

我国亚热带地区快生型大豆根瘤菌 遗传多样性研究

杨成运^{1,2}, 周俊初², 杨江科³, 段广才¹

(1. 郑州大学 公共卫生学院, 河南 郑州 450001;

2. 华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070;

3. 华中科技大学 生命科学技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘要: 利用 16S rDNA PCR-RELP、16S rDNA 基因序列分析以及 16S-23S rDNA IGS PCR-RELP 技术, 对分离自我国江苏盐城、浙江温州、湖北仙桃及重庆等亚热带地区的 31 株大豆快生型根瘤菌(fast-growing rhizobia)进行了群体遗传多样性研究。16S rDNA PCR-RELP 分析结果表明, 所有供试大豆根瘤菌都与费氏中华根瘤菌 USDA205 聚成一类。供试代表菌株 YcS2 的 16S rDNA 基因序列与费氏中华根瘤菌 USDA205 的该序列相似性超过 99.5%。16S-23S rDNA IGS PCR-RFLP 研究结果表明: 所有供试菌株分为 10 个基因型, 在 87% 的相似性上分为 4 个类群。在此基础上筛选出 10 个代表菌株进行 16S-23S rDNA 基因序列分析, 结果表明, 10 个供试菌株分为 2 个群, 群 II(YcS3、ZzS1、YcS14)与新疆中华根瘤菌 CCBAU110 聚在一起, 群 I(其余 7 个菌株)与费氏中华根瘤菌 USDA205 聚在一起。中国亚热带地区的快生型大豆根瘤菌具有高度的相似性。

关键词: 大豆根瘤菌; 多样性; 16S rDNA; 基因间区

中图分类号: S565.1, S154.38 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)01-0048-06

Genetic Diversity of Fast-growing Rhizobia Associated with *Glycine max* in Subtropical Regions of China

YANG Cheng-yun^{1,2}, ZHOU Jun-chu², YANG Jiang-ke³, DUAN Guang-cai¹

(1. College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Genetic diversity of 31 isolates from effective nodules of soybean in different geographical regions of China was studied using 16S rDNA gene RELP patterns, 16S rDNA gene sequencing, 16S-23S rDNA IGS region RELP patterns and 16S-23S rDNA IGS sequencing assays. The isolates were clustered into one genospecies with *Sinorhizobium fredii* USDA205 on the basis of their 16S rDNA gene PCR-RFLP patterns. 16S rDNA gene sequence of strains indicated that the isolates were very closely related (identities higher than 99.5%) to *Sinorhizobium fredii* USDA205. The analysis of the 16S-23S intergenic spacer (IGS) divided the isolates into 10 genotypes and four groups. The 16S-23S rDNA IGS sequencing assays divided the isolates into two groups. Group I was clustered with *Sinorhizobium fredii* USDA205. Group II was less similarity to *Sinorhizobium fredii* USDA205 than *Sinorhizobium xinjiangense*. The isolates from the subtropical regions of China had higher genetic similarity.

Key words: Soybean rhizobia; Diversity; 16S rDNA; IGS

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 科技部微生物资源课题(2005DKA21208-6); 国家高技术研究发展计划(2007AA5Z417); 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室开放基金

作者简介: 杨成运(1975-), 女, 河南南阳人, 讲师, 博士后, 主要从事固氮微生物研究。E-mail: tochyun@163.com

豆科植物是一个大家族,广泛分布在世界各地。许多豆科植物可以与根瘤菌形成独特的共生关系。根瘤菌可以将大气中的氮气转换为植物可以利用的形式,为植物提供氮元素。

大豆可以与慢生根瘤菌(*Bradyrhizobia*)和中华根瘤菌(*Sinorhizobium*)形成共生关系。在很长一段时间慢生根瘤菌被认为是唯一可以与大豆共生的根瘤菌^[1],直到 1980 年有研究表明,从土壤中分离出生长很快的根瘤菌,并且这些根瘤菌可以提高大豆的共生结瘤能力^[2-3]。这些新菌株与慢生大豆根瘤菌不同,它们生长非常快,并且与慢生根瘤菌的亲缘关系较远,这些根瘤菌中含有携带有固氮基因的共生质粒,而慢生根瘤菌的共生固氮基因分布在染色体上。1988 年,这些大豆根瘤菌被命名为 1 个新属:中华根瘤菌属^[4]。

