

# 新疆棉田土壤固氮菌遗传多样性分析

郑贺云 冯姝 李超 赵夏博 龚明福\*

(新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 塔里木大学生命科学学院 新疆 阿拉尔 843300)

**摘要:** 利用 ERIC-PCR 和 16S rDNA 全序列测定方法, 研究了新疆棉田土壤中分离获得的 58 株固氮菌的遗传多样性及系统发育。采用平均连锁法(UPGMA)分析 ERIC-PCR 的聚类结果表明在 Watson 距离为 0.65 左右时可以将供试菌株分为 9 个大群。选取 ERIC-PCR 各群中代表菌株进行 16S rRNA 全序列测定分析, 结果表明这些菌株分别属于 *Enterobacter*、*Bacillus*、*Acinetobacter*、*Pseudomonas*、*Serratia* 和 *Yersinia* 6 个属。

**关键词:** 连作棉田, 固氮菌, ERIC-PCR, 新疆, 遗传多样性

## Genetic Diversity Analysis of Nitrogen-fixing Bacteria in Cotton Soil of the South Xinjiang

ZHENG He-Yun FENG Shu LI Chao ZHAO Xia-Bo GONG Ming-Fu\*

(Xinjiang Production & Struction Corps Key Laboratory of Protection & Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

**Abstract:** To research the effect of nitrogen-fixing bacteria on grow of cotton, we used the technique of ERIC-PCR and 16S rDNA sequencing analysis to study genetic diversity of 58 nitrogen-fixing bacteria isolated from Tarim cotton soils in Xinjiang province. Cluster analysis was used for ERIC-PCR results of these strains by UPGMA. The results showed that the tested strains formed 9 clusters when the Waston distance was about 0.65. The typic strains of 9 clusters were identified as *Enterobacter*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Yersinia* by 16S rRNA sequencing analysis.

**Keywords:** Cotton field, Nitrogen-fixing bacteria, ERIC-PCR, Xinjiang, Genetic diversity

自生固氮菌是植物根际促生细菌的重要组成部分, 并且可以将大气中的  $N_2$  通过生物固氮作用供给植物生长, 提高植物对氮素的利用<sup>[1]</sup>。其研究始于 19 世纪末, 维诺格拉斯基于 1893 年分离出第 1 个厌气的自生固氮菌巴氏梭菌, 荷兰学者 Beijerinck 在 1901 年最先分离出好气性的自生固氮菌属的褐

球固氮菌<sup>[2]</sup>。到目前为止, 研究发现具有自生固氮能力的细菌有数十个种, 它们分属于不同的科属, 在不同气候条件下的土壤和水域中分布广泛。据报道, 土壤中自生固氮菌每年的固氮量为  $60 \text{ kg/hm}^2$ , 虽然与共生固氮体系相比, 其固氮量相对较低, 但它不需要与特定的植物配合, 同时具有资源总量大、分

基金项目: 国家 973 计划前期研究专项项目(No. 2007CB116303); 新疆生产建设兵团基础研究项目(No. 2007JC06); 新疆生产建设兵团科技攻关计划项目(No. 2006GG26)

\* 通讯作者: Tel: 86-997-4681612; 信箱: gongmingfu98@163.com  
收稿日期: 2009-11-15; 接受日期: 2010-02-05

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

布广泛、适应性强等特点,因此在天然生态系统,特别是贫瘠荒地的氮素循环中,自生固氮菌可能具有较为重要的作用。

ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus, 肠细菌基因间共有重复序列)是最初在部分革兰氏阴性菌基因组中发现的一个长度为 126 bp,以多拷贝形式存在的反向重复序列,是在对大肠杆菌基因的 3'端进行分析时被发现的<sup>[3]</sup>,命名为“基因间重复单位”(Intergenic repeat unit, IRU)。后来, Hulton 等<sup>[4]</sup>在实验中也发现了同样高度保守的重复序列,由于该序列主要存在于肠杆菌科,故称为“肠杆菌基因间重复共有序列”。

