

水稻基腐细菌 Tn5 插入突变体库的构建及其致病相关突变体的筛选

谭秀明 陈雪凤 林敏怡 刘琼光

华南农业大学资源环境学院, 广州 510642

摘要 采用转座子 Tn5 插入突变技术, 共获得 5 261 个接合子。通过马铃薯软腐快速筛选和 PCR 检测验证, 获得 267 个使马铃薯软腐能力丧失或下降的 Tn5 插入突变体, 并测定其在水稻上的致病力和烟草上的过敏性坏死反应(HR)。结果表明: 在 267 个突变体菌株中, 对水稻无致病力的有 71 个, 其中在烟草上无 HR 反应的有 59 个, 产生 HR 反应的有 12 个; 对水稻致病力下降的有 68 个, 其余突变体菌株对水稻致病力与野生菌株差异不明显。另外, 267 个突变体菌株中有 146 个无 HR 反应, 其中有 90 个对水稻无致病力或者致病力下降。致病力的分析结果表明, 获得的突变体是由 Tn5 插入 *Dickeya zeae* 染色体上不同的致病相关基因位点导致的。

关键词 水稻基腐菌; Tn5 转座子; 致病性; 突变体; 致病力

中图分类号 S 432.4⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)02-0193-06

水稻细菌性基腐病是水稻上一种重要病害, 在东南亚一些国家都有分布, 我国主要稻区都有发生, 且有扩展蔓延和逐年加重的趋势, 罹病水稻分蘖减少, 茎基部腐烂, 严重的可造成水稻大面积受损^[1]。该病是由菊欧氏菌玉米致病变种(*Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*, 现更名为 *Dickeya zeae*) 引起。*D. zeae* 是世界性重要植物病原细菌, 其寄主已增加到 13 种^[2]。侵染水稻的 *D. zeae* 能潜伏侵染和抑制水稻根的生长, 来自水稻的 *D. zeae* 还能产生毒素^[3-5]。植物病原细菌的致病性是受复杂的网络系统调控的, 要弄清 *D. zeae* 的致病性及其调控机制, 需要对相关基因进行分离、鉴定以及功能分析, 而进行功能突变并获得致病相关基因的突变体, 是了解基因功能最重要、最常规的方法。

近年来, Tn5 转座子突变技术成为革兰氏阴性细菌分子遗传研究的一种简便方法, 其应用十分广泛^[6-7]。关于菊欧氏杆菌, 用 Tn5 诱导细菌素基因突变并进行分析鉴定^[8], 国外报道用 Tn5 技术已获得 *D. zeae* 的群体感应 (quorum-sensing, QS) 相关基因^[9], 但有关 *D. zeae* 的致病基因、致病机制及其致病性调控等方面还知之甚少。笔者通过 Tn5 转座突变技术对水稻基腐病菌 *D. zeae* 进行随机突变, 筛选致

病力下降或者完全丧失致病力的菌株, 获得了一定数量的 *D. zeae* 致病相关基因的突变体菌株, 旨在为 *D. zeae* 后续致病相关基因的功能分析及其致病机制的分子遗传学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1) 植物、菌株和质粒。供试接种的水稻为感基腐病品种特粘 13, 烟草品种为 K326。水稻基腐细菌野生型菌株 EC1 由华南农业大学资源环境学院细菌研究室保存。大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 为笔者所在实验室保存, 供体菌大肠杆菌 *E. coli* S17.1 (携带自杀性质粒 mini-Tn5) 由新加坡分子与细胞生物学研究所张炼辉教授惠赠。

2) 酶和试剂。普通 Taq 酶、dNTPs 等购于全式金生物技术(北京)有限公司, 各类抗生素、琼脂糖、胰蛋白酶和酵母提取物等均购自 Sigma 公司。

3) 培养基。筛选使用 MM 培养基, 其制备配方: K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, CaCl₂ 10 mg, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, KH₂PO₄ 4.5 g, FeSO₄ 5 mg, MnCl₂ 2 mg, 甘露醇 2.0 g, 葡萄糖 1.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

