



湖北地区快生型大豆根瘤菌的质粒及结瘤基因的初步定位

沈 辉 曹 燕 珍

(武汉华中农业大学土化系)

摘要 从湖北省潜江县和监利县的 4 个采集点分离纯化 26 株快生型大豆根瘤菌。质粒分离分析结果表明: 所测快生型大豆根瘤菌中均有 1—3 条质粒带, 分子量范围在 50—300 Md 之间。

从 26 株快生型大豆根瘤菌中, 选出分属两个血清型的 5 个菌株, 依据根瘤菌 *nodABC* 基因在所有根瘤菌种中的结构同源性, 对快生型大豆根瘤菌的结瘤基因 (*nod*) 进行了初步定位, 其结果表明: R173、X143、B21、B2、D13 菌株的质粒 DNA 中没有与 *nodABC* 基因同源的片段存在, 而 R173、X143、B21、D13 菌株的总 DNA 中含有部分 *nodABC* 基因的 *EcoRI* 酶切片段分别为 15.96 kb、6.56 kb、3.70 kb; B2 菌株的总 DNA 中含有部分 *nodABC* 基因的 *EcoRI* 酶切片段分别为 51.94 kb、11.6 kb、6.56 kb、3.70 kb。

关键词 快生型大豆根瘤菌; 质粒; 结瘤基因

大豆是一种经济价值较高的油料作物, 长期以来, 研究豆科作物与根瘤菌之间的共生固氮作用, 以获得豆科作物廉价的氮素营养来源, 一直是人们所关心的问题。与大豆共生的根瘤菌有两类: 一种是中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 的根瘤菌, 按其生长的代时而言, 属于快生型大豆根瘤菌; 另一种是慢生型大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)。其中快生型大豆根瘤菌目前仅在亚洲一些国家分离得到, 是亚太地区农业生产所特有的固氮资源。这类根瘤菌不仅具有一定的固氮能力及竞争结瘤能力, 而且具有生长繁殖快、耐盐度高、抗逆性强, 以及能较广泛地利用碳源物质等特点^[1], 是一值得开发利用的固氮根瘤菌。对其遗传背景开展深入广泛地研究, 改良其遗传性状, 构建出快生、高效的固氮根瘤菌, 将会为农业生产提供最佳氮源。

本文以湖北地区的快生型大豆根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) 为模式, 对筛选到的 26 株快生型大豆根瘤菌的质粒背景进行了考察, 并且对不同来源的几株快生型大豆根瘤菌的结瘤基因 (*nod*) 进行了初步定位。

材 料 和 方 法

(一) 菌株及质粒 (表 1)

(二) 培养基及培养条件

1. TY 斜面培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 1 g, CaCl_2 0.2 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.0, 28℃, 培养 48 小时。用于根瘤菌菌株传代培养。

2. PA 液体培养基: 胰蛋白胨 4g, MgSO_4 0.5g, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.0, 28℃, 振荡过夜。用于根瘤菌分离质粒菌株培养。

3. 将用于提取总 DNA 的根瘤菌菌株, 先接种在 TY 液体培养基中活化培养, 28℃, 振荡过夜, 再转接 PA 液体培养基, 28℃, 培养 24 小时。

(三) 质粒 DNA 及总 DNA 分离

根瘤菌质粒 DNA 的分离方法是采用改良后的 Eckhardt 方法^[2]。根瘤菌总 DNA 的提取采用温和溶菌法^[3]。

(四) 酶切

EcoRI 酶购自华美生物工程公司, 缓冲液根据厂家推荐条件。每 μg DNA 用 10 个单位

表 1 根瘤菌菌株及质粒

菌株及质粒	质粒数目及分子量				有关性状	采集点及土壤性质				提供者
	≥200Md	90-200 Md	<90Md	总计		采集点	土类	土壤亚类	pH 值	
<i>S. fredii</i>					Nod+Nif+Fix+ (野生型)	监利县红星队	潮土	沙土型潮土	7.7-7.9	曹燕珍
R2	1	1		2						
R9	1	1		2						
R34	1	1		2						
R35	1	1	1	3						
R43		1		1						
L81	1	1		2						
K92		1		1						
R117	1	1		2						
R118	1	1		2						
R135		1		1						
R141	1			1						
R142	1			1						
R144	1			1						
R166	1			1						
R173	1	1		2						
X105	1		2	3	Nod+Nif+Fix+ (野生型)	监利县肖桥队	灰潮土	壤土型灰潮土	7.4-7.6	曹燕珍
X116	1			1						
X133		1	1	2						
X143	1	1	1	3						
D13	1	1		2	Nod+Nif+Fix+ (野生型)	监利县白螺区	淹育型水稻土	浅灰潮田	7.5	曹燕珍
B2		1		1	Nod+Nif+Fix+ (野生型)	潜江县李家岩	潮土	壤土型潮土	7.2-7.3	曹燕珍
B3	1	1		2						
B13	1	1	1	3						
B17	1	1		2						
B19	1	1		2						
B21	1	1	1	3						
USDA205 (CK)	1	1	1	3	Nod+Nif+Fix+ (野生型)					本室保存
质粒 pRmSL42					苜蓿根瘤菌的 nodABC 基 因克隆在 pBR325 上					本室保存

