

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49 (7): 874–879; 4 July 2009
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

转录调控因子 OxyRxoo 对水稻白叶枯病菌 H₂O₂ 降解途径的调控作用

张建唐^{1,2}, 高洁², 吴茂森¹, 陈华民¹, 何晨阳^{1*}

(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)

²吉林农业大学植物保护学系, 长春 130118)

摘要: 【目的】为了阐明水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 简称 Xoo) 转录调控因子 OxyRxoo 对过氧化氢 (H₂O₂) 降解途径的调控作用。【方法】本研究对推导的 H₂O₂ 识别调控基因 *oxyRxoo* 进行了基因克隆、序列分析、缺失突变和互补试验及其相关表型的鉴定。【结果】克隆的 *oxyRxoo* 基因序列与其它几种病原黄单胞菌的同源序列高度保守。OxyRxoo 是 LysR 家族成员之一, 具有 PBPB 结构域和 DNA 结合保守结构域 (HTH)。用标记交换法构建了 Δ *oxyRxoo* 基因缺失突变体。与野生型菌株 PXO99^A 相比, 尽管 Δ *oxyRxoo* 在离体培养条件下的生长无明显变化, 但 H₂O₂ 抗性显著地降低, 过氧化物酶 (CAT) 活性明显下降, 基因互补可以使之恢复; 过氧化物酶基因表达下调, *oxyRxoo* 自身表达显著上调。【结论】OxyRxoo 作为一个重要转录调控因子, 调控了 Xoo 的 H₂O₂ 降解途径。

关键词: 水稻白叶枯病菌; OxyRxoo; H₂O₂ 降解; 过氧化物酶; 调控作用

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0874-06

病原细菌对活性氧的降解是抗氧化和侵染中的重要毒性机制之一, 当寄主植物受到病原物的侵染时, 作为一种防卫反应, 在寄主体内会迅速产生并积聚具有活性的氧化物质 (ROS) 来杀死外来入侵的微生物。H₂O₂ 是氧胁迫过程中产生的主要氧化物质, 对活细胞具有致命性的伤害^[1-2]。前期研究表明, 在水稻-白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) 互作过程中, 作为寄主防卫反应, 水稻植株内迅速产生大量的过氧化氢 (H₂O₂) 等活性氧物质^[3]。同时, 无论是互作产生的还是外源添加 H₂O₂ 均能显著地诱导了病菌过氧化物酶基因 (*oxyRxoo*、*catBxoo*、*katExoo* 和 *srpAxoo*) 上调表达, 从而活化了

H₂O₂ 降解途径^[4]。然而, 对于 H₂O₂ 信号分子如何诱导和活化 H₂O₂ 降解途径的机理至今尚不清楚。大肠杆菌 OxyR 是 H₂O₂ 的主要识别和调控蛋白, 它属于 LysR 家族的转录激活子蛋白, 作为一个全局性的转录调控因子, 对 H₂O₂ 的识别以及对过氧化物酶基因转录的起着非常重要的调控作用^[5]。因此, 为了阐明 Xoo 转录调控因子 OxyRxoo 对 H₂O₂ 降解途径的调控作用, 本研究首先通过基因克隆、序列分析、缺失突变及其表型测定, 对 Xoo 中 OxyR 同源物 OxyRxoo 进行了分子鉴定及其调控功能分析, 明确了 OxyRxoo 对 H₂O₂ 抗性、过氧化物酶 (CAT) 活性和过氧化物酶基因表达的调控功能。

基金项目: 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: 张建唐 (1982-), 男, 河北唐山人, 硕士研究生, 研究方向为植物-病原物分子互作。E-mail: zh.jiantang@126.com

收稿日期: 2009-01-09; 修回日期: 2009-02-26

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、质粒和培养条件: 供试菌株和质粒特征及其来源列表 1。Xoo 菌株在 28℃ PSA 培养基 (蛋白胨 10 g/L, 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℃, LB 培养基 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH7.0)上培养。试验用抗生素浓度为氨苄青霉素 (Amp)50 μg/mL、卡那霉素 (Kan)50 μg/mL、庆大霉素 (Gm)30 μg/mL 和壮观霉素 (Sp)40 μg/mL。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 The bacterial strains and plasmids used in the study

