

西瓜噬酸菌Ⅲ型分泌系统 *hrcQ* 基因功能分析

于 畅, 吴林娜, 赵立萍, 张晓晓, 杨玉文, 关 巍, 赵廷昌*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system, T3SS)是影响西瓜噬酸菌 *Acidovorax citrulli* 致病性的重要因素, *hrcQ* 作为 T3SS 的保守基因, 在组成和维持该系统功能方面扮演着重要角色, 但 *hrcQ* 在西瓜噬酸菌中的具体生物学功能尚不明确。本试验以西瓜噬酸菌 Aac5 菌株为研究对象, 通过基因敲除、致病力及相关表型测定等, 解析了 *hrcQ* 基因的功能。结果表明: *hrcQ* 缺失导致 Aac5 菌株对寄主的致病能力丧失, 运动性及生物膜形成能力降低, 并丧失了引起烟草过敏反应能力; *hrcJ* 和 *hrcR* 基因在 *hrcQ* 缺失突变株中的表达量下调, *hrcQ* 对 *hrcJ* 和 *hrcR* 基因均为正调控。表明 *hrcQ* 在维持西瓜噬酸菌致病能力中起着不可或缺的作用。

关键词 西瓜噬酸菌; Ⅲ型分泌系统; *hrcQ*; 基因功能分析

中图分类号: S 432.42 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018183

Functional analysis of *hrcQ* in type Ⅲ secretion system of *Acidovorax citrulli*

YU Chang, WU Linna, ZHAO Liping, ZHANG Xiaoxiao, YANG Yuwen, GUAN Wei, ZHAO Tingchang

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract *Acidovorax citrulli* is the causal agent of bacterial fruit blotch, which causes serious losses in watermelon and melon industry. Type Ⅲ secretion system (T3SS) plays an important role in the pathogenicity of *A. citrulli*. The *hrcQ* is an important and conserved gene in forming and maintaining the function of T3SS. However, the biological function of this gene in *A. citrulli* is unclear. Therefore, in this study, we analyzed the functions of *hrcQ* by gene knockout, virulence and phenotypic determinations based on the wild type strain Aac5. The results showed that the *hrcQ* gene deletion mutant strain caused significant reduction in pathogenicity, swimming motility and biofilm formation, and it lost the ability to induce hypersensitive reaction in non-host *Nicotiana tabacum*. Besides, the expressions of *hrcJ* and *hrcR* genes were decreased in the mutant strain, indicating a positive regulation of *hrcQ* to both genes. More importantly, we confirmed that the deletion of *hrcQ* resulted in the loss of virulence of Aac5 on its host. Taken together, these results indicated that *hrcQ* was the key gene for maintaining the pathogenicity of *A. citrulli*.

Key words *Acidovorax citrulli*; type Ⅲ secretion system; *hrcQ*; gene functional analysis

瓜类细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)是葫芦科作物上的一种重要病害。大量报道表明, BFB 可在全球范围内发生, 威胁着葫芦科作物的种植^[1], 造成了严重的经济损失, 其病原菌为西瓜噬酸菌 *Acidovorax citrulli*, 属于革兰氏阴性菌^[2-3]。目前, 由于缺乏抗性品种, 防治手段仍然以病原菌检疫、种子检测、种子处理和生物防治等传统方法为主^[4-5], 因此亟需解析西瓜噬酸菌的致病机理, 从而制定新的防控策略提高 BFB 的防治效果。

Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system, T3SS)是

植物病原细菌致病过程中的关键因子^[6], 许多植物病原细菌依靠 T3SS 分泌的效应蛋白干扰寄主免疫反应从而实现侵染^[7]。在丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae*、欧美杨细菌性溃疡病菌 *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* 和水稻条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* 中 T3SS 均扮演着重要作用。T3SS 中 *hrp/hrc* 基因的突变可导致菌株丧失寄主植物致病性和非寄主植物致敏性(hypersensitive response, HR), 同时也影响着一些致病表型和Ⅲ型分泌效应蛋白的传递^[8-10]。

收稿日期: 2018-04-27

修订日期: 2018-06-29

基金项目: 国家自然科学基金(31701754); 北京市自然科学基金(61602023); 国家西甜瓜产业技术体系(CARS-26); 国家重点研发计划项目(2016YFD0201004)

* 通信作者 E-mail: zhaotgcg@163.com

T3SS 在西瓜噬酸菌中同样扮演着重要角色。实验室前期研究证明Ⅲ型分泌系统保守基因 *hrcN* 与细菌致病力有关,喷雾接种时突变株的致病力完全丧失,使用针刺的方法进行接种时突变菌株仍然有些许致病力^[11]。西瓜噬酸菌 AAC00-1 菌株中 *hrcC* 基因的缺失使得菌株丧失了致病力及致敏性^[12]。任争光等研究表明 *hrcR* 基因直接影响 MH21 菌株在珊西烟叶片上引起 HR 的能力,基因缺失后菌株的致病力也完全丧失^[13];Wang 等研究发现 *hpaA* 和 *hrpG* 基因突变体的鞭毛缺失且细胞形态发生显著变化^[14]。

HrcQ 是 T3SS 跨膜装置蛋白,决定着Ⅲ型效应蛋白的转运和输出,是维持 T3SS 完整结构的重要组成部分^[15]。报道表明在水稻条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* 和野油菜黄单胞菌 *X. campestris* 中 HrcQ 对维持细菌致病性和在 T3SS 中的功能至关重要^[16-17]。然而在西瓜噬酸菌中 *hrcQ* 未见报道,生物信息学分析表明西瓜噬酸菌 Aac5 菌株参考基

因组 AAC00-1 中存在 *hrcQ* 基因,鉴于其高度保守性,我们推测 *hrcQ* 基因可能在西瓜噬酸菌致病过程中同样起着重要作用。为明确西瓜噬酸菌的 *hrcQ* 基因在致病性中的作用,本研究通过基因敲除完全缺失了 Aac5(WT)菌株中 *hrcQ* 基因,同时对该基因在致病性和表型中的贡献,以及 *hrcQ* 与其他基因间的调控关系进行了初步探索,以解析其在致病性及致病表型中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、质粒及培养条件

本试验所用菌株及质粒详见表 1。西瓜噬酸菌 *A. citrulli* 及其衍生菌株于 King's B(KB)培养基 28℃培养;大肠杆菌 *Escherichia coli* 及其衍生菌株于 LB 培养基 37℃培养。抗生素终浓度分别为:氨苄青霉素(ampicillin)100 μg/mL;卡那霉素(kanamycin)50 μg/mL;氯霉素(chloramphenicol)50 μg/mL。

