

青海省不同生态区蚕豆根瘤菌 16S rDNA 分析

张小娟

(青海大学生态环境工程学院,省部共建三江源生态与农牧业国家重点实验室,青海 西宁 810016)

摘 要:为了阐明青海省蚕豆根瘤菌的遗传多样性和亲缘关系,同时为发现和获得新的根瘤菌物种提供资源,采集和分离了青海省不同生态区蚕豆主栽品种青蚕 14 中的根瘤菌,并对其分离到的 6 个菌株(CD1~6)进行 16S rDNA 鉴定分析。将 6 株蚕豆根瘤菌的全序列结果与 NCBI 中已报道的序列进行相似性比对,发现其相似度较高,其中供试菌株 CD4 与 KF008225.1 相似度最高,达到 98%,其余均在 95%到 96%之间。6 株供试菌分属 4 个菌属,CD1 和 CD2 共属节细菌属,CD3 属于分枝杆菌属,CD4 和 CD5 属于快生根瘤菌属,CD6 属于中慢生根瘤菌属,表明来自不同地区的蚕豆根瘤菌存在较大差异。聚类分析结果显示,蚕豆根瘤菌的 6 个菌株分属 5 个不同系统发育分支,证明青海省不同生态区蚕豆根瘤菌种类多样性较为丰富。

关键词:蚕豆;根瘤菌;16S rDNA;系统发育

中图分类号:S154.38⁺1 **文献标志码:**A

16S rDNA of rhizobium isolated from faba bean of different ecotopes in Qinghai Province

ZHANG Xiao-juan

(College of Eco-Environmental Engineering, The Open Project of State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: It has been proved to be beneficial for utilization of faba bean-rhizobium system. To clarify genetic diversity of faba bean rhizobia in Qinghai province and discover new rhizobiums, we isolated rhizobiums from Qingcan14 and used 16S rDNA to analyze the six isolated strains. Blast results showed a high similarity between the six strains and reported sequences. Among them, CD4 showed 98% similarity with KF008225.1, and the remaining strains showed a similarity ranging from 95% to 96%. The six strains belonged to four genus, *Arthrobacter* (CD1 and CD2), *Mycobacterium* (CD3), *Rhizobium* (CD4 and CD5), *Mesorhizobium* (CD6), which were diverse between ecotopes. The cluster results showed that six strains belonged to five branches, indicating the high genetic diversity of rhizobiums in Qinghai province.

Key words: faba bean, rhizobium, 16S rDNA, phylogeny

蚕豆不仅是一种重要的粮食作物,同时也是蔬菜、饲料和绿肥。蚕豆作为粮食作物,可为人体提供所必须的蛋白质和其它各类营养物质;蚕豆的根瘤较其它作物大而且多,因此蚕豆享有“生物固氮之王”的美誉^[1-2]。蚕豆与禾本科其它作物套种可带来良好的经济效益,是“绿色农业”中重要的养地作物。根瘤菌与豆科植物的共生固氮体系是生物固氮中效率最高的体系,约占生物固氮总量的 65%。该体系具有固氮能力强、固氮量大、抗逆能力

强等特点,可以提高土壤肥力,对可持续农业的发展具有重要的意义^[3-7]。蚕豆根瘤菌共生体系是这一体系的成员之一,对其进行广泛和深入的研究,可以加强对共生固氮的认识。目前国际上对蚕豆根瘤菌有不少的研究,但是对同一品种不同区域共生的根瘤菌研究较少^[8-10]。本研究采用 16S rDNA 全序列分析的方法对青蚕 14 号蚕豆品种在不同生态区的根瘤菌进行系统发育研究。鉴定筛选共生紧密的根瘤菌为蚕豆根瘤菌的配型及根瘤菌菌剂

生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 6~7 月在青蚕 14 号生长地区进行采样,本研究选择青海省湟中县拦隆口镇及海子沟乡、共和县铁盖乡、乐都县蒲台乡、互助县台子乡和西宁市为青蚕 14 号根瘤菌采样地,这 6 个地区为青蚕 14 号主要栽培区,地理特征上属于半干旱地区,光照充沛,气候干燥。除互助县台子乡和乐都县蒲台乡为水浇地外,其余 5 个地区均为旱地。采集植株高大,根系发达,根瘤较多且根瘤颜色鲜艳、形状饱满,体积较大的蚕豆样本。将蚕豆的根部装入样本袋中(不要去掉泥土),标注好日期地点。-20℃冰箱内保存备用。采样地区、经纬度及采集的根瘤菌形状见表 1。

