

消除共生质粒的费氏中华根瘤菌 HND29SR 在大豆根圈的定殖动态

李友国, 周俊初*

(农业部农业微生物重点实验室, 华中农业大学, 武汉 430070)

摘要:比较研究了费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*) HN01(出发菌)、发光酶基因标记菌 HN01L(参照菌)、消除 HN01 共生质粒的菌株 HND29SR 在无菌砂培条件下的大豆根圈定殖动态。供试菌单独接种时, HN01、HN01L 和 HND29SR 的定殖动态基本一致, 其早期定殖密度下降较快, 播种后第 16 天时 HN01 和 HN01L 分别达到较高的定殖水平 $6.49\log\text{cfu/g}$ 鲜根和 $6.78\log\text{cfu/g}$ 鲜根, 然后维持相对稳定的定殖水平。但 HND29SR 的定殖密度持续下降到播种后第 16 天才开始上升, 至第 35 天时仍维持相对稳定的定殖密度 $6.94\log\text{cfu/g}$ 鲜根。等量混合接种时供试菌在根圈定殖群体中各自定殖密度在测定过程中基本相等。结果表明消除 HN01 的共生质粒对其在大豆根圈中定殖能力无显著影响。

关键词:费氏中华根瘤菌; 共生质粒消除菌株; 大豆根圈; 定殖; 发光酶基因

Root Colonization of *Sinorhizobium fredii* pSym-Cured Strain HN01 in Rhizosphere of *Glycine max*

LI You-Guo, ZHOU Jun-Chu* (Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(9): 1420~1424.

Abstract: Root colonization is a first step during the development of symbiosis between rhizobium and legume plant. It was reported that rhizobium colonization on roots was determined by its ability of chemotaxis and mobility. The relationship between indigenous plasmid and root colonization was reported by using *luxAB* gene marked strains and modified Leonard jar apparatus. The root colonization dynamics of *Sinorhizobium fredii* HN01, HN01L marked with *luxAB* and HND29SR (pSym-cured HN01) in rhizosphere of *Glycine max* in sterilized pot-sand microcosm was studied. The results showed that the root colonization dynamics of HN01, HN01L and HND29SR was basically identical and their colonization density decreased rapidly first 12 days stage during a single-inoculation experiment. The root colonization density of HN01 and HN01L increased gradual up to $6.49\log\text{cfu/g}$ root and $6.78\log\text{cfu/g}$ root respectively on the 16th day after inoculation, and reduced again to keep a relative stable level. But the root colonization density of HND29SR decreased constantly at first 16 days and then began to rise up to a relative stable colonization density of $6.94\log\text{cfu/g}$ root until the 35th day. Furthermore, the root colonization dynamics of double inoculation of HN01 tested in soybean rhizosphere shown no significant differences. The result demonstrated that the introduce of mark gene *luxAB* did not influence colonization ability of HN01 so that marked strain HN01L could be used as referential strain for further studies. The root colonization dynamics of double inoculation of HN01L and HND29SR was also no significant differences. The results indicted that the pSym deletion of HN01 did not affect its root colonization ability

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2001AA214021); 欧盟 RTD 合作计划资助项目(ICA4-2000-10137)

收稿日期: 2001-07-29; 修订日期: 2002-03-05

* 通讯作者 Author for correspondence, zjc42926@public.wh.hb.cn

作者简介: 李友国, 男, 博士, 副教授。主要从事固氮遗传学和分子生态学研究。Liyouguo 2001@yahoo.com.cn

in soybean rhizosphere. The results of nodule occupancy detected by using X-ray film exposed by luminous nodules proved that the competitive ability of nodulation between HN01 and HN01L was nearly the same which was also corresponded to the results of root colonization.

Our results indicated that genes regulating root colonization of rhizobia are not located on the symbiotic plasmid.

