

两株发光酶基因标记的重组大豆根瘤菌 在土壤缩影中的存活研究*

李友国 周俊初[†]

(农业部农业微生物重点实验室, 华中农业大学, 武汉 430070)

摘 要 研究了发光酶基因 (*luxAB*) 标记的重组费氏中华根瘤菌 HN01DL、大豆慢生根瘤菌 TA113QD 与其出发菌株 HN01、TA11 在灭菌和未灭菌土壤缩影中的存活动态。结果表明: HN01DL 和 TA113QD 在灭菌土壤缩影和未灭菌土壤缩影中的存活动态特征显著不同: 标记菌株在灭菌土壤缩影中的早期存活数量一般有所下降后而保持相对稳定的较高存活水平, 而在未灭菌土壤缩影中其存活数量在整个跟踪过程中持续下降至约 $4.5 \lg \text{ cfu g}^{-1}$ 土。在本实验中未发现供试标记重组菌株和出发菌株在土壤缩影中的存活性存在显著差异。

关键词 大豆根瘤菌, 土壤缩影, 存活性, 发光酶基因
中图分类号 Q938.1^{†3}

释放到环境中的遗传重组微生物和天然有益微生物的作用发挥常常依赖于遗传信息的高效表达, 而存活是表达的前提, 所以释放微生物在环境 (主要是土壤) 中的生长和存活动态^[1~3] 是研究转基因微生物效能的中心问题。目前已有许多用于监测引入环境中的微生物动态的遗传标记系统 (包括传统的抗性基因、生物发光基因和发色基因等), 其中发光酶标记基因由于具有灵敏、稳定、快捷和简便等优点, 因而在跟踪释放微生物的生长、存活和动态活动中应用非常广泛。本文选择 *luxAB* 基因为检测标记, 分别比较研究本室构建的重组费氏中华根瘤菌 HN01DL 和 大豆慢生根瘤菌 TA113QD 在灭菌土与未灭菌土壤缩影中的存活动态, 进而分析其在土壤中存活动态的差异, 同时考察利用 *luxAB* 基因来监测根瘤菌在土壤环境中存活动态的有效性与实用性。

1 材料与amp;方法

1.1 供试菌株

两株供试菌株均为本室构建的重组大豆根瘤菌, 其有关特性参见表 1。

1.2 土壤缩影

供试土壤为华中农业大学实验农场采集的田间表层 (0~20 cm) 黄棕壤, 土样经风干和过筛 (<2 mm) 后, 加入适量蒸馏水使含水量达到约 30% 并混合均匀。连续两次在 121℃ 下灭菌 1 h, 获得无菌土样。取 1 kg 无菌土样装于土壤缩影盒中, 于温室模拟自然条件下培养, 并定期补水以维持土壤湿度。

1.3 培养基

蔗糖葡萄糖培养基 SG^[5] 和蛋白胨酵母粉培养基 TY^[6] 分别用于供试根瘤菌 TA113QD 和 HN01DL 的斜面和液体培养, 蔗糖甘露醇培养基 SM^[7] 用于回收土壤缩影中的标记根瘤菌。

1.4 根瘤菌接种

将供试根瘤菌 HN01 和 HN01DL 接种到 TY 培养液中, TA11 和 TA113QD 接种到 SG 培养液中, 于 28℃ 培养到对数生长期后期, 分别离心收集菌体, 用 0.9% NaCl 溶液洗涤 2 次后重新悬浮于无菌水中, 调整菌液浓度至数量级为 10^{10} ml^{-1} (HN01 和 HN01DL) 或 10^9 ml^{-1} (TA11 和 TA113QD), 在每一个 1 kg 土壤

* 国家 863 高技术研究发展计划课题 (2001AA214021) 和国家 973 重点基础研究发展规划项目 (001CB1089) 资助
- 通讯作者

收稿日期: 2001-11-14; 收到修改稿日期: 2002-07-26

表 1 供试菌株与质粒
Table 1 Strain tested and plasmid

供试菌株及质粒 Strain tested and plasmid	有关特性 Relevant characteristics	来源或参考文献 Source or reference
质粒		
pHN205	pTR102 上克隆有 <i>dct</i> 和 <i>luxAB</i> 表达单元, Tc^r , Amp^r	[4]
pHN207	pLAFR3 上克隆有 <i>dct</i> 和 <i>luxAB</i> 表达单元, Tc^r	[5]
费氏中华根瘤菌 (<i>Sinorhizobium fredii</i>)		
HN01 ¹⁾	Nod ⁺ , Fix ⁺ , 出发菌	
HN01(pHN205)	Nod ⁺ , Fix ⁺ , Tc^r , Amp^r , <i>dct</i> , <i>luxAB</i> , 简称 HN01DL	[4]
大豆慢生根瘤菌 (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>)		
TA11 ²⁾	Nod ⁺ , Fix ⁺ , 出发菌	
TA11(pHN207)	Nod ⁺ , Fix ⁺ , Tc^r , <i>dct</i> , <i>luxAB</i> , 简称 TA113QD	[5]

