

水稻白叶枯病抗性基因 *Xa23* 鉴别菌株突变体库的构建及无毒基因突变体的筛选Construction of Mutant Population of Differential Race of *Xa23* Resistant to Rice Bacterial Blight and Avirulence Activity Identification of Mutants周永力¹, 潘雅姣^{1,2}, 翟文学³, 徐建龙¹, 章琦¹, 黎志康^{1*}ZHOU Yong-Li¹, PAN Ya-Jiao^{1,2}, ZHAI Wen-Xue³, XU Jian-Long¹, ZHANG Qi¹ and LI Zhi-Kang^{1*}

1. 中国农业科学院作物科学研究所 农业部作物遗传育种重点实验室, 北京 100081

2. 沈阳农业大学生物技术学院, 沈阳 110161

3. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

1. Key Laboratory of Crop Genetic and Breeding of Ministry of Agriculture, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2. Department of Biology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

3. Institute of genetics and developmental biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China

摘要 利用 *in vivo* 转座技术构建了白叶枯病抗性基因 *Xa23* 鉴别菌株的突变体库, 特异性引物 PCR 扩增和转座子插入位点旁侧序列分析结果表明转座子插入到白叶枯病菌的基因组中。经人工接种鉴定, 筛选到 4 个毒力发生变化的突变体。为进一步克隆 *Xa23* 无毒基因提供了条件。

关键词 *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, *Xa23*, 突变体

中图分类号 Q93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0486-03

Abstract The mutant population of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* strain differential to rice bacterial blight resistance gene *Xa23* has been constructed mediated by transposon *in vivo*. The results of PCR amplification with specific primers and analysis of flanking sequence of mutants indicated that the foreign DNA has been integrated into *X. oryzae* pv *oryzae* genome. Four mutants with changed avirulent activity to *Xa23* gene have been identified by artificial inoculation. It is possible to clone genes that are required for *AvrXa23* avirulence activity using this new strategy.

Key words *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, *Xa23*, mutant

水稻白叶枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, *Xoo*) 是世界水稻生产中的主要病害之一, 也是我国水稻高产、稳产的重要限制因素。利用抗性基因选育抗病品种是防治白叶枯病的有效手段, 目前国际上命名的水稻白叶枯病基因已达 28 个之多。我国章琦等从普通野生稻 (*Oryza rufipogon*) 中发掘

鉴定的新基因 *Xa23* 是迄今发现的抗谱最广、抗性转移效应最强的全生育期完全显性的白叶枯病抗性基因, 不同遗传背景的 F₁ 植株从苗期到成株期均表现高度抗病^[1,2], 是改良水稻、特别是杂交稻白叶枯病抗性的优异抗源。水稻与白叶枯病菌之间存在典型的特异性互作关系, 克隆 *Xa23* 无毒基因,

Received: October 25, 2004; Accepted: January 6, 2005.

* Corresponding author. Tel: 86-10-62136040; Fax: 86-10-68918559; E-mail: lizhk@caas.net.cn

将有助于阐明白叶枯病抗性基因的广谱抗性机理。本文采用一种新的 *in vivo* 转座技术构建了 *Xa23* 鉴别菌株的突变体库,并对突变体的毒力变化进行了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻白叶枯病菌菌株为 *Xa23* 基因的鉴别菌株——菲律宾生理小种 6 代表菌株 PXO99。携有 *Xa23* 的水稻品系 CBB23(轮回亲本为 JG30)用于突变体鉴定,对 PXO99 表现高度感病的品种 IR24 作为感病对照。

