

水稻白叶枯病菌 *hrp* 调节基因 *hrpXoo* 的克隆 与序列分析

陈功友, 余晓江, 王金生

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

摘要: 用化学方法诱变水稻白叶枯病菌 PX099^A 菌株, 获得 6 株 *hrp*⁻ 突变体, 此突变体除丧失在非寄主烟草上激发过敏反应和在感病寄主水稻上的致病能力外, 有些缺乏激发烟草产生 HR 的信号物质, 有些在胞内存在此信号物质, 而不能泌至胞外。来自 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* JXOIII 粘粒基因文库的 *hrp* 基因克隆 pUHRX245 所携 *hrp* 基因片段大小为 36.8 kb。系列亚克隆 36.8 kb *hrp* 基因片段及各亚克隆对 *hrp*⁻ 突变体功能互补作用的结果显示, 3.3 kb *Sac*I 片段为最小酶切功能片段。序列测定和分析结果表明, 3.3 kb *hrp* 片段含 *hrpXoo* 基因和含与热激蛋白 90 家族有关的 2 个开放阅读框 *hsp*ORF1 和 *hsp*ORF2。HspORF1 在蛋白质数据库中未发现序列蛋白。HspORF2 与 Hsp90_{Xo} 的同源性达 99%。*hrpXoo* 与黄单胞菌中已报道的 *hrpX* 基因有很高的同源性 (90% 以上)。在黄单胞菌中高度保守的编码 α -螺旋-转- α -螺旋结构的 60-bp 核苷酸序列, 在交叉功能互补时是必需的。不含此结构的 *hrpXoo* (1.1 kb) 片段, 可使 JXOIII 的 *hrp*⁻ 突变体在水稻上具致病性和在非寄主烟草上激发产生 HR, 但不能使来自 PX099^A 和 RS105 的 *hrp*⁻ 突变体恢复在烟草上激发产生 HR 的功能。黄单胞菌中已知 HrpX 的同列比较显示, *X. oryzae* 和 *X. campestris* 种间在 88、196 和 247 位点的氨基酸上有差异, 而 175 位点的氨基酸变化可能代表着黄单胞菌中系统维管束病原菌和局部斑点病原菌间的差异。

关键词: 水稻白叶枯病菌; 水稻条斑病细菌; *hrpXoo*; 过敏反应; 致病性

Cloning and Sequencing Analysis of an *hrp* Regulatory Gene, *hrpXoo*, of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

CHEN Gong-you, YU Xiao-jiang, WANG Jin-sheng

(Key Laboratory for Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture / Department of Plant Pathology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Six *hrp*⁻ mutants obtained from the PX099^A strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) by using diethyl sulfate (DES) as a mutagenic chemical. These mutants lost their pathogenicity on susceptible rice, Shanyou63, and the ability to trigger hypersensitive response (HR) on a nonhost plant of tobacco. Some of the mutants lack a substrate that induces HR on tobacco, while others possess the substrate within cells but do not secrete it out. An *hrp* gene clone, pUHRX245, screened from a gene library of *Xoo* by biparental conjugation, originally contained 36.8 kb foreign DNA of *Xoo* genome. A series of subclones from 36.8 kb *hrp* fragment in pUHRX245 showed that a 3.3 kb *Sac*I DNA complemented all *hrp*⁻ mutants to hypersensitive response (HR) elicitation on tobacco, but only restored the pathogenicity to *hrp*⁻ mutants, JCM2482 of *Xoo* and M1005 of *X. o. pv. oryzicola* (*Xooc*), with symptoms of rice leaf blight and streak, respectively. The fragment sequenced confirms that *hrpXoo* genes and two open reading frames, *hsp*ORF1 and *hsp*ORF2, related

收稿日期: 2002-04-18

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2001AA214061)、国家重点基础研究计划资助项目(G2000016201)和国家自然科学基金重点资助项目(30230240)

作者简介: 陈功友(1963-)男, 河南潢川人, 副教授, 博士, 主要从事分子植物病理学研究, E-mail: gyouchen@njau.edu.cn。王金生为通讯作者, Tel: 025-4396072; Fax: 025-4395246; E-mail: wangjsh@njau.edu.cn

with heat shock protein 90 family, are contained in 3.3 kb DNA. There was no alignment of HspORF1 in protein database while HspORF2 was homologous to Hsp90_{Xo} with an identity over 99%. The *hrpXoo* gene was highly homologous to *hrpX* genes already reported in other *Xanthomonas*. A 60-bp nucleotide sequence coding for a structure of an alpha-helix-turn-alpha-helix is highly conserved in *Xanthomonas*. A 1.1 kb upstream DNA of the *hrpXoo* without the 60-bp fragment conferred pathogenicity on rice and HR induction on tobacco only to *hrp*⁻ mutant of a JXOIII strain of *Xoo* but not to *hrp*⁻ mutants either of PXO99^A or of RS105 strain of *Xooc*. Sequence comparison of *hrpXoo* with other *hrpX* genes of *Xanthomonas* already loaded in GenBank showed at least 90% identity. The differences in amino acids between HrpXoo and the other five HrpX proteins suggest that the alternation of amino acids at sites 88, 196 and 247 might reflect the differences between *X. campestris* and *X. oryzae*, and that the amino acid change at the site 175 in HrpX represent the difference between *Xanthomonas* that develop systemically in vascular bundles and locally in infected tissues after infection.

