

西瓜食酸菌 RND 蛋白家族外排转运体 *cusB* 基因抗铜功能研究

刘星¹ 王希东^{1*} 刘君^{2*}

(1. 新疆农业大学农学院 新疆 乌鲁木齐 830052)

(2. 新疆农业大学林学与园艺学院 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要:【目的】研究 RND 外排泵中 *cusB* 基因突变对西瓜食酸菌抗铜性的影响。【方法】采用 Tn5 转座子随机插入基因组制备筛选得到突变体,通过双亲杂交的方法构建功能互补菌株,并从西瓜食酸菌抗铜性、胞外纤维素酶和胞外蛋白酶分泌、胞外多糖产生、生物膜形成、致病性及过敏性反应等方面阐明 RND 外排泵中 MFP 蛋白亚基对西瓜食酸菌的影响。【结果】突变体 $\Delta cusB$ 在含有 1.25 mmol/L 或 2.5 mmol/L $CuSO_4$ 的 KMB 平板上不能生长, *cusB* 基因的突变导致西瓜食酸菌的胞外多糖分泌和生物膜形成与野生型有差异,但不影响胞外纤维素酶、胞外蛋白酶、致病性及过敏性反应。【结论】RND 外排泵相关基因 *cusB* 的突变会影响西瓜食酸菌的某些生物学特性,并导致病菌对铜十分敏感。研究以 RND 外排泵转运重金属为导向初步解析了西瓜食酸菌的抗铜机制。

关键词: 西瓜食酸菌, RND 外排泵, 抗铜性

Functional analysis of a RND family efflux transporter component-*cusB* gene associated with copper resistance in *Acidovorax citrulli*

LIU Xing¹ WANG Xi-Dong^{1*} LIU Jun^{2*}

(1. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

(2. College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: [Objective] We test the influence of RND family efflux transporter, MFP subunit *cusB* gene, on the copper resistance for *Acidovorax citrulli*. [Methods] Transposon (Tn5) was inserted into the genome randomly screened to prepare mutant strains constructed by functional complementation biparents mating and discussed on the effect of RND family efflux transporter MFP subunit *cusB* gene on the copper resistance for *A. citrulli* on basis of the copper resistance for *A. citrulli*, extracellular cellulase and extracellular protease secreted extracellular polysaccharide production, biofilm formation, virulence and motility etc. [Results] The mutant $\Delta cusB$ can't be grown when it contained the 1.25 mmol/L $CuSO_4$ or 2.5 mmol/L flat on KMB. The structure of *cusB* extracellular polysaccharide

Foundation item: The Xinjiang Uygur Autonomous Region Natural Science Foundation (No. 2015211A020)

*Corresponding author: E-mail: WANG Xi-Dong: wxdxnd@126.com; LIU Jun: liujem@126.com

Received: November 18, 2014; Accepted: August 14, 2015; Published online (www.cnki.net): September 14, 2015
基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(No. 2015211A020)

*通讯作者: E-mail: 王希东: wxdxnd@126.com; 刘君: liujem@126.com

收稿日期: 2014-11-18; 接受日期: 2015-08-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-09-14

secretion and biofilm formation *A. citrulli* can be different from wild-type due to the effect of the mutant gene. Whatever, the mutant gene can't directly affect the extracellular cellulase enzymes, extracellular protease, pathogenicity and allergic reactions also be obtained in our investigation. **[Conclusion]** The biological characteristics of *A. citrulli* can be affected by *cusB* associated mutations. Meanwhile, *cusB* associated mutations affect the copper resistance for *A. citrulli*.

Keywords: *Acidovorax citrulli*, RND efflux pump, Copper resistance

瓜类细菌性果斑病是由革兰氏阴性菌——西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*)引起的一种严重危害西瓜、甜瓜等葫芦科植物的世界性的种传细菌性病害。在高温高湿环境下,病菌可快速传播而导致植株的叶片、茎发生萎蔫或果实腐烂^[1]。目前人们对瓜类细菌性果斑病的研究多集中在致病性、病原菌鉴定等方面^[2],对于因过度使用铜化合物作为杀菌剂而导致抗铜菌株产生的抗铜机理方面研究却很少。Nies 对细菌抗重金属机制做了初步研究发现可能存在 3 种机制:(1) 通过外排系统将有毒离子排出体外;(2) 通过含巯基等分子将有毒离子形成络合物或螯合物;(3) 通过酶促或化学反应将有毒物质还原成无毒或低毒物质^[3]。2010 年,杨亮对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中 RND 外排泵所有成员基因表达调节及重金属对铜绿假单胞菌的抗性影响进行了系统研究,研究发现缺失了 RND 外排泵基因的铜绿假单胞菌在重金属锌的环境下生长受严重抑制^[4]。到目前为止国内对于西瓜食酸菌抗铜性的研究仅有赵文龙报道了 P 型 ATP 酶基因缺失对于西瓜食酸菌两个亚群抗铜性的影响,结果表明:P 型 ATP 酶在铜离子转运过程中发挥了重要作用^[5]。

