



刘国芳, 蒋 蓉, 苏辉昭, 等. 水稻白叶枯病菌 III 型效应物基因 *hpaF* 与毒力相关[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(5): 67-74.

水稻白叶枯病菌 III 型效应物基因 *hpaF* 与毒力相关

刘国芳¹, 蒋 蓉², 苏辉昭², 牛祥娜², 玉延华², 姜 伟², 何勇强²
(1 广西大学 农学院, 广西 南宁 530004; 2 广西大学 生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004)

摘要:【目的】稻黄单胞杆菌水稻致病变种 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) PXO99^A 菌株中 *PXO_03420* 基因被注释为编码具有多个 LRR 的 III 型效应物基因 *hpaF*, 本研究旨在明确 *hpaF* 基因的功能, 为完善 *Xoo* III 型效应物的研究提供一定的理论基础. 【方法】通过同源双交换构建 *hpaF* 基因的缺失突变体, 并通过表型分析、致病性试验和遗传互补对该基因的功能进行研究. 【结果和结论】本研究发现, *hpaF* 基因突变后对水稻日本晴品种的致病力降低了 51.81%, 减弱了细菌在非寄主植物蓖麻上的过敏反应. 而带有 *hpaF* 全基因片段的 pLAFR3 能够恢复 *hpaF* 突变体的致病表型, 结果表明 *hpaF* 基因与水稻白叶枯病菌的致病性相关.

关键词: 水稻白叶枯病菌; III 型效应物; *hpaF* 基因; 毒力; 过敏反应
中图分类号: S435 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2015)05-0067-08

Type III secretion effector gene *hpaF* is required for full virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

LIU Guofang¹, JIANG Rong², SU Huizhao², NIU Xiangna², YU Yanhua², JIANG Wei², HE Yongqiang²
(1 College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530004, China;
2 College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract:【Objective】*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) is the causal agent of rice bacterial leaf blight disease. The type III secretion system (T3SS) and type III secretion effectors (T3SEs) play important roles in the pathogenesis of this phytopathogen. The gene *PXO_03420* of Philippines strain *Xoo* PXO99^A is annotated as *hpaF* gene, which was predicted to encode T3SE gene with leucine-rich repeat domains. The purpose of the study is to identify the function of gene *PXO_03420* (*hpaF*), which can provide theoretical supports for the study of type III secretion effectors of *Xoo*. 【Method】The *hpaF* gene deletion mutant was constructed by homologous double exchange mutational method. The mutant was subjected to phenotypic analysis, virulence assays and genetic complementation experiments. 【Result and conclusion】It was found that the virulence of *hpaF* gene mutant on rice, *Oryza sativa* L. *japonica* cv. Nipponbare, was reduced by 51.81% compared with the wild type strain, and the hypersensitive response (HR) induction of the mutant on the leaves of non-host castor oil plant, *Ricinus communis*, was significantly weakened. The intact coding region of *hpaF* carried by pLAFR3 could partly complement the virulence of mutant to the level of wild type strain. This study demonstrates that *hpaF* gene is required for full virulence of *Xoo*.

收稿日期: 2014-07-21 优先出版时间: 2015-07-27
优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150727.1424.007.html>
作者简介: 刘国芳 (1984—), 女, 博士研究生, E-mail: lgf8411@126.com; 通信作者: 何勇强 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: yqhe@gxu.edu.cn
基金项目: 973 计划项目 (2011CB100701); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303015)

Key words: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; type III secretion effector (T3SE); *hpaF* gene; virulence; hypersensitive response

稻黄单胞菌水稻致病变种 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), 俗称水稻白叶枯病菌, 属于革兰阴性菌的 γ 变形菌纲黄单胞菌属^[1]. 该菌主要是通过叶片上的伤口与水孔进入水稻的维管组织中定殖、扩展, 最终导致感病品种罹患白叶枯病 (Bacterial leaf blight, BLB)^[1-2]. 水稻白叶枯病最早在日本九州岛被发现^[3], 目前, 全世界种植水稻的国家或地区几乎都发生了水稻白叶枯病, 对水稻生产造成了严重的危害^[2, 4]. *Xoo* 的致病机理研究和 BLB 防治一直是植物病理学领域的研究热点, *Xoo* 作为模式细菌在病原菌与植物互作分子机理研究方面发挥了重要作用^[2].

