

## 紫云英根瘤菌胞外多糖缺陷型变种的分离及遗传分析

陈汉才 龙北国 宋鸿遇

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

经转座子 Tn5 诱变, 获得 20 株紫云英根瘤菌菌株 109 胞外多糖 (Exopolysaccharide, EPS) 缺陷型 (EPS-deficient,  $\text{Exo}^-$ ) 变种。这些变种仍都是原养型, 在含不同的碳底物或不同浓度碳底物的固体培养基上, 菌落型态均无改变。与亲本菌相比, 变种的 EPS 产量明显降低。所有变种未能在其宿主植物紫云英上结瘤。

利用载体质粒 pMN2, 经  $\text{Exo}^-$  变种与大肠杆菌受体菌交配, 通过选择 Tn5 卡那霉素抗性标记的转移, 构建成带有 Tn5 及菌株 109 多糖基因 DNA 片段的 R-prime 质粒。R-prime 质粒能稳定地存在于菌株 109 中。大部分变种的  $\text{Exo}^-$  表型能被 R-prime 质粒互补, 但 R-prime 质粒未能使这些  $\text{Exo}^-$  变种恢复有效结瘤的共生能力。根据互补结果, 20 株  $\text{Exo}^-$  变种分为 6 种不同的互补群, 其中 5 种互补群的多糖位点在遗传上是连锁的。

**关键词** 根瘤菌; 转座子诱变; 胞外多糖合成; 遗传分析

许多野生型根瘤菌能产生大量的胞外多糖 (EPS), 形成具粘液的菌落。早期的研究表明, EPS 在豆科植物与根瘤菌的共生关系中起有重要作用, 如专一性识别<sup>[1-3]</sup>, 根瘤菌吸附到根表面和宿主专一性<sup>[4]</sup>。

分离根瘤菌胞外多糖缺陷型 ( $\text{Exo}^-$ ) 变种是研究胞外多糖在共生固氮中生理作用的一条重要途径。 $\text{Exo}^-$  变种已分别从豌豆根瘤菌<sup>[5]</sup>、大豆根瘤菌<sup>[6]</sup>、三叶草根瘤菌<sup>[7]</sup>、苜蓿根瘤菌<sup>[8]</sup>、快生型豇豆根瘤菌<sup>[9]</sup>和菜豆根瘤菌<sup>[10]</sup>中分离获得。对这些  $\text{Exo}^-$  变种的共生特性分析发现, EPS 是形成有固氮活性根瘤的一个必不可少的因子<sup>[6-9]</sup>, 并在少数共生体系中, 对根瘤菌感染宿主植物, 诱导根瘤的形成也有重要的作用<sup>[5,10]</sup>。

紫云英根瘤菌也产生许多 EPS。利用转座子诱变技术, 我们从紫云英根瘤菌菌株 109 中筛选到一批  $\text{Exo}^-$  变种, 从生理、共生特性及遗传诸方面对这些变种进行了

分析研究。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌种和培养方法

1. 菌种: 紫云英根瘤菌菌株 109<sup>[11]</sup> 作分离变种的出发菌。带有质粒 (pACYC 184-Mob) :: Tn5 的大肠杆菌 Sm10-1011<sup>[12]</sup> 用于转座子 Tn5 诱变菌株 109。质粒 pMN2<sup>[13]</sup> 用于构建 R-prime 质粒的载体质粒, 大肠杆菌 HB101 和 HB1011<sup>[14]</sup> 用于构建 R-prime 质粒的受体菌。

2. 培养方法: 根瘤菌生长培养基为 BMM、TY 或 minimal<sup>[15]</sup>, 培养温度为 28°C。大肠杆菌生长培养基为 LB<sup>[15]</sup>, 培养温度为 37°C。

