

中慢生华癭根瘤菌 *nodD*-突变株的筛选 及其对紫云英的促生作用^①

杜寒春^{1,2}, 高轶静¹, 郑会明^{1*}, 钟增涛¹, 朱 军¹

(1 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095; 2 广西区分析测试研究中心, 南宁 530022)

摘 要: 通过二亲接合的方式, 将含有 *sacB* 基因和 *nodD* 基因部分片段的质粒与中慢生华癭根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*)93(Mh93)菌株进行同源重组, 在含 10% 蔗糖的 TY 平板上成功地筛选到了 *nodD* 基因突变株 Mh93-27。利用温室盆栽试验研究了紫云英单作及紫云英-小麦间作体系 Mh93-27 对紫云英的促生作用, 结果表明, 接种 Mh93-27 后, 紫云英的地上部生物量和全氮含量以及根部生长得到了不同程度的提高, 但只有在小麦孕穗期和收获期时, 根瘤菌才表现出显著的促生作用。

关键词: 中慢生华癭根瘤菌; *sacB*; *nodD*; 紫云英; 促生; 氮素

中图分类号: Q939.96

豆科-禾本科间作体系是一种广泛的种植模式, 国内外学者对其进行了多方面的研究, 目前已经研究了由豆科作物蚕豆、花生、大豆以及豆科牧草苜蓿、紫云英与小麦、玉米、水稻、禾本科牧草组成的十几种复合体系。结果表明接种根瘤菌后, 体系中的豆科、禾本科植株的产量和氮素含量以及土壤氮素肥力均有明显的提高^[1-6]。对于豆科作物而言, 根瘤菌的共生固氮作用无疑是促进其氮素含量提高和生长的主要原因。而对于禾本科作物而言, ¹⁵N 同位素示踪技术表明这主要是因为体系中的豆科植物向禾本科作物迁移氮素的结果^[7-8]。

接种中慢生华癭根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)93(Mh93)的紫云英-小麦间作体系已被证明有利于促进体系中小麦的生长^[9]。有研究表明, 根瘤菌对豆科植物生长的促进作用除了固氮作用, 还能在豆科植物根圈定殖, 根瘤菌作为根圈促生细菌(PGPR)的一种, 可以产生植物激素(如生长素、赤霉素、细胞分裂素等)促进植物的生长发育, 也可通过适当提高植物的抗逆性从而间接促进植物的生长^[10-12]。本文旨在研究间作体系中根瘤菌的根圈促生作用对于豆科植物本身的作用。

本研究通过基因框内敲除的方法对 Mh93 菌株的结瘤调节基因 *nodD* 进行失活, 使其丧失结瘤固氮

能力。将含果聚糖蔗糖转移酶基因 *sacB* 基因^[13]和 *nodD* 基因片段的质粒, 通过基因的同源重组, 在 *sacB* 蔗糖平板中筛选 *nodD* 基因缺失突变菌株。这种基因框内敲除的方法不影响被敲除基因上下游基因的转录与翻译, 是最理想的筛选基因突变株方法之一。本文即以该 *nodD* 突变株作为主要供试材料, 比较了紫云英-小麦混作体系中紫云英地上部分及根部的生长, 探讨了根瘤菌的促生作用对紫云英生长的影响, 以期更准确地考察根瘤菌固定的氮素对紫云英的贡献, 为进一步研究根瘤菌固定的氮素转移后对小麦生长的促进作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及生长条件 表 1 为本试验所使用的菌株特性。根瘤菌在 TY 培养基中于 28℃ 培养, 大肠杆菌在 LB 培养基中于 37℃ 培养。

1.1.2 供试土壤和植物 供试土壤为采自江苏省如皋市的高砂土, 土壤的基本性状为: pH 8.1, 有机质含量 6.45 g/kg, 全氮含量 0.12 g/kg, 全磷含量 0.25 g/kg, 速效氮含量 36.47 mg/kg, 速效磷含量 6.29 mg/kg。供试紫云英和小麦品种分别为闽紫一号和杨麦 158(半春性品种)。