Key words: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; *X. oryzae* pv. *oryzicola*; *hrpXoo* gene; Hypersensitive response; Pathogenicity

动物和植物病原细菌与其寄主互作,具有多种相同机制,其中之一是将效应蛋白(如 harpin、Vir 或 Avr 和 Dsp)通过 III 型分泌系统(type III secretion system, TTSS)泌至胞外,从而对寄主细胞产生毒害^[1,2]。植物病原细菌 TTSS 是由 *hrp* 基因编码的。*hrp* 基因决定着植物病原细菌在非寄主植物上激发过敏反应(hypersensitive response, HR)和在寄主植物上的致病性(pathogenicity, Pth)。植物病原细菌激发非寄主产生 HR 的信号物质是 harpin^[1-3]。迄今为止,植物病原细菌 *Erwinia amylovora*、*Pseudomonas syringae*、*Ralstonia solanacearum* 和 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 的 *hrp* 基因簇的结构与功能较为清楚,并已完成 *hrp* 基因簇的全序列测定。*hrp* 基因成簇存在,一般位于染色体上,也有少数位于质粒上^[1,4]。植物病原细菌 *hrp* 基因簇拥有 20 多个基因,其中 9 个基因产物与组成 TTSS(又称 Hrp 通道)的装置有关,并且广泛保守^[1-3,5]。保守的 *hrp* 基因又称 *hrc* 基因(*hrp* and conserved)。目前开展的植物病原细菌致病岛(pathogenicity islands, PAIs)中 *avr*、*hrp* 和 *dsp* 的研究,也是以 *hrp* 基因为基础来进行的^[1]。

绝大多数黄单胞菌是植物病原细菌,由众多的种和致病变种构成,可侵染 392 种植物,与植物互作存在更为严格的寄生专化性^[4]。黄单胞菌引起的植物病害可分为两类,一类是系统性维管束病害,如 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(简称 *Xoo*)引起的水稻白叶枯病和 *X. campestris* pv. *campestris*(简称 *Xcc*)引起的甘蓝黑腐病等;另一类是局部斑点病害,如 *X. oryzae* pv. *oryzicola*(简称 *Xooc*)引起的水稻条斑病和 *X. campestris* pv. *vesicatoria*(简称

Xcv)引起的辣椒斑点病。*Xoo* 是水稻上最重要的病原细菌^[4,6],但由于该病菌 *XorI* 和/或 *XorII* 限制修饰系统使外源 DNA 导入其中困难,遗传操作难度较大^[4],所以迄今水稻黄单胞菌 *hrp* 基因克隆的报道中转座子标签法使用较少,而异源探针克隆法较多。例如, Kamder 等人^[7]以 *R. solana-cearum* 的 *hrpB* 为探针,从 *Xoo* 和 *Xcc* 中获得了 *hrpXo* 和 *hrpXc* 基因片段,并证明两者可交叉互补,但未能与其它黄单胞菌作交叉互补验证。White 等人以 *Xcv* 的 *hrpA1* 为探针从 PXO86 中克隆了 *hrpA_{Xo}* 基因(资料未发表),但至今未见 *Xoo* *hrp* 基因簇完整克隆的报道。陈功友等人^[6,8]研究认为,*Xooc* 的化学诱变 *hrp*⁻ 突变体丧失在非寄主烟草上激发 HR 和在感病寄主水稻上致病的能力,与 *hrp* 基因簇中某一 *hrp* 基因发生突变有关,主要表现在 harpin-like protein 的丧失或因不能形成 TTSS 而 harpin 类蛋白不被泌出胞外。笔者在此基础上,采用交叉互补法(reciprocal complementation)将 JXOIII 粘粒基因文库与 *Xooc* 的 *hrp*⁻ 突变体进行功能互补,获得了 *hrp* 基因阳性克隆 pUHRX245^[8]。本研究旨在对 pUHRX245 所携 *hrp* 基因片段进行进一步亚克隆,通过功能互补 *Xoo* 和 *Xooc* 的 *hrp*⁻ 突变体,获得最小酶切功能片段,并对最小功能片段进行序列分析,以期水稻黄单胞菌致病性分子遗传学研究提供基因水平上的切入点。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、粘粒和培养条件

