

# BOX-PCR 分子标记对补播 紫花苜蓿共生根瘤菌田间竞争结瘤能力的研究

肖 猛,刘晓云,刘桂霞,戴燕燕,郭振国,郭晓叶,魏 爽

(河北大学 生命科学学院,河北省微生物多样性研究与应用实验室,河北 保定 071002)

**摘要:**本研究利用 SX01、HB02 两株根瘤菌菌株对山西右玉草地补植的紫花苜蓿中苜一号进行了田间接种试验。为了检验根瘤菌菌株的接种效果和筛选高效紫花苜蓿根瘤菌菌株,采用 BOX-PCR 分子标记方法对接种根瘤菌菌株的田间竞争结瘤能力进行了研究。通过对接种供试菌株及田间分离获得的根瘤菌菌株进行 BOX-PCR 及不同菌株之间的 BOX 分子指纹图谱比较,检测供试菌株的田间占瘤率。结果表明,紫花苜蓿接种供试菌株 60 d 后, SX01、HB02 两株根瘤菌菌株的田间占瘤率分别达到 46.7%、53.3%,说明这两株根瘤菌菌株均具有较强竞争结瘤能力,可以作为高效根瘤菌菌株进行田间推广应用;并阐明了 BOX-PCR 作为一种分子标记方法,可对根瘤菌菌株竞争结瘤能力进行研究。

**关键词:** BOX-PCR; 中苜一号; 根瘤菌; 占瘤率

中图分类号: S144 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)01-0187-04

## Study on Competitive Nodulation Ability of *Rhizobia* in Symbiosis with Reseeding *Medicago sativa* in Field Test by Using BOX-PCR Molecular Marker Method

XIAO Meng, LIU Xiao-yun, LIU Gui-xia, DAI Yan-yan, GUO Zhen-guo, GUO Xiao-ye, WEI Shuang

(College of Life Sciences, Hebei University, Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, Baoding 071002, China)

**Abstract:** In this study, two rhizobial strains SX01 and HB02 were used to carry out the inoculation experiment with reseeded *Medicago sativa* Zhongmu no. 1 in You Yu county, Shanxi Province. In order to test the effect of rhizobial strains inoculation and screen high efficient rhizobia strains, we used BOX-PCR Molecular Marker Method to study the competitive nodulation ability of strain SX01 and HB02. The rhizobia strains reisolated from root nodules of alfalfa and inoculation stains were analyzed by BOX-PCR on meantime, the nodule occupancy of inoculation stains were detected by comparing BOX molecular fingerprint. The results showed that the nodule occupancy of two strains for SX01 and HB02 were 46.7% 53.3% respectively, when the plant are harvest after the plant grew 60 days in the field, this indicated that two rhizobia strains have high competitive abilities and can promote to use it in the field. In general, the results suggested that BOX molecular marker method is an easy, rapid and accurate method for studying the competitive nodulation ability of inoculation of *Rhizobia* in soil.

**Key words:** BOX-PCR; Zhongmu no. 1; *Rhizobia*; Nodule occupancy

山西右玉县地处黄土高原东北部,属晋西北黄土缓坡丘陵区,地势南高北低,平均海拔高度 1 400 m,气候属温带大陆性季风气候区半干旱草原气候<sup>[1]</sup>。草地类型为温性草原类草地,具有天然草地 34 万亩,由于过渡放牧和干旱导致草地普遍退化、

生产力下降,尤其是优良豆科牧草减少和草质变差。研究表明经补播牧草尤其是补播豆科牧草,可有效恢复草地植被,提高草地牧草的粗蛋白质和粗脂肪钙,改变草地植物群落的营养成分含量,从根本上改善了草群的营养成分<sup>[2]</sup>;王玉海等<sup>[3]</sup>研究表明补播

收稿日期: 2010-11-12

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划课题(2007BAD56B01)

