

拮抗性大豆根瘤菌原生质体制备研究

王媛媛^{1,2}, 段玉玺², 陈立杰², 朱晓峰²

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 选用具有拮抗作用的根瘤菌 L396, 对影响该菌原生质体制备的几个重要因素进行了研究。结果表明: 制备原生质体的最佳菌龄为对数生长期, 培养液中加入 0.5% 青霉素可以促进原生质体的形成, 在溶菌酶浓度 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、酶解温度为 35°C 的情况下可以较快较好的产生原生质体, 同时显微观察了原生质体的释放过程。

关键词: 根瘤菌; 原生质体; 制备; 影响因素

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)01-0092-05

Protoplast Formation of Antagonistic Rhizobium

WANG Yuan-yuan^{1,2}, DUAN Yu-xi², CHEN Li-jie², ZHU Xiao-feng²

(1. Department of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; 2. Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: Several factors affecting the protoplasts formation of *Sinorhizobium. Fredii* with antagonistic to SCN and root rot of soybean were studied. The growth curve was determined and the optimum cell-age for protoplasts formation was in the logarithmic growth mid-phase, the maximum yield of protoplast was accelerated when pretreated by 0.5% penicillium in the culture medium, the optimum enzyme condition was digesting at 35°C with $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ lysozyme, the process of protoplasts release was observed using microscope. The foundation for genetic breeding of *S. Fredii* has been laid by using the protoplasts.

Key words: Rhizobium; Protoplast; Formation; Affecting factors

微生物原生质体融合技术是近 30 a 来国内外细胞工程领域的一个研究热点^[1]。目前原生质体融合技术在细胞生物学中迅速发展, 成为生物技术界颇受瞩目的研究领域, 也为实现 2 个具有不同遗传性状的菌株间的基因交换重组, 产生多种新基因型提供了重要技术手段。较高的原生质体形成率是原生质体融合成功的必要条件, 前人的研究表明, 不同细菌细胞壁成分是不同的, 所以不同菌株的原生质体制备的条件和影响因素也各不相同^[1]。

选择对大豆根腐病菌和胞囊线虫均有一定活性作用的根瘤菌菌株^[2], 从原生质体形成的几个影响因素入手, 详细探索了根瘤菌原生质体的制备条件, 为活性菌株的进一步选育优良菌株、改造等工作打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株 费氏中华根瘤菌 (*Sinorhizobium. fredii*) L396: 由沈阳农业大学植物保护学院线虫研究室分离保存, 该菌株对大豆根腐病菌具有一定的拮抗作用, 并且对离体大豆胞囊线虫具有微弱的毒力。

1.1.2 培养基 YMA 培养液: 甘露醇 10 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 硫酸镁 0.2 g, 氯化钠 0. g, 酵母浸出汁 0.4 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, 调 pH 7.2^[3]。

1.1.3 主要试剂及溶液 顺丁烯二酸: 天津市化学试剂一厂生产; 氯化镁: 天津市大茂化学试剂厂生产; 溶菌酶: 上海生工产品生产; 青霉素: 购于 BBI 公司生产; SMM 高渗透缓冲液: 蔗糖 0.5 mol, 顺丁烯二酸 20 nmol, MgCl_2 0.02 mol, pH 7.2, 蒸馏水: 1 000 mL, 高温灭菌 30 min 备用^[4]。溶菌酶溶液:

收稿日期: 2009-09-27

基金项目: 现代大豆产业技术体系资助项目; 沈阳农业大学青年教师科研基金资助项目 (20070210)。

第一作者简介: 王媛媛 (1978-), 女, 讲师, 研究方向为植物病害生物防治。E-mail: wyuanyuan1225@sohu.com。

通讯作者: 段玉玺, 教授, 博士生导师。E-mail: duanyx6407@163.com。

用SMM高渗透压缓冲液溶液配制成 $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度,用无菌的微孔滤膜(孔径微 $0.22\text{ }\mu\text{m}$)过滤除菌, -20°C 保存。

