文章编号:1674-7054(2020)02-0217-06

转录调节因子 VrhR 负调控野油菜黄单胞菌的致病力

张 钰1.2,林茂娟2,李 婷1.2,李春霞2,陈银华2,陶 均2

(1. 海南大学生命科学与药学院海口, 570228; 2. 海南大学海南省热带生物资源可持续利用 重点实验室/热带作物学院,海口 570228)

摘 要: 以野油菜黄单胞菌(Xanthomonas campestris pv. campestris, Xcc)转录调节因子 VrhR, VrhA 和 VrhB 为研究对象, 通过基因敲除和致病性分析确定它们在 Xcc 与宿主互作过程中的作用。结果表明: VrhR 只含有 HTH(helix-turn-helix)结构域; 在基因组上 vrhR 位于其他 2 个 lysR 类转录调节因子(vrhA 和 vrhB)之间, 但转录方向相反。vrhR 突变会提高 Xcc 的致病能力, 但 vrhA 和 vrhB 突变对病原菌的致病能力 没有影响。同时, vrhR, vrhA 和 vrhB 突变均不影响细菌的运动性及胞外酶(蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶)的 活性。

关键词:野油菜黄单胞菌;HTH 转录调节因子; VrhR; 致病性
 中图分类号: S 43.4⁺2;Q 756
 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdswxb.2020.02.012

在原核生物中, 超过 95% 的 DNA 结合蛋白含有螺旋-转角-螺旋(Helix-turn-helix, HTH)基序(motif), 其余的 DNA 结合蛋白可能具有螺旋-环-螺旋(Helix-loop-helix)、锌指(zinc-finger)和反向 β 折叠(antiparallel β-sheet)等结构域。HTH 基序大约由 20 个氨基酸组成, 有 2 个 α 螺旋和 1 个连接型转角, 第 1 个 α螺旋起到稳定的作用,第2个α螺旋通过氢键和疏水作用与 DNA 结合[1-2]。HTH 在基因表达调控中起 到非常重要的作用,所有已知的 LysR 类转录调节因子和绝大多数的 DNA 结合型响应调节因子都含有 HTH^[3]。绝大多数 HTH 蛋白含有其他调节其活性的结构域,通过感应特殊的信号分子影响 HTH 结构以 及与 DNA 的结合能力^[4-5], 同时, 这些结构域还可能与其他蛋白互作进而影响其与 DNA 的结合效率^[3-4]。 在目前发现的调控蛋白中,只具有 HTH 结构的调控蛋白占比很少。只具有 HTH 结构的调控蛋白由于缺 乏信号感应或蛋白互作的结构域,其调控机制仍需进一步研究。野油菜黄单胞菌(Xanthomonas campestris pv. campestris, Xcc)是十字花科植物重要的病原菌,也是研究病原细菌与宿主互作的重要模式 菌株⁶⁶。Xcc 成功侵染宿主依赖于毒力相关基因的有序表达,并受到严格的调控⁶⁶。只有细菌感应到宿主 信号并启动侵染相关基因表达后,细菌才能进入植物体内、逃脱植物的防卫反应并成功繁殖。在该过程 中,转录调节因子起着非常重要的作用。目前已在 Xcc 中分离鉴定了一系列与致病相关的转录调节因 子, 且大部分都具有 HTH 结构域[7-13]。如 HrpX 和 HrpG 调控 III 型分泌系统及效应因子的表达[10-12]; Clp 作为全局性的转录调节因子与细胞第二信使 C-di-GMP 结合调节细胞群体感应和致病力相关的基 因表达^[7-9]; FleQ 可以调节细菌鞭毛合成相关基因的表达,影响细菌的运动能力和生物膜(biofilm)的形 成[13-14]。这些转录调节因子都具有 HTH 结构域和感应信号或蛋白互作的结构域。本研究分析了同一个 基因簇中3个 LysR 类转录调节因子(VrhA, VrhB和 VrhR)对 Xcc 致病力的影响及其可能调控的致病相 关因子,发现 VrhR 可负调控 Xcc 的致病力,为进一步了解 VrhR 的功能及其调控通路奠定基础。

