

猕猴桃溃疡病菌质粒的分离与功能分析

王月^{1,2} 董俊² 吴群³ 汤小美¹ 刘普²

1. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; 2. 安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036;
3. 浙江省衢州市经济特产站, 衢州 324000

摘要 分离猕猴桃溃疡病菌中的质粒, 从质粒角度探索细菌的致病机制, 分析其编码的主要基因、毒力因子。用试剂盒提取分离自安徽省岳西县猕猴桃溃疡病菌株 JF8 的质粒, 对质粒 DNA 进行高通量测序及生物信息学分析。质粒基因组拼接显示菌株 JF8 质粒全长 65 149 bp, GC 含量 56.29%, 包含 45 个假定蛋白(hypothetical protein)和 38 个有预测功能的蛋白。生物信息学分析发现, 质粒携带多达 8 个直接参与基因重组和转移的转运蛋白(mobile element protein), 5 个基因直接参与细菌Ⅳ型分泌系统、1 个基因参与细菌Ⅲ型分泌系统。基因 *ParA* 编码的蛋白是一个 ATP 酶, 对质粒的分配以及维持质粒稳定具有重要作用, 编码转录激活蛋白的基因 *LuxR* 与细菌的群体感应机制相关, 影响毒力因子的表达和分泌, 基因 *UmuC* 是细菌中 SOS 应答系统的组分之一, 控制细胞中聚合酶 V 的量。

关键词 丁香假单胞菌; 猕猴桃溃疡病; 质粒; 功能分析

中图分类号 S 436.634 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)03-0039-07

由丁香假单胞菌猕猴桃致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Psa*) 引起的猕猴桃细菌性溃疡病是威胁猕猴桃产业发展的重要病害。特别是近些年出现的红肉猕猴桃种植热潮, 导致溃疡病随‘红阳’等易感病品种迅速在猕猴桃产区扩散蔓延, 给我国乃至全球猕猴桃产业造成了严重的经济损失。

猕猴桃溃疡病是一种细菌性病害, 病原菌为革兰氏阴性菌, 主要危害猕猴桃的主蔓、枝干、叶片和花蕾^[1-2]。该病自 1984 年在日本首次被发现, 随后在韩国、意大利、智利、新西兰和中国等十几个国家中均有发现^[2-4]。在我国, 自 20 世纪 90 年代在湖南省石门县东山峰农场和安徽省岳西县主簿镇等地方发现猕猴桃溃疡病以来, 现已在陕西、四川、湖南、贵州、江苏、浙江和安徽等 16 个省份发生和为害, 一般病株率在 20% 左右, 发病严重的果园病株率高达 86%^[5-6]。中国、新西兰、美国和欧洲植物保护组织 (EPPO) 已分别将 *Psa* 作为植物检疫对象和 A₂ 类检疫性有害生物, 以控制该病害的迅速蔓延。

溃疡病具有发生范围广、致病性强、传播速度快和防治难度大等特点, 极易短期内在园区内扩散蔓

延。按照分泌毒素和致病力等不同, 将世界猕猴桃 *Psa* 分为 4 种不同的致病基因型 (genotype), 即 *Psa*-J (含有编码菜豆毒素基因簇)、*Psa*-K (含有编码冠菌素基因簇)、*Psa*-V (缺乏编码菜豆毒素和冠菌素基因簇) 和 *Psa*-LV (缺少部分 effector 基因簇)^[4,7], 不同基因型菌株存在着明显的致病差异。其中, *Psa*-LV 致病力较弱, 仅在叶片上形成病斑; 而 *Psa*-V 致病力最强, 危害也最为严重^[4,8]。我国 *Psa* 菌株均为 *Psa*-V, 到目前为止虽然尚未发现其他基因型, 但在筛选有效防治药剂和防控手段时, 应该考虑不同致病基因型之间的差异。目前猕猴桃溃疡病的防治主要依赖药物防治, 如溃注灵、噻霉酮、硫酸铜、噻菌铜和氢氧化铜等, 春雷霉素和农用链霉素等抗生素也有很好的防治效果。然而, 铜制剂的使用易使猕猴桃产生药害, 长期使用链霉素也已经在病原菌 (包括 *Psa*) 中引起了链霉素抗性, 并且药物防治还会污染环境, 许多国家限制了铜化合物和抗生素的使用^[9-10], 因此, 抗病品种的选育以及新型预防手段、防治药剂的开发至关重要。

