

研究报告

Tn5 转座子插入 α -酮戊二酸脱氢酶基因 *sucA* 对香蕉细菌性软腐病菌毒力的影响

蒋尚伯^{#1,2,3}, 孙大元^{#1,2,3}, 沈会芳^{1,2,3}, 蒲小明^{1,2,3}, 刘平平^{1,2,3}, 林壁润^{1,2,3}, 杨祁云^{1,2,3}, 张景欣^{*1,2,3}

1 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东 广州 510640

2 广东省植物保护新技术重点实验室, 广东 广州 510640

3 农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室, 广东 广州 510640

蒋尚伯, 孙大元, 沈会芳, 蒲小明, 刘平平, 林壁润, 杨祁云, 张景欣. Tn5 转座子插入 α -酮戊二酸脱氢酶基因 *sucA* 对香蕉细菌性软腐病菌毒力的影响[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2107-2122.

JIANG Shangbo, SUN Dayuan, SHEN Huifang, PU Xiaoming, LIU Pingping, LIN Birun, YANG Qiyun, ZHANG Jingxin. Tn5 transposon insertion of α -ketoglutarate dehydrogenase gene *sucA* affects the virulence of the pathogen causing bacterial soft rot of banana[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2107-2122.

摘要:【背景】玉米迪克氏菌(*Dickeya zeae*)可引起作物细菌性软腐病, 严重威胁香蕉、水稻等重要作物的生产安全。本研究在香蕉细菌性软腐病菌 *D. zeae* MS1 的 Tn5 突变体库中筛选到 4 个毒力显著减弱的突变体。【目的】进一步鉴定 Tn5 转座子插入突变体的具体基因位点, 并明确该基因对细菌毒力的影响。【方法】通过热不对称交错 PCR (thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction, TAIL-PCR) 鉴定转座子插入位点; 利用同源重组方法构建插入基因的敲除突变体及其互补菌株, 并比较它们与野生型在细菌生长、相关代谢产物活性、植物细胞壁降解酶(plant cell wall-degrading enzymes, PCWDEs)分泌、运动性及毒力等方面的差异。【结果】TAIL-PCR 鉴定出 4 个突变体的转座子插入位点均是位于 α -酮戊二酸脱氢酶(α -ketoglutarate dehydrogenase, α -KGDH)基因 *sucA* 内, 该基因编码三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环过程的关键酶组分。基因敲除突变体 Δ *sucA* 在细菌生长曲线上受到一定程度的影响, 但是其 α -KGDH 活性完全丧失。基因突变可显著减少 PCWDEs 的分泌并降低 *pelB* 和 *pelC* 等基因的转录表达, 而不影响细菌的涌动、游动能力。对比野生型, Δ *sucA* 在烟叶上产生的过敏性反应明显减弱, 对香蕉幼苗的致病性也显著降低。回补菌

资助项目: 广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515010082); 国家自然科学基金(32372509); 广东省农业科学院协同创新中心项目(XTXM202202)

This work was supported by the Basic and Applied Basic Research Foundation of Guangdong Province (2022A1515010082), the National Natural Science Foundation of China (32372509), and the Guangdong Academy of Agricultural Sciences Collaborative Innovation Center Project (XTXM202202).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: zhangjingxin@gdaas.cn

Received: 2024-08-31; Accepted: 2024-11-03; Published online: 2024-12-13

株则可将上述细菌表型均恢复至与野生型接近的水平。【结论】本研究利用 Tn5 转座子插入突变鉴定到可影响细菌毒力的 TCA 关键酶基因 *sucA*, 该基因的突变可减弱重要毒力因子 PCWDEs 的分泌, 但不影响细菌运动性。

关键词: 香蕉细菌性软腐病菌; Tn5 转座子; *sucA*; 植物细胞壁降解酶; 细菌毒力

Tn5 transposon insertion of α -ketoglutarate dehydrogenase gene *sucA* affects the virulence of the pathogen causing bacterial soft rot of banana

JIANG Shangbo^{#1,2,3}, SUN Dayuan^{#1,2,3}, SHEN Huifang^{1,2,3}, PU Xiaoming^{1,2,3}, LIU Pingping^{1,2,3}, LIN Birun^{1,2,3}, YANG Qiyun^{1,2,3}, ZHANG Jingxin^{*1,2,3}

1 Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, Guangdong, China

3 Key Laboratory of Green Prevention and Control on Fruits and Vegetables in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: [Background] *Dickeya zae* is a phytopathogen causing bacterial soft rot and has seriously threatened the production of a wide variety of crops including banana and rice worldwide. In this study, four Tn5 transposon mutants of *D. zae* MS1 isolated from diseased banana plants were obtained and found to exhibit attenuated virulence in banana plants. **[Objective]** To determine the gene loci inserted with the transposon in the four mutants and examine the effect of this gene on bacterial virulence. **[Methods]** Thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction (TAIL-PCR) was applied to identify the transposon-inserting genes; further, homologous recombination was used for the construction of in-frame deletion mutants and the complementation strains of target genes, which were compared with the wild-type strain *D. zae* MS1 in terms of growth, metabolite activity, secretion of plant cell wall-degrading enzymes (PCWDEs), motility, and virulence. **[Results]** TAIL-PCR showed that all the four mutants were produced by the insertion in the same gene, *sucA*, which encoded an α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH) in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. An in-frame deletion mutant Δ *sucA* showcased partially affected growth, and its α -KGDH activity was completely deprived. Δ *sucA* showed significantly reduced secretion of PCWDEs and was repressed at the transcription levels of genes encoding PCWDEs, such as *pelB* and *pelC*. However, mutation of *sucA* did not affect the swarming or swimming motility. In comparison with the wild-type, Δ *sucA* induced weakened hypersensitive responses (HR) in tobacco leaves and demonstrated significantly attenuated pathogenicity in banana seedlings. The complementation of this gene restored all these phenotypes to the levels as the wild-type. **[Conclusion]** Generation of Tn5 transposon mutants revealed that *sucA* was involved in virulence of *D. zae*, which encoded a key enzyme in the TCA cycle. Mutation of this gene

could weaken the secretion of key virulence factors PCWDEs but did not affect bacterial motility.

Keywords: pathogen causing bacterial soft rot of banana; Tn5 transposon; *sucA*; plant cell wall-degrading enzymes (PCWDEs); bacterial virulence

玉米迪克氏菌(*Dickeya zeae*), 原名 *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*, 可引起香蕉、水稻、马铃薯和玉米等重要作物的细菌性软腐病发生, 并在全球范围内造成严重减产^[1]。在粮食作物上, 由 *D. zeae* 引起的水稻基腐病和玉米细菌性茎腐病在易感品种或有利于病原菌生长的环境条件下发生较为普遍^[2-3]。在华南地区, 由 *D. zeae* 引起的香蕉细菌性软腐病最初在广东省被发现, 随后迅速传播至中国广西、云南、海南和福建等地^[4]; 由于病害传播速度快、传播范围广和发病症状严重, 该病害已成为香蕉生产过程中的重要威胁^[4-5]。

目前, 已报道的与迪克氏菌属(*Dickeya*)感染寄主植物相关的毒力因子主要包括: 植物细胞壁降解酶(plant cell wall-degrading enzymes, PCWDEs)^[6-7]、细菌分泌系统^[8]、鞭毛运动性^[9]、群体感应信号^[10-11]和细菌生物被膜^[12]等。不同毒力因子间多表现密切的联系, 果胶裂解酶(pectate lyase, Pel)和纤维素酶(cellulose, Cel)通过 II 型分泌系统(type II secretion system, T2SS)分泌至 *Dickeya* 胞外, 蛋白酶(protease, Prt)则利用 I 型分泌系统(type I secretion system, T1SS)进行分泌^[13]。在很多情况下, 同一基因的突变常可影响上述不同毒力因子的作用, 并进一步减弱细菌毒力, 如转录调控基因 *fis* 的敲除突变可减少 PCWDEs 的产生, 降低细菌的游动性和群集运动性, 减少生物被膜的形成和 zeamine 毒素的产生, 从而影响了其对水稻种子的致病性^[14]; 编码 MarR 家族转录调节因子的 *slyA* 发生突变后, *D. zeae* 生物被膜形成能力、细菌运动性和毒力均降低, 并且其 PCWDEs 的产生也受到不同程度的影响^[15]; 此外, 研究发现有机过氧化物还原酶调节因子(organic hydroperoxide reductase

regulator, OhrR)可调节 Cel 的产生, 并影响细菌运动性、生物被膜形成及对于双子叶植物和单子叶植物的毒力^[16]。

细菌的毒力调控机制较为复杂, 除上述常见的毒力因子外, 仍然有较多的毒力调控机制有待进一步探讨。如, 三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环作为细胞中产生能量的关键代谢途径, 已有报道表明细菌可通过该途径来影响细胞行为和毒力因子。在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica*)中, 多个 TCA 循环基因的突变导致其对于 BALB/c 小鼠上的毒力减弱^[17]; 相较于鲶鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)野生型, TCA 循环基因突变体对鲶鱼的毒力显著减弱^[18]; 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, *ymdB* 突变可介导 *sucA* 的下调表达, 进一步导致生物被膜形成减少^[19]。在达旦提迪克氏菌(*Dickeya dadantii*)中, 2 个 TCA 循环基因 *fumA* 和 *sdhCDAB* 的突变则可导致细胞内环状二鸟苷酸(cyclic diguanosine monophosphate, c di-GMP)浓度降低, 进而增加 Pel 的产生^[20]。因此, 本研究构建香蕉细菌性软腐病菌 *D. zeae* MS1 的 Tn5 转座子插入突变体库并筛选毒力减弱的突变体, 探索更多潜在的可影响 *D. zeae* 细菌毒力的调控机制; 同时, 通过鉴定 Tn5 转座子插入的基因位点、构建被插入基因的敲除突变体与回补菌株等方法, 研究基因敲除突变后细菌生长代谢、PCWDEs 分泌和相关基因表达及细菌运动性等方面产生的变化, 明确该基因对于 *D. zeae* 细菌毒力的影响, 以期为细菌性软腐病菌致病机制提供新的见解。

