

## 水稻白叶枯病菌 EAL 结构域蛋白 VieA<sub>xoo</sub> 基因缺失突变和功能分析

梁士敏<sup>1, 2#</sup>, 杨凤环<sup>2#</sup>, 管文静<sup>2</sup>, 吴茂森<sup>2</sup>, 陈华民<sup>2</sup>, 田芳<sup>2</sup>, 许艳丽<sup>1</sup>, 何晨阳<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150012

<sup>2</sup>中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

**摘要:**【目的】旨在揭示水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 简称 Xoo) 环鸟苷二磷酸 (c-di-GMP) 信号蛋白 VieA<sub>xoo</sub> 的生物学功能。【方法】本研究通过标记置换法对 *vieA<sub>xoo</sub>* 基因 (PXO\_04753) 进行了缺失突变研究, 采用表型测定进行了功能鉴定。【结果】从野生型菌株 PXO99<sup>A</sup> 中克隆的 *vieA<sub>xoo</sub>* 基因序列与其它病原黄单胞菌的同源序列高度保守。VieA<sub>xoo</sub> 具有参与 c-di-GMP 降解的磷酸二酯酶 (PDE) EAL 结构域和磷酸信号识别受体 REC 结构域。与 PXO99<sup>A</sup> 相比,  $\Delta$ *vieA<sub>xoo</sub>* 基因缺失突变体对水稻的致病性、胞外多糖 (EPS) 产生和运动性无明显改变; 但对烟草的致敏性和生物膜形成显著降低; 基因互补可以使之完全恢复。【结论】VieA<sub>xoo</sub> 正向调控了 Xoo 对烟草的致敏性和生物膜形成能力。

**关键词:** 水稻白叶枯病菌, 环鸟苷二磷酸, *vieA<sub>xoo</sub>*, 缺失突变, 功能鉴定

**中图分类号:** Q933    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2011) 01-0029-06

环鸟苷二磷酸 (c-di-GMP) 是一种新型的细胞第二信使, 在许多 G 细菌的毒性、环境适应性、生物膜形成 (BF) 和运动性等方面具有重要的调控作用<sup>[1]</sup>。高浓度 c-di-GMP 通常可以促进 BF, 使细菌趋于静止; 而低浓度可以激发毒性和运动性表达<sup>[2]</sup>。c-di-GMP 代谢受到具有鸟苷酸环化酶 (DGC) 和磷酸二酯酶 (PDE) 活性、含有 GGDEF 和/或 EAL 结构域的蛋白严格控制<sup>[3]</sup>。研究表明, 霍乱弧菌应答调控因子 VieA<sub>vc</sub> 含有 EAL 结构域, 具有 PDE 活性, 调控了 BF 和毒性表达<sup>[4-5]</sup>。在水稻白

叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 简称 Xoo) 基因组测序菌株 PXO99 中, 也发现了 *vieA<sub>vc</sub>* 的同源序列 *vieA<sub>xoo</sub>* (PXO\_04753)<sup>[6]</sup>, 但不清楚其结构和功能特征。

因此, 本研究通过标记置换法, 构建了 *vieA<sub>xoo</sub>* 基因缺失突变体及其互补菌株, 分析了该基因缺失突变对于 Xoo 毒性、BF 和运动性等表型的影响。研究目的在于从 Xoo 中鉴别出 EAL 结构域蛋白基因, 揭示其生物学功能, 为全面阐明 c-di-GMP 代谢调控机理提供科学依据。

**基金项目:** 中央财政国家重点实验室自主研究课题专项 (SKL2009SR03)

\* 通信作者。Tel: +86-10-62894147; E-mail: cyhe@caas.net.cn

**作者简介:** #并列第一作者。杨凤环 (1982-), 女, 河北雄县人, 博士研究生, 研究方向为植物病原微生物分子互作机理, E-mail: fhyang1982@163.com; 梁士敏 (1986-), 男, 黑龙江安达市人, 硕士研究生, 研究方向为植物病原微生物学, E-mail: liangshimin308@126.com