本研究利用 Tn5 转座子随机插入西瓜食酸菌 FC440 基因组中,构建突变体文库,通过筛选该突变体库的 2 100 个菌株,得到一株 Tn5 转座子插入到 RND 家族外排转运体(Efflux transporter)膜融合蛋白(MFP)亚基基因 *cusB* 中的突变体,该突变体在含铜培养基上表现出生长受严重抑制,在胞外多糖分泌量和生物膜形成上与野生型相比均表现出明显下降,而通过双亲杂交得到的功能互补菌株在上述检测中功能上又得到部分恢复。

RND 蛋白家族是一类以质子驱动力(即质子进入细胞质释放的自由能转化为 RND 把底物排出细胞所需要的动力)为能量的外排系统,由三部分组成,包括内膜外排蛋白(IMP)、外膜外排蛋白(OMP)和膜融合蛋白(MFP),这三组分对于 RND 外排系统的正常工作缺一不可。膜融合蛋白(MFP)具有 β -桶状结构、酯域和一个 α -螺旋发卡结构,这些结构最终组装成富含 β 片段的 α -螺旋柱状结构,产生一个跨整个周质空间的通道,诱导或稳定了外膜蛋白开放状态,从而使得底物直接排到细胞外而不是周质空间内。

到目前为止还没有报道 RND 外排系统对西瓜食酸菌中的抗铜影响,细菌抗铜性可能由多种基因共同表达调控,但 RND 外排系统作为革兰氏阴性菌所特有的系统,如果缺失某个组分,必定受到影响,因此本课题组针对 *cusB* 构建了突变体,并对突变体性状进行了生物学分析,初步研究了 *cusB* 基因在西瓜食酸菌中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物: 黄瓜(*Cucumis sativus*)品种为长春密刺,烟草(*Nicotiana benthamiana*)品种为本氏烟草,菌株与质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xba* I、T4 DNA ligase、*Taq* 酶、克隆载体 pMD19-T,购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司;表达载体 pHC60 本实验室提供;细菌基因组提取试剂盒与 DNA marker 购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA Gel Extraction Kit 购自美国 Axygen 公司;Plasmid Mini Kit 购自美国 OMEGA 公司;抗生素购

表 1 供试菌株、质粒和引物
Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒和引物 Strains, plasmid and primers	特征 Characteristics	来源 Source
菌株 Strains		
FC440	Amp ^R ; wild type	This lab
<i>Escherichia coli</i> DH10B	80 lacZ M15, (lacZYA-argF), <i>recA1</i> , <i>endA1</i>	This lab
$\Delta cusB$	Amp ^R ; Kan ^R ; FC440 mutant defective in <i>cusB</i>	This study
$\Delta cusB+cusB$	Amp ^R ; Kan ^R ; Tet ^R ; complement strain of $\Delta cusB$	This study
质粒 Plasmids		
pMD19-T	Amp ^R ; ColE1 origin, T-vector	TaKaRa
pHC60	Tet ^R ; expression vector; low copy	This lab
引物 Primers		
MF	CGGGATCCACCGCAACTTCCGGACCCTT <i>Bam</i> H I	This study
MR	GCTCTAGAGGCGGGGACAGCTTCTT <i>Xba</i> I	This study
AAC-1	GACCAGCCCACAACCTGGGAC	This lab
AAC-2	CTGCCGCACTCCAGCGA	This lab

注: 下划线处为酶切位点。

Note: The restriction sites are underlined.

自德国 Sigma 公司; 其余化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

PCR 仪, 德国 Biometra 公司; 电子天平 AL-204-IC, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; 分光光度计 722 型, 上海仪电分析仪器总厂; 凝胶成像系统 FC2, 美国 Alpha Innotech 公司。

1.1.3 培养基和培养条件: 西瓜食酸菌在 28 °C 培养于含 30 mg/L Amp 的 KMB (King's medium B)^[6] 固体或 NB (Nutrient broth, NB) 液体培养基中。大肠杆菌(*E. coli*) 在 37 °C 培养于 Luria-Bertani 液体固体培养基, 或者 SOB^[7] 液体培养基中。本研究中所使用的抗生素浓度, 除特别说明外, 均为 Amp 30 mg/L, Kan 50 mg/L, Tet 10 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 *cusB* 基因突变体制备: 将含有 Amp 和 Kan 的 NB 培养基倒入灭菌后的培养皿盖(2 个 96 孔板约 40 mL), 用排枪吸取混合液 140 μ L, 注入 96 孔板相应孔中, 按照编号用灭菌牙签挑取由本实验室

提供的插入 Tn5 转座子的 FC440 适量的菌液于相应的孔中, 用滤纸小心吸取表面的水分, 封膜, 28 °C 培养 48 h, 再取 2 个 96 孔板, 注入 140 μ L 含 Amp 和 Kan 的 NB 培养基, 用机械手将含有适当浓度菌液的 96 孔板转移到另外两个板上(简称转存板), 转存板予以封膜, 28 °C 培养 48 h。待培养完成时, 在 384 孔板中注入 60 μ L 含有 Amp 和 Kan 的 NB 培养基, 用机械手将上述 96 孔板中全部菌液转移至 384 孔板, 用滤纸小心吸取表面的水分, 封膜, 28 °C 培养 48 h, 最后用机械手将 384 孔板中含有适当浓度的菌液转移至含有 1.25 mmol/L 和 2.5 mmol/L CuSO₄ 的 KMB 平板上, 28 °C 培养 48 h, 观察菌落生长情况。将铜敏感型菌株送往华大基因测序鉴定插入位点。

