

研究报告

西瓜食酸菌III型效应蛋白 AopBF1 的鉴定与功能分析

马博雅¹, 李莹莹¹, 优丽图孜·乃比¹, 陈宝强¹, 刘君^{*1,2}

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

马博雅, 李莹莹, 优丽图孜·乃比, 陈宝强, 刘君. 西瓜食酸菌III型效应蛋白 AopBF1 的鉴定与功能分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 189-208.

MA Boya, LI Yingying, Youlituzi Naibi, CHEN Baoqiang, LIU Jun. Identification and functional analysis of the type III effector AopBF1 in *Acidovorax citrulli*[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 189-208.

摘要: 【背景】细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)是一种发生在葫芦科作物上的检疫性病害,其病原菌为西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*),西瓜食酸菌通过III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)将重要的致病因子III型效应蛋白(type III effector, T3E)转运到植物体内,从而致病。目前,对于 T3E 致病机制的认识非常有限。课题组前期已鉴定到西瓜食酸菌 FC440 菌株中的一些候选 T3E。

【目的】明确西瓜食酸菌 FC440 菌株候选 T3E 中 AopBF1 的序列特征、转运特性及其在病原菌致病过程中的作用,可以为深入解析病原菌致病机制奠定理论基础。【方法】利用生物信息学手段,预测分析 AopBF1 的 T3E 序列特征;通过 RT-qPCR、无毒蛋白报告系统检测 AopBF1 所受调控及其转运特性;观察 *aopBF1* 突变体(插入突变)及过表达时西瓜食酸菌的致病力表型,分析 AopBF1 对西瓜食酸菌致病性的贡献。【结果】AopBF1 具有 T3E 的序列特征、不含保守结构域,具有蛋白激酶序列特征;AopBF1 在 T3SS 核心调控基因 *hrpX*、*hrpG* 突变株中的表达量显著降低;当 *aopBF1* 基因与 *AvrBs1* 功能区(59–445 aa)片段同时于 *avrBs1* 突变株中表达时,能够诱发含 Bs1 蛋白的 ECW-10R 辣椒叶片发生过敏性坏死反应;*aopBF1* 突变株对寄主黄瓜的致病力显著减弱,而同时黄瓜组织中过氧化氢、超氧阴离子自由基及胍胍质的积累量表现为显著增加;AopBF1 过表达菌株对寄主的致病力显著增强,其在诱导本氏烟的 hypersensitive response (HR)反应发生上表现延迟;AopBF1 瞬时表达时,显示定位于本氏烟细胞的细胞质、细胞核和细胞膜,可诱发本氏烟发生 HR 反应,促进 PAMP-triggered immunity (PTI)及激素通路相关基因的表达。【结论】AopBF1 是西瓜食酸菌的一个具有蛋白激酶特征的 T3E,抑制寄主活性氧和胍胍质积累等 PTI 免疫反应以促进西瓜食酸菌的致病,激发含 R 抗性蛋白的本氏烟的 PTI 和激素相关抗病免疫反应。

关键词: 西瓜食酸菌; AopBF1; III型效应蛋白; 毒性蛋白; 蛋白激酶

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

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

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

Received: 2023-05-22; Accepted: 2023-06-19; Published online: 2023-07-07

Identification and functional analysis of the type III effector AopBF1 in *Acidovorax citrulli*

MA Boya¹, LI Yingying¹, Youlituzi Naibi¹, CHEN Baoqiang¹, LIU Jun^{*1,2}

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 is a prevalent quarantine disease caused by *Acidovorax citrulli* in cucurbit crops. *A. citrulli* secretes the key pathogenic factor, known as type III effectors (T3Es), into plant cells via the type III secretion system (T3SS). However, the pathogenesis of T3Es remains elusive. In previous studies, we have identified several candidate T3Es in *A. citrulli* FC440. [Objective] To reveal the sequence features, transport characteristics, and the role in the pathogenic process of the candidate T3E AopBF1 from *A. citrulli* FC440 strain, so as to lay a theoretical foundation for dissecting the mechanism of pathogenesis. [Methods] Bioinformatic tools were used to predict and analyze the T3E sequence characteristics of AopBF1. Then, RT-qPCR and an avirulent protein reporter system analysis were conducted to reveal the regulation and transport characteristics of AopBF1. The pathogenicity of *aopBF1* mutant (insertion mutation) and overexpressing strain was investigated to unveil the role of AopBF1 in pathogenicity. [Results] AopBF1 had the typical T3E characteristics, possessing a protein kinase domain and no other conserved domain. The expression of AopBF1 was significantly down-regulated in the mutants of the T3SS core regulatory genes *hrpX* and *hrpG*. The co-expression of *aopBF1* and the AvrBs1 functional region (59–445 aa) in the *avrBs1* mutant induced hypersensitive reactions (HRs) in the leaves of ECW-10R pepper containing the Bs1 protein. The pathogenicity of the *aopBF1* mutant in cucumber was significantly reduced, while the accumulation of hydrogen peroxide, superoxide anion radical, and callose significantly increased. The overexpression of *aopBF1* significantly enhanced the pathogenicity and delayed HRs in *Nicotiana benthamiana*. The AopBF1 transiently expressed in *N. benthamiana* was localized in the cytoplasm, nucleus, and cell membrane, and then induced HRs and up-regulated the expression of PTI and hormone pathway-related genes. [Conclusion] AopBF1 is demonstrated to be a T3E with a protein kinase domain in *A. citrulli*. It can inhibit PTI immune responses such as host reactive oxygen species and callose accumulation to enhance the pathogenicity of *A. citrulli* and can trigger PTI and hormone-related immune responses in *N. benthamiana* containing R proteins.

Keywords: *Acidovorax citrulli*; AopBF1; type III effectors; virulent protein; protein kinase

西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*)引起的细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)自首次被我国发现以来,已在全国范围内广泛传播,

造成西瓜、甜瓜等葫芦科作物大量减产、甚至绝收,经济损失巨大^[1],至今对 BFB 仍缺乏有效的防治措施。研究西瓜食酸菌的致病机制可

以为发掘防治 BFB 的新方法提供理论依据。目前西瓜食酸菌的致病机制尚未明确, 已知其作为一种革兰氏阴性菌^[2], 通过III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)将III型效应蛋白(type III effector, T3E)转运到植物细胞内发挥作用^[3], T3E 是西瓜食酸菌致病过程中的重要因子, 因此, 筛选西瓜食酸菌中的 T3E 并研究其与植物相互作用的方式是解析该病菌致病机制的重要环节。

近年来, 对西瓜食酸菌中 T3E 相关的研究发现, *hrpG* 和 *hrpX* 基因是该菌的 T3SS 核心调控因子, 该认识为大规模筛选鉴定西瓜食酸菌的 T3E 奠定了重要基础^[4]。基于转录组数据结合生物信息学分析, 在 Aac5 菌株中筛选鉴定到了 Ace1, 其通过抑制本氏烟的活性氧积累和胼胝质沉积等 PAMP-triggered immunity (PTI) 免疫反应, 促进西瓜食酸菌对寄主西瓜的侵染^[5]。西瓜食酸菌 T3E Ace1242 受 T3SS 核心基因调控, 促进病原菌在寄主西瓜中的致病性, 抑制本氏烟的 PTI 免疫反应^[6]。西瓜食酸菌 T3E AopP 通过靶向 CIWRKY6 蛋白抑制植物免疫反应以及抑制 SA 信号转导进而增强西瓜食酸菌对宿主的毒力^[7]。西瓜食酸菌中的 T3E AopN 可以通过抑制活性氧的产生等 PTI 免疫反应显著提高病原菌在本氏烟上的致病能力^[8]。上述研究中均将本氏烟作为西瓜食酸菌的寄主植物分析了 T3E 中毒性蛋白在病原菌致病过程中的作用, 即通过抑制寄主植物 PTI 免疫反应促进病原菌致病, 而对于激发本氏烟 PTI 免疫反应的 T3E, 如蛋白激酶类毒性蛋白还未见报道。

蛋白激酶家族的蛋白参与植物病原菌侵染过程^[9]。禾谷镰刀菌株中 42 个编码蛋白激酶的基因被分别敲除后, 突变体均表现为致病力下降甚至完全丧失^[10]; 蛋白激酶 A 对玉米黑粉病菌的毒力功能至关重要^[11]。目前, 很少在革兰

氏阴性菌中发现蛋白激酶类的 T3E。研究西瓜食酸菌 FC440 菌株 T3E 中是否存在蛋白激酶类效应蛋白, 可以为进一步解析西瓜食酸菌与植物之间的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

试验中所用植物材料辣椒(*Capsicum annuum*) ECW-10R 由广西大学姜伯乐教授惠赠, 黄瓜(*Cucumis sativus*)种子农城三号购自新疆乌鲁木齐市三坪农场, 本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)和普通烟草(*Nicotiana tabacum*)秦烟 95 均由西北农林科技大学单卫星教授惠赠。

1.1.2 菌株、质粒及引物

本研究中所用菌株及质粒载体见表 1, 引物见表 2。

1.1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶、*Taq* 酶及高保真 DNA 聚合酶, 宝生物工程(大连)有限公司; 各种抗生素, 北京索莱宝科技有限公司; 无缝克隆试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 基因组提取试剂盒和质粒小提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 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, 爱必梦生物科技股份有限公司。实时荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 应用生物系统公司产品; 激光共聚焦显微镜, 卡尔蔡司光学有限公司。

1.1.4 培养基及培养条件

农杆菌 GV3101、大肠杆菌及西瓜食酸菌培养基、培养条件及部分注射缓冲液的配制参考文献[17]; 黄单胞菌培养基及培养条件参考文献[14]; 本氏烟瞬时表达缓冲液的配制参考文献[18]。

