

* 学术论文 *

水稻白叶枯病菌 *hrp* 调节基因 *hrpG* 的鉴定及其变异分析*

叶静晓 张家环 李连德 王金生**

南京农业大学植物保护学院, 农业部病虫害检测与治理重点开放实验室, 南京 210095

摘要 根据水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, Xooc)*hrp* 基因的序列设计引物, 通过 PCR 方法从水稻白叶枯病菌 JXOIII 和 PXO99^A 菌株中扩增得到核苷酸序列完全一致的 *hrpG* 基因. 以该基因为探针与 JXOIII/pUFR034 基因组文库中含有 *hrpX* 克隆 pUHRX245 (36.8 kb) 的 4 个亚克隆进行 southern blot 分子杂交, 确定在亚克隆 pB1 中 1.3 kb 大小的片段和 AE4 (3.0 kb) 片段中存在 *hrpG* 同源序列. 测序结果表明, 在 pB1 中有 586 个碱基序列, 在 AE4 中有 206 个碱基, 共同构成完整的 *hrpG* 基因, 且与已知的 *hrpX* 基因是毗邻的. 以同样方法从水稻白叶枯病菌 PXO99^A 菌株的 *hrp*⁻ 突变体 M16 中扩增得到 *hrpG* 基因对应位置的同源突变序列. 序列分析表明其有意义突变为 541 位的 C→T 的突变, 从而导致亮氨酸变为苯丙氨酸 (Leu→Phe). 将 *hrpG* 基因和突变序列分别导入突变体 M16 中, 转移结合子 M16/*hrpG*(PXO99^A) 恢复了其在烟草上的过敏反应和在水稻上的致病性, 而突变序列的结合子 M16/*hrpG*(M16) 则不能使其恢复功能, 从而确定 M16 是由于单个碱基的突变所引起的功能突变. 经过对基因及其产物的比对发现, 对于第 II 组 *hrp* 调节基因 *hrpG* 的变异, 种间变化明显高于种内不同致病变种的变化.

关键词 水稻白叶枯病菌 *hrpG* 基因 *hrpG* 基因突变体 变异分析

hrp 基因 (hypersensitive reaction and pathogenicity gene) 是植物病原细菌致病关键因子, 控制对非寄主植物烟草的过敏反应和在寄主植物上的致病性^[1,2]. *hrp* 基因是一个基因簇, 根据 *hrp* 基因的调控机制和结构特征, 革兰氏阴性植物病原细菌的 *hrp* 基因被分为两组^[3]. 第一组 *hrp* 基因以 *Erwinia amylovora* 和 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 的 *hrp* 基因为代表; 第二组以 *Ralstonia solanacearum* 和 *Xanthomonas campestris* 的 *hrp* 基因为代表. 第一组 *hrp* 基因的调节基因主要是 *hrpR* 和 *hrpS*^[4], 而第二组 *hrp* 基因的调节基因主要是 *hrpG* 和 *hrpX*^[5,6]. 两组 *hrp* 基因调

节基因在结构上的特征是第一组的调节基因 *hrpR* 和 *hrpS* 与 *hrp* 基因簇紧密相连, 而第二组的调节基因 *hrpG* 和 *hrpX* 是远离 *hrp* 基因簇的, 在 *hrp* 基因簇附近都未发现调节基因^[3,7,8]. 在 *Xanthomonas* 属中, *hrpG* 基因控制 *hrpX* 和 *hrpA* 的表达, 而 *hrpX* 则控制 *hrp* 基因中其他基因的表达^[9]. 据 Wengelnik 等报道, 辣椒斑点病菌 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) 的 *hrpG* 基因和 *hrpX* 基因是毗邻的. 水稻黄单胞 *Xanthomonas oryzae* 包括两个致病变种 pv. *oryzae* 和 pv. *oryzicola*, 分别引起白叶枯病和条斑病^[10]. 本实验室的研究表明水稻黄单胞 *Xanthomonas oryzae* 由 *hrp* 基

2004 07 06 收稿, 2004-08-27 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 30230240)和国家重点基础研究发展规划(批准号: G2000016201)资助项目

