

研究报告



天然氨基酸诱导野油菜黄单胞菌降解 DSF-家族群体感应信号活性分析

陈慧 周莲 陈博 宋凯 郭晓春 何亚文*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 代谢与发育科学国际合作联合实验室
上海 200240

摘要:【背景】野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)是十字花科植物黑腐病的致病菌。*Xcc* 中 DSF (Diffusible signal factor)信号依赖的群体感应系统和 RpfB 介导的群体感应退出机制均与其致病性密切相关。【目的】分别检测 18 种氨基酸对 DSF-家族群体感应信号分子合成的影响, 为研发新型生物防治方法提供思路。【方法】添加不同浓度的氨基酸到 $\Delta rpfC$ 菌株 XY5 培养体系中, 接种后不同时间点取样提取 DSF 信号分子, 利用高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)分析 DSF 和 BDSF 浓度。【结果】18 种氨基酸中, 甲硫氨酸、色氨酸和胱氨酸能有效降低 $\Delta rpfC$ 菌株培养体系中 DSF 和 BDSF 水平, 抑制效果与氨基酸浓度密切相关; 3 种氨基酸对 DSF 信号分子的抑制作用存在叠加效应; 甲硫氨酸、色氨酸或胱氨酸不影响 $\Delta rpfC\Delta rpfB$ 双突变菌株中 DSF 和 BDSF 水平。【结论】首次发现了甲硫氨酸、色氨酸和胱氨酸通过 RpfB 诱导 *Xcc* 退出群体感应状态。

关键词: 野油菜黄单胞菌, DSF-家族群体感应信号, 甲硫氨酸, 色氨酸, 胱氨酸

The activities of natural amino acids to induce *Xanthomonas campestris* to degrade DSF-family quorum sensing signals

CHEN Hui ZHOU Lian CHEN Bo SONG Kai GUO Xiao-Chun HE Ya-Wen*

School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) is a causal agent of black rot in cruciferous plants. The diffusible signal factor (DSF)-dependent quorum sensing (QS) system and RpfB-dependent QS exit mechanism are closely associated with *Xcc* pathogenicity. [Objective] We investigated the effects of 18 amino acids on the biosynthesis of DSF-family QS signals, to provide a clue for developing new strategy to control plant diseases. [Methods] The *Xcc* mutant strain $\Delta rpfC$ was grown in the XY5 medium supplemented with 18 amino acids, respectively. The crude DSF extracts after 24 h to 36 h inoculation were then analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). [Results] 1) Among

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31772121, 31471743)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34207941; E-mail: yawenhe@sjtu.edu.cn

Received: 24-04-2019; Accepted: 22-05-2019; Published online: 13-07-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31772121, 31471743)

*通信作者: Tel: 021-34207941; E-mail: yawenhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2019-04-24; 接受日期: 2019-05-22; 网络首发日期: 2019-07-13

the 18 amino acids tested, methionine, tryptophan and cystine were found to significantly decrease DSF and BDSF levels in the $\Delta rpfC$ culture. The inhibitory effect was closely associated with amino acid concentration; 2) Additive inhibitory effects between three amino acids were observed; 3) Addition of methionine, tryptophan or cystine had no significant effect on the levels of DSF and BDSF in the $\Delta rpfC\Delta rpfB$ culture. **[Conclusion]** Methionine, tryptophan and cystine probably induce *Xcc* to exit from quorum sensing stage via the RpfB-dependent pathway.

Keywords: *Xanthomonas campestris*, DSF-family quorum sensing signals, Methionine, Tryptophan, Cystine

野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)属革兰氏阴性细菌, 侵染十字花科花卉、蔬菜和油料作物引起黑腐病^[1]。在适宜的温度和湿度条件下, *Xcc* 利用植物表面有限的营养快速繁殖, 通过水孔或伤口侵入植物, 在质外体空间增殖; 当群体密度达到一定阈值时, 触发群体感应(Quorum sensing, 简称 QS), 产生大量致病因子, 如胞外酶(果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶和酯酶等)、胞外多糖和菌黄素等。这些致病因子主要有两方面的作用: (1) 抵抗植物宿主的免疫攻击, 适应寄生环境; (2) 降解植物细胞和组织, 使病原菌获得生长所必需的营养^[2]。*Xcc* 利用自身产生的 DSF 家族 QS 信号感应群体密度, 调控上述致病因子的表达。DSF 家族 QS 信号包括: 顺式-11-甲基-2-十二碳烯酸(DSF)、顺式-2-十二碳烯酸(BDSF)、顺式, 顺式-11-甲基-2,5-十二碳二烯酸(CDSF)、顺式-10-甲基-2-十二碳烯酸(IDSF), 其中 DSF 和 BDSF 为主要信号分子^[3]。它们的合成前体为氨基酸和碳水化合物, 通过脂肪酸循环途径合成 3-羟基酯酰 ACP; 再经 RpfF 催化脱水和脱硫得到结构稍有不同的信号分子^[4]。在 *Xcc* 中, DSF 主要调控三类生物学功能: 一是促进致病相关基因表达; 二是抑制生物膜的形成; 三是促进菌群作出代谢调整, 适应高群体密度环境^[5]。双组分系统 RpfC/RpfG 负责感应和传导 DSF 信号; RpfG 具有磷酸二酯酶活性, 激活后降解二级信使环二鸟苷酸(c-di-GMP); 环二鸟苷酸(c-di-GMP)与全局性转录因子 Clp 互作, 直接或间接调控下游基因的表达^[6-7]。

群体感应是一个高度耗能的过程, 群体感应后期细菌必须退出感应状态, 恢复正常生理状态才能有效生存和适应环境; 迅速酶促降解群体感应信号

是细菌退出群体感应状态的一条重要途径^[8]。群体感应退出机制在根瘤农杆菌群体感应中有详细的报道^[9]: 根瘤农杆菌利用 N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine-lactone, AHL)为主要群体感应信号, 调控 Ti 质粒转移至植物体内诱发生冠瘿瘤。根瘤农杆菌还编码一个 AHL-内酯酶 BlcC, 负责降解 AHL 信号, 终止 Ti 质粒转移。在侵染过程中, 植物源代谢产物, 如水杨酸(Salicylic acid, SA)、 γ -氨基丁酸(Gamma-aminobutyric acid, GABA)、 γ -丁内酯(Gamma butyrolactone, GBL)和吲哚乙酸(Indole acetic acid, IAA)等, 具有诱导农杆菌退出群体感应状态的活性。在感染早期, GABA 正调控根瘤农杆菌 *blcC* 的表达, 使 AHL 信号分子维持在较低水平^[10-11]; 在感染后期, 植物根瘤中积累的游离氨基酸, 如丙氨酸、脯氨酸和缬氨酸通过抑制根瘤农杆菌吸收 GABA, 间接抑制 *blcC* 表达, 使 AHL 信号分子维持在较高水平^[8,12]。

