

水稻白叶枯病菌 TonB-Dep-Rec 蛋白家族成员 Tdrxoo 的功能鉴定

许景升, 吴茂森, 何晨阳*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:【目的】旨在揭示水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)致病性和运动性及其基因表达的调控途径。【方法】本研究通过基因克隆、序列分析和缺失突变方法, 对与应答调节子 GacAxoo 互作的 Tdrxoo 的分子特征和功能进行了鉴定。【结果】利用序列特异性引物进行基因扩增, 成功地从野生型菌株 PXO99^A 中克隆了 *tdrxoo* 基因。Tdrxoo 与其它病原黄单胞菌的同源序列高度保守, 具有 TonB-Dependent-Receptor (TDR) 结构域, 推测其是位于细菌外膜、可能接收来自细菌体外环境信号的蛋白。用基因标记交换法, 构建了 Δ *tdrxoo* 基因缺失突变体。与 PXO99^A 相比, Δ *tdrxoo* 在人工培养条件下的生长受到影响, 致病性完全丧失, 胞外纤维素酶和木聚糖酶活性和运动能力显著减弱, 基因互补可以使之恢复; Δ *tdrxoo* 嗜铁素产生无明显改变。【结论】Tdrxoo 作为一种细胞外膜蛋白, 可能参与调控了病菌的生长、致病性、胞外酶活性和运动性等表型。

关键词: 水稻白叶枯病菌; Tdrxoo; TonB-Dep-Rec 蛋白; 致病性; 调控作用

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0155-07

由信号感应子/应答调节子组成的双组分系统 (two-component regulatory system, TCS) 通过信号识别和传递, 调节基因转录, 控制细菌细胞反应^[1]。根据全基因组序列推测, 水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 简称 Xoo) 存在几十对 TCS 成员, 共同组成了精密的调控网络系统^[2-3]。对由 TCS 组成的调控网络系统进行解析, 将可以阐明病菌致病性的分子机理。

前人研究表明, 应答调节子 GacA 作为一个主控因子, 控制了细菌毒性、运动性、胞外多糖和酶类产生、毒素合成、群体感应、生物膜形成、存活、次生代谢产物产生等表型及其基因表达^[4]。在前期研究中, 我们已对 GacAxoo 基因结构和功能进行了分子鉴定; 同时, 利用酵母双杂交方法, 获得了一个

GacAxoo 的互作蛋白 Tdrxoo, 它属于 TonB-Dep-Rec 蛋白家族成员。本文报道通过基因克隆、序列分析和缺失突变分析, 对 Tdrxoo 的结构和功能进行分子定性的研究结果。本研究的目的在于为发掘可能由 Tdrxoo/GacAxoo 组成的一对新型 TCS, 为阐明其对病菌生长、致病性、运动性及其基因表达的调控作用机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 凝胶回收纯化试剂盒、pMD18-T Vector 试剂盒以及限制性内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司, Carboxymethyl Cellulose 和 Remazol Brilliant Blue R - D-Xylan (RBB-xylan)

基金项目: 国家自然科学基金(30671353); 中央财政国家重点实验室自主研究课题专项(SKL2007SR06)

* 通信作者。Tel: +86-10-62894147; E-mail: cyhe@caas.net.cn

作者简介: 许景升(1976-), 男, 河北人, 博士研究生, 从事植物-病原物分子互作研究。E-mail: jsxu@ippeaas.cn

收稿日期: 2009-06-30; 修回日期: 2009-09-15

购自 Sigma-Aldrich Co.。电击仪 (BIO-RAD 公司 Pluse Controller 仪)。

1.1.2 菌株、质粒和培养条件:供试细菌菌株和质粒的特征及来源列表 1。Xoo 菌株在 28℃ PSA 培养基上培养。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 在 37℃ LB

培养基上培养。实验用抗生素浓度为卡那霉素 (Kan) 25 mg/L、壮观霉素 (Sp) 100 mg/L、氨基青霉素 (Amp) 100 mg/L。质粒 pK18mobSacB 为中国科学院微生物研究所植物基因组学重点实验室惠赠,该质粒不能在 Xoo 中复制。