1 材料与方法

1.1 样品

本研究使用的细菌菌株和质粒列于

表 1^[21-23]; 其中, *D. zeae* MS1 野生型于 2009 年在感染细菌性软腐病的香蕉组织中分离得到^[4]。细菌菌株和质粒保存于广东省植物保护新技术重点实验室, -80 °C 保存备用; 烟草苗和香蕉苗在本实验室内培育、备用。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 细菌蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0。固体培养基加 10.0 g/L 琼脂粉。

Minimal medium (MM)基础培养基(g/L): MgSO₄·7H₂O 0.246, 琥珀酸钠 2.000, 硫胺素 0.040, CaCl₂ 0.011, 10×M9 (Na₂HPO₄ 6.8 g/L, KH₂PO₄ 3.0 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH₄Cl 1.0 g/L) 100 mL。固体培养基加 10.0 g/L 琼脂粉。

刚果红-考马斯亮蓝培养基: 配制 900.0 mL 不含 NaCl 的 LB 固体培养基、50.0 mL 刚果红溶液(刚果红 0.8 g/L)、50.0 mL 考马斯亮蓝溶液(考马斯亮蓝 0.4 g/L); 分别灭菌并冷却至 60 °C 后,

混匀 3 种溶液并倒入培养皿中制成平板。

选择性培养基(g/L): K₂HPO₄ 10.500, KH₂PO₄ 4.500, 甘露醇 2.000, (NH₄)₂SO₄ 2.000, MgSO₄·7H₂O 0.200, CaCl₂ 0.010, FeSO₄ 0.005, MnCl₂ 0.002, 甘油 2.000, pH 7.0。固体培养基加 10.0 g/L 琼脂粉。根据需要, 按以下浓度在培养基内添加抗生素(μg/mL): 庆大霉素(Gm) 20.0; 氨苄青霉素(Amp) 100.0; 氯霉素(Cm) 34.0。

Cel 检测培养基(g/L): Na₃PO₄ 3.8, 羧甲基纤维素 1.0, 琼脂粉 8.0, pH 7.0。

Pel 检测培养基(g/L): 酵母提取物 10.000 0, 聚半乳糖醛酸 10.000 0, Tris-HCl 4.844 8, CaCl₂ 0.112 5, 琼脂粉 8.000 0, pH 8.5。

Prt 检测培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 细菌蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 脱脂奶粉 10.0, pH 7.0。

检测细菌涌动能力的固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 5.0, NaCl 5.0, 琼脂粉 4.0, pH 7.0。

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant phenotypes and characteristics	Reference or source
<i>Dickeya zeae</i>		
MS1	Wild-type of <i>Dickeya zeae</i>	Lab collection
C45	Tn5 mutant derived from MS1	This study
XT20	Tn5 mutant derived from MS1	This study
Q63	Tn5 mutant derived from MS1	This study
XT120	Tn5 mutant derived from MS1	This study
ΔsucA	A deletion mutant derived from MS1	This study
C-ΔsucA	Complementation strain of ΔsucA	This study
<i>Escherichia coli</i>		
SM10	<i>thi, thr, leu, tonA, lacY, supE, recA::RP4-2-Tc::Mu, λ pir</i>	Lab collection
S17-1	<i>RP4-2(Km:Tn7,Tc::Mu-1), pro-82, LAMpir, recA1, endA1, thiE1, hsdR17, creC510</i>	Lab collection
DH5α	<i>fhuA2, Δ(argF-lacZ)U169, phoA, glnV44, Φ80, Δ(lacZ)M15, gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi-1 hsdR17</i>	Lab collection
Plasmid		
pBT20	The mariner transposon mutagenesis vector; Gm ^R and Amp ^R R6K	[21]
pDS132	Suicide vector with <i>sacB</i> gene; Cm ^R	[22]
pBBR1MCS4	Expression vector contains a <i>lacZ</i> promoter; Amp ^R	[23]

Gm^R、Amp^R、Cm^R 分别表示庆大霉素抗性、氨苄西林抗性和氯霉素抗性。

Gm^R, Amp^R, Cm^R: Indicate resistances to gentamycin, ampicillin, chloramphenicol, respectively.

检测细菌游动能力的固体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 细菌蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 2.5, pH 7.0。

1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 无缝克隆试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; α -酮戊二酸脱氢酶(α -ketoglutarate dehydrogenase, α -KGDH)活性的紫外比色法测定试剂盒, 迪信泰检测科技(北京)有限公司; RNeasy Mini 试剂盒, Qiagen 公司; Taq DNA Polymerase 试剂盒及 2×EasyTaq® PCR SuperMix, 北京全式金生物技术股份有限公司; PrimeScript™ RT 试剂盒及 Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒, TaKaRa 公司。超微量分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司。实时荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.4 转座子插入突变体的产生

参照 Kulasekara 等^[24]的方法, 将携带 Tn5 转座子的质粒 pBT20 通过双亲接合的方式从供体菌株(*E. coli* SM10)转移到受体菌株(*D. zeae* MS1)中, 具体步骤包括: *D. zeae* MS1 野生型在 LB 培养基中 32 °C、180 r/min 培养过夜; *E. coli* 在 LB 培养基中 37 °C、180 r/min 培养过夜。在 5 000 r/min 条件下离心 3 min 后, 收集供体和受体菌株的过夜培养物, 用不含抗生素的新鲜 LB 液体培养基洗涤 2 次并重新悬浮。将供体和受体菌株的细菌悬浮液调整至相同 OD₆₀₀ 并以 4:1 的比例混合, 将混合物点接在 LB 固体培养基上并在 32 °C 孵育 8 h。将培养后的菌体重新悬浮于 LB 液体培养基中, 稀释不同浓度(10 倍、100 倍、1 000 倍)后涂布于添加 20 μ g/mL 庆大霉素的选择性培养基。将 *D. zeae* MS1 野生型和产生的 Tn5 转座子插入突变体在 LB 液体培养基中 32 °C、180 r/min 培养过夜; 点接 1 μ L 细菌培养物至刚果红-考马斯亮蓝培养基上, 32 °C 条件下静置培养 48 h; 比较 *D. zeae* MS1 野生型和 Tn5 转座子插入突变体的表型差异。

1.5 Tn5 突变体的转座子插入位点鉴定

根据质粒 pBT20 序列设计特异引物 Gn-0a、Gn-1a 和 Gn-2a (表 2); 联合使用兼并引物 LAD-1/LAD-2/LAD-3/LAD-4 和 AC1 (表 2)进行热不对称交错 PCR (thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction, TAIL-PCR), 扩增出 Tn5 转座子插入位点的侧翼序列并鉴定到插入位点^[25-26]。参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌 DNA, 使用引物 Gn-0a/LAD (-1/-2/-3/-4)作 TAIL-PCR 预扩增反应。预扩增反应体系(25.0 μ L): 10×PCR buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 引物 Gn-0a/LAD (10.0 μ mol/L) 各 0.5 μ L, DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, DNA 模板(100 ng/ μ L) 1.0 μ L, ddH₂O 18.0 μ L。预扩增反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 3 min, 10 个循环; 72 °C 3 min, 1 个循环; 94 °C 20 s, 58 °C 1 min, 72 °C 3 min, 25 个循环; 72 °C 5 min。用 ddH₂O 将 1.0 μ L 预扩增反应产物稀释 50 倍作为模板进行第 1 轮扩增反应, 引物使用 Gn-1a/AC1。第 1 轮扩增反应体系(25.0 μ L): 10×PCR buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 引物 Gn-1a/AC1 (10.0 μ mol/L) 各 0.5 μ L, DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 稀释 PCR 产物 1.0 μ L, ddH₂O 18.0 μ L。第 1 轮扩增反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 20 s, 65 °C 1 min, 72 °C 3 min, 94 °C 20 s, 68 °C 1 min, 72 °C 3 min, 1 个循环; 94 °C 20 s, 68 °C 1 min, 72 °C 3 min, 94 °C 20 s, 50 °C 1 min, 72 °C 3 min, 13 个循环; 72 °C 5 min。将第 1 轮扩增反应稀释 50 倍作为模板进行第 2 轮扩增反应, 引物使用 Gn-2a/AC1。第 2 轮扩增反应体系(25.0 μ L): 10×PCR buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 引物 Gn-2a/AC1 (10.0 μ mol/L) 各 0.5 μ L, DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 稀释 PCR 产物 1.0 μ L, ddH₂O 18.0 μ L。第 2 轮扩增反应条件: 95 °C 2 min; 94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 3 min; 94 °C 20 s, 58 °C 1 min, 72 °C 3 min, 25 个循环; 72 °C 5 min。在第 2 轮扩增反应产物

