西瓜噬酸菌III型分泌系统 hrcS 基因功能分析

白庆荣1.2 范泽慧1.2 关 巍2* 杨琳琳2 杨玉文2 赵廷昌2*

(1. 吉林农业大学植物保护学院,长春 130118; 2. 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:为明确编码III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)中重要核心蛋白的 hrcS基因对西瓜噬酸菌 Acidovorax citrulli 致病力的影响,以西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5 为对象,通过基因敲除构建 hrcS 基因缺失突变菌株 $\Delta hrcS$ 及其互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp,测定其致病力及致病相关基因表达量、烟草过敏性反应能力、运动能力及运动能力相关基因表达量、生物膜形成能力和离体生长能力。结果显示,与野生型菌株 Aac5 相比, hrcS 基因缺失突变菌株丧失了对寄主的致病能力和引起非寄主烟草过敏性反应能力,运动能力显著增强了 191.75%,生物膜形成能力显著下降了 43.90%,离体生长能力在达到对数期后呈下降趋势。 hrcS 基因缺失使西瓜噬酸菌 T3SS 中 hrpG、hrpX 和 hrpE 基因以及鞭毛 fliC 基因表达量显著上调,分别为野生型菌株的 2.27 倍、2.38 倍、1.26 倍和 1.77 倍,1.26 件次 1.26 经本产品,以为野生型菌株的 1.26 经本产品,以为野生型菌林的 1.26 经本产品,以为野生型菌株的 1.26 经本产品,以为野生型菌株的 1.26 经本产品,以为野生型菌株的 1.26 经本产品,以为野生型菌株的 1.26 经本产品,以为野生型菌林的 1.26 经本产品,以为野生型菌林的 1.26 经本产品,以为财

关键词: 西瓜噬酸菌; Ⅲ型分泌系统; hrcS基因; 基因功能; 致病力

Functional analysis of *hrcS* gene in type III secretion system of bacterial pathogen *Acidovorax citrulli*

Bai Qingrong^{1,2} Fan Zehui^{1,2} Guan Wei^{2*} Yang Linlin² Yang Yuwen² Zhao Tingchang^{2*}

- (1. College of Plant Protection, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China;
- State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
 Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to understand the role of hrcS gene encoding core protein of type III secretion system (T3SS) in the pathogenicity of $Acidovorax\ citrulli$, the hrcS deletion strain $\Delta hrcS$, and its complementation strain $\Delta hrcS$ -comp were derived from Aac5, a wild type strain of $A.\ citrulli$ in this study. The pathogenicity and the expression levels of genes involved in pathogenicity, hypersensitive response on tobacco, motility and the expression levels of genes involved in motility, biofilm formation, $in\ vitro$ growth rate of the $A.\ citrulli$ strains were determined. The results showed that the hrcS deletion mutant strain lost its virulence to the watermelon seedlings and the ability to induce hypersensitive reaction on non-host $Nicotiana\ tabacum$. Compared to the wild type strain Aac5, the swimming motility of the mutant strain significantly increased by 191.75%, while the biofilm formation decreased by 43.90%, and the $in\ vitro$ growth rate decreased after logarithmic phase. The hrcS gene deletion significantly increased the expression level of T3SS genes hrpG, hrpX, hrpE and flagellin gene fliC by 2.27, 2.38, 1.26 and 1.77 times, respectively. However, the expression level of T3SS gene hrcO was significantly re-

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201300,2017YFD0201608),财政部和农业农村部国家西甜瓜产业技术体系(CARS-25),中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(S2019XM06),中国农业科学院创新工程

^{*} 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: wguan@ippcaas.cn, zhaotgcg@163.com 收稿日期: 2021-02-07

duced by 50.75%. These results indicated that the gene *hrcS* plays an important role in maintaining the pathogenicity of *A. citrulli*.

Key words: Acidovorax citrulli; type III secretion system (T3SS); hrcS; gene function; pathogenicity

西瓜和甜瓜在我国水果生产和消费中占有重要 地位,是我国城乡居民生活的重要时令水果,也是一 种高效园艺作物,能够带动农民脱贫致富和乡村振 兴。瓜类细菌性果斑病在西瓜和甜瓜的整个生长期 均可发生,其病原菌为西瓜噬酸菌 Acidovorax citrulli,果实期寄主果实表皮出现褐色病斑并龟裂, 果肉腐烂,严重影响西瓜和甜瓜的产量和品质(Bahar & Burdman, 2010; Burdman & Walcott, 2012)。西 瓜噬酸菌是革兰氏阴性细菌,通过单根长约4.0~5.0 µm 的极生鞭毛运动,不产芽胞,无荚膜(赵廷昌等, 2001)。目前西瓜和甜瓜种植业中仍缺乏大规模推 广的商业抗性品种,对瓜类细菌性果斑病的防治仍 主要依靠化学药剂等相对传统的植保措施,随着长 期的化学药剂施用,瓜类细菌性果斑病病原菌群体 有产生抗药性的趋势,因此研发多类型抗菌抑制剂 对于防控瓜类细菌性果斑病具有重要意义。

