

hrpD6 基因决定白叶枯病菌在烟草上的过敏反应和在水稻上的致病性

郭晓霞¹, 邹华松², 李玉蓉¹, 邹丽芳², 陈功友^{1,2*}

(¹ 南京农业大学植物保护学院, 农业部病虫害监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

(² 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘要:【目的】白叶枯病菌 *hrp* 基因簇由包括 *hrpD6* 在内的 26 个 *hpa-hrp-hrc* 基因组成, 与植物互作后形成 III 型分泌系统 (T3S), 将 T3S 效应分子注入寄主细胞中从而决定在非寄主上的过敏反应 (HR) 和在水稻上的致病性。但 *hrpD6* 基因是否参与了白叶枯病菌在非寄主上的过敏反应 (HR) 和在水稻上的致病性 (pathogenicity) 还不清楚。【方法】借助同源重组方法, 本研究对白叶枯病菌 *hrpD6* 基因进行了突变。【结果】PCR 和 Southern 杂交结果显示, *hrpD6* 基因被成功敲除。烟草上测定结果显示, *hrpD6* 突变体 $\Delta PhrpD6$ 丧失了 HR 激发能力。致病性测定发现, $\Delta PhrpD6$ 在水稻苗期不能形成水渍症状, 在成株期水稻上不具有致病性, 并且细菌生长能力显著下降。功能互补结果显示, *hrpD6* 基因可恢复 $\Delta PhrpD6$ 在烟草上激发 HR 和在水稻上的致病性以及在水稻组织中的生长能力。RT-PCR 结果显示, *hrpD6* 基因的转录表达不仅受水稻诱导, 而且受 *hrpG* 和 *hrpX* 基因调控。不仅如此, *hrpD6* 基因突变还影响 T3S 效应分子 *hpa1* 基因的转录表达和 Hpa1 蛋白的分泌, 暗示 *hrpD6* 基因对 *hpa1* 基因转录表达具有调控作用。【结论】*hrpD6* 基因的缺失导致白叶枯病菌不能激发烟草产生 HR 和丧失在水稻上的致病性, 主要是 HrpD6 对 *hpa1* 基因转录表达具有调控作用, 并影响 T3S 效应分子 Hpa1 的分泌。这些结果为进一步分析 *hrpD6* 是否参与 T3S 分泌装置的形成和调控其它 *hrp* 基因的转录表达从而决定病菌在非寄主上的 HR 和在水稻上的致病性, 提供了科学线索。

关键词: 水稻黄单胞菌; *hrpD6*; 三型分泌系统; 过敏性反应; 致病性

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1155-09

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) 引起的水稻白叶枯病是水稻上的重要细菌病害。和其他革兰氏阴性植物病原细菌一样, *Xoo* 拥有 *hrp* 基因簇, 决定着病原细菌在非寄主植物上的过敏反应 (HR) 和在寄主植物上的致病性 (pathogenicity)^[1]。*Xoo* 的 *hrp* 基因簇由 9 个保守的 *hrc* (*hrp*-conserved)、8 个 *hpa* (*hrp*-associated) 和 9 个 *hrp* 基因组成。9 个保守的 Hrc 蛋白组装形成 T3S 分泌装置 (T3S)^[2], 借助 HrpE 形成的 Hrp pilus 和 HrpF 形成的转位装置^[3], 将致病性效应分子 (T3S effectors) 注射到植物细胞

中, 从而导致产生感病性或抗病性^[4]。在 8 个 *hpa* 基因中, *hpa1* 和 *hpa2* 基因在毒性中具有作用^[5], 并且较早明确 Hpa1 蛋白具有 HR 激发能力^[6]。*hpaB* 和 *hpaP* 基因产物具有控制 T3S 效应分子分泌的作用, 是 T3S 出口控制蛋白^[7]。HpaA 主要与 HpaB 结合, 控制 T3S 的分泌效率^[8]。Hpa4 和 Hpa3 对病菌的毒性有作用^[9]。

在 9 个 *hrp* 基因中, *hrpE* 基因产物形成 Hrp pilus^[10], *hrpF* 形成转位装置^[11], *hrpB1*、*hrpB2* 和 *hrpB4* 可以被 T3S 装置分泌并且 *hrpB5* 对病菌的致

基金项目: 国家“973 项目” (2006CB101902); 国家自然科学基金 (30710103902, 30671354); 农业部公益行业专项 (NYHYZX07-056)

* 通信作者。Tel: +86-25-84395028; Fax: +86-25-84399002; E-mail: gyouchen@njau.edu.cn

作者简介: 郭晓霞 (1984-), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: guoxiaoxia413@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-03-19; **修回日期:** 2010-04-26

病性起关键作用^[12],而 *hrpD* 转录单元中的 *hrpD5* 和 *hrpD6* 基因在水稻白叶枯病菌致病性中如何起作用,还不清楚。

一般来说,植物病原细菌 *hrp* 基因的表达受环境信号的诱导。在丰富培养基中生长,病原菌的 *hrp* 系统仅有微弱的表达,而在植物组织或类似植物组织的特殊培养基中,*hrp* 基因的表达可以被有效激活^[13-14]。*hrp* 调节基因和调节系统在 *Pseudomonas syringae*、*Erwinia* spp.、*Ralstonia solanacearum* 和 *Xanthomonas* spp. 中差异很大^[15]。在 *Xanthomonas* 属,*hrp* 基因表达由 *hrpG* 和 *hrpX* 调控^[16]。*HrpG* 属于双组分调控系统中 *OmpR* 家族成员,激活 *AraC* 类型的调控因子 *HrpX*,再由 *HrpX* 调节下游的 *hrp* 转录单元和 T3S 效应分子^[17-18]。虽然有报道称 *Xoo* 的 *trh* 基因可以调节 *hrpG* 的表达,目前还不清楚细菌是怎样识别环境信号从而激活 *hrp* 基因的^[19]。

