

DSM-18020 菌株 *expI* 基因的克隆及生物信息学分析

程毅¹, 周静煌^{1,2}, 严准¹, 高春生¹, 李智敏¹, 余永廷¹

(1.中国农业科学院麻类研究所/南方经济作物研究中心, 湖南 长沙 410205; 2.湖南农业大学植物保护学院, 湖南长沙 410128)

摘要:为克隆和研究软腐病菌 *Dickeya dadantii* 的信号分子合成酶基因 *expI*, 从 *Dickeya* 属模式菌 DSM-18020 的基因组中扩增获得了基因 *expI*。生物信息学分析显示, 该基因全长 639 bp, 与 *Dickeya dadantii* 3937 的 N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactone, AHLs)合成酶基因同源性达 99%; DSM-18020 *expI* 编码的蛋白质相对分子质量为 24 704, 理论等电点为 5.85, 整个肽链中均匀分布疏水氨基酸, 且比亲水性氨基酸多, 没有信号肽存在; 将获得的 *expI* 基因构建到表达载体 pET-28α(+)并转入大肠杆菌 BL21(DE3), 诱导后的表达产物与理论值一致。

关键词: 迪基氏菌; DSM-18020 菌株; 群体信号分子合成酶基因 *expI*; 生物信息学

中图分类号: Q785 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2018)01-0039-06

Cloning and bioinformatics analysis of *expI* gene from strain DSM-18020

CHENG Yi¹, ZHOU Jinghuang^{1,2}, YAN Zhun¹, GAO Chunsheng¹, LI Zhimin¹, YU Yongting¹

(1.Institute of Bast Fibre Crops and Centre of Southern Economic Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205, China; 2.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: In order to study the signal molecule synthase gene *expI* of *Dickeya dadantii*, the gene *expI* was amplified from the genome of the type strain DSM-18020. Bioinformatics analysis showed that there was a complete open reading frame (ORF) in DSM-18020 *expI*, which was 639 bp in length and had 99% homology to N-acyl-homoserine lactone (AHLs) synthetase of *D. dadantii* 3937. The molecular weight of the protein encoded by DSM-18020 *expI* is 24,704, and the theoretical isoelectric point is 5.85. The hydrophobic amino acids are more abundant than hydrophilic amino acids and distributed evenly throughout the peptide chain, with no signal peptide. *expI* gene was cloned into the expression vector pET28α and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The expression product was basically identical with the expectation.

Keywords: *Dickeya*; DSM-18020 strain; signal molecular synthetase gene *expI*; bioinformatics

Dickeya 属是近年来从植物病原细菌菊果胶杆菌中分离出来的一个新属^[1]。该属细菌能产生大量果胶酶、纤维素酶等胞外酶类, 可降解植物组织, 瓦解植物防御体系, 导致植物组织或器官发生萎蔫, 甚至腐烂^[2]。现已发现的对农作物或花卉有致病性的 *Dickeya* 属细菌主要有 7 个种, 分别为: *D.*

chrysanthemi、*D. dianthicola*、*D. dieffenbachiae*、*D. paradisiaca*、*D. dadantii*、*D. zeae* 和 *D. solan*^[3-7], 其中, 对 *D. dadantii* 的研究较为深入, 被发现可引起多种园艺作物和观赏植物的软腐病(也称褐腐病或基腐病), 主要寄主有马铃薯、甘薯、香蕉、玉米、菠萝、康乃馨、菊花等^[8]。在生产中发现 *Dickeya*

