

应用发光酶基因对快生型大豆根瘤菌 HN01 结瘤作用进行检测*

莫才清 覃雅丽** 周俊初 李阜棣

(华中农业大学微生物系 武汉 430070)

摘 要 含发光酶基因 *luxAB* 的 Tn5 转座子自杀质粒 pHNC3, 在辅助质粒 pRK2013 的帮助下, 转入快生型大豆根瘤菌 HN01 中, pHNC3 经自杀重组, 其 Tn5-*luxAB* 转座插入 HN01 基因组中, 从而赋予 HN01 以发光活性。挑取具有发光活性的 HN01 杂交单菌落, 进行质粒快检和以 *luxAB* 为探针的分子杂交, 选取 Tn5-*luxAB* 分别插入到 HN01 染色体上和不同质粒上的标记菌株, 进行灭菌盆栽实验, 并对一株 Tn5-*luxAB* 标记于染色体上的菌株 HN01LC02 进行了模拟大豆栽培条件下的有菌盆栽实验, 包括对发光根瘤菌占瘤率的测定和发光根瘤在根系上分布情况的测定。

关键词 发光酶基因, 大豆根瘤菌, 检测

分类号 Q93-31

大豆是世界范围内种植最广泛的豆科植物, 也是农业生产中的主要农作物之一, 为全世界提供了 60% 以上的蛋白粉来源和 40% 以上的油料来源^[1]。由于豆科植物与根瘤菌之间存在共生固氮作用, 使得大豆根瘤菌的研究成为根瘤菌方面研究的重点。随着分子生物学技术的发展和根瘤菌遗传学认识的深入, 一些通过群体遗传学研究手段筛选或经遗传改造的大豆根瘤菌将作为接种剂施入土壤^[2]。为了对接种到土壤中的大豆根瘤菌进行检测, 并对接种效果进行直观的评价, 国外已有许多标记技术^[3]。作者采用来自哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 的 *luxAB* 基因^[4]作外源标记基因, 首先对其进行了有针对性的改造, 以利于对根瘤菌的质粒和染色体分别进行定向标记和筛选^[5], 然后对几株发光酶基因分别标记到快生型大豆根瘤菌 HN01^[6]不同质粒上和染色体上的菌株进行了盆栽结瘤实验, 以考查发光酶基因标记对原始菌株 HN01 共生功能的影响, 然后对一发光酶基因标记位于染色体上, 且发光活性较强的菌株 HN01LC02 进行了模拟栽培条件下的检测。

1 材料和方法

1.1 细菌、质粒和培养基

快生型大豆根瘤菌 HN01 由本室陈雯莉分离自洪湖土壤^[6], 质粒 pHNC3 由作者改造而成^[5], 质粒 pRK2013 (含 *tra* 基因) 由华中农业大学生物固氮室提供。有关菌株的培养及

* 国家高技术863资助课题和国家自然科学基金资助项目。

** 本校九二级微生物系学生。

收稿日期: 1996-11-13

抗生素使用浓度均参见文献 [5]。

1.2 三亲本杂交

质粒 pHNC3 在辅助质粒 pRK2013 的帮助下,转入快生型大豆根瘤菌 HN01,实验过程按文献 [5] 进行。

1.3 根瘤菌质粒的电泳分离、Southern 转移及分子杂交

包括原始根瘤菌 HN01 及所获得的一系列发光酶基因标记的 HN01 衍生菌株,其质粒快速检测方法均按 Eckhardt 的方法作适当修改后进行^[7]。凝胶中质粒 DNA 的 Southern 转移采用 Bio-Rad 公司生产的真空转移仪进行,发光酶基因 *luxAB* 探针采用从 Promega 公司购置的随机引物标记试剂盒进行,分子杂交参考萨姆布鲁克^[8]的方法于 68℃ 进行。

1.4 植物盆栽实验

豆科植物盆栽实验包括采用无菌砂钵进行盆栽实验^[9]和模拟田间栽培条件下的有菌盆栽试验。模拟田间栽培条件下的有菌盆栽采用长、宽、深依次为 60 × 40 × 18 cm 的塑料食品盒进行,内装满从田间采集的土壤。选取籽粒饱满的豆种进行直播,并分别设不接种对照、液体菌剂接种、种衣剂接种及草炭菌剂接种等根瘤菌接种方式。按田间栽培方式管理,当大雨来临时,将盆栽盒移至避雨棚内,久晴无雨时每晚浇水 800 ml,约相当于降水 3.3 mm。至开花期和初荚期收获植物,根据根瘤的发光活性,确定接种根瘤菌形成根瘤的位置分布并进行占瘤率测定。

