



主持人: 缪卫国

木薯细菌性萎蔫病菌 2 个候选抗铜基因簇的克隆和分析

徐春华^{1,2}, 李超萍¹, 时 涛¹, 王国芬¹, 蔡吉苗¹, 李博勋¹, 黄贵修¹

(1. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所/农业农村部 热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海口 571101; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘 要: 为对木薯细菌性萎蔫病菌 2 个候选抗铜基因簇的功能进行验证和对病原菌抗铜机理进行分析, 在进一步评价不同来源菌株抗铜性水平的基础上, 开展 2 个基因簇的克隆工作。结果表明, 来自国内及密克罗尼西亚、马来西亚等国家的供试菌株对铜离子同样具有较高水平的抗性, 不同国家的代表性菌株均编码有 copTAB 和 XmeRSA 两个抗铜基因簇。不同菌株的 2 个基因簇具有高度同源性, 分析其除参与抗铜代谢外, 可能还和致病等其他保守功能相关。

关键词: 木薯细菌性萎蔫病; 抗铜基因簇; copTAB; XmeRSA

中图分类号: S435.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2023)05-0499-07

徐春华, 李超萍, 时涛, 等. 木薯细菌性萎蔫病菌 2 个候选抗铜基因簇的克隆和分析 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(5): 499-505. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20220009

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 为大戟科木薯属灌木状多年生作物, 是和马铃薯、甘薯并称的世界三大薯类作物之一, 有近五千年的栽培史^[1], 广泛栽种于热带和亚热带地区的 100 多个国家和地区^[2]。1820 年前后, 木薯首次传入我国广东地区, 目前种植范围已遍及华南地区。木薯在我国主要用作工业原料, 可生产 2 000 多种产品^[3], 相关产业在当地农业经济中占有重要地位。自 2005 年以来, 我国一直是世界上最大的木薯进口国^[4]。由地毯草黄单胞木薯萎蔫致病变种 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, 简称 Xam) 侵染引起的细菌性萎蔫病, 也称细菌性枯萎病或细菌性疫病, 是世界木薯种植中的重要病害。病原菌从气孔或伤口侵入并在附近细胞的间隙内增殖, 通过维管束进行系统性扩散。病原菌主要危害叶片和茎

秆, 能够产生叶片角斑、萎蔫、枯萎、提前脱落及幼苗萎蔫、枝条回枯、茎干溃疡、维管束坏死等症状。植株受害后长势变弱、严重时死亡, 重病田块产量损失可达一半以上。1963 年, 该病首次在我国台湾地区发生^[5], 1980 年在我国海南省发生, 随后扩散到广东、广西等地区^[6]。李超萍等^[7] 的调查表明, 该病已在国内木薯主产区普遍发生, 是当前危害我国木薯最严重的病害。

铜基杀菌剂是作物细菌性病害防控中的常用药剂, 也是我国木薯细菌性萎蔫病防控中常见的推荐药剂^[8]。前期研究发现国内外代表性菌株对铜离子和氢氧化铜、噻菌铜等铜基杀菌剂均具有较高水平的抗性, 而国外部分已测序的菌株中均编码有 copTAB 和 XmeRSA 两个候选的抗铜基因簇^[9], 但国内及其他地区的 Xam 菌株是否具有抗铜

收稿日期: 2022-03-21

修回日期: 2023-02-20

基金项目: 海南省自然科学基金(2019RC274); 国家现代木薯产业技术体系病害防控岗项目(CARS-11-HNHGX); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630042017003); 农作物病虫鼠害疫情综合防控项目(18210019)