** 通讯作者, E-mail: wangjsh@njau.edu.cn

因编码的效应分子 harpin_m 在致病变种间的区别比致病变种内菌株间的变化大^[11]。Zhu 等报道了水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) PXO86 菌株不完整的 *hrpG* 基因与完整的 *hrpX* 基因之间有 761 个碱基的距离^[12]。本实验室的研究表明水稻细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xooc*) 的 *hrpG* 基因和 *hrpX* 基因也是毗邻的, 两者之间的距离也为 761 个碱基^[13]。我们还从 *Xoo* JXOIII 基因组文库克隆 pUHRX245 中鉴定出调节基因 *hrpX*, 但尚未明确 *hrpG* 的序列特征及其位置关系^[14]。在同一研究中用硫酸二乙酯化学诱变方法从 PXO99 菌株得到 *hrp*⁻ 突变体 M16, 其不能在非寄主植物烟草上引起过敏反应, 在寄主植物水稻上只能产生很弱的致病性。M16 能与水稻细菌性条斑菌 RS105 中含有 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的片段互补恢复功能, 即在烟草上恢复过敏反应, 在水稻上恢复致病能力, 而仅含 *hrpX* 的片段则不能互补恢复功能。M16 是否在 *hrpG* 位点发生突变尚不清楚。

本文报道从 *Xoo* 两个菌株 (JXOIII 和 PXO99^A) 得到的 *hrpG* 基因, 通过序列分析对 *hrpG* 基因进

行定位, 同时通过与水稻细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xooc*) 和 *Xoo* 突变体 M16 中 *hrpG* 基因的同源性比对, 以期了解水稻黄单胞不同致病变种及菌株间 *hrpG* 的变异和对致病性的影响。本文研究结果对阐明水稻黄单胞菌致病性变异机制和与水稻的互作关系有一定意义。

1 材料与方法

1.1 供试水稻品种, 菌株及 *Xoo* 的基因文库克隆和亚克隆

供试水稻品种为感病品种汕优 63 (由安徽省农业科学院赠送), 接种水稻白叶枯病菌后病斑长度可超过 20 cm。 *Xoo* 菌株 JXOIII 的致病表型与日本系统小种 3 相同, PXO99^A 为菲律宾小种 6, 在汕优 63 上接种 12 d 后病斑长度分别达 21 和 20 cm, 而突变体 M16 形成的病斑只有 4 cm。用于 PCR 扩增 *hrpG_{Xoo}* 的 JXOIII 基因文库构建在粘粒 pUFR034 上, 转化大肠杆菌 DH5 α 。含调控区的文库克隆 pUHRX245 和有关亚克隆片段由本实验室筛选获得 (表 1)。

表 1 本研究使用的菌株与质粒

菌株或质粒	有关特征	来源
菌株		
<i>X. o</i> pv. <i>oryzae</i>	水稻白叶枯病菌	
JXOIII	野生型, 日本系统小种 3	本研究室
PXO99 ^A	野生型, 菲律宾小种	本研究室
M16	PXO99 ^A 的 <i>hrp</i> ⁻ 突变体	本研究室
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F' <i>minrecA</i> , Φ 80 d <i>lacZ</i> , Δ M12	Gibco-BRL 公司
S17-1	Tra ⁺ <i>recA</i> Sp ^f	Simon ^[15]
粘粒和质粒		
pGEM [®] -T-Easy-Vector	Ap ^r	Promega 公司
pUFR034	粘粒 <i>IncW</i> , <i>Nmr</i> , <i>Km</i> ^r , <i>Mob</i> ⁺ , <i>Mob</i> (P), <i>LacZa</i> ⁺	De Feyter et al ^[16]
pUHRX245	<i>Xoo</i> 基因组粘粒 (pUFR034) 文库中含 <i>hrpX</i> 基因的克隆	本实验室 ^[43]
pB1	pUHRX245 的亚克隆 (含 1.3 kb 和 5.2 kb 两个片段)	本研究
AE7	pUHRX245 的亚克隆 (3.0 kb)	本研究
AE4	pUHRX245 的亚克隆 (3.0 kb)	本研究
pBK6	<i>Xooc</i> 基因组文库中含 <i>hrpG</i> 和 <i>hrpX</i> 基因的克隆	本研究室 ^[13]
pHRS3.3	<i>Xoo</i> 基因组文库中含 <i>hrpX</i> 基因的克隆	本研究室 ^[14]
pB7	pUHRX245 的亚克隆 (5.2 kb)	本研究

1.2 PCR 扩增 *Xoo* 的 *hrpG_{Xoo}* 基因

根据水稻细菌性条斑病菌 RS105 的 *hrpG* 基因

序列设计了特异性引物: 5'-CGGGATCCATGAA-CATCCCTTGCCCCCTTGC-3' 和 5'-C G G G A T

C C A TGTCAGCAGGCGGCTGTGCGATG-3', 从水稻白叶枯病菌菌株 JXOIII, PXO99^A, M16 中扩增同源序列. 扩增条件为 94°C 5 min; 94°C 30 s, 61.5°C 1 s, 72°C 2 s, 72°C 10 s.

