

水稻黄单胞菌黄色素合成相关基因的克隆与鉴定*

邹华松 陈功友 赖志兵 李光永 王金生**

(南京农业大学植物保护学院农业部病虫监测与治理重点开放实验室 南京 210095)

摘要:用硫酸二乙酯(DES)诱变水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 简称 *Xoo*)和条斑病细菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, 简称 *Xooc*), 分别得到 5 株和 13 株黄色素缺失突变体, 其中来自 *Xooc* 的 M6 和 M12 还丧失了对水稻的致病性和在烟草上激发过敏反应的能力。以 *Xooc* 黄色素缺失突变体 M51 为受体菌交叉互补从 *Xoo* JXOIII 基因文库中筛选出一个黄色素合成相关的基因克隆 pA341, 以 *Xoo* 黄色素缺失突变体 M1071 为受体菌, 从 *Xooc* RS105 基因文库中获得了黄色素合成相关的基因克隆 pA270。功能互补显示, 18 株黄色素缺失突变体中的 10 株能分别被 pA341 和 pA270 互补后正常产生黄色素, 但这两个克隆不能同时互补同一株黄色素缺失突变体。能被 pA341 互补的黄色素缺失突变体 M6 没有恢复对水稻的致病性和在烟草上激发过敏反应, 表明黄色素合成相关基因与 *hrp* 基因间不存在相关性。斑点杂交结果表明, pA270 与 pA341 之间没有同源性。pA270 亚克隆结果显示, 与黄色素合成相关的基因约 11.6kb 大小, 以基因簇的形式存在, 不仅决定了黄色素的产生, 还影响黄色素合成的数量和质量(吸收峰)。在紫外光条件下, 黄色素能够提高菌体的存活率, 提示黄色素对病原细菌有保护作用。

关键词:水稻条斑病细菌, 水稻白叶枯病菌, 黄色素, 基因克隆

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2003)02-0180-09

水稻白叶枯病菌(*Xoo*)和水稻条斑病细菌(*Xooc*)是我国水稻种植区域的重要细菌病害的病原菌, 是稻黄单胞菌种下的两个致病变种^[1]。能够产生黄色素和胞外多糖是黄单胞属细菌的两个重要特征。许多植物病原细菌的胞外多糖已被证明与致病性有关, 如茄科植物青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)、梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*)、玉米细菌性萎蔫病菌(*E. stewartii*)和甘蓝黑腐病菌(*X. campestris* pv. *campestris*)等^[1, 2]。1997 年, Poplawsky 等人克隆了甘蓝黑腐病菌黄色素合成的基因簇, 发现 *pigG* 基因编码一种可扩散因子(Diffusible Factor, DF), 调控着胞外多糖和黄色素的合成, 而胞外多糖与毒性相关^[2, 3]。随后他还发现黄色素和胞外多糖对菌体在寄主植物上的存活有重要的作用并借此对病菌的侵染过程起作用^[4]。目前, 还不知道水稻黄单胞菌的黄色素是否有类似的情形。

已有研究表明, 水稻黄单胞菌同其它革兰氏阴性植物病原细菌一样拥有 *hrp* 基因簇, 决定着细菌在非寄主植物上的过敏反应(hypersensitive response on non-host plants)和寄主植物上的致病性(pathogenicity on host plants)。陈功友等在获得 *hrp* 基因突变体时也观察到有些黄色素缺失突变体, 其致病性也发生了改变, 但没有从分子水平上进一步证实这种关

* 国家重点基础研究发展计划(G2000016201)和教育部博士点基金(2000030721)项目资助

** 通讯作者。Tel 025-4396072; E-mail: wangjsh@mail.njau.edu.cn

作者简介: 邹华松(1972-)男, 安徽全椒县人, 博士研究生, 主要从事植物病原菌致病性分子遗传学研究。

收稿日期: 2002-05-23, 修回日期: 2002-09-16

系是否有关联性。为了探索黄色素合成及黄色素在致病性中的可能作用,本研究用硫酸二乙酯分别对 *Xoo* 和 *Xooc* 进行化学诱变获得黄色素缺失突变体,利用功能互补方法克隆和鉴定黄色素合成相关基因,为进一步揭示黄色素合成的分子遗传学机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株、质粒及生长条件

