

采用 *gfp* 和 *rfp* 基因标记评价大豆根瘤菌竞争结瘤能力

肖文丽, 关大伟, 李俊, 曹凤明, 陈慧君

(中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要:采用二亲本接合方法,将绿色荧光蛋白基因(*gfp*)或红色荧光蛋白基因(*rfp*)分别导入与大豆品种中黄 13 相匹配的快生根瘤菌 *Sinorhizobium fredii* SR25a、*S. fredii* USDA205、与慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* 4222、*B. japonicum* 4230 和 *B. japonicum* 4534 菌株中,得到 6 株标记成功的菌株,并检验标记菌株的外源基因在培养条件下和共生条件下的稳定性,以及对菌株结瘤性能的影响。进一步将带有不同荧光蛋白基因的供试菌株按等密度等体积配成 9 组,通过蛭石盆栽试验评价菌株的竞争结瘤能力。结果表明:外源基因能够遗传稳定,且不影响共生结瘤固氮行为,该标记方法可用于评价菌株竞争结瘤能力;慢生大豆根瘤菌的竞争能力明显高于快生大豆根瘤菌,其中慢生大豆根瘤菌 *B. japonicum* 4534 竞争能力最强,其占瘤率比慢生菌株 *B. japonicum* 4230 和 *B. japonicum* 4222 分别高出 35% 和 90%。结果证明 *gfp* 和 *rfp* 双标记技术为根瘤菌竞争结瘤能力评价提供了直观、简便、准确的检测手段。

关键词:荧光蛋白基因;大豆根瘤菌;竞争结瘤

中图分类号:S565.1 文献标识码:A 文章编号:1000-9841(2010)03-0366-04

Evaluation on the Competitiveness of Strains of Soybean Rhizobia Marking with *gfp* and *rfp* Genes

XIAO Wen-li, GUAN Da-wei, LI Jun, CAO Feng-ming, CHEN Hui-jun

(Institute of Agricultural Resources and Agricultural Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10081, China)

Abstract:The green-fluorescent protein gene (*gfp*) or red-fluorescent protein gene (*rfp*) was transferred into *Sinorhizobium fredii* SR25a, *S. fredii* USDA205, *Bradyrhizobium japonicum* 4222, *B. japonicum* 4230 and *B. japonicum* 4534 by double-parent hybridizing method respectively to obtain 6 marked strains. The genetic stability of the foreign genes were detected and their effects on the strains' nodulation ability were evaluated. Nine pairs of strains from testing strains with different fluorescent protein gene were inoculated on the soybean cultivar Zhonghuang 13 for competitive nodulation experiment. The results showed that the foreign genes could transfer stably, and they had no impact on the symbiotic nitrogen fixation activity of strains. The competitive nodulation ability of *B. japonicum* was higher than *S. fredii*. Among the *B. japonicum* strains, nodule occupancy of *B. japonicum* 4534 was the highest and its nodule occupancy was 35% and 90% over *B. japonicum* 4230 and *B. japonicum* 4222, respectively. Marking with fluorescent protein gene provides one way to evaluate rapidly the competitive nodulation ability of rhizobial strains.

Key words:Fluorescent protein gene; Rhizobium; Competitive nodulation

根瘤菌——豆科植物共生固氮体系在减少化学氮肥施用、保护生态环境、促进农业可持续发展等方面具有重要意义,研究和开发利用这一共生固氮体系具有重大的生态、经济和社会价值。在大豆种植主产区域,由于土壤中存在大量的土著根瘤菌群,且它们竞争结瘤能力强但固氮能力弱,这直接影响到接种根瘤菌的占瘤率,使根瘤菌接种经常难以达到预期效果。因此,筛选和应用具有高效竞争结瘤能力的根瘤菌具有重要意义,科学准确评价根瘤菌结

瘤竞争能力又是其技术的关键。

近年来随着分子生物学技术的发展,尤其是各种标记基因的相继发现,为研究根瘤菌的竞争结瘤能力评价提供了快速准确的手段。目前广泛应用的标记基因有发光酶基因(Luciferas gene, *luxAB*)、β-葡萄糖苷酶基因(β-Glucuronidase gene, *gusA*)、绿色荧光蛋白基因(Green Fluorescent Protein gene, *gfp*)和红色荧光蛋白基因(Red Fluorescent Protein gene, *rfp*)。其中 *gfp* 和 *rfp* 基因标记由于具有快速、方便、

