

國立交通大學生物科技學系
Department of Biological Science and Technology
National Chiao-Tung University

博士論文
Doctor Dissertation

利用 AFLP 分析茄科細菌性斑點病菌之變異性
並選殖與致病性相關之基因產物
Using AFLP to analyze the diversity of *Xanthomonas campestris*
pv. *vesicatoria* and cloning the pathogenesis-related genes

研究生：林榕華 (Rong-Hwa Lin)

指導教授：彭慧玲博士 (Dr. Hwei-Ling Peng)
黃秀珍博士 (Dr. Hsiou-Chen Huang)

中華民國九十九年七月
July, 2010

中文摘要

由 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) 引起的茄科細菌性斑點病，是台灣番椒及番茄栽培區之重要病害，需透過第三型分泌系統的調控機制和分泌的有效蛋白(effectors)引發其病原性。台灣之 Xcv 菌株為多樣性的族群，本研究中所採用的十四株菌株依據澱粉分解酶之有無，可將菌株區分為 A、B 兩菌群，而利用增幅限制片段核酸多型性技術(AFLP) 亦可得到相同的結果。從 AFLP 的分析圖譜中篩選各菌株間有差異性之片段，並選殖出 *xopE2* 基因，*xopE2* 基因在 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 菌株間具高度保留性，可作為分類之指標。根據胺基酸序列所作樹狀親源分析，顯示 A 群菌株 Xvt122 與 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 的親源關係較之 B 群菌株 Xvt45 為近。剔除 Xcv Xvt45 染色體上的 *xopE2* 基因會降低病原菌的感染力；然而，Xcv Xvt122 的 *xopE2* 基因突變株並不會影響其病原性。此外，無論是 Xcv Xvt122 或 Xcv Xvt45 的 XopE2 蛋白(XopE2_A 和 XopE2_B)皆能透過第三型分泌系統抑制由 HopPsyA 所引發的過敏性反應；大量表現 XopE2 蛋白則會降低其在感病番茄品系的毒性，而這些生物性功能和 XopE2 蛋白所具有的保留性三元催化胺基酸 (consensus catalytic triad, 159th cysteine) 與 His 硫醇蛋白酶胺基酸 (thiol-protease His residue, 47th histidine) 無關。

2005 年 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 基因組解序後發現有 Vir/Tra 和 Icm/DotT4SS 兩套第四型分泌系統存在。*X. campestris* pv. *vesicatoria* 的第三型分泌系統為致病性上不可或缺的分泌胞器，但對於其所具有的第四型分泌系統所扮演的角色所知甚少。本研究從建構好的 *X. campestris* pv. *vesicatoria* A 群菌株 Xvt122 和 B 群菌株 Xvt45 基因庫中選殖出與 VirB/D4 系統相關的基因，目前兩菌群所選殖出來的 *virB/D4* 基因組並非很完整，但以目前的結果顯示，A 群菌株 Xvt122 的基因數目和排列順序和 *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 (Xcc ATCC33913) 相似，而 B 群菌株 Xvt45 的基因數目和排列順序則和 *X. campestris* pv. *campestris* B100 (Xcc B100) 和 *X. axonopodis* pv. *citrus* 306 (Xac 306) 最為相似。兩菌株的 VirB/D4 基因組

G+C 含量遠較其兩側基因的 G+C 含量為低，其基因組下游具有 IS4 family 和 ISxac4 transposase 序列，可知，Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 的 VirB/D4 基因組是由其他菌屬經水平式基因轉移 (horizontal gene transfer) 而來。VirB/D4 第四型分泌系統中，VirB4、VirB11 及 VirD4 是保留性最高的組成蛋白，為此系統組合之能量提供者，Xcv Xvt45 的 *virB4* 和 *virB11* 基因突變株，對寄主植物番茄病徵的發展和病原菌的生長並沒有影響，但 Xcv Xvt122 的 *virB4*、*virB11* 基因突變株，雖然發病指數沒有顯著差異，但對病原菌的生長卻有抑制作用。

關鍵字：增幅限制片段核酸多型性分析；茄科細菌性斑點病；第三型分泌系統；XopE2 有效蛋白；VirB/D4 系統；第四型分泌系統；水平式基因轉移



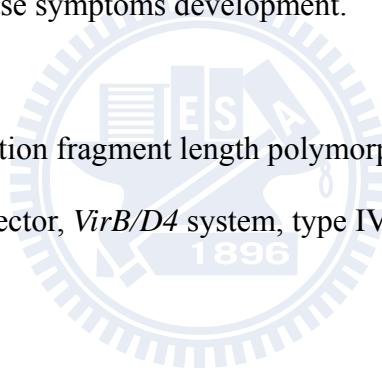
英文摘要 (Abstract)

The bacterial spot diseases on tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) causing by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) are very destructive in Taiwan. The mechanism that Xcv causing this disease depends on type III secretion system (T3SS) and T3SS effectors. The recent study showed that strains of Xcv isolated in Taiwan were heterogeneous and could be divided into two genetically distinct groups (group A and group B). In this study, we proved that using the AFLP technique to discriminate Xcv group A from group B is feasible, and consequently, a XopE2 homologue was identified in all fourteen Xcv strains and it also could be used as an index for classification. Phylogenic analysis of XopE2 amino acid sequences indicated that XopE2 of Xcv Xvt122 (group A) has a closer genetic distance to XopE2 of Xcv 85-10 than to that of Xcv Xvt45 (group B). A single copy deletion of *xopE2* within the genome caused a substantial reduction in virulence, but no effect of *xopE2* mutation on virulence of Xvt122 were observed. Furthermore, our results revealed that XopE2 of Xcv Xvt122 or Xcv Xvt45 was able to suppress HR in a T3SS-dependent manner and the heterologously expressed XopE2 was sufficient to modulate the virulence on susceptible tomato plants. And those biological functions are not dependent on the consensus catalytic triad (159th cysteine) and thiol-protease His residue (47th histidine) of XopE2.

Recent genome sequencing projects have identified Vir/Tra and Icm/Dot T4SSs in *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10, but their precise function awaits further investigation. In this study, we identified the VirB/D4 T4SSs from *X. campestris* pv. *vesicatoria* group A (Xvt122) and group B (Xvt45). Based on sequence analysis and gene composition, the *virB/D4* cluster of Xcv Xvt122 shows the highest similarity with that of *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 ; but the *virB/D4* cluster of Xcv Xvt45 seems more homologous with that of *X. campestris* pv. *campestris* B100 and *X. axonopodis* pv. *citrus* 306 (Xac 306).

Moreover, the G+C content of the *virB/D4* cluster of Xcv Xvt122 or Xcv Xvt45 is lower than that of the neighborhood genes, and the presence of IS4 family and ISxac4 transposase in those loci suggests that the *virB/D4* cluster may be a result of horizontal gene transfer from other bacteria. Because *VirB4*, *VirB11* and *VirD4*, are the most conserved components of the T4SS, and they serve as an energy-consuming process for their assembly or function. We also generated the *virB4* and *virB11* knocked out mutants to assess the virulence of the genes on the host plant tomato. The inoculation assay revealed that the *virB4* or *virB11* deletion in Xcv Xvt45 retained its ability to develop disease symptoms and the bacterial growth on tomato Bony Best L305. In contrast, the *virB4* or *virB11* mutation in Xcv Xvt122 reduced bacterial growth on its host tomato and pepper, but there were no effect on disease symptoms development.

Keywords: amplified restriction fragment length polymorphism, bacterial spot, type III secretion system, XopE2 effector, *VirB/D4* system, type IV secretion system, horizontal gene transfer,



誌 謝

闊別學生生涯已十多年了，重拾學生的身份修習博士學位，心中總是忐忑不安，兼顧著在職生的身份，繁忙的公務難免有時擔擱了實驗進度，由衷感激指導教授黃秀珍老師及彭慧玲老師的包容與關切，一直沒有太多的苛責與要求，論文終於在有驚無險中完成了，為自己的求學生涯再度劃下了完整的句點，也為自己人生規劃開啓另一個契機。承蒙指導教授在修業期間的諄諄教誨，以及在實驗方面提供充沛的研究資源與無限的支持，在文章寫作的指導與建議，獲益良多，特致謝忱！感謝口試委員清華大學張晃猷老師、交通大學林志生老師、交通大學楊昀良老師對於論文詳細的審閱與斧正，並且在資格考中給予寶貴的意見，使得本論文更趨完善。

回首從前，點滴在心頭，碩士班畢業後不知何去何從，感謝慈濟大學曾義雄老師於擔任中興大學遺傳工程中心(現更名為生物科技發展中心)主任時的賞識得以進入任職，在曾夢蛟老師的啓蒙下，正式接觸分生的專業知識，黃秀珍老師的教導使我更能暢快地悠遊於生技領域，曾老師和黃老師長久以來一直是我亦師亦友的上司與工作夥伴，在此至上誠摯的謝意。

感謝中興大學葉錫東副校長的厚愛，得以獲得進修的機會，完成多年來的夢想，提攜之情銘記在心！同時感謝生科中心楊長賢主任的支持與點提，得以順利完成學業；謝謝所有同仁的加油，特別是張法正專員值進修期間於業務上的幫忙與關懷，減輕了心中的壓力，是工作上不可或缺的好夥伴。

一路走來，陪伴的夥伴不勝枚舉，特別感謝興大黃老師實驗室的學弟妹們，元春長久以來在實驗上的建議與研究細節的協助；嘉鋒除了在實驗技巧的討論外，一直是我的電腦工程師；本慈和逸喬除了彼此在研究上的切磋外，更是談心的好對象，尤其在這最難熬的一年裏給予鼓勵與陪伴；蔡慶修老師實驗室依璇學妹在AFLP技術上的指導。交大彭老師實驗室學弟妹們，盈蓉、健誠、新耀、平輝、靖婷、盈聰及育聖在課業上的協助與生活上的關照，使遠在台中的我，不至遺漏許多系上的規定與實驗室的聚會。林志生老師實驗室純慧學妹的陪伴，使我在新竹的日子不會太寂寞。所有與我共事過的學弟妹們，進欽老師、萬欣、文玲老師、純榮、智聖、英誠、美惠、璐琳、育銘、忠哲、宗志、妍璘、東益、文鴻、寶勝、明龍、蓓茹、碩彥、粹芳、惠玲、嘉真、政憲、冠麟、子閔、學文、張簡、有容、羿君、Bocky老師及成正等多位學弟妹，無法一一道名言謝，但你們帶給我的歡樂與幫助讓我備感溫馨，我會永遠記得大家族裏的每個成員。

親情永遠是支持我作任何決定的最大動力，感謝爸媽的身教、言教及栽培之恩，培養我今日認真負責的態度，兄嫂、姊、妹的手足之情，替我分憂解勞，使我無後顧之憂，侄子渝軒、渝修、外甥彥廷、外甥女敬雯的乖巧與體貼帶給我的歡笑，讓我有信心接受挑戰。僅以此論文獻給所有關心我的師長、朋友、家人們及在天堂的媽媽，謝謝你們！

榕華 謹誌
2010.7.27

目 錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
誌謝.....	v
目錄.....	vi
表目錄.....	ix
圖目錄.....	x
縮寫字對照表.....	xii

第一章 緒論

1.1 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 概述與分類.....	1
1.2 增幅限制片段核酸多型性分析技術 (Amplified restriction fragment length polymorphism, AFLP).....	2
1.3 病原島嶼 (Pathogenicity island, PAI).....	3
1.4 第三型分泌系統 (Type III secretion system, T3SS).....	4
1.5 第四型分泌系統 (Type IV secretion system, T4SS).....	5
1.6 植物防禦系統.....	7
1.7 研究目的.....	8

第二章 利用 AFLP 分析茄科細菌性斑點病菌之變異性及探討 XopE2 有效蛋白與致病性的關係

2.1 前言.....	10
2.2 材料與方法	
2.2.1 供試菌株、質體及菌體生長環境.....	13
2.2.2 重組 DNA 技術.....	13
2.2.3 染色體 DNA (genomic DNA) 之製備	
(1) AFLP 分析和染色體基因庫建構採用之法.....	14
(2) 南方轉漬雜合反應採用之法.....	14

2.2.4 AFLP 分析.....	15
2.2.5 選殖與定序 AFLP 片段.....	15
2.2.6 選殖與定序 <i>xopE2</i> 基因.....	16
2.2.7 染色體基因庫之建構	
(1)染色體 DNA 以 <i>EcoRI</i> 作非完整截切 (partial digestion).....	16
(2)利用 CopyControl™ BAC Cloning Kit (<i>EPICENTRE</i>)建構染色體基因庫..	17
2.2.8 南方轉漬雜合反應 (Southern hybridization)	
(1)探針之製備.....	17
(2)轉漬 DNA 至 Hybond-N 濾膜.....	18
(3)前雜合反應 (pre-hybridization)與雜合反應 (hybridization).....	18
(4)洗滌與偵測.....	18
2.2.9 菌落雜合反應 (Colony hybridization).....	19
2.2.10 構築 <i>xopE2</i> 非極性突變菌株.....	19
2.2.11 單點突變株之構築 (Site-directed mutagenesis).....	20
2.2.12 病原性測定.....	22
2.2.13 抑制過敏性反應之測定(Hypersensitive response-Suppressed assay).....	22
2.2.14 以農桿菌為媒介作短暫性的基因表現(<i>Agrobacterium</i> -mediated transient assay).....	23
2.3 結果	
2.3.1 利用 AFLP 分析 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 菌株.....	24
2.3.2 <i>xopE2</i> 基因在 <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 菌株間具高度保留性.....	25
2.3.3 A 群 <i>XopE2</i> (<i>XopE2_A</i>)與 <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 85-10 <i>XopE2</i> 的基因距離 (genetic distance) 較之 B 群 <i>XopE2</i> (<i>XopE2_B</i>)為近.....	25
2.3.4 以 <i>xopE2</i> 兩側基因序列可區分出 <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> A 群和 B 群.....	26
2.3.5 B 群 <i>XopE2</i> (<i>XopE2_B</i>)突變株會降低對寄主植物番茄的致病性 但 A 群 <i>XopE2</i> (<i>XopE2_A</i>)突變株則不具影響作用.....	27
2.3.6 大量表現 (overexpress) <i>XopE2</i> 蛋白會抑制 <i>X. campestris</i> <i>pv. vesicatoria</i> 對寄主植物番茄的毒力性.....	28

2.3.7 XopE2 蛋白會透過第三型分泌系統抑制過敏性反應發生.....	30
2.4 討論.....	32
2.5 圖表.....	36
第三章 選殖茄科細菌性斑點病菌第四型分泌系統及探討 VirB4 與 VirB11 蛋白與毒力的關係	
3.1 前言.....	57
3.2 材料與方法	
3.2.1 供試菌株、質體、菌體生長環境.....	60
3.2.2 重組 DNA 技術.....	60
3.2.3 染色體基因庫之建構.....	60
3.2.4 菌落雜合反應 (Colony hybridization).....	60
3.2.5 南方轉漬雜合反應 (Southern hybridization).....	60
3.2.6 構築非極性突變株 Xvt122 Δ virB4 和 Xvt45 Δ virB4 之重組質體.....	61
3.2.7 構築非極性突變株 Xvt122 Δ virB11 和 Xvt45 Δ virB11 之重組質體.....	62
3.2.8 病原性測定.....	62
3.3 結果	
3.3.1 選殖茄科細菌性斑點病菌 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 第四型 分泌系統相關的基因組.....	63
3.3.2 茄科細菌性斑點病菌 Xcv Xvt122 第四型分泌系統相關的基因組成.....	64
3.3.3 茄科細菌性斑點病菌 Xcv Xvt45 第四型分泌系統相關的基因組成.....	66
3.3.4 <i>virB4</i> 和 <i>virB11</i> 基因缺失株之構築與致病力分析.....	67
3.4 討論.....	69
3.5 圖表.....	72
第四章 結論.....	91
參考文獻.....	94

表目錄

表 2-1. 研究中所使用之菌株及質體.....	36
表 2-2. 研究中所使用之引子.....	38
表 2-3. 研究中所使用之 <i>Xanthomonas</i> 菌株.....	39
表 2-4. AFLP 片段分析.....	40
表 2-5. 茄科細菌性斑點病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Xvt122 <i>xopE2</i> 基因及相鄰基因序列分.....	41
表 2-6. 茄科細菌性斑點病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Xvt45 <i>xopE2</i> 基因及相鄰基因序列分析.....	42
表 3-1. 研究中所使用之菌株及質體.....	72
表 3-2. 研究中所使用之引子.....	75
表 3-3. 茄科細菌性斑點病 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Xvt122 <i>virB/D4</i> 基因組及相鄰基因序列分析.....	76
表 3-4. 茄科細菌性斑點病 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Xvt45 <i>virB/D4</i> 基因組及相鄰基因序列分析.....	78
表 3-5. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Xvt122 其 <i>virB/D4</i> 基因組 與其他 <i>Xanthomonas.spp.</i> 同源蛋白之胺基酸序列比對.....	80
表 3-6. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Xvt45 其 <i>virB/D4</i> 基因組 與其他 <i>Xanthomonas.spp.</i> 同源蛋白之胺基酸序列比對.....	81

圖目錄

圖 2-1. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 菌株之 AFLP 分析圖譜.....	43
圖 2-2. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 菌株(A)染色體 DNA 以 <i>EcoRI</i> 截切後之電泳分析圖，(B)上述之電泳膠片進行南方雜合分析，(C)抽取質體 DNA 進行南方雜合分析，(B) (C)探針為 Dig-labeled <i>XopE2</i>	44
圖 2-3. 十四株 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 菌株之 <i>XopE2</i> 胺基酸序列比對.....	46
圖 2-4. <i>Xcv</i> <i>Xvt122</i> <i>XopE2</i> 和 <i>Xcv</i> <i>Xvt45</i> <i>XopE2</i> 與其同源蛋白之胺基酸序列比對(A)及樹狀親源關係分析(B).....	47
圖 2-5. 茄科細菌性斑點病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (A) <i>Xvt122</i> (B) <i>Xvt45 xopE2</i> 基因及相鄰片段之基因組成.....	49
圖 2-6. 南方雜合法確認 <i>Xcv</i> <i>Xvt122 xopE2</i> 和 <i>Xcv</i> <i>Xvt45 xopE2</i> 基因缺失株 (<i>Xcv</i> <i>Xvt122</i> △ <i>XopE2</i> 和 <i>Xcv</i> <i>Xvt45</i> △ <i>XopE2</i>).....	51
圖 2-7. <i>Xcv</i> <i>Xvt122</i> 和 <i>Xcv</i> <i>Xvt45</i> 及其 <i>xopE2</i> 基因缺失株 (<i>Xcv</i> <i>Xvt122</i> △ <i>XopE2</i> 和 <i>Xcv</i> <i>Xvt45</i> △ <i>XopE2</i>)對寄主植物番茄的病徵發展和菌量生長之影響.....	52
圖 2-8. 大量表現 <i>XopE2</i> 蛋白能抑制菌株在寄主植物番茄上菌量之生長.....	53
圖 2-9. <i>Xcv</i> <i>Xvt122</i> <i>XopE2</i> (<i>XopE2A</i>) 和 <i>Xcv</i> <i>Xvt45</i> <i>XopE2</i> (<i>XopE2B</i>) 抑制 <i>HopPsyA</i> 所誘發的過敏性反應.....	55
圖 3-1. 南方雜合分析 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 菌株的 <i>virB1</i> 基因.....	82
圖 3-2. 茄科細菌性斑點病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> <i>Xvt122</i> <i>virB/D4</i> 基因組及相鄰片段之基因組成.....	83
圖 3-3. 茄科細菌性斑點病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> <i>Xvt45</i> <i>virB/D4</i> 基因組及相鄰片段之基因組成.....	85

圖 3-4. Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 野生株及 *virB4* 基因缺失株 (Xcv Xvt122 Δ *virB4*、
Xcv Xvt45 Δ *virB4*) 和 *virB11* 基因缺失株 (Xcv Xvt122 Δ *virB11*、
Xcv Xvt45 Δ *virB11*) 對寄主番茄病徵發展之影響.....87

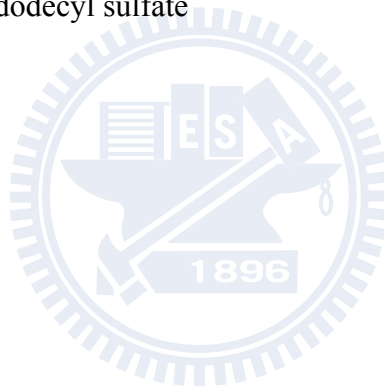
圖 3-5. Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 野生株及 *virB4* 基因缺失株 (Xcv Xvt122 Δ *virB4*、
Xcv Xvt45 Δ *virB4*) 和 *virB11* 基因缺失株 (Xcv Xvt122 Δ *virB11*、
Xcv Xvt45 Δ *virB11*) 對寄主番茄和甜椒菌量生長之影響.....89



縮寫字對照表 (Abbreviation)

Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Xam	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>
Psy	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
AFLP	Amplified restriction fragment length polymorphism
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
PFGE	Pulse field gel electrophoresis
T3SS	Type III secretion system
T4SS	Type IV secretion system
Dot/Icm	defect in organelle trafficking/intracellular multiplication
PAI	Pathogenicity island
<i>hrc</i>	Hypersensitive response and conserved
<i>hrp</i>	Hypersensitive response and pathogenicity
HR	Hypersensitive response
PCD	Programmed cell death
Hop	Hrp-dependent outer protein
Xop	<i>Xanthomonas</i> outer protein
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
MAMP	Microbes-associated molecular patterns
PTI	PAMP-triggered immunity
ETI	Effector-triggered immunity
LPS	lipopolysaccharide
PRR	Pattern recognition receptor
ROS	Reactive oxygen species
NLS	Nuclear localization signal
AAD	Acidic transcriptional activation domain
PIP	Plant inducible promoter

R protein	Resistance protein
PR protein	Pathogenesis related protein
Mpf	Mating pair formation
DIG	digoxigenin
CDP-Star™	disodium 2-chloro-5-(4-methoxy spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate
CFU	colony-forming units
LB	Luria-Bertani broth
NptII	Neomycin phosphotransferase type II
OD ₆₀₀	Optical density at 600 nm
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	Sodium dodecyl sulfate



第一章、緒論

1.1 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 概述與分類

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye (Xcv) 屬於革蘭氏陰性細菌，為具圓邊的桿狀細胞，大小為 1.5-2.7 x 0.6-1.6 μm ，單極生鞭毛，可游動，好氣性且具夾膜 (capsule)，於 Berkey's manud 或馬鈴薯瓊脂培養基 (PDA) 上形成圓形、平滑、黏濕、具光亮、稍微突起的黃色菌落；所引起的茄科細菌性斑點病 (bacterial spot) 為世界許多番茄及番椒 (包含甜椒及辣椒) 產區重要的病害。此病原菌會經由葉片氣孔或傷口侵入植物，而在細胞間隙大量繁殖增生，其主要危害番茄及番椒之葉部、莖部及果實而造成植株生長不良，果實品質降低，嚴重時產量損失亦甚鉅。(許氏, 1998)。

近年來對於 Xcv 之變異及歸類有進一步的探討，依其生理、化學、血清及分子等特性可將 Xcv 分為 A 群 (A group) 及 B 群 (B group) (Beaulieu et al., 1991; Bouzar et al., 1994; Stall et al., 1994; Jones and Stall, 1998)。利用傳統之生理生化特性測試，發現 A 群菌株不具澱粉水解及果膠分解活性，而 B 群菌株則具此活性 (Beaulieu, et al., 1991)。以 SDS-PAGE 法分離細胞蛋白質後再以銀染法所顯現之蛋白圖譜中，A 群菌株中會出現獨特之 32~35 kDa 蛋白條帶 (α 條帶)，而於 B 群菌株則具有 25~27 kDa 的蛋白條帶 (β 條帶)，此二個特殊條帶是一個熱穩定蛋白條帶，因此可做為區分此兩群菌株之一重要依據 (Bouzar et al., 1994)。1984 年由 Schwartz 和 Cantor 建立了應用脈衝電泳 (pulse-field gel electrophoresis, PFGE) 系統，Xcv 菌株以此技術分析之結果，發現分別以 *Xba*I 及 *Spe*I 限制酵素切割後，同群菌株間其相似係數高，而於不同群菌株間則低；以 *Spe*I 切割時，應用 cluster analysis 構築樹狀圖，顯示同群菌株基因距離 (genetic distance) 皆很近，而不同群菌株則較遠，可知 A 及 B 群菌株於基因體上之差異頗為顯著 (Stall et al., 1994)。Louws 等人 (1995) 以重複的基因序列 (repetitive extragenic sequences, REP, ERIC 及 BOX) 為引子，進行 PCR 反應，所得之基因指紋型式 (fingerprint pattern) 顯示 A 群菌株較為同質性，而 B 群菌株則為多樣性。最近

Vauterin 等人依據 DNA-DNA 雜合及碳素源利用之研究結果，將 *Xanthomonas* 屬之細菌重新加以分類，其中有關 Xcv 之菌株則分為兩種，即前面所提之 A 群菌株歸屬於 *X. axonopodis* 的一個病原型命名為 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*，而 B 群菌株則修訂為新種 *X. vesicatoria* (Vauterin et al., 1995)。Jones 等人於 2000 年根據更詳細型態鑑定和基因型分類技術，將 Xcv 之菌株又重新分類為四群：*X. euvesicatoria* (= *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*)、*X. vesicatoria*、*X. perforans* 和 *X. gardneri* (Jones et al., 2000; 2004)。

Xcv 可依其對甜椒及番茄之致病力而區分為三個菌群 (group): 1. 番茄菌群 (Xcv T group)，只於番茄上有致病力；2. 甜椒菌群 (Xcv P group)，只在甜椒上有致病力；3. 甜椒-番茄菌群 (Xcv PT group)，於甜椒及番茄上均有致病力。屬於 Xcv P group 與 Xcv PT group 之菌株又可依其於不同甜椒品系 Early Calwonder (ECW)、ECW-10R (含 Bs1)、ECW-20R (含 Bs2)、ECW-30R (含 Bs3)、PI1235047 (含 Bs4) 所形成的致病力再分為 11 個甜椒生理小種 (race P0-P10)。屬於 Xcv T group 之菌株，最初只歸屬一個番茄生理小種，但之後於高抗性番茄品系 Hawaii7998 和 Hawaii7981 中發現第二和第三個生理小種 (race T1-T3) (Jones et al., 1998)。

1.2 增幅限制片段核酸多型性分析技術 (Amplified restriction fragment length polymorphism, AFLP)

AFLP 技術是於 1995 年由學者 Vos 等人結合 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 和 RAPD (random amplified polymorphism DNA) 技術所提出，可改進利用 RFLP 技術需大量的染色體 DNA 和特定之探針，以及 RAPD 需選擇適合的引子之限制 (Vos et al., 1995; Lin et al., 1996)。此技術基本之步驟為：(1)限制酶截切 DNA 後與相同限制酶連合子(adapters)進行接合作用，(2)選擇性增幅反應(Selective amplification)，引子之設計為限制酶連合子之序列，在 3'端再任意加上 1~3 個核苷酸，(3)進行膠片電泳分析 (Vos et al., 1995)。

為有助於病原菌之分類及瞭解病原菌和寄主的相互關係，應用更有效率的 DNA 多型性技術實為必要，AFLP 分析的差異反應在限制酶切位和鄰近位置序列的變異

上，單一核苷酸的突變就能影響多型性條帶的表現。早期 *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) 主要是應用 RFLP 技術配合致病基因(*pthB*)為探針來作分類，利用 AFLP 技術則更有效率的鑑定出特殊品系和病原型 (Restrepo et al., 1999)。Noël 等人 (2001)則利用 cDNA-AFLP 的方法，由 Xcv 找出 30 個受 *hrpG* 誘導(*hgi*)和 5 個被 *hrpG* 抑制(*hgr*)的基因，DNA 序列分析顯示，這些基因具有的功能有胞外蛋白酶、轉錄調控子 XopJ 和 XopB 以及 YopJ、AvrPphD 同源蛋白等，將其中幾個 *hgi* 進行突變後可降低病原菌的毒力，可知利用此技術可成功地篩選和毒力相關的基因和可能的 effector 蛋白 (Noël et al., 2002)。

1.3 病原島嶼 (Pathogenicity island, PAI)

病原島嶼名詞是於 1990 年由學者 Hacker and Kaper 根據人類病原菌 enterobacteriaceae (especially pathogenic *E. coli*) 的基因組結構和病原性所提出的。它具有下列的特性：(1)帶有毒性(virulence)，(2)不存在於非病原菌中，(3)和病原菌的核心染色體 (core genome) 相比較，具有不同的 G+C 含量和 codon usage，(4)通常帶有移動性 (mobility) 因子，如 integrases、transposases 和 insertion sequence (IS)，(5)兩端有 direct repeats (DR) 序列作連接，(6)具有 tRNA 基因，(7)不穩定存在，可藉由 DR 或 IS 做水平式傳送 (horizontal gene transfer)。病原島嶼普遍存在於多種病原菌屬中，包括動物病原菌屬的 *Escherichia*、*Yersinia*、*Salmonella*、*Vibrio* 和 *Helicobacter* 等，以及植物病原菌屬的 *Erwinia*、*Pseudomonas*、*Xanthomonas*、*Ralstonia* 和 *Agrobacterium* 等 (Hacker and Kaper, 2000)。上述植物病原菌除 *Agrobacteria* 外，其餘四屬的病原島嶼皆包含 *hrc/hrp* 基因組。病原島嶼可能藉由水平的基因傳送方式，使非致病性菌的基因體獲得一套病原島嶼序列 (Groisman and Ochman, 1996)。在同種細菌，病原島嶼可能存在於染色體或質體，且病原島嶼具有 multiple horizontal acquisitions 的鑲嵌結構型式 (Hensel et al., 1999)，因此可利用病原島嶼上的基因組成及核酸序列的差異，作為菌種分類和演化分析的依據之一 (Sawada et al., 1999; Gophna et al., 2003)。

1.4 第三型分泌系統 (Type III secretion system, T3SS)

植物與病原菌在自然界中為了生存，會彼此發展出不同的生存策略，以病原細菌來說，發展出多種分泌系統，使其能夠順利的侵入寄主，並成功的在寄主體內繁殖寄生，其中第三型分泌系統 (Type III secretion system, T3SS) 是革蘭氏陰性菌在致病性上不可或缺的秘密胞器。植物病原細菌所擁有的 *hrp* 基因組 (hypersensitive response and pathogenicity, *hrp*) 於 1986 年在 *P. syringae* 中被證實存在 (Lindgren et al., 1986)，構成第三型分泌系統的核心區域 (core region)，為高度保留性的基因，存在於 *Pseudomonas*、*Xanthomonas*、*Ralstonia* 及 *Erwinia* 等菌屬中，且成群的 (cluster) 位於染色體或大型質體上。其中有九個 *hrp* 基因具有較高保留性，也同時存在於動物性病原菌 *Yersinia*、*Shigella* 和 *Salmonella* 等菌屬中，因而改稱為 *hrc* (hypersensitive response and conserved) 基因 (Bogdanove et al., 1996)。此 *hrp/hrc* 基因組產物控制病原菌在寄主植物中產生致病性 (pathogenicity)，使寄主植物葉片中的細胞間隙形成壞疽的病斑，在非寄主植物或具抗性的寄主植物 (incompatible plant) 中誘發過敏性反應 (hypersensitive response, HR) (Alfano and Collmer, 1997)。過敏性反應是一種快速、局部壞疽，與防禦機制相關的反應，由植物細胞與其非親和性的病原菌相互接觸所引發植物細胞程式性死亡 (programmed cell death, PCD) 產生的結果 (He et al., 1993; Greenberg et al., 1994)。

hrp/hrc 基因組產物依功能特性可區分為三類：(1) 調控蛋白 (2) 組成分泌蛋白的胞器 (3) 分泌有效蛋白 (effector)。effector 蛋白可分為二類：一類為作用於植物的細胞間隙而不進入細胞，如 harpin 蛋白，另一類 effector 蛋白則作用於植物細胞內，如 Avr (avirulence) 和 Hop (Hrp-dependent out protein) 和 Xop (Xanthomonas out protein) 基因所編譯的蛋白 (Alfano and Collmer, 1997)。這些 effector 蛋白可能具有共同的訊號傳導分子，例如 *E. amylovora* 與 *P. syringae* 可互相分泌彼此的 DspE 和 AvrE 蛋白，*Y. enterocolitica* 可分泌 *P. syringae* 的 AvrB 和 AvrPto 蛋白，*X. campestris* pv. *vesicatoria* 可分泌 *Y. enterocolitica* 的 YopE 蛋白 (Collmer et al., 2000)。但至今尚無法確定分泌過程中，被分泌蛋白所攜帶的訊號主要是存在於 N 端的胺基酸訊號序列 (signal peptide)

或 5'端 RNA 序列 (Anderson and Schneewind, 1997; Lloyd et al., 2002)。Avr 蛋白的功能為當其進入植物細胞內，若此植物體帶有相對的 R (resistance) 基因時，便會經由專一性的辨認作用，而誘發植物產生過敏性反應，非造成病害，此即基因對基因 (gene-for-gene) 現象，為植物的一種防禦機制；因此 *avr* 基因的存在與否，可能影響病原菌在植物體內的表現，甚至改變寄主範圍 (Keen et al., 1990)。目前已發現許多 effector 蛋白可抑制或促進寄主植物的防禦反應 (Grant et al., 2006)，如 *P. syringae* 的 AvrE 與 HopM 蛋白可抑制水楊酸誘導的抗性而促進病斑的形成 (DebRoy et al., 2004)，HopPtoN 蛋白具 cysteine protease 活性，可抑制病原菌與親和性及非親和性植物交互作用中壞疽反應的形成 (Lopez-Solanilla et al., 2004)，*X. campestris* 的 XopX 蛋白雖尚未瞭解其生化功能，但實驗證明此蛋白可經由 T3SS 傳送至植物而抑制植物的防禦反應，將 XopX 的突變株接種於寄主甜椒和番茄，可降低病原菌的生長 (Metz et al., 2005)，*P. syringae* 的 HopPsyA 蛋白則可誘導植物的抗性表現，而其於菸草及阿拉伯芥細胞所誘導的細胞死亡，又可被 AvrPphE 等蛋白所抑制 (Jamir et al., 2004)，在 *X. campestris* 歸屬於 *avrBs3/pthA* 族群的 *apl1*, *avrXa7*, *avrXa10* 基因，會抑制攜帶有 pHIR11 的 *P. fluorescens* 所引起的過敏性反應，並同時抑制 *RbohB*、*PAL* 及 *PR1* 等防禦反應基因的表現 (Fujikawa et al., 2006)。

1.5 第四型分泌系統 (Type IV secretion system, T4SS)

細菌可透過不同的分泌系統傳遞不同的物質來產生與致病性相關訊息，依據演化和基因功能可將分泌系統區分為六大類 type I-VI (Fronzes et al., 2009)，第四型分泌系統 (Type IV secretion system, T4SS) 為傳送大分子的分泌機制，這些分子通常是蛋白質，但有些則是核酸與蛋白質的複合體 (Christie, 2001; Economou, et al., 2006)。第四型分泌系統的功能可分三類：(1)接合作用 (Conjugation)，(2)有效蛋白傳送 (Effector translocators)，(3)DNA 吸收與釋放 (DNA uptake and release)(Cascales and Christie, 2003; Backert and Meyer, 2006)。細菌的接合作用為最早被歸類且普遍存在的第四型分泌機制，由一群分子組成所謂的 mating pair formation (Mpf)結構來作調控，Mpf 具

