

文章编号: 1003-8701(2001)06-0024-06

利用标记基因 lacZ 研究根瘤菌 对烟草发根的侵染

王逸群¹, 赵仁贵², 王玉兰², 孙珊珊³

(1. 福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007;

2. 吉林农业大学农学院, 吉林 长春 130118; 3. 福建师范大学历史系)

摘要: 用发根农杆菌菌株 LBA1314 采用叶盘法对烟草进行转化, 诱导烟草发根。将标记基因 *nifHDK-lacZ*、*nifH-lacZ*、*hemA-lacZ* 通过三亲交配法导入根瘤菌, 然后接种烟草发根。 β -半乳糖苷酶组织化学染色和徒手切片观察表明, 野生型根瘤菌可以感染烟草发根, 回接试验证明侵染烟草发根的细菌是根瘤菌。

关键词: 根瘤菌; 感染; 烟草发根; β -半乳糖苷酶

中图分类号: Q945.13; S572

文献标识码: A

自 1973 年发现非豆科植物 (*Parasponia*) 根上有固氮根瘤, 而且证明根瘤内的细菌又确实是根瘤菌后, 促进了根瘤菌对非豆科植物感染和结瘤固氮的研究。

近年来, 国内外学者对发根农杆菌的 Ri 质粒转化植物越来越感兴趣, 由于发根生长速度快, 生长条件可以人为控制, 而且遗传上稳定, 因而发根是进行许多与根相关理论研究的理想实验系统。报道较多的是应用发根来研究根与根际微生物之间的关系。

生物固氮在提供植物氮素营养方面占有重要的地位。据统计, 每年生物固氮提供了约 80% 的氮素营养, 豆科植物的共生固氮量是非豆科植物固氮量的 4.58 倍 (Wani 等, 1995)。扩大共生固氮的范围, 是共生固氮研究领域的一个宏伟目标。

本试验的目的在于用含有固氮酶调节基因 *nifHDK* 启动子-*lacZ*、*nifH* 启动子-*lacZ*、血红蛋白基因 *hemA* 启动子-*lacZ* 的融合标记基因的野生型根瘤菌接种烟草发根, 观察根瘤菌是否对其感染, 如果有所结果, 将重新评估根瘤菌对非豆科植物的作用, 这无论在理论上还是在实践上都有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

植物材料: 烟草红花大金元由本室保存。

菌株和质粒: 野生型豌豆根瘤菌 *R. L. bv. Viciae* USDA 2370^T、野生型三叶草根瘤菌 *R. l. bv. trifolii* 162K68^R、野生型苜蓿根瘤菌 *R. l. bv. phaseoli* 127K17^R 由中国农业大学陈文新

收稿日期: 2000-12-11

作者简介: 王逸群(1965-)男, 福建师范大学生物工程学院讲师, 从事作物数量遗传和植物基因工程研究。

教授赠送。豌豆根瘤菌 *R. l. bv. Viciae* ACCC16101、*R. l. bv. Viciae* ACCC16102、*R. l. bv. Viciae* ACCC16103、*R. l. bv. Viciae* ACCC16106 由中国农业科学院刘慧琴副研究员赠送。pAB358、pRK2013 HB101 由中国农业大学李季伦教授惠赠,其中 pAB358 含有 *nifH* 启动子调控的 *lacZ* 基因,pRK2013 为协助质粒。Gmi10504 由 G.Truchet 博士提供,Gmi10504 含有 *hemA* 启动子调控的 *lacZ* 基因。pMB210 由北京大学的王忆平教授赠送,pMB210 含有 *nifHDK* 启动子调控的 *lacZ* 基因。野生型发根农杆菌 LBA1314 由荷兰的 Diaz 博士提供。

1.2 试验方法

烟草无菌苗的制备:用 0.1% 的硝酸银消毒 5 min 后,无菌水洗涤 5 次,用 95% 的乙醇消毒 10 s,再用无菌水洗涤 5 次,然后在 1/2 MS 固体培养基上萌发。

烟草发根的诱导:采用叶盘法转化,按文献[9]介绍的方法进行。

三亲交配法:按文献[3、4]所介绍的方法进行。将启动子 *HemA*、*nifH*、*nifHDK*、*nifA* 启动子调控的 *lacZ* 基因通过三亲交配法导入根瘤菌。

