

## 水稻细菌性条斑病菌中受 DSF 调控的鞭毛基因 *flgD*、*flgE* 的功能分析

殷芳群<sup>1,2</sup>, 赵延存<sup>1,2</sup>, 刘春晖<sup>1,2</sup>, 钱国良<sup>1,2</sup>, 范加勤<sup>1,2</sup>, 胡白石<sup>1,2</sup>, 刘凤权<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学植物保护学院, <sup>2</sup>农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 南京 210095

**摘要:** 【目的】为了阐明可扩散性信号分子 (diffusible signal factor, DSF) 调控的鞭毛基因对水稻细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*) Rs105 的致病性等方面的影响。【方法】采用 PCR 的方法克隆靶基因 *flgD<sub>xoc</sub>* 和 *flgE<sub>xoc</sub>*, 用同源重组法构建缺失突变体, 测定突变体及其互补菌株的菌体形态、运动性、致病性及过敏反应等表型, 用反转录 PCR (RT-PCR) 的方法验证 Rs105 和  $\Delta rpfXoc$  (*rpfXoc* 基因的缺失突变体, 不产生 DSF) 中 *flgD<sub>xoc</sub>*、*flgE<sub>xoc</sub>* 表达量的差异。【结果】从 Rs105 基因组中克隆到 *flgD<sub>xoc</sub>*、*flgE<sub>xoc</sub>* 基因, 并证实这两个基因在基因组中均为单拷贝。PCR 和 Southern 杂交结果显示 *flgD<sub>xoc</sub>*、*flgE<sub>xoc</sub>* 基因被成功敲除。与野生型相比, 突变体的鞭毛产生能力丧失, 游动性和趋化性能力减弱, 接种水稻叶片显示其致病性部分减弱, 基因互补可使其恢复。生长能力和对烟草叶片的致敏性无明显改变。RT-PCR 结果显示 *flgD<sub>xoc</sub>*、*flgE<sub>xoc</sub>* 基因在  $\Delta rpfXoc$  中的转录水平明显降低。【结论】本试验表明: FlgD、FlgE 是水稻细菌性条斑病菌鞭毛形成所必需的因子; 进一步证明了 DSF 通过调控 *flgD<sub>xoc</sub>*、*flgE<sub>xoc</sub>* 基因表达, 从而影响条斑病菌的致病性等表型。为深入认识 DSF 对细菌性条斑病菌鞭毛基因簇的调控提供了科学依据。

**关键词:** 水稻细菌性条斑病菌, 鞭毛, *flgD*, *flgE*, DSF

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)07-0891-07

一般而言, 鞭毛是细菌的重要结构, 由超过 40 个基因编码的蛋白组装而成, 它在细菌鉴别与分类、致病性、运动性等方面具有重要意义<sup>[1-3]</sup>。鞭毛由 3 部分组成: 基础小体 (basal body)、鞭毛钩 (hook)、鞭毛丝 (filament)。其中鞭毛钩作为分子铰链, 连接马达 (motor) 的主轴和鞭毛丝, 起传递扭矩的作用<sup>[4]</sup>。FlgD 和 FlgE 蛋白是鞭毛钩状体形成多必需的, 分别在钩状体的组装和结构组成中起作用。

原核生物界细胞间普遍存在着信号传导, 这种细胞间的信号传导通常被称为群体感应 (quorum

sensing, QS)。Xanthomonas 属中发现的依赖可扩散性信号分子 (diffusible signal factor, DSF) 的 QS 系统是一种新的调节机制<sup>[5-7]</sup>。基因组和遗传分析表明, DSF 型 QS 信号传导路径调节多种生物学功能, 包括致病性、运动性、生物膜消散等特性<sup>[8-11]</sup>。据报道 *rpf* 基因簇是 DSF 型 QS 系统的核心基因, 包括 *rpfF*、*rpfC* 和 *rpfG*。RpfF 是催化合成 DSF 信号分子的关键酶。RpfC (感应磷酸激酶) 和 RpfG (应答调节蛋白) 组成一个双组分系统来感应和转换细胞间的 DSF 信号<sup>[9-11]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金 (31071657, 30971894); 国家公益行业 (农业) 科研专项 (3-23)

\* 通信作者。Tel: +86-25-84396726; Fax: +86-25-84395325; E-mail: fqliu20011@sina.com

作者简介: 殷芳群 (1986-), 女, 安徽合肥人, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: 2008102024@njau.edu.cn

