

文心兰软腐病菌 *Dickeya fangzhongdai* Onc5 *vfmE* 基因的克隆及表达分析

王文婷, 任 驰, 丁建华, 荆恩荣, 卢秋巍*

忻州师范学院生物系, 山西忻州 034000

摘 要: 狄克氏菌 (*Dickeya fangzhongdai*) 是引起兰科植物毁灭性病害软腐病 (soft rot disease) 的主要病原菌之一。病原菌致病基因在病原菌与植物互作中发挥至关重要的作用。软腐病菌 *D. fangzhongdai* Onc5 从福建南茜文心兰 (*Oncidium*, Gower Ramsey) 软腐病患植株中分离而来。本研究旨在明确 *D. fangzhongdai* Onc5 *vfmE* 基因的分子生物学特征, 并分析其在侵染寄主过程中的作用, 为揭示 *vfmE* 基因在 *D. fangzhongdai* Onc5 侵染寄主过程中的致病机制提供理论依据。本研究以 *D. fangzhongdai* Onc5 基因组 DNA 为模版, 通过 RT-PCR 扩增, 成功获得 *vfmE* 基因, 并进行生物信息学分析; 利用 RT-qPCR 分析 *vfmE* 基因在 *D. fangzhongdai* Onc5 侵染文心兰过程中的表达情况。结果表明: *D. fangzhongdai* Onc5 *vfmE* 基因的 ORF 为 564 bp, 编码 187 个氨基酸; *vfmE* 蛋白质的分子质量为 21.93 kDa, 理论等电点 (pI) 为 9.01, 含 1 个 AraC 超家族结构域; *vfmE* 蛋白质为结构不稳定的亲水性蛋白, 无信号肽, 不存在跨膜结构域; 其蛋白质二级结构主要为 α -螺旋 (58.29%) 和无规则卷曲 (40.64%); 同源性分析表明, 其氨基酸序列与 *Dickeya* 属其他菌种的 *vfmE* 序列具有很高的相似性 (>86%); RT-qPCR 分析表明: *vfmE* 基因在 *D. fangzhongdai* Onc5 侵染文心兰叶片和假鳞茎后均持续高表达, 在 12 h 的表达量最高 ($P<0.01$), 表明 *vfmE* 蛋白在 *D. fangzhongdai* Onc5 侵染文心兰的过程中发挥着重要的作用。本研究结果为进一步研究 *vfmE* 基因功能和 *Dickeya* 属病原菌致病机制提供提论基础, 同时也有利于发展植物软腐病新的防治靶标。

关键词: 狄克氏菌; *vfmE* 基因; 克隆; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: S432.1 文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of *vfmE* gene from Soft Rot Pathogen *Dickeya fangzhongdai* Onc5 of *Oncidium*

WANG Wenting, REN Chi, DING Jianhua, JING Enrong, LU Qiuwei*

Department of Biology, Xinzhou Normal University, Xinzhou, Shanxi 034000, China

Abstract: *Dickeya fangzhongdai* is one of the main pathogens causing the devastating disease (soft rot disease) of *Orchidaceae*. Pathogenic genes play a crucial role in the infection process. *Dickeya fangzhongdai* Onc5 was isolated from the diseased plant (*Oncidium*, Gower Ramsey) in Fujian province. Pathogenic gene play an important role in the interaction between pathogens and plants. The purpose of this study was to larify the molecular biological characteristics of *D. fangzhongdai* Onc5 *vfmE* gene and analysis its role in the infection process, so as to provide theretical basis for further reveal the pathogenic mechanism of *D. fangzhongdai* Onc5 *vfmE* gene in the infection process. Using the *D. fangzhongdai* Onc5 DNA as template, of *vfmE* gene was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and its bioinformatics were analyzed. The expression of *vfmE* gene was analyzed during *D. fangzhongdai* Onc5 infecting *Oncidium* by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). The result showed that the ORF se-

收稿日期 2024-10-21; 接受日期 2024-11-07

基金项目 山西省科技厅基础研究计划项目 (No. 20210302124516, No. 20210302124502); 山西省高校科技创新计划项目 (No. 2021L462)。

作者简介 王文婷 (1992—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 植物天然产物活性与植物病理。*通信作者 (Corresponding author): 卢秋巍 (LU Qiuwei), E-mail: luqiuwei2020@163.com。

quence of *vfme* gene was 564 bp, encoding 187 amino acids with a molecular weight of 21.93 kDa and isoelectric point of 9.01 and a conserved AraC-superfamily domain. The *vfme* protein was an unstable hydrophilic protein without signal peptide and transmembrane structure. The secondary structure of protein was mainly composed of α -helix (58.29%) and random coil (40.64%). Sequence similarity analysis revealed that the translated molecules showed high homology with other pathogens in the genus *Dickeya* (>86%). RT-qPCR analysis showed that *vfme* gene was highly expressed continuously throughout the infection process of *D. fangzhongdai* *Onc5*, and the highest expression level was at 12 h. *vfme* protein plays an important role in the infection of *D. fangzhongdai* *Onc5*. Research on the pathogenesis-related gene *vfme* in *D. fangzhongdai* *Onc5* provide a theoretical basis for further research on the *vfme* gene function and pathogenic regulation mechanism in *Dickeya* genus. Furthermore, such studies may be useful for finding new target to control plant soft rot disease.