第一作者: 徐春华(1991-), 男, 硕士. 研究方向: 植物保护. E-mail: 407391999@qq.com

通信作者: 黄贵修(1968-), 男, 研究员. 研究方向: 植物病理学. E-mail: hgxiu@vip.163.com

性并携带这2个抗铜基因簇尚缺少研究。因此,本研究在继续收集相关菌株并进行抗铜性评价的基础上,根据基因序列特征设计引物,通过PCR扩增进行这2个基因簇的克隆和序列分析研究,为进一步开展相关基因的功能验证和病原菌抗铜机理分析提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)菌株:供试的39个Xam菌株均由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所提供,菌株编号、分离所用样品采集时间和地点见表1。(2)培养基和试剂:Xam菌株的活化和培养均采用YGP培养基;大肠杆菌的培养采用LB培养基(参照方中达^[10]的方法制备)。DNA片段胶回收试剂盒和pMD18-T载体购买自宝生物工程(大连)有限公司;Taq酶和dNTP购买自天根生化科技(北京)有限公司;所用引物对(Cop1: GT-GCTGCATCGCCTGCTC和Cop2: TCAAACCA-CACGCGTACAC; Xme1: ATCAGTCGGCCTTGG-GC和Xme2: TCACGGCTCAAACCGATACC)由北京六合华大基因科技股份有限公司合成;大肠杆菌T1感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 不同来源Xam病菌抗铜性评价 采用含毒介质法中的最低抑制浓度法^[11]进行,参照慕立义^[12]的方法进行结果的检查及计算。

1.3 候选抗铜基因簇的克隆和分析 各病原菌株活化、培养后收集菌体,用SDS法提取基因组DNA^[13]。PCR反应体系为:10×PCR缓冲液2.5 μL、10 mmol·L⁻¹ dNTP 1 μL、10 μmol·L⁻¹各引物溶液1 μL、40%甘油3.75 μL、20%DMSO 3.75 μL、DNA模板50~100 ng、Taq DNA聚合酶1.0 U,加无菌水至25 μL。PCR循环参数为:94℃预变性3 min;94℃30 s、54℃30 s、72℃2 min,35个循环;最后72℃延伸10 min。扩增产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。参照DNA片段胶回收试剂盒和pMD18-T载体试剂盒说明书进行扩增产物的回收、连接和克隆,筛选阳性克隆后,各样品随机挑选3个克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司进行序列测定,确认序列后在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>上进行比对。和近源菌株这2个基因簇的序列进行聚类分析,用MEGA

version 4.0中的NJ(Neighbor-Joining)方法生成系统树,用Bootstrap对系统树进行检验,1000次重复。

2 结果与分析

2.1 Xam病菌抗铜性评价 完成了39个菌株的抗铜性评价,结果表明,硫酸铜对各菌株的抑菌最低有效浓度在1.25~1.55 mmol·L⁻¹之间。来自哥伦比亚的菌株Xam1197抗铜能力最强,为1.55 mmol·L⁻¹,来自江西的XamJX08,广西的XamGX44、XamGX45、XamGX46、XamGX51、XamGX52、XamGX53、XamGX68和XamGX70,来自广东的XamGD54、XamGD55,来自海南的XamHN57,来自柬埔寨的XamKHM05和马来西亚XamML1825的抗铜性较差,均为1.25 mmol·L⁻¹,其他菌株的抗铜性在1.30~1.45 mmol·L⁻¹之间(表1)。

2.2 候选抗铜基因簇的克隆和初步分析 根据2个候选基因簇的序列特征,分别设计了Cop1、Cop2和Xme1、Xme2两对引物。提取各菌株基因组DNA后,分别进行PCR扩增,各菌株用2个引物对均能获得大小约3.4 kb的扩增产物。随机选择国内外17个代表性菌株(XamJX02、XamJX08、XamGX46、XamGX69、XamGX70、XamGD26、XamGD54、XamHN16、XamHN57、XamMK1823、XamKHM04、XamKHM05、XamMLXY1825、Xam1197、Xam1198、XamUG1和XamUG2)的扩增产物,纯化回收、克隆后测序并进行同源基因的比较。

