

紫云英根瘤菌质粒功能研究*

邹向宏^{1,2} 李阜棣¹ 陈华癸¹

(¹华中农业大学微生物系 武汉 430070) (²中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘要 紫云英根瘤菌 CH203 含有 3 条质粒 (pRHa, 97MD; pRHb, 168MD; pRHc, 251MD 为共生质粒), 用带蔗糖敏感基因 Tn5-sacB 进行菌株质粒消除和质粒缺失突变株筛选, 获得一系列突变株。与野生型菌相比, 质粒 pRHa 的丢失导致菌株结无效根瘤, 质粒 pRHb 的丢失使菌株失去共生能力, 在 TY 培养基平板上菌落变得粗糙, 失去了脂多糖 (LPSI)。质粒 pRHc (共生质粒) 的丢失显然失去其菌株的共生能力, 同时使菌株抗酸性明显减弱。质粒回复能恢复突变株的表现特征和共生能力。此外, 紫云英根瘤菌 CH205 含有 5 条大小不同的质粒 (分子量 42MD~230MD), 该菌株某些质粒的消除能显著增强菌株的结瘤固氮能力, 研究结果也表明除共生质粒外, 紫云英根瘤菌其它质粒明显影响菌株的共生效应。

关键词 紫云英根瘤菌, 质粒, 共生效应

根瘤菌通过与豆科植物共生, 将大气中的氮气转化为氨供植物生长利用, 大多数根瘤结瘤菌的基因 (*nod*) 和固氮基因 (*nif* 或 *fix*) 定位在大质粒上 (称为共生质粒)^[1, 2], 除三叶草根瘤菌少数菌株含有三条共生质粒外, 每个根瘤菌菌株一般只有一条共生质粒, 但大多数根瘤菌含有至少一条有时高达 10 条其它不同质粒。对于苜蓿根瘤菌, 共生质粒 (1 000~1 500kb) 至少带有 3 个基因簇涉及结瘤固氮, 山羊豆根瘤菌含有 1 700kb 巨型质粒^[3, 4], 关于这些质粒的功能以及质粒间相互关系了解甚少。只是豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) 和菜豆根瘤菌 (*R. leguminosarum phaseoli*) 个别菌株研究结果表明, 除共生质粒外, 隐蔽质粒也是有效共生行为必需的^[5, 6]。紫云英根瘤菌是我国特有的生物固氮资源, 它具有严格的互接种族关系, 在分类上被定为一个新种 (*Rhizobium huakuii*)^[7], 紫云英根瘤菌含有 1~5 条大质粒, 分子量从 35MD 到 600MD 或更大^[8], 人们很少了解这些质粒的生物学特性。本研究引用我国特有的紫云英根瘤菌为材料, 运用 Tn5-sacB 转座子进行质粒消除和质粒缺失菌株筛选, 初步探究质粒的多种功能及相互关系。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

紫云英根瘤菌 CH203 和 CH205 由作者从湖北省武昌水稻田分离, 农杆菌 GMI9023、质粒 pRK2013 (含 *tra* 基因) 由华中农业大学生物固氮室提供, 质粒 pMH1701 (含 Tn5-sacB) 由加拿大构建者 Hynes M F 惠赠。

*博士点基金和自然科学基金项目。

本文于 1996 年 5 月 3 日收到。

1.2 培养基

YMA 培养基^[9], TY 培养基^[9]。所用抗生素浓度如下: 新霉素(Nm), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 萘啶酮酸(Nal), 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 利福平(Rif), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 链霉素(Str), 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.3 质粒检测和分子杂交

质粒快速检测参考修改的 Eckhardt 方法^[10], 分子杂交参考 Dig-分子杂交手册(1993)。

1.4 脂多糖(LPS)测定

方法见参考文献[11]。

1.5 质粒消除和菌株抗酸性测定

质粒消除见参考文献[5], 抗酸性测定见参考文献[12]。

1.6 植物试验

紫云英种子经表面消毒, 将萌发一致的种子转接到经改进的 Leonard 双层钵, 置光照室内培养(光照 12h, 光强度 7 000Lx, 温度 20 $^{\circ}\text{C}$)。待长出第一片真叶时, 接种 0.5ml 菌悬液($10^8/\text{ml}$), 每一处理 5 次重复, 设未接种根瘤菌作对照, 继续光照培养。7 周后收获植株, 检查结瘤情况, 测定固氮酶活, 同时烘干植株, 称量每株植株干重。

