

应用 BOX 分子标记技术筛选南苜蓿高效根瘤菌菌株

刘晓云^{1,3*} 郭晓叶¹ 魏爽¹ 李乔仙² 薛世明² 王易鹏³ 董鑫³

(1. 河北大学 生命科学学院 河北省微生物多样性研究与应用重点实验室 河北 保定 071002)

(2. 云南省草地动物科学研究院 云南 昆明 650212)

(3. 西南林学院 保护生物学院 云南 昆明 650224)

摘要:【目的】应用 BOX-PCR 技术对 12 株南苜蓿(*Medicago polymorpha*)接种根瘤菌菌株在土壤中的竞争结瘤能力进行研究,以占瘤率的高低配合植物生长性状最终确定与南苜蓿共生的高效根瘤菌菌株。【方法】对接种根瘤菌产生的南苜蓿根瘤进行分离培养,选择部分结瘤菌株和 12 株全部供试接种菌株进行 BOX 分子指纹图谱研究,经过对图谱的比较与分析获得了各接种菌株的占瘤率。【结果】在供试菌株中,来自于云南盈江的菌株 SWF67523 占瘤率最高,为 93.33%,说明菌株 SWF67523 具有较强的竞争结瘤能力,该菌株对南苜蓿干重增幅也较高,为 100%;菌株 SWF67409 来自于云南楚雄,其占瘤率略低于菌株 SWF67523,但其对提高植物干重的贡献最大(增幅 106.5%);来自于云南楚雄的菌株 SWF67394 占瘤率较低,但其结瘤率高,对植物生长的影响作用也较明显。【结论】将根瘤菌菌株的竞争结瘤能力纳入南苜蓿高效根瘤菌菌株的筛选中,研究获得了一株竞争结瘤能力强、显著提高植物生物量的菌株 SWF67523,以及促生根瘤菌菌株 SWF67409 和 SWF67394,为生产高效根瘤菌菌剂提供了物质基础。

关键词: 南苜蓿, 根瘤菌, BOX-PCR, 分子标记, 占瘤率

Screening effective rhizobial strains associated with *Medicago polymorpha* by BOX molecular fingerprint

LIU Xiao-Yun^{1,3*} GUO Xiao-Ye¹ WEI Shuang¹ LI Qiao-Xian²
XUE Shi-Ming² WANG Yi-Peng³ DONG Xin³

基金项目: 云南省应用基础研究计划项目(No. 2007C067M); 公益性行业(农业)科研专项经费项目(No. 201103005-7)

*通讯作者: Tel: 86-312-5079696; E-mail: liuxiaoyunly@126.com

收稿日期: 2011-07-28; 接受日期: 2011-10-25

- (1. College of Life Sciences, Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)
- (2. Yuannan Academy of Grassland and Animal Science, Kunming, Yunnan 650212, China)
- (3. School of Conservation Biology, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: [Objective] Competitive nodulation ability of 12 rhizobial strains associated with *Medicago polymorpha* is tested by using BOX-PCR Molecular fingerprint; effective rhizobial strains were finally confirmed using the nodule occupancy rate combined with plant growth. **[Methods]** The nodule occupancy rate calculated by comparing BOX-PCR Molecular fingerprints of inoculated strains with those part of re-isolated strains. **[Results]** It showed that nodule occupancy of strain SWF67523 from Yingjiang district was of the highest occupation nodulation rate, reach 93.33%, showing strong ability of competitive nodulation, and it increased the dry-weight of their host-plants for 100% by plant test; while the other strain SWF67409 was of lower nodule occupancy rate, but with highly nodulation rate and increased the dry-weight of their host-plants for 106.5%. Furthermore, strain SWF67394 obviously increased the dry-weight of their host-plants and with high nodulation rate and lower nodule occupancy rate, these two strains may had effect on influencing activities of the native rhizobia and other microorganisms in soil. **[Conclusion]** We have introduced the competitive nodulation ability in screening effective rhizobial strains, and obtained a strain SWF67523 that with highly competitive nodulation ability and highly ability of plant growth promoting, and plant growth promoting strains of SWF67409 and SWF67394, this will provide precarious strains resources for producing rhizobial inoculants.