随着分子生物学技术的迅速发展,特别是聚合酶链式反应(PCR)技术的发展,出现了一系列的分子生物学分型方法,如质粒图谱、限制性核酸内切酶图谱、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、随机引物 PCR (RAPD)及 ERIC-PCR 等。它们主要是对微生物基因组 DNA 进行分析,从遗传进化的角度去认识微生物,从分子水平对它们进行分类与鉴定。以肠杆菌基因间重复共有序列为引物的聚合酶链式反应(Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction, ERIC-PCR)分型技术是根据肠杆菌基因间重复共有序列中的一段反向重复序列设计了一组引物进行 PCR 扩增,其独特、保守的位置使得这种 PCR 能产生多种独特的扩增产物,根据扩增产物的电泳条带来区分细菌的株(型)<sup>[5-7]</sup>。

塔里木盆地是中国最古老的内陆产棉区,光照条件好,热量丰富,能满足中、晚熟陆地棉和长绒棉的需要。昼夜温差大,有利于作物积累养分,又不利于害虫孳生,是中国优质棉种植的高产稳产区。塔里木盆地地域广阔,植棉业是新疆农业发展的主导产业和支柱产业,随着植棉效益增高,新疆棉花种植面积不断扩大,受诸多因素的制约,棉田与其它农作物倒茬困难,逐步形成了棉田连作。这种复杂而特殊的环境条件导致了该区域棉田土壤固氮菌在遗传型方面表现出丰富的多样性。利用 ERIC-PCR 研究其遗传多样性,利用 16S rRNA 全序列测序法确定其分类地位以及系统发育关系上的多样性特征,为丰富固氮菌多样性的基因库、优良菌株的选育提供种质资源具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

分离培养基采用阿须贝(Ashby)无氮培养基,培养液采用 TY 培养液,菌种保藏采用 PDA 综合培养基<sup>[8]</sup>。

### 1.2 棉田自生固氮菌的分离

土样采自新疆生产建设兵团农一师各团场不同连作年限棉田土壤。按十倍递减稀释法制备土壤稀释液<sup>[9]</sup>,涂布接种于 Ashby 平板上,倒置培养 3-5 d,根据单菌落的形态和颜色不同挑选菌株保存至 PDA 斜面上备用。

### 1.3 固氮菌的 ERIC-PCR 图谱分析

用改良 SDS 法提取自生固氮菌基因组总 DNA<sup>[10]</sup>,特异性引物选取、反应总体系及 ERIC-PCR 反应程序均参照马溪平等(2008)的方法<sup>[11]</sup>。反应结束后取出 PCR 小管,1%的琼脂糖凝胶电泳 3.5 h,利用凝胶成像系统仪拍照并保存图谱。凝胶图像经电脑扫描处理后,在同一位置有带的记为“1”,没有的记为“0”。采用 DPS 数据处理系统(V7.05 版)用 Watson 距离按类平均连锁聚类法(UPGMA)进行 0-1 系统聚类分析,得出树状图<sup>[12]</sup>。

### 1.4 固氮菌的 16S rRNA 序列测定及系统发育分析

16S rDNA 扩增引物采用 P1 和 P6<sup>[13]</sup>,由上海生工生物工程技术有限公司合成。供试菌株扩增产物由上海生工生物工程技术有限公司测序,将所测序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等公共数据库中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列,用 ClustalX 进行多序列比对,系统进化矩阵根据 Kimura 模型估算,用 MEGA4.0 (Molecular evolutionary genetics analysis) 软件采用邻接法(Neighbor-joining)聚类分析,并构建出系统发育树<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 自生固氮菌的 ERIC-PCR 图谱分析

从不同连作棉田中分离纯化得到 58 株供试菌株,对其进行 ERIC-PCR 扩增,图 1 为部分供试菌株 ERIC-PCR 扩增图谱。供试菌株 ERIC-PCR 图谱多呈现 5-14 条带,范围从 100-2500 bp 左右不等,表明这些菌株间存在明显的遗传差异。

