



地毯草黄单胞菌双组分系统 VgrS-VgrR 基因敲除及表型筛选

孟繁凡^{1,2}, 武瑶^{1,2}, 时涛³, 黄贵修^{3*}, 王莉^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 植物基因组国家重点实验室, 北京 100101

²中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

³中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101

摘要: 【目的】研究地毯草黄单胞菌双组分系统VgrS-VgrR与致病性的关系, 为木薯细菌性病害的高效防控提供分子生物学证据。【方法】采用同源重组方法构建vgrS和vgrR的插入失活突变体, 用可移动的cosmid载体pHM1构建互补菌株。检测突变体的致病性、细菌游动性、胞外酶、胞外多糖的变化, 观察细菌对H₂O₂和金属离子胁迫的反应。【结果】相比野生型菌株, vgrS和vgrR突变体接种寄主植物木薯后致病力显著降低, 突变体的游动性减少、蛋白酶活性减弱、H₂O₂耐受性降低, 在高浓度金属离子Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Co²⁺的胁迫条件下菌体生长显著减弱。然而, vgrS和vgrR突变体的胞外多糖含量显著升高, 分别是野生型的2.14和1.89倍。【结论】阐明了VgrS-VgrR系统在细菌致病过程中发挥的重要作用, 为鉴定VgrS-VgrR调控机制提供线索, 为药物筛选提供靶向目标。

关键词: 地毯草黄单胞菌, 双组分系统, 突变体, 表型筛选

由地毯草黄单胞菌木薯萎蔫致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xam*)引起的细菌性萎蔫病是一种世界性病害, 严重影响木薯产量, 甚至可造成毁种绝收^[1]。该病是乌干达木薯产区发生面积最大的病害^[2], 2012年对我国广东湛江和广西贵港近400 hm²的木薯种植区造成极大危害, 2015年4月贵港地区苗期发病面积已达20 hm²^[3]。截止2020年11月的入侵物种纲

要数据库(Invasive Species Compendium, CABI)显示, 该病依然是威胁广东、广西、海南和云南等地区木薯产量的主要病害^[4]。

双组分系统(two-component system, TCS)是原核生物感应外界环境刺激调控目标基因表达的主要调控元件^[5-6]。该系统在感应外界环境刺激下, 调节细菌毒力因子、III型分泌系统、胞外酶、胞外多糖、生物膜形成等^[7]。2012年,

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201109); 国家自然科学基金(31772123)

*通信作者: Tel: +86-10-64806124; Fax: +86-10-64858245; E-mail: 黄贵修, hgxiu@vip.163.com, 王莉, jennywangli@im.ac.cn

收稿日期: 2020-10-24; 修回日期: 2020-12-26; 网络出版日期: 2021-01-11

加州大学伯克利分校完成了来自巴西、哥伦比亚、乌干达、印度尼西亚等地 65 株 *Xam* 的全基因组测序工作, 并系统分析了 III 型分泌系统效应子在致病过程中的作用^[8]。其中, 效应子 TALE1 作为一个关键致病因子, 能够被寄主木薯诱导表达^[9]; TALE20 作为糖类转运体 MeSWEET10 的激活子, 能够促进 *Xam* 668 的毒性^[10]。进一步全面筛选 III 型分泌系统效应子的功能, 发现 9 个效应蛋白在细菌毒力和植物免疫中发挥了重要作用, 其中效应蛋白 XopZ、XopX、XopAO1 和 AvrBs2 的缺失突变体完全丧失了对寄主植物的致病性^[11]。除效应蛋白, 研究显示 *Xam* 产生的胞外淀粉酶也可以作为致病生化因子^[12]。2013 年, 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所在完成了 *Xam* 小种 GX11 的全基因组测序工作基础上, 构建了 Tn5 插入失活突变体库^[13]。随机挑取 Tn5 转化子, 筛选并验证了 III 型分泌系统调节子 HrpX、HrpG 以及精氨酸琥珀酸裂解酶 *Xam_asl* 是细菌致病过程中的重要因子^[14-15]。以上研究都集中在 II 和 III 型效应子对细菌毒力的作用, 然而对于其他毒力因子和调控元件在 *Xam* 中的作用, 特别是与野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *Campestris*, *Xcc*)、水稻黄单胞菌(*X. oryzae* pv. *Oryzae*, *Xoo*)相比, 包括双组分系统在内的调控元件在 *Xam* 中的致病机理还有待进一步挖掘。

到目前为止, 黄单胞菌属(*Xanthomonas*)中经活性和调控功能验证的 TCS 蛋白有 19 个, 分别是 RpfC-RpfG、RavS-RavA-RavR、VgrS-VgrR、PhoQ-PhoP、RaxH-RaxR、HpaS-HrpG、SreK-SreR-SreS、PcrK-PcrR 和 VemR^[16-20]。其中 VgrS-VgrR 是一组控制细菌毒力的典型调控子。*vgrS* 和 *vgrR*

突变后, *Xcc* 的致病力、胞外多糖与脂多糖合成、胞外蛋白酶活性、细菌生长速度等均明显下降^[16]。*Xoo* 中的 *vgrS* 和 *vgrR* 突变后, 也分别造成水稻 (IR24) 的致病力下降和丧失^[21]。此外, VgrS-VgrR 还特异性地调控 *Xcc* 在非寄主植物辣椒上的过敏反应, 影响细菌 III 型分泌系统 *hrcC* 和 *hrcE* 操纵子的表达^[22]。在柑桔溃疡病黄单胞菌(*X. citri* pv. *citri*)中, VgrS-VgrR 被证明影响细菌 III 型分泌系统基因 *hrpD6*、*hpaF*、O-抗原合成相关基因 *rfbC* 和过氧化物酶基因 *katE* 的转录^[23]。研究显示, VgrS 作为组氨酸激酶能够直接感应来自外界环境中 Fe 离子的变化, 调节细菌体内 Fe 的平衡^[24]。由此可见, VgrS-VgrR 是一个在多种黄单胞菌中调控致病力的关键 TCS。

本文在 *Xam* 小种 GX08 基因组中搜索到与 *Xcc* 和 *Xoo* 的 *vgrR-vgrS* 遗传位点同源的基因, 命名为 *vgrR^{Xam}* 和 *vgrS^{Xam}*。通过同源重组的方法获得 *vgrR^{Xam}* 和 *vgrS^{Xam}* 插入失活突变体, 表型分析结果证实了该 VgrS-VgrR 系统与致病性的关系, 研究将为木薯细菌性病害的高效定向防控提供可供选择的靶标。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 地毯草黄单胞菌木薯萎蔫致病变种 *Xam* GX08、重组质粒 pK18mob、互补载体 pHM1 以及大肠杆菌 DH5 α 菌株皆为本实验室保存。EZ-T 载体购自 GenStar 生物科技有限公司。抗生素工作浓度为: 氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 壮观霉素 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验过程中的质粒和菌株见表 1, 所需引物见表 2。