Key words: *Sinorhizobium fredii*; pSym-curved mutant; soybean rhizosphere; root colonization; *luxAB*
文章编号:1000-0933(2002)09-1420-05 中图分类号:Q938.1+3,Q948,S182 文献标识码:A

在根瘤菌-豆科植物共生体系建立过程中,宿主植物的根系能够分泌多种有机化合物供根瘤菌在根圈中生长、繁殖和定殖,根瘤菌亦表现出对有机化合物的趋化性,因此根瘤菌的趋化性和运动性也影响其竞争性和根圈定殖能力^[1~3]。已有研究报道根瘤菌内源质粒能影响其对某一类特定底物的趋化性和利用能力^[4~6]。但对根瘤菌内源质粒组成与根圈定殖动态和水平之间的相互关系的研究报道很少^[7],而费氏中华根瘤菌的共生质粒对其在大豆根圈中的定殖动态和水平的影响研究则未见报道。本研究以出发菌株 HN01、发光酶基因标记菌株 HN01L、消除 HN01 共生质粒的菌株 HND29SR 为供试菌,比较测定了其在 大豆根圈中的定殖动态与水平,进而初步分析消除 HN01 的共生质粒对其大豆根圈定殖能力的影响,同时考察发光酶基因标记引入出发菌 HN01 后对其根圈定殖能力的影响。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与质粒 菌株与质粒的特性见表 1。

1.2 培养基 TY^[8]用于根瘤菌液体培养,SM^[9]用于在固体平板上回收和测定根瘤菌数量。

1.3 大豆品种 黑农 33 由中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所提供。

1.4 接种物制备及接种 供试菌 HN01、HN01L 和 HND29SR 用 TY 培养液于 28℃、150r/min 培养 3 d。然后取培养液离心,去上清液,收集菌体。以无菌生理盐水离心洗涤 2 次后,加入 1%羧甲基纤维素-磷酸缓冲液(PBS)10ml,旋涡振荡打散菌体后转入无菌 PA 瓶中备用。大豆种子经 95%乙醇处理后再用 0.1% HgCl₂ 表面灭菌后催芽,发芽后选择生长良好且一致的种子于 4℃备用。分别取上述 3 种备用根瘤菌悬液适量(以淹没种子为宜)加入盛有经发芽已露白的备用大豆种子的小三角瓶内,于 80~100r/min 振荡 10 min(等量混合接种时先将两个供试菌悬液 1:1 等量混合后再接种大豆种子),然后将种子取出置于灭菌培养皿内,在超净工作台上吹干至种子表面无水后播种,并同时测定每颗种子上所粘附的根瘤菌数。对照组采用未接入根瘤菌的 1%羧甲基纤维素-PBS 作为接种剂。

1.5 无菌砂培盆栽 采用本室改进的双层钵作无菌砂培盆栽,大豆种子分别接种供试根瘤菌后播入灭菌砂钵中,HN01、HN01L 和 HND29SR 在大豆种子表面上的初始接种量基本相等,分别为 7.95, 8.08, 8.19 (logcfu/粒种子)。以播种时间计为起点(第 0 天),从播种后第 3 天开始于大豆不同生长时间(d)取样。栽培大豆用 Fahraeus 无氮营养液^[10],自然光照培养。

1.6 根瘤菌定殖密度的测定 以全根系为取样单位,按照无菌操作规程自塑料杯中小心地取出整个根系,抖掉附着在根系上的砂粒,转入对应的无菌培养皿内,称量根系重量。分别转入盛有 20ml 或 5.0ml 无菌生理盐水和数颗玻璃珠的三角瓶或 PA 瓶内,浸泡 15 min 后,于 100r/min 振荡 30 min,在旋涡振荡 5

表 1 供试菌株及质粒

Table 1 Strains and Plasmid Tested		
供试菌株及质粒 Strains or plasmids	有关特性 Related characteristics	来源 Source
pHN102 费氏中华根瘤菌 <i>Sinorhizobium fredii</i>	pTR102; <i>luxAB</i> cassette, Tc ^r , Amp ^r	This Laboratory
HN01	Nod ⁺ , Fix ⁺ , wild strain	This Laboratory
HN01(pHN102)	Nod ⁺ , Fix ⁺ , Tc ^r , Amp ^r , <i>luxAB</i> , Abbreviation HN01L	This research
HND29SR	Nod ⁻ , Fix ⁻ , Str ^r , Rif ^r , Symbiotic plasmid cured HN01	Dr. Miao Lihong

min 或超声波处理 10 s。作 10 倍系列稀释(盛有样品的悬液为原液,其稀释度为 0 次方)。用 SM 平板测定发光菌落数。根瘤菌及根瘤发光活性的检测参见文献^[11]。

