

一株能在大豆上结瘤的苜蓿中华根瘤菌

林榕姗 杜秉海 李小红 王 磊 杨苏声*

(中国农业大学生物学院 农业部农业微生物资源与其应用重点开放实验室 北京 100094)

摘 要 :苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) XJ96077 分离自新疆的苜蓿根瘤中,其原宿主为紫花苜蓿(*Medicago sativa*)。交叉结瘤试验发现,它既可在苜蓿上又能在大豆上结瘤固氮。DNA (G + C) mol% 分析表明,XJ96077 的 DNA (G + C) mol% 为 61.9%,与已报道的根瘤菌属的 DNA (G + C) mol% 范围(59% ~ 64%)相符。DNA 同源性分析表明,XJ96077 与苜蓿中华根瘤菌 USDA1002^T 和 042BM 的同源性分别达到 93% 和 80%,说明 XJ96077 归属于苜蓿中华根瘤菌。应用绿色荧光蛋白基因标记 XJ96077,得到重组菌株 XJ96077(G)。将其接种普通紫花苜蓿,通过激光共聚焦荧光显微镜可以检测到标记基因的表达。接种北引 1 号大豆上,同样可以清楚地观察到标记基因在根瘤中的表达,从而确证了 XJ96077 能同时在苜蓿和大豆上结瘤。通过不同品种大豆的结瘤试验,发现 XJ96077 对大豆品种的结瘤能力不同。

关键词 :苜蓿中华根瘤菌,大豆,结瘤作用,宿主范围

中图分类号 :Q439.9 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)06-0729-04

宿主专一性是豆科植物-根瘤菌共生固氮体系的主要特征,即每种根瘤菌只能在一种或数种豆科植物结瘤固氮。同样,每种豆科植物只能被特定的根瘤菌感染形成根瘤^[1]。但是,不同根瘤菌的宿主范围差异很大,而且根瘤菌与豆科植物特定的共生相互关系的形成依赖于二者之间的分子信号交换。植物产生的类黄酮等信号分子诱导根瘤菌的结瘤基因的表达,形成的结瘤因子引起植物根发生一系列形态和生理变化,进而发育成可以固氮的根瘤。此外,根瘤菌产生的胞外多糖、脂多糖、K-抗原和环 β -葡聚糖等对结瘤过程也具有重要作用^[2]。

苜蓿中华根瘤菌与费氏中华根瘤菌(*S. fredii*)的系统发育地位非常接近,但是,它们的宿主范围明显不同。费氏中华根瘤菌的宿主范围较广,其中,USDA257 可在 79 属 130 多种豆科植物上结瘤^[3]。近年来的研究发现,费氏中华根瘤菌还能在苜蓿上结瘤^[4,5]。然而,苜蓿中华根瘤菌的宿主范围较窄,仅在豆科植物的苜蓿属(*Medicago*)、草木樨属(*Meliloti*)和胡卢巴属(*Trigonella*)上结瘤固氮^[1]。在以前的研究中,我们曾经报道过一株苜蓿中华根瘤菌 042B 能够在大豆上结瘤固氮的情况^[6]。由于该菌株产生大量黏液,而且当时缺乏有效的报告基因标记,所以未能排除其他根瘤菌的混杂。后来,在进一

步的研究中发现,在该菌株的原始分离物中,除含有一株苜蓿中华根瘤菌外,还混杂有一株能在苜蓿上结瘤固氮的费氏中华根瘤菌,这两个菌株分别命名为 042BM 和 042BS^[5]。在我们以前的报道中^[6],042B 与费氏中华根瘤菌 USDA205^T 的 DNA 同源性仅为 10%,说明该菌株的原始分离物中可能只含有少量的 042BS。

在交叉结瘤试验中,我们发现分离自新疆的苜蓿根瘤的菌株 XJ96077,既能在苜蓿上又能在大豆上结瘤。本文报道对该菌株的结瘤特性和分类地位的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :表 1 为本研究所用菌株和质粒。

1.1.2 豆科植物 :大豆品种为北引 1 号、黑农 33、吉 38、晋豆 19 和晋豆 20。苜蓿品种为普通紫花。

1.1.3 培养基和抗生素 :LB 培养基^[7]用于培养大肠杆菌。YMA 培养基^[8]用于培养根瘤菌。培养大肠杆菌和根瘤菌所用的庆大霉素(Gm)浓度分别为 10 μ g/mL 和 40 μ g/mL。

1.1.4 试剂及仪器 :Taq DNA 聚合酶、PCR 等其他

基金项目 :国家 973 项目 (2001CB108905) 欧盟科技合作项目 (ICA4-CT-2001-10056)