表 1 供试菌株				
Table 1 The tested strains				
来源 Origin	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔/m Altitude	形状 Size
湟中县拦隆口镇 Lanlongkou Town of Huangzhong County	101°57'1"	36°43'06"	2434	珊瑚状 Coral
共和县铁盖乡 Tiegai Town of Gonghe County	101°62'1"	36°28'2"	2600	珊瑚状 Coral
乐都县蒲台乡 Putai Town of ledu County	101°9'35"	36°43'26"	2756	珊瑚状 Coral
西宁市 Xining City	101°45'2"	36°43'47"	2304	珊瑚状 Coral
互助县台子乡 Taizi Town of Huzhu County	102°0'59"	36°52'8"	2634	珊瑚状 Coral
湟中县海子沟乡 Haizigou Town of Huangzhong county	101°37'15"	36°40'44"	2556	珊瑚状 Coral

1.1.2 引物 PCR 引物选用根瘤菌 16S rDNA 通用引物。扩增引物序列:P1:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGA ACG AAC GCT-3';P2:5'-TACG-GCTACCTTGTTACGACTTCACCCC'-3。

1.2 方法

1.2.1 蚕豆根瘤菌的分离和纯化 将冰箱中的备用蚕豆样本取出,用镊子将根上的根瘤小心剥下,用自来水冲掉泥土,用蒸馏水洗净并装入离心管。向离心管中加水至没过根瘤,浸泡 1 h 以上,使根瘤充分吸水膨胀。在超净工作台中,用 95%乙醇浸泡 1 min,随即 75%乙醇浸泡 30 s,无菌水冲洗一次,5%次氯酸钠浸泡 5 min,无菌水冲洗 10 次。将表面消毒的根瘤在研钵中碾碎,并加入适量无菌水,搅

拌均匀。平板涂布法接入 YMA 培养基中。28℃培养 2~3 d。纯化方法采用平板连续划线法。将长出的根瘤菌用接种环挑出,在 YMA 平板上连续划线,培养 3~5 d 长出单菌落。

1.2.2 蚕豆根瘤菌基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取采用 BioSpin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。基因组 DNA 检测:取 2.5 μl PCR 扩增产物与 2.5 μl 溴酚兰混合点样,0.8%琼脂糖凝胶水平电泳,在 120 V 条件下电泳 30 min。凝胶电泳成像系统下拍照观察。

1.2.3 蚕豆根瘤菌 16S rDNA 的 PCR 扩增 PCR 扩增在 Model MG96+基因扩增仪上进行扩增。反应体系(10 μl):Mix 7 μl,模板 DNA 1 μl,上下游引物各 1 μl,ddH₂O 补足。反应程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,50℃复性 45 s,72℃延伸 1.5 min,36 个循环,最后 72℃延伸 10 min,4℃保存。扩增结束后,在反应混合物中加入 5 μl 溴酚蓝,混匀。取 7 μl 点入含 0.5 μg·ml⁻¹溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶中,于 1×TAE 电泳缓冲液中、100 V 电场下电泳 90 min,凝胶电泳成像系统下拍照观察。PCR 扩增产物回收:回收采用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物技术有限公司生产)。

1.2.4 根瘤菌 16S rDNA 全序列测定 用于测序的菌株 PCR 扩增产物回收后直接测序,由上海生工生物技术有限公司完成测序。从 GenBank 中获取参比菌株的 16S rDNA 序列,数据经编辑后应用 MEGA 6 进行比对,并利用 Neighbor-Joining 法构建供试菌株与参比菌株的系统发育树。