研究大豆根瘤菌多样性和系统发育,有助于认识其微观进化、生物分类,有助于发掘、充实和保存根瘤菌资源,揭示根瘤菌的系统发育、遗传和进化的本质。在应用方面,可为农业生产选育高效根瘤菌菌株提供依据。大豆接种合适的根瘤菌、菌根制剂后,可以提高其固氮能力及吸收土壤中营养物质的能力。为此,利用 16S rDNA PCR-RELP, 16S rDNA 基因序列分析以及 16S-23S rDNA IGS PCR-RELP 技术系统地考察了我国亚热带不同地区快生型大豆根瘤菌的遗传多样性。

1 材料和方法

1.1 菌株的分离

从采自我国亚热带 4 个不同地区(江苏盐城、浙江温州、湖北仙桃和重庆)的土样中,使用常规方法^[5]共分离出 31 株快生型根瘤菌。将分离出的菌株在 YMA 培养基上进行划线纯化,所有的分离菌株和参比菌株都在 28℃ YMA 培养基上培养。供试菌株的回接试验在原宿主植物上进行,结果所有的分离菌株均可在大豆上结瘤。本研究中供试菌株和参比菌株见表 1。总 DNA 的提取按照 Pitcher 等^[6]描述的方法进行。

1.2 16S rDNA、16S-23S IGS PCR-RELP 分析

16S rDNA 基因扩增所用引物: fD1 (5'- CCCGG-GATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC - 3'), rD1 (5'- CCGAATTTCGTCGACAACAGAGTTT-GATCCTGGCTCAG - 3'), 分别对应于 *E. coli* 16S rDNA 基因序列的第 8-27 和第 1524-1540 碱基位置^[7]。IGS 扩增所用引物 pHr (5'- TGCGGCTG-GATCACTCCTT - 3') 和 p23SR01 (5'- GGCT-

GCTTCTAAGCCAAC - 3'), 分别对应于 *E. coli* 16S rDNA 基因序列的第 1518-1541 碱基位置和 23S rDNA 基因序列的第 1069-1052 碱基位置^[8]。扩增产物分别用 *Hae* III, *Hha* I, *Hinf* I 和 *Msp* I 等限制性内切酶在 37℃ 下酶切,酶切产物经电泳、染色后,采用 Kodak 凝胶成像系统记录 RELP 指纹图谱。

1.3 16S rDNA 和 IGS 基因测序、聚类及进化分析

根据 16S rDNA 基因 RELP 聚类分析结果,选取代表菌株 YcS2, 根据 IGS RELP 聚类结果选取代表菌株 XtS15、CqS1、ZzS1、YcS14、XtS7、XtS11、YcS2、YcS3、YcS11 和 ZzS10, 将其 PCR 产物纯化, 连接在 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5α, 并测定其全序列。

将测序得到的序列去除载体序列后,并在其中找到扩增所用的上下游引物序列,然后在 GenBank 中进行比对(BLAST),如果序列比对结果与其他根瘤菌的基因同源,证明测序结果正确,将得到的序列利用 BioEdit 软件对供试菌株和参比菌株先进行基因序列的对位排列,再利用 Mega 软件采用 Kimura-2 参数^[9],进行邻接法(neighbor-joining)分析,构建系统发育树。

1.4 聚类分析

凝胶扫描成像系统得到的凝胶图像经过均一化处理后,按有条带为“1”,无条带为“0”,将条带转化为“0”和“1”数字符,再通过 NTSYS Applied Biostatistics 软件进行相似性分析,并利用平均连锁法(UPGMA)进行聚类分析后将结果转化为树状图谱。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 基因 PCR-RELP 聚类分析

以 fD1 和 rD1 为引物,对供试 31 株大豆根瘤菌和参比菌株的 16S rDNA 基因进行扩增,扩增产物大小约为 1.5 kb。利用 *Hae* III、*Hha* I、*Hinf* I 和 *Msp* I 4 种限制性内切酶分别对扩增的 1.5 kb 片段进行了酶切分析,所有的供试菌株都与 *Sinorhizobium fredii* USDA205 聚在了一起,只有 1 种基因型(表 1)。利用 UPGMA 法进行聚类分析构建树状图谱(图 1)。

2.2 16S rDNA 基因序列分析

根据 16S rDNA 基因 PCR-RELP 聚类结果,测定了代表菌株 YcS2 的 16S rDNA 的全长 DNA 序列,其 GenBank 序列登录号为: EU637926。利用 BioEdit 软件对 YcS2 和参比菌株的 16S rDNA 基因序列进行 Neighbor-joining 分析, YcS2 和 *Sinorhizobium fredii*