收稿日期: 2011-01-04; 修回日期: 2011-03-01

水稻细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* *Xoc*) 是稻黄单胞菌种下的致病变种之一, 侵染水稻引起细菌性条斑病<sup>[12]</sup>。本课题组前期以 Rs105 为研究对象, 证实水稻细菌性条斑病菌具有 DSF 型群体感应系统, 缺失 *rpjF<sub>xoc</sub>* 基因后, 条斑病菌则不能产生 DSF 信号分子, 同时完全丧失了致病性<sup>[13]</sup>。之后, 应用双向电泳技术 (2-DE), 分析野生型和  $\Delta$ *rpjF<sub>xoc</sub>* 的差异表达蛋白, 发现  $\Delta$ *rpjF<sub>xoc</sub>* 中有 48 个蛋白表达量与野生型有明显差异, 其中包括 FlgD、FlgE 蛋白<sup>[13]</sup>。生物信息学和文献报道显示: FlgD 和 FlgE 分别是鞭毛钩帽蛋白 (flagellar hook cap protein) 和鞭毛钩蛋白 (flagellar hook protein)。

在许多病原细菌中鞭毛被证实具有重要的生物学功能。然而 *flgD<sub>xoc</sub>*、*flgE<sub>xoc</sub>* 基因在水稻细菌性条斑病菌鞭毛形成、致病性、运动性等方面的功能尚未见报道。为了解 *flgD<sub>xoc</sub>*、*flgE<sub>xoc</sub>* 基因的生物学功能, 特别是与病菌致病性的关系, 本研究从 *Xoc* 基因组中克隆了 *flgD<sub>xoc</sub>*、*flgE<sub>xoc</sub>* 基因, 用同源重组的方法构建缺失突变株。初步研究了 *flgD<sub>xoc</sub>*、*flgE<sub>xoc</sub>* 基因在 *Xoc* 中的生物学功能, 并研究了 *flgD<sub>xoc</sub>*、*flgE<sub>xoc</sub>* 基因与 DSF 信号分子之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** 引物合成和测序由 Invitrogen 公司完成; 基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购于 Axygen 公司, 总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购于 TaKaRa 公司, 杂交用地高辛试剂盒购于 Roche 公司; 连接所用 PMD19-T 载体、连接酶、限制性内切酶、*r-Taq* 酶和 DNA marker 均购于 TaKaRa 公司; 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。

**1.1.2 供试菌株、质粒及其培养条件:** 本研究使用的菌株和质粒见表 1。水稻细菌性条斑病菌 Rs105 由本实验室保存, 于 Nutrient Agar (NA) 培养基中 28℃ 培养, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 于 Luria Bertani (LB) 中 37℃ 培养。所用抗生素及其浓度分别为: 氨苄青霉素 (Ap) 100 mg /L, 卡那霉素 (Km) 25 mg /L 和利福平 (Rif) 100 mg /L, 壮观霉素 (Sp) 100 mg /L。烟草品种为枯斑三生烟 (*Nicotiana tabacum* L., “Samsun” NN), 水稻品种汕优 63 是条斑病菌的感病寄主。

表 1 本研究所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains, plasmids	Characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	$\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169. <i>recA1</i> , <i>endA1</i> . <i>thi-1</i>	Lab collection
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>		
Rs105	Rif <sup>st</sup> , Wild type	This lab
$\Delta$ <i>rpjF<sub>xoc</sub></i>	Rif <sup>st</sup> , The <i>rpjF<sub>xoc</sub></i> gene knock-out mutant of strain Rs105	This lab
$\Delta$ <i>flgD<sub>xoc</sub></i>	Rif <sup>st</sup> , The <i>flgD<sub>xoc</sub></i> gene knock-out mutant of strain Rs105	This study
$\Delta$ <i>flgE<sub>xoc</sub></i>	Rif <sup>st</sup> , The <i>flgE<sub>xoc</sub></i> gene knock-out mutant of strain Rs105	This study
$\Delta$ <i>flgD<sub>xoc</sub></i> (flgD <sub>xoc</sub> )	Rif <sup>st</sup> , Km <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>flgD<sub>xoc</sub></i> complemented with pHMI-D	This study
$\Delta$ <i>flgE<sub>xoc</sub></i> (flgE <sub>xoc</sub> )	Rif <sup>st</sup> , Km <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>flgE<sub>xoc</sub></i> complemented with pHMI-E	This study
Plasmid		
pMD19-T (simple)	Ap <sup>R</sup> , T-cloning vector <i>colE1</i> origin, without MCS	TaKaRa
pMD19-D1	Ap <sup>R</sup> , <i>FlgD-1</i> gene ligated in pMD19-T (simple)	This study
pMD19-D2	Ap <sup>R</sup> , <i>FlgD-2</i> gene ligated in pMD19-T (simple)	This study
pMD19-E1	Ap <sup>R</sup> , <i>FlgE-1</i> gene ligated in pMD19-T (simple)	This study
pMD19-E2	Ap <sup>R</sup> , <i>FlgE-2</i> gene ligated in pMD19-T (simple)	This study
pK18 <i>mobsacB</i>	Km <sup>R</sup> , <i>mob</i> , <i>sacB</i>	Lab collection
pKS-D	Km <sup>R</sup> , a 1472 bp fusion fragment of <i>FlgD-1</i> 、 <i>FlgD-2</i> gene ligated in pK18 <i>mobsacB</i>	This study
pKS-E	Km <sup>R</sup> , a 1764 bp fusion fragment of <i>FlgE-1</i> 、 <i>FlgE-2</i> gene ligated in pK18 <i>mobsacB</i>	This study
pHMI	Sp <sup>R</sup> , Broad-host-range cosmid vector <i>pSa ori</i>	Lab collection
pHMI-D	Sp <sup>R</sup> , <i>flgD-H</i> gene ligated in pHMI	This study
pHMI-E	Sp <sup>R</sup> , <i>flgE-H</i> gene ligated in pHMI	This study

