

应用 RAPD 分子标记技术研究苜蓿根瘤菌的田间竞争结瘤能力

曾昭海^{1,2}, 陈文新², 胡跃高¹, 隋新华², 陈丹明²

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院草业工程研究中心, 北京 10094;

2. 中国农业大学生物学院 农业部农业微生物资源及其应用重点实验室, 北京 100094)

摘要:以在温室条件筛选出与 Vector 苜蓿品中匹配较好的根瘤菌系 CCBAU30138 和 Vector 为材料,应用 RAPD 技术研究 CCBAU30138 田间竞争结瘤能力。结果显示,利用冻融法处理的根瘤、菌体提取的 DNA 可以直接作为 PCR 扩增的模板,扩增结果与以类菌体 DNA 及总 DNA 作为模板处理的结果相同;以根瘤处理物作为 PCR 扩增的模板,应用 RAPD 分子标记技术对接种菌 CCBAU30138 田间竞争结瘤能力进行研究,接种 140d 后,CCBAU30138 田间占瘤率为 47.7%,表明该菌具有较强竞争结瘤能力和持久力。试验结果还说明,在接种菌与土著菌有差异的条件下,应用 RAPD 技术开展竞争结瘤能力研究,可以直接以根瘤处理物作为 PCR 扩增的模板,具有简易、快速、准确等优点。

关键词:RAPD;根瘤菌;占瘤率;紫花苜蓿

Study on competitive nodulation ability of *Rhizobium meliloti* in field test by using RAPD Molecular Marker Method

ZENG Zhao-Hai^{1,2}, CHEN Wen-Xin², HU Yue-Gao¹, SUI Xin-Hua², CHEN Dan-Ming² (1. PERC, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094; 2. College of Biology/Key Laboratory of Agro-Microbial Resource and Application, Ministry of Agricultural, China Agricultural University, Beijing 100094). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(7): 1341~1345.

Abstract: CCBAU30138 was the most effective *Rhizobium* strains in nitrogen fixation screening for Vector cultivar in greenhouse. Study on competitive nodulation ability of CCBAU30138 strain in field test by using RAPD Molecular Marker Method. The results showed that: DNA extracted from nodules and strains by freeze- thaw bacterial cell lysates could be amplified as template for PCR, the same as the total DNA from strain and root nodules. RAPD-PCR amplification of *Rhizobium meliloti* DNA obtained from nodules isolates that were collected 140days after inoculating in the field, the nodule occupancy of CCBAU30138 strain was 47.7%. The result indicated that CCBAU30138 have high competitive abilities and persistence. In general, the results suggested that RAPD Molecular Marker Method was a good method to differentiate the studied strain when the strain has different profiles with the indigenous strains, and it is an easy, rapid and accurate method for the research on ecology and effective strains screen for *Rhizobia*.

Key words: RAPD; *Rhizobium* strain; nodule occupancy; alfalfa

文章编号:1000-0933(2004)07-1341-05 中图分类号:Q938 文献标识码:A

根瘤菌与豆科作物的共生固氮作用在改良土壤肥力、提高作物产量、改善生态环境等方面有着十分重要的意义和作用。在农业和林业生产中,接种根瘤菌以提高豆科作物固氮能力是一种常见的农业措施。豆科作物-根瘤菌共生体的共生固氮效率是由根瘤菌和豆科作物双方的基因所控制,涉及到宿主植物、根瘤菌和环境间复杂的互作,豆科作物和根瘤菌间完全有效的结合仰赖宿主植物相关基因和根瘤菌相关基因的相容性^[1]。因此,为每一种豆科作物筛选最有效的根瘤菌是必须的。由于释放到田

基金项目:国家跨越计划资助项目(2000-22);国家重点基础研究发展规划“973”资助项目(2001CB108905)

收稿日期:2003-12-06;修订日期:2004-04-12

作者简介:曾昭海(1971~),男,河南光山人,博士,主要从事牧草及根瘤菌应用研究。

Foundation item: National Span Plan Project (No. 2000-22) the State Key Basic Research and Development of China (No. 2001CB108905)

Received date: 2003-12-06; Accepted date: 2004-04-12

Biography: ZENG Zhao-Hai, Ph. D, mainly engaged in forage and Rhizobia strain applied research.

