

用发光酶基因(*luxAB*)标记法研究慢生花生根瘤菌的竞争结瘤能力

罗明云^{1,2}, 张小平^{1,*}, 李登煜¹, 陈 强¹, 周俊初³

(1. 四川农业大学, 雅安 625000; 2. 四川师范学院地理系, 南充 637002; 3. 华中农业大学, 武汉 430000)

摘要: *luxAB* 基因标记是一种新型基因标记技术, 在很多研究领域都有着良好的应用前景。研究通过三亲本杂交将 *luxAB* 基因成功地向慢生型花生根瘤菌进行了转移, 并获得了一株带 *LuxAB* 基因标记的菌株 Cspr7-1。对 Cspr7-1 进行性状、标记基因的遗传稳定性检测, 结果表明, *LuxAB* 基因不仅能有效表达, 而且性状稳定。在无氮水培条件下进行标记菌株与土著根瘤菌的竞争结瘤试验。结果证实, Cspr7-1 在植物根系上的占瘤率平均达到 61.3%, 比土著根瘤菌的竞争结瘤能力强, 而且 Cspr7-1 在主根上的侵染能力远较侧根上的强, 平均高出 22.3%~39.6%。

关键词: *luxAB* 基因标记; 慢生型花生根瘤菌; 竞争性

The competitiveness of *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) studied by using *luxAB* marker gene technique

LUO Ming-Yun^{1,2}, ZHANG Xiao-Ping^{1,*}, LI Deng-Yu¹, CHENG Qiang¹, ZHOU Jun-Chu³ (1. Sichuan Agricultural University, Yaan, 625000, China; 2. Sichuan Teacher's College, Nanchong, 637002, China; 3. Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430000, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(2): 278~283.

Abstract: The *luxAB* marker gene is useful in microbial ecological studies. One strain Cspr7-1 marked with *luxAB* gene was obtained triumphantly by thri-patent mating. Detecting the characteristic and stability of Cspr7-1, the results showed that: the *luxAB* gene not only expressed in Cspr7-1, but also kept stabilized. Using the *luxAB* marked gene to study competitive ability of Cspr7-1 with soil indigenous rhizobia in N-free solution pot, we found that the Cspr7-1 had higher nitrogen fixing efficiency and stronger competitive ability than that of the soil indigenous bradyrhizobia. Nodule occupancy of Cspr7-1 on peanut root was 61.3% on average. The competitive ability of Cspr7-1 was different between main root and lateral root.

Key words: *luxAB* marker gene; *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*); competitiveness

文章编号: 1000-0933(2003)02-0278-06 中图分类号: Q142, Q939.11, S182 文献标识码: A

根瘤菌与豆科植物的共生固氮作用在改良土壤肥力, 提高农作物产量, 改善生态环境等方面有着十分

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970029); 华中农业大学农业部农业微生物重点实验室开放课题资助项目(AML0017)

收稿日期: 2001-11-08; **修订日期:** 2002-06-10

作者简介: 罗明云(1969~), 男, 四川省南充人, 硕士, 讲师。主要从事环境微生物和土壤微生物研究。Lmy68@sohu.com

* 通讯作者 Author for correspondence

Foundation Item: Project Granted by National Science Foundation(No. 39970029) and Huazhong Agricultural University Key Laboratory Opening Task (No. AML0017)

Received date: 2001-11-08; **Accepted date:** 2002-06-10

Biography: LUO Ming-Yun, Master. Undertaking mostly soil and environment microbe job. E-mail: Lmy68@sohu.com