作者简介: 肖 猛(1982-),男,山东枣庄人,硕士研究生,主要从事微生物资源与生物固氮研究。

通讯作者: 刘晓云(1968-),女,甘肃镇原人,副教授,博士,主要从事微生物资源与应用研究。

紫花苜蓿和红豆草可以显著提高产量和植被盖度,植被盖度提高 15%~25%,产草量提高 47%~95%。

紫花苜蓿-根瘤菌共生固氮效率涉及宿主植物、根瘤菌和环境之间复杂的互作。以往对高效根瘤菌的筛选主要是以有效性作为最为重要甚至是唯一的指标<sup>[4]</sup>,以此筛选出高效根瘤菌,但在田间应用试验中发现,有一些筛选菌株并不能充分发挥出其应有的共生固氮潜能<sup>[5-6]</sup>。分析其原因,主要是因为土壤中存在大量有效性差但竞争结瘤能力强的土著根瘤菌株,人工选育的菌株尽管固氮的有效性高,但如果比土著性菌株的竞争力差,就不能侵染结瘤,接种效果就不明显。这使人们认识到接种根瘤菌是否有效,很大程度上取决于高效根瘤菌能否在根系形成根瘤,也就是说接种菌株的竞争结瘤能力是接种成功的关键<sup>[7-8]</sup>。因此,为了充分发挥根瘤菌在生产上的应用,必须筛选有效性高且竞争性强的菌株。本研究利用从实验室筛选到的两株紫花苜蓿根瘤菌进行田间试验,来检验两株根瘤菌的田间接种效果,采用 BOX-PCR 分子标记方法来研究两株根瘤菌的田间竞争结瘤能力。

BOX-PCR 是根据 BOX 插入因子设计引物进行 PCR 扩增以获得细菌指纹图谱信息的一种方法<sup>[9,10]</sup>。BOX 插入因子散布于整个细菌基因间,大小为 154 bp,由保守性不同的 boxA、boxB 和 boxC 等亚单位组成,其中 boxA 最为保守<sup>[11]</sup>,据 boxA 设计的引物 boxAIR 可用于对不同菌株进行 PCR 扩增以获得不同的图谱,能够方便快捷地在种及种以下水平上揭示菌株基因组间的差异及其遗传多样性<sup>[12]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验地概况

试验在山西省右玉县山西农业大学野外试验基地进行,其年平均气温 3.68℃,最高气温 36.0℃,最低气温 -40.4℃,≥10℃积温为 2 217.2℃。年平均降雨量 430.9 mm。降水集中在 6-9 月,占年降水量的 77.3%。年平均蒸发量 1 743.5 mm,约为降水量的 4 倍。无霜期 104 d 左右,一般在 9 月下旬结冰。全年日照时数 2 929.6 h,年平均风速 2.6 m/s。土壤类型主要是栗钙土和风沙土。

### 1.2 试验材料

1.2.1 紫花苜蓿种子 中苜一号种子(休眠级数 2~3)由中国农业大学提供,千粒重 1.985 g,室内发芽率 88%。

1.2.2 试验菌株及来源 试验采用 SX01、HB02 两株紫花苜蓿根瘤菌菌株,分离、筛选自河北、山西紫

花苜蓿根瘤。

1.2.3 接种用菌悬液的制备 将 SX01、HB02 供试菌株分别接种到克氏瓶 YMA 培养基上,28℃ 培养 2 d,用 100 mL 无菌水洗下菌体,装进无菌三角瓶中摇床振荡 15 min,测其含菌量 OD 值( $\lambda = 600\text{nm}$ )。

### 1.3 试验设计与方法

1.3.1 根瘤菌田间试验 试验设 3 组处理,施加根瘤菌菌株 SX01、HB02(采用当地土壤与根瘤菌液混合进行种子拌种并保证每一粒种子接菌数达到  $10^7$ )及对照 CK。每个处理 5 个重复,随机排列,共 15 个小区,每小区面积为 2 m × 2 m,小区间隔离带宽 1 m。2009 年 7 月 23 日进行播种,播种前对草地土壤进行轻度翻耙(5~8 cm)并镇压;采用条播方式播种,播种量 0.75 kg/667 m<sup>2</sup>,行间距 30 cm,挖沟 5 cm,播种后覆土 2~3 cm,然后进行镇压。

