

## 菜豆根瘤菌 sym和mel 基因在农杆菌中的转移和表达

王常霖\* 陈华癸

(华中农业大学土化系, 武汉)

菜豆根瘤菌 (*Rhizobium phaseoli*) 共生质粒 pSYM3622 具有诱导宿主植物 (*Phaseolus vulgaris* cv. "Jamapa") 结瘤固氮的有效基因, 以及菜豆根瘤菌特征性的产黑素基因 (Melanin production gene)。在诱动因子 RP4 的存在下, 共生质粒能够有效地向三叶草根瘤菌和农杆菌转移。种间和属间杂交子都能诱导菜豆植物形成无效根瘤, 并且具备在特定培养基上产生黑素的能力。pSYM3622 在三叶草根瘤菌菌株 RCR226 中具有明显的不亲和性; 但是在农杆菌杂交子中, 这些结瘤和产生黑素的特征在植物根瘤分离菌中能够稳定地保持下去。试验同时研究了 pSYM3622 向假单胞菌和大肠杆菌的诱动转移。

**关键词** 共生质粒转移; 农杆菌; 结瘤; 产生黑素

根瘤菌与豆科植物共生有着较为严格的宿主专一性。但是, 通过对共生质粒在根瘤菌种间杂交转移能够打破这种专性关系, 使杂交子具备有诱导非种族内宿主植物形成根瘤的能力<sup>[1-3]</sup>。比如, 在结瘤缺陷型 (Nod<sup>-</sup>) 菜豆根瘤菌 J18400 中导入豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*) 共生质粒 pRL1 J1, 杂交子能够在豌豆植物上形成无效根瘤<sup>[2]</sup>; 而在野生型 (Nod<sup>+</sup>) 三叶草根瘤菌 (*R. trifolii*) 中导入豌豆根瘤菌共生质粒 pJB5J1, 杂交子在三叶草和豌豆两种植物上都能诱导产生根瘤<sup>[4,5]</sup>。但是, 更有效的共生基因表达范围的研究是把共生质粒转到根瘤菌属以外的一些其它细菌中, 以消除与共生过程相关的一切遗传背景。比如, 将苜蓿根瘤菌 (*R. meliloti*) 共生基因导入农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 以及大肠杆菌 (*E. coli*) 中并给予表达<sup>[3,6,7]</sup>。最近, Plazinski 和 Rolfe<sup>[8]</sup> 将三叶草根瘤菌的共生基因转入到 *Lignobacter* 和 *Pseudomonas* 中, 用这些杂交子接种三叶草植物, 只能诱导根毛畸形, 但不能形成正常的根瘤形

状。

本文报道菜豆根瘤菌共生大质粒 pSYM3622 (MW285kb) 在三叶草根瘤菌以及三种表型不同的农杆菌菌株中的表达范围, 同时对 pSYM3622 向假单胞菌和大肠杆菌的诱动转移也作了初步研究。

### 材料与方 法

#### (一) 细菌菌株和杂交子的获得

细菌菌株和质粒见表 1。根瘤菌培养基采用 TY<sup>[12]</sup>, 农杆菌和其他细菌的培养基采用 ONA [Oxoid Nutrient Broth Powder 1.3% (W/V), Agar 1.5% (W/V)]。细菌的生物膜杂交是在 TY 平板上进行的。由无菌水制取的受体和供体菌悬液中各取 0.1ml 在生物膜上混匀并置于无菌操作柜中风干, 然后倒置于 28°C 中