基金项目: 国家重大基础研究 973 项目(2010CB126500-G)和国家自然科学基金面上项目(31170077)资助。

* 通讯作者(hmzheng@njau.edu.cn)

作者简介: 杜寒春(1980—), 女, 广西南宁人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物学与生物固氮以及微生物分析检测研究。E-mail: duhanchuncn@yahoo.com.cn

表 1 供试菌株
Table 1 Strains used in study

菌株与质粒	特性	来源
华癭根瘤菌 Mh93	野生型	本实验室保存
Mh93Sm	链霉素自发突变株	本实验室保存
Mh93-27	<i>nodD</i> 基因框内敲除菌株, Str ^R	本实验室保存
大肠杆菌 SM10λpir	pJZ1003 接合宿主细胞, Str ^s	本实验室保存
pJZ1003	含 <i>traR</i> 、 <i>sacB</i> 基因和 <i>nodD</i> 基因片段	本实验室保存

1.1.3 试剂和仪器 PCR 试剂为 TaKaRa 产品, PCR 引物由上海博亚公司合成;生化与分子生物学试剂购自南京生兴生物技术有限公司。庆大霉素 (Gen)450 μg/ml;链霉素(Str)100 μg/ml。

1.2 试验方法

1.2.1 *nodD* 基因的敲除 参照参考文献[13]描述方法进行。

1.2.2 *nodD*-菌株的 PCR 检测 扩增的目的条带为 500 bp 的 *nodD* 基因片段。所用引物序列分别为: 5'ACTTGAGCAGGGCTGTGGC3'和 5'GTTGGAGCCGTGCGGAGAA3'。反应体系参照文献[14]描述方法进行。将扩增产物直接进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳确证。

1.2.3 结瘤实验 将获得的缺失菌株及其出发菌株感染紫云英植物,观察结瘤情况。结瘤实验在试管中进行,使用 Fahraeus 无氮植物营养液^[15]。

1.2.4 盆栽试验 试验在南京农业大学农业部作物生长调控重点开放实验室的温室内进行。土壤处理和小麦、紫云英种子的无菌发芽处理参照参考文献[9]进行。将催芽后的紫云英种子分别置于 TY 培养基和细菌细胞浓度为 10⁹/ml 的 Mh93 和 Mh93-27 菌悬液中浸泡 2 h 后播种。

试验设 6 个处理,分别为: I 组,紫云英单作, 6 株/钵,不接种根瘤菌; II 组,紫云英单作, 6 株/钵,接种 *nodD*-菌株 Mh93-27; III 组,紫云英单作, 6 株/钵,接种野生菌株 Mh93Sm; IV 组,小麦-紫云英间作,各 3 株/钵,不接种根瘤菌; V 组,小麦-紫云英间作,各 3 株/钵,接种 *nodD*-菌株 Mh93-27; VI 组,小麦-紫云英间作,各 3 株/钵,接种野生菌株 Mh93Sm。每个处理设 3 个重复。分别于小麦拔节、孕穗和收获期采集植株样品分析测定。

1.3 分析方法

1.3.1 根体积 采用排水法测定。将收获的根系用自来水冲洗干净后用吸水纸吸干,再置于量筒中测定其体积。

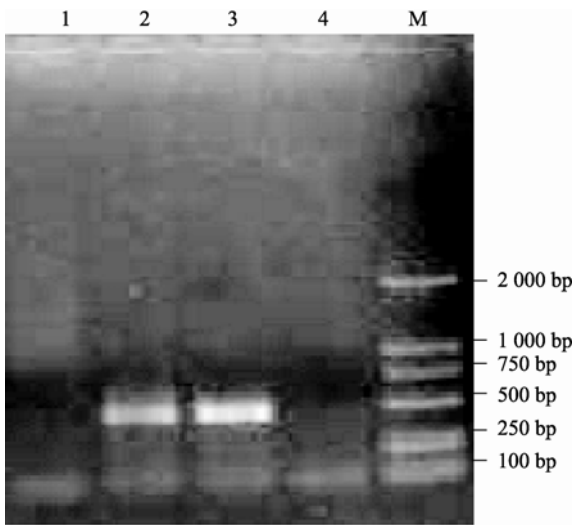
1.3.2 植株全氮含量 植株分为地上部和地下部分别收获后,样品经过 105℃ 杀青 0.5 h,60℃ 烘干后,采用半微量凯氏定氮法进行测定^[16]。