1.2 试验方法

1.2.1 出发菌株的生长曲线及对数生长期的确定

在装有 50 mL 的YMA培养液三角瓶中接入出发菌株L396新鲜菌苔1环,振荡培养 48 h ,作为后续试验的接种源,以排除生长量测定过程中由于接种量不同而造成的误差。取YMA培养液中含有出发菌株L396的细菌悬液 5 mL ,置于 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 28°C 摇床振荡培养,分别在 7 、 24 、 30 、 36 、 48 、 54 、 60 、 72 、 84 、 94 h 取出, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,弃上清,取各瓶的菌体干物质, 60°C 烘干,称重,再烘干,再称重,直至菌体重量保持不变。

1.2.2 青霉素浓度对细菌生长量的影响 在装有 50 mL 的YMA培养液三角瓶中接入出发菌株L396接种源细菌悬液 5 mL ,并加入不等体积的青霉素母液,分别至终浓度为 0.1% 、 0.2% 、 0.3% 、 0.4% 、 0.5% 、 0.6% 、 0.7% 。置于 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 28°C 摇床振荡培养, 72 h 后 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,弃上清,取各瓶的菌体干物质, 60°C 烘干,称重,再烘干,再称重,直至菌体重量保持不变。

1.2.3 敏感菌体的制备 取出发菌株L396接种源细菌悬液 5 mL 接种于 30 mL YMA培养液中,在 28°C 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h 。取 5 mL L396菌悬液接种到 30 mL 基本培养基中, $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 10 h 后,加入青霉素,使青霉素培养液中的终浓度分别达到 0.3% 和 0.5% ,原条件下继续培养,分别至菌株的对数培养期。将菌株的上述培养液用无菌水稀释约至 $10^8\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,取 5 mL 加入离心管中, $6000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min ,弃上清,管底菌体沉淀用SMM高渗缓冲液离心洗涤2次后,再用该缓冲液重新悬浮,并将离心管中的菌体轻轻敲打,使之充分分散, -20°C 保存备用。

1.2.4 原生质体的制备 在上述制备好的L396的高渗菌体悬浮液中加入溶菌酶,于 37°C 水浴锅中恒温培养,并在间隔一定时间取少量菌悬液,在 $100\times$ 油镜下观察原生质体获得释放的过程,并记录菌株释放的原生质体个数达到 10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的时间。制备完毕后,用差速离心法去除未去壁的残余菌体,即 $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min ,上清液重新移至新的无菌离心管中, $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,弃上清,底部油状的沉淀即为菌体在溶菌酶的作用下

去壁形成的原生质体,用SMM缓冲液重新悬浮备用。

1.2.5 酶解浓度对原生质体形成的影响 分别取菌悬液 5 mL ,加入溶菌酶母液,至终浓度达到 0.5 、 0.8 、 1.2 、 1.5 、 2.0 、 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,于 37°C 恒温水浴条件下酶解,每隔 15 min 用吸管缓慢吹吸2次,促使原生质体从菌体上脱离释放出来,分别在显微镜下计数,记录释放的原生质体个数达到 10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的时间。

1.2.6 酶解温度对原生质体形成的影响 取最适溶菌酶浓度处理细菌菌体,分别于 25 、 30 、 32 、 35 、 37 、 40 、 45°C 恒温水浴酶解,观察菌体细胞壁酶解情况,每隔 15 min 用吸管吹吸2次,促使原生质体从菌体中释放出来,分别在显微镜下计数,记录释放的原生质体个数达到 10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的时间。

1.2.7 菌龄对原生质体形成的影响 参考细菌生长曲线,在细菌菌体培养过程中,分别取对数生长前期、中期、后期及静止期的菌体用上述方法进行酶解,观察原生质体的释放。其它操作步骤同上,并在显微镜下计数,记录菌株释放的原生质体个数达到 10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的时间。

2 结果与分析

2.1 出发菌株的生长曲线及对数生长期的确定

采用干重法测定菌体的生长量,费氏中华根瘤菌L396在 28°C 培养 94 h ,取样 10 次,以时间为横坐标,以菌体重量为纵坐标,绘制生长趋势图,由图1可知,菌株L396在此培养条件下, $7\sim 32\text{ h}$ 为延迟生长期, $32\sim 42\text{ h}$ 为对数生长期,培养 60 h 后进入衰退期。

