

荒漠植物柠条根瘤菌的抗逆性及其系统发育分析

代金霞,王玉炯,郭晶静,武雪娟,张晓玲

(宁夏大学生命科学学院,宁夏 银川 750021)

摘 要:对分离自宁夏白芨滩国家级自然保护区的 62 株柠条根瘤菌的耐盐性、耐酸碱性、生长温度范围和抗生素抗性进行了测定,并采用 16S rDNA PCR—RFLP 和 16S rDNA 全序列分析方法对其进行了遗传多样性及系统发育分析。结果表明:柠条根瘤菌具有较强的耐受高温和耐盐、耐酸碱能力,抗逆性较强,但仍存在菌株间差异。70.8% 的菌株可耐受 4% 的 NaCl,全部菌株对 100 μg/mL 的青霉素具有抗性,均可在 pH5.0~11.0 的培养基中生长。经 16S rDNA 序列测定鉴定为豌豆根瘤菌的 CNXE4、CNXLW24 和中华根瘤菌的 CNXC3,这 3 株菌在 pH4.0~12.0 的范围内都可生长,可以耐受 6% 的 NaCl、50 μg/mL 浓度的卡那霉素和链霉素、300 μg/mL 的青霉素,在 60℃ 热激后可生长,表现出极强的抗逆性。16S rDNA PCR—RFLP 将 62 株菌分为 7 种图谱类型,16S rDNA 全序列分析的结果表明,它们分别归属于根瘤菌属、中华根瘤菌属、土壤杆菌属、叶杆菌属和慢生根瘤菌属,遗传多样性较为丰富。

关键词:柠条;根瘤菌;抗逆性;系统发育

中图分类号: S154.3;Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2011)04-0223-05

豆科植物与根瘤菌共生体系具有固氮能力强、固氮量大、抗逆性强的优点,可以提高土壤肥力、为人类提供高蛋白质营养,具有巨大的生态、经济和社会价值,在农业的可持续发展中占有重要的地位^[1,2]。

柠条是豆科蝶形花亚科锦鸡儿属(*Caragana Fabr.*)植物几种灌木的俗称,不仅具有生物产量高、营养丰富等品质,而且有极强的生命力和抗逆性,它可以抗 50℃ 的高温,耐 -40℃ 的严寒,在防风固沙、水土保持、改善生态环境方面有突出作用,是中国西北、华北、东北西部水土保持和固沙造林的重要树种之一^[3]。因而作为防风固沙的先锋物种,柠条的生态学意义远大于其经济学意义,发掘与其共生的根瘤菌资源,寻找高效的固氮共生体系,将对沙漠化治理起到积极的作用。而目前,国内外对豆科与根瘤菌共生固氮体系的研究主要集中于对农业生产有重大意义的植物如大豆、苜蓿、花生等,对乔木、灌木、半灌木豆科植物根瘤菌的研究相对较少。针对锦鸡儿属植物根瘤菌进行的抗逆性与系统发育研究亦十分有限^[4~6],尤其对于干旱半干旱荒漠草原这种特殊的生态环境中锦鸡儿植物超强的抗逆性与根瘤菌的互作和协同进化的研究至今还未见报道。本研究对分离自宁夏荒漠草原的柠条根瘤菌的生长温度、耐酸碱、耐盐、对抗生素的抗性等抗逆性进行研究,同

时采用 16S rDNA PCR—RFLP 和序列分析方法对柠条根瘤菌进行多样性及系统发育分析,旨在筛选出有实际应用前景的菌株,为干旱半干旱生态环境中锦鸡儿植物与根瘤菌的互作和协同进化研究及柠条根瘤菌的系统分类地位和应用研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