## 1.2 缺失突变体的构建

本研究利用同源重组法构建缺失突变体。以 Rs105 基因组 DNA 为模板, 分别利用引物 FlgD-1F 和 FlgD-1R、FlgD-2F 和 FlgD-2R (表 2) 扩增得到 *flgDxoc* 基因上游和下游片段 *FlgD-1* (744 bp)、*FlgD-2* (728 bp), 分别连接到 pMD19-T 上, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  得到 pMD19-D1 和 pMD19-D2 质粒。分别用 *Bam*HI 和 *Kpn*I、*Kpn*I 和 *Xba*I 双酶切, 共同连接到用 *Bam*HI 和 *Xba*I 双酶切的自杀载体 pK18*mobsacB* 载体上, 得到重组质粒 pKS-D。

分别利用引物 FlgE-1F 和 FlgE-1R、FlgE-2F 和 FlgE-2R (表 2) 扩增得到 *flgExoc* 基因上游和下游片段 *FlgE-1* (899 bp)、*FlgE-2* (865 bp), 分别连接到 pMD19-T 上, 转化 DH5 $\alpha$  得到 pMD19-E1 和 pMD19-E2 质粒。分别用 *Bam*HI 和 *Eco*RI、*Eco*RI 和 *Xba*I 双酶切, 共同连接到用 *Bam*HI 和 *Xba*I 双酶切的 pK18*mobsacB* 载体上, 得到重组质粒 pKS-E。

表 2 本研究所用引物及其序列

Primers	Sequence (5'→3')	Source
FlgD-1F	CGGGATCCGTTCCGGTTGGCGGTCTTGA	This study
FlgD-1R	GGGGTACCGCTCGGACGGCTGTATCTC	This study
FlgD-2F	GGGGTACCTGGCCGTTTTGCTGCTGGTA	This study
FlgD-2R	GCTCTAGAACCAACCGACGCCAAGCACTA	This study
FlgE-1F	CGGGATCCGTCGGCTGTTGATGGTCTTG	This study
FlgE-1R	CGGAATTCGAATCGGGCTCGCTGGAATC	This study
FlgE-2F	CGGAATTCGTTGGCGATGTTGTTGGAC	This study
FlgE-2R	GCTCTAGAGCTCAATACCGCCAAGGAAC	This study
flgD-HF	CCAAGCTTGCTCAATACCGCCAAGGAAC	This study
flgD-HR	CGGAATTCGTTGGCGATGTTGTTGGAC	This study
flgE-HF	CCAAGCTTCTCGGACGGCTGTATCTCA	This study
flgE-HR	CGGAATTCCTCCTAATCCCGAATCACCA	This study
16SrDNA-F	AATGGCGCAAGCCTGATC	This study
16SrDNA-R	TTTGTCACCGCGGTCTCC	This study
flgD-RTF	TTGGCGATGTTGTTGGACGT	This study
flgD-RTR	CAGGCGTGAAATGCTCAAT	This study
flgE-RTF	CGATTCCAGCGAGCCCGATT	This study
flgE-RTR	TCAAGACCGCAACCCGAAC	This study

用电击法将纯化的 pKS-D、pKS-E 质粒 DNA 分别转入 Rs105 感受态细胞中, 涂布于不含蔗糖的 NA + Km 平板上进行第一次交换, 对长出的单菌落进行 PCR 验证, 筛选单交换子。验证正确的单菌落在不含蔗糖的 NA 培养液中摇菌 7-9 h, 吸取部分培养液涂布于含 10% 蔗糖的 NA 平板上, 长出的单菌落即为二次交换子, 进行 PCR 和 Southern 杂交验证突变体。

