

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(8):1018-1025; 4 August 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

水稻条斑病菌 *hrcC*、*hpa3* 和 *hrpE* 基因表达不依赖 *hrpG* 和 *hrpX* 基因调控

姜佳¹, 邹华松², 李玉蓉¹, 陈功友^{1, 2*}

(¹南京农业大学植物保护学院, 农业部病虫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】决定水稻条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)在非寄主植物上激发过敏反应(hypersensitive response, HR)和在寄主水稻上致病性(pathogenicity)的 *hrp* 基因簇是受 *hrpG* 和 *hrpX* 基因调控的, 但还不清楚 *hrpG* 和 *hrpX* 基因是否共同决定着所有 *hrp* 基因的表达。【方法】本文通过基因敲除方式获得了水稻条斑病菌的 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的双突变体。【结果】烟草和水稻上测定结果显示, 双突变体与单突变体一样, 均在烟草上失去 HR 激发能力和丧失在水稻上的致病性; 相应地, 功能互补后双突变体恢复至野生表型。细菌在水稻悬浮细胞、*hrp* 诱导培养基 XOM3 和营养丰富的培养基 NB 中生长后的 RT-PCR 结果显示, NB 中 *hrp* 基因低水平表达, XOM3 和水稻细胞能够高水平诱导 *hrp* 基因表达。无论何种生长条件, *hrpG* 单突变体中 *hrcC*、*hrcT*、*hpa3* 和 *hrpE* 基因表达, 而 *hpa1*、*hpa2*、*hpaB*、*hrcJ* 和 *hrpG* 基因不表达; *hrpX* 单突变体中 *hpa2*、*hrcC*、*hpa3*、*hrpE* 和 *hrpG* 基因表达, 而 *hpa1*、*hrcT*、*hpaB* 和 *hrcJ* 基因不表达; *hrpG* 和 *hrpX* 双突变体中 *hrcC*、*hpa3* 和 *hrpE* 基因表达, 而 *hpa1*、*hpa2*、*hpaB*、*hrcT*、*hrcJ* 和 *hrpG* 基因不表达。【结论】这提示, 水稻条斑病菌的 *hrcC*、*hrpE* 和 *hpa3* 基因不受 *hrpG* 和 *hrpX* 基因单独或同时调控, 而 *hrcT* 基因受 *HrpG* 调控。由此推测, 水稻条斑病菌 III 型分泌系统关键组份的表达有可能通过另外的信号途径进行调控, 这为进一步分析 III 型分泌途径的形成提供了线索。

关键词: 水稻条斑病菌; *hrp* 调节基因; III 型分泌系统; RT-PCR

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)08-1018-08

水稻条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xooc*)是东南亚国家和我国南方水稻种植区的一种重要细菌病害^[1]。*Xooc* 和其它革兰氏阴性植物病原细菌一样拥有 *hrp*(hypersensitive response on nonhost plants and pathogenicity in host plants)基因簇, 决定着在非寄主植物上激发过敏性反应(HR)和在寄主植物上的致病性(pathogenicity)^[2]。*Xooc* 的 *hrp* 基因簇由两部分构成: 核心 *hrp* 基因簇由 9 个

hrc(*hrp*-conserved)基因、10 个 *hrp* 基因和 8 个 *hpa*(*hrp*-associated)基因组成; *hrp* 调节基因簇由 *hrpG* 和 *hrpX* 组成, 独立存在于核心 *hrp* 基因簇外的其它染色体区域^[3]。目前, 有关 *Xooc* 的 *hrp* 基因和 *hrp* 调控基因间的关系并不清楚。根据结构上的保守性和相关植物病原黄单胞菌的研究结果推测, 9 个 *hrc* 基因产物形成 III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS), 负责将致病性效应物注入寄主细胞中, 从而

基金项目: 基金项目: 国家 863 计划(2006AA10A210), 国家自然科学基金项目(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: 姜佳(1983-)女, 河南安阳人, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: jiangjiazb@163.com

收稿日期: 2009-01-22; 修回日期: 2009-04-09

使寄主产生抗(感)病性^[3-5],其中 HrcC 蛋白位于细菌细胞外膜上,HrcT 蛋白与 HrcV、HrcR、HrcS 和 HrcU 蛋白组成复合体位于细菌的内膜上,介于内膜和外膜间的是 HrcJ 蛋白^[6-7]。T3SS 效应物经 T3SS 分泌后经过 Hrp pilus,再由 HrpF 转位进入寄主细胞中^[8-9]。8 个 *hpa* 基因中,*hpa2* 和 *hpa1* 基因位于 *hrpA* 转录单元的左端,*hpa2* 基因产物推测与细胞溶解酶有关^[10],*hpa1* 基因产物为 HR 激发因子^[3],*hpa3* 和 *hpa4* 基因位于 *hrpE* 和 *hrpF* 转录单元之间,在致病性方面的功能并不是很清楚。