* 通讯作者。Tel 86-10-62892674 86-10-62891332 E-mail :yangssh@cau.edu.cn

作者简介 :林榕姗 (1976 -),女,山东人,理学硕士,主要从事分子微生物学研究。

收稿日期 2004-03-16,修回日期 2004-05-11

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmid		
Strains or plasmid	Characteristic	Source
Strains		
<i>S. meliloti</i>		
XJ96077	Wide type ,Cm ^r	CCBAU83077
XJ96077 (G)	Derivative of XJ96077 , containing pMP2444	This laboratory
XJ96077 (GM)	Reisolate of XJ96077(G) from alfalfa nodules	This laboratory
XJ96077 (GS)	Reisolate of XJ96077(G) from soybean nodules	This laboratory
USDA1002 ^T	Type strain	USDA
Rm41	Reference strain	USDA
042BM	Reference strain	CCBAU
<i>S. fredii</i>		
USDA205 ^T	Type strain	USDA
042BS	Reference strain	CCBAU
<i>S. xinjiangensis</i>		
CCBAU110 ^T	Type strain	CCBAU
Plasmid		
pMP2444	<i>gfp</i> cloned into pBBR1MCS-5 ,Sm ^r Gm ^r	Leiden Univ. , The Netherlands

CCBAU : Culture Collection of Beijing Agriculture University ; USDA : United States Department of Agriculture.

试剂和抗生素均购自上海生物工程技术服务有限公司。(G + C) mol% 和 DNA-DNA 杂交所用的仪器为 Lambda Bio20 紫外分光光度计。

1.2 DNA (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。采用热变性法测定 *T_m* 值和(G + C) mol%^[8]。根据复性速率测定菌株间的 DNA 同源性^[10]。

1.3 ERIC-PCR 指纹分析

按照 Versalovic 等^[11]的方法进行。

1.4 结瘤试验

按照文献[12]进行 ,用乙炔还原法测定固氮酶活性。

1.5 绿色荧光蛋白基因的标记和激光共聚焦荧光显微镜的检测

按照文献[5]进行 ,其激发光的波长为 488nm。

2 结果

2.1 XJ96077 在苜蓿和大豆上的结瘤特性

为了确证 XJ96077 在苜蓿和大豆上的结瘤情

况 ,通过接合转移将含有组成型表达的绿色荧光蛋白基因 *gfp* 的质粒 pMP2444 转入 XJ96077 中 ,获得接合子 XJ96077(G)。用 XJ96077(G)接种普通紫花苜蓿和北引 1 号 ,30d 后收获。收集的根瘤分别在激光共聚焦荧光显微镜下观察 ,其在 488nm 蓝光激发下均发出绿色荧光(图版Ⅲ -A)。再次对从苜蓿和大豆根瘤中获得的分离物 XJ96077(GM)和 XJ96077 (GS)进行激光共聚焦显微观察 ,二者的菌体同样发出绿色荧光。通过多次回接试验 ,表明 XJ96077 确实能够在苜蓿和大豆上结瘤。

为了进一步了解 XJ96077 在不同大豆品种上的结瘤情况 ,将该菌株分别接种在 5 个大豆品种 ,并分别以不接菌的处理为对照。结果表明 ,XJ96077 只与北引 1 号、吉 38 和黑农 33 等 3 个大豆品种结瘤 ,分别记录根瘤的数量、重量、颜色、植株地上部分干重和根瘤的固氮酶活性。表 2 显示 ,XJ96077 对不同品种的结瘤能力差异较大 ,其中在北引 1 号的结瘤固氮能力最强 ,所结的根瘤菌为粉红色的有效瘤 ,固氮酶活性最高。而在其他大豆品种上的结瘤数少 ,

表 2 XJ96077 在不同大豆品种上的结瘤试验

Table 2 Nodulation experiment with strain XJ96077 with different soybean cultivars						
Cultivar	Strain	Nodule number	Nodule Wt/mg	Plant top dry Wt/mg	Colour of nodule	Nitrogenase activity /mol C ₂ H ₄ h ⁻¹
Beiyin 1	XJ96077	29.0 ± 2.5	138.8 ± 11.2	843.3 ± 53.3	Pink	175.5 ± 32.5
Beiyin 1	Uninoculated	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	362.2 ± 28.5	—	0.0 ± 0.0
Ji 38	XJ96077	6.5 ± 1.0	6.3 ± 1.5	653.0 ± 40.1	Pink/white	11.6 ± 4.6
Ji 38	Uninoculated	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	304.6 ± 30.5	—	0.0 ± 0.0
Heinong 33	XJ96077	8.0 ± 1.0	1.0 ± 0.2	714.0 ± 50.2	Pink/white	0.5 ± 0.2
Heinong 33	Uninoculated	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	256.1 ± 25.7	—	0.0 ± 0.0

Values in the Table are the means ± SD.

