中华苜蓿根瘤菌受种子分泌物诱导的基因筛选和分析*

张　江　王彦涛　郑会明　钟增涛†　朱　军
（南京农业大学生命科学学院，南京　210095）

SCREENING AND ANALYSIS OF GENES INDUCED BY SEED EXUDATES IN *SINORHIZOBIUM* sp. 1128

Zhang Jiang　Wang Yantao　Zheng Huiming　Zhong Zengtao†　Zhu Jun
(*College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing*　210095, *China*)

关键词　*Sinorhizobium* sp. 1128；紫花苜蓿；种子分泌物；刀豆氨酸
中图分类号　Q93　　**文献标识码**　A

土壤中的根瘤菌与宿主植物的共生结瘤过程中，豆科植物可以通过分泌氨基酸，有机酸，糖类，有机酚及其他的次级代谢产物[1]的种类及丰度来影响根圈范围内微生物的群体种类及数量。豆科植物可以通过分泌趋化性物质如糖蛋白等[2]协助根瘤菌吸附在合适的侵染位点，从而增加自身被感染的机率。植物还可以分泌抗菌类物质对根系微生物进行筛选，如在 *Mirabilis jalapa* 的种子分泌物中分离到一种抗菌肽物质，该物质对根系中的真菌有广谱的杀菌作用，同时对一些革兰氏阳性菌具有抗性，但是对革兰氏阴性菌则没有明显的抑制活性[3]。这种现象在 *Arabidopsis thaliana* 中同样存在，其根部产生的丁酸可以使植物免受多种植物病原细菌的侵害[4]。在根瘤菌与豆科植物的共生体系中，当根瘤菌发生不能利用宿主豆科植物根系分泌的特定氨基酸的突变时其在根部的定殖能力也会急剧减弱[5]。

为了了解中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp. 1128 在与其宿主豆科植物紫花苜蓿和草木樨前期相互作用的过程中根瘤菌基因表达的变化，以进一步从分子水平上了解共生模式下两种不同生物互相交流的情况，本文通过采用一类含有无启动子卡那霉素抗性基因的转座子诱变技术，通过基于卡那霉素抗性的活体表达技术，筛选获得中华苜蓿根瘤菌与宿主植物种子分泌物相互作用的基因，并研究了相关基因被种子分泌物诱导表达的情况及其生理功能，发现基因 *ssiA* 在根瘤菌与宿主的早期信号识别具有重要意义。这些研究工作为深入研究共生结瘤固氮这一复杂的过程提供了材料。

1　材料与方法

1.1　供试材料

1.1.1　菌株与质粒　　本试验所用菌株和质粒及其特征见表 1。

1.1.2　培养基和培养条件　　根瘤菌及相关突变株采用 TY 培养基在 28 ℃下培养。*E. coli* SM10λpir 和 BW20676 菌株采用 LB 培养基在 37 ℃下培养。所用试剂浓度：卡那霉素（Km）为 15 μg ml^{-1}；链霉素（Sm）为 100 μg ml^{-1}；氯霉素（Cm）为 20 μg ml^{-1}，刀豆氨酸（CAN）为 100 μg ml^{-1}。

* 国家自然科学基金项目（30870065，30800013）和国家重点基础研究发展规划（973）项目（2010CB126500）资助
† 通讯作者，Tel/Fax：86－25－84396645；E-mail：ztzhong@njau.edu.cn
作者简介：张　江（1983—），男，硕士研究生。E-mail：iamzhangjiang2008@163.com
收稿日期：2009－04－11；收到修改稿日期：2009－11－11