在 *Xcc* 摇瓶培养过程中, 培养体系中 DSF 群体感应信号分子在细菌进入稳定期后大量合成, 随后迅速降低^[13-15], 这一现象说明黄单胞菌具有天然群体感应信号调控机制。*rpf* 基因簇中的 *rpfB* 编码一个脂酰辅酶 A 连接酶, 位于 DSF 合成酶基因 *rpfF* 上游。Bi 等^[16]首次通过生物化学和遗传学分析阐明 RpfB 具有酯酰辅酶 A 连接酶活性, 与大肠杆菌 FadD 酶活性类似。Zhou 等^[17]发现敲除 *rpfB* 显著提高 DSF 和 BDSF 的内源水平, 过表达 *rpfB* 显著降低二者的含量; 点突变辅酶 A 连接酶活性所需的关键氨基酸 E365 显著影响 RpfB 降解 DSF 信号的活性。因此, RpfB 参与 DSF 群体感应信号分子的降解。*rpfB* 的表达与细胞密度密切相关, 转录水平在对数生长中期较低, 对数生长后期略有增

加,在稳定期前期达到最高。*rpjB* 的表达也受到群体感应信号系统的调控:进入群体感应状态前,*Xcc* 胞内高水平的 c-di-GMP 与转录因子 Clp 形成复合体,结合在 *rpjB* 启动子区域,抑制 *rpjB* 转录;进入群体感应状态后,胞内 c-di-GMP 水平降低,Clp 和 c-di-GMP 形成的复合体解散,并脱离 *rpjB* 启动子,*rpjB* 转录启动^[17-18]。

氨基酸是一类重要的营养物质和信号分子^[19-20]。Zhou 等^[4]和 Diab 等^[21]利用双突变体 $\Delta rpjB\Delta rpjC$ 研究了所有氨基酸对 DSF-家族 QS 生物合成的影响,前者发现亮氨酸和缬氨酸促进 DSF 生物合成,异亮氨酸促进 IDSF 生物合成,非支链氨基酸和碳水化合物主要促进 BDSF 生物合成;后者发现 BDSF 是 *Xcc* 在感染植物过程中产生的主要 QS 信号。本研究进一步利用 $\Delta rpjB\Delta rpjC$ 和 $\Delta rpjC$ 两个菌株,系统探究 18 种氨基酸对 DSF-家族群体感应信号分子降解的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器及培养基

蛋白胨、酵母粉、甘油、蔗糖、氨基酸和各种无机盐试剂都购自生工生物工程(上海)股份有限公司;无水甲醇、无水乙醇和乙酸乙酯等分析纯级别的有机试剂购自国药集团化学试剂有限公司;HPLC 级别的有机试剂购自 Sigma-Aldrich (中国)公司。旋转蒸发仪购自东京理化株式会社;HPLC 购自安捷伦科技(中国)有限公司。

NYG 培养基(g/L):蛋白胨 5.0,酵母提取物 3.0,甘油 20.0。

XYs 培养基(g/L): K_2HPO_4 0.7, KH_2PO_4 0.2, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, $MgCl_2$ 0.1, $FeSO_4$ 0.01, $MnCl_2$ 0.001, 酵母提取物 0.625, 蔗糖 5.0, pH 7.0。

1.2 菌株及其培养条件

$\Delta rpjC$ 和 $\Delta rpjC\Delta rpjB$ 是本实验室早期构建的突变菌株^[17,22]。接种和培养方法:首先用无菌接种环从平板上刮取菌体,接种到 20 mL NYG 培养基(添加 25 $\mu g/mL$ 利福平)中,28 $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养过夜,得到 OD_{600} 值为 1.0 左右的起始培养液。按

2%的体积比例分别再接种到 50 mL XYs 培养基中,同时添加氨基酸母液(50 mg/mL),28 $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养 24–36 h 后,分别采集 20 mL 菌液用于提取 DSF 和 BDSF。

1.3 DSF 和 BDSF 的提取纯化方法^[4,23]

用 6 mol/L HCl 调节培养 24–36 h 后的菌液 pH 至 4.0,加入等体积乙酸乙酯,28 $^{\circ}C$ 、200 r/min 振荡萃取 20 min;转移萃取混合液到 50 mL 离心管中,室温、8 000 r/min 离心 5 min,促进乙酸乙酯相与水相分离;吸取 15 mL 乙酸乙酯提取液到圆底烧瓶中,利用旋转蒸发仪(40 $^{\circ}C$)蒸干乙酸乙酯;DSF 粗提物溶解在 1 mL 无水甲醇中,转移到 1.5 mL EP 离心管中;利用真空离心浓缩仪(40 $^{\circ}C$, 60 min)蒸干粗提物,蒸干的样品可在 -20 $^{\circ}C$ 保藏备用。

1.4 DSF 和 BDSF 的检测与定量分析方法^[4]

用 100 μL 无水甲醇(HPLC 级别)充分溶解提取物,室温离心 15 min (12 000 r/min)去除提取液中的不溶性杂质,转移上清液至新的 EP 离心管中,取 70 μL 到 HPLC 样品管中用于检测。HPLC 检测分析方法:上样量 5 μL ; C18 反相色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, Agilent);流动相比比例为水:甲醇(体积比 23:77, 0.1%甲酸),流速 1 mL/min;检测系统参数为 Agilent Technologies 1260 Infinity system with DAD G1315D VL detector。DSF 和 BDSF 的保留时间分别为 21.1 min 和 15.2 min,最大紫外吸收波长在 212 nm。根据 HPLC 出峰面积(Peak area, A)计算 DSF 和 BDSF 浓度,DSF ($\mu mol/L$)=1.32A–50.24,相关系数(*r*)为 0.999;BDSF ($\mu mol/L$)=0.71A–10.64,相关系数(*r*)为 0.998。

2 结果与分析

2.1 18 种氨基酸对 $\Delta rpjC$ 菌株培养过程中 BDSF 和 DSF 水平的影响

为了方便 DSF 和 BDSF 的检测,选用 DSF 高产菌株 *rpjC* 突变体($\Delta rpjC$)作为出发菌株。在 XYs 培养基中分别添加 0.1 mmol/L 18 种氨基酸,接种 $\Delta rpjC$ 菌株后培养 12–36 h,分别检测生长(OD_{600})、BDSF 和 DSF 水平。实验结果表明:添加任何一

种氨基酸对 $\Delta rpfC$ 菌株生长没有显著影响, 培养 24 h 后菌群生长进入了稳定期, 菌液 OD_{600} 值约为 1.2 (图 1A、1B)。HPLC 分析结果表明: 18 种氨基酸中甲硫氨酸(Met)、胱氨酸(Cyss)和色氨酸(Trp)能显著降低 $\Delta rpfC$ 菌株培养体系中 DSF 和 BDSF

水平, 其它氨基酸没有显著效果。接种培养 24 h 后, 添加 Met、Cyss 或 Trp 的培养体系中 BDSF 水平分别为对照培养体系 XYZ 中的 63.1%、61.7% 和 33.3%, DSF 水平分别为对照培养体系 XYZ 中的 71.8%、62.0% 和 42.9% (图 1C、1D)。接种培养