Keywords: *Dickeya fangzhongdai* *Onc5*; *vfme* gene; cloning; bioinformatics analysis; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.03.004

文心兰(*Oncidium*)属于兰科文心兰属植物,其植株轻巧,花形优美,花色艳丽,具有较高的观赏价值和商业价值,是世界上最重要的切花和盆花之一。近年来,中国尤其是台湾省文心兰种植面积和产量也在逐年上升,但文心兰切花高峰期正值高温高湿季节,易受到病原菌的侵害引起软腐病。软腐病是文心兰栽培生产最致命的病害之一,感病后植株迅速水渍化,常引起整株植株腐烂致死,进而影响文心兰全产业链的发展^[1]。

软腐病菌 *Dickeya fangzhongdai* *Onc5* 从福建南茜文心兰(*Oncidium*, Gower Ramsey)软腐病患植株中分离而来,其基因组已测序完成。体外侵染实验证实该菌株还可侵染蝴蝶兰、金线莲及铁皮石斛等其他兰科植物^[2]。*Dickeya* 属病原菌主要通过合成和分泌大量植物细胞壁降解酶(plant cell wall degradation enzymes, PCWDEs)侵染宿主植物,使其展现“软腐”症状^[3]。*Dickeya* 属病原菌寄主范围较广,可引起多种作物和花卉的细菌性软腐病,造成巨大的经济损失。花卉宿主包括菊花、蝴蝶兰、百合、杜鹃、海棠和向日葵等,其他宿主主要涉及土豆、水稻、香蕉、番茄、玉米、菠萝、大米、胡萝卜、梨树和烟草等^[4],尤其近年来由 *D. zeae* 引起的水稻细菌性基腐病和香蕉软腐病^[5],以及由 *D. solani* 引起的马铃薯软腐病均造成重大的农业损失^[6],因此,关于 *Dickeya* 属病原菌致病机理的研究是当前的研究热点。

群体感应(quorum sensing, QS)是一种细菌细胞之间的通信机制,通过释放与细胞密度相关的 QS 信号分子来调节特定基因的表达,调节细菌的群体行为,涉及细菌毒力和感染寄主^[7]。2013

年, NASSER 等^[8]在 *D. dadantii* 3937 菌株中发现一种新的群体感应系统——*vfme* 基因簇,该基因簇仅在 *Dickeya* 属中被发现且高度保守,该 QS 系统含有 *vfmeAZBCD*, *vfmeKLMNOPQRSTUVWXYZ*, *vfmeFGHIJ* 三个操纵子和关键调控基因 *vfme*。操纵子 *vfmeAZBCD* 和 *vfmeKLMNOPQRSTUVWXYZ* 主要参与信号分子 VFM 的合成,随后通过 ABC 转运蛋白 *vfmeFG* 输出胞外。胞外信号 VFM 随着细胞数量的增加逐渐积累,当 VFM 达到一定的阈值,引发双组分系统 *vfmeH/vfmeI* 间的磷酸化,被激活的 *vfmeH* 诱导 *vfme* 表达, *vfme* 可进一步激活下游 PCWDEs 相关基因的表达,影响 *D. dadantii* 3937 对寄主的侵染。此外, *vfme* 也可激活 *vfmeKLMNOPQRSTUVWXYZ*、*vfmeFGHIJ* 和 *vfmeAZBCD*, 由此,在分子水平上增加了 VFM 信号合成相关基因的转录样本,实现了 VFM 信号的快速积累(图1)。与野生型菌株相比, *D. dadantii* 3937 *Δvfme* 突变体对非洲紫罗兰(*Saintpaulia ionantha*)的致病性明显减弱。2019年, LV 等^[9]在 *D. zeae* EC1 菌株中也发现了 *D. dadantii* 3937 同源 *vfme* 基因簇,该项研究表明: *Δvfme* 突变体中 zeamines(*D. zeae* EC1 分泌的一种抗生素类植物毒素)生物合成相关基因(*zmsK*、*zmsA*、*zmsC* 和 *zmsD*)以及 PCWDEs 合成相关基因的表达量均显著降低。此外,该菌株 *vfme* 群体感应系统还能够影响 T1SS(type I secretion systems)、T2SS、T3SS 和 T4SS 分泌系统基因的表达以及病原菌的运动性(motility)。BANERJEE 等^[10]研究表明, *D. dadantii* 的毒力与第二信使环二鸟苷酸(cyclic-di-GMP, c-di-GMP)有关,当环境中 c-di-GMP 浓度较低时, *vfme* 可作为效应蛋白与 c-di-GMP 结合激活果胶酶(pectate lyase, Pel)合

