

水稻基腐病细菌毒素的遗传特性和产毒相关的分子标记

刘琼光, 张静一, 王玉涛, 王振中*

(华南农业大学资源环境学院植物病理系, 广州 510642)

摘要:【目的】水稻基腐病(*Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*)是水稻上重要的细菌病害之一, 本论文对该病菌的毒素遗传特性和产毒相关的分子标记进行了研究。【方法】通过化学诱变方法, 筛选基腐细菌去质粒的突变体 Ech7-mu1; 应用 RAPD 技术, 筛选产毒素相关的分子标记。【结果】毒素活性测定结果表明, 野生菌 Ech7 和去质粒菌株 Ech7-mu1 都能产生毒素。从 260 条随机引物中, 筛选出引物 K10, 该引物能从不产生毒素的突变株 Ech7-4 中扩增出大小为 2139bp 的 DNA 特异片段, 但不能扩增野生菌 Ech7, 将该片段克隆, 测序分析, 设计特异引物, 在突变体 Ech7-4 中获得了与毒素产生相关的 SCAR 分子标记(标记符合率为 100%)。该基因片段有 5 个 ORFs, 其中 2 个 ORFs 分别编码 NADH-黄素还原酶和 N-乙酰转移酶, 另外 2 个不完整的 ORFs 编码的蛋白分别与 *Pseudomonas aeruginosa*(ZP00136947)和 *Yersinia Pestis*(ZP01177873)的抗菌素代谢转运蛋白通透酶(DMT)具有 66% 和 46% 的同源率。【结论】水稻基腐细菌毒素的生物合成是由染色体基因编码, 与质粒无关。不产生毒素的突变菌株基因突变的位点位于 SCAR 标记 DNA 的 3' 末端。

关键词: 水稻基腐细菌; 毒素; 质粒; 分子标记

中图分类号: S432.4+2,Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0446-06

水稻细菌性基腐病是水稻上一种重要病害, 1979 年 Goto 首次在日本报道^[1], 在东南亚一些国家的水稻产区都有发生。中国于二十世纪 80 年代初, 在浙江省首先发现, 目前在我国 13 个省区先后报道发生, 且有扩展蔓延和逐年加重的趋势^[2,3]。罹病水稻分蘖减少, 茎基部腐烂, 产生白穗, 秕谷, 严重的可造成水稻大面积失收^[3,4], 成为水稻高产、稳产的严重障碍。该病是由菊欧氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)的玉米致病变种(*E. chrysanthemi* pv. *zeae*)引起。关于菊欧氏菌致病因子的研究, 国内外大量的文献报道是菊致病变种产生的胞外致病酶, 果胶裂解酶是主要的毒性因子^[5]。迄今关于水稻基腐病菌的致病机理研究相对极少, 刘琼光等^[6]研究表明, 该病菌可在种子萌芽过程中侵入, 造成烂种、烂芽, 幼苗的出苗率及萌发率均明显降低, 明显抑制水稻长根, 认为是病菌分泌

毒素的作用。笔者随后研究证明, 毒素是水稻基腐病细菌重要的致病因子之一, 毒素具有使水稻秧苗萎蔫、烟草细胞坏死和抑制细菌的作用(论文另文发表)。

细菌的质粒存在于染色体外, 可决定细菌的一些生物学特性, 质粒携带的基因所编码的产物并非细菌的生存所必须者, 因此质粒可以在细菌间传递与丢失。用紫外线、吖啶类染料及其他可以作用于 DNA 的物理、化学因子处理后, 可以使一部分质粒消失, 称为消除。革兰氏阴性菌一般都带有质粒, 一些植物病原细菌的质粒决定病菌的致病性和毒素的产生, 以及各种抗性^[7]。

关于水稻基腐病细菌产生的毒素是否由质粒编码, 并不清楚, 毒素的相关基因也未曾报道, 本研究在已经获得的毒素突变体的基础上, 应用 RAPD 技术以期获得与毒素产生相关的基因分子标记, 并对该