hrpD6 是一个比较特殊的 *hrp* 基因,仅在 *Xanthomonas* 属植物病原细菌中存在。稻黄单胞菌的 *hrpD6* 是否决定在非寄主上的 HR 和在寄主上的致病性以及对其余 *hpa-hrp-hrc* 基因是否产生影响,还少见报道。本文对 *Xoo* 的 *hrpD6* 基因进行缺失突变,发现其在非寄主植物上丧失了 HR 激发能力和在水稻上的致病性,并且 *hrpD6* 的表达受水稻细胞诱导和受 *hrpG* 与 *hrpX* 调节,对 T3S 效应分子 *hpa1*

基因的表达和 *Hpa1* 蛋白的分泌具有重要的影响作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: *Xoo* 各供试菌株基因组 DNA 提取试剂盒购于 Axygen 公司,总 RNA 提取试剂盒购于 Roche 公司,反转录试剂盒购于 Roche 公司。连接所用 PMD18-T 载体、连接酶、限制性内切酶、Ex-Tag 酶和 DNA marker 均购于 TaKaRa 公司。Southern blot 所用 DIG 试剂盒购于 Roche 公司。Western blot 试剂盒购于 GeneScript 公司。引物合成和测序由 Invitrogen 公司完成。冷冻离心机、PCR 仪和分光光度计购于 Eppendorf 公司。凝胶成像系统购于 Bio-Rad 公司。

1.1.2 供试菌株、质粒、植物和生长条件: 本研究所使用的菌株及质粒见表 1。*Xoo* 菌株在 NA 和 NB 培养基中 28℃ 培养。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 于 LB 中 37℃ 培养。所用抗生素及浓度分别为:氨基青霉素 (Ap) 100 mg/L,卡那霉素 (Km) 25 mg/L 和利福平 (Rif) 100 mg/L。

烟草为 *Nicotiana tabacum* L. cv. *xanthi* 和水稻为感病品种 IR24,本实验室保存和种植于南京农业大学温室。

表 1 本研究所用菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains or Plasmids	Properties	Source
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		
PXO99 ^A	Wild type, Philippine race 6	This lab
Δ <i>PhrpD6</i>	The <i>hrpD6</i> knock-out mutant of the strain PXO99 ^A	This study
Δ <i>PhrpD6</i> (p Δ <i>hrpD6</i>)	Km ^r , the transconjugant of Δ <i>PhrpD6</i> with the <i>hrpD6</i> gene ligated in pUFR034	This study
Δ <i>PhrpG</i>	The <i>hrpG</i> gene knock-out mutant of strain PXO99 ^A	This lab
Δ <i>PhrpX</i>	The <i>hrpX</i> gene knock-out mutant of strain PXO99 ^A	This lab
Δ <i>PhrcV</i>	The <i>hrcV</i> gene knock-out mutant of strain PXO99 ^A	This lab
PXO99 ^A (pHhpa1myc)	Sp ^r , PXO99 ^A harboring pHhpa1myc	This Lab
Δ <i>PhrcV</i> (pHhpa1myc)	Sp ^r , Δ <i>PhrcV</i> harboring pHhpa1myc	This Lab
Δ <i>PhrpD6</i> (pHhpa1myc)	Sp ^r , Δ <i>PhrpD6</i> harboring pHhpa1myc	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁺</i>) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-l</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Invitrogen
Plasmids		
pMD18-T	Ap ^r , pUC18 derivative, TA cloning vector, 2692 bp	TaKaRa
pKSM1	Km ^r , <i>sacB</i> +, <i>mob</i> , <i>oriV</i> , derivative from pK18mobGII	This lab
pKMS Δ <i>hrpD6</i>	Km ^r , 871bp fusion of the left and right fragments flanking the <i>hrpD6</i> gene ligated in pKSM1	This study
p Δ <i>hrpD6</i>	A 644 bp fusion of the <i>hrpD</i> operon promoter and the <i>hrpD6</i> gene in pUFR034	This study
pHhpa1myc	Sp ^r , a 604 bp fusion fragment of <i>hpa1</i> and Myc ligated in pHM1	This study

1.2 *hrpD6* 突变体的构建

本研究所用引物根据水稻白叶枯病菌 *Xoo hrp* 基因簇序列 (GenBank AP008229) 设计。根据基因位置和转录方向, 设计引物 PhrpD61 - F 和 PhrpD61-R (表 2), PCR 扩增 *hrpD6* 上游 543 bp 同源臂; 以 PhrpD62-F 和 PhrpD62 - R 为引物 (表 2), PCR 扩增 *hrpD6* 下游 328 bp 同源臂。同源臂分别经 *Bam*H I - *Xba* I 和 *Xba*I - *Sal* I 酶切后连接到

pKMS1 载体上, 转化 DH5 α , 得到重组质粒 pKMS Δ PhrpD6。质粒 DNA 纯化后按王寅鹏等 (2009) 的方法电转入 PX099^A 的感受态细胞中, 涂板于不含蔗糖的 NA 固体培养基上进行第一次交换, 单交换子长出后于无蔗糖的 NA 液体中进行培养, 取少许涂板于含 10% 蔗糖的 NA 平板上, 长出的双交换子进行 PCR 和 Southern 杂交验证。Southern 杂交分析参照 Roche 的 DIG 试剂盒手册。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study Primers Sequence (restriction sites underlined)