## 1.3 互补菌株的构建

利用引物 flgD-HF 和 flgD-HR、flgE-HF 和 flgE-HR (表 2), 以 Rs105 DNA 为模板, 扩增得到互补片段 *flgD-H* (865bp) 和 *flgE-H* (1358bp), 都经 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切后分别连接到被同样酶切的载体 pHMI 上, 转化 DH5 $\alpha$  得到重组质粒 pHMI-D 和 pHMI-E。

提取 pHMI-DH 和 pHMI-EH 质粒, 纯化后电转入  $\Delta$ *flgDxoc* 和  $\Delta$ *flgExoc* 感受态细胞中, 涂布 NA + Sp + Rif 平板, 经 PCR 验证得到互补菌株  $\Delta$ *flgDxoc* (flgDxoc) 和  $\Delta$ *flgExoc* (flgExoc)。

## 1.4 细菌生长、运动性、致敏性、致病性测定

参照文献 [14] 的方法, 利用 MMX 基本培养基进行细菌生长测定。实验重复 3 次。

参照文献 [15] 的方法, 进行细菌鞭毛的电镜观察, 在 0.3% 半固体 NA 培养基上进行细菌游动性、趋化性的测定。实验重复 3 次。

参照文献 [16] 的方法, 野生型菌株 Rs105、突变体  $\Delta$ *flgDxoc* 和  $\Delta$ *flgExoc* 及互补菌  $\Delta$ *flgDxoc* (flgDxoc) 和  $\Delta$ *flgExoc* (flgExoc) 在 NA 培养液中培养至  $OD_{600} = 0.5$ , 注射接种到烟草叶片, 接种后 24-48 h 观察叶片过敏反应。

将  $OD_{600} = 0.5$  的细菌注射生长 10-15 d 的水稻 (汕优 63) 3 d 后观察水浸症状。同时针刺接种分蘖盛期水稻, 每个菌株接种 15 张叶片, 14 d 后观察发病情况并测量病斑长度。

## 1.5 RT-PCR

将 Rs105 和突变体的单菌落分别接种于 50 mL NA 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 摇床上 200 r/min 培养至  $OD_{600} = 1.0$  后按照 TaKaRa 公司操作手册提取细菌总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测质量, 分光光度计定量, 然后按照 Reverse Transcriptase 试剂盒 (TaKaRa) 的方法合成 cDNA, 以 Rs105 和  $\Delta$ *rpfXoc* 的 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 检测 *flgDxoc*、*flgExoc* 基因的转录表达。16S rDNA 基因为内参, 以引物 16S rDNA-F 和 16S rDNA-R (表 2) 进行 RT-PCR, 校正 PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

## 2 结果和分析

### 2.1 *flgDxoc*、*flgExoc* 基因的缺失突变株及互补菌株构建

质粒 pK18*mobsacB* 上带有反向筛选标记 *sacB*, 含

有该质粒的细菌不能在含 10% 蔗糖的 NA 培养基上生长。对重组质粒 pKS-D、pKS-E 进行酶切验证和测序结果分析(未列出资料)。经电击转化,重组质粒 pKS-D、pKS-E 与细菌 DNA 发生双交换后,分别以引物 FlgD-1F 和 FlgD-2R、FlgE-1F 和 FlgE-2R 进行 PCR 扩增,  $\Delta flgDxoc$  和  $\Delta flgExoc$  中分别扩增出大小为 1472、1764 bp 的条带,而 Rs105 中对应的扩增出

2000、2765 bp 的条带(图 1-A、B)。用 *EcoRI* 单酶切 Rs105、 $\Delta flgDxoc$  和  $\Delta flgExoc$  的基因组 DNA,分别以 FlgD-1 和 FlgE-1 为探针进行 Southern 杂交分析(图 1-C、D)。由此表明成功构建了 *flgDxoc* 和 *flgExoc* 的缺失突变体。互补菌株在 NA + Sp + Rif 平板上筛选,进行质粒提取和酶切分析验证(未列出资料),获得了互补菌株  $\Delta flgDxoc$  (*flgDxoc*) 和  $\Delta flgExoc$  (*flgExoc*)。