收稿日期: 2011-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071658)

谭秀明, 硕士研究生, 研究方向: 植物病原细菌学. E-mail: kaoyan401@126.com

通讯作者: 刘琼光, 副教授, 研究方向: 植物病原细菌学. E-mail: qgliu@scau.edu.cn

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 酵母提取物 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.5; LB 固体培养基为每升 LB 液体中加入 15 g 琼脂。

4) 引物。用于检测水稻基腐病菌的引物 ADE-1/ADE-2, 其序列为 ADE-1: 5'-GATCAGAAAGC-CCGCAGCCAGAT-3', ADE-2: 5'-CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC-3'; 用于检测 Tn5 的引物 GT-F/GT-R, 其序列为 GT-F: 5'-G CAGTCGCCCTAAAACAAA-3', GT-R: 5'-CACT TCTTCCCGTATGCCCAACTT-3' 序列。测序及引物合成由英骏生物技术有限公司完成。

1.2 突变体库构建的步骤

参考双亲本接合法^[10]进行, 并略作改进。将供体菌 *E. coli* S17.1 和受体菌 EC1 菌株活化后, 接种在 LB 平板上, 30 °C 下培养过夜, 共设 3 个对照。将过夜培养的供体和受体菌混在一起共培养, 将 3 个对照共培养时间设置为 5、6、7 h, 分别用 2 mL 无菌水将菌体洗脱出来, 将原液稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍后均匀涂布在含有卡那霉素 (50 μg/mL) 的 MM 抗性平板上, 30 °C 下培养 48 h。由于含有 Tn5 的供体菌 *E. coli* S17.1 能在卡那霉素平板上生长, 不能在 MM 平板上生长, 而受体菌 EC1 则能在 MM 平板上生长, 不能在卡那霉素平板上生长, 因此在含卡那霉素的 MM 抗性平板上生长的菌落, 可初步认为是 Tn5 插入的突变子。挑取该平板上的单菌落保存, 用于后续筛选。

1.3 致病突变体的初步筛选

因水稻基腐病野生型致病力菌株具有使马铃薯块软腐的能力, 故采用马铃薯软腐试验进行突变子的快速筛选。将新鲜马铃薯切成片 (厚度约 5 mm) 后置于灭菌培养皿里, 在超净工作台上用紫外灯杀菌 15 min, 再将待测的接合子接种到马铃薯切片上, 以野生菌和无菌水为对照。每个接合子设 3 个重复, 筛选出具有使马铃薯软腐的能力和与野生菌比较具有明显差异的突变子保存备用。

1.4 突变体的 PCR 验证

使用 ADE-1/ADE-2 引物检测 *D. zeae*, 同时用 GT-F/GT-R 引物检测 Tn5 插入质粒。采用 25 μL PCR 反应体系: *Taq* 酶 Buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, 引物各 1 μL, *Taq* 酶 0.4 μL, 模板 1 μL。PCR 反应条件: 94 °C 7 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环, 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.5 突变体致病力的测定

将待测的 Tn5 插入突变体和野生菌 EC1 接种于 LB 培养液中, 30 °C 下 180 r/min 振荡培养过夜, 将菌液浓度调整为 $D_{600} \approx 0.8$ (约 1×10^8 cfu/mL), 使用注射接种法分别接种 3~4 片叶苗龄的水稻茎基部, 烟叶接种从叶背叶脉中注射。每个菌株 3 个重复, 24~48 h 后观察其发病状况及过敏性坏死反应 (HR)。

