



核桃细菌性黑斑病菌 *rpfG* 基因的功能分析

李峰, 邓江丽, 陈雯雯, 王立华, 毛雅慧*

湖北工程学院生命科学技术学院, 特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室, 湖北 孝感 432000

摘要: 【目的】本研究旨在揭示核桃细菌性黑斑病菌(*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, *Xaj*) DW3F3 中 *rpfG* 基因的生物学功能, 从而为核桃细菌性黑斑病防治药剂的开发提供作用靶点。【方法】以野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 8004 菌株以及水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) PXO99^A 的 *rpfG* 基因为模板序列, 对 *Xaj* 野生型菌株 DW3F3 的基因组序列进行检索。利用同源重组技术, 对 *Xaj* 中 *rpfG* 基因进行敲除, 并用生物化学方法对基因缺失菌株的相关毒力因子、抗逆性进行检测。【结果】通过同源比对, 在 *Xaj* DW3F3 的基因组中发现了与 *XccrpfG*、*XoorpfG* 同源的基因, 并成功获得 *rpfG* 的缺失突变株 $\Delta rpfG$ 。与野生型相比, 突变株 $\Delta rpfG$ 的生物被膜形成能力仅为野生型 *Xaj* DW3F3 的 44.58%; 胞外多糖产量也由野生型的 8.47 mg/mL 降为 5.23 mg/mL; $\Delta rpfG$ 的絮凝活性增加, 能使菌液变澄清; 运动性实验显示 $\Delta rpfG$ 的运动直径比野生型增加了 12.38%; 胞外酶的分泌也发生了不同程度的改变, 突变株分泌纤维素酶的能力极显著降低, 淀粉酶活性有所提高, 而分泌蛋白酶的能力未发生变化; 此外 *rpfG* 缺失后, *Xaj* 对逆境(盐、酸、SDS、硫酸铜)的耐受力降低。【结论】结果表明 *rpfG* 基因能影响核桃细菌性黑斑病菌的致病相关性状, 并赋予了细菌一定的抗逆性。

关键词: 核桃细菌性黑斑病菌, *rpfG* 基因, 基因突变株, 毒力因子

我国是核桃种植大国, 截止 2018 年, 国家林业局共公布了 74 个国家级核桃示范基地名单^[1]。核桃病害种类多达 30 多种, 严重影响着核桃的产量和品质, 其中黑斑病是最为严重的病害之一。该病是由多种致病变种引起的, 树生黄单胞菌核桃致病变种(*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, *Xaj*), 又称核桃细菌性黑斑病菌, 是其中的主要

病原^[2]。

扩散信号分子(diffusible signal factor, DSF)是 2004 年首先在野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)中鉴定的一种新型群体感应信号分子^[3]。在 *Xcc* 中, *rpf* 基因簇参与了 DSF 的合成和调控, *rpfG* 则位于该基因簇中, 其编码蛋白 RpfG 与 RpfC、RpfF、RpfB 组成关键

基金项目: 国家自然科学基金(31700567); 2019 年中央引导地方科技发展专项(2019ZYDD045)

*通信作者。E-mail: maoyh3@sina.com

收稿日期: 2021-01-30; 修回日期: 2021-04-24; 网络出版日期: 2021-06-08

元件^[4-5]。研究表明在黄单胞菌属中包含两大类致病调控系统,分别是 *hrp*/T3SS 和 *rpf*/DSF 两大双组分信号传导系统(two-component signal transduction system, TCSTS)^[6]。*rpfC*/*rpfG* 是黄单胞菌属目前研究最多、作用机理最为清楚的 TCSTS 基因,该调控系统正向调控胞外酶和胞外多糖的合成,负向调控细菌生物被膜形成与解聚等^[7]。DSF 合成与调控机制如图 1 所示, RpfG 是一个应答性调节蛋白,具有磷酸二酯酶活性,降解胞内第二信使环二鸟苷酸(c-di-GMP),使 c-di-GMP 与其结合的全局性转录因子 cAMP 类受体蛋白(Clp)发生解离,而 Clp 直接或间接调控相关毒力基因的表达^[8],与病原菌对植物的致病性密切相关。*rpfC* 和 *rpfG* 双组分系统在黄单胞菌属中广泛存在,且基因序列非常保守,但其生物学功能在不同的病原菌中不尽相同^[9]。

在分类地位上, 树生黄单胞菌核桃致病变种

属于黄单胞属。通过对 *Xaj* 野生型菌株 DW3F3 的基因组生物信息学分析发现, *Xaj*DW3F3 的 *rpf* 基因簇和 *Xcc* 菌株 8004 的 *rpf* 基因簇在基因组成及排列顺序上基本一致,并且两者 *rpf* 基因簇所编码的蛋白高度同源,其中 RpfG 序列同源性>90%。鉴于此,我们推测 *XajrpfG* 可能具有调控细菌相关毒力因子的功能,并参与群体感应信号的合成。本研究通过基因敲除和表型分析等手段,分析了树生黄单胞菌核桃致病变种的 *rpfG* 在胞外多糖合成、胞外水解酶分泌、生物被膜形成、DSF 的合成中的功能。DSF 依赖的群体感应系统是调控病原微生物致病性和环境适应性的重要方式,也是防治植物细菌性病害的重要切入点。目前尚未见针对黄单胞属核桃致病变种群体感应的研究,本研究将为揭示 *Xaj* 的致病机理提供研究证据,同时将为开发核桃细菌性黑斑病防治药剂提供一个新的作用靶点。

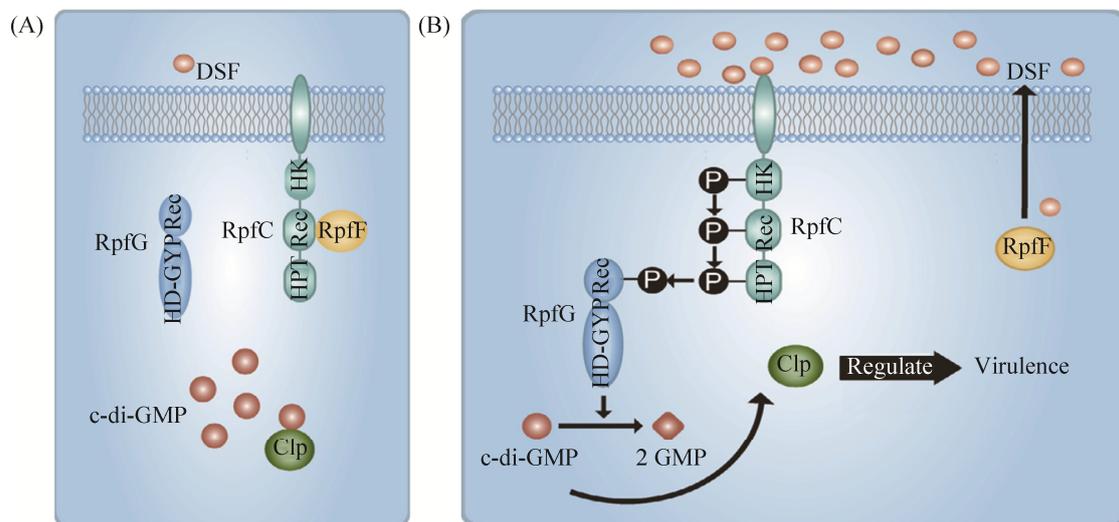


图 1. DSF 型 QS 系统模型^[4]

