中国水稻科学(*Chin J Rice Sci*)，2011，25(1)：11～18
http://www.ricesci.cn
DOI：10.3969/j.issn.1001-7216.2011.01.002

hrcQ 基因决定水稻条斑病菌在非寄主烟草上的过敏性反应和在寄主水稻上的致病性

张鼎鼎[1]　邹丽芳[2]　赵梅勤[1]　邹华松[2]　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，江苏 南京 210095；[2]上海交通大学 农业与生物学院，上海 200240；[*]通讯联系人，E-mail：gyouchen@sjtu.edu.cn)

hrcQ Gene Determines *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* to Trigger Hypersensitive Response in Nonhost Tobacco and Pathogenicity in Host Rice

ZHANG Ding-ding[1], ZOU Li-fang[2], ZHAO Mei-qin[1], ZOU Hua-song[2], CHEN Gong-you[1,2,*]
([1]*Key Laboratory for Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture/Department of Plant Pathology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*; [2]*School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China*; [*]*Corresponding author, E-mail: gyouchen@sjtu.edu.cn*)

ZHANG Dingding, ZOU Lifang, ZHAO Meiqin, et al. *hrcQ* gene determines *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* to trigger hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in host rice. Chin J Rice Sci, 2011, 25(1): 11-18.

Abstract: *hrcQ* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) is highly conserved in the animal and plant pathogens. It has been postulated that the differentiation at the N-terminal of HrcQ proteins in different plant pathogenic bacteria is related to the secretion of specific effectors through type Ⅲ secretion system (T3SS). However, it is unclear whether HrcQ affects the formation of T3SS and the secretion of T3SS effectors. To understand the effect of HrcQ on the formation of T3SS and the secretion of T3SS effectors, *hrcQ* mutant of *Xoc* was generated by knocking-out mutagenesis through allelic exchange. Pathogenicity assays verified that the *hrcQ* mutant lost the ability to trigger hypersensitive response (HR) in nonhost tobacco and pathogenicity in host rice. The expression of *hrcQ* was induced when the pathogen interacted with rice cells. The protein-protein interaction assay by yeast two-hybrid system showed that HrcQ could interact with Hpa1, HrcN, HrpB5 and HrpB2. Immunobloting assay confirmed that HrcQ was not secreted through T3SS, whereas the mutation of *hrcQ* led to no secretion of Hpa1 and HrpB2 through T3SS. These results suggest that HrcQ is the core component of T3SS helping Hpa1 and HrpB2 secret through T3SS to determine HR in tobacco and pathogenicity in rice. All the above also provides a basis for further understanding of the secretion mechanisms by *X. oryzae* pv. *oryzicola* T3SS.
Key words: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*; hypersensitive response-conserved gene; type Ⅲ secretion system; hypersensitive response; pathogenicity

张鼎鼎，邹丽芳，赵梅勤，等. *hrcQ* 基因决定水稻条斑病菌在非寄主烟草上的过敏性反应和在寄主水稻上的致病性. 中国水稻科学，2011，25(1)：11-18.

摘　要：水稻条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)*hrcQ* 基因在动植物病原细菌中高度保守。不同植物病原细菌的 HrcQ 蛋白因在 N 端有变化，推测可能与分泌的效应分子特异性有关。但水稻条斑病菌 HrcQ 蛋白对Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system，T3SS)的形成以及对效应分子的分泌性影响还不清楚。为弄清 HrcQ 蛋白在此方面的作用，利用同源重组方式获得了水稻条斑病菌 *hrcQ* 基因的敲除突变体，该突变体丧失了在烟草上激发过敏性反应的能力和在水稻上的致病性。*hrcQ* 基因与水稻细胞互作时受诱导表达。蛋白质-蛋白质互作结果显示，HrcQ 可分别与 Hpa1、HrcN、HrpB5 和 HrpB2 互作。分泌性检测发现，HrcQ 不通过 T3SS 分泌至胞外。*hrcQ* 基因突变，影响 Hpa1 和 HrpB2 蛋白分泌。这些结果表明，HrcQ 蛋白是形成Ⅲ型分泌系统的基本组分，并通过帮助 Hpa1 和 HrpB2 等 T3SS 效应因子的分泌，从而影响病菌在非寄主上的过敏性反应和在水稻上的致病性。这为进一步分析水稻黄单胞菌 T3SS 的形成和分泌机制奠定了基础。
关键词：水稻条斑病菌；*hrcQ* 基因；Ⅲ型分泌系统；过敏性反应；致病性
中图分类号：Q933；S435.111.4^{+}9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1001-7216(2011)01-0011-08

水稻条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*，*Xoc*)侵染水稻产生细菌性条斑病(bacterial leaf streak，简称条斑病)，是东南亚国家和我国水稻上的重要细菌病害，在局部地区已成为水稻上的第四大病害[1]。*Xoc* 在非寄主植物上的过敏性反应(hypersensitive response)和在寄主植物上的致病性(pathogenicity)是由 *hrp* 基因簇决定的[2]。*hrp* 基因编码Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system，T3SS)将各类效应蛋白(T3SS effectors)注入植物细胞中，干扰和改变植物的代谢途径从而导

收稿日期：2010-03-31；**修改稿收到日期**：2010-05-10。
基金项目：国家 973 计划资助项目(2006CB101902)；国家自然科学基金资助项目(30710103902)；国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(NYHYZX07-056)。