表 1. 菌株及质粒
Table 1. Strains and plasmids in this study

Strains/Plasmids	Genotype or description	Resources
Strains		
DH5 α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Lab collection
<i>Xam</i> GX08	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> GX08	Lab collection
Δ vgrS	Insertional mutant of <i>vgrS</i> , Kan ^R	This study
Δ vgrR	Insertional mutant of <i>vgrR</i> , Kan ^R	This study
Δ vgrS-pHM1	Δ vgrS strain containing a blank pHM1 vector, Sp ^R	This study
Δ vgrR-pHM1	Δ vgrR strain containing a blank pHM1 vector, Sp ^R	This study
Δ vgrS-vgrS	Genetic complementary strain of <i>vgrS</i> mutant which contains a vector of pHM1:: <i>vgrS</i> , Sp ^R	This study
Δ vgrR-vgrR	Genetic complementary strain of <i>vgrR</i> mutant which contains a vector of pHM1:: <i>vgrR</i> , Sp ^R	This study
Plasmids		
pK18mob	Suicide plasmid for <i>Xam</i> , Kan ^R	Lab collection
pHM1	Broad-host-range <i>cos</i> IncW derivative of pRI40, Sp ^R	Lab collection
pK18-vgrS	Recombinant suicide vector for constructing <i>vgrS</i> insertion inactivation mutant, Kan ^R	This study
pK18-vgrR	Recombinant suicide vector for constructing <i>vgrR</i> insertion inactivation mutant, kan ^R	This study
pHM1-vgrS	Recombinant vector for genetic complementation of <i>vgrS</i> mutant, Sp ^R	This study
pHM1-vgrR	Recombinant vector for genetic complementation of <i>vgrR</i> mutant, Sp ^R	This study

表 2. 本研究所用引物
Table 2. Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Enzyme
VgrR-F	GAATTCGGACCGGGGCCACACTGT	<i>EcoR</i> I
VgrR-R	AAGCTTCGCACTTCCAGCGTATCCA	<i>Hind</i> III
VgrS-F	GAATTCGGGTGTTGGTATTCAGCGGGTT	<i>EcoR</i> I
VgrS-R	AAGCTTCGCTCGTTACGCGAGAGCA	<i>Hind</i> III
pcom-VR-F	AAGCTTGTGCGAATTCTAGTAATTGAAGATAAC	<i>Hind</i> III
pcom-VR-R	GAGCTCTCAGGCATCGGGCGAGGC	<i>Sac</i> I
pcom-VS-F	GTCGACATGAATCGCAACATCGACGCCTT	<i>Sal</i> I
pcom-VS-R	GAGCTCTCAGCGATGGAAGGCCA	<i>Sac</i> I
VS-up-F	GAATTCCTCCCGGTGTTGATGCTGA	Paired with M13F
VS-down-R	AAGCTTCGCACGGACAACGGCAA	Paired with M13R
VR-up-F	AAGCTTTGGTGCTGGAGGTCAACTCGA	Paired with M13F
VR-down-R	GAATTCGCAGCCAGTGGCTTGGGTT	Paired with M13R

1.1.2 生化试剂及培养基: 限制性内切酶购自 Thermo Scientific 公司, T₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶购自康为世纪生物科技有限公司。氨基青霉素、卡那霉素购自 Sigma 公司, 壮观霉素购自北京鼎国生物技术有限责任公司。质粒纯化和胶回收试剂盒购自博迈德基因技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯, 购自北京化工厂。大肠杆

菌用 LB 培养基 37 °C 培养, *Xam* 用 NYG 培养基 28 °C 培养, 胞外多糖含量测定用 TGM 培养基 (1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 2%甘油, 1%葡萄糖, 0.07% K₂HPO₄, 0.025% MgSO₄·7H₂O)。

1.2 *vgrS* 和 *vgrR* 插入失活菌株的构建

以 *Xam* GX08 基因组 DNA 为模板, VgrS-F/VgrS-R 和 VgrR-F/VgrR-R 为引物扩增基因内部

分片段。PCR 产物连接 EZ-T 载体测序, 酶切后连接 pK18mob 载体, 分别得到重组质粒 pK18-vgrS 和 pK18-vgrR。重组质粒电击转化 *Xam* 感受态细胞, 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 NYG 培养基上筛选并 PCR 鉴定阳性克隆。鉴定引物分别为 M13F/VS-up-F、VS-down-R/M13R 和 M13F/VR-up-F、VR-down-R/M13R。引物 VS-up-F 和 VS-down-R 是 *vgrS* 基因编码区以外的上下游序列, VR-up-F 和 VR-down-R 是 *vgrR* 基因编码区外的上下游序列, M13F 和 M13R 为载体序列。载体引物和基因组引物配对扩增时, 单交换重组子可以扩增到特异片段, 分别为 1389、1566、1264、1258 bp, 野生型菌株没有相应扩增产物。

1.3 互补菌株的构建

以 *Xam* GX08 基因组 DNA 为模板, pcom-VS-F/pcom-VS-R 和 pcom-VR-F/pcom-VR-R 为引物扩增全基因片段。PCR 产物连接 EZ-T 载体测序, 酶切后连接 pHM1, 分别得到互补质粒 pHM1-vgrS 和 pHM1-vgrR。互补质粒分别电击转化 *vgrS* 和 *vgrR* 突变体感受态细胞, 在含 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素的 NYG 培养基上筛选并 PCR 鉴定阳性克隆。

1.4 *Xam* 致病力检测

挑取野生型、突变体菌株单菌落于 5 mL 含不同抗生素的 NYG 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 16 h 以上, 使之达到对数生长后期。离心收集菌体, 10 mmol/L MgCl_2 清洗 2 次去除抗生素并重悬至 $OD_{600}=0.4$ 。灭菌剪刀沾取菌液沿木薯叶片横向剪掉叶尖约 1 cm 大小的部分, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 d 观察病斑的长度。

1.5 胞外酶活性检测

1.5.1 纤维素酶活性检测: 不同菌株单克隆培养在含抗生素的 NYG 液体培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 离心收集菌体, 灭菌 ddH₂O 洗菌体 2 次, 菌体重悬至 $OD_{600}=0.4$ 。取 1 μL 培养液点接于含 0.5% 羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC, Sigma) 的 NYG 固体平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。加入 20 mL 0.1% 刚果红染色 30 min, 1 mol/L 的 NaCl 洗 2 次, 染色后在红色背景下可见一透明圈。野生型 *Xam* 和互补菌株作阳性对照。

1.5.2 淀粉酶活性检测: 将调 $OD_{600}=0.4$ 的不同待测菌株接种在含有 0.1% 可溶性淀粉的 NYG 固体平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h; 用 I₂/KI (0.08 mol/L I₂, 3.2 mol/L KI) 溶液染色 10 min。淀粉酶活性通过紫黑色背景下形成无色透明圈的大小来衡量。

1.5.3 蛋白酶活性检测: 将调 $OD_{600}=0.4$ 的不同待测菌株接种在终浓度为 2% 的脱脂奶粉 NYG 固体平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。能产生胞外蛋白酶的菌株在菌落周围形成一个水解脱脂奶粉的透明圈。

1.6 细菌游动性检测

单克隆细菌接种于 5 mL 含抗生素的 NYG 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 10000 r/min 室温离心收集菌体, 灭菌 ddH₂O 清洗 2 次, 菌体重悬至 $OD_{600}=0.4$ 。取 2 μL 点板到含 0.3% 琼脂糖的 NYG 半固体培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48–72 h, 观察并测量菌落直径。