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	功能 Function
vfmE-F	ATGAGCTTACAGAACACCTACG	扩增
vfmE-R	TTAATTACAGAGGTTCTGGATATTATC	
recA-F	CAATCGGTCAAGGCAAGGCTAACG	
recA-R	ACACTCGGCACGGCTTCATTATC	
E-F	AACTGGTCGCTACCGATATTTC	荧光定量
E-R	CGGCGGAATGTTGTAGGTCTTGG	

菌株 DNA, 以此为模板进行 *vfmE* 基因扩增。PCR 扩增体系: PCR Mix 12.5 μ L, 上、下游引物各 20 pmol, DNA 模板 5 ng, ddH₂O 补足至 25 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 54 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。凝胶电泳检测, 回收产物与 pUCm-T 在 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 将其转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 涂布于含氨苄霉素 (ampicillin, Amp) 的 LB 培养基, 采用 Amp 抗性筛选与 α -互补现象筛选阳性克隆转化子, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析 通过 EXPASY 在线工具 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测和分析目的基因的分子质量、理论等电点、氨基酸等理化性质; 利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线工具分析蛋白质的亲/疏水性; 通过 Conserved Domain Search 软件预测 *vfmE* 蛋白保守结构域; 使用 NCBI 在线软件 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对功能和 DNAMAN 软件^[11]对 *vfmE* 蛋白的氨基酸序列进行同源性分析; 通过 SignalP-5.0 (<https://www.novopro.cn/tools/signalp>) 在线工具进行信号肽预测; 利用 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 在线工具进行跨膜结构预测^[12]; 利用 PSORTb version 3.0.3 (<https://www.psорт.org/psортb/>) 在线工具进行蛋白亚细胞定位; 利用 SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.htm) 在线工具对蛋白二级结构进行分析^[13]; 利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线工具进行蛋白质三级结构预测^[14]; 利用蛋白质互作网络数据库 (<https://string-db.org/>) 进行 *vfmE* 基因编码蛋白的互作预测^[15]。

1.2.4 RT-qPCR 分析 以 *recA* 为内参基因, 以 E-F

和 E-R 为引物 (表 1), 检测 *vfmE* 在 *D. fangzhongdai* *Onc5* 菌株侵染文心兰叶片过程中的相对表达量。取样方法参考苏初连等^[16]的方法作适当调整, 具体如下: 选取健康文心兰的叶片与长势一致的假鳞茎, 将清洗干净的叶片和假鳞茎浸泡于 1% NaClO 溶液中 15 min, 随后用无菌水清洗 3 遍, 置于无菌培养皿中。用无菌穿刺注射接种生长期文心兰叶片和假鳞茎, 每个接种点 5 μ L *D. fangzhongdai* *Onc5* 菌液 (浓度为 1×10^7 个/mL)。选择 0 h 以及发病期时间点取样 (3、6、9、12、18、24 h), 剪取接种点周边 1 cm $\times$ 1 cm 的叶片 (包括接种点在内), 每个时间点选取 12 个接种点, 每 4 个接种点为一个样本, 共计 3 个样本, 液氮速冻后置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

利用细菌总 RNA 抽提试剂盒提取 *D. fangzhongdai* *Onc5* 菌株总 RNA, 参照 cDNA 合成试剂盒自带试剂说明书的使用方法, 对 cDNA 的第一链进行生物合成。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μ L: TransStart[®] Top Green qPCR SuperMix (+Dye I) 10 μ L、cDNA 1 μ L、F-Primer 0.4 μ L、R-Primer 0.4 μ L 和 Nuclease-free water 8.2 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 s; 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 42 个循环; 在 72 $^{\circ}$ C 时收集荧光信号。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因的相对表达量。

1.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件处理试验数据, 采用 Duncan 法进行样本间差异显著性分析, $P < 0.01$ 表示差异显著。每组实验均重复 3 次。使用 Origin Pro 8 软件制图表。

2 结果与分析

2.1 *vfmE* 基因的克隆与序列分析

如图 2 所示, 在预期位置处出现单一条带, 且条带清晰明亮。将该产物连接到 pUCm-T 载体上克隆测序, 经序列比对分析, 成功克隆 *D. fangzhongdai* *Onc5 vfmE* 基因。对 *vfmE* 基因序列分析后发现, 该序列长 564 bp, 共编码 187 个氨基酸。通过 Conserved Domain Search 对该基因的氨基酸序列进行分析, 显示其具有 1 个保守结构域, 该结构域位于氨基酸序列的 172~426 位置, 为 AraC-superfamily 结构域 (图 3), 结果表明 *vfmE* 基因属于 AraC 转录激活蛋白家族成员。

