

西瓜副噬酸菌 RpoN(σ^{54} 因子)功能分析

李展鸿, 杨玉文, 关 巍, 赵廷昌

(中国农业科学院植物保护研究所 北京 100193)

摘要: RpoN, 即 σ^{54} 因子, 是细菌中的一种 DNA 结合蛋白, 在基因转录起始过程中协助 RNA 聚合酶发挥功能, 并参与多种关键的生物学过程, 包括毒力、细胞运动、鞭毛组装和氮源利用。本研究在西瓜副噬酸菌 (*Paracidovorax citrulli*) 基因组中鉴定了 2 个 RpoN 编码基因 (分别命名为 *rpoN1* 和 *rpoN2*), 以 *P. citrulli* 野生型菌株 Aac5 为背景构建了 *rpoN1* 和 *rpoN2* 的缺失突变菌株和回补菌株, 通过生物学表型测定、RNA-seq 分析及 EMSA (electrophoretic mobility shift assay) 分析了 RpoN1 和 RpoN2 在西瓜副噬酸菌中的功能及两者的异同。结果表明, 2 个 *rpoN* 基因的缺失均显著降低了 Aac5 的致病性和运动能力, 并使其在 M9 最小培养基中生长迟缓。而仅缺失 *rpoN1* 会显著降低 Aac5 的黏附能力和硝酸盐利用能力, 仅缺失 *rpoN2* 则会显著提高生物膜的形成能力。RNA-seq 分析显示, $\Delta rpoN1$ 中与 IV 型菌毛合成相关基因 *pilA* 的表达量显著降低, EMSA 进一步证实了 RpoN1 对 *pilA* 的直接调控。综上, RpoN1 和 RpoN2 在西瓜副噬酸菌中并不是冗余的, 两者在细菌性果斑病致病机制中都起着至关重要的作用。本研究结果为瓜类细菌性果斑病的科学防治提供了重要的理论依据。

关键词: RpoN; 西瓜副噬酸菌; 细菌性果斑病; 同源蛋白

中图分类号: S651

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2026)04-028-14

Functional analysis of RpoN(σ^{54} factor) in *Paracidovorax citrulli*

LI Zhanhong, YANG Yuwen, GUAN Wei, ZHAO Tingchang

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: RpoN, also known as the α^{54} factor, is a group of DNA-binding proteins in bacteria. RpoN assists RNA polymerase in gene transcription initiation and is involved in various critical biological processes, including virulence, cell motility, flagellar assembly, and nitrogen assimilation. In this study, two RpoN-coding genes (designated *rpoN1* and *rpoN2*), were found in the *Paracidovorax citrulli* genome. The *rpoN1* and *rpoN2* mutant strains and complementary strains were constructed based on the wild-type strain Aac5. And then, genetic phenotypic determination, RNA-seq and EMSA (electrophoretic mobility shift assay) were performed to explore the function of RpoN1 and RpoN2 in *P. citrulli* and their difference. The results showed that the deletion of either *rpoN* gene significantly impaired virulence and motility of *P. citrulli* group II strain Aac5, as well as retarded growth in M9 minimum medium. In addition, the deletion of *rpoN1* alone affected *P. citrulli* seed adhesion and nitrate assimilation, while deletion of *rpoN2* alone enhanced biofilm formation ability. RNA-seq analysis revealed significantly reduced expression of *pilA*, a gene related to type IV pili synthesis in $\Delta rpoN1$. Further investigation using EMSA confirmed the binding of RpoN1 to *pilA*. Overall, our findings demonstrate that RpoN1 and RpoN2 are not redundant in *P. citrulli*, but rather, both play crucial and distinct roles in the pathogenic mechanisms of bacterial fruit blotch. This study provides an important theoretical basis for scientific prevention and control of bacterial fruit blotch.

Key words: RpoN; *Paracidovorax citrulli*; Bacterial fruit blotch; Homologous protein

瓜类细菌性果斑病 (bacterial fruit blotch, BFB) 是一种毁灭性种传病害, 主要危害西瓜、甜瓜等葫芦科作物, 其病原菌为革兰氏阴性细菌西瓜副噬酸菌 (*Paracidovorax citrulli*)^[1-2]。自 1965 年 BFB 在美

国首次被报道以来, 全球许多国家陆续均有报道, 对西瓜和甜瓜产业造成了严重影响^[3-5]。BFB 发病快、破坏性强、难以控制, 严重时可导致西瓜、甜瓜颗粒无收^[5]。尽管 BFB 经济危害性较强, 但由于其

收稿日期: 2026-01-26; 修回日期: 2026-02-27

基金项目: 国家西瓜产业技术体系 (CARS-25); 中国农业科学院科技创新工程 (CAAS-ASTIP); 国家重点研发计划 (2018YFD0201300)

作者简介: 李展鸿, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为植物病理学。E-mail: 1558014875@qq.com

通信简介: 赵廷昌, 男, 研究员, 研究方向为植物病理学。E-mail: zhaotcg@163.com

致病机制尚不清楚,目前仍缺乏有效的病害管理策略。*P. citrulli* 根据遗传背景和生化特征不同主要分为I组和II组2个组群:I组菌株(模式菌为M6)主要分离于非西瓜的葫芦科作物,对多数葫芦科寄主具有中高毒性;而II组菌株(模式菌为AAC00-1)主要分离于西瓜,对寄主西瓜高毒,而对其他葫芦科寄主表现出较弱毒性^[6]。

P. citrulli 感染多种寄主植物并在全球各西瓜、甜瓜产区广泛传播,主要依赖其多样的毒力因子及入侵机制。目前,已报道多种毒力因子,如III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)^[7-12]、VI型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)^[13-14]、群体感应(quorum sensing, QS)^[15]、运动性^[16-18],以及IV型菌毛(type IV pili, T4P)^[19],而调控这些毒力因子的全局调控子却研究较少。

RpoN,也被称为 σ^{54} ,是一种在增强子结合蛋白(enhancer binding protein, EBP)存在下协助RNA核心聚合酶(RNA core polymerase, RNAP)启动转录的 σ 因子。1978年首次报道了RpoN在氮代谢中的作用^[20],后又被证明在许多细菌中发挥全局调节的功能,调控与各种过程相关的基因,包括毒力、运动性、鞭毛合成、生物膜形成和氮同化^[20-25],调控的基因数量众多。例如,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)基因组中大约20%的基因受RpoN调控^[26]。此外,许多细菌中都存在1~4个RpoN(甚至更多),但RpoN的功能在不同细菌中不尽相同^[27],甚至同一细菌中RpoN的功能也不一致^[28]。例如,*Rhodobacter sphaeroides*具有4个拷贝的*rpoN*基因。其中,*rpoN1*特异性调控固氮相关基因的表达,*rpoN2*特异性调控鞭毛组装相关基因的表达,而*rpoN3*和*rpoN4*的功能尚不清楚^[28]。在铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)和水稻黄单胞菌(*X. oryzae* pv. *oryzae*)等细菌中,单个RpoN拷贝或RpoN2作为鞭毛合成的主调控因子^[29-31],而丁香假单胞菌(*P. syringae*)、梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*)的单拷贝RpoN通过调控T3SS基因的表达来控制毒力^[32-35]。

虽然RpoN蛋白在细菌中发挥着重要作用,但其在*P. citrulli*中的功能尚未明确。为研究*P. citrulli*中RpoN蛋白的功能和调控机制,笔者鉴定了2个RpoN蛋白编码基因,并以野生型菌株Aac5为背景构建了这2个基因的缺失突变体。通过对*rpoN*基因的致病性、运动性、生物膜形成、种子黏附、氮同化和生长能力等表型的分析,阐明了西瓜

副噬酸菌*rpoN*基因的功能。采用RNA-seq分析进一步验证表型分析结果,探索RpoN蛋白的调控网络,并通过EMSA验证RpoN1的下游靶基因,深入了解其调控网络,以期为瓜类细菌性果斑病的科学防治奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试植物及培养条件 表型测定试验所用西瓜(*Citrullus lanatus*)品种为瑞鑫(中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供),西瓜苗培养于智能气候培养箱(设置为:光照12 h, 25 °C;黑暗12 h, 22 °C,相对湿度65%)。所用烟草品种为枯斑三生烟(*Nicotiana tabacum* var. *samsun*),烟草种子为植物病虫害生物学国家重点实验室(以下简称本实验室)保存。烟草苗培养于智能气候培养箱(设置为:光照16 h, 25 °C;黑暗8 h, 20 °C,相对湿度60%)。

1.1.2 供试菌株、质粒及引物 试验于2022年4—11月在中国农业科学院植物保护研究所进行。试验所用菌株和质粒详见表1。试验所用引物详见表2。

1.2 方 法

1.2.1 突变菌株和回补菌株的构建 登录NCBI网站(National Center for Biotechnology Information),获取西瓜副噬酸菌II组模式菌株的RpoN编码基因的基本信息,并设计引物。以野生型Aac5菌株为背景,通过同源重组双交换原理构建无抗性标记的缺失突变菌株。利用引物L-*rpoN1*-F/R和R-*rpoN1*-F/R(或L-*rpoN2*-F/R和R-*rpoN2*-F/R),从西瓜副噬酸菌Aac5基因组DNA中分别扩增出*rpoN1*、*rpoN2*基因的上下游片段,各约500 bp。再将*rpoN1*、*rpoN2*基因的上下游片段通过overlap PCR融合,并与自杀性载体pK18mobsacB连接,生成重组载体pK18- Δ *rpoN1*和pK18- Δ *rpoN2*。然后以pRK60为辅助载体,通过三亲本杂交的方式导入西瓜副噬酸菌野生型菌株Aac5。利用pK18mobsacB载体蔗糖致死的特性,筛选重组载体的上下游融合片段与基因组上相应的同源片段发生交换的菌株,即*rpoN*突变菌株 Δ *rpoN1*和 Δ *rpoN2*。基于获得的 Δ *rpoN1*菌株,利用三亲本杂交方法将pK18- Δ *rpoN2*重组载体导入 Δ *rpoN1*中并进行蔗糖筛选,同源重组后获得*rpoN1*、*rpoN2*双基因缺失突变菌株 Δ *rpoN1N2*,验证方法同上。