Primers	Sequence (restriction sites underlined) 5'→3'	Annealing temperature /°C	Time for Extension /s	PCR product /bp	Target genes
PhrpD61-F	AATGGATCC <u>CCCCG</u> TTTCTGTCCGATGCT	57	40	543	The left arm flanking the <i>hrpD6</i> loci of <i>Xoo</i>
PhrpD61-R	ATATCTAGAGGTGGGCTCTCATTGCGCCGC				
PhrpD62-F	AATTCTAGAGCGGCTGCGCAACCTGGACAC	57	30	328	The right arm flanking the <i>hrpD6</i> loci of <i>Xoo</i>
PhrpD62-R	ATAGTCGACTTCCATTGGCCACACCTCCGG				
<i>hrpD6</i> QXooF	ATAGGTACCCTGCAGGCGCAGGAGGGCCGCATCATTG	58	30	400	HrpD operon promoter
<i>hrpD6</i> QXooR	AATGGATCCGACTTTTCGCCACACCAGCTATCGCT				
<i>hrpD6</i> XooF	AATGAATTCACCAAGAAATCGATTTACCGCATATT	58	25	243	The ORF of <i>hrpD6</i>
<i>hrpD6</i> XooR	ATAGGTACCATGTTTCGATGCAATGACCGATGCCG				
Hpa1-F	TTACTGCATCGATGCGCTGTC	52	25	346	For RT-PCR
Hpa1-R	CGGTTCCAACCAAGGGCGGCA				
HrpD6-F	CGATGCGGTCACTCAGGATAT	52	25	216	For RT-PCR
<i>hrpD6</i> -R	CTGGCGATATGCACGACGAT				
hpa1-F	TTAAGCTTTTCGCGCTACAAGCACAATTTCCGA	58	40	604	For Western Blot
hpa1 myc-R	AACTGCAGTTACAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTT GTTCTGCATCGATCCGCTGTCGTT				
16S-F	AATGGCGCAAGCCTGATC	58	25	220	For RT-PCR
16S-R	TTTCTGACCGGCGTCTCC				

1.3 功能互补

分别以引物 *hrpD6*QXooF 和 *hrpD6*QXooR 以及引物 *hrpD6*XooF 和 *hrpD6*XooR (表 2) PCR 扩增 *hrpD6* 的启动子和 *hrpD6* 基因的开放阅读框, 两片段经 *Kpn*I - *Bam*HI 和 *Kpn*I - *Eco*rI 酶切后构建在 pUFRO34 载体上, 获得重组载体 phrpD6。将该质粒电转入 Δ PhrpD6 菌株中, 在含 Km 抗生素的 NA 平板上筛选, 经 PCR 验证, 得到互补菌株 Δ PhrpD6 (phrpD6)。该接合子用于烟草上的 HR 和水稻上的致病性测定。

1.4 水稻上致病性和烟草上 HR 测定以及细菌生长能力测定

野生型菌株 PX099^A、突变体 Δ PhrpD6 及互补菌 Δ PhrpD6 (phrpD6) 在 NB 培养液中培养至菌量浓度达到 1×10^8 CFU/mL。无针头注射器将细菌注射于烟草叶中 24 h 时观察 HR; 将细菌注射到生长两周的水稻 (IR24) 叶中, 3 d 后观察水浸症状

(water soaking), 同时每隔 24 h 进行 1 次细菌种群数量测定。用打孔器取注射区内的水稻叶片, 经 70% 酒精和 30% 次氯酸消毒后, 将叶碟捣碎后悬浮在 1 ml 的无菌水中。菌悬液经梯度稀释, 涂布在含有相应抗生素的 NA 培养基上, 3 - 4 d 后计数菌落数。水稻成株期 (2 月龄) 经剪叶接种供试菌株, 14 d 后测量病斑长度。上述试验重复 3 次, 每次处理 5 片叶。

1.5 水稻悬浮细胞的制备

水稻悬浮细胞用 N6 液体培养基于 28°C、120 r/min 摇床上振荡培养。取 1 周龄、 $OD_{600} = 110$ 的悬浮细胞与水稻白叶枯病菌进行互作^[20]。

1.6 *hrpD6* 基因转录和调控

PX099^A 菌株在 NB 液中过夜培养后, 无菌水洗涤 2 次, 重悬至 $OD_{600} = 1.0$ 。1 mL 菌液中加入 1 mL 水稻悬浮细胞后在 28°C 黑暗下培养。在互作的 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、16 h、20 h 和 24 h 时, 分

别取互作体系经 $10000 \times g$ 离心 5 min 收集菌体。按照 Tripture 操作手册 (Roche 公司) 提取细菌总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测质量, 分光光度计定量, 然后按照 Reverse Transcripase 试剂盒 (TaKaRa) 的方法合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 检测 *hrpD6* 基因的转录表达。16S rRNA 基因为内参, 以引物 16S-F 和 16S-R 进行 RT-PCR 校正。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 50 s; 58°C 退火 45 s, 72°C 延伸 25 s, 28 个循环; 72°C 下延伸 10 min 终止。