本文于 1987 年 8 月 2 日收到。

本研究由国家“七五”攻关项目植物基因工程资助。

本校植物组王灶安教授帮助拍摄植物根瘤照片, 特此致谢。

\* 现在通讯地址是中国科学院上海植物生理所。

表 1 细菌菌株和质粒  
Table 1 Bacterial strains and plasmid

菌 株 Strains	有 关 特 征 及 质 粒 Relevant characteristics and plasmid	来 源 Reference
<i>Rhizobium phaseoli</i> 3622-15	sym plasmid pSYM <sub>3622</sub> marked with Tn5-Mob, Km <sup>r</sup> , mobilizing plasmid RP4-4 Tc <sup>r</sup>	[1]
<i>R. trifolii</i> RCR226	wild type	Rothamsted collection
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GM19023	derivative of C58C <sub>1</sub> cured of both pAtC <sub>58</sub> and pTiC <sub>58</sub> , a plasmid-free strain, Sm <sup>r</sup> , Rif <sup>r</sup>	[9]
UBAPF <sub>2</sub>	derivative of LBA <sub>275</sub> cured of both pAtC <sub>58</sub> and pTiC <sub>58</sub> , Rif <sup>r</sup>	[10]
UBAT <sub>1</sub>	derivative of LBA <sub>275</sub> cured of pAtC <sub>58</sub>	[10]
<i>E. coli</i> J5-3	pro, met, nal <sup>r</sup>	[11]
<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 10007		Stanier et al., (1966)
<i>P. fluorescens</i> NCIB10527		Ibid

培养过夜。菌体用无菌水从生物膜上洗下来,用适当稀释度在 ONA 添加卡那霉素 (50 $\mu$ g/ml) 的平板上涂皿。杂交子经过对形成菌落的分离纯化,并通过质粒电泳胶验证后获得。

## (二) 细菌的生物学检测技术

快速琼脂糖凝胶电泳,分子原位杂交以及细菌产生黑素的鉴定均按文献[1]的方法。

## (三) 植物接种方法

接种三叶草植物的无菌培养同以前描述的方法<sup>[16]</sup>。接种菜豆植物的无菌培养是采用双层塑料沙钵和蛭石培养体,在 Fahreaus<sup>[13]</sup>培养液中培养。开口的塑料沙钵用双层牛皮纸封闭,并留下对剪约 1 cm 的十字小孔让植物幼苗伸出,然后用胶带封闭,置于 22 $^{\circ}$ C 灯光室中生长

(16/8: 明/暗)。根瘤在 4—5 周内形成。从根瘤中分离根瘤菌按常规方法在 YMA 刚果红平板上划线获得。

## (四) 光学显微镜检查

根瘤形态使用植物解剖镜,根毛检查用相差光学显微镜按常规方法拍摄。

## 结 果

### (一) 菜豆根瘤菌共生质粒向三叶草根瘤菌转移

在菜豆根瘤菌菌株 RCR3622 中至少含有 4 个分子量大小不等的质粒。采用转座子 Tn5-Mob 诱变技术,两个分子量较小的质粒受到标记并转出该诱变菌株,将其中的一个质粒 (pSYM3622) 导入结瘤缺陷型 (Nod<sup>-</sup>) 的菜豆根瘤菌菌株 J18400

中,能够恢复其亲本菌株的  $\text{Nod}^+ \text{Fix}^+ \text{Mel}^+$  特征。对菌株3622-15作  $37^\circ\text{C}$  热处理诱变,发现该质粒的消除或缺失与诱导寄主植物结瘤能力的丧失是一致的<sup>[1]</sup>。在DNA分子同源杂交试验中, $^{32}\text{P}$  标记的 *nifHDK* (*Klebsiella*) 能够对该质粒进行标记(王常霖,私人通讯)。可以认为,质粒 pSYM3622 载有结瘤基因 (*nod*)、固氮酶结构基因 (*nif*) 以及产黑素(*mel*) 的全部有效基因。同时,由于转座子 *Tn5-Mob* 插入所赋予质粒的卡那霉素抗性和诱动转移特征,使菌株 3622-15成为共生基因研究中有效的供体菌株之一。