溃疡病菌作为革兰氏阴性细菌, 在病菌基因组中除染色质以外, 常常还含有质粒, 参与病菌的致病

收稿日期: 2017-09-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401831); 国家大学生创新训练项目 (201610364018)

王月, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学, 逆境生物学与遗传改良, E-mail: 1479309514@qq.com

通信作者: 刘普, 博士, 副教授, 研究方向: 猕猴桃溃疡病菌演化、抗病种质资源筛选, E-mail: puliu@ahau.edu.cn

过程和基因的平行转移来快速适应新环境。质粒是位于染色体外的能够自我复制的 DNA 分子,大多数质粒是环状的。根据质粒编码的基因以及其对宿主细胞的影响不同,将质粒分为 5 种类型,分别是抗性质粒、产细菌素和抗生物质粒、产毒质粒、接合性质粒、具生理功能的质粒^[11]。质粒的作用可能包括以下几个方面:(1)作为能够自主复制的遗传单位,质粒能够提升宿主对营养缺乏、有抗生素和重金属存在等逆境环境的适应力;(2)很多质粒携带有毒力基因座,可以影响病原菌的致病性;(3)质粒经常携带可移动元件(如转座子),可以作为基因水平转移的介导,这是耐药细菌产生的重要机制之一^[12-13]。基于以上研究,促使我们从质粒角度探索细菌的致病机制,分析编码的主要基因、毒力因子等。

1 材料与方法

1.1 试材及取样

猕猴桃溃疡病病菌选取笔者所在实验室于 2012 年自安徽省岳西县主簿镇‘金丰’猕猴桃的溃疡病菌株 JF8。取 -80 °C 保存的菌种,在液体 KB 培养基中于 25 °C 的条件下活化 48 h,取适量菌液接种在斜面上,25 °C 培养 48 h。挑取单菌落于液体培养基中,25 °C,180 r/min,培养 24 h,4 °C 保存备用。

1.2 质粒提取

按照溃疡病菌的生长曲线,选取对数生长期菌体,4 °C 离心后收集菌体,双蒸水(ddH₂O)洗涤后用少量质粒提取试剂盒(TIANGEN,北京)提取质粒,详细步骤参考说明指导书。为提高洗脱率,将 ddH₂O 在 65 °C 恒温水浴锅中预热,最后质粒溶解于 20 μL 的 ddH₂O 中,保存在 -20 °C 的冰箱中备用。

1.3 测序质控及信息分析

对样本进行双端(paired end)测序获得原始数据,对原始数据进行质量控制。质控结果符合测序标准后,用 SPAdes 软件进行基因组拼接,其中 SPAdes 是专门用来拼接小型基因组的软件,拼接获得原始 scaffold,而后用 Gapcloser 及 GapFiller 对 scaffold 补 Gap,最后采用 PrInSeS-G 进行序列校正^[14]。随后采用 RAST 对基因组进行注释,RAST 首先对基因组进行基因预测,而后对基因组做功能注释。样本预测的 ORF 序列通过 EMBOSS 中的 transeq 程序转换为蛋白序列,后将蛋白序列与公共数据进行比较,通过基因的同源性进行功能注释。注释上 NR、CDD、PFAM、SWISS-PROT、

TREMBL 和 COG 库的基因,进一步进行 GO 功能、COG 功能和 pathway 显著性的富集分析。

2 结果与分析

2.1 质粒 DNA 的提取

根据电泳检测结果,选取条带清晰的质粒 DNA (OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.8~2.1)切胶回收后送到生工生物工程股份有限公司(上海)进行下一步的测序工作。双端(paired end)测序,共获得的数据量为:reads 数目 413 666 条,共 104 902 726 bp,其中高质量的数据(>Q20)94 531 269 bp,占总数 90.11%。鉴于高通量测序数据错误率可能对拼接结果产生影响,需对原始数据进行质量控制,滑动窗口法去除低质量片段:质量阈值 20(错误率=1%),窗口大小 5 bp,长度阈值 35 bp。切除 reads 中含 N 部分序列:长度阈值 35 bp。99% 以上的序列经 QC 之后留存下来,该质控结果符合正常测序数据质量标准。从 QC 之后数据中随机抽取 10 000 条 reads 比对到 nt 数据库中来污染检测(表 1)。

