

# HrcJ 参与了III型分泌装置的形成从而决定条斑病菌在非寄主上的过敏反应和在水稻上的致病性

赵文祥<sup>1</sup>, 韩阳春<sup>1</sup>, 崔一平<sup>1</sup>, 赵梅勤<sup>1</sup>, 李玉蓉<sup>1</sup>, 邹丽芳<sup>2</sup>, 陈功友<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学植物保护学院/农业部病虫害监测与治理重点开放实验室, 南京 210095; <sup>2</sup>上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

**摘要:**【目的】水稻条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xooc*) 的 *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) 基因编码形成的III型分泌系统 (type III secretion system, T3SS), 将致病性效应分子注入水稻细胞中, 但 *Xooc* 的 *hrcJ* 基因在致病性中的作用以及其如何参与形成 T3SS 分泌装置, 并不明确。【方法】本研究根据标记交换原理对 *Xooc* 的 *hrcJ* 基因进行了敲除。【结果】发现 *hrcJ* 突变体丧失在水稻上的致病性和在烟草上的 HR 激发能力。酵母双杂交显示, HrcJ 蛋白 N 端脂蛋白结构域可与 HrcC 互作, HrcJ 蛋白 C 端跨膜结构域可与 HrcV 互作, 提示 HrcJ 蛋白联接于 T3SS 装置的内膜和外膜之间。功能互补结果显示, 缺失脂蛋白结构域和跨膜结构域的 *hrcJ* 基因均不能恢复 *hrcJ* 突变体在烟草上的 HR 激发能力和在水稻上的致病性。RT-PCR 结果显示, *hrcJ* 的表达受 *hrpX* 基因调控, *hrcJ* 基因突变后不影响效应分子 *hpaI* 的表达。【结论】*hrcJ* 基因是水稻条斑病菌致病性和非寄主上激发 HR 的关键因子, 其基因产物参与了 T3SS 装置的形成。

**关键词:** 水稻条斑病菌; *hrcJ*; III型分泌系统; 致病性; 过敏反应

## HrcJ is Involved in Type-III Apparatus Formation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* for Hypersensitive Response in Nonhost Tobacco and Pathogenicity in Rice

ZHAO Wen-xiang<sup>1</sup>, HAN Yang-chun<sup>1</sup>, CUI Yi-ping<sup>1</sup>, ZHAO Mei-qin<sup>1</sup>, LI Yu-rong<sup>1</sup>,  
ZOU Li-fang<sup>2</sup>, CHEN Gong-you<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory for Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095; <sup>2</sup>Department of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

**Abstract:** 【Objective】Repertoires of pathogenicity effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* are injected into plant cells through type-III secretion system (T3SS) which is encoded by the *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) genes, but it is unclear what roles the *hrcJ* gene plays in pathogen pathogenesis in rice and in T3SS formation. 【Method】In this report, the *hrcJ* gene was knocked out by marker exchange method. 【Result】It was found that the mutant had lost the ability to trigger HR in tobacco and pathogenicity in rice. Protein-protein interactions, revealed by yeast two-hybrid system, demonstrated that the lipoprotein domain at N-terminal of HrcJ interacted with HrcC and the transmembrane domain at C-terminal interacted with HrcV, indicating that HrcJ was a linker protein between the inner and out membranes of the pathogen cell for T3SS formation. Complementation assays in planta showed that either the deletion in the lipoprotein domain or in the transmembrane domain did not restore HR induction in tobacco and pathogenicity in rice to the *hrcJ* mutant. The reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) revealed that the *hrcJ* gene expression was regulated by the *hrpX* gene and the expression of the effector gene *hpaI* was not affected in the *hrcJ* mutant. 【Conclusion】These results suggest that the *hrcJ* gene is required not only for HR induction in

收稿日期: 2009-05-04; 接受日期: 2009-06-08

基金项目: 国家“863”计划 (2006AA10A210)、国家自然科学基金项目 (30710103902, 30671354)、教育部重点项目 (106093)、农业部公益行业专项 (NYHYZX07-056)

作者简介: 赵文祥, 硕士研究生。E-mail: iamwenxiang@gmail.com。通信作者陈功友, 教授。Tel: 021-34205873; E-mail: gyouchen@njau.edu.cn

tobacco and pathogenicity in rice, but also in T3SS formation through which pathogenicity determinants are secreted into plant cells.

**Key words:** *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*; *hrcJ*; type-III secretion system; pathogenicity; hypersensitive response

## 0 引言

【研究意义】革兰氏阴性植物病原细菌在非寄主和抗性寄主上引起的过敏反应 (hypersensitive response) 及寄主植物上的致病性 (pathogenicity) 是由其 *hrp* 基因簇决定的<sup>[1-2]</sup>。致病性效应分子通过 *hrp* 基因簇编码的 III 型分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 分泌转运进入寄主细胞内, 干扰寄主植物的正常代谢途径和抑制寄主的先天免疫反应, 从而有利于病菌自身的定殖和生长<sup>[3-6]</sup>。【前人研究进展】*Xooc* 的 *hrp* 基因簇由核心 *hrp* 基因簇和 *hrp* 调节基因簇组成, 核心 *hrp* 基因簇由 27 个 *hrp* 基因构成, 其中包括 9 个 *hrc* (*hrp*-conserved)、10 个 *hrp* 和 8 个 *hpa* (*hrp*-associated) 基因<sup>[7]</sup>。根据动植物病原细菌组成 T3SS 装置组分结构上的保守性推测, HrcV 蛋白与 HrcT、HrcR、HrcS 形成复合体, 位于细菌的内膜, HrcC 蛋白位于细菌的外膜<sup>[8-10]</sup>。效应分子通过 T3SS 装置分泌至联接于 HrcC 并延伸进入寄主细胞壁的 Hrp pilus 顶端<sup>[11-12]</sup>, 再由结合于寄主细胞膜上形成转位装置 (translocator) 的 HrpF 转位进入寄主细胞中<sup>[13-14]</sup>。丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae pv. syringae*) 的相关研究结果显示, HrcJ 蛋白位于细菌的内外膜之间<sup>[15-16]</sup>, 【本研究切入点】但植物病原细菌 HrcJ 蛋白是如何与 T3SS 组分相互作用并在致病性中起作用的, 还不明确。水稻细菌性条斑病由稻黄单胞菌稻生致病变种 (*Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*, *Xooc*) 引起, 近年来在中国南方稻区发生重于白叶枯病, 现已成为水稻上第 4 大病害<sup>[17-18]</sup>。【拟解决的关键问题】为明确 *Xooc* 的 *hrcJ* 基因在致病性中的作用和是否参与 T3SS 装置的形成, 本研究通过基因敲除方式, 缺失了 *Xooc* 中的 *hrcJ* 基因, 发现 *hrcJ* 突变体在水稻上丧失致病性和在烟草上丧失激发 HR 的能力。利用酵母双杂交系统, 揭示了 HrcJ 蛋白 N 端脂蛋白结构域是与 HrcC 蛋白互作所需的; HrcJ 蛋白 C 端跨膜结构域是与 HrcV 互作所需的。这为进一步揭示 *Xooc* T3SS 装置的形成以及在病菌致病性中的作用提供了科学线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和植物材料