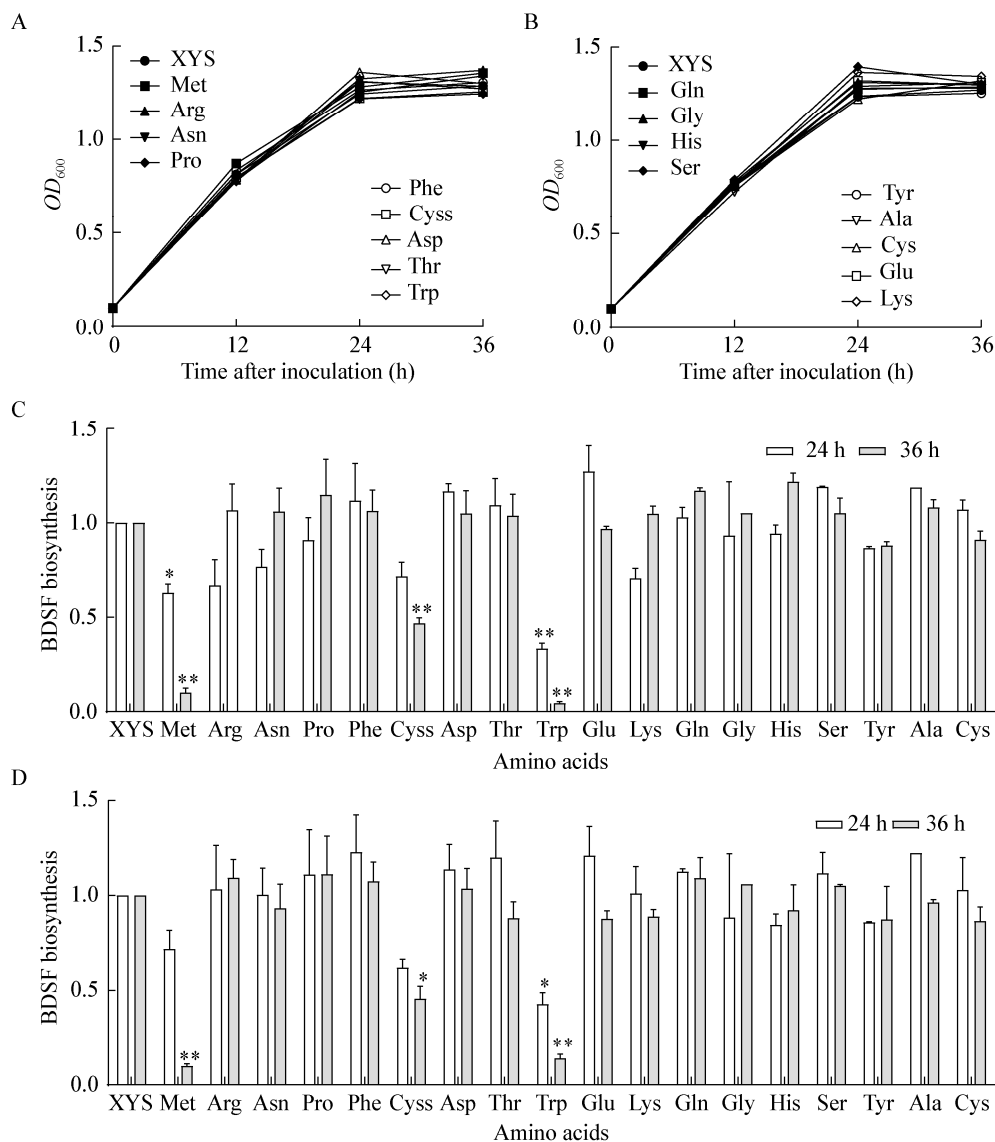


图 1 18 种氨基酸对 $\Delta rpfC$ 菌株在 XYZ 培养基中生长、BDSF 和 DSF 水平的影响

Figure 1 Effects of 18 amino acids on the growth, BDSF and DSF levels of $\Delta rpfC$ strain in XYZ medium

注: A、B: $\Delta rpfC$ 菌株在 XYZ 培养基中的生长曲线, 所有氨基酸的最终浓度为 0.1 mmol/L; C: 接种 24 h 或 36 h 后, 添加氨基酸培养体系与对照培养体系中 BDSF 的相对水平; D: 接种 24 h 或 36 h 后, 添加氨基酸培养体系与对照培养体系中 DSF 的相对水平。所有实验重复 3 次后, 数据代表平均值 \pm 标准偏差。统计学上显著差异($P \leq 0.05$)用“*”或“**”表示。

Note: A, B: Time-course of bacterial growth. The $\Delta rpfC$ strain was grown in XYZ medium supplemented with 0.1 mmol/L amino acid; C: The relative BDSF levels 24 h or 36 h after inoculation; D: The relative DSF levels 24 h or 36 h after inoculation. Averages for three technical repeats with standard deviation are shown. Statistically significant differences with respect to culture without additional amino acids are indicated by “*” or “**” ($P \leq 0.05$).

36 h 后,添加 Met、Cyss 或 Trp 的培养体系中 BDSF 水平分别为对照培养体系 XYZ 中的 10.0%、46.8% 和 4.5%, DSF 水平分别为对照培养体系 XYZ 中的 9.9%、45.6% 和 13.9% (图 1C、1D)。

2.2 Met 对 $\Delta rpfC$ 菌株培养过程中 BDSF 和 DSF 水平的影响

为了进一步研究 Met、Cyss 和 Trp 对 $\Delta rpfC$ 菌株中 BDSF 和 DSF 水平的影响,分别针对 3 种氨基酸设置了浓度梯度实验。外源添加 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L Met 到 $\Delta rpfC$ 菌株 XYZ 培养体系中对菌株的生长没有显著影响(图 2A)。接种培养 24 h 后,添加 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L Met 的培养体系中 BDSF 水平分别为 1.69、1.45 和 0.13 $\mu\text{mol/L}$,分别是对照培养体系 XYZ 中 BDSF 水平的 77.2%、65.8% 和 5.80%; DSF 水平分别为 2.24、1.71 和 0.31 $\mu\text{mol/L}$,分别是对照培养体系 XYZ 中 DSF 水平的 106.8%、81.1% 和 14.7% (图 2B、2C)。接种培养 36 h 后,添加 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L Met 的培养体系中 BDSF 水平分别为 0.17、0.22 和 0.06 $\mu\text{mol/L}$,分别是对照培养体系 XYZ 中 BDSF 水平的 8.1%、10.8% 和 3.1%; DSF 水平分别为 0.82、0.54 和 0.21 $\mu\text{mol/L}$,分别是对照培养体系 XYZ 中 DSF 水平的 41.3%、27.2% 和 10.8% (图 2B、2C)。

2.3 Cyss 对 $\Delta rpfC$ 菌株培养过程中 BDSF 和 DSF 水平的影响

外源添加 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L Cyss 到 $\Delta rpfC$ 菌株 XYZ 培养体系中对菌株的生长没有显著影响(图 3A)。接种培养 24 h 后,添加 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L Cyss 的培养体系中 BDSF 水平分别为 1.86、1.43 和 0.25 $\mu\text{mol/L}$,是对照培养体系 XYZ 中 BDSF 水平的 91.7%、70.3% 和 12.4%; DSF 水平分别为 1.72、1.15 和 0.34 $\mu\text{mol/L}$,是对照培养体系 XYZ 中 DSF 水平的 83.8%、56.3% 和 16.5% (图 3B、3C)。接种培养 36 h 后,添加 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L Cyss 的培养体系中 BDSF 水平分别为 1.95、1.56 和 0.06 $\mu\text{mol/L}$,是对照培养体系 XYZ 中 BDSF 水平的 102%、81.7% 和 2.9%; DSF 水