2.2 基因预测

通过质粒基因组拼接,结果显示质粒全长 65 149 bp,平均 GC 含量为 56.29%,编码有 83 个基因(表 2 和表 3),基因平均编码长度 611 bp,编码 45 个假定蛋白(hypothetical protein)和 38 个有预测功能的蛋白(表 4)。38 个功能蛋白中,有 6 个与 T4SS 或 T3SS 型分泌系统相关,参与细菌的结合转移和毒力因子的传送,涉及病原菌耐药性和致病性的产生^[15-16];含 8 个直接参与基因重组和转移的转运蛋白(mobile element protein);还含有与转录调控、毒素代谢与转运相关的蛋白,如 DMT 基因家族。

2.3 JF8 基因组功能注释

1) Gene Ontology(GO)分类。对预测的基因进行了 GO 功能分类预测,共有 33 个基因注释上 69 条 GO 功能分类。如图 1 所示,从生物学过程、细胞组分和分子功能 3 个方面分析基因功能。

生物过程中,有与细胞杀伤、代谢进程、细胞进程、信号、运动、单一有机体进程、生物调控、应激、定位、多组织进程、细胞成分组织或生物合成相关的基因,其中与应激、生物调控及生物合成相关的基因可能在宿主抵御不良环境时发挥作用;细胞组分中,有与胞外区、细胞、细胞膜、细胞零件、胞外区零件、细胞膜零件、细胞器相关的基因,其中与膜相关的基因数量最多。

表 1 双端测序部分比对结果

Table 1 Paired end sequences compared with database

物种 Species	读取数 Read numbers
丁香假单胞菌番茄致病变种 DC3000 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000	3 820
丁香假单胞菌菜豆致病变种 1448A <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	696
丁香假单胞猕猴桃致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	636
丁香假单胞菌 <i>Pseudomonas syringae</i>	462
树生黄单胞菌李变种 CFBP5530 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> str. CFBP5530	378
丁香假单胞菌丁香致病变种 B728a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	270
萨氏假单胞菌 <i>Pseudomonas savastanoi</i>	254
丁香假单胞菌茶致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Theae</i>	137
丁香假单胞菌番茄致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	129
丁香假单胞菌斑点致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	91
丁香假单胞菌菜豆致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	84
荧光假单胞菌 F113 <i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	72
假单胞根际土壤菌 NFM421 <i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421	61
丁香假单胞大豆致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	41

表 2 猕猴桃溃疡病菌株 JF-8 基因组基本情况

Table 2 The fundental state about kiwifruit bacterial canker of JF8 genome

分类 Class	数值 Number
基因组大小/bp Size	65 149
GC 含量/% G+C content	56.29
编码蛋白的基因 Protein-coding genes	83
最小长度/bp Min length	117
最大长度/bp Max length	3 375
平均长度/bp Average length	611.13
编码基因总长/bp Total coding gene	50 724
编码率/% Coding ratio	77.86
tRNA	0
rRNA	0

表 3 数据库注释结果统计

Table 3 Gene annotation by databases

数据库来源 Database source	基因数 Number of unigenes	占基因总数比例/% Percentage
保守域数据库 CDD	34	40.96
蛋白直系同源数据库 COG	24	28.92
非冗余数据库 NR	82	98.8
蛋白家族数据库 PFAM	32	38.55
已注释的蛋白质序列数据库 Swissprot	26	31.33
EMBL 数据库翻译所得蛋白质数据库	79	95.18
TrEMBL		
基因本体数据库 GO	33	39.76
京都基因和基因组百科全书 KEGG	15	18.07
全部注释基因 Total unigenes	83	100

