

## 研究报告

## 野油菜黄单胞菌中 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶 FabZ 的生理功能

马建荣<sup>1</sup>, 余永红<sup>\*1</sup>, 张源寅<sup>2</sup>, 鄢明峰<sup>2</sup>

1 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520

2 华南农业大学生命科学学院 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广东 广州 510642

马建荣, 余永红, 张源寅, 鄢明峰. 野油菜黄单胞菌中 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶 FabZ 的生理功能[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 448-459.

MA Jianrong, YU Yonghong, ZHANG Yuanyin, YAN Mingfeng. Physiological functions of 3-hydroxyacyl ACP dehydratase FabZ in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 448-459.

**摘要:** 【背景】野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Xcc)引起十字花科植物黑腐病, 在全球范围内造成经济损失, 亟须深入研究其致病机理, 开发新的黑腐病防控措施。细菌脂肪酸合成系统不仅为细胞膜合成提供原料, 其中间代谢产物还是许多生物活性分子合成的底物, 具有重要的生理功能, 也是抗菌药物筛选的重要靶标。【目的】研究 Xcc fabZ 对扩散信号分子(diffusible signal factor, DSF)类信号产量、致病力、胞外酶、胞外多糖和运动性等方面的影响。

【方法】利用报告菌株检测法分析了不同替换突变株的 DSF 类群体感应信号产量。利用同源重组原理, 在 DSF 类信号高产菌株中获得替换突变株, 利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定 DSF 类信号产量。利用剪叶法检测替换突变株对寄主植物甘蓝的致病力, 并分析了不同菌株的胞外多糖、胞外酶和运动性差异。【结果】报告菌株检测法和 HPLC 法都证明大肠杆菌 fabZ 替换突变株(Xcc ΔfabZ/pSRK-Ec fabZ)中 DSF 类信号产量显著下降。而该突变株对寄主植物的致病性也下降, 在白菜提取物中生长也变慢, 胞外酶产量下降, 运动性也变弱。而 Xcc fabZ 替换突变株的 DSF 类信号产量恢复到野生菌水平, 且过量产生胞外多糖使得致病性增强, 胞外酶、运动性也都有所恢复。【结论】Xcc 中 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶(FabZ)与其致病性相关, 不仅影响 DSF 类信号产量, 还在胞外酶、运动性等方面发挥作用。

**关键词:** 野油菜黄单胞菌; 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶; DSF 类信号; 致病性

资助项目: 广东省普通高校特色创新类项目(2022KTSCX271); 广东省医学科研基金(A2023056); 广东食品药品职业学院自然科学课题(2022ZR06, 2021ZR15)

This work was supported by the Characteristic Innovation Project of Colleges and Universities in Guangdong Province (2022KTSCX271), the Medical Science and Technology Foundation of Guangdong Province (A2023056), and the Natural Science Project of Guangdong Food and Drug Vocational College (2022ZR06, 2021ZR15).

\*Corresponding author. E-mail: yuyh@gdyzy.edu.cn

Received: 2023-07-06; Accepted: 2023-08-24; Published online: 2023-09-28

## Physiological functions of 3-hydroxyacyl ACP dehydratase FabZ in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

MA Jianrong<sup>1</sup>, YU Yonghong<sup>\*1</sup>, ZHANG Yuanyin<sup>2</sup>, YAN Mingfeng<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, Guangdong, China

<sup>2</sup> Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

**Abstract:** [Background] *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) is the pathogen of black rot in cruciferous plants, causing immense economic losses worldwide. Therefore, it is urgent to study the pathogenic mechanism of this pathogen and develop novel methods to control this disease. The bacterial fatty acid synthesis system provides not only substrates for cell membrane synthesis but also the intermediates to be used as precursors for the synthesis of bioactive molecules. With important functions, the fatty acid synthesis system is a promising target for the screening of antibacterial agents. [Objective] To investigate the effects of *Xcc fabZ* on the diffusible signal factor (DSF) family signals production, pathogenicity, extracellular enzymes, extracellular polysaccharides, and motility of *Xcc*. [Methods] The yields of DSF family signals produced by different strains were estimated by the bioassay method with the DSF reporter strain. The replacement mutants were established from the DSF family signals high yield strain based on homologous recombination. Then, the yields of DSF family signals were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The pathogenicity of different strains to the host plant *Brassica oleracea* L. was examined by the leaf-clipping method, and the production of exopolysaccharides (EPS), extracellular enzymes, and motility were compared among different strains. [Results] The DSF family signals produced by the *Escherichia coli fabZ* replacement mutant (*Xcc*  $\Delta$ *fabZ*/pSRK-*EcfabZ*) decreased sharply. Moreover, the mutant presented attenuated pathogenicity to the host plant, slow growth in the plant extract, reduced extracellular enzyme production, and weakened motility. The production of DSF family signals by the *Xcc fabZ* replacement mutant was restored to the level of the wild-type strain, and excessive production of EPS enhanced the pathogenicity and restored the extracellular enzymes and motility. [Conclusion] FabZ affects the production of DSF family signals and extracellular enzymes, pathogenicity, and motility of *Xcc*.

**Keywords:** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; 3-hydroxyacyl ACP dehydratase; DSF family signals; pathogenicity

黄单胞菌(*Xanthomonas*)是植物病原菌中较大类群,能侵染许多重要的农作物,在全球范围内造成大面积减产,引起巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。其中野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)能侵染几乎所有十字花科植物,

包括卷心菜、甘蓝、油菜、白菜和模式植物拟南芥等。*Xcc* 侵染会引起黑腐病,一旦发病,会严重影响许多重要经济类蔬菜的产量与品质<sup>[2]</sup>。随着我国菜田复种指数的普遍提高,细菌性黑腐病的发病程度和发病率逐渐上升,严重危害我

国十字花科蔬菜的生产,亟须开发有针对性的新防控方法。

*Xcc* 是研究病原菌与寄主植物相互作用的模式菌株<sup>[3]</sup>,其侵染寄主植物是一个复杂的、动态的多因子相互作用过程。在此过程中,*Xcc* 产生多种致病因子,包括胞外多糖、胞外酶(纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶等)、运动性等<sup>[4]</sup>。研究表明,*Xcc* 产生上述致病因子主要受扩散信号因子(diffusible signal factor, DSF)类信号介导的群体感应系统的严格调控<sup>[5]</sup>。DSF 类信号为主链含有 12 个碳原子的不饱和脂肪酸,其合成前体是脂肪酸合成途径的中间代谢产物 3-羟基脂酰 ACP (acyl carrier protein),因此 DSF 类信号合成与脂肪酸合成途径紧密相关<sup>[6-7]</sup>。