的部分种比黑胫病菌(*E. carotovora* pv. *atroseptica*)的致病性更强^[1]。

研究表明, *Dickeya* 致病相关胞外酶的分泌受群体感应(quorum sensing, QS)系统调控^[9]。当宿主植物周围只有少量 *Dickeya* 细菌存在时, *Dickeya* 细菌并不侵染植物组织产生病害。只有当病原菌群的数量超过一定阈值时, 才会激发病原细菌分泌大量胞外酶, 从而击溃植物防御系统。该属细菌的群体感应主要依赖于 ExpR-ExpI 双组分系统, 以产生和接受信号分子, 主要释放的信号分子是 N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactone, AHLs)。AHL 为小分子化合物, 可穿透细胞膜并在环境中积累, 当积累到一定浓度时, 它可以结合到细胞内相应受体 ExpR 蛋白氨基酸残端部位, 激活所调控的生理特征的表达, 从而诱发 *Dickeya* 病菌产生大量分解酶^[9]。N-3-氧-几酰高丝氨酸内酯(3-Oxo-C6-HSL, OHHL)和 N-几酰高丝氨酸内酯(C6-HSL, HHL)由 AHLs 信号分子合成酶 *expI* 基因编码产生^[10]。*expI* 基因的突变可显著影响菌株的果胶酶 *PelA* 和 *PelB* 的产生, 从而改变其对植物组织的降解作用。*expI* 基因的突变还可加强细胞活性, 减少生物膜的形成, 导致部分病原菌对水稻和马铃薯的侵染能力变弱^[11]。近年来的研究表明, 少量的信号分子 AHL 可激发植物的防御系统, 导致植物多个防御机制的上调^[12-13]。宋水山等^[12]用几种细菌信号分子 AHL 处理拟南芥、马铃薯易受软腐病菌侵染的植株, 发现植株体内与自身抗病反应相关的酶的活性提高, 拟南芥对由软腐欧文氏菌引起的软腐病的抗性增加, 这说明 AHL 可在植物体内传送并诱导植物防御系统产生抗性, 因此, *D. dadantii* AHLs 信号分子合成酶基因 *expI* 的研究对防治 *D. dadantii* 细菌造成的软腐病有重要意义。

笔者以 *D. dadantii* 的模式菌 DSM-18020 基因组 DNA 为模板, 克隆了信号分子合成酶基因 *expI*, 利用生物信息学软件对 DSM-18020 菌株 *expI* 基因的 DNA 序列进行了生物信息分析, 构建了重组工程菌 pET28a-*expI*/BL21 并诱导表达。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)购自北京擎科生物公司; *Dickeya dadantii* 模式菌株 DSM-18020 购自德国微生物菌种保藏中心(DSMZ); 载体 pET-28a(+)购自 Novagen; 限制性内切酶 *Hind*III 和 *Bam*H I 购自 Thermo Fisher; 质粒提取试剂盒使用 OMEGA 提供的 Plasmid Mini Kit I。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化与基因操作

保存的菌株 DSM-18020, 置于 35 °C 摇床 LB 培养基中活化。细菌 DNA 提取与纯化、PCR 扩增、DNA 连接与转化、琼脂糖凝胶电泳、原核表达与 SDS-PAGE 检验均参照文献^[14]进行。

1.2.2 目的基因的克隆

据 GenBank 上公布的 *E. chrysanthemi expI* 基因参考序列(GenBank 登录号 X96440)^[15]设计引物, 扩增引物为 F_{expI6} (5'-CGGGATCCATGTTAGAAATATTTGATG-3') 和 F_{expI6} (5'-CCCAAGCTTGTCTCAAGCCAGTGGGACCAG-3')(下划线部分分别为引入的酶切位点 *Bam*H I 和 *Hind*III)。以 DSM-18020 总 DNA 为模板扩增 *expI* 基因。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 20 s; 共 30 个循环。扩增产物经电泳检测后用 Gel Extraction Kit 纯化, 置于 -20 °C 备用。

1.2.3 生物信息学分析

通过 NCBI 数据库中的 BLASTx 对 DSM-18020 *expI* 的 DNA 序列及编码的氨基酸进行同源性搜索以及比对; 通过 MEGA 比较分析 *D. dadantii* DSM-18020 *expI* 基因与 *Dickeya* 属其他种 *expI* 基因的进化关系, 同时构建分子进化树; 通过 ExPASy 数据库(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测 DSM-18020 *expI* 基因编码的蛋白质等电点和其相对分子质量; 通过 ProtScale(<http://www.expasy.ch/tools/prot-scale.html/>)分析 *expI* 编码的蛋白质产物的疏水性和亲水性; 用 SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/>)

services/SignalP/) 预测其信号肽的存在状态；用 Psipred(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 对 DSM-18020 *expI* 基因编码的蛋白质进行二级结构预测；用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>) 对 *expI* 编码蛋白质进行三级结构预测^[15-16]。

