

水稻白叶枯病菌 $\Delta rpfxoo$ 基因缺失突变体 DSF 信号产生和毒性表达

孙蕾, 吴茂森, 陈华民, 何晨阳*

(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】旨在阐明 3 个 DSF/Rpf xoo 信号系统成员 RpfF xoo 、RpfC xoo 和 RpfG xoo 在水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) 毒性表达中的功能。【方法】用标记置换法缺失突变 $rpfFxoo$ 、 $rpfCxoo$ 和 $rpfGxoo$ 基因, 测定突变体及其互补菌株的 DSF (diffusible signal factor) 信号分子产生、胞外多糖 (EPS) 产生及其对水稻的致病性。【结果】从野生型菌株 PXO99^A 基因组中克隆了推测与 DSF 信号生成和传导有关的基因 $rpfFxoo$ 、 $rpfCxoo$ 和 $rpfGxoo$, 获得了相应的单基因或双基因缺失突变体。与 PXO99^A 产生 DSF 相比, $\Delta rpfFxoo$ 、 $\Delta rpfF + Cxoo$ 和 $\Delta rpfF + Gxoo$ 均不产生 DSF, $\Delta rpfCxoo$ 过量产生, $\Delta rpfGxoo$ 产量降低; $rpfFxoo$ 、 $rpfCxoo$ 和 $rpfGxoo$ 可以分别互补 Xoo 和 Xcc 的相应基因突变体, 恢复 DSF 产生表型。除 $\Delta rpfFxoo$ 的 EPS 产生无明显变化外, 其余突变体的均显著减少。所有突变体对水稻的致病性均显著下降。【结论】RpfF xoo 、RpfC xoo 和 RpfG xoo 调控了 Xoo 的 DSF 信号生成、EPS 产生和致病性。

关键词: 水稻白叶枯病菌; DSF (diffusible signal factor); rpf 基因; 毒性; 调控

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0717-07

植物病原黄单胞 [如甘蓝黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Xcc)] 可利用一种新的可扩散信号因子 (DSF) (顺式-11-甲基-2-十二烯酸) 介导的群体感应 (QS) 机制, 调节毒性表达^[1-2]。 rpf 基因簇调控了 DSF 信号生成、接受和传导过程; RpfF 是乙酰辅酶 A 合成酶, 负责 DSF 信号合成。由 RpfC (感应磷酸激酶)/RpfG (应答调节蛋白) 组成了一对双组份调控系统, 负责信号感应、接受并传递, 从而调控了胞外毒性因子的合成、生物膜形成、运动性和致病性等^[3-4]。

前期研究表明, 水稻白叶枯病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) 在侵染水稻叶组织后, 其种群量与致病性表达具有典型的 QS 特征^[5], 但不清楚何种信号分子介导了这种 QS 机制。在水稻白叶枯病菌 (*X.*

oryzae pv. *oryzae*, Xoo) 测序菌株基因组中发现了与 Xcc 结构高度保守的 $rpfxoo$ 基因簇^[6], 但对基因功能的研究结果不尽相同。 $rpfFxoo$ 基因突变导致对四环素敏感和在低铁条件下出现生长缺陷, 但不影响 EPS 和胞外酶合成^[7]; $rpfCxoo$ 基因突变影响 EPS 产生和致病性, 但不影响胞外酶产生^[8]; $rpfBxoo$ 、 $rpfFxoo$ 、 $rpfCxoo$ 和 $rpfGxoo$ 基因突变导致致病性和 EPS 产生下降^[9]。至今也尚未见到 $rpfxoo$ 基因突变对 DSF 信号产生影响的有关报道。因此, 本研究构建了 $\Delta rpfFxoo$ 、 $\Delta rpfCxoo$ 和 $\Delta rpfGxoo$ 单基因或双基因缺失突变体, 分析了野生型菌株 PXO99^A 与突变体及其互补菌株的 DSF 信号、EPS 产生及其对水稻的致病性, 阐明了 $rpfxoo$ 基因与 DSF 信号分子合成、EPS 产生及其毒性表达之间的关系。

