

华癸中生根瘤菌 HN3015 非共生质粒 pMhHN3015a 的不相容性行为

胡国元^{1*} 李伟伟¹ 周俊初²

(1. 武汉工程大学绿色化工过程省部共建教育部重点实验室 湖北 武汉 430073)

(2. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

摘要: 采用三亲本杂交将 Tn5-*mob-sacB* 标记华癸中生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)HN3015 的非共生质粒 pMhHN3015a 分别导入 HN308SR 和 7653R-1SR, 获得 2 个转移接合子 HN308SRN29 和 7653R-1SRN29。HN308SRN29 的质粒图谱显示 HN308SR 的 pMhHN308b 被消除, 该结果暗示 pMhHN3015a 和 pMhHN308b 不相容。然而, HN308SRN29 的质粒消除实验未获得标记质粒消除突变株。pMhHN3015a 和 pMhHN308a 的大小相近, 仅凭凝胶电泳位置难于区分。pMhHN308a 可能因与 pMhHN3015a 发生了重组, 其 Tn5 亦可能因转座至染色体而不能获得标记质粒消除突变株。7653R-1SRN29 的质粒图谱显示 pMhHN3015a 可与 pMh7653Ra 共存。但 7653R-1SRN29 的质粒消除实验获得的 2 个质粒消除突变株 7653R-1SRN29D-A 和 7653R-1SRN29D-B 均消除了 pMhHN3015a, 而 7653R-1SRN29D-B 产生了一个新质粒 p76H4。植物盆栽结瘤试验结果表明: HN308SRN29 失去了结瘤能力, 7653R-1SRN29 的结瘤能力提高。7653R-1SRN29D-A 只能形成少量无效根瘤, 7653R-1SRN29D-B 却完全丧失了结瘤能力。

关键词: 华癸中生根瘤菌, 内源质粒, 接合质粒转移, 质粒不相容性, 质粒消除

Incompatibility Behavior of a Non-symbiotic Plasmid pMhHN3015a in *Mesorhizobium huakuii* HN3015

HU Guo-Yuan^{1*} LI Wei-Wei¹ ZHOU Jun-Chu²

(1. Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan Institute of Technology,
Wuhan, Hubei 430073, China)

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

Abstract: The Tn5-*mob-sacB*-labeled non-symbiotic pMhHN3015a of *Mesorhizobium huakuii* HN3015 was respectively transferred into *M. huakuii* HN308SR and 7653R-1SR by tri-parent mating. Two transconjugants, HN308SRN29 and 7653R-1SRN29 were obtained. The plasmid profiles of HN308SRN29 showed that pMhHN308b of HN308SR were cured. The results implied that pMhHN3015a and pMhHN308b were incompatible. However, the results from plasmid curing tests of HN308SRN29 showed that labeled plasmid cured derivative of HN308SRN29 could not be obtained. Since the sizes of pMhHN3015a and pMhHN308a

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30470065); 湖北省自然科学基金(No. 2007ABA316); 湖北省教育厅重点科研项目(No. D20081509)

* 通讯作者: Tel: 86-27-87194708; ✉: hgy701@tom.com

收稿日期: 2009-03-09; 接受日期: 2009-05-18

were almost the same and their positions in agarose gels were difficult to distinguished, so that two plasmids might have been recombined and transposon Tn5 transferred into the chromosome. The plasmid profiles of transconjugant 7653R-1SRN29 showed that pMhHN3015a could coexist with pMh7653Ra. Furthermore, the results from plasmid curing tests of 7653R-1SRN29 showed that two mutants, 7653R-1SRN29D-A and 7653R-1SRN29D-B were obtained. The plasmid profiles showed that 7653R-1SRN29D-A and 7653R-1SRN29D-B lost pMhHN3015a, and that 7653R-1SRN29D-B showed an additional plasmid that was named p76H4. Results from plant nodulation tests showed that HN308SRN29 lost nodulation ability. But nodulation of 7653R-1SRN29 was enhanced. 7653R-1SRN29D-A could only form null nodules. However, 7653R-1SRN29D-B lost its nodulation ability.

