

 农业科学技术理论研究丛书



花生根瘤菌的 多样性及应用

HUASHENGGENLIUJUNDEDUOYANGXINGJIYINGYONG

张小平 主编



科学出版社
www.sciencep.com

农业科学技术理论研究丛书

花生根瘤菌的多样性及应用

张小平 主编

郑林用 陈 强 副主编



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书介绍了花生根瘤菌的多样性、系统发育、分类、高效菌株选育及应用方面的最新研究成果,重点突出了现代根瘤菌的多相分类技术体系。在高效菌种选育中,考虑了花生品种-土壤条件-菌株遗传型的匹配关系,系统地比较了各种分子标记和 DNA 指纹技术在根瘤菌竞争能力研究中的应用的可行性。

本书内容新颖,研究方法先进。本书可供大专院校师生、科研单位及生产单位技术人员参考使用。

图书在版编目 (CIP) 数据

花生根瘤菌的多样性及应用/张小平主编. —北京:科学出版社,2009
(农业科学技术理论研究丛书)

ISBN 978-7-03-023366-0

I. 花… II. 张… III. 花生-根瘤菌-生物多样性 IV. S565.206

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 176062 号

责任编辑:胡华强 甄文全 席 慧/责任校对:陈玉凤

责任印制:张克忠/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009 年 1 月第一次印刷 印张:17 3/4

印数:1—1 500 字数:400 000

定价:60.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

序

花生是我国重要的豆科油料作物，也是我国重要的出口创汇农产品，据统计，其年出口量占世界花生市场的42%，年均创汇5亿美元以上。研究花生根瘤菌的多样性，选育优良菌株进行人工接种，对提高花生产量和品质具有重大意义。

本书作者长期致力于花生根瘤菌的基础及应用研究，先后承担了国家“973计划”、国家自然科学基金及欧盟框架项目。应用现代分子生物学技术系统地揭示了花生根瘤菌的遗传多样性、系统发育及分类地位。针对“天府”花生系列品种，以及四川花生种植区酸性及石灰性紫色土特点，阐明了花生根瘤菌的有效性和竞争性与花生品种、土壤养分条件的最佳匹配关系，为充分发挥花生根瘤菌剂的固氮效果提供了科学依据。

作者集多年的研究成果，汇编成《花生根瘤菌的多样性及应用》一书，我欣然为该书作序，并借此机会把该书介绍给广大读者，希望在我国根瘤菌共生固氮研究和应用从低谷走向再升高的进程中起到促进作用。

陈文新^①

2008年5月于北京

^① 陈文新：中国农业大学教授，中国科学院院士，国际著名根瘤菌分类学家。

前 言

根瘤菌是一类广泛分布于土壤中的革兰氏阴性细菌，与豆科植物相互识别后，形成根瘤或茎瘤，固定空气中的分子态氮形成氨，为植物提供氮素养分，从而培肥地力，提高植物产量和品质。据估计，每年收获农产品要从土壤中带走约 1.1 亿吨氮素，施用氮肥可供应约 4000 万吨，其余所需的 7000 万吨是由生物固氮补给的。因此，研究和合理利用生物固氮资源，对于促进农业的可持续发展和生态环境的永续利用具有重大意义。

花生是一种食、油两用的豆科经济作物，栽培的品种多，分布的范围广，为广大农民的增收起到了重要作用。由于花生品种及其分布的生态环境的多样性，必然影响其共生伙伴——根瘤菌的进化与发育。因此，发掘花生根瘤菌的多样性基因资源，选育与品种及土壤生态条件相匹配的高效菌株，能充分发挥共生体系的固氮效率。

19 世纪 70 年代以来，本文作者们一直从事高效花生根瘤菌基因资源的多样性及应用研究，得到了四川省科学技术厅和四川省教育厅、国家自然科学基金、“973 计划”和欧盟科技框架计划项目的资助，取得了一系列研究成果：花生根瘤菌的多样性及分类地位；花生根瘤菌共生基因的分布及共生效应；标记基因及 DNA 指纹技术在花生根瘤菌的有效性及竞争性鉴定中的应用；高效花生根瘤菌的选育及示范推广；花生品种—根瘤菌—土壤条件的最佳匹配关系。历经三代人的不懈努力，选育出一系列高效菌株，在生产上接种应用，取得了显著的增产效果。现将研究成果整理汇编成《花生根瘤菌的多样性及应用》一书，奉献给广大读者，旨在与同行交流及供研究人员参考。囿于水平和时间，难免有疏漏和不足之处，敬请读者指正。

编 者

2008 年 4 月

目 录

序

前言

第一篇 花生根瘤菌的多样性

花生根瘤菌的遗传多样性与分类.....	2
用 AFLP 技术研究花生品种——花生根瘤菌的遗传匹配关系	37
天府花生品种内生细菌的分离及种群多样性	63
四川慢生型花生根瘤菌的多样性	80