1.7 根瘤组织切片

将接种根 7 周后形成的根瘤, 按 Johasen 描述的方法^[11], 进行组织切片、固定、染色、在显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 菌株 CH203 被 Tn5-sacB 转座的质粒确定

菌株 CH203 含有 3 条大质粒, 其分子量分别为 pRH_a, 97MD; pRH_b, 168MD; pRH_c, 251MD^[8]。以豌豆根瘤菌的 *nod* DABC 和肺炎克氏杆菌 *nif* HDK 为探针, 通过分子杂交, 确定 pRH_c 为共生质粒。将菌株 CH203 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 纯培养条件下传代 100 次, 以及与紫云英共结瘤七周后, 各随机分离 100 个单菌落, 质粒检测结果表明, 它们的质粒组成不变, 说明菌株 CH203 内源质粒较稳定。以该质粒稳定性菌株作为质粒消除出发菌株。

将菌株 CH203 与 *E.coli* 17-1(pMH1701) 进行二亲本杂交, 在 TY + Nm + Nal 平板上选择转移接合子。CH203 对 Nm 敏感, *E.coli* 对 Nal 敏感, 只有转移接合子(被 pMH1701 上 Tn5-sacB 转座的菌株)才能在 TY + Nm + Nal 平板上生长。随机选择这些接合子单菌落, 通过辅助菌株 MM294(含辅助质粒 pRK2013)与无质粒的农杆菌 GMI9023 进行三亲本杂交, 将根瘤菌 CH203 被 Tn5-sacB 转座的质粒转移到无质粒的农杆菌中(选择平板为 TY+Nm + Rif + Str)。在该实验中, 只有转座子 Tn5-sacB 插入到质粒上的菌株才能被转移, 被 Tn5-sacB 转座质粒在辅助质粒 pRK2013 协助下, 从根瘤菌向农杆菌转移(其转移频率为 $10^{-4} \sim 10^{-6}$), 随机选取在 TY + Nm + Rif + Str 平板上生长的农杆菌转移接合子进行质粒检测, 通过与出发菌株 CH203 质粒谱相比较, 初步确定在菌株 CH203 中被 Tn5-sacB 转座的质粒。为了进一步确定质粒由 Tn5-sacB 转座, 以 Dig-Tn5 为探针与农杆菌捕获的质粒进行杂交, 农杆菌 GMI9023(pJB5J1:Tn5)和野生型 CH203 的质粒作对照。图 1 显示, pJB5J1:Tn5 质粒与 Dig-Tn5 探针反应呈阳性, CH203 的质粒与该探针反应呈

阴性,农杆菌捕获的质粒与 Dig-Tn5 有明显的杂交信号。

2.2 质粒缺失菌株的获得

将已确定被 Tn5-*sacB* 转座质粒的紫云英根瘤菌在 TY 液体中培养到一定浓度 ($10^7 \sim 10^8$ / ml), 稀释 ($10^{-1} \sim 10^{-3}$) 涂在 TY + 7% 蔗糖平板, 首先置 39℃ 处理 2d, 然后 28℃ 条件下继续培养 7d, 若带有 Tn5-*sacB* 的质粒发生缺失或丢失, 则该菌能在 TY + 7% 蔗糖平板上生长; 否则, 菌株由于蔗糖敏感基因 (*sacB*) 所编码的酶使蔗糖降解后的产物对革兰氏阴性细菌有毒害作用,

导致菌体死亡。在 TY + 7% 蔗糖平板上出现的菌落再影印到 TY 与 TY + Nm 平板上, 选取对新霉素 (Nm) 敏感的菌落进行质粒检测, 确定质粒被消除的菌株。因为实验中可能 *sacB* 失活, 而 Tn5 还存在, 质粒并未消除, 但能在 TY + 7% 蔗糖平板上生长, 因此影印 TY 与 TY + Nm 可淘汰这些菌落, 获得消除一条不同质粒的菌株 (图 2)。以这些缺失一条质粒的菌株为出发菌株, 重复利用转座子 Tn5-*sacB* 正向筛选质粒缺失菌株可获得消除 2 条不同质粒的突变株, 反复试验未能获得不含质粒或只含最小质粒的突变株 (图 2), 或许最大质粒或第二大质粒与菌株在纯培养条件下的生存能力相关。事实上, 根瘤菌 CH203 的某些质粒显著影响菌株的生长速度。

