

水稻细菌性条斑病菌 RpfCxoc/RpfGxoc 双组分系统的功能

赵延存^{1,2,3}, 刘春晖^{1,2}, 钱国良^{1,2}, 殷芳群^{1,2}, 周奕景^{1,2}, 宋志伟^{1,2}, 刘凤权^{1,2*}

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

³江苏省农业科学院农产品加工研究所, 南京 210014

摘要:【目的】旨在阐明双组分系统 RpfCxoc/RpfGxoc 在水稻细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, Xoc) DSF (diffusible signal factor) 合成、致病性等相关方面的生物学功能。【方法】以 Xoc 野生型菌株 Rs105 为母体, 利用自杀载体 pK18mobsacB 缺失突变 *rpfCxoc*、*rpfGxoc* 和 *rpfGCxoc* (*rpfCxoc* 和 *rpfGxoc* 双基因) 测定突变体及其互补菌株的 DSF 合成水平、对水稻的致病性、胞外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS) 产量、菌体形态及群体结构。【结果】从 Rs105 基因组中克隆了 *rpfCxoc* 和 *rpfGxoc* 基因, 并获得了相应的单基因或双基因缺失突变体。与 Rs105 相比, $\Delta rpfCxoc$ 和 $\Delta rpfGCxoc$ 过量合成 DSF 信号分子, 但是 $\Delta rpfGxoc$ 合成 DSF 的能力显著下降; *rpfCxoc* 和 *rpfGxoc* 单基因或双基因的缺失突变均导致 Xoc 的致病性丧失, EPS 合成水平下降 34.1% - 48.5%, 形成菌体高度聚集的生物膜结构。【结论】RpfCxoc/RpfGxoc 双组分系统调控 Xoc 的 DSF 生物合成、EPS 产生和生物膜的驱散, 是 Xoc 保持致病性所必需的因子。

关键词: 水稻细菌性条斑病菌, RpfCxoc/RpfGxoc, DSF, 毒性, 生物膜

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)04-0449-08

群体感应 (quorum sensing, QS) 是细菌依靠自身产生的一种可扩散性小分子化合物进行细胞间信息交流的机制, 是植物病原细菌全局性毒性调控网络的重要组成部分^[1]。这个错综复杂的调控网络受到许多双组分系统 (two-component system, TCS) 的控制, 双组分系统由组氨酸激酶 (histidine kinase, HK) 和应答调节蛋白 (response regulator, RR) 组成。细菌感应到周围环境的刺激信号后, 组氨酸激酶通过磷酸化机制激活应答调节蛋白, 然后调控下游基因的表达^[2-4]。

黄单胞属细菌是重要的植物病原菌, 也进化出了在群体水平进行遗传调节的 QS 系统。大量的研究揭示了一个保守的 *rpf* 基因簇, 包括 3 个核心基

因: *rpfF*、*rpfC* 和 *rpfG*。 *rpfF* 编码一个类似于烯酰辅酶 A 水合酶的蛋白, 它催化 DSF 的生物合成^[5]。研究表明, RpfC 和 RpfG 组成一个双组分系统, 这种双组分系统在所有已研究的黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 细菌中保守存在^[4]。RpfC 是一个锚定在细胞膜上的杂合感应激酶, 当细胞外的 DSF 信号分子浓度积累到一定水平时, 就能够激活这个感应激酶, 接着通过磷酸化机制将 DSF 信号传递给应答调节蛋白 RpfG, 然后转化成细胞内信号, 从而调控下游功能基因的表达, 例如毒性、运动性、生物膜驱散、胞外蛋白酶和胞外多糖的产生等^[4,6]。但是, 不同植物病原细菌的 *rpfC* 和 *rpfG* 生物学功能也存在差异^[3,7]。

目前为止, 通过文献检索, 尚未发现关于水稻细

基金项目: 国家自然科学基金 (31171810, 31071657); 农业部转基因专项 (2009ZX08001-005B)

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

作者简介: 赵延存 (1976 -), 男, 山东省单县人, 博士, 主要从事植物病原细菌学研究。E-mail: zhaoyc27@126.com

收稿日期: 2011-11-28; 修回日期: 2012-02-28

菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*) *rpfCxoc* 和 *rpfGxoc* 基因功能分析的相关报道。因此,本研究构建了 *rpfCxoc* 和 *rpfGxoc* 的单基因和双基因缺失突变体,分析了这两个基因对水稻细菌性条斑病菌 DSF 合成、毒性、胞外多糖合成、蛋白酶活性、生物膜形成等的影响,阐明了双组份系统 RpfCxoc/RpfGxoc 与 DSF 合成、致病性及其毒性相关因子的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:PCR 引物合成和测序由上海英俊公司 (Invitrogen) 完成;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 Tiangen 公司,质粒提取试剂盒购自

Omega 公司;pMD19-T 载体、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;分光光度计购自 Eppendorf 公司;PCR 仪、核酸电转仪和凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司;倒置荧光显微镜为 OLYMPUS 公司生产的 CX41-32PFL 型。