III型分泌系统(type III secretion system, T3SS) 是一个注射器状结构的装置蛋白(乔培等,2020),由 hrp(hypersensitive response & pathogenicity)基因簇 编码组装,是西瓜噬酸菌致病过程中定殖的关键因 子。西瓜噬酸菌 T3SS 中的 hrp 基因簇调控机制属 于hrp II型,其核心调控基因与野油菜黄单胞菌Xanthomonas campestris 相同,均为 hrpG和 hrpX基因 (姜伯乐,2004; Zhang et al.,2018)。基因簇 hrp 中具 有高度保守的 hrc (hypersensitive response & conserved)基因簇,其编码的hrc蛋白能使效应蛋白穿 过细菌胞膜转运,进而侵染寄主(Bogdanove et al., 1996; Alfano & Collmer, 2004)。西瓜噬酸菌中 hrc 基因簇在西瓜噬酸菌致病过程中起着关键作用,基 因 hrcV(Bahar et al., 2009)、hrcR(任争光等, 2009)、 hrcT(汪新,2010)、hrcC(Johnson et al.,2011)和hrcQ (于畅等,2019)的单独缺失均能导致西瓜噬酸菌致 病力和引起烟草过敏性反应(hypersensitive response,HR)能力的丧失;hrcN基因缺失后西瓜噬酸 菌致病力和引起HR的能力也会减弱(严婉荣等, 2015)。以保守基因 hrcC、hrcU和 hrcJ的转录表达 量为标准,陈亮(2016)和 Ma et al.(2019)在西瓜噬 酸菌菌株 MH21 中筛选获得能抑制西瓜噬酸菌 T3SS 分泌效应蛋白的丙二腈肟醚类化合物和苄基 羰基酰二氰化物衍生物,其能使T3SS失去致病力。 西瓜噬酸菌同属的燕麦噬酸菌 A. avenae 中 hrcS基因与 hrcR、hpaA基因之间存在调控关系(Tampakaki et al.,2010),西瓜噬酸菌中 hrcS基因与 hrcQ基因也存在调控关系(于畅等,2019),但其功能及与T3SS中其他重要调控基因的关系尚不明晰,探究 hrcS基因致病机理对研发靶性西瓜噬酸菌药物具有重要意义。

为明确编码T3SS中重要核心蛋白的 hrcS基因对西瓜噬酸菌致病力的影响,本研究通过基因敲除构建 hrcS基因缺失突变菌株 ΔhrcS 及其互补菌株 ΔhrcS-comp,测定这些菌株致病力及其与致病相关基因的表达量、烟草过敏性反应能力、运动能力及其与运动能力相关基因的表达量、生物膜形成能力和离体生长能力,解析 hrcS基因在西瓜噬酸菌致病中的角色和在致病调控网络中的作用,以期为开发西瓜噬酸菌新型靶标非抗生素抗细菌药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和植物:西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5 自感病西瓜叶片中分离,由本实验室保存,经鉴定为西瓜噬酸菌II组菌株(Yan et al., 2013),对氨苄青霉素有抗性;具有氯霉素抗性的助手菌大肠杆菌 Escherichia coli pRK600 菌株;具有卡那霉素抗性的质粒 pK18mobsacB 且含有 sacB 蔗糖致死位点;具有卡那霉素抗性的质粒 pBBR1MCS-2,具有 lac 启动子,以上菌株和质粒均由本实验室保存。西瓜品种为中蔬瑞宏,种子由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供;烟草品种为枯斑三生烟 Nicotiana tabacum var. samsun,由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保存,在日光温室内种植,待其长到6叶期供试。

培养基: KB(King's B)液体培养基成分为丙三醇 15 mL、MgSO $_4$ 1.5 g、K $_2$ HPO $_4$ 1.5 g、胰蛋白胨 15 g,pH 7.0; LB(Luria-Bertani)固体培养基成分为胰蛋白胨 15 g、酵母提取物 10 g、NaCl 10 g、琼脂粉 15 g,pH 7.0; 0.3% 半固体运动性专用培养基成分为酵母提取物 0.3 g、细菌专用蛋白胨 0.3 g、琼脂粉 3 g,pH 7.0。上述培养基均加去离子水配至 1 L,以 121 $^{\circ}$ 灭菌 20 min,待温度降至 40 $^{\circ}$ 、边摇边加入相应试验的抗生素再倒至平板中备用。 M9 培养基成分为

MgSO₄ 200 μL、20% 柠檬酸钠 2 mL、琼脂 3 g、蔗糖 20 g及 40 mL的 5×M9溶液(NaCl 0.1 g、NH₄Cl 0.2 g、KH₂PO₄ 0.6 g、Na₂HPO₄·12H₂O 3.0 g,去离子水定容至 200 mL),pH 7.0,去离子水定容至 1 L,以 110 ℃ 灭菌 20 min,待温度降至 40 ℃,边摇边加入相应试验的抗生素再倒至平板中备用。培养基中所用到的抗生素均以双蒸水作为溶剂,氨苄青霉素、卡那霉素和氯霉素的浓度分别为 100、50 和 50 μg/mL。

试剂和仪器:大肠杆菌感受态细胞 $DH5\alpha$ 菌株, 天根生化科技(北京)有限公司; Axygen Multisource DNA 试剂盒,康宁生命科学(吴江)有限公司; KOD plus Neo 试剂盒,日本 TOYOBO 公司; Axygen 凝胶 回收试剂盒,美国 Axygen公司; Kpn I/BamH I,日本 TaKaRa公司; EcoR I/BamH I限制性内切酶,宝日医生物技术(北京)有限公司;其他试剂均为国产分析纯。RXZ型智能人工气候箱,宁波江南仪器厂; Evolution E300 紫外可见分光光度计,美国 Thermo Fisher公司; 24孔和 200孔聚苯乙烯培养板,美国 Axygen公司。AriaMx Mx3000P 荧光定量 PCR 仪,美国 Agilent公司; EOS 7D 相机,日本 Canon公司。

1.2 方法

1.2.1 西瓜噬酸菌hrcS基因的生物信息学分析

通过 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 和 KEGG (https://www.kegg.jp/) 网站查找并了解 hrcS 蛋白的基本信息。使用 SMART 9.0 在线软件分析 hrcS 蛋白质结构域。使用 BlastP 软件进行 hrcS蛋白质序列同源性比对。利用 MEGA 11.0 软件采用最大似然法构建系统发育树,自展检测重复 1 000 次。使用 TMHMM 2.0 在线软件预测 hrcS 蛋白跨膜结构域。使用 DNAMAN 6软件进行 hrcS基因序列分析。

