

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



(43) 国际公布日  
2011年9月29日 (29.09.2011)

PCT

(10) 国际公布号  
WO 2011/116708 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/072213
- (22) 国际申请日: 2011年3月28日 (28.03.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201010133089.0 2010年3月26日 (26.03.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国科学院上海生命科学研究院 (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 罗利 (LUO, Li) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。 徐霁 (XU, Ji) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。 李晓琳 (LI, Xiaolin) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 本国际公布:  
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。  
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: METHOD OF CHANGING PLANTS' CHARACTERS

(54) 发明名称: 一种改变植物性状的方法

(57) Abstract: The present invention relates to a method to change characters in plants by utilizing the special feature of the symbiotic relationship between root nodule-forming plants and rhizobia. Exogenous genes can be expressed in the rhizobia localized in the root nodule cells of the plants. Gene products can then be transported to other tissues and organs of the plants through the inner transport system, which will then change the characters or phenotypes of the plants.

(57) 摘要:

本发明涉及一种改变植物性状的方法, 应用可形成根瘤的植物与根瘤菌形成共生关系的特殊性质, 在植物根瘤细胞内部定殖的根瘤菌中表达外源基因, 然后通过植物体内已经存在的运输系统将基因表达产物转运到植物的其它组织器官, 从而改变植物的性状或表型。



WO 2011/116708 A1

## 一种改变植物性状的方法

### 技术领域

本发明属于生物技术和植物学领域；更具体地，本发明涉及一种改变植物性状的方法。

5

### 背景技术

现有技术中，普遍采用转基因技术来改变植物的性状或表型，获得植物的新品种。尽管现有技术中植物的转基因技术已经被广泛地研究和应用，经典的例如利用农杆菌携带目的基因，将之转化植物的愈伤组织，该技术对于许多种类的植物均是有益的，例如模式植物拟南芥、经济作物水稻、小麦、棉花、烟草等等。人们却发现，对豆科作物等其它一些植物采用常规的转基因技术(如农杆菌法)以获得转基因植物非常困难。目前还没有特别高效的针对豆科作物的转基因技术，这大大限制了豆科作物的品种改良。此外，由于可能存在对健康的影响，一些转基因植物目前还不能被很多人接受。

15 豆科作物为种子植物中很大的一个科，分布很广。例如，作为豆科作物的一种，紫花苜蓿是一种分布广泛的豆科牧草，还可以作为饲料和绿肥以及人们日常食用的蔬菜。干旱是影响豆科作物正常生长以及产量的主要因素之一。因此，目前迫切需要提高豆科作物的抗旱能力，从而扩大豆科作物的种植面积，提高产量。

因此，本领域迫切需要研究一种可方便、有效地改变植物性状或表型的方法。

20

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种改变植物性状的方法。

一种改变植物或作物性状或表型的方法，所述方法包括：

25 (1) 提供一种重组根瘤菌，所述的重组根瘤菌细胞中含有外源基因的表达盒(游离于基因组之外，也可以整合到基因组中)；所述的外源基因是改变植物性状相关基因，或是被表达后能形成改变植物性状相关成分的基因；和

(2) 将重组根瘤菌与植物接触共生，从而所述的外源基因(在植物体内，特别是根瘤内)被表达并被转运到植物的细胞、组织或器官内；或者所述的外源基因(在植物体内，特别是根瘤内)被表达并形成改变植物性状相关成分(如激素，生长素，细胞分裂素等)，该成分被转运到植物的细胞、组织或器官内。

30

在一个优选例中，所述的重组根瘤菌的出发菌株选自(但不限于)：苜蓿中华根

瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)、费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)、豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*)、花生根瘤菌(*Bradyrhizobium* sp. *arachis*)、茎瘤固氮根瘤菌(田菁(茎瘤)根瘤菌) (*Azorhizobium caulinodans*)、埃氏慢生根瘤菌(慢生大豆根瘤菌) (*Bradyrhizobium elkanii*)、辽宁慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium liaoningense*)、华癸中生根瘤菌(紫云英) (*Mesorhizobium huakuii*)、百脉根中生根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)、埃特里根瘤菌(菜豆) (*Rhizobium etli*)、豌豆根瘤菌(菜豆生物型) (*Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*)、豌豆根瘤菌(三叶草生物型) (*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*)、甘草根瘤菌(*Mesorhizobium glycyrrhiza*)或黄芪根瘤菌(*Mesorhizobium astragalus*)。

在另一优选例中，所述的植物是能与根瘤菌共生的植物。

在另一优选例中，所述的植物选自：豆科植物(豆科作物)。

在另一优选例中，所述的豆科植物选自：苜蓿、大豆、豌豆、花生、菜豆、绿豆、赤豆、蚕豆、豇豆、紫云英、甘草或黄芪。

15 在另一优选例中，所述的外源基因选自：异戊烯基转移酶基因、 $\gamma$ -氨基丁酸合成酶基因、赤霉素3合成酶基因、古巴焦磷酸合成酶基因，内根-贝壳杉烯合成酶基因，内根-贝壳杉烯19-氧化酶基因，内根-贝壳杉烯酸7 $\beta$ 羟化酶基因，GA12-醛合成酶基因，GA-7-氧化酶基因，GA-13-羟化酶基因，GA20-氧化酶基因，GA3 $\beta$ 羟化酶基因，GA2-氧化酶基因或细胞色素P450单加氧酶基因。

20 在另一优选例中，所述的外源基因选自：异戊烯基转移酶基因、 $\gamma$ -氨基丁酸合成酶基因。

在本发明的另一方面，提供一种重组根瘤菌，其细胞中含有外源基因的表达盒；所述的外源基因是改变植物性状相关基因，或是被表达后能形成改变植物性状相关成分(如植物细胞分裂素)的基因。

25 在另一优选例中，所述的外源基因选自：异戊烯基转移酶基因、 $\gamma$ -氨基丁酸合成酶基因和赤霉素3合成酶基因、古巴焦磷酸合成酶基因，内根-贝壳杉烯合成酶基因，内根-贝壳杉烯19-氧化酶基因，内根-贝壳杉烯酸7 $\beta$ 羟化酶基因，GA12-醛合成酶基因，GA-7-氧化酶基因，GA-13-羟化酶基因，GA20-氧化酶基因，GA3 $\beta$ 羟化酶基因，GA2-氧化酶基因或细胞色素P450单加氧酶基因。

30 在另一优选例中，所述的重组根瘤菌表达异戊烯基转移酶，所述的异戊烯基转移酶能合成植物细胞分裂素。

在另一优选例中，所述的植物细胞分裂素是反式玉米素。

在另一优选例中，所述的重组根瘤菌表达  $\gamma$ -氨基丁酸合成酶，所述的  $\gamma$ -氨基丁酸合成酶能合成  $\gamma$ -氨基丁酸。

在本发明的另一方面，提供所述的重组根瘤菌的制备方法，所述方法包括：

5 将表达载体转移入根瘤菌中；其中，所述的表达载体中含有外源基因的表达盒，所述的外源基因是改变植物性状相关基因或是被表达后能形成改变植物性状相关成分的基因。

10 在一个优选例中，采用辅助菌(优选选自大肠杆菌(*Escherichia coli*) MT616/pRK600 和 MM294/pRK2013)进行辅助接合，从而将表达载体转移入根瘤菌中。

在另一优选例中，所述的表达载体选自(但不限于)：pSRK-km、pMB393 和 pPHU231。

在本发明的另一方面，提供一种所述的重组根瘤菌的用途，用于改变植物(或作物)性状。

15 在另一优选例中，所述的重组根瘤菌表达异戊烯基转移酶或  $\gamma$ -氨基丁酸合成酶，该重组根瘤菌用于提高植物(优选豆科作物)的抗旱能力，提高植物的固氮酶活力，促进植物的生长，提高植物的生物量，提高植物组织中细胞分裂素含量，提高植物组织的水份含量，降低植物组织(如叶片)中过氧化物的含量，提高植物组织(如叶片)中抗氧化酶类基因的表达或提高植物抗病虫害(铃夜蛾、沙柳木蠹蛾  
20 和番茄叶霉菌)能力。

在本发明的另一方面，提供一种改变植物(或作物)性状的组合物，包括：

(1) 有效量的所述的重组根瘤菌；和

(2) 农药学上可接受的载体。

在一个优选例中，所述的组合物是肥料。

25 在另一优选例中，所述的组合物为选自下组的剂型：可湿粉剂，可乳化浓缩物，水溶液，乳液，可喷洒溶液，油性或水性分散系，悬浮剂，粉剂，颗粒剂，或微胶囊。

在另一优选例中，所述组合物还含有选自下组的物质：表面活性剂、展着剂、填充物质、或根瘤菌活性促进剂。

30

在本发明的另一方面，提供一种制备改变植物(或作物)性状的组合物的方法，

所述方法包括：将有效量的所述的重组根瘤菌与有效量的农药学上可接受的载体混合。

本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

5

### 附图说明

图 1. 苜蓿根瘤菌工程菌株的构建流程示意图。

图 2. 接种工程根瘤菌的紫花苜蓿的生物量与结瘤固氮能力。

A, **Shoot**, 接种根瘤菌的紫花苜蓿地上部分的生物量(生长至第四周的茎和叶, 纵坐标单位为克); **plant**, 接种根瘤菌的紫花苜蓿总的生物量(纵坐标单位为克);

B, 接种根瘤菌的紫花苜蓿上形成的总瘤数;

C, 接种根瘤菌的紫花苜蓿上形成的根瘤的固氮酶活性(单位为 [nmol 乙烯]/nmol[乙炔]/g 植物的总生物量)。WT, 接种携带空载体苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* Rm1021/pvector); LMG202, 接种苜蓿根瘤菌工程菌株。

15 图 3. 接种工程根瘤菌的紫花苜蓿对于干旱的耐受能力测试。

A, 未经干旱处理接种根瘤菌的紫花苜蓿(生长至第 4 周);

B, 经过干旱处理 4 天接种根瘤菌的紫花苜蓿;

C, 经过干旱处理 6 天接种根瘤菌的紫花苜蓿;

D, 经过干旱处理 6 天再重新浇水后第 2 天的接种根瘤菌的紫花苜蓿。WT, 接  
20 种携带空载体苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* Rm1021/pvector); LMG202, 接种苜蓿根瘤菌工程菌株。

