



不同致病力青枯雷尔氏菌的甲基化敏感扩增多态分析

郑雪芳^{1#}, 舒江霞^{2#}, 林莹⁴, 王阶平¹, 陈燕萍¹, 陈梅春¹, 陈峥³, 刘波^{1*}

- 福建省农业科学院资源环境与土壤肥料研究所, 福建 福州 350003
- 中福海峡(平潭)发展股份有限公司, 福建 福州 350000
- 福建省农业科学院植物保护研究所, 福建 福州 350003
- 福建省种植业技术推广总站, 福建 福州 350003

郑雪芳, 舒江霞, 林莹, 王阶平, 陈燕萍, 陈梅春, 陈峥, 刘波. 不同致病力青枯雷尔氏菌的甲基化敏感扩增多态分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2986-2997.

ZHENG Xuefang, SHU Jiangxia, LIN Ying, WANG Jieping, CHEN Yanping, CHEN Meichun, CHEN Zheng, LIU Bo. Methylation sensitive amplification polymorphism of *Ralstonia solanacearum* strains with different pathogenicity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2986-2997.

摘要:【目的】探究不同致病力青枯雷尔氏菌连续传代过程中致病力、DNA 甲基化水平与模式的变化。【方法】将不同致病力青枯雷尔氏菌连续传代培养 50 次, 通过弱化指数(attenuated index, AI)和接种番茄盆栽苗, 分析其 F₁ 和 F₅₀ 菌株致病力变化; 采用甲基化敏感扩增多态(methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术分析不同致病力和传代数青枯雷尔氏菌 DNA 甲基化水平变化; 利用荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR)技术分析 DNA 甲基化和去甲基化相关酶基因的表达量变化。【结果】经连续传代 50 次后, 强致病力菌株 FJAT15304 和过渡型菌株 FJAT445 均变为无致病力菌株, 而无致病力菌株 FJAT15249 仍然保持其无致病力特性。MSAP 分析显示, 与 F₁ 菌株相比, 强致病力菌株传代 50 次的 FJAT15304.F₅₀ 和致病力衰退型菌株传代 50 次的 FJAT445.F₅₀ 的总甲基化率分别增加 7.82%和 38.22%; 无致病力菌株 FJAT15249 的 F₁ 和 F₅₀ 的总甲基化率均为 33.33%; 强致病力和过渡型菌株的主要甲基化模式为全甲基化, 其全甲基化率高于半甲基化率, 而所有无致病力菌株主要甲基化模式为半甲基化。qRT-PCR 分析表明, 强致病力和过渡型菌株连续传代致病力衰退菌株的 DNA 甲基化酶相关基因 *dam*、*dcm*

资助项目: 福建省公益类科研院所基本专项(2021R1034003, 2021R1034005)

This work was supported by the Fujian Special Fund for Scientific Research Institutes in the Public Interest (2021R1034003, 2021R1034005).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: fzliubo@163.com

Received: 2024-01-26; Accepted: 2024-03-05; Published online: 2024-03-05

和 *ftsZ* 表达量显著增加, 而去甲基化酶相关基因 *alkB* 表达量显著降低, 推测 DNA 甲基化水平变化在致病力衰退过程起重要作用。【结论】青枯雷尔氏菌连续传代出现致病力衰退现象, 这种致病力衰退可能与 DNA 甲基化水平有关。本研究为利用无致病力菌株防治青枯病害提供依据。

关键词: 青枯雷尔氏菌; 连续传代培养; DNA 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性

Methylation sensitive amplification polymorphism of *Ralstonia solanacearum* strains with different pathogenicity

ZHENG Xuefang^{1#}, SHU Jiangxia^{2#}, LIN Ying⁴, WANG Jieping¹, CHEN Yanping¹, CHEN Meichun¹, CHEN Zheng³, LIU Bo^{1*}

1 Institute of Resources, Environment and Soil Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China

2 Zhongfu Straits (Pingtan) Development Co. Ltd., Fuzhou 350000, Fujian, China

3 Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China

4 Fujian Provincial Farming Technology Promotion Station, Fuzhou 350003, Fujian, China

Abstract: [Objective] To investigate the changes of pathogenicity and DNA methylation levels and patterns of *Ralstonia solanacearum* strains with different pathogenicity during consecutive subculture. **[Methods]** *R. solanacearum* strains with different pathogenicity were consecutively subcultured for 50 passages. The pathogenicity of different strains was determined by the attenuated index (AI) method and the pot experiments. Methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis was performed to profile the DNA methylation levels of different strains. Moreover, the relative expression levels of genes related to methylases and demethylases were determined by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). **[Results]** After 50 passages, both of the virulent strain FJAT15304 and the intermediate strain FJAT445 evolved into avirulent strains, while the avirulent strain FJAT15249 remained to be avirulent. Compared with F₁ strains, FJAT15304.F₅₀ and FJAT445.F₅₀ showed the total methylation rates increasing by 7.82% and 38.22%, respectively. However, both of FJAT15249.F₁ and FJAT15249.F₅₀ had the total methylation rate of 33.33%. Full methylation was the main pattern in the virulent and intermediate strains, while hemi-methylation was the main pattern in all the avirulent strains. Compared with F₁ strains, strains FJAT15304.F₅₀ and FJAT445.F₅₀ showed up-regulated expression of three methylase-related genes *dam*, *dcm*, and *ftsZ* and down-regulated expression of demethylase-related gene *alkB*, which suggested that the change of DNA methylation might play a key role in the debilitation of pathogenicity. **[Conclusion]** The pathogenicity of *R. solanacearum* attenuates during the consecutive subculture, which might be related to the level of DNA methylation. The findings provide a scientific basis for the application of avirulent strains in the biocontrol of bacterial wilt.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*; consecutive subculture; DNA methylation; methylation sensitive amplification polymorphism