1.1.2 供试菌株、质粒及其培养条件:本研究所包含的细菌菌株和质粒列在表 1 中。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株在 LB 或含有 1.5% 琼脂的 LB 培养基上培养,培养温度为 37℃。如果没有特殊说明,黄单胞菌 (*Xanthomonas*) 菌株在 NB 或含有 1.5% 琼脂的 NB 培养基 (NA) 上培养,培养温度为 28℃。当需要抗生素时,按照下列终浓度添加:对于大肠杆菌,氨苄青霉素 (Ap) 为 100 μg/mL,卡那霉素 (Km) 为 50 μg/mL;对于黄单胞菌株,利福平 (Rif) 为 100 μg/mL,卡那霉素 50 μg/mL。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F ⁻ , φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i>	TaKaRa
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>		
Rs105	Rif ^R , Wild type	This lab
Δ <i>rpfCxoc</i>	Rif ^R , <i>rpfCxoc</i> deletion mutant	This study
Δ <i>rpfGxoc</i>	Rif ^R , <i>rpfGxoc</i> in-frame deletion mutant	This study
Δ <i>rpfGCxoc</i>	Rif ^R , <i>rpfCxoc</i> and <i>rpfGxoc</i> double gene deletion mutant	This study
Δ <i>rpfCxoc</i> (<i>rpfCxoc</i>)	Km ^R , Rif ^R , Δ <i>rpfCxoc</i> complemented with pUFR- <i>rpfCxoc</i>	This study
Δ <i>rpfGxoc</i> (<i>rpfGxoc</i>)	Km ^R , Rif ^R , Δ <i>rpfGxoc</i> complemented with pUFR- <i>rpfGxoc</i>	This study
Δ <i>rpfGCxoc</i> (<i>rpfGCxoc</i>)	Km ^R , Rif ^R , Δ <i>rpfGCxoc</i> complemented with pUFR- <i>rpfGCxoc</i>	This study
<i>Xanthomonas campestris</i> 8523 (pKLN55)	Km ^R , Sp ^R , <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> strain 8004 <i>rpfF</i> mutant harboring pKLN55, DSF reporter, GFP	[8]
Plasmids		
pUC19	Amp ^R , ColE1 origin, Multi cloning site	This lab
pMD19-T (simple)	Amp ^R , ColE1 origin, T-cloning simple vector	TaKaRa
pK18mobsacB	Km ^R , oriT (RP4), <i>sacB</i> , <i>lacZ</i> α, Plac, Pmbi, Mobilization and counter selection	[9]
pUFR034	<i>IncW</i> , Nm ^R , Km ^R , <i>Mob</i> ⁺ , <i>Mob</i> (p), <i>lacZ</i> α, PK2 replicon, cosmid	[10]
pK18- <i>rpfCxoc</i>	Km ^R , pK18mobsacB with two <i>rpfCxoc</i> flanking fragments	This study
pK18- <i>rpfGxoc</i>	Km ^R , pK18mobsacB with two <i>rpfGxoc</i> flanking fragments	This study
pK18- <i>rpfGCxoc</i>	Km ^R , pK18mobsacB with two <i>rpfGCxoc</i> flanking fragments	This study
pUFR- <i>rpfCxoc</i>	Nm ^R , Km ^R , pUFR034 with 3.02 kb fragment including <i>rpfCxoc</i>	This study
pUFR- <i>rpfGxoc</i>	Nm ^R , Km ^R , pUFR034 with 2.14 kb fragment including <i>rpfGxoc</i>	This study
pUFR- <i>rpfGCxoc</i>	Nm ^R , Km ^R , pUFR034 with 4.50 kb fragment including <i>rpfGxoc</i> and <i>rpfCxoc</i>	This study

1.1.3 引物:本研究所用引物根据 *X. oryzae* pv. *oryzicola* BLS256 菌株基因组序列设计,引物序列及

用途见表 2。

表2 本研究所用的引物及其序列

Table 2 The sequences of PCR primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3') ^a	Purpose
<i>rpfC_{xoc}</i> -1F	GCTCTAGAGGTTGTCGGAAGAAGAGGTC	To in-frame delete <i>rpfC_{xoc}</i> from <i>Xoc</i> strain Rs105
<i>rpfC_{xoc}</i> -1R	GGGGTACCCAGGTAGGAGATGAACAACG	
<i>rpfC_{xoc}</i> -2F	GGGGTACCTCAAAGACGACGAACGCTCC	
<i>rpfC_{xoc}</i> -2R	AACTGCAGTTCAACCTTATGTCCGTCGG	
<i>rpfG_{xoc}</i> -1F	CGGGATCCCGTTCGCCACCATAATCCG	To in-frame delete <i>rpfG_{xoc}</i> from <i>Xoc</i> strain Rs105
<i>rpfG_{xoc}</i> -1R	GGGGTACCGCCTTTTCCGCACAGCTTC	
<i>rpfG_{xoc}</i> -2F	GGGGTACCGCCTACCTGTATGCCAAC	
<i>rpfG_{xoc}</i> -2R	GCTCTAGACAAGCCCCAACTCAAATAGG	
<i>rpfC_{xoc}</i> -F _{pc}	GGGGTACCCAGCCGACCTTCATCACCGAC	To amplify <i>rpfC_{xoc}</i> gene and its promoter from <i>Xoc</i> strain Rs105
<i>rpfC_{xoc}</i> -R _{pc}	GCTCTAGAGGTTGCTCCTCTATTCTCGG	
<i>rpfC_{xoc}</i> -F _{oc}	GCTCTAGAAACCCATTGACGCGAGAGCG	
<i>rpfC_{xoc}</i> -R _{oc}	CGGGATCCGTTAGCGGAGAAGTCGTTGC	
<i>rpfGC_{xoc}</i> -1F _c	GGGGTACCCAGCCGACCTTCATCACCGAC	To amplify <i>rpfC_{xoc}</i> and <i>rpfG_{xoc}</i> gene from <i>Xoc</i> strain Rs105
<i>rpfGC_{xoc}</i> -1R _c	GCTCTAGAATGATGCTTGGGCTGGCTCG	
<i>rpfGC_{xoc}</i> -2F _c	GCTCTAGAAACCCATTGACGCGAGAGCG	
<i>rpfGC_{xoc}</i> -2R _c	CGGGATCCGTTAGCGGAGAAGTCGTTGC	
<i>rpfC_{xoc}</i> -YMF	GAGCCAGCCCAAGCATCATC	To confirm the deleted mutation of <i>rpfC_{xoc}</i> and <i>rpfGC_{xoc}</i> from <i>Xoc</i> strain Rs105
<i>rpfGC_{xoc}</i> -YMF	GCGTATTGTTCCGGGAGAGTC	
<i>rpfGC_{xoc}</i> -YMR	CGAGGAAGGCGTGATGATGG	