1.3.3 数据处理 采用 SPSS 软件进行统计分析(方差分析和显著性检验)。

2 结果与分析

2.1 *nodD* 基因缺失菌株的获得

2.1.1 *nodD* 基因缺失菌株的 PCR 扩增确认 将经过两次同源重组在蔗糖平板中失去 Gen 抗性的菌株提取总 DNA 并进行 PCR 扩增检测(图 1)。结果发现,菌株 Mh93-27 并未检测出 500 bp 的目的条带,表明其 *nodD* 基因已经缺失。重复检测也得到同样的结果。



(1: Negative control; 2: Mh93; 3: Mh93Sm; 4: Mh93-27; M: Marker DL2000)

图 1 *nodD* 基因片段的 PCR 扩增检测

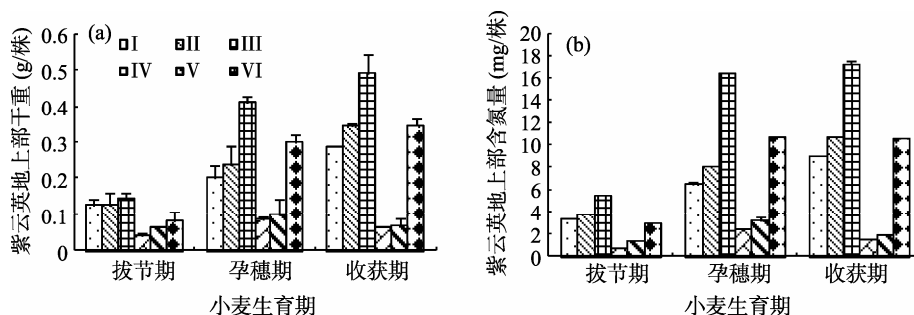
Fig. 1 PCR examination of *nodD* gene fragment

2.1.2 缺失菌株的共生结瘤能力验证 将 *nodD* 基因缺失突变株 Mh93-27 做结瘤实验,并用野生菌株 Mh93 作为阳性对照。4 个星期后,可看到菌株 Mh93 正常结瘤,而突变株 Mh93-27 未结瘤,进一步表明了其 *nodD* 基因已缺失。

2.2 根瘤菌的促生作用

2.2.1 对紫云英地上部生物量及全氮含量的影响

如图 2 所示,无论是单作或是与小麦间作,在小麦孕穗期和收获期时,紫云英地上部的生物量及全氮含量均明显比拔节期高($P<0.05$)。接种 Mh93-27 后,紫云英的生物量及全氮含量均有提高,但不显著($P>0.05$),表明根瘤菌的促生作用能促进紫云英的生长,但效果不明显。接种野生菌株 Mh93 后,紫云英的地上部生物量和全氮含量均得到了显著的提高



(I: 紫云英单作不接种; II: 紫云英单作接种 Mh93-27; III: 紫云英单作接种 Mh93; IV: 小麦紫云英间作不接种; V: 小麦紫云英间作接种 Mh93-27; VI: 小麦紫云英混作接种 Mh93)

图2 小麦各生长期紫云英地上部生物量(a)及全氮含量(b)变化

Fig. 2 Changes of above ground biomass (a) and total nitrogen of astragalus (b) in different growth stages of wheat

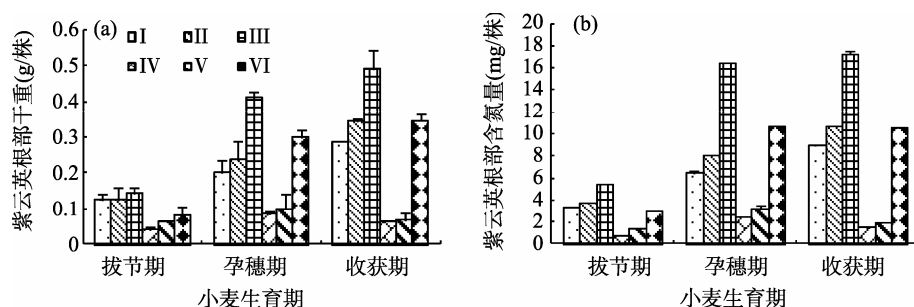


图3 小麦各生长期紫云英根部生物量(a)及全氮含量(b)变化

Fig. 3 Changes of biomass of root (a) and total nitrogen of astragalus (b) in different growth stages of wheat