表 2 用于 TAIL-PCR、实时荧光定量 PCR 和构建基因敲除突变体、回补菌株的引物及序列

Table 2 Primers used for TAIL-PCR, RT-qPCR, and the construction of deletion mutant and complementation

Primer	Sequence (5'→3')	Description
Gn-0a	GCGGCTTACGTTCTGCCAAGTTTGA	TAIL-PCR
Gn-1a	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCGAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCT	TAIL-PCR
Gn-2a	ATTGCCACCGCGCTCATCAATCTCCT	TAIL-PCR
LAD-1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNNGGAA	TAIL-PCR
LAD-2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNNNNGGTT	TAIL-PCR
LAD-3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNNNCCAA	TAIL-PCR
LAD-4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDBNNNCGGT	TAIL-PCR
AC1	ACGATGGACTCCAGAG	TAIL-PCR
pDS- <i>sucA</i> -F1	GATCCTCTAGAGTCGACCTTCTGGCTCTGTAGCACACTGT	Construction of Δ <i>sucA</i>
pDS- <i>sucA</i> -R1	GGCACCAAATTCGTCCGGTGTGGTGATGTG	mutant
pDS- <i>sucA</i> -F2	ACCGACGAATTTGGTGCCTCGTTGCGG	Construction of Δ <i>sucA</i>
pDS- <i>sucA</i> -R2	CGGGAGAGCTCGATATCGCGTGGTCAACATGGCGGT	mutant
pBBR- <i>sucA</i> -F	CGACGGTATCGATAAGCTGCATGCTGTTGACATCCTGCC	Complementation of
pBBR- <i>sucA</i> -R	CTCTAGAACTAGTGGATCCCGGCAGATCAGGGACAAG	<i>sucA</i>
<i>sucA</i> -JF	GATCCGCTGGGTCTGTGG	Sequencing of Δ <i>sucA</i>
<i>sucA</i> -JR	GACAGTCGCGTCAGCTAC	deletion
pDS132-F	GTTTCTGTTGCATGGGCATAAAG	Universal primer of
pDS132-R	AACAAGCCAGGGATGTAACG	pDS132
MCS-F	TCTTCGCTATTACGCCAGCT	Universal primer of
MCS-R	GGCTCGTATGTTGTGTGGAA	pBBR1MCS4
<i>bglA</i> -qF	GGTTGGATGAGCCGTAA	Detection of <i>bglA</i> gene
<i>bglA</i> -qR	GCCGATACATTCTTCTGGTTA	expression
<i>celH</i> -qF	TGATACAGGACGACTACC	Detection of <i>celH</i> gene
<i>celH</i> -qR	TAAACGCCCACAGCATAT	expression
<i>pelB</i> -qF	GTCCATGCGTACAACAAC	Detection of <i>pelB</i> gene
<i>pelB</i> -qR	CGTCATAGCGTGAGGTTA	expression
<i>pelC</i> -qF	CAACCGCTATAACGACGTGAAC	Detection of <i>pelC</i> gene
<i>pelC</i> -qR	AGACCGGAAGTGGTGACATTG	expression
<i>prtE</i> -qF	CCAGCGAAGGATTAGGTT	Detection of <i>prtE</i> gene
<i>prtE</i> -qR	CCACTAACGATGACTGATTG	expression
<i>prtF</i> -qF	CTACAGCCATTCCAAGGT	Detection of <i>prtF</i> gene
<i>prtF</i> -qR	GTCAGCGTTGATACATAGTTG	expression
<i>hemF</i> -F	GAAATGGTGCGATGATTAC	Detection of <i>hemF</i> gene
<i>hemF</i> -R	ATTGACGATAGGCAGATAG	expression

电泳后,纯化扩增产物并在生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。根据 pBT20 转座子定位序列确定插入的基因序列,比对 *D. zeae* MS1 基因组获取插入的基因信息。

1.6 *sucA* 基因敲除突变体和回补菌株的构建

使用自杀载体 pDS132^[22],通过同源重组方法构建 *D. zeae* MS1 的 *sucA* 基因敲除突变体。

使用 pDS-*sucA* 引物(表 2)扩增 *sucA* 上游(778 bp)和下游(752 bp)的 DNA 片段。*sucA* 上下游片段扩增体系(50.0 μ L): 2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix 25.0 μ L, 引物 pDS-*sucA*-F1/pDS-*sucA*-R1 (或者 pDS-*sucA*-F2/pDS-*sucA*-R2) (10.0 μ mol/L) 各 1.0 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, ddH₂O 22.0 μ L。扩增反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。利用无缝克隆试剂盒将 DNA 片段连接至已用 *Pst* I 和 *Sph* I 双酶切的 pDS132 载体上, 构建出重组质粒(pDS-*sucA*)。在 pDS-*sucA* 转化至 *E. coli* S17-1 后, 参照 1.4 双亲接合方法将 pDS-*sucA* 转移至 *D. zeae* MS1 获得一次交换菌株; 一次交换菌株在 LB 液体培养基中 32 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 24 h 后, 将不同浓度稀释(10、100、1 000 倍)的细菌悬浮液涂布于含 10%蔗糖的 LB 固体培养基上, 筛选二次交换菌株。使用 *sucA*-JF/JR 引物进行菌落 PCR, 筛选已剔除质粒且无抗性基因的 *sucA* 基因敲除突变体。

使用 pBBR-*sucA*-F/R 引物扩增 *D. zeae* MS1 野生型的 *sucA* 基因完整编码序列。扩增反应体系(50.0 μ L): 2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix 25.0 μ L, 引物 pBBR-*sucA*-F/R (10.0 μ mol/L)各 1.0 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, ddH₂O 22.0 μ L。扩增反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。使用无缝克隆试剂盒将纯化的 PCR 产物连接到已用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的 pBBR1MCS4 载体上。参照 1.4 将重组质粒通过双亲接合方法转移至 *sucA* 基因敲除突变体中, 使用 MCS-F/MCS-R 引物进行筛选并获得回补菌株。反应体系(25.0 μ L): 2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix 12.5 μ L, 引物 MCS-F/MCS-R (10.0 μ mol/L)各 0.5 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, ddH₂O 10.5 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.7 细菌生长曲线的测定

将培养过夜的 *D. zeae* MS1 野生型、基因敲

除突变体 Δ *sucA*、回补菌株 C- Δ *sucA* 细菌培养物调整至 OD₆₀₀ 为 1.0, 并按 1%的接种量接种到 LB 或 MM 液体培养基中, 32 $^{\circ}$ C、200 r/min 连续培养, 每隔 2 h 测量其 OD₆₀₀。试验设置 3 次生物学重复。

1.8 α -KGDH 活性的测定

将 *D. zeae* MS1 野生型、基因敲除突变体 Δ *sucA*、回补菌株 C- Δ *sucA* 在 LB 液体培养基中培养至 OD₆₀₀=1.0, 在 5 000 r/min 条件下离心 3 min 收集菌体。向待测样品中加入 1 mL 提取液并置于冰上, 使用超声波破碎(130 W, 工作 5 s, 间隔 10 s) 3 min; 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min 并收集上清液用于活性测定。参照 α -KGDH 活性的紫外比色法测定试剂盒说明书测定细菌的 α -KGDH 活性。试验设置 3 次生物学重复。

1.9 PCWDEs 活性的测定

参考已报道的平板测试方法测定 PCWDEs 的活性^[14,27-28]。将每种酶活性测定的培养基(30 mL)倒入方形平板(120 mm $\times$ 120 mm)中, 在测定平板中心打孔(直径 5 mm), 在每个孔中加入 40 μ L 已调整过的 *D. zeae* MS1 野生型、基因敲除突变体 Δ *sucA*、回补菌株 C- Δ *sucA* 培养物(OD₆₀₀=1.0), 32 $^{\circ}$ C 静置培养 15 h。Cel 检测培养基用 0.1%刚果红染色 20 min, 再用 1 mol/L NaCl 冲洗 2 次; Pel 检测培养基加入 1 mol/L HCl 进行显色; Prt 检测培养基无须进一步处理, 直接测量蛋白水解透明圈。试验设置 3 次生物学重复。

1.10 细菌涌动性和游动性测定

采用平板法测定细菌涌动性和游动性。制作检测细菌涌动能力的固体培养基, 将 1 μ L *D. zeae* MS1 野生型、基因敲除突变体 Δ *sucA*、回补菌株 C- Δ *sucA* 培养物(OD₆₀₀=1.0)点接在固体平板中心, 32 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后测量其涌动直径。制作检测细菌游动能力的固体培养基, 将 1 μ L 细菌培养物(OD₆₀₀=1.0)点接在固体平板中心, 32 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后测量其游动直径。试验设置 3 次生物学重复。