表 1 本研究所用细菌菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i>	Lab collection
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		
PX099 ^A	Wild-type strain, Philippine race 6	Lab collection
Δ <i>tdrxoo</i>	<i>tdrxoo</i> gene inserted by pK- <i>tdr</i> , Kan ^R	This study
Δ <i>tdrxoo</i> -C	Δ <i>tdrxoo</i> complemented with pH- <i>tdrxoo</i> , Kan ^R , Sp ^R	This study
Plasmid		
pMD18-T	Amp ^R , <i>ColE1</i> origin, T-vector	TaRaKa
pK18mobSacB	Kan ^R , <i>oriT</i> (RP4), <i>lacZα</i>	[5]
pHM1	Sp ^R , Sm ^R , <i>cos</i> , <i>parA</i> , <i>IncW</i> , derivative of pRI40	[6]
pH- <i>tdrxoo</i>	pHM1 with <i>tdrxoo</i> gene	This study
pK- <i>tdr</i>	pK18mobSacB with <i>tdrxoo</i> fragment	This study

1.2 基因克隆和序列分析

1.2.1 引物:根据含有 TonB-Dep-Rec 片段的基因 *tdrxoo* 序列,采用在线软件 Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计引物 *tdrxoo*F/R 和 *tdr*F/R。表 2 为本次研究所用引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 2 本研究所用引物序列

Table 2 The sequences of primers used in the study

Primers	Sequences(5'→3')
<i>tdrxoo</i> F	TGGGCAGCTTGTAGTTTCAGGCCAA
<i>tdrxoo</i> R	CCATTATGGCCGGG GGGACTACTGG
<i>tdr</i> F	ATCACTGATTTTATTTAAATTTACTG
<i>tdr</i> R	GCTGACGTGGTGAGATCGAACCG

1.2.2 PCR:以 PX099^A 基因组 DNA 为模板, *tdrxoo*F/*tdrxoo*R 为特异性引物,进行 PCR 扩增,扩增条件为:95℃ 5 min;95℃ 45 s,60℃ 3 min,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 7 min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 基因克隆和序列分析:分别使用凝胶回收纯化试剂盒和 pMD18-T Vector 试剂盒纯化和连接目的基因。连接产物按照文献[7]的方法转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。采用 ABI Prism 377 测序仪测定目的基因的核苷酸序列。序列分析软件为:DNASar 7.1、DNAMAN 6 和 BioEdit 7。蛋白质结构域分析通过 SMART 程序和 CDS 程序进行。BLAST 进行序列同源性比对。

1.3 基因标记交换与突变体构建及其互补分析

参照文献[8]的方法进行基因标记交换。以 PX099^A 基因组 DNA 为模板,设计引物 *tdr*F/*tdr*R (表 2),扩增 *tdrxoo* 基因片段。将该片段连接 pMD18-T 载体,转化 *E. coli* 感受态细胞,提取重组子质粒,*Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切分析质粒 DNA,回收酶切片段,与经过相同内切酶处理的 pK18mobSacB 载体连接,转化 *E. coli* 感受态细胞。选取阳性克隆提取重组子质粒 DNA,*Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切分析验证。

将 pK-*tdr* 通过电击导入 PX099^A 感受态细胞中,转化液铺于含 Kan^R 的 PSA 平板,在 28℃ 下培养 3-5 d;将阳性转化子菌落重新转接于含 Kan^R 的 PSA 平板,转接 3-4 次;然后将阳性菌落接种含 Kan^R 的 M210 液体培养基,在 28℃ 下振荡 (200 r/min) 培养 48 h,接种针蘸取少量菌液划线于含 Kan^R 的 PSA 平板,在 28℃ 下培养 48-72 h;挑取阳性单克隆接种含 Kan^R 的 M210 液体培养基,在 28℃ 下振荡 (200 r/min) 培养 48 h,保存 *tdrxoo* 突变体菌种于 -70℃。用 PCR 引物 *tdrxoo*F/*tdrxoo*R 分析验证 Δ *tdrxoo* 突变体。

