

# 根瘤菌吸氢酶基因转移的研究\*

王振宇 龙敏南\*\* 刘月英 张凤章 许良树

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

朱天赐 蒋水柳

(厦门市同安汀溪灌溉试验站 厦门 361100)

**摘 要:**通过三亲本杂交将含有花生根瘤菌吸氢基因的质粒 pZ 55(Tc<sup>r</sup>)转入不吸氢的花生根瘤菌 Ra 34 等菌株(Hup<sup>-</sup>, Nif<sup>+</sup>, Ap<sup>r</sup>)中,筛选到既具有吸氢又具有固氮能力的花生根瘤菌结合株 Rz34-2。在自生和共生条件下,结合株均可表达高吸氢和高固氮活性。以结合株 Rz34-2 接种的花生植株叶片的干重比不接种的、接种受体株 Ra34(Hup<sup>-</sup>)和接种对照菌株 L8-3(Hup<sup>+</sup>, Nif<sup>+</sup>)的分别高 6.2%、7.6%和 6.3%;种子的含氮量分别高 8.9%、10.0%和 6.0%;产量分别高 18.8%、10.5%和 10.7%。研究表明,以含吸氢基因的结合株接种花生能提高根瘤菌与花生的共生固氮效率,增加作物的产量。

**关键词:**花生根瘤菌, 转吸氢基因, 大田实验

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 04-0421-06

固氮酶在还原 N<sub>2</sub> 为 NH<sub>3</sub> 的同时还原 H<sup>+</sup> 为 H<sub>2</sub>。在根瘤菌与豆科作物的共生固氮过程中,因放 H<sub>2</sub> 所消耗的能量占固氮总能量的 25% 以上。少数具有吸氢酶的根瘤菌则能循环利用固氮过程中放出的 H<sub>2</sub>,通过 H<sub>2</sub> 的氧化回收部分因固氮放氢所消耗的能量,从而减少能量的损失、提高共生固氮效率、增加作物产量<sup>[1-3]</sup>。然而,大多数农业上重要的土著根瘤菌(如花生根瘤菌、大豆根瘤菌等)不具有吸氢酶<sup>[4]</sup>。八十年代以来,国外对大豆根瘤菌和豌豆根瘤菌的吸氢基因进行了克隆和转移<sup>[5-7]</sup>。结果表明,通过吸氢基因的转移,使不具吸氢能力的根瘤菌获得了吸氢能力,利用该转化结合株接种豆科作物能提高作物产量。本研究室以具有高吸氢活性的花生根瘤菌(*Rhizobium arachis*) L8-3 为材料,构建了花生根瘤菌部分基因组文库,并筛选到含有吸氢基因的阳性克隆子<sup>[8,9]</sup>。本论文报道了花生根瘤菌吸氢基因的转移、结合株在自生和共生条件下的表达以及接种结合株对作物生长和产量的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

本研究所用的菌株和质粒见表 1。

\* 国家自然科学基金(39770070)和福建省自然科学基金(B 9910001)资助

\*\* 联系人

作者简介:王振宇(1973-),男,河南人,硕士,现在河南师范大学生物系工作。

收稿日期:2000-11-12,修回日期:2001-02-19

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
<i>R. arachis</i> L8-3	Nif <sup>+</sup> Hup <sup>+</sup> Ap <sup>r</sup>	Applied Institute of ecology of Shenyang, Chinese Academy
<i>R. arachis</i> Ra-n	Nif <sup>+</sup> Hup <sup>-</sup> Apr	This lab.
<i>R. arachis</i> Rz-n	Nif <sup>+</sup> Hup <sup>+</sup> Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	This lab.
pRK 2013	Tra Km <sup>r</sup>	Ditta(1980) <sup>[10]</sup>
pZ55	pLAFR3 containing hup gene fragment	This lab.

