



辣椒溶杆菌 X2-3 LC_Clp 转录因子功能分析

李志远[#], 韩胜男[#], 王进, 赵丹, 韩超, 刘爱新^{*}

山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018

李志远, 韩胜男, 王进, 赵丹, 韩超, 刘爱新. 辣椒溶杆菌 X2-3 LC_Clp 转录因子功能分析. 微生物学报, 2022, 62(11): 4529–4540.

Li Zhiyuan, Han Shengnan, Wang Jin, Zhao Dan, Han Chao, Liu Aixin. Function analysis of LC_Clp transcription factor in *Lysobacter capsici* X2-3. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4529–4540.

摘要: 辣椒溶杆菌(*Lysobacter capsici*) X2-3 是从小麦根际分离的一株对多种病原真菌和卵菌有抑菌活性的菌株, 目前对该菌株产生的抗菌物质及其产生调控机制尚不明确。【目的】明确转录因子 LC_Clp 对该菌株抗菌物质产生的调节作用, 为深入了解 *L. capsici* X2-3 的生防机制提供依据。【方法】从转座子 EZ-Tn5 随机插入突变体库中筛选获得 X2-3 的 *LC_clp* 基因突变体 M356, 通过恢复性克隆获得功能互补菌株, 分析 *LC_clp* 基因在拮抗活性、胞外酶分泌以及调控基因表达方面的差异。【结果】与 X2-3 相比, M356 对测试病原真菌、卵菌的抑菌活性和产生体外抗菌物质的能力完全丧失, 蛋白酶和纤维素酶产生量明显减少, 几乎不产几丁质酶; 所检测的转录调节因子、次生代谢及胞外酶等相关基因的表达量均显著低于野生株 X2-3, 而互补菌株 MCS28 和 X2-3 水平相当。【结论】LC_Clp 不仅与菌株的抗菌物质合成及抑菌活性有关, 还影响胞外酶的产生, 并调控多种基因的表达, 具有广泛的调节作用。

关键词: 辣椒溶杆菌; Clp 转录因子; 抑菌活性; 抗菌物质合成; 胞外酶

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201100)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0201100)

[#]These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.** E-mail: liuax@sdau.edu.cn

Received: 24 March 2022; **Revised:** 23 April 2022; **Published online:** 11 May 2022

Function analysis of LC_Clp transcription factor in *Lysobacter capsici* X2-3

LI Zhiyuan[#], HAN Shengnan[#], WANG Jin, ZHAO Dan, HAN Chao, LIU Aixin^{*}

College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

Abstract: *Lysobacter capsici* X2-3, a plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strain isolated from the wheat rhizosphere, shows strong antimicrobial activity against many plant pathogenic fungi and oomycetes. However, little is known about the antibiotics produced by X2-3 as well as their regulation mechanism. **[Objective]** Our study aimed to clarify the regulation effect of LC_Clp transcription factor on the antibiotic production of *L. capsici* X2-3 and to provide reference for deep understanding of its biocontrol mechanism. **[Methods]** We selected a *LC_clp* mutant M356 from the mutant bank that was generated by the random insertion of the EZ-Tn5 transposon and certified by plasmid rescue. Additionally, we analyzed the differences of *LC_clp* gene in antimicrobial activity, secretion of extracellular enzymes, and regulation of gene expression among X2-3, mutant M356 and the complementary strain MCS28. **[Results]** Antimicrobial activity of mutant M356 against pathogenic fungi and oomycetes was completely lost as compared with that of X2-3 and the antibiotics produced by M356 was undetected by HPLC method. Extracellular enzymes such as protease, cellulase and chitinase that was secreted by mutant M356 decreased significantly. Expression of genes relating transcriptional regulators, secondary metabolism and extracellular enzymes were lowered dramatically in M356 as compared with that of wild-type strain X2-3. However, all the items tested in complementary strain MCS28 were similar with those of wild-type strain X2-3. **[Conclusion]** As a global regulator, LC_Clp regulates the synthesis of antibiotics, the production of extracellular enzymes and the expression of multiple genes in *L. capsici* X2-3.

Keywords: *Lysobacter capsici*; Clp transcription factor; antimicrobial activity; antibiotic production; extracellular enzymes

溶杆菌属(*Lysobacter*)包括 70 多个种,常见的有产酶溶杆菌(*Lysobacter enzymogenes*)、抗生素溶杆菌(*L. antibiotics*)、胶状溶杆菌(*L. gummosus*)和辣椒溶杆菌(*L. capsici*)等,广泛存在于植物根围、水体等环境,是常见的植物根际促生菌(PGPR)^[1-2]。辣椒溶杆菌 X2-3 是本实验室从小麦根际分离得到的一株 PGPR 菌株,可分泌多种胞外酶,对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、麦根腐平脐蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)、尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)等真菌,群结腐霉(*Pythium*

myriotylum)和寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*)等卵菌,具有明显的抑菌作用^[3]。目前大多数关于溶杆菌的研究来自于产酶溶杆菌 OH11,包括其抗菌物质的成分、分泌和调控机制等^[4-5],对辣椒溶杆菌的研究相对较少。

Clp (cAMP receptor-like protein)是一类重要的转录因子,属于 CRP (cyclic AMP receptor protein)家族蛋白。该蛋白含有 2 个结构域,分别为 N-端 cNMP 结构域和 C-末端 HTH/DNA 结合域。对大肠杆菌的研究发现,CRP 蛋白的 cNMP 结构域通过与 cAMP 结合改变自身构象,

形成 cAMP-CRP 复合体, 识别并结合临近基因的启动子调控基因表达^[6-8]。野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 和稻生黄单胞菌稻生致病变种 (*X. oryzae* pv. *oryzae*) 中, *clp* 基因的突变不仅影响病菌的胞外酶和胞外多糖的分泌和合成, 而且对菌株的运动性、抗氧化能力及致病性都有不同的影响^[9-10]。在产酶溶杆菌 OH11 中, *clp* 基因的突变不仅改变菌落的形态、胞外酶的产生和生物膜的形成, 还对抗菌物质的合成以及 IV 型菌毛依赖性的表面运动有调控作用^[11], 表明 Clp 是一种广泛的调控因子。

