

豌豆根瘤菌共生基因 pJB5JI 与华癸中生根瘤菌 7653R 共生质粒的相互关系

杨成运^{1,2} 周俊初^{1*} 段广才² 张伟涛³

(1. 华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

(2. 河南省分子医学重点学科开放实验室 河南 郑州 450052)

(3. 中南林业科技大学 湖南 长沙 410004)

摘要: 华癸中生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*) 7653R 是分离自我国南方水稻田的一株根瘤菌, 含有 2 个内源质粒: p7653Ra 和 p7653Rb, 其中 7653Rb 是共生质粒。通过 Tn5-sacB 的插入方法来消除质粒, 获得 7653Rb 消除的突变株 7653RD。将豌豆根瘤菌 T83K3 的共生质粒 pJB5JI 导入 7653R 和 7653RD 中, 盆栽结果表明含有 pJB5JI 的转移接合子 7653R-197 的竞争结瘤能力和共生固氮能力均高于 7653R。pJB5JI 不能恢复 7653RD 在紫云英上的结瘤能力。含有 pJB5JI 的 7653RD 可以在豌豆上结无效瘤, 表明 pJB5JI 可以在 7653R 的染色体背景下表达其功能。对转移接合子中的质粒稳定性进行检测, 结果表明 pJB5JI 在人工传代的情况下可以稳定存在, 但经过共生之后发生了遗传分离, 对转移接合子和出发菌株及分离菌株进行 *kan* 基因的 PCR 扩增, 除了受体菌外其他菌株都可得到 PCR 产物, 由此推测, pJB5JI 可能部分或全部整合到了受体菌的染色体基因组中。
关键词: 共生质粒, 华癸中生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*), pJB5JI, 质粒转移

The Interaction Between the Symbiotic Genes pJB5JI of *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Viciae* and the Symbiotic Plasmid of *Mesorhizobium huakuii* 7653R

YANG Cheng-Yun^{1,2} ZHOU Jun-Chu^{1*} DUAN Guang-Cai² ZHANG Wei-Tao³

(1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. Henan Key Laboratory of Molecular Medicine, Zhengzhou, Henan 450052, China)

(3. Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: *Mesorhizobium huakuii* strain 7653R, isolated from nodules of *A. sinicus* L, contains two indigenous plasmids, p7653Ra and p7653Rb, the latter being the symbiotic plasmid. We eliminated the plasmids via Tn5-sacB insertion and obtained its symbiotic plasmid-cured derivative 7653RD. Then, we transferred the symbiotic plasmid pJB5JI of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* T83K3 into 7653R and 7653RD. The pot plant test showed an increase in competitive ability and symbiotic nitrogen fixation of transconjugant 7653R-197 (pJB5JI) compared to 7653R. pJB5JI could not restore the ability of 7653RD to nodulate *Astra-*

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30470065); 科技部微生物学资源课题(No. 2005DKA21208-6)

* 通讯作者: Tel: 86-27-87281685; Fax: 86-27-87280670 ✉: junchuzhou@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-23; 接受日期: 2009-06-26

galus sinicus. 7653RD (pJB5JI) could form ineffective nodules on peas, implying that the symbiotic plasmid pJB5JI could express its function at the chromosomal background of *Mesorhizobium huakuii* 7653R. We checked the stability of plasmid in transconjugants under free-living and during symbiosis. The results indicated pJB5JI could not be detected in some nodule isolates. We amplified *kan* resistance gene from all transconjugants and nodule isolates which suggested that pJB5JI might fully or partially integrated into the chromosome of recipients.