表 1 供试菌株及质粒载体

Table 1 Bacterial strains used in this study

Strains/Plasmids	Characteristics	Sources or references
Strains		
FC440 (WT)	Amp ^R , wild type	Our laboratory
FC440 ($\Delta aopBF1$)	Amp ^R , Kan ^R , FC440 mutant defective in <i>aopBF1</i>	Our laboratory
FC440 ($\Delta aopBF1$ -AopBF1)	Amp ^R , Kan ^R , Gm ^R , FC440 ($\Delta aopBF1$) complemented with AopBF1 gene expressed by vector pBBR1MCS-5	This study
FC440 ($\Delta hrpG$)	Amp ^R , Kan ^R , FC440 mutant defective in <i>hrpG</i>	[12]
FC440 ($\Delta hrpX$)	Amp ^R , Kan ^R , FC440 mutant defective in <i>hrpX</i>	[12]
FC440 (AopBF1)	Amp ^R , Kan ^R , Gm ^R , FC440 strain containing vector pBBR1MCS-5-AopBF1	This study
TransT1	<i>Escherichia coli</i> strain	Our laboratory
GV3101	Rif ^R , Gm ^R , wild type	Our laboratory
GV3101 (GFP)	Spec ^R , Rif ^R , Gm ^R , GV3101 strain containing vector mAEV-GFP	[13]
GV3101 (pAPK-AopBF1)	Spec ^R , Rif ^R , Gm ^R , GV3101 strain containing vector pAPK-AopBF1	This study
GV3101 (pBINGFP2-AopBF1)	Kan ^R , Rif ^R , Gm ^R , GV3101 strain containing vector pBINGFP2-AopBF1	This study
<i>Xcc</i> 8004 (WT)	Rif ^R , wild type	Our laboratory
<i>Xcc</i> 8004 ($\Delta avrBs1$)	Kan ^R , Rif ^R , <i>Xcc</i> 8004 mutant defective in <i>avrBs1</i>	This study
<i>Xcc</i> 8004 ($\Delta avrBs1$ -AvrBs1)	Rif ^R , Kan ^R , Gm ^R , <i>Xcc</i> 8004 ($\Delta avrBs1$) complemented with AvrBs1 gene expressed by vector pBBR1MCS-5	This study
<i>Xcc</i> 8004 ($\Delta avrBs1$ -AvrBs1 ⁵⁹⁻⁴⁴⁵)	Rif ^R , Kan ^R , Gm ^R , <i>Xcc</i> 8004 ($\Delta avrBs1$) complements the functional regions of AvrBs1 gene expressed by vector pBBR1MCS-5	This study
<i>Xcc</i> 8004 ($\Delta avrBs1$ -AopBF1-AvrBs1 ⁵⁹⁻⁴⁴⁵)	Rif ^R , Kan ^R , Gm ^R , <i>Xcc</i> 8004 ($\Delta avrBs1$) complements the functional regions of AvrBs1 gene and AopBF1 gene expressed by vector pBBR1MCS-5	This study
<i>Xcc</i> 8004 ($\Delta hrpF$ -AopBF1-AvrBs1 ⁵⁹⁻⁴⁴⁵)	Rif ^R , Kan ^R , Gm ^R , <i>Xcc</i> 8004 ($\Delta hrpF$) complements the functional regions of AvrBs1 gene and AopBF1 gene expressed by vector pBBR1MCS-5	This study
Plasmids		
pK19mob2 Ω HMB	Kan ^R , suicide vector	Our laboratory
pAPK	Spec ^R , transient expression vector	[13]
pBINGFP2	Kan ^R , transient expression vector	[13]
pBINGFP2-AopBF1	Kan ^R , pBINGFP2 vector containing AopBF1 gene	This study
pMD19-T-AopBF1	Amp ^R , vector containing AopBF1 gene	This study
pK19mob2 Ω HMB-AopBF1	Kan ^R , vector containing AopBF1 gene	This study
pAPK-AopBF1	Kan ^R , pAPK vector containing AopBF1 gene	This study
pBBR1MCS-5	Gm ^R , expression vector	Our laboratory

表 2 供试引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Sequence (5'→3')	Size (bp)	Sources or references
AopBF1-F	CGGAATTCCTTGCGGGGCTCCATACC (<i>EcoR</i> I)	370	This study
AopBF1-R	CCAAGCTTCGGTCAGGGTGGTGAGATA (<i>Hind</i> III)		This study
AopBF1-SF	TTTGAGAGGACACGCTCGAGATGCCCCGGCAACCCCCAT (<i>Xho</i> I)	714	This study
AopBF1-SR	TCATTAAAGCAGGACTCTAGATCAGGCGCTGTCGTCGTC (<i>Xba</i> I)		This study
AopBF1-YF	CTGTCAAAGGGTACCCCCGGGATGCCCCGGCAACCCCCAT (<i>Sma</i> I)	714	This study
AopBF1-YR	AGAGGATCCGTCGACCCCGGGTCAGGCGCTGTCGTCGTC (<i>Sma</i> I)		This study
AopBF1-ZF	AGGGAACAAAAGCTGGGTACCATGCCCCGGCAACCCCCAT (<i>Kpn</i> I)	714	This study
AopBF1-ZR	GTGCAAAGCCTGCAGGAATTCGGCGCTGTCGTCGTCGTC (<i>EcoR</i> I)		This study
<i>avrBs1</i> -F	CCCTGCAGCAAGGGCGAAGGATAAAC (<i>Pst</i> I)	413	This study
<i>avrBs1</i> -R	CGGAATTCGGCACGAGATTCACCAAC (<i>EcoR</i> I)		This study
AvrBs1-QF	GATAAGCTTGATATCGAATTCATGTCCGACATGAAAGTTAATTTCTC (<i>EcoR</i> I)	1 335	[14]
AvrBs1-QR	AGTGGATCCCCCGGGCTGCAGTTACGCTTCTCCTGCATTTGTAA (<i>Pst</i> I)		[14]
AvrBs1-59F	CCCTGCAGGCTTTGCACACCTCATCGTTAGAG (<i>Pst</i> I)	1 158	[14]
AvrBs1-445R	CCTCTAGATTACGCTTCTCCTGCATTTGTAAAC (<i>Xba</i> I)		[14]
RT-AopBF1-F	AAAGATCGGCAGTGGCAGC	195	This study
RT-AopBF1-R	ACCCGCACCAGCGAATACA		This study
RopB-F	GCGACAGCGTGCTCAAAGTG	104	[12]
RopB-R	GGCCTTCGTTGGTGCGTTTCT		[12]
NbPR2b-F	TCCAACCTGGAATCAAAGGG	/	[15]
NbPR2b-R	GTGGACACTATACTCAGGTG		[15]
NbLOX-F	AAAACCTATGCCTCAAGAAC	/	[15]
NbLOX-R	ACTGCTGCATAGGCTTTGG		[15]
NbERF1-F	GCTCTTAACGTCGGATGGTC	/	[15]
NbERF1-R	AGCCAAACCCTAGCTCCATT		[15]
NbWRKY7-F	CACAAGGGTACAAACAACACAG	/	[15]
NbWRKY7-R	GGTTGCATTTGGTTCATGTAAG		[15]
ACRE31-F	GCTCTTAACGTCGGATGGTC	/	[15]
ACRE31-R	GCTCTTAACGTCGGATGGTC		[15]
NbPTI5-F	CCTCCAAGTTTGAGCTCGGATAGT	/	[15]
NbPTI5-R	CCAAGAAATTCTCCATGCACTCTGTC		[15]
NbGRAS2-F	TACCTAGCACCAAGCAGATGCAGA	/	[15]
NbGRAS2-R	TCATGAGGCGTTACTCGGAGCATT		[15]
18S RNA-F	GCAAGACCGAAACTCAAAGG	/	[16]
18S RNA-R	TGTTTCATATGTCAAGGGCTGG		[16]

下划线处为酶切位点；/：片段大小未知

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

黄瓜幼苗在 28 °C/25 °C、16 h/8 h 明暗交替条件下培养 5 d 后使用；烟草于 28 °C/25 °C、16 h/8 h 明暗交替条件下培养 50 d 左右使用，辣椒 ECW-10R 于 28 °C/25 °C、16 h/8 h 明暗交替条件下培养 60 d 左右使用。

1.2 方法

1.2.1 核酸与蛋白质序列分析

西瓜食酸菌 FC440 菌株基因组中的 GE03701 在本研究中命名为 AopBF1, GenBank 登录号为 OP748401；用 fuzznuc 分析 AopBF1 的启动子区；使用 SignalP 5.0 Server 在线软件分析 AopBF1 是否存在信号肽；使用 TMHMM-2.0 在线工具进行跨膜结构分析；使用 SMART Server 在线工具进行结构域预测；利用 Cell-PLoc 2.0 在线工具预测 AopBF1 在细菌细胞中的定位；用 MEME 分析 AopBF1 的保守位点；用 SWISS-MODEL 预测 AopBF1 的三级结构。

1.2.2 菌株制备

FC440 菌株及 Xcc 8004 菌株的基因组 DNA 按照基因组提取试剂盒说明书进行提取。

利用同源重组双亲杂交的方法制备 FC440 ($\Delta aopBF1$ -AopBF1)、FC440 (AopBF1) 菌株，利用插入突变及同源重组双亲杂交的方法制备 Xcc 8004 ($\Delta hrpF$)、Xcc 8004 ($\Delta avrBs1$) 及 Xcc 8004 ($\Delta avrBs1$ -AvrBs1⁵⁹⁻⁴⁴⁵) 菌株，具体方法参考文献[19]。

采用无缝克隆技术将 FC440 基因 *aopBF1* 连接到 pBBR1MCS-5- $\Delta avrBs1$ -AvrBs1⁵⁹⁻⁴⁴⁵ 载体上并通过双亲杂交的方法制备 Xcc 8004 ($\Delta avrBs1$ -AvrBs1⁵⁹⁻⁴⁴⁵-AopBF1) 菌株；pAPK-AopBF1、pBINGFP2-AopBF1 重组质粒的构建采用无缝克隆的方法，通过冻融法转化农杆菌 GV3101 感受态细胞，制备 GV3101 (pAPK-AopBF1) 和 GV3101 (pBINGFP2-AopBF1) 瞬时表达菌株。

