

## 水稻条斑病菌胞外多糖相关基因的鉴定

周丹<sup>1</sup>, 邹丽芳<sup>2</sup>, 邹华松<sup>2</sup>, 陈功友<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学植物保护学院, 教育部农作物生物灾害综合治理重点实验室, 南京 210095

<sup>2</sup>上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240

**摘要:** 【目的】前期研究中从 Tn5 转座子插入的水稻条斑病菌突变体库中获得了 17 个胞外多糖改变的突变体。【方法】本文对这些突变体的 Tn5 插入位点和基因类型进行了鉴定。【结果】结果显示, 胞外多糖减少的 11 个突变体中多数为 Tn5 插入在已知的 *gum*、*xan* 和 *wxoc* 基因簇上, *Xoryp\_4217*、*Xoryp\_2488* 和 *Xoryp\_0918* 为未知的与胞外多糖产生有关的基因, 属首次报道; 6 个胞外多糖增多的突变体中 *fimO*、*pilY* 和 *xopQ* 与胞外多糖产生有关, 但在水稻条斑病菌中未见报道; *Xoryp2392*、*Xoryp\_4221* 和 *Xoryp\_3511* 为首次鉴定, 其中 *Xoryp\_3511* 仅在水稻黄单胞菌中存在。毒性测定结果显示, 胞外多糖减少的突变体在水稻上的毒性变弱, 而胞外多糖增加的突变体在水稻上的毒性没有显著变化。【结论】这些结果为进一步分析水稻条斑病菌胞外多糖代谢途径以及与水稻的互作关系奠定了基础。

**关键词:** 水稻条斑病菌, 胞外多糖, Tn5 插入突变体, 基因位点, 毒性

**中图分类号:** Q933    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2011) 10-1334-08

水稻条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, 以下简称 *Xoc*) 引起的水稻细菌性条斑病是水稻上的重要细菌病害之一。其如同其他植物病原黄单胞菌一样, 也产生丰富的胞外多糖 (extracellular polysaccharides, 以下简称 EPS)<sup>[1]</sup>。EPS 分布于细胞的最外层, 是由 D-葡萄糖、D-甘露糖、D-葡萄糖醛酸、乙酸和丙酮酸组成的“五糖重复单元”结构聚合物<sup>[1-2]</sup>。EPS 不仅在防止菌体干燥、免受外界侵害和聚集矿物元素和营养等细菌生命活动中有重要意义, 而且对于细菌在植物组织的生长及病害症状的扩展等方面也具有重要贡献<sup>[3]</sup>。EPS 的主要成分黄原胶 (xanthan gum) 还是重要的工业原料。

许多植物病原细菌如青枯假单胞菌、梨火疫病

菌、玉米萎蔫病菌和甘蓝黑腐病菌等的 EPS 已被证明是主要的毒性因子之一<sup>[4]</sup>。植物病原黄单胞菌的 EPS 产生主要由 *gum*、*xan* 和 *wxoc* 等 3 个基因簇控制, 但在不同的黄单胞菌中这 3 个基因簇的遗传组成存在很大差异<sup>[5]</sup>。黄原胶的产物主要由 12 个基因 (从 *gumB* 到 *gumM*) 组成的 *gum* 基因簇控制, 该基因簇在主要的植物病原黄单胞菌中高度保守<sup>[6]</sup>。水稻黄单胞菌的 *gum* 基因簇从 *gumB* 到 *gumM* 呈线性排列, 各包含一个 ORF, 但水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 以下简称为 *Xoo*) 的 *gumN* 中有 3 个 ORF<sup>[6]</sup>。*xan* 基因簇在植物病原黄单胞菌中也高度保守<sup>[7]</sup>。在水稻黄单胞菌 2 个致病变种中 *wxoc* 基因簇存在较大差异, *wxocA* 和 *wxocB* 基因不存在于 *Xoo* 中, 仅在 *Xoc* 中存在<sup>[8]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金 (31071656; 31000071); 公益性行业 (农业) 科研专项 (NYHYZX07-056)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-21-34205873; E-mail: [gyouchen@sjtu.edu.cn](mailto:gyouchen@sjtu.edu.cn)

作者简介: 周丹 (1985-), 女, 江苏常州市人, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: [2008102005@njau.edu.cn](mailto:2008102005@njau.edu.cn)

