

## 一株能在苜蓿上结瘤的费氏中华根瘤菌\*

张海瑜 张海予 李小红 杨苏声\*\*

(中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094)

**摘 要:**费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)042BS 分离自新疆的苜蓿根瘤,通过交叉结瘤试验,发现它既可在苜蓿上又可在大豆上结瘤固氮。16S rDNA PCR-RFLP 分析表明,042BS 与费氏中华根瘤菌模式菌株 USDA205 的 4 种限制性酶切图谱完全一致。其 G+C mol% 为 60.0,与费氏中华根瘤菌 USDA205 和 USDA191 的 DNA 同源性分别为 84.9% 和 89.6%,表明 042BS 属于费氏中华根瘤菌。应用绿色荧光蛋白基因标记 042BS,得到重组菌株 042BSG。将其接种保定苜蓿和北引 1 号大豆,并重新分离出根瘤菌,利用激光共聚焦荧光显微镜检测到标记基因的表达,从而确证了 042BS 能在苜蓿和大豆上结瘤。而且,042BS 对不同苜蓿品种的结瘤能力不同。

**关键词:**费氏中华根瘤菌, DNA 同源性, 绿色荧光蛋白

**中图分类号:**S182 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 02-0127-06

寄主专一性是豆科植物-根瘤菌共生固氮体系的重要特征,即每种根瘤菌只能在一定种类的豆科植物上结瘤。同样,每种豆科植物只能被特定的根瘤菌侵染形成共生体<sup>[1]</sup>。不同根瘤菌的寄主范围的差异很大。根瘤菌(*Rhizobium* sp.)NGR234 是目前发现的寄主范围最广的根瘤菌菌株。它可在 112 属 200 多种豆科植物以及非豆科植物 *Parasponia andersonii* 上结瘤<sup>[2]</sup>。费氏中华根瘤菌的寄主范围较广,其中 USDA257 可在 79 属 130 多种豆科植物上结瘤。但是这两个菌株均不能在苜蓿上结瘤<sup>[2]</sup>。相反,苜蓿中华根瘤菌(*S. meliloti*)的寄主范围较窄,只能与苜蓿、草木樨和葫芦巴 3 个属的豆科植物结瘤<sup>[1]</sup>。

近年的研究表明,费氏中华根瘤菌与苜蓿中华根瘤菌的系统发育地位非常接近。同属于中华根瘤菌属,都含有大于 100G MD 的大质粒,而且费氏中华根瘤菌的噬菌体能感染某些苜蓿中华根瘤菌菌株<sup>[3]</sup>。但它们的寄主范围不同。长期以来,一直认为费氏中华根瘤菌不能在苜蓿上结瘤<sup>[4]</sup>。1997 年 Hashem 等在研究 22 株费氏中华根瘤菌对‘ARC’苜蓿的结瘤试验时发现,USDA201、USDA208、USDA209 和 USDA214 等菌株能与‘ARC’苜蓿结瘤<sup>[5]</sup>。

本实验室在交叉结瘤试验中,发现一株分离自新疆的苜蓿根瘤的根瘤菌菌株 042BS,既能在苜蓿上又能在大豆上结瘤。本文报道对该菌株的分类地位和结瘤特性的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒:费氏中华根瘤菌(*S. fredii*)042BS 由本室分离保存;费氏中华根瘤

\* 国家自然科学基金(39870045)和欧盟科研基金项目(IC18CT970191)资助

\*\* 通讯作者

作者简介:张海瑜(1973-),女,河南新乡市人,博士,主要从事微生物遗传学研究。

收稿日期:2000-03-29,修回日期:2000-07-18

菌 USDA205、USDA191, 苜蓿中华根瘤菌 USDA1002、102F28 以及 *S. medicae* USDA1037 均来自美国农业部 (USDA); 苜蓿中华根瘤菌 Rm41 来自中国农业科学院 (CAAS); 新疆中华根瘤菌 (*S. xinjiangensis*) CCBAU110 来自中国农业大学菌种保藏中心 (CCBAU); 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) S17-1 ( $pro^- tra^+$ ) 和大肠杆菌 K12 由本室保存。质粒 pMP2444 携带组成型表达的绿色荧光蛋白基因 (*gfp*), 庆大霉素抗性, 由荷兰莱登大学惠赠。

