

丁香假单胞大豆致病变种两个 III 型效应因子的克隆及功能分析

张金梅 伍辉军 高学文*

(南京农业大学 植物保护学院 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室 江苏 南京 210095)

摘要: 为了研究 III 型分泌效应因子在丁香假单胞大豆致病变种中的作用, 利用反向 PCR 技术, 首次从丁香假单胞大豆致病变种全基因组中克隆得到两个效应因子 *HopAB1* 和 *HopAF1* 基因的同源物, 分别命名为 *HopAB1s* 和 *HopAF1s*。生物信息学分析表明, *HopAB1s* 基因全长是 1 572 bp, 编码 523 个氨基酸; *HopAF1s* 基因全长是 855 bp, 编码 284 个氨基酸。即基因的登录号分别为 JF826562 和 JF826563。保守功能区预测显示 *HopAB1s* 在 N 末端包含一个 E3 泛素连接酶功能区。将这 2 个基因克隆到 PVX 二元表达载体并转化农杆菌, 利用农杆菌介导的瞬时侵染技术在本生烟中表达, 发现 2 个效应因子均能抑制由鼠凋亡因子激发的细胞程序性死亡; 将烟草疫霉接种在表达效应基因的区域, 发现效应因子能促进烟草疫霉感染烟草, 因此本研究得到的两个效应因子是免疫抑制因子, 为进一步研究该菌的致病机理奠定基础。

关键词: 丁香假单胞大豆致病变种, 效应因子, 反向 PCR, 生物信息学, 免疫抑制因子

Cloning and functional analysis of two type III-secreted effectors in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

ZHANG Jin-Mei WU Hui-Jun GAO Xue-Wen*

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University /Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education, Nanjing 210095, China)

Abstract: For studying the pathogenesis of the soybean pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, two types of homologous genes of III-secreted effectors, named as *HopAB1s* and *HopAF1s* respectively, were first cloned from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by means of inverse PCR (iPCR) method. The ORF of *HopAB1s* gene contained 1 572 bp, encoding 523 amino acid residues. The ORF of *HopAF1s* gene contained 855 bp, encoding 283 amino acid residues. The two genes registered in GenBank with accession numbers JF826562 and JF826563. The N-terminus of *HopAB1s* was sufficient for E3

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项项目(No. 2011ZX08004-004); 国际科技合作项目(No. 2009DFA32740); 公益性行业(农业)科研专项(No. 3-23); 国家 863 计划项目(No. 2006AA10Z172); 国家大学生创新性实验计划项目(No. 091030707)

* 通讯作者: ✉ gaoxw@njau.edu.cn

收稿日期: 2011-04-21; 接受日期: 2011-06-03

ubiquitin ligases functional domain. The two effectors were inserted into the binary PVX vector, transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, and the *Agrobacterium*-mediated transient expression experiments confirmed that two effectors functioned to inhibit the ability of the pro-apoptotic protein *Bax* inducing PCD in plant. Furthermore, infection experiment results showed that the effectors can promote ability of *Phytophthora nicotianae* infecting tobacco (*Nicotiana benthamiana*). Two cloned genes both belong to suppressive effector, our research is lay a foundation for revealed the molecular pathogenesis of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, Effector, Inverse PCR, Bioinformatics, Suppressive effector

效应因子是病原物和寄主在互作中起关键作用的因子。大多数革兰氏阴性植物和动物病原细菌通过 III 型分泌系统(Type III secretion system, TTSS)将大量的效应蛋白注射到寄主细胞,抑制寄主的防卫反应和促进细菌的生长和扩散^[1-2]。在动物细胞中,这些效应蛋白通过吞噬作用、免疫炎症、细胞凋亡和胞内运输来改变寄主细胞的功能,但是关于植物病原细菌的 III 型效应分子和它们在寄主内的靶标却知之甚少^[3],最近的研究发现许多植物病原细菌的 III 型分泌因子具有抑制植物免疫应答的作用^[4]。自从第一个无毒基因从 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 克隆得到后^[5],目前已经从各种植物病原菌中鉴定出几百个 III 型效应分子,但仅有少量的效应蛋白进行了功能鉴定^[6-7]。迄今为止,已发现的效应蛋白主要有半胱氨酸蛋白酶活性^[8-9]、络氨酸磷酸酶^[10]、丝氨酸/苏氨酸激酶^[11]和 E3 泛素连接酶活性^[12],然而,大多数植物病原 III 型效应分子先天免疫抑制活性还不清楚。

丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)是一种能够侵害植物枝、叶、花、果等组织的植物病原菌,根据寄主范围的不同至少可以分成 50 个致病变种^[13]。目前在模式菌株 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 中,有多于 30 个效应蛋白被鉴定^[7,14],随着对已经全基因组测序的四个丁香假单胞致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* T1, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A)^[13,15-16]全基因组分析发现,每个致病变种中均存在多个效应分子,这些效应分子有的保守性较高,同时存在于不同的致病变种中,

有的仅存于个别致病变种中^[17],这为研究效应分子的进化机制及致病机理提供了基础。

由丁香假单胞大豆致病变种[*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Cooper)Young et al.]引起的大豆细菌性斑点病是大豆生产上最普遍的细菌性病害,也是造成大豆减产的主要原因。目前,对大豆细菌性斑点病的研究主要集中在病原菌及抗病品种的鉴定等方面,而对效应因子的研究及致病分子机制还知之甚少。本研究通过对丁香假单胞菌不同致病变种中效应因子的生物信息学分析,预测本实验室分离的丁香假单胞大豆致病变种中可能存在的效应因子,并首次从它的全基因组中克隆得到两个效应因子 *HopAB1s* 和 *HopAF1s* 的同源物,还对其生物学功能进行了初步研究,为进一步探明 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及植物的培养条件

本研究所使用的菌株和质粒见表 1。

E. coli DH5 α 及其转化菌株均采用 LB 培养基,在 37 °C 培养;*A. tumefaciens* GV3101 及其转化菌株均采用 LB 培养基,在 28 °C 培养;*P. syringae* pv. *glycinea* S1 采用 KB 培养基,在 28 °C 培养;烟草疫霉用 V8 培养基,在 25 °C 培养。抗生素所用浓度:*E. coli* DH5 α (pMD18-T)为 Ampicillin (100 mg/L);*A. tumefaciens* GV3101 (PVX)和 *E. coli* DH5 α (PVX)为 Kanamycin (50 mg/L)。

本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)在温室(22 °C-25 °C,高光强度)中生长 4-6 周供试验所用^[18]。

表 1 本研究所用的菌株和质粒的特性和来源
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strain and plasmids	特征 Characteristics	来源 Source
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> S1	Virulent strain isolated from soybean leaf	Stored in this lab
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Cloning host for maintaining the recombinant plasmids	Stored in this lab
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101		Fungi lab
<i>Phylophthora nicotianae</i>	Infect <i>Nicotiana benthamian</i>	Fungi lab
pMD18-T	Amp ^R , TA cloning vector	TaKaRa
PVX	Km ^R , a binary express vector	Fungi lab

注: Amp^R: Ampicillin 抗性; Km^R: Kanamycin 抗性.

Note: Amp^R: Ampicillin resistant; Km^R: Kanamycin resistant.

1.2 主要试剂和仪器

Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒、基因组/质粒提取试剂盒、DNA marker 均购自 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素(Ampicillin)、卡那霉素(Kanamycin)、琼脂粉及其他试剂等均购自南京金斯瑞生物技术有限公司; Gene Pulser Xcell™ 型电穿孔仪及电转杯均为 Bio-Rad 公司产品。

1.3 *P. syringae* pv. *glycinea* 中效应因子的生物信息学预测

以丁香假单胞不同致病变种所存在的效应因子的基因序列建立数据库, 用 DNAMAN 分析每个效应因子的存在频率、同源性及基因大小, 预测 *P. syringae* pv. *glycinea* 中可能存在并适合反向

PCR 扩增的效应分子。

1.4 效应因子的克隆

P. syringae pv. *glycinea* S1 菌株基因组 DNA 的提取参照 Invitrogen 公司的试剂盒说明进行, DNA 置 -20 °C 保存。通过 DNAMAN 分析, 以 *HopAB1s* 及 *HopAF1s* 基因的保守区分别设计特异性引物, 以 S1 基因组为模板, 克隆保守区基因序列。根据保守区序列设计特异性引物, 用反向巢式 PCR (Inverse Nest PCR) 方法, 克隆目的基因的侧翼序列。

以 S1 菌株总 DNA 为模板, 根据已经测定的基因序列设计引物, 扩增完整的目标基因。所需引物序列见表 2, 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。PCR 扩增条件见表 3。