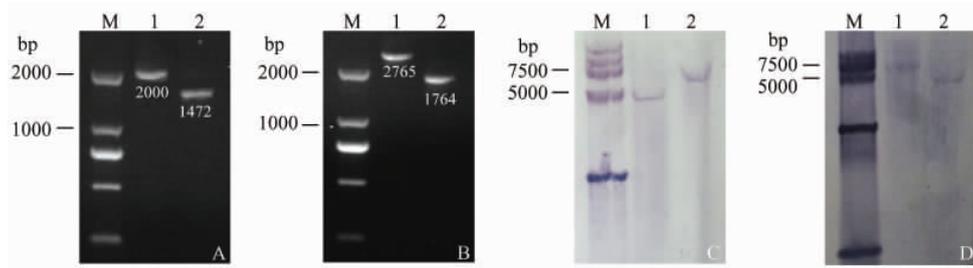


图 1 水稻细菌性条斑病菌 *flgDxoc* 和 *flgExoc* 基因突变体的分子验证

Fig. 1 Molecular analysis of the knock-out mutant in the *flgDxoc* and *flgExoc* gene of *X. oryzae* pv. *oryzicola*. A: PCR confirmation for the deletion *flgDxoc* gene by using primers FlgD-1F and FlgD-2R (M. DL2000; 1. Rs105; 2.  $\Delta flgDxoc$ ). B: PCR confirmation for the deletion *flgExoc* gene by using primers FlgE-1F and FlgE-2R (M. DL2000; 1. Rs105; 2.  $\Delta flgExoc$ ). C: Southern hybridization to confirm  $\Delta flgDxoc$  with *FlgD-1* as the probe (M. DL15000; 1.  $\Delta flgDxoc$ ; 2. Rs105). D: Southern hybridization to confirm  $\Delta flgExoc$  with *FlgE-1* as the probe (M. DL15000; 1. Rs105; 2.  $\Delta flgExoc$ ).

## 2.2 $\Delta flgDxoc$ 、 $\Delta flgExoc$ 的运动性及生长能力测定

在 0.3% 半固体 NA 平板上对各个菌株进行了趋化性和游动性测定,发现  $\Delta flgDxoc$  和  $\Delta flgExoc$  运动能力明显下降(图 2-A、B)。电镜观察结果表明,  $\Delta flgDxoc$  和  $\Delta flgExoc$  均丧失了产生鞭毛的能力(图

2-C)。基因互补可以恢复突变体上述表型。用基本培养基 MMX 测定生长曲线  $\Delta flgDxoc$  和  $\Delta flgExoc$  的生长速率没有发生明显变化(图 3)。这些结果都显示突变体运动能力降低主要是由于细菌鞭毛缺失引起的。

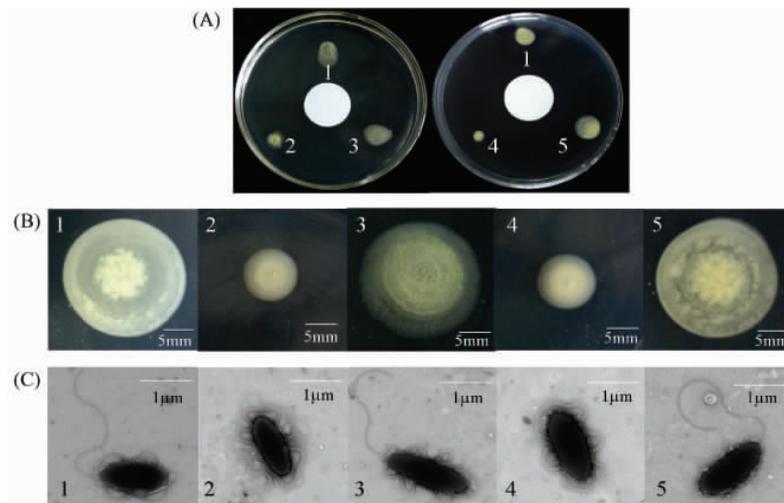


图 2 Rs105、突变体和及其互补菌株的趋化性、游动性和鞭毛电镜照片

Fig. 2 Bacterial motility and flagellum production of Rs105, deletion mutants and the complementation strains. A: Chemotaxis of *Xoc* strains. B: Motility of *Xoc* strains. C: Flagellum production (1. Rs105; 2.  $\Delta flgDxoc$ ; 3.  $\Delta flgDxoc$  (*flgDxoc*); 4.  $\Delta flgExoc$ ; 5.  $\Delta flgExoc$  (*flgExoc*)).

