

## 几类快生型根瘤菌质粒的研究\*

宁林夫 龚汉英 周路明 岑英华

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

用一种重现性好而较简便的方法,对国内的紫云英、豌豆、三叶草、大豆等快生型根瘤菌及根癌农杆菌共 40 多号菌进行了质粒分离,所得质粒图谱具有一定的菌株特异性。每株菌有 1—3 个质粒,其中至少有一个大质粒或巨大质粒。用质粒消除法获得失去结瘤(或致癌)能力的变异株,均缺少一个大质粒。快生型根瘤菌的结瘤基因定位在大质粒或巨大质粒上。用接合法将 RP1::Tn501 等质粒转入根瘤菌中,能诱动根瘤菌的结瘤基因转移给失去结瘤能力的变异株,可表达功能,质粒图谱也发生变化,与供体或受体都不同。

**关键词** 快生型根瘤菌;质粒分离;质粒消除;接合转移

Higash<sup>[1]</sup> 最先用质粒消除和接合试验,推断三叶草根瘤菌的结瘤能力是由质粒控制的。Zurkowski 等<sup>[2-4]</sup>通过热处理获得不结瘤变异株,证明了三叶草根瘤菌携带有一个控制结瘤特性的 Sym 质粒。

此后,豌豆根瘤菌、菜豆根瘤菌<sup>[5,6]</sup>和苜蓿根瘤菌<sup>[7]</sup>、快生型豇豆根瘤菌<sup>[8]</sup>的共生(Sym)质粒先后得到确证。许多文献报道快生型根瘤菌中普遍携带一个以上的内源质粒。

我国根瘤菌资源非常丰富,但有关它们的质粒分离、转移等研究尚少,仅李仲贤等<sup>[9]</sup>曾用热处理获得不结瘤的紫云英根瘤菌变异株。

本文着重介绍应用重现性好的质粒分离方法对国内的紫云英根瘤菌(*Rhizobium astragalii*)、豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)、三叶草根瘤菌(*R. trifolii*)、大豆根瘤菌(*R. japonicum*)的快生型和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)等 40 多株菌(包括变异株和接合子)进行质粒分离的结果。

## 材料与方法

### (一) 培养基

菌株保存用根瘤菌常规 YM 培养基;质粒分离用 PA 培养基(0.4%蛋白胨,2mMMgSO<sub>4</sub>)。

### (二) 菌株

见表 1。

### (三) 质粒分离方法

按 Hirsch 等<sup>[11]</sup>方法,但用 80—100ml 培养液,获得 DNA 粗制品之后,再用苯酚-氯仿(1:1)抽提一次,然后进行琼脂糖凝胶电泳。

### (四) 质粒消除

37℃ 热处理根瘤菌获得不结瘤的变异株;用 50μg/ml 吡啶黄处理根癌农杆菌获得不致癌的变异株。

### (五) 接合转移

将具有不同抗药标记的供、受体菌,用滤膜杂交法<sup>[10]</sup>获得接合子,经试管结瘤试验,从根瘤中分离出具有结瘤能力的 Nod<sup>+</sup>接合子,并经抗药标记检查,证实为“杂种”,然后分离其质粒。

