bacterial blight, demonstrating that editing the susceptibility gene *OsXa13* through

本研究由 NSFC-云南联合基金(U2102219, U1302261)资助。

This study was supported by NSFC Yunnan United Fund (U2102219, U1302261).

* 通信作者(Corresponding author): 罗琼, E-mail: qiongbf@aliyun.com

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 张正康, E-mail: 1055909547@qq.com; 苏延红, E-mail: 594355519@qq.com

Received (收稿日期): 2023-02-12; Accepted (接受日期): 2024-10-25; Published online (网络出版日期): 2024-11-13.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20241112.1337.012>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

CRISPR/Cas9 is an effective strategy for improving resistance. This study provides a valuable genetic resource and new insights for breeding rice with enhanced resistance to bacterial blight.

Keywords: rice; *Oryza meyeriana*; bacterial blight resistance; gene cloning; *OgXa13*

水稻(*Oryza sativa*)是我国主要的粮食作物之一,也是世界上半以上人口的主粮^[1]。由革兰氏阴性菌黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)引起的白叶枯病(Bacterial blight)是我国水稻生产上最严重的细菌性病害之一^[2],主要通过气孔和伤口等侵入水稻维管束,沿维管束组织传播并大量繁殖^[3]。白叶枯病菌在水稻整个生育期的各个器官均可侵染,在不同情况下可表现为叶缘(枯)型、凋萎型、中脉型和黄化型等多种病症^[4]。发病田块一般减产 10%~30%,严重时减产 50%以上,甚至颗粒无收^[5]。化学农药施用是目前水稻生产上防治白叶枯病的主要措施,不仅成本较高,带来严重的环境和食品污染,而且化学农药的长期大量使用会导致白叶枯病菌的耐药性和致病性变异^[6]。利用抗病基因培育抗病品种是控制该病害发生最经济有效的措施,也是农业绿色发展的必由之路^[7]。

截至目前,已经从水稻及其野生近缘种中鉴定了至少 43 个白叶枯病抗性基因^[8-9],其中已克隆的基因有 16 个,分别是 *Xa1*^[10]、*Xa2*^[11]、*Xa3/Xa26*^[12]、*Xa4*^[13]、*xa5*^[14]、*Xa7*^[15]、*Xa10*^[16]、*xa13*^[17]、*Xa14*^[11]、*Xa21*^[18]、*Xa23*^[19]、*xa25*^[20]、*Xa27*^[21]、*Xa31(t)*^[11]、*xa41(t)*^[22]和 *Xa45(t)*^[11]。*Xa4*、*Xa7*、*Xa21*和 *Xa23*等显性抗病基因在育种应用中取得了巨大的效益,但 *xa5*和 *xa13*等隐性抗病基因及一些抗病谱有限的显性基因在育种的应用受到了极大限制^[23]。因此,新的白叶枯病抗性基因,尤其是广谱抗性基因的发掘,是拓宽水稻品种抗病谱和水稻生产绿色可持续发展的重要保障。

疣粒野生稻(*Oryza meyeriana*)具有高抗白叶枯病甚至免疫的特性,是白叶枯病抗性基因资源的天然宝库。但 GG 染色体组的疣粒野生稻与 AA 染色体组的栽培稻亲缘关系较远,杂交不育,其优良抗病基因无法通过传统杂交育种方法利用。为了有效挖掘和利用疣粒野生稻中的优异抗病基因资源,课题组对疣粒野生稻进行了全基因组和 5 个不同组织部位的转录组测序^[24-25],并通过 3'/5'RACE 从疣粒野生稻中克隆了水稻 *Xa13* (*OsXa13*)的同源基因 *OgXa13* 的 cDNA 全长和核心启动子序列。发现 *OgXa13* 的核心启动子序列(UPT_{PthXo1}-box)与水稻感病

基因 *OsXa13* 一致^[24],但 *OgXa13* 蛋白序列由 304 个氨基酸组成,与水稻中 *OsXa13* 有 21 个氨基酸的差异,其中 4 个氨基酸的替换差异位于与 COPT1 和 COPT5 互作的保守 MtN3.1 结构域^[24-26]。

为明确疣粒野生稻中 *OgXa13* 基因的功能,在前期研究基础上,本研究进一步克隆了 *OgXa13* 的全长序列,构建了 *OgXa13* 过表达载体和基因转化载体,通过农杆菌介导的遗传转化方法转化感病水稻 TP309,对基因功能进行了研究。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对感病水稻日本晴中 *OsXa13* 基因进行敲除,而后进行了敲除纯合 T₁ 及 T₂ 代植株的抗性表型分析。明确了 *OgXa13* 为显性的白叶枯病抗性基因,通过水稻中感病基因 *OsXa13* 的定点编辑可改良水稻的白叶枯病抗性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻材料:疣粒野生稻(*Oryza meyeriana*) (IRGC Acc.No.102117)由扬州大学农学院提供,用于基因组和转录组测序。用于本研究 *OgXa13* 基因克隆的疣粒野生稻(*Oryza meyeriana*)为本实验室 2014 年从云南西双版纳景洪市嘎洒镇曼玉村原生境采集,种植于温室。日本晴(Nipponbare)对菲律宾小种 PXO99 表现感病,本研究中用于 *OsXa13* 敲除实验。TP309 对菲律宾小种 PXO99 表现感病,为本研究中 *OgXa13* 过表达和基因组转化试验的受体材料。

质粒载体:质粒 pCambia1300-ox 由中国科学院遗传与发育生物学研究所植物基因组国家重点实验室程祝宽研究员惠赠。载体中包含 2 个 35S 强启动子,一个用于启动目的基因,一个用于启动潮霉素基因,本研究中用于构建过表达载体。质粒 pCambia1300 包含一个 35S 强启动子,用于启动潮霉素基因,本研究中用于构建基因组转化载体。

1.2 DNA 提取

将疣粒野生稻叶片剪碎,置于研钵中加入液氮充分研磨成粉末,转移至干净的离心管中,利用 CTAB 法^[27]提取疣粒野生稻叶片基因组 DNA,存于 4℃ 备用。

1.3 总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

利用 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒提取叶片总 RNA, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度计(型号: UV-2700)检测浓度和纯度。利用 SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 反转录试剂盒合成第一链 cDNA, -20°C 保存备用。

1.4 *OgXa13* 基因组全长克隆和基因组结构分析

利用前期研究克隆的 *OgXa13* 全长 cDNA 序列^[23], 比对到疣粒野生稻基因组数据库(Genome Warehouse (<http://bigd.big.ac.cn/gwh>), 登录号为 (GWHAEL00000000)), 根据比对的疣粒野生稻中 *OgXa13* 的基因序列, 在其起始密码子前约 3000 bp 和终止密码子后约 3000 bp 处设计特异 PCR 引物(F: 5'-GTACTCATCATCAGGCAGATTCTCCACCACAGTG-3'/R: 5'-GGATCCTTTACCACGTGCAACCGTCGACAAAT-3'), 以疣粒野生稻基因组 DNA 为模板, 使用 KOD 高保真酶进行扩增。PCR 反应体系 20 μL : 5.6 μL RNase Free ddH₂O, 1 μL DNA (100 ng μL^{-1}), 10 μL 2 $\times$ PCR Buffer for KOD Fx Neo, 2 μL 2 mmol L^{-1} dNTPs, 0.4 μL DNA Polymerase (KOD Fx), 正向引物和反向引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$)。PCR 反应条件: 94°C 预变性 2 min; 98°C 变性 10 s, 65°C 退火 30 s, 68°C 延伸 6 min, 34 个循环; 68°C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒回收纯化目的片段, 送北京擎科生物科技有限公司测序。测序确认 *OgXa13* 的基因序列, 利用 DNAMAN 软件与 *OgXa13* 的 cDNA 序列进行比对, 结合水稻中 *OsXa13* 的基因组结构, 利用软件 IBS 绘制 *OgXa13* 基因结构。