1.2.3 蛋白质转运检测

参考韦红玉^[14]的方法构建无毒蛋白报告系统。挑取携带相应重组质粒的 Xcc 8004 菌株单菌落于 NYGB 液体培养基 28 °C、220 r/min 振荡培养，调整 OD₆₀₀ 达 0.3，用注射接种的方法接种 ECW-10R 辣椒叶片。每隔 24 h 观察并拍照记录。

1.2.4 细菌致病能力检测

参考张晓晓^[5]的方法稍作改动检测细菌致病能力。使用注射接种的方法处理植物叶片，接种浓度如下：寄主黄瓜为 1×10³ CFU/mL；本氏烟为 1×10⁴ CFU/mL；非寄主秦烟 95 用 OD₆₀₀ 为 0.3 的菌悬液。每隔 24 h 拍照记录。

1.2.5 植物组织过氧化氢(H₂O₂)积累量检测

H₂O₂ 含量测定参考张美祥等^[13]的方法。将 FC440(WT) 及 FC440 ($\Delta aopBF1$) 的菌悬液浓度调整为 1×10⁸ CFU/mL 注射接种黄瓜子叶，24 h 后取下子叶用二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色，脱色后观察子叶 H₂O₂ 积累情况并拍照统计，染色强度用 ImageJ 进行分析。

1.2.6 植物组织超氧阴离子自由基(·O₂⁻)含量检测

参考陆巍等^[20]的方法取 1.2.5 接种 24 h 的黄瓜子叶 1.5 g 左右加入适量磷酸缓冲液研磨匀浆，10 000 r/min 离心 10 min，取上清液加入盐酸羟胺于 25 °C 反应 20 min，加入对氨基苯磺酸和 α -萘胺进行显色反应，读取 530 nm 波长下的吸光度值，代入回归方程，求得·O₂⁻含量。

1.2.7 AopBF1 在本氏烟瞬时表达

AopBF1 亚细胞定位检测参考张美祥等^[13]的方法，分别取 GV3101 (pBINGFP2-AopBF1) 和 GV3101 (pBINGFP2) 菌株的单菌落于 LB 液体培养基中 28 °C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 达 0.8–1.2，4 000 r/min 离心 10 min 后用缓冲液调整 OD₆₀₀ 为 0.6，室温孵育 2 h，用注射接种的

方法注入整片叶子, 48 h 后用激光共聚焦显微镜进行观察。

AopBF1 瞬时表达参考 Lopez 等^[18]的方法: 将 GV3101 (pAPK-AopBF1) 及携带空载体 GFP 的农杆菌单菌落于 LB 液体培养基中 37 °C、220 r/min 培养 20 h 左右, 常温下 4 000 r/min 离心 10 min 后用缓冲液重悬, 调节 OD_{600} 为 0.7, 室温孵育 1 h 后注射接种本氏烟叶片。

1.2.8 基因表达量分析

AopBF1 基因表达量检测: 将 FC440 (WT)、FC440 ($\Delta hrpX$) 及 FC440 ($\Delta hrpG$) 单菌落于 T3SS 诱导培养基中 28 °C、220 r/min 培养 16 h, 待 OD_{600} 达 0.55 时, 3 800 r/min 常温下离心 10 min 收集菌体, 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取待测菌株的 RNA, 使用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 以 *rpoB* 作为西瓜食酸菌的内参基因、表 2 中的 RT-AopBF1-F/R 为引物进行 RT-qPCR 检测, RT-qPCR 反应体系及反应条件参照文献[12]。

本氏烟抗病通路中相关基因表达量检测: 瞬时表达按照 1.2.7 的方法处理植物叶片, 48 h 后取下叶片使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 以 18S rRNA 基因为本氏烟的内参基因进行 RT-qPCR, 检测水杨酸(PR2b)、茉莉酸(LOX)、乙烯(ERF1) 和 PTI 通路(WRKY7、PTI5、ACRE31 和 GRAS2) 基因的表达量^[21-23], RT-qPCR 反应体系及反应条件参照文献[12]。

1.2.9 数据统计与分析

上述试验均进行了至少 3 个生物学重复。使用 GraphPad Prism 5 进行数据统计, 用 IBM SPSS Statistics 19 进行单因素 ANOVA 检验, $P>0.05$ 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。

2 结果与分析

2.1 西瓜食酸菌候选效应蛋白 AopBF1 序列特征分析

FC440 菌株基因 *GE03701* 编码的蛋白在本研究中命名为 AopBF1。序列分析显示, AopBF1 由 224 个氨基酸残基组成。*aopBF1* 基因序列起始密码子上游 130 bp 处存在可被 HrpX 识别并结合的 PIP-box 序列, -10 区序列为 GAGCAT, 第 1 个碱基与模体不符(图 1A)。预测结果显示: AopBF1 不存在信号肽(图 1B)及跨膜结构(图 1C), 无典型的结构域, 定位于细菌细胞外。以上结果表明 AopBF1 具有 T3E 序列特征。

通过 NCBI 同源蛋白比对, 结果显示 AopBF1 与丁香假单胞菌中的蛋白激酶 HopBF1 相似性为 76%; AopBF1 保守位点分析结果(图 2A)显示: 第 50 aa 处存在 3 个高度保守的甘氨酸(Gly)残基组成 ATP 结合环, 第 173 aa 和 188 aa 分别为天冬氨酸活性位点和 Mg^{2+} 结合位点; 三级结构预测结果(图 2B)显示: AopBF1 与 HopBF1 的三级结构高度相似。以上结果表明, AopBF1 是具有蛋白激酶序列特征的 T3E。

2.2 AopBF1 的转录水平受 T3SS 核心基因调控

RT-qPCR 分析结果(图 3)显示: 相较野生型(WT), 在 *hrpG* 和 *hrpX* 突变株中 AopBF1 的表达量极显著降低, 推测 AopBF1 的表达受 T3SS 核心基因 *hrpG* 和 *hrpX* 的正调控。

2.3 AopBF1 蛋白具有 T3SS 转运识别信号

无毒蛋白报告系统检测结果(图 4)显示: 野生型 *Xcc* 8004 菌株可以诱发 ECW-10R 叶片的 HR 反应, 产生组织坏死斑, 而 *avrBs1* 突变菌株和 *hrpF* 突变的菌株均不能, *avrBs1* 突变体功能互补菌株恢复了引起 HR 反应的能力; 仅表达 AvrBs1 功能区(59-445 aa)的 *avrBs1* 突变体

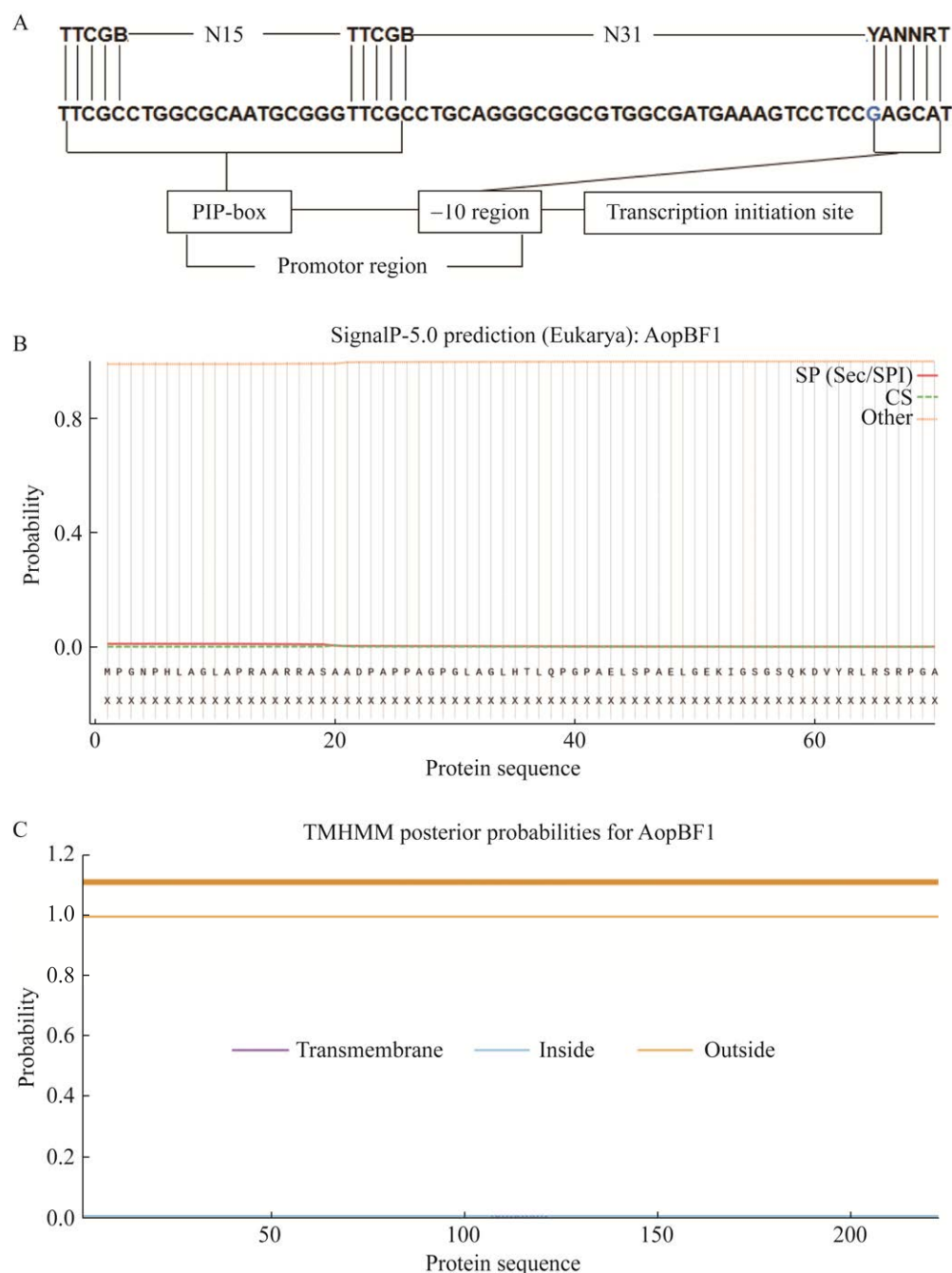


图 1 AopBF1 生物信息学分析 A: AopBF1 上游启动子区分析; 启动子区包括 PIP-box 及-10 区. 图中第 1 行为 T3E 的启动子区保守序列的模体, 其中 B 代表 C、G 和 T; Y 代表 C、T; R 代表 A、G 和 T. 第 2 行为 AopBF1 的启动子区序列. B: AopBF1 信号肽预测图. C: AopBF1 蛋白跨膜结构预测图

Figure 1 Bioinformatics analysis of AopBF1. A: Analysis of the upstream promoter region of AopBF1; The promoter region includes the PIP-box and -10 regions. The first row of the figure shows the model of the conserved sequence of T3E promoter regions, where B represents C, G and T; Y stands for C, T; R stands for A, G, and T. The second row shows the promoter region sequence of AopBF1. B: Signal peptide prediction of AopBF1. C: Transmembrane structure prediction of AopBF1 protein.

