

耐盐高效大豆根瘤菌株的构建

杨苏声 李季伦

(北京农业大学微生物专业, 北京)

快生型大豆根瘤菌 RT19 是一株耐盐而固氮能力差的菌株, 在含有 0.3 mol/L NaCl 的 YM 培养液中生长良好, 代时为 3.5h, 甚至在 0.6 mol/L NaCl 条件下仍可生长。慢生型大豆根瘤菌 USDA110 对盐敏感, 在含有 0.1 mol/L NaCl 的 YM 培养液中不生长, 但结瘤固氮能力强。

本实验以 RT19 的 DNA 转化 USDA110 细胞, 在以 0.3 mol/L NaCl 为选择标记的 YMA 培养基上, 挑取 322 个耐盐和生长快的菌落, 将其中 101 个菌落纯化, 并回接到大豆“112-2-4”, 得到两株耐盐、生长快而且固氮活性强的转化子 RTt19 和 RTt50。

供体菌 RT19 和转化子 RTt19、RTt50 在 0.4 mol/L NaCl 培养基中生长时, 细胞内积累大量谷氨酸, 而且丙氨酸和缬氨酸有不同程度的增长。

RTt19 和 RTt50 经过 20 代的转管移植, 其性状保持不变。

关键词 DNA 转化; 耐盐性; 大豆根瘤菌

我国土壤中广泛存在着快生型大豆根瘤菌^[1-4], 其特点是生长快、耐盐、可在 0.3—0.4 mol/L NaCl 条件下生长, 除少数外, 一般结瘤固氮效率都低^[5,6]。慢生型大豆根瘤菌却相反, 它对盐敏感, 在 0.1 mol/L NaCl 条件下受到抑制, 然而结瘤固氮效率比快生型大豆根瘤菌高^[6]。据报道, 高浓度的 NaCl 会降低豆科植物接种剂中根瘤菌的数目^[7]。所以, 根瘤菌的耐盐性与它们在土壤中的存活能力以及与土著根瘤菌的竞争性有关。

1954 年, Balassa 首次用异源 DNA 在根瘤菌中进行遗传转化^[8], 随后陆续报道了三叶草根瘤菌、花生根瘤菌、苜蓿根瘤菌、羽扇豆根瘤菌和大豆根瘤菌等的种内、种间 DNA 转化^[9-12]。在这些实验中, 研究了根瘤菌 DNA 转化的条件和感受态等因素, 并以抗生素及营养缺陷型作为选择标记, 证明 DNA 转化能够提高根瘤菌的有效性和扩大寄主专一性^[9]。

为了提高大豆根瘤菌的耐盐性和共生

效应, 我们用 DNA 转化方法, 把耐盐特性从快生型菌株转移至慢生型菌株中, 构建成耐盐高效的大豆根瘤菌株, 这将在大豆栽培生产中应用接种技术获得高固氮有重要意义。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

快生型大豆根瘤菌 RT19 分离自天津盐碱地; 慢生型大豆根瘤菌 USDA110 引自美国加州大学戴维斯分校 Valentine 实验室, 分别作为转化供体菌和受体菌。

(二) 培养基

1. YMA 培养基和 YM 培养液^[13]
2. TY 培养基的成分如下(每升): 胰蛋白胨 5g, 酵母粉 3g, CaCl₂ · 2H₂O 0.5g。
3. 感受态培养基^[12]、水培营养液和基本培养基分别参照文献 [12]、[14] 和 [15]。

(三) DNA 的提取及转化

本文于 1987 年 8 月 26 日收到。

秦海英及崔拓同志参加部分试验工作, 特致谢。

将供体菌转入 TY 培养液, 28℃ 振荡培养, 在对数生长期后期收集细胞, 参照 Saito 等的方法^[16]提取 DNA。

将受体菌 USDA110 接种在 YM 培养液中, 28℃ 振荡培养 3 天后, 转入感受态培养液, 使其起始的 OD 值为 0.1, 28℃ 振荡培养至对数生长期后期, 将菌液取出 1ml, 稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} , 作平皿菌落计数, 其余的菌液置冰箱 (4℃) 过夜。次日取 0.5 ml 受体菌液放入小试管, 加感受态培养液 0.4 ml, 然后加供体菌 RT19 的 DNA 溶液, 使其 DNA 最终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在 28℃ 振荡培养 24h, 进行转化。

