

## 瓜类细菌性果斑病菌组氨酸营养缺陷型与致病性相关

王敏杰<sup>#</sup>, 韩振华<sup>#</sup>, 武珍, 赵玉强, 高杜娟, 王健超, 钱国良, 胡白石<sup>\*</sup>

南京农业大学植物保护学院, 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 南京 210095

**摘要:**瓜类细菌性果斑病菌 (*Acidovorax citrulli*, Ac) 是近年来发生在西瓜、甜瓜等葫芦科植物上的一种重要病原细菌。它主要危害西瓜、甜瓜, 引起叶斑或叶枯, 造成果实腐烂, 严重时导致绝产。【目的】验证组氨酸的合成缺陷与 Ac 的致病性之间的关系。【方法】采用 Mini-Tn5 转座子随机插入方法, 从瓜类细菌性果斑病菌 xjl12 突变体文库中筛选突变体, 并通过亚克隆技术对基因进行鉴定。【结果】筛选到一株在烟草上失去过敏反应且致病性降低的突变体。鉴定其为 *hisC* (histidinol-phosphate aminotransferase) 基因的突变体。同时也对 Ac 中组氨酸合成过程中的另外 3 个酶 (*hisA*、*hisB* 和 *hisD* 基因) 进行了研究。这些基因突变后均丧失了激发烟草过敏性反应的能力, 致病性明显下降, 发病时间比野生型延迟了约 48 h, 通过外源添加组氨酸可恢复其突变特征。【结论】这些基因的突变所致性状改变与组氨酸的合成缺陷直接相关。

**关键词:** 瓜类细菌性果斑病, 致病性, *his* 基因, 组氨酸

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)09-1185-09

瓜类细菌性果斑病 (Bacterial Fruit Blotch of Melon 简称 BFBM) 是由西瓜噬酸菌 (*Acidovorax citrulli*, Ac) 引起的一种细菌病害, 是严重危害西瓜、甜瓜等葫芦科作物的世界性病害。该病害为种传病害, 其病原菌可侵染子叶、真叶以及果实, 在高温高湿环境下, 病害可迅速传播甚至造成毁灭性损害。目前人们对瓜类细菌性果斑病的研究多侧重于鉴定、生物学特性和种子带菌检测等方面, 对于其致病机理及致病相关基因的研究却很少。2007 年, 闻慧<sup>[1]</sup>从西瓜噬酸菌“哈 17A”中克隆到 1 个与致病性相关的基因 *lysR* 并做了初步研究。2008 年, 陈涛<sup>[2]</sup>首次研究了瓜类细菌性果斑病菌中由酰基高丝氨酸内酯类化合物介导的群体感应调节系统对该病原菌致病性的影响。2009 年, Bahar Ofir 等<sup>[3]</sup>研

究表明瓜类细菌性果斑病菌是一种维管束病害, 并且指出 TFP (Type IV Pili) 与该菌致病性, 生物膜的形成以及菌体运动有关。本研究利用 Mini-Tn5 转座子随机插入瓜类细菌性果斑病菌 xjl12 基因组中, 建立突变体文库。通过筛选该突变体库的 10000 个菌株, 得到 1 株 Tn5 插入到 *hisC* (histidinol-phosphate aminotransferase) 基因中的突变体, 该突变体在高感果斑病的哈密瓜皇后品种上表现为发病延缓, 在烟草叶片上表现为不引发过敏反应。

组氨酸是生物体蛋白质合成的必需氨基酸之一, 其生物合成途径已得到广泛的研究。结果表明, 原核生物组氨酸生物合成途径具有代表性, 特别是在 *Escherichia coli* 和 *Salmonella typhimurium* 中, 共包括 11 个反应, 8 种酶催化<sup>[4]</sup>。这一途径在其它微

基金项目: 国家“973 项目” (2009CB119202); 全国科技支撑计划项目 (200840102-03); 公益性行业科研专项 (201003066)

<sup>\*</sup> 通信作者。E-mail: hbs@njau.edu.cn

作者简介: <sup>#</sup>并列第一作者。王敏杰 (1985–), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 植物检疫与入侵生物学方向, E-mail: wminjie1985@126.com;

韩振华 (1985–), 女, 山东淄博人, 硕士研究生, 植物检疫与入侵生物学方向, E-mail: zhenhuapan@163.com

收稿日期: 2011-03-14; 修回日期: 2011-04-19

生物中也已被研究:如古细菌:*Methanococcus vannielii*<sup>[5]</sup>、*M. voltae*<sup>[6]</sup>和*M. thermolithotrophicus*<sup>[7]</sup>;真细菌:*Bacillus subtilis*<sup>[8]</sup>、*Streptomyces coelicolor*<sup>[9]</sup>和*Azospirillum brasilense*<sup>[10]</sup>;真核生物:*Saccharomyces cerevisiae*<sup>[11]</sup>和*Neurospora crassa*<sup>[12]</sup>。在这些微生物中,*his*基因至少部分成簇。磷酸组胺醇氨基转移酶(HPA)作为组氨酸合成酶的一种,在微生物中早已被发现,此酶催化组氨酸合成反应的第8步,把谷氨酸的氨基基团转移到imidazole phosphate,生成磷酸组胺醇(histidinol phosphate)<sup>[13]</sup>。在细菌中,此酶由*hisC*基因编码<sup>[14]</sup>。HPA的作用原理在*Salmonella typhimurium*<sup>[15]</sup>中已经被阐明。和大多数氨基转移酶采用的机制相似,HPA通过穿梭或乒乓原理进行转氨作用。在植物中,*hisC*基因的突变影响拟南芥根部的生长发育<sup>[16]</sup>。