回补菌株的构建则扩增带有HA标签序列的*rpoN1*、*rpoN2*基因全长片段,并连接至PB-

表1 试验所用菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株或质粒名称 Strian or plasmid name	特征 Characterization	来源 Source
Aac5	西瓜副噬酸菌II组野生型菌株, Amp ^r The wild type strain of <i>Paracidovorax citrulli</i> group II, Amp ^r	[36]
$\Delta rpoN1$	Aac5 的 <i>rpoN1</i> 基因缺失突变菌株, Amp ^r <i>rpoN1</i> gene deletion mutant derived from Aac5, Amp ^r	本实验室 This lab
$\Delta rpoN2$	Aac5 的 <i>rpoN2</i> 基因缺失突变菌株, Amp ^r <i>rpoN2</i> gene deletion mutant derived from of Aac5, Amp ^r	本实验室 This lab
$\Delta rpoN1N2$	Aac5 的 <i>rpoN1</i> 和 <i>rpoN2</i> 双基因缺失突变菌株, Amp ^r <i>rpoN1</i> and <i>rpoN2</i> double gene deletion mutant derived from Aac5, Amp ^r	本实验室 This lab
$\Delta rpoN1$ -HA-C	$\Delta rpoN1$ 回补菌株, 含有 PBBR- <i>rpoN1</i> -HA 重组载体, Amp ^r , Kan ^r Complementary strian of $\Delta rpoN1$, containing recombinant vector PBBR- <i>rpoN1</i> -HA, Amp ^r , Kan ^r	本实验室 This lab
$\Delta rpoN2$ -HA-C	$\Delta rpoN2$ 回补菌株, 含有 PBBR- <i>rpoN2</i> -HA 重组载体, Amp ^r , Kan ^r Complementary strian of $\Delta rpoN2$, containing recombinant vector PBBR- <i>rpoN2</i> -HA, Amp ^r , Kan ^r	本实验室 This lab
DH5 α	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169recA1endA1hsdR17 (rk-,mk+) phoAsupE44thi-1gyrA96 relA1tonA	[37]
BL21(DE3)	<i>F-ompT hsdS_B(r_Bm_B)galdcM(DE3)</i>	Biomed
pRK600	含有助手质粒 pRK600 的 DH5 α , Cm ^r DH5 α carrying helper plasmid pRK600, Cm ^r	本实验室 This lab
pK18mobsacB	含有 <i>sacB</i> 蔗糖致死位点的自杀性载体, Kan ^r Sucrose suicidal vector carrying <i>sacB</i> gene for mutagenesis, Kan ^r	[38]
pET-28a	带有 T7 启动子和 His ₆ -tag 的重组蛋白表达载体, Kan ^r Recombinant protein expression vector with a T7 promoter and a His ₆ -tag, Kan ^r	本实验室 This lab

表2 试验所用引物
Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequences (5'-3')	产物长度 Product length/bp
WFB1	GACCAGCCACACTGGGAC	360
WFB2	CTGCCGCACTCCAGCGA	
R- <i>rpoN1</i> -F	TGAAGCCGGGACTGTCGCTGAAGGCGCTGTAAAGGCCG	562
R- <i>rpoN1</i> -R	CAGTCTGACTCTAGAGGATCCGCCCTGTCGTCCACAC	
L- <i>rpoN2</i> -F	CTATGACATGATTACGAATCCCATGTCCAGCGTCACGGTC	560
L- <i>rpoN2</i> -R	CTGCAGCTTCAGGGACGTGTCGGCATCGGACGAAAGG	
R- <i>rpoN2</i> -F	CCTTTCGTCCGATGCCGACACGTCCCTGAAGCTGCAG	565
R- <i>rpoN2</i> -R	CAGGTCTGACTCTAGAGGATCCGGGAAGAGGAAAGAATGCGT	
N- <i>rpoN1</i> -F	CCCCGAGCAGGTGGAGGAAC	754
N- <i>rpoN1</i> -R	GCCCAGCCGAAGAAATACT	
N- <i>rpoN2</i> -F	CTGGTGGTCAAGAGTTGTC	687
N- <i>rpoN2</i> -R	GTATTCCAGGAAGTGGGGCT	

BR1MCS-2 载体上,通过卡那霉素抗性筛选阳性转化子。验证正确的阳性转化子中的重组质粒通过三亲本杂交转化至 Aac5 中。对于三亲杂交获得的转化子,通过果斑特异性引物 WFB1/2,卡那霉素引物 Kan-F/R 以及目的基因检测引物 N-*rpoN1*-F/R、N-*rpoN2*-F/R 进行琼脂糖凝胶电泳验证,从 DNA 层面确认基因的回补,再通过 western blot 检测 HA 标签的存在,从蛋白质层面确认基因的回补,获得正确的回补菌株 $\Delta rpoN1$ -HA-C、 $\Delta rpoN2$ -HA-C。

1.2.2 烟草过敏性反应测定 野生型菌株、突变菌株以及回补菌株($\Delta rpoN1$ 、 $\Delta rpoN1$ -HA-C、 $\Delta rpoN2$

和 $\Delta rpoN2$ -HA-C)在 28 °C、220 r·min⁻¹ 的 KB 培养液中过夜后,收集细菌并清洗,再用灭菌水重悬,将菌悬液调至 OD₆₀₀=0.3。将菌悬液注射入幼嫩烟草(约 3 周大小)叶片的两叶脉中间区域,直至注满。以注射灭菌水为对照(Mock)。接种后 48 h 观察症状。试验重复 3 次。

1.2.3 致病性测定 采用真叶喷雾接种和子叶注射接种两种方式测定。

(1)真叶喷雾接种。按照 1.2.2 方法将 Aac5、 $\Delta rpoN1$ 、 $\Delta rpoN1$ -HA-C、 $\Delta rpoN2$ 、 $\Delta rpoN2$ -HA-C、 $\Delta rpoN1N2$ 的菌悬液调至 OD₆₀₀=0.3,通过无菌喷头

均匀喷施于健壮的3真叶期西瓜苗的正反面,每组处理20株西瓜苗,以无菌水处理为对照(Mock)。喷施完成后,将西瓜苗用有通风孔的白色塑料袋套袋,置于气候培养箱中培养,5 dpi(days post inoculation)开始观察发病情况。根据严重程度将发病情况分为0~9级,并以此计算病情指数(disease index, DI)^[15]。试验重复3次。

(2)子叶注射接种。按照1.2.2方法制备 $OD_{600}=0.3$ 的Aac5、 $\Delta rpoN1$ 、 $\Delta rpoN1$ -HA-C、 $\Delta rpoN2$ 、 $\Delta rpoN2$ -HA-C、 $\Delta rpoN1N2$ 的菌悬液,稀释100倍备用。用无菌的无针注射器将菌悬液注射到2周大的西瓜子叶中,直至子叶饱和,无菌水处理作为阴性对照(Mock)。注射完成的西瓜苗置于气候箱中培养。每个菌株接种40片子叶。0、24、48、72和96 h后,每个处理收集6片子叶拍照并取样研磨。每片子叶取直径为8 mm的叶饼,加入500 μ L灭菌水充分研磨,按照梯度稀释的方法将研磨后的原液稀释至 $1\sim 10^5$ 倍。每个稀释梯度液取10 μ L轻点于添加了适当抗生素的KB琼脂糖培养基上,28 $^{\circ}$ C倒置培养。2 d后观察单菌落生长情况,选取合适的浓度梯度下的单菌落进行计算。试验重复3次。

1.2.4 体外生长能力测定 分别使用富营养的KB培养基和贫营养的M9培养基进行体外生长能力测定。按照1.2.2方法制备 $OD_{600}=0.3$ 的Aac5、 $\Delta rpoN1$ 、 $\Delta rpoN1$ -HA-C、 $\Delta rpoN2$ 、 $\Delta rpoN2$ -HA-C、 $\Delta rpoN1N2$ 的菌悬液,稀释100倍后再收集菌体,用KB培养基或M9培养基重悬。每组吸取200 μ L菌悬液加入100孔聚苯乙烯细胞培养板中,置于28 $^{\circ}$ C的Bioscreen C生长曲线仪中振荡培养。每处理10个重复,以不含菌的KB、M9培养基作为对照(Mock)。每隔2 h测定各个孔的 OD_{600} 值,直至各 OD_{600} 值保持相对稳定一段时间,停止培养。将各处理不同时间下的 OD_{600} 值绘制成曲线图,以反映各菌株在不同营养条件下的体外生长能力。试验重复3次。

1.2.5 运动性测定 (1)游泳运动能力测定。待测菌株Aac5、 $\Delta rpoN1$ 、 $\Delta rpoN1$ -HA-C、 $\Delta rpoN2$ 、 $\Delta rpoN2$ -HA-C、 $\Delta rpoN1N2$ 在KB液体培养基中28 $^{\circ}$ C培养过夜,收集菌体,用灭菌水重悬并调整至 $OD_{600}=0.3$ 。每个菌悬液取5 μ L轻点于0.3%半固体琼脂板上,28 $^{\circ}$ C孵育48 h后,测量菌落直径。每个处理设置3个重复,试验至少进行3次。(2)蹭行运动能力测定。使用无菌接种环蘸取适量待测菌株的新鲜菌液,通过三线法在KB平板培养基中轻轻

划线,28 $^{\circ}$ C倒置培养72 h后,置于倒置荧光显微镜(Olympus IX83)下观察各菌株单菌落的晕圈或边缘。每个处理设置3个重复,试验至少进行3次。

1.2.6 鞭毛形成能力测定 使用无菌接种环蘸取适量待测菌株的新鲜菌液,通过三线法在KB平板培养基中轻轻划线,28 $^{\circ}$ C倒置培养48 h。用无菌吸头挑取单菌落置于10 μ L无菌水2 min,再覆盖1个200目铜网格,1 min后利用1.0%醋酸铀复染3次,每次30 s,再用无菌水将染色液洗去,置于滤纸片上备用^[18]。用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察待测菌株的鞭毛生成情况。每个处理设置3个重复,试验至少进行3次。