Keywords: *Medicago polymorpha*, Rhizobia, BOX-PCR, Molecular fingerprint, Nodule occupancy

南苜蓿(*Medicago polymorpha*)是一年生草本植物, 其草质柔嫩, 蛋白质含量高, 嫩茎叶可食, 适口性好。不仅是冬春季节美味野菜, 也是优良的牧草饲料^[1]。南苜蓿抗逆性强, 耐寒、耐旱, 对土壤适应范围较广, 与水稻等大用作物轮作, 适宜在亚热带及热带地区进行推广种植。南苜蓿大面积栽培与接种根瘤菌关系密切, 接种适宜的根瘤菌, 可充分发挥豆科植物与根瘤菌的生物固氮作用, 对减施化肥、提高苜蓿生长品质具有重要的实际应用价值。我国对紫花苜蓿及其高效根瘤菌研究较多^[2-4], 对南苜蓿较少涉及, 在对中国豆科牧草根瘤菌资源的采集和调查中, 也未涉及南苜蓿根瘤菌的研究^[5]。我们对南苜蓿高效根瘤菌菌株进行了初步研究^[6], 获得了 3 株结瘤率高、

对植物干重贡献较大的菌株, 但仅凭结瘤率和对植物干重的贡献, 尚不能确定这 3 株菌株是筛选的高效菌株, 因为植物所形成的根瘤并不一定均是由菌株接种而引起。有研究表明, 结瘤率较高的菌株, 通过分子标记研究, 其田间占瘤率不是很高^[7]。这是因为土壤中存在大量的土著根瘤菌, 与接种根瘤菌菌株争夺营养、空间以及与植物共生互作, 植物的根瘤也有可能是土著根瘤菌侵染所形成。我们在研究中也发现, 结瘤检测试验中结瘤率不高的菌株在土壤盆栽中植株结瘤率较高。因此, 需要对接种植株进行分子指纹标记研究, 通过对结瘤菌株和原接种菌株的分子指纹图谱比较, 检测其对植物的侵染能力, 并获得各接种菌株在形成根瘤中的占瘤率, 以此评价根瘤菌

菌株在土壤中的竞争结瘤能力,最终筛选高效根瘤菌菌株。

目前用来标记根瘤菌的分子标记方法有两类,一类是利用基因重组的方法,将标记基因如发光酶基因 *luxAB*、 β -葡萄糖苷酶基因 *gusA*、生色基因 *LacZ* 基因,或者荧光蛋白(GFP, RFP, ECFP)等导入根瘤菌,接种根瘤菌后,检测根瘤内标记的根瘤菌存在状态^[8-10];另一类方法是利用根瘤菌菌株的遗传图谱指纹来标记根瘤菌,如 RAPD、AFLP 指纹图谱等^[7,11]。BOX 分子是基因间重复序列的一种,其数量和大小的差异适用于微生物多样性的分析^[12],具有种或菌株水平,能够揭示菌株基因组间的差异^[13]。本研究应用 BOX-PCR 技术对根瘤菌菌株进行遗传指纹图谱研究,以揭示不同根瘤菌菌株在土壤的竞争结瘤能力,并配合植物的生长性状来筛选可靠、准确的高效根瘤菌菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用 12 株接种菌株进行本次试验。菌株 SWF67501、SWF67340、SWF67456、SWF67394、SWF67409 及 SWF67350 分离自云南楚雄的南苜蓿(*Medicago polymorpha*);菌株 SWF67523 和 SWF67524 分离自德宏等地区的南苜蓿;菌株 SWF65100 分离自云南昆明的南苜蓿;菌株 SWF67450 及 HBU07001 均分离自紫花苜蓿(*M. sativa*);菌株 SWF66437 分离自云南文山的天蓝苜蓿(*M. lupulina*)。

