

# 水稻黄单胞菌 *hrp* 基因簇中致病相关基因 *hpaB* 的鉴定

曾申艳<sup>1,2</sup> 胡 军<sup>1,2</sup> 黄贵修<sup>3</sup> 何朝族<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所 植物基因组国家重点实验室 北京 100080)

(<sup>2</sup> 中国科学院研究生院 北京 100039)

(<sup>3</sup> 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 儋州 571737)

**摘 要** :由水稻黄单胞菌引起的水稻白叶枯病是水稻最严重的细菌性病害。通过筛选 18000 个 *Xoo* Tn5 转座子插入突变体,得到其中一个致病力缺失的突变体 XOG11。TAIL-PCR 方法分离该突变体中插入转座子的侧翼序列,发现转座子插入到位于 *hrp* 基因簇的 *hpaB* 基因中。对该基因进一步的分析表明该基因编码一个含有 156 个氨基酸,等电点为 4.28,亮氨酸含量为 14.4% 的蛋白 HpaB。Southern blot 和 PCR 验证表明 Tn5 在该突变体中为单拷贝插入且未发生转座子携带侧翼序列的转移。将 *hpaB* 克隆到具有广泛寄主的质粒 pHM1 中,转化重组质粒进入突变体后,突变体恢复了在其寄主水稻 IR24 上的致病力,而转化空质粒 pHM1 后的突变体仍然表现为致病力缺失。证实了水稻黄单胞菌中 *hpaB* 基因与该细菌的致病力相关,在侵染水稻的过程中起着不可缺失的作用。

**关键词** :水稻黄单胞菌;TAIL-PCR;*hrp* 基因簇;*hpaB* 基因

中图分类号:Q 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)03-0402-05

由水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)侵染引起的白叶枯病是水稻生产上一种严重的细菌病害<sup>[1]</sup>,同时 *Xoo* 与水稻的相互作用为典型的基因对基因(gene-for-gene)关系,是分子植物病理学中研究植物与病原菌互作的重要模式系统。植物病原细菌对其寄主中的致病过程是由多种成分参与的复杂的生物化学和生理代谢过程,它包括了细菌细胞的表面结构、多种分泌系统、胞外多糖与脂多糖、毒素与细胞解毒系统、氨基酸、核酸及脂肪代谢等<sup>[2,3]</sup>。由 *hrp* (Hypersensitive Response & Pathogenicity)基因编码的Ⅲ型分泌系统能将效应因子(effectors)或无毒基因产物转运到寄主植物细胞内,因而在细菌对寄主的致病过程和非寄主的过敏反应中起重要作用<sup>[4]</sup>。在 *Xoo* 中,*hrpXo* 是第一个被证实的与 *Xoo* 在寄主中的致病力和在非寄主中的过敏反应(Hypersensitive Response,HR)有关的Ⅲ型分泌系统相关基因<sup>[4]</sup>;*hrp* 基因簇中的 *hpa1* (*hpa* 即 *hrp*-associated)的插入突变使细菌在寄主中的致病力减弱且在烟草中仅能引起微弱的过敏,而 *hpa2*, *hpa3*, *hpa4* 和 *hpaF* 的突变对致病力没有明显影响;*hrpF* 的突变极大削弱了 *Xoo* 在寄主中的致病能力,同时发现 *hrpF* 与 *hpa1* 缺失后可能降低了Ⅲ型分泌因子的有效运输<sup>[5,6]</sup>。

目前已有两个 *Xoo* 菌株完成了基因组测序:即 *Xoo* KACC10331<sup>[8]</sup>和 *Xoo* MAFF 311018<sup>[9]</sup>。另外已有