致植物产生抗(感)病性[3]。*Xoc* 的 *hrp* 基因簇位于染色体上 27 kb 的区域,由 9 个 *hrc*(*hrp* conserved)、10 个 *hrp* 和 8 个 *hpa*(*hrp* associated)基因构成[4]。9 个 *hrc*(*hrp* conserved)基因在动植物病原细菌中高度保守,推测编码Ⅲ型分泌系统的核心组分。生物信息学和蛋白质-蛋白质互作研究推测 HrcR、HrcS、HrcT、HrcU 和 HrcV 蛋白位于细菌内膜上[5-6];HrcC 蛋白位于外膜环上[5-6];HrcJ 蛋白跨膜连接内膜和外膜环[6];HrcN 是一个 ATP 酶(ATPase),主要位于 T3SS 系统内膜环的顶部,能够水解 ATP,提供能量,驱动效应蛋白通过 T3SS 分泌[7-8];HrcQ 是一个可溶性的蛋白,在细胞中的精确定位还不清楚[6]。在植物病原细菌 *Pseudomonas syringae* 中 HrcQ 的 HrcQ(B)亚基以及动物病原细菌 *Shigella* 中的 HrcQ(B)同源物 Spa33,都与 TTSS 的 C 环结构的组成相关[9-10]。而在水稻条斑病菌中,是否所有的 Hrc 蛋白都是病菌在水稻上致病所必需的以及这些 Hpa、Hrc 和 Hrp 蛋白如何相互作用构成 T3SS 系统,仍然不清楚。本研究通过基因敲除、致病性测定、酵母双杂交和免疫杂交等方式研究了水稻条斑病菌的 *hrcQ* 基因对于致病性的贡献、表达特性、HrcQ 蛋白的 T3SS 分泌性以及 HrcQ 蛋白与其他 Hrp 蛋白的互作关系,以期为揭示水稻条斑病菌与水稻的分子互作机制提供科学线索。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和质粒

本研究所用的菌株及质粒详见表 1。水稻条斑病菌培养于 NA 固体和 NB 液体培养基中,置于 28℃下生长;大肠杆菌(*Escherichia coli*)于 LB 培养基中 37℃下培养。*hrp* 诱导培养基为 XOM3[11]。生长中所用到的抗生素终浓度:氨苄青霉素(Ap) 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) 25 μg/mL。

1.2 植物材料

烟草为本生烟(*Nicotiana benthamiana*),水稻品种为 IR24,种植于南京农业大学温室中。水稻悬浮细胞的培养按照肖友伦等[11]的方法进行。

1.3 主要试剂、引物合成及相关仪器

水稻条斑病菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒均购于 Axygen 公司。总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、pMD18-T 载体、限制性内切酶、连接酶、*Ex-Taq* 酶和 DNA marker 均购于大连 TaKaRa 公司。Southern 杂交所用试剂及探针标记试剂盒购于 Roche 公司。本研究所用引物(表 2)由金思瑞科技(南京)公司合成。凝胶成像系统(Gel Doc 2000TM BIORAD, USA)购于 Bio-Rad。C-Myc 多克隆抗体购于金思瑞科技(南京)公司。

1.4 水稻条斑病菌 *hrcQ* 突变体的构建

以菌株 RS105 的 *hrp* 基因簇序列(AY875714)为依据,根据基因位置和转录方向,分别选取 *hrcQ* 基因编码区上游 346 bp 和下游 909 bp 的 DNA 片段作为左右同源臂。以 RS105 菌株的基因组 DNA 为模板,分别使用 hrcQ1-F 和 hrcQ1-R 及 hrcQ2-F 和 hrcQ2-R 引物(表 2)进行 PCR 扩增。分别经 *Bam*HⅠ-*Xba*Ⅰ及 *Xba*Ⅰ-*Sal*Ⅰ双酶切、纯化,连接在经 *Bam*HⅠ-*Sal*Ⅰ酶切的 pKMS1 载体上,获得 pKMSΔR*hrcQ* 的重组载体(表 1)。通过电转化将 pKMSΔR*hrcQ* 质粒导入 RS105 菌株中,在不含蔗糖的 NA+Km 培养基上筛选第一次同源重组的单交换子,再在 10%蔗糖的 NA 平板上借助 *sacB* 的负选择压力进行第二次同源交换,对应 NA+Km 平板上不生长的菌落,即为 *hrcQ* 基因突变体 ΔR*hrcQ*。为了准确,以 hrcQ1-F 和 hrcQ2-R 为引物对 ΔR*hrcQ* 进行 PCR 验证;以 hrcQ1-F 和 hrcQ1-R 扩增获得的 PCR 片段为探针进行 Southern 杂交验证。

1.5 功能互补

以 ChrcQ-F 和 ChrcQ-R 为引物(表 2),以 RS105 的基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增得到包含 *hrcQ* 启动子区域的 1366 bp 的功能互补片段。经 *Bam*HⅠ-*Eco*RⅠ双酶切后克隆到经相同酶切处理的 pUFR034 载体上,得到重组质粒 pUFR*hrcQ*。将 pUFR*hrcQ* 载体电转化至 ΔR*hrcQ* 的感受态细胞中,获得经 PCR 验证的功能互补子 CΔR*hrcQ*。

1.6 水稻上致病性、烟草上过敏性反应以及细菌生长能力的测定

水稻条斑病菌各供试菌株培养至对数生长期,菌体浓度约为 3×10^8 CFU/mL($OD_{600}=0.5$)。使用无针头注射器将菌液注射到叶龄为 14 d 的 IR24 水稻叶中,3 d 后观察水渍症状的形成,同时每隔 1 d 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 后统计细菌数量,连续测定 5 d,试验重复 3 次。使用带有菌液的针头针刺两个月龄的水稻叶片,共计10张叶

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study.