1.2.7 种子黏附能力测定 使用灭菌水制备浓度为 $OD_{600}=0.3$ 的待测菌株的菌悬液。每个处理吸取1 mL菌悬液于2 mL离心管中,并加入3粒西瓜种子使其完全浸于菌悬液内,28 $^{\circ}$ C、220 $r \cdot \min^{-1}$ 振荡孵育60 min。每个处理设置3次重复,以无菌水为对照(Mock)。孵育后,用灭菌水将未附着的细菌从种子表面上洗去,然后将种子转移到1个新的装有1 mL KB培养基的离心管中,28 $^{\circ}$ C、220 $r \cdot \min^{-1}$ 振荡孵育60 min。孵育完成后,将各管内的液体梯度稀释至 $1\sim 10^5$ 倍,吸取各梯度稀释液10 μ L轻点于含有抗生素的KB方格平板上,28 $^{\circ}$ C培养48 h后拍照,清点并统计各处理的菌落数。每个处理设置3个重复,试验至少进行3次。

1.2.8 生物膜形成能力测定 将待测菌株于28 $^{\circ}$ C、220 $r \cdot \min^{-1}$ 条件下过夜培养。收集菌体,使用KB液体培养基重悬,制备浓度为 $OD_{600}=0.3$ 的待测菌株的菌悬液。每种菌株的菌悬液吸取800 μ L于24孔聚苯乙烯细胞培养板中,设置3个重复。28 $^{\circ}$ C培养箱放置6 d后取出,80 $^{\circ}$ C固定40 min,倒掉菌液,PBS缓冲液(pH 7.2~7.4, 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)轻轻洗涤3次,每孔加入1 mL 0.1%结晶紫,室温染色45 min后倒掉结晶紫染液,自来水清洗至清洗液变为无色透明。细胞培养板于37 $^{\circ}$ C下干燥数小时,控干水分,拍照记录后每孔的生物膜用1.2 mL 95%乙醇溶解,再通过分光光度计测定溶解液在575 nm下的吸光值(OD_{575}),从而评估各菌株在该试验条件下的生物膜形成能力。试验至少重复3次。

1.2.9 氮源利用能力测定 基于MMX培养基,分别以 NaNO_2 (20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{CH}_3\text{N}_2\text{O}$ (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 KNO_3 (20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 NaNO_3 (20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)为唯一氮源,用于培养待测菌株。各取10 μ L $OD_{600}=0.6$ 的待测菌悬液接种到

1 mL 含有不同氮源培养基中,28 °C、220 r·min⁻¹ 振荡培养 72 h。以对应的含不同氮源的培养基作为空白对照(Mock)。培养 72 h 后,用分光光度计测定各处理的吸光度,以反应其对不同氮源的利用能力。每个处理设置 3 个重复,试验至少进行 3 次。

1.2.10 转录组测序及 qRT-PCR 将所有待测菌株在 KB 培养基中 28 °C 培养,至 OD₆₀₀ 达到 0.6~1.0。4 °C、5000 r·min⁻¹ 离心收集菌体。每个菌株设置 3 个生物学重复。收集的菌体立即用液氮冷冻并于 -80 °C 冻存,委托北京诺禾致源科技股份有限公司测序。测序完成后,选取部分差异表达的基因并设计检测引物(表 3),使用 SYBER Green I 试剂盒(天根生化科技有限公司)通过 qRT-PCR 核对测序结果,以 *rpoB* 作为内参基因。

1.2.11 RpoN 蛋白表达及纯化 使用引物

E-*rpoN1*-F/R(表 3)分别扩增 *rpoN1*、*rpoN2* 基因并连接至 pET-28a 质粒,构成重组表达载体。再将重组表达载体导入大肠杆菌感受态 BL21(DE3)菌株中,获得重组表达菌株。通过测序和 western blot 分别从序列上确认重组表达菌株构建成功。重组表达菌株表达的 RpoN1 通过蛋白可溶性检测确认合适的纯化方式。Ni 柱纯化后,经 SDS-PAGE 检测蛋白的纯化结果,再将获得的蛋白超滤离心,-80 °C 保存。

1.2.12 凝胶阻滞试验(EMSA) EMSA 参照 Hellman 等^[39]的方法,并进行了适当修改。利用 FAM 标记的引物 5' FAM *pilA*- F/R 和不含标记的引物 *pilA*- F/R,扩增 354 bp 的 *pilA* 基因启动子片段,即为 *pilA* 基因的 EMSA 探针(表 3)。将 *pilA* 探针片段(60 ng)与浓度分别为 0、2、4、6 和 8 μmol·L⁻¹ 的

表 3 qRT-PCR、蛋白表达及 EMSA 所用引物
Table 3 Primers for qRT-PCR, protein expression and EMSA

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequences (5'-3')	产物长度 Product length/bp
E- <i>rpoN1</i> -F	ATGGGTCGCGGATCCGAATTCGGAACACTTCCGCATGTGATG	1605
E- <i>rpoN1</i> -R	CTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTCAGCGCCTTGCGCAGGTT	
<i>pilA</i> -probe-F	CACCACGGCTTCGTCTCTG	354
<i>pilA</i> -probe-F	ACGCTTCATAAAATCTCTCTCC	
<i>ropB</i> -F	GCGACAGCGTGCTCAAAGTG	134
<i>ropB</i> -R	GCCTTCGTTGGTGCGTTTCT	
Q- <i>pilA</i> -F	ACCACCGCTGGTGCAGCCATGAC	150
Q- <i>pilA</i> -R	AGGAGCAAACGTGCCAGCATTTCG	
Q- <i>rpoN2</i> -F	ACCCCGCACCTTTTCGCCCCG	126
Q- <i>rpoN2</i> -R	CGCCGCTCGTCTTCCTC	
Q- <i>fliC</i> -F	GCTCGTTGACGATTCCAT	179
Q- <i>fliC</i> -R	TTCCTTTCCAGGAAGAAGT	
Q- <i>flhD</i> -F	TTCGTTGCCGACCTTCTTG	171
Q- <i>flhD</i> -R	TTCCGCCTGGGCATCAA	
Q-R0009-F	GCGATGTGGGGACGGAGAAGGTT	196
Q-R0009-R	CGGTTTGCGGTACGGTCTGTGTG	

RpoN1 蛋白在含有 4 μL EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液和无核酸酶水的 20 μL 反应混合物中混合。室温孵育 30 min,加入 2 μL 的 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液。以预冷的 0.5×TBE 缓冲液为电泳液,在 5% 不变性丙烯酰胺凝胶上以 80 V 电压电泳约 1 h。EMSA 结果使用激光扫描系统(Typhoon 9410)观察各条带迁移情况。

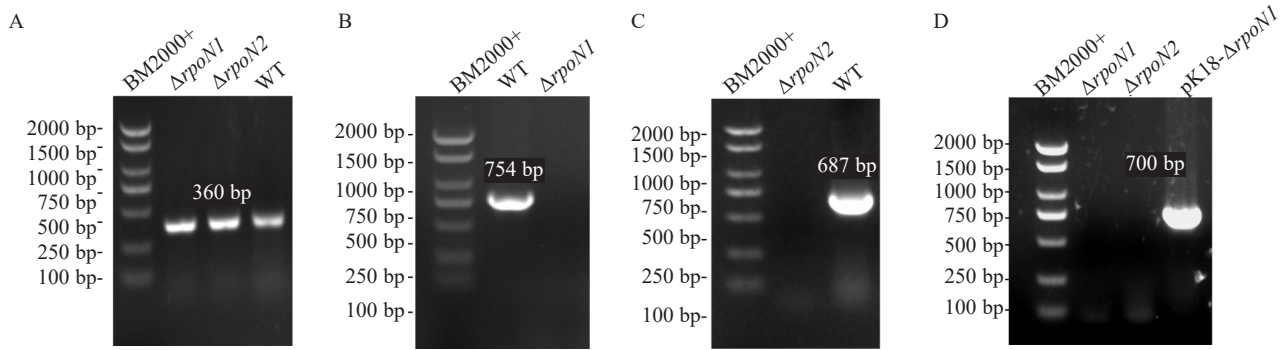
2 结果与分析

2.1 突变菌株及回补菌株的构建与验证

西瓜副噬酸菌 AAC00-1 基因组中含有 2 个编码 RpoN 蛋白的基因,locus tag 分别为 Aave_0419、

Aave_1899。为便于区分,笔者将 Aave_0419 和 Aave_1899 分别命名为 *rpoN1*、*rpoN2*。

通过果斑病特异性引物 WFB-1/2、基因检测引物 N-*rpoN1*-F/R 或 N-*rpoN2*-F/R 以及卡那霉素基因特异引物 Kan-F/R 对构建的缺失突变菌株进行验证。结果如图 1 所示,利用果斑病特异性引物 WFB-1/2,缺失突变菌株均能扩增出与野生型 Aac5 大小相同的片段(360 bp),表明其为西瓜副噬酸菌;而利用基因特异引物 N-*rpoN1*-F/R 或 N-*rpoN2*-F/R 未扩增出与野生型菌株大小相同的 DNA 片段(754、687 bp),利用卡那霉素基因特异引物 Kan-F/R 也未扩增出与 pk18 质粒(阳性对照)一致的 DNA



注:A. 果斑特异性引物验证;B. *rpoN1* 基因检测引物验证;C. *rpoN2* 基因检测引物验证;D. 卡那引物验证。下同。

Note: A. Verification by primer WFB1/2; B. Verification by primer N-*rpoN1*-F/R; C. Verification by primer N-*rpoN2*-F/R; D. Verification by primer Kan-F/R. The same below.

