

研究报告

Research Reports

青枯菌 Po82 菌株 VI 型分泌系统基因簇功能研究

罗亚婷, 许景升, 徐进, 张昊, 冯洁*

(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 VI型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)是革兰氏阴性细菌中新近发现的分泌系统,控制细菌的毒性和蛋白分泌。本试验构建了植物青枯菌 Po82 菌株的 T6SS 基因簇完全缺失菌株,从全局水平初步分析了 T6SS 的功能。与野生型菌株相比,T6SS 基因簇的缺失导致了突变菌株运动能力显著增强,在接种前期突变株病情指数明显下降;通过 qRT-PCR 分析 III 型分泌系统效应子基因,其中 *popA*、*popB* 和 *popP* 基因表达量上调,而 *popC* 表达水平下调。T6SS 基因簇的缺失影响了 Po82 菌株的运动能力和 III 型效应子基因的表达,使得 Po82 病程延长。这些结果说明,T6SS 参与青枯菌的致病过程,且 T6SS 与 T3SS 之间有复杂的未知调控关系。

关键词 青枯菌; VI 型分泌系统; 基因簇; 致病力

中图分类号: S 432.42 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.06.005

Functional analysis of a T6SS cluster of *Ralstonia solanacearum* Po82

Luo Yating, Xu Jingsheng, Xu Jin, Zhang Hao, Feng Jie

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

Abstract The type VI secretion system (T6SS) is a machinery recently discovered in Gram-negative bacteria for translocation of proteins and also required for full virulence. In this study, T6SS gene cluster-deleted mutants of *Ralstonia solanacearum* strain Po82 were constructed in order to evaluate global functions of the T6SS cluster. We showed that the mutant strains had significantly attenuated their virulence on tomato plants in early stage. The expression of type III effector genes, *popA*, *popB* and *popP*, but not *popC*, was up-regulated revealed by real-time PCR. In addition, the motility of the mutants was increased. These results indicated that the T6SS gene cluster is involved in pathogenesis of *R. solanacearum* and there are complex unknown regulatory mechanisms between T6SS and T3SS.

Key words *Ralstonia solanacearum*; type VI secretion system; gene cluster; virulence

由青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的植物细菌性枯萎病是危害性巨大的植物细菌性病害之一。青枯菌寄主范围非常广,可危害马铃薯、烟草、番茄、香蕉、花生、茄子和姜等重要作物,造成严重的经济损失^[1-2]。青枯菌通过非常复杂的多元件网络调控众多致病因子,如胞外蛋白酶,细胞壁降解酶,多糖和 III 型分泌系统及其效应蛋白等^[3],感知内部和外部环境的变化,增强其致病力和适应能力。

VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)广泛存在于致病性革兰氏阴性细菌中,包括霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、

沙门氏菌(*Salmonella enterica*)和鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia mallei*)等,与病原菌的致病力、细菌竞争及互作等多种生命活动密切相关,其分泌的效应蛋白作用于原核和真核细胞。T6SS 通常由一个平均长度超过 20 kb 的基因簇编码^[4]。关于 T6SS 及其效应子的研究多集中在人类病原菌中,如,黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、霍乱弧菌(*V. cholera*)和铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)。比较基因组分析和功能验证发现,动物病原菌中的 T6SS 在细菌毒性方面具有重要作用^[5-7],而在其他细菌存在的情况下,动物病原菌中的 T6SS 通过刺

收稿日期: 2016-01-26 修订日期: 2016-02-29

基金项目: 国家自然科学基金(31371908)

* 通信作者 E-mail: jfeng@ippcaas.cn

激菌体增殖,抑制寄主免疫反应,从而增加自身对环境的竞争适应性^[8]。目前研究人员也在根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、青枯菌(*R. solanacearum*)、丁香假单胞菌(*P. syringae*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)和 *P. protegens* 等植物病原菌中开展 T6SS 的相关研究。在 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 菌株中有 3 个 T6SS, 分别缺失 T6SS-II 和 T6SS-III 后均影响病原菌在烟草上的定殖以及对番茄的致病力^[9]。

我们前期研究发现,青枯菌 Po82 菌株的 4 个核心基因 *vasF*、*hcp*、*vgrG* 和 *impA* 的缺失,可导致病菌致病力明显减弱,但致病性并未完全丧失,而 VI 型分泌系统重要组成基因 *tssM* 的突变不仅影响了病菌的致病力,而且影响了 III 型分泌系统部分效应子

的表达^[10],表明 VI 型与 III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS)之间可能存在着某种未知的协同调控机制。单个基因的突变不足以反映 T6SS 的整体功能,因此我们决定整体缺失 Po82 菌株中 T6SS 基因簇,通过致病力和基础生物学测定,以期评价 T6SS 的作用和发掘 T6SS 与 T3SS 之间的调控关系,探究 T6SS 在青枯菌致病过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和质粒

本研究所使用的菌株、质粒特征及来源见表 1。青枯菌菌株 Po82 采用 NA 或 NB 培养基,28℃ 条件下培养。大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 α)采用 LB 培养基(固体或液体),37℃ 培养箱中培养。