^a Restriction sites are underlined.

1.2 $\Delta rpfC_{xoc}$ 、 $\Delta rpfG_{xoc}$ 和 $\Delta rpfGC_{xoc}$ 单基因或双基因缺失突变体的构建

根据等位基因同源重组原理,利用自杀载体 pK18mobsacB,以 *Xoc* 野生型菌株 Rs105 为母体菌株来构建目的基因缺失突变体。基因缺失突变按照以前描述的方法进行操作^[9,11]。利用含有酶切位点的引物(表2)分别从 Rs105 基因组中扩增 *rpfC_{xoc}*、*rpfG_{xoc}* 和 *rpfGC_{xoc}* (*rpfG_{xoc}* 和 *rpfC_{xoc}* 双基因)基因的上、下游臂,将酶切后纯化的 PCR 产物与相应酶切的自杀载体 pK18mobsacB 连接,获得重组质粒(表1)。将重组质粒通过电击转化的方法导入 Rs105 感受态细胞中,然后涂布于不含蔗糖的 NA + Km 平板上,利用 PCR 技术从平板上长出的单菌落中筛选 1 次交换子。将验证正确的 1 次交换子在不含蔗糖的 NB 液体培养基中震荡培养 7-9 h,吸取 100 μ L 菌液涂布含 10% 蔗糖的 NA 平板,利用 PCR 筛选 2 次交换子,即为缺失突变体。

1.3 互补菌株的构建

利用引物(表2)从 *Xoc* 野生型菌株 Rs105 基因组中扩增完整的 *rpfC_{xoc}*、*rpfG_{xoc}* 和 *rpfGC_{xoc}* DNA 片段,分别酶切后连接 pUC19 载体测序。将测序正确的片段连接表达载体 pUFR034,将重组好的互补载体电击转化到相应基因缺失突变株中。利用卡那霉素抗性平板和 PCR 筛选互补转化子。

1.4 群体感应信号分子 DSF 的测定

按照 Newman 等(2004)的方法^[8],利用 GFP 报告菌株 [*X. campestris* 8523 (pKLN55)] 检测 *Xoc* 各菌株 DSF 的产生情况。将检测菌株与 *Xoc* 菌株在 NB 固体平板上对峙培养 24-36 h,如果 *Xoc* 菌株产生 DSF 信号分子,DSF 将在培养基中扩散。DSF 能够诱导报告菌株中的 GFP 蛋白表达,在荧光显微镜下可以观察到绿色荧光,从而判定 *Xoc* 是否产生 DSF 信号分子。

1.5 致病性测定

Xoc 菌株在含有相应抗生素的 NB 培养基中培养至 $\approx 10^8$ CFU/mL,针刺接种 50 天叶龄水稻叶片(汕优 63,易感病品种)。每个处理接种 25 张水稻叶片,然后在 22-30 $^{\circ}$ C 温室中培养,接种后 14 d 测量病斑长度。每个试验至少重复 3 次。

1.6 胞外多糖 EPS 的测定

Xoc 菌株在 28 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养 5 d;然后加入 2 倍体积的无水乙醇,室温过夜;13200 \times g 离心 20 min,将 EPS 沉淀物在 55 $^{\circ}$ C 烘至恒重。每个试验至少重复 3 次。

1.7 细菌生物膜的聚集和驱散试验

按照 Dow 等(2003)描述的实验方法测定了 *Xoc* 菌株在液体培养基中的聚集和驱散情况^[12]。将 *Xoc* 各菌株的培养液 ($OD_{600} = 0.5$) 400 μ L 分别转接到

40 mL L 液体培养基 (Tryptoen, 10 g/L; yeast extract, 5 g/L; sodium chloride, 5 g/L; D-glucose, 1 g/L; pH7.0) 在 28°C 静置培养 5 d 然后拍照纪录细菌细胞的群体生长形态。