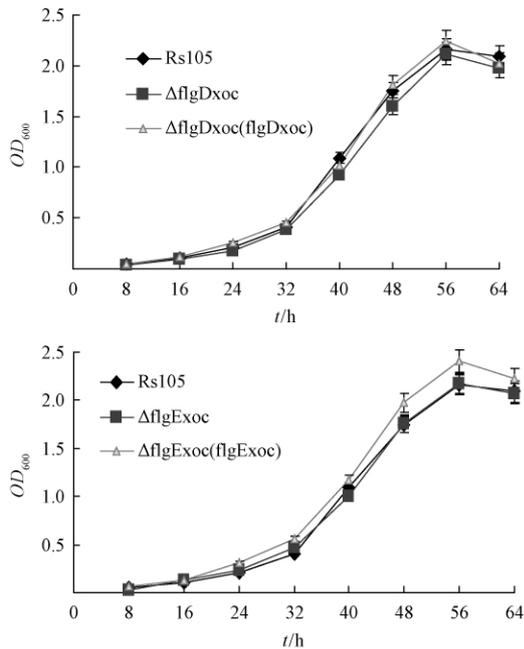


图 3 Rs105、突变体和及其互补菌株的生长能力  
Fig.3 Bacterial growth *in vitro* of Rs105 ,deletion mutants ( A) and the complementation strains ( B) .

2.3 ΔflgDxoc、ΔflgExoc 的过敏性反应及致病性检测

将野生型菌株 Rs105、突变体 ΔflgDxoc 和 ΔflgExoc 及互补菌 ΔflgDxoc (flgDxoc) 和 ΔflgExoc (flgExoc) 注射接种烟草叶片,48 h 后都观察到叶片过敏性反应,结果说明 flgDxoc 和 flgExoc 基因的缺失不影响 Xoc 的 HR 的激发能力(图 4-C)。注射接种水稻品种汕优 63 突变体在水稻苗期叶片上形成水浸症状的能力比野生型弱(图 4-A);针刺接种分蘖盛期期水稻叶片,14 天后观察发病情况,发现突变体在接种叶片上的扩展能力明显减弱,而互补菌株发病情况与野生型接近(图 4-B)。同时记录病斑长度,各菌株分别测量 10 张叶片,统计结果如图 4-D。这些结果都显示 flgDxoc 和 flgExoc 基因的缺失使得细菌性条斑病菌的致病性减弱。

2.4 flgDxoc 和 flgExoc 基因受 DSF 调控

实验室前期研究获得了缺失突变体 ΔrpfF<sub>xoc</sub>, rpfF<sub>xoc</sub> 基因与 DSF 信号产生和传导有关,缺失该基因后,细菌性条斑病菌不产生 DSF<sup>[13]</sup>。Rs105 与 ΔrpfF<sub>xoc</sub> 的蛋白质双向电泳结果对比显示:与野生型相比,突变体中的 FlgD<sub>xoc</sub>、FlgE<sub>xoc</sub> 表达量有明显差异。为了了解 flgDxoc 和 flgExoc 基因的转录水平

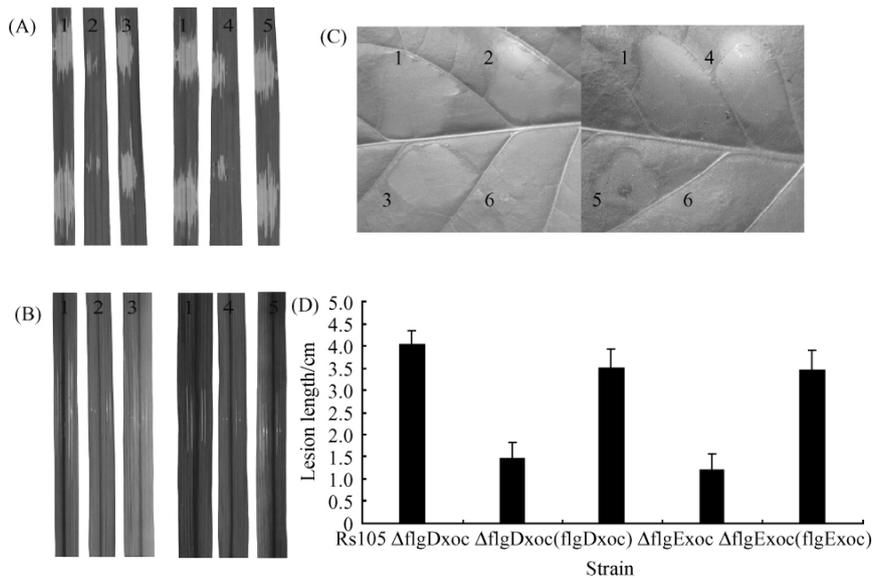


图 4 水稻细菌性条斑病菌 flgDxoc 和 flgExoc 突变体对水稻致病性和在非寄主烟草上引发的过敏反应

Fig.4 Pathogenicity analysis and hypersensitive response of the knock-out mutants in the flgDxoc and flgExoc genes of Xanthomonas oryzae pv. oryzaicola. A: Water soaking symptoms in rice seedlings(2 weeks old). B: Streak formed in adult rice. C: Hypersensitive response in tobacco. D: The lesion lengths were caused by Rs105 , deletion mutants and the complementation strains. 1. The wide-type strain Rs105; 2. ΔflgDxoc; 3. ΔflgDxoc (flgDxoc); 4. ΔflgExoc ; 5. ΔflgExoc (flgExoc); 6. H<sub>2</sub>O.