**1.1.2 供试豆科植物:**大豆品种为北引 1 号; 苜蓿品种为保定、傲汉、秘鲁、百发、宁夏、皇后、美国杂花、普通紫花和 86-266 (购自中国农业科学院畜牧研究所)。

**1.1.3 培养基和抗生素:**LB 培养基<sup>[6]</sup>用于培养大肠杆菌。YMA 和 TY 培养基<sup>[7]</sup>用于培养根瘤菌, FY 基本培养基<sup>[8]</sup>用于筛选接合转移子。培养大肠杆菌和根瘤菌所用的庆大霉素 (Gm) 浓度分别为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 1.2 方法

**1.2.1 G + C mol% 和 DNA-DNA 杂交:**根瘤菌总 DNA 的提取参照文献[9]的方法进行。采用热变性法<sup>[10]</sup>测定  $T_m$  值和 G + C mol%, 以大肠杆菌 K-12 为参比菌株。用超声波剪切 DNA, 其输出功率为 6W, 剪切时间为 4min, 间隔时间为 2s, 重复 3 次。采取复性速率法<sup>[11]</sup>测定菌株间的 DNA 同源性。 $T_m$  值及复性速率的测定均在 Lambda Bio20 紫外分光光度计上进行。

**1.2.2 16S rDNA PCR-RFLP 分析:**按照 Laguerre 的方法, 用引物 P1、P6<sup>[12]</sup>扩增 042BS 和标准菌株的 16S rDNA。分别选用 *Hae* III、*Hinf* I、*Msp* I 和 *Rsa* I 等 4 种限制性内切酶消化扩增产物。电泳成像, 分析酶切图谱。

**1.2.3 结瘤试验:**采用双层瓶法。种子经表面消毒, 种植于无菌的双层瓶中。上层瓶装满蛭石, 下层瓶中装有无氮营养液, 用纱布经上层瓶底的小孔引流到上层瓶中。双层瓶经高压灭菌 1h。根瘤菌在 TY 培养液中培养至对数期, 每瓶接种量为  $10^7 \sim 10^8$  菌体。以不接菌的处理为对照。每组处理设 3 到 5 瓶重复。将双层瓶随机摆放在温室中。每天光照时间约为 12h, 温度约为 25℃。用乙炔还原法测定固氮酶活性。剪取地上部分, 于 70℃ 烘至恒重。

**1.2.4 绿色荧光蛋白基因的标记和检测:**用 pMP2444 转化大肠杆菌 S17-1, 将得到的转化子作为供体菌, 以 042BS 为受体菌进行二亲本杂交。在含有 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  庆大霉素的 FY 基本培养基上筛选接合子。将待测菌株制成水浸片, 在激光共聚焦荧光显微镜下观测, 并记录荧光。其激发光波长为 488nm。

## 2 结果和分析

### 2.1 042BS 分类地位的确定

**2.1.1 16S rDNA PCR-RFLP 分析:**选取苜蓿中华根瘤菌模式菌株 USDA1002、费氏中华根瘤菌模式菌株 USDA205、新疆中华根瘤菌模式菌株 CCBAU110 和 *S. medicae* 模式菌株 USDA1037 为参比菌株。042BS 和上述标准菌株的 16S rDNA PCR 扩增产物分别经 4 种限制性内切酶消化, 所得酶切图谱如图版 I -A ~ D 所示。其中, 采用 *Hae* III、*Hinf* I 酶切各菌株所得的图谱完全一致。在用 *Rsa* I 酶切时, 042BS 和 USDA1037 及 USDA205

