

东北地区大豆根瘤菌遗传多样性与系统发育研究

王卫卫, 关大伟, 马鸣超, 李力, 曹凤明, 李俊

(中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所/农业部农业微生物资源收集与保藏重点实验室, 北京 100081)

摘要:为明确我国东北地区大豆根瘤菌的系统发育地位及主要类群的分布情况, 采用 BOX-PCR、IGS PCR-RFLP、16S rDNA PCR-RFLP 和 16S rDNA 基因序列分析法对分离自我国东北地区 14 个地点 18 个大豆品种的 312 株大豆根瘤菌及部分参比菌株进行了遗传多样性和系统发育分析。结果表明: 供试菌株均为大豆慢生根瘤菌, 以 *Bradyrhizobium japonicum* 为优势种; 在 IGS PCR-RFLP 72% 和 16S rDNA PCR-RFLP 76% 相似性水平上, 供试菌株可分别被分为 6 和 4 个群; 在 BOX-PCR 90% 相似性水平上, 可将供试菌株分为 31 个群, 表明东北地区慢生大豆根瘤菌具有丰富的遗传多样性。综合考察各种分析结果发现, 供试菌株的遗传多样性与其地理来源有一定的相关性, 而与大豆品种间相关性不明显。

关键词:大豆根瘤菌; BOX-PCR; IGS PCR-RFLP; 16S PCR-RFLP; 遗传多样性; 系统发育

中图分类号: S154 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2013)04-0433-05

Genetic Diversity and Phylogeny of Soybean Rhizobia Isolated from Northeast China

WANG Wei-wei, GUAN Da-wei, MA Ming-chao, LI Li, CAO Feng-ming, LI Jun

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture, Beijing 10081, China)

Abstract: In order to reveal the genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia in the Northeast China, BOX-PCR, 16S rDNA PCR-RFLP, IGS PCR-RFLP and 16S rDNA gene sequencing methods were used to analyze 312 soybean rhizobia isolated from 18 soybean cultivars in 14 sites in the Northeast China. The results indicated that all the tested rhizobia belonged to *Bradyrhizobium*, of which *B. japonicum* was the dominant species. Under IGS PCR-RFLP 72% and 16S rDNA PCR-RFLP 76% similarity level, tested rhizobia were divided into 6 and 4 groups, respectively. BOX-PCR fingerprint showed the tested rhizobia were divided into 31 groups under 90% similarity level, which suggested the abundance genetic diversity of *Bradyrhizobium* in this area. The results suggested that the genetic diversity of tested strains was closely related to the geographical environment, rather than their soybean cultivar hosts.

Key words: Soybean rhizobia; BOX-PCR; IGS PCR-RFLP; 16S PCR-RFLP; Genetic diversity; Phylogeny

根瘤菌与豆科植物共生固氮, 可为宿主植物提供 50% 以上的氮素营养, 是自然界和农业系统中最有价值的微生物资源之一。大豆根瘤菌在美国、巴西和阿根廷等主要大豆生产国得到了广泛应用, 接种面积已经达到了 50% ~ 100%, 并取得了显著的经济效益^[1]。而我国在大豆种植中大量施用化学氮肥, 造成生产成本增加和土壤生态环境的恶化, 接种根瘤菌的大豆种植面积只占大豆种植总面积的 1% ~ 2%^[2]。我国东北地区大豆种植面积多年来一直占全国大豆种植面积的 55% 以上, 对全国大豆产量起着决定性作用^[3]。因此, 研究东北地区大豆根瘤菌的系统发育地位及主要类群的分布情况, 可为根瘤菌的筛选提供依据, 对推动我国根瘤菌的应用具有重要的意义。

根瘤菌遗传多样性是指生物物种内的基因多样性, 包括个体间和种群间的遗传变异。在多样性研究的基础上, 测定各遗传群代表菌株保守基因片段 16S rDNA 的基因序列, 可进一步确定该菌株的系统发育地位。现利用 BOX-PCR 指纹图谱、IGS PCR-RFLP、16S rDNA PCR-RFLP 和 16S rDNA 基因序列分析方法, 综合考察了从东北地区分离的大豆根瘤菌的遗传多样性及其系统发育地位, 并对大豆根瘤菌的聚类分布与宿主和地理来源的关系进行了具体分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 PCR 试剂及各种限制性内切酶均购自大连宝生物公司。试验仪器主要有

