

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (10) :1264 – 1272; 4 October 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150012

十字花科黑腐病菌一个新的 III 型效应物 XC3176 的鉴定

杨丽超¹, 苏华¹, 杨凤¹, 蹇华晔¹, 周敏¹, 姜伟^{1,2}, 姜伯乐^{1,2*}

¹广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004

²亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004

摘要: 【目的】在十字花科黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 的致病因子中, III 型分泌系统 (Type III Secretion System, T3SS) 是至关重要的致病系统, III 型效应物通过 III 型分泌系统直接转运到寄主植物细胞内。本研究通过效应物水平转移的特征获得候选基因, 旨在鉴定一个新的依赖于 III 型分泌的效应物。【方法】以缺失了 N-端 58 个氨基酸的 AvrBs1 作为报告系统构建效应物鉴定报告质粒 pLJB3176, 导入 Δ avrBs1 和 Δ hrcV, 通过检测报告菌株在辣椒 ECW-40R 上的过敏反应来鉴定 XC3176 是否为 III 型效应物。构建 XC3176 融合 GUS 报告质粒 pLGUS3176, 导入野生菌株 *Xcc* 8004、 Δ hrpG 和 Δ hrpX, 通过测定菌株 GUS 活性检测 *hrpG*、*hrpX* 对 XC3176 的调控作用。构建 XC3176 缺失突变体和互补菌株, 通过剪叶法接种检测 XC3176 对 *Xcc* 8004 致病性的影响。【结果】XC3176 融合 AvrBs1 报告菌株在非寄主辣椒 ECW-40R 上能引发过敏反应, GUS 活性检测显示 Δ hrpG/pLGUS3176、 Δ hrpX/pLGUS3176 比 8004/pLGUS3176 的 GUS 酶活显著降低, 致病性检测显示突变体 Δ 3176 与野生型 *Xcc* 8004 相比在寄主满身红萝卜上的病斑长度有显著减少, 互补菌株 C3176 的病斑长度能补回到野生型水平。【结论】XC3176 是依赖于 *hrcV* 分泌的 III 型效应物, *hrpG*、*hrpX* 正调控 XC3176, XC3176 与 *Xcc* 致病相关。

关键词: 十字花科黑腐病菌, XC3176, III 型效应物, *hrpG*, *hrpX*

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 10-1264-09

十字花科黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 能引起十字花科植物产生黑腐病, 是研究植物与病原微生物互作的重要模式菌^[1]。植物病原细菌的 III 型分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 由 *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) 基因编码^[2]。编码 T3SS 的基因最早报道于丁香假单胞菌菜豆致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)^[3-4], 这些基因总是成簇存在于 *hrp* 致病岛上^[5-7]。III 型分泌效应物 (type III

secreted effectors, T3SEs) 指通过 T3SS 转运至寄主细胞内, 起识别和致病作用的病原细菌分泌蛋白, 包括无毒蛋白和一些其他分泌蛋白。无毒蛋白是由无毒基因编码的, 无毒基因属于 T3SEs 基因。依赖于 T3SS 分泌的蛋白并不都进入宿主细胞, 不进入宿主细胞的那部分蛋白主要的作用是辅助效应物的分泌和转运^[8]。有研究表明 *hrp* 致病岛和许多 III 型效应物基因是水平转移获得的^[5-7]。

十字花科黑腐病菌中, *hrpG* 和 *hrpX* 是 *hrp* 基因

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260443); 广西自然科学基金项目 (2014GXNSFFA118005, 2013GXNSFAA019097)

* 通信作者。Tel: +86-771-3239255; E-mail: jbl1971@gxu.edu.cn

作者简介: 杨丽超 (1986 -), 女, 广西南宁人, 博士研究生, 主要从事微生物学及微生物与植物相互作用研究。E-mail: yang_lichao@qq.com

收稿日期: 2015-01-11; **修回日期:** 2015-03-20

调控最关键的调控基因。HrpG 是一个隶属 OmpR 家族的双组分系统调控蛋白^[9], HrpX 是一个类 AraC 家族的转录激活蛋白, 调控下游 *hrp* 基因簇内的 *hrp* 基因以及效应物基因的表达^[10]。

