

用 AFLP 技术检测慢生型花生根瘤菌竞争结瘤的研究

陈 强^{1, 2}, 张小平^{1*}, 李登煜¹, 陈文新², K. Lindstrom³, Z. Terefework³

(1. 四川农业大学资源环境学院, 四川雅安 625000; 2. 中国农业大学生物学院, 北京 100094; 3. Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Finland Fin-00014)

摘要:以 5 株慢生型花生根瘤菌和天府 3 号花生为材料, 用 AFLP 技术研究了慢生型花生根瘤菌 Spr2-9、Spr3-3、Spr3-5、Spr4-5 和 Spr7-1 的遗传特性和竞争结瘤能力。结果显示, 供试条件下, 传代次数对菌株的遗传性状无明显影响, 28℃ 培养条件下, 花生根瘤菌连续传 96 代, 其 AFLP 指纹未发生明显变化; 37℃ 培养, 仅 Spr3-3 和 Spr3-5 能够存活并正常生长, 其 AFLP 指纹也未发生明显改变, 然而其它菌株不能生长。将供试慢生型花生根瘤菌分别接种天府 3 号花生, 光照培养 30d 后, 随机各取 4 个根瘤, 从根瘤中提取类菌体 DNA 进行 AFLP 分析, 各根瘤类菌体 DNA 的 AFLP 指纹图谱与该菌株纯培养物 AFLP 指纹相同。将 5 个菌株混合接种天府 3 号花生, 不同菌株的占瘤率存在差异, Spr3-3 和 Spr3-5 的竞争结瘤能力最强, 两菌株的占瘤率之和为 85.4%; Spr4-5 的占瘤率为 12.2%; Spr7-1 为 2.4%; 而 Spr2-9 的竞争结瘤能力最差。本试验结果说明, AFLP 技术用于根瘤菌生态和竞争结瘤能力研究, 具有下列优点: 简易、快速、准确; 直接取豆科植物的根瘤提取 DNA, 进行原位研究; 在不改变菌株遗传特性, 即不使用突变株的前提下, 可以直接测定已知菌株的竞争结瘤能力。

关键词:慢生型花生根瘤菌; AFLP 指纹图谱; 竞争结瘤能力; 原位标记技术

A test on competition in nodulation ability of peanut bradyrhizobia by AFLP fingerprinting method

CHEN Qiang^{1, 2}, ZHANG Xiao-Ping^{1*}, LI Deng-Yu¹, CHEN Wen-Xin², K. Lindstrom³, Z. Terefework³, (1. Faculty of Resource and Environmental Sciences, Sichuan Agricultural University, Yaan 625000, China; 2. Faculty of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Fin-00014, Finland). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23 (10): 2189~2194.

Abstract: The hereditary character and the nodulation competition ability, with the Tianfu No. 3 peanut cultivar, were determined by AFLP fingerprinting method with Five peanut bradyrhizobial strains of Spr2-9, Spr3-3, Spr3-5, Spr4-5, and Spr7-1. The results showed that: the variation of AFLP fingerprinting for all of the experimental strains cultivated at 28℃ as well as the strains of Spr3-3 and Spr3-5 incubated at 37℃ in YMB medium for 96 generations was not obvious, however, the strains of Spr2-9, Spr4-5, and

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970029);“973”重点资助项目(2001CB108905);四川省生物技术基金资助项目

收稿日期:2002-10-02; **修订日期:**2003-06-15

作者简介:陈 强(1965~),男,四川平昌人,副教授,博士生,从事根瘤菌分类及分子生物学研究, E-mail: cqiang@sicau.edu.cn.

