

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (9) :1105 – 1116; 4 September 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140574

如东田菁根瘤菌遗传多样性及高效促生菌株筛选

李项岳^{1,2}, 李岩¹, 姜南^{1,2}, 吴海龙^{1,2}, 宋万平³, 徐化凌⁴, 解志红^{1*}

¹中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003

²中国科学院大学, 北京 100049

³如东县海堤林业管理站, 江苏 如东 226409

⁴山东省农业科学院盐生植物与生态农业研究所, 山东 东营 257000

摘要:【目的】研究江苏如东沿海滩涂田菁根瘤菌的遗传多样性和系统发育, 筛选高效促生田菁根瘤菌。【方法】采用 16S rRNA 基因、持家基因 (*recA*、*atpD*、*gln II*)、共生基因 (*nodA*、*nifH*) 的系统发育分析, 并进行温室盆栽接种试验筛选高效菌株。【结果】分离到的 32 株田菁根瘤菌分布于 *Ensifer*、*Neorhizobium*、*Rhizobium*, 并与 *E. meliloti*、*N. huautlense*、*E. sesbaniae*、*R. pusense* 亲缘关系最近。共生基因 *nodA*、*nifH* 的系统进化分析结果基本一致, 均与 *E. saheli* 最为相近。7 株代表菌株均能耐受 5% 的 NaCl (W/V) 浓度, 其中 YIC5082 耐盐性最强, 能够耐受 6% 的 NaCl。温室盆栽试验表明 7 株代表菌株均能与田菁有效结瘤固氮, 其中 6 株菌显著提高了植株的株高和鲜重。【结论】江苏如东沿海滩涂田菁根瘤菌具有较丰富的遗传多样性, 其中 *N. huautlense*、*E. meliloti* 为优势种。该地区的田菁根瘤菌多数具有较好的共生有效性及耐盐性, YIC5077 促生效果最为突出, 并表现出较强的固氮及结瘤能力, 具有良好的应用前景。

关键词: 如东, 田菁根瘤菌, 16S rRNA 基因, 持家基因, 遗传多样性, 高效菌株筛选

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 09-1105-12

江苏省如东县位于江苏省东部和南通市域东北部, 东濒黄海, 南濒长江口, 海岸线长 94 km。由长江冲积物沉积而成的滩涂是如东县最为宝贵的土地资源之一, 据有关文献报道, 如东县沿海高程负 2 m 以上滩涂面积约有 (6.93×10^4) hm², 每年可增加滩涂面积 330 hm², 土地利用潜力较大^[1]。近年来, 当地积极探索快速改良土壤新途径, 采取种植耐盐碱的先锋作物如田菁、美国黑牧草等, 进行深耕埋青改良, 降低土壤盐分, 提高土壤有机质含量, 加速了盐碱地改良进程, 取得了良好的改良效果, 并获得 2009 年 11 月全国

滩涂湿地保护和利用学术年会专家们的一致认可^[2]。

田菁 (*Sesbania cannabina*) 为豆科田菁属植物, 一年生, 多为草本、灌木, 又名碱菁、涝豆。田菁抗旱、抗病虫能力较强, 并具有很强的耐盐、耐涝、耐瘠能力^[3]; 其根系发达, 根瘤多且大, 固氮能力强, 鲜草产量高, 养分含量丰富。这些特点使得田菁成为一种优良的夏季绿肥并可作为滩涂盐碱地土壤修复和改造的先锋植物。田菁还可配合其他饲料喂牛、羊或打浆喂猪, 是禽、畜、鱼的良好饲料^[4], 其茎秆纤维可用来造纸, 其种子生产的田菁胶可用于采矿

基金项目: 中科院重点部署项目 (KZZD-EW-14); 烟台市科技发展计划 (2013JH021); 中科院百人计划项目; 国家自然科学基金 (31370108)

* 通信作者。Tel: +86-535-2109183; Fax: +86-535-2109000; E-mail: zhxie@yic.ac.cn

作者简介: 李项岳 (1988 -) 男, 山东滨州人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物方面的研究。E-mail: xiangyue9154@163.com

收稿日期: 2014-12-02; **修回日期:** 2015-01-25

爆破、油田采油、选矿冶金、纺织和日用化工,是工业胶用作物^[3]。因此,田菁是一种具有较高生态学意义和经济价值的植物。

根瘤菌-豆科植物形成的根瘤或茎瘤共生固氮系统,是最高效的生物固氮体系,在农业的可持续发展和生态环境保护中有着重要的作用^[5]。据报道,豆科植物根瘤菌所固定的氮每年约为 1.5×10^8 t,占生物固氮的 80%,是世界工业氮肥产量的 3.5 倍^[6]。国内外对于分离自田菁的根瘤菌的研究已有少量报道:Wang 等对墨西哥胡奥特拉当地田菁品种 (*Sesbania herbacea*) 根瘤菌进行研究,发现田菁根瘤菌的一个新的优势类群并命名为 *N. huautlense* (曾被命名为 *R. huautlense*)^[7-8];黄昌学等对金沙江干热河谷区田菁根瘤菌多样性与系统发育进行了系统研究,发现在金沙江干热河谷区田菁根瘤菌主要分布于 *Ensifer*、*Agrobacterium* 和 *Rhizobium* 三个属,其中代表菌株为 *N. huautlense*^[9];Lajudie 从 Sahel 地区田菁 (*S. cannabina*) 根瘤中分离鉴定了新种 *Ensifer saheli*^[10];Wang 等对云南地区田菁 (*S. cannabina*) 根瘤菌进行研究,发现并命名了新种 *Ensifer sesbaniae*^[11]。

江苏如东具有悠久的种植田菁的历史,同时又是北方田菁的引种地之一,然而对如东田菁根瘤菌资源的系统考察研究以及优良菌株的筛选却未见报道。本研究对采集到的田菁根瘤菌进行基于 16S rRNA 基因、持家基因 (*recA*, *atpD*, *gln II*) 及共生基因 *nodA*、*nifH* 的系统发育分析,从不同角度揭示如东田菁根瘤菌遗传多样性及系统发育地位,同时通过温室接种栽培试验,筛选得到高效促生菌株。这不仅对开发当地的田菁根瘤菌资源,提高田菁抗逆性促进田菁生长,助力如东沿海滩涂改造有重要的实用价值,对研究北方地区田菁根瘤菌的系统进化和分类学地位也有一定的参考意义。

1 材料和方法

1.1 菌株

本研究从江苏如东县沿海滩涂采集野生田菁的根瘤,分离纯化获得田菁根瘤菌 32 株,用灭菌的 20% 甘油将纯化培养后的菌株保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2 培养基

实验用 YMA 培养基、TY 培养基、低氮营养液,

成分和配制方法参照文献 [12-13]。

1.3 总 DNA 提取

将 YMA 培养基上纯培养的菌落收集后,用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒,按照说明书要求提取供试菌株基因组 DNA,并保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用。