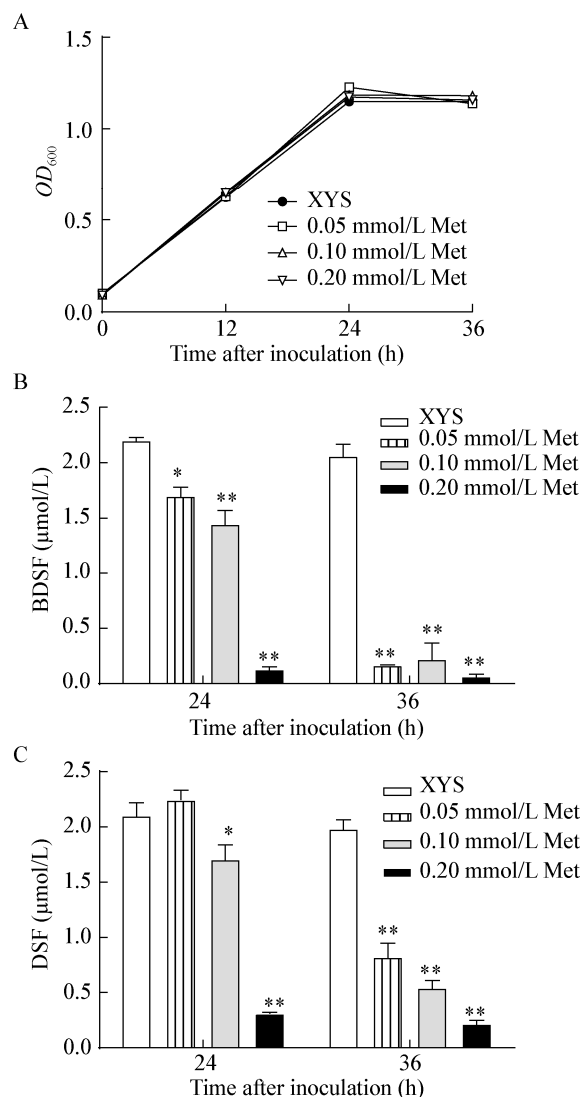


图 2 甲硫氨酸对 $\Delta rpfC$ 菌株在 XYZ 培养基中生长、BDSF 和 DSF 水平的影响

Figure 2 Effects of methionine on the growth, BDSF and DSF levels of $\Delta rpfC$ strain

注: A: $\Delta rpfC$ 菌株在 XYZ 培养基中的生长曲线, 甲硫氨酸最终浓度分别为 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L; B: 接种 24 h 或 36 h 后, 培养体系中 BDSF 水平; C: 接种 24 h 或 36 h 后培养体系中 DSF 水平. 所有实验重复 3 次, 数据代表平均值 \pm 标准偏差. 统计学上显著差异($P \leq 0.05$)用“*”或“**”表示.

Note: A: Time-course of bacterial growth. The $\Delta rpfC$ strain was grown in XYZ medium supplemented with 0.05, 0.1 or 0.2 mmol/L methionine; B: BDSF levels in the culture 24 h or 36 h after inoculation; C: DSF levels in the culture 24 h or 36 h after inoculation. Averages for three technical repeats with standard deviation are shown. Statistically significant differences with respect to culture without additional amino acids are indicated by “*” or “**” ($P \leq 0.05$).

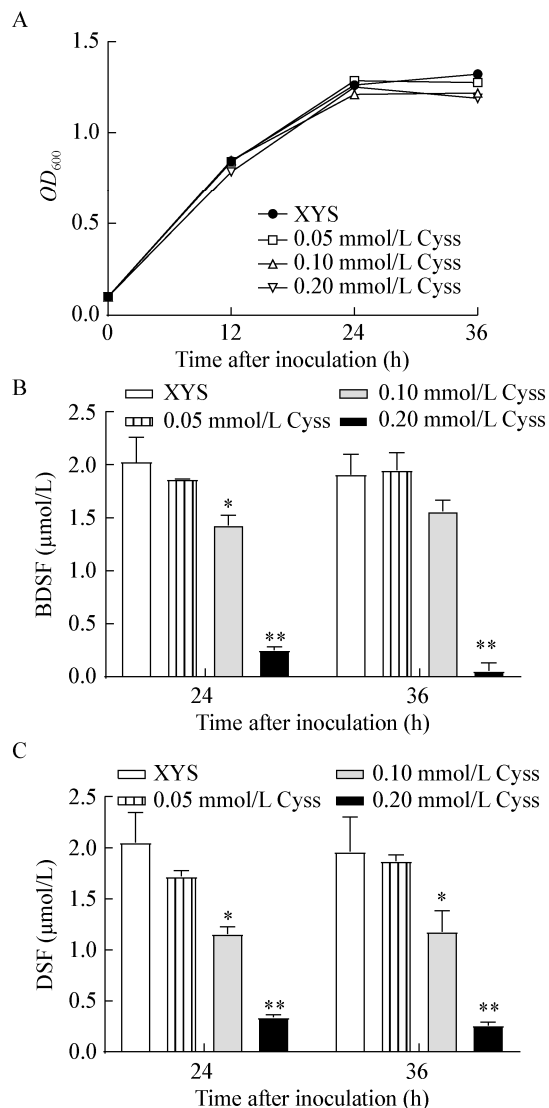


图3 胱氨酸对 $\Delta rpfC$ 菌株在 XYZ 培养基中生长、BDSF 和 DSF 水平的影响

Figure 3 Effects of cystine on the growth, BDSF and DSF levels of $\Delta rpfC$ strain

注: A: $\Delta rpfC$ 菌株在 XYZ 培养基中的生长曲线, 胱氨酸最终浓度分别为 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L; B: 接种 24 h 或 36 h 后培养体系中 BDSF 水平; C: 接种 24 h 或 36 h 后培养体系中 DSF 水平。所有实验重复 3 次, 数据代表平均值±标准偏差。统计学上显著差异 ($P \leq 0.05$) 用“*”或“**”表示。

Note: A: Time-course of bacterial growth. The $\Delta rpfC$ strain was grown in XYZ medium supplemented with 0.05, 0.1 or 0.2 mmol/L cystine; B: BDSF levels in the culture 24 h or 36 h after inoculation; C: DSF levels in the cultures 24 h or 36 h after inoculation. Averages for three technical repeats with standard deviation are shown. Statistically significant differences with respect to culture without additional amino acids are indicated by “*” or “**” ($P \leq 0.05$).