Strain or plasmid	Characteristic	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i>	Lab collection
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		
PXO99 ^A	Wild-type strain, Philippine race 6	Lab collection
Δ <i>oxyR_{xoo}</i>	Gm ^R , <i>oxyR_{xoo}</i> gene replaced by <i>Gm^R</i> gene	This study
Δ <i>oxyR_{xoo}</i> -C	Gm ^R , Sp ^R , Δ <i>oxyR_{xoo}</i> complemented with pHM1F	This study
Plasmid		
pMD18-T	Amp ^R , <i>ColE1</i> origin, T-vector	KaTaRa Co.
pK18mobsacB	<i>sacB</i> , <i>lacZα</i> , Km ^R , <i>mcs</i> mobilizable	Schafer et al. 1994
pHMI	Sp ^R , Sm ^R , <i>cos</i> , <i>parA</i> , <i>IncW</i> , derivative of pRI40	Hopkins et al., 1992
pMD- <i>oxyR_{xoo}</i>	pMD18-T with fragment containing <i>oxyR_{xoo}</i>	This study
pKS- <i>oxyR_{xoo}</i>	pK18sacB with fragment containing <i>oxyR_{xoo}</i>	This study
pKS- <i>oxyRoo-Gm</i>	pK18sacB with <i>oxyR_{xoo}</i> gene inserted by <i>Gm^R</i> gene	This study
pHM- <i>oxyR_{xoo}</i>	pHMI with fragment containing <i>oxyR_{xoo}</i>	This study

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa (大连)公司; 凝胶回收试剂盒, DNA 分子量标准购自诺德金生物公司; 电击仪 (BIO-RAD 公司 Plus Controller 仪); 紫外分光光度计 (Lambda35 PerkinElmer); 全自动 DNA 测序仪 (ABI Prism377); 实时定量 PCR 仪 (BIO-RAD 公司)。

1.2 基因克隆和序列分析

用 DNAMAN 6 软件对 Xoo 基因组中 *oxyR_{xoo}* 序列进行分析, 设计了特异性引物 (*oxyR_{xoo}*-1F/R、*oxyR_{xoo}*-rF/R) (表 2)。以 PXO99^A 基因组 DNA 为模板, 对 *oxyR_{xoo}* 基因左右各 320 bp 的 2 个片段进行 PCR 扩增。1.5% 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 试剂盒进行基因扩增产物纯化和连接, 获得质粒 pMD-*oxyR_{xoo}*-1r。按照文献 [6] 电击法进行 *E. coli* 细胞转化。用 ABI Prism 377 测序仪进行基因序列测定; 用 DNAMAN 6 和 BioEdit 7 进行序列分析; 用 SMART 进行蛋白质结构域分析; 用 BLAST 进行序列同源性比对。