表 2 PCR 使用的引物
Table 2 PCR primers

引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence (5'→3')	酶切位点 Restriction site
AB1F	TCATCATCRRGMAGCAGGWCAGCGT	
AB1R	ACCTGCTGATSCGGATTACT	
AF1F	TCAAGCAGAAAGACGGCAT	
AF1R	TACGCGAGTCGTACTACAGA	
AB2F	TTCAGAGATGCCCGAGATCAC	
AB2-1R	TCAATCTGCGCAGATCTTCG	
AB2-2R	AGCACTGAAGTTCAACACG	
AFAF	TGCATGGAGGAAATAGAGA	
AF2-1R	ATGCCGAGTCTTTCCATC	
AF2-2R	AGTGCGGATTGACTACGATC	
HopABF	GCC <u>ATCGAT</u> ATGCCGGTATCAAC	<i>Cla</i> I
HopABR	TG <u>AGCGCCG</u> CTCATGGAACAATT	<i>Not</i> I
HopAFF	GCC <u>ATCGAT</u> ATGGGACTATGTAT	<i>Cla</i> I
HopAFR	CGCGT <u>CGACT</u> CATAAAGCGACC	<i>Sal</i> I

注: 下划线处为添加的酶切位点; 简并碱基: R...A,G; M...A,C; W...A,T; S...C, G

Note: The restriction sites are underlined; Merger bases: R...A, G; M...A, C; W...A, T; S...C.

表3 PCR循环条件
Table 3 Cycle setting for PCR

反应编号 Reaction No.	HopAB1s 扩增条件 Cycle setting for HopAB1s	HopAF1s 扩增条件 Cycle setting for HopAF1s
Conservative domain	95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 34 cycle; 72 °C 10 min	95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min, 34 cycle; 72 °C 10 min
Primary reaction of Nested PCR	95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min, 20 cycle; 72 °C 10 min	95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 20 cycle; 72 °C 10 min
Secondary reaction of Nested PCR	95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 32 cycle; 72 °C 10 min	95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, 34 cycle; 72 °C 10 min
The whole gene	95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 53 °C 2 min, 72 °C 1 min, 34 cycle; 72 °C 10 min	95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min, 34 cycle; 72 °C 10 min

1.5 效应因子的序列测定

PCR产物连接到pMD18-T载体上,转化*E. coli* DH5 α ,采用蓝白斑及Ampicillin (100 mg/L)的抗性平板初筛转化子,疑似阳性转化子进一步做菌落PCR验证。序列的测定由南京金斯瑞生物科技有限

公司完成。

1.6 效应因子的生物信息学分析

使用在线生物信息学软件(表4)对效应因子的同源性、推测蛋白的氨基酸组成及结构域进行预测与分析。

表4 生物信息学预测分析所用软件和网
Table 4 The software and web site used in this study

软件或在线网址 Software or website	工具 Tools	功能 Function
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi	Blast	DNA 在线同源性分析
http://www.expasy.org/tools/protparam.html	Protparam	蛋白质组成分析
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	CDD	结构域分析

1.7 表达载体的构建及转化农杆菌

*HopAB1s*基因的PCR产物用*Cla* I、*Not* I双酶切,纯化回收后与同样酶切回收的PVX载体连接,连接液转化*E. coli* DH5 α 。*HopAF1s*基因PCR产物用*Cla* I、*Sal* I双酶切,纯化回收后与同样酶切回收的PVX载体连接,连接液转化*E. coli* DH5 α 。转化子涂布在Kanamycin (50 mg/L)抗性的LB平板上,37 °C培养16 h。对长出的单菌落提取质粒进行PCR和双酶切鉴定,筛选出含*HopAB1s*基因与*HopAF1s*基因的阳性重组质粒。

通过电转化的方法将重组质粒分别转入*A. tumefaciens* GV3101中,用Kanamycin (50 mg/L)抗性平板筛选转化子,并提取转化子质粒进行PCR验证。

1.8 效应因子的生物学功能分析

将农杆菌的阳性转化子接种到添加Kanamycin (50 mg/L)的LB培养液中,200 r/min、28 °C培养

48 h,5 000 r/min离心5 min,收集菌体,用10 mol/L MgCl₂重悬,重复3次后,用10 mmol/L MgCl₂定容至OD₆₀₀=0.4-0.6。上数第3至第6片烟草叶片用于渗透法接种农杆菌。用针头在烟草下表皮造成一小伤口,用1 mL无针头的注射器将30-50 μ L农杆菌悬液渗透到本生烟叶片中。