2 结果与分析

2.1 Tn5 插入突变体库的构建

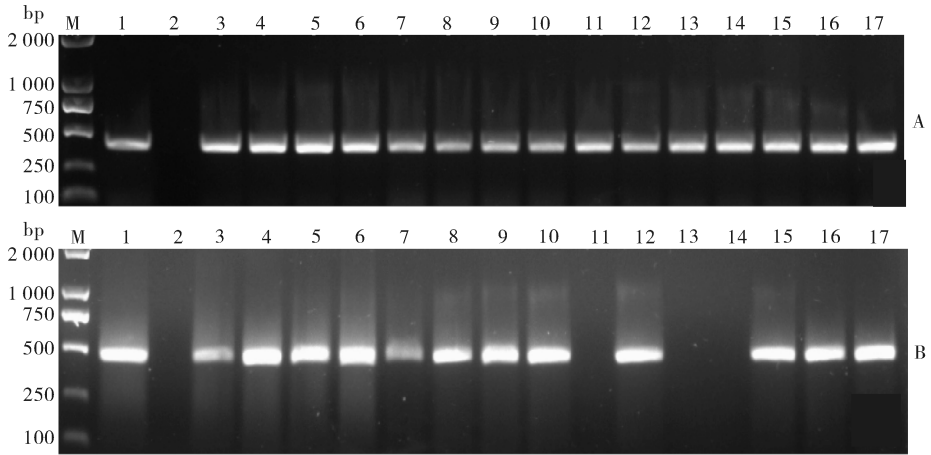
试验结果表明, 共培养 5、6、7 h 的接合子分别有 1 253 个、2 568 个和 1 440 个。由此可知, 双亲本接合试验中, 若要获得较多的接合子, 供体菌和受体菌共培养时间以 6 h 为宜。在本试验中, 双亲本接合共获得 5 261 个接合子, 其中受体菌和供体菌共培养液浓度约为 4.0×10^6 cfu/mL, *E. coli* S17.1 (pmini-Tn5) 的转座突变率为 1×10^{-8} 。

2.2 致病突变体的筛选

由于 *D. zeae* 具有使马铃薯软腐的能力, 本研究中以马铃薯块软腐的能力作为致病突变体的快速筛选, 5 261 个接合子接种马铃薯块软腐试验的结果表明, 软腐能力下降和完全不致软腐的菌株共有 565 个, 占接合子总数的 10.74%。

2.3 Tn5 插入突变体的 PCR 验证

为了进一步确定不引起马铃薯软腐的接合子是由于 Tn5 插入突变所致, 本研究同时使用 2 套引物进行 PCR 检测验证, 其中引物 ADE-1/ADE-2 用来检测野生菌 EC1, 引物 GT-F/GT-R 用于检测 Tn5 质粒中的某一片段, 如果 2 套引物 PCR 都能同时扩增各自特异的目的片段, 则说明该接合子有 Tn5 插入。试验结果表明, 所有被测的 565 个马铃薯软腐接合子中, 引物 ADE-1/ADE-2 的 PCR 扩增都能获得 420 bp 大小的特异目的片段 (图 1-A), 而引物 GT-F/GT-R 的 PCR 结果, 只有部分接合子 (267 个) 能扩增出特异目的片段, 大小 464 bp (图 1-B), 占软腐突变体总数的 47.3%, 这表明 267 个突变体含有 Tn5 插入。然而在马铃薯软腐突变体的接合子中, 仍有 52.7% 的接合子用引物 GT-F/GT-R 不能 PCR 扩增目的片段, 其原因可能是转座子 Tn5 中其他位置的 DNA 片段插入到细菌的染色体中, 或部分接合子的自身突变等, 同时也有可能存在污染菌或者假阳性菌株。



M: DNA marker; 1:野生菌株 EC1; 2:清水; 3~17:分别为马铃薯软腐突变体菌株 M0101、M0102、M0106、M0108、M0118、M0210、M0215、M0226、M0334、M0239、M0257、M0305、M0310、M0346、M0404。1: Wild strain EC1; 2: Water; 3-17: Mutants M0101, M0102, M0106, M0108, M0118, M0210, M0215, M0226, M0334, M0239, M0257, M0305, M0310, M0346, M0404 respectively.