表 1 本试验所用菌株与质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in the study

菌株或质粒	Strain and plasmid	特征	Description	来源	Source
<i>E. coli</i> DH5 α			<i>mcrA</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i>	Our laboratory	
Po82			Wild type, phy II B/seq4	Our laboratory	
Po82 Δ VI			Po82 mutant of the T6SS gene cluster deleted	This study	
pKMS1-VI- <i>gm</i>			Gm ^r , Kan ^r , for T6SS gene cluster deletion	This study	
pKMS1- <i>gm</i> (+U)			Gm ^r , Kan ^r , <i>sacB oriT</i> region of RP4	Our laboratory	
pBBR1MCS-4			Amp ^r <i>lacZ</i> alpha	Our laboratory	
pBBR1MCS-4_PSA			Amp ^r <i>lacZ</i> alpha	This study	
pBR4PSA- <i>vgrG1</i>			Amp ^r , for <i>vgrG1</i> gene complementation	This study	
pBR4PSA- <i>vgrG2</i>			Amp ^r , for <i>vgrG2</i> gene complementation	This study	
pBR4PSA- <i>hcp</i>			Amp ^r , for <i>hcp</i> gene complementation	This study	

1.2 主要试剂和仪器

2 \times GC buffer I, Ex Taq 酶, dNTP Mix (2.5 μ mol/L) 等购自大连宝生物(TaKaRa)公司; Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)、SYBR Green Master Mix (Low ROX Premixed) 等购自诺唯赞(Vazyme)生物科技公司;其他试剂和仪器包括 DNA ladder、琼脂糖凝胶回收试剂盒(Axygen)、质粒小提试剂盒(Axygen)、中美泰和无缝连接试剂盒;荧光定量 PCR 仪(ABI 7500), 分光光度计(Analytik Jena)等。氨苄青霉素 Amp(终浓度 100 μ g/mL), 庆大霉素 Gm(终浓度 50 μ g/mL), 卡那霉素 Kan(终浓度 50 μ g/mL)。

1.3 培养基

1% 蔗糖 NA 培养基为 NA 培养基加 1% (W/V) 蔗糖, 10% 蔗糖 NA 培养基为 NA 培养基加 10% (W/V) 蔗糖; 半固体培养基(SMM): 葡萄糖 100 mg,

蛋白胨 100 mg, 乙二胺四乙酸二钠 38 mg, pH=7.0 的磷酸盐缓冲液 10 mL, 琼脂 2.5 g, 用蒸馏水定容到 1 000 mL, 121℃ 灭菌 15 min; *hrp* 诱导培养基^[11]等。

1.4 试验方法

1.4.1 青枯菌 Po82 菌株 T6SS 基因簇缺失载体构建

本试验采用 USER(uracil-specific excision reagent) 技术一步构建自杀载体进行同源重组双交换, 敲除目标基因^[12-13]。参照 Po82(全基因组序列 GenBank 登录号: CP002819), 根据 T6SS 基因簇的上下游序列设计引物。其中左臂引物为 821UF/UR, 右臂引物为 821DF/DR(表 2)。以青枯菌菌株 Po82 基因组 DNA 为模板分别扩增 T6SS 基因簇的上下游, 得到左臂片段 2.5 kb, 右臂片段 2.8 kb。扩增条件为: 95℃ 3 min; 93℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收后备用; 将基因左臂序列、右

臂序列连接到酶切处理后的 pKMS1-gm(+U)载体上,连接体系 25 μ L; USER 酶(1 000 U/mL)1 μ L, pKMS1-gm(+U)质粒 4 μ L, 上游片段(+U)10 μ L, 下游片段(+U)10 μ L; 连接条件: 37 $^{\circ}$ C, 20 min; 25 $^{\circ}$ C, 20 min。

连接产物采用热击法转化 *E. coli* DH5 α : 转化菌液涂于含 50 μ g/mL Gm 的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑单菌落于含 50 μ g/mL Gm 的液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 培养过夜, 离心收集菌体提取质粒。将构建好的重组质粒(pKMS1-VI-gm)进行 PCR 验证后交由上海生工生物工程有限公司进行测序鉴定。

植物青枯菌 Po82 菌株的自然转化^[14-15]: 挑取 Po82 菌株单菌落于 *hrp* 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C, 180 r/min 培养至 $A_{600}=0.8\sim 1.0$, 取 50 μ L 菌液于 1.5 mL 离心管中后加入 2~5 μ g 重组自杀质粒后混匀备用, 将灭菌后的 0.45 μ m 的滤膜放在 *hrp* 固体培养基中, 约 3~5 个/皿。将菌液点在滤膜上, 不倒置, 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h。

基因突变菌株的筛选和鉴定: (1) 自然转化培养 48 h 后, 用无菌水洗脱滤膜上的菌液并涂布于含 Gm 的 NA 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h, 从中挑取单菌落, 用含 Gm 的 1% 蔗糖 NA 液体培养基摇菌 3~4 次后, 用植物青枯菌特异性引物 759/760 鉴定筛选的菌株为青枯菌; (2) 将上一步得到的菌液稀释到 10^{-6} 后, 取 200 μ L 涂布于含 Gm 的 10% 蔗糖 NA 固体平板上, 于 28 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h。将长出的单菌落挑出, 用含 Gm 的 10% 蔗糖 NA 液体培养基摇菌; (3) 用 T6SS 基因簇核心基因引物(表 2)进行目的基因扩增鉴定, 根据扩增情况判断是否发生双交换, 最后得到突变菌株 Po82 Δ VI。