第二篇 花生根瘤菌的有效性、竞争性及应用

酸性紫色土上钼对花生根瘤菌共生固氮的影响	94
石灰性紫色土铁对花生根瘤菌共生固氮的影响.....	109
利用水培法研究铁对快生型根瘤菌不同菌株固氮效应的影响.....	118
钼、硼与花生根瘤菌复配及在酸性紫色土上的接种效果.....	124
“Mo+复合花生根瘤菌”复合菌肥的田间应用效果	139
分子标记技术在根瘤菌生态研究中的应用.....	144
用 AFLP 技术检测慢生型花生根瘤菌的竞争性	151
用发光酶基因 (<i>LuxAB</i>) 标记法研究慢生花生根瘤菌的竞争结瘤能力	164
用 <i>gusA</i> 和 <i>celB</i> 基因标记技术检测花生根瘤菌的竞争性	180
基因标记法研究紫色土上施铁钼肥对花生根瘤菌有效性及竞争性的影响.....	200
快生型花生根瘤菌株与土著根瘤菌的竞争结瘤能力.....	222
花生根瘤菌共生固氮体系的研究进展.....	238
金沙江干热河谷区土著花生根瘤菌的耐旱性.....	248
一株高效花生根瘤菌的有效性 & 遗传特性.....	266

第一篇 花生根瘤菌的多样性

花生根瘤菌的遗传多样性与分类

张小平¹, 李阜棣², 李登煜¹, Lindström Kristina³

(1. 四川农业大学资源环境学院, 雅安 625014; 2. 华中农业大学生命科学院, 武汉 430070; 3. 芬兰赫尔辛基大学应用化学与微生物学系, 赫尔辛基 00014)

摘要:本研究用从四川省4个花生主产区和2个花生品种上分离的22株花生根瘤菌为研究对象, 以 *B. japonicum*、*B. elkanii* 的代表菌株和分类地位未知的其他慢生根瘤菌株 *Bradyrhizobium* sp. 为参照, 测定了花生根瘤菌的生长速度, 采用 16S rDNA PCR-RFLP、16S rDNA 部分序列 (780bp) 分析、rep-PCR、AFLP、FAME 和 DNA-DNA 杂交方法, 系统地研究了四川花生根瘤菌的遗传多样性和系统发育。试验结果表明: 四川花生根瘤菌为慢生型 *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*), 与分离自以色列和津巴布韦的花生根瘤菌相似。rep-PCR、AFLP 和 16S rDNA PCR-RFLP 分析揭示了四川花生根瘤菌存在高度的遗传多样性。根据 REP-PCR 和 AFLP 指纹图谱的相似性进行的聚类分析结果与菌株的分离地和寄主相关, 即分离自同一地点或同一种寄主的菌株聚为一群, 表明了环境条件对根瘤菌的发育和遗传分化有影响。但是, ERIC-PCR 聚类分群的结果与寄主和菌株分离地的相关性不明显。在 58% 同一相似性水平处, REP-PCR 比 ERIC-PCR 指纹图谱揭示的多样性更丰富。AFLP 在反映关系密切的菌株间微小遗传差异性时是一种非常有效的方法。16S rDNA PCR-RFLP 分析表明四川花生根瘤菌存在 A、B、C、D 4 种遗传型, 绝大多数为 B 型, 在所用的 8 种限制性内切核酸酶中, *Dde* I 切割的带谱最丰富, 是反映慢生根瘤菌 16S rDNA 序列差异性的最有效的限制性内切核酸酶。16S rDNA PCR-RFLP、16S rDNA 部分序列测定、FAME 和 DNA-DNA 杂交分析结果一致表明, 花生根瘤菌与 *B. japonicum* 的系统发育关系最接近。FAME 分析的结果表明, 花生根瘤菌与 *B. japonicum* 虽然均含有脂肪酸 16:1 ω 5c, 但前者的含量显著地高于后者, 其他慢生根瘤菌不含这种脂肪酸。依据本试验结果和花生根瘤菌与慢生大豆根瘤菌属于同一互接种族的事实, 作者认为花生根瘤菌的确切分类地位应定为慢生大豆根瘤菌种的一个生物型 *Bradyrhizobium japonicum* biovar *Arachis*。

关键词: 花生根瘤菌, 分类, 16S rDNA, rep-PCR, AFLP, FAME, DNA-DNA 杂交, 遗传多样性

Diversity and taxonomy of *Bradyrhizobium* strains isolated from the root nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.)