本研究用的菌株及粘粒特性和来源见表 1。培养条件见文献[8]。

表 1 供试菌株、粘粒的特性与来源

Table 1 Properties of strains and cosmids used in this study

菌株或粘粒 Strains or cosmids	特性 Properties	来源 Source
<i>E. coli</i>		
DH5 α	$\Phi 901acZ\Delta m15$, <i>recA1</i>	本研究室 This lab
S17-1	294 <i>recA</i> , chromosomally integrated RP4 derivative, T p^+ , Sp r	R. Simor ^[10]
<i>X. o. pv. oryzae</i>		
JXOIII	Rif r , wild type(日本系统 III 号小种 Japanes III)	本研究室 This lab
JCM2482	Rif r , <i>hrp</i> $^-$ 突变体, harpin $^-$	陈功夫等 ^[6]
PXO99 A	Rif r , A r , wild type(菲律宾系统小种 6, Philippine6)	本研究室 This lab
M1	Rif r , <i>hrp</i> $^-$ 突变体, harpin $^-$	本研究 This study
M4	Rif r , <i>hrp</i> $^-$ 突变体, III $^-$	本研究 This study
M20	Rif r , <i>hrp</i> $^-$ 突变体, harpin $^-$	本研究 This study
M27	Rif r , <i>hrp</i> $^-$ 突变体, III $^-$	本研究 This study
M37	Rif r , <i>hrp</i> $^-$ 突变体, harpin $^-$	本研究 This study
M39	Rif r , <i>hrp</i> $^-$ 突变体, harpin $^-$	本研究 This study
<i>X. o. pv. oryzicola</i>		
RS105	Rif r , wild type	本研究室 This lab.
M51	Rif r , <i>hrp</i> $^-$ 突变体, III $^-$	陈功夫等 ^[8]
M55	Rif r , <i>hrp</i> $^-$ 突变体, harpin $^-$	陈功夫等 ^[8]
M1005	Rif r , <i>hrp</i> $^-$ 突变体, harpin $^-$	陈功夫等 ^[8]
Cosmid		
pUHR034	<i>IncW</i> , <i>Nmr</i> , <i>Kmr</i> , <i>Mob(K p)</i> , <i>Mob$^+$</i> , <i>LacZa$^+$</i>	De Feyter ^[3]
pUHRX245	pUFR034 clone from JXOIII gene library, containing 36.8kb partial <i>EcoRI</i> fragment	陈功夫等 ^[8]
pHRE17.0	17kb <i>EcoRI</i> fragment in pUFR034 from pUHRX245	本研究 This study
pHRE13.5	3.3kb <i>EcoRI</i> fragment in pUFR034 from pUHRX245	本研究 This study
pHRE3	3kb <i>EcoRI</i> fragment in pUFR034 from pUHRX245	本研究 This study
pHRB7.2	7.2kb <i>BamHI</i> partuclyly digested fragment in pUFR034 from pE13.5	本研究 This study
pHRB6	6.0kb <i>BamHI</i> fragment in pUFR034 from pE13.5	本研究 This study
pHRB5.2	5.2kb <i>BamHI</i> fragment in pUFR034 from pE13.5	本研究 This study
pHRB2.3	2.3kb <i>EcoRI-BamHI</i> fragment in pUFR034 from pE13.5	本研究 This study
pHRS3.3	3.3kb <i>SacI</i> fragment in pUFR034 from pHRB6	本研究 This study
pHRS2.7	2.7kb <i>SacI</i> fragment in pUFR034 from pHRB6	本研究 This study
pSK2.2	2.2kb <i>SacI-KpnI</i> fragment in pUFR034 from pHRS3.3	本研究 This study
pSK1.1	1.1kb <i>SacI-KpnI</i> fragment in pUFR034 from pHRS3.3	本研究 This study

1.2 化学诱变 PXO99 A 获得 *hrp* $^-$ 突变体

方法见文献 [8]

1.3 *hrp* $^-$ 突变体中 harpin 类蛋白的检测

方法见文献 [8]

1.4 亚克隆和 DNA 重组

方法见文献 [6]

1.5 两亲交配

方法见文献 [8]

1.6 过敏反应和致病性测定

方法见文献 [8]

1.7 序列测定和分析

在 TaKaRa 大连生物技术有限公司测序。来自 JXOIII *hrp* 基因克隆中的 3.3 kb *SacI* 片段的序列测定号为 :NJS057。应用 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中的 Blast 程序^[9]分析测定序列的同列物,应用 ORF Finder 程序分析开放阅读框,用 BioEdit 程序比较同列物间的差异。3.3 kb *hrp* DNA 序列在 GenBank 中的登录号为 AF272886。

2 结果与分析

2.1 PXO99 A 的 *hrp* $^-$ 突变体表型分析

DES 诱变 PXO99 A 获得的突变株,经接种烟草和水稻检测 HR 和致病性,获得 6 株 *hrp* $^-$ 突变体。经超声波破碎 *hrp* $^-$ 菌体细胞后在烟草叶片上注射接种细胞破碎液、离心上清液、离心上清液热处理、蛋白酶 K 水解的离心上清液和菌残体,结果发现,*hrp* $^-$ 突变体可分为两种表型(表 2)。(1)HR $^-$ /Pth $^-$ /III $^-$ 类 *hrp* $^-$ 突变体,其细胞破碎液、离心上清液和热处理的离心上清液注射接种烟草叶片,均可激发产生 HR,但经蛋白酶 K 处理的离心上清液则失去激发烟草产生 HR 的能力,如 M4 和 M27,表明激发烟草产生 HR 的蛋白质存在于胞内,但不能泌出胞外。(2)HR $^-$ /Pth $^-$ /harpin $^-$ 类 *hrp* $^-$ 突变体,其细胞破碎液、离心上清液、热处理的离心上清液注射接种烟草叶片,均不能激发产生 HR,如 M1、M20、M37 和 M39,表明该类突变体中不存在激发烟草产生 HR 的蛋白质。

2.2 pUHRX245 的亚克隆及功能片段

来自 *Xoo* JXOIII 基因文库的 *hrp* 基因重组粘粒 pUHRX245,经 *EcoRI* 完全酶切后除载体外产生 4 个片段,依次大小分别为 3.0、3.3、13.5 和 17.0 kb(图 1),将其构建于载体 pUHR034 上,分别得到