Figure 1. Model of DSF type QS system^[4]. A: at low cell density, the DSF production is restricted by RpfC, meanwhile, the activity of Clp is inhibited by formation of a c-di-GMP-Clp complex; B: at high cell density, the DSF accumulates and causes the autophosphorylation of RpfC, phosphorylated RpfC loses the inhibition of DSF synthase RpfF and activates RpfG by phosphorylation, as a result, c-di-GMP is degraded by the activated RpfG, the released Clp promotes the expression of virulence genes.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株与质粒: 树生黄单胞核桃致病变种 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*) DW3F3, 分离自丹江口核桃园内病变核桃果, 保藏于湖北工程学院特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室。本研究所用菌株和质粒详见表 1。

1.1.2 培养基: YPG 培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母粉 5.0, 葡萄糖 10.0, pH 7.0。YPGA 培养基(g/L): YPG 培养基中含琼脂 15.0, pH 7.0。YPGS 培养基(g/L): YPGA 培养基中含蔗糖 100.0, pH 7.0。胞外蛋白酶检测培养基: YPGA 中含 1% (W/V) 的脱脂奶粉。胞外淀粉酶检测培养基: YPGA 中

含 0.1% (W/V) 的可溶性淀粉。胞外纤维素酶检测培养基: YPGA 中含有 0.5% (W/V) 的羧甲基纤维素(CMC)。运动性检测培养基(*swarming* 平板): YPG 中添加 0.5% (W/V) 琼脂糖。

1.1.3 主要试剂: 头孢氨苄(Cef), 工作浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 卡那霉素(Km), 工作浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 工作浓度 1 mmol/L, 抗生素、IPTG 均购于上海生工生物工程有限公司; 刚果红、结晶紫购于上海生工生物公司; PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海生工生物公司; 限制性内切酶、T₄ 连接酶、细菌总 DNA 提取试剂盒购自大连宝生物公司, PCR 扩增酶类购自北京擎科生物公司; 引物合成和测序均由上海生工完成, 研究所用引物见表 2。其他化学试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司(上海)。

表 1. 本研究使用的菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmid in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-,mk+)	Laboratory collection
S17-1	F ⁻ , <i>thi pro hsdR</i> (RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7 (Tp Sm))	Laboratory collection
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>		
DW3F3	Wild-type strain, Cef ^r	Laboratory collection
Δ <i>rpfG</i>	<i>Xaj</i> DW3F3 <i>rpfG</i> deletion	This study
Δ <i>rpfG</i> (<i>rpfG</i>)	Δ <i>rpfG</i> carrying plasmid PS- <i>rpfG</i> , Cef ^r , Gm ^r	This study
Plasmids		
pSRK-Gm	pBBR1MCS-2-derived broad-host-range expression vector containing the <i>lac</i> promoter, <i>lacI</i> ^q , and <i>lacZ</i> α ⁺ , Gm ^r	Laboratory collection
pK18mobsacB	<i>sacB</i> -based gene replacement vector, Km ^r	Laboratory collection
PK- <i>rpfG</i>	DNA fragment used to deleted <i>rpfG</i> was cloned in pK18mobsacB, Km ^r	This study
PS- <i>rpfG</i>	<i>rpfG</i> ORF fragment inserted into vector pSRK, Gm ^r	This study

表 2. 本研究所使用的引物序列信息
Table 2. Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Digestion sites ^a
<i>rpfG</i> Nde I	GATTAC <u>CATATG</u> GGTTTTCTTTCCGGTAAGCGC	<i>Nde</i> I
<i>rpfG</i> Hind III	CTGACTA <u>AGCTT</u> ATTTTCAGTTCGAGTTCGTTTC	<i>Hind</i> III
<i>rpfG</i> up for	AGCAGAA <u>TTCT</u> GCCGATCGATCTTCAGAAC	<i>Eco</i> R I
<i>rpfG</i> up rev	GCTGTCTAGAGGATCCATATGATGTCCCAATACTG	
<i>rpfG</i> dn for	ACATCATATGGATCCTCTAGACAGCCTTTGCTCGACAG	
<i>rpfG</i> dn rev	GTTGA <u>AGCTT</u> CAGTTCGGGAAGCGTGTAG	<i>Hind</i> III
pK18-R	ACGGACGGCCAGGCGAT	
pK18-F	GACCGTAGGCCGCGTCA	
pSRK-R	GCCATGAAGATCTCGACTG	
pSRK-F	CTCAAGGGCATCGATCTGT	

Underlined parts are restriction sites.

1.1.4 主要仪器:超净工作台 SW-CJ-2G (苏州净化设备有限公司), 恒温培养箱(北京中兴伟业仪器有限公司), 立式压力蒸汽灭菌锅 LDZX-75KBS (上海申安医疗器械厂), 双光束紫外-可见分光光度计 UV-6100S (上海美谱达), 恒温振荡式摇床 ZQTY-50NS (上海知楚)。

1.2 核桃细菌性黑斑病菌中 *rpfG* 基因的克隆

以黄单胞菌科的两种细菌水稻白叶枯病菌 *Xoo*PXO99^A 和野油菜黄单胞菌 *Xcc*8004 的基因组为参照序列, 通过 NCBI 网站上的核酸序列比对功能 (BLASTn), 在核桃细菌性黑斑病菌 *Xaj*DW3F3 基因组中寻找是否存在 *rpfG* 的同源基因, 在获得基因序列后, 根据其核酸序列, 设计合适引物, 进行后续的 PCR 克隆和定向基因敲除。利用生物信息学软件 DNA Star 中 MegAlign 的功能对 *rpfG* 基因编码的蛋白 RpfG 进行同源比对分析, 并进一步比较 3 种细菌中 *rpf* 基因簇的异同。

1.3 *rpfG* 基因缺失突变株及回补株的构建

1.3.1 缺失突变体的构建: 本研究采用同源双交换的方法构建了 *rpfG* 基因的缺失突变体。以 *Xaj*DW3F3 总 DNA 为模板, PCR 扩增目标基因上

下游 DNA 片段, 再采用搭桥 PCR 将上下游片段融合, 限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切后连接到自杀性载体 pK18mobsacB 上, 筛选重组质粒, 将用于基因敲除的重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞 S17-1 中, 通过三亲本接合将敲除质粒导入野生型 *Xaj*DW3F3 中。用含有 Cef、Km 的 YPG 平板筛选发生同源单交换的一次重组子, 同时进行 PCR 验证。挑取验证正确的一次重组子于 28 °C、180 r/min 摇床振荡传代培养, 将菌液稀释涂布于含 Cef 的 YPGS 平板上, 长出的单克隆经 PCR 验证, 筛选出发生双交换的菌株, 获得缺失突变体 Δ *rpfG*。

1.3.2 回补菌株的构建: 以 *Xaj*DW3F3 总 DNA 为模板, PCR 扩增目标基因 *rpfG* 的完整 DNA 片段, 限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切后连接到广宿主表达载体 pSRK 上构建重组质粒, 通过三亲本接合将重组质粒导入缺失突变体 Δ *rpfG* 中, 用含有 Cef、Gm 抗性的 YPG 平板筛选接合子, PCR 验证正确即为回补菌株 Δ *rpfG*/*rpfG*。