重要的意义和作用,因而在生产中应用人工接种根瘤菌便成为一种常规的农业措施。随着分子生物技术的发展,通过群体遗传学筛选或遗传重组的工程菌已在不断生产应用。释放到田间的接种根瘤菌,必然要与土著根瘤菌在土壤营养、生活空间及宿主植物等方面进行竞争,接种根瘤菌能否提高作物产量则直接取决于其竞争力的大小。另外,接种工程菌对环境的影响也逐渐受到各国政府的重视。为了追踪接种根瘤菌在土壤—植物—环境这一系统中的动态,需要有一个可靠的检测手段。虽然近年来已出现了许多标记技术,但由于大多数方法存在背景干扰、技术难度大或需要的设备、化学试剂昂贵而难于在实际工作中应用。*luxAB* 基因作为一种简便、实用的基因标记技术,已在国内外很多领域中成功应用^[1~4]。目前应用 *luxAB* 基因标记技术研究快生型根瘤菌的分子生态学,已有过报道^[1,3],但应用 *luxAB* 基因标记技术研究慢生型花生根瘤菌与土著根瘤菌竞争结瘤的分子生态学问题,仍未见报道。

1 材料和方法

1.1 细菌、质粒和培养基

供试慢生型花生根瘤菌、质粒见表 1。大肠杆菌用 LB 固体或液体培养基,慢生型花生根瘤菌用 YMA 固体培养基,SM 固体培养基用于筛选转移接合子,并能淘汰大肠杆菌。培养菌体和筛选所使用的抗生素及其浓度分别为四环素(20μg/ml),壮观霉素(50μg/ml),新霉素(10μg/ml),氨基青霉素(50μg/ml)。

表 1 菌株及质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids tested

菌株/质粒 Strain/Plasmids	相关特征 Relevant characteristics	来源 Sources
<i>Bradyrhizobium</i> sp Spr7-1	Ap ^r Spe ^r Neo	四川农业大学微生物系 Department of microbiology, Sichuan Agricultural University
Plasmids		华中农业大学微生物固氮室
pHN102	<i>luxAB</i> Tc ^r Spe ^r	Department of microbiology, Huazhong Agricultural University
pRK2073	Spe ^r tra ⁺ mob ⁻	

1.2 *luxAB* 基因标记

含发光酶基因的质粒 pHN102 的供体大肠杆菌和含辅助质粒 pRK2073 的协助大肠杆菌与慢生型花生根瘤菌的接合按三亲本杂交方法进行。将慢生型花生根瘤菌 spr7-1 接种在含有 Neo(10μg/ml)抗生素的 5ml TY 培养液中,于 28℃振荡培养 72h,带重组质粒 pHN102 的大肠杆菌接种于 5ml 加相应浓度的抗生素 Ap(50μg/ml)的 LB 培养液中,带质粒 pRK2073 的大肠杆菌接种于 5ml 加相应浓度抗生素 Spe(50μg/ml)的 LB 培养液中,37℃振荡培养过夜。将上述供体菌、受体菌及辅助菌株以 2:1:1 的比例混合,用无菌注射器将混合菌液过滤到微孔滤膜上,滤膜置 TY 平板上,于 28℃培养 24~48h,用无菌水将滤膜片上的菌苔洗下,制成菌悬液,作 10 倍系列稀释,涂布于加相应浓度抗生素 Tc(20μg/ml)的 SM 选择平板和不加抗生素的 SM 计数平板上,置 28℃培养至长出菌落,记录菌落数,并由此计算出转移频率。

1.3 标记菌株发光活性的检测

采用修改的 Eckhardt 方法进行质粒检测,其具体操作按文献进行^[5]。*luxAB* 基因发光活性的检测采用平皿点种法进行,将已纯化的标记菌株,均匀点种在 YMA 培养基平板上,28℃培养至长出菌落后,在培养皿盖上加 5~10μl 0.1%的萘醛,在暗室中观察菌落是否发光,并用 X-光片记录。

1.4 基因标记对出发菌株的影响及其遗传稳定性检测

在相同的培养条件下,测定标记菌株和出发菌株各自的生长曲线以及在不同营养条件下的生存竞争能力,以此推断标记菌株的性状相对于出发菌株是否有明显的改变。在无菌盆栽条件下,将出发菌株、标记菌株分别回接植株,在光照室培养,于盛花期收获,对根瘤数、根瘤重和植株干重等数据进行统计分析。

