

转座子诱变甘蓝黑腐病菌所获胞外多糖突变体的类型*

Classification of the Exopolysaccharide-deficient Mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Derived from Transposon Mutagenesis

查冬兴 唐纪良 马庆生
Zha Dongxing Tang Jiliang Ma Qingsheng

(广西农业大学分子遗传研究室 南宁市秀灵路13号 530005)
(Laboratory of Molecular Genetics, Guangxi Agricultural University,
13 Xuiling Road, Nanning, Guangxi, 530005)

摘要 根据对转座子 Tn5_{gusA5}诱变甘蓝黑腐病菌所获得 39株胞外多糖突变体的 种胞外酶活性和在含 2% 葡萄糖的 NYGA培养基上的菌落形态的检测结果, 将突变株分成 5种类型。Southern杂交结果表明它们的突变位于基因组中的 8个不同的位置, 其中 1个位于已鉴定的 rpf调控基因簇。

关键词 甘蓝黑腐病菌 胞外多糖 突变体

Abstract The 39 exopolysaccharide-deficient mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, which were derived from the transposon Tn5_{gusA5} mutagenesis, were divided into five groups by their activities of three extracellular enzymes and colony-phenotypes on the NY-GA plates containing 2% glucose. Southern hybridization analysis revealed that their mutation sites were located respectively in eight different positions of the genome and one of them was located in the identified rpf regulatory gene cluster.

Key words *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, exopolysaccharide, mutant

中图法分类号 S436.35; S432.42

甘蓝黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 不仅能侵染十字花科大多数植物种类, 而且危害严重, 是十字花科植物最重要的病原菌之一^[1]。这种病菌产生的大量胞外多糖一方面被认为在致病过程中可能起着重要作用, 另一方面由于具有优良的特性已被广泛应用于工业的多种行业^[1]。因此, 研究这种胞外多糖合成的机理具有十分重要的意义。

应用现代分子遗传学实验技术, 我们曾经鉴定、克隆分析了甘蓝黑腐病菌控制胞外多糖和胞外酶合成的全局性正调控基因簇和一全局性负调控基因^[2~4]。Baré re等克隆了一段与胞外多糖合成有关的 DNA序列, 但对其没有深入研究^[5]。胞外多糖的合成是个复杂的过程, 涉及的基因很多。要了解它合成的分子机理, 就必须对与它合成有关的基因进行

克隆分析。而要鉴定、克隆到这些基因, 首先必须获得相应的突变体。我们最近建立了一个有利于基因克隆的转座子 Tn5_{gusA5}诱变体系, 并应用该体系诱变甘蓝黑腐病菌获得了 39个胞外多糖突变体^[6], 通过克隆其中三个突变体的转座子及其相邻染色体序列和标记置换重新构建突变体, 证实了这些突变体确为转座子的插入诱变所致^[7]。本文对这 39个突变体的表型及插入转座子在染色体中的位置作一报道。

1 材料与方法

本研究所用菌株及培养条件均为已报道的^[6]; 胞外多糖和胞外酶的检测分别按 Osbourn等^[8]和 Tang等^[2]所描述的方法; DNA提取、酶解、琼脂糖凝胶电泳、探针制备、Southern杂交等均按标准方法^[9]。

2 结果与分析

甘蓝黑腐病菌野生型菌株 8004在含有 2% 葡萄糖

1996-11-11收稿, 1996-12-13修回

* 国家自然科学基金资助项目。(项目编号 39100064)

的 NYGA 培养基上生长产生大量粘稠的胞外多糖, 表现为菌落大而突起, 并且湿润有光泽。通过转座子 Tn5gusA5 诱变所获得的 39 个胞外多糖突变株虽然在 NYGA 培养基上生长的菌落的大小和形态都与野生型菌株无明显差别, 但在含有 2% 葡萄糖的 NYGA 上

由于不能合成胞外多糖或合成量很少, 在菌落大小和形态上表现出与野生型菌株明显的差别。其中 36 株的菌落小、干燥、扁平, 株小、干燥、微突, 2 株小、扁平、湿润 (见附表)