细菌一般采用 II 型脂肪酸合成系统(fatty acid synthase II, FAS II)合成脂肪酸,主要包括聚合、还原、脱水和再还原 4 个步骤<sup>[8]</sup>。本课题组通过多年研究,已经基本阐明了 *Xcc* 的脂肪酸合成机制,详细研究了多个 3-酮脂酰 ACP 合成酶 FabH/FabB/FabF<sup>[6,9]</sup>、多个 3-酮脂酰 ACP 还原酶 FabG<sup>[10-11]</sup>,以及烯脂酰 ACP 还原酶 FabV<sup>[12]</sup>的功能,发现均影响 DSF 类信号产量。本课题组研究还发现,与模式生物大肠杆菌(*Escherichia coli*)类似,*Xcc* 也编码 2 个 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶 FabA 和 FabZ,其中 *Xcc* FabA 具有催化不饱和脂肪酸(unsaturated fatty acid, UFA)合成的活性,但 *Xcc* fabA 不是细菌生长和 UFA 合成的必需基因,只影响 DSF 类信号合成量和对寄主植物的致病性<sup>[13]</sup>。而 *Xcc* FabZ 能催化不同链长的 3-羟基脂酰 ACP 脱水,参与饱和脂肪酸合成,但 *Xcc* fabZ (XC\_2876)是生长的必需基因,只能将携带 *Ec* fabZ (b0180)或 *Xcc* fabZ 的表达质粒导入后,才能获得替换突变株,但 *Xcc* FabZ 的生理功能尚不清楚<sup>[14]</sup>。因此,本研究进一步利用植物病理学方法,研究了不同 fabZ 基因替换

突变株对寄主植物的致病性,并测定了不同菌株的致病因子产量,分析了 *Xcc* FabZ 在 DSF 类信号合成中的功能,以期开发新型防治黑腐病病害药物提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和培养基

本研究使用了大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 S17-1,野油菜黄单胞菌 *Xcc* 8004、XC1, DSF 类信号报告菌株 *Xcc* FE58<sup>[15]</sup>。使用的质粒有 pK18mobsacB 和 pSRK-Gm<sup>[16]</sup>,其他载体均为上述质粒的衍生质粒,细菌菌株和质粒特征具体见表 1。LB 培养基用作培养大肠杆菌, NYG 培养基<sup>[13]</sup>用于 *Xcc* 培养, DSF 类信号提取时用 NA 培养基(牛肉膏 3.0 g/L,蛋白胨 5.0 g/L,酵母粉 1.0 g/L,蔗糖 10.0 g/L)培养 *Xcc*。抗生素的工作浓度:利福平(Rif) 50  $\mu$ g/L、卡那霉素(Km) 30  $\mu$ g/L、庆大霉素(Gm) 10  $\mu$ g/L 和四环素(Tc) 25  $\mu$ g/L。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

PCR Mix、DNA Marker 等试剂, DNA 回收和质粒提取等试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司;卡那霉素、庆大霉素、IPTG 等试剂购自 Sigma 公司;PCR 扩增引物的合成以及核酸序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。恒温光照培养箱,宁波乐电仪器制造有限公司;分光光度计和 HPLC,岛津公司;自动生长曲线仪, OY Growth Curves 公司。

### 1.2 替换突变株的构建

将 pJR-4 转化大肠杆菌 S17-1,与 *Xcc*  $\Delta$ rpfB $\Delta$ rpfC 在 NYG 平板上 30  $^{\circ}$ C 共培养 36 h 后,稀释至  $10^{-2}$  后取 100  $\mu$ L 涂布于 NYG 平板(含 Rif 和 Km), 30  $^{\circ}$ C 继续培养后获得单菌落。进一步提取总 DNA 后 PCR 检测,确认获得 *Xcc* fabZ 敲除的一次重组菌株 *Xcc* JR6。分别将互补

表 1 本研究使用的菌株与质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strain/Plasmid	Relevant genotype or characteristics	Sources or reference
<i>E. coli</i> strains		
DH5 $\alpha$	$\phi 80\Delta lacZ\Delta M15\ endA1\ recA1\ hsdR17$ ( $r_K^-$ , $m_K^+$ )	Lab collection
S17-1	$Tp^r\ Sm^r\ recA, thi, pro, hsdR^-M^+$ RP4::2-Tc::Mu:Km::Tn7, $\lambda pir$	Lab collection
<i>Xcc</i> strains		
8004	Rif <sup>R</sup> , wild type	Lab collection
FE58	Rif <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , DSF signal reporter	[15]
JR4	Rif <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , $\Delta XccfabZ$ /pJR-5	Lab collection
JR5	Rif <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , $\Delta XccfabZ$ /pJR-6	Lab collection
$\Delta rpfB\Delta rpfC$	Rif <sup>R</sup> , higher amounts of DSF signals producer, in which the <i>rpfB</i> and <i>rpfC</i> genes were deleted	[17]
JR6	Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , pJR-4 integrated in <i>Xcc</i> $\Delta rpfB\Delta rpfC$ genome	This study
JR7	Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , <i>Xcc</i> JR6 harboring pJR-5	This study
JR8	Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , <i>Xcc</i> JR6 harboring pJR-6	This study
JR9	Rif <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , $\Delta rpfB\Delta rpfC\Delta XccfabZ$ /pJR-5	This study
JR10	Rif <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , $\Delta rpfB\Delta rpfC\Delta XccfabZ$ /pJR-6	This study
Plasmids		
pK18mobsacB	Km <sup>r</sup> , conjugation vector	Lab collection
pSRK-Gm	Gm <sup>r</sup> , expression vector	Lab collection
pJR-4	Km <sup>r</sup> , <i>XccfabZ</i> in-frame deletion fragment inserted to pK18mobsacB between <i>EcoR</i> I/ <i>Hind</i> III sites	Lab collection
pJR-5	Gm <sup>r</sup> , <i>EcfabZ</i> in pSRK-Gm	Lab collection
pJR-6	Gm <sup>r</sup> , <i>XccfabZ</i> in pSRK-Gm	Lab collection

质粒 pJR-5 (*Ec fabZ*)和 pJR-6 (*Xcc fabZ*)导入大肠杆菌 S17-1 后, 与一次重组菌株结合, 利用 Rif、Km 和 Gm 抗性筛选分别获得 *Xcc* JR7 和 *Xcc* JR8。分别将其在 NYG (含 Rif 和 Gm)中培养后, 涂布于含有 Rif、Gm 和 10%蔗糖的 NYGS<sup>[13]</sup>平板, 筛选出 Km 敏感单菌落, 参考文献[14]利用 PCR 检测并测序验证后, 获得基因组上 *Xcc fabZ* 被敲除的二次重组菌株 *Xcc* JR9 ( $\Delta fabZ/Ec fabZ$ )和 *Xcc* JR10 ( $\Delta fabZ/Xcc fabZ$ )。