1.8.1 效应因子的免疫抑制活性测定:将含有效应基因和作为阴性对照*gfp*基因的农杆菌菌悬液注射烟草叶片,12 h后在同一位点注射含细胞死亡诱导因子*Bax*的农杆菌菌悬液。每组实验设置5个技术重复和5个生物学重复,5 d后记录结果并拍照。

1.8.2 效应因子的致病性测定:将含有效应基因和作为阴性对照*gfp*基因的农杆菌菌悬液注射烟草叶片,5 d后,将提前培养4 d的烟草疫霉用叶盘法打成小圆片,用镊子夹取菌丝块,首先在0.1%的灭菌吐温中浸一下,再在灭菌的去离子水中浸一下后,接种到注射农杆菌菌液的叶片区域的中间位置。每组

实验设置 5 个技术重复和 5 个生物学重复, 48 h 后记录结果, 将烟草叶片用 75% 的乙醇脱色并拍照。

2 结果与分析

2.1 *P. s. pv. glycinea* 中效应因子的生物信息学预测

通过生物信息学分析发现, 效应因子 *avrE1*、*AvrPto*、*HopI*、*HopAB1*、*HopAE1*、*HopAF1*、*HopAG1*、*HopAH1*、*HopAS1*、*HopD*、*HopH1*、*HopM1* 在丁香假单胞菌中存在的频率较高。用 DNAMAN 分析这些效应因子的保守性及基因大小, 结果表明, *HopAB1* 与 *HopAF1* 两个效应因子在多个致病变种中均存在且保守性相对更高, 因此将这两个基因作为候选基因。

2.2 效应因子的克隆及序列测定

利用保守区设计的 AB1F/AB1R 与 AF1F/AF1R 引物, 以菌株 S1 总 DNA 为模板分别克隆得到 850 bp 与 480 bp 片段(图 1A); 以 S1 基因组完全酶切的回收产物为模板, 采用反向 PCR 的方式分别扩增得到 1 280 bp 与 560 bp 的侧翼区片段(图 1B); 将两次测序结果利用 DNAMAN 软件分析拼接, 得到 *HopAB1s* 及 *HopAF1s* 两个效应基因理论上的全长序列, 并据此设计扩增基因全长的引物 HopABF/HopABR 与 HopAFF/ HopAFR, 以 S1 基因组为模板, 扩增全长基因, 分别得到 1 572 bp 与 855 bp 的片段(图 1C)。回收片段并与 pMD18-T 载体连接, 获得的重组载体经 PCR 验证正确后, 委托南京金斯瑞生物技术有限公司测序。测序结果与预计相符, 并将序列结果递交 GenBank 数据库, 获得登录号分别为 JF826562 和 JF826563。

2.3 效应因子生物信息学分析

2.3.1 效应因子的同源性分析: 将得到的 *HopAB1s* 和 *HopAF1s* 基因测序结果用在线的 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 与其同源基因进行同源性分析。结果显示, *HopAB1s* 与同类基因同源性在 69%–96% 之间, *HopAF1s* 与同类基因同源性在 86%–99% 之间, 且 2 个效应基因均与 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A 中的同类基因同源性最高。