图 1 引物 ADE-1/ADE-2(A)和引物 GTF/GTR(B)PCR 检测部分马铃薯软腐突变菌株

Fig.1 PCR detection of potato soft rot mutants by primers ADE-1/ADE-2(A) and primers GTF/GTR(B)

2.4 突变体致病力的分析

不能侵染水稻,对水稻无致病力。另外,有 68 个菌株致病力下降,其余突变体菌株对水稻则表现一定的致病力(表 1,图 2)。

1)水稻的致病力测定。试验结果表明,在测定的 267 个 Tn5 插入突变体中,有 71 个突变体菌株

不能侵染水稻,对水稻无致病力。另外,有 68 个菌株致病力下降,其余突变体菌株对水稻则表现一定的致病力(表 1,图 2)。

表 1 *D. zeae* Tn5 插入突变体菌株致病表型分析¹⁾

Table 1 The pathogenic phenotype analysis of *D. zeae* Tn5 mutants

菌株序号 No. of mutants	马铃薯 Potato	水稻 Rice	烟草 Tobacco	总数 Total
M0118, M0215, M0346, M0446, M0449, M1302, M1303, M1317, M1547, M1602, M1603, M1701, M1723, M1806, M2003, M2604, M2622, M2641, M2643, M2901, M2928, M3021, M3049, M3166, M3262, M4103, M4110, M4115, M4124, M4136, M4140, M4142, M4145, M4247, M4312, M4323, M4327, M4336, M4628, M4705, M4750, M4755, M4914, M4919, M4957, M4950, M5002, M5010, M5030, M5129, M5133, M5137, M5303, M5308, M5314, M5315, M5335, M6749, M7141	—	—	—	59
M0106, M0422, M1370, M1963, M1974, M2023, M2110, M2131, M2424, M2851, M2854, M3045, M3192, M3563, M3584, M4001, M4263, M4327, M4149, M4933, M4771, M5042, M5175, M5649, M5923, M6745, M6869, M7253, M7342, M7346, M7516	—	+	—	31
M0101, M0102, M0239, M0404, M0414, M0437, M0438, M1344, M1410, M2241, M1427, M1452, M1807, M2039, M2055, M2242, M2331, M2702, M2736, M2846, M2853, M2907, M2911, M3024, M3078, M3117, M3137, M3239, M3556, M3557, M3928, M4290, M4293, M4325, M4616, M4856, M4897, M4953, M4991, M5011, M5161, M5227, M5240, M5306, M5419, M5621, M5812, M5828, M5978, M6027, M6282, M6341, M6647, M6749, M7428, M7523	—	++	—	56
M0226, M0442, M0447, M0450, M1528, M4723	—	—	+	6
M0108, M1309, M1343, M1921, M1936, M2004, M2017, M2276, M2347, M2642, M2744, M3116, M4731, M5212, M5349, M5343, M5741, M5938, M6712, M6869	—	+	+	20
M0310, M0431, M0438, M1224, M1803, M1923, M2042, M2226, M2273, M2332, M2417, M2420, M2426, M2633, M2634, M2719, M2814, M2856, M2910, M2927, M2942, M3026, M3031, M3046, M3063, M3121, M3138, M3728, M3884, M3964, M4262, M4411, M44101, M4562, M4584, M4913, M5405, M5538, M5970, M6431, M6738, M7278	—	++	+	42
M0210, M2454, 4138, M4758, M4801, M4907	—	—	++	6
M0413, M0452, M0457, M1317, M1926, M1935, M2288, M2833, M2912, M3186, M4867, M4872, M5566	—	+	++	13
M0412, M0432, M0439, M0440, M0441, M1530, M1631, M1816, M1928, M1937, M2033, M2034, M2038, M2041, M2278, M2282, M2627, M2650, M2822, M2832, M2842, M2843, M2913, M2914, M2926, M4618, M4744, M5670, M5847, M6938	—	++	++	30
M2312, M2332, M2355, M2372	+	+	++	4
CK	—	—	—	
EC1	++	++	++	

1) —: 无致病力 No virulence; +: 致病力弱 Weak virulence; ++: 致病力较强 High virulence.