表 1 本研究所用的菌株、质粒及引物
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株及质粒 Strain and plasmid	特性 Characteristic	来源 Source
菌株 Strains		
Aac5	野生型菌株,氨苄青霉素抗性 Amp ^R , the wild type strain	[18]
Δ <i>hrcQ</i>	野生型 Aac5 缺失 <i>hrcQ</i> 基因突变株,氨苄青霉素抗性 Amp ^R , <i>hrcQ</i> knock-out mutant of the WT Aac5	本研究
Δ <i>hrcQ</i> comp	Δ <i>hrcQ</i> 突变株互补 <i>hrcQ</i> 基因,氨苄青霉素抗性 Amp ^R , Km ^R , Δ <i>hrcQ</i> complemented with <i>hrcQ</i> gene	本研究
<i>E. coli</i> DH5α	大肠杆菌感受态细胞 F-,Φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> ,Δ (<i>lacZYA</i> -argF) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> ,λ ⁻ thi-1, <i>gyrA96 relA1</i>	Tiangen
质粒 Plasmids		
pK18mobsacB	含有 <i>sacB</i> 蔗糖致死位点的自杀性载体,卡那霉素抗性 Km ^R , contains the <i>sacB</i> sucrose lethal site	[18]
pK18- <i>hrcQ</i>	用于构建突变株 Δ <i>hrcQ</i> 的自杀性重组载体,卡那霉素抗性 Km ^R , suicide recombinant vector used to generate the mutant strain Δ <i>hrcQ</i>	本研究
pBBR1MCS-2	含 <i>lac</i> 启动子的广泛宿主表达载体,卡那霉素抗性 Km ^R , broad host range expression vector with <i>lac</i> promoter	[19]
pBBR- <i>hrcQ</i>	具有 <i>hrcQ</i> 基因片段的 pBBR1MCS-2 载体用于构建互补菌株 Δ <i>hrcQ</i> comp,卡那霉素抗性 Km ^R , pBBR1MCS-2 with fragment of <i>hrcQ</i> gene for Δ <i>hrcQ</i> comp	本研究
pRK600	三亲本杂交中的辅助菌株,氯霉素抗性 Cm ^R , helper strain in tri-parental mating	[20]

1.1.2 试剂及仪器

2×Taq PCR Master Mix,天根生化科技(北京)有限公司;KOD plus Neo 高保真酶,TOYOBO;Infusion 无缝连接酶及 Q5 反应液,Vazyme;质粒提取试剂盒及琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒,Axygen;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,BioTeke;SuperReal PreMix Plus 和 FastQuent RT Kit,天根生化科技(北京)有限公司,试验所用引物由华大基因(北京)合成。DHP120 立式恒温培养箱,上海实验仪器厂

有限公司;Thermo 低温离心机,American;Molecular Biology FastPrep-24 研磨机,(MP Biomedicals, German)。

1.1.3 培养基

培养基:King's B(KB)培养基(pH 7.0):胰蛋白胨 10 g、MgSO₄ 0.75 g、K₂HPO₄ 0.75 g、丙三醇 7.5 mL;LB 培养基(pH 7.0):胰蛋白胨 5 g、酵母提取物 2.5 g、NaCl 5 g;Ⅲ型分泌系统诱导培养基(pH 5.8)^[21]:胰蛋白胨 5 g、酵母提取物 2.5 g、NaC

2.5 g、MgCl₂ · 6H₂O 1.015 g;以上 3 种培养基均加入蒸馏水至 500 mL,121℃,灭菌 20 min。0.3% 半固体培养基(pH 7.0):细菌专用蛋白胨 0.06 g、酵母提取物 0.06 g、琼脂粉 0.6 g;加入蒸馏水至 200 mL,121℃高温高压灭菌,20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 *hrcQ* 基因缺失突变菌株的筛选

利用 Primer 5.0 软件设计引物 *hrcQ*-1F/R 和

hrcQ-2F/R,克隆 *Aac5* 菌株 *hrcQ* 基因的上下游片段,并使用 DNAMAN 5.2.2 将 *Aac5* 与 AAC00-1 进行比对,序列相似性为 100%。设计引物对 *hrcQL*-F/*hrcQL*-R 和 *hrcQR*-F/*hrcQR*-R,以西瓜噬酸菌 *Aac5* 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *hrcQ*(*Aave*_0450)上游和下游片段。通过 overlap PCR 技术将上下游片段融合^[22],随后连接到自杀性质粒 pk18mobsacB 中形成重组质粒 pk18-*hrcQ*。

表 2 目的片段扩增及检测所用引物

Table 2 Primers for amplification and detection of target fragments

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	产物大小/bp Size
WFB1	GACCAGCCACACTGGGAC	360
WFB2	CTGCCGCACTCCAGCGA	
<i>hrcQL</i> -F	CTATGACATGATTACGAATTCGTGGGGGAAACCTGGGA	568
<i>hrcQL</i> -R	CGACCGCTGCCGATCCCCGATCTCGGGACTC	
<i>hrcQR</i> -F	GAGTCCCGAGATCGGGGGATCGGCAGGCGGTCTG	431
<i>hrcQR</i> -R	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGACGGCGACGCATCCC	
C- <i>hrcQF</i>	GGTACCGGGCCCCCCTCGAGACGCATCCCGGCAACG	1 603
C- <i>hrcQR</i>	GGCGGCCGCTCTAGAACTAGTTACTGGCGCGCCTGTG	
<i>hrcQ</i> -TF	GTCTCCGTGCCCCGTGTC	469
<i>hrcQ</i> -TR	CGAGTTCTGCGGGTATGTG	
JC- <i>hrcQF</i>	TGGGTGTTGGAGCTTTGG	1 059
JC- <i>hrcQR</i>	GCGAATCGGCACGACTAA	

采用同源重组双交换原理,筛选突变菌株^[23]。通过与携带辅助质粒 pRK600 的大肠杆菌进行三亲本杂交,将 pk18-*hrcQ* 转化到西瓜噬酸菌 *Aac5* 中。在含有 Amp 和 Km 抗性的 KB 平板上选择单交换克隆,涂布于 KB+Amp^R+10%蔗糖抗性平皿中,由于 pK18mobsacB 质粒中含有蔗糖致死位点 *sacB*,因此携带该质粒的菌落无法在含有蔗糖的平板中生长;挑取生长出的单菌落,使用果斑菌特异性引物 WFB1/WFB2^[24] 及 JC-*hrcQF*/R 引物进行 PCR 验证,验证正确的 PCR 产物送测序再次验证。引物见表 2。