植物病原黄单胞菌的 *hrp* 基因调控机制还没有像茄科青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)那样清楚,但肯定的是植物病原黄单胞菌的 *hrp* 基因是诱导表达的^[6,11],并受到 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的调控^[6,12-18]。HrpG 是双组分调控系统的 OmpR 家族成员,调控 *hrpA* 转录单元和 *hrpX* 基因的表达^[12]。HrpX 属于 Arc 家族成员,调控 *hrpB-hrpF* 转录单元中的 *hrp* 基因和一些启动子中存在 PIP(plant-inducible promoter)-box(TTCGC-N15-TTCGC)特征的 T3SS 效应物的表达^[13,15]。推测 HrpG 位于细胞外膜上,作为感应器的接收部分,当 pH、Ca⁺、活性氧和渗透压等信号激发因子存在时^[19],感应信号通过磷酸化的方式传递信号到 HrpX,HrpX 位于细胞内膜上,被激活后启动启动子区含有 PIP-box 的 *hrp* 基因的表达^[6,13,15]。据研究,*Xooc* 的 *hrp* 基因簇中存在 PIP-box 的有 *hpa1* 基因、*hrpB-hrpF* 转录单元和 *hpa3* 基因^[3]。*Xooc* 的 *hrpG* 和 *hrpX* 基因分别单突变,都能导致病菌的致病性丧失和在非寄主上失去激发 HR 的能力^[3,20]。但 *hrpG* 和 *hrpX* 基因同时被突变后

hrp 基因表达是否全部受到影响,至今仍不清楚。本文通过基因敲除方法获得了 *Xooc* 的 *hrpG* 和 *hrpX* 的双突变体,发现 *hrcC*、*hrpE* 和 *hpa3* 基因的表达并不受影响,推测其表达依赖于另一调控途径的调控。这为进一步分析 *hrp* 基因的调控机理和 T3SS 装置的形成奠定了工作基础和提供了科学线索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、质粒和植物的培养条件:菌株及质粒特性见表 1。*Xooc* 于 NA 培养基 28℃ 培养,大肠杆菌(*Escherichia coli*)于 LB 培养基 37℃ 培养^[3]。*Xooc* 的 *hrpG* 和 *hrpX* 基因突变体筛选所用培养基见文献^[21]。所用抗生素浓度:氨苄青霉素(Amp)100 μg/mL,卡那霉素(Km)25 μg/mL,利福平(Rif)100 μg/mL,硫酸链霉素(Sm)100 μg/mL 和壮观霉素(Sp)100 μg/mL。

烟草品种为 *Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*,水稻品种为感病品种 IR24,本实验室保存,种植于南京农业大学温室。

1.1.2 主要试剂和仪器:*Xooc* 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,反转录试剂购于 TaKaRa 公司。连接所用 pMD18-T 载体、连接酶、限制性内切酶、*Ex-Taq* 酶和 DNA marker 均购于 TaKaRa 公司。Southern blot 所用 DIG 试剂盒购于 Roche 公司。引物合成和测序由 Invitrogene 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。

表 1 本研究所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Property	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	φ90, <i>lacZΔm15</i> , <i>recA1</i> , hosts of pUC18-T, pUC19-T, pRFR034, and their derivatives	Invitrogene
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>		
RS105	Rif ^r , wild type	This lab
ΔR <i>hrpG</i>	Rif ^r , <i>hrpG</i> knock-out mutant of the strain RS105	This lab
ΔR <i>hrpX</i>	Rif ^r , <i>hrpX</i> knock-out mutant of the strain RS105	This lab
ΔR <i>hrpGX</i>	Rif ^r , <i>hrpG</i> and <i>hrpX</i> double knock-out mutant of the strain RS105	This study
PM <i>hrpGX</i>	Transconjugant of ΔR <i>hrpGX</i> with pHMI- <i>hrpGX</i>	This study
Plasmid		
pMD18-T	Nm ^r , Ap ^r , Mob ⁺ , Mob(P), LacZα ⁺	TaKaRa
pHMI	Sp ^r or Sm ^r , <i>IncW</i> , Mob(p), Mob ⁺ , LacIP ⁺ , PK2 replicon, cosmid	Shan et al. ^[22]
pKMS1	Km ^r , 6.4 kb, pUC18 polylinker, <i>mob</i> , <i>oriV</i> , <i>sacB</i>	This lab
pMD18-T- <i>hrpGX</i>	A 3 kb fragment containing <i>hrpG</i> and <i>hrpX</i> genes was ligated into pMD18-T	This study
pKMS Δ <i>hrpGX</i>	A 1137 bp fusion of the left and right arms flanking the <i>hrpG</i> and <i>hrpX</i> locus was ligated into pKMS1 at <i>Sal</i> I and <i>Xba</i> I sites	This study
pHMI- <i>hrpGX</i>	The <i>hrpG</i> and <i>hrpX</i> genes in pMD18-T was transferred into pHMI at <i>Hind</i> III site	This study

1.2 *hrpG* 和 *hrpX* 基因双突变体的构建和分子验证

参照 *Xooc* BLS256 菌株的基因组序列^[23], 根据基因位置和转录方向, 选取 *hrpG* 上游 370 bp 和 *hrpX* 下游 800 bp 的 DNA 片段作为 *hrpG* 和 *hrpX* 位点的左右同源臂, 以 RS105 菌株的基因组 DNA 为模板, 利用 $\Delta RhrpGX$ -F1 和 $\Delta RhrpGX$ -R1 及 $\Delta RhrpGX$ -F2 和 $\Delta RhrpGX$ -R2 (表 2) 两对引物分别 PCR 扩增得到 2 个同源臂片段 (图 1), 分别经 *Sal* I 和 *Sma* I 及 *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切, 连接至 *Sal* I 和 *Xba* I 双酶切处理后的 pKMS1 载体上, 转化至 DH5 α 后经 PCR

