

张敬宜,王金华,熊智,等.文山石漠化地区豆科植物根瘤菌的 16S rDNA 序列分析[J].江苏农业科学,2014,42(12):44-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.012

文山石漠化地区豆科植物根瘤菌的 16S rDNA 序列分析

张敬宜,王金华,熊智,思斯,王凯,杨应勇

(西南林业大学/西南山地森林资源保护与利用省部共建教育部重点实验室,云南昆明 650224)

摘要:为研究和利用云南省文山石漠化地区豆科植物根瘤菌的种质资源多样性,对从文山地区豆科植物根瘤分离获得的 13 株根瘤菌株进行 16S rDNA 全序列分析,并与相关参比菌株的 16S rDNA 序列进行比较及聚类分析,建立 13 株文山石漠化地区豆科植物根瘤菌的发育树状图,初步确定 13 株豆科植物根瘤菌的分类地位,为以后石漠化生态修复中种植豆科植物接种适宜的根瘤菌提供种质资源。

关键词:石漠化;豆科植物;根瘤菌;16S rDNA;系统发育分析

中图分类号: S182;S156 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0044-03

石漠化是指在喀斯特脆弱的岩溶生态环境下,由于人类不合理的社会经济活动而造成的地表植被破坏、水土严重流失、土壤贫瘠、基岩裸露或砾石堆积等生态系统退化现象,是岩溶地区土壤退化的极端形式^[1]。石漠化地区干旱,土壤肥力下降,土地生产力衰减,严重影响了农、林、牧业的生产,当地群众的生活和生产环境日趋恶化。云南省是我国石漠化主要分布区之一,石漠化土地总面积 288.20 万 hm^2 ,占云南省国土总面积的 15.35%。在 11 个石漠化分布州(市)中,文山州居首位,石漠化总面积 83.18 万 hm^2 ,主要分布在广南、丘北和文山等县,是典型的峰丛洼地石漠化类型^[2]。

根瘤菌是一类存在于土壤中的革兰氏阴性细菌,它能够侵染豆科植物的根部或茎部形成共生体——根瘤(或茎瘤),并在其中将空气中的游离态的氮气转化成植物可以利用的化合态氮,为宿主植物的生长提供必需的氮素营养。根瘤菌-豆科植物共生固氮体系是已知固氮能力最强的生物固氮体系之一,能有效促进植物生长,增加土壤肥力^[3]。因此,发现新的根瘤菌资源,建立高效的共生体系是石漠化地区植被恢复的首要工作。目前许多学者对国内很多地区的豆科植物根瘤菌进行了研究^[4-8],但对文山石漠化地区豆科植物根瘤菌的研究还鲜见报道。本试验以文山石漠化地区的豆科植物为材料,调查这一特殊生境下的根瘤菌资源,研究其遗传多样性,筛选优良根瘤菌,在石漠化生态恢复时,拌种于豆科植物的种子,与豆科植物形成共生固氮体系,为改良石漠化土壤、恢复石漠化生态环境提供优质种库和有效途径。

1 材料与方法

1.1 根瘤的采集

2011 年 4 月在云南省文山州广南县、文山市、丘北县、砚

收稿日期:2014-02-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31100007);云南省教育厅科学研究基金(编号:2012Z068)。

作者简介:张敬宜(1987—),女,河北唐山人,硕士研究生,研究方向为植物生物技术。E-mail: zjymmy87q@sina.com。

通信作者:王金华,博士研究生,副教授,研究方向为资源微生物学。E-mail: lsxcary@gmail.com。

山县 4 个地区采集豆科植物,挖出根须,挑选新鲜、个大、饱满的根瘤装入装有干燥变色硅胶的离心管,密封。供试菌株编号、宿主植物名称及来源见表 1。

1.2 根瘤菌的分离及筛选

根瘤带回实验室后,用无菌水洗涤,以 75% 乙醇 3 ~ 5 min、0.1% HgCl_2 1 ~ 3 min 进行表面灭菌,无菌水冲洗 5 ~ 6 次,然后在无菌条件下用灭菌的手术刀将根瘤切开,并用灭菌的镊子挤出汁液,最后接种于 YMA 培养基上,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下进行培养。采用稀释平板划线法,分离纯化,挑取单菌落,革兰氏染色,镜检,最后接入试管斜面中保藏备用。