Keywords: *Mesorhizobium huakuii*, Indigenous plasmid, Conjugative plasmid transfer, Plasmid incompatibility, Plasmid curing

在根瘤菌之间或根瘤菌与根癌土壤杆菌之间质粒转移的生物学效应和质粒不相容性已有很多报道。然而,关于华癸中生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)菌株间的质粒转移和质粒不相容性研究报道较少。华癸中生根瘤菌只能在紫云英(*Astragalus sinicus*)上结瘤固氮。Hu 等报道华癸中生根瘤菌 HN3015 含有 3 个内源质粒(pMhHN3015a, pMhHN3015b, pMhHN3015c), pMhHN3015c 与固氮有关, pMhHN3015b 的消除则失去结瘤能力, pMhHN3015a 的消除可增强突变株的竞争结瘤能力和共生效率^[1]。HN3015 的共生质粒 pMhHN3015c 在华癸中生根瘤菌菌株 HN308 和 7653R-1 中的不相容行为已有报道。HN308 中稳定的内源质粒 pMhHN308c 由于 pMhHN3015c 的导入而被消除, pMhHN3015c 却能与 7653R-1SR 中的 pMh7653Ra 共存^[2]。

为了进一步研究 HN3015 的非共生质粒 pMhHN3015a 在华癸中生根瘤菌菌株 HN308 和 7653R-1 中的不相容行为。一个 Tn5-*mob-sacB* 标记的华癸中生根瘤菌 HN3015 的非共生质粒 pMhHN3015a 被分别采用三亲本杂交导入 HN308SR(Sm^r, Rif^r; pMhHN308a, pMhHN308b, pMhHN308c)和 7653R-1SR(Sm^r, Rif^r; pMh7653Rb, pMh7653Ra)。研究导入受体菌株的外源质粒 pMhHN3015a 与内源质粒之间的不相容性及其对受体菌株共生效应的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

实验所供试的菌株和质粒见表 1。

1.2 培养条件

供试菌株的培养条件参见文献[2]。本研究使用的抗生素浓度($\mu\text{g/mL}$)如下:卡那霉素(Km) 50;链霉素(Sm) 200;利福平(Rif) 20;壮观霉素(Spe) 50;氨苄青霉素(Amp) 100。

1.3 质粒的检测、转移与消除

根瘤菌质粒的快速检测采用经修改的 Eckhardt 方法^[2]。根瘤菌种内内源标记质粒的诱动转移方法参照文献[2]进行。利用 *sacB* 基因对蔗糖的敏感性消除根瘤菌标记质粒^[1,2]。

1.4 PCR 扩增

供试菌株总 DNA 的提取按常规方法进行。扩增由 Tn5-*sacB* 编码 *Kan* 基因的方法参见文献[2]。

1.5 植物盆栽结瘤实验

采用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,砂钵能通过纱布条均匀吸收营养液以保持湿度。紫云英(红花 1 号)种子经表面灭菌、催芽后播种于含无氮植物营养液的无菌砂钵,每钵 3 颗。播种 3 d 后,每株接种 1 mL 瘤菌悬液(10^8 CFU/mL),于光照培养箱(20°C,每天光照 18 h,黑暗 6 h)栽培 35 d~40 d 后观察结瘤情况,并测定根瘤数、植株地上部分鲜重、植株地上部分干重和固氮酶活等指标^[3]。

2 结果与分析

2.1 内源质粒 pMhHN3015a 和 pMhHN308b 之间的不相容性

HN308SR 为含有 3 个质粒(pMhHN308a, pMhHN308b, pMhHN308c)的野生菌株 HN308 的

表 1 供试的菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids tested in this study

