

邓博涵,刘丹蕾,陈秋菊,等. 1 株三型丁香假单胞菌猕猴桃致病变种细菌全基因组扫描图测序及分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(20):67-74.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.011

# 1 株三型丁香假单胞菌猕猴桃致病变种细菌 全基因组扫描图测序及分析

邓博涵<sup>1</sup>, 刘丹蕾<sup>1</sup>, 陈秋菊<sup>1</sup>, 倪培恩<sup>1</sup>, 张子蕾<sup>1</sup>, 王大鹏<sup>1</sup>, 糾松涛<sup>1</sup>, 王 磊<sup>1</sup>, 马 超<sup>1</sup>,  
张才喜<sup>1</sup>, 王世平<sup>1</sup>, 沈叶鑫<sup>2</sup>, 鲍金平<sup>3</sup>, 许文平<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海浦蔬农业科技有限公司, 上海 200240;

3. 浙江省遂昌县农业农村局, 浙江遂昌 323300)

**摘要:**丁香假单胞菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, 简称 Psa)是引起猕猴桃细菌性溃疡病的病原菌。对从感染溃疡病的东红猕猴桃枝条中分离得到的 1 株 Psa 野生株(命名为 GX05)进行全基因组测序,获得基因组草图,分析其中毒力基因、耐药基因和致病基因的情况。研究发现,多位点序列分型结果显示 GX05 为 biovar 3,与毒力因子数据库比对,GX05 携带 99 种毒力因子及 692 个相关毒力基因,同源性和匹配度最高的毒力因子是 *PvdL* 和 *Irp1*;与综合抗生素抗性基因数据库比对,GX05 携带 336 种耐药基因,与 29 种抗生素有关;与病原宿主互作数据库比对,不表达导致病原菌致病力减弱的基因数量最多,其中同源性和匹配度最高的是 *PvdL*,此外与增强致病力相关的同源性和匹配度最高的基因是 *hrcC*。通过全基因组测序信息初步分析了 1 株三型 Psa 菌株中存在的毒力、耐药及致病基因情况,对深入研究其致病机制和合理用药有重要意义。

**关键词:**丁香假单胞菌猕猴桃致病变种;猕猴桃细菌性溃疡病;全基因组测序;毒力基因;耐药基因;致病基因

**中图分类号:**S436.634.1<sup>+</sup>9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)20-0067-08

猕猴桃细菌性溃疡病严重威胁着猕猴桃产业的发展,给世界猕猴桃产业造成了巨大损失<sup>[1]</sup>,丁香假单胞菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, 简称 Psa)是猕猴桃细菌性溃疡病的致病菌<sup>[2]</sup>。研究发现,原本健康的猕猴桃植株在春季初次出现溃疡病症状(如叶斑)后,年底便会死

亡。溃疡病的传播速度快、危害大,1 年便可毁坏整个猕猴桃园<sup>[3-4]</sup>。目前还没有直接杀灭病原菌的有效措施<sup>[5]</sup>,主要的防治方法包括以铜制剂为主的化学防治<sup>[6-7]</sup>、以链霉素为主的生物防治<sup>[8-9]</sup>、果园管理<sup>[10]</sup>和抗性品种选育<sup>[11]</sup>等。化学和生物防治可造成植物毒性、药物残留、产生耐药细菌等缺点,并且基因水平转移可使耐药基因在细菌间流动<sup>[12]</sup>,目前已有报道表明部分 Psa 对链霉素<sup>[13]</sup>和铜制剂<sup>[14]</sup>产生了抗性。

寻找猕猴桃细菌性溃疡病的有效防治途径是全球猕猴桃产业面临的重要任务。已发现的 Psa 有 5 种生物型,分别为 biovar 1、biovar 2、biovar 3、biovar 5、biovar 6。我国目前只发现 biovar 3 群体<sup>[15]</sup>,但其

收稿日期:2020-01-02

基金项目:猕猴桃根域限制栽培技术研究及示范(编号:MH235);猕猴桃溃疡病综合防治技术研究与示范(编号:2018-J15)。

作者简介:邓博涵(1995—),女,湖北荆州人,硕士研究生,研究方向为果树病害的研究。E-mail:bohanded@163.com。

通信作者:许文平,博士,副研究员,从事果实品质生物学、果实采后生物学等研究。E-mail:wp-xu@sjtu.edu.cn。

[15] Chen Z, Huang Y W, Yang W J, et al. The hydrogen sulfide signal enhances seed germination tolerance to high temperatures by retaining nuclear COP1 for HY5 degradation[J]. Plant Science, 2019, 285:34-43.

[16] 周 波,王 宇,孙 梅,等. 津田芜菁 bZIP 蛋白 HY5 cDNA 的克隆及表达特性[J]. 分子植物育种,2008,6(1):59-64.

[17] 张 荔,周 波,李玉花. 植物 HY5 蛋白结构与功能的研究进展[J]. 植物生理学通讯,2010,46(10):985-990.

[18] 郭继平. 油菜 HY5 基因的电子克隆及生物信息学分析[J]. 北

方园艺,2013(23):116-118.

[19] Ang L H, Chattopadhyay S, Wei N, et al. Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development[J]. Mol Cell Biol, 1998, 1(2):213-222.

[20] 刘晓庆,徐照龙,许 玲,等. 大豆 *GmNAC8* 基因克隆与原核表达[J]. 江苏农业学报,2013,29(4):734-737.

[21] 唐 琦. 可用作生物杀虫剂的家蚕核型多角体病毒 orf65、orf91 的基因功能分析[D]. 镇江:江苏大学,2013:138.