为了解辣椒溶杆菌抗真菌物质产生及其调节, 本研究以假禾谷镰孢菌 (*F. pseudograminearum*, *Fps*) 为指示菌, 从 X2-3 的 EZ-Tn5 随机插入突变体库中筛选到抑菌活性完全丧失的突变体 M356, 并对 Tn5 所插入基因、突变体胞外酶、抗菌物质产生及基因表达等进行了分析, 研究结果为深入了解 *LC_clp* 在 *L. capsici* X2-3 中的调控作用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、质粒、培养条件和培养基

本研究所用菌株、质粒见表 1。表中病原

真菌和卵菌用于抑菌活性测定。

所用培养基: PDA 培养基用于对真菌和卵菌抑菌活性分析; 蛋白酶、纤维素酶及几丁质酶检测培养基用于胞外酶分泌能力分析; 培养基配方参考文献[5]。

1.2 基因分析、引物设计

本研究所用的引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。各基因所用引物及其详细信息见表 2。

1.3 DNA 的提取、连接、转化及感受态的制备

DNA 的提取、酶切、连接、转化及感受态的制备等操作参考文献[3]。

1.4 菌株突变体的筛选及质粒拯救法鉴定侧翼序列

采用转座子随机插入法结合平板抑菌测定, 筛选抑菌活性缺失或减弱突变体。根据转座子使用说明操作步骤将 EZ-Tn5 转入辣椒溶杆菌 X2-3 感受态细胞, 在含卡那霉素(50 mg/mL)的 NA 平板筛选获得突变体, 纯化后保存备用; 将 *Fps* 孢子悬浮液涂布于 PDA 平板, 挑取纯化的突变株点接在平板上与 *Fps* 进行共培养; 挑选对 *Fps* 抑菌活性明显减弱或缺失的突变体, 提取基因组 DNA, 以 Tn5 转座子序列为目标, 用

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	Resource
<i>Lysobacter capsici</i> X2-3	Nutrient broth; 28 °C	This lab
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Luria broth; 37 °C	Vazyme
<i>Escherichia coli</i> Transfor Max EC100D <i>pir</i> ⁺	Luria broth; 37 °C	Epicentre
<i>Fusarium pseudograminearum</i> (<i>Fps</i>)	Potato dextrose agar; 25 °C	This lab
<i>Fusarium graminearum</i>	Potato dextrose agar; 25 °C	This lab
<i>Rhizoctonia solani</i>	Potato dextrose agar; 25 °C	This lab
<i>Rhizotonia cerealis</i>	Potato dextrose agar; 25 °C	This lab
<i>Fusarium oxysporum</i>	Potato dextrose agar; 25 °C	This lab
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Potato dextrose agar; 25 °C	This lab
<i>pEASY-Blunt</i> Simple Cloning Vector	Kanamycin or Ampicillin, 50 µg/mL	TransGen
<i>pBBR1MCS-5</i>	Gentamycin, 50 µg/mL	Vazyme

表 2 本研究所用引物及对应基因

Table 2 Primers used in this study

Primers	Primer sequences (5'→3')	Use	Length/bp	Genes
<i>clp</i> -F	CGGAATTCTGTAGGAAGATTCCAGTCGGA	PCR	840	<i>LC_clp</i> gene
<i>clp</i> -R	CCCAAGCTTTTAGCGGGTCCCCTAGAGGA			
R6kF1	GGGTAGCCAGCAGCATCCT	PCR	1 044	EZ-Tn5
KanR	TAACATCATTGGCAAGGCTACC			
16S rRNA-F	GCTCGTGTCTGAGATGTT	qPCR		16S rRNA gene
16S rRNA-R	TGTAGCCCAGGTCATAAGG			
RT-4356F	GCTGATGAATCTGCCGAAGG	qPCR	111	GntR
RT-4356R	TAAGCGTCGCCACGGTAGAAG			
RT-4649F	CCGACCTGGAATCCAAGAT	qPCR	75	MerR
RT-4649R	CCGACCTGGAATCCAAGAT			
RT-4969F	CGCACGCATGAAGATATTGCC	qPCR	93	TfoX family
RT-4969R	GTAAAGCAGGTTCAAGGTCGG			
RT-1572F	GTTACCCATCACCACATCCT	qPCR	80	Peptide synthase waps1
RT-1572R	GCGAGTGATACAGGTTGAACAATT			
RT-1573F	AATTGAAGACATCCTGCCGCTGAC	qPCR	80	Peptide synthase waps2
RT-1573R	TGTCCTGCACCTTGTCGTCGTA			
RT-0895F	GCTACCGCCTGGAATACATCG	qPCR	85	NRPS/PKS gene
RT-0895R	TGGTCGGCTTCGTCTTCATAC			
RT-0893F	GCACTACTTCAGCGACTTCA	qPCR	80	FAD-dependent oxidoreductase
RT-0893R	CTGCTTCTTCTCCGCCAATA			
RT-5068F	GCCAATCTTTCCTTCGACTCC	qPCR	89	threonine dehydratase
RT-5068R	AGTTCCTCTGTTGCGTCTGAA			
RT-0231F	AAGCCAAGACGAATCACCCT	qPCR	92	Chitinase A
RT-0231R	GATGGCGTCGTTGGAGTTGTA			
RT-3538F	CGTCATCATCGAAGGCAACTG	qPCR	88	Cellulase
RT-3538R	GAAACTCAGCACCAGGTTGTC			
RT-4408F	CGGTTTCATCGTCGCTACAA	qPCR	108	Extracellular protease
RT-4408R	TGCTTGATGCTCAGGTCCTTC			

