

对两个分离自海南尖峰岭的木本豆科植物 根瘤菌菌株的多相鉴定

程涛^{1,2}, 焦如珍^{1,2*}, 高俊莲³

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091;
3. 北京市农林科学研究院生物技术研究中心, 北京 100097)

摘要:对分离自海南尖峰岭自然保护区木本豆科植物的 2 个根瘤菌菌株 RIF200835 和 RIF200845 进行了鉴定。这两个菌株的 16S rDNA 序列同模式菌株 *Rhizobium miluonense* CCU AU 41251^T 的相似度分别为 98.28% 和 98.51%。对这两个菌株进行全细胞脂肪酸组分和全细胞醌组分的分析结果表明, 菌株 RIF200835 和 RIF200845 在组分上与模式菌株较为一致, 但在含量上稍有差异。RIF200835 和 RIF200845 这两个菌株的 DNA G + C mol % 含量分别为 63.68% 和 60.56%, 介于根瘤菌 G + C mol % 含量范围(57%~65%)之内。这两个菌株的看家基因 *atpD*、*glnII*、*recA* 和 *rpoB*, 不同于模式菌株, 而独立聚成一个分支。研究结果表明, 菌株 RIF200835 和 RIF200845 可能为根瘤菌属 *Rhizobium* 中的新种。

关键词:根瘤菌; 16S rDNA; 全细胞脂肪酸组分; 全细胞醌组分; 看家基因; DNA G + C mol % 含量
中图分类号: S714.3 文献标识码: A

Polyphasic Identification of Two *Rhizobium* Strains from Woody Legumes in Jianfengling of Hainan Province

CHENG Tao^{1,2} JIAO Ru-zhen^{1,2} GAO Jun-lian³

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Key Laboratory of Forest Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 3. Research Center of Agricultural Biotechnology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: Two *Rhizobium* strains RIF200835 and RIF200845 isolated from woody legumes in Jianfengling National Nature Reserve, Hainan province, were analyzed by molecular methods. Their 16S rDNA sequences showed 98.28% and 98.51% of similarity to *R. miluonense* CCU AU 41251^T respectively. The two strains were also investigated for compositions of fatty acid and quinone. The results showed that they were basically similar to the model strain in content but slightly different in components. The DNA G + C contents of the two strains were 63.68% and 60.56%, falling in the range of 57%~65% of the genus of *Rhizobia*. Their housekeep genes (*atpD*, *glnII*, *recA* and *rpoB*) formed a clade separating from the model strain *R. miluonense* CCU AU 41251^T. The results showed that the two strains might be new species of *Rhizobium*.

Key words: *Rhizobium*; 16S rDNA; fatty acid composition; Quinone composition; Housekeep gene; G + C content

众所周知, 豆科植物同根瘤菌之间的共生固氮作用是土壤氮最为重要的来源^[1-3]。根瘤菌与豆科

植物、生态环境之间存在着复杂的关系, 因此, 在选择豆科植物最佳匹配根瘤菌时, 应根据种植地的生

态环境和宿主植物两方面因素选择合适的根瘤菌。对木本豆科植物根瘤菌的分离、筛选及鉴定是木本豆科植物高效固氮研究的基础,同时也是科学认识根瘤菌和宿主协同进化、固氮生理、固氮遗传以及微生物与高等植物之间的分子对话机制研究的基础^[4]。目前,世界上已知豆科植物有约750属和近2万个种,但人们只对其中0.3%~0.5%的豆科植物进行过共生关系研究,表明根瘤菌的资源调查及分类研究还存在明显不足。另外,对根瘤菌的研究多集中在重要农作物,如大豆、田菁、苜蓿、花生和紫云英等如草本豆科植物,而对乔木、灌木、半灌木状的木本豆科植物(占总种数的近乎一半)根瘤菌的研究则较少。木本豆科植物生长环境的广泛多样性,也决定了其共生固氮菌也具有广泛的生物多样性特点。近些年来,随着根瘤菌宿主研究范围的不断扩大和多相分类技术的应用,根瘤菌的分类研究突飞猛进,不断有新属和新种报道。据预测,根瘤菌的种类数量与豆科植物种的数量(18 000种)应该一样多^[4]。在我国,对根瘤菌种质资源的开发利用研究总体上来讲很有限,而且侧重于农业、牧业等,缺少对木本豆科植物根瘤菌的系统研究^[5]。因此,寻找和培育优良高效和抗逆性强的根瘤固氮菌株显得异常重要^[6]。