注: 1) 本室保存; 2) 本研究

缩影中加入 20 ml 单菌悬液或混合菌悬液各 10 ml。

1.5 取样与根瘤菌数量测定

分别在接种后 0、5、10、15、20、25、30、35、40 和 45 d 取样, 用稀释平板法, 在抗性选择平板 SM + Tc + Amp 上并结合发光标记回收、测定标记根瘤菌 TA113QD 和 HN01DL 的数量, 操作方法参见文献[5]。

2 结果

2.1 HN01DL 和 HN01 在灭菌土壤缩影中的存活动态比较

在灭菌土缩影中比较研究了重组根瘤菌 HN01DL 和参比菌 HN01 的存活动态, 由图 1 可见: 供试根瘤菌的存活数量在灭菌土缩影中下降的速度比较缓慢, 同时还可看出, 导入重组质粒 pHN205 对受体菌 HN01 的生长与存活能力无显著影响。

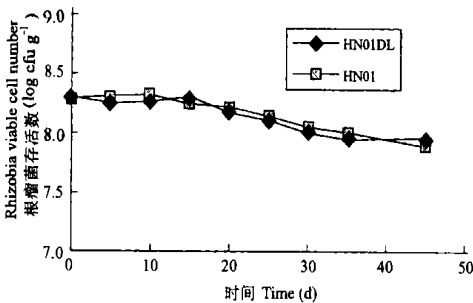


图 1 单独接种时 HN01DL 和 HN01 的存活动态

Fig. 1 Survival dynamics of HN01DL and HN01 by a single-strain inoculation

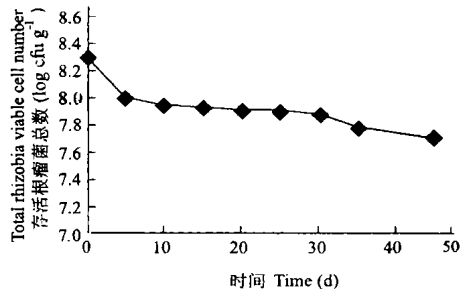


图 2 HN01DL 和 HN01 1:1 混合接种时的存活动态

Fig. 2 Survival dynamics of HN01DL and HN01 by a dual-strain 1:1 mixed inoculation

2.2 HN01DL 和 HN01 在灭菌土壤缩影中的存活动态比较

进一步将 HN01DL 和 HN01 按照 1:1 等量混合后接种, 在非抗性选择平板 SM 上回收和测量释放的根瘤菌群体数量, 发现其存活动态的变化与分别单独接种时是相似的(图 2)。同时检查回收平板上形

成的根瘤菌单菌落的发光活性, 可以计算出标记重组菌 HN01DL 在供试群体中的比例, 由图 3 可见, 在整个跟踪过程中, HN01DL 的比例基本在 50% 范围内波动。本实验结果进一步证明 HN01DL 和 HN01 的存活能力相同, 外源基因(*detABD* 和 *luxAB*) 的导入和表达并未影响其存活与竞争能力。

2.3 HN01DL 在未灭菌土壤缩影中的存活动态

研究了 HN01DL 在非灭菌土壤缩影中的存活动态, 由图 1 和图 4 比较可见, 由于生物因素的影响, 根瘤菌 HN01DL 在未灭菌土缩影中的存活动态明显不同于其在灭菌土缩影中的存活动态, 其存活数量在整个跟踪过程中下降速度快(特别在早期), 这一现象同已报道的某些接种细菌(如荧光假单胞菌群等)在土壤环境中的存活动态研究结果相似。

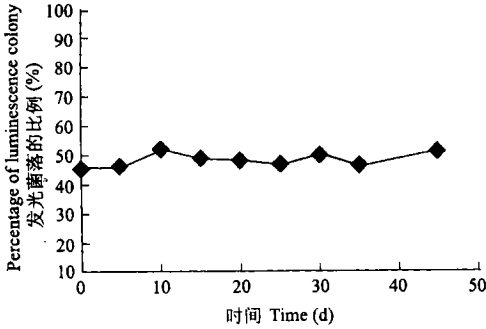


图 3 混合接种时 HN01DL 形成的发光菌落比例

Fig. 3 Luminescence colony percentage of HN01DL by a dual-strain mixed inoculation

