

文章编号: 1674-7054(2016)02-0246-07

木薯地毯草黄单胞菌转化子 T-DNA 插入模式分析

张长正^{1,2}, 刘进平¹, 时 涛², 李超萍², 陈奕鹏², 黄贵修²

(1. 海南大学 农学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海口 571101)

摘 要: 随机挑取 30 个已构建的木薯地毯草黄单胞菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) Tn5 转化子, 利用 hiTail-PCR 技术获得 Tn5 转座子插入位点的侧翼序列 64 条。其中, 有 19 个转化子获得了插入位点左右两端的侧翼序列, 11 个转化子获得了单侧侧翼序列。序列分析结果发现, 插入位点集中在低 GC 含量区, 特别是 49%~50% 的区域; Tn5 转座子倾向于插入基因编码区内; Tn5 转座子的插入会形成 9 bp 正向重复序列, 且插入方向没有偏好性, 9 bp 正向重复序列的上下游碱基位点中, -5, -2, 1, 4, 5, 6, 9, 11 位可能对转座酶的识别起关键作用。

关键词: 木薯; 细菌性枯萎病菌; T-DNA 插入模式

中图分类号: S 435.33

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.02.018

木薯(*Manihot esculenta*)起源于热带美洲地区^[1], 具有高产、易栽培、耐旱、耐贫瘠等特点, 目前广泛种植于亚洲、非洲和拉丁美洲的 100 多个国家和地区^[2]。木薯在我国的种植历史接近两百年, 主要用作工业原料生产淀粉、酒精等产品^[3]。我国 2014 年木薯种植面积约 39.27 万 hm^2 , 但是仍不能满足自给, 是世界第 1 大木薯进口国^[4-6]。由地毯草黄单胞木薯萎蔫致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, Xam)引起的细菌性枯萎病可造成 12%~100% 的产量损失^[7], 是世界范围内木薯生产中的重要病害, 也是我国木薯第 1 大病害^[8]。国外完成了 65 个 Xam 菌株的基因组序列测定及 2 个菌株基因组序列的分析工作^[9-11], 并证明病菌质粒上的 *TALE1* 基因和致病性相关^[12]。中国热带农业科学院环境与植物保护研究所也完成了菌株 GX11 的全基因组序列测定并构建了插入转化子库^[13], 发现 *HrpG* 基因参与了病菌的致病过程^[14]。与水稻、小麦等作物主要病害相比, Xam 病菌的致病机理研究还很少, 限制了相关防控技术的研究工作。利用 Tn5 转座子进行插入突变是病原细菌研究中的常用手段, 但有关该转座子插入模式方面的研究还鲜见报道。笔者在前期构建 Xam 病菌转化子库的基础上, 开展了 Tn5 转座子插入模式的研究, 以便更好地开展该病菌致病分子机理研究, 同时也为其他病原细菌致病相关基因的鉴定提供有益的借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料 (1) 供试菌株: 供试转化子 30 个, 编号见表 1。(2) 试剂和培养基: Xam 病菌转化子和大肠杆菌使用的培养基分别为 YPG, LB, SOC 等培养基, 制备方法参照文献^[15]。*Taq* 酶、dNTP 和大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司; X-gal, IPTG, pMD18-T 载体和 DNA 片段胶回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成; 其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2016-02-25

基金项目: 国家木薯现代产业技术体系建设项目(CARS-12-hnhgx); 2014 年海南省研究生创新科研课题(Hys2014-04)

作者简介: 张长正(1991-), 男, 海南大学农学院 2013 级硕士研究生. E-mail: djzcz@outlook.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

1.2 转化子 DNA 的提取 各转化子活化后,参照文献 [6] 的方法提取基因组 DNA。

1.3 转化子插入位点侧翼序列的分离 采用 hiTail-PCR 进行转化子插入位点,侧翼序列的分离。参照文献 [3] 和文献 [7] 的方法,合成简并引物 LAD1-1, LAD1-2, LAD1-3, LAD1-4, 通用引物 AC1, 特异性引物 SP1, SP3, SPF1, SPF3。根据 T-DNA 片段序列和简并引物(LAD1-1 ~ LAD1-4) 5'端部分序列设计特异性引物 LSP2(ACGATGGACTCCAGTCCGG CCAAGACGTTTCCCGTTGAATATG) 和 LSPF2(ACGATGGACTC-CAGTCCGGCCACCTACAACAA AGC TCTCATCAACC) 2 条特异引物。预扩增、第 1 轮扩增和第 2 轮扩增的反应体系和参数参照文献 [7]。扩增产物纯化回收后连接 T 载体并转化大肠杆菌,各条带分别选择 3 个阳性转化子进行测序确认。采用 Blast 程序将所获序列和 pMD18-T 载体、Tn5 转座子插入片段序列进行比对,获得插入位点侧翼序列。

