



## 水稻条斑病菌 *pilT* 基因在致病性中的功能分析

杨阳阳, 蔡璐璐, 邹丽芳, 陈晓斌\*, 陈功友\*

上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240

**摘要:**【目的】本实验室前期研究发现水稻条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*) RS105 菌株中 *pilT* 基因 Tn5 转座子插入突变体在寄主水稻上致病性明显降低, 在非寄主烟草上激发过敏反应(hypersensitive response, HR)的能力也明显减弱。为了揭示 *pilT* 基因在 *Xoc* 菌株中的功能, 本文进行了深入研究。【方法】本实验通过无标记双交换敲除的方法获得 *Xoc* RS105 菌株 *pilT* 基因缺失突变体  $\Delta pilT$ , 并对该突变体的游动性以及生物膜等表型进行了检测。【结果】与野生型 RS105 菌株相比, 敲除突变体  $\Delta pilT$  不仅在感病水稻 IR24 上的致病性显著降低, 在非寄主烟草上产生过敏反应的能力减弱, 而且突变体游动性降低, 生物膜含量增加, 互补子能够恢复上述缺陷至野生型水平。qRT-PCR 结果显示, 在  $\Delta pilT$  中, *hrpG*、*hrpX*、*hrcC*、*clp*、*rpfG*、*pilA*、*pilC* 基因表达量明显降低。【结论】*Xoc* 中 *pilT* 为重要的毒性相关基因, 其致病性与游动性和生物膜含量变化相关, 并且受 *clp*、*rpfG*、*pilA*、*pilC* 等基因调控。*pilT* 基因编码的 PilT 蛋白是构成 IV 型菌毛的亚基之一, 为菌体运动提供能量。本文对 *pilT* 基因的功能研究, 为进一步分析 IV 型菌毛在 *Xoc* 中的功能提供了线索。

**关键词:** 水稻条斑病菌, *pilT* 基因, 致病性, 游动性, 生物膜

水稻条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*) 是水稻稻黄单胞菌种下致病变种之一, 引起水稻细菌性条斑病(bacterial leaf streak, BLS), 近年来该病发生日趋严重, 成为水稻的第四大病害<sup>[1-2]</sup>。该病原菌从水稻叶片的气孔或伤口侵入, 在薄壁细胞间繁殖与危害, 因受叶脉限制产生条斑病症状。随着高产杂交水稻品系的大面积推广, 以及生产上无有效的抗条斑病种质资源,

使水稻安全生产受到严重的威胁。*Xoc* 能够成功侵染其寄主水稻, 主要依靠胞外酶类(extracellular enzymes)、胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)、生物膜(biofilm)、鞭毛(flagellum)以及III型效应蛋白(type III secretion system effectors, T3SEs)等毒性因子<sup>[3]</sup>的帮助。

Type IV pili (T4P)是革兰氏阴性菌产生的直径为 5–8 nm、长约为 20  $\mu$ m 的长纤维复合体, 是

基金项目: 国家自然科学基金(31470235); 农业部公益性行业专项(201303015)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-21-34205873; E-mail: 陈晓斌, xbchen@sjtu.edu.cn, 陈功友, gyouchen@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-05-16; 修回日期: 2017-06-14; 网络出版日期: 2017-07-21

细菌表面的毛状附属物<sup>[4]</sup>。*Ralstonia solanacearum*、*Xylella fastidiosa*、*Acidovorax citrullin* 和 *Pseudomonas species* 等细菌都能产生 T4P。数十个基因参与 T4P 的合成和调节，大多数被命名为 *pil/fim* 基因。革兰氏阴性菌的 T4P 参与细菌活动，如蹭行运动(twitching motility)、生物膜的形成、宿主表面粘附及定殖、细菌毒性、DNA 摄取及蛋白分泌等，这些细菌活动都需要具有 ATP 酶活性的 PilT、PilU 等蛋白水解 ATP 提供能量<sup>[5]</sup>。T4P 在同源六聚体环 PilT 蛋白水解 ATP 作用下收缩以发生颤动运动、吸附以及细胞间信息的传递。PilT 属于 ATP 酶家族的成员，具有核苷酸结合模体，与 T4P 的合成有关。PilT 紧贴细胞内膜上，与 T4P 相连，是 T4P 收缩所必需的分子马达。PilT 是六聚体 ATP 酶，通过分解 ATP 提供给纤毛运动的能量，从而保证纤毛在固体表面上运动，同时 PilT 还有协助纤毛组装的作用。在 *Pseudomonas aeruginosa* 中，静态条件下，*pilT* 突变体相比野生型可以形成更加密集的生物膜，揭示了 *pilT* 基因与生物膜形成相关<sup>[6]</sup>。在 *Geobacter sulfurreducens* 中，PilT 具有 ATP 酶活性，能够为细胞外电子转移提供能量<sup>[7]</sup>。研究表明，IV 型菌毛及 Twitching

motility 影响 *P. aeruginosa* 的致病性，丧失 Twitching motility 或 IV 型菌毛的突变体致病性丧失或减弱。Twitching motility 还参与生物被膜的形成，而形成生物被膜则是难以根治铜绿假单胞菌感染的最主要的根源<sup>[8]</sup>。

T4P 及其在动物致病菌中的致病性已有很多研究报道<sup>[9]</sup>，但 T4P 在植物病原菌中的作用很少涉及，近几年人们开始关注这些表面附属物与植物细菌病原物毒力的关系。PilT 作为形成 IV 型菌毛过程中重要的亚基之一，对于揭示 IV 型菌毛在 *Xoc* 中的作用具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒：**菌株和质粒的特性见表 1。大肠杆菌(*Escherichia coli*)于 LB 培养基中 37 °C 培养，*Xoc* 菌株于 NA 或 NB 培养基中 28 °C 培养。NY 培养基用于游动性测定，XOM3 培养基用于 *hrpG* 基因等的诱导表达<sup>[10]</sup>。生长所需抗生素浓度：氨苄青霉素(Ap) 100 µg/mL，卡那霉素(Km) 20 µg/mL，利福平(Rif) 75 µg/mL。