### 1.3 DSF 类信号分析

利用报告菌株 *Xcc* FE58 检测 DSF 类信号参考文献[10]进行。在 50 mL NYG 培养基(冷却后)中添加 1 mL *Xcc* FE58 过夜培养物( $OD_{600}$  约 2.0), 并添加 X-Gluc (终浓度 160  $\mu g/mL$ )后制备平板。将待测菌株培养物用无菌水洗 2 次后, 取 2  $\mu L$

点种到平板上, 30  $^{\circ}C$ 避光培养 24 h 观察结果。

DSF 类信号提取与分析参考文献[18]。具体做法如下: 不同菌株在 NA 培养基中 30  $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养 24 h 后, 6 000 r/min 室温离心 10 min 收集上清, 调 pH 至 3.8, 加入等体积的乙酸乙酯, 放置于 30  $^{\circ}C$ 、200 r/min 摇床萃取 1 h; 室温 8 000 r/min 离心 5 min 收集乙酸乙酯提取液, 利用旋转蒸发仪(45  $^{\circ}C$ )蒸干乙酸乙酯; DSF 粗提物溶解在 2 mL 无水甲醇(HPLC 级)中; 利用氮气吹干后在 -20  $^{\circ}C$  保藏备用。HPLC 检测时用 100  $\mu L$  无水甲醇(HPLC 级)充分溶解提取物, 用 0.22  $\mu m$  微孔滤膜过滤后取 20  $\mu L$  样品用于 HPLC 检测。

HPLC 检测分析方法: 上样量: 20  $\mu L$ ; C18 反相色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, Agilent); 流动相:

水和甲醇均含有 0.1%甲酸, 比值为水(23%):甲醇(77%), 流速 1 mL/min; 检测波长为 212 nm; 检测系统参数: Shimadzu prominence LC-20AT system with UV220 detector。根据 HPLC 出峰面积计算群体感应信号分子的相对含量。

### 1.4 致病性分析

*Xcc* 菌株侵染寄主植物参考文献[13]和[19]进行。将野生菌 *Xcc* 8004、两种替换突变株 *Xcc* JR4 和 JR5 分别接种到 NYG 中 30 °C、200 r/min 培养约 24 h 后, 调整不同菌株浓度至  $OD_{600}$  均约为 1.0, 利用剪叶法分别接种到 4 片叶龄的甘蓝叶片上, 继续培养 2 周后, 测定并统计叶片病斑长度。取不同接种天数的叶片, 无菌水冲洗 3 次, 磨碎后用 1 mL NYG 重悬, 10 倍系列稀释至  $10^{-5}$ , 分别涂布 NYG 平板(含 Rif), 30 °C 培养约 36 h 后计数单菌落。取新鲜大白菜捣碎, 4 000 r/min 室温离心 10 min 后取上清经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜除菌备用。不同菌株 30 °C、200 r/min 培养过夜后, 调整菌体浓度一致, 按 1%比例接种到白菜汁中并转移至 96 孔板上, 然后将平板放置到自动生长曲线仪上, 读取  $OD_{600}$  数值, 直到各个菌株生长至平稳期, 停止读数并导出记录, 分析数据。

### 1.5 胞外多糖与胞外酶分析

将不同菌株调整菌体浓度至  $OD_{600}$  约为 1.0, 按 1%比例接种至含 4%葡萄糖的 NYG 中, 30 °C、200 r/min 培养 5 d, 加入 4 倍体积的无水乙醇沉淀胞外多糖, 边注入边搅拌, 然后将絮状沉淀物取出后置于 60 °C烘箱充分干燥后称重。胞外酶测定参考文献[13]和[20]方法进行, 其中蛋白酶测定方法: 将不同菌株(2  $\mu$ L)点种到含 1%脱脂牛奶的 NYG 平板上, 30 °C培养 48 h 后观察并测定透明圈大小, 直径代表胞外蛋白酶产量的高低; 淀粉酶测定方法: 将不同菌株(2  $\mu$ L)点种到含 0.1%可溶性淀粉的 NYG 平

板上, 30 °C培养 36 h, 用 1:100 (体积比)的  $I_2/KI$  溶液染色 10 min, 再用 70%的酒精洗平板后, 观察并记录透明圈的大小, 透明圈的直径大小代表胞外淀粉酶产量的高低。纤维素酶测定方法: 将不同菌株(2  $\mu$ L)点种到含有 0.5% (质量体积分数)的羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)的 NYG 平板上 28 °C培养 48 h 后加入约 20 mL 0.1%的刚果红(Congo red)染色 30 h, 水洗 2 次, 再用 20 mL 1 mol/L NaCl 溶液脱色 2 次, 每次约 20 min, 观察并记录透明圈的大小, 透明圈的直径大小代表胞外纤维素酶产量的高低。

### 1.6 运动性分析

将不同菌株培养物调整到浓度一致( $OD_{600}$  约为 2.0)后, 取 2  $\mu$ L 菌液点接于含 0.6%琼脂糖的葡萄糖代甘油的 NYG 半固体培养基平板上, 正置于 30 °C培养箱静置培养 3 d, 观察并测量菌落大小, 统计分析不同菌株的群集运动(swarming)能力差异。与之类似, 用牙签将不同菌株穿刺接种于含有 0.3%琼脂糖的葡萄糖代甘油的 NYG 半固体培养基平板, 测定不同菌株的泳动(swimming)能力。