青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*, 简称青枯菌)可导致多种重要经济作物毁灭性枯萎^[1], 被认为是全球危害最大的植物病原菌之一^[2-3], 在“9·11”事件发生之后, 美国一度将青枯菌列为十大农业恐怖微生物之首^[4]。作为复合种(species complex), 青枯菌呈现出高度种下分化的多态性^[5]。在自然状态、继代培养和回接植株时, 青枯菌均会出现致病力分化现象^[6-8], 存在强致病力型、无致病力型及致病力衰退型菌株^[9]。研究表明青枯菌强致病力菌株会丧失致病性, 弱化成无致病力菌株^[10], 而无致病力菌株一般无法恢复为强致病力菌株^[11]。1993年, 张长龄等对青枯菌连续传代5次后, 观察到其致病力出现衰退现象^[8]。

DNA 甲基化是一种常见的表观遗传修饰, 在生命体的生理生化反应中起重要作用, 调节基因的表达与关闭, 如限制修饰系统(restriction modification systems, R-M 系统)、DNA 复制与修复、转录和翻译等^[12]。DNA 甲基化在维持正常细胞功能、调控组织特异性基因表达、保持转座子沉默和疾病的发生过程中都十分重要^[13]。细菌以 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)作为甲基供体, 通过 R-M 系统和孤儿甲基转移酶实现 N⁶-腺嘌呤(m6A)、C⁵-胞嘧啶(m5C)和 N⁴-胞嘧啶(m4C)的甲基化修饰^[14-15]。细菌中的 DNA 甲基转移酶主要包括 DNA 腺嘌呤甲基化酶(DNA adenine methylase, Dam)、细胞周期调控性甲基化酶(cell cycle-regulating methylases, CcrM)和 DNA 胞嘧啶甲基化酶(DNA cytosine methylase, Dcm)^[16]。Dam 是第一个发现的孤儿甲基转移酶, 其介导的甲基化通过调控其他基因转录, 间接调控关键毒力因子的表达^[17]。CcrM 是另一类重要的孤儿甲基转移酶, 对细菌生命周期调控非常关键, 其介导的 DNA 甲基化直接激活细胞分裂所必需基因 *ftsZ* 的转录^[18]。另外, 去甲基化基因 *alkB* 在 m6A 去甲基化中起重要作用,

能修复 DNA 碱基异常甲基化^[19-20]。

甲基化敏感扩增多态(methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术是检测基因组 DNA 甲基化的重要方法之一, 它是在扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术的基础上发展起来的, 根据 *Hpa* II 和 *Msp* I 对甲基化敏感性的不同, 将基因组 DNA 划分为全甲基化(双链甲基化)和半甲基化(单链甲基化)两种不同模式, 同时可以检测 DNA 总甲基化水平^[21]。本研究将不同致病力青枯菌连续传代培养, 采用 MSAP 技术对不同致病力和传代数青枯菌的基因组 DNA 进行甲基化分析, 旨在探究青枯菌传代过程 DNA 甲基化水平与模式, 有利于揭示青枯菌致病力衰退的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

青枯雷尔氏菌强致病力菌株 FJAT15304、无致病力菌株 FJAT15249 和致病力衰退型菌株 FJAT445 分别分离自福建省莆田市荔城区东阳村番茄青枯病发病田块的病株、健株、健株^[9], 由福建省农业科学院资源环境与土壤肥料研究所收集并保存。

青枯雷尔氏菌鉴别采用氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)培养基^[22], 液体培养采用 SP 培养基^[9]。

番茄品种为‘金石王 1 号’, 厦门如意种苗高科技股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, *Eco*R I、*Msp* I、*Hpa*II 等限制性内切酶, 基因组 DNA 接头的连接试剂等, 北京全式金生物技术有限公司; 引物合成由福州博尚生物技术有限公司完成。

1.2 青枯菌的连续传代培养

将不同致病力的青枯菌活化于 TTC 平板

上, 30 °C培养 48 h, 挑选单菌落接种于 SP 培养基, 30 °C、180 r/min 培养 24 h。前期研究发现^[23], 青枯菌培养 24 h 时处于稳定生长期。为了保证菌种稳定和连续传代的长期操作, 选择 24 h 为一个传代周期。每次传代按体积分数 1%接种量接种到 SP 液体培养基, 连续传代 50 次(F₅₀)。

1.3 青枯菌的致病力测定

采用弱化指数结合番茄盆栽苗接种试验对不同致病力及传代数青枯菌进行致病力测定。弱化指数(attenuated index, AI)测定参照刘波等^[24]方法: 青枯菌于 TTC 平板 30 °C培养 2 d, 选取 10 个单菌落, 在体视显微镜下测量整个菌落和红斑直径, 计算 AI 值(菌落红斑直径/菌落直径), 强致病力菌株的 AI≤0.65, 无致病力菌株的 AI≥0.75, 过渡型菌株的 AI 值范围在 0.65–0.75 之间。致病力的生物测定: 将上述 TTC 平板上活化好的青枯菌单菌落转接至 SP 液体培养基中, 30 °C、170 r/min 振荡培养 24 h 后, 用清水将培养液稀释至 1×10⁷ CFU/mL。番茄苗种植于含有 1 kg 栽培基质的 10 cm×12 cm 的钵中, 植株定植 3 d 后接种处理。采用灌根接种法, 即沿着植株根围缓缓浇入菌液, 接种量为 80 mL/盆, 等量清水灌根为阴性对照, 每个处理 10 盆, 菌剂处理和清水对照处理各重复 3 次, 接种后每天(持续 30 d)观察植株发病情况, 计算发病率。发病率(%)=∑发病株数/总株数×100。

1.4 青枯菌 DNA 甲基化 MSAP 体系的建立

1.4.1 基因组 DNA 提取及双酶切

采用细菌 DNA 提取试剂盒提取青枯菌基因组 DNA, 具体操作步骤参照试剂盒说明书。分别用 *EcoR* I/*Hpa* II 和 *EcoR* I/*Msp* I 对 DNA 进行双酶切。酶切反应体系(25 μL): 模板 DNA (100 ng/μL) 5.0 μL, *EcoR* I (20 U/μL) 0.5 μL, *Msp* I (或 *Hpa* II) (20 U/μL) 5.0 μL, 10×Buffer T 2.5 μL, ddH₂O 12 μL。酶切反应程序: 37 °C 12 h,