本研究供试菌株、质粒及其特性见表 1。大肠杆菌在 LB 培养基上 37℃ 培养。黄单胞菌在 NA 或 NB 培养基上 28℃ 培养。所用抗生素及其浓度分别为:利福平(Rifampicin, Rif) 75 μg/mL,壮观霉素(Spectinomycin, Sp) 11 μg/mL,卡那霉素(Kanamycin, Km) 20 μg/mL。

表 1 供试菌株与质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Properties	Sources
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>		
RS105	Rif ^r wild type	Laboratory stock
M51	Rif ^r xanthomonadin minus mutants derived from RS105 Δhrp ⁻	1
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		
PXO99	Rif ^r wild type	Laboratory stock
<i>E. coli</i>		Laboratory stock
DH5α	F' <i>recA</i> Δ80d <i>lacZ</i> ΔM15	
Plasmids		
RS105/pUF034 gDNA library	Sp ^r , Km ^r	Laboratory stock
pRK2013	Km ^r , Tra ⁺ , mob ⁺ , ColE1 replicon	Laboratory stock
pA341	Sp ^r , Km ^r , xanthomonadin gene clone from <i>Xoo</i>	13
pHM1	Sp ^r , <i>cos</i> , <i>parA</i> , <i>incW</i> , derivative of pR140, <i>lacI</i> 'OPZ'	This study
pA270	Km ^r , 30.8kb xanthomonadin gene clone from RS105	This study
pAE1	Sp ^r , 18.1kb <i>EcoRI</i> fragment from pA270	This study
pAE2	Sp ^r , 13.2kb <i>EcoRI</i> fragment from pA270	This study
pAES1	Sp ^r , 4.7kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES2	Sp ^r , 4.1kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES3	Sp ^r , 0.8kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES4	Sp ^r , 2.0kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES5	Sp ^r , 1.8kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES6	Sp ^r , 1.0kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES7	Sp ^r , 0.4kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES8	Sp ^r , 1.5kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES9	Sp ^r , 1.8kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES10	Sp ^r , 8.3kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES11	Sp ^r , 4.7kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES12	Sp ^r , 2.8kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES13	Sp ^r , 7.6kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES14	Sp ^r , 2.8kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES15	Sp ^r , 2.9kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study
pAES16	Sp ^r , 3.3kb <i>Sal I</i> fragment from pAE1 in pHM1	This study

1.2 黄色素缺失突变体的筛选

化学诱变参见陈功友等人的方法^[5]。在不含抗生素的 NA 平板筛选白色突变株。

1.3 HR 和致病性的测定

参见文献 [5] 方法。

1.4 两亲和三亲交配互补

两亲交配方法参见文献 [5] ; 三亲交配仅在灭菌细菌滤膜上同时加入少许活化的帮助质粒 pRK2013。

1.5 DNA 重组和亚克隆

质粒的提取、酶切及连接等方法见文献 [5, 6] ; 限制性内切酶 *EcoRI*、*BamHI*、*KpnI* 和 *SalI* 及 T4 DNA 连接酶均来自华美生物工程公司 (Sino-American Biotechnology Company)。

1.6 斑点杂交

将尼龙膜自上而下在纯水中浸 30 min , 再移至 $20 \times \text{SSC}$ (3mol/L 氯化钠 + 0.3mol/L 柠檬酸钠, pH7.0) 中浸 30min 后室温干燥。将目的 DNA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴中变性 10min , 点样 1 μL 于尼龙膜上 , 80 $^{\circ}\text{C}$ 真空烘烤 2h 固定。克隆 pA341 的质粒 DNA 经 *EcoRI* 酶切后在 0.7% 的熔点琼脂糖上电泳 , 回收外源片段作为地高辛探针标记的模板。有关探针标记、杂交及显色方法详见 Roche 公司地高辛杂交操作手册。