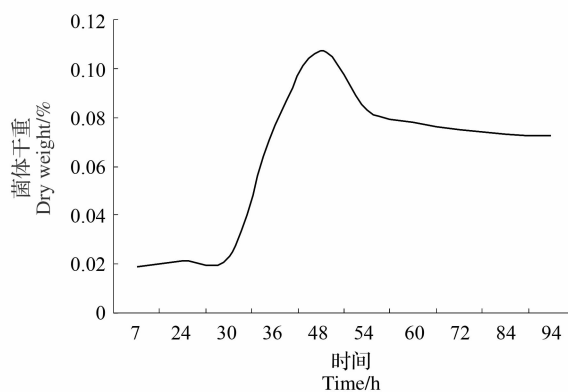


图1 *Sinorhizobium. fredii* 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Sinorhizobium. fredii*

2.2 青霉素浓度对细菌生长量的影响

在菌体的对数前期加入一定量的青霉素进行菌体预处理,使溶菌酶更易作用于细胞壁,增加脱壁效果^[5];但是青霉素本身可以通过抑制繁殖期细菌细胞壁的合成而发挥杀菌作用,对细菌的生长有一定的抑制作用,所以首先确定加入青霉素的量是一个关键问题。

通过干重法测定在培养液中加入不同青霉素含量对菌体生长量的影响,表明出发菌株 L396 加入的最适青霉素浓度为 0.5% (图 2)。且加入一定量的青霉素后,菌液的粘稠度降低,挂壁现象减少,菌体分散更加均匀。

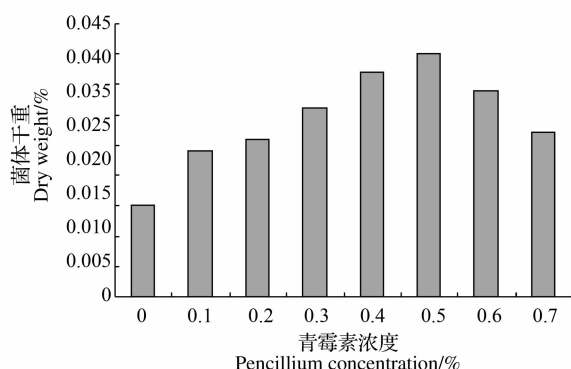


图 2 青霉素添加量对原生质体形成量的影响

Fig. 2 Effect of penicillin concentration on protoplast formation

2.3 酶浓度对原生质体形成的影响

在溶菌酶促使细菌细胞壁溶解释放原生质体的过程中,溶菌酶的浓度与形成原生质的数量和活性有非常密切的关系。随着溶菌酶浓度的增加,原生质体化的程度增加,但是酶溶液中各种杂酶的浓度也相应增加,对原生质体的毒害作用也越来越严重,影响原生质体的活性。并且细胞脱壁过于彻底,缺少细胞壁再生的引物,会使原生质体再生率降低^[6];同时酶的浓度增加,容易使菌体凝聚成团,减少单位菌体的表面积,同时也减小与酶液接触的面积,不利于原生质体的形成和释放。结果表明,出发菌株 L396 在酶浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,作用 30 min 可以使原生质体的浓度达到 10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ (图 3)。

2.4 酶解温度对原生质体形成的影响

溶菌酶作用于细菌细胞壁,细胞壁的降解属于酶促反应,因此酶解作用会受到温度的双重影响。一方面随着温度的不断升高,促进酶解反应,酶解速度加快,但如果温度过高,则会使溶菌酶发生钝化作用;另一方面,如果温度较低,则会使酶解时间过长。

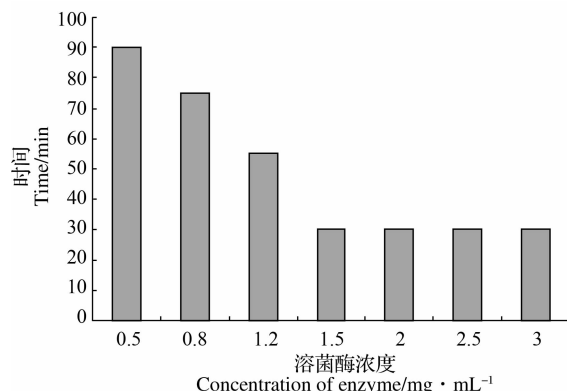


图 3 酶解浓度对原生质体形成量的影响

Fig. 3 Effect of the enzyme concentration on the protoplast formation

从而增加了酶中某些物质对原生质体的毒害作用,对原生质体造成伤害,进而影响原生质体的再生。结果表明,不同温度下,形成原生质体数量达到 10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的时间各有不同。结合对原生质体活性的影响,确定 35°C 作为该酶解反应的最佳温度 (图 4)。