表 1 本研究中所用的菌株和质粒

菌株和质粒	特征	文献及来源
菌株		
Sinorhizobium sp. 1128	Wild type	本实验室[6]
Sinorhizobium sp. YW0	Derivative of Wild type, Spontaneous Sm^r	本实验室[4]
smA, smB, smC, smD	Derivative of YW0 carrying a mariner transposon	本研究
ZHJ1	Derivative of YW0 carrying a *ssiA-lacZ*	本研究
Escherichia coli DH5αλpir	Standard cloning host	本实验室
BW20676	Conjugation strain	本实验室
Escherichia coli SM10λpir	Conjugal donor strain, Sm^s, host of pJZ290	本实验室
质粒		
pJZ260	Mariner transposon with promoter-less Km gene (Cm^r)	本实验室
pVIK112	LacZ transcriptional fusion vector, R6K origin	本实验室[7]
pZHJ1	*ssiA-lacZ* internal fusion in pVIK112, Km^R	本研究

1.2 方法

1.2.1 种子分泌物(SE)的制作 取 10 g 紫花苜蓿种子用 70% 酒精表面消毒,20 ml 无菌水浸泡 24 h,浸泡后的种子用无氮营养液培养至发芽,将培养液过滤除菌,于 4 ℃贮存。

1.2.2 突变株的筛选 将 *Sinorhizobium* sp-YW0 与 SM10λpir(pJZ260)两亲接合的突变株文库稀释后,涂布于含有 Sm 100 μg ml^{-1},Km 15 μg ml^{-1},SE 1%(v/v)的 TY 平板上。为了去除 Km 基因组成型表达的突变株,轻挑菌落分别划线于 Km 15 μg ml^{-1} 和 Km 15 μg ml^{-1},SE 1%(v/v)的 TY 平板上,如果前者平板上无生长,而后者平板上有生长,这说明卡那霉素抗性基因很有可能插在了种子分泌物诱导表达的基因里。

1.2.3 突变株菌体浓度的测定 1% 接种突变株至 TY 液体培养基(Km,15 μg ml^{-1})中,等量分装成两瓶,一瓶加入 1% 种子浸提物(SE),而另一瓶加入相同体积的无菌水做对照,28 ℃摇床培养。每隔 24 h 左右测定一次菌体浓度(OD_{600})。

1.2.4 任意 PCR(arbitrary PCR) 按照文献[6]进行操作。

1.2.5 β-半乳糖苷酶活性的测定 将待测菌株培养至 OD_{600} 于 0.2 ~ 1.0 之间,按照文献[8]的方法进行,并对每个待测菌株重复 3 次试验,以获得误差值。

1.2.6 刀豆氨酸(CAN)抑菌试验 按照文献[9]进行操作,即将待测菌株进行刀豆氨酸未处理和处理的液体培养,梯度稀释后获得细胞数量,并计算比值。同样的试验重复 3 次,获得比值的误差数。

2 结 果

2.1 种子分泌物能够诱导 Km 表达的突变株的筛选

从 8 000 个接合子突变株中筛选得到了 4 株能够诱导 Km 抗性基因表达突变株,即突变株在没有分泌物的 Km 培养基中生长被抑制,在添加分泌物的 Km 培养基中由于 Km 抗性基因诱导表达,可以生长,二者之间菌体浓度(OD_{600})形成明显差异,但种子分泌物对不同突变株的诱导能力也不同(图 1)。

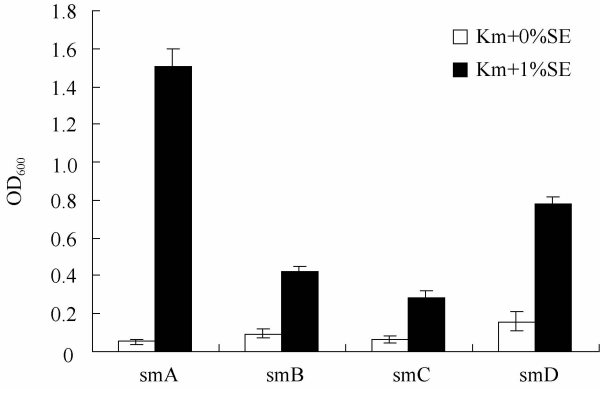

图 1 种子分泌物(SE)对突变株的诱导

2.2 转座子插入位点序列分析

分别以 mariner 转座子 5' 和 3' 端的引物进行 arbitrary PCR 扩增分别得到 mariner 转座子的 5' 和 3' 端的序列。经 DNA 测序,BLAST 比对发现能够诱导 Km 基因表达的 4 株突变株的转座子插入到了 4 个不同的基因中(图 2,箭头表示转座子中卡那霉素抗性基因的方向),与全基因组测序的中华根瘤菌 *Sinorhizobium medicae* WSM419 中的 *smed_*