收稿日期: 2011-03-19; 修回日期: 2011-05-10

是否在 *Xoc* 中还存在其他未知的控制胞外多糖产生的基因或者基因簇, 目前还不清楚。

为了探索 *Xoc* 中是否存在未知的 EPS 相关基因, 本实验室前期工作构建了 Tn5 插入的 *Xoc* 突变体库, 获得了 17 个胞外多糖产量改变的突变体<sup>[9]</sup>。本研究对这些突变体的突变位点以及在水稻上的毒性进行了分析, 鉴定了 10 个未知的与 EPS 相关的基因。这些基因将为分析 *Xoc* 胞外多糖产生的途径以及与水稻的互作机制提供新的科学线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和培养条件:** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 S17-1 $\lambda$ pir 于 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 下培养; *Xoc* 的 RS105 菌株及其相应的 Tn5 插入突变体于 NA 固体和 NB 液体培养基中 28 $^{\circ}$ C 培养<sup>[9]</sup>。生长所需抗生素浓度: ampicillin (Ap, 100  $\mu$ g/mL), kanamycin (Km, 20  $\mu$ g/mL), spectinomycin (Sp, 25  $\mu$ g/mL), rifampicin (Rif, 50  $\mu$ g/mL)。

**1.1.2 试剂和仪器:** *Xoc* 基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒购于 AXYGENT (南京) 公司。实验所用的限制性内切酶和修饰酶均购自 TaKaRa (大连) 公司。引物合成和序列测定均由 Invitrogen (南京) 公司完成。

**1.1.3 供试植物材料:** 杂交水稻汕优 63 高感水稻条斑病, 种植于上海交通大学农业与生物学院温室大棚内。水稻生长 2-3 周时用于水渍症状测定, 生长 2 月大小时用于病斑长度测定。

### 1.2 突变体中 Tn5 位点和拷贝数确定

提取突变体基因组 DNA 后进行 *Pst* I 酶切, 以 TnF 和 TnR 为引物组合<sup>[9]</sup>, 扩增得到 Tn5 转座子的 DNA 片段作为探针, 通过 Southern 杂交分析 Tn5 插入的拷贝数。

以转座子 EZ-Tn5<sup>TM</sup> (KAN-2) 的序列设计 6 个特异性引物<sup>[9]</sup>, 根据细菌基因组 DNA 特点设计 6 个简并引物, 将这 6 对引物进行组合。以新鲜生长的突变体菌落为模板, 进行 TAIL-PCR 扩增。PCR 的反应体系参见文献 [9]。TAIL-PCR 大小接近、条带清晰的产物, 经 TA 克隆后转化 DH5 $\alpha$ , 在含氨苄青霉素 (Amp) 抗性的 LB 平板上筛选转化子, 正确的克隆进行序列测定。

### 1.3 胞外多糖突变体在水稻上的毒性测定

待测菌株单菌落接种于 20 mL NB 培养液中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h 后, 按 1% 的比例转接入新鲜的 NB 培养基中再过夜培养, 接种前水洗 2 次, 统一  $OD_{600}$  值为 0.5, 在 2-3 周叶龄的汕优 63 水稻叶上进行注射接种, 每个菌株注射接种 3 张叶, 每叶 3 个点。2-3 d 后观察水渍症状产生, 6-7 d 时观察病斑扩展情况。在 2 月大小的水稻上进行针刺接种, 每菌株针刺 5 张叶, 2 周后统计病斑长度。

### 1.4 胞外多糖产量分析

在 NA 平板上, 单菌落测定突变体的生长状态, 5 d 时观察菌落大小。胞外多糖产量测定采用摇瓶发酵法<sup>[10]</sup>。将 *Xoc* 待测菌株单菌落接种到 20 mL 的 NB 中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 调  $OD_{600}$  值一致, 取 5 mL 培养液, 分别接种于 100 mL 含 2% 葡萄糖的 NB 中, 以 200 r/min 于 28 $^{\circ}$ C 下振荡发酵。4 d 后, 将 3 倍的无水乙醇加入到培养液中, 边注入边搅拌, 然后将絮状沉淀物取出、干燥后称重。实验重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 水稻条斑病菌胞外多糖相关突变体

本研究前期利用 Tn5 转座子获得了水稻条斑病菌 RS105 菌株的 25000 个突变体, 获得了 17 个推测胞外多糖发生改变的突变体<sup>[17]</sup>。根据其在 NA 平板上生长状态, 与野生型 RS105 菌株相比, 菌落变小的突变体分别有 Mxoc610、Mxoc631、Mxoc799、Mxoc1044、Mxoc1143、Mxoc1317、Mxoc1514、Mxoc1563、Mxoc1572、Mxoc1594 和 Mxoc1606 (图 1-A); 菌落变大的突变体分别为 Mxoc62、Mxoc528、Mxoc655、Mxoc756、Mxoc1067 和 Mxoc1417 (图 1-B)。