间的根瘤菌必然要与土著根瘤菌在土壤营养、生活空间及宿主植物等方面进行竞争,其竞争能力的大小直接影响到能否提高作物的产量和品质。为了深入的了解筛选的根瘤菌在豆科作物上的结瘤状况,需要一个可靠、快速的检测手段。目前用来检测根瘤菌的方法有免疫学方法、酶标记和 DNA 分子标记。免疫学方法有荧光抗体法(FA)、酶联免疫反应(ELISA)血凝结法等,由于有些交叉反应不起作用,因此有相当的局限性^[2];常用的酶标记主要是同工酶标记,但由于同工酶是基因的产物,仅为 DNA 全部多态性为基础的遗传标记,而且其特异性易受环境条件等因素的影响^[3];DNA 分子标记是以 DNA 多态性为基础的遗传标记,能稳定遗传,且遗传方式简单。当前 DNA 多态性的各种分子标记技术发展迅速,已有数十种,并在动植物遗传中广泛的应用。随机扩增多态性 DNA(简称 RAPD)是用短的随机序列 DNA 作为引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增而产生的多态性 DNA 片段,在研究植物病原菌上应用广泛,但应用 RAPD 分子标记技术研究筛选根瘤菌在宿主植物上的结瘤状况尚属首次报道。

1 材料与方法

1.1 菌株及来源

试验用 CCBAU30138 菌株,来源于河北省,是在温室条件下,针对河北省吴桥土壤和 Vector 苜蓿品种筛选的高效菌株,该菌株在所有供选择的 19 株菌株中,效果最好。

1.2 培养条件及培养基

将 30138 接种于含 YMA 培养基平板上,在 28℃ 培养 48 h。

1.3 试剂

Taq 酶由鼎国公司提供,dNTPs 为 TaKaRa 产品,PCR 引物由上海生工合成;生化与分子生物学试剂购自原平皓试剂公司、上海生工生物公司、鼎国生物公司。

1.4 CCBAU30138 菌株总 DNA 提取

取单菌落接种于 5 mL 相应的 YMA 培养基中,在 28℃、150r/min 培养 3d。取 1.0 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中,13 000 r/min 离心 2 min,弃上清。用 SDS-蛋白酶 K 裂解,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)沉淀细胞碎片和多糖,再用异丙醇沉淀来提取总 DNA^[4]。DNA 沉淀溶于 100μl×TE 缓冲液,−20℃ 保存备用。

1.5 土著菌数量的测定

从田间小区中随机挑选 5 个点,将每一点地表 2~3cm 的植物残茬及土壤去掉,取 30cm 以内的土壤,风干后充分混匀,利用 MPN (most probable number)法计算土壤中的土著根瘤菌^[5]数。

1.6 田间接种

2002 年 4 月 28 日将培养好的根瘤菌剂通过测定 OD 值计数后,在田间通过自来水按照一定的比例稀释,在保证每一粒种子接菌数达到 10⁷ 个情况下,均匀的适于田间的播种沟中,播后立即覆土。

1.7 根瘤采集及处理

在播种后 140d,于 2002 年 9 月 18 日在田间接种小区随机进行根瘤采集。在田间挖取后进行冲洗。将冲洗干净的根瘤放在培养皿中,先用 95%乙醇处理 20s,用超纯水冲洗 5~6 次后,用 5%次氯酸钠处理 3min,再用超纯水冲洗 5~6 次。贮存于 −20℃ 冰箱中备用。

1.8 根瘤类菌体 DNA 的提取

将冰箱中取出采集的根瘤分别置于 1.5ml Eppendorf 管中,按照陈强等^[6]方法提取类菌体 DNA。以已知浓度的 λDNA 作为标准,1%琼脂糖凝胶电泳确定待测 DNA 浓度后,−20℃ 保存 DNA。