1.4 持家基因 *recA* 系统发育分析及代表菌株选取

持家基因 *recA* PCR 扩增引物、反应体系及条件参照文献 [14],PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 40 min) 验证合格后送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将测序结果在 NCBI 进行 BLAST 程序在线比对,从 GenBank 中下载与所测序列相近种的模式菌株的 *recA* 基因序列,用 MEGA 5.0 软件将序列比对后,采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 构建进化树,自展值 (bootstrap) 为 1000。根据进化树和对比结果,*recA* 序列相似性 100% 的定为同一基因型,分别从每个基因型选取一个代表菌株进行后续分析^[15]。

1.5 16S rRNA 基因、持家基因 (*atpD*, *gln II*)、共生基因 *nodA*、*nifH* 系统发育分析

代表菌株的 16S rRNA 基因 PCR 扩增引物和反应体系参见文献 [16],反应条件参照文献 [17]。持家基因 (*atpD*, *gln II*) 共生基因 *nifH*、*nodA* PCR 扩增引物,反应体系及条件参照文献 [15, 18]。测序得到的 16S rRNA 基因、*nodA*、*nifH* 序列,按照 1.4 的方法分别构建进化树。此外,将各代表菌株的 3 个持家基因按 *recA*、*atpD*、*gln II* 的顺序进行拼接^[5],用相同的方法构建系统发育树,进行多位点基因序列分析 (MLSA)。

1.6 耐盐性检测

挑取代表菌株 1-2 环接种于 5 mL TY 液体培养基中,振荡培养过夜 ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 220 r/min),统一调整 $OD_{600} = 1$,以 10 μL 的接种量重新接种于灭菌的不同浓度 NaCl 的 TY 液体培养基中 (W/V: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7),每个浓度设置 3 个重复,同时以不接菌的各 NaCl 浓度 TY 培养基做对照。振荡培养 48 h ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 220 r/min) 后,用 722 分光光度计测 OD_{600} 值,并以 OD_{600} 的大小表示各株菌在不同 NaCl 浓度下的生长繁殖情况。

1.7 高效固氮根瘤菌的筛选

选择颗粒饱满、种皮完整的田菁种子,表面消毒后置于恒温箱内催芽。待主根长到 2 cm 左右,须根

未长出时转移栽培到盛满拌有低氮营养液的灭菌蛭石的双层钵中培养。将 1 mL 用 TY 培养基活化好的代表菌株菌液 ($OD_{600} = 0.8 - 1.0$) 接种于幼苗根部,用灭菌封口膜封住双层钵,仅割开为幼苗生长的缝隙。对照处理仅在幼苗根部喷入 1 mL 灭菌的 TY 培养基;每个处理做 5 个重复。将所有培育在双层钵中的幼苗按随机区组分布于温度为 26 °C,光照时间为 14 h/d 的温室内培养,培养期间及时补充灭菌水。待子叶营养耗尽脱落后一段时间用叶绿素计 SPAD-502 Plus 测田菁叶片叶绿素含量,生长 70 d 后收获。立即测量田菁地上部株高、鲜重、根瘤固氮活性、根瘤重,并用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。田菁根瘤固氮活性检测采用乙炔还原法,具体操作参照文献 [13]。差异显著性检验采用配对样品 t 检验法 ($P < 0.05$)。

2 结果和分析

2.1 *recA* 基因型分群结果

根据持家基因 *recA* 测序结果(图 1),将分离到的 32 株田菁根瘤菌初步分为 7 个 *recA* 基因型,其中最大的两个类群分别有 13 株菌,为如东田菁根瘤菌的优势类群。分别从每个类群中随机选取一株菌即:YIC5037、YIC5091、YIC5077、YIC5079、YIC5090、YIC5072、YIC5082,共 7 株菌作为代表菌株进行后续持家基因、共生基因的测序分析及耐盐性和接种栽培试验。

2.2 代表菌株的 16S rRNA 基因序列分析

对选取的代表菌株进行 16S rRNA 基因序列测序,同时与 GenBank 中序列相近的模式菌株的 16S rRNA 基因序列比对,构建系统进化树(图 2)进行系统发育分析。

如图 2 所示,所有供试菌株在系统发育上分布于 *Ensifer*、*Neorhizobium*、*Rhizobium* 三个属。*Ensifer* 包括 5 个 *recA* 基因型,16S rRNA 基因序列分析结果表明 YIC5072、YIC5090、YIC5037、YIC5077 与参照菌株 *E. numidicus* ORS 1407^T最为相近,相似性均为 99.7%;YIC5079 与参照菌株 *E. sesbaniae* CCBAU 65729^T相似性为 100%。*Neorhizobium* 包括一个 *recA* 基因型,代表菌株 YIC5091 的 16S rRNA 基因与 *N. huautlense* HAMBI 2409^T 的相似性为 99.8%。*Rhizobium* 包括一个 *recA* 基因型,代表菌株 YIC5082

的 16S rRNA 基因与 *R. pusense* NRCPB10^T 的相似性为 100%。

2.3 持家基因 *recA*、*atpD*、*gln II* 的 MLSA 系统发育分析

由于 16S rRNA 基因序列在根瘤菌研究中的保守性,不足以区分不同的种,以持家基因作为补充,尤其是对多个持家基因序列的测定和分析已广泛用于根瘤菌种群的划分、系统发育及种内遗传多样性的研究。通过 MLSA 分析对细菌染色体上不同位点的保守基因序列进行比较分析,确定根瘤菌的亲缘关系和分类地位,同时也往往能提供比 16S rRNA 基因更丰富的细节^[19]。

各代表菌株的 3 个持家基因按照 *recA* (377 bp)、*atpD* (378 bp)、*gln II* (491 bp) 的顺序拼接成一条 1244 bp 片段,并作系统发育树分析。由图 3 可以看出,在属的水平上 3 个持家基因 MLSA 结果与 16S rRNA 基因的分析结果一致;但在种的水平上,分析结果与 16S rRNA 基因却存在一些差异。在 MLSA 分析中,YIC5037、YIC5077 与 *E. meliloti* USDA 1002^T形成姊妹分支,相似性分别为 97.8%、97.5%;YIC5072 的 *recA*、*atpD*、*gln II* 基因分别与 *E. sojae* CCBAU 05684^T、*E. fredii* USDA 205^T、*E. meliloti* USDA 1002^T最为相近,而在 MLSA 中,其与 *E. sojae* CCBAU 05684^T 的相似性最高,相似性为 92.6%;YIC5090 与 YIC5072 基本相同,但其 *gln II* 基因与 *E. sojae* CCBAU 05684^T 更为相近,且在 MLSA 中,其与 *E. sojae* CCBAU 05684^T 的相似性为 93.6%,这两株菌与参考菌株的距离较远,且与 *E. sojae* CCBAU 05684^T、*E. fredii* USDA 205^T 形成姊妹分支,因而可能是 *Ensifer* 的一个潜在新种。YIC5079、YIC5091、YIC5082 的持家基因 MLSA 分析与 16S rRNA 基因系统发育分析结果一致,其分别与 *E. sesbaniae* CCBAU 65729^T、*N. huautlense* HAMBI 2409^T、*R. pusense* 最为相近,相似性分别为 99.6%、99.3% 和 96.0%。