所有菌株均编码有和XamGX11完全相同的CopTAB基因簇,该基因簇由CopT、CopA和CopB等编码方向一致的3个基因组成,3个基因之间的非编码区长度分别为90 nt和454 nt。这些菌株中,仅有XamGD26和其他菌株在copA编码区的第964个nt为“A”,而其他菌株为“C”,对应的氨基酸为异亮氨酸,其他菌株为缬氨酸。以其他菌株共有的基因序列进行了初步分析,CopT编码区全长425 nt,和多个黄单胞菌的预测CopL家族金属结合调节基因(或称铜转运蛋白)仅有2个碱基的差异,同源性最高为99%(登录号CP012063.1、CP012060.1等),该基因编码139个aa,和番茄细菌性斑点病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*)菌株7882的预测蛋白序列

表 1 供试菌株及其来源

序号	菌株	病样采集时间	病样采集地点	重复次数	抑菌最低有效浓度/(mmol·L ⁻¹)
1	XamJX02	2018.10	江西省抚州市东乡区	3	1.45
2	XamJX08	2020.08	江西省抚州东乡区圩上桥镇	3	1.25
3	XamJX10	2020.05	江西省抚州东乡区	4	1.30
4	XamGX09	2019.09	广西壮族自治区桂平市	4	1.30
5	XamGX39	2017.11	广西壮族自治区合浦县	3	1.40
6	XamGX42	2017.10	广西壮族自治区桂平市石龙镇	3	1.35
7	XamGX43	2018.09	广西壮族自治区南宁市	5	1.45
8	XamGX44	2019.07	广西壮族自治区隆安县那桐镇大藤村	4	1.25
9	XamGX45	2019.07	广西壮族自治区北海市合浦县石湾镇	3	1.25
10	XamGX46	2019.07	广西壮族自治区南宁市武鸣区里建镇	3	1.25
11	XamGX47	2017.11	广西壮族自治区合浦县	3	1.40
12	XamGX48	2017.11	广西壮族自治区合浦县	3	1.40
13	XamGX49	2017.11	广西壮族自治区南宁市武鸣区	3	1.40
14	XamGX50	2018.11	广西壮族自治区合浦县	4	1.35
15	XamGX51	2019.09	广西壮族自治区桂平市	3	1.25
16	XamGX52	2019.08	广西壮族自治区隆安县	3	1.25
17	XamGX53	2019.09	广西壮族自治区隆安县	3	1.25
18	XamGX68	2019.10	广西壮族自治区平南县	4	1.25
19	XamGX69	2020.07	广西壮族自治区平南县武林镇安塘村	3	1.30
20	XamGX70	2020.07	广西壮族自治区桂平市石龙镇黄塘村	3	1.25
21	XamGD25	2017.04	广东省云浮市	3	1.35
22	XamGD26	2017.09	广东省遂溪县乐民镇	3	1.30
23	XamGD54	2018.09	广东省广州市花都区	4	1.25
24	XamGD55	2019.09	广东省开平市苍城镇	3	1.25
25	XamHN16	2017.09	海南省澄迈县美亭镇美玉村	3	1.30
26	XamHN17	2017.09	海南省儋州市大成镇	4	1.35
27	XamHN54	2018.07	海南省儋州市新盈农场	3	1.35
28	XamHN56	2018.10	海南省儋州市大成镇	3	1.35
29	XamHN57	2019.07	海南省儋州市	4	1.25
30	XamHN58	2019.07	海南省澄迈县美亭镇	3	1.35
31	XamMK1822	2018.08	密克罗尼西亚	3	1.45
32	XamMK1823	2018.08	密克罗尼西亚	4	1.55
33	XamKHM04	2019.09	柬埔寨桔井省	3	1.35
34	XamKHM05	2019.09	柬埔寨上丁省	3	1.25
35	XamML1825	2018.12	马来西亚沙巴市	3	1.25
36	Xam1197	2013.12	哥伦比亚	3	1.65
37	Xam1198	2013.12	哥伦比亚	3	1.35
38	XamUG1	2014.12	乌干达基里扬东戈区	3	1.35
39	XamUG2	2015.02	乌干达马辛迪区	3	1.45