引物对 R6KF1/KanR 进行 PCR 验证,以野生菌株 X2-3 基因组 DNA 为对照。

将验证正确的突变体用质粒拯救法鉴定 EZ-Tn5 在突变体中的插入位点。提取突变体基因组 DNA,根据 EZ-Tn5 说明书提供的多克隆酶切位点,选择 *Eco*R I 对突变体的 gDNA 进行酶切。酶切产物用 T4 连接酶自连接,将连接产物转入 *E. coli* Transfor Max EC100D *pir*⁺ 感受态细胞,在含卡那霉素(50 mg/mL)的 LA 平板上

筛选获得单菌落;提取单菌落中的质粒,对 Tn5 的两端侧翼进行序列测定,所得序列与已知基因组 DNA 全序列比对,并在 NCBI 上进行 BLAST 分析,确定 Tn5 所插入的基因及插入的位点。

1.5 互补载体构建和互补突变体鉴定

以辣椒溶杆菌 X2-3 基因组 DNA 为模板,*clp*-F/*clp*-R 为引物扩增 *LC_clp* 基因完整序列,再连接 pEASY-Blunt-Simple,经 PCR 验证得到

重组质粒 pEASY-*clp*; 用 *Hind* III 和 *Eco*R I 从重组质粒中将 *-clp* 切下, 连接到表达载体 pBBR1-MCS5, 经酶切验证获得质粒 pBBR1-*clp*。将质粒 pBBR1-*clp* 电转入 M356 感受态细胞, 经含庆大霉素(500 μ g/mL)的 NA 平板筛选、从抑菌活性明显恢复的突变体中提取质粒进行酶切验证, 同时利用引物 *clp*-F/*clp*-R 对抑菌活性明显恢复的突变体进行菌落 PCR 验证, 获得互补突变体。

1.6 野生株、突变株和互补菌株的抑菌活性测定

采用平板对峙法测定突变体及野生株的抑菌活性。将活化的 X2-3 及突变体 M356 和 MCS28 在 NA 培养基培养, 分别调节菌体浓度至 OD_{600} 为 1.0, 分别取 2 μ L 菌液滴于 PDA 平板, 28 $^{\circ}$ C 静置培养 2 d; 将待测病原菌的菌饼接种于平板中央, 28 $^{\circ}$ C 继续培养 5 d, 观察并记录各菌株对病原菌的抑菌圈直径。以抑菌圈直径大小评价不同菌株的抑菌能力, 试验重复 3 次。

1.7 抗菌物质的提取及活性测定

参考文献[12]的方法提取 X2-3 和突变株的胞外抗菌物质。挑取 X2-3 和 M356 的单菌落, 分别接种至 50 mL NB 培养液, 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养 24 h 作为种子液; 按 0.5% 的接种量将种子液分别转接到融化后冷却的 1/10 TBS 培养基、混匀, 然后倒平板; 待培养基凝固后, 放入 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 4 d; 将培养好的培养基切成小块分装于玻璃瓶中, 用乙酸乙酯-甲醇-冰乙酸 (80:15:5) 浸提, 每次 12–14 h; 合并 3 次的浸提液, 用滤纸过滤去除培养基残渣, 滤液经 38 $^{\circ}$ C 减压浓缩后, 用乙酸乙酯和水按照 1:1 的体积比进行萃取, 直至水相无色; 合并萃取液, 38 $^{\circ}$ C 减压浓缩得到黄褐色粉状物, 即为抑菌物质的粗提物。

粗提物用甲醇溶解, 并用反向高效液相色谱法(RP-HPLC)对抑菌物质进行分析: 使用注射器将 20 μ L 的粗提物缓缓注入 Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm) 5 μ m 的色谱柱进行洗脱, 流动相 A 为三氟乙酸(TFA)水溶液(浓度 0.005 mol/L), 流动相 B 为乙腈(含 0.005 mol/L TFA), 柱温为 25 $^{\circ}$ C, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 318 nm。检测程序见表 3。

收集各菌株在洗脱时间 19.6–24.0 min 的洗脱液, 经旋转蒸发浓缩后, 用灭菌水溶解浓缩液, 并对浓缩液进行 0、10、50 和 100 倍稀释。然后在 12 孔板中加入 1 mL 融化的 PDA 培养基和 500 μ L 梯度洗脱稀释液, 混匀, 待培养基凝固后, 将相同直径大小的 *Fps* 接种于平板中央, 28 $^{\circ}$ C 培养 2 d。以无菌水同样处理作对照。观察并记录 *Fps* 的直径大小作为衡量洗脱液对 *Fps* 的抑菌活性。

1.8 野生株、突变株和互补菌株的胞外酶测定

平板法测定各菌株的蛋白酶、纤维素酶和几丁质酶产生能力。将活化的 X2-3、M356 和 MCS28 调节菌体浓度至 OD_{600} 为 1.0, 分别取 2.5 μ L 菌液滴于检测培养基平板中央, 28 $^{\circ}$ C 静置培养 3 d, 观察并记录各菌落周围透明圈直径, 以透明圈直径大小评估胞外酶产生能力。试验重复 3 次。

表 3 HPLC 的检测程序

Table 3 The testing procedures of HPLC

t/min	Mobile phase A/%	Mobile phase B/%
0	95	5
5	75	25
25	20	80
26	0	100
28	0	100
29	95	5
30	95	5

1.9 荧光定量 PCR

Trizol 法提取菌株 X2-3 和 M356 的 RNA, 参考 PrimeScript™ RT Regent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) 说明反转录合成 cDNA 用于 Real-time PCR 分析。待测基因包括 GntR、MerR 和 TfoX family 等转录调控因子或调节蛋白基因(LC4356、LC4969 和 LC-4649)、与次生代谢相关的基因(LC1573、LC1572、LC0893、LC0895 和 LC5068)和胞外酶相关基因(LC0231、LC3538 和 LC4408), 以 16S rRNA 为内参基因。各基因的详细信息见表 2。荧光定量 PCR 用 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) RR820A (TaKaRa) 进行分析。反应体系为 2×SYBR Green pro Taq/10 μL, Primer F/R 各 0.4 μL, cDNA/2 μL, RNase-free H₂O 补足总体积为 20 μL。试验重复 3 次。