1.4.2 基因互补菌株的构建

根据基因序列, 以青枯菌 Po82 基因组 DNA 为模板, 设计 T6SS 基因簇 3 个核心基因 *vgrG1*、*vgrG2*、*hcp* 引物对: VgrG1OF/R、VgrG2OF/R 和 HCPOF/R, 引物对含上游约 600 bp 区域, 可能包含其启动子(表 2)。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 93 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。质粒 pBBR1MCS-4 是广寄主克隆载体, 在细菌体内表达能力较弱, 故加入一段强启动子序列得到重组质粒 pBBR1MCS-4_PSA, 作为互补质粒。设计引物对 pBR4PSAF/R(表 2), PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 93 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 4 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。所得 PCR 产物(*vgrG1* 为 1 238 bp, *vgrG2* 为 1 232 bp, *hcp* 为 1 143 bp)经琼脂糖凝胶电泳回收纯化, 连接到质粒 pBBR1MCS-4_PSA 上。连接体系为 10 μ L: 2 \times Master Assembly Mix 5 μ L, pBBR1MCS-4_PSA (64 μ g/mL) 1 μ L, 片段 2 μ L, ddH₂O 2 μ L。50 $^{\circ}$ C 连接 15 min, 采用热击法转化 *E. coli* DH5 α 。

在含 Amp 的 LB 平板上挑取单菌落于含 Amp 的液体 LB 中振荡培养后提取质粒。将构建好的重组质粒(pBR4PSA-*vgrG1*、pBR4PSA-*vgrG2*、pBR4PSA-*hcp*)进行 PCR 验证后交由上海生工生物工程有限公司进行测序鉴定后用于互补试验。

制备青枯菌 Po82 菌株电击感受态: 参照 Lavie 等^[16]的方法, 将构建好的重组表达载体 pBR4PSA-*vgrG1*、pBR4PSA-*vgrG2*、pBR4PSA-*hcp* 分别电击导入青枯菌 Po82 Δ VI 菌株中, 在含有 Gm 和 Amp 的平板上筛选后进行 PCR 检验和测序验证, 最终获得具有抗性的互补菌株 Po82 Δ VI-*vgrG1*、Po82 Δ VI-*vgrG2* 和 Po82 Δ VI-*hcp*。

表 2 所用引物序列

Table 2 Sequences of primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3')(下划线部分为接头) Primer sequences (The underlined part is the joint)	靶标基因 Target gene	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature	延伸时间 Extension time
821UF	<u>GGTCTTAAUCGTTTCGACCCCTCAGAAGAA</u>	<i>vgrG1</i>	60	2 min
821UR	<u>GGCATTTAAUCCGGGAGGATCG TATGGAAC</u>			
821DF	<u>GGACTTAAUAAACGAATCGGGAATCGGGG</u>			
821DR	<u>GGGTTTAAUTATCGAGCTTCAAACCCGGAG</u>	<i>vgrG2</i>	60	2 min
VgrG1OF	<u>CTGCCGTTTCGACGATTCAGCCAAGCGCGTTCGAATGC</u>			
VgrG1OR	<u>GGATCTTCCAGAGATTCCTGTCTGCTCCAACCTCGCCATC</u>			
VgrG2OF	<u>CTGCCGTTTCGACGATCGCTGGTGGAAATCCGTGCTGGC</u>	<i>hcp</i>	60	1 min
VgrG2OR	<u>GGATCTTCCAGAGATTCAAACCCGTA CTGGCCGGGGT</u>			
HCPOF	<u>CTGCCGTTTCGACGATTCGCCACGCATACCTTCAA</u>			
HCPOR	<u>GGATCTTCCAGAGATTTAAACCGAGTAGGTCTTG</u>		60	1 min

续表 2 Table 2(Continued)