收稿日期: 2013-03-11

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-04); 国家自然科学基金(31200388); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2013-1)。

第一作者简介: 王卫卫(1985-), 男, 在读硕士, 主要从事生物固氮方面的研究。E-mail: dbnywzw@163.com。

通讯作者: 李俊(1965-), 男, 研究员, 主要从事农业微生物学资源和生物固氮研究。E-mail: jli@caas.ac.cn。

PCR 扩增仪 (Eppendorf, 美国), 高速冷冻离心机 Eppendorf 5417R (Eppendorf, 美国)。

1.1.2 供试菌株 从东北三省 14 个地点采集 18 个大豆品种的根瘤, 在实验室条件下分离、纯化大豆根瘤菌, 并将菌株进行盆栽结瘤试验, 经确认得到大豆根瘤菌菌株 312 株。将此 312 个供试菌株及 3 个参比菌株 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110、*Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T和 *Sinorhizobium fredii* USDA 205^T) 进行 BOX-PCR 指纹图谱、IGS PCR-

RFLP 和 16S rDNA PCR-RFLP 分析。从中选出具有明显差异的 42 个代表菌株进行聚类分析。

1.1.3 引物及限制性内切酶 采用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rDNA 片段 PCR 扩增; IGS 扩增引物 FGPS1490 和 FGPS132 参照文献 [4]; BOX-PCR 采用引物 BOXAIR (表 1)。5 种限制性内切酶分别为 *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Hha* I 和 *Mbo* I, 参考文献 [5]。

表 1 所用的引物

Table 1 The primers of this study

目的片段 Target fragment	引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	大小 Size/bp
16S	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	19
IGS	FGPS1490	CCGGGTTTCCCATTCGG	18
	FGPS132	TGCGGCATCACCTCCTT	17
BOX	BOXAIR	CTAGGCAAGGCGACGCTGACC	22

1.2 总 DNA 的提取

供试菌株经 YMA 斜面活化后接种于 5 mL YMA 液体培养基中, 28℃, 200 r·min⁻¹ 摇床培养 2~3 d, 取 1.5 mL 菌液于 EP 管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min 收集菌体, 利用 Bead-beater 法提取总 DNA^[6], 使用前调至 50 μg·μL⁻¹。

1.3 BOX-PCR 指纹图谱分析

PCR 扩增按文献 [7] 进行。取 8~10 μL PCR 产物和 3 μL 上样缓冲液混合后点样, 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 EB) 70 V 电泳 6 h。电泳结果在凝胶成像仪下扫描, 用 TIFF 格式保存图像。图谱分析采用 Gelcompar II (version 5.0) 分析软件, 用平均连锁法聚类, 构建菌株的树状图。

1.4 IGS PCR 和 16S rDNA PCR

按照文献 [7] 的方法进行。

1.5 RFLP 分析

16S rDNA-PCR 产物用 *Hinf* I、*Msp* I、*Hha* I 和 *Mbo* I 4 种限制性内切酶分别进行酶切; IGS-PCR 产物用 *Hae* III、*Msp* I 和 *Mbo* I 3 种限制性内切酶分别进行酶切。酶切反应体系按照限制性内切酶自带说明书进行。取酶切产物 6 μL 加 2 μL 上样缓冲液混合后点样, 2% 琼脂糖凝胶 (含 EB) 100 V 电泳 1 h。电泳结束后, 凝胶在紫外凝胶扫描仪下扫描、照相, 以 Tiff 格式保存图像。图像信息用 Gelcompar II (Version 5.0) 软件分析, 用平均连锁法聚类, 最终绘成菌株的 UPGMA 树状图。

1.6 16S rDNA 序列测定

6 株代表菌株的 16S rDNA 产物扩增同 1.3,

PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司测序。从 GenBank 中获取参比菌株的 16S rDNA 序列, 序列的比对和系统发育树的构建通过 MEGA5.1 软件完成。序列比对采用 Clustal W, 系统发育树的构建采用 Neighbor-Joining 和 Jukes-Cantor 模型, 自展分析采用 1 000 次重复。