表 1. 本研究所用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Relevant characteristics	Source
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>		
RS105	Wild-type, Chinese race 2; Rif <sup>r</sup>	This lab
RΔ <i>pilT</i>	<i>pilT</i> deletion mutant of RS105; Rif <sup>r</sup>	This study
CRΔ <i>pilT</i>	RΔ <i>pilT</i> containing a functional <i>pilT</i> gene; Rif <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	This study
RΔ <i>hrcV</i>	<i>hrcV</i> deletion mutant of RS105; Rif <sup>r</sup>	This lab
<i>E. coli</i>		
DH5α	φ90, lacZΔm15, recA1, host of pHM1	Invitrogen
Plasmids		
pUFR034	<i>IncW</i> , <i>Mob(p)</i> , <i>Mob</i> <sup>+</sup> , <i>LacZa</i> <sup>+</sup> , PK2 replicon, Km <sup>r</sup>	This lab
pKMS1	Suicidal vector for deletion mutant; <i>mob</i> , <i>oriV</i> , <i>sacB</i> , Km <sup>r</sup>	This lab
pKΔ <i>pilT</i>	A fusion ligated in pKMS1 for <i>pilT</i> deletion mutant; Km <sup>r</sup>	This study
pUFR-pilT	The full length of <i>pilT</i> gene in pUFR034; Km <sup>r</sup>	This study

**1.1.2 供试植物材料:** 烟草品种为本氏烟, 水稻品种为感病品种 IR24, 本实验室保存, 种植于上海交通大学农业与生物学院温室。烟草生长 4–6 周时用于 HR 反应测定; 水稻生长 2–3 周时用于水渍症状测定, 生长 2 个月大小时用于病斑长度测定。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** *Xoc* 基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒购于 Axygen 公司, 总 RNA

提取试剂盒、反转录试剂盒购于 TransGen 公司, 实验中所用的限制性内切酶、修饰酶购于 TaKaRa 公司。冷冻离心机、PCR 仪和分光光度计购于 Eppendorf 公司, 凝胶成像系统购于 Bio-Rad 公司。

**1.1.4 引物:** 表 2 为本研究中所用的引物, 根据 GenBank 登录的基因序列用 Primer 5.0 软件设计, 引物由上海捷瑞生物公司合成。

表 2. 本研究所用引物  
Table 2. Primers used in this study

Primer	Sequence 5'→3' (restriction sites underlined)	Description
upF	TCCCCCGGGAATACGGCCACATCCTCACC	A 700 bp upstream fragment of <i>pilT</i> gene
upR	CGGGATCCGGCGTGCTCCTCTGGAGCAG	
downF	CGGGATCCGCGCGTCGGCAGGCATGCAG	A 500 bp downstream fragment of <i>pilT</i> gene
downR	GCTCTAGAGTAGTGCAGCAGAAAGGCCA	
<i>pilT</i> -F	AATACGGCCACATCCTCACC	Primers to identify the <i>pilT</i> mutant
<i>pilT</i> -R	GCAGCGCGTAGTGCAGCAGA	
<i>pilT</i> com-F	CGGGATCCATGAGCACCATCGACTTCAC	A 1131 bp complementary fragment of <i>pilT</i> gene
<i>pilT</i> com-R	GGATCCTTACAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTTGT TCTCGAACTTCGGAAATCTCCAC	
<i>gyrB</i> rRNA-F	CGGCACTTACGACTCCAGCAAG	A 121 bp <i>gyrB</i> rRNA gene fragment for qPCR
<i>gyrB</i> rRNA-R	CGACCAGGATTTTCACCACGATG	
<i>rpoD</i> -F	CGACAACACCACCAACATCAATC	A 140 bp <i>rpoD</i> gene fragment for qPCR
<i>rpoD</i> -R	GCTTACCGACCTCTTCCAACG	
<i>hrpG</i> -F	GTTGCTCCGCGACGAAAATAC	A 199 bp <i>hrpG</i> gene fragment for qPCR
<i>hrpG</i> -R	CTTGCGCAGCTTGATAGATATG	
<i>hrpX</i> -F	GGCGAHGTTGTCTTHGCTC	A 209 bp <i>hrpX</i> gene fragment for qPCR
<i>hrpX</i> -R	GACCTCATCGTCGGCTCCATC	
<i>hrcC</i> -F	TGGCAATCGCCGAAACGGTATCCAC	A 200 bp <i>hrcC</i> gene fragment for qPCR
<i>hrcC</i> -R	CATGCTCAGGATCTGGGGTGCAA	
<i>rpfG</i> -F	CGACAACACCACCAACATCAATC	A 164 bp <i>rpfG</i> gene fragment for qPCR
<i>rpfG</i> -R	GCTTACCGACCTCTTCCAACG	
<i>clp</i> -F	CGACAACACCACCAACATCAATC	A 167 bp <i>clp</i> gene fragment for qPCR
<i>clp</i> -R	GCTTACCGACCTCTTCCAACG	
<i>pilA</i> -F	TCGGTGGAAGTTGGGTATCG	A 130 bp <i>pilA</i> gene fragment for qPCR
<i>pilA</i> -R	GGTATCGAAGCGCTCATCCA	
<i>pilC</i> -F	AAGGGACATAGATGGGTGCG	A 110 bp <i>pilC</i> gene fragment for qPCR
<i>pilC</i> -R	CGAGCCTAAGGTCAATCCCA	
<i>pilT</i> -F	CGACAACACCACCAACATCAATC	A 154 bp <i>pilT</i> gene fragment for qPCR
<i>pilT</i> -R	GCTTACCGACCTCTTCCAACG	