1.5 *OgXa13* 表达载体构建

以 1.4 中的胶回收产物 8908 bp (5'UTR 3695 bp + 2252 bp + 3'UTR 2961 bp) 为模板, 以特异引物 (*OgXa13*-F: 5'-GGAATTCGTACTCATCATCAGGCAGATTCTCCACCACAGTG-3'/*OgXa13*-R: 5'-GGAAATTCGGATCCTTTACCACGTGCAACCGTCGACAAAT-3', 下划线为 *EcoR* I 限制性内切酶识别序列, 开端 G 为 5'端添加的保护碱基) 进行 PCR 扩增。反应体系及程序同上述 1.4。PCR 产物回收纯化, 将纯化和测序确认的目的基因片段连接到 pMD19-T 中间克隆载体上。连接反应体系为 10 μL : 3.5 μL (0.57 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 胶回收产物 DNA, 0.5 μL pMD19-T, 1 μL T4 DNA 连接酶 (400,000 U mL^{-1}), 5 μL 10 $\times$ T4 DNA 连接酶 Buffer, 16°C 反应 2 h。取 5 μL 连接产物

加到 50 μL DH5 α 感受态细胞中, 轻轻旋转混匀, 冰上静置 30 min, 42°C 热激 90 s, 立即置于冰上 2 min; 加入 500 μL 无抗生素 LB 培养液, 37°C 、220 r min^{-1} 轻摇温育 1 h; 涂含有氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 的固体 LB 平板, 37°C 倒置培养过夜; 挑取 12 个单克隆, 分别接种于 500 μL 含有 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 220 r min^{-1} 、 37°C 培养 4 h; 取 1 μL 菌液, 利用 *OgXa13*-F/R 特异性引物进行 PCR 扩增, 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选取 3 个代表性阳性克隆的菌液送北京擎科生物科技有限公司测序, 测序结果利用软件 Vector NTI Advance 11 进行比对, 确定目的片段成功连入克隆载体。

利用 MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0 质粒提取试剂盒提取阳性重组质粒 DNA。利用 *EcoR* I 内切酶分别酶切重组质粒 pMD19-*OgXa13* 和表达载体 pCAMBIA1300。酶切体系 (50 μL): 15 μL pMD19-*OgXa13* 或 4 μL pCAMBIA1300 质粒 DNA, 2 μL *EcoR* I 内切酶 (20,000 U mL^{-1}), 5 μL 10 $\times$ cutSmart Buffer, ddH₂O 补足至 50 μL 。 37°C 酶切过夜, 1% 凝胶电泳, 并用 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 试剂盒回收目的片段。将酶切后纯化回收的基因组片段与表达载体 pCAMBIA1300 进行连接, 反应体系 (10 μL): 7 μL 目的片段 DNA (0.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$), 1 μL 酶切后的线性载体 DNA, 1 μL T4 DNA 连接酶 (400,000 U mL^{-1}), 1 μL 10 $\times$ T4 DNA 连接酶 Buffer。 16°C 连接反应 2 h 后, 取 5 μL 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α (方法同上述 1.5)。阳性克隆菌液送北京擎科生物科技有限公司测序, 通过 Vector NTI Advance 11 进行序列比对, 提取目的基因成功连入表达载体 pCAMBIA1300 的质粒 DNA 送至武汉伯远生物科技有限公司进行水稻遗传转化。参照 Nishimura 等^[28] 农杆菌介导的遗传转化方法转入感病水稻 TP309 中。

1.6 过表达载体构建

以疣粒野生稻 cDNA 为模板, 特异性引物 (*OgXa13*-ox-F: 5'-AGGTCGACTCTAGAGATGGCAGGAGGGTTCTTGTCATGGC-3'/*OgXa13*-ox-R: 5'-AGCTCGGTACCCGGGTCACACGGCGGCGGTGATCTCGAT-3', 下划线处为 15 bp 与载体同源的碱基) 进行 PCR。PCR 产物经凝胶电泳检测和回收纯化后, 于 -20°C 保存备用。PCR 反应体系、程序及纯化方法同上述 1.4。然后利用 *Bam*H I 内切酶对过表达载体 pCAMBIA1300-ox 进行酶切, 酶切体系为 50 μL : 4 μL pCAMBIA1300-ox, 2 μL *Bam*H I 内切酶

(10 U μL^{-1}), 5 μL 10 $\times$ Buffer *Bam*H I, ddH₂O 补足至 50 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜, 1%凝胶电泳检测, 并纯化回收符合预计大小的载体片段。然后将 *OgXa13* 胶回收后的 CDS 片段连接到酶切后纯化回收的过表达载体 pCambia1300-ox 上, 反应体系为 10 μL : 3.5 μL 目的片段(10 ng μL^{-1}), 1.5 μL 酶切后的线性载体, 5 μL 2 $\times$ Seamless Master Mix, 50 $^{\circ}\text{C}$ 连接反应 15 min。取 5 μL 连接产物, 转化大肠杆菌(方法同 1.5, pCambia1300-ox 载体为卡那霉素抗性)。最后挑取 3 个阳性克隆送至北京擎科生物科技有限公司测序, 结果通过 Vector NTI Advance 11 进行序列比对, 确定目的基因成功连入过表达载体 pCambia1300-ox 后, 提取质粒送至武汉伯远生物科技有限公司进行水稻遗传转化。参照 Nishimura 等^[28]农杆菌介导的遗传转化方法转入感病水稻 TP309 中。

1.7 *OsXa13* 基因 CRISPR/Cas9 敲除载体构建

从国家水稻数据库中心(www.ricedata.com)下载 *OsXa13* (*LOC_Os08g42350*)基因组序列, 在基因外显子不同区域设计了 4 个特异的 gRNA 靶序列(图 1)。在 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中比对设计好的 gRNA 序列, 排除非特异性酶切位点, 并在线(<http://www.biogle.com>)生成寡核苷酸(Oligo)序列(表 1)。

然后按 CRISPR/Cas 载体构建试剂盒(购自百格生物科技有限公司)操作说明, 分别构建靶点 1、靶

点 2、靶点 3 和靶点 4 (图 1)的 pGK03-Xa13-gRNA 载体。寡核苷酸(Oligo)二聚体制备: 将 Oligo 序列加水溶解至 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 按照总体积 20 μL (18 μL Buffer Anneal+1 μL Oligo-F+1 μL Oligo-R)混匀后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 3 min, 然后以约 0.2 $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ 降至 20 $^{\circ}\text{C}$ 。Oligo 二聚体连接到 CRISPR/Cas 载体: 总体积 10 μL , 于冰上依次加入 6 μL ddH₂O, 2 μL CRISPR/Cas Vector, 1 μL Oligo 二聚体和 1 μL Enzyme Mix, 混匀, 室温(20 $^{\circ}\text{C}$)反应 1 h, 形成 pGK03-Xa13-gRNA 载体。取包含 pGK03-Xa13-gRNA 载体的反应液 5 μL 转化大肠杆菌 DH5 α (方法同 1.5, 载体为卡那霉素抗性)。菌液 PCR 检测, 筛选阳性克隆, 提取阳性克隆菌液质粒 DNA, 参照 Nishimura 等^[28]农杆菌介导的遗传转化方法转入水稻日本晴。

1.8 转基因 T₁ 代植株分子检测

提取转基因 T₁ 株系叶片基因组 DNA, 首先利用潮霉素标记基因引物进行 PCR 鉴定, 潮霉素阳性株系进一步用基因靶点特异 PCR 引物(表 2)鉴定。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 能扩增出与目的片段大小相符条带的过表达和转基因株系, 鉴定为转基因阳性植株。阳性株系的 PCR 产物送北京擎科生物科技有限公司测序, 测序结果双峰为杂合株系, 单峰为纯合株系。

表 1 寡核苷酸序列
Table 1 Oligo sequence

Oligo 名称 Oligo name	正向序列 Forward sequence (5'-3')	反向互补序列 Reverse complementary sequence (5'-3')
Oligo-Target1	TGTGTGTCACCCTCTCCGGTGTTC	AAACGCAACACCGGAGAGGGTGACA
Oligo-Target2	TGTGTGGGTACAGCTCGGTGCCGT	AAACACGGCACCGAGCTGTACCCCA
Oligo-Target3	TGTGTGCTACCTCGTCTACGCGCCG	AAACCGCGCGGTAGACGAGGTAGCA
Oligo-Target4	TGTGTGAGCCGAGGAACACGGCCGT	AAACACGGCCGTGTTCTCGGCTCA