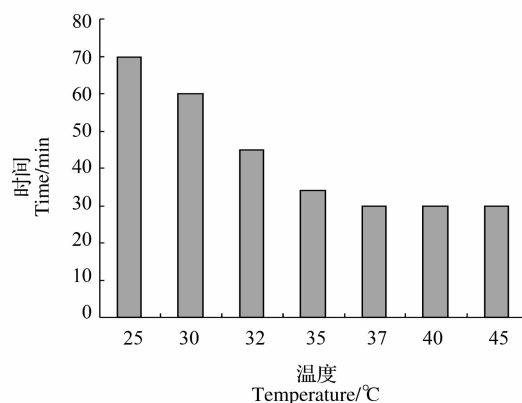


图 4 酶解温度对原生质体形成量的影响

Fig. 4 Effect of the hydrolyze temperature on the protoplast formation

2.5 菌龄对原生质体形成的影响

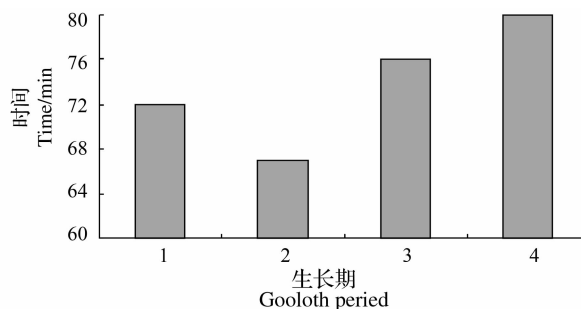
处于不同生长时期的菌体,都可以经过酶解而释放原生质体,但是形成原生质体的数量会有很大差异。在稳定期和衰退期,菌体逐渐老化,胞壁相对变厚,生理活性降低,制备生成的原生质体活性也会较低,再生能力差。处于对数生长期的菌体生理状态基本一致,代谢能力强盛,菌体活性比较高,细胞壁中肽聚糖含量低,对酶的敏感性强,有益于原生质体化而再生^[1]。

在研究中发现出发菌株处于对数生长期时,对

酶裂解液的敏感性、原生质体的产生量以及原生质体化的速度均明显高于静止期。但在整个对数生长期的前期、中期和后期,菌体原生质体化的速度相差不是很大,可能与整个对数生长期时间间隔较短有关。但是在试验中以使用对数生长中期的菌体为主(图5)。

2.6 出发菌株原生质体的释放过程观察

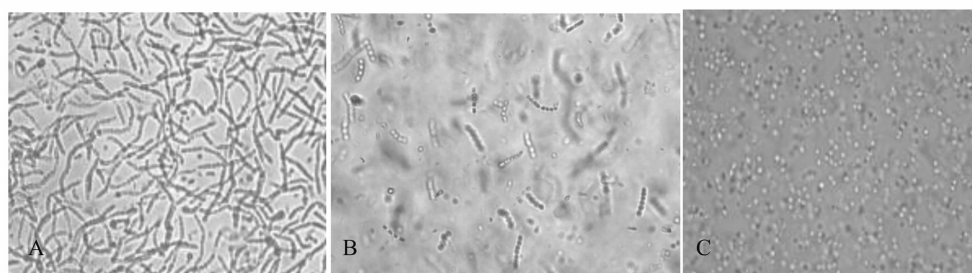
在稳定的高渗缓冲液中,细胞的细胞壁逐渐溶解,缓慢释放出球形的原生质体,并且与酶液接触的细胞壁的溶解速度相对较快(图6)。破壁形成的原生质体的体积往往比菌体略有膨大。经测量,L396原生质体直径为 $3.69\text{ }\mu\text{m}$ 。



1. 对数生长前期;2. 对数生长中期;3. 对数生长后期;4. 静止期
1. Logarithmic growth pre-phase, 2. Logarithmic growth mid-phase,
3. Logarithmic growth post-phase, 4. Stationary growth phase

