

转座子 Tn5 诱变对三叶草根瘤菌早期侵染和结瘤的影响

黄世贞

(福建省农业科学院土肥所, 福州)

对三叶草根瘤菌 *Rhizobium trifolii* 野生型菌株 ANU843 及其转座子 Tn5 诱导的突变株 nod258 和 nod261 的侵染和结瘤能力进行了比较。Ⅰ区结瘤基因 nodFE 的突变株 (nod258) 能在地三叶草 (*Subterranean clover*) 上正常侵染和结瘤, 但瘤数比 ANU843 所诱导的略有减少。而Ⅱ区结瘤基因 nodIJ 的突变株 (nod261) 却表现侵染力减弱, 诱导无效瘤和瘤数大大减少。显微镜观察和超微结构研究表明菌株 ANU843 在接种后 24h 侵染已经从植物根毛开始, 48h 侵染线 (infection thread) 发展到表皮细胞并开始分支, 接种后 72h 侵染线进一步发展, 深入皮层细胞, 这时皮层细胞已经大量分裂增生, 形成瘤的分生组织。成熟的瘤细胞内充满了类菌体。而 nod261 突变株侵染植物比 ANU843 推迟了 24h, 侵染线的发展受阻, 接种后 72h 侵染线仍然停留在根毛细胞中。nod261 突变株所诱导的瘤细胞内没有或仅有个别类菌体, 是无效瘤。这表明结瘤基因 nodIJ 与侵染线的正常形成和发展密切相关。

关键词 转座子诱变; 点接种; 侵染; 结瘤; 超微结构

在三叶草根瘤菌野生型菌株 ANU843 中, 共有结瘤基因 (common nod) 和寄主专一性基因 (hsn) 位于共生质粒 (Symplasmid) 的 14kb DNA 片段上^[1]。转座子 Tn5 诱变将该 DNA 片段上的基因划分为五个区 (称为 I, II, III, IV 和 V 区), 这些区段的基因影响侵染、结瘤或寄主范围^[2-4]。

本实验用转座子 Tn5 诱变三叶草根瘤菌野生型菌株 ANU843 所产生的 II 区突变株 nod261 和 III 区突变株 nod258 为材料, 研究它们对寄主植物地三叶草结瘤的影响, 并且比较了 II 区结瘤缺失突变株 nod261 和 ANU843 对植物早期侵染, 侵染线形成和发展的超微结构。

材料和方法

(一) 菌株及培养条件

实验所用的菌株由澳大利亚国立大学

生物科学院植物分子生物学系 B.G. Rolfe 教授实验室提供。

1. 三叶草根瘤菌 (*R. trifolii* ANU 843): 按文献[5]。

2. Nod261: 转座子 Tn5 诱导 ANU-843 产生的 II 区突变株, 具有 Km^r 标志^[2,5]。

3. Nod258: 转座子 Tn5 诱导 ANU 843 产生的 III 区突变株, 带有 Km^r 标志^[2,5]。

R. trifolii ANU843 以改良的 Bergersen's 培养液 (BMM) 培养^[6]。突变子 nod261 和 nod258 以 BMM 培养液另加卡那霉素 50μg/ml, 30°C 振荡培养 24h, 达到对数后期 (350 Klett units) 的菌悬液用于

本文于 1988 年 12 月 1 日收到。

本文系作者在澳大利亚国立大学生物科学院植物分子生物学系访问期间的部分科研成果。在工作中曾得到 Prof. B.G. Rolfe 和 Dr. M.A. Djordjevic 的指导与帮助, 特此致谢。

接种。

(二) 种子表面消毒和幼苗培养

地三叶草种子 (*T. subterranean* cv. Mt Baker) 的消毒和发芽参照 Rolfe 的方法^[6]。当种子根长约 1cm 时, 取健康的苗转移到 *Fahracus* (F) 培养基上^[6], 每个平皿 (9cm) 2 株苗。移苗后将平皿以芽朝上的方向竖立置光照培养箱中, 27°C, 光周期 16h/8h, 光强 480 μ EM⁻²/s, 培养物用作点接种实验。或者当种籽发芽根长约 1.5cm 时, 将苗转移到预先已灭菌的 7.5ml 1/2 浓度 Jensen's 无氮培养液^[7] 湿润的无菌塑料袋中, 每袋 3 株苗。移苗后袋口朝上, 苗根部用 *Alumilum foci* 遮光, 在光照培养箱 27°C, 16h/8h, 550 μ EM⁻²/s 培养, 作结瘤模式实验。

