

## 植物青枯菌相关基因的克隆及致病力测定分析

罗天宽<sup>1</sup>, 刘焕利<sup>2</sup>, 张小玲<sup>1</sup>, 何礼远<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>温州市农业科学研究院 生物技术研究所, 浙江 温州 325006; <sup>2</sup>中国农业科学院 植物保护研究所, 北京 100094)

**摘要:**以 PM2644 为受菌体, 通过基因功能互补的方法, 将从野生青枯菌基因文库中筛选得到的克隆进一步克隆得到克隆 pLTK15。胞外酶活性测定结果表明, pLTK15 与突变株 PM2644 接合产生的接合子能完全恢复突变株 PM2644 聚半乳糖醛酸酶的活性, 接合子上清液 SDS-PAGE 电泳结果表明, 接合子只能互补 PM2644 所缺失的 62.5 kDa 的一种胞外蛋白, 经致病力测定, pLTK15 能使突变株 PM2644 的致病力得到部分恢复。结果表明, 聚半乳糖醛酸酶和 62.5 kDa 的胞外蛋白在青枯菌的致病过程中起着一定的作用。

**关键词:**植物青枯菌; 基因克隆; 致病力分析

中图分类号: Q785.5432

文献标识码: A

文章编号: 1004-1524(2002)03-0131-04

### Cloning of the gene relating to extracellular proteins of *Ralstonia solanacearum* and analysis of the virulence

LUO Tian-kuan<sup>1</sup>, LIU Huan-li<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-ling<sup>1</sup>, HE Li-yuan<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Wenzhou Academy of Agricultural Sciences, Wenzhou 325006, China; <sup>2</sup>Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The clone (pLTK15) was cloned from the clone which were screened out from genomic library of wild type stain PO41 by gene function complementation test. pLTK15 related to extracellular protein of *Ralstonia solanacearum*. The complementary conjugants of PM2644 with pLTK15 restored all of the activity of polygalacturonase. The result of SDS-PAGE showed that it restored only one kind of the lost extracellular proteins (62.5 kDa). The virulence of the complementary conjugants of PM2644 with it can be partially restored. The results showed that polygalacturonase and the 62.5 kDa extracellular protein play a role in the process of *Ralstonia solanacearum* infect plants.

**Key words:** *Ralstonia solanacearum*; gene cloning; virulence analysis

植物青枯病原细菌(*Ralstonia solanacearum* nov. comb., 简称青枯菌)引起的青枯病是世界范围内发生的一种重大细菌病害<sup>[1]</sup>。野生型毒性青枯菌可产生大量的胞外多糖, 它

们能影响和阻碍植物体内的水分运输引起植物的萎蔫和死亡。刘焕利等采用转座子的方法<sup>[2,3]</sup>获得能正常产生胞外多糖, 但缺失不同种类胞外蛋白的突变菌株 21 株, 其中有 5 株 (PM239, PM2594, PM2644, PM2678, PM3440) 都失去了 9 种胞外蛋白和聚半乳糖醛酸酶的活性, 同时这些菌株均失去致病

收稿日期: 2001-08-21

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目

作者简介: 罗天宽(1976-), 男, 湖南张家界人, 助理农艺师, 从事生物技术科研工作。E-mail: wuj\_s\_000@263.net

力<sup>[1]</sup>,说明胞外蛋白在青枯菌致病中起着十分重要的作用,通过基因互补的方法,获得克隆 pLCQ2 能完全互补突变株 PM2644 所缺失的胞外蛋白和聚半乳糖醛酸酶的活性,并恢复其致病力。为了研究上述突变株 PM2644 所缺失的每一种胞外蛋白在致病中的作用,本研究对 pLCQ2 进行进一步克隆,使其只能互补一种或几种 PM2644 所缺失的胞外蛋白,对其致病力进行测定分析,从而对所缺失的每一种胞外蛋白进行更深一步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及质粒