Abstract: Twenty-two rhizobial strains isolated from the root nodules of two Sichuan peanut cultivars (*Arachis hypogaea* L. tianfu No. 3 and a local cultivar) growing at four different sites in Sichuan province were characterized by growth rate, rep-PCR, AFLP, PCR-RFLP of 16S rDNA, partial sequencing of ribosomal genes, fatty acid-methyl ester analysis (FAME) and DNA-DNA hybridization, and were compared with strains representing *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii* and other unclassified *Bradyrhizobium* sp. The results indicated that all isolates from Sichuan were bradyrhizobia that could be expressed as *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*), and were resemble to the strains from Africa and Israel. The results of rep-PCR fingerprints, AFLP fingerprinting patterns and PCR-RFLP of 16S rDNA revealed the high diversity among the Sichuan peanut bradyrhizobia. Four 16S rDNA genotypes (A, B, C, D) were detected, and the majority were genotype B. Among the 8 restriction enzymes used, *Dde* I was the most discriminating enzyme. The dendrogram constructed using REP-PCR and AFLP fingerprints grouped the strains mainly according to their geographical and cultivar origins. However, the clusters based on the similarity of ERIC-PCR fingerprints did not correlated well with the geographical and cultivar origins as REP-PCR and AFLP. At the same similarity level of 58%, REP-PCR revealed more diversity than that of ERIC-PCR. AFLP is more useful in revealing minor differences among closely related strains. The results of 16S rDNA PCR-RFLP, the partial sequence analysis of 16S rRNA gene, FAME and DNA-DNA hybridization were in good agreement which indicated that *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) were phylogenetically closely related to *B. japonicum*. Mainwhile, FAME data showed that *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) and *B. japonicum* were differing with other bradyrhizobia in the presence of the fatty acid 16:1 ω 5c. However, the level of the fatty acid 16:1 ω 5c in *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) was significantly higher than that in *B. japonicum* strains. The results suggested that *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) could be a biovar of *B. japonicum* biovar *Arachis*.

Key words: *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*), Taxonomy, 16S rDNA, rep-PCR, AFLP, FAME, DNA-DNA hybridization, Genetic diversity

花生在世界农业和人民生活占有重要地位, 为世界各国温暖地区的食、油两用豆

科经济作物。它能与“豇豆族杂群”(cowpea miscellany)中的某些根瘤菌结瘤固氮。“豇豆族杂群”是按传统的“互接种族”关系为标准进行归类的一群寄主关系复杂、分类地位不清楚的根瘤菌。因此,花生根瘤菌的系统分类地位是一个有待研究的问题。我国栽培的花生品种多,约有200个栽培种,可归纳为普通丛生型、龙生型、珍珠豆型和多粒型4种遗传型^[1]。分布的范围广,包括黄河流域、长江流域、东南沿海地区、云贵高原、黄土高原等温暖地带,适宜于由各种母质发育而成的质地较轻的土壤。花生品种及其分布的生态环境多样性,必然影响与之共生的根瘤菌的进化与发育,不同生态条件下的花生根瘤菌在系统发育过程中,可能向不同方向进化,造成性状及种类的多样性。Van Rossum等^[2]对15株分离自非洲的花生根瘤菌进行了RAPD分析,发现了A、B两种遗传型。采用多种分子标记技术和“分子钟”基因序列分析,系统地研究我国花生根瘤菌的遗传多样性和系统发育关系,目前尚无报道。

本研究用FAME、rep-PCR、AFLP、16S rRNA PCR-RFLP、16S rDNA部分序列分析和DNA-DNA杂交技术,系统地研究四川不同生态条件下的花生根瘤菌的遗传多样性,以及花生根瘤菌与其他慢生根瘤菌的系统发育关系。旨在为确定花生根瘤菌的系统分类地位提供科学依据;保藏并合理利用花生根瘤菌多样性的基因资源,为高效花生根瘤菌的选育和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

从4个花生生产区分离的花生根瘤菌株和12株参照菌株列于表1。采集地常年种植花生、油菜或小麦,未接种过根瘤菌剂。分离和培养花生根瘤菌的培养基为YEM+0.5%甘油(简称YEMG)^[3,4]。菌株的纯度用革兰氏染色法检验。用水培养法在无氮培养液中进行了回接试验。

为了确定花生根瘤菌的快生或慢生性,在YEMG平板上28℃培养7d后测定了菌落的直径(表1),并在YEMG+0.0025%溴百里酚蓝平板上测定了菌株的产酸或产碱性,蓝色为产碱,黄色为产酸(表1)。

表1 供试菌株
Table 1 Bacterial strains used

菌株 Strains	寄主 Host plant	分离地、来源、 参考文献 Origin, source, reference	菌落直径 Colony size/mm	产碱性 Alkali production	16S rDNA 序列号 16S rDNA sequence accession number
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Arachis</i>)					
Spr2-8	<i>A. hypogaea</i> L. tianfu No. 3	洪雅	0.70	+	AJ162569
Spr2-9	<i>A. hypogaea</i> L. tianfu No. 3	洪雅	0.65	+	
Spr3-1	<i>A. hypogaea</i> L. tianfu No. 3	雅安	0.70	+	
Spr3-2	<i>A. hypogaea</i> L. tianfu No. 3	雅安	0.60	+	