标记基因的遗传稳定性检测在两种条件下进行。一种是在 YMA 培养基上连续转接 5 次,最后挑取 100 个单菌落,分别点种在加抗生素和不加抗生素的 YMA 培养基上,于 28℃培养至长出菌落,检查菌落的发光,计数并计算出外源质粒的丢失百分率。另一种是在共生条件下,即将标记菌株制成菌悬液,接种于花

生水培养液中,并以出发菌株和不接种作对照,光照培养 40d 后收获。将收获的根瘤在培养皿中用 5~10 μ l 0.1% 的萘醛检查,在暗室中观察发光,并用 X-光片记录,由此计算发光根瘤占所有根瘤的百分比。

1.5 标记菌株与土著根瘤菌的竞争结瘤试验

用无菌水浸提土壤(水土比为 9:1),将浸提液(每 1ml 含菌 1.47 $\times 10^3$ 个)接入种有花生幼苗的细口瓶中,同时将带有 *luxAB* 基因标记的根瘤菌用无菌水制成菌悬液(每 1ml 含菌 1.28 $\times 10^6$ 个)按 1:1,把菌悬液注入接有土壤浸提液的瓶中,以不接种为对照,在盛花期时收获花生植株,检查花生根系上发光根瘤和不发光根瘤的比例。

2 结果

2.1 *luxAB* 标记基因的导入与表达

携带 *luxAB* 发光酶基因的质粒 pHN102,在辅助质粒 pRK2073 的协助下,通过三亲本杂交进行接合转移。以上这些质粒的宿主均是营养缺陷型大肠杆菌。利用加入抗生素 Tc 的根瘤菌合成培养基 SM,即可将杂交混合体中供体菌、受体菌(非标记菌)和辅助菌株淘汰掉,再加抗生素筛选不难得到转移接合子。统计选择平板上的转移接合子和计数平板上的菌落数,便可计算出转移频率。结果见表 2。

表 2 *luxAB* 基因向慢生型花生根瘤菌的转移
Table 2 Transfer of *luxAB* gene to *Bradyrhizobium* sp (*Arachis*)

菌株 Strain	选择培养基(抗生素浓度 μ l)Choice medium(Antibiotic concentration μ l)	计数培养基 Count medium	发光菌落数 Luminouse colonies	菌落总数(个/ml) Total colonies	转移频率 Transfer frequency
Spr7-1-1	Sm+Tc(20)	SM	2	1.57 $\times 10^7$	1.27 $\times 10^{-7}$
Spr7-1-2	Sm+Tc(20)	SM	1	1.74 $\times 10^7$	5.70 $\times 10^{-7}$
Spr7-1-3	Sm+Tc(20)	SM	3	5.7 $\times 10^6$	5.26 $\times 10^{-7}$
Spr7-1-4	Sm+Tc(20)	SM	2	1.12 $\times 10^7$	1.79 $\times 10^{-7}$
Spr7-1-5	Sm+Tc(20)	SM	1	2.3 $\times 10^6$	4.35 $\times 10^{-7}$

由表 3 可见,慢生型花生根瘤菌通过三亲本杂交进行质粒转移的频率很低,其范围在 1.27 $\times 10^{-7}$ ~5.7 $\times 10^{-7}$ 之间。

转移接合子经纯化后,在 TY 液体培养基中培养至对数生长期,离心收集菌体,进行质粒抽提和凝胶电泳。从凝胶电泳的结果来看,转移接合子与出发菌株相比,明显多了一条带,表明外源质粒已成功导入慢生型花生根瘤菌中,见图 1。