2.4 共生基因 *nodA*、*nifH* 的系统发育分析

对代表菌株的 *nodA*、*nifH* 基因进行 PCR 扩增测序,除 YIC5079、YIC5082 的 *nodA* 基因及 YIC5082 的 *nifH* 基因未成功获得相应片段外,其余代表菌株均测得长度分别约为 620 bp、750 bp 的序列,采用邻接法构建系统发育树进行系统发育分析(图 4,图 5)并计算与参照菌株的相似性。5 个代表菌株的

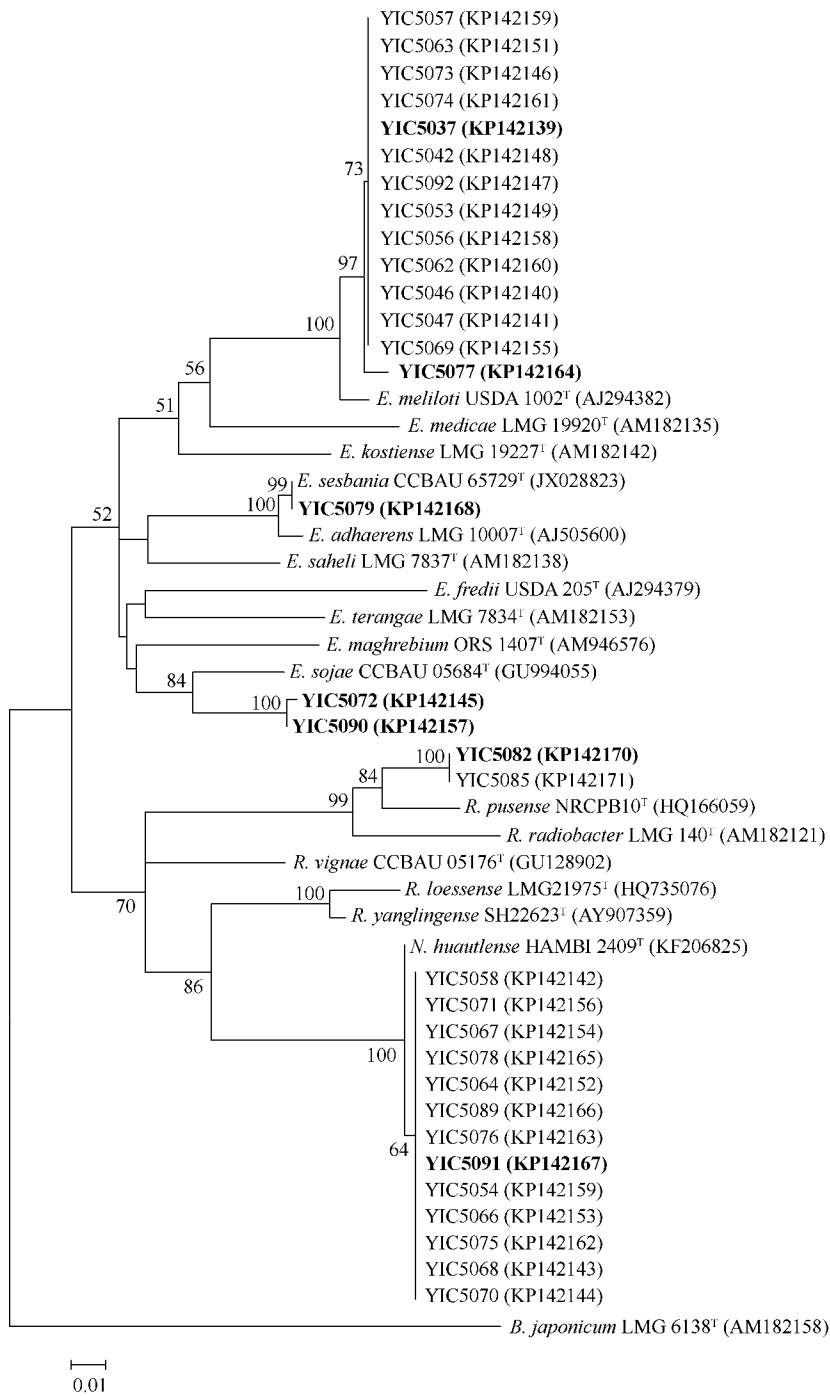


图 1. 所有菌株的 *recA* 基因系统发育树

Figure 1. Neighbour-joining phylogenetic tree based on *recA* gene sequences showing positions of all the 32 isolates isolated from *S. cannabina* and numbered with the beginning of YIC and the closest type strains of species in related genera. The accession numbers in NCBI database are indicated after the bacterial names. Isolates boldfaced are selected randomly as representatives used for other further analyses. Bootstrap analyses were made with 1000 cycles and only bootstrap values > 50% are shown at the branch points. Scale bar indicates 0.01 changes/site.

nodA 基因形成 3 个分支, 相比 16S rRNA 基因与持家基因, *nodA* 基因之间进化关系更近, 并与同宿主的 *N. huautlense* Ss121、*E. saheli* ORS609^T、*E. teranga* bv. *sesbaniae* ORS604 聚群, 与标准菌株 *E.*

saheli LMG 7837^T 相似性为 90.1% – 91.7%。*nifH* 基因的系统发育分析结果与 *nodA* 基因的基本一致, 所得 6 个代表菌株的 *nifH* 基因形成 4 个分支, 并与 *E. saheli* ORS609^T、*N. huautlense* HAMBI 2409^T 形成

姊妹分支,且均与 *E. saheli* ORS609^T最为相近,相似性为 96.7% – 97.2%。

2.5 耐盐性试验结果

由表 1 可知,7 株代表菌株均能够耐受 5% 的 NaCl(W/V) 浓度水平,但除 YIC5082 外,其余 6 株菌生长均较微弱;YIC5082 能够在 6% 的 NaCl 浓度水平下较好地生长,但不能耐受 7% 的 NaCl 浓度水平。可见,采自如东沿海滩涂的田菁根瘤菌有着较强的耐盐性。

2.6 代表菌株接种试验:田菁生长指标及根瘤菌固氮能力检测

本实验在温室内用蛭石培养初步检测了代表菌株 YIC5037、YIC5072、YIC5077、YIC5079、YIC5082、

YIC5090、YIC5091 的共生固氮效果。收获时发现对照组均没有结瘤,接种根瘤菌处理的田菁根部均有不同数量的根瘤存在。由表 2 可以看出,与对照相比,接种后的田菁在株高、地上部鲜重、叶片叶绿素含量上均有不同幅度的增长。在株高和地上部鲜重方面,除接种 YIC5037 的没有达到显著水平外,其余均达到显著水平且增幅较大:鲜重增幅在 58.8% 以上,其中接种 YIC5077、YIC5090 的植株鲜重增长 95% 以上;株高增幅在 18.8% 以上,其中 YIC5077、YIC5090 株高增长最为明显,增幅均在 46.7% 以上。植物叶片的叶绿素含量与氮含量水平存在十分紧密的正相关关系^[20],能够定量地反映出植物叶片氮含量水平及共生结瘤的有效性^[11,21]。在本研究中,接

