中国科学 C 辑: 生命科学
2007 年 第 37 卷 第 1 期: 52~57
http://www.scichina.com

《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

# 一株分离自裸子植物罗汉松根瘤的根瘤菌

黄宝灵[①*] 吕成群[①] 武 波[②] 樊利勤[①]

(① 广西大学林学院, 南宁 530004; ② 广西亚热带生物保护与利用重点实验室, 南宁 530004)

**摘要** 根瘤菌与豆科植物共生结瘤固氮被认为是地球上最重要的生物固氮体系. 裸子植物罗汉松与根瘤菌共生结瘤至今未见报道. 采用常规根瘤菌分离技术从罗汉松及其变种小叶罗汉松根瘤中分离获得 11 株内生细菌, 将它们回接宿主可导致结瘤, 乙炔还原法测出微弱的固氮酶活性. 传统的生理生化鉴定方法和16S rDNA全序列分析证明该内生细菌代表菌株GXLO 02隶属于根瘤菌.

**关键词** 罗汉松 小叶罗汉松 根瘤菌 生理生化特性 16S rDNA 序列

根瘤菌能够与豆科植物共生结瘤固氮, 其固氮量大约占全球生物固氮的 65%[1], 从而在地球的氮素循环中扮演着重要的生态角色. 自根瘤菌被发现以来的研究表明, 每一种根瘤菌都有一定的宿主范围[2~4], 有的根瘤菌如固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans*)的宿主范围很窄[5], 但有的根瘤菌的宿主范围却很宽[6~8]. 尽管根瘤菌与宿主之间存在着共生关系的多样性, 但是所有研究过的根瘤菌宿主植物均为豆科植物, 它们分别隶属蝶形花亚科、含羞草亚科和苏木亚科. 1973 年Trinick[9,10]发现了榆科山黄麻(*Parasponia andersonii*)与根瘤菌共生结瘤固氮体系, 并得到了后人的充分证实. 这一发现从另一个角度证明了根瘤菌的宿主范围不仅仅限于豆科植物, 很可能存在更大范围的宿主多样性.

本文作者近年的研究表明, 裸子植物亚门的罗汉松属(*Podocarpus*)植物在自然界中具有普遍结瘤的现象, 其根瘤形态和结构与豆科植物根瘤结构有诸多相同和相似之处[11], 证明了罗汉松的根瘤是由其内生细菌引起的[12], 并且通过传统的微生物生理生化技术和现代分子生物学方法, 从罗汉松属植物的根瘤内生细菌中鉴定出一批根瘤菌, 现将罗汉松(*Podocarpus macrophyllus*)及其变种小叶罗汉松(*Podocarpus macrophyllus* var. *maki*)根瘤内生细菌代表菌株的鉴定结果报道如下.

## 1 材料与方法

### 1.1 根瘤的采集和内生细菌的分离

在中国广西的罗汉松及其变种小叶罗汉松的天然林和人工林中采集新鲜饱满的罗汉松和小叶罗汉松根瘤, 清水冲洗掉根瘤表面的泥土后, 75%乙醇表面消毒 1 min, 酸性氯化汞表面消毒 6~7 min, 无菌水彻底清洗后, 将根瘤置于灭菌的研钵中研碎, 取根瘤液汁在含有刚果红的 YEM 培养基上划线, 28℃培养至菌落出现, 挑取刚果红不吸色的典型菌落, 稀释纯化后接种于罗汉松幼苗结瘤, 所结根瘤再用上述方法分离其内生细菌, 纯化后保存待鉴定.

### 1.2 传统生理生化鉴定

按照下列步骤进行生理生化鉴定: 内生细菌形态、菌落特征、芽孢的检出、革兰氏染色、耐热性、厌氧性、发酵性、乙醇氧化能力、体外固定大气氮能力、在宿主植物能否形成根瘤、在酵母膏-甘露醇琼

收稿日期: 2006-04-03; 接受日期: 2006-05-24
国家自然科学基金资助项目(批准号: 30170033)
* E-mail: hnboln@126.com

脂上是否产酸、精氨酸双水解酶、精氨酸为唯一氮源、以及 3-酮基乳糖等. 其中芽孢的检出采用周德庆 [13]的方法, 其余测定项目均采用东秀珠等人 [14]的方法或中国科学院微生物研究所细菌分类组的方法 [15]. 每实验均设相应对照, 3 次以上重复, 并以分离自厚荚相思(*Aacia crassicapa*)根瘤的热带根瘤菌 *Rhizobium tropici*为参比菌.