采用引物 *tdrxoo*F/*tdrxoo*R 扩增含自身启动子的 *tdrxoo*,克隆到 pMD18-T 载体上,测序鉴定后,用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切回收约 3.2 kb 的片断,与经同样双酶切处理的 pHM1 载体相连接,构建 *tdrxoo* 突变基因互补质粒,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,提取阳性克隆中的质粒,将其转入 *tdrxoo* 突变体中,含 Sp^R 和 Kan^R 的 PSA 平板筛选阳性转化子。

1.4 生长曲线测定

将待测菌株在 28℃ 下振荡培养 48 h 后, 用新鲜的 M210 或 XOM2 培养基将各菌稀释至 $OD_{600} = 0.5$, 以 1:1000 (V/V) 的比例将各个相同浓度的菌种接种于 100 mL 的 M210 或 XOM2 培养基中, 在 28℃ 下振荡 (200 r/min) 培养, 每隔 6 h 同时测定各菌株在 600 nm 的吸光值。

1.5 致病性测定

将待测菌株在 28℃ 下振荡培养至 10^8 CFU/mL 以上, 离心收集菌体, 无菌水稀释菌液至 $OD_{600} = 0.5$ 。用剪叶法将稀释好的各个菌种均匀接种到生长期为 40 d 的感病水稻品种 IR24 的 2-3 心叶上, 每个菌株接种叶片 15 张。温室温度控制在 25-35℃, 湿度达到 90% 左右, 以利于 Xoo 的发病, 接种后 12 d 和 20 d 调查白叶枯病的发病情况。

1.6 胞外降解酶类活性测定

参照文献 [7-9] 的方法, 检测测试培养基上菌落周围产生的底物水解圈, 进行木聚糖酶和纤维素酶活性的测定。

1.7 运动性检测

运动性检测方法参照 Shen 等 [10] 的方法, 将待测细菌在 NA 平板上活化后, 在含相应抗生素的 NA 液体培养基中振荡培养 48 h, 至对数生长期, 离心收集菌体, 无菌水稀释菌液至 $OD_{600} = 0.5$, 取 1 μ L 培养液点接于半固体培养基平板, 28℃ 温箱培养 4 d 或以上, 观察细菌运动痕迹。

1.8 嗜铁素产生测定

嗜铁素检测培养基 (CAS-PSA) 制作参照 Schwyn 和 Neilands 方法 [11]: 取 0.012 g 铬天青 S (CAS) 溶于 10 mL ddH₂O 中, 并与 2 mL 1 mmol/L FeCl₃ 溶液混匀配制为溶液 A; 取 0.015 g 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 溶于 8 mL ddH₂O 中配制溶液 B; 将溶液 A 缓慢加入到溶液 B 中, 充分混匀即为 CAS 染液。将待测菌用牙签蘸取少许菌液点接于含 1% CAS 染液的 PSA 平板上。28℃ 培养 48 h 后, 由于嗜铁素竞争培养基中 EDTA 螯合的铁离子, 使培养基由蓝色变成黄色, 观察菌落黄色晕圈的有无或者大小, 判断菌株间嗜铁素产量的差异。每个处理设 3 个重复。

2 结果和分析

2.1 *tdrxoo* 基因克隆、功能结构域和序列同源性

SMART 程序分析显示 *tdrxoo* 基因全长为 2910 bp, 编码 969 个氨基酸, 分子量为 103.3 kDa, 等电点为 4.656。1-23 位氨基酸为信号肽, 55-167 位氨基酸为 plug 结构域, 608-969 位氨基酸为 TonB-Dependent Receptor 结构域 (图 1)。Tdrxoo 具有接受胞外信号的胞外环和可以进行跨膜的反向 β -折叠桶。CDS 程序搜索保守结构域, 发现 Tdrxoo 与离子通道配体蛋白、铁离子运输蛋白、TonB-Dep-Rec 蛋白和细菌外膜蛋白具有同源性。推测其是位于细菌外膜的蛋白, 可能接收来自细菌体外环境的信号。*tdrxoo* 在已测序菌株 Xoo KACC10331 中注释为未知功能蛋白。



图 1 Tdrxoo 保守结构域

Fig. 1 Domain architecture of Tdrxoo signal peptide (red).