柠条根瘤样品采自宁夏白芨滩国家级自然保护区,该区不仅是我国典型的荒漠类型自然保护区,而且是全国最大的防风治沙先锋树种柠条的集中分布地和西北最大的猫头刺荒漠自然保护区。根瘤采集后用无菌水浸泡至吸涨,经 75% 的乙醇和 0.1% 的 HgCl₂ 分别进行表面消毒后,用无菌水冲洗多次,在无菌的条件下用镊子夹碎根瘤,挤出汁液接种于 YMA 培养基上,置 28℃ 下培养 3~5 d,挑取单菌落进行分离纯化^[7]。革兰氏染色并镜检细胞形态和纯度后,将纯菌落转接于试管斜面保存。本实验共筛选待测菌株 62 株。菌株编号见表 1。

1.2 抗逆性测定

将供试菌株进行活化培养后接种于待测指标平板,置恒温培养箱中 28℃ 培养 3~7 d,观察平板上菌的生长情况,生长记为“+”,不生长记为“-”,各处理均 3 次重复。

收稿日期:2010-12-01
基金项目:宁夏自然科学基金资助项目(NZ1040)
作者简介:代金霞(1973—),女,回族,副教授,研究方向为分子系统学。
通讯作者:王玉炯,E-mail:wyj@nxu.edu.cn。

表 1 供试菌株及其 16S rDNA PCR-RFLP 图谱类型
Table 1 Tested strains and the types of 16S rDNA PCR-RFLP

菌株 Strain	16S rDNA 酶切类型 Type of 16S rDNA PCR-RFLP				酶切组合类型 Combination of RFLP types
	Hinf I	Hae III	Msp I	Taq I	
CNXE1 ,CNXF1 ,CNXF2 ,CNX222 ,CNX223 ,CNX051 ,CNX821	A	A	A	A	I (AAAA)
CNXE2 , CNXE3 , CNXE4 , CNXE5 , CNXE7 , CNXF5 , CNXF6 , CNXLW14 , CNXF7 , CNXF8 , CNXF9 , CNXLW20 , CNXLW24 , CNXLW25 ,CNXC6	B	A	B	B	II (BABB)
CNXE6 ,CNX053 ,CNX054	B	C	E	E	III (BCEE)
CNXF3 ,CNXF4 ,CNXLW17 ,CNXC7 ,CNXC8 ,CNXC10	B	A	B	C	IV (BABC)
CNXC1 , CNXC2 , CNXC3 , CNXC4 , CNXC5 , CNXC9 , CNX331 , CNX332 ,CNX334 ,CNX052	C	A	C	D	V (CACD)
CNX333 ,CNX335 ,CNX221	D	B	D	E	VI (DBDE)
CNX401 ,CNX402 ,CNX403 ,CNX404 ,CNX411 ,CNX412 ,CNX413 , CNX414 ,CNX501 ,CNX502 ,CNX511 ,CNX512 ,CNX513 ,CNX514 , CNX811 ,CNX812 ,CNX813 ,CNX822	B	D	F	D	VII (BDFD)

1.2.1 耐盐性测定 将 NaCl 加入到 YMA 培养基中配成质量分数为 1%、2%、3%、4%、5% 和 6% 六个梯度,灭菌后倒平板。以含 0.01% NaCl 的 YMA 平板作为阳性对照。

1.2.2 耐酸碱性测定 将高压灭菌的 YMA 培养基用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节 pH 值为 4.0、5.0、6.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 八个梯度后倒平板。以 pH7.0 的 YMA 平板作为阳性对照。

1.2.3 生长温度范围测定 YMA 平板上接种供试菌株后置于 4℃、10℃、40℃ 培养;将菌株 60℃ 热激处理 10 min 后置于 28℃ 培养,以 28℃ 生长的 YMA 平板为阳性对照。

1.2.4 抗生素抗性测定 选取氨苄青霉素(AMP)、氯霉素(CAP)、卡那霉素(KM)、庆大霉素(GM)和链霉素(SM)5 种抗生素,每种抗生素设置 5、50、100 μg/mL 和 300 μg/mL 四个浓度梯度加入 YMA 培养基中倒平板。以不含抗生素的 YMA 平板作为阳性对照。