和相应酶切验证得到 pKMS $\Delta hrpGX$ 的阳性克隆。

将 pKMS $\Delta hrpGX$ 质粒按照 Jean Leach 等^[24]的方法电转化导入 RS105 菌株中, 经过 2 次不同培养基上的筛选^[21]获得 *hrpG* 和 *hrpX* 基因双突变菌株。以 $\Delta RhrpGX$ -F1 和 $\Delta RhrpGX$ -R2 为引物组合 (图 1) 经 PCR 验证得到正确的突变体克隆。按照基因 DNA 提取试剂盒提取 *hrpG* 和 *hrpX* 双突变体基因组, 经 *Acc* I 酶切, 以基因敲除所用的 370 bp 同源臂片段为探针, 用 DIG 试剂盒进行 Southern blot (具体步骤参见 DIG 试剂盒操作手册)。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequence (restriction sites underlined) 5'→3'	Annealing temperature /°C	Time for Extension /s	PCR Product /bp	Target genes
$\Delta RhrpGX$ -F1	ATAGTCGACTCTGCAGATCTTCACGTCC	56	20	370	The left arm flanking the <i>hrpG</i> and <i>hrpX</i> loci
$\Delta RhrpGX$ -R1	ATTCCCGGGGCAAGTCCACCGCTGCAGG				
$\Delta RhrpGX$ -F2	TATCCCGGGGCGTTAAGGTGCGCAACGT	57	50	800	The right arm flanking the <i>hrpG</i> and <i>hrpX</i> loci
$\Delta RhrpGX$ -R2	ATATCTAGACGGCGGCTCGGGATTGA				
<i>hrpGXxooc</i> -F	GGTAAAGCTTCCACGTTGCGCACCTTAAC	59	180	3000	The <i>hrpG</i> and <i>hrpX</i> genes
<i>hrpGXxooc</i> -R	CAGAAGCTTCTCAGCAGGCGGCTGTGCGATGT				
ΔR <i>hpa1</i>	TTCCAGGTTGACCAAAAGCCA AGAAGCTGCTGGCGAAACTG			464	<i>hpa1</i>
ΔR <i>hpa2</i>	TTCAACGGTTCGCATGCCAGTA CTACTGCAGCCAGGTATTTCAT			346	<i>hpa2</i>
ΔR <i>hrcC</i>	ATGCAGAGCTATGGCACCT GCTGGAGTAATGACCGGAAT			567	<i>hrcC</i>
ΔR <i>hrcT</i>	GGCCACCTTCTGCGTCTGATC AGCAAGGCGAGCAGCAATA			644	<i>hrcT</i>
ΔR <i>hpa3</i>	GGCCACCTTCTGCGTCTGATC TTCGTGTATGGCGGGTTGGTTC	52	45	380	<i>hpa3</i>
ΔR <i>hpaB</i>	ACTTGCCAGATGTGGACTCGGTT GAACATCTCGTCTGCCGAA			377	<i>hpaB</i>
ΔR <i>hrpE</i>	CGCTTCGAACAGGGTATGGAT GCCTTGCCGATGAACTTGTT			211	<i>hrpE</i>
ΔR <i>hrcJ</i>	TTGCCTTTCGTCGTCGCAACTCG TCGTCTGGCGTACTTTGGAC			620	<i>hrcJ</i>
ΔR <i>hrpG</i>	GCAATGTCTCGGTGTTTTCC GCACGCAAGCCGATC			380	<i>hrpG</i>

1.3 功能互补

以 RS105 菌株基因组 DNA 为模板, 以 *hrpGXxooc*-F 和 *hrpGXxooc*-R (表 2) 为引物, PCR 扩增 3 kb 含有 *hrpG* 和 *hrpX* 元件的 DNA 片段, 连接在到 PMD18-T 载体上, 获得重组质粒 pMD18-T-*hrpGX*, *Hind* III 单酶切该质粒后回收 3 kb 的 DNA 片段再与 *Hind* III 相应酶切的 pHMI 载体连接, 获得重组质粒 pHMI-*hrpGX*。将该质粒电转入 $\Delta RhrpGX$ 菌株中, 在含壮观霉素的 NA 平板上筛选, 经过 PCR 验证, 得到互补菌株 PM*hrpGX*。该接合子用于烟草上的 HR 测定和水稻上的致病性测定。

1.4 烟草过敏反应和水稻水浸症状、致病性及菌体生长能力的测定

按照 Zou 等方法^[3], 将水稻条斑病菌培养至对数生长期 ($OD_{600} = 0.6 \sim 0.7$) 进行植物上的表型测定。无针头注射器注射细菌于非寄主植物烟草的叶片中, 12~24 h 内观察是否产生过敏性反应; 将细菌注射到生长两周左右的 IR24 水稻叶片中, 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。用打孔器取注射区域的水稻叶片研碎, 通过梯度稀释涂布在含有相应抗生素的 NA 平板上, 3~4 d 后计数菌落数量^[2,20]。水稻成株期经

