

苜蓿中华根瘤菌与鹰嘴豆中慢生根瘤菌 原生质体的融合研究^{*}

韦革宏¹, 朱铭莪¹, 郭 杰¹, 陈文新²

(1 西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨陵 712100; 2 中国农业大学 生物学院, 北京 100094)

[摘 要] 利用原生质体融合技术, 以链霉素和青霉素分别作为苜蓿中华根瘤菌(*S. inorhizobium meliloti*) 102F28 和鹰嘴豆中慢生根瘤菌(*M. esorhizobium ciceri*) U SDA 3383 的抗药性选择标记, 成功地获得了 102F28 和 U SDA 3383 的属间融合子。该融合子可分别在双亲寄主植物上结瘤, 其在细胞形态、大小和蛋白质电泳图谱上与亲本菌株均有所差异。融合子与 102F28 的 DNA 同源率为 90.8%, 而与 U SDA 3383 的 DNA 同源率为 15.2%。

[关键词] 原生质体融合; 苜蓿中华根瘤菌; 鹰嘴豆中慢生根瘤菌

[中图分类号] Q 939.11+4.03

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)01-0018-05

原生质体融合技术作为高频重组的有效方法和遗传学研究的工具, 已受到国内外生物学家的重视。细菌原生质体可以经溶菌酶处理而制备, 在高渗条件下通过 PEG 促融, 使两个亲株的基因之间发生接触、交换而产生重组体, 并通过再生而获得重组子。因此, 原生质体融合克服了种、属间杂交的“不育性”; 大大提高了基因间重组的频率^[1]。

微生物原生质体融合技术已有多年的实际应用, 但如何利用原生质体融合技术扩大根瘤菌的结瘤范围, 目前尚未见报道。本研究以苜蓿中华根瘤菌(*S. inorhizobium meliloti*) 和鹰嘴豆中慢生根瘤菌(*M. esorhizobium ciceri*) 为材料, 进行根瘤菌原生质体的属间融合研究。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

S. inorhizobium meliloti 102F28, 寄主为苜蓿; *M. esorhizobium ciceri* U SDA 3383, 寄主为鹰嘴豆。均由中国农业大学根瘤菌资源库提供。

1.2 培养基及有关试剂

YMA 高渗培养基: 在 YMA 培养基中再加入 0.25 mol/L 丁二酸钠和 0.25 mol/L 蔗糖。

DF 稀释液: 0.25 mol/L 蔗糖, 0.25 mol/L 丁二酸钠, 0.01 mol/L EDTA, 0.02 mol/L K_2HPO_4 , 0.11 mol/L KH_2PO_4 , 0.01 mol/L $MgCl_2$, pH 7.0。

新生磷酸钙: K_2HPO_4 0.5 g, $CaCl_2 \cdot H_2O$

29.4 g, 溶于 100 mL 水, 用时等体积混合。

PEG 溶液: 400 g/L PEG 8000 溶于 DF 稀释液中。

1.3 方 法

1.3.1 抗性标记的筛选 将青霉素、链霉素、卡那霉素和氯霉素 4 种抗生素分别按 5, 50, 100, 300 mg/L 的终质量浓度加入到 YMA 培养基中, 倒平板, 接种 102F28 和 U SDA 3383。每个处理设 3 个重复。

1.3.2 原生质体的形成及形成率和再生率的计算 按文献[2]的方法进行。

1.3.3 原生质体的融合 供试菌株培养到对数生长期, 离心收集菌体, 加入质量浓度 1 g/L 的溶菌酶, 37℃ 保温 1 h, 离心弃上清, 悬浮于含有 5 mg/L DNA 酶和 5 mmol/L EDTA 的 DF 液中, 总体积为 4 mL, 各取原生质体 1 mL 充分混合, 离心弃上清, 加含 5 mg/L DNA 酶的质量浓度为 400 g/L 的 PEG 8000 至 4 mL, 轻轻悬浮, 随后加入 0.05 倍体积的新生磷酸钙, 在紫外灯下 28 cm 处照射 90 s, 保温 30 min, 接种到 YMA 高渗培养基和基础培养基上, 28℃ 培养 3 d。

1.3.4 根瘤菌的回接及固氮酶活测定 根瘤菌的回接采用水培法, 固氮酶活测定采用乙炔还原法。按照文献[3]的方法进行。

1.3.5 SDS-全细胞可溶性蛋白电泳分析 蛋白样品的制备、电泳及染色方法按照文献[4]的方法进行。

1.3.6 DNA-DNA 杂交 采用复性速率法, 在 Lambda Bio 20 型紫外分光光度计上自动测定^[5]。

* [收稿日期] 2001-03-07

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(3000005)