- 2 结果
- 2.1 单独接种时供试菌在大豆根圈的定殖动态比较测定
- 测定结果见图 1。由图可见 HN01 和 HN01L 的定殖动态基本一致,其定殖水平下降到第 12 天后又开始上升,在第 16 天时达到较高的定殖水平,然后开始缓慢下降并维持一段时间的相对稳定。HND29SR 的定殖动态与前者比较稍有差异,其定殖密度持续下降到第 16 天后才开始上升,然后维持相对稳定的定殖水平,并且后期的定殖水平稍高于 HN01 和 HN01L。
- 2.2 HN01 和 HN01L 等量混合接种时的定殖动态比较测定
- 从测定结果图 2 可以看出,HN01 和 HN01L 的定殖动态与定殖密度在测定过程中具有很高的 consistency。结合结果 2.1 和 2.2 可看出,标记基因 *luxAB* 不影响受体菌 HN01 的大豆根圈定殖动态和水平,因而可将发光酶基因标记菌 HN01L 作为参照来研究消除共生质粒后的 HN01 对其根圈定殖能力的影响。

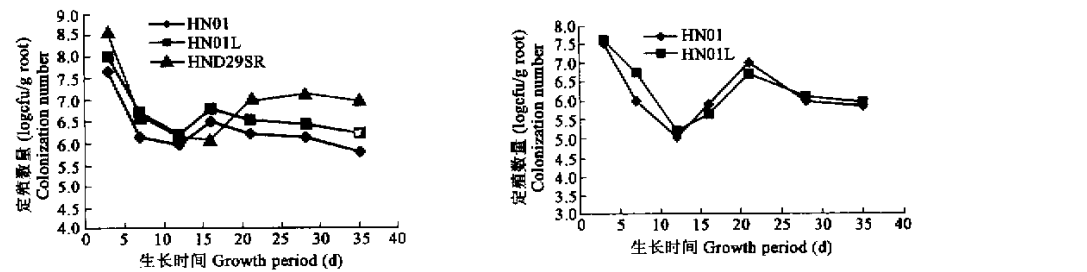


图 1 单独接种时供试菌的定殖动态

Fig. 1 Colonization dynamics of strains with single inoculation

图 2 HN01 和 HN01L 等量混合接种供试菌定殖动态

Fig. 2 Colonization dynamics of HN01 and HN01L with equal-dual-inoculation

- 2.3 HN01L 和 HND29SR 等量混合接种时的定殖动态比较测定
- 测定结果见图 3。由图可见,HND29SR 和 HN01L 在根圈定殖群体中各自的定殖密度在测定过程中基本相等,其定殖动态与密度表现出高度的一致性。结果表明,在无菌盆栽条件下,共生质粒的消除对出发菌 HN01 在大豆根圈的定殖能力和动态并无显著影响。
- 2.4 供试菌在单独或混合接种条件下的占瘤率检测
- 从检测结果表 2 可见,HND29SR 由于消除了共生质粒而失去了在大豆根系上的结瘤能力,HN01L 形成的根瘤均具有发光活性,再次证明标记基因 *luxAB* 在所构建的标记大豆根瘤菌株中的共生稳定性。HN01L 和 HN01(1:1)等量混合接种黑农 33 后所结根瘤中的发光比例大约为 50%(图 4),这与其混合接种下的定殖动态和密度测定结果相符;而 HN01L 和 HND29SR (1:1)等量混合接种黑农 33 后所结根瘤发光比例为 100%(图 5),与预期实验结果相同。