1.3 Southern blot 杂交

将 PCR 扩增得到的 *hrpG_{xoo}* 基因, 连接至 pEGM[®]-T-easy 载体, 得到 pETe-GXoo. 地高辛标记后作为探针, 与 pUHRX245 的各亚克隆进行 Southern blot 杂交^[17] 以决定 *hrpG* 基因与 *hrpX* 的位置.

1.4 序列测定与序列分析

从 JXOIII, PXO99^A, M16 中扩增的 *hrpG* 同源序列以及将有杂交信号的亚克隆片段 AE4 和 pB1 以 EcoRI 酶切位点为中心向两边进行测序测定. 序列测定在 Takara 公司进行. 序列分析应用 Bioedit 软件.

1.5 两亲交配法进行功能互补

将 PXO99^A 和 M16 两者的 PCR 产物分别导入 pUFR034^[16] 粘粒中, 通过两亲交配法^[15,18] 获得互补结合子 M16/*hrpG* (PXO99^A) 和 M16/*hrpG*

(M16), 在寄主植物水稻上采用剪叶接种, 在非寄主植物烟草上采用注射接种. 菌体培养及接种方法参照文献^[19] 进行.

2 结果与分析

2.1 从 JXOIII, PXO99^A 和 M16 菌株中 PCR 获得的 *hrpG_{xoo}* 基因及相应序列

以水稻条斑病细菌 *hrpG_{xoo}* 基因的序列设计引物, 从水稻白叶枯病菌菌株 JXOIII 和 PXO99^A 基因组 DNA 扩增得到 *hrpG_{xoo}* 序列, 大小均为 792bp (GenBank 登录号分别为 AY048682 和 AY048683), 两者有两个碱基的区别, 但推测的氨基酸序列完全一致 (资料未显示). 它们与细菌性条斑病菌 RS105 的 *hrpG_{xoo}* 基因和氨基酸序列分别有 96% 和 98% 的一致性, 与辣椒斑点病菌的 *hrpG_{xoo}* 基因和氨基酸有 87% 和 85% 的一致性. 三者推测的氨基酸序列的比较见图 1. 根据黄单胞细菌 *hrpG* 基因编码产物的氨基酸序列比较发现, 水稻黄单胞两致病变种的 *hrpG* 在第 22, 29 和 252 位点有三个氨基酸不同, 而水稻黄单胞与辣椒斑点病菌 (*Xcv*) 的 *hrpG* 则有较大区别, 有 30 多个氨基酸发生变化 (图 1).

<i>HrpG_{xoo}</i>	MNIPCPLAHGSAFLLTQDAPLVSQVNASLAPLSRNVSVFSDLELELLRSLRHSFPCBLLVFD	60
<i>HrpG_{xoo}</i>	MNIPCPLAHGSAFLLTQDAPLVSQVNASLAPLSRNVSVFSDLELELLRSLRHSFPCBLLVFD	60
<i>HrpG_{xcv}</i>	MNDHSPSNAGSVFLLTQDAPLTSQVNASLAPLAPRNVSVFSDLELELLRSLRHSFPCBLLIFD	60
<i>HrpG_{xoo}</i>	ASCVASDESSLAWQRCHSCHPTPLIVLGRFDCANDILDWYRAGAQEVVLALPFPNHELQV	120
<i>HrpG_{xoo}</i>	ASCVASDESSLAWQRCHSCHPTPLIVLGRFDCANDILDWYRAGAQEVVLALPFPNHELQV	120
<i>HrpG_{xcv}</i>	ASCVAADSSSLAWQRCHSQPTPLIVLGRFDCADNILANWYRAGAQEVVLALPFPNSHELHV	120
<i>HrpG_{xoo}</i>	RAALALS PVAHACPETQQLEVGPYQLLEENTVYVYLGKPIVLTAREFSIAWLLFSSPGVC	180
<i>HrpG_{xoo}</i>	RAALALS PVAHACPETQQLEVGPYQLLEENTVYVYLGKPIVLTAREFSIAWLLFSSPGVC	180
<i>HrpG_{xcv}</i>	RAALALS PVAHACPETQHLVGPYKLIENENTVYVYLGKPIALTAREFSIAWLLFSSPGVC	180
<i>HrpG_{xoo}</i>	FRRCQLAKAVWGSHT EFTDRIMEQHIIYKLRKQLQLGNNHGA VRI RTVYSHCYKLELALQD	240
<i>HrpG_{xoo}</i>	FRRCQLAKAVWGSHT EFTDRIMEQHIIYKLRKQLQLGNNHGA VRI RAUVYSHCYKLELALQD	240
<i>HrpG_{xcv}</i>	FRRCQLAKAVWGSHT EFTDRIMEQHIIYKLRKQLQLSGDSSAVRI RTVYSHCYKLELALHD	240
<i>HrpG_{xoo}</i>	KDAT TMSKAVSLSLSPAHR TAAC*	264
<i>HrpG_{xoo}</i>	KDAT TMSKAVSLSLSPAHR TAAC*	264
<i>HrpG_{xcv}</i>	TRAT TMSKAVSLSLSPAHR TAAC*	264