Keywords: Symbiotic plasmid, *Mesorhizobium huakuii*, pJB5JI, Plasmid transfer

根瘤菌(*Rhizobia*)是一类可以和豆科植物形成共生关系的革兰氏阴性细菌。共生关系的建立依赖于信号分子和受体蛋白的一系列相互作用。在共生过程中豆科植物产生类黄酮,根瘤菌则由结瘤基因编码产生结瘤因子。根瘤菌中的结瘤基因包括 *nod*、*nol* 和 *noe*, 这些基因定位在共生质粒或染色体中的共生岛上。

质粒是根瘤菌基因组的重要组成部分,在根瘤菌的多样化和重组中起着重要的作用。有大量的证据表明根瘤菌的共生质粒或共生岛可在不同种或属之间进行转移,比如 NGR234 的共生质粒的转移。质粒的转移可以提高豌豆根瘤菌的结瘤或固氮能力^[1]。pJB5JI 是豌豆根瘤菌的共生质粒,大小为 200 kb,将其导入不结瘤的豌豆根瘤菌中,可使受体菌获得在豌豆上结瘤的能力。

华葵中生根瘤菌 7653R 是从紫云英根瘤上分离而来,只能在紫云英上结瘤。紫云英是我国长江流域及南方的一种重要的稻田绿肥。本实验研究了 pJB5JI 和 7653R 内源质粒的相互关系,同时也研究了 pJB5JI 在华葵中生根瘤菌中的稳定性。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

本研究中所用的菌株和质粒见表 1。大肠杆菌采用 LB 培养基, 37°C 培养; 根瘤菌, TY 或 YMA 培养基, 28°C 培养。抗生素的使用浓度如下: 壮观霉素 (Spe) 50 µg/mL, 卡那霉素(Km) 50 µg/mL, 四环素 (Tc) 10 µg/mL。

1.2 质粒图谱和稳定性实验

根瘤菌质粒的快速检测采用经修改的 Eckhardt 法^[3]。质粒稳定性的实验采用 Miao 等^[4]的方法。

1.3 质粒消除

采用两亲本接合转移的方法, 受体菌为 7653R, 供体菌为含有质粒 pMH1701 的大肠杆菌 S17-1, 其

表 1 供试菌株和质粒 Table 1 Bacterial strains and plasmids tested in this study		
菌株和质粒 Strain and plasmid	相关性状 Relevant characteristics	来源及文献 Reference or source
华葵中生根瘤菌 <i>Mesorhizobium huakuii</i>		
7653R	含有质粒 p7653Ra 和 p7653Rb, Nod ⁺ , Fix ⁺	本室保存
7653RD	消除了质粒 p7653Rb, Nod ⁻ , Fix ⁻	本研究
7653R(pRK404)	Tc ^r	本研究
7653RD(pRK404)	Tc ^r	本研究
7653R-15	Km ^r	本研究
7653R-197	Km ^r	本研究
7653RD-5	Km ^r	本研究
7653RD-35	Km ^r	本研究
豌豆根瘤菌 <i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viceae</i>		
T83K3	含有共生质粒 pJB5JI, Str ^r , Km ^r	本室保存
大肠杆菌 <i>E. coli</i>		
S17-1	含有质粒 pMH1701	Hynes <i>et al.</i> ^[2]
MM294	含有质粒 pRK2073	本室保存
质粒 Plasmids		
pMH1701	携带 Tn5- <i>mob</i> - <i>SacB</i>	Hynes <i>et al.</i> ^[2]
pRK2073	辅助质粒, Spe ^r , Tra ⁺	本室保存
pRK404	Tc ^r	本室保存

中质粒 pMH1701 携带有 Tn5-*mob*-*SacB*。用含有 Km 的 SM 平板来筛选转移接合子。质粒消除实验利用蔗糖敏感基因 *sacB* 对蔗糖的敏感性来进行^[2]。用 TY 液体培养基将得到的转移接合子培养至对数期并涂布于加 7%蔗糖的 TY 平板, 首先在 37°C 培养 2 d, 然后转入 28°C 培养 4 d~5 d。每一菌株各挑取 10 个单菌落分别点种于 TY 和 TY+Km 平板, 28°C 培养后, 选取失去 Km 抗性的菌落做质粒检测, 确证是否有质粒被消除。

1.4 共生质粒的接合转移和转移频率的测定

在本实验中, 共生质粒的接合转移均采用滤膜杂交法。将处于对数生长期的供体菌、受体菌及三亲杂交中的辅助菌等比例混合离心, 收集菌体悬浮于 80 μ L TY 液体中, 滴加于 TY 平板上的灭菌微孔滤膜上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后, 用 2 mL 无菌水将滤膜上的菌体制成菌悬液, 做 10 倍系列稀释, 分别涂布加有不同抗生素的选择性平板。