[作者简介] 韦革宏(1969-), 男, 甘肃兰州人, 副教授, 博士, 主要从事根瘤菌研究。

2 结果和讨论

2.1 出发菌株的抗性鉴定

分别用 4 种抗生素, 以 5, 50, 100, 300 mg/L

个质量浓度梯度对出发菌株进行抗生素抗性鉴定, 其结果见表 1。

表 1 出发菌株的抗性鉴定结果

Table 1 The results of resistance to antibiotics of parental strains

菌株 Strains	CK	青霉素/(mg · L ⁻¹) Penicillin				链霉素/(mg · L ⁻¹) Streptomycin				卡那霉素/(mg · L ⁻¹) Kanamycin				氯霉素/(mg · L ⁻¹) Chloromycetin			
		5	50	100	300	5	50	100	300	5	50	100	300	5	50	100	300
102F28	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
USDA3383	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-

注: “+”表示具有抗性,“-”表示不具有抗性。
Note: “+” indicating resistance to antibiotics,“-” indicating no resistance to antibiotics

由表 1 可见, 供试菌株对不同质量浓度的青霉素、链霉素和卡那霉素 3 种抗生素的抗药性显示出一定的差异。102F28 对青霉素(5~ 100 mg/L)具有抗性, 而 USDA 3383 对青霉素(50~ 100 mg/L)却很敏感; 102F28 对链霉素(5~ 50 mg/L)不具有抗性, 而 USDA 3383 却具有抗性; USDA 3383 在含 100 mg/L 的卡那霉素培养基上不能生长, 而

102F28 却能生长。两菌株对氯霉素的抗药性没有差异。因为微生物的抗药性是其菌种本身的特性, 所以, 可将抗性鉴定特征作为亲本菌株进行融合试验的标记^[1]。根据供试菌株抗性鉴定结果, 以 100 mg/L 的青霉素和 50 mg/L 的链霉素分别作为筛选 102F28 和 USDA 3383 融合子的抗药性选择标记。

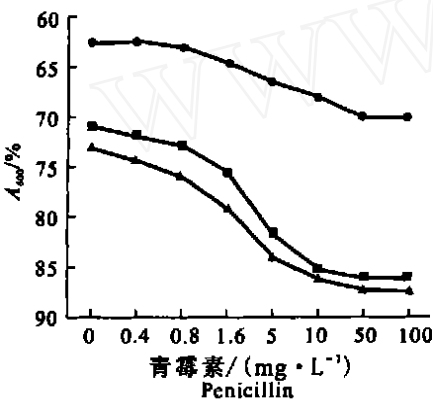


图 1 102F28 经青霉素处理后对溶菌酶的敏感性
Fig.1 Effect of penicillin pre-treatment on sensitivity of 102F28 cell to lysozyme
—○— CK; —■— 0.2 g/L; —▲— 1.0 g/L

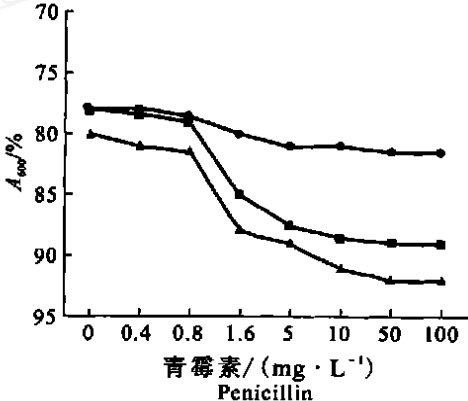


图 2 USDA3383 经青霉素处理后对溶菌酶的敏感性
Fig.2 Effect of penicillin pre-treatment on sensitivity of USDA3383 cell to lysozyme
—○— CK; —■— 0.2 g/L; —▲— 1.0 g/L

2.2 青霉素处理对溶菌酶作用效果的影响

经不同质量浓度青霉素预处理后, 分别加入质量浓度 0.2, 1.0 g/L 的溶菌酶, 考察青霉素质量浓度对溶菌酶作用效果及不同质量浓度溶菌酶对原生质体形成的影响, 其结果见图 1, 2。

