

# 西瓜食酸菌III型效应蛋白 AopAI 的鉴定及其功能初步分析

李莹莹<sup>1</sup>, 马博雅<sup>1</sup>, 优丽图孜·乃比<sup>1</sup>, 陈宝强<sup>1</sup>, 刘君<sup>\*1,2</sup>

1 新疆农业大学生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

2 新疆极端环境生物生态适应与进化重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052

李莹莹, 马博雅, 优丽图孜·乃比, 陈宝强, 刘君. 西瓜食酸菌III型效应蛋白 AopAI 的鉴定及其功能初步分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 140-154.

LI Yingying, MA Boya, Youlituzi Naibi, CHEN Baoqiang, LIU Jun. Identification and functional analysis of the type III effector AopAI in *Acidovorax citrulli*[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 140-154.

**摘要:**【背景】西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*, Ac)引起的细菌性果斑病是葫芦科植物重要的病害之一, 通过III型分泌系统(type III secreted system, T3SS)分泌至植物体内的III型效应蛋白(type III effector, T3E)是该菌重要的致病因子, 目前对 Ac T3E 的认识仍然非常有限。【目的】鉴定西瓜食酸菌候选的 T3E *Acidovorax* outer protein AI (AopAI), 分析其对 Ac 致病力的影响和干扰植物免疫的方式。【方法】利用生物信息学方法分析 AopAI 序列特征、AvrBs1 无毒报告系统验证蛋白转运功能; 通过荧光定量 PCR 技术分析 *aopAI* 基因表达的调控及其对植物病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)激发的免疫反应(PAMP-triggered immunity, PTI)信号通路标记基因表达的影响; 利用基因插入突变和基因功能互补方法, 检测菌的致病力、植物组织过氧化氢和胍胍质积累量的变化; 运用瞬时表达技术分析 AopAI 亚细胞定位和其抑制激发子诱导细胞死亡的能力。【结果】AopAI 蛋白序列中不含跨膜螺旋区和信号肽, 含有二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)核糖基转移酶保守结构域; 在 T3SS 核心基因 *hrpG* 和 *hrpX* 突变体中 *aopAI* 基因表达量显著降低; 表达 AopAI 及 AvrBs1 功能区(59–445 aa)的 *avrBs1* 突变体可诱导 ECW-10R 辣椒叶发生过敏性坏死反应, 表明 AopAI 具有转运功能; *aopAI* 基因突变体在黄瓜子叶上的致病力减弱, 但与其互作的黄瓜子叶组织中过氧化氢和胍胍质的含量均显著增加; AopAI 在本氏烟叶瞬时表达后, 显示其定位于细胞膜和细胞核, 还表现抑制激发子 NIP 诱导的叶细胞死亡, 导致叶细胞的 PTI 信号通路标记基因 *GRAS2* 和 *ACRE31* 的表达量显著降低。【结论】在西瓜食酸菌中具有一个定位于细胞核和细胞膜、有 ADP 核糖基转移酶结构域的 T3E 蛋白 AopAI, 该 T3E 是能够抑制 NIP 诱导的细胞死亡的毒性蛋白, 通过抑制 *ACRE31* 调节的免疫途径降低植物过氧化氢和胍胍质

资助项目: 国家自然科学基金(31260419); 新疆西甜瓜产业技术体系(XJARS-06)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31260419) and the Earmarked Fund for XJARS (XJARS-06).

\*Corresponding author. E-mail: liujem@126.com

Received: 2023-06-13; Accepted: 2023-07-25; Published online: 2023-09-07

的积累, 以抑制植物 PTI 防御反应机制。

关键词: III 型效应蛋白; AopAI; PTI; 西瓜食酸菌; 功能

## Identification and functional analysis of the type III effector AopAI in *Acidovorax citrulli*

LI Yingying<sup>1</sup>, MA Boya<sup>1</sup>, Youlituzi Naibi<sup>1</sup>, CHEN Baoqiang<sup>1</sup>, LIU Jun<sup>\*1,2</sup>

1 College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

2 Xinjiang Key Laboratory of Ecological Adaptation and Evolution of Extreme Environment Organisms, Urumqi 830052, Xinjiang, China

**Abstract:** [Background] Bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax citrulli* is a prevalent disease in cucurbitaceous crops, and the type III effectors (T3Es) secreted by the type III system into plants are the major pathogenic factors of *A. citrulli*. However, the knowledge about the T3Es in *A. citrulli* is limited. [Objective] To identify a novel T3E, *Acidovorax* outer protein AI (AopAI), in *A. citrulli*, and investigate its impact on the bacterial pathogenicity and interference with plant immunity. [Methods] Bioinformatics tools were used to analyze the sequence characteristics of AopAI, and then the AvrBs1 as an avirulent reporter was used to verify the transport function of AopAI. Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) was carried out to determine the expression of *aopAI* and the effect of AopAI on the expression of marker genes of the PAMP-triggered immunity (PTI) signaling pathway in plants. Furthermore, the gene insertion mutation and functional complementation methods were employed to examine the pathogenicity of the pathogen and the accumulation of hydrogen peroxide and callose in plants. Finally, the transient expression method was used to predict the subcellular localization and the ability of AopAI to inhibit elicitor-induced cell death. [Results] AopAI had a conserved domain of adenosine diphosphate (ADP) ribosyltransferase and no transmembrane helix region or signal peptide. The expression of *aopAI* was significantly down-regulated in the mutants of *hrpX* and *hrpG* (core regulatory genes of T3SS). The co-expression of *aopAI* and the AvrBs1 functional region (59–445 aa) induced the hypersensitive reaction in the leaves of ‘ECW-10R’ pepper, which indicated that AopAI was a transporter protein. The *aopAI* mutant presented declined pathogenicity to cucumber cotyledons, while it increased the accumulation of hydrogen peroxide and callose. After transient expression of AopAI in *Nicotiana benthamiana*, the protein was localized in the cell membrane and nucleus. Additionally, AopAI inhibited the elicitor NIP-induced leaf cell death and down-regulated the expression of the PTI marker genes *GRAS2* and *ACRE31*. [Conclusion] We identified a typical T3E, AopAI in *A. citrulli*, which was localized in the nucleus and cell membrane and had an ADP ribosyltransferase domain. AopAI functioned as a virulent protein inhibiting NIP-induced cell death and reduced hydrogen peroxide and callose by inhibiting the *ACRE31*-regulated immune pathway, thus suppressing the PTI defense mechanism in plants.

**Keywords:** type III effector; AopAI; PAMP-triggered immunity (PTI); *Acidovorax citrulli*; function

细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)是由革兰氏阴性菌——西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*, Ac)引起的一种危害全球葫芦科植物的种传病害<sup>[1]</sup>。BFB在我国已经蔓延开,给瓜类产业带来了重大经济损失<sup>[2]</sup>。由于现有的防治手段无法有效地控制病害<sup>[3]</sup>,BFB成为瓜类作物安全生产的严重威胁。研究发现,植物细胞对Ac中不同的蛋白分泌系统具有不同的免疫反应,其中III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)分泌的III型效应蛋白(type III effector, T3E)是其主要的毒力因子<sup>[4]</sup>。研究Ac的T3E可以为解析病菌的致病机制奠定重要基础,同时可以为抗病育种、发掘有效的防治病害的新措施提供理论依据。

T3E的筛选鉴定包含3个方面<sup>[5-6]</sup>。首先,T3E存在共性的序列特征<sup>[7]</sup>,利用依据序列特征开发的预测软件进行大规模筛选,可以获得一批候选的Ac T3E<sup>[8]</sup>。其次,革兰氏阴性菌中,T3E的表达受T3SS核心基因的调控<sup>[9]</sup>,Ac Aac5菌株的T3SS核心基因*hrpG*和*hrpX*调控病菌T3E的表达,这一研究结果为Ac T3E的筛选鉴定奠定了基础<sup>[6,10-11]</sup>。再有,T3E具有转运的特征,应用无毒报告系统能够验证植物病原细菌候选T3E的转运功能,如徐荣旗以野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Xcc) 8004菌株无毒基因*avrBs1*为报告基因的系统鉴定出Xcc的新型效应蛋白XC1553<sup>[12]</sup>;Jiménez-Guerrero等以*AvrBs2*无毒报告系统鉴定出7个Ac的T3E<sup>[13]</sup>。该研究结果表明,以Xcc的无毒基因为报告基因的无毒报告系统可以应用于Ac T3E转运特征的鉴定。将上述3个方面结合应用于Ac细菌,有助于筛选鉴定到同源的,甚至新型的T3E。