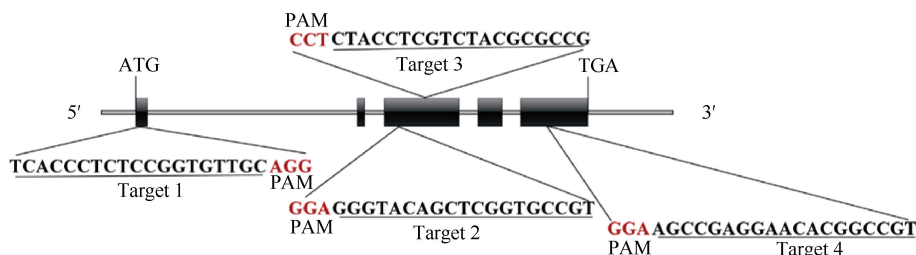


图 1 4 个 gRNA 靶点在 *OsXa13* 基因上的位置

Fig. 1 Locations of the four gRNA target sites on the *OsXa13* gene

PAM: CRISPR/Cas 对特定短 DNA 序列的识别, 标红处为 PAM 序列。

PAM: CRISPR/Cas identification of specific short DNA sequences, marked in red with PAM sequences.

表 2 转基因植株鉴定引物
Table 2 Primers used for the detection of transgenic plants

引物 Primers	引物序列 Primer sequences (5'-3')	用途 Purpose
HYG	F: GCTTCTGCGGGCGATTTGTGT R: GGTCGCGGAGGCTATGGATGC	潮霉素检测引物 Hygromycin detection primer
<i>OgXa13</i> -ox	F: TAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCC R: TGGGGACGAAGTAGAGCGTGAC	过表达阳性株系鉴定 Identification of positive overexpression lines
<i>OgXa13</i>	F: GGCAAGCTGCTCTAGCCAATAC R: CAAGGGGAACAGCTAACAAAGTGC	<i>OgXa13</i> 基因阳性株系鉴定 Identification of transgenic <i>OgXa13</i> gene-positive lines
Target1	F: GCTAGAGAGGAAGGCTTAAG R: CAATGCAATGGTGCAGACAAC	靶点 1 测序引物 Target 1 sequencing primer
Target2/3	F: CATCATCTCCTTCCTGGTGTTCC R: GACGGAGAGCCCGATCGGCATG	靶点 2 和靶点 3 测序引物 Target 2 and target 3 sequencing primers
Target4	F: CATGCCGATCGGGCTCTCCGTC R: CACCACCTCGACCTTGTGCAC	靶点 4 测序引物 Target 4 sequencing primer

HYG: 潮霉素抗性基因。HYG: hygromycin resistance gene.

1.9 转基因株系抗性鉴定

水稻培养: 采集 T₀代表达量较高的阳性转基因株系的种子。挑选足够数量的成熟饱满的水稻种子, 进行消毒、泡种和催芽, 待种子根长到 1 cm 左右可播种到盛放水的黑盒中水培, 待根全部长至 10 cm 左右时, 将水换成营养液, 并每周更换 1 次。水稻四叶期时将其移栽到塑料盆(60 cm × 40 cm × 15 cm)中, 保持土壤湿润, 并做好标记。后期做好水肥管理, 待生长到孕穗期时用于白叶枯病菌接种。

接种菌液准备: 将用甘油保存于-80℃的 PXO99 菌株, 在 NB 培养平板(蛋白胨 5 g, 酵母粉 1 g, 蔗糖 10 g, 牛肉浸膏 3 g, pH 6.8~7.0, 定容至 1 L)上进行划线, 于 28℃培养箱活化培养 2 d。然后用无菌水洗菌体, 通过分光光度计测量菌体浓度(OD₆₀₀)并将终浓度调至 0.5~0.6, 用于接种水稻。孕穗期水稻白叶枯病菌接种参照 Sun 等^[29]剪叶接种法, 每株系选 3 株, 每株水稻接种 2 片完全伸展的叶子, 接种后第 14 天进行发病调查, 根据病斑占叶片总长度的百分比评估病情。

菌物量检测: 在统计完接菌叶片的表型, 拍照完成后, 撕下叶片将叶片切样剪碎后, 转移到 15 mL 灭菌的 EP 管中, 加入 10 mL 的 ddH₂O, 充分震荡 2 min, 放入 28℃的摇床培养 3 h; 之后按梯度进行稀释, 含 9 mL 无菌水的灭菌 EP 管中加入 1 mL 菌液, 混合均匀, 按此梯度依次稀释; 每个稀释倍数菌液取 1 mL 均匀涂在 NB 培养平板上, 3 次重复;

置 28℃培养箱培养 2~3 d, 计数单菌落。

1.10 基因表达量检测

提取转基因水稻叶片的总 RNA, 然后用 TOYOBO 公司的 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix RNA 反转录试剂盒将总 RNA 反转录成第一链 cDNA。以 cDNA 为模板, 以 *β-actin* 为内参基因, 使用 Promega 公司的 GoTaq qPCR Master Mix 荧光定量试剂盒, qRT-PCR 方法检测过表达株系中 *OgXa13* 基因的表达以及转 *OgXa13* 基因的株系接菌 0 h 和 48 h 后 *OgXa13* 基因的表达, 反应体系 10 μL: 5 μL qPCR Master Mix, 0.5 μL Primer Mix (10 μmol L⁻¹), 2 μL cDNA (50 ng μL⁻¹), 2.5 μL ddH₂O; 反应条件: 95℃预变性 60 s; 95℃变性 10 s, 60℃退火 60 s, 72℃延伸 20 s, 40 个循环; 温度由 65℃在 10 min 升至 95℃。3 个生物学重复, 采用 2^{-ΔΔCT} 法^[30]计算基因相对表达量。qRT-PCR 引物为: *β-actin*-F: 5'-TGGCAATGTTGT CCTTAGTGG-3'/*β-actin*-R: 5'-CTGTATTTTCCTTTCA GGTGGTG-3'; *OgXa13*-qPCR-F: 5'-TGGTTCTGCTA CGGCCTCTT-3'/*OgXa13*-qPCR-R: 5'-ACCAGAAGT AGAGCCCCATCT-3'。

1.11 蛋白跨膜区预测和分析

从国家水稻数据中心(www.ricedata.com)下载 OsXa13 (*LOC_Os08g42350*)的氨基酸序列, 再根据 *OgXa13* 克隆的 CDS 序列, 翻译出 *OgXa13* 的氨基酸序列。利用在线软件 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测 *OgXa13* 和 OsXa13 蛋白的跨膜区域。

2 结果与分析

2.1 *OgXa13* 的克隆和基因组结构分析

利用 *OgXa13* 的 cDNA 序列比对到疣粒野生稻基因组数据库^[24-25], 再根据比对到的疣粒野生稻 *OgXa13* 的基因组序列设计特异的 PCR 引物, 获得了 8908 bp 的基因组序列, 包含 5' 端起始密码子上游的非编码序列 3695 bp、基因序列 2252 bp 和 3' 端下游非编码序列 2961 bp。然后通过 DNAMAN 软件对 *OgXa13* 的基因序列和 CDS 序列进行比对, 结合水

稻中 *OsXa13* 的基因结构, 利用软件 IBS 绘制了 *OgXa13* 基因结构(图 2-A)。*OgXa13* 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 与水稻 *OsXa13* 基因一致(图 2-B)。*OgXa13* 与水稻 *OsXa13* 的外显子大小极其相似, 两者第 1~4 个外显子大小相同, 只有最后一个外显子相差 9 bp。它们的差异主要在内含子上, 相比水稻 *OsXa13* 基因, *OgXa13* 的第 1 个内含子少了 75 bp, 而第 2 个内含子多了 25 bp, 第 3 个和第 4 个内含子均比 *OsXa13* 多了 30 bp。

