

西瓜噬酸菌 *hflX* 基因功能分析

乔培^{1,2} 刘博¹ 杨玉文² 郭彦彤¹ 关巍² 赵廷昌^{2*}

(1. 吉林农业大学农学院, 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 GTP 结合蛋白基因 *hflX* 在西瓜噬酸菌 *Acidovorax citrulli* 中的功能尤其是对该菌致病力的影响, 以西瓜噬酸菌 Aac5 菌株为材料获得 *hflX* 基因的缺失突变菌株及互补菌株, 通过对致病力等表型以及相关基因表达量的测定初步探究西瓜噬酸菌 *hflX* 基因的功能。结果显示, 同野生型菌株 Aac5 相比, 缺失突变菌株的致病力显著下降, III 型分泌系统基因 *hrpG* 和 *hrpE* 的表达量显著下调, 仅为野生型菌株表达量的 54.99% 和 27.39%; *hflX* 基因的缺失并未影响其引起烟草过敏性坏死反应的能力; 但缺失突变菌株的运动能力显著下降, 鞭毛基因 *fliR* 和 *fliC* 的表达量显著下调, 仅分别为野生型菌株的 37.04% 和 29.68%。此外, 缺失突变菌株的生物膜形成能力相较于野生型菌株显著增强了 26.32%, 同时, 其体外生长能力也有所增强。表明 *hflX* 基因可能通过调控 III 型分泌系统基因 *hrpG* 和 *hrpE*、鞭毛基因 *fliR* 和 *fliC* 的表达以及运动能力来影响西瓜噬酸菌 Aac5 菌株的致病力。
关键词: 西瓜噬酸菌; *hflX*; 致病力; 功能分析

Functional analysis of fruit blotch pathogen *hflX* in *Acidovorax citrulli*

QIAO Pei^{1,2} LIU Bo¹ YANG Yuwen² GUO Yantong¹ GUAN Wei² ZHAO Tingchang^{2*}

(1. College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China; 2. 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 clarify the function of GTP-binding protein gene *hflX* in fruit blotch pathogen *Acidovorax citrulli* and its effect on pathogenicity, *A. citrulli* Aac5 strain was used as wild-type strain, resulting in a *hflX*-deletion mutant and its complementary strain. Compared with the wild-type strain Aac5, *hflX* mutant showed significantly reduced virulence, and the expression levels of type III secretion system genes *hrpG* and *hrpE* decreased significantly, only 54.99% and 27.39% of the wild-type strain. Deletion of *hflX* did not influence the bacterial ability to trigger hypersensitive response on non-host *Nicotiana tabacum* var. Samsun; the swimming motility significantly reduced, the expression levels of flagellar genes *fliR* and *fliC* decreased significantly, only 37.04% and 29.68% of the wild-type strain. In addition, the biofilm formation ability of *hflX* mutant strain was 26.32% higher than that of the wild strain, and enhanced significantly. The growth ability *in vitro* of *hflX* mutant strain had also been enhanced. The results indicated that *hflX* might regulate virulence of *A. citrulli* Aac5 strain by expression of type III secretion system genes *hrpG* and *hrpE*, flagellar genes *fliR* and *fliC*, and swimming motility.

Key words: *Acidovorax citrulli*; *hflX*; virulence; functional analysis

瓜类细菌性果斑病是世界性检疫细菌性病害, 严重危害西瓜、甜瓜等葫芦科作物, 在世界各国的西

瓜和甜瓜产区普遍发生(吴秀芹等, 2018); 自20世纪末在我国被报道以来, 已在新疆、海南、内蒙古、山东等省区发生, 并呈逐年加重趋势(赵廷昌等, 2001; 商明清等, 2014)。该病害的病原菌为西瓜噬酸菌 *Acidovorax citrulli* (Schaad et al., 2008), 革兰氏阴性菌, 菌体平均大小约为 $0.5\ \mu\text{m} \times 1.7\ \mu\text{m}$ (Burdman & Walcott, 2012), 最适生长温度为 $24\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 在寄主植株的整个发育期均能发生侵染, 一般从叶缘气孔侵入, 初期叶片出现水渍状斑点, 随后病斑扩大变为黑褐色坏死病斑, 最后致使整个叶片枯萎, 但是坏死叶片不会从叶柄上脱落; 侵染果实初期, 果皮上会出现水浸状凹陷的斑点, 随后果皮龟裂, 渗出菌脓; 发病严重时果实会腐烂, 并致使种子带菌(彭斌和古勤生, 2014)。

目前已有研究证实, III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)是西瓜噬酸菌致病过程中的关键因子(任争光等, 2009; Johnson et al., 2011)。许多植物病原菌通过T3SS将毒性效应蛋白直接注入寄主植物细胞内, 对于没有T3SS的病原菌, 由于其无法克服寄主的基础抗性, 从而无法在寄主体内成功定殖(Alfano & Collmer, 1997)。T3SS主要由 *hrp* 基因编码, 且许多植物病原细菌T3SS中都存在核心调控基因(Tampakaki et al., 2010), 如野油菜黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* 中的 *hrpG* 和 *hrpX* 基因(Wengelnik & Bonas, 1996; Huang et al., 2009), 以及胡萝卜欧文氏菌 *Erwinia carotovora* 或假单胞菌 *Pseudomonas* spp. 中的 *hrpL* 和 *hrpS* 基因(Tampakaki et al., 2010)等。

T3SS及毒性效应蛋白作为蛋白质, 其在翻译的每个阶段都需要额外的核糖体相关蛋白(Coatham et al., 2016)。其中, GTP酶起着重要作用, 利用GTP的水解可以驱动其它相关蛋白的功能循环。GTP结合蛋白HflX通常在原核生物及真核生物中保守(Jain et al., 2009; Shields et al., 2009; Blombach et al., 2011), 能够与50S核糖体亚基结合来结合和水解GTP或ATP(Shields et al., 2009)。在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中, HflX有3个结构域, 具有独特的N-末端结构域(Jain et al., 2013), 编码HflX的基因位于 *hfq* 基因的下游, Hfq是细菌中的通用应激反应蛋白, 两者都处于热敏启动子的控制之下(Noble et al., 1993; Tsui et al., 1996)。在大肠杆菌中, HflX同锰离子代谢和群体感应调控等有关(Kaur et al., 2014)。在压力环境下, 细菌能够将70S核糖体二聚化形成翻译沉默的100S核糖体, 在金黄色葡萄球菌

Staphylococcus aureus 中, GTP结合蛋白HflX能够作为100S核糖体的解离因子, 当 *hflX* 缺失后, 100S核糖体的积累增多, 其致病力减弱(Basu et al., 2018)。通过NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索发现西瓜噬酸菌 AAC00-1 基因组中存在 *hflX* 基因, 但功能尚不明确。因此, 本研究拟通过构建 *hflX* 基因的缺失突变体, 分析 *hflX* 对西瓜噬酸菌致病力和运动能力等表型的影响, 明确 *hflX* 基因在西瓜噬酸菌中的功能, 以期为瓜类细菌性果斑病防治药物的开发提供有效靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物、菌株及质粒: 所用西瓜品种为中蔬瑞宏(原称中选2号), 种子由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供, 于 $25\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温室中培养, 幼苗育龄为3周时供试; 烟草品种为三生烟 *Nicotiana tabacum* var. Samsun, 种子由本实验室保存并提供, 于 $25\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温室培养, 幼苗育龄为1个月时供试。所用野生型菌株为西瓜噬酸菌II组菌株 Aac5(Yan et al., 2013), 具氨苄青霉素(ampicillin, Amp)抗性; 助手菌 helper 具氯霉素(chloramphenicol, Cm)抗性; 质粒 pK18mobsacB, 含有蔗糖致死位点 *sacB* (Schäfera et al., 1994) 且具 Kan 抗性, 用于目的基因的敲除; 质粒 pBBR1MCS-2 具 Kan 抗性(Kovach et al., 1995), 用于缺失基因的回补; 上述材料均由中国农业科学院植物保护研究所蔬菜病害组保存并提供。