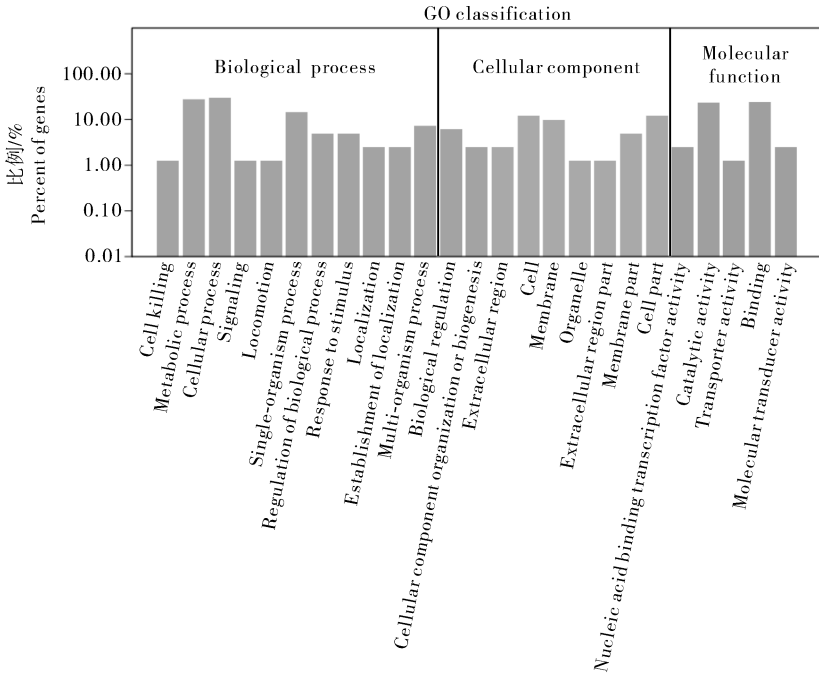
表 4 基因功能预测

Table 4 The result of gene prediction

基因种类 The type of gene	数量 Amount
假定蛋白 Hypothetical protein	45
复制、重组、转录调控基因 Replication, recombination and repair	10
酶代谢和转运相关基因 Enzyme transport and metabolism concerning gene	9
转运蛋白 Mobile element protein	8
细菌分泌系统相关基因 Bacterial secretion system concerning gene	6
噬菌体 Phage	2
其他功能 Other function	3
基因总数 Total gene	83

2) COG 功能分类。对预测基因进行 COG 功能分类预测，共有 24 个 Genes 被注释上 8 种 COG 分类。unigenes 的 COG 分类图如图 2 所示，与质粒复制、重组、修复方面的基因数量最多，其次为胞内运输、分泌和囊泡运输，此类功能基因参与分泌蛋白的合成，可能与病原菌的致病性相关^[17]。

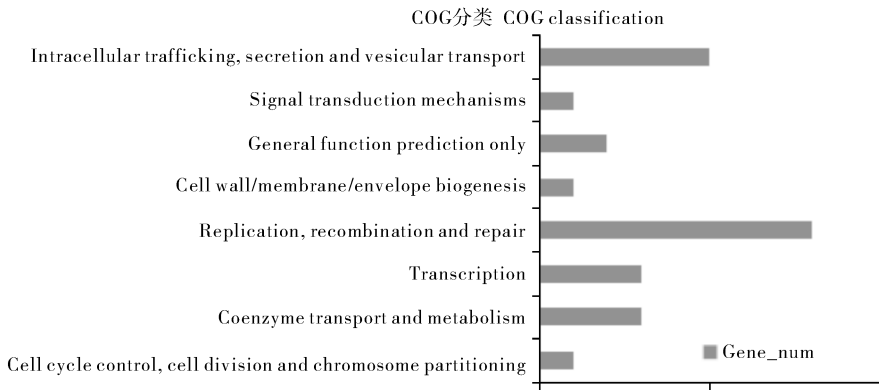
3) unigenes 的 KEGG 代谢通路注释。对所有 unigenes 进行 KEGG 代谢通路注释，9 个基因共注释上 7 个 pathway，该样本注释上的 7 个 pathway 如表 5。由表可知，与环境信息处理相关的基因数最多，包含在细菌分泌系统和双组分系统中，值得关注的是细胞进程中含有与细菌趋化性相关的基因，细菌的趋化性能够帮助其适应不良环境^[18]，这可能与 *Psa* 的耐药性相关。



有 33 个基因注释上 69 条 GO 功能分类,从生物学过程、细胞组分和分子功能 3 个方面对基因及其产物的功能进行定义。其中生物过程是指细胞水平、器官水平、组织水平等一系列分子事件的集合,细胞组分描述的是在亚细胞结构和大分子化合物水平基因产物的位置,分子功能指的是基因产物在分子水平上的基本活动。There are 33 genes annotated on 69 function classifications. Defining the functions of genes and their products in terms of biological processes, cellular components and molecular functions. The biological process refers to the collection of a series of molecular events such as cell level, organ level, and tissue level. The cell component describes the position of the gene product at the subcellular structure and the macromolecular compound level. The molecular function refers to the gene product in the molecule level.