准确的优点,在根瘤菌定殖和竞争结瘤研究中得到了广泛的应用^[1-4]。

中黄 13 是黄淮海夏播区的主栽品种,也是我国目前种植面积最大的品种,2007 年推广面积已经达到 53.80 万 hm²^[5]。筛选与中黄 13 相匹配的高竞争能力和高固氮能力的根瘤菌,是提高根瘤菌应用效果的重要途径。该文以与中黄 13 相匹配的固氮能力强的大豆根瘤菌为对象,采用绿色(*gfp*)和红色(*rfp*)荧光基因标记根瘤菌,通过占瘤率来评价根瘤菌的竞争结瘤能力,为其生产应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供体菌、受体菌及其质粒特征见表 1。大肠杆菌采用 LB 培养基,培养温度 37℃;根瘤菌应用 YMA、SM 培养基,28℃下培养。抗生素浓度分别是:壮观霉素(Spe)100 μg·mL⁻¹,庆大霉素(Gen)50 μg·mL⁻¹,四环素(Tc)10 μg·mL⁻¹,氯霉素(Cm)50 μg·mL⁻¹,卡那霉素(Km)50 μg·mL⁻¹,萘啶酮酸(NA)30 μg·mL⁻¹。

表 1 供试菌株及质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids tested				
	菌株 Strain	质粒 Plasmid	相关特性 Relevant characteristic	来源 Source
供体菌 Donor strain	<i>E. coli</i> SM10λ	pMP2444	<i>gfp</i> Gen ^r	中国农大
	<i>E. coli</i> SM10λ	pJZ383	<i>gfp</i> Spe ^r	南京农大
	<i>E. coli</i> SM10λ	MINI	<i>gfp</i> Cm ^r	南京农大
	<i>E. coli</i> SM10λ	pJZ402	<i>rfp</i> Spe ^r	南京农大
受体菌 Recipient strain	<i>S. fredii</i> SR25a		Gm ^s NA ^r	中国农大
	<i>S. fredii</i> USDA205		Gm ^s NA ^r	美国 USDA
	<i>B. japonicum</i> 4222		Spe ^s NA ^r	本实验室
	<i>B. japonicum</i> 4230		Spe ^s NA ^r	本实验室
	<i>B. japonicum</i> 4534		Spe ^s NA ^r	本实验室

1.2 试验方法

1.2.1 根瘤菌菌株荧光标记 采用双亲结合方法进行根瘤菌菌株的 *gfp* 和 *rfp* 基因的标记^[6]。

1.2.2 标记菌株的发光检测 将菌体用无菌水涂片的方法在荧光显微镜下用 100 倍油镜观察。绿色荧光在激发波长 450~490 nm,检测波长 505 nm,在 500 nm 滤光片下观察,红色荧光在激发波长 510~560 nm,检测波长 575 nm,在 590 nm 滤光片下观察。图像采集由 Leica DM 2500 显微成像系统进行。

1.2.3 标记菌株在纯培养条件下的遗传稳定性检测 将标记好的菌株接种到无任何抗生素的 YMA 液体中,并以 1% 的接种量连续转接 15 次,每次转接后培养时间 24 h,取样检测其发光情况。

1.2.4 标记菌株在共生条件下的遗传稳定性检测 通过蛭石盆栽进行结瘤实验。选择大小一致的种子在 95% 的酒精中浸泡 30 s,用 0.1% 升汞灭菌 5 min,然后用无菌水清洗 5~6 遍,播种在盛有灭菌蛭石的塑料盆中,每盆 5 粒种子。将出发菌株、标记菌株分别接种大豆植株,每盆接种 1 mL 菌液,以不接种为对照,每个处理设 3 个重复。将植株置于白天 28~30℃、夜间 15~20℃、每天光照 8 h 的温室中培养。30 d 后收获,观察结瘤特性有无明显差别,用灭过菌的镊子将根瘤捏碎,将汁液涂于载玻片上,通过荧光显微镜观察是否发光。

1.2.5 荧光标记对植株生长和共生固氮的影响 蛭石盆栽和处理方法同 1.2.4。收获后,测植株的根瘤数量,将收获的新鲜植株在靠近茎基部剪去根系,先在 85℃ 下烘 30 min,再于 65℃ 下烘干至恒重,用分析天平测定植株干重,用凯氏定氮法测植株总氮,考察荧光标记是否影响植株的生长和结瘤固氮。

