

## 豌豆根瘤菌与新疆中华根瘤菌原生质体的属间融合研究

韦革宏<sup>1\*</sup> 贺学礼<sup>1</sup> 郭 杰<sup>1</sup> 朱铭莪<sup>1</sup> 陈文新<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(西北农林科技大学资环学院,杨凌 712100)

<sup>2</sup>(中国农业大学生物学院,北京 100094)

**摘 要** 以青霉素和氯霉素分别作为 *Rhizobium leguminosorum* USDA2370 和 *Sinorhizobium xinjiangnesis* CCBAU110 的抗性标记。利用原生质体融合技术,成功地获得了 USDA2370 和 CCBAU110 的属间融合菌株。该融合菌株可分别在双亲寄主植物上结瘤。融合菌株在细胞形态、大小、菌落特征及蛋白质电泳图谱上与亲本菌株均有所不同。融合菌株与 USDA2370 的 DNA 同源率为 56.6%,而与 CCBAU110 的 DNA 同源率为 10.2%。

**关键词** 原生质体融合, 豌豆根瘤菌, 新疆中华根瘤菌

**中图分类号** Q939 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0534-05

原生质体融合技术不仅能使遗传基因高频率重组,而且可以集双亲的优良性状为一体。1977 年, Hopwood 等人通过原生质体融合进行了链霉菌的遗传重组<sup>[1]</sup>。70 年代以来,该技术被广泛应用到微生物育种方面。据报道,通过原生质体融合能产生两个亲本各自所产生的抗生素,并将亲本所产抗生素的产量提高。近年来,我国学者利用原生质体融合技术在提高谷氨酸产量、抗生素效价等方面也取得了许多进展<sup>[1]</sup>。

根瘤菌的结瘤及固氮具有一定的专一性,特定的根瘤菌只能与相应的豆科植物形成有效根瘤<sup>[2]</sup>。如何利用原生质体融合技术选育结瘤范围广、固氮酶活高的优良菌株,目前还未见报道。为此,我们以不同寄主来源,不同种的根瘤菌为材料,探索原生质体形成、再生及融合的条件和方法。

### 1 材料和方法

#### 1.1 供试菌株

*Rhizobium leguminosorum* USDA2370 寄主为野豌豆,来源于中国农业大学根瘤菌库;

*Sinorhizobium xinjiangnesis* CCBAU110 寄主为大豆,来源于中国农业大学根瘤菌库。

#### 1.2 培养基及有关试剂

YMA 高渗培养基: YMA 培养基 + 0.25 mol/L 丁二酸钠—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  $MgCl_2$ , pH7.0 灭菌。

新生磷酸钙:  $K_2HPO_4$  0.5g,  $CaCl_2 \cdot H_2O$  29.4g, 溶于 100mL 水中灭菌, 用时等体积混合。PEG 溶液: 40% PEG 8000 溶于 DF 稀释液中灭菌。

溶菌酶、DNA 酶: 华美生物有限公司。

#### 1.3 方法

**1.3.1 抗生素抗性标记的筛选:** 将青霉素、链霉素、红霉素、白霉素、卡那霉素、氯霉素和庆大霉素 7 种抗生素分别按 5 $\mu$ g/mL, 50 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL 和 300 $\mu$ g/mL 的终浓度加入到 YMA 培养基中, 倒平板, 接种 USDA2370 和 CCBAU110。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:** 参见文献[3]方法进行。

**1.3.3 原生质体的融合:** 供试菌株培养到对数期, 离心收集菌体, 用 DF 液洗 2 次, 再加入 1mg/mL 浓度的溶菌酶, 37℃保温 1h, 离心弃上清, 悬浮于含有 5 $\mu$ g/mL DNA 酶和 5mmol/L EDTA 的 DF 液中, 总体积为 4mL, 各取原生质体 1mL 充分混合。离心弃上清, 加含 5 $\mu$ g/mL DNA 酶的 40% 的 PEG 8000 至 4mL, 轻轻悬浮, 随后加入 0.05 倍体积的新生磷酸钙, 在紫外灯下 28cm 处照射 90s。保温 30min, 接种到 YMA 高渗培养基和 YMA 基础培养基上, 28℃培养 3d。

**1.3.4 根瘤菌的回接及固氮酶活测定:** 根瘤菌的回

收稿日期: 2001-01-17, 修回日期: 2001-05-22。

基金项目: 国家自然科学基金(3000005)和国家自然科学基金重点项目(39730010)资助。

\* 通讯作者。Tel: 86-29-7092133; Fax: 86-29-7082838; E-mail: weigh@public.xa.sn.cn

接采用水培法,固氮酶活测定采用乙炔还原法,参见文献[4]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、电泳及染色方法参见文献[5]。

