

水稻白叶枯病菌 1 个毒性相关基因的鉴定*

Identification of A Gene Involved in the Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

唐纪良 赵东玲** 黎起秦 马庆生
Tang Jiliang Zhao Donglin Li Qiqin Ma Qingsheng

(广西农业大学 南宁市秀灵路 13号 530005)

(Guangxi Agric. Univ., 13 Xiuling Road, Nanning, Guangxi, 530005)

摘要 我们曾报道了来自水稻白叶枯病菌基因文库的重组质粒 pGXN3000 中含有一个能互补甘蓝黑腐病菌 rpfC 致病因子调控基因突变体的基因, 并通过转座子诱变获得了转座子插入在 pGXN3000 中的这一基因的转座子插入重组质粒^[1]。本研究利用这些转座子插入重组质粒, 通过标记置换方法构建了水稻白叶枯病菌这一基因的突变体菌株。植株试验结果表明, 突变株虽然在水稻中仍能正常生长繁殖, 但毒性严重降低, 说明水稻白叶枯病菌的这一基因在致病过程中起着重要作用。

关键词 水稻白叶枯病菌 毒性相关基因 突变

Abstract We have reported that the recombinant plasmid pGXN3000 isolated from a genomic library of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) contained a gene which could complement an rpfC mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, and that several transposon⁻ insertion recombinant plasmids with transposons located in the gene cloned in pGXN3000 were obtained by transposon mutagenesis of pGXN3000^[1]. Xoo mutants of the gene were created in this study by marker exchange with the transposon⁻ insertion recombinant plasmids. Plant tests revealed that the virulence of the mutants reduced significantly although their growth in planta was unaltered, indicating that the gene may play an important role in the pathogenicity of Xoo.

Key words *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, virulence-related gene, mutagenesis

水稻白叶枯病是危害水稻最严重的细菌性病害, 它已遍及全球所有水稻栽培区^[2]。近年来, 虽然通过选育和推广抗病品种对此病害起到了一定的防治作用, 但由于引起此病的病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 致病性的变异, 导致栽培品种抗性不起作用, 造成水稻减产仍十分严重。为了探索此病菌的致病性及其变异机理, 为培育抗病品种及开辟有效防治途径提供依据, 我们对此病菌的致病基因进行了克隆研究。

通过 DNA-DNA 杂交、转座子 Tn 诱变和功能互补等实验, 我们从水稻白叶枯病菌基因文库中鉴定筛选到一个重组质粒 (pGXN3000), 并证实了此重组

质粒中含有与甘蓝黑腐病菌的一个致病因子调控基因 (rpfC) 在结构上和功能上都具有同源性的基因^[1]。本研究通过标记置换 (marker exchange) 构建了水稻白叶枯病菌的这一基因的突变体, 植株试验结果表明, 这一基因突变后会使得病菌在水稻上的毒性严重降低, 从而证实了这一基因在水稻白叶枯病菌的致病过程中起着重要的作用。

1 材料与方法

1.1 培养基及培养条件

大肠杆菌的培养基及培养条件同文献 [1]。水稻白叶枯病菌的培养温度为 28℃, 培养基为 OB, 此培养基是在 Yuan^[3] 报道的培养基的基础上稍加改进形成的, 每升含 2 g 蛋白胨, 5 g 胰蛋白胨, 10 g 蔗糖, 1 g 谷氨酸钠, 0.1 g 蛋氨酸, 0.72 g 磷酸氢二钾, 0.28 g 磷酸二氢钾, 1 g 氯化铵, 1 g 氯化镁, $K \cdot 10^{-6}$

1996-08-14 收稿

* 国家“863”高技术计划资助项目 863-101-02-05

** 现在工作单位: 柳州市广西工学院

EDTA铁盐。固体培养基 (OA) 含 1.2% 琼脂。使用的抗菌素及其最终浓度分别为: 四环素 (Tc): 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 链霉素 (Sm): 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 卡那霉素 (Km): 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 庆大霉素 (Gm): 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

1.2 三亲本接合

本研究采用三亲本接合将质粒从大肠杆菌转移到白叶枯病菌, 帮助质粒为 pRK2073^[4]。具体方法为: 分别用 OB和 NYGB^[4]培养基过夜培养白叶枯病菌和大肠杆菌, 分别取 1 mL供体和受体菌株菌液与 0.5 mL帮助菌株菌液混合一起, 离心收集细胞, 用 OB洗涤细胞 2次后, 将菌体悬浮在 30 μL OB中, 然后将细菌悬浮液转移到一张硝酸纤维素滤膜表面, 并事先将滤膜置于 OA固体培养基上。在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后, 将细菌悬浮在 3 mL无菌水中, 然后将悬浮液涂布于固体选择培养基, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 d-4 d