在瓜类细菌性果斑病菌中,*his*基因簇包括9个基因,按其参与组氨酸合成反应的先后顺序分别为*hisG*、*hisE*、*hisI*、*hisA*、*hisF*、*hisH*、*hisB*、*hisC*、*hisD*。到目前为止几乎没有*his*基因在植物病原细菌中的报道。致病性发生变化可能由多方面的原因引起,组氨酸作为一种必须氨基酸,如果其合成过程中的某个酶被破坏,果斑菌的致病性是否也会受到影响。因此在本研究中,我们分别对*hisA*、*hisB*、*hisC*和*hisD*基因构建了突变体,并对这些组氨酸营养缺陷菌株的性状进行了观察,初步研究了*his*基因在*Ac*中的功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:本研究所用菌株及质粒见表1。

表1 供试菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Source or reference
<i>Acidovorax. avenae</i>		
<i>subsp. citrulli</i>		
xj112	Amp <sup>R</sup> ; Wild type	This lab
136	Rif <sup>r</sup> , Derivative of xj112 carrying Tn5 transpon	This work
HCM	Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; <i>hisC</i> -deletion mutant	This work
CHCM	Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> ; complement strain of HCM	This work
HAM	Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; xj112 insersional mutant defective in <i>hisA</i>	This work
CHAM	Gm <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; complement strain of HAM	This work
HBM	Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; xj112 insersional mutant defective in <i>hisB</i>	This work
CHBM	Gm <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; complement strain of HBM	This work
HDM	Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; xj112 insersional mutant defective in <i>hisD</i>	This work
CHDM	Gm <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; complement strain of HDM	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44lacU169 (ΔlacZ ΔM15) hsdR17 recA lendA1gyrA96 thi-1 relA11</i>	This lab
DH5α. λpir	<i>recA1 creC510 hsdR17 endA1 zbf-5 uidA(ΔmluI); pir + thi</i>	This lab
S17-1. λpir	<i>Apir pro hsdR, recA</i>	This lab
Plasmids		
pRK600	ColE1 ori V; RP4; tra +; RP4 oriT; helper plasmid in Triparental matings; Cm <sup>R</sup>	This lab
pUT-Km	Delivery plasmid for Tn5; R6K rep lion; Amp <sup>R</sup> ; Km <sup>R</sup>	This lab
pUC19	Amp <sup>R</sup> , ColE1 origin	This lab
pEX18GM	Suicide vector with a <i>sacB</i> gene, Gm <sup>r</sup>	This lab
pTE30	Km <sup>R</sup>	This lab
pVIK112	Suicide vector, entrobacterium replicate; Km <sup>R</sup>	This lab
pEXLKR	Km <sup>R</sup> fragment cloned into the vector pEXLR	This work
pBBRLMCS-5	Broad-host-range vector with a P <sub>lac</sub> Promoter, Gm <sup>r</sup>	This lab
pVIK-HA	A-bp inernal fragment of the <i>hisA</i> gene cloned into suicide vector pVIK112	This work
pVIK-HB	A 398-bp inernal fragment of the <i>hisB</i> gene cloned into suicide vector pVIK112	This work
pVIK-HD	A 851-bp inernal fragment of the <i>hisD</i> gene cloned into suicide vector pVIK112	This work
pBBRCHA	A bp containing promoter of the <i>hisA</i> gene cloned into Broad-host-range vector pBBRLMCS-5	This work
pBBRCHC	A 2310bp containing promoter of the <i>hisC</i> gene cloned into Broad-host-range vector pBBRLMCS-5	This work
pBBRCHB	A 712bp containing promoter of the <i>hisB</i> gene cloned into Broad-host-range vector pBBRLMCS-5	This work
pBBRCHD	A 1729bp containing promoter of the <i>hisD</i> gene cloned into Broad-host-range vector pBBRLMCS-5	This work