1.2.2 hrcS突变菌株及互补菌株的筛选及验证

通过 KEGG 数据库获取西瓜噬酸菌 hrcS基因上下游序列,使用软件 Primer Premier 5.0设计引物 hrcS-L F (5'-GCTATGACATGATTACGAATTCTCC-GCCCAAAGCTCCA-3')/R (5'-TGAGAAGCGCTG-CGAGCATGAGTTCTCGGAGGT-3') 和 hrcS-R F (5'-ACCTCCGAAGCACTCATGCTCGCAGCGGC-TTCTCA-3')/R (5'-GCAGGTCGACTCTAGAGGAT-CCGCTGCCTTCCTCATCCTG-3'),所有引物均由北京华大基因科技有限公司合成。按照 Axygen Multisource DNA 试剂盒说明书提取西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5的 DNA。以提取的 DNA 为模板,使用KOD plus Neo试剂盒克隆 hrcS上下游片段,然后再进行重叠 PCR 将上下游片段融合。使用限制性

内切酶 EcoR I/BamH I对自杀性质粒 pK18mobsacB 进行双酶切并提取纯化,再将酶切后的质粒与hrcS 基因上下游片段融合产物连接,得到质粒pK18hrcS,导入至大肠杆菌感受态细胞 DH5α 菌株后在 含100 μg/mL卡那霉素的LB固体平板上培养24 h, 收集菌体后提取质粒,并使用引物 hrcS-L F/R 对重 组质粒进行验证,将验证正确的菌液委托北京华大 基因科技有限公司测序。利用三亲本杂交方法将具 有氯霉素抗性的大肠杆菌菌株pRK600、具有氨苄 青霉素抗性的野生型菌株 Aac5 和具有卡那霉素抗 性的大肠杆菌菌株 pK18-hrcS 分别在 200 r/min、 28 ℃条件下培养24 h,于无菌水中重悬,混合后涂 布于LB固体培养基上,于28 ℃、200 r/min条件下培 养48 h后挑取圆形褐色单菌落置于含有卡那霉素的 KB液体培养基中于28 ℃、200 r/min条件下摇培, 12 h 后使用引物 hrcS-J F (5'-GTGAACCGTTCC-GCAAGT-3')/R (5'-GCTGCTTGAGGCGGAAT-3') 对筛选到的菌株进行PCR验证。25 µL反应体系: 菌液 1 μL、2×PCR Mix 12.5 μL、Primer-F/R各 1 μL、 ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应程序:95 ℃预变性 3 min; 95 ℃变性30 s,退火30 s(hrcS-J、hrcS-T和WFB的退 火温度分别为56、58和58 ℃),72 ℃延伸30 s,25 个 循环;72 ℃再延伸5 min后12 ℃终止反应。将验 证为阴性的菌株涂布在含10%蔗糖及具有氨苄青 霉素抗性的M9培养基上于28 ℃培养,直至出现单 菌落,挑取单菌落置于KB液体培养基中于28℃、 200 r/min条件下培养。使用 hrcS基因特异性引物 hrcS-T F (5'-AACATCGTCCAGCTCACCTCC-3')/R (5'-GCCGTGAGAAGCCGCTG-3') 及西瓜噬酸菌 特异性引物 WFB1 (5'-GACCAGCCACACTGGG-AC-3')/WFB2(5'-CTGCCGCACTCCAGCGA-3')对 所得菌株进行PCR验证,反应体系及程序同上。在 PCR 结果中 hrcS-T F/S 阴性且 WFB1/WFB2 为阳性 的菌株为 hrcS 基因缺失突变菌株,即突变菌株 $\Delta hrcS_{\circ}$

通过KEGG数据库获取 hrcS基因序列及其上游启动子序列,使用软件 Primer Premier 5.0设计引物 hrcS-H F (5'-TAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCCAACATGGTGCTCAACGG-3')/R (5'-GCTCTAGAACTAGTGGATCCGCTGCTTGAGGCGGAAT-3')。以西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5 基因组DNA 为模板,使用 KOD plus Neo 试剂盒进行 PCR 扩增。50 μL 扩增体系: KOD Buffer 5 μL、KOD neoase 1 μL、MgSO₄3 μL、dNTP 5 μL、Aac-5 DNA 1 μL、

GC enhancer 10 µL、Primer-F/R 各1.5 µL、dd H₂O 22 µL。 PCR 反应程序: 94 ℃预变性 2 min; 98 ℃变性 10 s, 60 ℃退火 30 s,68 ℃延伸 2 min,30 个循环;68 ℃再 延伸3 min后4℃终止反应。使用Axygen凝胶回收 试剂盒回收821 bp的扩增产物。使用Kpn I/BamH I 对质粒pBBR1MCS-2进行双酶切,用融合PCR将目 的基因及其上游启动子片段与酶切后的 pBBR1 MCS-2载体连接,获得pBBR-hrcS互补载体。通过 助手菌大肠杆菌菌株 pRK600 将互补载体 pBBRhrcS导入到突变菌株 $\Delta hrcS$ 中,使用 hrcS基因特异 性引物 hrcS-T F/R 及西瓜噬酸菌特异性引物 WFB1/ WFB2进行筛选,均呈阳性的菌株即为待测互补菌 株。将所得菌株委托北京华大基因科技有限公司测 序,产物与AAC00-1基因组中hrcS基因序列比对成 功则为 $\Delta hrcS$ 互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp。所用序列均委 托北京华大基因科技有限公司测序。