1.7 黄色素的提取和吸收峰的测定

将黄单胞菌在含相应抗生素的 NB 培养基中培养至对数生长中后期 , 离心收集菌体 , 用 1/5 体积的甲醇 (分析纯) 重新悬浮 , 转入玻璃试管 , 水浴加热至沸腾时立即取出 , 冷却后离心 (8000 r/min , 10 min) 除去菌体 , 上清为黄色素的粗提物。在 DU-7 分光光度计 (BECKMAN) 上扫描测定 360 ~ 500nm 可见光的吸收峰^[7]。

1.8 黄色素对菌体的保护作用

供试菌株在 NB 培养基中生长至对数生长期 , 按 10 倍梯度稀释 10^6 倍制备 8 份样品。一份作对照 , 另 7 份在紫外透射分析仪上用 302nm 光照射 , 每隔 1.5 min 取出一个样品。每份样品涂板 5 块 (每板 100 μL) , 置 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 36 ~ 48h 后记菌落形成数。

2 结果和分析

2.1 黄色素缺失突变体表型分析

Xoo 野生菌株 PXO99 和 *Xooc* RS105 经 DES 诱变后 , 获得 18 株黄色素缺失突变体 , 其中 MPL1 ~ MPL5 来自 PXO99 , M1 ~ M12 和 M1071 共 13 株来自 RS105 (表 2)。来自条斑病细菌的两株突变体 M6 和 M12 还丧失了对水稻的致病性和在烟草上激发过敏反应的能力。经测定 , 这 18 株突变体的胞外酶 (果胶酶、纤维素酶、蛋白酶、脂酶及淀粉酶) 活性与野生型相比没有改变 (资料未显示)。

2.2 黄色素合成相关基因的克隆和交叉互补作用

在先前的研究中 , 我们以黄色素缺失突变体 M51 为受体菌 , 从 *Xoo* JXOIII 基因文库中筛选出一个黄色素合成相关的基因克隆 pA341 (资料未显示) 。在本研究中 , 将水稻条斑病细菌 RS105 基因文库 (in S17-1) 克隆逐一导入 *Xooc* 黄色素缺失突变体 M1071 , 获得一个能够使该突变体恢复产生黄色素的克隆 pA270。用 pA341 和 pA270 分别互补 19 株黄色素缺失突变体 (包括 M51) , 发现有 10 个突变体能够恢复黄色素表型。突变体 MPL1、M51、M4 和 M6 能被克隆 pA341 互补而 pA270 却不能互补这四个突变体 ; M1071、M3、M7、M9、

M11 和 MPL3 能被 pA270 互补,而 pA341 也同样不能互补这 6 个突变体。这表明,黄单胞菌两个致病变种来源的突变体在黄色素合成相关的基因突变位点上有可能不一致,两个克隆所携带与黄色素合成相关的基因 DNA 片段也不足以覆盖这些突变位点。另外,丧失致病性和过敏反应的突变体 M6 的接合子 M6/pA341,能够恢复产生黄色素但不能恢复致病性,表明克隆 pA341 所携带的外源 DNA 片段不包含与致病性有关的基因(表 2)。

表 2 克隆 pA270 和 pA341 对突变体的功能互补分析

Table 2 Restoration of xanthomonadin synthesis to mutants by clone pA341 and pA270

Strains	Xanthomonadin	Pathogenicity	Strains	Xanthomonadin	Pathogenicity
PX099	+	S	M4/pA270	-	S
MPL1	-	S	M4/pA341	+	S
MPL1/pA270	-	S	M5	-	S
PML1/pA341	+	S	M5/pA270	-	S
MPL2	-	S	M5/pA341	-	S
MPL2/pA270	-	S	M6	-	R
MPL2/pA341	-	S	M6/pA270	-	R
MPL3	-	S	M6/pA341	+	R
MPL3/pA270	+	S	M7	-	S
MPL3/pA341	-	S	M7/pA270	+	S
MPL4	-	S	M7/pA341	-	S
MPL4/pA270	-	S	M8	-	S
MPL4/pA341	-	S	M8/pA270	-	S
MPL5	-	S	M8/pA341	-	S
MPL5/pA270	-	S	M9	-	S
MPL5/pA341	-	S	M9/pA270	+	S
RS105	+	S	M9/pA341	-	S
M51	-	S	M10	-	S
M51/pA270	-	S	M10/pA270	-	S
M51/pA341	+	S	M10/pA341	-	S
M1	-	S	M11	-	S
M1/pA270	-	S	M11/pA270	+	S
M1/pA341	-	S	M11/pA341	-	S
M2	-	S	M12	-	R
M2/pA270	-	S	M12/pA270	-	R
M2/pA341	-	S	M12/pA341	-	R
M3	-	S	M1071	-	S
M3/pA270	+	S	M1071/pA270	+	S
M3/pA341	-	S	M1071/pA341	-	S
M4	-				

Symbols: "+" restoration of xanthomonadin synthesis; "-" restoration; R no disease symptom observed on rice; S typical disease symptom.