采用平均连锁法(UPGMA)对这些菌株的 ERIC-PCR 结果进行聚类分析得到树状图(图 2),

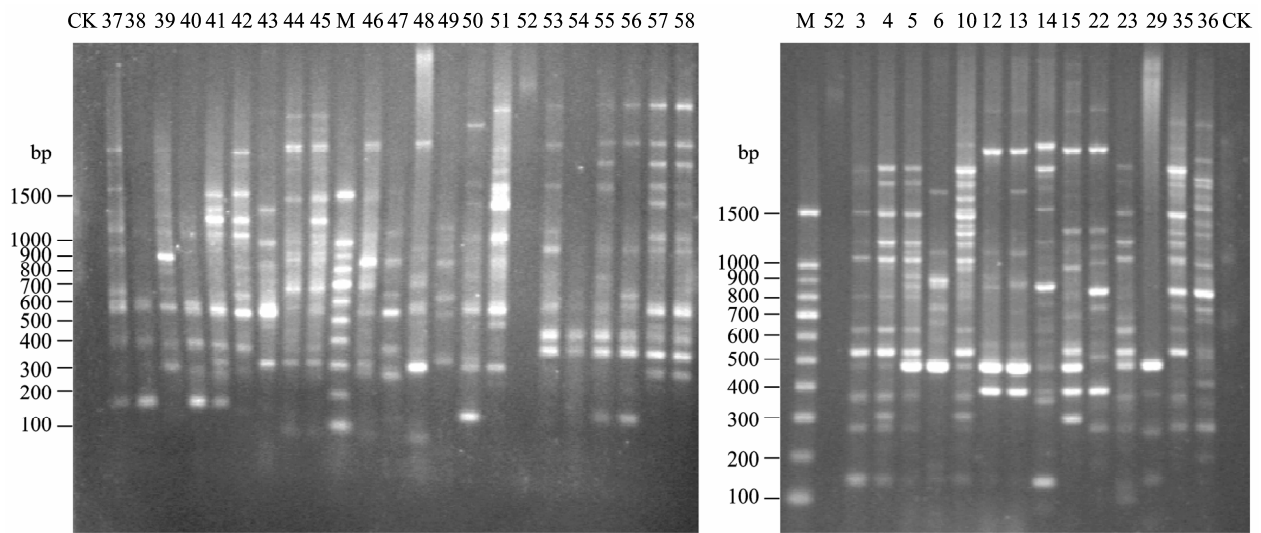


图 1 不同固氮菌的 ERIC-PCR 指纹图谱

Fig. 1 The ERIC-PCR fingerprints of different nitrogen-fixing bacteria

注: CK: 阴性对照; M: 100 bp ladder marker.  
Note: CK: Negative contro; M: 100 bp ladder marker.