在向三叶草根瘤菌菌株 RCR226 诱动转移试验中, pSYM3622 以  $10^{-5}$  频率导入受体菌株。在杂交子 RCR226(pSYM3622) 琼脂糖凝胶电泳检测中,可见到相应于 pSYM3622 质粒带的存在,把这些分离菌同时用来接种三叶草 (*Trifolium repens*, *T. pratense*, *T. subterraneans*) 和菜豆四种植物,杂交子不但保持诱导三叶草寄主植物结瘤固氮的原有特性,同时诱导菜豆植物形成无效根瘤。在含有卡那霉素平板上检查来自不同植物的根瘤分离菌的抗药性时,发现有90%的三叶草根瘤分离菌都丧失了卡那霉素抗性能力 ( $\text{Km}^+$ )。其中白三叶,红三叶和地三叶的  $\text{Km}^+$  百分比分别为 95%, 95% 和 57%, ( $\text{Km}^+$  菌落数/实际测试菌落数各为 203/214, 57/60 和 27/47, 每个根瘤分离平板中挑两个菌落)。琼脂糖凝胶电泳进一步证实,在这些菌株中,菜豆根瘤菌共生质粒 pSYM3622 已经丢失(见图版 I-A)。从菜豆根瘤中获得的所有分离菌依然保持卡那霉素抗性。将这些依旧载有 pSYM3622 质粒的根瘤分离菌按同样的方法在4种植物上做两次接种试验,得到与第一次回接试验类似的结果。

为了检查载有 pSYM3622 杂交子在实验室培养条件下的稳定性,将6株杂交子接连4周在不含  $\text{Km}$  抗性的富养平板上培养。把这些培养菌制成菌悬液后涂皿得到的单菌落,在含卡那霉素的平板上复制,发现约10%的菌落在实验室培养条件下也丧失  $\text{Km}$  抗性。虽然,在试验中还没有发现三叶草根瘤菌内源质粒的丢失现象(由于选择是以卡那霉素抗性为基础的),但可以认为,菜豆根瘤菌的共生质粒 pSYM3622 与三叶草根瘤菌 RCR226 中的某内源质粒同属于一个质粒不相容组。有关与三叶草根瘤菌质粒不相容性的详细材料将另文讨论。

## (二) 菜豆根瘤菌共生质粒向农杆菌的转移

为了排除 Ti-DNA 诱导双子叶植物形成的肿瘤对共生基因诱导根瘤形成结果的干扰,在这个试验中,受体菌株选用了三株具有不同表型的农杆菌。GMI9023 是消除了 pAtC58 和 pTiC58 的无质粒菌株; UBAPP2 也是无质粒菌株,但是,与 Hynes 等<sup>[10]</sup> 报道有所不同的是在本试验中,总能看到一条分子量很大的巨型质粒带 ( $>1000\text{kb}$ ) 的存在,另一个菌株是保留有 Ti 质粒的菌株 UBATi1。采用与根瘤菌类似的杂交转移方法, pSYM3622 能够很容易转入这些农杆菌菌株中,诱动转移的频率均在  $10^{-4}$  左右。从每一杂交组合中挑选5个菌落,在相同培养条件下分离纯化,然后用琼脂糖凝胶电泳检测。导入质粒 pSYM3622 在所有的杂交子中清晰可辨(见图版 I-B),初步证明共生基因已经转入农杆菌中。