致病机制尚不明确。有关 Psa 的研究主要集中在群体结构、病原菌鉴定、防控药物筛选等方面,对毒力基因、耐药基因和致病基因的研究报道较少。本试验对 1 株从贵州省贵阳市修文县古堡镇猕猴桃养殖基地采集的患病东红猕猴桃 (*Actinidia chinensis* “Donghong”) 枝条中分离出的 Psa 进行全基因组扫描图测序,分别与毒力因子数据库、综合抗生素抗性基因数据库和病原宿主互作数据库等进行比较,筛选出与毒力基因、耐药基因和致病基因同源性最高的基因组,利用基因组信息从分子水平揭示病原菌的致病机制,为 Psa 的致病机制研究提供理论积累。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株的分离纯化

2018 年 3 月在贵州省贵阳市修文县古堡镇的猕猴桃园内采集感染猕猴桃溃疡病的东红猕猴桃枝条。在无菌环境下,削取枝条病部,置于无菌的生理盐水中,27 ℃ 振荡 10 min,接种于 1.5% NB 固体培养基(国药集团化学试剂有限公司)表面,参考马志宏等的方法<sup>[16]</sup>进行平板划线纯化。倒置平板于恒温培养箱中,27 ℃ 培养 24 h,挑单菌落于 NB 液体培养基中,于 27 ℃ 恒温摇床中 180 r/min 摇菌 16 h。吸取最后一轮纯化的菌液于无菌离心管中离心后弃上清,收集菌体沉淀用于提取 DNA 和浸染烟草试验。

### 1.2 菌株基因组 DNA 的提取与菌种鉴定

根据细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司]说明书提取基因组 DNA,用 27F/1492R 通用引物进行 16S rDNA 测序[由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序],测序结果在 NCBI 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行核酸 BLAST 比对,筛选出属于 Psa 的菌株。

### 1.3 烟草过敏反应

细菌缓冲液(100 mL)成分包括 1 mL 的 1 mol/L  $MgCl_2$ 、1 mL 的 1 mol/L 2-(N-吗啉代)乙烷磺酸一水(用 KOH 调整 pH 值至 5.6)和 100  $\mu$ L 的 100  $\mu$ mol/L 乙酰丁香酮。用配制好的缓冲液将细菌沉淀悬浮,调整浓度为  $D_{600\text{ nm}} = 0.5$ ,避光 3~4 h 后备用。在本氏烟草叶片背面用注射器针头轻微划伤,将无针注射器压在伤口处,轻轻往里注射,使菌液直径扩散至 2 cm 左右。处理组(接种细菌悬浮

液)和对照组(直接注射缓冲液)各选择 5 个叶片进行接种,24 h 后观察叶片的变化情况。

### 1.4 抗生素敏感性试验

采用纸片扩散法,选择 11 种抗生素进行抗生素敏感性试验。用无菌的生理盐水稀释菌液至 0.5 麦氏浊度,用无菌涂布棒均匀涂抹菌液至整个 NB 琼脂平板,镊子灭菌后夹取各药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司)于平板正中。每种药敏片做 3 个平行,进行 3 次生物学重复,每个抑菌圈统计 3 个直径,计算平均值,判断抗生素敏感性<sup>[17]</sup>。

### 1.5 GX05 全基因组测序

将 GX05 的基因组 DNA 送往上海美吉生物医药科技有限公司二代测序平台 Illumina Hiseq  $\times 10$  进行测序。使用短序列组装软件 SOAPdenovo2<sup>[18]</sup>对二代测序后的经过滤得到的有效数据进行多个 K-mer 参数的拼接,得到最优的重叠群(contigs)组装结果。随后通过将测序读长(reads)比对到 contig 上,对组装结果进行局部组装和优化,获得基因组骨架(scaffolds)。使用 CGview<sup>[19]</sup>软件绘制基因组圈图。使用 Glimmer 3<sup>[20]</sup>软件预测编码基因,使用 Tandem Repeats Finder 软件<sup>[21]</sup>进行串联重复序列预测。按照管家基因在标准株 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 基因组上的位置,使用 biovar 1~biovar 6 型以及 Pfm 菌株<sup>[15]</sup>的管家基因以 *gapA* - *pgi* - *rpoD* - *gyrB* - *pfk* - *acn* 的顺序串联<sup>[22]</sup>,使用 MEGA 7.0 用 Tamura-Nei 模型和近邻法进行系统发育分析<sup>[23]</sup>。比对病原菌毒力因子数据库(virulence factors of pathogenic bacteria,简称 VFDB)<sup>[24]</sup>,综合抗生素抗性基因数据库(comprehensive antibiotic resistance database,简称 CARD)<sup>[25]</sup>和病原与宿主互作数据库(pathogen host interactions,简称 PHI)<sup>[26]</sup>分别获得毒力基因、耐药基因和致病基因的信息。

## 2 结果与分析

### 2.1 Psa 菌株的分离与鉴定

经过多轮纯化后分离得到的 Psa 菌株在 NB 平板上的菌落形态呈光滑圆形,白色半透明状。16S rDNA 测序结果在 NCBI 数据库经过 BLAST 比对,结果显示与 Psa 菌株(序列号:MH071159.1)相似度为 98.24%,判断为 Psa 菌株,命名为 GX05。

### 2.2 烟草过敏反应

图 1-a、图 1-b 分别为注射细菌悬浮液(处

理)和无菌缓冲液(对照)的烟草,注射范围约 2 cm,呈现出水渍状。24 h 后,处理组叶片的注射部位出现明显的黄色枯斑,产生了过敏反应(图 1 - c),而对照组叶片注射无菌缓冲液的部位水渍消失,叶片