1.2.3 菌株致病力及相关基因表达量的测定

将西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5、突变菌株 ΔhrcS和互补菌株 ΔhrcS-comp 于 KB 液体培养基中 28 ℃摇培48 h,将菌悬液浓度均调至3×108 CFU/mL 待用。将西瓜种子置于50 ℃无菌水中浸泡30 min, 常温无菌水冲洗3次,于菌悬液中浸泡30 min,将其 播于直径9 cm、高 15 cm 的花盆中,花盆中装有灭菌 的混合培植土(营养土、草炭土、蛭石土和珍珠岩的 体积比为2:2:1:1),每个处理种3个花盆,每盆8颗种 子。将花盆置于光周期为16L:8D(光照时温度为 28 ℃、黑暗时温度为16 ℃)的光照培养箱中培养。 从发芽开始每7d对西瓜出芽情况、叶片发病情况及 幼苗死亡情况进行调查并记录,共调查3次。根据 发病情况按照病情指数分级标准确定病情分级,计 算病情指数,并计算出芽率和幼苗死亡率。病情分 级标准:0级,未发病;1级,西瓜子叶叶片以及幼苗 茎部发病面积占总面积≤25%;2级,25%<发病面积 占总面积的比例<50%;3级,50%<发病面积占总面 积的比例<70%;4级,70%<发病面积占总面积的比 例≤90%;5级,发病面积占总面积的比例>90%。病 情指数=100×∑(各级病叶数×各级代表值)/调查总 叶数×最高级代表值。

为明确 hrcS基因缺失菌株对西瓜噬酸菌致病力影响是否与T3SS有关,利用实时荧光定量PCR技术检测西瓜噬酸菌突变菌株 $\Delta hrcS$ 中T3SS主要调控基因 hrpG、hrpX 及致病相关基因 hrpE、hrcQ相对表达量较野生型菌株 Aac5 的变化。利用TRIzol方法(于畅等, 2019)提取野生型菌株 Aac5 和突变菌

株 $\Delta hrcS$ 的总 RNA 并反转录成 cDNA,将其浓度均 调节为100 ng/μL。以 hrpG F(5'-CTCGCCTGGCT-GCTGTT-3')/R (5'-CCTTGTAGATGTGCTGCTCC-3') \hrpX F (5'-GCGCTCACGCAAATGCT-3')/R (5'-GGCAAGCTCCTCCTGTCCTA-3') , hrpE F (5'-GT-CAGGATGGACACGCAGGC-3')/R (5'-AACGCAT-GGTGCTGGCAGAG-3')和 hrcQF (5'-CGAAATC-GCCCTCCACG-3')/R (5'-GTGGCCTCGGGTTCG-G-3')为引物,以内参基因 rpoB F(5'-GCGACAGC-GTGCTCAAAGTG-3')/R (5'-GCCTTCGTTGGTG-CGTTTCT-3′)进行实时荧光定量PCR。25 µL荧光定 量 PCR 反应体系: cDNA 1 μL、2×SuperReal PreMix Plus 12.5 μL, 50×ROX Reference Dye 0.3 μL, Primer-F/R 各 1 μL、ddH₂O 9.2 μL。反应程序:95 ℃预变性 15 min; 95 ℃变性 10 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s,40个循环。试验处理3次重复,通过荧光定量 PCR 得到 Ct 值, 将野生型菌株中相关基因表达量视 为1,计算目的基因相对表达量(Livak & Schmittgen, 2001)_o

1.2.4 西瓜噬酸菌菌株烟草过敏性反应能力测定

用KB液体培养基将西瓜噬酸菌野生型菌株Aac5、突变菌株 ΔhrcS和互补菌株 ΔhrcS-comp 分别培养至对数期,将其菌液均调节至 3×10⁸ CFU/mL。用一次性无菌注射器将3种菌液注射分别接种到6叶期三生烟草叶背,以接种ddH₂O为阴性对照,24 h后观察烟草的发病情况,并拍照记录。每株菌株接种3片叶片,试验重复3次。

1.2.5 西瓜噬酸菌菌株运动能力及基因表达量测定 用KB液体培养基将西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5、突变菌株 ΔhrcS和和互补菌株 ΔhrcS-comp 培 养至对数期,将菌液浓度均调节至3×10°CFU/mL, 各取2 µL菌液轻点于0.3%半固体运动性专用培养 基中央,28 ℃培养48 h后拍照并测量菌落晕圈直 径。每株菌株6个生物学重复,试验重复3次。菌株 运动能力与病原菌对寄主植物的定殖能力有关,西 瓜噬酸菌中鞭毛基因fliC(张爱萍,2017)和趋化性 基因 cheA (杨姗姗, 2015) 均对运动能力有影响。为 明确hrcS基因缺失对西瓜噬酸菌运动能力的影响 是否与运动能力相关基因有关,利用实时荧光定量 PCR技术检测西瓜噬酸菌突变菌株 $\Delta hrcS$ 中 cheA 及 fliC基因相对表达量的变化。以cheAF(5'-CGGC-GATTTCGACCTCAG-3')/R (5'-GCGCTCAGGTC-CAGATCCA-3')和fliC F (5'-GAGTCGGGCAAGG-ACATCA-3')/R(5'-CTGCCGTGGCGGTAGTGA-3')

为引物进行实时荧光定量 PCR, 反应条件、反应体系及测定方法同1.2.3。

1.2.6 西瓜噬酸菌菌株生物膜形成能力的测定

用吸光度来定量测定生物膜的形成能力。分别吸取 1.2.5 制备的浓度均为 3×10⁸ CFU/mL 的 3 株菌株菌液 500 μL,分别加入到 24 孔聚苯乙烯培养板中,28 ℃静置7 d,弃菌液并用无菌水清洗孔板2~3次,80 ℃固定30 min后加入1 mL 0.1%结晶紫,静置45 min以染色,无菌水清洗孔板3次后于37 ℃烘干,待孔板干涸且呈透明紫色拍照观察,每个孔板加1.5 mL 95% 乙醇溶液溶解,静置2 h,用分光光度计于575 nm 波长处测定吸光度(Head & Yu,2004)。每株菌株6个生物学重复,试验重复3次。