1.2.2 *cusB* 基因的 PCR 扩增和克隆: 根据 GenBank 已公布的 *Acidovorax citrulli* AAC00-1 的全基因组序列设计引物 MF、MR (表 1) 扩增 *cusB* 片段。PCR 扩增体系如下: 5 \times Primer STARTM buffer (Mg²⁺)

4 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μL , MF (30 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , MR (30 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , FC440 DNA (0.03 mg/L) 1.0 μL , Primer STARTM HS DNA polymerase (2.5 U/L) 0.2 μL , ddH₂O 11.2 μL 。PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 98 °C 10 s, 68 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 产物回收纯化后与 pMD19-T 连接, 热激法转化入 *E. coli* DH10B, 在 LB+Amp 的平板上筛选重组子, 提取质粒双酶切验证并测序。用 *Bam*HI 和 *Xba*I 双酶切重组子和表达载体 pHC60, 将其连接形成 pHC60-*cusB*, 热激法转化 *E. coli* S17-1 感受态, 构建载体 pHC60-*cusB*, 提取质粒, 双酶切验证。

1.2.3 互补菌株的构建: 将得到的重组载体 pHC60-*cusB* 利用双亲杂交的方法将质粒转入突变体中, 在 KMB+Amp+Kan+Tet 的平板上筛选, 并双酶切及用西瓜食酸菌特异性引物 AAC-1 和 AAC-2 (表 1)^[8]验证。

1.2.4 抗铜性的生物测定: 待测菌株 FC440、FC440-pHC60、 $\Delta cusB$ 、 $\Delta cusB+cusB$ 活化培养后, 用 NB 制备菌悬液 OD_{600} 为 0.18, 取菌悬液 0.5 μL 转接至含 1.25 mmol/L 或者 2.5 mmol/L CuSO₄ 的 KMB 平板上(含 30 mg/L Amp), 置于 28 °C 培养 48 h。同样浓度的菌悬液于 1.25 mmol/L 和 2.5 mmol/L 的 CuSO₄ 的 NB 培养基, 28 °C、220 r/min 培养, 培养前(0 h)于 600 nm 波长下检测吸光度, 随后每 2 h 检测一次并记录吸光值。以不含菌的相应铜浓度的 NB 液体作为上述菌液浓度检测时的对照组。

1.2.5 胞外纤维素酶测定: 待测菌株 FC440、FC440-pHC60、 $\Delta cusB$ 、 $\Delta cusB+cusB$ 过夜培养后, 稀释至 $OD_{600}=0.5$, 取 2 μL 接种于含有 0.5% 羧甲基纤维素(CMC)的 KMB 平板上, 静置 10 min, 28 °C 培养 48 h, 在平板上加入 20 mL 的 0.1% 刚果红染色 30 min, 水清洗 2 次, 再通过比较菌落周围水解透明圈的有无或大小判断菌株间胞外纤维素酶产量的差异, 1 mol/L 的 NaCl 20 mL 脱色 2 次, 每次

20 min, 能产生纤维素酶的菌株, 在红色背景下其菌落生长处及周围形成一个透明圈。每个处理重复 3 次^[9]。

1.2.6 生物膜测定: 将待测菌株 FC440、FC440-pHC60、 $\Delta cusB$ 、 $\Delta cusB+cusB$ 用 NB 液体培养基 28 °C、180 r/min 振荡培养至吸光度为 1.0, 按 1:100 的比例吸取菌液加入 5 mL 新鲜的液体 NB 培养基中, 室温静置 7 d, 加入 0.1% 结晶紫溶液染色 500 μL , 20 min 后用蒸馏水缓慢冲洗, 观察实验结果。用 95% 乙醇润洗生物膜, 在 575 nm 波长下检测吸光度, 每个处理重复 3 次^[10]。

1.2.7 胞外蛋白酶测定: 待测菌株 FC440、FC440-pHC60、 $\Delta cusB$ 、 $\Delta cusB+cusB$ 过夜培养后, 稀释至 $OD_{600}=0.5$, 取 2 μL 接种于含有 1% 脱脂乳 KMB 平板上, 静置 10 min, 28 °C 培养 48 h, 观察透明圈的大小。每个处理重复 3 次^[11]。

1.2.8 胞外多糖测定: 将待测菌株 FC440、FC440-pHC60、 $\Delta cusB$ 、 $\Delta cusB+cusB$ 用 NB 培养基 28 °C、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 1.0, 吸取 20 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 10 min, 将上清转移至记录重量的离心管中, 边搅拌边缓慢加入 40 mL 冰乙醇, 12 000 r/min 离心 2 min, 37 °C 烘干 3-5 d, 称量产生的 EPS 干重。每个处理重复 3 次^[12]。