### (二) 转座子诱变

用转座子 Tn5 诱变法分离  $\text{Exo}^-$  变种,

本文于 1989 年 6 月 12 日收到。

参加本工作的还有郁宝麟和朱美珍同志, 特此致谢。

参见Chen等<sup>[9]</sup>方法, 稍作改进。用含卡那霉素(200 $\mu$ g/ml)的minimal培养基作为筛选结合子的选择培养基。

### (三) 植物分析

1. 种子消毒与萌发: 将紫云英种子在水里洗净后, 在 75% 的乙醇中浸泡 10min, 倾去乙醇, 用无菌水将种子洗 4 次, 再在 0.25% 的氯化汞中浸泡 10min, 最后用无菌水将种子冲洗五六次。消毒过的种子被置于培养皿中的固体 BMM 培养基上, 并用镊子尽量将种子分开, 然后将培养皿置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中进行冷处理 24h 左右(冷处理可提高发芽率和结瘤率), 再放到 28 $^{\circ}$ C 培养箱中进行萌发。

2. 回接试验: 根瘤菌在紫云英上的结瘤分析采用培养皿植物分析法<sup>[15]</sup>。植物在人工气候箱中生长(照光时间为 12h, 光强为 7000lx, 光照温度为 22 $^{\circ}$ C。黑暗时

间为 12h, 黑暗时温度为 16 $^{\circ}$ C)。

### (四) 胞外多糖测定

参见Chen等<sup>[9]</sup>方法。

### (五) R-prime 质粒分离

参见Chen等<sup>[14]</sup>方法。

### (六) 质粒显示

参见Plazinski等<sup>[16]</sup>方法。

## 结 果

### (一) 筛选Exo<sup>-</sup>变种

将紫云英根瘤菌菌株 109 划线于固体培养基上, 形成均一的、含大量粘液的光滑型(Exo<sup>+</sup>)菌落(图1a)。菌株 109 经转座子 Tn5 诱变后, 出现频率约为受体菌  $5 \times 10^{-8}$  的粗糙型(Exo<sup>-</sup>)小菌落(图1b)。经在选择培养基上多次分离纯化, 筛选出 20 株胞外多糖缺陷型(Exo<sup>-</sup>)变种。

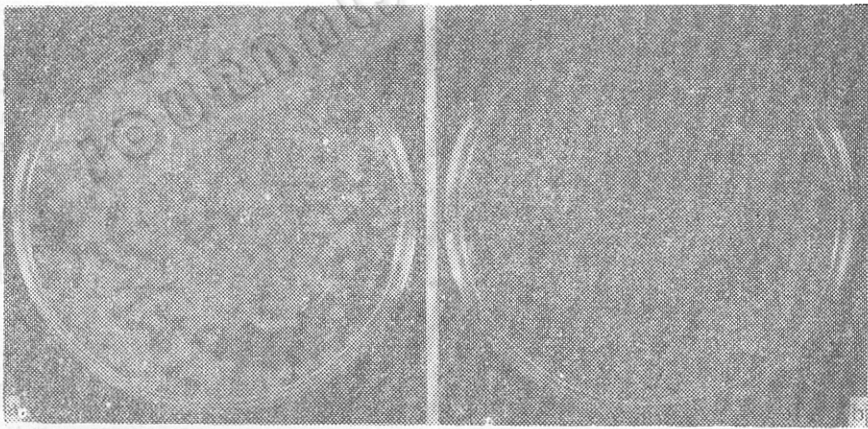


图 1 菌株 109 与其 Exo<sup>-</sup> 衍生菌菌落形态的比较, 细菌生长在 BMM 琼脂培养基上  
Fig.1 Comparison of the colony morphologies of strain 109 and its Exo<sup>-</sup> derivative.  
Bacteria were grown on BMM agar medium  
a) 亲本菌 109, Exo<sup>+</sup>; Parent strain 109, Exo<sup>+</sup>  
b) 变种 Ra107, Exo<sup>-</sup>; Mutant Ra107, Exo<sup>-</sup>

所有 Exo<sup>-</sup> 变种均能在最低培养基上生长, 表明这些变种仍是原养型。每个 Exo<sup>-</sup> 变种只对卡那霉素 (Tn5 携带的抗药标记) 具有抗性, 而对氯霉素 (Tn5 的载体质粒, pACYC184 所携带的抗药标记) 敏