表 2 本研究所用 PCR 引物序列

Table 2 The sequences of primers used in the study

Primer	Sequence (5'→3')
<i>oxyR_{xoo}</i> -1F	AAGCTTTGGCCGACCACAAGCAC
<i>oxyR_{xoo}</i> -1R	CTGCAGTTTCCTCGATCAGCAGCACT
<i>oxyR_{xoo}</i> -rF	CTGCAGTTGTTGCTACTGGGAGACG
<i>oxyR_{xoo}</i> -rR	TCTAGAACAGGCTATCGGGCAAT
<i>oxyR_{xoo}</i> -qF	AAGCTTCCTGCTGCCCAACACCCGAG
<i>oxyR_{xoo}</i> -qR	GGTACC GCGAGCTT CACAACCCAC
<i>oxyR_{xoo}</i> F	ATCCGCCTGATCCGCTTCC
<i>oxyR_{xoo}</i> R	CTAAGCCGCAACCCGCTTC
<i>katExoo</i> F	CACGGTCGGTATCCTGATTCAC
<i>katExoo</i> R	GTFTGCTGCCATCGCTGAG
<i>catB_{xoo}</i> F	ATCGCTTCATGGATGGCAATGG
<i>catB_{xoo}</i> R	TCGTTGGTCCAGGTGGCTGTAG
<i>ahpC_{xoo}</i> F	CCAGCCTGAAGGGCAAGT
<i>ahpC_{xoo}</i> R	AGTGCCTGTCCGTGGTG
<i>srpA_{xoo}</i> F	CCGTGCTGCCGTGTGTTGG
<i>srpA_{xoo}</i> R	TGCCGCTGGACTGGAAGTG
<i>gyrB_{xoo}</i> F	GCCAGCACAAATGGCATT
<i>gyrB_{xoo}</i> R	CCATCCTTCTCGGGGATGT

1.3 突变体构建及其互补试验

按照文献 [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 PXO99^A 中复制和扩增, 并且含有蔗糖致死基因 *sacB*, 带有该质粒的菌株不能在含有蔗糖的培养基上生长。将已克隆到 pMD18-T 载体上的 *oxyR_{xoo}* 两端片段用内切酶 *Hind* III 和 *Pst* I 消化, 回收酶切片

段后, 连接到 pK18mobsacB 载体上。获得重组质粒 pK18-*oxyRxoo*。将该质粒用 *Pst* I 消化、脱磷、电泳回收, 与用 *Nsi* I 消化的得到的 *Gm^R* 基因片段进行连接。得到重组质粒 pK18*oxyRxoo-Gm^R*。用电击法将其转化到 PX099^A 中后, 涂布到含有 10% 蔗糖的 PSA + *Gm* 培养基平板上, 由于载体与细菌基因组上的相应基因片段发生双交换使突变菌株具有 *Gm* 抗性, 所以 28℃ 培养长出的菌落即为突变体。设计了 *oxyRxoo* 的全长引物 *oxyRxoo-qF/R* (表 2)。并用该引物对 Δ *oxyRxoo* 进行 PCR 验证。

用全长引物 *oxyRxoo-qF/R* PCR 得到全长基因片段后, 经电泳回收、连接到广泛寄主质粒载体 pHMI 上, 获得重组质粒 pHM-*oxyRxoo*。将其电击转化到 Δ *oxyRxoo* 中, 涂布到含有 PSA + Sp 培养基平板上, 在 28℃ 下培养 4 d 后, 挑取菌落。用 M210 培养基 (蔗糖 5 g/L, 酶水解酪素 8 g/L, 酵母提取物 4 g/L, K₂HPO₄ 3 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g/L, pH7.0) 培养 12 h 后提取质粒、酶切验证是否为互补菌株 Δ *oxyRxoo-C*。

1.4 H₂O₂ 抗性测定

参照文献 [8] 抑菌圈法进行细菌对 H₂O₂ 的抗性试验。在 0.5% 的半固体 PSA 中加入细菌悬浮液 (*OD*₆₀₀ = 1.0), 混匀后, 倒入含有已凝固的 PSA 培养皿中后。在培养皿中央放上滤纸片圆碟, 加上 6 μ L 500 mmol/L H₂O₂。在 28℃ 下培养 24 h 后, 测量抑菌圈直径。

1.5 过氧化物酶活性测定

参照文献 [9, 10] 进行细菌蛋白质提取、定量和过氧化氢酶活性测定。加入 100 μ mol/L H₂O₂ (终浓度) 处理细菌培养液 (*OD*₆₀₀ = 1.0) 10 min, 未诱导处理菌株作为对照。

1.6 基因表达测定

参照文献 [6] 进行细菌 RNA 提取和反转录。按照 IQ SYBR[®] Green Supermix 试剂盒 (Bio-Rad, USA) 的方法 [11], 用 iCycler IQ[™] 实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad, USA) 进行 RT-Q-PCR 检测。参照文献 [12] 的方法, 以 *gyrBxoo* 基因为参照内标, 计算 *Xoo* 靶基因的相对表达量。