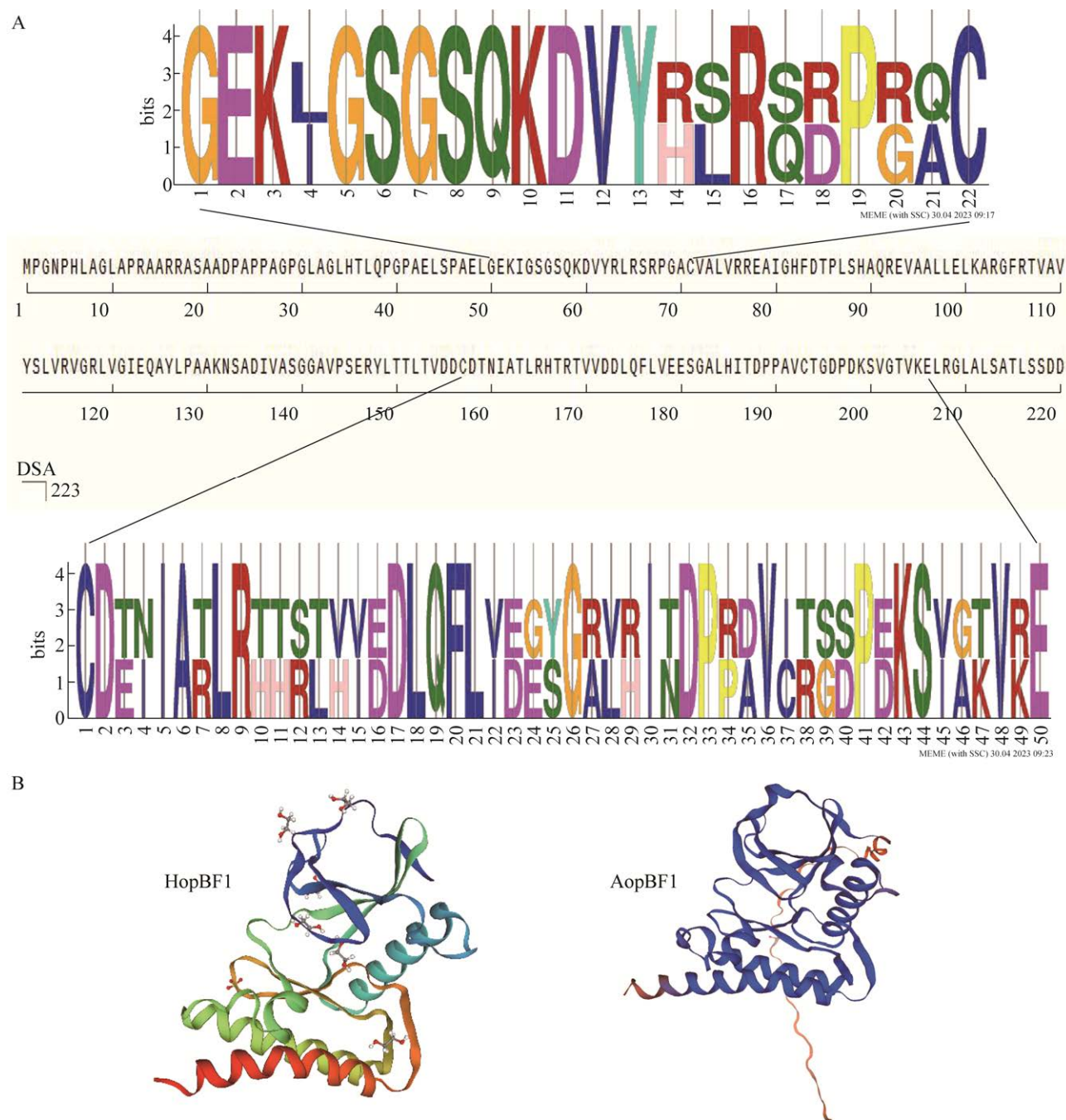


图 2 AopBF1 保守位点及三级结构预测 A: AopBF1 氨基酸序列 motif 分析图; 图中第 1 行红色框中为位于第 50 个 aa 附近的 3 个保守甘氨酸残基, 第 2 行红色框中为两个位点保守的天冬氨酸残基. B: 三级结构预测图

Figure 2 The conserved sites and tertiary structure prediction of AopBF1. A: Motif analysis of the amino acid sequence of AopBF1; The red boxes in the first row indicate three conserved glycine residues near the 50th aa, and the red boxes in the second row indicate two conserved aspartic acid residues at specific sites. B: Tertiary structure prediction.

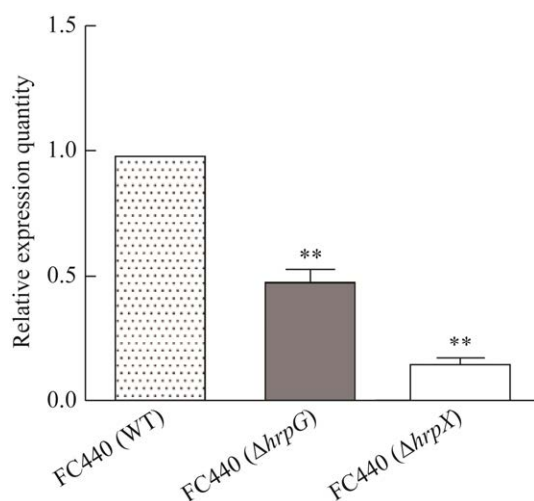


图3 *aopBF1* 基因在 FC440 (WT)及 T3SS 核心调控基因突变菌株中的表达量

Figure 3 Expression levels of the *aopBF1* gene in FC440 (WT) and T3SS core regulatory gene mutant strains. **: $P < 0.01$.

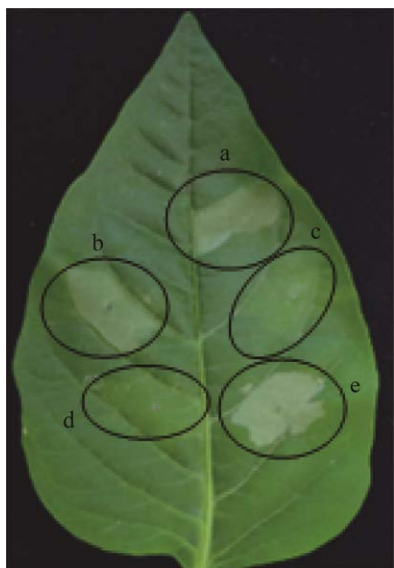


图4 *AopBF1* 转运功能验证 不同菌株处理的 ECW-10R 辣椒叶片 72 h 表型

Figure 4 *AopBF1* transport function verification. Phenotypes of ECW-10R pepper leaves treated with different bacterial strains for 72 hours. a: *Xcc* 8004; b: *Xcc* 8004 ($\Delta avrBs1$ -*AvrBs1*); c: *Xcc* 8004 ($\Delta avrBs1$ -*AvrBs1*⁵⁹⁻⁴⁴⁵); d: *Xcc* 8004 ($\Delta hrpF$ -*AopBF1*-*AvrBs1*⁵⁹⁻⁴⁴⁵); e: *Xcc* 8004 ($\Delta avrBs1$ -*AopBF1*-*AvrBs1*⁵⁹⁻⁴⁴⁵).