图 4. 大豆根瘤菌工程菌株的构建流程示意图。

图 5. 接种工程大豆根瘤菌 LMG102 增强了栽培大豆的抗旱性。左侧植株为接种工程大豆根瘤菌 LMG102 的大豆植株; 右侧植株为接种野生型大豆根瘤菌(慢生型大豆根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum*/pvector)的大豆植株。  
25

图 6. 苜蓿中华根瘤菌处理的紫花苜蓿叶片中细胞分裂素(CK)含量。接种工程苜蓿中华根瘤菌 LMG202 的紫花苜蓿叶片中 CK 含量较接种携带空载体苜蓿根瘤菌的 CK 含量明显增加。

图 7. 接种工程苜蓿根瘤菌的紫花苜蓿的水分含量。

30 A. 干旱处理前没有明显差异;

B. 干旱处理后, 产生差异。

**Shoot**, 紫花苜蓿地上部分的水份含量; **whole**, 接种根瘤菌的紫花苜蓿总的水

份含量；root，紫花苜蓿根的水份含量。纵坐标单位：百分数(%)。图中 CK 指对照植株即接种携带空载体苜蓿根瘤菌的紫花苜蓿植株。

图 8. PCR 检测 *IPT* 基因在根瘤菌中表达情况。以 *rpsF*(苜蓿中华根瘤菌核糖体蛋白 S6 基因)的表达作为阳性对照。图中 CK 指携带空载体的野生型苜蓿中华根瘤菌。

A. 自生状态下的根瘤菌；

B. 共生状态下的根瘤菌。

图 9. 经干旱处理的紫花苜蓿叶片的过氧化物 DAB 染色。接种工程苜蓿中华根瘤菌 LMG202 的紫花苜蓿叶片中过氧化物含量明显降低。

图 10、紫花苜蓿叶片的抗氧化酶的表达。

### 具体实施方式

本发明人经过广泛的研究，意外地发现可应用一些植物与根瘤菌形成共生关系的特殊性质，在植物根瘤细胞内部定殖的根瘤菌中表达外源基因(如异戊烯基转移酶基因，其可合成植物细胞分裂素(如反式玉米素))，然后通过植物体内已经存在的运输系统将外源基因的表达产物或由该外源基因的表达而形成的成分转运到植物的其它组织或器官，从而改变植物的性状或表型。

### 植物

如本文所用，所述的“植物”是能与根瘤菌共生的植物。本领域人员清楚哪些植物是能够与根瘤菌共生的。多种植物都可形成根瘤结构，这种根瘤结构是相同或相似的，并且都能与根瘤菌共生。

作为本发明的一种实施方式，所述的植物选自：豆科植物(豆科作物)。其中豆科植物种类很多，本发明的方法适用于任何具有根瘤结构或可形成根瘤结构且能够与根瘤菌形成共生关系的豆科作物。例如，所述的豆科植物包括如下：食用类如大豆、蚕豆、豌豆、绿豆、赤豆、豇豆、菜豆、藜豆、木豆、落花生等；饲料类如紫云英、苜蓿、蚕豆、翘摇等；材用类如合欢、黄檀、皂角、格木、红豆、槐等；染料类如马棘、槐花、木蓝、苏木等；树胶等；树脂类如阿拉伯胶、木黄芪胶、柯伯胶等；纤维类如印度麻、葛藤等；油料类如大豆、落花生等。应理解，在本发明的技术方案的提示下，本领域人员易于想到变换各种豆科作物的种类而实现相同或相似的技术效果，这些变换形式也包含于本发明。

## 外源基因

本发明对于外源基因没有特别的限制，只要其能够被根瘤菌表达，并且自身能够改变植物的性状或表型，或表达后能够形成改变植物性状相关成分。所述的外源基因可以是结构基因。合适的外源基因例如但不限于：异戊烯基转移酶基因、  
5  $\gamma$ -氨基丁酸合成酶基因和赤霉素 3 合成酶基因等。

此外，外源基因还包括其变体，该变体表达的蛋白与该外源基因表达的蛋白具有相同的功能。其通过插入或删除部分碱基，进行随机或定点突变等来获得。

所述的外源基因的表达盒还可包括操作性与所述外源基因相连的启动子等元件。

10 作为本发明的一种实施方式，所述的源基因是异戊烯基转移酶基因。异戊烯基转移酶(IPT)是一种可指导细胞分裂素合成的催化酶，参与调控植物发育、形态和生理过程，在调控植物组织中细胞分裂素水平方面具有重要作用。其氨基酸序列例如 GenBank 登录号 AAK90970.2 所示；其编码基因的序列例如 GenBank 登录号 AE007871.2 所示。

15 所述的异戊烯基转移酶可在根瘤菌中合成植物细胞分裂素，特别是反式玉米素，所述的反式玉米素(为小分子)是一种细胞分裂素，可调控细胞分裂及影响多种发育事件，例如枝条(shoot)的发育、库强、根的分枝、枝条顶端优势的控制、叶的发育、叶绿体发育和叶片衰老等。

其它可用的外源基因包括但不限于： $\gamma$ -氨基丁酸合成酶，赤霉素 3 合成酶古  
20 巴焦磷酸合成酶，内根-贝壳杉烯合成酶，内根-贝壳杉烯 19-氧化酶，内根-贝壳杉烯酸 7 $\beta$ 羟化酶，GA12-醛合成酶，GA-7-氧化酶，GA-13-羟化酶，GA20-氧化酶，GA3 $\beta$ 羟化酶，GA2-氧化酶或细胞色素 P450 单加氧酶等的编码基因。

$\gamma$ -氨基丁酸合成酶是一种谷氨酸脱羧酶，是以谷氨酸为底物，合成 $\gamma$ -氨基  
25 丁酸的关键酶，参与植物与环境之间的信息交流。其氨基酸序列例如 GenBank 登录号 AAB18493.1 所示；其编码基因的序列例如 GenBank 登录号 M84024.1 所示。

赤霉素 3 合成酶是一种参与植物生长调节剂——赤霉素生物合成的关键酶。其氨基酸序列例如 GenBank 登录号 AAC39506.1 所示；其编码基因的序列例如如 GenBank 登录号 AF047720.1 所示。

古巴焦磷酸合酶(entcopalyl pyrophosphate synthase, CPS)和内根-贝壳杉烯合  
30 酶(ent- kaurene synthase, KS)也是赤霉素生物合成的关键酶，在赤霉菌中 CPS 和 KS 是以双功能蛋白复合体形式存在，其氨基酸序列例如 GenBank 登录号

CAA75244.1, Q9UVY5.1 或 ABC46413.1 所示; 在高等植物中, 其氨基酸序列例如 GenBank 登录号 AAA73960.1, Q0E088.1, BAH56558.1, BAH56559.1, BAH56560.1, BAD91286.1 或 Q947C4.1 等所示。

5 另外, 内根-贝壳杉烯 19-氧化酶, 内根-贝壳杉烯酸 7 $\beta$  羟化酶, GA12-醛合成酶, GA-7-氧化酶, GA-13-羟化酶, GA20-氧化酶, GA3 $\beta$  羟化酶, GA2-氧化酶或细胞色素 P450 单加氧酶等也是赤霉素生物合成过程中的酶(应用与环境生物学报 2008, 14(4): 571~577, 赤霉素生物合成途径及其相关研究进展; 植物学通报 2002, 19(2):137~149 植物赤霉素生物合成和信号传导的分子生物学), 也可以用于本发明。

10 细胞分裂素、 $\gamma$ -氨基丁酸、赤霉素均为小分子化合物, 为植物生长调解剂。与 3-吲哚乙酸在植物中主动运输的机制不同, 它们在植物中是被动运输的。而且, 根瘤菌本身无法合成细胞分裂素、 $\gamma$ -氨基丁酸和赤霉素。

编码以上各蛋白(酶)的基因均可用于本发明。所述的蛋白包括全长的蛋白或其生物活性片段(或称为活性片段)。例如, 所述的异戊烯基转移酶的氨基酸序列可以  
15 与 GenBank 登录号 AAK90970.2 所示的序列基本上相同。

经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的蛋白也包括在本发明中。以上蛋白或它们的生物活性片段包括一部分保守氨基酸的替代序列, 所述经氨基酸替换的序列并不影响它们的活性或保留了它们的部分的活性。适当替换氨基酸是本领域公知的技术, 所述技术可以很容易地被实施, 并且确保不改变所得  
20 分子的生物活性。这些技术使本领域人员认识到, 一般来说, 在一种多肽的非必要区域改变单个氨基酸基本上不会改变生物活性。

任何一种以上蛋白的生物活性片段都可以应用到本发明中。在这里, 蛋白的生物活性片段的含义是指作为一种多肽, 其仍然能保持全长蛋白的全部或部分功能。通常情况下, 所述的生物活性片段至少保持 50%的全长蛋白的活性。在更优选的  
25 条件下, 所述活性片段能够保持全长蛋白的 60%、70%、80%、90%、95%、99%、或 100%的活性。

本发明也可采用经修饰或改良的上述蛋白, 比如, 可采用为了促进其半衰期、有效性、代谢和/或蛋白的效力而加以修饰或改良的蛋白。所述经过修饰或改良的蛋白可以是一种蛋白的共轭物, 或其可包含被取代的或人工的氨基酸。所述经过  
30 修饰或改良的蛋白可以是与天然存在的蛋白具有较小的共同点, 但也能在根瘤菌中合成改变植物性状相关的成分(如细胞分裂素), 且不会带来其它不良影响或毒



性。也就是说，任何不影响上述蛋白的生物活性的变化形式都可用于本发明中。

本发明还包括了编码上述蛋白的生物活性片段的分离的核酸，也可以是其互补链。编码生物活性片段的 DNA 序列，可以全序列人工合成，也可用 PCR 扩增的方法获得。

- 5 本发明还包括了包含编码所述蛋白或其生物活性片段的核酸分子的载体。所述的载体还可包含与所述核酸分子的序列操作性相连的表达调控序列，以便于蛋白的表达。所述的“操作性相连”或“可操作地连于”指这样一种状况，即线性 DNA 序列的某些部分能够调节或控制同一线性 DNA 序列其它部分的活性。例如，如果启动子控制序列的转录，那么它就是可操作地连于编码序列。