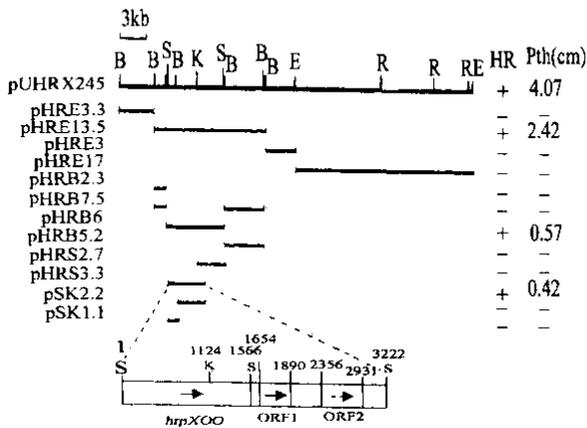
表 2 DES 诱变 PXO99^A 获得的 *hrp*⁻ 突变体表型分析¹⁾

Table 2 Phenotypes of *hrp*⁻ mutants produced by DES from PXO99^A

菌株 Strains	植物的反应 Plant response		激发烟草产生 HR 的活性物质测定 Detection of active substrate for HR on tobacco				
	烟草 Tobacco	水稻 Rice	破碎液 Sonicated cell	离心上清液 Supernatant	热处理 Heat treatment	蛋白酶 K 水解物 Lyased by protease K	菌残体 Debris
M1	-	-	-	-	-	-	-
M4	-	-	+	+	+	-	-
M20	-	-	-	-	-	-	-
M27	-	-	+	+	+	-	-
M37	-	-	-	-	-	-	-
M39	-	-	-	-	-	-	-
PXO99 ^A	+	22.4	+	+	+	-	-
CK	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾“+”示在烟草上产生 HR；“-”示在烟草上无 HR，在水稻上无致病性。数字示病斑长度 (cm)

“+” stands for HR on tobacco and pathogenicity on rice, while“-” for no HR or no pathogenicity. Figures represent lesion length (cm)



图下端为 *hrpXoo* 和 *hspORF1* 及 *hspORF2* 位置。图右端 HR 示亚克隆对 *hrp*⁻ 突变体 M1005 激发烟草产生过敏反应的恢复能力；Pth 示亚克隆对 *hrp*⁻ 突变体致病性的恢复能力，数字示病斑长度。E. EcoRI；K, KpnI；B, BamHI；S, SacI

The subclones of the 36.8 kb *hrp* fragment were labeled in the left lane; the numbers in the subclone names indicate the DNA sizes from the *hrp* fragment. Biparental conjugants of M1005 with the subclones are shown on the right two lanes. The conjugants were determined for the HR induction on tobacco and pathogenicity (Pth) on rice. The symbols “+” or “-” indicate that the HR was or was not induced; the extent of pathogenicity is given as length of the lesion (cm). The location and transcriptional orientation of *hrpXoo* gene and *hspORFs* are displayed on the bottom lines

图 1 pUHRX245 中所携 36.8 kb *hrp*⁻ 基因片段的酶切图谱及其亚克隆对 *hrp*⁻ 突变体 M1005 的功能互补作用

Fig. 1 The endonuclease restriction map and subclones of the 36.8 kb *hrp* fragment harbored in pUHRX245

重组粘粒 pHRE3、pHRE3.3、pHRE13.5 和 pHRE17.0。由此推算 pUHRX245 所携 *hrp* 基因片段大小为 36.8 kb。4 个重组粘粒转化 S17-1 后，分别与

来自 PXO99^A 和 RS105 的 *hrp*⁻ 突变体进行功能互补，结果发现，携 13.5 kb DNA 片段的重组粘粒 p-HRE13.5 可使所测 *hrp*⁻ 突变体恢复激发烟草产生 HR，使 M1005 恢复在水稻上的致病性 (表 3)。这说明，13.5 kb DNA 为 *hrp* 基因功能片段。

对 pHRE13.5 粘粒 DNA 进行 *Bam*HI 酶切，与载体 pUFR034 连接后，获得 4 个亚克隆，分别为 pHRB 2.3、pHRB 5.2、pHRB 6 和 pHRB 7.5，所携 DNA 片段大小分别为 2.3、5.2、6.0 和 7.5 kb。将此 4 个亚克隆分别与来自 RS105 的 *hrp*⁻ 突变体进行功能互补，发现重组粘粒 pHRB6 能使所测 *hrp*⁻ 突变体恢复激发烟草产生 HR 能力，使 *hrp*⁻ 突变体 M1005 恢复在水稻上的致病性 (表 3，图 1，图 2)。这说明，pHRB6 所携 6.0 kb DNA 具有互补 *hrp* 基因突变体功能的片段。

pHRB6 的亚克隆 pHRS 3.3、pHRS 2.7、pSK 1.1、pSK 2.2 分别与来自 JXOIII、PXO99^A、RS105 的 *hrp*⁻ 突变体进行功能互补。相应接合子注射烟草发现，只有 pHRS 3.3 能恢复所有被测 *hrp*⁻ 突变体激发 HR 的能力 (表 3，图 2) 并且使 JCM2482 和 M1005 的致病性有所恢复 (图 2、4)。这说明 pHRS 3.3 中的 3.3 kb 片段为功能片段。将 pUHRX245 及其亚克隆分别转化 DH5 α ，培养至 OD₆₀₀ = 2.0，接种烟草，未见 HR 反应 (表 3)，说明重组粘粒中要么未携带编码 harpin 蛋白的基因，要么该基因不能够表达。