纯化后的转移接合子在适合于慢生型花生根瘤菌的培养基上能很好地生长,用萘醛检测发光活性,全部菌落均能发光,表明发光酶基因已在根瘤菌中表达,见图 2。

2.2 标记基因对出发菌株的影响与遗传稳定性检测

将标记菌株 Cspr7-1 与出发菌株 spr7-1 以 1:1 的比例混合,于 28 C 和 4 C 下用无菌水保存,每隔 7d 取

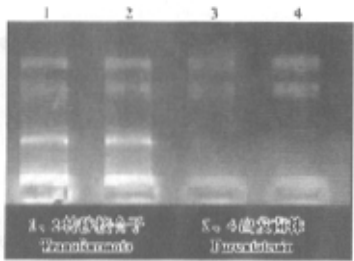


图 1 转移接合子的质粒带谱
Fig. 1 Plasmid patterns of transformants

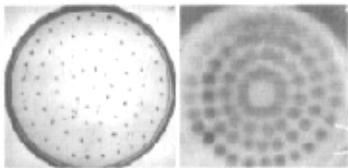


图 2 转移接合子的发光活性检测
Fig. 2 Luminescence detection of transformants

一次样,稀释涂平板,培养至菌落出现,然后根据菌数随时间的改变作图,结果见图 3。

由图可见,在 28℃条件下总菌数和发光菌数都有所增加,而在 4℃条件下总菌数和发光菌数都呈下降趋势,但无论是总菌数的增加或减少,发光菌落数总是随着总菌数的变化而变化,并保持一定比例关系,说明标记根瘤菌与原出发菌株在生存竞争方面差异不大,即标记基因的导入对出发菌株在不同温度条件下的生存竞争能力没有明显的影响。

选择 YMA 液体培养基进行试验,以时间为横坐标,以活菌数的对数为纵坐标,作出标记菌株和出发菌株的生长曲线,结果见图 4。

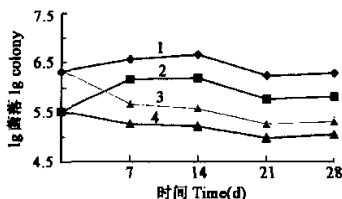


图 3 标记菌株与出发菌株间的生存竞争曲线图

Fig. 3 Survival and competitive curve of labelled strain and parent strain

1 28℃总菌落数 Total colonies; 2——28℃发光菌落数 Luminouse colonies; 3——4℃总菌落数 Total colonies; 4 --- 4℃发光菌落数 Luminouse

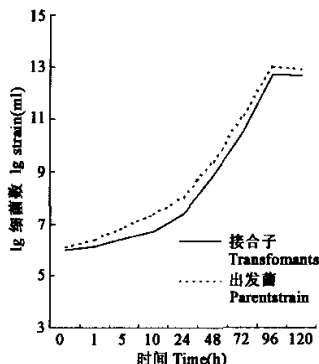


图 4 标记菌株和出发菌株的生长曲线图

Fig. 4 Growth curve of labelled strain and parent strain

由图 4 可见,标记菌株和出发菌株的生长曲线变化趋势一致,在相同的培养条件下,达到菌体量最高峰值均处在接种后 96h 左右。

在标记菌株与出发菌株的共生效应的比较研究结果见表 3,通过对根瘤总数、根瘤重和地上部分干重等数据的统计分析,证明用发光酶基因标记慢生型花生根瘤菌,不影响菌株的共生固氮能力。

将标记菌株在 YMA 固体培养基上连续转接 5 次后,挑取 100 个单菌落点种在加抗生素 Tc 和没加抗生素 Tc 的 YMA 培养基上,待菌落出现后,进行发光检测,5 次重复,结果见表 4。

从表 4 的结果来看,*luxAB* 基因经传 100 多代后在非抗性平板上,其质粒未见丢失,即使在抗性平板上也只是个别菌落不发光,说明转移质粒丢失的百分率低,遗传性很稳定。

将标记菌株回接花生“资阳三号”,在水培条件下培养至根瘤出现,采集花生植株根系上的根瘤,经表面灭菌后,用解剖刀切开根瘤,倒扣于培养皿底部,观察发光活性,以 X-光片曝光记录根瘤的发光活性。图 5 示任选一株花生根系上的 15 个根瘤依次切成两半后,放入培养皿,在暗室内曝光记录的结果