10

### 根瘤菌

- 根瘤菌(rhizobia)是与可形成根瘤结构的植物共生，形成根瘤并固定空气中的氮气供植物营养的一类杆状细菌。这种共生体系具有很强的固氮能力。根瘤菌是通过植物根毛、侧根杈口(如花生)或其他部位侵入，形成侵入线，进到根的皮层，  
15 刺激宿主皮层细胞分裂，形成根瘤，根瘤菌从侵入线进到根瘤细胞，继续繁殖，根瘤中含有根瘤菌的细胞群构成含菌组织。例如，豆科作物的根瘤中，有能固氮的根瘤菌与之共生。根瘤菌将空气中的氮转化为植物能吸收的含氮物质，如氨，而植物为根瘤菌提供有机物。

- 20 尽管根瘤菌通过侵入植物的组织，与植物共生，然而其并非如农杆菌那样，可将携带的任意外源基因良好地转化入植物中。目前本领域人员也无从了解根瘤菌是否可表达外源基因(如异戊烯基转移酶基因)以及是否可形成对于植物的影响(如合成植物细胞分裂素并将植物细胞分裂素转移入植物的组织或器官中)。而本发明人第一次揭示了根瘤菌在与植物共生后，可表达外源基因并有效合成和输送外源基因表达产物或成分进入植物的组织或器官中。

- 25 基于本发明人的新发现，本发明提供了一种重组根瘤菌，其细胞中含有外源基因(如异戊烯基转移酶基因)的表达盒，从而能表达外源基因。当所述的外源基因是异戊烯基转移酶基因时，所述的异戊烯基转移酶能够在根瘤菌内合成细胞分裂素如玉米素(特别是反式玉米素)，玉米素能够被根瘤菌输送给与之共生的植物，并改变植物性状，特别是增强的植物抗逆性。当所述的外源基因是  $\gamma$ -  
30 氨基丁酸合成酶基因时，所述的  $\gamma$ -氨基丁酸合成酶能够在根瘤菌内合成  $\gamma$ -氨基丁酸，能够增强植物的抗病能力。

如本文所用，所述的“重组根瘤菌”可与“根瘤菌工程菌株”或“工程根瘤菌”互换使用，均是指细胞中含有外源基因的表达盒的根瘤菌。所述的重组根瘤菌的出发菌株(即重组操作前的原始菌株)可以是多种根瘤菌，例如选自但不限于：苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)、费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)、豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*)、花生根瘤菌(*Bradyrhizobium* sp. *arachis*)、茎瘤固氮根瘤菌 (*Azorhizobium caulinodans*)，埃氏慢生根瘤菌(慢生大豆根瘤菌) (*Bradyrhizobium elkanii*)、辽宁慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium liaoningense*)、华癸中生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*)、百脉根中生根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)，埃特

5  
10  
15

里根瘤菌 (*Rhizobium etli*)、豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*)、豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*)、甘草根瘤菌 (*Mesorhizobium glycyrrhiza*) 或黄芪根瘤菌 (*Mesorhizobium astragalus*)。也可根据植物的具体种类来选择合适的根瘤菌，这是本领域技术人员所已知的。

本发明还提供了所述的重组根瘤菌的用途，用于改变植物的性状或表型。

15  
20

本发明还提供了所述的一种重组根瘤菌的用途，该重组根瘤菌含有外源的异戊烯基转移酶基因，其可用于提高植物抗旱能力、固氮酶活力，促进植物生长，提高植物的生物量，提高植物组织中细胞分裂素含量，提高植物组织的水份含量，降低植物组织(如叶片)中过氧化物的含量，提高植物组织(如叶片)中抗氧化酶类基因的表达或提高植物抗病虫害(如铃夜蛾、沙柳木蠹蛾和番茄叶霉菌)能力。

25

在参考了本发明的方法后，本领域技术人员可以通过常规的细胞生物学技术大量地生产或培养出所述的重组根瘤菌。生产重组根瘤菌的方法通常是：将表达载体转移入根瘤菌中，所述的表达载体中含有外源基因的表达盒。较佳地，为了提高转移的效率，采用辅助菌进行辅助接合，从而将表达载体转移入根瘤菌中。所述的辅助菌可选自大肠杆菌(*Escherichia coli*) MT616 和 MM294/pRK2013 等。

30

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含有外源基因的表达盒的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的外源基因的转录本可有效连接到载体中的适当启动子上。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP)，或用于大肠杆菌的卡那霉素或氨苄青霉素抗性。本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子或增强子。

## 改变植物性状的方法

本发明提供了一种改变植物性状的方法,包括将重组根瘤菌与植物接触共生,从而所述的外源基因被表达并被转运到植物的细胞、组织或器官内;或者所述的外源基因被表达并形成改变植物性状相关成分,该成分被转运到植物的细胞、组织或器官内。

作为本发明的一个实施方式,提供了一种提高豆科作物抗旱能力、固氮酶活力或促进豆科作物生长的方法,包括:将豆科作物与有效量的可表达异戊烯基转移酶的重组根瘤菌接触,从而植物细胞分裂素(特别是反式玉米素)被转运到豆科作物的细胞、组织或器官内。

植物的各种组织和细胞均可与所述的重组根瘤菌接触(从而根瘤菌被接种上去),例如植物的种子和根系。

在本发明的一个优选例中,将所述的重组根瘤菌配制成菌液(介质上生理盐水)形式,通过浸泡的方法接种到植物的种子上。

15

## 肥料制剂

本发明提供了一种改变植物性状的组合物,其中含有有效量的所述的重组根瘤菌,以及余量的农药学上可接受的载体。较佳地,所述的组合物是肥料。

本发明中,术语“含有”表示各种成分可一起应用于本发明的混合物或组合物中。因此,术语“主要由...组成”和“由...组成”包含在术语“含有”中。

本发明中,“农药学上可接受的”的成分是适用于农业用途而对人或其它动物、植物没有过度不良副反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即有合理的效益/风险比的物质。

本发明中,“农药学上可接受的载体”是用于将本发明的重组根瘤菌传送给植物的可接受的溶剂、悬浮剂或赋形剂等。载体可以是液体或固体,较佳的是能够较高程度保持重组根瘤菌生物活性的载体。

所述组合物的剂型可以是多种多样的,包括但不限于:可湿粉剂,可乳化浓缩物,水溶液,乳液,可喷洒溶液,油性或水性分散系,悬浮剂,粉剂,颗粒剂,或微胶囊。应理解,只要能够将本发明所述的重组根瘤菌在保持全部或部分活性的前提递送到植物植株或种子上的剂型都是可取的。优选那些易于递送的剂型,作为本发明的优选方式,所述组合物是溶液、液体喷洒剂、或喷雾剂。

30

在本发明中，所述的农药学上可接受的载体还可包括辅剂。所述的辅剂是一种辅助成分，在组合物中起辅助调节功能，比如其可以是一种表面活性剂、附着助剂或其它类型助剂。

5 浓缩型的组合物中活性成分的含量较高，如 20-90wt%，而稀释型组合物和实际使用的组合物中活性成分含量较低，通常为 0.00005-0.5wt%。此外，还可以包含其他合适的化学剂、增效剂、微量元素、稳定剂、粘合剂、润湿剂、分散剂、乳化剂、渗透剂、溶剂、充填剂等常用组分。本发明组合物中还可以含有其它活性成分，如杀虫剂或其它肥料。

10 本发明的组合物可含有  $10^4$ - $10^{12}$  个重组根瘤菌/克(mL)组合物；更优选的，含有  $10^6$ - $10^{10}$  个重组根瘤菌/克(mL)组合物。

在制备组合物时，合适的固体稀释剂包括但不限于：硅藻土，玉米壳，磷酸三钙，软木粉，高岭土、膨润土或硅镁土等粘土，和水溶性聚合物。

此外，固体组合物还可以含有一种或多种相容性润湿剂，分散剂，乳化剂或色素，这些成分在固态时也可起稀释剂的作用。

15 这样的固体组合物可以是粉剂，颗粒剂或可湿粉剂的形式。通常通过研磨获得粉剂，通过造粒或压片获得颗粒剂、片剂或砖型剂。

20 液体组合物的形式可以是溶液，悬浮液和乳液，也可以将其包在天然或合成聚合物中，并可以包含润湿剂、分散剂或乳化剂。这样的乳液、悬浮液或溶液可用水性、有机或水-有机稀释剂来制备水溶性聚合物(以及上述稀释剂的混合物)。此外，所述稀释剂中可含有例如以上所述离子型或非离子型的润湿剂、分散剂或乳化剂或它们的混合物。

各种制剂的原理都是已知的，并在例如以下文献中有所描述：

25 Winnacker-Kuchler, "Chemische Technologie"化学技术, Vol.7, C.Hauser Verlag Munich, 第 4 版, 1986; van Valkenburg, "农药剂型", Marcel Dekker N. Y., 第 2 版, 1972-73; K. Martens, "喷雾干燥手册", 第 3 版, G. Goodwin Ltd. London.