*hrp* 基因簇全序列的 *Xoo* 小种有 PX086(基因登录号:AF026197)和 JXO III(基因登录号:AY139029, AY139030, AY205561)。大规模基因组测序的完成为 *Xoo* 基因功能及其产物性质的研究提供了重要的参考和支持,然而大规模测序所预测基因的生物功能最终需要通过实验来证实。为了全面了解 *Xoo* 的致病机理, Sun 等<sup>[10]</sup>利用 Tn5 转座子(EZ::TN 转座子)插入突变的方法,建立了一个 *Xoo* PX099 Tn5 插入突变体库。本研究通过筛选该突变体库的 18000 个菌株,得到一株 Tn5 插入到 *hpaB* 基因中的突变体,该突变体在高感白叶枯病的水稻品种 IR24 上表现为致病力丧失。遗传互补该突变体恢复了其对宿主水稻的致病力,揭示了 *hpaB* 基因在 *Xoo* 引起水稻白叶枯病中是不可或缺的。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒及细菌生长条件** :本研究所用菌株及质粒见表 1。水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)所用培养基为 PSA(每升含 tryptone 10g, sucrose 10g, L-glutamic acid 1g, pH 7.0), 28℃ 培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*)所用培养基为 Luria broth<sup>[11]</sup> 37℃ 培养。*Xoo* 感受态细胞的制备用 210 培养基(每升含 sucrose 5g, casein enzymatic hydrolysate 8g, yeast extract 4g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3g,

基金项目:中国科学院创新工程方向项目(KSCX2-YW-005)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-62642536; Fax: 86-10-62548243; E-mail: hecz@im.ac.cn

作者简介:曾申艳(1980-),女,四川人,硕士研究生,从事细菌遗传学研究。E-mail: zengsy@mail.im.ac.cn

收稿日期:2006-06-20;接受日期:2006-07-13;修回日期:2007-03-05

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3g ,pH 7.0 }<sup>[10]</sup> ,*E. coli* 感受态细胞制备用 SOB 培养基<sup>[11]</sup>。抗生素用法及用量为 *E. coli* :氨苄青霉素 100μg/mL、壮观霉素 100μg/mL ;*Xoo* :卡那霉素 25μg/mL、壮观霉素 100μg/mL。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Properties	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA lacZ</i> . M15. <i>lacX74 recA1 endA1</i>	Our lab
<i>Xoo</i> PXO99	Wild-type	Our lab
XOG11	XO <i>hpaB</i> : Tn5	This study
XOG11h	XOG11 containing pHM1 : XO <i>hpaB</i>	This study
XOG11p	XOG11 containing pHM1	This study
Plasmids		
pGEM-T Easy	Amp <sup>r</sup>	Promega
pHM1	Containing <i>plac</i> promoter Sp <sup>r</sup>	
pHM1- <i>hpaB</i>	pHM1 : XO <i>hpaB</i>	This study

1.1.2 试剂 :DNA Marker DL2000、限制性内切核酸酶和 *Taq* DNA 聚合酶购自宝生物( TaKaRa )大连公司 ;PCR 高保真酶( Easy-A<sup>TM</sup> high-fidelity PCR cloning enzyme )购自 Stratagene 公司 ;T4 DNA 连接酶、pGEM-T Easy 载体和标记试剂盒 Primer-a-gene Labeling System 购自 Promega 公司 ;卡那霉素、氨苄青霉素、壮观霉素购自 Sigma 公司 ;DNA 胶回收试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司 ;1kb Marker 为 NEB ( New England Biolabs ,Beverly ,MA ,USA )公司产品。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 转座子 Tn5 插入突变体的获得及侧翼序列的分离

利用转座子 EZ :TN < KAN-2 > Tnp( Tn5 )建立了 *Xoo* PXO99 插入突变体库<sup>[10]</sup>。菌株的致病性检测是通过将生长至对数中期( *OD*<sub>600</sub> = 0.6 ~ 0.7 )的菌液 ,用剪叶法接种于 40 ~ 50d 的水稻叶片上 ,7 ~ 14d 时观察其病斑长度。

转座子插入侧翼序列的分离用热不对称交互 PCR( Thermal Asymmetric Interlaced PCR ,TAIL-PCR )方法 ,所用引物及 TAIL-PCR 方法见 Sun 等<sup>[10]</sup>。TAIL-PCR 产物序列测定由上海生工生物公司完成。通过 blast( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> )来搜索 TAIL-PCR 产物的同源序列 ,并确定转座子的插入位点。