表 1 供试菌株及聚类结果

菌株	宿主	来源地	16S rDNA 基因型	IGS RELP 类型	菌株	宿主	来源地	16S rDNA 基因型	IGS RELP 类型
YcS2	大豆	江苏盐城	I	2	ZzS12	大豆	河南郑州	I	3
YcS3	大豆	江苏盐城	I	2	ZzS13	大豆	河南郑州	I	3
YcS4	大豆	江苏盐城	I	3	ZzS14	大豆	河南郑州	I	3
YcS8	大豆	江苏盐城	I	3	CqS1	大豆	重庆	I	10
YcS11	大豆	江苏盐城	I	4	CqS3	大豆	重庆	I	10
YcS14	大豆	江苏盐城	I	5	CqS6	大豆	重庆	I	3
YcS16	大豆	江苏盐城	I	3	CqS7	大豆	重庆	I	4
XtS2	大豆	湖北仙桃	I	3	CqS11	大豆	重庆	I	3
XtS4	大豆	湖北仙桃	I	3	CqS12	大豆	重庆	I	3
XtS5	大豆	湖北仙桃	I	3	CqS13	大豆	重庆	I	3
XtS7	大豆	湖北仙桃	I	6	CqS14	大豆	重庆	I	3
XtS9	大豆	湖北仙桃	I	3	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370T	菜豆	美国	II	11
XtS11	大豆	湖北仙桃	I	7	<i>Sinorhizobium medicae</i> USDA1037T	蒺藜苜蓿	美国	III	12
XtS14	大豆	湖北仙桃	I	3	<i>Rhizobium tropici</i> CFN299	紫花苜蓿	美国	IV	13
XtS15	大豆	湖北仙桃	I	8	<i>Rhizobium galegae</i> HAMB1540T	东方山羊豆	芬兰	V	14
ZzS1	大豆	河南郑州	I	3	<i>Mesorhizobium huakuii</i> USDA4779T	紫云英	中国	VI	15
ZzS5	大豆	河南郑州	I	3	<i>Rhizobium hainanense</i> CCBAU57015T	波叶山蚂蝗	中国	VII	16
ZzS9	大豆	河南郑州	I	3	<i>Mesorhizobium huakuii</i> CCBAU2609T	阿拉伯胶树	中国	VI	15
ZzS10	大豆	河南郑州	I	9	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i> USDA3392T	鹰嘴豆	西班牙	VIII	17
ZzS11	大豆	河南郑州	I	3	<i>Sinorhizobium fredii</i> USDA205	大豆	中国	I	19

USDA205 聚成了一类(图 2), 它们的相似性大于 99.5%。

2.3 16S-23S rDNA 基因 PCR-RFLP 分析

以 pHr、p23SR01 为引物对供试、参比菌株的 16S-23S rDNA 进行了 PCR 扩增, 所有供试菌株、参比菌株的 IGS 均为 2.1~2.3 kb, 分别用限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切, 供试菌株产生 10 种谱带(表 1)。按 UPGMA 法进行聚类。从图 3 可以看出, 在 87% 的相似性上, 供试菌株分为 4 个类群。类群 I 包含 23 个来自 4 个地区的菌株, 这些菌株属于 5 个谱带类型; 类群 II 包括 ZzS10 和 YcS2, 它们属于 2 个谱带类型; 类群 III 由来自江苏盐城、重庆、湖北仙桃的 YcS11、CqS1、CqS3、CqS7、XtS7 菌株组成; 类群 IV 包含 2 个分离自仙桃的菌株, XtS11 和 XtS5。所有供试菌株都在 76% 的相似性上和 *Sinorhizobium fredii* USDA205 聚在一起, 而和其他参

比菌株的关系较远。

2.4 16S-23S rDNA 基因序列分析

根据 IGS 的 PCR-RFLP 分析, 选取 10 个代表菌株 XtS15、CqS1、XtS11、ZzS10、YcS11、YcS2、XtS7、YcS3、YcS14、ZzS1 进行序列测定。其 GenBank 序列登录号为: EU660041-EU660050。利用 BioEdit 软件对这 10 个菌株和参比菌株的 IGS rDNA 基因序列进行 neighbor-joining 分析。由图 4 可以看出, 供试菌株聚成了 2 类, 群 I 包含 XtS11、XtS15、ZzS10、YcS11、YcS2、CqS1、XtS7 等 7 个菌株, 该群和 *Sinorhizobium fredii* USDA205 聚在一起。群 II 包括 YcS3、YcS14、ZzS1, 它们分别来自江苏盐城、河南郑州, 与新疆中华根瘤菌的亲缘关系较近。

