

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(6):740-745; 4 June 2009  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

# 糖基转移酶基因 *rbfCxoo* 缺失突变导致水稻白叶枯病菌毒性表达增强

孙艳伟<sup>1,2</sup>, 文景芝<sup>2</sup>, 吴茂森<sup>1</sup>, 陈华民<sup>1</sup>, 何晨阳<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>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)

(<sup>2</sup>东北农业大学农学院植物保护学系, 哈尔滨 150030)

**摘要:**【目的】阐明水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 简称 Xoo)基因组中推导的脂多糖 O 抗原合成蛋白基因 *rbfCxoo* (XOO2599) 的结构和生物学功能。【方法】通过基因克隆、序列分析、缺失突变和表型测定, 对 *rbfCxoo* 的分子特征及其功能进行了鉴定。【结果】用特异性引物进行 PCR 扩增, 从野生型菌株 PXO99<sup>A</sup> 基因组 DNA 中成功地获得了与已测序菌株 KACC10331 序列完全一致的全长基因序列; RbfCxoo 序列 N 端和 C 端分别具有一个糖基转移酶的保守结构域(Glycos. transf. 2)。用标记置换法获得了基因缺失突变体  $\Delta$ *rbfCxoo*。与 PXO99<sup>A</sup> 相比,  $\Delta$ *rbfCxoo* 脂多糖 O 抗原合成能力并未发生变化, 但鞭毛素糖基化能力有所降低。此外,  $\Delta$ *rbfCxoo* 鞭毛运动性、生物膜形成和胞外纤维素酶和木聚糖酶活性都无明显改变, 但对水稻的致病性显著增强, 毒性相关基因的表达也有所增加。【结论】RbfCxoo 可能与细菌鞭毛素糖基化修饰以及毒性表达有关。

**关键词:** 水稻白叶枯病菌; *rbfCxoo*; 糖基转移酶; 鞭毛素糖基化; 毒性

**中图分类号:** Q935    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0740-06

在水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 简称 Xoo)菌株 KACC10331 全基因组序列中, 存在一个由 10 个基因(XOO2590-2599)组成的糖基化基因岛, 其中 XOO2599 被注释为脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS) O 抗原合成蛋白基因 *rbfCxoo*; 该基因岛插入在一个由大约 60 个基因组成的鞭毛基因簇中<sup>[1]</sup>。在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)不同致病变种中, RbfC 被鉴别为一种糖基转移酶, 主要负责鞭毛素蛋白的糖基化<sup>[2-4]</sup>。鞭毛糖基化被认为是一个细菌鞭毛功能化的必需过程<sup>[5]</sup>。然而, 至今仍不清楚 *rbfCxoo* 的结构特征以及生物学功能。

本文报道对 *rbfCxoo* 进行分子克隆、序列分析、缺失突变和互补及其表型鉴定的研究结果。目的在于揭示 *rbfCxoo* 与鞭毛素糖基化、LPS O 抗原合成、运动性、生物膜形成、胞外降解酶活性和毒性表达之间的关系, 为进一步阐明鞭毛素糖基化在 Xoo 毒性表达中的作用机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株、质粒及培养条件:** 供试菌株和质粒的特征及其来源列于表 1。Xoo 菌株 PXO99<sup>A</sup> 及其突变体在 28℃ PSA 培养基(细菌培养用蛋白胨 10 g/L,

**基金项目:** 中央财政国家重点实验室自主研究课题专项(SK12007SR06)

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

**作者简介:** 孙艳伟(1983-), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 研究方向为植物-病原物分子互作。E-mail: sunyanwei2008@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2008-12-22; **修回日期:** 2009-02-25