平分别为 1.87、1.18 和 0.26 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系 XYZ 中 DSF 水平的 95.3%、60.0% 和 13.2% (图 3B、3C)。

2.4 Trp 对 $\Delta rpfC$ 菌株培养过程中 BDSF 和 DSF 水平的影响

外源添加 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L Trp 到 $\Delta rpfC$ 菌株 XYZ 培养体系中对菌株的生长没有显著影响 (图 4A)。接种培养 24 h 后, 添加 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L Trp 的培养体系中 BDSF 水平分别为 1.75、0.75 和 0.41 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系 XYZ 中 BDSF 水平的 85.3%、36.5% 和 20.0%; DSF 水平分别为 1.26、0.83 和 0.56 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系 XYZ 中 DSF 水平的 61.4%、40.3% 和 27.4% (图 4B、4C)。接种培养 36 h 后, 添加 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L Trp 的培养体系中 BDSF 水平分别为 0.15、0.11 和 0.04 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系 XYZ 中 BDSF 水平的 6.5%、4.7% 和 1.7%; DSF 水平分别为 0.85、0.29 和 0.19 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系 XYZ 中 DSF 水平的 41.2%、14.1% 和 9.1% (图 4B、4C)。

2.5 Met、Cyss 和 Trp 对 $\Delta rpfC$ 菌株 BDSF 和 DSF 水平的影响具有叠加效应

Met、Cyss 和 Trp 都能显著降低 $\Delta rpfC$ 菌株培养体系中 DSF 和 BDSF 水平, 为了探究它们的作用是否具有叠加效应, 设置了组合添加实验。在 XYZ 培养基中添加 Met+Trp、Met+Cyss、Trp+Cyss 或 Met+Trp+Cyss 组合, 每一组合中氨基酸浓度为 0.05 或 0.1 mmol/L; 以添加 0.05 或 0.1 mmol/L Met 的 XYZ 培养体系作为对照, 接种 $\Delta rpfC$ 菌株后培养 24 h 和 36 h, 分别检测 BDSF 和 DSF 水平。氨基酸浓度均为 0.05 mmol/L 条件下培养 24 h 后, 添加 Met+Trp、Met+Cyss、Trp+Cyss 或 Met+Trp+Cyss 的培养体系中 BDSF 水平分别为 0.45、1.35、1.43 和 0.35 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系中 BDSF 水平的 25.7%、77.1%、81.4% 和 20%; DSF 水平分别为 1.25、1.4、1.79 和 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系中 DSF 水平的 58.1%、65.2%、83.3% 和 18.6% (图 5A)。氨基酸浓度均为 0.1 mmol/L 条件下培养 24 h 后,

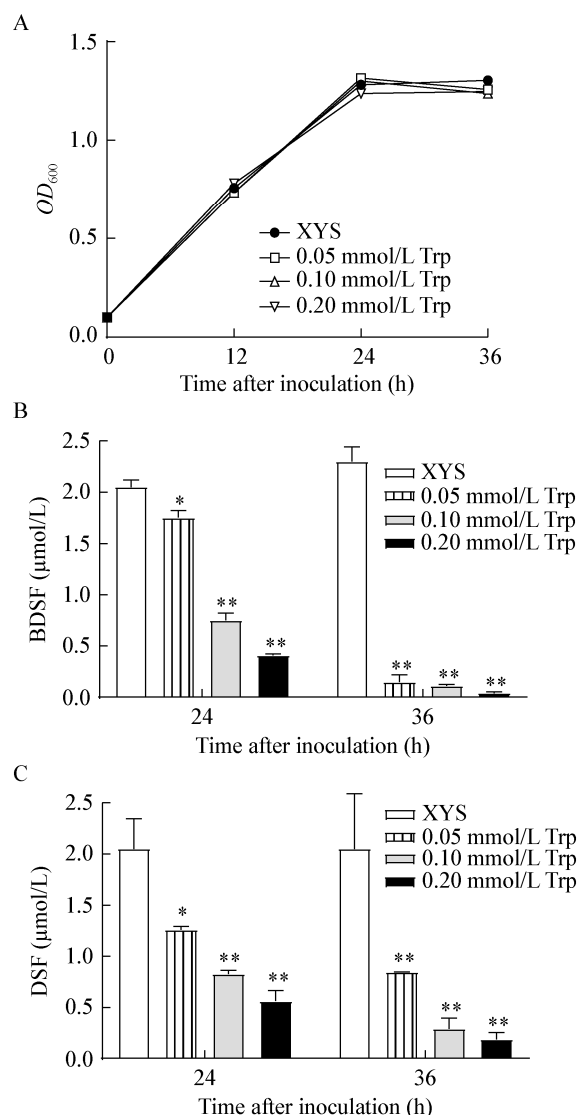


图4 色氨酸对 $\Delta rpfC$ 菌株在 XYZ 培养基中生长、BDSF 和 DSF 水平的影响

Figure 4 Effects of tryptophan on the growth, BDSF and DSF levels of $\Delta rpfC$ strain

注: A: $\Delta rpfC$ 菌株在 XYZ 培养基中的生长曲线, 色氨酸最终浓度分别为 0.05、0.1 或 0.2 mmol/L; B: 接种 24 h 或 36 h 后培养体系中的 BDSF 水平; C: 接种 24 h 或 36 h 后培养体系中的 DSF 水平. 所有实验重复 3 次, 数据代表平均值±标准偏差. 统计学上显著差异($P \leq 0.05$)用“*”或“**”表示.

Note: A: Time-course of bacterial growth. The $\Delta rpfC$ strain was grown in XYZ medium supplemented with 0.05, 0.1 or 0.2 mmol/L tryptophan; B: BDSF levels in the culture 24 h or 36 h after inoculation; C: DSF levels in the culture 24 h or 36 h after inoculation. Averages for three technical repeats with standard deviation are shown. Statistically significant differences with respect to culture without additional amino acids are indicated by “*” or “**” ($P \leq 0.05$).

添加 Met+Trp、Met+Cyss、Trp+Cyss 或 Met+Trp+Cyss 的培养体系中 BDSF 水平分别为 0.39、0.68、0.69 和 0.05 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系中 BDSF 水平的 30.5%、53.0%、54.2%和 4.2%; DSF 水平分别为 0.67、0.74、0.73 和 0.14 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系中 DSF 水平的 40.4%、44.5%、44.2%和 8.1% (图 5B)。

氨基酸浓度均为 0.05 mmol/L 条件下培养 36 h 后, 添加 Met+Trp、Met+Cyss、Trp+Cyss 或 Met+Trp+Cyss 的培养体系中 BDSF 水平分别为 0.08、0.15、0.12 和 0.00 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系中 BDSF 水平的 30.6%、61.2%、50.6%和 0.0%; DSF 水平分别为 0.18、0.25、0.41 和 0.11 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系中 DSF 水平的 31.4%、43.5%、70.0%和 19.3% (图 5C)。氨基酸浓度为 0.1 mmol/L 条件下培养 36 h 后, 添加 Met+Trp、Met+Cyss、Trp+Cyss 或 Met+Trp+Cyss 的培养体系中 BDSF 水平分别为 0.00、0.01、0.03 和 0.00 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系中 BDSF 水平的 0.0%、4.6%、13.2%和 0.0%; DSF 水平分别为 0.03、0.03、0.07 和 0.02 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系中 DSF 水平的 5.6%、5.6%、15.9%和 3.8% (图 5D)。综上所述, 添加上述组合氨基酸对 $\Delta rpfC$ 菌株培养体系中 DSF 和 BDSF 水平具有叠加效应, 氨基酸浓度越高或培养时间越长, 叠加效应越显著。

