

Tn5-Mob系统诱导根瘤菌属之间耐盐 和共生性状的转移

杨苏声 吴拙如 高为民 李季伦

(北京农业大学微生物专业, 北京 100084)

本实验通过质粒pSUP5011及其辅助质粒RP4将Tn5-Mob随机插入苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti* 042B)的基因组中,得到86株接合子SR。随机选取4株SR,通过辅助质粒R68.45的三亲本杂交,将它们的DNA片段引入慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110),获得106株接合子BSR。大部分BSR菌株获得了生长快速的特性和耐盐性,一般能耐0.3—0.5mol/L NaCl,其中有些菌株能产生黑色素。将90株BSR回接大豆和苜蓿植株,发现47株能在大豆和苜蓿植株结瘤,但在苜蓿上无固氮活性;26株只能在大豆植株结瘤固氮;13株只能在苜蓿植株结瘤而不固氮;4株在大豆和苜蓿植株均不结瘤。其中,获得了4株耐盐性和固氮酶活性强的接合子。

关键词 苜蓿根瘤菌;慢生型大豆根瘤菌;Tn5-Mob系统;耐盐;共生

由于根瘤菌遗传学的研究起步较晚,对其遗传背景尚未有充分的了解,所以对根瘤菌进行遗传改造的方法很有限^[1-5]。1989年我们将快生型大豆根瘤菌的DNA转化慢生型大豆根瘤菌,构建成耐盐高效的大豆根瘤菌^[6],而且将苜蓿根瘤菌的DNA转化红豆草根瘤菌也获得成功。在七十年代发现了P类质粒,为大肠杆菌以外的遗传学研究带来了新的工具和手段。1976年Holloway筛选到P-1类质粒RP4的一个接合转移能力较强的衍生质粒R68.45^[7]。1984年Simon将含有质粒RP4OriT片段的Mob基因插入Tn5中,再将Tn5-Mob克隆到pBR325中,构建了质粒pSUP5011^[8]。这个Tn5-Mob系统通过Tn5的随机转座,可使插入位点获得OriT片段,成为DNA转移的起点。但是,具有该片段的染色体并不能自主转移。如果引入RP4或R68.45,就可使插入Tn5-Mob的DNA片段具有自主转移的能力,从而构建了有效的染色体DNA诱导

转移系统。据报道,Tn5-Mob系统已用于构建豌豆根瘤菌的基因文库^[9]。

本实验拟利用Tn5-Mob及其辅助质粒构成的系统诱导苜蓿根瘤菌042B与慢生型大豆根瘤菌USDA110之间的接合,克服其亲缘关系疏远的障碍,完成有关耐盐和共生性状的转移,以提高大豆根瘤菌的耐盐性和共生效率。

材料和方 法

(一) 菌株和质粒

菌株和质粒列于表1。

表1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Rhizobium meliloti</i> 042B	Growth on YMA with 0.7 mol/L NaCl	This laboratory

本文于1992年8月8日收到。

续表 1

<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	No growth on YMA with 0.1 mol/L NaCl Gm ^r	Valentine
<i>E. coli</i> S17-1 pSUP5011	Chromosomally integrated RP4 derivative pro-Km ^r Nm ^r Cm ^r Ap ^r pBR326:: Tn5-Mob	Simon ^[8]
<i>E. coli</i> PJ183 R68.45	Pro-Km ^r Tc ^r	Holloway ^[7]

(二) 培养基

1. YMA培养基^[10]。

2. TY培养基^[8]。

3. FY培养基的成分如下(g/L): MgSO₄·7H₂O 0.1, CaCl₂·6H₂O 0.22, K₂HPO₄ 0.22, FeCl₃ 0.02, KNO₃ 1, 甘露醇 10, 生物素 0.75 mg, 硫胺素 0.75mg, 泛酸 0.75 mg, 琼脂粉 15。pH调至7.2。

4. LB培养基^[11]。

5. 水培营养液^[12]。

(三) 菌株的接合转移

1. S₁₇₋₁与042B的接合: 通过滤膜上接合转移的方法^[13], 将含有Tn5-Mob的质粒pSUP5011从供体菌S₁₇₋₁转移到042B受体菌中, 用含有170μg/ml Km的FY基本培养基作为选择性平板, 所获得的接合子称为SR。