1.3 *Xoo hpaB* 基因的序列分析

ORF 的预测采用 FramePlot 2.3.2( <http://www.nih.go.jp/jun/cgi-bin/frameplot.pl> )和基于同源比对的 Blast ;蛋白的基本性质预测用 DNAMAN ;蛋白序列的比对用 Clustal X( v.1.80 )软件完成 ,结果用 GeneDoc

处理。

1.4 突变体的 PCR 和 Southern blot 鉴定

根据本实验室的 *Xoo* 基因组序列( 未发表数据 ) ,在 *hpaB* 基因上游设计引物 *hpaB*-cF : 5'-AAGCTTCAACGTGGCACTCAACAAG-3' ( 含 *Hind*Ⅲ 酶切位点 ) ;在下游设计引物 *hpaB*-cR : 5'-GAATTCGCTGCAGCTGCAGCCATG-3' ( 含 *Eco* RⅠ 酶切位点 )。用该引物同时扩增野生型和突变体 ,扩增条件 :94℃ 5min ;94℃ 45s ,59℃ 1min ,72℃ 2min ,32 个循环 ,72℃ 5min。

Southern blot 鉴定是将 *Xoo* 野生型和突变体的 DNA 用 *Pst*Ⅰ 完全酶切后 ,毛细管法将 DNA 转移到 Hybond N<sup>+</sup> 尼龙膜上 ,用 Primer-a-Gene Labeling System 试剂盒将 α-[ <sup>32</sup>P ]dCTP 标记到抗卡那霉素基因( *aph* )片段<sup>[10]</sup>上 ,用作探针杂交 ,以验证转座子在突变体上的插入及插入的拷贝数。

1.5 突变体的遗传互补

以 *hpaB*-cF 和 *hpaB*-cR 为引物 ,用高保真 *Taq* 酶以 *Xoo* 野生型基因组 DNA 为模板 ,扩增 *hpaB* 基因 ,并连接于 pGEM-T easy 载体。测序正确后将 *Hind*Ⅲ /*Eco*RⅠ 双酶切获得的约 0.65kb 片段回收连接于用同样酶切后的 pHM1 质粒 ,转化大肠杆菌感受态细胞 DH10B ,获得质粒 pHM1-*hpaB*。将验证好的 pHM1-*hpaB* 电击转化 XOG11 感受态细胞。同时转化 pHM1 空载体 ,以作为对照。

2 结果

2.1 突变体的获得及其表型分析

通过剪叶法接种实验 ,从 *Xoo* Tn5 转座子插入突变体库<sup>[10]</sup>的 18000 个菌株中 ,筛选到一个致病力缺失突变体 ,命名为 XOG11。接种该突变体到宿主水稻 IR24 上 ,只在伤口以下形成很短的病斑 ,而野生型 *Xoo* PXO99 在水稻中接种 10 ~ 14d 后 ,病斑长度可以达到 15cm 左右甚至 20cm。通过分析 XOG11 的转座子侧翼序列表明 ,Tn5 插入到 *hpaB* 基因的 191bp 处。该突变体在 PSA 培养基中的生长表型与野生型没有明显差异。其胞外纤维素酶和木聚糖酶的分泌也与野生型相似。

2.2 *Xoo* PXO99 *hpaB* 基因及其产物性质

在 *Xoo* 中基因 *hpaB* 的全长 ORF 为 471bp ,编码一个 156 个氨基酸的蛋白 ,位于 *hrp* 基因簇的 *hrpE* 转录元<sup>[8,9]</sup>。 *hrp* 基因簇包括 6 个保守的转录元 ,即从 *hrpA* 到 *hrpF*。另外包含了 *hpa1*、*hpa2*<sup>[7]</sup>、*hpaF* 和 *hrpE* 到 *hrpF* 之间的一个 4 ~ 10 kb 的序列存在较大的变异区。基因 *hpaB* 和上游的编码 93 个氨基酸的 *hrpE1* 共同位于 *hrpE* 转录元 ,因此转座子对 *hpaB* 基因的插入阻断将不会导致其上游基因的极性效