2 结果与分析

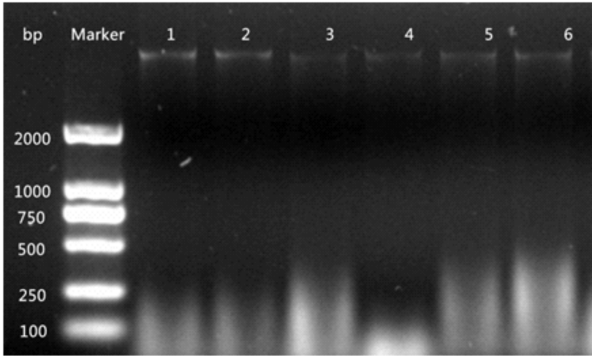
2.1 蚕豆根瘤菌的筛选及基因组 DNA 电泳结果及 16 S rDNA 的扩增

首先对采取的根瘤菌样本进行筛选,从中获得了 6 个菌株,即 CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6。对这 6 株根瘤菌提取基因组 DNA 并进行检测(图 1),结果显示其 DNA 大小均在 20 kb 左右,电泳条带整齐完整,无杂质和 RNA 污染,可满足后续实验的要求。利用根瘤菌 16S rDNA 通用引物对筛选的 6 个菌株进行 PCR 扩增(图 2)。

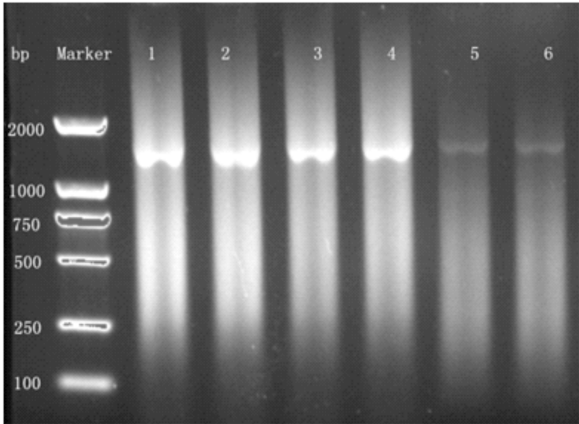
2.2 供试菌株与各参比菌株之间 16 S rDNA 基因全序列的相似性

获得的测序结果,利用 DNASTar 进行编辑,在 GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对,从中获得参比菌株序列,应用 MEGA6 进行比对,并利用 Neighbor-Joining 法构建供试菌株与参比

菌株的系统发育树。



1. CD1; 2. CD2; 3. CD3; 4. CD4; 5. CD5; 6. CD6
图 1 根瘤菌基因组 DNA 电泳图谱
Fig.1 Electrophoresis of rhizobium genomic DNA



1. CD1; 2. CD2; 3. CD3; 4. CD4; 5. CD5; 6. CD6
图 2 根瘤菌 16S rDNA PCR 扩增图谱
Fig.2 16S rDNA PCR products of rhizobiums

将 6 个供试菌株进行扩增回收后测序,将序列与 NCBI 中已报道的序列进行相似性比对,比对结果如表 2。供试 6 个蚕豆根瘤菌菌株分属 5 个不同系统发育分支。其中供试菌株 CD4 与 KF008225.1 相似度最高,达到 98%,其余均在 95%~96%之间。说明同一品种不同区域共生菌株不相同。

2.3 系统发育树构建

利用 MEGA 6.0 对供试菌种进行 Clustal 比对之后(图 3),与参比菌种进行聚类分析构建参比菌株与供试菌株的 N-J 树,从图 4 可以看出 CD1 和 CD2 共属同一菌属,即节细菌属(*Arthrobacter*),CD3 属于分枝杆菌属(*Mycobacterium*),CD4 和 CD5 属于快生根瘤菌属(*Rhizobium*),CD6 属于中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)。来自不同地区的根瘤菌显示出很大差异,说明青海省不同生态区根瘤菌种类比较丰富。具体的分类地位还需要进一步研究。

3 讨 论

本研究通过同一品种不同生态区 6 个菌株 16S rDNA 全序列数据分析和系统发育树显示位于 5 个系统发育分支上。CD1、CD2 同属一个类群节细菌属(*Arthrobacter*),CD4、CD5 同属一个类群快生根瘤菌属(*Rhizobium*),CD3、CD6 分别属于分枝杆菌属(*Mycobacterium*)和中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)。4 个类群亲缘关系较近。