1.10 数据统计与分析

试验数据用 Excel 和 SPSS 软件进行统计与分析。每种处理的条形图上的不同字母表示通过 Duncan 的多重范围检验在 $P < 0.05$ 处存在显著差异, 试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 突变体的筛选和验证

2.1.1 插入突变体的筛选和验证

首先将 EZ-Tn5 转座子转入辣椒溶杆菌 X2-3 感受态细胞中, 共获得 5 000 多个具有卡那霉素抗性的阳性单克隆, 以 *Fps* 为指示菌, 筛选得到 5 株对 *Fps* 抑菌活性完全消失的突变株(图 1A)。

分别提取菌株 X2-3 和突变株的基因组 DNA, 利用引物 R6kF1/KanR 进行 PCR 扩增, 验证 EZ-Tn5 的特定序列, 发现在突变体中均能扩增到与特定序列长度一致的 1 044 bp 大小的条带(图 1B), 而在 X2-3 中未能扩增相应大小的

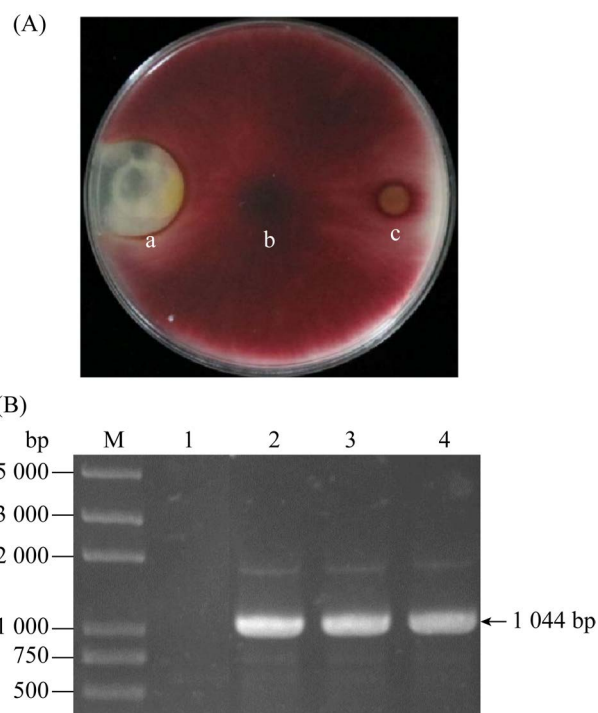


图 1 突变体筛选及 PCR 验证

Figure 1 Mutant selection and certification using PCR method. A: antimicrobial activity of wide-type X2-3 and mutant M356 against *F. pseudograminearum*. a: wide-type X2-3; b: *F. pseudograminearum*; c: mutant M356. B: PCR certification of mutants. 1: X2-3; 2–4: mutants.

条带, 说明突变体的基因组 DNA 中成功插入了 EZ-Tn5 转座子。

2.1.2 突变体插入基因分析

利用质粒拯救技术, 对 5 株突变株中 Tn5 的插入位点及其所在基因进行分析, 发现其中的 2 个突变株(编号分别为 M356 和 M1528)中 Tn5 的插入位点都位于 X2-3 全基因组(GenBank 登录号: LBMI00000000.1)中编号为 LC3106 的基因上。BLAST 分析发现, 该基因全长 840 bp, 编码 Clp 转录因子, 预测的该基因编码蛋白与功能明确的产酶溶杆菌 C3 (ID: CP013140.1)和产酶溶杆菌 OH11 (ID: MG851700.1)中 Clp 氨基酸测序相似性均为 98.92%。结构功能域分析发

现, 该预测蛋白有 2 个重要的结构域, 即 Clp 蛋白保守的 HTH/DNA 结合域和 cNMP 结合域 (图 S1)。本研究选择 M356 进行进一步分析。

2.1.3 互补突变体的筛选和验证

重组载体 pBBR1-*clp* 转化突变体 M356 感受态细胞后, 经 PCR 验证, 发现互补菌株 MCS28 中扩增到大小分别为 2 841 bp 和 840 bp 的条带, 分别与突变体 M356 中的 EZ-Tn5-*clp* 和互补载体 pBBR1-*clp* 中 *clp* 基因片段的大小一致, 而在野生株 X2-3 中只能扩增到 840 bp 左右的条带, 在突变体 M356 中只能扩增到与 EZ-Tn5-*clp* 大小一致的 2 841 bp 左右的条带 (图 2)。表明互补突变体正确, 命名为 MCS28。

2.2 突变体抑菌活性及抑菌物质测定

2.2.1 突变体抑菌活性测定

利用平板对峙法分析了野生株 X2-3、突变株 M356 和互补菌株 MCS28 对禾谷镰孢菌、禾谷

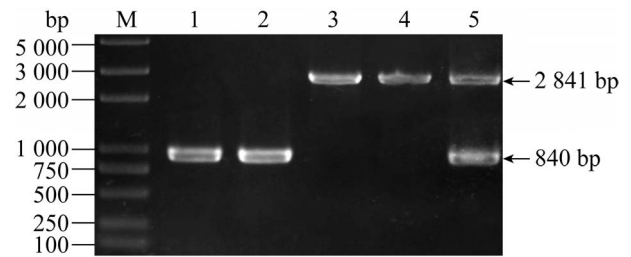


图 2 互补菌株 MCS28 菌落 PCR 验证

Figure 2 PCR products of complementary strain MCS28. M: 2K plus marker; 1–2: wild-type; 3–4: mutant M356 X2-3; 5: complementary strain MCS28.