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3')(下画线部分为接头) Primer sequences (The underlined part is the joint)	靶标基因 Target gene	退火温度/℃ Annealing temperature	延伸时间 Extension time
pBR4PSAF	<u>ATCGTCGAACGGCAGCGATAAAAGCTT</u> GCTGCAGGTCGA	pBR4PSA	60	4 min
pBR4PSAR	<u>ATGTCTGGAAGATCC</u> TGAGAGCTCCGATGATAAGCTG			
82 <i>tss</i> LF	CCGGCGAAACGTTCTTCATC	<i>tssL</i>	60	30 s
82 <i>tss</i> LR	GAATAGCCCTCCAGCGTCTC			
DUF876F	AGAAGTCGGTGAAGCTGGTG	DUF876	60	30 s
DUF876R	GAAGTAGCGGTCGAGATCA			
DUF877F	CGAGTACGCCAAGTGAAGT	DUF877	60	30 s
DUF877R	CACCGGTTGAGGAAGGTCTC			
82HcpF	TGAAGGATATCTACGTCAAGTTCG	<i>hcp</i>	60	30 s
82HcpR	AACCGAGTAGGTCTTGTGCGTTC			
82 <i>vas</i> AF	AAGCGGTCGGCTTTACAGAA	<i>vasA</i>	60	45 s
82 <i>vas</i> AR	ACCACGGACAGATGGTTGAG			
82 <i>vgr</i> GF	GCTCGATTTGCTGACCCAAC	<i>vgrG</i>	60	30 s
82 <i>vgr</i> GR	GTAAGTGGCCGGGGTAATCG			
82 <i>imp</i> AF	TGACCGAGATCAAGGAAGCG	<i>impA</i>	60	1 min
82 <i>imp</i> AR	CCCAACCCCAACAGTTCCTC			
<i>gyr</i> BF	GACCTTCCAGGGGTTGATCG	<i>gyrB</i>	58	30 s
<i>gyr</i> BR	TCTCCCCAGCCCCCTATAC			
<i>pop</i> AF	TTCAGGAGCTTACCAGGTCT	<i>popA</i>	58	30 s
<i>pop</i> AR	CAACACCAATGGCAACTCCAA			
<i>pop</i> BF	TGTTTCATCAGCGCATCTCC	<i>popB</i>	58	30 s
<i>pop</i> BR	CCGATACAGGCGGCGATAC			
<i>pop</i> CF	GCTTGTGCTTGTGCTTGTGCTTTG	<i>popC</i>	58	30 s
<i>pop</i> CR	CTGCGGAATCAGCTTGCGGTG			
<i>pop</i> PF	CTCGGTATAGCCCGGCAAAT	<i>popP</i>	58	30 s
<i>pop</i> PR	CAAAGGATGCGTTGTGGCA			

1.4.3 野生型、突变菌株以及互补菌株致病力测定

采用伤根浇注菌液接种法^[17],接种番茄感病品种‘中杂 9 号’,每株番茄苗浇注 30 mL 浓度为 3×10^7 cfu/mL 的菌悬液,野生型、突变株及互补菌株各接种 20 株,接种试验各重复 3 次。培养条件:光照培养箱,L//D=16 h//8 h 光周期,28~30℃,相对湿度 90%。调查方法:青枯病的病情调查参照 Meng 等^[18]的方法。每天调查发病情况,持续观察 2~3 周,记录病情指数并进行方差分析。

1.4.4 野生型、突变菌株以及互补菌株生长曲线的测定

分别挑取植物青枯菌 Po82 菌株、基因簇缺失突变株和互补菌株的单菌落,接于含 10 mL NB 培养基的三角瓶中,28℃ 振荡培养过夜。取过夜培养菌液稀释至 $A_{600}=0.1$,然后按 1:100 的体积比分别接种于 100 mL NB 液体培养基内。28℃,180 r/min 振荡培养。从振荡培养开始,每隔 3 h,取样检测培养基中的菌体浓度(A_{600}),以不含菌液的 NB 培养基为空白对照,当所测样品的浓度 $A_{600} > 1.0$ 时,对样品进行梯度稀释,使每个稀释后样品的 $A_{600} < 1.0$,再根据稀释倍数计算出原始菌液的 A_{600} 值,试验重

复 3 次,进行统计分析。

1.4.5 野生型、突变菌株以及互补菌株运动性的测定

采用针刺接种法进行运动性测定,用接种针粘取单菌落,穿刺到含 0.25% 琼脂的 SMM 平板上,不接触平板底部。培养皿不倒置,30℃ 静置培养 7~9 d^[19-22]。运动性细菌向周围爬行后会形成一个明显的圆形斑,观察并测量平板上的菌落直径并进行统计学分析。

1.4.6 野生型、突变菌株以及互补菌株生物膜的测定

生物被膜的测定方法参照 Zhang 等^[10,23]。挑取 NA 固体培养基平板上的青枯菌 Po82 菌株、突变株和互补菌株的单菌落至 NB 液体培养基中,培养至 $A_{490}=0.7 \sim 0.8$;用新鲜的 L 液体培养基按比例 1:100 稀释至 60 mL 三角瓶中;30℃ 静置培养 7 d,每个处理重复 3 次;加入 600 μ L 0.1%(W/V)结晶紫溶液染色 30 min;用洗瓶尽量小心地冲洗,避免将生物被膜破坏,反复冲洗 3~5 次;加入 95% 乙醇 1 mL 进行洗脱,采用分光光度计测量洗脱液的吸光度值(A_{490})。

1.4.7 qRT-PCR 检测 T3SS 相关基因的表达

本试验选取持家基因 *gyrB* 作为内参基因, T3SS 相关基因 *popA*、*popB*、*popC*、*popP* 进行 qRT-PCR 检测。设计引物(表 2), 扩增产物长度约 150~200 bp。通过 PCR 扩增检验引物特异性和扩增效率, 扩增条件: 95℃ 3 min; 93℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