图1 *rpoN* 单基因缺失突变菌株验证

Fig. 1 Verification of *rpoN* deletion mutant strains

片段(700 bp),说明这2个菌株是不具Kan抗性、不含*rpoN1/rpoN2*基因的西瓜副噬酸菌,即获得了正确的*rpoN1/rpoN2*缺失突变菌株 $\Delta rpoN1/\Delta rpoN2$ 。

对*rpoN1/rpoN2*双基因缺失突变菌株 $\Delta rpoN1N2$ 的验证方法同上。经西瓜副噬酸菌特异性引物WFB1/2和基因检测引物N-*rpoN1*-F/R,

N-*rpoN2*-F/R验证,确认获得目标突变菌株(图2)。

使用以上方法并结合western blot对回补菌株进行验证,扩增出了与野生型Aac5大小相同的目的片段,且western blot检测到了目的大小的蛋白条带,从DNA层面和蛋白质层面均确认获得了正确的*rpoN*回补菌株 $\Delta rpoN1$ -HA-C、 $\Delta rpoN2$ -HA-C(图3)。

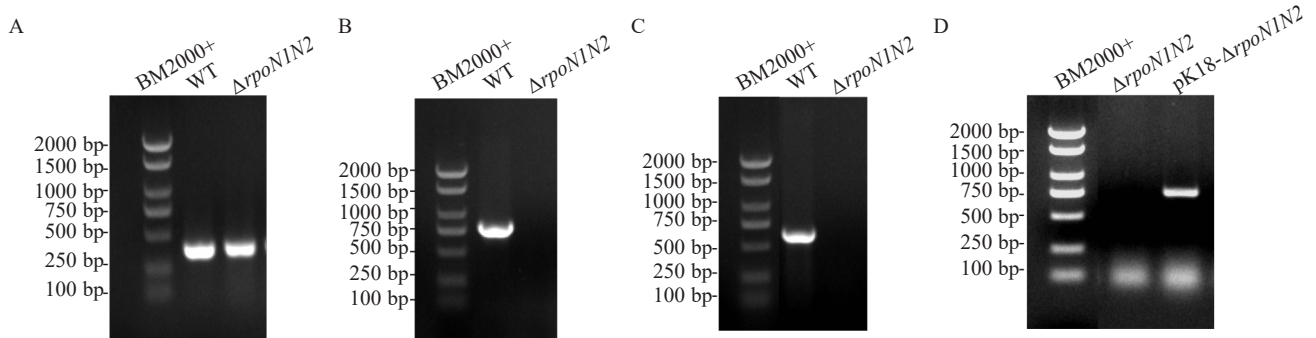
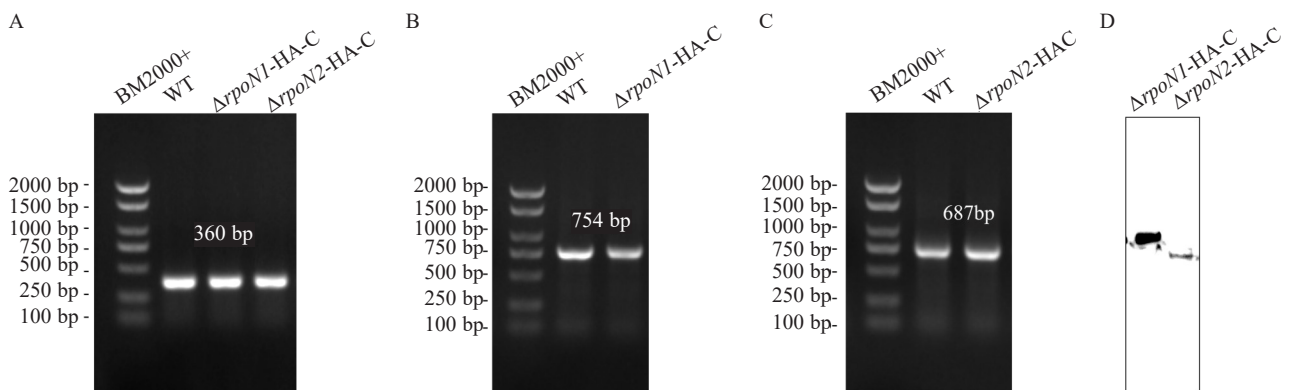


图2 *rpoN* 双基因缺失突变菌株验证

Fig. 2 Verification of double mutant strain $\Delta rpoN1N2$



注:A. 果斑特异性引物验证;B. *rpoN1* 基因检测引物验证;C. *rpoN2* 基因检测引物验证;D. Western blot 验证。

Note: A. Verification by primer WFB1/2; B. Verification by primer N-*rpoN1*-F/R; C. Verification by primer N-*rpoN2*-F/R; D. Verified by western blot.

图3 *rpoN* 回补菌株的验证

Fig. 3 Verification of *rpoN* complementary strains

2.2 基因 *rpoN* 的缺失不影响西瓜副噬酸菌诱导烟草过敏反应的能力

结果显示,无菌水接种部位(Mock)未出现烟草细胞坏死,而突变菌株 $\Delta rpoN1$ 、 $\Delta rpoN2$ 和回补菌株 $\Delta rpoN1$ -HA-C、 $\Delta rpoN2$ -HA-C 在接种后 48 h 均表现出与野生型菌株 Aac5 相似的烟草过敏性坏死反应(图 4)。这表明 *rpoN1* 和 *rpoN2* 不影响西瓜副噬酸菌诱导烟草产生过敏反应的能力。

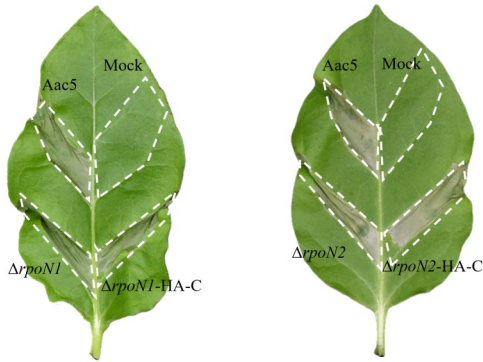


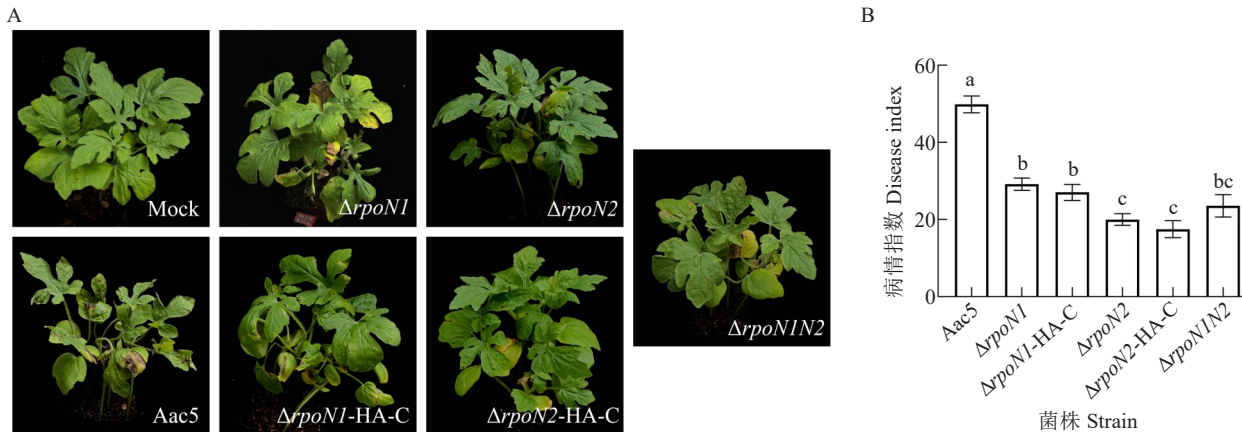
图 4 *RpoN1*、*RpoN2* 的缺失对西瓜副噬酸菌致敏性的影响

Fig. 4 Effects of *RpoN1* or *RpoN2* absence on introducing hypersensitive reaction of *Nicotiana tabacum* var. *samsun*

2.3 基因 *rpoN* 的缺失显著降低西瓜副噬酸菌的致病性

在喷雾接种试验中,接种灭菌水的西瓜幼苗在接种后 10 d(dpi) 仍保持健康,而接种西瓜副噬酸菌菌株的西瓜幼苗则表现出典型的 BFB 症状(图 5-A)。接种后 10 d,接种 $\Delta rpoN1$ 、 $\Delta rpoN2$ 和 $\Delta rpoN1N2$ 的西瓜幼苗平均病情指数(DI)分别为 29.13、19.97 和 23.53,显著低于 Aac5 (49.83)(图 5-B)。这表明 *rpoN1* 和/或 *rpoN2* 的缺失导致西瓜副噬酸菌对寄主西瓜的致病性显著降低。

在注射接种试验中,西瓜子叶用受试菌株的悬浮液进行接种,分别在接种后 0、24、48、72 和 96 h 取样并拍照,发现接种灭菌水的幼苗从头至尾未出现任何症状,而接种野生型菌株 Aac5、突变菌株 $\Delta rpoN1$ 、 $\Delta rpoN2$ 和 $\Delta rpoN1N2$ 以及回补菌株 $\Delta rpoN1$ -HA-C 和 $\Delta rpoN2$ -HA-C 的幼苗最后均表现出水渍状和坏死症状(图 6-A)。将子叶内部的活菌数量化并统计,结果显示,0 h 时各处理体内的活菌量处于同一水平,此后的 24、48 h 活菌量持续升高,72、96 h 后活菌量开始下降,但这 4 个时间点的各处理体内的活菌量无明显



注:A. 接种 10 dpi 时的发病情况;B. 病情指数。不同小写字母代表在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: A. Symptoms of watermelon plants treated with tested strains at 10 dpi; B. Disease index. Different small letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图 5 *RpoN1*、*RpoN2* 的缺失对西瓜副噬酸菌致病性的影响

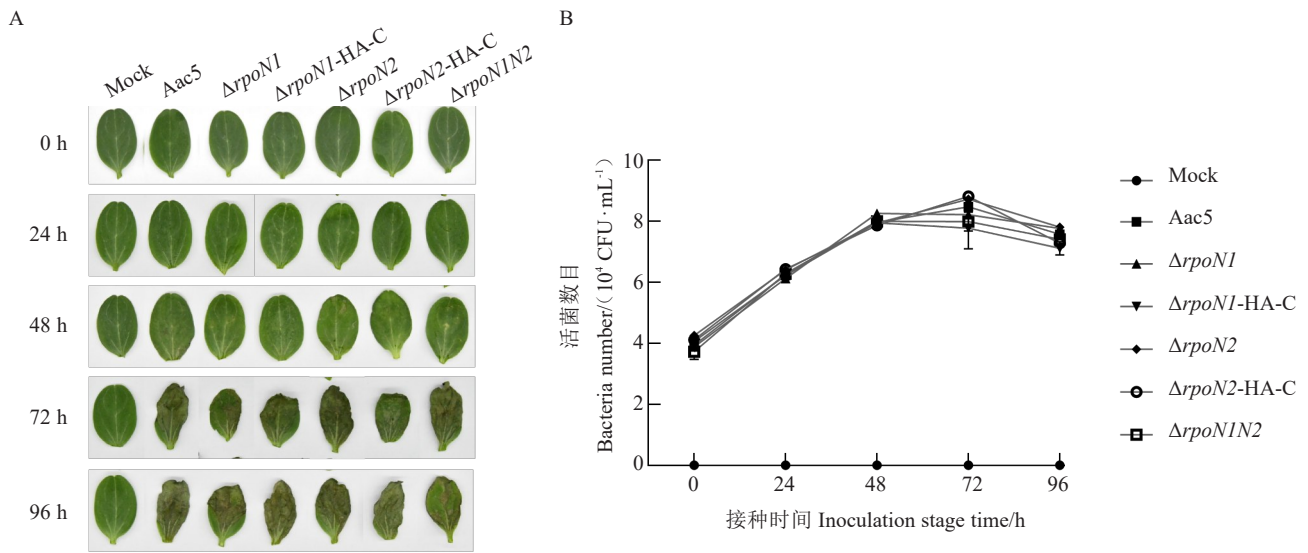
Fig. 5 Effects of *RpoN1* or *RpoN2* absence on pathogenicity of *P. citrulli*