## 1.2 *pilT* 基因敲除突变体的构建和分子验证

本实验通过无标记双交换敲除的方法<sup>[11]</sup>,以 RS105 gDNA 为模板,利用表 2 中的引物 *pilT*-up-F/R 和 *pilT*-down-F/R,扩增目的基因的上下游同源片段,上下游同源片段经 *Bam*H I 单酶切后连接,连接后的片段经 *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切消化处理后,再连接在经相同酶切处理的 pKMS1 载体上,将重组质粒转化进入 DH5 $\alpha$  菌株中, LB+Km 平板上挑取单克隆测序。将测序正确的重组质粒通过电转化方式导入 RS105 感受态细胞中,涂布在含有 Km+Rif 的 NAN (NA 中不含有蔗糖)平板上。28 °C 培养 3–5 d 后得到单交换子,将单交换子接种到 NAN 液体培养基中培养 12 h 后,取 100  $\mu$ L 涂布到 NAS (NA 中含有 10%蔗糖)平板上,28 °C 培养 3–5 d 后,挑取单菌落分别于 NA+Rif 和 NA+Km+Rif 的平板上生长,能在 NA+Rif 平板上生长但不能在 NA+Km+Rif 平板上生长的单菌落,即为敲除突变体,命名为 R $\Delta$ *pilT*。

获得的突变体经 PCR 和 Southern 杂交验证。用 *pilT*-up-F 和 *pilT*-down-R 为引物,以敲除突变体基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。*pilT* 敲除突变体产生 1200 bp 的 DNA 片段,比野生型小 1131 bp。经 PCR 筛选验证的突变体用 Southern 杂交验证。将突变体 R $\Delta$ *pilT* 和野生型 RS105 菌株的基因组 DNA 用 *Not* I 和 *Sma* I 酶切处理,同时将 *pilT* 基因上游 700 bp 片段标记成地高辛探针,按照 Southern 杂交的方法进行杂交,探针的标记、杂交和检测过程参照 Roche 的 DIG 试剂盒说明书。

## 1.3 *pilT* 基因功能互补子的构建

利用引物 *pilT* com-F 和 *pilT* com-R,以 RS105 的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增得到 1131 bp

DNA 片段,经 *Bam*H I 酶切消化处理后,连接在经相同酶切处理的 pUFR034 载体上,获得重组质粒 pUFR-*pilT*。经酶切及测序验证后,将该质粒通过电转化的方法导入敲除突变体 R $\Delta$ *pilT* 中,挑取单克隆,经 Western 杂交<sup>[12]</sup>验证正确后,获得功能互补子 CR $\Delta$ *pilT*。

## 1.4 水稻上致病性和烟草上过敏反应测定

待测菌株单菌落接种于含有相应抗生素的 NB 培养基中,28 °C 振荡培养 24 h 后,取一定比例菌液转接入新鲜的 NB 培养基中,继续培养 12 h 后,收集菌体,无菌水洗涤 1 次,调整菌液浓度为  $OD_{600}=2.0$ ,针刺接种于生长 2 个月的 IR24 水稻叶片,15 d 后观察病斑扩展情况,并统计病斑长度。同样,调整菌液浓度为  $OD_{600}=0.6$ ,用无针头的注射器注射接种于生长状况良好的 IR24 水稻幼苗叶片上,3 d 后观察叶片上水渍状病斑(water soaking, WS)的产生情况。

将上述菌液调整  $OD_{600}=0.1$ ,同样用无针头的注射器注射接种于生长 4–6 周的本氏烟叶片上,24 h 内观察过敏性反应产生情况。上述实验重复 3 次,每次处理 5 片叶。

## 1.5 细菌游动性检测

按照 1.4 中的方法准备待测菌株。调整菌液浓度为  $OD_{600}=0.5$ ,用移液器取 2  $\mu$ L 待测菌液,接种于含有 0.5%葡萄糖的 NY 半固体培养基上,水平放置,28 °C 培养 3–4 d 后,观察细菌的游动圈,每个样品设置 3 个重复,统计细菌游动圈的直径,并计算平均值<sup>[13]</sup>。

## 1.6 细菌生物膜检测

采取两种方法进行细菌生物膜测定实验。取浓度  $OD_{600}=2.0$  的待测菌株 5 mL 于试管中,室温

静置 3 d, 用移液枪将试管内的菌液吸出, 用等体积的无菌水洗涤试管 2 次, 加入 6 mL 结晶紫, 染色 30 min。将结晶紫吸出, 用等体积的无菌水洗涤试管 3 次; 于 37 °C 将试管烘干, 观察试管周围的紫色圈, 即为生物膜。每个菌株设置 3 个重复<sup>[14]</sup>。

取浓度  $OD_{600}=0.5$  的待测菌液 200  $\mu$ L 于 96 孔板中, 28 °C 培养 12 h, 将菌液弃去, 无菌水洗 1 次, 加入 210  $\mu$ L 1% 的结晶紫, 染色 15–20 min 后弃去结晶紫, 无菌水洗 2 次, 加入 210  $\mu$ L 无水乙醇溶解后, 用酶标仪读取数值。