1.2.9 致病性及过敏性坏死反应: 待测菌株 FC440、FC440-pHC60、 $\Delta cusB$ 、 $\Delta cusB+cusB$ 过夜培养后, 用灭菌蒸馏水稀释至 $OD_{600}=0.5$, 接种于培养在 28 °C 生长 6 d 的黄瓜子叶上, 每个叶片 20 μL , 5 d 后观察病斑大小。每个处理重复 3 次。同时用处理好的稀释至 OD_{600} 为 0.5 菌液注射烟草叶片, 接种 12-48 h 观察叶片有无 HR 反应产生。无菌水作空白对照^[13]。

2 结果与分析

2.1 *cusB* 基因突变体制备

对 FC440 Tn5 转座子插入诱变突变体库的 2 100 个突变体进行了铜敏感性测试(表 2), 其中有 7 个菌株对铜离子敏感, 即不能在含 1.25 mmol/L

表 2 FC440 及 Tn5 转座子突变菌株在不同铜离子浓度培养基上的敏感性检测
Table 2 FC440 and Tn5 transposon mutant strain sensitivity detection based on cultured in different concentration of copper ion

菌株 Strains	1.25 mmol/L CuSO ₄	2.5 mmol/L CuSO ₄
FC440	-	-
08-3-12-40	+++	+++
08-4-15-5	+++	+++
08-4-16-20	++	+++
08-3-12-27	+	+
08-4-16-48	+	+
08-9-8-15	+++	+++
08-10-13-11	++	+++
08-10-13-27	+	++
08-9-7-56	+	+
08-10-13-94	+++	+++
08-5-23-224	+++	+++
08-11-18-1	+++	+++
08-11-8-16	+	++
10-7-29-64	+++	+++
08-9-10-2	+	+
08-4-16-47	+	++
08-3-19-12	++	+
08-10-13-10	+++	+++
08-10-13-43	++	+
Other strains	-	-

注: -: 对铜不敏感; +: 对铜轻微敏感; ++: 对铜较敏感; +++: 对铜严重敏感.

Note: -: Not sensitive to copper; +: Sensitive to copper slightly; ++: More sensitive to copper; +++: Sensitive to copper seriously.

CuSO₄ 的 KMB 平板上生长; 另外有 12 个菌株表现不同程度抗铜性的减弱。经亚克隆鉴定发现: Tn5 转座子插在 *cusB* 基因的 129 bp 位置处(图 1), 由于转座子的插入, 致使该基因功能失活, 不能正确翻译出 MFP 蛋白, 导致突变体比野生型 FC440 对铜的抗性明显降低, 证明了 *cusB* 基因在西瓜食酸菌的 RND 外排泵中具有重要作用。

2.2 *cusB* 基因的 PCR 扩增和克隆

以西瓜食酸菌野生型菌株 FC440 的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增出约 1 231 bp 的 DNA 片段(图 2), 将其回收纯化后连接于 pMD19-T, 热

激法转化入大肠杆菌感受态细胞 DH10B, 得到转化子, 随机选取 3 个送北京华大基因公司测序, 测序结果用 DNAMAN 进行比对, 结果显示扩增片段与 NCBI 中西瓜食酸菌 AAC00-1 的同源基因相似性为 99.66%, 氨基酸序列相似性为 99.75%, 将其测序结果上传至 NCBI, 命名为 *cusB*, 获得 GenBank 登录号为 KP334122。

2.3 互补菌株的验证

提取互补菌株的质粒, 通过双酶切验证重组质粒(图 3), 通过双亲杂交得到的互补菌株利用西瓜食酸菌特异性引物 AAC-1、AAC-2 验证得到互补菌株

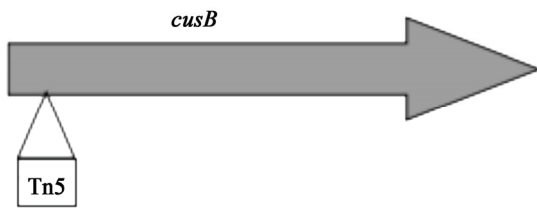


图1 突变体插入基因的结构图

Figure 1 Organization of insertion gene of mutant

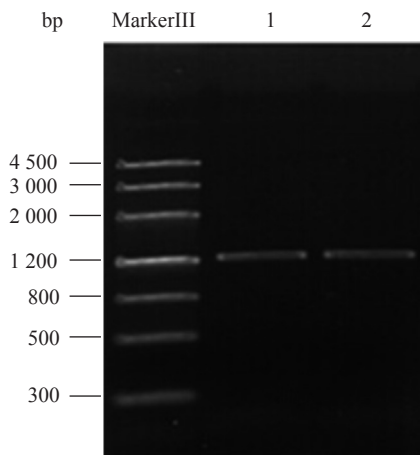


图2 目的片段的扩增电泳图

Figure 2 Amplification of target fragments

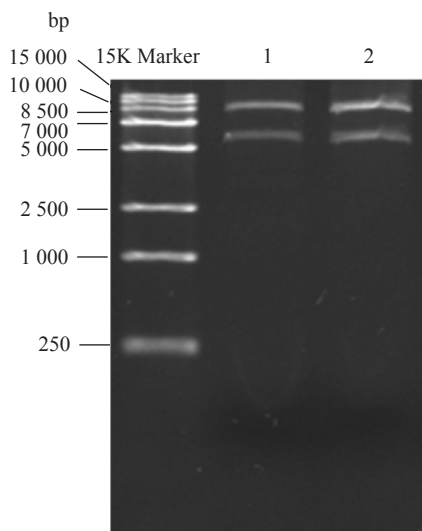
Note: 1, 2: *cusB* gene.