## 2 结果与分析

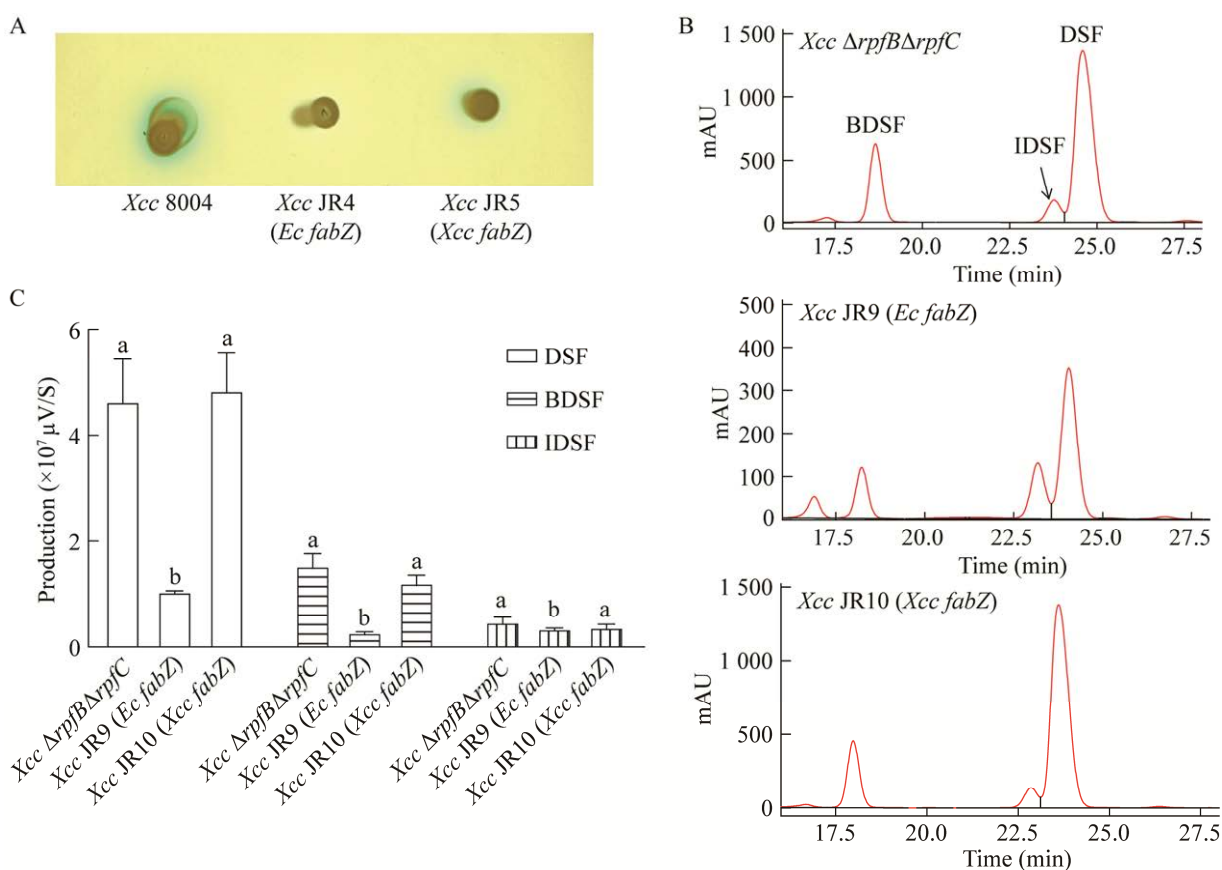
### 2.1 *Xcc fabZ* 替换突变株 DSF 类信号产量下降

本课题组前期通过异体遗传互补、体外活性分析, 证明 *Xcc* FabZ 具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性, 参与脂肪酸合成, 且 *Xcc fabZ* 是必需基因, 只能获得替换突变株 *Xcc* JR4 (*Ec fabZ*)和 *Xcc* JR5 (*Xcc fabZ*)<sup>[14]</sup>。由于脂肪酸合成代谢中间产物为 DSF 类信号合成的底物, 因此 *Xcc* 中参与脂肪酸合成的酶类, 如 3-酮脂酰 ACP 合成酶 FabH/FabB、3-酮脂酰 ACP 还原酶 FabG 和 3-羟基脂酰 ACP 脱水/异构酶 FabA, 都影响 DSF 类信号产量<sup>[6,10-11,13]</sup>。为研究 *Xcc* FabZ 是否

影响 DSF 类信号产量, 本研究首先利用 DSF 类信号报告菌株 *Xcc* FE58<sup>[16]</sup> 在平板上测定了不同菌株的 DSF 类信号产量。结果显示, 野生菌 *Xcc* 8004 和 *Xcc* JR5 (*Xcc fabZ*) 菌株的周围都产生了蓝色指示圈, 而替换突变株 *Xcc* JR4 (*Ec fabZ*) 未产生蓝色的指示圈(图 1A), 初步说明 *Xcc fabZ* 被 *Ec fabZ* 替换后, 影响了 DSF 类信号产量。

由于 *Xcc ΔrpfBΔrpfC* 菌株能产生大量的 DSF 类信号<sup>[17]</sup>, 便于后续检测, 本研究进一步在 *Xcc*

*ΔrpfBΔrpfC* 菌株中构建替换突变株。首先将 *Xcc fabZ* 敲除质粒 pJR-4 导入 *Xcc ΔrpfBΔrpfC* 后获得一次重组菌株 *Xcc* JR6。然后将表达质粒 pJR-5 (*Ec fabZ*) 和 pJR-6 (*Xcc fabZ*) 分别导入 *Xcc* JR6 后, 在含有 Gm、Rif 和 10% 蔗糖的 NYGS 平板上, 分别筛选获得基因组上 *Xcc fabZ* 被敲除的替换突变株 *Xcc* JR9 (*Ec fabZ*) 和 *Xcc* JR10 (*Xcc fabZ*)。进一步利用 HPLC 法测定了不同菌株的 DSF 类信号的组分和产量, 结果显示 *Xcc ΔrpfBΔrpfC*、



**图 1 不同菌株的 DSF 类信号检测** A: DSF 报告菌株检测, 出现蓝色光圈说明有 DSF 类信号. B: HPLC 法测定 DSF 类信号. C: DSF 类信号产量, 基于不同 DSF 类信号面积分析, 不同小写字母代表显著性差异 ( $P < 0.05$ )

**Figure 1 DSF-family signals tests of different strains.** A: DSF family signals bioassay with reporter strain, the formation of a blue halo indicates the presence of DSF-like activity. B: DSF-family signals tests with hplc methods. C: The amounts of DSF-family signals of different strains. The relative amounts of DSF-family signal molecules were calculated on the basis of their peak areas. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments based on the least significant difference at  $P < 0.05$ .