30 用于本发明组合物的所需的配制辅剂，(例如惰性物质，表面活性剂，溶剂和其他添加剂)，也是已知的，其描述例如：Watkins "杀虫粉剂稀释剂和载体手册" 第 2 版, Darland Books, Caldwell N. J.; H.v.Olphen, "粘土胶体化学导引" 第 2 版, J. Wiley & Sons, N.Y., Marsden, "溶剂指南" 第 2 版, Interscience, N.Y. 1950; McCutcheon's, "除垢剂和乳化剂年刊", MC Publ. Corp., Ridgewood N.J.; Sisley 和 Wood, "表面活性剂百科全书", Chem.Publ. Co. Inc., N.Y.1964; Schonfelt,

“Grenzflächenaktive Athylenoxidaddukte” 表面活性环氧乙烷加成产物，  
Wiss.Verlagsgesell., Stuttgart 1976; Winnacker-Kuchler, “Chemische Technologie”  
化学技术, Vol.7, C.Hauser Verlag Munich, 第4版, 1986。

可湿粉剂可均匀分散于水。除活性物质之外,可湿粉剂还可包含润湿剂,分散  
5 剂,稀释剂等无环境公害的物质。粉剂的制备可以是:将活性物质与精细粉碎后  
的滑石、高岭土、膨润土之类天然粘土或硅藻土等固体物质一同研磨。颗粒剂的  
制备可以用活性物质喷涂吸附于惰性物质颗粒,或将活性物质溶液通过粘合剂  
(例如聚乙烯醇、聚丙烯酸钠,或矿物油)施加于载体(例如砂、高岭土或惰性物质  
10 颗粒)表面。如果欲与化肥混合施用,则可将合适的活性物质制备成化肥颗粒那样  
制备成颗粒。

#### 本发明的主要优点:

(1) 本发明首次提出可以利用根瘤菌与可形成根瘤的植物共生,将重组表达的  
的外源基因表达产物或因外源基因表达而形成的成分输送到植物的组织或器官  
15 中,从而改变植物的性状或表型。

(2) 本发明第一次揭示根瘤菌在与植物共生后,可表达异戊烯基转移酶并有效  
合成和输送植物细胞分裂素,特别是反式玉米素(小分子化合物)进入植物的组  
织或器官中。克服了常规的植物转基因技术难以应用于豆科作物的技术难题。

(3) 由于可能存在对健康的影响,转基因植物目前还不能被很多人接受。而  
20 本发明提供了一种无需制备转基因植物即可改变植物性状或表型(如提高植物抗  
旱能力)的新方法,满足了人们对于环保以及食品安全的要求。

(4) 发明的重组根瘤菌繁殖方便,成本低廉,可以制成生物肥料,特别是种  
衣剂,大规模地应用到农牧业生产中。

(5) 本发明的重组根瘤菌能够特异性与可形成根瘤的植物共生,而对其它动物  
25 或植物都没有可见的毒害,是一种安全环保的产品。

下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明  
本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,  
通常按照常规条件如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室指南(New York: Cold  
30 Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条  
件。

除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

## 5 实施例 1、表达异戊烯基转移酶的苜蓿根瘤菌工程菌的构建

设计一对靶向根瘤农杆菌异戊烯基转移酶基因阅读框架的寡聚核苷酸引物，序列如下：正向：5'-GCTCATATGTTACTCCATCTCATCTACGG-3'，和反向：5'-CAGTCTAGAGTGCAATACTTGTAACAGGATCCGTAG-3'。

以 *Agrobacterium tumefaciens* C58 pTiC58 (参见 Danhorn T, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR, Fuqua C. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *J Bacteriol.* 2004, 186(14):4492-501, 由 Fuqua 博士提供) 为模板，通过 PCR 扩增，获得目标 DNA 片段；经过限制性内切酶 XbaI 和 NdeI 处理后，克隆至表达载体 pSRK-Km (参见 Khan SR, Gaines J, Roop RM 2nd, Farrand SK. Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl Environ Microbiol.* 2008, 74(16):5053-62; 由 Farrand 博士提供) 的 *lac* 启动子下游，获得重组质粒 pSSJ003；通过三亲本接合(辅助菌为 MT616/pRK600 (参见 Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. Leigh JA, Signer ER, Walker GC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985, 82(18):6231-5; 由 Walker 博士提供)，转移至野生型苜蓿根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 (参见 Leigh 等, 1985)中，获得工程菌株 LMG202。构建过程见图 1。

## 25 实施例 2、根瘤菌工程菌 LMG202 对紫花苜蓿固氮根瘤形成的影响

将紫花苜蓿(*Medicago sativa* Shangdong, 购自山东农科院)种子进行表面消毒以后，与生理盐水(浓度 0.85%(w/v))重悬的根瘤菌 LMG202 (含有  $10^8$  个根瘤菌/ml)混合在一起浸泡 0.5 小时，再播种于经过消毒的砗石珍珠岩人工土壤中，置于人工气候室中发芽生长至第 4 周，倒掉人工土壤，洗净植株，观察并统计根瘤数目，测定固氮酶活性。以接种携带空载体苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* Rm1021/pvector)的紫花苜蓿为对照。

固氮酶活性测定方法如下：收集 10 棵紫花苜蓿根系(子叶以下)，置于一个 10 毫升的玻璃瓶，盖紧瓶塞，用注射器注入 1 毫升乙炔，28℃，反应 30 分钟，吸取 100 微升气体，通过气相色谱仪(Gc961)分析气体的组成成分，其中载气为氮气，柱压为 0.1 兆帕，柱温为 60℃，使用氢离子火焰监测器。通过计算乙烯的平均含量，来确定固氮酶活性大小。

结果发现，接种根瘤菌工程菌株 LMG202 的紫花苜蓿，形成的有效(红色)或者固氮)根瘤数明显减少(下降了 18.9%，图 2B)，红色根瘤比接种携带空载体苜蓿根瘤菌所诱导的略为增大，根瘤的固氮酶活力明显提高(工程菌是 WT 的 2.2 倍，图 2C)。

因此，根瘤菌工程菌 LMG202 可以诱导紫花苜蓿形成较少的固氮根瘤，固氮酶活力明显提高。

### 实施例 3、根瘤菌工程菌 LMG2 促进紫花苜蓿生长

将紫花苜蓿种子进行表面消毒以后，与生理盐水(0.85%(w/v))重悬的根瘤菌 LMG202 (含有  $10^8$  个根瘤菌/ml) 混合在一起浸泡 0.5 小时，再播种。以接种携带空载体苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* Rm1021/pvector, WT)的紫花苜蓿为对照。在种植 28 天后，分别对接种根瘤菌工程菌 LMG202 和接种携带空载体苜蓿根瘤菌(WT)的紫花苜蓿的茎叶和根系的鲜重，分别进行了称量和统计，发现 LMG202 处理的植株生物量高于 WT 株(茎叶和总的鲜重分别增加了 5.8 和 10.9%，图 2A)。因此，工程菌株 LMG202 具有促进紫花苜蓿生长的能力。

因此，接种根瘤菌工程菌 LMG202 的紫花苜蓿，4 周后的生物量比接种携带空载体苜蓿根瘤菌的紫花苜蓿显著提高。

### 实施例 4、接种根瘤菌工程菌 LMG202 的紫花苜蓿抗旱能力显著增强

将紫花苜蓿种子进行表面消毒以后，与生理盐水(0.85%(w/v))重悬的根瘤菌 LMG202 (含有  $10^8$  个根瘤菌/ml) 混合在一起浸泡 0.5 小时，再播种。以未接种根瘤菌的紫花苜蓿为对照。在紫花苜蓿生长过程，每周浇 Jensen 营养液 2 次，每次 80ml。从第 3 周开始，进行干旱耐受试验。干旱耐受试验开始以后，不再浇水或者营养液，直至发现植株枯萎为止。在试验开始后的第 3 天，接种携带空载体苜蓿根瘤菌(WT)的植株开始枯萎，第 4 天就全部枯萎；而接种工程菌株 LMG202 的紫花苜蓿，到 4 天才出现轻微的枯萎现象，直到第 6 天才大部分枯萎。重新浇水

后第 2 天, 接种携带空载体苜蓿根瘤菌的植株仍全部枯萎, 无法恢复, 而接种工程根瘤菌的植株则全部或者大部分恢复生长(见图 3)。

以上实验均有两个平行并重复 3 次以上。

## 5 实施例 5、接种根瘤菌工程菌 LMG102 的大豆的抗旱能力验证

本发明人应用组成型 lac 启动子 (Ptrp) 驱动 IPT 基因的表达也获得类似的抗旱效果。

表达异戊烯基转移酶的大豆根瘤菌工程菌的构建: 如前述实施例 1 的方法获得重组质粒 pSSJ003; 通过电转, 转移至慢生型大豆根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* (参见 Mesa S, Reutimann L, Fischer HM, Hennecke H. Posttranslational control of transcription factor FixK2, a key regulator for the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106(51):21860-5; 由 Hennecke 博士提供) 中, 获得工程菌株 LMG102 (图 4)。如前述实施例 4 所述的方法将该根瘤菌与大豆种子接触, 并将接种后的大豆种子种植于土壤中, 进行干旱耐受试验。

干旱耐受试验的处理条件是: 每周浇水一次, 每次每盆植物浇水 80ml, 从第四周开始不再浇水, 进行持续的极端干旱处理。温室的温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 每天光照 16 小时, 黑暗 8 小时。至干旱处理 5 天后观察植物抗旱的效果。

结果如图 5, LMG102 菌株与苜蓿根瘤菌工程菌类似, 具有促进宿主植物抗旱的效果。

## 实施例 6、接种根瘤菌工程菌 LMG202 的紫花苜蓿叶片中细胞分裂素(CK, 玉米素)含量变化

将紫花苜蓿种子进行表面消毒以后, 与生理盐水(0.85%(w/v))重悬的根瘤菌 LMG202 (含有  $10^8$  个根瘤菌/ml) 混合在一起浸泡 0.5 小时, 再播种于经过消毒的砒石珍珠岩人工土壤中, 置于人工气候室中发芽生长至第 4 周, 倒掉人工土壤, 洗净植株。以接种携带空载体苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* Rm1021/pvector) 的紫花苜蓿为对照。

CK 提取方法如下:

取 0.4g 植物鲜样于液氮中研磨成粉末, 加提取液 (甲醇:水:甲酸=15:4:1, 色谱纯, 于  $-20^\circ\text{C}$  预冷) 继续研磨成匀浆, 转移至离心管中, 置于  $-20^\circ\text{C}$  浸提过夜, 次日



离心, 收集上清, 用提取液定容至 2mL。经 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤后, 用于色谱分析 (参考 Journal of Chromatography A, 2002, (950): 21-29; nature protocols, 2010, 5(6): 986-992)。

CK 测定:

- 5 色谱柱: Zorbax extend -C18 4.6\*50mm 1.8 $\mu$ m;  
进样量: 5 $\mu$ l;  
流速: 0.2 ml/min;  
流动相: A= 0.1%FA H<sub>2</sub>O B=0.1%FA MeOH, from 0-2 min B 30% >20 min 100% >22 min 100%, >25 min 30%, 在 35min 结束;
- 10 检测波长: 210, 254, 280, 320, 360, 226nm;  
质谱扫描范围: 50-400;  
电喷雾离子源参数: Nebulizer pressure 40 psig, drying gas N<sub>2</sub> 350C 9L/min, ESI;  
Vcap 3500V;
- 15 毛细管电压: fragmentor 160v, skimmer 65V, Oct RF Vpp750V;  
扫描模式: with negative ms scan mode 2GHzExt Dyn(1700)。

图 6 显示, 相对于对照(接种携带空载体苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* Rm1021/pvector)的紫花苜蓿), 接种了苜蓿中华根瘤菌 LMG202 的紫花苜蓿叶片中细胞分裂素的含量增加 18%。