图 1 水稻黄单胞细菌 JXOIII 和一些其他黄单胞细菌 *hrpG* 基因推测的氨基酸序列的比较

突变体 M16 与 PXO99^A 的 *hrpG* 同源序列比较发现 (M16 *hrpG* 基因的序列登录号为 AY049753), 仅在 514 和 541 两个位置上的碱基发生了变化, 且都是由 C 转换为 T. 但氨基酸分析结果表明 (见图 2), 第 514 位上的碱基变化为无意义突变, 而 541

位上的碱基变化引起了氨基酸的变化, 使亮氨酸 (Leu) 突变为苯丙氨酸 (Phe). 这表明突变体 M16 的 *hrpG* 基因是由于单一氨基酸的改变而使功能丧失.

通过与 *Xanthomonas* 属其他种 *hrpG* 比较时发现, 水稻白叶枯病菌之间 *hrpG* 及其产物的一致性

高于与水稻条斑病细菌 *hrpG* 的一致性，而与其他 黄单胞细菌 *hrpG* 的差别较大(表 2)。

<i>hrpGM16</i>	MNIPCPLAHGSAFLLTQDARLASQVNASIAPLSRNVSVFSDELELLRSLR	50
<i>hrpG99</i>	MNIPCPLAHGSAFLLTQDARLASQVNASIAPLSRNVSVFSDELELLRSLR	50
<i>hrpGM16</i>	HSPCELLVFDASCVA SDESSLAWQRCHSGHPTPLIVLGRFDCANDILDW	100
<i>hrpG99</i>	HSPCELLVFDASCVA SDESSLAWQRCHSGHPTPLIVLGRFDCANDILDW	100
<i>hrpGM16</i>	YRAGAQEVLALPFPNSHELQVRAALALSPVAHACPETQQLSVGPYQLLRDE	150
<i>hrpG99</i>	YRAGAQEVLALPFPNSHELQVRAALALSPVAHACPETQQLSVGPYQLLRDE	150
<i>hrpGM16</i>	NTVYLHGKPIVLTAREFSIAWLLFSSPGVCFRRCLAKAVWGSHTFTDR	200
<i>hrpG99</i>	NTVYLHGKPIVLTAREFSIAWLLFSSPGVCLRRCLAKAVWGSHTFTDR	200
<i>hrpGM16</i>	TMEQHIIYKLRKKLQLGNHNGAVRI RTVY SHGYKLELALQDKDAT TMSKAV	250
<i>hrpG99</i>	TMEQHIIYKLRKKLQLGNHNGAVRI RTVY SHGYKLELALQDKDAT TMSKAV	250
<i>hrpGM16</i>	SLSLSPAHR TAA C * 264	
<i>hrpG99</i>	SLSLSPAHR TAA C * 264	