1.9 PCR 模板的制备及引物合成

从冰箱取出贮备的根瘤,待到完全融解后,随机挑取单一根瘤放在 1.5ml、装有 30μl 超纯水的 Eppendorf 管中,用灭菌牙签充分破碎根瘤。先放在液氮中处理 2 min,再在 65℃ 水浴中处理 2 min,重复处理 3~5 次。将上述处理过的样品放在离心机中,12 000 r/min,离心 10 min,吸取上清液作为 PCR 反应体系的模板。菌体 PCR 模板的制备是从单菌落的培养物中随机挑取一小部分菌体于 1.5 mL、装有 30 μl 超纯水的 Eppendorf 管中,处理方式与根瘤处理相同。

1.10 CCBAU30138 田间根瘤的 PCR 检测

采用 Idaho Technology 毛细管 PCR 仪扩增,根据 Diane. M. Hebb 筛选出比较适合区分苜蓿根瘤菌随机引物,由上海生工完成了 10 个碱基寡聚核苷酸的生物合成,设计如下:

(1)随机引物 5'-AGTCGTCCCC-3'。

(2)10 μl 反应体系中 随机引物 0.3 μl(50 pmol/L, 约 35ng),dNTP 1μl(2.5 mmol/L),10×buffer 1μl,BSA 1μl(2.5 μg/μl),模板 DNA 1μl,Taq DNA 聚合酶 0.8 μl(2 U/μl),ddH₂O 4.9 μl。混匀后吸入毛细管中,加热封口。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 DNA 15 s 后,进行 5 个循环,每个循环为 92℃ 变性 5 s,40℃ 退火 10 s,然后 72℃ 延伸 60 s;接下来进行 35 个循环反应,

每个循环为 92℃变性 2 s,45℃退火 5 s,72℃延伸 60 s;最后 92℃变性 2 s,45℃退火 2 s,72℃延伸 2 min;将获得的 PCR 产物 4℃下保存。

1.11 将扩增的产物直接进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳(16 孔板在 80V 电压,9 孔板 50V 电压)1 h,EB 染色,UV 下检查,照相。

2 结果与分析

2.1 利用 PCR 扩增技术区分菌体、菌体 DNA、根瘤及根瘤 DNA

图 1 中是分别利用 *Rhizobium meliloti* 菌体和直接从苜蓿根部采摘的根瘤,采用液氮冻融法破碎菌体或根瘤,离心后获得的含 *Rhizobium meliloti* DNA 的上清液为模板的 PCR 扩增结果,图中 2、3、6 分别是 96068 的根瘤、菌体提取的 DNA 为模板的 PCR 扩增结果,从中可以看出,它们 PCR 产物的带型一致,说明冻融法处理获得的上清液可以直接作为 PCR 模板,进行扩增。从图中还可以看出,CCBAU96068、CCBAU30138、CCBAU96077 及 CCBAUN210 扩增结果不同,说明利用 PCR 扩增技术可以直接区分不同的菌系。

2.2 田间对照区根瘤 PCR 电泳检测结果

随机挑取从田间对照区采集的根瘤,利用液氮冻溶法进行处理,离心后获得的含 *Rhizobium meliloti* DNA 的上清液作为模板进行 PCR 扩增,扩增后得到电泳图谱(图 2)。从电泳结果可以看出,对照区土著菌可分为 3 种类型,其中 2、3、7、9、10、12 为第 1 种类型,4、5、6、11 为第 2 种类型,8 为第 3 种类型。其中第 1 种、第 2 种所占的比例较多,第 3 种所占比例较少。而且土著菌的带型与检测菌的带型明显不同。

2.3 紫花苜蓿接种根瘤菌的田间占瘤率

图 3 中第 1 条泳带为 CCBAU 30138 菌体 DNA 的 PCR 扩增结果,2~14 为随机采集的田间根瘤,利用冻溶法处理,离心后获得的含 *Rhizobium meliloti* DNA 的上清液作为模板进行 PCR 扩增,从扩增结果可以看出,与第 1 条泳带完全相同的泳道分别是 6、8、10、12、13 和 14 共计 6 条泳道,占瘤率为 46.2%。