为了说明这些突变体菌落大小的变化与胞外多糖产量有关, 本研究利用摇瓶法对上述 17 个突变体进行了胞外多糖产量分析。结果显示, NA 平板上菌落变小的突变体, 其胞外多糖产量仍是减少的; NA 平板上菌落变大的突变体, 其胞外多糖产量是增加的 (图 2)。无论是胞外多糖增加的或减少的突变体, 与野生型 RS105 菌株相比, 差异性均达到显著水平。这表明, 这些突变体是因 Tn5 转座子的插入而导致了胞外多糖产生途径发生了改变。

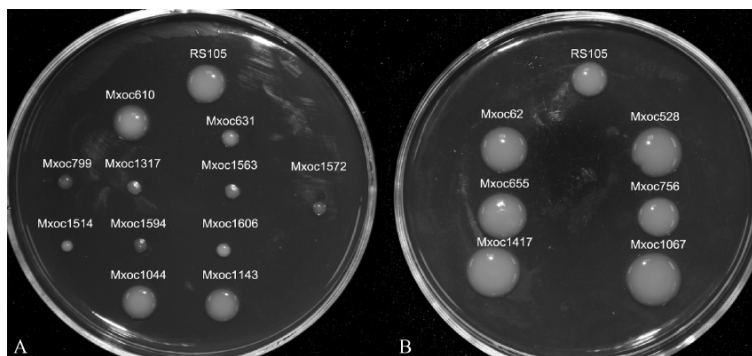


图 1 水稻条斑病菌胞外多糖相关突变体在 NA 平板上的生长状态

Fig. 1 Growth status of extracellular polysaccharide-related Tn5-inserted mutants of *X. oryzae* pv. *oryzaicola* on NA plates. A: Smaller colonies of Tn5-inserted mutants; B: Larger colonies of Tn5-inserted mutants. The single colony of relevant strain was picked by toothpick on the surface of NA plate. The photos were taken 5 days after inoculation. Experiments were performed in triplicate with similar results.

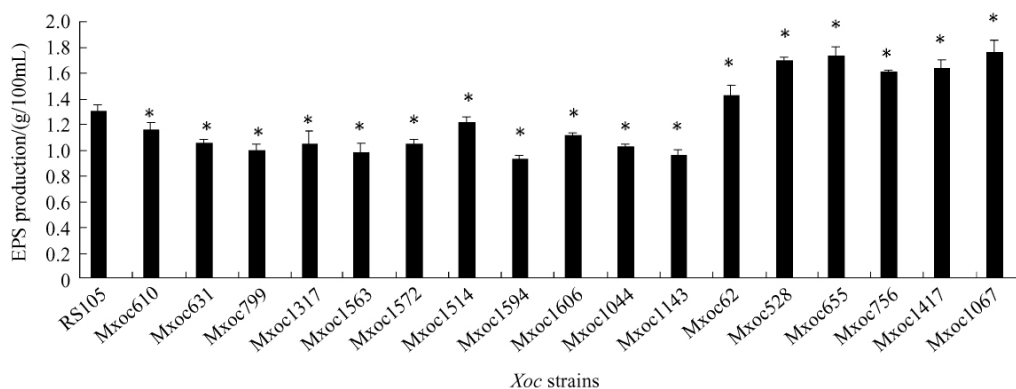


图 2 水稻条斑病菌胞外多糖相关突变体的胞外多糖产量测定

Fig. 2 Detection of extracellular polysaccharide-related Tn5-tagged mutants of *X. oryzae* pv. *oryzaicola*. Overnight cultures of the relevant Tn5-mutants and the wild-type strain RS105 grown in 20 mL NB broth were diluted 1:20 in 100 mL fresh NB broth with 2% glucose and grown for 4 days at 28°C by shaking to induce production of EPS. The precipitates by ethanol were weighted after drying. Asterisks indicate statistically significant differences in EPS weights between the wild-type RS105 and the individual mutants ( $P = 0.05$ , Student's  $t$  test).

## 2.2 胞外多糖相关突变体中 Tn5 插入拷贝数分析

通过电转化方式将 Tn5 转座子随机插入细菌的染色体 DNA 中,可能造成 Tn5 插入的多拷贝现象。为了明确 Tn5 插入的拷贝数,本研究提取这 17 个突变体的基因组 DNA,经过 *Pst* I 酶切,以 Tn5 的 DNA 为探针进行了 Southern 杂交分析。结果显示,所有突变体中 Tn5 转座子都以单拷贝的形式插入到 *Xoc* 的染色体中(图 3),表明 17 个突变体中的 Tn5 转座子为单拷贝插入。