在黄单胞菌属的辣椒斑点黄单胞菌 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*) 中, 效应物的研究进展相对领先, 建立了一些筛查效应物的方法。比较有实用性和代表性的方法有植物诱导启动子盒 (PIP-box) 搜寻^[11]、HrpG 调控基因 cDNA-AFLP^[12]、无毒蛋白^[13] 和腺苷酸环化酶报告系统^[14] 等。在辣椒斑点病菌的 *hrp* 基因簇中, 受 HrpX 直接调控的基因启动子区域一般都有一段保守的 DNA 序列 TTCGB-N₁₅-TTCGB, 被称为植物诱导启动子盒 (Plant-inducible promoter, PIP-box)^[11]。虽然目前已知部分 III 型效应物基因启动子区并没有 PIP-box, 但通过全基因组范围搜索 PIP-box 仍是一种鉴定病原细菌效应物候选基因的重要方法。采用 cDNA-AFLP 技术, 目前在黄单胞菌属辣椒斑点病菌致病变种中已鉴定了 30 个 *hrpG* 诱导的 cDNA 片段和 5 个 *hrpG* 抑制的 cDNA 片段。序列分析显示这些片段有的编码胞外蛋白酶, 有的为转录调控蛋白, 还有的为效应物蛋白 XopJ 和 XopB。通过以无毒蛋白和腺苷酸环化酶作为报告蛋白鉴定 III 型效应物的系统, 鉴定了大量的效应物基因。已经成功利用腺苷酸环化酶实现对黄单胞菌 III 型效应物的转运的研究^[14]。目前在水稻白叶枯病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzae*)^[15]、茄科罗尔斯通氏菌 (*Ralstonia solanacearum* GMI1000)^[16]、丁香假单胞菌 (*P. syringae*)^[17] 中利用这个报告系统已经鉴定了一批效应物基因。

在 *Xcc* 8004 中, 利用在抗性品种鉴定无毒基因的方法鉴定了 AvrBs2^[18]、AvrXccC、AvrXccE1、AvrBs1 为 III 型效应物^[19]。通过缺失了 N 端 1-58 个氨基酸的 AvrBs1 作为报告系统鉴定了 AvrAC_{Xcc8004}^[20]、XopXccN^[21] 为 III 型效应物, 通过全基因组搜寻启动子区含有 PIP-box 以及受到 *hrpX* 调控的基因作为候选基因, 并用 AvrBs1 报告系统鉴定了 6 个 III 型效应物: XopXccE1、XopXccP、XopXccQ、XopXccR1、XopXccLR 和 AvrXccB^[22]。

通过对已鉴定的 III 型效应物分析可知大部分效应物基因具有水平转移特征, 包括: 在基因附近有明显的基因缺失或重排、基因附近含有移动元

件 IS 序列或 tRNA、相比基因组其他部分的 DNA 的 G + C 含量有明显差异等等^[23-24]。*Xcc* 8004 中已鉴定的 III 型效应物 XopXccQ 由 XC3177 编码, KEGG 分析 XC3177 及其附近基因在黄单胞菌属其他致病变种的同源基因发现, 这些基因发生了重排, 暗示这部分基因可能是在进化过程中水平转移而来。本研究以 XC3177 附近水平转移的基因 XC3176 作为候选基因, 鉴定其是否为依赖于 III 型分泌的效应物。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

本研究所用的菌株和质粒见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 培养温度为 37 °C, 培养基为 LB (Lysogeny Broth)^[25], 十字花科黑腐病菌培养温度为 28 °C, 培养基为 NYG (Nutrient Yeast Glycerol)^[26] 或 MMX^[27]。菌株培养使用的抗生素浓度如下: 四环素 (Tetracycline, Tc) 大肠杆菌用量为 15 μg/mL, *Xcc* 用量为 5 μg/mL, 利福平 (Rifampicin, Rif) 50 μg/mL, 卡那霉素 (Kanamycin, Kan) 25 μg/mL。

1.2 引物和试剂

主要试剂: *Taq* DNA 聚合酶购买于 TaKaRa 公司 (中国大连), T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购买于 Promega 公司 (中国上海), PCR 产物纯化试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、质粒提取试剂盒等购买于博日公司 (中国杭州), 根据 *Xcc* 8004 菌株的核苷酸序列^[30], 按照试验需要设计引物见表 2。

1.3 效应物转运报告系统的检测

1.3.1 效应物转运报告系统的构建: 以 *Xcc* 8004 的 DNA 为模板, XC3176F、XC3176R 为引物, 用 *Ex Taq* 酶扩增 XC3176 启动子及信号区 DNA 片段, 将扩增的 XC3176 启动子及信号区 DNA 片段和 pK18mob 载体分别用 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切, 然后连接, 转化。所得转化子提质粒进行 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切鉴定, 酶切正确的阳性克隆送至北京六合华大基因股份有限公司测序, 将测序正确的 pK3176 经 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切, 克隆至报告质粒 pLJB, 获得重组报告质粒 pLJB3176。将重组质粒 pLJB3176 通过三亲本接合, 分别导入十字花科黑腐病菌 ΔavrBs1 和 ΔhreV 菌株, 在丰富培养基上以 Rif + Kan + Tc 筛选获得三亲接合子。