基金项目: 国家重点实验室自主研究课题专项 (SKL2009SR03); 国家农业行业科研专项经费项目 (nyhyzx07-056)

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

作者简介: 孙蕾 (1982-), 女, 江苏人, 博士研究生, 主要从事植物-病原物分子互作研究。E-mail: sunleisunny@163.com

收稿日期: 2009-11-24; 修回日期: 2010-01-28

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:PCR 引物合成和测序由北京英骏公司(Invitrogen)完成;T4 DNA 聚合酶、限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自北京英骏公司(Invitrogen)。

1.1.2 供试菌株、质粒和培养条件:供试菌株和质粒的特征和来源列于表 1。Xoo 和 Xcc 菌株在 28℃ PSA 培养基(蛋白胨 10 g/L,蔗糖 10 g/L,谷氨酸 1.0 g/L, pH7.0)上培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*)在 37℃ LB 培养基上培养。试验用抗生素浓度为:庆大霉素(Gm)50 mg/L、卡那霉素(Kan)50 mg/L、氨苄青霉素(Amp)100 mg/L、壮观霉素(Sp)40 mg/L、利福霉素(Rif)50 mg/L。

表 1 本研究供试菌株和质粒

Table1 The bacterial strains and plasmids used in this study

| Strain or plasmid | Characteristics | Source |
|--|---|----------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| DH5 α | Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> | Our laboratory |
| <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> | | |
| PX099 ^A | Wild-type strain, Philippine race 6 | Our laboratory |
| Δ <i>rpfF</i> Xoo | Gm ^R , <i>rpfF</i> Xoo gene replaced by Gm ^R | This study |
| Δ <i>rpfC</i> Xoo | Gm ^R , <i>rpfC</i> Xoo gene replaced by Gm ^R | This study |
| Δ <i>rpfG</i> Xoo | Gm ^R , <i>rpfG</i> Xoo gene replaced by Gm ^R | This study |
| Δ <i>rpfF</i> + <i>Cxoo</i> | Gm ^R , <i>rpfF</i> and <i>rpfC</i> double gene deletion mutants | This study |
| Δ <i>rpfF</i> + <i>Gxoo</i> | Gm ^R , <i>rpfF</i> and <i>rpfG</i> double gene deletion mutants | This study |
| Δ <i>rpfF</i> Xoo-F | Sp ^R , Δ <i>rpfF</i> Xoo complemented with pHM1-F | This study |
| Δ <i>rpfC</i> Xoo-C | Sp ^R , Δ <i>rpfC</i> Xoo complemented with pHM1-C | This study |
| Δ <i>rpfG</i> Xoo-G | Sp ^R , Δ <i>rpfG</i> Xoo complemented with pHM1-G | This study |
| <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> | | |
| XC1 | Rif ^R , Wild-type strain | Wang et al., 2004 |
| FE58 | Rif ^R , DSF biosensor | Wang et al., 2004 |
| Δ <i>rpfF</i> xcc | Rif ^R , <i>rpfF</i> xcc knock-out mutant | Wang et al., 2004 |
| Δ <i>rpfC</i> xcc | Rif ^R , <i>rpfC</i> xcc knock-out mutant | Wang et al., 2004 |
| Δ <i>rpfG</i> xcc | Rif ^R , <i>rpfG</i> xcc knock-out mutant | Wang et al., 2004 |
| Plasmid | | |
| pMD18-T simple | Amp ^R , <i>ColE1</i> origin, T-vector | TaRaKa Co. |
| pBS-T | Amp ^R , <i>ColE1</i> origin, T-vector | Tiagen Co. |
| pK18 <i>mobsacB</i> | Kan ^R , <i>mob</i> , <i>sacB</i> | Our laboratory |
| pBS-F1 | pBS-T with F1 fragment | This study |
| pKS-F1 | pK18 <i>mobsacB</i> with F1 fragment | This study |
| pKS-F2 | pKSF1 lack 600 bp fragment | This study |
| pKS-F-Gm | pK18 <i>mobsacB</i> with <i>rpfF</i> Xoo gene inserted by Gm ^R | This study |
| pMDS-C1 | pMD18-T simple with C1 fragment | This study |
| pMDS-C2 | pMDSC1 with <i>rpfC</i> Xoo gene inserted by Gm ^R | This study |
| pKS-C-Gm | pK18 <i>mobsacB</i> with <i>rpfC</i> Xoo gene inserted by Gm ^R | This study |
| pBS-G | pBS-T with G3 fragment | This study |
| pKS-G1 | pK18 <i>mobsacB</i> with G3 fragment | This study |
| pKS-G-Gm | pK18 <i>mobsacB</i> with <i>rpfG</i> Xoo gene inserted by Gm ^R | This study |
| pHM1 | Sp ^R , Sm ^R , <i>cos</i> , <i>parA</i> , <i>IncW</i> , derivative of pRI40 | Hopkins et al., 1992 |
| pHM1-F | pHM1 containing <i>rpfF</i> Xoo fragment | This study |
| pHM1-C | pHM1 containing <i>rpfC</i> Xoo fragment | This study |
| pHM1-G | pHM1 containing <i>rpfG</i> Xoo fragment | This study |