65 °C 20 min, 最后 4 °C 保存备用。

1.4.2 基因组 DNA 连接、预扩增和选择性扩增

连接反应体系(20 μL): 酶切产物 8 μL, T4 DNA 连接酶(5 U/μL) 2 μL, 连接酶缓冲液 3 μL, *EcoR* I 和 *Hpa* II-*Msp* I 接头引物(5 μmol/L)各 2 μL, ddH₂O 3 μL。连接反应程序: 16 °C 恒温水浴锅静置培养过夜, 70 °C 灭活 10 min, -20 °C 保存备用。

预扩增 PCR 反应体系(25 μL): 连接产物 2 μL, 2×*EasyTaq* PCR SuperMix 12 μL, 预扩增上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 反应程序: 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

选择性扩增 PCR 反应体系(25 μL): 预扩增产物 20 倍稀释液 5 μL, 2×*EasyTaq* PCR SuperMix 12 μL, 选择性扩增上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, ddH₂O 4 μL。PCR 反应程序: 94 °C 变性 30 s, 65 °C (每个循环降低 0.7 °C) 退火 30 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 13 个循环; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 23 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。接头、预扩增及选择性扩增引物序列见表 1。

1.4.3 电泳

采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测选择性扩增产物。电压 1 800 V 预电泳 30 min, 使凝胶预热。然后上样, 1 200 V 电泳 2.0–2.5 h, 取出凝胶, 银染显色。

1.5 总 RNA 提取、cDNA 合成和荧光定量 PCR

总 RNA 提取和 cDNA 反转录参照相应试剂盒操作说明进行, 引物序列见表 2。荧光定量 PCR 反应体系(20 μL): 模板 cDNA (300 ng/μL) 2 μL, TB Green 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 0.4 μL, Dye II 0.4 μL, ddH₂O 6.8 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火/延伸 34 s, 共 40 个循环。

表 1 MSAP 分析的引物序列

Table 1 Primer sequences for MSAP analysis

Primer type	<i>EcoR</i> I (E)		<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I (HM)	
	Primer name	Sequence (5'→3')	Primer name	Sequence (5'→3')
Adapter	EF	CTCGTAGACTGCGTACC	HMF	GACGATGAGTCTAGAA
	ER	AATTGGTACGCAGTC	HMR	CGTTCTAGACTCATC
Pre-amplification	E00	GACTGCGTACCAATTCA	HM00	ATCATGAGTCCTGCTCGG
Selective amplification	E1	GACTGCGTACCAATTCAACA	HM1	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAG
	E2	GACTGCGTACCAATTCAAAG	HM2	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAA
	E3	GACTGCGTACCAATTCAAAT	HM3	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGT
	E4	GACTGCGTACCAATTCAACT	HM4	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGC
	E5	GACTGCGTACCAATTCAACC	HM5	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAC
	E6	GACTGCGTACCAATTCAAAA	HM6	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGC

表 2 用于荧光定量 PCR 检测的 DNA 甲基化酶和去甲基化酶相关基因的引物序列

Table 2 Primer sequences of methylase and demethylase related genes used in RT-qPCR

Gene	Gene description	Primer sequence (5'→3')
<i>dam</i>	N ⁶ adenine-specific DNA methyltransferase	F: TGGTCGTTGTGCTCGTAATAG R: GGACAAATCAGCGTGCATAAC
<i>dcm</i>	C ⁵ cytosine-specific DNA methylase	F: CTGAAGGTGCTCAACTACGG R: TGATCCACTTGTCTTCCGC
<i>ftsZ</i>	Cell division protein FtsZ	F: CCGAGACCAAGGAAGTGATG R: GTAGACCGTACCGAAGATGAC
<i>alkB</i>	Oxidative demethylase	F: GTAATCCCGCTCATCCTTGTC R: GCTTCCCAGGCTTCACG

1.6 数据统计分析

采用 Excel 2007 和 DPS 17.10 软件对数据进行统计和方差分析。MASP 分析时, 将聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上有条带标记为“1”, 无条带记为“0”, 组成二次元矩阵, 统计分析青枯菌 DNA 的甲基化多态性。

2 结果与分析

2.1 青枯菌连续传代过程致病力衰退

比较不同致病力青枯菌的 F₅₀ 和 F₁ 代菌株菌落形态的异质性, 结果表明, 强致病力菌株 FJAT15304 连续传代 50 次后菌落形态发生明显变化(图 1), FJAT15304.F₅₀ 的 AI 平均值为 0.76, 显著高于 FJAT15304.F₁ 的 AI 值(0.52) ($P=0.031$); 无致病力菌株 FJAT15249 的 F₅₀ 和 F₁ 代菌株的

AI 平均值分别为 0.85 和 0.88, 差异不显著 ($P=0.448$); 致病力衰退型菌株 FJAT445 的 F₅₀ 和 F₁ 代菌株 AI 平均值分别为 0.80 和 0.69, 二者之间差异达显著水平 ($P=0.038$) (表 3)。

比较不同致病力及传代数青枯菌接种番茄植株后的发病情况, 结果表明, 接种强致病力菌株 FJAT15304.F₁ 第 5 天, 植株开始发病(发病率为 19.44%), 接种 21 d 后植株完全发病(发病率为 100%); 番茄接种致病力衰退型菌株 FJAT445.F₁ 第 10 天, 植株开始发病, 发病率为 9.72%, 接种 21 d 后植株发病率为 29.16%; 无致病力菌株及传代导致致病力衰退的菌株接种番茄, 在观察期(21 d)内, 植株均未出现发病症状(表 3)。