1.3 系统发育分析

1.3.1 细菌基因组 DNA 的提取 将供试菌株接入 TY 液体培养基中,28℃,150 r/min 振荡培养 3 d,4℃ 8 000 r/min 离心收集菌体,弃去上清,用 TE 洗涤 3 次,溶菌酶破壁,蛋白酶 K 处理,酚/氯仿/异戊醇抽提基因组 DNA,乙醇沉淀,最后溶于灭菌双蒸水中^[4]。

1.3.2 16S rDNA 的 PCR 扩增 采用细菌 16S rDNA 通用引物进行扩增,引物序列为:27F:5′—AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG—3′;1492R:5′—TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T—3′,分别对应于大肠杆菌(Escherichia coli)16S rDNA 基因的 8~27 位和 1 492

~1 513 位。PCR 扩增方法参照文献[8]。

1.3.3 16S rDNA PCR-RFLP 分析及序列测定 选用 HinfI、HaeIII、MspI、TaqI 四种限制性内切酶分别进行酶切。酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,GelRed 染色,Bio-Rad 凝胶成像系统拍照。分析各酶切图谱类型,选取每种图谱类型组合中的代表菌株进行 16S rDNA 全序列测定,序列测定委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行。将测得的序列与 GenBank 中已知根瘤菌的 16S rDNA 序列进行同源性比较,获得同源性相近的菌种序列,用 Clustal X 进行多重比对,运用 MEGA5.0 软件,采用 UPGMA 法构建系统树。

2 结果与分析

2.1 柠条根瘤菌的抗性

供试菌株普遍具有较强的耐盐、耐酸碱能力。所有菌株都能在含 1% NaCl 的培养基中生长,92% 的菌株可以耐 2% 的 NaCl,80% 的菌株可耐受 3% 的 NaCl,70.8% 的菌株可耐受 4% 的 NaCl。36.1% 的菌株可耐受 5% 的 NaCl,有 8 株菌(12.9%)可以耐受 6% 的 NaCl。随着 NaCl 浓度的不断升高,菌株的耐盐性逐渐降低,生活力逐渐下降,表现在平板上的菌落不仅数目减少,菌的生长也变得十分缓慢,4~5 d 才可见 1.5 mm 的菌落。全部菌株均可在 pH5.0~11.0 的培养基中生长,除 12 株菌外其余菌株均能在 pH12.0 的培养基中生长,CNXE4、CNXLW24,CNX501,CNX414,CNX811 和 CNXC3 这 6 株菌能在 pH4.0~12.0 下生长。

供试菌株在 4℃ 时均不能生长,所有菌株可在 10℃ 和 40℃ 下生长,60℃ 热激处理 10 min 后置于

28℃培养,93%的菌株能继续生长,表现出极强的耐高温性质。

绝大部分菌株对青霉素具有极强的抗性,在含 100 μg/mL 青霉素的培养基中均能正常生长,有 62%的菌株能耐受 300 μg/mL 青霉素。90%以上的菌株能耐受 5 μg/mL 的氯霉素、卡那霉素、链霉素和庆大霉素,而 50~100 μg/mL 浓度的卡那霉素、链霉素和庆大霉素则对菌株具有很强的抑制作用,多数菌株在该浓度下均不能生长。