试验用的植物材料来源于前期研究中的土壤盆栽试验^[6]。

土壤采自于云南盈江县的平原镇及弄璋镇,平原镇取两个地点的土壤,为平原镇 I 和平原镇 II,加上弄璋镇取的土壤共 3 个地点的土壤,均为稻田土。土壤营养成分经过测定,平原镇

II 土壤速效钾含量为 150.5 mg/kg,平原镇 I 为 76 mg/kg,弄璋镇为 91 mg/kg,3 个地点的土壤有效磷相近,为 32.70–37.75 mg/kg,全氮为 1.003–1.403 g/kg,有机质为 48–57 g/kg。试验以盛有 2.0 kg 土壤的花盆为种植单位,12 株不同的根瘤菌菌株分别接种经消毒、催芽后的南苜蓿种苗,植物种苗分别种植在不同的 3 种土壤中,每个花盆种植 5 棵植物,以不接菌为对照,采用完全随机试验设计,共 39 个处理,每个处理重复 3 次^[6]。

YMA 培养基(g/L):甘露醇 10.00,酵母粉 0.80, K_2HPO_4 0.25, KH_2PO_4 0.25, $MgSO_4$ 0.12, NaCl 0.10,琼脂粉 15.00, pH 6.8–7.2。

1.2 试验方法

1.2.1 根瘤的采集和结瘤菌株的分离和培养:开花植物接近总种植量一半以上时,开始收获。将植物连根挖取,保留完整根系,进行冲洗,待统计完结瘤率,对根瘤进行采集,每个处理选择 5 棵植物,每棵植物选取 6–7 颗根瘤。

将冲洗干净的根瘤放在培养皿中,先用 95%乙醇处理 20 s,用 5% 次氯酸钠处理 3 min,再用无菌水冲洗 5–6 次。将处理的根瘤放置于灭菌的空平皿里,压碎根瘤,以划线法、YMA 培养基对根瘤菌进行分离和培养,纯化后冷藏保存于 YMA 试管斜面。分离获得的新菌株称为结瘤菌株。

1.2.2 BOX-PCR 分析:由于 BOX 指纹图谱分析要求菌株培养及扩增条件一致,因此不能将所有分离获得的结瘤菌株进行研究,按照不同菌株处理取样,每处理按不同重复随机挑取 5 株菌株,即组成 5 个重复,加上 15 株分离自空白对照的菌株,共 195 株结瘤菌株及原接种菌株 12 株同时进行 BOX-PCR 分析。

(1) DNA 的提取

将菌株分别接种至 TY 斜面培养基于 28 °C

培养 2–3 d 后, 加入 1 mL 生理盐水, 取菌液于 1.5 mL Eppendorf 管中, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 用 1×TE 缓冲液洗涤菌体 3 次, 用 GUTC^[14]法快速提取总 DNA。

以已知浓度的 λ DNA 为标准, 取待测 DNA 样品各 1.0 μ L, 用 1%的琼脂糖凝胶电泳确定样品 DNA 的浓度。DNA 样品贮藏于–20 °C。

(2) BOX-PCR 分析

BOX 扩增通用引物: boxAIR: 5'-CGTCAGC GTCGGCTTGCCGTA G-3'^[15]

25 μ L 反应体系: 10×Reaction buffer 2.5 μ L, MgCl₂ (20 mmol/L) 5.6 μ L, BSA (10 mg/mL) 0.2 μ L, 4×dNTPs (10 mmol/L) 2 μ L, 100% DMSO 2.5 μ L, BOX Primer (30 μ mol/L) 0.32 μ L, 模板 DNA (100 ng/Ml) 1.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 1.0 μ L, ddH₂O 补足至 25.0 μ L。

BOX-PCR 扩增程序: 95 °C 2 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 65 °C 8 min, 30 个循环; 65 °C 18 min。获得的 PCR 产物–20 °C 保存。