2.3 水稻白叶枯病菌 *hrpXoo* 基因位点和与 *hsp90_{Xo}* 基因同源的 ORF1 和 ORF2 位点

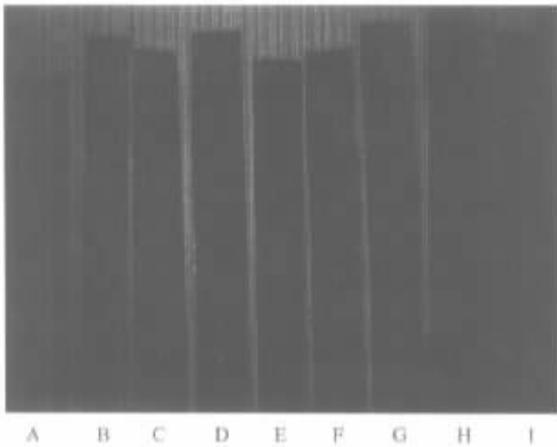
对来自 pUHRX245 的 3.3 kb *Sac*I 片段进行序列测定和同列物比较，结果显示，3.3 kb *Sac*I 片段含有 *hrpXoo* 基因 (1-1566) 和与热激蛋白 (heat shock

表 3 pUHRX245 所携 36.8 kb *hrp* 基因片段的亚克隆对来自 PX099^A 和 RS105 *hrp*⁻ 突变体致病性和 HR 能力的恢复作用¹⁾
 Table 3 HR and Pathogenicity restoration to *hrp*⁻ mutants of PX099^A and RS105 by a 36.8 kb *hrp* fragment harboured in pUHRX245 and its subclones

克隆 Clones	RS105 的 <i>hrp</i> ⁻ 突变体 <i>hrp</i> ⁻ mutants of RS105			PX099 ^A 的 <i>hrp</i> ⁻ 突变体 <i>hrp</i> ⁻ mutants of PX099 ^A						DH5 α
	M51	M55	M1005	M1	M4	M20	M27	M37	M39	
pUHRX245	+	+	+(4.07)	+	+	+	+	+	+	-
pHRE3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pHRE3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pHRE13.5	+	+	+(2.42)	+	+	+	+	+	+	-
pHRE17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pHRB7.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pHRB6	+	+	+(0.57)	+	+	+	+	+	+	-
pHRB5.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pHRB2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pHRS3.3	+	+	+(0.42)	+	+	+	+	+	+	-
pHRS2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pUFR034	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1) + 示接合子在烟草上激发 HR, - 示无 HR 或致病性, 括弧中数字示病斑长度

The symbols " + " or " - " indicate that the HR was or was not induced on tobacco; the extent of pathogenicity is given as length of the lesion (cm) in parentheses



A. M1005; B. M1005/pUHRX245; C. M1005/pHRE13.5; D. M1005/pHRB6; E. M1005/pHRS3.3; F. M1005/pHRB7.5; G. M1005/pUFR034; H. RS105; I. CK