平均瘤重和固氮酶活性低,所结的根瘤中有部分是白色的无效瘤。由此说明,XJ96077 对大豆的结瘤具有品种特异性。

2.2 XJ96077 分类地位的确定

2.2.1 ERIC-PCR 指纹分析 选取苜蓿中华根瘤菌模式菌株 USDA1002^T、费氏中华根瘤菌模式菌株 USDA205^T、新疆中华根瘤菌模式菌株 CCBAU110 和苜蓿中华根瘤菌 Rm41 为参比菌株。XJ96077^T 和上述菌株的 ERIC-PCR 扩增产物经电泳,所得电泳图谱如图版 III-B 所示,可以看出,XJ96077 与 USDA1002^T、Rm41 在 2.1kb 和 1.2kb 各有 1 条大小完全相同的条带;USDA205^T 与 USDA1002^T、Rm41、XJ96077 无明显相同的特征条带;CCBAU110^T 仅有 1 条扩增条带,而且与其他参比菌株明显不同,也无相同条带。

为了更直观地反映 ERIC-PCR 中 XJ96077 与各参比菌株间的遗传关系,将上述扩增产物的电泳图谱转换成“1”和“0”,用简单匹配系数方法计算得到各菌株的相似性,然后用平均连锁法将结果转化为树状图谱。

从图版 III-C 中可以看出,USDA1002^T 与 Rm41 的相似水平为 75%。XJ96077 与 USDA1002^T 和 Rm41 的相似水平为 71%,而与 USDA205^T 和 CCBAU110^T 的相似性水平仅为 43%。为了确定 XJ96077 的分类地位,还需要测定其与费氏中华根瘤菌及苜蓿中华根瘤菌各参比菌株的 DNA 同源性。

2.2.2 DNA (G + C) mol % 和 DNA 同源性 测定 XJ96077 的 (G + C) mol % 和 DNA 同源性,并以费氏中华根瘤菌 USDA205^T 和 042BS,苜蓿中华根瘤菌 USDA1002^T 和 042BM,以及新疆中华根瘤菌 CCBAU110^T 为参比菌株。由表 3 可以看出,XJ96077

的 (G + C) mol % 含量为 61.9%,其他对照菌株的 (G + C) mol % 均在 60.4% ~ 61.7% 之间,与已报道的根瘤菌属的 (G + C) mol % 范围 59% ~ 64% 相符。XJ96077 与苜蓿中华根瘤菌 USDA1002^T、042BM 的 DNA 同源性分别为 93% 和 80%,而与费氏中华根瘤菌 USDA205^T、042BS 及新疆中华根瘤菌 CCBAU110^T 的 DNA 同源性均小于 32%。根据国际系统细菌学委员会根瘤菌分会规定的 DNA 同源性在 70% 以上为定种的标准^[13],XJ96077 应归属于苜蓿中华根瘤菌。这与闫爱民等^[14]的分类鉴定结果是一致的。

3 讨论

在本研究中,为了避免其他根瘤菌的混杂侵染,我们采用了绿色荧光蛋白基因 *gfp* 标记 XJ96077,通过该基因在根瘤中的表达,并经过多次回接试验,确证它能在大豆上结瘤。对其进行的分类地位的研究表明,该菌株属于苜蓿中华根瘤菌。能在苜蓿上结瘤固氮良好,但在大豆上的结瘤能力较差,而且表现出明显的品种特异性。目前,尚未见到有关苜蓿中华根瘤菌能在大豆上结瘤固氮的报道。本室已发现 042BS 是一株能在苜蓿上结瘤的费氏中华根瘤菌,在大豆上结瘤良好,但对苜蓿结瘤较差,而且对品种具有选择性^[5]。研究表明,尽管 XJ96077 和 042BS 分别具有一定的在大豆和苜蓿上结瘤固氮的能力,但是,仍然保留了其对原宿主的高亲和性。

根瘤菌与豆科植物的共生固氮作用是一个由双方有关基因共同参与、相互对话、识别、协同作用并自主调节的复杂过程。根瘤菌的结瘤基因、结瘤因子、胞外多糖和脂多糖等都参与两者的相互识别,而且在不同程度上决定了根瘤菌的宿主范围^[2,45]。苜蓿中华根瘤菌与费氏中华根瘤菌结瘤因子的结构不同。前者的还原端 C6 的 N-乙酰葡萄糖胺残基上含有磺酸基团,是由宿主专一性基因 *nodH* 和 *nodPQ* 等编码的酶催化合成的。而后者的相应位置上为 (甲酰基)岩藻糖基团,是由 *noeL* 等基因编码的酶催化的。根据推理,能在苜蓿上结瘤的费氏中华根瘤菌应该产生磺酸化的结瘤因子。但是,研究表明,费氏中华根瘤菌 042BS 能在苜蓿上结瘤,并不需要具磺酸基团的结瘤因子^[16],说明该菌株在苜蓿上结瘤的能力可能是由胞外多糖、脂多糖等因子决定的^[2]。在本研究中,XJ96077 在大豆上的结瘤能力和表现的品种特异性,同样不能从结瘤因子的角度给予合理的解释,可能存在特殊的共生遗传机制,有待进一步研究。