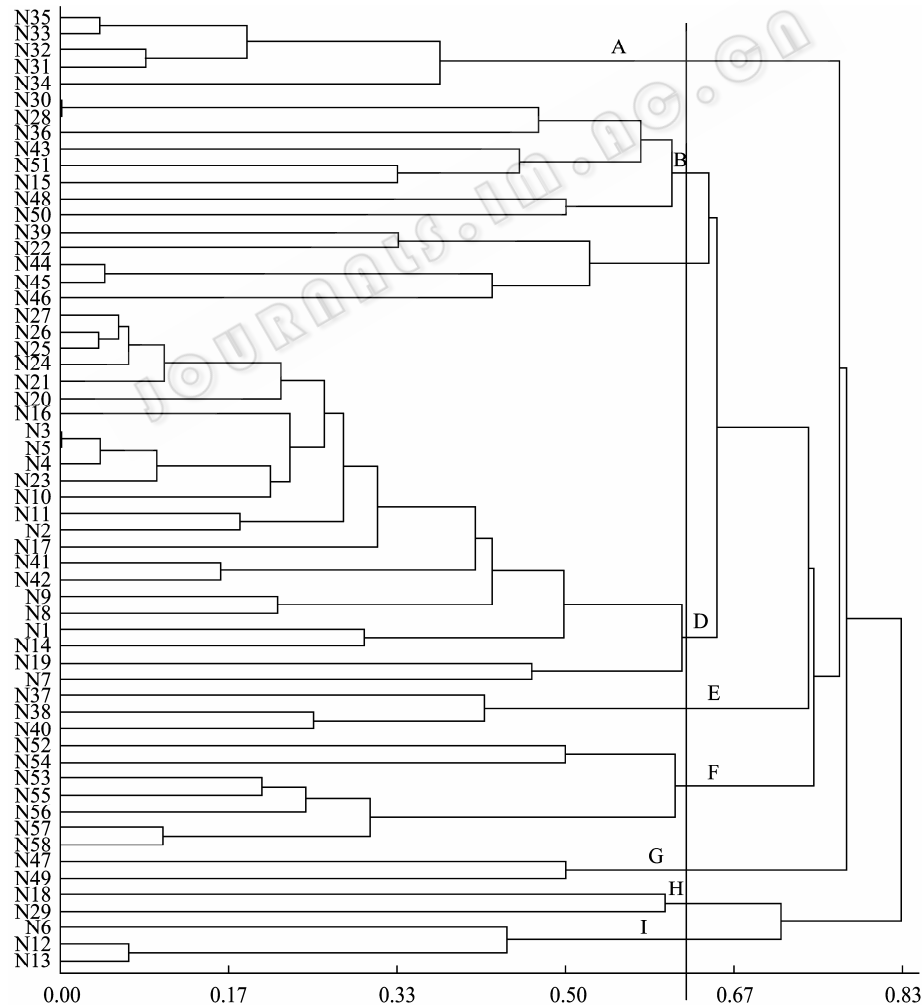


图 2 不同固氮菌的 ERIC-PCR 带型聚类分析树状图

Fig. 2 ERIC-PCR Dendrogram of tested aerobic self-nitrogen-fixing bacteria

注: N1–N58: 供试菌株; A–I: ERIC群编号; 0.01: 遗传距离。  
Note: Numbers from N1 to N58 were tested strains. Symbols from A to I were serial number of ERIC clusters. 0.01 denoted genetic distances.