基金项目: 广东省攻关项目(E99032)

*通讯作者. Tel: +86-20-85281469; E-mail: zzwang@scau.edu.cn

作者简介: 刘琼光(1964-), 男, 江西吉安人, 副教授, 博士, 研究方向为植物病原细菌学。E-mail: qgliu@scau.edu.cn

收稿日期: 2007-10-14; 修回日期: 2007-12-14

标记片段进行基因突变位点的初步分析,为今后研究毒素产生的有关基因,奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:水稻基腐病菌野生菌株 Ech7 和 Ech7 经化学诱变的毒素突变菌株 Ech7-4,均由华南农业大学植物细菌研究室提供。

1.1.2 主要试剂和仪器:吖啶橙(Acridine orange),购置上海化学试剂采购供应站,蛋白酶 K、RNA 酶、Taq 酶、DNA Marker DL2000 购自 TaKaRa 生物工程有限公司。引物合成和测序均由上海英俊基因公司完成。PCR 仪(TaKaRa TP 600,德国);HJ 系列电泳仪、水平电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);凝胶成像系统(AlphaImager,美国)。

1.2 野生菌株 Ech7 质粒的消除

在 LB 培养液中加入吖啶橙,稀释浓度梯度分别为 20、40、60、80、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。先将野生型 Ech7 菌株在含低浓度的吖啶橙 LB 培养液中培养,24h 后依次转入含次高浓度吖啶橙的培养液培养,直至最高浓度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吖啶橙的平板上稀释分离,挑取单菌落提取质粒 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳,检测是否仍然存在质粒 DNA。

1.3 DNA 的提取

细菌在 LB 培养液中 30 \times 培养 24h,4 \times 下,8000 \times g,离心 10 min,收集菌体。按常规的碱裂解方法提取细菌质粒 DNA。

细菌 DNA 提取采用北京天为时代的细菌基因组 DNA 提取试剂盒,按试剂盒说明方法进行。

1.4 Ech7 质粒突变菌株产生毒素能力测定

将野生菌、毒素突变体和质粒突变菌株分别培养 48h,获得的培养菌,调整菌液浓度均为 1×10^{10} CFU/mL,分别提取野生菌株、毒素突变体和质粒突变菌株胞外上清液粗毒素,加入蛋白酶 K(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理 2h,100 \times 热处理 20min,以破坏过敏性坏死蛋白及其它蛋白质,调整粗毒素浓度 1mg/mL,然后注射烟草和浸根水稻幼苗,检测毒素的生物活性。

1.5 野生菌和毒素突变株 DNA 的 RAPD 随机扩增及产物测序

选择 260 条随机引物(上海英俊基因公司引物合成)进行 PCR 扩增,采用 25 μL 反应体系,反应条件为:94 \times 5min;94 \times 1min,37 \times 1min,72 \times 2min,40 个循环;72 \times 10min,最后在 4 \times 下保存。扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳。

PCR 产物纯化、用 Omega 公司试剂盒回收,DNA 片段连接到 pMD-T 载体,转化大肠杆菌,随机提取 5 个克隆,由上海英俊基因公司完成测序。

1.6 与毒素相关基因的 SCAR 标记

根据测序结果设计特异引物,1F:5'-GTGCAAC-GTGCCATCACTCA-3',2139R:5'-GTGCAACGTGT-GGCGGTGAG-3',扩增 Ech7 和 Ech7-4 各 50 个单菌落。采用 25 μL 反应体系,反应条件为:94 \times 5min;94 \times 1min,56 \times 1min,72 \times 2min,40 个循环;72 \times 10min,最后在 4 \times 下保存。