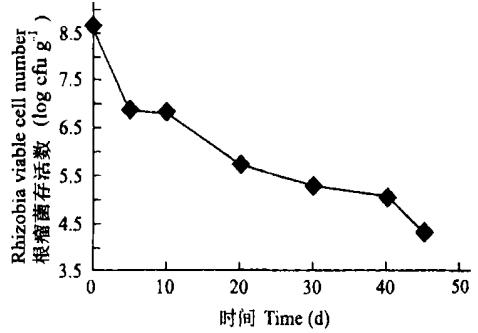


图 4 HN01DL 在未灭菌土缩影中的存活动态

Fig. 4 Survival dynamics of HN01DL in non-sterilized soil microcosm

2.4 TA113QD 和 TA11 在灭菌土壤缩影中的存活动态比较

研究了重组大豆慢生根瘤菌 TA113QD 和出发菌 TA11 在分别单独接种与 1:1 等量混合接种条件下的存活动态, 由图 5 和图 6 可见, TA113QD 和 TA11 在灭菌土缩影中的生长和存活能力并无明显差异。

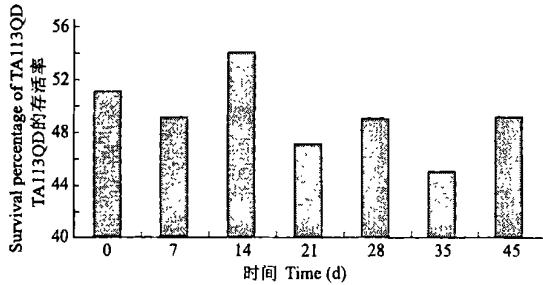


图 5 TA113QD 在与 TA11 1:1 混合接种时的存活率

Fig. 5 Survival rate of TA113QD during 1:1 mixed inoculation with TA11

2.5 TA113QD 在未灭菌土壤缩影中的存活动态

由图 6 和图 7 比较可见, TA113QD 在未灭菌和灭菌土缩影中的存活动态特征明显不同, 在灭菌土缩影中其早期存活数量有所下降, 然后保持一个相对稳定的较高存活水平, 而在未灭菌土缩影中其存活数量在整个跟踪过程中持续下降(特别在早期下降速度最快)至约 $4.5 \log \text{cfu g}^{-1}$ 土。由图 4 和图 7 还可看出, HN01DL 和 TA113QD 在未灭菌土壤缩影中的存活动态特征相似, 在整个跟踪过程中其存活数量分别降低了 4 个和 3 个数量级。

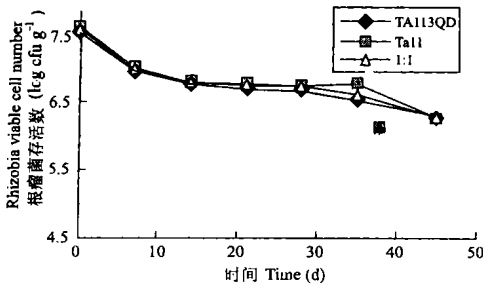


图6 单独接种与混合接种时 TA113QD 和 TA11 在灭菌土缩影中的存活动态

Fig. 6 Survival dynamics of TA113QD and TA11 by a single strain and 1:1 mixed inoculation in sterilized soil microcosm