- 20 **实施例 7、接种根瘤菌工程菌 LMG202 的紫花苜蓿水份含量变化**
- 如实施例 6 的方法制备接种根瘤菌工程菌 LMG202 的紫花苜蓿, 以接种携带空载体苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* Rm1021/pvector)的紫花苜蓿为对照。
- 干旱处理过程为: 将紫花苜蓿种子进行表面消毒以后, 与生理盐水(0.85%(w/v))
- 25 重悬的根瘤菌 LMG202 (含有 10<sup>8</sup> 个根瘤菌/ml) 混合在一起浸泡 0.5 小时, 再播种。以未接种根瘤菌的紫花苜蓿为对照。在紫花苜蓿生长过程, 每周浇 Jensen 营养液 2 次, 每次 80ml。从第 3 周开始, 不再浇水或者营养液, 直至植物叶片出现萎蔫。
- 对没有进行干旱处理的接种植株以及干旱处理 5 天的接种植物, 先分别称量植株鲜重, 然后将植株包裹在牛皮纸袋中 65 $^{\circ}$ C 过夜烘干, 称量干重, 鲜重减去干重
- 30 即是植株的含水量。

接种工程苜蓿根瘤菌的紫花苜蓿的水分含量与接种携带空载体苜蓿根瘤菌的

植株的区别请见图 7。干旱处理前没有明显差异；干旱处理后，接种工程菌的植物，水分含量较对照植物高 40%；其中，地上部分的含水量差异很明显，达到 70% 以上，地下部分仅相差 20%左右。

### 5 实施例 8、IPT 在根瘤菌中表达

获取自生状态下的根瘤菌(接种根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti* Rm1021) 于液体培养基中，28℃过夜培养，离心后收集菌体)，以及本发明的基因工程根瘤菌 LMG202。通过提取总 RNA，反转录成 cDNA，PCR 检测导入的外源基因 IPT 的表达(采用的引物：IPT：TTCGGACGCCTTTCTCAC (SEQ ID NO: 1)，  
10 GCCGCCCTGCATCAATAT (SEQ ID NO: 2)；rpsF：CCTCGCTCGGCAGGACAT (SEQ ID NO: 3)，GCCTTGCGGTTCTTCTTGAT (SEQ ID NO: 4))。

结果如图 8，发现 IPT 基因在本发明的基因工程根瘤菌 LMG202 中自生（图 8A）还是共生（图 8B）状态下均表达，而野生型根瘤菌中不论在自生（图 8A）还是共生（图 8B）状态下均无任何表达。

15

### 实施例 9、紫花苜蓿叶片的过氧化物 DAB 的变化

苜蓿种子用 25%次氯酸钠溶液表面消毒 10min，浸种催芽后，于根瘤菌菌液中浸泡 10min，播于无菌无氮的蛭石珍珠岩中，置于人工气候室生长。

将经干旱处理的紫花苜蓿叶片的过氧化物 DAB 染色，具体为：生长期每 5 天  
20 浇水一次，待生长至 3 周后停止浇水，观察植株表型。

DAB 染色用于检测内源活性氧 ( $H_2O_2$ ) 含量。第 3 周停止浇水 5 天后，出现萎蔫现象时，取植株上从上往下第 3-4 片叶片，于 0.1%DAB 溶液 (pH 5.8, 现配) 中 22℃孵育 12h，然后将叶片转移至 95%乙醇中，沸水浴 5min，重复 3 次至背景干净，镜检。

25 结果如图 9，对照植株(接种携带空载体的野生型苜蓿中华根瘤菌)的植物叶片中含有较多的过氧化物，接种工程根瘤菌 LMG202 的植物则明显较少。

### 实施例 10、紫花苜蓿叶片的抗氧化酶的表达变化

如前述实施例 9 方法培养紫花苜蓿，接种根瘤菌，以及干旱处理。

30 通过提取叶片总 RNA，反转录成 cDNA，PCR 检测导入的抗氧化酶类基因的表达。

采用的 PCR 引物：

SOD 超氧化物歧化酶：AATGTCACCGTCGGTGATGATG(SEQ ID NO: 5)，

GTTTCATCCTTGCAAACCAATAATACC(SEQ ID NO: 6);

*CAT* 过氧化氢酶: CCTATTTGATGATGTGGGTGTCC(SEQ ID NO: 7),  
GTCTTGAGTAGCATGGCTGTGGT(SEQ ID NO: 8);

*sAPX* 叶绿体基质抗坏血酸过氧化物酶: ACCAACCTCGTTCAGTGTCCAT  
5 (SEQ ID NO: 9), AGAGCGCTGTCTGCGTTCTATT(SEQ ID NO: 10);

*thylAPX* 类囊体膜抗坏血酸过氧化物酶: TCATCCTCTTTTGATTTCGTTTGG  
(SEQ ID NO: 11), CTTTGATTGGCTGGAG AAGTTTC (SEQ ID NO: 12);

*DHAR* 脱氢抗坏血酸还原酶: GATTGGAGACTGCCCTTTTAGC(SEQ ID NO:  
13), CTGTAGCCTTTTCAGGTGGTGT(SEQ ID NO: 14);

10 *MDHAR* 单脱氢抗坏血酸还原酶: AGCGTTCGTTTACGTGATTCTTG(SEQ ID  
NO: 15), CATTTGGGAGTTAGCCTTTCCTC(SEQ ID NO: 16);

*GR* 谷胱甘肽还原酶: TTTGAACAAAGGTGCAGAAGAAGG(SEQ ID NO: 17),  
TGGGAACACAACCACGAATGAC(SEQ ID NO: 18);

*GPX* 谷胱甘肽过氧化物酶: TGGACAGGAGCCAGGATCTAGT(SEQ ID NO:  
15 19), ATTTTCAGAGGAGCGGTGGTAG(SEQ ID NO: 20);

*actin2* 肌动蛋白(内参): TGGCATCACTCAGTACCTTTCAAG(SEQ ID NO:  
21), ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAACC(SEQ ID NO: 22);

结果如图 10, 干旱处理前, 植物叶片中抗氧化酶类的表达量区别不明显; 干  
旱处理后, 对照植株(接种携带空载体的野生型苜蓿中华根瘤菌)的植物叶片中多  
20 数抗氧化酶基因的表达明显少于接种工程根瘤菌 LMG202 的植物。

### 实施例 11、工程根瘤菌对紫花苜蓿抗病性的影响

以大肠杆菌 *E.coli* 基因组序列为模板, 以  
gctcatATGGACCAGAAGCTGTAAACGG(SEQ ID NO: 23) 和  
25 gcatctagaTCAGGTGTGTTTAAAGCTGTTCTGC(SEQ ID NO: 24)为引物, 获得大肠  
杆菌 *E.coli* 中的  $\gamma$ -氨基丁酸合成酶基因(*GAD*), 以 Nde I /Xba I 酶切后插入到表达  
载体 pSRK-Km 的相应位点中, 获得重组质粒。将该重组质粒转化苜蓿中华根瘤  
菌 Rm1021, 获得工程根瘤菌 LMG206, 如前述接种工程菌 LMG202 相同的方法  
将工程根瘤菌 LMG206 接种紫花苜蓿。

30 试验的结果显示, 接种工程根瘤菌 LMG206 能够增强苜蓿抗铃夜蛾的能力。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被  
单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本  
领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所  
35 附权利要求书所限定的范围。

## 权 利 要 求

1. 一种改变植物性状的方法，其特征在于，所述方法包括：

(1) 提供一种重组根瘤菌，所述的重组根瘤菌细胞中含有外源基因的表达盒；所述的外源基因是改变植物性状相关基因，或是被表达后能形成改变植物性状相关成分的基因；和

(2) 将重组根瘤菌与植物接触共生，从而所述的外源基因被表达并被转运到植物的细胞、组织或器官内；或者所述的外源基因被表达并形成改变植物性状相关成分，该成分被转运到植物的细胞、组织或器官内。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的重组根瘤菌的出发菌株选自：苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)、费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)、豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*)、花生根瘤菌(*Bradyrhizobium* sp. *arachis*)、茎瘤固氮根瘤菌 (*Azorhizobium caulinodans*)，埃氏慢生根瘤菌 (慢生大豆根瘤菌) (*Bradyrhizobium elkanii*)、辽宁慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium liaoningense*)、华癸中生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*)、百脉根中生根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)，埃特里根瘤菌 (*Rhizobium etli*)、豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*)、豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*)、甘草根瘤菌 (*Mesorhizobium glycyrrhiza*) 或黄芪根瘤菌 (*Mesorhizobium astragalus*)。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的植物是能与根瘤菌共生的植物。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述的植物选自：豆科植物。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述的豆科植物选自：苜蓿、大豆、豌豆、花生、菜豆、绿豆、赤豆、蚕豆、豇豆、紫云英、甘草或黄芪。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的外源基因选自：异戊烯基转移酶基因、 $\gamma$ -氨基丁酸合成酶基因、赤霉素 3 合成酶基因、古巴焦磷酸合成酶基因，内根-贝壳杉烯合成酶基因，内根-贝壳杉烯 19-氧化酶基因，内根-贝壳杉

烯酸 7 $\beta$  羟化酶基因, GA12-醛合成酶基因, GA-7-氧化酶基因, GA-13-羟化酶基因, GA20-氧化酶基因, GA3 $\beta$  羟化酶基因, GA2-氧化酶基因或细胞色素 P450 单加氧酶基因。

5 7. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的外源基因选自: 异戊烯基转移酶基因、 $\gamma$ -氨基丁酸合成酶基因。

8. 一种重组根瘤菌, 其细胞中含有外源基因的表达盒; 所述的外源基因是改变植物性状相关基因, 或是被表达后能形成改变植物性状相关成分的基因。

10

9. 如权利要求 8 所述的重组根瘤菌, 其特征在于, 所述的外源基因选自: 异戊烯基转移酶基因、 $\gamma$  氨基丁酸合成酶基因、赤霉素 3 合成酶基因、古巴焦磷酸合成酶基因, 内根-贝壳杉烯合成酶基因, 内根-贝壳杉烯 19-氧化酶基因, 内根-贝壳杉烯酸 7 $\beta$  羟化酶基因, GA12-醛合成酶基因, GA-7-氧化酶基因, GA-13-羟化酶基因, GA20-氧化酶基因, GA3 $\beta$  羟化酶基因, GA2-氧化酶基因或细胞色素 P450 单加氧酶基因。