2.3 水稻条斑病细菌黄色素合成相关基因的克隆

2.3.1 黄色素合成相关基因克隆 pA270 与 pA341 的同源性比较

:用 *Eco*RI 对克隆 pA270 进行酶切得到 3 个片段 8.7kb(vector)+ 18.1kb + 13.2kb,这和 pA341 的酶切图谱不同(图 1-A)。以 pA341 作探针进行斑点杂交, pA270 与之未检测到杂交信号(图 1-B),表明 pA270 与 pA341 有较大的差别,所含控制黄色素合成相关的基因有所不同。

2.3.2 pA270 的亚克隆及对黄色素缺失突变体的互补作用

:用限制性内切酶 *Eco*RI 对克

隆 pA270 的质粒 DNA 进行完全酶切得到 pAEI(18.1kb)和 pAE χ (13.2kb)两个亚克隆。功能互补结果显示,只有 pAEI 能够互补能被 pA270 功能互补的 6 株黄色素缺失突变体(表 3)接合子产生的黄色素的吸收峰和细菌性条斑病菌黄色素的峰型一致,表明 18.1kb (in pAEI)DNA 片段含有 6 株突变体黄色素合成所需的基因。

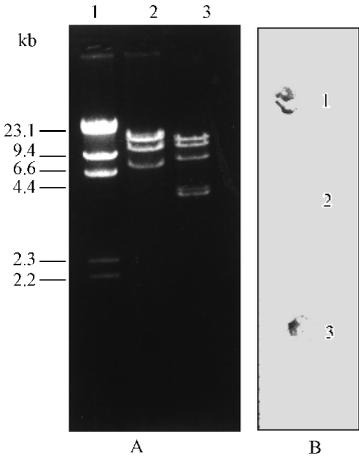


图 1 pA270 与 pA341 的酶切电泳及斑点杂交

Fig.1 The restriction and colony blot analyses of pA270 and pA341

A : 1. λ DNA/*Hind*III ; 2. pA341/*Eco*RI ; 3. pA270/*Eco*RI. B : 1. pA341 ; 2. pA270 ; 3. DIG-labeled probe based on pA341 .

用 *Bam*HI 和 *Kpn*I 对 pAEI 继续酶切,分别得到 4 个和 3 个亚克隆片段,每种酶均产生 10kb 左右的大片段,所产生的小片段都未能互补任何一个突变体(资料未显示),表明用这两种酶对 18.1kb DNA 片段进行亚克隆不可行。选择内切酶 *Sal*I 对 pAEI 进行亚克隆,共得到 9 个完全酶切亚克隆和 7 个不完全酶切亚克隆。根据上述结果推导出 pA270 所携带 31.3kb DNA 的酶切图谱(图 2)。