丝核菌、立枯丝核菌、尖孢镰孢菌、假禾谷镰孢菌和烟草疫霉等菌株的抑菌活性, 结果如图 3。突变体 M356 对病原真菌和卵菌的抑菌活性完全丧失, 而 MCS28 的抑菌活性基本恢复到了野生株水平, 表明 *LC_clp* 基因的突变使 X2-3 丧失了对病原真菌和卵菌的抑菌活性。

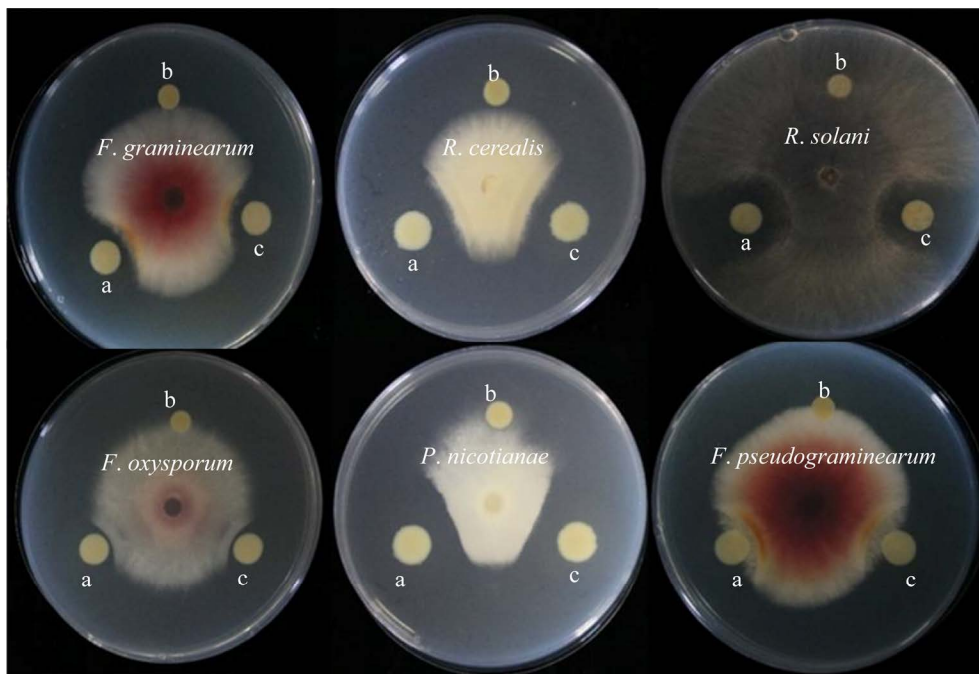


图 3 菌株对不同病原菌的抑菌活性测定

Figure 3 Antimicrobial activity of strains against different pathogens. a: wild-type X2-3; b: mutant M356; c: complementary strain MCS28.

2.2.2 突变体抗菌物质分析

为了解突变株 M356 抑菌活性的丧失是否与其抗菌物质合成减少有关, 采用液相色谱法比较分析了粗提物中的成分变化, 结果表明, 与 X2-3 相比, M356 萃取物中明显缺少保留时间为 19.61–24.00 min 之间的吸收峰(图 4A)。

为明确该时段的洗脱液是否有抗菌活性,

收集了 19.61–24.00 min 的洗脱液, 梯度稀释后, 用 12 孔板检测了不同稀释液对 *Fps* 的抑菌活性, 发现 X2-3 中该吸收峰对应的洗脱液具有明显的抑菌活性, 而 M356 中的该组分完全丧失了对病原菌的抑菌活性(图 4B), 这些结果表明 *clp* 基因的突变使 X2-3 失去抗菌物质的产生能力, 因而使菌株丧失了对病原菌的抑菌活性。