菌株和质粒 Strain and plasmid	特性 Property	来源 Source
酵母 Yeast		
AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, His3-200, gal4, gal80, LYS2::$GAL1_{UAS}$-$GAL1_{TATA}$-His3	Clonetech
大肠杆菌 *Escherichia coli*		
DH5α	φ90, *lacZ*Δ*m15*, recA, hosts of pUC182T, pUC192T, pRFR034, and their derivatives	Invitrogene
水稻条斑病菌 *X. oryzae* pv. *oryzicola*		
RS105	Rif^r, 野生型, 中国 2 号小种	本实验室
	Rif^r, the wild type strain, Chinese race 2	This laboratory
Δ*RhrcQ*	Rif^r, 野生型 RS105 的 *hrcQ* 基因敲除突变体	本研究
	Rif^r, the *hrcQ* knock-out mutant of the wild type RS105	This study
C*ΔRhrcQ*	Rif^r, Km^r, *hrcQ* 基因敲除突变体的功能互补菌株	本研究
	Rif^r, Km^r, a complementary strain of the *hrcQ* knock-out mutant	This study
Δ*RhrcV*	Rif^r, 野生型 RS105 的 *hrcV* 基因敲除突变体	本实验室
	Rif^r, the *hrcV* gene knock-out mutant of the wild type RS105	This laboratory
质粒 Plasmid		
pGBKT-7	Km^r, DNA/bait, c-Myc, TRP1, 7.3 kb	Clonetech
pGADT-7	Ap^r, AD/library, HA, LEU2, 8.0 kb	Clonetech
pA-*hrcQ*	Ap^r, 构建在 pGADT-7 上, 含有 *hrcQ* 基因的 831 bp 片段	本研究
	Ap^r, a 831 bp *hrcQ* ligated in pGADT-7	This study
pB-*hpa1*	Km^r, 构建在 pGBKT-7 上, 含有 *hpa1* 基因的 414 bp 片段	本研究
	Km^r, a 414 bp *hpa1* ligated in pGBKT-7	This study
pB-*hrcN*	Km^r, 构建在 pGBKT-7 上, 含有 *hrcN* 基因的 1330 bp 片段	本研究
	Km^r, a 1330 bp *hrcN* ligated in pGBKT-7	This study
pB-*hrpB2*	Km^r,构建在 pGBKT-7 上, 含有 *hrpB2* 基因的 393 bp 片段	本研究
	Km^r, a 393 bp *hrpB2* ligated in pGBKT-7	This study
pB-*hrpB5*	Km^r, 构建在 pGBKT-7 上, 含有 *hrpB5* 基因的 261 bp 片段	本研究
	Km^r, a 261 bp *hrpB5* ligated in pGBKT-7	This study
pMD18-T	Ap^r, TA 克隆载体, 来源于 pUC18	TaKaRa
	Ap^r, TA cloning vector, pUC18 derivative	
pMD18-*hrcQmyc*	Ap^r,构建在 pMD18-T 上, *hrcQ* 和 *myc* 融合基因质粒	本实验室
	Ap^r, The fusion gene of *hrcQ* and *myc* ligated in pMD18-T	This laboratory
pKMS1	Km^r, 6.4 kb, pUC18 的多克隆位点, 含有 *mob*、*oriV* 和 *sacB* 基因	本实验室
	Km^r, 6.4 kb, pUC18 polylinker, containing *mob*, *oriV*, and *sacB*	This laboratory
pHM1	Sp^r, 广泛寄主范围的载体,含有 pUC19 的多克隆位点	Hopkins et al[12]
	SP^r, Broad-host-range vector with pUC19 polylinker	
pUFR034	Km^r, 8.7 kb, IncW, Nm^r, Mob^+, $LacZa^+$, cosmid	De Feyter[13]
pKMSΔ*RhrcQ*	Km^r, 构建在 pKMS1 上, 含有 *hrcQ* 基因左右两端同源臂 1255 bp 的融合片段	本研究
	Km^r, a 1255 bp fusion of the left and right flanking fragment of the *hrcQ* locus was ligated into pKMS1	This study
pH*hpa1myc*	Sp^r, Sm^r, 构建在 pHM1 上, 含有 *hpa1* 和 *myc* 的 604 bp 的融合基因	本实验室
	SP^r, Sm^r, a 604 bp fusion fragment of *hpa1* and *myc* ligated in pHM1	This laboratory
pH*hrpB2myc*	Sp^r, Sm^r,构建在 pHM1 上, 含有 *hrpB2* 和 *myc* 的 624 bp 的融合基因	本实验室
	SP^r, Sm^r, a 624 bp fusion fragment of *hrpB2* and *myc* ligated in pHM1	This laboratory
pH*hrcQmyc*	Sp^r, Sm^r, 构建在 pHM1 上, 含有 *hrcQ* 和 *myc* 的 1481 bp 的融合基因	本研究
	SP^r, Sm^r, a 1481 bp fusion fragment of *hrcQ* and *myc* ligated in pHM1	This study
pUFR*hrcQ*	Km^r, 构建在 pUFR034 上的携带 *hrcQ* 基因及其启动子的 1366 bp 的片段	本研究
	Km^r, a 1366 bp fragment including the promoter and ORF of *hrcQ* (RS105) ligated in pUFR034	This study

Km^r－卡那霉素抗性；Rif^r－利福平抗性；Sp^r－壮观霉素抗性；Ap^r－青霉素抗性；Sm^r－链霉素抗性。

Km^r, Kanamycin-resistant; Rif^r, Rifampicin-resistant; Sp^r, Spectinomycin-resistant; Ap^r, Ampicillin-resistant; Sm^r, Streptomycin-resistant.

片，14 d 后测量病斑长度。以同样的菌液浓度注射非寄主烟草，24 h 内观察过敏性反应是否形成，重复 3 次。

1.7 细菌 RNA 提取和 RT-PCR

水稻条斑病菌在 *hrp* 诱导培养基 XOM3 中生长 16 h 后收集菌体，按照 RNAiso Plus 操作手册

表 2 本研究所用引物

Table 2. Primers used in this study.