1.7 与毒素产生相关的分子标记基因分析

根据 SCAR 特异扩增片段 DNA 测序结果,与 Gene Bank 中 blast 比对分析,设计该片段中两个基因的两对引物,分别为 NADH-H171(以下简称为 H171),NADH-C913(以下简称为 C913)以及 HAT-H974(以下简称为 H974),HAT-C1530(以下简称为 C1530),与引物 1F 和 2139R 组成 1F 与 C913,1F 与 C1530,H974 与 2139R 和 1F 与 2139R 等不同引物组合,同时扩增野生菌和突变体。方法同 1.6。

引物序列:H171:5'-CACACGGGTGACTTCTT-GCG-3',C913:5'-AATGCATTCTGTGCATCACG-3';H974:5'-TTTTCCGCAACGGATACTCC-3',C1530:5'-TTCTCACTTCCCGTTATCG-3'。

2 结果和分析

2.1 Ech7 菌株质粒的消除

吖啶橙能抑制质粒 DNA 复制,从而达到去除质粒的目的。通过系列吖啶橙浓度梯度的培养,得到抗 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吖啶橙的水稻基腐病菌菌株单菌落。挑取单菌落进行质粒 DNA 检测,结果得到一个脱去质粒的突变体(图 1),命名为 Ech7-mul。

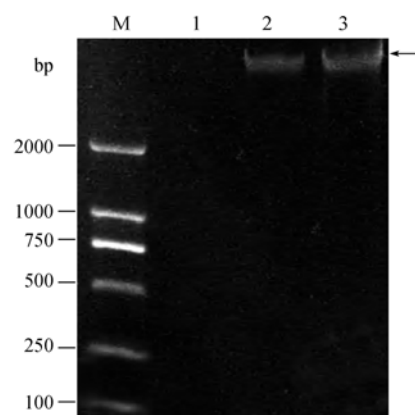


图 1 基腐病细菌质粒 DNA 电泳

Fig. 1 Plasmid DNA from *Erwinia.chrysanthemi* pv. *zea* electrophoresis. M. Mark, 1. Ech7-mul, 2. Ech7, 3. Ech7-4.

2.2 质粒缺失突变体 Ech7-mu1 产毒素生物活性测定
 野生菌株 Ech7 质粒缺失后的菌株 Ech7-mu1 的产毒素能力的测定, 结果表明, 去除质粒后的 Ech7-mu1 与有质粒的野生菌株胞外提取液, 处理烟草和水稻后 12h 均可表现使烟草细胞坏死和水稻秧苗

致萎现象, 24h 症状加重, 而不产毒素的突变体 Ech7-4, 尽管含有质粒, 仍然没有毒素生物活性(图 2 和图 3), 表明野生菌去除质粒后(Ech7-mu1)仍然具有产生毒素的能力, 由此说明, 基腐病细菌毒素的产生与质粒无关。

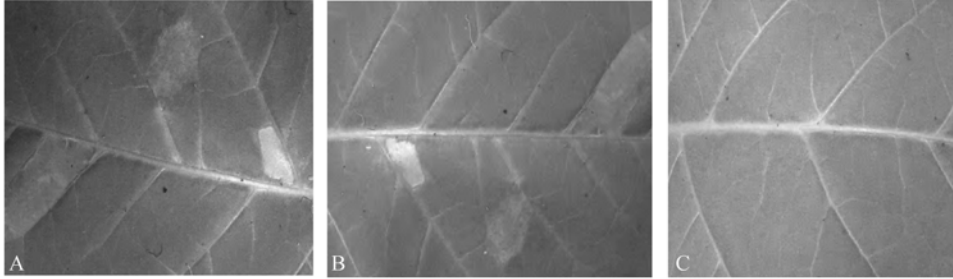


图 2 基腐病菌质粒缺失突变体引起烟草细胞坏死(12h)

Fig. 2 Tobacco cell death caused by wild and plasmid-deficient strain(12h).A : Ech7-mu1; B : Ech7; C : Ech7-4.