续表

		分离地、来源、 参考文献	菌落直径	产碱性 Alkali production	16S rDNA 序列号 16S rDNA sequence accession number
菌株 Strains	寄主 Host plant	Origin, source, reference	Colony size/mm		
Bradyrhizobium sp. (Arachis)					
Spr3-3	A. hypogaea L. tianfu No. 3	雅安	0.65	+	AJ132570
Spr3-4	A. hypogaea L. tianfu No. 3	雅安	0.50	+	
Spr3-5	A. hypogaea L. tianfu No. 3	雅安	0.50	+	
Spr3-6	A. hypogaea L. tianfu No. 3	雅安	0.60	+	
Spr3-7	A. hypogaea L. tianfu No. 3	雅安	0.60	+	
Spr4-1	A. hypogaea L. local	雅安	0.70	+	AJ132571
Spr4-2	A. hypogaea L. local	雅安	0.80	+	
Spr4-4	A. hypogaea L. local	雅安	0.70	+	
Spr4-5	A. hypogaea L. local	雅安	0.80	+	
Spr4-6	A. hypogaea L. local	雅安	0.70	+	
Spr4-10	A. hypogaea L. local	雅安	0.80	+	AJ132567
Spr6-3	A. hypogaea L. tianfu No. 3	宜宾	0.65	+	
Spr7-1	A. hypogaea L. tianfu No. 3	南充	0.65	+	
Spr7-5	A. hypogaea L. tianfu No. 3	南充	0.70	+	
Spr7-7	A. hypogaea L. tianfu No. 3	南充	0.70	+	
Spr7-8	A. hypogaea L. tianfu No. 3	南充	0.50	+	AJ132568
Spr7-9	A. hypogaea L. tianfu No. 3	南充	0.70	+	
Spr7-10	A. hypogaea L. tianfu No. 3	南充	0.80	+	
283A	A. hypogaea L.	以色列	0.75	+	
297A	A. hypogaea L.	以色列	0.75	+	
MAR253	A. hypogaea L.	津巴布韦	0.60	+	U12888
MAR411	A. hypogaea L.	津巴布韦	0.65	+	U12889
MAR1445	A. hypogaea L.	津巴布韦	0.65	+	U12900
Bradyrhizobium japonicum					
ATCC10324 ^T (=USDA6 ^T)	Glycine max	ATCC, Barrera et al. 1997			U69938
USDA110	Glycine max	Barrera et al. 1997			Z35330
USDA59	Glycine max	Young et al. 1991			M55489
USDA123	Glycine max	Van Rossum et al. 1995			U12912
Bradyrhizobium elkanii					
USDA76 ^T	Glycine max	Barrera et al. 1997			U35000
Bradyrhizobium sp.					
BTAil	Aeschynomene indica	P. H. Graham			M55492
NAP2257	Lotus uliginosus	Young et al. 1991			M55486
PCR3047	Glycine max	Young et al. 1991			M55488

					续表
菌株 Strains	寄主 Host plant	分离地、来源、 参考文献 Origin, source, reference	菌落直径 Colony size/mm	产碱性 Alkali production	16S rDNA 序列号 16S rDNA sequence accession number
<i>Bradyrhizobium</i> sp.					
LMG10689	<i>Acacia albida</i>	Dupuy <i>et al.</i> 1994			X70405
LMG9966	<i>Acacia mangium</i>	Dupuy <i>et al.</i> 1994			X70403
USDA3505	<i>Lupinus montanus</i>	Barrera <i>et al.</i> 1997			U69636
ATCC35685	<i>Azospirillum cleavelandensis</i>				M69186
LMG8442 ^T	<i>Blastobacter denitrificans</i>				S46917
ATCC17001	<i>Phodopseudomonas palustri</i>				D25312

采用稀释平板计数法, 选取分属于 A、B、C、D 遗传型的 5 株花生根瘤菌, 在 28℃ YEMG 液体振荡培养条件下, 分别在 0h、1h、5h、10h、24h、48h、72h、96h 和 120h 取样测数绘制生长曲线, 计算对数期代时 $G^{[5]}$ 。

1.2 总 DNA 提取

将供试菌株接种于 TY 液体培养基中, 28℃ 振荡培养 5d 后, 用 TE 缓冲液洗涤菌体, 总 DNA 按 Ausunel 等^[6]介绍的方法提取。DNA 溶液浓度用已知浓度的 DNA 在 1.0% 的凝胶上同时电泳确定, 收集于微量离心管中 -20℃ 保存, 用于 PCR 扩增的模板 DNA。

1.3 16S rDNA PCR-RFLP

PCR 扩增: 用 fD1 和 rD1^[7] 为引物 (引物序列见表 2), 按 Leguerre G 描述的方法^[8]对全部供试菌株的 16S rDNA 进行扩增, 取 5μL 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 检验扩增长度和产量。

表 2 供试引物
Table 2 The primers

引物 Primers	序列 Sequences	用途 Uses
REP 1R-1 ^[9]	5'-IIICGICGICATCIGGC-3'	REP-PCR
REP 2-1 ^[9]	5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'	REP-PCR
ERIC 1R ^[9]	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	ERIC-PCR
ERIC 2 ^[9]	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	ERIC-PCR
<i>Eco</i> R I 引物 ^[10]	5'-GACTGCGTACCAATTCGC-3'	AFLP
<i>Mse</i> I 引物 ^[10]	5'-GATGAGTCCTGAGTAACG-3'	AFLP
rD1 ^[7]	5'-CCCGGGATCCAAGCttAAGGAGGTGATCCAGCC-3'	16S rDNA PCR-RFLP