供试菌株和质粒的特性和来源见表 1。

### 1.2 培养基和抗生素

供试培养基有 LB 培养基,青枯菌培养用 NA 培养基<sup>[4]</sup>,Holloway's MM 培养基,果胶酶活性测定培养基,利福平(Rif)所用浓度为 100 μg/ml,卡那霉素(Km)所用浓度为 50 μg/ml,四环素(Tc)所用浓度为 40 μg/ml。

### 1.3 基因克隆

用 XhoI 酶切 pLCQ2 回收 3.0 kb 大小的片段克隆到载体 pCPP33 上,基因功能互补参照 Allen 等<sup>[5]</sup>的方法。

### 1.4 与突变株 PM2644 的结合

1.4.1 载体和宿主分别为 pLA2917, S17-1 的各重组克隆与突变株 PM2644 的结合 突变株 PM2644 菌悬液涂布在 NA + Tc + Km 的平板上,将各重组克隆在平板上划线,28℃培养 48 h。

1.4.2 载体和宿主分别为 pCPP33, DH5α 的各重组克隆与突变株 PM2644 的结合 将 PM2644, pRK2013/HB101, 各重组克隆/DH5α 分别制成菌悬液,按 PM2644:pRK2013/HB101:各重组克隆/DH5α = 2:1:1 混合,将混合液点滴在 NA 平板上,28℃培养 3 h,然后将混合液从 NA 平板上转移到 NA + rif + Tc 平板上,28℃培养。

### 1.5 接合子胞外酶活性的测定

将接合子接种在测试果胶酶的平板上,28℃培养 5~6 d,用 10% 的 CTAB 溶液浸泡测试果胶酶的平板 15 min,若在菌落周围形成一个透明圈,表明该接合子可以产生聚半乳糖醛酸酶,透明圈越大,聚半乳糖醛酸酶活性也越强,其方法参照 Roberts 等<sup>[6]</sup>的方法。

### 1.6 SDS-PAGE 电泳

参照 Sambrook 等<sup>[5]</sup>的方法。

### 1.7 致病力的测定

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株和质粒	特性	来源或参考文献
<i>E. coli</i> S17-1	recA <sup>-</sup> RP4-2 (Tc :Mu X Km :Tn7) pro hsdR <sup>-</sup> hsdm <sup>+</sup>	*
<i>E. coli</i> DH5α	sup E444Δlac U169(Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	*
pCPP33	cosmid, Tc <sup>r</sup>	D. W. Bauer
HB101	宿主菌	*
pRK2013	辅助质粒	*
PO41	马铃薯青枯菌野生型菌株	*
PM2644	PO41 经转座子 Tn5 诱变后得到的缺失 9 种胞外蛋白的突变株	*
pPSP1	阳性克隆,能互补 PM2644 突变株胞外酶及 9 种胞外蛋白	*
PGZ1	阳性克隆,不能互补 PM2644 突变株胞外酶及 9 种胞外蛋白	*
pLCQ2	阳性克隆,质粒载体为 pLA2917,外源片段为 4.2kb Tc <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ,能互补 PM2644 突变株胞外酶及 9 种胞外蛋白	*
pLTK15	阳性克隆	本研究

注：“\*”为中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室

供试寄主系感病品种马铃薯中薯 3 号,测定用茎部毛细管滴注法,菌液浓度为  $3 \times 10^8$  cfp/ml。

## 2 结果与分析

### 2.1 克隆的筛选

用 XhoI 限制性内切酶酶切 pLCQ2,用透析袋电泳的方法回收酶切得到的 3.0 kb 的外源片段,连接到 pCPP33 载体质粒上,并利用热击处理转化到感受态 DH5 $\alpha$  中,通过蓝白斑反应筛选得到含 3.0 kb 的阳性克隆 pLTK15(图 1)。图 1-c 所示为 pLTK15 用 XhoI 完全酶切,切下的 3.0 kb 的条带为克隆的目的片段。