生长季末(9 月 23 日)每处理分别随机选取 50 株单株植物测量株高、有效根瘤数和干质量(105℃ 杀青 15 min 后放在干燥箱中 65℃ 下烘 24 h,至恒重,称量干质量)。

1.3.2 BOX-PCR 分子标记在根瘤菌田间竞争结瘤能力的应用

1.3.2.1 根瘤的采集及根瘤菌的分离、纯化 每一小区随机采集 5 株植物,共 75 株植物,选择饱满、健壮的根瘤,根瘤水洗后,晾干,卫生纸包裹放到装有变色硅胶的甘油管里,带回实验室进行分离、纯化;镜检确认已纯化,保存 YMA 培养基斜面中。每一根瘤分离获得 1 株菌株,每小区随机选取 3 株根瘤菌菌株,共 45 株,进行 DNA 提取及 BOX-PCR 扩增。

1.3.2.2 DNA 的提取 将菌株分别接种至 TY 斜面培养基于 28℃ 培养 3~4 d 后,加入 1 mL 生理盐水漩涡震荡后,将菌液倒入 1.5 mL Eppendorf 管中,13 000 r/min 离心 2 min,弃上清,用 1 × TE 缓冲液洗涤菌体 3 次,然后参照文献[13]方法快速提取总 DNA。

以已知浓度的  $\lambda$ DNA 为标准,取待测 DNA 样品各 2.5  $\mu\text{L}$ ,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳确定样品 DNA 的浓度。全部 DNA 样品贮藏于 -20℃。

1.3.2.3 BOX-PCR 分析 ①引物: BOXAIR 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'。②25  $\mu\text{L}$  反应体系: 10 × Reaction Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , MgCl<sub>2</sub> (20 mmol/L) 5.6  $\mu\text{L}$ , BSA(10 mg/mL) 0.2  $\mu\text{L}$ , 4 × dNTP (10 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , 100% DMSO 2.5  $\mu\text{L}$ , BOX Primer (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.32  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足至 25.0  $\mu\text{L}$ 。BOX-PCR 扩增程序为 95℃ 预变性 2

min 94℃ 变性 1 min 52℃ 退火 1 min 65℃ 延伸 8 min 接下来进行 30 个循环反应 65℃ 最终延伸 18 min。获得的 PCR 产物 -20℃ 保存。③各取 PCR 产物 6 μL 分别与 1 μL 溴酚蓝混匀 ,用 DNA Marker 作参照 在 2% 琼脂糖凝胶( 含 EB) 电泳 6 h( 电压 90 V) ;电泳后用紫外凝胶扫描仪扫描、照相 ,以备分析。

1.3.3 数据统计处理   Excel 和 SPSS 进行统计分析。

表 1   根瘤菌对中苜一号不同生长性状的影响

Tab.1   Effects of rhizobia on the growth performance of Zhongmu No. 1

根瘤菌 Rhizobia	性状 Characters		
	株高/cm Height	单株干质量/( g/株) Dry weight	单株有效瘤/个 Availably rhizobia
CK	17.85 ±0.24 b	0.298 ±0.028 b	10.7 ±0.56 b
SX01	19.94 ±0.39 a	0.402 ±0.035 a	13.0 ±0.58 a
HB02	19.65 ±0.28 a	0.400 ±0.021 a	12.8 ±0.48 a

注: 根据 Tukey 检验 不同的小写字母表示同一列不同处理存在显著差异( *P* <0.05) 。

Note: Different small letters in a row mean significant different( *P* <0.05) among different treatment by Tukey test.