分析已完成全基因组序列测定的六个黄单胞属细菌的基因组序列, 发现 *tdrxoo* 及其在其它黄单胞属细菌中的同源基因, 在基因组中的位置具有高度保守性, *tdrxoo* 上游为热激蛋白基因和与内膜转运相关的基因, 下游为 *terR* 类调控抑制子和水解酶相关基因 (图 2)。

2.2 $\Delta tdrxoo$ 突变体构建和互补

引物 *tdrF/R* 扩增 *tdrxoo* 含有的 TonB-Dep-Rec 结构域, 长度为 571 bp, *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切分因突变体 $\Delta tdrxoo$ 。

析 *tdrxoo* 突变体质粒, 表明片段正确插入 pK18mob*SacB* 载体, 命名为 pK-*tdr*。

pK-*tdr* 中含有的 *tdrxoo* 片段为 PX099^A 基因组中 *tdrxoo* 的一部分, 二者发生同源重组, 质粒整合到 PX099^A 基因组中, 造成 *tdrxoo* 的断裂, 达到突变该基因的目的。*tdrxooF/tdrxooR* 位于 *tdrxoo* 基因相邻的 5' 端和 3' 端, 在 PX099^A 中的扩增产物是 3.2 kb, *tdrxoo* 突变体中由于 pK18mob*SacB* 插入到 *tdrxoo* 基因中, 其扩增产物为 7.2 kb, 证明已经获得 *tdrxoo* 基因与 pHM1 载体连接, 获得 *tdrxoo* 突变体

