

紫花苜蓿根瘤微生物组成及16S rDNA鉴定

颜珲璘, 祁岩慧, 苟恒瑞, 李雪飞, 芦光新*

青海大学, 青海 西宁

收稿日期: 2022年5月21日; 录用日期: 2022年6月17日; 发布日期: 2022年6月30日

摘要

目的: 鉴定环青海湖地区紫花苜蓿根瘤内细菌组成的多样性。方法: 试验以环青海湖地区紫花苜蓿根瘤作为供试材料, 刚果红YMA培养基通过平板划线法进行细菌培养, 进行分子鉴定。结果: 共分离出14株菌株, 分别属于苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis strain*)、假单胞菌(*Pseudomonas kilonesis*)以及桃色欧文氏菌(*Erwinia persicina*)。结论: 表明环青海湖地区紫花苜蓿根瘤内细菌具有多样性, 本研究不仅拓展了紫花苜蓿根瘤内细菌多样性的研究方法, 还为寄主植物根际促生菌的研究提供了分析思路。

关键词

紫花苜蓿, 根瘤, 分离培养, 16S rDNA鉴定

Microbial Composition and 16S rDNA Identification of Alfalfa Root Nodules

Huilin Yan, Yanhui Qi, Hengrui Gou, Xuefei Li, Guangxin Lu*

Qinghai University, Xining Qinghai

Received: May 21st, 2022; accepted: Jun. 17th, 2022; published: Jun. 30th, 2022

Abstract

Objective: To identify the diversity of bacterial composition in alfalfa root nodules around Qinghai Lake. **Method:** Alfalfa root nodules from Qinghai Lake area were used as test materials, and Congo red YMA medium was used for bacterial culture by plate streak method, and molecular identification was carried out. **Results:** A total of 14 strains were isolated. They belong to *Sinorhizobium meliloti*, *Bacillus Subtilis strain*, *Pseudomonas kilonesis* and *Erwinia persicina*. **Conclusion:** This study not only expanded the research method of bacterial diversity in alfalfa root nodule, but also provided an analytical idea for the study of rhizosphere growth promoting bacteria of host plants.

*通讯作者。

Keywords

Alfalfa, Nodules, Isolation Culture, 16S rDNA Identification

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

紫花苜蓿属豆科(*Leguminosae* sp.)蝶形花亚科(*Papilionoideae*)苜蓿属(*Medicago* L.)多年生草本植物,是目前世界种植最广泛的一种栽培牧草,在我国已有 2000 多年的种植历史[1] [2]。豆科植物紫花苜蓿是一种典型的结瘤植物,在共生固氮中,大部分豆科植物的根系能够与土壤中的氮建立共生体,形成特殊的结构——根瘤[3]。根瘤是植物与根际土壤微生物形成共生体的器官,是固氮作用的主要场所,将大气中的氮转换为铵态氮供植物生长。除此之外,植物和根瘤菌共生可以提高植株的抗逆性及提高产量[4]。大量的研究表明,苜蓿根系分泌物影响了根际与根周的微生物群落组成,同时,根瘤细菌的多样性不但影响根际促生菌的分离,也可能影响促生菌的功能[5] [6]。因此,研究苜蓿根瘤微生物的组成有助于了解根瘤与植物生长的关系,而目前对于环青海湖地区紫花苜蓿根瘤内的细菌组成及促生菌的鉴定较少。本试验采集了环青海湖地区种植的紫花苜蓿新鲜根瘤,在室内进行了分离培养分子鉴定,旨在明确紫花苜蓿根瘤的细菌组成,以期加深对结瘤植物根瘤微生物多样性的认识,为进一步探讨紫花苜蓿根瘤促生作用提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