2 结果和分析

2.1 $\Delta rpfCxoc$ 、 $\Delta rpfGxoc$ 和 $\Delta rpfGCxoc$ 突变体构建和互补

利用带有反向筛选标记的自杀载体 pK18mobsacB 通过 2 次等位基因的同源重组, 分别使 $rpfCxoc$ 、 $rpfGxoc$ 和 $rpfGCxoc$ 基因缺失了 2029、973

和 3552bp。因此, 利用引物 $rpfCxoc$ -YMF/ $rpfGCxoc$ -YMR、 $rpfGxoc$ -1F/2R 和 $rpfGCxoc$ -YMF/YMR 分别从 2 次交换子中筛选缺失突变体, 以 $\Delta rpfCxoc$ 、 $\Delta rpfGxoc$ 和 $\Delta rpfGCxoc$ 基因组为模板 PCR 扩增的 DNA 片段分别比野生型菌株 Rs105 为模板扩增的片段小 2029、973 和 3552 bp。PCR 产物电泳结果表明, 成功获得了 $\Delta rpfCxoc$ 、 $\Delta rpfGxoc$ 和 $\Delta rpfGCxoc$ 缺失突变体 (图 1)。将互补载体电击转化到相应的缺失突变体中, 在 NA + Km + Rif 平板上筛选互补菌株, 然后进行质粒提取及 PCR 验证 (未列出资料), 成功获得了互补菌株 $\Delta rpfCxoc$ ($rpfCxoc$)、 $\Delta rpfGxoc$ ($rpfGxoc$) 和 $\Delta rpfGCxoc$ ($rpfGCxoc$)。

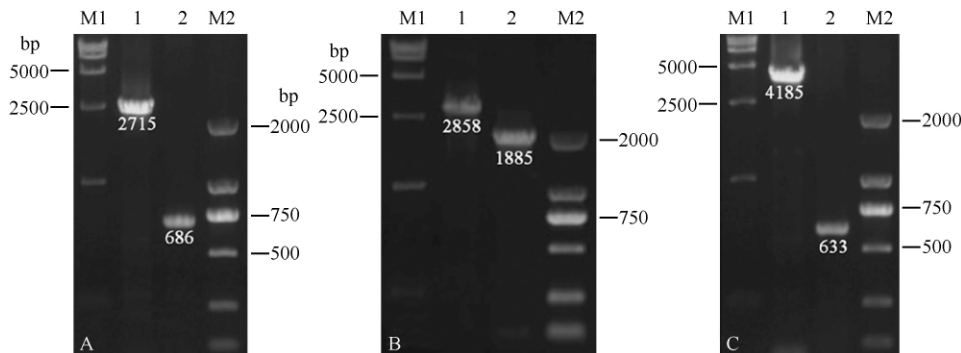


图 1 水稻细菌性条斑病菌 $rpfCxoc$ 、 $rpfGxoc$ 和 $rpfGCxoc$ 基因缺失突变体的 PCR 验证

Fig. 1 PCR analysis of the deleted mutation of $rpfCxoc$, $rpfGxoc$ and $rpfGCxoc$ in *X. oryzae* pv. *oryzaicola*. A: PCR confirmation for $\Delta rpfCxoc$ (1. Rs105; 2. $\Delta rpfCxoc$); B: PCR confirmation for $\Delta rpfGxoc$ (1. Rs105; 2. $\Delta rpfGxoc$); C: PCR confirmation for $\Delta rpfGCxoc$ (1. Rs105; 2. $\Delta rpfGCxoc$). M1: DL15000; M2: DL2000.

2.2 $\Delta rpfCxoc$ 、 $\Delta rpfGxoc$ 和 $\Delta rpfGCxoc$ 产生 DSF 信号分子能力的测定

利用 DSF 报告菌株 *X. campestris* 8523 (pKLN55) 对 *Xoc* 野生型菌株 Rs105 及其衍生的各菌株 DSF 信号分子产生水平进行检测, 结果发现

$rpfCxoc$ 基因的缺失导致 *Xoc* 合成 DSF 的水平明显增加 (图 2-B), $rpfCxoc$ 和 $rpfGxoc$ 的同时缺失也促进了 DSF 的生物合成 (图 2-D); 但是单独缺失 $rpfGxoc$ 导致 DSF 的合成量显著下降 (图 2-C); 互补菌株的 DSF 合成水平基本恢复到野生型菌株的水平 (图 2-

