

水稻条斑病细菌 *hrp* 基因诱导表达系统的建立

肖友伦, 李玉蓉, 刘之洋, 向 勇, 陈功友*

(南京农业大学植保学院 农业部病虫害监测与治理实验室 南京 210095)

摘 要 水稻条斑病细菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xooc*) 决定在非寄主植物上激发过敏反应(hypersensitive response)和在寄主水稻上具致病性(pathogenicity)的 *hrp* 基因簇是诱导表达的。为研究 *hrp* 基因的功能,利用 *hpa1* 和 *hrpX* 基因的启动子与 *gfp* 基因进行融合,构建了 *hrp* 基因诱导表达系统。绿色荧光蛋白表达揭示,*Xooc* 的 *hrp* 基因在营养丰富的 NB 培养基上不能有效表达,在 *hrp* 诱导培养基 XOM3 上可有效表达。以 *hrpX* 和 *hrpG* 突变体为参照,RT-PCR 研究结果提示,*Xooc* 野生型菌株 *hpa1* 基因在 NB 上不能有效表达,在 XOM3 培养基上可有效表达。相应地,*hrpX* 突变体中 *hpa1* 基因不能被诱导表达,而在 *hrpG* 突变体中 *hpa1* 基因转录表达水平低于野生菌。研究结果还证实,水稻悬浮细胞能高效诱导 *Xooc* 的 *hrp* 基因表达。*Xooc* *hrp* 基因诱导表达系统的建立为研究 *hrp* 基因功能、发掘 T3SS 效应分子以及开展 *Xooc* 致病性研究奠定了基础。

关键词: 水稻条斑病细菌; *hrp* 基因; *hrp* 诱导培养基; 水稻; RT-PCR

中图分类号: Q786.093 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)03-0396-06

水稻细菌性条斑病(*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^[1,2]。*Xooc* 是水稻黄单胞菌种下的致病变种,如同其它革兰氏阴性植物病原细菌一样,*Xooc* 也拥有 *hrp* (hypersensitive response on nonhost plants and pathogenicity on host plants) 基因簇^[3]。植物病原细菌 *hrp* 基因簇的功能之一是编码 III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS) 将致病性效应分子(T3SS effector) 转运至寄主植物细胞中,从而引发病害^[4-6]。*Xooc* *hrp* 基因簇序列已经全部测定^[3],*Xooc* 的 *hrp* 调控基因 *hrpG* 和 *hrpX* 以基因簇形式独立于 *hrp* 基因簇外^[3,7]。根据其它植物病原黄单胞菌的研究结果推测,*Xooc* 的 *hrpG* 和 *hrpX* 基因对 *Xooc* 的 *hrp* 基因也具有调控作用,但未见文献报道。*HrpX* 属 AraC 家族成员,对启动子区具有 PIP-box(TTCGC-N15-TTCGC) 的 *hrp* 基因具有调控作用^[8-10]。*hpa1* 基因位于 *hrp* 基因簇左端,它是编码 harpin 蛋白的基因,在其启动子中含有 PIP-box,可能受 *HrpX* 蛋白的调控,但没有直接证据^[3,11,12]。

植物病原细菌 *hrp* 基因是诱导表达的^[13-16]。在营养丰富的培养基上 *hrp* 基因表达受到抑制,只有与植物互作、或在营养贫乏的无机培养基上,植物病原细菌的 *hrp* 基因才会被诱导表达^[13-18]。1996 年, Wengeling 等^[18] 获得了辣椒斑点病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*) 的 *hrp* 诱导培养基 XVM2,但它并不适合诱导 *Xooc* 的 *hrp* 基

因表达(资料未发表)。Marenda 等^[15] 报道茄青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*) 与拟南芥或烟草悬浮细胞互作时,*hrp* 基因极显著的被诱导表达。本文以 *gfp*(green fluorescence protein) 为报道基因,通过与 *hpa1* 和 *hrpX* 基因的启动子融合,以 *hrp* 诱导培养基 XOM3^[3] 或水稻悬浮细胞和水稻愈伤细胞为基质,建立了 *Xooc* 的 *hrp* 基因诱导表达系统。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 供试菌株和质粒参见表 1。