将上述杂交子分别用来接种菜豆寄主植物。在4—5周后检查菜豆结瘤情况,发现含有 pSYM3622 的全部农杆菌杂交子均能诱导菜豆形成灰白色无效根瘤。这些

根瘤均小于由三叶草根瘤菌 RCR226 (pSYM3622) 形成的无效根瘤, 但具有

典型的根瘤形状 (见图 1), 与单纯农杆菌诱导的根部肿瘤明显不同。有趣的是尽

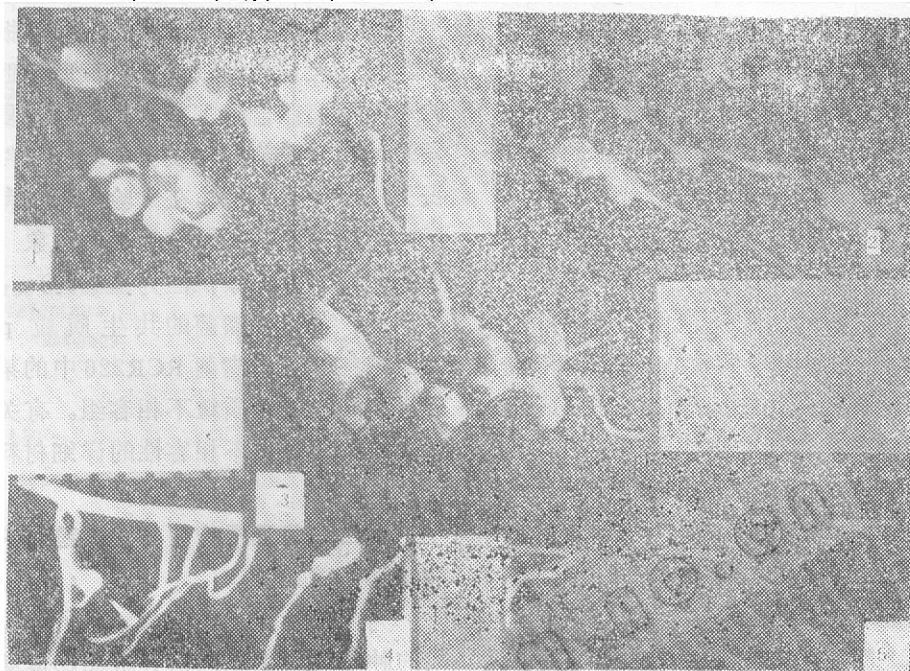


图 1 由三叶草根瘤菌杂交子和农杆菌杂交子感染菜豆形成的根瘤

Fig.1 Bean nodules induced by transconjugants of RCR226(pSYM3622) and GMI9023 (pSYM3622)

1. RCR226 (pSYM3622) 2. GMI9023 (pSYM3622) 3. control *R. phaseoli* 3622-15  
4. control *R. trifolii* RCR226 5. control *A. tumefaciens* GMI9023

管对照菌株GMI9023和UBAPF2 (消除Ti质粒的农杆菌) 不能诱导菜豆产生根瘤, 通过光学显微镜对这些处理中植物根系的检查, 发现根毛的形状呈“7”形 (见图版 I -C), 既不象未接种处理的正常根毛, 也不象根瘤菌侵染所引起的根毛弯曲。

为了证实这些根瘤的形成是由农杆菌杂交子诱导而不是由于根瘤菌污染造成, 通过对根瘤分离菌进行生长特征和抗药性标记的鉴定表明, 这些分离菌都具有在 ONA 平板上形成粗糙菌落和具有卡那霉素抗性的能力。并且, 用这些分离菌对菜豆植物作二次接种试验, 依然产生形状类似的根瘤。

比较三株不同质粒内容的农杆菌杂交子的植物结瘤试验结果, 在植物生长和根

瘤形态等方面, 三者之间没有明显差异。本试验没有用电镜对根瘤内部显微结构作分析。

### (三) 菜豆根瘤菌共生质粒 pSYM 3622 向假单胞菌和大肠杆菌的转移试验

在诱动共生质粒 pSYM3622 向假单胞菌菌株 *P. putida* NCIB10007 和 *P. fluorescens* NCIB10527 以及大肠杆菌 *E. coli* J5-3 的转移试验中, 卡那霉素抗性能够以  $10^{-6}$  左右向这些受体菌株转移, 这一频率比卡那霉素抗性的自发突变频率高 10—100 倍。但是, 在质粒电泳检测时, 除了在菌株 NCIB10007 杂交子中检测到 pSYM 3622 的存在外, 其余二个菌株没有发现相应于 pSYM3622 质粒带的存在。对这些杂交子的表型分析结果表明, 它们既不能在植物回接试验中诱导菜豆结瘤, 也不具备产