1.4 生物被膜形成能力检测

用结晶紫染色法检测 *rpfG* 缺失后对 *Xaj* 生物

被膜形成的影响。分别接种 *XajDW3F3*、 $\Delta rpfG$ 、 $\Delta rpfG/rpfG$ 于 5 mL YPG 液体培养基中, 28 °C 振荡培养至对数期, 分别稀释至 OD_{600} 为 1.0 左右, 各取 5 mL 培养物离心收集菌体, 用 1 mL YPG 培养基重悬菌体, 接种至装有 4 mL YPG 培养基的玻璃指形管中, 加入相应抗生素和 IPTG, 置于 28 °C 培养箱中静置培养 5 d 后, 倒掉培养液, 无菌水洗管壁 3 次, 烘干加入 6 mL 1% 的结晶紫染色 30 min。倒掉染色液, 用无菌水冲洗管壁, 烘干指形管, 观察管壁上是否有一圈紫色物质, 拍照记录; 用 1 mL 无水乙醇溶解管壁结晶紫, 测定 630 nm 处吸收值并记录, 试验设置 3 个重复。

1.5 胞外多糖(EPS)形成能力检测

利用液体摇瓶发酵法测定各菌株产生 EPS 的量。分别接种 *XajDW3F3*、 $\Delta rpfG$ 、 $\Delta rpfG/rpfG$ 于 YPG 液体培养基中, 28 °C 振荡培养至平台期, 再分别稀释至 OD_{600} 为 1.0 左右, 按 1%–2% (V/V) 的量转接至 50 mL 新鲜 YPG 液体培养基中, 加入相应抗生素和 IPTG, 28 °C 振荡培养 5 d 后, 向培养液中注入 4 倍体积的无水乙醇, 边注入边搅拌, 然后挑出絮状沉淀物, 置于 55 °C 烘箱中烘干, 称重, 记录, 并计算培养物形成 EPS 的量(g/L), 试验设置 3 个重复。

1.6 胞外酶分泌能力的检测

本研究采用平板检测法分别检测了各菌株分泌胞外蛋白酶、胞外淀粉酶及胞外纤维素酶的能力。

1.6.1 胞外蛋白酶: 将过夜培养的待测菌株培养物稀释并调 OD_{600} 至 1.0 后, 用移液器分别吸取 2 μ L 菌液接种于含 1% 的脱脂牛奶、相应抗生素和 IPTG 的 YPG 平板上, 静置 10 min。28 °C 培养 2 d, 通过比较菌落周围水解透明圈的有无或大小

判断菌株产胞外蛋白酶的活性, 试验设置 3 个重复。

1.6.2 胞外淀粉酶: 将过夜培养的待测菌株培养物稀释并调 OD_{600} 至 1.0 后, 用移液器吸取 2 μ L 菌液接种于含 0.1% 可溶性淀粉、相应抗生素和 IPTG 的 YPG 平板上, 静置 10 min, 28 °C 培养 2 d 后, 用体积比为 1:100 的 I_2/KI (0.08 mol/L I_2 , 3.2 mol/L KI) 溶液染色 10 min, 然后用 70% 的酒精洗平板, 能产生胞外淀粉酶的菌株, 其菌落生长处及周围可形成无色透明圈, 观察并测量透明圈的大小, 试验设置 3 个重复。

1.6.3 胞外纤维素酶: 将过夜培养的待测菌株培养物稀释并调 OD_{600} 至 1.0 后, 用移液器吸取 2 μ L 菌液接种于含有 0.5% (W/V) 的羧甲基纤维素、相应抗生素和 IPTG 的 YPG 平板上, 静置 10 min。28 °C 培养 2 d 后, 在平板上加入约 20 mL 0.1% (W/V) 的刚果红(Congo Red)染色 30 min, 水洗 2 次, 再用 20 mL 1 mol/L 的 NaCl 脱色 2 次, 每次约 20 min, 能产生纤维素酶的菌株, 其菌落生长处及周围形成一透明圈, 观察并测量透明圈的大小, 试验设置 3 个重复。

1.7 运动性检测

将过夜培养的待测菌株培养物稀释并调 OD_{600} 至 1.0 后, 用微量移液枪吸取 2 μ L 菌液点接于含有 0.5% 琼脂糖的半固体培养基平板上(平板使用前在超净台晾 5–10 min), 正置于超净台中待晾干, 再置于 28 °C 正置培养 2 d, 观察菌苔的扩散情况并测量菌苔直径, 进行统计分析, 试验设置 3 个重复。

1.8 菌株的抗逆性分析

1.8.1 耐盐实验: 制备含 NaCl 浓度分别为 0.01、1.5、2.0、2.5 g/mL 的 YPG 固体平板, 将培养好的各菌株培养液调至 OD_{600} 一致, 约为 1.0, 此时

菌液浓度约为 1×10^8 CFU/mL, 用新鲜的 YPG 液体培养基将待测菌液进行梯度稀释, 稀释倍数依次为 10^0 (原液)、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ; 分别吸取 2.5 μ L 各稀释梯度的菌液依次滴于上述准备好的平板上, 待晾干后, 平板置于 28 $^{\circ}$ C 培养 2 d, 观察菌株生长情况, 试验重复 3 次。

1.8.2 耐酸实验: 用 HCl 调节 YPG 培养基的 pH 值, 使其 pH 值分别为 5.0、5.5、6.0、7.0, 再向培养基中添加 1.5% (W/V) 的琼脂, 制备成固体培养基。菌液处理方法同耐盐实验, 将不同菌株培养液点接于不同 pH 梯度的固体平板上, 检测各菌株对酸的耐受情况。

1.8.3 耐 SDS 实验: 向 YPG 中加入灭菌的 5% SDS, 使培养基中所含 SDS 浓度分别为 0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL, 制成相应平板, 其他步骤同上。

1.8.4 耐硫酸铜实验: 向 YPG 中加入灭菌的 100 mg/mL GuSO_4 溶液, 使培养基中所含 GuSO_4 浓度分别为 80、100、120、140 μ g/mL, 制成相应平板, 其他步骤同上述。

1.9 数据处理方法

采用 Excel 2010 进行数据处理, 并采用 *t* 检验进行显著性分析。 $P < 0.05$ (*), 有统计学差异;

$P < 0.01$ (**), 差异显著; $P < 0.001$ (***), 差异极其显著; $P > 0.05$ 差异不显著(NS)。

2 结果和分析

2.1 *rpfG* 的生物信息学分析

通过序列同源比对, 在 *Xaj*DW3F3 的基因组中发现了与 *Xcc*8004、*Xoo*PXO99^A 中 *rpfG* 同源的基因, 我们将其命名为 *XajrpfG*。研究进一步对野油菜黄单胞菌(*Xcc*)、水稻白叶枯病菌(*Xoo*)以及树生黄单胞菌核桃致病变种(*Xaj*) 3 种黄单胞菌 *rpf* 基因簇进行了比对, *rpfG* 基因在基因组上的位置及其编码的蛋白结构域组成如图 2 所示。在 *Xaj*DW3F3 中 *rpfG* 与 *rpfC* 相邻, 且转录方向相同, *rpfG* 基因全长为 1148 bp, 其编码产物是一个双组分系统响应调控蛋白, 由 REC 和 HD-GYP 两个结构域组成。REC 为磷酸信号识别受体, HD-GYP 具有磷酸二酯酶活性。通过对三者 *rpf* 基因簇比对分析发现, *Xaj* 的 *rpf* 基因簇排布与 *Xoo* 完全一致, 与 *Xcc* 基本一致, *Xcc* 多了一个 *rpfH* 基因。通过 MegAlign 软件对 *rpfG* 基因编码的 RpfG 蛋白同源性进行分析, 比对结果显示 *Xaj*RpfG 与 *Xcc*RpfG 蛋白序列相似性为 95.9%, *Xaj*RpfG 与 *Xoo*RpfG 蛋白序列相似性为 95.6%。