1.4 转化子 T-DNA 插入模式分析 参考文献 [8] 的方法分析其序列同源性、明确各转化子的插入位点。比较转座子插入片段上 Kan 基因和插入位点预测的读码框,明确该位点的插入方向。提取插入位点上下游各 0.5 kb 的基因组序列,分析其 GC 含量。根据插入位点基因预测结果分析编码基因的保守区,明确 T-DNA 片段的插入区域。对于同时获得两侧侧翼序列的转化子,分析转化子的识别位点。提取识别位点上下游各 18 nt 的序列,分析各位点的 GC 含量并与基因组序列进行比较。

2 结果与分析

2.1 转化子插入位点侧翼序列的分离 经过 3 轮扩增反应,30 个转化子都获得了 1 个以上扩增产物条带,其中共有 19 个转化子 Tn5 转座子插入两侧方向都获得了条带,11 个转化子单侧方向获得了条带。共 49 个方向的序列中,经常出现单个插入方向出现多个产物条带的现象(图 1),有 37 个插入方向获得了 1 个产物条带,8 个插入方向获得了 2 个产物条带,4 个插入方向获得了 3 个产物条带。共计 65 个产物条带,回收测序。

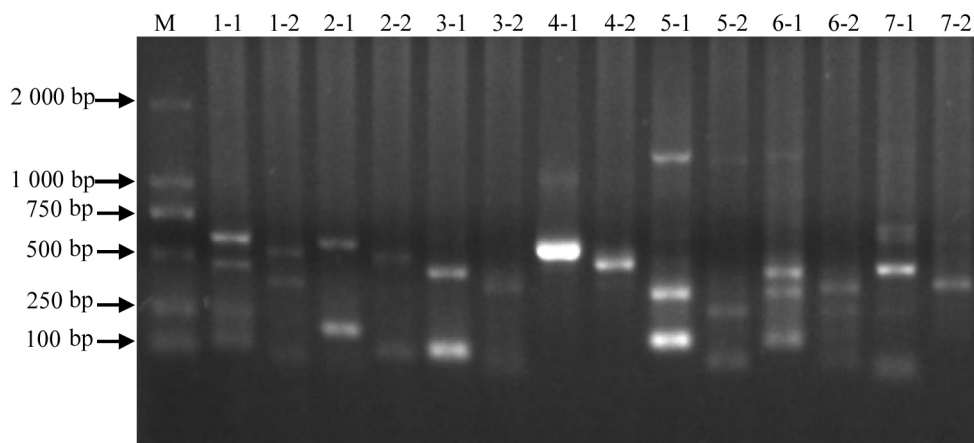


图 1 部分转化子 hiTail-PCR 的第 1 轮和第 2 轮扩增产物电泳检测

M: DL2000; 1-1, 2-1, 3-1, 4-1, 5-1, 6-1, 7-1: 分别是转化子 GX11-6945, GX11-1107, GX11-6319, GX11-8261, GX11-6388, GX11-6395, GX11-6348 的 hiTail-PCR 第 1 轮扩增产物; 1-2, 2-2, 3-2, 4-2, 5-2, 6-2, 7-2: hiTail-PCR 第 2 轮扩增产物。

Fig. 1 Electrophoresis analysis of the first and second hiTail-PCR products of transformants

M: DL2000; 1-1, 2-1, 3-1, 4-1, 5-1, 6-1, 7-1: The primary hiTail-PCR products of transformants GX11-6945, GX11-1107, GX11-6319, GX11-8261, GX11-6388, GX11-6395, GX11-6348; 1-2, 2-2, 3-2, 4-2, 5-2, 6-2, 7-2: The secondary hiTail-PCR products of transformants

测序结果的长度在 150 ~ 1 200 bp 之间,将测序结果与 GX11 基因组序列进行比对分析,共获得 39 个 T-DNA 插入位点左侧侧翼序列,25 个右侧侧翼序列,且同源性均高于 96%。有 3 个测序结果发现为空载体,有 1 个测序结果在 GX11 基因组序列中没有比对到同源序列。最终结果统计,19 个转化子成功获得