收稿日期: 2019-11-24 修回日期: 2019-12-29

基金项目:海南大学科研启动基金(kyqd1546);海南省自然科学基金(20163049;20163050)

第一作者: 张钰(1994-), 女, 海南大学生命科学与药学院 2017 级硕士研究生. E-mail: 976822326@qq.com

通信作者: 陶均(1976-), 男, 副研究员, 博士. 研究方向: 病原微生物与宿主互作机制研究. E-mail: taoj@hainu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料 Xcc 8004 由本实验室保存于-80 ℃ 冰箱; 普通化学试剂购自广州化学试剂公司; PCR 试剂购 自诺唯赞生物科技有限公司; 限制性内切酶购自 New England Biolabs 及 Thermo Fisher Scientific 公司; 所 用敲除载体为 pK18mobSacB(本实验室保存); 接种植物为文兴西兰花; 基因预测及结构分析采用在线工 具(KEGG, https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_organism?org=xcb 和 SMART, http://smart.embl-heidelberg. de/), 采用默认参数; 同源性比对采用 Clustal X2 (http://www.clustal.org/clustal2/); 基因组信息来源于 NCBI (accession: CP000050.1)。

1.2 突变体构建和致病力分析 将 vrhA, vrhB 上下游各约 500 bp 序列通过 PCR 扩增(引物见表 1), 分别用 HindIII/BamHI 和 BamHI/EcoRI 酶 切后一起连接到经 HindIII/EcoRI 酶 切的自杀性载体 pK18mobSacB(Kan^R)上,用热激法进行转化,获得载体(pK18-vrhA, pK18-vrhR 或 pK18-vrhB),载体 (pK18-vrhA, pK18-vrhR 或 pK18-vrhB)经测序正确后采用三亲接合的方法构建突变体^[14]。具体方法:将 供体菌(含敲除载体的菌)、协助菌(pRK2013)、受体菌(*Xcc* 8004)混合起来, 28 ℃ 培养 1 d, 然后将供体 菌涂布在含 25 mg·L⁻¹卡拉霉素的平板上, 28 ℃ 培养 3 d, 长出的菌落在不含抗生素的液体培养基中振荡 培养 72h, 200 r·min⁻¹, 涂布在含 15% 蔗糖, 不含抗生素的平板上, 经过此次负筛选后获得的相应菌株进 行 PCR 验证。基因组提取采用 SDS 法, PCR 反应条件: 95 ℃ 4 min, 95 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min,

rab. 1 Timer sequences						
名称 Primer	序列 Sequence, 5'-3'	退火温度 Tm/℃	产物长度 Product length/bp	用途 Uses		
vrhBqF	AAGGATGTGACTGCAACCCG	60.61	147	vrhB qPCR		
vrhBqR	GCTGGCAAAGCGTGCTATTT	60.11				
vrhRqF	ATGAAACCAGGACGCCCAAT	59.96	121	vrhR qPCR		
vrhRqR	GGGTTGCCAGCTCTTCTTGA	60.25				
vrhAqF	CGTTCCTCTTCGATCACGGT	59.83	142	vrhA qPCR		
vrhAqR	CTTTGTGGTTTTGGCCGAGG	59.97				
rpoDqF	GTCGGCTTCAACGACCTGAT	60.39	110	<i>rpoD</i> qPCR		
rpoDqR	TCTTCGTCTGCGTCTTCGTC	60.11				
vrhAddFF	GACC <u>AAGCTT</u> CAGAACCGGGAGCTAGAACG	60.18	489	vrhA deletion		
vrhAddFR	GACA <u>GGATCC</u> TGTCGTGCATCGCTGCTATC	60.87				
vrhAddRF	GACA <u>GGATCC</u> AACCGATGCCTAGATCGTAG	56.62	420	vrhA deletion		
vrhAddRR	GACC <u>GAATTC</u> AGCTCTTCTTGAGATATGTC	51.81				
vrhRddFF	GACC <u>AAGCTT</u> GCATGCACGAATGGTTGCAG	61.07	443	<i>vrhR</i> deletion		
vrhRddFR	GACA <u>GGATCC</u> CTCAGAAGGGTGAAGTGTTC	55.70				
vrhRddRF	GACA <u>GGATCC</u> CAATCGCTGGCTCAGCTTCA	64.86	437	<i>vrhR</i> deletion		
vrhRddRR	GACC <u>GAATTC</u> GAACGAGCGGGCAAAGCGAC	62.91				
vrhBddFF	GACC <u>AAGCTT</u> GATGCAGAAGCGCACAATGA	59.55	364	<i>vrhB</i> deletion		
vrhBddFR	GACA <u>GGATCC</u> TCTGTGGATCGCTTCACAAC	58.20				
vrhBddRF	GACA <u>GGATCC</u> CAGCTCCATCCGCAAGACTC	60.81	404	vrhB deletion		
vrhBddRR	GACC <u>GAATTC</u> TGACTCATCGCATGTGTCAC	58.29				