1.1.2 培养基、抗生素及培养条件: 黄单胞菌于 NA 固体和 NB 液体培养基中^[23] 28℃ 培养;大肠杆菌(*Escherichia coli*) 于 LB 培养基^[24] 中 37℃ 条件下培养。水稻愈伤组织和悬浮细胞培养采用 N6 培养基。N6 培养基中含 3% 蔗糖、5mg/L 的 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-二氯苯氧乙酸),1mg/L 的 KT(6-Furifuryl-Aminopurine, 激动素),继代和培养条件见文献^[25]。诱导培养基 XOM3 在 XVM2^[10] 基础上进行改良,基本成分见文献^[3]。抗生素浓度: 壮观霉素(Sp) 25μg/mL;卡那霉素(Km) 培养 *E. coli* 用 20μg/mL,筛选接合子时用 10~12μg/mL;硫酸链霉素(Sm) 100μg/mL。

1.1.3 试剂和仪器: *Xooc* 各供试菌株基因组 DNA 提取试剂盒购于 V-gene 公司。总 RNA 的提取试剂盒购于 Roche 公司。反转录试剂购自 Promega 公司。

基金项目: 国家 863 计划(2006AA10A210); 国家自然科学基金项目(30370926); 教育部重点项目(106093)

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

作者简介: 肖友伦(1981-),男,湖南武冈人,硕士研究生,主要从事分子植物病理学研究。

收稿日期: 2006-09-27; 接受日期: 2006-11-10; 修回日期: 2007-04-04

表1 本研究所用的供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Properties	Sources
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 deoR recA1 hsdR17</i> (<i>r_K-m_K+</i>) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-l gyrA96 relA1</i>	This lab
S17-1	294 <i>recA</i> , chromosomally integrated RP4 derivative T _p ^r , Sp ^r	Simor ^[19] , et al.
<i>Xanthomonas oryzae</i> .pv. <i>oryzicola</i>		
RS105	Rif ^r , wild type	This lab
RX	Rif ^r , Km ^r , <i>hrpX</i> mutant, no HR in tobacco and no pathogenicity in rice.	This study
RG	Rif ^r , Km ^r , <i>hrpG</i> mutant no HR in tobacco and no pathogenicity in rice.	This study
RS105/pXG	Transconjugant of RS105 with pXG	This study
RS105/pAG	Transconjugant of RS105 with pAG	This study
RX/pAGM1	Transconjugant of RX with pAGM1	This study
Plasmid		
pAD123	Ap ^r , <i>LacZa</i> ⁺	Dr. Anne K. Dunne
pMD18-T	Ap ^r , <i>LacZa</i> ⁺	TaKaRa
pHMI	Sp ^r or Sm ^r <i>IncW</i> , <i>Mob</i> (<i>p</i>), <i>Mob</i> ⁺ , <i>LacIP</i> ⁺ , PK2 replicon, cosmid	R. Innes ^[20]
pUFR034	Km ^r , <i>IncW</i> , <i>Mob</i> (<i>p</i>), <i>Mob</i> ⁺ , <i>LacZa</i> ⁺ , PK2 replicon, cosmid	De Feyter ^[21] et al.
pKmob18	Km ^r , <i>Mob</i> (<i>p</i>), <i>Mob</i> ⁺ , <i>LacZ</i> , Sp ^r , <i>audi</i>	Federico ^[22] et al.
pUC18::gfp	717 bp <i>gfp</i> ORF ligated in pUC18	This lab
pAGM1	250 bp promoter region fused with <i>gfp</i> ORF in pHMI	This study
pXG	234 bp promoter region fused with <i>gfp</i> ORF in pUFR034	This study
pAG	250 bp promoter region fused with <i>gfp</i> ORF in pUFR034	This study

连接用 pMD18-T 载体、连接酶和限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。Evans blue, poly-L-Lysine 购自 Sigma 公司。荧光显微镜(Leica, DMRA Microscope)购于 Leica 公司;冷冻离心机购于 Beckman 公司;2,4-D,KT 购于南京博全生化试剂公司。试验用引物合成和序列测定均由 TaKaRa 公司完成。

1.2 *hrp*::gfp 融合基因的构建

Xooc 菌株 RS105 基因组 DNA 提取参照 V-gene 公司操作手册。从 *Xooc* 的 RS105 菌株基因组 DNA 中 PCR 扩增获得 *hrpX* 和 *hpa1* 启动子,连接到 pMD18-T 载体上, *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切并回收。