感, 说明突变是由于 Tn5 插入, 而不是 Tn5 连同载体质粒整合到菌株 109 的基因组所致。在含不同碳底物(葡萄糖、果糖、蔗糖、山梨醇糖、甘露糖和甘露醇)及不同浓度甘露醇 (5—39g/L) 的培养基上,

所有变种的表型均为 Exo<sup>-</sup>，表明这些变种的多糖合成不受培养基中碳底物的影响，即 Exo<sup>-</sup>表型可能是非条件型的。菌株109含有4个大质粒，每个 Exo<sup>-</sup>变种也都含有4个大小与亲本菌质粒相似的质粒（图2），证明这些 Exo<sup>-</sup>变种是菌株109的衍生菌。

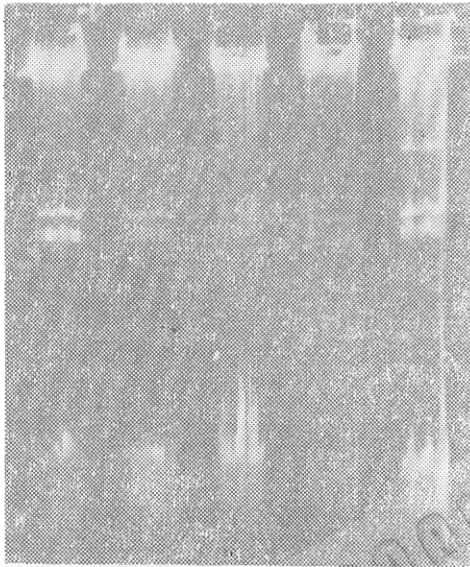


图2 从菌株109和其 Exo<sup>-</sup> 衍生菌中分离获得的质粒DNA的凝胶电泳图样  
Fig.2 Gel electrophoresis pattern of plasmid DNA isolated from strain 109 and its Exo<sup>-</sup> derivatives, from left to right;  
1. Ra109; 2. Ra102; 3. Ra111;  
4. Ra104; 5. Ra120

（二）变种的胞外多糖合成及结瘤分析

与亲本菌菌株109相比，Exo<sup>-</sup>变种的EPS产量明显降低，约是亲本菌EPS水平的0.5—36%（表1）。同时，Exo<sup>-</sup>变种也改变了它们的共生特性。菌株109能诱导紫云英形成有效瘤，而所有 Exo<sup>-</sup>变种则未能使紫云英结瘤。

（三）构建R-prime质粒

质粒R68.45能整合大片段的根瘤菌染色体或共生质粒DNA，形成prime(R')质粒<sup>[13,14,17]</sup>。由于R68.45是一个广宿

表1 紫云英根瘤菌菌株109及其 Tn5 诱导的Exo<sup>-</sup> 变种的胞外多糖水平  
Table 1 EPS levels of *R. astragalus* strain 109 and its Tn5-induced Exo<sup>-</sup> mutants

菌株	表型	胞外多糖含量 (亲本菌胞外多糖水平的百分数)
Strain	Phenotype	EPS content (% of the parental EPS level)
109	Exo <sup>+</sup>	100
Ra101	Exo <sup>-</sup>	10.3
Ra102	Exo <sup>-</sup>	4.1
Ra103	Exo <sup>-</sup>	4.7
Ra104	Exo <sup>-</sup>	7.7
Ra105	Exo <sup>-</sup>	1.0
Ra106	Exo <sup>-</sup>	0.5
Ra107	Exo <sup>-</sup>	8.8
Ra108	Exo <sup>-</sup>	11.4
Ra109	Exo <sup>-</sup>	6.0
Ra110	Exo <sup>-</sup>	4.1
Ra111	Exo <sup>-</sup>	29.2
Ra112	Exo <sup>-</sup>	9.0
Ra113	Exo <sup>-</sup>	19.2
Ra114	Exo <sup>-</sup>	10.2
Ra115	Exo <sup>-</sup>	36.3
Ra116	Exo <sup>-</sup>	3.0
Ra117	Exo <sup>-</sup>	11.3
Ra118	Exo <sup>-</sup>	29.3
Ra119	Exo <sup>-</sup>	13.0
Ra120	Exo <sup>-</sup>	13.9