蔗糖 10 g/L, 谷氨酸 1.0 g/L, pH7.0) 上培养。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 在 37°C LB 培养基(细菌培养用蛋白胨 10 g/L, 细菌培养用酵母膏 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH7.0) 上培养。试验用抗生素浓度: 氨苄青霉素 (Amp) 50  $\mu$ g/mL、卡那霉素 (Kan) 50  $\mu$ g/mL、庆大霉素 (Gm) 50  $\mu$ g/mL 和壮观霉素 (Sp) 40  $\mu$ g/mL。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶和 T4 连接酶购自 TaKaRa(大连)公司; 凝胶回收纯化试剂盒和 DNA 分子量标准购自诺德金生物公司; 羧甲基纤维素 (Carboxymethyl Cellulose, CMC) 和木聚糖 (RBB-xylan) 购自 Sigma 公司; LPS 提取试剂盒购自 iNtRON Biotechnology 公司; 逆转录酶 (Reverse Transcriptase) 试剂盒购自 Invitrogen 公司; IQ SYBR® Green Supermix 试剂盒购自 BIO-RAD 公司。电击仪 (BIO-RAD 公司 Pluse Controller 仪); 全自动

DNA 测序仪 (ABI Prism377)。

## 1.2 基因克隆和序列分析

用 DNAMAN 6 软件对 *Xoo* 菌株 KACC10331 基因组中 *rbfCxoo* 序列 (XOO2599) 进行分析, 设计特异性引物 *rbfCxoo* F/R (表 2), 以 PXO99<sup>A</sup> 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增含有 *rbfCxoo* 基因及其上下游基因序列的片段, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行产物检测。分别使用凝胶回收纯化试剂盒和 pMD18-T Vector 试剂盒进行基因纯化和连接, 获得质粒 pMD-*rbfCxoo*。按照文献[6]的方法进行 *E. coli* 细胞转化。用 ABI Prism 377 测序仪进行基因序列测定。用 DNASTar 7.1、DNAMAN 6 和 BioEdit 7 进行序列分析; 用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 和 CDS 进行蛋白质结构域分析; 用 Blast 进行序列同源性比对。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 The bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	$\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i>	Our laboratory
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		
PXO99 <sup>A</sup>	Wild-type strain, Philippine race 6	Our laboratory
$\Delta$ <i>rbfCxoo</i>	Gm <sup>R</sup> , <i>rbfCxoo</i> gene replaced by Gm <sup>R</sup> gene	This study
$\Delta$ <i>rbfCxoo</i> -C	Gm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rbfCxoo</i> complemented with pHM- <i>rbfCxoo</i>	This study
Plasmid		
pMD18-T	Amp <sup>R</sup> , <i>ColE1</i> origin, T-vector	TaKaRa Co.
pK18mobsacB	<i>sacB</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Kan <sup>R</sup> , <i>mcs</i> mobilizable	Our laboratory
pHMI	Sp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , <i>cos</i> , <i>parA</i> , <i>IncW</i> , derivative of pRI40	Hopkins et al., 1992
pMD- <i>rbfCxoo</i>	pMD18-T with fragment containing <i>rbfCxoo</i>	This study
pMD- <i>rbfCxoo</i> -G	<i>rbfCxoo</i> gene replaced by the Gm <sup>R</sup> gene in pMD- <i>rbfCxoo</i>	This study
pKS- <i>rbfCxoo</i> -G	pK18mobsacB with <i>rbfCxoo</i> gene inserted by Gm <sup>R</sup> gene	This study
pHM- <i>rbfCxoo</i>	pHM I with fragment containing <i>rbfCxoo</i>	This study

表 2 本研究所用 PCR 引物序列

Table 2 PCR primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>rbfCxoo</i> F	AAGCTTCCACTACGCCAGGATTTGC
<i>rbfCxoo</i> R	GAATTCTGGATGCTGCCATCGAGCC
Gm <sup>R</sup> F	CTAATGCATGACGCACACCGTGGAAA
Gm <sup>R</sup> R	ATAATGCATGCGCGTGTGACAAATTT
<i>gyr</i> BF	GGCGAGCACAAATGGCATT
<i>gyr</i> BR	CCATCCTTCTGCGGGATGT
<i>hrp</i> GF	TGTCCACCTGATGAACGACCCT
<i>hrp</i> GR	GGCGAATGCCGCAACGAA
<i>hrp</i> XF	AGGCACTGACCCACTTTC
<i>hrp</i> XoR	ATCGGAAGCACCACCTCTC
<i>cls</i> AF	GTATGGCGAAGGCGATGCC
<i>cls</i> AR	CCCCACGGCCAGTAGAACC
<i>xyn</i> BF	GTTCCATGTCCGGCTCTGG
<i>xyn</i> BR	GATTGTCCGGCTGGTTGTG