1.2.7 西瓜噬酸菌菌株离体生长能力的测定

用 KB 液体培养基将西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5、突变菌株 AhrcS 和互补菌株 AhrcS-comp 培养 至对数期,将菌悬液浓度均调节至 3×10⁸ CFU/mL, 稀释 100 倍后置于 200 孔聚苯乙烯培养板上,于 28 ℃振荡培养,每 2 h于 600 nm 处测定菌液吸光度 OD_{600 nm},共测定 36次。试验重复 3次。

1.3 数据分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。应用 t 检验法对基因表达量进行差异显著性检验,其他数据均采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 西瓜噬酸菌hrcS基因生物信息学分析

hrcS基因在西瓜噬酸菌 AAC00-1基因组中编号为 Aave_0448,全长 264 bp,与上下游基因转录方向均一致。hrcS 基因与 T3SS 基因 hrcQ (Aave_0450)调控关系密切,并与编码 T3SS 鞭毛合成相关蛋白基因 flhB (Aave_4412)可能存在互作,hrcS基因编码 T3SS 结构蛋白 hrcS,hrcS 蛋白由 87个氨基酸组成,等电点为 5.36,分子量为 9 071.73。hrcS蛋白具有 2个跨膜螺旋结构,期望值超过 18。hrcS蛋白与多个同源物在效应区域具有较高的序列相似性。系统发育树结果显示,噬酸菌属与青枯菌属 Ralstonia sp.的 hrcS 同源蛋白聚为一类,西瓜噬酸菌 hrcS蛋白与燕麦噬酸菌 hrcS蛋白亲缘关系较近(图 1),表明西瓜噬酸菌中的 hrcS蛋白较保守。



图1 基于hrcS蛋白序列采用最大似然法构建西瓜噬酸菌与其相关种的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Acidovorax citrulli and related species using maximum likelihood method based on hrcS protein sequence

2.2 西瓜噬酸菌hrcS突变菌株及其互补菌株的验证

经西瓜噬酸菌引物 WFB1/WFB2 扩增后, hrcS 基因缺失突变菌株 $\Delta hrcS$ 和互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp 均可得到大小 360 bp 的目的条带(图 2-A), 表明该菌株为西瓜噬酸菌。经hrcS基因特异性引物hrcS-TF/R 扩增后, hrcS 基因缺失突变菌株 $\Delta hrcS$ 不能扩增出相应的目的条带, 而互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp 能扩增出大小 360 bp 的目的条带(图 2-B), 表明 hrcS 基因缺失突变菌株及互补菌株均已成功获得。

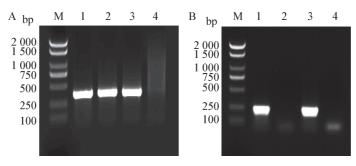
2.3 hrcS突变菌株致病力及相关基因表达量

与西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5 相比,突变菌株 ΔhrcS完全丧失了致病力,西瓜幼苗生长良好,生长 状态同对照;互补菌株 ΔhrcS-comp 恢复部分致病力,子叶期西瓜嫩叶叶尖呈黑色,叶片有水渍状的黄色病斑,严重者有幼芽死亡(图3)。

西瓜噬酸菌突变菌株 $\Delta hrcS$ 处理后,西瓜幼苗的病情指数为0,较野生型菌株 Aac5 处理后的病情指数(59.0)显著下降(P<0.05),西瓜噬酸菌互补菌

株 $\Delta hrcS$ -comp 处理后,西瓜幼苗的病情指数为25.5,较突变菌株 $\Delta hrcS$ 处理后的病情指数有所恢复,但仍显著低于野生型菌株 Aac5 处理后的病情指数(P<0.05,图4-A),表明 hrcS 基因影响西瓜噬酸菌的致病力。在西瓜噬酸菌突变菌株 $\Delta hrcS$ 中, T3SS相关基因 hrpG、hrpX、hrpE 的相对表达量显著上调

(P<0.05),分别为野生型菌株 Aac5中 hrpG、hrpX和 hrpE基因相对表达量的 2.27倍、2.38倍和 1.26倍,在 西瓜噬酸菌突变菌株 $\Delta hrcS$ 中,T3SS 相关基因 hrcQ 显著下调 (P<0.05),为野生型菌株 Aac5中 hrpQ基 因相对表达量的 50.75% (图 4-B),表明 hrcS基因是 T3SS的主要调控基因。



A: 西瓜噬酸菌引物 WFB1/WFB2 检测; B: hrcS基因特异性引物 hrcS-T F/R 检测。M: 2000 bp DNA marker; 1: 野生型菌株 Aac5; 2~3: hrcS基因缺失突变菌株 ΔhrcS和互补菌株 ΔhrcS-comp; 4: 阴性对照。A: Detection of primers WFB1/WFB2 for Acidovorax citrulli; B: detection of specific primers hrcS-T F/R. M: 2000 bp DNA marker; 1: wild type strain Aac5; 2–3: mutant strain of hrcS gene ΔhrcS and complementary strain ΔhrcS-comp; 4: negative control.