应。HpaB 蛋白分子量 17.6kDa, 预测等电点为 4.28, 亮氨酸含量为 14.4%, 具有 TTSS 分子伴侣的特点<sup>[13]</sup>。

HpaB 在黄单胞菌属(*Xanthomonas*)中有很高的同源性。*Xoo* HpaB 和其他黄单胞菌同源蛋白中氨基酸序列同源性接近 90%: 与 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 (*Xcv*, Accssion no. YP\_362147) 为 95%; *X. axonopodis* pv. *citri* 306 (*Xac*, Accssion no. AAM35287) 和 *X. axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*, Accssion no. AAP34355) 为 92%; *X. campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913 (*Xcc*, Accssion no. AAM40518) 为 86%。另外与 *Burkholderia pseudomallei* 1710b (*Bp*, Accssion no. ABA52332), *Acidovorax avenae* subsp. *avena* (*Aaa*, Accssion no. AAW81008) 和 *Ralstonia solanacearum* (*Rs*, Accssion no. CAD18004) 中的同源蛋白的同源性分别达 53%, 51% 和 50%。

### 2.3 突变体及其插入拷贝数的验证

为排除突变体是由于转座子插入后又带动侧翼序列发生二次转移产生, 用位于插入位点上下游的引物 *hpaB*-cF 和 *hpaB*-cR, 分别扩增野生型和突变体的 DNA。PCR 扩增结果表明, 与 *Xoo* PXO99 菌株扩增片段相比, XOG11 菌株扩增片段由于转座子的插入而增加了 1.2kb (转座子 Tn5 为 1.2kb), 说明该突变株确为转座子插入突变体, 且转座子没有发生附带侧翼的二次转移。为了确认转座子在突变体 XOG11 中的插入拷贝数, 以 <sup>32</sup>P 标记 Tn5 上抗卡那霉素基因(*aph*) 片段为探针与 *Pst* I 完全酶切的 XOG11 总基因组进行 Southern blot。由于 *Pst* I 在转座子 3' 远末端有一个酶切位点, 因此该酶进行的 Southern blot, 不但可以确定在基因组上不同位点的

转座子插入, 而且可以区分出转座子串联重复插入的情况。杂交结果表明, 只有 XOG11 突变体在 1.5kb 处出现单一的杂交条带, 负对照(野生型) *Xoo* PXO99 未出现条带。因此证明 XOG11 为 Tn5 转座子的单拷贝插入突变体, 突变体致病性降低是由转座子在 *hpaB* 基因位点的插入阻断引起(图 1)。

### 2.4 *hpaB* 基因的克隆和遗传互补

为了排除致病力的缺失是由于 Tn5 的插入影响了上下游基因而产生, 对 *hpaB* 基因进行了克隆并对突变体进行了遗传互补。以 *hpaB*-cF 和 *hpaB*-cR 为引物, 从 *Xoo* 野生型基因组 DNA 中扩增 *hpaB* 基因, 并定向克隆到广寄主范围的 pHM1 载体上<sup>[12]</sup> (pHM1 上有一个来源于 pUC19 的多克隆位点和 *plac* 启动子)。提取质粒以 *Hind* III 和 *Eco* R I 双酶切除一条 13kb 左右的载体大片段外, 分离到一条约 0.65 kb 的小片段, 说明 *hpaB* 基因片段已连入 pHM1 载体。电击转化重组质粒 pHM1-*hpaB* 到 XOG11 中, 抗性筛选到互补突变系 XOG11h (XOG11h 由于质粒的进入而获得了壮观霉素的抗性, 能够在含有壮观霉素的 PSA 培养基中生长, 而野生型 *XOO* PXO99 和 *HpaB* 基因的突变体 XOG11 都没有壮观霉素抗性)。从 XOG11h 中提取质粒并做酶切鉴定, 确证 XOG11h 中确实转入了 pHM1-*hpaB*。另外将 pHM1 空质粒转入 XOG11 得到 XOG11p 作为对照。