(WP_017157235.1)完全一致^[14]。*CopA* 全长 1806 nt, 和黄单胞菌的预测多铜氧化酶基因同源性最高, 为 99%(CP012063.1、CP012060.1 等), 有 21 个碱基的差异, 该基因编码 601 个 aa, 和菜豆黄单胞菌 (*Xanthomonas phaseoli*) 预测蛋白序列 (WP_017157234) 一致^[15]。*CopB* 全长 654 nt, 和地毯黄

单胞万年青致病变种 (*Xanthomonas axonopodis* pv.*dieffenbachiae*) 菌株 LMG 695 预测的抗铜相关基因 (CP014347.1) 仅有 16 个碱基的差异, 同源性为 99%, 编码 369 个 aa, 和菜豆黄单胞菌预测蛋白序列 (WP_017157233) 一致。

和 *CopTAB* 基因簇相同, 所有菌株同样编码

有 *XmeRSA* 基因簇, 其中 *XmeR* 和 *XmeS* 位于染色体负链上, 两者编码区有 4 个碱基的重叠, 而 *XmeA* 位于正链上, 和另外 2 个基因编码区方向相反并有 161 nt 的间隔区。这些菌株中, XamGX69 和 XamGD54 与其他菌株均有 1nt 的序列差异。XamGX69 在 *XmeS* 编码区的第 1 015 个 nt 为“A”, 而其他菌株为“C”, 对应的氨基酸为苏氨酸, 其他菌株为丙氨酸。XamGD54 在 *XmeA* 编码区的第 1 141 个 nt 为“C”, 而其他菌株为“G”, 对应的氨基酸为天冬氨酸, 其他菌株为组氨酸。以其他菌株共有的基因序列进行了分析, *XmeR* 编码区全长 684 nt, 和多个黄单胞菌预测的 DNA 结合转录调节因子 *BaeR* 基因(CP012063.1、CP012060.1、CP012057.1 等) 同源性最高, 为 99%, 仅有 6 个 nt 的差异, 该基因编码 227 个 aa, 和菜豆黄单胞菌等病原菌预测蛋白序列(WP_046833221、WP_

017157623)一致^[16]。*XmeS* 编码区全长 1 380 nt, 和黄单胞菌预测的组氨酸激酶感受分泌调节基因 *BaeS* 同源性为 99%, 有 12 个 nt 的差异, 编码 459 个 aa, 和菜豆黄单胞菌预测蛋白序列(WP_017157622)完全相同。*XmeA* 编码区全长 1 224 nt, 和多个黄单胞菌预测的外排 RND(*resistance-nodulation-cell-division*, 简称 RND, 耐药结节细胞分化)转运蛋白亚基基因(CP012063.1、CP012060.1、CP012057.1 等) 有 24 个 nt 的差异, 同源性为 99%, 编码 407aa, 和菜豆黄单胞菌预测基因蛋白序列(WP_017157621)完全一致。

2.3 候选抗铜基因簇的系统发育分析 在 NCBI 数据库中检索和下载近源黄单胞病原菌及其他病原菌中的 *copTAB* 和 *XmeRSA* 同源基因簇(表 2), 构建 NJ 系统进化树, 分析其进化关系, 结果表明, 所获 17 个木薯细菌性萎蔫病菌菌株的