2.3 质粒缺失菌株的表型特征

通过运用转座子 Tn5-*sacB* 正向筛选质粒缺失菌株。将这些突变株与野生型出发菌株进行表型特征比较, 有些突变株的培养特征发生明显改变 (表 1), 如缺失了 pRHb 的菌株 CH203-2 和 CH203-4, 在 TY 平板上菌落粗糙, 在 PA 液体培养基中发生凝聚现象, 出现絮状。在辅助菌株 MM294 (含辅助质粒 pRK2013) 协助下, 以捕获了根瘤菌质粒 (载 Tn5) 的农杆菌为供体, 缺失对应质粒的根瘤菌为受体进行反向三亲本杂交, 在 TY + Nal + Nm 平板上筛选根瘤菌转移接合子 (辅助菌和农杆菌对 Nal 敏感, 受体根瘤菌对 Nm 敏感)。将这些根瘤菌转移接合子菌落进行质粒检测, 获得一系列质粒回复菌株。CH203-6 (pRH^{a-} / pRH^a), CH203-7 (pRH^{b-} / pRH^b) 和 CH203-8 (pRH^{c-} / pRH^c)。pRH^b 质粒回复突变株 CH203-7 (pRH^{b-} / pRH^b) 的菌落培养特征与野生型一致, 如菌落表面光滑, 在 PA 液体中菌体不发生凝聚等, 该质粒回复能完全恢复菌株的培养特征, 进一步证实了突变株 CH203-2 (pRH^{b-}) 表型变化是由质粒 pRH^b 缺失引起的。

2.4 根瘤菌脂多糖

缺失质粒的突变菌株 CH203-2 (pRH^{b-}) 在 TY 平板上菌落粗糙, 在 PA 液体中菌体凝聚, 这种现象与 Cava (1989)^[11]、Hynes (1990)^[5] 和 Sussan Brom (1992)^[6] 描述的 LPS 突变

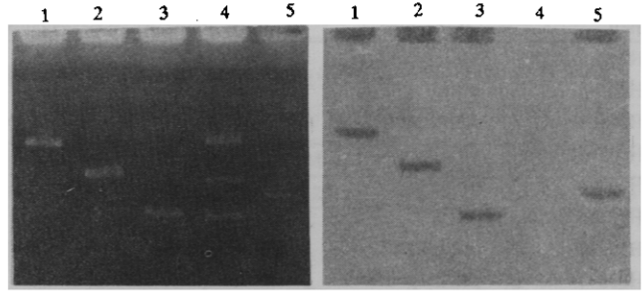


图 1 菌株 CH203 被 Tn5-*sacB* 转座质粒的鉴别

Fig.1 Identification of different plasmids in *R. huakuii* CH203 labelled with Tns-*sacB*

1. GMI9023(pRH^a); 2. GMI9023(pRH^b); 3. GMI9023(pRH^c);
4. CH203; 5. GMI9023(pJB5JI).

www.cnki.net

表1 根瘤菌质粒缺失突变株的表型特征

Table 1 Characteristics of plasmid-cured derivatives of *R. huakuii* CH203

| 菌株 Strain | 相关基因型 Gene type | 菌落特征 ^① Morphology | 凝絮性 ^② Flocculation | 结瘤 ^③ Nodulation | 固氮酶活 Acetylene reduction |
|--------------|---|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| CH203 | wild type | S | - | + | + |
| CH203-1 | pRH ^a | S | - | + | - |
| CH203-2 | pRH ^b | R | + | - | - |
| CH203-3 | pRH ^c | S | - | - | - |
| CH203-4 | pRH ^a ⁻ b ⁻ | R | + | - | - |
| CH203-5 | pRH ^a ⁻ c ⁻ | S | - | - | - |
| CH203-6 | pRH ^a ⁻ /pRH ^a | S | - | + | + |
| CH203-7 | pRH ^b ⁻ /pRH ^b | S | - | + | + |
| CH203-9 | pRH ^c ⁻ /pRH ^c | S | - | + | + |

①R: 在TY平板上菌落粗糙; S: 在TY平板上菌落光滑

R: rough colong on TY medium; S: Grossy colony on TY medium.

②+: 在PA液体培养基中菌体凝絮+: Flocculation in PA broth.

③: 在接种根瘤菌7周内观察结果 Examined for 7 weeks after inoculation strains.