100%的胞外多糖等于2.7mg糖酸/mg蛋白  
The 100% of EPS is equal to 2.7mg of uronic acid per mg protein

主，可自行转移的质粒，构建 R' 质粒已成为研究根瘤菌遗传学的一种有用的工具<sup>[13,14,17]</sup>。

质粒pMN2（质粒R68.45卡那霉素敏感型的衍生质粒）被用于构建带有紫云英多糖基因的R-prime质粒的载体质粒。质粒pMN2被转入各株Exo<sup>-</sup>变种，将带有质粒pMN2的根瘤菌结合子作为供体菌，与大肠杆菌菌株HB101进行交配，筛选出抗卡那霉素的大肠杆菌结合子，这些抗卡那霉素的HB101结合子再与大肠杆菌HB101进行交配，以四环素作为选择标记，卡那霉素作为非选择标记，测试两种抗药标记的共同转移频率。凡两种抗药性标记的共

同转移率达到 100% 的抗卡那霉素的 HB101 结合子被视为可能带有 R-prime 质粒。由于 R-prime 质粒带有外源 DNA 片段，其分子量应大于载体质粒 pMN2。通过电泳分析，在大部分被测的 HB101 抗卡那霉素的结合子中观察到一个明显大于质粒 pMN2 的质粒存在(图 3)。以 10 个不同的 Exo<sup>-</sup> 变种 (Ra101, Ra102, Ra107, Ra108, Ra109, Ra110, Ra111, Ra114, Ra115 和 Ra119) 中分离获得的 10 个不同的 R-prime 质粒被依次命名为质粒 R'101, R'102, R'107, R'108, R'109, R'110, R'111, R'114, R'115 和 R'119。这些 R' 质粒被用于进一步的遗传互补分析。

(四) 遗传互补分析

将 R' 质粒分别转移至各株 Exo<sup>-</sup> 变种进行互补分析(表 2)。

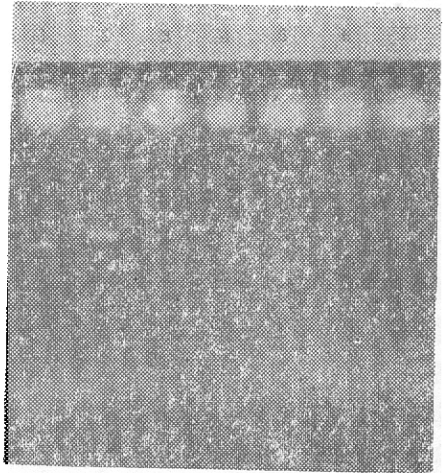


图 3 大肠杆菌 HB101 抗卡那霉素结合子中 R-prime 质粒的显示

Fig.3 Visualization of R-prime plasmids in *E.coli* strain HB101 kanamycin-resistant transconjugants

1. R'117;      2. R'101;      3. pMN2;
4. R'107;      5. R'108;      6. R'109;
7. R'111

表 2 R-prime 质粒对 Exo<sup>-</sup> 变种的互补作用  
Table 2 Complementation of Exo<sup>-</sup> mutants with R-prime plasmids

互补群 Complementation group	菌 株 Strain	被 R-prime 互补 Complementation by R-prime					
		R'117 R'101	R'108	R'111	R'102 R'107 R'115	R'110 R'114	R'109
A	Ra102	-	-	+	-	-	-
	Ra105	-	-	+	-	-	-
	Ra115	-	-	+	-	-	-
	Ra113	-	-	+	-	-	-
	Ra112	-	-	+	-	-	-
	Ra107	-	-	+	-	-	-
	Ra110	-	-	+	-	-	-
B	Ra118	-	-	+	+	-	-
C	Ra111	-	-	-	+	-	-
D	Ra114	-	+	-	-	-	-
	Ra104	-	+	-	-	-	-
	Ra103	-	+	-	-	-	-
	Ra101	-	+	-	-	-	-
	Ra117	-	+	-	-	-	-
E	Ra108	+	-	-	-	-	-
	Ra120	+	-	-	-	-	-
	Ra106	+	-	-	-	-	-
	Ra119	+	-	-	-	-	-
F	Ra109	-	-	-	-	-	-
	Ra116	-	-	-	-	-	-