本文于 1985 年 5 月 10 日收到。

\* 本工作获中国科学院自然科学基金会资助。

表 1 菌株特性及其质粒

Table 1 The relevant characteristics and plasmids of the strain tested

菌株 Strain	质粒数目及大小 Number of plasmid				菌株特性 Relevant characteristics	来源 Source or reference
	巨大 Mega	大 Large	小 Small	合计 Total		
紫云英根瘤菌						
<i>R. astragalii</i>						
F6		2		2	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	本工作分离
S52		2		2	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	本工作分离
84		1	1	2	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	本工作分离
85		1		1	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	本工作分离
86	1	1	1	3	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	本工作分离
A301		1	1	2	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	浙江农科院赠
103		1		1	Nod <sup>-</sup>	本工作分离
184		1	2	3	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 84(pRP1::Tn501)	本工作分离
103/184 N5		1	1	2	103 接受 3184 的质粒 Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	本工作获得
103/184 N7		1	1	2	103 接受 3184 的质粒 Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	本工作获得
76531		2		2	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 的野生型	浙江农科院赠
531HCl=104		1		1	76531 经热处理后得 Nod <sup>-</sup> 变株	本工作获得
531HC2		1		1	76531 经热处理后得 Nod <sup>-</sup> 变株	本工作获得
531HC3		1		1	76531 经热处理后得 Nod <sup>-</sup> 变株	本工作获得
SR72		2		2	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 的野生型	浙江农科院
SR72HCl=103		1		1	SR72 经热处理后得 Nod <sup>-</sup> 变株	本工作获得
SR72HC2		1		1	SR72 经热处理后得 Nod <sup>-</sup> 变株	本工作获得
SR72HC3		1		1	SR72 经热处理后得 Nod <sup>-</sup> 变株	本工作获得
14		2	1	3	SR72 带质粒 pRP1::Tn501, Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	本工作获得
104/14		1	1	2	104 接受了 14 的质粒 Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	本工作获得
豌豆根瘤菌						
<i>R. leguminosarum</i>						
252	1	1	1	3	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	西北农学院赠
R30	1	1	1	3	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	西北农学院赠
R50	1	2		3	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	西北农学院赠
2101				0	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	西北农学院赠
P20		1		1	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	浙江农科院赠
112		1		1	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	本工作分离
48		2	1	3	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	本工作分离
S-7103	1	1		2	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	南京土壤所赠
R30(pRP1::Tn501)	1	1	2	4	R30 带质粒 (pRP1::Tn501) Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	本工作获得
三叶草根瘤菌						
<i>R. trifolii</i>						
S-32-1		1		1	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	南京土壤所赠
62	1	1		2	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	农科院土肥所赠
大豆根瘤菌						
<i>R. japonicum</i>						
2048(快生)	1			1	Nod <sup>+</sup> 野生型	农科院土肥所赠
2050(快生)		1		1	Nod <sup>+</sup> 野生型	农科院土肥所赠
2059(快生)		1	2	3	Nod <sup>+</sup> 野生型	农科院土肥所赠
191(快生)		1	1	2	Nod <sup>+</sup> 野生型	农科院土肥所赠

续表 1

菌株 Strain	质粒数目及大小 Number of plasmid				菌株特征 Relevant characteristics	来源 Source or reference
	巨大 Mega	大 Large	小 Small	合计 Total		
194(快生)		1		1	Nod <sup>+</sup> 野生型	农科院土肥所赠
USDA 205		2	1	3	Nod <sup>+</sup> 野生型	USDA
USDA 205HC		1	1	2	热处理后得的 Nod <sup>-</sup> 变株	本工作获得
USDA 110(慢生)				0	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 野生型	USDA
110(pRP1::Tn501)			1	1	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> 带质粒 (pRP1::Tn501)	本工作获得
根癌农杆菌 <i>A. tumefaciens</i>						
702	1	1		2	致癌的野生型	上海植生所赠
702Ay-12	1			1	吡啶黄处理后的不致癌变株	本工作获得
C58	1	1		2	致癌的野生型	昆明植物所赠

## 结 果

利用上述质粒分离方法,对国内的 S52、SR72、531 等 21 株紫云英根瘤菌、变异株及其接合子;252、R30 等 9 株豌豆根瘤菌及其接合子;62 等 2 株三叶草根瘤菌;2048、2059 等 7 株快生型大豆根瘤菌及其变异株;110 等 4 株慢生型大豆根瘤菌及其接合子;009 慢生型豇豆根瘤菌以及 702 等 3 株根癌农杆菌和变异株,共计 47 株菌进行了质粒分离。重复三次以上。

用快生型大豆根瘤菌 USDA 205 菌株(已知其三个质粒的分子量分别为 200、112、57Md)和根癌农杆菌 C58 菌株(已知其二质粒的分子量分别为 300、130Md)为标尺,在琼脂糖凝胶电泳图谱上进行比较,并按分子量在 90Md 以下者称为小质粒,90—200Md 者为大质粒,200Md 以上者为巨大质粒,其结果列于表 1 和图 1—4。