*Xcc* JR9 和 *Xcc* JR10 都产生了不同种类的 DSF 类信号,其中以具有支链结构的 DSF 为主要组分(图 1B)。但 *Xcc* JR9 (*Ec fabZ*)产生的各种 DSF 类信号产量都显著降低,其中 DSF 产量仅为 *Xcc*  $\Delta rpfB\Delta rpfC$  的 22.5%, BDSF 仅为 17.8%。而 *Xcc fabZ* 替换菌株 *Xcc* JR10 的 DSF 类信号产量均有所恢复(图 1C)。以上结果说明, *Xcc* FabZ 在 DSF 类信号产生过程中发挥作用,而且该功能不能被大肠杆菌 FabZ 替换。

## 2.2 *Xcc fabZ* 与致病性相关

*Xcc* 中 DSF 类信号与致病性紧密相关,而 *Xcc* FabZ 在 DSF 类信号产生过程中发挥作用,

大肠杆菌 *fabZ* 替换突变株的 DSF 类信号产量显著下降,推测 *fabZ* 在 *Xcc* 的致病过程中也发挥作用。为此,利用剪叶法分别将野生菌、替换突变株 *Xcc* JR4 (*Ec fabZ*)和 *Xcc* JR5 (*Xcc fabZ*)感染寄主植物甘蓝,测定不同菌株的致病性。结果显示,3 个菌株都能引起甘蓝产生病斑(图 2A),但不同菌株引起的病斑长度有差异,野生菌 *Xcc* 8004 引起的病斑长度平均值为 10.7 mm,而 *Xcc* JR4 菌株引起的病斑长度为 8.0 mm,与野生菌有显著性差异。*Xcc* JR5 的病斑长度平均值为 18.1 mm,显著大于野生菌和 *Xcc* JR4 引起的病斑长度(图 2B),说明两种替换突变株的致病力差异显著。

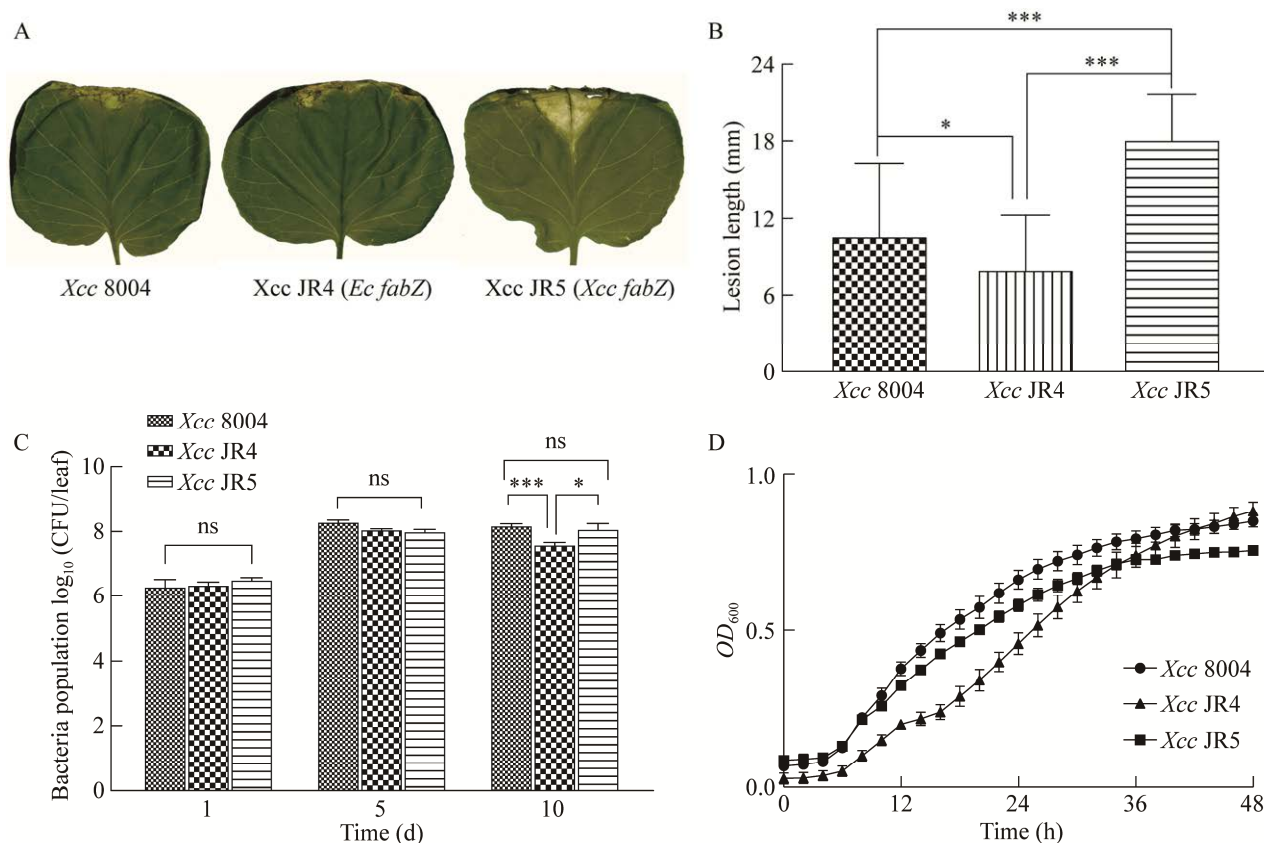


图 2 不同菌株的致病性检测 A: 不同菌株侵染引起的病斑叶片. B: 病斑长度统计. C: 叶片中细菌总数测定. D: 白菜提取物中生长曲线分析. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: 无显著性差异

Figure 2 Pathogenicity assay of different strains. A: Leaves with lesion caused by different strains. B: Lesion lengths of different strains. C: Colony counts in each lesion-exhibiting leaf. D: Growth analysis of different strains in Chinese cabbage extracts. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: No significant difference.



由于细菌在寄主植物中繁殖速度是影响致病性的重要因素,本研究进一步测定了不同菌株在甘蓝叶片中的总含量,结果如图 2C 所示。随着侵染天数增加,叶片中细菌总数也显著增加,而 3 种菌种总数在侵染后第 1、5 天均无差异,但在侵染第 10 天时,替换突变株 *Xcc* JR4 (*Ec fabZ*)的数量要显著低于野生菌,而 *Xcc fabZ* 替换菌株 *Xcc* JR5 的总数与野生菌无差异。本研究还测定了不同菌株在白菜提取物中的生长曲线,发现 *Xcc* JR5 与野生菌生长无显著差异,但 *Xcc* JR4 生长速度要弱于野生菌(图 2D)。基于以上结果推测,细菌总数减少可能是 *Xcc* JR4 致病力弱的原因之一。

### 2.3 *Xcc fabZ* 影响胞外多糖和胞外酶产量

*Xcc* 在致病过程中会产生多种致病因子,分泌胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)堵塞寄主植物维管束,引起植物黑腐病<sup>[21]</sup>。为进一步分析 2 种替换突变株致病性具有显著差异的原因,本研究测定了不同菌株在含有 4%葡萄糖的 NYG 培养基中 EPS 产量。结果显示, *Ec fabZ* 替换突变株 *Xcc* JR4 的 EPS 产量为 3.6 mg/mL,与野生菌 *Xcc* 8004 (EPS 产量为 4.6 mg/mL)无明显差异。但 *Xcc fabZ* 替换突变株