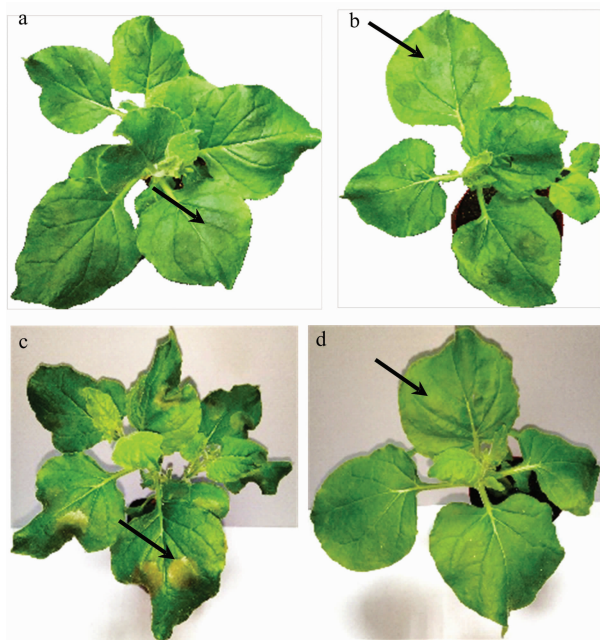


图1 烟草过敏反应

恢复正常状态(图 1 - d),说明分离纯化所得的 Psa 野生株 GX05 具有相应的致病性。

### 2.3 抗生素敏感性试验结果

由表 1、图 2 可知,Psa 菌株 GX05 对磷霉素、多黏菌素、卡那霉素、氨基糖苷类、羧苄青霉素、阿洛西林、美罗培南、头孢噻肟等表现为敏感,对替考拉宁、杆菌肽和阿莫西林表现为耐药。

表 1 11 种抗生素的耐药性信息

抗生素	浓度	耐药性
磷霉素	200 μg	S
多黏菌素	300 IU	S
卡那霉素	30 μg	S
氨基糖苷	30 μg	S
羧苄青霉素	100 μg	S
阿洛西林	75 μg	S
美罗培南	10 μg	S
头孢噻肟	30 μg	S
替考拉宁	30 μg	R
杆菌肽	0.04 μg	R
阿莫西林	20 μg	R

注:S 表示敏感;R 表示耐药。

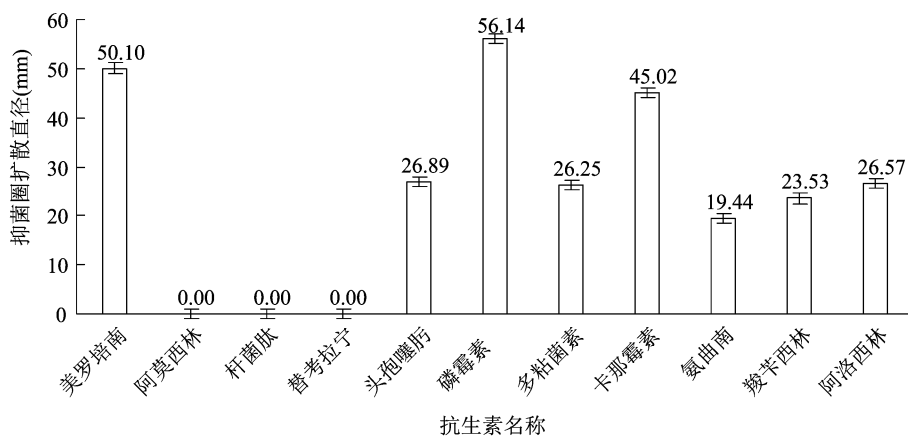


图2 11 种抗生素产生的抑菌圈直径

### 2.4 Psa 菌株 GX05 全基因组测序结果

Psa GX05 进行全基因组测序后,对获得的片段进行过滤和组装,得到 251 条 scaffolds,总长度为 6 212 819 bp(图 3),N50 为 46 356 bp。长度大于 1 000 bp 的 scaffolds 有 223 条,共 6 195 265 bp,最大的 scaffold 长度为 181 097 bp,鸟嘌呤 - 胞嘧啶 (G + C) 含量为 58.53%。经预测,基因组的编码基因总长度为 5 180 589 bp,共有 5 725 个。非编码区有 57 个 tRNA,9 个 rRNA,包括 1 个 23S rRNA 1 个 16S rRNA、7 个 5S rRNA,有 195 个串联重复序列,

占基因组的 0.97%。根据多位点序列分型 (MLST) 构建的系统发育树结果可知,GX05 属于 biovar 3 型 Psa(图 4)。

### 2.5 Psa 菌株 GX05 毒力因子分析

VFDB 数据库预测到 692 个毒力基因,其中 367 个毒力基因注释为 99 种毒力因子,52 种毒力因子的功能属于攻击型毒力因子(28 种)、防御型毒力因子(11 种)、非特异性毒力因子(11 种)和调控毒力基因的毒力因子(2 种),剩余的 47 种没有功能归类。按照打分由高到低的条件筛选,同源性和匹配