4165、*smed*_4658、*smed*_4659 和 *smed*_5465 基因的同源性很高(99%~100%),其编码的蛋白分别为 LysE 家族氨基酸外运蛋白、组氨酸氨解酶、咪唑酮丙酸酶、NADH:黄素氧化酶。

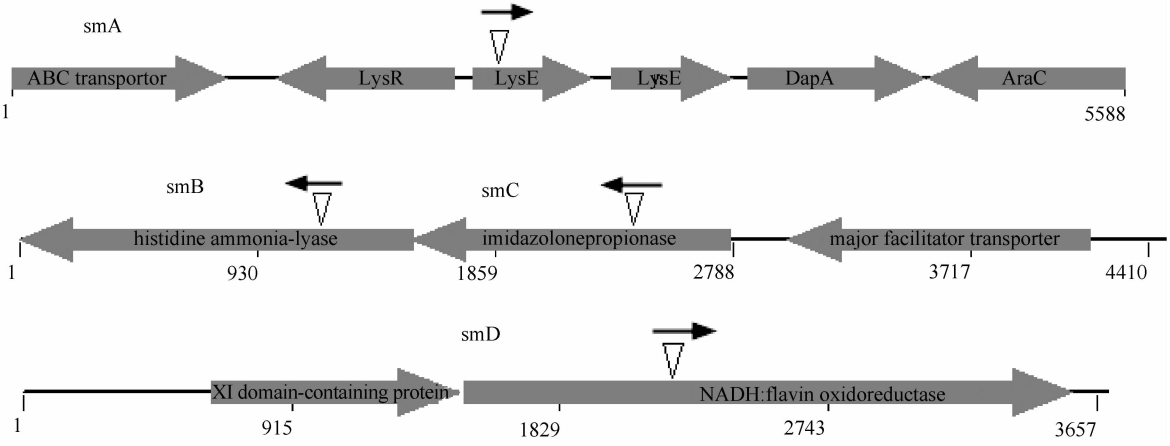

图 2　突变株的转座子插入位点示意图

2.3　*ssiA-lacZ* 的诱导表达

为了验证所筛选的基因是否正确,取其中一个基因 *lysE*(命名为 *ssiA*)通过 *lacZ* 融合验证是否能被种子分泌物诱导,通过测定 β-半乳糖苷酶活性来检测基因 *ssiA* 的表达情况。实验发现宿主植物种子分泌物(SE)中确实存在可以引物根瘤菌 *ssiA* 基因表达的物质(图 3),这进一步说明所筛选的基因确实是在分泌物存在的条件下表达的,并且该基因可能参与了早期菌植互作的过程。序列分析发现,*ssiA* 与天山根瘤菌 *Mesorhizobium tianshanense* 刀豆氨酸外运基因 *msiA*(GenBank 登录号 FJ160755)编码蛋白的序列中有 75% 的同源性,而苜蓿种子及种子分泌物中含有大量刀豆氨酸[10-11]。不同氨基酸诱导试验发现刀豆氨酸确实能够诱导 *ssiA* 表达,而其他常见碱性(包括中性)氨基酸不能诱导其表达(图 4),这意味着 *ssiA* 可能编码刀豆氨酸外运蛋白。