**1.3.6 DNA-DNA 同源性分析:**采用复性速率法,在 Lambda Bio 20 型紫外分光光度计上由计算机控制,自动测定<sup>[6]</sup>。

2 结果和讨论

2.1 供试菌株的抗性鉴定结果

将供试菌株分别用青霉素、链霉素、红霉素、白霉素、卡那霉素、氯霉素和庆大霉素 7 种抗生素,以 5μg/mL,50μg/mL,100μg/mL 和 300μg/mL 4 个浓度梯度进行抗生素抗性试验,其结果见表 1。

表 1 供试菌株的抗性鉴定结果  
Table 1 Results of resistance to antibiotics of tested strains

Antibiotic Concentration (μg/mL)	CK	Penicillin				Chloromycetin				Kanamycin				Streptomycin			
		5	50	100	300	5	50	100	300	5	50	100	300	5	50	100	300
USDA2370	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CCBAU110	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

“+” Indicating resistance to antibiotics;  
“-” Indicating no resistance to antibiotics.

由表 1 可见,供试菌株对不同浓度的青霉素、氯霉素、卡那霉素和链霉素 4 种抗生素表现出不同的抗性。USDA2370 对青霉素(5~100μg/mL)和链霉素(5~50μg/mL)具有抗性,而 CCBAU110 却非常敏感。USDA2370 在含 5~300μg/mL 的氯霉素培养基上不能生长,而 CCBAU110 在含 5~50μg/mL 的氯霉素培养基上却能生长。因为微生物的抗药性是其菌种的特性,是由遗传物质决定的,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<sup>[1]</sup>。根据供试菌株抗性鉴定结果,100μg/mL 的青霉素和 50μg/mL 的氯霉素可分别作为 USDA2370 和 CCBAU110 的抗药性标记。

2.2 供试菌株经不同浓度青霉素处理后对溶菌酶的敏感性

经不同浓度青霉素处理后,分别加入 0.2 mg/mL、1mg/mL 浓度的溶菌酶,考察青霉素浓度对溶菌酶作用的敏感性,其结果见图 1,2。

由图 1,2 可见 1mg/mL 浓度的溶菌酶破壁效果比 0.2mg/mL 的强。因此,选择 1mg/mL 的溶菌酶比较理想。在 1mg/mL 溶菌酶作用下,随着青霉素浓度的升高,曲线呈下降趋势,原生质体的形成率增高。青霉素浓度在 0~0.8μg/mL 范围内,曲线下降幅度较小,说明青霉素浓度的增加对溶菌酶的作用影响不大;在 0.8~50μg/mL 范围内曲线迅速下降,透光率增大。当青霉素浓度达到 50μg/mL 后,基本呈一条直线。因此,选择 4.0μg/mL 的青霉素处理,

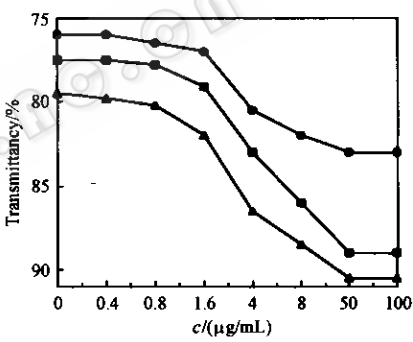


图 1 USDA2370 经青霉素处理后对溶菌酶的敏感性(600nm)  
Fig.1 Effect of penicillin pre-treatment on sensitivity of USDA2370 cell to lysozyme  
●—CK; ■—0.2mg/mL lysozyme; ▲—1.0mg/mL lysozyme

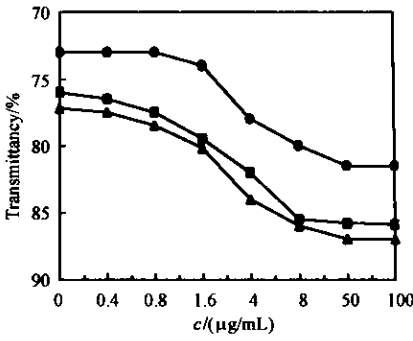


图 2 CCBAU110 经青霉素处理后对溶菌酶的敏感性(600nm)  
Fig.2 Effect of penicillin pre-treatment on sensitivity of CCBAU110 cell to lysozyme  
●—CK; ■—0.2mg/mL lysozyme; ▲—1.0mg/mL lysozyme

对菌体的生长虽有一定影响,但能增加溶菌酶对细胞壁的作用效果。

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 4.0μg/mL 和 1.6μg/mL 青霉素,考察预处理时间对增强溶菌酶敏感性的影响,结果见图 3,4。