图3 双酶切验证重组质粒电泳图

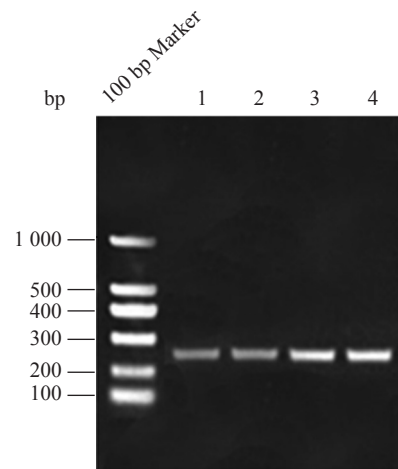
Figure 3 Enzyme digestion of pHC60-*cusB*Note: 1, 2: pHC60-*cusB*.图4 *A. citrulli* 特异性引物 PCR 扩增结果

Figure 4 The PCR production of AAC-1/AAC-2

Note: 1: FC440; 2: FC440-pHC60; 3: $\Delta cusB$ 4: $\Delta cusB+cusB$.

为西瓜食酸菌(图4)。

2.4 抗铜性的生物测定

对野生型菌株 FC440、FC440-pHC60、突变体 $\Delta cusB$ 以及功能互补菌株 $\Delta cusB+cusB$ 的硫酸铜敏感性进行检测, 从而对西瓜食酸菌抗铜性分子机理进行初步研究, 实验结果表明: 在 48 h 后, 突变体在含有 1.25 mmol/L 和 2.5 mmol/L $CuSO_4$ 的 KMB 上没有生长, 说明突变体对于 1.25 mmol/L 和 2.5 mmol/L $CuSO_4$ 极度敏感。在含有 1.25 mmol/L 和 2.5 mmol/L $CuSO_4$ 的 NB 液体培养基中, 每 2 h 检测一次在 600 nm 波长下的吸光值, 与野生型相比, 差异达到显著水平($P<0.05$) (图5)。

2.5 胞外纤维素酶检测

如图 6A 所示, 在含有 5% CMC 的 KMB 平板上, 突变体 $\Delta cusB$ 、野生型 FC440、FC440-pHC60、互补菌株 $\Delta cusB+cusB$ 都能在菌落周围生成透明圈, 测量透明圈的直径并且进行统计学分析后无显著差异($P>0.05$), 说明 *cusB* 基因的功能与胞外纤维素酶的活性无关。