表1 引物序列

Note: Restriction sites are underlined.

注:下划线表示酶切位点。

30 循环数,最后 72 ℃ 5 min。如果突变成功,则其 PCR 片段比野生型菌株小^[14]。采取剪叶法,接种野生 型菌株 *Xcc* 8004 和突变体 Δ*vrhB*, Δ*vrhR* 及 Δ*vrhA* 于生长 40 d 的西兰花叶片, 15 d 后量取从剪口处到枯 斑内部边界的长度,统计病斑大小与数量^[14]。

1.3 胞外酶检测 将 *Xcc* 8004, Δ*vrhA*, Δ*vrhR* 及 Δ*vrhB* 挑单克隆菌接种至 5 mL NYG(Nutrition Yeast Glycerol)[1% 胰化蛋白胨 (Peptone), 0.5% 酵母提取物 (Yeast extract), 1% 甘油 (glycerol)] 液体培养基中, 28 ℃ 200 r·min⁻¹ 振荡培养 36 h(*OD*₆₀₀=2.0)。取 1 mL 培养物, 6 000 r·min⁻¹ 室温离心 1 min 收集菌体, 用 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 清洗菌体 2 次, 重悬于 100 μL MgCl₂ 溶液中。取重悬于 MgCl₂ 的溶液 1 μL 接种 到补充有纤维素(纤维素酶), 淀粉(淀粉酶), 脱脂奶粉(蛋白酶)的 NYG 固体培养基中, 28 ℃ 培养 48 h, 每处理重复 3 次。如果菌株具有分泌相应酶的能力,则会在菌落周围形成一圈透明的水解圈。通过比较 水解产物的直径 (D) 和菌落直径 (d) 的大小(D/d) 以鉴定菌株产酶能力, D/d 值越大, 说明菌株产酶的能力, 力越强。

1.4 游动性检测 菌培养及收集如 1.3 所述, 取 1 μL MgCl₂ 菌悬液接种到含 0.3% 琼脂糖的 NYG 平板 上, 28 ℃ 培养 48 h, 测量菌落直径并拍照。

1.5 数据分析 数据分析采用 GraphPad Prism 5 作图分析, 所有实验至少设 3 个生物学重复, 计算平均 值±SD(标准差)。图像后期用 Adobe Photoshop 8.0 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 VrhR的生物信息学分析 vrhR 与另外 2个 基因 vrhA 和 vrhB 共同组成 1 个基因簇(图 1A)。 VrhR 蛋白只有 1 个 HTH 结构域,没有其他结构 域(图 1B); VrhA 只有 LysR 感应信号结构域 (LysRS),可能参与信号感应作用,但没有输出结 构域; VrhB 为典型的转录调节因子,既有 LysRS 结构域,又有 HTH 结构域(图 1B)。VrhA, VrhR 和 VrhB 在细菌中,尤其是在植物病原菌中相对保 守(图 2),暗示 VrhA, VrhR 和 VrhB 对细菌的生存 可能具有重要的功能,但 VrhA 的保守性较 VrhR 和 VrhB 低(图 2),其功能的保守性可能低于 VrhR 和 VrhB。