的 EcoRI 酶量进行酶切，37℃ 恒温水浴 2 小时，然后转入 68℃ 水浴保温 10 分钟，使酶切反应终止。

(五) DNA 印迹固定

质粒 DNA 在 0.65% 的琼脂糖凝胶上电泳后，在 2537 Å 紫外灯下照射 20—30 分钟，然后按照常规 Southern^[5] 转移法将质粒 DNA 转移固定到硝酸纤维素滤膜上。总 DNA 酶切片段在 0.60% 的琼脂糖凝胶上电泳后，直接按

照常规 Southern^[5] 转移法将 DNA 片段转移、固定。

(六) 分子杂交及放射性自显影

质粒 pRmSL 42 含有苜蓿根瘤菌 nodABC 基因片段，经 CsCl 密度梯度离心纯化后，按常规缺口转译法^[6]用 α³²PdCTP 标记，并用 Sephadex G50 柱纯化，用作 nod 基因探针。

DNA 的分子杂交方法见文献[6]。质粒 DNA 的预杂交温度为 37℃，杂交温度为

37℃, 洗脱温度为 50℃。预杂交液为: 50% 甲酰胺, 5×Denhard't 液, 5×SSPE 液, 200 μg/ml 单链 DNA, 0.1% SDS (十二烷基硫酸钠)。

总 DNA 酶切片段的预杂交温度为 42℃, 杂交温度为 42℃, 洗脱温度为 65℃, 预杂交液为: 50% 甲酰胺, 5×Denhard't 液, 5×SSPE 液, 200 μg/ml 单链 DNA, 0.5% SDS。

杂交后的滤膜, 放入带增感屏的暗盒中, 装上 X 光片, -70℃ 下, 总 DNA 酶切片段杂交放射自显影 4 小时, 质粒 DNA 杂交放射自显影 1 个月, 冲洗 X 光片, 观察结果。

结 果

(一) 快生型大豆根瘤菌的质粒

根瘤菌的质粒 DNA 由于具有分子量大, 拷贝数少, 易被剪切等特点, 给质粒 DNA 的提取带来一定的困难, 本试验采用在凝胶上直接裂解菌体、分离质粒的方法。结果表明: 从所有供试菌株中均分离出了质粒带, 见图版 I-1。其中从 USDA 205 中分离到三条质粒带, 已知这三条质粒带的分子量分别为 200 Md, 120 Md, 70 Md^[3], 以此作为分子量对照, 估测出供试菌株的质粒分子量范围在 50—300 Md 之间, 按其大小分为三类: 分子量大于 200 Md 的为巨大质粒; 分子量在 90—200 Md 之间的为大质粒; 分子量小于 90 Md 的为小质粒(表 1), 从表 1 结果可知: 所有被检测的菌株至少含有一条大质粒或巨大质粒。

(二) 质粒 DNA 与 nod 基因探针杂交

由于 nod ABC DNA 顺序在已研究过的根瘤菌中有很高的保守性^[9], 我们采用 $\alpha^{32}\text{P}$ 标记后的质粒 pRmSL 42 (含有苜蓿根瘤菌 nod ABC 基因)作为 nod 基因探针与 R173、X143、D13、B2、B21 菌株的质粒 DNA 进行分子杂交, 其中 R173、X143、D13 菌株属于 R2 血清型组的菌株, B2、B21 属于 B2 血清型组的菌株^[2]。杂交结果(见图版 II-2)表明: R173、X143、D13、B2、B21 菌株的质粒 DNA 带均未表现出与 nod 基因有同源性杂交, 说明 nod