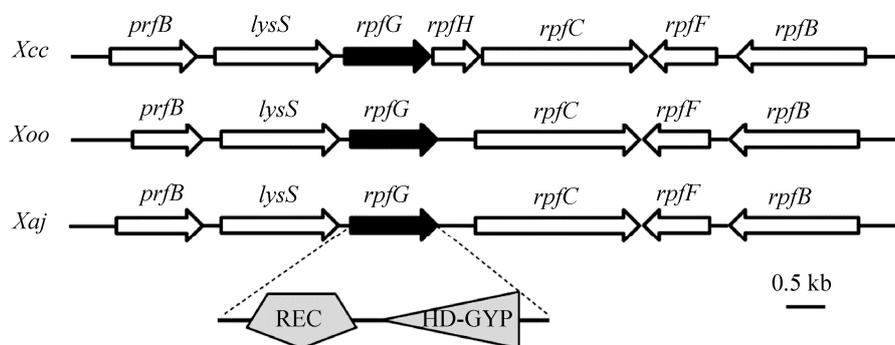


图 2. *rpfG* 生物信息学分析

Figure 2. Bioinformatics analysis of the predicted gene *rpfG*.

2.2 *rpfG* 基因缺失突变株与回补菌株的构建

本研究构建了 *rpfG* 基因缺失突变体。用对应的外部基因敲除引物 P1 和 P4 对 $\Delta rpfG$ 和野生型 *Xaj*DW3F3 进行 PCR 验证, PCR 电泳结构显示突变体 $\Delta rpfG$ 扩增出的条带为小于 1 kb, 而 DW3F3 扩增条带在 2 kb 左右, 与理论值一致(图 3-A), 表明成功获得 *rpfG* 基因的缺失菌株。将克隆得到的 *rpfG*-pSRK 重组质粒通过三亲本接合导入到已获得的缺失突变体中, 进行 PCR 验证, 电泳结果显示扩增条带正确, 即为成功得到回补菌株 $\Delta rpfG/rpfG$ (图 3-B)。

2.3 *rpfG* 突变对生物被膜形成、胞外多糖产生及絮凝能力的影响

生物被膜(biofilm, BF)是细菌通过胞外基质(多糖、蛋白质、脂肪和核酸等)聚集附着于生物或非生物表面、结构复杂的群落^[10]。细菌生物被膜是一个重要的致病因子, 在人植物-病原物互作中具有毒性作用^[11]。与之相似, 胞外多糖(exopolysaccharides,

EPS)是植物病原菌产生的与病程密切相关的一类重要致病因子, 且胞外多糖是生物被膜的主要组成成分。因此, 为了研究 *rpfG* 基因是否影响细菌相关毒力因子的分泌, 本研究检测了突变体生物被膜形成能力、絮凝能力以及胞外多糖产量。结果显示, 突变体 $\Delta rpfG$ 生物被膜形成能力显著降低 ($P < 0.001$), 仅为野生型的 44.58% (图 4-A); 胞外多糖产量也由野生型的 8.47 mg/mL 降为 5.23 mg/mL (图 4-B), 表明 *rpfG* 基因正调控生物被膜的形成和胞外多糖的产生; 而回补株 $\Delta rpfG/rpfG$ 的生物被膜形成量及胞外多糖产量虽有增加, 但不能恢复到野生型水平。除此以外, 对菌株絮凝情况检测结果显示, 野生型在培养基中不形成絮凝, 而突变株 $\Delta rpfG$ 出现明显絮凝现象, 上层菌液较澄清, 底部形成大量絮凝物, 表明 *rpfG* 基因缺失导致菌株形成絮凝; 回补株上层菌液浑浊, 底部有少量絮凝物, 未能完全恢复至野生型菌液表型 (图 4-C)。

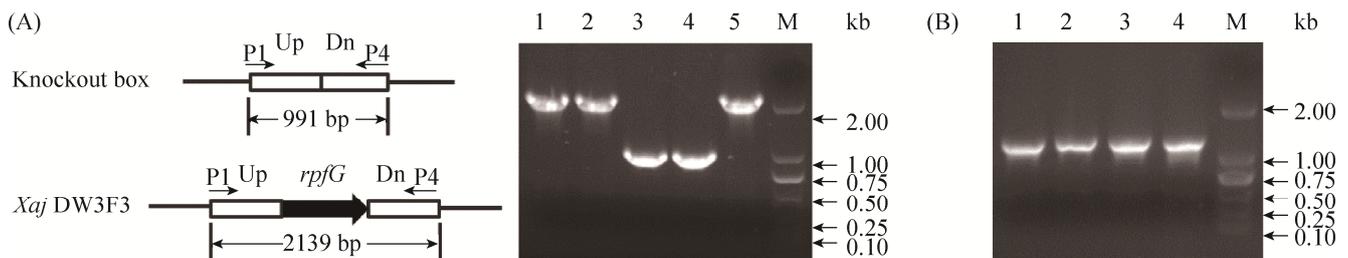


图 3. *rpfG* 的缺失突变株和回补株的 PCR 验证电泳图

Figure 3. PCR analysis of the deleted mutation and complementary strains of *rpfG*. A: Construction and characterization of *rpfG* mutant strains. The maps of the *rpfG* deletion mutant and the map of the wild-type allele (on the left) and PCR confirmation for $\Delta rpfG$ (on the right). lane 1–4: the PCR product from colony to screen $\Delta rpfG$; lane 5: the PCR product from wild-type strain; M: DL2000 DNA marker. B: PCR confirmation for $\Delta rpfG/rpfG$. lane 1–3: the PCR product from colony to screen $\Delta rpfG/rpfG$; lane 4: *rpfG*-pSRK plasmid as control.