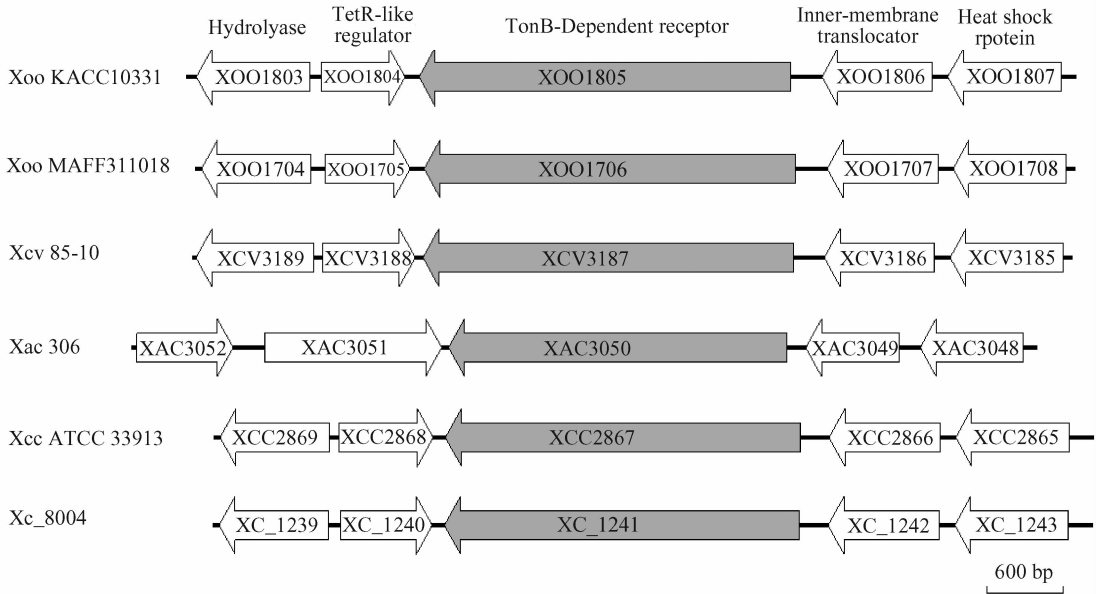


图 2 *tdrxoo* 基因在黄单胞属细菌基因组中位置

Fig. 2 The genome organization of *tdrxoo* in completely sequenced *Xanthomonas* bacterial genomes. *Xac*, *X. axonopodis* pv. *citri*; *Xcv*, *X. campestris* pv. *vesicatoria*; *Xcc* and *Xc*, *X. campestris* pv. *campestris*.

互补质粒 pH-*tdrxoo*, 将 pH-*tdrxoo* 电击导入 Δ *tdrxoo* 感受态细胞, 在含 Sp^R 和 Kan^R 的 PSA 平板获得阳性转化子, 命名为 Δ *tdrxoo*-C。从互补菌株中提取质粒, *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切分析, 证明互补菌株含有 pH-*tdrxoo* 质粒。

2.3 Δ *tdrxoo* 的生长

在丰富培养基 M210 中, Δ *tdrxoo* 迟滞期比 PX099^A 晚 12 h, 而且在静止生长期突变体菌株的最大菌浓度明显低于 PX099^A, 互补菌株 Δ *tdrxoo*-C 则恢复至野生型水平(图 3-A)。选择 *hrp* 基因诱导培养基 XOM2 模拟细菌在植物体内的环境。与 PX099^A 相比, Δ *tdrxoo* 菌株在 XOM2 培养基中不能达到静止生长期(图 3-B), 生长受到严重抑制。因此, *tdrxoo* 基因突变使得 Xoo 在 M210 和 XOM2 中的生长均受到影响。

2.4 Δ *tdrxoo* 致病性、胞外降解酶活性和运动性

与 PX099^A 相比, Δ *tdrxoo* 丧失致病性, 在接种叶片上几乎看不到病斑的产生(图 4-A), 纤维素酶和木聚糖酶活性、运动能力明显减弱(图 4-B), 互补菌株 Δ *tdrxoo*-C 的致病性、酶活性、运动能力恢复至 PX099^A 相同的水平。表明 *tdrxoo* 的突变影响了 Xoo 的致病性、纤维素酶和木聚糖酶活性以及运动性。

2.5 Δ *tdrxoo* 嗜铁素产生

各个测试菌株的嗜铁素产生水平并无明显差异, 表明虽然 Tdrxoo 具有 TonB-Dep-Rec 结构域, 但是该基因的表达与否与胞外铁离子的浓度无关(结果未列出)。

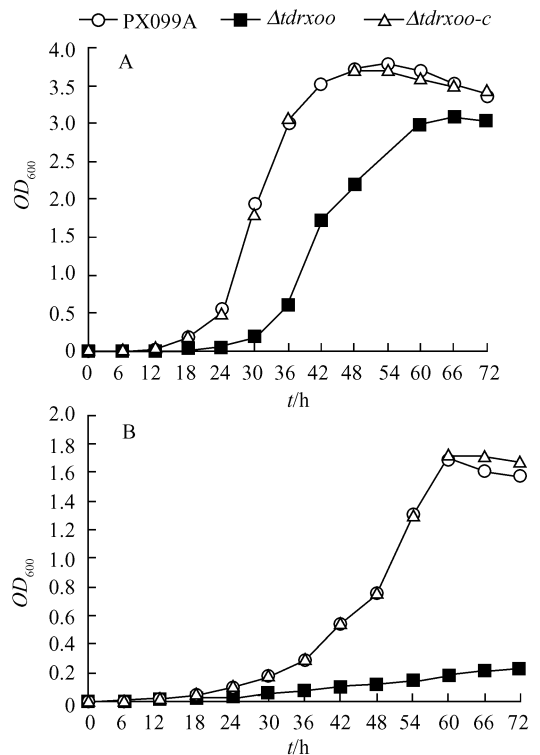


图 3 PX099^A 及 *tdrxoo* 突变体株和互补株在 M210 和 XOM2 培养基中生长曲线测定

Fig. 3 The growth curve of PX099^A and its *tdrxoo* derivatives in M210 (A) and XOM2 (B) medium.