2.2 16S rDNA PCR-RFLP 及序列测定

62 株供试菌株的 16S rDNA 的 PCR 产物经 4 种限制性内切酶酶切后分别产生 4~6 种图谱类型。所有待测菌株的 4 种酶切图谱类型组合后共获得 7 种组合类型(表 1)。揭示出该保护区内与柠条共生的根瘤菌具有较丰富的遗传多样性。选取不同组合类型的代表菌株进行序列测定,根据代表菌株的 16S rDNA 全序列与已知种的根瘤菌序列比较,构建出系统分类树状图(图 1)。从树状图可以看出,62 株供试根瘤菌在系统分类上分别归属于慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)及叶杆菌属(*Phyllobacterium*)的系统发育分支上。酶切组合类型 II (BABB) 的代表菌株 CNXE4 和 CNXLW24 与豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum* CCBAU 15266, *R. leguminosarum* BKBLP5)的亲缘关系最近,序列相似性达到 100%,可认为是同种菌;组合类型 III (BCEE) 的代表菌株 CNXE6 与山羊豆根瘤菌 *R. galegae* 的序列相似性为 100%,与根瘤菌属内各已知种的模式菌株 16S rDNA 序列相似性最小,为 96%,大于划分属的标准(95%);类型 IV (BABC) 的代表菌株 CNXF3、CNXLW17 分别与岩黄芪根瘤菌 *R. sullae*、高卢根瘤菌 *R. gallicum* 的序列相似性也达到 100%,与根瘤菌属内其它已知种序列相似性最小,为 96.5%。这一结果表明这些菌株所代表的类型 II、III 和 IV 的 24 株菌在系统分类上都属于根瘤菌属;类型 I (AAAA) 的代表菌株 CNXE1、CNXF1 与叶杆菌属 *Phyllobacterium* 已知模式菌株的序列相似性最小,为 98.2%,表明这一类型的 7 株菌在系统分类上都属于叶杆菌属;类型 V (CACD) 的代表菌株 CNXC3 与草木樨中华根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* CCBAU65887 的序列相似性达到 100%,与新疆中华根瘤菌 *S. xinjiangensis* CCBAU83084、费氏中华根瘤菌 *S. fredii* MWE7、苜蓿中华根瘤菌 *S. medicae* LMG 18864 的 16S rDNA 序列相似性分别为 98.5%、98.3% 和 99.8%;类型 VI (DBDE) 的代表菌株

CNX333, CNX221 与慢生根瘤菌属内的 *Bradyrhizobium* sp. CCBAU 85055 和 *Bradyrhizobium* sp. CCBAU 85057 等菌株的序列相似性为 99.5%,而与该属已知种的模式菌株序列相似性最大仅为 94.2%,这三株菌可能代表一个新分类群,其系统地位尚需要结合其它基因进一步分析;类型 VII (BDFD) 的代表菌株 CNX404、CNX502 与根瘤土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 的亲缘关系最近,序列相似性达到 100%,属于土壤杆菌属分支。

3 结论与讨论

在抗逆性实验中,供试菌株表现出不同的耐盐、耐酸碱能力和抗生素抗性。其中,经 16S rDNA 序列测定结果鉴定为豌豆根瘤菌的 CNXE4、CNXLW24 和中华根瘤菌的 CNXC3 这 3 株菌的抗逆性较为显著,不仅可以耐受 6% 的 NaCl、300 μg/mL 的青霉素、50 μg/mL 浓度的卡那霉素和链霉素,而且表现出极强的耐高温和耐酸碱性质,在 pH4.0~12.0 的酸碱范围内都可生长。已有的研究表明,根瘤菌与其宿主共生固氮体系的形成,除受到遗传因素的主导作用外,生态环境也有可能成为重要的调节因素^[6,9~12]。高丽锋等对毛乌素沙地的中间锦鸡儿根瘤菌的抗逆性研究表明,分离的根瘤菌中 77% 的菌株能够耐受 8% 的 NaCl,在 10% NaCl 浓度下仍有 13.3% 的菌株能够生长,表现出极强的耐盐性,在 pH 为 4.0 和 10.0 的环境中仍有较强的生活力^[6]。何恒斌等在对荒漠常绿植物沙冬青根瘤菌的研究中也筛选出了一些抗盐碱、耐高温的高抗逆性的菌株^[13]。本研究的供试菌株全部来源于白芨滩国家级自然保护区,该保护区属于毛乌素沙地的边缘和鄂尔多斯台地区域,是典型的荒漠类型自然保护区,降雨量小,蒸发量大,土壤贫瘠,盐碱化和沙漠化严重。然而在这一地区,分布有全国最大的天然柠条灌木林地 1.67 万 hm²、猫头刺近 2 万 hm² 及各种各样的共生固氮的豆科植物^[14]。高温干旱是动植物和微生物生长发育的限制因子,但这种生态条件同时亦赋予柠条及其共生根瘤菌较强的抗逆性。不论是宿主还是细菌,均经自然选择不断适应干旱环境,表现出耐盐、耐酸碱、耐高温的特性。目前的研究结果揭示,根瘤菌耐盐机理是由于细胞中海藻糖、甜菜碱和多胺等的调节,进而提高了根瘤菌的耐盐能力^[15~17]。而根瘤菌在抗干旱和抗盐碱方面具有相关性,一般来说,抗旱性强的根瘤菌耐盐碱能力也强^[18]。供试菌株及其宿主分布于干旱半干旱的荒漠区,土壤盐碱化程度较高,它们所具有的特殊性状