2 结果和分析

2.1 *OxyRxoo* 的基因克隆和功能结构域

用特异性引物进行 PCR 扩增, 成功地获得 1435 bp 的 *oxyRxoo* 基因片段。并将克隆片段进行测序, 发现其序列与 GenBank 中已测序菌株 KACC10331 中的序列完全相同。对克隆序列进行生物信息学分析, 表明 *OxyRxoo* 是 LysR 家族蛋白成员之一, 由 313 个氨基酸组成, 分子量为 34.8 kDa; 在 N 端 3 ~ 56 氨基酸具有 DNA 结合保守结构域 (HTH), 通过结合靶基因启动子区域、激活基因的转录; 88 ~ 293 氨基酸为 PBpB 结构域, 其功能为底物结合结构, 通过二硫键的形成改变蛋白结构来识别 H₂O₂ 分子 (图 1)。

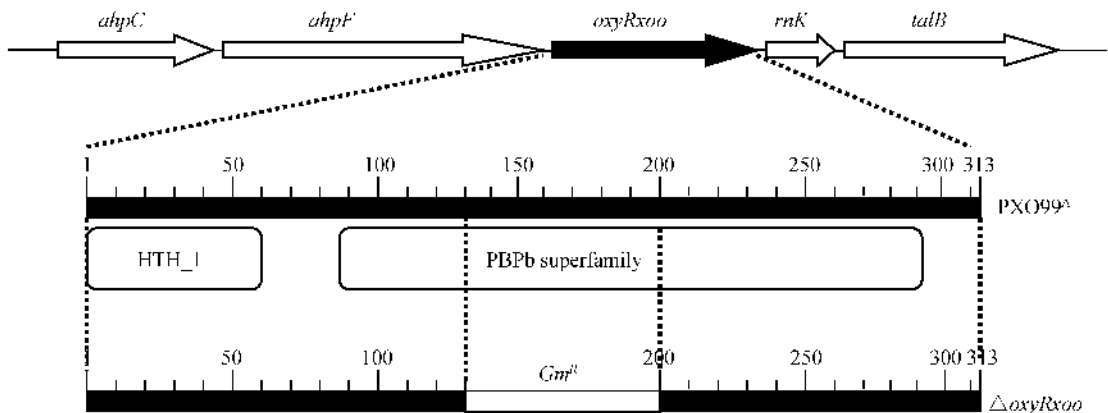


图 1 *oxyRxoo* 在基因组中的位置、编码蛋白保守结构域及其突变体构建

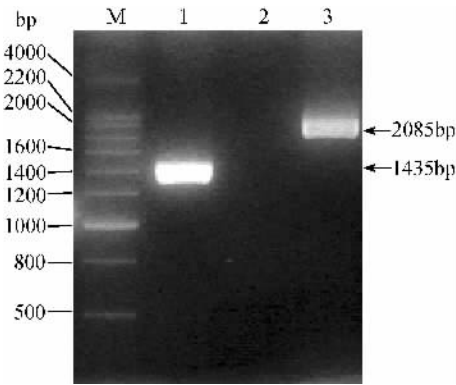
Fig. 1 Gene arrangement, conserved domains and deletion of *oxyRxoo*.