## 2.3 17 个胞外多糖相关突变体 Tn5 插入位点的基因鉴定

为了明确 Tn5 插入位点,本研究利用已建立的

TAIL-PCR 方法<sup>[9]</sup>,对 Tn5 转座子的旁侧序列进行了扩增。PCR 产物经过测序和利用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行了分析。17 个突变体中的 Tn5 插入位点、目标基因推测产物及其在其它植物病原黄单胞菌中的同源性分析见表 2。在胞外多糖减少的突变体 Mxoc799 和 Mxoc1317 中 Tn5 分别插入在 *wxocA* 基因的不同位点;在 Mxoc1563 中 Tn5 插入 *wxocB* 基因中;在 Mxoc1514、Mxoc1594 和 Mxoc1606 中 Tn5 分别插入 *xanA* 基因 3 个不同的位点;在 Mxoc1572 中 Tn5 插入 *gumD* 基因中。*wxocA*、*wxocB*、*xanA* 和 *gumD* 均为已鉴定的胞外多糖相关基因<sup>[6-8]</sup>。在突变体 Mxoc631 中 Tn5 插入一个推测产物为 UDP-葡萄糖

脱氢酶 (UDP-glucose dehydrogenase) 的基因<sup>[11]</sup>中。在 Mxoc610、Mxoc1044 和 Mxoc1143 中, Tn5 插入在功能未知的可能与胞外多糖相关的基因上, 其中 Mxoc1044 突变体的基因是 *Xoryp\_2488* (推测产物为 hypothetical protein) 仅存在于 *Xoo* 和 *Xoc* 中, 在其他植物病原黄单胞菌中不存在同源基因。在胞外多糖增多的突变体 Mxoc62、Mxoc528 和 Mxoc1067 中, Tn5 分别插入功能已知的基因 *fimO*、*pilY* 和 *xopQ* 基因上<sup>[8, 12, 13]</sup>, 这些基因突变增加了水稻条斑病菌胞外多糖的产量, 还属首次报道。 *Xoo* 和 *Xoc* 的 *pilY*

基因具有较高的同源性<sup>[8]</sup>, 但与其他黄单胞菌的同源性较小。在 Mxoc655、Mxoc756 和 Mxoc1417 中 Tn5 分别插入 *Xoryp\_4221*、*Xoryp\_3511* 和 *Xoryp\_2392* 基因上, 其中 *Xoryp\_4221* 基因产物功能未知, 而 *Xoryp\_3551* 仅在 *Xoo* 和 *Xoc* 中存在。这些基因与水稻条斑病菌胞外多糖的产量有关也属于首次报道。这些新的胞外多糖相关基因的鉴定为水稻条斑病菌胞外多糖合成途径解析以及它们参与水稻条斑病菌在水稻上的毒性机理提供了新线索。

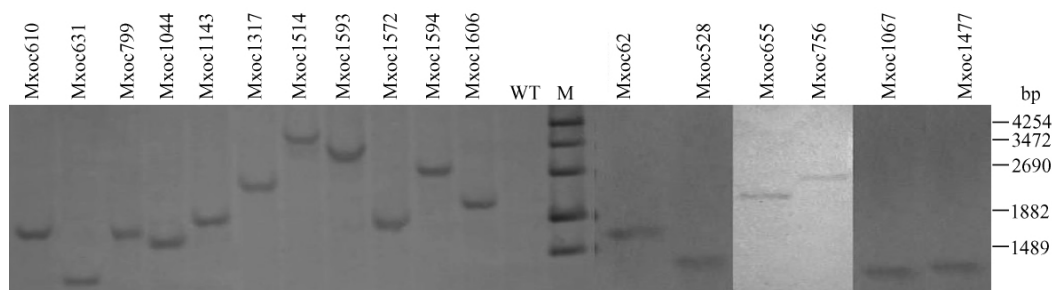


图3 水稻条斑病菌胞外多糖突变体中 Tn5 转座子拷贝数分析

Fig. 3 Southern blot analysis of the copy number of Tn5 transposon in EPS-associated mutants of *X. oryzae* pv. *oryzicola*. The genomic DNAs of the wild-type RS105 and 17 EPS-associated mutants were digested by *Pst* I and then analyzed by Southern hybridization with the Tn5 DNA as the probe. Lane WT, the wild-type strain RS105; Lane M, *EcoT14A* DNA marker (TaKaRa).

表1 水稻条斑病菌 17 个突变体的基因位点以及在其他植物病原黄单胞菌中的同源性分析

Table 1 Tn5 inserted genes in 17 EPS-associated mutants of *X. oryzae* pv. *oryzicola* and their homologs in other *Xanthomonas* species