由图 5 可见,检测到的具有发光活性的根瘤占 95%以上,只有极少数的根瘤不具发光性,表明

表 3 标记菌株与出发菌株的差异性比较

Table 3 Differential comparison of marked strain and parent strain

菌株代号 Strain code	根瘤数(个) Nodule number	鲜瘤重(g) Fresh nodule weight	植株干重(g) Dry lant weight
Cspr7-1-1	23.4 a	0.073 a	1.274 a
Cspr7-1-2	21.2 a	0.075 a	1.331 a
Cspr7-1-3	25.5 a	0.086 a	1.376 a
Cspr7-1-4	24.0 a	0.077 a	1.172 a
Cspr7-1-5	23.9 a	0.090 a	1.267 a
spr7-1	23.7 a	0.081 a	1.403 a
CK			0.917 b
F	2.045	1.391	0.192

以上数据均为 3 次重复的平均数,a 表示菌株之间的差异性很小,b 表示对照株与标记菌株间差异显著 The data is the average of triplicates. a indicated there were no difference, and b indicated there were significant difference between marker strains and origins strains

标记基因在共生条件下是稳定的。

2.3 标记菌株与土著根瘤菌的竞争结瘤能力

在水培条件下标记根瘤菌与土著根瘤菌在花生根系上的占瘤率的测定结果见表 5。

表 4 luxAB 基因丢失百分率测定

Table 4 Fault percent of luxAB gene			
处理 Treatment	抗性平板菌落数 Colonies on resistance plating	YMA 平板 菌落数 Colonies on YMA plating	标记基因 丢失百分率(%) Fault ratio of marker gene
Cspr7-1-1	100	100	0
Cspr7-1-2	95	100	5
Cspr7-1-3	100	100	0
Cspr7-1-4	100	100	0
Cspr7-1-5	98	100	2

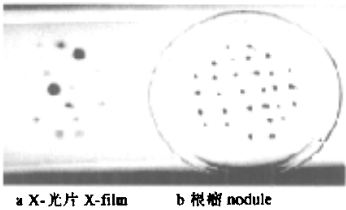


图 5 标记菌株在共生条件下所结根瘤的发光性检测
Fig. 5 Luminescence detection of nodules inoculated with tagged strain under symbiotic conditions

表 5 标记根瘤菌与土著根瘤菌在花生上的占瘤率

Table 5 Nodule occupancy between luminescence rhizobia and soil indigenous bradyrhizobia on peanut plants						
处 理 Treatment	主瘤数(个) Nodule number on main roots			侧瘤数(个) Nodule number on side roots		发光根瘤 占瘤率(%) Occupacy of luminescent nodules
	总瘤数 Total nodules	发光根瘤数 Luminescent nodules	发光根瘤占瘤数(%) Occupacy of luminescent nodules	发光根瘤数 Luminescent nodules	发光根瘤占瘤率(%) Occupacy of luminescent nodules	
Cspr7-1-1	11.7	5.8	49.6	1.3	11.1	60.7
Cspr7-1-2	15.1	6.3	41.7	2.9	19.2	60.9
Cspr7-1-3	14.2	6.0	42.3	3.4	23.9	66.2
Cspr7-1-4	14.8	6.1	41.2	2.4	16.2	57.4
Cspr7-1-5	16.7	6.9	41.3	3.3	19.8	61.1

表中所列数据均为三次重复的平均数 The results were the average of triplicates

由表 5 可见,Cspr7-1 在花生根系上的占瘤率比土著根瘤菌的竞争能力强平均达到 61.3%。通过对根系所结根瘤的直接发光检测,可以直观地了解接种根瘤菌在花生植株根系上与土著根瘤菌的竞争结瘤情况,并能追踪标记根瘤菌在土壤中的分布。本研究发现接种菌在植物根系不同部位的占瘤率不同,与前人的研究成果相符^[5]。接种根瘤菌在主根上的侵染力较侧根高出 22.3%~39.6%,与土著根瘤菌在土壤中的均匀分布有关。