3 讨论

tdrxoo 基因突变对病菌嗜铁素产生无明显影响。TDR (TonB-dependent receptors) 蛋白最初是作

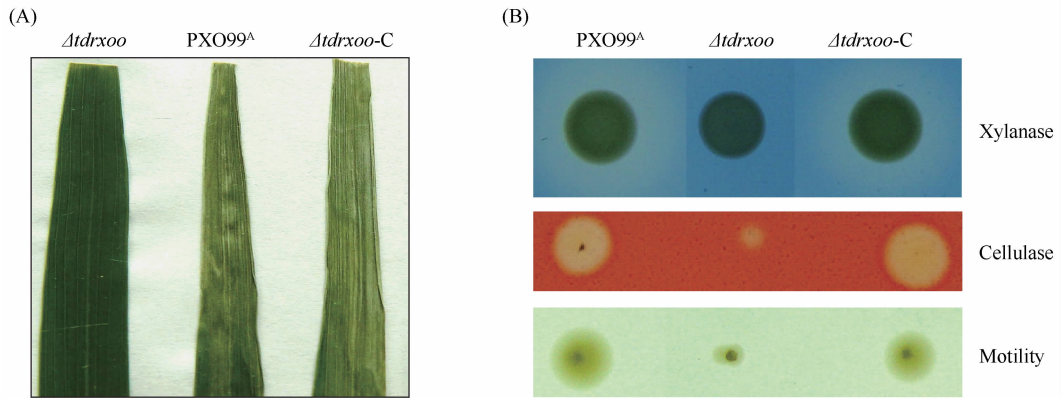


图 4 致病性、胞外酶活性和运动性测定

Fig. 4 Pathogenicity, extracellular enzyme production and motility of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains.

为铁离子转运载体而为人们所认知^[12]。由位于细菌细胞内膜的 TonB-ExbB-ExbD 复合体提供能量, 位于外膜的依赖于 TonB 的受体特异性识别结合有 Fe^{3+} 离子的铁载体, 将 Fe^{3+} 从胞外转运至周质空间^[13]。近年来, 研究表明 TDR 除参与铁离子运输外, 在细菌转运和吸收其他大分子过程中也具有重要作用。在甘蓝黑腐病菌中, 包含 TDR 基因的 *suxABCR* 基因簇调控蔗糖的运输^[14], 而在伊拉克固氮螺菌 (*Azospirillum irakensis*) 中, *sal* 操纵子含有一个 *tdr* 基因, 控制着细菌对植物中水杨苷的吸收和代谢^[15]。本研究发现 *tdrxoo* 基因突变对细菌嗜铁素产生无明显影响, 可能 Tdrxoo 涉及某些大分子的运输。

tdrxoo 基因参与调控了病菌致病性。 *tdr* 基因在黄单胞菌属中是保守的, 在柑橘溃疡病菌、甘蓝黑腐病菌、辣椒斑点病菌、Xoo 基因组中分别存在几十个 *tdr* 基因, 仅有少数 *tdr* 基因涉及到铁离子运输, 其他的基因功能仍是未知的。在甘蓝黑腐病菌 (Xcc) 中, *tonB-exbB1-exbD1* 基因簇是引起寄主花椰菜黑腐病和激发非寄主植物 HR 所必需的^[16]。青枯病菌中 PrhA 作为一个外膜蛋白受体, 具有 TonB-Dep-Rec 结构, 但是 PrhA 并不能感应胞外铁离子的浓度, 而感应来自拟南芥或烟草悬浮细胞的非扩散性信号分子, 调控 *hrp* 基因簇。因此, PrhA 作为受体位于这个信号级联调控途径的顶级位置, 接受来自植物特异性信号; 但是 *prhA* 基因突变, 青枯病菌对烟草和拟南芥仍具有致病性^[17-20]。水稻条斑病菌 *prhA* 基因同样具有 TDR 结构域, 该基因突变导致致病性和致敏性丧失; 但仍能引起水稻幼苗叶片的水渍症状, *hap1* 基因表达不受影响^[21]。然而, *tdrxoo* 与植物青枯病菌和水稻条斑病菌 *prhA* 比较, 发现三者核苷酸同源率为 41%, 氨基酸同源率仅为