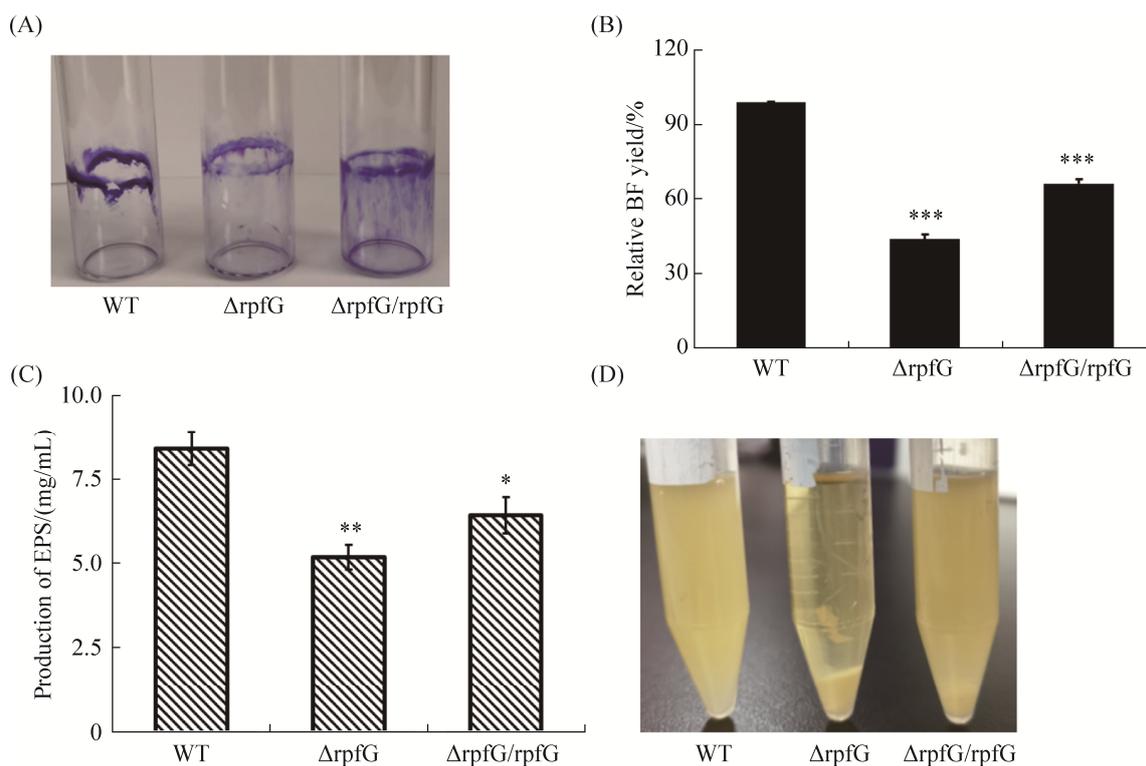


图 4. 菌株的生物被膜形成、胞外多糖产生、絮凝能力检测

Figure 4. Biofilm, extracellular polysaccharide and flocculation tests of strains. A: Biofilm formation on the surface of finger tube; B: the histogram of biofilm yield; C: comparison of dry weight extracellular polysaccharide; D: flocculation test. Different numbers of star (*) above the bars indicate a significant difference. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; t -test.

2.4 *rpfG* 突变对细菌分泌胞外酶的影响

尽管植物的细胞壁是病原菌侵入的主要障碍, 但病原菌通过分泌一系列降解表皮角质层和细胞壁的酶, 顺利地侵入植物, 因此胞外酶的分泌间接反映了病原菌的致病潜力。与致病有关的降解酶包括胞外蛋白酶(extracellular protease)、胞外淀粉酶(extracellular amylase)、胞外纤维素酶(extracellular cellulase)、胞外角质酶(extracellular cutinase)和胞外果胶酶(extracellular pectinase)等。本研究对菌株所产胞外纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶的活性进行了检测, 结果见图 5。与野生型相比, 突变株 $\Delta rpfG$ 分泌纤维素酶所形成的降解

圈极显著变小($P < 0.001$), 圈直径大小为野生型的 52.94%左右, 说明 *rpfG* 突变后菌株分泌纤维素酶的能力下降, 回补株 $\Delta rpfG/rpfG$ 的分泌能力有所升高, 是突变株的 1.38 倍, 但未能完全恢复到野生型水平; 分泌淀粉酶形成的降解圈显著变大($P < 0.01$), 圈直径大小为野生型的 123.29%左右, 说明分泌淀粉酶的能力提高, 而回补株的分泌能力也未能完全恢复至野生型水平; 突变株 $\Delta rpfG$ 分泌蛋白酶形成的降解圈与野生型相比, 无显著差异($P > 0.05$), 说明分泌蛋白酶能力没有变化。这些结果表明 *rpfG* 基因正调控 *XajDW3F3* 纤维素酶分泌, 负调控淀粉酶分泌, 对蛋白酶的分泌没有影响。

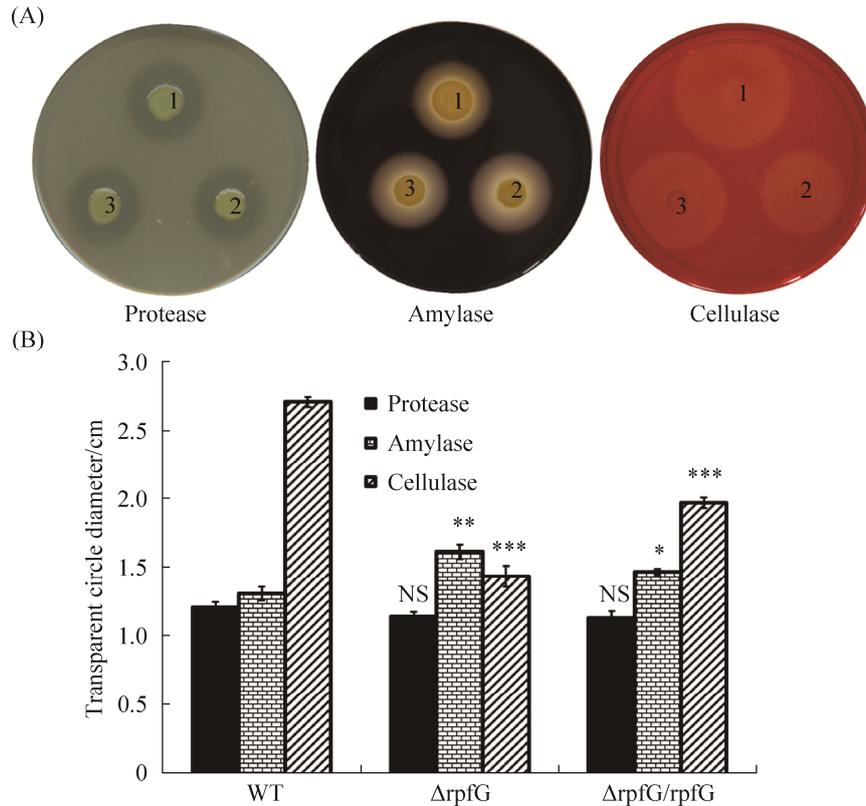


图 5. 菌株胞外酶产生能力检测

Figure 5. Detection of extracellular enzyme produced by stains. A: The test plates of extracellular enzyme. 1: WT; 2: $\Delta rpfG$; 3: $\Delta rpfG/rpfG$. B: the histogram of enzyme yield. Different numbers of star (*) above the bars indicate a significant difference. ns: not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; t -test.