试验地位于青海省草原改良试验站的牧草育种试验区(37°03'43.0"N, 99°34'00.6"E, 海拔 3270 米)。年平均气温-0.7°C, 绝对无霜期为 20 d。年平均降水量为 368.11 mm, 相对湿度 58%, 年蒸发量 1495.3 mm, 土壤为暗栗钙土。于 2020 年 9 月在苜蓿种植试验区, 随机选取 10 株紫花苜蓿植株, 挖取其根瘤部分, 并装入无菌袋中进行保存, 并记录好标签带回实验室, 于 4°C 冰箱保存。

2.2. 研究方法

2.2.1. 刚果红 YMA 培养基的配置

参照文献[7]进行如下改进: 取甘露醇 10.0 g/L、NaCl 0.1 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L、酵母粉 1.0 g/L、K₂HPO₄ 0.5 g/L、琼脂 15~20 g/L、0.5%刚果红液 4 mL/L、蒸馏水 1000 mL/L 于 1000 mL 容量瓶中, 调 pH 7.0~7.2。置高压灭菌锅 121°C, 灭菌 20 min, 备用。

2.2.2. 根瘤微生物的分离和培养

将粉红色饱满的根瘤装于已灭菌的培养皿中,用 95%的乙醇浸泡 5 min,随后转入 0.1%的碘汞 1 min,再用无菌水冲洗 5~6 次,清洗残留消毒液,然后用研钵将根际土壤磨碎,并将根瘤压碎使浆液流出,加入少量无菌水,用接种环蘸取 1 环菌液,在刚果红 YMA 培养基上划线,28°C 培养 24 h 获取单菌落,进行革兰氏染色。并于 4°C 斜面试管保存。

2.2.3. 菌液培养和 DNA 提取及鉴定

菌株基因组 DNA 提取 将试管斜面保存的菌落活化后, 接种到盛有 50 ml 液体培养基的 250 mL 的锥形瓶中, 在 28℃ 震荡培养箱中培养, 直至瓶内溶液变得浑浊, 离心后弃去上清液, 用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒。

16S rDNA 基因 PCR 扩增 以细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'), 进行扩增。

PCR 反应体系的配制 27F 和 1492R 混合液 4.0 μL, 2× San Tap PCR Mix (含蓝染液) 25.0 μL, 模板 DNA 1.0 μL, 双蒸水(ddH₂O) 21.0 μL。扩增条件: 1) 94℃ 预变性 5 min; 2) 94℃ 变性 1 min; 3) 57℃ 退火 1 min; 4) 72℃ 延伸 90 s; 5) 重复步骤 2~4) 30 次; 5) 72℃ 延伸 15 min; 6) 6℃ for ever。PCR 产物送上海生物工程有限公司测序, 参照文献[8]采用 Maximum Likelihood 法构建系统进化树。

2.3. 数据处理

采用 Excel 2020 以及 IBM SPSS Statistic25 软件进行统计分析, 用 MEGA7.0.26 软件作系统发育树, 用单因素方差(ANOVA)分析其显著性差异。

3. 研究结果

3.1. 根瘤微生物的分离和形态观察

根据菌落形态进行归类并统一编号, 菌株编号分别为 SBL 2-1-01、SBL 2-1-02、SBL 9-2、SWL 8-3-01、SWL 8-3-02、SWP 4-3-01、SWP 4-3-02、SWP 5-2、NBL 15-3、NBL 14-4、NWL 17-3、NBP 15-1、NWL 17-3-01、NWL 17-3-02, 革兰氏染色和菌落形态观察的结果见表 1。