Xoo 与水稻之间的互作关系遵循基因对基因假说^[5], 其分子机理是 *Xoo* 的类转录激活因子 (Transcription activator-like, TAL) 效应物与水稻的抗病或感病基因 (启动子区) 之间的相互作用^[6-7]. TAL 效应物的分泌和转运依赖于 *Xoo* 的 III 型分泌系统 (Type III secretion system, T3SS), 是一类 III 型效应物 (Type III secretion effector, T3SE). 除了 TAL 效应物外, *Xoo* 中还具有另外一些 T3SE, 非类转录激活子 (non-Transcription activator-like, non-TAL) 效应物^[6]. 目前, 人们对 *Xoo* 的 TAL 效应物在病原菌致病中的作用机理已有了较为深入的了解^[7], 而 *Xoo* 多数 non-TAL 效应物的功能或致病机制鲜见报道^[6]. 已有试验证明, non-TAL 效应物在丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*^[9]、欧文氏菌 *Erwinia amylovora*^[10]、辣椒斑点病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*^[11]、十字花科黑腐病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*^[12] 等植物病原细菌的致病机制中发挥着重要作用. 在 *Xoo* 中也发现了 non-TAL 效应物与致病相关, 在 *Xoo* KACC10859 菌株中, 效应物基因 *hpaF* 突变导致突变体致病力降低, 但不影响突变体的致敏性^[13]; *Xoo* PXO99^A 中编码蛋白 XopZ 的基因突变后, 突变体的致病力显著下降^[14]. 在 *Xoo* MAFF311018 菌株中证实了 XopR 与致病相关, 该效应物可抑制植物的早期防卫基因的表达^[15]. 在 *Xoo* 13751 菌株 *xopR* 的同源基因突变, 同样导致相应突变体致病力显著降低^[16]. 这些研究提示, non-TAL 效应物在 *Xoo* 的致病过程中发挥着重要作用.

Xoo PXO99^A 菌株是目前全基因组测序完成质量最高的 *Xoo* 菌株^[8, 17-18], 该菌株是最早分离于菲律

<http://xuebao.scau.edu.cn>

宾 *Xoo* 的 6 号小种 (PXO99) 的 5-氮杂胞嘧啶核苷 (5-Azacytidine) 抗性突变体, 作为鉴别菌株用于研究 *Xoo* 与水稻的互作机理^[8, 19]. *Xoo* PXO99^A 菌株中包括至少 42 个已知和预测的 III 型效应物^[8], 其中包括 19 个 TAL 效应物基因和 23 个 non-TAL 效应物基因. 广西大学植物病原细菌功能基因组学实验室对该菌株的 non-TAL 效应物基因进行了突变研究. 其中 1 个基因 *hpaF*, 位于 *hrp* 基因簇的 *hrpF* 基因的下游, 其编码的蛋白与茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* PopC 蛋白高度相似, PopC 蛋白是 1 个具有多个 LRR (Leucine-rich repeat domain) 重复结构的蛋白, 与细菌在寄主植物上的致病过程相关^[20]. 为了弄清该基因在致病中的作用, 本研究对 *Xoo* PXO99^A 中被注释为 non-TAL 效应物的基因 *PXO_03420* (*hpaF*) 进行了突变和表型分析.

1 材料与方法

1.1 材料

菌株和质粒见表 1. 供试寄主植物水稻为粳稻日本晴 *Oryza sativa* L. *japonica* cv. Nipponbare, 由亚热带生物资源保护与利用国家重点实验室 (广西大学) 提供, 供试非寄主植物蓖麻 *Ricinus communis* L. 由广西壮族自治区蚕业技术推广总站提供.

大肠埃希菌 *Escherichia coli* 在 LB 培养基 (1 L 培养基含 10.0 g 胰蛋白胨, 5.0 g 酵母提取物, 10.0 g 氯化钠) 中培养, 培养温度为 37 ℃, 水稻白叶枯病菌 *Xoo* 在 OB 培养基 (1 L 培养基含 2.00 g 多聚蛋白胨, 5.00 g 胰蛋白胨, 10.00 g 蔗糖, 1.00 g 谷氨酸钠, 0.10 g · L⁻¹ 甲硫氨酸, 0.72 g 磷酸氢二钾, 0.28 g 磷酸二氢钾, 1.00 g 氯化铵, 1.00 g 六水氯化镁) 或者 NB 培养基 (1 L 培养基含 10 g 胰蛋白胨, 1 g 酵母提取物, 3 g 多聚蛋白胨) 中培养, 培养温度为 28 ℃. LA、OA、NA 培养基分别为 LB、OB、NB 培养基添加 15 g · L⁻¹ 琼脂粉的固体培养基.

抗生素的用量为: 利福平 (Rif) 50 μg · mL⁻¹、卡那霉素 (Km) 25 μg · mL⁻¹、壮观霉素 (Spc) 25 μg · mL⁻¹; 四环素 (Tc) 用量: 大肠埃希菌 15 μg · mL⁻¹, 水稻白叶枯病菌 5 μg · mL⁻¹. 异丙基-硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 40 μg · mL⁻¹, 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (X-gal) 40 μg · mL⁻¹.