### 1.3　回接结瘤试验

为避免土壤微生物的感染, 直接从树上采收罗汉松种子, 用 75%的乙醇溶液浸泡 1~2 min, 无菌水冲洗 4 次后, 用 0.1%酸性氯化汞溶液浸泡 7~8 min, 无菌水冲洗 6 次, 此表面消毒重复两次. 采用根瘤菌回接结瘤试验中的全封闭式方法 [15] 进行接种, 接种量为每植株 2 mL对数期菌液. 每菌株接种 20 植株, 以不接种为对照.

### 1.4　固氮酶活性的测定方法

罗汉松植物的根瘤很小, 其直径仅为 1~1.5 mm. 为避免根瘤离体后对酶活性的负面影响, 取植物完整根系置于 10 mL的小瓶子内, 采用乙炔还原法 [16] 测定固氮酶活性, 重复 2 次. 固氮酶活性的计算公式: E(nmol $C_2H_4$ • $g^{-1}$ 生物量 • $h^{-1}$)=K • 样品乙烯峰高(μv) • 反应瓶体积(μL)/(标准乙烯峰高(μv) • 样品乙炔进样量(μL) •生物量(g) •反应时间(h)), 其中K为常数.

### 1.5　16S rDNA 全序列测定和分析

(1) 菌株: 用于 16S rDNA 全序列测定的菌株为 GXLO 02, 载体为 pGEM-3Zf (+)质粒. 大肠杆菌 JM109 作为转化受体.

(2) DNA提取: 菌株用YMB培养基培养至对数期, 12000 r/min 离心收集菌体, 用 10 mmol/L Tris-HCl洗涤 3 次, 溶菌酶破壁, 蛋白酶处理, 再用酚/氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀, 风干, 最后溶于TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 1 mmol/L EDTA , pH 8.0)中 [17].

(3) 16S rDNA 的扩增: 以总 DNA 为模板, 正向引物 F27(5′-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3′)和反向引物 R1492(5′-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3′), 经 PCR 扩增出 16S rDNA. 用 $T_4$ DNA 连接酶对 PCR 产物与经过酶切质粒 pGEM-3Zf (+)进行连接后, 用电脉冲法转化大肠杆菌 JM109, 蓝白斑筛选得到转化子. 挑取白色转化子培养过夜, 然后重新提取质粒 DNA, 由上海基康生物技术公司测序.

(4) 16S rDNA 的同源性分析: 将所测定的 GXLO 02 的 16S rDNA 全序列输入生物技术信息网页 http://www.ncbi.nlm.nib.gov/进行序列分析及同源性比较, 用 ClustalX 和 Treecovnw 软件绘制系统发育树状图. 序列相似性所用参比菌株来自 GenBank.

## 2　结果与分析

### 2.1　生理生化鉴定结果

从生长在不同立地条件的罗汉松及其变种小叶罗汉松植物根部共采集到 28 份样品, 按照根瘤菌的分离方法共分离获得 11 株内生细菌的纯培养物.

采用传统的根瘤菌生理生化鉴定方法对 11 株菌株进行分类鉴定, 并以分离自厚荚相思根瘤的热带根瘤菌 *R. tropici* 为参比菌. 结果表明, 该 11 株菌株中大多数具有根瘤菌的典型特性: 菌体形态均为杆状, 菌落均为圆形, 乳脂至乳白色, 有丰富的胞外多糖, 不产芽孢, 革兰氏染色阴性, 好气, 葡萄糖氧化发酵阴性, 在大于 60℃, 30 min 时不能生长, 乙醇氧化反应阴性, 在植物体外不固定大气中的$N_2$, 在宿主植物上结瘤(图 1)并有弱的固氮酶活性(平均酶活 21.6＞对照 15.1 μmol$C_2H_4$/(g 生物量 • h)), 在酵母膏甘露醇上产酸, 精氨酸双水解酶反应阴性, 可利用精氨酸为唯一氮源(表 1). 此鉴定结果可将它们归入根瘤菌科. 3-酮基乳糖反应呈阴性可排除它们为根癌农杆菌. 另外, 菌株 GXLO 08 的葡萄糖氧化发酵呈阳性反应, 菌株 GXXL 07, GXXL 10 和 GXXL 11 的乙醇氧化反应为阳性, 与根瘤菌的特性不相符, 但它们都具有结瘤的能力, 因此暂且称之为未知的结瘤细菌.