2.2 BOX-PCR 分子标记在根瘤菌田间竞争结瘤能力的研究

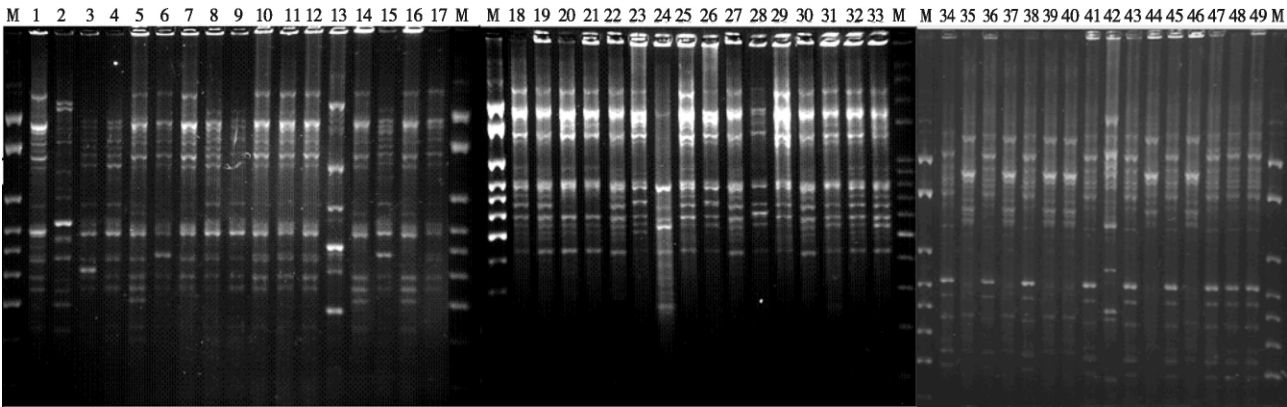
45 株来自田间生长的苜蓿植物分离的根瘤菌

2 结果与分析

2.1 施加根瘤菌对紫花苜蓿中苜一号不同生长性状的影响

根瘤菌与紫花苜蓿是共生关系 ,对紫花苜蓿生长具有显著的影响。由表 1 可知 ,接种根瘤菌对中苜一号植株的株高、单株干质量和有效瘤都有显著影响 ,均不同程度地提高了紫花苜蓿的株高、单株干质量和有效瘤数。

菌株与接种菌株 SX01、HB02 共同采用 GUTC 裂解方法提取 DNA ,并以此为模板进行 BOX-PCR 扩增 ,扩增后得到电泳图谱( 图 1) 。整理结果见表 2。



M. Marker ; 1 33. 接种菌株 SX01; 2 49. 接种菌株 HB02; 3 ~17. 空白对照分离获得的土著根瘤菌菌株; 18 ~32. SX01 接种获得的测试菌株; 34 ~48. HB02 接种获得的测试菌株。

M. Marker; 1 33. Nodulation SX01; 2 49. Nodulation HB02; 3 -17. Indigenous rhizobia strains isolated from control; 18 -32. Test strains were obtained from nodulation SX01; 34 -48. Test strains were obtained from nodulation SX01.

图 1 田间试验获得的根瘤菌与菌株 SX01、HB02 的 BOX-PCR 电泳图谱

Fig.1 BOX-PCR gel electrophoresis profiles of field tests of strains and SX01 HB02 of rhizobia

表 2 田间试验获得的根瘤菌的 BOX-PCR 图谱归类

Tab.2 BOX-PCR gel electrophoresis profiles classification of field tests of rhizobia strains

	空白对照分离获得的土著根瘤菌菌株 Indigenous rhizobia strains isolated from control					SX01 接种获得的测试菌株 Test strains were obtained from nodulation SX01				HB02 接种获得的测试菌株 Test strains were obtained from nodulation HB02		
BOX 图谱类型 BOX map type	c	d	e	f	g	a	c	d	h	b	c	g
菌株合计 Total strain	10	2	1	1	1	7	5	2	1	8	6	1
占瘤率% Nodule occupancy	66.7	13.3	6.7	6.7	6.7	46.7	33.3	13.3	6.7	53.3	40	6.7

从图 1 表 2 可以看出 ,对照区土著菌共有 5 种图谱类型 ,分别为 c、d、e、f、g 型 ,其中 c 型图谱的菌株数目最多 ,具有 10 株 ,占空白对照所分离的根瘤菌菌株的 667% ,说明试验地中具有 c 型图谱的土