图 1 Xcc 8004 中 vrhA-vrhB 基因簇(A)及其编码蛋白的结构特征(B)

Fig. 1 The *vrhA-vrhB* gene cluster (A) and the domain organization (B) of *VrhA*, *VrhB* and *VrhR*

2.2 构建 vrhR, vrhA和 vrhB的突变体 通过 PCR 验证缺失突变体,在目的基因上下游约 500 bp 设计 引物,以疑似突变体基因组为模板,以 Xcc 8004 基因组为对照。如果缺失成功,则扩增片段短于野生型菌 株。ΔvrhB, ΔvrhR 及 ΔvrhA 缺失型菌株的基因组 PCR 片段大约为 1 000 bp(图 3 中 1 ~ 3 泳道验证基因 为 ΔvrhB; 5 ~ 9 泳道验证基因为 ΔvrhR; 11 ~ 15 泳道验证基因为 ΔvrhA),比野生型菌株(图 3 中 4, 10, 16 泳道)小,说明这些检测的菌株为突变体。

2.3 vrhR 等突变增强 Xcc 致病力 为分析 vrhA, vrhB 和 vrhR 对 Xcc 致病力的影响,利用剪叶法接种野 生型菌株 Xcc 8004 和突变体 ΔvrhB, ΔvrhA, ΔvrhA 于西兰花叶片, 15 d 后量取从剪口处到枯斑内部 边界的长度,根据病斑长度获得致病力的变化。结果显示,剪接部位均出现不定形淡黄褐色坏死斑现 象, ΔvrhR 病斑比野生型增长大约 1.85 cm,呈极显著性差异(**: P < 0.01); ΔvrhA 和 ΔvrhB 与比野生型相 比,没有显著变化(图 4),说明 vrhR 突变可增强细菌的致病力,而 vrhA 和 vrhB 突变对 Xcc 致病性没有显 著影响。

2.4 vrhR 等突变对细菌胞外酶活性的影响 胞外酶是黄单胞属植物病原细菌的重要毒性因子,在病原

xcb : xhr : xya : xga : eba : sdf : thk : bxe : aes : tcl : axy : mela :	NODCCSRL V ANAPAL PEADLARST STREALCONDOUVITS LOCATE SIDE STREAM AND AVE LARDEN AND AVE LARDEN AND AVE AND A	F F
xcb : xhr : xva : eba : eba : sdf : bxe : bxe : aes : rme : tcl : axy : mela :	120 • 140 • 200 • 200 • 220 IC MEMBE VEGUTEACTORSAHLCKYA US DITTAKA OGGAN VIN SANKOVIN LGTAK VIN LGTAK VIN DE SANLERAV VIN SANKAVIN VEGUTEACTORSAHLCKYA US DITTAKATORSALCKYA VIN LGTAK VIN LGTAK VIN LGTAK VIN US DITTAKATORSAHLCKYA VIN LGTAK VIN LGT	RH RH R-
VrhR	20 40 40 40 100	
xcb : xhr : xva : xga : eba : sdf : thk : mela : axy : tke : bxe : tcl : aes :	• 20 • 40 • 60 • 80 • 100 Propriod	
VrhR	20	
xcb : xga : xva : xhr : eba : sdf : thk : tcl : me : aes : axy : bxe :		
xcb : xga : xva : xhr : eba : mela : sdf : tcl : tcl : tcl : aes : axy : bxe :	* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 DID A TO TO A TO TO A TO A TO A TO TO TO TO TO TO A TO	
xch ·	* 220 * 240 * 260 * 280 * 300 • CODENTED BRAN BUT 2010 - 1	
xga : xva : eba : mela : sdf : thk : tcl : mea	TATE CONTRACTOR TATE CONTR	

图 2 VrhA, VrhB 和 VrhR 的同源序列比对 Fig. 2 Alignments of VrhA, VrhB and VrhR homologs

xcb: Xanthomonas campestris pv. campestris 8004; xhr: Xanthomonas hortorum; xva: Xanthomonas vasicola; xga: Xanthomonas gardneri; sdf: Steroidobacter denitrificans; thk: Thauera sp. K11; eba: Aromatoleum aromaticum; tcl: Thauera chlorobenzoica; mela: Melaminivora sp. SC2-9; rme: Cupriavidus metallidurans; bxe: Paraburkholderia xenovorans LB400; axy: Achromobacter xylosoxidans A8; aes: Aeromonas sp. ASNIH5. 黑色: 同源性高于 90%; 灰色: 同源性 60%~ 90%。 Black: Sequence identity > 90%; Grey: Sequence identity 60%-90%.