基因不存在于质粒 DNA 上。对照菌株 USDA 205 的质粒 DNA 带与 nod 基因探针有杂交信号, 说明 nod 基因位于该菌株的质粒 DNA 上, 与 Masterson 等人^[4]的研究结果相符, 同时也表明本试验中 Southern 转移和分子杂交的结果是可信的。

(三) 总 DNA 酶切片段与 nod 基因探针的杂交

R173、X143、D13、B2、B21 菌株的总 DNA 的 EcoRI 酶切片段与 nod 基因探针杂交的放射自显影结果见图版 II-3, λ DNA 的 Hind III 酶切片段作为分子量对照。

从图版 II-3 中可以看出: R173、X143、B21、D13 菌株具有相同的杂交带型, 即有三个 EcoRI 片段上带有 nod 基因, 大小分别为 15.96 kb、6.56 kb、3.70 kb, 而 B2 菌株有 4 条 EcoRI 片段与 nod 基因探针有同源性, 大小分别为 51.94 kb、11.60 kb、6.56 kb、3.70 kb, 其中 R173、X143、B21、D13 菌株的 15.96 kb 片段和 B2 菌株的 11.60 kb 片段表现出强杂交信号(在同一菌株的杂交片段间进行比较), 其上可能带有完整的或大部分 nod ABC 基因片段, 是主要的同源性片段。6.56 kb 和 3.70 kb 片段的同源性在 5 株菌中均存在, 反映出快生型大豆根瘤菌的 nod 基因结构有相同的组成部分, 但个体之间也存在着差异。

讨 论

1. 快生型根瘤菌中普遍含有大质粒, 在已研究过的苜蓿根瘤菌、豌豆根瘤菌(包括菜豆生物型、三叶草生物型和野豌豆生物型)以及快生型大豆根瘤菌的菌株中都报道有大质粒的存在^[7], 因而认为大质粒的存在是快生型根瘤菌的组成特征之一, 本实验的结果也证实了这一点。

2. 从湖北省监利县红星大队、肖桥队、白螺区及潜江县的李家岩共 4 个采集点中, 分离纯化的 26 株快生型大豆根瘤菌分属两个血清型, 其中来自监利县三个采集点的共 20 株菌属 R2 血清型组, 来自潜江县李家岩的 6 株菌属于 B2

(下转第17页)

血清型组,从对这些菌株的质粒分析结果来看,来自同一血清型的菌株,其质粒谱带(即质粒带数及分子量大小)呈现出多样性,结合试验结果(三)来看,来自同一血清型的菌株,其 *nod* 基因的结构,也并非完全一致,如同属 B2 血清型的两个菌株 B2 和 B21,前者总 DNA 的 *EcoRI* 酶切片段中含有 *nod* 基因的片段大小分别为: 15.96 kb、6.56 kb、3.70 kb,而后者的同源性片段大小则分别为: 51.94 kb、11.60 kb、6.56 kb 和 3.70 kb。

3. 现有的研究结果表明: 快生型大豆根瘤菌共生基因的存在方式比较复杂,随菌株的不同而存在差异。已报道的菌中,如 USDA 205,其 *nod* 基因, *nif* 基因都位于大质粒上,而 USDA 194 的 *nod* 基因和 *nif* 基因则位于染色体上^[4]。但也有报道认为 USDA 194 的 *nif* 基因也位于 150 Md 的质粒上^[9]; USDA 206 的共生基因既位于染色体上也位于 197 Md 的大质粒和 1—2 个更小的质粒上^[10]。本实验结

果表明,供试的 5 株湖北省快生型大豆根瘤菌,其结瘤基因都不存在于质粒上而位于染色体上,该 5 株菌所表现出来的这一特性,是否是湖北省快生型大豆根瘤菌的共性,尚有待进一步研究。

参 考 文 献

1. 王常霖等: 遗传学报, 15: 25—33, 1988.
2. 石小岩等: 中国油料, 2: 56—59, 1989.
3. Yelton M M et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 129: 1537—1547, 1983.
4. Masterson R V et al.: *J. of Bacteriol.*, 163: 21—26, 1985.
5. Southern E M: *J. Mol. Biol.* 98: 503—517, 1975.
6. Maniatis T et al.: *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, New York 324—328, 1982.
7. Plazinski J et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 1001—1003, 1985.
8. Kondorosi A et al.: *Nitrogen Fixation Research Progress*, 73—78, 1985.
9. Broughton W J et al.: *Proc Natl. Acad. USA*, 81: 3093—3097, 1984.
10. Prakash R K et al.: *J. of Bacteriol.* 160:785—787, 1984.