1.2.2 互补菌株的筛选

根据 *hrcQ* 基因序列,设计引物 C-*hrcQF*/R,以 *Aac5* DNA 为模板,扩增基因及其上游启动子序列,并回收目的条带。应用无缝连接酶将目的基因及其启动子片段与 pBBR1MCS-2 载体连接,获得 pBBR-*hrcQ* 互补载体,使用 JC-*hrcQF*/R 引物进行 PCR 验证,条带正确的菌液送至华大基因,以 pBBR1MCS-2 载体通用引物 M13-F/R 测序验证。采用三亲本杂交的方法,利用抗性筛选,进行 PCR 及测序验证。引物见表 2。

1.2.3 致病力测定

采用喷雾接种法^[11,25],接种西瓜品种‘瑞宏’(原‘中选 2 号’)和甜瓜品种‘IVF192’。将每个品系的种子分别播种于盛有相同土壤混合物的盆中。西瓜 9 盆,每盆 5 粒西瓜种子;甜瓜 9 盆,每盆 10 粒甜瓜种子。幼苗在温室(25~28℃)中生长至 2 片真叶期后,进行喷雾接种。

野生型菌株 *Aac5*、突变菌株及互补菌株振荡培养至对数期,离心并收集菌体,使用无菌水重悬,并配制成浓度为 3×10⁸ cfu/mL 的菌悬液 200 mL。使用一次性无菌喷头,将菌液均匀喷雾于西瓜和甜瓜幼苗叶片的正面及背面,每种幼苗接种 3 盆,并喷雾无菌水为阴性对照。喷雾后使用无菌塑料袋覆盖,并置于光照气候培养箱中,设定 16 h 光照、28℃,8 h 黑暗、16℃,相对湿度 85%。接种 8 d 后调查植株的发病情况,计算病情指数^[25]。试验重复 3 次。

1.2.4 烟草过敏反应反应测定

用加有相应抗生素的 KB 液体培养基摇培野生型菌株 *Aac5*、突变菌株和互补菌株至对数期,离心并收集菌体,加入无菌水吸打悬浮菌体,并调节菌液浓度为 3×10⁸ cfu/mL。使用 1 mL 无针注射器吸

取 200 μL 菌液,注射于幼嫩烟草叶背面的叶脉交界处,以无菌水为阴性对照;置于光照培养箱中,16~28℃,相对湿度 85%;24 h 后观察有无过敏性反应发生^[25]。试验重复 3 次。

1.2.5 运动能力测定

使用无菌水将供试菌株的菌悬液浓度调至 3×10^8 cfu/mL,每种菌液各取 2 μL 轻点在 0.3%半固体琼脂培养基中,28℃正置培养 48 h,测量平皿中的晕圈直径大小,拍照记录并进行统计学分析^[25]。每个菌株进行 9 次生物学重复,试验重复 3 次。

1.2.6 生物膜形成能力测定

KB 液体培养基摇培野生型菌株、突变株及互补菌株,用新鲜的 KB 液体培养基清洗并重悬菌体,调节菌液浓度至 3×10^8 cfu/mL,以 1:100 的比例稀释菌悬液,并吸取 500 μL 菌液垂直加入聚苯乙烯 24 孔板中,28℃静置条件下孵育 48 h;然后倾尽菌液,用无菌蒸馏水清洗,80℃固定 20 min 后,将表面的生物膜用 1 mL 0.1%结晶紫染色 45 min,无菌蒸馏水漂洗 5 次,37℃烘干;用 1.5 mL 95%乙醇溶液溶解染色的生物膜 2 h,并在分光光度计中测定染色菌悬液的 OD₅₉₀^[26],以此对生物膜的形成能力进行定性和定量分析。每种菌株进行 9 次生物学重复,试验重复 3 次。

1.2.7 寄主体内生长期能力测定

将所有供试菌株在 KB 液体培养基中培养至对数期,调节菌悬液浓度至 10^4 cfu/mL 和 10^6 cfu/mL。使用一次性无针注射器将菌悬液手动注入至完全展开的 2 周龄西瓜幼苗子叶中;接种 1、24、48、72 和 96 h 后,取注射浓度为 10^6 cfu/mL 的子叶进行发病情况的观察和拍照,取注射浓度为 10^4 cfu/mL 的每种菌株处理的子叶 6 片,每片子叶取面积约为 0.5 cm² 的叶盘,使用 MP 仪器研磨,并在连续稀释后涂布于 KB 固体琼脂培养基上,28℃孵育 48 h,统计细菌菌落数^[27]。试验重复 3 次。

1.2.8 qRT-PCR 测定

通过 TRizol 方法提取野生型菌株 Aac5 和突变株 $\Delta hrcQ$ 的总 RNA,并进行反转录,将 cDNA 浓度统一调节至 100 ng/ μL ^[28]。本试验选取 *rpoB* 作为内参基因^[20],对 T3SS 相关基因 (*hrpG*、*hrpX*、*hrpE*、*hrcS*、*hrcR* 和 *hrcJ*)、鞭毛相关基因 (*fliC* 和 *fliP*)、群体感应基因 (*luxR*)、趋化性基因 (*cheA*) 及调控因子 (*rpoN*) 进行 qRT-PCR 检测,引物序列见

表 3。采用相对定量 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 的方法测定基因表达量^[29]。

反应程序:95℃ 15 min;95℃ 10 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 30 s,60℃ 15 s。试验重复 3 次。

