

柑橘溃疡病菌 II 型分泌通道基因 *xpsD* 突变体的鉴定及功能分析

卓涛¹ 郭静² 范晓静¹ 孙东玲¹ 邹华松^{1*}

(1. 福建农林大学 植物保护学院 福建 福州 350002)

(2. 上海交通大学 农业与生物学院 上海 200240)

摘要:【目的】鉴定柑橘溃疡病菌胞外水解酶减弱突变体 Mxac56-20 的 Tn5 插入位点, 及其在柑橘上的致病力。【方法】采用质粒拯救方法获得 Tn5 旁侧序列, 与基因组信息比对后明确突变体的插入位点; 构建功能互补载体对突变体进行功能互补, 检测互补菌株胞外蛋白水解酶、纤维素酶和淀粉酶的恢复情况; 在寄主植物柑橘上观察致病力变化。【结果】Mxac56-20 的 Tn5 插入位点是 II 型分泌系统 *xpsD* 基因, 所构建的互补载体使突变体的胞外水解酶活性和致病力得到恢复。【结论】柑橘溃疡病菌 *xpsD* 基因的突变, 导致胞外水解酶活性降低, 在寄主上的致病力减弱, 说明柑橘溃疡病菌的 II 型分泌系统在与寄主互动过程中起到致病因子的作用。

关键词: 柑橘溃疡病菌, *xpsD* 基因, 功能互补, 胞外水解酶, 致病力

Functional characterization of the general secretion pathway *xpsD* gene in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

ZHUO Tao¹ GUO Jing² FAN Xiao-Jing¹ SUN Dong-Ling¹ ZOU Hua-Song^{1*}

(1. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

(2. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this work was to identify the insertion site of mutant Mxac56-20 with reduced extracellular enzyme activities, and to characterize the function of the mutated gene. [Methods] The Tn5 flanking sequence was identified by using plasmid rescue method. After the complementary recombinant was constructed, the restorations of extracellular enzyme and pathogenicity on host plant were tested. [Results] Tn5 transposon was inserted in the general secretion pathway *xpsD* gene in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. The phenotypic alterations were restored when constitutively expressing *xpsD* gene in mutant Mxac56-20. [Conclusion] The mutagenesis of *xpsD* gene in *X. citri* subsp. *citri* led to the reductions in extracellular enzyme activities and pathogenicity on host plant. These collected data demonstrated that the general secretion pathway is required for full virulence on host plant by *X. citri* subsp. *citri*.

Keywords: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *xpsD* gene, Complementation, Extracellular enzyme, Pathogenicity

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31171832)

*通讯作者: Tel: 86-591-83789365; 信箱: hszou@fafu.edu.cn

收稿日期: 2014-10-10; 接受日期: 2014-11-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-26

柑桔溃疡病是由黄单胞属病原细菌引起的柑橘细菌病害。病原菌在世界范围内主要为来源于亚洲的 A 菌系、来源于美洲的 B 菌系和来源于巴西的 C 菌系^[1]。中国柑橘产区的病原菌属亚洲 A 菌系, 学名为柑橘黄单胞菌柑橘亚种 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, 以前在分类上归为地毯草黄单胞 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, 是致病力最强、蔓延最为广泛的菌系, 使绝大多数柑橘品种发病^[2-3]。

植物病原细菌的胞外水解酶是通过 II 型分泌系统(Type II secretion system, T2SS)扩散到胞外的, 是一个非常重要的致病因子^[4]。植物细胞壁主要成分是纤维素和半纤维素, 以及少量的木质素和果胶^[5]。在 *Dickeya dadantii* 侵染危害过程中, 分泌的果胶酶能够降解植物细胞壁, 但将果胶酶合成基因 *pel* 突变后就不能在寄主上引起发病^[4]。在植物病原黄单胞菌 *X. oryzae* pv. *oryzae*、*X. oryzae* pv. *oryzicola* 和 *X. campestris* pv. *campestris* 中, T2SS 的完整性是分泌胞外水解酶所必需的, T2SS 功能的丧失影响病原菌在寄主上的致病力^[6-8]。