图 1 猕猴桃溃疡病菌株 JF-8 基因功能 GO 分析

Fig.1 Gene ontology analysis about JF8



有 24 个基因预测有相应的 COG 注释,注释功能包括胞内运输、分泌和囊泡运输,信号转导、通用功能预测,细胞壁、细胞被膜起源,复制、重组和修复,转录,辅酶转运和代谢,细胞周期调控、细胞分裂和染色体分离。There are 24 genes predicted to have COG annotations. Annotation functions include intracellular trafficking, secretion and vesicular transport, signal transduction mechanisms, general function prediction, cell wall, membrane and cell envelope biogenesis, replication, recombination and repair, transcription, coenzyme transport and metabolism, cell cycle control, cell division and chromosome partitioning.

图 2 COG 功能分类

Fig.2 COG function classification

表5 代谢通路 pathway 注释

Table 5 Unigenes annotated in KEGG pathway

KEGG号 Pathway ID	途径名 Pathway name	分类 Group	基因数 Gene number
ko03070	细菌分泌系统 Bacterial secretion system	环境信息处理 Environmental information processing	3
ko01230	氨基酸生物合成 Biosynthesis of amino acids	代谢 Metabolism	2
ko02020	双组份系统 Two-component system	环境信息处理 Environmental information processing	2
ko05120	幽门螺旋杆菌感染上皮细胞信号传导通路 Epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> infection	病害 Diseases	2
ko00400	苯丙氨酸 Phenylalanine	代谢 Metabolism	2
ko02030	细菌趋化性 Bacterial chemotaxis	细胞过程 Cellular processes	1
ko00360	苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	代谢 Metabolism	1

3 讨论

质粒是细菌细胞内一种可以自我复制的双链DNA分子,参与细菌基因重组和基因平行转移,促进细菌新遗传信息的获得或交换,最近发现质粒拷贝数还与细菌 T3SS 功能和致病性有关^[19]。细菌耐药性问题日益严峻,大量研究表明细菌的耐药性是由质粒介导的,如高升杰^[20]研究发现在肺炎克雷伯杆菌的质粒中含有大量的耐药基因,认为细菌耐药基因的传播与质粒结合转移相关。Stall 等^[21]研究发现 *Xcv* 菌株的耐铜性与一个可以自我转移的质粒相关。向平安等^[22]报道 *Xanthomonas vesicatoria* 和 *X. oryzae* pv. *oryzicola* 的一些含有质粒的菌株耐硫酸链霉素。本研究从我国猕猴桃溃疡病菌 JF8 中成功分离获其质粒,测序结果显示质粒含有 83 个基因,其中 38 个已知功能基因。通过基因聚类分析可以看出溃疡病病菌的质粒携带有大量参与溃疡病致病过程的基因,如多达 8 个直接参与基因重组和转移的转运蛋白^[23-24],6 个基因直接参与细菌 IV 型或 III 型分泌系统,植物病原细菌的 TTSS(III 型分泌系统),作为丁香假单胞菌属细菌入侵宿主过程中的重要蛋白分泌系统,通过分泌效应蛋白,能够抑制寄主的先天免疫,帮助细菌致病^[15]。已有研究证实,在 TTSS(III 型分泌系统)中,致病细菌感染宿主的必要条件之一是质粒编码基因数量的增加,低数量的毒力因子还不足以诱导感染^[19]。此外,还有一些其他涉及致病相关基因被发现,如基因 *ParA* 编码的蛋白是一个 ATP 酶,对