培养基: 金氏B(King's B, KB)液体培养基: 胰蛋白胨 15 g、甘油 15 mL、 MgSO_4 1.5 g、 K_2HPO_4 1.5 g, pH 7.0, 配置固体培养基时添加琼脂粉 15 g; 溶菌肉汤(lysogeny broth, LB)液体培养基: 胰蛋白胨 15 g、酵母粉 10 g、NaCl 10 g, pH 7.0, 配置固体培养基时添加琼脂粉 15 g; T3SS诱导培养基: 胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 5 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.03 g, pH 5.8; M9蔗糖固体培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 75.6 g、 KH_2PO_4 15 g、 NH_4Cl 5 g、NaCl 2.5 g、20% 柠檬酸钠 10 mL、 MgSO_4 1 mL、蔗糖 100 g、琼脂粉 15 g, pH 7.0; 运动性测定专用培养基: 酵母粉 0.3 g、胰蛋白胨 0.3 g、琼脂粉 3 g, pH 7.0; 上述培养基均使用去离子水定容至 1 L。

试剂: 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 天根生化科技(北京)有限公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒, 北京百泰克生物技术有限公司; 质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒、PCR 清洁试剂盒, 美国 Axygen 公司;

核酸限制性内切酶,日本 TaKaRa 公司;KOD 高保真酶,日本 ToYoBo 公司;Infusion 无缝连接酶,南京诺唯赞生物科技有限公司;DNA Marker,博迈德(北京)科技发展有限公司;抗生素,美国 Sigma 公司;结晶紫,北京索莱宝科技有限公司;2×*Taq* PCR Master Mix、FastQuant RT Kit (With gDNase)、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green, 含 2×SuperReal PreMix Plus、50×ROX Reference Dye 及 RNase-Free ddH₂O), 天根生化科技(北京)有限公司。

仪器:DHP120 智能人工气候培养箱,上海实验仪器厂有限公司;T100 TM Thermal Cycler PCR 仪、Gel Doc TM XR Imaging System 凝胶成像分析系统,美国 Bio-Rad 公司;Micro CL 17R 低温离心机、Evo300 PC 分光光度计、NanoVue Plus 核酸蛋白分析仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Centrifuge 5424 台式离心机,德国 Eppendorf 公司;FP-1100-C 全自动生长曲线分析仪,芬兰 Biosceen 公司;M×3000P 荧光定量 PCR 仪,美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 缺失突变菌株的构建及验证

登录 NCBI 数据库中西瓜噬酸菌 AAC00-1 全基因组数据库,获取 *hflX* (Aave_1430) 上下游序列,使用 Primer Premier 5 软件设计引物 *hflXL*-F/*hflXL*-R 和 *hflXR*-F/*hflXR*-R (表 1),通过高保真酶 KODplus NEO (Mizuguchi et al., 1999) 以野生型菌株 Aac5 的 DNA 为模板克隆目的基因上下游片段,经北京六合华大基因科技有限公司测序后,使用 DNAMAN 8 软件比对所得序列与数据库中 AAC00-1 基因组的同段序列,相似性为 100%。用 Overlapping PCR 法 (Zhang et al., 2013) 连接上下游片段,将所得片段连接到经酶切 (*Sal* I/*Hind* III) 的 pK18*mobsacB* 载体 (Schäfera et al., 1994) 上构成敲除载体 pK18*mobsacB*-*hflX*,并导入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,将所得菌液涂布于加有 50 μ g/mL Kan 的 LB 固体培养基上倒置静置培养,于 37℃ 下黑暗培养 12~18 h,挑取 LB 固体培养基上长出的单菌落于加有 50 μ g/mL Kan 的 LB 液体培养基中,于 37℃、200 r/min 条件下振荡培养。所得携带敲除载体 pK18*mobsacB*-*hflX* 的菌液经北京六合华大基因科技有限公司测序验证连接结果。利用同源重组双交换的原理两步法筛选缺失突变菌株 (Philippe et al., 2004; 张爱萍等, 2017; Zhang et al., 2018): 第 1 步,通过三亲杂交法在助手菌 helper 的协助下将敲除载体 pK18*mobsacB*-*hflX* 导入野生型菌株 Aac5 中,利用 Amp 和 Kan 抗性筛选

单交换克隆;第 2 步,将单交换克隆涂布于 M9 蔗糖固体培养基上,利用携带 pK18*mobsacB* 质粒的菌株因含有蔗糖致死位点 *sacB* 而不能在 M9 蔗糖固体培养基上生长的原理筛选缺失突变菌株 (Schäfera et al., 1994),使用西瓜噬酸菌特异性引物 WFB1/WFB2 (Walcott & Gitaitis, 2007)、Kan 抗性验证引物 Kan^r-F/Kan^r-R 及目的基因验证引物 Δ *hflX*-L/ Δ *hflX*-R 进行 PCR 验证 (表 1),西瓜噬酸菌特异性及目的基因验证时以野生型菌株 Aac5 为阳性对照,Kan 抗性验证时以具 Kan 抗性的 pK18*mobsacB* 质粒为阳性对照,ddH₂O 为阴性对照。所有引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成。25 μ L PCR 反应体系:2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μ L、10 μ mol/L 正反向引物各 1 μ L、模板 1 μ L,加 ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 反应条件:95℃ 预变性 3min;95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 50 s,40 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min;4℃ 保存。

1.2.2 互补菌株的构建及验证

同 1.2.1 方法设计引物 HB-*hflXL*/HB-*hflXR* (表 1),以野生型菌株 Aac5 的 DNA 为模板,克隆目的基因 *hflX* 及其上游启动子序列,根据 Zhang et al. (2018) 方法,将片段连接至经酶切 (*Sal* I/*Hind* III) 的 pBBR1MCS-2 载体 (Kovach et al., 1995) 上构成互补载体 pBBR1MCS-2-*hflX*,并导入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,将所得菌液涂布于加有 50 μ g/mL Kan 的 LB 固体培养基上倒置静置培养,于 37℃ 下黑暗培养 12~18 h,挑取 LB 固体培养基上长出的单菌落于加有 50 μ g/mL Kan 的 LB 液体培养基中,于 37℃、200 r/min 条件下振荡培养。所得携带有互补载体 pBBR1MCS-2-*hflX* 的菌液经北京六合华大基因科技有限公司测序验证连接结果。通过三亲杂交法在助手菌 helper 的协助下将互补载体 pBBR1MCS-2-*hflX* 导入缺失突变菌株 Δ *hflX* 中 (Schäfera et al., 1994),利用 Amp 和 Kan 抗性筛选互补菌株,使用西瓜噬酸菌特异性引物 WFB1/WFB2 (Walcott & Gitaitis, 2007)、Kan 抗性验证引物 Kan^r-F/Kan^r-R 及目的基因验证引物 Δ *hflX*-L/ Δ *hflX*-R 进行 PCR 验证 (表 1),西瓜噬酸菌特异性及目的基因验证时以野生型菌株 Aac5 为阳性对照,Kan 抗性验证时以具 Kan 抗性的 pBBR1MCS-2 质粒为阳性对照,ddH₂O 为阴性对照,反应体系及条件同 1.2.1。