植物病原效应蛋白基因间的同源性均较低<sup>[7]</sup>,但通过同源比对在Ac中仍可以筛选到一些T3E,并进一步分析其干扰植物免疫反应的方

式。Zhang等发现Ac Aac5菌株的AopN与黄单胞菌T3E XopN同源,表现可以诱导本氏烟过敏反应(hypersensitive response, HR),并且抑制病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)激发的免疫反应(PAMP-triggered immunity, PTI)<sup>[14]</sup>;Ac FC440菌株中的超敏蛋白(harpin) AopW与丁香假单胞菌HopW1-1同源,AopW在寄主黄瓜中发挥毒性功能并可以引发本氏烟发生HR反应<sup>[15]</sup>。本课题组在Ac FC440菌株中发现一个候选T3E蛋白,其与黄单胞菌中具有二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)核糖基转移酶(ADP-ribosyltransferase, ART)结构域的XopAI(*Xanthomonas* outer protein AI,序列号为NZ\_CP008998.1)同源<sup>[16]</sup>,因此命名其为*Acidovorax* outer protein AI (AopAI)。植物病原细菌中具有ART活性的T3E功能已有报道,发现该类蛋白能够通过核糖基化靶蛋白来抑制宿主细胞靶蛋白的活性,从而抑制植物免疫途径,促进病原菌的侵染<sup>[17]</sup>,如丁香假单胞菌中的HopU1<sup>[18]</sup>和HopF2<sup>[19]</sup>,其中HopU1通过核糖基化GRP7抑制靶蛋白结合RNA的能力从而抑制下游PTI免疫反应<sup>[18]</sup>。目前对该类蛋白的功能认识仍非常有限。本研究对Ac的具有ART结构域的AopAI进行鉴定和功能初步分析,为进一步全面解析此类T3E的功能、阐明其参与病菌的致病机制奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 样 品

供试植物为黄瓜(*Cucumis sativus*)长春密刺品种,种子购自淘宝店铺,培养5 d时使用;烟草有本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)和普通烟草(*Nicotiana tabacum*)秦烟95,种子均由西北农林科技大学单卫星教授惠赠,培养约50 d时使用;辣椒(*Capsicum annuum*) ECW-10R品种,种子由

广西大学姜伯乐教授惠赠, 培养约 60 d 时使用。植物材料于光照培养箱 28 °C/25 °C、16 h/8 h 交替条件下培养。

供试菌株西瓜食酸菌、农杆菌 GV3101 和大肠杆菌的培养参考陈宝强等<sup>[15]</sup>的方法, 黄单胞菌 Xcc 8004 培养参考韦红玉<sup>[20]</sup>的方法。西瓜食酸菌 FC440 野生型菌株由南京农业大学胡白石教授惠赠, 菌株 Xcc 8004 由中国科学院微生物研究所钱韦教授惠赠, 农杆菌 GV3101 和大肠杆菌 S17-1 为本实验室保存。

本研究所用载体为自杀载体 pK19mob2ΩHMB、原核表达载体 pBBR1MCS-5、瞬时表达载体 pAPK 及 pBINGFP2, 均为本实验室保存。

### 1.1.2 培养基

黄单胞菌的培养条件及培养所需的含氮酵母甘油液体培养基(nitrogen yeast glycerol broth, NYGB)参考文献[20], 西瓜食酸菌、大肠杆菌及农杆菌的培养条件及培养所需的培养基参考文献[15]。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

细菌 RNA 提取试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; 反转录试剂盒和荧光定量试剂盒, 上海爱必梦生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 过氧化氢含量检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; PrimeSTAR HS DNA Polymerase 及限制性内切酶, 宝生物工程(大连)有限公司。激光共聚焦显微镜, 卡尔蔡司光学(中国)有限公司; 荧光定量 PCR 仪, 应用生物系统公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 AopAI 生物信息学分析

菌株 Ac FC440 的 *aopAI* 基因(GenBank 登录号为 OP748399), 分别用 fuzznuc、SingalP、TMHMM、SMART 和 Cell-PLoc 预测分析其基因启动子区 PIP-box、编码蛋白序列是否含有信

号肽、跨膜螺旋区、保守结构域和亚细胞定位, 具体步骤参考陈宝强等<sup>[15]</sup>的方法。

### 1.2.2 构建基因突变菌株及功能互补菌株

参照颀兵兵等<sup>[21]</sup>的方法, 使用软件 Primer Premier 5 设计引物 *aopAI*-F/R (表 1), 由细菌基因组 DNA 提取试剂盒获得的 FC440 菌株基因组 DNA 为模板, 使用高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增获得用于制备基因突变体的 249 bp 目的片段, PCR 反应体系及条件参考文献[21], 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切验证后转入感受态大肠杆菌 S17-1 中, 采用双亲杂交的方法将重组质粒导入野生型 FC440 菌株细胞中, 使用 Ac 特异性引物 AAC-1/AAC-2 及基因全长的引物 *aopAI*-QF/QR 进行菌液 PCR 验证, 验证反应体系及条件参考文献[21], 突变株保存于 15% 甘油。以 *aopAI*-QF/QR 引物扩增 *aopAI* 基因全长, 利用双亲杂交的方法构建功能互补菌株。

### 1.2.3 细菌致病力检测

参考陈宝强等<sup>[15]</sup>的方法并略微修改, 用注射接种叶背面的方式, 分别将浓度为  $1 \times 10^4$  CFU/mL 和  $OD_{600}$  为 0.3 的菌悬液接种至培养 5 d 的黄瓜子叶和 50 d 的秦烟 95 叶片, 观察记录黄瓜子叶的发病情况和烟草叶片 HR 反应情况, 并计算不同处理下黄瓜子叶的病情指数。

### 1.2.4 AopAI 转运功能验证

参照韦红玉<sup>[20]</sup>的方法并略微修改, 通过双亲杂交法将重组载体 pBBR*avrBs1*<sub>59-445</sub>-*aopAI* 分别导入 *hrpF* 和 *avrBs1* 突变株中, 获得 Xcc 8004 ( $\Delta$ *hrpF*-pBBR*avrBs1*<sub>59-445</sub>-*aopAI*) 和 Xcc 8004 ( $\Delta$ *avrBs1*-pBBR*avrBs1*<sub>59-445</sub>-*aopAI*) 菌株。使用 NYGB 培养基 28 °C、220 r/min 培养供试各菌株至  $OD_{600}$  大于 1, 吸取 1.4 mL 菌液 12 000 r/min 离心 1 min 弃上清收集菌体, 再用无菌水重悬菌体, 调整菌悬液浓度至  $OD_{600}$  为 0.3, 注射接种至 ECW-10R 辣椒叶背面, 观察记录是否引起 HR 反应, 以无菌水、Xcc 8004 ( $\Delta$ *hrpF*-pBBR*avrBs1*<sub>59-445</sub>)

和 Xcc 8004 ( $\Delta avrBs1$ -pBBR $avrBs1_{59-445}$ )为阴性对照,以野生型 Xcc 8004、表达 Ac FC440 菌株 1044(Ac M6 菌株 T3E APS58\_1448 的同源蛋白<sup>[13]</sup>)及 *avrBs1* 功能区(59–445 aa)的菌株 Xcc 8004 ( $\Delta avrBs1$ -pBBR $avrBs1_{59-445}$ -1044)为阳性对照。

### 1.2.5 AopAI 抑制激发子诱导的细胞死亡能力检测

参考杨琳琳<sup>[5]</sup>的方法并略微修改,将供试各农杆菌菌液浓度调至  $OD_{600}$  为 0.4,黑暗静置 2 h 后注射接种于同样黑暗处理的本氏烟叶背面,24 h 后在接种部位分别注射激发子细胞凋亡调控因子 bcl2 associated X protein (BAX)、坏死诱导蛋白(necrosis inducing protein, NIP)、坏死及乙烯

诱导蛋白(necrosis and ethylene-inducing peptide, NEP)和致病疫霉激发子 INF1 置于培养箱中培养,3–8 d 后观察记录接种部位的细胞坏死程度。