1.7 过氧化氢(H₂O₂)耐受性分析

培养过夜的细菌用 ddH₂O 清洗 2 次并重悬至 $OD_{600}=0.4$ 。加终浓度为 10 mmol/L 的 H₂O₂, 室温静置 15 min, ddH₂O 清洗 2 次, 重悬至原体积。细菌梯度稀释至 4×10^4 CFU/mL, 取 100 μL 涂 NYG 平板, 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 48 h, 计算菌落数。

1.8 金属离子胁迫实验

培养过夜的细菌用 ddH₂O 清洗 2 次并重悬至 OD₆₀₀=0.4, 细菌稀释成 5 个梯度: 4×10⁸、4×10⁷、4×10⁶、4×10⁵、4×10⁴ CFU/mL。取 1.5 μL 稀释培养液分别点接于含 2.5 mmol/L FeSO₄+0.5 mmol/L 抗坏血酸、1.5 mmol/L FeCl₃、0.4 mmol/L CuSO₄、0.4 mmol/L ZnSO₄、0.3 mmol/L CoCl₂ 和 0.5 mmol/L NiSO₄ 的 NYG 平板上, 28 °C 静置培养 2–3 d, 观察菌体生长状况。

1.9 胞外多糖(EPS)含量测定

挑取单菌落于 5 mL NYG 液体培养基中, 28 °C 摇床培养过夜, 取 1 mL 转接到 40 mL TGM 液体培养基, 28 °C、220 r/min 培养 96 h。4 °C、25000×g 离心 45 min 分离菌体, 沉淀烘干为菌体干重。上清加入 1/10 体积的饱和 KCl, 等体积的无水乙醇, 混匀, 4 °C 沉淀过夜。4 °C、25000×g 离心 30 min, 用等体积 95%乙醇洗 2 次, 烘干得到多糖干重。胞外多糖含量为每克菌体干重包含的多糖干重量^[25–26]。

2 结果和分析

2.1 VgrR-VgrS 的结构特征分析

tblastn 序列比对结果显示, *Xam* 中 *vgrR-vgrS* 遗传位点的序列长度为 2.0 kb, *vgrR* 基因全长 678 bp, *vgrS* 全长 1158 bp, 基因间隔区 169 bp, *vgrR* 位于 *vgrS* 的基因组上游。搜索 NCBI 数据库中具有 *vgrR-vgrS* 基因簇的细菌基因组, 筛选相似度最高的前 500 个序列进行比对, 发现 *vgrR-vgrS* 基因簇在革兰氏阴性菌中具有广泛的相似性, 并且在植物病原菌中相对保守。根据基

因间隔区序列的长度, 将 *vgrR-vgrR* 遗传位点分为 3 种主要形式(图 1)。

第一种模式 *vgrR* 和 *vgrS* 之间有 4–44 bp 的重叠区, 即 *vgrR* 的 3'区与 *vgrS* 的 5'区重叠, 这样的细菌包括 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10、*Pseudomonas oryzae* KCTC 32247、*Dyella* sp. M7H15-1、*X. citri* pv. *mangiferaeindicae* XC01、*X. translucens* pv. *undulosa* Xtu 4699 和 *X. fragariae* Fap21 等。

第二种 *vgrR* 和 *vgrS* 基因之间存在 100 bp 左右基因间隔区, 包含这种模式的细菌有 *Xam* GX08、*Xcc* 8004、*X. axonopodis* pv. *citri* 306、*X. vasicola* pv. *vasculorum* Xv1601、*Lysobacter capsici* 55、*Stenotrophomonas maltophilia* JV3 以及基因间隔区序列为 495 bp 的 *X. albilineans* GPE PC73 等。

第三种模式只存在于 *Xoo* 中, *vgrR* 和 *vgrS* 之间不仅有基因间隔区, 而且基因间隔区编码一个 IXO1 transposase 蛋白。虽然这种模式区别于其他细菌, 但进化谱系树分析显示其遗传位点依然与 *Xam* GX08 进化距离较近, 与 *Pseudomonas* 和 *Lysobacter* 的亲缘关系较远, 推测此遗传位点发生重大功能改变的位置不在基因间隔区(图 1)。

2.2 *vgrS* 和 *vgrR* 突变体菌株的构建和筛选

生物信息学分析显示 *vgrR-vgrS* 遗传位点的分析重点在于基因编码蛋白功能的不同, 实验首先构建了 *vgrR* 和 *vgrS* 的突变体, 按照 1.2.1 方法筛选阳性克隆子。图 2-A 结果显示, 以不同菌株基因组 DNA 为模板, M13F/VS-up-F 为配对引物时, Δ*vgrS* 的 2、5、9 和 12 克隆能够得到 1389 bp 的 PCR 条带, 以 M13R/VS-down-R 为配对引物,

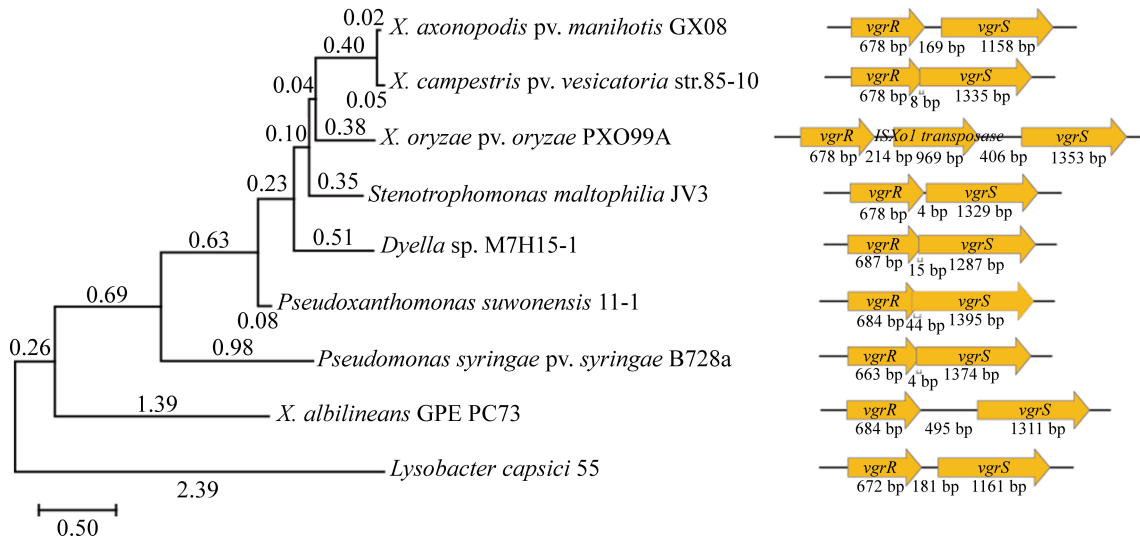


图 1. *vgrR-vgrS* 遗传位点进化树及基因序列排列模式分析

Figure 1. Phylogenetic tree analysis for *vgrR-vgrS* gene cluster. The phylogenetic tree is constructed by Neighbor-Joining method. The arranged pattern of *vgrR-vgrS* locus based on gene spacer region is shown in the schematics. The gene name and the gene size are marked in the figure.