图5 菌龄对原生质体形成量的影响

Fig. 5 Effect of cell-age on the protoplast formation



A. 细菌菌体 B. 细胞壁逐渐溶解 C. 原生质体
A. Thalli of bacteria B. Dissolve of cell wall C. Protoplast

图6 菌株 L396 原生质体释放过程的观察

Fig. 6 Releasing process of strain L396 protoplast

3 结论与讨论

自从1953年Weibull首次用溶菌酶酶解分离巨大芽孢杆菌的原生质体开始^[7],有关原生质体的研究随即迅速开展起来。目前,以原生质体为核心的多种操作技术已经建立,包括原生质体的制备、再生、诱变、融合等方面。无论是在基础理论研究还是在实际生产应用中,这些研究技术都发挥重要作用^[8]。

原生质体制备是微生物优良菌种选育和遗传研究的一个重要组成部分。在原生质体化的过程中,许多因素同时影响着原生质体形成和再生,包括酶液的种类和浓度,酶解温度和酶解时间等,同时微生物的发育阶段也会从不同方面影响原生质体的形成。虽然已有许多相关研究,但是由于菌株不同,其原生质体制备和再生的条件也会有较大的差别。

根瘤菌是一类能侵染豆科植物根部形成根瘤进行生物固氮的革兰氏阴性细菌^[9]。根瘤菌在植物根部定殖的同时,不可避免的与土壤中其他微生物发生互作,其中一些种类的根瘤菌会对某些病原微生物产生拮抗作用^[10-14],这类大豆根瘤菌将成为非

常有前途的生防因子。该文针对拮抗性根瘤菌菌株进行原生质体制备影响因素研究,获得了根瘤菌L396原生质体制备的条件,由于采用溶菌酶促使细胞壁溶解,释放原生质体的过程也属于酶解反应,故试验结果符合酶反应动力学的规律,并且在显微条件下观察了原生质体的形成和释放过程。

参考文献

- [1] 余健秀,李建华,庞义. 芽孢杆菌原生质体融合技术[J]. 生物技术,2000,10(3):45-47. (Yu J X, Li J H, Pang Y. Studies on protoplast fusion of *Bacillus* [J]. Biotechnology, 2000, 10(3): 45-47.)
- [2] 王媛媛,段玉玺,陈立杰. 拮抗性根瘤菌对大豆根部病原物的影响研究[J]. 植物病理学报,2008,38(6):607-612. (Wang Y Y, Duan Y X, Chen L J. Antagonism of rhizobium against pathogens of soybean root [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2008, 38(6): 607-612.)
- [3] 韦革宏,朱铭菽,郭杰,等. 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[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(1):18-22. (Wei G H, Zhu M E, Guo J, et al. Study on fusion of protoplasts from *Sinorhizobium meliloti* and *Mesorhizobium ciceri* [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2002, 30(1): 18-22.)

高油高产大豆新品种石豆4号的选育及栽培技术

王玉岭, 赵 静

(1. 石家庄市农业科学研究院, 河北 石家庄 050041; 2. 河北交通职业技术学院, 河北 石家庄 050035)

“石豆4号”是河北省石家庄市农业科学研究院与中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心合作, 采用化学诱变和常规育种相结合育成的高油、高产夏大豆新品种。2009年通过河北省品种审定委员会审定, 定名为“石豆4号”。该品种的突出特点是高产、高油, 含油率高达22.11%, 比我国大豆平均含油量高2~3个百分点。

1 选育经过

“石豆4号”是1997年用浓度为 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲基磺酸乙酯诱变液浸泡“分枝2号”(自选品系)大豆植株花朵里的合子2h, 再用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的平阳霉素诱变液浸泡2h, 成熟后收获88粒种子, 1998年对 M_1 代进行混收, 1999年 M_2 代及2000年 M_3 代进行突变株选择, 2001年 M_4 代中第413行表现生长整齐, 农艺性状好, 收全行测产, 产量为 $3\,420\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。

2 产量表现

该品种2003~2005年连续3a参加石家庄市农业科学研究院的品比试验, 2007、2008年参加河北省夏大豆区域试验和生产试验, 2a平均产量为 $3\,282.75\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$, 在区域试验和生产试验各点均较对照品种冀豆12显著增产10.66%, 均居所有参试品种第一位。

3 特征特性

生育期105d左右。株高80cm左右, 百粒重21.9g左右。该品种出苗整齐, 生长稳健, 抗病性好, 适应性强。粗蛋白含量40.02%, 粗脂肪含量22.11%。