1.1.3 引物:实验中所使用的引物及其序列见表 2。

1.2 Δ *rpfF*Xoo、 Δ *rpfG*Xoo 和 Δ *rpfC*Xoo 单基因缺失突变体构建及其互补

按照文献[10]的标记交换方法进行基因克隆

及其缺失突变。以 PX099^A 基因组 DNA 为模板,分别利用引物(表 2)进行 PCR 扩增目标基因片段。用引物 *rpfF*Xoo-F/R 扩增得到片段 F1, 连接到 pBS-T, 转化 *E. coli*, 获得质粒 pBS-F1; 用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切, 电泳回收 *rpfF*Xoo 片段, 与经过 *Hind* III 和

表 2 本研究所用引物及其序列

Table 2 The sequences of PCR primers used in this study

| Prime | Sequence (5' → 3') | Source |
|--------------------|---------------------------------|------------|
| <i>rpfF</i> Xoo-F | CAAGGCATTGCGGGCGTTT | This study |
| <i>rpfF</i> Xoo-R | TCAGCCGGCGTCAAG | This study |
| <i>rpfC</i> Xoo-F | AAGCTTTCTCCACTGACATGTTGAAA | This study |
| <i>rpfC</i> Xoo-R | GGATCCGGATCCCCTCTTTGACGCCTTGC | This study |
| <i>rpfG</i> Xoo-F | GCTAGTGCAGAGCCTCGAACA | This study |
| <i>rpfG</i> Xoo-R1 | CTTCTGCAGATCCCATATCCGCCTTTT | This study |
| <i>rpfG</i> Xoo-F2 | CTTCTGCAGGCAGTGGCCGACGTGTT | This study |
| <i>rpfG</i> Xoo-R | GCCGATGCGGTGAGAA | This study |
| <i>rpfF</i> -F-H | GGTACCGTTCATCGTGAAGAAGGACCCTGCC | This study |
| <i>rpfF</i> -R-H | AAGCTTGTGGCTTGGCCAGCAATCTGGGGCT | This study |
| <i>rpfC</i> -F-H | GAGCTCAGCTCAGCTTGGGTGCAATGTTGG | This study |
| <i>rpfC</i> -R-H | GTCGACGGCCGACGTGCAACAGGTGATCCGC | This study |
| <i>rpfG</i> -F-H | GGTACCGCCAAGGACGGCGGTGACGACGAAG | This study |
| <i>rpfG</i> -R-H | AAGCTTAACGTACAGGACTGCAGGTCAACG | This study |

Xba I 双酶切的 pK18*mobsacB* 载体连接, 转化 *E. coli*, 获得重组质粒 pKS-F1; 用 *Sph* I 酶解, 载体纯化后自连, 获得质粒 pKS-F2; 用 *Nsi* I 酶切 pKS-F2, 回收载体片段, 与经过 *Nsi* I 处理的 *Gm^R* 基因连接, 得到重组质粒 pKS-F-Gm, 用于 $\Delta rpfF$ Xoo 突变体的构建。