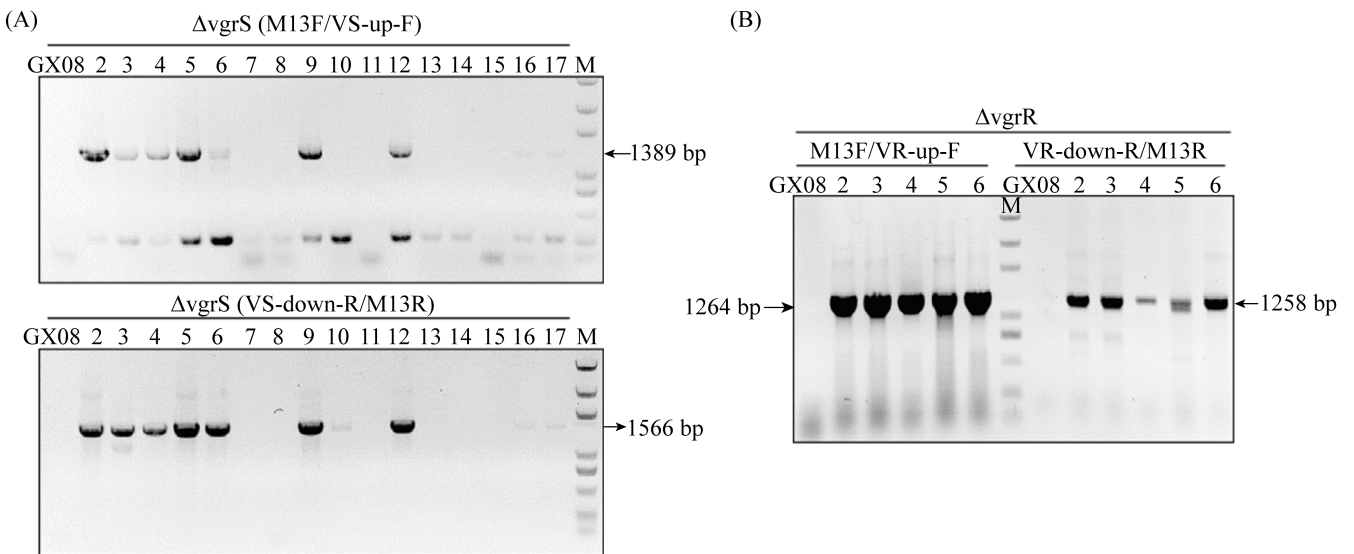


图 2. *vgrS* 和 *vgrR* 突变体菌株的 PCR 鉴定结果

Figure 2. PCR detection results of *vgrS* and *vgrR* mutants. A: PCR verification of $\Delta vgrS$. Lane 1: Amplifications with chromosomal DNA of wild type GX08 as template; lane 2–17: Amplifications with chromosomal DNA of candidate mutant clones; M: DL2000 plus DNA marker. Upper panels: PCR results generated by M13F/VS-up-F primer pairs; lower panels: PCR results generated by VS-down-R/M13R primer pairs. B: PCR verification of $\Delta vgrR$. Lane 1: Amplifications with chromosomal DNA of wild type GX08 as template; lane 2–6: Amplifications with chromosomal DNA of candidate mutant clones. Left panels: PCR results of M13F/VR-up-F primer pairs; right panels: PCR results of VR-down-R/M13R primer pairs.

2、3、4、5、6、9 和 12 号克隆的 PCR 产物是 1566 bp, 野生型 GX08 基因组 DNA 模板条件下, 两对引物都没有得到 PCR 产物。结合两次实验结果, 2、5、9 和 12 是筛选到的 *vgrS* 阳性突变体菌株。同样, 根据图 2-B 结果, *vgrR* 的阳性突变体为 2、4 和 6 号克隆。

2.3 *vgrR* 和 *vgrS* 突变体降低 *Xam* 的致病力

10 d 后病症观察结果表明, *vgrR* 和 *vgrS* 插入失活突变体都导致 *Xam* 的致病力下降(图 3)。根据致病分级标准, *Xam* GX08 致病严重程度为 3 级(发病症状分级标准: 0, 无症状; 1, 剪切口周围变黄; 2, 发黄表型从切口向外延伸; 3, 发黄区域内的叶脉变黑, 组织枯死; 4, 组织枯死及叶脉变黑的表型向外延伸), $\Delta vgrS$ 为 1 级, $\Delta vgrR$ 为 0.5 级, 互补菌株 $\Delta vgrS$ -*vgrS* 和 $\Delta vgrR$ -*vgrR* 的致病力恢复至接近野生型水平。

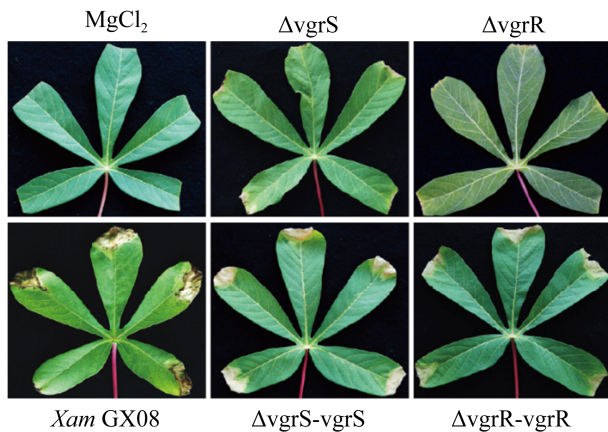


图 3. *vgrS* 和 *vgrR* 突变体的致病力分析

Figure 3. The virulence detection of *vgrS* and *vgrR* mutants against host cassava. Bacteria were suspended in NYG media at a concentration of 10^8 CFU/mL for inoculation. Virulence levels were recorded 10 days after inoculation. The *Xam* GX08, *vgrS* mutant, *vgrR* mutant and complementary strains were used.

2.4 *vgrR* 和 *vgrS* 影响 *Xam* 的胞外蛋白酶含量

胞外蛋白酶含量结果显示, *vgrR* 和 *vgrS* 突变导致细菌蛋白酶活性降低, *vgrR* 突变体蛋白酶圈直径大小(平均直径 0.95 cm)是野生型(平均直径 1.85 cm)的 50%–80%, *vgrS* 突变体蛋白酶圈直径大小(平均直径 1.35 cm)是野生型的 60%–80%, 互补菌株能够完全或者部分恢复至野生型水平(图 4)。 *vgrR* 和 *vgrS* 突变体并不影响纤维素酶和淀粉酶的产生(数据未显示)。表明 *vgrR* 和 *vgrS* 只是通过调控胞外蛋白酶的分泌影响细菌的致病力。

2.5 *vgrR* 和 *vgrS* 突变体降低 *Xam* 的游动水平

如图 5 所示, *vgrS* 突变体在 0.3% 的 NYG 半固体培养基培养 3 d 后, 其菌落大小在 1.15–1.40 cm 之间, 平均值是 1.27 cm, 野生型的菌落直径为 1.75–1.90 cm, 平均直径是 1.82 cm, 表明 *vgrS* 突变体的游动性(swimming)减弱(下降至野生型的 69.7%)。同样, 与野生型相比, *vgrR* 突变体的游