通过 TRIzol 法提取青枯菌野生型和突变菌株的 RNA, 具体步骤参考张丽勋等^[17]。用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度。采用反转录试剂盒 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper) 得到 cDNA 后, 进行 qRT-PCR。相关基因表达情况的分析采用相对定量的方法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)^[24]。

反应体系 20 μ L: SYBR Green Master Mix 10 μ L, cDNA 2.0 μ L, Primer F/R(10 μ mol/L) 0.4 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。反应程序: 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 30 s, 60℃ 15 s。

2 结果与分析

2.1 青枯菌 Po82 菌株 T6SS 基因簇突变株的构建与鉴定

通过培养基筛选得到具有 Gm 抗性和对蔗糖敏感的突变株后, 进行 PCR 验证, 选用 T6SS 基因簇 7 个核心基因引物进行验证(图 1), 同时将 PCR 产物纯化后送上海生工公司测序, 通过序列比对后, 得到性状稳定的突变菌株 Po82 Δ VI。

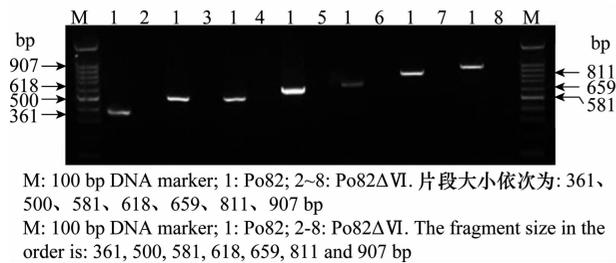


图 1 T6SS 突变菌株 Po82 Δ VI 的 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR analysis of T6SS gene cluster of the mutant strains

2.2 互补菌株的构建与鉴定

hcp 和 *vgrG* 不仅是 T6SS 装置的结构组分, 也是 T6SS 分泌出的效应子蛋白, 作为功能性 T6SS 的标志基因, 存在于所有的 T6SS 中。本研究选取 *hcp*、*vgrG1* 和 *vgrG2* 作为 T6SS 基因簇缺失突变株的互补基因。根据 Po82 基因组中 *hcp*、*vgrG1* 和 *vgrG2* 核苷酸序列设计引物, PCR 扩增得到 3 个基因片段并连接

至互补载体 pBBR1MCS-4_PSA 中, 经 PCR 和测序验证, 载体 pBR4PSA-*vgrG1*、pBR4PSA-*vgrG2* 和 pBR4PSA-*hcp* 构建成功。随后, 将重组载体分别电转化转至突变株 Po82 Δ VI 中, 于含有 Gm 和 Amp 抗性的 NA 平板上筛选转化子。PCR 检验和测序验证, 最后获得互补菌株, 分别命名为 Po82 Δ VI-*vgrG1*、Po82 Δ VI-*vgrG2* 和 Po82 Δ VI-*hcp* (图 2)。

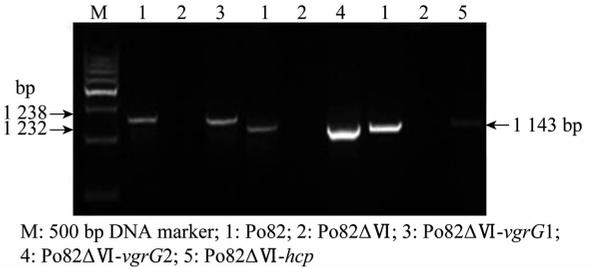
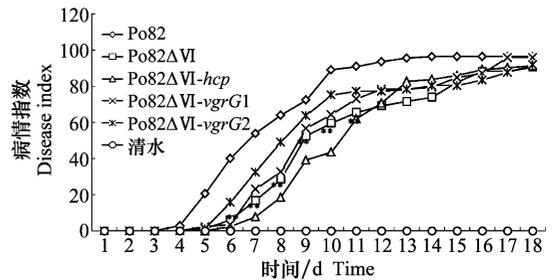


图 2 T6SS 基因簇 3 个核心基因互补菌株 Po82 Δ VI-*vgrG1*、Po82 Δ VI-*vgrG2* 和 Po82 Δ VI-*hcp* 的鉴定
Fig. 2 PCR analysis of the three core gene complementary strains Po82 Δ VI-*vgrG1*, Po82 Δ VI-*vgrG2* and Po82 Δ VI-*hcp*

2.3 T6SS 缺失对青枯菌致病力的影响

伤根浇注菌液接种法接种番茄进行致病力测定, 统计结果表明: Po82 菌株在接种后第 4 天开始发病, 突变株 Po82 Δ VI 在接种后第 5 天才出现明显的萎蔫症状; 在接种后的第 10 天, Po82 野生型菌株的病情指数达到 88.89, 而突变株 Po82 Δ VI 仅为 59.52, 下降了 33.04%, 两者差异极显著 ($P < 0.01$) (图 3)。随着接种天数的增加, 15 d 后, 互补菌株的病情指数与野生型菌株没有明显差异 ($P > 0.05$)。



** 表示相同处理下突变菌株与野生型菌株致病力之间差异极显著 ($\alpha = 0.01$)
** indicates significant difference between Po82 and Po82 Δ VI at 0.01 level under the same treatment