### 1.2.6 AopAI 亚细胞定位分析

以引物 *aopAI*-DF/DR(表 1)扩增目的片段,无缝克隆技术构建表达载体 pBINGFP2-*aopAI*,并导入农杆菌 GV3101。亚细胞定位的观察参照张美祥等<sup>[25]</sup>的方法并稍作改动,使用缓冲液调整待测菌液浓度至  $OD_{600}$  为 0.6,注射接种于本氏烟叶片背面,标记出接种位置,置于培养箱中培养 48 h 后使用激光共聚焦显微镜观察 AopAI 的亚细胞定位。

表 1 供试引物

Table 1 Primers used in this study

| Primers             | Sequences (5'→3')   | Size (bp) | Sources or references |
|---------------------|---|-----------|-----------------------|
| <i>aopAI</i> -F     | <u>CGGAATTC</u> GTCTCAACGGTTCGCCATC ( <i>EcoR</i> I)                | 249       | This study            |
| <i>aopAI</i> -R     | CCAAGCTTTCGCCCCATTGTGGTCG ( <i>Hind</i> III)                        |           |                       |
| <i>aopAI</i> -QF    | CCAAGCTTATGGATCGGCGCATTTTCG ( <i>Hind</i> III)                      | 876       | This study            |
| <i>aopAI</i> -QR    | <u>CGGAATTC</u> CGCATCAGACTTCCCTTTGGT ( <i>EcoR</i> I)              |           |                       |
| <i>avrBs1</i> -59F  | <u>CCCTGCAGG</u> CTTTGCACACCTCATCGTTAGAG ( <i>Pst</i> I)            | 1 161     | This study            |
| <i>avrBs1</i> -445R | CCTCTAGATTACGCTTCTCCTGCATTTGTAAC ( <i>Xba</i> I)                    |           |                       |
| <i>aopAI</i> -ZF    | AGGGAACAAAAGCTGGGT <u>ACC</u> ATGGATCGGCGCATTTTCG ( <i>Kpn</i> I)   | 876       | This study            |
| <i>aopAI</i> -ZR    | GTGCAAAGCCTGCAGGAATTCGACTTCCCTTTGGTGGATCGT ( <i>EcoR</i> I)         |           |                       |
| <i>aopAI</i> -SF    | TTTGGAGAGGACACGCTCGAGATGGATCGGCGCATTTTCG ( <i>Xho</i> I)            | 876       | This study            |
| <i>aopAI</i> -SR    | TCATTAAGCAGGACTCTAGATCAGACTTCCCTTTGGTGGATC ( <i>Xba</i> I)          |           |                       |
| <i>aopAI</i> -DF    | TGTACAAGGGTACCC <u>CCCGGG</u> ATGGATCGGCGCATTTTCG ( <i>Sma</i> I)   | 876       | This study            |
| <i>aopAI</i> -DR    | GAGGATCCGTCGAC <u>CCCGGG</u> TGAGACTTCCCTTTGGTGGATC ( <i>Sma</i> I) |           |                       |
| RT- <i>aopAI</i> -F | TCTTCGCAATCCGACACC  | 167       | This study            |
| RT- <i>aopAI</i> -R | TGGCAGGTCCTTCGCTCA  |           |                       |
| <i>rpoB</i> -F      | GCGACAGCGTGCTCAAAGTG  | 104       | [22]                  |
| <i>rpoB</i> -R      | GGCCTTCGTTGGTGCCTTTCT   |           |                       |
| AAC-1               | GACCAGCCCACTGGGAC   | 246       | [23]                  |
| AAC-2               | CTGCCGCACTCCAGCGA   |           |                       |
| <i>PTI5</i> -F      | CCTCCAAGTTTGAGCTCGGATAGT  | /         | [15]                  |
| <i>PTI5</i> -R      | CCAAGAAATTCTCCATGCACTCTGTC  |           |                       |
| <i>GRAS2</i> -F     | TACCTAGCACCAAGCAGATGCAGA  | /         | [15]                  |
| <i>GRAS2</i> -R     | TCATGAGGCGTTACTCGGAGCATT  |           |                       |
| <i>WRKY7</i> -F     | CACAAGGTACAAACAACACAG   | /         | [15]                  |
| <i>WRKY7</i> -R     | GGTTGCATTTGGTTCATGTAAG  |           |                       |
| <i>ACRE31</i> -F    | GCTCTTAACGTCGGATGGTC  | /         | [15]                  |
| <i>ACRE31</i> -R    | AGCCAAACCCTAGCTCCATT  |           |                       |
| <i>GAPDH</i> -F     | AGCTCAAGGGAATTCTCGATG   | /         | [24]                  |
| <i>GAPDH</i> -R     | AACCTTAACCATGTCATCTCCC  |           |                       |

下划线处表示限制性酶切位点; /: 片段大小未知

The restriction sites are underlined; /: The fragment size is unknown.

### 1.2.7 PTI 响应物质含量检测

过氧化氢和胍胍质积累量定性测定分别参考 Rajput 等<sup>[26]</sup>和刘静等<sup>[27]</sup>的方法并略微修改,使用无菌水将供试各菌株菌体重悬后调整浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL,注射接种于大小相近的黄瓜子叶,24 h 后将子叶剪下,分别使用二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色法和苯胺蓝法染色定性测定过氧化氢和胍胍质积累量,并分析子叶的相对染色强度,染色强度用 Image J 软件进行分析。

过氧化氢含量的检测方法:黄瓜子叶的接种处理方式同上,称取 0.1 g 的黄瓜子叶加入 1 mL 丙酮进行冰浴研磨,4 °C、8 000×g 离心 10 min,吸取上清置于冰上备用;过氧化氢含量测定步骤参考索莱宝过氧化氢含量检测试剂盒。

### 1.2.8 mRNA 表达量分析

参考陈宝强等<sup>[15]</sup>的方法并略微修改,分别提取瞬时表达了 AopAI 和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的本氏烟叶片总 RNA,经反转录后检测 PTI 信号通路标记基因(*PTI5*、*GRAS2*、*ACRE31* 和 *WRKY7*)的表达量,反应条件及体系参考文献<sup>[22]</sup>,选取 *GAPDH* 为内参基

因进行归一化处理。

AopAI 编码基因表达量分析:使用细菌 RNA 提取试剂盒提取供试各菌株中的总 RNA,将 RNA 浓度调整一致后反转录成 cDNA,按照荧光定量试剂盒说明书配制反应体系,测定 *aopAI* 在 FC440 (WT)、FC440 ( $\Delta hrpG$ )和 FC440 ( $\Delta hrpX$ )中的表达量,反应体系及条件参考优丽图·乃比<sup>[22]</sup>的方法,以 *rpoB* 作为内参基因。

### 1.2.9 数据统计分析

各试验均进行了 3 次以上的生物学重复,试验数据使用 IBM SPSS Statistics 单因素方差进行差异性分析,  $P > 0.05$  表示差异不显著;  $0.01 < P < 0.05$  为显著性差异,在图中用 \* 表示;  $P < 0.01$  为极显著差异,在图中用 \*\* 表示;用 GraphPad Prism 5 进行作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 AopAI 序列特征分析

Ac FC440 菌株的 *aopAI* 基因(GenBank 登录号为 OP748399)全长 876 bp,该基因起始位点上游 94 bp 处具有典型的 PIP-box (图 1A),其与

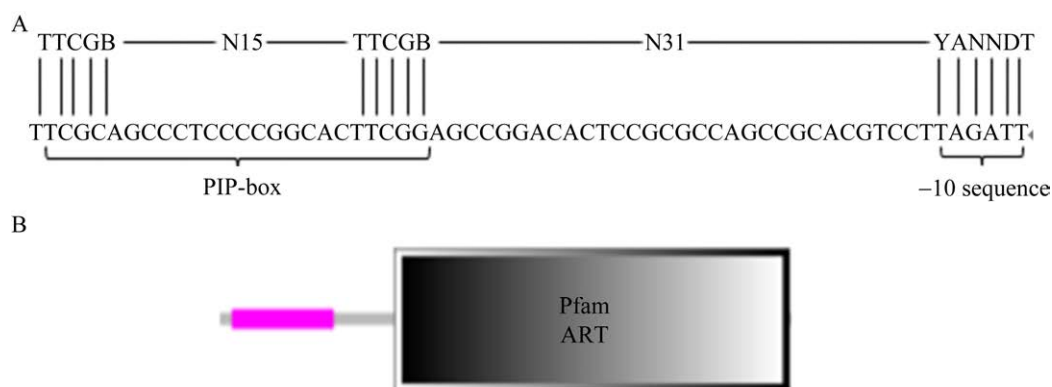


图1 Ac *aopAI* 及其表达产物的序列特征分析 A: *aopAI* 基因转录起始位点上游 PIP-box 分析, A、T、C 和 G 为单个碱基的缩写; Y 代表碱基 C 或 T; D 代表碱基 A、G 或 T; N 代表 A、G、C 或 T. B: AopAI 蛋白结构域预测结果

Figure 1 Sequence feature analysis of Ac *aopAI* and its expression products. A: PIP-box analysis of upstream of *aopAI* gene transcription start site, A, T, C, and G are the single letter abbreviations of base; Y represents C and T; D represents A, G, and T; N represents A, G, C, and T. B: Prediction results of AopAI protein domain.