β -半乳糖苷酶活性测定:按文献[10]所介绍的方法进行。测定导入 *lacZ* 标记基因根瘤菌和对照的 β -半乳糖苷酶活性。

β -半乳糖苷酶组织化学染色:按文献[6]所介绍的方法进行。用含有标记基因根瘤菌感染烟草发根,进行 β -半乳糖苷酶组织化学染色。

β -半乳糖苷酶组织化学染色后的徒手切片观察:按文献[1、6]所介绍的方法进行。

根瘤菌回接试验:按文献[5]所介绍的方法进行。

2 试验结果

2.1 烟草发根的诱导

本试验选用苗龄 7 d 的无菌烟草苗,用发根农杆菌菌株 LBA1314 采用叶盘法对其进行转化,将发根农杆菌 LBA1314 接种于含 50 mg/L Rif 的 YEB 液体培养基中,28℃ 振荡培养,两次培养活化至菌的浓度为 $OD_{600}=0.4\sim 0.6$ 。第 2 次培养活化的细菌用 MS 液体培养基稀释至原来体积的 3~5 倍。将烟草无菌叶片剪成 5 mm×5 mm 小块,在上述菌液中浸泡 10~30 min。用无菌滤纸吸干表面的菌液后,转入 MS 固体培养基上共培养 1~3 d,然后转入附加杀菌的 500 mg/头孢噻肟钠和 500 mg/L 羧苄青霉素的 MS 基本培养基上,25℃ 下光照 12 h,诱导发根的形成。一周左右呈现烟草发根。每隔一周,继代杀菌一次,4~5 代后将抗生素浓度降为 100 mg/L,直至杀菌完全。获得烟草发根。

2.2 根瘤菌的 β -半乳糖苷酶活力测定

为了标记根瘤菌,将固氮酶调节基因 *nifA* 启动子、固氮酶结构基因 *nifHDK* 启动子、固氮酶结构基因之一 *nifH* 启动子、根瘤菌合成血红素的基因 *hemA* 启动子接上 β -半乳糖苷酶 *lacZ* 基因,以便对标记的根瘤菌进行挑选、活性测定和染色鉴定。将根瘤菌在含有 IPTG 和 X-gal 的培养基上培养,挑取蓝色菌落,再进行微氧液体培养,测定其 β -半乳糖苷酶的活力。测定结果见表 1。

从表 1 中可以看出,对照根瘤菌有一定本底的 β -半乳糖苷酶活性,而导入质粒后 β -半乳糖苷酶活性显著提高。与对照菌相比,*hemA-lacZ* 的活性最高,提高了 4.33~13.38 倍,*nifKDH-lacZ* 提高了 1.30~8.71 倍,*nifH-lacZ* 的活性提高了 1.65~8.99 倍。Boivin C. 等(1990)、Wu Tong 等(1995)在测定 β -半乳糖苷酶活性时,也测出了根瘤菌的本底。在 pG-mi10504 质粒中根瘤菌 *hemA* 启动子表达不受氧含量的影响,活性最高,而 pAB358、pMB210

表 1 根瘤菌 β -半乳糖苷酶活力的测定

根瘤菌菌株	质粒	启动子	β -半乳糖苷酶活力	与对照比酶活力提高的百分率(%)
<i>R. l. bv. Viciae</i> USDA2370 ^T	CK		296	0
	PGmi10504	hemA	2 251	660
	PAB358	nifH	1 050	254
	PMB210	nifHDK	1 055	256
<i>R. l. bv. trifolii</i> 162K68 ^R	CK		250	0
	PGmi10504	hemA	1 332	433
	PAB358	nifH	662	165
	PMB210	nifHDK	576	130
<i>R. l. bv. phaseoli</i> 127K17 ^R	CK		210	0
	PGmi10504	hemA	1 160	452
	PAB358	nifH	951	353
	PMB210	nifHDK	624	197
<i>R. l. bv. Viciae</i> ACCC16101	CK		85	0
	PGmi10504	hemA	1 223	1 338
	PAB358	nifH	849	899
	PMB210	nifHDK	826	871
<i>R. l. bv. viciae</i> ACCC16102	CK		150	0
	PGmi10504	hemA	1 071	614
	PAB358	nifH	700	366
	PMB210	nifHDK	803	435
<i>R. l. bv. viciae</i> ACCC16103	CK		170	0
	PGmi10504	hemA	1 011	495
	PAB358	nifH	773	355
	PMB210	nifHDK	771	353
<i>R. l. bv. viciae</i> ACCC16106	CK		169	0
	PGmi10504	hemA	1 168	591
	PAB358	nifH	936	454
	PMB210	nifHDK	789	366