2.2 青枯菌基因组 DNA 的选择性扩增

Hpa II (简称 H) 和 *Msp* I (简称 M) 是一组同

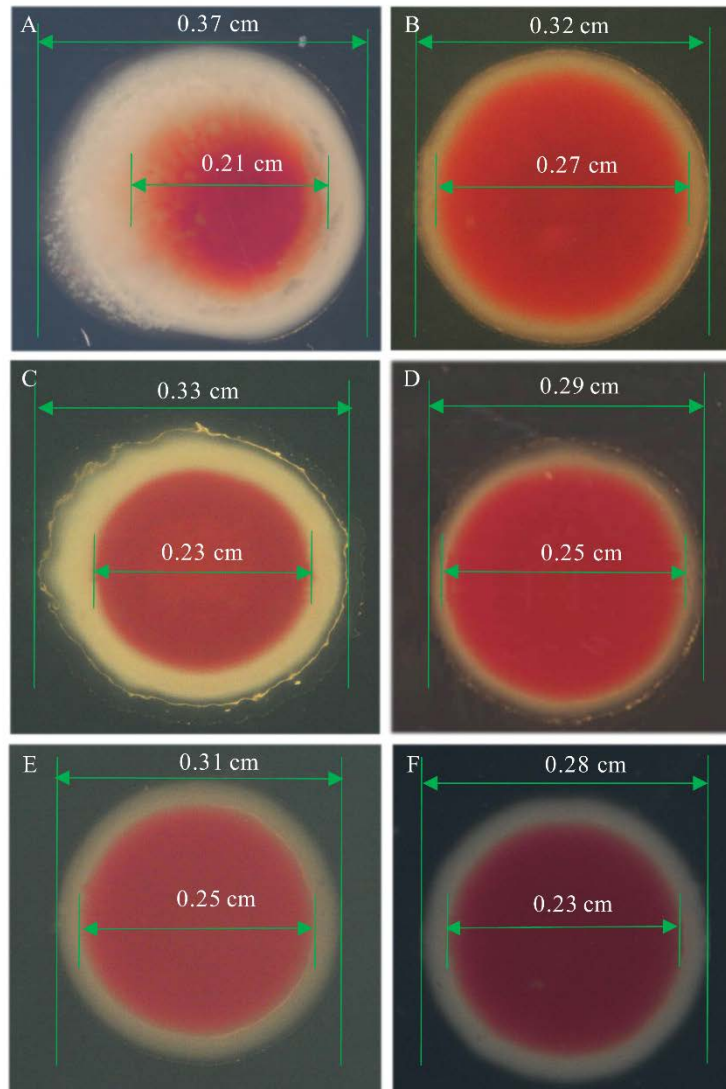


图 1 不同致病力青枯菌的 F₁ 和 F₅₀ 代菌株弱化指数测定

Figure 1 Attenuation index determination of F₁ and F₅₀ generations of *Ralstonia solanacearum* with different pathogenicity. A and B were FJAT15304.F₁ and FJAT15304.F₅₀, respectively; C and D were FJAT445.F₁ and FJAT445.F₅₀, respectively; E and F were FJAT15249.F₁ and FJAT15249.F₅₀, respectively.

表 3 供试青枯菌的弱化指数及其接种后番茄青枯病发病率

Table 3 The attenuation index (AI) value and disease incidence (DI) values of tomato seedlings using the tested *Ralstonia solanacearum* strains

Strain number	AI	P-value	DI (%)			
			5 d	10 d	15 d	21 d
FJAT15304.F ₁	0.52±0.10	0.031	19.44±2.40	62.50±4.17	84.72±2.41	100.00±0.00
FJAT15304.F ₅₀	0.76±0.08		0	0	0	0
FJAT445.F ₁	0.69±0.02	0.038	0	9.72±2.41	22.22±2.41	29.16±4.17
FJAT445.F ₅₀	0.80±0.05		0	0	0	0
FJAT15249.F ₁	0.88±0.05	0.448	0	0	0	0
FJAT15249.F ₅₀	0.85±0.06		0	0	0	0

Mean count ± standard deviation (n=10 and 3 for AI and DI, respectively)

裂酶，可识别并切割 5'-CCGG-3'序列，其中，H 只识别并切割半甲基化的 5'-CCGG-3'序列；M 只能切割外部胞嘧啶未发生甲基化的

5'-CCGG-3'序列。研究发现，供试菌株经选择性 PCR 扩增可划分为 4 种类型(图 2)：I 型(无甲基化或半甲基化类型)，H 和 M 酶切产物扩增均有条