1.2.3 供试菌株致病力及 T3SS 相关基因表达量测定

采用喷雾接种法 (张爱萍等, 2017) 测定供试菌株的致病力。取 -80℃ 冰箱保存的野生型菌株 Aac5、

缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 和互补菌株 $\Delta hflXcomp$ 分别于加有 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 KB 固体培养基上划线, 28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置静置黑暗培养 48 h 后, 分别挑取单菌落于加有浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 KB 液体培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下振荡培养至对数生长期, 即菌液 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 处于 0.6~1.0 之间, 以 4 000 r/min 离心 3 min, 使用无菌蒸馏水洗去菌株表面抗性后吸打重悬菌体。分别将菌液浓度统一调至 $3 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$, 各取 200 mL 菌液分别均匀喷洒在 3~4 叶龄的健壮西瓜幼苗叶片的两面, 每个处理接种 3 盆西瓜幼苗, 即 3 次重复, 每盆 5~6 棵, 以喷洒清水处理作为对照。幼苗接种后套袋培养, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h 光照与 16 $^{\circ}\text{C}$ 、8 h 黑暗交替的智能人工气候培养箱中培养,

相对湿度为 90% (Bahar et al., 2009; 张爱萍等, 2017)。接种 7 d 后开始调查西瓜幼苗的发病情况, 按照病情严重程度分为 7 级 (Bahar et al., 2009), 并计算病情指数。分级标准为: 0 级: 叶片无明显发病症状; 1 级: 叶片病斑较少, 病斑面积占整个面积的比例 $\leq 10\%$; 2 级: 病斑较多, $10\% < \text{病斑面积占整个面积的比例} \leq 25\%$; 3 级: 病斑较多, $25\% < \text{病斑面积占整个面积的比例} \leq 50\%$; 4 级: 病斑很多或融合成大斑, $50\% < \text{病斑面积占整个面积的比例} \leq 75\%$; 5 级: 病斑很多或融合成大斑, $75\% < \text{病斑面积占整个面积的比例} \leq 90\%$; 6 级: 病斑很多或融合成大斑, 病斑面积占整个面积的比例 $> 90\%$ 。病情指数 = $100 \times \Sigma (\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查病叶数} \times \text{最高级代表值})$ 。

表 1 本研究中用到的引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度/bp Expected size	引物用途 Use of primer
<i>hflX</i> -F	ATCCTCTAGAGTCGACTGTTCCGCCCCGAAGATGC	609	克隆 <i>hflX</i> 基因上游片段
<i>hflX</i> -R	TGGAAATTCAGCATCGGCGTACACGGGCGCAGGAATG		<i>hflX</i> gene upstream fragment cloning
<i>hflX</i> -F	CATTCTGCGCCCGTGTACGCCGATGCTGAATTTCCA	607	克隆 <i>hflX</i> 基因下游片段
<i>hflX</i> -R	GGCCAGTGCCAAGCTTAGTTCGTGCCGCTGGATGG		<i>hflX</i> gene downstream fragment cloning
HB- <i>hflX</i>	CCCCCTCGAGGTCGACTGTTCCGCCCCGAAGATGC	2 282	克隆带启动子的 <i>hflX</i> 基因
HB- <i>hflX</i>	ATTCGATATCAAGCTTCAGATCAGCACGGCCACC		<i>hflX</i> gene with promoter fragment cloning
WFB1	GACCAGCCACACTGGGAC	360	验证西瓜噬酸菌
WFB2	CTGCCGTACTCCAGCGA		<i>Acidovorax citrulli</i> confirmation
$\Delta hflX$ -L	TCGCCCCGTCTGCAATACC	548	验证 <i>hflX</i> 缺失突变菌株及互补菌株
$\Delta hflX$ -R	CCCGATTTCGCCAAGCAC		$\Delta hflX$ and $\Delta hflXcomp$ confirmation
Kan'-F	CAAGATGGATTGCACGCA	738	验证 Kan 抗性基因
Kan'-R	CTTGAGCCTGGCGAACA		Kan fragment confirmation
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT	-	pBBR 质粒测序
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC		pBBR plasmid sequencing
18F	CAGGAAACAGCTATGAC	-	pK18 质粒测序
18R	GTAAAACGACGGCCAGT		pK18 plasmid sequencing
<i>hrpX</i> -F	GCGCTCACGCAAATGCT	175	qPCR 测定 <i>hrpX</i>
<i>hrpX</i> -L	GGCAAGCTCCTCCTGTCCTA		<i>hrpX</i> assay by qPCR
<i>hrpG</i> -F	CTCGCCTGGCTGCTGTT	197	qPCR 测定 <i>hrpG</i>
<i>hrpG</i> -L	GCTTGATAGATGTGCTGCTCC		<i>hrpG</i> assay by qPCR
<i>hrpE</i> -F	GTCAGGATGGACACGCAGGC	119	qPCR 测定 <i>hrpE</i>
<i>hrpE</i> -L	AACGCATGGTGCTGGCAGAG		<i>hrpE</i> assay by qPCR
<i>fliR</i> -F	GCGCTGCTGATGTTCTGTC	175	qPCR 测定 <i>fliR</i>
<i>fliR</i> -L	GGTCGATGGATTGCTGCA		<i>fliR</i> assay by qPCR
<i>fliC</i> -F	GCTCGTTGACGATTTCAT	179	qPCR 测定 <i>fliC</i>
<i>fliC</i> -L	TTCCTTTCCAGGAAGAAGT		<i>fliC</i> assay by qPCR
<i>ropB</i> -F	GCGACAGCGTGCTCAAAGTG	134	qPCR 内参
<i>ropB</i> -L	GCCTTCGTTGGTGCGTTTCT		Internal reference for qPCR

下划线部分为限制性酶切位点。The restriction enzyme sites are underlined.

为明确 *hflX* 基因是否对 T3SS 有调控作用, 采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 技术检测缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 的 T3SS 相关基因

hrpX、*hrpG* 和 *hrpE* 相较于野生型菌株 Aac5 的相对表达量变化。分别从接种野生型菌株 Aac5、缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 和互补菌株 $\Delta hflXcomp$ 的 KB 固体培养

基上挑取单菌落于加有浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 T3SS 诱导培养基中,于 28℃、200 r/min 条件下摇培至对数期,即菌液 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 处于 0.6~1.0 之间,分别使用 Trizol 法提取总 RNA,使用 RNase-Free ddH_2O 将总 RNA 浓度调为 80 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 后反转录合成 cDNA。选取 *rpoB* 为内参基因 (Mizuguchi et al., 1999; Zhang et al., 2018),利用引物 *hrpX*-F/*hrpX*-L、*hrpG*-F/*hrpG*-L、*hrpE*-F/*hrpE*-L 进行 qPCR 检测 (表 1),采用相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (任争光等, 2009) 对野生型菌株 Aac5 和缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 中 T3SS 相关基因 *hrpX*、*hrpG*、*hrpE* 的表达量进行测定。25 μL 反应体系: 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 12.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 正反向引物各 1 μL 、50 $\times$ ROX Reference Dye 0.5 μL 、cDNA 模板 1 μL ,加 RNase-Free ddH_2O 补足至 25 μL 。反应条件: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30 s; 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 40 个循环。试验进行 3 次生物学重复。

