

红豆草根瘤菌的耐盐和共生性状改造

朱晓玉 杨苏声 李季伦

(生物学院)

摘要: 本实验以 042B 的 DNA 转化 ROG31 细胞, 在以 0.2 mol/L NaCl 为选择标记的 YMA 培养基上, 获得 37 个耐盐的菌落, 纯化后又经 30 代的转管移植, 有 8 株转化子获得了稳定的耐盐性, 再将这 8 株转化子回接红豆草植株, 得到 1 株耐 0.4 mol/L NaCl 和固氮能力较好的红豆草根瘤菌 RO16。供体菌 042B 和转化子 RO11 和 RO16 在 0.3 mol/L NaCl 培养基中生长时, 细胞内积累大量谷氨酸。

关键词: DNA 转化; 耐盐性; 红豆草根瘤菌

中图分类号: Q939.114; Q933

红豆草 (*Onobrychis viciae folia*) 是多年生豆科草本植物, 近年来作为一种优良牧草在我国各地大量引种, 尤其在西北和北方干旱、半干旱地区, 栽培面积逐年扩大^[1]。该牧草耐旱, 抗瘠薄, 生长快, 适于作为饲草。然而, 它在共生过程中获得的氮素难以满足本身生长需要^[2], 如要获得高产, 仍需施用一定数量的化肥。这对大面积栽培的豆科牧草来说, 无疑是一个缺陷。1979 年, Major 等报道^[3], 红豆草根瘤菌的固氮活性大大低于苜蓿根瘤菌。因此, 红豆草根瘤菌的固氮能力差是造成红豆草植株对外界氮素具有一定依赖性的原因之一。另一方面, 红豆草主要栽培在我国西北和北方地区, 干旱和高浓度盐对根瘤菌在土壤中的生存产生不利的影响^[4,5], 因此, 提高红豆草根瘤菌的结瘤固氮性能及其抗逆性是很有必要的。

由于 DNA 转化实验在大豆根瘤菌、苜蓿根瘤菌、豌豆根瘤菌和羽扇豆根瘤菌等均有成功的报道^[6-9] 而且苜蓿根瘤菌具有相当高的耐盐性和优良的共生效应, 所以, 我们试图采用 DNA 转化方法, 将其总 DNA 片段转移至红豆草根瘤菌株, 从而选出耐盐高效的红豆草根瘤菌株, 用于接种, 以提高固氮效能。

1 材料和方法

1.1 菌株 红豆草根瘤菌 ROG31 是一株分离自甘肃省红豆草根瘤的菌株, 对盐敏感, 在含有 0.1 mol/L NaCl 的 YM 培养液中不生长, 而且固氮能力差。苜蓿根瘤菌 042B 在含有 0.8 mol/L NaCl 的 YM 培养液中可以生长, 结瘤固氮能力也很强。

1.2 培养基 YMA 培养基和 YM 培养液^[10], TY 培养基^[6], 感受态培养基, 基本培养基和水培培养液分别参照文献 [9,11,12]。

1.3 DNA 的提取及转化 将供体菌 042B 转入 TY 培养液, 28°C 振荡培养, 在对数生长期后期收集细胞, 参照 Saito 等的方法^[13] 提取 DNA。

将受体菌 ROG31 接种在 TY 培养液中, 28°C 振荡培养 24 h 后, 4000 r/min 离心 15

min, 收集菌体, 洗涤, 弃上清液。加 TY 培养液悬浮菌体, 28℃ 振荡培养 5 h, 离心收集菌体, 洗涤, 弃上清液, 加入 1 mL 感受态培养基悬浮菌体。取一管菌液计数, 将 1 mL 菌液稀释成 10^{-5} , 10^{-6} 和 10^{-7} , 作平皿菌落计数。其余管静置于 28℃, 在 60 min 时取样加入 DNA 液, 使其 DNA 最终浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$, 在 28℃ 振荡培养 30 min, 取出, 再加入 1 mL TY 培养液, 28℃ 振荡培养 72 h, 进行转化。

本实验以 $0.2 \text{ mol}/\text{L}$ NaCl 作为转化的选择标记。将经过转化处理的菌液和不加 DNA 的受体菌 ROG31 菌液各取 0.1 mL, 取供体菌 042B 的 DNA $50 \mu\text{L}$, 分别涂在含有 $0.2 \text{ mol}/\text{L}$ NaCl 的 YMA 培养基平板上, 28℃ 培养。