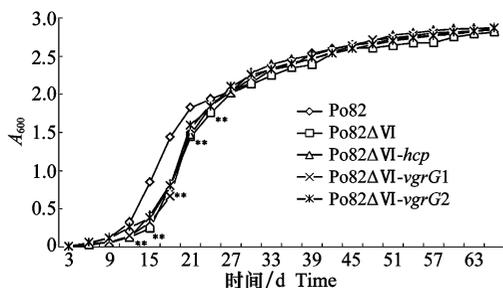
图 3 野生型菌株、T6SS 基因簇突变株和互补菌株致病力测定结果

Fig. 3 Virulence test of the wild-type Po82, Po82 Δ VI, Po82 Δ VI-*vgrG1*, Po82 Δ VI-*vgrG2* and Po82 Δ VI-*hcp*

2.4 T6SS 缺失对青枯菌生长能力的影响

试验结果显示, 在 NB 培养基的培养条件下, 突变株 Po82 Δ VI 较野生型菌株在对数生长期的生长速

率减慢, 差异极显著 ($P < 0.01$)。随着培养时间的增加, 突变菌株、互补菌株的生长速率与野生型菌株没有明显差异 ($P > 0.05$) (图 4)。结果表明: T6SS 基因簇影响青枯菌 Po82 菌株前期的生长速率。



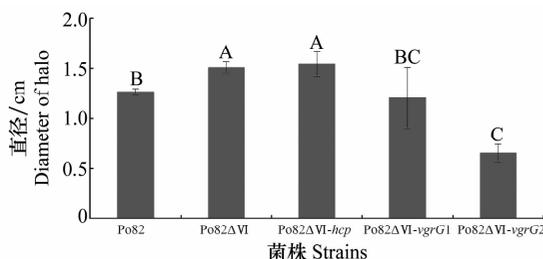
** 表示相同处理下突变菌株与野生型菌株生长速率之间差异极显著 ($\alpha=0.01$)
** indicates significant difference between Po82 and Po82 Δ VI at 0.01 level under the same treatment

图 4 野生型菌株、T6SS 基因簇突变株和互补菌株生长曲线测定结果

Fig. 4 Growth curve of the wild-type Po82, Po82 Δ VI, Po82 Δ VI-*vgrG1*, Po82 Δ VI-*vgrG2* and Po82 Δ VI-*hcp*

2.5 T6SS 缺失对细菌运动性的影响

将各菌株接种至半固体培养基, 菌落直径测量结果分析表明, 突变株 Po82 Δ VI 的运动能力增强, 与野生型菌株 Po82 有极显著差异 ($P < 0.01$), 互补 *hcp* 的菌株运动能力增强, 有极显著差异 ($P < 0.01$); 互补 *vgrG1* 的菌株运动能力减弱, 没有明显差异; 互补 *vgrG2* 基因的菌株运动能力明显减弱, 有极显著差异 ($P < 0.01$) (图 5)。结果表明: T6SS 基因簇影响青枯菌 Po82 菌株运动能力, 并且 T6SS 基因簇内不同基因对青枯菌的运动性具有不同的作用。



柱上不同大写字母表示相同处理下突变株、野生型菌株以及互补菌株运动性之间的差异 ($P < 0.01$)

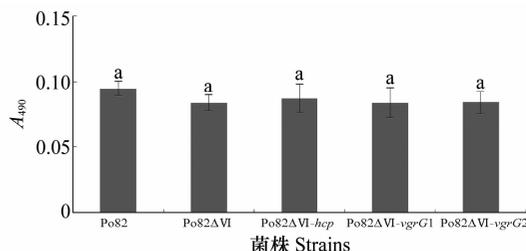
Different capital letters on the bars indicate significant difference among the T6SS gene cluster mutant strain, wild type strain and the complementary strains at 0.01 level under the same treatment

图 5 野生型菌株、突变菌株及互补菌株的运动性试验
Fig. 5 The mobility of the wild-type Po82 strain, Po82 Δ VI, Po82 Δ VI-*vgrG1*, Po82 Δ VI-*vgrG2* and Po82 Δ VI-*hcp*

2.6 T6SS 缺失对细菌生物膜形成的影响

采用结晶紫法对青枯菌株 Po82 野生菌株、突变

株及互补菌株进行了测定。研究表明, 突变菌株 Po82 Δ VI 形成生物被膜的能力较野生型弱, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。互补菌株与野生型菌株形成生物被膜的能力没有明显差异 ($P > 0.05$) (图 6)。结果表明, 青枯菌 T6SS 不影响青枯菌生物膜的形成。



柱上相同小写字母表示相同处理下突变株、野生型菌株以及互补菌株运动性之间的差异不显著 ($P > 0.05$)

The same lowercase letters on the bars indicate no significant difference among the T6SS gene cluster mutant strain, wild type strain and the complementary strains at 0.05 level under the same treatment

图 6 野生型菌株、突变菌株及互补菌株的生物被膜形成结果
Fig. 6 Biofilm formation of the wild-type Po82 strain, Po82 Δ VI, Po82 Δ VI-*vgrG1*, Po82 Δ VI-*vgrG2* and Po82 Δ VI-*hcp*