各取 PCR 产物 6 μ L 分别与 1 μ L 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 数据处理与统计分析

通过统计软件 SPSS 13.0 对实验数据进行单因素和双因素方差分析(One-way or Two-way ANOVA); 在满足方差齐性的情况下, 再利用 Turkey 检验进行多重比较, 确定各因子内部不同水平平均值之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 菌株的 BOX-PCR 指纹图谱分析

通过对盆栽试验的结瘤菌株进行分离, 共保存获得 975 株结瘤菌株。

对接种菌株和选取的代表结瘤菌株进行

BOX-PCR 分析, 获得了这些菌株的图谱类型, 图 1 为部分菌株 BOX 分子指纹图谱。从图中发现, 泳道 12 和泳道 4 的图谱一致, 泳道 1 和泳道 9 的图谱一致, 4 种接种菌株为泳道 9 到 12, 其图谱均不相同。本研究根据不同 BOX-PCR 图谱形成的不同分子大小的条带, 进行命名, 将接种菌株的图谱类型按字母顺序从 A–L 命名; 并将与接种菌株图谱不一致的图谱类型按字母顺序从 a–g 命名, 每处理菌株每土壤机质进行了 5 株结瘤菌株分析, 通过与接种菌株 BOX 图谱类型比较, 获得每接种菌株在不同土壤的占瘤率和 BOX 指纹图谱类型, 见表 1。

由表 1 可知, 接种菌株共有 12 种 BOX 分子指纹图谱, 为 A、B、C–L 型; 结瘤菌株图谱多样, 有与接种菌株一致的, 如 A、B、C 等, 也有 a、b、c、d 等其他图谱类型, 菌株的占瘤率是以接种菌株图谱在其结瘤菌株中占有的百分比获得。分析表 1 数据, 菌株 SWF67523、SWF67501 和 SWF67409 的接种菌株与结瘤菌株图谱比较一致, 分别为 A、B 和 G, 这 3 种图谱在其各自接种获得的结瘤菌株中出现频率较高, 说明其占瘤率高; 其他菌株 SWF67501、SWF67350 和 SWF67409 接种菌株与结瘤菌株图谱一致的数目少, 占瘤率低于菌株 SWF67523。除了上述这 4 株菌外, 接种菌株 SWF67394 的 BOX 分子指纹图谱与其结瘤菌株图谱一致的略少, 在 3 种土壤中, 占瘤率分别为 60%、20%和 40%; 而剩余其他菌株的接种菌株与结瘤菌株图谱一致的很少, 或者结瘤菌株中没有接种菌株的图谱, 如菌株 SWF67524 和 SWF67450 接种菌株的图谱与结瘤菌株的图谱完全不同。