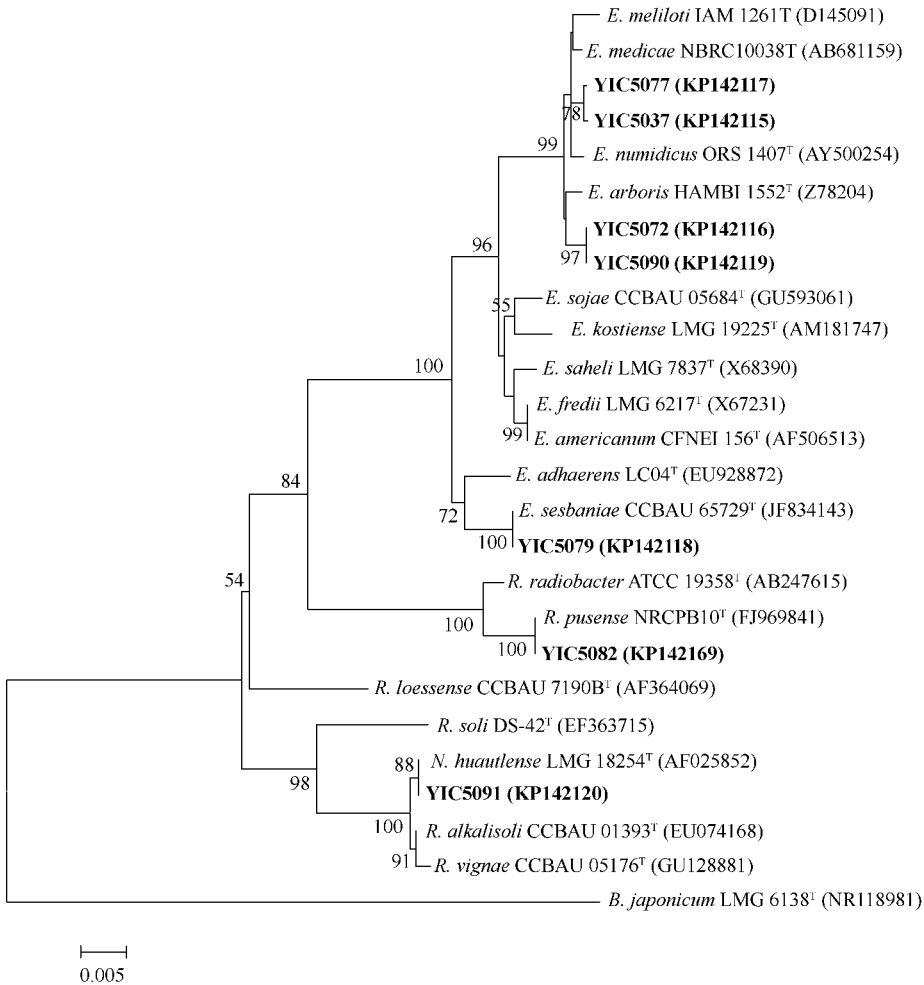


图 2. 代表菌株的 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 2. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing positions of the 6 representative isolates and the closest type strains of species in different genera. The accession numbers in NCBI database are indicated after the bacterial names. Isolates boldfaced are representatives isolated from *S. cannabina*. Bootstrap analyses were made with 1000 cycles and only bootstrap values >50% are shown at the branch points. Scale bar indicates 0.005 changes/site.

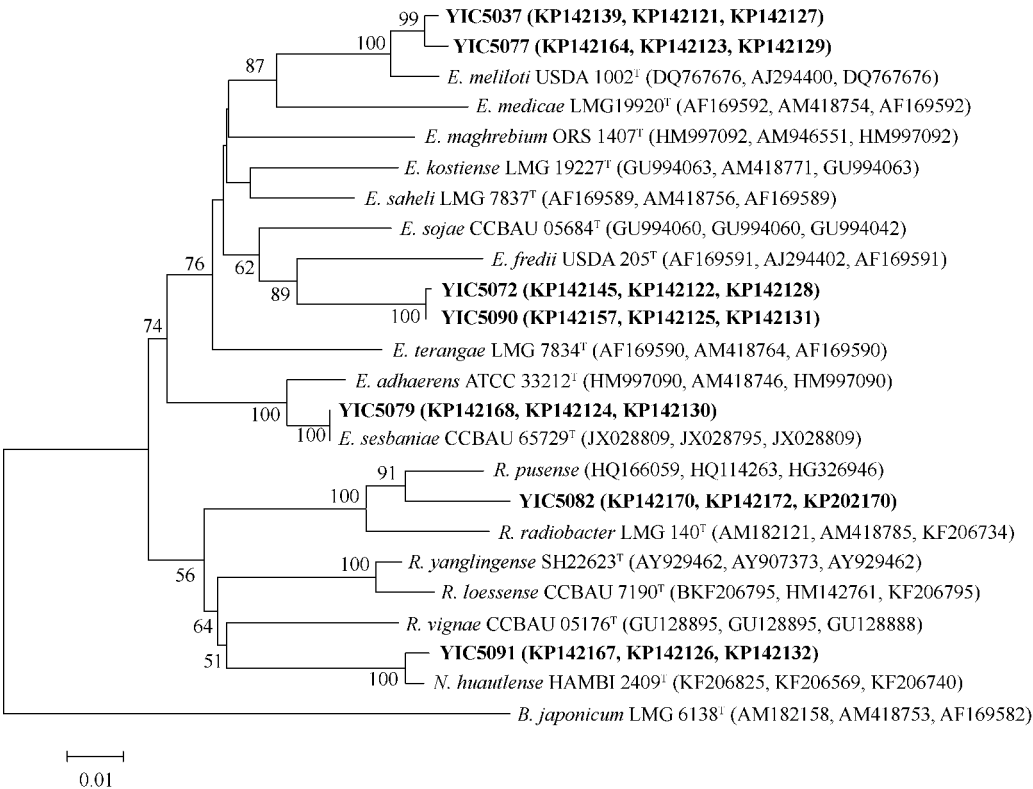


图 3. 持家基因 *recA-atpD-glnII* 拼接后 MLSA 系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of the 6 representative isolates and the reference strains based on concatenated sequences of *recA*, *atpD*, *glnII*. The accession numbers in NCBI database are indicated after the bacterial names. Isolates boldfaced are representatives isolated from *S. cannabina*. Bootstrap analyses were made with 1000 cycles and only bootstrap values >50% are shown at the branch points. Scale bar indicates 0.01 changes/site. As the *glnII* gene of the type strain of *R. pusense* hasn't been sequenced, we took the *glnII* gene sequence of *R. pusense* CIP 497-74 instead and the accession number is HG326946.