1.2.4 载体的构建与表达

用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 对获得的 DNA 片段进行双酶切, 连接到表达载体 pET-28a(+) 上相对应的位点上, 获得重组质粒 pET28a-*expI*。连接产物先转化进大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单斑克隆, 提取质粒酶切验证。将重组成功的质粒 pET28a-*expI* 转入 BL21 感受态细胞中, 并用 100 μ g/mL 卡那霉素 37 $^{\circ}$ C 筛选培养^[17-18]。

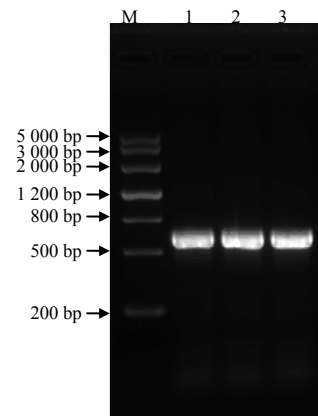
取 3 mL 过夜培养菌液接种到 200 mL 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD_{600} 达 0.6。加入 1×10^{-3} mol/L IPTG, 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 诱导表达 3 h。以宿主菌全菌为参照, 分别取 0.2 mL 菌液, 超声磨碎菌体后 12 000 r/min 离心 2 min, 加入 4 \times Loading Buffer 裂解后进行 SDS-PAGE 检测^[19-20]。

2 结果与分析

2.1 DSM-18020 *expI* 基因的克隆

以 DSM-18020 的总 DNA 为模板, F_{expI6} 和 R_{expI6} 为引物, 从 DSM-18020 中克隆出 *expI* 基因 (GenBank 登录号 MF974565), 基因大小为 639 bp,

PCR 电泳结果如图 1 所示。



M 5 000 bp 分子量标准; 1~3 DSM-18020 *expI* PCR 产物。
图 1 DSM-18020 *expI* 基因 PCR 扩增电泳结果

Fig.1 PCR of DSM-18020 *expI* gene

2.2 DSM-18020 *expI* 基因的生物信息学分析

2.2.1 *expI* 基因编码的氨基酸序列比对

运用 NCBI 中的 ORF 对 DSM-18020 *expI* 基因 DNA 的测序序列进行查找翻译, 并用 Blastp 验证正确的 ORF 区, 得到它的氨基酸序列。Blastp 结果表明, DSM-18020 *expI* 基因与 *D. dadantii* 的 N-酰基高丝氨酸内酯合成酶基因同源性最高, 为 99%, 其后依次是与 *D. solani*、*D. dianthicola* 以及 *D. zea* 的 AHLs 合成酶基因, 同源性分别为 95%、94% 和 92%。用 DNA_{MAN} 进行氨基酸多序列比对, 结果显示所比对的 9 个氨基酸序列一致性高达 97.01% (图 2、图 3)。