野生型 *XOO* PXO99, *hpaB* 基因的突变体 XOG11, 互补菌株 XOG11h 和对照 XOG11p 接种到寄主水稻 IR24 上, 于接种后 7d 和 13d 调查白叶枯病的发病情况, 详细记录其病斑长度(图 2)。发现 *Xoo* 突变体互补系 XOG11h 的致病性已基本恢复至野生

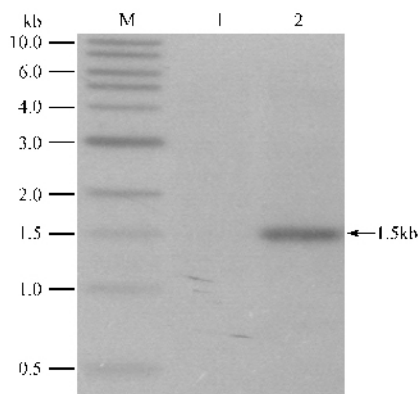


图 1 突变体 Southern blot

Fig.1 Southern blot hybridization of *Xoo* strains. Genomic DNA was digested with *Pst* I and hybridized with the Km resistance gene *aph*. M. 1-kb molecular weight markers; 1. *XOO* PXO99; 2. XOG11.

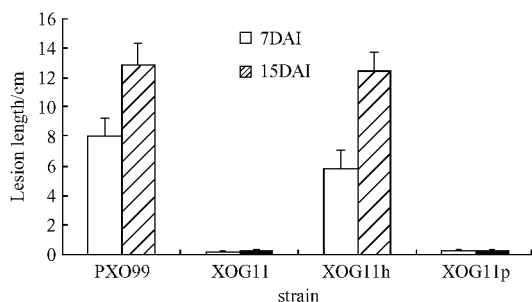


图 2 *hpaB* 突变体及其互补系的致病性分析

Fig.2 Pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains on the susceptible rice cultivar IR24. Inoculation was performed by leaf clipping. Lesion lengths were measured 7 and 13 days after inoculation (DAI). PXO99, mutant XOG11, complemented strains XOG11h and XOG11p were tested. Mean and standard deviation of lesion length from 7 replicate measurements are given. Similar results were obtained in independent experiments.

型,而只转入空载体 pHM1 的 XOG11p 表型与突变体类似。说明突变致病力的恢复是由于 *hpaB* 基因转入而非质粒 pHM1 的转入产生。以上结果表明转座子插入失活导致的致病力下降确实是由于 *Xoo* *hpaB* 基因的失活引起的。

### 3 讨论

病原细菌的分泌系统在致病过程中起重要作用。植物和动物病原细菌都是通过分泌系统将效应蛋白、胞外酶、毒素等致病因子转入寄主细胞内或分泌到细胞表面<sup>[14]</sup>。细菌的Ⅲ型分泌系统由一组称为 *hrp* 基因的基因簇编码,它是细菌分泌效应蛋白进入植物细胞的主要通道。*hrp* 基因簇由 *hrp*、*hrc* (Hypersensitive Response & Conserved), *hpa* 和一些转座子组成,这些基因在诱导条件下表达并形成针状分泌系统。效应因子在一些辅助蛋白的帮助下通过该分泌系统而进入到植物细胞中<sup>[15~17]</sup>。目前有关植物病原细菌 *hrp* 基因簇中基因的研究在 *Xcv* 和 *Rs* 中较为清楚,而在 *Xoo* 中研究还很少<sup>[6,7]</sup>。本文通过转座子插入失活的方法证实了 *Xoo* PXO99 *hrp* 基因簇中 *hpaB* 基因的突变导致其在寄主 IR24 上的致病力的丧失。