带型相同;用 *Msp* I 酶切时,042BS 与 USDA205 的带型相同。由此可见,042BS 与 USDA205 的 16S rDNA 同源性最高。为了确定其分类地位,还需要测定 042BS 和费氏中华根瘤菌及苜蓿中华根瘤菌各对照菌株的 DNA 同源性。

2.1.2 G + C mol% 和 DNA 同源性:测定 042BS 的 G + C mol% 和 DNA 同源性,并以费氏中华根瘤菌 USDA205、USDA191,以及苜蓿中华根瘤菌 USDA1002、102F28 和 Rm41 为参比菌株。由表 1 可以看出,042BS 的 G + C mol% 为 60.0,其它参比菌株 G + C mol% 均在 59.7 到 60.5 之间,与已报道的根瘤菌的 G + C mol% 范围<sup>[1]</sup>相符。042BS 与费氏中华根瘤菌 USDA205 和 USDA191 的同源性分别为 84.9% 和 89.6%,而与苜蓿中华根瘤菌各菌株的同源性小于 48.5%。根据国际系统细菌学委员会根瘤菌分委会规定的 DNA 同源性在 70% 以上为定种的标准<sup>[13]</sup>,042BS 应归属于费氏中华根瘤菌。

表 1 042BS 和参比菌株间的 DNA 同源性和 DNA G + C mol%

Table 1 DNA homology (%) between strain 042BS and reference strains and their DNA contents

Species	Strain	G + C mol%	Homology with 042BS/%
<i>S. fredii</i>	042BS	60.0	100.0
	USDA205	59.7	84.9
	USDA191	60.0	89.6
<i>S. meliloti</i>	USDA1002	60.5	18.9
	102F28	60.0	48.5
	Rm41	60.2	45.4

2.2 042BS 在苜蓿和大豆的结瘤特性

2.2.1 042BS 在苜蓿和大豆的结瘤试验:对 042BS 在保定苜蓿和北引 1 号大豆的结瘤能力进行试验。在温室生长 30d 后收获。接种 042BS 的大豆植株均正常,叶片呈绿色,不接菌的对照组植株矮小,叶片呈黄色。接种 042BS 的部分苜蓿植株正常,根中有粉红色根瘤,部分植株矮小,不结瘤(图版 I -E,F)。我们进行了多次结瘤试验,均得到相近的结果。

2.2.2 042BS 在苜蓿和大豆结瘤能力的确证:为了证实在苜蓿和大豆结瘤的菌株确为 042BS,我们通过接合转移将携带组成型表达的绿色荧光蛋白基因(*gfp*)的质粒 pMP2444 转入 042BS 中,从而赋予 042BS 产生绿色荧光的能力。将得到的接合子称为 042BSG。pMP2444 是以稳定的广谱宿主质粒 pBBR1MCS-5 为载体构建的,它在根瘤菌中具有较强的稳定性,在不含选择压力的情况下可稳定存在 1 个月以上<sup>[14]</sup>。因而在结瘤试验中,pMP2444 不会被丢失。用 042BSG 接种保定苜蓿和北引 1 号大豆,在 30d 后收获。分别收集根瘤,经表面消毒后,在含有 40μg/mL 庆大霉素的 YMA 平板上分离出根瘤菌,然后在激光共聚焦荧光显微镜下观察。重新分离的菌体在 488nm 蓝光激发下均发出绿色荧光(图版 I -G)。作为对照的菌株 042BS 不发绿色荧光。将从苜蓿根瘤中重新分离的标记菌株 042BSG 再次接种苜蓿和大豆,重复上述试验,得到同样的结果。此试验说明 042BS 确实可以在苜蓿和大豆结瘤。

2.2.3 042BS 在不同苜蓿品种的结瘤试验:对 042BS 在 9 个供试苜蓿品种的结瘤能力进行试验,分别以不接菌和接种 USDA1002 的处理为对照。结果表明,042BS 只与傲汉、保