质粒的分配以及维持质粒稳定具有重要作用^[25];编码转录激活蛋白的基因 *LuxR* 与细菌的群体感应机制相关,影响毒力因子的表达和分泌^[26];基因 *UmuC* 是细菌中 SOS 应答系统的组分之一,控制细胞中聚合酶 V 的量^[27];还含有和生物体 DNA 复制、重组及转录调控相关的基因,这说明质粒含有独立的复制系统,具有自主性,也可以解释质粒为什么转移到其他菌株中仍具有活性。此外,注释中还有大量的基因功能未知,说明 *Psa* 菌株携带的质粒具有一些其他已知功能质粒不具备的功能。通过高通量测序,GO 细胞组分聚类中,与膜相关的基因数量最多,生物膜在细菌致病中占有重要作用,当细菌入侵宿主时可能会遭遇强酸、强碱、高盐等不利条件,细菌可以通过形成生物膜来躲避宿主免疫杀伤系统,从而实现自我保护。此外,生物膜还与细菌的耐药性相关,保护其免受抗生素的杀菌作用^[28];分子功能中,含有与核酸结合转录因子活性、催化活性、结合、转运子活性、分子转换器活性相关的基因。最近有学者对新西兰果园分离得到的 *Psa* 菌株及其携带的质粒进行了全基因组测序,发现质粒基因组中含有与抗铜性相关的基因位点^[29],然而有关 *Psa* 质粒可能具备的其他功能,如抗生素抗性、致病性尚未有研究报道,关于 *Psa* 质粒耐药的机制也尚未被揭示。本研究为 *Psa* 致病机制研究提供了新思路,也为多基因组学比较分析提供了基础数据。

参 考 文 献

[1] ANGELO M,STUDHOLME D J,TARATUFOLOM C,et al.

- Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36518.
- [2] KHANDAN H A N, WORNER S P, JONESE E, et al. Predicting the potential global distribution of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) [J]. *New Zealand plant protection conference*, 2013, 66(11): 184-193.
- [3] BUTLER M I, STOCKWELL P A, BLACKM A, et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57464.
- [4] SCORTICINI M, MARCELLETTI S, FERRANTE P, et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multifaceted, pandemic pathogen [J]. *Molecular plant pathology*, 2012, 13(7): 631-640.
- [5] ZHAO Z B, GAO X N, HUANGQ L, et al. Identification and characterization of the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in the Shaanxi Province of China[J]. *Journal of plant pathology*, 2013, 95(1): 155-162.
- [6] ZHANG T, JIANG Y, HUANG J, et al. Isolation and identification of the causal pathogens for kiwifruit bacterial canker and the isolation of the antagonistic endophytic fungi from kiwifruit in Sichuan, China[J]. *Journal of agricultural science*, 2013, 5(7): 2415-2419.
- [7] SERIZAWA S, ICHIKAWA T, TAKIKAWA Y, et al. Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan; description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides[J]. *Japanese journal of phytopathology*, 1989, 55(4): 427-436.
- [8] CHAPMAN J R, TAYLOR R K, WEIR B S, et al. Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* [J]. *Phytopathology*, 2012, 102(11): 1034-1044.
- [9] CAMERON A, SAROJINI V. *Pseudomonas syringae*, pv. *actinidiae*: chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives[J]. *Plant pathology*, 2014, 63(1): 1-11.
- [10] ZHAO Z, GAO X, YANG D, et al. Field detection of canker-causing bacteria on kiwifruit trees: *Pseudomonas syringae*, pv. *actinidiae*, is the major causal agent [J]. *Crop protection*, 2015, 75: 55-62.
- [11] CUNTY A, POLIAKOFF F, RIVOAL C, et al. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. [J]. *Plant pathology*, 2015, 64(3): 582-596.
- [12] SOBECKY P A, COOMBS J M. Horizontal gene transfer in metal and radionuclide contaminated soils[J]. *Methods in molecular biology*, 2009, 532: 455-472.
- [13] SZCZEPANOWSKI R, BRAUN S, RIEDEL V, et al. The 120592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions[J]. *Microbiology*, 2005, 151(4): 1095-1111.
- [14] 曹欣, 刘婉婷, 张弓. 非模式细菌功能基因组获取策略比较[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017(7): 2897-2904.
- [15] JI H, DONG H. Key steps in type III secretion system (T3SS) towards translocon assembly with potential sensor at plant plasma membrane[J]. *Molecular plant pathology*, 2015, 16(7): 762-773.
- [16] ATMAKURI K, CASCALES E, CHRISTIE P J. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion[J]. *Molecular microbiology*, 2004, 54(5): 1199-1211.
- [17] WELSH J B, SAPINOSO L M, KERN S G, et al. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(6): 3410-3415.
- [18] DONG J J, FU Z R, JIAN H E, et al. Bacterial chemotaxis to environmental pollutants and its significance in bioremediation[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(7): 1764-1771.
- [19] WANG H, AVICAN K, FAHLGREN A, et al. Increased plasmid copy number is essential for *Yersinia* T3SS function and virulence[J]. *Science*, 2016, 353: 493-495.
- [20] 高升杰. 克雷伯杆菌质粒耐药性研究[D]. 温州: 温州医学院, 2009.
- [21] STALL R E, LOSCHKE D C, JONES J B. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [J]. *Phytopathology*, 1986, 76(2): 240-243.
- [22] 向平安, 周燕, 高必达. 辣椒疮痂病菌 (*Xanthomonas vesicatoria*) 和水稻细菌性条斑病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzicola*) 的质粒及其与耐链霉素和耐铜性关系[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(4): 330-333.
- [23] TETT A, SPIERS A J, CROSSMAN L C, et al. Sequence-based analysis of pQBR103; a representative of a unique, transfer-proficient mega plasmid resident in the microbial community of sugar beet[J]. *Isme journal*, 2007, 1(4): 331-340.
- [24] DORMAN C J. H-NS-like nucleoid-associated proteins, mobile genetic elements and horizontal gene transfer in bacteria[J]. *Plasmid*, 2014, 75(9): 1-11.
- [25] EBERSBACH G, RINGGAARD S, MØLLERJENSEN J, et al. Regular cellular distribution of plasmids by oscillating and filament-forming ParA ATPase of plasmid pB171 [J]. *Molecular microbiology*, 2006, 61(6): 1428-1442.
- [26] HUDAIBERDIEV S, CHOUDHARY K S, ALVAREZ R V, et al. Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes[J]. *Frontiers in cellular & infection microbiology*, 2015, 5: 20.
- [27] REUVEN N B, ARAD G, MAORSHOSHANI A, et al. The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD, RecA, and SSB and is specialized for translesion repli-