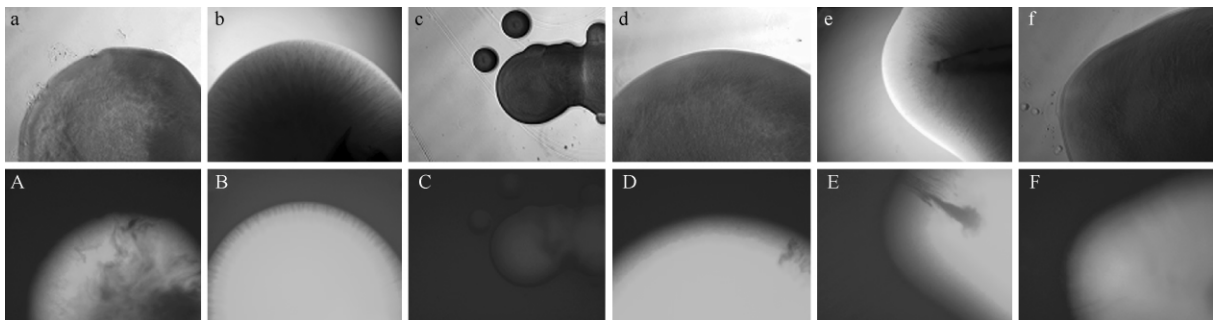


图 2 $rpfCxoc$ 和 $rpfGxoc$ 调控水稻细菌性条斑病菌 DSF 信号分子的生物合成

Fig. 2 $rpfCxoc$ and $rpfGxoc$ regulated DSF biosynthesis in *X. oryzae* pv. *oryzaicola*. The wild-type strain Rs105 (a and A), $\Delta rpfCxoc$ (b and B), $\Delta rpfGxoc$ (c and C), $\Delta rpfGCxoc$ (d and D), $\Delta rpfCxoc$ ($rpfCxoc$) (e and E), $\Delta rpfGxoc$ ($rpfGxoc$) (f and F). Green fluorescence was viewed on fluorescence microscope (A, B, C, D, E and F), and the corresponding reporter was viewed under white light (a, b, c, d, e and f).

E, 2-F)。这些结果表明, *rpfC_{xoc}* 抑制 DSF 的生物合成, *rpfG_{xoc}* 促进 DSF 的生物合成, 但是, 在 RpfC_{xoc}/RpfG_{xoc} 对 DSF 生物合成进行联合调控的过程中, RpfC_{xoc} 扮演关键角色。

2.3 *rpfC_{xoc}* 和 *rpfG_{xoc}* 基因的缺失突变均导致水稻细菌性条斑病菌的致病性丧失

本研究发现 *rpfC_{xoc}* 和 *rpfG_{xoc}* 单基因或双基因缺失突变均导致 *Xoc* 在敏感寄主水稻上的致病性丧失, 另外, 互补菌株的致病性基本恢复到野生型水平(图 3)。这个结果表明 *rpfC_{xoc}* 和 *rpfG_{xoc}* 是 *Xoc* 保持致病性所必需的基因。

2.4 *rpfC_{xoc}* 和 *rpfG_{xoc}* 基因的缺失突变导致水稻细菌性条斑病菌菌体细胞聚集

rpfC_{xoc} 和 *rpfG_{xoc}* 基因的缺失突变显著影响了 DSF 信号分子的生物合成水平, 破坏了 DSF 的信号转

导途径, 使细菌无法在群体水平对自身的生物学功能进行正常调控。本研究发现 *rpfC_{xoc}* 和 *rpfG_{xoc}* 单基因或双基因的缺失突变均改变了 *Xoc* 细胞的群体形态, 并且不同突变体之间也表现差异(图 4)。野生型菌株 Rs105 细胞主要以悬浮状态生长, 仅仅在三角瓶底形成很稀薄细胞聚集体; 然而, $\Delta rpfC_{xoc}$ 在液面和瓶壁交界处形成聚集态菌圈, 菌圈面向液面呈齿轮状; $\Delta rpfG_{xoc}$ 在液面和瓶壁交界处也形成了聚集态菌圈, 但是该菌圈与瓶壁结合的极不牢固, 轻微晃动就导致菌圈滑落到瓶底, 另外, 在三角瓶底还形成网格状细胞聚集体; $\Delta rpfGC_{xoc}$ 在液面和瓶壁交界处没有形成菌体聚集体, 但是在三角瓶底形成了一层网格状细胞聚集体(图 4)。与野生型菌株 Rs105 相比, 互补菌株 $\Delta rpfC_{xoc}(rpfC_{xoc})$, $\Delta rpfG_{xoc}(rpfG_{xoc})$ 和 $\Delta rpfGC_{xoc}(rpfGC_{xoc})$ 的表型基本恢复(未列出资料)。

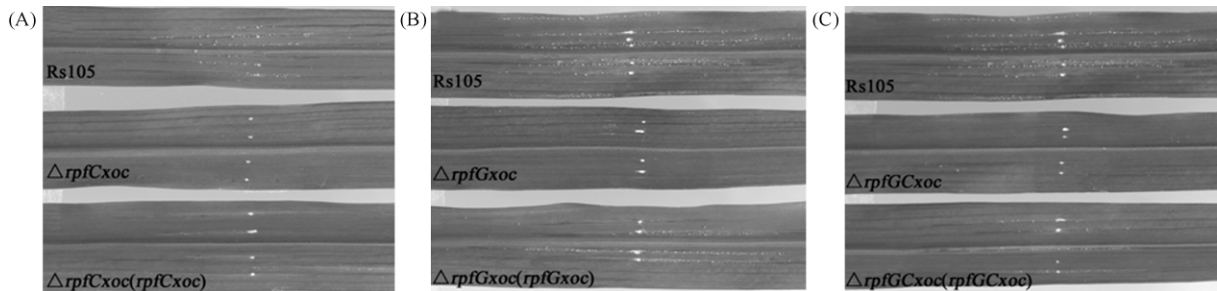


图 3 $\Delta rpfC_{xoc}$ 、 $\Delta rpfG_{xoc}$ 和 $\Delta rpfGC_{xoc}$ 的致病性分析

Fig. 3 Pathogenicity analysis of $\Delta rpfC_{xoc}$, $\Delta rpfG_{xoc}$ and $\Delta rpfGC_{xoc}$ derived from *X. oryzae* pv. *oryzicola* strain Rs105.