以 pAD123 为模板,PCR 扩增得到 *gfp* 完整编码区(717bp)并连接到 pUC18 载体上。荧光检测转化子证实 *gfp* 能正常表达,提取质粒并 *Pst* I 和 *Kpn* I 双酶切回收 *gfp* 基因。pUFR034 载体经 *EcoR* I -*Kpn* I 双酶切后回收。将回收的 *hrpX* 和 *hpa1* 启动子分别与回收的 *gfp* 连接于 pUFR034 上(图 1)转化 DH5 α , 提取质粒,经酶切验证正确后用于后续研究。PCR 扩增的 *hrpX* 和 *hpa1* 启动子以及 *gfp* 均经测序验证。上述质粒 DNA 和外源 DNA 的提取、回收、限制性酶切、连接、电泳、转化等操作均参照 Maniatis^[26]的方法进行。所用引物及 PCR 扩增参数列于表 2。

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Primers sequenc(5'→3')	Annealing temperature/°C	Time for extension (second)	Size of PCR products/bp	Accession number in GenBank
<i>hrpX</i> -PF1	CGAATTCGATATCCGGCCGGATGG	59	30	234	
<i>hrpX</i> -PR1	ATCTGCAGGCCGGTCTCTCTCTTG				
<i>hpa1</i> -PF1	GAATTCGATCCACTTAACGGGCAAGC	58	30	250	AY205561
<i>hpa1</i> -PR1	CTGCAGCGTGACGATTCCTCTCTGAT				
<i>gfp</i> -F1	TACTGCAGATGAGTAAAGGAGAAG	56	45	717	Dr. Anne K. Dunne
<i>gfp</i> -R1	GCGGTACCTTATTGTATAGTICA				
<i>hpa1</i> -F	TTGAACACACAATTCGGCCG	56	40	414	AY205561
<i>hpa1</i> -R	TTACTGCATCGATGCGCTGTC				

1.3 两亲交配

两亲交配参照文献[8]进行。将连接 *hrpX*::gfp 和 *hpa1*::gfp 融合基因的重组载体 pXG 和 pAG 分

别导入 RS105 及其相应的 *hrpX* 突变体中。为确保 *gfp* 表达受 *hrpX* 和 *hpa1* 启动子启动,将带有 *hrpX*::gfp 和 *hpa1*::gfp 融合基因的载体 pXG 和 pAG 分别

导入 S17-1 中后 荧光检测转化子 *gfp* 表达情况。

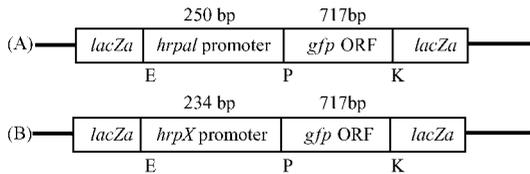


图 1 *hpa1::gfp* 与 *hrpX::gfp* 融合基因构建示意图

Fig.1 Schematic constructs of *hpa1::gfp* (A) and *hrpX::gfp* (B) fusion genes. The 250bp or 234bp promoter region of the *hpa1* or *hrpX* genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* were fused with the open reading frame for the green fluorescence protein (*gfp*) into vector pUFR034, respectively. The consensus motif called the plant-inducibile promoter(PIP) box (TTCGC-N15-TTCGC) is found in the promoter region of the *hpa1* gene. E. *EcoRI*; P. *PstI*; K. *KpnI*.

1.4 水稻条斑病菌和水稻愈伤组织、水稻悬浮细胞共培养

水稻悬浮细胞用 N6 液体培养基于 28℃、120r/min 摇床上振荡培养。取 1 周龄的悬浮细胞、 OD_{600} 值约为 1.0 的 100 μ L *Xooc* 各供试菌株的菌液组成互作体系,同时在其中加 Km 至终浓度为 10 μ g/mL。菌液按如下方法准备:供试菌株在 NB 培养液中培养 16h,离心收集菌体(5000r/min, 10min),用无菌水洗两次后定容至菌液 OD_{600} 值为 1.0。供试菌株与悬浮细胞共培养 16h 后,荧光检测 *Xooc* 各菌株中 *gfp* 是否转录表达。