2 结果与分析

2.1 BOX-PCR 结果的聚类分析

各菌株的 BOX-PCR 电泳图谱条带数量为 12~18 个; 其大小为 0.2~3.0 kb, 不同地理来源的菌株间的差异明显。从 312 株大豆根瘤菌中选取 42 株代表菌株进行聚类分析, 从图 1 可以看出, 供试菌株与费氏中华根瘤菌 (*S. fredii* USDA 205^T) 和埃尔坎慢生根瘤菌 (*B. elkanii* USDA 76^T) 分别在 30% 和 40% 的相似性水平上分开, 而与日本慢生根瘤菌 (*B. japonicum* USDA 110) 聚成一大类群; 在 51% 相似性水平上, 供试菌株可分成 4 个类群。其中, 第 I 类群所占比例最大, 在 14 个根瘤采集地点中有 11 个地点分离到该群菌株; 第 II 类群的菌株主要来自沈阳和铁岭; 第 III 类群的菌株主要分离自齐齐哈尔和大庆; 第 IV 类群的菌株主要来自九三农场和佳木斯。在 90% 相似性水平上, 供试菌株可分为 31 个群。BOX-PCR 聚类结果表明东北地区慢生大豆根瘤菌在遗传上具有很大的多样性, 且菌株的亲缘关系与其分离地存在较为密切的相关性。

2.2 IGS PCR-RFLP 的聚类分析

312 个供试菌株的 IGS PCR-RFLP 电泳凝胶成

像图谱中 283 株为单条带,大小在 1.0 kb 左右;另 29 株为双条带,大小分别为 1.0 kb 和 0.6 kb 左右。对 42 株代表菌株进行聚类分析,结果(表 2)表明:所有供试菌株均与日本慢生根瘤菌(*B. japonicum* USDA 110)聚在一起,而与费氏中华根瘤菌(*S. fredii* USDA 205^T)和埃尔坎慢生根瘤菌(*B. elkanii* USDA 76^T)分开。在 59% 相似性水平上,供试菌株可分为 4 个类群,分别命名为 A、B、C 和 D,在 72% 相似性水平上,A 群又可分为 A1 和 A2 两个亚群,B 群又可分为 B1 和 B2 两个亚群。A 群所占比例最高,包括了根瘤采集区域各个地点的菌株,相当于 BOX-PCR 聚类结果中的 I 和 II 群;B 群和 C 群相当于 BOX-PCR 聚类结果中的 III 群;D 群与 BOX-PCR 聚

类结果中的 IV 群相当。

2.3 16S rDNA PCR-RFLP 的聚类分析

312 个供试菌株及 3 个参比菌株经 16S rDNA PCR 扩增后均产生大小约 1.5 kb 的单条带。用 4 种限制性内切酶对 PCR 产物分别进行酶切,对 42 株代表菌株的聚类分析结果(表 2)表明:供试菌株的 16S rDNA PCR-RFLP 多样性较低,在 76% 水平上,所有菌株可分为 4 个类群,分别命名为 i、ii、iii 和 iv。与 BOX-PCR 和 IGS PCR-RFLP 分析结果一样,供试菌株与日本慢生根瘤菌(*B. japonicum* USDA 110)聚在一起,而与埃尔坎慢生根瘤菌(*B. elkanii* USDA 76^T)和费氏中华根瘤菌(*S. fredii* USDA 205^T)分开。