以中国柑橘溃疡病菌株 *Xac* 29-1 为初发菌构建 Tn5 随机插入突变体库的工作中, 我们得到了

突变体 Mxac56-20, 它在柑橘上的致病力减弱, 平板上检测的胞外水解酶活性也显著降低。本研究通过质粒拯救方法明确了 Mxac56-20 突变体的 Tn5 插入位点是 II 型分泌系统的 *xpsD* 基因; 构建 *xpsD* 基因的互补载体, 完成对突变体表型的互补, 证明 T2SS 在柑橘溃疡病菌 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 致病力中的作用。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

研究所用的菌株和质粒见表 1。柑橘黄单胞 *X. citri* subsp. *citri* 在 NB 液体或 NA 固体培养基中 28 °C 培养^[7]。大肠杆菌在 LB 培养基(g/L, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 5, 酵母粉 5)中 37 °C 培养。抗生素卡那霉素和庆大霉素的使用浓度分别为 50 mg/L 和 10 mg/L。

1.2 质粒拯救

提取 Tn5 插入突变体 Mxac56-20 的基因组 DNA, 取 2 μg DNA 经 *Pst* I 完全酶切后进行连接反应, 连接产物转化大肠杆菌 S17-1λpir 感受态细胞, 涂布于卡那霉素抗性 LB 平板, 培养过夜。待菌落长出后, 提取质粒 DNA, 用 Tn5 特异性引物 R6KAN-2 RP-1 (5'-CTACCCTGTGGAACACCTACTCT-3')进行测序, 获得 Tn5 插入旁侧序列。

表 1 实验中所用的菌株和质粒		
Table 1 Strains and plasmids used in this study		
菌株或质粒	相关特性	来源
Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Φ901acZΔm15, recA1	Invitrogen
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>		
<i>Xac</i> 29-1	Wild-type	This lab
Mxac56-20	A <i>xpsD</i> mutant with Tn5 insertion derived from <i>Xac</i> 29-1	This lab
CMxac56-20	Mxac56-20 carrying pBB- <i>xpsD</i>	This work
Plasmids		
pBBR1MCS-5	Gm ^r , <i>mob</i> , broad host range cloning vector	[9]
pBB- <i>xpsD</i>	pBBR1MCS-5 expressing <i>xpsD</i> gene under <i>wxacO</i> promoter	This work

1.3 功能互补构建

根据 *X. citri* subsp. *citri* 的基因组信息, 设计特异性引物 (5'-TTAAGCTTATGAGTGAACGCA TGACGCC-3'; 5'-TTTCTAGATTATTTTCCATCC CGACTTAT-3'), 从基因组中扩增 *xpsD* 的全长编码序列, 克隆到载体 pBBR1MCS-5 的 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点。用引物 5'-TTCTCGAGGGTTCTA CATGGCCGATACG-3' 和 5'-CTCAAGCTTGCTGC CTGATTCATCGATGC-3' 扩增柑橘溃疡病菌 *wxacO* 基因 500 bp 启动子区域^[10], 克隆到 pBBR1MCS-5 的 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点, 使 *xpsD* 可以在 *wxacO* 基因启动子的推动下, 在 *X. citri* subsp. *citri* 中组成型表达。将得到的重组质粒 pBB-*xpsD* 电转进入突变体 Mxac56-20, 获得互补菌株 CMxac56-20。

1.4 胞外水解酶活性分析

将新鲜活化的突变体和野生型 *Xac* 29-1 接入含有合适抗生素的 NB 培养基中 28 °C 培养 24-48 h, 将菌液的 OD_{600} 值调成 1.0, 分别取 1.5 μ L 点到含 1% 脱脂牛奶的 NA 平板上, 28 °C 培养 2 d, 观察蛋白水解圈的形成; 在含有 1% 淀粉的 NA 平板上 28 °C 培养 2 d, 碘液染色观察淀粉水解圈的形成; 在含有 0.5% 羧甲基纤维素钠盐的平板(NaNO_3 1.0 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, KCl 1.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, Yeast extract 0.5 g/L, Glucose 1.0 g/L)上, 28 °C 培养 2 d, 用刚果红染色, 观察纤维素水解圈的形成。测量水解圈直径和菌落直径大小, 以两者之间的差值衡量菌株对底物的水解, 反映胞外水解酶的活性大小。