了两侧侧翼序列,10 个转化子获得了单侧侧翼序列,1 个转化子的侧翼序列在基因组序列中未比对到同源序列。分析比对结果发现,单侧插入方向出现 2~3 条产物条带的时候,均为同样的插入位置,可能是简并引物(LAD1-1~LAD1-4)在基因组序列上有多个结合位点所致。

2.2 Xam 转化子 T-DNA 侧翼序列分析 有研究表明 Tn5 转座子的插入与插入位点的 GC 含量有关^[18]。分析插入位点上下游各 500 bp 碱基的 GC 含量(表 1),结果显示,插入位点在 GC 含量为 49%~50% 的区域最多,占 34.48%,GC 含量低于 47% 的区域占 13.79%,GC 含量为 47%~48% 的区域占 10.34%,GC 含量为 48%~49% 的区域占 20.69%,GC 含量为 50%~51% 的区域占 13.79%,GC 含量高于 51% 的区域占 6.90%。

本实验定位的 29 个转化子插入位点中,有 24 个转化子的插入位点在不同预测基因的编码区,占所有已知插入位点转化子的 82.8%,这说明 Tn5 转座子的插入位点可能更偏向于编码区。GX11-6388,GX11-6348,GX11-7301 和 GX11-6401 的插入位点都是不同预测基因的起始密码子前 24~160 bp 处,可能是插入在启动子区域。GX11-7622 插入位点是预测基因 XANwfvDGL000109 和 XANwfvDGL000110 终止密码子之间。

表 1 29 个 hiTail-PCR 扩增的侧翼序列在细菌性枯萎病菌株 GX11 基因组上的位置

Tab. 1 Locations of 29 flanking sequences in genome of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotix*

转化子 Transformants	同源性(上游/ 下游) Identity (Upstream/ downstream)	插入方向 Orientation of insertion	插入位点 GC 含量 GC content of insertion site	预测基因功能 Prediction of gene function	插入位置 Location of insert
GX11-6945	99% /96%	反向 (Reverse)	48.60%	烷基氢化过氧化酶 Alkylhydroperoxidase	编码区烷基氢化过氧化酶 AhpD 家族保守结构域 Alkylhydroperoxidase AhpD family core domain
GX11-4796	98% /99%	反向 (Reverse)	48.70%	硝酸盐转运底物结合蛋白 Nitrate ABC transporter substrate-binding protein	编码区 Coding region
GX11-7622	99% /100%	同向 (Forward)	45.30%	乙基叔丁基醚降解蛋白质 EthD Ethyl tert-butyl ether degradation protein EthD	预测基因 XANwfvDGL000109 和 XANwfvDGL000110 之间 Between the predicted genes XANwfvDGL000109 and XANwfvDGL000110
GX11-7408	99% /100%	同向 (Forward)	50.90%	庚二酰[酰基载体蛋白]甲基酯酯酶 Pimeloyl-[acyl-carrier protein] methyl ester esterase	编码区硫酯酶结构域 Thioesterase domain
GX11-8291	100% /96%	同向 (Forward)	49.30%	未知蛋白 Hypothetical protein	编码区 Coding region
GX11-4107	100% /99%	同向 (Forward)	49.20%	核糖核酸外切酶 RRibonuclease R	编码区核糖体类 S1 RNA 结合蛋白结构域 S1 RNA binding domain
GX11-6319	97% /100%	反向 (Reverse)	49.70%	未知蛋白 Hypothetical protein	编码区类 SCP 细胞外蛋白结构域 SCP-like extracellular protein domain
GX11-8261	99% /99%	反向 (Reverse)	49.80%	II 型分泌系统蛋白 GSPD Type II secretion system protein GspD	编码区细菌 II 型和 III 型分泌系统蛋白结构域 Bacterial type II/III secretion system short domain