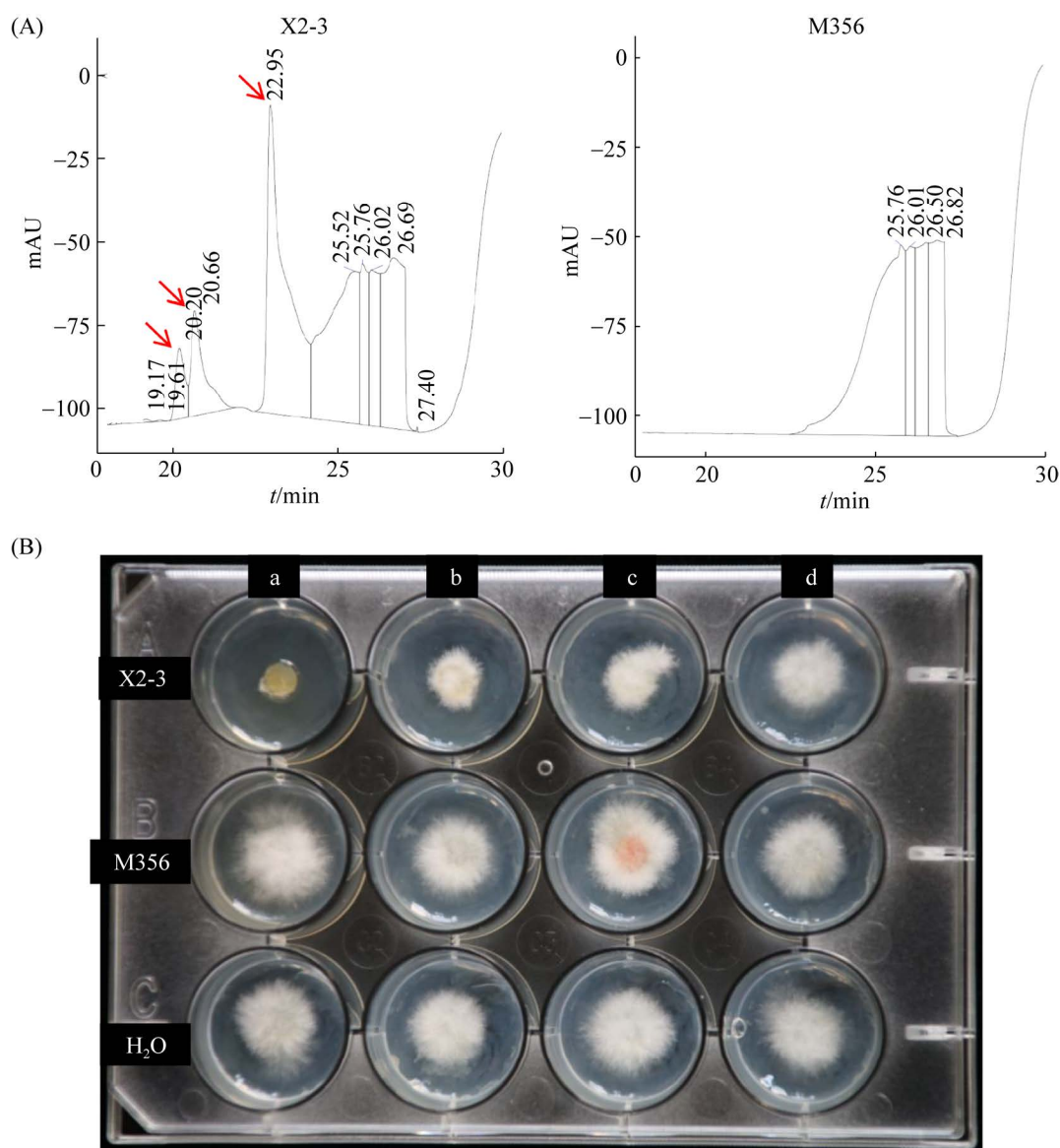


图 4 反向液相色谱分析及抑菌活性检测

Figure 4 Antimicrobial activities and analysis of RP-HPLC. A: results of liquid chromatography; B: results of antibacterial activity of eluent fractions. Dilution factor: a: 0; b: 10; c: 50; d: 100.

2.2.3 菌株胞外酶产生能力测定

对突变体和野生株的胞外酶检测发现, 与 X2-3 相比, 突变体 M356 在蛋白酶和纤维素酶检测平板上产生的水解圈明显减小(图 5A, 5B), 在几丁质酶检测平板上, 突变体 M356 几乎不产生透明水解圈(图 5C), 说明 *LC_clp* 基因的突变使 M356 产蛋白酶和纤维素酶的能力明显减弱, 产几丁质酶的能力几乎完全丧失, 而互补菌株 MCS28 产生蛋白酶、纤维素酶和几丁质酶的能力基本恢复到野生株水平。这些结果表明, *LC_clp* 基因的突变, 不仅影响抗菌物质的产生, 而且对 X2-3 的胞外酶产生有调节作用。

2.3 荧光定量 PCR 分析

荧光定量 PCR 法分析了突变体与野生株中转录调控因子、次生代谢相关基因及胞外酶基因的表达情况, 结果发现, 突变体 M356 中, 转录因子 *GntR*、*MerR* 和调节蛋白 *TfoX* (对应

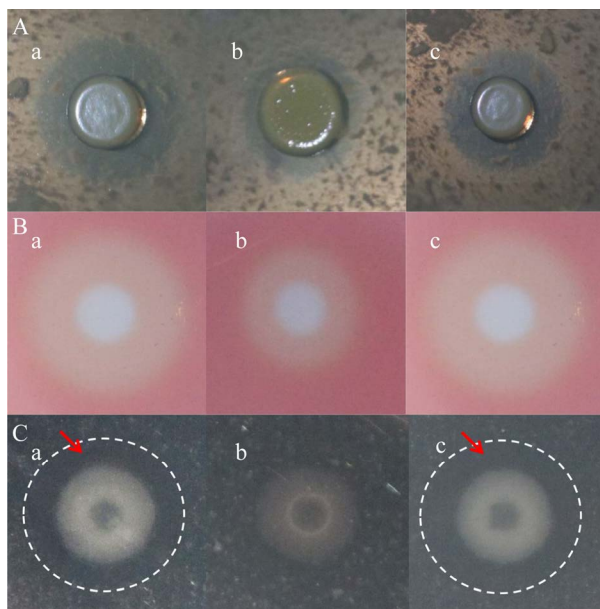


图 5 各菌株的胞外酶活性

Figure 5 Extracellular enzyme activity of each strains. A: protease; B: cellulase; C: chitinase. a: wild-type X2-3; b: mutant M356; c: complementary strain MCS28.

基因 *LC4356*、*LC4969* 和 *LC-4649*) 的基因表达量均显著下降, 次生代谢相关基因及胞外酶基因的表达量均也显著低于野生株, 尤其是与抗真菌物质合成相关的基因(基因号: *LC0895*)几乎不表达(图 6B), 这一结果进一步表明, *LC_clp* 基因明显抑制了抗真菌物质的合成, 从而使 M356 完全丧失对病原菌的拮抗活性。