2.2 Δ *oxyRxoo* 基因缺失突变体构建和互补

扩增了含有 *oxyRxoo* 上游 346 bp 和下游 324 bp 核苷酸序列片段, 构建了用于基因突变的重组质粒 pKS-*oxyRxoo-Gm^R*; 导入 PX099^A 后, *Gm^R* 两端相应的 *oxyRxoo* 片段与 PX099^A 基因组相应的片段发生同源重组和标记双交换事件, 从而获得了缺失突变体

Δ *oxyRxoo* (图 2)。由于 *Gm^R* 比所置换的 *oxyRxoo* 大 600 bp, *oxyRxoo* F/R 引物在 PX099^A 中的 PCR 扩增条带要比 Δ *oxyRxoo* 中的小约 600 bp (图 2)。表明在 Δ *oxyRxoo* 中 *oxyRxoo* 已从基因组中缺失掉部分片段。

将构建好的互补载体 pHM-*oxyRxoo* 电击转化到 Δ *oxyRxoo* 中, 在 PSA + Sp + *Gm* 平板上连续培养, 挑



2 Xoo 不同菌株中全长引物 *oxyR_{xoo}-qF/R* *oxyR_{xoo}* 基因片段的 PCR 扩增检测

Fig.2 PCR amplification of *oxyR_{xoo}* in Xoo strains by the primers *oxyR_{xoo}-qF/R*. M: DNA Ladder; 1: PXO99^A; 2: CK; 3: $\Delta oxyR_{xoo}$.

选互补子 Δsp^R 、 ΔGm^R). 对互补子进行质粒提取和酶

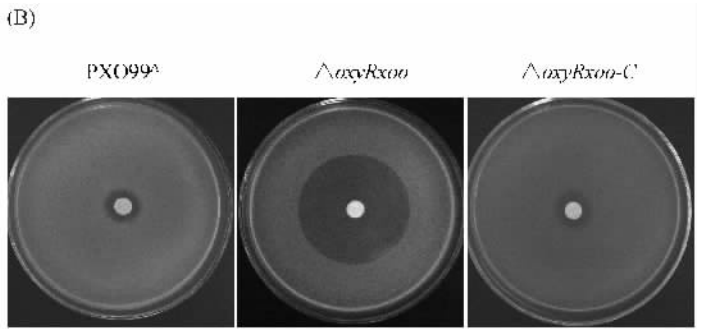
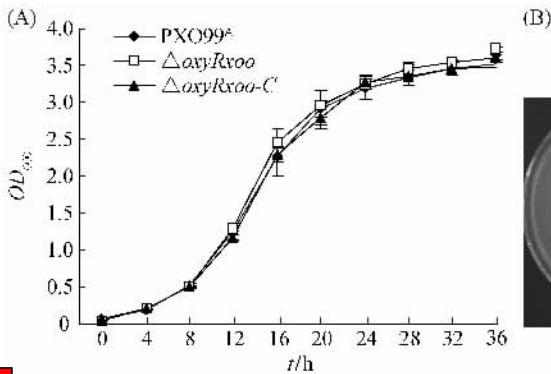
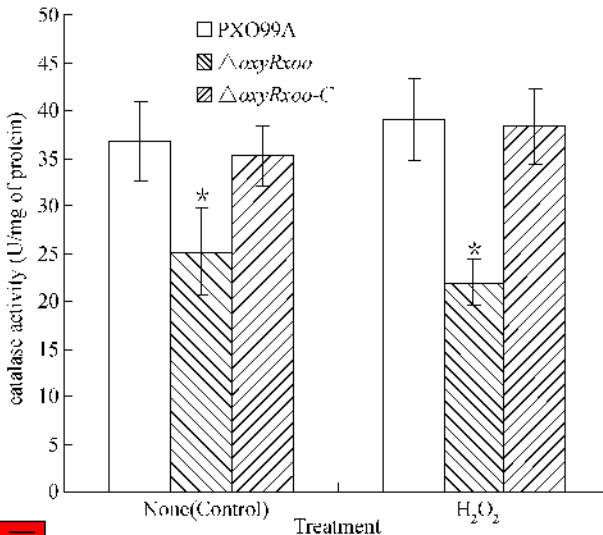


图3 Xoo 不同菌株在 M210 培养基 28°C, 200rpm 的生长状态 (A)和指数增长期对 *H₂O₂* 抗性 (B)

Fig.3 Growth in M210 medium at 28°C, 200rpm (A) and resistance to *H₂O₂* of exponential phase Xoo strains (B).