图 2 西瓜噬酸菌 hrcS 基因缺失突变菌株 ΔhrcS 及互补菌株 ΔhrcS-comp 的 PCR 验证

Fig. 2 PCR verification of hrcS gene deletion mutant strain ΔhrcS and complementary strain ΔhrcS-comp of Acidovorax citrulli

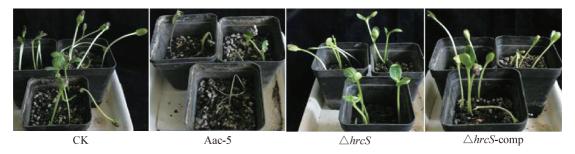


图3 接种西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5、突变菌株 AhrcS 和互补菌株 AhrcS-comp 7 d 后西瓜幼苗的症状

Fig. 3 Symptoms of watermelon seedlings seven days after inoculating with wide type strain of Aac5, hrcS gene deletion mutant strain $\Delta hrcS$ and complementary strain $\Delta hrcS$ -comp of $Acidovorax\ citrulli$

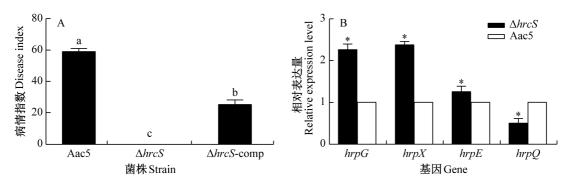


图 4 西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5、突变菌株 $\Delta hrcS$ 和互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp 的致病力(A)及其相关基因表达量(B)

Fig. 4 Pathogenicity (A) and relative expression levels of genes related to pathogenicity (B) of wide type strain of Aac5, hrcS gene deletion mutant strain $\Delta hrcS$ and complementary strain $\Delta hrcS$ -comp of Acidovorax citrulli

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著(P<0.05); *表示处理之间经t检验 法检验差异显著(P<0.05)。 Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference used by Duncan's new multiple range test (P<0.05); * indicates significant difference between treatments used by t test (P<0.05).

2.4 hrcS突变菌株对烟草的过敏性反应能力

将西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5、突变菌株 $\Delta hrcS$ 和互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp接种到烟草叶背 24 h后,只有野生型菌株 Aac5 能引起非寄主烟草的过敏性反应,表明 hrcS-基因缺失后西瓜噬酸菌丧失烟草过敏性反应能力,且互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp未恢复烟草过敏性反应能力(图5)。

2.5 hrcS突变菌株运动能力及其相关基因表达量

突变菌株 $\Delta hrcS$ 和互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp 菌落晕圈直径分别为 2.83 cm 和 0.83 cm,前者较野生型菌株 Aac5 菌落直径(0.97 cm)显著增加 191.75%(P<0.05,图 6-A),后者与野生型菌株 Aac5 菌落直径差异不显著,表明 hrcS基因缺失后西瓜噬酸菌的运动能力显著增强。在突变菌株 $\Delta hrcS$ 中,鞭毛基因 fliC 相对

表达量显著上调(*P*<0.05),为野生型菌株 Aac5 中 *fliC*基因相对表达量的 1.77 倍;趋化性基因 *cheA* 相 对表达量上调,但与野生型菌株 Aac5 差异不显著 (图 6-B)。

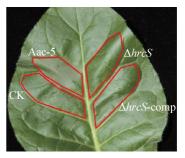


图5 西瓜噬酸菌不同菌株对非寄主烟草的过敏性反应 Fig. 5 Tobacco hypersensitive reaction test using different strains of *Acidovorax citrulli*

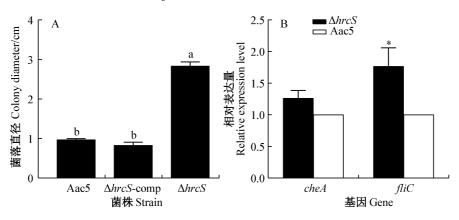


图 6 基因 hrcS 缺失对西瓜噬酸菌游动能力(A)及运动相关基因表达量(B)的影响

Fig. 6 Effects of *hrcS* gene deletion on swimming motility (A) and relative expression level (B) of motility-related genes in *Acidovorax citrulli*

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著(P<0.05); *表示处理之间经 t 检验 法检验差异显著(P<0.05)。 Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference used by Duncan's new multiple range test (P<0.05); * indicates significant difference between treatments used by t test (P<0.05).

2.6 西瓜噬酸菌hrcS突变菌株生物膜形成能力

西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5、互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp 和突变菌株 $\Delta hrcS$ 吸光度分别为 0.41、0.42 和 0.23,突变菌株 $\Delta hrcS$ 吸光度较野生型菌株 Aac5 显著降低 43.90% (P<0.05,图7),而互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp 的吸光度与野生型菌株 Aac5 的吸光度接近,表明互补菌株的生物膜形成能力已经恢复。

2.7 西瓜噬酸菌hrcS突变菌株离体生长能力

西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5、突变菌株 $\Delta hrcS$ 及互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp 同时到达对数期;从对数生长期向平稳期过渡时,突变菌株 $\Delta hrcS$ 的离体生长能力较野生型菌株 Aac5 下降,而互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp 离体生长能力略高于野生型菌株 Aac5 (图 8),表明 hrcS基因缺失后西瓜噬酸菌在寄主体内及离体生长

能力减弱。

3 讨论

本研究通过同源重组双交换筛选得到西瓜噬酸菌 hrcS 基因缺失突变菌株 $\Delta hrcS$, 与野生菌株相比该菌株丧失对西瓜幼苗的致病性, 丧失对非寄主烟草的过敏性坏死反应能力, 离体生长能力也出现下降趋势, 表明 hrcS 基因在维持西瓜噬酸菌致病能力方面有不可或缺的作用。在基因缺失突变菌株 $\Delta hrcS$ 中, hrpG、hrpX 和 hrpE 基因表达量均显著上调, 基因 hrcQ 表达量显著下调, 表明 hrcS 基因同hrpG、hrpX 和 hrpE 基因之间存在负相关调控关系,同 hrcQ 基因存在正相关调控关系,进一步完善了T3SS 中 hrp 基因簇调控关系,但 hrcS 基因与其他致

病基因之间更确切的调控关系还需结合蛋白试验等 进一步验证。

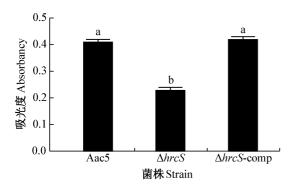


图 7 基因 hrcS 缺失对西瓜噬酸菌生物膜形成能力的影响 Fig. 7 Effects of hrcS gene deletion on biofilm formation of Acidovorax citrulli

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经Duncan 氏新复极差法检验差异显著(P<0.05)。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference used by Duncan's new multiple range test (P<0.05).