A: 叶上部症状; B,C: 茎基部症状; CK 为无菌水, EC1 为野生菌株, M0118、M0215 和 M0346 为致病力完全丧失的突变体菌株, M0422 为致病力下降的突变体菌株, M1530 和 M2226 为致病力增强的突变体菌株。A: Symptoms on the upper leaves of rice; B, C: Symptoms on the down stem of rice plants; CK is water; EC1 is *D. zeae* wild strain; M0118, M0215 and M0346 are mutants with none virulence on rice; M0422 is the mutant with virulence reduction, M1530 and M2226 are the mutants with pathogenicity increase.

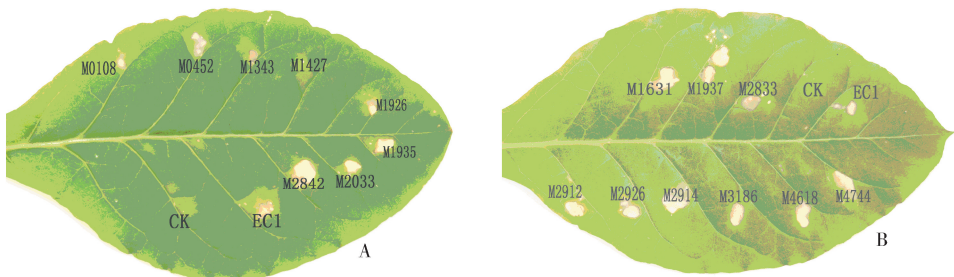
图 2 部分突变体接种水稻后的症状

Fig. 2 The symptom on rice plants inoculated by some mutants

2) 烟草的 HR 反应。用供试的 267 个突变体菌株分别接种烟草 24~48 h 后, 观察发现不能使烟草产生过敏性坏死反应(HR)的突变体菌株有 146 个(图 3)。

综合分析水稻的致病力和非寄主烟草的 HR 反应, 发现有 59 个突变体菌株对水稻无致病力和对

烟草无 HR 反应, 有 12 个突变体菌株对水稻无致病力, 但对烟草有 HR 反应。在 146 个无 HR 的突变体菌株中, 有 31 个菌株对水稻有弱致病力, 56 个菌株对水稻仍有致病力(表 1)。这表明获得的突变体是由 Tn5 插入 *D. zeae* 染色体上不同的致病相关基因位点所导致的。



EC1 为野生菌株, CK 为无菌水, 其他均为 Tn5 插入突变体。EC1 is *D. zeae* wild strain, CK is water, others are Tn5 mutants.

图 3 部分突变体接种烟草后的 HR 反应

Fig. 3 The hypersensitive reaction on tobacco after some mutants inoculated

3 讨论

随着后基因组时代的到来,基因功能研究越来越重要。通过转座子 Tn5 突变技术来构建突变体以研究基因功能是一种操作简便而备受关注的方法,目前已经产生了一系列 Tn5 衍生物,如 mini-Tn5,该系列转座子构建于自杀性质粒 pUT 上^[11]。与普通诱变法如亚硝基胍诱变、吡啶橙诱变、紫外线照射诱变比较,采用 mini-Tn5 系列转座子诱导突变株有明显的优势。包括 Tn5 转座子载体均为自杀性载体,必须在特定的宿主中才能复制;转座区域带有可选择的抗生素抗性基因,便于突变体的筛选;Tn5 能抑制自身的转座,保证在突变菌株上的单拷贝插入,有利于突变性状的筛选;转座子在插入位点留下一段已知 DNA 序列,比传统的诱变方法更容易定位;由于转座酶不发生转座,转座子在 DNA 上稳定存在,保证了突变性状的稳定。近年来,Tn5 转座子突变技术已成为革兰氏阴性细菌分子遗传研究的一种简便方法^[6]。

目前,采用 mini-Tn5 方法获得了大量有关 *Dickeya dadantii* 的胞外酶致病酶、Hrp 系统、代谢酶和 QS 信号分子合成酶以及双组份调控系统的相关基因突变体和病菌分子遗传学研究材料^[12-13],但关于水稻基腐病细菌的致病基因及其功能研究较少。Hussain 等^[9]通过转座子突变途径,获得了 *D. zeae* 的群体感应信号分子合成酶基因 *expIEcz*,该基因在调控 *D. zeae* 的运动性中有重要作用。