按上述方法, 将 PXO99^A、 $\Delta PhrpG$ 、 $\Delta PhrpX$ 、 $\Delta PhrpD6$ 、 $\Delta PhrpD6$ (*phrpD6*) 和 $\Delta PhrpD6$ (*pHhp1myc*) 与水稻细胞互作 8 h, 提取细菌总 RNA, 以 Hpa1-F 和 Hpa1-R 以及 HrpD6-F 和 HrpD6-R 为引物, 通过 RT-PCR 方法检测 *hrpD6* 和 *hpa1* 基因的转录表达。

1.7 *hrpD6* 基因突变后对 Hpa 蛋白的 T3S 分泌性影响

将 *myc* 标签与 *hpa1* 基因进行融合, 分别以 *hpa1*-F 和 *hpa1myc*-R (表 2) 为引物, PCR 扩增 604 bp 含有启动子和 *hpa1* 基因的片段。带有 *myc* 的 PCR 产物纯化后连接于 pHM1 载体上, 获得重组质粒 pHhp1myc (表 1)。将重组载体电转化方式分别导入 RS105、*hrcV* 突变体和 *hrpD6* 突变体中, 相应

菌株 (表 1) 在含有相应抗生素的 NB 培养液中培养后, 无菌水洗涤菌体 2 次, $OD_{600} = 0.2$, 加入 2 mL XOM3 诱导培养基培养 15 h, $10000 \times g$ 离心 5 min 收集菌体和上清。上清进行冻干处理, 得到上清蛋白 (SN)。冻干后的上清蛋白和菌体均使用适量 PBS 溶解, 加入 1/5V 的 $5 \times$ SDS loading buffer, 沸水浴 5 min, 得到用于加样的上清蛋白 (SN) 与总蛋白 (TE), 保存于 -20°C 。将处理好的样品在 15% 分离胶和 6% 浓缩胶上进行 SDS-PAGE 电泳分析, 将 SDS-PAGE 电泳分离的蛋白质采用湿转法转移到 PVDF 膜上, 在含有 5% 脱脂牛奶的封闭液中 4°C 封闭过夜。将 1 g/L 的 C-Myc 兔抗单克隆抗体按照 1:5000 的比例稀释加入到封闭液中, 室温孵育 30 min, 在 $1 \times$ TBST 中清洗 3 次, 每次 10 min。在终浓度为 0.2 mg/L 的羊抗兔 IgG/HRP 的封闭液中孵育 45 min, 在 $1 \times$ TBST 中清洗 3 次, 每次 10 min。用 Easyssee Western Blot kid 荧光底物溶液孵育 30 s, 在暗室中将医用 X 胶片与膜压入相片夹曝光 5 - 15 min, 胶片经显影和定影后拍照保存。

2 结果和分析

2.1 *hrpD6* 基因突变体的构建和分子验证

水稻白叶枯病菌 *hrpD6* 基因位于 *hrp* 基因簇的 *hrpD* 转录单元 (图 1-A)。为研究 *hrpD6* 基因在致病

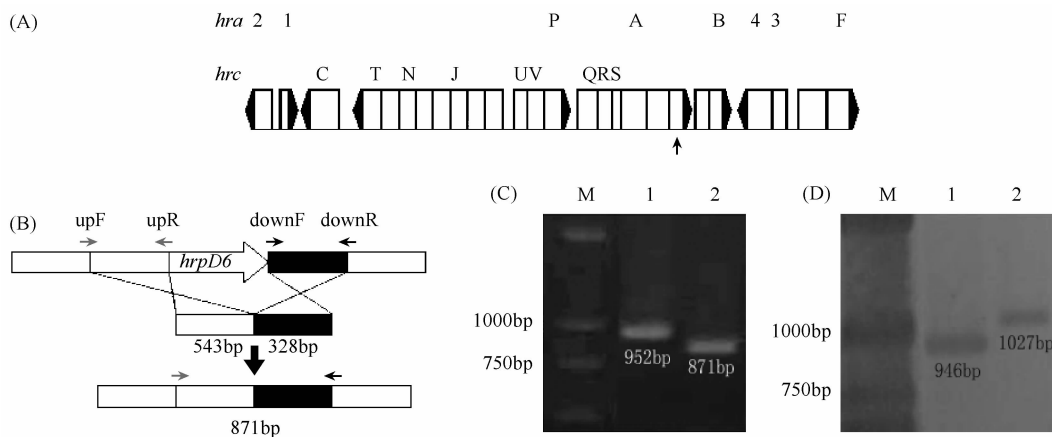


图 1 水稻白叶枯病菌 *hrpD6* 基因突变体的构建和分子验证

Fig. 1 Construction and molecular analysis of the knock-out mutant in the *hrpD6* gene of *X. oryzae* pv. *oryzae*. A: Linear map of the *hrp* cluster of *X. oryzae* pv. *oryzae* PXO99^A including *hpa*, *hrp* and *hrc* genes. The arrow points to the *hrpD6* locus. B: Schematic construction of a knock-out mutant in the *hrpD6* gene. Grey region stands for the left arm of the *hrpD6* gene locus (white region) and the black presents the left arm. upF and upR, and downF and downR are the primers for the right and left arms for PCR amplification, respectively, demonstrated by arrows. The right and left arms were fused in pKMS1 and the knock-out mutant was obtained after two-step recombination occurred. C: PCR confirmation for the deletion of the *hrpD6* gene by using primers upF and downR. Lane 1. The wild-type strain PXO99^A; Lane2. *hrpD6* mutant $\Delta PhrpD6$. D: Southern hybridization to confirm the knock-out mutant with the right arm as the probe. The genomic DNAs were digested by *Kpn* I. Lane 1. The knock-out mutant $\Delta PhrpD6$; Lane2. The wild type strain PXO99^A.