针刺法接种供试菌株,14 d后测量病斑长度。上述 试验重复3次,每次处理5片叶。

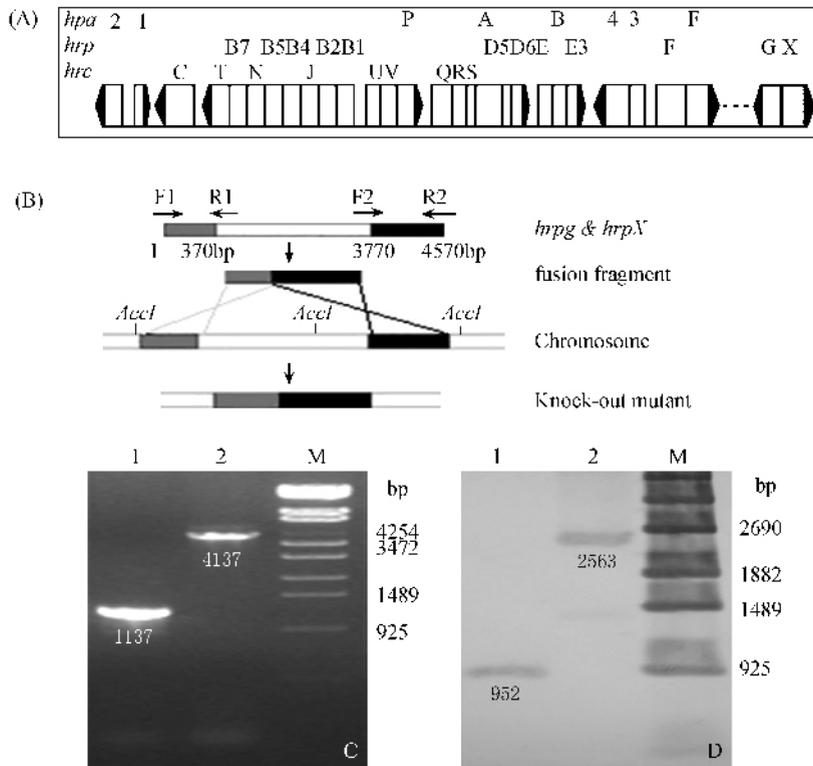


图1 水稻条斑病菌 *hrp* 基因簇结构示意图以及 *hrpG* 和 *hrpX* 基因敲除突变体的构建和分子验证

Fig.1 Genetic organization of the *hrp* clusters and construction and molecular analysis of the knock-out mutant in the *hrpG* and *hrpX* genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. A. *hrp*, *hrc* and *hpa* gene positions in the *hrp* clusters of *X. oryzae* pv. *oryzicola*. Black arrows stand for the transcriptional orientation. B. Schematic construction of a knock-out mutant in the *hrpG* and *hrpX* genes. Grey region stands for the left arm of the *hrpG* and *hrpX* gene loci (white region) and the black presents the right arm. F1 and R1, and F2 and R2 are the primers for the right and left arms for PCR amplification, respectively. The right and left arms were fused in pKMS1 and the knock-out mutant was obtained after two step recombination occurred. C. PCR confirmation of the knock-out mutant in the *hrpG* and *hrpX* genes. D. Southern hybridization to confirm the knock-out mutant with the left arm as the probe. The genomic DNA was digested by *AccI* enzyme. Lane 1. The knock-out mutant $\Delta RhrpGX$; Lane 2. The wild type strain RS105. *AccI* stands for the enzyme sites for Southern blot.

1.5 RT-PCR 检测 *hrp* 基因的表达

Xooc 各菌株在水稻悬浮细胞、*hrp* 诱导培养基 XOM3 和营养丰富的培养基 NB^[25] 中生长 16 h 后收集菌体,按照 Tripture 操作手册(Roche 公司)提取总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测质量,分光光度计下定量,然后按照 Reverse Transcripase 试剂盒的方法合成 cDNA。以 cDNA 为模板,PCR 扩增 *hrp* 基因(引物见表 2)。以 16sRNA 为内参,确定 cDNA 模板浓度。每 25 μ L PCR 反应体系中, *Ex-Taq* 1 U, GC buffer 12.5 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 2.5 μ L, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)2 μ L, cDNA 1 ng, 引物(20 μ mol/L)各 1 μ L, 加灭菌水至 25 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后通过凝胶成像系统(Gel Doc 2000™ BIORAD, USA)分析含量。

2 结果和分析

2.1 水稻条斑病菌 *hrpG* 和 *hrpX* 基因双突变体的构建

水稻条斑病菌各 *hrp*、*hrc* 和 *hpa* 基因在 *hrp* 基因簇中的位置和转录方向如图 1-A 所示。为研究 *hrpG* 和 *hrpX* 的功能,本研究采用同源重组的方法获得 *hrpG* 和 *hrpX* 的双突变体 $\Delta RhrpGX$ 。选取 *hrpG* 和 *hrpX* 基因位点的上游 370 bp 和下游 800 bp 作为两个同源交换臂,PCR 扩增后构建在 pKMS1 载体上成为融合片段,通过电转后在 NAN 平板上进行生长,获得发生第一次同源交换的重组子(图 1-B)。重组子再在含有 10% 蔗糖的 NA 平板上进行筛选,对应卡那霉素的平板上不生长的菌落即为发生第二次同源重组的突变体(图 1-B)。表明 *hrpG* 和 *hrpX* 基因被敲除(图 1-B)。以同源臂的上游引物和另一同源臂的下游引物进行 PCR 扩增,结果发现,*hrpG* 和 *hrpX*

基因突变体 $\Delta RhrpGX$ 中的 PCR 产物为 1137 bp,而野生型菌株 RS105 为 4137 bp(图 1-C);Southern 杂交结果显示,突变体 $\Delta RhrpGX$ 中杂交信号条带为 952 bp,比野生型菌株的信号条带 2563 bp 小(图 1-D)。这说明本研究构建获得了正确的 *hrpG* 和 *hrpX* 双基因敲除突变体。

2.2 水稻条斑病菌 *hrpG* 和 *hrpX* 基因决定着在非寄主上的 HR 和在水稻上的致病性

将同时敲除 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的双突变体 $\Delta RhrpGX$ 注射接种感病水稻品种 IR24(3 周龄)发现,其与 *hrpG* 和 *hrpX* 单突变体一样,丧失了在水稻上产生水浸症状的能力(图 2-A);经针刺接种成株期水稻 IR24 发现,其也与 *hrpG* 和 *hrpX* 单突变体一