与 GenBank 中注册的 *Dickeya* 属病原菌 *vfmE* 基因序列进行比对, 结果表明, *D. fangzhongdai*

Onc5 *vfmE* 与 *D. dadantii* 3937、*D. dianthicola* 16JP03、*D. poaceiphila* NCPPB 569、*D. solani* CFBP5647、*D. zeae* EC2、*D. chrysanthemi* Ech1591

和 *D. fangzhongdai* DSM 101947 菌株的同源性分别为 95.74%、94.86%、91.13%、96.93%、86.88%、89.18%和 98.82%。

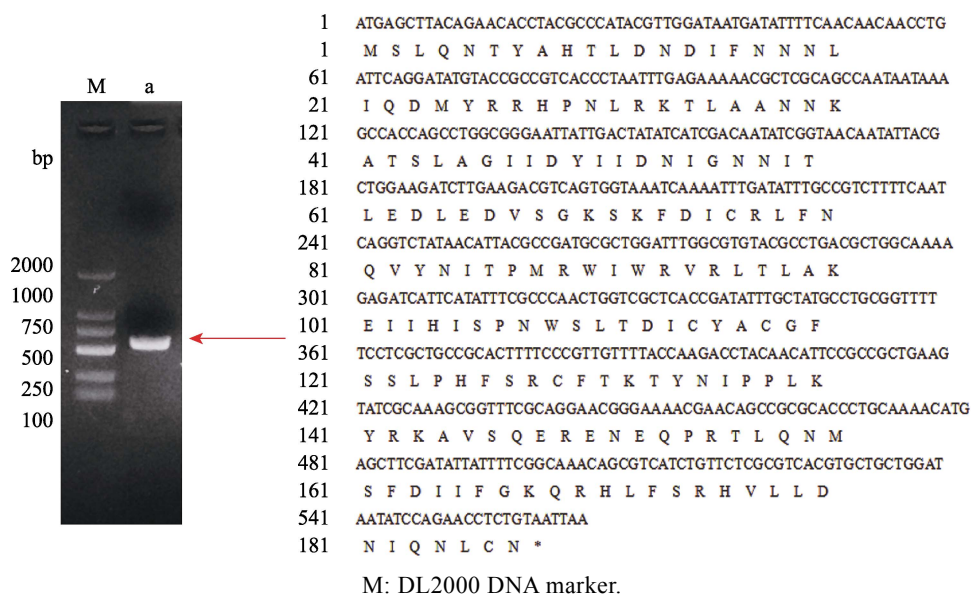


图 2 *D. fangzhongdai* Onc5 中 *vfmE* 基因的克隆
Fig. 2 Cloning *vfmE* gene from *D. fangzhongdai* Onc5



图 3 *vfmE* 蛋白的保守结构域预测
Fig. 3 Conserved domain prediction of *vfmE* protein

2.2 *vfmE* 蛋白理化性质分析

蛋白质的理化性质是蛋白质研究的基础。用 ExPASy 的在线软件 ProtParam 预测蛋白质分子式为： $C_{976}H_{1528}N_{278}O_{280}S_9$ ，蛋白质分子量为 21.93 kDa，理论等电点 (pI) 为 9.01，属于碱性蛋白质 (>7)；不稳定指数为 59.65，属于不稳定蛋白 (>40)。脂溶性指数为 91.28，亲水性平均系数为 -0.397。氨基酸疏水性是氨基酸的一种基本性质，疏水性氨基酸位于蛋白质内部，由于其疏水性的相互作用，故在保持蛋白质三级结构上起作用。*vfmE* 蛋白的氨基酸最大疏水位置为第 47 位异亮氨酸，最大值为 2.044，第 150 位谷氨酸出现最小值 -3.511 (图 4)，推测 *vfmE* 蛋白为结构不稳定的亲水性蛋白。

2.3 信号肽、跨膜区预测及亚细胞定位

TMMHM 预测结果表明，*vfmE* 蛋白不存在跨膜结构域，不是跨膜蛋白 (图 5A)。SignalP-5.0 预测结果显示，*vfmE* 蛋白不存在信号肽，不是分

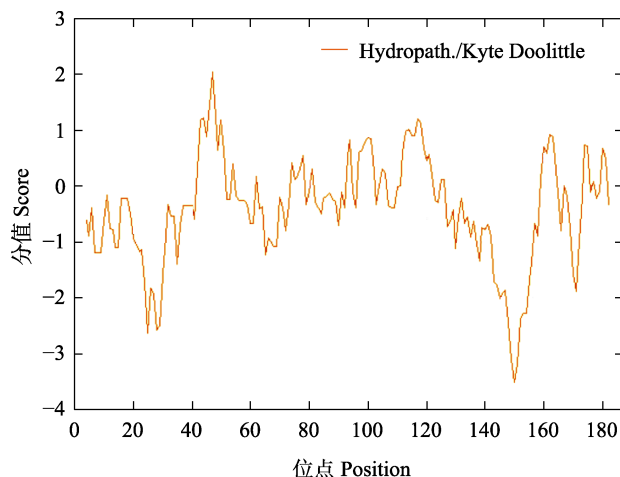


图 4 *vfmE* 蛋白氨基酸亲/疏水性分析
Fig. 4 *vfmE* protein hydrophilicity and hydrophobicity analysis