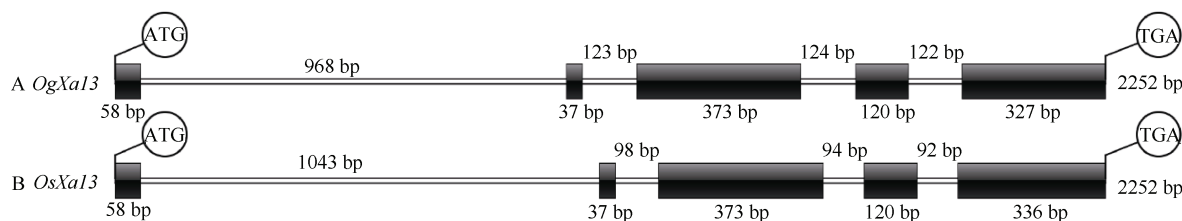


图 2 *OgXa13* 与 *OsXa13* 的基因结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of gene structure of *OgXa13* and *OsXa13*

A: *OgXa13* 的基因结构示意图; B: *OsXa13* 的基因结构示意图。外显子用黑色方框表示, 内含子用白色方框表示。

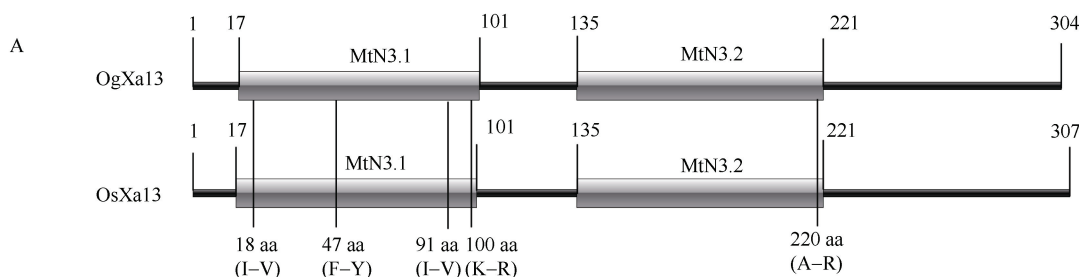
A: schematic diagram of the gene structure of *OgXa13*; B: schematic diagram of the gene structure of *OsXa13*. Exons are represented by black boxes and introns by white boxes.

2.2 *OgXa13* 氨基酸组成与蛋白结构

OgXa13 编码一个由 304 个氨基酸组成的 MtN3/saliva/SWEET 家族蛋白, 包含 2 个保守的 MtN3-slv 结构域, 分别位于第 17~101 个和第 135~221 个氨基酸位置(图 3-A), 与 *OsXa13* 相比^[31], 总共有 21 个位点的氨基酸差异^[24], 其中 4 个氨基酸的替换差异位于 MtN3.1 结构域, 分别为 18 aa (I-V)、47 aa (F-Y)、91 aa (I-V) 和 100 aa (K-R) (图 3-A)。其中苯丙氨酸(F)是非极性、疏水性氨基酸, 参与蛋白质的三级结构形成和维持; 酪氨酸(Y)是极性氨基酸, 通常是蛋白质磷酸化的位点, 这些位点氨基酸的变化会引起蛋白质结构和功能的变化。Bertoldi 等^[32]的研究表明, 苯丙氨酸(F)取代 Tyr-332 会影响 3,4-二羟基苯丙氨酸脱羧酶与底物的结合。Abraham 和 Veillette^[33]研究表明, Tyr-505 位点酪氨酸(Y)被苯丙

氨酸(F)取代抑制了 p56^{lck} 的激活。Yuan 等^[26]研究表明, *OsXa13* 蛋白的 MtN3.1 能够与铜转运蛋白 COPT1 和 COPT5 相互作用, 将水稻维管束组织中铜离子转运出去导致水稻感病。为此, 推测 *OsXa13* 位于 MtN3.1 结构域的第 47 位氨基酸 Y 在 *OgXa13* 中被 F 取代, 可能会影响 *OgXa13* 与铜转运蛋白 COPT1 和 COPT5 相互作用, 阻止水稻维管束组织中铜离子的转出, 增强水稻的白叶枯病抗性。通过酵母双杂交进行了 *OgXa13* 与铜转运蛋白 *OgCOPT1* 和 *OgCOPT5* 互作的初步研究, 发现它们之间确实没有相互作用(待发表), 但结果还有待进一步验证。

OsXa13 是膜定位蛋白^[34], 为了更多地了解 *OgXa13* 与 *OsXa13* 间 21 个氨基酸位点的差异对蛋白质结构和功能的影响, 课题组运用在线软件 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)进行



(图 3)

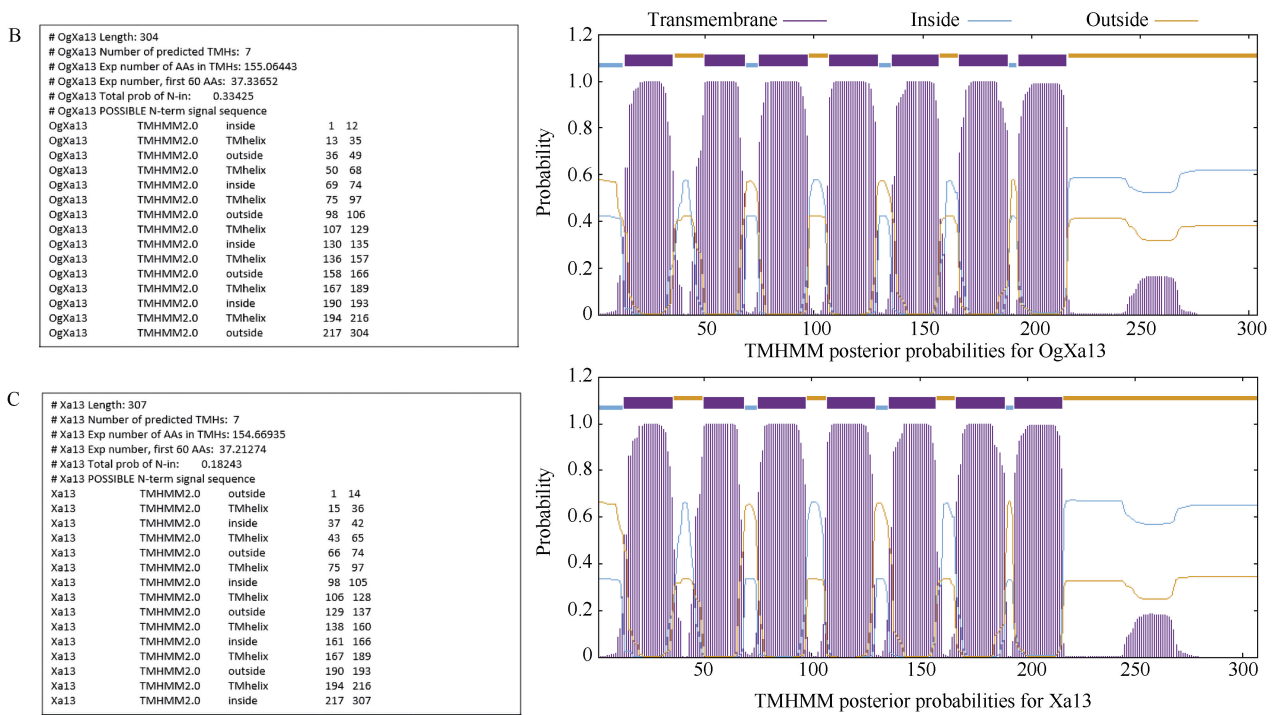


图 3 *OgXa13* 和 *OsXa13* 蛋白结构分析
Fig. 3 Protein structure analysis of *OgXa13* and *OsXa13*

A: *OgXa13* 与 *OsXa13* 的蛋白结构示意图, 灰色方框代表 MtN3_slv 结构域; 黑色细线标注的是 *OgXa13* 和 *OsXa13* 在 MtN3_slv 结构域上的差异氨基酸及其位点; B: *OgXa13* 蛋白的跨膜预测图; C: *OsXa13* 蛋白的跨膜预测图。

A: a schematic representation of *OgXa13* and *OsXa13*; the MtN3_slv domain are indicated by gray boxes; the thin black lines indicate the different amino acids and sites of *OgXa13* and *OsXa13* in the MtN3_slv domain; B: transmembrane prediction map of *OgXa13* protein; C: transmembrane prediction map of *OsXa13* protein.