用引物 *rpfC*Xoo-F/R 扩增得到片段 G1, 连接到 pMD18-T Simple, 转化 *E. coli*, 获得质粒 pMDS-C1; 用 *Eco*R I 酶解, 电泳回收载体片段, 与经过 *Eco*R I 酶解的 *Gm^R* 基因片段连接, 得到重组质粒 pMDS-C2; 用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切 pMDS-C2, 与经过相同双酶切处理的 pK18*mobsacB* 连接, 转化 *E. coli*, 获得重组质粒 pKS-C-Gm, 用于 $\Delta rpfC$ Xoo 突变体的构建。

用引物 *rpfG*Xoo-F/R1、*rpfG*Xoo-F2/R 进行 *rpfG*Xoo 两端片段 G1 和 G2 的扩增。用 *Pst* I 充分酶切 G1 和 G2 后, 电泳回收, 用 T4 DNA 连接酶进行连接。用引物 *rpfG*Xoo-F/R 扩增稀释后的连接产物得到片段 G3。将片段 G3 连接到 pBS-T, 转化 *E. coli*, 获得重组质粒 pBS-G。用 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切 pBS-G, 电泳回收 G3 片段, 与经过相同酶切处理的 pK18*mobsacB* 连接, 获得重组质粒 pKS-G1。用 *Pst* I 充分酶解 pKS-G1 后, 与经过 *Nsi* I 酶解的 *Gm^R* 基因片段连接, 得到重组质粒 pKS-G-Gm, 用于 $\Delta rpfG$ Xoo 突变体的构建。

用电击法分别将 pKS-F-Gm、pKS-C-Gm 和 pKS-G-Gm 转化到 PXO99^A 后, 涂布于 PSA + Gm 平板上生长, 对长出的菌落进行 PCR, 筛选和验证突变体。

用引物 *rpfF*-F/R-H、*rpfC*-F/R-H 和 *rpfG*-F/R-H 扩增 *rpfF*Xoo、*rpfC*Xoo 和 *rpfG*Xoo 全长基因片段, 克隆到广宿主质粒载体 pHM1 上, 获得重组质粒 pHM1-

F、pHM1-C 和 pHM1-G。通过电击转化到对应的突变体中, 涂布于 PSA + Sp 平板上生长, 将长出的菌落重新转接 3 次以上, 得到互补子。对互补菌株进行质粒提取及其酶切验证。

1.3 $\Delta rpfFC$ Xoo 和 $\Delta rpfFG$ Xoo 双基因缺失突变体构建

用电击法将重组质粒 pKS-F2 分别导入 $\Delta rpfC$ Xoo 和 $\Delta rpfG$ Xoo 中, 涂布于 LB + Kan 平板上, 在 28℃ 下培养 37 d。将阳性转化子重新转接于 PSA 平板, 28℃ 培养 3-7 d, 挑选单菌落, 利用引物 *rpfF*Xoo-F/R 进行 PCR, 验证双基因缺失突变体。

1.4 DSF 信号产生测定

参照文献[2]的方法进行 DSF 信号检测, 方法未作改动。

1.5 EPS 产量测定

参照文献[8]的方法进行 EPS 产量测定和文献[11]的方法进行菌落形态观察, 方法未作改动。

1.6 致病性测定

采用剪叶接种法[12]进行致病性测定。将待测细菌在 28℃ 下振荡培养, 离心收集菌体, 用无菌水稀释菌液至 $OD_{600} = 0.5$, 接种孕穗期水稻品种 IR24 叶片 10 张。在温室条件(温度 25-35℃, 湿度 90% 左右)下, 接种 14 d 后测定叶片病斑长度。

2 结果和分析

2.1 $\Delta rpfF$ Xoo、 $\Delta rpfC$ Xoo、 $\Delta rpfG$ Xoo、 $\Delta rpfF + C$ Xoo 和 *rpfF* + *G*Xoo 构建和互补

由于 *Gm^R* 基因比被置换的 *rpfF*Xoo 片段长 200 bp, 比 *rpfC*Xoo 片段短 200 bp, 比 *rpfG*Xoo 片段长 100 bp, 因此, 用引物 *rpfF*Xoo F/R、*rpfC*Xoo F/R 和 *rpfG*Xoo F/R 分别从 3 个突变体中扩增的条带与