本研究所用的质粒和菌株见表 1。水稻条斑病菌生长于 NA 固体和 NB 液体培养基中, 置于 28℃ 下培养; 大肠杆菌 (*Escherich coli*) 于 LB 培养基中, 置于 37℃ 下培养。培养基中相应抗生素浓度为: 氨苄青霉素 (Ap) 100 μg·mL<sup>-1</sup>, 卡那霉素 (Km) 25 μg·mL<sup>-1</sup>, 利福平 (Rif) 100 μg·mL<sup>-1</sup>。烟草品种为 *Nicotiana tabacum* L.cv. *Xanthi*, 水稻 (*Oryza sativa*) 为感病品种 IR24, 南京农业大学分子植物病理学实验室保存, 种植于南京农业大学温室。

### 1.2 主要试剂、PCR 引物设计与合成

*Xooc* 各供试菌株基因组 DNA 提取试剂盒购于 Axygen 公司, 总 RNA 提取试剂盒购于 Roche 公司, 反转录试剂购于 TaKaRa 公司。连接所用 pMD18-T 载体、连接酶、限制性内切酶、*Ex-Taq* 酶和 DNA marker 均购于 TaKaRa 公司。Southern blot 所用 DIG 试剂盒购于 Roche 公司。测序由 Invitrogen 公司完成。冷冻离心机、PCR 仪和分光光度计购于 Eppendorf 公司。凝胶成像系统购于 Bio-Rad 公司。

本研究所用引物是根据 *Xooc* 的 *hrp* 基因簇序列 (GenBank AY875714) 设计的<sup>[7]</sup>, 由金思特科技 (南京) 公司合成, 见表 2。

### 1.3 *hrcJ* 突变体的构建

分别以 *hrcJ1*-F 和 *hrcJ1*-R 以及 *hrcJ2*-F 和 *hrcJ2*-R 2 对引物从 p6*hrp* 质粒<sup>[7]</sup>中扩增得到 *Bam*H I -*Xba* I 和 *Xba* I -*Sal*I 2 个 DNA 片段, 大小分别为 220 bp 和 630 bp。2 个 DNA 片段分别进行酶切和纯化后, 通过 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接, 以 *hrcJ1*-F 和 *hrcJ2*-R 为引物, 以连接混合物为模板, PCR 扩增得到缺失 *hrcJ* 基因 765 bp 的融合片段, 经 *Bam*H I 和 *Sal*I 酶切纯化后克隆到 pKMS1 载体中, 得到重组载体 pKMSΔ*hrcJ* (表 1)。质粒 DNA 纯化后电转入 RS105 的感受态细胞中, 方法见文献<sup>[19]</sup>, 涂板于不含蔗糖的 NA 固体培养基上进行第一次交换, 单交换子长出后于无蔗糖的 NB 液体中进行培养, 取少许涂板于含 10% 蔗糖的 NA 平板上, 长出的双交换子进行 PCR 和 Southern 杂交验证。Southern 杂交分析参照 Roche 的 DIG 试剂盒手册。

### 1.4 *hrcJ* 基因缺失片段的构建

利用 Smart 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析 HrcJ 蛋白的结构域。根据结构域, 以质粒 p6*hrp* 为模板, 以表 2 中的引物扩增对应 HrcJ 蛋白结构域的