## 1.3 基因缺失突变体构建及其互补

参照文献[7]的方法进行基因标记交换。用于基因标记交换的自杀性质粒载体 pK18mobsacB 不能在 PXO99<sup>A</sup> 中复制和扩增, 并且含有蔗糖致死基因 *sacB*, 带有质粒的菌株在含有蔗糖的培养基上不能生长。以 pBBR1MCS-5 为模板, 用 Gm<sup>R</sup> F/R 引物 (表 2), 进行 Gm<sup>R</sup> 基因 PCR 扩增。用 *Pst*I 消化 pMD-*rbfCxoo*, 切除基因 *rbfCxoo* 中间约 2.6 kb, 获得 pMD-*rbfCxoo* 载体部分的 DNA 片段, 进行脱磷处理和电泳回收。将该片段与经过 *Nsi*I 酶解的 Gm<sup>R</sup> 基因片段连接, 得到重组质粒 pMD-*rbfCxoo*-G。用 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切 pMD-*rbfCxoo*-G, 回收获得约 2.3 kb 含有 Gm<sup>R</sup> 和部分 *rbfCxoo* 的片段。将其与经同样酶切处理的 pK18mobsacB 连接, 获得重组质粒 pKS-*rbfCxoo*-G。用电击法将 pKS-*rbfCxoo*-G 转化 PXO99<sup>A</sup>

后,涂布于 PSA + Gm<sup>R</sup> 平板上,对长出的菌落用引物 *rbfC<sub>xoo</sub>*F/R 进行 PCR,筛选和验证突变体  $\Delta$ *rbfC<sub>xoo</sub>*。

用 *Hind*III 和 *Eco*RI 消化 pMD-*rbfC<sub>xoo</sub>*, 将获得的片段克隆到广寄主质粒载体 pHMI 上, 获得重组质粒 pHM-*rbfC<sub>xoo</sub>*。用电击法转化到  $\Delta$ *rbfC<sub>xoo</sub>* 中, 涂布在 PSA + Sp<sup>R</sup> 平板上生长, 连续培养 3 代以上。在 PSA + Sp<sup>R</sup> 平板上筛选互补子。对互补菌株  $\Delta$ *rbfC<sub>xoo</sub>*-C 进行提取质粒及其酶切验证。

#### 1.4 LPS O 抗原和鞭毛素检测

参照文献[8-9]的方法, 使用 LPS 提取试剂盒 (iNtRON Biotech) 进行 LPS 的提取; 经过 Tricine-SDS-PAGE 和银染, 检测 LPS O-抗原合成情况。

参照文献[10]的超速离心法, 提取鞭毛素蛋白; 经过 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色, 检测鞭毛素蛋白糖基化情况。

#### 1.5 鞭毛运动性、生物膜形成和胞外酶活性测定

参照文献[11]的方法, 在 0.3% 琼脂半固体培养基上测定鞭毛运动性。参照文献[12]的方法, 用结晶紫染色法检测生物膜形成能力。参照文献[13-14]的方法, 检测培养基上菌落周围产生的底物水解圈, 测定纤维素酶和木聚糖酶活性。

#### 1.6 细菌致病性及其毒性基因转录测定

参照文献[15]的方法, 用剪叶法将菌悬液 ( $OD_{600} = 0.5$ ) 接种到水稻感病品种 IR24 叶片, 在温室生长条件 (25°C ~ 35°C, 湿度 90% 左右) 下, 接种 14 d 后观察发病情况。

用 Primer premier 5.0 软件设计 T2SS 基因 (*clsA* 和 *xynB*)、T3SS 基因 (*hrpG* 和 *hrpXo*) 和内参基因 *gyrB* 的特异性引物 (表 2)。参照文献[16]的方法, 提取总 RNA, 在反转录之前对总 RNA 用 DNase 处理。按

照 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) 试剂盒方法, 进行 cDNA 合成。

按照 IQ SYBR® Green Supermix 试剂盒 (Bio-Rad, USA) 的方法, 用 iCycler IQ® 实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad, USA) 进行 RT-Q-PCR 的检测。参照文献[17]的方法, 以 *gyrB* 为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对相关基因进行定量分析。目标基因相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 其中  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{gyrB}) Time X - (Ct_{target} - Ct_{gyrB}) Time 0$ ,  $Ct$  为荧光阈值。