表 3 XJ96077 和参比菌株间的 DNA (G + C) mol % 和 DNA 同源性			
Table 3 DNA homology between strain XJ96077 and reference strains and DNA (G + C) mol %			
Species	Strain	DNA (G + C) mol %	DNA homology with XJ96077/%
<i>S. meliloti</i>	XJ96077	61.9	100
	USDA1002 ^T	61.3	93
	042BM	60.4	80
<i>S. fredii</i>	USDA205 ^T	61.7	32
	042BS	61.0	22
<i>S. xinjiangensis</i>	CCBAU110 ^T	60.8	28

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] Spaink H P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2000, **54**: 257 – 288.
- [3] Pueppke S G, Broughton W J. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, **12**(4): 293 – 318.
- [4] Hashem F M, Kuykandall L D, Fadly G E, et al. Strains of *Rhizobium fredii* effectively nodulate and efficiently fix nitrogen with *Medicago sativa* and *Glycine max*. *Symbiosis*, 1997, **22**: 255 – 264.
- [5] 张海瑜, 张海予, 李小红, 等. 一株能在苜蓿上结瘤的费氏中华根瘤菌. *微生物学报*, 2001, **41**(2): 127 – 131.
- [6] Gao W M, Yang S S. A *Rhizobium* strain that nodulates and fixes nitrogen in association with alfalfa and soybean plants. *Microbiology*, 1995, **141**: 1957 – 1962.
- [7] Maniatis T, Fritsh E F, Sambrook J. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Vincent J M. A Manual for the Practical Study of the Root-nodule Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.
- [9] Johnson J L. Determination of DNA base composition, DNA association and DNA hybridization of bacterial nucleic acid. *Methods Microbiol*, 1985, **18**: 1 – 74.
- [10] De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem*, 1970, **12**: 133 – 142.
- [11] Versalovic J M, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprint of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**(24): 6823 – 6831.
- [12] Hardy R W F, Burns R C, Holsten R D. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol Biochem*, 1973, **5**: 47 – 81.
- [13] Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H, et al. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulation bacteria. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, **41**: 582 – 587.
- [14] Yan A M, Wang E T, Kan F L, et al. *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline in Xinjiang, China. *IJSEM*, 2000, **50**: 1887 – 1891.
- [15] Cullimore J V, Ranjeva R, Bono J J. Perception of lipo-chitin oligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci*, 2001, **6**: 24 – 30.
- [16] Noreen S, Schlaman H R M, Bellogín R A, et al. Alfalfa nodulation by *S. fredii* does not require sulfated Nod-factors. *Functional Plant Biology*, 2003, **30**(12): 1219 – 1232.

A *Sinorhizobium meliloti* Strain That Can Nodulate Soybean Plants

LIN Rong-Shan DU Bing-Hai LI Xiao-Hong WANG Lei YANG Su-Sheng*

(College of Biological Science, China Agricultural University, Key Laboratory for Microbial Research and Application of Agriculture Ministry, Beijing 100094, China)

Abstract: *Sinorhizobium meliloti* XJ96077 was isolated from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) in Xinjiang Region of China. Nodulation experiments showed that both soybean and alfalfa were effectively nodulated by XJ96077. The DNA (G + C) mol% of strain XJ96077 was 61.9%. The DNA homologies of strain XJ96077 were 93% and 80% with *S. meliloti* USDA1002^T and 042BM, respectively. These results showed that XJ96077 belongs to *Sinorhizobium meliloti*. To prove the capability of XJ96077 to nodulate both soybean and alfalfa, constitutively expressed green fluorescence protein gene *gfp* was introduced to XJ96077, and the recombinant strain XJ96077(G) was obtained. Root nodules of the soybean and alfalfa inoculated with XJ96077(G) and the expression of *gfp* were observed using the confocal laser scanning microscope. XJ96077 showed various nodulation capacities with different soybean cultivars.

Key words: *Sinorhizobium meliloti*, Soybean, Nodulation, Broad host range

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (001CB108905); European Commission INCO-DC Program (ICA4-CT-2001-10056)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62892674; Fax: 86-10-62891332; E-mail: yangssh@cau.edu.cn

Received date: 03-16-2004