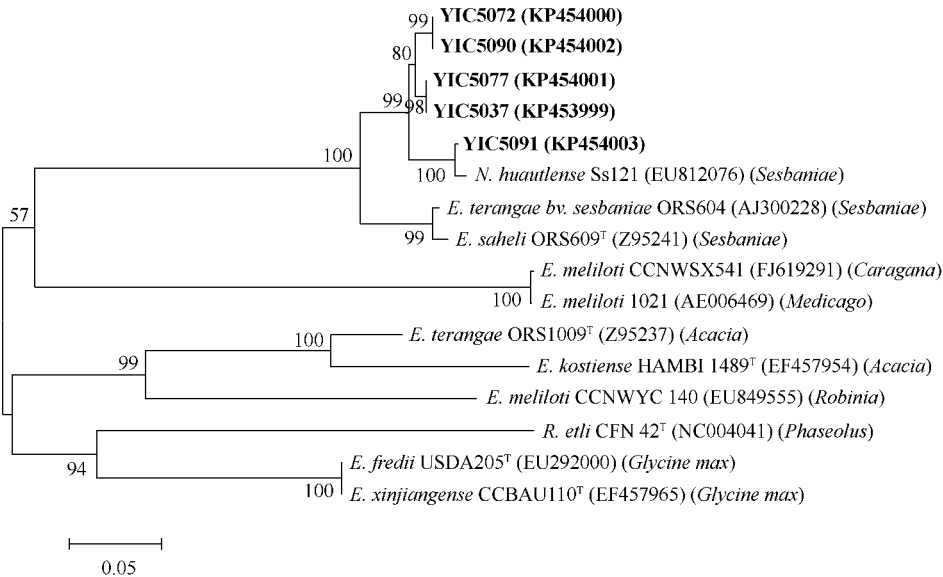


图 4. 代表菌株的 *nodA* 系统进化树

Figure 4. Phylogenetic tree of the 5 representative isolates and the reference strains based on *nodA* gene. The accession numbers in NCBI database are indicated after the bacterial names. Isolates boldfaced are representatives isolated from *S. cannabina*. Bootstrap analyses were made with 1000 cycles and only bootstrap values >50% are shown at the branch points. Scale bar indicates 0.05 changes/site.

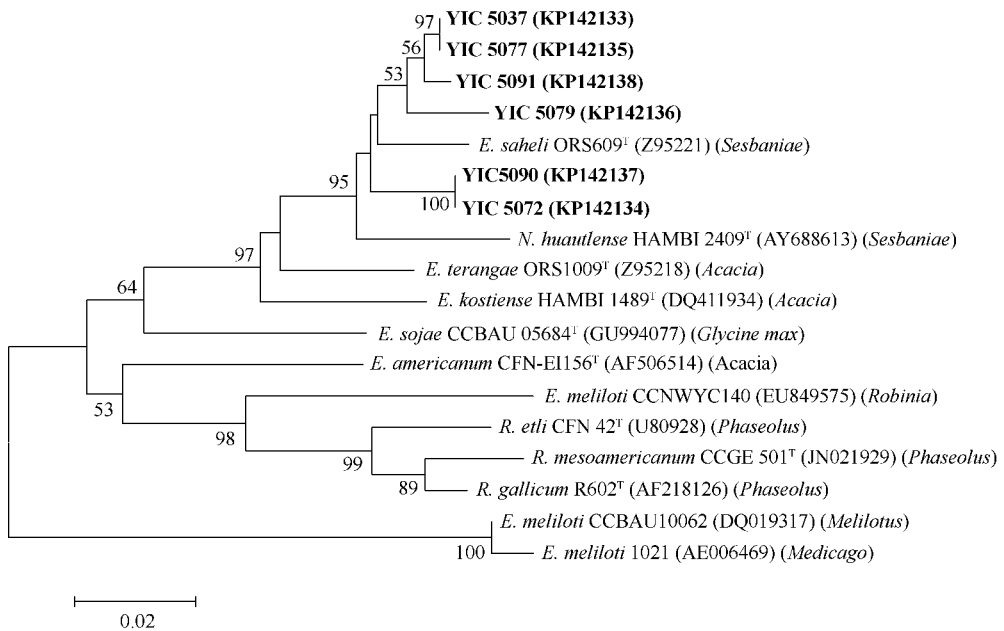


图 5. 代表菌株的 *nifH* 系统进化树

Figure 5. Phylogenetic tree of the 6 representative isolates and the reference strains based on *nifH* gene. The accession numbers in NCBI database are indicated after the bacterial names. Isolates boldfaced are representatives isolated from *S. cannabina*. Bootstrap analyses were made with 1000 cycles and only bootstrap values >50% are shown at the branch points. Scale bar indicates 0.01 changes/site.

表 1. 不同盐浓度下各株菌的生长状况

Table 1. Effect of various concentrations of NaCl on the growth of each isolate

Strains	NaCl (% , W/V)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
YIC5037	1.52 ± 0.12	1.50 ± 0.09	1.35 ± 0.05	1.34 ± 0.04	0.53 ± 0.07	0.04 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
YIC5072	1.79 ± 0.15	1.52 ± 0.10	1.39 ± 0.09	1.38 ± 0.07	1.32 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
YIC5077	1.58 ± 0.09	1.48 ± 0.10	1.45 ± 0.06	1.41 ± 0.04	1.04 ± 0.05	0.06 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
YIC5079	1.63 ± 0.10	1.46 ± 0.07	1.24 ± 0.08	1.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
YIC5082	1.81 ± 0.20	1.39 ± 0.08	1.36 ± 0.10	1.27 ± 0.05	1.17 ± 0.07	1.04 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.00 ± 0.00
YIC5090	1.61 ± 0.08	1.55 ± 0.10	1.33 ± 0.07	1.21 ± 0.02	0.90 ± 0.05	0.10 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
YIC5091	1.68 ± 0.11	1.39 ± 0.10	0.99 ± 0.08	0.81 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
CK	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Data was the value of *OD*₆₀₀ and presented as the means ± standard deviation. CK: control.

种根瘤菌后,田菁叶片叶绿素含量均有不同程度的增长,可见接种供试菌株均能够与植株有效共生并提高了田菁叶片的氮含量水平。其中除 YIC5077、YIC5090 外,其余 5 株菌均达到了显著水平,接种 YIC5072 的植株增幅最高,为 31.7%。

采用乙炔还原法,通过测定反应体系中生成乙烯的量来评价根瘤的固氮能力。测完后摘下根瘤称重,计算乙烯生产量/根瘤重,该结果可以从一定程度上反映所接菌株的固氮酶活性。如表 2 所示,所结根瘤量最大的前 3 株菌依次为

YIC5037、YIC5077、YIC5090;所结根瘤固氮能力最强的前 3 株菌依次为 YIC5077、YIC5079、YIC5090,菌株固氮酶活性最高的前 3 株菌依次为 YIC5091、YIC5079、YIC5072。对比可知,对田菁生长促进作用(地上部鲜重和株高)表现最突出的前 3 株与所结总根瘤固氮能力最强的前 3 株基本一致,而与结瘤量和菌株的固氮酶活的结果存在明显差异。可见,筛选高效固氮根瘤菌不应仅用单一的根瘤菌固氮酶活性或者所结根瘤的量为指标,而应综合考虑这两个因素。