表 3 荧光定量 PCR 引物序列表

Table 3 The list of qPCR primers

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物大小/bp Size
<i>hrpG</i> -F	CTCGCCTGGCTGCTGTT	136
<i>hrpG</i> -R	GCTTGTAGATGTGCTGCTCC	
<i>hrpX</i> -F	GCGCTCACGCAAATGCT	175
<i>hrpX</i> -R	GGCAAGCTCCTCCTGTCCTA	
<i>hrpE</i> -F	GTCAGGATGGACACGCAGGC	162
<i>hrpE</i> -R	AACGCATGGTGTCTGGCAGAG	
<i>hrcS</i> -F	ATGCTGTGCCTGCTGCTG	142
<i>hrcS</i> -R	GCTTGATGCCTGCGAG	
<i>hrcR</i> -F	CCGCAAGTTCCTGGACAAG	144
<i>hrcR</i> -R	GCCGTGAGTTCGGTGAGC	
<i>hrcJ</i> -F	CGGCAAGACCTGGAACG	151
<i>hrcJ</i> -R	GCGACGCCATAGATGAAGC	
<i>fliC</i> -F	ACGCACTCCAACGTGAATC	165
<i>fliC</i> -R	TCTTGAGCAGCAGCGACTT	
<i>fliP</i> -F	GACGCCTACCTGCCCTACA	173
<i>fliP</i> -R	GGCGAACAGGGCGAAGT	
<i>luxR</i> -F	GTGAGCATGGAGCTGATGGG	133
<i>luxR</i> -R	GCTTGGGTAACGGCAACG	
<i>cheA</i> -F	CCATCGTGTTCAGCCGTTTC	126
<i>cheA</i> -R	CATTTTCGATGCCGTGGTCG	
<i>rpoN</i> -F	GCCGACACTCGCTCTTGGA	158
<i>rpoN</i> -R	TCACGCTCTGGATGAACTCC	
<i>rpoB</i> -F	GCGACAGCGTGCTCAAAGTG	134
<i>rpoB</i> -R	GCCTTCGTTGGTGCGTTTCT	

2 结果与分析

2.1 突变菌株及互补菌株的制备与验证

本试验通过三亲本杂交的方法将质粒 pK18-*hrcQ* 导入野生型菌株 Aac5 中,经同源重组双交换,得到无标记的 *hrcQ* 突变株。以西瓜噬酸菌特异性引物 WFB1/WFB2 对获得的突变株进行验证,能够扩增出 360 bp 的电泳条带(图 1a),确定其为西瓜噬酸菌;使用目的基因检测引物 JC-*hrcQ*F/R 进行 PCR 验证,突变株无法扩增出该片段(图 1b),证明成功敲除 *hrcQ* 基因。以同样方法将互补载体质粒 pB-BR-*hrcQ* 导入突变株中,使用载体通用引物对导入互补质粒的突变株进行 PCR 检测,能够扩增出相应的 *hrcQ*(1 059 bp)片段(图 1b),比对测序结果与目的基因序列一致,证明获得互补菌株 $\Delta hrcQ$ comp。

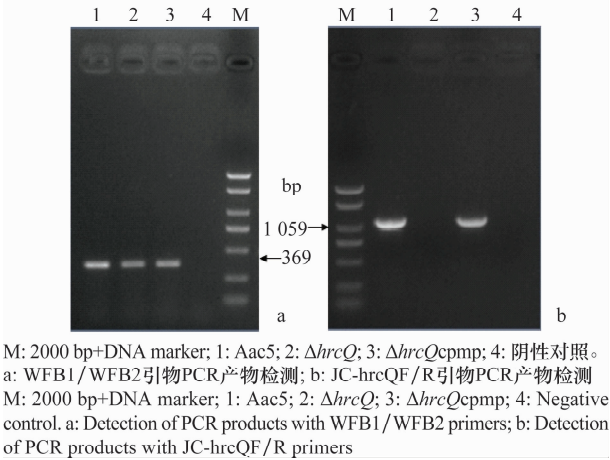


图 1 突变株及互补菌株电泳检测图

Fig.1 Electrophoretic detection of mutant and complementary strains

2.2 致病力测定结果

野生型菌株 Aac5(WT)、突变株 $\Delta hrcQ$ 和互补

菌株 $\Delta hrcQ_{comp}$ 喷雾接种于健康的西瓜、甜瓜幼苗,8 d 后调查西瓜(图 2a)、甜瓜(图 2b)幼苗子叶及真叶的发病情况,发现接种野生型 Aac5(WT)后西瓜子叶和真叶上出现不同面积大小的黑褐色病斑,后期病斑扩大,导致整片叶片枯黄皱缩;而接种突变株 $\Delta hrcQ$ 的西瓜叶片则无明显发病症状,表明突变株丧失了寄主致病力;接种互补菌株 $\Delta hrcQ_{comp}$ 后西瓜叶片上产生坏死病斑,说明互补菌株部分恢复致病力(图 2a1,2)。接种后,甜瓜幼苗的发病程度较西瓜幼苗轻,但发病趋势与西瓜幼苗基本一致(图 2b1,2)。

西瓜和甜瓜幼苗喷雾接种 8 d 后调查病情指数,发现:接种野生型 Aac5、突变株 $\Delta hrcQ$ 和互补菌株 $\Delta hrcQ_{comp}$ 后,西瓜幼苗的病情指数分别为 58.5、0、52.9,甜瓜幼苗的病情指数分别为 37.56、0、27.44(图 2c~d)。其中,与野生菌株和互补菌株相比,突变菌株 $\Delta hrcQ$ 对西、甜瓜的致病性均表现出显著差异($P < 0.05$),表明 *hrcQ* 基因正调控西瓜噬酸菌的致病能力。