Nif: Nitrogen-fixation; Hup: hydrogen-uptake; Ap: ampicillian; Tc: tetracycline; Km: kanamycin; Tra: transfer; r: resistance

1.2 三亲本杂交

将花生根瘤菌 Ra-n 接种于 YEM<sup>[11]</sup> 液体培养基(氨苄青霉素 50μg/mL), *E. coli* HB 101 (pZ 55)和 *E. coli* HB101(pRK 2013)分别接种于含四环素(20μg/mL)和卡那霉素(25μg/mL)的 LB 培养基中培养过夜。待菌体生长至对数生长期后期,取花生根瘤菌 Ra-n 0.8mL、HB101(pZ 55)和 HB101(pRK 2013)各 0.1mL 混合均匀,用无菌的 0.25μm 的微孔滤膜过滤,然后将滤膜置于 YEM 平板(含 Tc 5μg/mL)上温育 24h。将滤膜于 3mL 无菌生理盐水中漂洗,取 0.1mL 含菌的生理盐水分别稀释 10 倍、100 倍、1000 倍。取 0.1mL 稀释的菌液涂布于 YEM 选择平板(Ap 50μg/mL, Tc 30μg/mL)上,于 28℃ 培养 48h,挑取双抗的克隆子作进一步分析。

1.3 根瘤菌吸氢酶活性和固氮酶活性的测定

1.3.1 吸氢酶活性的测定:将根瘤菌结合株接种于 YEM 液体选择培养基(Ap 50μg/mL, Tc 20μg/mL)中培养 1d,取 1mL 菌液接种于 20mL 吸氢培养基(HUM)<sup>[12]</sup> 中培养 48h,换上带翻口的橡皮塞,调节瓶内气体的比例为 N<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> = 80:10:10。诱导培养 4d,离心收集菌体并悬浮于 12mL 50m mol/L 的磷酸缓冲液(含 25mmol/L MgSO<sub>4</sub>, pH6.8),分装于三个 20mL 的反应瓶中,调节瓶内气体的比例为 Ar:H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> = 88:10:2,于 102G 型气相层析仪测定气相中氢量的变化。菌体蛋白含量的测定参照 Folin-酚法。

1.3.2 固氮酶活性的测定:将根瘤菌接种到预培养基<sup>[13]</sup> 上培养 48h,至细胞浓度达光密度为 OD<sub>540</sub> = 1.0 ~ 1.5 时,收集菌体并悬浮于固氮酶诱导培养基中,调节菌体的起始浓度为 OD<sub>540</sub> = 0.2,取 5mL 菌悬液加入到 25mL 的血清瓶中,换上带翻口的橡皮塞,反复抽气充 Ar,调节瓶内气体的比例为 Ar:C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> = 88:10:2。于 28℃ 下振荡培养,然后取样于 103 型气相层析仪定时测定乙烯的生成量。

1.4 大田接种实验

1.4.1 实验小区设计:实验地分为五个长方形小区,小区与小区并排,每个小区的面积为 1 分地。将每个小区整理成 10 个均匀的小块,两边的小块作为间隔行,中间的八个小块分别用来接种花生根瘤菌受体株 Ra34、对照株 L8-3、结合株 Rz34-2 和不含根瘤菌的培养液,小区内每个处理两个重复。五个重复小区的处理方式相同,但接种的顺序不相同。在整个实验区内每个菌株接种处理的总面积为 1 分地(共 10 个小块)。

1.4.2 接种实验:每个实验小块播种 3 行,每行 32 穴,每穴播种两粒籽粒均匀的花生种子。播种后在花生种子的周围分别接种不同的根瘤菌培养液。待种子萌发破土后及破土

一周后分别再接种一次。于花生生长的初花期(60 d)和盛花期(73 d)取根瘤,每个小块每次取两株,测定根瘤的吸氢活性和固氮酶活性。

**1.4.3 根瘤的吸氢与固氮酶活性测定:**分别准确称取 0.3g 根瘤于 8mL 带翻口橡皮塞的血清瓶中,每个样品三个重复;每瓶加入终浓度为 10% 的氢气,混匀后于 102G 型气相层析仪测本底,然后置于 28℃ 温育,定时取样测氢量的变化。测定固氮酶乙炔还原活性时,每瓶加入终浓度为 10% 的乙炔,混匀后于 28℃ 温育,定时取样于 103 型气相层析仪上测定乙烯的生成量。