4 指数增长期 Xoo 不同菌株在有无 *H₂O₂* 诱导条件下的过氧化氢酶活性

Fig.4 Catalase activity of exponential phase Xoo strains in presence and absence of *H₂O₂*. * Significant at 0.05 level.

切分析验证 (未列出资料), 获得了互补菌株 $\Delta oxyR_{xoo}-C$ 。

2.3 $\Delta oxyR_{xoo}$ 的 *H₂O₂* 抗性、CAT 活性和过氧化物酶基因表达

与 PXO99^A 相比, $\Delta oxyR_{xoo}$ 在离体培养条件下的生长无明显变化 (图 3-A); *H₂O₂* 抑菌圈大小测定表明, $\Delta oxyR_{xoo}$ 的 *H₂O₂* 抗性降低了 3 倍 (图 3-B); 无论有无 *H₂O₂* 存在, $\Delta oxyR_{xoo}$ CAT 活性均明显地下降 (图 4); 基因互补可以使 $\Delta oxyR_{xoo}$ 的 *H₂O₂* 抗性和 CAT 活性恢复到与 PXO99^A 基本相同的水平。此外, 在 *H₂O₂* 诱导的条件下, 在 $\Delta oxyR_{xoo}$ 中 4 个过氧化物酶基因 (*ahpC_{xoo}*、*catB_{xoo}*、*katE_{xoo}* 和 *srpA_{xoo}*) 均下调表达 (图 5)。无论有无 *H₂O₂* 存在, *oxyR_{xoo}* 基因本身在 $\Delta oxyR_{xoo}$ 中均显著地上调表达, 表明 *oxyR_{xoo}* 基因表达受 *OxyR_{xoo}* 自身调控。

3 讨论

一般认为, *OxyR* 是细菌中 *H₂O₂* 的识别及调控因子之一, 存在两种氧化型和还原型状态, 通过两种状态之间的转化, 识别 *H₂O₂*, 进而调节相关基因的表达。如果基因发生突变, 就会导致细菌无法识别外源和内源的 *H₂O₂*, 不能启动 *H₂O₂* 降解机制, *H₂O₂* 分子在体内发生积累。当其积累到一定浓度时, 就会破坏体内核酸和蛋白质等大分子物质, 导致细菌不能正常生长或死亡 [6, 13]。本研究首先报道了 *oxyR_{xoo}* 基因发生缺失突变, 将导致 *H₂O₂* 抗性显著地降低、CAT 活性明显下降、过氧化物酶基因表达下调。因此, *OxyR_{xoo}* 作为一个重要转录调控因子介导和调控了 Xoo 的 *H₂O₂* 降解途径。