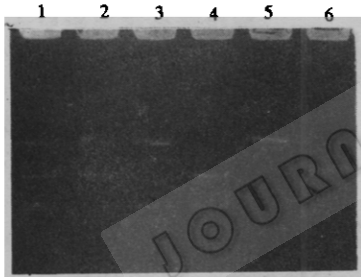


图2 菌株 CH205 及其突变株质粒图谱

Fig.2 Plasmid Profiles of strain CH205 and its derivatives

1. CH203; 2.CH203-1; 3.CH203-2; 4.CH203-3;
5.CH203-4; 6.CH203-5.

株表型特征相似。用 SDS-PAGE 检测菌株的脂多糖 (LPS)。结果 (图 3) 表明, 质粒缺失菌株 CH203-2 (pRH^b) 与野生型相比缺少脂多糖 I, 而质粒恢复菌株 CH203-7 (pRH^b / pRH^b) 与亲本菌株 CH203 一样具有 LPS I 和 LPS II, 进一步证实质粒 pRH^b 与完整的 LPS 产生有关。

2.5 根瘤菌的抗酸性

根瘤菌 CH203 在 pH4.2 以上条件下能生长, 低于 4.2 则不能生长。将各突变株转接于不同的 pH 缓冲培养液中, 在温度为 28℃, 转速为 150r / min 条件下培养一周, 观察培养液是否变混浊, 确定菌株生长与否。所有培养液接种培养一周后, 缓冲液 pH 未变, 结果表明 (表 2) 突变株的抗酸性能力有所下降, 其中缺失了质粒 pRH^b 的菌株, 其抗酸性明显

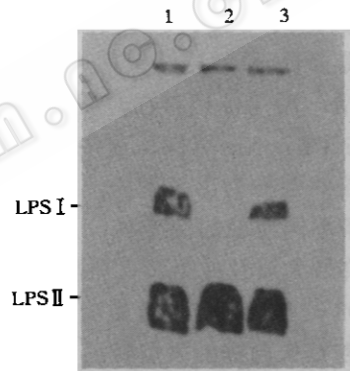


图3 紫云英根瘤菌脂多糖 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.3 LPS profiles of *R. huakuii* strains on SDS-PAGE

1.CH203; 2.CH203-2(pRH^b);
3.CH203-7(pRH^b/pRH^b).

减弱。质粒回复试验表明, 回复菌株 CH203-6(pRH^{a-} / pRH^a)和 CH203-7(pRH^b / pRH^b)能完全恢复菌株的抗酸性, 而质粒回复菌株 CH203-8(pRH^{c-} / pRH^c)的抗酸性只能恢复到一定程度(pH = 4.8), 可能回复质粒 pRH^c上的 Tns 插入微弱影响其抗酸性功能, 由此可见, 菌株的质粒与菌株的抗酸性密切相关。

表2 菌株在不同pH培养基条件下的生长情况

Table 2 Growth of the strains in the different pH TY broth

| 菌株 Strain | 培养液的pH值 | | | | pH in TY broth | | | |
|--|---------|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|
| | 4.2 | 4.5 | 4.8 | 5.0 | 5.2 | 5.5 | 5.8 | 6.0 |
| CH203 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| CH203-1(pRH ^{a-}) | - | - | + | + | + | + | + | + |
| CH203-2(pRH ^{ba}) | - | - | - | + | + | + | + | + |
| CH203-3(pRH ^c) | - | - | - | + | + | + | + | + |
| CH203-4(pRH ^{a b}) | - | - | - | - | + | + | + | + |
| CH203-5(pRH ^{a c}) | - | - | - | - | - | + | + | + |
| CH203-6(pRH ^a /pRH ^a) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| CH203-7(pRH ^b /pRH ^b) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| CH203-8(pRH ^c /pRH ^c) | - | - | + | + | + | + | + | + |

+: 表示在TY液体培养基中生长; -: 表示在TY液体培养基中不生长。

+: Indicating growth in TY broth; -: Indicating no growth in TY broth.