Mutants	Inserted genes <sup>a</sup>	Putative products	Inserted position <sup>b</sup>	Homolog (Similarity %)			
				<i>Xoo</i> PX099 <sup>A</sup>	<i>Xcc</i> 8004	<i>Xac</i> 306	<i>Xcv</i> 85-10
Mxoc610	<i>Xoryp_4127</i>	CDP-glycerophosphotransferase family (unknow)	(235/1056)	100	99	99	100
Mxoc631	<i>Xoryp_1774</i>	UDP-glucose dehydrogenase ( <i>udgH</i> )	(-2/1344)	100	100	100	N
Mxoc799	<i>Xoryp_3865</i>	putative glycosyltransferase ( <i>wxocA</i> )	(699/1314)	N <sup>c</sup>	N	N	N
Mxoc1044	<i>Xoryp_2488</i>	conserved hypothetical protein	(459/2835)	99	N	N	N
Mxoc1143	<i>Xoryp_0918</i>	organic solvent tolerance protein	(2328/2442)	100	100	100	100
Mxoc1317	<i>Xoryp_3865</i>	putative glycosyltransferase ( <i>wxocA</i> )	(929/1314)	N	N	N	N
Mxoc1514	<i>Xoryp_3841</i>	phosphohexose mutases ( <i>xanA</i> )	(499/1347)	100	100	100	100
Mxoc1563	<i>Xoryp_3864</i>	putative glycosyltransferase ( <i>wxocB</i> )	(525/1698)	N	N	N	N
Mxoc1572	<i>Xoryp_1869</i>	Exopolysaccharide xanthan biosynthesis glycosyltransferase GumD ( <i>gumD</i> )	(1345/1455)	100	100	100	100
Mxoc1594	<i>Xoryp_3841</i>	phosphohexose mutases ( <i>xanA</i> )	(83/1347)	100	100	100	100
Mxoc1606	<i>Xoryp_3841</i>	phosphohexose mutases ( <i>xanA</i> )	(702/1347)	100	100	100	100
Mxoc62	<i>Xoryp_3513</i>	type IV fimbriae formation ( <i>fimO</i> )	(558/1260)	100	99	94	100
Mxoc528	<i>Xoryp_2899</i>	twitch motility of type IV fimbriae ( <i>pilY</i> )	(2668/2988)	100	21	N	Y30
Mxoc655	<i>Xoryp_4221</i>	conserved hypothetical protein	(432/632)	99	95	100	Y100
Mxoc756	<i>Xoryp_3511</i>	Sulfatase domain protein	(681/1590)	100	N	N	N
Mxoc1067	<i>Xoryp_0099</i>	<i>xopQ</i>	(376/1395)	100	84	100	100
Mxoc1417	<i>Xoryp_2392</i>	Histidine kinase	(401/1227)	100	99	99	100

<sup>a</sup> The genome sequence of a Philippine strain BLS256 was used as the reference (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/94721236>). <sup>b</sup> the first number indicates where the Tn5 is inserted in a target gene and the second shows the length (bp) of the gene. <sup>c</sup> N means no homolog existing.

*Xoo*. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; *Xcc*. *X. campestris* pv. *campestris*, *Xac*. *X. axonopodis* pv. *citri*; and *Xcv*. *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

## 2.4 胞外多糖相关突变体在水稻上的毒性

胞外多糖是水稻条斑病菌最主要的致病因素之一。为了检测这些胞外多糖改变的突变体在水稻上的毒性,本研究通过针刺接种法将这 17 个突变体接种在感病水稻品种汕优 63 上,2 周后统计病斑长度。结果显示,胞外多糖显著减少的突变体 Mxoc799、Mxoc1317、Mxoc1563、Mxoc1572、Mxoc1514、Mxoc1594 和 Mxoc1606 在水稻上的毒性显著降低(图 4),而 Mxoc610 和 Mxoc631 在水稻上的毒性与野生菌株相比也明显下降,其中 Mxoc631 在接种部分不形成扩展的条斑(图 5-A),但在苗期水稻上注射接种 3 d 后能够形成水渍状但无明显扩

展的病斑,表明该突变体在水稻仍具有致病性(图 5-B),Mxoc610 在接种部位形成非常短小的水渍状条斑(图 5-A),注射接种在叶片上也形成透明的水渍状病斑(图 5-B)。突变体 Mxoc1044 和 Mxoc1143 虽然胞外多糖减少,但是在水稻上的毒性没有明显的降低(图 4)。胞外多糖增多的突变体 Mxoc528 和 Mxoc756 在感病水稻上的毒性有微弱的增加,但是突变体 Mxoc62、Mxoc655、Mxoc1067 和 Mxoc1417 在汕优 63 上的毒性与野生型菌株相似,没有明显的变化。这些结果暗示,水稻条斑病菌胞外多糖产生能力下降越明显,其在水稻上的毒性下降也越显著,胞外多糖增加并不显著增加病菌在水稻上的毒性。