3 讨论

根瘤菌内源质粒能够影响其运动性(趋化性)和对根分泌的特定有机化合物的利用、代谢能力,从而对根瘤菌在根圈内的定殖、繁殖和定殖动态与水平。通过消除质粒并比较研究消除了不同质粒的衍生菌株和出

图 3 等量混合接种时供试菌的定殖动态

Fig. 3 Colonization dynamics of HN01 and HND 29SR with equal-dual-inoculation

发菌的根圈定殖动态和水平,可以阐明质粒(包括共生大质粒)在根圈定殖过程中的作用。Moenne-Loccoz Y 和 Weaver R W^[7]研究了三叶草根瘤菌 W14-2 所含的 4 个质粒(包括共生质粒)在影响其根圈定殖能力时的作用。结果表明消除全部质粒或仅保留质粒 a 或 d 的衍生菌在根圈的群体定殖水平显著低于出发菌,证实其共生质粒 b 和非共生质粒 c 上均含有与定殖有关的基因,从而影响 W14-2 在根圈的生长和定殖能力。本研究结果表明:消除了共生质粒后的 HN01(本文简称 HND29SR)虽然失去了在宿主大豆上的结瘤能力,但其在大豆根圈中的定殖动态与水平和出发

表 2 供试菌株单独或等量混合接种黑农 33 的占瘤率检测
Table 2 Nodule occupancy of Heinong 33 with single or equal-dual-inoculation

处理 Treatment	检测根瘤数 (ind)Nocule number tested	发光根瘤数 (ind)Number of luminous nodules	发光比例 (%)Percentage of luminous nodules
CK	0	0	0
HN01	35	0	0
HN01L	38	38	100
HND29SR	0	0	0
HN01;HN01L	36	19	52.8
HN01L;HND29SR	33	33	100

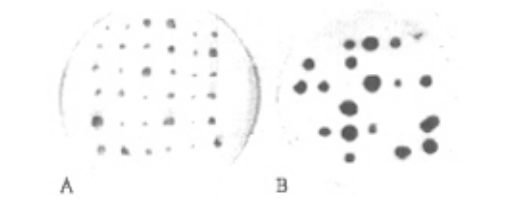


图 4 HN01L 和 HN01 等量混合接种黑农 33 后所结根瘤发光检测

Fig. 4 Luminous detection of Heinong 33 nodules by equal-dual-inoculation of HN01 and HN01L

A. 平皿上切开的根瘤 Cut nodules on Petri dish;B. 发光根瘤的 X 光片曝光显影 Exposed X-film of luminous nodules

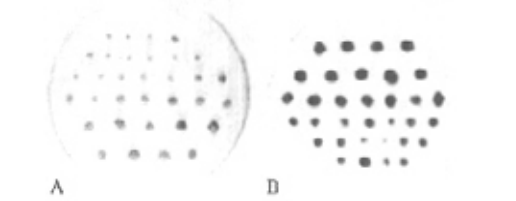


图 5 HN01L 和 HND29SR 等量混合接种黑农 33 后所结根瘤发光检测

Fig. 5 Luminous detection of Heinong 33 nodules by equal-dual-inoculation of HN01L and HND29SR