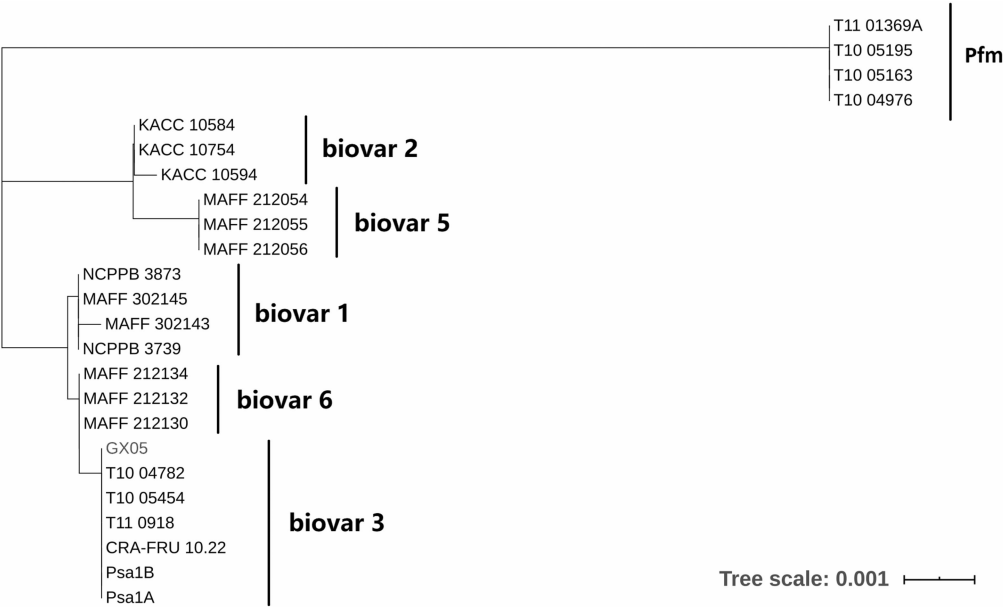
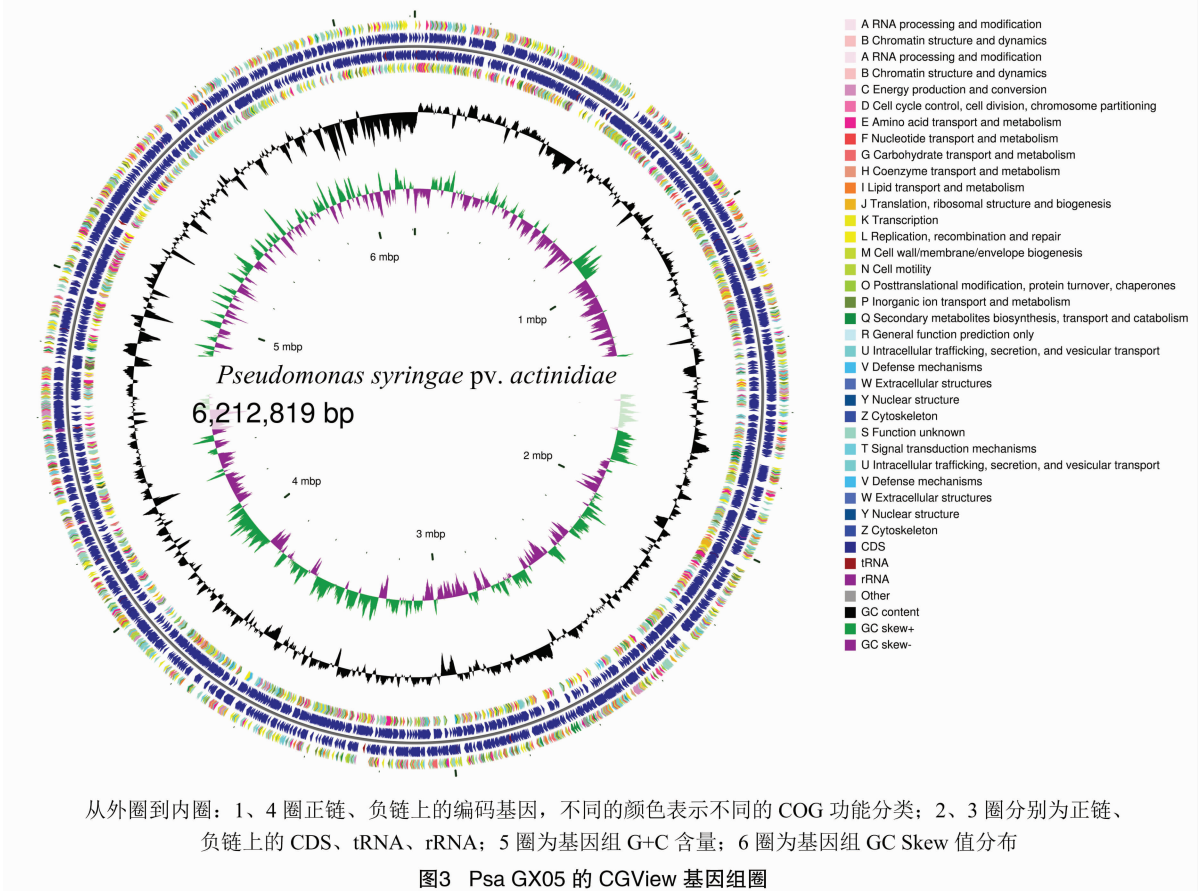


图4 基于多位点序列分型的系统发育分析结果

度最高的 2 个毒力因子与铁载体 (siderophore) 有关: 荧光铁载体 (pyoverdine, 简称 PVD) 肽合成酶 PvdL 以及合成耶尔森菌素 (yersiniabactin) 有关的耶尔森菌素生物合成蛋白 Irp1。另外经统计, 共匹配