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| 菌株或质粒<br>Strains or plasmids          | 特性<br>Properties                                                                                                                                                                                                        | 来源<br>Source   |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <i>Yeast</i>                          |                                                                                                                                                                                                                         |                |
| AH109                                 | MATa, <i>trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, His3-200, gal4A, gal80A, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-His3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> | Clonetech      |
| <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> |                                                                                                                                                                                                                         |                |
| RS105                                 | 利福平 <sup>r</sup> , 野生型, 中国 2 号小种 Rif <sup>r</sup> , wild type, Chinese race 2                                                                                                                                           | 本实验室 This lab  |
| ΔRhrpX                                | 利福平 <sup>r</sup> , RS105 的 <i>hrpX</i> 基因敲除突变体 Rif <sup>r</sup> , the <i>hrpX</i> knock-out mutant, derivative of RS105                                                                                                 | 本实验室 This lab  |
| ΔRhrcJ                                | 利福平 <sup>r</sup> , RS105 的 <i>hrcJ</i> 基因敲除突变体 Rif <sup>r</sup> , the <i>hrcJ</i> knock-out mutant, derivative of RS105                                                                                                 | 本研究 This study |
| CRhrcJ-A                              | ΔRhrcJ 的 pUhrCJ-A 接合子 ΔRhrcJ with plasmid of pUhrCJ-A                                                                                                                                                                   | 本研究 This study |
| CRhrcJ-B                              | ΔRhrcJ 的 pUhrCJ-B 接合子 ΔRhrcJ with plasmid of pUhrCJ-B                                                                                                                                                                   | 本研究 This study |
| CRhrcJ-C                              | ΔRhrcJ 的 pUhrCJ-C 接合子 ΔRhrcJ with plasmid of pUhrCJ-C                                                                                                                                                                   | 本研究 This study |
| CRhrcJ-D                              | ΔRhrcJ 的 pUhrCJ-D 接合子 ΔRhrcJ with plasmid of pUhrCJ-D                                                                                                                                                                   | 本研究 This study |
| CRhrcJ-E                              | ΔRhrcJ 的 pUhrCJ-E 接合子 ΔRhrcJ with plasmid of pUhrCJ-E                                                                                                                                                                   | 本研究 This study |
| CRpUFR034                             | ΔRhrcJ 的 pUFR034 接合子 ΔRhrcJ with plasmid of pUFR034                                                                                                                                                                     | 本研究 This study |
| <i>E. coli</i>                        |                                                                                                                                                                                                                         |                |
| DH5α                                  | φ901ac ZΔm15, recA1                                                                                                                                                                                                     | Invitrogen     |
| Plasmids                              |                                                                                                                                                                                                                         |                |
| pMD 18-T                              | Ap <sup>r</sup> , pUC18 derivative, TA cloning vector, 2 692 bp                                                                                                                                                         | TaKaRa         |
| pUFR034                               | Km <sup>r</sup> , <i>IncW, Mob+</i> , <i>LacZa</i> <sup>+</sup> , clone vector, 8.7 kb                                                                                                                                  | 本实验室 This lab  |
| p6hrp                                 | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ</i> 的 <i>hrp</i> 基因簇构建到 pUFR034 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , the core <i>hrp</i> cluster including <i>hrcJ</i> gene ligated into pUFR034                                                    | 文献[7] Ref [7]  |
| pKSM1                                 | Km <sup>r</sup> , <i>sacB+</i> , <i>mob, oriV</i> , derivative from pK18mobGII, 6.4 kb                                                                                                                                  | 本实验室 This lab  |
| pKMSΔ <i>hrcJ</i>                     | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 构建到 pKMS1 上用于敲除 <i>hrcJ</i> 基因的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 850 bp fused fragment with a 765 bp deletion in the <i>hrcJ</i> gene ligated into pKSM1                                                    | 本研究 This study |
| pGADT-7                               | Ap <sup>r</sup> , <i>GAL4</i> <sub>(768-881)</sub> AD, <i>LEU2</i> , HA epitope tag, 8.0 kb                                                                                                                             | Clonetech      |
| pGBKT-7                               | Km <sup>r</sup> , <i>GAL4</i> <sub>(1-147)</sub> DNA-BD, <i>TRP1</i> , c-Myc epitope tag, 7.3 kb                                                                                                                        | Clonetech      |
| pGADT7-T                              | Ap <sup>r</sup> , SV40 large T-antigen <sub>(84-708)</sub> in pGADT7, <i>LEU2</i> , 10.0 kb                                                                                                                             | Clonetech      |
| pGBKT7-53                             | Km <sup>r</sup> , murine p53 <sub>(72-390)</sub> in pGBKT7, <i>TRP1</i> , 8.3 kb                                                                                                                                        | Clonetech      |
| pGBKT7-Lam                            | Km <sup>r</sup> , Human lamin C <sub>(66-230)</sub> in pGBKT7, <i>TRP1</i> , 7.9 kb                                                                                                                                     | Clonetech      |
| pA-hrcC                               | 氨基青霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcC</i> 的 1 824 bp 片段利用 <i>NdeI</i> 和 <i>EcoRI</i> 构建到 pGADT-7 上的质粒<br>Ap <sup>r</sup> , a 1 824 bp <i>hrcC</i> ligated in pGADT-7 at the sites of <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i>             | 本实验室 This lab  |
| pA-hrcV                               | 氨基青霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcV</i> 的 1 938 bp 片段利用 <i>NdeI</i> 和 <i>EcoRI</i> 构建到 pGADT-7 上的质粒<br>Ap <sup>r</sup> , a 1 938 bp <i>hrcV</i> ligated in pGADT-7 at the sites of <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i>             | 本实验室 This lab  |
| pB-hrcJ-A                             | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ-A</i> 的 765 bp 片段构建到 pGBKT-7 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 765 bp fragment including <i>hrcJ-A</i> ligated into pGBKT-7                                                                    | 本研究 This study |
| pB-hrcJ-B                             | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ-B</i> 的 175 bp 片段构建到 pGBKT-7 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 175 bp fragment including <i>hrcJ-B</i> ligated into pGBKT-7                                                                    | 本研究 This study |
| pB-hrcJ-C                             | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ-C</i> 的 738 bp 片段构建到 pGBKT-7 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 738 bp fragment including <i>hrcJ-C</i> ligated into pGBKT-7                                                                    | 本研究 This study |
| pB-hrcJ-D                             | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ-D</i> 的 741 bp 片段构建到 pGBKT-7 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 741 bp fragment including <i>hrcJ-D</i> ligated into pGBKT-7                                                                    | 本研究 This study |
| pB-hrcJ-E                             | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ-E</i> 的 851 bp 片段构建到 pGBKT-7 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 851 bp fragment including <i>hrcJ-E</i> ligated into pGBKT-7                                                                    | 本研究 This study |
| pUhrCJ-A                              | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ-A</i> 的 765 bp 片段构建到 pUFR034 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 765 bp fragment including <i>hrcJ-A</i> ligated into pUFR034                                                                    | 本研究 This study |
| pUhrCJ-B                              | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ-B</i> 的 175 bp 片段构建到 pUFR034 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 175 bp fragment including <i>hrcJ-B</i> ligated into pUFR034                                                                    | 本研究 This study |
| pUhrCJ-C                              | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ-C</i> 的 738 bp 片段构建到 pUFR034 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 738 bp fragment including <i>hrcJ-C</i> ligated into pUFR034                                                                    | 本研究 This study |
| pUhrCJ-D                              | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ-D</i> 的 741 bp 片段构建到 pUFR034 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 741 bp fragment including <i>hrcJ-D</i> ligated into pUFR034                                                                    | 本研究 This study |
| pUhrCJ-E                              | 卡那霉素 <sup>r</sup> , 含有 <i>hrcJ-E</i> 的 851 bp 片段构建到 pUFR034 上的质粒<br>Km <sup>r</sup> , a 851 bp fragment including <i>hrcJ-E</i> ligated into pUFR034                                                                    | 本研究 This study |