本实验以 0.3 mol/L NaCl 作为转化的选择标记。将经过转化处理的菌液和不加 DNA 的受体菌 USDA110 菌液各取 0.1 ml, 取供体菌的 DNA 50 μl , 分别涂在含有 0.3 mol/L NaCl 的 YMA 培养基平板上, 28℃ 培养。

(四) 代时和耐盐性的测定

按文献 [15] 进行。

(五) 结瘤试验

采用水培法^[14]

(六) 细胞内游离氨基酸含量的测定

方法见 Yap, S. F. 等的论文^[17]

结 果

(一) 供体菌和受体菌的选择

测定供体菌 RT19 和受体菌 USDA 110 的代时、耐盐性和结瘤固氮能力, 表明它们有显著的差别。RT19 为轻度嗜盐细菌, 在不加盐的 YM 培养液生长缓慢, 代时为 15.2h, 但在含有 0.1 和 0.3 mol/L NaCl 的 YM 培养液中则生长迅速, 代时分别为 3.0 和 3.5h, 而且可耐 0.6 mol/L NaCl。USDA110 在 0.1 mol/L NaCl 受到抑制(表 1)。

USDA110 虽然对盐敏感, 但其结瘤和固氮能力都比 RT19 强。RT19 和 USDA110 的主要特征有很大的不同(表 2), 所以它们是 DNA 转化中一对理想的供体和受体菌。

表 1 RT19 和 USDA110 的代时和耐盐性
Table 1 Growth rate and salt tolerance of strain RT19 and USDA110

耐盐性 (mol/L NaCl) Salt tolerance	代 时 Generation time (h)	
	RT19	USDA110
0.0	15.2	9.6
0.1	3.0	—
0.3	3.5	—
0.6	11.0	—
0.8	—	—

(二) 转化子的获得

从 RT19 提取 DNA, 测得其浓度为 104.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 并测得 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 之比为 1.9, 表明所提的 DNA 较纯。

将 RT19 的 DNA (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 转化 USDA110, 然后把转化菌液涂在含有 0.3 mol/L NaCl 的 YMA 培养基平板上, 并将供体菌 DNA 和受体菌分别涂在同样的平板上作对照。3 天后检查, 两组对照皿未出现菌落, 但在每个转化皿上平均出现 2.9 个菌落。而且, 在 USDA110 稀释计数的不含盐 YMA 平板上, 10^{-8} 皿上平均出现 13 个菌落, 表明每毫升 USDA 110 菌液含有 13×10^7 个细菌。所以, 转化频率为 2.15×10^{-5} 。

(三) 转化子的结瘤试验

为了确证转化子的结瘤和固氮能力, 挑选 101 个菌落纯化转管, 并回接到大豆“112-2-4”, 得到两株耐盐、生长快和固氮活性强的转化子 RTt19 和 RTt50, 主根瘤居多, 类似于 USDA110 的结瘤状况。从所结的根瘤中分离这两个菌株, 再回接大豆植株, 其结瘤固氮效能不变, 结果如表 3。

其余的 99 株转化子在回接大豆植株后, 其中 33 株不形成根瘤, 66 株可形成根瘤, 而且主根瘤居多, 但不固氮。

(四) 转化子的代时和耐盐性测定

表 2 RT19 和 USDA110 的主要特征

Table 2 Main characteristics of strain RT19 and USDA110

特征 Characteristics	RT19	USDA110
代时 Generation time (h)	3.5(0.3 mol/L NaCl)	9.6(0.0 mol/L NaCl)
耐盐性 (mol/L NaCl) Salt tolerance	0.6	0.05
固氮酶活性 Specific nitrogenase activity nmol $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot (mg \text{ nodules})^{-1}$	21.4	55.9
显瘤时间 (d) Time of appearance of nodules	10.0	7.0
结瘤状况 Nodulation	主根瘤少 less nodules	主根瘤多 more nodules