此外, 我们发现某些接种菌株的图谱在其他接种菌株获得的结瘤菌株图谱中也有出现, 如 SWF67523、SWF67501 接种菌株图谱 A 和 B 较

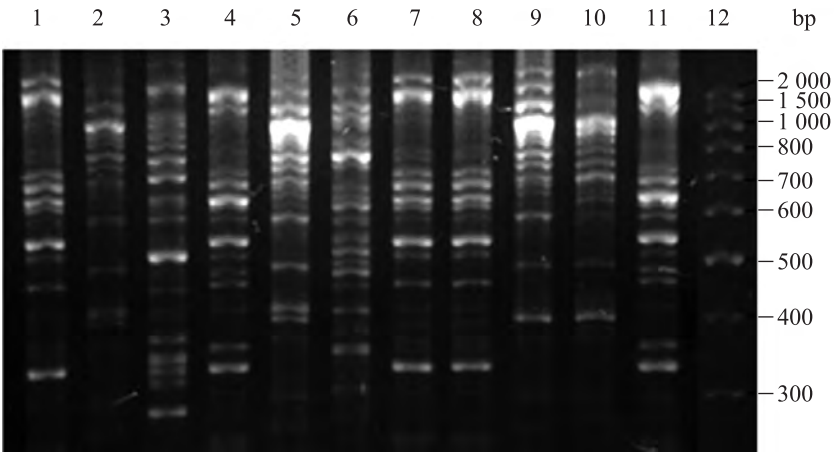


图 1 部分接种菌株与结瘤菌株 BOX 分子指纹图谱

Fig. 1 BOX profiles of part of inoculated strains and re-isolated strains

注: 1: CK-1 (弄璋镇); 2: 结瘤菌株 SWF67350-1 (弄璋镇); 3: 结瘤菌株 SWF67350-2 (弄璋镇); 4: 结瘤菌株 SWF67501-1 (平原镇 I); 5: 结瘤菌株 SWF67524-1 (平原镇 I); 6: 结瘤菌株 SWF67350-3 (平原镇 I); 7: 结瘤菌株 SWF67501-2 (平原镇 I); 8: 接种菌株 SWF67350; 9: 接种菌株 SWF67523; 10: 接种菌株 SWF67524; 11: 接种菌株 SWF67501; 12: Marker.

Note: 1: CK-1 (Nongzhang town); 2: Re-isolates SWF67350-1 (Nongzhang town); 3: Re-isolates SWF67350-2 (Nongzhang town); 4: Re-isolates SWF67501-1 (Pingyuan town I); 5: Re-isolates SWF67524-1 (Pingyuan town I); 6: Re-isolates SWF67350-3 (Pingyuan town I); 7: Re-isolates SWF67501-2 (Pingyuan town I); 8: Original strain SWF67350; 9: Original strain SWF67523; 10: Original strain SWF67524; 11: Original strain SWF67501; 12: Marker.

表 1 不同接种菌株对占瘤率及 BOX-PCR 图谱类型的影响							
Table 1		Effect of different strains on occupancy rate and BOX-PCR Molecular fingerprints					
不同菌株 处理 Strains	接种菌株 图谱类型 Profile types of riginal strain	弄璋镇 Nongzhang town		平原镇 I Pingyuan town I		平原镇 II Pingyuan town II	
		结瘤菌株图谱 Profile types of re-isolated strains	占瘤率 Occupancy rate (%)	结瘤菌株图谱 Profile types of re-isolated strains	占瘤率 Occupancy rate (%)	结瘤菌株图谱 Profile types of re-isolated strains	占瘤率 Occupancy rate (%)
SWF67523	A	A(5)	100	A(4), I(1)	80	A(5)	100
SWF67501	B	B(5)	100	B(4), I(1)	80	B(3), a(1), b(1)	60
SWF67524	C	A(3), B(1), C(0), a(1)	60	A(4), B(1), C(0)	80	C(0), a(2), b(3)	0
SWF67350	D	D(1), B(3), a(1)	20	D(3), B(1), c(1)	60	D(1), B(4)	20
SWF65100	E	B(1), b(2), c(1), d(1)	20	E(2), B(1), a(1), b(1)	40	E(2), a(1), b(1), B(1)	40
SWF67340	F	F(0), A(1), I(1), a(1), b(1), c(1)	0	F(0), d(2), e(1), f(1), g(1)	0	F(0), b(2), c(1), e(1), f(1)	0
SWF67409	G	G(4), a(1)	80	G(4),c(1)	80	G(4), e(1)	80
SWF66437	H	H(1), c(2), f(2)	20	H(0), d(1), f(1), I(3)	0	H(0), c(2), f(1), h(2)	0
SWF67450	J	J(0), a(2), b(1), c(2)	0	J(0), b(2), c(2), d(1)	0	J(0), a(2), b(2), d(1)	0
SWF67456	K	K(1), a(2), b(1), c(1)	20	K(0), a(2), b(1), c(2)	0	K(2), c(3)	40
HBU07001	M	M(0), B(3), d(1), f(1)	0	M(0), f(2), h(3)	0	M(1), d(2), c(1), a(1)	20
SWF67394	L	L(3), B(1), A(1)	60	L(1), b(1), c(2), d(1)	20	L(2), B(2), a(1)	40
Control		A(2), B(1), c(1), d(1)		A(1), I(1), e(1), f(2)		B(4), e(1)	

注: 括号内数字为具有该图谱的结瘤菌株数。
Note: The number in bracket are quantity of strain for with certain profile types.