表 2 本研究所用引物和 PCR 条件

Table 2 Primers and PCR amplification conditions used in this study

| 引物<br>Primers     | 序列 (下划线示酶切位点)<br>Sequence 5'→3' (restriction sites underlined) | 内切酶<br>Enzyme sites | 产物大小<br>PCR product<br>(bp) | 退火温度<br>Annealing<br>temperature (°C) | 延伸时间<br>Extention time<br>(s) |
|-------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| <i>hpa1</i> -F    | ATGAATCTTTGAACACACAATTCG                                       |                     | 415                         | 52                                    | 45                            |
| <i>hpa1</i> -R    | TTACTGCATCGATCCGCTGTCGTTC                                      |                     |                             |                                       |                               |
| <i>hrcJ</i> -F    | ATGCGCGCGCTGAGATACCTGGTGG                                      |                     | 480                         | 52                                    | 45                            |
| <i>hrcJ</i> -R    | ACCATGCTGGTCAGATCGCTACCGA                                      |                     |                             |                                       |                               |
| <i>hrcJ1</i> -F   | AATGGATCCCAGTGCAGACGGCGATA                                     | <i>Bam</i> HI       | 220                         | 51                                    | 50                            |
| <i>hrcJ1</i> -R   | TATCTAGAGTGTGGATGGACAACCACG                                    | <i>Xba</i> I        |                             |                                       |                               |
| <i>hrcJ2</i> -F   | AATCTAGAGCTACTGGTTCTTACCAGCGTCTG                               | <i>Xba</i> I        | 630                         | 55                                    | 45                            |
| <i>hrcJ2</i> -R   | TAAGTCGACGCCTGCTGTCTGTTTCGGGATG                                | <i>Sal</i> I        |                             |                                       |                               |
| <i>hrcJ-A</i> -F  | TAACATATGATGCGCGCGCTGAGATACCTGGT                               | <i>Nde</i> I        | 765                         | 58                                    | 50                            |
| <i>hrcJ-A</i> -R  | TATGAATTCACCCGGCTTTGCCTTTCGTCG                                 | <i>Eco</i> RI       |                             |                                       |                               |
| <i>hrcJ-B</i> -F  | ATACATATGATGTTGGCCGCATCGGCACCGCC                               | <i>Nde</i> I        | 174                         | 58                                    | 15                            |
| <i>hrcJ-B</i> -R  | ATTGAATTCACCCGGCTTTGCCTTTCGTCG                                 | <i>Eco</i> RI       |                             |                                       |                               |
| <i>hrcJ-C1</i> -F | TAACATATGATGCGCGCGCTGAGATACCTGGT                               | <i>Nde</i> I        | 594                         | 58                                    | 40                            |
| <i>hrcJ-C1</i> -R | AATACTAGTCAACTGCGCATCGCTCTCCGCTC                               | <i>Spe</i> I        |                             |                                       |                               |
| <i>hrcJ-C2</i> -F | TAAACTAGTCCGTGGCCGTGGTTGGTCGGGTG                               | <i>Spe</i> I        | 144                         | 58                                    | 15                            |
| <i>hrcJ-C2</i> -R | TTAGAAATTCACCCGGCTTTGCCTTTCGTCG                                | <i>Eco</i> RI       |                             |                                       |                               |
| <i>hrcJ-D1</i> -F | AATCATATGATGCGCGCGCTGAGATACCTGGT                               | <i>Nde</i> I        | 624                         | 58                                    | 40                            |
| <i>hrcJ-D1</i> -R | TATACTAGTGAAGGTCTCGGCGGTGCCGATG                                | <i>Spe</i> I        |                             |                                       |                               |
| <i>hrcJ-D2</i> -F | ATAACTAGTGTGGTGACGTGTGTTGGCGGG                                 | <i>Spe</i> I        | 75                          | 58                                    | 15                            |
| <i>hrcJ-D2</i> -R | TAAGAAATTCACCCGGCTTTGCCTTTCGTCG                                | <i>Eco</i> RI       |                             |                                       |                               |
| <i>hrcJ-E</i> -F  | ATACATATGATGCGCGCGCTGAGATACCTGGT                               | <i>Nde</i> I        | 693                         | 58                                    | 50                            |
| <i>hrcJ-E</i> -R  | TAAGAAATTCACCAACAATACAGCGCCGACG                                | <i>Eco</i> RI       |                             |                                       |                               |

DNA 片段, 分别为 *hrcJ-A* 和缺失 HrcJ 部分结构域的 *hrcJ-B*、*hrcJ-C*、*hrcJ-D* 和 *hrcJ-E* (图 2-A)。利用 DNA-star 软件分析这些 DNA 片段在载体启动子下的 ORFs, 其中 HrcJ-B 与完整的 HrcJ 蛋白相比, 缺失了 N 端 1—197 位的氨基酸, HrcJ-C 缺失了 199—207 位的氨基酸, HrcJ-D 缺失了 208—230 位的氨基酸, HrcJ-E 缺失了 231—254 位的氨基酸 (图 2-A)。利用 *Nde* I—*Eco* R I 位点分别将 *hrcJ-A*、*hrcJ-B*、*hrcJ-C*、*hrcJ-D* 和 *hrcJ-E* 构建到 pGBKT-7 载体上, 得到相应重组载体 (表 1)。

### 1.5 功能互补

将 *hrcJ-A*、*hrcJ-B*、*hrcJ-C*、*hrcJ-D* 和 *hrcJ-E* 经 *Bam*HI—*Sal*I 酶切后克隆到 pUFR034 载体上, 得到的重组质粒 (表 1) 电转入 *hrcJ* 基因突变体  $\Delta$ RhrcJ 的感受态细胞中, 获得相应的功能互补子 (表 1)。