1.1.2 引物:本实验所需的引物、预扩增的 PCR 片段及 PCR 反应程序见表 2。

表 2 引物			
Table 2 The primers used in this study			
Primers	Primer sequences (5'→3')	Objective fragment	T <sub>m</sub> /℃ values <sup>a</sup>
WFB1	GACCAGCCACACTGGGAC	A 360-bp internal fragment of <i>Ac</i>	65
WFB2	CTGCCGTACTCCAGCGAT	A 360-bp internal fragment of <i>Ac</i>	65
KM-F	CTATCGATTGTATGGGAAGCC	A 586-bp internal fragment of Mini-Tn5	48
KM-R	CGAGGCAGTTCCATAGGATG	A 586-bp internal fragment of Mini-Tn5	48
d1	CCGGAATTCAAAGATGCGGCAGGAGGACG ( <i>Eco</i> RI, underlined)	787-bp fragment of <i>Ac</i> , used for PCR confirmation of <i>Ac</i> -deletion mutants	60
d2	CGCGGATCCGCACTTTTCAGGTCCGTCAG ( <i>Bam</i> HI, underlined)	787-bp fragment of <i>Ac</i> , used for PCR confirmation of <i>Ac</i> -deletion mutants	60
d3	CGCGGATCCCCGCAAGGTTCTCGTCAAG ( <i>Bam</i> HI, underlined)	649-bp fragment of <i>Ac</i> , used for PCR confirmation of <i>Ac</i> -deletion mutants	60
d4	TGCTCTAGACTGCTGTTGGGCATTGAAGC ( <i>Xba</i> I, underlined)	649-bp fragment of <i>Ac</i> , used for PCR confirmation of <i>Ac</i> -deletion mutants	60
Km1	CGCGGATCCGAAGCTCCCTCGTGC ( <i>Bam</i> HI, underlined)	A 1562-bp internal fragment of pTE30 plasmid	55
Km2	CGCGGATCCCAAGTGGCACTTTTCG ( <i>Bam</i> HI, underlined)	A 1562-bp internal fragment of pTE30 plasmid	55
CHC1	CGGAATTCCTCATAAGACCCCTTTTGC ( <i>Eco</i> RI, underlined)	A 2310-bp internal fragment of <i>Ac</i>	58
CHC2	GCTCTAGAGTGTGCTGTCGTCGATGT ( <i>Xba</i> I, underlined)	A 2310-bp internal fragment of <i>Ac</i>	58
<i>hisA</i> -mut-F	CGGAATTCACGGCAGTCGCTACAAGGTG ( <i>Eco</i> RI, underlined)	756-bp internal fragment of <i>hisA</i> ;used to creat HAM	58
<i>hisA</i> -mut-R	GCTCTAGACGGTCAGGAACATCGGCAAC ( <i>Xba</i> I, underlined)	756-bp internal fragment of <i>hisA</i> ;used to creat HAM	58
<i>hisB</i> -mut-F	CGGAATTCCTCGGGCATCGGCTTC ( <i>Eco</i> RI, underlined)	398-bp internal fragment of <i>hisB</i> ;used to creat HBM	62
<i>hisB</i> -mut-R	GCTCTAGAACTGCTGTTGGGCATTG ( <i>Xba</i> I, underlined)	398-bp internal fragment of <i>hisB</i> ;used to creat HBM	62
<i>hisA</i> -comp-F	CGGAATTC ACGGCAGTCGCTACAAGGTG ( <i>Eco</i> RI, underlined)	1303-bp fragment of <i>hisA</i> ;used for complemention of HAM	60
<i>hisA</i> -comp-R	GCTCTAGAGGTCAGGAACATCG GCAAC-3' ( <i>Xba</i> I, underlined)	1303-bp fragment of <i>hisA</i> ;used for complemention of HAM	60
<i>hisB</i> -comp-F	TCCCCCGGGCGACAACGCCCATG ( <i>Sma</i> I, underlined)	712-bp fragment of <i>hisB</i> ; used for complemention of HBM	60.8
<i>hisB</i> -comp-R	GCTCTAGACCACGACGGCGACAGT ( <i>Xba</i> I, underlined)	712-bp fragment of <i>hisB</i> ; used for complemention of HBM	60.8
<i>hisD</i> -mut-F	CGGAATTCAGAAGAAGGCGAGCG ( <i>Eco</i> RI, underlined)	851-bp internal fragment of <i>hisD</i> ;used to creat HDM	62
<i>hisD</i> -mut-R	GCTCTAGAAGCGGCGACGAGAACC ( <i>Xba</i> I, underlined)	851-bp internal fragment of <i>hisD</i> ;used to creat HDM	62
<i>hisD</i> -comp-F	CGGAATTCGCTCGCATCTCGTGGT ( <i>Eco</i> RI, underlined)	1729-bp fragment of <i>hisD</i> ;used for complemention of HDM	50.3
<i>hisD</i> -comp-R	GCTCTAGATGGCTCAACTCCTTCTG ( <i>Xba</i> I, underlined)	1729-bp fragment of <i>hisD</i> ;used for complemention of HDM	50.3

1.1.3 试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、PCR 高保真酶、Trans-*taq* 酶、X-gal、DNA 胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒均为宝生物工程(大连)

有限公司产品;Southern Blot 所用 DIG 试剂盒购于 Roche 公司;本实验所用抗生素均购于南京丁贝生物科技有限公司。其它试剂均为国产分析纯。

## 1.2 培养基和培养条件

大肠杆菌在 37℃ 的 2YT 培养基上培养, xjl12 在 28℃ NA 培养基上培养。测试 xjl12 生长速率用 MMX 培养基, 以氨基酸、蛋白胨、KNO<sub>3</sub> 为唯一氮源时, 用其替代 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

## 1.3 转座子 Tn5 插入突变体的获得及侧翼序列的分离

利用三亲交配的方法建立 xjl12 的突变体库。通过菌液注射接种观察其对哈密瓜子叶致病性和烟草过敏性反应的变化筛选到突变体 136。采用亚克隆技术鉴定出转座子插入在 *hisC* (histidinol-phosphate aminotransferase) 基因 499bp 处。

## 1.4 xjl12 *hisC*、*hisA*、*hisB* 和 *hisD* 基因突变体和互补菌株的构建

用双交换同源重组的方法构建 *hisC* 基因的缺失突变体, 命名为 HCM; 利用 <http://www.fruitfly.org/seq.tools/promoter.html> 在线启动子预测分析网站分析 *hisC* 基因的启动子, 设计引物, 构建 *hisC* 基因的互补菌株, 命名为 CHCM。通过同源重组构建 *hisA*、*hisB* 和 *hisD* 基因的插入突变体, 分别命名为 HAM、HBM、HDM; 互补菌株分别命名为 CHAM、CHBM、CHDM。