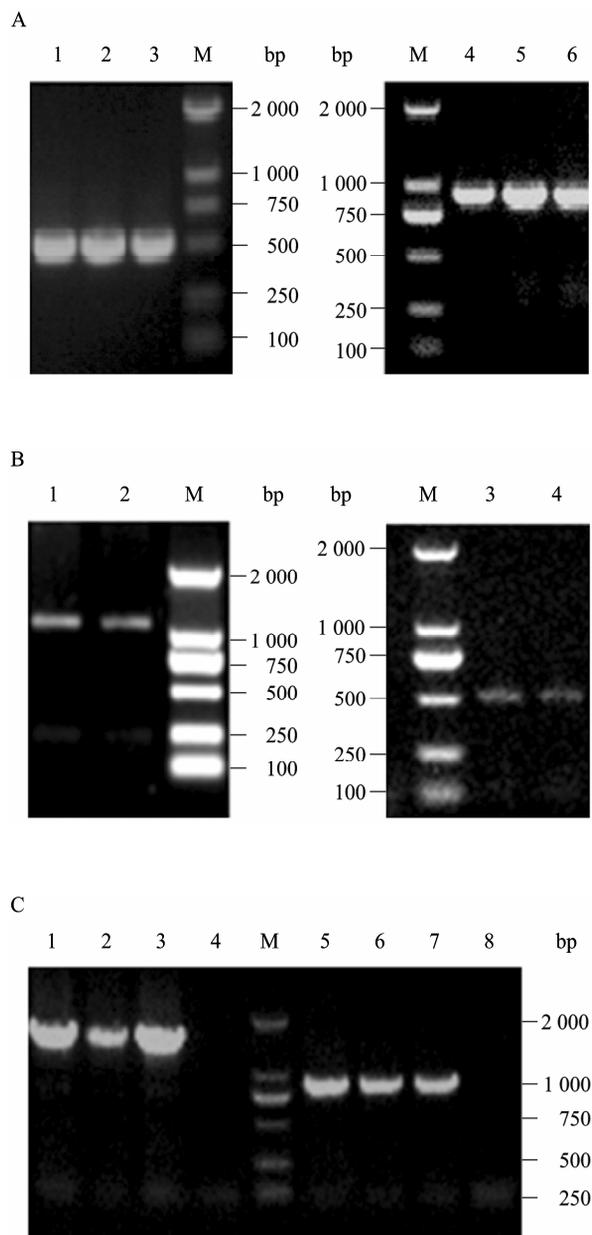


图 1 效应基因的克隆

Fig. 1 The clone of effector gene

注: A: 效应基因保守区的 PCR 扩增; 1–3: *HopAF1s*; 4–6: *HopAB1s*; M: DL2000 DNA marker. B: 效应基因旁侧区的 PCR 扩增; 1–2: *HopAB1s*; 3–4: *HopAF1s*; M: DL2000 DNA marker. C: 效应基因全长的 PCR 扩增; 1–3: *HopAF1s*; 5–7: *HopAB1s*; 4、8: 水对照; M: DL2000 DNA Marker.

Note: A: Conserved region of *HopAF1s*; 1–3: *HopAF1s*; 4–6: *HopAB1s*. B: Flanking region of effector genes; 1–2: *HopAB1s*; 3–4: *HopAF1s*. C: Complete sequence of effector gene; 1–3: *HopAF1s*; 5–7: *HopAB1s*; 4,8: Water control.

2.3.2 编码蛋白的氨基酸组分分析: 采用 ExPaSy (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 对效应基因编码的蛋白质的基本理化性质进行分析, 结果表明: *HopAB1s* 编码 523 个氨基酸, 蛋白质的相对分子质量约为 57.99 kD, 在其编码的氨基酸中, 亲水性氨基酸占 26.5%, 疏水性氨基酸占 42.5%, 酸性氨基酸占 13.0%, 碱性氨基酸占 12.2%; *HopAF1s* 编码 284 个氨基酸, 蛋白质的相对分子质量约为 31.29 kD, 在其编码的氨基酸中, 亲水性氨基酸占 32.7%, 疏水性氨基酸占 45.1%, 酸性氨基酸占 13.9%, 碱性氨基酸占 18.3%。

2.3.3 效应蛋白功能域分析: 在 www.ncbi.nlm.nih.gov 上对效应蛋白氨基酸序列进行保守功能域分析, 结果表明: *HopAB1s* 在 N 末端存在一个 E3 泛素连

接酶保守结构域(Ala₄₀₇-Pro₅₂₃) (图 2)。该保守区与真核生物中泛素连接酶复合物中的 Ring-finger 和 U-box 家族有显著的同源性, 它的中心位置位于一个折叠球形固定的四 β 链薄片上, 一面紧压着对螺旋状物, 另一面有 3 个完全伸展的环连接在二级结构的元件上(图 3)。E3 泛素连接酶是真核生物体内蛋白质降解途径所需的关键酶类, 决定靶蛋白的特异性识别, 通过调控蛋白的泛素化过程参与细胞内的多种生理过程。因此, *HopAB1s* 可能通过 N 末端的 E3 泛素连接酶活性, 特异性识别并降解寄主细胞内防卫反应的蛋白, 从而干扰寄主的免疫应答。效应蛋白 *HopAF1s* 并未找到与之匹配的数据, 因此关于它的功能域还不清楚, 需要进一步的研究证明。