(三) 点接种

当幼苗根长约 3cm 时, 以对数后期 (1×10^9 cells/ml) 的菌悬液 (ANU843 和 nod261) 进行点接种。参照 Turgeon 和 Bauer^[8] 的方法, 在双目解剖镜下操作, 以预先用微玻管 (DA 1.2mm, DI 0.6mm) 控制好经高压灭菌的微型接种针吸取少量菌悬液, 将小液滴接种在幼根上最敏感的部位 (介于根尖与最小根毛突起之间^[9,10]), 每株苗接种量约 20—50nl)。用防水笔标下接种时根尖 (RT) 所在位置, 作为取样时的参考。接种后幼苗继续在上述光照培养箱内培养。

(四) 结瘤模式实验

当幼苗根长约 4—5cm 时, 用新鲜培养的菌悬液 (1×10^9 cells/ml) 接种幼苗根部, 每株苗接种量为 200 μ l, 并用防水笔标下接种时 RT 的位置, 作为计标结瘤数目时区分在 RT 之上或 RT 之下所形成的瘤的标志。每种处理接种 60 株苗, 分别接种 ANU843, nod261 和 nod258 三种处理。接种后苗继续在光照培养箱中培养, 并经常

检查和根据塑料袋内干湿情况补加适量的培养液。接种 ANU843 和 nod258 的植株在接种后 9 天, 接种 nod261 的植株在接种后 13 天分别计算主根上的瘤数, 并在解剖镜下测量各个瘤与 RT 记号之间的距离, 每种处理计算 60 株苗, 绘制结瘤模式图。

(五) 显微镜技术

点接种以后分别在 24, 48 和 72h 取样。用刀片在双目解剖镜下切下点接种位点上下约 5mm 长的根段 (以 RT 记号为标志), 以 2.5% 戊二醛和 2% 锇酸双固定。样品脱水和渗透包埋参照 Roberston 和 Lytleton 方法^[11], 改用 Spurr 树脂, 在 60°C 包埋 24h。上述样品用于观察根毛弯曲和侵染。瘤的样品在接种后 20 天取样, 用改良的 Karnovsky 方法^[11], 以含 2.5% 戊二醛和 2% 聚甲醛的固定液和 1% 锇酸双固定, 丙酮系列脱水, 以 LR White 树脂包埋。厚度为 0.5 μ m 的切片经 1% toluidine blue 染色后在 Nikon 显微镜下观察照相。用 Reichert-Jung 超薄切片机切超薄片 (90—150nm), 醋酸铀和柠檬酸铅染色, 用日立 H-500 型电子显微镜在 75KV 观察。

结 果

(一) 结瘤模式

三叶草根瘤菌野生型菌株 ANU843 对地三叶草的结瘤模式图显示在围绕根尖记号 (RT) 周围形成明显的结瘤旺盛区带, 结瘤高峰离 RT 很近, 出现在 RT 上方 2mm 处 (图 1-A)。在从 RT 上方 20mm 到 RT 下方 20mm 范围内所形成的瘤占总瘤数的一半以上。

Ⅲ 区突变株 nod258 所诱导的结瘤模式图与 ANU843 所诱导的相似, 在 RT 周围也形成明显的结瘤旺盛区带, 但结瘤高峰却是出现在 RT 下方 2mm 处 (图 1-B)。