表 1. 本研究所用的菌株和质粒

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in the study

Strains and plasmids	Relevant characteristics ^a	Source reference
<i>Xcc</i>		
<i>Xcc</i> 8004	Wild type strain, Rif ^r	[26]
Δ hrpG	<i>hrpG</i> mutant of <i>Xcc</i> 8004, Rif ^r , Kan ^r	[21]
Δ hrpX	<i>hrpX</i> mutant of <i>Xcc</i> 8004, Rif ^r , Kan ^r	[21]
Δ avrBs1	<i>avrBs1</i> mutant of <i>Xcc</i> 8004, Rif ^r , Kan ^r	[21]
Δ hrcV	<i>hrcV</i> pK18mob integration mutant of 8004, Rif ^r , Kan ^r	[28]
Δ 3176	XC3176 deletion mutant of <i>Xcc</i> 8004, Rif ^r	this work
C3176	Δ 3176 harboring pJC3176, Rif ^r , Tc ^r	this work
Plasmids		
pK18mob	Suicide plasmid in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , Kan ^r	[29]
pK18mobsacB	Sucrose-sensitive suicide plasmid, Kan ^r	[29]
pLAFRJ	Shuttle plasmid pLAFR3 derivative containing the multiple cloning sites of pUC19, Tc ^r	[22]
pLGUS	pLAFR6 containing a promoterless <i>gus</i> gene, Tc ^r	[21]
pLJB	pLAFR6 containing <i>avrBs1</i> ₅₉₋₄₄₅ , Tc ^r	[21]
pK3176	pK18mob containing the promoter and signal region of XC3176, Kan ^r	this work
pK3176	pK18mob containing the promoter and entire XC3176 gene, Kan ^r	this work
pLGUS3176	pLGUS containing the promoter and signal region of XC3176, Tc ^r	this work
pLJB3176	pLJB containing the promoter and signal region of XC3176, Tc ^r	this work
pJC3176	pLAFRJ containing the promoter and entire XC3176 gene; Tc ^r	this work
pKD3176	A 1400-bp fusion of the flanking fragments of the XC3176 were ligated into pK18mobsacB, Kan ^r	this work

^a Rif = Rifampicin, Kan = Kanamycin, and Tc = Tetracycline.

表 2. 本研究所用的引物

Table 2. Primers used in the study

Primers	Primers sequence (5'→3') ^a	Purpose
XC3176F (<i>EcoR</i> I)	<u>GGGAATTC</u> CAGGTGTTGATCTGCCGACAC	PCR amplification of the promoter and signal region of XC3176
XC3176R (<i>BamH</i> I)	GGGGATCC ATTCTTTTCCAGGACACCTCCC	
3176LF (<i>EcoR</i> I)	<u>GGGGAATTC</u> TTCGGCAAGCATTGGCGCTGTGTG	deletion mutant construction of XC3176
3176LR (<i>BamH</i> I)	<u>GGGGATCC</u> CCACAGAAGTCACTGGGAAGGAACC	
3176RF (<i>BamH</i> I)	<u>GGGGATCC</u> ATGGTTGAAAGGTGTTTCATGCGTG	
3176RR (<i>Xba</i> I)	<u>GGTCTAGA</u> TCCAACGTCCTTCTGCTGCGTACCG	
C3176F (<i>EcoR</i> I)	<u>GGGGAATTC</u> ATTTTTCGGTCTTGGCCAAAGC	complementation
C3176R (<i>BamH</i> I)	<u>GGGGATCC</u> AAACCACCTTCAACCATCG	

^a Added restriction sites are underlined.

1.3.2 效应物转运报告系统的过敏反应检测: 将待测 *Xcc* 菌株培养过夜, 以空白 NYG 为对照, 测定 600 nm 的吸收值。将菌株的 OD_{600} 调整一致后离心收集菌体, 用无菌水稀释至 $OD_{600} = 0.5$ 。用经过灭菌的微量注射器, 采用压渗法将用水稀释过的菌液从非寄主辣椒 ECW-10R 的叶背压入细胞间隙, 置于 28 °C 持续光照培养。在辣椒叶压渗处, 约 8 h 后出现枯斑, 即为过敏性反应, 持续观察结果并照相。

1.4 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 的活性的检测

1.4.1 GUS 融合构建: 用 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切 pK3176, 获得 XC3176 启动子信号区片段, 胶回收后克隆至 pLGUS 的 *EcoR* I 和 *BamH* I 位点上, 获

得重组质粒 pLGUS3176。将重组质粒 pLGUS3176 通过三亲接合, 分别导入十字花科黑腐病菌 *Xcc* 8004、 Δ hrpG 和 Δ hrpX 菌株, 在丰富培养基上分别以 Rif + Tc 和 Rif + Kan + Tc 筛选获得三亲接合子。