表 2 供试菌株与各参比菌株之间 16S rDNA 全序列的相似性分析

Table 2 Similarity between strains in 16S rDNA sequence

供试菌株 Test strains	大小/bp Size	相似菌种属 Similar genus	基因 Genebank	相似度/% Similarity
CD1	1433	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KT997433.1	95
		<i>Arthrobacter</i>	KT314154.1	95
		<i>Arthrobacter</i>	KT314140.1	95
		<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	KT369866.1	96
CD2	1447	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	KC354453.1	95
		<i>Arthrobacter sp</i>	JQ976994.1	95
		<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	HQ202843.1	95
		<i>Bacterium</i>	KR029817.1	95
CD3	1439	<i>Bacterium</i>	HQ674995.1	96
		<i>Mycobacterium</i>	JX026704.2	96
		<i>Mycobacterium sacrum</i>	GU201853.2	96
		<i>Mycobacterium</i>	AJ245702.1	96
CD4	1440	<i>Bacillu</i>	AB188212.1	97
		<i>Mesorhizobium</i>	EU874894.1	97
		<i>Rhizobium</i>	KF008225.1	98
CD5	1455	<i>Rhizobium</i>	KF933536.1	97
		<i>Bacillus tequilensi</i>	KR085788.1	96
		<i>Sinorhizobium</i>	JX941516.1	96
CD6	1450	<i>Mesorhizobium</i>	JX840388.2	97
		<i>Microvirga</i>	JQ912079.1	96

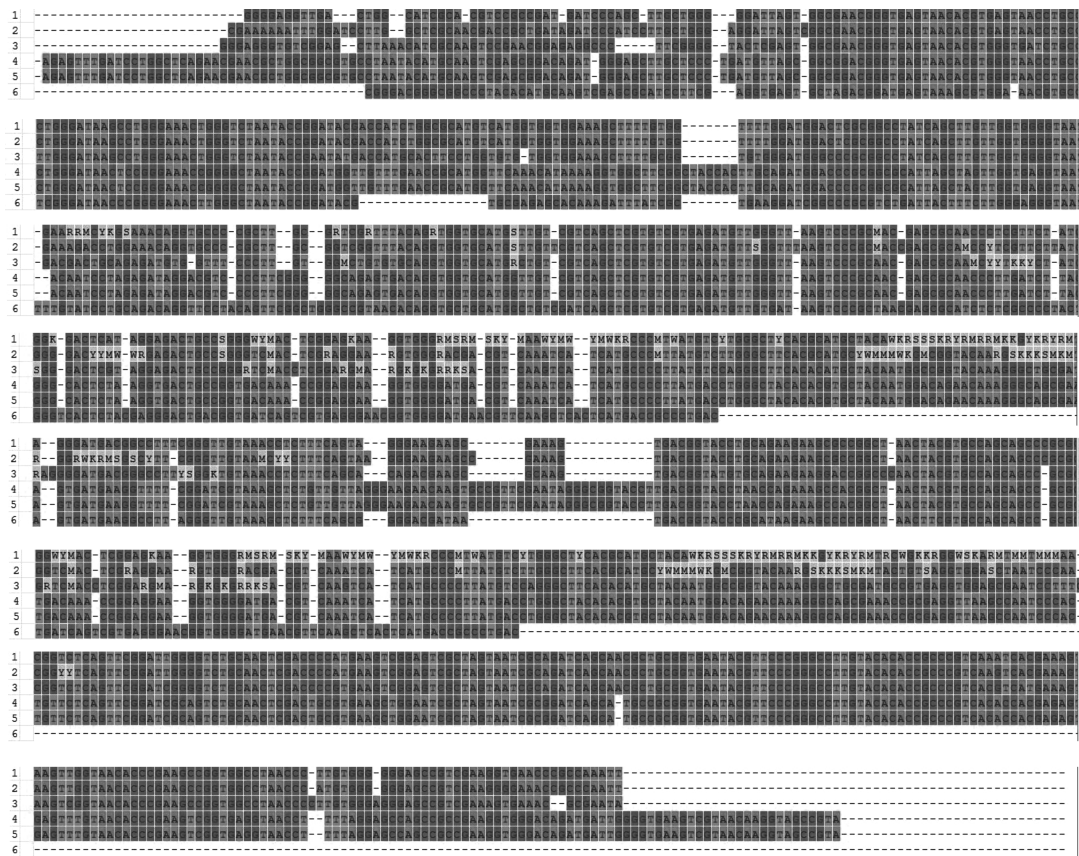


图 3 供试菌种序列比对
Figure 3 Clustal alignment between tested strains and the reported cultures