本文采用表型特征观察、细胞组分分析以及基因序列分析的方法对分离自海南尖峰岭的两株木本豆科植物根瘤菌进行了鉴定,为深入开展根瘤菌高效利用研究提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 主要仪器与试剂 Forma Class II A2型超净工作台、LRH-250A型生化培养箱、HC-TP11B-5型架盘药物天平、ML-3020型SANYO高压灭菌锅、pH211HANNA酸度计、Sigma 3-18K高速冷冻离心机、ABI型PCR仪、Shenergy Bilcolor DHZ-032型恒温摇床、电泳仪、Vilber3000型凝胶成像系统、北京鼎国生物技术有限公司UV-254暗箱式紫外透射仪、Ohaus Adventurer TM天平、Gilson及Eppendorf移液器、浊度仪、控温培养箱等。

1.1.2 供试菌株 从海南尖峰岭自然保护区海拔800 m处采集木本豆科植物的根瘤,并从中分离纯化到一批根瘤菌。本试验只对华楸(*Albizia chinensis*)根瘤和葫芦茶(*Lagenirisa siceraria*)根瘤处

获得的两个菌株RIF200835和RIF200845进行种类鉴定。

1.2 试验方法

1.2.1 形态特征观察 通过平板菌落法对菌落进行表征观察,观察和记录菌落的大小、形状、凹凸、边缘、硬度以及透明度等特征。采用革兰氏染色法在显微镜下进行菌体形态观察。

1.2.2 16S rDNA及看家基因的序列测定

1.2.2.1 供试菌株总DNA的提取及检测:采用Terefework^[7]的方法,提取根瘤菌基因组总DNA。

1.2.2.2 16S rDNA序列扩增:选用27F和1492R引物,扩增片断长度大致有1.5 kb左右。反应液组成:10 × PCR Buffer 5.0 μL, 10 mmol · mL⁻¹的dNTPs 1.0 μL,通用引物27F和1492R 10 mmol · mL⁻¹各1.0 μL, Taq聚合酶5 U · μL⁻¹ 0.5 μL,模板DNA 1.0 μL,补加超纯水至总体积50.0 μL。扩增反应在ABI-PCR仪上进行^[8-9]。PCR反应程序:95℃预变性5 min, 94℃变性1 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min, 30个循环, 72℃终延伸10 min。

1.2.2.3 看家基因扩增:选用*rpoB*、*recA*、*glnII*和*atpD*四个基因的引物分别为:*rpoB* 2070F/*rpoB* 3949R、*recA* 41F/*recA* 640R、*glnII* 12F/*glnII* 689R和*atpD* 255F/*atpD* 782R,这四个基因扩增片断长度在530 bp~880 bp之间。反应体系及程序同16S rDNA序列扩增相似。

1.2.2.4 16S rDNA和看家基因扩增产物的检测及序列分析:采用0.8%~1.2%浓度的琼脂糖凝胶,对基因扩增产物进行检测。将有条带的PCR扩增产物样品送交华大基因进行测序。将获得的序列采用Contig Express软件进行拼接,拼接结果通过NCBI网站进行比对,最后的结果通过Mega5.1和DNAMAN软件构建系统发育树和相似性矩阵表。

1.2.3 细胞组分测定

1.2.3.1 细胞脂肪酸和细胞醌型组分测定:脂肪酸的提取方法参照Sasser^[10]和刘天岩^[11]等的方法。将获得的样品送交北京市农林科学院农业生物技术研究中心,借助气相色谱仪测定脂肪酸组分和含量。