15

10. 如权利要求 8 所述的重组根瘤菌, 其特征在于, 所述的重组根瘤菌表达异戊烯基转移酶, 所述的异戊烯基转移酶能合成植物细胞分裂素。

20

11. 如权利要求 8 所述的重组根瘤菌, 其特征在于, 所述的重组根瘤菌表达  $\gamma$ -氨基丁酸合成酶, 所述的  $\gamma$ -氨基丁酸合成酶能合成  $\gamma$ -氨基丁酸。

12. 权利要求 8 所述的重组根瘤菌的制备方法, 所述方法包括: 将表达载体转移入根瘤菌中; 其中, 所述的表达载体中含有外源基因的表达盒, 所述的外源基因是改变植物性状相关基因或是被表达后能形成改变植物性状相关成分的基因。

25

13. 一种权利要求 8-11 任一所述的重组根瘤菌的用途, 用于改变植物性状。

14. 如权利要求 13 所述的用途, 其特征在于, 所述的重组根瘤菌表达异戊烯基转移酶或  $\gamma$ -氨基丁酸合成酶, 该重组根瘤菌用于提高植物的抗旱能力, 提高植

30

物的固氮酶活力，促进植物的生长，提高植物的生物量，提高植物组织中细胞分裂素含量，提高植物组织的水份含量，降低植物组织中过氧化物的含量，提高植物组织中抗氧化酶类基因的表达或提高植物抗病虫害能力。

5        15. 一种改变植物性状的组合物，包括：

- (1) 有效量的权利要求 8-11 任一所述的重组根瘤菌；和
- (2) 农药学上可接受的载体。

10        16. 一种制备改变植物性状的组合物的方法，其特征在于，所述方法包括：将有效量的权利要求 8-11 任一所述的重组根瘤菌与有效量的农药学上可接受的载体混合。