M6 菌株中 *APS58\_3344* 基因、AAC00-1 菌株中 *Aave\_1647* 基因的一致性达 100%，与柑桔溃疡病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac) 的 XopAI 序列一致性为 43.06%，*aopAI* 基因编码产物为一个 291 aa、32.58 kDa 的蛋白，预测分析显示，AopAI 序列中不存在跨膜螺旋区和不含信号肽，定位于细菌细胞外及细胞内膜，其蛋白 C 端片段具有一个保守的 ART 结构域(图 1B)。

## 2.2 *aopAI* 在 *hrpX* 和 *hrpG* 突变体中的表达量分析

荧光定量 PCR 检测结果(图 2)表明，与野生型相比，在 *hrpG* 和 *hrpX* 突变株中 *aopAI* 基因的表达量均显著降低，说明其表达受 T3SS 核心基因 *hrpG* 和 *hrpX* 的正调控。

## 2.3 AopAI 具有转运功能

Xcc 8004 的效应蛋白 AvrBs1 能引发携带 Bs1 抗性基因的 ECW-10R 辣椒植株产生 HR 反应，该蛋白引发 HR 反应的功能区为其 59–445 aa 片段，据此，AvrBs1 无毒报告系统即是将候选 T3E 的基因与 AvrBs1 的功能区(59–445 aa) DNA

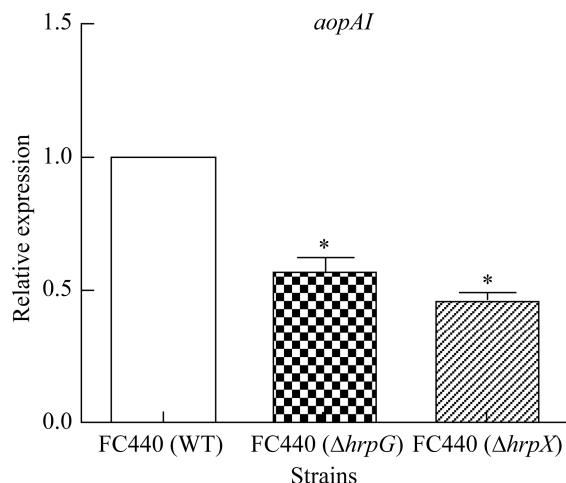


图 2 *Ac hrpG/hrpX* 基因突变株中 *aopAI* 基因的表达量分析

Figure 2 The expression analysis of *aopAI* gene in *hrpG* or *hrpX* gene mutant in *Ac*. \*:  $0.01 < P < 0.05$ .

片段融合表达，当重组质粒在 *avrBs1* 突变株中表达能够引发 ECW-10R 辣椒植株产生 HR 反应，但在 T3SS 功能缺失的突变株中不能引发 HR 反应时，即表明候选 T3E 具有依赖 T3SS 的转运功能。

ECW-10R 辣椒叶片接种各菌株后的表型(图 3)显示：阳性对照野生型 Xcc 8004 及表达 T3E 1044 及 *avrBs1* 功能区(59–445 aa)的 *avrBs1* 突变株均能够诱导叶片的 HR 反应；阴性对照表达 *avrBs1* 功能区(59–445 aa)的 *hrpF* 突变株和 *avrBs1* 突变株均未引起 HR 坏死斑出现；同时表达 *aopAI* 和 *avrBs1* 功能区(59–445 aa)的 *hrpF* 突变株未表现诱导叶片发生 HR 反应；而表达 *aopAI* 和 *avrBs1* 功能区(59–445 aa)的 *avrBs1* 突变株则表现诱导叶片产生了 HR 的坏死斑，表明 AopAI 可以介导 *avrBs1* 功能区(59–445 aa)转运出细菌从而诱导 HR 反应的发生。该结果说明 AopAI 具有转运特征，且其转运功能依赖结构完整的 T3SS。

## 2.4 AopAI 对 *Ac* FC440 致病力的影响

寄主黄瓜接种不同菌株 72 h 时的表型(图 4A)显示：野生型菌株导致黄瓜子叶发病严重，子叶

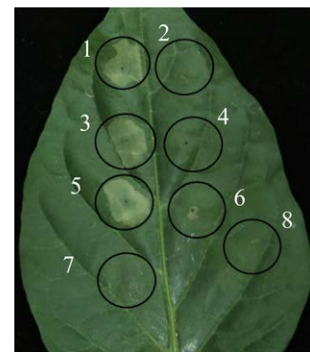
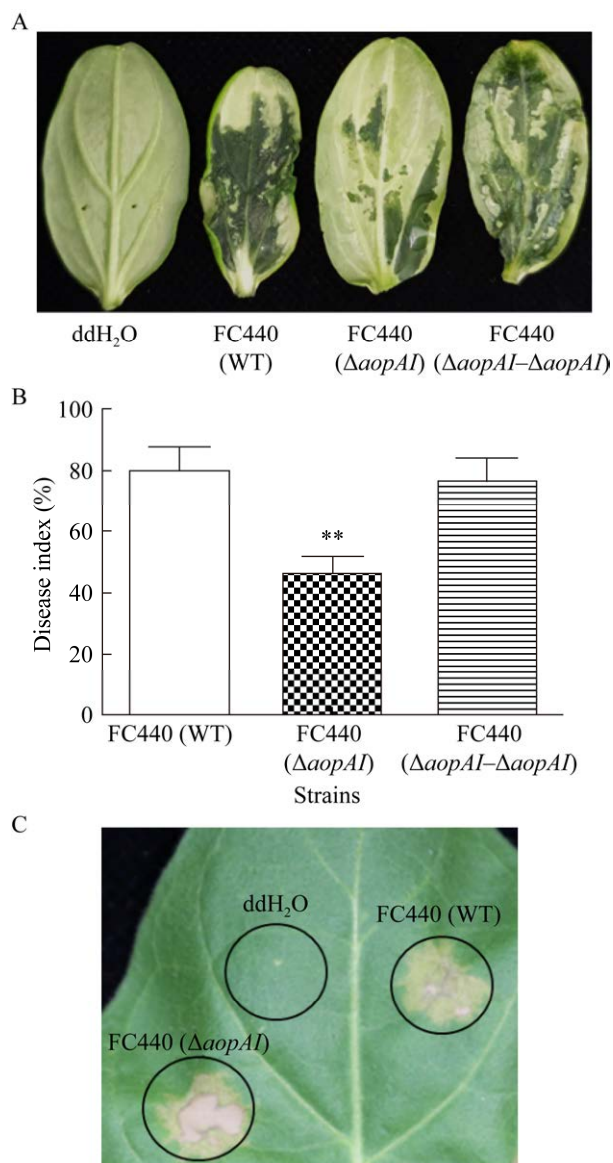


图 3 AopAI 转运功能检测 ECW-10R 辣椒接种 3 d 后的 HR 反应表型

Figure 3 AopAI transport function verification. Phenotypes of HR response on ECW-10R leaf after 3 days of inoculation. 1: Xcc 8004; 2: ddH<sub>2</sub>O; 3: Xcc 8004 ( $\Delta avrBs1$ -pBBR*avrBs1*<sub>59-445-1044</sub>); 4: Xcc 8004 ( $\Delta avrBs1$ -pBBR*avrBs1*<sub>59-445</sub>); 5: Xcc 8004 ( $\Delta avrBs1$ -pBBR*avrBs1*<sub>59-445-aopAI</sub>); 6: Xcc 8004 ( $\Delta hrpF$ -pBBR*avrBs1*<sub>59-445</sub>); 7: Xcc 8004 ( $\Delta hrpF$ -pBBR*avrBs1*<sub>59-445-aopAI</sub>); 8: Xcc 8004 ( $\Delta hrpF$ -pBBR*avrBs1*<sub>59-445-1044</sub>).