表 2 近源黄单胞病原菌及其他病原菌的抗铜基因簇

病原菌(简写)	菌株名称	序列登录号	基因(基因簇)组成
<i>Agrobacterium</i> (Agr)	CFBP 6623	LT009725.1	1个预测的铜输出P型ATP酶基因
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i> (Pseu)	DC3000	KY362372.1	由 <i>copS</i> 、 <i>copR</i> 、 <i>copD</i> 、 <i>copC</i> 、 <i>copB</i> 和 <i>copA</i> 等基因组成
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (Xcc)	A44	HM362782	由 <i>copL</i> 、 <i>copA</i> 、 <i>copB</i> 、 <i>copM</i> 、1个转座酶基因、 <i>copG</i> 、1个预测蛋白、 <i>copC</i> 、 <i>copD</i> 、 <i>copF</i> 等基因组成 ^[17]
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> (Xcc)	LH276	NZ_CP018854.1	由 <i>copL</i> 、 <i>copA</i> 和 <i>copB</i> 等基因组成
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandis</i> (Xcj)	C5	L19222.1	由4个预测基因组成 ^[18]
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (Xac)	306	AE008923.1	由 <i>copL</i> 、 <i>copA</i> 前体和 <i>copB</i> 等基因组成 ^[19]
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Xav)	7882	AY536748	由 <i>copL</i> 、 <i>copA</i> 、 <i>copB</i> 、 <i>copM</i> 、 <i>copG</i> 、 <i>copF</i> 等基因组成 ^[14]
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>punicae</i> (Xcp)	LMG7504	CP030166.1	由 <i>copL</i> 、 <i>copA</i> 和 <i>copB</i> 等基因组成
<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> (Xff)	ISO118C5	CP012051	由 <i>copL</i> 、 <i>copA</i> 和 <i>copB</i> 等基因组成
<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xpp)	PR1	NZ_CP029277.1	由 <i>copL</i> 、 <i>copA</i> 和 <i>copB</i> 等基因组成
<i>Bacillus methylotrophicus</i> (Baci)	B25	LN999829.1	由 <i>BaeM</i> 、 <i>BaeN</i> 、 <i>BaeR</i> 和 <i>BaeS</i> 等4个预测的外排RND转运相关基因组成
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> (Xcc)	29-1	CP023661.1	由 <i>BaeS</i> 及另外4个外排RND转运相关基因组成
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Xev)	85-10	CP017190.1	1个预测的多药运输蛋白基因
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> (Xcm)	GXG07	CP073209.1	由 <i>BaeR</i> 、 <i>BaeS</i> 、 <i>smeA</i> 和1个预测的多药运输蛋白基因组成
<i>Erwinia tasmaniensis</i> (Erw t)	ET1/99	CU468135.1	由 <i>BaeS</i> 和 <i>BaeR</i> 等2个基因组成 ^[19]
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xap)	ISO98C12	CP012057.1	由预测的1个RND转运蛋白和2个多药运输蛋白基因组成
<i>Xanthomonas perforans</i> (Xp)	91-118	CP019725.1	由预测的1个RND转运蛋白、1个短链脱氢酶和1个预测的多药运输渗透酶亚基组成 ^[20]
<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xpp)	Xcp25	CP029284.1	由预测的1个运输蛋白、1个多药外排RND转运体渗透酶亚基、1个外排RND转运蛋白细胞质适应亚基和 <i>BaeS</i> 组成

copTAB 基因簇聚为 1 个分枝, 和菜豆黄单胞菜豆变种 (*Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*) 菌株 PR1 同源基因的亲缘关系最近。柑橘溃疡病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) 菌株 306、柠檬黄单胞病柠檬致病变种 (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) 菌株 LH276、柠檬黄单胞菌 (*Xanthomonas citri* pv. *punicae*) 菌株 LMG7504 和菜豆普通细菌性疫病病菌 (*Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*) 菌株 ISO118C5 等聚成 1 个分枝, 和木薯细菌性萎蔫病菌菌株有很高的同源性。细菌性叶斑病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*) 菌株 7882、柠檬黄单胞病菌 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) 菌株 A44 和野油菜黄单胞菌胡桃致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*) 菌株 C5 聚为 1 个分枝, 同源性也较高。农杆菌 (*Agrobacterium*) 菌株 CFBP 6623、丁香假单胞菌丁香致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) 菌株 DC3000 和木薯细菌性萎蔫病菌菌株的同源性最低(图 1)。