## 2 结果和分析

### 2.1 *rbfC<sub>xoo</sub>* 分子克隆和功能结构域

本研究用特异性引物进行 PCR 扩增, 成功地从 PXO99<sup>A</sup> 基因组 DNA 中获得了含有 *rbfC<sub>xoo</sub>* 基因及其上下游基因序列长为 4096 bp 的片段。克隆片段序列与 GenBank 中 KACC10331 菌株基因序列完全一致。*rbfC<sub>xoo</sub>* 位于一个由 10 个基因组成的糖基化基因岛中, 上游为一个功能未知的假设蛋白基因, 下游为鞭毛基体蛋白基因 *fliExoo*, 它们均与 *rbfC<sub>xoo</sub>* 转录方向相同 (图 1)。

生物信息学分析表明, *rbfC<sub>xoo</sub>* 在 Xoo 基因组中为单拷贝, 全长为 3552 bp; RbfC<sub>xoo</sub> 由 1183 个氨基酸组成, 分子量为 130.53 kDa, N 端 16 ~ 191 氨基酸和 C 端 578 ~ 759 氨基酸分别具有一个糖基转移酶家族 2 的保守结构域 (Glycos<sub>transf</sub>\_2) (图 1)。因此, 推测 RbfC<sub>xoo</sub> 可能为一种糖基转移酶。

### 2.2 $\Delta$ *rbfC<sub>xoo</sub>* 缺失突变体的构建及其互补

本研究根据 *rbfC<sub>xoo</sub>* 上下游相邻核苷酸序列, 设计引物 *rbfC<sub>xoo</sub>*F/R 扩增 4100 bp 片段, 构建用于基因突变的重组质粒 pKS-*rbfC<sub>xoo</sub>*-G。将 pKS-*rbfC<sub>xoo</sub>*-G

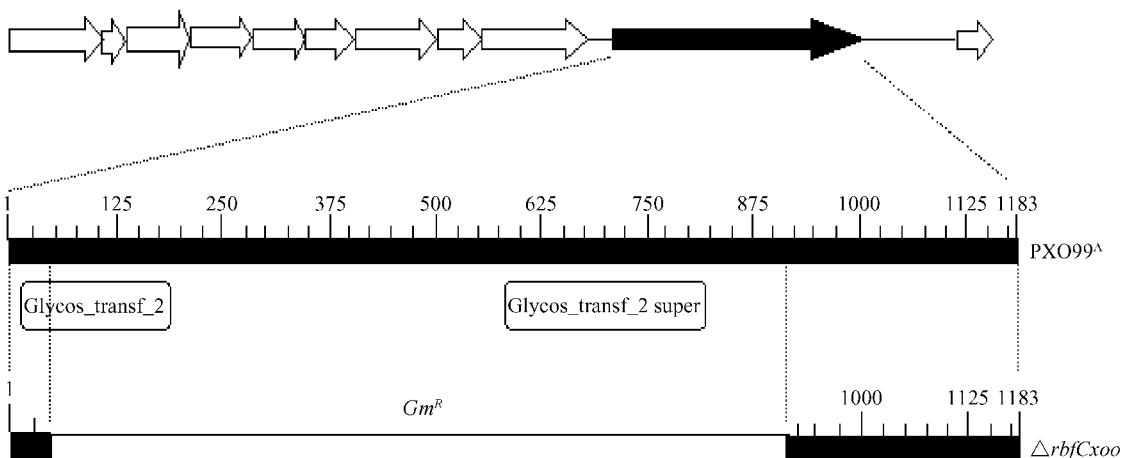


图 1 *rbfC<sub>xoo</sub>* 基因位置、保守结构域及突变体构建示意图

Fig. 1 Gene arrangement, conserved domains and deletion of *rbfC<sub>xoo</sub>*. Arrows represent the size and orientation of ORFs and names of them were indicated above. Black boxes represent conserved domains. The inner 870 amino acid sequence of *rbfC<sub>xoo</sub>* was replaced by *Gm<sup>R</sup>*.