精心挑选浅黄色生长旺盛的水稻愈伤组织,直接在愈伤表面滴加 20 μ L 上述菌液,28℃ 下互作 16h 后检测荧光表达情况。

1.5 RT-PCR 检测

Xooc 各菌株在 XOM3 上培养 16h 后提取总 RNA,总 RNA 的提取按照 Roche 公司 Tripure 操作手册进行。提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测质量,分光光度计下定量,然后反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板扩增。所用引物 *hpa1-F*、*hpa1-R* 及 PCR 扩增各参数列于表 2。

1.6 *hrp::gfp* 融合基因表达检测

在水稻悬浮细胞和愈伤组织-*Xooc* 互作体系中加入 Evans blue 至终浓度 0.001%,染色 1h 后观察。为防止组织掉片,载玻片和盖玻片在使用前经 poly-L-Lysin(Sigma)浸洗。荧光显微镜下观测时,选择激发光波长为 480nm 左右。荧光图像拍照时选用相同的参数。

2 结果和分析

2.1 XOM3 能有效诱导 *Xooc* 的 *hrp* 基因表达

辣椒斑点病菌 *hrp* 诱导培养基 XVM2 不能有效诱导 *Xooc* 的 *hrp* 基因表达(资料未显示),本研究对其进行了改良。由于 EDTA-Fe³⁺ 较难溶于水,且

Fe³⁺ 具强氧化性,本研究用 EDTA-Fe²⁺ Na 盐替代。因水稻细胞壁中木聚糖为主要的多糖^[29,30],故以木糖(D-(+)-xylose)作为唯一的碳源,所获得的培养基命名为 XOM3^[31]。将野生型菌株 RS105 及相应 *hrpX* 和 *hrpG* 突变体在 XOM3 培养基中培养 16h,提取总 RNA。RT-PCR 结果显示,野生型菌株 RS105 的 *hpa1* 基因在 XOM3 中被诱导表达,*hrpX* 突变体中 *hpa1* 基因不能被诱导表达,而在 *hrpG* 突变体中 *hpa1* 基因转录表达水平低于野生菌(图 2)。这表明,*HrpX* 调控 *hpa1* 基因表达。

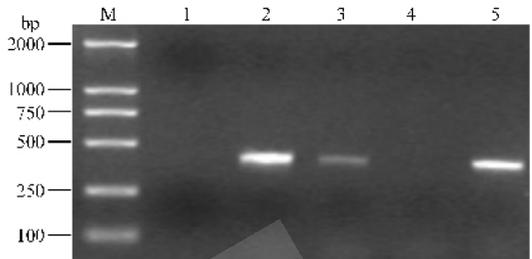


图 2 RT-PCR 检测 *hrp* 诱导培养基 XOM3 对水稻条斑病菌 *hpa1* 基因转录表达的影响

Fig.2 Effects of the *hrp* inducing medium XOM3 on expression of the *hpa1* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* tested by reverse-transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR). M. Marker DL2000; 1. Negative control; 2. RS105; 3. *hrpG* mutant; 4. *hrpX* mutant; 5. The genomic DNA of the strain RS105 was used as the positive control.

本研究构建了 *hrpX* 和 *hpa1* 启动子与 *gfp* 的融合基因(图 1)并分别导入 RS105、*hrpG* 和 *hrpX* 突变体中,在 XOM3 中培养 16h。荧光检测发现,RS105/pXG(图 3-A3) \ RS105/pAG(图 3-A4)能被有效诱导表达,而 NB 中培养的相应菌株,RS105/pXG 和 RS105/pAG,其 *gfp* 表达水平较低(图 3-A1, A2),含 *hrp::gfp* 的 *hrpX* 和 *hrpG* 突变体无论在 NA 或 XOM3 培养基上均不能使 *gfp* 基因有效表达(资料未显示)。这表明,XOM3 能有效诱导 *hrp* 基因表达。

2.2 水稻信号分子强烈诱导 *hrp* 基因表达

将 RS105/pXG 菌株与水稻愈伤组织、水稻悬浮细胞共培养 16h 后荧光检测结果表明,RS105/pXG 菌株附着于水稻愈伤细胞上能发出较强的荧光,而周围未附着的细菌发荧光很弱(图 3-C3);与水稻悬浮细胞互作 16h,附着于水稻细胞壁上的细菌发出强烈荧光,而在生长活力弱的水稻细胞上,附着的菌体最多,显微镜下能观察到耀眼的荧光(图 3-B3),而在水稻悬浮细胞培养液中菌体发荧光相对较弱,但仍较 NB 中培养的菌体强。