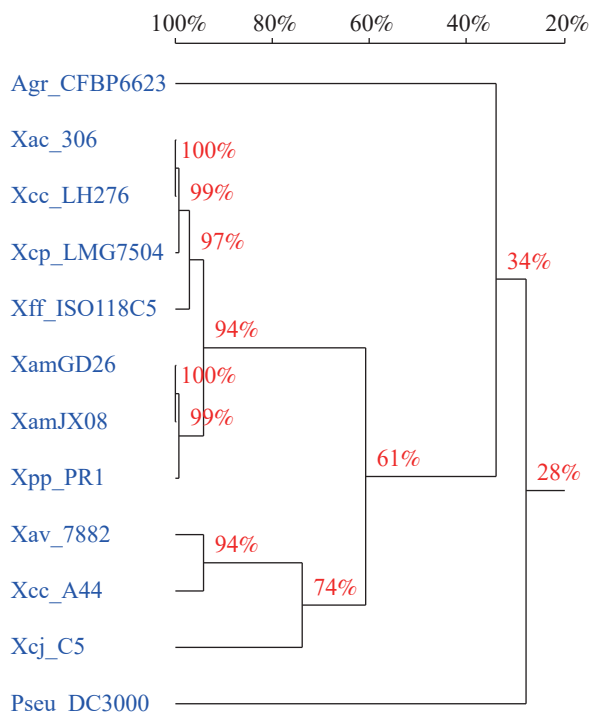


图 1 供试菌株的 *copTAB* 基因簇聚类分析
XamJX08 代表相同的 16 个序列。

各木薯细菌性萎蔫病菌菌株的 *XmeRSA* 基因簇同样聚为 1 个分枝, 菜豆黄单胞菜豆变种菌株 Xcp25 同源基因的相似性最高。地毯草黄单胞菌菜豆致病菌变种 (*Xanthomonas axonopodis* pv.

phaseoli) 菌株 ISO98C12 和野油菜黄单胞菌辣椒致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 菌株 85-10 聚为 1 个分枝, 同源性也较高。柠檬黄单胞病菌菌株 29-1、柠檬黄单胞病芒果致病变种 (*Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae*) GXG07 和塔斯曼尼亚欧文氏菌 (*Erwinia tasmaniensis*) 菌株 ET1/99 亲缘关系较近, 聚为 1 个分枝, 和木薯细菌性萎蔫病菌亲缘关系较远。穿孔黄单胞 (*Xanthomonas perforans*) 菌株 91-118 和甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*) 菌株 B25 与木薯细菌性萎蔫病菌亲缘关系最远(图 2)。

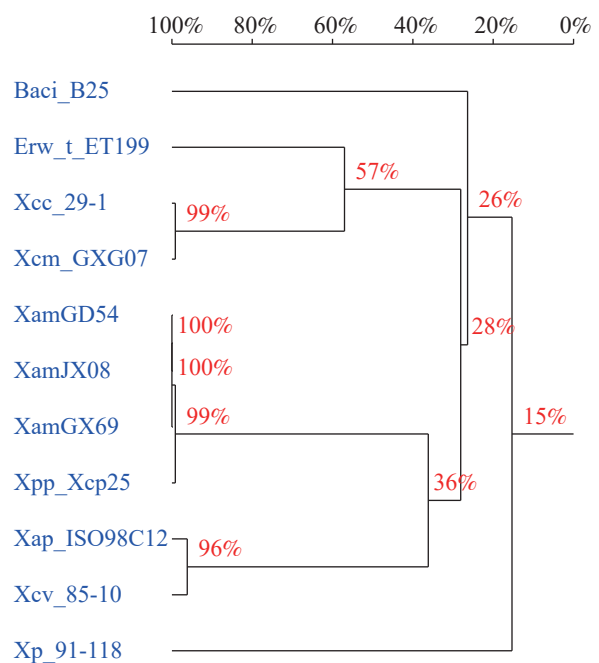


图 2 供试菌株的 *XmeRSA* 基因簇聚类分析
XamJX08 代表相同的 15 个序列。

3 讨论

研究表明, 来自国内不同种植区以及密克罗尼西亚、马来西亚、乌干达、哥伦比亚等不同国家的木薯细菌性萎蔫病菌均对铜离子具有较高的抗性。分子克隆结果表明, 所有供试菌株均携带有 *copTAB* 和 *XmeRSA* 两个高度保守的抗铜基因簇, 其和黄单胞及其他常见病原菌的抗铜相关基因也有较高的同源性, 相关基因在病原菌抗铜反应及其他方面的作用机制, 将是下一步的研究重点。