性中的作用,本研究采用同源重组方法获得了 *hrpD6* 基因的突变体 $\Delta PhrpD6$ 。将 *hrpD6* 基因上游 543 bp 和下游 328 bp 的 DNA 融合构建在 pKMS1 载体上,获得了重组载体 pKMS $hrpD6$ 。将重组载体通过电转化方法导入 PX099^A 菌株中,在含有 Km 的 NA 平板上筛选发生第一次同源交换的重组子,然后在含有 10% 蔗糖的 NA 平板上筛选能够生长但在含有 Km 的 10% 蔗糖 NA 平板上不能正常生长的重组子,即为发生了二次同源交换的重组子,推测 *hrpD6* 基因被敲除(图 1-B)。为验证 *hrpD6* 基因被敲除,利用 *hrpD6* 基因左端同源臂的上游引物 PhrpD61-F 和右端同源臂的下游引物 PhrpD62-R 进行 PCR 扩增。结果显示,野生菌 PX099^A 中的 PCR 产物大小为 952 bp,而 *hrpD6* 基因突变体的为 871 bp(图 1-C),表明 *hrpD6* 基因 81 bp 被敲除。为了证实这一结果,本研究用 *hrpD6* 右端同源臂 *hrpD62* 作为探针,对野生菌株和 *hrpD6* 突变体 gDNA 经 *KpnI* 酶切后进行 Southern 杂交。结果显示,野生型菌株 PX099^A 在 1027 bp 处有杂交信号,

符合 *hrpD6* 在 *hrp* 基因簇中的 *KpnI* 位点位置,而 *hrpD6* 突变体仅在 946 bp 处有杂交信号(图 1-D),表明 *hrpD6* 基因缺失 81 bp。PCR 和 Southern 杂交结果均表明,*hrpD6* 突变体中的 *hrpD6* 基因被成功敲除。

2.2 *hrpD6* 决定着白叶枯病菌在水稻上的致病性和在烟草上的 HR

将 *hrpD6* 突变体 $\Delta PhrpD6$ 突变体注射接种烟草后并不能形成 HR,说明 *hrpD6* 基因影响 HR 的激发能力(图 2-C)。注射接种感病水稻品种 IR24,突变体丧失了在水稻苗期叶片上形成水浸症状的能力(图 2-A)。剪叶接种成株期水稻,突变体不能在伤口处扩展,呈非亲和性互作(图 2-B),说明 *hrpD6* 基因影响了病原菌的致病性。水稻组织中细菌群体数量测定结果显示,*hrpD6* 基因突变后病菌的生长能力显著降低(图 2-D),与野生型菌株相比,突变体的繁殖能力下降近 1000 倍。功能互补结果显示,*hrpD6* 基因可互补突变体恢复至野生型,功能互补子在烟草上产生 HR、在水稻上产生水浸症状和形

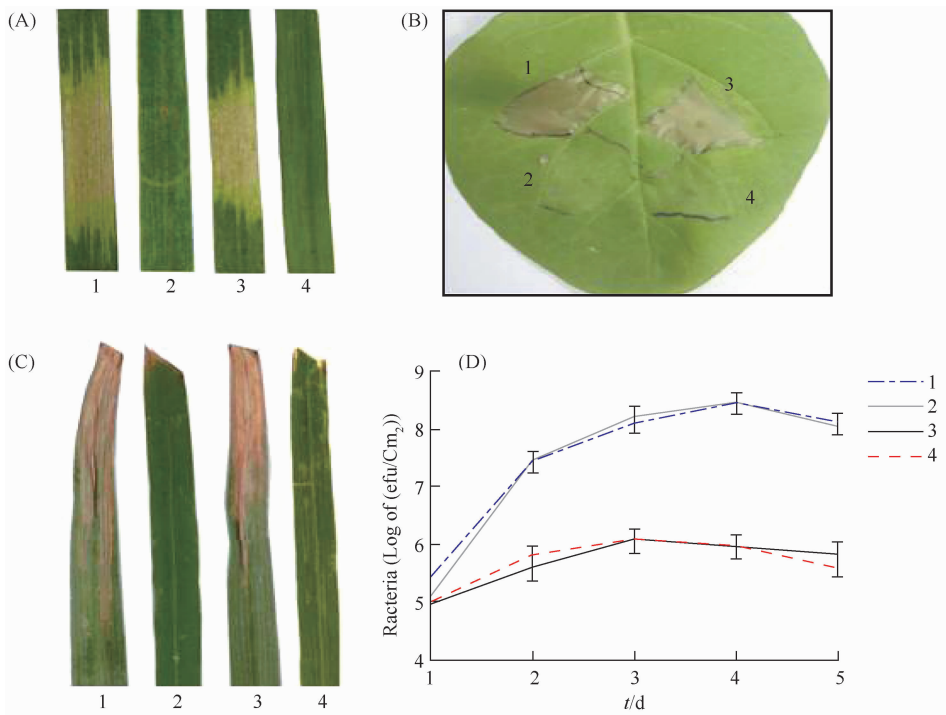


图 2 水稻白叶枯病菌 *hrpD6* 突变体在水稻和烟草上的反应

Fig. 2 Responses of tobacco and rice to the knock-out mutant in the *hrpD6* genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. A. Water soaking symptoms in rice seedlings (IR24, 2 week old); B. lesions formed in adult rice (two-month old); C. Hypersensitive response in tobacco; D. bacterial growth in infected tissues of rice. 1. The wild type strain PX099^A (pURF034); 2. *hrpD6* mutant $\Delta PhrpD6$; 3. $\Delta PhrpD6$ (phrpD6); 4. $\Delta PhrpX$.