2.6 质粒缺失菌株的共生效应

测定了菌株 CH203-1 的各质粒缺失菌株的结瘤和固氮能力。结果显示, 只有质粒 pRH^a 被消除的突变株 CH203-1 (pRH^{a-})能够在紫云英上结瘤, 其它质粒缺失菌株均失去了它们的共生效应。根瘤呈白色, 并且比野生型菌株 CH203 所结的根瘤小。菌株 CH203-1 所形成的根瘤无乙炔还原活性。这些白色根瘤的组织切片在光学显微镜下显示根瘤细胞量缺乏根瘤细菌, 为无效根瘤。上述结果表明, 紫云英根瘤菌其它隐性质粒也明显影响其共生效应。另外, 关于紫云英根瘤菌 CH205 的质粒缺失菌株的共生效应结果也支持了这个观点, 菌株 CH205 含有 5 条质粒, 它们的大小分别为 pRG_a, 42MD; pRG_b, 72MD; pRG_c, 112MD; pRG_d, 161MD; pRG_e, 230MD^[8]。质粒上未发现共生基因存在。实验结果(表 3)显示, 质粒菌 CH205 中质粒的 pRG_e 丢失明显降低菌株的共生效应。($\alpha = 0.05$), 而质粒 pRG_a 和 pRG_d 同时丢失明显增强菌株的共生效应($\alpha = 0.01$)。

表3 CH205质粒缺失菌株的共生反应

Table 3 Effectiveness of derivatives cured of plasmids in *R. huakuii* CH205

| 菌株 Strain | 基因型 Gene type | 结瘤数 No. of nodules | 植株干重 Dry wt(mg/plant) | 植株增重 Added dry wt (mg/plant) |
|--------------|--|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|
| CK | | 0 | 18.10±0.30 | 0 |
| CH205 | wild type | 15±2 | 45.82±0.41 | 27.72±0.41 |
| CH205-3 | pRG _e ⁻ | 14±1 | 32.16±0.39 | 14.06±0.39 |
| CH205-7 | pRG _a ⁻ d ⁻ | 25±3 | 65.75±0.62 | 47.65±0.62 |

CK: 未接种紫云英根瘤菌, 表中数据为30株植株平均测定值。

CK: Not inoculating *R. huakuii* strain values are the mean ±SE of thirty plants.

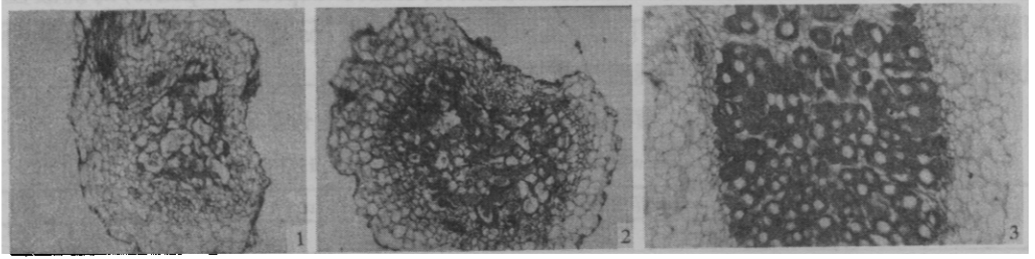


图4 CH205突变株根瘤切片(放大倍数 16×10)

Fig.4 Sections of nodules formed on *Astragalus sinicus* L. by plasmid-cured derivatives of CH205(magnification 16×10)

1. CH205-3(pRGe⁻); 2. CH205; 3. CH205-7(pRGa⁻d⁻).

根瘤切片光学显微图片(图4)显示,与菌株CH205形成根瘤相比,实突株CH205-3(pRGe⁻)的根瘤小,含菌细胞少,胞内含菌量少;突变株CH205-7(pRGa⁻d⁻)形成的根瘤大,含菌细胞多,胞内含菌量较多。