不具备引起辣椒组织发生 HR 反应的能力,而同时表达 *AopBF1* 及 *AvrBs1* 功能区(59-445 aa)的 *avrBs1* 突变体具有诱发叶片 HR 反应的能力,表明 *AopBF1* 蛋白可以将 *AvrBs1* 功能区(59-445 aa)表达产物通过 T3SS 分泌至植物细胞,引发植物组织发生 HR 反应,说明 *AopBF1* 具有 T3SS 转运识别信号、具有转运功能且受核心基因 *hrpF* 调控。

2.4 *AopBF1* 对西瓜食酸菌致病能力的影响

寄主黄瓜子叶在接种不同菌株 3 d 时的表型(图 5A)显示: *aopBF1* 突变体处理的出现零星的水浸状病斑,WT 处理的出现大面积病斑, *aopBF1* 突变体功能互补菌株作用下的子叶病斑处已经软烂;与表型对应的黄瓜子叶上的病情指数(图 5B)从大到小依次为: *aopBF1* 突变体功能互补菌株、WT 菌株和 *aopBF1* 突变株。黄瓜子叶在被侵染 10 d 时的表型显示 *AopBF1* 过表达菌株处理的黄瓜植株明显矮小(图 5C)。上述试验结果表明 *AopBF1* 促进西瓜食酸菌在黄瓜上的致病力。

不同菌株处理本氏烟叶片 6 d 时,致病力表型(图 6A)在菌株间差异不显著,但处理 10 d 时的表型(图 6B)显示, *aopBF1* 突变株与 WT 菌株均可以引起处理部位程度相近的过敏性反应(hypersensitive response, HR),但 *AopBF1* 过表达菌株处理的部位组织坏死程度比 WT、*aopBF1* 突变株明显减轻,HR 反应发生进程被延缓,表明 *AopBF1* 延迟西瓜食酸菌在本氏烟上的 HR 反应。非寄主秦烟 95 的致病性表型(图 6C)显示, WT、*aopBF1* 突变体、*aopBF1* 突变体功能互补菌株和过表达菌株都能诱导叶片组织发生 HR 反应,且坏死程度未显示出明显差异。

2.5 *AopBF1* 通过抑制 H_2O_2 及 $\cdot O_2^-$ 的产生抑制活性氧积累

不同菌株作用 1 d 后的黄瓜子叶 DAB 染色结果(图 7)显示: *aopBF1* 突变体作用下的子叶。

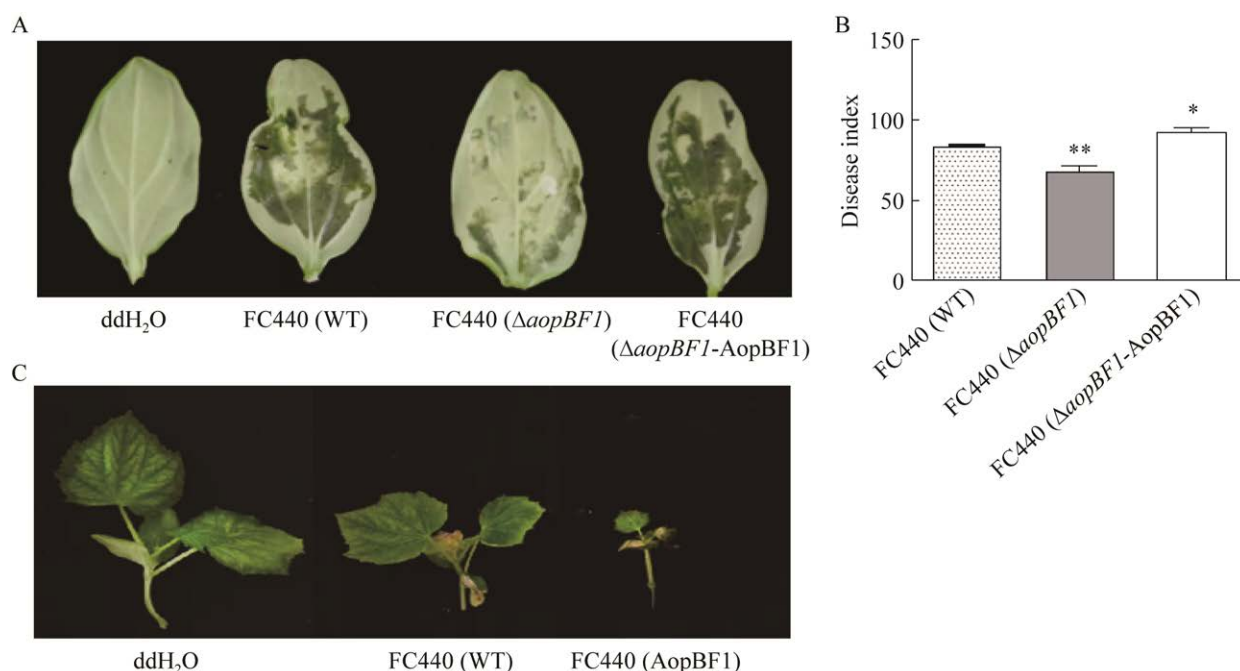


图5 AopBF1 在寄主黄瓜中的致病表型 A: 接种不同菌株 3 d 时的黄瓜子叶发病表型. B: 黄瓜子叶病情指数统计. C: 黄瓜子叶接种菌株 10 d 时植株的生长表型

Figure 5 The pathogenic phenotype of AopBF1 in the host cucumber. A: Pathogenic phenotypes of cucumber cotyledons at 3 days post-inoculation with different bacterial strains. B: Statistical analysis of disease severity index on cucumber cotyledons. C: Growth phenotype of cucumber plants 10 days post-inoculation with different bacterial strains. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

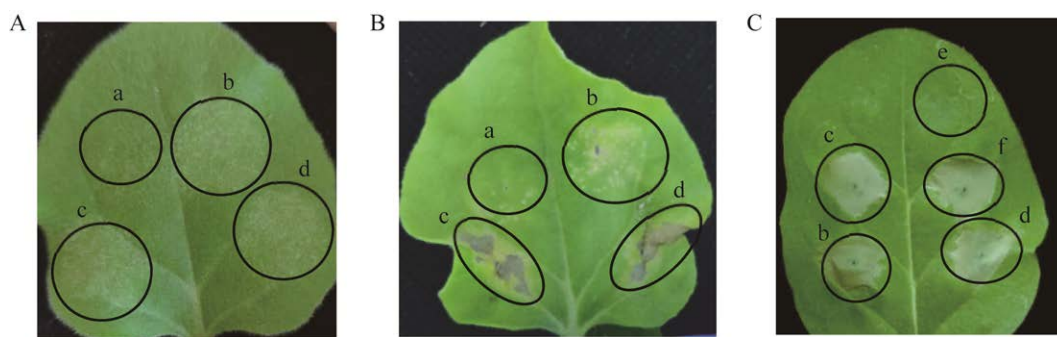


图6 AopBF1 在烟草中的致病表型 A: 本氏烟叶片接种不同菌株 6 d 时的表型. B: 本氏烟接种各菌株 10 d 时的表型. C: 秦烟 95 接种各菌株后发生 HR 反应的表型. a: MgCl₂; b: FC440 (AopBF1); c: FC440 ($\Delta aopBF1$); d: FC440 (WT); e: ddH₂O; f: FC440 ($\Delta aopBF1$ -AopBF1)

Figure 6 The pathogenic phenotype of AopBF1 in tobacco. A: Phenotype of *Nicotiana benthamiana* leaves inoculated with different strains for 6 days. B: Phenotype of *Nicotiana benthamiana* leaves 10 days post-inoculation with different bacterial strains. C: Phenotype of the occurrence of HR response after inoculation with different bacterial strains in Qinyan 95. a: MgCl₂; b: FC440 (AopBF1); c: FC440 ($\Delta aopBF1$); d: FC440 (WT); e: ddH₂O; f: FC440 ($\Delta aopBF1$ -AopBF1).

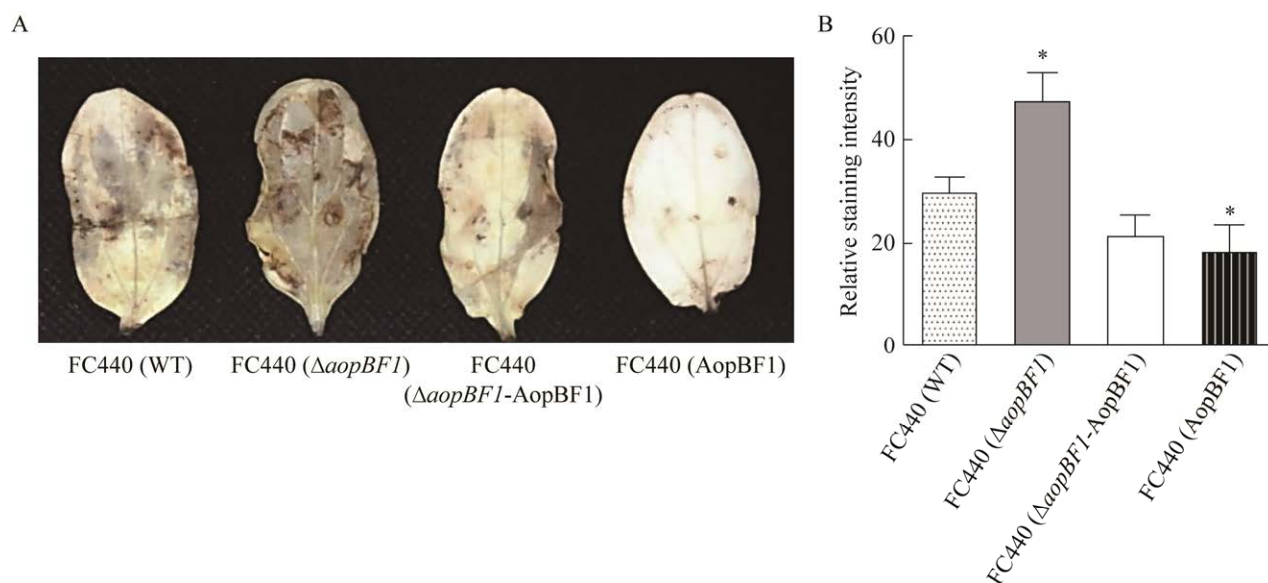


图7 AopBF1对黄瓜子叶 H_2O_2 积累量的影响 A: DAB染色后子叶 H_2O_2 积累表型. B: 不同处理下子叶染色程度统计图

Figure 7 Effect of AopBF1 on the accumulation of H_2O_2 in cucumber cotyledons. A: Phenotype of H_2O_2 accumulation in cotyledons after DAB staining. B: Statistical analysis of staining intensity in cotyledons under different treatments. *: $P < 0.05$.