图 4 中与 DNA 电泳条带(14)相同的泳带为分别为 3、4、5、7、8、9 和 10 共计 7 个,因此占瘤率为 53.9%。

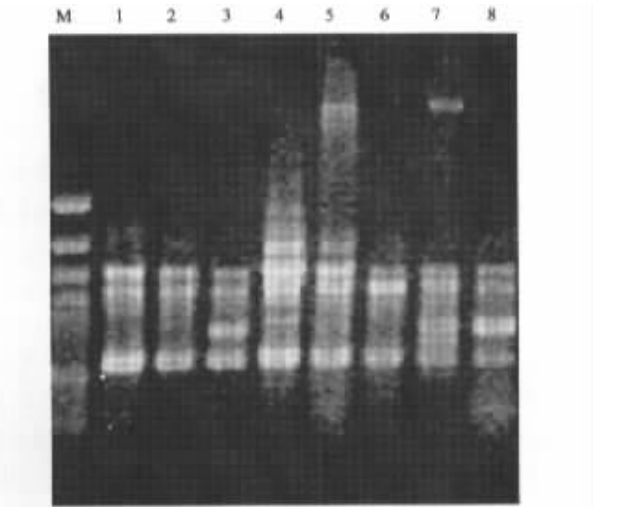
图 5 中 14 个泳道全部为田间根瘤处理后 PCR 扩增的结果,由图中可以看出与与菌体 DNA 条带完全相同的泳道有 1、4~6、8 和 10,共计 6 个,占瘤率为 42.9%。

上述结果可以看出,接种 140d 后,该接种菌的占瘤率为 47.7%,即接种根瘤菌后,有近一半的根瘤是由接种菌形成的,剩下 52.3%的根瘤由土著菌形成。

3 讨论

陈强^[7]、杨江科^[8]、罗明云^[9]、孟颂东^[10]和 Daniel^[11]等应用 AFLP、*luxAB*、*gusA* 和 *gfp* 等标记方法开展优良根瘤菌的筛选或检测根瘤菌的竞争结瘤能力。但上述标记要么存在周期长,供试菌株数受限;要么存在提取 DNA 等繁琐的工作。本研究利用冻融法直接处理田间根瘤,将获得含有根瘤菌 DNA 的上清液作为 PCR 扩增的模板,方法简便快速。但由于 RAPD 标记本身存在重复性不好,有可能在土壤中存在与检测菌相同的带型,因此使用本方法时首先检验土著菌中是否存在与检测菌相同的带型,如果不存在,可以直接利用。本试验中,对照区的根瘤菌类型与处理区完全不同,因此可以应用 RAPD 标记技术进行检测。

评定根瘤菌竞争结瘤能力的指标主要有占瘤率和持久性。以往的研究表明,接种根瘤菌后的起始阶段,豆科植物上所结的



M:Marker(λ DNA/*Hind* III); 1:96068 根瘤 nodules of 96068; 2:96068 菌体 strain of 96068; 3:96077 菌体 strain of 96077; 4:30138 菌体 strain of 30138; 5:N210 菌体 strain of N210; 6:96068 瘤子 DNA DNA extra cted from 96068 nodules; 7:96077 菌体总 DNA Total DNA extracted from 96077 strain; 8:96077 菌体 DNA DNA extracted from 96077 strain

图 1 利用 *Rhizobium meliloti* 菌体、根瘤,以及菌体和根瘤提取的 DNA 为模板的 PCR 扩增结果

Fig. 1 RAPD-PCR amplification of *Rhizobium meliloti* DNA obtained from nodules, strains, and the DNA extracted from the strains and nodules

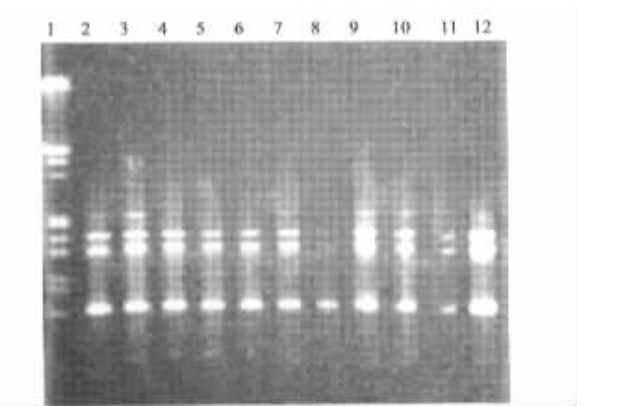


图 2 对照区根瘤 RAPD-PCR 电泳结果

Fig. 2 RAPD-PCR amplification of *Rhizobium meliloti* DNA obtained from nodules isolated from uninoculated control plots