## 1.5 各突变体在 MMX 培养基中的生长测定

将 xjl12、各突变体和互补菌株振荡培养至生长对数期, 将菌液稀释至 OD<sub>600</sub> = 0.6, 然后按 1:1000 的比例接种于 50mLMMX 基本培养基。28℃, 200 r/min 振荡培养, 每隔 12 h 测 1 次菌液浓度, 直到细菌的生长进入稳定期为止。

## 1.6 外源添加不同氮源的菌体生长恢复情况

按照 1.5 中的方法, 将基本培养基中的氮源分别替换为组氨酸、丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、蛋白胨、KNO<sub>3</sub>, 测定在添加不同氮源条件下各菌株的生长速率。

## 1.7 外源添加植物组织提取液的菌体生长恢复情况

在 50 mLMMX 基本培养基中添加 100 μL 植物组织提取液, 然后按照 1.5 中的方法测定各菌株的生长速率。

## 1.8 外源添加组氨酸合成抑制剂及同时添加组氨酸及其合成抑制剂各菌体生长能力测定

通过预实验在基本培养基中按 0.01 mol/L、0.1 mol/L、1 mol/L 的浓度添加 IGPD (imidazole glycerol phosphate dehydratase) 抑制剂 (triazole herbicides, 简称 TH), 测定 HBM、CHBM 及野生型的生长速率, 然后选取抑制效果最好的浓度再次测定待测菌株的生长速率, 另外, 在基本培养基中同时添加外源组氨酸及 IGPD 抑制剂, 测定待测菌株的生长速率。

## 1.9 致病性、过敏性反应测定及外源添加组氨酸的恢复情况

按照 1.5 中的方法, 在各菌液中分别放入哈密瓜种子 20 粒, 于 28℃ 震荡培养 3 h, 晾干, 分别种于塑料盆中。在 28℃ 温室中栽培观察发病情况。

按照 1.5 中的方法, 将各菌液注射接种烟草叶片, 12–48 h 后观察接种部位有无烟草过敏性反应。

另外, 将各菌株菌液用 0.005 g/mL 的组氨酸稀释至 OD<sub>600</sub> = 0.6, 注射烟草叶片, 观察其表型。

## 1.10 各突变体在寄主组织中菌体生长能力的测定

生长能力的测定主要参照魏娜等<sup>[17]</sup>方法, 用注射器接种两叶期哈密瓜子叶, 2d 后计算菌落数量, 推算出接种叶片内细菌数量。

## 1.11 胞外纤维素酶的检测

胞外纤维素酶的检测参照陈磊<sup>[18]</sup>所描述的方法, 观察待测菌株菌落生长处及周围形成的透明圈, 根据透明圈大小比较菌株间纤维素酶活性的差异。

## 1.12 游动性测定

游动性试验参照 Chesnokova 等<sup>[19]</sup>所描述的方法进行。将培养好的待测菌株分别接种于 0.3% 琼脂 LB 平板上, 置于 28℃ 培养箱中培养 2 d 后观察情况。

# 2 结果和分析

## 2.1 各基因的突变影响果斑菌的正常生长

在 MMX 培养基中, 各突变株生长速率明显降低, 几乎不能正常生长, 生长的延滞期、对数期、稳

定期及细胞繁殖的时代与 xjl12 相比差异明显,而各互补菌株则基本恢复了突变株的生长速率,与野生型基本相似(图 1-A)。这说明 *hisA*、*hisB*、*hisC* 和 *hisD* 基因的突变对细胞正常的营养利用产生了影响。

## 2.2 外源添加组氨酸和蛋白胨可恢复突变体的生长

在外源添加组氨酸或蛋白胨的情况下,各突变株的生长速率明显提高,与野生型基本相似。而在丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或  $\text{KNO}_3$  为唯一氮源时,突变株 HAM、HCM 的生长速率与在 MMX 培养基中的相似,不能正常生长(图 1-B);在丙氨酸、谷氨酸和天冬氨酸为唯一氮源时,突变株 HBM、HDM 的生长速率与野生型相差较大(图 1-C)。这说明 *hisA*、*hisB*、*hisC* 和 *hisD* 基因的突变对细胞正常的营养利用产生了影响,而且各基因突变与组氨酸的合成缺陷确实存在着直接联系。