2.5 *rpfG* 突变对细菌运动性的影响

通过图 6-A 的运动性平板可观察到，与野生型菌株相比，突变株 $\Delta rpfG$ 菌落边缘向外扩散得更明显，运动性菌苔直径比野生型增加了 12.38%，

说明此时菌株运动性增强；而回补株 $\Delta rpfG/rpfG$ 的菌苔直径显著减小 ($P < 0.001$)，比野生型减小 32.75%，表明 *rpfG* 基因对 *Xaj* 的运动性有抑制作用，负调控菌株运动性。

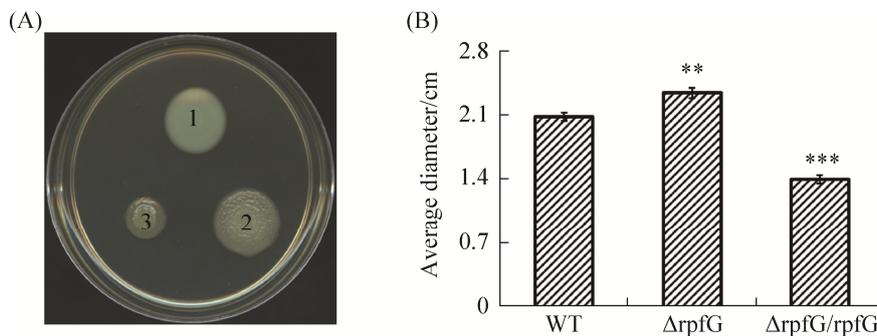


图 6. 菌株运动性检测

Figure 6. Motility test of strains. A: Colonial morphology on swarming plate. 1: WT; 2: $\Delta rpfG$; 3: $\Delta rpfG/rpfG$. B: Colony diameter on swarming plate. Different numbers of star (*) above the bars indicate a significant difference. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; t -test.

2.6 *rpfG* 突变对菌株抗逆性的影响

病原菌对逆境的耐受能力是间接反映其毒力强弱的一项指标, 为了研究 *rpfG* 在细菌抗逆性方面的功能, 分别检测了 *rpfG* 基因突变后, *Xaj* 对渗透压(NaCl)、SDS、酸的耐受性。由于目前国内

外采用外源喷洒含铜化学农药对该细菌侵染植物形成的黑斑病进行防治, 因此 *Xaj* 对铜离子的敏感性分析是十分必要的。研究结果如图 7 所示, *rpfG* 基因缺失突变后使 *Xaj* 在各种逆境条件下的生长均呈现减弱趋势。高渗透压时 $\Delta rpfG$ 生

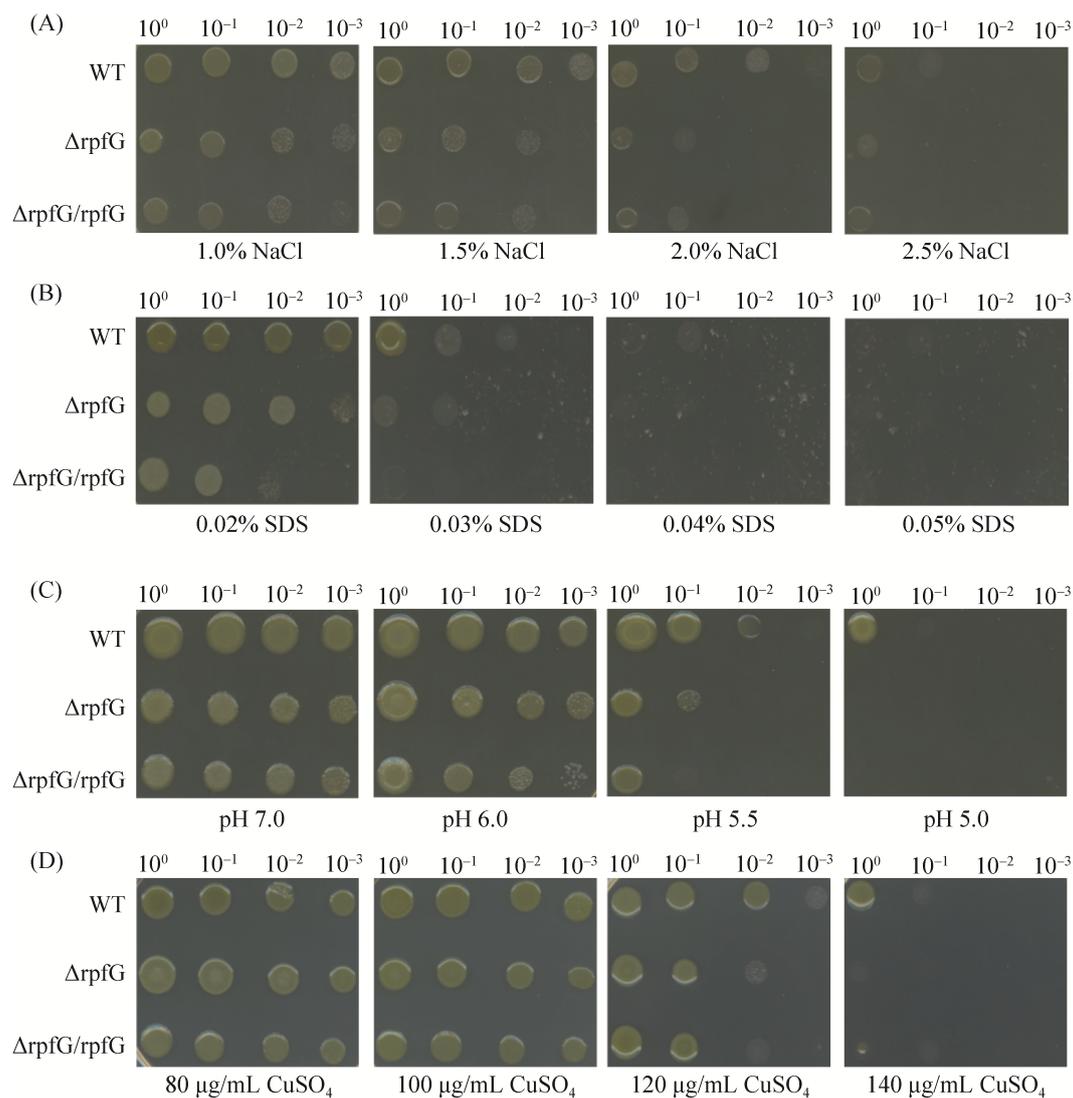


图 7. 菌株抗逆性检测

Figure 7. Detection of strains stress resistance. A: Comparison of colony growth on different concentration gradient NaCl plates; B: comparison of colony growth on different concentration gradient SDS plates; C: comparison of colony growth on different pH plates; D: comparison of colony growth on different concentration gradient CuSO_4 plates. The concentration of bacterial culture suspension of 10^0 is 1×10^8 CFU/mL; 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} represents dilution ratio.