醌的提取方法参照陈坚^[12]等的方法。将获得的样品送交北京市农林科学院农业生物技术研究中心,借助高效液相色谱仪测定醌型组分。

1.2.3.2 DNA G+Cmol%含量测定

1.2.3.2.1 菌体的培养与收集:供试菌株经YMA

平板活化后,接入 250 mL YM 液体培养基,28℃ 摇床振荡培养至对数生长后期。取菌液于无菌的 50 mL 离心管中,8 000 rpm 离心 10 min 收集菌体。用 1 × TES 缓冲液离心洗涤菌体 3 次, - 20℃ 保存备用。

1.2.3.2.2 基因组总 DNA 的提取:基因组总 DNA 的提取参照 Marmur^[13] 和 Johnson^[14] 的方法。 T_m 值的测定采用热变性温度法,主要参考刘天岩^[11] 和 Deley^[15] 的方法。借助仪器测得供试菌株的 T_m 值后代入 DNA G + C mol% 含量计算公式, $G + C \text{ mol}\% = 51.2 + 2.08 (T_m(X) - T_m(R))$, 其中: $T_m(X)$ 表示待测菌株的 T_m 值, $T_m(R)$ 表示 *Escherichia coli* K-12 的 T_m 值。

2 结果与分析

2.1 形态特征

供试菌株 RIF200835 和 RIF200845 在 YMA 培养基上生长的菌落形态为透明或半透明状,颜色为白色或乳白色,表面凸起,边缘光滑,培养 3 天后的

菌落直径 2 ~ 5 mm。革兰氏染色呈红色,为 G^- 菌,小杆状。

2.2 16S rDNA 序列分析

菌株 RIF200835 同模式菌株 *Rhizobium miluonense* strain CCBAU 41251^T、*R. multihospitium* strain CCBAU 8340^T、*R. calliandrae* strain CCGE 524、*R. mayense* strain CCGE 526、*R. hainanense* strain I66、*R. jaguaris* strain CCGE 525 和 *R. tropici* CIAT 899 的相似性分别为 98.5%、98.4%、98.0%、97.6%、97.8%、98.2% 和 97.31%,相似性大致在 98% 左右。而菌株 RIF200845 同上七株模式菌株的前六个模式菌株的相似性分别为 97.2%、97.3%、97.0%、96.7%、96.8% 和 97.2%,相似性大致在 97% 左右,并且同模式菌株 *R. mayense* strain CCGE 526 和 *R. hainanense* strain I66 的相似度都低于 97%,而同模式菌株 *R. multihospitium* strain CCBAU 83401^T 的相似性最高,但亦即只有 97.3% 的相似性。相似性矩阵表见表 1。系统发育树见图 1,模式菌株的 NCBI 序列登陆号列于菌株名称后。

表 1 菌株 RIF200835 和 RIF200845 的 16S rDNA 相似性矩阵表

菌株编号	1	2	3	4	5	6	7	8
CCBAU_41251 ^T	100%							
CCBAU_83401 ^T	99.8%	100%						
CCGE_524	99.4%	99.6%	100%					
CCGE_525	99.4%	99.3%	99.5%	100%				
CCGE_526	99.6%	99.4%	99.8%	99.6%	100%			
I66	99.8%	99.9%	99.5%	99.3%	99.4%	100%		
RIF200835	98.5%	98.4%	98.0%	97.6%	97.8%	98.2%	100%	
RIF200845	97.2%	97.3%	97.0%	96.7%	96.8%	97.2%	96.4%	100%