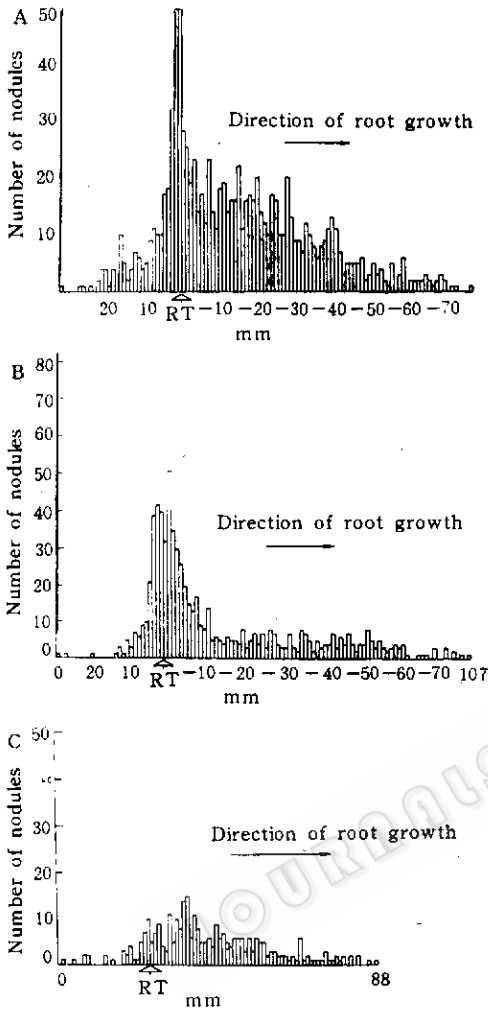


图 1 地三叶草的结瘤模式

Fig. 1 Nodulation profiles of *Subterranean clovers* A, B, 9 days after inoculation with ANU843 and nod258 mutant strain respectively, C, 13 days after inoculation with nod261 mutant strain

Ⅱ区突变株 nod261 的结瘤模式图与 ANU843 和 nod258 所诱导的显然不同(图 1-C), 图中没有明显的结瘤旺盛区段, 随着与 RT 距离的增加, 瘤数平缓地减少, 结瘤最高点与 RT 距离较远, 出现在 RT 下方 10mm 处。占总瘤数 86% 的瘤分布在 RT 下方。

(二) 结瘤基因突变对结瘤的影响

接种Ⅲ区突变株 nod258 的现瘤日期和结瘤株数都和野生型菌株相同, 但平均每株瘤数略有减少(表 1)。接种Ⅱ区突变株 nod261 比接种 ANU843 的现瘤日期推迟了 4 天, 结瘤情况也明显受影响, 在接种的植株中有 1/5 不结瘤, 而且所诱导的瘤的数量也大大减少了。

(三) 突变对诱导根毛弯曲, 侵染线形成和发展的影响

分别观察比较了 nod261 突变株和野生型菌株 ANU843 在接种后 24, 48 和 72h 的侵染情况。显微镜观察和超微结构研究表明, nod261 突变株与 ANU843 同样都诱导根毛弯曲或变形。ANU843 所诱导的根毛弯曲形状比较规则、典型, 多数是根毛细胞弯曲, 或者折迭, 或者弯曲后匍伏在表皮细胞上(图版 I-3,4), 而 nod261 所诱导的根毛弯曲变形比较不规则(图版 I-1,2)。

接种后 24h, ANU843 已侵入弯曲的根毛细胞。观察表明, 侵染大多数从典型

表 1 突变对结瘤的影响

Table 1 The effect of mutagenesis on nodulation

菌 株 Strain	现瘤日期 Date of 1st nodule appeared	结瘤株数* Number of plant nodulated	平均每株瘤数 Average number of nodule per plant	计瘤日期 Date of calculating nodules
ANU843	5	60	16	9
Nod258	5	60	11	9
Nod261	9	48	5	13

*每种处理接种 60 株苗 60 plants for each treatment

弯曲的根毛开始, 被侵染的根毛细胞内原生质很浓厚, 入侵的根瘤菌被包裹在侵染线内。在 48h, 侵染线已经发展到表皮细胞并且开始分支和继续向皮层细胞发展(图版 I-3)。接种后 72h, 侵染线已经由根毛细胞传递到植物的皮层组织, 皮层细胞因受到刺激而大量分裂(图版 I-4)。电子显微镜观察表明, 接种后 72h, 侵染线已经大量分支, 深入到许多皮层细胞中(图版 I-7)。