转化子 Transformants	同源性(上游/下游) Identity (Upstream/downstream)	插入方向 Orientation of insertion	插入位点 GC 含量 GC content of insertion site	预测基因功能 Prediction of gene function	插入位置 Location of insert
GX11-6358	100% /100%	同向 (Forward)	47.60%	葡萄糖磷酸胸苷酰转移酶 Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	编码区葡萄糖磷酸胸苷酰转移酶结构域 Glucose-1-phosphate thymidyltransferase domain
GX11-9607	99% /100%	同向 (Forward)	47.40%	乙酰鸟氨酸氨甲酰转移酶 Scetylornithine carbamoyltransferase	编码区 ASP/ORN 结合结构域 ASP/ORN binding domain
GX11-9951	100% /100%	同向 (Forward)	51.00%	磷酸烯醇丙酮酸合酶 Phosphoenolpyruvate synthase	编码区磷酸烯醇丙酮酸合酶结构域 Phosphoenolpyruvate synthase domain
GX11-6202	98% /100%	反向 (Reverse)	48.80%	亚硝酸还原酶 Nitrite reductase large subunit	编码区吡啶二硫核苷酸氧化还原酶结构域 Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain
-GX11-2709	98% /100%	同向 (Forward)	49.10%	烟酸核苷酸腺苷转移酶 Nicotinamide nucleotide adenyltransferase	编码区烟酸核苷酸腺苷转移酶结构域 Nicotinamide nucleotide adenyltransferase domain
GX11-6388	99% /99%	同向 (Forward)	49.10%	核糖体沉默因子 RsfS Ribosome silencing factor RsfS	起始密码子前 160 bp 160 bp before initiation codon
GX11-6355	100% /100%	反向 (Reverse)	50.60%	胱硫醚 β-合酶 Cystathionine beta-synthase	编码区半胱氨酸合成酶 A 结构域 Cysteine synthase A domain
GX11-8282	99% /100%	反向 (Reverse)	45.90%	胱硫醚 β-裂解酶 Cystathionine beta-lyase	编码区胱硫醚 β-裂解酶结构域 Cystathionine beta-lyase domain
GX11-6395	96% /100%	反向 (Reverse)	50.40%	接合转移蛋白 TraJ Conjugal transfer protein TraJ	编码区 IV 型分泌系统 Vir8 蛋白结构域 Type IV secretion system protein VirB8 domain
GX11-9341	100% /100%	同向 (Forward)	47.90%	未知蛋白 Hypothetical protein	编码区 Coding region
GX11-6348	100% /96%	反向 (Reverse)	48.50%	未知蛋白 Hypothetical protein	起始密码子前 24 bp 24 bp before initiation codon
GX11-8227	100%		45.10%	转座酶 Transposase	编码区 Coding region
GX11-8201	99%		48.20%	未知蛋白 Hypothetical protein	编码区 Coding region
GX11-4301	99%		49.40%	NmrA 家族蛋白 NmrA family protein	编码区 Coding region
GX11-6801	99%		48.10%	未知蛋白 Hypothetical protein	编码区 Coding region
GX11-7301	98%		43.70%	未知蛋白 Hypothetical protein	起始密码子前 48 bp 48 bp before initiation codon
GX11-8101	99%		53.40%	纤维素酶 Cellulase	编码区纤维素酶结构域 Cellulase domain
GX11-7812	100%		49.90%	未知蛋白 Hypothetical protein	编码区 Coding region

续表 1 Continued Tab. 1

转化子 Transformants	同源性(上游/ 下游) Identity (Upstream/ downstream)	插入方向 Orientation of insertion	插入位点 GC 含量 GC content of insertion site	预测基因功能 Prediction of gene function	插入位置 Location of insert
GX11-1801	99%		49.30%	IV 型分泌系统 VirB4 Type IV secretion system protein VirB4	编码区 IV 型分泌系统 ATP 酶 VirB4 结构域 Type IV secretion system protein VirB4 domain
GX11-8301	100%		51.80%	未知蛋白 Hypothetical protein	编码区 Coding region
GX11-6401	99%		50.00%	未知蛋白 Hypothetical protein	起始密码子前 111 bp 111 bp before initiation codon

将 29 个转化子中 Tn5 转座子插入位点所在的基因在 NCBI 进行 BLAST 比对,有 19 个基因已知预测功能,10 个基因为未知蛋白。将 29 个基因编码蛋白进行 BLASTp 比对后发现,24 个插入位点在预测基因编码区的转化子中,有 15 个转座子插入在基因的保守结构域内。

为研究 Tn5 转座子的插入方向与插入基因方向有无相关性,对 19 个获得两侧侧翼序列的转化子进行分析,有 10 个为同向插入,9 个为反向插入,所以两者没有明显关系。