可能是其在长期逆境胁迫下,经过双重选择,逐渐进化、适应生态环境的结果,是物种生态系统功能正常发挥的有效保障。柠条根瘤菌的高抗性与其宿主植

物的高抗性间可能有着密切的联系,其相互间的作用机理及协同进化关系尚有待于进一步的研究。

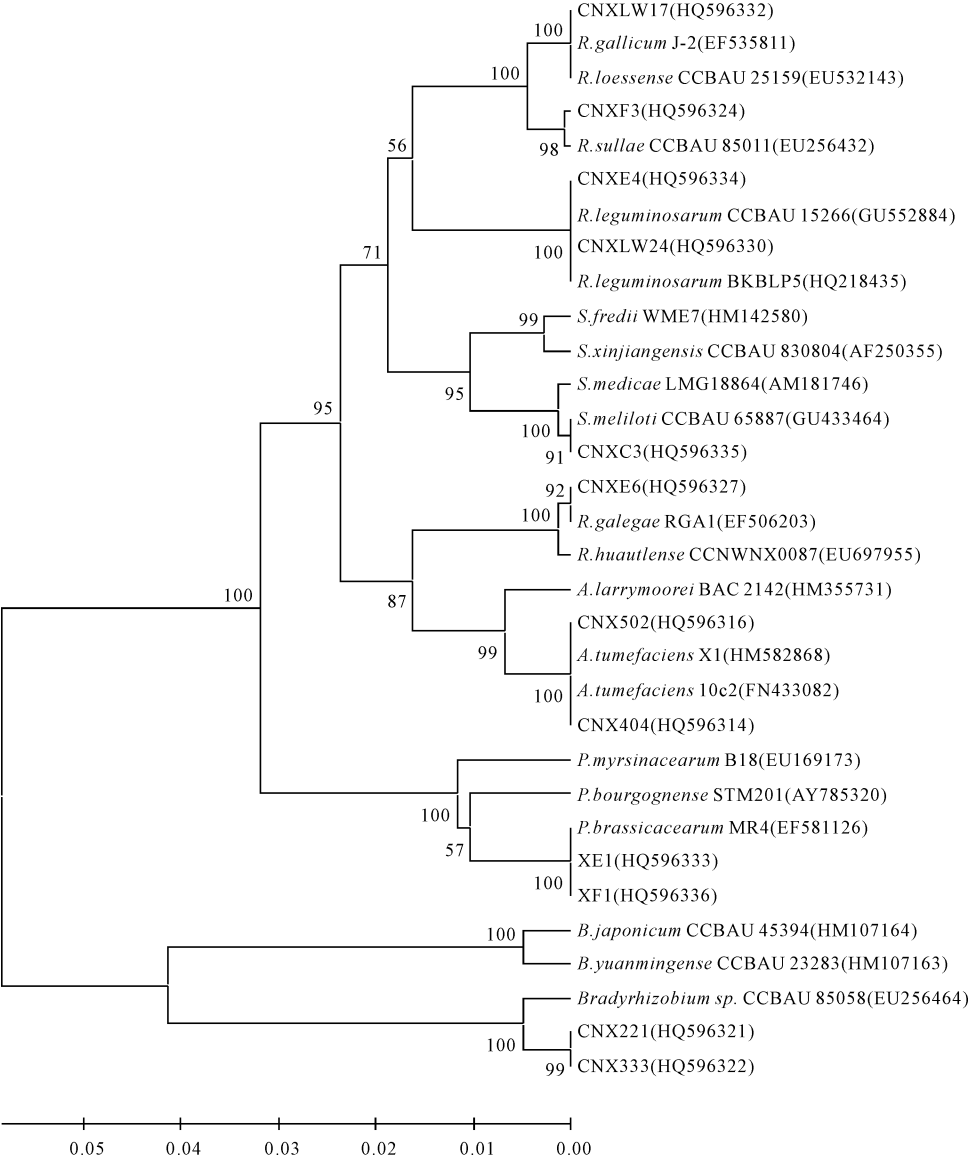


图 1 柠条根瘤菌 16S rDNA 全序列系统发育关系树状图

Fig.1 Phylogenetic relationship of rhizobia isolated from *Caragana* spp. based on 16S rDNA sequences

经 16S rDNA PCR-RFLP 及序列测定结果,本实验分离的 62 株菌株中,根瘤菌属与土壤杆菌属占总数的 67.7%,属于柠条根瘤内的优势菌。系统树中二者在种的系统发育上互有交叉,该结果与现有的一些报道相一致^[19,20]。Gao 等的研究表明从内蒙毛乌素沙地锦鸡儿植株中分离的主要根瘤菌类型为土壤杆菌^[21];Yan 等从东北地区锦鸡儿根瘤菌中分离出的主要根瘤菌类型是中慢生根瘤菌^[22]。本研究分离的根瘤菌中未发现中慢生根瘤菌的分布,这进一步说明植被的种类和地理环境的差异会影响到根瘤菌的种类和分布,根瘤菌与豆科植物的共生关

系是细菌、植物及环境三方面相互作用的结果^[10,23]。总之,柠条作为水土保持和固沙造林的先锋物种,干旱贫瘠的土壤生态条件必然会影响到与其共生的根瘤菌的遗传特性和在分类上的差异。对柠条根瘤菌多样性的研究,对于进一步丰富我国根瘤菌资源具有积极的意义。