图 2 PXO99^a 与其突变体 M16 的 *hrpG* 基因编码的氨基酸推测序列的分析

表 2 水稻白叶枯病菌(*Xoo*)菌株(JxoIII, PXO99, PXO86 和 M16)和其他黄单胞细菌 *hrpG* 基因及其产物的一致性

黄单胞细菌种或菌株 ^{a)}	与 HrpG(AY048682)的一致性/%	
	核苷酸	氨基酸
<i>Xooc</i> (AF272885) ^{b)}	96	98
<i>Xoo</i> (AB040402)	99	99
PXO86(AF022185)	99	99
PXO99(AY048683)	99	100
M16(AY049753)	99	99
<i>Xcc</i> (U57625)	87	85
<i>Xcc</i> (AE012215)	87	72
<i>Xac</i> (AE011756)	87	85

a) *Xooc*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*; *Xoo*, *X. oryzae* pv. *oryzae*; *X. campestris* pv. *vesicatoria*; *Xcc*, *X. campestris* pv. *campestris*; *Xac*, *X. axonopodis* pv. *citri*. b) 括号内为 GenBank 登录号

2.2 含调节基因克隆 pUHRX245 及亚克隆酶切图谱及 southern blot 杂交对 *hrpGxoo* 基因定位

含 *hrp* 调节基因的克隆 pUHRX245 及其亚克

隆 *EcoR*I 和 *Bam*H1 单酶切和双酶切图谱见图 3 (a)。以 *hrpG* 为探针(pETe-GXoo)进行 Southern blot 杂交的结果表明, *Xoo*(JXOIII)文库克隆 pUHRX245(第 6 泳道)和两个亚克隆片段 pB1(第 3 泳道)和 AE4 与阳性对照 *hrpG* 基因(pETe-Gxoo/*Bam*HI, 第 2 泳道)一样均有杂交信号(图 3(b))。

2.3 对亚克隆 pB1 和 AE4 中所含 *hrpG* 基因的测序分析

根据酶切图谱分析 pB1 和 AE4 位于含 *hrpX_{xoo}* 基因亚克隆片段 pHRS3.3 的左侧, pB1 和 AE4 两个相邻片段由一个 *EcoR*I 识别序列连接(图 4)。从上述 southern blot 杂交结果已知 pB1 和 AE4 与 *hrpG* 有杂交信号。因此, 从亚克隆 pB1 和 AE4 *EcoR*I 酶切位点向两侧测定核苷酸序列, 结果表明

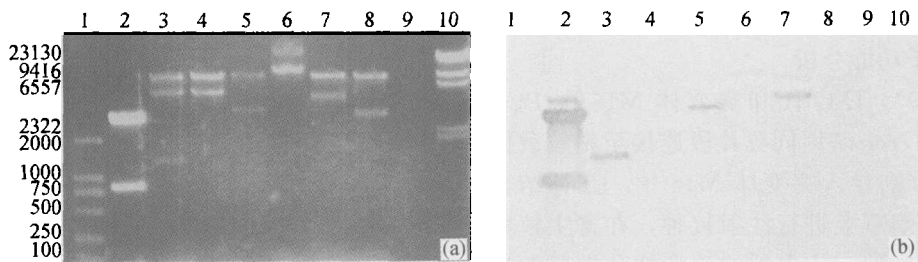


图 3 pUHRX245 及其亚克隆酶切电泳图(a)及 pETe-Gxoo 与各文库克隆, 亚克隆的 southern blot 杂交结果(b)

(a): 1, DL-2000 DNA 标志; 2, pETe-Gxoo/*Bam*HI; 3, pB1/*Bam*HI+*Eco*RI; 4, pB7/*Eco*RI; 5, AE4/*Eco*RI; 6, pUHRX245/*Eco*RI; 7, pBK6/*Eco*RI; 8, AE7/*Eco*RI; 9, 空白; 10, λ /*Hind*III
 (b): 1, DL-2000 DNA 标志; 2, pETe-Gxoo/*Bam*HI; 3, pB1/*Bam*HI+*Eco*RI; 4, pB7/*Eco*RI; 5, AE4/*Eco*RI; 6, pUHRX245/*Eco*RI; 7, pBK6/*Eco*RI; 8, AE7/*Eco*RI; 9, 空白; 10, λ /*Hind*III

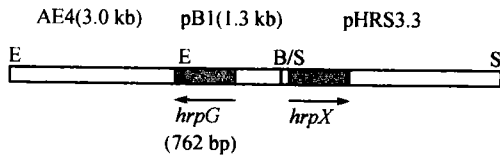


图4 水稻白叶枯病 JXOIII 菌株的 *hrpG_{xoo}* 基因与 *hrpX* 基因在 pUHRX245 文库克隆中的相对位置

AE4, pB1, pHRS 为粘粒文库克隆 pUHRX245 的亚克隆; E 表示 EcoRI; B 表示 BamHI; S 表示 SacI; 箭头表示基因转录方向