1.5 发光根瘤在根系上的原位观察和记录

无菌砂钵实验所获根瘤的发光活性,按文献 [5] 进行检测,大豆根系上发光根瘤的原位观察和记录方法如下:采收有菌土壤栽培的大豆植物根系,轻轻洗掉根系所附泥土,在一方形塑料板上展开根系,并小心切开根瘤,使每个根瘤的一半仍然留在根系上,用保鲜膜包好,并保持展开状态,用注射器向根系注入萘醛,在暗室观察并用 X 光片压片进行原位记录。

1.6 发光根瘤菌在有菌盆栽实验中占瘤率的测定

占瘤率的测定可以采用如下方法:采集根系上所有根瘤,然后洗净,用刀片将根瘤切成两半,取一半放在培养皿中,顺序摆放,滴入萘醛,在暗室观察记数发光根瘤数目,与总根瘤数相比,即可知道发光根瘤菌在大豆根系上的占瘤率。

2 结果和分析

2.1 标记菌株的质粒电泳图谱及标记基因定位

采用文献 [5] 的筛选方法,从 1250 个发光根瘤菌菌落中,共筛得 61 个能在 YMA + 8% 蔗糖平板上生长的根瘤菌菌落,对其 61 个原始菌落进行质粒快检,经两次 *luxAB* 探针分子杂交,证实 61 个菌落中,有 9 个菌落的发光酶基因插入到了 HN01 的第一大质粒上 (490MD),有 4 个菌落的发光酶基因插入到 HN01 的第二大质粒即共生质粒上 (275MD),有 1 个菌落的发光酶基因插入到 HN01 第三大质粒上 (201MD),分别将其编号为 HN01LP11 至 HN01LP19, HN01LP21 至 HN01LP24 和 HN01LP31 菌株,其余 47 个菌落的发光酶基因标记位于染色体上,从 *luxAB* 基因标记在染色体上的菌落中,挑取 5 个发光强的菌落,分别编号 HN01LC01 至 HN01LC05 菌株,图 1 为发光酶基因标记的发光根瘤菌菌

落的质粒电泳图及其发光酶基因的定位情况。有关标记菌的其他特征,如标记基因及其邻近基因的消除、缺失等特征将另文发表。

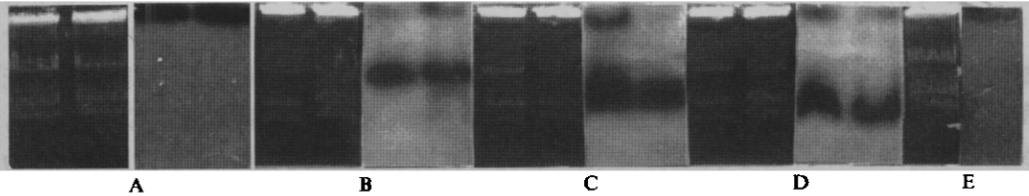


图 1 发光根瘤菌质粒带形及其 luxAB 基因定位

Fig.1 Plasmid profile of luminescent rhizobia and their luxAB location

A. luxAB 基因定位在菌株 HN01LC01~05 染色体上; B. luxAB 基因定位在菌株 HN01LP11~19 的 490MD 大质粒上; C. luxAB 基因定位在菌株 HN01LP21~24 的 275MD 质粒上; D. luxAB 基因定位在菌株 HN01LP31 的 201MD 质粒上; E. HN01.

A. luxAB on the chromosome (HN01LC01~HN01LC05); B. luxAB on the 490MD plasmid (HN01LP11~HN01LP19); C. luxAB on the 275MD plasmid (HN01LP21~HN01LP24); D. luxAB on the 201MD plasmid (HN01LP31); E. HN01.

2.2 部分发光酶基因标记菌株的共生固氮效应

采用双层砂钵的方法对所获得的部分标记菌株进行了灭菌盆栽试验,所用大豆品种为黑农 39,植物无氮营养液参照 Fahraeus 配方进行。盆栽在大豆栽培的适宜生育期 4 月 17 日~6 月 20 日分两次同时进行,经过对盆栽结果进行统计分析,表明本研究所获得的

表1 植物盆栽试验数据分析

Table 1 Statistics analysis of plant pot experiment

菌株 Strain	根瘤数 Nodule numbers	根瘤重 Nodule weight (g/plant)	固氮酶活 Nitrogen fixation activity ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	地上部鲜重 Shoot weight (g/plant)
HN01	64.4 a	0.634 a	13.24 a	4.552 a
HN01LC02	63.0 a	0.626 a	12.48 a	4.862 a
HN01LC04	60.6 a	0.672 a	11.66 a	5.424 a
HN01LP12	54.4 a	0.630 a	11.06 a	5.044 a
HN01LP14	53.8 a	0.540 a	12.16 a	4.312 a
HN01LP16	63.6 a	0.648 a	12.26 a	5.090 a
HN01LP22	64.4 a	0.644 a	10.60 a	5.072 a
HN01LP23	53.0 a	0.572 a	11.28 a	5.000 a
HN01LP24	58.0 a	0.602 a	10.88 a	4.438 a
HN01LP31	72.2 a	0.632 a	10.54 a	4.720 a
CK				3.236 b
F	0.42	0.4119	0.4381	2.30
F _{0.05}	2.12	2.12	2.12	2.05