- cation[J]. Journal of biological chemistry, 1999, 274 (45): 31763-31766.
- [28] HOIBY N, BIARNSHOLT T, GIVSKOY M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms[J]. International journal of antimicrobial agents, 2010, 35(4): 322-332.
- [29] COLOMBI E, STRAUB C, K NZEL S, et al. Evolution of copper resistance in the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through acquisition of integrative conjugative elements and plasmids[J]. Environmental microbiology, 2017, 19(2): 819-832.

Functional analysis of natural plasmid from the pathogen of bacterial canker of kiwifruit, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

WANG Yue^{1,2} DONG Jun² WU Qun³ TANG Xiaomei¹ LIU Pu²

1. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

3. Quzhou City, Zhejiang Province Economic Specialty Station, Quzhou 324000, China

Abstract To explore the pathogenic mechanism of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*) from the perspective of plasmid, and to analyze the main genes and virulence factors they encode, we isolated high purity plasmid from the *Psa* strain JF8 (Yuexi, Anhui) by plasmid extraction kit, sequenced and analyzed it bioinformatically. The results showed that the plasmid was 50 724 bp with an average GC content of 56.29%, containing 83 protein-coding genes. Among the 83 genes, 45 were predicted to encode hypothetical proteins and 38 were known functional genes. Bioinformatics analysis showed that the plasmid carried several genes associated with bacterial pathogenesis and disease resistance. The plasmid carries up to 8 mobile element proteins directly involved in gene recombination and metastasis. Five genes directly participate in the bacterial IV secretion system and one gene participates in the III secretion system. The protein encoded by the gene *ParA* is an ATPase that plays an important role in the distribution of plasmids and maintaining plasmid stability. The gene *LuxR*, which encodes a transcriptional activator protein, is involved in the quorum sensing mechanism of bacteria and affects the expression and secretion of virulence factors. The *UmuC* gene is one of the components of the medium SOS response system, controlling the amount of polymerase V in the cell.

Keywords *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*; kiwifruit canker; plasmid; functional analysis

(责任编辑:边书京)