*Xcc* JR5 的 EPS 产量显著上升,达到 9.1 mg/mL,说明 *Xcc fabZ* 与 EPS 产量紧密相关(图 3A)。

*Xcc* 依附在植物表面后,会产生胞外酶(纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶)破坏植物组织以便于侵染植物细胞<sup>[22]</sup>。本研究还测定了不同菌株的胞外酶产量,通过测定不同菌株在平板上的降解圈直径,结果发现与野生菌 *Xcc* 8004 相比, *Xcc* JR4 产生的纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶均显著下降,仅分别为 76.0%、77.8%和 67.4%,而 *Xcc* JR5 的胞外酶产量有所恢复,均达到野生菌产量的 85%左右,表明 *Xcc fabZ* 也影响胞外酶产量(图 3B)。

### 2.4 *Xcc fabZ* 影响运动性

运动性强弱一定程度上展示了细菌在环境中可延展的距离,因此在细菌复杂的调控网络中,运动性和致病性常常联系在一起<sup>[23]</sup>。本研究首先在含有 0.3%琼脂糖 NYG 平板上测定了不同菌株的泳动(swimming)能力,发现 *Ec fabZ* 替换突变株 *Xcc* JR4 的泳动直径显著变小(图 4A)。其次,在含有 0.6%琼脂糖 NYG 平板上测定不同菌株的群集运动(swarming)能力,结果也发现 *Xcc* JR4 的群集运动直径变小(图 4B)。统计分析不同菌株的运动性,发现 *Xcc* JR4 的

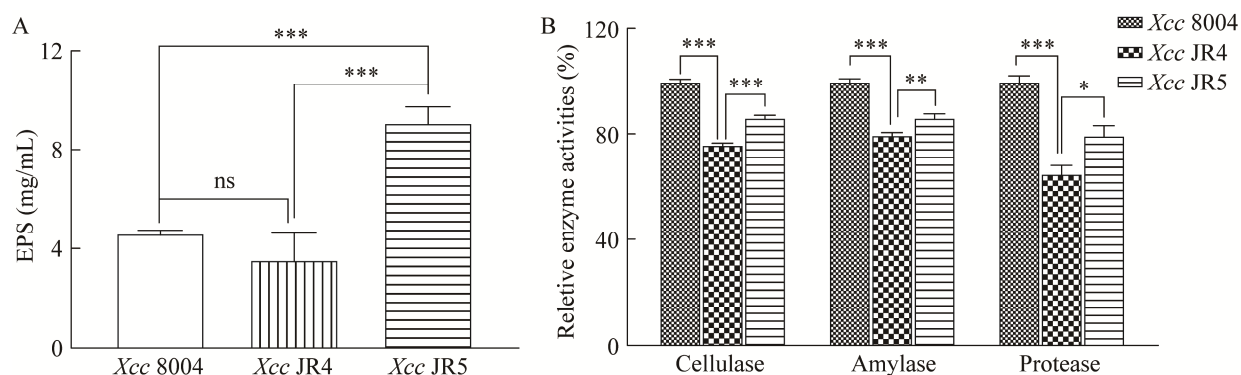
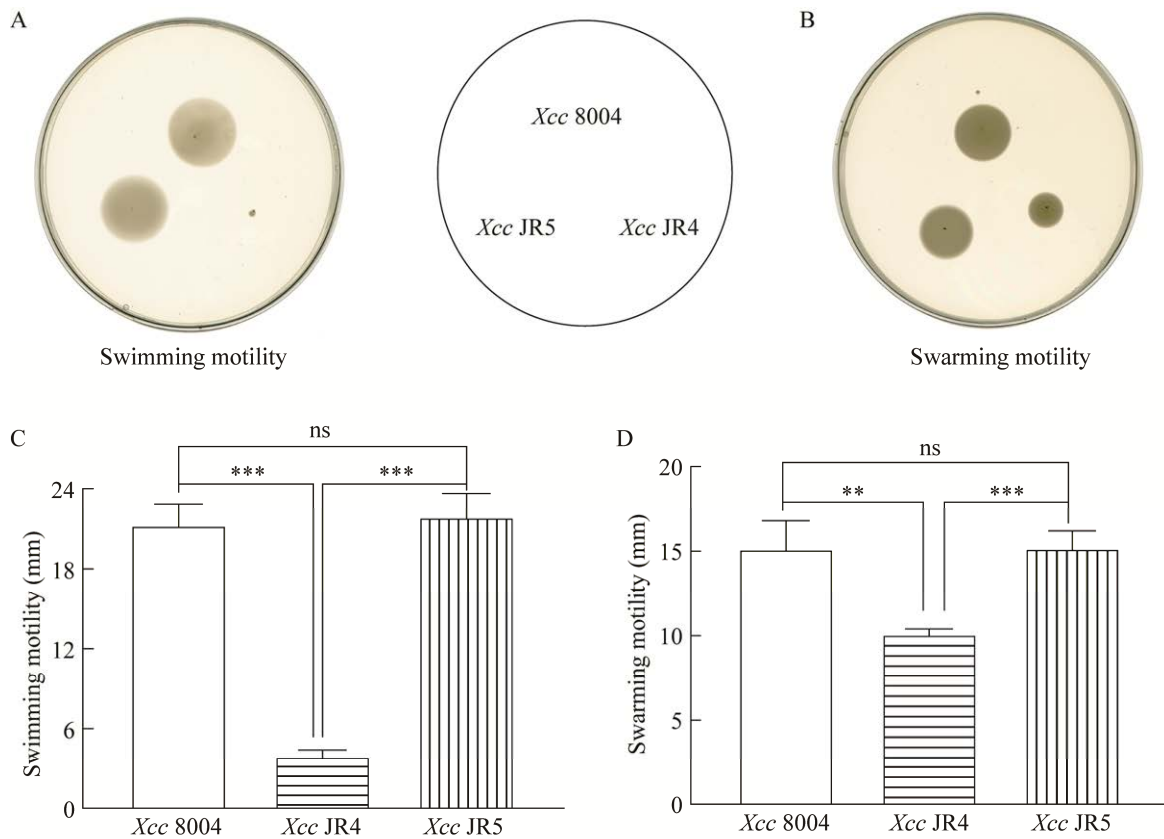


图 3 胞外多糖(A)与胞外酶(B)测定 \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: 无显著性差异

Figure 3 EPS production (A) and extracellular enzyme (B) assay. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: No significant difference.