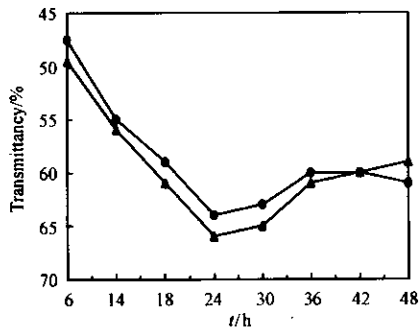


图 3 不同青霉素预处理时间 USDA2370 对溶菌酶的敏感性(420nm)

Fig.3 Effect of penicillin pre-treatment time on sensitivity of USDA2370 cell to lysozyme

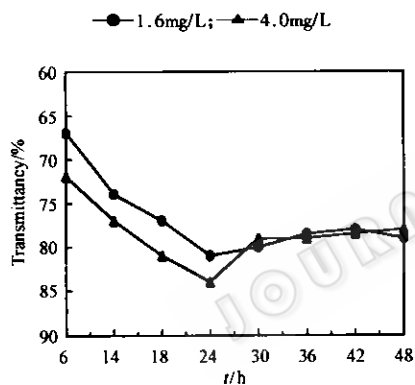


图 4 不同青霉素预处理时间 CCBAU110 对溶菌酶的敏感性(420nm)

Fig.4 Effect of penicillin pre-treatment time on sensitivity of CCBAU110 cell to lysozyme

由图 3,4 可见,6~24h 范围内,随着青霉素预处理时间的增加,曲线下降,透光率增大。24h 时曲线下降至最低点,透光率最大,表明预处理时间在此时溶菌酶对细胞壁的破壁作用最强。而超过 30h 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 24h 为最佳预处理时间。从图中还可以看出,在最佳青霉素预处理时间内选用浓度为 4.0μg/mL 的青霉素比 1.6μg/mL 的青霉素,更有利于原生质体的形成。

2.4 原生质体的形成率和再生率

根据供试菌株青霉素处理后和溶菌酶处理前,

在 YMA 培养基上的菌落数及溶菌酶处理后在高渗培养基和低渗培养基上的菌落数。计算出原生质体的形成率与再生率,结果见表 2。

表 2 原生质体的形成率和再生率

Table 2 Formation and regeneration of protoplasts

Strains/%	USDA2370	CCBAU110
Formation	75.0	96.0
Regeneration	20.0	6.3

由表 2 可见,USDA2370 原生质体的形成率为 75.0%,CCBAU110 原生质体的形成率高达 96.0%;USDA2370 原生质体的再生率为 20.0%,而 CCBAU110 原生质体的再生率为 6.3%。CCBAU110 原生质体的形成率很高而再生率却较低,其原因可能与细胞破壁过度有一定的关系。

2.5 融合菌株的检出及稳定性检验

2.5.1 融合菌株的检出:将供试菌株的原生质体经过 PEG 处理,接入到含有 100μg/mL 青霉素和 50μg/mL 氯霉素的 YMA 选择性高渗培养基上,28℃ 培养 2d 后,结果长出菌落,初步表明它们产生了融合菌株。USDA2370 分类地位上属于 *Rhizobium* 属,寄主为野豌豆;CCBAU110 属于 *Sinorhizobium* 属,寄主为大豆。二者属于不同的属,来源于不同的寄主。结果发生了原生质体的融合。

2.5.2 融合菌株稳定性的检验:初步得到的融合菌株经 5 次传代后,接入到青霉素和氯霉素抗性培养基中,发现经过传代后的融合菌株仍能继续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菌株。

2.6 融合菌株与亲本菌株的形态及菌落特征

将融合菌株与亲本菌株经革兰氏染色,镜检,均为革兰氏阴性菌。在 19000 倍的电子显微镜下,观察其形态,并测量细胞大小。结果见表 3 和图 5。

表 3 融合菌株及亲本菌株的细胞大小

Table 3 Size of cell of parents and fusion hybrid

Strains	USDA2370	Fusion hybrid	CCBAU110
Length	1.63	1.26	2.42
Wide	0.37	0.32	0.79
Capsule thick	0.21	0.42	0