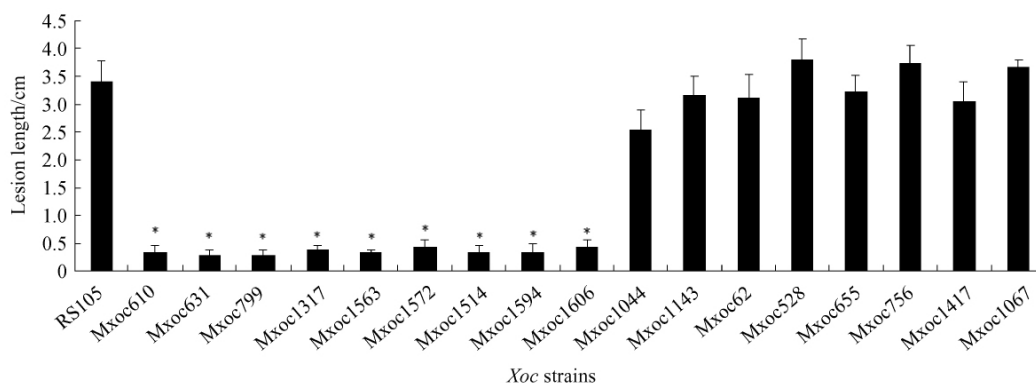


图 4 水稻条斑病菌 EPS 相关突变体在感病水稻汕优 63 上病斑长度的测定

Fig. 4 Lesion-length measurements of the EPS-associated mutants of *X. oryzae* pv. *oryzicola* on the susceptible rice Shanyou 63. The leaf of Shanyou 63 was inoculated individually with RS105 (wild type) and the EPS-associated mutants by needle syringe. The lesion lengths after 15 days of inoculation were shown in centimeter. Three replicates were used in this experiment. Asterisks indicate statistically significant differences in lesion length between the wild type and the relevant mutant ( $P=0.05$ , Student's *t* test).

## 3 讨论

本研究对前期工作中获得的 17 个与 EPS 有关的突变体进行了 Tn5 插入位点分析,确认这些突变体均为 Tn5 转座子单拷贝插入的突变体。这些突变体在 NA 平板上的菌落大小与其胞外多糖产量呈明显的相关性,即菌落小的突变体,其胞外多糖产量就少,而菌落大的突变体,其胞外多糖产量相对较高。

本研究鉴定的与 EPS 相关的基因大部分在植物病原黄单胞菌中高度保守(见表 1)。根据 Tn5 转座子插入位点的基因分析,17 个突变体中有 7 个是 Tn5 插入在已知功能的 *gum*、*xan* 和 *wxoc* 基因簇上,它们分别是 *gumD*、*xanA*、*wxocA* 和 *wxocB*;4 个是 Tn5

插入在产物已知并在其他植物病原黄单胞菌中其毒性功能已知的基因上,它们分别是 *udgH*、*fimO*、*pilY* 和 *xopQ*;4 个是 Tn5 插入在产物已知但在毒性中功能未知的基因上,分别是 *Xoryp\_4127*、*Xoryp\_0918*、*Xoryp\_3511* 和 *Xoryp\_2392*;2 个突变体是 Tn5 插入在产物未知并且在毒性中的功能未知的基因上,分别是 *Xoryp\_2488* 和 *Xoryp\_4221*。

*Xoo* 和 *Xoc* 侵染水稻,在侵入途径、危害部位和症状等方面截然不同,可能与病原菌的组织特异性基因有关。例如 *wxocA* 和 *wxocB* 不存在于 *Xoo* 和其他植物病原黄单胞菌中,属 *Xoc* 所特有<sup>[8]</sup>。本研究获得的 Mxoc799、Mxoc1313 和 Mxoc1563 突变体,就是 Tn5 插入 *wxocA* 和 *wxocB* 基因的结果,其在水稻上的毒性显著下降,可能是水稻条斑病菌侵染水稻的组织特异性基因。*Xoryp\_2488* 和 *Xoryp\_3511*

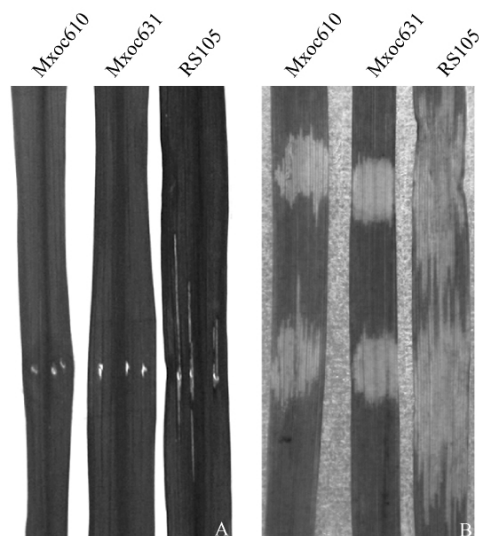


图5 Mxoc610 和 Mxoc631 突变体在汕优 63 水稻上的水渍病斑

Fig. 5 Water-soaked lesions were observed in the leaves of the seedlings of Shanyou63 caused by the mutant of Mxoc610 and Mxoc631. The leaves of two-month-old rice (A) and of 14-day-old seedlings (B) were inoculated by leaf-needling and needleless syringes, individually, with the wild-type RS105, and the Tn5 mutant Mxoc610 and Mxoc631, respectively. The images of A and B were taken 15 days and 3 days after inoculation.