Table Types of EPS mutants of *X. c. pv. campestris*

类型 Type	代表菌株 Typical Strain	所获菌株数 No. of strains isolated	胞外多糖 (菌落形态) Exopolysaccharide (Colony-phenotypes)	胞外酶相对活性 Relative activities of extracellular enzymes		
				淀粉酶 Amylase	纤维素酶 Cellulase	蛋白酶 Protease
野生型 Wild type	8004		大、粘稠、突起 Big, mucous, protruding	+++++	+++++	+++++
突变型 I Type I	T106	1	小、干燥、微突 Small, dry, slightly protruding	+	+	+
突变型 II Type II	T107	1	小、干燥、扁平 Small, dry, flat	+++++	++	+++++
突变型 III Type III	T109	1	小、湿润、扁平 Small, moist, flat	+++++	+++++	+++
突变型 IV Type IV	T112	1	小、湿润、扁平 Small, moist, flat	+++++	+++++	+++++
突变型 V Type V	T113, T116 T117, T118	35	小、干燥、扁平 Small, dry, flat	+++++	+++++	+++++



3— T107; 4— T108 (wild-type Tn5gusA5 mutant); 5— T109; 6— T112; 7— T113; 8— T114; 9— T116; 10— T117; 11— T118; 12— T119; 13— T120.

检测这些突变体菌株的胞外酶 (淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶) 后发现, 菌落干燥、扁平的 36 株突变体中, 除了 1 株 (T107) 的纤维素酶活性明显比野生型菌株弱以外, 其余 35 株的所有胞外酶活性均与野生型无明显差别; 菌落湿润、扁平的 2 株突变体, 1 株 (T112) 与野生型无差别, 另一株 (T109) 的蛋白酶活性明显比野生型弱; 菌落干燥、微突的突变体 T106 所有的胞外酶活性均明显比野生型弱。根据突变体的这些生化表型, 我们将它们分为 5 类 (见附表)

从以上结果可以看出, 所获得的突变体中, 绝大部分的菌落形态及胞外酶活性都极为相似, 为了明确这些突变体中的突变位点是否有差异, 以便进一步鉴定和克隆分析与胞外多糖合成有关的不同基因, 我们对这些突变体的总 DNA 进行了 Southern 杂交分析。通过提取各突变体的总 DNA, 用 Sal I 完全酶解 (Tn5gusA5 中有两个 Sal I 位

图 1 不同突变类型中突变体的突变位点的 Southern 杂交分析

Fig. 1 Southern hybridization analysis of the mutation positions in the different mutants

总 DNA 经 Sal I 酶解, 凝胶电泳分离及转移至尼龙膜后 (左) 与 α -³²P 标记的 pLAFRI: Tn5gusA5 探针进行杂交 (右); 1— pLAFRI: Tn5gusA5/Sal I; 2— T106; 3— T107; 4— T108 (表型与野生型相同的转座子插入突变体); 5— T109; 6— T112; 7— T113; 8— T114; 9— T116; 10— T117; 11— T118; 12— T119; 13— T120;

Total DNAs were digested with Sal I, separated by agarose gel electrophoresis (left) and transferred into nylon membrane, then hybridized with α -³²P labelled pLAFRI: Tn5gusA5 (right); 1— pLAFRI: Tn5gusA5/Sal I; 2— T106;

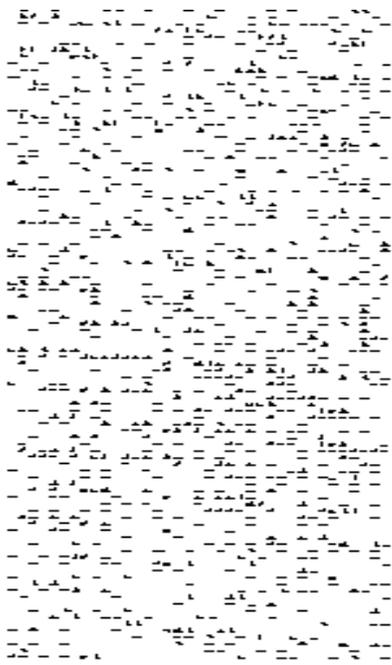


图2 突变体 T106突变位点的 Southern杂交分析

Fig. 2 Southern hybridization analysis of the mutation position of the mutant T106