+, 能互补 positive complementation; -, 不能互补 no complementation

结果可归纳为以下几点: (1) 每个 R' 质粒不能与其亲本 Exo<sup>-</sup> 变种发生互补作用, 但能与其他 Exo<sup>-</sup> 变种发生互补作用。质粒 pMN2 则不能互补任何一株变种的 Exo<sup>-</sup> 表型。这说明 R' 质粒不仅带有一个与其亲本 Exo<sup>-</sup> 变种相同的含 Tn5 的多糖突变基因, 而且带有能互补其他 Exo<sup>-</sup> 变种的野生型多糖基因; (2) 在 20 株 Exo<sup>-</sup> 变种中, R' 质粒能纠正其中 18 株变种的 Exo<sup>-</sup> 表型。根据互补分析结果, 20 株 Exo<sup>-</sup> 可分为 6 个不同的互补群(A—F), 其中 5 个(A—E)互补群变种的 Exo<sup>-</sup> 表型能被 R' 质粒互补; (3) 根据 R' 质粒互

补 Exo<sup>-</sup> 变种的类型, 以及该 R' 质粒所带有的多糖突变基因, 可以确定, 5 个多糖位点(A—E)应该具有连锁关系, 即 A—B—C—D—E 位点相互连锁; (4) 质粒 R'109 带有 F 互补群变种的突变基因, 但未能与任何一株 Exo<sup>-</sup> 变种发生互补作用。此外, F 互补群变种的 Exo<sup>-</sup> 表型不能被其他 R' 质粒所互补, 这说明 F 位点与其他 5 个位点(A—E)距离较远, 没有遗传连锁关系。

这些菌株 109 多糖位点的遗传连锁图谱如图 4 所示。

R' 质粒能纠正变种的 Exo<sup>-</sup> 表型, 但

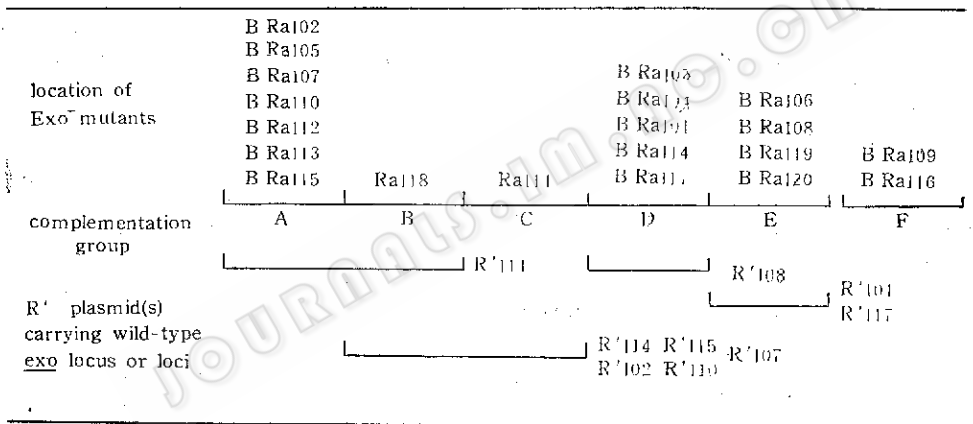


图 4 紫云英根瘤菌菌株 109 多糖位点的遗传连锁图谱

Fig.4 Genetic linkage map of *exo* loci of *R. astragalus* strain 109  
变种被分为 A—F 6 个不同的互补群。多糖位点, A、B、C、D 和 E 相互连锁。R-prime 质粒不能互补 F 互补群的 Exo<sup>-</sup> 变种, 因此多糖位点 F 没有与其他 5 个多糖位点连锁

The mutants have been classified into distinct complementation-groups A—F. The *exo* loci A, B, C, D and E are linked each other. The group F Exo<sup>-</sup> mutants are not complemented by R-primes and therefore the *exo* locus F is not linked to other five *exo* loci