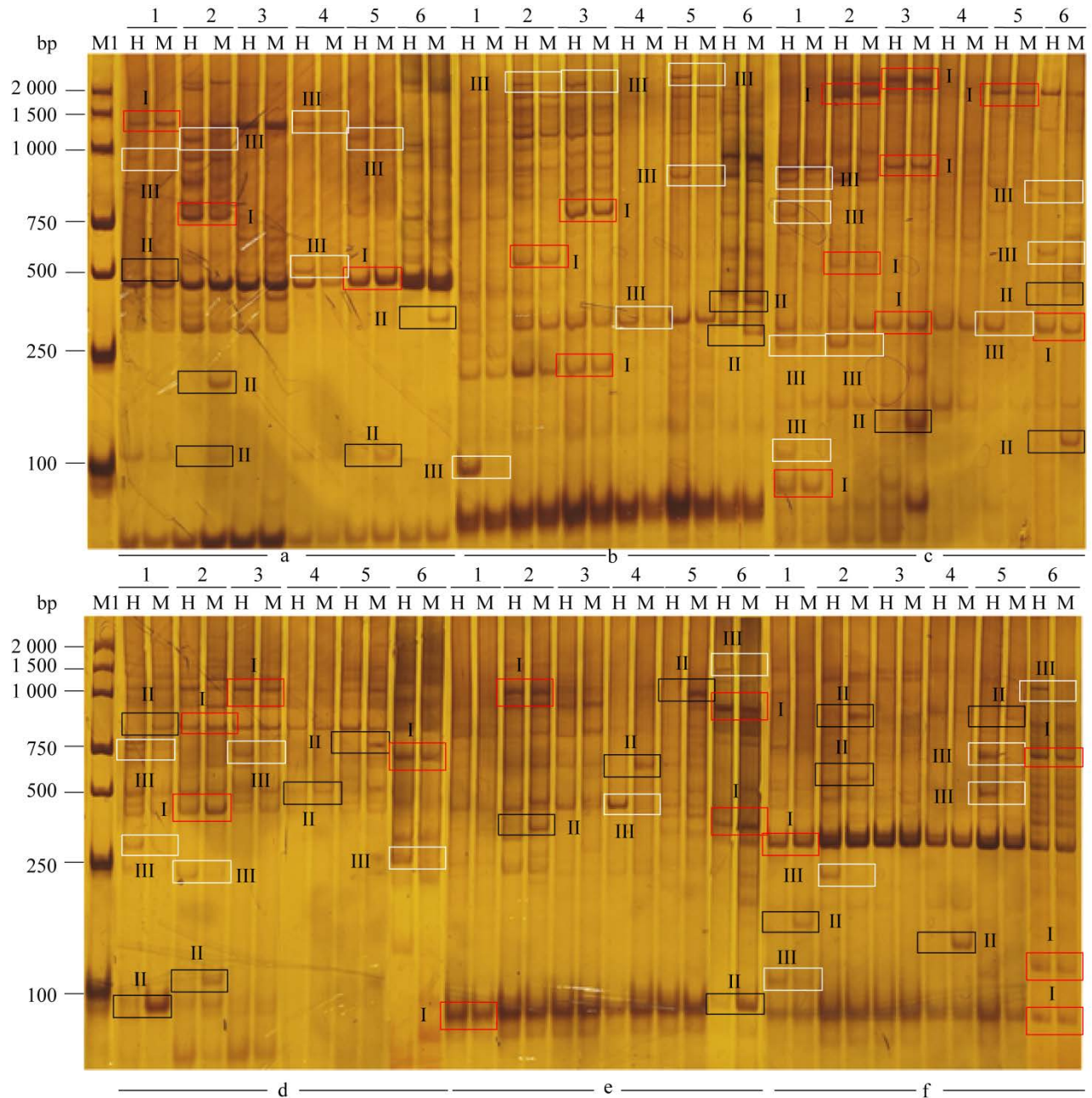


图 2 选择性扩增产物经 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Figure 2 Results of selective amplification in 6% polyacrylamide gel electrophoresis. Types I, II, and III were non-methylated, full-methylated, and hemi-methylated sites, respectively; M and H were *EcoR* I+*Msp* I and *EcoR* I+*Hpa* II double digestion, respectively; M1 is DNA marker; Lane 1–6 are FJAT15304.F₁, FJAT15249.F₁, FJAT445.F₁, FJAT15304.F₅₀, FJAT15249.F₅₀, and FJAT445.F₅₀, respectively. The areas of a-f were the results of selective amplification for primers of E₁/HM₁, E₂/HM₂, E₃/HM₃, E₄/HM₄, E₅/HM₅, and E₆/HM₆, respectively.

带(图 2, 红色方框); II 型(全甲基化类型), M 酶切产物扩增有条带, H 酶切产物扩增无条带(图 2, 黑色方框); III 型(半甲基化类型), H 酶切产物扩增泳道有条带, M 酶切产物扩增泳道无条带(图 2, 白色方框); IV 型, 不存在 CCGG 位点, 或内、外侧胞嘧啶同时甲基化, 鲜少见此甲基化类型。

经引物对 E₁/HM₁ 的选择性 PCR 扩增, FJAT15304.F₁、FJAT15249.F₁、FJAT15249.F₅₀、FJAT15304.F₅₀ 和 FJAT445.F₅₀ 出现 I、II 和 III 型, FJAT445.F₁ 只出现 I 和 II 型; 经引物对 E₂/HM₂ 的 PCR 扩增, FJAT15304.F₁、FJAT15249.F₁、FJAT445.F₁ 和 FJAT445.F₅₀ 出现 I、II 和 III 型, FJAT15304.F₅₀ 只出现 III 型, 而 FJAT15249.F₅₀ 只出现 I 和 II 型; 经引物对 E₃/HM₃ 的 PCR 扩增, 除 FJAT15304.F₅₀ 只出现 I 型外, 其他菌株都出现 I、II 和 III 型; 经引物对 E₄/HM₄ 的 PCR 扩增, 6 个菌株都出现 I、II 和 III 型; 经引物对 E₅/HM₅ 的 PCR 扩增, 除 FJAT15304.F₁ 只出现 I 型, 其余菌株都出现 I、II 和 III 型; 经引物对 E₆/HM₆ 的 PCR 扩增, 所有菌株都出现 I、II 和 III 型。此外, 供试菌株经所有引物的选择性 PCR 扩增均未出现 IV 型(图 2)。

2.3 青枯菌连续传代过程 DNA 甲基化水平分析

MSAP 技术分析连续传代过程青枯菌的 DNA 甲基化水平变化情况, 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 2, 统计结果见表 4。不同致病力及传代数青枯菌的总甲基化率较高, 在 33.33%–48.57%之间。

强致病力菌株 FJAT15304 连续传代 50 次后, 总扩增条带数由 F₁ 的 62 条减少至 F₅₀ 的 30 条, 与 FJAT15304.F₁ 相比, FJAT15304.F₅₀ 的总甲基化率增加 7.82%, 全甲基化率增加 141.01%, 而半甲基化率降低 39.20%; 致病力衰退型菌株 FJAT445 连续传代 50 次后, 菌株的甲基化变化规律与强致病力菌株连续传代菌株的甲基化变化规律相似, 与其 F₁ 菌株相比, FJAT445.F₅₀ 菌株的总扩增带数降低 52.70%, 总甲基化率增加 38.22%, 全甲基化率增加 178.80%, 而半甲基化率降低 15.44%; 无致病力菌株 FJAT15249 连续传代 50 次后, F₅₀ 与 F₁ 菌株的总甲基化率均为 33.33%。