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: zxp@sicau.edu.cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 39970029); the State Key Basic Research and Development Plan of China (No. 2001CB108905); Biotechnology Foundation of Sichuan Province

Received date: 2002-10-02; **Accepted date:** 2003-06-15

Biography: CHEN Qiang, Associate professor, Ph. D. candidate, main research field: rhizobial taxonomic and molecular research. E-mail: cqiang@sicau.edu.cn

Spr7-1 could not grow at 37 °C; the nodulation competition rate was 85.4% for the strains Spr3-3 and Spr3-5 together, 12.2% for Spr4-5, 2.4% for Spr7-1, and zero percent for Spr2-9; Spr3-3 and Spr3-5 were thus the best strains due to the highest nodulation competition rate and well growth ability at 37 °C. In general, the results suggested that AFLP fingerprinting was a good method to differentiate the studied strains, and it is an easy, rapid and accurate method for the research on ecology and effective strains selection of *Rhizobia*.

Key words: peanut bradyrhizobia; AFLP fingerprints; marker technique *in situ*; competitive ability

文章编号:1000-0933(2003)10-2189-06 中图分类号:Q938.1,Q939.11⁺⁴ 文献标识码:A

根瘤菌与豆科植物形成的根瘤能将大气中游离的氮转化为 NH_3 供植物利用,农牧业生产中,豆科植物接种高效根瘤菌株,可以提高产量和品质,减少化肥施用量,有效避免环境污染。因此,根瘤菌与豆科植物的高效共生固氮体系,在农业与环境的可持续发展中具有积极的意义。筛选共生有效性高、竞争结瘤能力强的根瘤菌常常是一件费力、耗时的工作。通常,研究者从不同地区收集某种豆科植物根瘤并分离纯化出大量的根瘤菌,再从这些菌株中筛选出高效菌株供生产应用。几十年来,人们建立了多种方法用于根瘤菌生态和选种研究,传统的方法如利用根瘤菌对抗生素的不同抗性^[1]、荧光抗体法(FA)、酶联免疫(ELISA)等。随着分子生物学技术的发展,人们开始利用不同的基因标记技术来研究根瘤菌的生态学,并将这些技术应用于优良根瘤菌的选育工作中,取得了良好的效果。

近十年来,AFLP技术^[2]被证明能反映出各种基因组DNA丰富的遗传信息,结果稳定可靠,已广泛应用于原核^[3]及真核基因组指纹图谱^[4,5]及基因定位研究。先前的研究表明,AFLP能够反映出各供试花生根瘤菌菌株间的微小差异^[6],根据这一特点,本文报道了AFLP技术用于花生根瘤菌生态研究和选育优良花生根瘤菌菌株的可行性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用了5株慢生型花生根瘤菌:Spr2-9,Spr3-3,Spr3-5,Spr4-5,Spr7-1,其中Spr3-3和Spr3-5分离自同一地点,遗传特性相似^[7]。花生品种为天府3号。

1.2 花生根瘤菌遗传稳定性测定

1.2.1 纯培养条件下花生根瘤菌AFLP指纹图谱的稳定性 虽然在纯培养条件下,菌株的自发突变几率很低,但经过多次传代后,菌株的AFLP指纹是否稳定?不同温度条件下培养菌株后,其AFLP稳定性如何?这是AFLP技术能否用于根瘤菌生态研究和菌种选育的关键。

(1)传代次数对根瘤菌AFLP指纹的影响 实验表明,分离自四川的慢生型花生根瘤菌的平均代时约为5h^①。将供试菌株分别接种到5mL的YMB试管中,150r/min,28°C培养5d。分别取0.5mL菌液接种到另一支5mL的YMB试管,28°C、150r/min培养24h,再分别取0.5mL菌液接种到另一支YMB试管。每天转接培养,一共转接15次,分别取第24代、第48代、第72代和第96代的根瘤菌提取DNA,进行AFLP分析。

(2)培养温度对供试菌株AFLP指纹的影响 分别于盛有50mL YMB的三角瓶中接种供试菌株,150r/min,37°C培养5d。用与28°C培养时相同的方法,对菌液进行转接培养及供试菌株DNA的提取和AFLP分析。

1.2.2 花生根瘤菌类菌体DNA的AFLP指纹 砂培瓶准备 取直径10cm,高20cm的广口玻璃瓶,装入洗净沥干的石英砂至瓶颈,170°C干热灭菌2h,冷却备用。