1.2 菌系转化

将供试菌株 PXO99 振荡培养至 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$, 制备悬浮细胞。参考 Igor Y Goryshinde 等^[5] 的方法,采用 Cell Porator Electroporation System (Life Technologies_{TM}) 将 $EZ::TN <KAN-2>Tnp$ Transposome(Epicentre[®])电激转化到悬浮细胞中。悬浮细胞在 SOC 培养基中于 28℃ 振荡培养 1h, 涂布于含有 30μg/mL 卡那霉素的 PSA 培养基表面,28℃ 培养 24~36h 后,将阳性菌落转移至装有 PS 培养基(含 30μg/mL 卡那霉素)的 384 孔培养板中。

1.3 突变体的 PCR 鉴定及转座子插入位点旁侧序列分析

随机取突变体进行 PCR 检测,引物序列为: 5' gagccatattcaacgggaaa 3'(TS2-FW), 5' cgagcatcaaatgaaactgc 3'(TS2-RV)。PCR 反应体系 25μL,内含 10×PCR 反应缓冲液 2.5μL, dNTPs (10mmol/L) 2μL,引物 (8μmol/L) 2μL, Taq DNA 聚合酶 (3u/μL) 0.2μL, Mg²⁺ (25mmol/L) 2μL, 菌液 1μL。以未转化的 PXO99 的 DNA 作阴性对照。扩增程序为 95℃ 5min, (95℃ 30s, 58℃ 45s, 72℃ 1.5min) 30 个循环, 72℃ 7min。

采用 Inverse PCR 方法^[5] 分析转座子在突变体基因组中插入位点旁侧序列。采用转座子内没有切点的限制酶 *EcoRI* 或 *BglII* 对突变体 DNA 进行酶切、连接,连接产物进行 Nested PCR 扩增,第一轮引物为 FP-2 (5'-gtaacactggcagagacallatcg-3') 和 RP-2 (5'-cacctgattgccgacallatc-3'),第二轮引物为 FP-1 (5'-acctacaacaagctctcatcaacc-3') 和 RP-1 (5'-gcaatgtaacatcagagatlltgag-3')。扩增程序为 95℃ 5min, 95℃ 30s, 52℃ 45s, 72℃ 1.5min) 30 个循环, 72℃ 7min。第二轮产物回收测序。

1.4 人工接种鉴定突变体

将保存于 -80℃ 的突变体在含有 30μg/mL 卡那霉素的 PSA 培养基活化,在水稻分蘖期采用剪叶法接种携有 *Xa23* 的水稻品系 CBB23,鉴定各突变体毒力的变化。不携带抗性基因的品种 IR24 作感病对照,接种后 12d 左右,当接种野生型菌株 PXO99 的感病品种病情趋于稳定时,调查 CBB23 各植株的抗性反应。

2 结果与讨论

2.1 突变体库构建

Xoo 感受态细胞经电激转化,经 SOC 培养基振荡培养后涂板,24~36h 开始在含有 30μg/mL 卡那霉素的 PSA 筛选培

培养基表面出现菌落,未经转化的受体菌株感受态细胞在筛选培养基表面无菌落产生。不同次试验白叶枯病菌感受态细胞的转化效率不同,转化效率为 20ng $EZ::TN <KAN-2>Tnp$ Transposome 产生 10² 个以上的 Kan^R 菌落,表 1 为 4 次转化试验的结果。阳性菌落转至 384 孔板培养后,保存于 -80℃。采用 *in vitro* 转座技术已获得 4700 个 *Xoo* 突变体,约覆盖白叶枯病菌基因组的 1.17 倍。

表 1 $EZ::TN <KAN-2>Tnp$ Transposome(20ng)电激转化水稻白叶枯病菌获得的 Kan^R 菌落数
Table 1 Kan^R colonies of $EZ::TN <KAN-2>Tnp$ Transposome(20ng) produced by Electroporation

| Experiment | 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| No. of Kan ^R colonies | 430 | 213 | 600 | 284 |