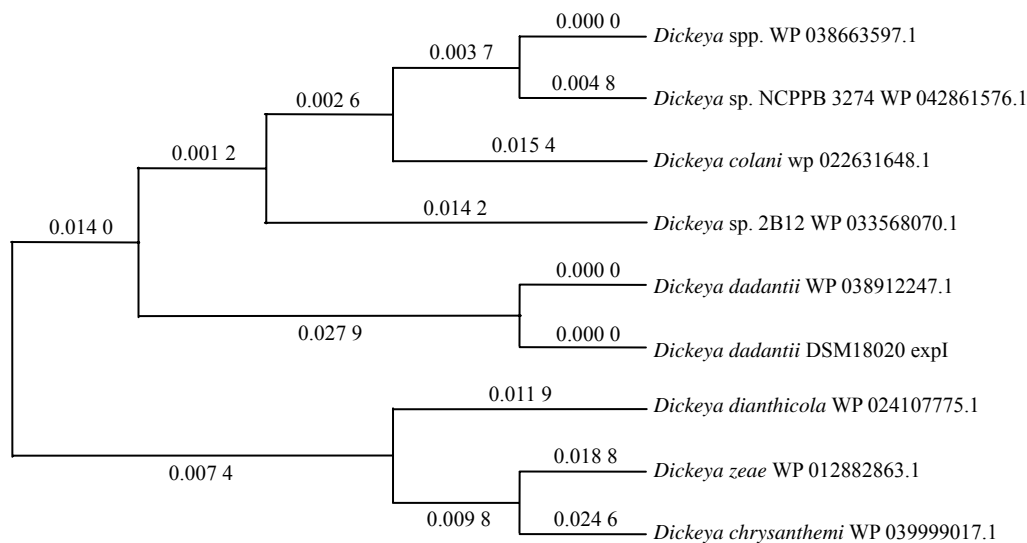


图 2 基于 *expI* 基因编码的蛋白序列的进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on amino acid residues coded by *expI* gene