导入 PXO99<sup>A</sup> 后, 缺失片段两端的 *rbfCxoo* 片段与 PXO99<sup>A</sup> 基因组中相应的片段发生同源重组和双交换, 从而获得了基因缺失突变体  $\Delta rbfCxoo$ 。对 PXO99<sup>A</sup> 和  $\Delta rbfCxoo$  菌株进行 *rbfCxoo* 片段的 PCR 检测, 发现引物 *rbfCxoo* F/R 从  $\Delta rbfCxoo$  中的扩增片段比 PXO99<sup>A</sup> 中的小 1800 bp (图 2-A), 表明在

$\Delta rbfCxoo$  基因组中已缺失了 *rbfCxoo*。

将重组质粒 pHM-*rbfCxoo* 电击转化到  $\Delta rbfCxoo$  中, 在 PSA + Sp<sup>R</sup> 平板上连续培养, 挑选互补子。对互补子进行质粒提取和酶切分析验证(未列出资料), 获得了互补菌株  $\Delta rbfCxoo$ -C。

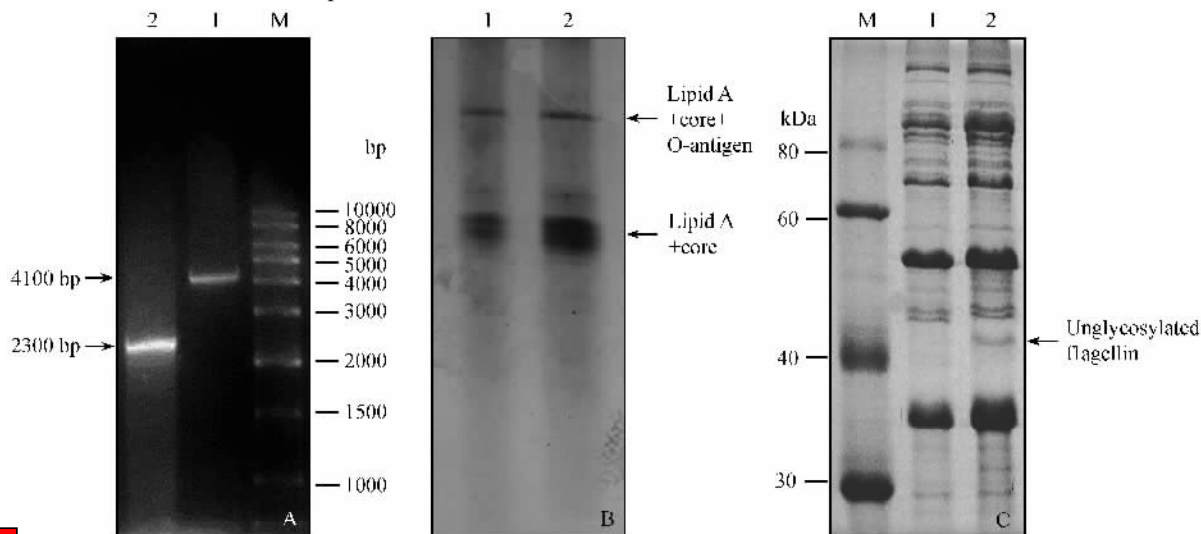


图 2 Xoo 不同菌株 *rbfCxoo* 扩增(A)、LPS O 抗原合成(B)和鞭毛素蛋白糖基化(C)的检测

Fig. 2 PCR amplification of *rbfCxoo* gene (A), LPS O-antigen production (B) and flagellin glycosylation (C) of Xoo strains. M: DNA or protein marker; 1: PXO99<sup>A</sup>; 2:  $\Delta rbfCxoo$ .