本研究发现在有无 *H₂O₂* 存在时, $\Delta oxyR_{xoo}$ 细菌生长明显不同。当参与氧胁迫反应的基因发生突

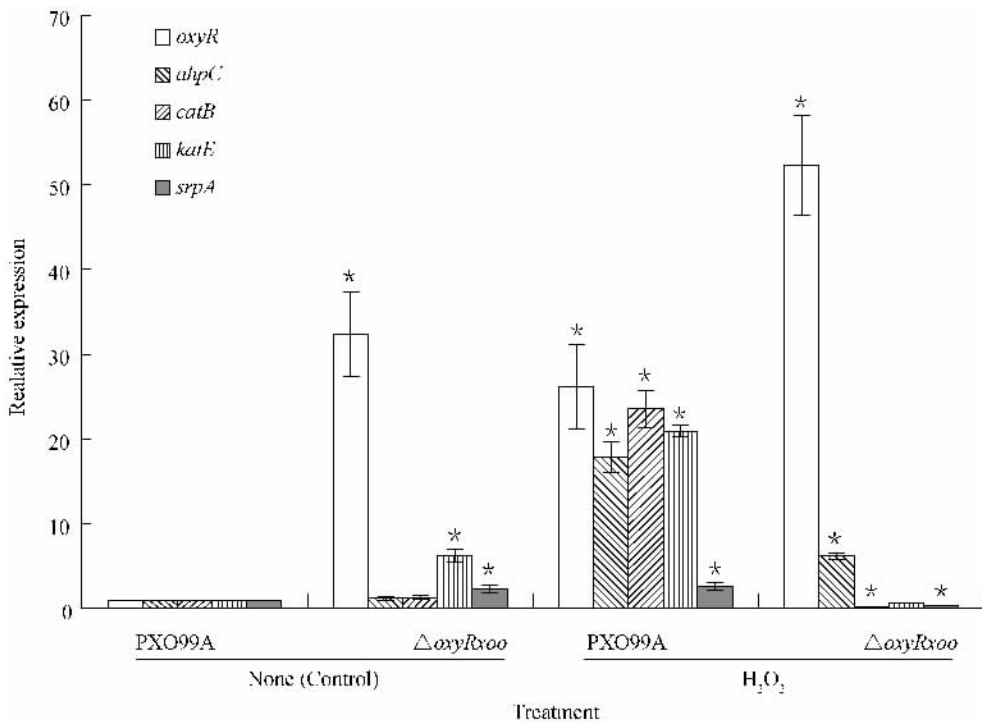


图5 指数增长期 Xoo 不同菌株在有 H₂O₂ 诱导条件下过氧化氢酶基因的表达

Fig.5 Expression of H₂O₂-detoxifying genes of exponential phase Xoo strains in presence and absence of H₂O₂. * Significant at 0.05 level.

变后,在有氧条件下的细菌生长会受到影响^[3-14]。然而,本研究发现 PXO99^A 与 ΔoxyRxo0 在离体培养条件下的生长无明显差异。其原因可能是 oxyRxo0 基因突变只是部分影响了 H₂O₂ 解毒功能,比如在 ΔoxyRxo0 中 CAT 酶活性只是下降,并未完全失活;另外 Xoo 可能还有其他不依靠 oxyRxo0 的 H₂O₂ 降解机制存在。需要指出的是,在有外源 H₂O₂ 存在的培养条件下,ΔoxyRxo0 对 H₂O₂ 抗性显著地降低,生长受到明显地抑制。表明该基因突变确实影响了细菌对外源 H₂O₂ 的解毒能力。这些结果与在其它病原细菌中也有相同报道^[5-17]。

本研究通过 RT-Q-PCR 检测发现, OxyRxo0 调控了 H₂O₂ 对过氧化物酶基因 (ahpCxo0、catBxo0、katExo0 和 srpAxo0) 的诱导表达。ahpCxo0 基因编码羟基过氧化氢酶的 C 亚基, katExo0 基因编码单功能过氧化氢酶, catBxo0 和 srpAxo0 基因编码过氧化氢酶^[8-20]。此外,在 H₂O₂ 诱导条件下,无论在 PXO99^A 和 ΔoxyRxo0 中, oxyRxo0 基因表达均明显上调,表明 oxyRxo0 受 H₂O₂ 诱导表达。无论在 H₂O₂ 诱导还是不诱导条件下, oxyRxo0 在 ΔoxyRxo0 中的基因表达量都明显高于 PXO99^A 中的,表明 oxyRxo0 基因表达受 OxyRxo0 自身反馈调控。尽管通过生物信息学分析法发现了上述受控基因启动子区存在

OxyRxo0 的结合位点和序列 (另文发表),这种调控作用是直接还是间接的有待进一步研究。

参考文献

- [1] Lushchak VL. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry*, 2001, 66 (5): 476 - 489.
- [2] Storz G, Imlay JA. Oxidative stress. *Current Opinion Microbiology*, 1999, 2: 188 - 194.
- [3] 齐放军,高世强,吴茂森,等. 过氧化氢诱导水稻细胞过敏反应的研究. *植物病理学报* (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2005, 35 (6): 504 - 508.
- [4] 周建波,吴茂森,胡俊,等. H₂O₂ 对水稻白叶枯病菌过氧化氢酶相关基因表达的诱导作用. *植物病理学报* (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2009. (已投稿).
- [5] Johnson JR, Clabots C, Rosen H. Effect of inactivation of the global oxidative stress regulator oxyR on the colonization ability of *Escherichia coli* O1: K1: H7 in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun*, 2006, 74: 461 - 468.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Lee SW, Ronald PC. Marker-exchange mutagenesis and complementation strategies for the Gram-negative bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 354: Plant-Pathogen Interactions. Edited by Ronald PC, Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2007.