2.6 胞外蛋白酶检测

在含有脱脂乳的 KMB 平板上, 突变体 $\Delta cusB$ 、野生型 FC440、FC440-pHC60、互补菌株

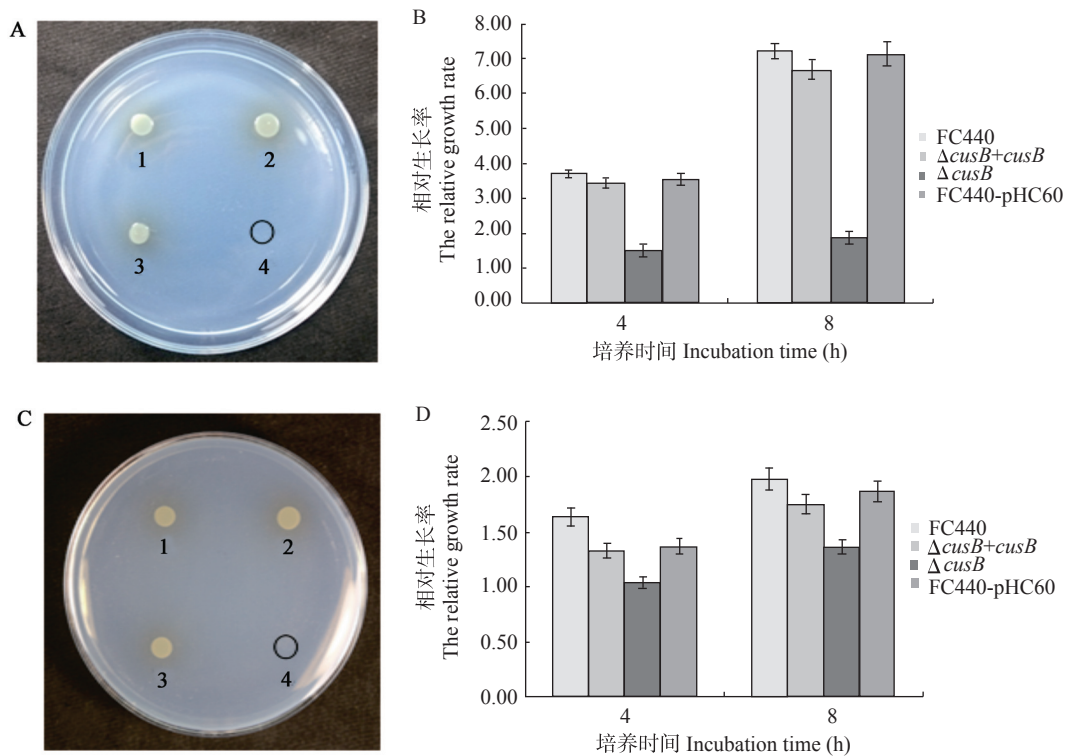


图 5 菌株在含不同浓度铜培养基的生长情况

Figure 5 The cupric sulphate sensitivity of strains

注: A, B: 1.25 mmol/L CuSO₄ 浓度下菌落在 KMB 培养基和 NB 培养基的生长情况; C, D: 2.5 mmol/L CuSO₄ 浓度下菌落在 KMB 培养基和 NB 培养基生长情况. 1-4: 依次是 FC440、 $\Delta cusB$ 、 $\Delta cusB+cusB$ 、FC440-pHC60.

Note: A, B: The growth of colonies in 1.25 mmol/L CuSO₄ concentration; C, D: The growth of colonies in 2.5 mmol/L CuSO₄ concentration. 1-4: FC440, $\Delta cusB$, $\Delta cusB+cusB$, FC440-pHC60.

$\Delta cusB+cusB$ 都能在菌落周围生成透明圈(图 6B), 测量透明圈的直径并且进行统计学分析后无显著差异($P>0.05$), 说明突变体对于胞外蛋白酶的分泌没有影响。

2.7 胞外多糖的测定

如图 6C 所示, 通过对待测菌株突变体 $\Delta cusB$ 、野生型 FC440、FC440-pHC60、互补菌株 $\Delta cusB+cusB$ 的胞外多糖检测, 结果表明: 互补菌株的胞外多糖分泌量在突变体和野生型之间生物统计学分析具有显著性差异($P<0.05$), 说明 *cusB* 基因的缺失可能对胞外多糖分泌产生影响。

2.8 生物膜检测

通过结晶紫染色, 图 6E 在菌液与空气接触面会出现一层紫色的圈, 表明有生物膜的存在, 如图

6D、E 所示, 通过统计学分析得知突变体 $\Delta cusB$ 与野生型 FC440 之间差异显著($P<0.05$), 说明 *cusB* 基因的功能可能与西瓜食酸菌的生物膜形成有关。

2.9 致病性及过敏反应

将待测菌株通过针刺法接种于黄瓜子叶上, 接种 5 d 后观察发病情况(图 7A), 与野生型 FC440 相比, 突变体的致病性无明显差异, 表明 *cusB* 基因与致病性关系不密切。在非寄主植物烟草上的过敏性坏死反应测定结果表明(图 7B): 待测菌株均能发生过敏性坏死反应, 野生型和突变体之间无明显差异。

3 结论

西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*)侵染葫芦科植物会使其发生一种危害极大的疾病——瓜类细菌