在向 *M. huakuii* 7653R 及其衍生菌中导入共生质粒 pJB5JI 时, 由于他们没有选择性标记, 为便于选择转移接合子, 我们先通过三亲接合转移将质粒 pRK404 导入受体菌, 使其具有 Tc^r 标记, 以便在随后的杂交中淘汰供体菌 T83K3。pRK404 质粒具有在大多数革兰氏阴性菌中复制的能力, 但在根瘤菌中, 在无选择压力的条件下很容易丢失^[5]。因此含有 pRK404 质粒的受体菌在杂交前一直在含有 Tc 的培养基上培养, 杂交后的转移接合子则在不含 Tc 的培养基上培养, 经转接 2 次, 即可选择到 Tc^s 单菌落, 从而淘汰了 pRK404。

为了计算接合转移中供体菌和受体菌的细胞数目, 将接合转移的混合液进行系列稀释涂在含有 Km(供体菌)或 Tc(受体菌)的 SM 平板上, 这样就可以计算出每一接合转移中供体菌的数目及其所占的比例, 质粒转移的频率以供体菌来表示。

1.5 植物结瘤实验和竞争结瘤实验

采用本研究室改进的双层钵法进行植物栽培。用带有纱布条的塑料杯内盛砂适量, 套在盛有 Fahraeus 无氮植物营养液的玻璃瓶内^[6], 砂钵能通过纱布条均匀吸收营养液以保持湿度。选择大小均一饱满的种子(豌豆、紫云英), 先用 95%乙醇浸泡 5 min, 再用 2%的次氯酸钠处理 10 min, 用无菌水洗涤 6~10 次后在无菌水中浸泡至种子发胀, 豌豆置于 28 $^{\circ}$ C 温箱中, 紫云英放在无菌琼脂平板上倒置于光照培养箱中, 待种子出芽后即可播种。豌豆每瓶种 1 株, 紫云英每钵 4 株。播种 3 d 后于根系接种 1 mL 根瘤菌菌悬液, 接种量约为 10⁸ CFU/株, 豌豆和紫云英于光照培养箱中培养, 每天光照 18 h, 强度 4500 lux~6000 lux, 白天温度 22 $^{\circ}$ C, 晚上 20 $^{\circ}$ C, 35 d~40 d 后观察结瘤情况, 并测定植株干重、根瘤数、根瘤鲜重和固氮酶活等指标。

取供试菌株与标记参比菌株的培养液按 1:1 的

体积比混合后接种盆栽植物, 每株接 1 mL 菌液, 同时测定各菌液的活菌数, 用于计算各菌株组合中参比菌株所占的菌数百分比, 盆栽植株于光照室生长 35 d~40 d 左右, 收集 50 个根瘤用于测定标记参比菌株的占瘤率。

1.6 *kan* 基因的 PCR 扩增

从根瘤菌基因组 DNA 中扩增 *kan* 基因, 片段长度大约为 700 bp, 引物序列如下: 5'-TCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAAT-3'和 5'-AGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAG-3'。

2 结果

2.1 华癸中生根瘤菌 7653R 质粒缺失菌株的获得和稳定性的测定

7653R 含有 2 个内源质粒 p7653Ra 和 p7653Rb, 质粒快检结果见图 1。从含有卡那霉素的 SM 平板上筛选出质粒上插入 Tn5-*sacB* 的转座子, 将质粒被标记的突变株涂在含有 7%蔗糖的 TY 平板上, 筛选丧失了 Km 抗性的突变株, 再通过琼脂糖凝胶电泳检测, 获得消除了 p7653Rb 的突变株, 命名为 7653RD(图 1)。对突变株 7653RD 进行了质粒稳定性测定, 结果表明 7653RD 的质粒图谱非常稳定。

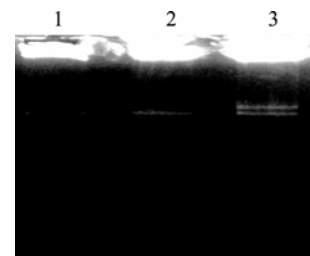


图 1 7653R 和突变株 7653RD 的质粒图谱

Fig. 1 Plasmid profiles of *M. huakuii* 7653R and its plasmid cured derivative.