4 适应性

“石豆4号”适应范围较广, 具有较强的抗病性和抗倒性。

5 栽培技术要点

5.1 施足底肥, 造好墒。底肥以磷钾肥为主, 播种前造好底墒。

5.2 早播、浅播, 从6月上旬到7月上旬均可播种, 但最佳播种期为6月中旬。播种深度2.5cm有利出苗, 播种量 $60\sim90\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。

5.3 早间苗、早定苗, 保全苗、促壮苗。

5.4 加强田间管理, 确保高产丰收。4~5片真叶时, 每公顷追施提苗肥尿素225kg, 有条件的可根外喷施锌、硼、钼等微肥。花期追施尿素, 开花期株高在70cm左右时喷施多效唑。在大豆鼓粒期即8月下旬到9月上、中旬遇干旱应及时灌溉能显著增加产量。

-
- [4] 涂永琴, 肖崇刚. 蜡质芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 原生质体形成与再生条件研究[J]. 生物学杂志, 2005, 22(5): 17-19. (Tu Y Q, Xiao C G. Studies on protoplast formation and regeneration of *Bacillus cereus* strains TO-8-24-2[J]. Journal of Biology, 2005, 22(5): 17-19.)
- [5] 金玉娟, 刘自谔, 任建平. 芽孢杆菌和欧文氏菌的原生质体融合的研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(3): 10-11. (Jin Y J, Liu Z R, Ren J P. Protoplast Fusion of *Bacillus* and *Erwinia*[J]. Journal of Microbiology, 2002, 22(3): 10-11.)
- [6] 程骥, 洪文荣, 苏建章, 等. 黑暗链霉菌与卡那链霉菌原生质体融合研究[J]. 福州大学学报(自然科学版)2003, 31(1): 111-115. (Chen J, Hong W R, Su J Z, et al. Study on protoplast fusion between *Streptomyces tenebrarius* and *Streptomyces kanamyceticus* [J]. Journal of Fuzhou University(Natural Science Edition)2003, 31(1): 111-115.)
- [7] 肖怀秋, 李玉珍, 兰立新. 枯草芽孢杆菌 Bx-4 原生质体形成与再生条件优化[J]. 中国酿造, 2008, 17: 30-32. (Xiao H Q, Li Y Z, Lan L X, et al. Study on optimal conditions of formation and regeneration of protoplast from *Bacillus subtilis* Bx-4 [J]. Chian Brewing, 2008, 17: 30-32.)
- [8] 雷虹, 曾伟民, 金忠斌, 等. 小白链霉菌 (*Streptomyces albulus*) 的原生质体制备研究[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2007, 24(3): 306-309. (Lei H, Zeng W M, Jin Z B. Study on the protoplasts formation of *Streptomyces albulus*[J]. Journal of Natural Science of Heilongjiang University, 2007, 24(3): 306-309.)
- [9] 阎爱民, 陈文新. 苜蓿、草木樨、锦鸡儿根瘤菌的表型多样性分析[J]. 生物多样性, 1999, 7(2): 112-118. (Yan A M, Chen W X. Phenotypic feature diversity of rhizobia isolated from *Medicago* sp., *Melilotus* sp. and *Caragana* sp. [J]. Chinese Biodiversity, 1999, 7(2): 112-118.)
- [10] Dileep Kumar B S, Berggren I, Mårtensson A M. Potential for improving pea production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*[J]. Plant and Soil, 2001, 229: 25-34.
- [11] Siddiqui I A, Ehteshamul Haque S, Zaki M J, et al. Greenhouse evaluation of rhizobia as biocontrol agent of root-infecting fungi in okra[J]. Acta Agrobot, 2000, 53: 13-22.
- [12] Omar S A, Abd-Alla M H. Biocontrol of fungal root rot diseases of crop plant by the use of rhizobia and bradyrhizobia[J]. Folia Microbiol, 1998, 43: 431-437.
- [13] Chakraborty U, Chakraborty B N. Interaction of *Rhizobium leguminosarum* and *Fusarium solani* f. sp. pisi on pea affecting disease development and phytoalexin production[J]. Canada Journal of Botany, 1989, 67: 1698-1701.
- [14] Xie Z P, Staehelin C, Wiemken A, et al. Symbiosis-stimulated chitinase isoenzymes of soybean[J]. Journal of Experimental Botany, 1999, 50: 327-333.