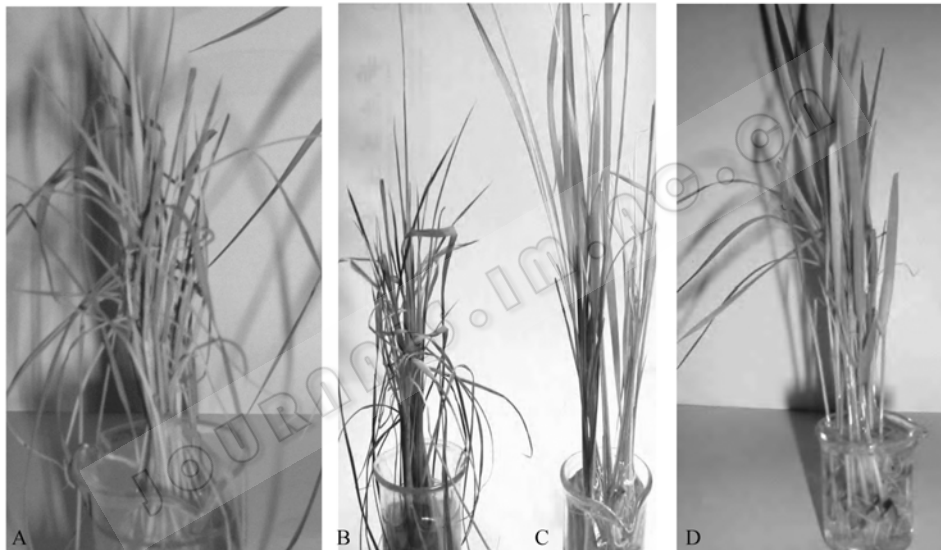


图 3 基腐病菌质粒缺失突变体引起水稻幼苗致萎

Fig. 3 Rice seedlings wilt caused by wild and plasmid-deficient strain. A : Ech7-mu1; B : Ech7; C : Ech7-4; D : CK(Water).

2.3 与毒素产生相关的 SCAR 分子标记

从 260 条随机引物中筛选到一条随机引物 K10, 该引物能扩增野生菌株 1000bp 左右的 DNA 片段, 而毒素突变体菌株除了能扩增 1000bp 片段外, 还能扩增 2100bp 左右的 DNA 片段(图 4), 将此片段回收, 连接到 pMD-T 载体, 转化大肠杆菌, 随机挑取 5 个克隆测序。结果表明, 5 个克隆测序的结果其序列完全一致, 该片段大小为 2139bp。根据 2139bp 的 DNA 序列, 分别向两端增加 10 个碱基, 设计特异引物 1F 和 2139R, 扩增野生菌株和突变菌株各 50 个单菌落。结果表明, 特异引物均能在不产毒素的突变体 Ech7-4 中扩增该片段, 而不能在产毒素的野生菌株 Ech7 中扩增, SCAR 标记符合率为 100%, 说明

RAPD 标记能够转化为特异性的 SCAR 标记(图 5)。

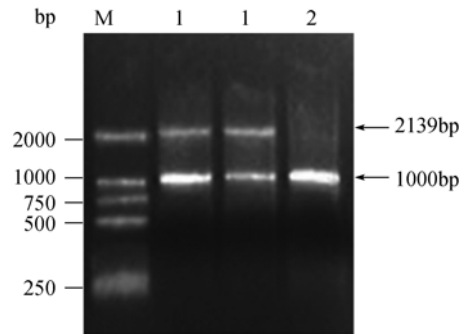


图 4 随机引物 K10 PCR 扩增

Fig. 4 PCR amplified wild and mutation strains by random primer K10. M. Marker; 1. Ech7-4; 2. Ech7.