本研究还构建了 *hpa1::gfp* 的融合基因,并导入 RS105 菌株中。通过荧光观察与水稻细胞互作的菌体,发现了上述同样的结果,与水稻细胞紧密接触的菌体 *gfp* 被强烈的诱导而表达(图 3-C4 和图 3-

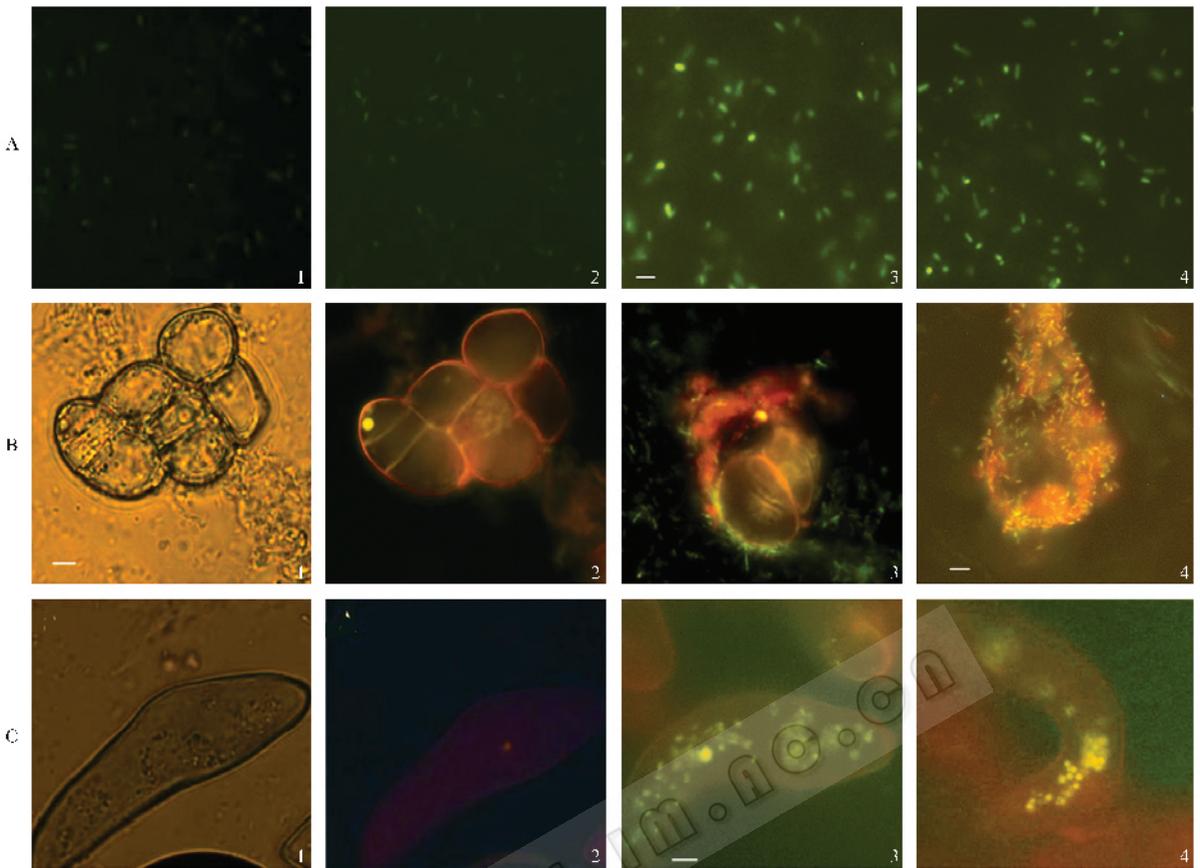


图3 *hrp::gfp* 融合基因在 NB、XOM3 中和与水稻细胞互动后的表达情况

Fig.3 Induction of the *hrp::gfp* fusion gene expression in NB (A1-2), in XOM3 (A3-4) medium or in response to rice cells (B and C). A: The level of the *gfp* gene expression was observed by fluorescence microscopy (40 \times) after transformants of RS105 with *hrp::gfp* genes were incubated in NB or XOM3 medium for 16h, respectively. A1. RS105/pAG in NB medium; A2. RS105/pXG in NB medium; A3. RS105/pXG in XOM3 medium; A4. RS105/pAG in XOM3 medium. B: Induction of the *hrp* gene expression in response to rice suspension cells. Interaction of *Xooc* with rice suspension cells was observed by fluorescence microscopy (40 \times) after 16h for co-cultivation. B1 and B2. Co-cultivation of RX/pAGMI with rice suspension cells. Images were acquired by light microscopy (B1) or fluorescence microscopy (B2). B3. Co-cultivation of RS105/pXG with rice suspension cells. B4. Co-cultivation of RS105/pAG with rice suspension cells. C: Induction of *hrp* gene expression in response to rice callus. Interaction of *Xooc* and rice callus was observed by fluorescence microscopy (40 \times) after 16h for co-cultivation (C1 and