2. SR、PJ183和USDA110的三亲本杂交: 随机挑取4株SR(SR₁、SR₂、SR₃和SR₄), 分别进行试验。通过三亲本杂交^[14], 在滤膜上进行接合转移。SR的DNA片段在PJ183所含的辅助质粒R68.45的协助下, 引入USDA110, 以含有40μg/ml Gm和120μg/ml Km的FY基本培养基作为选择性平板, 所获得的接合子称为BSR。

(四) 结瘤试验

大豆的结瘤试验采用水培法^[12], 首

梢的结瘤试验采用培养管法^[10], 该培养基成分同水培法。固氮酶活性测定采用乙炔还原法。

结 果

(一) 供体菌和受体菌的比较

供体菌042B和受体菌USDA110的代时和耐盐性有很大的差别。042B是生长快、耐盐性强的细菌, 而USDA110生长慢、对盐敏感。但是, 这两个菌株都有一个共同的特点, 其结瘤固氮能力都很强(表2)。

表 2 042B和USDA110的主要特征

Table 2 Main characteristics of strain 042B and USDA110

Characteristics	Strains	
	042B	USDA110
Generation time(h)	2.5	9.6
Salt tolerance	0.7	<0.1
Specific nitrogenase activity nmol·C ₂ H ₄ h ⁻¹ (mg nodules) ⁻¹	47.78	40.54
Time of appearance of nodules(d)	10.0	7.0

(二) SR菌株的构建

S₁₇₋₁和042B接合后, 放在28℃培养, 5天后在选择性平板上出现菌落。由于供体菌S₁₇₋₁是脯氨酸缺陷型, 受体菌042B不能耐受170μg/ml Km, 所以在含有170μg/ml Km的FY基本培养基上生长出来的菌落为接合子SR。SR的出现频率为10⁻⁵/每个受体细胞, 这与Simon的结果类似^[8]。挑取86个SR单菌落。

(三) BSR菌株的构建

三亲本杂交后, 放在28℃培养, 7天后在选择性平板上出现菌落。由于40μg/ml Gm可以抑制供体菌SR的生长, 120

$\mu\text{g/ml}$ Km可以抑制受体菌 USDA110 的生长, 而且PJ183 是脯氨酸缺陷型, 所以在含有上述浓度抗生素的FY基本培养基上长出来的菌落为接合子BSR。挑取106个BSR单菌落, 其中绝大多数是快生型菌株, 菌落出现的时间为3天, 少数是慢生型菌株, 菌落出现的时间为6天。BSR的出现频率为 10^{-6} /每个受体细胞。

(四) 耐盐性试验

将28株BSR分别点种在含有0.1、0.3、0.5和0.6mol/L NaCl的YMA平板上进行耐盐性试验。结果表明, 能在0.3—0.5mol/L NaCl条件下生长的BSR有24株, 占86%, 而不能在0.1mol/L NaCl条件下生长的有4株, 占14%, 结果说明大部分接合子获得了耐盐性。但在0.6mol/L NaCl浓度下, BSR不能生长。

(五) 黑色素的产生

实验观察到少数BSR菌株在含盐的YMA和TY培养基上, 培养3—4天后, 其菌落会分泌扩散性的棕黑色色素, 这种现象与培养基中高浓度的NaCl存在有关, 含盐则黑色素分泌多。

(六) 结瘤试验

为了确定接合子BSR的结瘤和固氮能力, 挑选90个菌落纯化转管, 并回接到大豆“112-2-4”和“保定”苜蓿, 发现47株能在大豆和苜蓿植株结瘤, 但在苜蓿无固氮活性, 占供试菌株52%; 26株只能在大豆植株结瘤固氮, 占29%; 13株只能在苜蓿植株结瘤而不固氮, 占14%; 4株在大豆和苜蓿植株均不结瘤, 占4%。

在这些接合子中, 有4株的固氮酶活性接近或超过受体菌USDA110, 其中3株耐盐、生长快, 但结瘤晚。另一株的性状则与USDA110相似(表3)。对于这些

表3 部分BSR菌株的大豆结瘤试验

Table 3 Soybean nodulation experiments of some BSR strains

Strains	Specific nitrogenase activity $\text{nmol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} (\text{mg nodules})^{-1}$	Time of appearance of nodules(d)	Salt tolerance (mol/L NaCl)	Growth rate
USDA110	40.54	8	<0.1	Slow
BSR4-10	44.16	8	<0.1	Slow
BSR4-10'	45.67	19	0.5	Fast
BSR4-15'	47.0	22	0.5	Fast
BSR1-3'	43.41	20	0.5	Fast