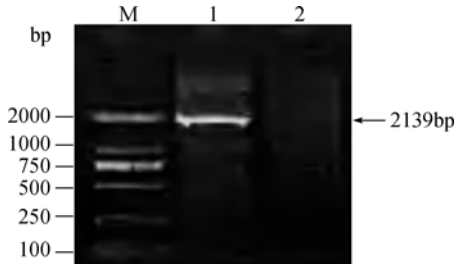


图 5 SCAR 特异引物扩增

Fig. 5 Specific amplified of 2139bp DNA fragment. M. Mark; 1. Ech7-4; 2. Ech7.

2.4 毒素产生相关的 SCAR 标记基因突变位点分析

2139bp DNA 序列其 GenBank 登陆号为 EU307209, 分析该 DNA 片段阅读框, 发现有 5 个 ORFs。正链 DNA 有 1 个 ORF, 编码的基因类似于 NADH-黄素还原酶 (NADH-flavin reductase); 互补链 DNA 有 4 个 ORFs, 其 5 端序列的 2 个不完整的 ORFs 编码的蛋白分别与 *Pseudomonas aeruginosa* (ZP00136947)和 *Yersinia Pestis* (ZP01177873) 的抗菌素/代谢物转运蛋白通透酶

(permeases of the drug/metabolite transporter, DMT)具有较高的同源性, 分别有 66%和 46%同源率; 其中间序列的 ORF 编码 N-乙酰转移酶(N-acetyltransferase); 其 3 端序列的 ORF 编码的蛋白与来自 *Burkholderia cenocepacia* 转录调节因子 Hx1R 有的 65%同源率(图 6)。

根据该 SCAR 标记片断可能编码的基因, 分别设计了系列引物组合(图 7), 其中 NADH-黄素还原酶和 N-乙酰转移酶基因的两对引物分别为 H171 和 C913 以及 H974 和 C1530, 与引物 1F 和 2193R 组合扩增野生菌和突变体 DNA。PCR 扩增结果表明, 所有引物组合均能扩增突变体 Ech7-4 菌株 DNA, 而在野生菌株 Ech7 中, 引物 1F 与 C913、H171 与 C913、1F 与 C1530 和 H171 与 C1530 能扩增相应片段大小的带, 而引物 H974 与 2139R 和 1F 与 2139R 均不能扩增野生菌株(图 8)。将野生菌株的引物 1F 与 C1530 扩增片段进行测序, 并且与突变体扩增的 2139bp 片段进行序列比对, 发现它们的序列完全相同。这说明 2139bp 特异片段中

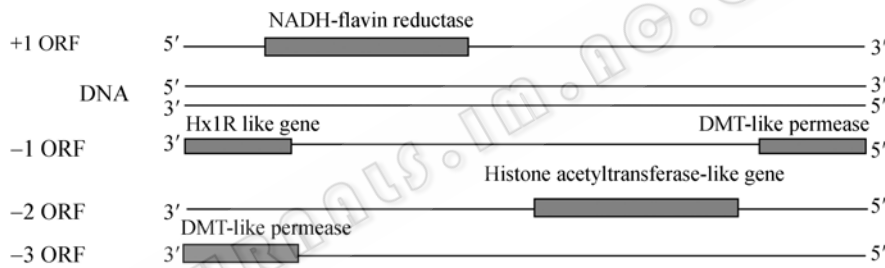


图 6 2139 DNA 片段的开放阅读框及可能编码的基因

Fig. 6 The ORFs and their possible coded genes of 2139bp DNA.