质粒中 nifH-、nifHDK-启动子的表达在有氧情况下是组成型低水平表达,活性降低。在同样情况下,又以根瘤菌 *R. l. bv. viciae* ACCC16101 的最好,本研究结果为根瘤菌的选择提供了实验依据。

2.3 lacZ 基因标记的野生型根瘤菌接种烟草发根后 β -半乳糖苷酶组织化学染色

取接种豌豆根瘤后的 7、10、14 d 的烟草发根,用无菌水进行数次洗涤,去除根表的根瘤菌,然后进行 β -半乳糖苷酶组织化学染色。经过次氯酸钠透明后,在解剖镜下观察染色结果(表 2)。可见根瘤菌进入了烟草,其显著特点是在根维管系统被染色,占 25%~30% 的比例。

表 2 接种根瘤菌的烟草发根组织化学染色结果

感染部位	<i>R. l. bv. viciae</i> USDA2370 ^T				<i>R. l. bv. phaseoli</i> 127K17 ^R				%
	hemA-lacZ	nifH-lacZ	nifHDK-lacZ	wild type	hemA-lacZ	nifH-lacZ	nifHDK-lacZ	wild type	
维管系统	20.9	37.5	25.9	0	31.3	31.7	25	0	
未感染	79.1	62.5	74.1	100	68.7	68.3	75	100	

2.4 烟草发根 β -半乳糖苷酶组织化学染色的徒手切片观察

将经过 β -半乳糖苷酶组织化学染色后的材料进行徒手切片,在显微镜下观察,结果见图 1-1、1-2、1-3、1-4。

从图中可见,染成蓝色的部位在烟草发根的维管系统和刚分化的侧根维管和分生组织部位。接种有 hemA-lacZ 质粒的根瘤菌,发根染色略深(图 1-2、图 1-4),而有 nifHDK-lacZ 质粒的根瘤菌染色略浅(图 1-3)。