Table 1. Observation results of Gram staining and colony morphology

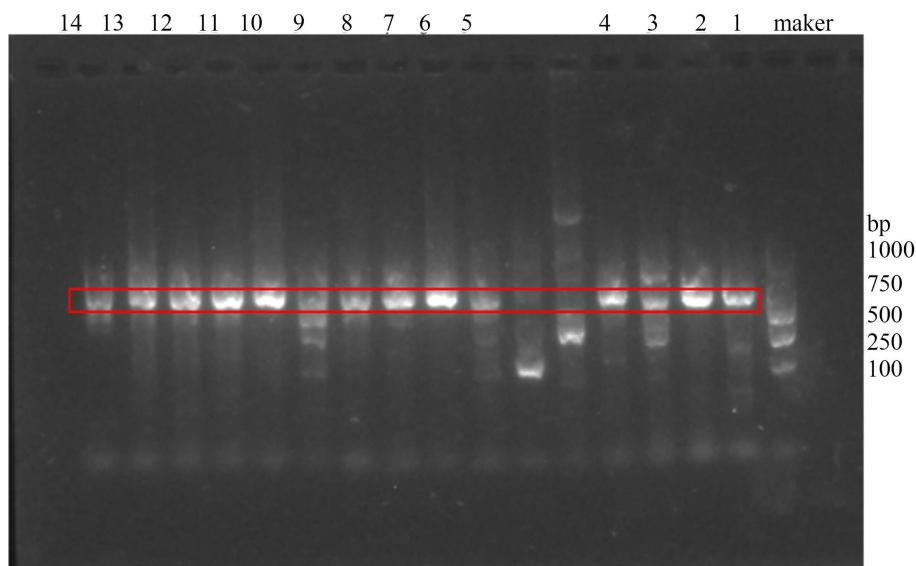
表 1. 革兰氏染色和菌落形态观察结果

编号	革兰氏染色	菌落形态
SBL 2-1-01	G ⁺	桃粉色, 有光泽, 凸起, 直径 1 mm
SBL 2-1-02	G ⁺	粉色, 表面粗糙, 形状不规则, 无光泽
SBL 9-2	G ⁺	粉色, 边缘为土灰色, 中央有白圈, 直径 5 mm
SWL 8-3-01	G ⁻	透明, 有光泽, 直径 9 mm
SWL 8-3-02	G ⁺	浅粉色, 边缘不规则, 直径 5 mm
SWP 4-3-01	G ⁻	透明, 中间粉色圈, 有光泽, 直径 6 mm
SWP 4-3-02	G ⁻	粉圈, 中间透明, 直径 2 mm
SWP 5-2	G ⁺	粉色, 中央颜色较深, 表面粗糙, 边缘不整齐
NBL 15-3	G ⁻	白色, 凸起, 无光泽, 直径 2 mm
NBL 14-4	G ⁺	桃粉色, 有光泽, 凸起, 边缘不规则
NWL 17-3	G ⁻	玫红色, 无光泽, 直径 1 mm
NBP 15-1	G ⁺	浅粉色, 边缘不规则, 直径 5 mm
NWL 17-3-01	G ⁻	淡黄色, 有光泽, 直径 1 mm
NWL 17-3-02	G ⁻	淡粉, 中间玫红色点, 凸起, 直径 3 mm

注: G⁺表示革兰氏阳性; G⁻表示革兰氏阴性。

3.2. 菌株的基因序列分析

将分离得到的14株菌种进行PCR扩增(见图1),扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,待测菌株样品分别用1~14代表,扩增产物均在500~750 bp之间出现特异性条带,将得到条带进行切胶回收,提取DNA,纯化后测序。测序得到的14种微生物的16S rDNA序列,经NCBI上的BLAST在线对比,找出相似菌株如表2所示。



注:图中1~14分别代表SBL 2-1-01、SBL 2-1-02、SBL 9-2、SWL 8-3-01、SWL 8-3-02、SWP 4-3-01、SWP 4-3-02、SWP 5-2、NBL 15-3、NBL 14-4、NWL 17-3、NBP 15-1、NWL 17-3-01、NWL 17-3-02