将这些功能互补子在含有相应抗生素的 NB 培养液中培养至菌体浓度达到  $10^8$  cfu/mL, 利用无针头注射器将菌液注入水稻和烟草。水稻每叶 (14 d 叶龄) 上注射 2 个点, 3 次重复, 3 d 后观察水渍症状; 烟草上的过敏反应在注射后 24 h 之内观察。水稻和烟草生长在温室中, 烟草接种前一天移至室温条件下放置 1 d。为了测定细菌在水稻组织中的生长能力, 用  $0.5\text{ cm}^2$  打孔器取接种点的叶片组织, 经表面消毒后置于 1 mL 的无菌水中捣碎, 菌悬液经适当稀释后取 100  $\mu$ L 涂布在含有相应抗生素的 NA 平板上, 28°C 下培养 3—4 d 后计数菌落形成单位。每处理接种 3 张水稻叶片, 重复 3 次。

### 1.6 酵母双杂交

按照 Clonetech 酵母双杂交操作手册, 将重组质粒 pA-*hrcC*、pA-*hrcC* 分别和 pB-*hrcJ-A*、pB-*hrcJ-B*、

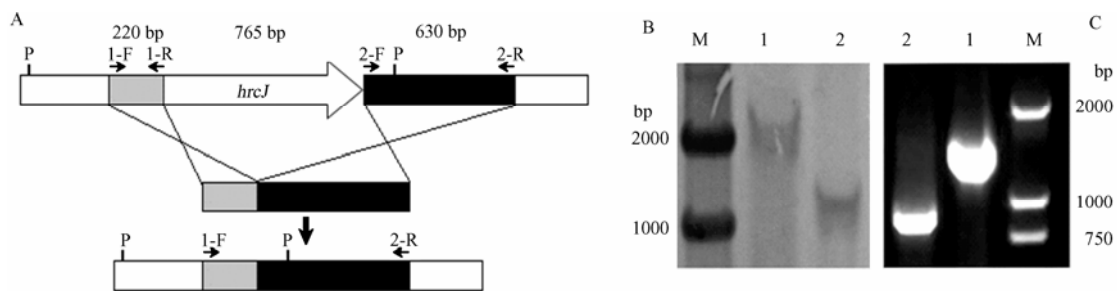
pB-hrcJ-C、pB-hrcJ-D、pB-hrcJ-E 进行两两组合, 同时设置 pGADT7-T 和 pGBKT7-53 作为阳性对照, pGADT7-T 和 pGBKT7-Lam 作为阴性对照, 转化 AH109 酵母菌, 然后涂布于 SD/-Leu/-Trp/-His 平板上, 于 30°C 倒置培养 4 d。挑取阳性克隆在 SD/-Ade/-Leu/-Trp/-His 平板上划线, 30°C 倒置培养 4 d 后, 选取在 SD/-Ade/-Leu/-Trp/-His 培养基上生长的阳性克隆, 进行  $\beta$ -gal 活性检测。酵母菌经 Z buffer/X-gal 处理后, 在 8 h 内显色变蓝, 即为阳性结果。

### 1.7 RT-PCR

*Xooc* 各菌株在 *hrp* 诱导培养基 XOM3<sup>[20]</sup> 中生长 16 h 后收集菌体, 按照 Tripture 操作手册 (Roche 公司) 提取总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测质量, 分光光度计下定量, 按照 Reverse Transcriptase 试剂盒的方法合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 分别利用引物 *hrcJ*-F 和 *hrcJ*-R 以及 *hpa1*-F 和 *hpa1*-R (表 2), PCR 扩增 *hrcJ* 和 *hpa1* 基因。以 16S rRNA 为内参, 确定 cDNA 模板浓度。每 25  $\mu$ L PCR 反应体系中, *Ex-Taq* 1 U, GC buffer 12.5  $\mu$ L, 25 mmol·L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> 2.5  $\mu$ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 2  $\mu$ L, cDNA 1 ng, 引物 (20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 各 1  $\mu$ L, 加灭菌水至 25  $\mu$ L。反应条件: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 50 s, 52°C 退火 45 s, 72°C 延伸 45 s, 35 个循环; 72°C 充分延伸 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 *hrcJ* 基因突变体的构建和分子验证



A: *hrcJ* 基因敲除过程示意图, 1-F 和 1-R 以及 2-F 和 2-R 分别为 *hrcJ* 基因左端臂和右端臂的 PCR 引物位置, *hrcJ* 基因左右 2 个片段与野生型发生同源交换后, *hrcJ* 基因被敲除; B: *hrcJ* 突变体的 Southern 杂交, 检测菌株基因组 DNA 经 *Pst* I 酶切后以 220 bp 的左端臂为探针, 进行 Southern 杂交; C: *hrcJ* 基因敲除后的 PCR 检测。1: 野生型菌株 RS105; 2: *hrcJ* 突变体  $\Delta$ RhrcJ; 1-F: 引物 *hrcJ*-F; 1-R: *hrcJ*-R; 2-F: *hrcJ*-F; 2-R: *hrcJ*-R; P: *Pst* I; M: DNA marker

A: Schematic process for the construction of the *hrcJ* knock-out mutant. The primers of 1-F and 1-R, and 2-F and 2-R indicated where the left and right flanks targeted the *hrcJ* gene. The *hrcJ* gene was knocked out after two homologous crossover events occurred; B: Southern blot for the *hrcJ* mutant. The Southern hybridization was taken with the left flank of *hrcJ* gene as the probe after the genomic DNAs of the wild-type and mutant were digested by *Pst*I; C: PCR analysis for the *hrcJ* mutant. 1: The wild-type strain RS105; 2: The *hrcJ* mutant  $\Delta$ RhrcJ. 1-F: primer *hrcJ*-F; 1-R: *hrcJ*-R; 2-F: *hrcJ*-F; 2-R: *hrcJ*-R; P: *Pst* I; M: DNA marker