2.7 T6SS 缺失对青枯菌 T3SS 分泌蛋白基因表达的影响

T3SS 在青枯菌致病过程中具有非常重要的作用, T3SS 分泌的效应子多与致病性相关, 而前期研究发现 VI 型分泌系统与 III 型分泌系统之间存在着某种竞争关系^[17]。T3SS 标志效应子 *popA*、*popB*、*popC* 和 *popP* 的 qPCR 分析结果表明, 突变株 Po82 Δ VI 中 *popC* 表达量下调, *popA*、*popB* 和 *popP* 表达量上调 (图 7); 因此青枯菌中 T6SS 基因簇对 T3SS 效应子蛋白表达的影响涉及复杂的调控机制。

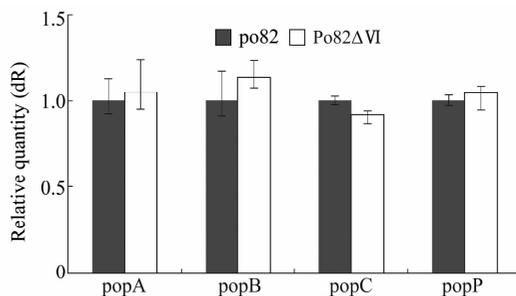


图 7 qPCR 检测 III 型分泌系统效应子基因表达

Fig. 7 qPCR analysis of T3SS effector gene expression

3 结论与讨论

本实验室前期研究发现, 将 T6SS 保守的核心基因 *tssM* 突变后, 青枯菌致病力明显降低; qRT-PCR 结果表明, 突变株的 III 型分泌系统部分效应子的表达显著上调, 推测 T6SS 可能与 T3SS 存在着某

种未知的竞争调控机制^[10]。在铜绿假单胞菌中, T6SS 和 T3SS 通过 RetS/GacS 和 c-di-GMP 途径来协同调控病原菌的生存方式及其感染策略^[25]。采用生物信息学方法搜索青枯菌全基因组序列时, 并未发现与铜绿假单胞菌中 *retS* 或 *gacS* 同源的基因或者蛋白, 仅发现二鸟苷酸环化酶 WspR 同源蛋白, 表明在植物青枯菌中 T6SS 影响 T3SS 效应子的机制不同于铜绿假单胞菌。T6SS 通常由一个单一的包含 15~20 个保守开放阅读框的基因簇编码, 基因簇中单个组成基因的突变不能从全局水平分析 T6SS 的作用, 因此我们采取整体缺失 T6SS 基因簇的方法鉴定 T6SS 的功能。本研究发现青枯菌中 T6SS 对不同的 III 型效应子蛋白的表达具有不同的影响, 在选取的 4 个 T3SS 效应子蛋白中, 与野生型菌株相比, 其中 3 个 (*popA*, *popB* 和 *popP*) 在 T6SS 基因簇缺失突变体中表达量上调, 这与单个 T6SS 基因 (*tssM*) 突变后的试验结果一致, 但是 *popC* 表达量则下调, 表明青枯菌通过复杂的调控机制和网络控制 III 型效应子蛋白的表达和分泌, 究竟 T6SS 采用何种方式影响 T3SS 效应子蛋白的表达还需要开展更为深入的研究, 以解析这种影响机制。

Hcp 和 VgrG 不仅是 T6SS 分泌蛋白, 也是 T6SS 结构组成因子。细胞外组件 Hcp(溶血素共调节蛋白)和 VgrG(缬氨酸-甘氨酸重复蛋白 G)形成类似细菌噬菌体尾部针状的注射装置, Hcp 蛋白类似于 λ gpV 尾管蛋白, 形成一个六聚管状结构^[26-27]。VgrG 三聚体位于 Hcp 管的远端, 形成一个类细胞穿刺装置的尾钉, VgrG 在结构上类似于 T4 噬菌体中 gp5-gp27 融合蛋白^[28]。因此选取 T6SS 核心组件基因 *hcp*、*vgrG1* 和 *vgrG2* 获得 T6SS 基因簇缺失菌株的互补菌株。

本试验通过构建 T6SS 缺失突变株和 3 个互补菌株, 检测了 T6SS 对青枯菌致病力的影响。发现突变株对番茄的致病力在接种早期明显减弱, 随着接种时间的延长, 其致病力逐渐达到野生菌株的水平, 而单基因的互补菌株致病力并没有完全恢复到野生型状态, 尽管 Hcp 和 VgrG 是 T6SS 具有功能性的标志, 但是单基因不具有 T6SS 基因簇的完整功能, 后期还需要通过基因组文库进行完整的 T6SS 基因簇互补分析。

随后对 T6SS 基因簇进行了运动性和生物膜方

面的试验, 发现 T6SS 基因簇影响青枯菌 Po82 菌株运动能力, 并且 T6SS 基因簇内不同基因对青枯菌的运动性具有不同的作用。Shalom 等^[29]的结果表明, *hcp* 基因可能与运动性相关, 本研究中也得到了相似的结果, *hcp* 基因互补菌株的运动能力显著增强。