由图 5 和表 3 可以看出:融合菌株与其亲本菌株在细胞形态和大小上存在着一定的差异。融合菌株细胞比两个亲本菌株均小,长度为 1.26μm 左右,

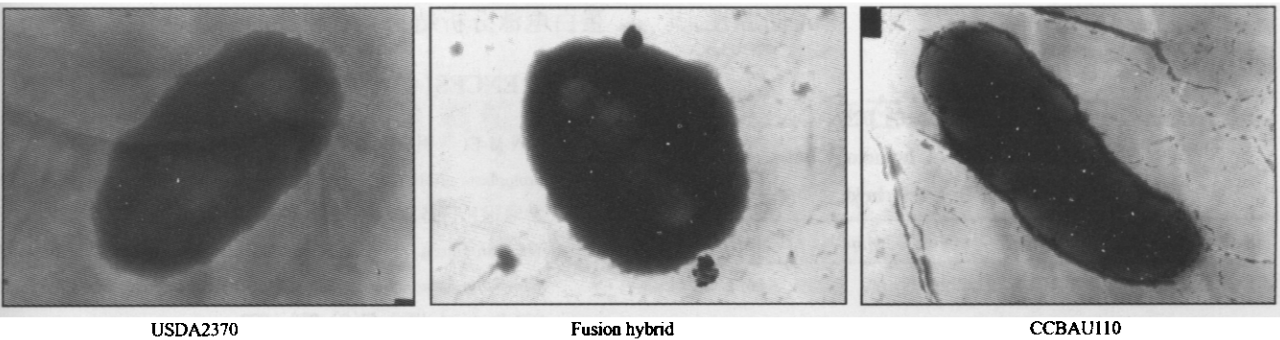


图5 融合菌株及亲本菌株的电镜照片(×19000倍)  
Fig.5 Cell electron micrographs of parents and fusion hybrid

较 USDA2370 稍短,却比 CCBAU110 短近一半;宽度与 USDA2370 相差不大,却比 CCBAU110 窄一半多。另外,CCBAU110 几乎没有荚膜,而融合菌株具有一层很厚的荚膜,厚度达 0.42μm 左右。

通过对融合菌株及亲本菌株菌落的观察,发现它们具有典型的根瘤菌菌落特征,表面光滑,湿润,粘稠,透明度较高,边缘整齐。但融合菌株与亲本菌株仍有较明显的差别。CCBAU110 菌落颜色发白,

USDA2370 稍透亮,而其融合菌株的菌落则具有很高的透明度,与其亲本差异较大。此结果与上述电镜观察中荚膜厚度与菌落透明度的关系是一致的。

**2.7 结瘤试验结果**

为了考察融合菌株与亲本菌株在结瘤方面的差异,以及融合菌株能否扩大亲本菌株的结瘤范围。我们将融合菌株分别回接于两个亲本菌株所属的豆科植物。经砂培回接试验,其结果见表 4。

表 4 结瘤试验结果及固氮酶活性  
Table 4 The results of inoculation in leguminous plant and enzymic activity of N-fixation

Plants	USDA2370		Fusion hybrid		CCBAU110	
	Inoculation	Activity	Inoculation	Activity	Inoculation	Activity
	situation	$/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	situation	$/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	situation	$/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$
<i>Biovar viceae</i>	Y	26.5	Y	28.2	N	/
<i>Glycine max</i>	N	/	Y	39.4	Y	37.8

“Y”: Indicating inoculation; “N”: Indicating no inoculation

由表 4 可见,USDA2370 可在原寄主野豌豆上结瘤,其固氮酶活性为 26.5μmol/(g·h),而不能在大豆上结瘤。CCBAU110 可在原寄主大豆上结瘤,其固氮酶活性为 37.8μmol/(g·h),而不能在野豌豆上结瘤。其融合菌株在野豌豆和大豆上均可结瘤。根瘤大小约 2mm 左右,颜色为粉红色,固氮酶活性分别为 28.2 和 39.4μmol/(g·h)。说明发生融合后其融合菌株的结瘤范围得以扩大,并且具有固氮能力。

**2.8 SDS-全细胞可溶性蛋白电泳分析**

蛋白质是基因表达的产物。根瘤菌细胞中可溶性蛋白种类较多,通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,可将各种蛋白质组分进行分离。为了研究融合菌株与亲本菌株蛋白质组分的异同,我们进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,结果见图 6。

从图中可见,融合菌株与亲本菌株 USDA2370 和 CCBAU110 在蛋白质组分上显示出一定的差异

性。USDA2370 和 CCBAU110 分别属于 *Rhizobium* 属和 *Sinorhizobium* 属,蛋白质电泳图谱差异较明显。融合菌株与 USDA2370 图谱更接近一些,但仍有 7~8 条带不同;融合菌株与 CCBAU110 也有一些条带相同。说明原生质体发生融合后菌株的蛋白质组分产生了变化。