了 *OgXa13* 和 *OsXa13* 蛋白的跨膜区域的预测分析。结果表明, 2 个蛋白都有 7 个跨膜螺旋, 但 *OgXa13* 的 N-term 位于细胞质膜内的总概率为 0.33425, *OsXa13* 的 N-term 位于膜细胞质膜内的总概率为 0.18243, 2 个蛋白 MtN3.1 结构域第 17~101 个氨基酸的跨膜走向完全相反(图 3), *OgXa13* 为 N 端-跨膜区-膜外-跨膜-膜内-跨膜-膜外-C 端(图 3-B), 而 *OsXa13* 为 N 端-跨膜区-膜内-跨膜-膜外-跨膜-膜内-C 端(图 3-C)。这一结果表明, *OgXa13* 与 *OsXa13* 蛋白间氨基酸的差异影响了蛋白质的细胞膜定位, 膜定位的改变如何影响蛋白功能有待进一步系统研究。

2.3 过表达 *OgXa13* 的 TP309 植株增强了对白叶枯病的抗性

通过农杆菌介导的遗传转化方法, 将 *OgXa13* 过表达载体转入感白叶枯病水稻材料 TP309, 获得了 22 个过表达 *OgXa13* 的阳性转基因 T_1 代株系 (*OgXa13*-ox)。对其中 3 个纯合株系(#1、#2 和 #3)进行了孕穗期白叶枯病菌 PXO99 接种的抗性鉴定, 与对照 TP309 相比, 过表达 *OgXa13* 的 TP309 水稻植

株显著增强了对白叶枯病的抗性(图 4-A~D), 植株中 *OgXa13* 的表达水平与白叶枯病抗性呈正相关(图 4-E)。

2.4 转 *OgXa13* 基因的 TP309 植株白叶枯病抗性增强

疣粒野生稻 *OgXa13* 的核心启动子序列与水稻感病基因 *OsXa13* 相同^[24], 为了进一步明确 *OgXa13* 的功能, 构建了 *OgXa13* 基因(5'UTR 3695 bp + 2252 bp + 3'UTR 2961 bp)表达载体, 通过农杆菌介导的遗传转化转入感白叶枯病水稻 TP309, 获得了 53 个转基因 T_1 代株系。对其中 2 个转基因阳性株系进行了接种白叶枯病菌 PXO99 的抗性鉴定, 发现与对照 TP309 相比, 转 *OgXa13* 基因的 TP309 株系不同程度增强了对白叶枯病菌的抗病性(图 5-D~E)。*OgXa13* 在 2 个株系中的表达受白叶枯病菌 PXO99 显著诱导, 其表达水平分别是对照的 1.60 倍和 1.59 倍(图 5-C), 与水稻中 *OsXa13* 受病菌诱导表达结果一致^[35]。*OsXa13* 表达与植株抗性呈负相关, 而 *OgXa13* 表达与植株的抗性呈正相关。

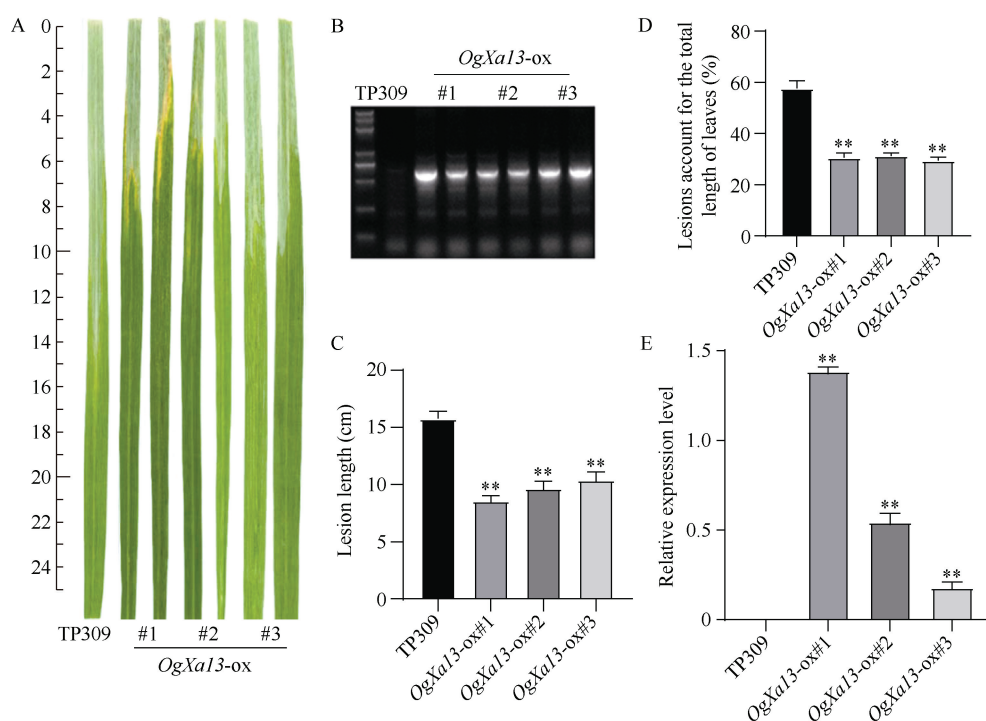


图 4 过表达 *OgXa13* 的 TP309 植株白叶枯病抗性

Fig. 4 Bacterial blight resistance of TP309 plants overexpressing *OgXa13*

A: *OgXa13* 过表达植株接种白叶枯病菌 *PXO99* 后 14 d 叶片发病症状; B: 过表达 TP309 植株 *OgXa13* 基因鉴定; C: 转 *OgXa13* 基因 T_1 代纯合植株接种白叶枯病菌 *PXO99* 后 14 d 病斑长度; D: 转 *OgXa13* 基因 T_1 代纯合植株接种白叶枯病菌 *PXO99* 后 14 d 病斑长度占叶片总长度百分比; E: 转 *OgXa13* 基因 T_1 代纯合植株叶片中 *OgXa13* 的表达水平。*, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

A: the leaf disease symptoms 14 days after inoculation of *OgXa13* positive transgenic plants with leaf blight bacterium *PXO99*; B: identification of positive transgenic plants with gene-specific primers; C: spot length 14 days after inoculation of *OgXa13* positive transgenic plants with bacterial pathogen *PXO99*; D: percentage of spot length to total leaf length at 14 days after inoculation of *OgXa13* positive transgenic plants lines with *PXO99*; E: *OgXa13* expression levels in leaves of positive transgenic T_1 generation homozygous plants. *, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$.