根瘤主要是接种的根瘤菌形成的,随着时间的推移,豆科植物的根瘤主要是土著菌所形成,而土著菌的固氮能力通常较弱,影响了固氮效果的发挥^[12]。土壤中土著菌数量的多少通常是影响接种菌占瘤率的一个关键因素,为了获得超过 50% 的占瘤率,接种菌数量必须超过土著菌的 1000 倍^[13];在黑龙江省进行大豆接种根瘤菌的试验结果表明,当土著菌数量分别是 <100 个/g 干土、100~1000 个/g 干土以及 >1000 个/g 干土时的占瘤率分别为 50.69%、20.37% 和 16.84%^[14]。本研究试验地土著菌数量为 3.5×10^5 个/g 干土,接种菌的数量为 10^9 个/g 干土,田间占瘤率为 47.7%,说明 CCBAU30138 具有较强的竞争能力;Bosworth A H 将含有额外拷贝 *dct* 基因工程菌 RMBPC-2 在 Marshfield 田间接种试验显示,试验小区土壤中土著菌数量为 10^4 个/g 干土,接种 30d 后接种菌的田间占瘤率为 18.2%^[15]。CCBAU30138 菌在接种 140d 后田间占瘤率为 47.7%,说明该菌有较强的持久性。因此,该菌可以在生产中进行推广应用。

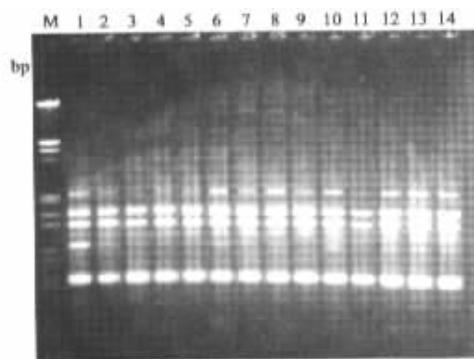


图 3 接种区不同根瘤的 RAPD-PCR 电泳图谱

Fig. 3 RAPD-PCR amplification of *Rhizobium meliloti* DNA obtained from nodule isolates. The size standard (lane M) is λ DNA digested with *EcoR* I and *Hind* III

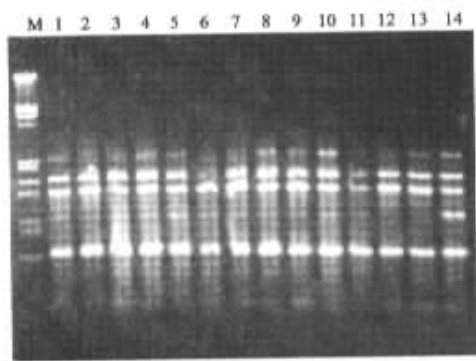


图 4 接种区不同根瘤的 RAPD-PCR 电泳图谱

Fig. 4 RAPD-PCR amplification of *Rhizobium meliloti* DNA obtained from nodule isolates. The size standard (lane M) is λ DNA digested with *EcoR* I and *Hind* III

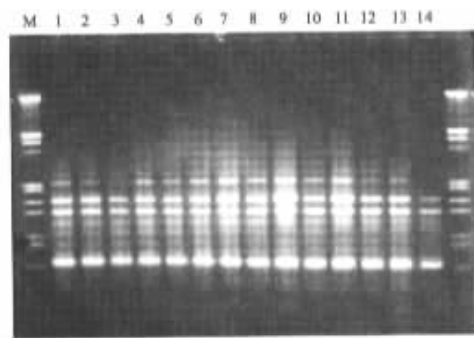


图 5 接种区不同根瘤的 RAPD-PCR 电泳图谱

Fig. 5 RAPD-PCR amplification of *Rhizobium meliloti* DNA obtained from nodule isolates. The size standard (lane M) is λ DNA digested with *EcoR* I and *Hind* III