仅在水稻黄单胞菌 *Xoo* 和 *Xoc* 中存在,不存在于其他黄单胞菌中。这暗示不同的黄单胞菌中 EPS 相关基因存在一定的差异性。另外,相同的 EPS 相关基因在不同的黄单胞菌种类中可能具有不同的功能。例如,柑橘溃疡病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xac*) 的 EPS 基因 *gumD* 在柑橘品种 (*Citrus sinensis*) 上不是病原菌生长和病害形成所必需的,但在柠檬品种 (*Citrus limon*) 上对病原菌的毒性具有明显的贡献作用<sup>[14-15]</sup>。

已有报道显示,一些涉及碳源代谢可能与胞外多糖产生有关的基因已被证明是病原菌在寄主组织中生长和病斑扩展所需的<sup>[11,16-17]</sup>。本研究获得的突变体 Mxoc610 能形成短小的条斑,但是与野生型 RS105 相比毒性明显降低,这可能与该突变体 EPS 的减少并不相关(与 *gum xan* 和 *wxoc* 突变体相比)(图 1),因为该突变体中被突变的基因为 CDP-甘油磷酸转移酶(CDP-glycerophosphotransferase)。该酶主要催化糖苷代谢的中间产物,这个基因在黄单胞菌中高度保守,是一个新的毒性相关基因,这暗示

CDP-甘油磷酸转移酶所涉及的糖代谢途径对于细菌在寄主上的毒性具有显著贡献。Mxoc631 突变体中被突变的基因为 *udgH*,该基因编码 UDP-葡萄糖脱氢酶(UDP-glucose dehydrogenase),是甘蓝黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 在寄主上全毒性所需的<sup>[11]</sup>。本研究针刺接种结果显示, Mxoc631 突变体针刺接种在水稻上没有形成病斑长度(图 5-A),但注射接种水稻则出现水渍状病斑(图 5-B),说明该突变体没有丧失在水稻上的致病性,主要是由于 EPS 减少、病菌在水稻组织内不能有效扩展,因而针刺接种无法显现扩展的条斑症状。这暗示,水稻条斑病菌的 EPS 减少越多,其在水稻上的毒性下降越明显。本研究中首次报道了 *xopQ*、*pilY* 和 *FimO* 等功能已知的基因与黄单胞菌 EPS 的形成有关。*fimO* 和 *pilY* 分别涉及 IV 型菌毛(IV type fimbriae)的形成和振颤<sup>[12-13]</sup>,这些基因的突变如何引起水稻条斑病菌 EPS 的增多以及 EPS 与 IV 型鞭毛的形成如何相关,有待于进一步的研究。目前,我们正在开展基因功能互补的遗传学分析,以期对 *Xoc* 与水稻互作机理有更深入的了解。

## 参考文献

- [1] 黄成栋,白雪芳,杜昱光. 黄原胶(Xanthan Gum)的特性、生产及应用. 微生物学通报(*Microbiology China*), 2005, 32(02): 91-98.
- [2] Jansson PE, Kenne L, and Lindberg B. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, 1975, 45(1): 274-282.
- [3] 周盛华,黄龙,张洪斌. 黄原胶结构、性能及其应用的研究. 食品科技(*Food Science And Technology*), 2008, 33(7): 156-160.
- [4] Chou FL, Chou HC, L YS, Yang BY, Lin NT, Weng SF, and Tseng YH. The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 1(5): 265-269.
- [5] Lee BM, Park YJ, Park DS, Kang HW, Kim JG, Song ES, Park IC, Yoon YH, Hahn JH, Koo BS, Lee GB,