成白叶枯病症状,病斑长度与野生型相当,病组织中的细菌生长能力也达到野生型水平(图 2-A、B、C)。这些结果提示,*hrpD6* 基因在白叶枯病菌激发烟草产生 HR 和在水稻上具有致病性方面具有决定性作用。

2.3 *hrpD6* 基因表达依赖水稻细胞诱导

植物病原细菌的 *hrp* 基因是诱导表达的。为了研究 PXO99^A 菌株 *hrpD6* 基因的表达情况,我们把 PXO99^A 与水稻悬浮细胞互作,分别在 0、2、4、8、12、16、20 和 24 h 点提取细菌的总 RNA,进行 RT-PCR 检测 *hrpD6* 的表达。当 PXO99^A 没有与水稻悬浮细胞互作时,*hrpD6* 表达量很弱,在与水稻悬浮细胞互作 2 h 后,*hrpD6* 的表达水平增强;互作 8 h 时 *hrpD6* 表达量达到最高,12 h 后表达量逐渐降低;到 20 h 后,*hrpD6* 恢复到丰富培养基中的低水平表达(图 3)。这说明水稻白叶枯病菌 *hrpD6* 基因也是诱导表达的,并在白叶枯病菌与水稻互作早期发挥作用。

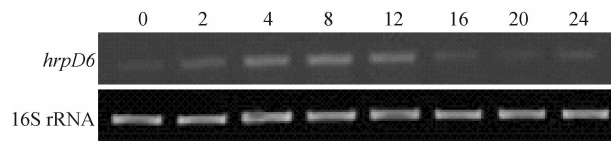


图 3 RT-PCR 检测水稻白叶枯菌 *hrpD6* 基因的表达

Fig. 3 Time-point expression analysis of the *hrpD6* gene of *X. oryzae* pv. *oryzae* by reverse-transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR). The wild-type strain PXO99^A was interacted with rice (IR24) suspending cells for 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h and then the total RNA were extracted and reverse-transcribed into cDNA as the templates to PCR-amplify the *hrpD6* gene. 16S *rRNA* gene was used as the constitutive control.

2.4 *hrpD6* 基因突变影响 *hpa1* 基因的表达和 Hpa1 蛋白的分泌

水稻白叶枯病菌的 *hpa1* 基因编码的 harpin 蛋白可在烟草上激发 HR^[6]。本研究中 *hrpD6* 基因突变后,在烟草上不能产生 HR(图 2-C)。这说明,*hrpD6* 基因对烟草上 HR 的影响,可能通过影响 *hpa1* 基因的转录表达或通过影响 Hpa1 蛋白的分泌而起作用。为了证明上述推测,通过 RT-PCR 途径对 *hrpD6* 突变体重的 *hpa1* 基因转录表达进行了测定。*hrpD6* 突变体与水稻细胞互作 8 h 后, Δ *PhrpD6*

以及过表达 *hpa1* 的 Δ *PhrpD6* (PH*hpa1Myc*) 中的 *hpa1* 基因不能转录表达;相应地,野生型菌株 PXO99^A 和功能互补子 Δ *PhrpD6* (*phrpD6*) 中的 *hpa1* 基因转录表达(图 4)。这提示,*hrpD6* 基因突变影响了 *hpa1* 基因的转录表达,从而在烟草上不能产生 HR。为了说明 *hrpD6* 与 *hrp* 调节基因 *hrpG* 和 *hrpX* 的关系,通过 RT-PCR 方式对 *hrpG* 和 *hrpX* 突变体(表 1)中的 *hrpD6* 基因转录表达进行了测定。结果显示,*hrpG* 突变体 Δ *PhrpG* 和 *hrpX* 突变体 Δ *PhrpX* 与水稻细胞互作 8 h 时,*hrpD6* 基因不转录表达(图 4)。这说明,*hrpG* 和 *hrpX* 基因对 *hrpD6* 基因表达具有调控作用。RT-PCR 结果还显示,*hrpG* 和 *hrpX* 突变体中 *hpa1* 基因也不转录表达(图 4)。这提示,*hrpD6* 和 *hpa1* 基因表达受到 *hrp* 调节基因 *hrpG* 和 *hrpX* 的调控,而 *hrpD6* 基因对 *hpa1* 基因的表达也具有调控作用。

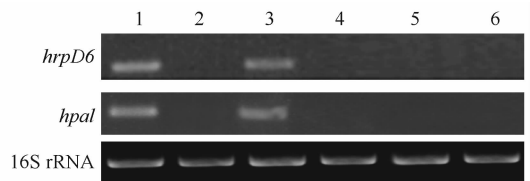


图 4 水稻白叶枯病菌与水稻互作后 *hrpD6* 和 *hpa1* 基因的表达模式

Fig. 4 Expression patterns of *hrpD6* and *hpa1* genes in *X. oryzae* pv. *oryzae*. The wild-type strain PXO99^A (pUFR034) (1), the *hrpD6* mutant Δ *PhrpD6* (2), the transconjugant of Δ *PhrpD6* with *hrpD6* genes in pUFR034 (3), the *hrpG* mutant Δ *PhrpG* (4), the *hrpX* mutant Δ *PhrpG* (5) and Δ *PhrpD6* (PH*hpa1Myc*) (6) interacted with rice (IR24) suspension cells for 8 h and then the bacterial RNAs were extracted for RT-PCR assays. The 16S *rRNA* gene was used as constitutive control.