菌株和质粒 Strains or plasmids	相关性状 Relevant characteristics	文献或来源 Source or reference
<i>Mesorhizobium huakuii</i>		
HN3015	Wild strain, Nod ⁺ , Fix ⁺	[1]
HN308	Wild strain, Nod ⁺ , Fix ⁺	[2]
7653R-1	7653R, cured pMh7653Rb, Nod ⁺ , Fix ⁻	[2]
HN3015T29	Derivative of HN3015, pMhHN3015c labeled with Tn5- <i>sacB</i>	[1]
HN308SR	Spontaneous Str ^r and Rif ^r mutant of HN308	[2]
7653R-1SR	Spontaneous Str ^r and Rif ^r mutant of 7653R-1	[2]
HN308SRN29	Derivative of HN308SR containing pMhHN3015a, pMhHN308a, pMhHN308c	This work
7653R-1SRN29	Derivative of 7653R-1SR harboring pMhHN3015a, pMh7653Ra	This work
7653R-1SRN29D-A	Derivative of 7653R-1SR containing pMh7653Ra	This work
7653R-1SRN29D-B	Derivative of 7653R-1SR harboring pMh7653Ra, p76H4	This work
<i>Escherichia coli</i>		
MM294	Containing pRK2073	This lab
Plasmid		
pRK2073	Help plasmid, Tra ⁺ , Spe ^r	This lab
pMhHN3015c	The largest plasmid of HN3015	[1]
pMhHN3015b	The second largest plasmid of HN3015	[1]
pMhHN3015a	The third largest plasmid of HN3015	[1]
pMhHN308c	The largest plasmid of HN308	[2]
pMhHN308b	The second largest plasmid of HN308	[2]
pMhHN308a	The third largest plasmid of HN308	[2]
pMh7653Ra	The smaller plasmid of 7653R	[2]
p76H4	The smaller plasmid of 7653R-1SRN29-B	This work

双抗性(Sm^r, Rif^r)自发突变株,能与紫云英正常结瘤固氮。采用三亲本杂交将供体菌 HN3015T29 的 pMhHN3015a::Tn5-*mob-sacB* 转移至受体菌 HN308SR。随机从 TY + Str + Rif + Km 平板上挑取 10 个转移接合子进行质粒检测。结果表明所有供试接合子均丢失了第二大质粒 pMhHN308b(图 1)。将该转移接合子命名为 HN308SRN29。pMhHN3015a 的诱动转移频率为 2.71×10^{-8} 。由于导入的 pMhHN3015a 和 pMhHN308a 大小相近,难以凭其在琼脂糖凝胶上的位置加以区别。为了进一步证实 pMhHN3015a::Tn5-*mob-sacB* 与 pMhHN308a 之间是否发生重组。对转移接合子 HN308SRN29 进行标记质粒消除实验。然而,经过多次消除实验均未能从 TY+7%蔗糖平板上获得 Km 敏感的单菌落,从而进一步证实这 2 个质粒可能发生重组的推测。未获得 Km 敏感单菌落的原因可能由于 Tn5 发生转座,转移到染色体中。

植物盆栽实验结果见表 2。由表 2 可见:转移接

合子 HN308SRN29 不能在紫云英上形成根瘤。HN3015 中 pMhHN3015a 的消除并不影响 HN3015 的结瘤能力,但它具有抑制 HN3015 共生效率的作用^[1]。已报道 pMhHN308b 与结瘤能力有关^[2]。而 pMhHN3015a 导入 HN308SR,消除了 pMhHN308b,使 HN308SRN29 失去结瘤能力。已有研究结果表明 HN308SR 的质粒 pMhHN308a 与 HN308SR 结瘤能力有关^[4]。转移接合子 HN308SRN29 不能形成根瘤也表明 HN308SRN29 的第三大质粒是 pMhHN3015a::Tn5-*mob-sacB* 与 pMhHN308a 的重组产物,并且丢失了 pMhHN308a 中的结瘤基因和 pMhHN3015a 中的 Tn5-*mob-sacB* 转座子,从而使质粒的大小并未发生可以观测到的改变。类似的质粒重组现象在其他根瘤菌,如 *Rhizobium phaseoli*、*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 和 *Sinorhizobium fredii* 中也有报道^[5-7]。