差异,说明 *rpoN1*、*rpoN2* 的缺失对西瓜副噬酸菌的体内生长能力无明显影响(图 6-B)。

2.4 基因 *rpoN* 的缺失显著降低西瓜副噬酸菌在 M9 培养基中的生长能力

在 KB 培养基中, $\Delta rpoN1$ 和 $\Delta rpoN1N2$ 在对数生长期的生长速率低于野生型菌株 Aac5 和突变型菌株 $\Delta rpoN2$ 。接种 32 h 后,野生型 Aac5 和 *rpoN*

突变菌株分别进入稳定期,OD₆₀₀ 分别为 1.4 和 1.2(图 7-A),表明 *rpoN1* 和 *rpoN2* 突变型菌株的最终细菌数量均略低于野生型菌株 Aac5。在 M9 培养基中, $\Delta rpoN1$ 、 $\Delta rpoN2$ 和 $\Delta rpoN1N2$ 的生长速率均有限(甚至不生长),明显低于野生型菌株 Aac5(图 7-B)。这些结果表明,*rpoN1* 或 *rpoN2* 或两者缺失会导致在 M9 最小培养基中生长缺陷。然而,*rpoN1*



注:A. 子叶在各取样时间的发病症状;B. 不同取样时间接种各菌株的子叶的活菌数定量分析。
 Note: A. Symptoms of watermelon cotyledons; B. Quantitative analysis of bacteria number of watermelon cotyledons.

图6 RpoN1、RpoN2 缺失对西瓜副噬酸菌体内生长能力的影响
 Fig. 6 Effects of RpoN1 or RpoN2 absence on *in-vivo* colonization ability of *P. citrulli*

或 *rpoN2* 的基因回补在 KB 培养基或 M9 培养基中均未恢复野生型生长(数据未展示)。总之,西瓜副噬酸菌的 RpoN1 或 RpoN2 在营养缺乏条件下对生长起关键作用,但在营养丰富条件下则不然。

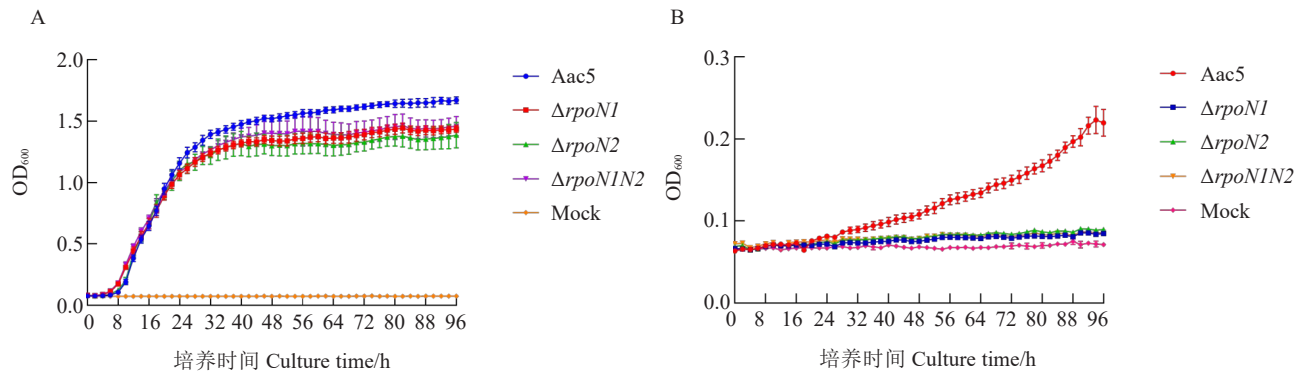
2.5 RpoN 的缺失显著降低西瓜副噬酸菌游泳运动能力但不影响其鞭毛形成能力

在 0.3% 琼脂平板上培养 48 h 后, $\Delta rpoN1$ 、 $\Delta rpoN2$ 和 $\Delta rpoN1N2$ 的平均菌落晕圈直径分别为 1.07、1.05 和 1.04 cm,显著小于野生型菌株 Aac5 的 2.06 cm,表明 *rpoN1* 和 *rpoN2* 均有助于提高西瓜副噬酸菌的游泳运动能力。然而,回补菌株 $\Delta rpoN1$ -HA-C 和 $\Delta rpoN2$ -HA-C 的游泳运动能力并未恢复(图 8-A~B)。为了进一步探究游泳运动能

力丧失的原因,使用透射电子显微镜观察细菌鞭毛,结果表明,野生型菌株以及 $\Delta rpoN1$ 和 $\Delta rpoN2$ 突变体的鞭毛均完整(图 8-C),这表明 RpoN1 和 RpoN2 并非通过影响 *P. citrulli* 鞭毛形成来调控细菌的游泳运动能力。

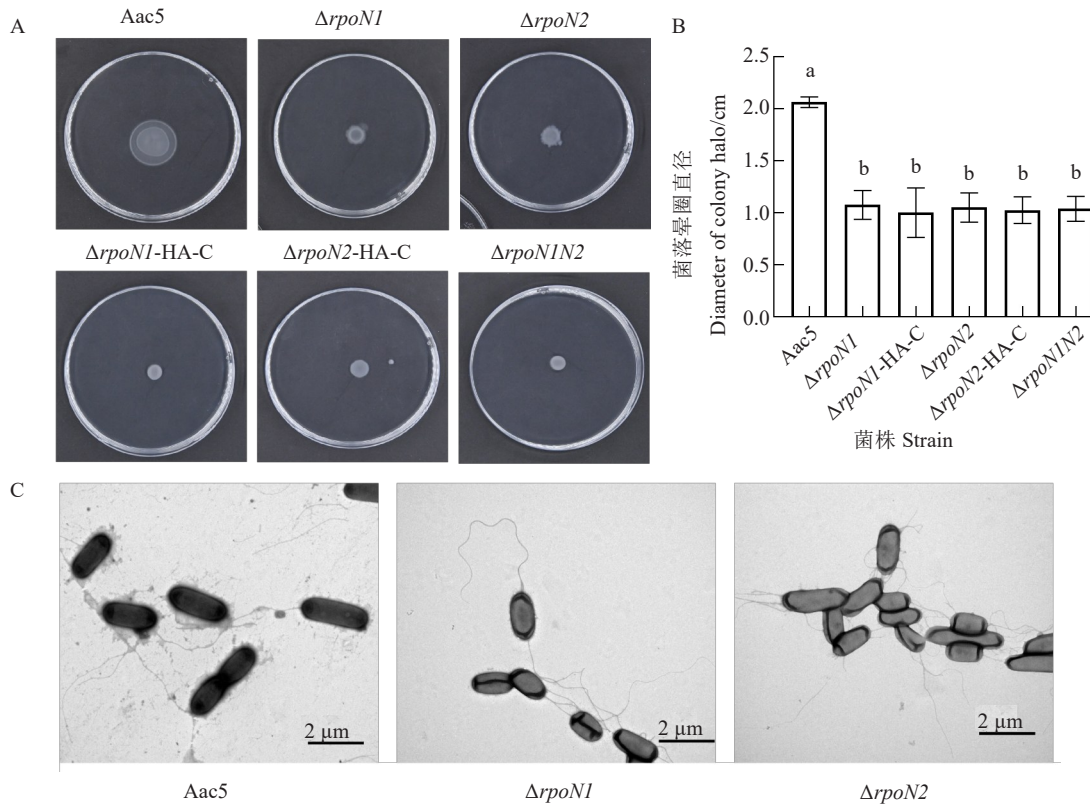
2.6 基因 *rpoN* 的缺失使西瓜副噬酸菌丧失蹭行运动能力

如图 9 所示, Aac5 的菌落边缘呈现出典型的波状突起,表明其进行了蹭行运动。然而, *rpoN1* 和 *rpoN2* 突变菌株的菌落边缘光滑,没有明显的蹭行运动,表明 *rpoN1* 和 *rpoN2* 基因都是西瓜副噬酸菌蹭行运动的必需基因,任何 1 个 *rpoN* 基因的缺失都会导致蹭行运动能力的丧失。然而,在 *rpoN1*



注:A. KB 培养基中的生长能力;B. M9 培养基中的生长能力。
 Note: A. Temporal population dynamics of tested strains in KB medium; B. Temporal population dynamics of tested strains in M9 medium.

图7 RpoN1、RpoN2 缺失对西瓜副噬酸菌体外生长能力的影响
 Fig. 7 Effects of RpoN1 or RpoN2 absence on *in-vitro* growth ability of *P. citrulli*



注:A. 供试菌株在0.3%琼脂培养基上培养48 h;B. 供试菌株游泳运动能力的定量分析;C. 对西瓜副噬酸菌鞭毛形成能力的影响。

Note: A. Cell suspensions of each tested strain was cultured on 0.3% agar plates for 48 h; B. Quantitative analysis of swimming ability of test strains; C. Flagellar synthesis of test strains.