表 3 RTt19 和 RTt50 的结瘤试验

Table 3 Nodulation experiments of strain RTt19 and RTt50

菌株 Strain	固氮酶活性 Specific nitrogenase activity nmol $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot (mg \text{ nodules})^{-1}$
RT19	21.3
USDA 110	44.8
RTt19	39.5
RTt50	31.5

表 4 RTt19 和 RTt50 的代时和耐盐性

Table 4 Growth rate and salt tolerance of strain RTt19 and RTt50

耐盐性 (mol/L NaCl) Salt tolerance	代 时 Generation time (h)	
	RTt19	RTt50
0.0	1.3	2.0
0.3	1.5	3.8
0.6	3.2	10.8
0.8	4.5	—

结果如表 4 所示: (1) RTt19 和 RTt50 都是耐盐的快生型菌株; (2) 这两株转化子在不含 NaCl 的 YM 培养液中生长比供体菌 RT19 迅速; (3) RTt50 在 0.3 mol/L NaCl 的生长速率与供体菌类似, 在 0.6 mol/L NaCl 也能生长; (4) RTt19 的生长速率比供体菌快得多, 并可耐 0.8 mol/L NaCl, 比供体菌的耐盐性

高。

将其他 66 株转化子从根瘤重新分离和纯化, 测定其代时和耐盐性, 发现在这些转化子中, 除 1 株 (RTt96) 仍保留耐盐 (0.3 mol/L NaCl) 和快速生长的特性外, 其他菌株在 0.3 mol/L NaCl 条件下都不生长, 而且在不加盐的 YMA 培养基上生长缓慢, 与受体菌 USDA110 相似。

(五) 转化子的稳定性分析

转化子 RTt19 和 RTt50 经过连续在 YMA 斜面转 20 代, 其生长率、耐盐性保持不变。

将转化子 RTt19 和 RTt50 的第 1 代、第 20 代分别回接大豆“112-2-4”, 测定其固氮酶活性、植株干重和全氮量, 并用方差分析结果, 表明第 20 代和第 1 代的固氮效率没有变化。从表 5 看出, RTt19 的植株干重和全氮量与受体菌 USDA110 相似, 但显著高于供体菌 RT19; RTt50 的植株干重和全氮量与 RT19 类似。总固氮酶活性的测定表明, RTt19 和 USDA110 相似, RTt50 次之, 都比 RT19 高。用方差分析, 各菌株间无显著差异。

(六) 细胞内游离氨基酸含量分析

RTt19、RTt50 和 RT19 生长在含有 0.4 mol/L NaCl 的基本培养液中, 细胞内

表5 RTt19 和 RTt50 (第1代,第20代)的结瘤试验

Table 5 Nodulation experiments of strain RTt19 and RTt50 (1st, 20th generation)

菌株 Strain	瘤数 Nodule number	瘤重 (mg) Nodule weight	总固氮酶活性 Total nitrogenase activity ($\text{nmol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1}$)	菌株 Strain	植物干重 (g) Plant top dry weight	5% 显著水 准 5% level of probabi- lity	菌株 Strain	植株全氮 量 (mg) Total nitrogen	5% 显著 水准 5% level of proba- bility
USDA 110	38	616.7	10,300	RTt19 (1代)	1.88	a	RTt19 (1代)	53.69	a
RTt19 (1代)	36	485.0	10,800	USDA 110	1.64	a	USDA 110	51.82	a
RTt19 (20代)	29	366.7	9,250	RTt19 (20代)	1.6	a	RTt19 (20代)	47.18	ab
RTt50 (1代)	29	278.3	5,970	RTt50 (1代)	0.92	b	RTt50 (1代)	21.13	b
RTt50 (20代)	25	261.3	5,620	RT19	0.86	b	RTt50 (20代)	13.85	b
RT19	17	213.3	4,580	RTt50 (20代)	0.83	b	RT19	11.22	b
不接菌对照 Control	0	0	0	不接菌对照 Control	0.79	—	不接菌对照 Control	6.48	—