到 51 个 PVD 合成相关毒力基因 (表 2, 未完全显示, 仅显示同源性最高的 10 个基因) 和 4 个非荧光铁载体 (pyochelin) 合成相关的毒力因子 [Fe(III) - pyochelin receptor precursor、salicylate biosynthesis

isochorismate synthase PchA、salicylate biosynthesis protein PchB、ABC transporter ATP – binding protein]。

2.6 Psa 菌株 GX05 耐药基因分析

通过与 CARD 数据库比对分析,预测 GX05 携带 366 个耐药基因,与 29 种抗生素有关(图 5)。经 ARO(Antibiotic Resistance Ontology)注释,GX05 有 5

种耐药机制,分别为抗生素外排、抗生素靶标改变、抗生素失活、抗生素靶标替代和抗生素靶标保护。外排泵系统的基因数量最多,主要包括 *macB* (31 个)、*oleC* (14 个)、*evgS* (13 个)、*drpA* (13 个)等 253 个相关抗生素耐药基因本体,其中根据 score 打分,同源性和匹配度最高的 10 个基因中与外排泵有关的基因是 *mexF*、*mexK*、*MexB*、*TriC*、*MexN*。

表 2 PVD 合成相关毒力基因统计

基因编号	位置	VFDB 编号	描述	同源性 (%)	覆盖度 (%)	E 值	得分
gene2544	Scaffold28	VFG016058 (gi:15597620)	肽合成酶 PvdL	72.3	100	0	16 429
gene2558	Scaffold28	VFG000161 (gi:15597595)	荧光铁载体合成酶 D	56.3	97.6	0	5 798
gene2556	Scaffold28	VFG016038 (gi:110645305)	荧光铁载体生物合成蛋白 PvdJ	52.0	95.6	$2.8 \times 10^{-302}$	2 667
gene4557	Scaffold81	VFG015950 (gi:15597581)	3 – 羧基 – C12 – 高丝氨酸内酯 PvdQ	54.2	98.7	$1.2 \times 10^{-237}$	2 108
gene2545	Scaffold28	VFG016046 (gi:15597609)	二氨基丁酸 – 2 – 氧化戊二酸氨基转移酶 PvdH	84.8	99.1	$9.7 \times 10^{-230}$	2 038
gene4548	Scaffold81	VFG000160 (gi:15597593)	荧光铁载体生物合成蛋白 PvdE	60.4	98.4	$1.8 \times 10^{-185}$	1 657
gene4550	Scaffold81	VFG015994 (gi:15597590)	荧光铁载体生物合成蛋白 PvdN	63.0	99.1	$1.6 \times 101^{-157}$	1 415
gene2560	Scaffold28	VFG000163 (gi:15597594)	荧光铁载体受体 FpvA	37.5	98.7	$5.9 \times 10^{-134}$	1 214
gene4549	Scaffold81	VFG016005 (gi:15597591)	荧光铁载体生物合成蛋白 PvdO	67.3	98.3	$5.8 \times 10^{-116}$	1 055
gene2543	Scaffold28	VFG016069 (gi:15597621)	荧光铁载体生物合成蛋白 PvdG	51.0	99.6	$1.0 \times 10^{-68}$	647

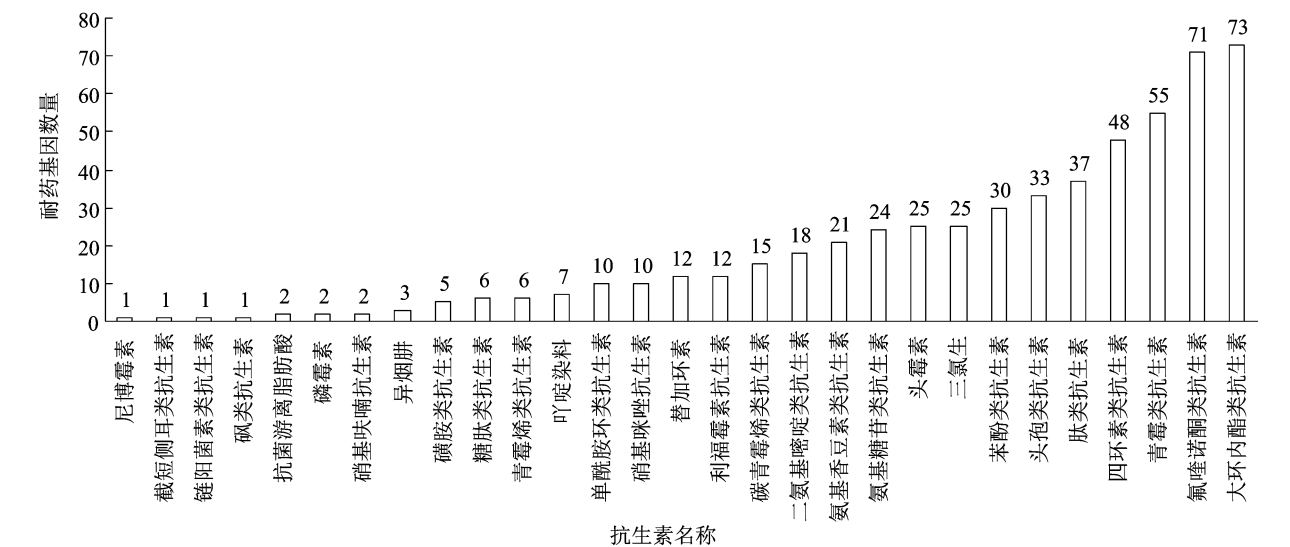


图5 耐药基因数量与抗生素种类的关系

2.7 Psa 菌株 GX05 致病基因分析

PHI 数据库注释预测 GX05 携带有 959 个与宿主病原菌互作相关的基因,属于 8 种表现型:缺失导致病原菌致病力减弱的基因 643 个、对病原菌致病性没有影响的基因 172 个、导致病原菌致病能力丧失的基因 99 个、使病原菌致病能力增强的基因 68 个、致病效应基因 34 个、致死因子 18 个、抗药基因 3 个、感药基因 2 个。比对结果按照得分打分,同源