**图 4 AopAI 对 Ac FC440 致病力影响的分析**  
A: 黄瓜子叶接种不同菌株 3 d 后的发病表型. B: 不同菌株的病情指数统计, \*\*:  $P < 0.01$ . C: 秦烟 95 接种各菌株 2 d 后的 HR 反应表型

Figure 4 Analysis of the effect of AopAI on the pathogenicity of Ac FC440. A: Pathogenic symptoms on cucumber cotyledon after 3 days inoculation with different strains. B: The disease statistical analysis index of different strains, \*\*:  $P < 0.01$ . C: Phenotype of the occurrence of HR response after 2 days inoculation with different bacterial strains in Qinian 95.

出现皱缩和腐烂; *aopAI* 突变株作用下的黄瓜子叶只有小面积的水浸状病斑; 基因功能互补株处理下子叶出现大面积病斑并发生皱缩; 与表型对应的黄瓜子叶上的病情指数(图 4B)也反映出突变株的病情指数显著低于野生型的和功能互补菌株的。此结果显示 *aopAI* 突变后导致 FC440 菌株在寄主上的致病力减弱, 说明其对病菌的致病力有贡献。但 *aopAI* 突变后不影响病菌诱导非寄主秦烟 95 叶片发生 HR 反应(图 4C)。

## 2.5 AopAI 对 Ac 侵染下黄瓜中 PTI 响应物质含量的影响

不同菌株作用黄瓜子叶 1 d 后经 DAB 染色, 结果(图 5A)显示: 野生型处理的黄瓜子叶组织中有少量的褐色络合物, 而 *aopAI* 突变株处理的黄瓜子叶组织则含有大量的褐色络合物, 染色强度结果(图 5B)分析表明, 突变株侵染后显示黄瓜子叶中过氧化氢积累量显著增加, *aopAI* 基因功能互补株的则与野生型的相近。进一步检测黄瓜子叶中的  $H_2O_2$  含量表明子叶中的  $H_2O_2$  含量变化与 DAB 染色结果相似, 即突变株侵染下的黄瓜子叶中  $H_2O_2$  含量显著高于野生型(图 5C)。这些结果表明, 病菌侵染寄主时, AopAI 通过抑制黄瓜组织中  $H_2O_2$  的积累以促进病菌的侵染。

黄瓜子叶组织中胍胍质积累量的苯胺蓝色结果(图 5D、5E)显示: *aopAI* 突变体处理的黄瓜子叶组织中有大量积累胍胍质, 而野生型和功能互补植株叶片的组织中胍胍质积累相对较少, 表明 AopAI 在病菌与寄主互动时, 可以抑制植物中由病菌诱导的胍胍质积累。

## 2.6 AopAI 抑制激发子诱导的细胞坏死表型

AopAI 分别与激发子 BAX、INF1、NEP 和 NIP 在本氏烟植株叶片的共表达表型所示。AopAI 与 NIP 共表达时可以抑制大豆疫霉激发子 NIP 诱导的本氏烟细胞坏死反应(图 6A), 但与 BAX、INF1 和 NEP 共表达时对细胞坏死反应无抑制作用(图 6B), 这表明 AopAI 能干扰 NIP 诱导的细胞死亡信号途径。



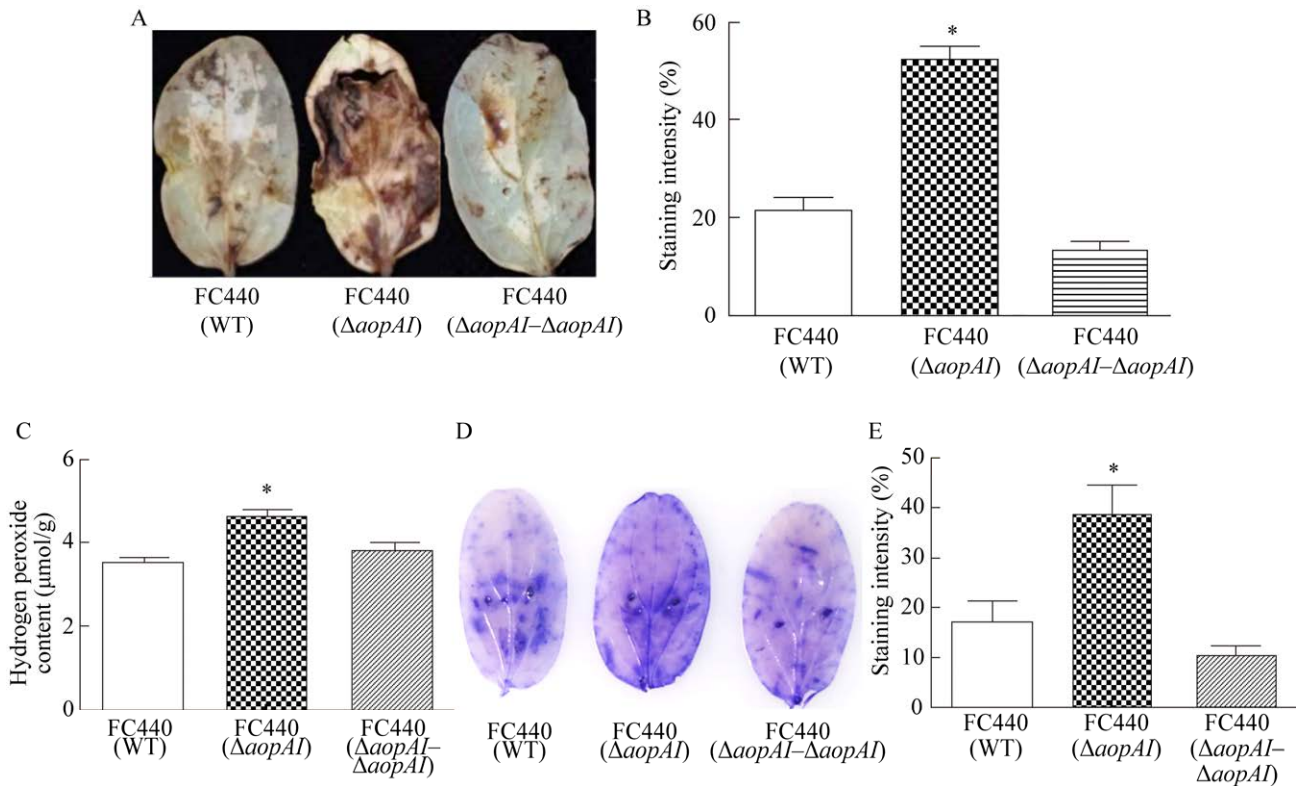


图5 *aopAI* 基因突变体侵染下的黄瓜组织过氧化氢和胼胝质积累量分析 A: 接种 1 d 后黄瓜子叶中过氧化氢染色表型. B: 不同处理的子叶染色强度统计分析. C: 接种 1 d 后黄瓜子叶中过氧化氢含量测定. D: 黄瓜子叶中苯胺蓝染色的表型. E: 不同处理的子叶染色强度统计分析. \*:  $0.01 < P < 0.05$

Figure 5 Analysis the effect of *aopAI* gene mutation on hydrogen peroxide and callose accumulation in cucumber tissue after inoculation. A: The phenotypes of hydrogen peroxide-stained cucumber cotyledons 1 d after inoculation. B: Statistical analysis of staining intensity in cotyledons under different treatments. C: Determination of hydrogen peroxide in cucumber cotyledon 1 d after inoculation. D: The phenotypes of aniline blue-stained cucumber cotyledons. E: Statistical analysis of staining intensity in cotyledons under different treatments. \*:  $0.01 < P < 0.05$ .