1.4.2 GUS 活性定量检测: 将待测 *Xcc* 菌株在 28 °C 过夜培养, 以空白 NYG 为对照, 测定 600 nm 的吸收值。将菌株的 OD_{600} 调整一致后按照 10% 接种量转接至 MMX 培养基培养 24 h 后测定 GUS 活性。酶活定义为: 1 mL 菌液在 OD_{600} 值为 1 的条件下, 每分钟水解对硝基苯基- β -D-葡萄糖醛酸苷 (*p*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, PNPG) 产生 1 mg 对硝基苯酚的量为一个酶活单位 1 U^[31]。

1.5 缺失突变体和互补菌株的构建

PCR 分别扩增 XC3176 基因 ORF 上游和下游大约 700 bp 左右长度片段, 上下游片段分别经双酶切后连接到相同酶切位点的 pK18mobsacB 载体上, 三片段连接后转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 得到的转化子经 PCR 验证、酶切验证和测序正确后, 通过三亲本接合方法导入到野生型 *Xcc* 8004 菌株中, 获得三亲接合子。三亲接合子先接种于含 Rif、不含蔗糖的 NYG 液体培养基中进行同源双交换, 然后梯度稀释涂板于含有 10% 蔗糖和 Rif 的 NYG 平板上, 长出的单菌落分别平行转点加 Rif 和 Rif + Kan 的 NYG 平板上, 挑取在 Rif 生长但是在 Kan 平板上不能生长的单菌落提取总 DNA 进行 PCR 验证, 验证正确的为突变体 Δ 3176。

PCR 扩增 XC3176 基因包含启动子以及完整 ORF 的 XC3176 互补 DNA 片段, 双酶切后连接至 pK18mob 克隆载体上得到重组质粒 pKC3176, 经测序正确的互补片段酶切胶回收连接至 pLAFRJ 载体, 得到重组质粒 pJC3176, 三亲本接合导入突变体 Δ 3176, 用含有 Rif + Tc 的 NYG 平板筛选, 得到互补菌株 C3176。

1.6 寄主植物满身红萝卜上的致病性检测以及菌株在寄主内生长情况的测定

选取苗龄一致、大小相近的 5 叶期的满身红萝卜苗作为供试寄主植物。所用的接种方法是剪叶法, 每盆苗剪 2 片叶, 为距心叶最近的全展叶及其内侧相邻的一片叶 (3、4 位叶), 每一处理重复 3 盆或以上。将过夜培养的 *Xcc* 菌株, 用 NYG 稀释到一致浓度 (OD_{600} 为 0.001), 用经过灭菌的剪刀蘸取菌液, 在叶片距叶尖 1 cm 处垂直于中轴叶脉剪断, 在剪断过程中停留 5 s, 25–30 °C 保湿培养 24 h 后继续在温室 25–30 °C 培养。接种后按天观察记录, 观察病症变化, 第 10 d 用直尺量取病斑长度。

为了检测菌株在寄主满身红上的生长情况, 从接种后的当天开始, 每隔一天每个菌株取 3 片叶子, 用 75% 酒精进行表面消毒后, 在超净工作台用灭菌后的研钵研磨, 并按一定梯度稀释, 涂布于含有相应抗生素的平板上, 放置于 28 °C 培养 3 d 后计算每片叶片上的细菌数, 并取对数绘制叶内生长曲线, 每个样本进行 3 个生物学重复。

1.7 生物信息学分析

通过 KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and

Genomes 网站 (网址: <http://www.kegg.jp/kegg/>) 获取基因序列。通过 NCBI 网站的 protein blast 功能 (网址: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析基因同源性和一致性。通过 SMART 软件 (网址: <http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析预测蛋白结构域。

2 结果和分析

2.1 XC3176 具有水平转移特征

通过 NCBI 网站的 blastp 功能分析已鉴定的 III 型效应物 XC3177 的同源性可知, XC3177 在黄单胞菌属中相对比较保守, 但是 *X. campestris* pv. *raphani* 756C (简称 *Xcp*)^[32] 菌株中没有 XC3177 的同源基因, 在多个黄单胞菌菌株中并不与旁侧的基因位于相同的基因簇, 具有水平转移特征。分析 XC3177 旁侧基因的保守性可知, XC3175 几乎存在于所有黄单胞菌菌株中, 且氨基酸一致性大于 90%。XC3176 在 *Xcp* 中没有同源基因, 而在黄单胞菌属的其他菌株中较保守, 但是在一些菌株中不与 *Xcc* 8004 中的旁侧基因相邻, 如 *X. axonopodis* *Xac* 29–1, 在其它属的病原细菌中没有同源基因, 与 XC3177 一样具有水平转移特征。XC3178 在黄单胞菌属的菌株中只在 *Xcc* 8004、*X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913^[33] 和 *X. campestris* pv. *campestris* B100^[34] 三个菌株中存在同源基因, 具有典型的水平转移特征。XC3177 和旁侧基因保守性分析结果显示 XC3175 水平转移特征弱, XC3176、XC3177 和 XC3178 具有典型水平转移特征。一般 III 型效应物具有 N 端分泌和转运信号区, 50 到 100 个氨基酸残基^[35], XC3178 只有 89 个氨基酸残基, 虽然具备水平转移特征但不具备 III 型效应物的特征, XC3177 已被鉴定为 *Xcc* 8004 的 III 型效应物, 因此 XC3176 被作为候选基因进行 III 型效应物的鉴定。