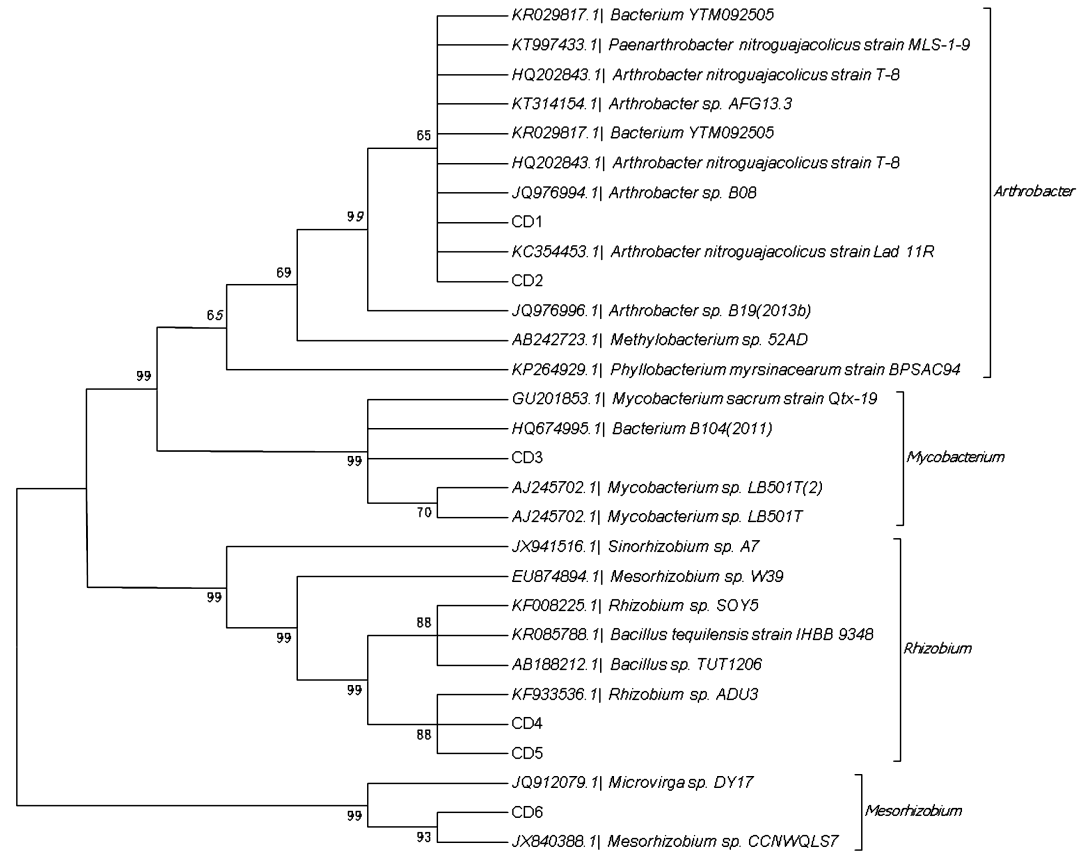


图 4 供试菌种与参比菌种系统发育进化树
Fig.4 Phylogentic tree based on aignment of the known cultures and tested strains

同一寄主在不同环境条件下共生了不同的菌种,说明青海不同区域有着不同的根瘤菌,其遗传多样性比较丰富。目前 16S rDNA 全序列分析是较为普遍及准确的确定根瘤菌系统发育研究的方法,一般来说,菌种相似度在 95% 以上可以认为是同一个种,但是在本研究进行过程中发现相似度最高的菌种有时并不是根瘤菌属,而其他文献对此现象也有报道^[4]。因此在确定其分类地位时还要结合 DNA 同源性分析来决定^[9]。

对于青海省蚕豆根瘤菌的研究目前还比较少,本研究分离出来的根瘤菌品种与之前报道过的存在较大差异,对于青海省蚕豆根瘤菌确切的种类及系统发育研究还需进一步扩大样品数量,收集更多代表性菌株,扩大大多样性。