1.11 RNA的提取和RT-qPCR

将 *D. zeae* MS1 野生型、基因敲除突变体 Δ sucA 在 LB 液体培养基中培养至 OD_{600} 为 1.0, 在 5 000 r/min 条件下离心 5 min 收集菌体, 使用 RNeasy Mini 试剂盒提取细菌的 RNA。使用电泳和超微量分光光度计检测 RNA 的完整性、浓度等。使用带有 gDNA Eraser 的 PrimeScriptTM RT 试剂盒合成 cDNA, 以 100.0 ng cDNA 作为 RT-qPCR 模板。反应体系: 2×Premix Ex TaqTM II 12.5 μ L, 基因特异引物(bglA-qF/R, celH-qF/R, pelB-qF/R, pelC-qF/R, prtE-qF/R, prtF-qF/R, hemF-F/R) (10.0 μ mol/L)各 1.0 μ L, cDNA 100.0 ng, ddH₂O 补足 25.0 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。RT-qPCR 结束后, 直接进行溶解曲线反应。以 *hemF* 基因作为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算目标基因的相对表达量。

1.12 烟草叶片和香蕉幼苗上的致病性测定

将 *D. zeae* MS1 野生型、基因敲除突变体 Δ sucA、回补菌株 C- Δ sucA 在 LB 液体培养基中培养过夜, 5 000 r/min 条件下离心 3 min 后收集菌体并重新悬浮于 ddH₂O 中, 调整细菌培养物至 OD_{600} 为 0.3。使用一次性注射器(无针头)将 100.0 μ L 细菌培养物浸润入烟草叶片; 以接种 ddH₂O 的叶片作为阴性对照。接种 24 h 后, 观察烟叶过敏性反应症状; 试验设置 3 次生物学重复。

在香蕉致病性检测方面, 选择生长一致的香蕉苗, 使用一次性注射器(带针头)将 200.0 μ L 细菌培养物注射入香蕉茎基部, 放置于温室中并保持 25–30 $^{\circ}$ C 的室温, 定期观察症状并于 7 d 后统计发病情况; 以接种 ddH₂O 的幼苗作为阴性对照; 试验设置 10 次生物学重复。发病严重程度可按照 0–4 的等级进行划分: 0 表示未出现症状; 1 表示茎部低于 25% 的面积出现软腐症状; 2 表示 25%–50% 的茎部面积出现软腐症状; 3 表示 50%–75% 的茎部面积出现软腐症状; 4 表示 75%–100% 的茎部面积出现软腐症状。病

情指数计算如下: 病情指数=[$\sum$ (发病植株数量×对应的发病等级)/(植株总数×4)]×100。

1.13 统计分析

使用 GraphPad Prism 7 软件进行平均值、标准误差和差异显著性检验等统计分析, 应用单因素方差分析进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 Tn5 转座子插入位点鉴定结果

在 *D. zeae* MS1 的 Tn5 转座子插入突变体库中筛选到 XT20、C45、XT120 和 Q63 这 4 个毒力减弱突变体, 突变体基本丧失致病性(Tn5 插入 *sucA* 基因突变体对香蕉的毒力变化图片, 已提交至国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDCNMDCX0001751, <https://nmhc.cn/resource/attachment/detail/NMDCX0001751>)。该 4 个 Tn5 转座子插入突变体在刚果红-考马斯亮蓝培养基上表现出较为相似的表型, 相较于野生型, 均表现菌落变小、边缘平滑且颜色变浅(Tn5 插入 *sucA* 基因突变体在刚果红-考马斯亮蓝平板上的菌落形态变化图片, 编号为 NMDCNMDCX0001751)。使用突变体的基因组 DNA 进行 TAIL-PCR 扩增、测序发现, Tn5 转座子在该 4 个突变体中均是插入了同一个基因 *sucA* 的不同位点: XT20, 第 1 870 bp; C45, 第 1 923 bp; XT120, 第 2 241 bp; Q63, 第 2 373 bp (图 1A)。在 *D. zeae* MS1 基因组中, *sucA* 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)长度为 2 808 bp, 编码 935 aa 组成的 α -酮戊二酸脱氢酶组分; 该基因与 *D. dadantii* 3937 菌株的 *sucA* 基因序列具有 89% 的同源性。*sucA* 基因广泛分布于肠杆菌目不同科的细菌中, SucA 蛋白序列的系统发育树分析表明迪克氏菌属(*Dickeya*)菌株和果胶杆菌属(*Pectobacterium*)菌株的遗传距离最近且可聚成一个遗传分支, 该遗传分支与欧文氏菌属(*Erwinia*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)等的代表性菌株可明显得到区分(图 1B)。

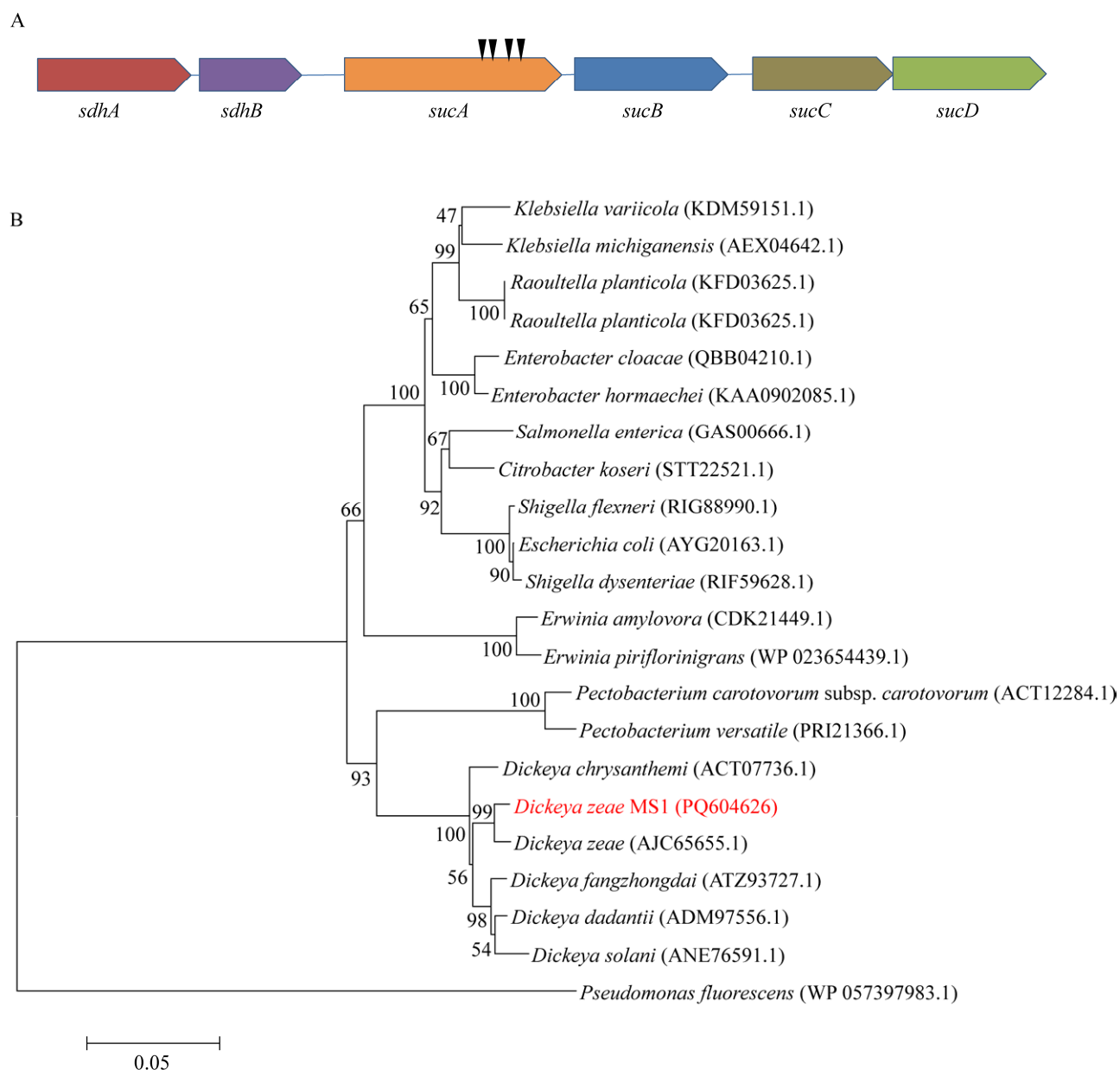


图1 Tn5 转座子插入的 *sucA* 基因及其系统发育树分析 A: 示意图显示 Tn5 转座子插入 *D. zeae* MS1 *sucA* 基因的不同位点, 黑色箭头从左至右分别表示突变体 XT20、C45、XT120 和 Q63 的插入位点; B: 基于 *SucA* 蛋白序列的系统发育树分析, 菌株拉丁名后括号内是 GenBank 序列号, 分支点上的数字代表该其 bootstrap 值(以百分比形式展示), 标尺数字代表该长度的分支所代表的基因遗传变异度。

Figure 1 The *sucA* gene inserted with Tn5 transposon and the phylogenetic tree. A: Schematic of the transposon insertions at gene *sucA* within *D. zeae* MS1 wild-type, black arrows from left to right represent the transposon insertion sites of mutations XT20, C45, XT120, and Q63; B: The phylogenetic tree based on *SucA* protein sequences, the GenBank accession numbers are enclosed in parentheses after the Latin name of the strains, the numbers at the nodes of different branches in the phylogenetic tree indicate the bootstrap values that are displayed in the form of percentage, and the number of scale bar indicates the variability of the gene sequences represented by the branch of this determined length.