性和匹配度最高的是不表达导致病原菌致病能力减弱的并与铁载体有关的基因 *PvdL*,此外与增强病原菌致病能力有关并且同源性和匹配度最高的基因是三型分泌系统通路上的基因 *hrcC*。当筛选作用宿主为拟南芥时,高度匹配得到 5 个基因,其中 *AvrE1*、*hrcC*、*HopD1* 等 3 个基因与植物感染后叶片出现细菌性斑点的症状有关(表 3)。

表 3 宿主为拟南芥的高度匹配的病原基因预测结果

基因编号	位置	基因名称	基因功能	PHI 编号	宿主名称	疾病名称	同源性 (%)	覆盖度 (%)	E 值	得分
gene1530	Scaffold14	<i>AvrEI</i>	Ⅲ型效应因子	PHI:6377	拟南芥	细菌性斑点病	94.3	100	0	8 473
gene3861	Scaffold58	<i>cyaA</i>	合成 cAMP	PHI:2950	拟南芥;烟草	野火病	93.5	100	0	4 696
gene4590	Scaffold82	<i>HopAUI</i>	莽草酸激酶	PHI:590	拟南芥	斑枯病	98.6	89.8	0	3 599
gene1542	Scaffold14	<i>hrcC</i>	与Ⅲ型分泌系统有关	PHI:6727; PHI:6728	拟南芥	番茄细菌性斑点病	99.9	100	0	3 559
gene4045	Scaffold63	<i>HopDI</i>	效应因子	PHI:4005	拟南芥	番茄细菌性斑点病	98.4	96.3	0	3 423

3 讨论与结论

由于红阳猕猴桃和黄金果猕猴桃的栽培面积最广、经济价值高,所以全世界对猕猴桃溃疡病的关注点主要集中于这 2 个品种,对其他患有猕猴桃细菌性溃疡病的猕猴桃品种的研究较少。本研究是首次对从患病的东红猕猴桃枝条中分离出的 *Psa* (菌株命名为 GX05) 进行全基因组扫描图测序,并且着重分析耐药基因以及同源性和匹配度最高的毒力基因和致病基因。

注射烟草和真空渗透叶盘的结果证明 *Psa* 菌株 GX05 有致病力。从使用 MLST 构建的系统发育树结果来看,GX05 属于 biovar 3。biovar 3 是我国目前发现唯一存在的 *Psa* 群体<sup>[15]</sup>,也是目前全世界最普遍流行的 *Psa* 群体<sup>[27]</sup>。在 5 种生物型中,biovar 3 的致病力最强<sup>[28]</sup>,但其致病机制尚不明确。Hacker 等发现,病原菌的致病性取决于位于毒力岛上的多种毒力基因<sup>[29-30]</sup>,而各种毒力因子的组合与平衡对于 *Psa* 的致病性(毒力)来说很重要<sup>[27]</sup>。目前对感染溃疡病的东红猕猴桃的研究主要以调查其发病情况<sup>[31]</sup>和抗性评价<sup>[32]</sup>为主,针对致病菌 *Psa* 致病及耐药机制的研究尚未见报道。因此本研究着重关注了导致东红感染猕猴桃细菌性溃疡病的 *Psa* 菌株的毒力和致病基因以及导致其产生耐药性的原因。本次测序结果得到的 GX05 基因组大小为 6 212 819 bp,与 NCBI 数据库中丁香假单胞菌的基因组大小(6.1 Mp)接近。根据全基因组测序结果,通过分析毒力基因和致病基因,筛选出 3 个同源性最高且最具代表性的基因:*PvdL*、*Irp1*、*hrcC*;分析耐药基因发现,该菌携带多种类型的耐药基因,并且以外排泵系统基因为主。