## 1.7 Real-time PCR

突变体和野生型菌株单菌落接种于含有相应抗生素的 NB 培养基中, 28 °C 振荡培养 24 h 后, 取一定比例菌液转接入新鲜的 NB 培养基中, 继续培养 12 h 后, 收集菌体, XOM3 洗涤沉淀 1 次后, 调整菌液  $OD_{600}=1.0$ ; XOM3 诱导培养 3 h 后, 按照 TransGen 公司总 RNA 提取试剂盒说明书提取细菌总 RNA, 经无 RNase 的 DNase I 充分消化, 去除 gDNA 的污染, 之后反转录成 cDNA; 用表 2 中的引物检测 *hrpG*、*rpfG*、*clp*、*pilA* 等基因的表达水平。

# 2 结果和分析

## 2.1 水稻条斑病菌 *pilT* 基因缺失突变体及功能互补子的构建

为了研究 *Xoc* RS105 菌株中 *pilT* 基因的功能, 本研究利用带有反向筛选标记的自杀载体 pKMS1, 对 *pilT* 基因进行无标记敲除。以 RS105 的 gDNA 为模板, 通过引物对 *pilT*-up-F/R 和 *pilT*-down-F/R, 分别扩增出 *pilT* 基因上下游同源

臂 *pilT* up 和 *pilT* down (图 1-A)。将同源臂构建在自杀载体 pKMS1 上, 获得重组质粒 pK $\Delta$ *pilT*。通过电转化, 将重组质粒导入 RS105 菌株中, 经过 2 次同源臂交换, 获得 *pilT* 基因敲除突变体 R $\Delta$ *pilT*。

用 *pilT*-up-F 和 *pilT*-down-R 对野生型和突变体基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 野生型获得预期 2331 bp 大小的 DNA 条带, 突变体因缺失 1131 bp 而得到 1200 bp 大小的条带(图 1-B)。Southern 杂交结果显示: 与野生型相比, 突变体缺失 1 个 1131 bp 的信号(图 1-C)。PCR 和 Southern 杂交结果证实, *pilT* 缺失突变体 R $\Delta$ *pilT* 构建正确。同时, PCR 扩增 *pilT* 基因全长并构建在 pUFR034 载体上, 导入 R $\Delta$ *pilT* 突变体, 进行功能互补, 命名为 CR $\Delta$ *pilT*。CR $\Delta$ *pilT* 经 Western 杂交验证正确后进行后面的实验研究(图 1-D)。

## 2.2 *pilT* 基因是水稻条斑病菌 *Xoc* 菌株在寄主水稻上的全毒性所必需的

为了检测 R $\Delta$ *pilT* 突变体在水稻上的毒性, 我们分别在水稻幼苗期和成株期进行了毒性测定实验。针刺接种成株期感病水稻品种 IR24, 2 周后观察病斑形成情况。野生型 RS105 菌株在针刺点上下扩展形成较长的条斑症状; 而突变体 R $\Delta$ *pilT* 仅在针刺部位形成条斑症状, 并不扩展; 功能互补子 CR $\Delta$ *pilT* 与野生型菌株症状相同(图 2-A)。同时将这 3 个菌株注射接种 3 周龄的感病水稻品种 IR24, 3 d 后观察水稻叶片上水渍状病斑的形成情况, 发现野生型 RS105 菌株、突变体 R $\Delta$ *pilT* 和功能互补子 CR $\Delta$ *pilT* 在水稻上均有致病性, 形成水渍状病斑, 但 4–5 d 后观察发现野生型 RS105 菌株和功能互补子 CR $\Delta$ *pilT* 能够上下扩展, 形成明显的条斑症状, 而突变体 R $\Delta$ *pilT* 仅在注射点形成

水渍状病斑,不能上下扩展(图 2-C)。这些结果表明, *pilT* 基因缺失并未使 *Xoc* 丧失在寄主水稻上的致病性,只是显著削弱了病原菌在水稻上的毒性, *pilT* 基因是 *Xoc* 在水稻全毒性上所必需的。非寄主烟草上 HR 测定结果显示,突变体  $R\Delta pilT$  激发烟草产生 HR 的能力减弱(图 2-D)。

### 2.3 *pilT* 基因影响水稻条斑病菌 *Xoc* 菌株的游动性

植物病原细菌的游动性能够使病原菌获得更多更好的营养物质,逃避不利的寄主环境,与毒

性呈正相关。为了检测 *pilT* 突变体对 *Xoc* 菌株游动性的影响,本研究检测了野生型 RS105 菌株、突变体  $R\Delta pilT$  以及功能互补子  $CR\Delta pilT$  的游动性。实验发现,在半固体 NY 培养基上,与野生型 RS105 菌株相比,  $R\Delta pilT$  突变体的游动性显著下降,功能互补子  $CR\Delta pilT$  的游动能力部分回补(图 3-A)。菌落扩散后的直径统计显示,突变体的游动性较野生型下降了 50%,互补菌株恢复至野生型水平的 80% (图 3-B)。该结果说明, *pilT* 基因影响 *Xoc* 菌株的游动性。