将上述 *Sal*I 酶切所获得的 16 个亚克隆与能被 pA270 功能互补的 6 株黄色素缺失突变体功能互补后发现,由一个 11.6kb 的 DNA 片段上所产生的四个亚克隆 pAES1、pAES2、pAES3 和 pAES4 都具有对突变体的互补能力。因此 pA270 中与黄色素合成有关的基因全部位于这个 11.6kb 的 DNA 片段上(表 3,图 2)。对克隆 pAEI 进行完全酶切得到的亚克隆 pAESI(4.7kb)互补了来源于条斑病菌的突变体 M3 和来源于白叶枯病菌的突变体 MPL3。比较有趣的是另一个亚克隆 pAES2(4.1kb)也能够互补 MPL3。接合子 MPL3/pAES1 和 MPL3/pAES2 所产生黄色素的吸收峰与野生型 RS105 菌株相似,MPL3/pAES2 的右肩比 MPL3/pAES1 稍宽一些(图 3-A)。与 M3 和 MPL3 不同的是,M9 和 M11 不能单独地被亚克隆 pAES1 和 pAES2 互补,但 pAES1 χ pAES1 + pAES2 却对 M9 和 M11 有互补能力,说明 pAES1 及 pAES2 中含有多个与黄色素合成相关的基因。功能互补还发现克隆 pAES3 和 pAES4 均不能互补上述 6 株黄色素缺失突变体。部分酶切的亚克隆 pAES12(pAES3 + pAES4)却对突变体 M7 和 M1071 有互补能力,接合子 M7/pAES12 和 M1071/pAES12 仅部分地恢复了产生黄色素的能力并且黄色素的吸收峰右肩很不明显,而亚克隆 pAES13(pAES2 + pAES3 + pAES4)对这两个突变体的恢复能力很强,接合子黄色素的吸收峰右肩与野生型 RS105 差异不大(图 3-B),表明 pAES12 所携的 2.8kb DNA 片段中间的 *Sal*I 酶切位点影响到黄色素合成相关基因的活性,并且该基因位点仅是黄色素合成所需的基因之一。

3 黄色素对菌体的保护作用

水稻条斑病细菌野生型菌株 RS105、黄色素缺失突变体 M51 和 M1071 以及接合子 M51/pA341 和 M1071/pA270 经紫外光照射后,突变体和接合子的活菌数要比野生型菌株低。在紫外光照射的前 3min 内,菌株间的存活率差异不大。4min 后,突变体菌体的存活率下降很快,菌株间存活率差异增大,到 7min 时,突变体菌体存活率均在 40% 以下,M51 只有 20% 的存活率(图 4)。虽然接合子的存活率比野生型菌株低但明显地要大干突

表 3 pA270 的亚克隆对不同黄色素缺失突变体的互补作用

Table 3 Restoration of xanthomonadin synthesis to various mutants by subclones of pA270

	M3	M7	M9	M11	M1071	MPL3
PAE1	+	+	+	+	+	+
PAE2	-	-	-	-	-	-
PAES1	+	-	-	-	-	+
PAES2	-	-	-	-	-	+
PAES3	-	-	-	-	-	-
PAES4	-	-	-	-	-	-
PAES5	-	-	-	-	-	-
PAES6	-	-	-	-	-	-
PAES7	-	-	-	-	-	-
PAES8	-	-	-	-	-	-
PAES9	-	-	-	-	-	-
PAES10	+	-	+	+	-	+
PAES11	-	-	-	-	-	+
PAES12	-	+	-	-	+	-
PAES13	-	+	-	-	+	+
PAES14	-	-	-	-	-	-
PAES15	-	-	-	-	-	-
PAES16	-	-	-	-	-	-

Symbols "+" "yellow pigmentation in the conjugants"; "-" "no pigmentation in the conjugants".