## 2.3 外源添加植物组织提取液可恢复突变体的生长

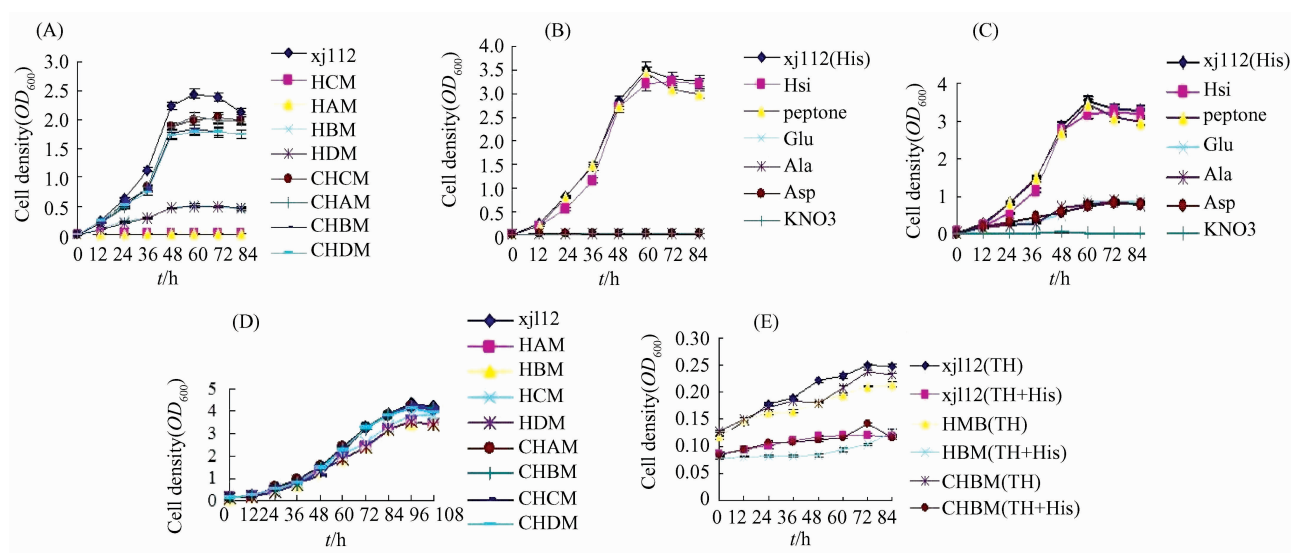


图 1 各菌株在不同条件下的生长测定

Fig. 1 Growth of *Ac* strains in different conditions. A: Growth of *Ac* strains in MMX medium; B: Growth of HAM and HCM in MMX medium with different N sources; C: Growth of HBM and HDM in MMX medium with different N sources; D: Growth of *Ac* strains in MMX medium with plants' tissue extracts; E: Growth of *Ac* strains in MMX medium with histidine biosynthesis inhibitor, and their growth in MMX medium with histidine biosynthesis inhibitor and histidine.

## 2.5 各基因的突变延缓果斑菌的致病时间同时丧失了烟草过敏性反应,外源添加组氨酸可恢复其致病性及烟草过敏性反应

在浸种种植十天后观察发病情况,如图 2 所示,

## 生长

从图 1-D 可看出,在基本培养基中添加哈密瓜植物组织提取液,各突变体的生长速率基本恢复到野生型状态,这可能是植物组织提取液中存在组氨酸,为突变体的生长提供了外源组氨酸。

## 2.4 外源添加组氨酸合成抑制剂以及同时添加组氨酸及其合成抑制剂的生长测定

根据预实验,当 IGPD 抑制剂浓度达到 1 mol/L 时,抑制效果最好(数据未列出),按 1 mol/L 的浓度在 MMX 基本培养基中加入抑制剂, HBM、CHBM 及野生型生长均受到强烈抑制,且再次添加外源组氨酸后(TH + His),生长速率并不能恢复,如图 1-E 所示。另外,在基本培养基中同时添加组氨酸及其合成抑制剂时,野生型及突变体的生长速率反而低于只添加组氨酸合成抑制剂时的生长速率,这表明可能在细菌数量较低的情况下,外源组氨酸的添加不促进菌体的生长反而抑制菌体的生长。

野生型浸种植株子叶明显坏死,而突变株浸种植株基本没有发病现象,互补株基本恢复了野生型的致病性。野生型及互补株将很快枯死,而突变株则缓慢出现病斑并逐渐变大但最终也将坏死。同时,与