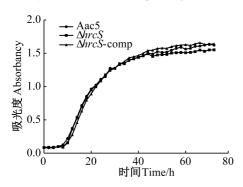


图 8 在 KB 培养基中西瓜噬酸菌野生型菌株 Aac5、突变菌 株 $\Delta hrcS$ 和互补菌株 $\Delta hrcS$ -comp 的生长能力

Fig. 8 Growth abilities of wide type strain of Aac5, hrcS gene deletion mutant strain $\Delta hrcS$ and complementary strain $\Delta hrcS$ -comp of $Acidovorax\ citrulli$ in KB medium

鞭毛是病原菌的运动器官,具有依附和定殖能力,在西瓜噬酸菌中基因 fliC已被证实与致病性相关(Bahar et al.,2011)。本研究通过生物信息学分析发现 hrcS基因与编码 T3SS 鞭毛合成相关蛋白的基因 flhB 可能存在互作。在运动能力测定中,ΔhrcS形成的菌落晕圈直径显著增大,其fliC基因表达量显著上调,为野生型菌株的1.77倍,表明 hrcS基因缺失影响基因 fliC表达。病原菌的趋化系统也与运动性相关。细菌的趋化系统使细菌趋向有益刺激,躲避有害刺激。西瓜噬酸菌中的趋化基因 cheA 编码组氨酸激酶,该基因缺失后,西瓜噬酸菌的趋化性、运动能力、种子表面定殖能力、致病能力均下降。本研究中 hrcS缺失后 cheA 表达量变化不显著,

表明 hrcS不影响该基因的表达,说明 hrcS基因对西瓜噬酸菌运动能力有重要影响,且通过鞭毛基因互作的可信度高于通过趋化性基因互作的可信度。后续试验中对西瓜噬酸菌中鞭毛与 T3SS 关系的研究可以以 hrcS 为关键点展开。以上结果说明 hrcS 基因影响西瓜噬酸菌中多个致病相关基因的表达,包括与西瓜噬酸菌在种子上定殖能力相关的 T3SS 基因、运动能力相关的鞭毛基因。生物膜是细菌聚集形成的黏稠状结构,对细胞有保护作用,与细菌致病性密切相关(Szomolay et al., 2005; Luo et al., 2015)。在水稻细菌性褐条病菌 Acidovorax oryzae 中, hrcS 缺失会显著降低病原菌对寄主的致病能力,生物膜形成能力也有下降趋势(Md. Mahidul Islam Masum, 2019),与本研究结果一致。

T3SS是植物病原细菌重要的致病元件,对其进行抑制或利用其突变体是生物防治的最新策略。如 Moss et al. (2007) 用番茄疮痂病菌 Xanthomonas campestris pv. vesicatoria 的 T3SS 相关基因 hrpG、hrpX、hrpF、hrpE1 突变体作为生物防治剂喷雾接种到番茄叶片上,随后接种野生菌株,与对照相比可有效降低发病程度;Johnson et al. (2011) 用西瓜噬酸菌 AAC00-1 菌株 ΔhrcC 突变体处理种子后,可有效降低幼苗携带野生菌株的数量,与本研究结果也显示 ΔhrcS处理种子后西瓜幼苗病情指数较野生型菌株显著下降相似。后期进一步验证用 ΔhrcS 处理种子作为辅助手段来防治西瓜噬酸菌 Aac5 的有效性,利用 hrcS 筛选 T3SS 抑制剂,以期为防治瓜类细菌性果斑病提供更多方法和手段。

参考文献(References)

Alfano JR, Collmer A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. Annual Review of Phytopathology, 42: 385-414

Bahar O, Burdman S. 2010. Bacterial fruit blotch: a threat to the cucurbit industry. Israel Journal of Plant Sciences, 58(1): 19–31

Bahar O, Goffer T, Burdman S. 2009. Type IV Pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22 (8): 909–920

Bahar O, Levi N, Burdman S. 2011. The cucurbit pathogenic bacterium Acidovorax citrulli requires a polar flagellum for full virulence before and after host-tissue penetration. Molecular Plant-Microbe Interactions, 24(9): 1040–1050

Bogdanove AJ, Beer SV, Bonas U, Boucher CA, Collmer A, Coplin DL, Cornelis GR, Huang HC, Hutcheson SW, Panopoulos NJ, et al. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes

- of phytopathogenic bacteria. Molecular Microbiology, 20(3): 681-683
- Burdman S, Walcott R. 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. Molecular Plant Pathology, 13(8): 805–815
- Chen L. 2016. High throughput screening for type three secretion system inhibitor in *Acidovorax citrulli*. PhD thesis. Beijing: China Agricultural University (in Chinese) [陈亮 . 2016. 西瓜食酸菌 (*Acidovorax citrulli*) III型分泌系统抑制剂的高通量筛选 . 博士 学位论文 . 北京: 中国农业大学]
- Head NE, Yu HW. 2004. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. Infection and Immunity, 72(1): 133–144
- Jiang BL. 2004. Function and regulation analyses of the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Master thesis. Nanning: Guangxi University (in Chinese) [姜伯乐. 2004. 野油菜黄单胞菌 *hrp* 基因簇的功能鉴定和表达调控分析. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学]
- Johnson KL, Minsavage GV, Le T, Jones JB, Walcott RR. 2011. Efficacy of a nonpathogenic *Acidovorax citrulli* strain as a biocontrol seed treatment for bacterial fruit blotch of cucurbits. Plant Disease, 95(6): 697–704
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402–408
- Luo JY, Qiu W, Chen L, Anjum S, Yu MH, Shan CL, Ilyas M, Li B, Wang YL, Sun GC. 2015. Identification of pathogenicity-related genes in biofilm-defective *Acidovorax citrulli* by transposon Tn5 mutagenesis. International Journal of Molecular Sciences, 16 (12): 28050–28062
- Ma YN, Chen L, Si NG, Jiang WJ, Zhou ZG, Liu JL, Zhang LQ. 2019.
 Identification of benzyloxy carbonimidoyl dicyanide derivatives as novel type III secretion system inhibitors via high-throughput screening. Frontiers in Plant Science, 10: 1059
- Md. Mahidul Islam Masum. 2019. Research on the virulence characteristics of secretion system-related genes and bio-based protection strategies of rice bacterial brown stripe pathogen *Acidovorax ory-zae*. PhD thesis. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese) [Md. Mahidul Islam Masum. 2019. 水稻细菌性褐条病菌(*Acidovorax oryzae*)分泌系统相关基因的毒力鉴定及对其生物防治策略的研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学]
- Moss WP, Byrne JM, Campbell HL, Ji P, Bonas U, Jones JB, Wilson M. 2007. Biological control of bacterial spot of tomato using hrp mutants of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. Biological Control, 41(2): 199–206
- Qiao P, Liu B, Yang YW, Guo YT, Guan W, Zhao TC. 2020. Functional analysis of fruit blotch pathogen *hflX* in *Acidovorax citrulli*. Journal of Plant Protection, 47(1): 150–160 (in Chinese) [乔培, 刘博, 杨玉文, 郭彦彤, 关巍, 赵廷昌. 2020. 西瓜噬酸菌 *hflX*基因功能分析. 植物保护学报, 47(1): 150–160]
- Ren ZG, Hou L, Song ZG, Zhang LQ. 2009. Screening of the pathoge-

- nicity mutants of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and cloning of the *hrcR* gene. Acta Phytopathologica Sinica, 39(5): 53–58 (in Chinese) [任争光, 侯磊, 宋治国, 张力群. 2009. 甜瓜细菌性果斑病菌致病性突变体筛选与 *hrcR* 基因的克隆. 植物病理学报, 39(5): 53–58]
- Szomolay B, Klapper I, Dockery J, Stewart PS. 2005. Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilms. Environmental Microbiology, 7(8): 1186–1191
- Tampakaki AP, Skandalis N, Gazi AD, Bastaki MN, Panagiotis FS, Charova SN, Kokkinidis M, Panopoulos NJ. 2010. Playing the "harp": evolution of our understanding of hrp/hrc genes. Annual Review of Phytopathology, 48: 347–370
- Wang X. 2010. Cloning and functional analysis of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* partial *hrp* gene cluster. Master thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [汪新. 2010. 瓜类细菌性果斑病菌 *hrp* 基因簇部分基因的克隆及功能研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学]
- Yan SS, Yang YW, Wang TL, Zhao TC, Schaad NW. 2013. Genetic diversity analysis of *Acidovorax citrulli* in China. European Journal of Plant Pathology, 136(1): 171–181
- Yan WR, Wang TL, Yang YW, Dai LY, Zhao TC. 2015. Biological function analysis of *hrcN* gene of *Acidovorax citrulli*. Acta Phytopathologica Sinica, 45(1): 33–40 (in Chinese) [严婉荣, 王铁霖, 杨玉文, 戴良英, 赵廷昌. 2015. 瓜类细菌性果斑病菌 *hrcN* 基因的生物学功能分析. 植物病理学报, 45(1): 33–40]
- Yang SS. 2015. Chemotaxis determination and functional analysis of *cheA* and *cheY* gene in chemotaxis system of *Acidovorax citrulli*. Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [杨姗姗. 2015. 西瓜噬酸菌趋化性测定及趋化基因 *cheA* 和 *cheY* 功能研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Yu C, Wu LN, Zhao LP, Zhang XX, Yang YW, Guan W, Zhao TC. 2019. Functional analysis of *hrcQ* in type III secretion system of *Acidovorax citrulli*. Plant Protection, 45(2): 48–56 (in Chinese) [于畅, 吴林娜, 赵立萍, 张晓晓, 杨玉文, 关巍, 赵廷昌. 2019. 西瓜噬酸菌III型分泌系统 *hrcQ*基因功能分析. 植物保护, 45 (2): 48–56]
- Zhang AP. 2017. Functional analysis of *fliA* and *fliC in Acidovorax citrulli*. Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [张爰萍. 2017. 西瓜噬酸菌 σ^{28} 因子 *fliA* 及鞭毛素基因 *fliC* 的功能研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Zhang XX, Zhao M, Yan JP, Yang LL, Yang YW, Guan W, Walcott R, Zhao TC. 2018. Involvement of *hrpX* and *hrpG* in the virulence of *Acidovorax citrulli* strain Aac5, causal agent of bacterial fruit blotch in cucurbits. Frontiers in Microbiology, 9: 507
- Zhao TC, Sun FZ, Wang BW, Hui WG. 2001. Pathogen identification of Hami melon bacterial fruit blotch. Acta Phytopathologica Sinica, 31(4): 357–364 (in Chinese) [赵廷昌, 孙福在, 王兵万, 回文广. 2001. 哈密瓜细菌性果斑病病原菌鉴定. 植物病理学报, 31(4): 357–364]