环境条件对根瘤菌有着深刻影响,包括对根瘤菌的直接影响和通过影响宿主植物间接地影响根瘤菌的遗传多样性区域环境条件的改变,既影响着宿主植物的生长,也改变了根瘤菌的生长条件,造成根瘤菌种群变化和数量的增减,因而在同一环境中出现了根瘤菌表型和遗传型的多样性。

在本研究中,从各地区分离的蚕豆根瘤菌无论是表型分析还是遗传型分析都没有按照地理来源进行聚群,根瘤菌与豆科植物共生关系的建立是细菌、植物及环境三方相互作用的结果,只有适应当地的土壤条件且又有高效固氮及竞争能力的豆科

植物根瘤菌共生体才能在该地发挥应有的作用。

参 考 文 献:

[1] 赵龙飞. 西北地区苦豆子根瘤菌遗传多样性和系统发育研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.

[2] 柴岩, 万富世. 中国小杂粮产业发展报告 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007.

[3] 韩梅, 马晓彤, 曹卫东, 等. 青海蚕豆根瘤菌的系统发育与多样性研究 [J]. 青海大学学报 (自然科学版), 2015, 33 (5): 5-9.

[4] 路敏琦, 李俊, 姜昕, 等. 我国蚕豆根瘤菌的多样性和系统发育研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13 (1): 73-77.

[5] 李正, 单辉辉, 齐雅琳, 等. 甘肃酒泉等地区豆科植物根瘤菌的遗传多样性和系统 [J]. 生物技术通报, 2014, (10): 188-195.

[6] 赵龙飞, 邓振山, 杨文权, 等. 我国西北部分地区豆科植物根瘤菌资源调查研究 [J]. 干旱地区农业研究, 2009, 27 (6): 33-39.

[7] Trinchant JC, Guerin V, Rigaud J. Acetylene reduction by symbiosomes and free bacteroids from broad bean (*Vicia faba* L.) nodules (role of oxalate) [J]. Plant Physiol, 1994, 105 (2): 555-561.

[8] 路敏琦, 李俊, 李力, 等. 我国蚕豆根瘤菌的数值分类及其 16S rDNA PCR-RFLP 研究 [J]. 微生物学通报, 2005, 32 (6): 26-31.

[9] 冯瑞华. 用 AFLP 技术和 16S rDNA PCR-RFLP 分析毛苕蓿根瘤菌的遗传多样性 [J]. 微生物学报, 2000, 40 (4): 339-345.

[10] 雷霞, 陈文峰, 隋新华, 等. 根瘤菌多相分类的研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2007, 27 (6): 77-80.

(上接第 258 页)

[13] 强胜, 魏守辉, 胡金良. 江苏省棉区棉田杂草草害发生规律的研究 [J]. 南京农业大学学报, 2000, 23 (2): 18-22.

[14] 柴继宽, 赵桂琴, 师尚礼. 7 个燕麦品种在甘肃二阴区的适应性评价 [J]. 草原与草坪, 2011, 31 (2): 1-6.

[15] 袁卉馥, 牛瑞明. 75% 苯磺隆 WG 在莠麦田间除草效果 [J]. 农药, 2009, 48 (3): 218-220.

[16] 杨书成, 韩美善, 韩启亮, 等. 莠麦田间杂草调查及除草剂筛选 [J]. 园艺与种苗, 2011, (2): 49-51.

[17] 王林, 刘景辉, 李立军, 等. 除草剂在农牧交错区保护耕作燕麦田间应用效果的研究 [J]. 作物杂志, 2009, (4): 76-79.

[18] 刘欢, 慕平, 许维诚, 姬承东, 等. 10 种除草剂对裸燕麦田杂草的药效、燕麦产量及安全性影响 [J]. 草原与草坪, 2015, 35 (2): 1-8.

[19] 崔芸萍, 赵桂琴, 刘欢. 3 种除草剂对燕麦田杂草的防除效果研究 [J]. 草原与草坪, 2013, 33 (1): 45-49.

[20] 据泽亮. 燕麦中 2, 4-D 丁酯的残留动态及其对燕麦光合生理、安全性和产量的影响研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.