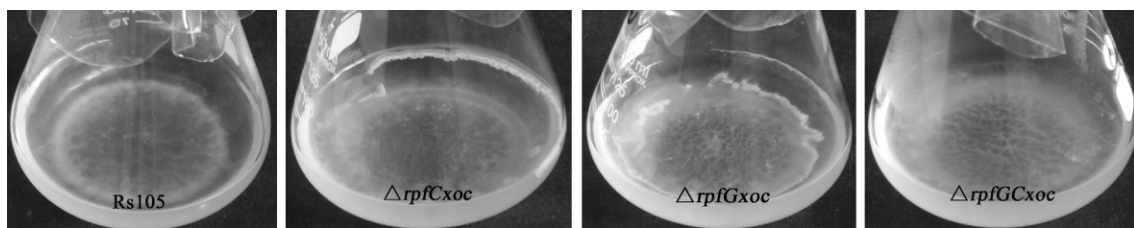


图 4 *rpfC_{xoc}* 和 *rpfG_{xoc}* 基因缺失突变改变了水稻细菌性条斑病菌的群体结构

Fig. 4 The *rpfC_{xoc}* and *rpfG_{xoc}* deletion mutation resulted in growth-fashion turnover from dispersal to aggregation in *X. oryzae* pv. *oryzicola*, respectively.

2.5 RpfC_{xoc}/RpfG_{xoc} 双组分系统调控水稻细菌性条斑病菌的 EPS 生物合成

前期研究证明 *rpfF_{xoc}* 正向调控 *Xoc* 的 EPS 生物合成, RpfC_{xoc}/RpfG_{xoc} 双组分系统的破坏对 EPS 的生物合成有什么影响? 本研究定量分析了 *rpfC_{xoc}* 和 *rpfG_{xoc}* 单基因或双基因缺失突变体的 EPS 合成, 结果表明: 与野生型菌株 Rs105 的 EPS 合成水平 (3.40 ± 0.07 mg/mL) 相比, $\Delta rpfC_{xoc}$ ($1.75 \pm$

0.08 mg/mL)、 $\Delta rpfG_{xoc}$ (1.90 ± 0.23 mg/mL) 和 $\Delta rpfGC_{xoc}$ (2.24 ± 0.24 mg/mL) EPS 的生物合成能力分别下降 48.5%、44.1% 和 34.1% (图 5)。电镜观察结果表明, 野生型菌株 Rs105 菌体周围具有大量多糖等附属物质, 但是 $\Delta rpfC_{xoc}$ 和 $\Delta rpfG_{xoc}$ 菌体周围附属物质较少(图 6), 观察结果与 EPS 定量分析结果一致。

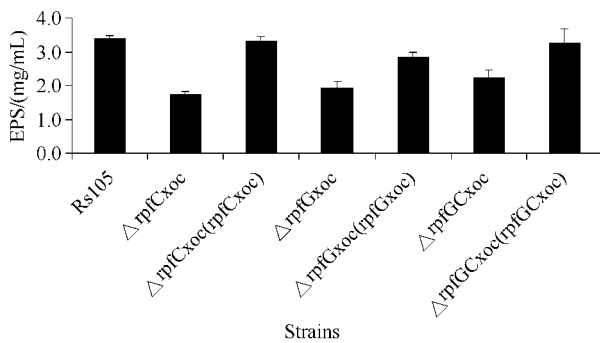


图5 RpfC_{xoc}/RpfG_{xoc} 双组分系统调控水稻细菌性条斑病菌的 EPS 生物合成

Fig. 5 Two component system RpfC_{xoc}/RpfG_{xoc} regulated EPS biosynthesis in *X. oryzae* pv. *oryzicola*.

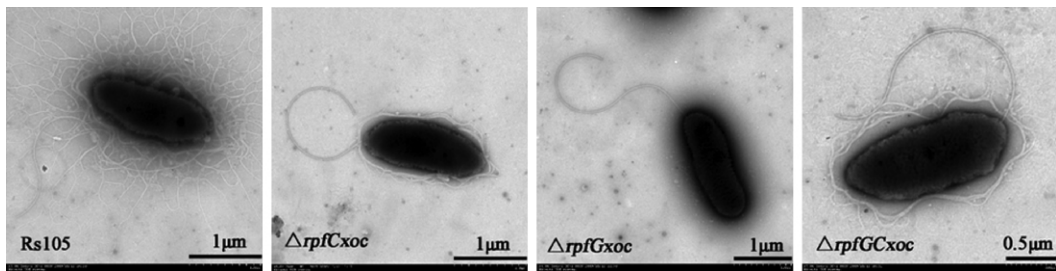


图6 ΔrpfC_{xoc}、ΔrpfG_{xoc} 和 ΔrpfGC_{xoc} 菌体形态观察

Fig. 6 Cell morphology of ΔrpfC_{xoc}、ΔrpfG_{xoc} 和 ΔrpfGC_{xoc}.