本研究通过采用 mini-Tn5 随机插入 *D. zeae* 染色体中,建立了以马铃薯软腐快速筛选致病突变体方法,供体菌和受体菌共培养时间以 6 h 为宜,能获得较多的接合子。在获得的 5 261 个接合子中,有 565 个接合子表现对马铃薯软腐能力下降和完全不致软腐,占总数的 10.74%,进一步通过 RCR 验证 Tn5 插入并测定这些突变体在水稻上的致病力和烟草上的 HR,结果表明,在 267 个无马铃薯软腐能力或者软腐能力下降的突变体菌株中,对水稻无致病力突变体菌株有 71 个,对水稻致病力下降的突变体菌株有 68 个。此外,267 个突变体菌株有 146 个对烟草不产生 HR 反应。由于本研究中突变体数量较大,其致病性测定是分批多次完成,尽管接种液浓度控制在 4.0×10^6 cfu/mL,但每次接种的细菌浓度、接种水稻和烟草的长势状况等可能存在偏差,所以对于突变体在水稻上的致病力以及烟草上的 HR

反应的强弱判断可能存在一定误差。在突变体筛选获得的一些单菌落中,是否还存在有污染菌或者假阳性菌株,也需要进一步研究证实。

根据上述研究结果,可以认为突变体在失去了使马铃薯软腐的能力同时,也失去了对水稻的致病力和烟草的 HR 反应,表明这些突变体是由于 Tn5 插入到致病关键基因的位点上所致,但这些推断还有待进行遗传学的分析加以证实。在失去了在水稻上的致病性,但不影响非寄主烟草 HR 反应的菌株中,发现这些突变体可能涉及某些病害特异性基因 (disease specific pathogenicity, *dsp*) 突变。此外,本研究中还发现,少数突变体菌株对水稻的致病力和烟草的 HR 反应能力增强,可能会涉及到病菌致病性调控中的一些负调控基因的突变,这些推断也有待于进一步研究证实。

以往有关菊欧氏菌的研究主要集中在菊致病变种 (*E. chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* = *Dickeya chrysanthemi*),特别是对侵染双子叶植物的 EC3937 和 EC16 两个菌株的研究较多,其致病因子的研究也主要集中在病菌产生和分泌的胞外酶,包括果胶裂解酶、纤维素酶、核酸酶、多聚半乳糖醛酸酶和果胶甲基酯酶等,其中果胶裂解酶被认为是主要毒性因子,含有多个同功酶。这些酶有选择性地植物体内被诱导,降解植物细胞壁,从而产生软腐症状^[14-16]。本研究在 *D. zeae* 的 Tn5 插入突变体库中发现,突变体菌株引起马铃薯软腐的能力差异显著,有些菌株产生软腐的能力下降,有些菌株产生软腐的能力甚至丧失,其原因可能涉及一些胞外酶基因突变,也可能是由于致病因子的 II 分泌系统或外泌基因 (*out*) 突变所致。

植物病原细菌的致病性是受复杂的网络系统调控的^[17]。本试验结果获得 *D. zeae* 不同基因位点的突变体,可为进一步弄清 *D. zeae* 的致病性及其调控机制提供研究材料。今后的研究将通过 TAIL-PCR 或者质粒拯救的方法获得 Tn5 插入基因的侧翼序列,并对插入基因进行鉴定和进一步的功能分析。

参 考 文 献

- [1] LIU Q G, HE L D, ZHANG J G, et al. Reactive oxygen species activity in the interaction of rice with *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* [J]. Front Agric China, 2008, 2(4): 441-445.
- [2] STEAD D E, PARKINSON N, BEW J, et al. The first record of *Dickeya zeae* in the UK [J]. Plant Pathology, 2010, 59: 401.