**收稿日期:** 2010-09-06; **修回日期:** 2010-10-24

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株、质粒及培养条件:**本研究供试菌株和质粒的特征和来源列表 1。实验用抗生素浓度为氨苄青霉素 (Ap) 50 mg/L 卡那霉素 (Km) 50 mg/L、庆大霉素 (Gm) 30 mg/L、链霉素 (Sm) 40 mg/L、壮观霉素 (Sp) 40 mg/L。在 28℃ 下先后用 PSA (蛋白胨 10 g/L, 蔗糖 10 g/L, 谷氨酸 1.0 g/L, pH7.0) 和 M210 (酶水解干酪素 8 g/L, 蔗

糖 5 g/L, 酵母提取物 4 g/L,  $K_2HPO_4$  3 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3 g/L, pH7.0) 培养基对 Xoo 菌株 (中国农科院作物科学研究所赵开军博士惠赠) 进行培养。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 在 37℃ 下用 LB 培养。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**Taq DNA 聚合酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA 分子量标准 (TIANGEN 公司); 限制性内切酶和 T4 连接酶 (TaKaRa 大连公司); 逆转录酶试剂盒 (Invitrogen 公司); IQ SYBR® Green Supermix 试剂盒 (BIO-RAD 公司); 电击仪 (BIO-RAD 公司 Pulse Controller)。

表 1 本实验所用菌株和质粒

Table 1 The bacterial strains and plasmids used in the study

Strain or plasmid	Characteristic	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	$\Phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZYA-argF) U169, recA1, endA1, thi-1	Lab collection
<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>		
PX099 <sup>A</sup>	Wild-type strain, Philippine race 6	Lab collection
$\Delta$ vieA <sub>xoo</sub>	Gm <sup>r</sup> , vieA <sub>xoo</sub> gene replaced by Gm <sup>R</sup> gene	This study
$\Delta$ vieA <sub>xoo</sub> -C	Gm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> , $\Delta$ vieA <sub>xoo</sub> complemented with pHM1-vieA <sub>xoo</sub>	This study
Plasmid		
pMD18-T	Ap <sup>r</sup> , ColE1 origin, T-vector	TaRaKa Co.
pK18mobsacB	sacB, lacZa, Km <sup>r</sup> , mcs mobilizable	Schafer et al. 1994
pHM1	Sp <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , cos, parA, IncW, derivative of pRI40	Hopkins et al., 1992
pMD-vieA <sub>xoo</sub>	pK18mobsacB with fragment containing vieA <sub>xoo</sub>	This study
pK18mobsacB-vieA <sub>xoo</sub>	pMD18-T with fragment containing vieA <sub>xoo</sub>	This study
pK18mobsacB-vieA <sub>xoo</sub> -Gm <sup>R</sup>	pK18mobsacB with vieA <sub>xoo</sub> gene inserted by Gm <sup>R</sup> gene	This study
pHM1-vieA <sub>xoo</sub>	pHM1 with fragment containing vieA <sub>xoo</sub> gene	This study

### 1.2 基因克隆和序列分析

用 DNAMAN 6 软件对 PX099<sup>A</sup> 基因 vieA<sub>xoo</sub> 序列进行分析, 设计特异性引物 vieA<sub>xoo</sub>-F/R (5'-CGAAGCTTACTGCGTGTAGGTGCTGAACT-3'/5'-CGAAGCTTACTGCGTGTAGGTGCTGAACT-3'), 以 PX099<sup>A</sup> 基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行产物检测。分别使用凝胶回收纯化试剂盒和 pMD18-T Vector 试剂盒, 进行基因纯化和连接。按照文献<sup>[7]</sup>电击法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  细胞。用 ABI Prism 377 测序仪进行基因序列测定; 用 DNAMAN 6 和 BioEdit 7 进行序列分析; 用 SMART 进行蛋白质结构域分析; 用 BLAST 进行序列同源性比对。