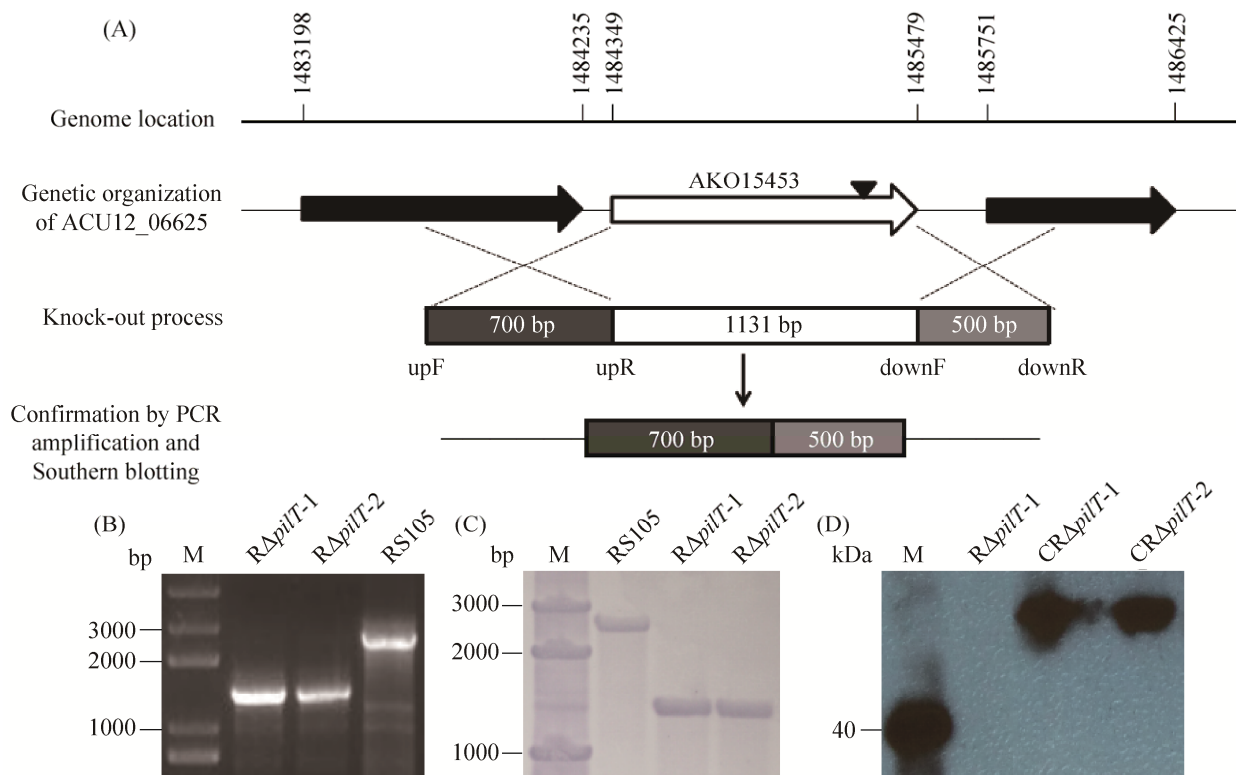


图 1. *Xoc pilT* 突变体的构建及分子验证

Figure 1. The construction of *Xoc pilT* mutant and molecular analysis. Schematic diagram about the construction of the *Xoc pilT* mutant. A: Black region stands for the left arm of the *pilT* gene locus (white region) and the grey presents the right arm. The left and right arms were fused in pKMS1 and the knock-out mutant was obtained after two steps recombination occurred; B: The *pilT* mutants were verified by PCR; C: The *pilT* mutants were verified by Southern blotting; D: The complementation of *pilT* mutant was verified by Western blotting.

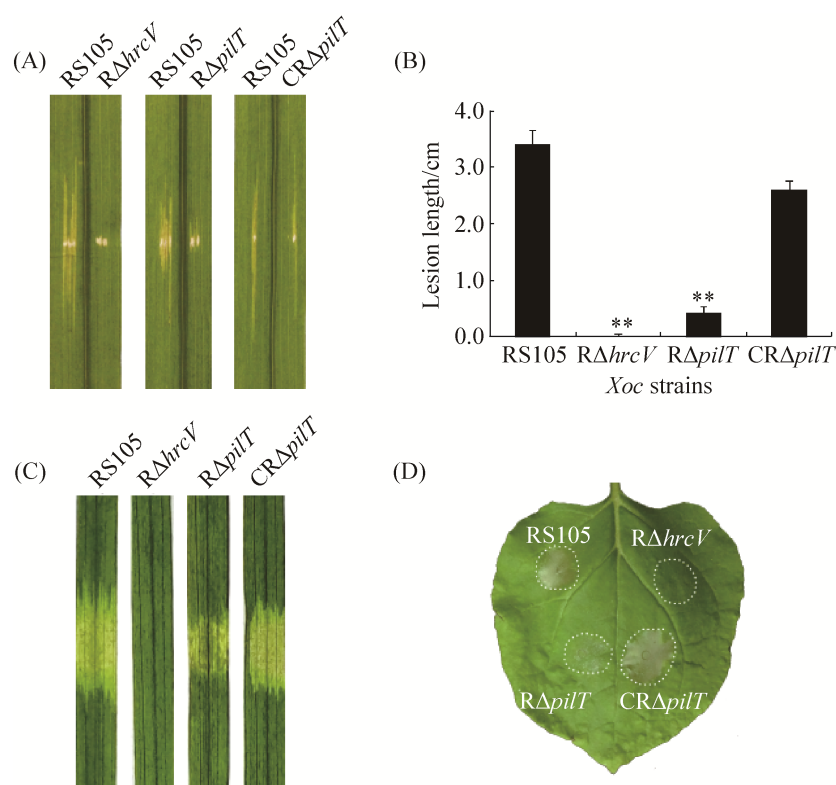


图 2. *Xoc pilT* 突变体在水稻和烟草上的反应

Figure 2. Responses of tobacco and rice to *Xoc pilT* mutant. A: Symptoms caused by RS105, RΔ*pilT* and CRΔ*pilT* ( $OD_{600}=0.3$ ; approximately  $1 \times 10^8$  CFU/mL) on inoculated leaves of the host rice IR24 by leaf-needling inoculation. The photograph was taken 15 d after infiltration; B: Lesion lengths of rice bacterial streak caused by *Xoc* strains in rice. The lesion lengths were measured at 15 d post-inoculation. Data are the means standard deviation from three replications. ( $P < 0.05$ , student's *t* test); C: Water-soaked symptoms on leaves of the rice IR24. The photographs were taken 4 d post-inoculation with *Xoc* strains ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) using needleless syringes; D: Induction of the hypersensitive response (HR) on the leaves of non-host tobacco by RS105, RΔ*pilT* and CRΔ*pilT*. The photograph was taken 24 h after infiltration.