C2). Co-cultivation of RX/pAGMI with rice callus. Images were acquired by light microscopy (C1) or fluorescence microscopy (C2). C3. Co-cultivation of RS105/pXG with rice callus. C4. Co-cultivation of RS105/pAG with rice callus.

B4)。这表明,在水稻细胞中存在 *hrp* 基因诱导因子,它能强烈地诱导 *hrp* 基因表达,而这种因子可能只有当细菌附着在水稻细胞上才最有效地发挥诱导作用。

2.3 HrpX 调控 *hpa1* 基因的表达

相关研究结果证实,II 组植物病原细菌中受 HrpX 蛋白调控的 *hrp* 基因在其启动子中均存在 PIP-box。若 *hrpX* 基因突变,则 *hrp* 基因不能被诱导表达^[10,31]。水稻条斑病菌 *hpa1* 基因启动子区也含有 PIP-box。为证实 *hpa1* 受 *hrpX* 的调节,将 RS105 的 *hrpX* 突变体在 XOM3 中培养 16h,提取总 RNA,RT-PCR 结果表明,*hpa1* 不再转录表达(图 2),而野生型 RS105 *hpa1* 基因能正常转录表达。将携带 *hpa1::gfp* 融合基因的 pUFR034 导入 *hrpX* 突变体

中,与水稻愈伤组织(图 3-C1, C2)、水稻悬浮细胞互作(图 3-B1, B2),荧光显微镜下观测不到发荧光的菌体,即使是附着于水稻细胞上的菌体也未观察到荧光,而荧光检测与水稻细胞互作的 RS105/pAG,发现附着于水稻细胞上的菌体发出强烈荧光。这些结果表明,*hrpX* 基因突变,*hpa1* 基因不能被诱导转录表达,提示 *hpa1* 基因的诱导表达受 HrpX 调控。

3 结论

相关研究结果表明,植物病原黄单胞菌 *hrpG* 基因突变,*hrpX* 和 *hrpA* 基因组成型表达^[29]。若 *hrpX* 基因突变,则 *hrp* 基因簇中的 *hrpB-hrpF* 转录单元不能表达,从而失去在非寄主上激发 HR 反应及在寄主上产生致病性的能力^[10]。HrpX 蛋白还调

控启动子区域中含有 PIP-box 的 T3SS 效应分子的表达^[30]。在 *Xooc* 的 *hrp* 基因簇中 Zou 等^[31]发现, *hpa1* 和 *hpa2* 启动子中具有 PIP-box。本研究根据这一特性将 *Xooc* 的 *hrpX* 和 *hpa1* 基因启动子与绿色荧光蛋白基因 *gfp* 构建为融合基因。通过荧光显微镜检测发现, 营养丰富的 NA 培养基不能有效诱导 *gfp* 表达, 而 XOM3 能有效诱导 *gfp* 表达。这表明 XOM3 是 *Xooc* 的 *hrp* 诱导培养基。*Xooc* 的 *hrp* 诱导培养基 XOM3 的发掘为进一步明确 *Xooc* 的 *hrp* 调控网络和发掘 T3SS 致病性效应分子奠定了基础。