Figure 1. PCR results of different strains
图 1. 不同菌株 PCR 扩增结果

Table 2. Comparison results of 16S rDNA

表 2. 16SrDNA 序列对比结果

编号	相似菌株	相似度	NCBI 登录号
SBL 2-1-01	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>)	98.00%	NR_102783.2
SBL 2-1-02	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	99.57%	NR_112116.2
SBL 9-2	液化淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	99.46%	NR_117946.1
SWL 8-3-01	桃色欧文氏菌(<i>Erwinia persicina</i>)	99.18%	NR_041975.1
SWL 8-3-02	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	99.28%	NR_027552.1
SWP 4-3-01	桃色欧文氏菌(<i>Erwinia persicina</i>)	99.12%	NR_119365.1
SWP 4-3-02	桃色欧文氏菌(<i>Erwinia persicina</i>)	99.36%	NR_114078.1
SWP 5-2	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i> strain)	99.57%	NR_027552.1
NBL 15-3	假单胞菌(<i>Pseudomonas kilonesis</i>)	100.00%	NR_028929.1
NBL 14-4	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i> strain)	99.54%	NR_075005.2
NWL 17-3	苜蓿中华根瘤菌(<i>Sinorhizobium meliloti</i>)	100.00%	NR_113670.1
NBP 15-1	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i> strain)	100%	NR_112116.2
NWL 17-3-01	假单胞菌(<i>Pseudomonas kilonesis</i>)	99.13%	NR_029042.2
NWL 17-3-02	桃色欧文氏菌(<i>Erwinia persicina</i>)	100.00%	NR_114078.1

3.3. 系统发育树的构建及分析

对测序得到的 14 株细菌进行系统发育树的构建, 从图 2 可以看到, 这 14 株菌分别隶属于 4 个属, 分别是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis strain*)、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、假单胞菌(*Pseudomonas kilonensis*)、桃色欧文氏菌(*Erwinia persicina*)。本研究的 SWL 8-3-01、NBP 15-1、SBL 2-1-02、SBL 2-1-01、SWP 5-2、NBL 14-4、NWL 17-3-01、NWL 17-3-02 菌株与 Genbank 中的 *Bacillus subtilis strain* 聚为一支, 八株菌株的亲缘关系非常相近, 总支持率达到了 100%, 被鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis strain*)。NWL 17-3 D1 菌株与 Genbank 中的苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)单独聚为 1 支, 二者关系非常相近, 支持率达到了 100%, 被鉴定为苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)。NBL 15-3 菌株与 Genbank 中的假单胞菌(*Pseudomonas kilonensis*)单独聚为 1 支, 说明二者关系相近, 支持率达到了 100%。SWP 4-3-02、SWL 8-3-01、SWP 4-3-01 菌株与 Genbank 中的桃色欧文氏菌(*Erwinia persicina*)聚成 1 支, 总支持率达到了 100%, 但是 SWL 8-3-01 和 SWP 4-3-01 两菌株的支持率只有 57%。