3 讨论

生物固氮在农业中的重要作用很早就得到了重

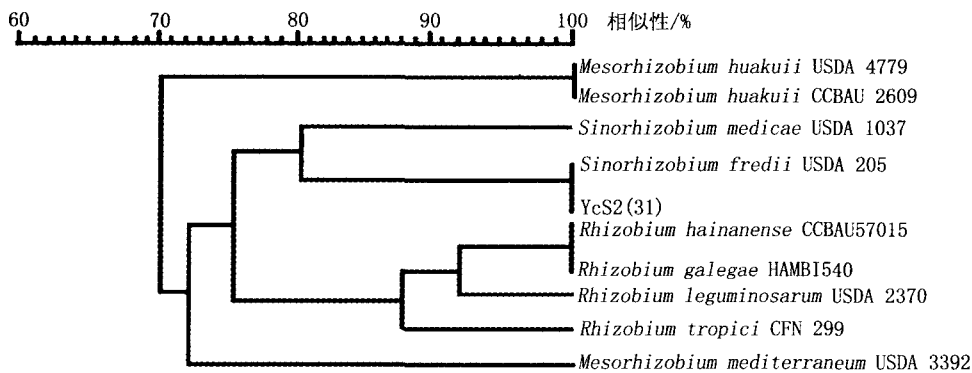


图 1 供试大豆根瘤菌菌株 16S rDNA 基因限制性内切酶酶切图谱分析

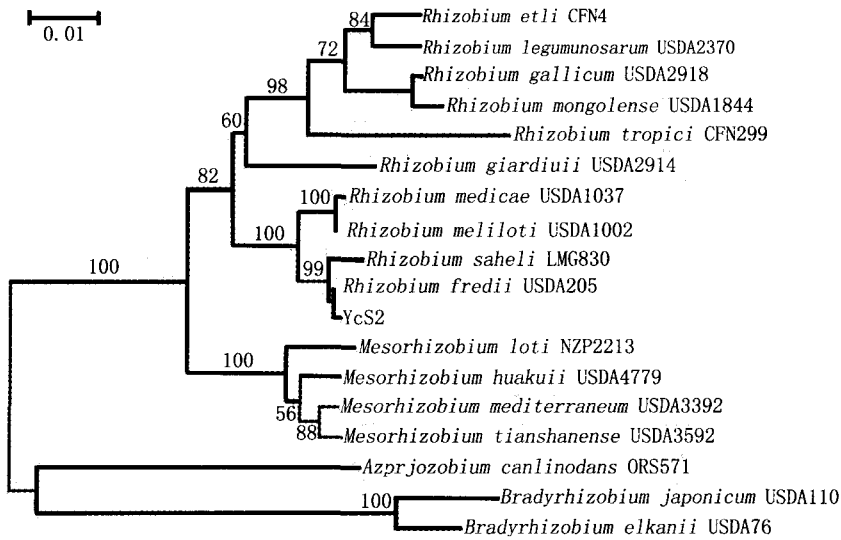


图 2 供试大豆根瘤菌菌株 16S rDNA 基因序列聚类分析

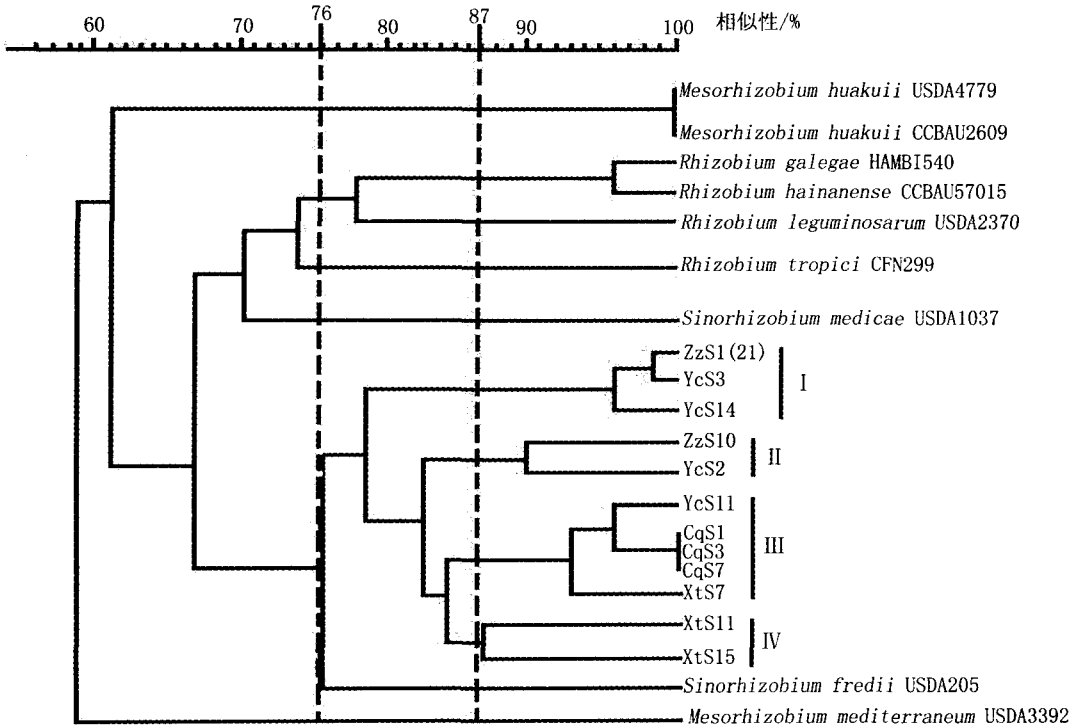


图 3 供试大豆根瘤菌菌株 16S—23S rDNA IGS 限制性内切酶酶切图谱分析

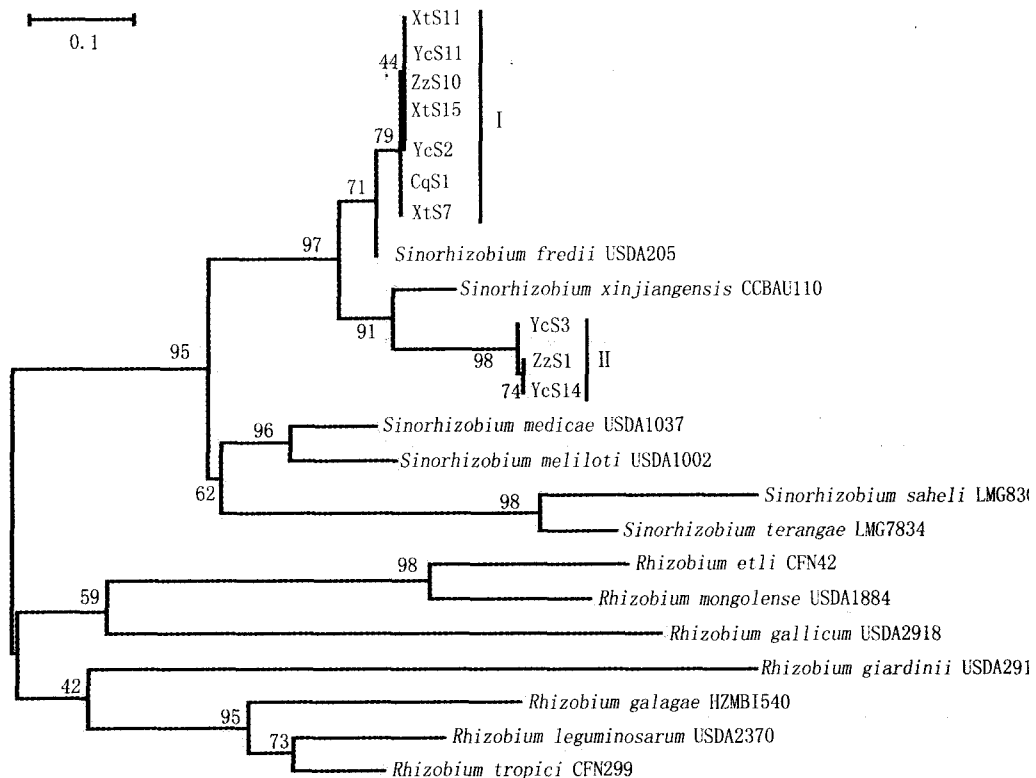


图 4 供试大豆根瘤菌菌株 16S-23S rDNA 基因序列聚类分析

视^[10],生物固氮对解决环境,食品和人口问题有很重要的作用。用于增强豆科植物结瘤和固氮的根瘤菌制剂的生产和应用差不多已经有 100 a 的历史。研究根瘤菌的多样性可以提供有价值的信息,此外,它还提供了有效的菌株来源,用于农业领域的接种试验,并且为遗传物质的进化趋势提供证据。分子生物学技术已经成为鉴定新的菌种的快速而有力的手段。与表型变异相比,作为分子时钟的 16S rDNA 基因序列更稳定、精确地记录着生物体的进化史^[11]。本研究中,采用 16S rDNA 基因 PCR-RFLP 和序列分析技术、16S-23S rDNA PCR-RFLP 技术和序列分析技术对分离自我国亚热带不同地方的大豆快生型根瘤菌的遗传多样性进行了系统研究。这些结果揭示了大豆在中国的温带和亚热带地区生长微共生系统的信息。