筛选出的抗逆性强的优良菌株(如 CNXE4、CNXLW24 和 CNXC3)需要进一步进行结瘤和固氮能力的测定,以期受损生态系统恢复重建、干旱风沙区自然保护区建设和优势生态林业资源产业化发展提供种质资源。

参 考 文 献:

[1] 陈文新.豆科植物根瘤菌—固氮体系在西部大开发中的作用[J].草地学报,2004,12(1):1—2.

[2] 陈文新.中国豆科植物根瘤菌资源多样性与系统发育[J].中国农业大学学报,2004,9(2):6—7.

[3] 牛西午.中国锦鸡儿属植物资源研究——分布及分种描述[J].西北植物学报,1999,19(5):107—133.

[4] 严雪瑞,陈文峰,陈文新,等.辽宁营口地区锦鸡儿与树锦鸡儿根瘤菌遗传多样性研究[J].沈阳农业大学学报,2007,38(1):44—48.

[5] 高丽锋,邓 馨,王洪新,等.毛乌素沙地中间锦鸡儿根瘤菌遗传多样性及 16S rDNA 全序列分析[J].微生物学报,2002,42(6):649—656.

[6] 高丽锋,邓 馨,王洪新,等.毛乌素沙地中间锦鸡儿根瘤菌的多样性及其抗逆性[J].应用生态学报,2004,15(1):44—48.

[7] 杨文权,郭军康,冯春生,等.宁夏豆科植物根瘤菌资源调查及其生态分布[J].干旱地区农业研究,2007,25(5):176—181.

[8] Berkum P V, Beyene B, Eardly B D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996,46:240—244.