生黑素的能力（见表 2）。

表 2 产生黑素基因在不同寄主细胞间的表达范围

Table 2 Host range of melanin genes expression by introduction of plasmid pSYM3622

菌 株 Strains	在含酪氨酸的TY培养基上产生黑素的特征 Melanin characteristics on TY-tyrosine	
	亲本菌株 Parental strains	杂交子 Transconjugants
<i>Rhizobium phaseoli</i> Control RCR 3622 Jl8400	+	+
<i>R. leguminosarum</i> B151	-	+
<i>R. trifolii</i> RCR226	-	+
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GMI9023 UBAPE2 UBAT11	- - -	+ + +
<i>Pseudomonas putida</i> NCIB10007	-	-
<i>P. fluorescens</i> NCIB10527	-	-
<i>E. coli</i> 15-3	-	-

（四）mel 基因的表达范围

在根瘤菌科（*Rhizobiaceae*）中，绝大多数菜豆根瘤菌具备有产生黑素的特征。对于黑素生成的起因和生化研究还不很清楚，但遗传研究已经证实了产生黑素基因（mel）存在于nod和nif基因附近，而它的产物生成独立于共生基因的表达。尽管如此，利用mel、nod、nif 基因的连锁可用作鉴别共生基因存在的识别标记。因此，研究mel基因的表达范围，在根瘤菌分子生物学研究中具有一定的实用价值。

在本试验中，丢失共生质粒 pSYM3622 的三叶草根瘤菌分离菌株全部不具备产生黑素的能力（Mel<sup>-</sup>）。对 Mel<sup>-</sup> 突变株的筛选获得少数 Km<sup>r</sup>，Mel<sup>-</sup> 突变株仍保留诱导三叶草和菜豆宿主结瘤的能力（Nod<sup>+</sup>）。可以推断，这些Mel<sup>-</sup>突变株的形成可能是自发突变的结果。在琼脂糖凝胶电泳中，质粒 pSYM3622在这些自发突变的 Km<sup>r</sup> Nod<sup>+</sup> Mel<sup>-</sup>突变菌中遭受大片段 DNA 缺失，导致该质粒的前移（见图版 I -A，第10孔）。这一结果进一步证实，在pSYM3622质粒上的mel基因与nod基因毗邻，但独立于共生基因（sym）的表达。比较共生质粒 pSYM3622在不同细菌寄主中的表达范围（见表 2），发现除了根瘤菌以外，mel 基因还能够在不同的农杆菌菌株之间表达（见图 2）。

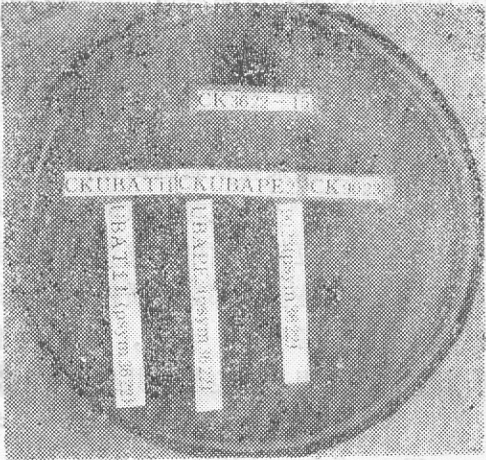


图 2. 农杆菌杂交子在平板上合成黑素  
Fig.2 Melanin production of *A. tumefaciens* introduced pSYM3622

讨 论

Beynon 等<sup>[14]</sup>曾经报道豌豆根瘤菌质粒在菜豆根瘤菌寄主细胞中的不亲和性。最近，Hooymaas 等<sup>[15]</sup>对三叶草根瘤菌