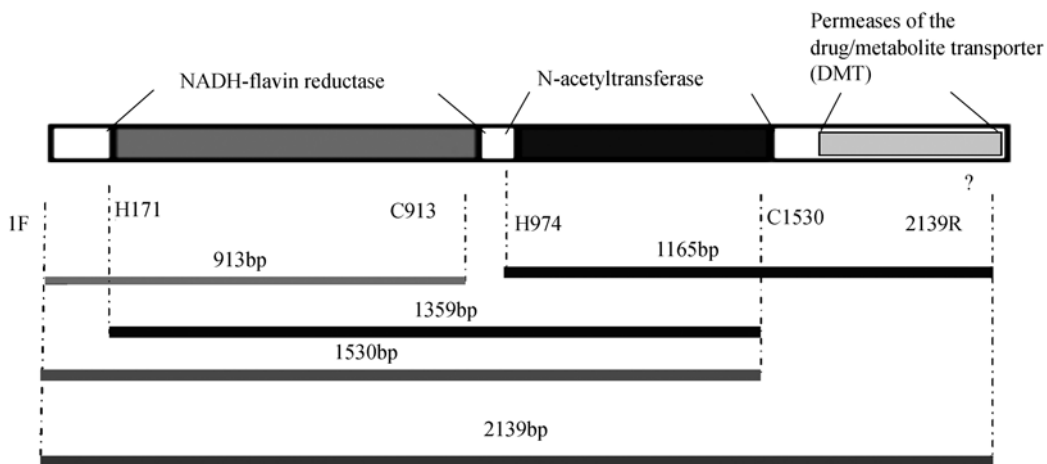


图 7 毒素突变体 Ech7-4 SCAR 标记的基因结构、引物位置及突变位点分析图

Fig. 7 Gene structure, primers place and mutation analysis of SCAR mark DNA from Ech7-4.

基因的突变位点很可能位于该片段的右末端(图 7), 其序列编码的蛋白类似抗菌素/代谢转运蛋白通透酶。

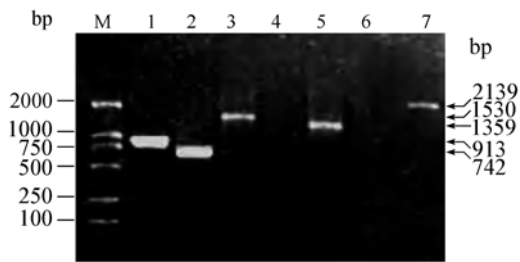


图 8 不同引物扩增野生菌(1-6)和突变菌株(7)

Fig. 8 Wild strain Ech7(lane 1-6)and mutant strain Ech7-4(lane 7)PCR amplified by different primers. 1. 1F-C913(913bp); 2. H171-C913(742bp); 3. 1F- C1530 (1530bp); 4. H974-2139R(1165bp, no band); 5. H171-C1530 (1359bp); 6. 1F-2139R(2139bp, no band), 7. Ech7-4(1F- 2139R).

3 讨论

许多革兰氏阴性细菌一般都带有质粒, 一些植物病原细菌的质粒决定病菌的致病性和寄主特异性, 决定毒素、激素的产生, 以及对药剂的抗性^[7]。毒素的遗传决定因子, 有些是由质粒编码, 如冠毒素、丁香菌素、菜豆毒素和烟毒素通常位于细菌的质粒上, 然而有些细菌毒素与质粒无关, 如 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 的大多数菌系, 其毒素基因位于染色体上^[8]。本研究通过获得去除质粒的突变体, 证明了水稻基腐病菌毒素的生物合成与质粒无关, 而与染色体基因编码有关。

RAPD 技术在农业生物技术领域中应用广泛, 最吸引人的研究是利用该技术已定位了许多有价值的目标性状抗病基因, 但 RAPD 技术最大的缺点是稳定性差。为解决这个问题, Paran 等^[9]将 RAPD 标记转化为特异序列扩增的 SCAR 标记。SCAR 标记兼具 RFLP 和 RAPD 二者的优点, 应用经典的 PCR 方法, 扩增特异的 DNA 片断。为了分析研究毒素突变体和野生菌在 DNA 碱基上的差异, 本研究利用该技术获得了与毒素产生相关的 SCAR 分子标记, 其 DNA 片段大小 2139bp, 为毒素基因的进一步研究奠定了基础。