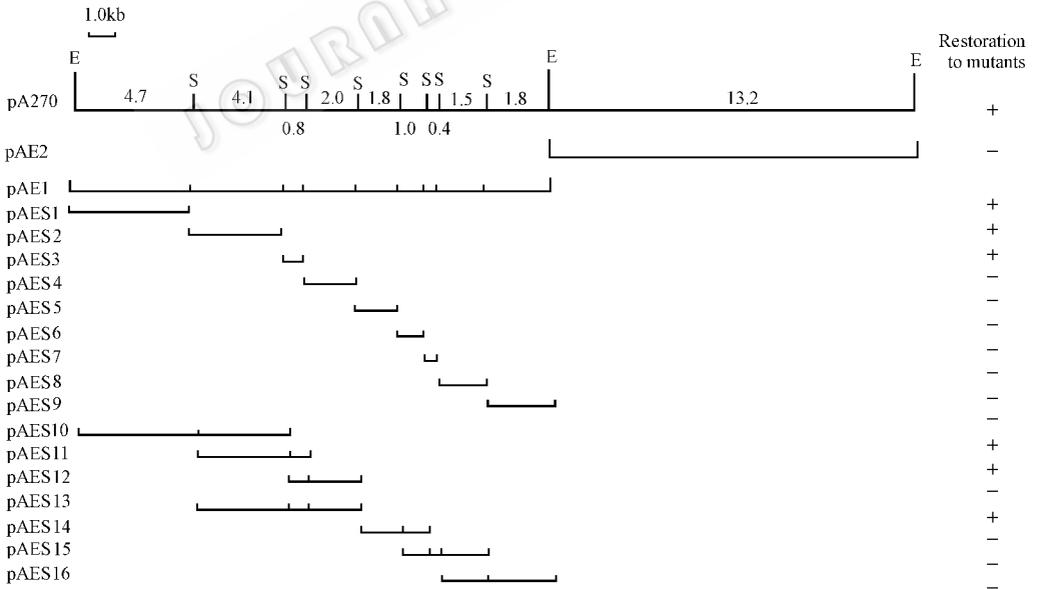


图 2 克隆 pA270 的酶切图谱及亚克隆对突变体的互补能力

Fig. 2 Restriction endonuclease map of clone pA270 and the ability of its subclones to restore xanthomonadin production to mutants.

E. *EcoRI*; S. *SalI*; "+" restored xanthomonadin production to mutants; "-" did not restored the mutants.

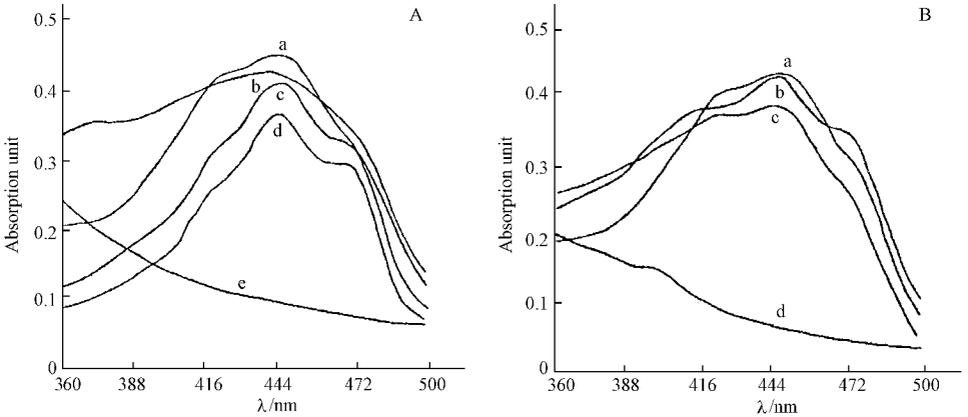


图 3 黄色素缺失突变体 M3 和 M1071 接合子产生黄色素的吸收峰

Fig. 3 The absorption spectra of xanthomonadin produced by conjugants of mutants M3 and M1071

A : a. RS105 ; b. PXO99 ; c. MPL3/pAES2 ; d. MPL3/pAES1 ; e. MPL3. B : a. RS105 ; b. M1071/pAES13 ; c. M1071/pAES12 ; d. M1071.

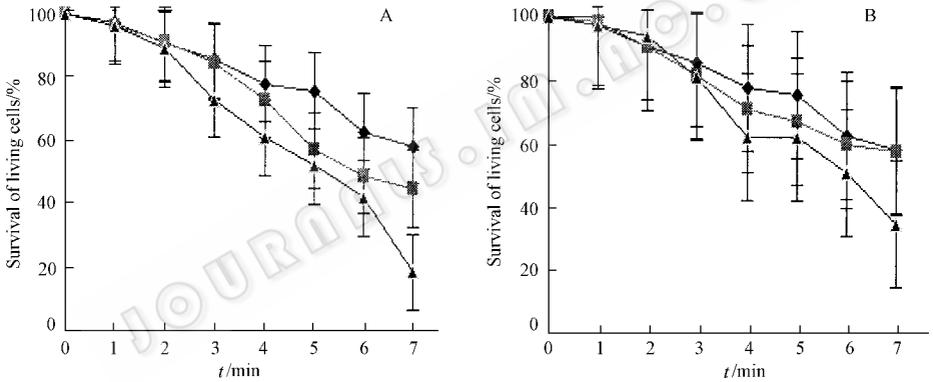


图 4 突变体 M51 和 M1071 及其接合子在紫外光下的存活率

Fig. 4 Survival of mutants and their conjugants following UV radiation

The survival ratio in percentage was calculated based on the number of living cells of UV radiated strains , as compared with that of the control.

