

欧美杨溃疡病病原细菌 *Brenneria quercina* N2-5 中 III 型分泌系统与致病性的关系

杨莉¹, 张力群², 贺伟^{1*}

(北京林业大学森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083,
中国农业大学农业部植物病理学重点开放实验室, 北京 100193)

摘要: 欧美杨溃疡病是由 *Brenneria quercina* (= *Erwinia quercina*) 引起的一种细菌性病害。该病害早期的症状表现为杨树树干形成层被破坏, 随后树木皮层开裂、从裂缝中流出大量汁液、树干韧皮部局部坏死, 感病树木病部枝条和树干顶梢枯死, 树木材积和其他可利用部分减少, 严重影响树木的健康生长。 *B. quercina* N2-5 菌株是分离自河南濮阳自然发病的中林 46 杨 (*Populus × euramericana* ‘zhonglin 46’) 的致病菌株。为了明确病害发生的机制, 开展了病原物致病因子的研究。

III 型分泌系统 (Type III secretion system, T3SS) 是病原细菌与致病性密切相关的分泌系统, T3SS 针状装置连接了细菌细胞和宿主细胞, 大多 T3SS 的效应分子为植物毒性因子, 通过针状装置注入宿主细胞, 破坏宿主细胞内正常的生理代谢从而发挥其毒性作用。T3SS 通常由 30~40k bp 大小的基因编码, 以致病岛 (pathogenicity island) 的形式存在于细菌的质粒或染色体中。

本研究已经完成 *B. quercina* N2-5 基因组测序草图工作。通过基因组分析比较发现 *B. quercina* N2-5 菌株基因组中具有与植物软腐病菌 *Dickeya dadantii* 3937 菌株 (= *Erwinia chrysanthemi* 3937) 相似的 T3SS 系统, 该系统共由 28 个基因组成, 共约 30k bp, 其中 10 个为保守的 Hrc 基因。根据 T3SS 结构的保守基因 HrcV 上下游序列设计引物, 利用 PCR 等分子生物学方法构建缺失载体 pQSHrcV, 将该载体通过三亲杂交导入 *B. quercina* N2-5 中, 同源重组获得缺失突变体 Δ HrcV。通过 HrcV 基因序列设计互补引物, 将目的片段克隆到 pBBR1MCS-2 穿梭质粒上, 构建互补载体 pHBHrcV, 利用三亲杂交将互补载体导入 Δ HrcV 突变体中, 得到互补菌株 HBV。将野生菌株 N2-5、突变体 Δ HrcV 和突变体互补菌株 HBV 用 LB 液体培养基摇培 24 h 后接种到 107 杨枝干上, 每个菌株 3 个重复, 在光照培养箱中 30°C 下水培已接种的杨树枝条, 接种 6 天后观察结果, 试验显示 Δ HrcV 突变体对杨树枝条的致病力明显下降, 病情指数为 33.3, 而互补菌株 HBV 致病力与野生菌株 N2-5 保持一致, 病情指数分别为 95.6 和 93.3。本试验表明 *B. quercina* N2-5 菌株的 III 型分泌系统与致病性有密切关系。

关键词：欧美杨溃疡病； *Brenneria quercina*； III 型分泌系统； 致病性