1.2.4 供试菌株烟草过敏性反应测定

为明确 *hflX* 基因的缺失是否会影响西瓜噬酸菌引起非寄主烟草过敏性坏死反应的能力,采用注射接种法进行测定。将 1.2.3 中获得的无菌蒸馏水重悬的浓度为 3×10^8 CFU/mL 的野生型菌株 Aac5、缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 和互补菌株 $\Delta hflX\text{comp}$ 菌液,使用 1 mL 无菌注射器分别取 200 μL 菌液注射至健康的 1 月龄三生烟叶片背面的叶脉间隙,以注射等量清水为对照,试验进行 3 次生物学重复。注射后 24 h 观察各处理叶片是否产生过敏性坏死反应 (Bahar et al., 2009),若被注射菌液部位呈半透明状,即细胞死亡,产生过敏性坏死反应。

1.2.5 供试菌株运动能力及鞭毛相关基因表达量测定

植物病原菌在进入植物之后,其运动能力的强弱对于能否成功定殖起着重要作用,细菌的运动主要归功于鞭毛。为明确 *hflX* 基因的缺失是否会影响西瓜噬酸菌的运动能力,将野生型菌株 Aac5、缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 和互补菌株 $\Delta hflX\text{comp}$ 使用含有浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 KB 液体培养基,在 28℃、200 r/min 条件下摇培至浓度为 3×10^8 CFU/mL,各吸取 5 μL 菌液轻轻点接于运动性测定专用平板上,于 28℃ 正置黑暗培养 72 h 后,观察拍照并测量记录各菌落晕圈直径,以晕圈直径的大小来判断西瓜噬酸菌运动能力的强弱 (Bahar et al., 2009)。每个处理 5 次技术重复,试验进行 3 次生物学重复。

为明确 *hflX* 基因对于鞭毛是否具有调控作用,采用 qPCR 法测定缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 的鞭毛相关

基因 *fliR* 和 *fliC* 相较于野生型菌株 Aac5 的相对表达量变化。将野生型菌株 Aac5、缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 使用加有浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 KB 液体培养基中,于 28℃、200 r/min 条件下摇培至对数期,即菌液 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 处于 0.6~1.0 之间,分别使用 Trizol 法提取总 RNA,使用 RNase-Free ddH_2O 将总 RNA 浓度调为 80 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 后反转录合成 cDNA。选取 *rpoB* 为内参基因 (Mizuguchi et al., 1999; Zhang et al., 2018),利用引物 *fliR*-F/*fliR*-L、*fliC*-F/*fliC*-L 进行 qPCR 检测 (表 1),分析野生型菌株 Aac5 和缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 中鞭毛相关基因 *fliR*、*fliC* 的表达量变化。反应体系及条件同 1.2.3。每个处理 3 次重复。

1.2.6 供试菌株生物膜形成能力测定

为明确 *hflX* 基因的缺失是否会影响西瓜噬酸菌的生物膜形成能力,采用聚苯乙烯法对供试菌株进行测定。采用 1.2.5 中获得的浓度为 3×10^8 CFU/mL 的野生型菌株 Aac5、缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 和互补菌株 $\Delta hflX\text{comp}$ 菌液,各取 1 mL 菌液加入 24 孔聚苯乙烯板,28℃ 正置黑暗孵育 48 h,弃菌液后于 80℃ 固定 30 min,无菌水清洗 3~5 次;加入 0.1% 结晶紫 1 mL,于室温静置染色 45 min,然后用无菌水漂洗至透明,37℃ 烘干,拍照并存档;加入 95% 乙醇 1 mL 洗脱染色生物膜,使用分光光度计测定洗脱液的 $\text{OD}_{575\text{ nm}}$ 值 (Bahar et al., 2009),分析各菌株的生物膜形成能力。每个处理 6 次技术重复,试验设 3 次生物学重复。

1.2.7 供试菌株体外生长能力测定

生长能力的强弱对于植物病原菌是否能在侵入寄主后快速定殖至关重要。为研究 *hflX* 的缺失能否影响西瓜噬酸菌的生长能力,采用体外培养法进行测定。将 1.2.5 中获得的浓度为 3×10^8 CFU/mL 的野生型菌株 Aac5、缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 和互补菌株 $\Delta hflX\text{comp}$ 菌液,各取 10 mL 以 4 000 r/min 离心 3 min,使用 KB 液体培养基洗去菌株表面抗性后吸打重悬菌体。均以 1:100 的体积比稀释后分别取 200 μL 加入 100 孔聚苯乙烯板,放入 Biosceen 自动生长曲线仪,28℃ 中级振荡培养 72 h,每 2 h 测定 1 次菌液的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值,观察并记录每个菌株的生长情况。每个处理 6 次技术重复,试验进行 3 次生物学重复。

1.3 数据分析

使用 SPSS 22.0 软件对试验数据进行统计分析,采用单因素方差分析法进行相同条件下不同菌株间的差异显著性检验,采用独立样本 *t* 测验法对基因表达量进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 的获取及验证

通过三亲本杂交法将敲除载体 pK18*mobsacB-hflX* 导入野生型菌株 Aac5 中, 经同源重组双交换得到无标记的 *hflX* 缺失突变菌株。使用西瓜噬酸菌特异性引物 WFB1/WFB2 对获得的缺失突变菌株进行验证, 能够扩增到大小为 360 bp 的条带(图 1-A), 确定其为西瓜噬酸菌; 使用 Kan 抗性验证引物 Kan^r-F/

Kan^r-R 验证缺失突变菌株是否已不具备 Kan 抗性标记, 阳性对照 pK18*mobsacB* 质粒能够扩增到大小为 738 bp 的条带, 缺失突变菌株无条带(图 1-B), 表明已不含有导入的敲除载体 pK18*mobsacB-hflX*; 使用特异性引物 $\Delta hflX$ -L/ $\Delta hflX$ -R 进行 PCR 验证, 在野生型菌株 Aac5 中扩增到大小为 548 bp 的条带, 而缺失突变菌株未扩增到目的条带(图 1-C), 证明成功敲除 *hflX* 基因, 获得基因缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 。

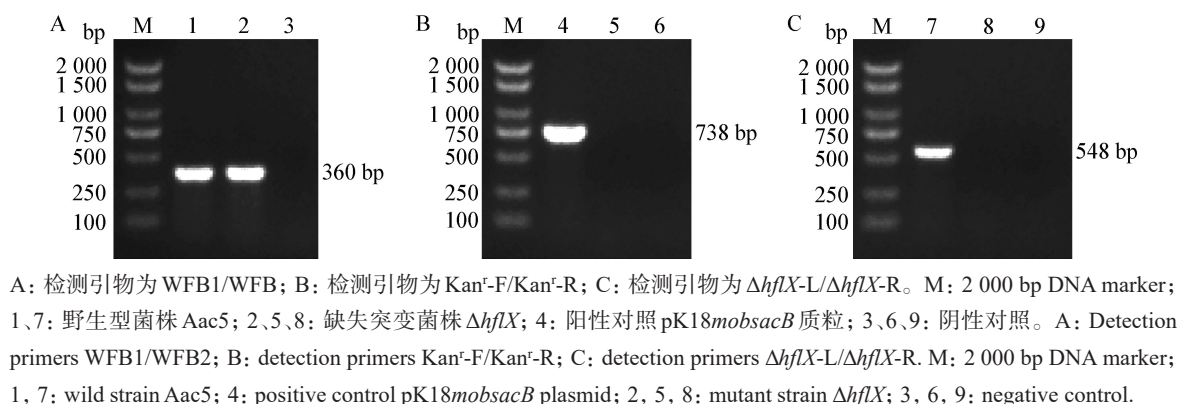


图1 西瓜噬酸菌缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 的 PCR 电泳检测图

Fig. 1 PCR detection of mutant strain $\Delta hflX$ of *Acidovorax citrulli*

2.2 互补菌株 $\Delta hflX$ comp 的获取及验证

通过三亲本杂交法将带有 *hflX* 基因及其启动子的互补载体 pBBR1MCS-2-*hflX* 导入 *hflX* 缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 中, 得到互补菌株 $\Delta hflX$ comp。使用西瓜噬酸菌特异性引物 WFB1/WFB2 对获得的互补菌株进行验证, 能够扩增到大小为 360 bp 的条带(图 2-A), 确定其为西瓜噬酸菌; 使用 Kan 抗性验证引物 Kan^r-F/Kan^r-R 验证互补菌株是否具备 Kan 抗性标