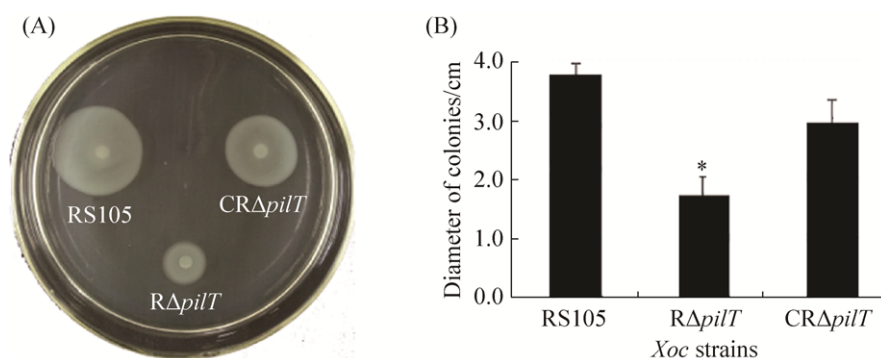


图 3. *Xoc* 菌株游动性测定

Figure 3. Determination of motility of *Xoc* strains. A: Cell were inoculated onto NY supplemented 0.5% glucose plates and photographed after 3–4 d of incubation at 28 °C; B: Data are the means standard deviation from three replications. ( $P < 0.05$ , student's *t* test).



## 2.4 *pilT* 基因影响水稻条斑病菌 *Xoc* 菌株的生物膜形成

$R\Delta pilT$  突变体致病性降低的同时,也会对生物膜的形成产生一定的影响,因此本研究检测了 *pilT* 缺失突变体生物膜的形成情况。玻璃试管表面的附着生长实验显示,  $R\Delta pilT$  突变体形成的生物膜明显多于野生型 RS105 以及功能互补子  $CR\Delta pilT$ , 其中功能互补子  $CR\Delta pilT$  形成的生物膜略多于野生型 RS105 菌株(图 4-A)。96 孔板方法测定生物膜形成情况的实验中,定量检测了 *Xoc* 菌株生物膜的形成,  $R\Delta pilT$  突变体形成的生物膜明显多于野生型 RS105 以及功能互补子  $CR\Delta pilT$ , 功能互补子  $CR\Delta pilT$  部分回补形成的生物膜略多

于野生型 RS105 菌株(图 4-B)。实验结果说明, *pilT* 基因影响 *Xoc* 菌株的生物膜形成。

## 2.5 *pilT* 基因影响 *Xoc* 菌株相关基因的表达

为了进一步解析 *pilT* 基因突变影响 *Xoc* 毒性的分子机理,本研究使用 qRT-PCR 来检测野生型 RS105 菌株和突变体  $R\Delta pilT$  中主要毒性相关基因的表达情况。水稻条斑病菌 *hrpG* 和 *hrpX* 两个基因主要调控 *hrp* 基因的表达,决定病原菌在寄主植物上的致病性,而 *hrcC* 与三型分泌系统(type III secretion system, T3SS)的形成相关,同样影响菌株的毒性。实验结果显示,与野生型菌株 RS105 相比, *hrpG*、*hrpX* 和 *hrcC* 的表达水平在突变体  $R\Delta pilT$  中显著降低(图 5)。这表明, *pilT* 突变体在

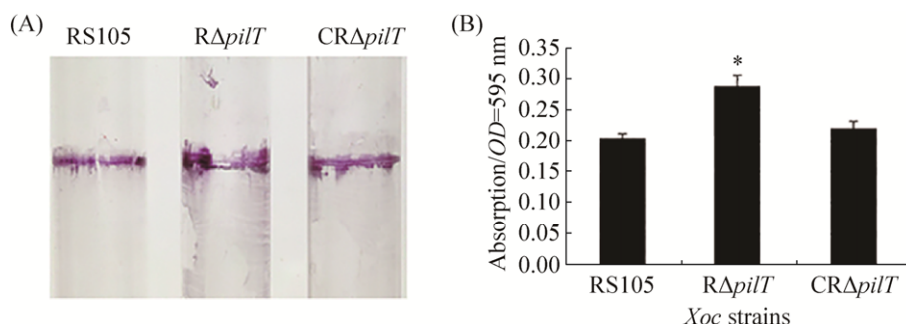


图 4. *Xoc* 菌株生物膜形成测定

Figure 4. Determination of biofilm formation of *Xoc* strains. A: Representative photographs of biofilm formation assay for RS105,  $R\Delta pilT$  and  $CR\Delta pilT$  strains grown statically in glass tubes; B: Data are the means standard deviation from three replications. ( $P < 0.05$ , student's *t* test).