图8 RpoN 缺失对西瓜副噬酸菌游泳运动能力的影响

Fig. 8 Effects of RpoN1 or RpoN2 absence on swimming ability of *P. citrulli*

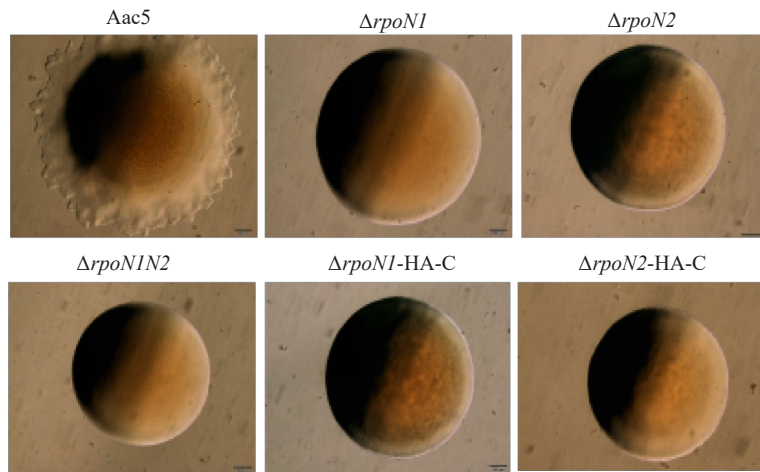


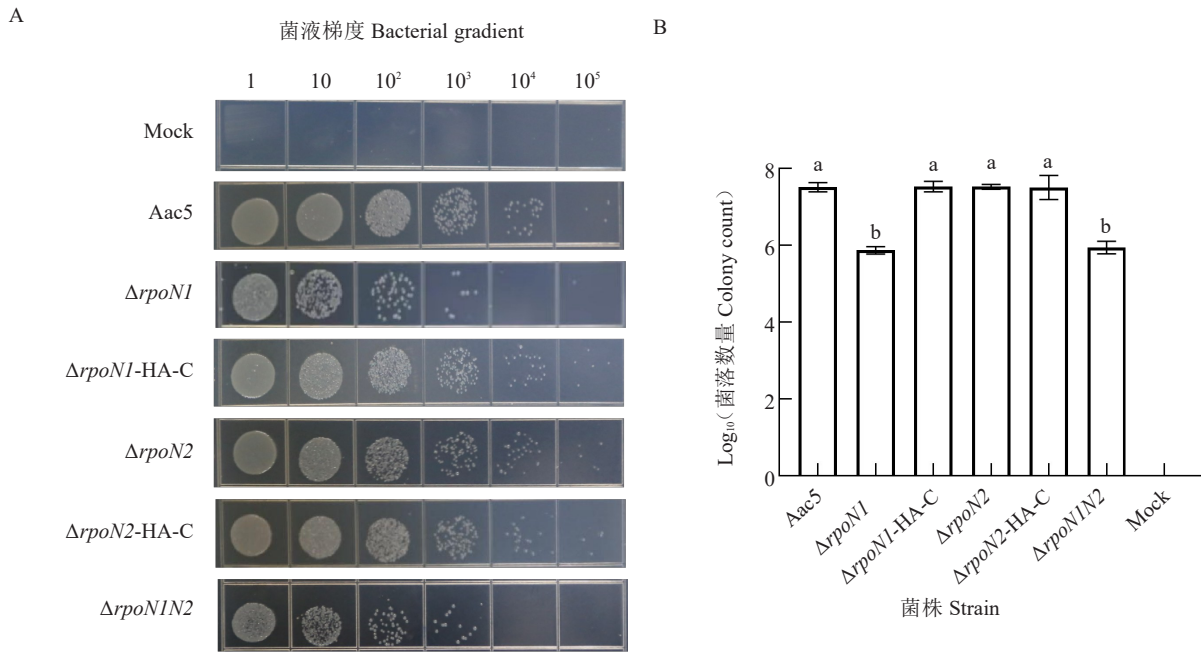
图9 RpoN1、RpoN2 的缺失对西瓜副噬酸菌蹭行运动能力的影响

Fig. 9 Effects of RpoN1 or RpoN2 absence on twitching ability of *P. citrulli*

和 *rpoN2* 回补菌株中未观察到蹭行运动的恢复。
2.7 基因 *rpoN1* 的缺失显著降低西瓜副噬酸菌的种子黏附能力

如图 10 所示, $\Delta rpoN1$ 和 $\Delta rpoN1N2$ 菌株在西瓜种子表面的菌落数量显著低于野生型 Aac5。

rpoN1 回补菌株恢复了 *P. citrulli* 的黏附能力至野生型水平,然而, $\Delta rpoN2$ 和 $\Delta rpoN2$ -HA-C 的菌落数量与野生型菌株相比并没有显著差异。这表明 RpoN1 而非 RpoN2 正向调节 *P. citrulli* 对西瓜种子表面的黏附能力。



注:A. 待测菌株黏附在种子表面的数量;B. 待测菌株种子黏附能力的定量分析。

Note: A. Population of tested strains adhered on the surface of watermelon seeds; B. Quantitative analysis of adhesion capacity of test strains.

图 10 RpoN1、RpoN2 缺失对西瓜副噬酸菌种子黏附能力的影响

Fig. 10 Effects of RopN1 or RopN2 absence on adhesion capacity of *P. citrulli* to the surfaces of watermelon seeds

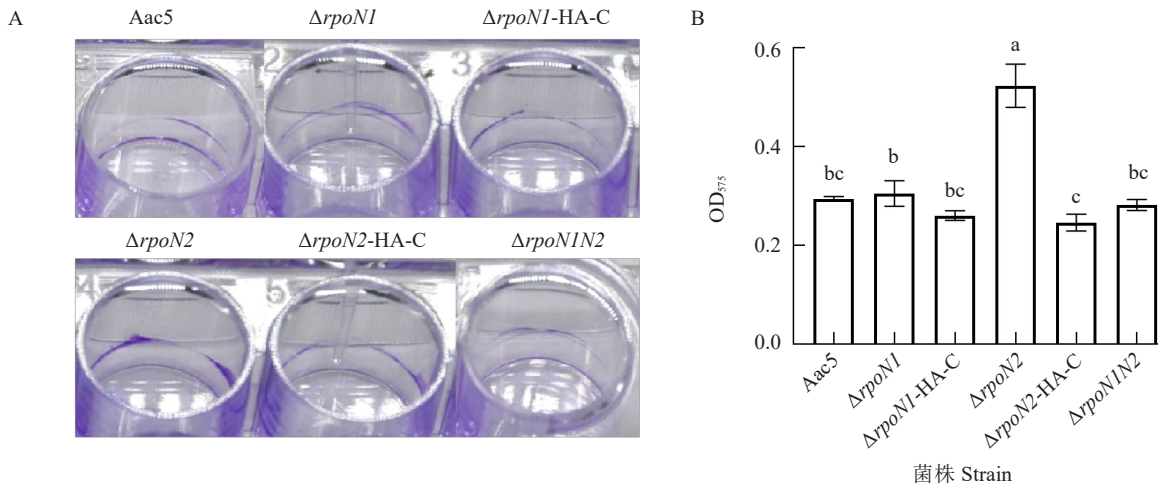
2.8 基因 *rpoN2* 的缺失显著增强西瓜副噬酸菌的生物膜形成能力

各组别的生物膜溶解后的 OD₅₇₅ 值统计结果显示,与野生型 Aac5 相比,Δ*rpoN2* 显著高于野生型 Aac5(Δ*rpoN2* 约为 Aac5 的 1.77 倍),而 Δ*rpoN1* 和 Δ*rpoN1N2* 与野生型 Aac5 均无显著差异(图 11)。说明 RpoN1 和 RpoN2 在生物膜形成能力调控方面功能不一致,RpoN2 可能负调控西瓜副噬酸菌的生

物膜形成能力。

2.9 基因 *rpoN1* 的缺失使西瓜副噬酸菌不能将硝酸盐作为唯一氮源利用

P. citrulli 及其衍生菌株在以 NaNO₂ 为唯一氮源的 MMX 培养基中均不能生长,而在以 NH₄Cl 和 CH₄N₂O 为唯一氮源的培养基中可以生长。在 KNO₃ 培养基中,Δ*rpoN1* 几乎不能生长(OD₆₀₀ 极低),而 Aac5 能正常生长(图 12-A),表明 *rpoN1* 对



注:A. 待测菌株生物膜形成情况;B. 待测菌株生物膜形成能力的定量分析。

Note: A. The formation of biofilms of the test strain; B. Quantitative analysis of biofilm formation capacity of test strains.

图 11 RpoN1、RpoN2 缺失对西瓜副噬酸菌生物膜形成能力的影响

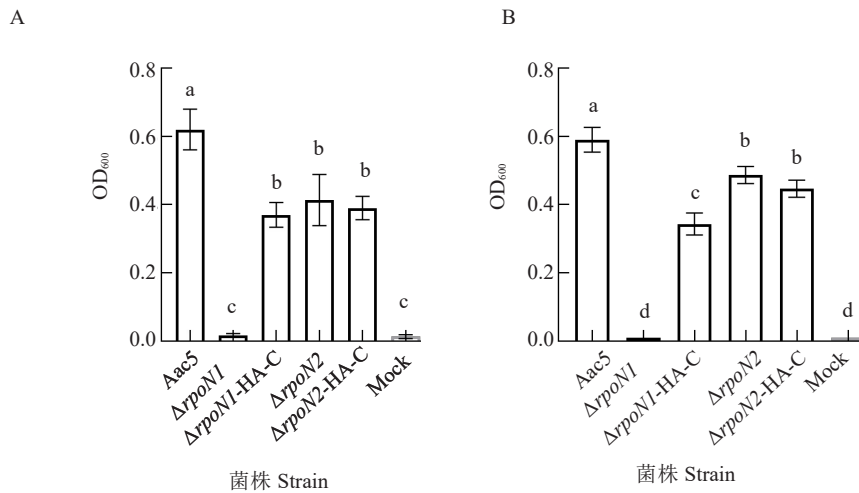
Fig. 11 Effects of RopN1 or RopN2 absence on biofilm formation of *P. citrulli*

P. citrulli 利用 KNO_3 至关重要。回补菌株 $\Delta rpoN1$ -HA-C 的平均 OD_{600} 为 0.37,说明氮源利用能力部分恢复到野生型水平。*rpoN2* 的缺失也使 *P. citrulli* 的 KNO_3 吸收能力显著下降,但仍能生长(图 12-A)。在添加 NaNO_3 作为唯一氮源的 MMX 培养基中进一步证实了这一结果(图 12-B)。综上

所述,*rpoN1* 而非 *rpoN2* 是西瓜副噬酸菌利用硝酸盐作为唯一氮源所必需的。

2.10 转录组测序结果分析

根据转录组测序结果,与野生型 Aac5 相比,在 $\Delta rpoN1$ 突变体中发现了 112 个差异表达基因(DEGs),其中 40 个上调,72 个下调;在 $\Delta rpoN2$ 突



注:A. 以 KNO_3 为唯一氮源;B. 以 NaNO_3 为唯一氮源。

Note: A. Growth of tested strains in medium containing KNO_3 as the sole nitrogen; B. Growth of tested strains in medium containing NaNO_3 as the sole nitrogen.