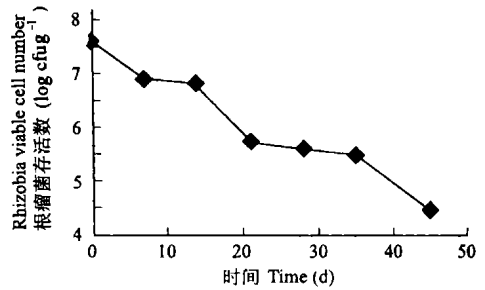


图7 TA113QD 在未灭菌土缩影中的存活动态

Fig. 7 Survival dynamics of TA113QD in non-sterilized soil microcosm

3 讨论

本研究将供试的两株重组大豆根瘤菌及其出发菌接种于灭菌土和未灭菌土缩影后,表现出基本类似的存活动态特征:在灭菌土缩影中接种初期的根瘤菌数量一般有所下降,而后很快趋于较长时间的稳定水平,但在未灭菌土缩影中供试根瘤菌的存活动态明显不同于前者。在研究假单胞菌群及其它微生物在未灭菌土壤中的存活动态时,也有许多类似的实验结果报道。本研究分析认为:(1)土壤与培养基比较是一种营养相对贫乏的基质,由营养丰富的人工培养条件释放到土壤后,部分细菌细胞由于环境条件的急剧变化而死亡或进入休眠状态,从而导致了释放根瘤菌在接种初期的数量下降速度较快(特别在未灭菌土缩影中)。(2)除了微生物本身固有的生理特性外,非生物和生物因素均会影响接种微生物在土壤中的生长繁殖和存活。土壤是一种不连续的、高度异质的环境,非生物因素(主要包括土壤类型、含水量、酸碱度、有效碳、矿物质等)可通过对细胞施加不同性质的压力直接影响土壤中接种根瘤菌群体动态的变化,也可通过影响土著微生物区系的活动而间接发挥作用。生物因素(一般包括土著微生物的竞争、原生动物的捕食、噬菌体的侵染裂解等)可抑制引入根瘤菌的生长繁殖和存活,是引起接种根瘤菌群体减少的另一方面原因。事实上,许多相关实验结果表明在灭菌土中很难观察到引入细菌群体的减少,且同时观察到引入细菌群体在灭菌土中的增长和在非灭菌土中的递减现象。这表明生物因素(在灭菌过程中被排除)在控制引入细菌(包括根瘤菌等)在土壤中的群体动态时发挥着非常重要的作用。(3)一般认为受体微生物引入额外基因会降低其存活能力,因为外源基因的表达会增加代谢负担甚至干扰受体的正常生理过程,但本实验结果表明含有固氮增效基因 *dct* 的供试重组根瘤菌与其出发菌在土壤缩影中的存活与竞争能力相同,初步证实 *dct* 基因的导入对所构建重组根瘤菌在土壤中的存活性无显著影响,具有良好的应用前景。(4)本结果还表明发光酶标记基因并未影响受体根瘤菌的存活力,可以方便地跟踪与检测根瘤菌在土壤中的存活动态,并进一步开展分子生态学研究。

参考文献

1. 崔民学,张成刚,靳素英. *xylE* 基因用于监测根瘤菌在土壤中存活的研究. 应用生态学报, 1996, 7(3): 287~ 292
2. 崔民学,张成刚,靳素英. 基模势对 *luxAB* 标记的快生型大豆根瘤菌在土壤中存活的影响. 应用生态学报, 1997, 8(5): 519~ 526
3. 蔺继尚,崔明学,靳素英,等. 高温胁迫对根瘤菌 Tn5 在土壤中的存活及其表型表达的影响. 应用生态学报, 1995, 6(4): 411~ 416
4. 李友国,李杰,刘墨青,等. 导入四羧酸转移酶基因对费氏中华根瘤菌共生固氮效率的影响. 高技术通讯, 2000, 10(5): 1~ 7
5. 李友国,李杰,刘墨青,等. 导入 *dctABD* 和 *parCBA/DE* 基因提高大豆慢生根瘤菌固氮效率和稳定性的研究. 遗传学报, 2000, 27(8): 742~ 750

6. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
7. 周俊初, 张克强. 大肠杆菌质粒在人工试验条件下转移的研究. 武汉大学学报, 1990, (专刊) 45~ 48

STUDY ON POPULATION SURVIVAL OF TWO RECOMBINANT SOYBEAN RHIZOBIA MARKED WITH *luxAB* GENE IN SOIL MICROCOSM

Li You-guo Zhou Jun-chu

(Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Summary

The survival dynamics of recombinant *Sinorhizobium fredii* HN01DL, *Bradyrhizobium japonicum* TA113QD both of which marked with *luxAB* gene and its wild-type strain HN01, TA11 in sterilized and non-sterilized soil microcosm were studied respectively. The results showed that the population dynamics of HN01DL and TA113QD in sterilized and non-sterilized soil microcosm was obviously different. The survival population of the marked rhizobia decreased slightly at an early stage after inoculation and then kept a relatively stable high survival level in sterilized soil microcosm, and its survival population in non-sterilized soil microcosm decreased regularly at a high speed until reaching about $4.5 \log \text{cfu g}^{-1}$ soil. No significant difference in soil survival was found between the recombinant marked strains and the wild-type strains.

Key words Soybean rhizobia, Soil microcosm, Survival dynamics, *luxAB*