为了分析 Tn5 转座子的插入是否与 9 bp 的正向重复序列的碱基及其上下游的碱基序列相关,统计 19 个获得两侧侧翼序列的转化子的 9 bp 正向重复序列及其上下游各 18 bp 的共 45 bp 碱基序列(表 2)。统计发现,在 9 bp 正向重复序列的首位和末位,出现碱基 G 和碱基 C 的概率分别达到 58% 和 50%,在 4 位出现 T/C 的概率为 88%,在 5 位出现 A/T 的概率为 63%,在 6 位出现 A/G 的概率为 63%。正向重复序列的上游-18 bp 和下游 18 bp 碱基序列中,在-5 位和 11 位出现碱基 G 概率分别达到 67% 和 61%(1 位为正向重复序列的第 1 个碱基),在-2 位出现碱基 C 的概率达到 63%。比较 G/C 出现概率发现,-15,-11,-9,-5,-4,-2,1,3,8,9,11,16,17,19,21,23,26 位出现 G/C 的概率均大于 71%。这些碱基的特异性可能与转座酶的识别作用相关。

表 2 19 个转化子形成的 9 bp 正向重复序列及其上下游 18 bp 碱基

Tab. 2 The 9 bp repetitive sequences and its upstream and downstream 18 bp bases of 19 transformants

转化子 Transformants	上游-18 bp 序列 18 bp upstream sequence	9 bp 重复序列 9 bp repeat sequence	下游 18 bp 序列 18 bp downstream sequence
GX11-6945	CAGCTATCACGTGGCTCA	GTGCAAGGA	AGCCGGCGTGAGCCGGGA
GX11-1107	GTGCATGTCACGCAGCTG	CCGCAGGAC	TATTACCAAGTTCGATCCG
GX11-1796	AAAAATTCCGCAAGGACA	ATCCCAAGA	CCTACCGCGCGTTTGTCTG
GX11-6319	ACATCCGTCGGCTGCACG	GTCTGGAGG	CGGTGCGACGACGCCCGG
GX11-7408	GGGCGGGCTGTTTGCCTT	GCATGCGGC	CGCCACCCTGCCGCAGGT
GX11-8261	AGACACAGAATACGGATC	GTCGTGAGG	TTATTGTCCTTATCACGC
GX11-2709	TGCCGCCCCCGGTGGCCG	GAATGATCC	AGCGCGAAGGCCTGTACC
GX11-9607	GCCCGACGCCGACTACA	TCCTGGATC	AGCGGTACATGGACTGGG
GX11-9341	GCCGCTGCGCGTTCTGCT	GTCCAAGGG	GCACCAAGGCGCGTAACAA
GX11-8291	AGGCATCGCCCATGCTGG	TGCTGGAAC	TGGACCGCAGCGGCCTGC
GX11-6395	GTTGAGATTGTCAGCGTT	GTTCTAAT	GGCGATGGCGTCGGCACG
GX11-7622	GCATGCGCCGCGCGCCA	ATCCACCGA	CGCCGGCCATCGGGATCC
GX11-8282	GCGTGGGATTGAGCG	GGCGCTGGG	TGAGGGGACTCGCTAATC
GX11-6355	CGCAGCAGAAGGGCTACC	AGCTGATCC	TGGTGTTCCGGACAAGA
GX11-9951	CCTGTGTTGCATGAGCT	ACGCCTGGC	CGACCTGGCCCCGCGTAGG
GX11-6388	GGTACAGGCCCTTCGCGCT	GGATCATTC	CGGCCACCGGGGGCGGCA
GX11-6358	AGCCGCTGGGACGCGGGT	ATGCATGGC	TGGATACCGGAACGCACC
GX11-6348	AAAGAGATGCATGCTGCA	GGATACGAG	GTCTCTACAGAACAAGCG
GX11-6202	ATCGCGATATCCAGGACA	CGCGCACCA	TGATCGATACCGCGCGTA

3 讨 论

笔者采用 hiTail-PCR 对 30 个转化子的 Tn5 转座子插入位点侧翼序列进行分析,从而对 Tn5 转座子的插入模式进行初步分析。对获得的 19 个转化子两侧侧翼序列和 10 个转化子的单侧侧翼序列进行分析统计后发现,Tn5 转座子倾向于插入低 GC 含量区,当 GC 含量为 49% ~ 50% 时插入数最多。笔者获得的 19 个转化子的两侧侧翼序列经过分析后均发现产生了 9 bp 的正向重复序列的情况。而且,没有发现转座子的插入方向具有偏好性。29 个转化子中,有 24 个插入位点是在预测基因的编码区内,说明转座子的插入可能偏向于插入编码区。对研究实验结果进行统计分析发现,9 bp 正向重复序列的上游-18 bp 和下游 18 bp 碱基的-5,-2,1,4,5,6,9,11 位可能与转座酶的结合具有相关性。孙其红^[13]构建了水稻白叶枯病菌的 Tn5 突变体库,分析其插入模式发现,在 Tn5 转座的过程中,会在插入位点产生 9 bp 的正向重复序列,这与本实验结果相同。唐江涛^[14]通过 Tn5gusA(Tn5gusA 和 Tn5 具有相同的转座机理和转座热点) 构建野油菜黄单胞菌的突变体库,并通过生物信息学的方法分析其插入规律,发现 Tn5gusA5 倾向于低 GC 含量区域,在 GC 含量为 50% 左右时插入密度最高,而且插入位点的把序列也有一定的特异性,本研究中 GC 含量为 49% ~ 50% 的区域的插入密度最高,与其结果相符。唐江涛研究^[14]也发现,在 9 bp 正向重复序列的上下游 18 bp 碱基的-5,-2,1,4,5,6,9,11,14 位碱基与转座酶的结合相关。本研究结果为更好地利用 tn5 转座子进行病原细菌致病分子机理研究提供了依据。