1.4 代时和耐盐性的测定 按文献 [11] 进行。

1.5 结瘤试验 采用培养管法^[10], 培养基成分见文献 [12]。

1.6 细胞内游离氨基酸含量的测定 方法见 Yap 等^[13]。

2 结果

2.1 供体菌和受体菌的选择 测定供体菌 042B 和受体菌 ROG31 的代时, 耐盐性和结瘤固氮能力, 表明它们有显著差异。

表 1 042B 和 ROG31 的主要特征

Table 1 Main characteristics of strain 042B and ROG31

菌株 Strain	代时 Generation time t/h	耐盐性 Salt tolerance mol. L NaCl	显瘤时间 Time of appearance of nodules t/d	固氮酶活性 Specific nitrogenase activity $\text{nmolC}_2\text{H}_4 \cdot (\text{mg nodules})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
042B	2.0	0.8	12.0	51.0
ROG31	3.6	0.05	30.0	3.3

042B 和 ROG31 均为快生型根瘤菌 (表 1)。但是, ROG31 对盐十分敏感, 固氮酶活性也很低, 而 042B 耐高浓度盐, 结瘤和固氮能力都比 ROG31 强。所以, 042B 是一个优良的供体菌, 适于改造红豆草根瘤菌。

2.2 转化子的获得 从 042B 提取 DNA, 测得其浓度为 $1.43 \text{ mg}/\text{mL}$, 并测得 OD_{260} 和 OD_{280} 之比为 1.8, 表明所提的 DNA 较纯。

将 042B 的 DNA ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 转化 ROG31, 然后把转化菌液涂在含有 $0.2 \text{ mol}/\text{L}$ NaCl 的 YMA 培养基平板上, 并将供体菌 DNA 和受体菌分别涂在同样的平板上作对照。2 天后检查, 2 组对照均未出现菌落, 但在每个转化皿上平均出现 36 个菌落。而且, 受体菌 ROG31 稀释活菌计数为 $9.6 \times 10^6/\text{mL}$, 所以, 转化频率为 3.75×10^{-6} 。

2.3 转化子的耐盐性测定和代时 从含有 $0.2 \text{ mol}/\text{L}$ NaCl 的 YMA 平板上挑取 37 株转化子, 纯化后连续在 YMA 斜面转 30 代, 然后在含有 $0.2 \text{ mol}/\text{L}$ NaCl 的平板上检查其耐盐性, 发现仅有 8 株转化子仍保持耐盐性, 其余 29 株则在 $0.2 \text{ mol}/\text{L}$ NaCl 条件下不能生长, 失去了耐盐性。将上述 8 株转化子接种在不同盐浓度的 YM 培养液中, 其中 5 株可在 $0.8 \text{ mol}/\text{L}$ NaCl 条件下生长, 另外 3 株只能在 $0.4 \text{ mol}/\text{L}$ NaCl 中生长。

在不同盐浓度的 YM 培养液中, 测定 042B, ROG31 和转化子 ROt1, ROt6 的代时 (表 2), 说明: ① 转化子获得了供体菌的耐盐性, 但程度不同; ② 转化子在不加盐条件下, 其生长速度与受体菌相同。

表2 供体菌、受体菌和转化子的代时

Table 2 Generation time of donor, recipient and transformants

耐盐性 Salt tolerance, mol / L NaCl	代时 Generation time, t / h			
	042B	ROG31	ROt1	ROt6
0.0	2.0	3.6	3.6	3.2
0.2	2.3	—	5.1	4.1
0.4	4.1	—	6.3	12.3
0.6	6.7	—	7.5	—
0.8	17.9	—	16.5	—

2.4 转化子的结瘤试验 为了验证转化子的结瘤和固氮能力, 挑选10株转化子回接红豆草“长城1号”, 分别以供体菌、受体菌回接红豆草, 以供体菌回接苜蓿, 并设不接菌对照, 观察结瘤结果。

表3 供体菌、受体菌和转化子的结瘤试验

Table 3 Nodulation experiments of donor, recipient and transformants

寄主 Host	菌株 Strain	耐盐性 Salt tolerance, mol / L NaCl	显瘤时间 Time of appearance of nodules, t / d	瘤数 Nodule number	固氮活性 Specific nitrogenase activity nmol C ₂ H ₄ · (mg nodules) ⁻¹ · h ⁻¹
红豆草 Sainfoin	ROt1	0.8	—	—	—
	ROt2	0.8	—	—	—
	ROt3	0.8	—	—	—
	ROt4	0.8	—	—	—
	ROt5	0.8	—	—	—
	ROt6	0.4	25~30	15	10.5
	ROt7	0.4	30~37	12	6.5
	ROt8	0.4	30~36	12	4.1
	ROt9	0.0	30~36	12	3.1
	ROt10	0.0	30~37	12	3.5
	ROG31	0.0	30~37	11	3.5
	042B	0.8	—	—	—
	不接菌对照	—	—	—	—
苜蓿 Alfalfa	042B	0.8	7~12	4	47.3