<i>D. dadantii</i>	WP 0389	MLEIFDVFSLSMNNKLDVEFALRRKTFKDRLDWVNCINGMEFDEYDNEHTTYLLGKKGKVICSVRFI	70
<i>D. spp.</i>	WP 0386	MLEIFDVFSLSMNNKLDVEFALRRKTFKDRLDWVNCINGMEFDEYDNEHTTYLLGKKGKVICSVRFI	70
<i>D. sp. NCPPB 3274</i>	WP 0428	MLEIFDVFSLSMNNKLDVEFALRRKTFKDRLDWVNCINGMEFDEYDNEHTTYLLGKKGKVICSVRFI	70
<i>D. sp. 2B12</i>	WP 0335	MLEIFDVFSLSMNNKLDVEFALRRKTFKDRLDWVNCINGMEFDEYDNEHTTYLLGKKGKVICSVRFI	70
<i>D. dianthicola</i>	WP 0241	MLEIFDVFSLSMNNKLDVEFALRRKTFKDRLDWVNCINGMEFDEYDNEHTTYLLGKKGKVICSVRFI	70
<i>D. solani</i>	WP 0226	MLEIFDVFSLSMNNKLDVEFALRRKTFKDRLDWVNCINGMEFDEYDNEHTTYLLGKKGKVICSVRFI	70
<i>D. zeae</i>	WP 0128	MLEIFDVFSLSMNNKLDVEFALRRKTFKDRLDWVNCINGMEFDEYDNEHTTYLLGKKGKVICSVRFI	70
<i>D. chrysanthemi</i>	WP 0399	MLEIFDVFSLSMNNKLDVEFALRRKTFKDRLDWVNCINGMEFDEYDNEHTTYLLGKKGKVICSVRFI	70
<i>D. dadantii</i>	DSM18020	MLEIFDVFSLSMNNKLDVEFALRRKTFKDRLDWVNCINGMEFDEYDNEHTTYLLGKKGKVICSVRFI	70
Consensus		mleifdvfsfslmsnnklddevftlrk tfkdrldwtvncingmefdeydneyhttyllgkkgkviicsvrfi	
<i>D. dadantii</i>	WP 0389	EMKYPNMITGTFESYFDGLNIPGNYIESSRFFVDRDRVRNLIGTRNPACLTFLFLAMINYARKYHYDGI	140
<i>D. spp.</i>	WP 0386	EMKYPNMITGTFESYFDGLNIPGNYIESSRFFVDRDRVRNLIGTRNPACLTFLFLAMINYARKYHYDGI	140
<i>D. sp. NCPPB 3274</i>	WP 0428	EMKYPNMITGTFESYFDGLNIPGNYIESSRFFVDRDRVRNLIGTRNPACLTFLFLAMINYARKYHYDGI	140
<i>D. sp. 2B12</i>	WP 0335	EMKYPNMITGTFESYFDGLNIPGNYIESSRFFVDRDRVRNLIGTRNPACLTFLFLAMINYARKYHYDGI	140
<i>D. dianthicola</i>	WP 0241	EMKYPNMITGTFESYFDGLNIPGNYIESSRFFVDRDRVRNLIGTRNPACLTFLFLAMINYARKYHYDGI	140
<i>D. solani</i>	WP 0226	EMKYPNMITGTFESYFDGLNIPGNYIESSRFFVDRDRVRNLIGTRNPACLTFLFLAMINYARKYHYDGI	140
<i>D. zeae</i>	WP 0128	EMKYPNMITGTFESYFDGLNIPGNYIESSRFFVDRDRVRNLIGTRNPACLTFLFLAMINYARKYHYDGI	140
<i>D. chrysanthemi</i>	WP 0399	EMKYPNMITGTFESYFDGLNIPGNYIESSRFFVDRDRVRNLIGTRNPACLTFLFLAMINYARKYHYDGI	140
<i>D. dadantii</i>	DSM18020	EMKYPNMITGTFESYFDGLNIPGNYIESSRFFVDRDRVRNLIGTRNPACLTFLFLAMINYARKYHYDGI	140
Consensus		emkypnmitgtfesyfdglnipegnyie SSRFFVDRDRVRNLIGTRNPACLTFLFLAMINYARKYHYDGI	
<i>D. dadantii</i>	WP 0389	TIVSHPMTLTKRSGWRISIIQQGLSERQEIYLLHLPDDSRALIERITRITNAESEQLTPLLV	209
<i>D. spp.</i>	WP 0386	TIVSHPMTLTKRSGWRISIIQQGLSERQEIYLLHLPDDSRALIERITRITNAESEQLTPLLV	209
<i>D. sp. NCPPB 3274</i>	WP 0428	TIVSHPMTLTKRSGWRISIIQQGLSERQEIYLLHLPDDSRALIERITRITNAESEQLTPLLV	209
<i>D. sp. 2B12</i>	WP 0335	TIVSHPMTLTKRSGWRISIIQQGLSERQEIYLLHLPDDSRALIERITRITNAESEQLTPLLV	209
<i>D. dianthicola</i>	WP 0241	TIVSHPMTLTKRSGWRISIIQQGLSERQEIYLLHLPDDSRALIERITRITNAESEQLTPLLV	209
<i>D. solani</i>	WP 0226	TIVSHPMTLTKRSGWRISIIQQGLSERQEIYLLHLPDDSRALIERITRITNAESEQLTPLLV	209
<i>D. zeae</i>	WP 0128	TIVSHPMTLTKRSGWRISIIQQGLSERQEIYLLHLPDDSRALIERITRITNAESEQLTPLLV	209
<i>D. chrysanthemi</i>	WP 0399	TIVSHPMTLTKRSGWRISIIQQGLSERQEIYLLHLPDDSRALIERITRITNAESEQLTPLLV	209
<i>D. dadantii</i>	DSM18020	TIVSHPMTLTKRSGWRISIIQQGLSERQEIYLLHLPDDSRALIERITRITNAESEQLTPLLV	209
Consensus		tivshpmtllkrsgwrisiqqglserqekiyllhlptddesryalieritqit aeseqlktpllv	

图 3 *expI* 基因编码蛋白的序列差异性比对

Fig.3 Difference comparison for protein sequence coded by *expI* gene

2.2.2 *expI* 基因编码蛋白的理化性质

用 ProtParam 在线工具分析蛋白序列的理化性质。结果表明, *expI* 基因编码的氨基酸为 212 个; 蛋白的相对分子质量为 24 704; 理论等电点为 5.85 (图 4)。在组成蛋白质的 20 种氨基酸中, 亮氨酸(Leu) 所占比例最高, 为 11.8%。DSM-18020 *expI* 编码蛋白氨基酸是带正电荷的碱性氨基酸百分比稍小于带负电荷的酸性氨基酸, 不稳定系数为 45.85, 蛋白结构不稳定, 属于不稳定蛋白。