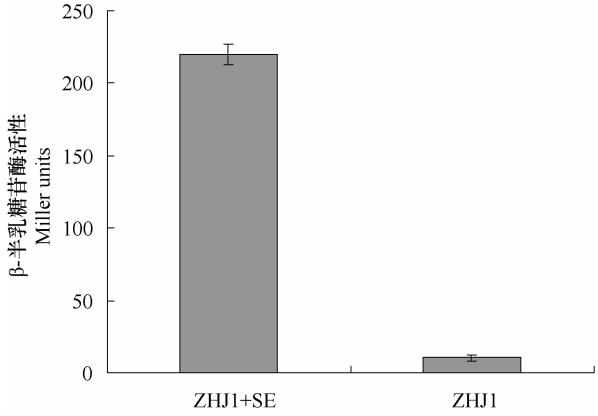

图 3　种子分泌物(SE)对 ZHJ1 的诱导表达

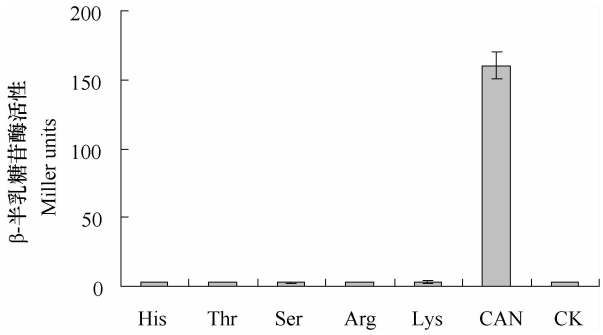

图 4　不同氨基酸对 ZHJ1 的诱导表达

2.4　刀豆氨酸的抑菌实验分析

用刀豆氨酸同时处理野生型和突变株 ZHJ1(中间片段融合使 *ssiA* 失活)后,进行梯度稀释计数并计算刀豆氨酸未处理和处理后的细胞数量的比值。结果发现,与不加入刀豆氨酸相比,刀豆氨酸处理野生型菌株,几乎没有造成细胞数量的减少,比值约为 1;而同样的条件作用于突变株,细胞数量显著降低,未处理的细胞数量约为处理后的 100 倍(图 5)。这进一步验证 *ssiA* 可能与刀豆氨酸的运输

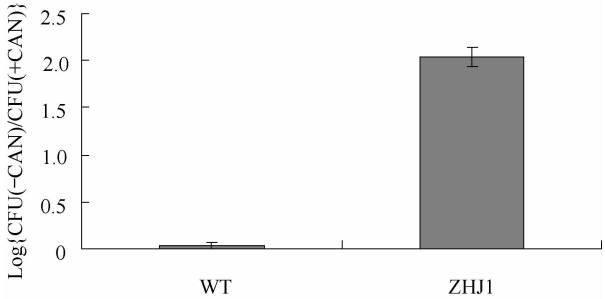

图 5　野生型(WT)和 *ssiA* 突变株(ZHJ1)对刀豆氨酸的敏感性

有关。*ssiA* 基因缺失的突变株不能将有毒的刀豆氨酸运出胞外造成对菌株刀豆氨酸的敏感。

3 讨 论

根瘤菌与宿主植物共生的过程中,需识别植物的一系列如有机酸、类黄酮、氨基酸、胞外多糖[12-13]等信号分子,并能够逃避宿主植物的免疫反应[12],才能成功侵入宿主植物,这其中就包括根瘤菌体内很多与该过程相关的基因的表达变化。本文运用无启动子的卡那霉素抗性基因作为基因表达筛选标记,获得了 4 种能被植物种子分泌物诱导表达的基因。其中组氨酸氨解酶和咪唑酮丙酸酶是一类与氨基酸代谢相关的酶,而 NADH:黄素氧化酶与生物的能量代谢有关,表明在菌植互作的前期过程中植物分泌物中的一些糖类、有机酸、芳香类化合物、氨基酸等化合物可以引起根瘤菌生理代谢的一些变化,具体机制尚待进一步研究。