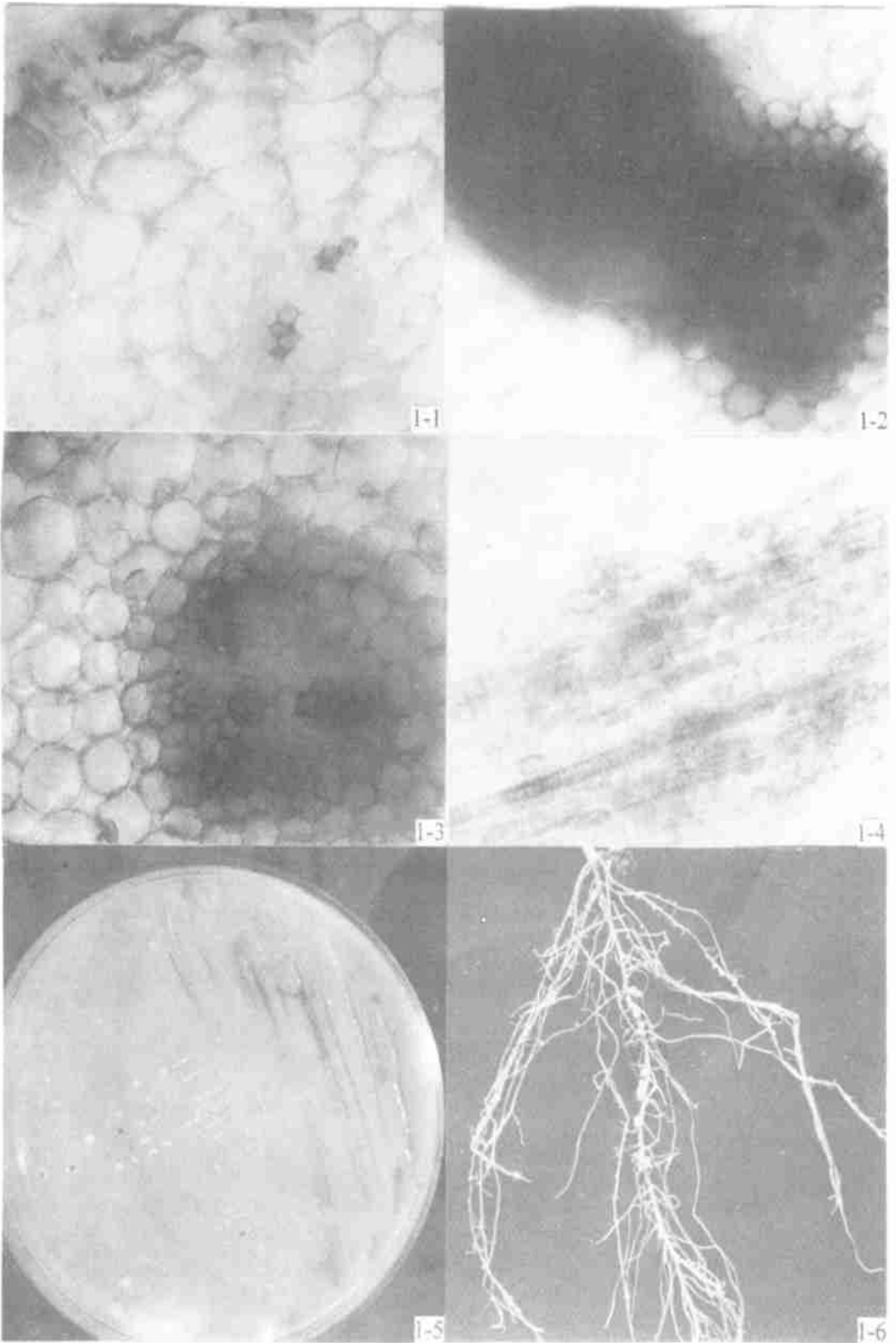


图 1-1:烟草发根对照;图 1-2:用含 *hemA-lacZ* 的豌豆根瘤菌接种烟草发根(横切);图 1-3:用含 *nifHDK-lacZ* 的豌豆根瘤菌接种烟草发根;图 1-4:用含 *hemA-lacZ* 的豌豆根瘤菌接种烟草发根(纵切);图 1-5:从接种豌豆根瘤菌的烟草发根中分离根瘤菌;图 1-6:从烟草发根中分离的豌豆根瘤菌回接豌豆后形成的根瘤

图 1 烟草发根 β -半乳糖苷酶组织化学染色的徒手切片

2.5 根瘤菌回接试验

将接种豌豆根瘤菌的烟草发根洗涤,表面消毒,磨碎,低速离心,取液涂皿。在 YMA 的平板上涂有 X-gal, IPTG, 出现蓝色菌落。再取菌落划线培养 2~3 d, 有蓝色菌落出现(图 1-5), 从而证明是被接种的有标记基因的根瘤菌。将此根瘤菌回接到萌发 3~7 d 的豌豆根上, 2~3 周后豌豆根上结有根瘤(图 1-6)。经过 β -半乳糖苷酶组织化学染色, 观察到根瘤也染成蓝色。

3 讨论

3.1 根瘤菌对烟草发根的感受

除了接种含有标记基因的豌豆根瘤菌外, 还接种了含有同样标记基因的菜豆根瘤菌、三叶草根瘤菌。从 β -半乳糖苷酶组织化学染色的结果来看, 烟草发根都能染成蓝色, 说明这 3 种根瘤菌对烟草发根的侵染并没有专一性。

3.2 lacZ 基因的表达

本试验中, 由于含有 nifHDK、nifH 启动子-lacZ 融合标记基因的根瘤菌接种烟草发根, 经过 β -半乳糖苷酶组织化学染色后都能染成蓝色, 说明 lacZ 得到了表达, 由此推断应有固氮酶的表达, 还需进一步试验来证实。

参考文献:

- [1] 李正理. 植物组织制片学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1996. 17-138.
- [2] 秦明波, 李国珍, 等. Ri 质粒转化植物细胞的机理[J]. 生物工程进展, 1993, 12(4): 41-44.
- [3] 莫才清, 覃雅丽, 等. 应用发光酶基因对快生型大豆根瘤菌 HN01 结瘤作用进行检测[J]. 微生物学报, 1998, 38(3): 213-218.
- [4] 莫才清, 周俊初, 李阜棣. 含发光酶基因的转座子质粒载体的改造及向根瘤菌 HN01 的转座[J]. 应用与环境生物学报, 1997, 3(3): 252-257.
- [5] Bergersen F J. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Research Studies Press. J. Wiley and Sons ed. New York, USA. 1980, 5-100.
- [6] Boivin C, Camut S, Carlos A, et al. Rhizobium meliloti genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. Plant Cell, 1990, 2: 1157-1170.
- [7] Diaz C L, Melchers L S, et al. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. Nature, 1989, 338(6216): 579-581.
- [8] Gough C, Vasse J, Galersa C, et al. Interactions between bacterial diazotrophs and non-legume dicots; Arabidopsis thaliana as a model plant. Plant and Soil, 1997, 194: 123-130.
- [9] Horsch R B. Leaf disc transformation. In: Gelvin S B, Schilperoot R A, and Verma D P S eds. Plant Molecular Biology Manual. Dordrecht: Kluwer, 1988, A5: 1-9.
- [10] Miller J H. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1972, 352-435.
- [11] Petit A, et al. Transformation and regeneration of the legume Lotus corniculatus; A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet, 1987, 207: 245-250.
- [12] Rolfe B G, et al. Root morphogenesis in legumes and cereals and the effect of bacterial inoculation on root development. Plant Soil, 1997, 194: 131-144.
- [13] Wani S P. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. Plant and soil, 1995, 174: 29-49.
- [14] Webster G, et al. Interaction of Rhizobia with rice and wheat. Plant and Soil, 1997, 194: 115-122.
- [15] Wu Tong, Zhu Jiabi, Yu Guanjiao, et al. Inhibition of nodule development by multicopy promoters of Rhizobium meliloti nif/fix genes. Science in China, 1995, 38(9): 1108-1116.
- [16] Yanni Y G, Rizk R Y, Corich V, et al. Natural endophytic association between Rhizobium leguminosarum bv. trifolii and rice roots

and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil*, 1997, 194, 99—114.

Study on Rhizobia Infections to Tobacco Hairy Roots by Using Reporter Gene lacZ

WANG Yi-qun, et al.

(College of Biological Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: Tobacco hairy roots were induced by *A. rhizogenes* strain LBA1314 using leaf disc transformation. The plasmids harboring the reporter gene lacZ fused to the promoters of hemA, nifHDK, and nifH respectively, were transformed into *rhizobia* by triparental mating and the conjugated *rhizobia* were inoculated into tobacco hairy roots. The results indicated that the histochemical staining of β -galactosidase and a cross-section of tobacco hairy roots showed that the *rhizobia* could infect or enter into the non-legume tobacco hairy roots. The bacteria isolated and purified from the colonized roots, which were stained again for β -galactosidase activity, were reinoculated into legume pea for nodulation. It was showed that the bacterias in the formed nodules with blue color after β -galactosidase staining were the pea *rhizobia* with lacZ reporter gene.

Key words: *Rhizobia*; Infection; Tobacco hairy roots; β -galactosidase

(上接 23 页)

- [10] 李大伟,等. 大豆未成熟胚培养中高浓度植物生长素的作用及其植株[J]. 植物学报, 1989, 3(5): 349—354.
- [11] 刘博林,等. 两个栽培大豆品种的体细胞胚胎发生和植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(2): 11—13.
- [12] 刘艳芝,等. 大豆幼胚子叶诱导胚胎发生[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(6): 16—18.
- [13] 邓向阳,等. 大豆主栽品种体细胞胚胎发生的影响因素及再生植株[J]. 实验生物学报, 2000, 33(1): 69—79.
- [14] Ranch J P, et al. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1985, 21(11): 653—658.
- [15] 周思君,等. 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 39—44.
- [16] Cheng T Y, et al. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Science Letters*, 1980, 19: 91—99.
- [17] Mante S, et al. A simple, rapid protocol for adventitious shoot development from mature cotyledons of *Glycine max* cv Bragg. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1989, 25(4): 385—388.
- [18] 袁 鹰,等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(1): 9—13.

Effect of Induce Factors on Multiple Bud Formation of Cotyledonary Node in Soybean

WANG Ping, WANG Jun-jun, SHNAG De-hu, WANG Gang

(Research Center of Plant Genetic Engineering, The Quatermaster
University of PLA, Changchun, 130062, China)

Abstract: The effects of four factors on multiple bud formation using two varieties (Jilin 43 and Dongnong 42) cotyledonary node in soybean were researched. The results showed that difference of frequency and number of multiple bud did not reached significant level. MSB medium is better than B₅ medium in inducing multiple bud. 6-benzylaminopurine (1.1 mg/L or 1.7 mg/L) stimulated multiple bud formation. The frequency of multiple bud formation was not different between two genotypes.

Key words: Trans gene soybean; Cotyledonary node; Multiple shoot-bud