表6 NaCl 浓度对 RT19、RTt19 和 RTt50 菌株细胞内游离氨基酸组成的影响

Table 6 Effect of sodium chloride on the intracellular free amino acid composition of strain RT19, RTt19 and RTt50

氨基酸 Amino acid	氨基酸浓度 Amino acid concentration ($\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1}$)					
	RT19		RTt19		RTt50	
	0	0.4 mol/L NaCl	0	0.4 mol/L NaCl	0	0.4 mol/L NaCl
天门冬氨酸 Asp	UD	2.14	UD	1.43	0.86	UD
苏氨酸 Thr	UD	8.4	—	—	0.83	5.27
丝氨酸 Ser	0.98	1.72	1.41	UD	1.56	3.09
谷氨酸 Glu	10.67	163.38	2.97	27.73	17.69	86.88
甘氨酸 Gly	4.19	5.86	4.15	3.11	4.57	4.98
丙氨酸 Ala	20.29	23.55	6.15	13.72	18.53	30.04
半胱氨酸 Cys	2.23	5.01	1.92	0.97	1.63	1.52
缬氨酸 Val	3.9	11.02	2.56	11.55	2.55	8.75
甲硫氨酸 Met	—	—	1.48	UD	—	—
亮氨酸 Leu	—	—	1.11	UD	0.67	UD
酪氨酸 Tyr	1.5	3.11	1.23	0.81	1.68	2.37
赖氨酸 Lys	1.65	2.51	5.58	2.06	1.31	2.23
游离氨基酸总含量 Total free amino acid	45.41	226.7	28.56	61.38	51.88	145.13
谷氨酸所占百分比 % as glutamate	23.5	72.1	10.4	45.2	34.1	59.9

UD=Undetectable

的游离氨基酸大量积累, 尤其是谷氨酸特别明显(表 6)。RT19 在无 NaCl 的条件下, 其游离谷氨酸含量为 10.67 nmol/mg 蛋白, 占游离氨基酸总量的 23.5%; 在 0.4 mol/L NaCl 条件下, 游离谷氨酸急剧上升为 163.38 nmol/mg 蛋白, 占总量的 72.1%。RTt19 在无 NaCl 时, 游离谷氨酸的水平为 2.97 nmol/mg 蛋白, 占总量的 10.4%; 在 0.4 mol/L NaCl 浓度下高达 27.73 nmol/mg 蛋白, 占总量的 45.2%。RTt50 在无 NaCl 时, 游离谷氨酸浓度为 17.69 nmol/mg 蛋白, 占总量的 34.1%; 在 0.4 mol/L NaCl 浓度下则为 86.88 nmol/mg 蛋白, 占总量的 59.9%。

在高盐浓度下, 细胞内除了游离谷氨酸水平显著提高外, 丙氨酸和缬氨酸也有所增长。

讨 论

本实验首次将与耐盐有关的性状从 RT19 转移至 USDA110, 得到既耐盐、生长快、共生效能高的转化子 RTt19 和 RTt50。在这两个转化子中, RTt19 获得了优良的性状, 生长速率比供体菌 RT19 快得多, 耐盐性也比 RT19 高。其第 1 代和第 20 代植株干重和全氮量的方差分析指出, RTt19 和 USDA110 处于相似的水平, 具有较高的固氮效率。因此, RTt19 是一株具有应用前景的耐盐高效大豆根瘤菌, 有待进一步作田间试验。

有趣的是, DNA 转化可以产生一批结瘤而不固氮的转化子。这些转化子除一株具有耐盐和生长快的特性外, 其他 65 株都不耐盐和生长缓慢, 说明 DNA 转化也是引起大豆根瘤菌变异的一种有效方法。

据报道, DNA 转化可在大豆根瘤菌和维涅兰德固氮菌之间进行^[13]。从当前根瘤菌的分类体系来看^[19,20], 本实验使用的

供体菌 (*Rhizobium fredii* RT19) 和受体菌 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110) 之间的转化是属间转化。