利用转 *OgXa13* 基因 TP309 纯合 T_1 代株系#1 的 2 个纯合 T_2 单株进行了接白叶枯菌 *PXO99* 抗性鉴定。接菌 21 d 后调查表型, 与对照 TP309 相比, 转 *OgXa13* 基因的 T_2 植株抗性明显增强(图 6-A~D), 转基因植株接种叶片培养液菌落数显著少于野生型对照 TP309(图 6-E)。上述结果进一步证实了氨基酸的变异导致了 *OgXa13* 与 *OsXa13* 功能的差异, *OgXa13* 是一个显性的白叶枯病抗性基因。

2.5 敲除 *OsXa13* 的日本晴株系白叶枯病抗性增强

水稻中的研究显示, 抗病水稻 Aus274 和 Kalimekri77-5 的 *xa13* 等位基因编码的蛋白质序列与 *OsXa13* 相同, 其余 8 个抗病水稻中的 *xa13* 等位基因编码的蛋白质与感病等位基因 *OsXa13* 编码的蛋白质有 1~3 个氨基酸的差异, 推测 1~3 氨基酸的变化不影响 *xa13* 介导的抗性, 抗、感基因功能差异是由于基因启动子核心序列的突变所致^[34]。为了明确更多 *OsXa13* 蛋白氨基酸序列的改变对蛋白功能

的影响, 课题组利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻日本晴中 *OsXa13* 基因进行了敲除, 通过基因测序分析鉴定了靶点 3 的 12 个 T_1 敲除株系, 对其中 3 个导致蛋白质翻译提前终止敲除纯合株系(#1: 有 1 个碱基替换和 2 个碱基插入, #2: 缺失了 1 个碱基, #3: 4 个碱基缺失) (图 7-A), 进行了孕穗期接种白叶枯病菌 *PXO99* 的抗性鉴定。结果显示, 与对照日本晴相比, 敲除株系的白叶枯病抗性显著增强(图 7-B~D), 为利用 CRISPR/Cas9 技术对感病基因 *OsXa13* 进行编辑改良水稻的白叶枯病抗性提供了试验支撑。

3 讨论

水稻白叶枯病是由 *Xoo* 引起的一种细菌性病害, 造成水稻严重减产^[36]。疣粒野生稻是我国 3 种野生稻之一, 对白叶枯病具有免疫、高抗等特征, 是栽培抗性改良的天然基因库^[37]; 但由于疣粒野生稻与栽培稻之间亲缘关系较远, 存在巨大杂交障碍, 常用的抗性基因克隆方法难以在疣粒野生稻中取得成

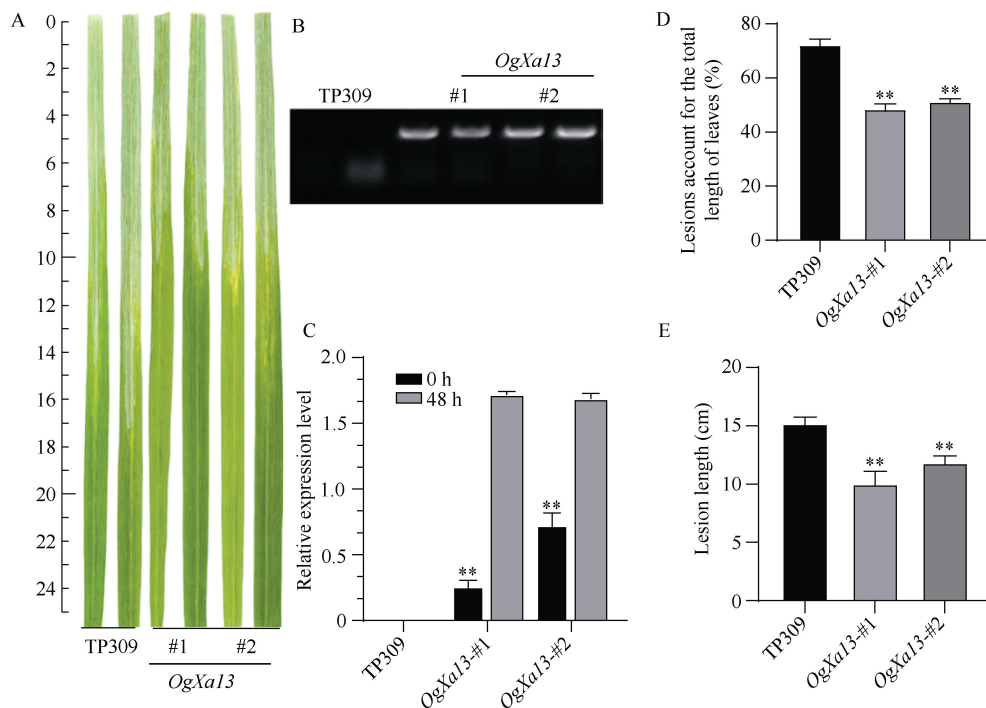


图 5 转 *OgXa13* 基因植株的白叶枯病抗性

Fig. 5 Bacterial blight resistance of *OgXa13* genes transgenic rice plants

A: 转基因植株接种白叶枯病菌 PXO99 后 14 d 叶片发病症状; B: 转基因植株的基因特异性引物鉴定; C: 阳性转基因 T_1 代纯合植株接种 PXO99 0 h 和 48 h 后叶片中 *OgXa13* 的表达水平; D: 转基因植株接种白叶枯病菌 PXO99 后 14 d 病斑长度占叶片总长度百分比; E: 转基因 T_1 代纯合植株接种白叶枯病菌 PXO99 后 14 d 病斑长度。*, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

A: the leaf disease symptoms 14 days after inoculation of positive transgenic plants with leaf blight bacterium PXO99; B: identification of positive transgenic plants with gene-specific primers; C: expression levels of *OgXa13* in leaves of positive transgenic T_1 generation homozygous plants inoculated with PXO99 for 0 h and 48 h; D: percentage of spot length to total leaf length at 14 days after inoculation of positive transgenic plants lines with PXO99; E: spot length 14 days after inoculation of positive transgenic plants with bacterial pathogen PXO99. *, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$.

功^[38-39]; 因此, 使其携带的优异抗病基因一直无法得到有效的利用。*xa13* 是一个编码 MtN3/saliva/SWEET 家族的隐性抗白叶枯病基因, 对菲律宾菌小种 PXO99 具有专化抗性^[31-40]。前期研究中, 课题组在疣粒野生稻转录组和基因组测序的基础上, 通过 3'/5'RACE 成功从疣粒野生稻中克隆了 1 个白叶枯病抗性位点基因 *OgXa13* 的 cDNA 全长序列, 通过对蛋白序列分析发现 *OgXa13* 与 *OsXa13* 有 21 个氨基酸的差异, 其中在保守结构域 MtN3.1 (17~101 aa) 中有 4 个氨基酸替换, 在 MtN3.2 (135~221 aa) 中有 1 个氨基酸替换^[24-25]。本研究中, 为了揭示这 5 个氨基酸的差异是否影响 *OgXa13* 的表达从而影响植株的抗感, 构建了 *OgXa13-ox* 过表达载体及转 *OgXa13* 基因表达载体并转入感病水稻 TP309 中; 结果显示过表达 *OgXa13-ox* 在接种白叶枯病菌 PXO99 后, 与感病对照材料 TP309 相比, 病斑面积减小, 植株表现出不同程度的抗性; *OgXa13* T_1 代转

基因植株中 *OgXa13* 基因表达受 PXO99 诱导显著上调表达, 表达水平与植株的抗性呈正相关。这些结果表明 *OgXa13* 可作为 1 个显性抗病基因在水稻育种中利用。

Chu 等^[34-40]研究结果表明, 有些抗病水稻品种的 *xa13* 抗病基因编码的蛋白与感病基因 *OsXa13* 编码的蛋白存在 1~3 个氨基酸的差异, 有的抗病品种中 *xa13* 抗病基因编码的蛋白与 *OsXa13* 的氨基酸序列相同, 认为水稻在抗、感基因的功能差异是由核心启动子序列差异所致; Römer 等^[35]研究发现感病水稻品种 IR24 中的显性感病基因 *OsXa13* 受病原菌 PXO99 诱导表达, 而抗病品种 IRBB13 中的隐性抗性基因 *xa13* 启动子区有 1 个 252 bp 的插入, 而不受病原菌诱导表达^[35-41]。研究发现, 白叶枯病菌 PXO99 的效应因子 PthXo1 特异性识别的核心启动子序列 UPT_{PthXo1} (-69 bp 到 -86 bp) 在 *OsXa13* 与 *OgXa13* 基因中相同^[24]。过表达 *OgXa13* 的转基因水