PXO99^A 的大小有所不同,并将从突变体中扩增的条带测序进行验证(未列出资料)。结果表明成功获得 $\Delta rpfF_{xoo}$ 、 $\Delta rpfC_{xoo}$ 和 $\Delta rpfG_{xoo}$ 单基因突变体。

在 PSA + Gm + Sp 平板上培养互补菌株,并转接 3 次以上。从互补菌株中提取质粒并酶切验证(未列出资料)。结果表明成功获得互补菌株 $\Delta rpfF_{xoo}$ -F、 $\Delta rpfC_{xoo}$ -C、 $\Delta rpfG_{xoo}$ -G。

将 pKS-F2 质粒导入 $\Delta rpfC_{xoo}$ 和 $\Delta rpfG_{xoo}$ 中,将在 LB + Kan 平板上长出的转化子转接到不含抗生素的 PSA 平板上生长,挑选单菌落,利用引物 *rpfF_{xoo}* F/R 进行 PCR 验证(未列出资料)。挑选验证正确的突变体菌落转接 3-4 次,获得了 $\Delta rpfF$ +

C_{xoo} 和 *rpfF* + *G_{xoo}* 双基因突变体。

2.2 $\Delta rpfF_{xoo}$ 、 $\Delta rpfC_{xoo}$ 、 $\Delta rpfG_{xoo}$ 、 $\Delta rpfF$ + *C_{xoo}* 和 *rpfF* + *G_{xoo}* DSF 信号产生

当外源 DSF 存在时,信号检测菌株 FE58 的 *engXCA* 启动子及其 *gusA* 基因被诱导表达,培养基中的 X-gluc 被分解而形成蓝色晕圈^[2]。本研究利用 FE58 菌株测定了对 PXO99^A 和突变体及其互补菌株 DSF 产生(图 1)。PXO99^A 可以产生 DSF, $\Delta rpfF_{xoo}$ 、 $\Delta rpfF$ + *C_{xoo}* 和 $\Delta rpfF$ + *G_{xoo}* 均不产生,而 $\Delta rpfC_{xoo}$ 过量产生, $\Delta rpfG_{xoo}$ 产量降低。*rpfF_{xoo}*、*rpfC_{xoo}* 和 *rpfG_{xoo}* 基因可以分别互补相应基因突变体,恢复 DSF 产生表型。

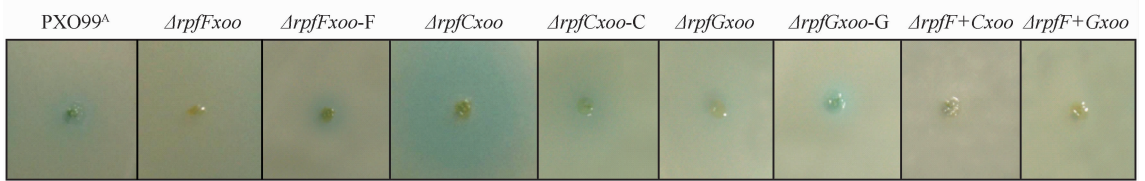


图 1 PXO99^A 和 Δrpf_{xoo} 及其互补菌株的 DSF 信号检测

Fig. 1 DSF production of PXO99^A, Δrpf_{xoo} mutants and complementation strains.

将 *rpfF_{xoo}*、*rpfC_{xoo}* 和 *rpfG_{xoo}* 分别转入到 $\Delta rpfF_{xcc}$ 、 $\Delta rpfC_{xcc}$ 和 $\Delta rpfG_{xcc}$ 中,可以使 DSF 产生恢复到与野生型 XC1 相同的水平(图 2)。表明

rpfF、*rpfC* 和 *rpfG* 在 Xoo 和 Xcc 中对 DSF 产生起着相同的调控作用。

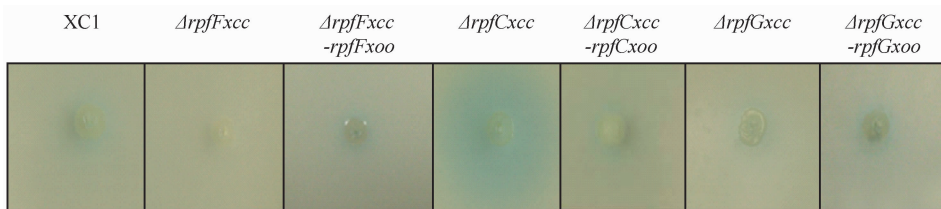


图 2 *rpf_{xoo}* 对 Δrpf_{xcc} DSF 产生的互补作用测定

Fig. 2 DSF production of XC1, Δrpf_{xcc} mutants and complementation strains with *rpf_{xoo}*.