关于植物病原细菌毒素的分子生物学, 较多的研究是假单胞菌产生的毒素和白纹毒素。如控制冠毒素生物合成的基因成簇排列, 某些菌株如 *P.s.pv.atropurpurea*、*P.s.pv.glycinea* 位于质粒上, 某些菌株如 *P.s.pv.tomato* 位于染色体, 编码毒素 coronafacic acid (CFA)或 coronamic acid(CMA)合成的酶, 这些基

因组成型表达或受植物信号(可能为糖、酚类化合物)的诱导或受温度的调控^[10]。

Syringopeptin 和丁香菌素基因簇位于丁香致病变种 B301D 菌株染色体上大约 145kb *DraI* 酶切片段^[11]。Syringopeptin 基因簇除了 Syringopeptin 和丁香菌素生物合成酶基因(*SyrE*、*Syrb1*、*SyrC*、*SypA*)外, 大约 80kb 大小, 该基因簇含有毒素调节的有关基因如 *SyrP*、*SalA*、*SyrF*、*SyrG* 和分泌的基因 *SyrD*^[11, 12], 整个基因簇大约占丁香假单胞菌基因组的 2%, 构成致病基因岛^[13]。

菜豆毒素也由基因簇控制, 至少有 8 个基因(*phtA~phtH*)^[14], 最大的基因是 *phtE*, 6.4-kb 区域, 其它基因片段长度在 1~2.5 kb 之间, 小肽如 phaseolotoxin 的合成已经报道由多个酶复合物参与^[15]。通过白纹毒素合成的主要基因簇的序列和同源性分析研究表明, *XALB1*(55839bp)和一个次要较小片段 *XALB2* (2986bp)与白纹毒素的生物合成有关, 进一步比较 *albi* 和 *xabB* 发现, 来自佛罗里达 *X. albilineans* Xa23R1 菌株的 *XALB1* 簇基因明显与来自昆士兰的 Xa13 菌株 *XALB1* 基因不同, 两个基因簇不编码相同的毒素^[16]。

迄今, 有关水稻基腐细菌产生的毒素及其毒素基因未见有报道, 本研究在基腐细菌毒素突变体 Ech7-4 菌株中获得的产毒相关的 SCAR 分子标记, NCBI 上 blast 搜索结果, 分析有 5 个阅读框, 其中有 2 个 ORFs 分别编码 NADH-黄素还原酶和 N - 乙酰转移酶, 另外 2 个 ORFs 位于该基因右端 600bp 区域内, 与 *Pseudomonas aeruginosa*(ZP00136947)和 *Yersinia Pestis* (ZP01177873)的抗菌素代谢转运蛋白通透酶 DMT 具有较高的同源性。为了进一步分析毒素突变体可能的突变位点, 根据 2139bpDNA 序列, 设计不同引物组合扩增出野生菌株 Ech7 和毒素突变体 DNA。能将 SCAR 标记片段中上游的 1530bp 在野生菌中扩增出来, 而且与突变体菌株该片段基因序列完全相同。但不能将从 1530bp 至 2139bp 中近 600bp 大小的片段从野生菌中扩增出来。这说明野生菌和毒素突变体在这一段 DNA 片段有差异, 推测毒素突变体基因突变位点很可能在这 600bp 中的某一位置。是否如此, 或者是 3 末端突变而引起下游基因的失活, 该基因是否为毒素生物合成的转录因子, 有待于进一步研究。此外, 水稻基腐病菌毒素是否由多基因控制, 其调控的分子机理, 也有待于今后进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Goto M. Bacterial foot rot of rice caused by a strain of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*. *Phytopathology*, 1979, 69: 213–216.
- [2] 洪晓富, 吴春赞, 林辉. 栽培因素对杂交水稻细菌性基腐病为害的影响. *浙江农业科学*(*Journal of Zhejiang Agricultural Science*), 2004, 4: 211–213.
- [3] 林兴祖, 冯健敏. 南繁基地水稻细菌性基腐病的发生及防治对策. *农业科学通讯*(*Agricultural Science Letter*), 2007, 1: 27.
- [4] 刘琼光, 曾宪铭, 李伯传. 广东省水稻一种新病害—水稻细菌基腐病原菌初步鉴定. *华南农业大学学报*(*Journal of South China Agricultural University*), 1997, 18(4): 128–129.
- [5] Hugouvieux CP, Condemine G, Nasser W, *et al.* Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol*, 1996, 50: 213–257.
- [6] 刘琼光, 王振中. 水稻细菌性基腐病菌侵染规律研究. *华南农业大学学报*(*Journal of South China Agricultural University*), 2004, 25(3): 55–57.
- [7] Alan V, Jesús M, Robert WJ. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals. *Microbiology*, 2001, 147: 763–780.
- [8] Cuppels DA, Ainsworth T. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronatine. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3530–3536.
- [9] Paran I, Micheltore RW. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in Lettuce. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 985–993.
- [10] Helge W, Stephan S, Alexander S, *et al.* Impact of Temperature on In Planta Expression of Genes Involved in Synthesis of the *Pseudomonas syringae* Phytotoxin Coronatine. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2004, 17 (10): 1095–1102.
- [11] Scholz-Schroeder, BK, Hutchison ML, Grgurina I, *et al.* The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of *sypA* and *syrB1* biosynthesis mutant analysis. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2001, 14: 336–348.
- [12] Lu SE, Scholz SBK, Gross DC. Characterization of the *sala*, *syrF*, and *syrG* regulatory genes located at the right border of the syringomycin gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15: 43–53.
- [13] Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*. 2000, 54: 641–679.
- [14] Zhang YX, Patil SS. The *phtE* locus in the phaseolotoxin gene cluster has ORFs with homologies to genes encoding amino acid transferases, the *araC* family of transcriptional factors, and fatty acid Desaturases. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 1997, 10(8): 947–960.
- [15] Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev*, 1997, 97: 2651–2673.
- [16] Monique R, Laurent C, Eric V, *et al.* Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. *Molecular Plant Microbe Interact*, 2004, 17(4): 414–427.