**1.4.4 植株叶片干重的测定:**在花生生长的初花期和盛花期,于每种处理的 10 个小块各取两株花生,摘取叶片,将同一处理的花生叶片混合在一起,准确称取 100g 叶片,经烘干恒重后测定干重,每种处理三个重复。

**1.4.5 植株叶片和种子含氮量的测定:**参照凯氏定氮法,每种处理三个重复。

2 结果

2.1 花生根瘤菌菌株的分离

从花生植株的根瘤中分离得到的菌株,其单菌落在 YEM 平板上为圆形,边缘整齐;具有光泽,粘稠状,乳白色;菌体呈杆状;革兰氏染色阴性。根据对菌落和菌体形态观察的结果,对照文献的描述,认为所分离的菌株为花生根瘤菌。经不同浓度的抗生素抗性的反复试验,筛选到具有抗生素抗性的花生根瘤菌菌株 Ra12、Ra27、Ra34、Ra35 等 100 多株。部分花生根瘤菌的抗生素抗性见表 2。

表 2 根瘤菌抗生素抗性特征

Table 2 The antibiotics resistance of *Rhizobium arachis*

Strains	Antibiotics (μg/mL)				
	Ap 50	Tc 10	Tc 30	Km 10	Km 30
<i>R. arachis</i> Ra12	+	+	-	+	-
<i>R. arachis</i> Ra27	+	+	-	+	-
<i>R. arachis</i> Ra34	+	+	-	+	-
<i>R. arachis</i> Ra35	+	+	-	+	-

+ + : grow well; + : grow poor; - : do not grow

2.2 花生根瘤菌结合株在自生条件下的吸氢和固氮活性

通过三亲本杂交,将含花生根瘤菌吸氢基因的质粒 pZ55 转移到不具吸氢活性的花生根瘤菌中,其结合株表现了较高的吸氢活性(表 3),并且结合株的固氮酶活性也明显高于受体株。

表 3 花生根瘤菌结合株在自生条件下的吸氢和乙炔还原活性

Table 3 H<sub>2</sub>-uptake and C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-reduction activity of *R. arachis* transconjugants under free-living state

Strains	Ra12	Z12-7	Rz12-10	Ra27	Rz27-6	Rz27-8	Ra34	Rz34-1	Rz34-2	Ra35	Rz35	Rz35-6
H <sub>2</sub> -uptake activity/ (μmol/h.mg prot.)	3	3.34	3.50	0	3.58	3.46	0	4.82	4.88	0	2.54	2.34
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -reduction activity/ (n mol/h.mg prot.)	3.88	4.88	5.54	3.56	4.17	4.70	3.44	5.44	5.36	2.76	3.76	3.73

2.3 花生根瘤菌结合株在共生条件下的吸氢和固氮活性

分别以花生根瘤菌 Ra34 和结合株 Rz34-2 接种大田花生,以接种花生根瘤菌 L8-3 的和不接种的作对照。在花生的不同生长期分别取共生根瘤,测定不同菌株接种花生所形成的根瘤的吸氢和固氮活性。结果表明,接种结合株的根瘤的吸氢活性为不接种的和接

种受体株的 4 倍多,接种结合株的根瘤的乙炔还原活性也明显高于不接种的和接种受体株的(表 4)。

表 4 共生根瘤吸氢活性和固氮活性的测定

Table 4 H<sub>2</sub>-uptake and C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-reduction activity of symbiotic nodules

Inoculated strains	H <sub>2</sub> -uptake activity *		C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -reduction activity #	
	After 60d	After 73d	After 60d	After 73d
Without inoculation	1.63	1.62	3.54	2.67
<i>R. arachis</i> Ra34	1.44	1.65	3.57	5.52
<i>R. arachis</i> L8-3	5.76	4.18	3.91	6.4
<i>R. arachis</i> Rz34-2	6.82	6.28	5.11	6.45

\* μmolH<sub>2</sub>/h.g nod; # μmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/h.g. nod

2.4 花生叶片干重的差异

在花生生长的初花期(60d),不同接种处理的花生叶片的干重差异并不明显。但到盛花期(73d)时,接种结合株 Rz34-2 的花生叶片的干重比不接种的增加 6.2%,比接种受体株 Ra34 的增加 7.6%(表 5)。