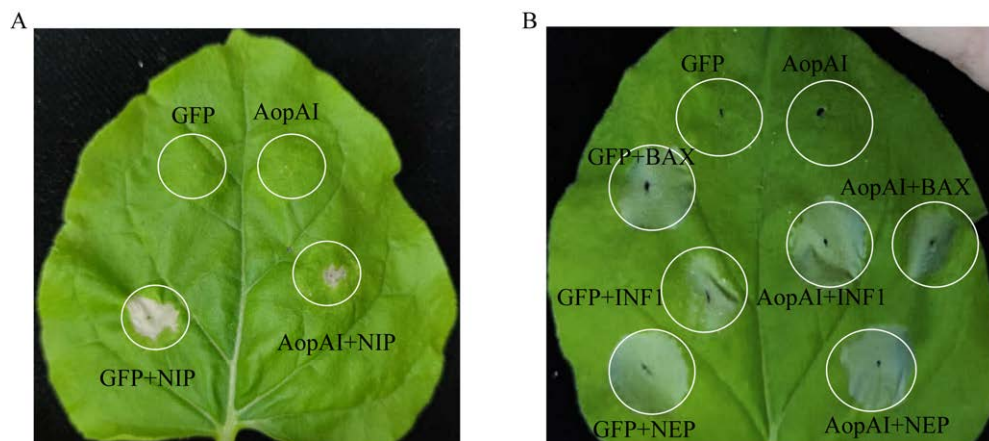


图6 本氏烟叶上 *AopAI* 抑制 4 种激发子诱导细胞坏死的表型

Figure 6 Phenotypes of *AopAI* inhibition of four elicitors induced cell necrosis responses on *Nicotiana benthamiana* leaves.

## 2.7 AopAI 蛋白定位于植物细胞核和细胞膜

激光共聚焦显微镜下观察的结果(图 7)显示:表达 GFP 时,本氏烟叶整个细胞中出现绿色荧光;表达 AopAI 蛋白时,本氏烟叶细胞的细胞核和细胞膜位置显示绿色荧光,表明 AopAI 定位于本氏烟叶细胞的细胞核和细胞膜上。

## 2.8 AopAI 影响本氏烟 PTI 信号通路标记基因的表达量

对本氏烟 PTI 信号通路标记基因的表达量检测结果显示:AopAI 瞬时表达后,叶细胞中 *WRKY7* 和 *PTI5* 的表达量未发生显著变化, *GRAS2* 和 *ACRE31* 的表达量显著降低(图 8)。该结果说明 AopAI 可以抑制本氏烟的 PTI 信号通路。

## 3 讨论与结论

植物病原菌可以通过共价修饰调节宿主特定蛋白的活性,从而破坏宿主细胞的活性以促进病原菌侵染<sup>[28]</sup>,由具有 ART 活性 T3E 介导的蛋

白 ADP 核糖基化是修饰方式之一,但该类 T3E 在包含 Ac 的革兰氏阴性植物病原菌中的研究甚少,本研究初步分析了 Ac 中具有 ART 结构域的 T3E AopAI 发挥毒性功能的方式。

植物病原 T3E 基因间的同源性虽然较低,但也存在共性之处<sup>[7]</sup>。首先, T3E 表达受 T3SS 核心基因调控,经对编码 Ac T3SS 的 *hrp* 基因簇分析发现,其属于 II 类 T3SS 系统,与黄单胞菌属的同源性较高<sup>[29]</sup>,黄单胞菌中的 *hrp* 基因已得到充分研究, *hrpG* 调节 *hrpX*, *hrpX* 可以识别 T3E 启动子区的 PIP-box<sup>[30]</sup>,黄单胞菌中已鉴定的 T3E 具有保守的 PIP-box 序列<sup>[31]</sup>; Ac 中 *hrpG* 和 *hrpX* 同样调控 T3E 的表达<sup>[6]</sup>。其次, T3E 还具有转运的特征, Western blotting 技术<sup>[32]</sup>及无毒基因报告系统<sup>[12]</sup>常被用于验证 T3E 的转运特征。Zhang 等利用 Western blotting 技术鉴定出 Ac Aac5 菌株中的 AopP 和 AopN 具有转运功能<sup>[10,14]</sup>; Jiménez-Guerrero 等利用黄单胞菌无毒蛋白 AvrBs2

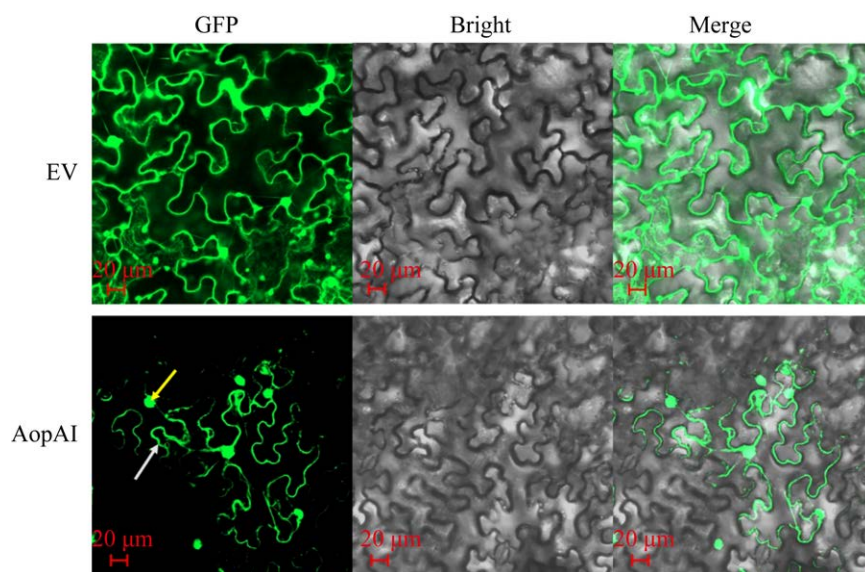


图 7 AopAI 在本氏烟叶细胞中的亚细胞定位 GFP 为绿色荧光蛋白; Bright 为明场; Merge 为叠加场; 黄色箭头代表细胞核; 白色箭头代表细胞膜

Figure 7 Subcellular localization analysis of AopAI in *Nicotiana benthamiana* leaf cells. GFP is green fluorescent protein; Bright is a bright field; Merge is a superposition field; The white arrow represents the cell membrane, and the yellow arrow represents the nucleus.

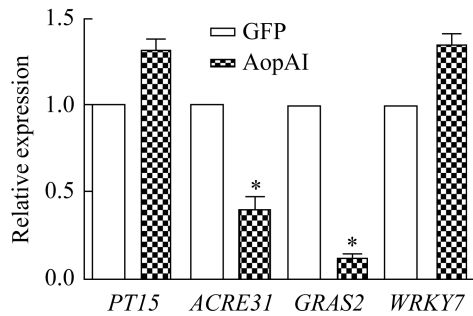


图 8 AopAI 对 PTI 信号通路标记基因表达量的影响分析 \*:  $0.01 < P < 0.05$

Figure 8 Analysis of the effect of AopAI on the expression of PTI signaling pathway marker genes. \*:  $0.01 < P < 0.05$ .

报告系统鉴定出 *Ac* 中 7 个 T3E<sup>[13]</sup>, 说明黄单胞菌无毒报告系统可以用于验证 *Ac* 中 T3E 的转运特征。本研究以 *AvrBs1* 为报告基因的黄单胞菌无毒蛋白报告系统, 鉴定出 AopAI 具有转运功能, 且该功能依赖结构完整的 T3SS; *aopAI* 基因上游启动子区存在 PIP-box 序列, 且表达量分析也表明 *aopAI* 的表达受 *hrpG* 和 *hrpX* 调控。这些试验结果均说明 AopAI 为 *Ac* 中一个 T3E。

T3E 可以通过抑制植物 PTI 免疫反应发挥毒性功能<sup>[33]</sup>, PTI 途径是植物重要的早期防御机制, 能引发活性氧暴发、胼胝质沉积和标记基因表达等免疫反应<sup>[34]</sup>。研究证明, *Ac* 中 4 个效应蛋白(*Ace0201*、*Ace1242*、*Ace1* 和 *AopP*)通过抑制活性氧暴发等干扰 PTI 途径<sup>[15]</sup>; 丁香假单胞菌 DC3000 中具有 ART 活性的 HopU1, 能够抑制植物胼胝质沉积从而抑制 PTI 免疫反应<sup>[17]</sup>。已报道的 PTI 标记基因 *PTI5*、*GRAS2*、*ACRE31* 和 *WRKY7* 均为重要的抗病途径转录因子, 调控下游抗病相关基因的表达<sup>[35-36]</sup>, 其中 *ACRE31* 编码含有 3 个 EF-hand 的钙结合蛋白<sup>[37]</sup>, 参与早期 PAMP 触发免疫反应所必需的类受体激酶 BAK1 介导的途径<sup>[35]</sup>, BAK1 作为模式识别受体的共受体是植物免疫信号通路的枢纽<sup>[38]</sup>, 是 T3E 的重