菌侵染甘蓝的过程中发挥重要作用^[6]。为分析 ΔvrhR 致病力变化是否与其胞外酶活性有关,笔者检测了 ΔvrhB, ΔvrhR 及 ΔvrhA 中的蛋白酶、纤维素和淀粉酶活性。结果显示, Xcc 8004, ΔvrhB, ΔvrhR 及 ΔvrhA 菌落所形成的蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶酶解圈都没有显著差异(图 5),表明 vrhR, vrhA 和 vrhB 的突变 并不影响胞外蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶的活性,且与这些酶的合成或分泌无关。

PP----- 296 LVRLRENLGG----- : 303

VrhA

axy bxe



图 3 缺失突变体 PCR 凝胶电泳验证

1~3,5~9,11~15,验证基因分别为 ΔvrhB, ΔvrhR 和 ΔvrhA;4,10,16:野生型对照。

Fig. 3 PCR validation of the deletion mutants

Electrophoresis analysis of the PCR products of $\Delta vrhB$ (lanes 1–3), $\Delta vrhR$ (lanes 5–9), $\Delta vrhA$ (lanes 11–15) and Xcc 8004 (lanes 4, 10, 16).



图 4 Xcc 8004, ΔvrhB, ΔvrhR 及 ΔvrhA 突变体的致病性分析

A: 接种 15 d 后, *Xcc* 8004, Δ*vrhB*, Δ*vrhR* 及 Δ*vrhA* 接种病斑表型, *Xcc* 8004 为野生型菌株, ddH₂O 为空白对照。B: 接种 15 d 后, 西兰花叶片病斑长度(cm)统计分析 (*t* 检验, **, *P*<0.01)。

Fig. 4 Pathogenicity analysis of *Xcc* 8004, $\Delta vrhB$, $\Delta vrhR$ and $\Delta vrhA$ mutants

A: 15 DPI morphology of lesions of broccoli inoculated with *Xcc* 8004, $\Delta vrhB$, $\Delta vrhR$ and $\Delta vrhA$ with ddH₂O as blank control; B: Lesion length of *Xcc* 8004, $\Delta vrhB$, $\Delta vrhR$ and $\Delta vrhA$ (*t*-Test, **: *P*<0.01).

2.5 vrhR 等突变对 Xcc 运动能力的影响 病原菌的致病力与细菌运动能力密切相关^[15],因此,笔者采用 半固体培养基平板法检测 vrhR 突变对菌体运动能力的影响。结果表明,在含 0.3% 琼脂糖的 NYG 平板 上野生型菌株和 ΔvrhB, ΔvrhR 及 ΔvrhA的泳动能力无明显差别(图 6),说明 vrhR, vrhA 和 vrhB 突变对细菌的运动能力没有影响。









图 6 Xcc 8004, ΔvrhB, ΔvrhR 及 ΔvrhA 游动力测定 Fig. 6 Swimming ability of Xcc 8004, ΔvrhB, ΔvrhR and ΔvrhA

3 讨 论

HTH类 DNA 结合蛋白是最广泛的转录调节因子,大约 95% 的转录因子属于 HTH 家族成员,调控着生物体内大部分基因的表达过程。一般情况下 HTH 结构域主要与 DNA 结合,而且活性调控需要其 N 末端信号输入结构域,此结构通过可感应信号分子或与其他蛋白相互作用来调控自身活性^[3]。通过分