Nod261 突变株虽然也诱导根毛细胞弯曲变形, 但是接种后 24h 没有观察到根毛细胞被侵染的迹象, 接种后 48h 才观察到侵染从根毛细胞开始, 形成比较粗而短的侵染线, 有时观察到二个或数个根毛细胞同时被侵染(图版 I-1)。与 ANU843 比较, nod261 所诱导的侵染推迟了 24h。超微结构研究表明, 根瘤菌侵入植物细胞后被包裹在侵染线内, 被侵染的细胞处于活跃状态, 原生质很浓厚(图版 I-5)。与 ANU843 显然不同的是, nod261 诱导的侵染在接种后 72h 仍然局限在根毛细胞内, 侵染线没有进一步向表皮细胞和皮层细胞扩展(图版 I-2)。电镜观察表明, 接种后 72h 根瘤菌已大量繁殖, 但仍然束缚在根毛细胞内(图版 I-6)。

(四) 瘤的结构

接种后 20 天, ANU843 所诱导的瘤已经成熟, 内含有豆血红蛋白, 成熟的瘤呈乳白带粉红色泽。切片观察瘤细胞染色很深, 细胞内充满了数量众多的类菌体。旺盛生长时期一个瘤细胞内可能含有几百个到上千个类菌体(图版 II-4,5)。三叶草根瘤的类菌体很大, 每个类菌体膜只包裹着一个类菌体, 呈球形或椭圆形, 有的瘤细胞中还可以观察到部分侵染线(图版 II-

6)。而结瘤缺失突变株 nod261 所诱导的瘤很小, 因缺乏豆血红蛋白, 瘤呈现乳白色, 不带有正常瘤所具有的粉红色泽。切片观察瘤细胞中没有典型的类菌体构造(图版 II-1,2)。电镜观察瘤细胞中常常有大空泡, 在个别瘤细胞中偶尔发现少数发育不全的类菌体, 其大小约只有正常发育的类菌体的 1/10—1/8(图版 II-3)。

讨 论

本实验采用了 Turgeon 和 Bauer 所建立的点接种技术^[8] 研究三叶草根瘤菌各突变株对侵染和结瘤的影响。点接种 ANU843 的植物样品, 接种后 10 天观察发现根部只在接种部位形成 1—2 个瘤。点接种技术的应用, 使得研究早期侵染的范围缩小在接种点周围的敏感细胞, 为详细观察接种后不同时间间隔的样品提供了可能性, 并且大大提高了工作效率。

ANU843 对地三叶草的早期侵染过程与所报道的大豆根瘤菌, 苜蓿根瘤菌和豇豆根瘤菌等对其寄主植物的侵染过程相似^{〔11-17〕}, 包括典型的根毛弯曲, 根瘤菌从根毛入侵, 侵染线的形成和发展以及皮层细胞分裂等过程。本实验精细观察了 II 区结瘤缺失突变株 nod261 对地三叶草的侵染和结瘤情况, 表明 nod261 所诱导的侵染线在接种后 72h 仍然停留在根毛细胞内而不能继续向其下的表皮细胞和皮层细胞发展。nod261 是转座子 Tn5 插入三叶草根瘤菌 II 区(即结瘤基因 nodIJ 所在位点)而产生的突变株^{〔2,3〕}, 由此说明三叶草根瘤菌的结瘤基因 nodIJ 与侵染线的正常形成和发展是密切相关的。