记, 阳性对照 pBBR1MCS-2 质粒能够扩增到大小为 738 bp 的条带, 且互补菌株有相同条带(图 2-B), 表明已含有导入的互补载体 pBBR1MCS-2-*hflX*; 使用特异性引物 $\Delta hflX$ -L/ $\Delta hflX$ -R 进行 PCR 验证, 在野生型菌株 Aac5 中扩增到大小为 548 bp 的条带, 在互补菌株中也能够扩增到大小相同的条带(图 2-C), 证明成功回补 *hflX* 基因, 获得 *hflX* 基因缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 的互补菌株 $\Delta hflX$ comp。

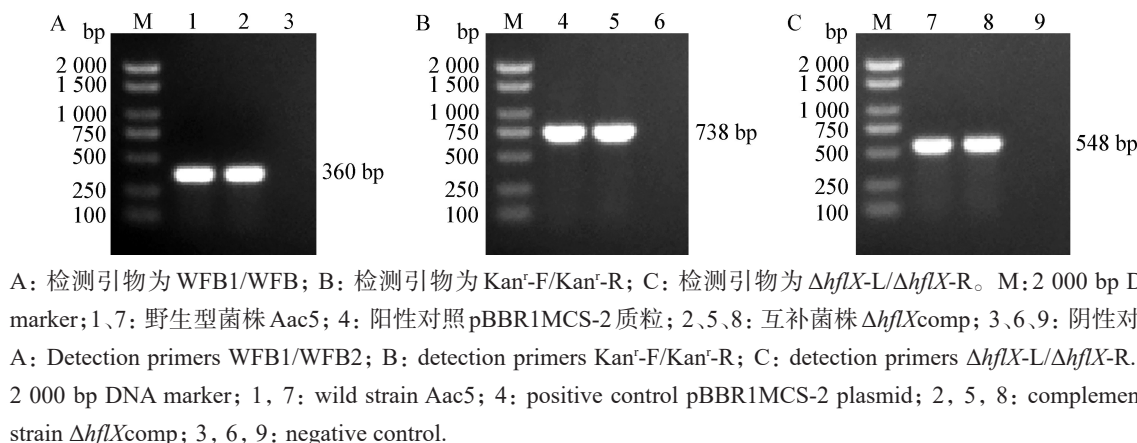


图2 西瓜噬酸菌互补菌株 $\Delta hflX$ comp 的 PCR 电泳检测图

Fig. 2 PCR detection of complementary strain $\Delta hflX$ comp of *Acidovorax citrulli*

2.3 供试菌株的致病力及 T3SS 基因表达量分析

喷雾接种西瓜幼苗 1 周后, 接种缺失突变菌株

$\Delta hflX$ 的幼苗较接种野生型菌株 Aac5 的幼苗发病轻, 接种缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 的西瓜幼苗病情指数为

12.09, 显著低于接种野生型菌株 Aac5 的西瓜幼苗的病情指数 24.72, 而互补菌株 $\Delta hflX$ comp 的致病力能恢复至野生型水平, 接种的西瓜幼苗病情指数为 20.61 (图 3-A), 表明 *hflX* 同西瓜噬酸菌的致病力有关, 且为正相关关系。

对三型分泌系统基因 *hrpX*、*hrpG*、*hrpE* 表达量的测定结果显示, 相较于野生型菌株 Aac5, 缺失突

变菌株 $\Delta hflX$ 中 *hrpX* 基因的表达量虽无显著变化, 但 *hrpG* 基因的表达量显著下调, 仅为野生型菌株 Aac5 中 *hrpG* 基因表达量的 54.99%, 而 *hrpE* 基因的表达量同样显著下调, 仅为野生型菌株 Aac5 中 *hrpE* 基因表达量的 27.39% (图 3-B)。表明缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 中三型分泌系统基因 *hrpG* 和 *hrpX* 的 mRNA 积累减少。

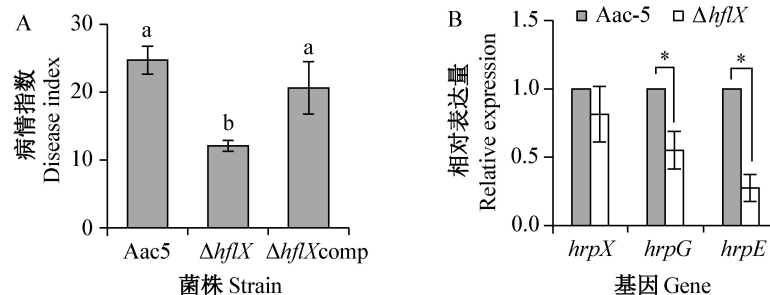


图3 西瓜噬酸菌 Aac5、 $\Delta hflX$ 、 $\Delta hflX$ comp 菌株的致病力及其相关 T3SS 基因的表达量

Fig. 3 Pathogenicity tests of *Acidovorax citrulli* strains Aac5, $\Delta hflX$, $\Delta hflX$ comp and relative expression levels of the gene associated with T3SS in strains Aac5 and $\Delta hflX$

图中数据均为平均数±标准误。图中不同小写字母表示经单因素方差分析法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著, *表示不同菌株间经 *t* 测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference at the $P<0.05$ level by one-way ANOVA test, * indicates significant difference among different strains at $P<0.05$ level by *t* test.

2.4 供试菌株烟草过敏性反应测定结果

将野生型菌株 Aac5、缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 及互补菌株 $\Delta hflX$ comp 用无菌水重悬后注射于非寄主三生烟叶片背面, 24 h 后观察发现这 3 株菌株均能引

起非寄主烟草的过敏性反应, 而清水对照未引起烟草过敏性反应的发生 (图 4)。表明 *hflX* 基因的缺失不影响西瓜噬酸菌 Aac5 菌株引起非寄主烟草产生过敏性反应的能力。

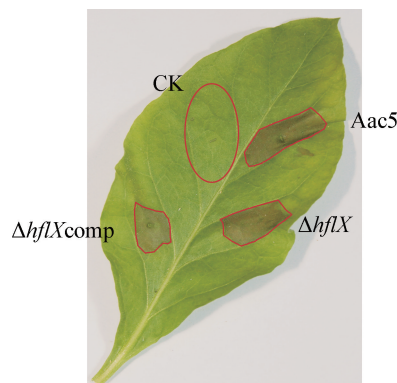


图4 西瓜噬酸菌 Aac5、 $\Delta hflX$ 、 $\Delta hflX$ comp 菌株的烟草过敏性反应

Fig. 4 Hypersensitive reaction test on tobacco inoculated with *Acidovorax citrulli* strains Aac5, $\Delta hflX$ and $\Delta hflX$ comp