注:表中所列数据均为各处理5次重复的平均值;字母相同表示差异不显著,不同表示差异显著(P<0.05);当F<F_{0.05}时,表明各处理不存在显著差异,当F>F_{0.05}时,表明处理间存在差异。

发光酶基因标记大豆根瘤菌,其共生固氮功能没有受到明显影响,对盆栽实验进行的统计分析结果见表 1。

2.3 应用根瘤的发光活性对接种根瘤菌进行检测

对接种根瘤菌进行检测,本研究从两方面开展了工作。

2.3.1 砂培条件下根瘤发光活性 X 光片记录:接种采用发光酶基因标记的根瘤菌进行无菌盆栽实验。采集大豆根系上的所有根瘤,进行根瘤表面灭菌,然后用解剖刀切开根瘤,倒扣于培养皿底部,观察发光活性;根瘤的发光活性以 X 光片曝光加以记录。图 2 所示为

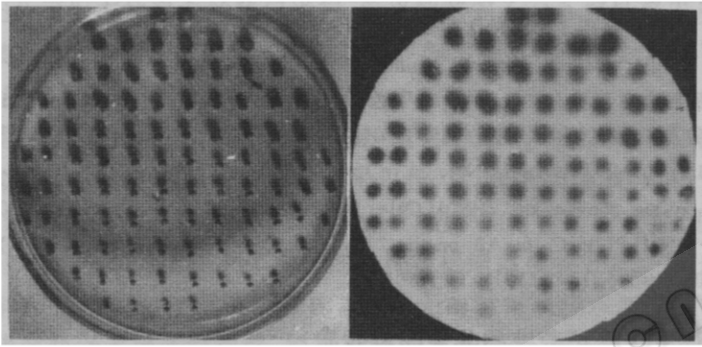


图2 根瘤及其发光活性的X光片记录

Fig. 2 Nodules and their luminescence activity (X-ray film recorded)

一株大豆根系上的 46 个根瘤从大到小依次切成两半后,放入培养皿,在暗室内用 X 光片记录的结果。所有检测的根瘤均具有发光活性并能用 X 光片进行记录,显示借用根瘤的发光活性检测根瘤菌结瘤作用是准确可靠的。

2.3.2 自然土壤栽培条件下根瘤原位 X 光片跟踪:图 3 是应用根瘤的发光活性,对接种根瘤菌结瘤部位等情况进行的原位压制 X 光片的结果。由于根系的立体状态和根瘤的正反面方向,使得在 X 光片上只能记录下正面离 X 光片较近根瘤的发光活性。

虽然如此,应用发光酶基因标记仍然可以对根瘤菌接种效果进行跟踪分析,作者采用

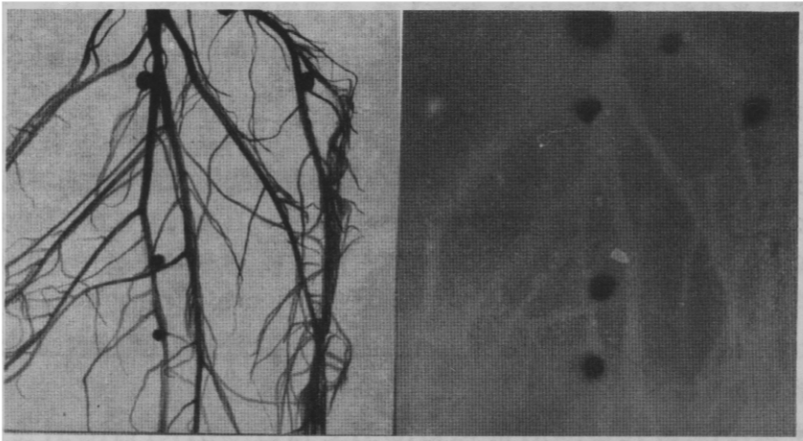


图3 发光根瘤在一株大豆根系上的位置

Fig. 3 Luminescent nodules and their location on a soybean root system

对根系进行垂直划线分区的办法,分别就主根和侧根的根瘤进行采集,观察根瘤的发光活性,然后建立了一套记录根瘤菌接种效果的“矩阵式”记录方法,可用于计算机进行多元统计分析。

2.4 发光根瘤菌在模拟大豆栽培条件下的占瘤率测定

表 2 测定了不同接种技术下发光根瘤菌在大豆黑农 39 根系上的占瘤率情况,所采用

表2 不同接种技术下发光根瘤菌HN01LC02在黑农39根系上的占瘤率(棕壤)