组织染色量增加, 染色强度分析显示 H_2O_2 积累量在 *aopBF1* 突变体作用的子叶内显著增加, 而 AopBF1 过表达菌株作用下的子叶染色较浅, 染色强度反映出 H_2O_2 积累量显著减弱, 表明 AopBF1 抑制黄瓜子叶的 H_2O_2 积累。

$\cdot O_2^-$ 含量检测结果(图8)显示: *aopBF1* 突变体处理的子叶 $\cdot O_2^-$ 含量显著增加, AopBF1 过表达菌株显著降低, 表明 AopBF1 抑制西瓜食酸菌诱导的黄瓜上 $\cdot O_2^-$ 的产生。

2.6 AopBF1 抑制寄主中病原菌诱导的胼胝质积累

黄瓜子叶胼胝质染色结果(图9)显示: *aopBF1* 突变体胼胝质染色更深, 相对染色强度统计结果也显著增强, AopBF1 过表达菌株显著降低, 表明 AopBF1 抑制西瓜食酸菌诱导的黄瓜上的胼胝质积累。

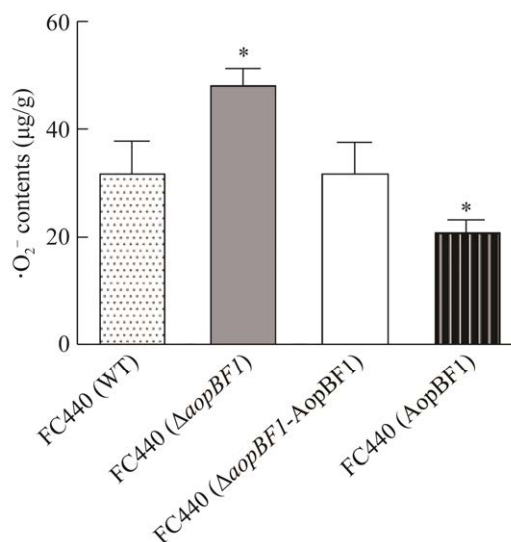


图8 AopBF1对黄瓜子叶 $\cdot O_2^-$ 产生量的影响 接种24 h时叶片组织中 $\cdot O_2^-$ 含量

Figure 8 The effect of AopBF1 on $\cdot O_2^-$ production in cucumber cotyledons. Content of $\cdot O_2^-$ in leaf tissues at 24 hours post-inoculation. *: $P < 0.05$.

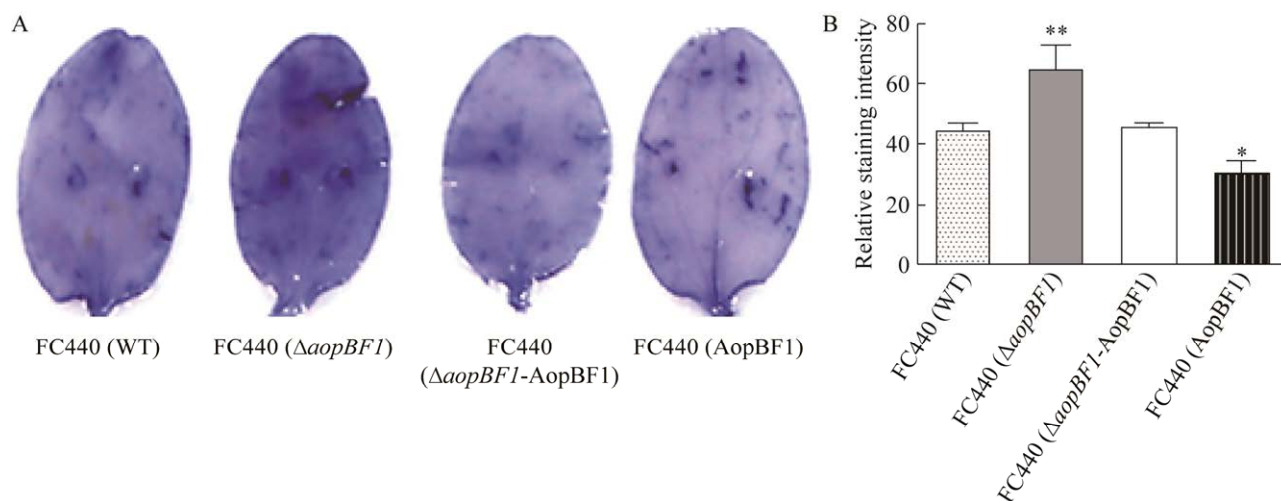


图9 AopBF1对黄瓜子叶中胼胝质积累量的影响 A: *aopBF1* 突变体及其衍生菌株侵染下黄瓜子叶胼胝质积累表型. B: 不同处理下子叶染色程度统计图

Figure 9 Effects of AopBF1 on callose accumulation in cucumber cotyledons. A: Phenotype of callose accumulation in cucumber cotyledons under infection by *aopBF1* mutants and their derived strains. B: Statistical chart of cotyledon staining intensity under different treatments. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.7 AopBF1 在本氏烟中的亚细胞定位分析

亚细胞定位结果(图 10)显示: 融合绿色荧光蛋白的 AopBF1 与对照 GFP 一样, 在本氏烟细胞的细胞质、细胞核和细胞膜都观察到荧光现象。

2.8 AopBF1 瞬时表达

瞬时表达检测结果(图 11)显示: AopBF1 处理的部位出现点状坏死。表明 AopBF1 的表达可以诱发本氏烟的抗性。

2.9 AopBF1 对本氏烟抗病通路基因表达量的影响

PTI 通路相关基因表达量检测结果(图 12)显示: AopBF1 在本氏烟中瞬时表达时, PTI 通路中基因 *WRKY7* 与 *PTI5* 的表达量显著上调, *ACRE31* 与 *GRAS2* 的表达量无显著差异。表明 AopBF1 的表达激活了本氏烟的 PTI 免疫途径。

抗病相关激素通路基因表达量检测结果(图 13)显示: *PR2b*、*LOX* 和 *ERF1* 的表达量均显著上调, 本氏烟叶片中水杨酸、茉莉酸以及

乙烯的含量提高。表明 AopBF1 的表达激活了本氏烟的激素抗性通路。

3 讨论与结论

目前西瓜食酸菌的具体致病机制还未得到广泛深入地研究^[24], T3E 作为其致病过程的关键因子, 在西瓜食酸菌致病过程中发挥的功能还有待阐明。本文初步分析了西瓜食酸菌中蛋白激酶类候选 T3E AopBF1 参与病原菌致病的机制。

革兰氏阴性细菌 T3E 具有两个特征: 表达受 T3SS 核心基因(*hrpX*、*hrpG*)的严格调控及具有转运功能^[5,25-27]。目前, T3E 的筛选验证中常用的方法有: 检测基因启动子活性并辅以 Western blotting 试验验证, 如西瓜食酸菌效应蛋白 Acl1 表达受 T3SS 核心基因调控, 体外 Western blotting 试验检测了其通过 T3SS 分泌到细菌胞外^[5]; 也有研究利用 FLAG 标签法结合免疫化学标记法验证蛋白转运, 如十字花科黑腐病菌

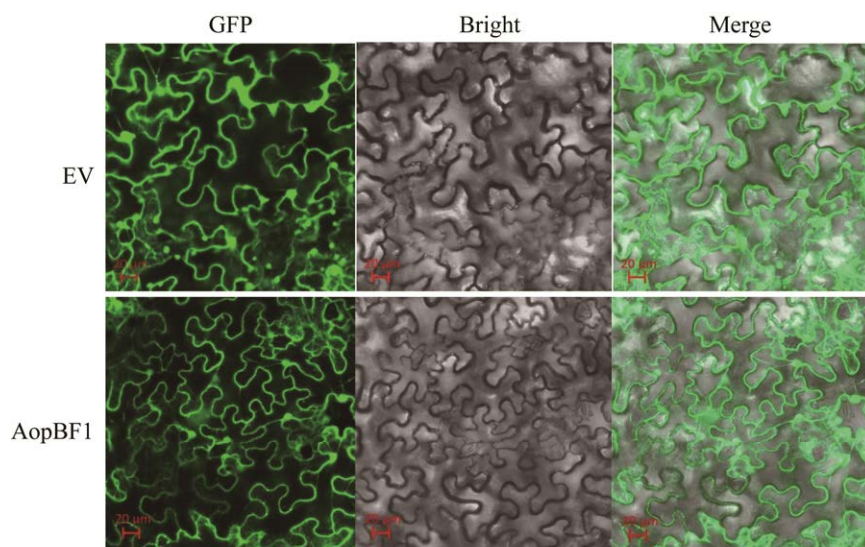


图 10 AopBF1 在本氏烟中的定位 GFP 为绿色荧光蛋白; Bright 为明场; Merge 为叠加场

Figure 10 Location of AopBF1 in *Nicotiana benthamiana*. GFP is green fluorescent protein; Bright is a bright field; Merge is a superposition field.

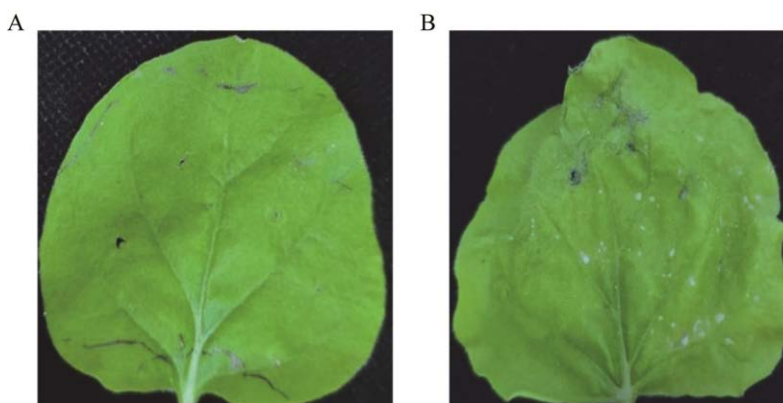


图 11 AopBF1 在本氏烟中瞬时表达表型 A: GFP 空载体瞬时表达 3 d 时采集图片. B: AopBF1 瞬时表达 3 d 时采集图片

Figure 11 AopBF1 expresses a transient phenotype in *Nicotiana benthamiana*. A: Images were collected after transient expression of empty GFP vector for 3 days. B: AopBF1 instantaneous expression images were collected at 3 days.