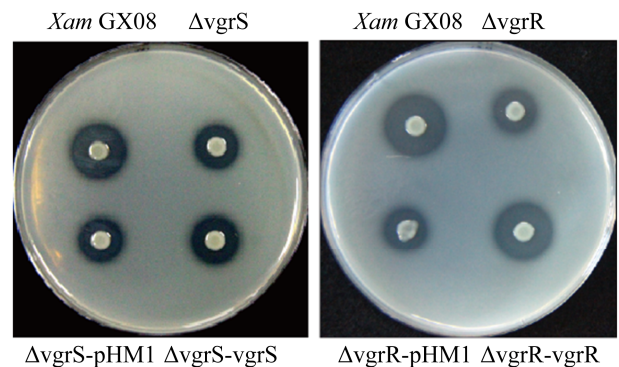


图 4. *vgrS* 和 *vgrR* 突变体的胞外蛋白酶活性检测

Figure 4. Extracellular protease activities of *vgrS* and *vgrR* mutants. The activity assay was performed on NYG solid medium containing 2% skimmed milk. $\Delta vgrS$ -pHM1 and $\Delta vgrR$ -pHM1 are control of mutants with empty vector. $\Delta vgrS$ -*vgrS* and $\Delta vgrR$ -*vgrR* are complementary strains.

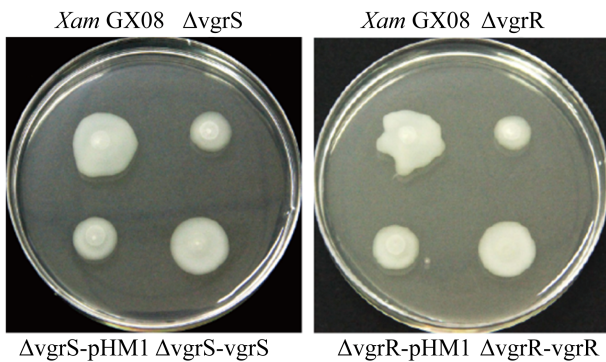


图 5. *vgrS* 和 *vgrR* 突变体的游动性分析

Figure 5. Swimming detection of *vgrS* and *vgrR* mutants. The motility of different stains on 0.3% NYG semi-solid media was compared. Strain names are the same as in Table 1.

动性下降了 42.7% (野生型平均菌落直径 1.92 cm, *vgrR* 突变体平均菌落直径 1.10 cm)。基因遗传互补完全或者部分恢复至野生型游动水平, 进一步证明了 *vgrS-vgrR* 调控子调节细菌游动性的能力。

2.6 *vgrR* 和 *vgrS* 突变体降低 *Xam* 对 H_2O_2 的耐受力

10 mmol/L H_2O_2 胁迫处理结果显示, 与未处理相比, *vgrS* 和 *vgrR* 突变体的存活率是野生型的 24.84%和 46.07%, 转化空载体的突变体存活率是野生型的 11.22%和 20.87%, 遗传互补部分恢复至野生型水平(图 6), 表明 *vgrR* 和 *vgrS* 在抗 H_2O_2 胁迫中起重要作用。

2.7 *vgrR* 和 *vgrS* 调节 *Xam* 对金属离子的胁迫反应

分析胁迫反应的结果, 高浓度 Cu^{2+} (0.4 mmol/L)、 Zn^{2+} (0.4 mmol/L)、 Co^{2+} (0.3 mmol/L) 和 Ni^{2+} (0.5 mmol/L) 条件下, *vgrR* 和 *vgrS* 突变体的生长速度低于野生型菌株, 遗传互补完全或部分恢复至野生型水平, 其中 VgrS 对 Cu^{2+} 更敏感, VgrR 对 Zn^{2+} 和 Ni^{2+} 的敏感性高于 VgrS (图 7-A)。

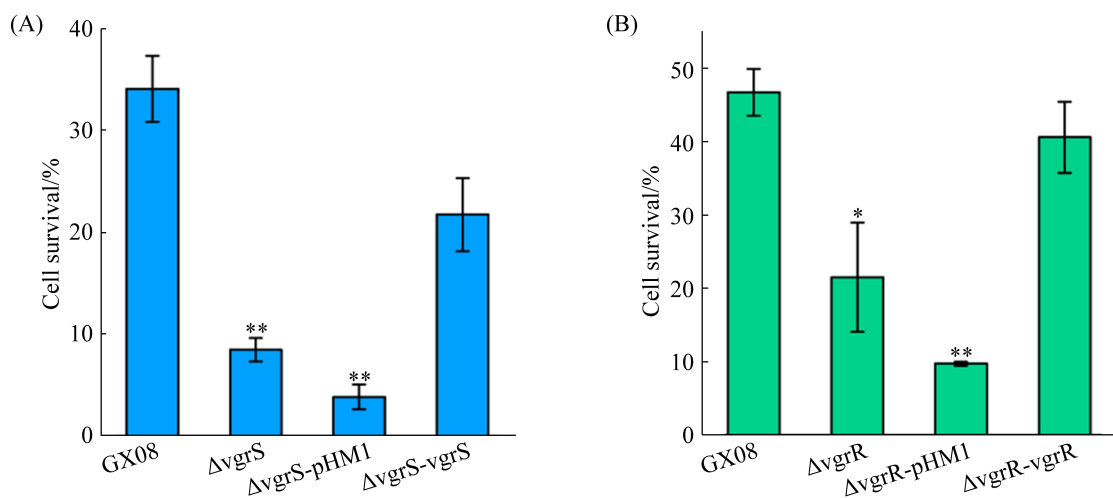


图 6. *vgrS* 和 *vgrR* 突变体的 H_2O_2 耐受力

Figure 6. Survival rate of *vgrS* and *vgrR* mutants subjected to H_2O_2 stress. Bacterial cultures ($OD_{600}=0.4$) in NYG media were treated with H_2O_2 and survival rates were calculated by counting cell numbers before and after the stress challenge. A: a measure result of *vgrS*; B: a measure result of *vgrR*. Data are shown as mean \pm SD. *: a significant difference (by Student's *t*-test, $P<0.05$) compared with that of WT; **: a significant difference by Student's *t*-test, $P<0.01$.