多出现在菌株 SWF67524、SWF67350 及对照的结瘤菌株图谱中, 也出现在其他菌株的结瘤菌株图谱中, 如出现在 SWF67340、SWF67394、SWF65100 和 HBU07001 中。

2.2 菌株占瘤率与植物生长和结瘤率的关系

综合不同接种菌株在3种土壤的总占瘤率及前期研究中接种菌株的结瘤率和植物干重获得表 2。

由均值分析可知, 菌株 SWF67523、SWF67501 和 SWF67409 的占瘤率与其他菌株具有显著差异($P<0.05$), 比较接种这 3 株菌的植物干重和结瘤率, 发现菌株 SWF67523、SWF67409 的结瘤率、植物干重和占瘤率均较高, 与其他菌株具有显著差异($P<0.05$), 菌株 SWF67523 在供试菌株中, 占瘤率最高, 为 93.33%, 结瘤率为 98.41%; 而菌株 SWF67501 结瘤率与占瘤率也较一致, 分别为 97.78%和 80%, 但其提高植物干重不明显; 菌株 SWF67394 和 SWF67350 接种植物结瘤率均高于 95%以上, 而接种菌株 SWF67394

较 SWF67350 对植物干重影响显著, 但这两株菌株占瘤率均较低且无差异。菌株 HBU071001、SWF67450 和 SWF67456 的结瘤率均在 70% 以上, 但是其占瘤率为零或很低, 其接种的植物干重处于中高水平。除以上分析菌株外, 其他菌株的占瘤率较低或为零, 植物干重及植物结瘤率也较低, 比较一致。由以上分析可知菌株的结瘤率、占瘤率与植物干重不成正相关。

3 讨论

3.1 菌株占瘤率、竞争结瘤能力对植物生长的影响

由菌株 BOX 指纹图谱分析数据可知, 不同的根瘤菌菌株的占瘤率之间具有明显差异, 占瘤率较高的 2 株菌为 SWF67523、SWF67501, 其图谱类型不仅在各自接种菌株获得的结瘤菌株图谱中占有较大的比例, 也出现在其他接种菌株获得的结瘤菌株图谱中。菌株 SWF67523 来源于云

表 2 不同接种根瘤菌菌株对占瘤率、结瘤率及地上部分干重的影响 Table 2 Nodulation rate, dry weight of plant, the nodule occupancy rate			
菌株编号 Strains	占瘤率 Occupancy rate (%)	结瘤率 Nodulation rate (%)	地上部分干重 Dry weight (mg/per plant)
SWF67523	93.33±3.33a	98.41±1.59a	74.19±7.75ab
SWF67501	80.00±5.77a	97.78±2.22a	53.18±10.22bcde
SWF67524	0.00d	51.11±14.20c	35.11±4.55e
SWF67350	53.33±8.82b	96.56±2.29a	47.55±3.19cde
SWF65100	33.33±8.82bc	53.10±7.22c	41.81±7.09cde
SWF67340	6.67±3.33d	30.47±2.97d	41.92±6.34cde
SWF67409	80.00±0.00a	84.58±6.18ab	76.58±3.89a
SWF67437	6.67±3.33d	21.96±3.95d	38.86±3.07de
SWF67450	0.00d	70.25±6.41b	61.07±2.96abcde
SWF67456	20.00±5.77cd	78.57±8.25b	55.45±3.91abcde
HBU07001	6.67±3.33d	76.25±4.11b	64.83±3.97abcd
SWF67394	40.00±5.77bc	97.50±2.22a	66.12±4.25abc
Control	0.00d	28.83±5.12d	37.08±3.29e

注: 根据 Turkey 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: The different small characters mean the same column different processing, showed significant differences ($P<0.05$), according to Turkey test.