浸种催芽 取天府3号花生50粒,0.2% HgCl_2 表面灭菌5min,无菌水洗涤5次,放置于4个无菌培养皿中,用无菌水催芽,每天换水一次,直到胚根长出2cm。

① 张小平,慢生花生根瘤菌系统发育和遗传多样性研究《华中农业大学博士学位论文》2001

接种试验 分别培养供试菌液 20mL(至浓度 1×10^8 个/mL),各取 10mL 移至无菌培养皿中,放入 3 株已催芽的花生浸泡 10min,再移栽到 3 个砂培瓶,每瓶各加入 5ml 供试菌液;同时分别取供试菌株培养液 5ml 于另一培养皿,充分混匀,同上法浸泡花生植株、移栽,接入混合菌液。最后向瓶内加入适量 Jensen 无氮营养液。置光照培养箱中,25℃培养。

1.2.3 DNA 提取 (1)纯培养根瘤菌 DNA 的提取 取 5ml YMB 培养基,接种供试菌株,28℃、150r/min 培养 5d,取根瘤菌液 1.4ml 于 Eppendorf 管中,13000r/min 离心 5min,倾去上清液,用 $1 \times$ TE 洗涤菌体 2 次,按 Terefework 的方法^[8]提取菌体 DNA。

(2)根瘤类菌体 DNA 的提取 取光照培养 30d 的花生植株,洗净根系,随机挑取根瘤,表面灭菌后分别置于 1.5ml 的 Eppendorf 管,按陈强等^[9]的方法提取类菌体 DNA。以已知浓度的 λ DNA 为标准,1%琼脂糖凝胶电泳确定待测 DNA 的浓度后,-20℃保存 DNA。

1.3 AFLP 分析

AFLP 反应按 Vos^[2]、张小平^[6]的方法进行,5~8 μ l 供试 DNA 样品经酶切连接后,用 2 个选择性碱基的引物扩增,取 2 μ l 的 PCR 产物用 5%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、银染、固定,在 60℃干燥,扫描凝胶,以 TIFF 格式保存文件,用 Gelcompar4.1 软件分析 AFLP 图谱,获得树状图。

1.4 根瘤菌占瘤率的测定

从混合接种试验的花生根系随机选取 41 个根瘤提取 DNA,AFLP 扩增后,用 5%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离得到电泳图谱,比较 AFLP 指纹图谱,按下式计算某种根瘤菌的占瘤率。

$$N = A \div B \times 100\%$$

式中, N 为占瘤率; A 为泳道中根瘤类菌体 DNA 的 AFLP 指纹与某一出发菌株 AFLP 指纹具有相同带谱的泳道数量。由于每条泳道是从一个根瘤中提取类菌体 DNA 进行 AFLP 反应后形成的,代表了一个根瘤,因此 A 实际上代表某个菌株侵入花生根系后形成根瘤的数量; B 为根瘤类菌体的 AFLP 指纹的总泳道数,即试验中调查的总根瘤数。

2 结果

2.1 传代次数对花生根瘤菌 AFLP 代型的影响

图 1 是供试慢生型花生根瘤菌在不同培养时间的 AFLP 指纹图谱。从图中可以看出,各菌株的 AFLP 图谱基本上是一致的。试验结果表明,经过连续传接 96 代,供试菌株的遗传特性是稳定的,即在供试条件下,菌株的遗传特性未发生变化。

2.2 温度对供试菌株 AFLP 图谱的影响

花生的生长季节为夏天,常常遇到高温。实验中设计了 37℃培养对菌株 AFLP 指纹的影响。结果表明,供试的 5 个菌株中,仅 Spr3-3 和 Spr3-5 能够生长,说明这两个菌株能够耐较高的温度,而其它菌株不能在 37℃时生长。从 Spr3-3 和 Spr3-5 的 AFLP 指纹图谱看(图 1),37℃条件下转接培养 15 次共 20d 后,两个菌株的遗传特性无明显变化。