续表

引物 Primers	序列 Sequences	用途 Uses
fD1 ^[7]	5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'	16S rDNA PCR-RFLP
pA' ^[11]	5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'	16S rDNA 测序
pE' ^[11]	5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'	16S rDNA 测序

酶切、电泳和成像：各取 9 μ L PCR 扩增产物，分别用 8 种限制性内切核酸酶 *Hae* III、*Cfo* I、*Rsa* I、*Hinf* I、*Msp* I、*Mbo* I、*Dde* I 和 *Mse* I (Promega) 在 37℃ 下进行 1h 酶切反应。酶切产物在 200V 电压下 5% 的琼脂糖凝胶上电泳 3h，获得全部供试菌株的 16S rRNA 8 种酶切电泳图谱，在紫外光的照射下，用 P55 正负胶片成像。

1.4 16S rDNA 部分序列分析

根据 16S rDNA PCR-RFLP 分析的结果，选择了 Spr2-8、Spr3-7、Spr4-5、Spr7-1、Spr7-10 和一株分离至以色列的花生根瘤菌 283A 作为研究对象，测定了 16S rDNA 起始部分 780bp 片段的序列。

PCR 扩增：以总 DNA 为模板，采用一对引物 pA' 和 pE'^[11] (引物序列见表 2) 进行 16S rDNA 扩增^[12]。

序列测定：PCR 扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上经电泳检验后，扩增产物直接用于序列测定。采用固相法在 ALF (automated laser fluorescent) DNA 序列分析仪中自动测序。为了保证测序结果的准确性，同时对双链进行了测定。所测序列为 16S rDNA 起始部分 780bp 片段。

序列分析：用 GCG 软件包 (Version 8, genetic computer group, 575 science drive Madison, Wisconsin, USA53711) 中的 PILEUP 程序将供试菌株的 16S rDNA 序列的相应位置对齐，用 CLUSTALW 程序^[13]和 UPGMA 方法建立系统发育树。

1.5 rep-PCR DNA 指纹分析

PCR 扩增：以总 DNA 为模板，用 REP 1R-1、REP 2-1、ERIC 1R 和 ERIC 2 为引物^[9]，进行 REP-PCR 和 ERIC-PCR 扩增 (REP-PCR 和 ERIC-PCR 合简称 rep-PCR，扩增引物序列见表 2)。REP-PCR 扩增反应液组成为：Dynazyme (10 $\times$) 缓冲液 2.5 μ L，100% DMSO 2.5 μ L，4dNTP (10mmol/L) 1.0 μ L，MgCl₂ (25mmol/L) 5.6 μ L，BSA (20mg/mL) 0.2 μ L，引物 REP 1R-1 (30pmol) 和 REP 2-1 (30pmol) 各 0.75 μ L，Dynazyme DNA 聚合酶 (2U/ μ L) 1 μ L，用无菌重蒸馏水补至总体积 25 μ L。ERIC-PCR 扩增总体积 25 μ L 反应液组成中，引物 ERIC 1R (30pmol) 和 ERIC 2 (30pmol) 各 0.6 μ L，除引物外的其他成分与 REP-PCR 扩增反应液相同 (总体积 25 μ L)。

REP-PCR 扩增反应程序为: 首先 95℃ 初始变性 6min; 然后 94℃ 变性 1min, 40℃ 复性 90s, 65℃ 延长 8min, 重复 30 个循环; 最后 65℃ 延伸 16min。ERIC-PCR 扩增反应程序为: 首先 95℃ 初始变性 7min; 然后 94℃ 变性 1min, 52℃ 复性 90s, 65℃ 延长 8min, 重复 30 个循环; 最后 65℃ 延伸 16min。

扩增产物电泳分离及聚类分析: PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 35V 电压下电泳 12h 后, 用 EB 染色, 紫外光下观察 rep-PCR 指纹图谱, 用 P55 正反胶片成像, 用 Gelcompar 2.2 (Applied Maths BVBA, Belgium) 凝胶分析软件进行 DNA 指纹图谱聚类分析, 获得 UPGMA 树状图。

1.6 AFLP 分析

酶切连接: 在 200ng 全量 DNA 中, 加入 10× 酶切连接缓冲液 2μL, *EcoR* I (12U/μL) 2μL, *Mse* I (4U/μL) 1μL, *EcoR* I 连接子 (5μmol/L) 0.5μL, *Mse* I 连接子 (10μmol/L) 1μL, T4 DNA 连接酶 (4U/μL) 1μL, 无菌重蒸馏水补足至 20μL, 再加 20μL 矿物油。置 PCR 仪中进行酶切连接反应。反应条件是 37℃ 恒温 2~3h, 然后以每分钟 0.5℃ 的速度降至 15℃, 再经 70℃ 高温处理 15min 使酶变性失活。将反应液置 -20℃ 保存, 作为 AFLP 扩增的模板 DNA^[10]。