参 考 文 献

- [1] Schofield, P.R. et al., *Plant Mol. Biol.*, 3: 3—11, 1984.
 [2] Djordjevic, M.A. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 200: 463—471, 1985.
 [3] Djordjevic, M.A. et al., *Plant Mol. Biol.*, 6: 389—401, 1986.
 [4] Innes, R.W. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 201:426—432, 1985.
 [5] Djordjevic, M.A. et al., *J. Bacteriol.*, 156: 1035—1045, 1983.
 [6] Rolfe, B.G. et al., *Plant Sci. Lett.*, 19: 277—284, 1980.
 [7] Vincent, J.M., *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria*, p. 72, 1970.
 [8] Turgeon, B.G. and Bauer, W.D., *Protoplasma*, 115: 122—128, 1983.
 [9] Bhuvanewari, T.V. et al., *Plant Physiol.*, 66: 1027—1031, 1980.
 [10] Bhuvanewari, T.V. et al., *Plant Physiol.*, 68: 1144—1149, 1981.
 [11] Roberston, J.G. and Lyttleton, P., *J. Cell. Sci.*, 58: 63—78, 1982.
 [12] Vincent, J.M., *Nitrogen Fixation I*, pp. 103—129, 1980.
 [13] Rolfe, B.G. et al., *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, pp. 142—145, 1981.
 [14] Dart, P.J., *The Biology of Nitrogen Fixation*, pp. 381—429, 1974.
 [15] Bauer, W.D., *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 32: 407—449, 1981.
 [16] Callaham, D.A. and Torrey, J.G., *Can. J. Bot.*, 59: 1647—1664, 1981.
 [17] Ridge, R.W. and Rolfe, B.G., *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 717—720, 1985.

THE EFFECT ON EARLY INFECTION AND NODULATION EVENTS OF *RHIZOBIUM TRIFOLII* BY TRANSPOSON Tn5 MUTAGENESIS

Huang Shizhen

(Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou)

The capability of infection and nodulation by Tn5 induced mutants nod 258 and nod 261 was compared to the wild-type *Rhizobium trifolii* strain ANU 843. The mutant strain of nodulation genes(nod FE)located in region III (nod 258) induced normal infection and nodulation on subterranean clovers with nodule number slightly reduced in comparison with strain ANU 843. However nod IJ mutant (nod 261)appeared a poor infective ability and induced non-effective nodule with the nodule number markedly reduced.

Observation by microscopy and ultrastructure study indicated that infection induced by ANU 843 had already started in root hair cell at 24h after inoculation, infection threads developed to epidermal cell and ramified at 48h, by 72h infection threads further developed to many cortical cells, intensive cortical cell divisions had already occurred and nodule meristem formed. The central tissues of mature

nodule induced by strain ANU 843 were filled with numbers of bacteroid (nitrogen fixation occurred there). In contrast, infection response induced by nod 261 mutant showed a 24h delay when compared to strain ANU 843. Infection threads aborted and still limited in root hair even 72h after inoculation. The central tissues of nodule induced by nod261 with few bacteroid and appeared no effective. This indicated that nodIJ genes play an important role in infection thread formation and development.

Key words

Transposon mutagenesis; spot inoculation; infection; nodulation; ultrastructure

图版 I 说明

Explanation of Plate I

1,2. 接种 nod 261 突变株的根纵切片的显微镜照片

Longi-sections of root with nod 261 mutant strain. 1. Infected root hair cell at 48h. $\times 40$; 2. Infection thread aborted in root hair cell 72h after inoculation. $\times 40$; Infection thread (indicated by arrow head)

3,4. 接种 ANU 843 的根纵切片的显微镜照片

Longi-sections of root with ANU 843. 3. Infection thread ramified and developed from root hair to epidermal cell. $\times 40$; 4. Infection threads traveled to plant cortex, extensive cortical cell divisions occurred 72h after inoculation. $\times 40$. Infection thread (indicated by arrow head); Cortex (indicated by star)