著根瘤菌是土壤中主要类群; 其余 4 种土著根瘤菌图谱类型的菌株较少 数量在 1 ~2 株。

接种 SX01 根瘤菌获得的测试菌株的图谱类型共有 4 种 ,分别为 a、c、d、h 型 ,其中具有 a 型图谱的

菌株数目最多,占 SX01 接种获得的测试菌株的 46.7%; c、d、h 型土著根瘤菌分别占 33.3%, 13.3% 6.7%。

接种 HB02 根瘤菌获得的测试菌株的图谱类型共有 3 种,分别为 b、c、g 型,其中具有 b 型图谱的菌株数目最多,占 HB02 接种获得的测试菌株的 53.3%,而具有 c、g 型图谱土著根瘤菌分别占 40% 6.7%。

由于接种菌株 SX01、HB02 图谱类型分别为 a 型、b 型,因此,接种 SX01、HB02 根瘤菌菌株的占瘤率分别为 46.7% 53.3%,均远远高于土著根瘤菌的占瘤率。通过比较未接种根瘤菌中土著根瘤菌的占瘤率,发现接种人工根瘤菌可明显降低土著根瘤菌菌株数目,如 c 型的优势土著根瘤菌由原来未接种的 66.7% 降低到接种 SX01、HB02 根瘤菌菌株后的 33.3% 40% (分别接种 SX01 和 HB02)。结合苜蓿生长指标,接种人工根瘤菌菌株的苜蓿植物的株高和干质量比未接种根瘤菌的对照均得以提高,说明接种人工根瘤菌菌株 SX01 和 HB02 对植物的生长具有明显的促进作用。

### 3 讨论

诸多研究表明,接种根瘤菌可显著改善紫花苜蓿的生长性能,但是否为接种根瘤菌菌株发挥作用尚需要进行分子标记的研究。在以往的高效根瘤菌菌株的筛选中,一般以植物地上生物量为指标作为高效根瘤菌的筛选,但是由于土著根瘤菌的存在及其较强的竞争结瘤能力,田间植物所结根瘤并非都是接种菌株的效果。因此许多研究者在进行高效根瘤菌菌株的筛选中采取各种各样的分子标记方法对供试根瘤菌的占瘤率进行了研究。陈强、曾昭海等<sup>[14-19]</sup>应用 AFLP、RAPD、luxAB、gusA 和 gfp 标记方法对筛选的高效根瘤菌菌株进行结瘤能力的检测。但上述标记存在周期长、费用高、供试菌株数目受限、技术难度大等问题。

BOX-PCR 分子标记具有操作简单、快捷、精确、容易获得较为丰富的扩增条带等特点,而主要被应用于细菌的多样性研究,但该技术的不足之处同 ERIC-PCR、REP-PCR 方法一样,其稳定性受多种因素的影响,如不同批次电泳、使用不同的 PCR 仪、凝胶成像仪、染料及染色效果等对复杂多带谱的 BOX-PCR 结果有一定影响<sup>[20]</sup>。尽管对 BOX-PCR 技术的稳定性存在一些争议,但只要在稳定的试验条件下,BOX-PCR 技术仍然是一种对大量菌株进行多样性研究的有效手段。

本试验将 BOX-PCR 作为一种分子标记来检测田间根瘤菌的竞争结瘤能力尚属首次。该研究结果显示,接种供试根瘤菌菌株后,获得的紫花苜蓿根瘤再分离菌株并非完全是供试根瘤菌菌株,所以植物所结根瘤并非都是接种菌株发挥效果所致,因此应用分子标记的方法对田间根瘤菌菌株进行检验是必要的。在本研究中,克服了 BOX-PCR 进行过程中不稳定的因素,使菌株培养、扩增和电泳条件一致,获得了比较好的检验效果,说明在稳定的条件下,BOX-PCR 技术具有较好的分子标记效果,能够对所接种根瘤菌菌株的竞争结瘤能力进行研究。通过该研究,我们认为除了对接种牧草植物的生长指标进行测定以确定接种根瘤菌对植物的促进作用之外,还应该采用分子标记方法对接种根瘤菌菌株的占瘤率进行跟踪研究,从而确认和证实起促进作用的是接种的根瘤菌而不是土壤中的土著根瘤菌,并以此作为筛选高效根瘤菌菌株的必要措施,以选择高效准确的根瘤菌菌株进行菌剂的研究和应用。