AFLP 扩增反应液的组成为: Dynazyme (10×) 缓冲液 2μL, 4dNTP (2mmol/L) 2μL, 选择性碱基 *EcoR* I 引物 (5μmol/L) 和选择性碱基 *Mse* I 引物 (10μmol/L) 各 1μL, Dynazyme DNA 聚合酶 (2U/μL) 1μL, 经酶切连接的模板 DNA 1μL, 用无菌重蒸馏水补足至总体积 20μL。

PCR 扩增程序为: 94℃ 变性 30s, 59℃ 复性 1min, 70℃ 延伸 1min, 30 个循环。最后 70℃ 延伸 3min。实验中所用方法和选择性碱基引物的设计参照 Vos 等^[10] 发表的文献, 引物序列见表 2。

聚丙烯酰胺凝胶电泳及结果分析: PCR 扩增产物用 Vos 等^[10] 的方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和银染。各菌株的 AFLP 图谱用惠普扫描仪扫描, 并用 Gelcompar 软件按 UPGMA 平均连锁法进行聚类分析, 获得 AFLP 树状图谱。

1.7 FAME

供试菌株 (表 1) 的培养、皂化、甲基化及脂肪酸的分析按照 Jarvis、Tighe^[14] 和 Graham 等^[15] 的方法进行。数据计算和分析用 Microbial Identification System 软件 (Newark, Delaware, USA)。供试花生根瘤菌的脂肪酸组成与 45 株 *B. japonicum*、14 株 *B. elkanii* 和 14 株其他慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium* sp.)^[15] 进行系统比较, 用二元分析方法获得花生根瘤菌脂肪酸组成与参照菌株脂肪酸组成的相似性坐标聚类图。

1.8 代表菌株的 G+C (mol%) 和 DNA-DNA 杂交

1.8.1 菌种

16S rDNA 遗传型分析结果表明, 四川花生根瘤菌有 A、B、C、D 4 种遗传型 (genotype), 绝大多数为 B 型, 本研究选取了 Spr2-8 (A)、Spr3-7 和 Spr7-10 (B)、

Spr4-5 (C)、Spr7-1 (D) 共 5 株花生根瘤菌代表菌株, 分别与模式菌株 *B. elkanii* USDA76^T 和 *B. japonicum* ATCC10324^T 进行 DNA-DNA 杂交。

1.8.2 菌体培养和收集

供试菌株在 YEMG 斜面上活化后, 接种于盛有 250mL 液体培养基的三角瓶中, 转速 120r/min, 28℃ 恒温振荡培养 4d (对数生长中后期), 镜检无杂菌后, 转速 5000r/min, 4℃ 离心 15min 收集菌体, 用 TES 悬浮菌体, 上述相同条件下离心洗涤菌体 3 次。

1.8.3 DNA 提取

洗涤后的菌体, 加入 15mL 1×TES 充分打散, 加 0.3mg 溶菌酶, 37℃ 水浴保温 1h 后, 加 20% SDS 1mL, 60℃ 水浴保温 10min, 加蛋白酶 K (50μg/mL 菌液), 37℃ 水浴保温 1h, 温和摇动, 加 8mL 5mol/L NaClO₄, 加等体积的 P : C : I [苯酚 : 氯仿 : 异戊醇 = 25 : 24 : 1 (V/V)] 混合液, 充分振荡呈乳浊液, 5000r/min, 40℃, 离心 30min, 然后取上清液, 5000r/min, 4℃, 重复离心 2 次, 至无蛋白膜出现; 加入 0.3mL RNase (用 10mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 配制成 10mg/mL 的溶液, 100℃ 加热 15min, 缓慢冷却至室温, 小量分装, 置 -20℃ 保存备用); 37℃ 水浴保温 1h; 加入等体积的 C : I 混合液 [氯仿 : 异戊醇 = 24 : 1 (V/V)], 充分振荡; 5000r/min, 40℃, 离心 30min; 上清液中加入 1/10 倍体积冷 3mol/L NaAC-1mol/L EDTA-Na₂ 及等体积冷异丙醇, 混合, DNA 沉淀; 离心, 倾去上清液, 加 70% 乙醇离心洗 2 次; 95% 乙醇脱水风干; 溶于 0.1×SSC (0.015mol/L NaCl, 0.0015mol/L 柠檬酸钠, pH7.0) 中, 检查纯度、浓度。

1.8.4 DNA 纯度、浓度检查

分别测定 DNA 样品在 260nm、280nm、230nm 的吸光值, 如果 $A_{260} : A_{280} : A_{230} = 1 : 0.515 : 0.450$, 则纯度符合要求。如果 A_{280} 和 A_{230} 分别与 A_{260} 的比值大于 0.515、0.450, 需重复 DNA 提取步骤中的去蛋白质和 RNA 步骤, 使其符合纯度要求。DNA 浓度为 A_{260} 大于 2.0 (100μg/mL)。