2.2 XC3176 为依赖 *hrcV* 分泌的新的 III 型效应物

以 *Xcc* 8004 的 DNA 为模板, XC3176F、XC3176R 为引物, 用 *Ex Taq* 酶扩增 XC3176 启动子及信号区 DNA 片段, 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳证实, 符合设计要求, 得到长度为 904 bp 的 DNA 片段。将扩增的 XC3176 启动子及信号区 DNA 片段

和 pK18mob 载体分别用 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切, 然后连接, 转化。所得转化子提质粒进行 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切鉴定, 证实 XC3176 启动子及信号区 DNA 片段已成功地克隆到 pK18mob 上, 酶切正确的阳性克隆送至北京六合华大基因股份有限公司测序, 测序正确的重组质粒命名为 pK3176。将测序正确的 pK3176 经 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切, 克隆至报告质粒 pLJB, 获得重组报告质粒 pLJB3176。

将 *Xcc* 8004、 Δ avrBs1/pLJB3176 和 Δ hrcV/pLJB3176 在非寄主辣椒 ECW-10R 上检测过敏反应, 结果显示 *Xcc* 8004 和 Δ avrBs1/pLJB3176 能在 ECW-10R 上引发典型的过敏反应, 而 Δ hrcV/pLJB3176 和 H₂O 不能引发过敏反应, 如图 1。结果表明 XC3176 是依赖于 *hrcV* 分泌的 III 型效应物。

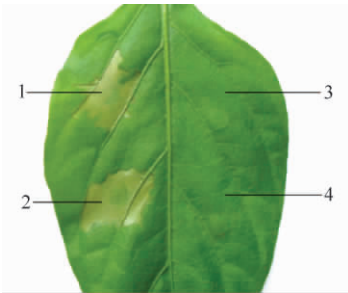


图 1. 报告菌株在辣椒 ECW-10R 植株上过敏反应的检测

Figure 1. HR test on pepper ECW-10R. 1. the wild-type strain 8004; 2. Δ avrBs1/pLJB3176; 3. H₂O; 4. Δ hrcV/pLJB3176.

2.3 *hrpG* 和 *hrpX* 正向调控 III 型效应物基因 XC3176

hrpG 和 *hrpX* 是 III 型分泌系统关键的两个调控基因, 正向调控大多数 III 型效应物的表达。为了检测新鉴定的 III 型效应物 XC3176 是否受到 *hrpG* 和 *hrpX* 的调控, 构建了 XC3176 启动子与信号区融合 GUS 报告质粒 pLGUS3176, 并分别导入到野生型菌株 *Xcc* 8004、突变体 Δ hrpG 和 Δ hrpX。在 III 型分泌系统受到诱导表达的 MMX 培养基中检测报告菌株的 GUS 活性, 结果显示如图 2, Δ hrpG/pLGUS3176、 Δ hrpX/pLGUS3176 与 8004/pLGUS3176 的 GUS 酶活相比显著降低 (*t*-test, $P < 0.01$), 表明 XC3176 基因的表达受 *hrpG*、*hrpX* 基因调控。

2.4 XC3176 基因影响 *Xcc* 8004 在寄主满身红萝卜上的致病性

为了检测新的 III 型效应物基因 XC3176 是否与 *Xcc* 8004 致病相关, 本研究构建了 XC3176 的缺

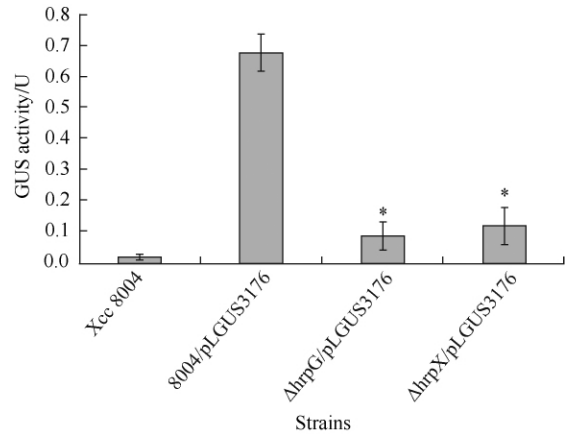


图 2. GUS 报告菌株在 MMX 培养基中的 GUS 酶活检测

Figure 2. Quantification assay for GUS activities of reporter strains in MMX medium.