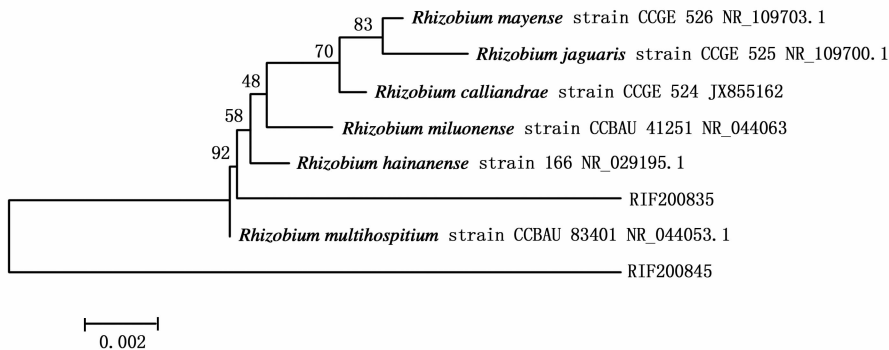


图 1 基于 16S rDNA 序列的菌株 RIF200835 和 RIF200845 与模式菌株的系统发育树

2.3 看家基因的序列分析

本研究对根瘤菌菌株 RIF200835 和 RIF200845 的 4 个看家基因 *atpD*、*glnII*、*recA* 和 *rpoB* 进行了 PCR 扩增与序列测定,将序列提交至 GenBank 数据库,参

比菌株的序列引自 GenBank 数据库,其序列号亦列于菌株名称之后。4 个看家基因的系统发育树分别见于图 2、3、4 和 5。从四个不同看家基因的系统发育树可以看出,菌株 RIF200835 和菌株 RIF200845