2.6 Met、Cyss 和 Trp 对 $\Delta rpfC$ 菌株 BDSF 和 DSF 水平的影响依赖 DSF 降解酶 RpfB

为了探究 Met、Cyss 和 Trp 是否通过 RpfB 依赖的群体感应退出机制来降低 $\Delta rpfC$ 菌株培养体系中 DSF 和 BDSF 水平, 进一步检测了这 3 种氨基酸对 $\Delta rpfC\Delta rpfB$ 菌株 DSF 和 BDSF 水平的影响。外源添加 Met、Cyss 或 Trp (终浓度为 0.1 mmol/L) 到 $\Delta rpfC\Delta rpfB$ 菌株 XYZ 培养体系中对菌株的生长没有显著影响 (图 6A)。HPLC 分析结果表明: Met、Cyss 和 Trp 对 $\Delta rpfC\Delta rpfB$ 菌株培养体系中 DSF 和 BDSF 水平没有显著影响。接种培养 36 h 后, 添加 Met、Cyss 或 Trp (终浓度为 0.1 mmol/L)

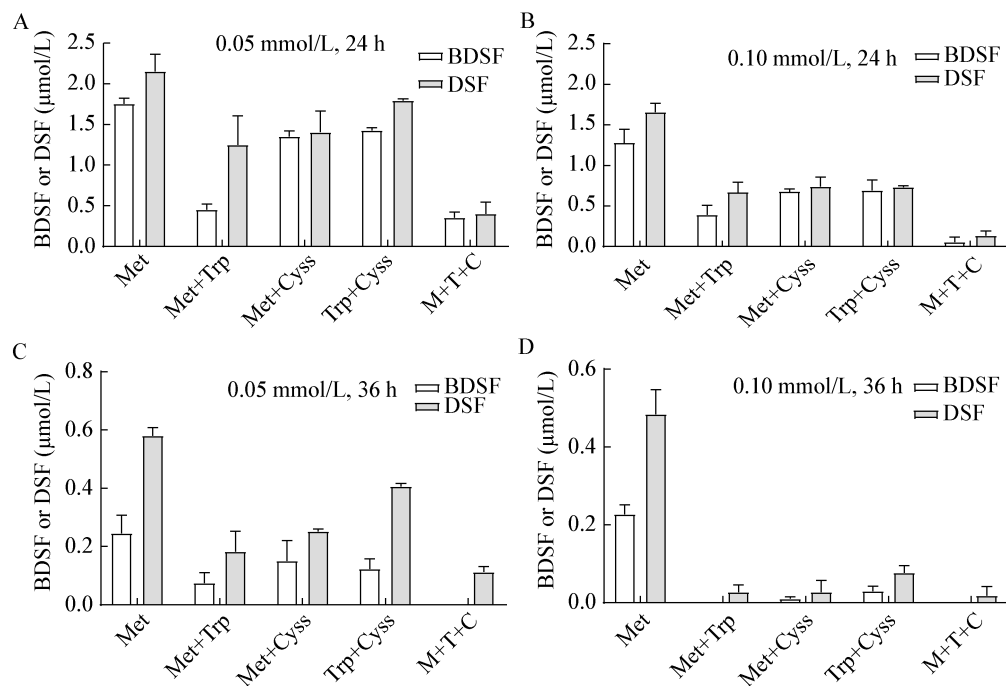


图5 3种氨基酸对 $\Delta rpfC$ 菌株 BDSF 和 DSF 水平影响的叠加作用

Figure 5 The superposition effect of three amino acids on the levels of BDSF and DSF of $\Delta rpfC$ strain

注: $\Delta rpfC$ 菌株在添加不同氨基酸组合的 XYZ 培养基中 BDSF 和 DSF 水平. A: 各氨基酸组合的单一氨基酸浓度为 0.05 mmol/L, 培养 24 h; B: 单一氨基酸浓度为 0.1 mmol/L, 培养 24 h; C: 单一氨基酸浓度为 0.05 mmol/L, 培养 36 h; D: 单一氨基酸浓度为 0.1 mmol/L, 培养 36 h. 所有实验重复 3 次, 数据代表平均值±标准偏差.

Note: The levels of BDSF and DSF of $\Delta rpfC$ strain in the XYZ medium with different amino acid combinations. A: The concentration of individual amino acid of each combination is 0.05 mmol/L and incubated for 24 h; B: Individual amino acid is 0.1 mmol/L and incubated for 24 h; C: Individual amino acid is 0.05 mmol/L and incubated for 36 h; D: Individual amino acid is 0.1 mmol/L and incubated for 36 h. Averages for three technical repeats with standard deviation are shown.

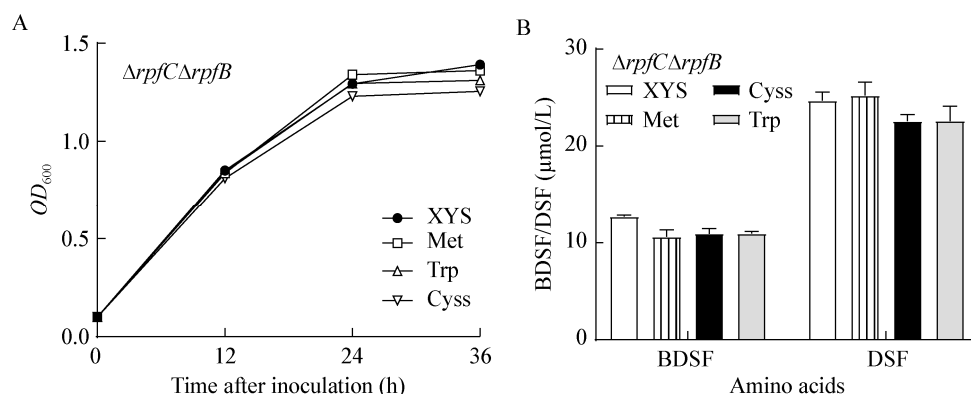


图6 3种氨基酸对 $\Delta rpfC\Delta rpfB$ 菌株在 XYZ 培养基中生长、BDSF 和 DSF 水平的影响

Figure 6 Effects of three amino acids on growth, BDSF and DSF levels of $\Delta rpfC\Delta rpfB$ strain in XYZ medium

注: A: $\Delta rpfC\Delta rpfB$ 菌株在 XYZ 培养基中的生长曲线, 3 种氨基酸的最终浓度为 0.1 mmol/L; B: 接种 36 h 后, 培养体系中 BDSF 和 DSF 水平. 所有实验重复 3 次, 数据代表平均值±标准偏差.

Note: A: Time-course of bacterial growth. The $\Delta rpfC\Delta rpfB$ strain was grown in XYZ medium supplemented with 0.1 mmol/L amino acid. B: BDSF and DSF levels 36 h after inoculation. Averages for three technical repeats with standard deviation are shown.