References:

- [1] Tan G Y. Genetic variation for acetylene reduction rate and other characters in alfalfa. *Crop science*, 1981, **21**: 485~488.
- [2] Liao D C, Luo M Y, Zhang X P, *et al.* Applications of molecular markers in rhizobial ecological study. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, **14**(suppl.): 117~119.
- [3] Jiang S J. The application of RAPD on the study of fungle plant disease. *Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University*, 2001, **13**(1): 17~22.
- [4] Wilson K. RepARATION of genomic DNA from bacteria. Preparation of genomic from bacteria. In: F. M. Ausubul, R. Bent, *et al.* *Current protocols in molecular biology*. J. Wiley and Sons, New N. Y., 1987. 2.1. ~2.12.
- [5] Mahler R L and Wollum A G. Seasonal variation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa hay and cultivated fields in North Carolina. *Agron. J.*, 1982, **74**: 428~431.
- [6] Chen Q, Zhang X P, Li D Y, *et al.* Isolation of DNA from the root nodule of legume plant. *Microbiology*, 2002, **29**(6): 65~68.
- [7] Chen Q, Zhang X P, Li D Y, *et al.* A test on competition in nodulation ability of peanut bradyrhizobia by AFLP fingerprinting method. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(10): 2189~2194.
- [8] Yang J K, Liu M Q, Zhou Q, *et al.* Study on the competitive nodulation of soybean rhizobia by using the report gene *luxAB*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, **35**(1): 110~112.
- [9] Luo M Y, Zhang X P, Li D Y, *et al.* The competitiveness of *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) studied by using *LuxAB* marker gene technique. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(2): 278~283.

[10] Meng S D, Zhang Z Z. Studies on nodulation and efficiency of *S. fredii* using GUS gene. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1997, **8** (6): 595~598.

[11] Daniel J G, Tanya B, and Sharon R L. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of bacteriology*, 1996, **178** (24): 1759~1766.

[12] Brockwell J, Gault R R, Zorin M, *et al.* Effects of environmental variables on the competition between inoculum strains and naturalized populations of *Rhizobium trifolii* for nodulation of *Trifolium subterraneum* L. and on rhizobia persistence in the soil. *Aust. J. Agric. Res.* , 1982, **33**: 803~815.

[13] Singleton P W and Tavares J W. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous rhizobium population. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, **51**: 1013~1015.

[14] Li X M, Gu S Y, Dou X T, *et al.* Study on plant response to inoculation with *Rhizobium Japonicum* strain in different soil types. *Heilongjiang Agricultural Science*, 1998, **4**: 1~5.

[15] Bosworth A H, Williams M K, Albrecht K A, *et al.* Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994,**60**: 3815~3832.

参考文献:

[2] 廖德聪,罗明云,张小平,等. 分子标记技术在根瘤菌生态研究中的应用. 西南农业学报,2001,**14**(增刊): 117~119.

[3] 姜述君. RAPD 标记及其在植物真菌病害研究中的应用. 黑龙江八一农垦大学学报, 2001, **13**(1): 17~22.

[6] 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.

[7] 陈强,张小平,李登煜. 用 AFLP 技术检测慢生型花生根瘤菌竞争结瘤的研究. 生态学报,2003, **23**(10): 2189~2194.

[8] 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. 中国农业科学,2002,**35**(1):110~112.

[9] 罗明云,张小平,李登煜,等. 用发光酶基因(*luxAB*)标记法研究慢生花生根瘤菌的竞争结瘤能力. 生态学报, 2003, **23** (2): 278~283.

[10] 孟颂东, 张忠泽. 应用 GUS 基因研究弗氏中华根瘤菌的结瘤及效果. 应用生态学报, 1997, **8**(6): 595~598.

[14] 李新民,谷思玉,窦新田,等. 不同土壤大豆接种根瘤菌剂反应的研究. 黑龙江省农业科学,1998,**4**:1~5