表 2. 代表菌株接种试验田菁生长指标及根瘤固氮能力检测

Table 2. Effect of inoculation with each isolate on the growth of *Sesbania cannabina* and N₂-fixing ability of the nodules

Isolates	Fresh shoot weight/g	Shoot height/cm	Chlorophyll content	ARA	Nodule fresh weight/g	ARA/TNFW
YIC5037	2. 18 ± 0. 25	22. 33 ± 2. 52	41. 33 ± 0. 64 ^{c*}	5. 98	0. 68	8. 79
YIC5072	2. 74 ± 0. 36 ^{a*}	31. 00 ± 2. 00 ^{b*}	45. 43 ± 1. 72 ^{c*}	5. 34	0. 29	18. 41
YIC5077	3. 07 ± 0. 23 ^{a*}	31. 67 ± 1. 53 ^{b*}	40. 93 ± 2. 51	7. 70	0. 49	15. 71
YIC5079	2. 80 ± 0. 03 ^{a*}	25. 33 ± 1. 15 ^{b*}	44. 47 ± 1. 69 ^{c*}	6. 47	0. 33	19. 61
YIC5082	2. 72 ± 0. 30 ^{a*}	28. 00 ± 1. 73 ^{b*}	41. 13 ± 0. 93 ^{c*}	2. 40	0. 30	8. 00
YIC5090	3. 07 ± 0. 20 ^{a*}	29. 67 ± 2. 89 ^{b*}	39. 83 ± 2. 34	6. 22	0. 45	13. 82
YIC5091	2. 76 ± 0. 11 ^{a*}	30. 33 ± 2. 08 ^{b*}	45. 27 ± 1. 91 ^{c*}	5. 93	0. 24	24. 71
ck	1. 57 ± 0. 12	21. 33 ± 2. 08	34. 5 ± 1. 57	nd	nd	nd

Data presented as the means ± standard deviation. ^{a*}, ^{b*} and ^{c*} indicate a significant increase in plant fresh shoot weight, shoot height and chlorophyll content, respectively, according to *t*-test (*P* < 0. 05). TNFW: the total nodule fresh weight. ARA: Acetylene reduction assay. Values represent N₂-fixing ability expressed as nmol C₂H₄/h. ARA/TNFW: N₂-fixing ability was expressed as nmol C₂H₄/(h·g nodule). nd, not determined. ck, control.

3 讨论

本研究通过持家基因 *recA* 序列对所有分离到的田菁根瘤菌进行聚类分析,相比传统的 16S rRNA 基因 PCR-RFLP、IGS-RFLP、BOX-PCR 等聚类分析方法,能够更加简便快捷地分群并选取代表菌株,大大减少工作量。通过 16S rRNA 基因、持家基因 (*recA*、*atpD*、*gln* II) MLSA 分析、共生基因 *nodA*、*nifH* 的序列进行系统发育分析,本研究对如东田菁根瘤菌的遗传多样性和系统发育关系进行了系统的分析研究。结果表明,如东县田菁根瘤菌遗传多样性较为丰富,其分布在 *Ensifer*、*Neorhizobium*、*Rhizobium* 3 个属: *Ensifer* 占 53. 13%, 包括 *E. meliloti* (43. 75%)、*E. sesbaniae* (3. 13%) 和一个潜在新种 *Ensifer* sp. (6. 25%); *Neorhizobium* 占 40. 62%, 均为 *N. huautlense*; *Rhizobium* 占 6. 25%, 为 *R. pusense*。可见 *E. meliloti* 和 *N. huautlense* 为如东沿海滩涂田菁根瘤菌的优势种。

部分菌株持家基因多序列基因分析结果与 16S rRNA 基因分析结果存在一定的差异。存在这些差异可能的原因是: (1) 16S rRNA 基因序列高度的保守性,其在根瘤菌研究中不足以区分关系比较近的种。(2) 16S rRNA 基因在细菌种或属间存在横向转移及重组也会造成某些菌株鉴定的不确定性^[22]。因而在根瘤菌种群的划分及种内遗传多样性和系统发育研究中持家基因的分析做补充是很有必要的。Martens 等对 *Ensifer* 属内不同种的 10 个持家基因

(*atpD*、*dnaK*、*gap*、*gltA*、*glnA*、*gyrB*、*pnp*、*recA*、*rpoB* 和 *thrC*) 进行分析,结果表明其比 16S rRNA 及 23S rRNA 基因有更好的分辨率^[23]。

N. huautlense 为田菁根瘤菌的常见根瘤菌类群,在 Wang 及黄昌学等的研究中均有发现。本研究中 *N. huautlense* 同样为如东田菁根瘤菌的优势类群,体现出豆科植物对与其共生的根瘤菌的选择性。在先前的报道中 *E. meliloti* 主要与苜蓿、草木犀及胡卢巴属的植物结瘤^[24],近年来也从菜豆根瘤中分离到^[25]。在本研究中发现其也能与田菁有效结瘤,并且是如东田菁根瘤菌的优势类群。Amarger 等研究发现豆科植物的引入是根瘤菌新种形成的进化压力,因为其会引起从该豆科植物发源中心的优势根瘤菌的共生基因的转移,从而形成新的根瘤菌类群^[26]。通过这种方式,一些根瘤菌获得了在不同的土壤类型或生态环境中与豆科植物结瘤的能力^[15]。在本研究中共生基因 *nodA*、*nifH* 的系统发育分析也印证了这一点。

共生基因 *nodA*、*nifH* 通常位于根瘤菌一个特定的可转移的区域(共生质粒或共生岛)上,它们虽然不能作为根瘤菌分类的基因标记,但可以提供根瘤菌与豆科植物共生特性方面的信息,并能在一定程度上体现根瘤菌的宿主范围^[27]。这些基因的研究对探索根瘤菌持家基因和共生基因的协同进化至关重要。本研究中各供试菌株的共生基因 *nodA*、*nifH* 的系统发育分析基本一致,但与 16S rRNA 基因及持家基因的系统发育分析结果并不完全一致,尤其是鉴定为 *E. meliloti* 的 YIC5037、YIC5077 的 *nodA*、

nifH 基因与已知的同苜蓿、草木犀等植物结瘤的 *E. meliloti* 的相应基因的进化距离均较远。这表明在这一生态区域内, 共生基因 *nodA*、*nifH* 可能存在横向转移现象, 从而使本不与田菁结瘤的根瘤菌类群获得了与田菁共生固氮的能力。同时这也印证了一些豆科植物对与其共生的根瘤菌的共生基因具有较强的选择性^[28], 以及宿主对根瘤菌演化的影响^[26-29]。

YIC5090, YIC5072 的 16S rRNA 基因序列与 *E. numidicus* 相似性最高达到 99.7%, 而 MLSA 分析中这两株菌形成一个独立的分支, 且与其它的参照菌株的相似性均低于细菌种基因分类界定的 97%^[30] 这一标准, 极有可能为 *Ensifer* 的一个新种, 这需要后续工作如基因组 ANI 值比较、生理生化表型分析和交叉结瘤等试验进一步确证。