- [8] Subramoni S, Sonti RV. Growth deficiency of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* fur mutant in rice leaves is rescued by ascorbic acid supplementation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18 (7): 644 – 651.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, 1976, 72: 248 – 254.
- [10] Beer RF, Jr., Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 196: 133 – 140.
- [11] Morrison T, Weis J, Wittwer C. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 1998, 24: 954 – 962.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method. *Methods*, 2001, 25: 402 – 408.
- [13] Mongkolsuk S, Helmann JD. Regulation of inducible peroxide stress responses. *Molecular Microbiology*, 2002, 45 (1): 9 – 15.
- [14] Sund CJ, Rocha ER, Tzinabos AO, et al. The *Bacteroides fragilis* transcriptome response to oxygen and H₂O₂: the role of OxyR and its effect on survival and virulence. *Molecular Microbiology*, 2008, 67 (1): 129 – 142.
- [15] Loprasert S, Fuangthong M, Whangsuk W, et al. Molecular and physiological analysis of an OxyR-regulated *ahpC* promoter in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Molecular Microbiology*, 2000, 37 (6): 1504 – 1514.
- [16] Rocha ER, Herren CD, Smalley DJ et al. The complex oxidative stress response of *Bacteroides fragilis*: the role of OxyR in control of gene expression. *Anaerobe*, 2003, 9: 165 – 173.
- [17] Chen H, Xu GZ, Zhao Y, et al. A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with one cysteine residue in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS ONE*, 2008, 3 (2): 1 – 14.
- [18] Mongkolsuk S, Whangsuk W, Vattanatviboon P, et al. A *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase subunit C (*ahpC*) mutant showed an altered peroxide stress response and complex regulation of compensatory response of peroxide detoxification enzymes. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (23): 6845 – 6849.
- [19] Hishinuma S, Yuki M, Fujimura M, et al. OxyR regulated the expression of two major catalase, KatA and KatB, along with peroxiredoxin AhpC in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 (12): 2115 – 2124.
- [20] Lee BM, Park YJ, Park DS. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (2): 577 – 586.

Roles of OxyRxoo, a transcriptional regulator of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in regulation of detoxification of hydrogen peroxide

Jiantang Zhang^{1,2}, Jie Gao², Maosen Wu¹, Huamin Chen¹, Chenyang He^{1*}

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

² Department of Plant Protection, Jilin Agricultural University, Changchun 4532980, China)

Abstract: [Objective] OxyRxoo is a homologue of OxyR from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), the pathogen of bacterial blight of rice. To elucidate the role of OxyRxoo in detoxification of hydrogen peroxide. [Methods] OxyRxoo was studied by gene cloning, sequencing, deletion, complement and phenotype analysis. [Result] Compared to those of the wild-type strain PXO99^A, there was no difference in bacterial growth *in vitro* of Δ oxyRxoo, but Δ oxyRxoo is more sensitive to H₂O₂ with reduced catalase activity. In the presence of H₂O₂, the expression of catalase genes (*ahpCxoo*, *catBxoo*, *katExoo* and *srpAxoo*) was significantly down-regulated, while the expression of *oxyRxoo* was up-regulated in Δ oxyRxoo. [Conclusion] OxyRxoo functions as a transcription regulator in mediating and controlling H₂O₂ detoxification in Xoo.

Keywords: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; OxyRxoo; H₂O₂ detoxification; catalase; regulation

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)