### 2.3 $\Delta rbfCxoo$ 的 LPS O 抗原合成和鞭毛素糖基化

为了阐明 RbfCxoo 是否与注释的 LPS O 抗原合成功能有关, 本研究对 PXO99<sup>A</sup> 及  $\Delta rbfCxoo$  的 LPS O 抗原合成进行了检测(图 2-B)。由于 LPS 电泳时一般出现 2 个条带(脂质 A + 核心 + O 抗原和脂质 A + 核心), 如果 O 抗原合成受阻, 则中间产物发生积累, 将会出现比脂质 A + 核心迁移速率更快的条带<sup>[9]</sup>。结果表明, PXO99<sup>A</sup> 和  $\Delta rbfCxoo$  在脂质 A + 核心条带下方均未发现任何条带, 两者在 O 抗原的合成能力上可能并无显著差异。

为了弄清 RbfCxoo 是否与鞭毛素糖基化功能有关, 本研究对 PXO99<sup>A</sup> 及  $\Delta rbfCxoo$  进行鞭毛素 FliCxoo 的提取和电泳分析(图 2-C)。结果显示, 在 PXO99<sup>A</sup> 和  $\Delta rbfCxoo$  中均出现了比 FliCxoo 分子量(40.44 kDa)大的条带; 而在  $\Delta rbfCxoo$  中在上述条带下方还有 1 个与 FliCxoo 分子量(40.44 kDa)大小相同的条带。推测这可能是部分鞭毛素蛋白未被糖基化。

### 2.4 $\Delta rbfCxoo$ 运动性、生物膜形成和胞外酶类活性

为了揭示 RbfCxoo 在离体条件下与其它生物学性状之间的关系, 本研究对 PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta rbfCxoo$  及其互补菌株  $\Delta rbfCxoo$ -C 进行运动性、生物膜形成和胞外酶活性测定(图 3)。结果表明, 与 PXO99<sup>A</sup> 相比,  $\Delta rbfCxoo$  的运动性、生物膜形成、胞外纤维素酶和木聚糖酶活性无明显改变。

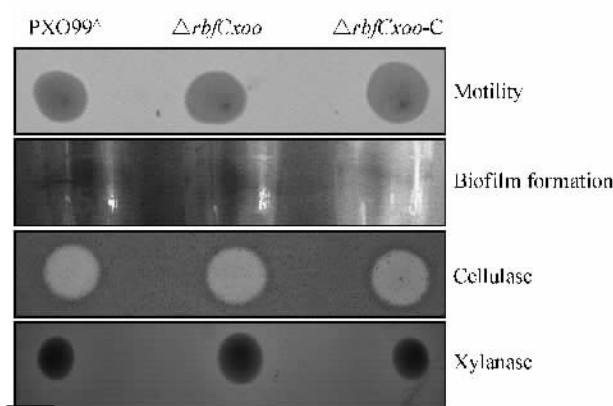


图 3 Xoo 不同菌株鞭毛运动性、生物膜形成和胞外酶活性的检测

Fig. 3 Flagellar motility, biofilm formation and extracellular enzyme production of Xoo strains.

### 2.5 $\Delta rbfCxoo$ 致病性以及毒性相关基因的表达

为了阐明 RbfCxoo 与致病性以及毒性相关基因表达之间的关系。本研究对 PXO99<sup>A</sup> 和  $\Delta rbfCxoo$  进行水稻致病性以及 T2SS 和 T3SS 代表性的毒性基因(*clsA*、*xynB*、*hrpG* 和 *hrpXo*)表达量的测定(图 4)。结果表明, 与 PXO99<sup>A</sup> 相比,  $\Delta rbfCxoo$  对水稻感病品种 IR24 的致病性显著增强, 基因互补可以使  $\Delta rbfCxoo$  恢复到与 PXO99<sup>A</sup> 相同的致病性; 此外, 在  $\Delta rbfCxoo$  中, 4 个毒性相关基因(*clsA*、*xynB*、*hrpG* 和 *hrpXo*)表