1.8.5 DNA G+C (mol%) 测定

采用热变性法^[16]测定 G+C (mol%) 含量。DNA 纯度要求为: $A_{260} : A_{280} : A_{230} = 1 : 0.515 : 0.450$, DNA 浓度 $A_{260} = 0.2 \sim 0.5$ (溶于 0.1×SSC 中)。离子强度对 T_m 影响明显, 全部供试菌株 DNA 样品溶解及 T_m 值测定中所需 SSC 缓冲液均需来自同一瓶 10×SSC 母液。

T_m 值的测定: 将待测 DNA 样品用 0.1×SSC 稀释至 $A_{260} = 0.2$, 用 *E. coli* K-12 菌株的 DNA 作参照以消除温度及其他实验误差。仪器由 Lambda Bio 20 紫外分光光度计 (Perkin Elmer 公司)、PTP-1 控温仪、循环水浴、联想计算机组成, 整个测定过程由 UV WinLab 软件包自动控制, 数据经软件处理后, 即可得 T_m 值。

G+C(mol%) 计算: 计算公式为 $G+C(\text{mol}\%) = 51.2 + 2.08 [T_m(X) - T_m(R)]$, 其中 $T_m(X)$ 为待测菌 T_m 值, $T_m(R)$ 为 *E. coli* K-12 T_m 值。

1.8.6 DNA-DNA 杂交

采用复性速率法^[16]测定 DNA 同源性,所用 DNA 样品要求及仪器与 DNA G+C mol%测定完全相同。

DNA 样品剪切:DNA 杂交一般要求 DNA 片段的大小集中在 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ Da。剪切方法是待样品的浓度用 $0.1 \times \text{SSC}$ 调整到 $A_{260} \approx 2$, 采用细针头注射器反复抽吸 DNA 样品进行剪切,还可采用超声波处理法剪切。剪切是否合适,用凝胶电泳检验。

DNA 变性:取剪切好的样品 1.4mL 放入比色杯中,放入可加热的比色架中,插入温度传感器探头,使 DNA 样品在 100°C 下变性 15min。

测定复性速率:DNA 样品变性结束后,立即将 PTP-1 控温器的温度设定为最适复性温度 78°C ,复性反应进行 20min,计算机记录 260nm 处吸光值随时间变化的复性反应曲线,按 UV WinLab 软件程序计算曲线斜率 (slope),即样品的复性速率。

DNA-DNA 同源性 ($H\%$) 计算:DNA-DNA 同源性按公式^[16] (De Lay, 1970) 计算:

$$H\% = \frac{4v_m - (v_a + v_b)}{2\sqrt{v_a \times v_b}}$$

式中: v_a 表示样品 A 的自身复性速率; v_b 表示样品 B 的自身复性速率; v_m 表示样品 A 与 B 等量混合后的复性速率。

2 结果与讨论

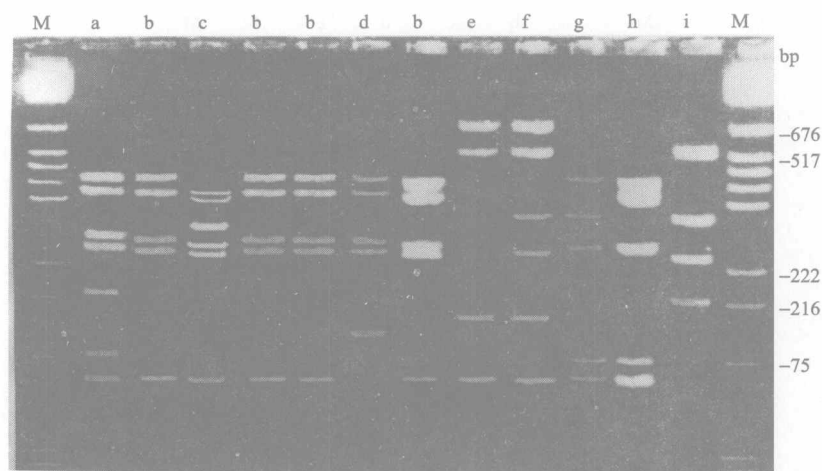
2.1 花生根瘤菌的生长速率

采用稀释平板法,供试 22 株四川花生根瘤菌及分离自以色列和津巴布韦的花生根瘤菌在 YEMG 琼脂平板上 28°C 培养 7d 后,单个菌落直径 $< 1.0\text{mm}$,并具有产碱能力 (表 1),5 株代表菌的代时在 4.23~5.50h (表 6)。按照 Hernandez 和 Focht (1984) 关于快生和慢生根瘤菌的界定标准,四川花生根瘤菌应属于慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*),在其确切分类地位未弄清楚之前,可表示为 *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*)。Van Rossum 等^[2]也证明花生根瘤菌属于慢生根瘤菌属。但是,黄怀琮等^[3,4]从四川天府 3 号花生品种上分离获得了 2 株快生型花生根瘤菌株 85-7 和 85-19,大量试验证明这两株菌共生固氮有效性高,接种效果显著。因此,花生根瘤菌可能像在大豆上结瘤的根瘤菌一样,既有慢生型,又有快生型。关于这个问题,值得进一步研究。