质粒在菜豆根瘤菌中的不稳定性也作了报道。这种外源质粒的不稳定性一般认为是由于寄主细胞中存在同一不相容组质粒所致。在本试验中, 10%的菜豆根瘤菌共生质粒在三叶草根瘤菌 RCR226 中自动丢失, 这种不稳定性在通过非种族内寄主植物的接种后加剧发生(90%丢失)。根据笔者早先<sup>[16]</sup>的研究, 寄主植物能赋予非种族内的共生质粒在功能上的不相容性。因此, 这种现象可能也是植物寄主在结瘤功能上的选择压力所致。

pSYM3622 同时能够导入农杆菌中并诱导菜豆宿主植物产生大量的无效根瘤。由根瘤中获得的分离菌仍保持农杆菌杂交子所具有的特征, 并重新侵染菜豆, 诱导形成根瘤组织。这一结果排除了根瘤的形成是由于根瘤菌污染造成的可能性。因此, 可认为质粒 pSYM3622 带有诱导菜豆形成根瘤的全部有效因子(包括 *nod* 和 *hcn* 基因), 这些因子全部能够在农杆菌寄主细胞中表达。

除了大多数菜豆根瘤菌菌株产生黑素外, Cubo 等<sup>[16]</sup>报道在少数豌豆, 三叶草和快生型大豆根瘤菌中也发现有产黑素基因, 并且这些基因都是由质粒携带。最近, 有些研究者<sup>[17,18]</sup>报道, 在菜豆根瘤菌中, 有两组基因控制着共生质粒 pRP

2J1 的黑素合成。一组是酪氨酸酶合成基因 *melA*, *melA*<sup>-</sup>突变子不合成黑素, 但不影响根瘤的有效固氮能力。对另一组突变株的研究表明, *melA* 的合成受 *nifA* 基因调控, *NifA*<sup>-</sup>突变子既不能合成黑素, 也不能固氮。并且在大肠杆菌中, *melA* 基因受肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella*) *nifA* 激活, 但必须有 *ntrC* 基因的存在。在我们的试验中, *mel* 基因在农杆菌中表达, 但是在假单胞菌和大肠杆菌中不能表达。Hawkins 等<sup>[17]</sup>研究表明 *melA* 基因在大肠杆菌中的表达是温度敏感型的。因此, 这些假单胞菌和大肠杆菌杂交子中的黑素不能合成, 可能也是受温度所制约。

在农杆菌杂交子中, *mel* 基因表达的时间通常比对照的菜豆根瘤菌要快得多。在相同条件下, 黑素在 3—4 天则明显可见, 而菜豆根瘤菌产生的黑素通常要在一周以后才能出现。我们认为这可能与农杆菌的生长周期短, 代谢旺盛有关。*mel* 基因的表达既然有助于共生基因在转移试验中对杂交子的检出, 设想将整接有目标基因的重组 *mel* 基因次级克隆接到 Ti 质粒上, 用构建新质粒来感染植物细胞, 采用黑素分析方法, 可以简单快速地检查细胞中目标基因的存在与否。

## 参 考 文 献

- [1] Wang, C.L. and Hirsch, P.R., *Acta Genet. Sinica*, 15(1), 25—33, 1988.
- [2] Johnston, A.W.B. et al., *Nature*, 276, 634—636, 1981.
- [3] Wong, C.H. et al., *J. Cell Biol.* 97, 787—794, 1983.
- [4] Christensen, A.H. et al., *J. Bacteriol.* 156, 592—599, 1983.
- [5] Wang, C.L. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 132, 2063—2070, 1986.
- [6] Hirsch, A.M. et al., *J. Bacteriol.*, 162, 1261—1269, 1984.
- [7] Truchet, G.C. et al., *J. Bacteriol.*, 157, 134—142, 1984.
- [8] Plazinski, J. and Rolfe, B.G., *J. Bacteriol.*, 162, 1261—1269, 1985.
- [9] Rosenberg, C. and Huguet, T., *Mol. Gen. Genet.*, 196, 533—536, 1984.
- [10] Hynes, M.F. et al., *Plasmid*, 13, 95—105, 1985.
- [11] Meynell, G.G., *Bacterial plasmids*, Macmillan, London, and Basingstoke, 1972.
- [12] Beringer, J.E., *J. Gen. Microbiol.*, 84, 188—198, 1974.
- [13] Fahraeus, G., *J. Gen. Microbiol.*, 16, 374—381, 1957.
- [14] Beynon, J.L. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 120, 421—429, 1980.