的效应蛋白 XC_1553 的转运与分泌^[28]。这些验证转运的方法操作相对复杂且花费较高。研究发现,无毒蛋白报告系统用于分析 T3E 的转运,方便且快捷,如以 AvrBs1 无毒蛋白作为报告基因验证了黄单胞菌的 XC0241、XC3160 和

AvrAC 等 T3E 的转运与分泌^[14,29-30]。利用 AvrBs2 无毒蛋白报告系统从西瓜食酸菌 M6 菌株中筛选到一系列 T3E^[31]。综合上述 T3E 的研究策略,本研究对 AopBF1 的序列分析后发现,在 AopBF1 起始密码子上游 130 bp 处存在严谨

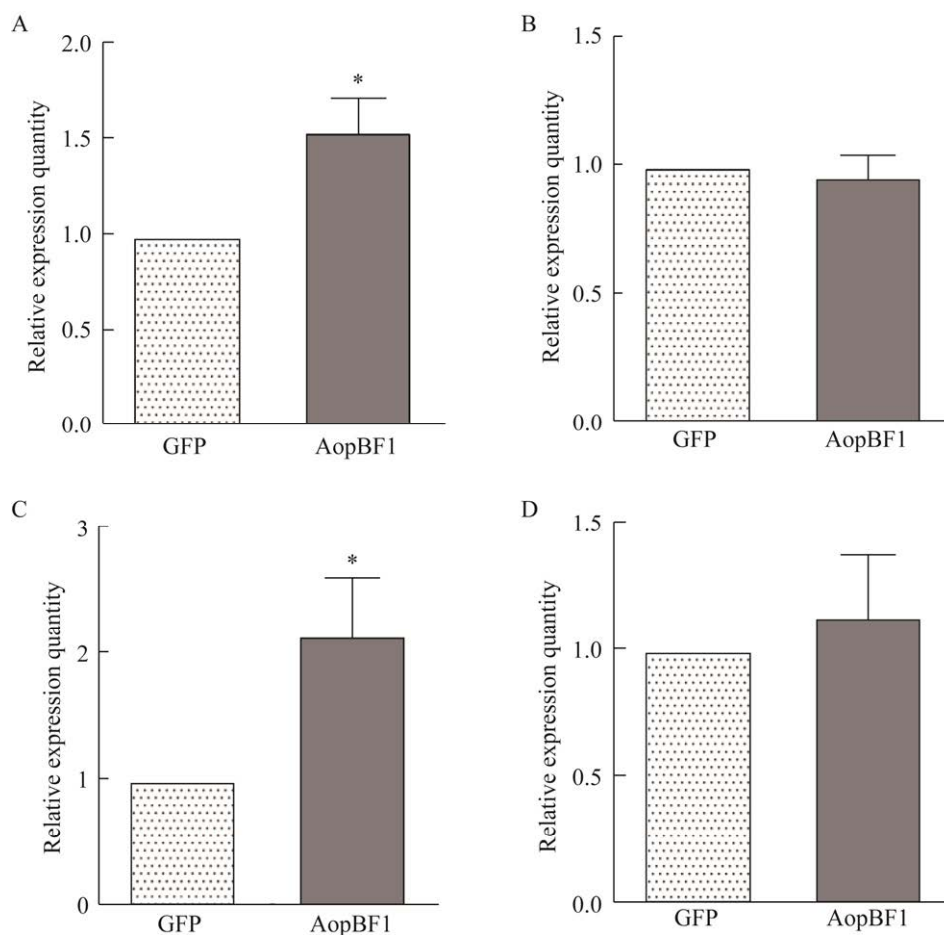


图 12 AopBF1 对本氏烟 PTI 抗病通路基因表达量的影响

Figure 12 The effect of AopBF1 on the expression levels of PTI disease resistance pathway genes in *Nicotiana benthamiana*. A: *PTI5*. B: *ACRE31*. C: *WRKY7*. D: *GRAS*. *: $P < 0.05$.

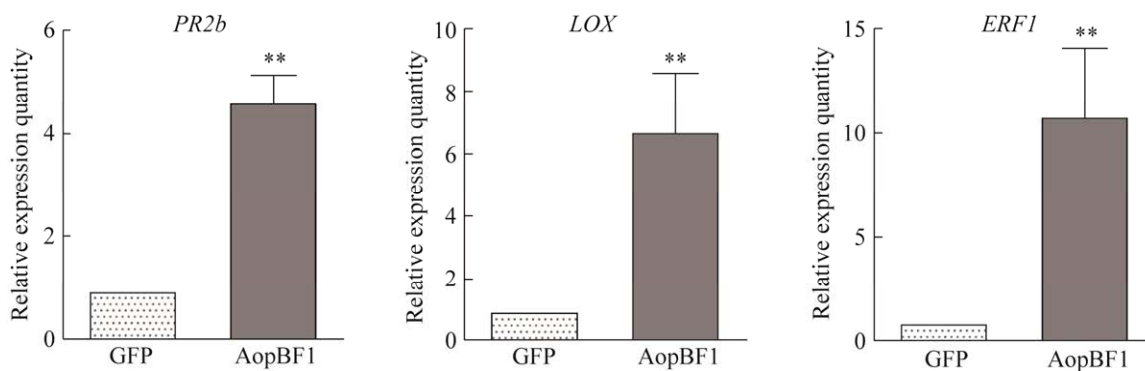


图 13 AopBF1 对本氏烟抗病相关激素通路基因表达量的影响 *PR2b*: 水杨酸; *LOX*: 茉莉酸; *ERF1*: 乙烯

Figure 13 Effect of AopBF1 on the expression of disease-resistance related hormone pathway genes in *Nicotiana benthamiana*. *PR2b*: Salicylic acid; *LOX*: Jasmonic acid; *ERF1*: Ethylene. **: $P < 0.01$.

的 PIP-box, AopBF1 不存在信号肽和跨膜结构、定位于细菌细胞外, 表明 AopBF1 具有 T3E 序列特征; RT-qPCR 检测结果也表明 AopBF1 受 T3SS 核心基因 *hrpX* 和 *hrpG* 的调控; 运用 AvrBs1 无毒蛋白报告系统证实了 AopBF1 具有 T3SS 转运识别信号且受 T3SS 核心基因 *hrpF* 调控, 这些研究结果共同证明: AopBF1 是西瓜食酸菌的一个 T3E。本研究首次将 AvrBs1 无毒蛋白报告系统应用于西瓜食酸菌候选 T3Es 的验证, 研究结果显示: 该系统具有较高的筛选效率且使用方便, 可用于西瓜食酸菌 T3Es 的大规模筛选。

基因启动子-10 区序列中保守的胸腺嘧啶 (thymine, T) 对于其转录活性至关重要^[32-33]。青枯菌 *Peps* 基因-10 区序列 TACAAT 中两个胸腺嘧啶单突变后导致下游 LacZ 的转录活性下降 10 倍左右^[33]。在本研究中, AopBF1 启动子-10 区序列模体 YANNRT 中的“Y”并非保守的胸腺嘧啶(T), 而是鸟嘌呤(guanine, G), 暗示在该启动子的调控下 AopBF1 转录活性可能降低, 本研究中致病力检测结果证实了这一推测, 即 *aopBF1* 突变体功能互补菌株及过表达菌株的致病能力比 WT 显著增强。有关该启动子活性的研究还可以通过定点突变技术做进一步分析。

毒性蛋白在病原菌与植物相互作用过程中发挥重要作用^[34-35]。*Pseudomonas syringae* 中的毒性因子 HopG1 通过干扰活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累抑制植物的 PTI 免疫反应^[34]; 毒性蛋白 HopAO1 及 HopF2 抑制由 PAMPs 诱导的 PTI 免疫反应、促进丁香假单胞菌致病^[35]。本研究中 AopBF1 通过抑制西瓜食酸菌诱导的黄瓜上 ROS 的积累、胼胝质沉积, 进而提高西瓜食酸菌对黄瓜的致病能力, 说明 AopBF1 作为毒性蛋白通过抑制黄瓜的 PTI 免

疫反应促进西瓜食酸菌对寄主黄瓜的侵染。有研究表明接种低浓度的西瓜食酸菌菌液时, 本氏烟可以作为代替宿主研究西瓜食酸菌的致病性; 由于本氏烟中含有识别西瓜食酸菌 T3Es 的非宿主 *R* 基因, 接种高浓度的菌液时可以触发本氏烟的抗病性^[36]。本文中 AopBF1 过表达的西瓜食酸菌株低浓度接种代替寄主本氏烟后, 随着病程发展菌量的增加, 过表达菌株诱发 HR 反应发生的时间相比野生型和 *aopBF1* 突变体有所延迟, 推测 AopBF1 抑制本氏烟的免疫反应, 这也印证了寄主黄瓜上致病性检测的结果, 即 AopBF1 通过抑制植物的免疫反应, 促进西瓜食酸菌致病。

病原菌中的蛋白激酶类蛋白具有毒性功能, 促进病原菌致病^[10,18,37]。蛋白激酶类基因 *gpmk1* 突变后导致禾谷镰刀菌的致病力完全丧失^[37]。已发现的蛋白激酶类 T3E, 如 *Pseudomonas syringae* 中的 HopBF1, 通过抑制植物的免疫反应提高病原菌的致病能力, 发挥毒性功能^[18]; 在本研究中 AopBF1 蛋白序列与蛋白激酶 HopBF1 序列相似度较高, 分析发现 AopBF1 与 HopBF1^[18]一样具有 ATP 结合环、天冬氨酸活性位点及 Mg²⁺ 结合位点、相似的三级结构, 表明 AopBF1 具有蛋白激酶序列特征; 另外, AopBF1 在寄主植物中发挥毒性功能的特性与很多病原菌蛋白激酶相似, 表明 AopBF1 可能是蛋白激酶类毒性蛋白, 对其激酶活性位点的验证及参与西瓜食酸菌致病机制的研究还有待进一步探究。

病原菌与植物互作过程中, 某些效应蛋白表达量不同时, 影响植物反应的表型也不同。致病性检测发现效应蛋白 PITG-14788 促进致病疫霉侵染寄主本氏烟; PITG-14788 在本氏烟中瞬时表达时却可以诱发植物的 HR 反应, 同时提高了抗病相关激素(乙烯、水杨酸和茉莉酸)