由图 1, 2 可以看出, 用 1.0 g/L 的溶菌酶处理效果比 0.2 g/L 的好, 对供试菌株的破壁作用强, 因此, 选择 1.0 g/L 的溶菌酶较为理想。在 1.0 g/L 溶菌酶作用下, 随着青霉素质量浓度的升高, 曲线呈下降趋势, 透光率增大, 原生质体形成率增高。青霉素

质量浓度在 0~ 0.8 mg/L 时, 曲线下降幅度较小; 在 0.8~ 10.0 mg/L 时曲线迅速下降, 透光率增大, 破壁作用增强。当青霉素质量浓度达到 50.0 mg/L 后, 基本呈一直线。本试验选择 5.0 mg/L 的青霉素处理, 虽对菌体生长有一定的影响, 但能增强溶菌酶的破壁效果。

2.3 青霉素预处理时间对溶菌酶敏感性的影响

供试菌株分别加入 1.6 和 5.0 mg/L 青霉素, 考察青霉素预处理时间对溶菌酶作用效果的影响, 结果见图 3, 4。

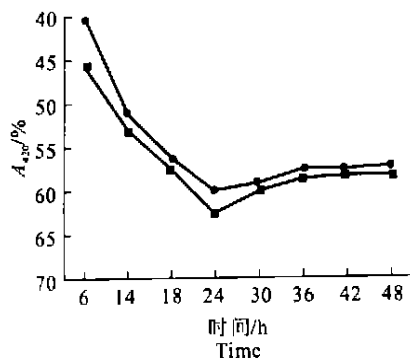


图 3 不同青霉素预处理时间 102F28 对溶菌酶的敏感性

Fig. 3 Effect of penicillin pre-treatment time on sensitivity of 102F28 cell to lysozyme

—○— 1.6 mg/L; —●— 5.0 mg/L

由图 3、4 可见, 6~24 h 时, 随青霉素预处理时间的增加, 曲线下降, 透光率增大。24 h 时曲线下降至最低点, 透光率最大, 表明预处理时间为 24 h 时溶菌酶对细胞壁的破壁作用最强。而超过 30 h 之后曲线又逐渐上升, 说明预处理时间过长, 又会降低破壁效果, 故选择 24 h 为最佳预处理时间。5.0 mg/L 的青霉素预处理比 1.6 mg/L 的青霉素更有利于原生质体的形成。

2.4 融合子的检出及稳定性检验

2.4.1 融合子的检出 将供试菌株的原生质体经 PEG 处理后, 接入到含有 100 mg/L 青霉素和 50 mg/L 链霉素的 YMA 选择性高渗培养基上, 28 培养 3 d 后, 结果长出菌落, 初步表明其在分类地位上属于 *S. inorhizobium* 属, 寄主为苜蓿的 102F28 与属于 *M. esorhizobium* 属, 寄主为鹰嘴豆的 USDA 3383 间发生了融合现象。

2.4.2 融合子稳定性的检验 初步得到的融合子, 在非选择条件下经 10 次传代后, 接入到青霉素和链霉素抗性培养基中。结果经过传代后的融合子仍能在双亲抗性培养基中正常生长, 说明双亲菌株经过融合后产生了稳定的融合子。

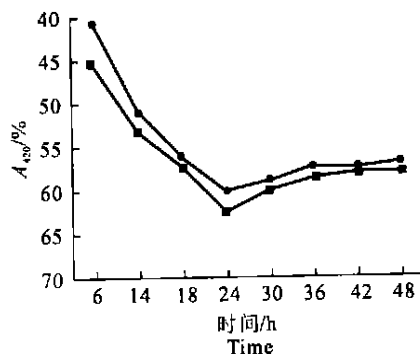


图 4 不同青霉素处理时间 USDA3383 对溶菌酶的敏感性

Fig. 4 Effect of penicillin pre-treatment time on sensitivity of USDA3383 cell to lysozyme

—○— 1.6 mg/L; —●— 5.0 mg/L

2.5 融合子及亲本菌株的形态特征

将融合子与亲本菌株经革兰氏染色、镜检, 均为革兰氏阴性菌。在 19 000 倍的电镜下, 观察细胞形态, 并测量其大小, 结果见表 2 和图 5。

表 2 融合子及亲本菌株的细胞大小

Table 2 Size of cell of parents and fusion hybrid μm

菌株 Strains	长 Length	宽 Width	荚膜厚 Capsule thickness
102F28	2.84	0.26	0
融合子 Fusion hybrid	1.47	0.28	0.68
USDA 3383	0.97	0.58	0.11