样丧失了致病性(图 2-B);经检测病菌在水稻组织中的生长能力发现,双突变体 $\Delta RhrpGX$ 在水稻中的繁殖能力显著降低,下降水平同 *hrpG* 和 *hrpX* 单突变体(图 2-D);注射接种非寄主烟草后发现,其与 *hrpG* 和 *hrpX* 单突变体一样也丧失了激发产生 HR 的能力。相应地, $\Delta RhrpGX$ 可被 *hrpG* 和 *hrpX* 基因互补,恢复在水稻幼苗上的水浸症状(图 2-A)和在成株期水稻上的致病性(图 2-B),同时在水稻病菌组织中的生长能力与野生型菌株 RS105 相当(图 2-D),在烟草上也可恢复产生 HR(图 2-C)。这表明,水稻条斑病菌 *hrpG* 和 *hrpX* 基因是决定病菌 Hrp 表型的关键基因。

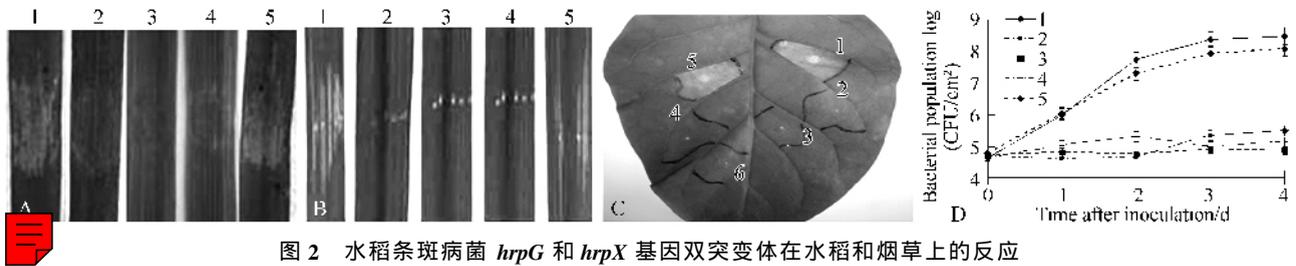


图 2 水稻条斑病菌 *hrpG* 和 *hrpX* 基因双突变体在水稻和烟草上的反应

Fig. 2 Responses of tobacco and rice to the knock-out mutant in the *hrpG* and *hrpX* genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzaicola*. A. Water soaking symptoms in rice seedlings (IR24, 3 weeks old); B. Pathogenicity assays in adult rice; C. Hypersensitive response in tobacco; D. Bacterial growth in infected tissues of rice. 1. The wild type strain RS105; 2. $\Delta RhrpGX$; 3. $\Delta RhrpG$; 4. $\Delta RhrpX$; 5. PMhrpGX, the conjugant of $\Delta RhrpGX$ with the *hrpG* and *hrpX* genes.

2.3 水稻条斑病菌 *hrpG* 和 *hrpX* 基因共同决定着 *hrp* 基因的转录表达

Xooc 的 *hrp* 基因是诱导表达的^[11, 26]。为了研究 *hrpG* 和 *hrpX* 对 *hrp* 基因(图 1-A)的调控表达情况,将野生型菌株 RS105、*hrpG* 突变体 $\Delta RhrpG$ 、*hrpX* 突变体 $\Delta RhrpX$ 、*hrpG* 和 *hrpX* 双突变体 $\Delta RhrpGX$ 及其功能互补菌株 PMhrpGX 分别在水稻悬浮细胞、*hrp* 诱导培养基 XOM3 和营养丰富的 NB 中生长 16 h,经 RT-PCR 检测发现,水稻细胞和 *hrp* 诱导培养基 XOM3 能够有效诱导 *hrp* 基因的表达,被检测的 *hpa1*、*hpa2*、*hrcC*、*hrcT*、*hpa3*、*hpaB*、*hrcJ*、*hrpE* 和 *hrpG* 等 9 个基因均被诱导表达(图 3-A, 3-B);在 NB 中生长的水稻条斑病菌,其 *hrp* 基因表达水平比水稻细胞和 XOM3 培养基中生长的要低(图 3-C, 3-D)。这表明,在 NB 中生长的水稻条斑病菌,其 *hrp* 基因也能被诱导表达,但表达水平远低于在水稻细胞和 XOM3 培养基中生长的水稻条斑病菌。在水稻细胞和 XOM3 培养基中生长的水稻条斑病菌,虽然野生型菌株 RS105 中的 *hpa2*、*hpa1*、*hrcC*、*hrcT*、*hpa3*、*hpaB*、*hrpE*、*hrcJ* 和 *hrpG* 基因均转录表达(图 3-A, 3-B),但比较而言, *hrcC*、*hrpE* 和 *hpa3* 基因的表达量较高(图 3-D)。有

意义的是,无论在何种生长条件下, *hrpG* 单突变体 $\Delta RhrpG$ 中, *hpa2*、*hpa1*、*hpaB* 和 *hrcJ* 基因不表达,而 *hrcC*、*hrcT*、*hpa3* 和 *hrpE* 基因转录表达,说明 *hrpG* 基因突变后 *hpa2*、*hpa1*、*hpaB* 和 *hrcJ* 基因的表达受到影响(图 3-A, 3-B, 3C- $\Delta RhrpG$); *hrpX* 单突变体 $\Delta RhrpX$ 中, *hpa2*、*hrcT*、*hpaB* 和 *hrcJ* 基因不表达,而 *hpa2*、*hrcC*、*hpa3*、*hrpE* 和 *hrpG* 基因转录表达(图 3-A, 3-B, 3C- $\Delta RhrpX$); *hrpG* 和 *hrpX* 基因均被敲除的突变体 $\Delta RhrpGX$ 中, *hrcC*、*hpa3* 和 *hrpE* 基因转录表达,而其它 *hrp* 基因不转录表达(图 3-A, 3-B, 3C- $\Delta RhrpGX$);功能互补子 PMhrpGX 中所有被测试的 *hrp* 基因表达水平与野生型菌株基本一致(图 3A, 3B, 3C-PMhrpGX)。以上结果提示, *hrpG* 基因控制着 *hpa2* 和 *hrpX* 基因的表达, *hrpX* 基因控制着 *hpa1*、*hrcT*、*hpaB* 和 *hrcJ* 基因的转录表达,而 *hrcC*、*hpa3* 和 *hrpE* 基因的转录既不受 *hrpG* 基因控制,也不受 *hrpX* 基因控制。这表明,水稻条斑病菌,无论是在水稻细胞和 *hrp* 诱导培养基中生长,还是在营养丰富的 NB 培养基中生长, *hrp* 基因均被诱导表达,但 *hrcC*、*hpa3* 和 *hrpE* 基因的转录表达可能受另一调节因子的调控。