### 1.3 基因缺失突变体构建及其互补

按照文献[8]的方法进行基因标记交换。用

vieA<sub>xoo</sub>-F/R (5'-CGAAGCTTACTGCGTGTAGGTGCTGAACT-3'/5'-CGAAGCTTACTGCGTGTAGGTGCTGAACT-3') 引物进行全长基因及其上下游 300 bp、150 bp 片段扩增, 在片段两端加 EcoR I 和 Hind III 酶切位点; 将 1700 bp 片段克隆到载体 pMD18-T 上, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ <sup>[7]</sup>, 获得重组质粒 pMD-vieA<sub>xoo</sub>-T; 用 EcoR I 和 Hind III 酶切消化, 与 pK18mobsacB 连接, 获得重组质粒 pK18-vieA<sub>xoo</sub>; 用 Pst I 酶解消化, 去除 vieA<sub>xoo</sub> 中间 585 bp 序列, 得到 pK18-vieA<sub>xoo</sub> 载体部分片段; 对该片段进行脱磷处理和电泳回收, 与经过 Nsi I (Pst I 同尾酶) 酶解的 Gm<sup>R</sup> 基因片段连接, 得到重组质粒 pK18-vieA<sub>xoo</sub>-Gm<sup>R</sup>; 用电击法转化 PX099<sup>A</sup> 后, 涂布于 PSA + Gm 高蔗糖平板生长, 筛选转化子, PCR 验证突变体。

将全长基因片段连接到广寄主质粒 pHM1 上, 得到重组质粒 pHM1-vieA<sub>xoo</sub>。用电击法转化到

$\Delta vieAxoo$  中,涂布在 PSA + Sp + Sm 平板上生长,在 28℃ 下培养 4 d 后,挑取菌落。在 M210 + Gm + Sp + Sm 平板上培养 12 h 后,对互补菌株  $\Delta vieAxoo$ -C 进行提取质粒及其酶切验证。

#### 1.4 过敏性反应和致病性(Hrp)表型测定

参照文献<sup>[9]</sup>的方法,用剪叶法将菌悬液( $OD_{600}$  = 0.5)接种到水稻(日本晴)叶片上,接种 14 d 后观察发病情况,用平板计数法测定水稻叶片中的菌量。用注射法将相同浓度的菌液注射接种到烟草(云烟六号)叶片内,24–48 h 后观察接种部位 HR 产生。

#### 1.5 生物膜形成、EPS 产生和运动性测定

参照文献<sup>[10]</sup>的方法,用结晶紫染色法检测生物膜形成能力,方法未作改动。

参照文献<sup>[11]</sup>的方法,进行 EPS 产生能力测定,方法未作改动。

参照文献<sup>[12]</sup>的方法,在 0.3% 半固体琼脂培养基上进行运动性测定,方法未作改动。

## 2 结果和分析

### 2.1 VieAxoo 基因克隆、功能结构域和序列同源性

用特异性引物 *vieAxoo*-F/R (5'-CGAAGCTTACTGCGTGTAGGTGCTGAACT-3' /5'-CGAAGCTTACTGCGTGTAGGTGCTGAACT-3') 进行 PCR 扩增,成功地获得 1700 bp 的 *vieAxoo* 基因片段。将克隆片段进行测序,发现其序列与 GenBank 中已测序菌株 PXO99<sup>A</sup> 和 KACC10331 中的序列完全相同。生物信息学分析表明,*vieAxoo* 为单拷贝,全长 1254 bp,编码 418 个氨基酸;VieAxoo 具有参与 c-di-GMP 降解的磷酸二酯酶 EAL 结构域和磷酸受体信号识别 REC 结构域(图 1)。