1.3 DNA 的提取

将活化的菌株接种于 TY 液体培养基中,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下、140 r/min 振荡培养至对数生长期,收集菌体,用细菌 DNA 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取 DNA。

1.4 16S rDNA PCR 扩增及测序

(1)引物选择。正向引物:5' - AGAGTTTGATCCTGGCT-CAGAACGAACGCT - 3';反向引物:5' - TACGGCTACCTTGT-TACGACTTCACCCC - 3'^[9],均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。(2)反应体系。10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物和反向引物各 1 μL , 2 \times Taq PCR MasterMix 25 μL , 25 ng/L 模板 DNA 2.5 μL ,加 ddH_2O 至 50 μL 。(3)反应程序。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min, - 20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。(4)PCR 产物检测。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。然后将 PCR 反应产物经纯化后直接测序,测序工作在上海英潍捷基公司完成。

1.5 多序列比较及进化树的建立

将测序结果通过美国国立生物信息中心和欧洲生物信息所的国际网站进行 BLAST 分析,进一步验证测序结果,并进行多序列比较,建立系统进化树。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA PCR 扩增

图 1 显示,通用引物对根瘤菌的 DNA 进行 16S rDNA 扩增后,均有 1 500 bp 左右的扩增条带。

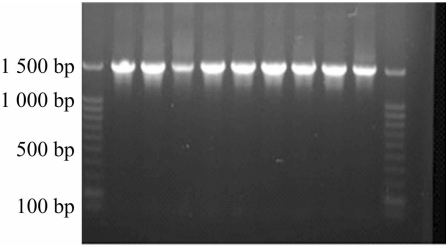


图1 部分扩增出的16S rDNA片段

2.2 序列测定结果

将菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比对,运用软件 MEGA 4.0 按 bootstrap 的 UPGMA 法构建系统发育树(表 1、表 2、图 2)。

从系统发育树状图上看,这 13 株菌属于不同的归属,说

明文山石漠化地区豆科植物根瘤菌多样性很丰富。有 7 株菌属于 *Rhizobium* sp. 系统发育分支,但它们分为两大分支,SWFU - W01、SWFU - W02、SWFU - W03、SWFU - W10 为一个分支,SWFU - W58、SWFU - W63、SWFU - W64 为另一分支的根瘤菌属 (*Rhizobium* sp.),其中来自不同采样地相同寄主(三叶草)的代表菌株 SWFU - W01、SWFU - W02、SWFU - W03,说明在不同的生境中 *Rhizobium* sp. 可以与寄主形成共生关系。SWFU - W13、SWFU - W14、SWFU - W50 属于热带根瘤菌属 (*Rhizobium tropici*),它们的寄主植物均为木本豆科植物木蓝,但是木蓝分别采集于文山市、广南县和砚山县 3 个地区。SWFU - W90、SWFU - W98、SWFU - W99 与根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的同源性最接近,它们与其他菌株的相似性也较小(表 2),故它们属于根瘤土壤杆菌。

表 1 文山石漠化地区自然生长的豆科植物根瘤菌

序号	菌株号	寄主植物中文名	植物学名	采集地点	生境
1	SWFU - W01	三叶草 I	<i>Trifolium repens</i> L.	文山市	山坡
2	SWFU - W02	三叶草 II	<i>Trifolium repens</i> L.	广南县	山脚
3	SWFU - W03	三叶草 II	<i>Trifolium repens</i> L.	广南县	山脚
4	SWFU - W10	广布野豌豆 I	<i>Vicia cracca</i> L.	砚山县	山脚
5	SWFU - W13	木蓝 I	<i>Indigofera tinctoria</i> L.	文山市	山坡
6	SWFU - W14	木蓝 II	<i>Indigofera tinctoria</i> L.	广南县	山坡
7	SWFU - W50	木蓝 III	<i>Indigofera tinctoria</i> L.	砚山县	山脚
8	SWFU - W58	广布野豌豆 II	<i>Vicia cracca</i> L.	丘北县	山脚
9	SWFU - W63	木蓝 II	<i>Indigofera tinctoria</i> L.	广南县	山坡
10	SWFU - W64	白刺花	<i>Sophora vicifolia</i> Hance.	砚山县	山坡
11	SWFU - W90	猪屎豆	<i>Crotalaria pallida</i> Ait.	丘北县	山脚
12	SWFU - W98	三叶草 III	<i>Trifolium repens</i> L.	砚山县	山脚
13	SWFU - W99	三叶草 III	<i>Trifolium repens</i> L.	砚山县	山坡