南盈江县种植的南苜蓿,其在土壤中分布也应是丰富的,因此在接种了其他菌株形成的根瘤中较多出现。而菌株 SWF67501 来源于禄丰种植的南苜蓿,由于南苜蓿在楚雄栽培历史悠久,因此,该菌株可能在苜蓿种子中分布丰富,在其为接种菌株获得的结瘤菌株中占瘤率也很高,紫花苜蓿种子带菌的现象就较普遍^[16]。而菌株 SWF67523 对植物干重贡献较大,菌株 SWF67501 对植物干重贡献略低,可能其固氮效率较低,导致对植物生长的促进作用不明显。菌株 SWF67409 接种后苜蓿植物干重表现最高,其结瘤率及占瘤率在所有菌株中处于中上;菌株 SWF67394 对植物干重贡献也较高,其结瘤率高,但其占瘤率略低;分析其产生原因,可能是这两株菌株的接种促进了土壤中土著根瘤菌及其他有益微生物的活动;有研究表明接种根瘤菌后,土壤中细菌数量增加,从而增加土壤的肥力^[17-18],促进了植物的生长。来源于紫花苜蓿的根瘤菌菌株 HBU07001 占瘤率很低,或几乎为零,但对南苜蓿植物生物量具有较高的影响,可能也和菌株的促生作用有关,同时说明了根瘤菌菌株与宿主的专一性共生关系。

研究表明,菌株的竞争结瘤能力是接种成功的关键^[19],因此,对根瘤菌菌株进行土壤竞争结瘤能力的研究是必要的,可以更明确各个菌株在接种试验中的不同结瘤能力及其对植物生长的不同促进作用,为筛选高效菌株和制作混合菌剂或其他生物复合肥提供研究基础。

3.2 土壤中营养元素与根瘤菌占瘤率的关系

土壤中营养元素与根瘤菌的结瘤密切相关,土壤中磷元素直接影响根瘤的形成,具有适宜的磷含量可促进植物结瘤^[23],而土壤钾的含量也影响根瘤的形成,钾影响着磷素浓度,可促进物质的合成与转化,促进其对磷素的吸收^[24];土壤中的生物因子如土著根瘤菌及其他微生物类群也影响接种根瘤菌的效果。另外,一些微量元素的

施用对豆科植物共生固氮也有一定影响。像钼元素,它是植物生长发育的必需微量元素,是豆科植物根瘤中固氮酶的重要组分,对植物固氮具有重要作用^[20]。其他诸如土壤肥力状况、温度、pH 也都影响结瘤。正是考虑了推广地的实际情况,本研究没有按照常规方法进行土壤消毒,而是保留了土壤的自然状态进行根瘤菌接种,以考虑其营养元素和生物因子对接种根瘤菌的影响,从而筛选适合当地土壤环境并与土著根瘤菌相比具有较强竞争能力的根瘤菌菌株。由研究结果可知,该方法具有较好的效果,能准确反映筛选的根瘤菌菌株在实际应用中的表现。本研究中 3 种土壤的磷含量适合根瘤菌的结瘤,因此,同一菌株在 3 种土壤的占瘤率没有显著差异。在前期研究中,我们也发现含钾量高的土壤(平原镇 II,含钾量为适中)接种根瘤菌后植物生长好于其他土壤类型,但本文的研究发现不同的菌株在这两种土壤中的占瘤率没有明显差异(由表 2 可看出),说明当土壤中磷元素含量已满足根瘤菌结瘤的条件下,钾对结瘤的促进作用不明显,但由于钾有利于促进物质合成,使植物干重得到较大增加。因此,在进行高效根瘤菌菌株筛选时,除了对菌株特性进行研究外,还应对施用地的土壤因子进行研究,根据根瘤菌对营养的需求,适当添加土壤中缺乏的营养物质,以充分发挥根瘤菌的结瘤固氮作用,从而筛选高效理想的根瘤菌菌株,为菌剂的生产和应用提供菌株资源和物质基础。