表 5 花生叶片干重的差异。

Table 5 Difference of dry matter of leaf

Inoculated strains	After 60d		After 73d	
	Dry weight *	Relative/ %	Dry weight *	Relative/ %
Without inoculation	16.76	100	16.68	100
<i>R. arachis</i> Ra34	16.46	98.2	16.45	98.6
<i>R. arachis</i> L8-3	16.73	99.8	16.67	99.9
<i>R. arachis</i> Rz34-2	16.68	99.5	17.72	106.2

\* g/100g fresh leaf

2.5 花生叶片和种子含氮量的差异

接种具有吸氢能力的根瘤菌(结合株 Rz34-2 和 L8-3)的植株的叶片含氮量明显高于不接种的和接种受体株的。其中接种结合株 Rz34-2 的植株的叶片的含氮量比不接种的和接种受体株 Ra34 分别高 11%和 6%。接种结合株的花生种子的含氮量比不接种的和接种受体株 Ra34 分别高 8.9%和 10%,比接种根瘤菌 L8-3 的也提高 6.0%(表 6)。

表 6 花生叶片和种子总氮含量的差异

Table 6 Difference of nitrogen content of leaf and seeds of peanut

Inoculated strains	N content of leaf *				N content of seeds	
	60d	Relative/ %	73d	Relative/ %	Content	Relative/ %
without inoculation	3.96	100	4.16	100	5.48	100
<i>R. arachis</i> Ra34	4.21	106.3	4.44	106.7	5.42	98.9
<i>R. arachis</i> L8-3	4.59	115.9	4.68	112.5	5.64	102.9
<i>R. arachis</i> Rz34-2	4.43	111.9	4.62	111.1	5.97	108.9

\* N content: g N/100g dry leaf or seeds

2.6 接种结合株对花生产量的影响

以不同的根瘤菌接种花生,其产量与接种的菌株有很大的关系。统计五个小区不同接种处理的花生的产量,发现接种花生根瘤菌结合株 Rz34-2 的产量比不接种的高

18.8%,比接种受体株的高 10.5%,比接种花生根瘤菌 L8-3 的高 10.7%(表 7)。

表 7 不同菌株接种花生对产量的影响

Table 7 The yield of peanut inoculated with different *Rhizobium* strains

Inoculated strains	Yield/(kg/mu)	Relative yield/%
Without inoculation	261.0	100
<i>R. arachis</i> Ra34	282.75	108.3
<i>R. arachis</i> L8-3	282.10	108.1
<i>R. arachis</i> Rz34-2	309.94	118.8

3 讨论

生物固氮是一个高耗能的过程,而在根瘤菌与豆科作物的共生固氮过程中,放氢所消耗的能量占有相当大的比例。以具有高吸氢活力的根瘤菌结合株接种豆科作物则能减少因放氢而造成的能量浪费,从而有利于豆科作物的生长发育。在花生生长的初花期以前,植物光合作物的产物主要用于植株和根瘤的生长与发育,根瘤固氮所消耗的能量相对较少,因此,以不同的菌株接种花生所形成的根瘤对植株生长发育的影响并不明显。而在花生生长的初花期以后,根瘤处于成熟期,进行旺盛的固氮作用;花生的种子处于发育期,需要消耗大量的能量;植株光合作用的产物主要在植株干物质的积累与根瘤固氮之间进行分配,而此时植株叶片的光合作用已达到了高峰,减少固氮过程的能量消耗,则意味可将更多的能量用于种子发育和植株干物质的积累。因此,接种不同的根瘤菌菌株对花生的干物质的积累和含氮量的影响主要表现在初花期以后。

根瘤菌与豆科作物的共生固氮作用受宿主和根瘤菌两方面的影响<sup>[14,15]</sup>,利用分子生物学的手段则可以实现根瘤菌不同优良性状的重组。通过吸氢基因的转移,构建具有高吸氢、高固氮活力的根瘤菌菌株,对提高根瘤菌与豆科作物的共生固氮效率,增加豆类作物(如花生和大豆)的蛋白质含量和豆类作物的产量有重要的意义。