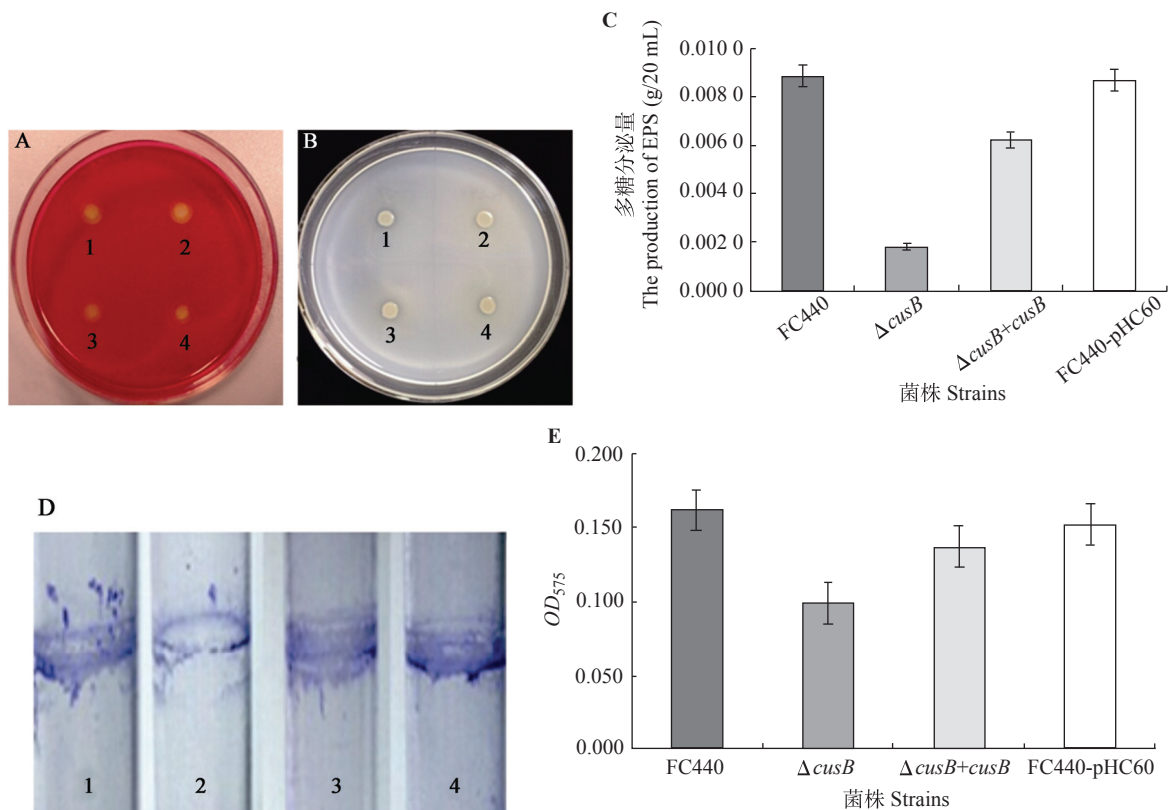


图6 菌株胞外分泌物的检测

Figure 6 The examination of extracellular secretion

注: A: 胞外纤维素酶检测; B: 胞外蛋白酶检测; C: 胞外多糖的测定; D, E: 生物膜检测。1-4: 依次是 FC440、 $\Delta cusB$ 、 $\Delta cusB+cusB$ 、FC440-pHC60。

Note: A: Extracellular cellulase test; B: Extracellular protease test; C: Extracellular polysaccharide production test; D, E: Biofilm formation test. 1-4: FC440, $\Delta cusB$, $\Delta cusB+cusB$, FC440-pHC60.



图7 黄瓜子叶上的的致病性及烟草叶上过敏性检测

Figure 7 Pathogenicity test in cucumber cotyledon and hypersensitive reaction test on tobacco

注: A: 1: 清水作为阴性对照; 2: 野生型 FC440 作为阳性对照; 3: FC440-pHC60; 4: 突变体 $\Delta cusB$; 5: 互补菌株 $\Delta cusB+cusB$ 。B: 1: 野生型 FC440; 2: FC440-pHC60; 3: 突变体 $\Delta cusB$; 4: 互补菌株 $\Delta cusB+cusB$ 。

Note: A: 1: Water sprayed (negative control); 2: Wild type FC440 (positive control); 3: FC440-pHC60; 4: Mutant strain $\Delta cusB$; 5: Complementary strain $\Delta cusB+cusB$. B: 1: Wild type FC440; 2: FC440-pHC60; 3: Mutant strain $\Delta cusB$; 4: Complementary strain $\Delta cusB+cusB$.

性果斑病(Bacterial fruit blotch, BFB), 该病害已在世界各国迅速传播, 对当地瓜农造成严重的经济损失。铜是细菌维持正常新陈代谢所必需的元素, 但是当铜浓度过高时会对细菌产生毒害作用^[14], 根据这一特性, 铜素类杀菌剂主要应用于瓜类细菌性病害的防治, 但过度使用, 使得西瓜食酸菌的铜敏感性日益降低, 因此, 研究该病菌的铜抗性机理显得尤为重要。

本文利用实验室保存的突变菌株 $\Delta cusB$, 根据已公布的西瓜食酸菌全基因组序列设计引物, 利用双亲杂交的方法得到了功能互补菌株 $\Delta cusB+cusB$, 根据菌株间表型上的差异来验证其功能。通过不同 $CuSO_4$ 浓度条件下的检测发现: 在 1.25 mmol/L 和 2.5 mmol/L $CuSO_4$ 的 KMB 平板上, 突变体的生长速率明显降低, 不能正常生长, 与野生型相比差异极显著, 说明 *cusB* 基因的突变阻断了 Cu^{2+} 的正常外排运输过程, 进而影响其正常生长, 在功能互补后, 可恢复其生长。另外, 植物病原菌通常在侵染寄主植物组织时会分泌多种致病因子, 例如: 胞外纤维素酶^[15]、胞外蛋白酶^[16]、胞外多糖^[17]、生物膜的形成^[18]等, 在胞外分泌物检测时发现: 突变体的多糖分泌量和生物膜形成与野生型相比差异显著, 生物膜对菌体本身具有保护作用, 其组分中包含了多糖等成分^[19], 进而随着多糖量的减少, 检测发现生物膜在形成上也受到影响, 说明西瓜食酸菌的 RND 外排系统与自身合成的多糖向外分泌有关, 并且一定程度上能够影响生物膜的形成。胞外纤维素酶和胞外蛋白酶的检测中未发现与野生型有差异, 说明它们的分泌途径与 RND 型外排转运体外排途径关系不密切, 可能与细菌的其他分泌系统有关。致病性及过敏性坏死反应检测中发现: 突变体的致病性没有丧失, 致病情况与野生型也没有差异, 并且均能产生过敏性坏死反应。可见, RND 外排转运体在西瓜食酸菌中与其致病性关系不密切。*cusB* 基因的突变影响了西瓜食酸菌的正常铜离子外排转运, 使其不能生长, 这对于有效防治瓜类细菌性果