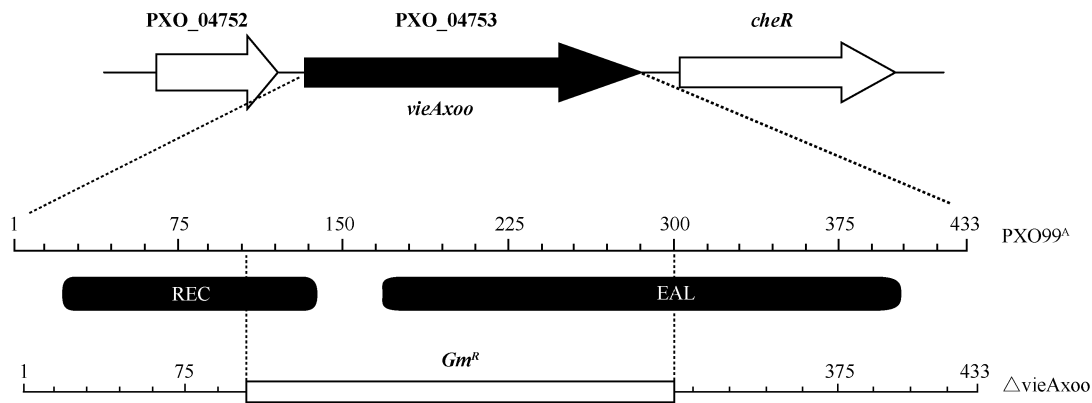


图 1 *vieAxoo* 在 Xoo 基因组中的位置、编码蛋白保守结构域及其突变体构建

Fig. 1 Gene arrangement, conserved domains and deletion of *vieAxoo*.

*vieAxoo* 与柑桔溃疡病菌 *vieAxac* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306) 同源性为 91%, 与甘蓝黑腐病菌 *vieAxcc* (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913) 同源性为 83%, 与番茄和辣椒细菌性斑点病菌 *vieAxcv* (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* str. 85–10) 同源性为 80%, 表明该基因与其它主要病原黄单胞的同源序列高度保守(未列出资料)。此外,其与霍乱弧菌 *vieAvc* (*Vibrio cholerae* 1587) 同源性仅为 30.11%, 主要差异是后者编码蛋白不仅具有 REC 和 EAL 结构域,还具有 HTH 和 CitB 结构域。

### 2.2 $\Delta vieAxoo$ 突变体构建和互补

将重组质粒 pK18mobsacB-*vieAxoo*-*Gm<sup>R</sup>* 转化到

PXO99<sup>A</sup> 中,*vieAxoo*-*Gm<sup>R</sup>* 相应片段与 PXO99<sup>A</sup> 基因组相应的片段发生同源重组和标记置换,获得基因缺失突变体  $\Delta vieAxoo$ 。PCR 扩增检测显示,从  $\Delta vieAxoo$  中的扩增片段比 PXO99<sup>A</sup> 中的长 270 bp (图 2),表明在  $\Delta vieAxoo$  中,*vieAxoo* 已被标记基因 *Gm<sup>R</sup>* 所置换,并且已从基因组中缺失。将重组质粒 pHM1-*vieAxoo* 转化到  $\Delta vieAxoo$  中,在 PSA + Gm + Sp + Sm 平板上连续培养,挑选互补子 (Sp<sup>r</sup>、Sm<sup>r</sup>、Gm<sup>r</sup>)。对互补子进行质粒提取和酶切验证,获得了互补菌株  $\Delta vieAxoo$ -C (未列出资料)。

### 2.3 $\Delta vieAxoo$ 对水稻的致病性和烟草的致敏性

在与寄主水稻和非寄主烟草互作条件下的致病性和致敏性测定表明,与 PXO99<sup>A</sup> 相比, $\Delta vieAxoo$  致病性无明显改变(图 3),而对烟草致敏性显著下降,基因互补可以使之恢复(图 4)。

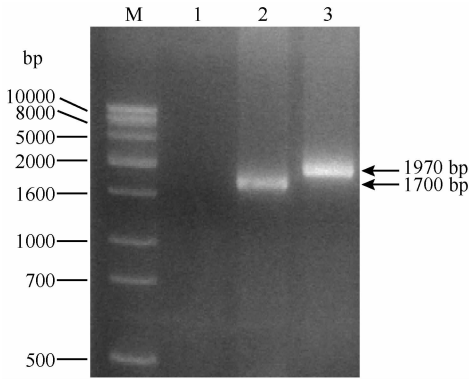


图2 Xoo 不同菌株中 *vieAxoo* 基因片段的 PCR 扩增检测

Fig.2 PCR amplification of *vieAxoo* in Xoo strains by using the *vieAxooF/R* primers. M. DNA Ladder; 1. Negative control; 2. PXO99<sup>A</sup>; 3.  $\Delta$ *vieAxoo*.