两个亚克隆各含有 *hrpG* 基因的部分序列, 共同组成一个完整的 *hrpG* 序列. pB1 的实际长度为 1313 bp, 从该片段 722 位开始为起始密码子, 直到 1307 位 EcoRI 酶切位点, 总共 586 个碱基, AE4 右端从 EcoRI 酶切位点开始共 206 个碱基是 *hrpG_{xoo}* 基因的剩余部分 (测序号: NJS645 和 NJS654). *hrpG_{xoo}* 的总长度与直接从 JXOIII 和 PXO99^A 基因组中 PCR 扩增的片段长度和序列完成一致.

2.4 JXOIII 菌株的 *hrpG* 基因与已知的 *hrpX* 基因位置关系的分析

hrpG 基因与 *hrpX* 基因是相毗邻的, 两者之间的距离在 722 个碱基以上, 其中包括 *hrpX_{oo}* 左侧从 SacI 酶切位点的 46 个碱基和 *hrpG_{xoo}* 右侧至 BamHI 酶切位点的 676 个碱基 (图 4), 但尚未包含从 BamHI 至 SacI 酶切位点之间的碱基距离. 本研究还对文库克隆 pUHRX245 中 *hrpG* 和 *hrpX* 右侧约 27 kb 的序列进行测定, 未发现 *hrp* 基因簇的结构基因 (资料未显示), 说明水稻黄单胞的调节基因与结构基因是远离的.

2.5 重组结合子功能分析

将从 PXO99^A, JXOIII 和突变体 M16 中 PCR 扩增获得的 *hrpG_{xoo}* 基因同源片段连接至粘粒载体 pUFR034 上, 分别导入突变体 M16 中. 互补结合子在非寄主植物烟草上进行注射接种, 在寄主植物水稻上进行剪叶接种. 从水稻的致病性和烟草的过敏反应上 (图 5, 6) 可以看出, 用 M16 中扩增得到的 *hrpG* 突变序列与 M16 互补后不能恢复突变体 M16 的功能, 其致病性和诱导过敏反应能力没有变化; 而从野生型菌株 PXO99^A 和 JXOIII 中扩增得到的 *hrpG* 片段则都可以恢复 M16 的功能, 包括在寄主植物上的致病性和非寄主植物上诱导过敏反应的能力.

力. 从不同菌株剪叶接种水稻后在叶片中的生长曲线也可以看出含 *hrpG* 基因突变体 M16 在水稻叶片中的繁殖量明显低于野生菌株, 而野生菌株与互补结合子 (M16/*hrpG*) 繁殖量差别不大 (资料未列出). 因此可以确定 M16 为 *hrpG* 基因缺失突变, 而且其突变位点 (541 位) 为功能性突变.

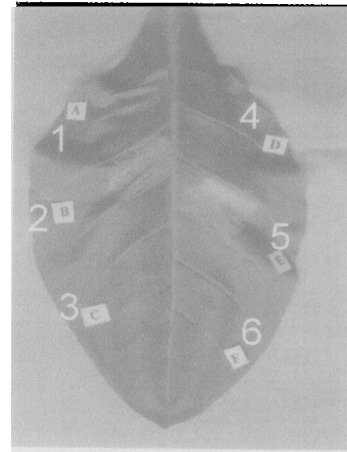


图5 *hrpG* 及突变序列与 M16 互补后在烟草上的过敏反应

A, PXO99^A; B, JXOIII; C, M16; D, M16/*hrpG_{xoo}* (PXO99^A 的 PCR 产物); E, 对照; F, M16/*hrpG* (M16 的 PCR 产物)

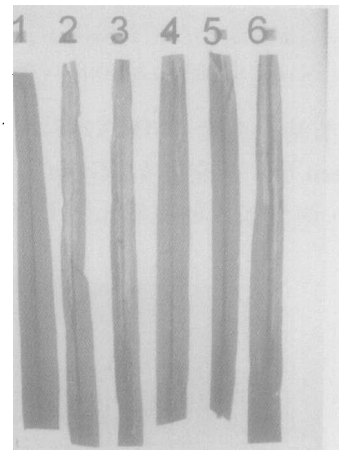


图6 *hrpG* 及突变序列与 M16 互补后的致病性烟草上的过敏反应

1, 对照; 2, JXOIII; 3, PXO99^A; 4, M16; 5, M16/*hrpG* (M16 的 PCR 产物) 6, M16/*hrpG_{xoo}* (PXO99^A 的 PCR 产物)