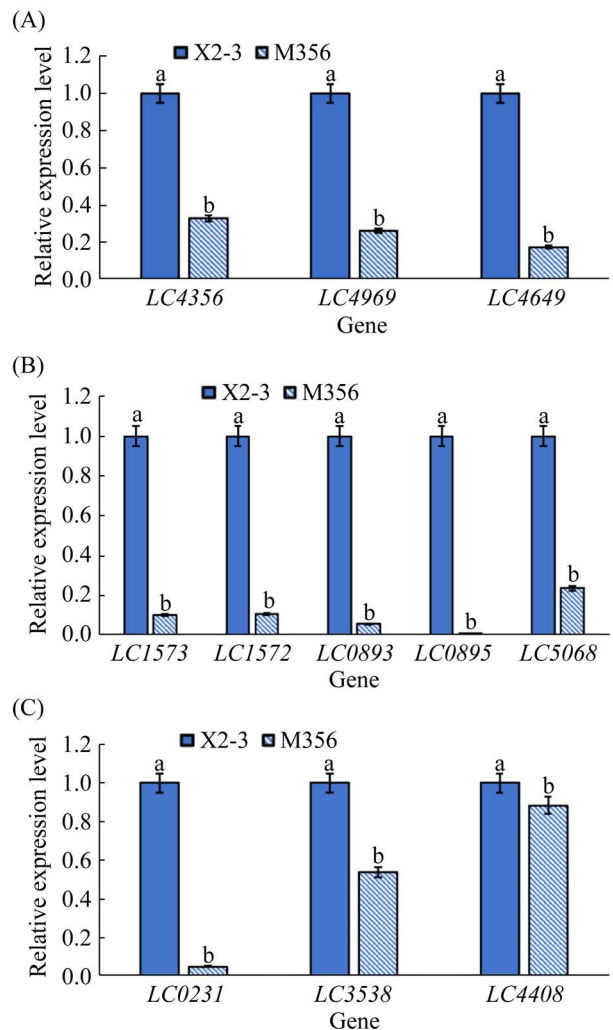


图 6 荧光定量 PCR 分析

Figure 6 Fluorescence quantitative PCR analysis. A: transcriptional regulator gene; B: secondary metabolism; C: extracellular enzymes. Different lowercase letters indicate significant difference between treatments, respectively ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

本研究分析了 *LC_clp* 基因突变体与野生株在拮抗活性、胞外酶分泌以及调控基因表达方面的差异,发现与野生株 X2-3 相比, M356 的抑菌活性和抗菌物质的产生能力完全丧失,胞外酶产生能力显著降低;在 M356 中,编码转录调控因子、次生代谢和胞外酶相关基因的表达量都显著低于野生株 X2-3,尤其与抗真菌物质合成相关的基因 *LC0895* 几乎不表达。表明 *LC_Clp* 是一个全局调控因子,在辣椒溶杆菌 X2-3 中具有多种生物学功能。

研究发现,产酶溶杆菌 OH11 可分泌一种大环内酰胺类抗真菌物质 HSAF^[13-15],该物质对丝状真菌和卵菌具有明显的拮抗活性。HSAF 能够引起细胞壁合成物质的过度积累导致菌丝形态发生卷曲、顶端肿胀和去极化生长,从而抑制病原菌的生长^[16]。HSAF 能够破坏链格孢菌 [*Alternaria alternata* (Fries) Keissler] 多种细胞代谢网络,诱导细胞壁厚度增加和细胞凋亡^[17]。在对果生刺盘孢菌 (*Colletotrichum fructicola*) 的研究中, HSAF 可以使菌丝过度分枝、肿胀和去极化生长,诱导分生孢子产生活性氧,破坏分生孢子细胞壁的完整性,抑制分生孢子萌发,干扰胞质分裂与生长^[18]。我们前期对 X2-3 全基因组分析发现,在 X2-3 中存在 6 个 *PKS/NRPS* 基因簇,这些基因簇都与抗菌物质合成相关^[3],其中抗真菌物质合成基因簇 *LC0895* 的氨基酸序列与 *L. enzymogenes* OH11 中 HSAF 合成基因簇的氨基酸序列相似性为 83%,预测该基因簇的合成产物可能与 HSAF 相似。本研究发现, *LC_clp* 基因的突变使 M356 完全失去对病原真菌及卵菌的拮抗活性;利用液相色谱法分析了 X2-3 与 M356 的抗菌物质差异,发现 M356 中

明显缺少 X2-3 中保留时间为 19.61–24.00 min 的吸收峰,活性检测发现该吸收峰所含的物质对病原菌具有明显的抑制活性。荧光定量 PCR 测定也发现,突变体 M356 中抗真菌物质合成基因 *LC0895* 几乎不表达,进一步说明 *LC_clp* 基因对抗真菌物质的合成有调控作用,但对该抗菌物质的具体成分还需进一步研究。