本研究以 *hrp::gfp* 为融合形式, 以 *hrpX* 和 *hrpG* 突变体为参照, 在水稻悬浮细胞和愈伤组织水平上, 荧光检测发现, *hrpX::gfp* 和 *hpa1::gfp* 融合基因均被显著地诱导表达。这与 Aldon 等^[31]研究 *R. solanacearum* 的 *hrp* 基因表达结果是一致的。韦忠明等^[32]认为植物信号对 *Erwinia amylovora* 的 *hrp* 基因诱导作用与体外条件下 *hrp* 诱导培养基的诱导效果相当。Laurance 等^[33]发现, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 的 *hrp* 基因在植物信号分子作用下被更高水平地诱导表达。Marenda、Aldon 等^[15, 31]报道植物信号分子更强地诱导了 *R. solanacearum* *hrp* 基因的表达。本研究也发现, *Xooc* *hrp* 基因高效诱导表达需要与水稻细胞紧密接触。荧光观测结果进一步显示, 在水稻悬浮细胞周围尤其是附着于细胞壁上的菌体发荧光最强, 而游离于培养液中的菌体发荧光较弱, 推测该信号分子不能由水稻细胞分泌至培养液中, 或者该信号很不稳定, 由水稻细胞中分泌出后分解而丧失诱导 *hrp* 基因表达的功能, 到底哪种推测正确, 还需要进一步的实验证据来证明。Aldon 等^[31]认为, 诱导 *R. solanacearum* 的 *hrp* 基因表达的植物信号可能是植物细胞壁的固有组分, 诱导 *Xooc* *hrp* 基因表达的水稻信号是不是如此, 还有待进一步证实。

Xooc 的 *hrpX* 基因与来自其它黄单胞菌中已报道的 *hrpX* 基因有很高的同源性, 同一性达 83% 以上, 据此推测水稻条斑病菌 *hrpX* 基因是 *hrp* 调节基因^[7]。本研究直接证实水稻条斑病菌 *hpa1* 基因的表达(启动子区含有 PIP-box)受 *hrpX* 的调控。在 *hrpX* 基因突变体中, *hpa1::gfp* 融合基因不表达; RT-PCR 显示, *hrpX* 突变体中的 *hpa1* 基因即使在 *hrp* 诱导培养基中也不表达, Zou 等^[31]通过 immunoblotting 也证实了这一点。基于 *gfp* 基因产物不具有 T3SS 泌出信号, 因而在 XOM3 中、或与水稻悬浮细胞和愈伤组织互作时, 相应的 *Xooc* 菌体呈现荧光, 提示 GFP 蛋白不被分泌出至 XOM3 中或水稻细胞中。这为发掘 *Xooc* 的 T3SS 致病性效应分子提供了研究思路。

参 考 文 献

- [1] Swings J, Van Den Mooter M, Vauterin L, et al. Classification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*X. campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1990, **40**: 309–311.
- [2] 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*, 1957, **3**(2): 99–122.
- [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 a non-host tobacco and pathogenicity in a susceptible host plant rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(9): 6212–6224.
- [4] He SY. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 1998, **36**: 363–392.
- [5] Anderson DM, Schneewind O. Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. *Curr Opin Microbiol*, 1999, **2**(1): 18–24.
- [6] Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 1092–2172.
- [7] 陈功友, 王金生. 水稻条斑病细菌 *hrp* 调节基因 *hrpGXooc* 和 *hrpXooc* 的克隆和序列分析. *植物病理学报*, 2003, **33**(3): 213–219.
- [8] Kamdar HV, Kamoun S, Kado CI. 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 analyses. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 2017–2025.
- [9] Oku T, Alvarez AM, Kado CI. Conservation of the hypersensitivity-pathogenicity regulatory gene *hrpX* of *Xanthomonas campestris* and *X. oryzae*. *DNA Seq*, 1995, **5**: 245–249.
- [10] 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*. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 3462–3469.
- [11] 闻伟刚, 王金生. 水稻白叶枯病菌 *harpin* 基因的克隆与表达. *植物病理学报*, 2001, **31**: 295–300.
- [12] Zhu WG, Magbanua MM, WHITE FF. Identification of Two Novel *hrp*-Associated Genes in the *hrp* Gene Cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 1844–1853.
- [13] Arlat M, Gough C, Barber CE, et al. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1991, **4**: 593–601.
- [14] Huang HC, Hutcheson SW, Collmer A. Characterization of the *hrp* cluster from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 and TnpHoA tagging of genes encoding exported of membrane spanning Hrp proteins. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1991, **4**: 469–476.
- [15] Marenda M, Brito B, Callard D, et al. PhrA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. *Mol Microbiol*, 1998, **27**: 437–453.
- [16] Schulte R, Bonas U. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J*