rpfG_{xoc} 在 *Xoc* 菌株 Rs105 的毒性和 DSF 生物合成中扮演重要角色。

DSF 群体感应信号分子,又被称为自体诱导物(autoinducer),在低浓度水平时,RpfC 与 RpfF 结合在一起,RpfF 合成 DSF 的能力被限制在基础水平;当 DSF 浓度随着菌体密度的增加积累到一定水平时,就激活 RpfC 的磷酸化机制,使其脱离 RpfF,从而使 RpfF 大量合成 DSF^[15]。He 等(2006)研究发现 rpfC_{xcc} 基因的缺失突变导致 *Xcc* 的 DSF 生物合成水平上升 16 倍^[3]。本研究也发现,*Xoc* 的 DSF 生物合成受到了 RpfC_{xoc} 的抑制,ΔrpfC_{xoc} 和 ΔrpfGC_{xoc} 的 DSF 合成水平显著高于野生型菌株(图 2)。这些研究结果都与 DSF 合成的自体诱导模式相一致。rpfG_{xoc} 缺失突变导致 *Xoc* 菌株 Rs105 的 DSF 合成能力几乎完全丧失(图 2),这个结果与水稻白叶枯病菌(*X. oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)的 rpfG_{xoo} 缺失突变体表型一致^[7],但是 rpfG_{xcc} 基因的缺失突变没有影响 *Xcc* 合成 DSF 信号分子的能力^[3],这种差异产生的原因还有待深入研究。

细菌外围的 DSF 信号分子浓度与其群体密度

3 讨论

自从 Tang 等(1991)利用转座子诱变技术在 *Xcc* 中发现负责 DSF 型群体感应的 rpf 基因簇以来^[14],截止目前,在许多细菌中发现了该基因簇,例如 *Xanthomonas* spp.、*Xylella fastidiosa*、*Stenotrophomonas maltophilia* 等^[15]。在模式植物病原细菌 *Xcc* 中 rpf 基因簇各基因的角色已经被深入的研究,其中 rpfC_{xcc} 和 rpfG_{xcc} 编码的蛋白组成一个双组份系统,参与调控病原菌的致病性和 DSF 信号分子的合成^[3,6]。本研究结果也表明 rpfC_{xoc} 和

成正比,细菌通过锚定在细胞膜上的感应激酶 RpfC 来感应 DSF 信号的浓度,从而监控细菌群体密度^[15];接着,通过 RpfC/RpfG 双组分系统将细菌群体信息转导给细胞内第二信使 c-di-GMP,调控病原细菌的多种生物学功能,例如毒性、生物膜形成、EPS 产生和胞外蛋白酶活性等,从而使病原细菌适应周围的环境变化^[15-17]。本研究中,rpfC_{xoc} 和 rpfG_{xoc} 的缺失突变破坏了 DSF 信号分子的转导,相应缺失突变体 ΔrpfC_{xoc}、ΔrpfG_{xoc} 和 ΔrpfGC_{xoc} 的致病性均丧失(图 3)。以前的研究也证实,rpfC 和 rpfG 基因的缺失突变分别导致 *Xoo* 和 *Xcc* 的致病性显著减弱或彻底丧失^[7,18]。

胞外多糖 EPS 和各种胞外酶是 *Xanthomonas* 属病原菌重要的毒性因子^[1]。在本研究中,相对于 *Xoc* 野生型菌株 Rs105,ΔrpfC_{xoc}、ΔrpfG_{xoc} 和 ΔrpfGC_{xoc} 缺失突变体的 EPS 产量分别下降 48.5%、44.1% 和 34.1%(图 5),与 *Xcc* 和 *Xoo* 的相应突变体 EPS 产量变化相一致^[3,7]。另外,本研究发现 rpfC_{xoc}、rpfG_{xoc} 和 rpfGC_{xoc} 基因的缺失突变均没有改变 *Xoc* 的胞外蛋白酶活性(未列出资料);但

是 *rpfC_{xcc}* 和 *rpfG_{xcc}* 的缺失突变均削弱了 *Xcc* 的胞外蛋白酶活性^[3]。这些结果表明,在不同的 *Xanthomonas* 属病原细菌中,DSF 群体感应系统调控的毒性因子存在差异。

许多病原细菌通过群体感应系统来控制生物膜的驱散,从而获得最佳的环境适应性和对寄主的致病性^[12]。在 L 液体培养基中静置培养时 *rpfC_{xcc}* 和 *rpfG_{xcc}* 基因的突变均导致 *Xcc* 以高度聚集态的形式生长^[12]。本研究也发现, *rpfC_{xoc}* 和 *rpfG_{xoc}* 基因的缺失突变也导致 *Xoc* 菌体细胞高度聚集(图 4)。但是, *Xcc* 和 *Xoc* 野生型菌株主要以浮游状态生长,没有形成大量的菌落聚集体。这些结果表明,DSF 群体感应系统通过调控 *Xoc* 菌体细胞的群体结构来达到最佳生存状态。

总之,本研究首次证明 RpfC_{xoc}/RpfG_{xoc} 双组分系统在 *Xoc* 的 DSF 信号分子生物合成中扮演重要角色,是使其保持致病性所必需的。目前,本实验室正在鉴定和分析 DSF 调控的下游致病相关基因,为全面阐明 *Xoc* 中的群体感应调控网络提供实验依据。