图 2 来自 JXOIII 36.8 kb 片段的亚克隆对 *Xooc hrp*⁻ 突变体 M1005 的致病性恢复作用

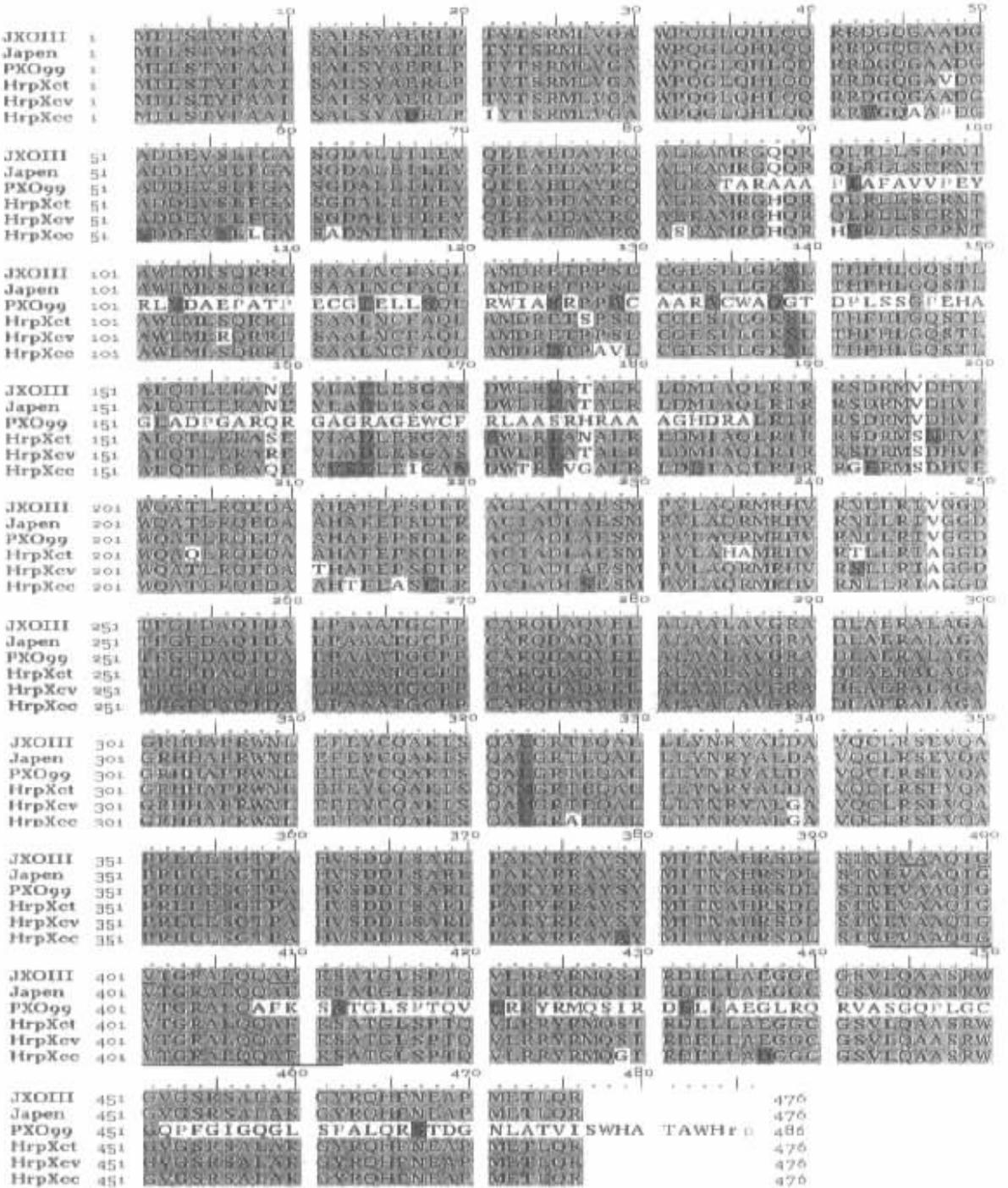
Fig. 2 Pathogenicity restored to the *hrp*⁻ mutant M1005 of *X. oryzae* pv. *oryzicola* by the subclones of pUHRX245 from *X. o.* pv. *oryzae*

protein) 90 家族有关的 ORF1(1654 ~ 1890) 和 ORF2(2356 ~ 2931)(图 1), 并发现 *hrpXoo* 和 *hspORFs* 与来自 PX099^A 的 *hrpXo* 和 *hsp90Xo* 基因(AF022885) 的同一性达 99%, *hrpXoo*(图 3) 与其它黄单胞菌中的相关序列的同一性达 90% 以上(资

料未显示)

蛋白质水平上比较发现, *HrpXoo* 与来自 *Xoo* 的另 2 个已登录的 *HrpX* 蛋白和来自 *X. campestris* 的 3 个 *HrpX* 基本相同, 差异主要表现在 88、139、159、164、175、177、196、247 和 323 位点的氨基酸变化上, 其中 88、196 和 247 位点的氨基酸变化可能代表着 *X. oryzae* 和 *X. campestris* 这 2 个种间在此蛋白功能上的差异, 175 位点的氨基酸变化可能反映着系统性维管束病原菌和局部斑点病原菌间的差异。非常有趣的是, 来自 PX099 的 *HrpX* 在上游区与来自 JXOIII 的 *HrpX* 和来自日本的 *HrpX* 有较大差别, 而来自 PX099 的 *HrpX* 在 α -螺旋-转- α -螺旋结构的下游与来自 JXOIII 和来自日本的 *HrpX* 有较大差别(图 3)。

3.3 kb *SacI* 片段中的 1.1 kb *SacI-KpnI* 片段, 含部分 *hrpXoo* 基因序列(1 ~ 1124), 无与 α -螺旋-转- α -螺旋结构有关的序列, 但能功能互补 JXOIII 的 *hrp*⁻ 突变体 JCM2482, 使其在水稻上具致病性和在烟草上激发产生 HR(图 4)。来自 3.3 kb *SacI* 片段中的 2.2 kb *SacI-KpnI* 片段, 含编码与 α -螺旋-转- α -螺旋有关的序列以及与 Hsp90 蛋白有关的 HspORF1 和 HspORF2, 不能互补来自 PX099^A 或 RS105 的 *hrp*⁻ 突变体, 使其在烟草上激发 HR。编码 α -螺旋-转- α -螺旋结构的 60-bp 的核苷酸序列, 在黄单胞菌中广泛保守(图 4)。