稻植株的白叶枯病抗性增强, 暗示 *OgXa13* 应是一个受病原菌 PXO99 诱导上调表达的基因; 利用自身启动子的转 *OgXa13* 基因的 T_1 代株系中 *OgXa13* 基因受 PXO99 诱导上调表达, 但与 *OsXa13* 基因被诱导上调表达后增强感病性相反, 转 *OgXa13* 基因的株系中 *OgXa13* 基因的表达水平与植株抗性呈正相关(图 4)。水稻 *OsXa13* 蛋白的 MtN3.1 能够与铜转运蛋白 COPT1 和 COPT5 相互作用, 调节寄主木质部维管束中铜(Cu)的再分配, 使寄主木质部维管束中的 Cu 离子浓度降低, 有利于病原菌生长^[26-42], *OsXa13* 具有调控葡萄糖和蔗糖从细胞内向质外体分泌的功能, 为病原菌生长提供营养^[43-44]。当水稻中 *OsXa13*、COPT1 和 COPT5 同时被激活表达时, 一方面 *OsXa13* 向木质部液流中运输蔗糖为病原菌提供碳营养; 另一方面,

OsXa13 与 COPT1 和 COPT5 相互作用降低木质部液流的铜离子浓度, 有利于病原菌生长繁殖, 使水稻感病^[45-46]。疣粒野生稻中 *OgXa13* 编码的氨基酸与水稻同源蛋白 *OsXa13* 有较大差异, 保守结构域 MtN3.1 跨膜区预测显示两者的 N-端和 C-端在膜上的方向恰好相反, 推测感病水稻(TP309)中 *OgXa13* 的表达和在细胞膜上的定位, 影响了 *OsXa13* 在细胞膜上定位和功能, 降低了与铜转运蛋白 COPT1 和 COPT5 的相互作用, 进而增强了转基因水稻的抗病性。不同氨基酸位点变异对 *OgXa13* 蛋白功能影响的系统研究, 将为 *OsXa13* 和 *OgXa13* 蛋白功能解析提供更多信息。

敲除感病基因 *OsXa13* 的日本晴株系白叶枯病抗性显著增强, 为水稻品种白叶枯病抗性改良提供了新信息和新思路。

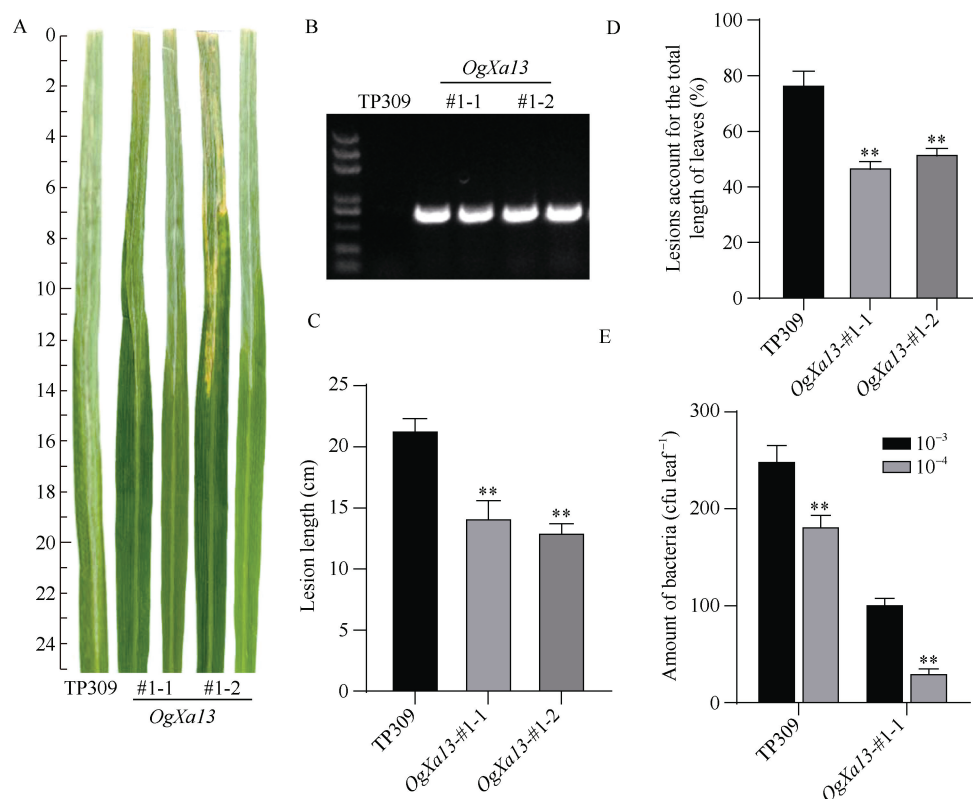


图 6 转 *OgXa13* 基因 T_2 代水稻植株的白叶枯病抗性

Fig. 6 Bacterial blight resistance of *OgXa13* genomic genes transgenic T_2 generation rice plants

A: T_2 转基因植株接种白叶枯病菌 PXO99 后 21 d 叶片发病症状; B: 转基因植株的基因特异性引物鉴定; C: T_2 代转基因植株接种白叶枯病菌 PXO99 后 21 d 后病斑长度; D: 转基因植株接种白叶枯病菌 PXO99 后 21 d 病斑长度占叶片总长度百分比; E: T_2 代转基因纯合植株接种 PXO99 后 21 d 菌物量统计。*, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

A: the leaf disease symptoms 21 days after inoculation of T_2 positive transgenic plants with leaf blight bacterium PXO99; B: identification of positive transgenic plants with gene-specific primers; C: spot length 21 days after inoculation of T_2 positive transgenic plants with bacterial pathogen PXO99; D: percentage of spot length to total leaf length at 21 days after inoculation of T_2 positive transgenic plants lines with PXO99; E: T_2 generation transgenic homozygous plants were inoculated with the Amount of bacterial on 21 days. *, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$.

- Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Crop Diseases and Pests in China, 3rd edn. Beijing: China Agriculture Press, 2015. pp 32–36 (in Chinese).
- [6] 翟文学, 朱立煌. 水稻白叶枯病抗性基因的研究与分子育种. 生物工程进展, 1999, (6): 9–15.
- Zhai W X, Zhu L H. Rice bacterial blight resistance genes and their utilization in molecular breeding. *Prog Biotechnol*, 1999, (6): 9–15 (in Chinese with English abstract).
- [7] 邓一文, 刘裕强, 王静, 陈学伟, 何祖华. 农作物抗病虫研究的战略思考. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 1435–1446.
- Deng Y W, Liu Y Q, Wang J, Chen X W, He Z H. Strategic thinking and research on crop disease and pest resistance in China. *Sci Sin Vitae*, 2021, 51: 1435–1446 (in Chinese with English abstract).
- [8] Korinsak S, Darwell C T, Wanchana S, Praphaisal L, Korinsak S, Thunnon B, Patarapuwadol S, Toojinda T. Identification of bacterial blight resistance loci in rice (*Oryza sativa* L.) against diverse *Xoo* Thai strains by genome-wide association study. *Plants* (Basel), 2021, 10: 518.
- [9] Shu X Y, Wang A J, Jiang B, Jiang Y Q, Xiang X, Yi X Q, Li S C, Deng Q M, Wang S Q, Zhu J, Liang Y Y, Liu H N, Zou T, Wang L X, Li P, Zheng A P. Genome-wide association study and transcriptome analysis discover new genes for bacterial leaf blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biol*, 2021, 21: 255.
- [10] Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang Z X, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N, Sasaki T. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 1663–1668.
- [11] Ji C H, Ji Z Y, Liu B, Cheng H, Liu H, Liu S Z, Yang B, Chen G Y. *Xa1* allelic *R* genes activate rice blight resistance suppressed by interfering TAL effectors. *Plant Commun*, 2020, 1: 100087.
- [12] Xiang Y, Cao Y L, Xu C G, Li X H, Wang S P. *Xa3*, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as *Xa26*. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 1347–1355.
- [13] Sun X, Yang Z, Wang S, Zhang Q. Identification of a 47-kb DNA fragment containing *Xa4*, a locus for bacterial blight resistance in rice. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 683–687.
- [14] Blair M W, Garris A J, Iyer A S, Chapman B, Kresovich S, McCouch S R. High resolution genetic mapping and candidate gene identification at the *xa5* locus for bacterial blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 62–73.
- [15] Chen X F, Liu P C, Mei L, He X L, Chen L, Liu H, Shen S R, Ji Z D, Zheng X X, Zhang Y C, Gao Z Y, Zeng D L, Qian Q, Ma B J. *Xa7*, a new executor *R* gene that confers durable and broad-spectrum resistance to bacterial blight disease in rice. *Plant Commun*, 2021, 2: 100143.
- [16] Gu K Y, Sangha J S, Li Y, Yin Z C. High-resolution genetic mapping of bacterial blight resistance gene *Xa10*. *Theor Appl Genet*, 2008, 116: 155–163.
- [17] Yang B, Sugio A, White F F. *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 10503–10508.
- [18] Song W Y, Wang G L, Chen L L, Kim H S, Pi L Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W X, Zhu L H, Fauquet C, Ronald P A. receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, 270: 1804–1806.
- [19] Wang C L, Zhang X P, Fan Y L, Gao Y, Zhu Q L, Zheng C K, Qin T F, Li Y Q, Che J Y, Zhang M W, Yang B, Liu Y G, Zhao K J. *XA23* is an executor *R* protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Mol Plant*, 2015, 8: 290–302.
- [20] Liu Q S, Yuan M, Zhou Y, Li X H, Xiao J H, Wang S P. A paralog of the *MtN3/saliva* family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant Cell Environ*, 2011, 34: 1958–1969.
- [21] Gu K Y, Yang B, Tian D S, Wu L F, Wang D J, Sreekala C, Yang F, Chu Z Q, Wang G L, White F F, Yin Z C. *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 2005, 435: 1122–1125.
- [22] Hutin M, Sabot F, Ghesquière A, Koebnik R, Szurek B. A knowledge-based molecular screen uncovers a broad-spectrum *OsSWEET14* resistance allele to bacterial blight from wild rice. *Plant J*, 2015, 84: 694–703.
- [23] 刘丙新, 季芝娟, 石建尧, 马良勇, 李西明, 杨长登. 水稻白叶枯病抗性基因的发掘及在育种中的应用. 中国稻米, 2010, 16(2): 10–15.
- Liu B X, Ji Z J, Shi J Y, Ma L Y, Li X M, Yang C D. Discovery of resistance genes to bacterial blight and its application in rice breeding. *China Rice*, 2010, 16(2): 10–15 (in Chinese).
- [24] Yang R, Li J, Zhang H, Yang F, Wu Z G, Zhuo X X, An X Y, Cheng Z Q, Zeng Q C, Luo Q. Transcriptome analysis and functional identification of *Xa13* and *Pi-ta* orthologs in *Oryza granulata*. *Plant Genome*, 2018, 11: 1–15.
- [25] Wu Z G, Fang D M, Yang R, Gao F, An X Y, Zhuo X X, Li Y F, Yi C D, Zhang T, Liang C Z, Cui P, Cheng Z K, Luo Q. De novo genome assembly of *Oryza granulata* reveals rapid genome expansion and adaptive evolution. *Commun Biol*, 2018, 1: 84.
- [26] Yuan M, Chu Z H, Li X H, Xu C G, Wang S P. The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. *Plant Cell*, 2010, 22: 3164–3176.
- [27] 王慧娜, 初志战, 马兴亮, 李日清, 刘耀光. 高通量 PCR 模板植物基因组 DNA 制备方法. 作物学报, 2013, 39: 1200–1205.
- Wang H N, Chu Z Z, Ma X L, Li R Q, Liu Y G. A high through-put protocol of plant genomic DNA preparation for PCR. *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 1200–1205 (in Chinese with English abstract).
- [28] Nishimura A, Ashikari M, Lin S Y, Takashi T, Angeles E R, Yamamoto T, Matsuoka M. Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11940–11944.
- [29] Sun X L, Cao Y L, Yang Z F, Xu C G, Li X H, Wang S P, Zhang Q F. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant J*, 2004, 37: 517–527.
- [30] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [31] Antony G, Zhou J H, Huang S, Li T, Liu B, White F, Yang B. Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os11N3*. *Plant Cell*, 2010, 22: 3864–3876.

- [32] Bertoldi M, Gonsalvi M, Contestabile R, Voltattorni C B. Mutation of tyrosine 332 to phenylalanine converts dopa decarboxylase into a decarboxylation-dependent oxidative deaminase. *J Biol Chem*, 2002, 277: 36357–36362.
- [33] Abraham N, Veillette A. Activation of p56lck through mutation of a regulatory carboxy-terminal tyrosine residue requires intact sites of autophosphorylation and myristylation. *Mol Cell Biol*, 1990, 10: 5197–5206.
- [34] Chu Z H, Yuan M, Yao J L, Ge X J, Yuan B, Xu C G, Li X H, Fu B Y, Li Z K, Bennetzen J L, Zhang Q F, Wang S P. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes Dev*, 2006, 20: 1250–1255.
- [35] Römer P, Recht S, Strauß T, Elsaesser J, Schornack S, Boch J, Wang S P, Lahaye T. Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytol*, 2010, 187: 1048–1057.
- [36] Nelson R J, Baraoidan M R, Cruz C M, Yap I V, Leach J E, Mew T W, Leung H. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 3275–3283.
- [37] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic diversity in accessions of wild rice *Oryza granulata* from south and Southeast Asia. *Genet Resour Crop Evol*, 2006, 53: 197–204.
- [38] 刘继梅, 程在全, 杨明攀, 吴成军, 王玲仙, 孙一丁, 黄兴奇. 云南 3 种野生稻中抗病基因同源序列的克隆及序列分析. *中国农业科学*, 2003, 36: 273–280.
- Liu J M, Cheng Z Q, Yang M Z, Wu C J, Wang L X, Sun Y D, Huang X Q. Cloning and sequence analysis of disease resistance gene analogues from three wild rice species in Yunnan. *Sci Agric Sin*, 2003, 36: 273–280 (in Chinese with English abstract).
- [39] 钱君, 程在全, 杨明攀, 刘继梅, 吴成军, 黄兴奇. 云南野生稻中 *Xa21* 基因外显子 II 的分离及序列分析. *遗传*, 2005, 27: 382–386.
- Qian J, Cheng Z Q, Yang M Z, Liu J M, Wu C J, Huang X Q. Isolation and sequence analysis of the *Xa21* gene exon II homologs from different species of wild rice in Yunnan. *Hereditas* (Beijing), 2005, 27: 382–386 (in Chinese with English abstract).
- [40] Chu Z H, Fu B Y, Yang H, Xu C G, Li Z K, Sanchez A, Park Y J, Bennetzen J L, Zhang Q F, Wang S P. Targeting *xa13*, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 455–461.
- [41] Yuan T, Li X H, Xiao J H, Wang S P. Characterization of *Xanthomonas oryzae*-responsive *cis*-acting element in the promoter of rice race-specific susceptibility gene *xa13*. *Mol Plant*, 2011, 4: 300–309.
- [42] Zhang G, Angeles E R, Abenes M L, Khush G S, Huang N. RAPD and RFLP mapping of the bacterial blight resistance gene *xa-13* in rice. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 65–70.
- [43] Yuan M, Zhao J W, Huang R Y, Li X H, Xiao J H, Wang S P. Rice *MtN3/saliva/SWEET* gene family: evolution, expression profiling, and sugar transport. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56: 559–570.
- [44] Chen L Q, Hou B H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung M L, Qu X Q, Guo W J, Kim J G, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White F F, Somerville S C, Mudgett M B, Frommer W B. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 2010, 468: 527–532.
- [45] 玄元虎, 朱毅勇, 胡一兵. SWEET 蛋白家族研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44: 676–684.
- Xuan Y H, Zhu Y Y, Hu Y B. Research advances of the SWEET proteins family. *Sci Sin Vitae*, 2014, 44: 676–684 (in Chinese with English abstract).
- [46] Yuan M, Wang S P. Rice MtN3/saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms. *Mol Plant*, 2013, 6: 665–674.