Note: 1, 2: 7653RD; 3: 7653R.

2.2 pJB5JI 的转移和转移接合子的鉴定

由于供体菌 T83K3 和受体菌 7653R 均具有相同的抗性, 缺少选择标记, 因此先将具有四环素标记的能自主转移的质粒 pRK404 通过三亲本结合转移转进 7653R 及 7653RD 中, 使受体菌具有了四环素的抗性标记, 受体菌在进行共生质粒转移之前一直在具有四环素的抗性平板上培养, 在含有 Km 和 Tc 两种抗生素的 SM 平板上筛选 pJB5JI 转移的接合子, 转移频率见表 2。

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

表 2 pJB5JI 向 7653R 和 7653RD 转移的频率
Table 2 Conjugation frequency of pJB5JI transferring into 7653R and 7653RD

菌株 Strain	转移频率 Conjugation frequency
7653R	9.56×10^{-4}
7653RD	8.67×10^{-4}

对转移接合子进行质粒检测, 结果见图 2, 华癭中生根瘤菌 7653R 具有 2 个大质粒, 与 7653R 的质粒图谱(图 2 中 4)相比, 转移接合子具有不同的质粒图谱(图 2 中 2 和 3)。7653R 和 7653RD 的转移接合子具有两种不同的类型(图 2)。第 1 种类型是 7653R-197 和 7653RD-35, 所含的外源质粒的大小和 pJB5JI 的大小相当(图 2 中 2 和 5); 第 2 类是 7653R-15 和 7653RD-5, 所含有的外源质粒的小于 pJB5JI(图 2 中 3 和 6)。

将纯化的转移接合子在不含任何抗生素的 YMA 培养基上连续转接 3 次, 经系列稀释后, 涂 YMA 平板, 将得到的单菌落随机挑取 50 个同时点种在 YMA + Km 平板和 YMA + Tc 平板上, 结果表明

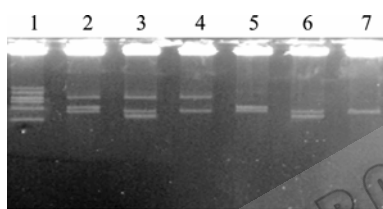


图 2 7653R 和 7653RD 转移接合子(pJB5JI)的质粒图谱
Fig. 2 Plasmid profiles of the transconjugants for the recipient of 7653R and 7653RD originated from the transfer of plasmid pJB5JI

Note: 1: T83K3; 2: 7653R-197; 3: 7653R-15; 4: 7653R; 5: 7653RD-35; 6: 7653RD-5; 7: 7653RD.

所有的单菌落都具有 Km 抗性, 而失去了 Tc 抗性, 随机挑选 10 个单菌落进行质粒检测, 发现他们均含有 pJB5JI, 以上结果说明在人工传代过程中 pJB5JI 在受体菌中能够稳定存在。

2.3 转移接合子的共生特性和共生状态下的稳定性

同时在紫云英和豌豆两种植物上对转移接合子进行了共生效应的测定, 与 7653R 相比, 7653R-15 的结瘤固氮能力没有明显的差异, 但 7653R-197 所结根瘤的固氮酶活与 7653R 所结根瘤的固氮酶活相比增加了 38.2%(表 3), 植株的干重也增加了 69.6%。接合子 7653RD-5 和 7653RD-35 均不能在紫云英上结瘤, 说明 pJB5JI 的导入并不能恢复 7653RD 在紫云英上的结瘤能力。除了 7653RD-35 所有的转移接合子都不能在豌豆上结瘤, 7653RD-35 可以在豌豆上结很少的白色无效瘤。

本试验对转移接合子在共生关系中的稳定性也进行了检测, 将 7653R 和 7653RD 的转移接合子在紫云英和豌豆上所结的根瘤进行表面灭菌, 压碎稀释涂布 YMA 平板, 随机挑选 100 个单菌落, 同时点种在 YMA 和 YMA + Km 平板上, 结果表明所有的单菌落都具有卡那霉素的抗性, 随机挑选出 5 个做质粒检测, 结果发现在 7653R-197、7653R-15 和 7653RD-35 所结根瘤的分离菌株中分别有 2、1 和 3 个可以检测到外源质粒的存在(图 3)。可见经过与植物共生之后, 外源质粒 pJB5JI 在受体菌中表现出不稳定的遗传特性。