2.3 $\Delta rpfF_{xoo}$ 、 $\Delta rpfC_{xoo}$ 、 $\Delta rpfG_{xoo}$ 、 $\Delta rpfF$ + *C_{xoo}* 和 *rpfF* + *G_{xoo}* EPS 产量和菌落形态

与 PXO99^A 菌落表面产生大量的 EPS 相比,除 $\Delta rpfF_{xoo}$ 无显著改变外, $\Delta rpfC_{xoo}$ 、 $\Delta rpfG_{xoo}$ 、 $\Delta rpfF$ + *C_{xoo}* 和 $\Delta rpfF$ + *G_{xoo}* EPS 产量明显降低(图 3-A),菌落形态扁平 and 干燥(图 3-B)。

2.4 $\Delta rpfF_{xoo}$ 、 $\Delta rpfC_{xoo}$ 、 $\Delta rpfG_{xoo}$ 、 $\Delta rpfF$ + *C_{xoo}* 和 *rpfF* + *G_{xoo}* 致病性

所有 Δrpf_{xoo} 突变体引起的病斑长度显著短于 PXO99^A,互补菌株均能恢复到 PXO99^A 相似的致病性(图 4)。

3 讨论

自从在 Xcc 中发现与高丝氨酸内酯类(AHL)

显著不同的 DSF 信号系统以来,已经在一些病原黄胞菌及其亲缘种中陆续检测出 DSF 信号,并鉴定出在结构上与 Xcc 高度同源和保守的 *rpf* 基因簇^[13-19]。前人曾用 AHL 报告菌株对 26 个 Xoo 菌株进行测试,均未能检测到 AHL 产生,推测 Xoo 可能不产生、或者产量极微、或者产生不能被现有报告菌株所识别的 AHL 信号^[20]。尽管从 Xoo 基因组中也鉴定出了 *rpf_{xoo}* 基因簇^[6],但至今不清楚 Xoo 是否产生 DSF 信号物质。本研究首次报道了利用报告菌株 FE58 能够从 Xoo 菌株 PXO99^A 中检测到 DSF 产生。此外,发现了 $\Delta rpfF_{xoo}$ 、 $\Delta rpfF$ + *C_{xoo}* 和 $\Delta rpfF$ + *G_{xoo}* 均不产生 DSF,而 $\Delta rpfC_{xoo}$ 过量产生, $\Delta rpfG_{xoo}$ 产量降低。表明在 Xoo 中 *rpfF_{xoo}* 可能与 DSF 合成直接有关,而 *rpfC_{xoo}* 和 *rpfG_{xoo}* 对 DSF 产