参考文献

- [1] Büttner D , Bonas U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews* , 2010 , 34(2) : 107-133.
- [2] Charles TC , Jin SG , Nester EW. Two-component sensory transduction systems in phyto bacteria. *Annual Review of Phytopathology* , 1992 , 30: 463-484.
- [3] 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 functions. *Molecular Microbiology* , 2006 , 59: 610-622.
- [4] Ryan RP , Dow JM. Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends in Microbiology* , 2011 , 19(3) : 145-152.
- [5] Barber CE , Tang JL , Feng JX , Pan MQ , Wilson TJ , 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(3) : 556-566.
- [6] Slater H , Alvarez-Morales A , Barber CE , Daniels MJ , Dow JM. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signaling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology* , 2000 , 38(5) : 986-1003.
- [7] 孙蕾, 吴茂森, 陈华民, 何晨阳. 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. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* , 2010 , 50(6) : 717-723.
- [8] Newman KL , Almeida RPP , Purcell AH , Lindow SE. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both in sects and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2004 , 101: 1737-1742.
- [9] Zou LF , Li YR , Chen GY. A Non-marker mutagenesis strategy to generate poly-hrp gene mutants in the Rice Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Agricultural Sciences in China* , 2011 , 10: 1139-1150.
- [10] De Feyter R , Kado CI , Gabriel DW. Small , stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. *Gene* , 1990 , 88: 65-72.
- [11] 殷芳群, 赵延存, 刘春辉, 钱国良, 范加勤, 胡白石, 刘凤权. 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. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2011 , 51(7) : 891-897.
- [12] Dow JM , 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 of the United States of America* , 2003 , 100: 10995-11000.
- [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*. *Microbial Pathogenesis* , 2011 , 50: 48-55.
- [14] Tang JL , Liu YN , Barber CE , Dow JM , Wootton JC , Daniels MJ. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Molecular and General Genetics* , 1991 , 226: 409-417.
- [15] He YW , Zhang LH. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiology Reviews* , 2008 , 32: 842-857.
- [16] Atkinson S , Williams P. Quorum sensing and social

networking in the microbial world. *Journal of the Royal Society Interface*, 2009, 6: 959-978.

- [17] Ryan RP, McCarthy Y, Andrade M, Farah CS, Armitage JP, Dow JM. Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 2010, 107: 5989-5994.

- [18] Wang LH, He YW, Gao YF, Wu JE, Dong YH, He CZ, 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.

Function of a two-component system RpfCxoc/RpfGxoc in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Yancun Zhao^{1 2 3}, Chunhui Liu^{1 2}, Guoliang Qian^{1 2}, Fangqun Yin^{1 2}, Yijing Zhou^{1 2}, Zhiwei Song^{1 2}, Fengquan Liu^{1 2*}

¹ College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University,

² Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests (Nanjing Agricultural University), Ministry of Education, Nanjing 210095, China

³ Institute of Agro-product processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract: [Objective] To elucidate the biological functions of a two-component system RpfCxoc/RpfGxoc in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). [Method] Based on the genome template from *Xoc* wild-type strain Rs105, the *rpfCxoc* and *rpfGxoc* genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The in-frame deletion mutations of *rpfCxoc*, *rpfGxoc* and *rpfGCxoc* (*rpfCxoc* and *rpfGxoc* double genes) were performed by the suicide vector pK18mobsacB, and determined diffusible signal factor (DSF) biosynthesis, pathogenicity in host rice, biofilm, extracellular polysaccharide (EPS) production and cell morphology. [Result] *rpfCxoc* and *rpfGxoc* were cloned from the genomic DNA of Rs105. PCR analysis demonstrated that the *rpfCxoc*, *rpfGxoc* and *rpfGCxoc* genes were in-frame deleted successfully. Compared to the wild-type strain Rs105, DSF were overproduced in $\Delta rpfCxoc$ and $\Delta rpfGCxoc$, but DSF production was remarkably decreased in $\Delta rpfGxoc$. The DSF production of these mutants was restored by introducing the complemented cosmid pUFR-*rpfCxoc*, pUFR-*rpfGxoc* and pUFR-*rpfGCxoc*, respectively. Subsequent experimental results indicated that mutation of *rpfCxoc*, *rpfGxoc* and *rpfGCxoc* resulted in pathogenicity loss of *Xoc* in host rice, and decreased biosynthesis level of EPS at 34.1% - 48.5% compared to that of Rs105. In L medium (Tryptoen, 10 g/L; yeast extract, 5 g/L; sodium chloride, 5 g/L; D-glucose, 1 g/L; pH7.0), Rs105 was growing at planktonic pattern, but the mutation of *rpfCxoc* and *rpfGxoc* led to *Xoc* cell aggregation at the wall of the flaks at the air-liquid interfaces, and $\Delta rpfGxoc$ generated reticulation biofilm at the bottom of the flaks. But $\Delta rpfGCxoc$ only generated reticulation biofilm at the bottom of the flaks. [Conclusion] The two-component system RpfCxoc/RpfGxoc modulated DSF biosynthesis, EPS production and biofilm dispersal of *Xoc*, which was required for the pathogenicity of *Xoc* in host rice.

Keywords: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, RpfCxoc/RpfGxoc, diffusible signal factor, pathogenicity, biofilm

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171810, 31071657) and by the Transgenic Special Fund of Ministry of Agriculture of China (2009ZX08001-405B)

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

Received: 28 November 2011/Revised: 28 February 2012