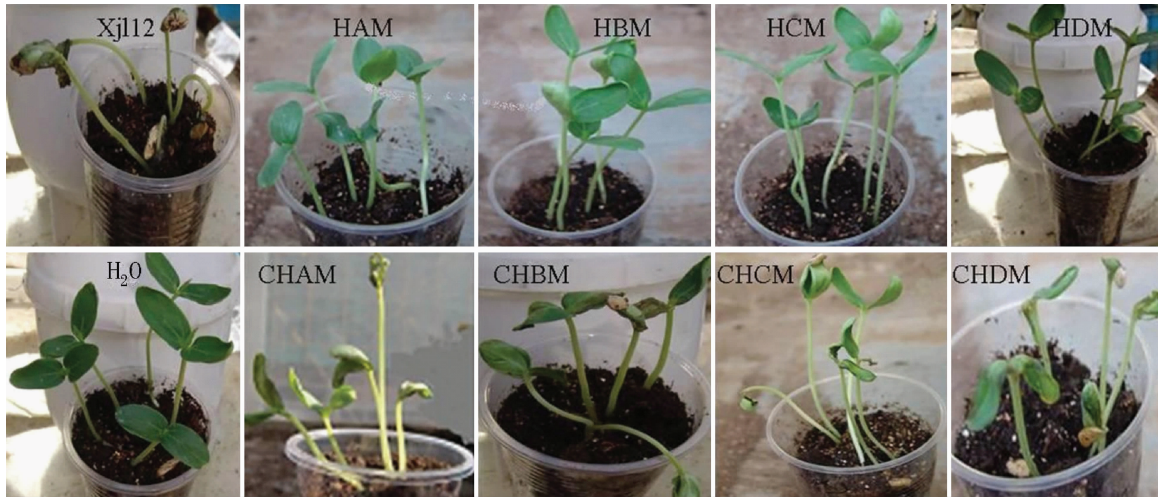


图2 浸种实验测定各基因突变株致病性

Fig. 2 Emerging seedlings following seed transmission

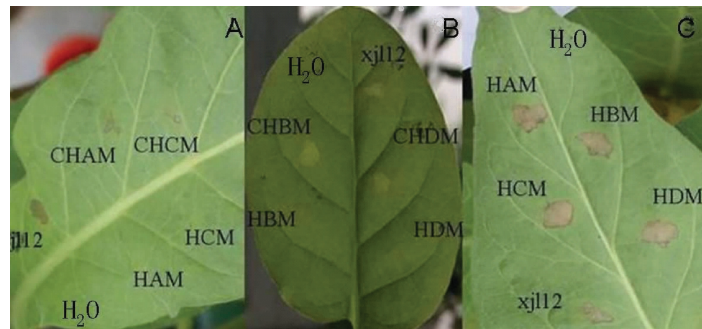


图3 烟草过敏性反应检测

Fig. 3 Hypersensitive response of *Ac* strains. A: Hypersensitive response of mutation HAM and HBM; B: Hypersensitive response of mutation HBM and HDM; C: Hypersensitive response of mutations added with histidine.

野生型相比,突变株不能激发烟草叶片的过敏性反应(图3-A、B)。

另外,在外源添加组氨酸的条件下,突变株的致病性恢复到野生型状态,同时可以激发烟草过敏反应(图3-C)。这说明 *hisA*、*hisB*、*hisC* 和 *hisD* 基因突变的特异表型与组氨酸的合成缺陷直接相关。

如图4-A所示(以突变株 HCM 为例,其它各突变株与此相同),接种1 d后,野生型 xjl12 和互补菌株的接种部位均形成淡黄色病斑,而突变株未发病;接种2 d后,野生型和互补菌株的接种部位均形成轻微的水浸状病斑,而突变体未发病;接种3 d后,野生型和互补菌株的病斑继续扩展,面积扩大至整个叶片的50%左右,突变株开始在叶片上引起淡黄色病斑,面积约占整个叶片的50%;接种4 d后,野生型和互补菌株的病斑面积扩大至整个叶片,突变株在接种部位形成水浸状病斑,面积约占整个叶片

的50%;接种5 d后,突变株的病斑面积也扩大至整个叶片,与野生型的致病情况基本一致。同时测定了叶片中细菌的数量,结果如图4-B所示,突变株的繁殖速度慢于野生型 xjl12 及互补菌株,但最终其数量也能达到野生型菌株的最大值。这表明, *hisA*、*hisB*、*hisC* 和 *hisD* 基因的突变影响果斑菌在寄主组织中的生长。

## 2.7 各基因的突变不影响果斑菌胞外纤维素酶的产生

通过观察菌落生长处及周围形成的透明圈的大小(图5),可看出本研究中各基因突变后果斑菌胞外纤维素酶的活性不受影响。说明 *hisA*、*hisB*、*hisC* 和 *hisD* 基因的功能与果斑菌胞外纤维素酶的活性无关。

## 2.8 各基因的突变不影响果斑菌的游动性

由图6可看出,可看出野生型 xjl12、各突变株



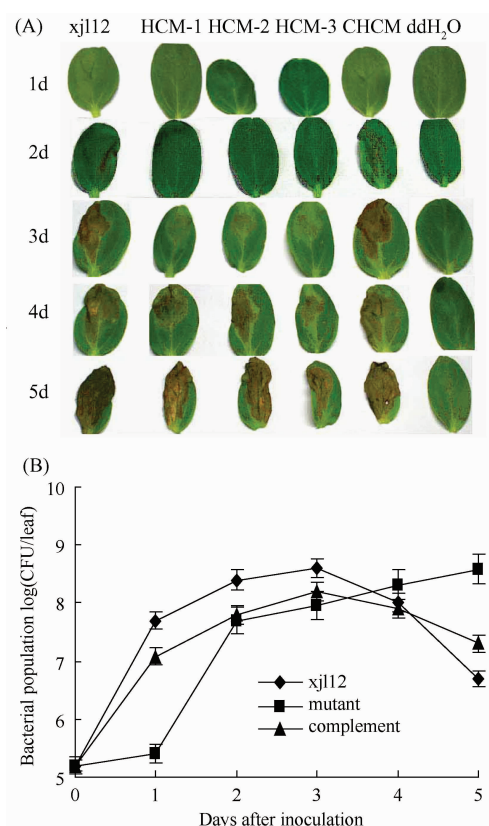


图4 突变株在接种的哈密瓜子叶中的生长测定

Fig. 4 Growth of *Ac* strains in cotyledon of Hami-melon. A: Enlargement of lesion in cotyledons; B: Quantification of the amount of bacteria extracted from cotyledons.