泌蛋白 (图 5B)。*D. fangzhongdai* Onc5 *vfmE* 蛋白亚细胞定位预测结果表明，*vfmE* 蛋白主要分布于细胞质，周质中也有少量分布。

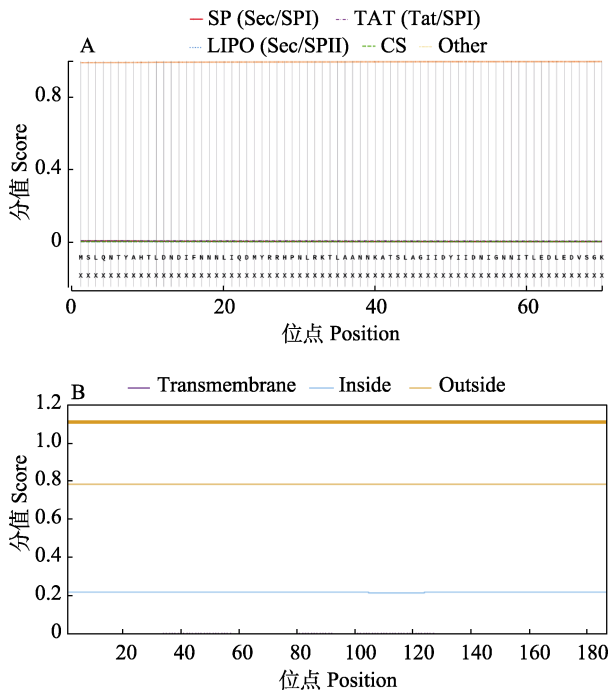
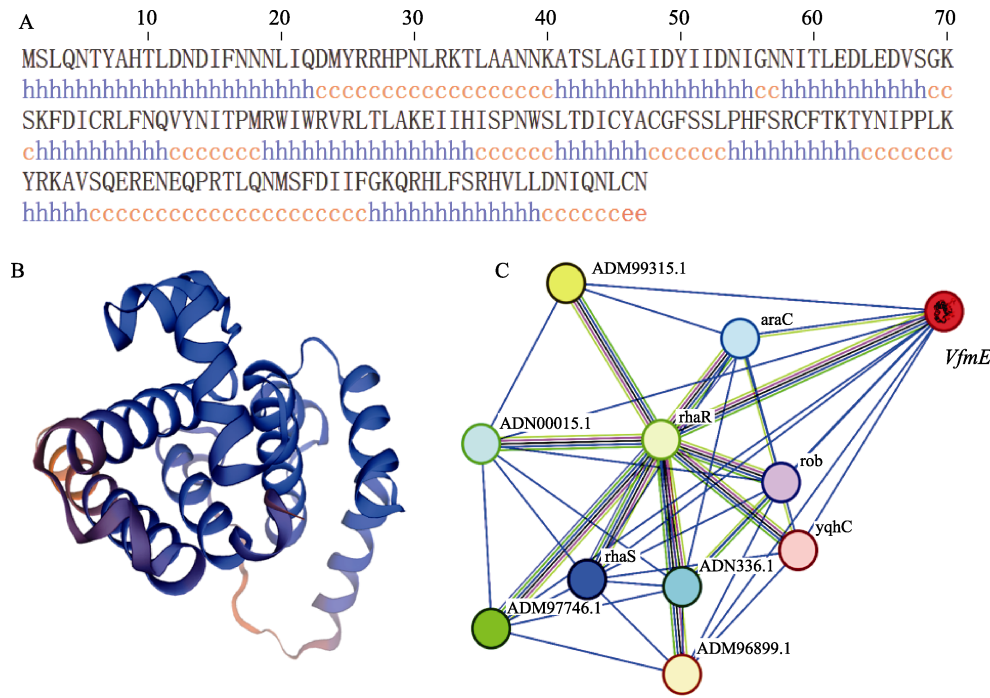


图 5 *D. fangzhongdai* *Onc5 vfmE* 蛋白信号肽 (A) 和跨膜区 (B) 预测

Fig. 5 Prediction of signal peptide (A) and transmembrane region (B) of *D. fangzhongdai* *Onc5 vfmE* protein



A: vfmE 蛋白质二级结构 (蓝色字母: α -螺旋; 黄色字母: 无规则卷曲; 红色字母: 延伸链); B: vfmE 蛋白质三级结构; C: vfmE 蛋白互作网络关系。

A: Secondary structure of vfmE protein(Blue letters: α -helix; Yellow letter: Random coil; Red letters: Extended strand); B: vfmE protein tertiary structure; C: Interaction network relationship of vfmE protein.