长微弱(图 7-A);*Xaj* 对 SDS 的敏感性较高,当 SDS 浓度从 0.02% 增到 0.03% 时,野生型菌株的生长已开始变弱,随着稀释倍数的增加, $\Delta rpfG$ 的生长变得极其微弱(图 7-B); 在 pH 值低于 5.5 的酸性条件下, $\Delta rpfG$ 几乎不能生长(图 7-C); 当 Cu^{2+} 浓度达到 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, $\Delta rpfG$ 则表现出对 Cu^{2+} 的不耐受,随着菌液浓度不断被稀释,菌株生长逐渐减弱(图 7-D); 而回补株 $\Delta rpfG/rpfG$ 在各种逆境条件下的生长情况与野生型相比仍然较弱。以上现象均表明 *rpfG* 基因赋予了 *Xaj* 一定的抗逆能力。

3 讨论

在本研究中,通过同源比对分析,在核桃细菌性黑斑病菌 *Xaj*DW3F3 中发现了野油菜黄单胞菌 *Xcc* 的 *rpfG* 基因的同系物,并完成了对该基因的敲除及突变株相关生理生化性状检测。结果显示, *rpfG* 基因的缺失影响 *Xaj* 的毒力因子,包括使菌株的生物被膜形成能力减弱,胞外多糖产量降低,出现明显絮凝现象,运动性增强,对逆境的抵抗力减弱。另外 *rpfG* 基因突变之后,细菌分泌的胞外酶也发生不同程度的变化。*rpfG* 基因可以调控核桃致病菌 *Xaj* 的多种重要的致病因子,而调控机理还有待深入研究,可能与 *rpfG* 基因影响病原物体内群体感应信号分子的合成有关。

rpfG 基因的缺失导致 *Xaj* 生物被膜形成能力、胞外多糖产量、纤维素酶分泌能力均显著降低,表明 *rpfG* 基因正调控这些毒力相关基因的表达,然而在研究中发现,尽管基因回补株的各项生理指标均有所升高,但不能回复到野生型水平,推测产生这一现象的原因可能与 *rpfG* 的表达水平有关。因为 pSRK 为高表达载体,其上携带的外源基因 *rpfG* 在诱导剂 IPTG 的作用下发生过量表达

(超出基因组本底表达水平),从而引起细菌体内代谢紊乱,这种代谢紊乱可能与 c-di-GMP 浓度有关,由于 c-di-GMP 在细胞内的分布不均匀,过量表达可能打破了局部 c-di-GMP 浓度环境而引起整个细胞内 c-di-GMP 浓度的变化,从而影响 c-di-GMP 下游相关毒力基因的表达,因此即便回补株中有 *rpfG* 基因的存在,但仍不能保持与野生型一致的表型。为了验证此观点,课题组通过 RT-qPCR 检测了野生型 *Xaj*DW3F3 及回补株 $\Delta rpfG/rpfG$ 中 *rpfG* 基因的表达情况,结果显示质粒载体携带的 *rpfG* 基因的表达量比野生型染色体上 *rpfG* 基因表达量高出 9 倍之多(结果未列),这一现象同时表明 *rpfG* 在细菌体内的表达需要维持一定水平,过高或过低都将改变细胞本身正常的代谢过程。在检测 *rpfG* 基因对胞外酶分泌的影响实验中,结果显示 *rpfG* 基因既有促进分泌的作用,又能抑制某些酶的分泌,说明细菌分泌的不同类型胞外酶的活性不同,受 *rpfG* 调控的方式也并非一致。曾有文献报道将 *Xcc* 的 *rpfC* 或 *rpfG* 敲除后胞外酶的产量将降低,检测的是果胶酶、葡聚糖酶,与本研究的检测对象不同^[12]。

目前许多病原菌中 *rpfG* 基因的生物学功能研究比较清楚,尽管在细菌中 *rpfG* 基因编码序列具有高度保守性,但不同病原菌的 *rpfG* 功能又有所区别。在稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) *Xoc*Rs105 中, *rpfG* 的缺失导致胞外多糖产量和致病力下降,生物被膜形成能力增加,但不影响游动性和胞外蛋白酶活性^[9,13]。在水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) *Xoo*KA-CC11313 中, *rpfG* 的缺失导致木聚糖酶活性、胞外多糖、游动性及致病力降低^[14]。在野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*) *Xcc*8004 中, *rpfG*

缺失导致胞外酶活性、生物被膜形成能力、游动性下降^[12,15], 胞外多糖产量下降^[12], 同时会降低菌株对寄主植物的致病性^[16]。病原菌通过 T3SS 与寄主或非寄主植物进行互作, *hrp* 基因是 T3SS 的重要组成部分, *rpfG* 参与群体感应信号分子的合成, 对下游基因以及 III 型分泌系统中的某些基因都具有调控作用。在水稻白叶枯病菌 PXO99^A 中, 通过 Min 系统负调控 *hrp* 基因, 其中 *rpfG* 参与了对 *hrpG* 的负调控过程^[17]。已知在稻黄单胞菌中, *rpfG* 的缺失引起菌株体内 *hrp* 调节子的表达发生改变, 并证明 *rpfG* 负调控 T3SS 编码基因的表达, 且 *rpfG* 的缺失将减弱 *Xoc* 对水稻的致病性^[18-19], 例如在 *Xoc*Rs105 中, RpfG 负调控 *hrpG*、*hrpX* 及 *hrpA* 的表达^[13]。但在不同细菌中, RpfG 调控着 *hrp* 基因簇中的不同基因。在番茄-辣椒疮痂病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*) 中, RpfG 调控 *hrpA*-*hrpF* 及 *hrpX* 表达^[20]; 而在 *Xcc* 中 RpfG 仅调控 *hrpX* 表达^[21]。另外, 从已搜集的相关文献看, *rpfG* 的缺失突变将导致细菌 DSF 的合成降低^[22-24], 这一结论为我们后续对该细菌体内群体感应信号产量的检测提供了一定参考价值。综上, *rpfG* 的功能在不同种属的细菌间不尽相同, RpfG 对细菌毒力的调控机制也并非完全一致。为了深入了解 *rpfG* 基因如何影响细菌群体感应系统及细菌毒力因子, 对 T3SS 系统相关调控蛋白的合成过程进行研究可作为一种思路, 如 HrpG 为 T3SS 的主调节器, 与其相互作用的蛋白发生磷酸化将减弱 HrpG 的水解作用, 从而抑制 T3SS 毒力基因表达, 降低细菌毒力, 而 *rpfG* 又被 HrpG 负调控^[25-26]。另外, RpfG 的磷酸二酯酶(PEG)活性的检测也是十分必要的, 酶活性高低与胞内 c-di-GMP 含量密切相关, 而胞内 c-di-GMP

水平又直接影响群体感应信号分子的感知、传导。本研究结果将丰富 *rpfG* 的功能多样性, 为进一步阐明核桃细菌性黑斑病菌的致病机理奠定基础, 为核桃黑斑病的防治提供了新的思路。

参考文献

- [1] Li ZX, Yang LL, Abulizi B, Yan SK, Liu K, Zhu ZJ. Research on the development of walnut industry in China. *Journal of Chinese Agricultural Mechanization*, 2013, 34(4): 23–28. (in Chinese)
李忠新, 杨莉玲, 阿布力孜·巴斯提, 闫圣坤, 刘奎, 朱占江. 中国核桃产业发展研究. *中国农机化学报*, 2013, 34(4): 23–28.
- [2] Soltani J, Aliabadi AA. Genetic resistance to bacterial blight disease in Persian walnut. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 128(1): 65–70.
- [3] 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(3): 903–912.
- [4] Zhao X, Liu X, Xu X, Fu YV. Microbe social skill: the cell-to-cell communication between microorganisms. *Science Bulletin*, 2017, 62(7): 516–524.
- [5] Deng YY, Wu JE, Yin WF, Li P, Zhou JN, Chen SH, He F, Cai J, Zhang LH. Diffusible signal factor family signals provide a fitness advantage to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in interspecies competition. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(5): 1534–1545.
- [6] Jiang BL, Jiang GF, Liu W, Yang LC, Yang LY, Wang L, Hang XH, Tang JL. RpfC regulates the expression of the key regulator *hrpX* of the *hrp*/T3SS system in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiology*, 2018, 18(1): 1–16.
- [7] Wu F, Li NN, Lv W, Niu XN, Zhu PC, He YQ, Jiang W, Tang JL. Functional analysis of *rpfC*/*rpfG* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(10): 2707–2715. (in Chinese)
吴凤, 李娜娜, 吕委, 牛祥娜, 朱平川, 何勇强, 姜伟, 唐纪良. 水稻细菌性条斑病菌 *rpfC*/*rpfG* 的功能分析. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(10): 2707–2715.