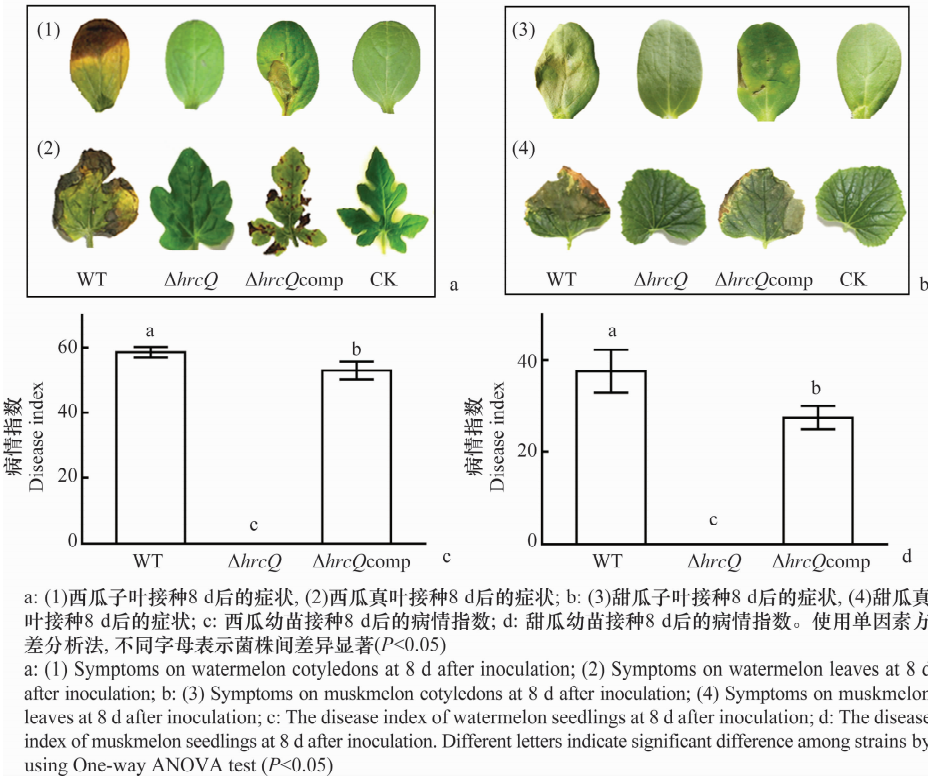


图 2 西瓜噬酸菌 Aac5、 $\Delta hrcQ$ 和 $\Delta hrcQ_{comp}$ 菌株对西瓜和甜瓜幼苗致病力测定

Fig.2 Pathogenicity test of Aac5, $\Delta hrcQ$ and $\Delta hrcQ_{comp}$ strains of *Acidovorax citrulli* on watermelon and muskmelon seedlings

2.3 烟草过敏性反应测定结果

注射野生型 Aac5(WT)、突变株 $\Delta hrcQ$ 及互补菌株 $\Delta hrcQ_{comp}$ 菌悬液于三生烟草 *Nicotiana tabacum* 中,无菌水作为阴性对照(CK),24 h 后观

察结果发现:注射 Aac5(WT)及 $\Delta hrcQ_{comp}$ 的烟草均产生过敏性反应,而注射 $\Delta hrcQ$ 的烟草不能引起过敏性反应的发生(图 3)。表明 *hrcQ* 缺失后使得西瓜噬酸菌丧失了诱导非寄主三生烟过敏性反应的能力。

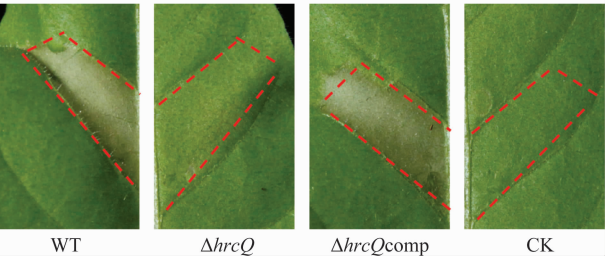
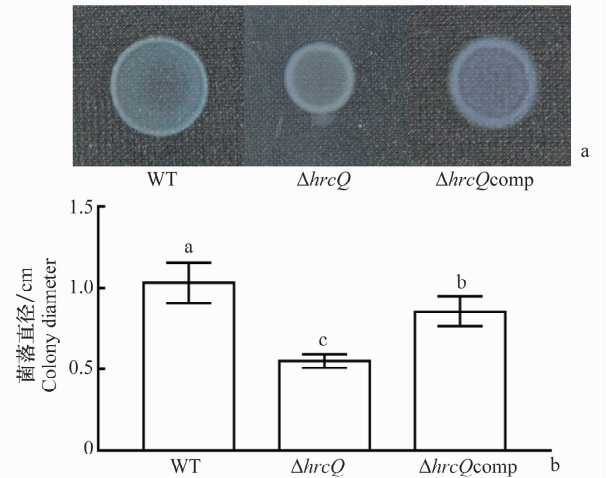


图 3 烟草过敏性反应测定

Fig. 3 Hypersensitive reaction test on tobacco

2.4 运动性测定结果

在 0.3% 半固体培养基中测定供试菌株的游动运动性,并对菌落晕圈直径进行测量。结果如图 4 所示:野生型菌株 *Aac5* (WT)、突变株 $\Delta hrcQ$ 和互补菌株 $\Delta hrcQcomp$ 的菌落直径大小分别为 1.03、0.55、0.86 cm(图 4b)。与野生型菌株相比,突变株 $\Delta hrcQ$ 所形成的晕圈直径缩小,差异显著 ($P < 0.05$);而与突变株相比,互补菌株的晕圈直径显著增加,恢复了一定的运动能力,但与野生型菌株相比仍存在显著差异 ($P < 0.05$)(图 4a~b)。



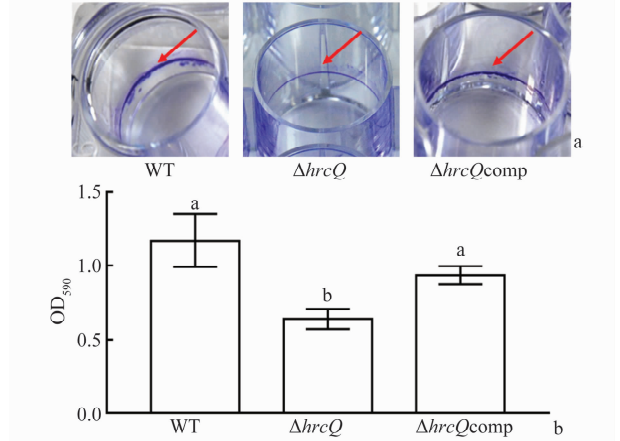
a: 供试菌株在 0.3% 半固体培养基中的运动情况; b: 菌落晕圈直径统计结果。使用单因素方差分析法, 不同字母表示菌株间差异显著 ($P < 0.05$)
a: Swimming ability of the tested strains in 0.3% semi-solid medium; b: Statistical results of colony diameter. Different letters indicate significant difference among strains by using One-way ANOVA test ($P < 0.05$)

图 4 *Aac5*、 $\Delta hrcQ$ 和 $\Delta hrcQcomp$ 游动运动能力测定
Fig. 4 Determination of swimming ability of *Aac5*, $\Delta hrcQ$ and $\Delta hrcQcomp$ strains of *Acidovorax citrulli*

2.5 生物膜形成能力测定结果

野生型菌株、突变株和互补菌株所形成的生物膜经结晶紫染色后在孔壁内呈现紫色(图 5a),使用 95% 无水乙醇洗脱并测定 590 nm 处的吸光值,分别为 1.18、0.64、0.94(图 5b)。与野生型 *Aac5* (WT) 菌株相比,突变株 $\Delta hrcQ$ 所形成的生物膜经染色