- [17] Schulte R, Bonas U. A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino acid. *Plant Cell*, 1992, **4**: 79–86.
- [18] Wengelnik K, Marie C, Russel M, et al. Expression and localization of HrpAl, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 1061–1069.
- [19] Simon R, Priefer U, Puhler A. A broad host range mobilization system for genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology*, 1983, **1**: 784–791.
- [20] Innes RW, Hirose MA, Kuempel PL. Induction of nitrogen-fixing nodules on clover requires only 32 kilobase pairs of DNA from the *Rhizobium trifolii* symbiosis plasmid. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 3793–3802.
- [21] De Feyter R, Kado CI, Gabriel DW. Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. *Gene*, 1990, **88**: 65–72.
- [22] Katzen F, Becker A, Ielmini MV, et al. New mobilizable vectors suitable for gene replacement in gram-negative bacterial and their use in mapping of the 3' end of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. *AEM*, 1999, **65**: 278–282.
- [23] 陈功友, 张学民, 张信娣, 等. 水稻细条斑病菌化学诱变及 *hrp* 基因功能互补研究. 农业和生物技术学报 2000 **8**: 117–122.
- [24] Klement Z, Rudolph K, Sands DC. Methods in Phytobacteriology (1st). Akademiai Kiado: Budapest, 1990.
- [25] 朱至清, 王敬驹, 孙敬三, 等. 通过氮源比较实验建立一种较好的水稻花药培养基. 中国科学, 1975 **5**: 484–490.
- [26] Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- [27] Takeuchi Y, Tohbaru M, Sato A. Polysaccharides in primary cell walls of rice cells in suspension culture. *Phytochemistry*, 1994, **35**: 361–363.
- [28] Suvendra KR, Rajeshwari R, Sonti RV. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, **13**: 394–401.
- [29] Wengelnik K, Van den Ackerveken G, Bonas 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.
- [30] Buttner D, Bonas U. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *The EMBO Journal*, 2002, **21**: 5313–5322.
- [31] Aldon D, Brito B, Boucher C, et al. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *The EMBO Journal*, 2000, **19**: 2304–2314.
- [32] Rahme LG, Mindrinos M, Panopoulos NJ. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 3499–3507.
- [33] Wei ZM, Sneath BJ, Beer SV. Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 1875–1882.

Establishment of the *hrp*-inducing systems for the expression of the *hrp* genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

XIAO You-lun, LI Yu-rong, LIU Zhi-yang, XIANG Yong, CHEN Gong-you*

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

Abstract The *hrp* genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xooc*), which is the causal agent of bacterial leaf streak in rice, possesses the ability to elicit hypersensitive response on nonhost plants and the pathogenicity in host rice. In order to analyze the function of the *hrp* genes, we developed *hrp*-inducing systems using transcriptional *hrp*:*gfp* fusions with the promoters of *hrpX* and *hpa1* of *Xooc*. The levels of GFP protein expression indicated that the *hrp* gene expression in *Xooc* was not efficiently induced in NB medium, but efficiently in XOM3 medium. Using the *hrpG* and *hrpX* mutants of *Xooc* as the controls, the results by RT-PCR demonstrated that in wild type strain the expression of the *hpa1* gene was suppressed in NB medium, but was increased in XOM3 medium. When incubated in XOM3, the expression of the *hpa1* gene was abolished in *hrpX* mutant, while the level of the *hpa1* gene expression was lower in the *hrpG* mutant than that in wild-type strain. More importantly, it was found that the induction of the *hrp* gene expression was strongly increased in response to rice suspension cells and callus in this study. This suggests that the *hrp*-inducing systems, XOM3 or rice suspension cells or rice callus, for the induction of the *hrp* genes expression be useful for functionally analyzing the *hrp* genes, mining effectors secreted by the type III secretion apparatus and understanding pathogenicity determinants of *Xooc*.

Keywords: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*; *hrp* genes; *hrp*-inducing medium; rice; RT-PCR