耐盐性是根瘤菌的一项重要生理指标。有研究认为豆科植物——根瘤菌的共生体系在应答盐胁迫时, 根瘤菌起主导作用^[31]。Ibragimova 通过对咸海地区与苜蓿、草木犀及胡卢巴结瘤的 *E. meliloti* 的大量研究分析发现, 在野生条件下, 无论是盐碱土壤还是非盐碱土壤中, 宿主植物均优先与耐盐菌株共生结瘤^[32]; Jebara 也发现在盐碱地中种植苜蓿, 接种耐盐菌株的苜蓿长势更好^[33]。此外, 高浓度的 NaCl 会降低根瘤菌接种剂中根瘤菌的数量^[34]。可见, 耐盐性对于根瘤菌在土壤中的存活能力、竞争性及对豆科植物的促生效果有着重要的影响。根据先前的报道根瘤菌都不能耐受很高的盐浓度, 已知的最耐盐的根瘤菌可以在含 5% 的 NaCl 的 YMA 培养基平板上生长^[35]。在本研究中, 7 株供试菌株表现出良好的耐盐性, 均能够耐受 5% 的 NaCl 浓度水平, 其中 YIC5082 能够在 6% 的 NaCl 浓度水平下较好地生长, 是宝贵的耐盐根瘤菌资源, 这对于供试菌株接种田菁并应用于盐碱土壤的改良有着积极的意义。

根瘤菌-豆科植物共生体系是生物固氮中效率最高的, 同时区别于根际促生菌的联合固氮, 根瘤菌与豆科植物形成根瘤共生体, 并可把固定的氮在根瘤内部直接输送给共生植物, 所固定的氮的量及利用效率更高, 因而根瘤菌对共生豆科植物具有更好的促生效果^[36]。在本研究中, 接种根瘤菌显著促进了田菁的生长, 然而这种促生作用并没有单独跟所结根瘤的重量及所接根瘤菌的固氮酶活性有着严格

的相关关系。因此, 筛选固氮和结瘤能力都比较强的根瘤菌菌株对于提高根瘤菌-豆科植物的共生有效性, 促进豆科植物的生长有着重要的实际意义。通过初步筛选, 菌株 YIC5077 在温室中蛭石条件下, 表现出良好的促生效果及较高的固氮和结瘤能力, 后期将测定其在野外滩涂地与田菁的结瘤固氮能力, 以评价其作为高效促生接种剂的潜力。

根瘤菌与豆科植物的共生固氮体系的应用是实现农业、环境和生态可持续利用与发展的重大研究课题。随着国内外大量调查研究, 人们发现根瘤菌有着宿主特异性和一定的生物地理分布特性^[37-38], 区域地理环境对根瘤菌与宿主共生关系的影响很大, 这表明在对根瘤菌接种剂的选种时要注意区域性, 土著高效根瘤菌能够更好的适应当地环境, 是根瘤菌剂应用的首选。本研究通过分离、纯化和鉴定如东田菁根瘤菌, 揭示了如东滩涂田菁根瘤菌的遗传多样性和系统发育地位, 丰富了田菁根瘤菌的基因库, 同时也为优良田菁根瘤菌菌株的选育储备了种质资源。

参考文献

- [1] Li X. Sustainable utilization and protection of Tidal-Flat resources in Rudong County. *Journal of University of Science and Technology of Suzhou*, 2004, (4): 8-12. (in Chinese)
李新. 如东县滩涂资源可持续利用研究. 苏州科技学院学报, 2004, (4): 8-12.
- [2] 新华报业网讯. 南通走出快速改良滩涂盐碱地新路径. <http://js.xhby.net/system/2009/12/11/010644716.shtml>, 2009-12-11
- [3] 焦彬. 中国绿肥. 北京: 农业出版社. 1986.
- [4] Yu XL, Zhu RY, Sun XM, Xia CA, Wu XY. The study of protein feeding of *Sesbania cannabina*. *Chinese Wild Plant*, 1988 (Z1): 21-26. (in Chinese)
于学玲, 朱荣誉, 孙晓明, 夏长安, 吴兴义. 田菁蛋白胨饲料的研究. 中国野生植物, 1988 (Z1): 21-26.
- [5] Xu KW, Zhang XP, Chen YX, Gu FY, Zhou DH, Tang CY. Symbiotic efficiency and genetic diversity of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in Liangshan Prefecture. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, (5): 498-508. (in Chinese)
徐开未, 张小平, 陈远学, 古飞越, 周德海, 唐成义. 凉山州新银合欢根瘤菌的共生有效性及遗传多样性. 微生物学报, 2014, (5): 498-508.

- [6] Han B, Kong JJ, Zou XM, Gong HD. The evolvement and expectation of biological nitrogen fixation. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2009, (10): 86-89. (in Chinese)
韩斌, 孔继君, 邹晓明, 巩合德. 生物固氮研究现状及展望. 山西农业科学, 2009, (10): 86-89.
- [7] Wang ET, van Berkum P, Beyene D, Sui XH, Dorado O, Chen WX, Martinez-Romero E. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48: 687-699.
- [8] Mousavi SA, Osterman J, Wahlberg N, Nesme X, Lavire C, Vial L, Paulin L, de Lajudie P, Lindstrom K. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov.. *Systematic and Applied Microbiology*, 2014, 37 (3): 208-215.
- [9] Huang CX, Zhang XP, Peng XC, Lindstrom K. Diversity and phylogeny of rhizobia isolated from root nodules of *Sesbania cannabina* in Jinshajiang arid river valley. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, (6): 725-732. (in Chinese)
黄昌学, 张小平, 彭贤超, K. Lindstrom. 金沙江干热河谷区田菁根瘤菌多样性与系统发育. 微生物学报, 2008, (6): 725-732.
- [10] Delajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins MD, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M. Polyphasic taxonomy of rhizobia—emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44 (4): 715-733.
- [11] Wang YC, Wang F, Hou BC, Wang ET, Chen WF, Sui XH, Chen WX, Li Y, Zhang YB. Proposal of *Ensifer psoraleae* sp. nov., *Ensifer sesbaniae* sp. nov., *Ensifer morelense* comb. nov. and *Ensifer americanum* comb. nov.. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36 (7): 467-473.
- [12] Vincent JM. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *Blackwell Scientific, Oxford*, 1970.
- [13] 李岩. *Sinorhizobium* sp. NGR234 的广宿主适应机制研究. 中国农业大学博士学位论文, 2013.
- [14] Yan J, Han XZ, Ji ZJ, Li Y, Wang ET, Xie ZH, Chen WF. Abundance and diversity of soybean-nodulating *Rhizobia* in black soil are impacted by land use and crop management. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (17): 5394-5402.
- [15] C Y, W ET, Zhao L, Chen WM, Wei GH. Diversity and distribution of *Rhizobia* nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.026>.
- [16] Zhang C, Kong F. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied Soil Ecology*, 2014, 82: 18-25.
- [17] Dou YJ, Lu JK, Kang LH, Wang SK, Jiang YG, Liao SB. Biodiversity of *Rhizobia* associated with *Acacia melanoxylon* grown in South China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (12): 1439-1448. (in Chinese)
窦雅静, 陆俊磊, 康丽华, 王胜坤, 江业根, 廖绍波. 黑木相思根瘤菌遗传多样性. 微生物学报, 2012, 52 (12): 1439-1448.
- [18] Haukka K, Lindstrom K, Young JPW. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (2): 419-426.
- [19] 陈文新, 王恩涛. 中华根瘤菌. 北京: 科学出版社. 2011.
- [20] Evans J. R. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia*, 1989, 78: 9-19.
- [21] Baret F, Houles V, Guerif M. Quantification of plant stress using remote sensing observations and crop models: the case of nitrogen management. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58 (4): 869-880.
- [22] Wernegreen JJ, Riley MA. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16 (1): 98-113.
- [23] Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P, Willems A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58: 200-214.
- [24] Kuykendall LD, Hashem FM, Wang ET. 2005. Genus *Sinorhizobium* Chen, Yan&Li 1988, 392^{VP} emend. //De Lajudie, willems, Pot, Dewettinck, Maestrojuan, Neyra, Collins, Dreyfus, Kersters & Gillis 1994, 714^{VP}. Garrity