图 12 RpoN 对西瓜副噬酸菌硝酸盐利用能力的影响

Fig. 12 Effects of RopN1 or RopN2 absence on nitrate assimilation ability of *P. citrulli*

变体中发现了 139 个差异表达基因,其中 78 个上调,61 个下调。 $\Delta rpoN1$ 和 $\Delta rpoN2$ 共有 35 个差异表达基因,其中大多数基因的功能未知。GO 功能富集分析表明, $\Delta rpoN1$ 突变体中的差异表达基因主要富集在次级代谢产物的生物合成、多种环境中的微生物代谢以及淀粉和蔗糖代谢途径中(图 13-A)。相反, $\Delta rpoN2$ 突变体中的差异表达基因主要富集在鞭毛组装和双组分系统中(图 13-B)。值得注意的是,与 IV 型菌毛合成相关的 *pilA* 基因在 $\Delta rpoN1$ 中几乎不表达,而 11 个鞭毛组装途径基因则上调表达。此外, $\Delta rpoN1$ 和 $\Delta rpoN2$ 中差异表达基因(DEGs)部分重叠,与表型结果一致。

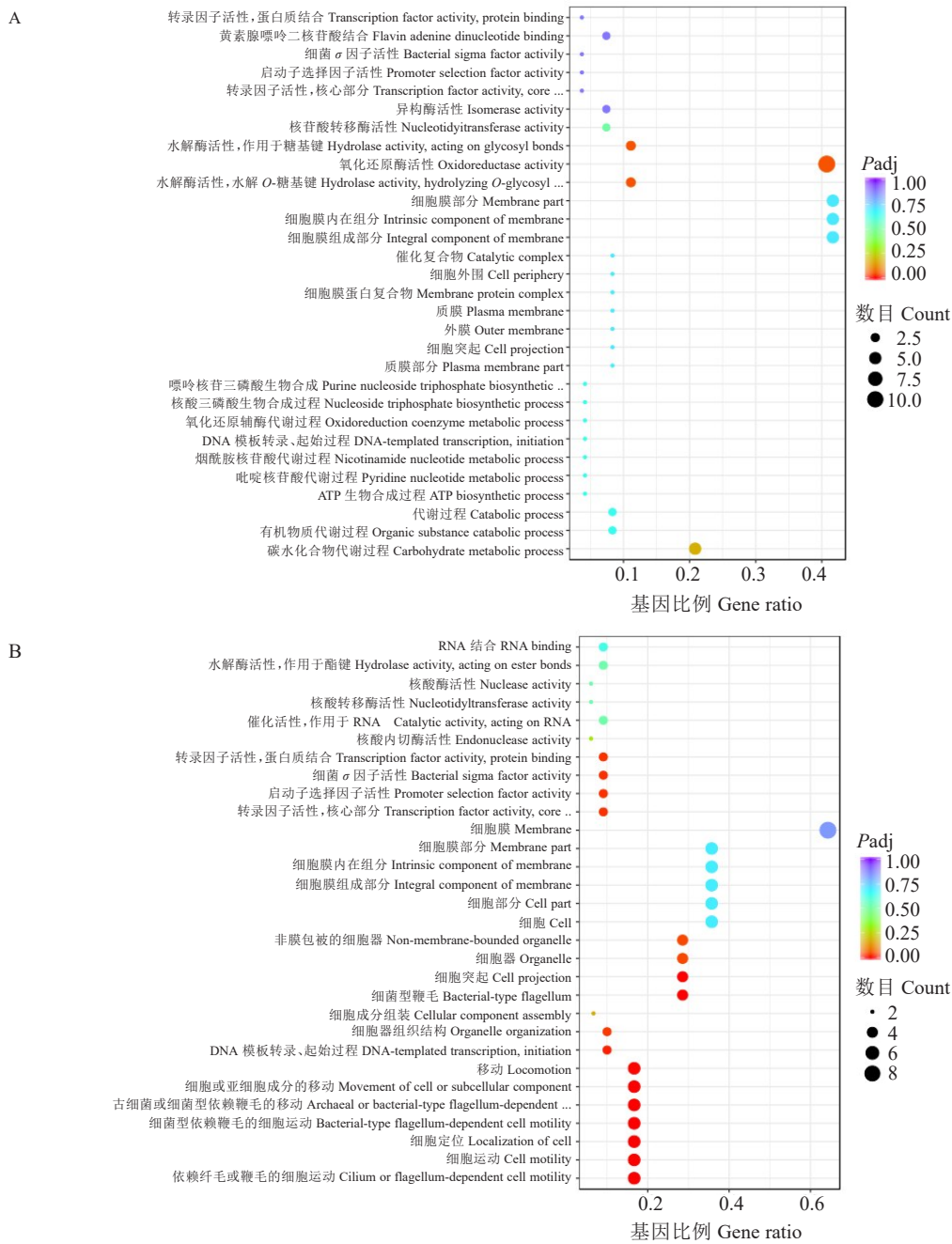
2.11 凝胶阻滞试验证明 RpoN1 与 *pilA* 启动子直接结合

前期的 RNA-seq 和 qRT-PCR 结果显示,*rpoN1* 缺失后,IV 型菌毛基因 *pilA* 几乎不表达,表明 RpoN1 可能直接调控 *P. citrulli* 中的 *pilA*。为了进一步确认 RpoN1 与 *pilA* 启动子区域的直接结合,进行了不含 RNA 聚合酶的 EMSA 试验,并使用激光扫描系统对结果进行可视化(图 14)。纯化的

RpoN 蛋白通过 SDS-PAGE 验证,确认获得了目的大小的蛋白。EMSA 结果显示,与阴性对照(无 RpoN1 蛋白)相比,在 2、4、6、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RpoN1 蛋白与 5'FAM 探针混合、5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RpoN1 蛋白与过量未标记探针混合时,均观察到了迁移阻滞现象,表明 RpoN1 与 *pilA* 启动子区域存在特异性直接结合。

3 讨论与结论

rpoN1 和 *rpoN2* 的缺失均不影响西瓜副噬酸菌 Aac5 诱导非寄主植株三生烟产生 HR,说明 RpoN1 与 RpoN2 都并不通过影响 T3SS 的功能直接调控西瓜副噬酸菌的毒力。因为 T3SS 对许多革兰氏阴性菌(包括西瓜副噬酸菌)在非寄主植物上诱导 HR 是必需的,若菌株无法诱导非寄主植物产生 HR,可能表明 T3SS 功能受损。这与 *P. syringae*、*E. amylovora* 中的单个 *rpoN* 基因功能有所不同^[21-34]。喷雾接种试验结果显示,RpoN1 和 RpoN2 的缺失均显著降低西瓜副噬酸菌 Aac5 对寄主西瓜的致病性,但子叶注射接种试验结果显示,两者的缺失对 Aac5



注:A. 野生型 Aac5 与突变菌株 $\Delta rpoN1$; B. 野生型 Aac5 与突变菌株 $\Delta rpoN2$ 。

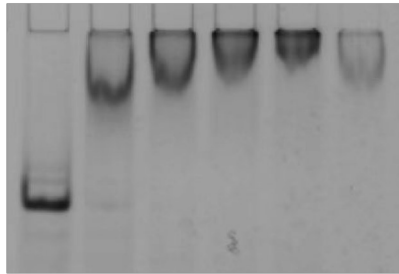
Note: A. Aac5 and $\Delta rpoN1$; B. Aac5 and $\Delta rpoN2$.

图 13 差异表达基因的 GO 功能富集分析

Fig. 13 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

体内的生长能力没有显著影响,表明西瓜副噬酸菌缺失 $rpoN1$ 或 $rpoN2$ 后,致病性的降低可能主要源于叶片表面的菌体难以通过移动穿过气孔进入内部。随后菌株运动能力测定结果支持了这一推测。 $rpoN1$ 和 $rpoN2$ 突变菌株的运动能力显著降低,甚至丧失。一般而言,细菌通过采用不同的运动策略,如游泳运动和蹭行运动,以远离不利的生存环境^[40]。气孔是细菌最主要的侵入途径。一旦失

去运动能力,附着在植物表面的细菌难以到达并进入气孔,便难以引发感染。因此,无法运动的细菌在喷雾接种时表现出较低的致病性,而通过注射接种进入的细菌仍能良好生长并引发寄主感染。然而,透射电子显微镜观察结果表明, $rpoN1$ 或 $rpoN2$ 缺失突变菌株的游泳运动能力显著下降并不源于鞭毛丧失。这表明 $rpoN1$ 和 $rpoN2$ 并不直接参与鞭毛合成转录级联,而是以一种间接的方式调控菌



RpoN1	-	+	+	+	+	+
5'-FAM <i>pilA</i> 探针	+	+	+	+	+	+
5'-FAM <i>pilA</i> probe	+	+	+	+	+	+
未标记 <i>pilA</i> 探针	-	-	-	-	-	+
Non-labeled <i>pilA</i> probe	-	-	-	-	-	+

图 14 EMSA 验证 RpoN1 与 *pilA* 启动子结合

Fig. 14 Interaction of RpoN1 and *pilA* promoter verified by EMSA

体的游泳运动。

此外,笔者发现 RpoN1 而非 RpoN2 能正向调节西瓜副噬酸菌的种子黏附能力,而 Bahar 等^[4]的研究表明,TP4 在西瓜副噬酸菌的表面附着中起关键作用,说明 RpoN1 很可能参与了 T4P 的调控。如预期所料, RNA-seq 结果显示,与 T4P 相关的基因 *pilA* 在 *rpoN1* 突变菌株中的表达水平显著低于野生型菌株 Aac5。通过 EMSA 试验证实了 RpoN1 蛋白与 *pilA* 启动子区域的直接结合,表明 *pilA* 是 RpoN1 的靶基因。