表 2 供试菌株的 16S rDNA 相似性矩阵

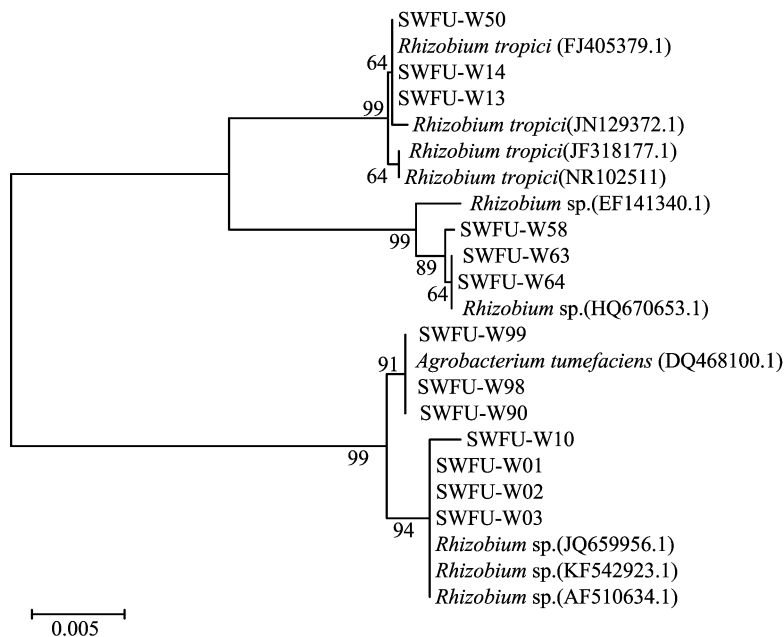
菌株	相似性(%)												
	SWFU - W01	SWFU - W02	SWFU - W03	SWFU - W10	SWFU - W13	SWFU - W14	SWFU - W50	SWFU - W58	SWFU - W63	SWFU - W64	SWFU - W90	SWFU - W98	SWFU - W99
SWFU - W01 (KF773123)	**												
SWFU - W02 (KF773124)	99.9	**											
SWFU - W03 (KF773125)	99.9	99.9	**										
SWFU - W10 (KF773135)	99.8	99.8	99.8	**									
SWFU - W13 (KF773126)	94.6	94.6	94.6	94.5	**								
SWFU - W14 (KF773127)	94.6	94.6	94.6	94.5	99.9	**							
SWFU - W50 (KF773128)	94.6	94.6	94.6	94.5	99.9	99.9	**						
SWFU - W58 (KF773129)	94.3	94.3	94.3	94.3	97.8	97.8	97.8	**					
SWFU - W63 (KF773130)	94.2	94.2	94.2	94.2	97.7	97.7	97.7	99.8	**				
SWFU - W64 (KF773131)	93.9	93.9	93.9	94.0	97.6	97.6	97.6	99.5	99.7	**			
SWFU - W90 (KF773132)	43.4	43.6	44.0	44.0	44.0	43.5	42.9	43.0	42.8	43.0	**		
SWFU - W98 (KF773133)	43.4	43.6	44.0	44.0	44.0	43.5	42.9	43.0	42.9	43.0	99.9	**	
SWFU - W99 (KF773134)	43.4	43.6	44.0	44.0	44.0	43.5	42.9	43.0	42.9	43.0	99.9	99.9	**