2.4 竞争结瘤能力的测定

为了检测 pJB5JI 对受体菌竞争结瘤能力的影响, 对 2 组根瘤菌 7653R 和 7653R-197、7653R 和 7653R-15 分别以 1:1 的比例混合接种紫云英, 从所

表 3 7653R 及其转移接合子共生效应的测定^a
Table 3 Symbiotic phenotype of 7653R and its transconjugants^a

菌株 Strains	瘤数(个/株) Nodule number (per plant)	植株干重(克/株) Shoot dry weight (g/plant)	鲜瘤重(克/株) Nodule fresh weight (g/plant)	固氮酶活(nmol 乙烯/株/h) Acetylene reduction activity (nmol of ethylene/plant/h)
Control	0	0.006 ± 0.003a	0	0
7653R	18.333 ± 3.215b	0.038 ± 0.006b	0.027 ± 0.008b	228.567 ± 64.279b
7653R-15	14.333 ± 1.155b	0.042 ± 0.002b	0.017 ± 0.005b	165.733 ± 22.477b
7653R-197	21.333 ± 6.658b	0.065 ± 0.003c	0.038 ± 0.006c	315.767 ± 54.989c
Control	0	0.006 ± 0.003a	0	0

注: a: 3 个重复, 相同字母表示没有差异, 不同字母表示差异极显著, $P = 0.05$.

Note: a: Data are $\bar{x} \pm s$ from three replicate tests. Data in the same letter marked with the same above were not significantly different according to Duncan's multiple range test, $P = 0.05$.

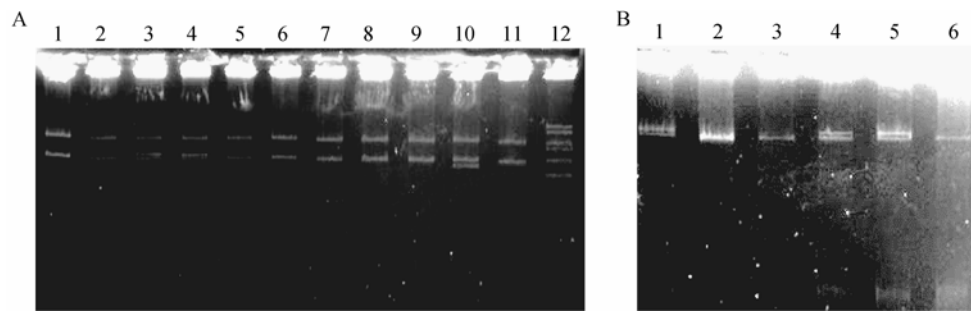


图 3 7653R-15 和 7653R-197 紫云英根瘤及 7653RD-35 豌豆根瘤分离物的质粒检测

Fig. 3 Plasmid profiles of nodules isolates from 7653R-15 and 7653R-197 on *A. sinicus* and 7653RD-35 on peas

注: A: 1~5: 7653R-197 的根瘤分离物; 6~10: 7653R-15 的根瘤分离物; 10: 7653R; 12: T83K3. B: 1~5: 7653RD-35 的根瘤分离物; 6: 7653RD.

Note: A: 1~5: Isolates from 7653R-197; 6~10: Isolates from 7653R-15; 11: 7653R; 12: T83K3. B: 1~5: Isolates from 7653RD-35; 6: 7653RD.