后, OD_{590} 显著降低 ($P < 0.05$),说明其生物膜形成能力显著下降;染色后互补菌株的生物膜在 590 nm 处吸光值与野生型菌株接近,无显著差异(图 5b)。



a: 野生型菌株、突变株和互补菌株经结晶紫染色后在聚苯乙烯 24 孔板中形成一圈紫色可视生物膜。1: *Aac5*; 2: $\Delta hrcQ$; 3: $\Delta hrcQcomp$; b: OD_{590} 统计结果。使用单因素方差分析法, 不同字母表示菌株间差异显著 ($P < 0.05$)
a: After crystal violet staining, wild-type, mutant strain and complementary strain form a circle of visible purple biofilm in polystyrene 24-well plates. 1: *Aac5*; 2: $\Delta hrcQ$; 3: $\Delta hrcQcomp$. b: Statistical results of OD_{590} . Different letters indicate significant difference among strains by using One-way ANOVA test ($P < 0.05$)

图 5 供试菌株生物膜形成能力测定
Fig. 5 Biofilm formation capacity of the tested strains

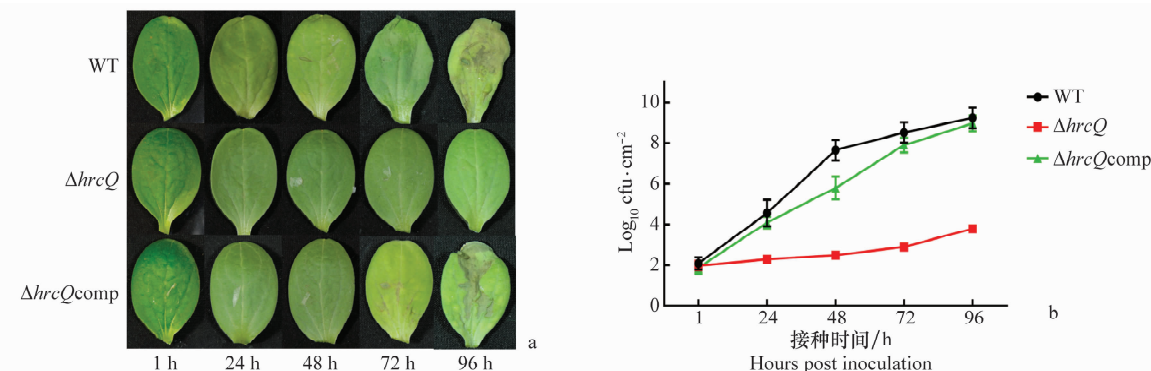
2.6 寄主体内生长能力测定结果

用高浓度 (10^6 cfu/mL) 及低浓度 (10^4 cfu/mL) 的细菌悬浮液渗透完全展开的西瓜子叶,以确定 *hrcQ* 基因突变对菌株体内生长能力和叶片发病程度的影响。发现注射高浓度 (10^6 cfu/mL) 的野生型 *Aac5* (WT) 和互补菌株 $\Delta hrcQcomp$ 菌液 72 h 后,子叶出现褪绿坏死症状,96 h 后子叶显现出大面积黑褐色坏死病斑(图 6a);而在观察时间范围内,注射高浓度 (10^6 cfu/mL) 突变株 $\Delta hrcQ$ 菌液的子叶无明显坏死症状(图 6a)。

注射低浓度 (10^4 cfu/mL) 的野生型菌株及互补菌株菌液后,随观察时间增加,子叶中的菌落数量均呈指数递增;而注射低浓度的 (10^4 cfu/mL) 突变株菌液后,子叶内的菌落数量增长速率较野生型缓慢,差异显著 ($P < 0.05$)(图 6b)。说明 *hrcQ* 基因缺失影响西瓜噬酸菌在寄主体内的生长能力。

2.7 *hrcQ* 缺失对 T3SS 及致病表型基因表达的影响

突变株 $\Delta hrcQ$ 中与Ⅲ型分泌系统相关的基因表达量如图 7a 所示。结果表明:突变株 $\Delta hrcQ$ 中 *hrcR* 和 *hrcJ* 基因表达量下调,与野生型相比差异极显著 ($P < 0.01$);*hrcS*、*hrpE*、*hrpG* 以及 *hrpX* 基因表达量显著上调 ($P < 0.05$)。

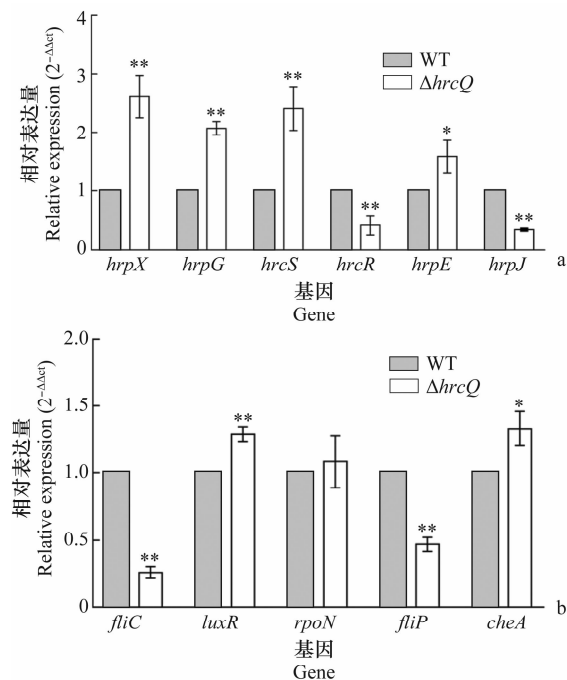


a: 注射高浓度(10^6 cfu/mL)西瓜噬酸菌菌液时西瓜子叶的发病情况; b: 注射低浓度(10^4 cfu/mL)菌液时西瓜噬酸菌在寄主体内的生长情况
a: Watermelon cotyledons are infiltrated with suspensions of wild type strain Aac5 and its mutant and complemented strains $\Delta hrcQ$ and $\Delta hrcQcomp$ at high density (10^6 cfu/mL); b: Growth of $\Delta hrcQ$, $\Delta hrcQ$, and $\Delta hrcQcomp$ when infiltrated at low density (10^4 cfu/mL)