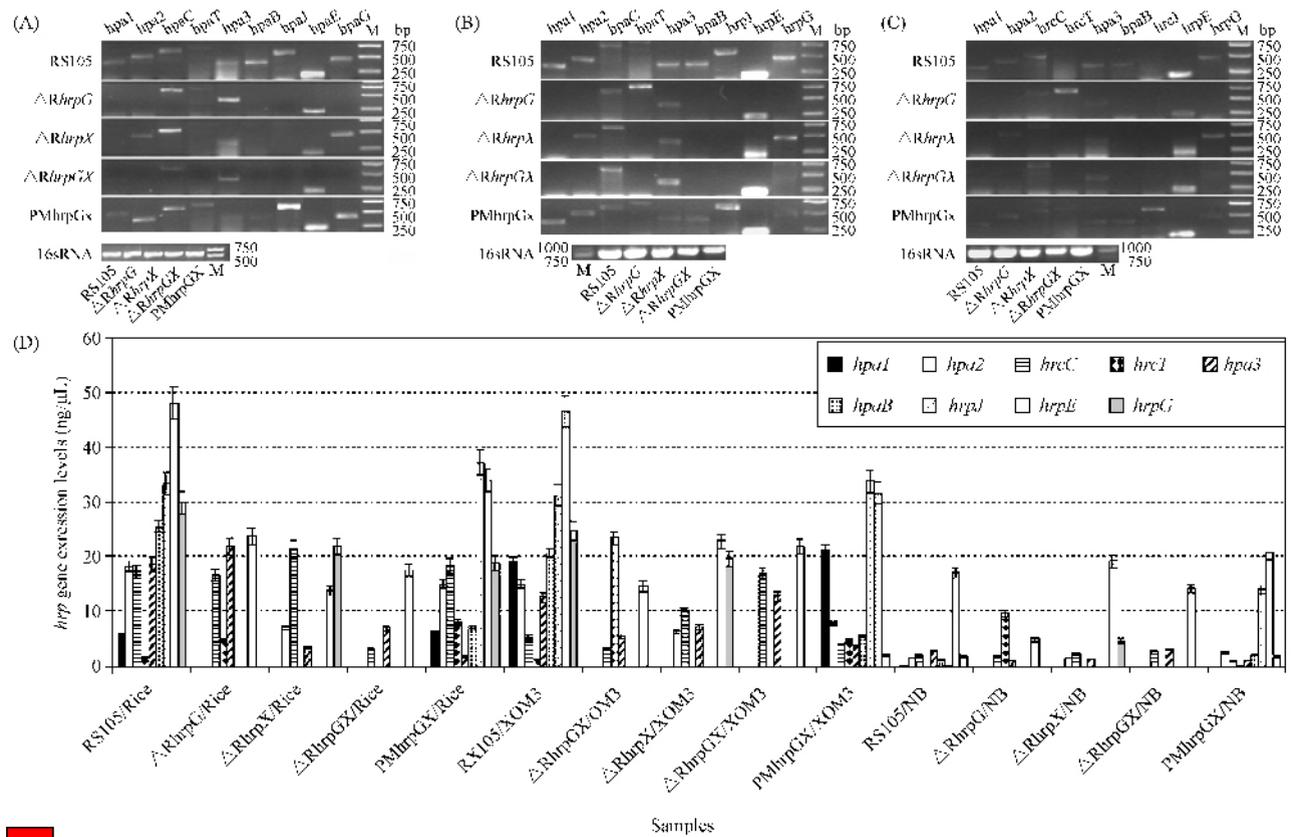
图3 RT-PCR 检测水稻条斑病菌中关键 *hrp* 基因的表达

Fig.3 Expression of key *hrp* genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* examined by RT-PCR. *Xanthomonas* strains were grown in rice suspending cells (A), *hrp*-inducing medium XOM3 (B) and nutrient-rich medium NB (C) for 16 h, respectively, and then their RNA was extracted as the templates for reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR). 16sRNA was used as constitutive control. M. DNA maker. After run in 1% agarose gel, the concentrations of RT-PCR products were analysed in gel imaging system (D). RS105/Rice means that the wild type strain was grown in rice suspension cells, and the others can be by the same taken.