结的根瘤中随机挑选 50 个, 压碎汁同时涂 YMA 平板和 YMA + Km 平板, 7653R 和 7653R-197 组合中, 有 35 个根瘤中分离出具有卡那霉素抗性的菌株, 而 7653R 和 7653R-15 组合中只有 6 个根瘤中分离出了卡那抗性的菌株, 由上述的数据分析可以得出 7653R-197 和 7653R-15 的占瘤率分别为 70% 和 12%。说明 7653R-197 的竞争结瘤能力显著高于 7653R, 而 7653R-15 的占瘤率低于 7653R。

2.5 *kan* 基因的鉴定

kan 基因位于质粒 pJB5JI 上, 从 7653R、T83K3 和他们的衍生菌的总 DNA 中扩增 *kan* 基因, 结果从 T83K3、转移接合子和所有的根瘤分离物的总 DNA 中扩增到了 *kan* 基因, 而从 7653R 和 7653RD 中没有扩增到 *kan* 基因(图 4), 其中 7653R 和 7653RD 的

卡那霉素抗性的自发突变率小于 10^{-9} , 这说明所有转移接合子中的 *kan* 基因确实都来自供体菌 T83K3。

3 讨论

据前人报道将 *R. leuminosarum* 的共生质粒导入 *R. trifolii*^[7] 和 *R. phaseoli*^[8] 中可以使转移接合子获得在豌豆上结瘤的能力, 但将其导入 *R. meliloti*^[9]、*Agrobacterium*^[9] 和快生根瘤菌^[10] 中却不能使受体菌获得在豌豆上的结瘤能力。我们得到的转移接合子只有 7653RD-35 可以在豌豆上结白色的无效瘤, 其它的接合子都不能结瘤, 对于 7653R-197 来说可能是两个共生质粒互相干扰的结果, 以前曾有类似的报道。对于 7653RD-5 来说可能是因为其中的 pJB5JI 不完整, 曾有报道称 pJB5JI 在转移的过程中

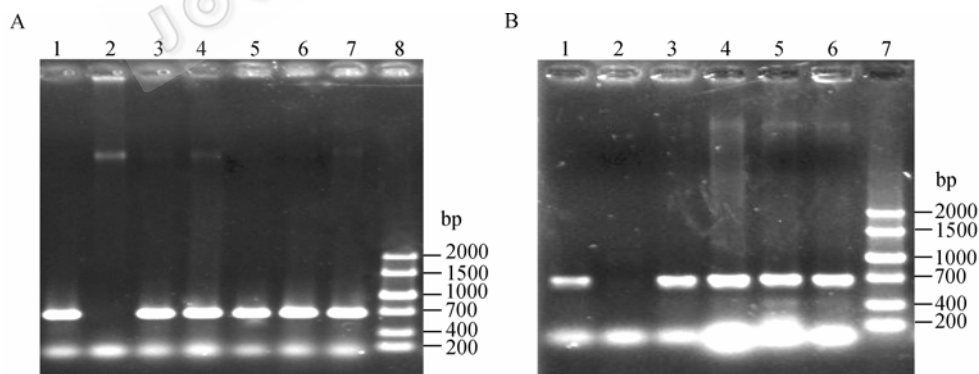


图 4 *kan* 基因的扩增图谱

Fig. 4 PCR products of *kan* gene amplified

注: A: 1: T83K3; 2: 7653R; 3: 7653R-15; 4: 7653R-197; 5: 7653R-15 紫云英根瘤的分离物(未检测到 pJB5JI); 6~7: 7653R-197 紫云英根瘤的分离物(未检测到 pJB5JI); 8: Marker V. B: 1: T83K3; 2: 7653RD; 3: 7653RD-5; 4: 7653RD-35; 5~6: 7653RD-35 豌豆根瘤的分离物(未检测到 pJB5JI); 7: Marker V.

Note: A: 1: T83K3; 2: 7653R; 3: 7653R-15; 4: 7653R-197; 5: isolates in which pJB5JI was not detected from the nodules formed by 7653R-15 on *A. sinicus*; 6~7: isolates in which pJB5JI was not detected from the nodules formed by 7653R-197 on *A. sinicus*. 8: Marker V. B: 1: T83K3; 2: 7653RD; 3: 7653RD-5; 4: 7653RD-35; 5~6: Isolates in which pJB5JI was not detected from the nodules formed by 7653RD-35 on peas; 8: Marker V.