定、皇后、普通紫花和秘鲁 5 个品种结瘤,分别记录结瘤株数所占的比例、根瘤颜色、地上部的干重和固氮酶活性。如表 2 所示,042BS 对不同品种的结瘤能力差异较大,其中在傲汉苜蓿的结瘤能力最强,可在 85.2% 的植株上结瘤,且地上部干重和固氮酶活性较高,分别为 USDA1002 的 71% 和 43%,而在秘鲁苜蓿上只形成少数白色根瘤。试验表明,042BS 在苜蓿的结瘤能力具有品种特异性。此外,042BS 在苜蓿的结瘤能力明显低于 USA1002,主要表现为结瘤株数少,固氮酶活性偏低。

表 2 042BS 在不同苜蓿品种的结瘤试验

Table 2 Nodulation experiment with strain 042BS and alfalfa cultivars

Cultivar	Strain	Plants forming nodules/% <sup>a</sup>	Color of nodule	Plant top dry weight/mg	Total nitrogenase activity/( $\mu$ mol/h) <sup>b</sup>
Aohan	042BS	85.2	Pink	96.4	34.1
	USDA1002	100	Pink	135.9	78.9
	Uninoculated	0	—	24.8	0
Baoding	042BS	57.4	Pink	98.4	33.2
	USDA1002	100	Pink	197.6	112.6
	Uninoculated	0	—	38.2	0
Huanghou	042BS	20.7	Pink	77.5	6.1
	USDA1002	100	Pink	198.3	50.1
	Uninoculated	0	—	48.1	0
Putongzihua	042BS	19.4	Pink/white	40.4	6.2
	USDA1002	100	Pink	139	78.8
	Uninoculated	0	—	36.8	0
Bilu	042BS	12.8	White	46.7	0
	USDA1002	100	Pink	187.6	81.3
	Uninoculated	0	—	43.2	0

<sup>a</sup> More than 100 plants were tested

<sup>b</sup> Values were means of ten plants

3 讨论

042BS 分离自新疆的苜蓿根瘤,通过交叉结瘤试验,发现它能在大豆上结瘤。对其分类地位的研究表明,它属于费氏中华根瘤菌,因而可以在大豆上结瘤。应用绿色荧光蛋白基因标记 042BS,进一步证实它还可以在苜蓿上结瘤,并且该菌株对苜蓿的结瘤具有品种特异性。因此,我们认为 042BS 存在特定的遗传机制,使其能在苜蓿上结瘤,同时不排除其它某些费氏中华根瘤菌菌株可在特定苜蓿品种上结瘤的可能。1997 年,Hashem 等也曾发现 4 株费氏中华根瘤菌可以在苜蓿结瘤固氮<sup>[5]</sup>,但并未对这些菌株在不同苜蓿品种的结瘤能力及其遗传机制作进一步研究。

根瘤的形成是非常复杂的过程,需要共生体双方的相互诱导和识别,以及各自一系列基因的时序表达。就根瘤菌而言,其结瘤基因、结瘤因子、胞外多糖和脂多糖等都与两者

的相互识别有关,而且在不同程度上决定了根瘤菌的寄主范围<sup>[15]</sup>。费氏中华根瘤菌与苜蓿中华根瘤菌结瘤因子的结构不同。前者的还原端 N-己酰葡萄糖胺残基上连有岩藻糖基团,而后的相应位置上则为磺酸基团,这两个取代基团被认为是决定各自的寄主范围的关键。后者的磺酸基团是由寄主专一性基因 *nodH* 和 *nodPQ* 等编码的酶催化合成的<sup>[15]</sup>。为此,我们曾试图从 042BS 中克隆上述基因,但未获成功。Jane 等对 042BS 结瘤因子进行了质谱分析,也未发现与苜蓿中华根瘤菌的结瘤因子相同的特异残基(Jane,私人交流,1999)。上述结果说明,从结瘤因子的角度不能解释 042BS 能在苜蓿结瘤的原因。而 042BS 对不同苜蓿品种结瘤能力的差异,也暗示两者间可能存在其它的识别机制。总之,对费氏中华根瘤菌 042BS 在苜蓿结瘤的发现及对其遗传机制的研究,将丰富对根瘤菌寄主专一性及菌株发育等领域的认识。