注: 设空白对照和SR菌株对照, 均未结瘤。

菌株, 有待进一步做盆栽和田间试验。

讨 论

苜蓿根瘤菌和慢生型大豆根瘤菌的亲缘关系疏远, 是两个不同属的菌种。本实验的成功表明, Tn5-Mob系统是克服细菌之间亲缘关系障碍、进行遗传操作的有效工具。

在三亲本杂交后不以NaCl为选择标记, 而以抗生素和营养缺陷作为选择标

记, 同时获得了耐盐和对盐敏感的接合子。其中, 耐盐菌株占绝大多数, 生长快, 盐敏感菌株很少, 生长慢。这个现象表明, 苜蓿根瘤菌的调渗基因可能和与生长因子有关的基因连锁在一起。在快生型大豆根瘤菌的DNA转化实验中也观察到类似的现象^[6]。

在结瘤固氮方面, 发现52%的接合子除了在大豆植株结瘤固氮外, 而且能在苜蓿植株结瘤, 但不固氮, 表明苜蓿根瘤菌的寄主专一性基因已被引入受体菌。虽然

少数接合子的固氮酶活性接近和超过受体菌,但其结瘤时间大都往后推延,原因待查。

由于Tn5-Mob系统诱导的DNA片段在受体菌的染色体上是随机插入的,所以产生多种变异现象。有趣的是,少数接合子在含有NaCl的YMA和TY培养基平板上分泌黑色素,无盐时不分泌。这个性状

在供体菌和受体菌都未曾发现,原因有待进一步研究。

Tn5-Mob系统不但能克服细菌之间的亲缘关系疏远的障碍,而且受体菌所接受的DNA片段可能比转化的DNA长,所以在本实验中可以看到多种性状的获得和变异,说明根瘤菌通过接合方式进行DNA重组比DNA转化更有优势。

参 考 文 献

- [1] Balassa, R., *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 2:51—78, 1954.
- [2] Balassa, G., *Bacteriol. Rev.*, 27:228—241, 1963.
- [3] Zelazna, I., *Acta Microbiol. Polon.*, 13:283—289, 1964.
- [4] Zelazna-Kowalska et al., *Acta Microbiol. Polon.*, 18(XX)(1—2), 21—28, 1971.
- [5] Raina, J. L. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 65:161—165, 1971.
- [6] 杨苏声、李季伦, *微生物学报*, 29(2):107—112, 1989.
- [7] Haas, D. and Holloway, B. W., *Mol. Gen. Genet.*, 144:243—251, 1976.
- [8] Simon, R., *Mol. Gen. Genet.*, 196:413—420, 1984.
- [9] Ivashina, T. V. and Zlotrikov, K. M., *Genetika*, 25(11):1960—1967, 1989.
- [10] 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.
- [11] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
- [12] 周平贞等, *中国油料*, 2:80—82, 1979.
- [13] Cen, Y. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:233—236, 1982.
- [14] Ditta, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:7347—7351, 1980.

Tn5-Mob Transposon Mediated Transfer of Salt Tolerance and Symbiotic Characteristics Between *Rhizobia* Genera

Yang Susheng Wu Zhuoru Gao Weimin Li Jilun

(Department of Microbiology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Rhizobium meliloti 042B is a fast-growing, salt tolerant and high efficient nitrogen fixing symbiont with alfalfa.

Bradyrhizobium japonicum USDA110 grows slowly, and cannot grow in YMA medium containing 0.1mol/L NaCl, but nodulates and fixes nitrogen efficiently with soybean.

86 transconjugants, called SR, were obtained by inserting Tn5-Mob randomly into genomes of 042B using pSUP5011 and helper plasmid RP4. Selecting 4 SR strains randomly, and introducing DNA fragment of SR

into USDA110 with helper plasmid R68.45 by triparental mating, 106 transconjugants, called BSR, were constructed.

Most of BSR strains had the fast-growing phenotype and could tolerate 0.3—0.5 mol/L NaCl generally. Some of them produced melanine.

When inoculated to soybean and alfalfa, 47 out of 90 BSR were found to nodulate in both of these plants, but no nitrogenase activity was observed with alfalfa; 26 strains could only nodulate and fix nitrogen in soybean; 13 strains could nodulate in alfalfa but not fix nitrogen; 4 strains failed to nodulate in either soybean or alfalfa. Among them, 4 transconjugants which tolerated high salt and fixed nitrogen more efficiently in soybean were constructed.

Key words *Rhizobium meliloti*; *Bradyrhizobium japonicum*; Tn5-Mob transposon; salt tolerance; symbiosis