- [15] Hooykaas, P.J.J. et al., *Plasmid*, 14, 47—52, 1985.
- [16] Cubo, M.T. et al., Abstracts of the 7th international Symposium on Nitrogen Fixation, FRG, pp. 10—42, 1988.
- [17] Hawkins, F.K.L. and Johnston, A.W.B., Abstracts of the 7th International Symposium on Nitrogen Fixation, FRG, pp. 10—23, 1988.
- [18] Borthakar, D. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 207, 158—160, 1987.

## TRANSFER AND EXPRESSION OF BOTH SYM AND MEL GENES OF *RHIZOBIUM PHASEOLI* IN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Wang Changlin\* Chen Huakui

(Dept. of Soil Agrochemistry, Huazhong Agricultural University, Wuhan)

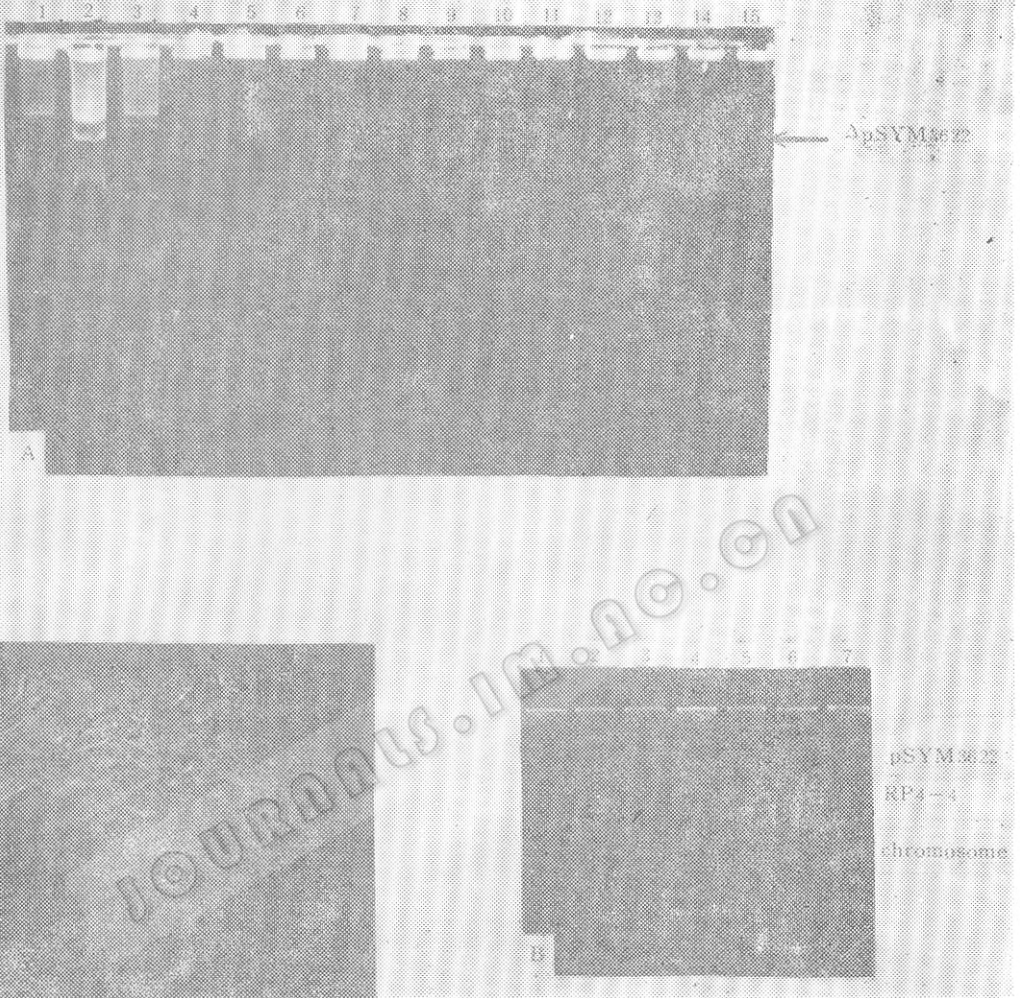
Plasmid pSYM3622 from *Rhizobium phaseoli* derivative 3622-15 carries effective nodulation and nitrogen fixation genes on *Phaseolus vulgaris* cv. "Jamapa" as well as melanin production genes. In the presence of the mobilizing factor RP4, the sym plasmid could be mobilized efficiently from *R. phaseoli* into *R. trifolii* and *Agrobacterium tumefaciens* strains. The resulted transconjugants not only induced ineffective nodules on *Phaseolus*, but also inherited the ability of melanin production. However, the sym plasmid pSYM3622 was not stably retained in the *R. trifolii* transconjugants RCR226 (pSYM3622). In the case of *A. tumefaciens* transconjugants, these characteristics could be retained stably in the nodule isolates. Study also showed the possibility to introduce pSYM3622 into *Pseudomonas* and *E. coli*, but all these transconjugants neither induced nodules on beans nor produced melanin.