### 参考文献:

- [1] 高志义,杨爱民.山西右玉县天然沙棘林林分类型及其经营作用方向的研究[J].北京林业大学学报,1990,12(3):9-17.
- [2] 刘法涛.百脉根补播草地效果[J].国外畜牧学-草原与牧草,1994,1:44.
- [3] 王玉海.草场除莠与补播牧草试验[J].新疆畜牧业,1985,2:17-18.
- [4] 缪礼鸿,周俊初.根瘤菌竞争结瘤的研究进展[J].华中农业大学学报,2003,22(1):84-89.
- [5] Janice E T. Influence of the size of indigenous Rhizobial Populations on establishment and symbiotic performance of introduced Rhizobia on field-grown Legumes[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1991, 57(1):19-28.
- [6] Streit W, Kosch K, Werner D. Nodulation competitiveness of Rhizobium leguminosarum by phaseoli and Rhizobium tropic strains measured by glucuronidase (GUS) gene fusions[J]. Biol and Fert soils, 1992, 14:140-144.
- [7] Dudeja S S. Persistence of Bradyrhizobium S P. (caianus) in a sandy loam[J]. Soil Biol Biochem, 1989, 21(5):709-713.
- [8] 陈翠翠,马云武,冯永君,等. MADS-box 家族蛋白在植物开花、结实及根瘤形成中的多功能调节作用[J]. 华北农学报,2008,23(S2):80-83.
- [9] Versalovic J, Schneider M, De Bruijn F J, et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR) [J]. Methods in Molecular and Cellular Biology, 1994, 5:25-40.
- [10] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R, et al. Distribution of

- repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes [J]. *Nucleic Acids Research* ,1991 ,19( 24) : 6823 – 6831.
- [11] Thearith K ,James V ,Lupski James R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX Elements in diverse bacteria [J]. *Genome Research* ,1995 5: 408 – 418.
- [12] 杨凤环 ,李正楠 ,姬惜珠 ,等. BOX-PCR 技术在微生物多样性研究中的应用 [J]. *微生物通报* 2008 ,35( 8) : 1282 – 1286 .
- [13] 高俊莲 ,陈文新 ,Terework Z ,等. 应用 AFLP 技术对斜茎黄芪根瘤菌遗传多样性的研究 [J]. *应用与环境生物学报* ,1999 5( 4) : 387 – 395 .
- [14] Chen Q ,Zhang X P ,Li D Y *et al.* A test on competition in nodulation ability of peanut bradyrhizobia by AFLP fingerprinting method [J]. *Acta Ecologica Sinica* ,2003 ,23( 10) : 2189 – 2194.
- [15] 曾昭海 ,陈文新 ,胡跃高 ,等. 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 [J]. *生态学报* 2004 24( 7) : 1341 – 1344.
- [16] Luo M Y ,Zhang X P ,Li D Y ,*et al.* The competitiveness of *Bradyrhizobium* sp. ( *Arachis*) studied by using LuxAB marker gene technique [J]. *Acta Ecologica Sinica* 2003 23( 2) : 278 – 283.
- [17] Yang J K ,Liu M Q ,Zhou Q *et al.* Study on the competitive nodulation of soybean rhizobia by using the report gene luxAB [J]. *Scientia Agricultura Sinica* ,2002 ,35( 1) : 110 – 112.
- [18] Meng S D ,Zhang Z Z. Studies on nodulation and efficiency of *S. fredii* using GUS gene [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology* ,1997 8( 6) : 595 – 598.
- [19] Daniel J G ,Tanya B ,Sharon R L. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa ( *Medicago sativa*) [J]. *Journal of Bacteriology* ,1996 ,178( 24) : 1759 – 1766.
- [20] Laguerre G ,Patrick M ,Marie-reine A ,*et al.* Typing of Rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology* ,1996 62( 6) : 2029 – 2036.