通路基因(*ERF1*、*PR2b* 和 *LOX*)的表达量^[38], 由这一研究结果推测, 效应蛋白表达量的差异影响着病原菌与植物互作的进程或结果。本研究中, AopBF1 过表达菌株延缓西瓜食酸菌在含 R 蛋白的代替寄主本氏烟的免疫反应; 瞬时表达时诱发本氏烟的 HR 反应, PTI 及激素(乙烯、水杨酸和茉莉酸)抗病通路相关基因表达量增加、植物的抗病性增强, 表明 AopBF1 表达量增多可以激发本氏烟的抗病反应。有关 AopBF1 作为蛋白激酶类毒性蛋白如何诱导本氏烟的抗病反应, 有待通过筛选与其互作的蛋白进一步解析。

T3E 在植物中的定位和与其发生相互作用蛋白的分布有关^[39-40]。HopI1 定位于植物中水杨酸合成位点即叶绿体, 抑制水杨酸合成^[39], XopD 靶标蛋白为转录因子因而定位于细胞核^[40]。蛋白激酶的种类较为丰富, 不同作用的蛋白激酶定位也不尽相同^[9]。AopBF1 定位于本氏烟的整个细胞, 推测该定位与 AopBF1 作为蛋白激酶诱导本氏烟抗病有关, 还需进一步验证。

综上所述, 本文对 AopBF1 的序列特征、转运能力及毒性功能进行了分析, 得出以下结论: AopBF1 是西瓜食酸菌 FC440 菌株中的一个 T3E; 作为蛋白激酶类毒性蛋白通过抑制寄主植物的免疫反应提高病原菌的致病能力; 激发本氏烟 PTI 和激素免疫抗性。本研究为深入解析西瓜食酸菌中蛋白激酶类 T3E 与植物的相互作用机制奠定重要基础。

REFERENCES

- [1] 赵廷昌, 孙福在, 王兵万. 西瓜细菌性果斑病研究进展[J]. 植保技术与推广, 2001(3): 37-38, 36.
ZHAO TC, SUN FZ, WANG BW. Review on the research of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*[J]. Plant Protection Technology and Extension, 2001(3): 37-38, 36 (in Chinese).
- [2] WILLEMS A, GOOR M, THIELEMANS S, GILLIS M, KERSTERS K, de LEY J. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42(1): 107-119.
- [3] SALMOND GPC, REEVES PJ. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1993, 18(1): 7-12.
- [4] 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.
- [5] 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.
ZHANG XX. Functional study of effector Ace1 and 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).
- [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.
YANG LL. Identification and biological function of the effector Ace0201 and Ace1242 in *Acidovorax citrulli*[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 段凯莉, 江聪, 王光辉. 禾谷镰刀菌蛋白激酶研究进展[J]. 生物技术进展, 2021, 11(5): 618-627.
DUAN KL, JIANG C, WANG GH. Research progress of protein kinases in wheat scab fungus *Fusarium*

- graminearum*[J]. Current Biotechnology, 2021, 11(5): 618-627 (in Chinese).
- [10] WANG CF, ZHANG SJ, HOU R, ZHAO ZT, ZHENG Q, XU QJ, ZHENG DW, WANG GH, LIU HQ, GAO XL, MA JW, KISTLER HC, KANG ZS, XU JR. Functional analysis of the kinome of the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*[J]. Public Library of Science Pathogens, 2011, 7(12): e1002460.
- [11] DÜRRENBARGER F, WONG K, KRONSTAD JW. Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(10): 5684-5689.
- [12] 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).
- [13] 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).
- [14] 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).
- [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] 池俊玲, 赵一博, 郭江波, 张龙, 刘汉阳, 辛翠花. 不同浓度 Cd²⁺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 Cd²⁺ stress in tobacco[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(10): 2133-2140 (in Chinese).
- [17] 优丽图孜·乃比, 王希东, 刘君, 陈宝强, 宋金迪. 西瓜食酸菌与黄瓜互作转录组分析[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3667-3681.
- YOULITUZI NB, WANG XD, LIU J, CHEN BQ, SONG JD. Transcriptome analysis of the interaction between *Acidovorax citrulli* and cucumber[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3667-3681 (in Chinese).
- [18] LOPEZ VA, PARK BC, NOWAK D, SREELATHA A, ZEMBEK P, FERNANDEZ J, SERVAGE KA, GRADOWSKI M, HENNIG J, TOMCHICK DR, PAWŁOWSKI K, KRZYMOWSKA M, TAGLIABRACCI VS. A bacterial effector mimics a host HSP90 client to undermine immunity[J]. Cell, 2019, 179(1): 205-218.e21.
- [19] 颜兵兵, 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).
- [20] 陆巍, 许晓明, 张荣铤, 戴新宾. 冰醋酸对于测定植物材料中超氧阴离子含量的灵敏度的影响[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2004, 27(1): 82-84.
- LU W, XU XM, ZHANG RX, DAI XB. Effect of adding acetic acid on improvement of determination of superoxide anion content in plants[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition), 2004, 27(1): 82-84 (in Chinese).
- [21] 张美祥, 刘廷利, 茹艳艳, 张琪梦, 窦道龙. 效应因子 PsCRN77 基因在本氏烟中的表达降低其对寄生疫霉的抗性[J]. 植物病理学报, 2015, 45(6): 619-625.
- ZHANG MX, LIU TL, RU YY, ZHANG QM, DOU DL. Expression of an effector gene PsCRN77 decreases *Nicotiana benthamiana* resistance to oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2015, 45(6): 619-625 (in Chinese).

- Chinese).
- [22] CHEN CL, LIU SS, LIU Q, NIU JH, LIU P, ZHAO JL, JIAN H. An ANNEXIN-like protein from the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* suppresses plant defense[J]. the Public Library of Science One, 2015, 10(4): e0122256.
- [23] 刘琳硕, 贺祥, 李红梅, 元青, 王暄. TRV 介导的 E3 泛素连接酶基因 NbE3R14 沉默对烟草基础免疫及南方根结线虫寄生的影响[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(1): 65-71.
- LIU LS, HE X, LI HM, YUAN Q, WANG X. Effects of TRV-mediated silencing of the E3 ubiquitin ligase gene NbE3R14 in *Nicotiana benthamiana* on the plant basal immunity and the parasitism of *Meloidogyne incognita*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2020, 43(1): 65-71 (in Chinese).
- [24] 季苇芹, 叶云峰, 张爱萍, 杨玉文, 关巍, 赵廷昌. 我国瓜类细菌性果斑病研究新进展[J]. 中国瓜菜, 2022, 35(9): 1-8.
- JI WQ, YE YF, ZHANG AP, YANG YW, GUAN W, ZHAO TC. Advances of bacterial fruit blotch in China[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2022, 35(9): 1-8 (in Chinese).
- [25] 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(1): 347-370.
- [26] WENGELNIK K, BONAS U. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(12): 3462-3469.
- [27] FENSELAU S. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Vsc, Spa, and Fli secretion systems[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995, 8(6): 845.
- [28] 成春燕. 一个用于鉴定十字花科黑腐病菌 III 型效应物转运与分泌的报告质粒的构建[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2013.
- CHENG CY. Construction of one reports palsmid for the identification of transport and secretion of type III effector in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2013 (in Chinese).
- [29] 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).
- [30] XU RQ, BLANVILLAIN S, FENG JX, JIANG BL, LI XZ, WEI HY, KROJ T, LAUBER E, ROBY D, CHEN BS, 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 *Arabidopsis thaliana* ecotype col-0[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(1): 343-355.
- [31] 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.
- [32] CUNNAC S, BOUCHER C, GENIN S. Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(8): 2309-2318.
- [33] GARG RP, HUANG J, YINDEEYOUNGYEON W, DENNY TP, SCHELL MA. Multicomponent transcriptional regulation at the complex promoter of the exopolysaccharide I biosynthetic operon of *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(23): 6659-6666.
- [34] WEI HL, ZHANG W, COLLMER A. Modular study of the type III effector repertoire in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reveals a matrix of effector interplay in pathogenesis[J]. Cell Reports, 2018, 23(6): 1630-1638.
- [35] GUO M, TIAN F, WAMBOLDT Y, ALFANO JR. The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2009, 22(9): 1069-1080.

- [36] TRAORE SM, ECKSHAIN-LEVI N, MIAO JM, CASTRO SPARKS A, WANG ZB, WANG KR, LI Q, BURDMAN S, WALCOTT R, WELBAUM GE, ZHAO BY. *Nicotiana* species as surrogate host for studying the pathogenicity of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits[J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(6): 800-814.
- [37] JENCZMIONKA NJ, MAIER FJ, LÖSCH AP, SCHÄFER W. Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head-blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase gpmk1[J]. Current Genetics, 2003, 43(2): 87-95.
- [38] 马英, 赵冬梅, 杨志辉, 朱杰华. RxLR 基因 PITG-14788 和 PITG-19831 促进致病疫霉对本氏烟的侵染[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2019 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2019: 240.
- MA Y, ZHAO DM, YANG ZH, ZHU JH. The RxLR genes PITG-14788 and PITG-19831 promote the infection of *Phytophthora infestans* on *Nicotiana benthamiana*[C]//Chinese Society for Plant Pathology. Proceedings of the 2019 Annual Conference of the Chinese Society for Plant Pathology. Beijing: China Agriculture Science and Technology Press, 2019: 240 (in Chinese).
- [39] JELENSKA J, YAO N, VINATZER BA, WRIGHT CM, BRODSKY JL, GREENBERG JT. A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses[J]. Current Biology: CB, 2007, 17(6): 499-508.
- [40] CANONNE J, MARINO D, JAUNEAU A, POUZET C, BRIÈRE C, ROBY D, RIVAS S. The *Xanthomonas* type III effector XopD targets the *Arabidopsis* transcription factor MYB30 to suppress plant defense[J]. The Plant Cell, 2011, 23(9): 3498-3511.