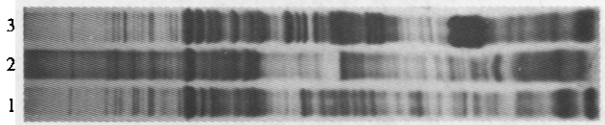


图 6 融合菌株与亲本的蛋白电泳图谱  
Fig.6 Patterns of whole-cell protein of parents and fusion hybrid  
1. USDA2370; 2. Fusion hybrid; 3. CCBAU110

2.9 DNA-DNA 同源性分析

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,求出融合菌

株与亲本菌株以及亲本菌株之间的 DNA 同源性,其结果见表 5。

表 5 融合菌株及亲本菌株的 DNA 同源性  
Table 5 The levels of DNA homology between  
parents and fusion hybrid

DNA homology/%	USDA2370	Fusion hybrid	CCBAU110
USDA2370	100	56.6	16.7
Fusion hybrid	56.6	100	10.2
CCBAU110	16.7	10.2	100

由表 5 可以看出:USDA2370 和 CCBAU110 是两个不同的根瘤菌菌种,其 DNA 同源性较低,为 16.7%。融合菌株与 USDA2370 的 DNA 同源性为 56.6%,而与 CCBAU110 的 DNA 同源性为 10.2%。DNA 同源性 70%作为根瘤菌定种的标准,大于 70%应为同一个种,小于 70%为不同的种<sup>[2]</sup>。融合菌株与亲本菌株的 DNA 同源性均小于 70%,但与 USDA2370 的 DNA 同源性较高。表明原生质体发生融合后,染色体 DNA 发生了一系列的变化,可能出现了 DNA 的交换、重排现象。融合菌株保留 USDA2370 染色体 DNA 的成分较多。此结果与全细胞

蛋白电泳分析结果具有较好的一致性。

REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] XIN M E(辛明秀),MA Y E(马玉娥). Application and fusion of protoplasts of Microbiology. *Chinese Journal of Microbiology*(微生物学通报),1995,22(6):365 ~ 370
- [ 2 ] Wen xin Chen, Zhi Yuan Tan, Jun Lian Gao *et al.* Description of *Rhizobium hainanense* sp. nov. isolated from tropical legumes. *Int J Syst Bacteriol*,1997,47(3):870 ~ 873
- [ 3 ] ZHANG KX(张克旭),CHEN N(陈宁),ZHANG YZH(张永志) *et al.* Breeding of easy-extracted high producing glutamate strain using the protoplast. *Chinese ACTA Microbiologica Sinica*(微生物学报),1991,31(2):108 ~ 114
- [ 4 ] ZHOU P ZH(周平贞).The introduction of water cultivate method of inoculation in leguminous plant. *Chinese oil plant*(中国油料),1979,2:60 ~ 62
- [ 5 ] WEI G H(韦革宏),CHEN W X(陈文新),ZHU M E(朱铭莪). SDS-PAGE of whole-cell protein of new rhizobia groups and DNA homology analysis. *Chinese Journal of Northwest University*(Natural Science Edition)(西北大学学报(自然科学版)),1998,5:1 ~ 5
- [ 6 ] WEI G H(韦革宏),CHEN W X(陈文新),ZHU M E(朱铭莪). Analysis of 16S rDNA sequence and DNA-DNA hybridization of rhizobia isolated from *Indigofera* sp., *Chinese Acta Genetic Sinica*(遗传学报),2000,27(11):1027 ~ 1032

Study on Intergenera Fusion of Protoplasts from *Rhizobium leguminosorum*  
and *Sinorhizobium xinjiangnesis*

WEI Ge-Hong<sup>1</sup>\* HE Xue-Li<sup>1</sup> GUO Jie<sup>1</sup> ZHU Ming-E<sup>1</sup> CHEN Wen-Xin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( College of Resources and Environment , Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

<sup>2</sup>( College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** Penicillin and chloromycetin were regarded as the sign-of resistance to antibiotics of *R. leguminosorum* USDA2370 and *S. xinjiangnesis* CCBAU110 respectively. Using the protoplast fusion technique, USDA2370 and CCBAU110 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, colony and pattern of whole-cell protein. The values of DNA homology between fusion hybrid and USDA2370 and CCBAU110 were 56.6% and 10.2% respectively.

**Key words** protoplast fusion, *Rhizobium leguminosorum*, *Sinorhizobium xinjiangnesis*

Received: January 17, 2001

This work was supported by Grant from the National Science Foundation of China (3000005 and 39730010).

\* Corresponding author. Tel:86-29-7092133; Fax:86-29-7082838; E-mail: weigh@public.xa.sn.cn