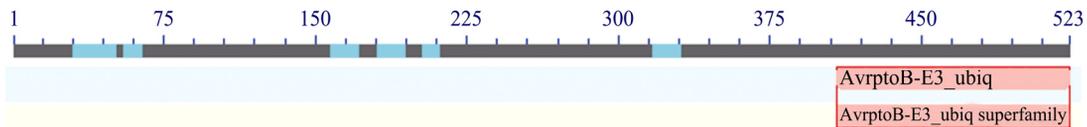


图 2 *HopAB1s* 蛋白氨基酸序列的保守区(NCBI 数据库)

Fig. 2 Conservative domain of *HopAB1s* amino acid sequence (NCBI date base)

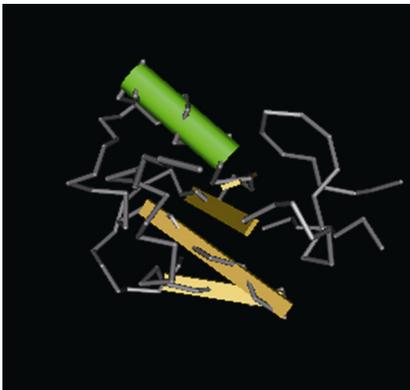


图 3 E3 泛素连接酶(NCBI 数据库)

Fig. 3 E3 ubiquitin ligase (NCBI date base)

2.4 效应因子表达载体的构建及转化农杆菌

将 Bio Basic Inc 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收得到的 *HopAB1s* 与 *HopAF1s* 酶切片段分别连接到表达载体 PVX 上, 形成重组质粒(pVAB 和 pVAF) 转化 *E. coli* DH5 α , 涂布 Kanamycin (50 mg/L)抗性

平板。随机挑取白色菌落进行菌落 PCR 验证, 1.0% 的琼脂糖电泳检测分析(图 4)。将构建好的表达载体通过电转化的方法转入 *A. tumefaciens* GV3101 感受态细胞中。经同样的筛选方法, 得到阳性转化子 GV3101-AB 与 GV3101-AF。

2.5 效应因子的生物学功能分析

2.5.1 效应因子能抑制鼠凋亡蛋白 *Bax* 诱导的细胞凋亡 为了研究克隆到的效应因子是否像细菌的其它效应因子一样, 可抑制激发子激发的烟草过敏反应^[19], 选择鼠凋亡因子 *Bax* 引起的细胞程序性死亡作为诱导因子。将 2 个效应基因 *HopAB1s* 与 *HopAF1s* 构建到 PVX 载体上, 通过农杆菌介导的瞬时表达在烟草上过表达效应基因, 结果发现, 2 个基因均能抑制鼠凋亡因子 *Bax* 引起的细胞程序性死亡(图 5)。这说明它们是 III 型分泌出效应因子中的免疫抑制因子(Suppressive effector)。

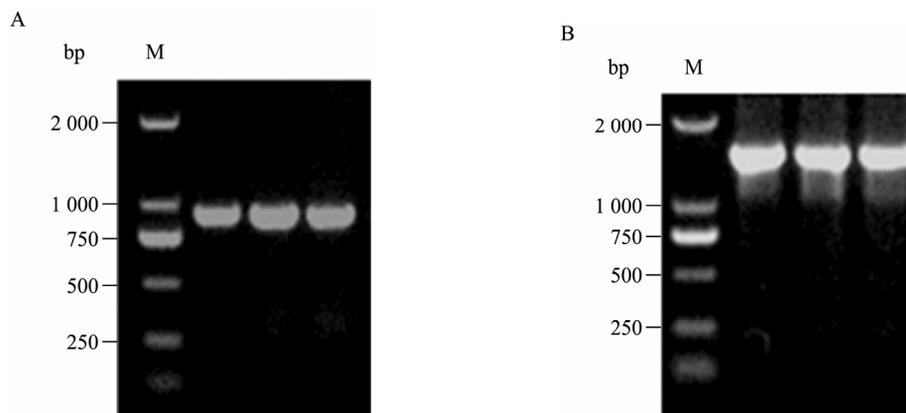


图 4 PVX 表达载体的 PCR 验证

Fig. 4 PCR amplification of expression vector PVX

A: pVAF 表达载体; B: pVAB 表达载体; M: DL2000 marker.