引物 Primer	序列(5′→3′,下划线示酶切位点) Sequence (5′→3′, underlined are the sites of restriction enzymes)	退火温度 Annealing temperature/℃	延伸时间 Time for extension/s	片段长度 PCR product /bp
hrcQ1-F (*Bam*HⅠ)	5′-TTAGGATCCGCGGCAGGGAACTGGGAAGCGT-3′	58	30	346
hrcQ1-R (*Xba*Ⅰ)	5′-ATTTCTAGACCTGCCCAGCTGCGCGCGCTC-3′			
hrcQ2-F (*Xba*Ⅰ)	5′-ATATCTAGACGTTGGCTCGCTGCTGCTGGT-3′	56	60	909
hrcQ2-R (*Sal*Ⅰ)	5′-TAAGTCGACGAGATGCGACGGATCATGGGAAC-3′			
ChrcQ-F (*Bam*HⅠ)	5′-TAAGGATCCGACCGAGTGGATACGCACGCAAC-3′	58	150	1366
ChrcQ-R(*Eco*RⅠ)	5′-ATAGAATTCTCAGGCATCTGCATGCGTGCTC-3′			
hrcQmyc-F (*Kpn*Ⅰ)	5′-TAAGGTACCAAGCTTTACAAACGGACCCGCCATCACGTCT-3′	64	90	1481
hrcQmyc-R(*Hind*Ⅲ)	5′-ATAAAGCTTGGTACCTCACAGATCTTCTTCAGAAATAAGT TTTTGTTCGGCATCTGCATGCGT-3′			
hrcQp-F(*Eco*RⅠ)	5′-ATTGAATTCGGCGACAGATCGCGACCGAGTGG-3′	54	40	551
hrcQ31-R	5′-TAATATCCAGCTGCAGGCGCAGGCGAG-3′			
hpa1myc-F(*Hind*Ⅲ)	5′-TTAAGCTTTTCGCGCGTACAAGCACAATTTCGCA-3′	58	50	604
hpa1myc-R(*Pst*Ⅰ)	5′-AACTGCAGTTACAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTT GTTCCTGCATCGATCCGCTGTCGTT-3′			
hrpB2myc-F(*Sal*Ⅰ)	5′-AATGTCGACATGACGCTCATTCCTCCT-3′	59	35	393
hrpB2myc-R(*Hind*Ⅲ)	5′-TATAAGCTTCTACAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTT GTTCCTGGTTCTTCACCAGCGTCTGCAC-3′			

(TaKaRa 公司) 提取总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测和分光光度计定量后,按照 Reverse Transcripase 试剂盒(TaKaRa 公司)的方法合成 cDNA。以 cDNA 为模板,PCR 扩增 *hrcQ* 基因。以 16S rRNA 基因为内参,校正 cDNA 模板浓度。25 μL PCR 体系包括 1 U Ex-*Taq*, GC 缓冲液 12.5 μL, 2.5 μL 25 mmol/L Mg^{2+}, 2 μL dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 5 ng cDNA , 2 μL 引物(20 pmol/L),用超纯水定容至 25 μL。PCR 条件:95℃下预变性 5 min;94℃下变性 50 s, 52℃下退火 45 s, 72℃下延伸 45 s,35 个循环;72℃下充分延伸 10 min。

1.8 酵母双杂交系统

按照 Clonetech 酵母双杂交操作手册,将 *hrcQ* 基因克隆在 pGADT-7 载体上,获得重组载体 pA-hrcQ,将 26 个 *hrp* 基因分别克隆在 pGBKT-7 载体上,获得相应 pB-*hrp* 重组质粒(未全部显示所有构建)。将 pA-hrcQ 分别和 pB-hrp 载体同时导入 AH109 酵母细胞中,涂布于营养缺陷的 SD/-Leu/-Trp/-His 平板上,于 30℃下培养 4 d 后挑取阳性克隆,在 SD/-Ade/-Leu/-Trp/-His 平板上划线,获得阳性克隆,随后进行 β-gal 活性检测。同时设置 pGADT7-T 和 pGBKT7-53 作为阳性对照,pGADT-7 和 pGBKT-7 作为阴性对照。

1.9 HrcQ 蛋白的Ⅲ型分泌性检测

将 C-Myc 标签与 *hrcQ* 基因进行融合,对 HrcQ 蛋白进行分泌性检测。以 hrcQmyc-F 和 hrcQmyc-R(表 2)为上下游引物,以 RS105 菌株 gDNA 为模板,PCR 扩增得到 1481 bp 含有启动子和 *hrcQ* 基因的片段;PCR 产物纯化回收后与 pMD18-T 载体连接,获得重组载体 pMD18-hrcQmyc。重组载体 pMD18-hrcQmyc 及 pHM1 载体同时进行 *Kpn*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切连接,得到重组质粒 pHhrcQmyc。按照同样的流程获得 *hpa1-C-myc* 和 *hrpB2-C-myc* 的重组质粒 pHhpa1myc 和 pHhrpB2myc。采用电转化方式,将所得重组质粒分别导入至 RS105、*hrcV* 突变体和 *hrcQ* 突变体中,获得相应阳性转化子(表 1)。相应菌株在含有相对应抗生素的 NB 培养液中培养至对数生长期,收集适量菌体,无菌水洗涤菌体 2 次后加入 2 mL XOM3 诱导培养基悬浮菌体,置于 28℃摇床中培养 16 h,10 000×*g* 下离心 5 min,收集菌体和上清。对上清进行冻干处理,得到上清蛋白(SN)。冻干处理后的上清蛋白和离心后收集的菌体均使用适量的 PBS 进行溶解,并加入 1/5体积的 5 × SDS 上样缓冲液,沸水浴 5 min,得到用于加样的上清蛋白(SN)和总蛋白(TE),于 −20℃下保存。在 15%分离胶和 6%浓缩胶上进行 SDS-PAGE 电泳,采用湿转法从蛋白胶转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜置于含有 5%脱脂牛奶的封闭液中,在 4℃条件下封闭过夜。将 1 mg/mL 的 C-Myc 兔抗多克隆抗体按照 1∶5000 的比例稀释加入到封闭液中,37℃下孵育 30 min,用 1×TBST 清洗 3 次,1×TBS 清洗 1 次,每次清洗置于摇床上 10 min。在终浓度为 0.2 μg/mL 的羊抗兔 IgG/HRP