图6 供试菌株在西瓜子叶中的体内生长能力

Fig. 6 *In vivo* growth ability of the tested strains in watermelon cotyledons

突变株中与其他表型相关的基因表达量如图7b所示:与野生型相比, $\Delta hrcQ$ 中鞭毛基因 *fliC* 和 *fliP* 的表达量均有不同程度的下降,差异极显著 ($P < 0.01$);群体感应相关基因 *luxR* 和趋化性基因 *cheA* 的表达量均显著上调 ($P < 0.05$)。结果说明 *hrcQ* 基因与 T3SS 中其他基因和致病表型相关基因间均存在一定的调控关系。



a: 与Ⅲ型分泌系统相关的基因表达量; b: 与其他表型相关的基因表达量。*: 突变株与野生型对照(Aac5)相比差异显著 ($P < 0.05$); **: 突变株与野生型对照(Aac5)相比差异极显著 ($P < 0.01$)

a: Relative expression levels of gene associated with the type III secretion system; b: Expression levels of genes associated with other phenotypes. *: Significant difference at $P < 0.05$ when compared with the WT control (Aac5); **: Extremely significant difference at $P < 0.01$ when compared with the WT control (Aac5)

图7 突变株中相关基因表达量测定结果

Fig. 7 Relative expression levels of pathogenicity-related genes in mutant strains

3 结论与讨论

西瓜噬酸菌作为革兰氏阴性菌在与寄主的长期互作过程中,已经进化出了多种复杂的致病机制,其中与致病力密切相关的机制即为 T3SS^[12]。T3SS 的核心组成部分是 8 种高度保守的 *hrc* 基因(*hrcR*、*hrcC*、*hrcN*、*hrcT*、*hrcQ*、*hrcU*、*hrcJ*、*hrcV*),它们在维持细菌 T3SS 完整性及病原菌致病能力方面均有重要作用^[6]。由于病原菌可通过 T3SS 将细菌效应蛋白转运到真核宿主细胞中^[17],因此,跨膜分泌装置在效应蛋白的转运过程中就显得尤为重要。HrcQ 所构成的胞质环为分泌装置的底座部分,其存在能够确保 T3SS 的完整性及Ⅲ型效应蛋白的输出^[16]。目前,在水稻条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* 和野油菜黄单胞菌 *X. campestris* 中 *hrcQ* 的研究较为透彻,已证实该基因在细菌致病过程中起着决定性作用^[16-17],但在西瓜噬酸菌中还未见报道。本研究证实西瓜噬酸菌中 *hrcQ* 缺失后,病原菌在非寄主烟草上引起过敏反应能力和在寄主上的致病性完全丧失,这说明 *hrcQ* 是西瓜噬酸菌在非寄主烟草上诱导 HR 的关键基因之一。在水稻条斑病菌 *X. oryzae* 中 *hrcQ* 基因缺失突变体丧失了非寄主烟草上的过敏反应和在寄主水稻上的致病性^[30],这与本试验结果相似。

群体感应系统(quorum-sensing, QS)对于西瓜噬酸菌 *A. citrulli* 的运动能力、毒力、种子黏附能力和生物膜形成能力等均有调控作用^[31],本研究中群体感应基因 *luxR* 在 $\Delta hrcQ$ 中表达量上升,表明 *hrcQ* 基因的缺失影响了该基因的表达。细菌鞭毛

及趋化性的存在对于病原菌的运动性和生物膜形成过程十分重要^[27,31],qRT-PCR 分析显示,*hrcQ* 与趋化性基因 *cheA*、鞭毛基因 *fliC* 和 *fliP* 等均存在调控关系,因而,该现象可以解释 *hrcQ* 缺失后菌株的运动性和生物膜形成能力均显著下降,低于野生型菌株。推测突变株 $\Delta hrcQ$ 可能是通过影响群体感应基因 *luxR*、鞭毛基因 *fliC* 和 *fliP* 以及趋化性基因 *cheA* 的表达,进而对菌株的运动性和生物膜形成能力等表型产生影响。前期研究结果表明,细菌的运动性和生物膜形成能力通常会影响其致病性^[27,32],在本研究中同样发现突变株 $\Delta hrcQ$ 丧失了寄主致病力,其在寄主体内的生长能力也显著降低,这与之前的报道相类似。

综上发现 T3SS 中 *hrcQ* 基因的缺失影响了多个致病表型相关基因的表达,包括鞭毛形成、群体感应及趋化性的相关基因,而鞭毛、趋化性及群体感应均与西瓜噬酸菌的定殖能力密切相关^[27,31]。瓜类细菌性果斑病为种传细菌性病害,而细菌在种子中定殖能力的强弱与幼苗发病率直接相关。因此,在本研究的基础上,可继续探究 *hrcQ* 缺失后是否影响西瓜噬酸菌在种子中的定殖能力。

由于种子的化学处理方法无法完全消灭定殖于种皮下的病原菌,因而种子处理对于 BFB 的防治效果有限^[33]。有研究表明,野油菜黄单胞菌 *X. campestris* 和解淀粉欧文氏菌 *Erwinia amylovora* 中 T3SS 突变体可作为生物防治剂^[34-35],防止病害的发生与流行。西瓜噬酸菌 AAC00-1 菌株中,提前使用 $\Delta hrcC$ 对种子进行处理,可以极大地降低幼苗带菌率,从而降低瓜类细菌性果斑病的发生^[12]。因此,后期我们将继续探索 $\Delta hrcQ$ 是否同样可以作为生物防治剂应用于种子或花,以期降低田间瓜类细菌性果斑病的大面积发生。