由表 2 和图 5 可以看出, 融合子与其亲本菌株在细胞形态和大小上存在着一定的差异。102F28 细胞形态为长杆状, USDA 3383 为粗杆状。其融合子细胞长度介于两个亲本菌株之间, 而宽度与 102F28 菌株相近。在荚膜厚度上融合子与亲本菌株之间的差别非常明显, 102F28 菌株几乎没有明显的荚膜, USDA 3383 菌株荚膜层厚度仅有 0.11 μm 左右, 而融合子荚膜厚度达 0.68 μm 左右。

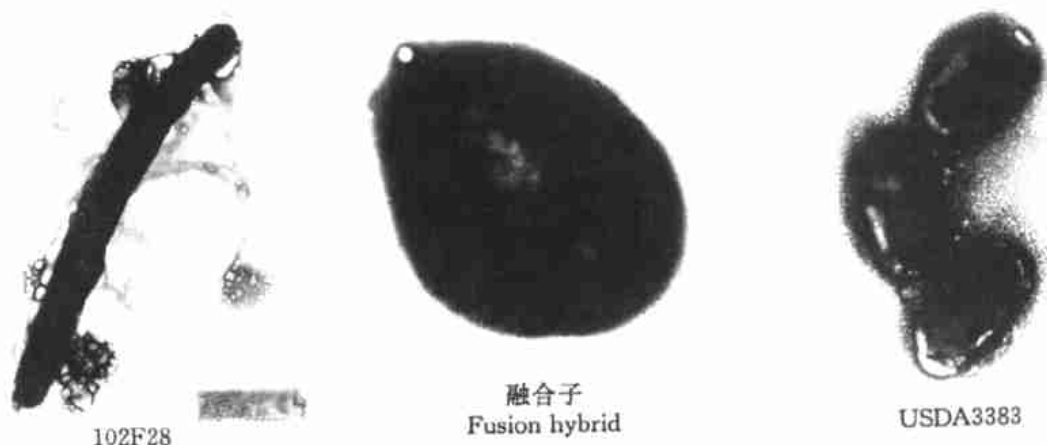
图 5 融合子及亲本菌株的电镜照片 ($\times 19\ 000$)

Fig. 5 Cell electron micrographs of parents and fusion hybrid

2 6 结瘤试验结果

为了考察融合子能否扩大亲本菌株的结瘤范围。笔者将融合子分别回接于两个亲本菌株所属的豆科植物。经水培回接试验, 结果见表 3。

表 3 3 个菌株的结瘤试验及固氮酶活性

Table 3 The results of inoculation in legum inous plant of three stains and ezym ic activity of N -fixation						
植 物 Plants	102F28		融合子 Fusion hybrid		U SDA 3383	
	结瘤情况 Situation of inoculation	酶活/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) Enzym ic activity	结瘤情况 Situation of inoculation	酶活/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) Enzym ic activity	结瘤情况 Situation of inoculation	酶活/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) Enzym ic activity
苜 蓿 Meliloti	Y	16 3	Y	16 5	N	/
鹰嘴豆 Ciceri	N	/	Y	12 4	Y	6 84

注: “Y ”表示能结瘤; “N ”表示不能结瘤。
Note: “Y ”indicating inoculation; “N ”indicating no inoculation

由表 3 可见, 102F28 可在原寄主苜蓿上结瘤, 其固氮酶活性为 $16.3 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$, 而不能在鹰嘴豆上结瘤。U SDA 3383 可在原寄主鹰嘴豆上结瘤, 其固氮酶活性为 $6.84 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$, 而不能在苜蓿上结瘤。102F28 与 U SDA 3383 的融合子在苜蓿和鹰嘴豆上均可结瘤。根瘤大小约 1.5 mm , 颜色为粉红色, 其在苜蓿和鹰嘴豆植株上产生的根瘤固氮酶活性分别为 16.5 和 $12.4 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 。融合子与 102F28 的固氮酶活性差异不大, 但比 U SDA 3383 的固氮酶活性提高了 $5.56 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 。表明发生融合后其融合子的结瘤范围得以扩大。

2 7 SDS-全细胞可溶性蛋白电泳分析

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 分析了融合子及其亲本菌株的全细胞可溶性蛋白质组分, 电泳图谱结果见图 6。

从图 6 中可以看出, 融合子及其亲本菌株 102F28 和 U SDA 3383 在蛋白质电泳图谱上存在着一定的差异。102F28 和 U SDA 3383 分别属于 *S inorhiz obium* 属和 *M esorhiz obium* 属, 蛋白质电泳图谱差异非常明显。融合子与 U SDA 3383 图谱差异很大, 而与 102F28 图谱很相近, 但仍有 2 条带不同。说明原生质体发生融合后菌株的蛋白质组分产生了一定的变化。