从表和图中看出,快生型根瘤菌中除了豌豆根瘤菌 2101 没有分离到质粒之外,其他都有 1—3 个质粒,并且每个菌株至少

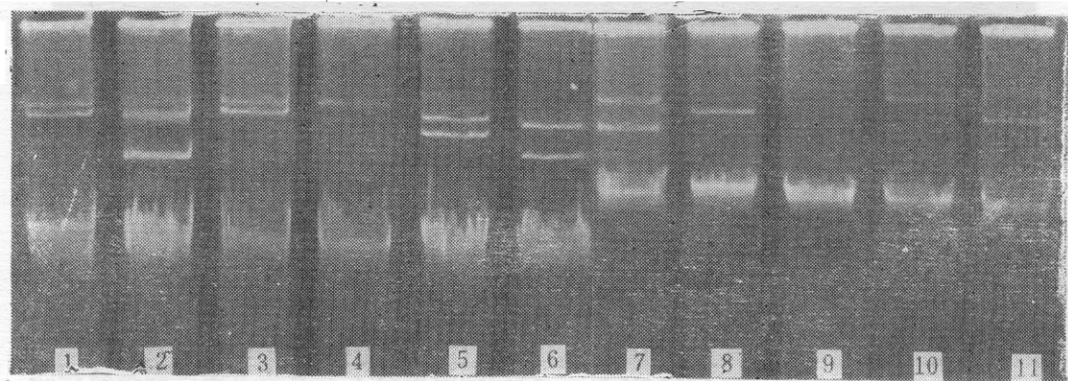


图 1 紫云英根瘤菌(1—6)和快生大豆根瘤菌(7—11)的质粒图谱

Fig. 1 Plasmid profiles of *R. astragalii* strains (lanes 1—6) and fast-growing *R. japonicum* strains (lanes 7—11)

1. F6; 2. 14; 3. S52; 4. 85; 5. 86; 6. A301; 7. 2059; 8. USDA 205 (as size marker); 9. 2048; 10. 194; 11. 191

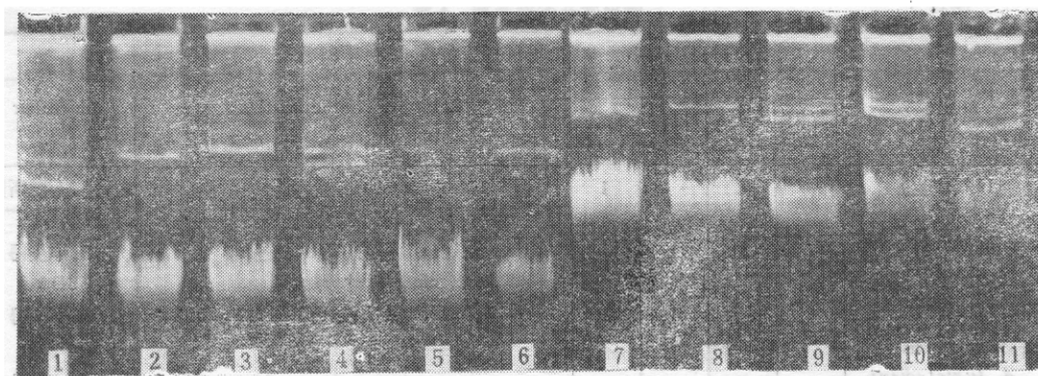


图2 豌豆根瘤菌(2—4, 7—11)和三叶草根瘤菌(5—6)的质粒图谱

Fig. 2. Plasmid profiles of *R. leguminosarum* strains (2—4; 7—11) and *R. trifolii* strains (5—6)

1. USDA 205; 2. 112; 3. S7103; 4. 48; 5. S-32-1; 6. 62; 7. 252; 8. P20; 9. R30; 10. R50; 11. USDA 205 as size marker

有1个大质粒或巨大质粒。86、252、R30、R50、S7103、62、2048等根瘤菌和702、C58等根瘤农杆菌,各有1个巨大质粒。还可以看出,绝大部分菌株的质粒,其数目或大小是有差异的,即各个菌株有自己独特的质粒图谱。

用热处理紫云英根瘤菌SR72、531和大豆根瘤USDA 205,获得丧失结瘤能力

(Nod<sup>-</sup>)的变异株(SR 72HC、531 HC、USDA 205 HC等),它们均缺少一个大质粒;用吡啶黄处理根瘤农杆菌702获得的702AY-12失去了致癌毒性的变异株,也缺少一个大质粒,即Ti质粒(见图3)。