以上结果表明: pMhHN3015a 和 pMhHN308b 之间存在不相容性,应属于同一不相容群,而

pMhHN3015a 与 pMhHN308a 和 pMhHN308c 相容, 属于不同的不相容群。本结果也证实 HN308 的 pMhHN308b 上存在结瘤基因。导入的 pMhHN3015a::Tn5-mob-sacB 与 pMhHN308a 发生了重组, Tn5-mob-sacB 可能转座到其染色体中, 这可能是未能获得 HN308SRN29 标记质粒消除突变株的原因。

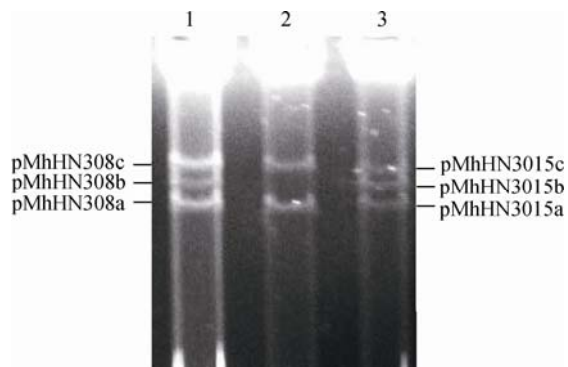


图 1 HN308SR、转移接合子 HN308SRN29 的质粒图谱
Fig. 1 Plasmid profiles of strain HN308SR and its derivatives originated by the transfer of pMhHN3015a

Note: 1: HN308SR; 2: HN308SRN29 (containing pMhHN3015a::Tn5-mob-sacB, pMhHN308a and pMhHN308c); 3: HN3015T29.

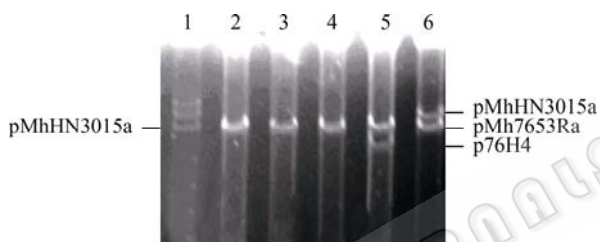


图 2 7653R-1SR、转移接合子 7653R-1SRN29 及其质粒消除菌株的质粒图谱

Fig. 2 Plasmid profiles of strain 7653R-1SR and its derivatives originated by the transfer of pMhHN3015a and by plasmid curing procedures

Note: 1: HN3015T29; 2: 7653R-1SR; 3,4: 7653R-1SRN29D-A (random colonies obtained from 7653R-1SRN29D and its plasmid of pMhHN3015a::Tn5-mob-sacB was eliminated); 5: 7653R-1SRN29D-B (containing pMh7653Ra and p76H4); 6: 7653R-1SRN29 (containing pMh7653Ra and pMhHN3015a::Tn5-mob-sacB).

2.2 内源质粒 pMhHN3015a 和 pMh7653Ra 之间的不相容性

7653R-1SR 为含非共生质粒 pMh7653Ra 的双抗性(Sm^r, Rif^r)自发突变株, 仅能与紫云英结少量无效根瘤。同样采用三亲本杂交法将供体菌 HN3015T29 的标记质粒 pMhHN3015a::Tn5-mob-sacB 转移至受体菌 7653R-1SR。pMhHN3015a 的诱动转移频率为 8.92×10^{-9} 。从 TY + Str + Rif + Km 平板上获得 5 个转移接合子, 质粒检测结果表明