3 结论

革兰氏阴性植物病原细菌通过 *hrp* 基因簇编码的 T3SS 装置分泌效应物至植物细胞中,使植物产生抗(感)病性,*hrp* 基因的转录表达受 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的调控。本文通过基因敲除的方法获得了 *Xooc* 的 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的双突变体,接种水稻和烟草后发现其丧失了致病性和激发 HR 的能力,同时菌的生长能力显著下降,这与 *Xooc* 中 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的单突变体结果一致^[27],遗传互补后又恢复了野生型。这表明 *Xooc* 中 *hrpG* 和 *hrpX* 作为调节基因缺失后直接影响 *hrp* 基因的表达,从而影响病菌的致病性。

植物病原细菌 *hrp* 基因的调控网络非常复杂,目前对 *hrp* 基因表达的调控机制也知之甚少。基本的概貌是:*hrp* 基因是诱导表达的^[26];在营养丰富的培养基中培养,*hrp* 基因的表达明显受到抑制,而只有在营养贫瘠的基本培养基中培养或与植物互动时,*hrp* 基因才会被诱导表达^[26]。一般认为,*hrpG* 和

hrpX 基因突变后所有的 *hrp* 基因表达都会受到影响^[4-5]。但本研究结果发现,在水稻悬浮细胞、*hrp* 诱导培养基 XOM3 和营养丰富的 NB 培养基中生长后,水稻条斑病菌 *hrp* 基因均被诱导表达,只是 NB 培养基中 *hrp* 基因的表达水平较低。这与 Seo 等人的研究结果是一致的^[28]。本研究还发现,无论在何种生长条件下,*hrpG* 和 *hrpX* 的单突变体中,大多数的 *hrp* 基因的转录表达受到抑制(资料未显示)。惊奇的是,*hrcC*、*hrpE* 和 *hpa3* 基因的转录并不受到 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的调控。鉴于本研究应用的是水稻悬浮细胞、*hrp* 诱导培养基 XOM3 和营养丰富的 NB 培养基,因此我们认为,*hrcC*、*hrpE* 和 *hpa3* 基因的转录表达并不受到 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的调控,而可能通过其他途径被调控。本研究还发现,*hpa1*、*hpa2*、*hpaB* 和 *hrcJ* 在调节基因 *hrpG* 和 *hrpX* 单缺失或同时缺失时均不能有效表达,这与 *Xcv* 和 *Xoo* 的研究结果一致^[29]。但例外的是,在其他植物病原黄单胞菌中认为位于 *hrpB* 转录单元的 *hrcT* 基因是受 *hrpX* 基因调控的,但在本研究中发现,它的表达还

受到 *hrpG* 基因的调控,当 *hrpG* 突变时, *hrcT* 基因表达。 *hrpG* 基因对 *hrcT* 基因的这一负调控机制尚待进一步研究。有趣的是, *hpa2* 基因的转录表达是受 *hrpG* 基因调控的,这在以往的研究中并没有发现。同源性比较发现, *hrcC* 和 *hrpE* 在 *Xooc*、*Xoo*、*Xcv*、*X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) 及 *X. axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) 及 *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) 中高度保守,其中 *hrcC* 编码 HrcC 蛋白,是组成 III 型分泌通道的外膜蛋白,属 PulD/pIV 类,也许通过 II 型分泌系统分泌^[30],并且在 *hrcC* 基因的上游 113 bp 内找不到诱导表达识别的 PIP-Box^[31]; *hrpE* 编码 HrpE 蛋白,组成 Hrp pilus,是一种外泌蛋白, Bonas 等发现其在复杂培养基 NYGB 上 *hrpE* 能低水平表达,而其它转录单元的表达完全受到抑制,表明 *hrpE* 的表达调控与其它转录单元可能有所不同^[6]。因此,本文作者认为, *hrcC*、*hrpE* 和 *hpa3* 基因的转录表达可能受其它未知调节机制的调控并独立于 *hrpG* 和 *hrpX* 基因。这种推测,还有待进一步证实。

参考文献

- [1] 方中达,任欣正,陈泰英,等. 水稻白叶枯及条斑病和李氏禾条斑病原细菌的比较研究. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 1957, 3(2): 99 - 122.
- [2] 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): 1 - 7.
- [3] 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.
- [4] Jha G, Rajeshwari R, Sonti RV. Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(1): 31 - 40.
- [5] Zhu WG, Magbanua MM, White FF. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(7): 1844 - 1853.
- [6] Wengelnik K, Bonas U. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(12): 3462 - 3469.
- [7] He SY. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 1998, 36: 363 - 392.
- [8] Büttner D, Bonas U. Port of entry the type III secretion translocon. *Microbiology*, 2002, 10(4): 186 - 192.
- [9] Büttner D, Bonas U. Getting across bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *The EMBO Journal*, 2002, 21(20): 5313 - 5322.
- [10] Zhang JH, Wang XY, Zhang Y, et al. Conserved Hpa2 protein has lytic activity against the bacterial cell wall in phytopathogenic *Xanthomonas oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79: 605 - 616.
- [11] Oku T, Alvarez AM, Kado CI. Conservation of the hypersensitivity-pathogenicity regulatory gene *hrpX* of *Xanthomonas campestris* and *X. oryzae*. *DNA Sequence*, 1995, 5(4): 245 - 249.
- [12] Lee SW, Jeong KS, Han SW, et al. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PhoP/Q two-component system is required for AvrXA21 activity, *hrpG* expression, and virulence. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(6): 2183 - 2197.
- [13] Büttner D, Noël L, Stüttmann J, et al. Characterization of the nonconserved *hpaB-hrpF* region in the *hrp* pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(9): 1063 - 1074.
- [14] 陈功友,王金生. 水稻条斑病菌 *hrp* 调节基因 *hrpG_{Xooc}* 和 *hrpX_{ooc}* 的克隆和序列分析. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2003, 33(3): 213 - 219.
- [15] Koebnik R, Krüger A, Thieme F, et al. Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator *hrpX* to plant-inducible promoter boxes. *Journal of bacteriology*, 2006, 188(21): 7652 - 7660.
- [16] Yamazaki A, Hirata H, Tsuyumu SJ. *hrpG* regulates type II secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of General Plant Pathology*, 2008, 74(2): 138 - 150.
- [17] Wei K, Tang DJ, He YQ, et al. *hpaR*, a putative marR family transcriptional regulator, is positively controlled by *hrpG* and *hrpX* and involved in the pathogenesis, hypersensitive response, and extracellular protease production of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(5): 2055 - 2062.
- [18] Tsuge S, Terashima S, Furutani A, et al. Effects on promoter activity of base substitutions in the cis-acting regulatory element of *hrpXo* regulons in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(7): 2308 - 2314.
- [19] Hofius D, Tsitsigiannis DI, Jones JDG, et al. Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in Cancer Biology*, 2007, 17(2): 166 - 187.
- [20] 陈功友,潘小玫,王金生. 水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 化学诱变 *hrp* 基因突变体及相关性状的研究. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2001, 31(3): 199 - 208.
- [21] Zou LF, Li YR, Chen GY. Novel phenotypes revealed by multiple mutagenesis in *hrp* genes of a rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* with a new suicide vector pKMS1. *Appl. Envir. Microbiol.* 2008, AEM02859-08.
- [22] Shan L, Oh H, 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 Inter*, 2004, 17(5): 447 - 455.