2.2 *sucA* 基因突变对 α -酮戊二酸脱氢酶活性和细菌生长的影响

相较于 *D. zeae* MS1 野生型, 基因敲除突变体 Δ *sucA* 的 α -酮戊二酸脱氢酶活性完全丧失, 这与该基因预期的生物功能一致; 回补菌株 C- Δ *sucA* 的 α -酮戊二酸脱氢酶活性则可恢复至与野生型相近的水平(图 2A)。在对细菌生长的影响方面, 研究发现 Δ *sucA* 在 LB 培养基内细菌生长密度较野生型和回补菌株表现出一定程度的降低; 在生长平台期时 Δ *sucA* 培养物的 OD₆₀₀ 为 1.50–1.60, 野生型和 C- Δ *sucA* 的 OD₆₀₀ 分别为 2.06–2.20 和 1.95–2.08 (图 2B)。当细菌在 MM 培养基中培养时, Δ *sucA* 在前期表现出一定程度的生长延迟; 在生长 14 h 后达到生长平台期时, Δ *sucA* 达到与野生型和 C- Δ *sucA* 接近的细菌生长密度(图 2C)。*sucA* 突变可完全破坏 *D. zeae* MS1 的 α -酮戊二酸脱氢酶活性, 但仅在一定程度上影响细菌生长。

2.3 *sucA* 基因突变降低 PCWDEs 的分泌

相较于 *D. zeae* MS1 野生型, Δ *sucA* 在测定平板培养后的 Cel、Pel 和 Prt 的活性分别降低了 44.25%、40.60% 和 97.48%, 差异达到显著水平 ($P < 0.05$); C- Δ *sucA* 菌株则将 PCWDEs 活性恢复至与野生型相似的水平(图 3A–3C)。*sucA* 基因对于香蕉细菌性软腐病菌分泌 PCWDEs 具有重要作用, RT-qPCR 分析也表明 *sucA* 基因突变可影响编码 PCWDEs 基因的转录表达。相较野生型, 编码 Pel 的基因 *pelB* 和 *pelC* 在 Δ *sucA* 中的转录水平显著降低; 但是, *sucA* 基因的突变对编码 Cel 的 *bglA* 和 *celH* 基因、编码 Prt 的 *prtE* 和 *prtF* 基因的转录表达均不产生明显的抑制作用(图 3D)。

2.4 *sucA* 基因突变不影响细菌运动性

在细菌运动性方面, *D. zeae* MS1 野生型表现出良好的涌动性和游动性。相较于野生型, Δ *sucA* 的涌动性和游动性均表现出相似的运动水平, 回补菌株 C- Δ *sucA* 也呈现与它们相似的细菌运动能力(图 4)。*sucA* 基因的敲除突变并未降低细菌的涌动性和游动性。

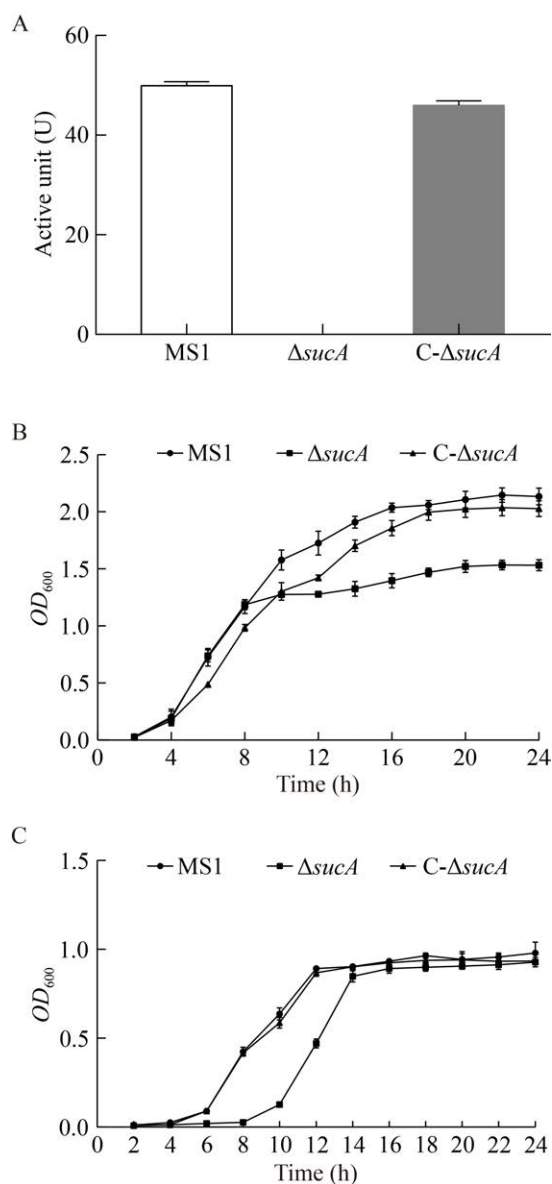


图 2 细菌的 α -酮戊二酸脱氢酶活性和生长曲线
A: *D. zeae* MS1 野生型、基因敲除突变体 Δ *sucA* 和回补菌株 C- Δ *sucA* 的 α -酮戊二酸脱氢酶活性差异;
B: 细菌在 LB 培养基内培养的生长曲线差异; C: 细菌在 MM 培养基内培养的生长曲线差异。

Figure 2 Bacterial α -KGDH activity and their growth curves. A: The difference in activity of α -KGDH among *D. zeae* MS1 wild-type strain, in-frame deletion mutant Δ *sucA*, and the complementation strain C- Δ *sucA*; B: The difference in bacterial growth curves when they were grown in LB medium; C: The difference in bacterial growth curves when they were grown in MM medium.

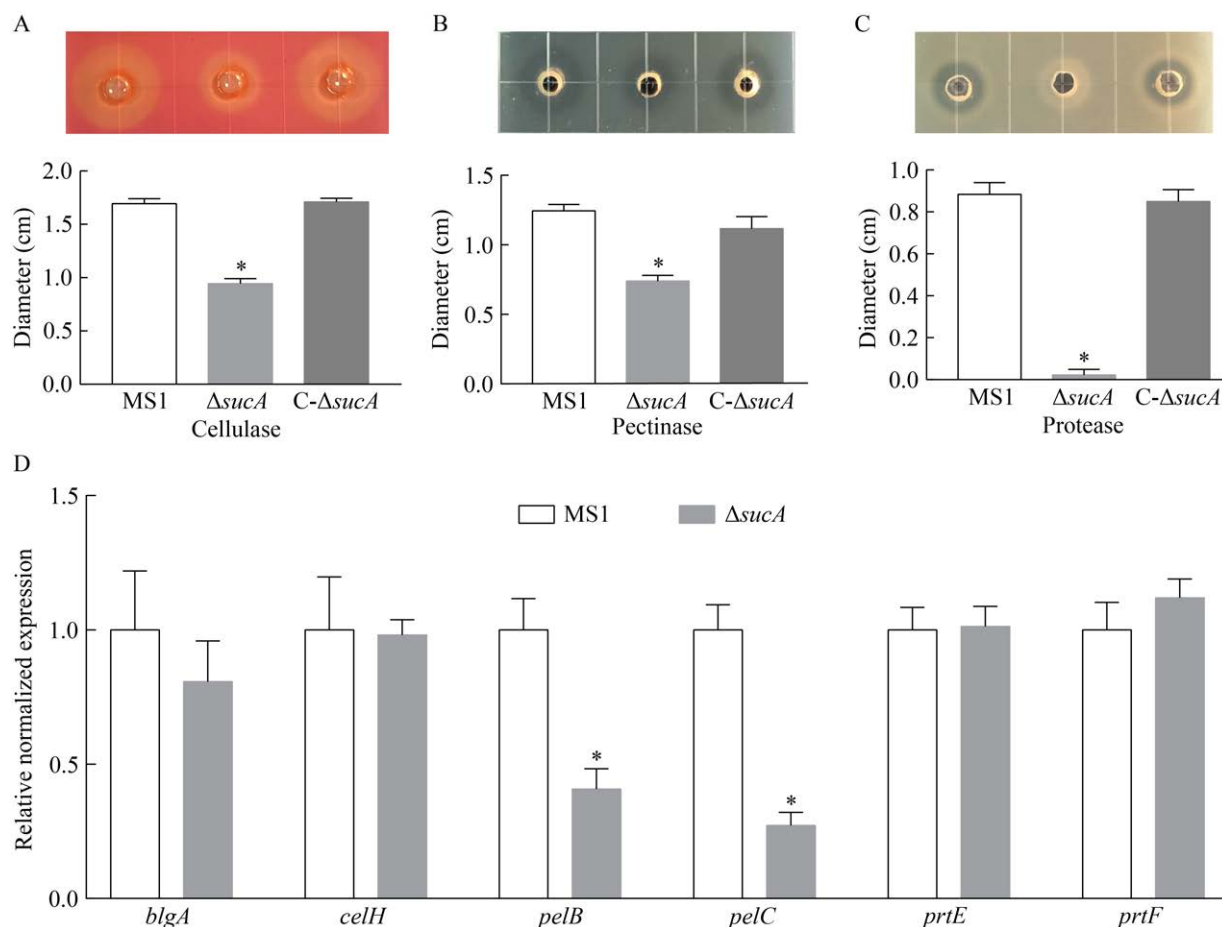


图3 植物细胞壁降解酶分泌及相关基因表达的差异 A: *D. zeae* MS1 野生型、基因敲除突变体 $\Delta sucA$ 和回补菌株 C- $\Delta sucA$ 的纤维素酶活性; B: 果胶裂解酶活性; C: 蛋白酶活性; D: 植物细胞壁降解酶编码基因的转录表达, *blgA* 和 *celH* 编码 Cel, *pelB* 和 *pelC* 编码 Pel, *prtE* 和 *prtF* 编码 Prt。