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Tab.1 The strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	材料	特征	抗性
大肠埃希菌	DH5α ¹⁾	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE4 gyrA96 relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 (w80dlacZDM15)	
	ED8767 ¹⁾	<i>RecA</i> , <i>met</i> , 包含质粒 pRK2073	壮观霉素
水稻白叶枯菌	PXO99 ^{A1)}	野生型	
	DM03420 ²⁾	缺失 <i>hpaF</i> (<i>PXO_03420</i>) 基因的野生型	利福平
	CDM03420 ²⁾	导入质粒 pL03420 的 DM03420 菌株	利福平,四环素
	P03420 ²⁾	导入质粒 pLAFR3 的 DM03420 菌株	利福平,四环素
质粒	pK18mobSacB ^[21]	插入 <i>sacB</i> 基因的 pK18mob	卡那霉素
	pRK2073 ¹⁾	辅助质粒, <i>Tra</i> ⁺ , <i>Mob</i> ⁺ , <i>ColE1</i> ,	壮观霉素
	pLAFR3 ¹⁾	广寄主克隆质粒	四环素
	pK03420 ²⁾	插入 <i>PXO_03420</i> 基因左右臂的 pK18mobsacB	卡那霉素
	pL03420 ²⁾	包含 <i>PXO_03420</i> 基因的 pLAFR3	四环素

1) 材料来源于本实验室;2) 材料来源于本研究.

根据 PXO99^A 菌株的基因组序列设计 *PXO_03420* PCR 扩增. PCR 扩增、质粒提取、总 DNA 提取、酶切及基因上下游片段引物及互补片段引物(表 2),用于电泳等方法参见《精编分子生物学实验指南》^[22].

表 2 本研究中所用的引物

Tab.2 The primers used in this study

引物名称	引物 (5'→3')	产物长度/bp	用途
03420LF/03420LR	<u>GAATTCACGCCGAACAATCACCC/TCTAGATGTAGCGCGTCGAGCC</u>	692	左臂引物
03420RF/03420RR	<u>TCTAGACTAGCGTCCGGCGATGTCACTC/AAGCTTGCTGTTCCTACTGCGCAG</u>	680	右臂引物
03420LF/03420RR	<u>GAATTCACGCCGAACAATCACCC/AAGCTTGCTGTTCCTACTGCGCAG</u>	1 372	突变体验证
C03420F/C03420R	<u>GGATCCCGGGATGTACTGCAAAGC/AAGCTTACATCGCCGGACGCTAGG</u>	1 610	互补试验

1.2 方法

1.2.1 *hpaF* 基因突变体构建及其功能互补 根据同源双交换的原理^[21],采用自杀质粒 pK18mobsacB 构建 *hpaF* 基因的缺失突变体. 以 PXO99^A 总 DNA 为模板,扩增 *hpaF* 上下游片段,回收后用相应的限制性内切酶酶切,连接到相应酶切的 pK18mobsacB 质粒上,转化至大肠埃希菌 DH5α 中,经 PCR 验证,测序后获得正确的重组质粒 pK03420. 通过三亲本结合的方法,将重组质粒导入到 PXO99^A 中,涂布在 NA + Rif + Km 培养基上,挑取单菌落,在 NB + Rif 中培养,诱导发生双交换,然后涂布在 NA + Rif + 蔗糖 150 g · L⁻¹ 的培养基上,挑取单菌落进行 PCR 验证,将验证正确的突变体,命名为 DM03420.

构建并筛选互补菌株 CDM03420. 将含有 *hpaF* 基因全长的 DNA 片段连接到相应酶切的 pLAFR3 质粒上,转化至大肠杆菌 DH5α 中,经 PCR 验证测序后获得正确的重组质粒 pL03420. 通过三亲本结合的方法,

将重组质粒导入到 DM03420 中,涂布在 OA + Rif + Tc 的培养基上,挑取单菌落,PCR 验证互补菌株 CDM03420. pLAFR3 空质粒导入突变体 DM03420 中作为对照,命名为 P03420.

1.2.2 胞外酶活性检测 方法参考文献[23]. 将待测 *Xoo* 菌株接种至含有相应抗生素的 OB 液体培养基中,28 ℃摇床培养 16 ~ 18 h,调节各菌液浓度一致 (*D*_{600 nm} = 0.3);用微量移液器精确吸取 2 μL 菌液,分别接种至含有 10 g · L⁻¹ 脱脂牛奶、1 g · L⁻¹ 可溶性淀粉或者 5 g · L⁻¹ 羧甲基纤维素(CMC)的 OA 平板上,在 28 ℃培养箱中培养 48 h. 胞外蛋白酶的差异是通过观察脱脂牛奶平板上菌落周围透明圈的大小来比较的;胞外淀粉酶是用稀释 100 倍的 I₂ (母液 0.08 mol · L⁻¹)/KI (母液 3.2 mol · L⁻¹) 染色液染色的方式通过水解圈的直径来比较胞外淀粉酶的差异;胞外纤维素酶是用 20 mL 1 g · L⁻¹ 的刚果红溶液染色的方式通过水解圈的直径来比较胞外纤

纤维素酶的差异.