外源质粒 pMhHN3015a::Tn5-mob-sacB 导入了 7653R-1SR(图 2), 将该转移接合子命名为 7653R-1SRN29。进一步对 7653R-1SRN29 进行质粒消除, 从 TY + 7%蔗糖平板获得 10 个 Km 敏感的单菌落, 质粒检测结果表明: 其中 9 个 Km 敏感的单菌落消除了导入的外源质粒 pMhHN3015a::Tn5-mob-sacB, 并命名为 7653R-1SRN29D-A。只有一个单菌落在丢失质粒 pMhHN3015a 的同时产生了一个新的质粒 p76H4, 其电泳迁移率比 pMh7653Ra 快, 将该质粒消除突变株命名为 7653R-1SRN29D-B(图 2)。

植物盆栽结瘤试验结果(见表 2)表明: 7653R-1SRN29 在紫云英根上形成无效根瘤, 但根瘤数超过 7653R^[2], 而 7653R-1SR 只能形成少量根瘤。已报道 pMhHN3015a 可抑制 HN3015 共生效应^[1], 但将它导入 7653R-1SR 反而提高了受体菌的结瘤能力。其质粒消除突变株 7653R-1SRN29D-A 也只能形成少量根瘤, 但另一质粒消除突变株 7653R-1SRN29D-B 由于在消除 pMhHN3015a 的同时产生了另一新质粒 p76H4, 反而使 7653R-1SRN29-B 完全丧失了结瘤能力(图 2), 本结果显然与产生的新质粒 p76H4 有关。本研究结果表明 pMh7653Ra 与 pMhHN3015a 相容, 应属于不同的不相容群。

2.3 Kan 基因的鉴定

采用 PCR 法对 HN3015T29、HN308SRN29、7653R-1SRN29、7653R-1SRN29D-A 和 7653R-1SRN29D-B 等进行检测由 Tn5-sacB 编码的大约 900 bp 的 Kan 基因, 结果表明, 在 HN3015T29 和 2 个转移接合子(HN308SRN29、7653R-1SRN29)中均检测出 Kan 基因, 但未从标记质粒消除菌株中检测出(数据未列出)。HN3015, HN308 和 7653R 的 Kan 抗性自发突频率低于 10^{-9} 。这些结果说明 HN3015T29 和 2 个转移接合子的 Kan 基因确实来自标记质粒中的 Tn5, 它们的质粒消除突变株当然不会扩出 Kan 基因。

3 讨论

有趣的是转移接合子 7653R-1SRN29 的质粒消除突变株 7653R-1SRN29D-B 在消除外源质粒的同时又产生了一个新质粒 p76H4。而在另一质粒消除突变株 7653R-1SRN29D-A 中却未发现这个新质粒。

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

表 2 华癸中生根瘤菌 HN308SR, HN3015T29, 7653R-1SR 及其突变株的共生效率
Table 2 Symbiotic efficiency of *M. huakuii* HN308SR, HN3015T29, 7653R-1SR and their derivatives

菌株 Strains	根瘤数 Nodule number (per plant)	地上部分鲜重 Shoot fresh weight (g/plant)	地上部分干重 Shoot dry weight (g/plant)	固氮酶活 Nitrogenase activity ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g/h}$)
Control	0	0.030 ^c	0.0055 ^c	ND
HN308SR	24.67 ^a	0.660 ^a	0.1041 ^a	74.35 ^a
HN3015T29	15.00 ^b	0.450 ^b	0.0650 ^b	40.9 ^b
7653R-1SR	8.33 ^c	0.046 ^c	0.0063 ^c	0
HN308SRN29	0	0.036 ^c	0.0059 ^c	ND
7653R-1SRN29	24.66 ^a	0.053 ^c	0.0108 ^c	0
7653R-1SRN29D-A	7.33 ^c	0.040 ^c	0.0061 ^c	0
7653R-1SRN29D-B	0	0.030 ^c	0.0049 ^c	ND