Figure 3 The activities of PCWDEs and the expression of the related genes. A: The activities of cellulose (Cel) secreted by *D. zeae* MS1 wild-type strain, in-frame deletion mutant $\Delta sucA$, and the complementation strain C- $\Delta sucA$; B: The activities of pectate lyase (Pel); C: The activities of protease (Prt); D: Transcriptional expression of genes encoding PCWDEs, *blgA* and *celH* encode Cel, *pelB* and *pelC* encode Pel, and *prtE* and *prtF* encode Prt. *: $P < 0.05$.

2.5 *sucA* 基因突变可影响细菌的毒力

在对非寄主烟草的过敏性反应上, *D. zeae* MS1 野生型在浸润接种至烟草叶片后可产生组织坏死等典型的过敏性反应, 接种 $\Delta sucA$ 的烟草叶片仅表现出微弱的过敏性反应, 两者间的反应差异明显(图 5A); C- $\Delta sucA$ 可恢复突变体在烟草上诱导产生过敏性反应的能力。在对寄主香蕉的致病性反应上, 接种 *D. zeae* MS1 野生型和 C- $\Delta sucA$ 的香蕉幼苗在 3 d 后均可呈现

出细菌性软腐病症状, 具体表现为假茎基部变褐和新叶开始失绿; 在接种 7 d 后, 多数香蕉幼苗均已呈现明显的症状, 具体表现为假茎腐烂、变黑并出现水渍状病斑, 新叶也表现出明显枯萎甚至整叶坏死(图 5B)。相反地, 接种 $\Delta sucA$ 的香蕉幼苗在 7 d 后仍然表现整株健康, 在接种处未出现明显的细菌性软腐病症状(图 5B)。接种 7 d 后, 香蕉幼苗发病严重程度的等级划分表明野生型和回补菌株可引起全部已接种幼

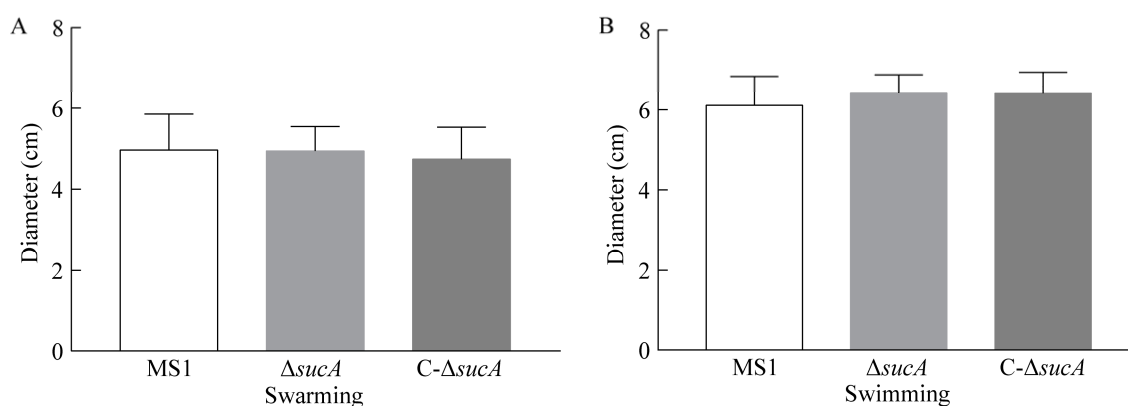


图 4 细菌运动性 A: 涌动力; B: 游动力。

Figure 4 Bacterial motility. A: Swarming motility; B: Swimming motility.

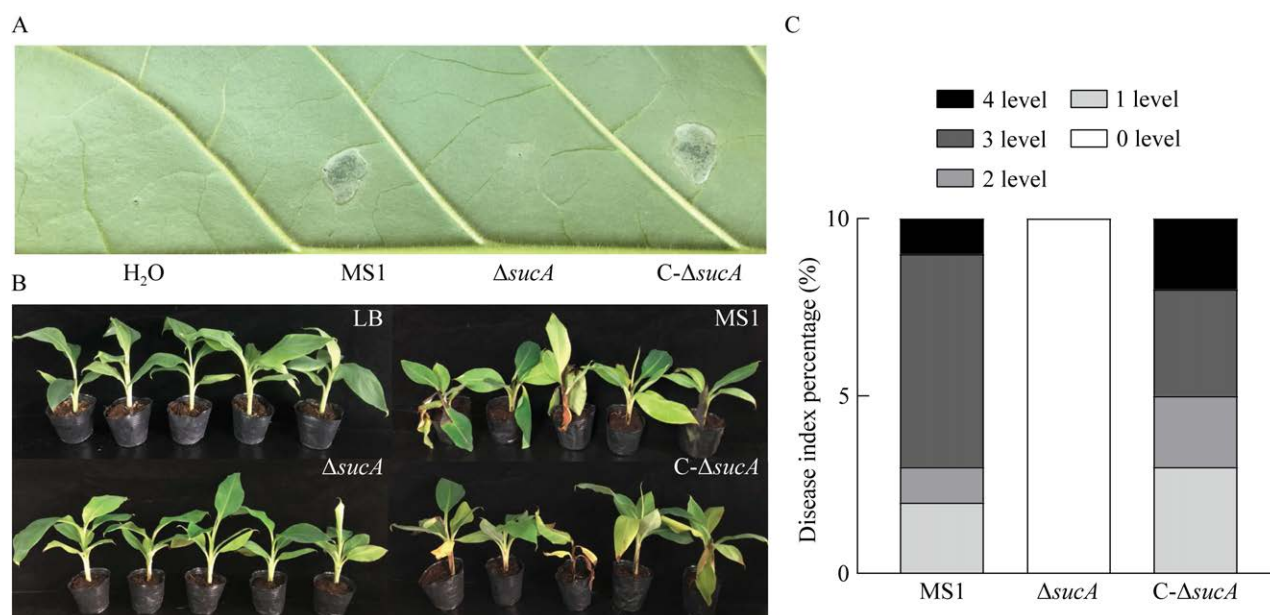


图 5 细菌的过敏性反应和致病性反应测定 A: *D. zea* MS1 野生型、基因敲除突变体 $\Delta sucA$ 和回补菌株 C- $\Delta sucA$ 接种烟叶 24 h 后的过敏性反应; B: 细菌接种香蕉幼苗 7 d 后的致病性反应; C: 接种 7 d 后香蕉幼苗发病严重程度分级的分布, 0-4 代表发病严重程度的不同等级。

Figure 5 Determination of hypersensitive reaction and pathogenicity of bacterial strains. A: Hypersensitive reaction on tobacco leaves after 24 hours of inoculation with *D. zea* MS1 wild-type strain, in-frame deletion mutant $\Delta sucA$, and the complementation strain C- $\Delta sucA$; B: Pathogenicity on banana seedlings after 7 days of inoculation with tested bacteria; C: The distribution of scores of diseased severity of different banana seedlings after 7 days of inoculation, 0-4 indicate different scores reflecting the diseased severity.