的封闭液中，37℃下孵育 45 min，用 TBST 和 TBS 清洗。最后用 Easysee Western Blot kid 荧光底物溶液孵育 30 s，在暗室中将医用 X 胶片与膜压入相片夹曝光 5～15 min，对胶片进行显影和定影，拍照保存。

2 结果与分析

2.1 *hrcQ* 是水稻条斑病菌在非寄主上激发过敏性反应和寄主上具有致病性所需的基因

将含有 *hrcQ* 左端臂（346 bp）和右端臂（909 bp）的融合片段构建于 pKMS Ⅰ中，获得了重组载体 pKMSΔ*hrcQ*，电转化至野生型菌株 RS105 中，经两次同源交换，获得 *hrcQ* 缺失突变体 ΔR*hrcQ*（图 1-A）。用 hrcQ1-F 和 hrcQ2-R 引物分别对野生型和突变体基因组 DNA 进行 PCR 扩增，野生型获得预期的 2017 bp 条带，突变体缺失了 915 bp 的条带（图 1-B）。以 hrcQ1-F 和 hrcQ1-R 扩增获得的 PCR 片段为探针，Southern 杂交结果显示，与野生型相比，突变体获得一个增加了 254 bp 的信号条带（图 1-C），与预期的结果一致。PCR 和 Southern 杂交结果证实，水稻条斑病菌 *hrcQ* 基因被成功敲除。

致病性测定结果显示，*hrcQ* 突变体同 *hrcV* 突变体一样，丧失了在苗期水稻上形成水浸症状（图 2-A）和在成株期水稻上的致病能力（图 2-B），也丧失了在非寄主烟草上激发过敏性反应的能力（图 2-C），同时在水稻中的生长能力也显著下降（图 2-D）。这提示，*hrcQ* 基因是水稻条斑病菌在水稻上具有致病性和在非寄主上激发过敏性反应所需的。将 *hrcQ* 基因功能互补突变体 ΔR*hrcQ*，结果显示，功能互补子恢复了在水稻上的致病性和烟草上产生过敏性反应的能力（图 2），细菌在水稻组织中的生长能力也恢复至野生型水平（图 2-D）。这表明 *hrcQ* 基因决定着水稻条斑病菌在烟草上产生过敏性反应和在水稻上的致病性。

2.2 *hrcQ* 基因受水稻细胞诱导表达

为了揭示水稻条斑病菌 *hrcQ* 基因是否受水稻细胞诱导表达及在病程中的表达特性，将水稻条斑病菌野生型菌株 RS105 与水稻悬浮细胞互作，通过 RT-PCR 分析 *hrcQ* 基因的转录表达水平。结果显示，*hrcQ* 基因在与水稻细胞互作 2 h 时呈微弱表达，互作 4 h 时表达水平增高，互作 8 h 时表达水平最高，互作 16 h 后表达呈减弱趋势（图 3）。这表明水稻条斑病菌 *hrcQ* 基因受水稻细胞诱导，并参与了病菌的病程。

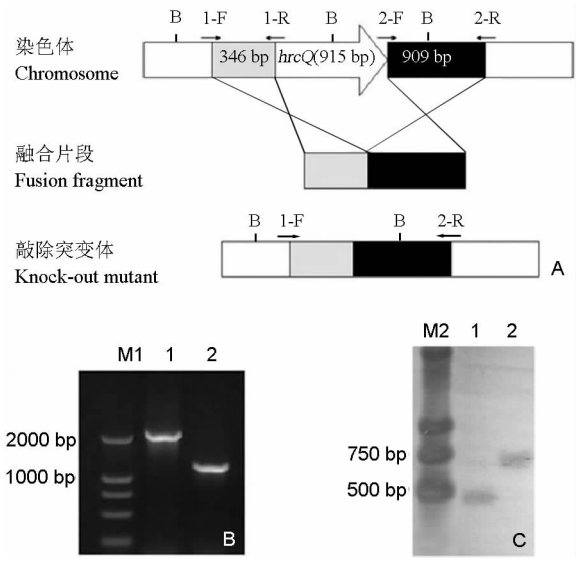


图 1 水稻条斑病菌 *hrcQ* 基因突变体的构建及分子验证

Fig. 1. Schematic map and molecular analysis of the *hrcQ* mutant of *X. oryzae* pv. *oryzicola*.