### Key words

sym plasmid transfer; *Agrobacterium tumefaciens*; nodulation; melanin production

\* present address; Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica





图版 说明

A. 由杂交子RCR226 (pSYM3622) 接种的根瘤分离菌质粒图谱

Plasmid pattern of nodule isolates inoculated with transconjugants RCR226(pSYM3622)

1, 2, 3, 分别为对照菌株三叶草根瘤菌RCR226, 菜豆根瘤菌RCR3622和杂交子RCR226 (pSYM3622); 4—9, 来自菜豆植物的根瘤分离菌株; 10—12, 来自白三叶草的根瘤分离菌株, 其中10号菌株质粒pSYM3622遭受大片DNA缺失, 导致Mel<sup>-</sup>的自发突变产生; 13—15, 来自红三叶草的根瘤分离菌, 其中13号表型为Nod<sup>+</sup>Mel<sup>+</sup>Km<sup>r</sup>菌株

Lane 1, 2 and 3, control *R. trifolii* RCR226, *R. phaseoli* RCR3622 and transconjugants RCR226(pSYM3622); Lanes 4—9, nodule isolates from beans; Lanes 10—12, nodule isolates from white clover, derivative in lane 10 suffered a large deletion of pSYM3622 causing Km<sup>r</sup> Mel<sup>-</sup> spontaneous mutation; Lanes 13—15, nodule isolates from red clover, derivative in lane 13 was Nod<sup>+</sup>Mel<sup>+</sup>Km<sup>r</sup> strain

B. 导入质粒pSYM3622的农杆菌杂交子的质粒图谱

Plasmid pattern of transconjugants of *Agrobacterium tumefaciens*

Lanes 1 and 2, UBAPF2(pSYM3622); Lane 3, UBAPF2;

Lanes 4 and 5, GMI9023(pSYM3622); Lane 6, GMI9023;

Lane 7, control *R. phaseoli* 3622—15

C. 农杆菌GMI9023诱发的根毛不正常卷曲

Root hair deformation induced by *A. tumefaciens* GMI9023