2.2 转座子插入到 *Xoo* 基因组中的证据

采用编码卡那霉素抗性基因的序列设计特异性引物 TS2-FW 和 TS2-RV,随机扩增保存于 -80℃ 的突变体。随机挑取的不同批次转化的各突变体扩增后均产生 800bp 的目标片段(图 1),野生型菌株没有相应的扩增带产生;突变体继代 3 次后,PCR 检测仍 100% 表现阳性,上述结果初步显示转座子已插入到突变体的基因组中。

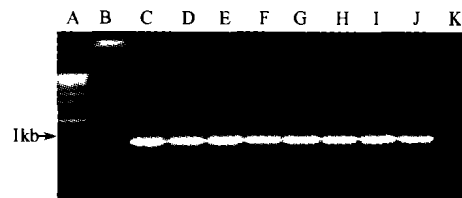


图 1 *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* 的 PCR 检测

Fig. 1 PCR analysis of mutants of *X. oryzae* pv *oryzae*

Primer pairs was TS 2-FW and TS2-RV. A: marker, 1kb ladder; B~J: mutants; K: *Xoo* wild strain.

采用 Inverse PCR 方法分析了几个突变体转座子插入位点的旁侧序列(图 2)。所测得的序列包括转座子两端的 Mosaic end,进一步表明转座子插入到了 *Xoo* 的基因组中,并且不同的突变体转座子的插入位点不同(图 3)。转座子在受体菌株基因组中随机插入为构建和筛选不同目标性状的突变体提供了可能。



图 2 $EZ::TN <KAN-2>Tnp$ Transposon 结构图和 inverse PCR 引物位置

Fig. 2 Schematic map of $EZ::TN <KAN-2>Tnp$ Transposon and the locations of primers used in inverse PCR

ME = Mosaic End.

2.3 无毒基因突变体的筛选

携带抗病基因 *Xa23* 的品系 CBB23 对 PXO99 菌株表现高度抗病反应,病斑面积为 0.5~1.0cm。在测定的突变体中,发现 4 个突变体的致病力与野生型菌株相比致病力明显提高(图 4),病斑长度达到 5.0~7.0cm。 *Xa23* 是一个高度抗病的广谱抗性基因,与病原菌存在清晰的特异性识别反应,对我国 7 个病原型、菲律宾和日本的全部生理小种以及韩国代表菌株均表现高度抗病,病斑长度均小于 1.0cm(章琦,个人

通讯)。上述几个突变体经 PCR 扩增后均有转座子特异性片段产生。从 CBB23 的抗性反应来看,可以初步推断上述突变体的致病力发生变化可能与转座子插入到无毒相关基因位点有关。

```

5-5  cgccgacggccgcgacgagtagcgcgacgtg[gcacggagatgtaga.....ccaaactactctgaacaacatcca...
10-3  cgtagggtgtctacagcgagacgatgcccaac[gcacggagatgtaga.....ccaaactactctgaacaacatcca...
2-16(9)gacgcaagcctgtgctgctctggcagcgtag[gcacggagatgtaga.....ccaaactactctgaacaacatcca...

          RFL↓
5-5  .....cgttacattgtagtctctaaact.....taccacatactctctc[gcgctcgtctggtaagagttggtagg
10-3  .....cgttacattgtagtctctaaact.....taccacatactctctc]atgcccaacgctcgcacgcttgc
2-16(9).....cgttacattgtagtctctaaact.....taccacatactctctc]ggcgcccgccggcctaggtagac

5-5  gccgctccgctagtcgcg
10-3  cgccgcataccggaatt
2-16(9) acactgtgcggccgt
    
```

图3 EZ::TN <KAN-2> Tnp Transposon 在突变体 5-5、10-3 和 2-16(9) Xoo 基因组中插入位点的旁侧序列

Fig. 3 Junction sequences of EZ::TN <KAN-2> Tnp Transposon to flanking DNA of mutants 5-5, 10-3 and 2-16(9)

The sequence in [] is the sequence of transposon, the shaded letters are the sequence of mosaic end. The sequence outside [] is DNA of Xoo.