耐盐的根瘤菌在一定浓度的 NaCl 条件下, 细胞内积累大量的谷氨酸, 以补偿体外所造成的盐压^[27]。测定转化子 RTt19 和 RTt50 在 0.4 mol/L NaCl 条件下细胞内氨基酸含量的变化, 发现其游离谷氨酸含量急剧提高, 证明转化子已获得供体菌的耐盐性状, 也说明根瘤菌的耐盐性与谷氨酸含量的增加有密切关系, 是一个渗透调节的现象。

耐盐高效大豆根瘤菌的构建证明, DNA 转化是改造大豆根瘤菌的一种有效手段。转化子具有生长速度快、抗逆性强和结瘤固氮能力高的特点, 这将有利于菌剂的工业化生产, 有利于它在盐碱地的生存和结瘤竞争性, 以及大豆共生体系的建立。

参 考 文 献

- [1] Keyser, H. H. et al.: *Science*, 215: 1631—1632, 1982.
- [2] 徐玲玫等: 土壤肥料, 2: 7—8, 1983.
- [3] Dowdle, S. F. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(5), 1171—1176, 1985.
- [4] 王书锦等: 微生物学杂志, 7(2)增刊: 18—26, 1987.
- [5] 徐玲玫等: 大豆科学, 3(2): 101—109, 1984.
- [6] Yelton, M. M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 129: 1537—1547, 1983.
- [7] Steinborn, J. et al.: *J. Appl. Bact.*, 37: 93—99, 1974.
- [8] Balassa, R.: *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 2: 51—78, 1954.
- [9] Balassa, G.: *Bacteriol. Rev.*, 27: 228—241, 1963.
- [10] Zelazna, I.: *Acta Microbiol. Polon.*, 13: 283—289, 1964.
- [11] Zelazna-Kowalska et al.: *Acta Microbiol. Polon.*, III(XX) (1—2): 21—28, 1971.
- [12] Raina, J. L. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 65: 161—165, 1971.
- [13] 上海植物生理研究所固氮室译: 根瘤菌实用研究手册, 上海人民出版社, P. 3, 1973.

- [14] 周平贞等: 中国油料, 2: 60—62, 1979。
- [15] 杨苏声等: 北京农业大学学报, 14(2): 143—148, 1988。
- [16] Saito, H. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 72: 619—629, 1963.
- [17] Yap, S. F. et al.: *Arch. Microbiol.*, 135: 224—228, 1983.
- [18] Maier, R. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 134(3): 1199—1201, 1978.
- [19] Krieg, N. R. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1: 235—244, 1984.
- [20] Scholla, M. H. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34(4): 484—486, 1984.

THE CONSTRUCTION OF SALT-TOLERANT HIGH EFFECTIVE STRAINS OF SOYBEAN RHIZOBIA

Yang Susheng Li Jilun

(Division of Microbiology, Beijing Agricultural University, Beijing)

Fast-growing soybean rhizobium RT19 is a salt-tolerant but less efficient nitrogen fixing strain. It has a doubling time of 3.5 h in YM liquid medium with 0.3 mol/L NaCl and even grows in concentrations of up to 0.6 mol/L NaCl, while slow-growing soybean rhizobium USDA110 is severely inhibited in medium containing 0.1 mol/L NaCl, but nodulates and fixes nitrogen effectively.

Two transformants, RTt19 and RTt50, which are salt-tolerant, fast-growing and more efficient nitrogen fixing, were obtained by transforming the DNA from strain RT19 into the cells of strain USDA110 and selected on YMA medium with 0.3 mol/L NaCl as selec-

tive marker.

Intracellular free glutamate was found to increase rapidly in strain RT19 and transformant RTt19 as well as RTt50 grown on medium containing 0.4 mol/L NaCl. Alanine and valine were found to be increased at lower level.

The characteristics of transformants RTt19 and RTt50 are maintained even after 20th transfer of the cultures.

Key words

DNA transformation; Salt tolerance; Soybean rhizobia