3 讨论

本研究结果表明水稻白叶枯病菌 (*Xoo*) JXOIII

与 PXO99^A 菌株的 *hrpG* 基因推测的氨基酸序列完全一致, *Xoo* 的 *hrpG* 基因与水稻细菌性条斑病菌 (*Xoo*) 的 *hrpG* 基因编码的氨基酸序列具有极高的同源性, 但是与 *Xcv* 的 *hrpG* 基因的同源性不到 90%。这说明 *hrpG* 基因在种内的同源性高于不同种之间同源性。在氨基酸水平上, 水稻黄单胞两个致病变种 HrpG 变化仅反映在第 22, 29 和 252 位氨基酸上, 而与辣椒斑点病菌 HrpG 的差别表现在 3—9 和 216—220 位约 30 个氨基酸发生变化。由此看来, 对于第 II 组 *hrp* 基因簇调控基因 *hrpG* 的变异, 种间变化明显高于种内不同致病变种的变化。

水稻黄单胞菌和辣椒斑点病黄单胞菌 (*Xcv*) 同属植物病原细菌 *hrp* 基因簇第二组^[3]。尽管它们的 *hrpG* 基因的序列有很高同源性, 且相对位置一致, 但它们突变后对不同细菌的致病性却有不同影响。如 Wengelnik 等认为, *Xcv* 的 *hrpG* 基因突变并不影响其在接种辣椒后的增殖, 且症状出现较早, 病斑较大^[16]。与 *Xcv* 不同, *Xoo* 的 *hrpG* 基因突变体 M16 在接种水稻后, 细菌在水稻体内虽然有一定增殖, 但仅表现微弱致病性, 且不能在烟草上激发过敏反应。

本研究证明, 在 M16 *hrpG* 基因序列中单个有意义的位点突变就可以引起 *hrpG* 基因的功能改变。根据 Wengelnik 等的报道, 在辣椒斑点病菌的 3 个 *hrpG*⁻ 突变体中, 也都是单一的碱基位点突变, 分别为: 第 130 位 G 变为 A, 第 595 位 G 变为 A, 第 581 位 A 变为 G。同时他们的研究还表明, *Xcv* 的 *hrpG* 基因突变引起的是所有 *hrp* 基因的组成性表达, 强化了致病症状和细胞死亡^[20]。而本研究中的 *Xoo* 的 *hrpG* 基因突变使细菌在寄主植物上的致病性减弱而在非寄主植物上丧失了诱导过敏反应能力。这表明, *Xoo* 的 *hrpG* 突变后由 *hrp* 基因编码的与致病性和诱导过敏反应有关的效应分子都没有正常表达。以往在辣椒斑点病菌的研究认为 HrpG 是一种直接与寄主互作的应答因子, 并且是 *hrp* 基因中第一个被活化的基因^[2]。M16 的致病性和诱导非寄主植物过敏反应能力的明显变化, 说明它确实是在寄主-病原细菌互作中起重要作用。水稻白叶枯病菌突变体 M16 与辣椒斑点病菌的 3 个 *hrpG*⁻ 突变体的不同表现说明在黄单胞属的不同种中, *hrpG* 基因对 *hrp* 基因簇的调节功能是有差别的。M16 能

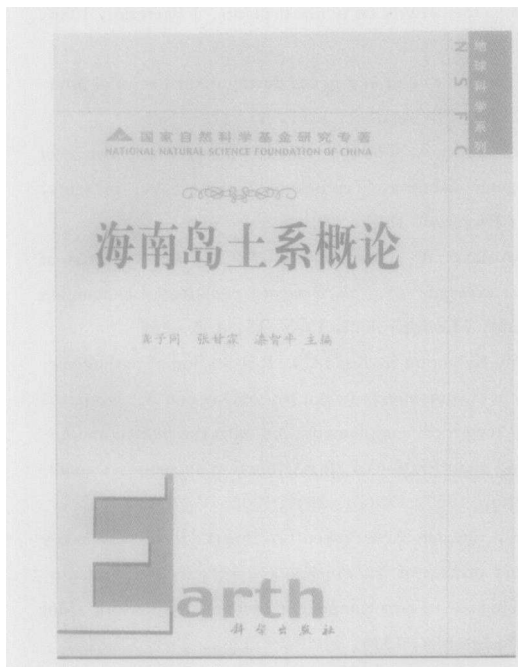
与水稻细菌性条斑病菌 RS105 中含有 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的片段互补而恢复其功能, 即在烟草上恢复过敏反应, 在水稻上恢复致病能力, 而仅含 *hrpX* 的片段则不能互补恢复功能^[14], 因此, *hrpG* 基因的正常表达对 *hrp* 基因的功能的表现是必须的。在本研究中, 克隆得到的 *hrpGxoo* 则能恢复 M16 的功能。因此, 可以确定 M16 为 *hrpG* 基因功能缺失突变体。