参考文献

- [1] BURDMAN S, WALCOTT R. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(8): 805 - 815.
- [2] SCHAAD N W, SOWELL G J, GOTH R W, et al. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1978, 28(1): 117 - 125.
- [3] SCHAAD N W, POSTNIKOVA E, SECHLER A, et al. Re-classification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend. *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov. *A. citrulli* Schaad et al. 1978) comb. nov. and proposal of *A. oryzae* sp. nov. [J]. Systematic & Applied Microbiology, 2008, 31(6): 434 - 446.
- [4] DUTTA B, GITAITIS R, SMITH S, et al. Interactions of seedborne bacterial pathogens with host and non-host plants in relation to seed infestation and seedling transmission [J/OL]. PLoS ONE, 2014, 9(6): e99215.
- [5] JIANG Chunhao, WU Fang, YU Zhenyun, et al. Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Microbiological Research, 2015, 170: 95 - 104.
- [6] BÜTTNER D, HE Shengyang. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria [J]. Plant Physiology, 2009, 150(4): 1656 - 1664.
- [7] GALÁN J E, COLLMER A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells [J]. Science, 1999, 284(5418): 1322 - 1328.
- [8] KVITKO B H, RAMOS A R, MORELLO J E, et al. Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(22): 8059 - 8072.
- [9] 李宾,李爱宁,魏强,等. 欧美杨细菌性溃疡病菌 *hrcJ* 基因的功能分析[J]. 林业科学, 2015, 51(12): 71 - 78.
- [10] SUGIO A, YANG Bing, WHITE F F. Characterization of the *hrpF* pathogenicity peninsula of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(6): 546 - 554.
- [11] 严婉荣,王铁霖,杨玉文,等. 瓜类细菌性果斑病菌 *hrcN* 基因的生物功能分析[J]. 植物病理学报, 2015, 45(1): 33 - 40.
- [12] JOHNSON K L, MINSAVAGE G V, LE T, et al. Efficacy of a nonpathogenic *Acidovorax citrulli* strain as a biocontrol seed treatment for bacterial fruit blotch of cucurbits [J]. Plant Disease, 2014, 95(6): 697 - 704.
- [13] 任争光,侯磊,宋治国,等. 甜瓜细菌性果斑病菌致病性突变体筛选与 *hrcR* 基因的克隆[J]. 植物病理学报, 2009, 39(5): 501 - 506.
- [14] 汪新,王卫,钱国良,等. 瓜类细菌性果斑病菌过敏反应和致病性(*hrp*)基因簇部分基因的克隆及功能分析[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(1): 36 - 44.
- [15] DENG Wanyin, MARSHALL N C, ROWLAND J L, et al. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems [J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(6): 323 - 337.
- [16] ZHANG Xiaoping, WANG Chunlian, ZHENG Chongke, et al. HrcQ is necessary for *Xanthomonas oryzae*, pv. *oryzae*, HR-induction in non-host tobacco and pathogenicity in host rice [J]. The Crop Journal, 2013, 1(2): 143 - 150.
- [17] LORENZ C, HAUSNER J, BÜTTNER D. HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas* [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e51063.
- [18] YAN Shasha, YANG Yuwen, WANG Tielin, et al. Genetic

- diversity analysis of *Acidovorax citrulli* in China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 136(1):171–181.
- [19] KOVACH M E, ELZER P H, HILL D S, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes [J]. Gene, 1995, 166(1):175–176.
- [20] ZHANG Xiaoxiao, ZHAO Mei, YAN Jianpei, et al. Involvement of *hrpX* and *hrpG* in the virulence of *Acidovorax citrulli* strain Aac5, causal agent of bacterial fruit blotch in cucurbits [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:507.
- [21] 陈亮. 西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*) III型分泌系统抑制剂的高通量筛选[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [22] ZHANG Yanbao, WEI Chao, JIANG Wendi, et al. The HD-GYP domain protein RpfG of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* regulates synthesis of extracellular polysaccharides that contribute to biofilm formation and virulence on rice [J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(3):e59428.
- [23] PHILIPPE N, ALCARAZ J P, COURSANGE E, et al. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria [J]. Plasmid, 2004, 51(3):246–255.
- [24] WALCOTT R R, GITAITIS R D. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 2000, 84(4):470–474.
- [25] BAHAR O, KRITZMAN G, BURDMAN S. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity [J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 123(1):71–83.
- [26] BAHAR O, GOFFER T, BURDMAN S. Type IV Pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, 22(8):909.
- [27] REN Zhengguang, JIANG Wenjun, NI Xingya, et al. Multiplication of *Acidovorax citrulli* in planta during infection of melon seedlings requires the ability to synthesize leucine [J]. Plant Pathology, 2014, 63(4):784–791.
- [28] 张爱萍, 张晓晓, 吴林娜, 等. 西瓜噬酸菌趋化性及鞭毛素基因 $\Delta cheA \Delta fliC$ 双突变体构建及功能 [J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(11):1838–1850.
- [29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4):402–408.
- [30] 张鼎鼎, 邹丽芳, 赵梅勤, 等. *hrcQ* 基因决定水稻条斑病菌在非寄主烟草上的过敏反应和在寄主水稻上的致病性 [J]. 中国水稻科学, 2011, 25(1):11–18.
- [31] WANG Tielin, GUAN Wei, HUANG Qi, et al. Quorum-sensing contributes to virulence, twitching motility, seed attachment and biofilm formation in the wild type strain Aac-5 of *Acidovorax citrulli* [J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 100:133–140.
- [32] TIAN Yanli, ZHAO Yuqiang, WU Xinrong, et al. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon [J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(1):38–47.
- [33] HOPKINS D L, THOMPSON C M. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits [J]. Hortscience A Publication of the American Society for Horticultural Science, 2002, 37(6):924–926.
- [34] MOSS W, BYRNE J, CAMPBELL H, et al. Biological control of bacterial spot of tomato using *hrp* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [J]. Biological Control, 2007, 41(2):199–206.
- [35] THARAUD M, LAURENT J, FAIZE M, et al. Fire blight protection with avirulent mutants of *Erwinia amylovora* [J]. Microbiology, 1997, 143(2):625–632.
- (责任编辑: 田 喆)
- ~~~~~
- (上接 24 页)
- [36] NAGOSHI R N, BRAMBILA J, MEAGHER R L. Use of DNA barcodes to identify invasive armyworm *Spodoptera* species in Florida [J]. Journal of Insect Science, 2011, 11: 154.
- [37] UNBEHEND M, HANNIGER S, VASQUEZ G M, et al. Geographic variation in sexual attraction of *Spodoptera frugiperda* corn-and rice-strain males to pheromone lures [J]. PLoS ONE, 2014, 9: e89255.
- [38] NAGOSHI R N, SILVIE P, MEAGHER R L. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil [J]. Journal of Economic Entomology, 2007, 100(3): 954–961.
- [39] NAGOSHI R N, MEAGHER R L, FLANDERS K, et al. Using haplotypes to monitor the migration of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Texas and Florida [J]. Journal of Economic Entomology, 2008, 101(3): 742–749.
- [40] NAGOSHI R N, ROSAS-GARCIA N M, MEAGHER R L, et al. Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior [J]. Journal of Economic Entomology, 2015, 108(1): 135–144.
- [41] NAGOSHI R N, MEAGHER R L, HAY-ROE M. Inferring the annual migration patterns of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the United States from mitochondrial haplotypes [J]. Ecology and Evolution, 2012, 2(7): 1458–1467.
- [42] GOUIN A, BRETAUDEAU A, NAM K. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 11816.
- [43] LIU Q N, CHAI X Y, BIAN D D. The complete mitochondrial genome of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Genes & Genomics, 2016, 38:205–216.
- (责任编辑: 田 喆)