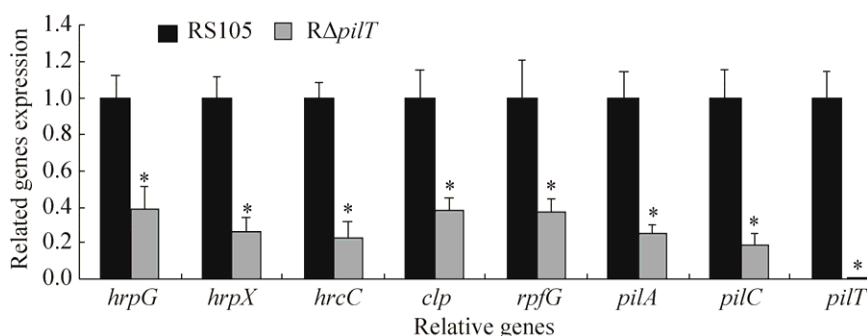


图 5. *pilT* 影响相关基因的表达

Figure 5. Relative genes expression levels in  $R\Delta pilT$  and RS105 strain. Similar results were observed in two independent experiments with three replicates. Asterisk indicates statistically significant differences between the WT and mutants. ( $P < 0.05$ , student's *t* test).



寄主水稻上致病性降低与 *hrpG*、*hrpX* 和 *hrcC* 的转录表达降低有关。在突变体  $R\Delta pilT$  中, *clp*、*rpfG*、*pilA* 和 *pilC* 的表达量同样明显低于在野生型菌株 RS105 中的表达量(图 5)。已有研究指出, *Xoc rpfG* 突变体显著影响 DSF 信号分子的生物合成水平, 改变 *Xoc* 细胞的群体形态, 生物膜聚集, 而 *pilA* 和 *pilC* 与菌体的游动性有关。以上实验结果表明, *pilT* 基因通过影响水稻条斑病菌 *Xoc* 相关基因的表达, 从而影响毒性、游动性以及生物膜的合成等相关表型。

### 3 讨论

本实验中, 为了研究 *Xoc* RS105 菌株中 *pilT* 基因的功能, 我们通过无标记敲除方式<sup>[11]</sup>构建了 *pilT* 基因的缺失突变体  $R\Delta pilT$ 。研究发现, 与野生型 RS105 菌株相比,  $R\Delta pilT$  在感病水稻上的致病性显著降低, 功能互补子  $CR\Delta pilT$  在水稻上的毒性恢复至野生型水平(图 2)。

研究 *pilT* 基因在病原菌致病性中的功能时, 我们发现与野生型 RS105 菌株相比, 突变体菌株  $R\Delta pilT$  在半固体 NY 培养基上的游动能力显著降低, 功能互补子  $CR\Delta pilT$  游动能力部分回补(图 3);  $R\Delta pilT$  形成的生物膜明显多于野生型 RS105 菌株, 功能互补子  $CR\Delta pilT$  部分恢复至野生型水平(图 4)。植物病原细菌的游动性和生物膜的产量都与病原菌的毒性相关, 影响其在寄主水稻上的致病性<sup>[15]</sup>。qRT-PCR 实验发现, *pilA* 和 *pilC* 的基因的转录表达水平在突变体  $R\Delta pilT$  中显著降低, *PilA* 是构成 T4P 的主要亚基, *PilT* 能够为 *PilA* 蛋白的组装与拆卸提供能量<sup>[16]</sup>。在本研究中, *pilT* 突变体能够继续形成 T4P, 但该突变体缺乏提供菌毛回缩和游动所需的 ATP 能量, 导致游动性降

低。同样, c-di-GMP 与病原菌的游动性和生物膜合成相关, 当菌体内 c-di-GMP 含量升高时, 细菌的游动性明显减弱, 而菌体内 c-di-GMP 的含量是受 *rpfG* 调控的, *RpfG* 可以降解 c-di-GMP<sup>[17]</sup>。在突变体  $R\Delta pilT$  中, *rpfG* 的表达量明显降低, 导致菌体内的 c-di-GMP 含量升高, 细菌游动性降低, 群体形态发生改变, 突变体形成更加致密的生物膜<sup>[18-19]</sup>。这些结果表明, 突变体  $R\Delta pilT$  可能通过影响游动性、生物膜形成进而影响病原菌的致病性。

在进一步解析 *pilT* 基因影响 *Xoc* 菌株毒性的分子机理时, 我们利用 qRT-PCR 检测了野生型 RS105 菌株和突变体  $R\Delta pilT$  中主要毒性相关基因的表达情况。结果显示, 与 *hrp* 基因表达调控相关的两个主要调控因子 *hrpG* 和 *hrpX* 基因的表达量明显降低, 并且与 T3SS 形成相关的 *hrcC* 基因表达同样明显降低(图 5), 这 3 个基因都是水稻条斑病菌全毒性所必需的基因<sup>[20-21]</sup>。由此我们推断, *pilT* 基因主要通过影响 *hrp* 基因表达导致其在水稻上致病性降低。对于 *pilT* 基因如何影响 *hrp* 基因的表达以及在 T4P 形成中的作用机制, 有待进一步探讨。

### 参考文献

- [1] Zou LF, Wang XP, Xiang Y, Zhang B, Li YR, Xiao YL, Wang JS, Walmsley AR, Chen GY. Elucidation of the *hrp* clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 6212–6224.
- [2] Pei JG, Zou LF, Zou HS, Chen GY. Functional analysis of *xopQ1<sub>Xoc</sub>* gene from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in pathogenesis on rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(17): 3538–3546. (in Chinese)  
裴俊国, 邹丽芳, 邹华松, 陈功友. 水稻条斑病菌 *xopQ1<sub>Xoc</sub>* 在病程中功能的初步研究. 中国农业科学, 2010, 43(17):