为了验证 *hrpD6* 是否影响 Hpa1 蛋白的分泌,我们对 Hpa1 进行 *myc* 标记,Western 杂交结果显示,野生型 PXO99^A、*hrpD6* 突变体和 *hrcV* 突变体总蛋白中均能检测到 *Myc* 的杂交信号(图 5),在野生型的上清液中能够检测到 *Myc* 的杂交信号,但在 *hrpD6* 突变体和 *hrcV* 突变体的上清液中均不能够检测到 *Myc* 的杂交信号(图 5)。这说明,Hpa1 蛋白能够通过 T3SS 进行分泌,*hrpD6* 基因突变后影响 Hpa1 蛋白的分泌。

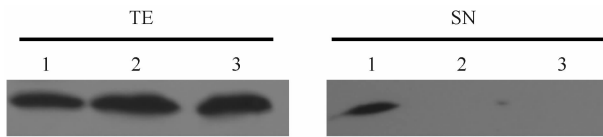


图5 水稻白叶枯菌 *hrpD6* 基因突变后对 Hpa1 蛋白的 T3S 分泌性影响

Fig. 5 Effects of the mutation in the *hrpD6* gene of *X. oryzae* pv. *oryzae* on the secretion of Hpa1 protein. The wild-type strain PX099 (1), the *hrpD6* mutant $\Delta PhrpD6$ (2) and the *hrcV* mutant $\Delta PhrcV$ (3), carrying the *hpa1-myc* fused gene were incubated in an *hrp*-inducing medium XOM3 for 16 h. Total proteins (TE) and supernatant proteins (SN) of the strains were analyzed by immunoblotting using Myc antibody.

3 讨论

水稻白叶枯病菌 *hrp* 基因簇决定着病原菌在非寄主烟草上的 HR 和在水稻上的致病性,分析 *hrp* 基因簇中单一 *hpa-hrp-hrc* 基因在 HR 和致病性中的作用已接近完成,但 26 个 *hpa-hrp-hrc* 基因间的相互作用对 HR 和致病性的影响仍未能有效展开。本研究发现,水稻白叶枯病菌位于 *hrpD* 转录单元的 *hrpD6* 基因突变后,病菌在烟草上失去了 HR 激发能力,并在水稻上失去了致病性。转录表达水平上的研究发现,*hrpD6* 基因对 *hpa1* 基因的转录表达有影响,说明 *hrpD6* 基因是通过影响其它 *hpa-hrp-hrc* 基因的表达而决定了病原菌在水稻上的致病性和在烟草上的 HR 的。在 *X. axonopodis* pv. *citri* 中还发现, HrpD6 可以与 HrpB1 互作^[21]。除 *hpa1* 和 *hrpB1* 基因外,*hrpD6* 基因对其它 *hpa-hrp-hrc* 基因转录表达以及对 T3S 分泌性的影响,还有待进一步的研究。

hrpD6 仅在植物病原黄单胞菌中存在,位于 *hrpD* 与 *hrpE* 转录单元之间。它应该不是形成 III 型分泌系统所必须的,因为其它没有 HrpD6 的植物病原细菌同样具有完整的 III 型分泌系统。在 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 中,*hrpD6* 被认为是在 *hrpE* 转录单元中^[21]。水稻条斑病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzicola*) 中 *hrpD6* 被认为是在 *hrpD* 转录单元中^[22]。水稻白叶枯病菌 KACC10859 菌株中,*hrpD6* 基因可以与 *hrpD* 和 *hrpE* 转录单元一同转录表达^[9]。本研究用 *hrpD* 转录单元的启动子与 *hrpD6* 基因一同构建,可以对 *hrpD6* 突变体进行功能互补,

而 *hrpE* 转录单元的启动子不可以使 *hrpD6* 基因功能互补 *hrpD6* 突变体(资料未显示),表明水稻白叶枯病菌 PX099^A 菌株的 *hrpD6* 基因位于 *hrpD* 转录单元中。这一发现还得到本实验室进一步的证实,即 *hrpD* 转录单元启动子突变后,*hrpD6* 基因不转录表达(资料待发表)。

植物病原细菌的 *hrp* 基因是在与植物互作过程中受诱导表达的。白叶枯病菌 *hrpD6* 基因表达可受水稻细胞诱导。与水稻细胞互作 2 h 后,*hrpD6* 的表达受到强烈的诱导,至互作 8 h 时 *hrpD6* 基因表达水平最高,说明 *hrpD6* 基因参与了白叶枯病菌的致病过程。同时,*hrpD6* 基因的转录表达还受到 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的调控。虽然 *hpa1* 基因的转录表达同样受到 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的调控,但 *hrpD6* 基因如何调控 *hpa1* 基因的转录表达和分泌,还有待进一步分析。

参考文献

- [1] 陈功友,王金生. 植物病原细菌致病性决定因子. 植物病理学报 (*Acta phytopathologica sinica*), 2002, 32: 1-7.
- [2] Alfano JR, Collmer A. The Type III (*hrp*) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking Harpins, Avr Proteins, and death. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179: 5655-5662.
- [3] Büttner D, Lorenz C, Weber E, and Bonas U. 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*. *Molecular Microbiology*, 2006, 59: 513-27.
- [4] Furutani A, Takaoka M, Sanada H, Noguchi Y, Oku T, Tsuno K, Ochiai H, and Tsuge S. Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2009, 22: 96-106.
- [5] Zhu WG, MaGbanua MM, and White FF. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 1844-53.
- [6] 闻伟刚,邵敏,陈功友,王金生. 水稻白叶枯病菌蛋白质激发子 Harpin_{Xoo} 诱导植物的防卫反应. 农业生物技术学报 (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2003, 11: 192-197.