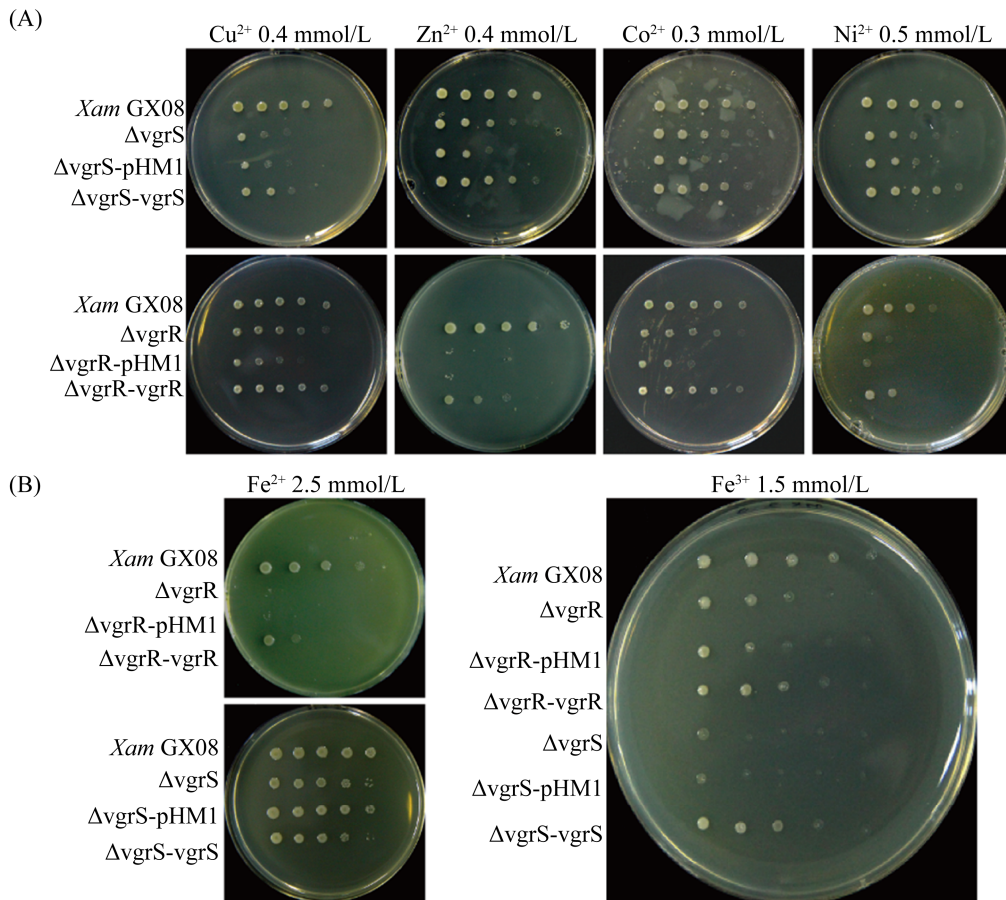


图 7. *vgrS* 和 *vgrR* 突变体对金属离子的胁迫反应

Figure 7. Bacterial growth under different metal stress. Bacterial strains were inoculated onto NYG plates containing different concentration of metals at 28 °C for 48–72 h. A: the bacteria cultured on NYG medium containing different concentration of Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ and Ni²⁺; B: the results of Fe²⁺ and Fe³⁺ stress.

在 Fe²⁺ (2.5 mmol/L) 条件时, *vgrS* 突变体的生长不受抑制, 而 *vgrR* 突变体基本不生长; 另一方面, Fe³⁺ (1.5 mmol/L) 浓度下, *vgrR* 和 *vgrS* 突变体的生长都受到抑制, 但是 *vgrS* 突变体的受抑制水平显著强于 *vgrR* 突变体, 遗传互补恢复表型 (图 7-B)。这些结果表明, 细菌生长需要 VgrS-VgrR 系统维持铁和其他金属离子的体内平衡。

2.8 *vgrR* 和 *vgrS* 突变体增强了 *Xam* 胞外多糖的产量

胞外多糖测定结果显示, *vgrS* 突变后平均每

克干重菌体含多糖 2.60 g, 是野生型多糖含量的 2.14 倍 (野生型平均每克干重菌体含多糖 1.22 g), 转化空载体的突变体为每克干重菌体含多糖 2.53 g, 互补菌株与野生型含量接近为 1.14 g (图 8-A)。同样, *vgrR* 突变后平均每克干重菌体含多糖 1.69 g, 是野生型多糖含量的 1.89 倍 (野生型平均每克干重菌体含多糖 0.90 g), 互补菌株与野生型接近为 1.12 g, 表明 VgrR 和 VgrS 影响了 EPS 的合成和产量。

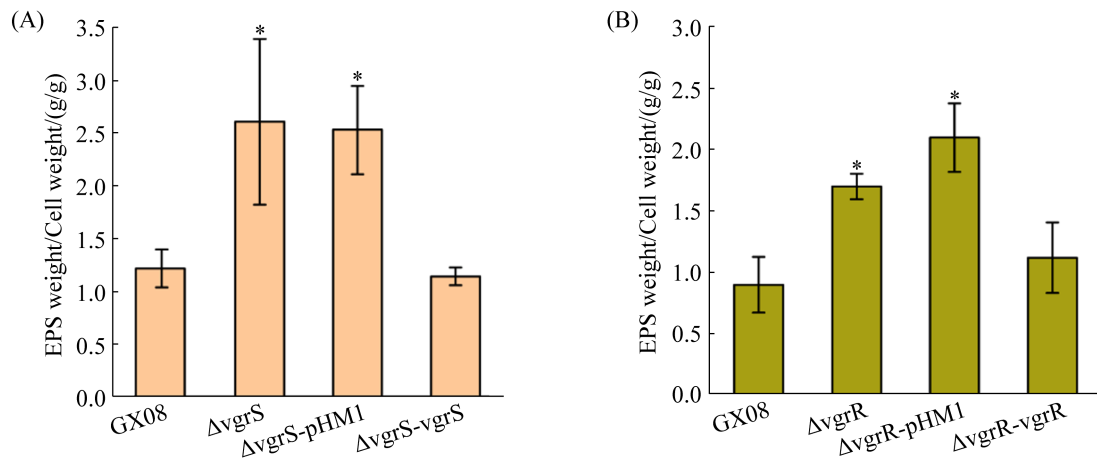


图 8. *vgrS* 和 *vgrR* 突变体胞外多糖产量检测

Figure 8. The EPS production of *vgrS* and *vgrR* mutants. Bacterial strains were inoculated in TGM media supplemented with 1% glucose and incubated at 28 °C for 96 h. EPS production was determined by dividing the dry weight of polysaccharides by the dry weight of bacteria. A: the EPS production of *vgrS* mutant; B: the result of *vgrR* mutant. Data are shown as mean±SD. *: a significant difference (by Student's *t*-test, $P < 0.05$) compared with that of WT.

3 讨论

本研究成功构建地毯草黄单胞菌木薯萎蔫致病变种(*Xam* GX08)双组分调控因子 *vgrR-vgrS* 的插入失活突变体, 并通过胞外酶、胞外多糖、游动性、过氧化氢耐受性、金属离子胁迫反应以及直接的致病性接种实验, 验证了 VgrS-VgrR 系统参与细菌的致病调控途径, 是细菌致病过程中不可或缺的调节子。

以 9 个具有代表性的植物病原菌绘制 *vgrR-vgrS* 基因簇的系统发育树显示, 辣椒溶杆菌(*L. capsici*)、甘蔗白纹病黄单胞菌(*X. albilineans*)与 *Xam* 的进化距离较远, 位于早期的进化分支, 推测完整的 *vgrR-vgrS* 基因簇起源于包括 *L. capsici* 或者 *X. albilineans* 在内的相关细菌, 它们通过水平基因转移的方式在同源物种中获得或者丢失基因(图 1)。这一假设表明, *Xam* 在黄单胞菌属中是较晚获得 *vgrR-vgrS* 基因簇的, 或者 *Xam* 基因簇