hrpG 基因与 *hrpX* 基因作为 *Xanthomonas* 属 *hrp* 基因簇的两个重要调控基因, 在水稻白叶枯病菌 JXOIII 中与其他种一致, 两者也是毗邻的。从对 *Xoo* JXOIII 菌株 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的测序结果和在文库克隆 pUHRX245 上相对位置看, 两者之间有 722 个碱基的距离, 与其他黄单胞 *hrpG* 和 *hrpX* 基因 761 个碱基的距离稍有差别^[13]。

参 考 文 献

- 1 Lindgren P B, Peet R C, Panopoulos N J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J Bacteriol*, 1986, 168: 512—522
- 2 Lindgren P B. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Ann Rev Phytopathol*, 1997, 35: 129—152
- 3 Alfano J R, Collmer A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol*, 1997, 179: 5655—5662
- 4 Grimm C, Aufsatz W, Panopoulos N J. The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. *Mol Microbiol*, 1995, 15: 155—165
- 5 Kamdar H V, Kamooun S, Kado C I. Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathotars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of HrpX function by sequence analyses. *J Bacteriol*, 1993, 175(7): 2017—2025
- 6 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
- 7 Kim Jung-Gun, Park Byoung Keun, Yoo Chang-Hyuk. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. *J Bacteriol*, 2003, 185(10) 3155—3166
- 8 Oku T, Tanaka K, Iwamoto M, et al. Structural conservation of the gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Gen Plant pathol*, 2004, 70: 159—167
- 9 Laurent Noël, Thieme F, Nennstiel D, et al. Two novel type

- III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J Bacteriol*, 2002, 184 (5): 1340—1348
- 10 Swings J, van Den Mooter M, Vauterin L, et al. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathogens of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 40: 309—311
- 11 李平, 陆徐忠, 邵敏, 等. 水稻黄单胞细菌 Harpin 蛋白的遗传多样性及其诱导烟草过敏反应和抗病性功能. *中国科学, C辑*, 2004, 34(2): 136—143
- 12 Zhu W G, MaGbanua M M, White F F. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol* 2000, 182: 1844—1853
- 13 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
- 14 陈功友, 余晓江, 王金生. 水稻白叶枯病菌 *hrp* 调节基因 *hrpXoo* 的克隆与序列分析. *中国农业科学*, 2003, 36(5): 528—535
- 15 Simon R, Priefer U, Pühler. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering; Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology*, 1983, 1: 784—791
- 16 De Feyter R, Kado C I, Gabriel D W. Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. *Gene*, 1990, 88: 65—72
- 17 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 18 De Feyter R, Gabriel D W. At least six avirulence gene are clustered on a 90 kilobase plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1991, 4: 423—432
- 19 方中达. *植病研究方法*. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 1998, 192—194
- 20 Wengelnik K, Rossier O, Bonas U. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J Bacteriol*, 1999, 181: 6828—6831



国家自然科学基金研究专著

《海南岛土系概论》龚子同 张甘霖 漆智平 主编
科学出版社 定价: 50.00 元

《海南岛土系概论》是中国土壤系统分类中基层分类研究项目成果之一, 是一本以土系为主的土壤基层分类研究专著, 涵盖了全岛 8 个土纲的 77 个土系. 本书分上下两篇, 上篇论述了海南土壤的成土条件、土壤分类的发展、土壤诊断高级单元、基层分类的建立和制图表达土系数据库的建立及土壤开发利用的途径和措施. 下篇系统阐述了各土系单元的生境条件, 主要性状及生产利用等. 篇末还介绍了全岛发生分类的土壤类型与土壤系统分类的参比. 最后附有海南岛土壤概图.

本书理论阐述较全面, 内容丰富, 数据翔实, 科学性、生产性强, 可供有关土壤、农业、生态科技人员、院校师生及生产部门应用.