2.4 青枯菌连续传代过程 DNA 甲基化相关酶基因的表达分析

细菌甲基化水平是由甲基化酶和去甲基化酶共同维持的^[25]。因此, 对青枯菌连续传代过程的 DNA 甲基化酶和去甲基化相关酶基因进行荧光定量 PCR 分析, 结果表明, 与 F₁ 菌株相比, 强致病力菌株 FJAT15304 和致病力衰退型菌株 FJAT445 连续传代 50 次后, DNA 甲基化酶相关基因 *dam*、*dcm* 和 *ftsZ* 表达量显著增加($P<0.01$), 而去甲基化酶基因 *alkB* 表达量显著降低; 无致病力菌株 FJAT15249 连续传代过程中, DNA 甲基化酶基因 *dcm* 表达量显著增加($P<0.01$), 去甲基化酶基因 *alkB* 表达量显著降低($P<0.05$), 而 DNA 甲基化酶基因 *dam* 和 *ftsZ* 表达量未发生明显变化(图 3)。

表 4 不同致病力及传代数青枯菌 DNA 甲基化 MSAP 分析

Table 4 MSAP analysis of DNA methylation for *Ralstonia solanacearum* with different pathogenicity and generation

Strain number	Pattern			Total amplified bands	Methylated sites	Total methylated band ratio (%)	Full-methylated ratio (%)	Hemi-methylated ratio (%)
	I	II	III					
FJAT15304.F ₁	39	6	17	62	23	37.10	9.68	27.42
FJAT445.F ₁	48	11	15	74	26	35.14	14.86	20.27
FJAT15249.F ₁	46	15	8	69	23	33.33	21.74	11.59
FJAT15304.F ₅₀	18	7	5	30	12	40.00	23.33	16.67
FJAT445.F ₅₀	18	11	6	35	17	48.57	31.43	17.14
FJAT15249.F ₅₀	44	11	11	66	22	33.33	20.66	12.67

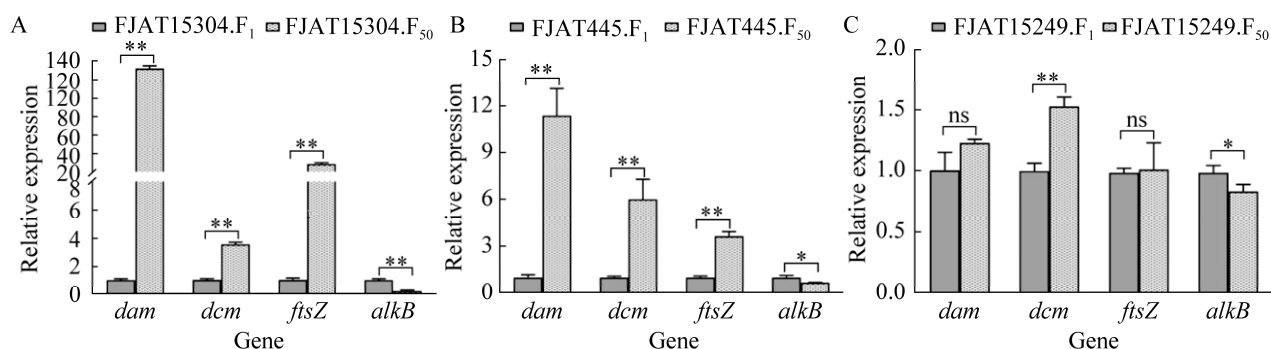


图3 青枯菌连续传代过程 DNA 甲基化和去甲基化相关酶基因的表达水平

Figure 3 The expression level of methylation-related and demethylation-related enzyme genes for *Ralstonia solanacearum* virulent (A), intermediate (B) and avirulent strains (C) during consecutive subculture. Error bars represent the standard of three biological replicates. *, **, and ns indicate a significant difference at 0.05 and 0.01 levels, and no significant difference of gene relative expression between strains of F₁ and F₅₀.

3 讨论

环境胁迫、体外和植株体内继代培养,青枯菌均会出现致病力衰退现象^[26-28]。Wang 等发现解淀粉芽胞杆菌 T-5 的挥发性物质会致弱青枯菌毒力^[26]。刘颖研究发现,在酸(pH 4.9)和低温(20 °C)胁迫条件下,长期继代培养的青枯菌从典型强致病力菌株菌落形态转变为无致病力菌落形态^[27]。Guidot 等发现青枯菌在寄主植株中连续继代 14-15 代,82%的菌落从强致病力形态转为无致病力形态^[28]。本研究发现,青枯菌强致病力菌株 FJAT15304 连续传代 50 次后菌落形态发生明显变化,FJAT15304.F₅₀ 的弱化指数(0.76)显著高于其 F₁(0.52) ($P=0.031$),该菌株接种番茄植株不发病,表明其为无致病力菌株。过渡型菌株 FJAT445 连续传代 50 次后,无论菌落形态还是接种番茄试验,均证实其为无致病力菌株,表明青枯菌连续传代会出现致病力衰退现象。Wang 等研究表明,传代培养可使致病力相关基因丢失或发生变异而不表达,随着传代次数增加,突变不断积累,群体中衰退型细胞数量增加,致使群体致病力表型出现衰退^[29]。

细菌 DNA 甲基化修饰在 DNA 复制起始、错配修复、细菌毒力等方面发挥重要功能^[17,30]。Blow 等通过对 200 余种不同细菌和古细菌等的研究发现,超过 180 种的生物体中存在 DNA 甲基化,并在生物体的毒力调节、抗生素耐药性、氧化适应等生理生化中发挥重要作用^[31]。Kumar 等研究发现,m4C 和 m5C 均参与幽门螺杆菌基因的表达调控,m4C 调控菌株自然转化能力、编码毒力基因、核糖体组装和细胞成分等^[32],m5C 在菌株的运动、黏附和毒力中起重要作用^[33]。本研究发现,青枯菌强致病力菌株和过渡型菌株连续传代致病力衰退后,其 DNA 甲基化水平显著增加,总甲基化率分别提高 7.82%和 38.22%,而无致病力菌株连续传代过程 DNA 甲基化率未发生明显变化,表明青枯菌 DNA 甲基化水平可能与其致病力衰退存在一定的关联性,研究结果与 Nye 等对链球菌的甲基化研究结果相吻合,Nye 等研究发现链球菌 MEW123 基因组的基因编码区存在高占比的 m6A 甲基化位点,影响毒力相关基因的表达^[34]。此外,本研究发现全甲基化是青枯菌强致病力菌株和过渡型菌株基因组 DNA 甲基化的主要模式,表现为全甲基化率