1.2.3 胞外多糖产量检测 方法参照文献[23]. 将待测 *Xoo* 菌株接种至含有相应抗生素的 OB 液体培养基中,28 ℃摇床培养 16~18 h,调节各菌液浓度一致($D_{600\text{ nm}}=0.3$);用微量移液器分别精确吸取 2 μL 菌液,接种至含有 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的 OA 平板上,28 ℃培养箱培养 5 d,根据菌落生长的外观观察各菌株合成胞外多糖的差异.

1.2.4 游动性检测 方法参照文献[23]. 将 *Xoo* 待测菌株的新鲜过夜培养物用 OB 培养基调节浓度一致($D_{600\text{ nm}}=0.3$),用微量移液器精确吸取 2 μL 菌液,接种至含有 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂的 OA 半固体培养基平板上,28 ℃培养箱静置培养 5 d,观察并照相记录.

1.2.5 致病性测定 试验参照文献[16]. 选取处于分蘖期的水稻日本晴植株用于试验,试验前 1 d 将水稻从露天盆栽场地移至 28 ℃培养室以适应环境. 选择长势一致,距叶心最近的 2 片叶. 采用剪叶接种法进行致病性检测:将待测菌株接种至 10 mL 加有相应抗生素的 OB 液体培养基中,28 ℃摇床培养 16~18 h,将各待测菌株菌液浓度调节一致($D_{600\text{ nm}}=0.3$),用灭菌的剪刀沾取各菌液,在距叶尖 3 cm 处垂直剪下叶尖,接种后将水稻置于 28 ℃温室培育. 约两周后,观察并测量病斑长度,对照致病力分级比较野生型与突变体的致病反应. 试验对照用 ddH_2O . 将 *Xoo* 菌株待测试寄主植物幼苗分为 3 组,每组处理 30 张以上的叶片,每组随机抽取 30 张叶片进行病情调查.

1.2.6 过敏反应(HR)检测 选取蓖麻嫩叶作为供试

植株. 取 *Xoo* 待测菌株的过夜培养物,离心,收集细胞,弃去上清,用微量移液器将残余的培养基吸干净,并用无菌水重悬菌体,将菌液稀释至 $D_{600\text{ nm}}=0.3$;用去针头的无菌注射器分别吸取各菌液,将菌液压渗至蓖麻叶片背面的叶肉中,形成大小一致的可见浸润斑;接种后将蓖麻苗置于 28 ℃温室中培育,并用荧光灯照射,每隔 12 h 观察并拍照记录过敏反应结果.

1.3 数据处理

使用统计分析软件 SPSS 21.0(<http://spss.en.softonic.com/>)进行数据处理,计算平均值和标准差.

相对致病力 = *Xoo* 待测菌株病斑长度平均值/野生型菌株病斑长度平均值.

2 结果与分析

2.1 *hpaF* 基因的生物信息学分析

hpaF 基因(*PXO_03420*)在水稻白叶枯病菌中被注释为 XopAE 效应物家族基因,长度为 1 437 bp,转录方向为反方向,编码的产物由 478 个氨基酸残基组成. 该基因编码的蛋白为 PopC 类蛋白,通过 SMART 在线软件分析可知,该蛋白质序列存在多个富含亮氨酸重复结构域(LRR)(图 1). 通过 KEGG (<http://www.genome.jp>)网站上的序列分析与同源分析,选取其中 10 个同源效应物基因,均含有 LRR 结构域进行同源进化树分析,采用 MEGA5 软件对 *hpaF* 基因及其近种同源基因进行进化关系分析(图 2),发现 *hpaF* 基因在黄单胞菌属中相当保守,*Xoo* *PXO99^A* 中的 *hpaF* 基因与发表的 *Xoc* BLS256 中的 *XOC_4459* 基因也有很高的相似性.