有與接受細胞 (recipient cell) 接觸的接合纖毛 (conjugal pilus) 和接合通道 (Mating channel) 來負責 DNA 的轉移。越來越多的研究指出，許多病原菌的分泌系統結構和 Mpf 的演化有關，如 *Agrobacterium tumefaciens* 利用此機制傳送 T-DNA 和 effector 分子至植物細胞核而造成腫瘤 (crown-gall tumors)，*Helicobacter pylori* 為引起胃潰瘍和胃腺癌的病原菌，可傳送約 145 kDa 的 CagA 蛋白至動物細胞內，而引起百日咳的 *Bordetella pertussis* 雖然不會直接進入寄主細胞內，但是會利用第四型分泌系統分泌 pertussis toxin (PT) 至細胞周圍再進入細胞。

第四型分泌系統依基因組成又可將分為三類：(1) type IVA：基因的組成與數目與 *A. tumefaciens* VirB/D4 系統相似，VirB/D4 系統主要由十二個蛋白所組成 (VirB1-VirB11, VirD4)，根據生物資訊和細胞分部分離法 (subcellular fractionation) 證明，可將這些基因依其功能分為三群：第一群為管道組成份 (VirB6-VirB10)，第二群為能量提供者 (nucleoside triphosphatases VirB4, VirB11, VirD4)，第三群和纖毛組成相關 (VirB2, VirB3, VirB5)，目前對這些蛋白的組合堆疊和對基質的傳送所扮演的角色，皆有較深入的瞭解 (Cascales and Christie, 2003; Backert and Meyer, 2006; Li et al., 2006; Fronzes et al., 2009)。(2) type IVB 為 *L. pneumophila* Dot/Icm (defect in organelle trafficking /intracellular multiplication) 系統，共包涵了二十五個基因，分別座落在基因組的兩個區域，其組成蛋白數量二倍於 *A. tumefaciens* VirB/D4 系統，雖然有些基因和 VirB/D4 系統有同源性，如 IcmE/DotG、DotB 和 VirB10、VirB11 有同源性，而 IcmQ/DotL、IcmB/DotO 則和 VirD4、VirB4 有同源性，但仍有諸多蛋白和 *A. tumefaciens* 的 VirB/D4 系統的組成蛋白並無相似性，功能的評估頗為艱難 (Segal et al., 2005; Vincent et al., 2006)，(3) 其他：不歸屬於 type IVA 或 type IVB，以其基因分類或生理特性個別命名 (Christie et al. 2005)，如 *H. pylori* 的 Cag 系統。早期有關第四型分泌系統的研究，大多致力於瞭解 *A. tumefaciens* VirB/D4 系統和 type IVA 的接合作用，如質體 F (IncF)、RP4 (IncP)、R388 (IncW) 和 pKM101 (IncN) (Baron et al., 2002; Lawley et al., 2003; Christie, 2004)。近年來漸漸將研究重心朝向 type IVA 的有效蛋白傳送機制、type IVB 機制和有關革蘭氏陽性菌的接合作用機制 (Christie et al., 2005)。

截至目前，除了對 *A. tumefaciens* 的第四型分泌系統及致病機制有深入之研究外，顯少有關於其他植物病原菌第四型分泌系統的相關報告。He 等人嘗試將 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 *virD4* 和 *virB* 的 9 個基因全部剔除後之突變株接種於寄主植物甘藍菜，發現並不影響其對寄主植物的致病力 (He et al., 2007)。*Burkholderia cenocepacia* strain K56-2 帶有的兩套第四型分泌系統中，位於質體的 PtwT4SS 為 *VirB/D4* 和 F-specific 單位的嵌合系統，*ptwD4*(*VirD4*-like)的突變株會抑制洋蔥組織水浸狀病徵的產生，而位於染色體的第四型分泌系統則與 *VirB/D4* 相似，突變株並不會影響病徵的表現 (Engledow et al., 2004)。目前植物病原菌所擁有的第四型分泌系統的功能與寄主的相互關係大部份仍不清楚，有待進一步的實驗證明，方知第四型分泌系統在不同菌株所扮演的角色 (Marques et al., 2001; Brunings and Gabriel, 2003)。

1.6 植物防禦系統

病原細菌與寄主之間的關係是互相進行演化的，當病原菌進入植物間隙(apoplast)克服了不利之生存條件後，寄主面對來自病原菌的威脅與營養剝奪，因此演化出能夠進行防禦之屏障。位於寄主細胞表面的受器，能專一辨認來自微生物的分子構造，此構造被稱為 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)，也被稱為 microbes-associated molecular patterns (MAMPs)，這些分子構造已被證實廣泛存在於微生物中，包括細菌表面構造之脂多醣類 (lipopolysaccharide, LPS)、細菌的鞭毛蛋白 (flagellin)以及轉錄因子 (elongation factor Tu, EF-Tu)。當植物表面的受器 (pattern recognition receptor, PRR) 辨認到有 PAMPs/MAMPs 出現情況下，將誘發 PAMP-triggered immunity (PTI) 的防禦反應。PTI目前被認為是植物面對入侵微生物最原始的主動防禦反應，一旦被誘發後，細胞之MAP kinase被活化而進行訊息傳遞，導致植物出現包括：(1)防禦相關之蛋白 (pathogenesis related proteins, PR) 的產生，(2)活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 與過氧化氫物的產生，(3)癒傷葡聚糖 (callose) 的沉積以強化感染部位的細胞壁強度等的反應，防止入侵之微生物的生長繁殖

(Nurnberger et al., 2004)。而在寄主表面之受器例如*Arabidopsis thaliana*中的FLS2受器能辨認鞭毛蛋白中的一段由22個氨基酸組成的短肽 (flg22)，若*A. thaliana*在缺失FLS2情形下，將導致植株對於病原菌的感受性提高 (Gomez-Gomez and Boller, 2000)。故植物利用PTI將入侵微生物建立較高族群量前，終止感染的繼續發生。相對地，病原細菌藉由第三型分泌系統遞送effector蛋白進入寄主細胞，以干擾PTI之訊息傳遞導致植物之抗性受到抑制 (Staskawicz et al., 2001)，例如*P. syringae*的effectors蛋白包括AvrPto、AvrRpt2與AvrRpm1能夠抑制由PAMP所誘發的防禦反應 (Hauck et al., 2003; Kim et al., 2005)；*X. campestris*之AvrBs3於C端具有nuclear localization signal (NLS) 以及acidic transcriptional activation domain (AAD)，顯示其能夠改變寄主的轉錄作用而能降低與防禦相關之基因的表達 (Zhu et al., 1998)。而寄主為了進一步反制病原菌的致病過程，發展出另一層次的防禦反應，稱為effector-triggered immunity (ETI)，ETI的誘發在於植物具有抗性蛋白，與病原菌所遞送的effector蛋白進行直接或間接的辨識，一旦effector蛋白與抗性蛋白辨識發生，使得病原菌入侵之區域產生局部組織的快速壞疽現象，即為程式性細胞死亡，而有效抑制病原菌生長及擴散，也就是所謂過敏性反應，而此反應屬於不親合性反應 (Collmer et al., 2002)。然而病原細菌又能夠利用第三型分泌系統所分泌的effector抑制ETI的發生，例如AvrPtoB為*P. syringae*的effector蛋白，能夠在感受性的番茄上抑制由ETI所引起的過敏性反應 (Abramovitch et al., 2003)，故植物與病原菌之間的交互作用，是一個動態且不停在演化的過程。

1.7 研究目的

由*X. campestris* pv. *vesicatoria*所引起茄科細菌性斑點病是台灣番椒及番茄栽培區之重要病害，尤其在高溫多溼季節時發生更為普遍。在 Stall 等人(1994)及 Bouzar 等人(1994)的比較研究中，曾包括來自台灣的一些 Xcv 菌株，而其結果均將台灣菌株歸屬於 A 群，但許氏等人(1990)測定台灣 58 個 Xcv 菌株中，約有 20%為澱粉水解呈正反應者。許氏(1998)以台灣各地收集的 152 個 Xcv 菌株，測試其生理特性、細胞組

成及分子特性，這些菌株中有 113 個菌株不具澱粉水解及果膠分解活性 (A 群菌株)，而 39 個菌株則具有此活性 (B 群菌株)；以脈衝電泳法及點漬雜合法分析 DNA 同質性，顯示台灣之 *Xcv* 菌株亦為多樣性的族群，但可歸納為兩大類群：A 群為 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (= *X. euvesicatoria*)，而 B 群菌株則為 *X. vesicatoria*。為有助於病原菌之分類及瞭解病原菌和寄主的相互關係，本研究第二章擬採用更有效率的 DNA 多型性分析技術 AFLP 來分析台灣地區茄科細菌性斑點病菌之變異性。試圖從 AFLP 的分析圖譜中篩選出各菌株間有差異性之片段，並選殖完整的基因，分析此基因在供試菌株間的差異性，以及是否可作為分類之指標。此外，擬進一步分析此基因的生物功能，探討其在菌株間扮演的角色與致病性之關係。

近幾年由於基因組解序的快速進展，陸續發現許多 *Xanthomonas* 屬具有 VirB/D4 第四型分泌系統的基因。*X. campestris* pv. *vesicatoria* 的第三型分泌系統為致病性上不可或缺的分泌胞器，對其致病機制也有較深入之瞭解，但對於其所具有的第四型分泌系統所扮演的角色所知甚少。本研究第三章擬針對台灣菌株 *Xcv* Xvt122 (A 群菌株) 和 *Xcv* Xvt45 (B 群菌株)，試圖建構兩菌株的染色體基因庫並選殖出與第四型分泌系統相關的 VirB/D4 基因組，探討兩菌株是否具有完整的第四型分泌系統，以及在基因組的排列順序是否有差異，並評估其對致病性之影響。

第二章、利用 AFLP 分析茄科細菌性斑點病菌之變異性

及探討 XopE2 有效蛋白與致病性的關係

2.1 前言

植物在自然界為了生存，必須發展精密的防禦機制以保護自身免於受到病原菌的入侵，反之亦然，病原細菌也必須演化具有更繁複的策略來抵抗寄主植物。例如，病原菌可以抑制植物的基本防禦機制 (basal defense) 以成功地建立入侵植物細胞的管道 (Nurberner, et al. 2004; Schechter et al. 2006)。 *Xanthomonas spp.* 如同許多革蘭氏陰性病原細菌，在感染真核寄主時可利用第三型分泌系統注入細菌毒力蛋白 (virulence factors) 到寄主細胞內，改變細胞正常的生理生化環境，或抑制寄主的防禦機制，使病原菌適合在寄主體內繁殖 (Galan and Wolf-Watz, 2006)。第三型分泌系統具有類似針狀結構 (Cornelis, 2006)，主要是受到 *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*)/*hrc* (*hrp conserved*) 基因組產物調控及數個結構性蛋白所組成，此基因組在不同種病原菌中具高度保留性。此系統可分泌胞外蛋白至植物的細胞間隙，包括 pilus 或 harpin 蛋白，或將 effector 蛋白 (如 Xop 或 Avr) 送入植物細胞內 (Grant et al., 2006; Gürlebeck et al., 2006; Kay and Bonas 2009)。當 Avr 蛋白進入植物細胞內，與植物體相對的 R 基因發生專一性的辨認作用，會誘發植物產生過敏性反應，此即基因對基因現象。過敏性反應是植物受到非親合性的病原菌入侵時，組織發生快速壞疽的現象，此反應造成植物與病原細菌接觸區域快速進程式性細胞死亡，以抑制病原細菌的擴散及繁殖 (Klement, 1982; Staskawicz et al., 2001; Mudgett, 2005; Grant et al., 2006)。當第三型分泌系統受到破壞，會阻礙病原菌在親合性植物內之繁殖而無法產生病徵，甚至喪失在非寄主植物或抗病植物引發過敏性反應的能力，可知第三型分泌系統的 effector 蛋白在病原細菌和植物的交互作用上扮演很重要的角色 (Kay and Bonus, 2009)。

單一病原型的 *Xanthomonas spp.* 至少可產生 15 或更多的 effector 蛋白，但只有少

數的 effector 蛋白是主要的毒力因子，發生突變時可導致毒力喪失 (Thieme et al., 2005; Gürlebeck et al., 2006; Kay and Bonas, 2009)。例如引起茄科細菌性斑點病的病原菌 *X. campestris* pv. *vesicatoria*，其分泌的 AvrBs2 蛋白對病徵的發展、病原菌的入侵以及在植物體內繁殖等有顯著的貢獻效果 (Gürlebeck et al., 2006)。XopX 蛋白能抑制植物基本的防禦機制，而加速在非寄主植物如 *Nicotiana benthamiana* 上病斑的擴增與病原菌的生長 (Metz et al., 2005)。而 *X. campestris* 歸屬於 *avrBs3/pthA* 族群的 *apl1*、*avrXa7* 及 *avrXa10* 基因，會抑制攜帶有 pHIR11 的 *P. fluorescens* 所引起的過敏性反應，並同時抑制 *RbohB*、*PAL* 及 *PR1* 等防禦反應基因的表現 (Fujikawa et al., 2006)。由 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 的基因解序結果顯示 XopE1 和 XopE2 為新被確認的第三型分泌系統 effector 蛋白，這兩個蛋白屬於 *Pseudomonas syringae* 的 HopX 族群 (Thieme et al., 2007)。XopE1 和 XopE2 蛋白 N 端所保有的 N-myristoylation motif，具有與寄主細胞膜辨認的功能，當此 motif 第二個胺基酸由 glycine 置換為 alaine，則蛋白只能分佈於細胞質中。此保留性 N-myristoylation motif 對 XopE1 而言，為造成 *N. benthamiana* 植物細胞死亡的必要結構，而 XopE2 引發 *Solanum pseudocapsicum* 植物的無毒性反應，則與細胞膜辨認的機制是無關的 (Thieme et al., 2007)。

茄科細菌性斑點病是由病原菌 *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) 所引起 (Jones and Stall, 1998)，過去二十年的研究結果顯示，依據澱粉水解及果膠分解活性的有無 (Beaulieu et al., 1991)，以及蛋白質與 DNA 的多型性分析等多樣生理、化學、血清及分子特性 (Bouzar et al., 1994; Stall et al., 1994; Vauterin et al., 1995; Jones and Stall, 1998)，可將 Xcv 區分為 A、B 兩群，A 群菌株歸屬於 *X. axonopodis* 的一個病原型稱 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*，而 B 群菌株則修訂為新種 *X. vesicatoria* (Vauterin et al., 1995; 2000)。Jones 等人於 2000 年根據更詳細型態鑑定和基因型分類技術，將 Xcv 之菌株又重新分類為四群：*X. euvesicatoria* (= *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*)、*X. vesicatoria*、*X. perforans* 和 *X. gardneri* (Jones et al., 2000; 2004; Shall et al., 2009)。現今，*X. campestris* pv. *vesicatoria* (*X. euvesicatoria*) strain 85-10 已被視為是研究第三型分泌系統及探討其 effector 蛋白如何參與病原性的模式菌株 (Thieme et al., 2007; Kay

and Bonas, 2009)。截至目前，*X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 和其近緣菌株，已證實有 17 種第三型分泌系統的 effector 蛋白存在 (Gürlebeck et al., 2006; Thieme et al., 2007)。

增幅限制片段核酸多型性分析技術 (Amplified restriction fragment length polymorphism, AFLP) 的發展已成功的應用於植物、細菌、真菌和線蟲上 (Vos et al., 1995; Folkerstma et al., 1996; Lin et al., 1996; O'Neill et al., 1997)。例如 *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) 為引起樹薯晚疫病的病原菌，為研究其品系間遺傳因子之差異，Gonzalez 等人(2002)選擇 *EcoRI*+*T/MseI*+*A* 和 *EcoRI*+*T/MseI*+*T* 引子對，以 AFLP 技術可以有效率的來鑑別 Xam 病原菌和非病原菌，序列分析顯示某些多型性條帶與病原菌的適應性和毒力的調節因子有關聯。Noël 等人(2001)則利用 cDNA-AFLP 的方法，可成功地篩選和毒力相關的基因和可能的 effector 蛋白，包括 XopA、XopB、XopC 及 XopJ。在台灣，細菌性斑點病是嚴重影響番茄與甜椒生長的病害，尤其在高溫多濕的雨季，主要是由 *X. campestris* pv. *vesicatoria* A 群 (= *X. euvesicatoria* = *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) 和 *X. campestris* pv. *vesicatoria* B 群 (= *X. vesicatori*) 所引起。本研究擬採用 AFLP 分析台灣的 *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) A、B 群菌株之差異，接著選殖與毒力相關的基因 *xopE2* 並分析其生物功能。南方雜合反應顯示，*xopE2* 在 *Xanthomonas* spp. 中為高度保留的基因，比較位於 *xopE2* 兩側區域的 DNA 序列，發現 *xopE2* 座落的位置以及兩側基因序列的順序可區分出 *X. campestris* pv. *vesicatoria* A 群與 B 群。B 群的 XopE2 (XopE2_B) 突變株會降低細菌的生長和病徵的形成，但 A 群的 XopE2 (XopE2_A) 突變株卻沒有此抑制現象發生。除此之外，兩菌群的 XopE2 蛋白皆能經由第三型分泌系統達到抑制 *P. syringae* pv. *syringae* 的 HopPsyA 蛋白所引起的過敏性反應。

2.2 材料與方法

2.2.1 供試菌株、質體、菌體生長環境

本研究所使用菌株與質體之特性及其來源分別列於表 2-1。*Escherichia coli* 以 Luria-Bertani (LB) medium 培養於 37 °C。*Xanthomonas* 菌株以 Luria-Bertani (LB) 或 523 medium (sucrose 10 g/l, casein hydrolysate 8 g/l, yeast extract 4 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.3 g/l) 培養於 28 °C，*Agrobacterium* 以 Luria-Bertani (LB) medium 培養於 30 °C。培養基依所需添加抗生素，其濃度分別如下：ampicillin (Amp)，100 µg/ml；Chloramphenicol (Cm)，12.5 µg/ml；gentamycin (Gm)，10µg/ml；kanamycin (Km)，50 µg/ml；tetracyclin (Tc)，20 µg/ml。

2.2.2 重組 DNA 技術

實驗過程中所使用的各項生物技術包括：染色體質體 DNA 之抽取 (chromosome or plasmid DNA extraction)，限制酵素的使用 (restriction enzyme digestion)，膠體電泳分 (agarose gel electrophoresis)，DNA 連接作用，DNA 片段回收 (gel filtration kit, QIAGEN Chatsworth, CA)，CaCl₂ 化學方法之菌體轉形作用 (transformation) 等係參考 Sambrook 等人所述之方法 (Sambrook et al., 1989)，電穿孔法根據 Bio-Rad 出廠的 GenePulser 使用手冊操作。聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 的溶液為每 20 µl 之反應液中包含 0.1-0.5 µg 模板 DNA，0.5 µM 引子對 (primers)，0.2 mM dNTP (MDBio, Inc)，1X Taq reaction buffer (Protech)，以及 4 unit 的 KlenTaq DNA polymerase (Protech)/0.5 unit *Pfu* DNA polymerase (8:1)。PCR 的反應條件為：94 °C 初始加熱 5 分鐘，接著重複進行下列循環：94 °C 反應 1 分鐘、55 至 65 °C (依據引子對之 T_m 值特性) 反應 1 分鐘、72 °C 反應 1~2 分鐘(所需時間依據所增幅之片段長度決定，每 kb 反應 60 秒)，總共作用 32 循環，最後以 72 °C 反應 10 分鐘作為最終之增幅反應。研究中所需的引子對則列於表 2-2。

2.2.3 染色體 DNA (Genomic DNA) 之製備

(1) AFLP 分析和染色體基因庫建構採用之法

供試菌株以 5 ml LB 液體培養液隔夜培養後，以 3,000 g 離心收集菌體並除去上清液。以 1 ml 的 pett IV 緩衝液 (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]) 懸浮菌體，再次離心收集菌體，並以 1 ml 的 STE 緩衝液 (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 懸浮菌體，再次離心收集菌體後，以 0.5 ml STE 緩衝液懸浮菌體，接著加入 50 μ l 10% SDS 並移至 65 °C 水浴槽放置 0.5~1 小時，待菌液由渾濁轉為澄清後移至室溫冷卻，並且加入 150 μ l 10 M 的 NH_4OAc ，均勻混搖數次直至均質化，以 12,000 g 離心 30 分鐘並收集上清液，加入 5 μ l RNAase (10 mg/ml) 於 37 °C 水浴槽作用 1.5~2 小時，接著加入相同體積的 phenol:chloroform (1:1, pH 8.0) 進行蛋白質之萃取。輕搖離心管至上清液呈乳化狀，於 4 °C 下以 12,000 g 離心 15 分鐘以分離有機層與水層。利用去尖頭之滴管吸取上清液至另一離心管，加入等體積的 isopropanol 和 1/10 體積的 3 M NaOAc，並置於 -20 °C 1 小時以上以沉澱核酸，接著於 4 °C 下 12,000 g 離心 60 分鐘收集 DNA 至管底。去除上清液並以 70 % 酒精沖洗管壁與管底的核酸並風乾後，將 DNA 溶於 50 的 μ l 的 TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) 中，將染色體 DNA 置於 4 °C 冰箱保存。

(2) 南方轉漬雜合反應採用之法

供試菌株以 5 ml LB 液體培養液隔夜培養後，以 3,000 g 離心收集菌體並除去上清液。以 1.5 ml 的 STE 緩衝液 (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 懸浮菌體並分裝至兩個 1.5 ml 微量離心管，再次離心收集菌體並去除上清液，以 0.75 ml STE 緩衝液懸浮菌體，接著加入 75 μ l 10% SDS 並移至 65 °C 水浴槽放置 1 小時，待菌液由渾濁轉為澄清後移至室溫冷卻，並且加入 50 μ l proteinase K (20 μ g/ml) 於 56 °C 水浴槽作用 2 小時，接著加入相同體積的 phenol:chloroform (1:1, pH 8.0) 進行蛋白質之萃取。輕搖離心管至有機層與水層均勻混合後，於 4 °C 下以 12,000 g 離心 10 分鐘以分離有機層與水層。利用去尖頭之滴管吸取上清液至另一離心管，並且加入 10 μ l

RNAase (10 mg/ml)於 37 °C 水浴槽作用 1 小時，再以相同體積的 phenol:chloroform (1:1) 萃取蛋白質，重複數次至有機層與水層間的蛋白質不再出現，再加入相同體積的 chloroform/isoamylalcohol (24:1)並且輕搖混合。以 12,000 g 離心分離水層後，加入等體積的 isopropanol 並置於-20 °C 1 小時以上以沉澱核酸，接著於 4 °C 下 12,000 g 離心 20 分鐘將 DNA 收集至管底。去除上清液並以 70 %酒精沖洗管壁與管底的核酸並風乾後，將 DNA 溶於 100~200 μ l 的 TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) 中，將染色體 DNA 置於 4 °C 冰箱保存。

2.2.4 AFLP 分析

AFLP 分析方法依據廠商所提供的使用手冊 (AFLP Expression Analysis Kit, *LI-COR* Biosciences) 操作。大致方法如下所述：250 ng 染色體 DNA 以 *TaqI/MseI* 截切完全後，與相同限制酵素連合子(adapters)進行接合作用。取 2.5 μ l 10 倍稀釋的接合反應液作為預增幅反應(Pre-amplification)的模板 DNA，引子對為廠商提供的 *MseI-N/TaqI-N*，PCR 反應條件設定為 94 °C 作用 30 秒，56 °C 作用 1 分鐘，72 °C 作用 1 分鐘，重覆此三步驟 20 次後，保持於 4 °C。接著進行選擇性增幅反應 (Selective amplification)，以 10 倍稀釋的 pre-amp DNA 為模板，引子對為 *MseI+NN primer /IRDyeTM 700-labeled TaqI+NN primer*，NN 為任意的核苷酸，依廠商所提供共有 64 種引子對組合。PCR 反應條件設定為“touchdown”程式，以 94 °C 作用 30 秒(denature)，65 °C 作用 30 秒(anneal)，72 °C 作用 1 分鐘(amplification)，重覆此三步驟 12 次，但每一循環將 annealing 的溫度降低 0.7 °C；接著改變反應條件為 94 °C 30 秒，56 °C 30 秒，72 °C 1 分鐘，重覆此三步驟 23 次，最後保持於 4°C。反應終產物則利用 *LI-COR* 之 DNA 定序儀，以 6.5 % polyacrylamide denaturing gel (KB^{Plus}TM)進行電泳分析，以 0.8 X TBE 為緩衝液，電壓控制為 1500 V、溫度為 45 °C，並以遠紅外線即時偵測與紀錄分析結果。

2.2.5 選殖與定序 AFLP 片段

電泳分析後之膠片利用遠紅外線掃瞄儀 (LI-COR Odyssey™) 掃瞄，以刀片切取並回收所需要的 DNA 片段，將回收的膠片加入 20 µl 的 TE 緩衝液，經過數次重覆的冷凍與解凍，於 4°C 下，以 15,000 g 離心 20 分鐘，回收之 DNA 即溶於 TE 緩衝液。以此回收的 DNA 為模板，加入 pre-amp 的引子對，進行增幅反應，反應條件為 94 °C 30 秒，56 °C 1 分鐘，72 °C 1 分鐘，重覆此三步驟 20 次。將增幅產物構築於 pGEM-T easy vector (Promega)，挑選數個重組質體，以 ABI 3700 自動化核酸定序儀 (中興大學生物科技發展中心) 進行核酸序列分析。

2.2.6 選殖與定序 *xopE2* 基因

為選殖不同 *Xcv* 菌株之 *xopE2* 基因，根據 NCBI 上註冊的 *Xac306 avrXacE3* (現更名為 *xopE2*) 基因序列，設計一組引子對 pavrXacE3-F/pavrXacE3-R，以不同品系的 *Xcv* 染色體 DNA 為模板進行 PCR，反應條件為 94 °C 作用 5 分鐘，94 °C 作用 1 分鐘，65 °C 作用 1 分鐘，72 °C 作用 1 分鐘，2~4 步驟重覆 35 次，最後 72°C 作用 10 分鐘。將增幅產物構築於 pGEM-T easy vector (Promega)，每個品系挑選 3 個重組質體，以 ABI3700 自動化核酸定序儀 (中興大學生物科技發展中心) 進行核酸序列分析，利用 BLASTN 和 BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 於資料庫進行資料搜尋與比對，如此可選殖出十四株 *Xcv xopE2* 基因，分別命名為 pNCHU1068~pNCHU1084 (表 2-1)。

2.2.7 染色體基因庫之建構

(1) 染色體 DNA 以 *EcoRI* 作非完整截切 (partial digestion)

將 30 µg 的染色體 DNA 溶於最終體積為 1 ml 的 1 倍 *EcoRI* 溶液中，混合均勻。依 1~7 號標示 7 支 1.5 ml 離心管，取 60 µl 稀釋的 DNA 置於編號 1 的離心管，取 30 µl 稀釋的 DNA 置於編號 2~7 的離心管。首先，取 1 µl (5 unit/µl) 的 *EcoRI* 到編號 1 的離心管中，均勻混合後取 30 µl 的混合液到編號 2 的離心管中混勻，如此操作至編號 6 的離心管後，捨棄 30 µl 的混合液，編號 7 的離心管則作為不含 *EcoRI* 的控制組。將

此 7 管的混合液置於 37 °C 中作用 30 分鐘後，立刻加入 1 µl 的 0.5 M EDTA 終止反應。取 3 µl 的反應液以 0.8 % 的洋菜膠分離 DNA，DNA 條帶在 15~20 kb 即為所要的 DNA 大小，以此方法可決定最適合的非完整截切酵素濃度。之後利用膠體電泳分析大量收集 10-25 kb 的 DNA 片段，並以 Elutrap Electro-Separation System (Schleicher & Schuell) 回收 DNA。

(2) 利用 CopyControl™ BAC Cloning Kit (EPICENTRE) 建構染色體基因庫

操作方法依據廠商提供之使用手冊，大致方法如下所述：取 100 ng 回收的 DNA 與廠商提供的 CopyControl pCC1BAC Cloning-Ready vector 進行接合作用，置於 16 °C 隔夜反應後，以 65 °C 處理 15 分鐘終止反應。接合反應液經過去鹽作用後，接合反應液以電穿孔法送入 TransforMax EPI300 *E. coli*，並加入 1 ml SOC medium 於 37 °C 培養 1 小時，最後取 50 µl 塗抹於含 chloramphenicol, X-gal and IPTG 的 LB 固體培養基，置於 37 °C 培養隔夜後，計算白色菌落的數目以評估染色體基因庫之建構是否完整。

2.2.8 南方轉漬雜合反應 (Southern hybridization)

(1) 探針之製備

質體經限制酶處理後進行電泳分析，回收特定之 DNA 片段再以非放射性之 DIG (disodium 2-chloro-5-(4-methoxy spiro {1,2-dioxetane-3,2'- (5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate) 標識作為探針，標定之方法參照廠商提供之手冊進行 (DIG Labeling Kit, Roche)。將質體 DNA 定量於 10 ng~3 µg 之間，以 100 °C 加熱 10 分鐘後立即置於冰上 5 分鐘，使 DNA 保持單股之變性狀態。分別加入 2 µl dNTP labeling mixture (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM DIG-dUTP)、2 µl hexanucleotide mixture (random primer) 及 1 µl Klenow enzyme (2 unit/µl)，補水至總體積為 20 µl，混合均勻後於 37 °C 下作用 16 小時，再以 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8.0) 終止標定反應。加入 2 µl 4 M LiCl 及 60 µl 95% 酒精並置於 -70 °C 下至少六小時以沉澱 DNA，以 4 °C、12,000 g 離心 20 分鐘，並以 100 µl 70 % 酒精洗去鹽

類後再次離心 (12,000 g, 5 分鐘, 4 °C), 去除上清液後將 DNA 真空乾燥並溶於 50 μ l TE 緩衝液中並保存於 -20 °C 中, 以備核酸雜合反應進行。

(2)轉漬 DNA 至 Hybond-N 濾膜

將 5 μ g *Eco*RI 截切完全的染色體 DNA, 以 1 %瓊膠電泳分離後, 將含 DNA 的膠片置於 0.25 N HCl 溶液中輕搖 20 分鐘, 以去離子水沖洗後, 再浸泡於鹼性緩衝液 (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) 中輕搖 30 分鐘, 再以去離子水沖洗, 接著浸泡於中和緩衝液 (1 M Tris-HCl [pH 8.0], 1.5 M NaCl) 中輕搖 30 分鐘後準備轉漬。Hybond-N (Amersham) 濾膜以 2 X SSC 緩衝液潤濕, 將處理好的電泳膠片置於 Hybond-N 濾膜上, 以 2 X SSC 緩衝液為轉漬溶液, 利用真空轉漬器 (Vacuum blotter model 785, Bio-Rad) 以真空度 5 in Hg 轉漬 40 分鐘。取出轉漬濾膜以 2 X SSC 緩衝液漂洗後, 置於乾淨的 3 MM 濾紙上, 以紫外光固定器 (UV stratalinker 1800, Stratagene) 進行聯結 (cross-linking), 使 DNA 固定在濾膜。

(3)前雜合反應 (pre-hybridization) 與雜合反應 (hybridization)

將轉漬濾膜置於雜合管中, 加入 10 ml 雜合溶液 (0.25 M NaHPO₄ [pH 7.2], 7 % SDS) 於 65 °C 進行前雜合反應至少 1 小時, 再加入已處理之探針 (於 100 °C 加熱 10 分鐘接著立即置於冰上 5 分鐘), 於 65 °C 進行雜合反應 12 小時以上。

(4)洗滌與偵測

雜合反應後, 倒去含探針之雜合溶液, 轉漬濾膜以 Wash solution I (2 X SSC, 0.1 % SDS) 於室溫下清洗二次, 每次 10 分鐘; 再以 Wash solution II (0.1 X SSC, 0.1% SDS) 於 65 °C 下清洗二次, 每次 15 分鐘。將轉漬濾膜以 Buffer I (0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.3 % Tween 20, pH 8.0) 於室溫浸洗二次, 每次 5 分鐘; 加入適量的 Buffer II (含 0.5% blocking reagent 之 Buffer I) 於室溫下作用 30 分鐘。倒掉 Buffer II, 加入以 Buffer II 稀釋 10,000 倍之 10 ml 二次抗體溶液 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate

(Roche)，於室溫下反應 30 分鐘。倒出二次抗體溶液後以 Buffer I 於室溫下沖洗濾膜二次，每次 15 分鐘；之後將轉漬濾膜於室溫下浸泡 Buffer III (0.1 M Tris-base, 50 mM MgCl₂, 0.1 M NaCl, pH 9.5) 5 分鐘，再將轉漬濾膜置於塑膠袋中。將 CDP-Star™ 以 Buffer III 稀釋 100 倍，依 0.5 ml/100 cm² 之比例加入內含轉漬濾膜的塑膠袋中，使其均勻分布於轉漬濾膜上，反應 10 分鐘之後抹除 CDP-Star 溶液，以 X-ray 底片進行壓片 10 分鐘後即可進行底片之顯影與定影。

2.2.9 菌落雜合反應 (Colony hybridization)

將細菌點在含 chloramphenicol 抗生素的 LB 固體培養基，於 37 °C 培養約 12~16 小時後 (菌落直徑大小以不超過 1 mm 為宜)，置於 4 °C 至少 30 分鐘。將圓形的 Hybond-N 濾膜放在含菌落的 LB 固體培養基上 1 分鐘，並以針頭在濾膜的外緣穿刺三孔成不等邊三角形的記號後，以鑷子快速地將濾膜掀起，置於含有變性緩衝液 (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) 的 3 MM 紙上 15 分鐘後，將濾膜放在乾淨的 3 MM 紙上約 1 分鐘以吸去多餘的變性緩衝液；再將濾膜放在含有中和緩衝液 (1 M Tris-HCl[pH 8.0], 1.5 M NaCl) 的 3 MM 紙上 15 分鐘後，再置於乾淨的 3 MM 紙上吸去多餘的中和緩衝液；最後將濾膜放在含有 2 X SSC 的 3 MM 紙上約 10 分鐘，再置於乾淨的 3 MM 紙上吸去多餘的 SSC 緩衝液。以紫外光固定器 (UV stratalinker 1800, Stratagene) 進行聯結(cross-linking)，使 DNA 固定在濾膜。取 1 ml Proteinase K (2 mg/ml) 均勻佈在濾膜上，以鋁箔包覆後，置於 37 °C 至少 1 小時，再將濾膜放到清洗緩衝液 (5 X SSC, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA) 中，手戴手套將濾膜上菌體殘骸搓掉，直到膜上不再有顆粒殘留為止，再將濾膜置於 2 x SSC 中浸潤 1 分鐘，作後續的前雜合及雜合反應，方法同前項南方雜合反應。