图 6 *D. fangzhongdai* *Onc5 vfmE* 蛋白高级结构预测与蛋白质互作网络关系分析

Fig. 6 Prediction of high level structure of Analysis of *D. fangzhongdai* *Onc5 vfmE* protein and analysis of the relationship between protein interactive network

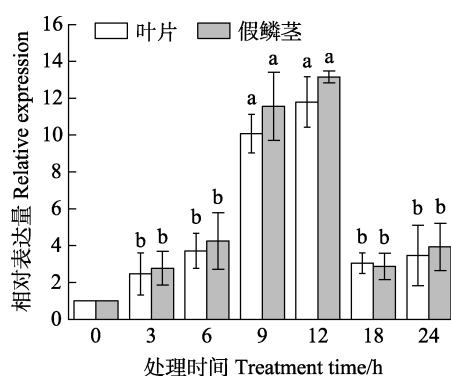
2.4 vfmE 蛋白高级结构预测与蛋白质互作网络分析

二级结构预测结果显示, vfmE 蛋白含有 3 种二级结构, 其中 α -螺旋区域有 109 个氨基酸, 占 58.29%, 延伸链区域有 2 个氨基酸, 占 1.07%, 无规则卷曲有 76 个氨基酸, 占 40.64%。从蛋白质整体结构来看, α -螺旋和无规则卷曲是 vfmE 蛋白的主要结构元件, 分散于整条多肽链 (图 6A)。本研究也对 *D. fangzhongdai* *Onc5 vfmE* 蛋白三级结构进行预测 (图 6B), 三级结构以 C6CFY9.1.A (*D. zeae* Ech1591 菌株中 AraC 家族转录因子) 为模版进行同源建模, 同源建模中要求序列相似度大于 30%^[14], 本研究中序列相似度为 96.26%, 说明结果可靠。得到的三级结构模型由 α -螺旋和无规则卷曲组成, 与二级结构预测结果相同。为了揭示 vfmE 基因编码蛋白之间的关系, 采用蛋白质互作网络数据库 (PPIs) 进行预测分析 (图 6C)。结果显示有 10 个蛋白质与 vfmE 蛋白互作, 即 AraC 家族转录调控蛋白 (ADM96899.1)、L-鼠李糖操纵子转录激活蛋白

(ADM99315.1)、L-鼠李糖结合蛋白(rhaR 和 rhaS)、2 个含 AraC 结构域的 Rob 蛋白(Right origin-binding protein)、2 个转录调控蛋白(ADN00015.1 和 ADN00336.1)、与诱导剂 1-阿拉伯糖互作的蛋白(araC)和 DNA 结合转录调控因子(yqhC)。

2.5 *vfmE* 基因在 *D. fangzhongdai* Onc5 中的表达分析

vfmE 在整个侵染过程中均持续高效表达,在接种的各个时间点的表达量均高于对照组。由图 7 可知,*vfmE* 在 *D. fangzhongdai* Onc5 侵染文心兰叶片和假鳞茎的过程中,其表达情况基本一致。在接种 3 h 后表达量明显上调;12 h 表达量达到最高;接种 18 h 时后,表达量明显下调且趋于稳定。可见,*vfmE* 基因在侵染的不同阶段均发挥着重要的作用。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.01$).

图 7 *vfmE* 基因在 *D. fangzhongdai* Onc5 侵染文心兰叶片和假鳞茎过程中的表达

Fig. 7 The expression of *vfmE* gene in the process of *D. fangzhongdai* Onc5 infecting *Oncidium* leaves and pseudobulb

3 讨论

现有研究表明 *vfmE* 基因与 *Dickeya* 属病原菌的新型群体感应系统的调控有关^[8, 10],但是关于 *vfmE* 基因分子特征的研究未见报道。本研究从文心兰 *D. fangzhongdai* Onc5 中克隆出 *vfmE* 基因,利用生物信息学软件对其理化性质、功能等情况进行预测分析。结果表明,文心兰 *vfmE* 基因全长 564 bp,共编码 187 个氨基酸,且在氨基酸水平上与 *Dickeya* 属其他病原菌的同源性较高,均在 86% 以上,说明 *vfmE* 基因在 *Dickeya* 属病原菌中高度保守。在亲疏水性上,*vfmE* 蛋白是一种亲水