Table 2 The nodule occupancy of HN01LC02 on soybean Heinong 39 root system by different inoculation methods (brown soil)

接种技术	总根瘤数	发光根瘤数	占瘤率(%)
Inoculate methods	Total nodules	Luminescent nodules	Nodulation occupancy
液体拌种	47.20±6.05	37.20±4.62	78.94±5.29
Liquid seed-dressing			
种衣剂	37.40±9.18	28.20±8.23	75.84±12.11
Seed coat imoculate			
草炭接种	39.00±11.26	33.00±11.15	83.55±7.47
Rotten mosses inoculate			

注:表中数据为5株豆科植物根系所得结果的平均值

的土壤为棕壤土。结果表明不同接种技术对结瘤部位和占瘤率存在影响,详细分析结果待另文发表。

3 讨论

虽然现已报道的有关根瘤菌标记技术多达十余种^[3],但真正在研究中应用较多的也仅限于 *gusA* 基因^[10]和*luxAB*^[11]。*gusA* 基因对研究根瘤较小的豆科植物根系或早期的大豆、菜豆根瘤时,效果较好,能明显地指示出接种根瘤菌所形成根瘤在根系上的分布情况,但对于根瘤较大的豆科植物特别是处于生长后期的大豆植物,由于根瘤的皮层较厚,底物不易渗入根瘤内部含菌区,再加上豆血红蛋白阻止氧气向含菌区的渗透,使 *gusA* 对底物的裂解产物不能完全被氧化成蓝色物质,因此所产生的蓝色物质较少,且蓝色变化也不容易观察到,需将根瘤切开进行染色观察^[12]。

由于大豆植物的根瘤较大,生长后期的根瘤更是如此,所以应用 *gusA* 基因标记大豆根瘤菌进行标记跟踪,无疑会被上述问题所困扰,况且β-葡萄糖苷的价格昂贵。而应用发光酶基因 *luxAB* 标记根瘤菌,测定每株根系上所形成的根瘤,可以在费用很少的情况下进行大量的田间采样和分析。

经过对发光酶基因标记的大豆根瘤菌进行灭菌盆栽实验和模拟田间栽培条件下的土壤盆栽实验,证明了应用发光酶基因标记大豆根瘤菌,研究其在大豆根系上形成根瘤的分布情况,进行占瘤率测定等是可行的,而且在记录时非常方便、有效,能直观地将结果显示出来。

参 考 文 献

- [1] 王连铮, 王金陵主编. 大豆遗传育种学, 北京: 科学出版社, 1992.
- [2] Shantharam S. Field testing of genetically engineered rhizobia. In: R Palacios ed. *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. 695~701.
- [3] Wilson K J. *Soil Biol Biochem*, 1995, 27: 501~514.
- [4] Boivin R, Chalifour F P, Dion P. *MGG*, 1988, 213: 50~55.
- [5] 莫才清, 周俊初, 李阜棣. 应用与环境生物学报, 1997, 3(3): 252~257.
- [6] Chen W L, Li F D. *Chinese Biodiversity*, 1995, 3: 36~42.
- [7] 莫才清, 李阜棣, 周俊初. 生物技术, 1996, 6(2): 42~43.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 莫才清, 张忠明, 沈 辉, 等. 华中农业大学学报, 1992, 11(4): 364~368.
- [10] Wilson K J. *Microbiology*, 1995, 141: 1691~1705.
- [11] Prosser J I. *Microbiology*, 1994, 140: 5~17.
- [12] Streit W, Botero L, Werner D *et al.* *Soil Biol Biochem*, 1995, 28(8): 1075~1081.

***luxAB* GENES AS MARKER FOR DETECTING *RHIZOBIUM FREDII* HN01 NODULATION FUNCTIONS**

Mo Caiqing Qin Yali Zhou Junchu Li Fudi

(Microbiology Department, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract A suicide plasmid pHNC3 which contains Tn5-*luxAB* was transferred into *Rhizobium fredii* HN01 by the help of pRK2013. Then Tn5-*luxAB* inserted on the genome of HN01 and gave luminescence activity. The luminescence colonies were picked up and the Eckhardt gel was performed for plasmids profile detection. The location of Tn5-*luxAB* on the genome was determined using the *luxAB* as probe. The colonies which were marked by Tn5-*luxAB* on the chromosome and different plasmids of HN01 were choosed for pot experiment, and a chromosome labelled strain HN01LC02 was detected by soil pot experiment. The detections included the nodulation occupancy and the luminescent nodules distribution on the root system formed by the *luxAB*-marked rhizobia.

Key words *luxAB* genes, *Rhizobium fredii*, Detection