2.5 供试菌株的运动性及其鞭毛基因表达量分析

将野生型菌株 Aac5、缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 及互补菌株 $\Delta hflX$ comp 于运动性测定专用培养基上培养 72 h 后, 野生型菌株 Aac5 的晕圈直径为 12.54 mm, 缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 的晕圈直径显著低于野生型菌株, 为 10.00 mm, 表明 *hflX* 基因同西瓜噬酸菌的运动能力有关, 且为正相关关系。互补菌株 $\Delta hflX$ comp

的晕圈直径为 9.98 mm, 显著低于野生型菌株 (图 5-A), 这可能是由于 *hflX* 基因的回补是在质粒上进行表达, 而非在基因组中进行表达。

对鞭毛基因 *fliR*、*fliC* 表达量的测定结果显示, 同野生型菌株 Aac5 相比, 缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 的 *fliR* 表达量显著下调, 仅为野生型菌株 Aac5 中 *fliR* 基因表达量的 37.04%, *fliC* 的表达量也出现显著下调, 仅

为野生型菌株 Aac5 中 *fliC* 基因表达量的 29.68% (图 5-B), 表明缺失突变菌株 $\Delta hfIX$ 运动能力的降低

可能是由于鞭毛相关基因 *fliR* 和 *fliC* 的表达下调所致。

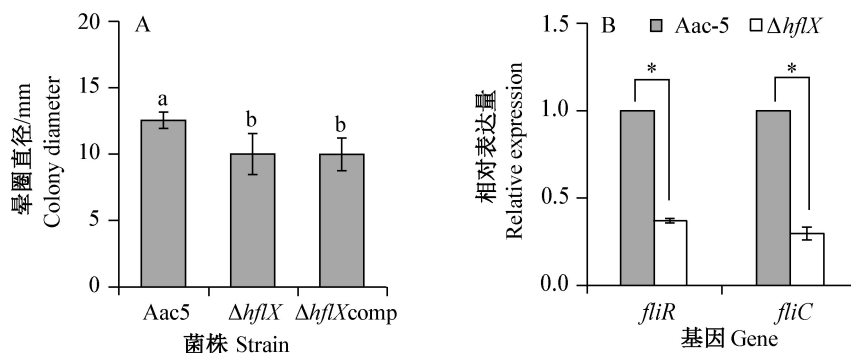


图5 西瓜噬酸菌 Aac5、 $\Delta hfIX$ 、 $\Delta hfIXcomp$ 菌株的运动能力及其鞭毛相关基因的表达量

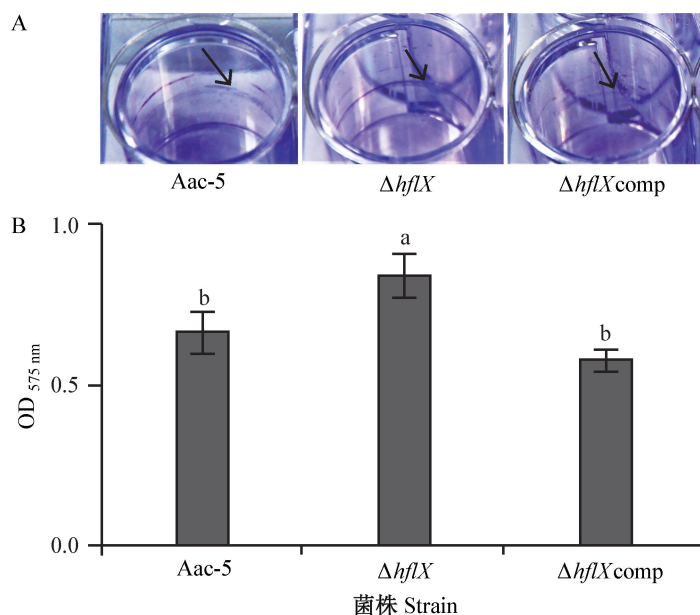
Fig. 5 Swimming ability of *Acidovorax citrulli* strains Aac5, $\Delta hfIX$, $\Delta hfIXcomp$ and relative expression levels of the gene associated with flagellum of Aac5 and $\Delta hfIX$ strains

图中数据均为平均数 $\pm$ 标准误。图中不同小写字母表示经单因素方差分析法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著, *表示不同菌株间经 *t* 测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SE. Different lowercase letters indicate significant difference at the $P<0.05$ level by one-way ANOVA test, * indicates significant difference among different strains at $P<0.05$ level by *t* test.

2.6 供试菌株的生物膜形成能力

同野生型菌株 Aac5 相比, 缺失突变菌株 $\Delta hfIX$ 的生物膜形成能力增强, 互补菌株 $\Delta hfIXcomp$ 基本能够恢复至野生型菌株 Aac5 水平 (图 6-A)。将生物膜溶于 95% 酒精, 测定其在 575 nm 波长光下的吸

光值: 野生型菌株 Aac5、缺失突变菌株 $\Delta hfIX$ 、互补菌株 $\Delta hfIXcomp$ 的吸光值分别为 0.58、0.84、0.67, 缺失突变菌株的吸光值显著高于野生型菌株和互补菌株, 分别显著增强了 26.32% 和 45.66%, 而互补菌株同野生型菌株间无显著差异 (图 6-B)。



A: Aac5、 $\Delta hfIX$ 、 $\Delta hfIXcomp$ 菌株经结晶紫染色后在聚苯乙烯 24 孔板中形成的紫色可视生物膜; B: 生物膜经 95% 酒精溶解后的 OD_{575 nm}。A: After crystal violet staining, Aac-5, $\Delta hfIX$ and $\Delta hfIXcomp$ strains form a circle of visible purple biofilm in polystyrene 24-well plates; B: OD_{575 nm} of the biofilm dissolved by 95% alcohol.

图6 西瓜噬酸菌 Aac5、 $\Delta hfIX$ 、 $\Delta hfIXcomp$ 菌株的生物膜形成能力

Fig. 6 Biofilm formation capacity of *Acidovorax citrulli* strains Aac5, $\Delta hfIX$ and $\Delta hfIXcomp$

图中数据均为平均数 $\pm$ 标准误。不同小写字母表示经单因素方差分析法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SE. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by one-way ANOVA test.

2.7 供试菌株的体外生长能力

在体外培养条件下,同野生型菌株 Aac5 相比,缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 和互补菌株 $\Delta hflXcomp$ 均提前

进入对数生长期,但互补菌株稳定期能够恢复至野生型水平(图7)。表明 $hflX$ 基因同西瓜噬酸菌的体外生长能力有关,且为负相关关系。

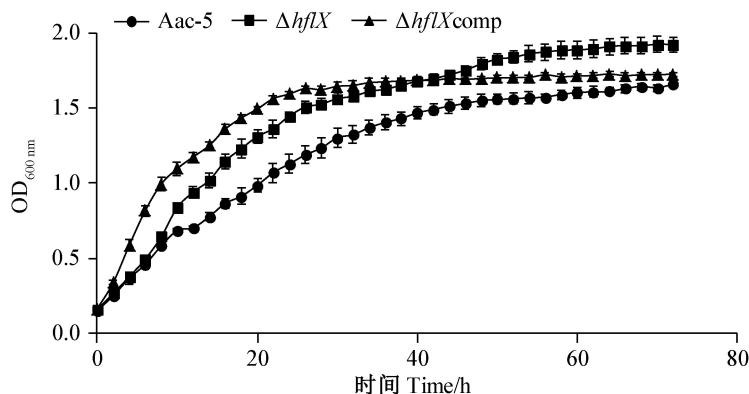


图7 西瓜噬酸菌 Aac5、 $\Delta hflX$ 、 $\Delta hflXcomp$ 菌株的体外生长能力

Fig. 7 Growth ability of *Acidovorax citrulli* strains Aac5, $\Delta hflX$ and $\Delta hflXcomp$ in vitro

图中数据均为平均数±标准误。Data are mean±SE.