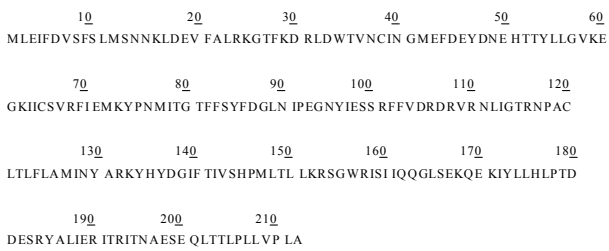


图 4 DSM-18020 *expI* 编码的蛋白序列

Fig. 4 Protein sequence encoded by DSM-18020 *expI*

2.2.3 *expI* 基因编码蛋白的疏水性与信号肽

蛋白质亲疏水性氨基酸的组成是蛋白质折叠的主要动力, 通过预测蛋白质疏水性可以反映其折叠情况^[14-16]。利用在线分析软件 ProtScale 分析 DSM-18020 *expI* 编码的蛋白质的疏水性/亲水性。结果表明, DSM-18020 *expI* 编码的蛋白质存在明显的亲水区和疏水区, 疏水区较多。

利用在线分析工具 SignalP 4.1 Serer 对 DSM-18020 菌株 *expI* 基因编码的蛋白质进行信号肽预测, 结果发现, 信号肽 *S* 值在第 1~22 个氨基酸上, 分值为 0.109, 其最大值在第 22 个氨基酸上, 分值为 0.131, 小于 0.5, 无信号肽存在。

2.2.4 *expI* 基因编码蛋白的二、三级结构

运用在线工具 Psipred 对 DSM-18020 *expI* 基因编码的蛋白质进行二级结构预测, 无规则卷曲占比最高, 为 50%, α 螺旋和 β 折叠分别为 29.72%和 20.28%(图 5)。用 SWISS-MODEL 在线工具对编码