### 2.2　16S rDNA PCR 扩增及序列测定结果

根据各菌株的结瘤表现, 以结瘤效果较好的 GXLO 02 为代表菌株, 进一步进行分子生物学鉴定. GXLO 02 PCR 扩增所得的 16S rDNA 1.5 kb 片段电泳检测结果见图 2, 测定的 16S rDNA 全序列为 1540 bp(表 2).

将所测得的 16S rDNA 全序列输入生物技术信息网页 http://www.ncbi.nib.gov/, 用 BLAST 程序与 GenBank 上的参比菌进行序列分析及同源性比较, 结

表 1 供试根瘤内生细菌的生理生化特性

| 菌株 | 菌体形态 | 菌落形状 | 菌落颜色 | 产粘液 | 产芽孢 | 革兰氏染色 | 好氧性 | 葡萄糖氧化发酵 | >60℃生长 | 乙醇氧化 | 体外固定大气 $N_2$ | 在宿主植物结瘤 | 酵母膏甘露醇产酸 | 精氨酸双水解酶 | 精氨酸为唯一氮源 | 3-酮基乳糖反应 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GXLO 01 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | – | – | + | + | – | + | – |
| GXLO 02 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | – | – | + | + | – | +- | – |
| GXLO 04 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | – | – | + | + | – | +- | – |
| GXLO 07 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | – | – | + | + | – | + | – |
| GXLO 08 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | + | – | – | – | + | + | – | – | – |
| GXXI 04 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | – | – | + | - | + | + | – |
| GXXI 07 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | + | – | + | + | + | + | – |
| GXXI 08 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | – | – | + | + | + | + | – |
| GXXI 09 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | – | – | + | – | + | + | – |
| GXXI 10 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | + | – | + | + | + | + | – |
| GXXI 11 | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | + | – | + | + | + | + | – |
| *R.tropici* | 杆菌 | 圆形、凸 | 乳脂至乳白色 | + | – | GN | + | – | – | – | – | + | + | – | + | – |

图 1 回接宿主苗木的结瘤情况

(a) 自然结瘤的罗汉松幼苗; (b) 自然根瘤; (c) 回接根瘤; (d) 不接种对照

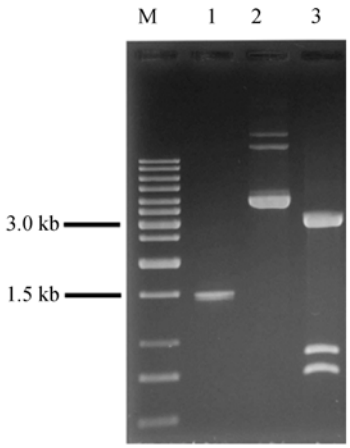


图 2　16S rDNA 扩增、连接及 *Eco*R Ⅰ酶切结果
M 示 1 kb Markers; 1 示 16S rDNA 扩增片段; 2 示重组质粒 pGEM-T16S; 3 示 pGEM-T16S/ *Eco*R Ⅰ

果表明, 菌株 GXLO 02 的 16S rDNA 全序列与 *R. tropici* 和 *R. rhizogenes* 的 16S rDNA 全序列的相似性均达到 99% .

### 2.3　16S rDNA 全序列的相似性和系统发育

将 GXLO 02 菌株的 16S rDNA 全序列与已知的豆科植物根瘤菌建立系统发育树如图 3.

从图 3 中可以看出, 在系统发育树中, 根瘤菌属(*Rhizobium*)与土壤杆菌属(*Agrobacterium*)的种在系统发育上互有交叉. 供试的GXLO 02 处于与根瘤菌属和土壤杆菌属的交叉分支中, 并与根瘤菌属的 *R. tropici* IAM 14206(D12798)和*R. genosp.* QBDV 5102(Z94806) 的遗传距离最近. 以 16S rDNA序列的相似性为划分属的标准, 属内相似性不低于 95%[18], 因此可以确定菌株GXLO 02 是隶属于*Rhizobium*属的种.