15%。因此, *tdrxoo* 明显不同于上述两个基因, 其参与调控的途径可能是一个全新的信号途径, 这或许是 $\Delta tdrxoo$ 与 $\Delta prhA$ 表型有差异的原因。

tdrxoo 基因参与调控了病菌生长。在甘蓝黑腐病菌中, *suxABCR* 由相邻的四个基因组成, 参与蔗糖的运输和代谢。 *suxA* 具有 TDR 结构域, *suxB* 编码蔗糖水解酶, *suxC* 编码蔗糖运输蛋白, 辅助底物分子通过细菌细胞内膜; *suxR* 编码 LacI/GalR 类转录抑制子。 *suxA*、*suxB* 和 *suxC* 的分别突变, 均导致 Xcc 相似的表型变化, 包括致病性丧失和生长缓慢^[14]。在 Xoo 基因组中, *tdrxoo* 相邻上游两个 ORF 中 XOO1806 为内膜转运蛋白, XOO1807 为热激蛋白基因, 相邻下游两个 ORF 中 XOO1803 为水解酶基因, XOO1804 为 TetR 转录调控抑制子, 具有 HTH 结构域。 *tdrxoo* 基因簇类似于 Xcc *suxABCR* 基因簇, 推测 Tdrxoo 参与了蔗糖代谢和运输。 *tdrxoo* 突变导致了 Xoo 不能利用培养基中的蔗糖作为碳源。因此, $\Delta tdrxoo$ 突变体生长缓慢, 进而影响到其它生理生化过程, 包括胞外酶活性和运动能力下降。

本研究初步阐述了 Tdrxoo 的功能, 然而 Tdrxoo 是通过什么机制、尤其是否以及如何通过其互作蛋白 GacAxoo 影响 Xoo 表型的变化仍需深入研究。

参考文献

- [1] Calva E, Oropeza R. Two-component signal transduction systems, environmental signals, and virulence. *Molecular ecology*, 2006, 51: 166-176.
- [2] 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 research*, 2005, 33(2): 577-586.
- [3] 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. *Japan agricultural research quarterly*, 2005, 39(4): 275-287.
- [4] Goodier RI, Ahmer BM. SirA orthologs affect both motility and virulence. *Journal of bacteriology*, 2001, 183: 2249-2258.
- [5] Schafer AA, Tauch WJ, J Kalinowski G, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145: 69-73.
- [6] Hopkins CM, White FF, Choi SH, et al. Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular plant-microbe interactions*, 1992, 5(6): 451-459.
- [7] Tsuchiya K, Mew TW, Wakimoto S. Bacteriological and pathological characteristics of wild types and induced mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Phytopathology*, 1982, 72(1): 43-46.
- [8] Keen NT, Boyd C, Henrissat B. Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular plant-microbe interactions*, 1996, 9(7): 651-657.
- [9] Andro T, Chambost JP, Kotoujansky A, et al. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *Journal of bacteriology*, 1984, 160(3): 1199-1203.
- [10] Shen Y, Chern M, Silva F, et al. Isolation of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* flagellar operon region and molecular characterization of *flhF*. *Molecular plant-microbe interactions*, 2001, 14: 204-213.
- [11] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 1987, 160(1): 47-56.
- [12] Braun V. Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS microbiology reviews*, 1995, 16(4): 295-307.
- [13] Larsen RA, Myers PS, Skare JT. Identification of TonB homologs in the family Enterobacteriaceae and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes. *Journal of bacteriology*, 1996, 178(5): 1363-1373.
- [14] Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, et al. Plant carbohydrate scavenging through TonB-Dependent receptors: A feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS One*, 2007, 2(2): e224. doi: 10.1371/journal.pone.0000224.
- [15] Faure D, Saier MH Jr, Vanderleyden J. An evolutionary alternative system for aryl β -glucosides assimilation in bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2001, 3: 467-470.
- [16] Wiggerich HG, Alfred Pühler^A. The *exbD2* gene as well as the iron-uptake genes *tonB*, *exbB* and *exbD1* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are essential for the induction of a hypersensitive response on pepper (*Capsicum annuum*). *Microbiology*, 2000, 146: 1053-1060.
- [17] Marena M, Brito B, Callard D, et al. PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. *Molecular microbiology*, 1998, 27: 437-453.
- [18] Belen B, Didier A, Patrick B, et al. A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Molecular plant-microbe interactions*, 2002, 15(2): 109-119.
- [19] Belen B, Marc M, Patrick B, et al. *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular microbiology*, 1999, 31(1): 237-251.
- [20] Didier A, Belen B, Christian B, et al. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *The EMBO journal*, 2000, 19: 2304-2314.
- [21] Zou LF, Wang XP, Xiang Y, et al. Elucidation of the *hrp* clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Applied and environmental microbiology*, 2006, 72(9): 6212-6224.