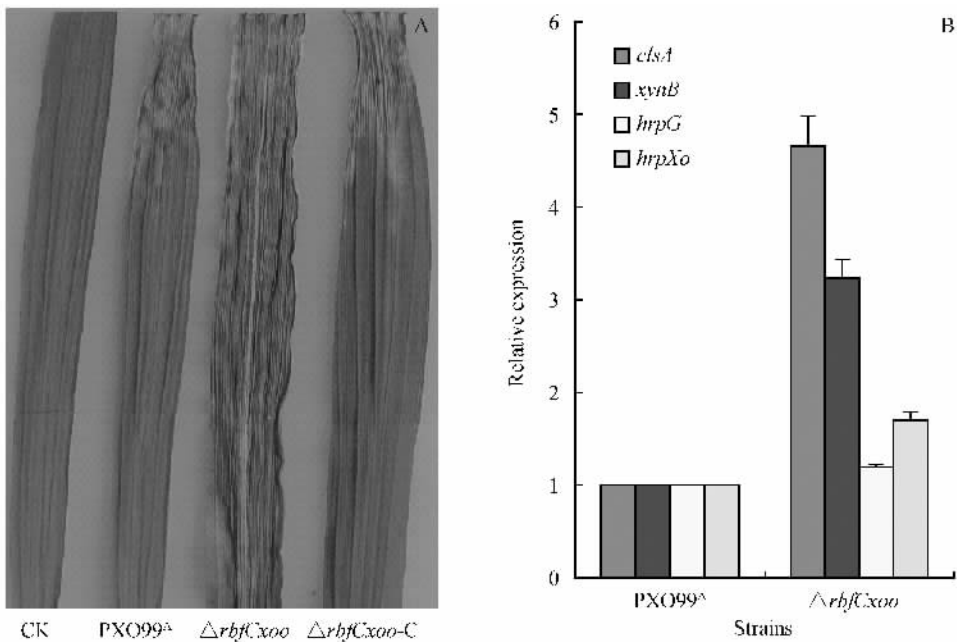


图4 Xoo不同菌株致病性(A)及其毒性相关基因表达(B)的测定

Fig.4 Pathogenicity on rice (A) and expression of virulence-related genes (B) of Xoo strains.

达量不同程度地有所增加。

### 3 讨论

前人研究表明,糖基转移酶基因 *rbfC* 对细菌鞭毛素糖基化、运动性、致病性、致敏性以及其它生物学性状表达具有重要作用<sup>[2,4-5,10]</sup>。本研究通过对 Xoo 糖基转移酶基因 *rbfCxoo* 进行分子克隆、序列分析、缺失突变和互补及其表型鉴定的研究,发现该基因可能并不与 GenBank 原来注释的 LPS O 抗原合成功能有关,而与鞭毛素蛋白糖基化有关。这是因为(1)生物信息学分析表明,RbfCxoo 序列 N 端和 C 端分别具有一个糖基转移酶家族 2 的保守结构域,可能为一种糖基转移酶;(2) *rbfCxoo* 发生缺失突变后,LPS O 抗原产生并无任何明显变化,但产生了部分未被糖基化的鞭毛素蛋白;(3) *rbfCxoo* 与前人研究比较清楚、功能明确的铜绿假单胞菌糖基转移酶基因 *rbfCpa* 和丁香假单胞菌糖基转移酶基因 *rbfCps* 具有同源性(未发表资料)。因此, *rbfCxoo* 发生缺失突变削弱了鞭毛素糖基化能力,初步证明了 RbfCxoo 具有与其它细菌 RbfC 相同的鞭毛素糖基化修饰功能,推测细菌 RbfC 鞭毛素糖基化修饰功能具有进化上的保守性。目前,正在对 *rbfCxoo* 进行原核表达、产物提取以及酶活性分析,以进一步确证其编码产物的糖基转移酶功能。

值得注意的是,本研究发现尽管 *rbfCxoo* 突变对病菌运动性、生物膜形成、胞外纤维素酶和木聚糖酶活性无明显影响,但病菌对水稻的致病性显著增强,毒性相关基因的表达也有所增加。推测这是由于

*rbfCxoo* 缺失突变,造成了部分鞭毛素蛋白未糖基化,后者可能引起水稻对其识别能力及其互作关系发生变化,从而导致了寄主感病性增加。目前,正在深入地分析 *rbfCxoo*—鞭毛素糖基化—毒性—寄主感病性之间的内在关系,为进一步阐明鞭毛素蛋白糖基化在 Xoo 致病性/毒性中的作用及其机理提供实验依据。