2 8 DNA-DNA 杂交

采用复性速率法, 利用计算机得出 DNA 样品的复性速率, 根据 DNA 同源性计算公式, 求出融合子与亲本菌株以及亲本菌株之间的 DNA 同源性, 其结果见表 4。

表 4 融合子及亲本菌株的 DNA 同源性
Table 4 The levels of DNA homology between parents and fusion hybrid %

菌 株 Strains	102F28	融合子 Fusion hybrid	U SDA 3383
102F28	100	90.8	56.6
融合子 Fusion hybrid	90.8	100	15.2
U SDA 3383	56.6	15.2	100

由表 4 可以看出, 102F28 和 U SDA 3383 是两个不同的根瘤菌菌种, 其 DNA 同源性为 56.6%, 小于 70%。融合子与 U SDA 3383 的 DNA 同源性很低, 为 15.2%, 而与 102F28 的 DNA 同源性高达 90.8%。DNA 同源性以 70% 作为根瘤菌定种的标准, 大于 70% 为同一个种, 小于 70% 为不同种^[6]。融合子与 U SDA 3383 的 DNA 同源性小于 70%, 而与 102F28 的 DNA 同源性大于 70%, 故融合子应该属

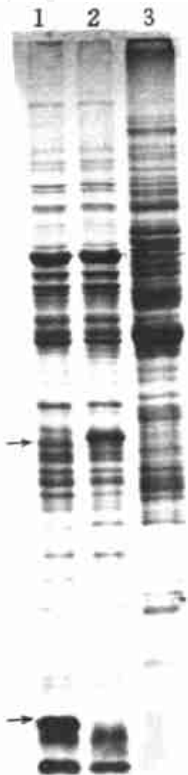


图 6 融合子与亲本菌株的蛋白电泳图谱
1. 102F28; 2. 融合子; 3. U SDA 3383
Fig 6 Electropherogram of whole-cell protein of parents and fusion hybrid
1. 102F28; 2. Fusion hybrid; 3. U SDA 3383

于 *S inorhizobium meliloti*。原生质体发生融合后, 染色体 DNA 发生了一系列的变化, 出现了 DNA 的交换、重排现象。融合子保留 102F28 染色体 DNA 的成分很多。此结果与全细胞蛋白电泳分析结果具有很好的一致性。

[参考文献]

- [1] 辛明秀, 马玉娥 微生物的原生质体融合及应用[J]. 微生物学通报, 1995, 22(6): 365- 370
- [2] 张克旭, 陈 宁, 张永志, 等. 用原生质体融合技术选育谷氨酸高产菌[J]. 微生物学报, 1991, 31(2): 108- 114
- [3] 周平贞 豆科植物结瘤试验水培法介绍[J]. 中国油料, 1979, (2): 60- 62
- [4] 韦革宏, 陈文新, 朱铭栽 根瘤菌新类群的全细胞蛋白电泳及DNA-DNA 杂交[J]. 西北大学学报(自然科学版), 1998, (5): 1- 5
- [5] 韦革宏, 陈文新, 朱铭栽 木蓝根瘤菌的 16S rDNA 全序列分析及DNA-DNA 杂交[J]. 遗传学报, 2000, 27(11): 1027- 1032
- [6] Chen W X, Tan Zh Y, Gao J L, et al Description of *Rhizobium Hainanense* sp nov isolated from tropical legumes[J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(3): 870- 873

Study on fusion of protoplasts from *S inorhizobium meliloti* and *M esorhizobium ciceri*

WEI Ge-hong¹, ZHUM in-e¹, GUO Jie¹, CHEN Wen-xin²

(1 College of Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Streptomycin and penicillin were regarded as the sign of resistance to antibiotics of *S inorhizobium meliloti* 102F28 and *M esorhizobium ciceri* U SDA 3383 respectively. Using the protoplast fusion technique, 102F28 and U SDA 3383 were successfully fused. Fusion hybrid can inoculate in the leguminous of parental strains respectively. There were apparent differences between parents and fusion hybrid in cell morphology, and pattern of whole-cell protein. The values of DNA homology between fusion hybrid and 102F28 and U SDA 3383 were 90.8% and 15.2% respectively.

Key words: Protoplast fusion; *S inorhizobium meliloti*; *M esorhizobium ciceri*