A ◆. RS105 ; ■. M51/pA341 ; ▲. M51. B ◆. RS105 ; ■. M1071/pA270 ; ▲. M1071.

变体的存活率。结合子 MPL3/pA270 在第 7 分钟的存活率几乎和野生型 RS105 相当。可见,在紫外光的条件下,黄色素对菌体有非常明显的保护作用。

4 讨论

黄色素在细菌中的作用一直是细菌学研究的重要内容。以前的研究主要集中在黄色素的理化特性及其在细菌分类学上的应用^[7-9]。Poplawsky 在研究 *X. campestris* pv. *campestris* 黄色素合成相关基因簇时曾得到具有致病性的色素突变体,但没有对突变体的致病性是否恢复作说明^[2]。在研究病菌侵染和定殖时,发现 *pigG* 能够增强 *X. campestris* pv. *campestris* 在甘蓝上的致病能力,这可能和黄色素能够增加菌体抵抗光损伤有关^[4]。

本研究所获得的黄色素合成相关基因克隆 pA341 和 pA270 能够互补黄色素和致病性都发生突变的突变体 M51 和 M6,未发现接合子的致病性被恢复,表明 M51 和 M6 中发生突变的黄色素合成相关基因不影响病原菌的致病性。在紫外光条件下, M51 和 M1071 的接合子的菌体存活率比突变体要高,可见黄色素可以增强病原菌对紫外光的抵抗能力。我们认为黄色素可能有利于菌体在自然条件下的存活,在侵染寄主过程中,菌体的繁殖数量大,有利于病原菌在寄主植物上的侵染与定殖。

黄色素是黄单胞菌属(*Xanthomonas*)的典型特征,编码黄色素的基因在黄单胞菌属细菌中应该具有保守性。黄色素的化学成分是溴化芳基多烯脂的衍生物^[8],其结构的复杂性决定了需要多个基因来参与合成。在研究水稻黄单胞菌黄色素基因的过程中,我们获得的两个克隆 pA341 和 pA270 均能互补来自水稻白叶枯病菌和条斑病细菌的黄色素缺失突变体,表明克隆 pA341 和 pA270 中的黄色素基因在这两个变种之间具有保守性。另外,还有 8 个突变体包括致病性也丧失的突变体 M12 未能被 pA341 和 pA270 互补使黄色素正常产生。因此,在 *Xoo* 和 *Xooc* 中,可能还有其它基因参与黄色素的合成。

已有证明野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*)有关黄色素合成的基因是以基因簇形式存在的^[2,3],根据本研究推测,水稻条斑病细菌黄色素合成的基因也是以基因簇形式存在的。我们所获得的 18 株黄色素缺失突变体在突变位点上有较大差异,不能被同一基因克隆 pA341 或 pA270 互补,并且 pA341 和 pA270 所携带黄色素合成所需的基因没有同源性,表明距离甚远。本文作者已从 pA341 中鉴定出黄色素合成所需的一个新基因 *pigH*。对 pA270 的进一步亚克隆表明,11.6kb 的 pAES1 + pAES2 + pAES3 + pAES4 的 DNA 片段是一个编码黄色素的基因簇。pAE1、pAES1 或 pAES2 可互补来自白叶枯病菌 PXO99 的突变体 MPL3。在 PXO99 的遗传背景下,接合子所产生黄色素的吸收峰与野生型的细条斑病菌 RS105 相似。我们曾用来自白叶枯病菌 JXOIII 基因文库的克隆 pA341 互补来自条斑病细菌的突变体 M51。在条斑病细菌的遗传背景下,接合子所产生黄色素的吸收峰与条斑病细菌的野生型菌株的吸收峰一致(资料未显示)。因此,该 11.6kb 的功能片段所含有的应该是编码条斑病细菌黄色素的基因。来自这一功能区域的每一个亚克隆对黄色素的合成都有作用,这些亚克隆片段不但决定了突变体能否产生黄色素而且还影响黄色素合成的数量。亚克隆 pAES1(α pAES3 + pAES4)仅部分地恢复了突变体 M7 和 M1071 产生黄色素的能力,接合子 M7/pAES12 和 M1071/pAES12 所产生黄色素的吸收峰的右肩不明显,和野生菌株 RS105 相比有较大差异。克隆 pAES13(α pAES2 + pAES3 + pAES4)对这两个突变体的互补能力较强,接合子产生黄色素的吸收峰都与 RS105 相似。不同的功能基因的突变都会影响黄色素的吸收峰的峰型,而这些功能基因在互补自身的突变体时,接合子的峰型也会有差异^[2]。上述结果尽管表明 11.6kb DNA 片段含有水稻条斑病细菌黄色素合成所需的基因簇,但该基因簇中含有多少个基因,每一个基因起何功能,与已报道的野油菜黄单胞菌的黄色素基因簇有无同源性以及水稻黄单胞菌两致病变种间有何差别,还值得进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] 王金生. 分子植物病理学. 北京:中国农业出版社, 1999