2.2.10 構築 *xopE2* 非極性突變菌株

策略為以不具有 Rho-independent transcription terminator 的 *nptII* 基因取代 *xopE2* 基因 (Beck et al., 1982; Alfano et al., 1996)。首先設計含 *XbaI/HindIII* 切位的引子對

pXvt122-8K-7-*Xba*I-F/pXvt122-8K-7-*Hind*III-R，以質體 pNCHU1227 為模板，增幅出 1 kb *Xba*I-*Hind*III 的 *xopE2* 基因上游片段，並選殖於 pCPP2988 載體，得到重組質體 pNCHU1229。設計含 *Xho*I/*Kpn*I 切位的引子對 pXvt122-8K-7-*Xho*I-F/pXvt122-8K-7-*Kpn*I-R，以質體 pNCHU1227 為模板，增幅出 0.9 kb *Xho*I-*Kpn*I 的 *xopE2* 基因下游片段，並選殖於 pBBR1MCS-5 載體，得到重組質體 pNCHU1230。再次從質體 pNCHU1229 選殖 2.5 kb *Xha*I-*Xho*I 片段接合於質體 pNCHU1300，得到重組質體 pNCHU1301 即為 *Xcv* Xvt122 *xopE2* 基因缺失之重組質體。以相同策略構築 *Xcv* Xvt45 *xopE2* 基因缺失之重組質體，首先設計含 *Xba*I/*Hind*III 切位的引子對 pXvt45857-*Xba*I-F/pXvt45857-*Hind*III-R，以質體 pNCHU1276 為模板，增幅出 1 kb *Xba*I-*Hind*III 的 *xopE2* 基因上游片段，並選殖於 pCPP2988 載體，得到重組質體 pNCHU1361。設計含 *Xho*I/*Kpn*I 切位的引子對 pXvt45852-*Xho*I-F/pXvt45852-*Kpn*I-R，以質體 pNCHU1275 為模板，增幅出 1 kb *Xho*I-*Kpn*I 的 *xopE2* 基因下游片段，並選殖於 pBBR1MCS-5 載體，得到重組質體 pNCHU1360。再次從質體 pNCHU1360 選殖 2.5 kb *Xha*I-*Xho*I 片段接合於質體 pNCHU1361，得到重組質體 pNCHU1362 即為 *Xcv* Xvt45 *xopE2* 基因缺失之重組質體。構築好的重組質體利用電穿孔法送入 *Xcv* 野生株，將菌液塗抹於含 Km 和 Gm 的 523 固體培養基，置於 28 °C 培養約 2~3 天，再挑取單一菌落進行標記置換法 (marker-exchanged mutagenesis)。將單一菌落培養於 Km 的 LB 培養液中，於 28 °C 下連續繼代培養五天，以接種環將菌畫於含 Km 的 523 固體培養基，於 28 °C 培養至產生單一菌落後，將菌落分別點於含 Km 及同時含 Km 和 Gm 之固體培養基，置於 28 °C 培養 2 天後，篩選出對於 Km 有抗性而對 Gm 沒有抗性的菌株，如此即可得到構築於質體的突變基因轉至野生菌株染色體上之突變株 (*Xvt122ΔxopE2*, *Xvt45ΔxopE2*)，再以南方雜合反應確認突變株是否如預期被破壞 (Huang et al., 1988)。

2.2.11 單點突變株之構築 (Site-directed mutagenesis)

利用 crossover PCR 法來構築單點突變株 *xopE2::H47A*、*xopE2::C159A* 和

xopE2::H47AC159A。根據 *xopE2* 基因設計 6 條引子，此 6 條引子可同時適用於 *Xcv Xvt122* 和 *Xcv Xvt45* 之構築，分別為 *pXvt45-E3-F-XhoI* (包含 start codon)、*pXvt45-E3-R-XbaI* (包含 stop codon)；*prH47A-1* 和 *prH47A-3* 設計之序列涵蓋第 47 個胺基酸且為互補序列，同時將第 47 個胺基酸的 histidine 變更為 alaine；*prC159A-1*、*prC159A-3* 之序列則涵蓋第 159 個胺基酸且為互補序列，同時將第 159 個胺基酸的 cysteine 更改為 alaine，引子序列列於表 2-2。首先以質體 *pNCHU1068* 為模板，*pXvt45-E3-F-XhoI* 和 *pXvt45-E3-R-XbaI* 為引子對，利用 PCR 增幅出約 1.1 kb 的 DNA 片段並構築於 *pDrive* 選殖載體 (GIAGEN PCR Cloning Kit)，得到 *pNCHU1913* 重組質體 (*Xvt122 xopE2*)。同樣以質體 *pNCHU1068* 為模板，各以 A 組引子對 *pXvt45-E3-F-XhoI*、*prH47A-1* 和 B 組引子對 *prH47A-3*、*pXvt45-E3-R-XbaI*，增幅出約 150 bp 和 950 bp 的 DNA 片段，反應條件為 94 °C 5 分鐘，94 °C 50 秒，55 °C 50 秒，68 °C 75 秒，2~4 步驟重覆 25 次。將 A、B 組 PCR 產物以 1:1 濃度混合後，作為第二次 PCR 的模板，引子對則為 *pXvt45-E3-F-XhoI* 和 *pXvt45-E3-R-XbaI*，反應條件為 94 °C 2 分鐘，94 °C 20 秒，40 °C 20 秒，68 °C 90 秒，2~4 步驟重覆 10 次，接著變更反應條件為 94 °C 1 分鐘，94 °C 60 秒，40 °C 60 秒，68 °C 90 秒，2~4 步驟重覆 25 次，最後 68 °C 5 分鐘。利用此方法可增幅出約 1.1 kb 的 DNA 片段，並構築於 *pDrive* 選殖載體 (GIAGEN PCR Cloning Kit)，得到 *pNCHU1914* 重組質體 (*Xvt122 xopE2::H47A*)，將此重組質體以 ABI 3730 自動化核酸定序儀 (中興大學生物科技發展中心) 進行核酸序列分析，確定第 47 個胺基酸已置換為 alaine，且其他胺基酸不變。同法，利用 C 組引子對 *pXvt45-E3-F-XhoI*、*prC159A-1* 和 D 組引子對 *prC159A-3*、*pXvt45-E3-R-XbaI*，可得到 *pNCHU1915* 重組質體 (*Xvt122 xopE2::C159A*)。選殖 *xopE2::H47AC159A* 突變株，則是以 *pNCHU1914* 為 PCR 模板，C、D 組為引子對進行 PCR 反應，可得到 *pNCHU1916* 重組質體。將 *pNCHU1913*、*pNCHU1914*、*pNCHU1915*、*pNCHU1916* 重組質體，再以 *XhoI/XbaI* 截切並選殖此片段於廣寄主載體 *pBBR1MCS-5*，得到 *pNCHU1921*、*pNCHU1922*、*pNCHU1923* 及 *pNCHU1924*。構築 *Xcv Xvt45* 單點突變株，則以質體 *pNCHU1070* 為模板，利用上述相同引子對和反應

條件，可分別得到 pNCHU1917 (Xvt45 *xopE2*)、pNCHU1918 (Xvt45 *xopE2::H47A*)、pNCHU1919 (Xvt45 *xopE2::C159A*)、pNCHU1920 (Xvt45 *xopE2::H47A C159A*)，再以 *XhoI/XbaI* 截切並選殖此片段於廣寄主載體 pBBR1MCS-5，可得到 pNCHU1925、pNCHU1926、pNCHU1927 及 pNCHU1928。

2.2.12 病原性測定

為測定病原菌於寄主番茄葉片內之生長，供試菌株培養於含適當抗生素的 523 培養基上約二天後，以 10 mM MgCl₂ 將菌體懸浮並調整其濃度至 10⁴ 或 10⁵ cfu/ml。取栽培於溫室(25 °C，光期 16 小時)本葉為 8 葉的番茄植株 (*Bonny Best* L305)，以針筒注射的方式將菌液接種於葉片。再分別於接種後的第 0、3、6 天，進行接種葉片的採樣。採樣的方法是利用打孔器取直徑為 6 mm 的葉圓盤，以 2 個葉圓盤為一重複，共取三個重複，加入 200 µl 10 mM MgCl₂ 後利用研磨棒將其磨碎，繼以 10 mM MgCl₂ 作系列稀釋，最後將不同濃度的磨碎液塗抹於含特定抗生素的培養基上計數菌落。

為評估病徵的發展，以去離子水將菌體懸浮且調整其濃度約 5 x 10⁷ cfu/ml，並添加 0.025 % (v/v) 展著劑 Silwet L-77。取栽培於溫室 (25 °C，光期 16 小時) 植株大小約本葉 5 葉的番茄植株 (*Bonny Best* L305)，將葉片浸泡於菌液中 20 秒後，套袋 3 天以維持溼度。接種後持續觀察病徵的發展，並於第 1、2、3 星期紀錄發病指數，發病指數之評估根據 Horsfall 等人的方法 (Horsfall and Barratt's, 1945)，以下列等級區分：0 級-無病徵者；1 級-病斑面積佔總葉片面積 1-3 %；2 級-病斑面積佔總葉片面積 3-6 %；3 級-病斑面積佔總葉片面積 6-12 %；4 級-病斑面積佔總葉片面積 12-25 %；5 級-病斑面積佔總葉片面積 25-50 %；6 級-病斑面積佔總葉片面積 50-75 %；7 級-病斑面積佔總葉片面積 75-88 %；8 級-病斑面積佔總葉片面積 88-94 %；9 級-病斑面積佔總葉片面積 94-97 %；10 級-病斑面積佔總葉片面積 97-100 %；11 級-病斑面積 100 %。

2.2.13 抑制過敏性反應之測定 (Hypersensitive response-suppressed assay)

將構築於廣寄主載體 pBBR1MCS-5 的重組質體，以 CaCl₂ 化學方法之菌體轉形

作用，送入已帶有 pHIR11 質體之 *E. coli* MC4100 菌株內。供試菌株培養於含 Tc 和 Gm 抗生素的 LB 液體培養基，於 37 °C 隔夜培養後，以 3,000 g 室溫離心 10 分鐘收集菌體，以 10 mM MgCl₂ 將菌體懸浮後再次離心，除去殘留之培養液，沉澱之菌體以 10 mM MgCl₂ 懸浮並調整其濃度約為 5 x 10⁸ cfu/ml。取栽培於溫室 (25 °C，光期 16 小時) 植株大小為本葉 6-7 葉的煙草植株 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Van-Hicks)，先用針頭輕刺葉片，以不含針頭的針筒吸取菌體懸浮液，注入煙草之葉肉 (Baker et al., 1987)，觀察並記錄煙草葉片產生過敏性反應的情形。

2.2.14 以農桿菌為媒介作短暫性的基因表現 (*Agrobacterium*-mediated transient assay)

將 *xopE2* 基因構築於 pBI121 載體，藉由農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404) 送入植物細胞內作短暫性的基因表現。Xcv Xvt122 以質體 pNCHU1068 為模板，pavrXacE3-F-*Xba*I / pavrXacE3-R-*Sma*I 為引子對，增幅出約 1.1 kb 的 DNA 片段，以 *Xba*I/*Sma*I 截切後構築於 pBI121 載體，得到重組質體 pNCHU1201。而 Xcv Xvt45 則以染色體 DNA 為模板，pavrXacE3-F-*Nde*I/pavrXacE3-R-*Eco*RI 為引子對，增幅出約 1.1 kb 的 DNA 片段，以 *Nde*I/*Eco*RI 截切後構築於 pT7-7 載體，得到重組質體 pNCHU1100。pNCHU1100 以 *Xba*I/*Sma*I 截切後再構築於 pBI121 載體，得到重組質體 pNCHU1200。得到的重組質體 pNCHU1200 和 pNCHU1201 以電穿孔送入農桿菌，以抗生素篩選並抽取質體作確認。將成功送入重組質體的菌株置於 30 °C 隔夜培養後，以 5 mM MES (pH 5.6) 的緩衝液清洗一次，並懸浮於 5 mM MES 中，調整菌液濃度為 OD₆₀₀=0.4，再加入終濃度為 200 μM 的 acetosyringone 繼續培養 2 小時後進行接種 (Kang et al., 2004)，接種方法同抑制過敏性反應測定接種法。

2.3 結果

2.3.1 利用 AFLP 分析 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 菌株

本研究以篩選自台灣地區的十四株 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 菌株作為 AFLP 分析的供試菌株，宿主各為番茄和甜椒，歸屬於不同的 races (表 2-3)，Xvt12、Xvt28、Xvt48、Xvt122、Xvt185、Xvp169、Xvp182、Xvp186、Xvp194、Xvp197 屬於 A 群，各為 T1Pn (n 為 1、2、3、7 及 8) 品系，具澱粉分解能力，Xvt45、Xvt46、Xvt147、Xvt148 屬於 B 群，皆為 T2P0 品系，不具澱粉分解能力(許氏, 1998)。於此，利用 AFLP 找尋基因標幟以期能更進一步分類這些品系，因於預備實驗中，以 *EcoRI/MseI* 截切後所得到的 AFLP 片段少於 *TaqI/MseI* 截切的結果，所以本實驗採用 *TaqI-GA IR700* 和 *MseI-NN* (NN 代表 AC、AG、CA、CT、GA、GT、TC 及 TG) 作為選擇性增幅反應的引子組合，並建立八張 AFLP 的圖譜。圖 2-1 為利用 *TaqI-GA IR700* and *MseI-GA* 引子所獲得的其中之一張圖譜，結果顯示，來自 A 群的菌株間具有高度的多型性，而 B 群菌株則較為一致性，由取得的影像挑選出比較獨特或表現量較多的多型性條帶，片段 Xvt12-1 在各菌株間為獨特的片段，片段 Xvt48-3 不出現分離自甜椒的菌株，片段 Xvt122-4 和 Xvt197-10 並不出現在 B 菌群，片段 Xvt148-6 只出現在 B 群，片段 Xvt186-8 出現在所有的 B 和部份 A 群，利用 *LI-COR Odyssey*TM 掃描後，回收 DNA 進行選殖與定序。回收的六條 DNA 片段，經由 NCBI BLASTX 比對結果列於表 2-4。其中有三條 DNA 片段在基因庫中搜尋不到相似的基因，Xvt48-3 與 type I site-specific deoxyribonuclease 有 98 % 的同源性；Xvt197-10 為轉移酶 Tn5044/Tn3926；由 Xcv Xvt122 菌株取得的片段大小為 271bp (即 Xvt122-4) 與 *X. axonopodis* pv. *citri* 306 的 AvrXacE3 (accession no. AAM39257) 胺基酸序列達 85 % 相似性，與 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 的 XopE2 (accession no. AAM39257) 有 92 % 的相似性。XopE2 為新被確認的第三型分泌系統 effector 蛋白，可造成 *Solanum pseudocapsicum* 植物的細胞死亡 (Thieme et al., 2007)，後續將探討 Xvt122-4 (XopE2) 在兩群菌株間的差異。

2.3.2 *xopE2* 基因在 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 菌株間具高度保留性

由 AFLP 分析的結果顯示，片段 Xvt122-4 (*xopE2*)並不出現在 B 群，為了瞭解 *xopE2* 在 *Xanthomonas* spp.不同族群間之差異，首先根據 *Xac306 avrXacE3* 的序列設計一組引子，選殖出 Xcv Xvt122 *xopE2* 完整的基因，以此當作探針進行南方雜合反應。供試菌株除十四株 Xcv 菌株外，另外有四株 *Xanthomonas* spp.對照組菌株，*X. campestris* pv. *campestris* 70 (Xcc 70)寄主為甘藍，*X. campestris* pv. *diffenbachiae* A49 (Xcd A49)寄主為火鶴，*X. campestris* pv. *oryzae* 84 (Xco 84)寄主為稻米，*X. axonopodis* pv. *citri* XW19 (Xac XW19)寄主為瓦倫西瓦柑橘 (表 2-3)。圖 2-2A 為所有菌株以 *EcoRI* 截切後之電泳膠片，以此膠片進行南方雜合反應 (圖 2-2B)，結果顯示十四株 Xcv 菌株和 Xco 84、Xac XW19 皆有 *xopE2* 基因的存在，而 Xcc 70、Xcd A49 則不具有 *xopE2* 基因。大部份的 A 群 Xcv 菌株和 Xco 84 只有一個 copy 的 *xopE2* 基因，而 A 群中的 Xvp169、Xvp182 及 Xvp197 和所有的 B 群菌株則有二個 copy 的 *xopE2* 基因。

根據 da Silva 等人(2002)的文獻指出，來自 *X. axonopodis* pv. *citri* 306 的 *xopE2* (XACb0011，之前命名為 *avrXacE3*)位於 64 kb 的質體上，為了確定 *xopE2* 是否可能存在於質體上，抽取十四株 Xcv 菌株和 Xac XW19 的質體 DNA 進行南方雜合反應，圖 2-2C 結果顯示，B 群菌株和 A 群中的 Xvp169、Xvp182 及 Xvp197 有一個 copy 的 *xopE2* 基因是位於質體上，而對照菌株 Xac XW19 的 *xopE2* 基因也出現在質體上，和 *X. axonopodis* pv. *citri* 306 所述相同 (da Silva et al. 2002)。

2.3.3 A 群 *XopE2* (*XopE2_A*)與 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 *XopE2* 的基因距離 (genetic distance) 較之 B 群 *XopE2* (*XopE2_B*)為近

因為 *xopE2* 存在於本實驗的所有 Xcv 菌株中，為探討究竟此兩群菌株間 *xopE2* 是否有序列之變異來佐證 AFLP 的結果，設計一組 pavrXacE3-F/pavrXacE3-R 引子對，利用 PCR 將十四株 Xcv 的 *xopE2* 進行選殖定序，由 Clustal W program 比對的結果顯示 (圖 2-3)，無論是 A 群或 B 群，各群間所選殖出的 *xopE2*，其胺基酸序列幾乎是

99~100 %一致性 (少數菌株有 1-2 個胺基酸的差異), 而 A 群 (如 Xvt122 XopE2) 和 B 群 (如 Xvt45 XopE2)間也有 93 %一致性。此外, 此十四株 Xcv 菌株皆具有保留性 N-myristoylation motif (G2) 和三元催化胺基酸 (catalytic triad), 這些特色亦存在於 HopX 蛋白家族內 (圖 2-4A; Nimchuk et al., 2007)。利用 NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、vector NTI (Informax) 和 SDSC Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu>)進行同源蛋白胺基酸比對和親源樹狀分析 (圖 2-4A、2-4B), Xcv 85-10 XopE2 和 Xac 306 XopE2、Xcv Xvt122 XopE2、Xcv Xvt45 XopE2 親源關係非常接近, 胺基酸序列分別有 98 %、97 %及 92 %的一致性 (identity); 而 Xcv 85-10 XopE2、Xcv Xvt122 XopE2 及 Xcv Xvt45 XopE2 則與同屬 HopX2 族群的 HopPmaB (*P. syringae* pv. *maculicola*)同源性較遠, 分別為 79 %、78 %及 77 %的一致性; 而 Xcv Xvt122 XopE2、Xcv Xvt45 XopE2 則與 Xcv 85-10 XopE1 的一致性約 62 % 及 61 %。根據 XopE2 親源樹狀分析結果顯示, A 群 Xvt122 與 Xcv 85-10 的基因距離較之 B 群 Xvt45 為近。

2.3.4 以 *xopE2* 兩側基因序列可區分出 *X. campestris* pv. *vesicatoria* A 群和 B 群

根據前人研究指出, 屬於 HopX1 族群的 *avrPphE* 存在於所有的 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 的品系中, 其 DNA 序列的變異能導致菌株對某些寄主大豆植物毒性 (virulence)改變 (Stevens et al. 1998)。為證實 *xopE2* (HopX2 族群)序列之差異是否會造成毒性的改變, 以及瞭解 *xopE2* 座落於 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 基因體上之差異, 本實驗構築了 *X. campestris* pv. *vesicatoria* A 群 (以 Xcv Xvt122 為代表品系) 和 B 群 (以 Xcv Xvt45 為代表品系)的染色體基因庫 (CopyControl™ BAC Cloning Kit, EPICENTRE)。利用菌落雜合法, 以 *xopE2* 為探針從 Xcv Xvt122 基因庫中篩選出內插片段為 8 kb 大小的重組質體 (pNCHU1227)。同法從 Xcv Xvt45 基因庫中篩選出內插片段為 30 kb 大小的重組質體 (pNCHU1226), 以 *EcoRI* 截切可區分出 13 kb、7 kb、5 kb、3.5 kb 及 1.5 kb 等五片段, 以南方雜合法偵測顯示 *xopE2* 落於 13 kb 的片段中, 將此 13 kb 片段以 *EcoRI/EcoRV* 處理後, 次選殖至 pBluescript II SK 載體, 得到

pNCHU1275 和 pNCHU1276。將 pNCHU1227、pNCHU1275 和 pNCHU1276 以 ABI 3700 進行解序 (中興大學生物科技發展中心)。

利用 NCBI BLAST、vector NTI 和 SDSC Biology Workbench 進行序列比對分析，結果顯示於圖 2-5A 與表 2-5，pNCHU1227 (accession no. HM125707) 包含六個完整的轉譯框架 (open reading frame, ORF)，二個不完整的轉譯框架，依序為 Hypothetical protein XCV2276 (incomplete)、Putative secreted protein XCV2277、Pectate lyase precursor XCV2278、Cointegrate resolution protein T (fragment) XCV2279、Avirulence protein XCV2280 (XopE2)、Hypothetical protein XACb0012、Hypothetical protein XCV2282、Hypothetical protein XCV2283 (incomplete)，除了 XACb0012 取代了 XCV2281 外，基因的相似性與組合順序與 Xcv 85-10 幾乎是相同的(Thieme et al., 2005)。而 Xcv Xvt45 *xopE2* 兩側的基因序列和 Xcv Xvt122 明顯不同，如圖 2-5B、表 2-6 所示，pNCHU1275 和 pNCHU1276 (accession no. HM125708) 共包含十三個完整的轉譯框架，二個不完整的轉譯框架，其中十一個轉譯框架可自基因庫中比對到相似的同源基因，四個為新預測的轉譯框架。此外，兩菌株的 *xopE2* 基因上游皆可發現受植物調控的保留性起動子序列 (plant-inducible promoter box, PIP box) 5'-TTCG-N16-TTCG-3' (Fenselau and Bonas 1995)，此兩菌株序列同時也發現具有保留性的 Cointegrate resolution protein T 和 Phage-related integrase 等基因，推測 *xopE2* 可能從其他 *Xanthomonas spp.* 經水平基因轉移方式 (horizontal gene transfer) 而來。

2.3.5 B 群 XopE2 (XopE2_B) 突變株會降低對寄主植物番茄的致病性但 A 群 XopE2 (XopE2_A) 突變株不具影響作用

因 Xcv 85-10 XopE2 可造成 *Solanum pseudocapsicum* 植物的細胞死亡 (Thieme et al., 2007)，為評估 Xcv Xvt122、Xcv Xvt45 兩菌株的 XopE2 與致病性的關係，構築非極性突變之重組質體 pNCHU1301 (圖 2-5A) 和 pNCHU1362 (圖 2-5B)，並以電穿孔法將此重組質體送入 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 菌株後，進行標記置換突變，利用抗生素篩選出置換成功的 *xopE2* 缺失菌株，並以南方雜合法確認是否為正確的突變株。結

果顯示(圖 2-6)，Xcv Xvt122 之染色體 DNA 以 *EcoRI* 處理後，並以 *xopE2* 基因為探針時，Xcv Xvt122 出現 7 kb 的雜合訊號，當以 *nptII* 基因為探針時，突變株會出現約 7.4 kb 的雜合訊號，表示 *nptII* 基因已取代了 *xopE2* 基因。但 Xcv Xvt45 之染色體 DNA 以 *EcoRI* 處理後，並以 *xopE2* 基因為探針時，Xcv Xvt45 於 13 kb 和大於 13 kb 處各出現一條雜合訊號，但突變株在大於 13 kb 處也出現了訊號，表示二個 copy 的 *xopE2* 只剔除了一個 copy，當以 *nptII* 基因為探針時，Xcv Xvt45 於 13 kb 處出現雜合訊號，表示 *nptII* 基因取代了 *xopE2* 基因。Xcv Xvt122 已成功篩選出 *xopE2* 缺失菌株 (Xvt122 Δ xopE2)，但 Xcv Xvt45 只篩選到其中一個 copy 缺失的突變株 (Xvt45 Δ xopE2)，因前述之實驗(圖 2-2C)推論有一個 copy 位於質體上，可能因其上下游的序列不同於染色體上之序列導致無法置換，因此以保留一個 copy 突變株繼續往後之接種實驗。

將 Xcv Xvt122、Xcv Xvt45 野生株及 *xopE2* 缺失株 (Xvt122 Δ xopE2、Xvt45 Δ xopE2) 接種於感病的番茄品系 (*Bonny Best L305*)，觀察其菌落的生長和病徵的發展。由圖 2-7A 結果顯示，Xvt122 Δ xopE2 其病徵的發展趨勢和 Xcv Xvt122 並沒有顯著差別，而在菌數的生長方面，Xcv Xvt122 和 Xvt122 Δ xopE2 菌量從 10^2 至接種第三天已爬升至 10^5 ，接種第九天為 $10^6\sim 10^7$ ，兩菌株沒有差異 (圖 2-7B)。相反地，接種 Xvt45 Δ xopE2 於感病的番茄品系明顯地延遲病徵的發展 (圖 2-7C)，接種一星期後即可觀察到 Xvt45 Δ xopE2 減輕 10%~20% 的病斑，此現象持續至第三星期。觀察菌量之生長，無論野生株或突變株，接種三天後菌量皆急速生長，但 Xvt45 Δ XopE2 菌量數明顯地比 Xcv Xvt45 降低 10 倍 (圖 2-7D)，此抑制效果持續至第九天更為顯著，高達 100 倍之差距。

2.3.6 大量表現 (overexpress) XopE2 蛋白會抑制 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 對寄主植物番茄的毒力性

為評估在兩群菌株中多量表現 XopE2 蛋白是否會改變對寄主的毒力，首先將 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 的 *xopE2* 基因分別構築於廣寄主載體 pBBR1MCS-5，得到的重

組質體 pNCHU1921 (以 XopE2_A 表示) 和 pNCHU1925 (以 XopE2_B 表示) 分別送至 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 野生株內，共可得到四株異質表現 XopE2 的菌株，分別為 Xcv Xvt122/XopE2_A、Xcv Xvt122/XopE2_B、Xcv Xvt45/XopE2_A 及 Xcv Xvt45/XopE2_B。據文獻報告指出 HopX 家族的 effector 蛋白具有保留性三元催化胺基酸 (consensus catalytic triad)，經比對後此保留性胺基酸位於 XopE2 的第 159 個胺基酸 cysteine 和第 211 個胺基酸 aspartic acid (Nimchuk et al., 2007)。此外，利用 PSORT II (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>) 程式預測，XopE2 第 47 個胺基酸 histidine 可能為 His 硫醇蛋白酶胺基酸 (thiol-protease His residue)。為瞭解這幾個胺基酸對 XopE2 的影響，構築單點突變重組質體，以 alaine 取代第 159 個胺基酸 cysteine 和第 47 個胺基酸 histidine，共得到下述重組質體 pNCHU1922 (XopE2_A-H47A)、pNCHU1923 (XopE2_A-C159A)、pNCHU1924 (XopE2_A-H47A/C159A)、pNCHU1926 (XopE2_B-H47A)、pNCHU1927 (XopE2_B-C159A) 及 pNCHU1928 (XopE2_B-H47A/C159A)，同樣的將這些重組質體送至 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 野生株內後進行接種實驗，觀察菌量之生長以評估其致病力。圖 2-8A 結果顯示，大量表現 Xvt122/XopE2_A、Xvt122/XopE2_A-H47A、Xvt122/XopE2_A-C159A、Xvt122/XopE2_A-H47A/C159A，無論是第三天或第六天，其菌量生長明顯地比 Xcv Xvt122 野生株降低 10 倍。表現 Xvt122/XopE2_B、Xvt122/XopE2_B-H47A、Xvt122/XopE2_B-C159A、Xvt122/XopE2_B-H47A/C159A 亦可觀察到相同的生長趨勢(圖 2-8B)。然而，過量表現 Xvt45/XopE2_A、Xvt45/XopE2_A-H47A、Xvt45/XopE2_A-C159A、Xvt45/XopE2_A-H47A/C159A，其菌量生長受生長的現象直到接種第六天才出現(圖 2-8C)，但表現 Xvt45/XopE2_B、Xvt45/XopE2_B-H47A、Xvt45/XopE2_B-C159A、Xvt45/XopE2_B-H47A/C159A，於接種第三天後就出現生長延遲的現象(圖 2-8D)。觀察接種葉片的病徵發展，處理 Xvt122/XopE2_A 或 Xvt122/XopE2_B 的葉片黃化程度明顯比野生株 Xcv Xvt122 輕微(圖 2-8E)。將上述結果作一歸納，過量表現 XopE2 蛋白可降低細菌在植物內之生長和減緩病徵的嚴重性，但第 47 個胺基酸 histidine 或第 159 個胺基酸 cysteine 的突變並不會影響 XopE2 蛋白之效果。

2.3.7 XopE2 蛋白會透過第三型分泌系統抑制過敏性反應發生

為證實 XopE2 具有抑制 *P. syringae* pv. *syringae* 61 (Psy61) 在非寄主作物煙草所引起的過敏性反應，利用農桿菌短暫表現系統表現 XopE2 來進行實驗。首先將 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 的 *xopE2* 基因分別構築於表現載體 pBI121，得到重組質體 pNCHU1201 (XopE2_A) 和 pNCHU1200 (XopE2_B)，將載體 pBI121 和重組質體轉形至 *A. tumefaciens* LBA4404，獲得的菌株標示為 At-pBI121、At-XopE2_A 和 At-XopE2_B。利用接種區域重疊之方式直接觀測過敏性反應的抑制情形。分別將 At-pBI121、At-XopE2_A 和 At-XopE2_B 接種至煙草葉片 *N. tabacum* (圖 2-9A) 和 *N. benthamiana* (圖 2-9B)，24 小時後再以 Psy61 (5×10^6 cfu/ml) 於同一葉片區域作第二次接種，6 天後可觀測到 At-XopE2_A 和 At-XopE2_B 會延遲 Psy61 所引起的過敏性反應，此抑制效果只持續約 12~24 小時。

pHIR11 攜帶一段由 Psy61 所選殖出之 30 kb 片段，含有完整 *hrp/hrc* 基因組及 *hopPsyA*，其產物可組裝第三型分泌系統及含 effector 蛋白 HopPsyA。在 pHIR11 中的 *hopPsyA* 基因產物會在煙草中引發過敏性反應，將 pHIR11 送入 *E. coli* MC4100 菌株中，可在接種的煙草上引發過敏性反應 (Huang et al., 1988; Alfano et al., 1997)。為證實 XopE2 蛋白具有抑制 effector 蛋白 HopPsyA 所引起的過敏性反應，將廣寄主載體 pBBR1MCS-5、pNCHU1921 (XopE2_A) 和 pNCHU1925 (XopE2_B) 送入已帶有 pHIR11 的 *E. coli* MC4100 菌株中，將此三菌株 *E. coli* MC4100(pHIR11+pBBR1MCS-5)、*E. coli* MC4100(pHIR11+XopE2_A)、*E. coli* MC4100(pHIR11+XopE2_B) 以 5×10^8 cfu/ml 接種至煙草葉片 *N. tabacum*，接種 2 天後，*E. coli* MC4100(pHIR11+pBBR1MCS-5) 可出現典型的過敏性反應，但接種 *E. coli* MC4100(pHIR11+XopE2_A) 或 *E. coli* MC4100(pHIR11+XopE2_B) 則無此反應(圖 2-9C)。此外，為瞭解保留性三元催化胺基酸和 His 硫醇蛋白酶胺基酸是否會影響抑制過敏性反應的能力，亦將構築好的突變重組質體送入 *E. coli* MC4100(pHIR11) 中，並作接種試驗觀測之。圖 2-9D 顯示，接種四天後，MC4100(pHIR11/XopE2_A-H₄₇A)、MC4100(pHIR11/XopE2_A-C₁₅₉A)、MC4100(pHIR11/

XopE2_A-H₄₇A/C₁₅₉A)和 MC4100(pHIR11+XopE2_A)的反應相同，也會抑制由 pHIR11 所引發的過敏性反應。歸納結果得知，無論是 A 群或 B 群的 XopE2 蛋白皆會透過第三型分泌系統達到抑制過敏性反應的作用，而且此抑制效果和 47th histidine 或 159th cysteine 是無關的。



2.4 討論

茄科細菌性斑點病是台灣番椒及番茄栽培區之重要病害，尤其在高溫多溼季節時發生更為普遍，主要是由 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 所引起。根據徐氏 (1998) 的研究，此十四株菌株依據澱粉水解及果膠分解活性的有無，可歸類為 *X. campestris* pv. *vesicatoria* A 群 (= *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) 和 *X. campestris* pv. *vesicatoria* B 群 (= *X. vesicatoria*)。本研究利用 AFLP 技術，配合 *TaqI*-GA IR700 和 *MseI*-NN (NN 代表 AC、AG、CA、CT、GA、GT、TC 及 TG) 作為選擇性增幅反應 (selective amplification) 的引子組合，來評估十四株 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 菌株的差異。從建立好的八張 AFLP 圖譜 (圖 2-1 為利用 *TaqI*-GA IR700 和 *MseI*-GA 引子所得到的其中一張圖譜) 顯示，A 群菌株較為多型性，而 B 群菌株則為一致性。選殖其中的一條多型性片段，經比對後與 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 的 *xopE2* 基因是相同的，屬於第三型分泌系統的 effector 蛋白 (Thieme et al., 2007)。於本研究中，發現來自 A、B 群菌株間的 XopE2 蛋白具有以下的特性，(1) 從胺基酸序列和兩側區域的基因組成看來，A、B 群間具有極度差異性，(2) *xopE2* 突變會影響 Xcv B 群菌株對番茄的毒性，(3) 大量表現 A 群或 B 群的 XopE2 蛋白皆能降低細菌的繁殖與病徵的嚴重性，(4) A 群或 B 群的 XopE2 蛋白皆能抑制 *P. syringae* pv. *syringae* 在煙草上引發的過敏性反應。

茄科細菌性斑點病依形態與演化的關係在分類上一直是有爭議的 (Jones et al., 2000)。Stall (1994) 和 Vauterin (1990) 等人依其生理、化學、形態等特性，把 *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) 分為 A 群及 B 群，隨後，A 群菌株重新命名為 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*，而 B 群菌株則修訂為新種 *X. vesicatoria* (Vauterin et al., 1995)。Jones 等人於 2000 年根據更詳細型態鑑定和基因型分類技術，發現 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 菌株間具異質性，又可區分出 A 群和 C 群，C 群重新歸屬於 *X. axonopodis* 的一個病原型稱 *X. perforans* (Jones et al., 2000)。本研究中從 AFLP 分析結果顯示，採用的 A 群供試菌株彼此之間具有遺傳差異性，所以台灣是否也有 C 群菌株的分佈是值得進一步探討的問題。

從本研究所使用 Xcv 兩群的 XopE2 蛋白的胺基酸序列和兩側區域的基因組成看來，Xcv Xvt122 (A 群)和 Xcv Xvt45 (B 群)間具差異性，所以根據 *xopE2* 基因兩側的序列設計適合的引子對，利用 PCR 的技術來區分兩群菌株是值得嘗試的。兩菌群的 *xopE2* 基因附近可發現有 Cointegrate resolution protein T, XCV 2279 (圖 2-5A)或 Phage-related integrase (圖 2-5B)存在，顯示 *xopE2* 基因從其他細菌經水平基因轉移方式 (horizontal gene transfer)而來，此現象從病原性的演化觀點上看來應具有某些特別的意義(Hacker and Kaper, 2000)。例如，某些無毒性基因可經水平基因轉移方式嵌入細菌基因體，因為此基因的存在，有助於其對植物的毒性、病徵發展及繁殖速度造成某些選擇性的優勢 (Alfano and Collmer, 2004; Rohmer et al., 2004)，以 B 群菌株而言，*xopE2* 基因的突變會有毒性降低的效果，正可回應此論點 (圖 2-7C、D)。