[9] Allen O N, Allen E K. The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation[M]. Wisconsin: The University of Wisconsin Press,1981:707—727.

[10] 王卫卫,关桂兰,郭沛新,等.甘肃天水地区豆科植物共生固氮资源调查[J].干旱区研究,1995,12(1):7—10.

[11] 陈文新,汪恩涛,陈文峰.根瘤菌—豆科植物共生多样性与地理环境的关系[J].中国农业科学,2004,37(1):81—86.

[12] 张学军,张 磊,张 琴,等.苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 的耐酸性研究[J].西南大学学报,2008,30(1):91—97.

[13] 何恒斌,贾昆峰,贾桂霞,等.沙冬青根瘤菌的抗逆性[J].植物生态学报,2006,30(1):140—146.

[14] 宋朝枢,王有德.宁夏白芨滩自然保护区科学考察集[M].北京:中国林业出版社,1999:1—245.

[15] Helemish F A, Abdel-Wahab S M, El-Mokadem M T, et al. Effect of sodium chloride salinity on the growth, survival and tolerance response of some rhizobial strains[J]. Ain Shams Sci Bull, 1991,28:423—440.

[16] Sauvage D, Hamelia J, Lacher F. Glycine betaine and other structurally related compounds improve the salt tolerance of *Rhizobium meliloti* [J]. Plant Sci Lett, 1983,31:291—302.

[17] Lal B, Khanna S. Selection of salt tolerant *Rhizobium* isolates of *Acacia nilotica* [J]. World Microbiol Biotechnol,1995,10:637—639.

[18] Mohammad R M, Akhavan-Kharazian M, Campbell W F, et al. Identification of salt and drought tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains[J]. Plant Soil,1991,134:271—276.

[19] Kwon S W, Park J Y, Kim J S, et al. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005,55:263—270.

[20] 韦革宏,陈文新,朱铭莪.西北半干旱地区黄芪根瘤菌 DNA 同源性及其 16S rDNA 全序列分析[J].中国农业科学,2001,34(4):410—415.

[21] Gao L F, Hu Z A, Wang H X. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Caragana intermedia* in Maowusu sandland, North of China[J]. Lett Appl Microbiol, 2002,35(4):347—352.

[22] Yan X R, Chen W F, Fu J F, et al. *Mesorhizobium* spp. are the main microsymbionts of *Caragana* spp. grown in Liaoning Province of China[J]. FEMS Microbiol Lett, 2007,271(2):265—273.

[23] Jill M S, Heather H W, Matthew A P. Nonrandom genotypic associations in a legume—*Bradyrhizobium* mutualism [J]. Evolution, 1996,50(1):146—154.

Analysis of stress resistance and phylogenesis of rhizobia isolated from *Caragana* spp.

DAI Jin-xia, WANG Yu-jiong, GUO Jing-jing, WU Xue-juan, ZHANG Xiao-ling
(School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: Several biochemical characteristics of 62 rhizobia isolated from *Caragana* spp. in Baijitan National Nature Reserve in Ningxia were detected, including resistance to salt, acid-alkali, temperature variation and intrinsic antibiotics. The results indicated that 70.8% strains could tolerate NaCl stress at 4% concentration. All of the strains could tolerate Amp stress at 100 μg/mL as well as could grow at a range of pH from 5~11. Strains CNXE4, CNXLW24 and CNXC3 had high resistance, they could grow at pH from 4~12, could tolerate 6% concentration NaCl, 50 μg/mL KM and SM, 300 μg/mL AMP, and could grow after being exposed to 60℃ for 10 min. The methods of 16S rDNA PCR-RFLP and 16S rDNA sequencing were used to analysis the diversity and phylogenesis of 62 rhizobia strains. The results revealed that all the tested strains belonged to the genus of *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium* and *Bradyrhizobium*. The rhizobia isolated from *Caragana* spp. showed a rich genetic diversity.

Keywords: *Caragana* spp.; rhizobia; stress resistance; phylogenesis