1.3 标记置换

标记置换 (marker exchange)除所用与 pLAFR1及其衍生质粒不相容的质粒为 pIJ3011^[5]外, 其余基本按 Turner等^[6]报道的方法

1.4 植株试验

植株试验所用水稻为品种广桂 110及汕优广 1的星期苗龄叶片, 接种方法为剪叶法^[7]。将剪刀先浸泡于浓度为 10⁹ cfu/mL的细菌悬浮液, 然后剪叶尖通过度量病斑的长度测定菌株的致病强弱^[7]。每菌株每 2 d取 5张接种叶片, 磨碎后稀释涂布于选择培养基上检测病菌在植株中的生长情况。

1.5 DNA操作

DNA提取 限制性内切酶酶解 琼脂糖凝胶电泳、Southern杂交等按 Sambrook等^[8]描述的方法。

2 结果

2.1 水稻白叶枯病菌突变体的构建

我们曾报道了来自水稻白叶枯病菌基因文库的重组质粒 pGXN3000中含有一个在结构上和功能上都与甘蓝黑腐病菌的致病因子调控基因 (rpfC) 具有同源性的基因, 并通过转座子 Tn₅诱变, 获得了 5个 Tn₅插入在 pGXN3000中的这一基因的不同位点的转座子插入重组质粒 (即 pGXN3000: Tn₅)^[1]。我们将这 5个 pGXN3000: Tn₅质粒通过三亲本接合导入水稻白叶枯病菌 13751菌株 (来自野生型菌株 T3000^[1]的一个抗 Sm的自发突变体, 致病性及其它各种特性与 T3000无区别), 然后应用“标记置换法”分别将这 5个 Tn₅转座子通过 DNA-DNA同源双交换从 pGXN3000: Tn₅中转移到病菌基因组的相应位置, 获得了 5个白叶枯病菌的这一基因的 Tn₅插入

突变体 我们将插入在 pGXN3000其它位置的一个 Tn₅通过同样的方法转移到了病菌染色体的相应位置, 构建了一个作为对照的突变体 这些突变体都分别通过抗性检测及 Southern杂交得到了验证。

2.2 突变体的致病性

为探讨水稻白叶枯病菌这一基因在致病性中的作用, 我们通过剪叶接种法在水稻品种广桂 110及汕优广 1的小苗上对这一基因的突变体菌株进行了植株试验 结果表明, 这一基因的突变株的致病力明显低于野生型菌株 13751 在品种广桂 110上, 野生型菌株在接种 5 d后就开始引起典型的白叶枯病病症, 然后症状发展迅速, 至第 14 d病斑平均长度达 6.4 cm, 而这一基因的突变株直到接种后第 8 d才出现可见病症, 至第 14 d病斑平均长度只有 1.3 cm (图 1) 在品种汕优广 1的致病性也相似 (图 1)。

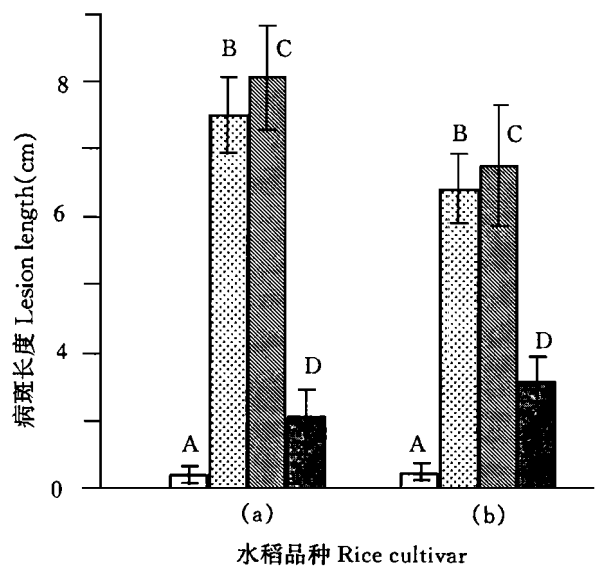


图 1 水稻白叶枯病菌不同菌株的致病性

Fig. 1 Pathogenicity of different strains of Xoo

(a) 接种在水稻品种广桂 110 14 d后的病斑长度 On rice cultivar Guanggui 110 14 days after inoculation; (b)接种在水稻品种汕优广 12 16 d后的病斑长度 On rice cultivar Shangyouguang 12 16 days after inoculation 柱子和线条分别表示 10张叶片的病斑平均长度和标准差 The mean and standard deviation of ten replicate measurements of lesion length are given. A, 培养液对照 Medium; B, 野生型菌株 Wild type; C, 对照 Tn₅插入突变株 Control Tn₅ insertion mutant; D, 毒性相关基因 Tn₅插入突变株 Tn₅ insertion mutant of the virulence-related gene.