### 2.2 产生互补接合子及互补接合子恢复产生聚半乳糖醛酸酶活性的测定

用牙签将 PO41,PM2644,pPSP1,pLCQ2,pLTK15 与 PM2644 的接合子接种于测试果胶酶活性的平板上,在 30 $^{\circ}$ C 培养 6 d 后,用 10% CTAB 溶液浸泡 15 min,产生大小不等的透明圈。从表 2 可以看出突变株 PM2644 和无功能的克隆 pGZ1 与 PM2644 的接合子不能产生透明圈,pLCQ2 与 pPSP1 均能完全恢复突变株 PM2644 所缺失的聚半乳糖醛酸酶的活

表 2 与突变株 PM2644 互补接合子果胶酶活性测定结果

Table 2 Activity of polygalacturonase of *R. solanacearum* and the complementary conjugants of PM2644 with the clones

菌株	透明圈直径		菌体直径		D1/D2		
	D1/mm		D2/mm				
	1	2	1	2	1	2	平均
PO41	16.0	15.0	10.0	6.0	1.6	2.5	2.1
PM2644	0.0	0.0	6.0	5.0	0.0	0.0	0.0
PM2644pPSP1	10.0	9.0	6.0	5.5	1.7	1.6	1.7
PM2644pGZ1	0.0	0.0	5.0	5.5	0.0	0.0	0.0
PM2644pLCQ2	10.0	10.0	4.5	6.0	2.2	1.7	1.9
PM2644pLTK15	8.5	11.0	5.0	6.0	1.7	1.8	1.8

性,pLTK15 与 PM2644 的接合子能产生透明圈,且与野生型菌株 PO41 的 D1/D2 相差不大,说明克隆 pLTK15 能完全恢复突变株 PM2644 产生聚半乳糖醛酸酶的能力。

### 2.3 互补接合子胞外蛋白恢复情况测定

挑取产生的接合子于 1.5 ml 的离心管中,用 0.6 ml NA 培养液于 30 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 40 h 后,14 000 r/min 离心 5 min,上清液在 -20 $^{\circ}$ C 冷冻,然后用冷冻干燥机抽成干粉,溶解在 40  $\mu$ l 的样品缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳(图 2)。由图 2 可知阳性克隆 pLTK15(1)只能互补突变株 PM2644 所缺失的 62.5 kDa 的胞外蛋白,pLCQ2(图 2-2),pPSP1(图 2-3)能恢复突变株 PM2644 所缺失的胞外蛋白;pGZ1(图 2-4)不能互补 PM2644 所缺失的胞外蛋白。

### 2.4 致病力分析

马铃薯茎部测定结果表明(表 3),在第 15 天野生型菌株 PO41 突变株 PM2644 与 pPSP1、pLCQ2 的结合子 PM2644pPSP1 和 PM2644pLCQ2 使绝大部分马铃薯萎蔫,而突变株 PM2644 几乎不能使马铃薯萎蔫,克隆 pLTK15 与 PM2644 的结合子 PM2644pLTK15 第 15 天使部分马铃薯植株萎蔫,其数量远远高于 PM2644 突变株本身,比野生菌株 PO41

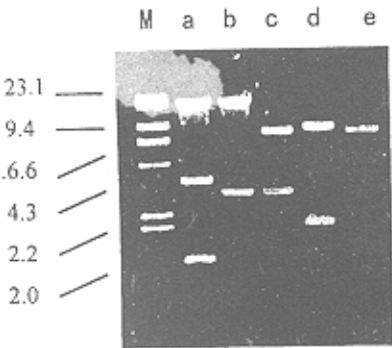


图 1 用 Xho I Pst I 完全酶切 pLCQ2,pLTK15 及 pCPP33 检测 pLTK15 的结果

Fig.1 The 3.0 kb DNA fragment cloned in pLTK15  
M  $\lambda$  DNA/HindIII a :pLCQ2/PstI b pLCQ2/XhoI  
c pLTK15/XhoI d pLTK15/PstI e pCPP33/XhoI