失突变体 Δ 3176 以及互补菌株 C3176 用以检测致病性。以野生型 *Xcc* 8004 为正对照, Δ hrpG 为负对照, 将 XC3176 缺失突变体剪叶接种到寄主满身红萝卜上检测菌株致病性。致病性试验结果如图 3-A 所示, 结果显示 XC3176 突变后, 致病力与野生型菌株 *Xcc* 8004 相比显著降低 (*t*-test, $P < 0.01$), 互补菌株能补回至野生型菌株的致病力水平。效应物基因 XC3176 是十字花科黑腐病菌的一个致病相关基因。通过叶回收实验检测菌株在寄主满身红萝卜上的生长情况如图 3-B, 结果显示突变体 Δ 3176 以及互补菌株 C3176 与野生型 *Xcc* 8004 相比生长没有差异, 而负对照 Δ hrpG 与野生型相比在寄主内的生长水平显著降低。

3 结论和讨论

通过 AvrBs1 报告系统的过敏反应检测证实 XC3176 是一个依赖于 *hrcV* 分泌的 III 型效应物。 Δ avrBs1/pLJB3176 能产生过敏反应说明 XC3176 的启动子区与信号区能够使鉴定系统中的 AvrBs1 通过 T3SS 分泌出去, 在具有 Bs1 抗性的辣椒苗 ECW-10R 上引发过敏反应。而 HrcV 是 III 型分泌系统的装置蛋白, Δ hrcV/pLJB3176 不能产生过敏反应揭示了 *hrcV* 的缺失导致 III 型分泌系统无法正常组装使得 XC3176 启动子区与信号区和 *avrBs1* 所形成的嵌合蛋白无法分泌出去, 这也说明了 XC3176 的分泌依赖于 *hrcV*。

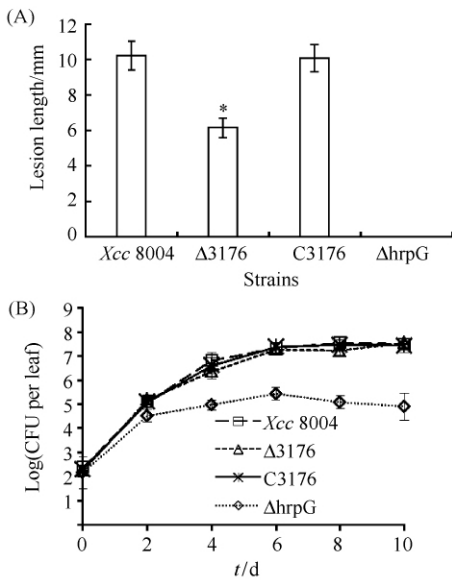


图 3. 野生型和突变体菌株在寄主满身红萝卜上的致病性检测

Figure 3. Virulence assay on host plant Chinese radish of the mutant and wild type strain.

XC3176 受到 *hrpG*、*hrpX* 正向调控, 表现为 $\Delta hrpG$ /pLGUS3176、 $\Delta hrpX$ /LGUS3176 与 8004/pLGUS3176 的 GUS 酶活相比显著降低。目前已有的研究发现 III 型效应物一般都受到 HrpX 的调控, 在 HrpX 直接调控的基因的启动子区域一般都有一段保守的 DNA 序列 TTCGB-N₁₅-TTCGB, 在 XC3176 的启动子区既没有严谨的 PIP-box, 也没有不严谨的 PIP-box, 因此 HrpX 对 XC3176 的调控是否为直接调控还需要进一步实验证实。也存在一种可能是 HrpX 直接调控另一个含有 PIP-box 的调控基因, 再由这个含有 PIP-box 的基因调控 XC3176 的表达。

许多 T3SEs 存在功能上的冗余且一般与已知功能的蛋白没有同源性, 因此单个 T3SE 的致病性可能很难被检测到^[36]。XC3176 突变后致病性与野生型菌株相比明显降低。在 *Xcc* 8004 菌株中已经鉴定的 III 型效应物中, 单个 T3SE 突变后影响致病性的还有 *XopXccN*^[21]、*XopXccE1*、*XopXccP*、*XopXccQ*、*XopXccR1* 和 *XopXccLR*^[22], 说明 *Xcc* T3SEs 对该植物病原细菌的致病性是极其重要的, 这可能与 *Xcc* 缺乏 TAL 效应物有关。