1.2.6 竞争能力试验 盆栽方法同 1.2.4。将试验菌株的菌液的 OD₆₀₀ 值调成一致,分别按照 1:1 的体积比两两混合,每盆植株接种 2 mL 混合的菌液。设置的处理分别为:USDA205 + 4222/*gfp*; USDA205/*gfp* + 4230/*rfp*; USDA205/*gfp* + 4534/*rfp*; SR25a + 4222/*gfp*; SR25a/*gfp* + 4230/*rfp*; SR25a/*gfp* + 4534/*rfp*; 4222/*gfp* + 4230/*rfp*; 4222/*gfp* + 4534/*rfp*; 4230/*rfp* + 4534/*gfp*,每个处理 3 个重复。植株培养 30 d 收获,采集根瘤,每个重复取 20 个根瘤,用灭菌的镊子捏碎根瘤,将汁液涂于载玻片上,用荧光显微镜观察荧光,记录各个菌株的结瘤数,计算其占瘤率。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌的荧光标记

含有 *gfp* 和 *rfp* 的质粒经过接合转移到受体根瘤菌中,大肠杆菌经双抗平板中的 NA 得以淘汰,同时带有的另一种抗生素又将未获得质粒的受体菌淘汰,这样在双抗平板上生长的菌落即是接合子。挑取菌体在荧光显微镜下检验,基因标记成功的菌体发红色或绿色荧光(图 1)。将发光单菌落转接斜面,分别记作 USDA205/*gfp*、SR25a/*gfp*、4222/*gfp*、4230/*rfp*、4534/*rfp*、4534/*gfp*。

菌株 *B. japonicum* 4534 竞争能力最强,占瘤率比菌株 *B. japonicum* 4230 和 *B. japonicum* 4222 分别高出 35% 和 90%,在菌株 *B. japonicum* 4222 和菌株 *B. japonicum* 4230 组合中,二者占瘤率都为 50%,表明 *B. japonicum* 4222 与 *B. japonicum* 4230 的竞争结瘤能力相当。

表 3 不同组合的竞争结瘤率

Table 3 Competitive nodulation test between various combinations				
菌株组合 Strain-pairs		菌株占瘤率 Occupancy rates of respective strains/%		
USDA205 + 4222/ <i>gfp</i>	USDA205	5	4222	95
USDA205/ <i>gfp</i> + 4230/ <i>rfp</i>	USDA205	5	4230	95
USDA205/ <i>gfp</i> + 4534/ <i>rfp</i>	USDA205	5	4534	95
SR25a + 4222/ <i>gfp</i>	SR25a	5	4222	95
SR25a/ <i>gfp</i> + 4230/ <i>rfp</i>	SR25a	10	4230	90
SR25a/ <i>gfp</i> + 4534/ <i>rfp</i>	SR25a	5	4534	95
4222/ <i>gfp</i> + 4230/ <i>rfp</i>	4222	50	4230	50
4222/ <i>gfp</i> + 4534/ <i>rfp</i>	4222	5	4534	95
4230/ <i>rfp</i> + 4534/ <i>gfp</i>	4230	35	4534	65

3 讨论

荧光标记技术具有易检测、灵敏、稳定、无干扰、无毒无害、广谱等优点,为分子生物学和细胞生物学研究的有效手段^[7]。而绿色荧光蛋白(GFP)是从维多利亚多管水母(*Aequoria victoria*)中发现的单体发光蛋白,受波长为 450~470 nm 光激发后能发出 510 nm 的绿色荧光^[8]。而红色荧光蛋白(RFP)是从与印度洋—太平洋中的海葵相关的珊瑚类 *Discosoma* 中分离得到的一种生物发光蛋白,最大激发波长为 558 nm,最大发射波长为 583 nm。这 2 种荧光蛋白具有不同的激发波长和发射波长,通过颜色即可分辨不同的荧光蛋白标记,因此二者结合使用可更方便和直观的检测生物体的动态变化^[9]。