在细菌 DNA 中,16S rDNA 基因序列是高度保守的^[12],16S rDNA 基因 RELP 是细菌基因型分类的有效方法^[13]。由于 16S-23S rDNA IGS 的片段较 16S rDNA 基因的片段大,包含的系统发育信息较多,变异的幅度也比 16S rDNA 基因大,保存着较丰富的多样性。因而,该分析能够较好地反映出亲缘关系很近的菌株之间的差异。本研究中,IGS 可以将 31 个供试菌株分为 10 个基因型,在 87% 的相似水平上将供试菌株分为 4 个类群。

16S rDNA 序列分析结果表明,所有供试菌株都属于费氏中华根瘤菌。然而,IGS 的序列却显示 Ycs3、Ycs14 和 Zzs1 与新疆中华根瘤菌的关系更近些。这说明在一个种中,IGS 分析是区分各菌株之间差异的有效方法。不过,IGS 作为基因组的 1 个特殊片段,它虽然反映了遗传多样性,但并不能反映所有的多样性。

宿主植物和地理环境是影响根瘤菌分布与多态性的 2 个重要因素,生活在特定的生态环境中的菌株具有特定的表型和遗传学特性。例如,辽宁慢生根瘤菌^[14]和新疆中华根瘤菌^[15]。但在我们的研究中,地域特点并没有表现出来。对于利用 16S rDNA 基因的 PCR-RELP 法所有供试菌株划分为 1 个群,可能有 3 个原因:第一是从不同的土壤环境来源的根瘤菌可能在相同的遗传背景。第二是由于根瘤菌在基因水平迁移造成的。第三是快生型大豆根瘤菌的确具有很高的同源性。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,而不只是细菌与植物间的相互作用,这就要求在今后根瘤菌接种剂的选菌种时要注意区域性,必须考虑当地的地理环境,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] Fred E B, Baldwin I L, McCoy E. Root nodule bacteria of leguminous plants [M]. Madison: Univ Wisconsin Press, 1932.
- [2] Dowdle S F, Bohlool B B. Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China[J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 50: 1171-1176.
- [3] Cleyet-Marel J C. Dynamics des populations de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* dans le sol et la rhizosphere[D]. Lyon: Universite Claude Bernard, France, 1987.
- [4] Chen W X, Yan G H, Li J L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen nov[J]. Int J Syst Bacteriol, 1988, 38: 392-397.
- [5] Vincent J M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria[M]. Oxford: Blackwell, 1970.
- [6] Pitcher D G, Saunders N A, Owen R J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate [J]. Lett Appl Microbiol, 1989, 8: 151-156.
- [7] Tan Z Y, Xu X D, Wang E T, et al. Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia[J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47 (31): 874-879.
- [8] Massol-Deyá A, Odelson D A, Hickey R F, et al. Bacterial community fingerprint of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA) [M]// Kowalchuk G A, de Bruijn F J, Head I M, et al. Molecular microbial ecology manual. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.
- [9] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol, 1980, 16 (2): 111-120.
- [10] Vance C P. Legume symbiotic nitrogen fixation: Agonomic aspects[M]// Spaink H P, Kondorosi A, Hooykaas P J J. The Rhizobiaceae. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998: 509-530.
- [11] Zuckerkandl E, Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history[J]. J Theor Biol, 1965, 8: 357-366.
- [12] Young J P W, Haukka K E. Diversity and phylogeny of rhizobia[J]. New Phytol, 1996, 133: 87-94.
- [13] Jarabo-Lorenzo A, Velázquez E, Pérez-Galdona R, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA and low molecular weight RNA profiling of rhizobial isolates from shrubby legumes endemic to the Canary islands[J]. Syst Appl Microbiol, 2000, 23: 418-425.
- [14] Xu L M, Ge C, Cui Z, et al. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans[J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45: 706-711.
- [15] Peng G X, Tan Z Y, Wang E T, et al. Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii* [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52: 457-462.