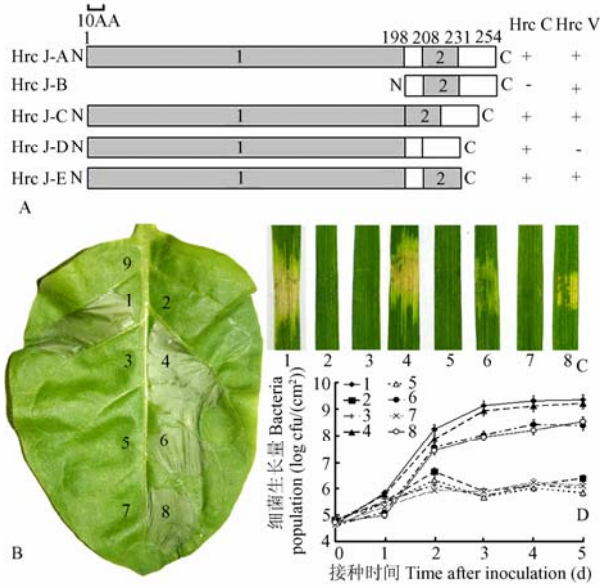
图 1 水稻条斑病菌 *hrcJ* 突变体的构建和分子验证

Fig. 1 Schematic map and molecular analysis of the *hrcJ* mutant of *X. oryzae* pv. *oryzzicola*

将缺失 *hrcJ* 基因 765 bp 的融合片段(左臂 220 bp 和右臂 630 bp) 构建于自杀性载体 pKMSI 上, 获得重组载体 pKMS $\Delta$ *hrcJ*, 将其电转于野生型菌株 RS105 中, 经在含蔗糖和 Km 的对应平板上筛选, 获得了经过 2 次同源交换而缺失 765 bp 的 *hrcJ* 基因缺失突变体  $\Delta$ RhrcJ (图 1-A)。用左端臂的上游引物 (*hrcJ*-F) 和右端臂的下游引物 (*hrcJ*-R) 对野生型和突变体进行 PCR 扩增, 结果显示突变体缺失了 765 bp (图 1-C)。用融合片段 220 bp 的左端臂作探针进行 Southern 杂交, 结果显示, 突变体也缺失了 765 bp (图 1-B)。这说明, 本研究构建获得了正确的 *hrcJ* 基因敲除突变体。

### 2.2 *hrcJ* 基因决定着水稻条斑病菌在水稻上的致病性和在烟草上 HR 激发能力

水稻和烟草上接种结果显示, *hrcJ* 基因突变后, *Xooc* 丧失了在水稻上产生水渍症状的能力 (图 2-C) 和在非寄主烟草上 HR 激发能力 (图 2-B)。水稻病组织中细菌生长能力测定结果显示, 与野生型菌株相比, *hrcJ* 基因突变体在水稻叶片组织中生长能力显著下降 (图 2-D)。用含有 *hrcJ* 基因以及相应的缺失分别互补 *hrcJ* 基因突变体, 结果显示, HrcJ-A 能够恢复 *hrcJ* 基因在水稻上的致病性和在烟草上激发 HR 反应的能力以及在水稻组织中具有与野生型菌株一样的生长能力 (图 2); HrcJ-C 和 HrcJ-E 能恢复 *hrcJ* 基因突变体在烟草上的 HR 反应和部分恢复在水稻上的致病性; 而缺失脂蛋白功能域的 HrcJ-B 和缺失跨膜功能域



A: *hrcJ* 基因缺失构建示意图; B: 水稻条斑病菌在烟草上激发 HR 能力的测定; C: 水稻条斑病菌在苗期水稻上形成水渍症状能力的测定; D: 水稻条斑病菌 *hrcJ* 突变体在水稻组织中生长能力的测定; 1: RS105; 2: Δ*RhrcJ*; 3: CRpUFR034; 4: CR*hrcJ*-A; 5: CR*hrcJ*-B; 6: CR*hrcJ*-C; 7: CR*hrcJ*-D; 8: CR*hrcJ*-E; 9: NB 培养液

图 2 *HrcJ* 突变体的构建和 *hrcJ* 突变体在水稻 IR24 上的致病性以及烟草 Xanthi 上过敏反应的测定

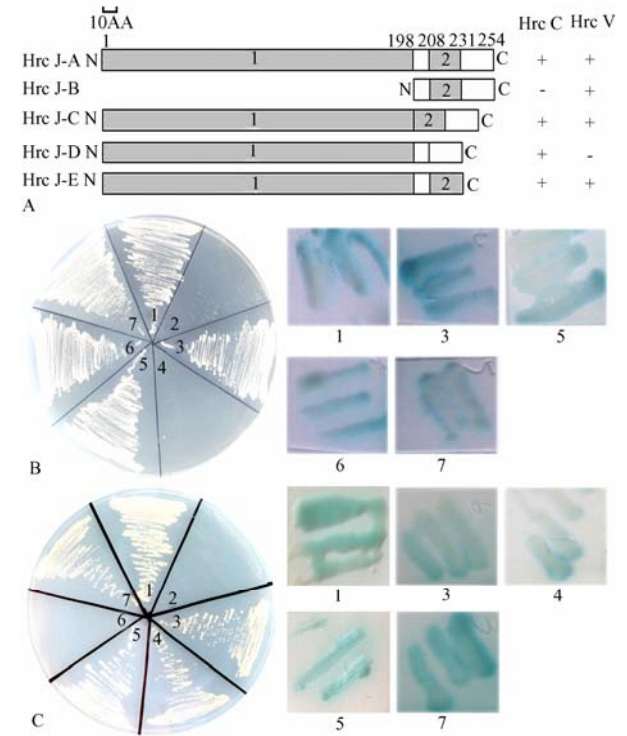
Fig. 2 Schematic map of the constructions of *HrcJ* mutant and pathogenicity tests in rice (IR24) and HR induction in tobacco (Xanthi) triggered by the *hrcJ* mutant