A. 平皿上切开的根瘤 Cut nodules on Petri dish;B. 发光根瘤的 X 光片曝光显影 Exposed X-film of luminous nodules

菌并不存在预期的显著性差异,可推测与其定殖有关的基因不在共生质粒上,消除 HN01 的共生大质粒不影响其在大豆根圈中的定殖能力,与 HN01 在大豆根圈中对根际分泌物(如碳水化合物、有机酸、维生素等)代谢和利用的相关基因可能存在于其非共生质粒或其染色体背景上,因而供试菌 HN01、HN01L 和 HND29SR 均能够在大豆根圈中生长繁殖并维持一定的根部定殖水平。虽然 HND29SR 在大豆根圈中能达到与出发菌同样的数量,但其共生质粒被消除后阻断了与宿主植物间的系列分子水平“对话”,因而不能成功结瘤。本研究结果也从一个侧面说明根瘤菌的结瘤数量并不一定与它们在植物根圈中的定殖水平正相关,虽然根瘤菌在根段的聚集与定殖对其感染与结瘤是重要的,成功的根部定殖也是其竞争结瘤的必要条件,但根圈定殖水平却不是决定其共生特异的主要因素。本实验结果还显示无论在单独接种或混菌接种时供试菌在大豆根圈的早期定殖密度下降较快,无菌砂与培养基比较是一种营养相对贫乏的基质,接种于大豆种子表面的供试菌随播种进入无菌砂钵后,部分细胞由于环境条件的急剧变化而死亡或进入休眠状态,但随着根系发育和根际有机营养分泌物数量的增多,根瘤菌在根段的聚集与定殖数量逐渐增大,因此其根圈定殖动态一般呈现出“先降后升并趋于稳定”的特点。进一步研究消除 HN01 的另外两个非共生质粒对其根圈定殖的影响正在进行中,可望获得更多的研究结果来分析费氏中华根瘤菌内源质粒对其根圈定殖与竞争性的影响。本研究还证明发光酶标记基因的引入并不影响 HN01 在根圈的生长和定殖能力,由于重组质粒 pRT29^{luxAB}和共生条件下均能稳定复制传代^[2],在本研究的发光标记菌株 HN01L 也未发生丢失,证明 *luxAB* 标记是开展根瘤菌根圈定殖与竞争结瘤等分子生态学研究的一个有效手段。

参考文献

[1] Caetano-Anolles G, Wall L G, De Micheli A T. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* , 1988, **86**:1228~1235.

[2] Catlow H Y, Glenn A R, Dilworth M J. Does rhizobial motility affect its ability to colonize along the legumes root? *Soil Bio. Biochem.* , 1990, **22**: 573~575.

[3] Michiel J, Pelemans H, Vlassak. Identification and characterization of a *Rhizobium Leguminosarum* by *phaseoli* gene that is important for nodulation competitiveness and show structure homology to a *Rhizobium fredii* host-inducible gene. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 1995, **8**: 468~472.

[4] Baldani J I, Weaver R W, Hynes M F, *et al.* Utilization of carbon substrate, electrophoretic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clove rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* , 1992, **58**: 2308~2314.

[5] Watson R J, Chan Y K, Wheatcroft R, *et al.* *Rhizobium meliloti* genes required for C4-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid. *J. Bacteriol.* , 1988, **170**(2): 927~934.

[6] Boivin C, Barran L R, Malpica C A, *et al.* Genetic analysis of a region of the *Rhizobium meliloti* pSym specifying catabolism of trigonelline, a secondary metabolite present in legumes. *J. Bacteriol.* , 1991, **173**: 2809~2817.

[7] Moenne-Loccoz Y, Weaver R W. Plasmids influence growth of rhizobia in the rhizosphere of clover. *Soil Biol. Biochem.* , 1995, **27**(8): 1001~1004.

[8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatias T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

[9] Zhou J C(周俊初),Zhang K Q(张克强). The transfer of a broad host range cosmid, pLAFR1, or *Eschrichia coli*. *Journal of Wuhan University* (Natural Science Edition) (in Chinese) (武汉大学学报(生物工程专刊)),1990,45~48.

[10] Vincent J M. A manual for practical study of the root-nodule bacteria. *International biological programme handbook* No. 15, Blackwell Scientific Publications Oxford, 1970.

[11] Mo C Q(莫才清),Zhou J C(周俊初),Li Fo D(李阜棣). *luxAB* genes as marker for detecting *Rhizobium fredii* HN01 nodulation functions. *Acta Microbiologica Sinica* (in Chinese) (微生物学报), 1998,**38**(3):131~141.

[12] Liu M Q(刘墨青),Li Y G(李友国),Zhou J C(周俊初). Study of the improvement of plasmid stabilityin soybean rhizobia. *Acta Microbiologica Sinica* (in Chinese) (微生物学报) , 2000, **40**(3): 296~300.