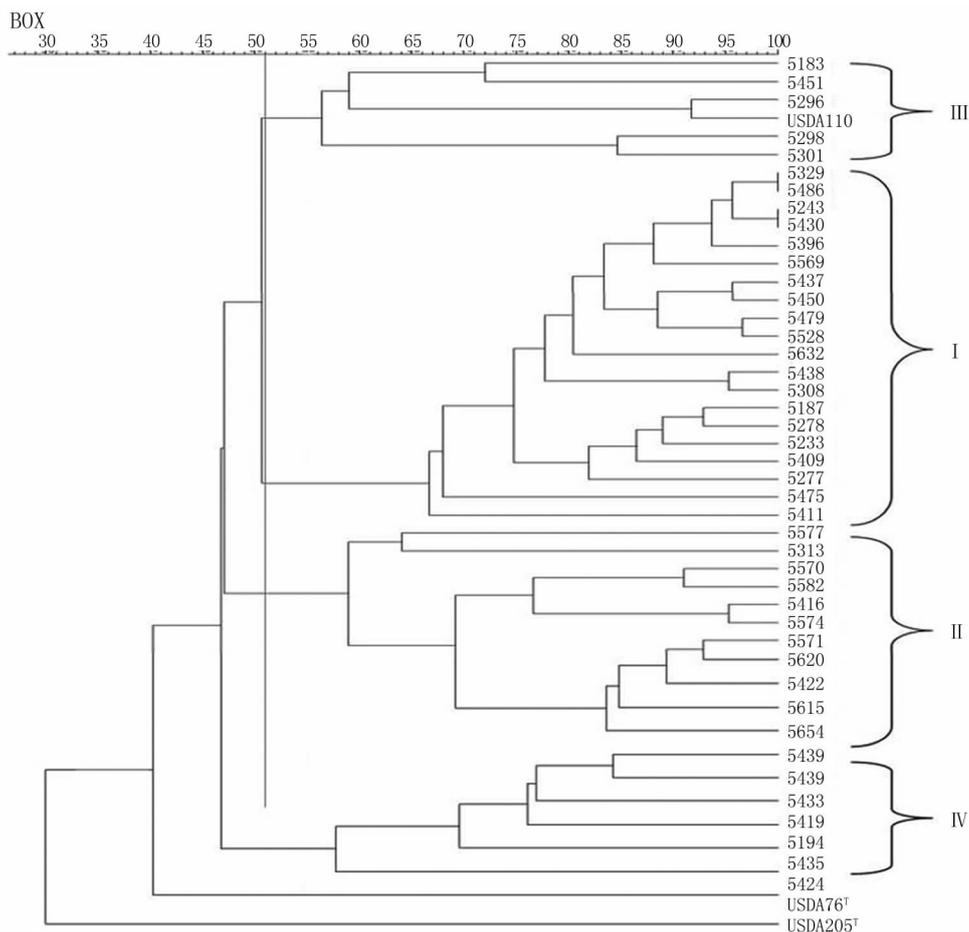


图 1 BOX-PCR 指纹图谱聚类分析树状图

Fig. 1 Analysis of BOX-PCR fingerprinting

表 2 供试大豆根瘤菌

Table 2 Tested soybean rhizobial strains

菌株 Strains	分离地 Origins	宿主 Host	IGS Types	16S Types
5475, 5479	吉林长春 Changchun, Jilin	长农 24	A1	ii
5486, 5528	吉林长春 Changchun, Jilin	长农 24	A1	i
5243	黑龙江哈尔滨 Harbin, Heilongjiang	垦农 63	A1	i
5233	黑龙江佳木斯 Hejiang, Heilongjiang	合丰 42	A1	i
5411	黑龙江佳木斯 Jiamusi, Heilongjiang	合丰 55	A1	ii

续表 2

菌株 Strains	分离地 Origins	宿主 Host	IGS Types	16S Types
5430	黑龙江九三农场 Jiusan, Heilongjiang	黑豆 38	A1	ii
5437, 5438	黑龙江嫩江 Nenjiang, Heilongjiang	垦鉴 28	A1	i
5450	黑龙江齐齐哈尔 Qiqihaer, Heilongjiang	嫩丰 16	A1	i
5569	辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning	辽豆 15	A1	i
5574	辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning	辽豆 15	A1	iii
5277, 5278	黑龙江绥化 Suihua, Heilongjiang	绥农 29	A1	i
5620, 5632	辽宁铁岭 Tieling, Liaoning	铁丰 31	A1	i
5313	黑龙江大庆 Daqing, Heilongjiang	<i>Clycine max</i>	A2	i
5187	黑龙江哈尔滨 Harbin, Heilongjiang	垦丰 16	A2	i
5329	黑龙江黑河 Heihe, Heilongjiang	黑豆 53	A2	i
5396	黑龙江黑河 Heihe, Heilongjiang	<i>Clycine max</i>	A2	ii
5416	黑龙江佳木斯 Jiamusi, Heilongjiang	合丰 55	A2	iii
5422	黑龙江佳木斯 Jiamusi, Heilongjiang	合丰 55	A2	iv
5570, 5571, 5582	辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning	辽豆 15	A2	i
5577	辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning	辽豆 15	A2	iv
5409	黑龙江绥化 Suihua, Heilongjiang	合丰 55	A2	i
5615, 5654	辽宁铁岭 Tieling, Liaoning	铁丰 31	A2	i
5308	黑龙江大庆 Daqing, Heilongjiang	抗线 4 号	B1	i
5183	黑龙江佳木斯 Jiamusi, Heilongjiang	合农 60	B1	i
5298	黑龙江安达 Anda, Heilongjiang	抗线 9 号	B2	i
5451	黑龙江齐齐哈尔 Qiqihaer, Heilongjiang	嫩丰 16	B2	i
5296, 5301	黑龙江安达 Anda, Heilongjiang	抗线 9 号	C	i
5194	黑龙江 853 农场 853, Heilongjiang	合丰 50	D	i
5419	黑龙江佳木斯 Jiamusi, Heilongjiang	合丰 55	D	i
5424	黑龙江佳木斯 Jiamusi, Heilongjiang	合丰 55	D	iii
5433	黑龙江九三农场 Jiusan, Heilongjiang	北豆 14	D	i
5435	黑龙江九三农场 Jiusan, Heilongjiang	黑豆 38	D	i
5439	黑龙江嫩江 Nenjiang, Heilongjiang	垦鉴 28	D	i
<i>B. japonicum</i> USDA 110	USA	<i>Clycine max</i>	C	i
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	USA	<i>Clycine max</i>		
<i>S. fredii</i> USDA 205 ^T	USA	<i>Clycine max</i>		