本研究预测到 692 个毒力基因,同源性和匹配度最高的基因与铁载体的合成有关。Marcelletti 等

对 2 株 *Psa* biovar 1 和 1 株 biovar 3 菌株基因组的草图进行研究,发现它们均携带一组编码铁载体(铁载体是假单胞菌属细菌的重要毒力因子<sup>[34]</sup>)的基因,例如 PVD、肠杆菌素(enterobactin)和耶尔森菌素<sup>[33]</sup>。Lamont 等发现,PVD 在铜绿假单胞菌中可以调控外毒素 A、PrpL 等其他毒力因子的表达<sup>[35]</sup>;Wooldridge 等发现,PVD 参与调控生物膜的形成,增加病原菌的耐药性<sup>[36]</sup>。从测序结果来看,GX05 的基因组中共计匹配到 51 个合成荧光铁载体相关毒力基因,覆盖了 PVD 合成、分泌和作用途径,其中 *PvdL* 的同源性最高。结合 GX05 中 PVD 的存在可以初步判定,*Psa* 分离株具有与铜绿假单胞菌相似的毒力因子和致病机制,生物膜的形成是 *Psa* 产生耐药性的主要原因。*Irp1* 广泛存在于假单胞菌属的细菌中<sup>[37]</sup>,编码耶尔森菌素生物合成蛋白<sup>[38]</sup>,与合成、摄取铁载体有关<sup>[39]</sup>,引起番茄和拟南芥的细菌性叶斑病<sup>[40]</sup>。测序结果预测显示,*Irp1* 是与增强 *Psa* 致病力有关同源性最高的基因。因此,*Psa* 可能通过 *Irp1* 来调控铁载体和其他铁吸收系统,从而在猕猴桃中繁殖并增强 *Psa* 的感染能力,这可能是 *Psa* 破坏力强大并造成毁园的主要原因。但目前 *Psa* 中还没有 *Irp1* 功能研究的相关报导。此外,感染溃疡病的猕猴桃叶片出现叶斑的原因也可能与 *Irp1* 有关。McCann 等研究发现,*Psa* 通过Ⅲ型分泌效应因子感染猕猴桃<sup>[41]</sup>,而 *hrcC* 蛋白是组成Ⅲ型分泌系统的外膜蛋白<sup>[42]</sup>,可以引起非宿主植物(如烟草)的过敏反应并使宿主植物感病<sup>[43]</sup>。本次的全基因组测序数据显示,同源性最高的互作基因是 *hrcC*。因此,携带 *hrcC* 的Ⅲ型分泌系统可能是引起 *Psa* 感染猕猴桃并使得叶片出现细菌性斑点的原因之一。目前对于 *Psa* 的毒力因子和病原菌宿主互作的主要集中于Ⅲ型分泌系统中的 *avr* 和 *hop* 基因<sup>[27]</sup>,而 *hrcC* 的存在为完善 *Psa* 分泌系统通路提供了新



的途径。通过 CARD 预测到 GX05 携带多种耐药基因,以外排泵系统产生抗生素耐药性为主。外排泵能够将进入细菌体内的抗生素排出<sup>[44]</sup>,因此 GX05 可能主要靠外排泵系统产生耐药性。药敏试验发现,GX05 对替考拉宁、杆菌肽和阿莫西林表现出了耐药性,这 3 种抗生素分别属于糖肽类抗生素、多肽类抗生素和青霉类抗生素,与预测到的信息相匹配。

首先从患病的东红猕猴桃枝条中分离出 Psa (菌株命名为 GX05),并对其进行烟草过敏反应试验和抗生素敏感性试验,最后对其基因组进行扫描图测序。分析发现,其致病机制主要是与 PVD 的合成和分泌有关,并发现其导致叶片出现叶斑病的是 Irp1 致病基因。这为进一步研究 Psa 的致病机制提供了新的思路,在未来可以寻找影响 Psa 的铁载体和外排泵系统发挥作用的方法来治疗猕猴桃细菌性溃疡病。

#### 参考文献:

- [1] Vanneste J L. The scientific, economic, and social impacts of the New Zealand outbreak of bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) [J]. Annual Review of Phytopathology, 2017, 55(1): 377–399.
- [2] Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan [J]. Japanese Journal of Phytopathology, 1989, 55(4): 437–444.
- [3] Scortichini M, Marcelletti S, Ferrante P, et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(7): 631–640.
- [4] Vanneste J L. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa): a threat to the New Zealand and global kiwifruit industry [J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2012, 40(4): 265–267.
- [5] Kim M J, Chae D H, Cho G, et al. Characterization of antibacterial strains against kiwifruit bacterial canker pathogen [J]. The Plant Pathology Journal, 2019, 35(5): 473–485.
- [6] Horgan D B, Gaskin R E. The effect of copper on the uptake and translocation of spirotetramat insecticide on kiwifruit [J]. New Zealand Plant Protection, 2015, 68: 26–31.
- [7] 秦虎强, 赵志博, 高小宁, 等. 四种杀菌剂防治猕猴桃溃疡病的效果及田间应用技术 [J]. 植物保护学报, 2016, 43(2): 321–328.
- [8] Wicaksono W A, Jones E E, Casonato S, et al. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, using endophytic bacteria recovered from a medicinal plant [J]. Biological Control, 2018, 116: 103–112.
- [9] Pinheiro L, Pereira C, Frazão C, et al. Efficiency of phage  $\phi 6$  for biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: an *in vitro* preliminary study [J]. Microorganisms, 2019, 7(9): 286.
- [10] 高小宁, 赵志博, 黄其玲, 等. 猕猴桃细菌性溃疡病研究进展 [J]. 果树学报, 2012, 29(2): 262–268.
- [11] 罗 轩, 李才国, 张 蕾, 等. 早熟抗溃疡病猕猴桃优系“JS67”选育初报 [J]. 中国南方果树, 2018, 47(5): 148–150.
- [12] de Jong H, Reglinski T, Elmer P A G, et al. Integrated use of *Aureobasidium pullulans* strain CG163 and acibenzolar-S-methyl for management of bacterial canker in kiwifruit [J]. Plants, 2019, 8(8): 287.
- [13] 李春游, 赵志博, 吴玉星, 等. 陕西关中地区猕猴桃溃疡病菌对链霉素的抗性监测 [J]. 中国果树, 2016(6): 59–62.
- [14] Masami N, Masao G, Hibi T. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato* [J]. Journal of General Plant Pathology, 2002, 68(1): 68–74.
- [15] He R, Liu P, Jia B, et al. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from different geographic regions in China [J]. Phytopathology, 2019, 109(3): 347–357.
- [16] 马志宏, 杨 慧, 李铁梁, 等. 西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 致病性维氏气单胞菌的分离鉴定 [J]. 微生物学报, 2009, 49(10): 1289–1294.
- [17] 钟永军, 何昕蔚, 余达勇, 等. 台州猕猴桃溃疡病病原分子鉴定及药剂筛选 [J]. 浙江农业学报, 2018, 30(9): 1548–1554.
- [18] Luo R B, Liu B H, Xie Y L, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler [J]. GigaScience, 2012, 1(1): 18.
- [19] Stothard P, Wishart D S. Circular genome visualization and exploration using CGView [J]. Bioinformatics, 2005, 21(4): 537–539.
- [20] Delcher A L, Bratke K A, Powers E C, et al. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer [J]. Bioinformatics, 2007, 23(6): 673–679.
- [21] Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(2): 573–580.
- [22] Sarkar S F, Guttman D S. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4): 1999–2012.
- [23] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [24] Chen L H, Zheng D D, Liu Bo, et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis – 10 years on [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(1): 694–697.
- [25] Jia B F, Raphenya A R, Alcock B, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(1): 566–573.
- [26] Urban M, Cuzick A, Rutherford K, et al. PHI-base: a new interface and further additions for the multi-species pathogen-host interactions database [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(1): 604–610.
- [27] Fujikawa T, Sawada H. Genome analysis of *Pseudomonas syringae*