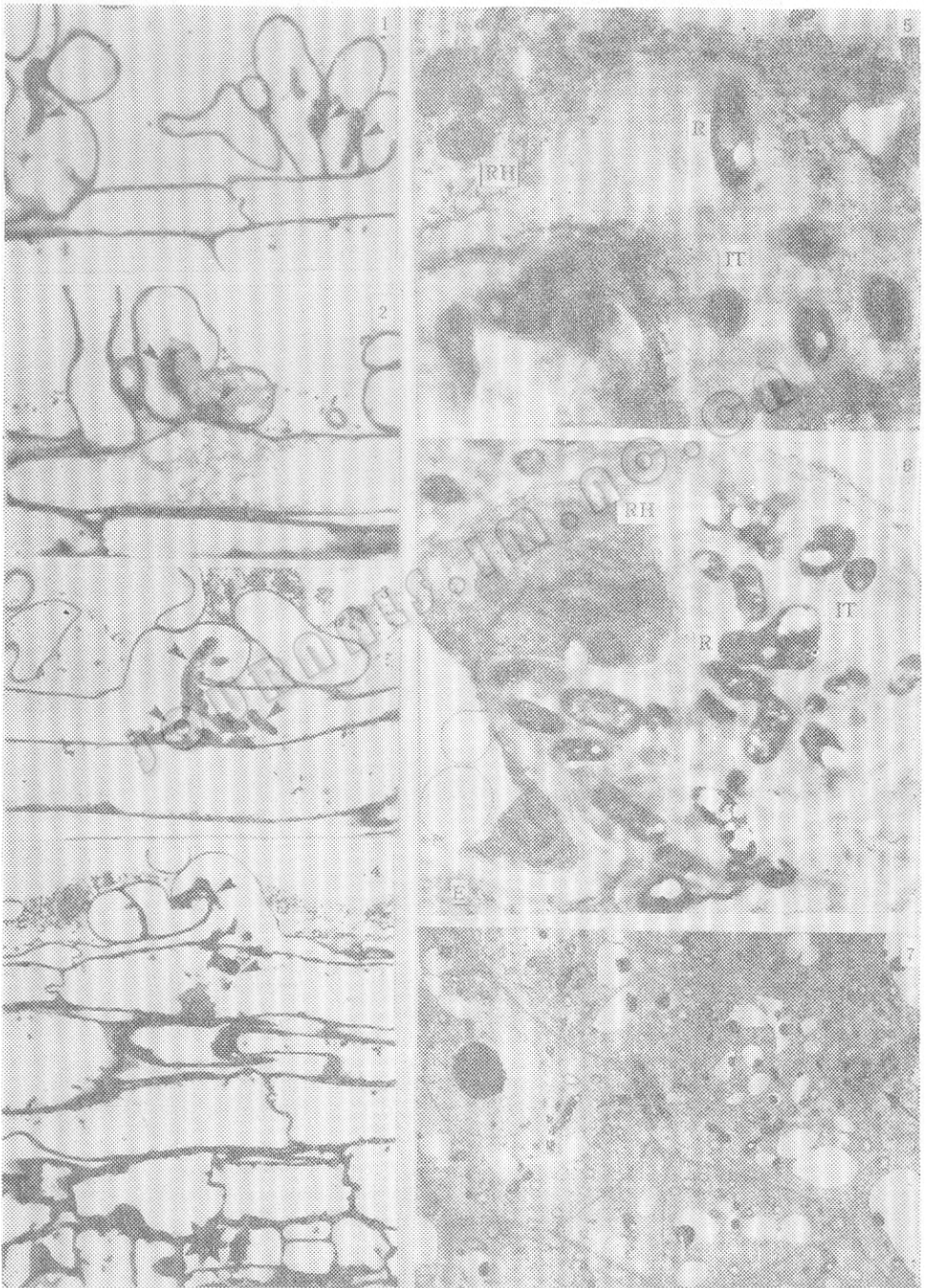
5,6. nod 261 突变株所侵染的根毛细胞超微结构

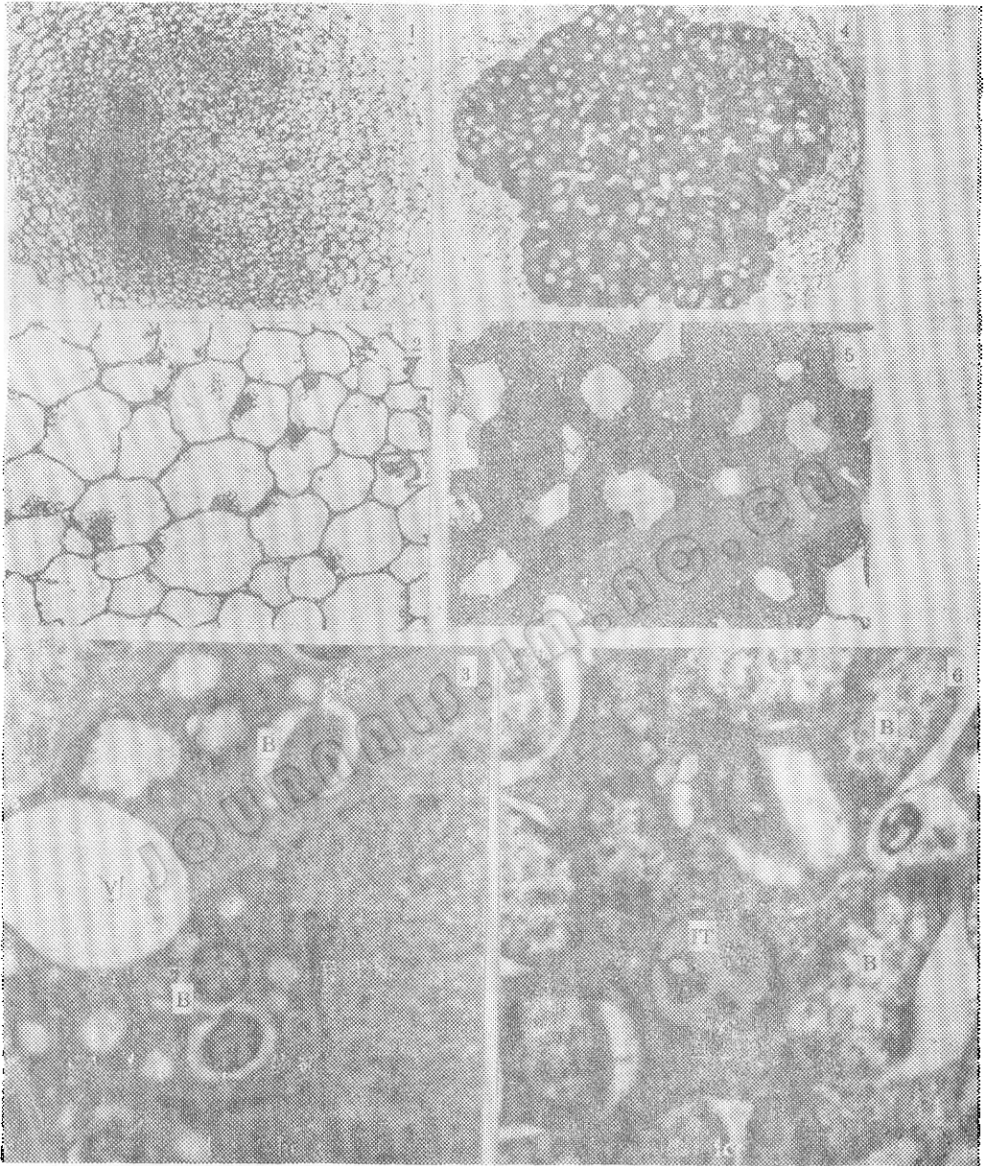
Ultrastructure of infected root hair cell with nod 261 mutant strain. 5. Infection in root hair at 48h. $\times 12000$; 6. Aborted infection thread in root hair cell 72h after inoculation. $\times 9000$. RH Root hair; IT Infection thread; R. *Rhizobium*; E. Epidermal cell

7. ANU 843 所侵染的根细胞超微结构

Ultrastructure of infected root by ANU 843 showing infection threads in cortex at 72h. $\times 2000$. Infection threads (indicated by arrows)

Huang Shizhen: The effect on early infection and nodulation events of *Rhizobium trifolii* by transposon Tn5 mutagenesis





1—3. Nod 261 突变株诱导的无效瘤20天的横切片

Transsection of non-effective nodule 20 days after inoculation with nod 261 mutant. 1. The whole nodule $\times 10$; 2. Central part of nodule section $\times 40$; 3. Electron micrograph of nodule cell with a few bacteroids $\times 14000$. B. Bacteroid; V. vacuole

4—6. ANU 843 诱导的成熟瘤20天的横切片

Transsection of mature nodule 20 days after inoculation with ANU 843. 4. The whole nodule $\times 10$; 5. Central part of nodule section filled with numbers of bacteroids $\times 40$; 6. Electron micrograph of nodule cell with bacteroids $\times 14000$. IT Infection thread; B. Bacteroid