- [8] He YW, Wang C, Zhou L, Song HW, Dow JM, Zhang LH. Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(44): 33414–33421.
- [9] Zhao YC, Liu CH, Qian GL, Yin FQ, Zhou YJ, Song ZW, Liu FQ. Function of a two-component system RpfC_{xoc}/RpfG_{xoc} in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(4): 449–456. (in Chinese)
赵延存, 刘春晖, 钱国良, 殷芳群, 周奕景, 宋志伟, 刘凤权. 水稻细菌性条斑病菌 RpfC_{xoc}/RpfG_{xoc} 双组分系统的功能. *微生物学报*, 2012, 52(4): 449–456.
- [10] Fu BZ, Wu MS, Chen HM, He CY. Detection of biofilm formation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* under static culture conditions *in vitro*. *Plant Protection*, 2010, 36(1): 47–50. (in Chinese)
傅本重, 吴茂森, 陈华民, 何晨阳. 水稻白叶枯病菌在离体培养条件下生物膜形成的检测. *植物保护*, 2010, 36(1): 47–50.
- [11] Fu BZ. Biofilm formation in plant-microbe interactions. *Plant Protection*, 2011, 37(1): 1–6, 18. (in Chinese)
傅本重. 植物与病原物互作中的生物膜研究. *植物保护*, 2011, 37(1): 1–6, 18.
- [12] Slater H, Alvarez-Morales A, Barber CE, Daniels MJ, Dow JM. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(5): 986–1003.
- [13] Zhang YB, Wei C, Jiang WD, Wang L, Li CR, Wang YY, Dow JM, Sun WX. The HD-GYP domain protein RpfG of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* regulates synthesis of extracellular polysaccharides that contribute to biofilm formation and virulence on rice. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e59428. DOI:10.1371/journal.pone.0059428.
- [14] Jeong KS, Lee SE, Han JW, Yang SU, Lee BM, Noh TH, Cha JS. Virulence reduction and differing regulation of virulence genes in rpf mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *The Plant Pathology Journal*, 2008, 24(2): 143–151.
- [15] 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(13): 5989–5994.
- [16] 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(19): 10995–11000.
- [17] 杨小菲. 水稻白叶枯病菌 Min 系统负调控 hrp 基因的分析. 上海交通大学硕士学位论文, 2019.
- [18] Li YR, Zou HS, Che YZ, Cui YP, Guo W, Zou LF, Chatterjee S, Biddle EM, Yang CH, Chen GY. A novel regulatory role of HrpD6 in regulating hrp-hrc-hpa genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(9): 1086–1101.
- [19] 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(8): 1139–1150.
- [20] Wengelnik K, Rossier O, Bonas U. Mutations in the regulatory gene hrpG of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all hrp genes. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(21): 6828–6831.
- [21] Huang DL, Tang DJ, Liao Q, Li HC, Chen Q, He YQ, Feng JX, Jiang BL, Lu GT, Chen BS, Tang JL. The Zur of *Xanthomonas campestris* functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(13): 4295–4309.
- [22] Sun L, Wu MS, Chen HM, He CY. Diffusible signal factor production and virulence expression in $\Delta rpfF_{xoo}$, $\Delta rpfC_{xoo}$ and $\Delta rpfG_{xoo}$, the gene deletion mutants of DSF/Rpf signaling proteins of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(6): 717–723. (in Chinese)
孙蕾, 吴茂森, 陈华民, 何晨阳. 水稻白叶枯病菌 $\Delta rpfF_{xoo}$ 基因缺失突变体 DSF 信号产生和毒性表达. *微生物学报*, 2010, 50(6): 717–723.
- [23] Ling J, Zhu RJ, Laborda P, Jiang TP, Jia YF, Zhao YY, Liu FQ. LbDSF, the *Lysobacter brunescens* quorum-sensing system diffusible signaling factor, regulates anti-*Xanthomonas* XSAC biosynthesis, colony morphology, and surface motility. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1230.
- [24] He YW, Wu JE, Cha JS, Zhang LH. Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple

- DSF-family signals in regulation of virulence factor production. *BMC Microbiology*, 2010, 10(1): 1–9.
- [25] Zhou XF, Teper D, Andrade MO, Zhang T, Chen SX, Song WY, Wang N. A phosphorylation switch on Icn protease regulates bacterial type III secretion system in host. *mBio*, 2018, 9(1): e02146–17.
- [26] Guo YP, Figueiredo F, Jones J, Wang N. HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(6): 649–661.

Functional analysis of *rpfG* gene in *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

Feng Li, Jiangli Deng, Wenwen Chen, Lihua Wang, Yahui Mao*

Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables, College of Life Science and Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] The purpose of this study was to reveal the biological function of *rpfG* gene in walnut bacterial black spot pathogen (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) *Xaj*DW3F3, so as to provide a target for the development of prevention and treatment agents for walnut bacterial black spot. [Methods] The *rpfG* gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* PXO99^A were used as template sequences to search the genome sequence of DW3F3, a wild-type strain of *Xaj*. With homologous recombination technology to knock out *XajrpfG*, the virulence factors and stress resistance of the mutant strain were detected by biochemical methods. [Results] Homologous gene was identified in *Xaj*DW3F3 genome through sequence homology analysis. The deletion mutant of *rpfG* was successfully obtained. Compared with the wild type, the mutant reduced the production of biofilm and extracellular polysaccharides, the ability of biofilm formation mutant strains $\Delta rpfG$ was only about 44.58% of wild type, the yield of exopolysaccharide decreased from 8.47 mg/mL in wild type to 5.23 mg/mL in $\Delta rpfG$; but $\Delta rpfG$ increased the motility and flocculation activity, motility experiments showed that the motility diameter of $\Delta rpfG$ increased 12.38% than the wild type. The secretion of extracellular enzymes also changed at different degrees: the ability to secrete cellulase was significantly decreased and amylase activity was increased, but the ability to secrete protease was not changed. What's more, after the deletion of *rpfG*, the resistance of *Xaj* to adversity (NaCl, pH, SDS, CuSO₄) was decreased. [Conclusion] The results showed that *rpfG* is an important pathogenic gene of walnut bacterial black spot pathogen, and endows bacteria with a certain degree of resistance to adversity.

Keywords: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, *rpfG* gene, mutant strain, virulence factor

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31700567) and by the Central Government Guides Local Science and Technology Development Project (2019ZYDD045)

*Corresponding author. E-mail: maoyh3@sina.com

Received: 30 January 2021; Revised: 24 April 2021; Published online: 8 June 2021