XC3176 基因注释为保守假定蛋白, 生物信息学分析未能发现典型结构域。XC3176 作为 III 型分泌效应物进入植物将行使什么功能、在植物中的靶标

是什么以及它被转运至植物细胞后是如何参与病原微生物与植物互作的, 都值得进一步研究。

生物信息学分析 XC3178 在大多数黄单胞菌的菌株中均不存在同源基因, 具备典型的水平转移特征。III 型效应物通常在 N 端有 50 - 100 个氨基酸残基的序列是分泌和转运信号区^[35], XC3178 只有 89 个氨基酸残基, 不具有 III 型效应物的分子特征, 因此本研究并没有把 XC3178 作为 III 型效应物的候选基因, 但 XC3178 是否与 XC3177、XC3176 分泌转运有关值得进一步研究。

参考文献

- [1] Rudolph K. Infection of the plant by *Xanthomonas*// Swings JG, Civerolo EL. *Xanthomonas*. Netherlands: Springer, 1993: 193-264.
- [2] Alfano JR, Collmer A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (18): 5655-5662.
- [3] Niepold F, Anderson D, Mills D. Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82 (2): 406-410.
- [4] Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *Journal of Bacteriology*, 1986, 168 (2): 512-522.
- [5] He SY, Nomura K, Whittam TS. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1694 (1/3): 181-206.
- [6] Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2 (5): 414-424.
- [7] Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33 (2): 376-393.
- [8] Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (5): 1340-1348.

- [9] Wengelnik K, Van den Ackerveken G, Bonas U. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9 (8) : 704-712.
- [10] Tang XY, Xiao YM, Zhou JM. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19 (11) : 1159-1166.
- [11] Koebnik R, Krüger A, Thieme F, Urban A, Bonas U. Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (21) : 7652-7660.
- [12] Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Microbiology*, 2001, 41 (6) : 1271-1281.
- [13] Roden JA, Belt B, Ross JB, Tachibana T, Vargas J, Mudgett MB. A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 (47) : 16624-16629.
- [14] Casper-Lindley C, Dahlbeck D, Clark ET, Staskawicz BJ. Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99 (12) : 8336-8341.
- [15] Furutani A, Takaoka M, Sanada H, Noguchi Y, Oku T, Tsuno K, Ochiai H, Tsuge S. Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22 (1) : 96-106.
- [16] Poueymiro M, Cunnac S, Barberis P, Deslandes L, Peeters N, Cazale-Noel AC, Boucher C, Genin S. Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22 (5) : 538-550.
- [17] Schechter LM, Roberts KA, Jamir Y, Alfano JR, Collmer A. *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (2) : 543-555.
- [18] Ignatov AN, Monakhos GF, Dzhaliilov FS, Pozmogova GV. A virulence gene from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* homologous to the *avrBs2* locus is recognized in race-specific reaction by two different resistance genes in *Brassica* plant species. *Genetika*, 2002, 38 (12) : 1656-1662. (in Russian)
- [19] He YQ, Zhang L, Jiang BL, Zhang ZC, Xu RQ, Tang DJ, Qin J, Jiang W, Zhang X, Liao J, Cao JR, Zhang SS, Wei ML, Liang XX, Lu GT, Feng JX, Chen B, Cheng J, Tang JL. Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biology*, 2007, 8 (10) : R218.
- [20] Xu RQ, Blanvillain S, Feng JX, Jiang BL, Li XZ, Wei HY, Kroj T, Lauber E, Roby D, Chen B, He YQ, Lu GT, Tang DJ, Vasse J, Arlat M, Tang JL. AvrAC_{Xcc8004}, a type III effector with a leucine rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (1) : 343-355.
- [21] Jiang BL, He YQ, Cen WJ, Wei HY, Jiang GF, Jiang W, Hang XH, Feng JX, Lu GT, Tang DJ, Tang JL. The type III secretion effector XopXccN of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for full virulence. *Research in Microbiology*, 2008, 159 (3) : 216-220.
- [22] Jiang W, Jiang BL, Xu RQ, Huang JD, Wei HY, Jiang GF, Cen WJ, Liu J, Ge YY, Li GH, Su LL, Hang XH, Tang DJ, Lu GT, Feng JX, He YQ, Tang JL. Identification of six type III effector genes with the PIP box in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and five of them contribute individually to full pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22 (11) : 1401-1411.
- [23] Büttner D, Bonas U. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6 (4) : 312-319.
- [24] Noël L, Thieme F, Gäbler J, Büttner D, Bonas U. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (24) : 7092-7102.
- [25] Miller JH. *Experiments in molecular genetics*. New York: Cold Spring Harbor, 1972.
- [26] Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Sawczyk MK, Byrde RJ, Fielding AH. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