1.5 致病力检测

柑橘黄单胞 *X. citri* subsp. *citri* 在 28 °C 培养至对数生长期, 将菌液的 OD_{600} 值调成 0.3, 用无针头注射器注射寄主柑橘叶片, 观察病原菌引起的水渍症状和病斑的发生和扩展。

2 结果与分析

2.1 突变体 Mxac56-20 插入位点的确定

在 Tn5 随机插入突变体库的构建工作中, 获得了 40 个在柑橘上致病力减弱或丧失的突变体,

其中突变体 Mxac56-20 不仅在柑橘上致病力减弱, 胞外水解酶的活性也同时降低。采用质粒拯救的方法, 获得在卡那平板上生长的阳性克隆。经测序确认, Tn5 插入在 *xpsD* 的编码基因 XAC3534 从起始密码子开始的第 74 个核苷酸位置, 转录方向与 *xpsD* 基因相反(图 1)。柑橘溃疡病菌 *X. citri* subsp. *citri* 的 *xpsD* 基因有 2 292 个核苷酸, 编码含有 764 个氨基酸的 XpsD 蛋白。在基因组上, *xpsD* 与 *xpsN* 紧密相连, 位于 II 型分泌系统的最左端, 与其他 9 个 *xps* 基因一起形成 *xps* II 型分泌系统。与 *X. campestris* 及 *X. oryzae* 一样, *X. citri* subsp. *citri* 也含有一套由 12 个 *xcs* 基因组成的 *xcs* II 型分泌系统(图 1)。本研究中的胞外水解酶减弱突变体的插入位点在 *xps*-II 型分泌系统的 *xpsD* 基因上。

2.2 互补载体构建

柑橘溃疡病菌的 *wxacO* 基因与脂多糖和生物膜的形成有关。为了获得组成型表达 *xpsD* 的重组质粒, 将 *wxacO* 基因的 500 bp 启动子区域构建到载体 pBB1MCS-5 的 *Xho* I 和 *Hind* III 位点^[10], 用特异性引物扩增 2 292 bp 的 *xpsD* 全长序列, 构建到载体 pBB1MCS-5 的 *Hind* III 和 *Xba* I 位点, 获得重组互补构建 pBB-*xpsD*, 使得 *xpsD* 在 *wxacO* 启动子下推动表达(图 2)。重组质粒电转进入突变体 Mxac56-20 进行功能互补后的表型分析。

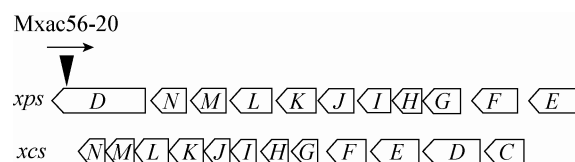


图 1 突变体 Mxac56-20 的 Tn5 插入位点
Figure 1 The Tn5 insertion site of mutant M56-20



图 2 *xpsD* 功能互补载体构建

Figure 2 The construction strategy for *xpsD* complementation analysis

2.3 *xpsD* 突变体胞外水解酶活性降低

将携带互补重组质粒 pBB-*xpsD* 的突变体 Mxac56-20, 在分别含有淀粉、脱脂牛奶和羧甲基纤维素钠盐的平板上检测菌株胞外水解酶活性。突变体的蛋白酶和淀粉酶的水解圈为 0.2 cm, 与野生型相比, 下降超过 50%。胞外纤维素酶的水解酶为 0.75 cm, 下降了 30%。功能互补菌株都恢复了突变体的胞外水解酶活性, 其中淀粉酶的活性恢复到了野生型的 75%, 蛋白酶和纤维素酶的活性接近野生型水平(图 3)。