Genetic and molecular characters of toxin producing *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*

Qiongguang Liu, Jingyi Zhang, Yutao Wang, Zhenzhong Wang*

(College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: [Objective] Bacterial foot rot, caused by *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*, is one of the most important diseases in rice. Genetic and molecular characters of toxin producing for *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* were conducted in this paper. [Methods] A plasmid-deficient strain, Ech7-mu1, was obtained by chemical mutation, and the relative specific molecular mark with toxin was screened from Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) by PCR. [Results] The wild strain Ech7 and the plasmid-deficient strain Ech7-mu1 could both produce toxin. We screened 260 random primers in PCR, and found that a specific fragment (2139bp) could be amplified with K10 primer from the minus-toxin strain Ech7-4 DNA, but could not from the wild strain Ech7 DNA. The amplified fragment DNA was cloned and sequenced, and specific primers were designed to amplify it. The 2139bp fragment DNA could be a specific molecular mark with 100% SCAR identity between wild strain and the toxin mutant strain. Sequence analysis showed that there were five open reading frame (ORF), two of them were NADH-flavin reductase and N-acetyltransferase, respectively. Another ORF, located in the end region of 2139bp fragment, had 66% and 46% homologies with permeases of the drug/metabolite transporter (DMT) from *Pseudomonas aeruginosa* (ZP00136947) and *Yersinia Pestis* (ZP01177873). [Conclusion] Toxin biosynthesis in *E. chrysanthemi* pv. *zeae* might be coded by chromosome, but not by the bacterial plasmid. The position of gene mutation in the mutant Ech7-4 might be at the 3' region of toxin-relation SCAR DNA fragment.

Keywords: *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*; toxin; plasmid; molecular mark

Supported by the Guangdong key Scientific and Technological Project (E99032)

*Corresponding author. Tel: +86-20-85281469; E-mail: zzwang@scau.edu.cn

Received: 26 October 2007/ Revised: 12 December 2007