的相似性较高,并且独立于模式菌株而成一支,说明在看家基因方面,这两个菌株不同于模式菌株。而且从这4个看家基因系统发育树可以发现,这两个

菌株与模式菌株的相似性相对较低,分属不同类群。表明菌株 RIF200835 和 RIF200845 与相关模式菌株的亲缘关系较远,为不同种。

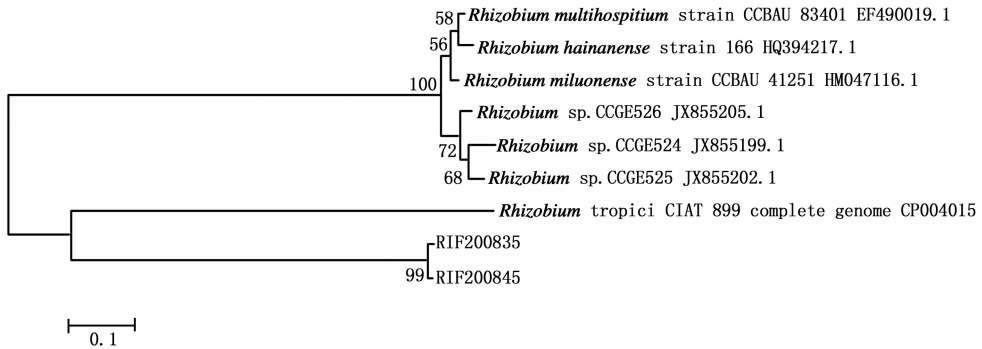


图2 基于 *atpD* 基因序列的菌株 RIF200835 和 RIF200845 的 ML 系统发育树

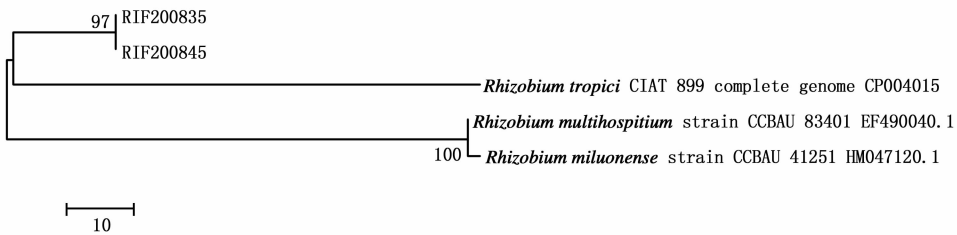


图3 基于 *glnII* 基因序列的菌株 RIF200835 和 RIF200845 的 ML 系统发育树

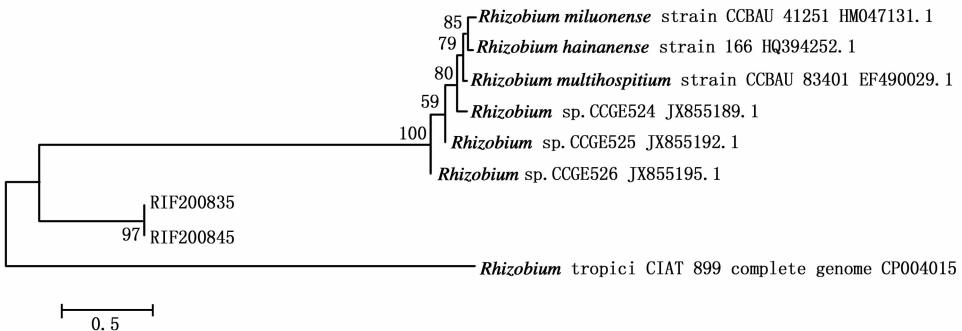


图4 基于 *recA* 基因序列的菌株 RIF200835 和 RIF200845 与模式菌株的 ML 系统发育树

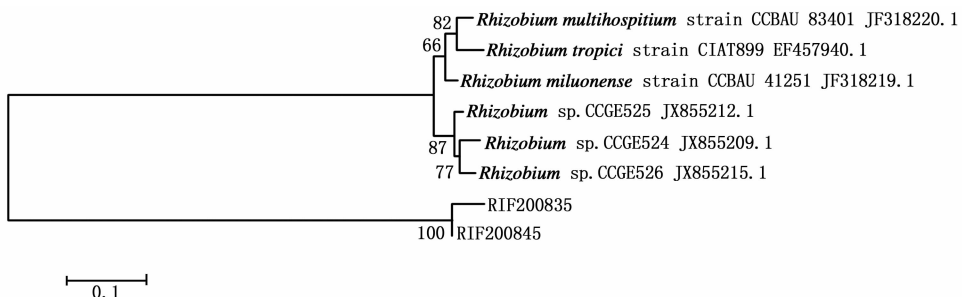


图5 基于 *rpoB* 基因序列的菌株 RIF200835 和 RIF200845 与模式菌株的 ML 系统发育树

将 *atpD*、*glnII*、*recA* 和 *rpoB* 四个看家基因的序列按顺序合并,构建的 ML 系统发育树表明,菌株

RIF200835 和 RIF200845 聚在一起,与模式菌株不在同一分支(图 6)。从 ML 图上的自展值可以看

出,两株菌株同模式菌株的差别较大。

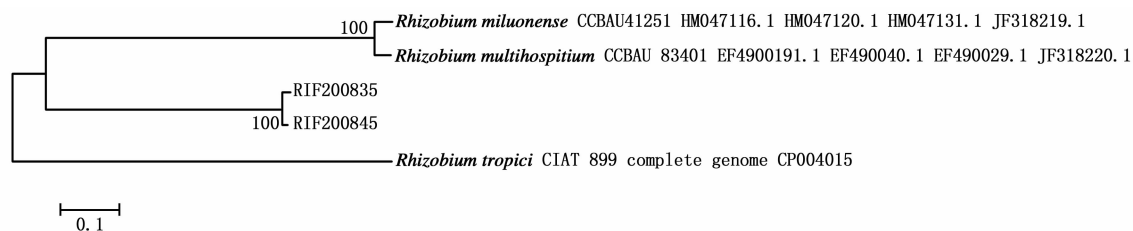


图 6 基于 4 个看家基因合的菌株 RIF200835 和 RIF200845 的 ML 系统发育树

2.4 细胞脂肪酸组分分析

对菌株 RIF200835 和 RIF200845 的全细胞脂肪酸组分测定结果见表 2。菌株 RIF200835 含有 24 种脂肪酸,菌株 RIF200845 含有 23 种脂肪酸。它们主要由 11 种脂肪酸组分构成。菌株 RIF200835 和菌

株 RIF200845 与三株模式菌株的成分基本一致,但少量成分的含量不同。脂肪酸组分分析结果表明,菌株 RIF200835 和 RIF200845 属于根瘤菌属 *Rhizobium*,但不同于已知种类。