图3 Xoo 不同菌株对水稻的致病性测定

Fig.3 Pathogenicity on rice of Xoo strains.

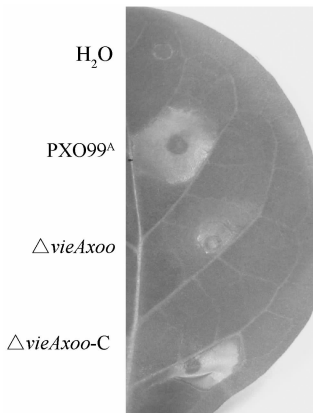


图4 Xoo 不同菌株对烟草的致敏性测定

Fig.4 Induction of hypersensitive response in tobacco leaves by Xoo strains.

## 2.4 $\Delta$ *vieAxoo* 生物膜形成、EPS 产生和运动性

在离体培养条件下的生物学性状测定表明,与

PXO99<sup>A</sup> 相比,  $\Delta$ *vieAxoo* BF 能力显著下降,基因互补可以使之恢复(图5),而 EPS 产生能力和运动性无明显改变(图6)。

## 3 讨论

由于细菌多种生物学功能(如致病性、BF、毒性因子产生和运动性等)受到新型第二信使 c-di-GMP 分子的调控<sup>[2]</sup>,而 c-di-GMP 降解及其胞内浓度又受到具有 PDE 活性、含有 EAL 结构域蛋白的控制<sup>[3]</sup>,因此对 c-di-GMP 代谢调控机制进行研究具有重要的科学价值。本研究对 Xoo 中一个 EAL 结构域蛋白 *VieAxoo* 进行了基因克隆、序列分析、缺失突变体构建和互补、功能鉴定,发现了  $\Delta$ *vieAxoo* 对水稻的致病性、EPS 产生和鞭毛运动性并无明显改变,但致敏性和 BF 能力明显降低,明确了 *VieAxoo* 可能作为一个应答调节子正向调控致敏性和 BF 的功能。

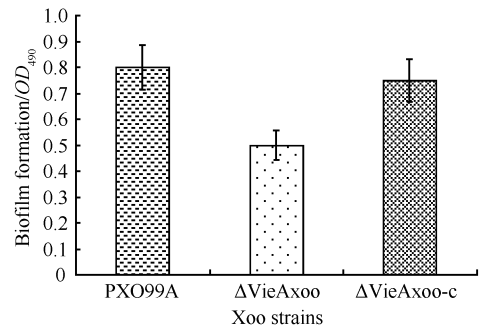


图5 Xoo 不同菌株生物膜形成能力测定

Fig.5 Biofilm formation of Xoo strains.

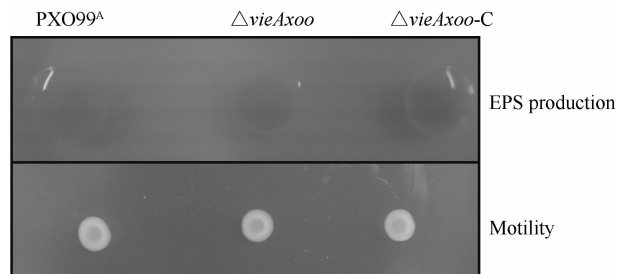


图6 Xoo 不同菌株 EPS 产生能力和运动性的测定

Fig.6 EPS production and flagellar motility of Xoo strains.

Xoo 的 Hrp 表型(即致病性和致敏性)受 *hrp* 基因编码 III 型分泌系统(T3SS)及其效应子所调控<sup>[13]</sup>。本研究发现 *VieAxoo* 可能与致病性无关,而

与致敏性相关。此外,在  $\Delta vieA_{xxo}$  中, T3SS 主控基因 *hrpG*、*hrpXo* 和效应子基因 *hapI* 的转录表达也下降了 40% - 70% (未发表资料)。表明 VieA<sub>xxo</sub> 与 T3SS 基因、致病性和致敏性之间可能存在差异性调控机制,需要对其进行深入探究。