由于细菌中存在多顺反子的现象,一个转录元下可能有多个基因,这种转座子插入阻断的突变不但影响了被阻断基因本身,还可能影响到了同一转录元中下游的基因甚至下游转录元中的基因,因此用突变体的遗传互补来验证其功能显得非常重要。本文通过将该基因的全长序列克隆到具有广泛寄主的 pHM1 质粒中,构建的质粒互补 XOG11 使其致病力得到恢复,发病情况与野生型相似,从而确证了该突变体致病力的缺失的确是由 *hpaB* 基因引起,而非其它基因。应当指出的是,本文报道的水稻 IR24 在接种野生型 PXO99 13d 后的发病病斑长度 13cm 左右与之前报道的可达到 20cm 有差异<sup>[3]</sup>。这是因为在网室中接种,虽然尽量严格控制接种条件,选择生长情况一致、生长 40~50d 水稻苗的 2~3 心叶接种,但是形成病斑的长度受到了当时的温度和湿度以及水稻苗本身生长情况的影响,导致不同批次接种的病斑长度有较大差异。因而该实验中设置好对照和重复实验就显得尤为重要。本文所用接种结果的数据均为同一批次相同条件下的接种结果,并且该结果在不同批次的接种中也得到了验证。另外,我们接种了对 PXO99 敏感的水稻品种 IRBB1, IRBB3, IRBB4, IRBB5, IRBB6, IRBB8, IRBB10, IRBB14 和

IRBB21,发现突变体 XOG11 在所有的这些品种中都表现为致病力的缺失,与在 IRBB24 中的情况类似(未显示结果),表明 *hpaB* 基因在细菌侵染以上寄主的过程中扮演着必不可少的角色。

通过对 *HpaB* 的序列分析表明,*HpaB* 具有 TTSS 分子伴侣的性质<sup>[13]</sup>与其它黄单胞菌具有很高的同源性。在 *Xcv* 中,*HpaB* 与一些效应因子蛋白如 *AvrBs1* 和 *AvrBs5* 相互作用并促进其分泌,但却不与 *HrpF* 或 *XopA* 等非效应因子蛋白作用并阻碍它们进入植物细胞<sup>[16]</sup>。进一步研究表明它与Ⅲ型分泌系统的核心结构 *HrcV* 有相互作用并且可能同 *HpaC* 形成复合体,能够有选择的促进一些蛋白如 *XopJ* 和 *XopF1* 的运输而于另对另外一些蛋白不起作用,在底物的分泌过程中起到了分子伴侣的作用<sup>[15]</sup>。通过酵母双杂交实验也发现在 *Xac* 中 *HpaB* 与 *HrcV* 和 *HpaA* 有相互作用<sup>[18]</sup>。据此有理由推测本研究中 *Xoo* *hpaB* 基因的突变体在寄主中致病力的缺失可能是由于该基因的突变影响了某些因子蛋白的有效分泌。由于与寄主特异性相关的因子蛋白在不同的菌株间有很大的差异,因此 *Xoo* 中 *HpaB* 与哪些蛋白有作用及在细菌致病过程中如何发挥其作用有待进一步深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] Swings J, Van den Mooter M, Vauterin L, et al. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol*, 1990, **40**: 309–311.
- [2] Shen Y, Ronald P. Molecular determinants of disease and resistance in interactions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *Microbes Infect*, 2002, **4**(13): 1361–1367.
- [3] Sun QH, Hu J, Huang GX, et al. Type-Ⅱ secretion pathway structural gene *xpsE*, xylanase- and cellulase secretion and virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathology*, 2005, **54**: 15–21.
- [4] Gurlebeck D, Thieme F, Bonas U. Type Ⅲ effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol*, 2006, **163**(3): 233–255.
- [5] Kamdar HV, Kamoun S, Kado CI. Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathovars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of *HrpX* function by sequence analyses. *J Bacteriol*, 1993, **175**(7): 2017–2025.
- [6] Sugio A, Yang B, White FF. Characterization of the *hrpF* pathogenicity peninsula of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, **18**(6): 546–554.
- [7] Zhu W, MaGbanua MM, White FF. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol*, 2000, **182**(12): 1844–1853.