- Kim H , Park HS , Yoon KO , Kim JH , Jung CH , Koh NH , Seo JS , and Go SJ. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331 , the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research* , 2005 , 33 (2) : 577-586.
- [ 6 ] Lee CK , Lee BM , and Cho JY. Identification of new internal promoters of the *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae gum* gene cluster. *Biotechnology Letters* , 2008 , 30 (3) : 521-527.
- [ 7 ] Hung CH , Wu HC , and Tseng YH. Mutation in the *Xanthomonas campestris xanA* gene required for synthesis of xanthan and lipopolysaccharide drastically reduces the efficiency of bacteriophage  $\phi$ L7 adsorption. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 2002 , 291 (2) : 338-343.
- [ 8 ] Wang L , Makino S , Subedee A , and Bogdanove A. Novel candidate virulence factors in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as revealed by mutational analysis. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 , 73 (24) : 8023-8027.
- [ 9 ] 袁亮 , 李玉蓉 , 张希福 , 郭威 , 车亦舟 , 陈功友. 热不对称 PCR (TAIL-PCR) 和 Tn5 转座子质粒拯救法快速分离水稻条斑病菌致病相关基因. *农业生物技术学 (Journal of Agricultural Biotechnology)* , 2009 , 17 (6) : 1089-1095.
- [10] Wilson TJ , Bertrand N , Tang JL , Feng JX , Pan MQ , Barber CE , Dow JM , and Daniels MJ. The *rfpA* gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* , which is involved in the regulation of pathogenicity factor production , encodes an aconitase. *Molecular Microbiology* , 1998 , 28 (5) : 961-970.
- [11] Chang KW , Weng SF , and Tseng YH. UDP-Glucose dehydrogenase gene of *Xanthomonas campestris* is required for virulence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 2001 , 287 (2) : 550-555.
- [12] Johnston JL , Billington SJ , Haring V , and Rood JI. Complementation analysis of the *dichelobacter nodosus fimN* , *fimO* , and *fimP* genes in *Pseudomonas aeruginosa* and transcriptional analysis of the *fimNOP* gene region. *Infection and Immunity* , 1998 , 66 (1) : 297-304.
- [13] 裴俊国 , 邹丽芳 , 邹华松 , 陈功友. 水稻条斑病菌 *xopQ1<sub>Xoc</sub>* 在病程中功能的初步研究. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)* , 2010 , 43 (17) : 3538-3546.
- [14] Dunger G , Relling VM , Tondo ML , Barreras M , Ielpi L , Orellano EG , and Ottado J. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Archives of Microbiology* , 2007 , 188 (2) : 127-135.
- [15] Rigano LA , Siciliano F , Enrique R , Sendfn L , Filippone P , Torres PS , Qüesta J , Dow JM , Castagnaro AP , Vojnov AA , and Marano MR. Biofilm formation , epiphytic fitness , and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* , 2007 , 20 (10) : 1222-1230.
- [16] Tung SY , and Kuo TT. Requirement for phosphoglucose isomerase of *Xanthomonas campestris* in pathogenesis of citrus caker. *Applied and Environmental Microbiology* , 1999 , 65 (12) : 5564-5570.
- [17] Zou HS , Yuan L , Guo W , Li YR , Che YZ , Zou LF , and Chen GY. Construction of a Tn5-tagged mutant library of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as an invaluable resource for functional genomics. *Current Microbiology* , 2011 , 62 (3) : 908-916.

# Identification of extracellular polysaccharide-associated genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

Dan Zhou<sup>1</sup>, Lifang Zou<sup>2</sup>, Huasong Zou<sup>2</sup>, Gongyou Chen<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education of China, Nanjing 210095, China

<sup>2</sup> Department of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Objective] Previously, seventeen extracellular polysaccharide-associated mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) were acquired from our randomly Tn5-inserted mutant library. To know the Tn5-inserted genes of these mutants and their contribution to EPS production and virulence in rice, [Methods] in this study, we first identified and characterized the Tn5-targeted genes in these mutants and then inoculated them in susceptible rice for virulence assessment. [Results] Tn5 transposon was inserted in genes of the *gum*, *xan* and *wxoc* clusters in the majority of EPS-reduced mutants. Of the EPS-reduced mutants, three were due to the Tn5 insertion in *Xoryp\_4217*, *Xoryp\_2488* and *Xoryp\_0918* genes, respectively. In six EPS-increased mutants, three were in mutagenesis in *fimO*, *pilY* and *xopQ* genes, respectively, resulting in higher EPS production than the wild-type strain RS105. Other three were because of the mutation in *Xoryp2392*, *Xoryp\_4221* and *Xoryp\_3511* genes. Interestingly, *XocORF-3511* only exists in *X. oryzae* but not in other *Xanthomonas* species. Virulence assays in rice showed that the less EPS production by the mutant, the weaker the virulence in rice. However, those mutants in higher EPS production did not increase virulence significantly in rice compared to that by the wild-type strain. [Conclusion] Our findings will help further understand the metabolic pathways for EPS synthesis in *Xoc* and the specific roles of EPS-associated genes in *Xoc*-rice interactions.

**Keywords:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, extracellular polysaccharide, Tn5-tagged mutant, gene locus, virulence

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of China (30710103902, 31000071) and by the Ministry of Agriculture of China (NYHYZX07-056)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-34205873; E-mail: gyouchen@njau.edu.cn

Received: 19 March 2011/Revised: 10 May 2011