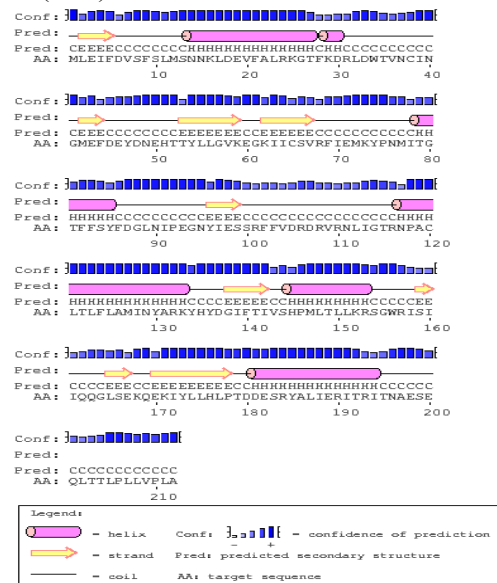


图 5 *expI* 基因编码蛋白的二级结构预测

Fig.5 Secondary structure prediction

蛋白的三级结构进行建模,结果(图 6)显示,该蛋白具有 5 个不保守的结合位点,推测这些位置可能与 AHLs 受体蛋白结合和相关基因的表达调控有关。

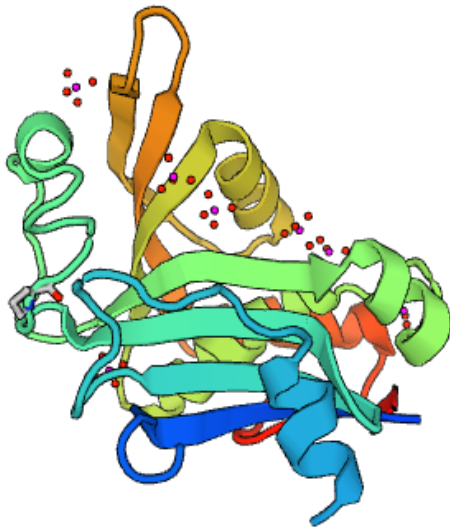
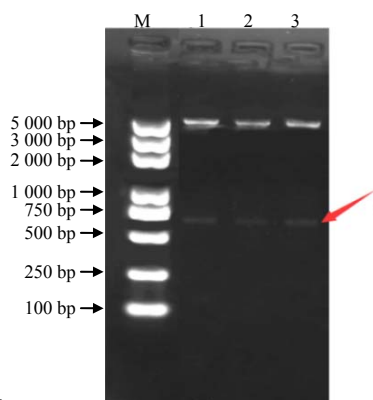


图 6 *expI* 基因编码蛋白的三级结构预测
Fig.6 Tertiary structure prediction

2.3 重组菌株鉴定与诱导表达

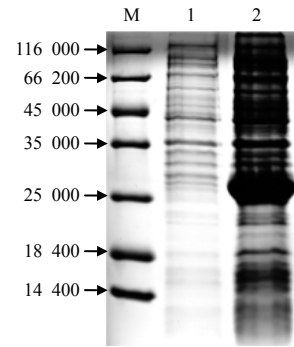
载体同时用 *Hind*III 和 *Bam*HI 内切酶酶切后,回收目的片段后连接,再分别转入 DH5 α 和 BL21 菌株,挑选阳性克隆后对重组质粒进行双酶切,双酶切条带均为 639 bp,与目的基因条带一致(图 7)。筛选获得 pET28 α -*expI*/BL21 菌株用于诱导表达和 SDS-PAGE 检测,与对照菌株 *E. coli* BL21(DE3)相比,pET28 α -*expI*/BL21 菌株在 25 000 附近有明显的特异蛋白条带(图 8),与预测的目的蛋白大小基本一致。



1 pET28 α -*expI* 重组质粒对照 ;2、3 从 pET28 α -*expI* /DH5 α 、pET28 α -*expI* /BL21 提取的质粒。

图 7 pET28 α -*expI*/重组质粒的双酶切鉴定结果

Fig.7 Double digestion of recombinant plasmids pET28 α -*expI*



1 *E. coli* BL21(DE3)全蛋白;2 IPTG 诱导的工程菌 pET28 α -*expI* /BL21 全蛋白。

图 8 重组菌株 pET28 α -*expI*/BL21 的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.8 SDS-PAGE electrophoresis of the recombinant strain pET28 α -*expI*/BL21

3 结论与讨论

病原菌致病侵染过程中的致病因子包括胞外多糖、细胞壁降解酶的分泌以及毒素的产生等,均受到群体感应系统的调控^[9-10]。*Dickeya* 属细菌主要利用 *ExpR-ExpI* 型 QS 系统调节病原菌分泌大量的胞外酶来击溃植物防御^[11]。*expI* 基因与 *LuxI*、*TraI*、*LasI* 基因有高度的同源性。*expI* 基因可调控胞外酶的表达,*expI* 基因发生突变的菌株,其胞外酶缺失,无法产生大量果胶酶 *pelA* 和 *pelB*,会减少对植物组织的降解作用,致病性明显降低^[2]。通过研究 *expI* 基因,可以深入了解 *Dickeya* 属细菌的群体感应现象。通过引起 *expI* 基因的突变,干扰 AHL 的生物合成途径,切断 AHL 的生物合成,可作为有效的阻断群体感应的研究靶点,用于防控其引发的植物软腐病。

从 *D.dadantii* 属模式菌 DSM-18020 中克隆了信号分子合成酶基因 *expI*,DSM-18020 *expI* 基因测序结果比对显示其与 *Dickeya* 属其他种细菌的 *expI* 基因相似度较高。对该属 *D. solani*、*D.zea* 的 *expI* 基因序列比对发现,该基因序列存在一定的变异性。这客观上也增加了各个种 *expI* 基因克隆的难度。根据已报道的 *expI* 序列数据设计了 6 对引物,通过优化筛选确立了引物 *F_{expI6}-R_{expI6}* 能有效扩增模式菌 DSM-18020 的 *expI* 基因,为后期工作打定了基础。初步对 DSM-18020 的 *expI* 基因序列进行分析。结果显示该基因编码 212 个氨基酸,且具有自诱导肽合成酶序列。这一特征是群体感应信号分子合成酶的重要指标,也是调节信号分子合成的重