表 2 菌株 RIF200835 和 RIF200845 与参比菌株的脂肪酸成分

脂肪酸	苜蓿中华根瘤 CCUAW 41251 ^T	相思根瘤菌 CCBAU 83401 ^T	海南根瘤菌 CCBAU 57015 ^T	RIF200845	RIF200835
Sum In Feature 2		0.54	0.42	0.63	0.62
10:0 3OH		0.78			0.63
12:1 AT 11 - 12 unknown 11.543			0.16	0.83	
13:1 AT 12 - 13			0.39	0.95	0.67
14:0 ANTEISO	0.18	0.18	0.21		0.72
Sum In Feature 1		0.62	0.47	0.54	
15:0 ISO	1.29	0.41	0.34		0.67
15:0 ANTEISO	0.45	0.32	0.22	0.72	0.97
unknown 14.959		0.61	0.27	0.66	0.79
15:0		0.73	0.60	0.60	
Sum In Feature 2	10.18	9.80	6.26	7.06	7.36
Sum In Feature 3	0.94	0.70	0.82		
16:0	6.93	6.73	6.47	6.90	6.40
15:0 ISO 3OH	15.83	13.10	9.12	8.96	9.29
15:0 3OH		2.50	2.20	2.33	2.58
17:0 ISO	0.90	0.74	0.89	0.77	0.93
17:1 w8c		1.21	1.93	1.34	1.59
17:0 CYCLO	1.22	1.38	2.31	1.65	1.26
17:0		1.26	2.24	1.68	1.84
16:0 3OH	8.37	7.69	3.39	6.93	5.62
18:1 w7c	19.29	16.77	29.95	17.98	19.01
18:1 w5c			0.52		
18:0			0.37		
17:0 ISO 3OH	0.93	0.90	0.53	0.95	0.85
17:0 3OH		3.97	1.96	3.97	4.31
19:0 CYCLO w8c	22.33	19.73	24.84	22.50	25.64
18:1 2OH	8.69	6.41	2.07	5.34	5.67
18:0 3OH	2.48	2.93	1.05	6.70	2.57
Summed Feature 1		0.62	0.47	0.54	
Summed Feature 2	10.18	10.34	6.68	7.69	7.98
Summed Feature 3	0.94	0.70	0.82		

2.5 细胞醌型组分分析

通过对菌株 RIF200835 和 RIF200845 及 1 株模式菌株的醌类测定(图 7、8、9,表 3),发现这 2 个菌株含有的醌类成分与模式菌株 *Rhizobium miluonense*