注:每一个菌株后括号内为其序列提取号。

3 讨论

目前石漠化已经成为导致西南岩溶地区生态恶化的主要因素,而人为破坏造成的地表植被覆盖率下降是石漠化的根

本原因,因此恢复植被是石漠化治理的首要任务。有机质、N、P、K、Ca、Mg 等养分有效含量低是石漠化植被恢复的最主要障碍^[10-11]。国内外许多学者的研究发现,通过构建根瘤菌-宿主植物共生体系,不仅能够显著促进植物生长,同时还



参比种属后面的为其GenBank登录号

图2 以16S rDNA全序列为基础的系统发育树状图

能够增加土壤肥力,改良土壤结构。如李建华等在山西矿区复垦土壤上种植接种根瘤菌的白三叶草(*Trifolium repens*),结果表明接种根瘤菌能显著提高植物生物量和土壤养分利用率^[12]; Requena 等用根瘤菌接种绒毛花(*Anthyllis cytisoides*)幼苗,对西班牙南部一个半干旱沙漠地区的退化植被进行恢复,发现接种根瘤菌在提高植株在半干旱沙漠地区的定植和存活能力、增加土壤的质量和肥力、促进自然群落演替过程中氮的转移等方面效果最好^[13]。根瘤菌与豆科植物的共生关系会因生态环境的差异而具多样性^[14-15],因此,在应用豆科植物-根瘤菌共生体系来修复石漠化退化地土壤和生态时,应根据石漠生态环境及宿主植物两方面因素选择合适的根瘤菌,为豆科植物选择最佳匹配的根瘤菌。本研究对文山石漠化地区豆科植物根瘤菌的分离鉴定,对建立石漠地区的根瘤菌菌库和改善石漠化环境具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 王代懿,容丽,梅再美,等. 喀斯特石漠化生态治理区结构与物种多样性研究[J]. 水土保持通报,2005,25(2):31-35.
- [2] 罗文生,宋维峰,尹义发. 云南石漠化防治现状[J]. 亚热带水土保持,2010,22(1):27-30,55.
- [3] Committee on a Study of Technologies to Benefit Farmers in Africa and South Asia, National Research Council. Emerging technologies to benefit farmers in sub-Saharan Africa and South Asia[M]. Washington D. C.: The National Academies Press, 2008:145-176.
- [4] 李颖,白雨,陈文新. 沙坡头地区根瘤菌 DNA 同源性及 16S rDNA 全序列[J]. 微生物学报,1999,39(2):95-99.
- [5] 彭玉红,焦如珍,牟新涛. 尖峰岭抗逆性根瘤菌的筛选及其 16S

- rDNA 序列的测定[J]. 林业科学研究,2010,23(4):530-536.
- [6] 赵龙飞. 河南商丘地区豆科植物根瘤菌资源多样性调查[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):329-332.
- [7] 吕飞,蒋欣,徐佳洁,等. 新疆和陕西三叶草属根瘤菌 16S rDNA 多态性及系统发育研究[J]. 草地学报,2009,17(3):304-309.
- [8] 龚秀会,缪福俊,赵平,等. 云南东川铜矿区豆科植物-根瘤菌对铜的耐受性[J]. 江苏农业科学,2012,40(6):312-314.
- [9] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991,173(2):697-703.
- [10] 袁道先. 全球岩溶生态系统对比:科学目标和执行计划[J]. 地球科学进展,2001,16(4):461-466.
- [11] 王建锋,谢世友,许建平. 丛枝菌根在石漠化生态恢复中的应用及前景分析[J]. 信阳师范学院学报:自然科学版,2009,22(1):157-160.
- [12] 李建华,郇春花,卢朝东,等. 接种根瘤菌的三叶草在矿区复垦土壤中的生态效应[J]. 山西农业科学,2010,38(2):55-56,67.
- [13] Requena N, Perez-Solis E, Azcón-Aguilar C, et al. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001,67(2):495-498.
- [14] 陈文峰,刘杰,陈文新. 木本豆科植物根瘤菌资源及多样性研究进展[J]. 科学技术与工程,2004,4(11):954-959.
- [15] 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[J]. 生物学通报,2003,38(7):1-4.