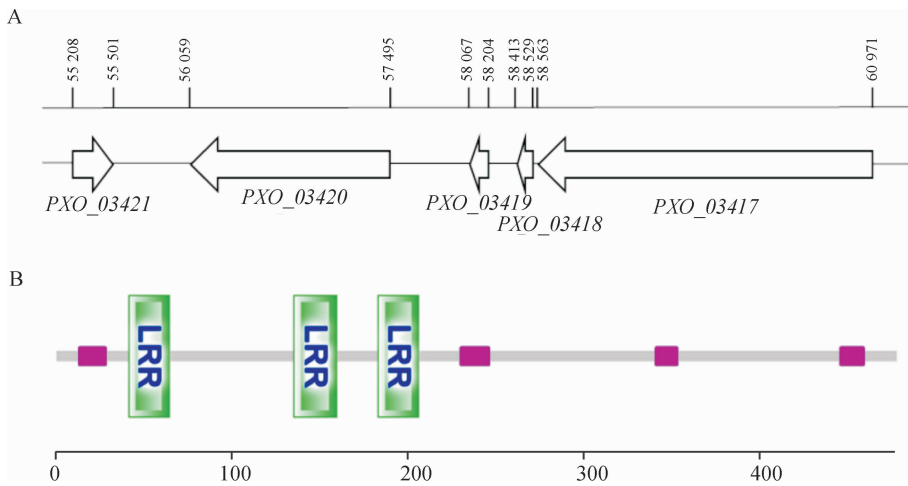


图 1 *PXO_03420* 基因在基因组中的位置及蛋白结构域分析

Fig. 1 The gene position and protein domain analysis of *PXO_03420*

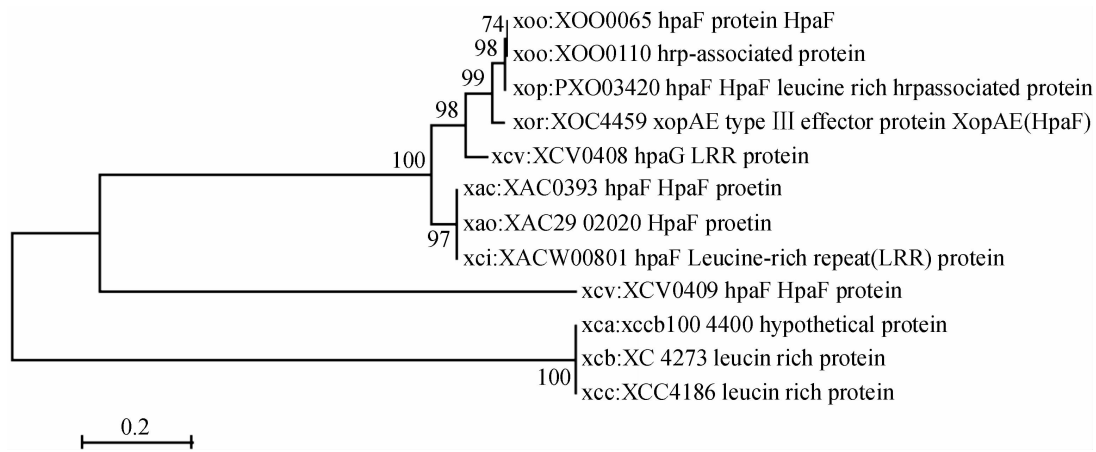
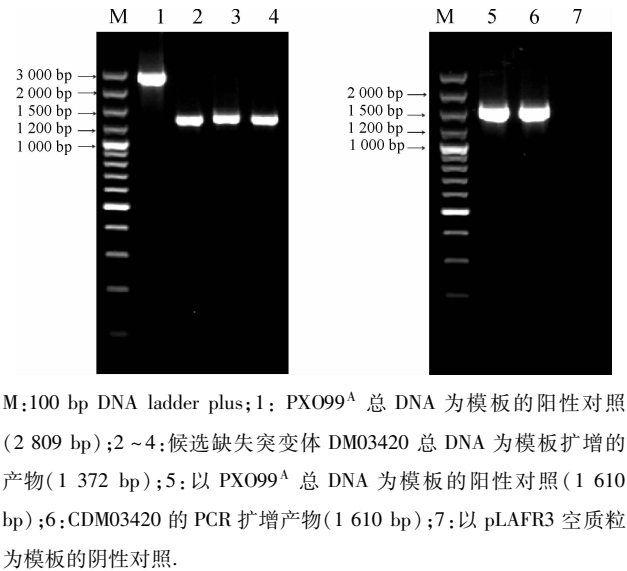


图2 *PXO_03420* 基因与同源基因进化关系分析

Fig.2 Phylogenic analysis of the homologues of *PXO_03420* in *Xanthomonas* spp.

2.2 *hpaF* 基因突变体的构建与表型鉴定

基于自杀质粒 pK18mobsacB 构建 *hpaF* 基因的缺失突变体 DM03420, 并对其进行了功能互补 (图3).



M:100 bp DNA ladder plus;1: PXO99^A 总 DNA 为模板的阳性对照 (2 809 bp);2~4:候选缺失突变体 DM03420 总 DNA 为模板扩增的产物(1 372 bp);5:以 PXO99^A 总 DNA 为模板的阳性对照(1 610 bp);6:CDM03420 的 PCR 扩增产物(1 610 bp);7:以 pLAFR3 空质粒为模板的阴性对照.