总 DNA 经 Bam H 酶解, 凝胶电泳分离及转移至尼龙膜后 (1, 2), 与 α -³²P 标记的含 rpf 基因簇的 pIJ3020 探针进行 Southern 杂交 (3, 4); 1, 3 野生型菌株 8004; 2, 4 突变体 T106。A 含有 rpf C 和 rpf F 基因的 3kb 片段; B 转座子 Tn5gusA5 插入含有 rpf C 和 rpf F 基因的 3kb 序列后形成的新片段 (Tn5gusA5 中无 Bam H 位点)。

Total DNAs were digested with BamHI, separated by agarose gel electrophoresis (1, 2), transferred into nylon membrane and hybridized with α -³²P labelled pIJ3020 which contains rpf C and rpf F genes (3, 4). 1, 3-wild type strain 8004, 2, 4-mutant T106. The 3kb fragment containing rpf gene; The new fragment formed from the 3kb fragment containing the rpf C and rpf F genes inserted by the transposon Tn5gusA5 (No Bam H1 site within Tn5gusA5).

(包括蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶等) 合成受阻^[2]。为明确突变体 T106 中的突变位点是否在 rpf 基因簇中, 我们以 pIJ3020 为探针与 Bam H 酶解的 T106 的总 DNA 进行 Southern 杂交, 结果表明突变体 T106

点) 凝胶电泳分离及 Southern 转移后, 以 pLAFR1:

Tn5gusA5 为探针进行杂交, 结果表明, 突变型 V 的 3 株突变体中有 30 株 (T114 和 T117 等) 的杂交图谱完全相同, 株 (T118, T119 和 T120) 为相同的另一图谱类型, 其余 2 株及另 4 种突变型的图谱均各不相同 (部分结果见图 1)。可见, 这些突变体的突变位点分别位于基因组中 8 个不同位置。

突变型 I 的 T10 菌株不仅胞外多糖产量减少, 而且所检查的几种胞外酶活性也明显减弱, 这些表型与克隆在重组质粒 pIJ3020 中的 rpf 基因簇控制的表型完全一致, rpf 基因簇 (rpf A-G) 中任一基因的突变都会导致病菌胞外多糖和胞外酶

中的转座子是插在与已克隆在 pIJ3020 中的 3kb Bam H 片段相应染色体序列中 (图 2) 这 3kb Bam H 片段含有 rpf C 和 rpf F 基因^[2], 可见突变体 T106 是由于 rpf C 或 rpf F 的突变导致的。

3 讨论

甘蓝黑腐病菌胞外多糖的产生涉及很多基因, 不仅有一系列基因直接参与其合成过程, 而且在其合成过程中还有不少基因起调控作用, 这些不同的基因一旦发生突变都会不同程度地影响胞外多糖的正常合成。通过转座子插入位点 (即突变位点) 的鉴定可以看出, 我们所获得的一系列突变体中, 涉及到基因组中 8 个与胞外多糖产生有关的位点发生了突变。突变体 T106、T110 和 T119 不仅胞外多糖产量减少, 而且胞外酶活性也减弱, 说明突变的位点很可能是调控基因, 它们不仅调控胞外多糖的合成, 而且还调控胞外酶的合成。通过用控制胞外多糖和胞外酶合成的全局性正调控基因簇 (rpf 基因簇)^[2] 作探针进行 Southern 杂交, 证实了突变体 T106 是 rpf C 或 rpf F 基因发生了突变。

突变型 V 的 3 株突变体中除了 T11 和 T116 菌株外, 其余 3 株 (即 T11 等) 和 3 株 (即 T11 等) 的突变位点分别是一致的, 这些菌株可能是分别由两个不同的突变体繁殖而来, 也可能是转座子 Tn5gusA5 在甘蓝黑腐病菌中转座过程存在插入“热点”所致。这些突变体以及突变型 IV 的突变体 T11 的胞外酶活性与野生型无差异, 说明突变的位点与所检测的胞外酶的合成无关。