clp 基因编码 CRP 家族的 Clp 转录因子,在细菌中调控多种生物学过程。在 *L. enzymogenes* C3 中, *clp* 基因的突变使菌株的蛋白酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性完全丧失,几丁质酶的活性显著降低,滑动性减弱,并且失去了对终极腐霉 (*Pythium ultimum*) 的拮抗活性^[19]。在 *L. enzymogenes* OH11 中, Clp 可调控 3 种生防因子 (HSAF、WAP-8294A2 和胞外几丁质酶) 的生物合成^[20]; Clp 还可作为 *LeDSF* 信号的下游调控因子控制抗菌物质的生成,同时通过 *LeDSF* 来调控几丁质酶和蛋白酶的产生以及抽搐运动^[21]。在野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 (*X. campestris* pv. *campestris*) 中, Clp 作为一种全局调控因子,对胞外酶、胞外多糖 (EPS) 合成、鞭毛运动和生物膜的合成都有调节作用^[22]。本研究中我们发现, *LC_clp* 基因的插入突变,使 X2-3 蛋白酶、纤维素酶和几丁质酶的产生能力明显减弱;荧光定量 PCR 结果显示, *LC_clp* 基因能够调控多种基因的表达,包括与转录调控因子或调节蛋白基因、次生代谢和胞外酶相关的基因。此外,我们还发现 *LC_clp* 突变后,突变株运动能力显著降低,但菌株在生长和抗逆能力方面没有明显变化 (图 S2–S4)。这些结果表明, *LC_clp* 基因对 X2-3 的多种生物学功能具有广泛的调节作用,是一个全局性的调控因子,但其具体的调控机制还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Zhao Y, Jiang T, Xu H, Xu G, Qian G, Liu F. Characterization of *Lysobacter* spp. strains and their potential use as biocontrol agents against pear anthracnose. *Microbiological Research*, 2021, 242(1): 126624.
- [2] 陈丹梅. 产酶溶杆菌新株 *Lysobacter enzymogenes* LE16 的促生防病作用及机理. 西南大学博士学位论文, 2020.
- [3] Yi JL, Wang J, Li Q, Liu ZX, Zhang L, Liu AX, Yu JF. Draft genome sequence of the bacterium *Lysobacter capsici* X2-3, with a broad spectrum of antimicrobial activity against multiple plant-pathogenic microbes. *Genome Announcements*, 2015, 3(3): e00589-15.
- [4] Shen X, Wang B, Yang N, Zhang L, Shen D, Wu H, Dong Y, Niu B, Chou SH, Puopolo G. *Lysobacter enzymogenes* antagonizes soilborne bacteria using the type IV secretion system. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(8): 4673–4688.
- [5] Han S, Shen DY, Zhao Y, Xu D, Liu J, Chou SH, Liu FQ, Qian GL. *Sigma factor* RpoN employs a dual transcriptional regulation for controlling twitching motility and biofilm formation in *Lysobacter enzymogenes* OH11. *Current Genetics*, 2018, 64(2): 515–527.
- [6] Jonas K, Melefors O, Römling U. Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiology*, 2009, 4(3): 341–358.
- [7] Uppal S, Jawali N. The cyclic AMP receptor protein (CRP) regulates mqsRA, coding for the bacterial toxin-antitoxin gene pair, in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 2016, 167(1): 58–62.
- [8] Saha A, Mukhopadhyay J, Datta AB, Parrack P. Revisiting the mechanism of activation of cyclic AMP receptor protein (CRP) by cAMP in *Escherichia coli*: lessons from a subunit-crosslinked form of CRP. *FEBS Letters*, 2015, 589(3): 358–363.
- [9] 刘国芳, 任沛东, 叶文新, 陆光涛. 十字花科黑腐病菌中转录因子 HpaR1 与 Clp 调控一个糖苷水解酶基因表达的分析. *遗传*, 2021, 43(9): 910–920.
- Liu GF, Ren PD, Ye WX, Lu GT. Analysis of transcriptional regulators HpaR1 and Clp regulating the expression of glycoside hydrolase-encoding gene in the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Hereditas*, 2021, 43(9): 910–920. (in Chinese)
- [10] Wang B, Wu GC, Zhang YQ, Qian GL, Liu FQ. Dissecting the virulence-related functionality and cellular transcription mechanism of a conserved hypothetical protein in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(8): 1859–1872.
- [11] Wang Y, Zhao Y, Zhang J, Zhao Y, Shen Y, Su Z, Xu G, Du L, Huffman JM, Venturi V, Qian G, Liu F. Transcriptomic analysis reveals new regulatory roles of Clp signaling in secondary metabolite biosynthesis and surface motility in *Lysobacter enzymogenes* OH11. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2014, 98(21): 9009–20.
- [12] 丁艳娇. 产酶溶杆菌 C3 菌株多环四胺酸大环内酰胺类化合物的分离与抗真菌作用机制研究. 山东大学博士学位论文, 2016.
- [13] Yuen GY, Broderick KC, Jochum CC, Chen CJ, Caswell C, Edward P. Control of cyst nematodes by *Lysobacter enzymogenes* strain C3 and the role of the antibiotic HSAF in the biological control activity. *Biological Control*, 2018, 117: 158–163.
- [14] Yu LJ, Li H, Zhou ZC, Liu FQ, Du LL. Antifungal polycyclic tetramate macrolactam HSAF is a novel oxidative stress modulator in *Lysobacter enzymogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(10): e03105-20.
- [15] Yu L, Khetrpal V, Liu F, Du L. LeTetR positively regulates 3-hydroxylation of the antifungal HSAF and its analogs in *Lysobacter enzymogenes* OH11. *Molecules*, 2020, 25(10): 2286.
- [16] Zhao YY, Cheng C, Jiang TP, Xu HY, Chen Y, Ma ZH, Qian GL, Liu FQ. Control of wheat *Fusarium* head blight by heat-stable antifungal factor (HSAF) from *Lysobacter enzymogenes*. *Plant Disease*, 2019, 103(6): 1286–1292.
- [17] He F, Li B, Ai G, Kange AM, Zhao Y, Zhang X, Jia Y, Dou D, Liu F, Cao H. Transcriptomics analysis of the Chinese pear pathotype of *Alternaria alternata* gives insights into novel mechanisms of HSAF antifungal activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1841.
- [18] Li CH, Tang B, Cao SL, Bao Y, Sun WB, Zhao YC, Liu FQ. Biocontrol ability and action mechanism of dihydromaltophilin against *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose of pear fruit. *Pest Management*

Science, 2021, 77(2): 1061–1069.

- [19] Kobayashi DY, Yuen GY. The role of *clp*-regulated factors in antagonism against *Magnaporthe poae* and biological control of summer patch disease of *Kentucky bluegrass* by *Lysobacter enzymogenes* C3. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51(8): 719–723.
- [20] Xu GG, Shi XF, Wang RP, Xu HY, Du LC, Shan-Ho Chou, Liu HX, Liu YZ, Qian GL, Liu FQ. Insights into the distinct cooperation between the transcription factor Clp and LeDSF signaling in the regulation of antifungal factors in *Lysobacter enzymogenes* OH11. *Academic Press*, 2018: 120.
- [21] He YW, Ng AYJ, Xu M, Lin K, Wang LH, Dong YH, Zhang LH. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Molecular Microbiology*, 2007, 64(2): 281–292.
- [22] 徐会永. 产酶溶杆菌转录因子 LeClp 调控几丁质酶和次级代谢产物生物合成的机制研究. 南京农业大学博士学位论文, 2016.

补充材料

附图 1 蛋白序列分析及功能预测

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附图 2 突变体生长能力分析

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附图 3 突变体运动能力分析

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附图 4 突变体对不同环境条件的耐受性分析

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附图 5 *LC_Clp* 基因相对表达量测定

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。