- using the broad host range cosmid pLAFR1. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*, 1984, 3 (13) : 3323-3328.
- [27] Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, 33 (1) : 103-119.
- [28] Jiang BL, Liu J, Chen LF, Ge YY, Hang XH, He YQ, Tang DJ, Lu GT, Tang JL. DsbB is required for the pathogenesis process of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21 (8) : 1036-1045.
- [29] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145 (1) : 69-73.
- [30] Qian W, Jia YT, Ren SX, He YQ, Feng JX, Lu LF, Sun Q, Ying G, Tang DJ, Tang H, Wu W, Hao P, Wang LF, Jiang BL, Zeng SY, Gu WY, Lu G, Rong L, Tian YC, Yao ZJ, Fu G, Chen BS, Fang RX, Qiang BQ, Chen Z, Zhao GP, Tang JL, He CZ. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Research*, 2005, 15 (6) : 757-767.
- [31] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*, 1987, 6 (13) : 3901-3907.
- [32] Bogdanove AJ, Koebnik R, Lu H, Furutani A, Angiuoli SV, Patil PB, Van Sluys MA, Ryan RP, Meyer DF, Han SW, Aparna G, Rajaram M, Delcher AL, Phillippy AM, Puiu D, Schatz MC, Shumway M, Sommer DD, Trapnell C, Benahmed F, Dimitrov G, Madupu R, Radune D, Sullivan S, Jha G, Ishihara H, Lee SW, Pandey A, Sharma V, Sriariyanun M, Szurek B, Vera-Cruz CM, Dorman KS, Ronald PC, Verdier V, Dow JM, Sonti RV, Tsuge S, Brendel VP, Rabinowicz PD, Leach JE, White FF, Salzberg SL. Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (19) : 5450-5464.
- [33] da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LMC, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LEA, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergro F, Ciapina LP, Cicarelli RMB, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJS, Ferreira RCC, Ferro MIT, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EGM, Lemos MVF, Locali EC, Machado MA, Madeira AMBN, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CFM, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MTM, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JAD, Silva C, de Souza RF, Spinola LAF, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RID, dos Santos MT, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 2002, 417 (6887) : 459-463.
- [34] Vorhölter FJ, Schneiker S, Goesmann A, Krause L, Bekel T, Kaiser O, Linke B, Patschkowski T, Rückert C, Schmid J, Sidhu VK, Sieber V, Tauch A, Watt SA, Weisshaar B, Becker A, Niehaus K, Pühler A. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *Journal of Biotechnology*, 2008, 134 (1/2) : 33-45.
- [35] Mudgett MB, Chesnokova O, Dahlbeck D, Clark ET, Rossier O, Bonas U, Staskawicz BJ. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (24) : 13324-13329.
- [36] Chang JH, Urbach JM, Law TF, Arnold LW, Hu A, Gombar S, Grant SR, Ausubel FM, Dangl JL. A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (7) : 2549-2554.

Identification of a new type III effector XC3176 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Lichao Yang¹, Hua Su¹, Feng Yang¹, Huahua Jian¹, Min Zhou¹, Wei Jiang^{1,2},
Bole Jiang^{1,2*}

¹ College of Life Sciences and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

² State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] Type III secretion system (T3SS) is essential for many phytopathogenic bacteria to cause disease in susceptible host plants and to elicit a hypersensitive response in resistant host and non-host plants. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) uses T3SS to deliver T3SS effectors (T3SEs) directly into host cells, where they play important roles in pathogenesis. The aim of this study was to identify a new T3SE in *Xcc*. [Methods] To validate if XC3176 is a T3S effector translocated into plant cells, the promoter and signal region of XC3176 were fused to the plasmid pLJB of harboring HR-inducing AvrBs1 C-terminal domain lack of 58 N-terminal amino acid residues. The recombinant plasmid pLJB3176 was introduced by triparental conjugation into Δ avrBs1 and Δ hrcV. Hypersensitive response induced by the obtained strains Δ avrBs1/pLJB3176 and Δ hrcV/pLJB3176 were examined on the pepper ECW-10R. To determine transcription of XC3176, GUS fusion report strains were constructed. The virulence of *Xcc* strains was investigated on the Chinese radish by the leaf-clipping method. [Results] Hypersensitive response was elicited on the pepper ECW-10R by the strain Δ avrBs1/pLJB3176, but not Δ hrcV/pLJB3176. The GUS activities in the mutant strains Δ hrpX and Δ hrpG were significantly lower than that in the wild type *Xcc* strain. The mutant of XC3176 reduced virulence significantly and the complementary strain C3176 could restore the virulence as the wild-type strain. [Conclusion] XC3176 is a T3SS-dependent effector of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. The expression of XC3176 is regulated by *hrpG* and *hrpX*. XC3176 is required for the full virulence of *Xcc* 8004.

Keywords: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, XC3176, T3SEs, *hrpG*, *hrpX*

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260443) and by the Guangxi Natural Science Foundation of China (2014GXNSFFA118005, 2013GXNSFAA019097)

* Corresponding author. Tel: +86-771-3239255; E-mail: jbl1971@gxu.edu.cn

Received: 11 January 2015/Revised: 20 March 2015