($P < 0.05$), 其中全氮含量的增加更为突出, 这表明根瘤菌的共生结瘤固氮作用仍然是促进紫云英生长的关键因素。

2.2.2 对紫云英根体积、根部生物量及全氮含量的影响 如图3、图4所示, 无论在间作体系还是单作体系中, 接种野生菌株 Mh93 后, 紫云英的根体积、根部生物量及全氮含量均明显提高。而接种突变菌株 Mh93-27 后, 根瘤菌对紫云英的促生作用效果在两种体系中不同。在单作体系中, 紫云英的根部生长状况与不接种的相比无明显改善($P > 0.05$)。在间作体系中, 紫云英生长到小麦孕穗期和收获期时, 根部的生物量和全氮

含量与不接种的相比则有显著的提高($P < 0.05$)。

3 讨论

由于根瘤菌能够与豆科作物共生结瘤固氮为作物生长提供氮素, 其固定的氮素转移给禾本科作物后也能明显地促进作物的生长^[2-4], 研究者往往更关注根瘤菌的固氮作用, 而忽视了根瘤菌对作物生长的其他促进作用, 因而在多数情况下并未能真实地反映根瘤菌固定的氮素及氮素转移作用对作物生长的贡献作用。本研究中, Mh93-27 菌株被敲除了 *nodD* 基因, 失去了在紫云英上的结瘤固氮能力, 但在紫云英-小麦间作体系中, 也能促进紫云英生长, 表现为在小麦孕穗期和收获期时对紫云英根部的生物量和全氮含量均有显著的提高效果, 说明除了固氮作用外, 根瘤菌的促生作用也能促进植物的生长发育。但这种促生作用在地上部分生物量和全氮含量及紫云英单作体系并不显著, 这说明小麦在孕穗期之后其根系可能会产生更多的根毛, 表皮细胞或根冠的脱落物或者合成了更多的氨基酸、植物碱或各种维生素^[17], 大大地改善了根际微生物的营养和能量, 刺激了 *nodD* 基因突变株的生长, 促生作用得到充分地发挥, 从而表现出显著性地促进了紫云英植株生长, 这种现象在小麦根部同样可以观察到^[9]。在整个检测过程中可以观察到在间作体系中紫云英的生物量和全氮含量水平均

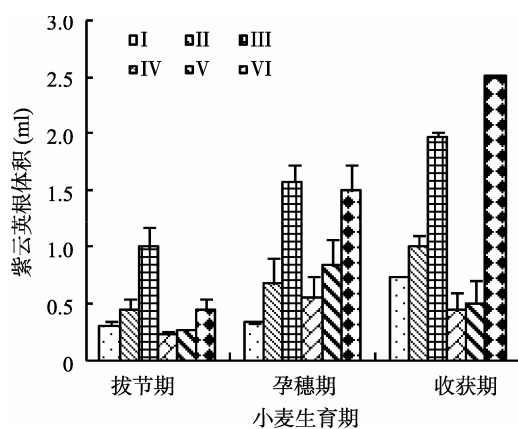


图4 小麦各生长期紫云英根体积的变化

Fig. 4 Changes of root volumes of astragalus in different growth stages of wheat

明显低于单作体系,根瘤菌对紫云英的促生作用效果也较单作下更不明显,这可能是由于禾本科作物竞争了部分土壤中的养分而影响了紫云英的生长。

尽管在小麦的整个生长期中,根瘤菌的促生作用没有生物固氮作用的效果明显,但对此的深入研究不仅可以更真实地反映根瘤菌固定的氮素及氮素转移作用对作物生长的贡献,还可以明确根瘤菌对植物的促生作用是多种作用机制共同作用的结果,这将有助于进一步充分发挥根瘤菌在农业生产中的作用。