要毒力靶点, 丁香假单胞菌中具有 ART 活性的 HopF2 通过靶向 BAK1 抑制多种 MAMPs 触发的包括 BIK1 磷酸化、MAPK 激活等早期免疫信号事件<sup>[39]</sup>; 致病疫霉菌 PITG\_06087 超量表达后抑制 *WRKY7*、*WRKY8* 和 *ACRE31* 的表达, 表明其对 PTI 免疫应答的抑制功能<sup>[40]</sup>。本研究中 AopAI 抑制病原菌侵染下的寄主黄瓜组织中过氧化氢和胼胝质的积累, 结合该蛋白瞬时表达后抑制了 PTI 途径标记基因 *GRAS2* 和 *ACRE31* 的表达, 说明 AopAI 属于 *Ac* 的毒性蛋白, 推测其通过抑制 ACRE31 介导的免疫途径以降低植物过氧化氢和胼胝质的积累, 从而抑制植物 PTI 防御反应机制。

利用 T3E 具有抑制不同激发子诱导的细胞死亡的能力, 可以初步筛选病原菌候选效应蛋白。Zhang 通过检测 *Ac* 中假定 T3E 是否具有抑制 BAX 诱导细胞坏死的功能, 筛选到 5 个候选 T3E<sup>[11]</sup>。激发子通过一定的信号途径诱导细胞死亡, 分析 T3E 所抑制激发子的信号途径, 助于解析效应蛋白干扰植物免疫通路的方式。例如: 致病疫霉菌中的 *Avr3a* 和 *Pi02860* 分别通过修饰 CMPG1 的酶活性<sup>[41]</sup>和降解免疫调节蛋白 AWAP70<sup>[42]</sup>来抑制 INF1 引起的本氏烟坏死反应; HopF2 通过干扰 *AvrRpt2* 介导的 RIN4 降解抑制 *AvrRpt2* 引起的 HR 反应<sup>[43]</sup>, 本研究中 AopAI 可以抑制 NIP 引起的细胞死亡, 表现具有毒性功能, 由于来源于大豆疫霉的激发子 NIP, 其引起宿主细胞死亡的具体信号通路仍然未知<sup>[44]</sup>, 因此关于 AopAI 通过何种信号通路来抑制 NIP 引起的细胞死亡还有待进一步研究。

效应蛋白的定位与其作用的蛋白相关, 具有相同活性的效应蛋白于细胞中的定位可能不同<sup>[45]</sup>。例如, 具有 E3 泛素连接酶活性的效应蛋白可以定位于植物的不同部位发挥功能<sup>[46-48]</sup>: 青枯菌中的 GALA 靶向烟草叶绿体蛋白以抑制光

合作用, 损害植物免疫<sup>[46]</sup>; 丁香假单胞菌中的 AvrPtoB 泛素化细胞质中的 Pto、Fen 激酶, 来抑制植物的 ETI 反应<sup>[47]</sup>、HopM1 通过降低细胞内膜免疫相关蛋白 AtMIN 的稳定性抑制植物免疫反应<sup>[48]</sup>。本研究中具有潜在 ART 活性的 AopAI 定位于本氏烟细胞核和细胞膜, 已报道丁香假单胞菌中含有 ART 活性的 T3E——HopF2 的植物细胞膜定位是其抑制 MAMP 触发免疫功能所必需的<sup>[18]</sup>, 而 HopU1 定位于细胞质和细胞核, 其细胞质定位与靶向 GRP7 蛋白抑制植物免疫反应相关<sup>[17]</sup>, 推测 AopAI 的定位与其发挥功能的靶向蛋白有关。

在西瓜食酸菌中具有一个定位于细胞核和细胞膜、有 ADP 核糖基转移酶结构域的 T3E 蛋白 AopAI, 该 T3E 是能够抑制 NIP 诱导的细胞死亡的毒性蛋白, 通过抑制 *ACRE31* 调节的免疫途径降低植物过氧化氢和胍胍质的积累, 从而抑制植物 PTI 防御反应机制。

## REFERENCES

- [1] 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.
- [2] 金明, 赵志伟, 高玉凤, 杨宁生. 吴忠市利通区西瓜果斑病的发生及防控措施[J]. *宁夏农林科技*, 2014, 55(8): 33-34.
- [3] JIN M, ZHAO ZW, GAO YF, YANG NS. Occurrence and control measures of watermelon fruit blotch in Litong district in Wuzhong municipality[J]. *Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology*, 2014, 55(8): 33-34 (in Chinese).
- [4] CHUNG MY, KIM H, BEUCHAT LR, RYU JH. Antimicrobial activities of plant essential oil vapours against *Acidovorax citrulli* and *Xanthomonas campestris* on *Cucurbitaceae*, *Brassicaceae* and *Solanaceae* seeds[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(3): 2189-2202.
- [5] KAN YM, ZHANG YJ, LIN WH, DONG T. Differential plant cell responses to *Acidovorax citrulli* T3SS and T6SS reveal an effective strategy for controlling plant-associated pathogens[J]. *Microbiology*, 2023: e0045923.
- [6] 杨琳琳. 西瓜噬酸菌效应蛋白 Ace0201 和 Ace1242 的鉴定及生物学功能初步分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2019.
- [7] YANG LL. Identification on biological function of the effector Ace0201 and Ace1242 in *Acidovorax citrulli*[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [8] ZHANG XX, ZHAO M, YAN JP, YANG LL, YANG YW, GUAN W, WALCOTT R, ZHAO TC. 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.
- [9] TAMIR-ARIEL D, NAVON N, BURDMAN S. Identification of genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* induced during its interaction with tomato[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(17): 6359-6371.
- [10] DONG XB, LU XT, ZHANG ZD. BEAN 2.0: an integrated web resource for the identification and functional analysis of type III secreted effectors[J]. *Database: the Journal of Biological Databases and Curation*, 2015, 2015: bav064.
- [11] 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[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 2009, 22(11): 1401-1411.
- [12] ZHANG XX, YANG YW, ZHAO M, YANG LL, JIANG J, WALCOTT R, YANG SS, ZHAO TC. *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] 张晓晓. 西瓜噬酸菌效应蛋白 Ace1 功能研究及光照黑暗条件下致病性差异分析[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2018.
- [14] ZHANG XX. Functional study of effector Ace1 & analysis of pathogenicity differences under light and dark conditions in *Acidovorax citrulli*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese).
- [15] 徐荣旗. 野油菜黄单胞菌野油菜致病变种新的依赖于 III 型分泌系统的效应物的鉴定[D]. 南宁: 广西大学博士学位论文, 2006.