- [23] Niño-Liu DO , Ronald PC , Bogdanove AJ. *Xanthomonas oryzae* pathovars : model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* , 2006 , 7 (5) : 303 – 324 .
- [24] Choi SH , Leach JE. Genetic manipulation of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *International Rice Research Notes* , 1994 , 19 (2) : 31 – 32 .
- [25] 肖友伦 , 李玉蓉 , 刘之洋 , 等 . 水稻条斑病细菌 *hrp* 基因诱导表达系统的建立 . 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) , 2007 47 (3) : 396 – 401 .
- [26] Lindgren PB. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annual Review of Phytopathology* , 1997 , 35 : 130 – 152 .
- [27] Cho HJ , Park YJ , Noh TH , et al. Molecular analysis of the *hrp* gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859. *Microbial Pathogenesis* , 2008 , 44 (6) : 473 – 483 .
- [28] Seo YS , Sriariyanun M , Wang L , et al. A two-genome microarray for the rice pathogens *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* and its use in the discovery of a difference in their regulation of *hrp* genes. *BMC Microbiology* , 2008 , 8 (1) : 99 .
- [29] Furutani A , Tsuge S , Oku T , et al. HpaI secretion via type III secretion system in *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Journal of General Plant Pathology* , 2003 , 69 (2) : 271 – 275 .
- [30] 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 (18) : 5655 – 5662 .
- [31] Wengelnik K , Marie C , Russel M , et al. Expression and localization of HrpA1 , a Protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *Journal of Bacteriology* , 1996 , 178 (4) : 1061 – 1069 .

Expression of the *hrcC* , *hrpE* and *hpa3* Genes Is not Regulated by the *hrpG* and *hrpX* Genes in a Rice Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Jia Jiang¹ , Huasong Zou² , Yurong Li¹ , Gongyou Chen^{1 2*}

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

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

Abstract [Objective] The *hrpX* (hypersensitive response on nonhost plants and pathogenicity in host plants) gene cluster , which conforms *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* , the causal agent of bacterial leaf streak in rice , to the ability to elicit a hypersensitive response (HR) in nonhost tobacco and pathogenicity in host rice , is thought to be regulated by the *hrpG* and *hrpX* genes . However , it is unclear whether the *hrpG* and *hrpX* genes regulate all the *hrp* gene expression of the cluster coordinately or not . **[Methods]** We constructed a mutant with both *hrpG* and *hrpX* genes knocked out . **[Results]** which , as the same as the single mutant at the *hrpG* or *hrpX* gene , lost the ability to trigger HR in tobacco and pathogenicity in rice , respectively . Correspondingly , the *hrpG* and *hrpX* genes together could restore such the ability to the double mutant at the *hrpG* and *hrpX* loci . After grew in rice suspension cells , *hrp*-inducing medium XOM3 and nutrient-rich medium NB for 16 hours , respectively , reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) revealed that : the expression of *hrp* genes in NB medium was lower than that in rice cells and XOM3 medium ; in whatever growth media , the *hrcC* , *hrcT* , *hrpE* and *hpa3* genes expressed , while the *hpa1* , *hpa2* , *hpaB* , *hrcJ* , and *hrpG* genes did not in the *hrpG* mutant ; the *hpa2* , *hrcC* , *hpa3* , *hrpE* and *hrpG* genes expressed , while the *hpa1* , *hrcT* , *hpaB* and *hrcJ* genes did not in the *hrpX* mutant ; the *hrcC* , *hrpE* and *hpa3* genes expressed , but the *hpa1* , *hpa2* , *hpaB* , *hrcT* , *hrcJ* and *hrpG* genes did not in the *hrpG* and *hrpX* double mutant . **[Conclusion]** This indicated that the expression of the *hrcC* , *hrpE* and *hpa3* genes was not regulated by the *hrpG* and/or *hrpX* genes , but the expression of the *hrcT* gene was negatively controlled by the *hrpG* gene . Thus , we postulated that the expression of key type-III secretion (T3S) apparatus components was controlled by an unknown signaling pathway , which may facilitate our further understanding on the formation of the T3S machine .

Keywords : *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ; *hrp* genes ; T3S components ; RT-PCR

(本文责编 : 王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A210) , the Natural Science Foundation of China (30710103902 , 30671354) and the Ministry of Agriculture of China (NYHYZX07-056)

* Corresponding author. Tel : + 86-25-84395028 ; Fax : + 86-25-84399002 ; E-mail : gyouchen @ njau . edu . cn

Received : 22 January 2009 / Revised : 9 April 2009