- pv. *actinidiae* biovar 6, which produces the phytotoxins, phaseolotoxin and coronatine [J]. Scientific Reports, 2019, 9 (1):3836.
- [28] Koh H S, Kim G H, Lee Y S, et al. Molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated in Korea and a multiplex PCR assay for haplotype differentiation [J]. The Plant Pathology Journal, 2014, 30(1):96–101.
- [29] Hacker J, Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity [J]. EMBO Reports, 2001, 2(5):376–381.
- [30] Hacker J, Blumoeher G, Muhldorfer I, et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution [J]. Molecular Microbiology, 1997, 23(6):1089–1097.
- [31] 何利钦, 王丽华, 李明章, 等. 四川省猕猴桃溃疡病调查及病原菌株型鉴定 [J]. 中国南方果树, 2019, 48(4):73–78, 90.
- [32] 崔丽红, 高小宁, 张迪, 等. 湘西地区猕猴桃细菌性溃疡病抗性资源筛选及其抗性机理研究 [J]. 植物保护, 2019, 45(3):158–164.
- [33] Marcelletti S, Ferrante P, Petriccione M, et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species [J]. PLoS One, 2011, 6(11):e27297.
- [34] Neilands J B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(45):26723–26726.
- [35] Lamont I L, Beare P A, Ochsner U, et al. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(10):7072–7077.
- [36] Wooldridge K G, Williams P H. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1993, 12(4):325–348.
- [37] Katuzna M. Characterization and phylogeny of the novel taxon of *Pseudomonas* spp., closely related to *Pseudomonas avellanae* as causal agent of a bacterial leaf blight of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* as a new bacterial pathogen of red dogwood (*Cornus sanguinea* L.) [J]. Journal of Plant Pathology, 2019, 101(2):251–261.
- [38] 王斌, 叶冬青, 王红, 等. 大肠埃希菌中强毒力岛的 *irp1*、*irp3*、*irp4* 基因检测 [J]. 疾病控制杂志, 2005, 9(5):376–379.
- [39] Carniel E, Guilvout I, Prentice M. Characterization of a large chromosomal “high-pathogenicity island” in biotype 1B *Yersinia enterocolitica* [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(23):6743–6751.
- [40] Expert D, Franza T, Dellagi A. Iron in plant-pathogen interactions [M]//Expert D, O'Brian M R. Molecular Aspects of Iron Metabolism in Pathogenic and Symbiotic Plant-Microbe Associations. Dordrecht:Springer, 2012:7–39.
- [41] McCann H C, Rikkerink E H, Bertels F, et al. Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease [J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(7):e1003503.
- [42] Alfano J R, Collmer A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, avr proteins, and death [J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(18):5655–5662.
- [43] Deng W L, Preston G, Collmer A, et al. Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *tomato*, and *glycinea* and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(17):4523–4531.
- [44] Abreu A C, McBain A J, Simões M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents [J]. Natural Product Reports, 2012, 29(9):1007–1021.
- (上接第 61 页)
- [26] 杜琳. *OsSUT* 对水稻灌浆生理的分子调控 [D]. 福州: 福建农林大学, 2010:9–10.
- [27] 王旭明, 赵夏夏, 陈景阳, 等. 盐胁迫下水稻孕穗期 SS 和 SPS 活性与糖积累的响应及其相关性分析 [J]. 江苏农业学报, 2018, 34(3):481–486.
- [28] Sun Y, Reinders A, Lafleur K R, et al. Transport activity of rice sucrose transporters *OsSUT1* and *OsSUT5* [J]. Plant & Cell Physiology, 2010, 51(1):114–122.
- [29] Evance L T. 作物产量的生理基础 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1978:253–274.
- [30] Murayama N, Oshima M, Tsukahara S. Studies on the dynamic status of substance during ripening processes in the rice plant VI [J]. J Sci Soil Manure, 1961, 32:261–265.
- [31] Yan S, Zou G H, Li S J, et al. Seed size is determined by the combinations of the genes controlling different seed characteristics in rice [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 123(7):1173–1181.
- [32] Wang E T, Wang J J, Zhu X D, et al. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication [J]. Nature Genetics, 2008, 40(11):1370–1374.
- [33] Wang E T, Xu X, Zhang L, et al. Duplication and independent selection of cell-wall invertase genes *GIF1* and *OsCIN1* during rice evolution and domestication [J]. BMC Evol Biol, 2010, 10:1471–2148.
- [34] Budsaraporn N, Anna S, Taito T, et al. Characterization of rice functional monosaccharide transporter, *OsMST5* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2014, 67(3):556–562.