用接合转移法,将质粒RP1::Tn501转入到SR72、84和R30中获得的接合子14、184和R30(pRP1::Tn501)均能表达

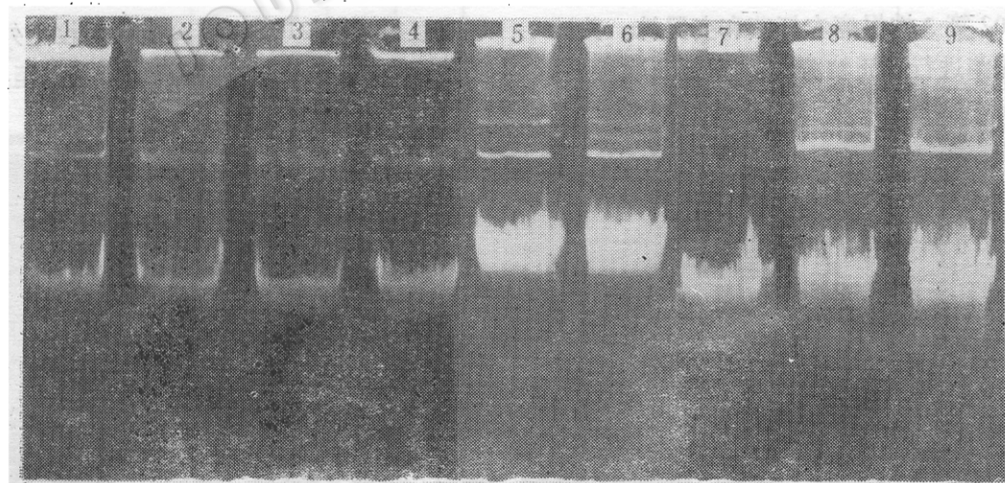


图3 紫云英根瘤菌(1—4),快生大豆根瘤菌(5—6)和根瘤农杆菌(7)质粒消除菌株的电泳图谱

Fig. 3. Gel electrophoresis patterns of plasmid DNA isolated from plasmid cured strains of *Rhizobium* or *Agrobacterium* lane

1. *R. astragalii* SR72; lanes 2—4. Sym plasmid cured Nod<sup>-</sup> strains of SR72; lane 5. Sym plasmid cured Nod<sup>-</sup> strain of USDA 205; lane 6. USDA 205; lane 7. Ti plasmid cured strain of 702; lane 8. *A. tumefaciens* 702; lane 9. C58

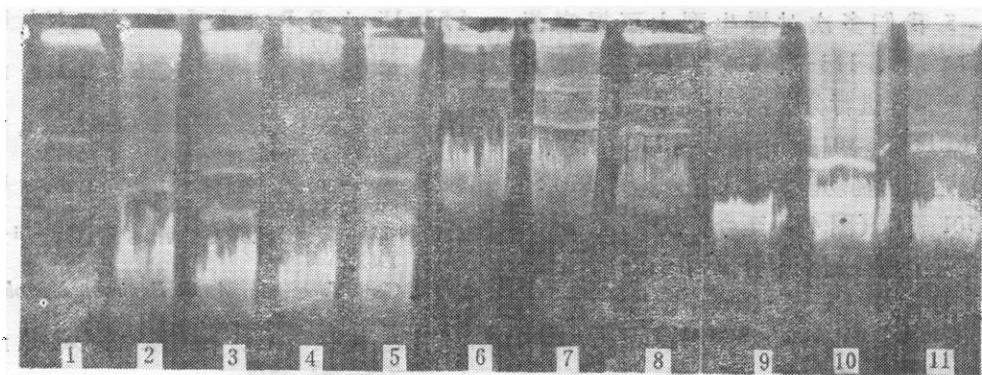


图4 转移到各种根瘤菌中的质粒 RP1::Tn501

Fig. 4 Plasmid pRP1::Tn501 transferred into different strains of *Rhizobium*.  
(lanes 3,5,7,8,10 shown the transconjugants carrying pRP1::Tn501)  
1. SR72; 2. 205; 3. 14; 4. 104; 5. 104/14; 6. 103; 7. 103/184; 8. 184;  
9. USDA 110; 10. USDA 110 (pRP1::Tn501); 11. USDA 205(size marker)

供体的抗药功能,并在凝胶电泳图上观察到转入的质粒带;携带有质粒 RP1::Tn501 的紫云英根瘤菌 14 和 184,能够诱动 (mobilization) 结瘤基因转移到失去结瘤能力的 104、103 变异株中,其接合子 104/14、103/184 均能在紫云英上结瘤并固氮,在凝胶电泳图上也增加了一条质粒带 (见图 4)。

## 讨 论

1. 根瘤菌大质粒的分离比较困难,我们曾先后用 Casse 等<sup>[11]</sup>、Cado 和 Liu<sup>[12]</sup>及其它方法进行分离,经过比较,认为按 Hirsch 等方法效果较佳。

2. 我们研究的 25 株快生型根瘤菌(野生型),其中 24 株均具有一个以上的大质粒或巨大质粒,而且 SR72、531、USDA205 等菌经热处理后,凡丧失结瘤能力的变异株均缺少一个大质粒,说明快生型根瘤菌的结瘤基因可能定位在一个大质粒或巨大质粒上,这与 Hooykaas 等<sup>[13]</sup>的报道是一致的。能结瘤固氮的豌豆根瘤菌 2101 菌株未分离到质粒,此菌株是否缺少质粒以及它的结瘤基因是否定位在染色体上,有待进