未能恢复这些 Exo<sup>-</sup> 变种在紫云英上的结瘤能力。进一步的分析发现, R' 质粒的载体质粒 pMN2 及转座子 Tn5 本身对菌株 109 的结瘤也有影响。菌株 109 带有质粒 pMN2 的结合子不能使紫云英结瘤。同样, 经 Tn5 诱变后, 随机挑取的抗卡那霉素的 Exo<sup>+</sup> 结合子也未能使紫云英结瘤。

### (五) R-prime 质粒的稳定性

在互补实验中未发现 R' 质粒不稳定现象。为了进一步证实 R' 质粒在菌株 109 背景下的稳定性, 将那些带有 R' 质粒, 表型由原来的 Exo<sup>-</sup> 变成 Exo<sup>+</sup> 的结合子, 利用连续复印技术, 在无选择力的条件下生长约 500 代, 在最终形成的单菌落中,

99%的菌落具有 Exo<sup>+</sup>表型。挑取部分这些Exo<sup>+</sup>单菌落,检测它们的抗药标记及电泳行径,结果观察到所有被测的菌落中都含有在遗传和物理性状上与原R'质粒相同的质粒(结果未列),表明R'质粒在菌株109的背景下确是稳定的。

## 讨 论

我们的结果再一次表明,转座子Tn5诱变技术可用于根瘤菌胞外多糖缺陷型变种的分离,质粒pMN2可用于构建带有菌株109DNA片段的R-prime质粒。

生理和遗传分析表明,Exo<sup>-</sup>变种的突变是由于Tn5插入在与菌株109多糖合成有关的基因中所致。遗传和物理分析表明,Exo<sup>-</sup>变种的Tn5及Tn5插入位点两侧的根瘤菌DNA片段已被克隆到质粒pMN2上。其证据有:(1)Tn5的卡那霉素抗性标记与载体质粒pMN2的四环素抗药性标记显示了遗传连锁关系;(2)每个R'质粒不能与亲本Exo<sup>-</sup>变种,但能与其他Exo<sup>-</sup>变种发生互补作用;(3)R'质粒的分子量大于载体质粒pMN2。

R-prime质粒在菌株109中能够稳定地存在,这与在快生型豇豆根瘤菌中观察到的现象是一致的<sup>[13,14]</sup>。但带有苜蓿根瘤菌DNA片段的R-prime质粒在苜蓿根瘤菌中则很不稳定,R'质粒上的插入DNA片段较易脱落<sup>[17]</sup>。其原因尚不清楚,可能与各种根瘤菌之间的DNA重组活性有关。R'质粒在菌株109中的稳定性,使我们有可能利用这些R'质粒构建一个遗传互补系统,研究紫云英根瘤菌多糖基因的机构。

细菌胞外多糖的生物合成是一个很复杂的过程,涉及到底物的吸收,中间代谢和聚合物的合成三个步骤<sup>[18]</sup>。因此有很多基因参与细菌胞外多糖的合成。在苜蓿根瘤菌中已发现14个多糖基因,其中12个基因群集在一段22kb的大质粒DNA片段上<sup>[19]</sup>。在快生型豇豆根瘤菌中已发现6个多糖基因,其中5个基因位于46kb的DNA片段上<sup>[14]</sup>。20株紫云英根瘤菌菌株109的Exo<sup>-</sup>变种在遗传上可分为6个不同的互补群,表明参与菌株109胞外多糖合成的基因至少有6个。R'质粒能够纠正5个互补群共18株变种的Exo<sup>-</sup>表型,表明R'质粒带有5个菌株109的多糖位点。遗传互补分析结果表明这5个已克隆到R'质粒上的多糖位点(exo loci A、B、C、D、E)具有遗传连锁关系。由此可推测,除质粒R'109外,其他9个质粒应该属于交搭型质粒(Overlapping plasmids),即一个R'质粒的插入DNA片段中有部分DNA序列与另一个R'质粒的插入DNA片段中的部分DNA序列是相同的,这些相同的DNA序列形成了两个质粒的交搭区(Overlapping region)。