4 结论

通过本研究,筛选出一株高效根瘤菌菌株 SWF67523,其不仅对植物的生长影响较显著,还具有较强的竞争结瘤能力;同时还获得了促生根瘤菌菌株 SWF67409 和 SWF67394,可作为混合菌剂制作的候选菌株。研究也证实应用分子指纹图谱能够对接种植株在实际应用中的占瘤率

进行研究,对菌株的结瘤能力做出评价,配合植物生长指标可综合而全面地鉴定和筛选高效根瘤菌菌株,使筛选高效结瘤固氮根瘤菌菌株技术日臻完善。

参 考 文 献

- [1] 奎嘉祥,钟声,匡崇义. 云南牧草品种与资源 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003: 160.
- [2] 刘杰,王赞文,李颖,等. 利用土壤筛选紫花苜蓿高效共生根瘤菌的初步研究[J]. 草业科学, 2005, 22(2): 21-25.
- [3] 曾昭海,隋新华,胡跃高. 紫花苜蓿-根瘤菌高效共生体筛选及田间作用效果[J]. 草业学报, 2004, 13(5): 95-100.
- [4] 陈丹明,曾昭海,隋新华,等. 紫花苜蓿高效共生根瘤菌的筛选[J]. 草业科学, 2002, 19(6): 27-31.
- [5] 宁国赞,刘惠琴,马晓彤. 中国豆科牧草根瘤菌资源的采集保藏及利用[J]. 草地学报, 1999(2): 165-172.
- [6] 刘晓云,郭振国,李乔仙,等. 南苜蓿高效共生根瘤菌土壤筛选的初步研究[J]. 生态学报, 2011, 7(14): 4034-4041.
- [7] 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): 1341-1345.
- [8] 莫才清,李阜棣. 应用 luxAB 基因和 gusA 基因标记大豆根瘤菌的效果[J]. 大豆科学, 1998, 17(1): 19-22.
- [9] 王逸群,赵仁贵,王玉兰,等. 利用标记基因 lacZ 研究根瘤菌对烟草发根的侵染[J]. 吉林农业科学, 2001, 26(6): 24-29.
- [10] Elliott GN, Chou JH, Chen WM, et al. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions [J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(4): 762-778.
- [11] 陈强,张小平,李登煜,等. 用 AFLP 技术检测慢生型花生根瘤菌竞争结瘤的研究[J]. 生态学报, 2003, 23(10): 2189-2194.
- [12] Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria [J]. Genome Research, 1995, 5(4): 408-418.
- [13] 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.
- [14] 高俊莲,陈文新, Terework Z, 等. 应用 AFLP 技术对斜茎黄芩根瘤菌遗传多样性的研究. 应用与环境生物学报, 1999, 5(4): 387-395.
- [15] Versalovic J, Schneider M, de Bruijn F J, et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction[J]. Methods in Molecular and Cellular Biology, 1994, 5(1): 25-40.
- [16] 祁娟,师尚礼. 苜蓿种子内生根瘤菌抗逆能力评价与筛选[J]. 草地学报, 2007(2): 137-141.
- [17] 郭丽琢,马剑,黄高宝. 根瘤菌接种对豌豆产量及根际微生物数量的影响[J]. 农业现代化研究, 2010, 31(5): 630-633.
- [18] 林国林,马晓明,迟玉成,等. 接种根瘤菌对花生生长及其根际土壤微生物数量的影响[J]. 山东农业科学, 2010(6): 63-65.
- [19] 钟文文. 高效苜蓿根瘤菌菌株的筛选[D]. 四川: 四川农业大学硕士学位论文, 2004.
- [20] 于景丽,张小平,李登煜,等. celB 基因标记法研究酸性土花生接种及施钼效果[J]. 植物营养与肥料学报, 2006, 12(2): 250-253.