3 讨论

根瘤菌大都含有多个巨大质粒,人们通常将根瘤菌质粒转移到适当的受体,探测该质粒的功能,我们考虑到质粒的不相容性,质粒有可能形成多聚体,或者质粒在新的遗传背景下难以表达等因素,我们采用了消除质粒的方法探究质粒的功能,引用转座子Tn5-sacB^[14]快速检出质粒缺失菌株,为紫云英根瘤菌质粒功能研究奠定了基础。近年来,对个别豌豆根瘤菌和菜豆根瘤菌研究结果表明,除共生质粒外,其它非共生质粒是有效根瘤形成所必需的^[5,6]。我们的结果表明,紫云英根瘤菌的隐性质粒显著影响菌株的共生行为,质粒间相互联系相互作用,共同决定根瘤菌的共生能力,也显示了涉及根瘤菌共生行为的基因复杂性与多样性。大多数情况下,质粒缺失使菌株失去共生能力或共生效率下降。但也有例外,我们研究发现消除紫云英根瘤菌CH205的某些质粒,能显著增强其共生效应,在百脉根根瘤菌和大豆根瘤菌USDA194也有类似现象^[15]。消除与菌株某些功能无关的基因组,一部分基因组未能编码蛋白,但从总体上或许节省了能量,这有助于其它功能的表达;同时,质粒消除有可能排除一些限制性因子,使菌株的特定功能得以表达,如菜豆根瘤菌的共生质粒上存在抑制胞外多糖合成基因(*psi*),从而影响菌株结瘤^[16]。迄今,除了对根瘤菌共生质粒上的共生基因外,人们对许多其它的质粒功能很少了解,事实上,根瘤菌许多其它重要性状与质粒紧密相关,如抗逆性、生长速率和胞外多糖产生等等^[11]。随着研究方法改进以及研究性状范围的扩大,我们不但能揭示质粒新的生物学特性,获得一些特殊基因材料,而且会更多地揭示质粒间(基因间)的相互关系,为根瘤菌的研究提供新的材料和新的理论依据。

参 考 文 献

[1] Johnston A W B, Beynon J L, Beringer J E et al. *Nature*, 1978, 276: 634~636.

- [2] Rosenberg C, Boistard P, Denarie J *et al.* *Mol Gen Genet*, 1981, **184**: 326~333.
- [3] Borthakur D, Lamb J W, Johnston A W B. *Mol Gen Genet*, 1987, **207**: 155~160.
- [4] Selenska-Trajkova S, Radewa G, Markov K. *Lett Appl Microbiol*, 1990, **10**: 123~126.
- [5] Hynes M F, McGregor N F. *Mol Microbiol*, 1990, **4**: 407~414.
- [6] Susana Brom, Alejandro G S, Tomasz Stepkowsky *et al.* *J Bacteriol*, 1992, **174**: 5183~5189.
- [7] Chen W X, Li G S, L Y *et al.* *Int J Syst Bacteriol*; 1991, **41**: 274~280.
- [8] 邹向宏, 曹燕珍, 李阜棣. 华中农业大学学报, 1994, **13**: 325~331.
- [9] Vincent M J. 上海植物生理研究所固氮室. 根瘤菌研究实用手册. 上海: 人民出版社, 1970. 3.
- [10] Eckhardt T. *Plasmid*, 1978, **1**: 585~588.
- [11] Gava J R, Elias P M, Neel K D *et al.* *J Bacteriol*, 1989, **171**: 8~15.
- [12] Chen H, Cartner E, Rolfe B G. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 1058~1064.
- [13] Johansen D A. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw Hill, 1940.
- [14] Hyne M F, Quandt, J, O'Connell M P *et al.* *Gene*, 1989, **78**: 111~120.
- [15] Pankhaurst C E. *J Gen Microbiol*, 1986, **132**: 2321~2328.
- [16] Borthakor D, Johnston A W B. *M Gen Genet*, 1987, **207**: 149~155.

FUNCTIONS OF PLASMIDS IN *RHIZOBIUM HUAKUII*

Zou Xianghong^{1,2} Li Fudi¹ Chen Huakui¹

¹Department of Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070

²College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094

Abstract *Rhizobium huakuii* CH203 harbors three plasmids (pRH_a, 97MD; pRH_b, 108MD; pRH_c, 251MD), and pRH_c has been shown to be the symbiotic plasmid. By positive selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmid using transposon carrying *Bacillus subtilis savB* gene, the derivatives cured of different plasmids were isolated. In comparison with the parent strain CH203, the strain cured of pRH_a lost its ability to fix nitrogen, only forming ineffective nodules. The derivative cured of pRH_b showed no nodulating on root of host plant. The strain lacking pRH_b had rough colonies on TY medium and lost lipopolysaccharide (LPS I). The strain lacking pRH_c(*sym* plasmid) obviously lost its symbiotic performance. Furthermore, curing of each plasmid in strain CH203 reduced the strain's tolerance to acid. Complementation of each plasmid cured with corresponding plasmid restored their original phenotypes. The study suggests that other plasmids in addition to *sym* plasmid affect symbiotic performance. Further studying on function of plasmids in *Rhizobium huakuii* CH205 also approved the hypothesis.

Key words *Rhizobium huakuii*, Plasmid, Symbiotic effectiveness