注: 本试验重复3次, 每次各回接5个植株。

从表3可知, 获得耐盐性的转化子的共生特性发生了改变。耐0.8 mol / L NaCl的ROt1~5号菌株均不形成根瘤, 说明它们在获得高耐盐特性后丧失了结瘤能力。在耐0.4 mol / L NaCl的ROt6~8号菌株中, 其固氮酶活性均有不同程度的提高。其中ROt6是一株较为优良的耐盐转化子, 其显瘤时间比受体菌提早5~7 d, 而且固氮酶活性也比受体菌提高了2倍。不耐盐的2株转化子ROt9和ROt10的共生特性与受体菌无显著差

异。从所结的根瘤中分离上述转化子，再回接红花草植株，其耐盐性及结瘤固氮效能不变。

表 4 NaCl 浓度对 042B 和转化子 ROT1 和 ROT6 细胞内游离氨基酸组成的影响

Table 4 Effect of sodium chloride on the intracellular free amino acid composition of strain 042B and its transformants ROT1, ROT6

氨基酸 Amino acid	氨基酸浓度 Amino acid concentration / nmol · (mg protein) ⁻¹					
	042B		ROT1		ROT6	
	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3
	mol / L NaCl		mol / L NaCl		mol / L NaCl	
天门冬氨酸 Asp	—	—	—	—	0.95	—
苏氨酸 Thr	7.19	13.96	8.88	15.89	7.90	5.06
谷氨酸 Glu	26.06	228.9	26.72	151.29	17.99	56.44
丝氨酸 Ser	—	—	—	—	1.18	—
甘氨酸 Gly	0.75	3.08	3.00	1.58	0.77	2.02
丙氨酸 Ala	5.63	30.86	9.49	26.46	9.58	—
半胱氨酸 Cys	1.06	1.19	1.15	1.80	1.32	2.11
缬氨酸 Val	4.02	7.59	3.84	9.70	3.37	5.25
异亮氨酸 Ile	1.57	2.85	—	3.52	1.11	0.94
亮氨酸 Leu	0.72	—	—	1.05	—	—
酪氨酸 Tyr	1.33	1.44	2.87	1.92	1.61	1.88
苯丙氨酸 Phe	1.52	0.91	3.63	1.03	2.49	3.13
赖氨酸 Lys	1.99	1.40	—	3.21	—	2.85
精氨酸 Arg	—	—	—	1.54	1.05	—
游离氨基酸总含量	51.84	291.7	59.63	218.99	49.32	76.68
Total free amino acid						
谷氨酸所占百分数比例 % as glutamate	50.2	78.3	44.8	69.1	36.4	70.8

2.5 细胞内游离氨基酸含量分析 042B、ROT1 和 ROT6 生长在含有 0.3 mol / L NaCl 的基本培养液中，细胞内的游离氨基酸大量积累，尤其是谷氨酸特别明显（表 4）。042B 在无 NaCl 的条件下，其游离谷氨酸含量为 26.06 nmol / mg 蛋白，占游离氨基酸总量的 50.2%；在 0.3 mol / L NaCl 条件下，游离谷氨酸急剧上升为 228.9 nmol / mg 蛋白，占总量的 78.3%。ROT1 在无 NaCl 时，游离谷氨酸水平为 26.72 nmol / mg 蛋白，占总量的 44.8%；在 0.3 mol / L NaCl 浓度下高达 151.29 nmol / mg 蛋白，占总量的 69.1%；ROT6 在无 NaCl 时，游离谷氨酸浓度为 17.99 nmol / mg 蛋白，占总量的 36.4%；在 0.3 mol / L NaCl 浓度下则为 56.44 nmol / mg 蛋白，占总量的 70.8%。

3 讨论

对根瘤菌耐盐性状的转化，仅在大豆根瘤菌株 RT19 和 USDA110 有过报道^[6]。本实验首次将与耐盐和共生有关的性状从苜蓿根瘤菌 042B 转移至红花草根瘤菌 ROG31，得到既耐盐、共生效能也较高的转化子 ROT6，该菌株可在 0.4 mol / L NaCl 条件下生长，固氮酶活性比受体菌高，显瘤时间也提早，是一株具有应用前景的红花草根瘤菌，还有待进一步作田间实验。