CCUAU 41251T 一致,主要为 Q10 型,与《伯杰氏细菌系统与发育学手册》报道的结果一致。但其 Rf 值却存在一定的差异,表明它们之间存在一定的差别。

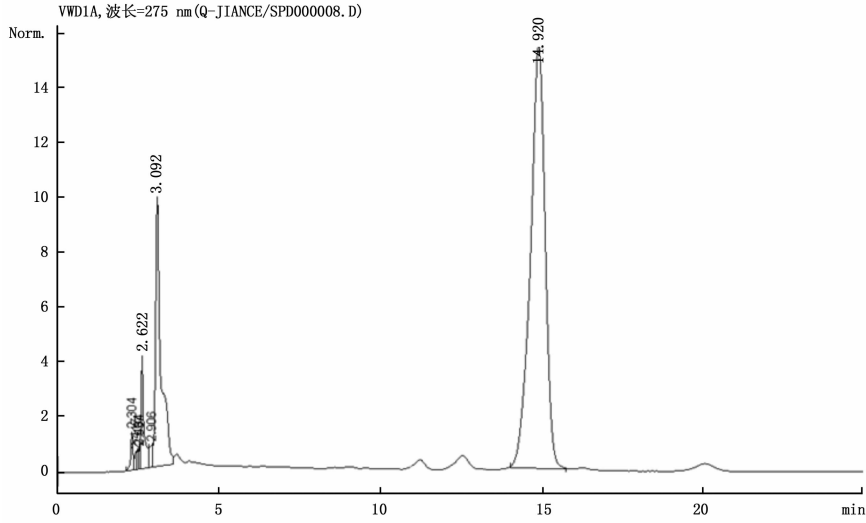


图7 菌株 RIF200835 醌组分高效液相色谱峰图

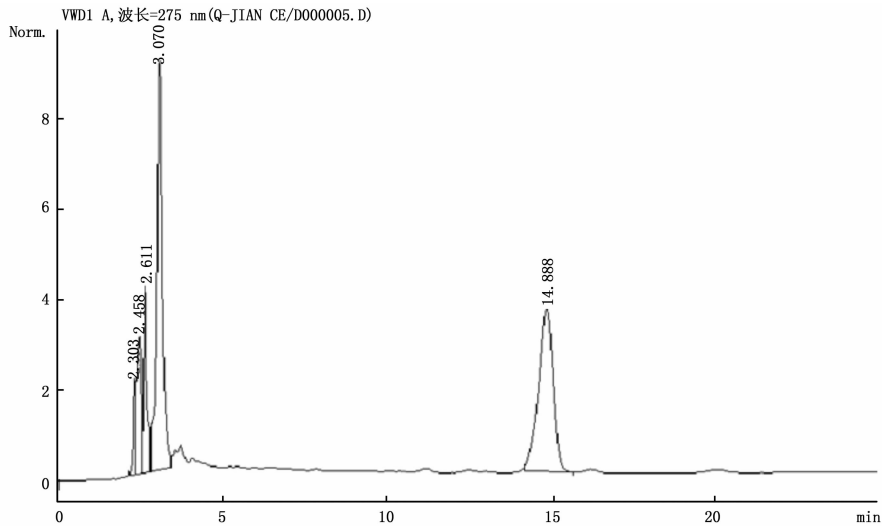


图8 菌株 RIF200845 醌组分高效液相色谱峰图

表3 菌株 RIF200835 和 RIF200845 醌组分的
高效液相色谱相关信息

菌株	培养温度	参考醌型	Rf	保留时间/min
RIF200835	28℃	Q10	0.17	14.920
RIF200845	28℃	Q10	0.16	14.888
<i>Rhizobium miluonense</i>	28℃	Q10	0.21	14.961
CCUAU 41251T				

2.6 DNA G + C mol% 含量分析

以 *E. coli* K 12 菌株的 DNA 作参照,测定菌株 RIF200835 和 RIF200845 的 DNA 样品。经公式计算

得出菌株 RIF200835 和 RIF200845 的 DNA G + C mol% 含量分别为 63.68% 和 60.56%,属于根瘤菌属的 DNA G + C mol% 含量 57% ~ 65% 的范围之内,表明这两个菌株属于根瘤菌属(*Rhizobium*)。

3 结论与讨论

本研究通过对两个分离自海南省尖峰岭的木本豆科植物根瘤菌菌株的形态特征观察、革兰氏染色、16S rDNA 序列和 4 个看家基因分析、全细胞脂肪酸组分和醌组分分析、以及 DNA G + Cmol% 含量分