致谢 本研究室孔波、汪琨和唐涛等同学帮助处理田间实验,在此表示感谢。

参 考 文 献

[ 1 ] Schubert K R. *Plant Physiol*, 1978, **61**:398 ~ 401.  
[ 2 ] De Souza A A, Burity H A, Figueiredo M D B, et al. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 1999, **34**:1925 ~ 1931.  
[ 3 ] Frioni L, Malates D, Irigoyen I, et al. *Appl Soil Ecol*, 1998, **7**(3): 239 ~ 244.  
[ 4 ] Gibson A H, Hewton W E. Current perspective in nitrogen fixation. New York: Elsevier-North Holland 1978.  
[ 5 ] Cantrell M A, Haugland M A, Evans H J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**:181 ~ 185.  
[ 6 ] Leyva A, Palacios J M, Mozo T, et al. *J Bacteriol*, 1987, **169**:4929 ~ 1934.  
[ 7 ] Leyva A, Palacios J M, Ruiz-Argueso T. *J Bacteriol*, 1990, **172**:1647 ~ 1665.  
[ 8 ] 王永保, 龙敏南, 张凤章, 等. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, **36**(6): 905 ~ 910.  
[ 9 ] 王建峰, 张凤章, 龙敏南, 等. 植物生理学报, 2000, **26**(1): 23 ~ 36.  
[ 10 ] Ditta G, Stanfield S, Corbin D, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**:7347 ~ 7351.  
[ 11 ] J M 芬林特著. 上海植物生理研究所固氮组译. 根瘤菌实用研究手册. 上海: 上海人民出版社, 1970.  
[ 12 ] 许良树, 吕荣富, 张凤章, 等. 厦门大学学报(自然科学版), 1994, **33**(2): 269 ~ 271.  
[ 13 ] 孙金华, 陈秉俭, 汪化. 植物生理学报, 1988, **14**(2): 152 ~ 159.

[14] Monza J, Diaz P, Borsani O, et al. *World J Microbiol Biotechnol*, 1997, 13(5): 565 ~ 571.  
[15] Hungria M, Boddey L H, Santos M A, et al. *Biol Fertil Soil*. 1998, 27(4): 393 ~ 399.

STUDIES ON TRANSFERENCE OF HYDROGENASE GENES  
OF *RHIZOBIUM ARACHIS* \*

Wang Zhenyu Long Minnan Liu Yueying Zhang Fengzhang Xu Liangshu

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School  
of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Zhu Tianci Jiang Shueiliu

(Tongan Irrigation testing station, Xiamen 361100, China)

**Abstract:** The hydrogen-uptake genes were transferred into wild *Rhizobium arachis* Ra strains (Hup<sup>-</sup>, Nif<sup>+</sup>, Ap<sup>+</sup>) by triparental mating using pRK2013 as help plasmid. A transconjugant *R. arachis* Rz34-2 (Hup<sup>+</sup>, Nif<sup>+</sup>, Ap<sup>+</sup>, Tc<sup>r</sup>) which expressed high activities of hydrogenase and nitrogenase under free-living and symbiotic state was screened. Peanut inoculation test with recipient *R. arachis* Ra34, transcojugant Rz34-2 and control strain *R. arachis* L8-3 (Hup<sup>+</sup>, Nif<sup>+</sup>) was carried out respectively. The results showed that, compare to treatment without inoculation, inoculation with *R. arachis* Ra34 and *R. arachis* L8-3, the dry weight of leaf inoculated with transconjuant Rz34-2 increased 6.2%、7.6% and 6.3% respectively; the N-content of seed increased 8.8%、10.0% and 6.0%; the output increased 18.8%、10.5% and 10.7%. This suggested that legume plants inoculated with *Rhizobium* strains (Hup<sup>+</sup>) were more efficient to accumulate N and to increase its output.

**Key words:** *Rhizobium arachis*, Hup gene, Plant test

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39770070)

《微生物学报》第七届编辑委员会名单

- 顾 问 张树政  
主 编 李季伦  
副主编 陆德如 朱关福 李阜棣 王敖全 谭华荣  
编 委 王修垣 邓子新 田 波 刘志恒 朱庆裴 孙志浩 李焕娄  
陈世平 陈永青 杨苏声 周培瑾 范云六 范孝用 钱新民  
钱世钧 诸葛健 徐怀恕 翟中和