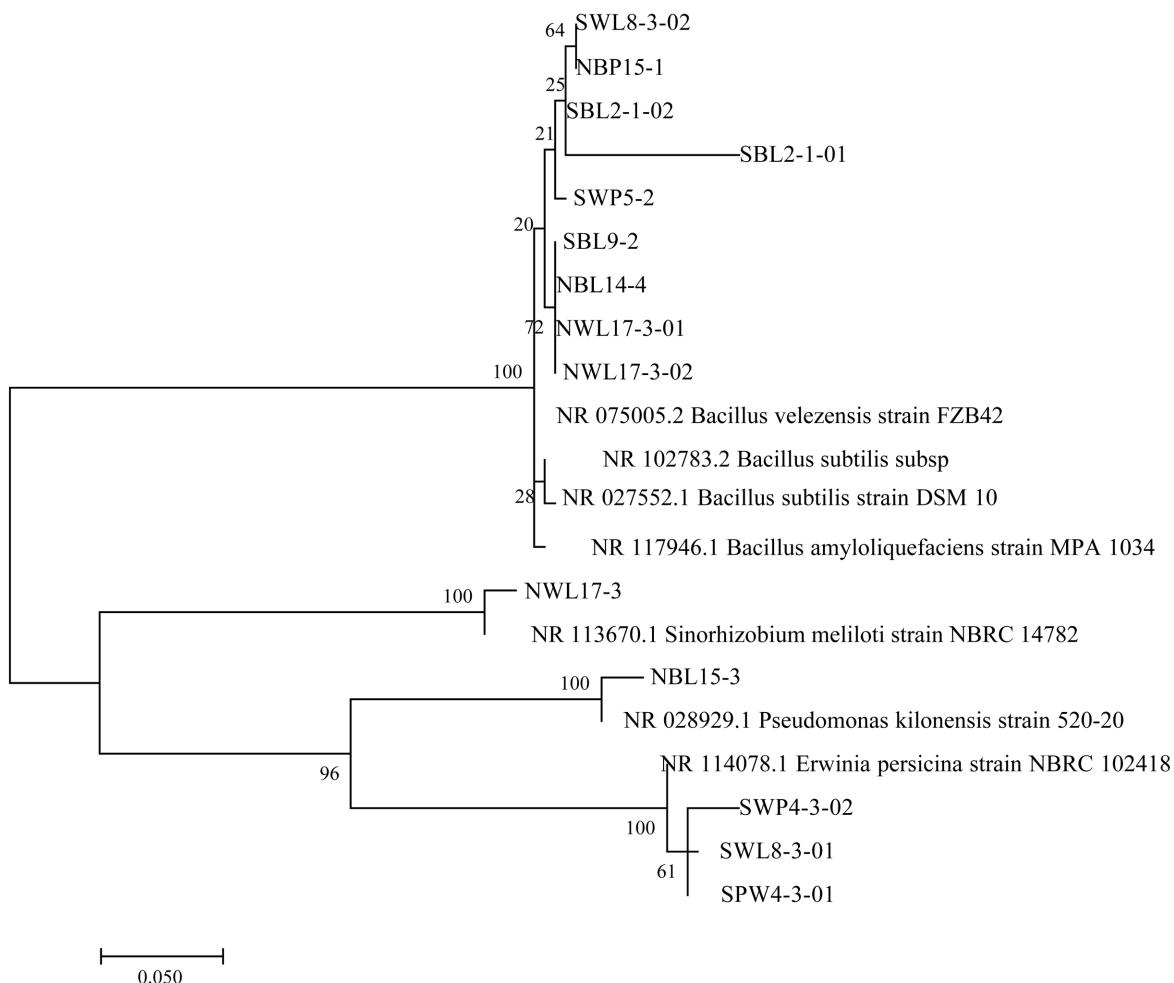


Figure 2. Molecular phylogenetic analysis by maximum likelihood method

图 2. 最大似然法分子系统发育分析

4. 讨论

紫花苜蓿是一种多年生的开花植物, 其须根中会形成根瘤, 从而促进植株的生长, 增强植株营养品

质[9]，根瘤存在于豆科植物和某些非豆科植物(木麻黄属等)的根系上[10]。根瘤菌是存在于根瘤中的一种慢生根瘤菌。它在摄取宿主养分的同时也能形成固氮酶，能够固定游离的氮，为植物的生长提供氮素并提高土壤肥力[11] [12] [13]，除此之外，植物和根瘤菌共生可以提高植株的抗逆性及提高产量。不同根瘤的组成以及分泌物可能会导致植物根系微生物群落结构有所不同，同时，根瘤细菌的多样性不但影响根际促生菌的分离，也可能影响促生菌的功能。在目前文献报道中，关于环青海湖地区紫花苜蓿根瘤多样性的研究甚少。国内外学者已分离获得植物的根际促生菌。Shaikhul Islam [14]等从黄瓜根际分离 10 株菌株，其中假单胞菌(*Pseudomonas*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等能够有效促进黄瓜生长，防止黄瓜的根腐病。郑恒[15]等综合讨论了根际促生菌对西藏青稞的促生作用，对生物菌肥在青稞种植中的应用进行了展望。