的进化速率要快于 *Xoo* 等其他黄单胞菌。虽然 *vgrR-vgrS* 基因簇的基因间隔区具有较大序列长度和碱基的差异, 但它们并不影响基因簇在进化树中的系统发育关系, 这些序列可能是 *vgrS* 基因转录和翻译的潜在起始序列, 因此间隔序列的多态性对基因簇的功能影响甚少, 进一步说明 *vgrR* 和 *vgrS* 保守基因是协同进化的。在细菌中, 通过水平基因转移获得新基因有助于病原菌的感染和生存, 同时不同的选择压力也会促进新功能的出现。

研究表明, *vgrR-vgrS* 基因簇与细菌的致病力紧密相关。另外, VgrS-VgrR 系统能够提高细菌对金属离子的耐受性, 在 *Xcc* 中 VgrS-VgrR 耐受 Fe、Cu、Zn、Ni、Mn 以及 Co 的高浓度胁迫^[24], 恶臭假单胞菌(*P. putida*)的 VgrS-VgrR 对 Fe、Zn、Mn 以及重金属镉具有较强的耐受性^[27], 柑桔溃疡病黄单胞菌是对 Cu 耐受^[23]。对比以上研究结

果, *vgrR-vgrS^{Xam}* 的突变体对 Cu、Zn、Ni、Co 的胁迫敏感(图 7-A), 这与 *Xcc* 的结果一致, 但是在 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 离子胁迫平板上, *vgrS* 和 *vgrR* 突变体的生长出现了差异。首先, *vgrS* 突变体对 Fe^{2+} 的胁迫没有反应, 突变体的生长速度与野生型基本一致, 而在 Fe^{3+} 平板上, *vgrS* 突变体的生长受到严重抑制(图 7-B); 其次, 虽然 *vgrR* 突变体对两种离子的胁迫都有反应, 但是对 Fe^{2+} 离子更敏感(图 7-B)。推测 *Xam* 中的 VgrS 可能既不感应 Fe^{2+} 离子信号也不调控 Fe^{2+} 的转运, 双组分系统 VgrS-VgrR 在 Fe^{2+} 还原条件下发生了调控分化, 此时 VgrR 可能接受来自其他组氨酸激酶的磷酸信号。考虑到 *Xam* 的寄主木薯属于热带作物, 不同于温带的甘蓝、萝卜等十字花科植物, VgrS-VgrR 系统在这 2 个菌中发生功能分化并不奇怪, VgrS^{Xam} 和 VgrS^{Xcc} 的蛋白序列达到 96.6% 的高相似度, 但是在信号感应区却有一个与细菌致死相关的位点差异(未发表数据), 推测 *Xam* 中 VgrS-VgrR 的信号识别机制可能与 *Xcc* 不同, 其针对不同环境启动的调控途径也会有差异。

细菌多糖可分为 3 种类型: 细胞壁多糖(如肽聚糖)、胞外多糖(如黄原胶)、胞内多糖(如脂多糖)^[28], 其中胞外多糖形成的粘质层能够为病原菌侵染、聚集、生长提供必需的条件, 是细菌致病过程中非常重要的致病因子^[29]。本研究显示, *vgrS* 和 *vgrR* 突变体产生的胞外多糖含量高于野生型(图 8), 暗示 VgrS-VgrR 负调控 EPS 的合成和转运。豆科根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*)的转录调节子抑制脂多糖 LPS、 β -葡聚糖等生物合成基因的转录, 同时促进肽聚糖、纤维素和 EPS 合成的基因表达^[30]; 油酸不动杆菌

(*Acinetobacter oleivorans* DR1)的烷基过氧化氢还原酶基因 *ahpC* 突变体产生的 EPS 是野生型菌株的 1.7 倍, 推测高水平的 EPS 有利于细胞承受更多的氧化应激^[31]; 另外, 不是所有 EPS 合成基因发生突变后都会使细菌感染能力减弱, 例如 *Xcc* EPS 合成基因族的 *gumL* 突变后并不影响致病力^[32]。这些结果都表明 EPS 对细菌感染过程的影响是多样化的, VgrS-VgrR 调控致病性的机制也是多途径的。

综上, 本研究对 *Xam* 中重要的调控系统 VgrS-VgrR 进行了全面的致病性分析, 结果显示该系统是一个全局性的转录调节系统, 通过不同方式参与多种细胞致病过程。本研究拓展了对地毯草黄单胞菌致病机制的认识, 为深入了解该细菌的调控网络提供了线索。

参考文献

- [1] Lahai MT, Ekanayake IJ, George JB. Leaf harvesting effects on leaf retention and pest and disease incidence of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Tropical Agriculture*, 1998, 75(1/2): 154–159.
- [2] Shi T, Li CP, Cai JM, Wang GF, Feng YL, Huang GX. Industry status and bacterial blight of cassava in Uganda. *China Plant Protection*, 2019, 39(10): 79–86. (in Chinese)
时涛, 李超萍, 蔡吉苗, 王国芬, 冯艳丽, 黄贵修. 乌干达木薯产业现状及病害. *中国植保导刊*, 2019, 39(10): 79–86.
- [3] Yang D, Li CP, Wei M, Huang GX. Plant protection problems and their countermeasures in cassava planting industry in China. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2017, 37(5): 114–120. (in Chinese)
杨丹, 李超萍, 韦明, 黄贵修. 当前中国木薯种植业所面临的主要植保问题及其对策. *热带农业科学*, 2017, 37(5): 114–120.
- [4] CABI-Invasive Species Compendium, <https://www.cabi.org/isc/>.