VieA<sub>xxo</sub> 对 BF 的正向调控功能与霍乱弧菌应答调节子 VieA<sub>vc</sub> 的相一致。VieA<sub>vc</sub> 具有 EAL 结构域和 PDE 活性,通过控制 c-di-GMP 的降解调控了 BF 能力。目前,正在对 *vieA<sub>xxo</sub>* 基因进行原核表达、产物提纯和 PDE 活性测定,以及对  $\Delta vieA_{xxo}$  中 c-di-GMP 浓度进行定性分析(另文发表),以确定 VieA<sub>xxo</sub> 具有 PDF 活性、降解 c-di-GMP 的功能。

## 参考文献

- [ 1 ] He YW, Zhang LH. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiological Review*, 2008, 1-16.
- [ 2 ] Urs J, Jacob M. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 2006, 40: 385-407.
- [ 3 ] 管文静, 吴茂森, 何晨阳. c-di-GMP 信号途径对细菌致病性的调控作用. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2009, 36(3): 427-431.
- [ 4 ] Tamayo R, Tischler AD, and Camilli A. The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (39): 33324 - 33330.
- [ 5 ] Tischler AD, and Camilli A. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infection and Immunity*, 2005, 73(9): 5873-5882.
- [ 6 ] Salzberg SL, Sommer DD, Schatz M C. Genome sequence and rapid evolution of rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99<sup>A</sup>. *BMC Genomics*, 2008, 9: 204.
- [ 7 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* (2<sup>nd</sup> ed.). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 8 ] Lee SW, Ronald PC. *Plant-pathogen interaction*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007.
- [ 9 ] Nino-Liu D, Damielle L, Bogdanove AJ. A simple method of mass inoculation of rice effective for both pathovars of *Xanthomonas oryzae*, and the construction of comparable sets of host cDNA libraries spanning early stages of bacterial leaf blight and bacterial leaf streak. *Journal of Phytopathology*, 2005, 153: 500-504.
- [ 10 ] Kulasakara H, Lee V. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proceeding of the National Academy Science of USA*, 2006, 103: 2839-2844.
- [ 11 ] He YW, Ng AY, Min X. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Molecular Microbiology*, 2007, 64 (2): 282-292.
- [ 12 ] Shen YW, Chern MS, Silva FG. Isolation of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* flagellar operon region and molecular characterization of *flhF*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(2): 204-213.
- [ 13 ] Oku T, Tanaka K, Iwamoto M. Structural conservation of the *hrp* gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of General Plant Pathology*, 2004, 70: 159-167.

# Gene deletion and functional analysis of the EAL domain protein VieAxoo in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Shimin Liang<sup>1,2#</sup>, Fenghuan Yang<sup>2#</sup>, Wenjing Guan<sup>2</sup>, Maosen Wu<sup>2</sup>, Huamin Chen<sup>2</sup>, Fang Tian<sup>2</sup>, Yanli Xu<sup>1</sup>, Chenyang He<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Northeast Forest University, Haerbin 130012, China

<sup>2</sup>State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** [ **Objective** ] To better reveal the functions of key members involved in cyclic di-GMP signal metabolism pathways in the bacterial blight pathogen of rice *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). [ **Methods** ] *vieAxoo* (PXO\_04753), a gene putatively encoding the EAL domain proteins was investigated by gene deletion mutation using the marker exchange, complementation and phenotypic analysis. [ **Result** ] The sequence of *vieAxoo* cloned from genomic DNA of the wild-type strain PXO99<sup>A</sup> was found to be highly conserved in plant-pathogenic *Xanthomonas* spp. VieAxoo was structurally featured with EAL and REC domains. No significant changes in virulence to rice, EPS production and flagellar motility were found in  $\Delta$ *vieAxoo* compared to PXO99<sup>A</sup>, whereas remarkable changes in induction of hypersensitive responses (HR) in tobacco and biofilm formation were observed. [ **Conclusion** ] VieAxoo might function as an important reponse regulator in cyclic di-GMP signaling and regulation of bacterial induction of HR and biofilm formation of Xoo.

**Keywords:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, C-di-GMP, *vieAxoo*, gene deletion, functional characterization

(本文责编:张晓丽)