- [3] 刘琼光,王振中,区伟明,等.水稻基腐病菌的越冬与侵染途径研究[J].华南农业大学学报,2003,24(1):24-26.
- [4] 刘琼光,张静一,王玉涛,等.水稻基腐病菌毒素的遗传特性和产毒相关的分子标记[J].微生物学报,2008,48(4):446-451.
- [5] 刘琼光,张静一,冯敏珊,等.水稻基腐病菌毒素对烟草活性氧代谢及细胞超微结构的影响[J].植物病理学报,2009,39(3):262-271.
- [6] 年洪娟,陈丽梅,李昆志. Tn5 转座突变技术在革兰氏阴性细菌分子遗传研究中的应用[J].中国生物工程杂志,2009,29(12):114-118.
- [7] 吴慧玲,焦睿,章家长,等. Tn5 转座诱变选育冠菌素耐高温生产菌株及其发酵条件研究[J].中国农业科技导报,2009,11(1):62-67.
- [8] 韦忠民,王金生,方中达.转座子 Tn5 诱导菊欧氏杆菌产细菌素菌株突变的研究[J].南京农业大学学报,1987(2):48-52.
- [9] HUSSAIN-MUMTAZ B B M, ZHANG H B, XU J L, et al. The acyl-homoserine lactone-type quorum-sensing system modulates cell motility and virulence of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(3): 1045-1053.
- [10] 康耀卫,黄键中,毛国璋,等.利用转座子 Tn5 诱变植物青枯菌获得胞外蛋白输出功能丧失突变体[J].植物病理学报,1994,24(3):265-269.
- [11] HERRERO M, LORENZO V, DE-TIMMIS K N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria [J]. J Bacteriol, 1990, 172: 6557-6567.
- [12] FRANK B, GILLES B, ANNE-FRANCE P, et al. The virulence of a *Dickeya dadantii* 3937 mutant devoid of osmoregulated periplasmic glucans is restored by inactivation of the RcsCD-RcsB phosphorelay [J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(13): 3484-3490.
- [13] YAP M N, YANG C H, CHARKOWSKI A O. The response regulator HrpY of *Dickeya dadantii* 3937 regulates virulence genes not linked to the *hrp* cluster [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2008, 21(3): 304-314.
- [14] HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N, CONDEMIN G, NASSER W, et al. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* [J]. Annu Rev Microbiol, 1996, 50: 213-257.
- [15] JAFRA S, FIGURA I, HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N, et al. Expression of *Erwinia chrysanthemi* pectinase genes *peII*, *peL*, and *peZ* during infection of potato tubers [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1999, 12: 845-851.
- [16] MURDOCH L, CORBRL J C, REIS D, et al. Differential cell wall degradation by *Erwinia chrysanthemi* in petiole of *Saint-paulia ionantha* [J]. Protoplasma, 1999, 210(1/2): 59-74.
- [17] ROBERT-BAUDOU Y, NASSER J W, CONDEMIN G, et al. Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria [J]. Trend in Microbiology, 2007, 490: 1-9.

Construction of a Tn5-inserted mutant library of *Dickeya zeae* and screening pathogenicity-related mutants

TAN Xiu-ming CHEN Xue-feng LIN Min-yi LIU Qiong-guang

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

Abstract In this report, 5 261 transconjugants of *Dickeya zeae* were obtained by a mini-Tn5 transposon. PCR determination revealed that 267 mutants were inserted by Tn5. Pathogenicity assay on potato indicated that they all lost or reduced the ability to cause soft rot on potato. Furthermore, the assays for pathogenicity or virulence on rice and hypersensitive reaction (HR) on tobacco showed that 71 mutants had no virulence on rice, of which 59 mutants had no HR on tobacco. In addition, 68 mutants reduced virulence in rice, the rest of mutants have no obvious difference with EC1. Moreover, 146 of 267 Tn5 mutants had no HR on tobacco, of which 90 had no or reduced the virulence on rice. The above results indicated that the mutants were produced by inserting Tn5 transposon into different genes in *D. zeae* chromosome. The screened mutants from our Tn5-inserted mutant library provide the basis for the further understanding of molecular mechanisms of *D. zeae* pathogenicity in rice.

Key words *Dickeya zeae*; Tn5 transposon; pathogenicity; mutants; virulence