注: Control 表示没有接种根瘤菌, ND 表示没有检测。根瘤数、地上部分鲜重、地上部分干重、固氮酶活至少为 3 个重复的平均值。

同一列中数值上标字母相同者为差异不显著, Duncan 实验, $\alpha=0.05$ 。固氮酶活为每克鲜根瘤每小时产生乙烯的 C_2H_4 微摩尔数。

Note: Control means no inoculation of Rhizobia; ND Not detected. Data of nodule number, shoot fresh weight, dry weight and nitrogenase activity are mean value from at least three replicates. Data in the same column with the same marked superscript (a, b, c) were not significantly different according to Duncan's multiple range test, the significance level $\alpha = 0.05$. Nitrogenase activity was shown in micromoles of C_2H_4 produced per hour per gram of fresh nodules.

本结果表明 p76H4 不是 pMhHN3015a 与辅助质粒 pRK2073 的共整合体, 因为如果是共整合体, 则也应在 7653R-1SRN29D-A 中出现 p76H4。Mavingui 等人^[7]在 *Rhizobium* sp. NGR234 基因组中发现大量重组现象, 包括细菌染色体和两个内源质粒之间的重组与切除, 并能产生相对稳定的后代。Miao 等人^[8]曾报道在 *S. fredii* 中发现不相容质粒之间的共整合现象。共生质粒与非共生质粒之间的重组的事件在 *R. Leguminosarum* 中也有报道^[6]。因此, p76H4 的形成可能来源于 pMhHN3015a 与 pMh7653Ra 之间的重组, 并只在用 TY+7%蔗糖平板进行质粒消除时发生。有关植物盆栽试验结果表明: 7653R-1SRN29-A 可形成少量无效根瘤, 而 7653R-1SRN29D-B 却完全失去结瘤能力, 说明 pMhHN3015a 因与 pMh7653Ra 重组而丢失了结瘤基因。Romero 等人^[9]将 *Rhizobium etli* CFN42 共生质粒的共生基因定位于基因组的一个区域, 发现该区域常发生前后串联的扩增。本研究 p76H4 的出现也可排除 pMh7653Ra 自发突变的可能性。有报道称 *R. etli* 存在重组与复制(RER)加强现象^[10]。并提出了一个新的不相容机制, 认为位点特异性重组(RinQ)在 *R. etli* 共生质粒的不相容性中发挥作用^[11]。

参 考 文 献

- [1] Hu GY, Li YG, Zhou JC. Biological characteristics of plasmids of *Mesorhizobium huakuii* HN3015 from *Astragalus sinicus*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007, **23**: 845–851.
- [2] Hu GY, Li YG, Zhou JC. Incompatibility behavior of a megaplasmid pMhHN3015c in *Mesorhizobium huakuii* HN3015. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, **24**: 1281–1287.
- [3] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002, pp.208–210.
- [4] 胡国元, 李伟伟, 周俊初. 华癸中生根瘤菌 7653R 共生质粒 pMH7653Rb 的不相容性行为. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, **39**(3): 310–314.
- [5] Soberón-Chavez G, Najera R, Olivora H, *et al.* Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. *J Bacteriol*, 1986, **167**: 487–491.
- [6] Zhang XX, Kosier B, Priefer UB. Symbiotic plasmid rearrangement in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39SM. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 2141–2144.
- [7] Mavingui P, Flores M, Guo X, *et al.* Dynamics of genome architecture in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J Bacteriol*, 2002, **184**: 171–176.
- [8] 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.
- [9] Romero D, Martínez-Salazar J, Girard L, *et al.* Discrete amplifiable regions (Amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 973–980.
- [10] Valencia-Morales E, Romero D. Recombination enhancement by replication (RER) in *Rhizobium etli*. *Genetics*, 2000, **154**: 971–983.
- [11] Quintero V, Miguel A, Cevallos MA, *et al.* A site-specific recombinase (RinQ) is required to exert incompatibility towards the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Mol Microbiol*, 2002, **46**: 1023–1032.