2.2 16S rDNA PCR-RFLP

用 rD1 和 fD1 为引物进行 PCR 扩增后,所有供试菌株均产生一条约 1500bp 的带,该片段 DNA 的大小与 Weisburg 等^[7]报道的细菌 16S rDNA 基因片段的大小一致。

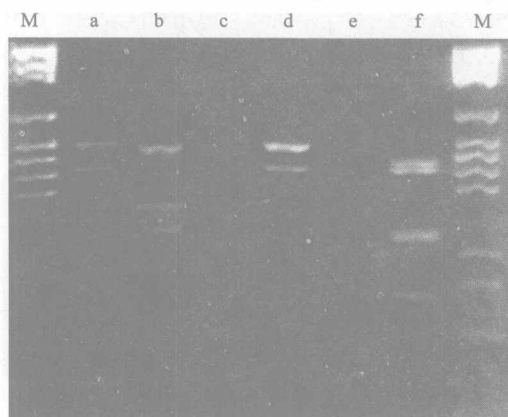
16S rDNA 扩增产物分别用 8 种限制性内切核酸酶 (*Hinf* I、*Cfo* I、*Rsa* I、*Hae* III、*Msp* I、*Mse* I、*Mbo* I 和 *Dde* I) 切割,经电泳分离后,得到各种酶切的 16S rDNA PCR-RFLP (图 1~图 8)。比较各种酶切图谱,*Dde* I 酶切图谱所反映的遗传信息量最丰富 (图 1)。因此,*Dde* I 是研究根瘤菌种内遗传多样性很有用的酶类。

图1 16S rDNA *Dde* I 酶切电泳图谱

a~i 表示不同的酶切带形。a: Spr2-8; b: Spr2-9, Spr3-1, Spr3-2, Spr3-3, Spr3-4, Spr3-5, Spr3-6, Spr3-7, Spr4-1, Spr4-2, Spr4-4, Spr4-5, Spr4-6, Spr4-10, Spr6-3, Spr7-1, Spr7-5, Spr7-7, Spr7-8, Spr7-9, Spr7-10, 283A, 297A, MAR253, MAR1445; c: ATCC10324^T; d: MAR411; e: USDA110; f: USDA4355, BTail; g: ANU289; h: USDA76^T; i: USDA4087, USDA4088。M: 分子质量标记 p^{GEM}DNA

Fig. 1 Restriction patterns of PCR amplified 16S rDNA digested with *Dde* I

Lane a to i represent different patterns. a: Spr2-8; b: Spr2-9, Spr3-1, Spr3-2, Spr3-3, Spr3-4, Spr3-5, Spr3-6, Spr3-7, Spr4-1, Spr4-2, Spr4-4, Spr4-5, Spr4-6, Spr4-10, Spr6-3, Spr7-1, Spr7-5, Spr7-7, Spr7-8, Spr7-9, Spr7-10, 283A, 297A, MAR253, MAR1445; c: ATCC10324^T; d: MAR411; e: USDA110; f: USDA4355, BTail; g: ANU289; h: USDA76^T; i: USDA4087, USDA4088。M: Marker p^{GEM} DNA

图2 16S rDNA *Rsa* I 酶切电泳图谱

a~f 表示不同的酶切带形。a: Spr2-8, Spr2-9, Spr3-1, Spr3-2, Spr3-3, Spr3-4, Spr3-5, Spr3-6, Spr3-7, Spr4-1, Spr4-2, Spr4-4, Spr4-6, Spr4-10, Spr6-3, Spr7-9, Spr7-10, MAR253, MAR411, MAR1445, ATCC10324^T; b: Spr4-5, 283A, 297A; c: Spr7-1, Spr7-5, Spr7-7, Spr7-8; d: USDA110; e: ANU289; f: USDA4087, USDA4088。M: 分子质量标记 p^{GEM} DNA

Fig. 2 Restriction patterns of PCR amplified 16S rDNA digested with *Rsa* I

Lane a to f represent different patterns. a: Spr2-8, Spr2-9, Spr3-1, Spr3-2, Spr3-3, Spr3-4, Spr3-5, Spr3-6, Spr3-7, Spr4-1, Spr4-2, Spr4-4, Spr4-6, Spr4-10, Spr6-3, Spr7-9, Spr7-10, MAR253, MAR411, MAR1445, ATCC10324^T; b: Spr4-5, 283A, 297A; c: Spr7-1, Spr7-5, Spr7-7, Spr7-8; d: USDA110; e: ANU289; f: USDA4087, USDA4088。M: Marker p^{GEM} DNA