的培养体系中 BDSF 水平分别为 10.61、10.95 和 10.94 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系 XYZ 中 BDSF 水平的 83.5%、86.2%和 86.1%; DSF 水平分别为 25.22、22.60 和 22.56 $\mu\text{mol/L}$, 是对照培养体系 XYZ 中 DSF 水平的 102.1%、91.5%和 91.3% (图 6B)。

3 讨论与结论

在病原菌与植物相互作用过程中, 寄主植物产生的特定代谢产物能影响病原菌致病性, 例如: 植物代谢物 SA 对铜绿假单胞菌的致病性有显著干扰作用, 包括抑制生物膜的形成、降低运动能力、下调绿脓菌素、蛋白酶和弹性蛋白酶等毒力因子水平等^[24-26]。Yuan 等^[27]发现 SA 能够抑制根瘤农杆菌表达毒力调节因子, 并诱导其 AHL 内酯酶基因 *attM* 的表达。Wang 等^[28]发现水果、蔬菜和中草药中富含的绿原酸(Chlorogenic acid, CA), 能够诱导铜绿假单胞菌中群体感应相关基因的表达下调, 并抑制其生物膜的形成、泳动能力以及包括蛋白酶、弹性蛋白酶、鼠李糖脂和绿脓菌素在内的毒力因子的产生。*Xcc* 与植物互作过程中天然代谢产物的作用近年来也被广泛研究。*Xcc* 编码一个脯氨酸亚氨基酸肽酶(Pip), 其不仅能够参与调控病原菌的运动性, 还能作为 III 型效应因子进入植物细胞, 抑制植物免疫反应^[29]。*pip* 的表达受到 AHL 信号受体同源蛋白 XccR 正调控^[30], 后者进一步受到转录因子 XerR 的抑制; Wang 等^[31]发现某种小分子量 (<1 kD)未知植物代谢产物能有效阻断 XerR 结合到 XccR 基因启动子区域, 却促进 XccR 结合到 *pip* 基因启动子。Coutinho 等^[32]在杨树与假单胞内生菌互作过程中观察到类似现象, 推测该植物代谢产物可能是乙醇胺衍生物。Wang 等^[33]发现植物细胞分裂素 2-iP 能有效结合 *Xcc* 细胞表面受体激酶 PcrK, 刺激 *Xcc* 抗氧化相关基因表达。

植物代谢产物不仅影响病原菌的致病性, 还可能干扰病原菌的群体感应与退出系统。在根瘤农杆菌与植物互作过程中, 寄主植物代谢产物 γ -氨基丁酸和农杆菌糖酯能分别诱导 AHL 内酯酶基因 *attM*

和 *aiiB* 的表达, 调节胞内 AHL 水平, 进而调控 Ti 质粒接合和致病因子表达等生理过程^[8]。在 *Xcc* 与植物互作过程中, Xu 等^[34]发现 SA 一方面抑制 *Xcc* 的运动能力, 另一方面又能够诱导 *Xcc* 合成 DSF 和 DF 群体感应信号分子, 并引起菌黄素和胞外多糖的积累; 脱落酸(Absciscic acid, ABA)不影响群体感应信号分子的合成, 但能够增强 *Xcc* 的运动能力。Zhang 等^[35]发现植物体内蔗糖与葡萄糖能够被 *Xcc* 有效利用, 参与 DSF 群体感应信号合成和 DSF 相关基因的表达。本研究以模拟植物体内营养环境的 XYZ 培养基作为基础培养基, 利用 HPLC 分别检测了 18 种氨基酸对 DSF-家族群体感应信号分子合成的影响, 首次发现 Met、Cyss 和 Trp 能有效降低 $\Delta rpfC$ 菌株培养体系中 DSF 和 BDSF 水平, 抑制效果与氨基酸浓度密切相关; 另外, Met 和 Trp 的抑制效果还与培养时间密切相关, Met 或 Trp 浓度越高, BDSF 和 DSF 水平降低现象越早出现, 我们推测该现象是由于低浓度氨基酸环境下, 菌体需要更长的积累时间才能达到氨基酸有效作用浓度。在与植物互作过程中, 病原菌常常受到多种植物源代谢产物的共同调控, Yuan 等^[10]发现 GABA 和 SA 对根瘤农杆菌群体感应退出机制的促进作用具有叠加效应, 而 SA 和 IAA 对根瘤农杆菌致病性的抑制作用也具有叠加效应。与这些研究结果相符合, 本研究发现 Met、Cyss 和 Trp 对 DSF 信号分子的抑制作用存在叠加效应。本研究还发现 Met、Cyss 和 Trp 对 $\Delta rpfC$ 菌株 BDSF 和 DSF 水平的影响依赖 DSF 降解酶 RpfB。

Xcc 是重要的农业病害, 目前主要的防治措施是化学防治, 例如施用叶枯宁、叶枯净、氯霉素, 这些农药的大量使用已经带来了环境污染、生态平衡破坏和粮食安全等负面问题^[5]。近年来, 通过在病原细菌或寄主植物中表达 AHL 降解酶来抑制病原细菌群体感应的策略被广泛应用于研究植物细菌病害的防治^[36]。例如: 在具有 AHL 群体感应系统的植物病原胡萝卜果胶杆菌(*Pectobacterium* subsp. *carotovora*, *Pcc*)或西甜瓜细菌性果斑病菌

(*Acidovorax citrulli*)中异源表达芽孢杆菌 AHL 降解酶基因 *aiiA*, 能够有效降低它们对宿主植物的致病性^[37-38]; 在烟草、马铃薯、魔芋和大白菜等植物中异源表达 *aiiA* 基因, 转基因植物对 *Pcc* 的抗性显著提高, 接种病原菌后病斑的出现显著推迟或不出现病斑^[39-41]。在植物细菌病害的生防菌株 *Pseudomonas fluorescens* P3 和溶酶杆菌 OH11 中转入 *aiiA* 基因也可提高其防病效果^[42-43]。苛养木杆菌(*Xylella fastidiosa*)产生一类新型群体感应信号 XfDSF, Lindow 等将 XfDSF 合成酶基因转入葡萄(‘Freedom’品种), 转基因葡萄对苛养木杆菌的抗病性显著增强^[44]。这些前人的研究结果表明群体感应系统是防治植物细菌病害的有效靶标。本研究发现 Met、Cyss 和 Trp 能够有效降低 *Xcc* 中 DSF 群体感应信号分子的水平, 有助于研发绿色环保的十字花科植物黑腐病防治措施, 其机理有待进一步阐明。