斑病具有一定的意义。本研究初步探索了 *cusB* 基因在 *A. citrulli* 中的功能, 而其他未见报道的外排蛋白基因的突变是否也与抗铜性相关还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Schaad NW, Postnikova E, Sechler A, et al. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov.[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2008, 31(6/8): 434-446
- [2] Yan SS, Wang TL, Zhao TC. Advances in the bacterial fruit blotch of melons caused by *Acidovorax citrulli*[J]. Plant Quarantine, 2011, 25(3): 71-76 (in Chinese)
阎莎莎, 王铁霖, 赵廷昌. 瓜类细菌性果斑病研究进展[J]. 植物检疫, 2011, 25(3): 71-76
- [3] Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(2/3): 313-339
- [4] Yang L. The regulation and functional characterization of the RND family in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[D]. Xi'an: Doctoral Dissertation of Northwest University, 2010 (in Chinese)
杨亮. 铜绿假单胞菌中 RND 外排泵基因表达调节和功能研究[D]. 西安: 西北大学博士学位论文, 2010
- [5] Zhao WL. Analysis of copper resistance in *Acidovorax citrulli*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013 (in Chinese)
赵文龙. 瓜类细菌性果斑病菌抗铜性研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2013
- [6] King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin[J]. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1954, 44(2): 301-307
- [7] Cheng HP, Walker GC. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(19): 5183-5191
- [8] Walcott RR, Gitaitis RD, Castro AC. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*[J]. Phytopathology, 2003, 93(5): 528-534
- [9] Chen L. Cloning and functional study of key genes of twin-arginine translocation system of *Xanthomonas oryzae*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2008 (in Chinese)
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[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2008
- [10] O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(2): 295-304
- [11] Xu RQ. Identification of novel effectors depended on type III secretion system in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[D]. Nanning: Doctoral Dissertation of Guangxi University, 2006 (in Chinese)
徐荣旗. 野油菜黄单胞菌野油菜致病变种新的依赖于III型分泌系统的效应物的鉴定[D]. 南宁: 广西大学博士学位论文, 2006
- [12] He LY, Zhang YF, Ma HY, et al. Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants[J]. Applied Soil Ecology, 2010, 44(1): 49-55
- [13] Ren ZG, Hou L, Song ZG, et al. Screening of the pathogenicity

- mutants of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and cloning of the *hrcR* gene[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(5): 501-506 (in Chinese)
任争光, 侯磊, 宋治国, 等. 甜瓜细菌性果斑病菌致病性突变体筛选与 *hrcR* 基因的克隆[J]. 植物病理学报, 2009, 39(5): 501-506
- [14] Li Q, Yang YW, Sun BX, et al. Advances in copper resistant mechanisms of cucurbit and vegetable pathogenic bacteria[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2014, 27(3): 5-9 (in Chinese)
李强, 杨玉文, 孙柏欣, 等. 瓜类及蔬菜等植物病原细菌抗铜机制研究进展[J]. 中国瓜菜, 2014, 27(3): 5-9
- [15] Li YS. Study on cellulase of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2011 (in Chinese)
李永胜. 柑桔溃疡病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)纤维素酶的分析[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2011
- [16] Fan WY, Wen JZ, Ma J, et al. Characterization of an extra-cellular protease produced by *Rhizoctonia solani*[J]. Plant Protection, 2010, 36(4): 55-59 (in Chinese)
范文艳, 文景芝, 马建, 等. 水稻纹枯病菌胞外蛋白酶特性研究[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 55-59
- [17] Zhou D, Zou LF, Zou HS, et al. Identification of extracellular polysaccharide-associated genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(10): 1334-1341 (in Chinese)
周丹, 邹丽芳, 邹华松, 等. 水稻条斑病菌胞外多糖相关基因的鉴定[J]. 微生物学报, 2011, 51(10): 1334-1341
- [18] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms[J]. The Lancet, 2001, 358(9276): 135-138
- [19] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2010, 35(4): 322-332

2016 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
13	第七届中国微生物学大会暨生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9月	400	待定	王苗苗 18758810661
14	2016年全国青年病毒学者学术年会	中国微生物学会病毒学专业委员会	9月	200	待定	吴莹 010-64807688
15	首届临床微生物学与医院感染论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9月	350	待定	王苗苗 18758810661
16	2016年微生物与人类健康学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	9月	200	上海	胡福泉 13594616136
17	第十一届中国微生物学会兽医微生物学专业委员会委员会会议	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	10月	400	待定	丁家波 13683505108
18	第十三届国际工业微生物遗传学大会	中国微生物学会	10月 16-20日	400	湖北武汉	孙雪 027-68756642
19	2016年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10月	600	陕西西安	杨海花 010-64807200
20	食品酿造技术与产业发展学术报告会	中国微生物学会酿造分会	10月	200	广东汕头	张秀梅 13503213265
21	第14届中日韩国际酶工程学术会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	11月	200	广西南宁	欧阳浩森 010-64807420
22	第十九次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11月	500	重庆	蒋建东 13915976780
23	中国微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	12月	200	待定	010-53218310
24	第六届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12月	200	海南乐东	吴悦 027-87287254