为了更深入地了解 RpoN1 和 RpoN2 在西瓜副噬酸菌游泳运动和蹭行运动中的作用,笔者还对野生型菌株和突变菌株进行了转录组测序。生物信息学分析结果表明,除了之前提到的靶基因 *pilA* 外, $\Delta rpoN1$ 与野生型 Aac5 之间的差异表达基因在基础代谢途径中富集,而非鞭毛组装途径,表明 RpoN1 可能通过影响基础生物途径间接调节细菌的游泳运动。相反, *pilA* 在 $\Delta rpoN2$ 与野生型之间没有差异表达,但在 $\Delta rpoN2$ 与野生型之间的差异表达基因中发现了一些鞭毛基因,包括 *flhDC*、*flgM*、*fliCGST*、*flgFHL* 和 *motA*。有趣的是,所有这些鞭毛差异表达基因在 *rpoN2* 缺失的情况下均表现为上调。

RpoN 最初因为氮代谢相关功能被发现^[20],因此本试验还进行了氮吸收能力测定。结果显示,与 *P. syringae*、*Ralstonia solanacearum* 中的 RpoN 功能类似^[25,32], RpoN1 对于西瓜副噬酸菌的硝酸盐利用也是必需的。近期一项关于 *ntrC* 基因(编码 RpoN 预测的 EBP NtrC)功能的研究显示, *ntrC* 的缺失使 *P. citrulli* 无法将硝酸盐作为唯一的氮源^[41]。由于

RpoN 与其 EBP 之间存在的特殊协同关系,可以合理推测 *P. citrulli* 的硝酸盐利用能力是 RpoN1 和 NtrC 协同作用的结果。综合以上表型结果,西瓜副噬酸菌 RpoN1、RpoN2 不是功能可相互替代的拷贝,而是功能有所不同的同源蛋白。

综上所述,笔者探索了西瓜副噬酸菌中 2 个同源蛋白 RpoN1 和 RpoN2 的若干功能及其潜在的调控机制,从而丰富了 RpoN 的调控网络,明晰了西瓜副噬酸菌的致病机制,为 BFB 病害的科学防治提供了理论依据。

参考文献

- [1] DUTTA B, SCHERM H, GITAITIS R D, et al. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions[J]. Plant Disease, 2012, 96(5): 705-711.
- [2] SCHAAD N W, POSTNIKOVA E, RANDHAWA P. Emergence of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a crop threatening disease of watermelon and melon[J]. Pseudomonas Syringae and Related Pathogens, 2003: 573-581.
- [3] WEBB R E, GOTH R W. A seedborne bacterium isolated from watermelon[J]. Plant Disease Report, 1965, 49: 818-821.
- [4] BAHAR O, BURDMAN S. Bacterial fruit blotch: A threat to the cucurbit industry[J]. Israel Journal of Plant Sciences, 2010, 58(1): 19-31.
- [5] BURDMAN S, WALCOTT R. *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(8): 805-815.
- [6] BURDMAN S, KOTS N, KRITZMAN G, et al. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel[J]. Plant Disease, 2005, 89(12): 1339-1347.
- [7] JI W Q, ZHAO M, FEI N Y, et al. Essential *Acidovorax citrulli* virulence gene *hrpE* activates host immune response against pathogen[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(16): 9144.
- [8] JIANG J, ZHAO M, ZHANG X X, et al. *Acidovorax citrulli* effector AopV suppresses plant immunity and interacts with aromatic dehydratase ADT6 in watermelon[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 11719.
- [9] ZHANG X X, ZHAO M, JIANG J, et al. Identification and functional analysis of AopN, an *Acidovorax citrulli* effector that induces programmed cell death in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(17): 6050.
- [10] QIAO P, ZHAO M, GUAN W, et al. A putative multi-sensor hybrid histidine kinase, BarA_{Ac}, inhibits the expression of the type III secretion system regulator HrpG in *Acidovorax citrulli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1064577.
- [11] ZHANG X X, ZHAO M, YAN J P, et al. Involvement of *hrpX* and *hrpG* in the virulence of *Acidovorax citrulli* strain Aac5, causal agent of bacterial fruit blotch in Cucurbits[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 507.
- [12] ZHANG X X, YANG Y W, ZHAO M, et al. *Acidovorax citrulli* type III effector AopP suppresses plant immunity by targeting the watermelon transcription factor WRKY6[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 579218.

- [13] TIAN Y L, ZHAO Y Q, WU X R, et al. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon[J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(1):38-47.
- [14] FEI N Y, JI W Q, YANG L L, et al. Hcp of the type VI secretion system (T6SS) in *Acidovorax citrulli* group II strain Aac5 has a dual role as a core structural protein and an effector protein in colonization, growth ability, competition, biofilm formation, and ferric iron absorption[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17):9632.
- [15] WANG T L, GUAN W, HUANG Q, et al. Quorum-sensing contributes to virulence, twitching motility, seed attachment and biofilm formation in the wild type strain Aac5 of *Acidovorax citrulli*[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 100:133-140.
- [16] BAHAR O, LEVI N, BURDMAN S. The cucurbit pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli* requires a polar flagellum for full virulence before and after host-tissue penetration[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2011, 24(9):1040-1050.
- [17] GUAN W, WANG T L, HUANG Q, et al. A LuxR-type regulator, AcrR, regulates flagellar assembly and contributes to virulence, motility, biofilm formation, and growth ability of *Acidovorax citrulli*[J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(4):489-501.
- [18] GUAN W, WANG T L, HUANG Q, et al. Transcriptomic and functional analyses reveal roles of AclR, a luxR-type global regulator, in regulating motility and virulence of *Acidovorax citrulli*[J]. Molecular Plant Microbe Interact, 2021, 34(8):952-961.
- [19] BAHAR O, GOFFER T, BURDMAN S. Type IV pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*[J]. Molecular Plant Microbe Interact, 2009, 22(8):909-920.
- [20] GAILLARDIN C M, MAGASANIK B. Involvement of the product of the *glnF* gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in *Klebsiella aerogenes*[J]. Journal of Bacteriology, 1978, 133(3):1329-1338.
- [21] ANCONA V, LI W T, ZHAO Y F. Alternative sigma factor RpoN and its modulation protein YhbH are indispensable for *Erwinia amylovora* virulence[J]. Molecular Plant Pathology, 2014, 15(1):58-66.
- [22] LIU X X, YE Y F, ZHU Y, et al. Involvement of RpoN in regulating motility, biofilm, resistance, and spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12:641844.
- [23] YANG T C, LEU Y W, CHANG-CHIEN H C, et al. Flagellar biogenesis of *Xanthomonas campestris* requires the alternative sigma factors RpoN2 and FlhA and is temporally regulated by FlhA, FlhB, and FlgM[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(7):2266-2275.
- [24] ISHIMOTO K S, LORY S. Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(6):1954-1957.
- [25] RAY S K, KUMAR R, PEETERS N, et al. *rpoN1*, but not *rpoN2*, is required for twitching motility, natural competence, growth on nitrate, and virulence of *Ralstonia solanacearum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6:229.
- [26] SHAO X L, ZHANG X N, ZHANG Y C, et al. RpoN-dependent direct regulation of quorum sensing and the type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(16):e00205-18.
- [27] TOM G K, CHRISTOF F, YANICK H, et al. Comparative analyses imply that the enigmatic sigma factor 54 is a central controller of the bacterial exterior[J]. BMC Genomics, 2011, 12(1):385.
- [28] DOMENZAIN C, CAMARENA L, OSORIO A, et al. Evolutionary origin of the *Rhodobacter sphaeroides* specialized RpoN sigma factors[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 327(2):193-202.
- [29] YU C, NGUYEN D P, YANG F, et al. Transcriptome analysis revealed overlapping and special regulatory roles of RpoN1 and RpoN2 in motility, virulence, and growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Frontiers Microbiology, 2021, 12:653354.
- [30] DASGUPTA N, WOLFGANG M C, GOODMAN A L, et al. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Molecular Microbiology, 2003, 50(3):809-824.
- [31] LI K H, WU G C, LIAO Y L, et al. RpoN1 and RpoN2 play different regulatory roles in virulence traits, flagellar biosynthesis, and basal metabolism in *Xanthomonas campestris*[J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(7):907-922.
- [32] HENDRICKSON E L, GUEVERA P, AUSUBEL F M. The alternative sigma factor RpoN is required for *hrp* activity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and acts at the level of *hrpL* transcription[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(12):3508-3516.
- [33] HUTCHESON S W, BRETZ J, SUSSAN T, et al. Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(19):5589-5598.
- [34] ALARCÓN-CHAIDEZ F J, KEITH L, ZHAO Y F, et al. RpoN [sigma(54)] is required for plasmid-encoded coronatine biosynthesis in *Pseudomonas syringae*[J]. Plasmid, 2003, 49(2):106-117.
- [35] RAMOS L S, LEHMAN B L, SINN J P, et al. The fire blight pathogen *Erwinia amylovora* requires the *rpoN* gene for pathogenicity in apple[J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14(8):838-843.
- [36] YAN S S, YANG Y W, WANG T L, et al. Genetic diversity analysis of *Acidovorax citrulli* in China[J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 136(1):171-181.
- [37] HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Journal of Molecular Biology, 1983, 166(4):557-580.
- [38] SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Gene, 1994, 145(1):69-73.
- [39] HELLMAN L M, FRIED M G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions[J]. Nature Protocols, 2007, 2(8):1849-1861.
- [40] CORRAL J, SEBASTIÀ P, COLL N S, et al. Twitching and swimming motility play a role in *Ralstonia solanacearum* pathogenicity[J]. mSphere, 2020, 5(2):e00740-19.
- [41] LIU D H, ZHAO M, QIAO P, et al. *ntrC* contributes to nitrogen utilization, stress tolerance, and virulence in *Acidovorax citrulli*[J]. Microorganisms, 2023, 11(3):767.