- [5] Hoch JA. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3(2): 165–170.
- [6] Zschiedrich CP, Keidel V, Szurmant H. Molecular mechanisms of two-component signal transduction. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(19): 3752–3775.
- [7] Bourret RB, Silversmith RE. Two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 113–115.
- [8] Bart R, Cohn M, Kassen A, McCallum EJ, Shybut M, Petriello A, Krasileva K, Dahlbeck D, Medina C, Alicai T, Kumar L, Moreira LM, Neto JR, Verdier V, Santana MA, Kositcharoenkul N, Vanderschuren H, Gruissem W, Bernal A, Staskawicz BJ. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(28): E1972–E1979.
- [9] Castiblanco LF, Gil J, Rojas A, Osorio D, Gutiérrez S, Muñoz-Bodnar A, Perez-Quintero AL, Koebnik R, Szurek B, López C, Restrepo S, Verdier V, Bernal AJ. TALE1 from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* acts as a transcriptional activator in plant cells and is important for pathogenicity in cassava plants. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(1): 84–95.
- [10] Cohn M, Morbitzer R, Lahaye T, Staskawicz BJ. Comparison of gene activation by two TAL effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* reveals candidate host susceptibility genes in cassava. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(6): 875–889.
- [11] Medina CA, Reyes PA, Trujillo CA, Gonzalez JL, Bejarano DA, Montenegro NA, Jacobs JM, Joe A, Restrepo S, Alfano JR, Bernal A. The role of type III effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in virulence and suppression of plant immunity. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(3): 593–606.
- [12] Cen ZL, He Z, Zheng LL. Study on pathogenicity and extracellular enzyme activity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Vauterin. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 24(6): 2213–2216. (in Chinese) 岑贞陆, 何忠, 郑露露. 木薯细菌性枯萎病原菌致病力差异及其胞外酶活性的研究. *西南农业学报*, 2011, 24(6): 2213–2216.
- [13] 陈江莎. 木薯地毯草黄单胞菌 Tn5 转座子插入突变体库的建立及其分子分析. 海南大学硕士学位论文, 2013.
- [14] 张长正. 木薯地毯草黄单胞菌 Tn5 转座子筛选及其 *asl_{Xam}* 基因的克隆. 海南大学硕士学位论文, 2016.
- [15] Shi T, Li CP, Liu XB, Huang GX. Establishment of *hrpG* gene mutant from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2013, 34(6): 1139–1143. (in Chinese) 时涛, 李超萍, 刘先宝, 黄贵修. 木薯细菌性枯萎病菌 *hrpG* 基因突变体的获得. *热带作物学报*, 2013, 34(6): 1139–1143.
- [16] Qian W, Han ZJ, Tao J, He CZ. Genome-scale mutagenesis and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(8): 1128–1138.
- [17] Cai Z, Yuan ZH, Zhang H, Pan Y, Wu Y, Tian XQ, Wang FF, Wang L, Qian W. Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum-sensing and virulence. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(4): e1006304.
- [18] Cheng ST, Wang FF, Qian W. Cyclic-di-GMP binds to histidine kinase RavS to control RavS-RavR phosphotransfer and regulates the bacterial lifestyle transition between virulence and swimming. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(8): e1007952.
- [19] Peng BY, Pan Y, Li RJ, Wei JW, Liang F, Wang L, Wang FF, Qian W. An essential regulatory system originating from polygenic transcriptional rewiring of PhoP-PhoQ of *Xanthomonas campestris*. *Genetics*, 2017, 206(4): 2207–2223.
- [20] Li RF, Lu GT, Li L, Su HZ, Feng GF, Chen Y, He YQ, Jiang BL, Tang DJ, Tang JL. Identification of a putative cognate sensor kinase for the two-component response regulator HrpG, a key regulator controlling the expression of the *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(7): 2053–2071.

- [21] Subramoni S, Pandey A, Priya MRV, Patel HK, Sonti RV. The ColRS system of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is required for virulence and growth in iron-limiting conditions. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(7): 690–703.
- [22] Zhang SS, He YQ, Xu LM, Chen BW, Jiang BL, Liao J, Cao JR, Liu D, Huang YQ, Liang XX, Tang DJ, Lu GT, Tang JL. A putative *colR_{XC1049}-colX_{XC1050}* two-component signal transduction system in *Xanthomonas campestris* positively regulates *hrpC* and *hrpE* operons and is involved in virulence, the hypersensitive response and tolerance to various stresses. *Research in Microbiology*, 2008, 159(7/8): 569–578.
- [23] Yan Q, Wang NA. The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(7): 1590–1599.
- [24] Wang L, Pan Y, Yuan ZH, Zhang H, Peng BY, Wang FF, Qian W. Two-component signaling system VgrRS directly senses extracytoplasmic and intracellular iron to control bacterial adaptation under iron depleted stress. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(12): e1006133.
- [25] Lu GT, Tang YQ, Li CY, Li RF, An SQ, Feng JX, He YQ, Jiang BL, Tang DJ, Tang JL. An adenosine kinase exists in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* and is involved in extracellular polysaccharide production, cell motility, and virulence. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(11): 3639–3648.
- [26] Bianco MI, Toum L, Yaryura PM, Mielnichuk N, Gudesblat GE, Roeschlin R, Marano MR, Ielpi L, Vojnov AA. Xanthan pyruvilation is essential for the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2016, 29(9): 688–699.
- [27] Ainsaar K, Mumm K, Ilves H, Hõrak R. The ColRS signal transduction system responds to the excess of external zinc, iron, manganese, and cadmium. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 162.
- [28] Chen LL, Wang WM, Zhu QJ, Du FL. Biosynthesis mechanisms of bacterial polysaccharide-A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(12): 1583–1589. (in Chinese)
陈蕾蕾, 王未名, 祝清俊, 杜方岭. 细菌多糖的生物合成机制. *微生物学报*, 2010, 50(12): 1583–1589.
- [29] Qiu JH, He YW. Advances in applications and research of Xanthan Gum. *Acta Laser Biology Sinica*, 2019, 28(5): 385–393, 409. (in Chinese)
邱嘉辉, 何亚文. 微生物胞外多糖黄原胶的应用与研究进展. *激光生物学报*, 2019, 28(5): 385–393, 409.
- [30] Rachwal K, Matczynska E, Janczarek M. Transcriptome profiling of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* mutant reveals the role of the transcriptional regulator RosR in motility, synthesis of cell-surface components, and other cellular processes. *BMC Genomics*, 2015, 16: 1111.
- [31] Jang IA, Kim J, Park W. Endogenous hydrogen peroxide increases biofilm formation by inducing exopolysaccharide production in *Acinetobacter oleivorans* DR1. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21121.
- [32] Katzen F, Ferreiro DU, Oddo CG, Ielmini MV, Becker A, Pühler A, Ielpi L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: Effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(7): 1607–1617.

Gene deletion and phenotype observation of two-component system VgrS-VgrR in *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Fanfan Meng^{1,2}, Yao Wu^{1,2}, Tao Shi³, Guixiu Huang^{3*}, Li Wang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² School of Biological Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan Province, China

Abstract: [Objective] In this study, we investigated the relationship between the VgrS-VgrR two-component system (TCS) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) and the bacterial pathogenicity. The study can provide molecular biological evidence for the effective prevention and control of cassava bacterial blight. **[Methods]** We constructed the insertion-inactivation mutants of *vgrS* and *vgrR* by homologous recombination, and constructed the complementary strains of each mutant by using the mobile cosmid vector pHM1. The study measured the pathogenicity of each mutant, its swimming and the changing in extracellular enzyme and extracellular polysaccharide production. We also observed the bacterial response to hydrogen peroxide and metal ion stress. **[Results]** Compared with wild-type strain, both *vgrS* and *vgrR* mutants exhibited significantly reduced pathogenicity after inoculation of the host plant cassava. Both mutants exhibited decreased swimming, reduced protease activity and hydrogen peroxide tolerance. Under the stress conditions of high concentrations of metal ions Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ and Cu²⁺, the mutants' growth were also significantly decreased. However, the extracellular polysaccharide content of *vgrS* and *vgrR* mutants increased dramatically, which was 2.14 and 1.89 times that of the wild type, respectively. **[Conclusion]** The results clarified the important role of the VgrS-VgrR TCS in the pathogenesis of *Xam*, and provided clues for further research on the regulation mechanism of VgrS-VgrR and drug screening targeting *Xam*.

Keywords: *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), two-component system, mutants, phenotype screening

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Project (2018YFD0201109) and by the National Natural Science Foundation of China (31772123)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-64806124; Fax: +86-10-64858245; E-mail: Guixiu Huang, hgxiu@vip.163.com, Li Wang, jennywangli@im.ac.cn

Received: 24 October 2020; Revised: 26 December 2020; Published online: 11 January 2021