参考文献:

- [1] 黄洁,周建国. 木薯间套作与高效利用技术 [M]. 海口:海南出版社,2015.
- [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): 124 - 126,129.
- [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] 农业部发展南亚热带作物办公室. 2014 年 12 月热作产品市场动态 [EB/OL]. <http://www.troagri.com.cn/Articles.php?url=BTwKZQFuVz5VaFBhAGdRZQ%3D%3D>, 2015-01-16.
- [6] 国务院. 可再生能源中长期发展规划 [R], 2007.
- [7] Lozano J C, Booth R H. Disease of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. Pans, 1974(20): 30 - 54.
- [8] 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(1): 116 - 121.
- [9] Rebecca Bart, Megan Cohn, Andrew Kassen, et al. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance [J]. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America 2012,109(28): 1972 - 1979.
- [10] Mario L Arrieta-Ortiz, Luis M Rodríguez-R, A' lvaro L. Pe' rez-QuinteroMireille Harimalala, et al. Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* strain CIO151 [J]. PLOS ONE, 2013, 8(11): e79704.
- [11] Stéphanie Bolot, Alejandra Munoz Bodnar, Sébastien Cunna, et al. Draft Genome sequence of the *Xanthomonas* cassavae type strain CFBP 4642 [J]. Genome, 2013, 1(4): e00679 - 13.
- [12] Castiblanco L F, Gil J, Rojas A, et al. TALE1 from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* acts as a transcriptional activator in plant cells and is important for pathogenicity in cassava plants [J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14(1): 84 - 95.
- [13] 陈江莎. 木薯地毯草黄单胞菌 Tn5 转座子插入突变体库的建立及其分子分析 [D]. 海口:海南大学,2013.
- [14] 时涛,李超萍,刘先宝,等. 木薯细菌性枯萎病菌 *hrpG* 基因突变体的获得 [J]. 热带作物学报,2013(6): 1139 - 1143.
- [15] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [16] 丁小云,耿俊丽,魏成熙. 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.
- [17] Liu Y G.,Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. BioTechniques, 2007, 43(5): 649 - 656.

- [[8] 唐江涛. 细菌转座子 Tn5_{gusA5} 在野油菜黄单胞菌 8004 中转座规律分析及生物学验证 [D]. 南宁: 广西大学, 2003.
- [[9] 孙其红. 水稻白叶枯菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 致病性的功能基因组学分析 [D]. 北京: 中国科学院微生物研究所, 2004.

T-DNA Insertion Patterns for the Genome of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Transformants

ZHANG Changzheng^{1,2}, LIU Jinping¹, SHI Tao², LI Chaoping², CHEN Yipeng², HUANG Guixiu²

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: Using high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR (hiTAIL-PCR), 64 specific fragments of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* (Xam) genomic DNA flanked on the T-DNA were successfully amplified from 30 randomly-picked Xam transformants. Nineteen transformants had fragments flanked on both borders of T-DNA, and 11 contained fragments flanked on the left border of T-DNA. Analysis showed that the insertion sites were mainly found in the area with low GC content, especially the area with the GC content ranging between 49%-50%; Tn5 transposon tended to be inserted into coding region; Tn5 transposon insertion formed a 9 bp direct repetitive sequence and had no preference in orientation. Among the upstream and downstream of the 9 bp direct repetitive sequence, the sites of -5, -2, 1, 4, 5, 6, 9 and 11 might play a key role in the transposase recognition.

Keywords: *Manihot esculenta*; bacterial blight; T-DNA insertion pattern