- [ 8 ] Lee BM , Park YJ , Park DS , *et al.* The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331 , the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res* , 2005 , **33**( 2 ) : 577 – 586.
- [ 9 ] Ochiai H , Inoue Y , Takeya M , *et al.* Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. *JARQ* , 2005 , 395 – 287.
- [ 10 ] Sun Q , Wu W , Qian W , *et al.* High-quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pv. *campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system. *FEMS Microbiol Lett* , 2003 , **226**( 1 ) : 145 – 150.
- [ 11 ] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [ 12 ] Shan L , Oh HS , Chen J , *et al.* The HopPtoF locus of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes a type III chaperone and a cognate effector. *Mol Plant Microbe Interact* , 2004 , **17**( 5 ) : 447 – 455.
- [ 13 ] Stebbins CE , Galan JE. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* , 2001 , **414** ( 6859 ) : 77 – 81.
- [ 14 ] Finlay BB , Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* , 1997 , **61**( 2 ) : 136 – 169.
- [ 15 ] Buttner D , Lorenz C , Weber E , *et al.* Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* , 2006 , **59**( 2 ) : 513 – 527.
- [ 16 ] Buttner D , Gurlebeck D , Noel LD , *et al.* HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III - dependent protein secretion. *Mol Microbiol* , 2004 , **54**( 3 ) : 755 – 768.
- [ 17 ] Rossier O , Van den Ackerveken G , Bonas U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III -secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiol* , 2000 , **38**( 4 ) : 828 – 838.
- [ 18 ] Alegria MC , Docena C , Khater L , *et al.* New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri*. *J Bacteriol* , 2004 , **186** ( 18 ) : 6186 – 6197.

## Identification of a hrp-associated gene *hpaB* in the role of pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

ZENG Shen-yan<sup>1,2</sup> , HU Jun<sup>1,2</sup> , HUANG Gui-xiu<sup>3</sup> , HE Chao-zu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> National Key Laboratory of Plant Genomics , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

(<sup>2</sup> Graduate School of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100039 , China )

(<sup>3</sup> Institute of Environmental and Plant Protection , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , Danzhou 571737 , China )

**Abstract :** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ( *Xoo* ), a Gram-negative bacterium , is the causal agent of rice bacterial blight disease , which can cause severe yield loss of rice worldwide. To identify genes contributing to virulence and explore the possible mechanism of pathogenicity , transposon mutagenesis was used to isolate nonpathogenic mutants. By screening of a high-quality Tn5-like transposon ( EZ : Tn ) insertional mutant library of *Xoo* PXO99 against a host plant ( rice cultivar IR24 ) , one virulence-deficient mutant , XOG11 , was identified. Genomic fragment flanking the insertion site of the mutant was amplified by thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction ( TAIL-PCR ) and sequenced. The result of NCBI blast homologue searching of the fragment shows that the transposon was inserted into a *hrp* associated gene , *hpaB*. *Xoo hpaB* gene is one of the *hrp* gene cluster members that encode a type III secretion system ( TTSS ) and locates at the downstream of *hrpE*. The product of *hpaB* in *Xoo* is a small ( Molecular Weight , 17.6kDa ) , acidic ( PI , 4.28 ) and Leucine-rich ( 14.4% ) protein and shares high homology with corresponding proteins in other *Xanthomonas*. It suggests that HpaB may play as a TTSS chaperone. Mutant XOG11 was confirmed both by PCR and Southern blotting : The PCR result by using primers upstream and downstream of *hpaB* respectively verified Tn5 insertion in *hpaB* and excluded the rare case of second transfer of the transposon associated with flanking sequence ; Southern blot of digested genomic DNA with the probe of Km resistance gene *aph* proved that XOG11 was inserted by a single-copy transposon , indicating that the loss of pathogenicity in XOG11 was due to the Tn5 insertion in *hpaB* gene. Genetic complementation by cloning *hpaB* in the wide host range plasmid pHM1 and transferring the recombinant plasmid into XOG11 restored its pathogenicity in IR24. These results suggest that the pathogenicity deficiency of XOG11 is due to the mutation of *hpaB* gene.

**Keywords :** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* , TAIL-PCR ; *hrp* gene cluster ; *hpaB*