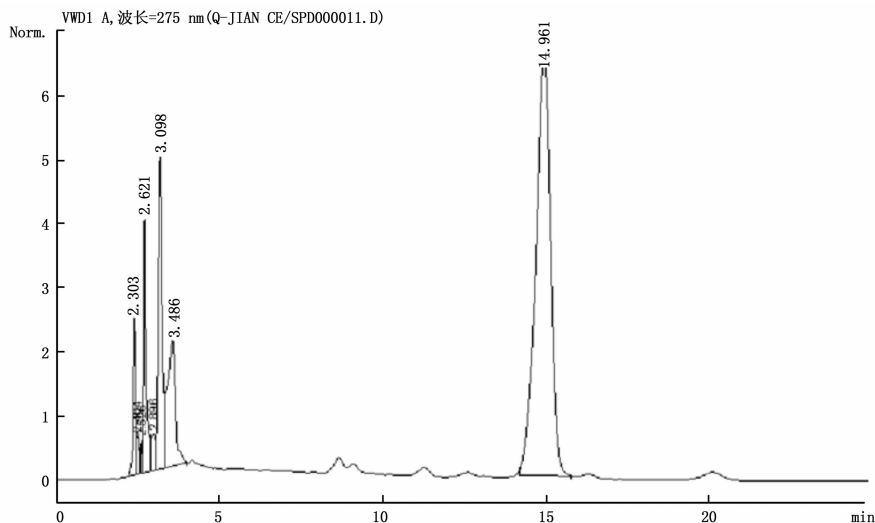


图9 模式菌株 *Rhizobium miluonense* CCUAU 41251^T 醌组分高效液相色谱峰图

析,证明菌株 RIF200835 和 RIF200845 属于根瘤菌属,但不同于已有报道的种类。

两菌株在 YMA 培养基上生长的菌落形态、革兰氏染色的结果都和根瘤菌属菌株的特征相符。16S rDNA 序列的序列比对结果说明,菌株 RIF200835 和 RIF200845 同模式菌株的相似度都在 97% 以上,说明两菌株属于根瘤菌属。四个看家基因的序列分析结果均表明,菌株 RIF200835 和 RIF200845 聚成一支,同模式菌株的不在一个分支上且自展值较小。将看家基因依次合并的多位点序列分析结果亦显示出独立于模式菌株而成一支的结果,说明两菌株可能是根瘤菌属的新种。全细胞脂肪酸组分分析结果显示两菌株同模式菌株的主要成分相同,仅有少量成分和某些成分的含量上存在一些差异。这也进一步说明两菌株是根瘤菌属内的菌株,更倾向于属于新种。醌组分分析结果表明,两菌株的醌型是 Q10,同根瘤菌属的相一致。同时,两菌株的 DNA G + C mol% 含量亦处于根瘤菌属 DNA 的含量范围之内。

综上所述,菌株 RIF200835 和 RIF200845 为根瘤菌属,但不同于已有报道的种类,其确切分类地位还有待进一步研究和确认。

参考文献:

- [1] 朱剑光,尉亚辉,吴异舟. 花生慢生根瘤菌的分离与鉴定[J]. 生物技术,2006,16(2):45-48.
- [2] 姚志恒. 基因在费氏中华根瘤菌中的验证及对结瘤的影响[J]. 江西农业学报,2009,21(2):8-10,54.
- [3] FAO(国际粮农组织). 豆科植物根瘤菌剂及其利用[M]. 北京:农业科技出版社,1988. 19~21.
- [4] 陈文峰,陈文新. 我国豆科植物根瘤菌资源多样性及应用基础研

究,生物学通报,38(7),1-3,2003.

- [5] 宁国赞,刘惠琴,马小彤. 中国豆科牧草根瘤菌资源的采集保藏及利用[J]. 草地学报,1999,7(2):165-172.
- [6] G 史晓霞;师尚礼;杨晶;王正凤 豆科植物根瘤菌分类研究进展 草原与草坪 2006.02.20.
- [7] Terefework Z, Kaijalainen S, Lindstrom K, et al. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *Journal of Biotechnology*. 2001, 91(2~3): 169-180.
- [8] Zhu Z L. Utilizing chemical and organic fertilizer reasonable, exploring friendly fertilizer system [J]. *Publication of Chinese Academy Science*, 2003, 2: 89293.
- [9] 彭玉红. 海南尖峰岭木本豆科植物根瘤菌资源研究 中国林业科学研究院硕士论文 2009, 05.01.
- [10] Sasser, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Newark, DE: MIDI Technical Note. 1990: 101.
- [11] 刘天岩. 鸡眼草根瘤菌的多相分类与分子进化研究 中国农业大学硕士论文 2013, 05.
- [12] 陈 坚. 根际 ACC 脱氨酶活性细菌的筛选与多相分类及其对番茄的促生作用研究 首都师范大学硕士论文 2012, 05.21.
- [13] Marmur, J. A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology*. 1961, 3(2): 208-218.
- [14] Johnson, J. L. DNA reassociation and RNA hybridisation of bacteria nucleic acids. *Methods in Microbiology*. 1995, 18, 33-74.
- [15] Deley, J. Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*. 1970, 101(3): 738-754.