的 *HrcJ*-D 则不能恢复 *hrcJ* 基因在水稻上的致病性和在烟草上激发 HR 反应的能力 (图 2-B, 图 2-C)。这表明, *hrcJ* 基因是水稻条斑病菌在水稻上具有致病性和在烟草上激发 HR 所必需的, 并且 *HrcJ* 的脂蛋白功能域和跨膜结构域是水稻条斑病菌保持这种能力所必需的。

2.3 *HrcJ* 蛋白可与 *HrcC* 和 *HrcV* 蛋白相互作用

根据 Smart 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测, *HrcJ* 蛋白有 2 个结构域, *HrcJ*<sup>1-198</sup> 为脂蛋白结构域和 *HrcJ*<sup>208-231</sup> 为跨膜结构域(图 2-A, 图 3-A)。酵母双杂交和 β-gal 检测结果显示: 野生型 *HrcJ* 蛋白既可与 *HrcC* 蛋白互作, 又可与 *HrcV* 蛋白互作; 相应地, 缺失 N 端脂蛋白功能域 *HrcJ*<sup>1-198</sup> 的 *HrcJ*-B 仅能与 *HrcV* 互作, 而缺失跨膜结构域 *HrcJ*<sup>208-231</sup> 的 *HrcJ*-D 蛋白仅能与 *HrcC* 蛋白互作 (图 3-B, 图 3-C)。这表明:

*HrcJ* 的 N 端脂蛋白功能域是与 *HrcC* 互作所需的, *HrcJ* 的 C 端跨膜结构域是与 *HrcV* 互作所需的。



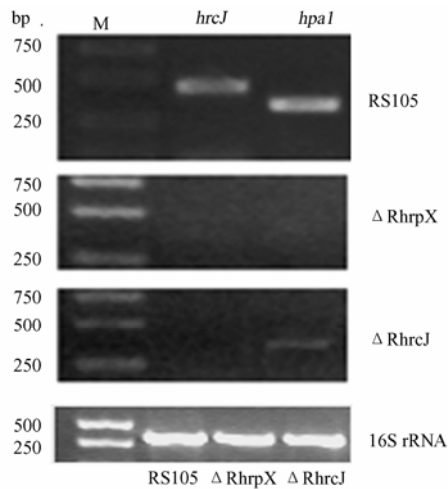
A: *HrcJ* 蛋白与 *HrcC* 和 *HrcV* 互作结果; B: *HrcJ* 与 *HrcC* 的互作及检测; C: *HrcJ* 与 *HrcV* 的互作及检测。1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: pB-*hrcJ*-A; 4: pB-*hrcJ*-B; 5: pB-*hrcJ*-C; 6: pB-*hrcJ*-D; 7: pB-*hrcJ*-E

图 3 酵母双杂交系统测定 *HrcJ* 蛋白与 T3SS 组分蛋白 *HrcC* 和 *HrcV* 的互作以及阳性克隆的 β-gal 检测

Fig. 3 Interaction detection of *HrcJ* protein with the components, *HrcC* and *HrcV*, of type-III secretion system of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by yeast two-hybrid and β-gal assay

2.4 *hpa1* 基因的表达不受 *hrcJ* 基因的影响

为说明 *hrcJ* 基因突变后是否对其它 *hrp* 基因表达产生影响, 笔者将 *hrcJ* 基因突变体 Δ*RhrcJ* 在 *hrp* 诱导培养基上进行诱导, 以野生菌株 RS105 和 *hrpX* 突变体 Δ*RhrpX* 为对照。RT-PCR 结果显示: *hrpX* 基因突变体中 *hrcJ* 和 *hpa1* 基因不表达; *hrcJ* 基因突变中 *hrcJ* 基因未检出, 而 *hpa1* 基因转录表达 (图 4)。这说明, *hrcJ* 基因和 *hpa1* 基因一样, 其表达受 *hrpX* 基因调控, 并且 *hrcJ* 基因突变后, *hpa1* 基因的表达不受影响。



菌株: RS105,  $\Delta$ RhrcJ,  $\Delta$ RhrpX; 内参: 16S rRNA; M: DNA marker  
Strains: RS105,  $\Delta$ RhrcJ,  $\Delta$ RhrpX; Constitutive control: 16S rRNA; M: DNA marker

图4 RT-PCR 检测水稻条斑病菌中 *hrcJ* 和 *hpaI* 基因的表达  
Fig. 4 Expression of the *hrcJ* and *hpaI* genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* examined by RT-PCR

### 3 讨论

*hrcJ* 基因在植物病原细菌中高度保守<sup>[8-10]</sup>。鉴于其与细菌鞭毛装置组分 *fliF* 基因同源, 因此推测其基因产物 HrcJ 是形成 T3SS 装置的组分之一<sup>[21-22]</sup>。水稻条斑病菌 *hrcJ* 基因是 *hrp* 基因簇 *hrpB* 转录单元的第 3 个基因, 与其它植物病原细菌的 *hrcJ* 基因具有高度同源性<sup>[7]</sup>。本研究发现, *hrcJ* 基因突变后, 其在非寄主上 HR 激发能力和在水稻上的致病性完全丧失, 并且 *hrcJ* 基因的表达受 *hrpX* 基因调控, 这说明, *hrcJ* 基因是水稻条斑病菌在非寄主烟草上激发 HR 和在水稻上产生致病性的关键基因之一。这种结果在 *P. syringae* pv. *syringae* 中也有类似报道。

过去认为, HrcJ 蛋白是介于 T3SS 装置中位于细菌内外膜间的一种蛋白<sup>[10,14,23]</sup>, 但没有证据显示 HrcJ 蛋白是如何与 T3SS 装置内膜部分以及与 T3SS 装置外膜部分相联接的。根据结构域预测, 水稻条斑病菌 HrcJ 蛋白 N 端 1—198 部分具有脂蛋白功能, C 端 208—231 部分是一跨膜结构域。本试验的酵母双杂交结果显示, HrcJ<sup>1-198</sup> 蛋白可与 HrcC 蛋白进行相互作用, 含有跨膜结构的 HrcJ 蛋白可与 HrcV 蛋白互作, 提示 HrcJ 蛋白的 N 端与 T3SS 装置的外膜蛋白 HrcC 相联接, HrcJ 的 C 端与 T3SS 装置的内膜蛋白 HrcV 相联接。这一结果第一次明确了 HrcJ 蛋白是如何参与 T3SS