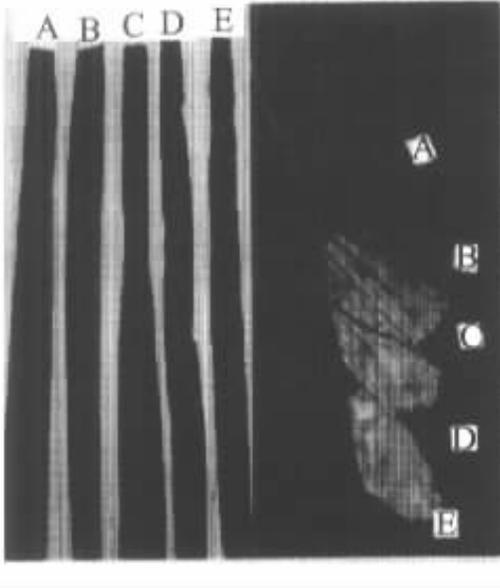


阴影中的氨基酸示在黄单胞菌中相同,下划线处的氨基酸示 α -螺旋-转- α -螺旋结构并在黄单胞菌中高度保守。JXOIII 示 HrpXoo 来自 *X. o. pv. oryzae* JXOIII 菌株, PXO99 示来自 PXO99 菌株 (L07046), Japan 示来自日本所测定的 *Xoo* 菌株 (AB026433), HrpXct 来自 *X. citri* (AF063488), HrpXcc 来自 *X. c. pv. campestris* (X79156), HrpXcv 来自 *X. c. pv. vesicatoria* (U45888)

The HrpXoo protein sequence is deduced from the sequence of the *hrpXoo* gene of *Xoo* JXOIII. It is aligned with the HrpX from PXO99 strain (L07046), HrpX from a strain of *Xoo* in Japan (AB026433), HrpXct from *X. citri* (AF063488), HrpXcc from *X. c. pv. campestris* (X79156), and HrpXv from *X. c. pv. vesicatoria* (U45888). The identical amino acids in six HrpX proteins are shaded. The alpha-helix-turn-alpha-helix structure highly conserved in xanthomonads is underlined

图 3 HrpXoo 蛋白质序列与其它已知 HrpX 蛋白质序列的比较

Fig. 3 Comparison of HrpXoo with reported HrpX proteins of xanthomonads



A. JCM2482; B. JCM2482/pUFR034; C. JXOIII; D. JCM2482/pHRS3.3; E. JCM2482/pSK1.1

图 4 3.3 kb *SacI* 片段的亚克隆对 JCM2482 致病性和 HR 功能的恢复作用

Fig. 4 Pathogenicity and HR restoration to JCM2482 by sub-clones of 3.3 kb *SacI* fragment

另一种类型的基因,与热激蛋白 90 家族(heat shock protein 90 family, Hsp90)有关,可能的开放阅读框架(ORF)有 2 个,即 *hspORF1*(1654-1890)和 *hspORF2*(2356-2931)(图 1)。 *hspORF1* 推测的蛋白质序列在数据库中无同源物, *hspORF2* 推测的氨基酸序列与 Hsp90_{Xo} 相同(资料未显示)。

3 结论与讨论

获得目的基因的策略可以根据已知基因同源探针法钓取,也可以从突变体入手,经基因文库互补后获取。本研究利用 DES 诱变 PXO99^A 菌株获得 6 株 *hrp*⁻ 突变体。根据表型和超声波破碎菌体检测激发 HR 活性物质,6 株 *hrp*⁻ 突变体可分为 2 类:(1)HR⁻/Pth⁻/III⁻类 *hrp*⁻ 突变体的菌体中仍有 harpin 类蛋白,但不能泌出胞外;(2)HR⁻/Pth⁻/harpin⁻类 *hrp*⁻ 突变体,失去在非寄主烟草上激发 HR 和在感病寄主水稻上的致病性,并且不产生 harpin。黄单胞菌已有的研究结果并未发现此类现象。

来自 JXOIII 基因文库的 *hrp* 重组粘粒 pUHRX245 携 36.8 kb *hrp* 基因片段。系列亚克隆和功能互补结果显示,3.3 kb *SacI* DNA 为最小酶

切功能片段。非常有趣的是,3.3 kb DNA 片段不仅能功能互补来自 JXOIII、PXO99^A 和 RS105 菌株的 *hrp*⁻ 突变体,使其在非寄主植物烟草上产生过敏反应,而且可恢复 JXOIII 的 *hrp*⁻ 突变体 JCM2482 和 *Xooc hrp*⁻ 突变体 M1005 的致病性,分别表现为白叶枯病和条斑病症状。这表明, *hrpXooc* 基因可以决定水稻黄单胞菌在寄主上的致病性和在非寄主植物上的 HR,但决定病害症状的基因可能是不同的。陈功友等已对此进行了分析^[1,8]。

序列测定分析显示,3.3 kb *SacI* 片段含 1 个 *hrpXooc* 基因和 2 个与热激蛋白 90 家族有关的开放阅读框, *hspORF1* 和 *hspORF2*。目前还不清楚与热激蛋白家族有关的基因在水稻白叶枯病菌致病性或激发非寄主产生 HR 中的作用,或其它生物学功能。已有研究表明, *E. coli* 自身在应答外界热激时才使热激蛋白大量表达^[4]。除去 *hrpXooc* 基因中与 α -螺旋-转- α -螺旋结构有关的核苷酸部分,1.1 kb *SacI*-*KpnI* 片段仍能使来自 JXOIII 的 *hrp*⁻ 突变体 JCM2482 恢复致病性和 HR 能力,但不能恢复来自 PXO99^A 和 RS105 的 *hrp*⁻ 突变体的 HR 激发能力。这表明,起作用的是 *hrpX* 基因。笔者用来自 *Xooc* 的 *hrpXooc* 基因可互补本试验的 *hrp*⁻ 突变体,也说明了这一点(另文待发)。Kado 等人也曾发现 *hrpXo* 和 *hrpXc* 间的交叉互补功能^[7]。蛋白质水平上比较发现, α -螺旋-转- α -螺旋结构在 5 种黄单胞菌的 HrpX 中高度保守。本研究认为, α -螺旋-转- α -螺旋结构是 HrpX 在交叉功能互补时必需的。据推测,第 2 个 α -螺旋可使 HrpX 结合到 *hrp* 基因簇 DNA 上,而第 1 个 α -螺旋可使这一结合更为牢固^[11,12]。