2.3 根瘤类菌体 DNA 的 AFLP 指纹

从接种了慢生型花生根瘤菌的天府 3 号花生植株根系分别随机采集 4 个根瘤,提取 DNA 作 AFLP 分析,各类菌体 DNA 的 AFLP 指纹与该菌株纯培养的 AFLP 指纹一样(图 2),表明该菌株的遗传特性仍然保持稳定。

从图 2 还可以看出,从混合接种的花生根系随机采集的 4 个根瘤,其 AFLP 指纹图谱存在差异,其中有 3 个根瘤的 AFLP 条带与 Spr3-3、Spr3-5 相同,另 1 个根瘤的条带与 Spr4-5 相同,表明 AFLP 能够区分出混合接种试验中浸染花生根系的某一个根瘤菌。将图 2 中 AFLP 指纹信息用 Gelcompar4.1 软件分析,得到根瘤类菌体 DNA 指纹分析树状图(图 3),从图 3 可见,聚类分析中各菌株在 88%相似水平很好地分开。

2.4 供试菌株的占瘤率

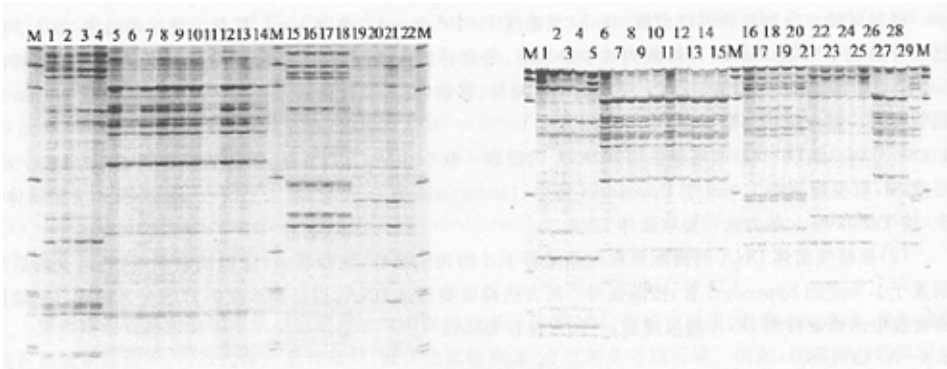


图1 不同培养条件下供试花生根瘤菌 AFLP 指纹图谱
Fig. 1 AFLP fingerprints of *Bradyrhizobium* sp. (*A. hypogaea*) after different treatment
M: pGEM, 1~4: spr2-9(5d, 10d, 15d, 20d); 5~8: Spr3-3(5d, 10, 15d, 20d), 9; Spr3-3(37 C, 20d); 10~13: Spr3-5(5d, 10d, 15d, 20d), 14; Spr3-5(37 C, 20d); 15~18: Spr3-5(5d, 10d, 15d, 20d); 19~22: Spr7-1(5d, 10d, 15d, 20d). Strains were incubated at 28 C except those at 37 C

图2 根瘤菌和类菌体 DNA 的 AFLP 指纹图谱
Fig. 2 AFLP fingerprints of rhizobium and bacteroids
M: pGEM, 1: Spr2-9, 2~5: Bacteroids of Spr2-9; 6: Spr3-3, 7~10: Bacteroids of Spr3-3; 11: Spr3-5, 12~15: Bacteroids of Spr3-5; 16: Spr4-5, 17~20: Bacteroids of Spr4-5; 21: Spr7-1, 22~25: Bacteroids of Spr7-1; 26~29: Bacteroids from peanut root nodules inoculated with mixture of 5 strains

为了研究各个供试菌株的占瘤率,从混合接种试验的 3 株花生植株根系随机采集了 41 个根瘤,提取类菌体 DNA 进行 AFLP 指纹分析,将其 PCR 产物与出发菌株的 AFLP 产物同时进行 5%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 4)。对其带型进行分析后,计算出各菌株的占瘤率,统计结果见表 1。