大于半甲基化率,而自然分离的无致病力菌株或连续传代 50 次后的无致病力菌株的 DNA 全甲基化率均低于半甲基化率,表明半甲基化是无致病力菌株 DNA 甲基化的主要模式。

DNA 甲基化水平主要是由 DNA 甲基转移酶和去甲基化酶创建和维持的^[25]。Dam 及其同源蛋白一直是细菌表观调控最重要的范例之一^[12]。dam 缺失后基因突变率升高^[35],许多基因表达发生改变^[36]。Wion 等研究表明,dam 缺失导致的 GATC 甲基化缺失,会引起沙门菌毒力减弱^[37]。本研究对不同致病力青枯菌连续传代过程 DNA 甲基化酶基因 dam、dcm 和 ftsZ,以及去甲基化酶基因 alkB 的表达水平变化分析,发现与 F₁ 菌株相比,强致病力和过渡型菌株连续传代致病力衰退菌株的 DNA 甲基化酶相关基因表达量显著增加,而 DNA 去甲基化酶相关基因的表达量显著降低,与 MSAP 结果相吻合,表明这些基因参与青枯菌 DNA 甲基化的调控。

青枯菌 DNA 甲基化位点的特征及其在整个基因组的分布,特定甲基化转移酶、去甲基化酶相关基因的表达、功能及其如何在分子水平上表观调控基因表达,青枯菌 DNA 甲基化与其致病力调控网络相关基因表达的关联性有待进一步研究与验证。

4 结论

本研究对不同致病力青枯菌进行连续传代培养,通过弱化指数 AI 值和番茄盆栽苗接种试验,确定强致病力和过渡型菌株连续传代 50 次后,为无致病力菌株,而无致病力菌株连续传代 50 次后,保持无致病力特性。随后利用 MSAP 技术分析不同致病力及传代数菌株的 DNA 甲基化水平,表明青枯菌 DNA 甲基化水平较高,而且其 DNA 甲基化水平可能与致病力衰退有关,无致病力菌株以 DNA 半甲基化为主要模式,强

致病力和过渡型菌株以 DNA 全甲基化为主要模式。进一步利用荧光定量 PCR 分析不同致病力及传代数青枯菌 DNA 甲基转移酶和去甲基化酶相关基因的表达水平,明确这些基因参与青枯菌 DNA 甲基化的调控。本研究最终为揭示青枯菌致病力衰退的分子机制提供理论依据,并为利用无致病力菌株防治青枯病害提供新的思路 and 依据。

参考文献

- [1] HAYWARD AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *pseudomonas solanacearum*[J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29: 65-87.
- [2] HU QL, TAN L, GU SS, XIAO YS, XIONG XY, ZENG WA, FENG K, WEI Z, DENG Y. Network analysis infers the wilt pathogen invasion associated with non-detrimental bacteria[J]. ppj Biofilms and Microbiomes, 2020, 6(1): 8.
- [3] GENIN S. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*[J]. The New Phytologist, 2010, 187(4): 920-928.
- [4] MANSFIELD J, GENIN S, MAGORI S, CITOVSKY V, SRIARIYANUM M, RONALD P, DOW M, VERDIER V, BEER SV, MACHADO MA, TOTH I, SALMOND G, FOSTER GD. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6): 614-629.
- [5] ETMINANI F, YOUSEFVAND M, HARIGHI B. Phylogenetic analysis and molecular signatures specific to the *Ralstonia solanacearum* species complex[J]. European Journal of Plant Pathology, 2020, 158(1): 261-279.
- [6] MOREL A, PEETERS N, VAILLEAU F, BARBERIS P, JIANG GF, BERTHOMÉ R, GUIDOT A. Plant pathogenicity phenotyping of *Ralstonia solanacearum* strains[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1734: 223-239.
- [7] PRIOR P, AILLOUD F, DALSSING BL, REMENANT B, SANCHEZ B, ALLEN C. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species[J]. BMC Genomics, 2016, 17: 90.
- [8] 张长龄, 华静月, 王东, 郑宏启. 青枯菌的菌种保存[J]. 植物保护, 1993, (1): 39-40.