黄单胞菌中 5 种 HrpX 的部分差异显示出一定的规律性,这在以前的研究结果中并未发现。HrpX 在 88 位点(Q-H)、196 位点(V-S)和 247 位点(V-A)的氨基酸变化,可能代表着 *X. oryzae* 和 *X. campestris* 种间 *hrpX* 基因功能的差异,175 位点(V-I)的变化可能代表着维管束病原细菌和斑点病原细菌间的差异,而其它位点氨基酸的变化,可能代表着黄单胞菌间的区别或进化上的某种联系。现有证据表明,来自 *X. c. pv. vesicatoria* 的 HrpX_{cv} 主要调节 *hrp* 基因簇 6 个操纵元中的 5 个(*hrpB*-*hrpF*)转录表达,来自 *R. solanacearum* 的 *hrpB* (*hrpX* 的同源物)除调节活化其它 *hrp* 基因外,还在病程中起作用^[5]。因此, *HrpX* 在这些位点上的氨基酸变化对于揭示其在调节保守的 *hrp* 基因簇的

差异以及在黄单胞菌所致不同病害的病程中起的作用,都具有重要意义。

hrp 基因簇约 25 kb^[1]。黄单胞菌中 *hrp* 基因研究比较清楚的是辣椒斑点病菌(*Xcv*),其 *hrp* 基因簇位于染色体上,在 *hrp* 簇以外的染色体区域还有 *hrp* 调节基因 *hrpG* 和 *hrpX*^[11,12]。无 *hrp* 基因簇的非病原细菌无 TTSS^[1,13]。将植物病原细菌 *hrp* 基因簇转入非病原细菌中,可赋予其激发 HR 的能力,如来自 *P. s. pv. syringae* 的 pHIR11 和来自 *E. amylovora* 的 pCCP430 均能使 *E. coli* 在烟草上激发 HR^[13]。这种表型也用作判断 *hrp* 基因簇的基本大小。目前在黄单胞菌中还未发现这种现象。本研究将携有 36.8 kb 的 *hrp* 基因片段和其它亚克隆片段导入 *E. coli* DH5 α 后,未发现它们有激发 HR 的能力。这说明,植物病原黄单胞细菌的 *hrp* 基因簇可能与 *hrp* 调控基因 *hrpG* 和 *hrpX* 共同作用时,才有可能使非病原菌激发 HR。或者 36.8 kb 的 *hrp* 片段(pUHRX245)不含 *hrp* 基因簇,或者仅含 *hrp* 调节基因。

References

- [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,2002,32(1):1-7.
Chen G Y, Wang J S. Pathogenicity determinant of plant pathogenic bacteria. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2002, 32(1):1-7.(in Chinese)
- [2] Rossier O, Wengelnik K, Hahn K, Bonas U. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 368-373.
- [3] De Feyter R, Kado C I, Gabriel D W. Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. *Gene*, 1990, 88: 65-72.
- [4] 王金生. 分子植物病理学. 北京:中国农业出版社,1999.
Wang J S. *Molecular Plant Pathology*. Beijing: China Agriculture Press, 1999. (in Chinese)
- [5] Vasse J, Genin S, Frey P, Boucher C, Brito B. The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required

for different stages of the tomato root infection process. *MPMI*, 2000, 13: 259-267.

- [6] 陈功友,潘小玫,王金生.水稻白叶枯病菌化学诱变 *hrp*⁻ 突变体及其相关性状研究.植物病理学报,2001,31(3):117-207.
Chen G Y, Pan X M, Wang J S. Pathological and biochemical characteristics of *hrp*⁻ mutants produced by chemical mutagenesis form *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. 2001, 31(3):117-207.(in Chinese)
- [7] Kamder H V, Kamoun S, Kado C I. Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathovars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of *HrpX* function by sequence analysis. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175: 2 017-2 025.
- [8] 陈功友,张信娣,张学民,王金生.水稻细条斑病菌化学诱变 *hrp*⁻ 突变体及其功能互补子相关性状研究.农业生物技术学报,2000,8:117-122.
Chen G Y, Zhang X D, Zhang X M, Wang J S. Chemical mutagenesis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and *hrp*⁻ mutants restored to the wild phenotype by gene library complementation. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 2000, 8(2):117-122. (in Chinese)
- [9] Altschul S F, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215: 403-410.
- [10] Simon R, Prefer U, Puhler A. A broad host range mobilization system for genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology*, 1983, 1: 784-791.
- [11] Wengelnik K, Vak Der Ackerveken G, Bonus U. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1996, 9: 704-712.
- [12] Wengelnik K, Bonus U. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of six loci in the *hrp* cluster *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178: 3 462-3 469.
- [13] He S Y. Type III protein secretion system in plant and animal pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 1998, 36: 363-392.

(责任编辑 王红艳)