表 1 的结果表明,供试的 5 个慢生型花生根瘤菌的竞争结瘤能力存在差异,从菌株的占瘤率看, Spr3-3

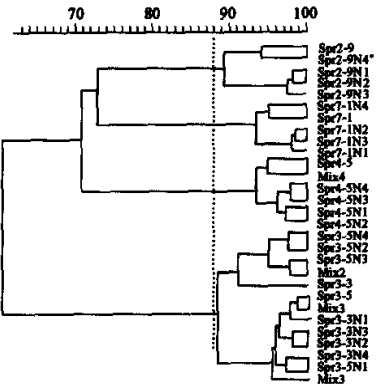


图3 根瘤菌及类菌体 DNA 的 AFLP 分析树状图
* 根瘤编号
Fig. 3 UPGMA dendrogram generated from AFLP patterns of rhizobium and bacteroid DNA, * the nodule number

表 1 混合接种试验中各菌株的占瘤率统计*
Table 1 The nodule occupancy rate for each strain of mixed rhizobia inoculation*

菌株 Strain	与出发菌株 AFLP 带谱 相同的根瘤个数(个) The number of nodules with the same AFLP patterns as original strain	占瘤率 Nodule occupancy (%)
Spr2-9	0	0
Spr3-3, Spr3-5	35	85.4
Spr4-5	5	12.2
Spr7-1	1	2.4
合计 Sum	41	100.0

* 由于 Spr3-3 和 Spr3-5 两株菌的的生理和遗传特性相似性极高,在本试验中未能将各菌株的占瘤率分开,故将 85.4%作为两者共有的占瘤率。Due to the high phenotypic and genetic homology between strains Spr3-3 and Spr3-5, they hasn't been distinguished in this trial, 85.4% was regarded as their common occupancy rate

和 Spr3-5 的占瘤率之和为 85.4%, Spr4-5 的占瘤率为 12.2%, Spr7-1 为 2.4%, Spr2-9 为 0, 说明在盆栽实验条件下, Spr3-3 和 Spr3-5 的竞争结瘤能力最强, 其次为 Spr4-5 和 Spr7-1, 而 Spr2-9 的竞争能力较差。由于 Spr3-3、Spr3-5 分离自同一个地方, 其生理和遗传相似性极高, 在结瘤试验中表现出了较强的竞争结瘤能力, 能够在 37℃ 生长, 可进一步在大田条件下研究其竞争结瘤能力。

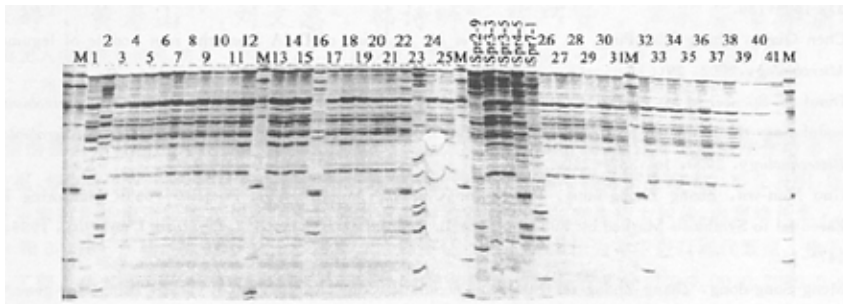


图 4 混合接种试验根瘤类菌体 DNA 的 AFLP 指纹图谱

M: pGEM 分子量标记, 1~41 为类菌体 DNA 的 AFLP 指纹图谱; Spr2-9, Spr3-3, Spr3-5, Spr4-5 和 Spr7-1 为纯培养物 DNA 的 AFLP 图谱

Fig. 4 The AFLP patterns generated by bacteroids DNA isolated from peanut root nodules inoculated by a mixture of strains Spr2-9, Spr3-3, Spr3-5, Spr4-5, and Spr7-1.