不同病原细菌之间的抗铜基因具有保守性, 敏感性菌株常通过结合转移获得相关基因并产生抗铜性^[21]。国外研究表明, 随着铜基杀菌剂使

用,危害番茄和柑橘的黄单胞病菌中,抗铜菌株的数量和比例也在不断增加^[22-23]。国内也有研究结果表明,随着铜基杀菌剂的使用,危害核桃的细菌性疫病病原菌(*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*)菌株种群中出现抗铜能力不同的抗铜性菌株^[24];台湾地区的细菌性疮痂病菌(*Xanthomonas euvesicatoria*)和柑橘溃疡病菌也都具有抗铜性^[25]。本研究结果表明,国内外代表性菌株均具备抗铜性,分析菌株之间可能存在广泛的抗铜相关基因转移现象。

除抗铜外,*copTAB* 基因簇还参与黄单胞菌的其他功能。例如番茄疮痂病菌(*Xanthomonas gardneri*)菌株 Xv10 的 *copB* 基因同时控制着抗铜性和侵染番茄的能力^[26],而水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)菌株 PXO99 的 *copAB* 上产生 6 个氨基酸突变,导致其对铜离子敏感而且降低了对水稻的侵染能力^[27]。笔者团队在国内木薯主栽区及柬埔寨、哥伦比亚、乌干达、密克罗尼西亚、马来西亚等地区收集病原菌,发现所有菌株均具有较高的抗铜性。除国内广西、广东等部分重病区之外,其他国家和地区并无使用铜基杀菌剂的记录,分析这 2 个基因簇可能和病原菌侵染寄主、适应环境等方面功能相关。

前人研究结果表明,抗铜性黄单胞病菌对铜离子的抗性水平通常在 $0.6 \sim 1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间^[24],本研究结果表明木薯细菌性萎蔫病菌的抗性水平在 $1.25 \sim 1.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,整体上其抗铜能力高于前人报道的其他菌株。*copTAB* 基因簇分别编码铜转运蛋白、多铜氧化酶和抗铜相关基因,而 *XmeRSA* 基因簇编码 DNA 结合转录调节因子、组氨酸激酶感受分泌调节因子和外排 RND 转运蛋白亚基。细菌的抗铜作用包括 RND 等基因家族的外排作用,阳离子扩散(CDF)基因家族的过滤作用,P 型 ATP 酶的调控作用等不同层次的作用机制,包括铜离子的吸附沉积、隔离、修饰及向外转运等。木薯细菌性萎蔫病菌的抗铜能力相对较高,可能和该病菌同时具备 *copTAB* 基因簇的铜离子转运功能和 *XmeRSA* 基因簇的外排作用相关。

参考文献:

- [1] 梁海波,黄洁,魏云霞.木薯营养施肥研究与实践[M].北京:中国农业科学技术出版社,2018.
- [2] 贾晶霞,李雷霞.世界及中国木薯生产概况[J].*农业工程*,2015,5(5):124-126.
- [3] 陈丽珍,叶剑秋.我国木薯加工业的发展现状与展望[J].*园艺与种苗*,2011(3):87-90.
- [4] 盘欢.亚洲 11 国木薯生产概况[J].*广西热带农业*,2009,5:29-31.
- [5] EU L S,张开明.中国台湾省的木薯细菌性疫病[J].*热带作物译丛*,1985,8:58-60.
- [6] 文衍堂.木薯细菌性疫病病原菌鉴定[J].*热带作物学报*,1982,3(2):91-97.
- [7] 李超萍,时涛,刘先宝,等.国内木薯病害普查及细菌性萎蔫病安全性评估[J].*热带作物学报*,2011,32(1):116-121.
- [8] 曾小荣,郑刚辉.木薯主要病虫害的发生及防治[J].*现代农业科技*,2011,18:200,205.
- [9] 时涛,蔡吉苗,李超萍,等.木薯细菌性萎蔫病菌抗铜性评价及抗铜相关基因簇分子分析[J].*热带作物学报*,2017,38(3):529-540.
- [10] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998.
- [11] 赵友福,张乐.植物病原细菌简明手册[M].北京:农业部植物检疫实验所,1992.
- [12] 慕立义.植物化学保护研究原理[M].北京:中国农业出版社,1999.
- [13] 丁小云,耿俊丽,魏成熙,等.不同破壁方法对大肠杆菌 DNA 提取的影响[J].*贵州农业科学*,2010,4:149-150.
- [14] VOLOUDAKIS A E, REIGNIER T M, COOKSEY D A. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(2): 782-789.
- [15] BROWN N L, BARRETT S R, CAMAKARIS J, et al. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004 [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 17(6): 1153-1166.
- [16] PAO G M, SAIER M H. Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution [J]. *Journal Of Molecular Evolution*, 1995, 40(2): 136-154.
- [17] FRANKLIN B, BLANCA I C, GERALD V M, et al. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*[J], 2011, 77(12): 4089-4096.
- [18] LEE Y A, HENDSON M, PANOPOULOS N J, et al. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase [J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(1): 173-188.
- [19] KUBE M, MIGDOLL A M, MULLER I, et al. The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-patho-

- genic bacterium in the genus *Erwinia* [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(9): 2211 – 2222.
- [20] POTNIS N, KRASILEVA K, CHOW V, et al. Comparative genomics reveals diversity among *Xanthomonads* infecting tomato and pepper [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 146.1471 – 2164.
- [21] BEHLAU F, HONG J C, JONES J B, et al. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated *Xanthomonads* [J]. *Phytopathology*, 2013, 130(5): 409 – 418.
- [22] ABBASI P A, KHABBAZ S E, WESELOWSKI B, et al. Occurrence of copper-resistant strains and a shift in *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot in Ontario [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2015, 61: 753 – 761.
- [23] MARIN T G S, GALVANIN A L, LANZA F E, et al. Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains [J]. *Plant Pathology*, 2019, 68(6): 1088 – 1098.
- [24] BENZHONG F, JIEQIAN Z, CONARD L, et al. Multi-locus sequence analysis and copper ion resistance detection of 60 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates from China [J]. 2021, 105(11): 3715-3719
- [25] LAI Y R, LIN C H, CHANG C P, et al. Distribution of copper resistance gene variants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* [J]. *Plant Protection Science*, 2021, 57(3): 206 – 216.
- [26] 吴亚男. *Xanthomonas gardneri* 抗铜基因 *copB* 的克隆及功能鉴定 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012
- [27] 孔令广, 巨延虎, 董冉, 等. *CopAB* 基因突变导致 PXO99 对铜敏感和致病性降低 [J]. *植物病理学报*, 2018, 48(2): 176 – 186.

Cloning and analysis of *copTAB* and *XmeRSA* gene clusters from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

XU Chunhua^{1,2}, LI Chaoping¹, SHI Tao¹, WANG Guofen¹, CAI Jimiao¹, LI Boxun¹, HUANG Guixiu¹
(1. Environment and Plant Protection Institute, CATAS; Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China; Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou 571101, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* is one of the important diseases in the world, and it is also the most serious disease in the cassava plantations of China. Some strains in other countries with their whole genomes being sequenced were found to encode two candidate copper resistance gene clusters, *copTAB* and *XmeRSA*, and part of these strains were higher in resistance to copper ion. An attempt was made to clone copper resistance gene clusters of more strains from different other countries and analyze their copper resistance level. The results showed all the tested strains from China, Micronesia, Malaysia and other countries were also higher in resistance to copper ion. All the representative strains from these countries also encoded the *copTAB* and *XmeRSA* gene clusters. The two gene clusters from these countries were highly homologous, and they were not only involved in copper-resistance metabolism, but might also be related to other conservative functions such as pathogenicity.

Keywords: cassava bacterial blight; copper-resistant gene clusters; *copTAB*; *XmeRSA*

(责任编辑: 钟云芳)