- ZHANG CL, HUA JY, WANG D, ZHENG HQ. Conservation of *Ralstonia solanacearum* strains[J]. *Plant Protection*, 1993, (1): 39-40 (in Chinese).
- [9] ZHENG XF, WANG ZR, CHEN MC, CHEN Z, WANG JP, ZHU YJ. Genetic stability of virulent, intermediate, and avirulent strains of *Ralstonia solanacearum* after extensive, consecutive subculturing[J]. *Biological Control*, 2022, 167: 104845.
- [10] KANDA A, YASUKOHCHI M, OHNISHI K, KIBA A, OKUNO T, HIKICHI Y. Ectopic expression of *Ralstonia solanacearum* effector protein PopA early in invasion results in loss of virulence[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(5): 447-455.
- [11] ROBERTSON AE, WECHTER WP, DENNY TP, FORTNUM BA, KLUEPFEL DA. Relationship between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(12): 1376-1384.
- [12] 张文婷, 姚玉峰. 细菌 DNA 甲基化研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45(10): 1026-1038. ZHANG WT, YAO YF. Research progress on bacterial DNA methylation[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2018, 45(10): 1026-1038 (in Chinese).
- [13] REIK W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development[J]. *Nature*, 2007, 447: 425-432.
- [14] 童童, 王连荣. 甲基化修饰在细菌表观调控中的功能[J]. *微生物学报*, 2017, 57(11): 1688-1697. TONG T, WANG LR. Epigenetic regulation role of DNA methylation in bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(11): 1688-1697 (in Chinese).
- [15] OLIVEIRA PH, FANG G. Conserved DNA methyltransferases: a window into fundamental mechanisms of epigenetic regulation in bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(1): 28-40.
- [16] 方和事, 吴杭, 张部昌. 细菌中 DNA 甲基转移酶的生物学功能及其作用机制[J]. *生命的化学*, 2020, 40(12): 2184-2192. FANG HS, WU H, ZHANG BC. DNA methyltransferase in bacteria: biological function and mechanism[J]. *Chemistry of Life*, 2020, 40(12): 2184-2192 (in Chinese).
- [17] MARINUS MG, CASADESUS J. Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(3): 488-503.
- [18] GONZALEZ D, KOZDON JB, McADAMS HH, SHAPIRO L, COLLIER J. The functions of DNA methylation by CcrM in *Caulobacter crescentus*: a global approach[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(6): 3720-3735.
- [19] ZHANGCZ, SAMANTA D, LU HQ, BULLEN JW, ZHANG HM, CHEN I, HE XS, SEMENZA GL. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(14): E2047-E2056.
- [20] ZHOU B, HAN ZF. Crystallization and preliminary X-ray diffraction of the RNA demethylase ALKBH5[J]. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 2013, 69(Pt 11): 1231-1234.
- [21] 李卫国, 常天俊, 龚红梅. MSAP 技术及其在植物遗传学研究中的应用[J]. *生物技术*, 2008, 18(1): 83-87. LI WG, CHANG TJ, GONG HM. Methylation-sensitive amplified polymorphism and its application to plant genetics[J]. *Biotechnology*, 2008, 18(1): 83-87 (in Chinese).
- [22] KELMAN A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetratzolium medium[J]. *Phytopathology*, 1954, 44: 693-695.
- [23] 车建美, 蓝江林, 刘波. 转绿色荧光蛋白基因的青枯雷尔氏菌生物学特性[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3626-3635.
- [24] 刘波, 林营志, 朱育菁, 葛慈斌, 曹宜. 生防菌对青枯雷尔氏菌的致弱特性[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(3): 322-329. LIU B, LIN YZ, ZHU YJ, GE CB, CAO Y. Attenuation characteristics of bacterial-wilt-disease biocontrol strain anti-8098A (*Bacillus cereus*) to *Ralstonia solanacearum*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12(3): 322-329 (in Chinese).
- [25] MANOHARLAL R, SAIPRASAD GVS, ULLAGADDI C, KOVAŘÍK A. Gibberellin A3 as an epigenetic determinant of global DNA hypo-methylation in tobacco[J]. *Biologia Plantarum*, 2018, 62(1): 11-23.
- [26] WANG JN, RAZA W, JIANG GF, YI Z, FIELDS B, GREENROD S, FRIMAN VP, JOUSSET A, SHEN QR, WEI Z. Bacterial volatile organic compounds attenuate pathogen virulence via evolutionary trade-offs[J]. *The ISME Journal*, 2023, 17(3): 443-452.

- [27] 刘颖. 青枯雷尔氏菌的遗传进化及其响应酸与低温胁迫的分子机制研究[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2020.
LIU Y. Genetic evolution of *Ralstonia solanacearum* and its molecular mechanism in response to acid and low temperature stress[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [28] GUIDOT A, JIANG W, FERDY JB, THÉBAUD C, BARBERIS P, GOUZY J, GENIN S. Multihost experimental evolution of the pathogen *Ralstonia solanacearum* unveils genes involved in adaptation to plants[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(11): 2913-2928.
- [29] WANG XF, LIN YZ, LI Q, LIU Q, ZHAO WW, DU C, CHEN J, WANG XJ, ZHOU JH. Genetic evolution during the development of an attenuated EIAV vaccine[J]. *Retrovirology*, 2016, 13: 9.
- [30] CASADESÚS J, LOW D. Epigenetic gene regulation in the bacterial world[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(3): 830-856.
- [31] BLOW MJ, CLARK TA, DAUM CG, DEUTSCHBAUER AM, FOMENKOV A, FRIES R, FROULA J, KANG DD, MALMSTROM RR, MORGAN RD, POSFAI J, SINGH K, VISEL A, WETMORE K, ZHAO ZY, RUBIN EM, KORLACH J, PENNACCHIO LA, ROBERTS RJ. The epigenomic landscape of prokaryotes[J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12(2): e1005854.
- [32] KUMAR S, KARMAKAR BC, NAGARAJAN D, MUKHOPADHYAY AK, MORGAN RD, RAO DN. N4-cytosine DNA methylation regulates transcription and pathogenesis in *Helicobacter pylori*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(7): 3429-3445.
- [33] KUMAR R, MUKHOPADHYAY AK, GHOSH P, RAO DN. Comparative transcriptomics of *H. pylori* strains AM5, SS1 and their *hpyAV1BM* deletion mutants: possible roles of cytosine methylation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42303.
- [34] NYE TM, JACOB KM, HOLLEY EK, NEVAREZ JM, DAWID S, SIMMONS LA, JR WATSON ME. DNA methylation from a type I restriction modification system influences gene expression and virulence in *Streptococcus pyogenes*[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(6): e1007841.
- [35] BALE A, D'ALARCAO M, MARINUS MG. Characterization of DNA adenine methylation mutants of *Escherichia coli* K12[J]. *Mutation Research*, 1979, 59(2): 157-165.
- [36] ROBBINS-MANKE JL, ZDRAVESKI ZZ, MARINUS M, ESSIGMANN JM. Analysis of global gene expression and double-strand-break formation in DNA adenine methyltransferase- and mismatch repair-deficient *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(20): 7027-7037.
- [37] WION D, CASADESÚS J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4: 183-192.