及互补菌株的游动晕圈大小基本相同,游动性没有大的变化,这表明,*hisA*、*hisB*、*hisC* 和 *hisD* 基因的功能与果斑菌的游动性无关。

### 3 讨论

本文利用三亲交配原理成功构建了 Mini-Tn5 转座子随机插入文库,通过致病性筛选得到了 1 株发病明显延缓的突变株,并用亚克隆技术鉴定了转座子的插入位点,得到 1 个代谢相关基因 *hisC*。根据已报道的果斑菌 *hisC* 基因序列设计引物,用双交换的方法得到了缺失型突变株,为验证其功能奠定了基础。同时,我们对组氨酸合成过程中的其它 3 个酶进行了研究,它们分别由 *hisA*、*hisB*、和 *hisD* 基因编码。

通过不同条件下的生长测定发现:在 MMX 培养基中,各突变株的生长速率明显降低,不能正常生长,生长的延滞期、对数期、稳定期及细胞繁殖的时代与 xjl12 相比差异明显;在外源添加组氨酸或蛋白胨的情况下,突变株的生长速率明显提高,与野生型基本相似,而在丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或 KNO<sub>3</sub> 为唯一氮源时,突变株的生长速率与在 MMX 培养基中的相似,基本不能正常生长;在添加植物组织提

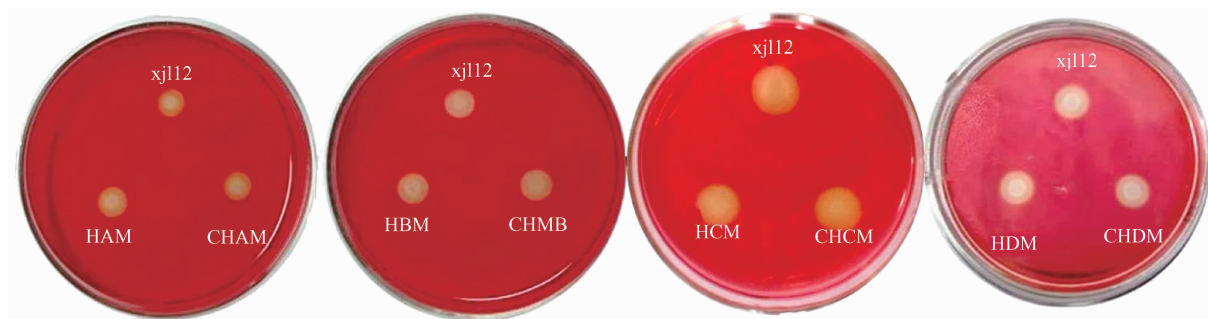


图5 各基因突变对胞外纤维素酶的影响

Fig. 5 Effect of mutations on extracellular cellulase.



图6 各基因突变对游动性的影响

Fig. 6 Effect of mutations on motility.

取液时同样能恢复各突变株的生长,可能是植物组织液中含有组氨酸所致。这些实验表明 *hisA*、*hisB*、*hisC* 和 *hisD* 基因的突变阻断了组氨酸的合成,从而影响其正常生长,但仍然能利用外源组氨酸恢复其生长。

通过浸种致病性测定发现,4 个基因分别突变后均延缓了果斑菌致病性,但最终都将使子叶坏死植株枯死,并且不能激发烟草过敏性反应。同时通过测定在哈密瓜叶片组织中各菌的生长速率,发现突变体的繁殖速度明显慢于野生型,但最终其菌体数量也能达到野生型菌株的最大值,这个结果与其致病性减缓相吻合。而外源添加组氨酸之后,其致病性和烟草过敏性反应均可恢复,说明 *hisA*、*hisB*、*hisC* 和 *hisD* 基因的突变与组氨酸的合成缺陷直接相关。

在本研究中,我们还在基本培养基中添加了 IGPD 抑制剂,结果野生型、突变株及互补株均不能正常生长,即使是再添加外源组氨酸后也不能恢复其生长。

此外,各突变体的胞外纤维素酶、菌体游动性与野生型相比并没有明显的变化。

致病性是病原物所具有的破坏寄主后引起病害的能力。病原物对寄主植物的破坏作用可是多方面的,除了从寄主的组织中获取大量的营养物质,影响植物的正常生长和发育外,还可能表现在产生影响寄主正常生理活动的代谢产物,如某些酶<sup>[20-21]</sup>、胞外多糖和生长调节物质等<sup>[22-23]</sup>,使寄主植物的正常生理功能受到破坏,发生一系列的内部组织和外部形态的病变,而表现出各种各样的症状。*his* 基因的突变影响了瓜类细菌性果斑病菌的正常营养利用,使其不能正常生长,作用于寄主植物哈密瓜时就表现为致病性明显延缓。这对于更好的防治果斑菌具有一定的意义。本研究初步探索了一些 *his* 基因在 *Ac* 中的功能,而其它 *his* 基因以及其它必需氨基酸的突变是否也和果斑菌的致病性相关有待进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] 闻慧. 甜瓜细菌性果斑病菌菌株哈 17A 致病相关基因 *lysR* 的克隆. 石河子大学的硕士学位论文, 2007.
- [2] 陈涛. 哈密瓜细菌性果斑病菌群体感应信号分子的检测及其合成基因 *luxI* 的功能. 南京农业大学的硕士学位论文, 2008.
- [3] Bahar O, Goffer T, Burdman S. Type IV Pili Are Required for Virulence, Twitching Motility, and Biofilm Formation of *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*. *The American Phytopathological Society*, 2009, 8:909-919.
- [4] Carlomagno MS, Chiariotti L, Atifano P, Nappo AG, Bruni CB. Structure and function of the *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* K-12 histidine operons. *Journal of Molecular Biology*, 1988, 203: 585-606.
- [5] Stepansky A, Leustek T. Histidine biosynthesis in plants. *Amino Acids*, 2006, 30:127-142.
- [6] Cue D, Beckler GS, Reeve JN, Konisky J. Structure and sequence divergence of two archaeobacterial genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1985, 82:4207-4211.
- [7] Weil CF, Beckler GS, Reeve JN. Structure and organization of the *hisA* gene of the thermophilic archaeobacterium *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(10): 4857-4860.
- [8] Delorme C, Godon JJ, Ehrlich SD, Renault P. Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: histidine biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(14): 4391-4399.
- [9] Limauro D, Avitabile A, Cappellano C, Puglia AM, Bruni CB. Cloning and characterization of the histidine biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Gene*, 1990, 90: 31-41.
- [10] Delorme C, Ehrlich SD, Renault P. Histidine biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(20): 6571-6579.
- [11] Struhl K. Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the yeast *pet56-his3-ded1* gene region. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13: 8587-8601.
- [12] Legerton TL, Yanofsky C. Cloning and characterization of the multifunctional *his-3* gene of *Neurospora crassa*. *Gene*, 1985, 39: 129-140.
- [13] Malki EL, Frankard V, Jacobs M. Molecular cloning and expression of a cDNA sequence encoding histidinol phosphate aminotransferase from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37:1013-1022.
- [14] Grisolia V, Carlomagno MS, Nappo AG, Bruni CB. Cloning, structure, and expression of the *Escherichia coli* K-12 *hisC* gene. *Best Available Control Technology*, 1985, 164: 1317-1323.
- [15] Albritton WL, Levin AP. Some comparative kinetic data on the enzyme imidazolacetyl phosphate aminotransferase derived from mutant strains of *Salmonella typhimurium*. *Biological Chemistry*, 1970, 245: 2525-2528.
- [16] 莫肖蓉. 拟南芥根系突变体 *hpa1* 的基因克隆及功能研究. 浙江大学的博士学位论文, 2006.