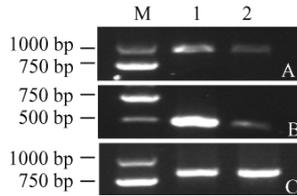


图5 RT-PCR 检测水稻细菌性条斑病菌中 *flgDxoc*、*flgExoc* 基因的表达

Fig. 5 Expression analysis of the *flgDxoc* and *flgExoc* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by reverse-transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR). A: Amplification of *flgDxoc* gene. B: Amplification of *flgExoc* gene. C: Amplification of 16S rDNA. M. DL2000; 1. Rs105 cDNA; 2.  $\Delta rpfExoc$  cDNA

是否受 DSF 调控,在本研究中,利用引物 flgD-RTF 和 flgD-RTR、flgE-RTF 和 flgE-RTR (表 2),以 Rs105 和  $\Delta rpfExoc$  的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,同时以 16SrDNA 为内参,结果 *flgDxoc* 和 *flgExoc* 基因在突变体内的转录表达水平与野生型相比明显减弱 (图 5),说明 DSF 正向调控 *flgDxoc* 和 *flgExoc* 基因的转录表达水平。

### 3 讨论

鞭毛是细菌的运动器官,是细菌在进化过程中长期适应的结果,有利于细菌的生存。此外,细菌还可以通过鞭毛的趋化作用寻找营养物质和逃避不利环境,细菌在鞭毛的带动下,朝着有利于自己生存的地方运动,这种“有目的”的运动将有助于阐明细菌对细胞的粘附和致病机理,它还在细菌侵入细胞组织等环节中起重要作用。本试验通过对 *flgDxoc* 和 *flgExoc* 进行基因克隆、缺失突变等研究,进一步证实了这些观点。

本研究对突变体的运动性、寄主植物致病性、非寄主烟草致敏性表型等功能进行验证,明确了它们在 *Xoc* 鞭毛生成、运动性、致病性等方面的作用。*flgDxoc* 基因为鞭毛钩的延伸提供支架,可能通过某些途径影响鞭毛钩亚蛋白连接到中央杆 (*rod*),在  $\Delta flgDxoc$  中,鞭毛合成过程中不能完成基体组装,换一句换说,无法组装鞭毛钩。*flgExoc* 基因编码鞭毛钩亚蛋白,是构成鞭毛钩-基础小体复合物 (hook-basal body complex) 的基础蛋白,该基因的缺失同样导致鞭毛无法形成。研究发现  $\Delta flgDxoc$  和  $\Delta flgExoc$  鞭毛结构上的缺失导致了鞭毛生物合成和组装受阻,鞭毛生成能力均丧失,进而引起运动能力下降,对寄主水稻的致病性减弱,基因互补可使其恢复。但在 MMX 基本培养基中的生长能力以及对烟草叶组织的致敏性无明显改变。因此 *flgDxoc* 和 *flgExoc* 应该主要参与了鞭毛生物合成及其运动性的调控,

进而影响了细菌的致病能力。

同时 RT-PCR 结果显示,依赖 DSF 信号分子的群体感应系统正向调控 *flgDxoc* 和 *flgExoc* 基因的表达,这个发现与野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 中研究结果相一致,该研究报道:在 *Xcc* 中鞭毛的合成、运动性和趋化性相关基因受 DSF 调控,涉及的基因有 *fliDEGLMOPR*、*flgABDEHILM*、*pilT*、*tlpC*、*cheA*、*cheRY*、*tsr*、*Xcc1873*、*Xcc0276*<sup>[11]</sup>。DSF 型 QS 信号传导系统调节多种生物学功能,包括毒性、生物膜消散和生态学特性<sup>[5-8]</sup>。因此,研究 QS 系统对细菌性条斑病菌鞭毛相关基因的表达调控具有重要意义。目前,作者正在深入地研究 DSF 对 *Xoc* 中 *flgDxoc* 和 *flgExoc* 基因以及其它鞭毛基因表达的调控作用机理。

### 参考文献

- [1] Macnab RM. The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 7149-7153.
- [2] Pallen MJ, Penn CW, Chaudhuri RR. Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends in Microbiology*, 2005, 13: 143-149.
- [3] Macnab RM. How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 77-100.
- [4] Köhler S. Basics for Biosystems of the Cell. *Assignment Report*, 2004: 1-12.
- [5] He YW, Zhang LH. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiological Reviews*, 2008, 32 (5): 842-857.
- [6] Wang LH, He Y, Gao Y, Wu JE, Dong YH, He C, Wang SX, Weng LX, Xu JL, Tay L, Fang RX, Zhang LH. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular Microbiology*, 2004, 51: 903-912.
- [7] Barber CE, Tang JL, Feng JX, Feng JX, Pan MQ, Wilson TJG, Slater H, Dow JM, Williams P, Daniels MJ. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology*, 1997, 24: 556-566.
- [8] Chatterjee S, Sonti RV. *rpfF* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2002, 15 (5): 463-471.
- [9] Chatterjee S, Wistrom C, Lindow SE. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105: 2670-2675.
- [10] Dow MJ, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX, Tang JL. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100: 10995-11000.