**图 4** 不同菌株的运动性分析 A: 在含有 0.3%琼脂糖平板上的泳动能力分析. B: 在含有 0.6%琼脂糖平板上的群集运动能力分析. C: 泳动圈直径统计结果. D: 群集运动圈直径统计结果. \*\*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: 无显著性差异

Figure 4 Motility assay of different *Xcc* strains. A: Swimming test on NYG plates with 0.3% agarose. B: Swarming test on NYG plates with 0.6% agarose. C: Swimming circle diameter. D: Swarming circle diameter. \*\*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: No significant difference.

泳动直径仅为 4.0 mm, 显著低于野生菌 *Xcc* 8004 (直径为 20.8 mm) 和 *Xcc* JR5 (*Xcc fabZ*) (直径为 21.8 mm), 但 *Xcc* 8004 和 *Xcc* JR5 的泳动能力无显著差别(图 4C)。 *Xcc* JR4 的群集运动能力也显著低于另外 2 个菌株, 但 *Xcc* 8004 和 *Xcc* JR5 的群集运动直径无显著性差异(图 4D)。 泳动能力与群集运动能力分析结果都证明, *Xcc fabZ* 在细菌的运动性中发挥重要功能, 且不能被 *Ec fabZ* 替代。

### 3 讨论与结论

野油菜黄单胞菌(*Xcc*)是十字花科黑腐病的

病原菌, 引起许多经济类蔬菜的黑腐病, 在全球范围内造成经济损失, 需深入研究其致病机理, 开发新的防控措施<sup>[3]</sup>。在 *Xcc* 中, DSF 类信号介导的群体感应系统调控胞外酶、胞外多糖和运动性等致病相关基因的表达, 在致病过程中发挥重要作用, 被认为是黑腐病防控的重要切入点<sup>[24]</sup>。研究证实 *Xcc* 中脂肪酸合成系统的中间代谢产物是 DSF 类信号合成前体, 因此脂肪酸合成与 DSF 类信号产生有紧密关系。本课题组前期已经在 *Xcc* 中鉴定出 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶 *FabZ*, 发现 *fabZ* 是其生长的必需

基因, 将携带 *Ec fabZ* 或 *Xcc fabZ* 的表达质粒导入后, 获得基因替换突变株 *Xcc* JR4 (*Ec fabZ*) 和 *Xcc* JR5 (*Xcc fabZ*)。但 *Xcc fabZ* 的生理功能尚不清楚。

为此, 本研究首先研究了 *Xcc fabZ* 与 DSF 类信号产生的关系。利用报告菌株检验法检测了不同菌株的 DSF 类信号产量, 发现野生菌和 *Xcc* JR5 都能产生明显蓝色指示圈, 但 *Xcc* JR4 (*Ec fabZ*) 周围无指示圈, 说明 *Ec fabZ* 替换后 DSF 类信号产量下降。按照类似策略, 在 DSF 类信号高产菌株 *Xcc*  $\Delta$ rpfB $\Delta$ rpfC 中获得替换菌株 *Xcc* JR9 (*Ec fabZ*) 和 *Xcc* JR10 (*Xcc fabZ*), 并利用 HPLC 法测定了不同菌株的 DSF 类信号产量, 结果也发现 *Xcc fabZ* 被 *Ec fabZ* 替换后, DSF 类信号显著下降, 证实 *Xcc fabZ* 在 DSF 类信号合成中发挥重要作用。本研究进一步分析了不同菌株对寄主植物甘蓝的致病性, 发现与野生菌 *Xcc* 8004 相比, *Ec fabZ* 替换菌株 *Xcc* JR4 的致病性下降, 而 *Xcc* JR5 (*Xcc fabZ*) 的致病性显著上升。而 *Xcc* JR4 在植物体内和白菜汁提取物中生长变慢, 可能是其致病性下降的原因。

在致病过程中, 致病因子产量对致病性有重要作用。*Xcc fabZ* 替换菌株 *Xcc* JR5 的胞外多糖产量显著提高, 可能是其致病性显著增强的重要原因; *Xcc* JR4 (*Ec fabZ*) 的胞外酶(蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶)与野生菌相比有显著下降, 而 *Xcc* JR5 的胞外酶产量都有不同程度的恢复, 说明 *Xcc fabZ* 也影响致病因子产量。细菌运动性与致病性也紧密相关, 本研究也发现 *Xcc* JR4 的泳动能力和群集运动能力都显著下降, 而 *Xcc* JR5 恢复到野生菌水平, 因此 *Xcc fabZ* 还影响运动性。

不同细菌来源的 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶具有多样性。模式生物大肠杆菌基因组编码 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶 FabA 和 FabZ, 其中 FabA

是 UFA 合成关键酶, 而 *fabZ* 是细菌生长必需基因<sup>[8]</sup>。与之类似, *Xcc* 也编码 *Xcc* FabA 和 *Xcc* FabZ, 其中 *Xcc* FabZ 也是生长关键酶, 而 *Xcc* FabA 不是 UFA 合成关键酶, 但 *Xcc fabA* 与 DSF 类信号合成、致病力都紧密相关<sup>[13-14]</sup>。乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中 FabZ1 和 FabZ2 也都具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性, 但前者能参与 UFA 合成<sup>[25]</sup>。而粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)和绿色气球菌(*Aerococcus viridans*)都只编码一个 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶, 均在脂肪酸合成过程中发挥重要作用<sup>[26-28]</sup>。

通过多年研究本课题组已基本阐明了 *Xcc* 的脂肪酸合成机制, 其中 3-酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH) 是脂肪酸合成起始关键酶, 影响 DSF 类信号的种类和产量<sup>[6]</sup>; 3-酮脂酰 ACP 还原酶 (FabG1/FabG2/FabG3) 催化生成 3-羟基脂酰 ACP, 为 DSF 类信号合成提供前体。而在脂肪酸合成循环反应中, *Xcc* FabZ 催化 3-羟基脂酰 ACP 脱水生成烯脂酰 ACP, 与 DSF 类信号合成竞争底物, 因此 *Xcc fabZ* 参与 DSF 类信号合成。本研究中用 *Ec fabZ* 替换 *Xcc fabZ* 后, DSF 类信号产量下降。尽管 *Xcc* FabZ 与 *Ec* FabZ 的氨基酸序列相似性较高(71%), Swiss-Model 分析发现两者也具有类似的三维空间结构, 但两者的催化特性可能有差异, 可能是由于 *Ec fabZ* 的催化效率较高, 使得 DSF 类信号合成的底物变少。而 *Xcc fabA* 突变株 DSF 类信号产量增加<sup>[13]</sup> 也印证了该推测, 但具体的生化机制还有待深入研究。

## REFERENCES

- [1] TIMILSINA S, POTNIS N, NEWBERRY EA, LIYANAPATHIRANAGE P, IRUEGAS-BOCARD O F, WHITE FF, GOSS EM, JONES JB. *Xanthomonas* diversity, virulence and plant-pathogen interactions[J].

- Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(8): 415-427.
- [2] 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[M]//中国微生物基因组研究. 北京: 科学出版社, 2012: 446-485.
- HE YQ, TANG JL. Genomic analysis and pathological genomics of black rot pathogens of *Brassicaceae*[M]//Chinese Microbial Genome Research. Beijing: Science Press, 2012: 446-485 (in Chinese).
- [3] MANSFIELD J, GENIN S, MAGORI S, CITOVSKY V, SRIARIYANUM M, RONALD P, DOW M, VERDIER V, BEER SV, MACHADO MA, TOTH I, SALMOND G, FOSTER GD. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6): 614-629.
- [4] BONAS U, van den ACKERVEKEN G, BÜTTNER D, HAHN K, MAROIS E, NENNSTIEL D, NOEL L, ROSSIER O, SZUREK B. How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host[J]. Molecular Plant Pathology, 2000, 1(1): 73-76.
- [5] HE YW, ZHANG LH. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(5): 842-857.
- [6] YU YH, HU Z, DONG HJ, MA JC, WANG HH. *Xanthomonas campestris* FabH is required for branched-chain fatty acid and DSF-family quorum sensing signal biosynthesis[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32811.
- [7] ZHOU L, YU YH, CHEN XP, DIAB AA, RUAN LF, HE J, WANG HH, HE YW. 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.
- [8] CAMPBELL JW, CRONAN JE Jr. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery[J]. Annual Review of Microbiology, 2001, 55: 305-332.
- [9] 董会娟, 余永红, 王海洪, 马金成. 野油菜黄单胞菌中长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶的鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(2): 49-54.
- DONG HJ, YU YH, WANG HH, MA JC. Characterization of long chain 3-ketoacyl-ACP synthase in *Xanthomonas campestris*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2015, 36(2): 49-54 (in Chinese).
- [10] YU YH, MA JR, GUO QQ, MA JC, WANG HH. A novel 3-oxoacyl-ACP reductase (FabG3) is involved in the xanthomonadin biosynthesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(12): 1696-1709.
- [11] HU Z, DONG HJ, MA JC, YU YH, LI KH, GUO QQ, ZHANG C, ZHANG WB, CAO XY, CRONAN JE, WANG HH. Novel *Xanthomonas campestris* long-chain-specific 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase involved in diffusible signal factor synthesis[J]. mBio, 2018, 9(3): 00596-00518.
- [12] 余永红, 马建荣, 王海洪. 野油菜黄单胞菌中烯脂酰 ACP 还原酶的功能鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2016, 43(5): 514-522.
- YU YH, MA JR, WANG HH. Identification and function research of the enoyl-ACP reductase in *Xanthomonas campestris*[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2016, 43(5): 514-522 (in Chinese).
- [13] YU YH, CHEN C, MA JR, ZHANG YY, YAN MF, ZHANG WB, HU Z, WANG HH, MA JC. The FabA-FabB pathway is not essential for unsaturated fatty acid synthesis but modulates diffusible signal factor synthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2023, 36(2): 119-130.
- [14] 马建荣, 陈程, 鄢明峰, 李先其, 张文彬, 余永红. 野油菜黄单胞菌中 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶功能研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(6): 688-697.
- MA JR, CHEN C, YAN MF, LI XQ, ZHANG WB, YU YH. Biological function research of 3-hydroxylacyl-ACP dehydratase in *Xanthomonas campestris*[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2021, 48(6): 688-697 (in Chinese).
- [15] BARBER CE, TANG JL, FENG JX, PAN MQ, WILSON TJG, 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[J]. Molecular Microbiology, 1997, 24(3): 555-566.
- [16] KHAN SR, GAINES J II, FARRAND SK. Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 5053-5062.
- [17] ZHOU L, WANG XY, SUN S, YANG LC, JIANG BL, HE YW. 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] LI KH, YU YH, DONG HJ, ZHANG WB, MA JC, WANG HH. Biological functions of *ilvC* in

- branched-chain fatty acid synthesis and diffusible signal factor family production in *Xanthomonas campestris*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2486.
- [19] LIAO CT, LI CH, CHANG HC, HSU CH, CHIANG YC, HSIAO YM. The *lolB* gene in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for bacterial attachment, stress tolerance, and virulence[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 1-13.
- [20] CHEN YC, HU Z, ZHANG WB, YIN Y, ZHONG CY, MO WY, YU YH, MA JC, WANG HH. HetI-like phosphopantetheinyl transferase post translationally modifies acyl carrier proteins in *Xanthomonas* spp.[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2022, 35(4): 323-335.
- [21] RIAZ T, IQBAL MW, JIANG B, CHENG JJ. A review of the enzymatic, physical, and chemical modification techniques of xanthan gum[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 186: 472-489.
- [22] LUNEAU JS, CERUTTI A, ROUX B, CARRÈRE S, JARDINAUD MF, GAILLAC A, GRIS C, LAUBER E, BERTHOMÉ R, ARLAT M, BOULANGER A, NOËL LD. *Xanthomonas* transcriptome inside cauliflower hydathodes reveals bacterial virulence strategies and physiological adaptations at early infection stages[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(2): 159-174.
- [23] RASHID MH, KORNBERG A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(9): 4885-4890.
- [24] CAI Z, YUAN ZH, ZHANG H, PAN Y, WU Y, TIAN XQ, WANG FF, WANG L, QIAN W. 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.
- [25] 马金成, 罗彪, 胡喆, 王海洪. 乳酸乳球菌 *fabZ1* 和 *fabZ2* 基因功能的鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2014, 41(8): 777-786.
- MA JC, LUO B, HU Z, WANG HH. Identification and function research of *fabZ1* and *fabZ2* of *Lactococcus lactis*[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2014, 41(8): 777-786 (in Chinese).
- [26] WANG HH, CRONAN JE Jr. Functional replacement of the FabA and FabB proteins of *Escherichia coli* fatty acid synthesis by *Enterococcus faecalis* FabZ and FabF homologues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(33): 34489-34495.
- [27] MARRAKCHI H, CHOI KH, ROCK CO. A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(47): 44809-44816.
- [28] BI HK, WANG HH, CRONAN JE Jr. FabQ, a dual-function dehydratase/isomerase, circumvents the last step of the classical fatty acid synthesis cycle[J]. *Chemistry & Biology*, 2013, 20(9): 1157-1167.