2.4 16S rDNA 基因序列分析

根据 IGS PCR-RFLP 的聚类分析结果,测定了 IGS 群 A1、A2、B1、B2、C 和 D 的代表菌株 5475、5329、5308、5451、5301 和 5194 的 16S rDNA 基因序列,利用 MEGA5.1 对代表菌株和参比菌株的 16S rDNA 基因序列进行 Neighbor-Joining 分析,得到系统发育树状图(图 2)。从图 2 中可知,所有供试菌株在系统发育上都与模式菌株 *S. fredii* USDA205^T (AY260149) 和 *B. elkanii* USDA 76^T (U35000) 分开,序列差异分别大于 11.4% 和 2.6%; A2 群的代表菌株 5329 和 B1 群的代表菌株 5308 与参比菌株

B. japonicum CCBAU 83623 (EU145982) 在系统发育上以相似性 100% 聚在一起, C 群的代表菌株 5301 和 B2 群的代表菌株 5451 与参比菌株 *B. japonicum* 110 (NC 004463) 在系统发育上以相似性 100% 聚在一起, A1 群的代表菌株 5475 与模式菌株 *B. japonicum* USDA6^T (AB231927) 在系统发育上聚在一起, 序列差异性小于 0.1%, 表明 IGS 群 A、B 和 C 与 *B. japonicum* 亲缘关系密切; D 群的代表菌株 5194 与模式菌株 *B. liaoningense* USDA 3622^T (AF208513) 聚在一起, 序列差异小于 0.3%, 表明 IGS 群 D 与 *B. liaoningense* 亲缘关系很近。

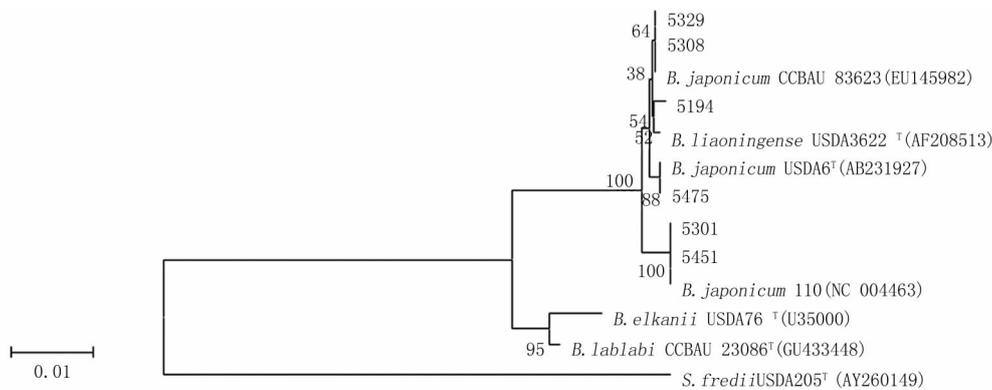


图2 大豆根瘤菌代表菌株与参比菌株 16S rDNA 序列同源性 Neighbor-Joining 聚类图
Fig.2 Phylogenetic relationship between the representatives of isolated soybean rhizobia and the reference strains based on aligned sequences of 16S rDNA