2.4 *xpsD* 突变体在柑橘上致病力减弱

xpsD 突变体在柑橘上的致病力与野生型有明显的差别。采用注射接种方法在叶片主脉两侧、次脉之间接种 $OD_{600}=0.3$ 的菌液。野生型一般在 3 d 后就可以看到水渍症状, 突变体 Mxac56-20 出现水渍症状的时间延迟 2 d; 接种后 7 d, 随着接种区域细胞的增生膨大, 注射接种区域出现典型的隆起症状, 突变体引起的症状比野生型轻; 接种 14 d 后, 野生型的接种区域伴有轻微的坏死, 而突变体接种区域没有坏死现象。携带 pBB-*xpsD* 的互补菌恢复了突变体在柑橘上的致病力, 引起的溃疡症状时间和发病程度与野生型一致(图 4)。

3 讨论

柑橘溃疡病菌的 II 型分泌系统是一个致病因

子。Baptista 等以胞外纤维素酶为筛选目标, 没有得到纤维素酶的编码基因, 仅得到了一个 *xpsD* 突变体, 胞外纤维素水解酶活性降低, 但未能构建互补载体对突变体进行功能互补验证^[11]。*Xanthomonas citri* subsp. *citri* 的 *xpsD* 突变体在柑橘上致病力减弱的表型与 *Xanthomonas campestris* 及 *Xanthomonas oryzae* 中报道一致^[12-13]。本研究中的胞外水解酶减弱突变体 Mxac56-20, 经质粒拯救实验证明也是一个 II 型分泌系统 *xpsD* 的插入突变体, *xpsD* 可能是 II 型编码基因中的一个 Tn5 插入热点^[14-15]。

与其他黄单胞细菌相似, *X. citri* subsp. *citri* 菌株中含有 2 套 II 型分泌系统 Xps 和 Xcs^[16]。在 *Xanthomonas campestris* 中研究结果显示: *xcs* 突变对胞外水解酶活性和细菌的致病力都没有影响, 但单个 *xcs* 基因可以互补 *xps* 系统中对应的同源基因的表型^[17]。因此, 在已知报道的 Xps 系统突变体中, 突变菌株的胞外水解酶活性几乎全部是减弱而不是完全丧失。在果斑病菌 *Acidovorax citrulli* AAC00-1 菌株中, 对 *xpsG1* 和 *xpsG2(xcsG)* 进行双突变, 获得了胞外纤维素酶活性全部丧失的突变体, 虽然在西瓜上仍然具有致病力, 但是在种子和寄主表面上的定殖能力下降, 其种子传播病害的效率降低了 50%^[18]。在 *X. citri* subsp. *citri* 中, 含有多个编码胞外纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶的

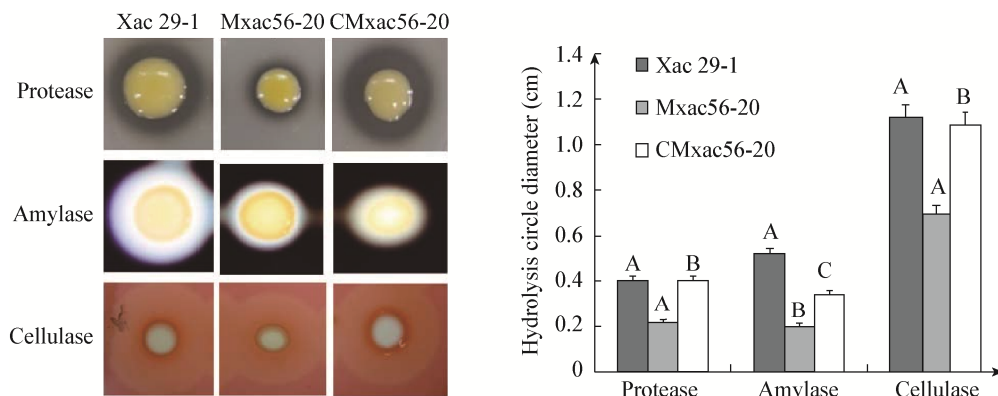


图 3 *xpsD* 突变体胞外水解酶活性检测
Figure 3 The extracellular enzyme activities of *xpsD* mutant