- [17] 魏娜, 钱国良, 李晓霞, 张志峰, 刘凤权, 胡白石. 瓜类细菌性果斑病菌 *avrR* 基因的克隆及其对致病性的影响. 南京农业大学学报 (*Journal of Nanjing Agricultural University*), 2010, 33(6): 68-74.
- [18] 陈磊. 水稻黄单胞菌双精氨酸运输 (Tat) 系统关键基因的克隆与功能分析. 南京农业大学的硕士学位论文, 2009.
- [19] Chesnokova O, Coutinho JB, Khan IH, Mikhail MS, Kado CI. Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of a bald strain on virulence. *Molecular Microbiology*, 1997, 23: 579-590.
- [20] 辛建华, 傅振清. 苯丙氨酸解氨酶, 多酚氧化酶与甜瓜抗枯萎病的关系. 石河子大学学报 (自然科学版) [*Journal of Shihezi University (Natural Science)*], 1997, 1(1): 47-50.
- [21] 曹赐生, 肖用森. 杂交稻不同抗性组合感染白叶枯病菌后几种酶活性的变化. 杂交水稻 (*Hybrid Rice*), 2001, 16(4): 45-47.
- [22] Keppler LD, Baker CJ. O<sub>2</sub> initiated lipid peroxidation in a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspensions. *Phytopathology*, 1989, 79: 555.
- [23] Chai HB, Doke N. Activation of the potential of potato leaf tissue to react hypersensitive to *Phytophthora infestans* cytoplast germination fluid and the enhancement of this potential by calcium ions. *Physiology Molecular Plant Pathology*, 1987, 30: 27.

## Relationship of histidine auxotrophy of *Acidovorax citrulli* with pathogenicity

Minjie Wang<sup>#</sup>, Zhenhua Han<sup>#</sup>, Zhen Wu, Yuqiang Zhao, Dujuan Gao, Jianchao Wang, Guoliang Qian, Baishi Hu<sup>\*</sup>

College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education, Nanjing 210095, China

**Abstract:** *Acidovorax citrulli* (Ac) is an important bacterium that occurs in watermelon, melon and other cucurbits. It mainly damages watermelon and melon, and can cause leaf blight, fruit rot, and even mortality. [ **Objective** ] To verify the relationship between defects in the synthesis of histidine and the pathogenicity of Ac. [ **Methods** ] We generated a transposon (Tn5) mutant library on the background of strain xjl12 of Ac. Then we used subclone technology to identify the gene. [ **Results** ] The mutant could not elicit the hypersensitive response (HR) in nonhost tobacco, and its virulence was reduced. It is impaired in *hisC*, which encodes the protein histidinolphosphate aminotransferase. The other three genes (*hisA*, *hisB* and *hisD*) involved in the process of histidine synthesis were also studied. These mutants could not elicit the hypersensitive response (HR) in nonhost tobacco; their virulence was reduced significantly and disease symptoms caused by mutants were delayed for 48 hours when compared to the wild type strain. By adding exogenous histidine, pathogenicity of the mutants was restored. [ **Conclusion** ] The change of the characteristics of the mutants was directly related to the synthesis of histidine.

**Keywords:** Bacterial fruit blotch, pathogenicity, *his* genes, histidine

(本文责编:王晋芳)

Supported by the China National Basic Research and Development Project (2009CB119202), by the Science and Technology support Xinjiang project (200840102-03) and by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201003066)

<sup>\*</sup> Corresponding author. E-mail: hbs@njau.edu.cn

<sup>#</sup> These authors contributed equally to this work.

Received: 14 March 2011/Revised: 19 April 2011