- 3538–3546.
- [3] Büttner D, Bonas U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(2): 107–133.
  - [4] Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, 2002, 56: 289–314.
  - [5] Craig L, Pique ME, Tainer JA. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(5): 363–378.
  - [6] Chiang P, Burrows LL. Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(7): 2374–2378.
  - [7] Speers AM, Schindler BD, Hwang J, Genc A, Reguera G. Genetic identification of a PilT motor in *Geobacter sulfurreducens* reveals a role for pilus retraction in extracellular electron transfer. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1578.
  - [8] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284(5418): 1318–1322.
  - [9] Bieber D, Ramer SW, Wu CY, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R, Schoolnik GK. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 1998, 280(5372): 2114–2118.
  - [10] Guo W, Zou LF, Li YR, Cui YP, Ji ZY, Cai LL, Zou HS, Hutchins WC, Yang CH, Chen GY. Fructose-bisphosphate aldolase exhibits functional roles between carbon metabolism and the *hrp* system in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31855.
  - [11] Zou HS, Yuan L, Guo W, Li YR, Che YZ, Zou LF, Chen GY. Construction of a Tn5-tagged mutant library of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as an invaluable resource for functional genomics. *Current Microbiology*, 2011, 62(3): 908–916.
  - [12] Zhao Q, Zou LF, Zou HS, Li YR, Chen GY. Genetic modification of a biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 by a harpin coding gene. *Chinese Journal of Biological Control*, 2012, 28(1): 87–94. (in Chinese)  
赵倩, 邹丽芳, 邹华松, 李玉蓉, 陈功友. 利用编码 harpin 蛋白的基因遗传改良生防荧光假单胞菌 2P24. *中国生物防治学报*, 2012, 28(1): 87–94.
  - [13] Cai LL, Zou LF, Ge L, Xue XB, Zou HS, Chen GY. An inner membrane protein (Imp) of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* functions in carbon acquisition, EPS production, bacterial motility and virulence in rice. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13(12): 2656–2668.
  - [14] Ficarra FA, Grandellis C, Galván EM, Ielpi L, Feil R, Lunn JE, Gottig N, Ottado J. *Xanthomonas citri* ssp. *citri* requires the outer membrane porin OprB for maximal virulence and biofilm formation. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(5): 720–733.
  - [15] Bahar O, Goffer T, Burdman S. Type IV pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citulli*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(8): 909–920.
  - [16] Craig L, Li J. Type IV pili: paradoxes in form and function. *Current Opinion in Structural Biology*, 2008, 18(2): 267–277.
  - [17] Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Crossman LC, Spiro S, He YW, Zhang LH, Heeb S, Cámara M, Williams P, Dow JM. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(17): 6712–6717.
  - [18] Yin FQ, Zhao YC, Liu CH, Qian GL, Fan JQ, Hu BS, Liu FQ. Analysis of the *flgD* and *figE* genes regulated by diffusible signal factor in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(7): 891–897. (in Chinese)  
殷芳群, 赵延存, 刘春晖, 钱国良, 范加勤, 胡白石, 刘凤权. 水稻细菌性条斑病菌中受 DSF 调控的鞭毛基因 *flgD*、*figE* 的功能分析. *微生物学报*, 2011, 51(7): 891–897.
  - [19] Zhao YC, Qian GL, Fan JQ, Yin FQ, Zhou YJ, Liu CH, Shen Q, Hu BS, Liu FQ. Identification and characterization of a novel gene, *hshB*, in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* co-regulated by quorum sensing and *clp*. *Phytopathology*, 2012, 102(3): 252–259.
  - [20] Tsuge S, Nakayama T, Terashima S, Ochiai H, Furutani A, Oku T, Tsuno K, Kubo Y, Kaku H. Gene involved in transcriptional activation of the *hrp* regulatory gene *hrpG* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(11): 4158–4162.
  - [21] Tsuge S, Terashima S, Furutani A, Ochiai H, Oku T, Tsuno K, Kaku H, Kubo Y. Effects on promoter activity of base substitutions in the *cis*-acting regulatory element of HrpXo regulons in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(7): 2308–2314.

# Roles of *pilT* gene in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* on rice

Yangyang Yang, Lulu Cai, Lifang Zou, Xiaobin Chen\*, Gongyou Chen\*

School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Objective] Our previous study found that a Tn5 transposon inserted mutant in *pilT* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) RS105 strain (the causal agent of bacterial leaf streak) significantly reduced bacterial virulence in susceptible rice plants, and the ability to trigger hypersensitive response (HR) on non-host tobacco. [Methods] To reveal the roles of *pilT* gene in bacterial pathogenicity in rice, we constructed a deletion mutant of *pilT* gene in *Xoc* RS105 named RΔ*pilT*. Then we tested phenotypes of the mutant compared to the wild-type RS105 in bacterial virulence, motility and biofilm formation. [Results] The *pilT* mutant RΔ*pilT* significantly reduced bacterial virulence in rice and the ability to trigger HR on tobacco. In addition, compared to RS105 strain, RΔ*pilT* mutant displayed severely weakened motility on semisolid medium, and increased the production of biofilm. Full virulence, bacterial motility and biofilm formation was restored to the mutant when *Xoc pilT* was expressed *in trans*. Through qRT PCR analysis, we found that *pilT* gene was regulated by *clp*, *rpfG*, *pilA* and *pilC*. [Conclusion] These results indicate that *pilT* gene is essential for full bacterial virulence in rice possibly due to the association with the reduced motility and increased biofilm production by the *pilT* mutation, implying that the importance of further investigation on the function of PilT in composition of type IV pili in *Xoc*.

**Keywords:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *pilT* gene, pathogenicity, motility, biofilm

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31470235) and by the Ministry of Agriculture of China (201303015)

\*Corresponding authors. Tel/Fax: +86-21-34205873; E-mail: Xiaobin Chen, xbchen@sjtu.edu.cn; Gongyou Chen, gyouchen@sjtu.edu.cn

Received: 16 May 2017; Revised: 14 June 2017; Published online: 21 July 2017