The sequence in [] is the sequence of transposon, the shaded letters are the sequence of mosaic end. The sequence outside [] is DNA of Xoo.



图4 毒力变化的突变体在叶片上的症状

Fig.4 Leaves with increased symptoms produced by mutants from infection assays

A: wild-type PXO99; B ~ E: the mutants.

EZ::TN <KAN-2> Tnp Transposome 转座系统是近年发展起来的一种转化细菌的新技术^[6],不需要进行细胞融合,也不需要种相容的转座酶表达系统和自杀载体,直接通过电激转化将转座子导入到活细胞中,并且转座子在大多数突变体基因组中均为单拷贝插入^[4]。

本文探索了 EZ::TN <KAN-2> Tnp Transposome 体系转化水稻白叶枯病菌的有效性,结果表明该系统可以用于黄单胞菌的转化,与常规的转座子转化技术相比^[3],具有操作简便、转化效率高的特点;同时构建了广谱基因 Xa23 鉴别菌株的突变体库,为克隆 AvrXa23 基因提供了条件。目前我们正同时通过序列测定和 Southern 杂交分析 EZ::TN <KAN-2> Tnp Transposome 在毒力发生变化的突变体基因组中的插入和分布情况,以期克隆到 Xa23 的无毒相关基因。

REFERENCES (参考文献)

[1] Zhang Q, Lin SC, Zhao BY et al. Identification and tagging a new gene for resistance to bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*) from *O. rufipogon*. *Rice Genetics Newsletter*, 1999, 15: 138 - 141

[2] Zhang Q, Wang CL, Zhao KJ et al. Development of near-isogenic line CBB23 with a new resistance gene to bacterial blight in rice and its application. *Chinese J Rice Sci*, 2002, 16(3): 206 - 210

[3] Shen YW, Sharma P, Sliva Francisco G da et al. The *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* *raxP* and *raxQ* genes encode and ATP sulphurylase and adenosine-5-phosphosulphate kinase that are required for AvrXa21 avirulence activity. *Molecular Microbiology*, 2002, 44(1): 37 - 48

[4] Igor Y Goryshinde, Jerry Jendrisak, Les M Hoffman et al. Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 97 - 100

[5] Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic application of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 1988, 120: 621 - 623

[6] Douglas R Davies, Igor Y Goryshin, William S et al. Three-dimensional structure of the Tn5 synaptic complex transposition intermediate. *Science*, 2000, 289: 77 - 85

科学出版社生命科学编辑部新书推介



精编分子生物学实验指南(第四版)(译)

Frederick Ausubel 等著

马学军、舒跃龙、颜子颖、王海林 等译

2005年1月出版, ISBN 7-03-014725-1/Q.1532, 定价:130元

被誉为分子生物学“红宝书”的《精编分子生物学实验指南》(Short Protocols in Molecular Biology)是知名度很高、不断更新的《最新分子生物学实验方法汇编》(Current Protocols in Molecular Biology)系列的精简版本,其囊括了《汇编》中所有基本方法及其详细实验步骤,是一本实验室必备的工具书。在上一版推出5年后,新版即将面世。新版对原有内容进行了修订和更新,包括:大肠杆菌、质粒和噬菌体, DNA 制备与分析, DNA 和 RNA 的酶促操作, RNA 的制备与纯化, 重组 DNA 文库, 重组 DNA 文库的筛选, DNA 测序, 重组 DNA 诱变, DNA 转染哺乳动物细胞方法的介绍, 蛋白质分析, 免疫学, DNA - 蛋白质相互作用, 酿酒酵母, 原位杂交与免疫组织化学, 聚合酶链式反应, 蛋白质表达, 蛋白质磷酸化分析等; 又新增了生物信息学、蛋白质相互作用、统计分析等新内容。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)。

邮购地址:100717 北京东黄城根北街16号科学出版社科学分社; 联系人:阮芯; 联系电话:010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目:010-64012501