本试验重点对 *ssiA* 基因进行了研究,其基因表达产物为一类 LysE 家族氨基酸外运蛋白,主要运输一些碱性氨基酸,如赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、刀豆氨酸(CAN)等[9,14];经氨基酸诱导性试验发现 *ssiA-lacZ* 只能被刀豆氨酸诱导,因此推测其可能与 L-刀豆氨酸的外运有关。L-刀豆氨酸是一类精氨酸类似物,普遍存在于豆科的 240 属、1 200 种植物中[15],在苜蓿种子中含量很高。刀豆氨酸掺入新合成的蛋白中,由于不能完成正确的折叠而变性,从而对细胞造成毒性。刀豆氨酸作为一种抗代谢物,被认为可以抑制植物根圈内昆虫的食害和病原微生物的侵染[16]。在苜蓿根际曾报道了刀豆氨酸抑制某些细菌的生长的现象[10]。本试验中,刀豆氨酸明显抑制了中华苜蓿根瘤菌 *ssiA* 突变株的生长,从而推测 *ssiA* 基因产物可能在中华苜蓿根瘤菌 *Sinorhizobium* sp. 1128 结瘤的过程中将刀豆氨酸运输至胞外,从而避免被苜蓿种子或根系分泌的刀豆氨酸杀死而成为根际土壤中的优势菌,为下一步的共生结瘤奠定了基础。根据同源性比对的结果可知,在 *ssiA* 基因上游还有一类 LysR 转录调控蛋白,该调控蛋白如何结合刀豆氨酸信号分子诱导下游 *ssiA* 基因的表达将是后续进一步研究的内容。

参 考 文 献

[1] Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M. Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. Crit Rev Microbiol, 2004, 30: 205—240

[2] Currier W W, Strobel G A. Chemotaxis of *Rhizobium* spp. to a glycoprotein produced by birdsfoot trefoil roots. Science, 1997, 196: 434—436

[3] Cammue B P, de Bolle M F, et al. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides form *Mirabilis jalapa* L. seeds. J Biol Chem, 1992, 267: 2 228—2 233

[4] Bais H P, Prithiviraj B, Jha A K, et al. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. Nature, 2005, 434: 217—221

[5] Jimenez-Zurdo J I, Garcia-Rodriguez F M, et al. The *Rhizobium meliloti putA* gene: Its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. Mol Microbiol, 1997, 23: 85—93

[6] 汪洋, 郑会明, 杨梦华, 等. 中华根瘤菌自体诱导物合成酶基因的筛选及其在大肠杆菌中的表达. 微生物学报, 2007, 47(5): 838—842

[7] Kalogeraki V S, Winans S C. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. Gene, 1997, 188: 69—75

[8] Miller J H. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972

[9] Nandineni M R, Gowrishankar J. Evidence for an arginine exporter encoded by *yggA* (*argO*) that is regulated by the LysR-type transcriptional regulator ArgP in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 2004, 186(11): 3 539—3 546

[10] Emmert E A, Jocelyn M, Julie C L, et al. Effect of canavanine from alfalfa seeds on the population biology of *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(12): 4 683—4 688

[11] 吴莹莹, 佟建明, 张琪, 等. 苜蓿种子中刀豆氨酸含量的测定. 中国饲料, 2008, 17: 35—37

[12] Kathryn M J, Hajime K, Bryan W D, et al. How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium-Medicago* model. Nature Review, 2007, 5: 619—633

[13] 周晶, 王鹏, 钟增涛, 等. 中慢生型天山根瘤菌胞外多糖相关基因 exo5 及其在根毛吸附和生物膜形成中作用的研究. 土壤, 2008, 40(3): 465—468

[14] Broer S, Kramer R. Lysine excretion by *Corynebactevium glutamicum*. Eur J Biochem, 1991, 202: 137—143

[15] Bell E A, Laky J A, Dohil R M. Systematic significana of canavanine in papillionoideae (Fabiodea). Biochem System Ecol, 1978, 6: 193—204

[16] Rosenthal G A. L-canavanine: A higher plant insecticidal allelochemical. Amino Acids, 2001, 21: 319—330