- [7] Büttner D, Gürlebeck D, Noël LD, and Bonas U. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Molecular Microbiology*, 2004, 54(3): 755-68.
- [8] Lorenz C, Kirchner O, Egler M, Stuttmann J, Bonas U, and Büttner D. HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Molecular Microbiology*, 2008, 69: 344-60.
- [9] Cho HJ, Park YJ, Noh TH, Kim YT, Kim JG, Song ES, Lee DH, and Lee BM. Molecular analysis of the *hrp* gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 44: 473-483.
- [10] 王寅鹏, 邹丽芳, 周丹, 陈功友. *hrpE* 基因在水稻条斑病菌 Hrp pilus 形成和致病性中起重要作用. 植物病理学报 (*Acta phytopathologica sinica*), 2009, 39(4): 392-398.
- [11] Sugio A, Yang B, and White FF. Characterization of the *hrpF* Pathogenicity Peninsula of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18: 546-554.
- [12] Rossier O, Van den Ackerveken G, and Bonas U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Molecular Microbiology*, 2000, 38: 828-838.
- [13] Schulte R, and Bonas U. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, Which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *Journal of bacteriology*, 1992, 174: 815-823.
- [14] 肖友伦, 李玉蓉, 刘之洋, 向勇, 陈功友. 水稻条斑病菌 *hrp* 基因诱导表达系统的建立. 微生物学报 (*Acta microbiologica Sinica*), 2007, 47: 396-401.
- [15] Brito B, Aldon D, Baberis P, Boucher C, and Genin S. 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: 109-119.
- [16] Wengelnik K, Van der Ackerveken G, and Bonas U. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, is homologous to two-component response regulators. *Molecular. Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9: 704-712.
- [17] Wengelnik K, Rossier O, and Bonas U. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 6828-6831.
- [18] 陈功友, 王金生. 水稻条斑病细菌 *hrp* 调节基因 *hrpG_{Xaac}* 和 *hrpXooc* 的克隆和序列. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2003, 33(3): 213-219.
- [19] Tsuge S, Nakayama T, Terashima S, Ochiai H, Furutani A, Oku T, Tsuno K, Kubo Y, and Kaku H. Gene involved in transcriptional activation of the *hrp* regulatory gene *hrpG* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188: 4158-4162.
- [20] Alegria MC, Docena C, Khater L, Romos CHI, da Silva ACR, and Farah CH. 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*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186: 6186-6197.
- [21] Weber E, Berger C, Bonas U, and Koebnik R. Refinement of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrpD* and *hrpE* operon structure. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20: 559-567.
- [22] Zou, LF, Wang, XP, Xiang Y, Zhang B, Li YR, Xiao YL, Wang JS, Walmsley AR, and Chen GY. 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: 6212-6224.

hrpD6 gene determines *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* to trigger hypersensitive response in tobacco and pathogenicity in rice

Xiaoxia Guo¹, Huasong Zou², Yurong Li¹, Lifang Zou², Gongyou Chen^{1,2,*}

(¹ Key Laboratory for Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture /College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(² Department of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [**Objective**] *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) possesses a type III secretion system (T3S), encoded by a *hpa-hrp-hrc* cluster, including *hrpD6*, to inject T3S effectors into plant cells to trigger hypersensitive response (HR) in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. However, it is unclear what roles of *Xoo hrpD6* gene plays in HR in tobacco and in pathogenicity in rice. [**Methods**] In this study, we constructed a deletion mutant of *hrpD6* gene by using marker-exchange method. PCR and Southern blot analysis demonstrated that the *hrpD6* gene was knocked out successfully. [**Results**] *in planta* assays indicated the *hrpD6* mutant, $\Delta PhrpD6$, lost the ability to induce HR in tobacco, to trigger water-soaked symptoms in seedlings rice and to cause bacterial blight in adult rice. Importantly, the bacterial growth in rice tissues was tremendously reduced. Complementation assays confirmed that *hrpD6* gene could restore HR induction in tobacco, pathogenicity and bacterial growth in rice to the mutant $\Delta PhrpD6$. Reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) revealed that the expression of *hrpD6* was not only induced by rice cells, but also controlled by *hrpG* and *hrpX*. Intriguingly, the expression of *hpa1*, encoding a harpin protein, was found to be dependent on *hrpD6*, implying that *hrpD6* regulates the expression of *hpa1*. Immunoblotting assay confirmed that the mutation of *hrpD6* affect the secretion of Hpa1 through T3S. [**Conclusion**] The mutant lost the ability of triggering hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in host rice is due to that *hrpD6* regulates the expression of *hpa1* gene and the mutation in *hrpD6* affects the secretion of T3S effectors, like Hpa1, through T3SS. Our results provide molecular clues to understand whether *hrpD6* is involved in the formation of T3S apparatus and in regulation of other *hpa-hrp-hrc* gene expression or not for HR induction in tobacco and pathogenicity in rice.

Keywords: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; *hrpD6*; T3S; hypersensitive response; pathogenicity

(本文责编:王晋芳)