- XU RQ. Identification of novel effectors depended on type III secretion system in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[D]. Nanning: Doctoral Dissertation of Guangxi University, 2006 (in Chinese).
- [13] JIMÉNEZ-GUERRERO I, PÉREZ-MONTAÑO F, Da SILVA GM, WAGNER N, SHKEDY D, ZHAO M, PIZARRO L, BAR M, WALCOTT R, SESSA G, PUPKO T, BURDMAN S. Show me your secret(ed) weapons: a multifaceted approach reveals a wide arsenal of type III-secreted effectors in the cucurbit pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli* and novel effectors in the *Acidovorax* genus[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(1): 17-37.
- [14] ZHANG XX, ZHAO M, JIANG J, YANG LL, YANG YW, YANG SS, WALCOTT R, QIU DW, ZHAO TC. 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.
- [15] 陈宝强, 马博雅, 李莹莹, 优丽图孜·乃比, 宋金迪, 刘君. 西瓜食酸菌III型分泌效应物基因 *aopW* 功能初步分析[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(5): 1973-1987.
- CHEN BQ, MA BY, LI YY, YOULITUZI NB, SONG JD, LIU J. Preliminary functional analysis of the type III secreted effector gene *aopW* in *Acidovorax citrulli*[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(5): 1973-1987 (in Chinese).
- [16] LIU JH, YANG JY, HSU DW, LAI YH, LI YP, TSAI YR, HOU MH. Crystal structure-based exploration of arginine-containing peptide binding in the ADP-ribosyltransferase domain of the type III effector XopAI protein[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(20): 5085.
- [17] HURLEY B, LEE D, MOTT A, WILTON M, LIU J, LIU YC, ANGERS S, COAKER G, GUTTMAN DS, DESVEAUX D. The *Pseudomonas syringae* type III effector HopF2 suppresses *Arabidopsis* stomatal immunity[J]. *The Public Library of Science One*, 2014, 9(12): e114921.
- [18] FU ZQ, GUO M, JEONG BR, TIAN F, ELTHON TE, CERNY RL, STAIGER D, ALFANO JR. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity[J]. *Nature*, 2007, 447(7142): 284-288.
- [19] WU SJ, LU DP, KABBAGE M, WEI HL, SWINGLE B, RECORDS AR, DICKMAN M, HE P, SHAN LB. Bacterial effector HopF2 suppresses *Arabidopsis* innate immunity at the plasma membrane[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 2011, 24(5): 585-593.
- [20] 韦红玉. 野油菜黄单胞菌效应物转运鉴定系统的构建[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2006.
- WEI HY. Construction of the identification system of the effector translocation in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2006 (in Chinese).
- [21] 颀兵兵, 刘君, 优丽图孜·乃比, 张春博. 西瓜食酸菌抗铜基因 *cueR* 的生物信息学分析及功能验证[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1534-1543.
- XIE BB, LIU J, YOULITUZI NB, ZHANG CB. Bioinformatics analysis and functional verification of copper resistance gene *cueR* in *Acidovorax citrulli*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1534-1543 (in Chinese).
- [22] 优丽图孜·乃比. 西瓜食酸菌与黄瓜互作转录组分析及 T3SEs 基因的初步鉴定[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2021.
- YOULITUZI NB. Transcriptome analysis of *Acidovorax citrulli*-cucumber interaction and preliminary identification of T3SE genes in *Acidovorax citrulli*[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [23] WALCOTT RR, FESSEHAIE A, CASTRO AC. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts[J]. *Journal of Phytopathology*, 2004, 152(5): 277-285.
- [24] 池俊玲, 赵一博, 郭江波, 张龙, 刘汉阳, 辛翠花. 不同浓度  $Cd^{2+}$  胁迫下烟草实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. *南方农业学报*, 2019, 50(10): 2133-2140.
- CHI JL, ZHAO YB, GUO JB, ZHANG L, LIU HY, XIN CH. Screening of internal reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR under different concentrations of  $Cd^{2+}$  stress in tobacco[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(10): 2133-2140 (in Chinese).
- [25] 张美祥, 安玉艳, 刘廷利, 茹艳艳, 李文号, 窦道龙. 在本氏烟中瞬时表达效应因子 PsCRN127 基因提高其对寄生疫霉的抗性[J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38(6): 930-935.
- ZHANG MX, AN YY, LIU TL, RU YY, LI WH, DOU DL. Transient expression of the PsCRN127 effector gene enhances *Nicotiana benthamiana* resistance to *Phytophthora parasitica*[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, 38(6): 930-935 (in Chinese).

- [26] RAJPUT NA, ZHANG MX, RU YY, LIU TL, XU J, LIU L, MAFURAH JJ, DOU DL. *Phytophthora sojae* effector PsCRN70 suppresses plant defenses in *Nicotiana benthamiana*[J]. The Public Library of Science One, 2014, 9(5): e98114.
- [27] 刘静, 赵立萍, 关巍, 杨玉文, 白庆荣, 赵廷昌. 西瓜噬酸菌效应蛋白 AopK 的功能研究[J]. 植物病理学报, 2023, 53(3): 436-446.  
LIU J, ZHAO LP, GUAN W, YANG YW, BAI QR, ZHAO TC. Functional study of effector protein AopK of *Acidovorax citrulli*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2023, 53(3): 436-446 (in Chinese).
- [28] SIMON NC, AKTORIES K, BARBIERI JT. Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function[J]. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(9): 599-611.
- [29] TAMPAKAKI AP, SKANDALIS N, GAZI AD, BASTAKI MN, PANAGIOTIS FS, CHAROVA SN, KOKKINIDIS M, PANOPOULOS NJ. Playing the “Harp”: evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes[J]. Annual Review of Phytopathology, 2010, 48: 347-370.
- [30] 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[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 1996, 9(8): 704-712.
- [31] WENGELNIK K, MARIE C, RUSSEL M, BONAS U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(4): 1061-1069.
- [32] LIU LJ, WANG YP, CUI FH, FANG AF, WANG SZ, WANG JY, WEI C, LI S, SUN WX. The type III effector AvrXccB in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* targets putative methyltransferases and suppresses innate immunity in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(6): 768-782.
- [33] BLOCK A, LI GY, FU ZQ, ALFANO JR. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2008, 11(4): 396-403.
- [34] HANN DR, RATHJEN JP. Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2007, 49(4): 607-618.
- [35] HEESE A, HANN DR, GIMENEZ-IBANEZ S, JONES AME, HE K, LI J, SCHROEDER JI, PECK SC, RATHJEN JP. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(29): 12217-12222.
- [36] NGUYEN HP, CHAKRAVARTHY S, VELÁSQUEZ AC, MCLANE HL, ZENG LR, NAKAYASHIKI H, PARK DH, COLLMER A, MARTIN GB. Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2010, 23(8): 991-999.
- [37] DURRANT WE, ROWLAND O, PIEDRAS P, HAMMOND-KOSACK KE, JONES JD. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles[J]. The Plant Cell, 2000, 12(6): 963-977.
- [38] 陈现朝, 周永力. BAK1 调控植物免疫信号识别和转导的分子机制[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(6): 1102-1107.  
CHEN XZ, ZHOU YL. Molecular mechanism underlying BAK1 involved in plant immunity signal recognition and transduction[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(6): 1102-1107 (in Chinese).
- [39] ZHOU JG, WU SJ, CHEN X, LIU CL, SHEEN J, SHAN LB, HE P. The *Pseudomonas syringae* effector HopF2 suppresses *Arabidopsis* immunity by targeting BAK1[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2014, 77(2): 235-245.
- [40] 路远. 晚疫病病菌效应子 PITG\_06087 及其靶标 StPUB33 在马铃薯晚疫病抗性中的作用[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2015.  
LU Y. Functional study of the *Phytophthora infestans* effector PITG\_06087 and its target StPUB33 in potato late blight resistance[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [41] BOS JIB, CHAPARRO-GARCIA A, QUESADA-OCAMPO LM, GARDENER BBM, KAMOUN S. Distinct amino acids of the *Phytophthora infestans* effector AVR3a condition activation of R3a hypersensitivity and suppression of cell death[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2009, 22(3): 269-281.
- [42] YANG LN, McLELLAN H, NAQVI S, HE Q, BOEVINK PC, ARMSTRONG M, GIULIANI LM, ZHANG W, TIAN ZD, ZHAN JS, GILROY EM, BIRCH PRJ. Potato NPH<sub>3</sub>/RPT<sub>2</sub>-like protein StNRL<sub>1</sub>, targeted by a *Phytophthora infestans* RXLR effector, is a susceptibility factor[J]. Plant Physiology, 2016, 171(1):

- 645-657.
- [43] WILTON M, SUBRAMANIAM R, ELMORE J, FELSENSTEINER C, COAKER G, DESVEAUX D. The type III effector HopF<sub>2</sub>Pto targets *Arabidopsis* RIN<sub>4</sub> protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(5): 2349-2354.
- [44] QUTOB D, KAMOUN S, GIJZEN M. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2002, 32(3): 361-373.
- [45] 张美祥. 卵菌胞内效应子研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(1): 18-25.  
ZHANG MX. Recent research progress on oomycete cytoplasmic effectors[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(1): 18-25 (in Chinese).
- [46] CHEN L, WEI QZ, OHNISHI K. Functions of type III effectors from multigenic family of *Ralstonia solanacearum* in plant disease development and immunity defense system[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(11): 2061-2068.
- [47] MATHIEU J, SCHWIZER S, MARTIN GB. Pto kinase binds two domains of AvrPtoB and its proximity to the effector E3 ligase determines if it evades degradation and activates plant immunity[J]. The Public Library of Science Pathogens, 2014, 10(7): e1004227.
- [48] NOMURA K, DEBROY S, LEE YH, PUMPLIN N, JONES J, HE SY. A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease[J]. Science, 2006, 313(5784): 220-223.