性蛋白,且该蛋白不具有信号肽序列,为不稳定蛋白;在结构上,*vfmE* 蛋白不具备跨膜区域的结构,不属于跨膜蛋白,主要定位在细胞质,说明 *vfmE* 蛋白主要在胞内发挥作用。

vfmE 蛋白具有 1 个保守结构域,该结构域位于氨基酸序列的 172~426 位置,属于 AraC (amino acid response and amino sugar catabolism) 超家族成员。AraC 蛋白超家族广泛存在于细菌中,参与碳代谢、应激反应,到细菌毒力和致病性的多种生命活动的调节^[17-18]。汪瑶等^[19]研究发现,嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) J-35 株 AraC 家族成员 *aetY* 基因敲除后,细菌生物被膜形成能力和对斑马鱼的致病力均下降。ZHANG 等^[20]将 AraC 家族成员 *orf02889* 基因敲除后,嗜水气单胞菌 LP-2 菌株表型改变,主要表现为生物被膜形成能力和铁载体产量上升,但对斑马鱼的致病力减弱。SAHEBI 等^[21]研究表明 *Erwinia amylovora* EaUMG3 菌株中 *yqhC* 基因 (AraC 家族成员) 能够影响毒力因子的产生,如铁载体和胞外多糖 amylovoran 的产生,且 *E. amylovora* EaUMG3 突变体 $\Delta yqhC$ 的运动性及对梨的致病性均降低。以上研究表明,AraC 家族成员可能直接调控某些病原菌与毒力因子、生物被膜形成、运动性相关的基因的表达。本研究通过 RT-qPCR 技术检测了 *D. fangzhongdai* Onc5 在侵染文心兰过程中 *vfmE* 基因的差异表达。结果显示,*vfmE* 基因在侵染文心兰叶片和假鳞茎的各个阶段均有表达,其中在 12 h 的表达量最高,说明 *vfmE* 基因在侵染的不同阶段均发挥着重要的作用,参与了对 *D. fangzhongdai* Onc5 的致病调控。

本研究克隆了 *D. fangzhongdai* Onc5 中新型群体感应系统 *vfm* 中的关键调控基因 *vfmE*,并进行生物信息学分析及其在侵染文心兰过程中的差异表达进行检测,有助于进一步揭示 *vfmE* 基因的功能及其对 *Dickeya* 属病原菌致病性的调控机制。

参考文献

- [1] 王培育. 文心兰 miRNA 在生长发育及抗软腐病中的应用研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2018.
WANG P Y. Application research of *Oncidium hybridum* miRNA in growth and soft rot disease resistance[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2018. (in Chinese)
- [2] 杨学, 叶炜, 李永清, 江金兰, 曹奕鸯, 雷伏贵. 南茜文心