图3 *hpaF* 缺失突变体和互补菌株的 PCR 验证
Fig.3 Identification of the *hpaF* gene deletion mutant and the complemented strains by PCR

本研究对 DM03420 的致病因子胞外酶(胞外蛋白酶、胞外淀粉酶、胞外纤维素酶)、胞外多糖的产量以及游动性进行了检测,结果发现,野生型菌株 PXO99^A、突变体 DM03420、互补菌株 CDM03420 胞外酶和胞外多糖的产量没有明显差异,因此推测 *hpaF* 基因与水稻白叶枯病菌 PXO99^A 胞外酶和胞外多糖的合成可能无关.

本研究采用半固体培养基平板检测法检测了 *Xoo* 菌株的运动情况(图4,5).将菌液浓度一致的 *Xoo* 菌株接种至含 3 g · L⁻¹ 琼脂的 OA 培养基平板上,28 °C

培养箱静置培养 5 d.结果显示,突变体 DM03420 游动的直径较野生型菌株 PXO99^A 减小了 46.62% ($P < 0.05$, t 检验),而互补菌株 CDM03420 游动的直径为野生型菌株 PXO99^A 的 76.9%,导入空质粒 pLAFR3 的缺失突变体 P03420 游动的直径与突变体 DM03420 无明显差异.这一结果表明,*hpaF* 基因与水稻白叶枯病菌 PXO99^A 的游动性相关.

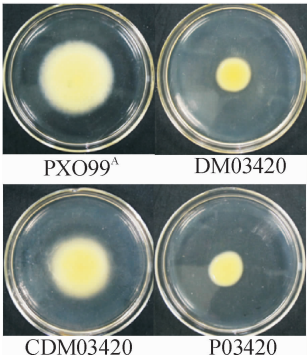


图4 *hpaF* 基因突变体与相关菌株的游动性检测
Fig.4 The motility test of *hpaF* mutant and other *Xoo* strains

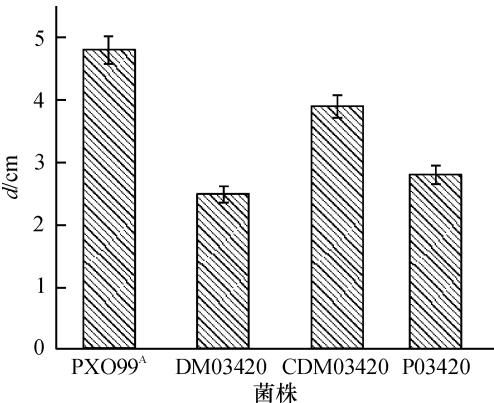


图5 *hpaF* 基因突变体与相关菌株的检测结果
Fig.5 The motility test results of *hpaF* mutant and other *Xoo* strains

2.3 *hpaF* 基因突变体致病力显著降低

剪叶接种检测了野生型菌株 PXO99^A、*hpaF* 基因缺失突变体 DM03420、互补菌株 CDM03420 及对照菌株 P03420 在寄主植物日本晴梗稻水稻上的致病力(图 6、7). 统计学分析发现,突变体 DM03420 在寄主植物上的致病力是野生型菌株 PXO99^A 致病力的 48.19% ($P < 0.05$, t 检验),互补菌株能够恢复部分致病力,导入空质粒 pLAFR3 的缺失突变体 P03420 在寄主植物上的致病力与突变体的致病力没有明显差异. 这一结果说明,*hpaF* 基因与 *Xoo* PXO99^A 在寄主植物上的致病相关.

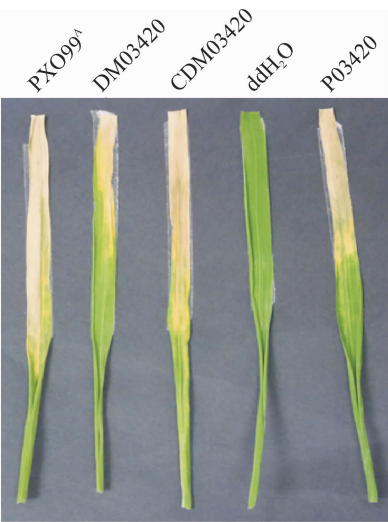


图 6 *hpaF* 基因突变体与相关菌株的致病力检测
Fig. 6 Virulence tests of *hpaF* mutant and other *Xoo* strains