3 结论与讨论

本研究通过 BOX-PCR 指纹图谱技术、16S rDNA PCR-RFLP、IGS PCR-RFLP 和 16S rDNA 基因序列分析法,对分离自东北地区的 312 株大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育关系进行了分析,结果表明,供试菌株都为大豆慢生根瘤菌,其中 *B. japonicum* 为优势种,部分菌株与 *B. liaoningensis* 亲缘关系密切。Wang 曾在东北地区分离到 *B. elkanii*^[8],但本研究并未发现该种,这一方面可能是由于 *B. elkanii* 在东北地区存在很少^[9],很难分离获得;另一方面可能是由于人类的农业活动对生态和种植环境造成了影响,进而改变了土壤微生物的多样性及其地理分布^[10]。

杨江科等认为影响根瘤菌遗传多样性的主要因素有宿主植物和地理环境两个方面^[11]。综合考察本研究各种结果发现,供试菌株的聚类分布与宿主品种的相关性不大,如:供试大豆根瘤菌株 5433 和 5435 分离自黑龙江九三农场的不同大豆品种北豆 14 和黑豆 38,但它们的 BOX-PCR 聚类在一个群中;供试大豆根瘤菌株 5450 和 5451 分离自齐齐哈尔的同一大豆品种嫩丰 16,但它们的 BOX-PCR 聚类在不同的群中。进一步对 BOX-PCR 聚类结果中 II、III 和 IV 群进行观察,发现分离地点相近的菌株更倾向于聚在一个群中,这说明供试菌株的聚类分布与地理来源存在较为密切的关系。

本研究中 BOX-PCR 聚类结果中第 I 类群的地理分布最广,而第 II、III 和 IV 类群的菌株都各自集中分布于特定的区域,这说明第 I 类群的菌株具有较高的环境适应性,而后 3 个类群的菌株环境适应性较差。此结果提示从第 I 类群中更易筛选到适应性强的高效菌株。

致谢:中国农业科学院农业资源与农业区划研究所张晓霞副研究员提供了 Gelcompar II (Version 5.0) 分析软件,在此表示感谢。

参考文献

- [1] 李俊,沈德龙,林先贵. 农业微生物研究与产业化进展[C]. 北京:科学出版社,2011:289. (Li J, Sheng D L, Lin X G. Agricultural microbial research and industrialization progress [C]. Beijing: Science Press, 2011: 289.)
- [2] 葛城. 微生物肥料生产及其产业化[C]. 北京:化学工业出版社,2007. (Ge C. Microbial fertilizer production and industrialization [C]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.)
- [3] 杨京. 我国 2010 年大豆和大豆油市场分析及其 2011 年展望[J]. 粮食与油脂, 2011(3): 35-38. (Yang J. Chinese soybeans and soybean oil market analysis in 2010 and prospect in 2011 [J]. Grain and Oil, 2011(3): 35-38.)
- [4] Terefevok Z, Nick G, Suomalainen S, et al. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48: 349-356.
- [5] 张红侠,冯瑞华,李俊,等. 黄土高原地区大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1466-1473. (Zhang H X, Feng R H, Li J, et al. Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the regions of Loess Plateau in China [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(11): 1466-1473.)
- [6] Petric I, Philippot L, Abbate C, et al. Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 'Soil Quality-Method to directly extract DNA from soil samples' [J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(3): 454-460.
- [7] Yue L C, Jing Y W, En T W, et al. *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov. isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 61(10): 2496-2502.
- [8] Wang H, Man C X, Wang E T, et al. Diversity of rhizobia and interactions among the host legumes and rhizobial genotypes in an agricultural-forestry ecosystem [J]. Plant and Soil, 2009, 314: 169-182.
- [9] Man C X, Wang H, Chen W X, et al. Diverse rhizobia associated with soybean grown in the subtropical and tropical regions of China [J]. Plant Soil, 2008, 310: 77-87.
- [10] 陈文新,汪恩涛. 中国根瘤菌[M]. 北京:科学出版社,2011: 44, 349. (Chen W X, Wang E T. Chinese rhizobia [M]. Beijing: Science Press, 2011: 44, 349.)
- [11] 杨江科,谢福莉,周俊初. 江汉平原及其周边地区花生根瘤菌的遗传多样性[J]. 生态学报, 2003, 23(3): 504-511. (Yang J K, Xie F L, Zhou J C. Genetic diversity of peanut rhizobia isolated from Jiangnan Plain and the adjacent area [J]. Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(3): 504-511.)