本实验共选取 37 株耐盐转化子，其中 29 株经连续转 30 代后，又回复成不耐盐的菌

株, 约占 78%。在大豆根瘤菌的转化实验中, 也约有 64% 的转化子在回接寄主后失去耐盐性⁽⁶⁾。可见, 耐盐性状在大部分转化子中很不稳定。只有当控制耐盐性状的基因稳定地整合到受体菌的染色体上后, 耐盐性状才是稳定的。在获得耐盐性的 8 株转化子中, 能耐 0.8 mol/L NaCl 的 5 株转化子失去结瘤性状, 成为不结瘤的突变菌株, 而耐 0.4 mol/L NaCl 的 3 株转化子均能结瘤固氮, 并且共生效率有所提高。可见, 耐盐性状的转化, 会导致根瘤菌共生固氮特性的改变。

转化子 ROT1 和 ROT6 在 0.3 mol/L NaCl 条件下, 其细胞内游离谷氨酸含量急剧提高。这个现象与苜蓿根瘤菌⁽¹⁶⁾、快生型大豆根瘤菌⁽⁶⁾和其他耐盐的根瘤菌是相同的, 说明红豆草根瘤菌的转化菌株已获得了苜蓿根瘤菌的耐盐性状, 也说明谷氨酸是根瘤菌的渗透调节物质。

本实验表明, 在对某种根瘤菌的遗传背景尚不十分清楚的情况下, 采用 DNA 转化对根瘤菌的耐盐和共生性状进行转移, 加以改造, 不失为一种简便有效的方法。耐盐高效大豆根瘤菌的构建已经证明了这点⁽⁶⁾。

参 考 文 献

- 1 宁国赞等. 红豆草根瘤菌选育初报. 土壤肥料, 1985, (2): 45
- 2 Mejer D W. Yield, regrowth and persistence of sainfoin under fertilization. Agron J, 1975, 67: 439
- 3 Major D J. Estimating nodule activity of sainfoin, alfalfa and cicer milkvetch seedlings. Agron J, 1979, 71: 983
- 4 Yadav M K, Vyvas S R. Response of root-nodule rhizobia to saline, alkaline and acid condition. Indian J Science, 1971, 41: 875~881
- 5 Steinborn J, Roughly R J. Sodium chloride as a cause of low number of *Rhizobium* in legume inoculants. J Appl Bact. 1974, 37: 93~99
- 6 杨苏声等. 耐盐高效大豆根瘤菌株的构建. 微生物学报, 1989, 29(2): 107~112
- 7 Balassa G. Genetic transformation of *Rhizobium*: A review of the work of R. Balassa. Bacteriol Rev. 1963, 27: 228~241
- 8 Zelazna-Kowalska et al. Conditions for genetical transformation in *Rhizobium meliloti*. Acta Microbiol Polon, 1971, III (XX) 1~2, 21~28
- 9 Raina J L et al. Further studies on transformation in *Rhizobium*. J Gen Microbiol. 1971, 65: 161~165
- 10 Vincent M J. 上海植物生理研究所固氮组译. 根瘤菌实用研究手册. 上海人民出版社, 1970.
- 11 杨苏声等. 快生型大豆根瘤菌的耐盐机制和结瘤性状. 北京农业大学学报, 14(2): 143~148
- 12 周平贞等. 豆科植物结瘤试验——水培法介绍. 中国油料, 1979, 2: 60~62
- 13 Saito H et al. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. Biochim Biophys Acta, 1963, 72: 619~629
- 14 Yap S F, Lim S T. Response of *Rhizobium* sp. UMKL20 to sodium chloride stress. Arch Microbiol, 1983, 135: 224~228
- 15 Hua S S et al. Accumulation of amino acid in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to so-

dium chloride salinity. Appl Environ Microbiol.1982,44:135~140

- 16 Botsford J L.Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: inhibition of growth by salts. Arch Microbiol.1984, 137: 124~127

The Improvement of Salt Tolerance and Symbiotic Characteristics of Sainfoin Rhizobia

Zhu Xiaoyu Yang Susheng Li Jilun

(College of Biology)

Abstract: Rhizobium strain ROG31 isolated from the root nodules of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) in Gansu province is sensitive to 0.1 mol / L NaCl and less efficient in nitrogen fixation. Alfalfa rhizobium 042B can grow in YM liquid medium containing 0.8 mol / L NaCl, and has high activity of symbiotic nitrogen fixation. Thirty seven transformants were obtained by transforming the DNA from strain 042B into the cells of strain ROG31 and selected on YMA medium with 0.2 mol / L NaCl as selection marker. However, only eight transformants maintained stably the characteristics of salt tolerance after 30 transfers of the cultures. Inoculation experiments showed that the sainfoin rhizobium strain named ROT6 fixed nitrogen more efficiently and tolerated 0.4 mol / L NaCl. Intracellular free glutamate increased rapidly in strain 042B and transformant ROT1 as well as ROT6 grown on medium containing 0.3 mol / L NaCl.

Key words: DNA transformation; salt tolerance; sainfoin rhizobia