來自 *Pseudomonas*、*Ralstonia* 和 *Xanthomonas* 菌屬的 AvrPphE (已被重新命名為 HopX)、XopE1、XopE2 和其他同源蛋白是屬於 HopX 家族蛋白，此家族包含兩個次家族 HopX1 和 HopX2 (Rohmer et al. 2004; Lindeberg et al. 2005; Nimchuk et al., 2007; Thieme et al., 2007)。Xcv 85-10 (=Xcv groupA= *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*)的 XopE1 和 XopE2 其胺基酸有 69% 的一致性，同屬於 HopX2 次家族(Thieme et al., 2007)。本研究中，所有 B 群菌株 (= *X. vesicatoria*)的 *xopE2* 基因不只存在於染色體上，亦存在於質體上(圖 2-2C)，但 A 群菌株中，除了品系 Xvp169、Xvp182 和 Xvp197 外，大部份的菌株都只有位於染色體的一套基因。而根據南方雜合反應，以 *xopE1* 基因當探針，顯示 *xopE1* 基因似乎只存在於 A 群菌株而不存在 B 群菌株。兩菌群之間 *xopE1* 基因存在與否以及質體上是否能獲得 *xopE2* 基因等現象，說明彼此之間的演化可能是由不同的路徑來進行。

本研究中 A 群菌株(Xcv Xvt122)的 *xopE2* 基因 (*xopE2_A*)突變後，並不影響病原菌在感病番茄品種(*Bony Best L305*) 上菌量的生長和病斑的形成。在 Thieme 等人研究中(2007)也發現以 Xcv 85-10 的 *xopE2* 基因突變株接種感病甜椒品種(ECW)對致病力無影響效果，在 *X. campestris* pv. *campestris* 菌株中，與 HopX2 同源的 *avrXccE1* 基因亦

有相同結果 (Castañeda et al., 2005; Thieme et al., 2007)。至於 XopE2_A 和其他同源的基因在毒力上看不出貢獻，此乃因第三型分泌的 effector 蛋白在功能上具有互補性 (functional redundancy) (Alfano and Collmer, 2004, Kay and Bonas, 2009)。B 群菌株(Xcv Xvt45)的 *xopE2* 基因(*xopE2_B*)突變後，雖然含有一套 *xopE2* 在質體上，但仍會降低其在感病番茄品系的增殖能力，意謂著 B 群菌株擁有不同的第三型分泌的 effector 蛋白 (如缺乏 *xopE1* 基因)，或位於質體上的 *xopE2* 基因產物也不能互補位於染色體上的 *xopE2* 基因產物之功能。此外，大量表現兩群的 XopE2 蛋白均能降低細菌在感病寄主的生長量達 10 倍之差，同時減緩病斑的形成(圖 2-8)，此現象和其同源蛋白 AvrPphE 有相似之點，Mansfield 等人於 1997 年曾提出，*P. syringae* pv. *phaseolicola* 不同品系的 AvrPphE 蛋白，其對偶基因(allele)序列的變異會改變其對不同的大豆品種的毒力性，具有“識別變阻器”(recognition rheostat)的特色，“識別變阻器”觀念由 Jones 和 Dangl (1996)等人提出，認為些微的改變能造成功能上的差異(如產生 HR 的反應)，可能和表現蛋白量和是否具活性狀態 (active form)有關，辨認和反應並不只是控制於開關(on/off)，而是量的效應。但發生在 Xcv 和番茄或甜椒上的交互作用上是經由什麼機制目前並不清楚。

目前已發現許多 effector 蛋白能抑制由基因對基因所引發的防禦反應(effector-triggered immunity, ETI)，而造成對親和性或非寄主植物的致病力(Abramovitch et al., 2003; Jamir et al., 2004; Kang et al., 2004; Fujikawa et al., 2006; Cunnac et al., 2009)。ETI 防禦反應截然不同於 PAMP-triggered immunity 防禦反應，ETI 的誘發在於植物的抗性蛋白與病原菌的 effector 蛋白發生辨認，產生局部組織快速壞疽現象，即為程式性細胞死亡，而有效抑制病原菌生長及擴散，也就是所謂過敏性反應(Cunnac et al., 2009)。藉由抑制程式性細胞死亡，如抑制 HopPsyA 所引起的過敏性反應，可使病原菌逃脫因過敏性反應而限制其增生的機制，為成功地存活於寄主中的策略之一(Tsiamis et al., 2000; Abramovitch et al., 2003; Jamir et al., 2004; Kang et al., 2004; Fujikawa et al., 2006)。目前，已有報導指出 HopX 家族具有對 *Nicotiana* spp 引發細胞死亡或抑制程式性細胞死亡的生物功能(Cunnac et al., 2009)。例如，*P. syringae* 的 HopPsyA 蛋白可

誘導植物的抗性表現，而其於菸草及阿拉伯芥細胞所誘導的細胞死亡，即可被 *P. syringae* pv. tomato DC3000 的 HopX1 蛋白所抑制 (Jamir et al., 2004; Guo et al., 2009)。本研究中顯示，來自兩群的 XopE2 蛋白 (XopE2_A 和 XopE2_B) 均能透過第三型分泌系統，進入煙草植物細胞內而抑制 *P. syringae* pv. *syringae* 61 的 HopPsyA 造成的過敏性反應(圖 2-9)；而對 Xcv85-10 而言，XopE1 會造成 *N. benthamiana* 植物細胞的死亡，XopE2 則會引發 *Solanum pseudocapsicum* 植物細胞的死亡 (Thieme et al., 2007)，XopE2 蛋白因在不同的非寄主作物上表現至少兩種的功能，可知其生物功能比預期的複雜。

HopX 家族蛋白屬於具有保留性三元催化胺基酸的 TGase (transglutaminase) 家族 (Makarova et al., 1999; Nimchuk et al., 2007)。將 HopX_{Pph race4} 蛋白中可能的催化胺基酸，包括 C₁₇₉、H₂₁₅ 和 D₂₃₃ 進行突變後，可破壞其對抗病大豆品系(表現 R2 蛋白)的無毒性反應，同時也會抑制其在阿拉伯芥上所造成的細胞死亡。如同 HopX_{Pph race4} 的反應結果，HopX_{Pto DC3000} 和 HopX_{Psy B728a} 在表現 R2 的大豆品系上所造成過敏性反應，也和保留性三元催化胺基酸有關(Nimchuk et al., 2007)。然而，本研究中將 XopE2 蛋白的保留性三元催化胺基酸 (C₁₅₉) 和 His 硫醇蛋白酶胺基酸 (H₄₇) 突變後，仍然保有完整 XopE2 蛋白所具有的功能，依然具有減低對感病植物的致病力和抑制過敏性反應的能力(圖 2-8、圖 2-9)，意謂著 XopE2 蛋白與植物細胞內標靶 (target) 的辨識是不同於 HopX 蛋白，或者是另有其他的 domain 參與其生物功能。Xcv 兩菌群的 XopE2 (XopE2_A 和 XopE2_B) 在 N 端皆具有保留性 N-myristoylation motif，此 N-myristoylation motif 具有趨使 effector 蛋白與寄主細胞膜辨認的功能 (Nimchuk et al., 2000; Shan et al., 2000; Robert-Selaniantz et al., 2006; Thieme et al. 2007)。此 motif 對 Xcv85-10 的 XopJ 蛋白而言，為引發 *N. benthamiana* 植物細胞死亡所必須，相反地，將 XopE1 的第二個胺基酸由 glycine 置換為 alaine，破壞此 N-myristoylation motif 後，卻會加速且加強細胞死亡的反應 (Thieme et al., 2007)。究竟本研究中 XopE2 蛋白的生物功能是否需要此 motif，仍需進一步評估。

表 2-1. 研究中所使用之菌株及質體

Table 2-1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Designation	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH10B	<i>endA1 hsdR17 recA1 relA</i> Δ (<i>argF-lacZYA</i>) <i>UI169</i> Φ 80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>	Life Sciences Technologies (Gaithersburg, MD)
EPI300™	<i>E. coli</i> carrying inducible <i>trfA</i> gene for amplification of high copy number. Used for genomic DNA library.	CopyControl™ BAC Cloning Kit (Epicentre)
MC4100	<i>F</i> <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lacZYA</i>) <i>UI169</i> <i>relA</i> <i>rpsL150</i> <i>flb-5301</i> <i>ptsF25</i> <i>deoC1</i> <i>thi</i> , Sm ^r	Casadaban (1976)
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	Wild type	Life Technologies
<i>X. c. pv. vesicatora</i>		
Xvt12, Xvt28, Xvt48, Xvt122, Xvt185, Xvp169, Xvp182, Xvp186, Xvp194, Xvp197	Wild types isolated from tomato, classified into group A, no amylolytic activity	Hsu (1998)
Xvt45, Xvt46, Xvt147, Xvt148	Wild types isolated from pepper, classified into group A, no amylolytic activity	Hsu (1998)
	Wild types isolated from tomato, classified into group B, amylolytic activity	Hsu (1998)
Plasmids		
pBluescript II SK ⁺	ColE1 <i>mcs-lacZ</i> , Ap ^r	Stratagene
pBBR1MCS-5	A broad host range vector containing <i>lac</i> promoter, compatible to IncP, IncQ, or IncW group plasmids, Gm ^r	Kovach et al. (1995)
pCC1BAC™	Used for construction of genomic DNA library, Cm ^r	Epicentre
pGEM-T easy	T/A cloning vector, Ap ^r	Promega Inc.
pDrive	T/A cloning vector carrying T7 & SP6 RNA polymerase, Km ^r , Ap ^r	Qiagen
pCPP2988	pBluescriptII SK ⁻ carrying 1.5 kb <i>HindIII-SalI</i> terminator-lacking <i>nptII</i> gene fragment from pRZ102	Aflano et al. (1996)
pHIR11	<i>P.s. pv. sringae</i> 61 <i>hrp/hrc/hrmA</i> cluster in pLAFR3, Tc ^r	Huang et al. (1988)
pNCHU1068	1.3 kb <i>pavrXacE3-F/pavrXacE3-R</i> -generated fragment containing <i>xopE2</i> from <i>Xcv</i> Xvt122 cloned in pGEM-T easy	This study
pNCHU1070	1,1 kb <i>pavrXacE3-F/pavrXacE3-R</i> -generated fragment containing <i>xopE2</i> from <i>Xcv</i> Xvt45 cloned in pGEM-T easy	This study
pNCHU1071 ~pNCHU1073	1,1 kb <i>pavrXacE3-F/pavrXacE3-R</i> -generated fragment containing <i>xopE2</i> from <i>Xcv</i> Xvt46, Xvt147, Xvt148 cloned in pGEM-T easy	This study
pNCHU1075 ~pNCHU1084	1,3 kb <i>pavrXacE3-F/pavrXacE3-R</i> -generated fragment containing <i>xopE2</i> from <i>Xcv</i> Xvt12, Xvt28, Xvt48, Xvt185, Xvp169, Xvp182, Xvp186, Xvp194, Xvp197 cloned in pGEM-T easy	This study

pNCHU1200	1.1 kb <i>pavrXacE3-F-XbaI/pavrXacE3-R-SmaI</i> -generated fragment containing <i>xopE2</i> from <i>Xcv</i> Xvt45 cloned in pBI121	This study
pNCHU1201	1.3kb <i>pavrXacE3-F-XbaI/pavrXacE3-R-SmaI</i> -generated fragment containing <i>xopE2</i> from <i>Xcv</i> Xvt122 cloned in pBI121	This study
pNCHU1226	30 kb <i>EcoRI</i> fragment containing <i>xopE2</i> from <i>Xcv</i> Xvt45 cloned in pCC1BAC™	This study
pNCHU1227	7 kb <i>EcoRI</i> fragment containing <i>xopE2</i> from <i>Xcv</i> Xvt122 cloned in pCC1BAC™	This study
pNCHU1275	7.8 kb <i>EcoRI-EcoRV</i> fragment from pNCHU1226 subcloned in pBluescript II SK	This study
pNCHU1276	5.8 kb <i>EcoRI-EcoRV</i> fragment from pNCHU1226 subcloned in pBluescript II SK	This study
pNCHU1229	1 kb pXvt122-8K-7- <i>XbaI-F/pXvt122-8K-7-HindIII-R</i> -generated <i>XbaI-HindIII</i> fragment containing upstream region of <i>xopE2</i> from Xvt122 cloned in pCPP2988	This study
pNCHU1300	0.9 kb pXvt122-8K-7- <i>XhoI-F/pXvt122-8K-7-KpnI-R</i> -generated <i>XhoI-KpnI</i> fragment containing downstream region of <i>xopE2</i> from Xvt122 cloned in pBBR1MCS-5	This study
pNCHU1301	2.5 kb <i>XbaI-XhoI</i> fragment from pNCHU1229 cloned in pNCHU1300, creating Xvt122 <i>xopE2</i> non-polar mutant.	This study
pNCHU1360	1 kb pXvt45852- <i>XhoI-F/Xvt45857-KpnI-R</i> -generated <i>XhoI-KpnI</i> fragment containing downstream region of <i>xopE2</i> from Xvt45 cloned in pBBR1MCS-5	This study
pNCHU1361	1 kb pXvt45857- <i>XbaI-F/pXvt45857-HindIII-R</i> -generated <i>XbaI-HindIII</i> fragment containing upstream region of <i>xopE2</i> from Xvt45 cloned in pCPP2988	This study
pNCHU1362	2.5 kb <i>XbaI-XhoI</i> fragment from pNCHU1361 cloned in pNCHU1360, creating Xvt45 <i>xopE2</i> non-polar mutant.	This study
pNCHU1921 (pNCHU1925)	1.1 kb pXvt45E3-F- <i>XhoI/pXvt45E3-R-XhaI</i> -generated fragment containing <i>xopE2</i> from pNCHU1068 (pNCHU1070) and cloned in pBBR1MCS-5	This study
pNCHU1922 (pNCHU1926)	1.1 kb pXvt45E3-F- <i>XhoI/prH47A-1</i> and <i>prH47A-3/pXvt45E3-R-XhaI</i> -generated XopE2(H47A) fragment from pNCHU1068 (pNCHU107) and cloned in pBBR1MCS-5	This study
pNCHU1923 (pNCHU1927)	1.1 kb pXvt45E3-F- <i>XhoI/prC159A-1</i> and <i>prC159A-3/pXvt45E3-R-XhaI</i> -generated XopE2(C159A) fragment from pNCHU1068 (pNCHU107) and cloned in pBBR1MCS-5	This study
pNCHU1924 (pNCHU1928)	1.1 kb pXvt45E3-F- <i>XhoI/prC159A-1</i> and <i>prC159A-3/pXvt45E3-R-XhaI</i> -generated XopE2(H47AC159A) fragment from pNCHU1914 (pNCHU1918) and cloned in pBBR1MCS-5	This study

表 2-2. 研究中所使用之引子

Table 2-2. Primers used in this study

Primer	Sequence	Restriction enzyme
pavrXacE3-F	5'-GTGAGGCGAAGCGAAGCGGA-3'	
pavrXacE3-R	5'-TCACCAACTCAAGGGGGGC-3'	
pavrXacE3-F- <i>Xba</i> I	5'-AGCCTCTAGAACCATGGGGCGGAGCGAA-3'	<i>Xba</i> I
pavrXacE3-R- <i>Sma</i> I	5'-ATTCACCCCGGTTTCACCAACTCAAGGG-3'	<i>Sma</i> I
pXvt122-8K-7- <i>Xba</i> I-F	5'-ATCGCCTCTAGACATGCGATGGAGAACC-3'	<i>Xba</i> I
pXvt122-8K-7- <i>Hind</i> III-R	5'-GCGATGAAGCTTTCGAGTTCGCCAACGG-3'	<i>Hind</i> III
pXvt122-8K-7- <i>Xho</i> I-F	5'-TGACGCTCGAGCAAGCCGGATGAGCG-3'	<i>Xho</i> I
pXvt122-8K-7- <i>Kpn</i> I-R	5'-GGCCGGTACCGCCTGGACGAACCTCG-3'	<i>Kpn</i> I
pXvt45857- <i>Xba</i> I-F	5'-GCGGTCTAGACCGTTTGCCGAGCTG-3'	<i>Xba</i> I
pXvt45857- <i>Hind</i> III-R	5'-CCGAAAGCTTGGCTGGGATGGCGAAG-3'	<i>Hind</i> III
pXvt45852- <i>Xho</i> I-F	5'-GACGCTCGAGTAAACCGGATGAGCG-3'	<i>Xho</i> I
pXvt45857- <i>Kpn</i> I-R	5'-TGGCGGTACCGATCAACGCAACCTTG-3'	<i>Kpn</i> I
pXvt45-E3-F- <i>Xho</i> I	5'-CGCCACTCGAGCCTCTACAGTCACTG-3'	<i>Xho</i> I
pXvt45-E3-R- <i>Xba</i> I	5'-GGTTTTCTAGAGCGTCACCAACTCAAG-3'	<i>Xba</i> I
prH47A-1	5'-CACCAAGCCAGCCAGGCTGGGTG-3'	
prH47A-3	5'-CACCCAGCCTGGCTGGCTTGGTG-3'	
prC159A-1	5'-TGTGGTCAGCGTTGCCTGCC-3'	
prC159A-3	5'-GGCAGGCAACGCTGACCACA-3'	



表 2-3. 研究中所使用之 *Xanthomonas* 菌株

Table 2-3. List of *Xanthomonas spp.* used in this study

Strains	Host	Region	Race
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vestriectoria</i> (Xcv) Group A: non-amylolytic			
Xvt-12	Tomato5138	Taichung	T1 P8
Xvt-28	Tomato	Furan Co	T1 P1
Xvt-48	Tomato	Nantou	T1 P2
Xvt-122	Tomato	Pingtung	T1 P3
Xvt-185	Tomato(ASVEG 5)	Hsinchu	T1 P7
Xvp-169	Queen Star	Nantou	T1 P3
Xvp-182	Pepper	Hualien	T1 P8
Xvp-186	Pepper	Hualien	T1 P1
Xvp-194	H. Pepper	Tainan	T1 P7
Xvp-197	H. Pepper	Tainan	T1 P2
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vestriectoria</i> (Xcv) Group B: amylolytic			
Xvt-45	Tomato	Nantou	T2 P0
Xvt-46	Tomato	Nantou	T2 P0
Xvt-147	Tomato	Nantou	T2 P0
Xvt-148	Tomato	Nantou	T2 P0
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Xcc)			
Xcc 70	cabbage	Changhuwa	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>diffenbachiae</i> (Xcd)			
Xcd A49	Anthrium	Tainan	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> (Xco)			
Xco 84	rice	Nantou	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (Xac)			
Xac XW19	Valencia orange	Taiwan	

表 2-4. AFLP 片段分析

Table 2-4. Similarities at the protein level between AFLP fragment sequences and the sequences in genebank.

AFLP fragments	Size (bp)	Matching sequence from the database	Origin of matching sequence and accession no.	% Similarity (BLASTX Evalue)
Xvt12-1	262	none		
Xvt48-3	186	type I site-specific deoxyribonuclease (modification subunit)	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_362244	98 % (6e-24)
Xvt122-4	271	avirulence protein AvrXacE3	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306, AAM39657	85 % (2e-15)
		XopE2	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, CAJ23957	92 %
Xvt148-6	190	none		
Xvp186-8	244	none		
Xvp197-10	232	putative transposase for transposon Tn5044/Tn3926	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a, YP_001972246	100 % (5e-23)

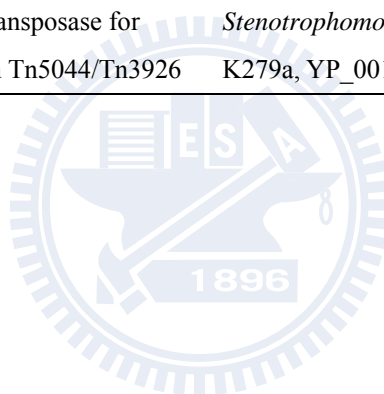


表 2-5. 茄科細菌性斑點病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Xvt122 *xopE2* 基因及相鄰基因序列分析

Table 2-5. The gene products encoded by the insert of pNCHU1227 cloned from *Xcv* Xvt122 showing the highest similarity with the matching sequences in genbank.

Gene products encoded by the insert in pNCHU1227	Size (a.a)	Origin of matching sequence and accession no.	% Similarity (BLASTX E value)
Hypothetical protein XCV2276 (incomplete)	52/122	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364007, CAJ23953	98% (7e-19)
Putative secreted protein XCV2277	192	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364008, CAJ23954	100% (6e-97)
Pectate lyase precursor XCV2278	440	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364009, CAJ23955	100% (0)
Cointegrate resolution protein T (fragment) XCV2279	206	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364010, CAJ23956	100% (1e-78)
Avirulence protein XCV2280 (XopE2)	358	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364011, CAJ23957	98% (7e-173)
Hypothetical protein XACb0012	59	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , YP_364012, AAM39258	88% (3e-22)
Hypothetical protein XCV2282	308	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364014, CAJ23959	100% (1e-175)
Hypothetical protein XCV2283 (incomplete)	228/708	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364014, CAJ23960	100% (5e-108)

表 2-6. 茄科細菌性斑點病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Xvt45 *xopE2* 基因及相鄰基因序列分析

Table 2-6. The gene products encoded by the insert of pNCHU1275 and pNCHU1276 cloned from Xcv Xvt45 showing the highest similarity with the matching sequences in genbank.

Gene products encoded by the insert in pNCHU1275 and pNCHU1276	Size (a.a)	Origin of matching sequence and accession no.	% Similarity (BLASTX E value)
DNA-methyltransferase (incomplete)	88/283	<i>Vibrio alginolyticus</i> 12G01, ZP_01262465, EAS74231	60% (1e-18)
Phage-related integrase	292/337	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14, ZP_05136433, EED40494	70% (1e-128)
Conserved hypothetical protein	74/76	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14, YP_002708994, EED37125	60% (7e-17)
XcvXvt45-1			
Hypothetical protein XALc_0184	99/96	<i>Xanthomonas albilineans</i> , YP_003374716, CBA14730	55% (6e-18)
XcvXvt45-2			
Avirulence protein XCV2280 (XopE2)	358/358	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364011, CAJ23957	91% (2e-172)
Hypothetical protein XACb0012	57/58	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306, NP_644740	63% (3e-06)
Cointegrate resolution protein T (fragment)	33/206	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364010	75% (9e-05)
Hypothetical protein SSKA14_4431	53/52	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14, YP_002028903, ACF52220	52% (2e-11)
Hypothetical protein XF2127	175/339	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c, NP_299406, AAF84926	40% (2e-20)
Hypothetical protein XF2126	70/81	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c, NP_299405, AAF84925	59% (4e-12)
XcvXvt45-3			
XcvXvt45-4			
Hypothetical protein XALc_0195	142/175	<i>Xanthomonas albilineans</i> , YP_003374727, CBA14740	60% (3e-45)
Putative primase	803/804	<i>Stenotrophomonas</i> phage S1, YP_002321451, ACJ24725	76% (0)
Hypothetical protein StPS1_gp2	92/116	<i>Stenotrophomonas</i> phage S1, YP_002321452, ACJ24726	40% (0.004)
Putative terminase small subunit	195/214	<i>Stenotrophomonas</i> phage S1, YP_002321453, CAJ24727	53% (3e-39)

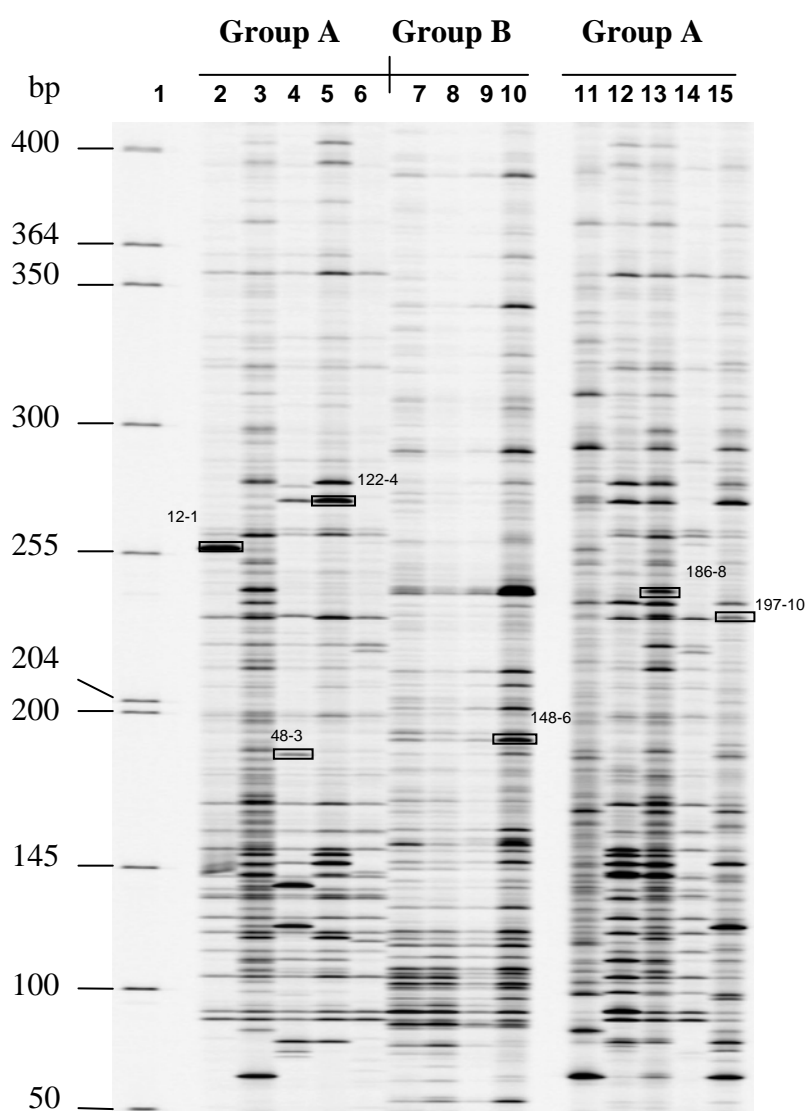


圖2-1. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 菌株之AFLP分析圖譜

Fig. 2-1. AFLP fingerprints of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. The genomic DNA isolated from each of the bacteria was digested with *EcoRI/MseI* and then subjected to PCR using primers IR700/MseI-GA and IR700/Mse-GT. Lanes 1: DNA marker; 2 to 15: Xvt12, Xvt28, Xvt48, Xvt122, Xvt185, Xvt45, Xvt46, Xvt147, Xvt148, Xvp169, Xvp182, Xvp186, Xv194, and Xvt197. The six polymorphic bands isolated for sequence determination are marked with rectangles.

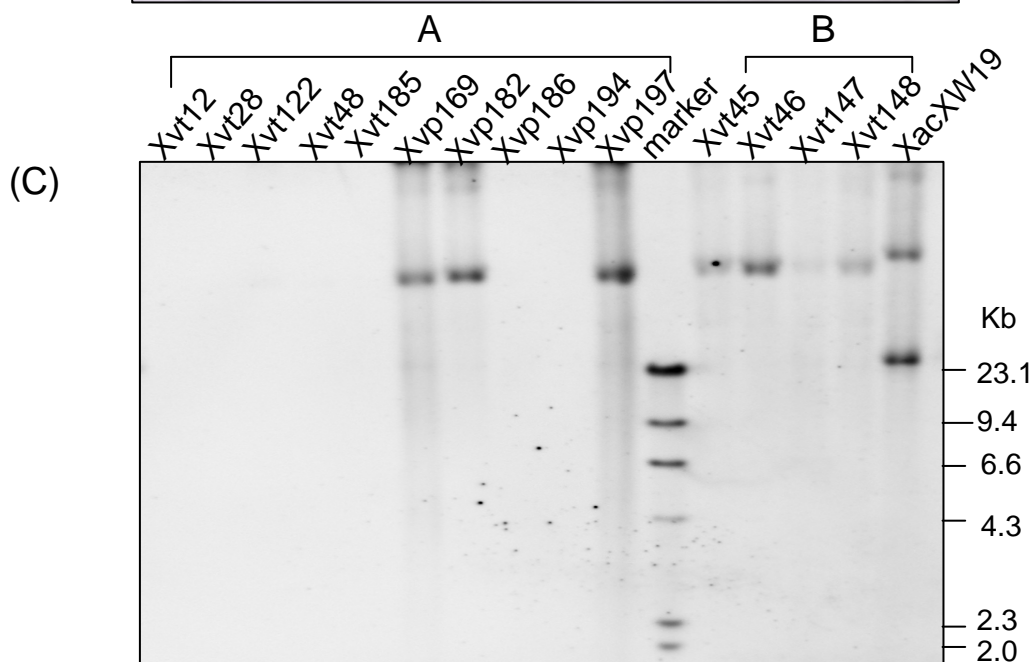
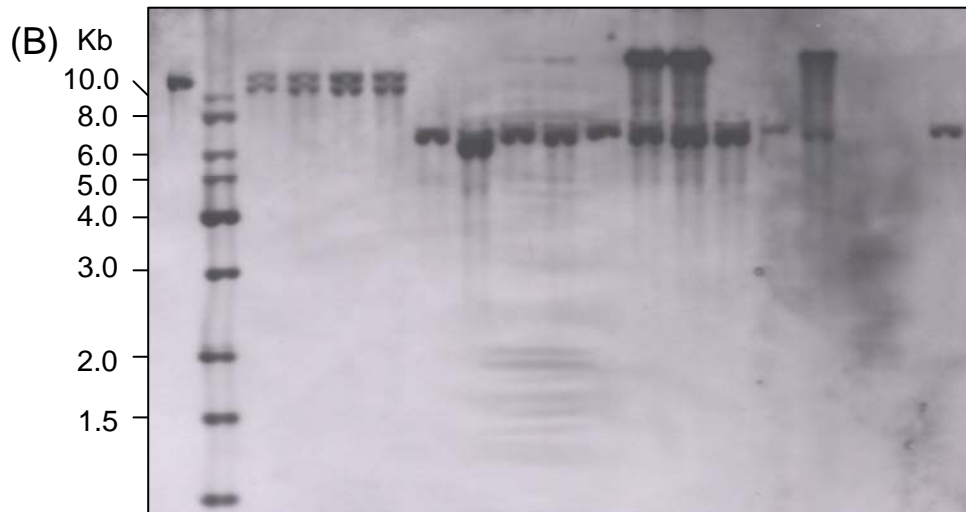
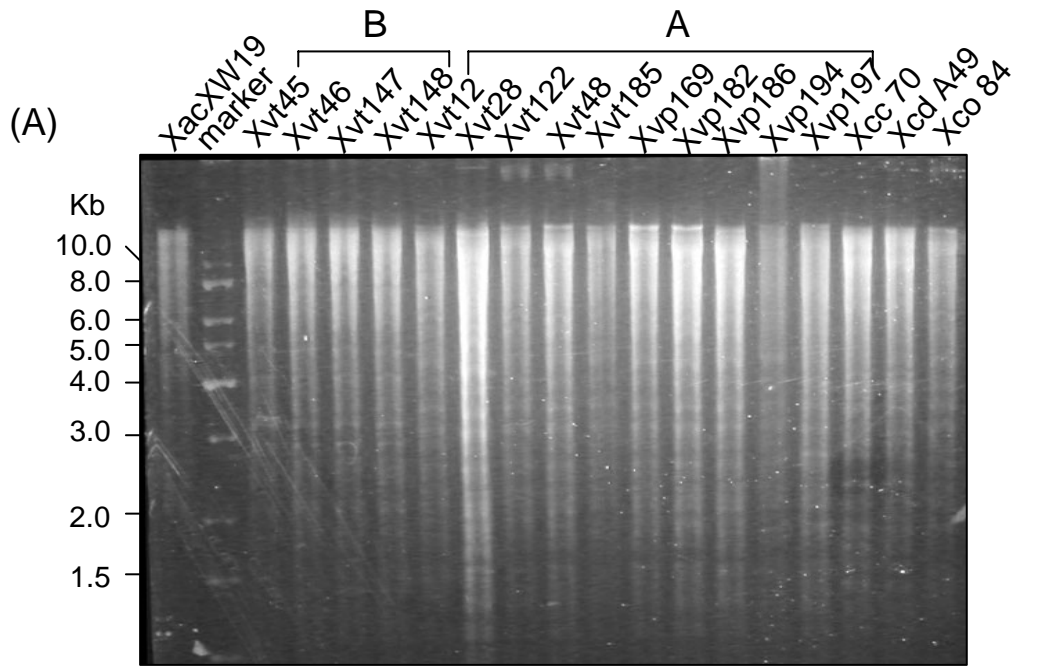


圖2-2. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 菌株(A)染色體DNA以EcoRI截切後之電泳分析圖，(B)上述之電泳膠片進行南方雜合分析，(C)抽取質體DNA進行南方雜合分析，(B)(C)探針為Dig-labeled XopE2

Fig. 2-2. Southern blot analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. The genomic DNA was isolated, subjected to *Eco*RI digestion, separated on 1% agarose gel, and the gel stained with ethidium bromide (A) or subjected to Southern blot hybridization with the Dig-labeled *XopE2* (B). Lane 1, XacXW19 (*X. axonopodis* pv. *citri* XW19); Lane 2, 1-Kb ladder; Lanes 3-19, XcvXvt45, Xvt46, Xvt147, Xvt148, Xvt12, Xvt28, Xvt48, Xvt122, Xvt185, Xvp169, Xvp182, Xvp186, Xvp194, Xvp197, Xcc70 (*X. c.* pv. *campestris* 70), XcdA49 (*X. c.* pv. *diffenbachiae* 49), and Xco84 (*X. c.* pv. *oryzae* 84) respectively. (C) The plasmid DNA was isolated, separated on 0.7 % agarose gel, and hybridized with the Dig-labeled *XopE2*. Lanes 1-10, XcvXvt12, Xvt28, Xvt48, Xvt122, Xvt185, Xvp169, Xvp182, Xvp186, Xvp194, and Xvp197; 11, λ /HindIII DNA marker; Lanes 12-16, Xvt45, Xvt46, Xvt147, Xvt148, and XacXW19.