本试验对生长于环青海湖地区的紫花苜蓿根瘤内细菌多样性进行了研究。研究结果表明，紫花苜蓿根瘤细菌具有多样性，共分离得到 14 株菌株。经过形态学观察及 16S rDNA 鉴定，确定了 SWL 8-3-01、NBP 15-1、SBL 2-1-02、SBL 2-1-01、SWP 5-2、NBL 14-4、NWL 17-3-01、NWL 17-3-02 菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis strain*)。NWL 17-3 D1 菌株为苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)。NBL 15-3 菌株为假单胞菌(*Pseudomonas kilonensis*)。SWP 4-3-02、SWL 8-3-01、SWP 4-3-01 菌株为桃色欧文氏菌(*Erwinia persicina*)。

基金项目

青海省科技厅科技成果转化专项项目，禾/豆混播的微生物调控及菌肥研发(2022-SF-147)。

参考文献

- [1] Lin, Y.X. and Wang, S. (2014) New Advances in Legume Systematics. *Botanical Research*, No. 3, 179-187. <https://doi.org/10.12677/BR.2014.35023>
- [2] 谭定贵. 紫花苜蓿种植推广技术运用[J]. 农民致富之友, 2013(12): 184.
- [3] 赵忠. 豆科植物 SHR-SCR 模块——根瘤“奠基细胞”的命运推手[J]. 植物学报, 2020, 55(6): 661-665.
- [4] 韩博远, 张闻, 胡芳雨, 等. 模拟及实际根系分泌物对芘污染土壤微生物群落的影响[J]. 环境科学, 2022, 43(2): 1077-1088.
- [5] 张萌萌, 敖红, 李鑫, 等. 桑树/苜蓿间作对根际土壤酶活性和微生物群落多样性的影响[J]. 草地学报, 2015, 23(2): 302-309.
- [6] Li, B.H., Dai, Y.J., Song, W.J., et al. (2021) Effects of Alfalfa Root Exudates on the Microbial Remediation of Nitrate-Heavy Metal Complex Pollution in Groundwater. *Science Asia*, **47**, 366. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2021.047>
- [7] 杨滢, 楼攻娟, 李子林, 等. 雷竹内生真菌分离及其功能性菌株筛选与鉴定[J]. 生物灾害科学, 2021, 44(3): 271-277.
- [8] 芦光新. 高寒草地真菌纤维素降解酶系及其对油菜秸秆降解活性的研究[D]: [博士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [9] 董汝, 曹扬荣. 豆科植物-根瘤菌共生固氮的免疫调控机制[J]. 生物技术通报, 2019, 35(10): 25-33.
- [10] 高丽敏, 苏晶, 田倩, 等. 施氮对不同水分条件下紫花苜蓿氮素吸收及根系固氮酶活性的影响[J]. 草业学报, 2020, 29(3): 130-136.
- [11] 刘忆, 袁玲. 根瘤菌和 AM 真菌对紫花苜蓿结瘤和产质量的影响[J]. 土壤学报, 2020, 57(5): 1292-1298.
- [12] 管凤贞, 钟少杰, 邱宏端, 等. 紫云英根瘤菌的分离与鉴定[J]. 福建农业学报, 2012, 27(5): 524-524.
- [13] 马文文, 姚拓, 蒲小鹏, 等. 东祁连山 7 种禾草根际溶磷菌筛选及其溶磷特性[J]. 草业科学, 2015, 32(4): 515-523.
- [14] Islam, S., Akanda, A.M., Prova, A., Islam, M.T. and Hossain, M.M. (2016) Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. *Frontiers in Microbiology*, **6**, Article No. 1360. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01360>
- [15] 郑恒, 刘怡萱, 刘星. 西藏青稞根际促生细菌研究进展[J]. 环境生态学, 2021, 3(4): 63-66.