此外, Po82 菌株在青枯菌新的分类系统中属于演化型 2, 序列变种 4, 进化地位十分特殊^[30-31]。本试验也为探究 T6SS 在青枯菌进化中是否发挥作用奠定了基础。

参考文献

- [1] Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* [J]. *Nature*, 2002, 415(6871): 497-502.
- [2] Genin S, Boucher C. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum* [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42: 107-134.
- [3] 蔡刘体, 刘艳霞, 石俊雄. 青枯菌致病力的主要决定因子研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2015, 43(8): 109-113.
- [4] 姚丰华, 张钰, 朱国强. 细菌 VI 型分泌系统结构与调控的研究进展[J]. *中国动物传染病学报*, 2013, 21(6): 80-86.
- [5] Silverman J M, Brunet R, Cascales E, et al. Structure and regulation of the type VI secretion system [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66: 453-472.
- [6] Blondel C J, Jimenez J C, Contreras I, et al. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella serotypes* [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 354.
- [7] Boyer F, Fichant G, Berthod J, et al. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: what can be learned from available microbial genomic resources [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 104.
- [8] Russell A B, Singh P, Brittnacher M, et al. A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach [J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 11(5): 538-549.
- [9] Wang Xiao'e, Basnayake B M V S, Zhang Huijuan, et al. The *Arabidopsis* ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(10): 1227-1238.
- [10] Zhang Liqing, Xu Jingsheng, Xu Jin, et al. TssM is essential for virulence and required for type VI secretion in *Ralstonia solanacearum* [J]. *Journal of Plant Disease and Protection*, 2012, 119(4): 125-134.

- [11] Cunnac S, Boucher C, Genin S. Characterization of the *cis*-acting regulatory element controlling *hrpB*-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(8): 2309-2318.
- [12] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19; selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Gene*, 1994, 145: 69-73.
- [13] Frandsen R J N, Andersson J A, Kristensen M B, et al. Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi [J]. *BMC Molecular Biology*, 2008, 9: 70.
- [14] Le T, Leccas D, Boucher C. Transformation of *Pseudomonas solanacearum* strain K60 [C]// Angers: INRA. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 1978: 819-822.
- [15] Boucher C A, Barberis P A, Trigalet A P, et al. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum* isolation of Tn5-induced avirulent mutants [J]. *Journal of General Microbiology*, 1985, 131(9): 2449-2457.
- [16] Lavie M, Shillington E, Eguiluz C, et al. PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector or proteins, acts as a host specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* [J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2002, 15(10): 1058-1068.
- [17] 张丽勍. 植物青枯菌 GMI1 000 菌株 VI 型分泌系统基因功能的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [18] Meng Fanghong, Yao Jian, Allen C. A MotN mutant of *Ralstonia solanacearum* is hypermotile and has reduced virulence [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(10): 2477-2486.
- [19] Adler J. Chemotaxis in bacteria [J]. *Science*, 1966, 153(3737): 708-716.
- [20] Adler J, Templeton B. The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1967, 46(2): 175-184.
- [21] Kelman A, Hruschk J. The role of motility and aerotaxis in the selective increase of avirulent bacteria in still broth cultures of *Pseudomonas solanacearum* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1973, 76(1): 177-188.
- [22] Yao Jian, Allen C. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(17): 6415-6424.
- [23] Zhang Liqing, Xu Jingsheng, Xu Jin, et al. TssB is essential for virulence and required for type VI secretion in *Ralstonia solanacearum* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2014, 74: 1-7.
- [24] 杨凤环. 水稻白叶枯病菌 c-di-GMP 信号相关基因的功能鉴定及其毒性调控机理[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [25] Basler M, Pillohofer M, Henderson G P, et al. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure [J]. *Nature*, 2012, 483(7388): 182-186.
- [26] Ballister E R, Lai A H, Zuckermann R N, et al. *In vitro* self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 2008, 105(10): 3733-3738.
- [27] Pell L G, Kanelis V, Donaldson L W, et al. The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 2009, 106(11): 4160-4165.
- [28] Leiman P G, Basler M, Ramagopal U A, et al. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 2009, 106(11): 4154-4159.
- [29] Shalom G, Shaw J G, Thomas M S. *In vivo* expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages [J]. *Microbiology*, 2007, 153: 2689-2699.
- [30] 潘哲超. 植物青枯菌遗传多样性及致病力分化研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [31] 刘蕾, 徐进, 许景升, 等. 青枯菌 Po82 菌株 III 型分泌系统调控基因 *hrpB* 的功能研究 [J]. *植物保护*, 2012, 38(5): 9-15.

(责任编辑: 田 喆)



作者撤稿致歉声明

原发于《植物保护》2014 年 4 期上的“油菜菌核病菌拮抗放线菌 HPS02 的分离、鉴定及其代谢产物性质研究”(作者何超, 周鑫钰, 黄军, 刘双清, 朱宏建)因存在版权纠纷问题, 全体作者一致声明将其撤回。我们对该文的不当发表承担全部责任, 并向读者、杂志社以及受此影响的任何个人与机构表示诚恳道歉。

本文作者: 何超, 周鑫钰, 黄军, 刘双清, 朱宏建

2016 年 11 月 2 日