A－*hrcQ* 敲除突变体的构建。灰色和黑色区域分别代表 *hrcQ* 基因的旁侧序列，连入自杀性载体 pKMS1，经两次同源交换，获得 *hrcQ* 基因的敲除突变体。B 代表 *Bgl* Ⅰ酶切位点。1-F、1-R、2-F 和 2-R 代表利用 PCR 扩增的引物结合位点。B－突变体 PCR 分析。1－野生型菌株 RS105；2－*hrcQ* 突变体。C－*hrcQ* 突变体 Southern 杂交分析。野生型和 *hrcQ* 突变体基因组 DNA 经 *Bgl* Ⅰ酶切，利用 hrcQ1-F 和 hrcQ1-R 引物进行 PCR 扩增获得的 DNA 片段（灰色区域）作为 Southern 杂交的探针。1－野生型菌株 RS105；2－*hrcQ* 突变体。

A, Schematic process for the construction of the *hrcQ* knock-out mutant. The grey and black regions, indicating two flanking fragments of the *hrcQ* gene, were ligated into a suicide vector pKMS1. The *hrcQ* gene was knocked out after two homologous crossover events occurred. B indicates the restriction enzyme cutting site of *Bgl* Ⅰ. 1-F, 1-R, 2-F and 2-R represent the primer positions for PCR amplification. B, PCR analysis for the *hrcQ* deletion mutant. 1, The wild type RS105; 2, The *hrcQ* mutant; C, Southern blot analysis for the *hrcQ* mutant. The PCR product (the grey region) by 1-F and 1-R primers was used as the probe for Southern blot analysis after the genomic DNAs of the wild-type and the *hrcQ* mutant were digested by *Bgl* Ⅰ. 1, The wild type RS105; 2, The *hrcQ* mutant.

2.3 HrcQ 不通过 T3SS 进行分泌

为了证实 HrcQ 蛋白是否通过 T3SS 进行分泌，将 *hrcQ* 基因与 C-Myc 融合，分别导入野生型和 *hrcV* 突变体中。Western 杂交结果显示，野生型菌株 RS105 及其 *hrcV* 突变体总蛋白中均能检测到 HrcQ 杂交信号（图 4），说明 HrcQ-myc 蛋白能够有效表达。但在野生型和 *hrcV* 突变体的细胞外均不能够检测到 HrcQ-myc 的杂交信号（图 4），说明 HrcQ 不通过 T3SS 进行分泌。

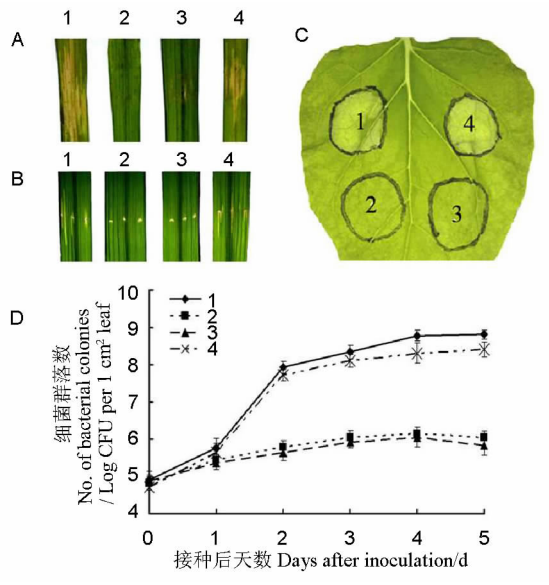


图 2 *hrcQ* 突变体在水稻上的致病性和在烟草上激发过敏性反应的能力

Fig. 2. Pathogenicity in rice and ability to trigger hypersensitive response in tobacco for the *hrcQ* mutant of *X. oryzae* pv. *oryzicola*.

A—注射接菌 IR24 苗期(两周叶龄)水稻叶片(3 d 后观察水渍症状的形成)。B—针刺接种成株期(两个月)水稻(14 d 后测量病斑长度)。C—利用无针头注射器将 3×10^8 CFU/mL 的菌液注射烟草叶片(24 h 后观察过敏性反应)。D—水稻条斑病菌 *hrcQ* 突变体在水稻 IR24 中生长能力的测定。1—野生型菌株 RS105;2—*hrcQ* 突变体 ΔR*hrcQ*;3—*hrcV* 突变体 ΔR*hrcV*;4—*hrcQ* 突变体的功能互补子 CΔR*hrcQ*。

A, Water soaking symptoms in rice seedlings(two-week old) of IR24 by using needleless syringes(observed 3 days after infiltration). B, Lesion lengths in adult rice(two-month old) by leaf-needling method(measured 14 days after inoculation). C, Response of tobacco to *X. oryzae* pv. *oryzicola* strains at 24 h after infiltration of bacteria at 3×10^8 CFU/mL into tobacco leaves with needleless syringes. D, The growth ability of the *hrcQ* mutant of *X. oryzae* pv. *oryzicola* in rice IR24. 1, The wild type RS105; 2, The *hrcQ* mutant ΔR*hrcQ*; 3, The *hrcV* mutant ΔR*hrcV*; 4, The complemented strain of the *hrcQ* mutant with *hrcQ* gene.

2.4 HrcQ 对水稻条斑病菌 T3SS 形成和 T3SS 效应分子的分泌具有重要影响

为了分析 HrcQ 与其他 26 个 Hrp 蛋白的互作关系从而明确 HrcQ 在分泌 T3SS 效应蛋白方面的作用,利用酵母双杂交系统(Y2H)对 HrcQ 与其他 26 个 Hrp 蛋白的互作关系进行了分析。结果显示,HrcQ 蛋白能够与 Hpa1、HrpB2、HrpB5 和 HrcN 呈互作关系(图 5)。这提示,HrcQ 在形成 T3SS 系统时可能需要这些因子的参与,或者HrcQ对这些因子的 T3SS 分泌性有影响。为了证实此点,我们对 Hpa1 和 HrpB2 进行 *myc* 标记,Western 杂交结果显示,野生型 RS105、*hrcQ* 突变体和 *hrcV* 突变体总蛋白中均能检测到 Myc 的杂交信号(图 6),在野生型的上清液中能够检测到 Myc 的杂交信号,但在 *hrcQ* 突变体和 *hrcV* 突变体的上清液中均不能够检测到 Myc 的杂交信号(图 6)。这说明,HrcQ 和 HrcV 一样,是 T3SS 的重要组分,它们突变后因 T3SS 不能形成而导致 Hpa1 和 HrpB2 不分泌。

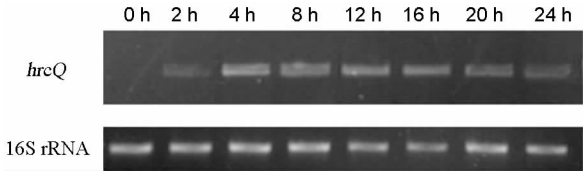


图 3 水稻条斑病菌 *hrcQ* 基因受水稻悬浮细胞诱导表达

Fig. 3. The *hrcQ* expression of *X. oryzae* pv. *oryzicola* being induced when the pathogen interacted with rice suspension cells.