A: PCR amplification of expression vector pVAF; B: PCR amplification of expression vector pVAB; M: DL2000 marker.



图 5 效应基因的抑制活性

Fig. 5 The suppress activity of effector gene

2.5.2 细菌效应蛋白能促进烟草疫霉侵染烟草 为了进一步研究效应因子 *HopAB1s* 与 *HopAF1s* 对植物免疫干扰作用, 是否影响其它病原物的侵染, 本研究检测了效应因子对烟草疫霉致病力的影响。试验结果表明: 与对照相比, 在表达了效应因子的烟草叶片区域烟草疫霉侵染寄主的能力明显增强(图 6)。这说明效应因子 *HopAB1s* 与 *HopAF1s* 起了毒性因子的作用, 通过干扰植物的免疫系统, 使之易感病。

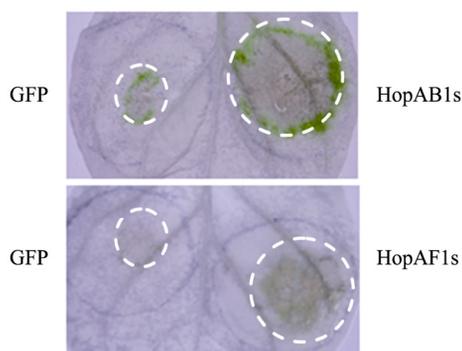


图 6 效应基因促进烟草疫霉侵染烟草

Fig. 6 The effectors promote *Phytophthora nicotianae* infection tobacco

3 讨论

III 型分泌效应因子是革兰氏阴性植物病原细菌及动物病原细菌与寄主互作的关键因子。III 型分泌系统分泌到植物细胞中的效应因子如果被植物的免疫系统所识别, 将会引起寄主植物的过敏反应 (Hypersensitive response, HR), 而在最近的研究中发现许多效应因子抑制寄主的这种过敏反应, 这说明长期的进化过程使病原菌产生了抑制寄主防卫反应的机制^[20-22]。最早鉴定的具有毒性功能的效应因子是 Jackson^[23]从 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 克隆到的 *VirPphA*, 他们的研究发现, 这类毒性因子具有抑制其他效应因子激发寄主过敏反应的能力, 以帮助病原菌进一步侵染植物。

Guo 等^[24]利用 *P. fluorescens* 表达系统在烟草中表达 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 效应分子, 发现 *HopS2*、*AvrRpm1* 和 *AvrRpt2* 等能抑制 *HopA1* 激发的 HR, 而 *HopE1*、*HopF2*、*AvrPtoB*、*HopAM1* 和 *HopX1* 能抑制 *AvrRpm1* 激发的 HR。本研究通过农杆菌瞬时表达系统在非寄主烟草中表达 *HopAB1s* 与 *HopAF1s* 基因, 发现它们能够抑制由鼠凋亡蛋白 *Bax* 激发的细胞程序死亡(PCD)。这说明效应因子抑制植物免疫应答是通过不同的分子机制进行的, 不同的效应因子可抑制不同激发子激发的过敏反应。进一步的生物信息学分析发现, *HopAB1s* 在 N 末端 408-523 氨基酸残基处编码一个 E3 泛素连接酶, 这

种酶标记那些需要被破坏的蛋白,被标记的蛋白通过真核生物体内高度选择的最为重要的蛋白质降解途径—泛素蛋白酶体途径降解。Abramovitch 等^[4]的研究发现, *AvrPtoB* 对植物的免疫抑制作用与其 C 末端的 E3 泛素连接酶活性相关,因此我们推测 *HopAB1s* 可能是通过操控寄主的泛素化系统来抑制植物的免疫应答,但是否仅与 E3 泛素连接酶的活性有关以及通过怎样的机制进行还有待进一步的研究。我们将 *HopAF1s* 预测的编码蛋白用多种数据库比对,均未发现与之同源性较高的蛋白功能域,从该效应因子抑制 *Bax* 激发的细胞程序性死亡的表型来看,推测该基因具有干扰植物防卫反应的能力,是一个致病相关的基因,但是该效应因子通过怎样的酶活性行使功能还需要更深入的研究。