析 Xcc 8004 基因组,绝大多数 HTH 类转录调节因子均匀分布在基因组上,没有 HTH 热点区域¹⁶。笔者发现, Xcc 8004 只有 1 个基因簇包含的 3 个基因(*whA*, *whR* 和 *whB*)都编码 LysR 类转录调节因子,这3 个基因的阅读框方向并不相同,表明其可能单独转录,各自构成 1 个转录单元。VrhA, VrhR 和 VrhB 在 细菌中广泛存在,保守性很高,表明 VrhA, VrhR 和 VrhB 对细菌的生存可能非常重要,功能上可能高度保守。由于 Xcc 属于高致病性植物病原菌,而这些 LysR 类转录调节因子可能调控其致病性,笔者在突变这些基因后发现 *whR* 突变体的致病力显著提高,说明 VrhR 负调控病原菌与植物的相互作用,但 VrhA 和 VrhB 并不参与致病力的调控;这些基因也都不参与胞外酶和游动性的调控;此外,在实验过程中笔者还发现这些突变体并不显著影响细菌的生长(数据未显示),因此,VrhR 调控的生理生化途径及其对病原菌 致病力的影响还需进一步探索。后续实验应关注 VrhR 调控的靶标基因,由于 VrhR 蛋白较小,只有 HTH 结构域,没有信号输入结构域,其确切的转录调控机制也有待进一步研究。

参考文献:

- [1] PEREZ-RUEDA E, COLLADO-VIDES J. Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria [J]. Journal of Molecular Evolution, 2001, 53(3): 172 – 179.
- [2] ARAVIND L, ANANTHARAMAN V, BALAJI S, et al. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(2): 231 – 262.
- [3] MADDOCKS S E, OYSTON P C. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins
 [J]. Microbiology, 2008, 154(Pt12): 3609 3623.
- [4] DORMEYER M, LUBKE A L, MULLER P, et al. Hierarchical mutational events compensate for glutamate auxotrophy of a Bacillus subtilis gltC mutant [J]. Environmental Microbiology Reports, 2017, 9(3): 279 – 289.
- [5] DORMEYER M, LENTES S, RICHTS B, et al. Variants of the *Bacillus subtilis* LysR-Type regulator GltC with altered activator and repressor function [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2321.
- [6] QIAN W, JIA Y, REN S X, et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv *campestris* [J]. Genome Research, 2005, 15(6): 757 – 767.
- [7] LIU G F, SU H Z, SUN H Y, et al. Competitive control of endoglucanase gene engXCA expression in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* by the global transcriptional regulators HpaR1 and Clp [J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(1): 51-68.
- [8] LU X H, AN S Q, TANG D J, et al. RsmA regulates biofilm formation in *Xanthomonas campestris* through a regulatory network involving cyclic di-GMP and the Clp transcription factor [J]. PloS One, 2012, 7(12): e52646.
- [9] TAO F, HE Y W, WU D H, et al. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors [J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(4): 1020 – 1029.
- [10] LI R F, LU G T, LI L, et al. Identification of a putative cognate sensor kinase for the two-component response regulator HrpG, a key regulator controlling the expression of the hrp genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(7): 2053 – 2071.
- [11] WEI K, TANG D J, HE Y Q, et al. hpaR, a putative marR family transcriptional regulator, is positively controlled by HrpG and HrpX and involved in the pathogenesis, hypersensitive response, and extracellular protease production of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(5): 2055 2062.
- [12] WENGELNIK K, VAN DEN ACKERVEKEN G, BONAS U. HrpG, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators [J]. Molecular Plant-microbe Interactions: MPMI, 1996, 9(8): 704 712.
- [13] HU R M, YANG T C, YANG S H, et al. Deduction of upstream sequences of *Xanthomonas campestris* flagellar genes responding to transcription activation by FleQ [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 335(4): 1035 – 1043.
- [14] TAO J, HE C. Response regulator, VemR, positively regulates the virulence and adaptation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 304(1): 20 – 28.
- [15] TAO J, LI C, LUO C, et al. RavA/RavR two-component system regulates *Xanthomonas campestris* pathogenesis and c-di-GMP turnover [J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 358(1): 81 – 90.