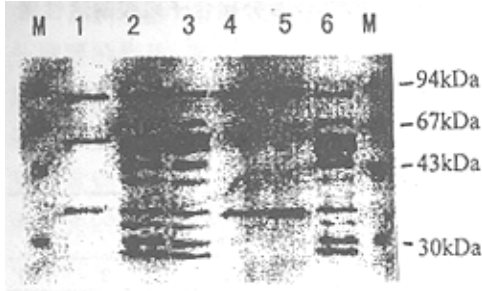


图 2 SDS-PAGE 电泳检测

Fig.2 SDS-PAGE

M :低分子蛋白标准

1 : PM2644pLTK15      2 : PM2644pLCQ2      3 : PM2644pPSP1  
 4 : PM2644pGZ1      5 : PM2644            6 : PO41

表 3 PM2644 与克隆形成的互补接合子的致病力

Table 3 Virulence of complementary conjugants of PM2644 with the positive clones

菌株	接种后不同时间(d)的病情指数			
	3	7	15	20
PO41	0	30	85	100
PM2644pPSP1	0	25	80	95
PM2644pLCQ2	0	20	75	80
PM2644pLTK15	0	5	35	75
PM2644	0	0	5	60

及 PM2644pPSP1、PM2644pLCQ2 要低。此结果表明,聚半乳糖醛酸酶和 62.5 kDa 的胞外蛋白在青枯菌的致病过程中起着一定的作用。

### 3 讨论

国内外植物病理学家对青枯菌的致病机制进行了大量的研究,认为胞外多糖、胞外蛋白以及植物生长调节物质在致病过程中可能起着重要的作用,其中分子量为 28 kDa 的胞外蛋白和聚半乳糖醛酸酶研究得比较清楚,研究发现聚半乳糖醛酸酶和 28 kDa 的胞外蛋白在致病过程中作用并非必需。康耀卫等<sup>[8]</sup>采用 Tn5 诱变青枯菌小种 3 号 PO41 获

得了青枯菌胞外蛋白输出基因缺失的突变株 D4,该突变株可以正常产生胞外多糖和胞外蛋白,只是丧失了向胞外输出胞外蛋白的能力而失去致病力,从而肯定了胞外蛋白在青枯菌致病过程中的重要作用。何礼远等进一步研究发现,62.5 kDa 的胞外蛋白在青枯菌致病过程中作用也不明显<sup>[1,9]</sup>。本研究发现当聚半乳糖醛酸酶与 62.5 kDa 的胞外蛋白共同存在时在青枯菌致病过程中有着明显的作用。据此分析推测,青枯菌在致病过程中可能是由多种蛋白(包括酶)共同作用的结果。

### 参考文献:

[1] 何礼远,康耀卫,毛国璋,等.植物青枯菌的致病机理[J].自然科学进展,1995,5(1):7-16.  
 [2] 刘焕利,何礼远,毛国璋,等.植物青枯菌胞外蛋白相关基因的克隆[J].植物病理学报,1999,29(2):110-113.  
 [3] 毛国璋,康耀卫,何礼远,等.转座子对马铃薯青枯菌的诱变[A].何礼远.植物病虫害生物学研究进展[C].北京:农业出版社,1996.49-53.  
 [4] 方中达.植病研究方法[M].北京:农业出版社,1979.  
 [5] Allen LN,Hanson RS. Construction of broad-host-range cosmid cloning vectors: identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol[J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 161(3):955-962.  
 [6] Roberts DP,Denny TP,Schell MA. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(4):1445-1451.  
 [7] Sambrook J,Frisch EF,Maniatis M. Molecular cloning: a laboratory manual(2nd ed. ) [M]. Harbor Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989.  
 [8] 康耀卫,何礼远.植物青枯菌致病机理[J].自然科学进展,1995,5(2):119-112.  
 [9] 刘焕利,何礼远,毛国璋,等.植物青枯菌胞外蛋白及其在致病中的作用[J].植物病理学报,1998,28(4):375.

(责任编辑 陈华平)