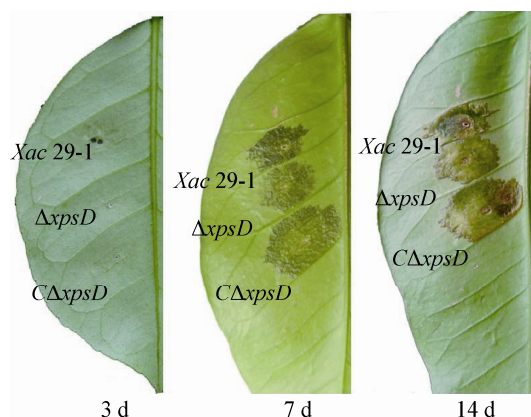


图4 *xpsD* 突变体在柑橘植物上的致病力检测

Figure 4 The pathogenicity of *xpsD* mutant on citrus plants

基因, 我们将 $EcpA_{Xoc}$ 的同源基因 XAC2763 进行缺失突变后, 用注射接种方法, 在葡萄柚上致病力下降, 但在平板上还保留部分的蛋白酶活性(未发表数据)。我们认为胞外酶对 *X. citri* subsp. *citri* 的致病力有一定的作用, 但需要在野生型菌株的基础上获得双突变或多突变菌株, 至胞外水解酶活性完全缺失, 才能对其功能有更准确的评价。

参考文献

- [1] Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS. Citrus canker: the pathogen and its impact[J]. Plant Health Progress, 2002. DOI: 10.1094/PHP-2002-0812-01-RV
- [2] Schaad N, Postnikova E, Lacy G, et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29(8): 690-695
- [3] Vauterin L, Hoste B, Kersters K, et al. Reclassification of *Xanthomonas*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology, 1995, 45(3): 472-489
- [4] Matsumoto H, Jitareerat P, Baba Y, et al. Comparative study of regulatory mechanisms for pectinase production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003, 16(3): 226-237
- [5] McNeil M, Darvill AG, Fry SC, et al. Structure and function of the primary cell walls of plants[J]. Annual Review of Biochemistry, 1984, 53: 625-663
- [6] Chen Y, Shiue SJ, Huang CW, et al. Structure and function of the XpsE N-terminal domain, an essential component of the *Xanthomonas campestris* type II secretion system[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(51): 42356-42363
- [7] Zou HS, Song X, Zou LF, et al. EcpA, an extracellular protease, is a specific virulence factor required by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* but not by *X. oryzae* pv. *oryzae* in rice[J]. Microbiology, 2012, 158(9): 2372-2383
- [8] Jha G, Rajeshwari R, Sonti RV. Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(9): 891-898
- [9] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes[J]. Gene, 1995, 166(1): 175-176
- [10] Li JY, Wang N. The *wxacO* gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence[J]. Molecular Plant Pathogen, 2011, 12(4): 381-396
- [11] Baptista JC, Machado MA, Homem RA, et al. Mutation in the *xpsD* gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence[J]. Genetics and Molecular Biology, 2010, 33(1): 146-153
- [12] Hu NT, Hung MN, Chen DC, et al. Insertion mutagenesis of XpsD, an outer-membrane protein involved in extracellular protein secretion in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. Microbiology, 1998, 144 (6): 1479-1486
- [13] Lu H, Patil P, van Sluys MA, et al. Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*[J]. PLoS One, 2008, 3(11): e3828
- [14] Yan Q, Wang N. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012, 25(1): 69-84
- [15] Laia ML, Moreira LM, Dezajacomo J, et al. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library[J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 12
- [16] Brunings AM, Gabriel DW. *Xanthomonas citri*: breaking the surface[J]. Molecular Plant Pathogen, 2003, 4(3): 141-157
- [17] Szczesny R, Jordan M, Schramm C. Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*[J]. New Phytologist, 2010, 187(4): 983-1002
- [18] Johnson KL. Elucidation of the molecular host-pathogen interactions that influence seed-to-seedling transmission of *cidovorax citrulli*[D]. Athens, Georgia, USA: Doctoral Dissertation of University of Georgia, 2010