3 讨论

采用发光酶基因标记法研究慢生型花生根瘤菌的竞争结瘤能力时,首先要将发光酶基因导入受体菌并正确表达,同时应比较研究标记基因导入对出发菌株的影响和遗传稳定性。本研究结果表明,无论是在自生条件下,还是在共生条件下,标记基因在 *spr7-1* 中均能稳定遗传,而且对出发菌株的影响也很小。*luxAB* 基因标记技术操作简便、快速,通过对植物所结根瘤发光测定,便可清楚地观察到接种菌在植物根系上的结瘤情况,从而确定其与土著根瘤菌竞争结瘤能力的大小,因此,该技术适用于根瘤菌的基因标记,以研究其在植物根系上的存活、迁移及结瘤等生态学问题。

此外,在本研究还发现,*luxAB* 基因标记系统虽然操作简单,性能稳定可靠,许多发光菌落在暗室内通过肉眼就可以观察到,但对单个的发光细菌却难以检测,在菌落小时,发光强度也较弱,应考虑辅以其它的手段。如借助 CCD 照相机(chargecoupled deviceenhanced camera)和流速发光仪等,来提高 *luxAB* 基因标记系统的灵敏度。

根瘤菌与豆科植物之间的竞争结瘤过程是一个复杂的过程,需要从多个因素及其相互作用去研

究^[6-8]。由于时间所限,本研究仅在水培条件下,做了标记菌株与土著菌株之间的竞争结瘤能力试验,其结论还有待于大田试验的进一步证实。

References

- [1] Muo C Q, Tan Y L, Zhou J C. Deteting nodulation of rhizobium fredii HN01 by use luminescence genes. *Acta Microbiologica Sinica*, 1998, **38**(3): 213~218.
- [2] Wang P, Hu Z J, Li F D. Colonization of fluorescent *Pseudomonas* X1612 with the firely luciferase in wheat rhizosphere. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, **40**(2): 151~154.
- [3] Masson I, *et al.* Construccation and application of chromosomally integrated Lac-Lux gene markers to monitor the fate of a 2, 4-dich loro phenoxyactic acid-degracling bacterium in contaminated soils. *Mictob. Release.*, 1993, **1**: 209~216.
- [4] Bai J L, Wang P, Hu Z J, use of *luxAB* genes marker technique to trace PL9L in wheat rhizosphere. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, **39**(1): 43~48.
- [5] Glenn A R, Tiwari R P. Rhizobium genes essential for acid tolerance. *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*, 1998, 491~492.
- [6] Shaw J J, *et al.* kloepfer. Use of bioluminescence for detection of qentically engineered microorganisms released into the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**(1): 267~273.
- [7] Kloepfer J W, *et al.* A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 1992, **38**: 1219~1232.
- [8] Ge C, Fan H, Xu L M. the competitiveness of rhizobial *fredii* and the survy of distribution in fields. *Soybology*, 1986, **5**(4): 327~332

参考文献

- [1] 莫才清, 覃雅丽, 周俊初. 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. *微生物学报*, 1998, **38**(3): 213~218.
- [2] 王平, 胡正嘉, 李卓隼. 发光酶基因标记的荧光假单胞菌 X16L2 在小麦根圈的定殖动态. *微生物学报*, 2000, **40**(2): 151~154.
- [4] 柏建玲, 王平, 胡正嘉. 利用发光酶基因标记技术跟踪棉花根圈中的绿针单胞菌 PL9L. *微生物学报*, 1999, **39**(1): 43~48.
- [8] 葛诚, 樊惠, 徐玲玫. 快生型大豆根瘤菌结瘤竞争研究及其在田间自然分布调查. *大豆科学*, 1986, **5**(4): 327~332.

万方数据
WANFANG DATA