苗出现症状, 7 株接种野生型的幼苗达到了 3 级以上的症状, 5 株接种回补菌株的幼苗达到了 3 级以上的症状; 接种 $\Delta sucA$ 的幼苗则均未出现症

状(0 级) (图 5C)。接种野生型和回补菌株的香蕉幼苗的病情指数分别为 62.50%和 60.00%, 接种 $\Delta sucA$ 的幼苗的病情指数为 0。

3 讨论

TCA 循环是以乙酰辅酶 A 为底物,使用 8 种不同酶催化每一步反应,最终生成草酰乙酸和 2 份的 CO_2 (<https://www.britannica.com/science/tricarboxylic-acid-cycle>)。已有研究发现 TCA 反应过程中酶的活性或中间产物的产生可调控细菌的生物被膜形成、多糖细胞间黏附素合成、持久性细胞形成及细菌毒力等^[29-31]。然而,与植物病原细菌 TCA 循环相关的研究报道则非常少,仅见到 TCA 循环可影响植物病原细菌丁香假单胞菌番茄致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)对拟南芥的毒力^[32]以及 *D. dadantii* 对大白菜和马铃薯的毒力^[20]。

在 TCA 反应过程中, α -KGDH 是催化 α -酮戊二酸氧化脱羧反应的关键酶,进而形成琥珀酰辅酶 A 和 CO_2 ,同时伴随 NADH 的产生; α -KGDH 缺乏会影响 α -酮戊二酸向琥珀酰辅酶 A 的转化。 α -KGDH 是一种由 E1、E2 和 E3 亚基共同组成的复合酶,其中 E1 亚基由 *sucA* 基因编码。Zhao 等^[33]发现了 *sucA* 基因可影响多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)对碳源的利用效率和菌株自身存活率。在 *E. coli* 中,*sucA* 基因突变可直接影响与 TCA 循环相关的酶活性和胞内代谢产物浓度^[34];该基因在 *ymdB* 基因的调控下可下调表达,进而影响细菌生物被膜的形成、降低抗生素耐药性^[19]。细菌生物被膜、耐药性等细菌表型的变化表明了 *sucA* 基因与细菌毒力相关,Yi 等^[35]研究也发现 *sucA* 基因的突变可显著减弱苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)对昆虫的毒力。然而,关于 *sucA* 基因作用于细菌毒力的研究仍然较少,特别是尚未见该基因在植物病原细菌中的生物学功能的相关报道。因此,本研究首次在植物病原细菌中开展了 *sucA* 基因的生物学功能研究,明确该基因对 *D. zea* 细菌毒力的影响可为进一步研究 TCA 循环调控细菌和寄主植物互作提供研究依据,并为植物病原菌致病机制

提供新的见解。

本研究通过基因敲除突变和遗传互补的功能验证方法明确了 *sucA* 在香蕉细菌性软腐病菌 *D. zea* MS1 中可决定 α -KGDH 生成和活性的生物功能(图 2A)。在 *Dickeya* 中, *D. zea* MS1 与菊迪克氏菌(*D. chrysanthemi*)、*D. dadantii*、方中达迪克氏菌(*D. fangzhongdai*)和茄迪克氏菌(*D. solani*)的代表性菌株的 SucA 蛋白序列是高度保守的,相似性达到 96%–97%。与溶果胶菌科的另一成员 *Pectobacterium* 菌株进行比对,发现 *D. zea* MS1 的 SucA 蛋白序列与胡萝卜果胶杆菌(*P. carotovorum*)和多功能果胶杆菌(*P. versatile*)的代表性菌株同样具有较高的相似性(88%)。尽管 SucA 蛋白序列的系统发育树分析表明 *Dickeya* 和 *Pectobacterium* 与肠杆菌目其他属细菌具有明显区别, *D. zea* MS1 与 *Klebsiella*、拉乌尔菌属(*Raoultella*)、*Enterobacter*、枸橼酸杆菌属(*Citrobacter*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、志贺菌属(*Shigella*)、*Escherichia*、*Erwinia* 和 *Edwardsiella* 等不同属的代表菌株仍然具有较高的相似性(83%–89%), *D. zea* MS1 与其他目的细菌如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)则仅有中等相似性(59%)。这些表明 *sucA* 基因在包括 *E. coli* 在内的肠杆菌目细菌中广泛存在且较为保守,在该类细菌中可能具有相似的分子作用机制。本研究在 Tn5 转座子插入突变体库中随机筛选到多个插入到 *sucA* 基因不同位点而引起毒力显著减弱的突变体;然而,关于 *sucA* 基因影响植物病原细菌毒力的研究也未见相关报道。因此,本研究需进一步分析 *sucA* 基因突变减弱细菌性软腐病菌毒力与哪一类毒力因子相关。

在细菌性软腐病菌重要毒力因子 PCWDEs 中, T2SS 分泌的 Pel 和 Cel 是造成软腐症状的“强大火力”^[36],而 T1SS 分泌的 Prt 也可破坏植物细胞壁的完整性或者影响病原菌分泌蛋白的活性^[37]。在本研究中, *sucA* 基因突变致使 Pel、Cel 和 Prt 均显著减少分泌,该表型的变化可能

是 *sucA* 基因突变体的毒力基本丧失的重要原因。已有研究表明, *D. dadantii* 中编码延胡索酸酶的 *fumA* 和编码琥珀酸脱氢酶的 *sdhCDAB* 等 TCA 循环相关基因的突变可降低细胞内 c-di-GMP 的产生并提高 Pel 的产生^[20], 该结果不同于本研究发现的 *sucA* 基因突变致使 PCWDEs 分泌显著降低。对此, 本研究比较了 c-di-GMP 合成关键酶二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGC)的编码基因 *gcpA*^[38]的转录水平变化, 发现该基因在突变体与野生型间并未表现明显转录表达差异。在 *D. zeae* 中, DGC 蛋白可通过调控整合宿主因子(integration host factor, IHF)来改变 c-di-GMP 水平, 进而影响细菌的游动性和 Pel 与 Prt 的活性^[39]。然而, 本研究发现 *sucA* 基因敲除突变体的细菌运动性并未与 PCWDEs 一样受到影响, *sucA* 基因敲除突变体的细菌涌动性和游动性与野生型均无明显差异, 均表现良好的细菌运动性。*D. dadantii* 的 *fumA* 和 *sdhCDAB* 的基因突变可改变 c-di-GMP 的胞内水平并影响其运动性^[20], *sucA* 基因的突变则并未影响 c-di-GMP 合成关键酶基因 *gcpA* 的表达和细菌运动性。因此, 与 *fumA* 和 *sdhCDAB* 等 TCA 相关基因不同, *sucA* 对 PCWDEs 分泌的影响应是通过不同的作用途径来实现。后续开展 *sucA* 影响 *D. zeae* 分泌 PCWDEs 的作用机制研究可进一步完善 TCA 循环调控细菌性软腐病菌的生长和毒力等方面的基础理论, 并有助于制定细菌性软腐病病害防控的新策略。

TCA 循环主要受到可用底物的浓度和酶蛋白的变构调节等方面的调控, 在整个反应过程中会产生多种不同的中间体且参与的酶也具有复杂多样的功能^[20]。 α -酮戊二酸是平衡碳代谢和氮代谢的关键代谢产物, α -酮戊二酸的积累是对氮限制的常见反应^[40]。*sucA* 基因的突变可引起 α -酮戊二酸的积累, 进而可能导致细菌体内代谢异常。细菌代谢活动对其在寄主体内定殖、侵染、致病至关重要, 也是决定细菌毒力的关键因子^[41]。因此, *sucA* 基因的突变所引起

的细菌毒力显著减弱应该是多种毒力影响因素受到干扰引起的, 包括 PCWDEs 和细菌代谢等。研究 *sucA* 影响 *D. zeae* 毒力因子 PCWDEs 分泌的作用机制可先探讨 α -酮戊二酸积累引起的代谢异常是否致使 PCWDEs 的分泌显著减少。

4 结论

本研究利用 Tn5 转座子插入突变体库筛选到菌落表型变异较为一致且毒力显著减弱的 4 个突变体, TAIL-PCR 鉴定到该 4 个突变体均为插入 *sucA* 基因产生的。*sucA* 基因的敲除突变致使细菌的 α -KGDH 活性完全丧失并显著减少 PCWDEs 的分泌, 进而降低细菌对烟叶的过敏性反应和香蕉的致病性; 与在 *D. dadantii* 中已报道 2 个 TCA 循环基因 *fumA* 和 *sdhCDAB* 的功能不同, *sucA* 基因不引起 PCWDEs 的分泌增加, 也不影响细菌的涌动和游动能力。因此, 明确 TCA 循环相关基因对于细菌毒力的影响, 可为进一步完善细菌性软腐病菌致病机制提供研究依据。

作者贡献声明

蒋尚伯: 实验方法设计, 各项实验实施和数据分析, 论文初稿撰写; 孙大元: 各项实验实施和数据分析, 论文初稿撰写; 沈会芳: 细菌培养, 细菌代谢、毒力等实验实施和数据分析; 蒲小明: Tn5 突变体库构建, 基因敲除突变体和回补菌株的构建; 刘平平: 基因表达荧光定量 PCR 检测; 林壁润: 数据分析和论文审阅与修订; 杨祁云: 数据分析和论文审阅与修订; 张景欣: 研究内容设计, 研究资金获取, 论文初稿撰写, 论文审阅与修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] HU M, LI JL, CHEN RT, LI WJ, FENG LW, SHI L,