野生型菌株 RS105 与水稻悬浮细胞互作 0、2、4、8、12、16、20 和 24 h 后,提取细菌的总 RNA,通过 RT-PCR 进行检测,16S rRNA 基因作为内参。

The wild-type strain RS105 was grown in rice suspension cells for 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h, respectively, and then the RNAs of the pathogen were extracted as the templates for RT-PCR. The 16S rRNA gene was used as constitutive control.

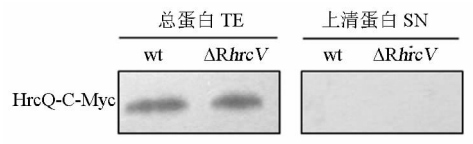


图 4 水稻条斑病菌 HrcQ 蛋白不通过 T3SS 分泌

Fig. 4. HrcQ of *X. oryzae* pv. *oryzicola* was not secreted through T3SS.

携带 *hrcQ*::*myc* 融合基因的野生型菌株 RS105 和 *hrcV* 突变体在 *hrp* 诱导培养基 XOM3 中诱导 16 h,细菌的总蛋白和上清蛋白用 C-Myc 抗体进行免疫杂交。

HrcQ secretion through T3SS was detected by immunoblotting. The wild-type RS105(wt) and the *hrcV* mutant ΔR*hrcV* carrying the fusion of *hrcQ*::*myc* were incubated in *hrp*-inducing medium XOM3 for 16 h. Total proteins (TE) and supernatant proteins (SN) of the bacteria were detected by Western blot using Myc antibody as the probe.

3 讨论

水稻条斑病菌 *hrcQ* 基因是 *hrp* 基因簇 *hrpD* 操纵单元第一个基因,在动植物病原细菌中高度保

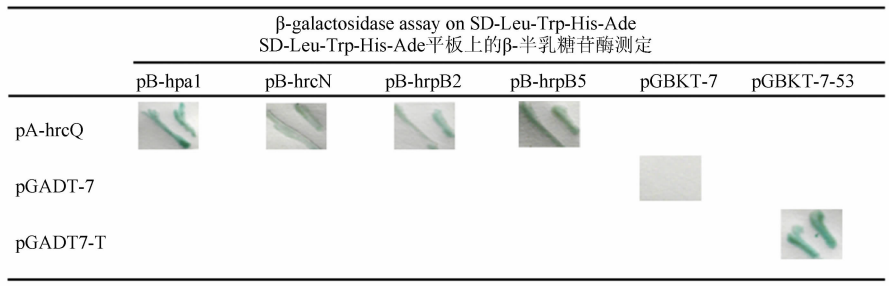


图 5 酵母双杂交分析水稻条斑病菌 HrcQ 蛋白与其他 Hrp 蛋白的互作

Fig. 5. Protein-protein interaction analysis of HrcQ with other Hrp proteins of *X. oryzae* pv. *oryzicola* revealed by yeast two-hybrid system.

生长在营养缺陷培养基上的酵母细胞显示 HrcQ 蛋白能够与 HrcN、Hpa1、HrpB5 以及 HrpB2 呈阳性互作，同时通过 β-半乳糖苷酶检测进行确认。

The positive interactions of HrcQ with HrcN, Hpa1, HrpB5, and HrpB2 was shown in yeast AH109 on SD/-Leu/-Trp/-His plates and confirmed by β-galactosidase assay.

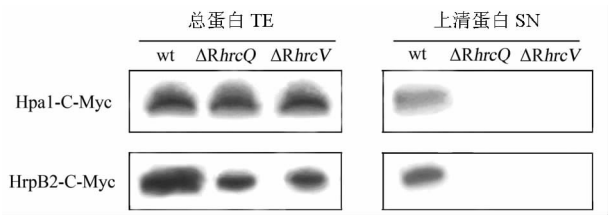


图 6 水稻条斑病菌的 *hrcQ* 基因突变对 Hpa1 和 HrpB2 蛋白分泌的影响

Fig. 6. Inhibition of the mutation in *hrcQ* gene on the secretion of Hpa1 and HrpB2 of *X. oryzae* pv. *oryzicola*.

携带 *hpa1-C-myc* 和 *hrpB2-C-myc* 融合基因的野生型菌株 RS105、*hrcV* 突变体以及 *hrcQ* 突变体在 *hrp* 诱导培养基 XOM3 中诱导 16 h，细菌的总蛋白(TE)和上清蛋白(SN)用 Myc 抗体进行免疫杂交。

The wild-type (wt) strain RS105, the *hrcQ* mutant ΔR*hrcQ* and the *hrcV* mutant ΔR*hrcQ*, carrying the *hpa1-C-myc* and *hrpB2-C-myc* fused gene, were incubated in an *hrp*-inducing medium XOM3 for 16 h. Total proteins (TE) and supernatant proteins (SN) of the strains were analyzed by immunoblotting using C-Myc antibody.