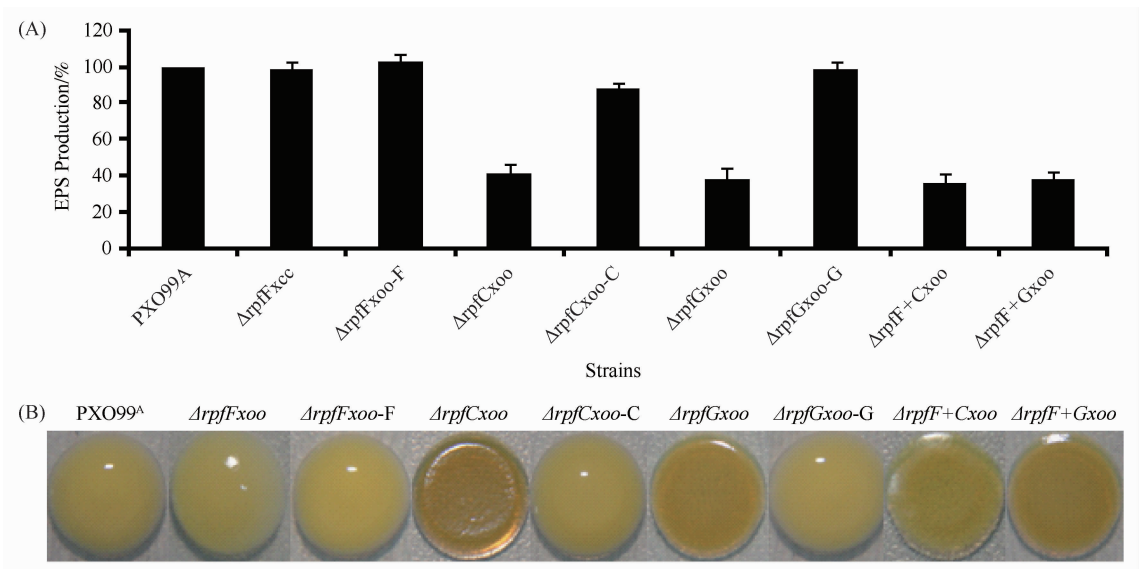


图3 PXO99^A、 $\Delta rpfxoo$ 及其互补菌株的胞外多糖检测 (A) 及菌落形态观察 (B)

Fig. 3 EPS production (A) and colony morphology (B) of Xoo strains.



图4 接种 PXO99^A、 $\Delta rpfxoo$ 和互补菌株 14 天后的水稻叶片症状

Fig. 4 Bacterial leaf blight of rice 14 d post-inoculation by Xoo strains.

生分别具有负、正调控功能。

本研究揭示了 $rpfxoo$ 基因缺失突变对 EPS 产生的不同影响。 $\Delta rpfF_{xoo}$ 具有与 PXO99^A 相同的 EPS 产生能力,而 $\Delta rpfC_{xoo}$ 、 $\Delta rpfG_{xoo}$ 、 $\Delta rpfF+C_{xoo}$ 和 $\Delta rpfF+G_{xoo}$ EPS 产量明显降低。表明 EPS 产生受 RpfC_{xoo}/RpfG_{xoo} 双组分系统、而非 RpfF_{xoo} 的调控。推测 RpfC_{xoo}/RpfG_{xoo} 在其上游可能接受环境或者寄主其它信号、而非 DSF 信号,从而调控了 EPS 产生。

所有 $\Delta rpfxoo$ 基因缺失突变体对水稻的致病性

均显著下降,这与其它研究者的结果是一致的^[7-9]。表明 DSF/Rpf_{xoo} 信号系统对 Xoo 致病性有重要的调控作用。目前正在鉴定和分析 DSF/Rpf_{xoo} 信号系统下游的 c-di-GMP 信号途径(待发表资料),为全面地阐明 Xoo 致病性表达的调控机理提供试验依据。

试验中未能获得 $\Delta rpfC+G_{xoo}$ 双基因缺失突变体。推测其原因可能是 RpfC_{xoo}/RpfG_{xoo} 基因同时突变可能会有致死效应;或者 2 个基因位置相邻,发生同源重组的概率低,导致筛选不到。