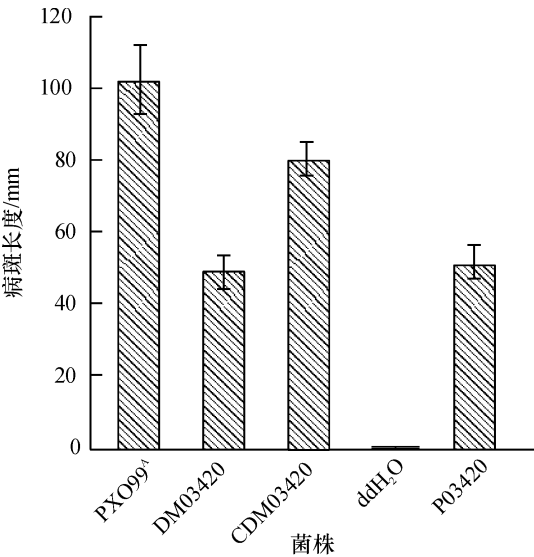


图 7 接种 *hpaF* 基因突变体与相关菌株的水稻病斑长度
Fig. 7 The lesion-length of rice inoculated by *hpaF* mutant and other *Xoo* strains

<http://xuebao.scau.edu.cn>

2.4 HR 反应

检测野生型菌株 PXO99^A、*hpaF* 基因缺失突变体 DM03420、互补菌株 CDM03420、对照菌株 P03420 在非寄主植物蓖麻叶片上 HR 反应(图 8). 结果发现,压渗 24 h 后,接种野生型菌株 PXO99^A 和互补菌株 CDM03420 的叶片出现了明显的组织坏死,而接种突变体 DM03420 和 P03420 的叶片出现较弱的组织坏死斑,接种 ddH₂O 的叶片没有明显的变化. 这一结果表明,*hpaF* 基因突变后,减弱了 *Xoo* 在非寄主植物蓖麻上引发的 HR,表明了 *hpaF* 基因与水稻白叶枯病菌 PXO99^A 与非寄主植物的 HR 反应有关.

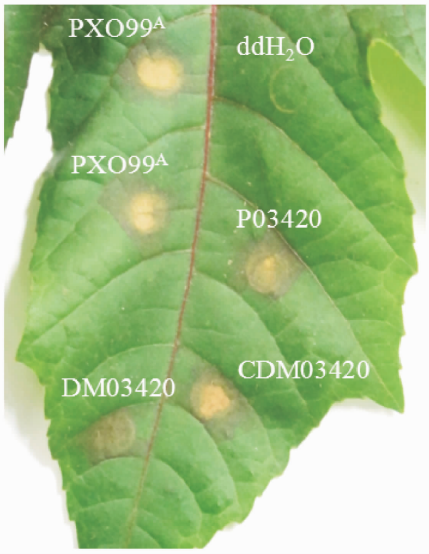


图 8 *hpaF* 基因突变体与相关菌株在蓖麻上的过敏反应(HR)
Fig. 8 The hypersensitive response tests of *hpaF* mutant and other *Xoo* strains on castor oil plant

3 讨论与结论

本研究通过构建 *Xoo* PXO99^A 菌株的 *hpaF* 基因的缺失突变体,并对该基因的功能进行了初步研究,结果表明,*hpaF* 基因突变体对水稻的致病力显著降低、对非寄主植物蓖麻的致敏性降低. 一般认为,一个病原菌的效应物在功能上具有一定的冗余性,单独突变的基因表型往往会被其他同型基因功能补偿,造成结果不明确^[24]. 但也应看到,如果单独突变具有显著的表型变化,则提示该基因功能的重要和独特. 本研究表明,*hpaF* 基因在 *Xoo* PXO99^A 菌株对水稻的致病机制中起主要作用.

有关 *hpaF* 基因突变体致病力降低的现象,已在 *Xoo* KACC10859 菌株和大豆细菌斑疹病菌 *X. axonopodis* pv. *glycines*, *Xag* 8ra 菌株中报道^[13, 25]. 同

时,在 *Xcc* 8004 菌株中,*hpaF* 的非等位同源基因*xopL* (*XC_4273*) 的突变体,致病力也显著降低^[12]. *hpaF* 基因产物含有 3 个 LRR 结构的重复,与茄科雷尔氏菌 PopC 蛋白高度相似,雷尔氏菌的 PopC 蛋白是 1 个具有多个 LRR 结构的蛋白,与细菌在寄主植物上的致病过程相关^[20]. 本研究结果提示,含有 LRR 结构域的蛋白质,在植物病原细菌致病过程中发挥着重要作用.

本研究也发现 *hpaF* 基因突变不影响胞外多糖产生和胞外酶类活性,表明 *hpaF* 基因不参与上述这类毒性因子的合成或分泌. 但是,令人意外的是 *hpaF* 基因突变导致了细菌游动能力明显降低,提示 *hpaF* 可能影响了细菌的鞭毛或与运动相关的功能. 这与常见的 III 型效应物的作用不同,通常情况下,III 型效应物进入寄主植物细胞后,与寄主体内的蛋白质发生相互作用^[6, 24]. 特别是,细菌的 LRR 蛋白与植物中 LRR 结构具有同源性,植物中 LRR 结构通过参与信号传导在植物发育与防御中发挥作用,在拟南芥中许多具有 LRR 结构域的蛋白被证明与发育有关^[26]. 可以肯定的是 *hpaF* 基因在 *Xoo* PXO99^A 菌株中与致病相关,但 *hpaF* 基因突变造成的病原菌运动能力对致病能力的影响究竟有多大,现在还不清楚.