参考文献:

- [1] 房增国, 赵秀芬, 孙建好, 包兴国, 张福锁, 李隆. 接种根瘤菌对蚕豆/玉米间作系统产量及结瘤作用的影响[J]. 土壤学报, 2009, 46(5): 887-893
- [2] 钟增涛, 沈其荣, 孙晓红, 冉炜, 茆泽圣. 根瘤菌在小麦与紫云英混作中的作用[J]. 应用生态学报, 2003, 14(2): 187-190
- [3] Fujita K, Ofusu-Budu KG, Ogata S. Biological nitrogen fixation in mixed legume-cereal cropping systems[J]. Plant and Soil, 1992, 141: 155-175
- [4] 肖焱波, 李隆, 张福锁. 接种不同根瘤菌对间作蚕豆和小麦生长的促进作用研究[J]. 农业现代化研究, 2003, 24(4): 275-277
- [5] 武帆, 李淑敏, 孟令波. 菌根真菌、根瘤菌对大豆/玉米氮素吸收作用的研究[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(6): 6-10
- [6] 李淑敏, 李隆, 张福锁. 蚕豆/玉米间作接种 AM 真菌与根瘤菌对其吸磷量的影响[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(3): 136-139
- [7] Xiao YB, Li L, Zhang FS. Effect of root contact on interspecific competition and N transfer between wheat and fababean using direct and indirect ^{15}N techniques[J]. Plant and Soil, 2004, 262: 45-54
- [8] Ledger SF. Nitrogen cycling in low input legume based agriculture with emphasis on legume/grass pastures[J]. Plant and Soil, 2001, 228: 43-59
- [9] 杜寒春, 郑会明, 周晶, 曹慧, 沈标, 姜无忌, 钟增涛. 紫云英-小麦混作体系中氮素转移对小麦生长的促进作用[J]. 土壤学报, 2006, 43(6): 1 043-1 046
- [10] Deshwal VK, Dubey RC, Maheshwari DK. Isolation of plant growth-promoting *Bradyrhizobium* (Arachis) sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut[J]. Current Science, 2003, 84: 443-448
- [11] Deshwal VK, Pandey P, Kang SC, Masheshwari DK. Rhizobia as biocontrol agents against soil borne plant borne plant pathogenic fungi[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2003, 41: 1 160-1 164
- [12] Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.) [J]. Molecular Microbial Ecology of the Soil, 1998, 204: 57-67
- [13] Ried JL, Collmer A. An nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis[J]. Gene, 1987, 57: 239-246
- [14] 汪洋, 郑会明, 杨梦华, 钟增涛, 朱军. 中华根瘤菌自体诱导物合成酶基因的筛选及其在大肠杆菌中的表达[J]. 微生物学报, 2007, 47 (5): 838-842
- [15] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [16] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 309-311
- [17] 胡江春, 薛德林, 马成新. 植物根际促生菌(PGPR)的研究与应用前景[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 963-966

Obtaining of *nodD*-strain of *Mesorhizobium huakuii* and Its Effect of Growth-promoting on Astragalus

DU Han-chun^{1,2}, GAO Yi-jing², ZHENG Hui-ming^{1*}, ZHONG Zeng-tao², ZHU Jun¹

(1 College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2 Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning 530022, China)

Abstract: A *nodD*-strain of *Mesorhizobium huakuii*, Mh93-27 was obtained and the effect of PGPR on astragalus was studied in a single cropping of astragalus and the mixed cropping of astragalus-wheat. Homologous recombination between the plasmid with *sacB* gene and *nodD* gene segment and symbiotic plasmid of Mh93 through parental mating could take place. *nodD* gene could be deleted or cured on TY plate with 10% sucrose, thus the *nodD*-strain could be obtained. The pot-growing experiment showed that the biomass and nitrogen content of astragalus increased after being inoculated with the *nodD*-strain of Mh93, but the rhizobium showed obvious effect on astragalus only during the heading and harvest stages of wheat.

Key words: *Mesorhizobium huakuii*, *sacB*, *nodD*, Astragalus, Growth-promoting, Nitrogen