2.3 突变体在水稻中的生长繁殖

为了解水稻白叶枯病菌这一基因突变后对病菌

在寄主植物中的生长是否有影响,我们从接种后的水稻小苗叶片中回收菌体。结果表明,这一基因的突变体在水稻小苗中仍能正常生长繁殖,它的增长速度及总群数量均与野生型菌株 1375t 没有明显差别(图 2)。

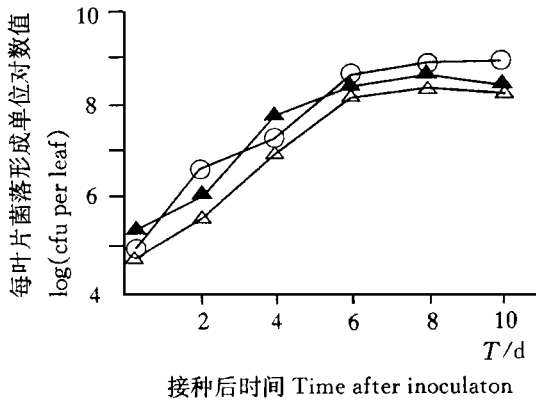


图 2 水稻白叶枯病菌不同菌株在品种广桂 110 水稻叶中的生长细菌数为 5 张叶片的平均值

Fig. 2 Growth of Xoo strains in leaves of rice cultivar Guanggui 110. Bacterial numbers are the averages from 5 leaves

A, 野生型菌株 Wild type; B, 对照 Tn 插入突变株 Control Tn5 insertion mutant; C, 毒性相关基因 Tn5 插入突变株 Tn5 insertion mutant of the virulence-related gene.

3 讨论

通过标记置换构建突变体的方法,我们证实了克隆在重组质粒 pGXN 3000 中的一个基因在水稻白叶枯病菌的致病过程中起重要的作用,因为这一基因突变后,会严重降低病菌对寄主水稻的毒性。这一基因的突变体在水稻中仍能保持与野生型菌株相似的生长增殖速率,表明它在致病过程中的作用与病菌在寄主体内的生长繁殖无关,可能直接涉及到病菌致病因子的表达。进一步研究这一基因突变体的生化表型将有助于我们了解该基因在病菌致病过程中的作用机理。

DNA-DNA 杂交结果表明,水稻白叶枯病菌的这一毒性相关基因与甘蓝黑腐病菌的 rpfC 致病因子调控基因具有同源性^[1],甘蓝黑腐病菌的 rpfC 基因编码的蛋白属于一种“双组份调控系统”成员,它调控其它致病因子的表达^[9]。水稻白叶枯病菌的这一基因编码的产物是否与甘蓝黑腐病菌的 rpfC 蛋白具有同源性,还有待于对水稻白叶枯病菌的这一基因进行测序分析。

参考文献

- 唐纪良等. 水稻白叶枯病菌黄单胞菌中与甘蓝黑腐病菌黄单胞菌致病因子调控基因 (rpf 基因) 同源基因的分子克隆. 广西农学院学报, 1991, 10 (2): 1-9.
- Mew T W, Alvarez A M, Leach J E et al. Focus on bacterial blight of rice. Plant Dis. 1993, 77: 5-12.
- Yuan W. Culture medium for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. J Appl. Bacteriol. 1990, 69: 798-805.
- Turner P, Barber C E, Daniels M J. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol. Gen. Genet. 1984, 195: 101-107.
- Sawczyk M K, Barber C E, Daniels M J. The role in pathogenicity of some related genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and translucens: A shuttle strategy of cloning genes required for pathogenicity. Mol. Plant-Microbe Interact. 1989, 2: 249-255.
- Turner P, Barber C E, Daniels M J. Evidence for clustered pathogenicity genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol. Gen. Genet. 1985, 199: 338-343.
- Kauffman H E, Reddy A P K, Hsieh S P Y et al. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis. Report. 1973, 57: 537-541.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Tang J L, Liu Y N, Barber C E, et al. Genetic and molecular analysis of a cluster of rpf genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol. Gen. Genet. 1991, 226: 409-417.

(责任编辑: 邓大玉 蒋汉明)