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

会丢失一个小的片段,而这个小片段与在豌豆上结瘤的性状有关^[11]。对于 7653R-15 来说两种原因可能都存在。共生质粒 pJB5JI 可以在 *M. huakuii* 的遗传背景下表达其在豌豆上结瘤的功能,说明 *M. huakuii* 的共生固氮系统与其它根瘤菌有着显著的差异。

Johnston 等人^[12]报道将 pJB5JI 导入到不同中的根瘤菌中,所得到的转移接合子保留了在其原宿主上结瘤的能力,但所结的根瘤数少,并且延迟了结瘤的时间。Martinez-Romero 和 Monica^[13]将 CFN42 的质粒导入到 *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* I 型菌株中,所获得的接合子的结瘤效率和竞争结瘤能力显著高于出发菌株。本研究的结果也显示 7653R-197 的固氮能力和竞争结瘤能力均显著高于出发菌株,而 7653R-15 无论是固氮能力还是竞争结瘤能力都不及出发菌株。这说明转移接合子的固氮能力和竞争结瘤能力与 pJB5JI 和受体菌的染色体背景都有关系。此前也曾有将相同的共生质粒导入不同的受体菌中其竞争结瘤能力不同的报道^[14],也有报道称决定竞争结瘤能力的基因存在于 pJB5JI^[15],但是还不清楚竞争结瘤能力的遗传机制。

本研究还考察了转移接合子的稳定性,结果显示,所有的转移接合子在人工传代的条件下都很稳定,但经过与植物共生之后出现了遗传不稳定现象,即在某些根瘤分离物中检测不到外源质粒的存在,从这些分离株中可以扩增出 *kan* 基因,我们推测导入的外源质粒并没有丢失,而是全部或者部分整合到了受体菌的染色体基因组中。

参 考 文 献

- [1] DeJonj TM, Brewin NJ, Johnston AWB, *et al.* Improvement of symbiotic properties in *Rhizobium leguminosarum* by plasmid transfer. *J Gen Microbiol*, 1982, **128**: 1829–1838.
- [2] Hynes MF, Jurgens Q, O'Connell MP, *et al.* Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposon carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. *Gene*, 1989, **78**: 111–120.
- [3] Eckhardt T. A rapid method for the identification of

plasmids deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1978, **1**: 584–588.

- [4] Miao LH, Zhou K, Zhou JC, *et al.* Apparent incompatibility of plasmid pSfrYC4b of *Sinorhizobium fredii* with two different plasmids in another strain. *Arch Microbiol*, 2005, **183**: 359–367.
- [5] Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E. Plasmids related to the broad host range vector. pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid*, 1985, **13**: 149–193.
- [6] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002, pp.208–210.
- [7] Wang CL, Beringer JE, Hirsch PR. Host plant effects on hybrids of *Rhizobium leguminosarum* biovars *viceae* and *trifolii*. *J Gen Microbiol*, 1986, **132**: 2063–2070.
- [8] Beynon JL, Beringer JE, Johnston AWB. Plasmids and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J Gen Microbiol*, 1980, **120**: 421–429.
- [9] Djordjevic MA, Zurkowski W, Shine J, *et al.* Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum*, and *R. meliloti*. *J Bacteriol*, 1983, **156**: 1035–1045.
- [10] Michael J. Differential expression of the pea symbiotic plasmid pJB5JI in genetically dissimilar backgrounds. *Symbiosis*, 1985, **1**: 125–138.
- [11] Christensen AH, Schubertt KR. Identification of a *Rhizobium trifolii* plasmid coding for nitrogen fixation and nodulation genes and its interaction with pJB5JI, a *Rhizobium leguminosarum* plasmid. *J Bacteriol*, 1983, **11**: 592–599.
- [12] Johnston AWB, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, *et al.* High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature (London)*, 1978, **276**: 635–636.
- [13] Martinez-Romero E, Monica R. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **8**: 2384–2388.
- [14] Brewin NJ, Wood EA, Young JPW. Contribution of the symbiotic plasmid to the competitiveness of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol*, 1983, **129**: 2973–2977.
- [15] Yost CK, Rochepeau P, Hynes MF. *Rhizobium leguminosarum* contains a group of genes that appear to code for methyl-accepting chemotaxis proteins. *Microbiology*, 1998, **144**: 1945–1956.