3 讨论

目前,对于 HflX 的研究多集中于其对核糖体结构调节的探索,而对其在植物病原菌中所起功能的研究却较少。本研究通过同源重组构建了 $hflX$ 基因的缺失突变菌株,通过喷雾接种西瓜幼苗后发现,同野生型菌株 Aac5 相比, $hflX$ 基因缺失菌株 $\Delta hflX$ 的致病力显著降低,这与 Basu et al. (2018) 在金黄色葡萄球菌中发现 $hflX$ 的缺失导致该菌致病力降低的结果一致。在植物病原菌模式菌株野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 中, OmpR 型调节剂 HrpG 诱导 $hrpX$ 的转录,其编码 AraC 型激活剂 (Wengelnik & Bonas, 1996; Wengelnik et al., 1996; 1999)。HrpG 和 HrpX 控制 hrp 基因簇、III 型效应子和其它毒力基因的表达 (Noël et al., 2001; Schmidtke et al., 2012)。Zhang et al. (2018) 发现在西瓜噬酸菌中 $hrpG$ 的缺失会使其丧失对寄主的致病力以及对非寄主烟草引起过敏性坏死反应的能力。本研究中,缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 的 $hrpG$ 表达量显著下调,仅为野生型菌株的 54.99%,表明 $hflX$ 基因同 $hrpG$ 基因之间存在调控关系,且为正相关关系。此外,缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 中同为 T3SS 基因的 $hrpE$ 表达量也显著减少,这可能是由于 HrpG 对 $hrpE$ 基因的表达存在调控作用所致。尽管如此,缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 引起非寄主三生烟过敏性坏死反应的能力并没有丧失,应是 T3SS 及其底物蛋白的表达虽有减少,但并没有完全丧失所致。

游动能力是细菌作为原核生物能够成功生存和

繁衍的关键 (司铁岩等, 2016)。细菌不仅能通过控制鞭毛来实现趋化、趋光、趋氧等定向行动 (López et al., 2010), 同时,对于病原细菌而言,鞭毛亦是一种十分重要的致病因子 (殷芳群等, 2011)。张爱萍等 (2017) 在构建了西瓜噬酸菌鞭毛基因 $fliC$ 缺失突变株后发现其运动能力显著降低,而在本研究中,缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 的鞭毛基因 $fliR$ 和 $fliC$ 的表达量显著下调,仅为野生型菌株的 37.04% 和 29.68%,且其在运动性测定专用培养基上的运动能力也显著降低,表明缺失突变株 $\Delta hflX$ 运动能力的降低可能是由于鞭毛基因的表达下调所致。细菌鞭毛的存在对于病原菌生物膜的形成十分重要 (Wang et al., 2016)。于畅等 (2019) 在研究西瓜噬酸菌中 T3SS 跨膜装置蛋白基因 $hrcQ$ 时发现, $hrcQ$ 的缺失会导致其运动能力和生物膜形成能力的降低,而本研究却发现缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 运动能力减弱的同时生物膜形成能力显著增强,这可能是由于 $hflX$ 基因除了参与西瓜噬酸菌鞭毛表达调控的同时,还参与调控生物膜的合成。生长能力的强弱对于植物病原菌能否于寄主体内快速定殖起着重要作用。AAA ATPase 家族蛋白参与病原菌生长能力的调控,在西瓜噬酸菌中 AAA ATPase 家族蛋白基因 $ftsH$ 的缺失使得其生长能力及致病力均减弱 (季苇芹等, 2018)。本研究中 $hflX$ 缺失突变菌株 $\Delta hflX$ 同野生型菌株相比提前进入对数生长期,生长能力增强,表明 $hflX$ 基因参与西瓜噬酸菌生长能力的调控,且为负调控关系。

综上所述, GTP 结合蛋白基因 $hflX$ 的缺失影响了西瓜噬酸菌多个致病表型,包括 T3SS 基因 $hrpG$ 、

hrpE、鞭毛相关基因 *fliR*、*fliC* 的表达以及运动能力,而这些均与西瓜噬酸菌在寄主体内能否成功定殖及侵染密切相关。在后期研究中可进一步探究西瓜噬酸菌中 HflX 的功能,测定其对抗生素及压力环境的抵抗能力,从而进一步探究该基因及蛋白的功能,以期将其作为农药开发的靶标,减弱西瓜噬酸菌的致病力,减少每年因其带来的经济损失。

参 考 文 献 (References)