要单元。DSM-18020 *expI* 编码的蛋白不含信号肽，可能因为其产物属于小分子，本身能够自由穿过细胞膜发挥其生物学功能。

参考文献：

- [1] 周佳暖,姜子德,张炼辉,等.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):338-349.
- [2] 黄媛媛,边子睿.胡萝卜软腐欧文氏菌中信号分子合成酶 *expI* 基因的克隆、表达及其分析[J].生物学杂志,2012,29(4):60-64.
- [3] ZHOU J N, ZHANG H B, WU J, et al. A novel multidomain polyketide synthase is essential for zeamine antibiotics production and the virulence of *Dickeya zeae*[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2011, 24(10): 1156-1164.
- [4] SLAWIAK M, van BECKHOVEN J R C M, SPEKSNIJDER A G C L, et al. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe[J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 125(2): 245-261.
- [5] TOTH I K, van der WOLF J M, SADDLER G, et al. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe [J]. Plant Pathology, 2011, 60(3): 385-399.
- [6] SAMSON R, LEGENDRE J B, CHRISTEN R, et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi*(Burkholder et al) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. Nov., *Dickeya dianthicola* sp. Nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 1415-1427.
- [7] MA B, HIBBING M E, KIM H S, et al. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*[J]. Phytopathology, 2007, 97(9): 1150-1163.
- [8] GRENIER A, DUPORT G, PAGE S, et al. The phytopathogen *dickeya dadantii*(*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1956-1965.
- [9] 罗利龙, 娄瑞娟, 邱健, 等. 细菌群体感应及其干扰策略的研究进展[J]. 生物学杂志, 2010, 27(6): 79-82.
- [10] 陈峰. 微生物的群体感应信号分子[J]. 上海农业学报, 2005, 21(1): 98-102.
- [11] HUSSAIN M B B M, ZHANG H B, XU J L, et al. The acyl-homoserine lactone-type quorum-sensing system modulates cell motility and virulence of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(3): 1045-1053.
- [12] 宋水山. N-酰基高丝氨酸内酯介导的细菌与其真核宿主之间的信息交流[J]. 中国细胞生物学学报, 2010, 32(2): 331-335.
- [13] HUSSAIN M B B M, ZHANG H B, XU J L, et al. Integration of the quorum-sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*[J]. Molecular Microbiology, 1998, 29(6): 1407-1418.
- [14] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] ZHANG J X, LIN B R, SHEN H F, et al. Genome sequence of the banana pathogen *Dickeya zeae* strain MS1, which causes bacteria soft rot[J]. Genome Announcements, 2013, 1(3): e00317-13.
- [16] 送顺, 金志强. 香蕉 *MaERF-1* 基因的克隆、序列分析及表达载体构建[J]. 热带作物学报, 2017, 38(1): 76-82.
- [17] 陈儒钢, 文超. 辣椒水通道蛋白基因 *CaAQP* 的克隆与序列分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(20): 4323-4329.
- [18] 杨成军. 甘蓝型油菜 *CHSA*、*CHSB* 基因以及 *WRKY44* 同源基因片段的克隆与序列分析[D]. 重庆: 西南农业大学, 2004.
- [19] 王敏敏, 赵婕, 常亚磊, 等. 双酶切和无缝克隆方法构建 HCVCORE 表达载体的比较[J]. 山西医药杂志, 2017, 46(3): 267-270.
- [20] 高海有. β -甘露聚糖酶和木聚糖酶基因在大肠杆菌中共表达[J]. 微生物学通报, 2012, 39(3): 344-352.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维