守，被认为是 T3SS 的核心组分[14]。本研究使水稻条斑病菌 *hrcQ* 基因发生突变，该突变体在水稻上丧失了致病性，不能在水稻苗期叶上形成典型的水渍症状和在成株期水稻上产生典型的条斑症状，同时也丧失了在非寄主烟草上产生过敏性反应的能力。分泌性检测发现，HrcQ 蛋白自身没有分泌性。蛋白质-蛋白质互作研究揭示，HrcQ 与 Hpa1、HrpB2、HrcN 和 HrpB5 等相互作用。如同 *hrcV* 基因一样，*hrcQ* 基因突变，Hpa1 和 HrpB2 蛋白的分泌性受到影响。这表明，HrcQ 是 T3SS 的重要组分。这提示 *hrcQ* 基因决定水稻条斑病菌在水稻上的致病性和在非寄主植物上的过敏性反应是通过 T3SS 的形成和影响 T3SS 效应分子的分泌而造成的。

水稻条斑病菌 *hrcQ* 基因，如同其他 *hrp* 基因一样，是受诱导表达的[15]，且这种诱导表达在病菌-水稻互作的早期发生，后期 *hrcQ* 基因的表达水平减弱。这表明 T3SS 效应分子通过 T3SS 系统分泌、识别和作用于植物，是病程的早期事件，这与其他动植物病原细菌的研究结果一致[16-19]。

有证据显示，HrcQ 是可溶性蛋白，不具有膜结合特性[5-6]。在部分动植物病原细菌中，HrcQ 的部分同源物与 T3SS 的 C 环结构形成有关[9-10]。而在水稻条斑病菌中，我们还不清楚 HrcQ 在形成 T3SS 系统时是位于细菌细胞的何种位置。本研究中证实，HrcQ 与 Hpa1、HrcN、HrpB5 和 HrpB2 间存在相互作用，这并未在其他植物病原细菌中发现。由于 HrcQ 可与 Hpa1、HrpB2、HrpB5 和 HrcN 互作，不与其他 Hrp 蛋白互作，而 Hpa1 和 HrpB2 蛋白被证实是 T3SS 效应分子[20]，我们推测，HrcQ 在形成 T3SS 系统时需要 HrpB5 蛋白的参与并需要 HrcN 提供能量，Hpa1 和 HrpB2 需要借助与 HrcQ 的互作才能被 T3SS 系统分泌进入寄主细胞中。虽然这仍需要进一步的证据进行证实，但这无疑对于进一步分析植物病原细菌，特别是水稻条斑病菌的 T3SS 形成和分泌机制以及与水稻的互作机理提供了科学线索。

参考文献：

[1] 郭亚辉，许志刚，胡白石，等. 中国南方水稻条斑病菌小种分

化研究. 中国水稻科学, 2004, 18(1): 83-85.

[2] Nino-Liu D O, Ronald P C, Bogdanove A J. *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. *Mol Plant Pathol*, 2006, 7: 303-324.

[3] Buttner D, Bonas U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *Fems Microbiol Rev*, 2010, 34: 107-133.

[4] Zou L F, Wang X P, 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. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 6212-6224.

[5] Alegria M C, Docena C, Khater L, et al. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type Ⅲ secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*. *J Bacteriol*, 2004, 186: 6186-6197.

[6] Rossier O, van den Ackerveken G, Bonas U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type Ⅲ-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiol*, 2000, 38: 828-838.

[7] Pozidis C, Chalkiadaki A, Gomez-Serrano A, et al. Type Ⅲ protein translocase-HrcN is a peripheral membrane ATPase that is activated by oligomerization. *J Biol Chem*, 2003, 278: 25816-25824.

[8] Muller S A, Pozidis C, Stone R, et al. Double hexameric ring assembly of the type Ⅲ protein translocase ATPase HrcN. *Mol Microbiol*, 2006, 61: 119-125.

[9] Fadouloglou V E, Tampakaki A P, Glykos N M, et al. Structure of HrcQB-C, a conserved component of the bacterial type Ⅲ secretion systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 70-75.

[10] Morita-Ishihara T, Ogawa M, Sagara H, et al. Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type Ⅲ secretion machinery. *J Biol Chem*, 2006, 281(1): 599-607.

[11] 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, 2007, 47(3): 396-401.

[12] Hopkins C M, White F F, Choi S H, et al. Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 1992, 5: 451-459.

[13] De Feyter R, Kado C I, Gabriel D W. Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. *Gene*, 1990, 88: 65-72.

[14] Oku T, Tanaka K, Iwamoto M, et al. Structural conservation of the *hrp* gene cluster in *Xanthomons oryzae* pv. *oryzae*. *J Gen Plant Pathol*, 2004, 70: 159-167.

[15] Tsuge S, Furutani A, Fukunaka R, et al. Expression of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae hrp* genes in XOM2, a novel synthetic medium. *J Gen Plant Pathol*, 2002, 68: 363-371.

[16] Wang L H, He Y W, Gao Y F, et al. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol*, 2004, 51: 903-912.

[17] He Y W, Xu M, Lin K, et al. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol Microbiol*, 2006, 59: 610-622.

[18] Dow J M, Crossman L, Findlay K, et al. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 10995-11000.

[19] Fouhy Y, Lucey J F, Ryan R P, et al. Cell-cell signaling, cyclic di-GMP turnover and regulation of virulence in *Xanthomonas campestris*. *Res Microbiol*, 2006, 157: 899-904.

[20] Dow M, McCarthy Y, O'Donovan K, et al. Cyclic di-GMP as a second messenger linking cell-cell signalling to biofilm formation in the plant pathogen *Xanthomonas campestris*. *FEBS J*, 2009, 276: 73-73.

[21] Furutani A, Tsuge S, Oku T, et al. Hpa1 secretion via type Ⅲ secretion system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Gen Plant Pathol*, 2003, 69: 271-275.