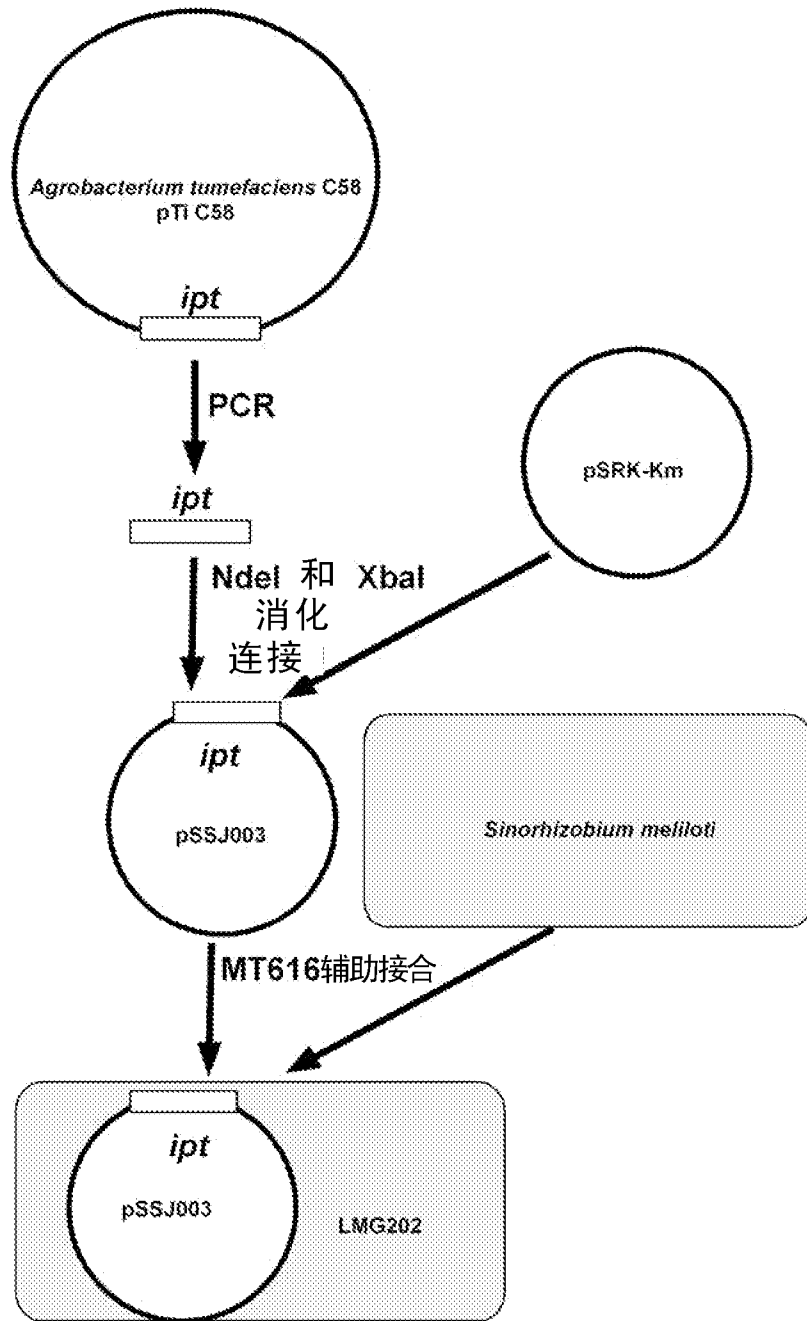


图 1

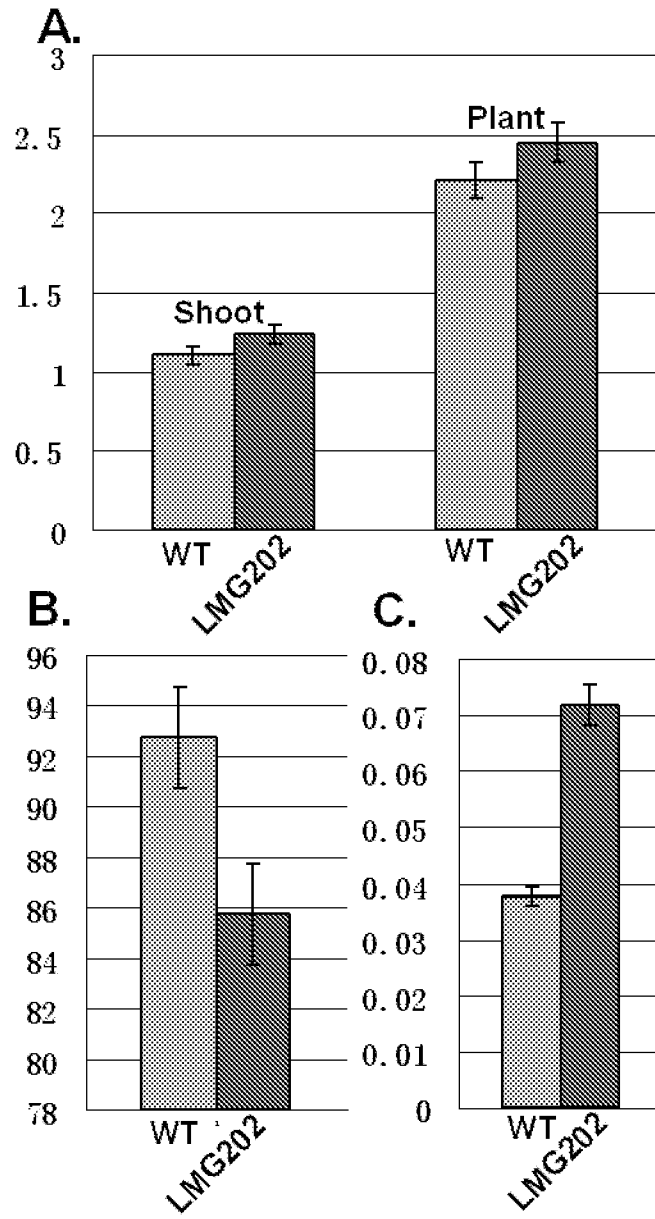


图 2



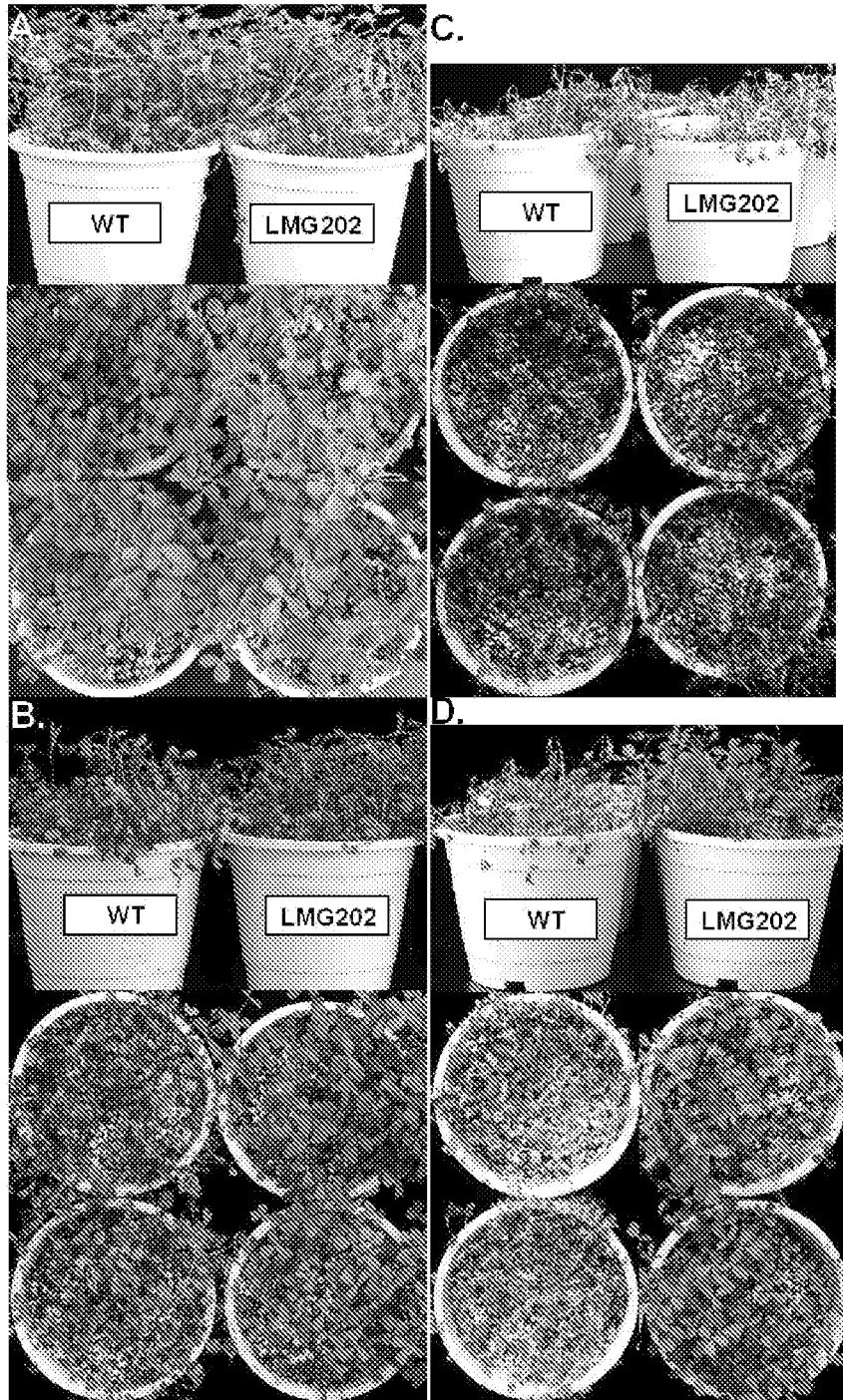


图 3

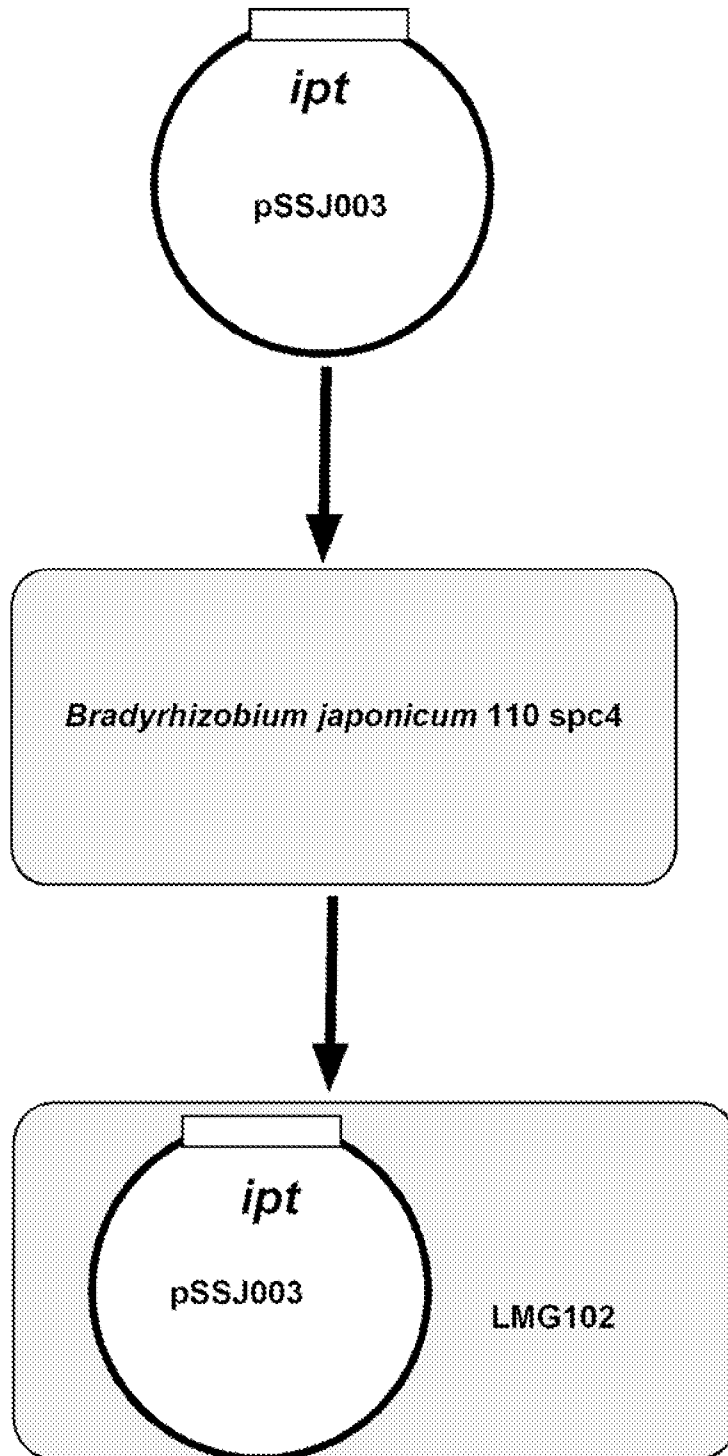


图 4

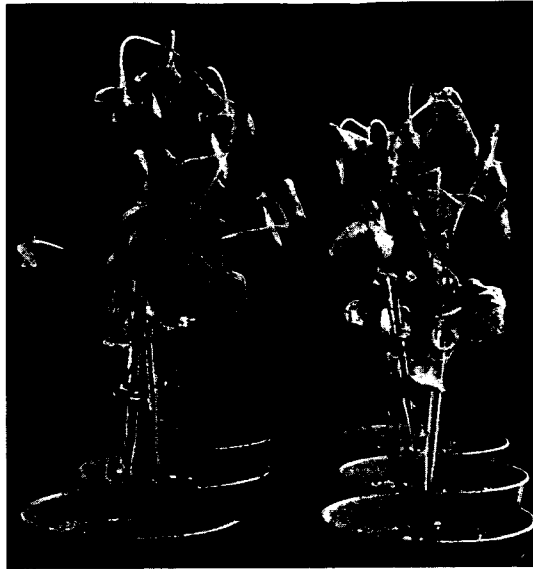


图 5

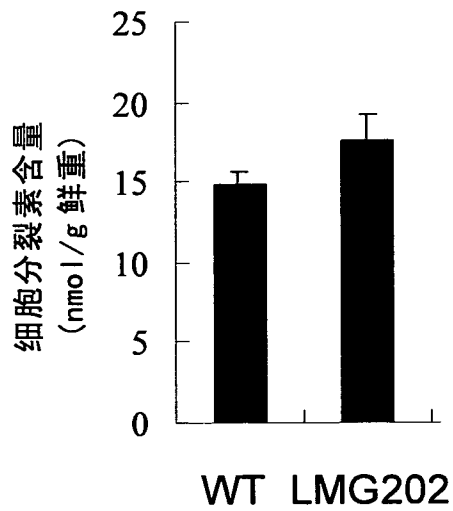


图 6

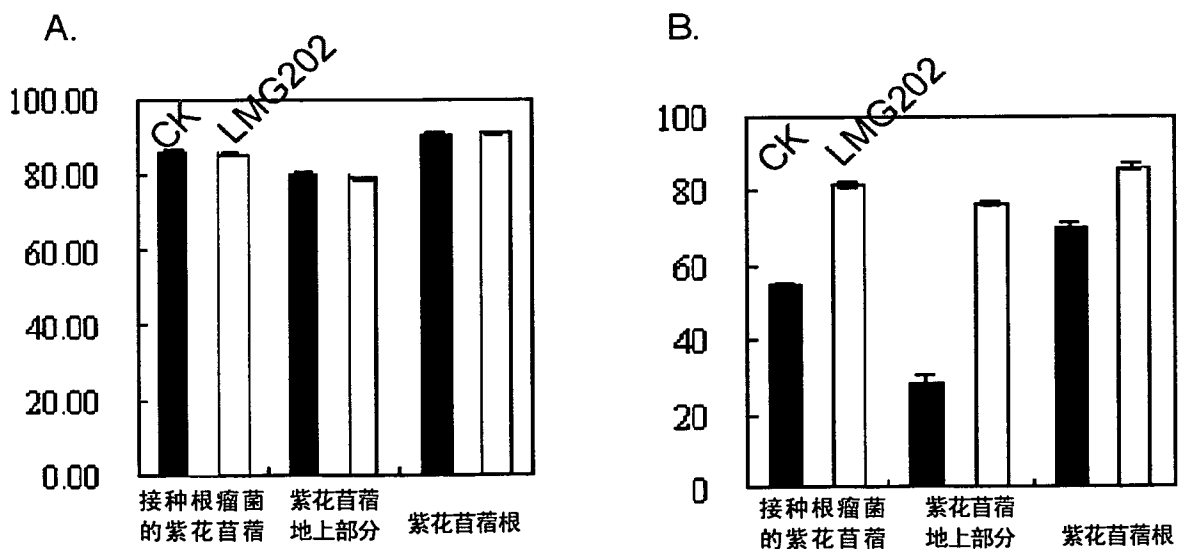


图 7

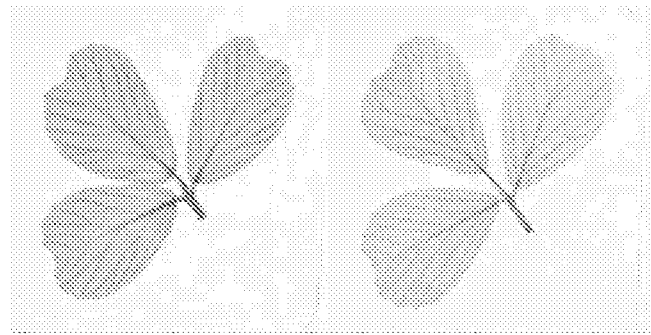
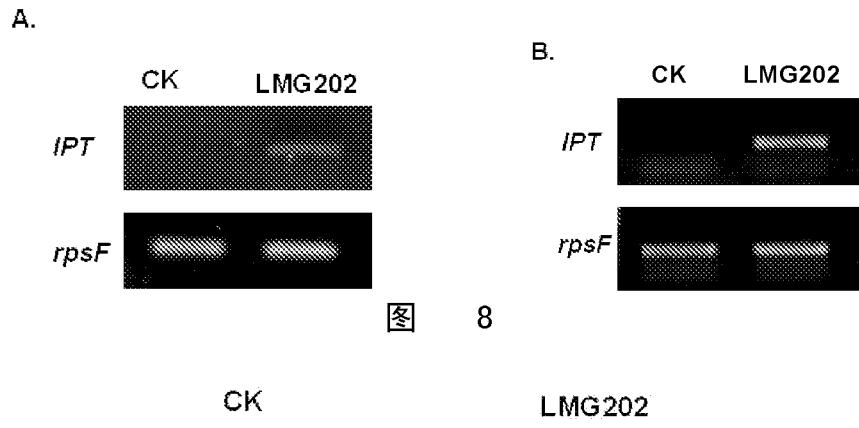