REFERENCES

- [1] Hayward AC. The hosts of *Xanthomonas*[A]//Swings JG, Civerolo EL. *Xanthomonas*[M]. Dordrecht: Springer, 1993: 1-119
- [2] He YQ, Tang JL. Genome analysis and pathological genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[A]//Yu ZN, Shao ZZ, Sun M. Microbial Genome Research in China[M]. Beijing: Science Press, 2012: 446-485 (in Chinese)
何勇强, 唐纪良. 十字花科黑腐病菌基因组分析与病理基因组学[A]//喻子牛, 邵宗泽, 孙明. 中国微生物基因组研究[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 446-485
- [3] Zhou L, Zhang LH, Cámara M, et al. The DSF family of quorum sensing signals: diversity, biosynthesis, and turnover[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(4): 293-303
- [4] Zhou L, Yu YH, Chen XP, et al. The multiple DSF-family QS signals are synthesized from carbohydrate and branched-chain amino acids via the FAS elongation cycle[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13294
- [5] Zhou L, Wang XY, He YW. DSF signal-dependent quorum sensing in plant pathogenic bacteria *Xanthomonas*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(14): 2910-2922 (in Chinese)
周莲, 王杏雨, 何亚文. 植物病原黄单胞菌 DSF 信号依赖的群体感应机制及调控网络[J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 2910-2922
- [6] He YW, Ng AYJ, Xu M, et al. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network[J]. Molecular Microbiology, 2007, 64(2): 281-292
- [7] Cai Z, Yuan ZH, Zhang H, et al. Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum-sensing and virulence[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(4): e1006304
- [8] Grandclément C, Tannières M, Moréra S, et al. Quorum quenching: role in nature and applied developments[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2016, 40(1): 86-116
- [9] Dessaux Y, Faure D. Quorum sensing and quorum quenching in *Agrobacterium*: a “go/no go system”?[J]. Genes, 2018, 9(4): 210
- [10] Yuan ZC, Haudecoeur E, Faure D, et al. Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and γ -amino butyric acid reveals signalling cross-talk and *Agrobacterium*-plant co-evolution[J]. Cellular Microbiology, 2008, 10(11): 2339-2354
- [11] Chevrot R, Rosen R, Haudecoeur E, et al. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(19): 7460-7464
- [12] Planamente S, Vigouroux A, Mondy S, et al. A conserved mechanism of GABA binding and antagonism is revealed by structure-function analysis of the periplasmic binding protein Atu2422 in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(39): 30294-30303
- [13] 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[J]. Molecular Microbiology, 1997, 24(3): 555-566
- [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[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(2): 610-622
- [15] Wang LH, He YW, Gao YF, et al. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(3): 903-912
- [16] Bi HK, Yu YH, Dong HJ, et al. *Xanthomonas campestris* RpfB is a fatty Acyl-CoA ligase required to counteract the thioesterase activity of the RpfF diffusible signal factor (DSF) synthase[J]. Molecular Microbiology, 2014, 93(2): 262-275
- [17] Zhou L, Wang XY, Sun S, et al. Identification and characterization of naturally occurring DSF-Family quorum sensing signal turnover system in the phytopathogen *Xanthomonas*[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(11): 4646-4658
- [18] Wang XY, Zhou L, Yang J, et al. The RpfB-dependent quorum sensing signal turnover system is required for adaptation and virulence in rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2016, 29(3): 220-230
- [19] Wu GY. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition[J]. Amino Acids, 2009, 37(1): 1-17
- [20] Sharma SS, Dietz KJ. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(4): 711-726
- [21] Diab AA, Cao XQ, Chen H, et al. BDSF is the predominant

- in-plant quorum-sensing signal used during *Xanthomonas campestris* infection and pathogenesis in Chinese cabbage[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2019, 32(2): 240-254
- [22] 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[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(44): 33414-33421
- [23] He YW, Wu JE, Cha JS, et al. Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production[J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 187
- [24] Bandara MBK, Zhu H, Sankaridurg PR, et al. Salicylic acid reduces the production of several potential virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with microbial keratitis[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006, 47(10): 4453-4460
- [25] Chow S, Gu K, Jiang L, et al. Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in decreased biofilm formation[J]. Journal of Experimental Microbiology and Immunology, 2011, 15: 22-29
- [26] Prithiviraj B, Bais HP, Weir T, et al. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(9): 5319-5328
- [27] Yuan ZC, Edlind MP, Liu P, et al. The plant signal salicylic acid shuts down expression of the *vir* regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(28): 11790-11795
- [28] Wang H, Chu WH, Ye C, et al. Chlorogenic acid attenuates virulence factors and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* by regulating quorum sensing[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(2): 903-915
- [29] Kan JH, An L, Wu Y, et al. A dual role for proline iminopeptidase in the regulation of bacterial motility and host immunity[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(8): 2011-2024
- [30] Zhang LL, Jia YT, Wang L, et al. A proline iminopeptidase gene upregulated in *in planta* by a LuxR homologue is essential for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(1): 121-136
- [31] Wang L, Zhang LL, Geng YF, et al. XerR, a negative regulator of XccR in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, relieves its repressor function in *in planta*[J]. Cell Research, 2011, 21(7): 1131-1142
- [32] Coutinho BG, Mevers E, Schaefer AL, et al. A plant-responsive bacterial-signaling system senses an ethanolamine derivative[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(39): 9785-9790
- [33] Wang FF, Cheng ST, Wu Y, et al. A bacterial receptor Prk senses the plant hormone cytokinin to promote adaptation to oxidative stress[J]. Cell Reports, 2017, 21(10): 2940-2951
- [34] Xu J, Zhou L, Venturi V, et al. Phytohormone-mediated interkingdom signaling shapes the outcome of rice-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interactions[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15: 10
- [35] Zhang CY, Lv MF, Yin WF, et al. *Xanthomonas campestris* promotes diffusible signal factor biosynthesis and pathogenicity by utilizing glucose and sucrose from host plants[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2018, 32(2): 157-166
- [36] Zhang LQ, Tian T, Mei GY. Quorum quenching, a new strategy for controlling plant bacterial diseases[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(3): 241-247 (in Chinese)
张力群, 田涛, 梅桂英. 群体感应淬灭——防治植物细菌病害的新策略[J]. 中国生物防治, 2010, 26(3): 241-247
- [37] Dong YH, Xu JL, Li XZ, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(7): 3526-3531
- [38] Chen T, Qian GL, Yang XL, et al. Detection of quorum sensing signal molecule of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and its regulation on pathogenicity[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2008, 16(4): 653-657 (in Chinese)
陈涛, 钱国良, 杨小丽, 等. 瓜类细菌性果斑病菌群体感应信号分子的检测及其对致病性的影响[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(4): 653-657
- [39] Ban HF, Chai XL, Lin YJ, et al. Transgenic *Amorphophallus konjac* expressing synthesized acyl-homoserine lactonase (*aiiA*) gene exhibit enhanced resistance to soft rot disease[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(12): 1847-1855
- [40] Dong YH, Wang LH, Xu JL, et al. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase[J]. Nature, 2001, 411(6839): 813-817
- [41] Vanjildorj E, Song SY, Yang ZH, et al. Enhancement of tolerance to soft rot disease in the transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) inbred line, Kenshin[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(10): 1581-1591
- [42] Molina L, Constantinescu F, Michel L, et al. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 45(1): 71-81
- [43] Qian GL, Fan JQ, Chen DF, et al. Reducing *Pectobacterium* virulence by expression of an *N*-acyl homoserine lactonase gene *P_{lpp}-aiiA* in *Lysobacter enzymogenes* strain OH11[J]. Biological Control, 2010, 52(1): 17-23
- [44] Lindow S, Newman K, Chatterjee S, et al. Production of *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor in transgenic grape causes pathogen confusion and reduction in severity of Pierce's disease[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2014, 27(3): 244-254