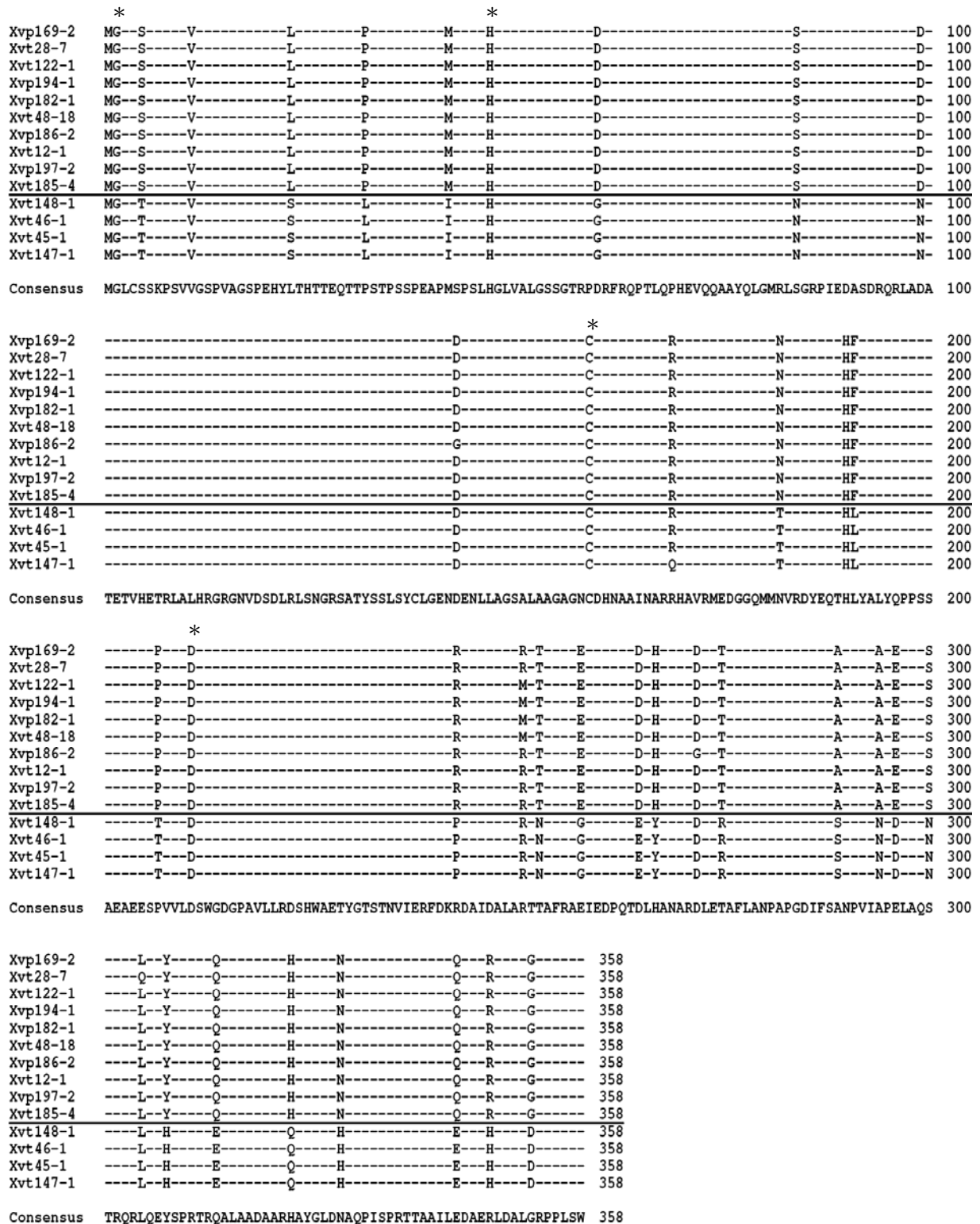


圖2-3. 十四株 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 菌株其 XopE2 胺基酸序列比對

Fig. 2-3. Multiple alignment of the amino acid sequence of XopE2 from 14 *Xcv* strains. The complete consensus sequence were shown in “-“. This alignment was made by using CLUSTAL W program. Symbol asterisk indicated N-myristoylation motif (G2), consensus catalytic triad, C159, D211 (Nimchuk et al., 2007) and Thiol_Protease_His residue (H47) based on PSORT II prediction.

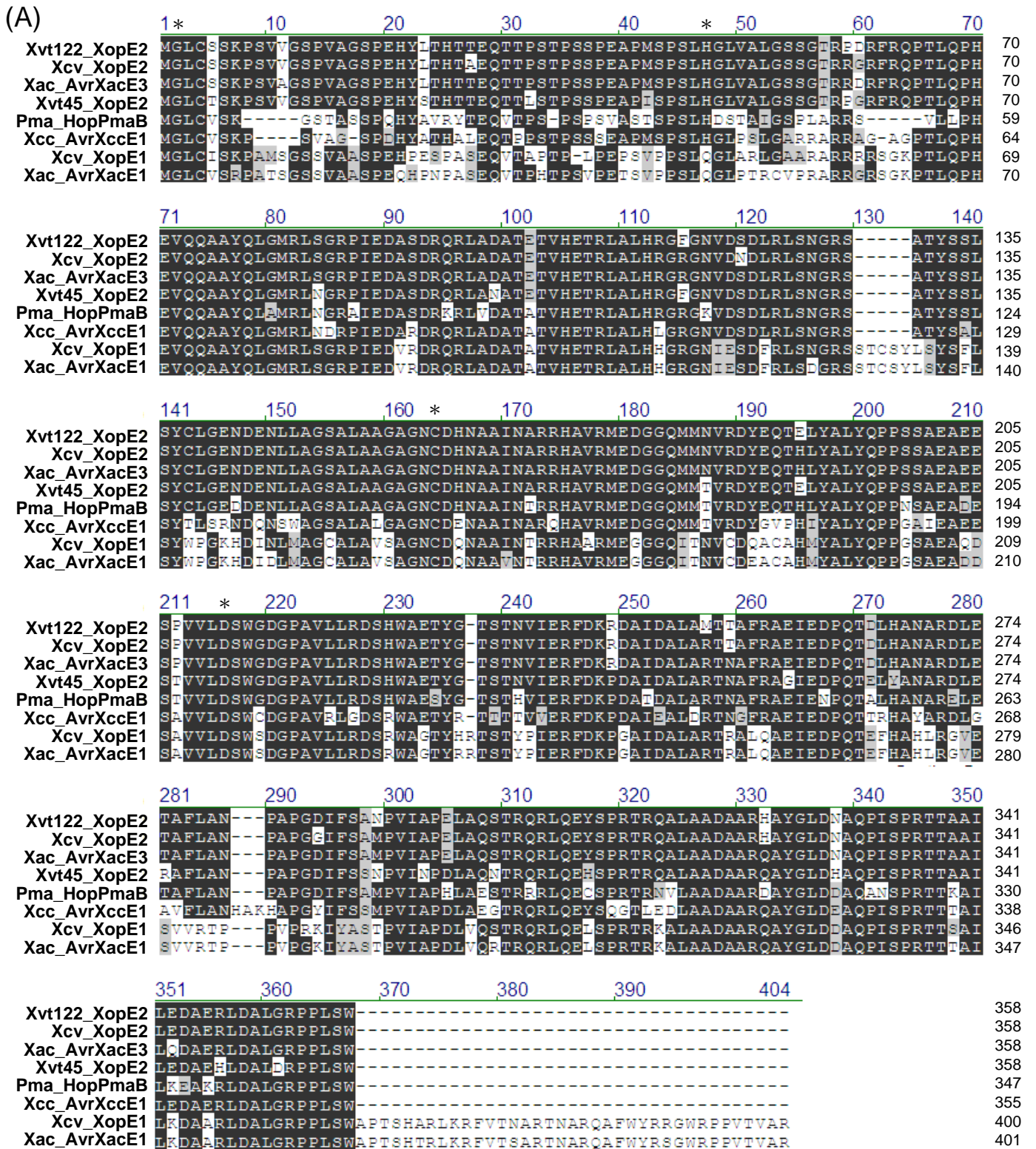
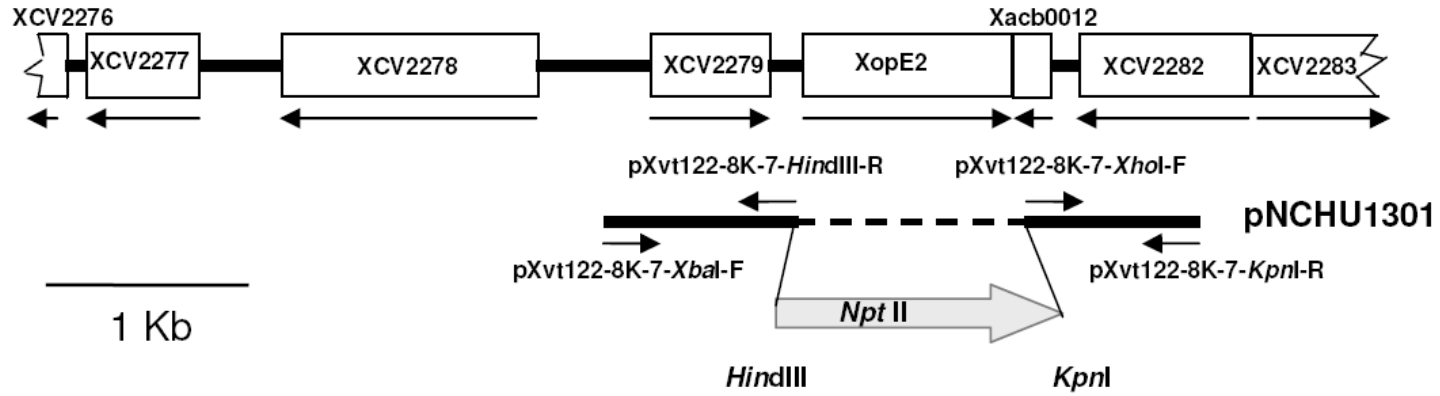


圖2-4. Xcv Xvt122 XopE2和 Xcv Xvt45 XopE2與其同源蛋白之胺基酸序列比對(A)及樹狀親源關係分析(B)

Fig. 2-4. Sequence comparison between XopE2 and its homologues. (A) Amino acid sequence alignment of XopE2 and its homologues according to CLUSTAL W. The conserved residues are highlighted and the GenBank accession numbers for the following proteins are CAJ23957 (Xcv XopE2, *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10), AAM39257 (Xac AvrXacE3, *X. axonopodis* pv. *citri* 306), AAL84240 (Pma HopPmaB, *P. syringae* pv. *maculicola*), AAM40923 (Xcc AvrXccE1, *X. c.* pv. *campestris* ATCC33913), CAJ21925 (Xcv XopE1, *X. c.* pv. *vesicatoria* 85-10), AAM35178 (Xac AvrXacE1, *X. axonopodis* pv. *citri* 306). The asterisk indicates the N-myristoylation motif (G2), the consensus catalytic triad, C159, D211 (Nimchuk et al., 2007) and the Thiol-Protease His residue (H47) based on PSORT II prediction. (B) Phylogenetic analysis using vector NTI (Informax). Each of the horizontal branched distance is proportional to the estimated numbers of amino acid substitutions.

(A)

pNCHU1227



(B)

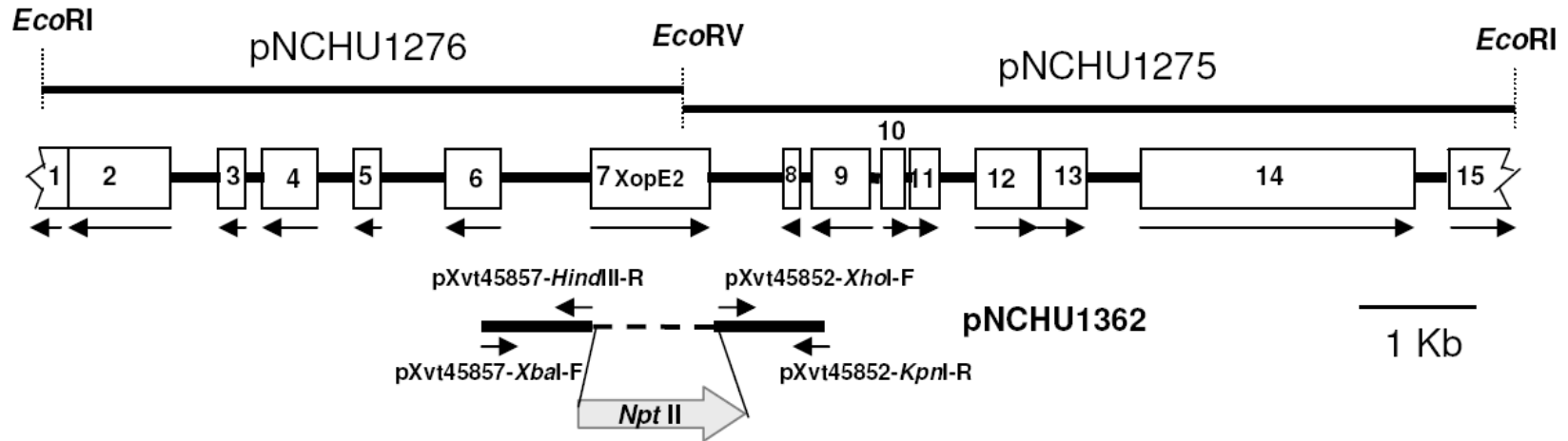


圖2-5. 茄科細菌性斑點病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (A)Xvt122
(B)Xvt45 *xopE2* 基因及相鄰片段之基因組成

Fig. 2-5. Organization of *xopE2* gene and its neighboring genes. (A) The insert from Xcv Xvt122 cloned into pNCHU1227 contains the *xopE2* and its flanking genes including an incomplete XCV2276 (Hypothetical protein), XCV2277 (Putative secreted protein), XCV2278 (Pectate lyase precursor), XCV2279 (Cointegrate resolution protein T), XCV2280 (XopE2), XACb0012 (Hypothetical protein), XCV2282 (Hypothetical protein), and incomplete XCV2283 (Hypothetical protein). (B) The *xopE2* and the flanking genes of Xcv Xvt45 encoded on pNCHU1275 and pNCHU1276 are shown. The ORFs are: 1, DNA-methyltransferase (*Vibrio alginolyticus* 12G01); 2, Phage-related integrase (*Stenotrophomonas* sp. SKA14); 3, Conserved hypothetical protein (*Stenotrophomonas* sp. SKA14); 4, Hypothetical protein Xvt45-1 (Xcv Xvt45); 5, Hypothetical protein XALc0184 (*X. albilineans*); 6, Hypothetical protein Xvt45-2 (Xcv Xvt45); 7, XopE2 (Xcv 85-10); 8, Hypothetical protein SSKA14_4431 (*Stenotrophomonas* sp. SKA14); 9, Hypothetical protein XF2127 (*Xylella fastidiosa* 9a5c); 10, Hypothetical protein XF2126 (*X. fastidiosa* 9a5c); 11, Hypothetical protein Xvt45-3 (Xcv Xvt45); 12, Hypothetical protein Xvt45-4 (Xcv Xvt45); 13, Hypothetical protein XALc0195 (*X. albilineans*); 14, Putative primase (*Stenotrophomonas* phage S1); 15, Putative terminase small subunit (*Stenotrophomonas* phage S1). The arrows show the direction of transcription of the ORF. The construction maps for nonpolar mutations of the *xopE2* genes of Xvt122 and Xvt45 are also shown below the gene organization maps.

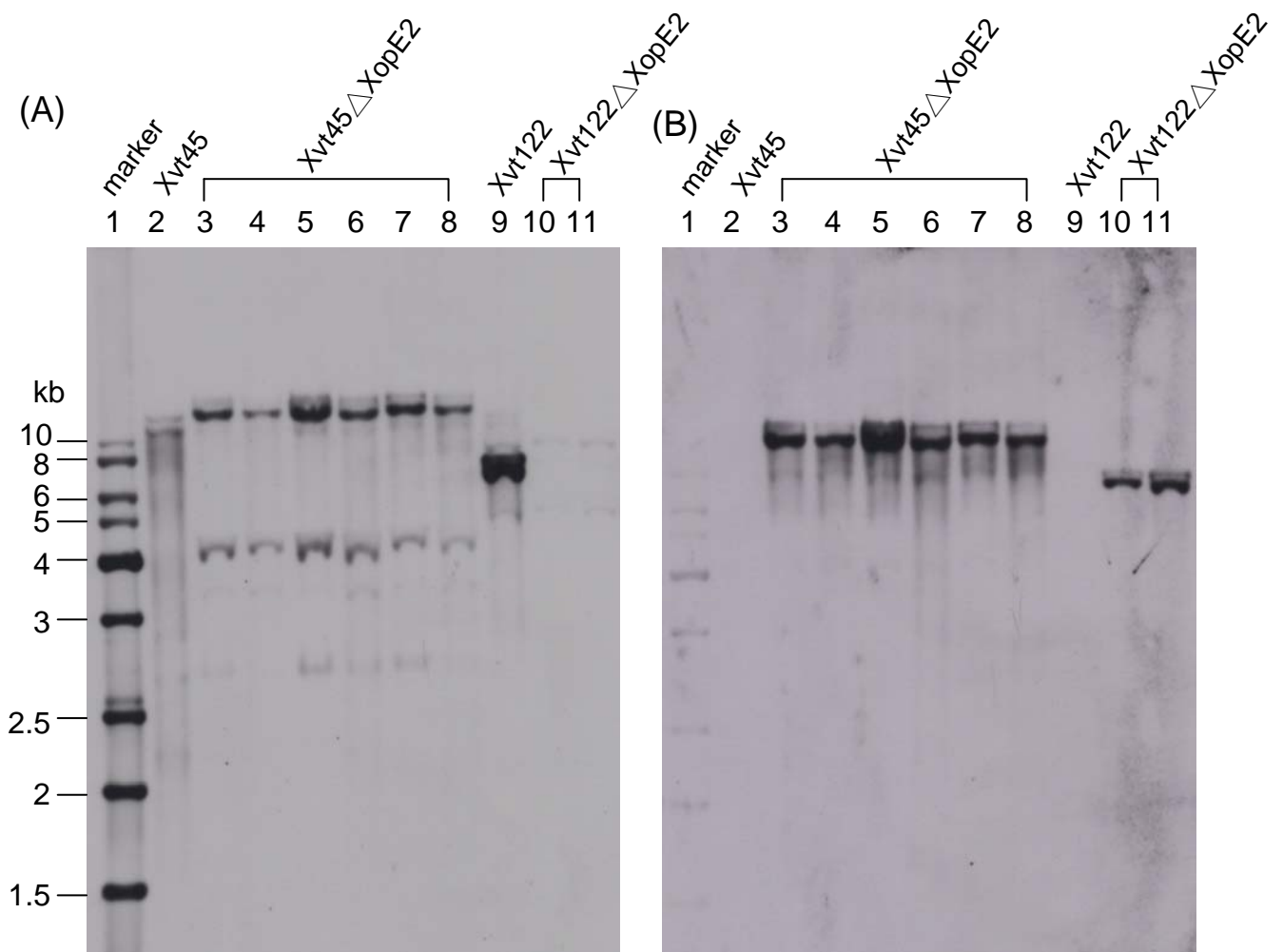


圖2-6.南方雜合法確認Xcv Xvt122 *xopE2*和Xcv Xvt45 *xopE2*基因缺失株 (Xcv Xvt122 Δ XopE2 和Xcv Xvt45 Δ XopE2)

Fig. 2-6. Southern hybridization analysis. *EcoRI*-digested genomic DNAs of Xcv Xvt122, Xcv Xvt122 *xopE2* mutant, Xcv Xvt45, Xcv Xvt45 *xopE2* mutant were separated on 1% agarose gel, and hybridized with Dig-labeled probe (A) *xopE2* (B) *nptII*. Lane 1, 1-Kb ladder; Lanes 2, XcvXvt45, Lanes 3-8, Xcv Xvt45 *xopE2* mutant, Lanes 9, XcvXvt122, Lanes 10-11, Xcv Xvt122 *xopE2* mutant, respectively.

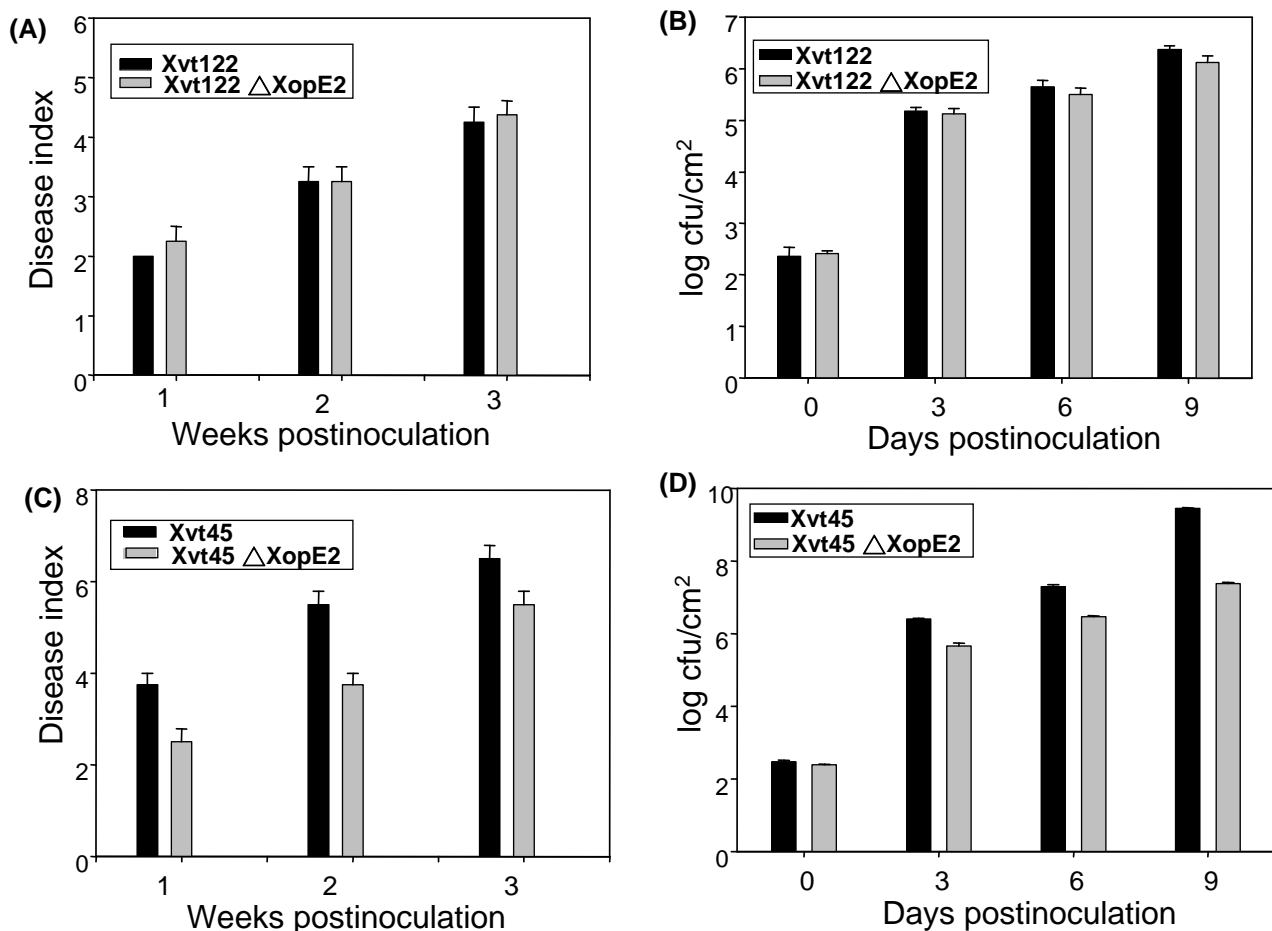
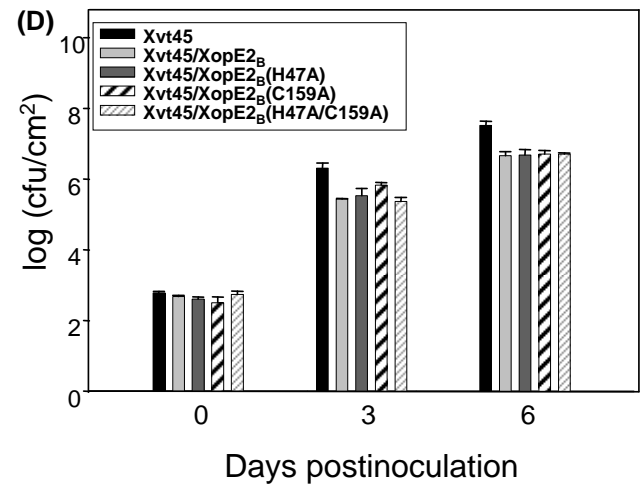
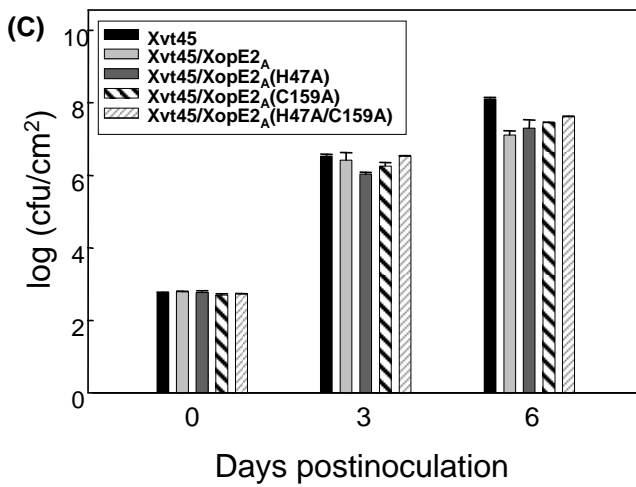
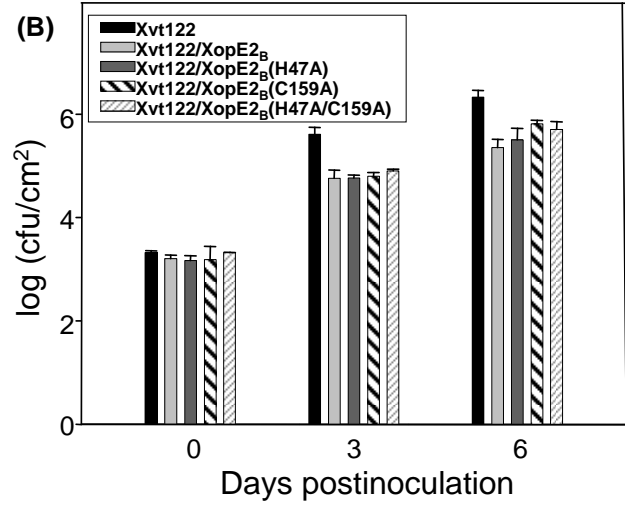
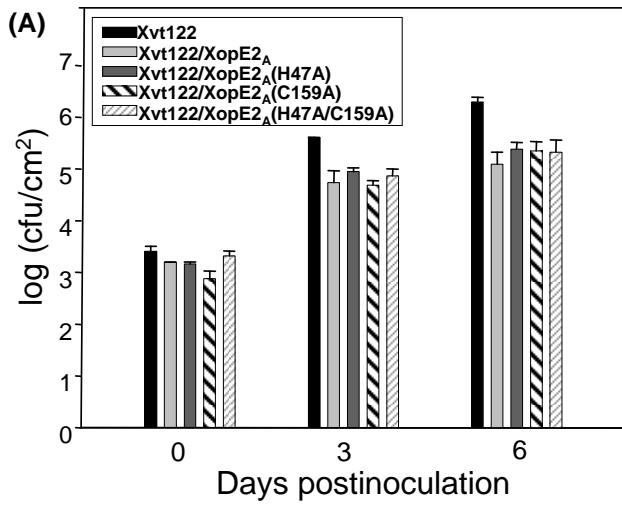


圖2-7. *Xcv* Xvt122和*Xcv* Xvt45 及其*xopE2*基因缺失株(*Xcv* Xvt122 Δ XopE2 和*Xcv* Xvt45 Δ XopE2)對寄主植物番茄的病徵發展和菌量生長之影響

Fig. 2-7. Symptom development and the bacterial growth on tomato leaves. (A)(C) Leaves of tomato cultivar *Bony Best L305* were dipped into 10^8 cfu/ml of bacteria culture and the disease symptom formation was scored following the rule described in the Materials and Methods. The disease index was the mean of the analysis of four independent plants. (B)(D) The tomato leaves were infiltrated with 10^4 cfu/ml of bacteria suspension, and the growth was quantified at 0, 3, 6, 9 days after inoculation. The bacterial growth was determined as the mean of the bacterial number obtained from three independent plants. The experiments were repeated three times with similar results.



(E)



10mM MgCl₂



Xvt122



Xvt122/XopE2_A



Xvt122/XopE2_B

圖2-8. 大量表現XopE2蛋白能抑制菌株在寄主植物番茄上菌量之生長

Fig. 2-8. The overexpression of XopE2 suppressed the formation of symptom and bacterial growth on tomato leaves. The expression plasmids carrying XopE2_A (pNCHU1921) or the XopE2A with site-directed mutation XopE2_A-H47A (pNCHU1922), XopE2_A-C159A (pNCHU1923), or XopE2_A-H47A/C159A (pNCHU1924) were used to transform *Xcv* Xvt122 (group A) or *Xcv* Xvt45 (group B). The XopE2_B expressing plasmids including pNCHU1925, pNCHU1926 (XopE2_B-H47A), pNCHU1927 (XopE2_B-C159A), and pNCHU1928 (XopE2_B-H47A/C159A) were also transformed into *Xcv* Xvt122 (group A) and *Xcv* Xvt45 (group B) individually. Bacterial growth was determined at 0, 3, 6 days after tomato leaves were inoculated with 10⁵ cfu/ml Xvt122 or the derivative strains (A)(B), or with 5 x 10⁴ cfu/ml of Xvt45 and the derivative strains (C)(D). The leaves were photographed 3 weeks after inoculation (E). The experiments were carried out twice and similar results were obtained.

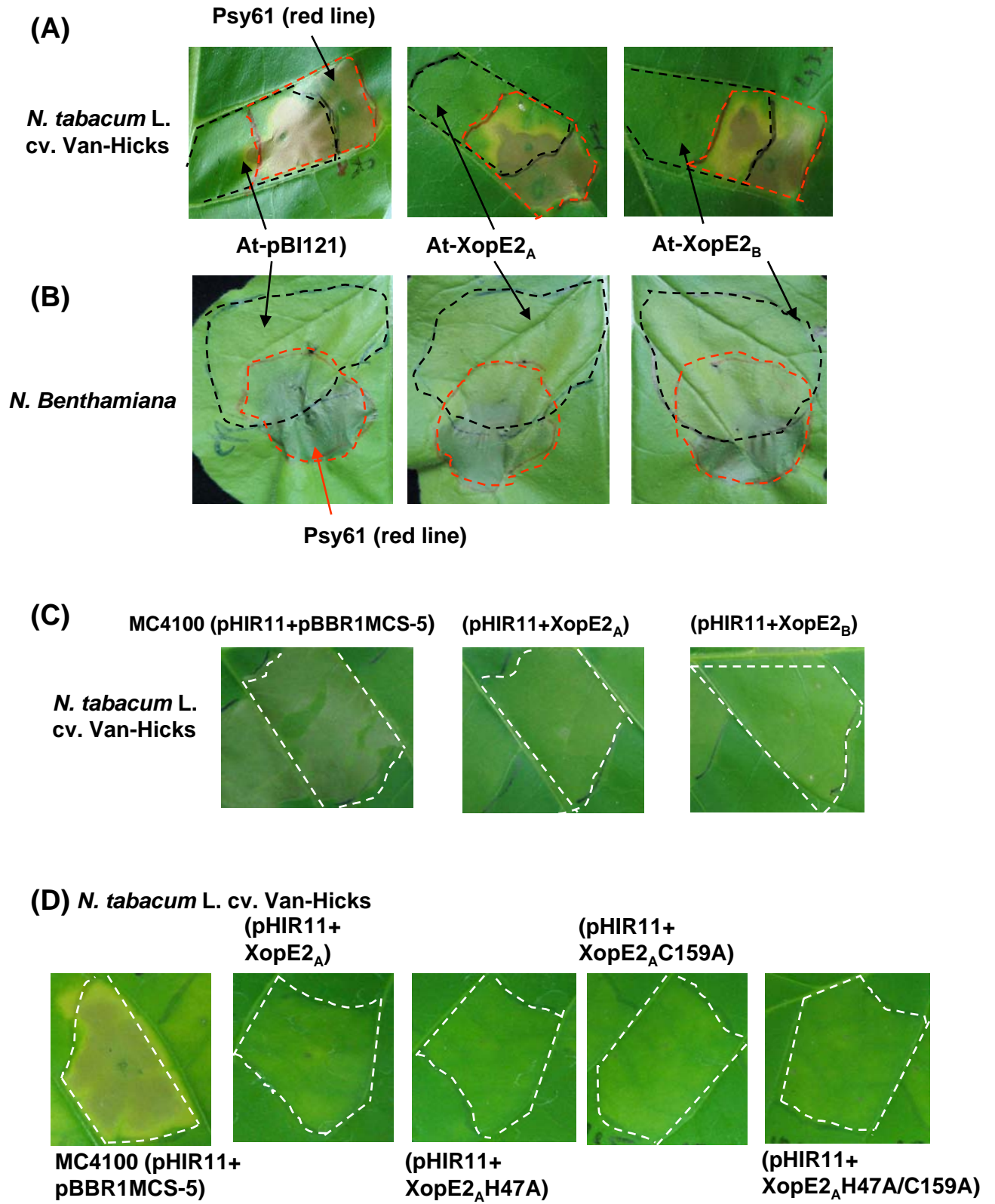


圖2-9. Xcv Xvt122 XopE2 (XopE2_A) 和 Xcv Xvt45 XopE2 (XopE2_B) 抑制HopPsyA所誘發的過敏性反應

Fig. 2-9. Suppression of the HR by the XopE2 of Xcv Xvt122 or Xcv Xvt45. The *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 carrying pBI121 or *xopE2* expressing plasmids was injected into the leaf of *Nicotiana tabacum* L. cv. Van-Hicks (A) or *N. benthamiana* (B) and the infiltrated areas were encircled with black dashed line. The leaves was challenged with 5×10^6 cfu/ml of *P. syringae* pv. *syringae* 61 (Psy61) 24 h after the infiltration. The second infiltrated sites were encircled with red dashed lines and photographs were taken six days after the challenge inoculation. (C) The tobacco leaves were infiltrated with 5×10^8 cfu/ml of *E. coli* MC4100(pHIR11/pBBR1MCS-5), MC4100(pHIR11/ XopE2_A), and MC4100(pHIR11/ XopE2_B) respectively and photographs were taken 48 h after the inoculation. (D) The tobacco leaves were infiltrated with 5×10^8 cfu/ml of *E. coli* MC4100(pHIR11/pBBR1MCS-5), MC4100(pHIR11/ XopE2_A); MC4100(pHIR11/XopE2_A-H47A), MC4100(pHIR11/ XopE2_A-C159A), and MC4100(pHIR11/XopE2_A-H47A/C159A) individually, and photographs were taken four days after the inoculation. The experiments were repeated three times with similar results.