- 兰软腐病病原分离鉴定及致病性分析[J]. 亚热带植物科学, 2017, 46(3): 201-208.
- YANG X, YE W, LI Y Q, JIANG J L, CAO Y Y, LEI F G. Isolation, identification and pathogenicity analysis of soft rot pathogen from *Oncidium* 'Gower Ramsey'[J]. Subtropical Plant Science, 2017, 46(3): 201-208. (in Chinese)
- [3] LIU F, HU M, TAN X, XUE Y, LI C H, WANG S, LV M F, CHEN X Y, ZHOU X F, ZHANG L H, ZHOU J N. *Pseudomonas chlororaphis* L5 and *Enterobacter asburiae* L95 biocontrol *Dickeya* soft rot diseases by quenching virulence factor modulating quorum sensing signal[J]. Microbial Biotechnology, 2023, 16(11): 2145-2160.
- [4] 周佳暖, 姜子德, 张炼辉. 细菌性软腐病菌 *Dickeya* 致病机理的研究进展[J]. 植物病理学报, 2015, 45(4): 337-349.
- ZHOU J N, JIANG Z D, ZHANG L H. Research progress in the pathogenic mechanism of *Dickeya* spp.[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2015, 45(4): 337-349. (in Chinese)
- [5] HU M, LI J, CHEN R, LI W J, FENG L W, SHI L, XUE Y, FENG X Y, ZHANG L H, ZHOU J N. *Dickeya zeae* strains isolated from rice, banana and clivia rot plants show great virulence differentials[J]. BMC Microbiology, 2018, 18: 1-15.
- [6] HADIZADEH I, PEIVASTEGAN B, WANG J H, SIPARI N, NIELSEN K L, PIRHONEN M. Gene expression and phytohormone levels in the asymptomatic and symptomatic phases of infection in potato tubers inoculated with *Dickeya solani*[J]. PloS One, 2022, 17(8): e0273481.
- [7] LIU Z H, SUN L, LI L P, WEN H T, MIAO E A, AMER E A, WOZNIAK D J. *Pseudomonas aeruginosa* mediates host necroptosis through Rhl-Pqs quorum sensing interaction[J]. ImmunoHorizons, 2024, 8(9): 721-728.
- [8] NASSER W, DORE C, WAWRZYNIAC J, GIJSEGEN F V, GROLEAU M C, DEZIEL E C, REVERCHON C. Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of *Dickeya dadantii*[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(3): 865-880.
- [9] LV M, HU M, LI P, JIANG Z D, ZHANG L H, ZHOU J N. A two-component regulatory system VfmIH modulates multiple virulence traits in *Dickeya zeae*[J]. Molecular Microbiology, 2019, 111(6): 1493-1509.
- [10] BANERJEE B, ZENG Q, YU M D, HSUEH B Y, WATERS C M, YANG C H. Quorum-sensing master regulator vfmE is a c-di-GMP effector that controls pectate lyase production in the phytopathogen *Dickeya dadantii*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(2): e0180521.
- [11] WANG W. The molecular detection of *Corynespora Cassii-cola* on cucumber by PCR assay using DNAMAN software and NCBI[C]. New Delhi: Springer, 2016: 248-258.
- [12] 杨雨婷, 杨国平. 结核分枝杆菌 *Rv0081* 基因编码蛋白的生物信息学分析[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(5): 81-90.
- YANG Y T, YANG G P. *Mycobacterium tuberculosis* *Rv0081* gene encoding protein bioinformatic analysis[J]. Journal of Microbiology, 2023, 43(5): 81-90. (in Chinese)
- [13] 申悦, 崔方超, 李婷婷, 王当丰, 刘景云, 谭茜倩, 吕欣然, 励建荣. 大菱鲷源荧光假单胞菌群体感应淬灭酶基因的克隆及生物信息学分析[J]. 中国食品学报, 2022, 22(7): 64-75.
- SHEN Y, CUI F C, LI T T, WANG D F, LIU J Y, TAN Q Q, LYU X R, LI J R. Cloning and bioinformatics analysis of quorum sensing quenching enzyme gene from *Pseudomonas fluorescens* isolated from Turbot[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(7): 64-75. (in Chinese)
- [14] 王福彬, 吴晓云, 顾亚荣, 郑青波, 马晓明, 褚敏, 阎萍, 潘和平. 大通牦牛 *ApoA1* 基因克隆及生物信息学分析与组织表达谱分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(4): 752-761.
- WANG F B, WU X Y, GU Y R, ZHENG Q B, MA X M, CHU M, YAN P, PAN H P. Cloning, bioinformatics analysis and tissue expression profile analysis of *ApoA1* gene in *Bos grunniens*[J]. Genomics and Applied Biology, 2022, 41(4): 752-761. (in Chinese)
- [15] 蒋应磊, 罗超, 陈诗雯, 邵欣, 邹一萍, 陶飞, 薛应钰. 小麦条锈菌新菌系 CYR34 中 *CDK5* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 西北农业学报, 2024, 33(1): 133-140.
- JIANG Y L, LUO C, CHEN S W, SHAO X, ZHOU Y P, TAO F, XUE Y Y. Cloning and bioinformatics analysis of *CDK5* gene from a new wheat stripe rust strain CYR34[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2024, 33(1): 133-140. (in Chinese)
- [16] 苏初连, 康浩, 梅志栋, 杨石有, 刘晓妹, 蒲金基, 张贺. 芒果炭疽病菌侵染过程中致病基因的表达分析[J]. 生物技术通报, 2018, 34(10): 182-186.
- SU C L, KANG H, MEI Z D, YANG S Y, LIU X M, PU J J, ZHANG H. Expression analysis of pathogenic genes during the infection of *Colletotrichum gloeosporioides* to mango[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(10): 182-186. (in Chinese)
- [17] 常慧敏, 马香, 李宏, 唐燕琼, 王丹, 唐鸿倩, 刘柱. 维氏气单胞菌 *asfR* 基因敲除菌株的构建及功能初探[J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(5): 1037-1047.
- CHANG H M, MA X, LI H, TANG Y Q, WANG D, TANG H Q, LIU Z. Construction and functional identification of *asfR* knockout strain of *Aeromonas veronii*[J]. Genomics and Applied Biology, 2022, 41(5): 1037-1047. (in Chinese)
- [18] MARTIN R G, ROSNER J L. The AraC transcriptional ac-

- tivators[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2001, 4(2): 132-137.
- [19] 汪瑶, 董雨豪, 刘锦, 王楠楠, 陆承平, 刘永杰. 嗜水气单胞菌 AraC 家族转录调控因子 AetY 的功能[J]. *水产学报*, 2018, 42(9): 1473-1480.
- WANG Y, DONG Y H, LIU J, WANG N N, LU C P, LIU Y J. Functional analysis of *Aeromonas hydrophila* AraC-family transcriptional factor AetY[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(9): 1473-1480. (in Chinese)
- [20] ZHANG L S, SUN L, SRINIVASAN R, LIN M, GONG L Q, LIN X M. Unveiling a virulence-regulating mechanism in *Aeromonas hydrophila*: a quantitative exoproteomic analysis of an AraC-like protein[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1191209.
- [21] SAHEBI M, TARIGHI S, TAHERI P. The Arac - like transcriptional regulator YqhC is involved in pathogenicity of *Erwinia amylovora*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(2): 1319-1329.