- [2] Poplawsky A R , Kawalek M D , Schaad N W . A xanthomonadin-encoding gene cluster for identification of pathovars of *Xanthomonas campestris* . *Mol Plant-Microbe Interact* ,1993 **6** : 545 ~ 552 .
- [3] Poplawsky A R , Chun W . *pigB* determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* . *J Bacteriol* ,1997 **179** :439 ~ 444 .
- [4] Poplawsky A R , Chun W . *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host plant infection . *Mol Plant-Microbe Interact* ,1996 **11** (6) : 466 ~ 252 .
- [5] 陈功友 , 潘小玫 , 王金生 . 水稻白叶枯病菌化诱变 *hrp* 基因突变体及相关性状的研究 . 植物病理学报 ,2001 **31** (3) : 199 ~ 205 .
- [6] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . Cold Spring Harbor Laboratory , NY . Cold Spring Harbor , 1989 .
- [7] Starr M P , and Stephens W L . Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas* . *J Bacteriol* ,1963 **87** : 293 ~ 302 .
- [8] Starr M P , Jenkins C L , Bussey L B , et al . Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins , novel brominated arylpolyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas* . *Arch Microbiol* ,1977 **113** : 1 ~ 9 .
- [9] Vauterin L , Hoste B , Kerster K , et al . Reclassification of *Xanthomonas* . *Int J Sys Bacteriol* ,1995 **45** : 472 ~ 489 .

Cloning and Characterization of a Xanthomonadin Gene Cluster from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Zou Huasong Chen Gongyou Lai Zhibing Li Guangyong Wang Jinsheng^{*}

(Key Lab of Monitory and management of Plant Disease and Insects of Ministry of Agriculture ,
Institute of Plant Protection , Nanjing Agriculture University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : A novel gene *pigH* had been identified from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gDNA library clone pA341 previously. This paper reports a xanthomonadin biosynthetic (*pig*) gene cluster from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xooc*). Five pigment minus mutants from *Xoo* and thirteen from *Xooc* were obtained by diethyl sulfate (DES) mutagenesis. The mutants M6 and M12 failed to cause disease in rice and induce the HR in tobacco either. One clone pA270 was screened from *Xooc* RS105 gDNA library after all individual clone was transferred into a mutant M1071. Clony blot hybridization displayed that the foreign NDA fragment harbored in pA341 was not homologous to that in pA270. Moreover, only 10 of the above 18 xanthomonadin mutants were restored to produce xanthomonadin by either pA341 or pA270 clone. This demonstrated that the mutated sites in the above 18 xanthomonadin were different and might not be in a same gene locus. Subclones of a 11.6kb *EcoRI* fragment affected either the amount or absorption spectra of pigment production, which indicated that this fragment encoded various functional fragments and was possibly a gene cluster. The roles of the pigment in protecting the bacterial cells from damage by UV radiation suggested that the pigment contribute to the survival of the pathogens during their colonization in rice.

Key words : *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* , *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* , Xanthomonadin , Gene cloning

^{*} Corresponding author. E-mail : wangjsh@mail.njau.edu.cn