### 参 考 文 献

- [1] Jordan D. C. Rhizobiaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1984. 234~256.
- [2] Pueppke S G, Broughton W J. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, 12(4): 293~318.
- [3] Hashem F M, Kuykendall L D, Udell S E, et al. *Plant and Soil*, 1996, 186: 127~134.
- [4] Keyser H H, Bohloul B B Hu T S, et al. *Science*, 1982, 215: 1631~1632.
- [5] Hashem F M, Kuykendall L D, Fadly G E, et al. *Symbiosis*, 1997, 22: 255~264.
- [6] Maniatis T, Fritsh E F, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Rhonda J H, Michael M, Bruno W S. *J Bacteriol*, 1993, 175(21): 6945~6952.
- [8] 杨兴洪, 张海瑜, 杨苏声. *农业生物技术学报*, 1989, 6(4): 319~326.
- [9] 林万明. *分析微生物学专辑*. 北京: 科学出版社, 1988. 88~89.
- [10] DeLey J. *J Bacteriol*, 1970, 101: 738~754.
- [11] DeLey J, Cattorir H, Reynaerts A. *Eur J Biochem*, 1970, 12: 133~142.
- [12] 吕爱民, 陈文新. *微生物学报*, 2000, 40(1): 1~8.
- [13] Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41: 582~587.
- [14] Michael E K, Philip H. E, Hill D S, et al. *Gene*, 1995, 166: 175~176.
- [15] Spaink H P, Kondorosi A, Hooykaas P J. *The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria*. London: Kluwer Academic Publishers, 1997.

## A SINORHIZOBIUM FREDII STRAIN THAT EFFECTIVELY NODULATE MEDICAGO SATIVA \*

Zhang Haiyu Zhang Haiyu Li Xiaohong Yang Susheng\*\*

(Department of Microbiology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** *Sinorhizobium fredii* 042BS was isolated from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) from Xinjiang Region. Nodulation experiments showed that both soybean and alfalfa were nodulated by 042BS effectively. The 16S rDNA PCR-RFLP analysis was carried out by

four restriction endonucleases, and the restriction maps of strain 042BS were identical with those of *S. fredii* USDA205. The DNA G + C mol% of strain 042BS was 60.0. The DNA homology between 042BS and *S. fredii* USDA205 and USDA191 were 84.9% and 89.6%, respectively. To prove the capability of 042BS to nodulate both soybean and alfalfa, constitutively expressed green fluorescence protein gene(*gfp*) was introduced to 042BS, and the recombinant strain 042BSG was obtained. The reisolates from nodules of the soybean and alfalfa inoculated with 042BSG were observed using the confocal laser-scanning microscope, and the expressions of *gfp* were detected, respectively. 042BS showed various nodulation capacities with different alfalfa cultivars used.

**Key words:** *Sinorhizobium fredii*, DNA homology, Green fluorescence protein

### 图版说明

Explanation of plate

A~D. 042BS 和参比菌株的 16S rDNA PCR-RFLP 的酶切图谱分析。

The analysis of restriction enzyme digestion for 16S rDNA PCR-RFLP products. A. *Hae* III; B. *Hinf* I; C. *Rsa* I; D. *Msp* I. 1. 042BS; 2. USDA1037; 3. USDA205; 4. CCBAU110; 5. USDA1002; M. 100bp ladder marker.

E. 接种 042BS 的大豆植株。

Soybean plants inoculated with 042BS.

F. 接种 042BS 的苜蓿植株。

Alfalfa plants inoculated with 042BS.

G. 绿色荧光蛋白基因在接种 042BSG 的苜蓿根瘤重新分离菌中的表达。

The expression of *gfp* gene in reisolates from alfalfa nodules inoculated with 042BSG.

\* This work was funded by National Natural Science Foundation of China (39870045) and European Commission INCO-DC Research Project (IC18CT970191)

\*\* Author for correspondence

## 《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 李焕姿

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