有研究报道真菌中的一些效应因子,如霜霉效应因子 ATR13 的两个等位基因能抑制病原相关分子模式(PAMP)激发的胍酰质累积并增强 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 在感病拟南芥上的毒性;在抗性植物中,效应因子 ATR1 与 ATR13 触发 RPP1-Nd/WsB-和 RPP13-Nd 依赖的抗性,则抑制 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 侵染拟南芥^[25]。为了研究细菌效应因子抑制植物防卫反应是否有类似的特性,本研究中将烟草疫霉接种到表达了效应因子的叶片区域,发现烟草疫霉的侵染能力与对照相比明显增强,这与 Jamir 等^[26]报道的免疫抑制因子能抑制寄主植物体内病程相关蛋白的表达相呼应。

利用生物信息学技术预测了丁香假单胞大豆致病变种中可能存在的效应因子,并建立了农杆菌介导的瞬时表达与烟草互作体系,通过这个体系我们发现本克隆得到的效应因子具有抑制 *Bax* 诱导的细胞程序性死亡及促进烟草疫霉侵染烟草的功能,为下一步发掘更多的具有类似功能的效应因子及通过定点突变技术研究效应因子在病原菌侵染大豆中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Galán JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines[J]. *Nature*, 2006, 444(7119): 567–573.
- [2] Mota LJ, Cornelis GR. The bacterial injection kit: type III secretion systems[J]. *Ann Med*, 2005, 37(4): 234–249.
- [3] Zheng QF, Guo M, Jeong BR, et al. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity[J]. *Nature*, 2007, 447(7142): 284–288.
- [4] Abramovitch RB, Janjusevic R, Stebbins CE, et al. Type III effector *AvrPtoB* requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2851–2856.
- [5] Staskawicz BJ, Dahlbeck D, Keen NT. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(19): 6024–6028.
- [6] Chang JH, Goel AK, Grant SR, et al. Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type of III effector proteins of phytopathogenic bacteria[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7(1): 11–18.
- [7] Mudgett MB. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, 56: 509–531.
- [8] Shao F, Merritt PM, Bao ZQ, et al. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis[J]. *Cell*, 2002, 109(5): 575–588.
- [9] Kim HS, Desveaux D, Singer AU, et al. The *Pseudomonas syringae* effector *AvrRpt2* cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from Arabidopsis membranes to block RPM1 activation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(18): 6496–6501.
- [10] Espinosa A, Guo M, Tam VC, et al. The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein *HopPtoD2* possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(2): 377–387.
- [11] Wareham DW, Curtis MA. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates[J]. *International Journal of Microbiology*, 2007, 297(4): 227–234.
- [12] Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, et al. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase[J]. *Science*, 2006, 311(5758): 222–226.
- [13] Joardar V, Lindeberg M, Jackson RW, et al. Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition[J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(18): 6488–6498.
- [14] Petnicki-Ocwieja T, Schneider DJ, Tam VC, et al. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae*

- pv. *tomato* DC3000[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(11): 7652-7657
- [15] Almeida NF, Yan S, Lindeberg M, et al. A draft genome sequence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* T1 reveals a Type III effector repertoire significantly divergent from that of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2009, 22(1): 52-62.
- [16] Helene F, William SF, Patrick C, et al. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(31): 11064-11069.
- [17] Cunnac S, Lindeberg M, Collmer A. *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions[J]. Current Opinion in Microbiology, 2009, 12(1): 53-60.
- [18] Dou D, Kale SD, Wang X, et al. Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b[J]. Plant Cell, 2008, 20(4): 1118-1133.
- [19] Abramovitch RB, Kim YJ, Chen SR, et al. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death[J]. The EMBO Journal, 2003, 22(1): 60-69.
- [20] He SY. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria[J]. Annu Rev Phytopathol, 1998, 36(1): 363-392.
- [21] Espinosa A, Alfano JR. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity[J]. Cell Microbiol, 2004, 6(11): 1027-1040.
- [22] Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, et al. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria[J]. Annu Rev Microbiol, 2006, 60: 425-449.
- [23] Jackson RW, Athanassopoulos E, Tsiamis G, et al. Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(10): 10875-10880.
- [24] Guo M, Tian F, Wamboldt Y, et al. The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. Mol Plant Microbe Interact, 2009, 22(9): 1069-1080.
- [25] Sohn KH, Lei R, Nemri A, et al. The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Cell, 2007, 19(12): 4077-4090.
- [26] Jamir Y, Guo M, Oh HS, et al. Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast[J]. The Plant Journal, 2004, 37(4): 554-565.

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。