第三章、選殖茄科細菌性斑點病菌第四型分泌系統

及探討 VirB4 與 VirB11 蛋白與毒力的關係

3.1 前言

革蘭氏陰性動植物病原細菌可利用不同的分泌系統，將大分子注射至寄主細胞而引發疾病的產生；這些分子通常是蛋白質，但有些則是核酸與蛋白質的複合體 (Hueck, 1998; Christie, 2001; Büttner and Bonas, 2002; Economou, et al., 2006)。其中第三型分泌系統 (Type III secretion system, T3SS) 已被証實廣泛存在於許多革蘭氏陰性動植物病原細菌中，如 *Yersinia*、*Shigella*、*Salmonella*、*enteropathogenic*、*Escherichia coli*、*Chlamydia*、*Pseudomonas*、*Erwinia*、*Xanthomonas*、*Ralstonia* 及 *Rhizobium* 等菌屬中 (Hueck, 1998)。其組成胞器在動植物病原菌中具有高度保留性，可形成類似鞭毛的結構 (Plano, et al., 2001)，以穿透式電子顯微鏡觀察動物病原細菌 *Y. enterocolitica* 可見菌體表面延伸出針狀複合體 (Needle complex) (Cornelis, 2006)。第四型分泌系統 (Type IV secretion system, T4SS) 其組成及功能則明顯不同於第三型分泌系統，依功能可將第四型分泌系統分為兩系統：(1)接合性第四型分泌系統 (Conjugative T4SS, cT4SS)，具有水平式基因轉移的功能，如質體 F (IncF), RP4 (IncP), R388(IncW)和 pKM101 (IncN)；(2)病原性第四型分泌系統 (Pathogenic T4SS, pT4SS)，藉由有效蛋白傳送 (Effector translocators)或 DNA 吸收與釋放 (DNA uptake and release)，傳送毒力因子而感染真核宿主細胞 (Cascales and Christie, 2003；Backert and Meyer, 2006)。例如 *Bordetella pertussis* (Covacci and Rappuoli, 1993)、*Helicobacter pylori* (Stein et al., 2000)、*Legionella pneumophila* (Vogel and Isberg, 1999)。

利用第四型分泌系統造成病害的植物病原菌，除了 *Agrobacterium tumefaciens* 利用 VirB/D4 系統將腫瘤基因送進植物細胞而造成腫瘤 (crown-gall tumors) 為最典型的例子，顯少有關於其他植物病原菌 T4SS 的研究報告 (Zhu et al. 2000)。*A. tumefaciens* 的 VirB/D4 系統主要由十二個蛋白所組成 (VirB1-VirB11, VirD4)，根據生物資訊和細

胞分部分離法 (subcellular fractionation)證明，這些基因依其功能可分為三類：(1)管道組成份 (VirB6-VirB10)：眾多證據顯示，由 VirB7、VirB8、VirB9 及 VirB10 所組成的中心穿膜管道 (transmembrane channel) 是主要的核心構造。VirB8、VirB9 及 VirB10 彼此會互相結合，且 VirB8 的存在方能促使 VirB9 和 VirB10 的結合 (Das and Xie, 2000; Kumar et al., 2000)，而 VirB9-VirB10 的結合對受質通過分泌管道是必須的 (Cascales and Christie, 2004a, b)。VirB7 亦對 VirB9 的作用有直接影響關係 (Spudich et al., 1996; Baron et al., 1997)，VirB10 在能量的供給下能進行結構的改變，繼之與 VirB7-VirB9 的複合物結合 (Cascales and Christie, 2004b)。(2)纖毛(pilus)組成相關成份 (VirB2, VirB3, VirB5)：VirB2 會分泌至外膜形成管狀構造，為構成纖毛的組要成份，VirB5 則和 VirB2 互相作用堆疊在 VirB2 表面，推測可能為直接和細胞接受器 (receptor) 接觸的分子。(3)能量提供(nucleoside triphosphatases VirB4, VirB11, VirD4)：VirD4 為一偶合蛋白 (coupling protein; T4CP)，除了與分泌受質結合外，其 N 端會繫於內膜上而與 VirB 基因所構成的分泌系統結合 (Llosa et al., 2004)，受質會藉由 VirD4 轉移至鑲嵌於內膜而面向細胞質部份的 VirB11；接著轉移至位於內膜之 VirB6 和 VirB8，而 VirB4 雖然不會與受質結合，但對此轉移步驟的進行是必要的元素；最後 VirB6 和 VirB8 會協力將受質傳送至位於周膜間隙 (periplasmic) 和外膜的蛋白 VirB2 和 VirB9 而通過至胞外 (Cascales and Christie, 2004a)。

近幾年由於基因組解序的快速進展，在 *Xylella fastidiosa* (Simpson et al., 2000)、*Xanthomonas spp.* (da Silva et al., 2002; Qian et al., 2005; Thieme et al., 2005)、*Erwinia carotovora* (Bell et al., 2004)、*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Joardar et al., 2005) 和 *Ralstonia solanacearum* (Salanoubat et al., 2002) 等植物病原菌陸續發現有第四型分泌系統的相關基因存在。da Silva 等人指出，*X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) 306 具有兩套的 VirB/D4 第四型分泌系統，一套位於染色體上，另一套則位於 pXAC64 質體，兩套系統皆缺少 *virB5* 和 *virB7* 兩個基因，在質體上同時也缺少 *virD4* 基因 (da Silva et al., 2002)。而 *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) ATCC33913 則只擁有一套 VirB/D4 系統，其基因數目與排列順序則與位於 Xac 306 染色體上的相同，但 *virB6* 則不緊臨此

VirB/D4 cluster (da Silva et al., 2002)。 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 的 pXCV38 質體帶有一套 Vir/Tra 的第四型分泌系統，扮演的功能可能和 conjugation 有關，在 pXCV183 質體上則帶有另一套 Icm/Dot 第四型分泌系統，這是第一株發現具 Icm/Dot 第四型分泌系統的植物病原菌，推測可能和 *Xanthomonas* 的致病性有關 (Thieme et al., 2005)。

病原細菌在自然界中為了生存，會發展出多種分泌系統，使其能夠順利的侵入寄主，並成功的在寄主體內繁殖寄生，如動物病原菌 *Bordetella pertussis* 所分泌的百日咳毒素 (pertussis toxin, PT)，混合使用了 type II 和 type IV 兩種分泌系統，任一系統的缺失都會使病原性喪失 (Pizza et al., 1990; Weiss et al., 1993)。 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 的第三型分泌系統為致病性上不可或缺的分泌胞器，對其致病機制也有較深入之瞭解，但第四型分泌系統的存在，對 *Xanthomonas* 的致病性是否有關聯並沒有進一步的探討。本研究從建構好的 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 基因庫中選殖出與第四型分泌系統相關的基因組，其中 Xcv Xvt122 的 *virB/D4* 基因組並非很完整，尚缺少 *virB5* 和 *virB6*，其胺基酸序列和 *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 (Xcc ATCC33913) 較為相似，而 Xcv Xvt45 的 *virB/D4* 基因組也不完整，缺少 *virB7* 和 *virD4*，其胺基酸序列和 *X. campestris* pv. *campestris* B100 (Xcc B100) 最為相似。Xcv Xvt45 的 *virB4* 或 *virB11* 基因突變株，對病徵的發展和菌原菌的生長並沒有影響，但 Xcv Xvt122 的 *virB4* 或 *virB11* 基因突變株，雖然對發病指數沒有顯著差異，但對病原菌的生長卻有抑制作用。

3.2 材料與方法

3.2.1 供試菌株、質體、菌體生長環境

本研究所使用菌株與質體之特性及其來源分別列於表 3-1。*Escherichia coli* 以 Luria-Bertani (LB) medium 培養於 37 °C。*Xanthomonas* 菌株以 Luria-Bertani (LB) 或 523 medium (sucrose 10g/l, casein hydrolysate 8g/l, yeast extract 4g/l, K₂HPO₄ 2g/l, MgSO₄·7H₂O 0.3g/l) 培養於 28 °C。培養基依所需添加抗生素，其濃度分別如下：ampicillin (Amp)，100 µg/ml；Chloramphenicol (Cm)，12.5 µg/ml；gentamycin (Gm)，10 µg/ml；kanamycin (km)，50 µg/ml；tetracyclin (Tc)，20 µg/ml。

3.2.2 重組 DNA 技術

實驗過程中所使用的各項生物技術包括：染色體質體 DNA 之抽取 (chromosome or plasmid DNA extraction)，限制酵素的使用 (restriction enzyme digestion)，膠體電泳分 (agarose gel electrophoresis)，DNA 連接作用，DNA 片段回收 (gel filtration kit, QIAGEN Chatsworth, CA)，CaCl₂ 化學方法之菌體轉形作用 (transformation) 等係參考 Sambrook 等人所述之方法 (Sambrook et al., 1989)，電穿孔法根據 Bio-Rad 出廠的 GenePulser 使用手冊操作。聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 所需的引子對則列於表 3-2。

3.2.3 染色體基因庫之建構

請參閱第二章材料與方法之 2.2.7 節

3.2.4 菌落雜合反應 (Colony hybridization)

請參閱第二章材料與方法之 2.2.9 節

3.2.5 南方轉漬雜合反應 (Southern hybridization)

請參閱第二章材料與方法之 2.2.8 節

3.2.6 構築非極性突變株 *Xvt122ΔvirB4* 和 *Xvt45ΔvirB4* 之重組質體

策略為以不具有 Rho-independent transcription terminator 的 *nptII* 基因取代 *virB4* 基因 (Beck et al., 1982; Alfano et al., 1996)。首先設計含 *XbaI/EcoRI* 切位的引子對 pXvt122-VirB4-*XbaI*-F/pXvt122-VirB4-*EcoRI*-R，以質體 pNCHU1287 為模板，增幅出 1.2 kb *XbaI-EcoRI* 的 *virB4* 基因上游片段，並選殖於 pCPP2988 載體，得到重組質體 pNCHU1699。設計含 *XhoI/KpnI* 切位的引子對 pXvt122-VirB4-*XhoI*-F/pXvt122-VirB4-*KpnI*-R，以質體 pNCHU1287 為模板，增幅出 1.2 kb *XhoI-KpnI* 的 *virB4* 基因下游片段，並選殖於 pBBR1MCS-5 載體，得到重組質體 pNCHU1700。再次從質體 pNCHU1699 選殖 2.7 Kb *SacI-SalI* 片段接合於質體 pNCHU1700，得到重組質體 pNCHU1701 即為 *Xcv Xvt122 virB4* 基因缺失之突變質體。以相同策略構築 *Xcv Xvt45 virB4* 基因缺失之突變菌株 (*Xvt45ΔvirB4*)，首先設計含 *XbaI/EcoRI* 切位的引子對 pXvt45-VirB4-*XbaI*-F/pXvt45-VirB4-*EcoRI*-R，以質體 pNCHU1271 為模板，增幅出 1.2 kb *XbaI-EcoRI* 的 *virB4* 基因上游片段，並選殖於 pCPP2988 載體，得到重組質體 pNCHU1705。設計含 *XhoI/KpnI* 切位的引子對 pXvt45-VirB4-*XhoI*-F/pXvt45-VirB4-*KpnI*-R，以質體 pNCHU1363 為模板，增幅出 1.2 kb *XhoI-KpnI* 的 *virB4* 基因下游片段，並選殖於 pBBR1MCS-5 載體，得到重組質體 pNCHU1706。再次從質體 pNCHU1705 選殖 2.7 Kb *XbaI-XhoI* 片段接合於質體 pNCHU1706，得到重組質體 pNCHU1708 即為 *Xcv Xvt45 virB4* 基因缺失之突變質體，引子序列列於表 3-2。構築好的重組質體利用電穿孔法 (Bio-Rad 出廠的 GenePulser) 送入 *Xcv* 野生菌株，將菌液塗抹於含 Km 和 Gm 的 523 固體培養基，置於 28°C 培養約 2~3 天，再挑取單一菌落進行標記置換法。將單一菌落養於含 Km 的 LB 培養液中，於 28 °C 下連續繼代培養五天，以接種環將菌畫於含 Km 的 523 固體培養基，於 28°C 培養至產生單一菌落後，將菌落分別點於含 Km 及同時含 Km 和 Gm 之固體培養基，置於 28 °C 培養 2 天後，篩選出對於 Km 有抗性而對 Gm 沒有抗性的菌株，如此即可得到構築於質體的突

變基因轉至野生菌株染色體上之菌株 (Xvt122 Δ *virB4*、Xvt45 Δ *virB4*)，再以南方雜合法確認突變株是否如預期被破壞 (Huang et al., 1988)。

3.2.7 構築非極性突變株 Xvt122 Δ *virB11* 和 Xvt45 Δ *virB11* 之重組質體

構築 Xcv Xvt122 的 *virB11* 基因缺失之突變菌株 (Xvt122 Δ *virB11*)，首先設計含 *XbaI/HindIII* 切位的引子對 pXvt122-*VirB4-XbaI-F* /pXvt122-*VirB4-HindIII-R*，以質體 pNCHU1286 為模板，增幅出 1.2 kb *XbaI-HindIII* 的 *virB11* 基因上游片段，並選殖於 pCPP2988 載體，得到重組質體 pNCHU1506。設計含 *XhoI/KpnI* 切位的引子對 pXvt122-*VirB11-XhoI-F*/pXvt122-*VirB11-KpnI-R*，以質體 pNCHU1286 為模板，增幅出 1.2 kb *XhoI-KpnI* 的 *virB11* 基因下游片段，並選殖於 pBBR1MCS-5 載體，得到重組質體 pNCHU1507。再次從質體 pNCHU1506 選殖 2.7 Kb *XbaI-XhoI* 片段接合於質體 pNCHU1507，得到重組質體 pNCHU1508 即為 Xcv Xvt122 的 *virB11* 基因缺失之突變質體。構築 Xcv Xvt45 的 *virB11* 基因缺失之突變菌株 (Xvt45 Δ *virB11*)，首先利用限制酶 *SacI/EcoRI*，從質體 pNCHU1394 截取出 1.2 kb *SacI-EcoRI* 的 *virB11* 基因上游片段，並選殖於 pCPP2988 載體，得到重組質體 pNCHU1502。設計含 *Sall/XhoI* 切位的引子對 pXvt45-*VirB11-Sall-F*/pXvt45-*VirB4-XhoI-R*，以質體 pNCHU1271 為模板，增幅出 1.2 kb *XhoI-KpnI* 的 *virB11* 基因下游片段，並選殖於 pBBR1MCS-5 載體，得到重組質體 pNCHU1503。再次從質體 pNCHU1502 選殖 2.7 Kb *SacI-Sall* 片段接合於質體 pNCHU1503，得到重組質體 pNCHU1504 即為 Xcv Xvt45 *virB11* 基因缺失之突變質體。引子序列列於表 3-2，構築好的重組質體亦如上所述利用電穿孔法和標記置換法得到突變菌株 (Xvt122 Δ *virB11*、Xvt45 Δ *virB11*)，再以南方雜合法確認突變株是否如預期被破壞。

3.2.8 病原性測定

請參閱第二章材料與方法之 2.2.12 節

3.3 結果

3.3.1 選殖茄科細菌性斑點病菌 *Xcv* Xvt122 和 *Xcv*Xvt45 第四型分泌系統相關的基因組

為了選殖 *Xcv* Xvt122 和 Xvt45 第四型分泌系統相關的基因組，根據已發表的 Xac306 和 Xcc ATCC33913 的 *virB1* 基因 (da Silva et al., 2002)，設計一組引子對 pVirB1-F-*Nde*I/pVirB1-R-*Eco*RI，以 *Xcv* Xvt122 和 Xvt45 的染色體 DNA 為模板進行 PCR 反應，各增幅出 1.1 kb 的 *virB1* 基因片段，並選殖於 pGEM-T 載體，得到重組質體 pNCHU1103 和 pNCHU1186。以 Dig 標幟的 *virB1* 基因片段當作探針，對十四株篩選自台灣地區的 *Xcv* 進行南方雜合分析，其中 Xvt12、Xvt28、Xvt48、Xvt122、Xvt185、Xvp169、Xvp182、Xvp186、Xvp194 及 Xvp197 等菌株屬於 A 群 (*X. euvesicatoria*=*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*)，具澱粉分解能力，而 Xvt45、Xvt46、Xvt147 及 Xvt148 等菌株則屬於 B 群 (*X. vesicatoria*)，不具澱粉分解能力 (表 3-1)。如圖 3-1A 所示，以 Xvt122 *virB1* 基因為探針，所有歸屬於 A 群的菌株皆在約 9 kb 處出現 *virB1* 基因的訊號，而 B 群的菌株只出現很微弱似乎是非專一的片段，為證實是否為含 *virB1* 基因片段，再以 Xvt45 *virB1* 基因為探針進行南方雜合分析，如圖 3-1B 所示，所有來自 B 群的菌株皆在約 3 kb 處出現 *virB1* 基因的訊號。由以上結果可知，*Xcv* Xvt122 和 Xvt45 的染色體確實存在與第四型分泌系統相關的 *virB1* 基因，以 *virB1* 基因為探針，可明顯將本實驗的菌株區分出 A、B 兩群，初步結果得知兩菌株的 *virB/D4* 基因組在染色體上的位置是有差異的，但其是否具有完整的 *virB/D4* 基因組和相同基因排列順序，需進一步選殖相關基因來驗證。

利用選殖得到的 *virB1* 基因為探針，以菌落雜合反應從已構築好的 Xvt122(A 群) 基因庫中篩選 *virB/D4* cluster，得到插入片段大小約 18 kb 的選殖株 pNCHU1286。為了定序此插入片段以 *Eco*RI 和 *Hind*III 截切後，所得到 1.5 kb、2 kb、2.5 kb、6 kb、1.5 kb 及 4.4 kb 等六片段 (由左端至右端)次選殖至 pBluescript II SK 載體，分別得到 pNCHU1294、pNCHU1293、pNCHU1292、pNCHU1287、pNCHU1295 及 pNCHU1291，

其中再將 pNCHU1287 (含 6 kb 插入片段) 以 *Hind*III 和 *Pst*I 截切後, 得到 2.2 kb、1.3 kb 及 2.1 kb 等三片段, 再次選殖得到 pNCHU1288、pNCHU1289 及 pNCHU1290 (表 3-1、圖 3-2), 將上述轉殖質體以 ABI 3700 進行定序 (中興大學生物科技發展中心)。

同法, 利用選殖得到的 *virB1* 基因為探針, 以菌落雜合反應從已構築好的 Xvt45(B 群) 基因庫中篩選 *virB/D4* cluster, 得到 insert 片段大小約 30 kb 的選殖株 pNCHU1224。以 *Eco*RI 截切後, 所得到 13.2 kb、6 kb、7 kb、2.6 kb、2.2 kb、5 kb、1.2 kb 及 2.8 kb 等八片段 (由左端至右端) 次選殖至 pBluescript II SK 載體, 分別得到 pNCHU1271、pNCHU1363、pNCHU1364、pNCHU1269、pNCHU1268、pNCHU1272、pNCHU1267 及 pNCHU1270; 其中將 pNCHU1363 (含 6 kb 插入片段) 以 *Eco*RI 和 *Hind*III 截切後, 得到 1.3 kb、1.7 kb 及 3 kb 等 3 片段, 再次選殖得到 pNCHU1389、pNCHU1388 及 pNCHU1387; 將 pNCHU1364 (含 7 kb 插入片段) 以 *Eco*RI 和 *Bam*HI 截切後, 得到 3 kb 和 7 kb 等二片段, 再次選殖得到 pNCHU1390 和 pNCHU1391 (表 3-1、圖 3-3), 將上述轉殖質體以 ABI3700 進行定序 (中興大學生物科技發展中心)。定序結果顯示, pNCHU1224 選殖株並未涵蓋所有的 *virB/D4* cluster, 再次從基因庫中篩選出選殖株 pNCHU1394, 次選殖出 4.7 kb 的 *Hind*III 片段, 包含了 *virB1* 更上游的區域 (表 3-1、圖 3-3)。

3.3.2 茄科細菌性斑點病菌 Xcv Xvt122 第四型分泌系統相關的基因組成

上述選殖得到的基因完成解序後, 利用 vector NTI (Informax)、NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 及 SDSC Biology Workbench 網站 (<http://workbench.sdsc.edu/>) 程式進行分析。分析結果顯示: pNCHU1286 包含十三個完整的轉譯框架 (open reading frame, ORF), 二個不完整的轉譯框架, 依序為 VirD4 (不完整)、VirB7、VirB8、VirB9、VirB10、Vir B11、VirB1、VirB2、VirB3、VirB4、Hypothetical protein XCV2804、Alpha-glucosidase、Hypothetical protein XCV2802、TonB-dependent outer membrane receptor、Putative alpha-glucosidase (不完整) (表 3-3、圖 3-2)。目前從 Xcv Xvt122 基因庫選殖出來的 *virB/D4* 基因組並非很完整, 缺少 *virB5* 及 *virB6* 基因,

而 VirD 只有 C 端 154 個胺基酸，其胺基酸序列和 *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 (*Xcc* ATCC33913)較為相似(表 3-3)。將 *Xcv* Xvt122 的 *virB/D4* 基因組和其他已發表之 *Xanthomonas* spp.作比較(表 3-5)，結果顯示這些 *Xanthomonas* spp.雖然都具有 *virB/D4* 基因組，但都不完整，而 *Xcv* Xvt122 的 *VirB/D4* 胺基酸序列和其他 *Xanthomonas* spp.之間 37~100 %的相似度，其中和 *X. albilineans* 相似度雖較低，但仍保有 50~80 幾百分比的相似度，較為奇特的是，*Xcv* Xvt122 與和 *Xcv* 85-10 同屬 A 群菌株，胺基酸序列皆只有 20~40 幾百分比的相似度。*Xcv* 85-10 的 *virB/D4* 基因組是位於 38 kb 的質體上 (Thieme et al.,2005)，搜尋其全基因體序列發現，在 *Xcv* 85-10 的染色體亦有七個 *virB/D4* 相關基因，分別為 *virD4*、*virB8*、*virB9* 及 4 套 *virB6*，除了 *virB6*，其他基因的胺基酸序列則和 *Xcv* Xvt122 達 99~100 %的相似度。

以目前已有的資料發現，*Xcv* Xvt122 的 *virB* 基因數和排列順序和 *Xcc* ATCC33913 相同 (da Silva et al., 2002; Zhao et al., 2005)，da Silva 等人(2002)指出 *Xcc* ATCC33913 的 *VirB/D4* 基因組缺少 *virB5* 和 *virB7* 兩個基因，而 *virB6* 位於 *virD4* 上游，但並不緊臨此 *VirB/D4* 基因組，究竟 *Xcv* Xvt122 之 *virB5* 是否存在，而 *virB6* 是否位於 *virD4* 上游，尚需進一步證實。至於 *Xcv* Xvt122 之 *virB* 基因排列順序則完全不同於 *Xcv* 85-10 質體，其順序為 *VirB2*、*VirB4*、Site-specific recombinase、Hypothetical protein、Hypothetical protein、Tn5045 transposase、Hypothetical protein、*VirB5*、Hypothetical protein、*VirB6*、*VirB8*、*VirB9*、*VirB10*、*Vir B11*、*VirB1* 等基因，但尚未選殖到 *virB3* 和 *virB7* 基因。

Xcv Xvt122 緊臨 *VirB4* 基因的 Hypothetical protein XCV2804、Alpha-glucosidase、Hypothetical protein XCV2802、TonB-dependent outer membrane receptor、Putative alpha-glucosidase 五個蛋白的基因，其產物胺基酸序列則和 *Xcv* 85-10 達 99~100 %的相似度。在 *Xcv* 85-10 菌株，這些基因是位於染色體的 *VirB9* 上游區域，與 *VirB9* 基因間夾了二個 IS1477 transposase 的序列，但這些基因並沒有出現在 *Xcv* 85-10 質體的 *VirB/D4* 基因組區域。

3.3.3 茄科細菌性斑點病菌 *Xcv* Xvt45 第四型分泌系統相關的基因組成

從 Xvt45(B 群)基因庫中篩選出涵蓋 *virB/D4* cluster 的重組質體 pNCHU1394 和 pNCHU1224, 經解序與比對結果顯示: 共包含二十二個完整的轉譯框架 (open reading frame, ORF), 一個不完整的轉譯框架, 依序為 VirB8 (不完整)、VirB9、VirB10、VirB11、VirB1、VirB2、VirB3、VirB4、Hypothetical protein xccb100_1686 (VirB5)、VirB6-like membrane protein、Hypothetical protein XAC2611、VirB6-like membrane protein、Hypothetical protein xccb100_1688、Hypothetical protein XAC2610、ISxac4 transposase、Alpha-glucosidase、TonB-dependent outer membrane receptor、Putative alpha-glucosidase、Hypothetical protein XAC2598、Transport protein、Cyclomaltodextrin glucanotransferase precursor、Maltose transport gene repressor、Threonyl-tRNA synthetase (表 3-4、圖 3-3) 目前從 *Xcv* Xvt45 基因庫選殖出來的 *virB/D4* 基因組並非很完整, 但尚未選殖到 VirB7、VirD4, 而 VirB8 只有 C 端 175 個胺基酸, 其胺基酸序列和 *X. campestris* pv. *campestris* B100 (Xcc B100) 最為相似, 幾乎 90~100 % 的相似度(表 3-4)。將 *Xcv* Xvt45 的 *virB/D4* 基因組和 *Xcv* Xvt122 及其他已發表之 *Xanthomonas* spp. 作比較(表 3-6), 其胺基酸序列亦可高達 80~90 幾百分比的相似度, 和 *X. albilineans* 相似度雖較低, 但仍保有 50~80 幾百分比的相似度, 同樣地, 和 *Xcv* 85-10 質體上的胺基酸序列只有 20~40 幾百分比的相似度, 而與 *Xcv* 85-10 染色體上 VirB8、VirB9 及 VirB6 分別為 66 %、88 % 和 39 % 的相似度。

以目前已有的資料顯示, *Xcv* Xvt45 的 *virB* 基因數和排列順序和 Xcc B100、Xac306 很相近 (da Silva et al., 2002; Zhao et al., 2005), 但 *Xcv* Xvt45 和 Xcc B100 並沒有發現 *virB7*, 究竟 *Xcv* Xvt45 之 *virB7* 不存在或位於 *virB8* 上游, 尚需進一步證實。這三株菌株還有較明顯之差別為, Xcc B100 只有一個 copy 的 *virB6*, 但 Xac306 有二個 copy 的 *virB6*, 二個 *virB6* 間插入了好幾個基因, 而 *Xcv* Xvt45 雖然也有二個 copy 的 *virB6*, 但二個 *virB6* 間只插入了一個 Hypothetical protein XAC2611。此外, Xcc B100 和 Xac306 亦同時具有 *Xcv* Xvt45 緊臨 VirB6 的其他非 VirB/D4 基因組的基因, 其基因排列順序和 *Xcv* Xvt45 相同, 但非緊臨 VirB6 而是相隔有七(Xcc B100)或八(Xac306)

個基因遠，其胺基酸序列則和 Xac 306 最為相似 (表 3-4)。

3.3.4 *virB4* 和 *virB11* 基因缺失株之構築與致病力分析

為探討茄科植物細菌性斑點病菌 *virB4* 和 *virB11* 基因產物與致病力之關係，因此構築 *virB4* 和 *virB11* 基因缺失之突變菌株以進一步分析。策略為以不具有 Rho-independent transcription terminator 的 *nptII* 基因取代 *virB4* 和 *virB11* 基因 (Beck et al., 1982; Alfano et al., 1996)，如圖二、三所示。構築於質體的突變基因轉至野生菌株染色體上之菌株 (*Xvt122ΔvirB4*、*Xvt122ΔvirB11*、*Xvt45ΔvirB4* 及 *Xvt45ΔvirB11*)，以南方雜合法確認突變株已如預期被破壞，即進行接種試驗以評估其對宿主植物之致病力。

首先將野生菌株(*Xcv Xvt122*、*Xcv Xvt45*)和 *virB4* 和 *virB11* 基因缺失株 (*Xvt122ΔvirB4*、*Xvt122ΔvirB11*、*Xvt45ΔvirB4*、*Xvt45ΔvirB11*) 調整菌液至 5×10^7 ，將感病番茄 (*Bonny Best L305*) 葉片浸泡於菌液中 20 秒後，置於溫室觀察病徵的發展。結果顯示，*Xcv Xvt122* 從第一星期發病指數介於 2~3，持續漸增至第四星期發病指數為 5~6，而 *Xvt122ΔvirB4*，*Xvt122ΔvirB11* 其病徵的發展的趨勢和 *Xcv Xvt122* 並沒有顯著差別，至第四星期其葉片病斑皆已達 40 %~60 % (圖 3-4A)。同樣發病現象亦發生在 *Xcv Xvt45*、*Xvt45ΔvirB4*、*Xvt45ΔvirB11* 的試驗中，持續觀察的四星期中，處理不同菌株的植株，發病指數皆從 2~3 爬升至 5~6，菌株間並無明顯的差異 (圖 3-4B)。

進一步分析病原菌於寄主番茄葉片內之生長能力，以 10^5 cfu/ml 之濃度注射至番茄葉片，接種 *Xcv Xvt122* 的葉片，菌量從 10^3 至接種第三天已爬升至 $10^6 \sim 10^7$ ，而接種 *Xvt122ΔvirB4*，*Xvt122ΔvirB11* 的葉片，其菌量之生長亦達 10^6 ，較之野生株降低約 4~5 倍，生長至第六天，三株處理菌株雖然沒有大幅度的菌量生長，但仍可發現突變株的生長菌量略低於野生株 (圖 3-5A)。為進一步證實突變株的生長受到抑制，以感病甜椒 (*ECW30R*) 進行同樣的接種試驗，結果顯示，接種 *Xcv Xvt122* 的葉片，菌量從 10^3 至接種第三天已爬升至 10^8 ，而接種 *Xvt122ΔvirB4* 的葉片菌量為 10^7 ，明顯降低 10 倍，而接種 *Xvt122ΔvirB11* 的葉片，其菌量之生長達 10^6 ，較之野生株降低

100 倍，觀察至第六天，接種 Xcv Xvt122 的葉片菌量已高達 10^{10} ，而 Xvt122 Δ virB4 菌量生長漸漸緩慢，較之野生株明顯降低約 30 倍，Xvt122 Δ virB11 菌量持續生長，但仍與野生株有 30 倍之差 (圖 3-5B)。但菌量生長受抑制的現象並沒有發生在 Xcv Xvt45、Xvt45 Δ virB4、Xvt45 Δ virB11 的試驗中，接種第三天，Xcv Xvt45 菌量生長已從 10^3 爬升至 $10^6\sim 10^7$ ，第六天達 10^{10} ，而 Xvt45 Δ virB4、Xvt45 Δ virB11 菌量生長趨勢和 Xcv Xvt45 是一致的 (圖 3-5C)。



3.4 討論

原核細菌利用質體的接合作用以達到水平式基因轉移的目的，以增加遺傳的變異性與細菌的適應性，接合作用主要機制即為第四型分泌系統。如 *Pseudomonas syringae* 的 pPT23A 家族質體 (pPT23A family plasmid, PFPs)，因具有病原島嶼的特色，在致病性上扮演著很重要的角色，分析這些 PFPs 的序列，發現存在有兩種基因組合的第四型分泌系統，pPSR1 (*P. syringae* pv. *syringae*)、pPh1448A (*P. syringae* pv. *phaseolicola*)、pPMA4328A (*P. syringae* pv. *maculicola*) 的第四型分泌系統屬於 IVA 型，與 *A. tumefaciens* *virB/D4* 基因組相同。而 pDC3000A 和 pDC3000B (*P. syringae* pv. *tomato* DC3000) 則屬於 IVB 型-*tra* 系統 (Zhao et al., 2005)。近幾年由於基因組解序的快速進展，陸續發現在 *Erwinia*、*Xanthomonas* 和 *Xylella* 等植物病原菌的質體中皆存在有第四型分泌系統的相關基因。而 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10，除了在 pXCV38 質體上有一套 VirB/Tra 系統，在染色體也發現有部份 *virB* 基因存在，反之，*H. pylori*、*L. pneumophila* 的第四型分泌系統則是分佈於染色體上，利用接合作用轉移染色體 DNA 亦可見於 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10，Xcv 85-10 的 pXCV183 質體上即發現帶有一套 *L. pneumophila* 的 *icm/dot* 基因組 (Thieme et al., 2005; Sundin, 2007)。

X. axonopodis pv. *citri* 306 具有兩套的第四型分泌系統，皆屬於 VirB/D4 系統，一套位於染色體上，另一套則位於 pXAC64 質體，而 *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 則只擁有一套第四型分泌系統，亦屬於 VirB/D4 系統 (da Silva et al., 2002)。本研究發現在 *X. campestris* pv. *vesicatoria* Xvt122 (*X. euvesicatoria*=*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) 和 *X. campestris* pv. *vesicatoria* Xvt45 (*X. vesicatoria*) 的染色體均存在有 VirB/D4 第四型分泌系統，Xcv Xvt122 VirB/D4 基因組的胺基酸序列和基因排列順序和 Xcc ATCC33913 較為相似 (圖 3-2)，而 Xcv Xvt45 則和 Xcc B100、Xac 306 較為相近 (圖 3-3)。位於 Xcv Xvt122 VirB4 下游的序列，雖比對到完整的 Hypothetical protein XCV 2804，但同時也比對到與 *X. oryzae* pv. *oryzae* 和 *Ralstonia* sp.