图 9

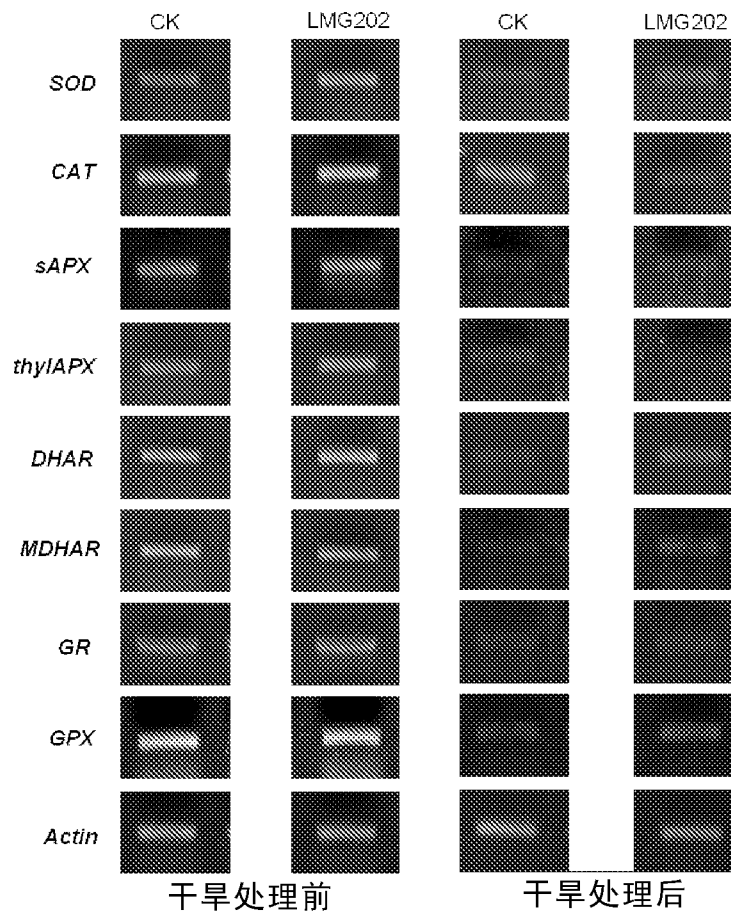


图 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/072213

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N 15/82, C12N 15/-, C12N 1/21, C12N 1/-, A01H 5/00, A01H 5/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Wiley InterScience, Nature, Science, Embase, Agrobacterium tumefaciens, Rhizobia, IPT, IPPS, isopenentenyl transferase, prenyltransferase, GABA synthase, GAD, glutamate decarboxylase, character, characteristic, phenotype, property, transfer, transform, transgenic, plant, Medicago Sativa

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN101490266A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC.)22 Jul.2009 (22.07.2009) claims 2, 6, 11, 16-19, 27, 30, 33, page 20, paragraph 3- page 21, paragraph 1, page 23, paragraph 3	1-16
X	CN1537160A (JAPAN SCI. & TECHNOLOGY AGENCY)13 Oct.2004(13.10.2004) examples 1-4 of description	1-16
X	WO2006004914A2(CAMBIA)12 Jan.2006 (12.01.2006) claims 1-36	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;”document member of the same patent family</p>
--	--

<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p style="text-align: center;">01Jun.2011 (01.06.2011)</p>	<p>Date of mailing of the international search report</p> <p style="text-align: center;"><b>07 Jul. 2011 (07.07.2011)</b></p>
<p>Name and mailing address of the ISA/CN</p> <p>The State Intellectual Property Office, the P.R.China</p> <p>6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China</p> <p>100088</p> <p>Facsimile No. 86-10-62019451</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;"><b>LI, Zidong</b></p> <p>Telephone No. (86-10)82245296</p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2011/072213

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BROOThAERTS, Wim et al. Gene Transfer to Plants by Diverse Species of Bacteria, NATURE, 10 Feb.2005 (10.02.2005) , Vol.433, pages 629-633	1-16
A	MA, Qinghu et al. Expression of Isopentenyl Transferase Gene (ipt) in Leaf and Stem Delayed Leaf Senescence without Affecting Root Growth, PLANT CELL REPORT, 10 Oct.2009 (10.10.2009) , Vol.28, pages 1759-1765	1-16
A	HU, Yuanlei et al. Transgenic Tall Fescue Containing the <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ipt Gene Shows Enhanced Cold Tolerance, PLANT CELL REPORT, 09 Oct.2004 (09.10.2004) , Vol.23, pages 705-709	1-16
A	LUO, Li et al. A LuxR Family Regulator, ExpR Regulates the Expression of motC Operon from Sinorhizobium meliloti, Acta Microbiologica Sinica, 04 Jun.2006 (04.06.2006) , Vol.46, No.3, pages 474-477	1-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2011/072213

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101490266A	22.07.2009	US2007271627A1	22.11.2007
		WO2007137075A2	29.11.2007
		WO2007137075A3	24.04.2008
		WO2007137075A8	17.07.2008
		WO2007137075A9	18.12.2008
		EP2027275 A2	25.02.2009
		AU2007253903A1	29.11.2007
		INDELNP200809778E	20.03.2009
		CA2652377A1	29.11.2007
		MXPA08014663A	30.11.2008
		ZA200809626A	29.07.2009
		JP2009537150T	29.10.2009
		CN1537160A	13.10.2004
JP2003033174A	04.02.2003		
EP1416043A1	06.05.2004		
US2004241847A1	02.12.2004		
US2006270555A1	30.11.2006		
US7109020B2	19.09.2006		
CA2453672A	23.01.2003		
WO2006004914A2	12.01.2006	US2005289672A1	29.12.2005
		EP1781082A2	09.05.2007
		INDELNP200608004E	03.08.2007
		BRPI0512791A	23.10.2007
		CN101123869A	13.02.2008
		WO2006004914A3	11.10.2007
		US2005289667A	29.12.2005

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/072213

Continuation of: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER OF SECOND SHEET

C12N 15/82 (2006.01)i

C12N 1/21 (2006.01)i

A01H 5/00 (2006.01)i



<b>A. 主题的分类</b>		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
<b>B. 检索领域</b>		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C12N 15/82, C12N 15-, C12N 1/21, C12N 1/-, A01H 5/00, A01H 5/-		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Wiley InterScience, Nature, Science, Embase, 根瘤菌, 根癌菌, 根癌农杆菌, 苜蓿根瘤菌, 外源基因, 异戊烯基转移酶, 异戊烯基二磷酸合酶, $\gamma$ -氨基丁酸合成酶, 性状, 表型, 转化, 转基因, 植物, 紫花苜蓿, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Rhizobia</i> , IPT, IPPS, isopenentenyl transferase, prenyltransferase, GABA synthase, GAD, glutamate decarboxylase, character, characteristic, phenotype, property, transfer, transform, transgenic, plant, Medicago Sativa		
<b>C. 相关文件</b>		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN101490266A (孟山都技术有限公司)22.7 月 2009 (22.07.2009) 权利要求 2, 6, 11, 16-19, 27, 30, 33, 说明书第 20 页第 3 段至第 21 页第 1 段, 第 23 页第 3 段	1-16
X	CN1537160A (独立行政法人科学技术振兴机构)13.10 月 2004 (13.10.2004) 说明书实施例 1-4	1-16
X	WO2006004914A2(CAMBIA)12.1 月 2006 (12.01.2006) 权利要求 1-36	1-16
X	BROOThAERTS, Wim 等, Gene Transfer to Plants by Diverse Species of Bacteria, NATURE, 10.2 月 2005 (10.02.2005), 第 433 卷, 第 629-633 页	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 01.6 月 2011 年 (01.06.2011)		国际检索报告邮寄日期 <b>07.7 月 2011 (07.07.2011)</b>
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员  <b>李子东</b> 电话号码: (86-10) <b>82245296</b>

## C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	MA, Qinghu 等, Expression of Isopentenyl Transferase Gene (ipt) in Leaf and Stem Delayed Leaf Senescence without Affecting Root Growth, PLANT CELL REPORT, 10.10 月 2009 (10.10.2009), 第 28 卷, 第 1759-1765 页	1-16
A	HU, Yuanlei 等, Transgenic Tall Fescue Containing the <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> ipt Gene Shows Enhanced Cold Tolerance, PLANT CELL REPORT, 09.10 月 2004 (09.10.2004), 第 23 卷, 第 705-709 页	1-16
A	罗利等, 苜蓿中华根瘤菌( <i>Sinorhizobium meliloti</i> )LuxR 家族转录因子 ExpR 调节 motC 操纵子的表达, 微生物学报, 04.6 月 2006 (04.06.2006), 第 46 卷第 3 期, 第 474-477 页	1-16

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2011/072213**

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101490266A	22.07.2009	US2007271627A1	22.11.2007
		WO2007137075A2	29.11.2007
		WO2007137075A3	24.04.2008
		WO2007137075A8	17.07.2008
		WO2007137075A9	18.12.2008
		EP2027275 A2	25.02.2009
		AU2007253903A1	29.11.2007
		INDELNP200809778E	20.03.2009
		CA2652377A1	29.11.2007
		MXPA08014663A	30.11.2008
		ZA200809626A	29.07.2009
		JP2009537150T	29.10.2009
		CN1537160A	13.10.2004
JP2003033174A	04.02.2003		
EP1416043A1	06.05.2004		
US2004241847A1	02.12.2004		
US2006270555A1	30.11.2006		
US7109020B2	19.09.2006		
CA2453672A	23.01.2003		
WO2006004914A2	12.01.2006	US2005289672A1	29.12.2005
		EP1781082A2	09.05.2007
		INDELNP200608004E	03.08.2007
		BRPI0512791A	23.10.2007
		CN101123869A	13.02.2008
		WO2006004914A3	11.10.2007
		US2005289667A	29.12.2005

续： 第 2 页： A.主题的分类

C12N 15/82 (2006.01)i

C12N 1/21 (2006.01)i

A01H 5/00 (2006.01)i