## 3　结论与讨论

随着对根瘤菌研究的深入, 人们发现根瘤菌具有丰富的多样性和与寄主关系的复杂性 [19]. 尽管如此, 迄今为止人们尚未发现豆科植物和榆科山黄麻植物以外的植物与根瘤菌的共生体系, 根瘤菌与裸子植物共生结瘤的研究也未见报道. 本研究中, 从裸子植物罗汉松及其变种小叶罗汉松根瘤中分离获得的大多数菌株具有根瘤菌的一般生理生化特性, 其代表菌株GXLO 02 不仅具有根瘤菌的一般生理生化特性, 回接宿主能产生与自然根瘤形态一致的根瘤, 同时采用 16S rDNA分析技术鉴定为根瘤菌, 说明罗汉松也能与根瘤菌形成共生体系.

根瘤的形成是一个非常复杂的过程, 需要共生双方的相互诱导与识别. 本研究结果表明, 根瘤菌与罗汉松植物之间存在某种相互识别和共生结瘤的机制. 但由于裸子植物与被子植物在细胞构造以及生理生化代谢上的不同, 根瘤菌与罗汉松植物之间的相互识别和共生结瘤的机制与豆科植物-根瘤菌的机制有何同异, 还有待进一步深入研究.

裸子植物是全球最大的木材生产的树种, 对全

表 2　GXLO 02 的 16S rDNA 全序列

| 菌　株 | 16S rDNA 全序列 |
|---|---|
| GXLO02 | TCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAAGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAG<br>GCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCTTTTGCTACG<br>GAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGCAAGAGATGAGCCCGCGTTGG<br>ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACT<br>GAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATACTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC<br>GTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTA<br>ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGAT<br>CGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAACTGCCTTTGATACTGTCGATCTGGAGTATGGAAAGAGGGTG<br>AGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACT<br>GGACGCTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGC<br>CGTCGGGCAGTATACTGTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCA<br>AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGA<br>CATCCTGTGTTACCCGTAGAGATATGGGGTCCACTTCGGTGGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC<br>GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACT<br>GCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAA<br>TGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACT<br>CGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC<br>CGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCTAACCACGGTAGGGTCAGCGAC<br>TGGGGTGAAGTCGTAACAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGC |

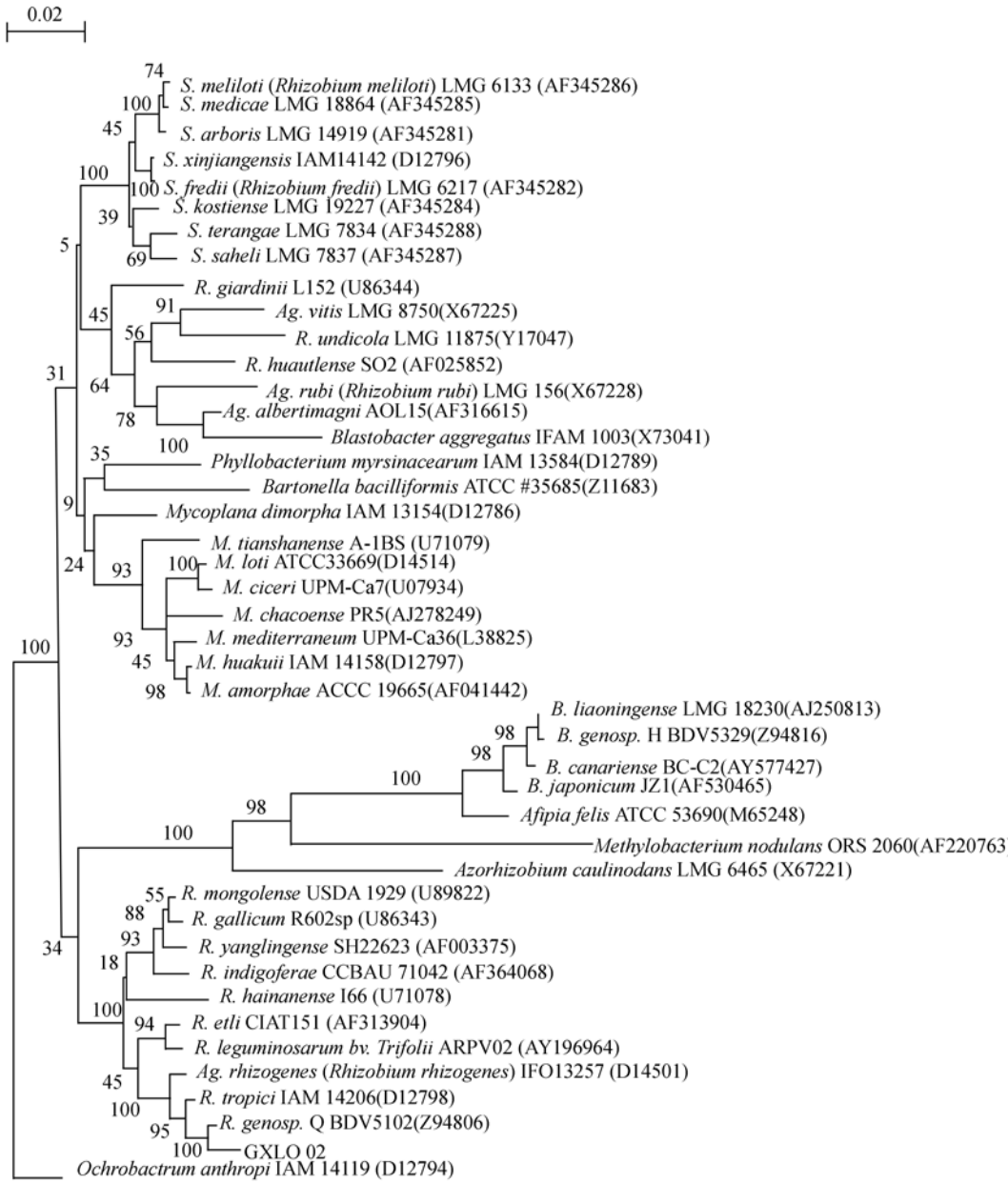


图 3 GXLO 02 与相关根瘤菌的系统发育树

球的生态环境影响巨大，本研究的发现，将有助于对裸子植物生物固氮的研究和利用．在植物学的分类系统中，裸子植物比被子植物在进化上更为古老，本实验从裸子植物罗汉松根瘤中分离出根瘤菌，还可能为根瘤菌的起源与进化的研究提供重要参考依据，将极大丰富根瘤菌研究领域的内容.

**致谢** 感谢中国农业大学生命科学学院陈文新院士和陈文峰老师对本文工作给予的指导和帮助.

## 参 考 文 献

1 Zsbrau H H. Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under sever conditions and in arid climate. Microbiol Mol Biol Rev,1999, (63): 968—989

2 Jordan D C. Rhizobiaceae Bergey's Manual of Systematic Bacriology. Vol Ⅰ. Baltimore: The Williams & Willikins Co, 1984. 234—256

3 Zhang X P, Chen Q, Li D Y, et al. The toxonomic position of peanutrhizobia. Acta Microbiol Sin, 1996, 36(3): 227—233

4 Sy A, Giraud E, Jourand P, et al. Methylotrophic *Methylobacte-*

*rium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. Journal of Bacteriology, 2001, 214—220

5 Boivin C, Ndoye I, Lortet G, et al. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. Sesbaniae can form stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 1040—1047

6 Pueppke S G, Broughton W J. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. Mol Plat-Microbe Interact, 1999, 12(4): 293—318

7 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, 37(1): 81—86

8 张海瑜, 张海予, 李小红, 等. 一株能在苜蓿上结瘤的费氏中华根瘤菌. 微生物学报, 2001, 41(2): 127—132

9 Trinick M J. Symbiotis between Rhizobium and nonlegume —— *Trema aspera*. Nature, 1973, 244: 459－460

10 Trinick M J. Structure of nitrogen —— fixing nodules formed by *Rhizobium* on crops of *Parasponia andersonii* Planch. Can J Microbiol, 1979, 25: 565－578

11 黄宝灵, 吕成群, 于新宁, 等. 几种罗汉松属植物根瘤的形态与结构. 广西植物, 2005, 25(3): 226—228

12 黄宝灵, 吕成群, 唐东阶, 等. 罗汉松根瘤内生细菌的分离和特性. 微生物学报, 2002, 42(5): 620—624

13 周德庆主编. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 14—32

14 东秀珠, 蔡妙英主编. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 353—363

15 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978. 111—133

16 上海植物生理学会编. 植物生理实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 239—330

17 Sambrook J, Fritsh F F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

18 谭志远, 陈文新. 根瘤菌新类群代表菌株的 16S rDNA 全序列测定及其系统发育地位. 微生物学报, 1997, 37(6): 411—416

19 Chen W X, Wang E T, Chen W F, et al. Biodiversity and phylogeny of rhizobial germplasm in China. Wang Y P, Lin M, Tian Z X, et al. eds. Biological Nitrogen Fixation, Sustainable Agriculture and the Environment. Proceedings of the 14th International Nitrogen Fixation Congress. Springer, 2005, 367—371