同源性很高的 transposase 以及 IS4 family，但是個缺失 (truncated)的蛋白，而 Xcv Xvt122 VirB/D4 基因組 G+C 含量為 50.4 %，其鄰近基因的 G+C 含量則為 62 %。分析 Xcv Xvt45 VirB/D4 基因組下游的序列，亦具有 ISxac4 transposase，其 G+C 含量為 56 %，也遠較其鄰近基因的 G+C 含量 62.5 %為低。可知，Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 的 VirB/D4 基因組是由其他菌屬經水平式基因轉移而來 (Hacker and Kaper, 1999)。

最典型的第四型分泌系統為 *A. tumefaciens* T-DNA 的傳送系統，*A. tumefaciens* 利用 VirB/D4 系統將腫瘤基因送進植物細胞而造成腫瘤 (crown-gall tumors) (Zhu et al. 2000)。VirB/D4 第四型分泌系統中，VirB4、VirB11 和 VirD4 是保留性最高的組成蛋白，具有 NTP-binding domains，參與此系統組合之能量提供 (Li et al. 2005)。將 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 的 *virB/D4* 基因組和及其他已發表之 *Xanthomonas spp.* 作比較 (表 3-5、表 3-6)，確實可發現 VirD4、VirB4、VirB11 是保留性最高的，高達 90 幾百分比的相似性。Qian 等人(2005)分析 *X. campestris pv. campestris* 8004 的基因組資料得知，Xcc 8004 的 VirD4 及 VirB4 蛋白，分別具有 TraG/TraD 和 ATPase 的 domains。在 *H. pylori* 和 *A. tumefaciens* 中，這兩個蛋白具有 NTPase 的功能，扮演著耦合因子 (coupling factors) 的角色，能幫助聯繫受質分子進入分泌通道 (Israel et al., 2001; Cascales and Christie, 2003)。將 Xcc 8004 *virD4* 和 *virB* 基因組等 9 個基因全部剔除後之突變株接種於宿主植物甘藍菜，發現並不影響其對宿主植物的致病力 (He et al., 2007)。本研究亦嘗試將 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 的 *virB4* 及 *virB11* 基因進行突變，評估其對寄主番茄植物致病力之影響。結果顯示，Xcv Xvt45 的 *virB4* 和 *virB11* 基因突變株，對病徵的發展和病原菌在寄主內的生長並沒有影響 (圖 3-4B、圖 3-5C)。但 Xcv Xvt122 的 *virB4* 和 *virB11* 基因突變株，雖然對發病指數沒有顯著差異 (圖 3-4A)，但對病原菌的生長確實有抑制作用 (圖 3-5A)，此抑制效果在宿主甜椒 ECW30R 上更為明顯 (圖 3-5B)，Xvt122 在不同寄主反應略不同是否因 T4SS 受質只在甜椒上作用，有待探討。例如，*Mesorhizobium loti* R7A 所分泌的受質在 *Lotus corniculatus* 植物會產生無毒性而阻止病原菌侵入，對 *Liucaena leucocephala* 可能會抑制植物防禦反應而幫助入侵。將 *M. loti* R7A 共生島嶼 (symbiosis island) 上的 *virB/D4* 基因組突變後，對 *L.*

corniculatus 植物會延遲根瘤作用，但對 *L. leucocephala* 則能有效的產生根瘤作用 (Marie et al., 2001; Hubber et al., 2004)。

L. pneumophila 所具有的 Dot/Icm 第四型分泌系統，同時兼具接合和傳送的功能 (Nagai and Roy, 2003)，而 *H. pylori* 同時擁有兩套的第四型分泌系統來擔任不同的角色，Cag 分泌系統負責分泌 CagA 至宿主細胞，而 Com 系統則用來吸收 DNA，以加速基因組的改變來幫助細胞的存活 (Dhar et al., 2003; Ding et al., 2003)。*Bartonella* 則需要 Trw 和 VirB/VirD4 兩套第四型分泌系統同時作用，才能成功的侵入紅血球 (Schuein and Dehio, 2002; Seubert et al., 2003)。*Burkholderia cenocepacia* strain K56-2 位於質體的 PtwT4SS 為 VirB/D4 和 F-specific 單位的嵌合系統，*ptwD4*(VirD4-like)的突變株會抑制洋蔥組織水浸狀病徵的產生，而位於染色體的第四型分泌系統則與 VirB/D4 相似，突變株並不會影響病徵的表現 (Engledow et al., 2004)。*X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 的 pXCV38 質體帶有一套 Vir/Tra 的 T4SS，扮演的功能可能和接合作用有關，在 pXCV183 質體上則帶有另一套 Icm/Dot T4SS，這是第一株發現具 Icm/Dot T4SS 的植物病原菌，推測可能和 *Xanthomonas* 的致病性有關 (Thieme et al., 2005)。位於 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 中的 VirB/D4 第四型分泌系統，其胺基酸序列和 Xcv 85-10 的 Vir/Tra 系統只有 20~30 %的相似度，究竟 VirB/D4 基因組在 Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 中所扮演的角色，是負責接合作用、受質傳送或同時具有兩者功能，值得進一步探討。Xcv Xvt122 和 Xcv Xvt45 是否也和 Xcv85-10 一樣，具有另一套 Dot/Icm 系統，和 VirB4/D4 系統並存下互相影響致病力，需待實驗證明。

表 3-1. 研究中所使用之菌株及質體

Table 3-1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Designation	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH10B	<i>endA1 hsdR17 recA1 relA</i> Δ (<i>argF-lacZYA</i>)U169 Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15	Life Sciences Technologies (Gaithersburg, MD)
EPI300™	<i>E. coli</i> carrying inducible <i>trfA</i> gene for amplification of high copy number. Used for genomic DNA library.	CopyControl™ BAC Cloning Kit (Epicentre)
<i>X. c. pv. vesicatora</i>		
Xvt12, Xvt28, Xvt48, Xvt122, Xvt185, Xvp169, Xvp182, Xvp186, Xvp194, Xvp197	Wild types isolated from tomato, classified into group A, no amylolytic activity	Hsu (1998)
Xvt45, Xvt46, Xvt147, Xvt148	Wild types isolated from pepper, classified into group A, no amylolytic activity	Hsu (1998)
Xvt45, Xvt46, Xvt147, Xvt148	Wild types isolated from tomato, classified into group B, amylolytic activity	Hsu (1998)
Plasmids		
pBluescript II SK ⁺	ColE1 <i>mcs-lacZ</i> , Ap ^r	Stratagene
pBBR1MCS-5	A broad host range vector containing <i>lac</i> promoter, compatible to IncP, IncQ, or IncW group plasmids, Gm ^r	Kovach et al. (1995)
pCC1BAC™	Used for construction of genomic DNA library, Cm ^r	Epicentre
pGEM-T easy	T/A cloning vector, Ap ^r	Promega Inc.
pDrive	T/A cloning vector carrying T7 & SP6 RNA polymerase, Km ^r , Ap ^r	Qiagen
pCPP2988	pBluescriptII SK ⁻ carrying 1.5 kb <i>HindIII-SalI</i> terminator-lacking <i>nptII</i> gene fragment from pRZ102	Aflano et al. (1996)
pNCHU1103	1.1 kb pVirB1-F- <i>NdeI</i> /pVirB1-R- <i>EcoRI</i> -generated fragment containing <i>virB1</i> from Xcv Xvt122 cloned in pGEM-T easy	This study
pNCHU1186	1.1 kb pVirB1-F- <i>NdeI</i> /pVirB1-R- <i>EcoRI</i> -generated fragment containing <i>virB1</i> from Xcv Xvt45 cloned in pGEM-T easy	This study
pNCHU1224	30 kb <i>EcoRI</i> fragment containing <i>virB1</i> from Xcv Xvt45 cloned in pCC1BAC™	This study
pNCHU1267	1.2 kb <i>EcoRI</i> fragment from pNCHU1224 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1268	2.2 kb <i>EcoRI</i> fragment from pNCHU1224 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1269	2.6 kb <i>EcoRI</i> fragment from pNCHU1224 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1270	2.8 kb <i>EcoRI</i> fragment from pNCHU1224 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study

pNCHU1271	3.2 kb <i>EcoRI</i> fragment from pNCHU1224 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1272	5.0 kb <i>EcoRI</i> fragment from pNCHU1224 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1286	18 kb <i>EcoRI</i> fragment containing <i>virB1</i> from Xcv Xvt122 cloned in pCC1BAC TM	This study
pNCHU1287	6 kb <i>HindIII</i> fragment from pNCHU1286 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1288	2.2 kb <i>PstI-HindIII</i> fragment from pNCHU1286 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1289	1.3 kb <i>PstI</i> fragment from pNCHU1286 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1290	2.1 kb <i>PstI</i> fragment from pNCHU1286 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1291	4kb <i>EcoRI</i> fragment from pNCHU1286 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1292	2 kb <i>EcoRI-HindIII</i> fragment from pNCHU1286 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1293	1.2 kb <i>EcoRI-HindIII</i> fragment from pNCHU1286 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1294	1.5 kb <i>EcoRI-HindIII</i> fragment from pNCHU1286 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1295	1.3 kb <i>EcoRI-HindIII</i> fragment from pNCHU1286 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1393	17 kb <i>EcoRI</i> fragment containing <i>virB1</i> from Xcv Xvt45 cloned in pCC1BAC TM	This study
pNCHU1363	6kb <i>EcoRI</i> fragment from pNCHU1224 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1364	7kb <i>EcoRI</i> fragment from pNCHU1224 subcloned into pCC1BAC TM	This study
pNCHU1387	3 kb <i>EcoRI-HindIII</i> fragment from pNCHU1363 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1388	1.7 kb <i>HindIII</i> fragment from pNCHU1363 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1389	1.3 kb <i>EcoRI-HindIII</i> fragment from pNCHU1363 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1390	3 kb <i>EcoRI-BamHI</i> fragment from pNCHU1364 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1391	4 kb <i>EcoRI- BamHI</i> fragment from pNCHU1364 subcloned into pBluescriptII SK ⁻	This study
pNCHU1394	4.7 kb <i>HindIII</i> fragment from pNCHU1393 subcloned in pSK	This study
pNCHU1502	1.2 kb <i>SacII-EcoRI</i> fragment from pNCHU1394 containing	This study

	upstream region of <i>virB11</i> from Xvt45 cloned in pCPP2988	
pNCHU1503	1.2 kb pXvt45-VirB11- <i>Sall</i> -F2/PXvt45-VirB11- <i>XhoI</i> -R-generated <i>Sall</i> - <i>XhoI</i> fragment containing downstream region of <i>virB11</i> from Xvt45 cloned in pBBR1MCS-5	This study
pNCHU1504	2.7 kb <i>SacI</i> - <i>Sall</i> fragment from pNCHU1502 cloned in pNCHU1503, creating Xvt45 <i>virB11</i> non-polar mutant.	This study
pNCHU1506	1.2 kb pXvt122-VirB11- <i>XbaI</i> -F/pXvt122-VirB11- <i>HindIII</i> -R-generated <i>XbaI</i> - <i>HindIII</i> fragment containing downstream region of <i>virB11</i> from Xvt122 cloned in pCPP2988	This study
pNCHU1507	1.2 kb pXvt122- VirB11- <i>XhoI</i> -F/pXvt122-VirB11- <i>KpnI</i> -R-generated <i>XhoI</i> - <i>KpnI</i> fragment containing upstream region of <i>virB11</i> from Xvt122 cloned in pBBR1MCS-5	This study
pNCHU1508	2.7 kb <i>XbaI</i> - <i>XhoI</i> fragment from pNCHU1506 cloned in pNCHU1507, creating Xvt122 <i>virB11</i> non-polar mutant.	This study
pNCHU1699	1.2 kb pXvt122-VirB4- <i>XbaI</i> -F/pXvt122-VirB4- <i>EcoRI</i> -R-generated <i>XbaI</i> - <i>EcoRI</i> fragment containing upstream region of <i>virB4</i> from Xvt122 cloned in pCPP2988	This study
pNCHU1700	1.2 kb pXvt122-VirB4- <i>XhoI</i> -F/pXvt122-VirB4- <i>KpnI</i> -R-generated <i>XhoI</i> - <i>KpnI</i> fragment containing downstream region of <i>virB4</i> from Xvt122 cloned in pBBR1MCS-5	This study
pNCHU1701	2.7 kb <i>SacI</i> - <i>Sall</i> fragment from pNCHU1699 cloned in pNCHU1700 creating Xvt122 <i>virB4</i> non-polar mutant.	This study
pNCHU1705	1.2 kb pXvt45-VirB4- <i>XbaI</i> -F/pXvt45-VirB4- <i>EcoRI</i> -R-generated <i>XbaI</i> - <i>EcoRI</i> fragment containing downstream region of <i>virB4</i> from Xvt45 cloned in pCPP2988	This study
pNCHU1706	1.2 kb pXvt45-VirB4- <i>XhoI</i> -F/pXvt45-VirB4- <i>KpnI</i> -R-generated <i>XhoI</i> - <i>KpnI</i> fragment containing upstream region of <i>virB4</i> from Xvt45 cloned in pBBR1MCS-5	This study
pNCHU1708	2.7 kb <i>XbaI</i> - <i>XhoI</i> fragment from pNCHU1507 cloned in pNCHU1706, creating Xvt45 <i>virB4</i> non-polar mutant.	This study

表 3-2. 研究中所使用之引子

Table 3-2. Primers used in this study

Primer	Sequence	Restriction enzyme
pVirB1-F- <i>Nde</i> I	5'-GACTC <u>CATATG</u> CTGCCTGGCATGGAG-3'	<i>Nde</i> I
pVirB1-R- <i>Eco</i> RI*	5'-GCCTGAATTCYTA ^Y AAAAACRAATGCKSTRTC-3'	<i>Eco</i> RI
pXvt122-VirB11- <i>Xba</i> I-F	5'-TGGT <u>TCTAGAC</u> CGGCGATAATGTTGTCG-3'	<i>Xba</i> I
pXvt122-VirB11- <i>Hind</i> III-R	5'-GCACTA <u>AAGCTT</u> GGCAGCACCCGCTGAG-3'	<i>Hind</i> III
pXvt122- VirB11- <i>Xho</i> I-F	5'-TGAT <u>CTCGAG</u> CTGGCCTGGAGGAGAG-3'	<i>Xho</i> I
pXvt122- VirB11- <i>Kpn</i> I-R	5'-CACAGGT <u>ACCGT</u> CACTACAGCAACAG-3'	<i>Kpn</i> I
pXvt45-VirB11- <i>Sal</i> I-F2	5'-AGAGGT <u>CGACT</u> CCTTTAGTTGGGGCTG-3'	<i>Sal</i> I
PXvt45- VirB11- <i>Xho</i> I-R	5'-ATGCG <u>CTCGAG</u> TGCAAAGGCGATCTG-3'	<i>Xho</i> I
pXvt122-VirB4- <i>Xba</i> I-F	5'-TATGCG <u>TCTAGAC</u> CGAGAGTCAGTTGG-3'	<i>Xba</i> I
pXvt122-VirB4- <i>Eco</i> RI-R	5'-CGGGAGGAAT <u>TCTAC</u> GATATTCGTTAGG-3'	<i>Eco</i> RI
pXvt122-VirB4- <i>Xho</i> I-F	5'-CTTT <u>CTCGAG</u> GCAGTCAGTAGCGTG-3'	<i>Xho</i> I
p Xvt122-VirB4- <i>Kpn</i> I-R	5'-AGATGGT <u>ACCCAC</u> ACCCAGCCCAGC-3'	<i>Kpn</i> I
pXvt45-VirB4- <i>Xba</i> I-F	5'-GTCG <u>TCTAGAG</u> GATCTTTCCGGGAC-3'	<i>Xba</i> I
pXvt45-VirB4- <i>Eco</i> RI-R	5'-ATCGGAAT <u>TACCA</u> ACCCCGCGCCG-3'	<i>Eco</i> RI
pXvt45-VirB4- <i>Xho</i> I-F	5'-GGAC <u>CTCGAG</u> GTCTGAAGATGCATAG-3'	<i>Xho</i> I
pXvt45-VirB4- <i>Kpn</i> I-R	5'-ATGCGGT <u>ACCCCT</u> GGAAGATGACC-3'	<i>Kpn</i> I

* Y : C/T

K : G/T

S : C/G

R : A/G

表 3-3. 茄科細菌性斑點病 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Xvt122 *virB/D4* 基因組及相鄰基因序列分析

Table 3-3. The gene products encoded by the insert of pNCHU1286 cloned from Xcv Xvt122 showing the highest similarity with the matching sequences in genbank.

Gene products encoded by the insert in pNCHU1286	Size (a.a)	Origin of matching sequence and accession no.	% Similarity (BLASTX E value)
Type IV secretion system protein VirD4 (incomplete)	154/557	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364541	100% (1e-80)
VirB7	139	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , YP_642935	99% (1e-61)
VirB8	338	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC33913, NP_637829	86% (3e-137)
VirB9	255	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC33913, NP_637830	88% (2e-130)
VirB10 protein	358	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC33913, NP_637831	81% (2e-152)
VirB11 protein	346	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC33913, NP_637832	97% (0)
VirB1 protein	275	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC33913, NP_637829	76% (6e-112)
VirB2 protein	135	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC33913, NP_637828	70% (2e-23)
VirB3 protein	103	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC33913, NP_637827	90% (4e-35)
VirB4 protein	817	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC33913, NP_637826	95% (0)
Hypothetical protein XCV2804	113	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364535	99% (6e-49)
Alpha-glucosidase	538	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364534	99% (0)
Hypothetical protein XCV2802	96	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10, YP_364533	100% (1e-47)

TonB-dependent outer membrane receptor	924	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str: 85-10, YP_364532	100% (0)
Putative alpha-glucosidase (incomplete)	489	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str: 85-10, YP_364531	99% (0)



表 3-4. 茄科細菌性斑點病 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Xvt45 *virB/D4* 基因組及相鄰基因序列分析

Table 3-4. The gene products encoded by the insert of pNCHU1394 and pNCHU1224 cloned from Xcv Xvt45 showing the highest similarity with the matching sequences in genbank.

Gene products encoded by the insert in pNCHU1394 and pNCHU1224	Size (a.a)	Origin of matching sequence and accession no.	% Similarity (BLASTX E value)
VirB8-like type IV secretion system protein PtlE (incomplete)	177/335	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903084	95% (8e-67)
VirB9-like type IV secretion system protein PtlF	255	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903085	98% (6e-135)
Type IV secretion system putative channel component VirB10	389	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903086	95% (6e-167)
Type IV secretion system energizing component VirB11	346	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903087	100% (0)
Type IV secretion system lytic murein transglycosylase component VirB1	278	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903088	93% (4e-138)
Hypothetical protein xccb100_1683 (VirB2)	137	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903089	89% (2e-36)
VirB3 protein	103	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903090	96% (5e-48)
Type IV secretion system energizing component VirB4	817	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903091	97% (0)
Hypothetical protein xccb100_1686 (VirB5)	277	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903092	84 (1e-115)
VirB6-like membrane protein	359	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903093	90 (5e-151)
Hypothetical protein XAC2611	164	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_642924	68 (6e-53)
VirB6-like membrane protein	359	<i>Xanthomonas campestris</i> pv.	90 (5e-151)

		<i>campestris</i> str. B100, YP_001903093	
Hypothetical protein xccb100_1688	162	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100, YP_001903094	88 (1e-70)
Hypothetical protein XAC2610	267	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_642923	83% (8e-126)
ISxac4 transposase	274	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_643811	93% (2e-134)
Alpha-glucosidase	538	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_642914	94% (0)
TonB-dependent outer membrane receptor	924	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_642913	94% (0)
Putative alpha-glucosidase	693	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_642912	90% (0)
Hypothetical protein XAC2598	728	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_642911	86% (0)
Transport protein	492	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_642910	91% (0)
Cyclomaltodextrin glucanotransferase	557	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_642909	85% (0)
Maltose transport gene repressor	373	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_642908	94% (0)
Threonyl-tRNA synthetase	634	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , str. 306, NP_642907	98% (0)

表 3-5. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Xvt122 其 *virB/D4* 基因組與其他 *Xanthomonas*.*spp.* 同源蛋白之胺基酸序列比對

Table 3-5. Comparison of *virB/D4* genes from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xvt122) with homologs of other *Xanthomonas spp.*

<i>Pathovars</i>	VirD (557) ^a	VirB7 (139)	VirB8 (338)	VirB9 (255)	VirB10 (394)	VirB11 (346)	VirB1 (275)	VirB2 (136)	VirB3 (103)	VirB4 (817)
Xcv Xvt45			(338/?) 66/73	(255) 88/93	(389) 80/86	(346) 93/98	(278) 71/82	(137) 68/78	(103) 90/94	(817) 93/96
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 85-10	(557/404-557) ^b 98/100 ^c	na ^d	(224) 23/37	(260) 26/43	(406) 24/38	(340) 34/53	(303) 43/50	(125) 27/43	na	(877) 25/42
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citric</i> 306	(557/404-557) 98/100	XAC2622 (139) 99/100	(348/1-250) 86/92	(255) 87/92	(389) 80/86	(346) 93/98	(280) 72/80	(136) 69/80	(103) 91/96	(817) 93/97
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC 33913 (8004)	(557/404-556) 96/97	(80/1-80) 95/97	(347/1-250) 86/92	(255) 88/92	(393) 81/89	(352) 97/98	(277) 76/84	(134) 70/77	(103) 90/96	(817) 95/98
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> B100	(557/404-557) 96/99	na	VirB8-like PtlE (347/1-250) 86/92	VirB9-like PtlF (255)87/91	(389) 79/85	(352) 93/98	(279) 70/79	(136) 72/81	(101) 89/94	(817) 94/97
<i>X. campestris</i> pv. <i>vasculorum</i> NCPPB702	(557/404-557) 96/99	na	(347/1-250) 86/91	(255) 86/91	(389) 80/87	(349) 93/98	(291) 71/79	na	(101) 90/94	na
<i>X. campestris</i> pv. <i>musacearum</i> NCPPB4381	(557/404-462) 98/100	XcampmN_02 144 (139) 97/98	(347/1-250) 86/92	na	(389) 80/87	(346) 93/98	(280) 7179	(136) 71/80	(101) 91/95	na
<i>X. albilineans</i>	na	na	na	na	(391) 58/72	(346) 87/93	(295) 50/63	(134) 54/69	(103) 75/89	(817) 84/93

a. Total amino acid of protein

b. Total amino acid of protein/the position of the aligned amino acid

c. Percentage of amino acids in identity/positives

d. No. sequence available

表 3-6. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Xvt45 其 *virB/D4* 基因組與其他 *Xanthomonas.spp.* 同源蛋白之胺基酸序列比對

Table 3-6. Comparison of *virB/D4* genes from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xvt45) with homologs of other *Xanthomonas spp.*

<i>Pathovars</i>	VirB8	VirB9	VirB10	VirB11	VirB1	VirB2	VirB3	VirB4	VirB5	VirB6
	(338) ^a	(255)	(389)	(346)	(278)	(137)	(103)	(817)	(277)	
<i>Xcv</i> Xvt122	(338/162-338) ^b	(255)	(389)	(346)	(275)	(136)	(103)	(817)	na	na
	66/73 ^c	88/93	80/86	93/98	71/82	68/78	90/94	93/96		
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 85-10	(338/161-338)	(260)	(406)	(340)	(303)	(125)	na	(877)	(190)	(288)
	62/69	23/41	25/38	34/52	41/25	33/45		25/41	28/40	20/37
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citric</i> 306	(348/164-348)	(255)	(389)	(346)	(280)	(136)	(103)	(817)	XAC2613 (275)	(350)
	70/75	96/97	89/94	99/100	84/89	84/91	97/98	95/97	60/76	73/86
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC 33913 (8004)	(347/166-347)	(255)	(393)	(352)	(277)	(134)	(103)	(817)	na	(373)
	60/68	90/94	81/88	94/97	74/82	67/77	92/94	94/97		40/58
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> B100	VirB8-like PtlE (335/159-335)	(255)	(389)	(346)	(279)	(136)	(103)	(817)	(276)	90/94
	95/97	98/98	95/97	100/100	93/94	89/94	96/97	97/98	84/89	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vasculorum</i> NCPPB702	(344/164-344)	na	(389)	(346)	(291)	XcampvN_19715 (136/16-107)	(103)	na	XcampvN_19740 (252)	na
	71/77		90/94	99/100	82/88	91/95	96/96		88/92	
<i>X. campestris</i> pv. <i>musacearum</i> NCPPB4381	(343/159-343)	(255)	(389)	(346)	(280)	(136)	(103)	na	XcampmN_02094 (274)	na
	76/82	96/97	89/94	99/100	82/88	83/89	97/97		60/76	
<i>X. albilineans</i>	na ^d	na	na	(346)	(296)	na	(103)	(817)	na	na
				86/94	52/63		87/86	82/92		

a. Total amino acid of protein

b. Total amino acid of protein/the position of the aligned amino acid

c. Percentage of amino acids in identity/positives

d. No. sequence available

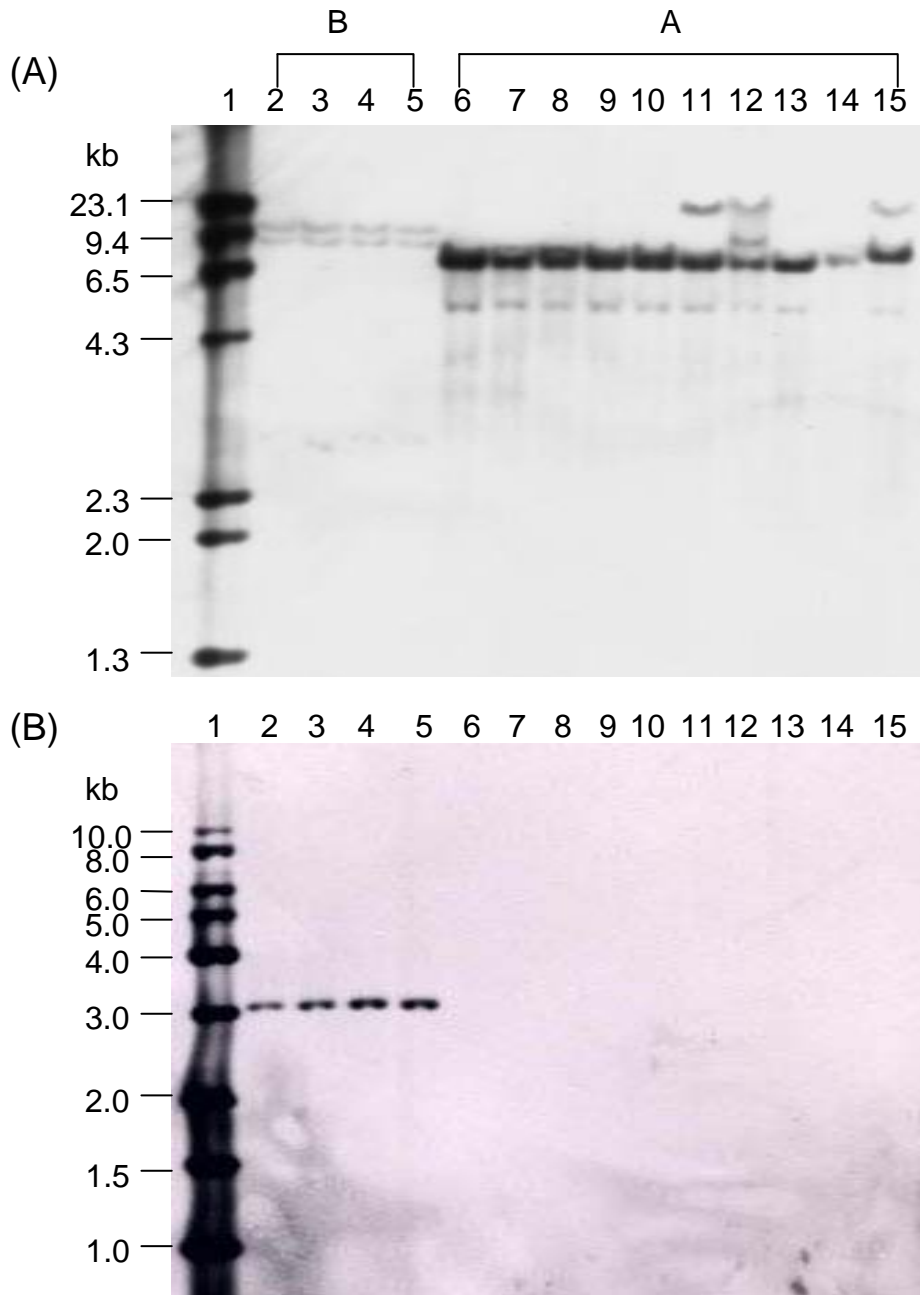


圖3-1.南方雜合分析*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 菌株的*virB1*基因

Fig. 3-1. Southern blot analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. The genomic DNA was isolated, subjected to *Eco*RI digestion, separated on 1% agarose gel, and the gel was subjected to Southern blot hybridization with the Dig-labeled *virB1* of Xcv Xvt122 (A) and Dig-labeled *virB1* of Xcv Xvt45. Lane 1, λ /HindIII DNA marker; Lane 2, Lanes 2-15, XcvXvt45, Xvt46, Xvt147, Xvt148, Xvt12, Xvt28, Xvt48, Xvt122, Xvt185, Xvp169, Xvp182, Xvp186, Xvp194, Xvp197, respectively.

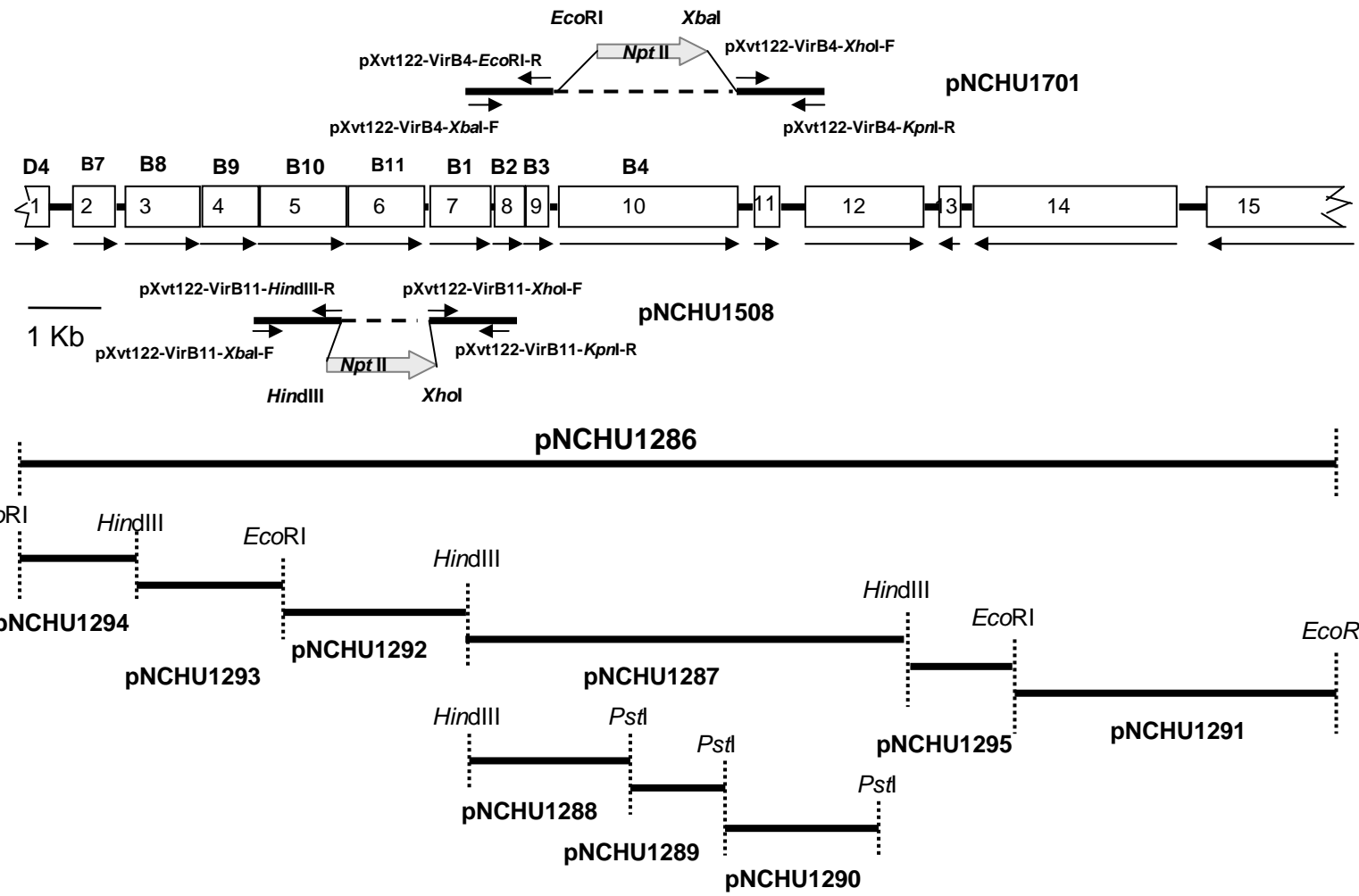


圖3-2. 茄科細菌性斑點病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Xvt122 *virB/D4* 基因組及相鄰片段之基因組成

Fig. 2. Organization of *virB4/D4* cluster from Xcv Xvt122 and its neighboring genes. The *virB4/D4* cluster and the flanking genes of Xcv Xvt122 encoded on pNCHU1286 are shown. The ORFs are: 1, incomplete VirD4; 2, VirB7; 3, VirB8; 4, VirB9; 5, VirB10; 6, Vir B11; 7, VirB1; 8, VirB2; 9, VirB3; 10, VirB4; 11, Hypothetical protein XCV2804; 12, Alpha-glucosidase; 13, Hypothetical protein XCV2802; 14, TonB-dependent outer membrane receptor; 15, incomplete Putative alpha-glucosidase . The arrows show the direction of transcription of the ORF. The construction maps for nonpolar mutations of the *virB4* and *virB11* genes are also shown upper or below the gene organization maps.

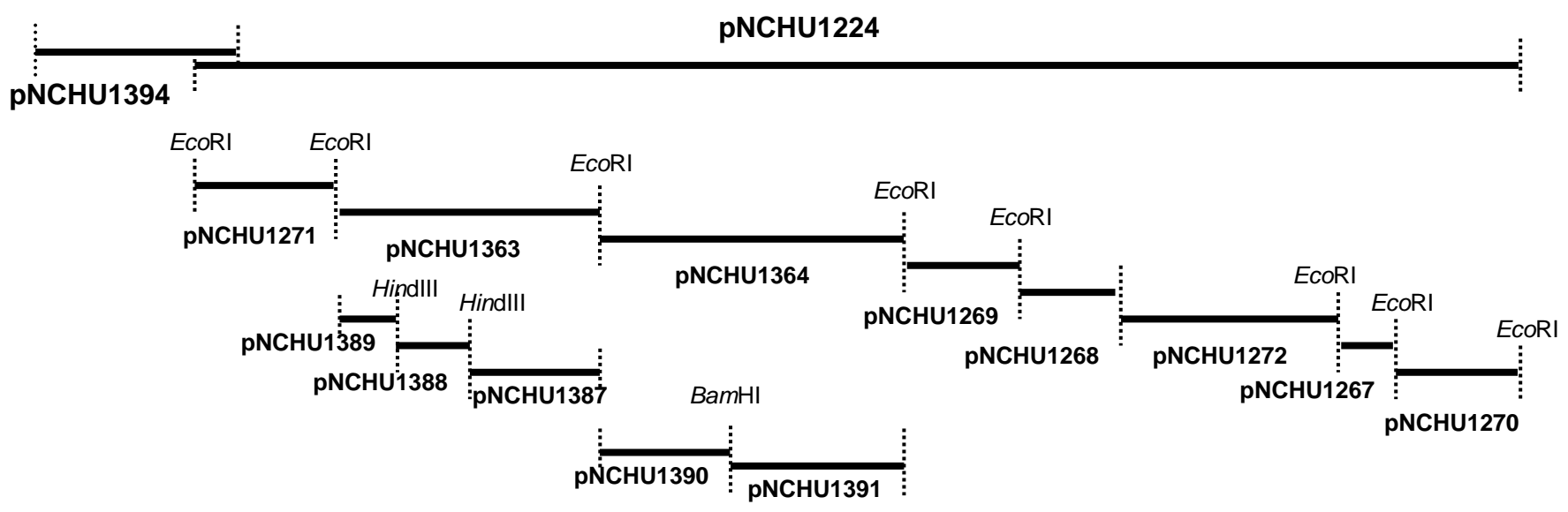
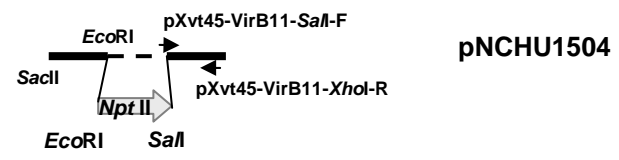
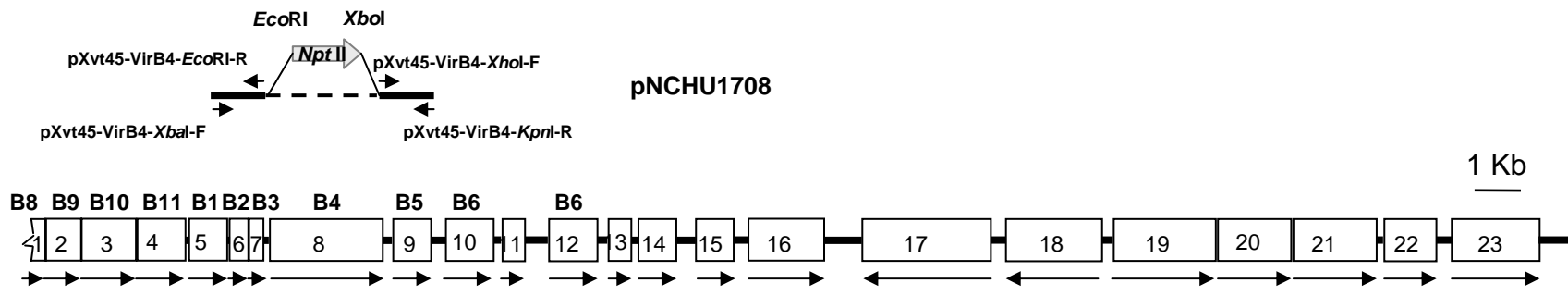


圖3-3. 茄科細菌性斑點病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Xvt45 *virB/D4* 基因組及相鄰片段之基因組成

Fig. 3-3. Organization of *virB4/D4* cluster from Xcv Xvt45 and its neighboring
The *virB4/D4* cluster and the flanking genes of Xcv Xvt45 encoded on pNCHU1394
and pNCHU1224 are shown. The ORFs are: 1, incomplete VirB8; 2, VirB9; 3,
VirB10; 4, VirB11; 5, VirB1; 6, VirB2; 7, VirB3; 8, VirB4; 9, Hypothetical protein
xccb100_1686 (VirB5); 10, VirB6-like membrane protein; 11, Hypothetical protein
XAC2611; 12, VirB6-like membrane protein; 13, Hypothetical protein
xccb100_1688; 14, Hypothetical protein XAC2610; 15, ISxac4 transposase. 16,
Alpha-glucosidase; 17, TonB-dependent outer membrane receptor; 18, Putative
alpha-glucosidase; 19, Hypothetical protein XAC2598; 20, Transport protein; 21,
Cyclomaltodextrin glucanotransferase precursor; 22, Maltose transport gene
repressor; 23, Threonyl-tRNA synthetase. The arrows show the direction of
transcription of the ORF. The construction maps for nonpolar mutations of the *virB4*
and *virB11* genes of Xvt45 are also shown upper or below the gene organization
maps, respectively.