### 参考文献

- [1] 张静,许景升,吴茂森,等. 水稻白叶枯病菌转录调控因子基因 *fleQxoo* 和  $\sigma^{54}$  因子基因 *rpoNxoo* 的分子鉴定. 植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica), 2008, 38 (5): 449 - 455.
- [2] Arora S, Bangera M, Lory S, et al. A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98 (16): 9342 - 9347.
- [3] Takeuchi K, Taguchi F, Inagaki Y, et al. Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringe* pv. *glycinea* and its role in host specificity. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (22): 6658 - 6665.
- [4] Taguchi F, Takeuchi K, Katoh E, et al. Identification of glycosylation genes and glycosylated amino acids of flagellin in *Pseudomonas syringe* pv. *tabaci*. *Cellular Microbiology*, 2006, 8 (6): 923 - 938.
- [5] Logan S. Flagellar glycosylation—a new component of the motility repertoire? *Microbiology*, 2006, 152: 1249 - 1262.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Lee SW, Ronald PC. *Plant-pathogen interaction*. Totowa,

- [ 8 ] Lesse A, Campagnari A, Bittner W, et al. Increased resolution of lipopolysaccharides utilizing tricine - sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Immunological Methods*, 1990, 126: 109 - 117.
- [ 9 ] Vorholter F, Niehaus K, Puhler A. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: a cluster of 15 genes is involved in the biosynthesis of the LPS O-antigen and the LPS core. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 266: 79 - 95.
- [10] Verma A, Schirm M, Arora S, et al. Glycosylation of b - type flagellin of *Pseudomonas aeruginosa*: structural and genetic basis. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 ( 12 ): 4395 - 4403.
- [11] Shen YW, Chern MS, Silva FG, et al. Isolation of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* flagellar operon region and molecular characterization of *flhF*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14 ( 2 ): 204 - 213.
- [12] Kulasakara H, Lee V, Brencic A, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 2839 - 2844.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Nino-Liu D, Damielle L, Bogdanove AJ. A simple method of mass inoculation of rice effective for both pathovars of *Xanthomonas oryzae*, and the construction of comparable sets of host cDNA libraries spanning early stages of bacterial leaf blight and bacterial leaf streak. *Journal of Phytopathology*, 1996, 153: 500 - 504.
- [16] Seiji T, Takeshi N, Shinsaku T, et al. Gene involved in transcriptional activation of the *hrp* regulatory gene *hrpG* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 ( 11 ): 4158 - 4162.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 2001, 25: 402 - 408.

## Deletion mutation of *rbfCxoo*, encoding a putative glycosyltransferase in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* leads to enhanced virulence expression

Yanwei Sun<sup>1,2</sup>, Jingzhi Wen<sup>2</sup>, Maosen Wu<sup>1</sup>, Huamin Chen<sup>1</sup>, Chenyang He<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

(<sup>2</sup> Department of Plant Protection, Northeast Agricultural University, Haerbin 150030, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To better understand the structure and biological function of *rbfCxoo*, a gene with the putative function in lipopolysaccharide O-antigen synthesis in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), the causal pathogen of bacterial blight of rice. [ **Methods** ] The molecular identification and function analysis of *rbfCxoo* were performed through gene cloning, sequencing and deletion analysis. [ **Results** ] The sequence of *rbfCxoo* cloned from the genomic DNA of wild-type PXO99<sup>A</sup> was the same as that of the sequenced strain KACC10331. There were glycosyltransferase domains (Glycos\_ transf\_2) at N and C terminal of RbfCxoo respectively. The deletion mutant  $\Delta$ *rbfCxoo* generated through a double crossover recombination and validated by PCR assay displayed the reduced flagellin glycosylation and no change in lipopolysaccharide O-antigen synthesis compared with PXO99<sup>A</sup>. Moreover, no significant changes in flagellar mobility, biofilm formation and production of extracellular cellulase and xylanase *in vitro* were observed in  $\Delta$ *rbfCxoo* compared to PXO99<sup>A</sup>. Most importantly, the deletion mutation of *rbfCxoo* resulted in enhanced virulence and gene expression. [ **Conclusion** ] RbfCxoo might be related to flagellin glycosylation and virulence expression in Xoo.

**Keywords:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; *rbfCxoo*; glycosyltransferase; flagellin glycosylation; virulence

( 本文责编 : 张晓丽 , 谷志静 )