菌株109的Exo<sup>-</sup>变种都未能在紫云英上结瘤,而R'质粒只能互补Exo<sup>-</sup>变种在合成胞外多糖方面的生理缺陷,却未能恢复这些变种在宿主植物上的有效结瘤能力。这一现象存在两种可能性:(1)缺失胞外多糖对细菌的结瘤和固氮有一定的影响,但这种影响被转座子Tn5或质粒pMN2的作用所掩盖;(2)胞外多糖对细菌的结瘤和固氮没有影响,变种的共生缺陷是由于Tn5或pMN2作用所致。这些还有待于进一步阐明。

## 参 考 文 献

- [1] Dazzo, F. B. and Brill, W. J.: *J. Bacteriol.*, 137:1362, 1978.
- [2] Kato, G. Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44:2843, 1980.
- [3] Stacey, G. et al.: *Plant Physiol.*, 66:609, 1980.
- [4] Dudman, W. F.: *Surface Polysaccharides of prokaryotic cell* (Ed Sutherland, I. ), Academic Press, New York, p.357, 1977.
- [5] Sanders, R. E. et al.: *Nature*, 271:240, 1978.
- [6] Law, I. J. et al.: *Planta*, 154:100, 1982.
- [7] Chakravorty, A. K. et al.: *J. Mol. Appl. Genet.*, 1:585, 1982.
- [8] Leigh, J. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:6231, 1985.
- [9] Chen, H. et al.: *J. Plant Physiol.*, 120:331, 1985.
- [10] Borthakur, D. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 203:320, 1986.
- [11] 汪 化, 宋鸿遇: *植物生理学报*, 10:63, 1984.
- [12] Simon, R. et al.: *Proc. 8th. Northern American Rhizobium Conference* (Eds Clark, K., J. H. G. Stephens), University of Manitoba, Winnipeg, p.67, 1981.
- [13] Nayudu, M. and Rolfe, B. G.: *Mol. Gen. Genet.*, 206:326, 1987.
- [14] Chen, H. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 212:310, 1988.
- [15] Rolfe, B. G. et al.: *Plant Sci. Lett.*, 19:277, 1980.
- [16] Plazinski, J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48:1001, 1984.
- [17] Banfalvi, Z. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 189:129, 1983.
- [18] *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases* (Ed Berkeley, R. C. W. ), Academic Press, London, p.1, 1979.
- [19] Long, S. et al.: *J. Bacteriol.*, 170:4239, 1988.

## Isolation and Genetic Analysis of Exopolysaccharide-deficient Mutants of *Rhizobium astragalus*

Chen Hancal Long Beiguo Song Hongyu

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

Twenty exopolysaccharide (EPS)-deficient (Exo<sup>-</sup>) mutants were isolated after *Rhizobium astragalus* strain 109 was subjected to transposon Tn5 mutagenesis. These mutants had similar colony morphologies and their phenotype was not altered by growing on the media supplemented with different carbohydrates or different concentrations of carbohydrate. The EPS yields of the mutants were dramatically decreased which were about 0.5% to 36% of wild-type levels of EPS. None of the Exo<sup>-</sup> mutants were able to nodulate their host plant, *Astragalus sinicus*.

R-prime plasmids carrying regions of strain 109 coding for exopolysaccharide synthesis were isolated from plasmid PMN2, a kanamycin-sensitive derivative of plasmid R68.45. The R-primes were obtained from

matings between Tn5-induced Exo<sup>-</sup> mutants of strain 109 and *E. coli*, recipients by selecting for the kanamycin resistance marker of Tn5. It was shown that the regions inserted into the R-primes were identical with those DNA segments where Tn5 was located in the respective parental Exo<sup>-</sup> mutant. The R-primes were stable in strain 109 background. R-primes were able to complement the Exo<sup>-</sup> phenotype of most mutants. Complementation of these Exo<sup>-</sup> mutants did not restore their symbiotic abilities of effective nodulation. Strain 109 containing plasmid pMN2 or Tn5 was also unable to nodulate *A. sinicus*. The 20 Exo<sup>-</sup> mutants were classified into six distinct complementation groups based on complementation data. Five of the six *exo* loci were genetically linked.

#### Key words

*Rhizobium*; transposon mutagenesis; exopolysaccharide synthesis; genetic analysis