装置的形成。

功能互补研究结果还显示, 完整的 HrcJ 蛋白可以互补 *hrcJ* 基因突变体在烟草上的 HR 激发能力和在水稻上的致病性, 但缺失脂蛋白结构域的 HrcJ 和缺失跨膜结构域的 HrcJ 蛋白均不能互补水稻条斑病菌 *hrcJ* 基因突变体在烟草上的 HR 激发能力和在水稻上的致病性。这说明, HrcJ 蛋白在参与形成 T3SS 装置过程中均需要有脂蛋白结构域和跨膜结构域的参与, 才能保证 T3SS 效应分子的完整分泌, 从而在烟草上激发 HR 和在水稻上具有致病性。在 *P. syringae* pv. *syringae* 中, Deng 和 Huang 等<sup>[23-25]</sup>认为, *hrcJ* 基因突变后影响了 HrpZ 蛋白的分泌从而影响了病菌在烟草上激发 HR 的能力。RT-PCR 结果显示, *hrcJ* 基因突变后, 编码 harpin 蛋白的 *hpaI* 基因仍能够转录表达。由此推测, 水稻条斑病菌 *hrcJ* 基因突变后, T3SS 装置不能有效形成, 影响了 Hpa1 等效应分子的分泌, 从而影响病原菌与植物的互作关系。

### 4 结论

水稻条斑病菌 HrcJ 蛋白以其 N 端脂蛋白部分与 HrcC 蛋白互作和以其 C 端的跨膜结构域部分与 HrcV 蛋白互作, 参与 T3SS 的形成, 从而决定病菌在非寄主上的 HR 和在寄主上的致病性。

### 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. Determinants of pathogenicity in plant pathogenic bacteria. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2002, 32(1): 1-7. (in Chinese)
- [2] 陈功友, 邹丽芳, 王邢平, 向勇, 王金生. 水稻白叶枯病菌致病性分子遗传学基础. 中国农业科学, 2004, 37(9): 1301-1307.  
Chen G Y, Zou L F, Wang X P, Xiang Y, Wang J S. Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(9): 1301-1307. (in Chinese)
- [3] Chang J H, Goel A K, Grant S R, Dangl J L. Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7: 11-18.
- [4] Espinosa A, Alfano J R. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(11): 1027-1040.
- [5] Mudgett M B. New insights to the function of phytopathogenic

- bacterial type III effectors in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, 56: 509-531.
- [6] Navarro L, Alto N M, Dixon J E. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8: 21-27.
- [7] Zou L F, Wang X P, Xiang Y, Zhang B, Li Y R, Xiao Y L, Wang J S, Walmsley A R, Chen G Y. Elucidation of the *hrp* clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 6212-6224.
- [8] Alfano J R, Collmer A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42: 385-414.
- [9] Büttner D, Bonas U. Port of entry - the type III secretion translocation. *Trends in Microbiology*, 2002, 10: 186-192.
- [10] Alegria M C, Docena C, Khater L, Ramos C H, da Silva A C, Farah C S. 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*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186: 6186-6197.
- [11] Weber E, Reuhs T O, Huguet E, Hause G, Romantschuk M, Korhonen T K, Bonas U, Koebnik R. The type III-dependent Hrp Pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187: 2458-2468.
- [12] Weber E, Koebnik R. Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187: 6175-6186.
- [13] Rossier O, Ackerveken G Van den, Bonas U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Molecular Microbiology*, 2000, 38: 828-838.
- [14] Büttner D, Nennstiel D, Klusener B, Bonas U. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184: 2389-2398.
- [15] He S Y. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 1998, 36: 363-392.
- [16] Jin Q L, Thilmony R, Zwiesler-Vollick J, He S Y. Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Microbes and Infection*, 2003, 5: 301-310.
- [17] 梁传永, 李大春, 易建平, 许志刚. 中国水稻条斑病毒力型的研究. 南京农业大学学报, 1994, 17(增刊): 48-52.
- Liang C Y, Li D C, Yi J P, Xu Z G. Studys on virulence type of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* from diseased area in China. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1994, 17 (Suppl.): 48-52. (in Chinese)
- [18] 夏怡厚, 林维英, 陈藕英. 水稻品种系对稻细菌性条斑病的抗性鉴定和抗性筛选. 福建农学院学报, 1992, 21(1): 32-36.
- Xia Y H, Lin W Y, Chen O Y. Resistance-identification and resistant-source screening for rice varieties against bacteria leaf streak. *Journal of Fujian Agriculture College*, 1992, 21(1): 32-36. (in Chinese)
- [19] Choi S H, Leach J E. Genetic manipulation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *International Rice Research Notes*, 1994, 19(2): 31-32.
- [20] 肖友伦, 李玉蓉, 刘之洋, 向 勇, 陈功友. 水稻条斑病菌 *hrp* 基因诱导表达系统的建立. 微生物学报, 2007, 47(3): 396-401.
- Xiao Y L, Li Y R, Liu Z Y, Xiang Y, Chen G Y. Establishment of the *hrp*-inducing systems for the expression of the *hrp* genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(3): 396-401. (in Chinese)
- [21] Kimbrough T G, Miller S I. Contribution of the *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2000, 97: 11008-11013.
- [22] Huang H C, Lin R W, Chang C J, Collmer A, Deng W L. The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpinPss secretion that are arranged colinearly with *Yersinia ysc* homologues. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1995, 8: 733-746.
- [23] Deng W L, Preston G, Collmer A, Chang C J, Huang H C. Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, tomato, and glycinea and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180: 4523-4531.
- [24] Deng W L, Huang H C. Cellular locations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ proteins, required for Harpin secretion via the type III pathway. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 2298-2301.
- [25] Charkowski A O, Huang H C, Collmer A. Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp* mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179: 3866-3874.

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)