采用荧光基因标记法研究根瘤菌的竞争能力时,首先将荧光蛋白基因导入受体菌中并使之能表达,同时基因导入不对出发菌株遗传稳定性和共生特性产生影响。结果证明,无论是在培养条件下,还是在共生结瘤条件下,*gfp* 和 *rfp* 基因标记的根瘤菌株均能稳定遗传并有效表达。此外,通过回接试验发现,荧光标记并未引起根瘤菌菌株的共生能力、固氮能力的变化,因此,荧光基因标记可以用来评价强根瘤菌的竞争结瘤能力。

宿主植物及其品种是影响竞争结瘤的重要因素之一,菌株的竞争结瘤能力对宿主植物品种的基因型有一定的依赖性^[10]。该研究中不同类型菌株的结瘤能力受到宿主品种的影响,在快生/慢生大豆根瘤菌组合中,3 株慢生大豆根瘤菌的占瘤率都分别

高于同组的快生大豆根瘤菌,表明大豆品种中黄 13 对慢生大豆根瘤菌有较高的选择性。此外,3 株慢生大豆根瘤菌之间的竞争能力也存在差异显著,菌株 *B. japonicum* 4534 明显高于菌株 *B. japonicum* 4222 和 *B. japonicum* 4230,这可能是根瘤菌与根瘤菌之间复杂的相互作用造成的^[11],其作用机理还需要进一步研究和探讨。

参考文献

[1] Stuurman N, Bras C P, Schlaman H R M, et al. Use of Green Fluorescent Protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants [J]. Molecular Plant - Microbe Interactions, 2000, 13(11):1163 - 1169.

[2] 刘桢付. 费氏中华根瘤菌的基因标记与竞争结瘤的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2001:10 - 13. (Liu Z F. Studies on gene marking and competitive nodulation of *Sinorhizobium fredii* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2001:10 - 13.)

[3] D' Haeze W. A *gfp* reporter plasmid to visualize *Azorhizobium caulinodans* during nodulation of *Sesbania rostrata* [J]. Plasmid, 2004, 51:185 - 191.

[4] 杜寒春. 根瘤菌对禾本科作物生长的促进作用研究[D]. 南京:南京农业大学,2005:9 - 16. (Du H C. The study on effects of *Rhizobium* on cerfal plants growth[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005:9 - 16.)

[5] 全国农业技术推广服务中心. 2007 年全国农作物主要品种面积推广情况统计汇编[G]. 2008. (National Agricultural Technology Extension Service. Planting area statistics of major crop varieties in 2007[G]. 2008.)

[6] 周俊初. 高效结瘤固氮大豆根瘤菌基因工程菌株的构建及应用[J]. 武汉大学学报,1990,(增刊):11 - 17. (Zhou J C. Construction and application of gene engineering *Rhizobium* strains with efficient nitrogen fixation [J]. Wuhan University Journal, 1990 (Supplement): 11 - 17.)

[7] 巴沛桥,巴晓革,胡海,等. 绿色荧光蛋白 GFP 的研究进展及应用[J]. 生物医学工程研究,2009,28(1):83 - 86. (Ba P Q, Ba X G, Hu H, et al. Research progress and application of green fluorescent protein[J]. Journal of Biomedical Engineering Research, 2009,28(1):83 - 86.)

[8] 吴世康. 绿色荧光蛋白质(GFP)的发现、表达和发展[J]. 影像科学与光化学,2009,27(1):69 - 78. (Wu S K. The discovery and development of the green fluorescent protein[J]. Imaging Science and Photochemistry, 2009,27(1):69 - 78.)

[9] 樊晋宇,崔宗强,张先恩. 红色荧光蛋白的光谱多样性及体外分子进化[J]. 生物化学与生物物理进展,2008,35(10):1112 - 1120. (Fan J Y, Cui Z Q, Zhang X E. Optical spectra diversity and *in vitro* Molecular evolution of red fluotescent proteins[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2008,35(10):1112 - 1120.)

[10] Josephson K L, Bourque D P, Bliss F A, et al. Competitiveness of KIM5 and VIKING 1 bean rhizobia: strain by cultivar interactions [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1991, 23:249 - 253.

[11] 杨江科,刘墨青,周琴,等. 以 *luxAB* 为报告基因的大豆根瘤菌的竞争结瘤研究[J]. 中国农业科学,2002,35(1):110 - 112. (Yang J K, Liu M Q, Zhou Q, et al. Studies on the competitiveness of soybean rhizobia marking with *luxAB* gene [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002,35(1):110 - 112.)