一步查证。

3. 从 25 株快生型根瘤菌的质粒图谱看来,质粒的数目或大小,除了 F6 和 S52 相同之外,其它菌株均有差异。而 F6 和 S52 两个紫云英根瘤菌是 1973 年在同一地方选出的,有可能是同一菌株。我们认为,根据质粒数目和大小的差异,可为菌株鉴定提供参考。

4. 根瘤菌结瘤的共生质粒可以通过 RP1::Tn501 等质粒的诱动而发生转移,使不结瘤的变异株获得结瘤的功能,这为根瘤菌的育种开辟了新途径。已有许多资料报道根瘤菌的结瘤基因和固氮基因同在一个共生质粒上,因此可以设想将具有某些优良特性(如抗旱、适应性强等)但固氮能力较差的菌株,通过接合转移而获得较强的固氮能力。我们在接合子 104/14 中只分离到转入的 RP1::Tn501 质粒带,而未发现转入的大质粒带;接合子 103/184 中只分离到转入的一条大质粒带,而未发现独立存在的 RP1::Tn501 质粒带,可能如 Lorkiewicz 等<sup>[14]</sup>在研究苜蓿根瘤菌和三叶草根瘤菌的接合转移中所指出的,转入的质粒进行了整合。

5. 我们多次对慢生型大豆根瘤菌 USDA 110、113-2、005 以及豇豆根瘤菌 009 等菌株进行分离, 均未发现质粒带。但将 RP1::Tn 501 质粒转入到 110 菌株中, 既表达了抗药功能, 也从中分离到 RP1::Tn501 质粒(图 4)。至今, 仅个别文献提到在慢生型根瘤菌中分离到质粒<sup>[15]</sup>, 但未见其图谱。

### 参 考 文 献

- [1] Higashi, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 13: 391—403, 1967.
- [2] Zurkowski, W. and Z. Lorkiewicz: *Genet. Res.*, 32: 311—314, 1978.
- [3] Zurkowski, W. and Z. Lorkiewicz: *Arch. Microbiol.*, 123: 195—201, 1979.
- [4] Zurkowski, W.: *Mol. Gen. Genet.*, 181: 523—524, 1981.
- [5] Hirsch, P. R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 120: 403—412, 1980.
- [6] Beynon, J. L. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 120: 421—429, 1980.
- [7] Rosenberg, C. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 184: 326—333, 1981.
- [8] Morrison, A. N. et al.: *J. Bacteriol.*, 153: 527—531, 1983.
- [9] 李仲贤等: 华中农学院学报, 2 (1): 1—9, 1983.
- [10] Cen, Y. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 233—236, 1982.
- [11] Casse, F. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 113: 229—242, 1979.
- [12] Kado, C. I. and S. T. Liu: *J. Bacteriol.*, 145: 1365—1373, 1981.
- [13] Hooykaas, P. J. J. et al.: *Nature*, 291: 351—353, 1981.
- [14] Lorkiewicz, M. Derylo et al.: Current Perspectives in Nitrogen Fixation, P. 409, 1981.
- [15] Masterson, R. V. et al.: *J. Bacteriol.*, 152: 928—931, 1982.

## STUDY ON THE PLASMID PROFILES FROM FAST-GROWING RHIZOBIA

Ning Linfu Gong Hanying Zhou Luming Cen Yinghua  
(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Plasmids were isolated from more than 40 strains of Rhizobiaceae, including *Rhizobium astragalii*, *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. japonicum* and *Agrobacterium tumefaciens* by a reproducible and convenient method. The plasmid profiles was varied among these strains. Each strain tested contained 1—3 plasmids with molecular sizes from 40 Md to 300 Md except the *R. leguminosarum* strain 2101 which did not show any plasmid band on the agarose gel electrophoresis. After plasmid curing all of the Nod<sup>-</sup> *Rhizobium* mutants and the avirulent mutants of *A. tumefaciens* lost a large plasmid.

The IncP1 group plasmid RP1::Tn 501 can mobilize the nodulation determinant(s) from Nod<sup>+</sup> Fix<sup>+</sup> wild type *R. astragalii* strain to the Nod<sup>-</sup> mutants of *R. astragalii*. The plasmid profiles of the Nod<sup>+</sup> transconjugants were different from the donor- and the recipient- strains. The possibility for improving *Rhizobium* strains by the plasmid transfer technique was implied.

### Key words

Fast-growing rhizobia; Plasmid isolation; Plasmid curing; Transconjugation