- G M Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. Vol. 2. New York: Springer Publishing. 358-361.
- [25] Zurdo-Pineiro JL, Garcia-Fraile P, Rivas R, Peix A, Leon-Barrios M, Willems A, Mateos PF, Martinez-Molina E, Velazquez E, van Berkum P. *Rhizobia* from Lanzarote, the Canary Islands, that nodulate *Phaseolus vulgaris* have characteristics in common with *Sinorhizobium meliloti* isolates from mainland Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (8) : 2354-2359.
- [26] Amarger N. *Rhizobia* in the field. *Advances in Agronomy*, 2001, 73: 109-168.
- [27] Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. Classification of *Rhizobia* based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology-Uk*, 2001, 147: 981-993.
- [28] Lu YL, Chen WF, Wang ET, Guan SH, Yan XR, Chen WX. Genetic diversity and biogeography of *Rhizobia* associated with *Caragana* species in three ecological regions of China. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32 (5) : 351-361.
- [29] Cao Y, Wang ET, Zhao L, Chen WM, Wei GH. Diversity and distribution of *Rhizobia* nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, (78) : 128 - 137.
- [30] Lopez-Guerrero MG, Ormeno-Orrillo E, Velazquez E, Rogel MA, Luis Acosta J, Gonzalez V, Martinez J, Martinez-Romero E. *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35 (6) : 353-358.
- [31] Mhadhbi H, Jebara M, Limam F, Aouani ME. *Rhizobial* strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42 (9) : 717-722.
- [32] Ibragimova MV, Rumyantseva ML, Onishchuk OP, Belova VS, Kurchak ON, Andronov EE, Dzyubenko NI, Simarov BV. Symbiosis between the root-nodule bacterium *Sinorhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) under salinization conditions (vol 75, pg 77, 2006). *Microbiology*, 2006, 75 (2) : 242-242.
- [33] Jebara M, Mhamdi R, Aouani ME, Ghrir R, Mars M. Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different Medicago varieties cultivated in Tunisian soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47 (2) : 139-147.
- [34] Steinborn J, Roughley RJ. Toxicity of sodium and chloride-ions to *Rhizobium* spp. in broth and peat culture. *Journal of Applied Bacteriology*, 1975, 39 (2) : 133-138.
- [35] Kan FL, Chen ZY, Wang ET, Tian CF, Sui XH, Chen WX. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. *Archives of Microbiology*, 2007, 188 (2) : 103-115.
- [36] Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2003, 22 (2) : 107-149.
- [37] Zhang YM, Li Y, Chen WF, Wang ET, Tian CF, Li QQ, Zhang YZ, Sui XH, Chen WX. Biodiversity and biogeography of *Rhizobia* associated with soybean plants grown in the North China Plain. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (18) : 6331-6342.
- [38] CHEN WX, Wang ET, CHEN WF. The relationship between the symbiotic promiscuity of *Rhizobia* and legumes and their geographical environments. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, (1) : 81-86. (in Chinese)
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. 中国农业科学, 2004, (1) : 81-86.

Genetic diversity of the *Rhizobia* and screening of high-efficient growth-promoting strains isolated from *Sesbania cannabina* in Rudong County

Xiangyue Li^{1,2}, Yan Li¹, Nan Jiang^{1,2}, Hailong Wu^{1,2}, Wanping Song³, Hualing Xu⁴, Zhihong Xie^{1*}

¹Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong Province, China

²University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

³Haiti Forestry Station of Rudong, Rudong 226409, Jiangsu Province, China

⁴Shandong Academy of Agriculture Sciences, Dongying 257000, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] To study the genetic diversity and phylogeny of *Rhizobia* isolated from *Sesbania cannabina* growing on the tidal flat in Rudong County and screen high-efficient growth-promoting strains as *Rhizobia* inoculator to *S. cannabina*. [Methods] Phylogenetic analyses were based on 16S rRNA gene, housekeeping genes (*recA*, *atpD*, *glnII*) and symbiotic genes (*nodA*, *nifH*). The growth-promoting efficiency was tested by plant inoculation assay on *S. cannabina* in greenhouse. [Results] The 32 isolates belonged to *Ensifer*, *Neorhizobium*, *Rhizobium*, and most closely related to *E. meliloti*, *N. huautlense*, *R. pusense*. The phylogenies of *nodA* and *nifH* were congruent, and most closely related to *E. saheli*. The 7 representative isolates were resistant to high concentration of NaCl (5%, W/V), and YIC5082 grew well in TY medium with 6% NaCl. In plant inoculation assay, all the 7 representative isolates were effective on symbiotic nitrogen fixation, and 6 out of the 7 isolates significantly enhanced the fresh weight and height of plants. [Conclusion] *Rhizobia* isolated from *S. cannabina* growing on the tidal flat in Rudong County showed rich genetic diversity. *N. huautlense* and *E. meliloti* were the dominant species. Most of the isolates showed fine growth-promoting efficiency and salt tolerance. YIC5077 showed the best growth-promoting efficiency, good nodulation and nitrogen fixation abilities, which has promising potential applications as *Rhizobia* inoculator to *S. cannabina*.

Keywords: Rudong, *S. cannabina* *Rhizobia*, 16S rRNA gene, housekeeping genes, genetic diversity, high-efficient growth-promoting isolates

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (KZZD-EW-44), by the Yantai Science and Technology Project (2013JH021), by One Hundred-Talent Plan of Chinese Academy of Sciences and by the National Natural Science Foundation of China (31370108)

* Corresponding author. Tel: +86-535-2109183; Fax: +86-535-2109000; E-mail: zhxie@yic.ac.cn

Received: 2 December 2014/Revised: 25 January 2015