本研究结果表明 III 型效应物基因 *hpaF* 具有多重生物学功能,是水稻白叶枯病菌 PXO99^A 中一个重要的致病相关基因,为 non-TAL 效应物基因的研究提供了一定的基础.

参考文献:

[1] NINO-LIU D O, RONALD P C, BOGDANOVE A J. *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop [J]. Mol Plant Pathol, 2006, 7(5): 303-324.

[2] OU S H. Rice diseases [M]. 2 Ed. Slough, Berkshire: C. A. B. International Mycological Institute, 1985.

[3] YAMANUKI S, NAKANURA K, KAYANO M, et al. First occurrence of bacterial leaf blight of rice in Hokkaido [J]. Ann Phytopathol Soc Jpn, 1962, 27: 264.

[4] SEO Y S, 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 [J]. BMC Microbiol, 2008, 8(1): 1-12.

[5] FLOR H H. Current status of the gene-for-gene concept [J]. Annu Rev Phytopathol, 1971, 9(1): 275-296.

[6] WHITE F F, POTNIS N, JONES J B, et al. The type III

effectors of *Xanthomonas* [J]. Mol Plant Pathol, 2009, 10 (6): 749-766.

[7] MOSCOU M J, BOGDANOVE A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. Science, 2009, 326(5959): 1501.

[8] SALZBERG S L, SOMMER D D, SCHATZ M C, et al. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99^A [J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 204.

[9] LINDEBERG M, CUNNAC S, COLLMER A. *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: Last words in endless arguments [J]. Trends Microbiol, 2012, 20(4): 199-208.

[10] VOGT I, WOHNER T, RICHTER K, et al. Gene-for-gene relationship in the host-pathogen system *Malus × robusta* 5-*Erwinia amylovora* [J]. New Phytol, 2013, 197 (4): 1262-1275.

[11] KIM J G, TAYLOR K W, MUDGETT M B. Comparative analysis of the XopD type III secretion (T3S) effector family in plant pathogenic bacteria [J]. Mol Plant Pathol, 2011, 12 (8): 715-730.

[12] JIANG Wei, JIANG Bole, XU Rongqi, et al. Identification of six type III effector genes with the PIP box in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and five of them contribute individually to full pathogenicity [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2009, 22(11): 1401-1411.

[13] CHO H J, PARK Y J, NOH T H, et al. Molecular analysis of the *hrp* gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859 [J]. Microb pathogenesis, 2008, 44 (6): 473-483.

[14] SONG Congfeng, YANG Bing. Mutagenesis of 18 type III effectors reveals virulence function of XopZ_{PXO99} in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2010, 23 (7): 893-902.

[15] AKIMOTO-TOMIYAMA C, FURUTANI A, TSUGE S, et al. XopR, a type III effector secreted by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, suppresses microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2012, 25(4): 505-514.

[16] ZHAO Shuai, MO Weilan, WU Fan, et al. Identification of non-TAL effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Chinese strain 13751 and analysis of their role in the bacterial virulence [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2013, 29 (4): 733-744.

[17] LEE B M, PARK Y J, PARK D S, et al. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC-

- 10331, the bacterial blight pathogen of rice [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(2): 577-586.
- [18] OCHIAI H, INOUE Y, TAKEYA M, et al. Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity [J]. *Jpn Agri Res Quart*, 2005, 39(5): 275-287.
- [19] MEW T W, VERA-CRUZ C M, MEDALLA E S. Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars planted in the Philippines [J]. *Plant Dis*, 1992, 76(10): 1029-1032.
- [20] GUÉNÉRON M, TIMMERS A C, BOUCHER C, et al. Two novel proteins, PopB, which has functional nuclear localization signals, and PopC, which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the hrp-secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum* [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36(2): 261-277.
- [21] SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* [J]. 1994, *Gene*, 145(1): 69-73.
- [22] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 塞得尔 J G, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 2001.
- [23] 嵯优优, 来元亮, 伍燕, 等. 水稻细菌性条斑病菌 REC 结构域蛋白基因 *vemR* (*Xoc*) 的功能鉴定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2011, 30(5): 521-528.
- [24] BÜTTNER D, HE SY. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150(4): 1656-1664.
- [25] KIM J G, PARK B K, YOO C H, et al. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* *hrp* pathogenicity island [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(10): 3155-3166.
- [26] CLARK S E, WILLIAMS R W, MEYEROWITZ E M. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 1997, 89(4): 575-585.

【责任编辑 霍 欢】