- XUE Y, FENG XY, ZHANG LH, ZHOU JN. *Dickeya zeae* strains isolated from rice, banana and *Clivia* rot plants show great virulence differentials[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 136.
- [2] LI JL, HU M, XUE Y, CHEN X, LU GT, ZHANG LH, ZHOU JN. Screening, identification and efficacy evaluation of antagonistic bacteria for biocontrol of soft rot disease caused by *Dickeya zeae*[J]. Microorganisms, 2020, 8(5): 697.
- [3] ZHANG JX, ARIF M, SHEN HF, HU J, SUN DY, PU XM, YANG QY, LIN BR. Genomic divergence between *Dickeya zeae* strain EC2 isolated from rice and previously identified strains, suggests a different rice foot rot strain[J]. PLoS One, 2020, 15(10): e0240908.
- [4] ZHANG JX, SHEN HF, PU XM, LIN BR, HU J. Identification of *Dickeya zeae* as a causal agent of bacterial soft rot in banana in China[J]. Plant Disease, 2014, 98(4): 436-442.
- [5] LIN BR, SHEN HF, PU XM, TIAN XS, ZHAO WJ, ZHU SF, DONG MM. First report of a soft rot of banana in China's mainland caused by a *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*)[J]. Plant Disease, 2010, 94(5): 640.
- [6] ZHOU JN, ZHANG HB, WU JE, LIU QG, XI PG, LEE J, LIAO JL, JIANG ZD, ZHANG LH. A novel multidomain polyketide synthase is essential for zeamine production and the virulence of *Dickeya zeae*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24(10): 1156-1164.
- [7] JIANG SB, ZHANG JX, YANG QY, SUN DY, PU XM, SHEN HF, LI QQ, WANG ZW, LIN BR. Antimicrobial activity of natural plant compound carvacrol against soft rot disease agent *Dickeya zeae*[J]. Current Microbiology, 2021, 78(9): 3453-3463.
- [8] HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N, CONDEMIN G, NASSER W, REVERCHON S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*[J]. Annual Review of Microbiology, 1996, 50: 213-257.
- [9] NASSER W, BOUILLANT ML, SALMOND G, REVERCHON S. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expl-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules[J]. Molecular Microbiology, 1998, 29(6): 1391-1405.
- [10] NASSER W, DOREL C, WAWRZYNIAK J, van GIJSEGEM F, GROLEAU MC, DÉZIEL E, REVERCHON S. Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of *Dickeya dadantii*[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(3): 865-880.
- [11] 黄宁, 张景欣, 蒲小明, 沈会芳, 杨祁云, 王忠文, 林壁润. 香蕉细菌性软腐病菌生物被膜形成特性[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(5): 82-89.
- HUANG N, ZHANG JX, PU XM, SHEN HF, YANG QY, WANG ZW, LIN BR. Biofilm formation characteristics of *Dickeya zeae* MS1[J]. Journal of China Agricultural University, 2019, 24(5): 82-89 (in Chinese).
- [12] HUANG N, PU XM, ZHANG JX, SHEN HF, YANG QY, WANG ZW, LIN BR. *In vitro* formation of *Dickeya zeae* MS1 biofilm[J]. Current Microbiology, 2019, 76(1): 100-107.
- [13] REVERCHON S, MUSKHELISVILI G, NASSER W. Virulence program of a bacterial plant pathogen: the *Dickeya* model[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2016, 142: 51-92.
- [14] LV MF, CHEN YF, LIAO LS, LIANG ZB, SHI ZR, TANG YX, YE SX, ZHOU JN, ZHANG LH. Fis is a global regulator critical for modulation of virulence factor production and pathogenicity of *Dickeya zeae*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 341.
- [15] ZHOU JN, ZHANG HB, LV MF, CHEN YF, LIAO LS, CHENG YY, LIU SY, CHEN SH, HE F, CUI ZN, JIANG ZD, CHANG CQ, ZHANG LH. SlyA regulates phytotoxin production and virulence in *Dickeya zeae* EC1[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(9): 1398-1408.
- [16] LV MF, CHEN YF, HU M, YU QL, DUAN C, YE SX, LING JF, ZHOU JN, ZHOU XF, ZHANG LH. OhrR is a central transcriptional regulator of virulence in *Dickeya zeae*[J]. Molecular Plant Pathology, 2022, 23(1): 45-59.
- [17] MERCADO-LUBO R, GAUGER EJ, LEATHAM MP, CONWAY T, COHEN PS. A *Salmonella enterica* serovar typhimurium succinate dehydrogenase/fumarate reductase double mutant is avirulent and immunogenic in BALB/c mice[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(3): 1128-1134.
- [18] DAHAL N, ABDELHAMED H, LU J, KARS I A, LAWRENCE ML. Effect of multiple mutations in tricarboxylic acid cycle and one-carbon metabolism pathways on *Edwardsiella ictaluri* pathogenesis[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 169(1/2): 107-112.
- [19] KIM M, KIM M, KIM KS. YmdB-mediated down-regulation of *SucA* inhibits biofilm formation and induces apramycin susceptibility in *Escherichia coli*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 483(1): 252-257.
- [20] YUAN XC, ZENG Q, XU JS, SEVERIN GB, ZHOU X, WATERS CM, SUNDIN GW, IBEKWE AM, LIU FQ, YANG CH. Tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes and intermediates modulate intracellular cyclic di-GMP levels and the production of plant cell wall-degrading enzymes in soft rot pathogen *Dickeya dadantii*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2020, 33(2): 296-307.
- [21] LV MF, HU M, LI P, JIANG ZD, ZHANG LH, ZHOU JN. A two-component regulatory system VfmH modulates multiple virulence traits in *Dickeya zeae*[J]. Molecular Microbiology, 2019, 111(6): 1493-1509.
- [22] PHILIPPE N, ALCARAZ JP, COURANGE E, GEISELMANN J, SCHNEIDER D. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria[J]. Plasmid, 2004, 51(3): 246-255.
- [23] KOVACH ME, ELZER PH, STEVEN HILL D, ROBERTSON GT, FARRIS MA, ROOP RM, PETERSON KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes[J]. Gene, 1995, 166(1): 175-176.
- [24] KULASEKARA HD, VENTRE I, KULASEKARA BR, LAZDUNSKI A, FILLOUX A, LORY S. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes[J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(2): 368-380.
- [25] LIU YG, CHEN YL. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. BioTechniques, 2007,

- 43(5): 649-650, 652, 654 passim.
- [26] 冯起顺. 绿脓杆菌集成型群体感应系统相关基因的筛选与功能研究[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2016.
- FENG QS. Screening and functional analysis of the integrated quorum sensing system related genes of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [27] CHATTERJEE A, CUI Y, LIU Y, DUMENYO CK, CHATTERJEE AK. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(5): 1959-1967.
- [28] CALDAS C, CHERQUI A, PEREIRA A, SIMÕES N. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(3): 1297-1304.
- [29] SADYKOV MR, OLSON ME, HALOUSKA S, ZHU YF, FEY PD, POWERS R, SOMERVILLE GA. Tricarboxylic acid cycle-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin synthesis[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(23): 7621-7632.
- [30] ZHU YF, XIONG YQ, SADYKOV MR, FEY PD, LEI MG, LEE CY, BAYER AS, SOMERVILLE GA. Tricarboxylic acid cycle-dependent attenuation of *Staphylococcus aureus* in vivo virulence by selective inhibition of amino acid transport[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(10): 4256-4264.
- [31] WANG Y, BOJER MS, GEORGE SE, WANG ZH, JENSEN PR, WOLZ C, INGMER H. Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 10849.
- [32] MELLGREN EM, KLOEK AP, KUNKEL BN. Mqo, a tricarboxylic acid cycle enzyme, is required for virulence of *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000 on *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(9): 3132-3141.
- [33] ZHAO DY, LI H, CUI YR, TANG SY, WANG CQ, DU BH, DING YQ. MsmR1, a global transcription factor, regulates polymyxin synthesis and carbohydrate metabolism in *Paenibacillus polymyxa* SC2[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1039806.
- [34] LI M, HO PY, YAO SJ, SHIMIZU K. Effect of *SucA* or *sucC* gene knockout on the metabolism in *Escherichia coli* based on gene expressions, enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic fluxes by ¹³C-labeling experiments[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 30(3): 286-296.
- [35] YI ZX, ZHANG T, XIE JY, ZHU ZR, LUO SS, ZHOU KX, ZHOU PJ, CHEN WH, ZHAO XL, SUN YJ, XIA LQ, DING XZ. iTRAQ analysis reveals the effect of *gabD* and *SucA* gene knockouts on lysine metabolism and crystal protein formation in *Bacillus thuringiensis*[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(4): 2230-2243.
- [36] TOTH IK, BIRCH PR. Rotting softly and stealthily[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8(4): 424-429.
- [37] HOMMAIS F, OGER-DESFEUX C, van GIJSEGEM F, CASTANG S, LIGORI S, EXPERT D, NASSER W, REVERCHON S. PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(22): 7508-7522.
- [38] SCHIRMER T, JENAL U. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(10): 724-735.
- [39] CHEN XF, YU CP, LI SC, LI XW, LIU QG. Integration host factor is essential for biofilm formation, extracellular enzyme, zeamine production, and virulence in *Dickeya zeae*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2019, 32(3): 325-335.
- [40] DOUCETTE CD, SCHWAB DJ, WINGREEN NS, RABINOWITZ JD. α -ketoglutarate coordinates carbon and nitrogen utilization via enzyme I inhibition[J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7(12): 894-901.
- [41] ROHMER L, HOCQUET D, MILLER SI. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis[J]. Trends in Microbiology, 2011, 19(7): 341-348.