参考文献

- [1] He YW, Zhang LH. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiological Review*, 2008, 32 (5) :842-857.
- [2] Wang LH, He YW, Gao YF, et al. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular Microbiology*, 2004, 51 :903-912.
- [3] Barber CE, Tang JL, Feng JX, et al. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology*, 1997, 24 :555-566.
- [4] He YW, Wang C, Zhou L, et al. Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 :33414-33421.
- [5] 孙蕾, 吴茂森, 何晨阳. 建立以 *lipA* 和 *purH* 为靶基因的实时 PCR 方法对水稻白叶枯病菌侵染过程进行定量分析. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)*, 2007, 40(8) :1660-1666.
- [6] Lee BM, Park YJ, Park DS, et al. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (2) :577-86.
- [7] 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 :463-471.
- [8] Tang JL, Feng JX, Li QQ. Cloning and characterization of the *rpfC* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: involvement in exopolysaccharide production and virulence to rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9 :664-666.
- [9] Jeong KS, Lee SE, Han JW, et al. Virulence reduction and differing regulation of virulence genes in *rpf* mutants of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. *The Plant Pathology Journal*, 2008, 24 (2) :143-151.
- [10] Lee SW, Ronald PC. Marker-exchange mutagenesis and complementation strategies for the Gram-negative bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* // Ronald PC. Plant-Pathogen Interaction. 1st ed. Totowa: Humana Press, 2007 :11-18.
- [11] Lim B, Beyhan S, Meir J, et al. Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholera*: modulation of rugosity and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 2006, 60 :331-348.
- [12] Nin? o-Liu DO, Darnielle L and 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.
- [13] Dow JM, Crossman L, Findlay K, et al. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proceeding of the National Academy Science of USA*, 2003, 100 :10995-11000.
- [14] He YW, Xu M, Lin K, et al. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Molecular Microbiology*, 2006, 59 :610-622.
- [15] Jacques MA, Josi K, Darrasse A, et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 :2008-2015.
- [16] Scarpari LM, Lambais MR, Silva DS, et al. Expression of putative pathogenicity-related genes in *Xylella fastidiosa* grown at low and high cell density conditions *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 222 :83-92.
- [17] Fouhy Y, Scanlon K, Schouest K, et al. Diffusible signal factor dependent cell-cell signaling and virulence in the Nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 :4964-4968.
- [18] Boon C, Deng Y, Wang LH, et al. A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition. *The ISME Journal*, 2008, 2 :27-36.
- [19] Chatterjee S, Wistrom C, Lindow SE. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proceeding of the National Academy Science of USA*, 2008, 105 :2670-2675.
- [20] Ferluga S, Bigirimana J, Hofte M, et al. A LuxR homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is required for optimal rice virulence. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8 :529-538.

Diffusible signal factor production and virulence expression in $\Delta rpfFxoo$, $\Delta rpfCxoo$ and $\Delta rpfGxoo$, the gene deletion mutants of DSF/Rpf signaling proteins of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Lei Sun, Maosen Wu, Huamin Chen, Chenyang He*

(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 elucidate the functions of RpfF_{xoo}, RpfC_{xoo} and RpfG_{xoo}, 3 proteins of diffusible signal factor (DSF)-dependent cell-cell signaling system in regulation of virulence expression of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). **[Method]** $\Delta rpfxoo$, the gene deletion mutants were generated from PX099^A, the wild-type strain of Xoo via marker-exchanging and DSF biosynthesis and extracellular polysaccharide production and virulence to rice of the mutants were assayed. **[Result]** $rpfFxoo$, $rpfCxoo$ and $rpfGxoo$ were cloned from the genomic DNA of PX099^A and the relative single or double mutants were constructed. Compared to PX099^A, DSF production was deficient in $\Delta rpfFxoo$, $\Delta rpfFCxoo$ and $\Delta rpfFGxoo$, while DSF was overproduced in $\Delta rpfCxoo$ and reduced in $\Delta rpfGxoo$. DSF production of $\Delta rpfFxcc$, $\Delta rpfCxcc$ and $\Delta rpfGxcc$, the mutants of *X. campestris* pv. *campestris* can be restored as XC1, the wild-type strain by *in trans* complementation of $rpfFxoo$, $rpfCxoo$ and $rpfGxoo$. All the mutants except $\Delta rpfFxoo$ were remarkably deficient in production of extracellular polysaccharide. All the mutants significantly exhibited the reduced bacterial virulence to rice. **[Conclusion]** DSF signaling proteins RpfF_{xoo}, RpfC_{xoo} and RpfG_{xoo} might function in regulation of DSF biogenesis and EPS production and bacterial virulence.

Keywords: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; diffusible signal factor (DSF); *rpf*; virulence; regulation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Special Funding of State Key Laboratory of China (SKL2009SR03)

* Corresponding author. Tel: +86-10-62894147; E-mail: cyhe@caas.net.cn

Received: 24 November 2009 / Revised: 28 January 2010

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5-7个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。