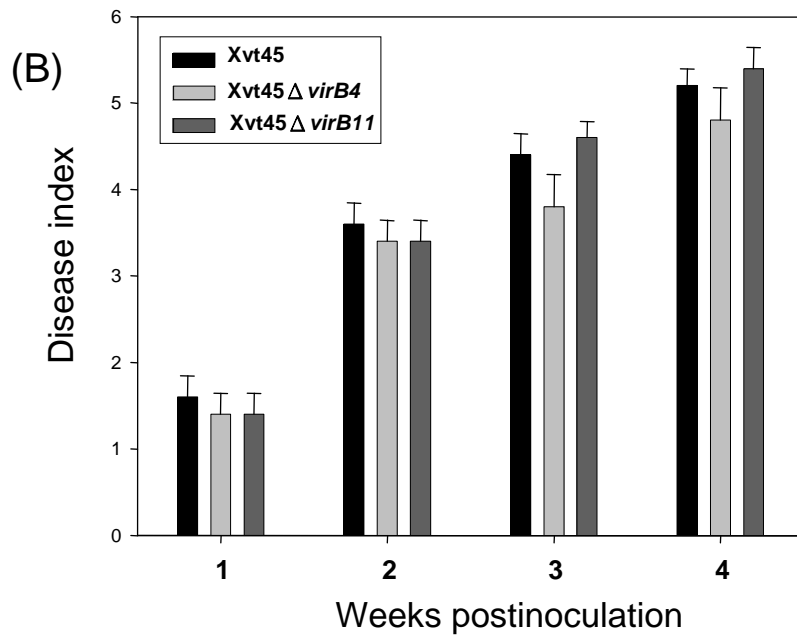
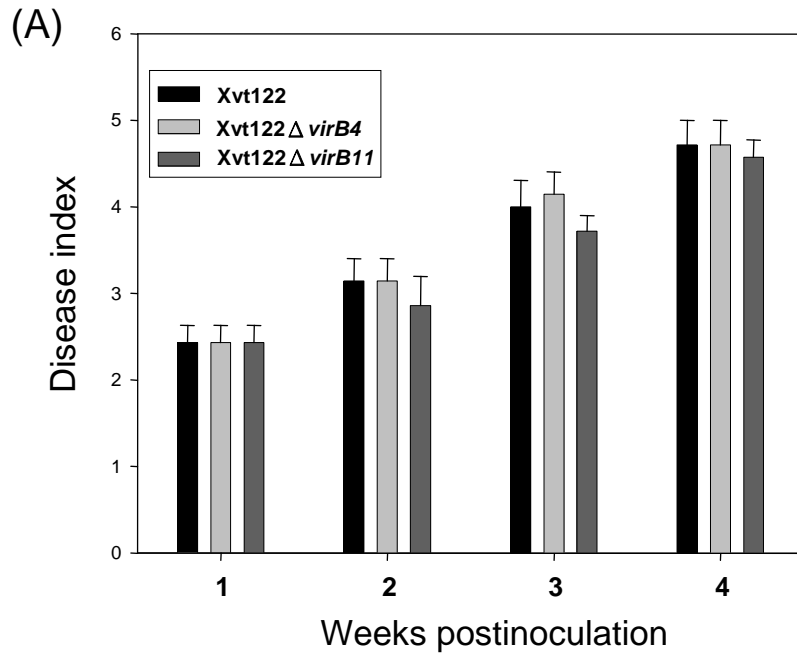
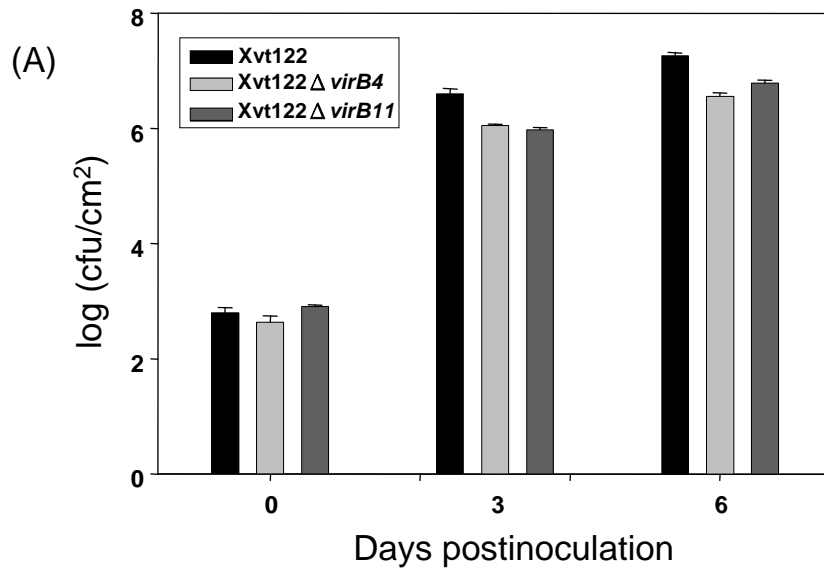


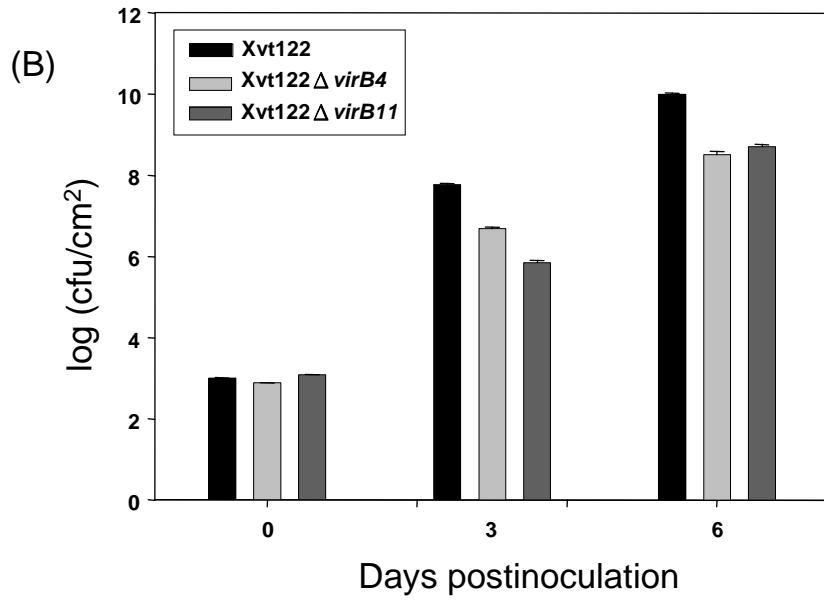
圖3-4. *Xcv* Xvt122和*Xcv* Xvt45野生株及*virB4*基因缺失株 (*Xcv* Xvt122 Δ *virB4*、*Xcv* Xvt45 Δ *VirB4*) 和*virB11*基因缺失株 (*Xcv* Xvt122 Δ *virB11*、*Xcv* Xvt45 Δ *VirB11*) 對寄主番茄病徵發展之影響

Fig. 3-4. Symptom development on tomato leaves. Leaves of tomato cultivar *Bony Best L305* were dipped into 5×10^7 cfu/ml of indicated strains including (A).*Xcv* Xvt122, *virB4* deleted mutant of *Xcv* Xvt122, *virB11* deleted mutant of *Xcv* Xvt122 (B).*Xcv* Xvt45, *virB4* deleted mutant of *Xcv* Xvt45, *virB11* deleted mutant of *Xcv* Xvt45. The disease index was quantified at 1, 2, 3, 4 weeks after inoculation and was scored following the rule described in the Materials and Methods. The disease index was the mean of the analysis of six independent plants. The experiments were repeated two times with similar results.

BB L305



ECW 30R



BB L305

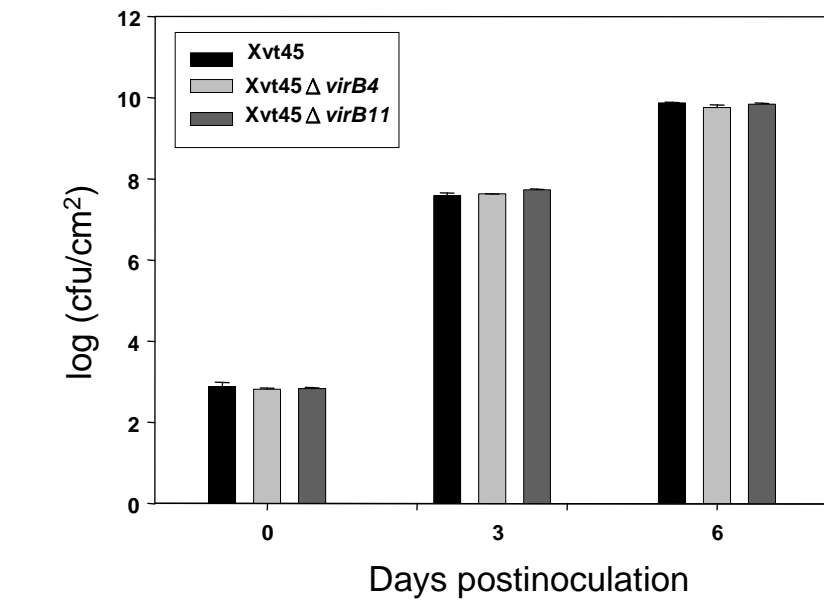


圖3-5. Xcv Xvt122和Xcv Xvt45野生株及*virB4*基因缺失株 (Xcv Xvt122 Δ *virB4*、Xcv Xvt45 Δ *VirB4*) 和*virB11*基因缺失株 (Xcv Xvt122 Δ *virB11*、Xcv Xvt45 Δ *VirB11*) 對寄主番茄和甜椒菌量生長之影響

Fig. 3-5. The bacterial growth on tomato and pepper leaves. (A) The tomato leaves (BBL305) and (B) pepper leaves (ECW30R) were infiltrated with 10^5 cfu/ml of indicated strains including Xcv Xvt122, *virB4* deleted mutant of Xcv Xvt122 and *virB11* deleted mutant of Xcv Xvt122. (C) The tomato leaves were infiltrated with 5×10^4 cfu/ml of indicated strains including Xcv Xvt45, *virB4* deleted mutant of Xcv Xvt45 and *virB11* deleted mutant of Xcv Xvt45. The bacterial growth was quantified at 0, 3, 6, days after inoculation and was determined as the mean of the bacterial number obtained from three independent plants. The experiments were repeated three times with similar results.

第四章、結論

由 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) 引起的茄科細菌性斑點病，需透過第三型分泌系統的調控機制和分泌的有效蛋白(effectors)引發其病原性。病原菌感染植物後所分泌的 effector 蛋白與植物交互作用的結果，可呈現感病性或抗病性等不同反應，因此尋找 effector 蛋白及探討其功能，是目前植物病理學的主流之一。*Xanthomonas* 不同病原型的基因體內個別所包含的 effector 基因至少為 15 種以上 (Thieme et al., 2007)，這些基因除了少數集中分布於病原島嶼區域外，其餘則分散於染色體其他區域及質體上 (Joardar et al., 2005)。本研究中利用 AFLP 分析選殖出 XopE2 effector 蛋白，*xopE2* 在 *Xanthomonas* spp. 中為高度保留的基因。有效蛋白的退化代表其在致病過程中不被需要，或是有其他功能相近的蛋白可以相互取代、因此不同病原型菌株所保留的完整有效蛋白，應對其病原性或寄主範圍有效度不等的影響。實驗結果顯示(1) *xopE2* 突變會影響 Xcv B 群菌株對番茄的毒性，(2)大量表現 A 群或 B 群的 XopE2 蛋白皆能降低細菌的繁殖與病徵的嚴重性，(3) A 群或 B 群的 XopE2 蛋白皆能抑制 *P. syringae* pv. *syringae* 在煙草上引發的過敏性反應。此外，本研究中，所有 B 群菌株的 *xopE2* 基因不只存在於染色體上，亦存在於質體上，而 *xopE1* 基因似乎只存在於 A 群菌株而不存在 B 群菌株。有效蛋白的消長可能反應病原菌於寄主上的適應性，是兩者共同演化的結果，兩菌群之間 *xopE1* 基因存在與否以及質體上是否能獲得 *xopE2* 基因等現象，說明彼此之間的演化可能是由不同的路徑來進行。

茄科細菌性斑點病菌在分類上一直是有爭議的，目前已將 Xcv 之菌株重新分類為四群：A 群 *X. euvesicatoria* (= *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*)、B 群 *X. vesicatoria*、C 群 *X. perforans* 和 D 群 *X. gardneri* (Jones et al., 2000; 2004)。本研究中採用的 A 群供試菌株屬於不同的生理小種，從 AFLP 分析圖譜結果顯示，彼此之間差異性極大，利用生物資訊分析，應有助於探討這些差異是否和生理小種不同所致，以及台灣是否也有 C 群菌株的分佈問題。此外，本研究所使用 Xcv 兩群的 XopE2 蛋白的胺基酸序列

和兩側區域的基因組成具差異性，所以根據 *xopE2* 基因兩側的序列設計適合的引子對，利用 PCR 的技術來區分兩群菌株是值得嘗試且可行之法。

病原細菌在自然界中為了生存，會發展出多種分泌系統，使其能夠順利的侵入寄主，並成功的在寄主體內繁殖寄生，目前認為第三型分泌系統是由鞭毛 (flagellum) 系統演變而來 (Galan and Collmer, 1999)，而第四型分泌系統則由纖毛 (conjugative pilus) 系統演變而來 (Covacci et al., 1999)，雖然在組成分子的序列相似度上並不明顯，兩者間仍具有許多共通處。如 *Helicobacter pylori* 的 CagY 蛋白是和 VirB10 同源的蛋白，根據共軛焦免疫電子顯微鏡觀察結果顯示，CagY 所構成的表面突出物和第三型分泌系統的針狀結構類似 (Rohde et al., 2003)。剔除 *Mesorhizobium loti* R7A 的第四型分泌系統會造成其對不同的寄主植物根瘤的產生有不同的反應，有趣的是，很多 *M. loti* 的品系具有第四型分泌系統，但缺乏第三型分泌系統，可能對某些細菌而言，這兩種系統的功能具重疊性，因此不需兩種系統同時存在即可達到傳送受質的功能 (Llosa and O'Callaghan, 2004)。

X. campestris pv. *vesicatoria* 的第三型分泌系統為致病性上不可或缺的分泌胞器，對其致病機制也有深入之瞭解 (Gürlebeck et al., 2006; Kay and Bonas, 2009)，但所具有的第四型分泌系統的功能與寄主的相互關係大部份仍不清楚，有待深入探討方知其在不同菌株所扮演的角色 (Marques et al., 2001; Brunings and Gabriel, 2003)。本研究從建構好的 *X. campestris* pv. *vesicatoria* A 群菌株 Xvt122 和 B 群菌株 Xvt45 基因庫中選殖出與 VirB/D4 系統相關的基因，在 VirB/D4 基因組的模式中，VirB11 進行 ATP 水解過程後，會改變本身的構形，將受質傳遞至 VirB6/VirB8 的核心構造 (Cascales and Christie, 2004a)，除此之外，VirB11 對 T-pilus 的組成也是必要的 (Sagulenko et al., 2001)。而 VirB4 雖然具有 NTP-binding motif，但目前沒有相當的證據支持其具有 ATP 水解功能，但其對受質傳遞是必要的因子 (Yuan et al., 2005)。將 *Mesorhizobium loti* R7A 共生島嶼 (symbiosis island) 上的 VirB/D4 基因組突變後，發現其在不同寄主有不同的反應，對 *Lotus corniculatus* 植物會延遲根瘤作用，但對 *Liucaena leucocephala* 則能有效產生根瘤作用 (Hubber et al., 2004)。本研究中不同菌株 *virB4* 和 *virB11* 基因缺失

株對寄主有不同反應，甚至同一菌株對不同寄主反應也略有差異，是因必須有其他的第四型分泌系統共同作用，或是其傳送的受質不同所致，需進一步求證。

Alegria 等人(2005)利用酵母菌雙雜合系統 (yeast two-hybrid) 分析顯示 *X. axonopodis* pv. *citri* 的 VirD4 和十二個未知功能的蛋白間有相互關係，這十二個未知蛋白在 C 端皆具有約 120 個胺基酸的相似性區域，包括保留性序列 GLxRIDHV 和 GxxDPAHxRAHV (x 為任意胺基酸) 和高含量的麩胺酸 (glutamine-rich) 特性，推測有可能是第四型分泌系統的受質，將這些蛋白命名為 XVIPs (*Xanthomonas* VirD4 Interacting proteins)。除了酵母菌雙雜合系統外，亦可嘗試利用第二章所採用的 AFLP 技術或二維蛋白質電泳分析技術，篩選出接種 *virB/D4* 基因缺失菌株所誘導表現的寄主植物基因，進而探討這些基因的生物功能與 *virB/D4* 基因的相互關係，以瞭解第四型分泌系統與寄主間的交互作用。



參考文獻

- 許秀惠、徐世典、曾國欽。1990。臺灣茄科植物細菌性斑點病菌之特性、病原型與血清型。植保會刊 32:59-69。
- 許淑瑩。1998。臺灣茄科植物細菌性斑點病菌之變異性及歸類。國立中興大學植物病理學研究所。碩士論文。
- Abramovitch, R. B., Kim, Y. J., Chen, S., Dickman, M. B., and Martin, G. B. 2003. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. EMBO J. 22: 60–69.
- Alegria, M. C., Souza, D. P., Andrade, M. O., Docena, C., Khater, L., Ramos, C. H. I., and Da Silva, A. C. R. 2005. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded Type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. J. Bacteriol. 187:2315-2325.
- Alfano, J. R., Bauer, D. W., Milos, T. M., and Collmer, A. 1996. Analysis of the role of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrpZ harpin in elicitation of the hypersensitive response in tobacco using functionally non-polar *hrpZ* deletion mutations, truncated HrpZ fragments, and *hrmA* mutations. Mol. Microbiol. 19:715-728.
- Alfano, J. R., and Collmer, A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, avr proteins, and death. J. Bacteriol. 179:5655-5662.
- Alfano, J. R., Kim, H.-S., Delaney, T. P., and Collmer, A. 1997. Evidence that the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp*-linked *hrmA* gene encodes an Avr-like protein that acts in an *hrp*-dependent manner within tobacco cells. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:580-588.
- Alfano, J. R., and Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. Annu. Rev. Phytopathol. 42:385-414.
- Anderson, D. M., and Schneewind, O. 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. Science 278:1140-1143.
- Backert, S., and Meyer, T. F. 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. Curr. Opin. Microbiol. 9:1-11.
- Baker, C. J., Atkinson, M. M., and Collmer, A. (1987) Concurrent loss in Tn5 mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* of the ability to induce the hypersensitive response

- and host plasma membrane K^+/H^+ exchange in tobacco. *Phytopathology* **77**: 1268-1272.
- Baron, C., O'Callaghan, D., Lanka, E. 2002. Bacterial secrets of secretion: Euroconference on the biology of type IV secretion processes. *Mol. Microbiol.* 43:1359-1365.
- Baron, G., Thorstenson, Y. R., and Zambryski, P. C. 1997. The lipoprotein VirB7 interacts with VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 179:1211-1218.
- Beaulieu, C., Minsavage, G. V., Canteros, B. I., and Stall, R. E. 1991. Biochemical and genetic analysis of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:446-451.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswaid, E. A., Reiss, B., and Schaller, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19:327-336.
- Bell, K. S., Sebahia, M., Pritchard, L., Holden, M. T., Hyman, L. J., Holeva, M. C., Thomson, N. R., Bentley, S. D., Churcher L. J., Mungall, K. et al. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11105-11110.
- Bogdanove, A. J., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Cornelis, G. R., Huang, H.-C., Hutcheson, S. W., Panopoulos, N. J., and Van Gilsegem, F. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 20:681-683.
- Bouzar, H., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Stall, R. E., and Scott, J. W. 1994. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathology* 84:39-44.
- Bruning, A. M., and Gabriel, D. W. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4:141-157.
- Büttner, D., and Bonas, U. 2002. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* 21:5313-5322.
- Cascales, E., and Christie, P. J. 2003. The versatile bacterial Type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:137-149.
- Cascales, E., and Christie, P. J. 2004a. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* 304:1170-1173.

- Cascales, E., and Christie, P. J. 2004b. *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17228-17233.
- Castañeda, A., Reddy, J. D., El-Yacoubi, B., and Gabriel, D. W. 2005. Mutagenesis of all eight *avr* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one *avr* gene affected race specificity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:1306-1317.
- Christie, P. J. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* 40:294-305
- Christie, P. J. 2004. Bacterial type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochem. Biophys. Acta* 1694:219-234.
- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., Cascales, E. 2005. Biogenesis, architecture, and function of bacterial Type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:451-85.
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W.-L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., van Dijk, K., and Alfano, J. R. 2000. *Pseudomonas syringae* Hrp type secretion system and effector proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8770-8777.
- Collmer, A., Lindeberg, M., Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D. J., and Alfano, J. R. 2002. Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends Microbiol.* 10: 462-469.
- Cornelis, G. R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:811-825.
- Covacci, A., and Rappuoli, R. 1993. Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. *Mol. Microbiol.* 8:429-434.
- Covacci, A., Telford, J. L., Giudice, G. D., Parsonnet, J., and Rappuoli, R. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284:1328-1333.
- Cunnas, S., Lindeberg, M., and Collmer, A. 2009. *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr. Opin. in Microbiol.* 12:1-8.
- da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furian, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M. C., Amaral, A. M. do, Bertolini, M. C., Camargo, L. E., Camarotte, A., Cannavan, G. F., et al. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-463.

- Das, A., and Xie, Y. H. 2000. The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J. Bacteriol.* 182:758-763.
- DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y. B., Nomura, K., and He, S. Y. 2004. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9927-9932
- Dhar, S. K., Soni, R. K., Das, B. K., and Mukhopadhyay, G. 2003. Molecular mechanism of action of major *Helicobacter pylori* virulence factors. *Mol. Cell. Biochem.* 253:207-215.
- Ding, Z., Atmakuri, K., and Christie, P. J. 2003. The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.* 11:527-535.
- Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Plano, G. V., and Pugsley, A. P. 2006. Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 62:308-319.
- Engledow, A. S., Medrano, E. G., Mahenthiralingam, E., LiPuma, J. J. and Gonzalez, C. F. 2004. Involvement of a plasmid-encoded Type IV secretion system in the plant tissue watersoaking phenotype of *Burkholderia cenocepacia*. *J. Bacteriol.* 186:6015-6024.
- Fenselau, S., and Bonas, U. 1995. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encode eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:845-854.
- Folkertsma, R. T., Rouppe van der Voort, J. N., de Groot, K. E., van Zandvoort, P. M., Schots, A., Gommers, F. J., Helder, J., and Bakker, J. 1996. Gene pool similarities of potato cyst nematode populations assessed by AFLP analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:47-54.
- Fronzes, R., Christie, P. J., and Waksman, G. 2009. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:703-714.
- Fujikawa, T., Ishihara, H., Leach, J. E., and Tsuyumu, S. 2006. Suppression of defense response in plants by the *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:342-349.
- Galan, J., and Collmer, A. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284:1322-1328.
- Galan, J. E., and Wolf-Watz, H. 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.

- Gomez-Gomez, L., and Boller, T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* 5: 1003–1011.
- Gonzalez, C., Restrepo, S., Tohme, J., and Verdier, V. 2002. Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-based DNA fingerprinting techniques. *FEMS Microbiol. Lett.* 215:23-31.
- Gophna, U., Ron, E. Z., and Graur, D. 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal transfer events. *Gene* 312:151-163.
- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., and Dangl, J. L. 2006. subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 60:425-449.
- Greenberg, J. T., Guo, A., Klessig, D. F., and Ausubel, F. M. 1994. Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77:551-563.
- Groisman, E. A., and Ochman, H. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87:791-794.
- Guo, M., Tian, F., Wamboldt, Y., and Alfano, J. R. 2009. The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 1069-1080.
- Gürlebeck, D., Thieme, F., and Bonas, U. 2006. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant. Physiol.* 163:233-255.
- Hacker, J., and Kaper, J. B. 1999. The concept of pathogenicity islands, P. 1-11. *In* J. B. Kaper and J. Hacker (ed.), *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Hacker, J. and Kaper, J. B. 2000. Pathogenicity island and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:641-679.
- Hauck, P., Thilmony, R., and He, S. Y. 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 8577–8582.
- He, S. Y., Huang, H. C., and Collmer, A. 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{PSS}: A protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73:1255-1266.

- He, Y.-Q., Zhang, L., Jiang, B.-L., Zhang, Z.-C., Xu, R.-Q., Tang, D.-J., Qin, J., Zhang, X., Liao, J., Cao, J.-R., Zhang, S.-S., Wei, M.-L., Liang, X.-X., Lu, G.-T., Feng, J.-X., Chen, B., Cheng, J., and Tang, J.-L. 2007. Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biology* 8:R218.
- Hensel, M., Nilolaus, T., and Egelseer, C. 1999. Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 31:489-498.
- Horsfall, J. G., and Barratt, R. W. 1945. An improved grading system for measuring plant disease. *Phytopathology* 35: 655. (Abstract)
- Huang, H.-C., Schuurink, R., Denny, T. P., Atkinson, M. M., Baler, C. J., Yucel, I., et al. 1988. Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco. *J Bacteriol* 170:4748-4756.
- Hubber, A., Vergunst, A. C., Sullivan, J. T., Hooykans, P. J. J., and Ronson, C. W. 2004. Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 typeIV secretion system. *Mol. Microbiol.* 54:561-574.
- Hueck, C. J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 62:379-433.
- Israel, D. A., Salama, N., Krishna, U., Rieger, U. M., Atherton, J. C., Falkow, S., and Peek, R. M. 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:14625-14630.
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H. S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S., Tang, X., Dickman, M. B., Collmer, A. and Alfano, J. R. 2004. Identification of *Pseudomonas syringae* Type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J.* 37:554-565.
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R. W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Deboy, R., Durkin, A. S., Giglio, M. G. et al. 2005. Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J. Bacteriol.* 187:6488-6498.
- Jones, A. M., and Dangl, J. L. 1996. Logjam at the Styx: programmed cell death in plants.

- Trends Plant Sci 1:114-119.
- Jones, J. B., and Stall, R. E. 1998. Diversity among Xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:41-58.
- Jones, J. B., Bouzar, H., Stall, R. E., Almira, P. D., Roberts, P. D., Bowen, B. W., Sudberry, J., Strickler, P. M. and Chun, J. 2000. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 50:1211-1219.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., and Schaad, N. W. 2004. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *System. Appl. Microbiol.* 27:755-762.
- Kang, L., Tang, X., and Mysore, K. S. 2004 *Pseudomonas* type III effector AvrPto suppresses the programmed cell death induced by two nonhost pathogens in *Nicotiana benthamiana* and Tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:1328-1336.
- Kay, S., and Bonas, U. 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. in Microbiol.* 12:37-43.
- Keen, N. T. 1990. gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24:447-463.
- Kim, M. G., da Cunha, L., McFall, A. J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J. L., and Mackey, D. 2005. Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* 121:749–759.
- Klement, Z. 1982. Hypersensitivity. In M. S. Mount and G. H. Lacy (eds.) *Phytopathogenic Prokaryotes*, Vol. 2. Academic Press, New York, pp.149-177.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Rorer, G. T., Farris, M. A., Roop II, R. M., and Peterson, K. M. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175-176.
- Kumar, R. B., Xie, Y. H. And Das, A. 2000. Subcellular localization of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. *Mol. Microbiol.* 36:608-617.
- Lawley, T. D., Klimke, W. A., Gubbins, M. J., and Frost, L. S. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.* 224:1-15.
- Li, J., Wolf, S. G., Elbaum M., and Tzfira, T. 2005. Exploring cargo transport mechanics in the type IV secretion systems. *Trends Microbiol.* 13:295-298

- Lin, J.-J., Kuo, J., and Ma, J. 1996. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Research* 24:3649-3650.
- Lindeberg, M., Stavarinides, J., Chang, J. H., Alfano, J. R., Collmer, A., Dangl, J. L., Greenberg, J. T., Mansfield, J. W., and Guttman, D. S. 2005. Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:275-282.
- Lindgren, P.B., Peet, R. C., and Panopoulos, N. J. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168:512-522.
- Llosa, M. and O'Callaghan, D. 2004. Euroconference on the biology of type IV secretion processes: bacterial gates into the outer world. *Mol. Microbiol.* 53:1-8.
- Lopez-Solanilla, E., Bronstein, P. A., Schneider, A. R., and Collmer, A. 2004. HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol. Microbiol.* 54:353-365.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephen, C. T., and Bruijn, F. J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85:528-536.
- Makarova, K. S., Aravind, L., and Koonin, E. V. 1999. A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Sci.* 8:1714-1719.
- Mansfield, J., Bennett, M., Bestwick, C., and Woods-Tör, A. 1997. Phenotypic expression of gene-for-gene interaction involving fungal and bacterial pathogens: variation from recognition to response. In Crute, I. R., Holub, E. B., Burdon, J. J. (eds), *The Gene-for-Gene Relationship in Plant-Parasite Interactions*. Wallingford: CAB International, pp. 265-291.
- Marie, C., Broughton, W. J., and Deakin, W. J. 2001. Rhizobium type III secretion systems: Legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:336-342.
- Marques, M. V., da Silva, A. M., and Gomes, S. L. 2001. Genetic organization of plasmid pXF51 from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Plasmid* 45:184-199.
- Metz, M., Dahlbeck, D., Morales, C. Q., Sady, B. A., Clark, E. T., and Staskawicz, B. J. 2005. The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *Plant. J.*

41:801-814.

- Mudgett, M. B. 2005 New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:509-531.
- Nagai, H., and Roy, C. R. 2003. Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. *Cell. Microbiol.* 5:373-383.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., and Bonas, U. 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* 41:1271-1281.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., and Bonas, U. 2002. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J. Bacteriol.* 184:1340-1348.
- Nimchuk, Z. L., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R. T., Katagiri, F., and Dangl, J. L. 2000. Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several Type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* 101:353-363.
- Nimchuk, Z. L., Fisher, E. J., Desveaux, D., Chang, J. H., and Dangl, J. L. 2007. The HopX (AvrPphE) family of *Pseudomonas syringae* Type III effectors require a catalytic triad and a novel N-terminal domain for function. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:346-357.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198: 249–266.
- O'Neill, N. R., van Berkum, P., Lin, J. J., Kuo, J., Ude, G. N., Kenworthy, W. and Saunders, J. A. 1997. Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopathology* 87:745-750.
- Pizza, M., Bognoli, M., Manetti, R., Covacci, A., and Rappuoli, R. 1990. The subunit S1 is important for pertussis toxin secretion. *J. Biol. Chem.* 265:17759-17763.
- Plano, G. V., Day, J. B., and Ferracci, F. 2001. Type III export: new uses for an old pathway. *Mol. Microbiol.* 40:284-293.
- Qian, W., Jia, Y., Ren, S. X., He, Y. Q., Feng, J. X., Lu, L. F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D. J., Tang, H. et al. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* 15:757-767.

- Restrepo, S., Duque, M., Tohme, J., and Verdier, V. 1999. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiology* 145:107-114.
- Robert-Seilaniantz, A., Shan, L., Zhou, J. M., and Tang, X. 2006. The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Type III effector HopF2 has a putative myristoylation site required for its avirulence and virulence functions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:130-138.
- Rohde, M., Puls, J., Buhrdorf, R., Fischer, W., and Haas, R. 2003. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol Microbiol.* 49: 219-234.
- Rohmer, L., Guttman, D. S., and Dangl, J. L. 2004. Diverse evolutionary mechanisms shape the type III effector virulence factor repertoire in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Genetics* 167:1341-1360.
- Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J., and Christie, P. J. 2001. Role of *Agrobacterium* Vir B11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J. Bacteriol.* 183: 5813-5825.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L. et al. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415: 497-502.
- Sambrook, J., Maniatis, T. I., and Fritsch, E. F. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawada, H., Suzuki, F., Matsuda, I., and Saitou, N. 1999. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and evolutionary stability of *hrp* gene cluster. *J. Mol. Evol.* 49:627-644.
- Schechter, L. M., Vencato, M., Jordan, K. L., Schneider, S. E., Schneider, D. J., and Collmer, A. 2006. Multiple approaches to a complete inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion system effector proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1180-1192.
- Schulein, R., and Deho, C. 2002. The VirB/VirD4 type IV secretion system of Bartonella is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol. Microbiol.* 46:1053-1067.
- Segal, G., Feldman, M., and Zusman, T. 2005. The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:65-81.
- Seubert, A., Hiestand, R., de la Cruz, F., and Dehio, C. 2003. A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 49:1253-1266.

- Shan, L., Thara, V. K., Martin, G. B., Zhou, J.-M., and Tang, X. 2000. The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell* 12:2323-2337.
- Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. C., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., Barros, M. H., Bonaccorsi, E. D., Bordin, S., Bové, J. M., Briones, M. R. S., Bueno, M. R. P., Camargo, A. A. et al. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151-157.
- Spudich, G. M., Fernandez, D., Zhou, X. R., and Christie, P. J. 1996. Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7512-7517.
- Stall, R. E., Beaulieu, Egel, C., D., Hodge, N. C., Leite, R. P., Minsavage, G. V., Bouzar, H., Jones, J. B., Alvarez, A. M. and Benedict, A. A. 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44:47-53.
- Stall, R. E., Jones, J. B., and Minsavage, G. V. 2009. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:265-284.
- Staskawicz, B. J., Mudgett, M. B., Dangl, J., and Galan, J. E. 2001 Common and contrasting themes of plants and animal diseases. *Science* 292:2285-2289.
- Stein, M., Rappuoli, R., Covacci, A. 2000. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1263-1268.
- Stevens, C., Bennett, M. A., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Taylor, J. D., and Mansfield, J. W. 1998 Sequence variations in alleles of the avirulence gene *avrPphE.R2* from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* lead to loss of recognition of the AvrPphE protein within bean cells and a gain in cultivar-specific virulence. *Mol. Microbiol.* 29:165-177.
- Sundin, G. W. 2007. Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to their evolutionary history of their hosts. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:129-151.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., A. C., McHardy, Meyer F.,

- Mittenhuber, G., Nies, D. H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S. C., Vorholter F.-J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D., and Kaiser, O. 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.* 187:7254-7266.
- Thieme, F., Szczesny, R., Urban, A., Kirchner, O. Hause, G., and Bonas, U. 2007. New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:1250-1261
- Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Hockenhull, R., Jackson, R. W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., Bennett, M. A., Stevens, C., Vivian, A., Taylor, J. D., and Murillo, J. 2000. Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.* 19:3204-3214.
- Vauterin, L. Swings, J., Kersters, K., Gillis, M., Mew, T. W., Schroth, M. N., Palleroni, N. J., Hildebrand, D. C., Stead, D. E., Civerolo, E. L., Hayward, A. C., Maraïte, H., Stall, R. E., Vidaver, A. K., and Bradbury, J. F. 1990. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 312-316.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swing, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:472-489.
- Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90:677-682.
- Vincent, C. D., Friedman, J. R., Jeong, K. C., Buford, E. C., Miller, J. L., and Vogel, J. P. 2006. Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 62:1278-1291.
- Vogel, J. P., and Isberg, R. R. 1999. Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:30-34.
- Vos, P., Hoger, R., Bleeker, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijter, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Weiss, A. A., Johnson, F. D., and Burns, D. L. 1993. Molecular characterization of an operon requires for pertussis toxin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2970-2974.
- Yuan, Q., Carle, A., and Gao, C., et al. 2005 Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-

VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J. Biol. Chem.* 280:26349-26359.

Zhao, Y., Ma, Z., and Sundin, G. W. 2005. Comparative genomic analysis of the pPT23A plasmid family of *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 187:2113-2126.

Zhu, W., Yang, B., Chittoor, J. M., Johnson, L. B., and White, F. F. 1998. AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 824–832.