由于所获得的突变体是由转座子 Tn5gusA5 插入所致以及 Tn5gusA5 携带有卡那霉素抗性基因, 对进一步通过从突变体中克隆 Tn5gusA5 及其相邻序列及以该序列为探针从野生型菌株中克隆相应的完整基因 (或操纵子) 极为便捷。我们最近通过此法已克隆到了能反式互补突变体 T117, 恢复其胞外多糖正常合成的 DNA 序列。目前, 我们正在从野生型菌株中克隆与其他突变体的突变位点相应的 DNA 序列及对这些序列中的基因的结构、功能等进行深入的研究。

参考文献

- 1 Williams PH. Black rot, a continuing threat to world crucifers. *Plant Dis*, 1980, 64: 736~742.
- 2 Tang JL, Liu YN, Barber CE et al. Genetic and molecular analysis of a cluster of rpf genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and

polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol Gen Genet, 1991, 226: 409~ 417.

- 冯家勋, 唐纪良, Wilson GT等. 甘蓝黑腐病菌 rpf 基因簇对胞外蛋白酶 I 基因表达的调控. 广西农业大学学报, 1996, 15 (1): 5~ 13.
- Tang JL, Gough CL, Daniels MJ. Cloning of genes involved in negative regulation of production of extracellular enzymes and polysaccharide of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol Gen Genet, 1990, 222: 157~ 160.
- Barère GC, Barber CE, Daniels MJ. Molecular cloning of genes involved in the biosynthesis of the extracellular polysaccharide xanthan by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Int J Biol Macromol, 1986, 8: 372~ 374.

- 查冬兴, 唐纪良. 转座子报告基因 Tn5gus A5 诱变甘蓝黑腐病菌分离与致病相关的突变体. 广西农业大学学报, 1996, 15 (1): 23~ 29.
- 查冬兴, 唐纪良, 马庆生. 转座子诱变甘蓝黑腐病菌所获胞外多糖突变体的验证. 广西农业大学学报, 1996, 15 (4): 279~ 284.
- Osbourn AE, Clarke BR, Stevens BJH et al. Use of oligonucleotide probes to identify members of two-component regulatory systems in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol Gen Genet, 1990, 222: 145~ 151.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning—A Laboratory Manual. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 30 页 Continue from page 30)

为 1~ 3 位) 组成必要性条件子集的问题. 其研究的背景是一个复杂的生态系统, 在此系统中, 蔬菜害虫通过选择一种策略, 将它们与环境中的生活要素的耦合调节到无论哪个值都可能会使之达到最佳配合的状况. 本实验研究利用“CRF 法与 R. R. Yager 的决策函数相结合, 初步推断了菜地生态系统中生活要素对黄曲条跳甲作用的地位顺序, 其结果的正确性是符合植保工作者的一般认识观念的. 它具有广泛的适用性. 它为在生物学、生态学的研究中, 按不同目的需要而选择不同的生活要素提供了依据, 是一种良好的分析方法. 可为它赋名“长程系统信息量推理合成运算准则杨戈函数判决”法, 简记为 LSIQCRIYF 法.

参考文献

- Bellman R E, Zadeh L A. Decision-making in a Fuzzy Environment. Manage. Sci. 1970, 17: B141~ B164.

- 蔡训武等. 农作物病虫害测报综合决策. Fuzzy 控制在玻璃窑炉微机中的应用. 应用数学, 1988, (1): 47~ 52.
- 韦泽平. 果树捕食螨对害螨的生态控制功能. 昆虫知识, 1995, (2): 115~ 120.
- 陈国范. Fuzzy 集合理论在气象中的应用. 模糊数学, 1982, (3): 131~ 134.
- 王怀清, 粟载福. Fuzzy 数学应用于中医计算机诊断. 模糊数学, 1982, (1): 91~ 102.
- 武汉. 教学过程中的综合评判问题. 模糊数学, 1982, (1): 117~ 120.
- Zadeh L A. Outline of a new approach to the analysis of complex systems and decision processes. IEEE Trans Systems, Man and Cybernet, 1973, 1: 28~ 44.
- Yager R R. Muticriteria decisions with soft information (I) (II). 模糊数学, 1982, 2: 21~ 28.
- Gerhara Neuweiler, 进化与责任. 自然杂志, 1987, 9: 687.
- 吴望名等. 应用模糊集方法. 北京: 北京师范大学出版社, 1985. 164~ 189.

(责任编辑: 蒋汉明)