- [11] He YW, Xu M, Lin K, Ng YJ, Wen CM, Wang LH, Liu ZD, Zhang HB, Dong YH, Dow JM, Zhang LH. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and function. *Molecular Microbiology*, 2006, 59: 610-622.
- [12] Ou SH. Rice diseases. Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institution. CAB, 1985.
- [13] Zhao YC, Qian GL, Yin FQ, Fan JQ, Zhai ZW, Liu CH, Hu BS, Liu FQ. Proteomic analysis of the regulatory function of DSF-dependent quorum sensing in *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*. *Microbiological Pathogenesis*, 2011, 50(1): 48-55.
- [14] Jagannathan A, Constantinidou C, Penn CW. Roles of *rpoN*, *fliA* and *flgR* in expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(9): 2937-2942.
- [15] Shen YW, Chern MS, Silva FG, Ronald P. Isolation of a *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* flagellar operon region and molecular characterization of *flhF*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(2): 204-213.
- [16] Tsuchiya K, Mew TW, Wakimoto S. Bacteriological and pathological characteristics of wild types and induced mutant s of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Phytopathology*, 1982, 72(1): 43-46.

## Analysis of the *flgD* and *flgE* genes regulated by diffusible signal factor in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Fangqun Yin<sup>1 2</sup>, Yancun Zhao<sup>1 2</sup>, Chunhui Liu<sup>1 2</sup>, Gouliang Qian<sup>1 2</sup>, Jiaqin Fan<sup>1 2</sup>, Baishi Hu<sup>1 2</sup>, Fengquan Liu<sup>1 2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, <sup>2</sup> Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests (Nanjing Agricultural University), Ministry of Education, Nanjing 210095, China

**Abstract:** [Objective] To investigate functions of *flgDxoc* and *flgExoc* genes regulated by diffusible signal factor (DSF) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) Rs105. [Methods] The *flgDxoc* and *flgExoc* genes were amplified by PCR. We constructed  $\Delta flgDxoc$  and  $\Delta flgExoc$ , the deletion mutants from Rs105 by using double crossover method, and determined cell morphology, motility, pathogenicity in host rice and hypersensitive response (HR) in nonhost tobacco. We tested the differential expression of *flgDxoc* and *flgExoc* gene by reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) between the wide type and  $\Delta rpfFxoc$  (the deletion mutant of *rpfFxoc* gene, which could not produce DSF). [Results] We cloned *flgDxoc* and *flgExoc* from genomic DNA of Rs105. PCR and Southern blot analysis demonstrated that the *flgDxoc* and *flgExoc* genes were knocked out successfully. Both mutants were non-flagellated and significantly attenuated motility on the 0.3% semi-solid medium. The pathogenicity on rice were obviously attenuated in  $\Delta flgDxoc$  and  $\Delta flgExoc$  compared to the wild type. All the changes in mutant could be restored through the complementation. However, there was no significant difference in bacterial growth in MMX medium and induction of HR between mutant ( $\Delta flgDxoc$  or  $\Delta flgExoc$ ) and the wild type. In addition, the results of RT-PCR demonstrated that the transcription level of *flgDxoc* and *flgExoc* were down-regulated in  $\Delta rpfFxoc$ . [Conclusion] This study showed that expressions of *flgDxoc* and *flgExoc* were positively regulated by DSF, and necessary for flagellar hook assembly and flagellar structure in Xoc. Meanwhile, FlgD and FlgE contributed to pathogen's virulence, motility and chemotaxis, but no differences at growth rate in MMX medium and HR in nonhost. In addition, our results provided molecular evidences that the contribution of DSF-type quorum sensing to pathogen's virulence might be, at least partially, dependent on bacterial flagellar in Xoc.

**Keywords:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, flagellum, *flgD*, *flgE*, DSF

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31071657, 30971894) and by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (3-23)

\* Corresponding author. Tel: +86-25-84396726; Fax: +86-25-84395325; E-mail: fqliu20011@sina.com

Received: 4 January 2011 / Revised: 1 March 2011