Identification and functional analysis of Tdrxoo, the member of TonB-dependent-receptor family proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Jingsheng Xu, Maosen Wu, Chenyang He*

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: [**Objective**] To demonstrate the novel regulatory pathways mediated in bacterial pathogenicity and motility in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), the casual agent of bacterial blight in rice. [**Methods**] Molecular identification and functional characterization of Tdrxoo, which interacts with GacAxoo of the two-component regulatory system (GacSxoo/GacAxoo) in Xoo, were performed through gene cloning, sequencing and disrupt analysis. [**Results**] *tdrxoo* was successfully cloned from the genomic DNA of wild-type PXO99^A by using polymerase chain reactions with the degenerated primers *tdrxoo*F/R. The *tdrxoo* gene was found to be highly conserved in the plant-pathogenic *Xanthomonas* spp. Sequence analysis showed that Tdrxoo was homological to a protein with the TonB-Dependent-Receptor (TDR) domain. Tdrxoo is probably localized in the outer membrane of bacterial cells, recognizing the signals from extracellular environment, and inducing the intracellular signal transduction. Δ *tdrxoo*, the disrupted mutant, was obtained after a single cross-over recombination event between *tdrxoo* and the plasmid pK-*tdr* with the *tdrxoo* segment. The mutant lost the ability of causing the disease, and was affected in growth *in vitro* compared to PXO99^A. In addition, the motility and the extracellular enzymes production of Δ *tdrxoo* were reduced, which can be restored through complementation of the Δ *tdrxoo* mutant by introduction of *tdrxoo*. *tdrxoo* deficiency didn't affect siderophore production. [**Conclusion**] According to the existence of *tdrxoo* in Xoo genome and phenotype of Δ *tdrxoo*, Tdrxoo, as the outer membrane protein, is proposed to be involved in regulation of pathogenicity, extracellular enzyme production, the growth and motility of Xoo.

Keywords: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; Tdrxoo; TonB-Dep-Rec protein; pathogenicity; regulation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (30671353) and the Special Funding of State Key Laboratory of China (SKL2007SR06)

* Corresponding author. Tel: +86-10-62894147; E-mail: cyhe@caas.net.cn

Received: 30 June 2009/ Revised: 15 September 2009

1953 年创刊以来所有文章全文上网

2008 年 1 月,《微生物学报》自 1953 年创刊以来的所有文章开始全文上网。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远,为方便读者查阅,将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表
2010 年 2 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008	月刊	48	1 - 12
2009	月刊	49	1 - 12
2010	月刊	50	2