M: pGEM marker; 1~41: AFLP patterns obtained by bacteroids DNA; Spr2-9, Spr3-3, Spr3-5, Spr4-5, and Spr7-1 indicated that patterns obtained by the pure culture of these strains, respectively

3 小结与讨论

在不同的培养条件下以及在根瘤内, 供试菌株的 AFLP 指纹图谱是稳定的, 因此 AFLP 技术可用于根瘤菌生态学的研究及优良根瘤菌的选育与应用。

目前, 多用外源标记基因或报告基因, 如 Diouf^[10]等、郭先武^[11]、孟颂东^[12]和 Sessitsch 等^[13]用 *gusA*、*LuxAB* 或 *gfp* 等标记方法筛选优良的根瘤菌或检测根瘤菌的竞争结瘤能力。但基因标记法存在周期长、供试菌株数受限等缺点。本实验利用 AFLP 获得的根瘤菌自身遗传信息, 研究根瘤菌的生态或筛选优良菌株。具有简易、快速、准确; 能够进行原位研究; 不需要获得突变株等优点。但本研究中, Spr3-3 和 Spr3-5 的 AFLP 图谱及其占瘤率未能被很好地分开, 有待于进一步研究。

References:

- [1] Fesenko A N, Provorov N A, Orlova I F, et al. Selection of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* strains for inoculation of *Pisum sativum* L. cultivars; Analysis of symbiotic efficiency and nodulation competitiveness. *Plant and Soil*, 1995, 172:189~198.
- [2] Vos P R, Hogers M, Reijans T, et al. AFLP; a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, 1997, 23:4407~4414.
- [3] Torriani S, Clementi F, Vancanneyt M, et al. Differentiation of *Lactobacillus plantarum* L. *pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2001, 24(4):554~560.
- [4] Osten M, den Bieman M, Kuipen M T R, et al. Use of AFLP markers for gene mapping and QTL mapping in rat. *Genomics*, 1996, 37:289~294.
- [5] Van Eck H J, Van der Voort J R, Draaaisrtra P, et al. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in Non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding*, 1995, 1:397~410.
- [6] Zhang Xiao-ping, Chen Qiang, Li Deng-yu, et al. The use of AFLP Technique for the study of genetic diversity in Peanut bradyrhizobia. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(6):483~487.
- [7] Zhang X P, Giselle N, Lindstrom K, et al. Phylogeny and diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from the

- root nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in Sichuan, China. *Systematic Applied Microbiology*, 1999, **22**(3): 378~386.
- [8] Terefework Z, Kaijalainen S, Lindstrom K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *Journal of Biotechnology*, 2001, **91**(2~3): 169~180.
- [9] Chen Qiang, Zhang Xiao-Ping, Li Deng-Yu, *et al.* Isolation of DNA from the root nodule of legume plant. *Microbiology*, 2002, **29**(6): 65~68.
- [10] Diouf A, Spencer M M, Gueye M, *et al.* Use of *gusA* gene marker in a competition study of the *Rhizobium* strains nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Senegal soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, **16**: 337~340.
- [11] Guo Xian-wu, Zhang Zhong-ming, Hu Fu-rong, *et al.* *Mesorhizobium Huakuii* 7653R Harboring Plasmids Essential to Symbiosis Marked by Tn5-luxAB-sacB. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1999, **18**(2): 147~150.
- [12] Meng Song-dong, Zhang Zhong-ze. Study on nodulation and efficiency of *S. fredii* using *Gus* gene. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1997, **8**(6): 595~598.
- [13] Sessitsch A, Wilson K J, Antoon D L, *et al.* Simultaneous detection of different *Rhizobium* strains marked with either the *Escherichia coli gusA* gene or the *Pyrococcus furiosus celB* gene. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, **62** (11): 4191~4194.

参考文献:

- [6] 张小平, 陈强, 李登煜, 等. 用 AFLP 技术研究花生根瘤菌的遗传多样性. *微生物学报*, 1999, **39**(6): 483~488.
- [9] 陈强, 张小平, 李登煜, 等. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法. *微生物学通报*, 2002, **29**(6): 65~68.
- [11] 郭先武, 张忠明, 胡福荣, 等. 用 Tn5 标记带发光酶基因的华葵根瘤菌 7653R 质粒. *华中农业大学学报*, 1999, **18**(2): 147~150.
- [12] 孟颂东, 张忠泽. 应用 GUS 基因研究弗氏中华根瘤菌结瘤及效果. *应用生态学报* 1997, **8**(6): 595~598.