- ALFANO JR, COLLMER A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology*, 179(18): 5655–5662
- BAHAR O, KRITZMAN G, BURDMAN S. 2009. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. *European Journal of Plant Pathology*, 123(1): 71–83
- BASU A, SHIELDS KE, EICKHOFF CS, HOFT DF, YAP MN. 2018. Thermal and nutritional regulation of ribosome hibernation in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 200(24): e00426–18
- BLOMBACH F, LAUNAY H, ZORRAQUINO V, SWARTS DC, CABRITA LD, BENELLI D, CHRISTODOULOU J, LONDEI P, VAN DER OOST J. 2011. An HflX-type GTPase from *Sulfolobus solfataricus* binds to the 50S ribosomal subunit in all nucleotide-bound states. *Journal of Bacteriology*, 193(11): 2861–2867
- BURDMAN S, WALCOTT RR. 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. *Molecular Plant Pathology*, 13(8): 805–815
- COATHAM ML, BRANDON HE, FISCHER JJ, SCHÜMMER T, WIEDEN HJ. 2016. The conserved GTPase HflX is a ribosome splitting factor that binds to the E-site of the bacterial ribosome. *Nucleic Acids Research*, 44(4): 1952–1961
- HUANG DL, TANG DJ, LIAO Q, LI XQ, HE YQ, FENG JX, JIANG BL, LU GT, TANG JL. 2009. The Zur of *Xanthomonas campestris* is involved in hypersensitive response and positively regulates the expression of the *hrp* cluster via *hrpX* but not *hrpG*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(3): 321–329
- JAIN N, DHIMOLE N, KHAN AR, DE D, TOMAR SK, SAJISH M, DUTTA D, PARRACK P, PRAKASH B. 2009. *E. coli* HflX interacts with 50S ribosomal subunits in presence of nucleotides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2): 201–205
- JAIN N, VITHANI N, RAFAY A, PRAKASH B. 2013. Identification and characterization of a hitherto unknown nucleotide-binding domain and an intricate interdomain regulation in HflX-a ribosome binding GTPase. *Nucleic Acids Research*, 41(20): 9557–9569
- JI WQ, YAN JP, BAI X, QIAO P, LI ZP, YANG YW, GUAN W, ZHAO TC. 2018. Functional analysis of the gene *ftsH* in *Acidovorax citrulli*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 49(4): 488–499 (in Chinese) [季苇芹, 闫建培, 白雪, 乔培, 李智鹏, 杨玉文, 关巍, 赵廷昌. 2018. 西瓜噬酸菌 *ftsH* 基因功能分析. *植物病理学报*, 49(4): 488–499]
- JOHNSON KL, MINSAVAGE GV, LE T, JONES JB, WALCOTT R. 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
- KAUR G, SENGUPTA S, KUMAR V, KUMARI A, GHOSH A, PARRACK P, DUTTA D. 2014. Novel MntR-independent mechanism of manganese homeostasis in *Escherichia coli* by the ribosome-associated protein HflX. *Journal of Bacteriology*, 196(14): 2587–2597
- KOVACH ME, ELZER PH, HILL DS, ROBERTSON GT, FARRIS MA, ROOP RM Jr., PETERSON KM. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1): 175–176
- LÓPEZ D, VLAMAKIS H, KOLTER R. 2010. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7): a000398
- MIZUGUCHI H, NAKATSUJI M, FUJIWARA S, TAKAGI M, IMANAKA T. 1999. Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase. *Journal of Biochemistry*, 126(4): 762–768
- NOBLE JA, INNIS MA, KOONIN EV, RUDD KE, BANUETT F, HERSKOWITZ I. 1993. The *Escherichia coli* HflA locus encodes a putative GTP-binding protein and two membrane proteins, one of which contains a protease-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22): 10866–10870
- NOËL L, THIEME F, NENNSTIEL D, BONAS U. 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Microbiology*, 41(6): 1271–1281
- PENG B, GU QS. 2014. Survival and pathogenicity of *Acidovorax citrulli* overwintering in soils. *Journal of Plant Protection*, 41(3): 381–382 (in Chinese) [彭斌, 古勤生. 2014. 西瓜嗜酸菌的土壤越冬存活和致病性测定. *植物保护学报*, 41(3): 381–382]
- PHILIPPE N, ALCARAZ JP, COURSANGE E, GEISELMANN J, SCHNEIDER D. 2004. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. *Plasmid*, 51(3): 246–255
- REN ZG, HOU L, SONG ZG, ZHANG LQ. 2009. Screening of the pathogenicity mutants of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and cloning of the *hrcR* gene. *Acta Phytopathologica Sinica*, 39(5): 501–506 (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于 *hrcR* 基因的克隆. *植物病理学报*, 39(5): 501–506]
- SCHAAD NW, POSTNIKOVA E, SECHLER A, CLAFLIN LE, VIDAVER AM, JONES JB, AGARKOVA I, IGNATOV A, DICKSTEIN E, RAMUNDO BA. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. catleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al. 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic*

- and Applied Microbiology, 31(6/7/8): 434–446
- SCHÄFERA A, TAUCH A, JÄGER W, KALINOWSKI J, THIERBACH G, PÜHLER A. 1994. 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*. Gene, 145(1): 69–73
- SCHMIDTKE C, FINDEISS S, SHARMA CM, KUHFUSS J, HOFFMANN S, VOGEL J, STADLER PF, BONAS U. 2012. Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions. Nucleic Acids Research, 40(5): 2020–2031
- SHANG MQ, ZHANG DM, YANG QM, JIN YX, XU L, CHANG ZZ. 2014. Occurrence and management of bacterial fruit blotch on cucurbits in Shandong Province. Plant Quarantine, 28(3): 93–96 (in Chinese) [商明清, 张德满, 杨勤民, 金扬秀, 徐鲁, 常兆芝. 2014. 山东省瓜类细菌性果斑病的发生与防控. 植物检疫, 28(3): 93–96]
- SHIELDS MJ, FISCHER JJ, WIEDEN HJ. 2009. Toward understanding the function of the universally conserved GTPase HflX from *Escherichia coli*: a kinetic approach. Biochemistry, 48(45): 10793–10802
- SI TY, YUAN JH, WU YL, TANG JX. 2016. Physical biology of bacterial motility. Acta Physica Sinica, 65(17): 178703 (in Chinese) [司铁岩, 袁军华, 吴艺林, 唐建新. 2016. 细菌运动中的物理生物学. 物理学报, 65(17): 178703]
- TAMPAKAKI AP, SKANDALIS N, GAZI AD, BASTAKI MN, SARRIS PF, 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
- TSUI HC, FENG G, WINKLER ME. 1996. Transcription of the *mutL* repair, *miaA* tRNA modification, *hfq* pleiotropic regulator, and *hflA* region protease genes of *Escherichia coli* K-12 from clustered σ^{32} -specific promoters during heat shock. Journal of Bacteriology, 178(19): 5719–5731
- WALCOTT RR, GITAITIS RD. 2007. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Disease, 84(4): 470–474
- WANG TL, GUAN W, HUANG Q, YANG YW, YAN WR, SUN B, ZHAO TC. 2016. Quorum sensing contributes to virulence, twitching motility, seed attachment and biofilm formation I the wild type strain Aac-5 of *Acidovorax citrulli*. Microbial Pathogenesis, 100: 133–140
- WENGELNIK K, BONAS U. 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Journal of Bacteriology, 178(12): 3462–3469
- WENGELNIK K, MARIE C, RUSSEL M, BONAS U. 1996. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. Journal of Bacteriology, 178(4): 1061–1069
- WENGELNIK K, ROSSIER O, BONAS U. 1999. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. Journal of Bacteriology, 181(21): 6828–6831
- WU XQ, YANG YZ, LUO JY, QIU W, AN QL, LI B. 2018. Rapid detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with loop-mediated isothermal amplification. Journal of Plant Protection, 45(6): 1235–1241 (in Chinese) [吴秀芹, 杨樱子, 罗金燕, 邱文, 安千里, 李斌. 2018. 利用环介导等温扩增方法快速检测瓜类细菌性果斑病菌和番茄细菌性溃疡病菌. 植物保护学报, 45(6): 1235–1241]
- 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
- YIN FQ, ZHAO YC, LIU CH, QIAN GL, FAN JQ, HU BS, LIU FQ. 2011. Analysis of the *flgD* and *flgE* genes regulated by diffusible signal factor in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Journal of Microbiology, 51(7): 891–897 (in Chinese) [殷芳群, 赵延存, 刘春晖, 钱国良, 范加勤, 胡白石, 刘凤权. 2011. 水稻细菌性条斑病菌中受 DSF 调控的鞭毛基因 *flgD*、*flgE* 的功能分析. 微生物学报, 51(7): 891–897]
- 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, 赵丽萍, 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, ZHANG XX, WU LN, YU C, QIAO P, YANG YW, GUAN W, ZHAO TC. 2017. Construction of chemotaxis and flagella gene double mutant $\Delta cheA\Delta fliC$ and its functional analysis in *Acidovorax citrulli*. Journal of Agricultural Biotechnology, 25(11): 1838–1850 (in Chinese) [张爱萍, 张晓晓, 吴林娜, 于畅, 乔培, 杨玉文, 关巍, 赵廷昌. 2017. 西瓜噬酸菌趋化性及鞭毛素基因 $\Delta cheA\Delta fliC$ 双突变体构建及功能. 农业生物技术学报, 25(11): 1838–1850]
- 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
- ZHANG YB, WEI C, JIANG WD, WANG L, LI CR, WANG YY, DOW JM, SUN WX. 2013. The HD-GYP domain protein RpfG of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* regulates synthesis of extracellular polysaccharides that contribute to biofilm formation and virulence on rice. PLoS ONE, 8(3): e59428
- 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原菌鉴定. 植物病理学报, 31(4): 357–364]

(责任编辑:李美娟)