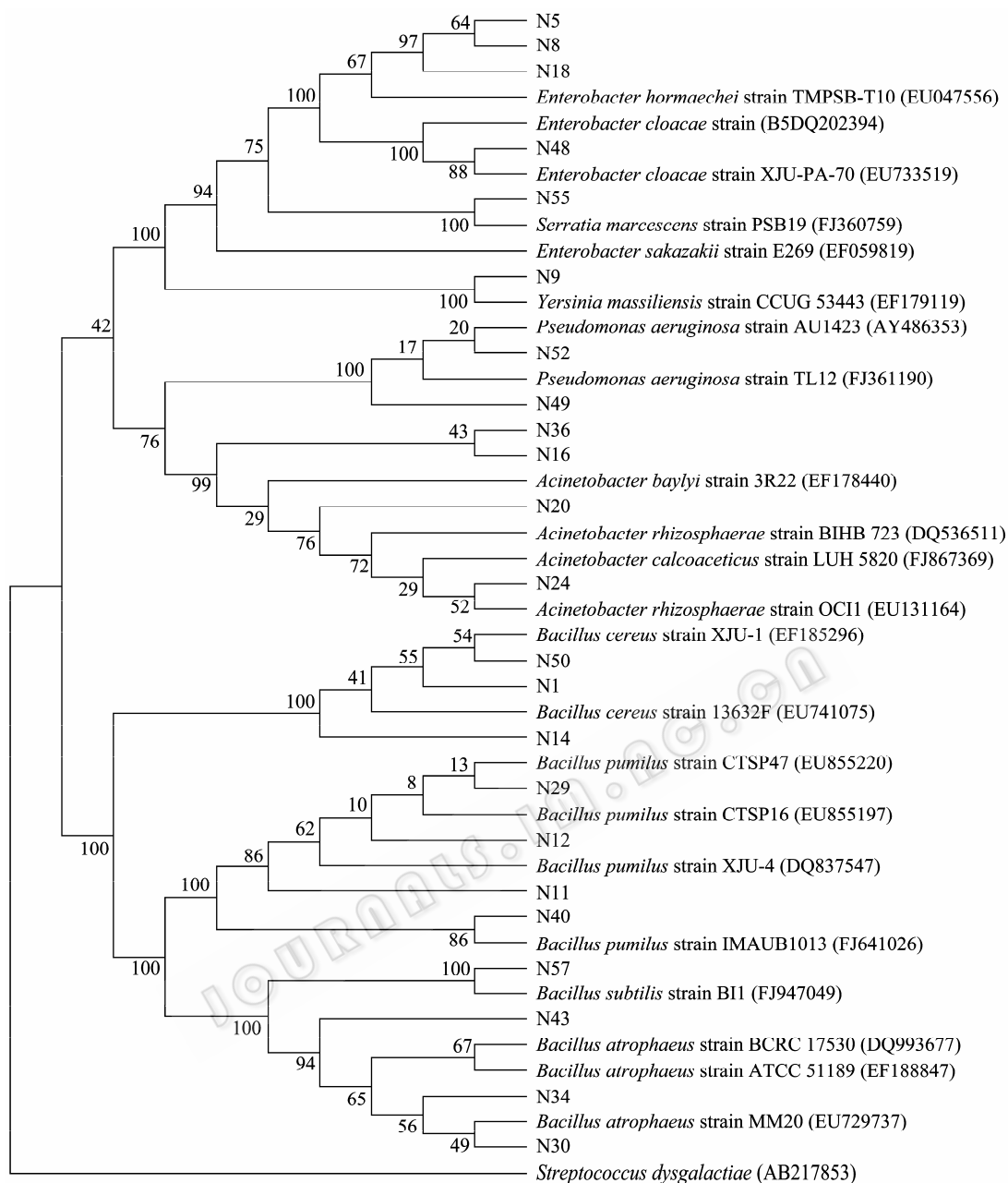


图 3 固氮菌 16S rRNA 全序列系统发育树状图

Fig. 3 Phylogenetic tree of tested nitrogen-fixing bacteria on the basis of 16S rRNA sequence

注: 图中分支上的数字表示树形可信度, 括号内为菌株名称和菌株。

Note: The figures on branch stand for the reliabilities, the numbers in the parenthesis are the strains number of the sequences.

在  $D = 0.83$  时将所有供试菌株聚在一起,  $D = 0.65$  时供试菌株进一步被划分为 9 个 ERIC 群, 分别命名为 A、B、C、D、E、F、G、H、I, 每个群的菌株数分别为 5、8、5、23、3、7、2、2、3。

## 2.2 共生固氮菌的系统发育分析

26 个菌株的 16S rRNA 全序列用 MEGA4.0 软件中的邻接法构建了系统发育树(见图 3)。供试菌株和与其相似性很高的已知菌株可以分为

*Enterobacter*、*Bacillus*、*Acinetobacter* 和 *Pseudomonas* 4 个分支, 包括 *Enterobacter*、*Bacillus*、*Acinetobacter*、*Pseudomonas*、*Yersinia* 和 *Serratia* 6 个属。

供试菌株 N11、N29、N12、N14、N40、N30、N34、N43、N50、N57、N1 共同构成芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 发育分支; N11、N29、N12、N40 与短小芽孢杆菌亲缘关系较近; N57 与参比菌株枯草芽孢杆菌亲缘关系较近, N30、N34、N43 与萎缩芽孢杆

菌聚为一个小的分支, N14、N50、N1 与蜡状芽孢杆菌聚在一个小分支内; 供试菌株 N52 和 N49 共同归属假单胞菌属(*Pseudomonas*); N9 为耶尔森氏菌属(*Yersinia*); N55 为沙雷氏菌属(*Serratia*); N5、N18、N48、N8 共同归属于肠杆菌属(*Enterobacter*); N36、N16、N20、N24 共同归属于不动杆菌属(*Acinetobacter*)。供试菌株在系统发育树中以芽孢杆菌属为主, 其次是肠杆菌属和不动杆菌属。

### 3 结论与讨论

分离自新疆生产建设兵团农一师不同团场棉田土壤中的 58 株固氮菌可以分为 9 个 ERIC 群, 分属于 *Enterobacter*、*Bacillus*、*Acinetobacter*、*Pseudomonas*、*Yersinia* 和 *Serratia* 6 个属, 说明棉田土壤中自生固氮菌遗传多样性较为丰富。这些固氮菌确切的分类地位还需要结合菌株的生理生化特征及与已知菌株间的分子杂交来进行确认。

新疆棉田中固氮菌的数量随棉花生育期不同变化较大, 在花铃期为最高, 在苗期最低<sup>[15]</sup>, 这种变化规律是否与固氮菌在新疆棉田特殊微生态环境中固氮作用方式有关? 新疆连作棉田丰富的固氮菌中哪些种类的固氮菌能在棉田微生境中较好地发挥固氮作用? 除了固氮作用之外, 是否存在其他方式促进棉花生长? 这些问题的解决对建立健康、平衡的棉田微生态系统, 促进新疆棉花可持续生产有重要意义, 有必要进一步深入研究。

本实验对从棉田土壤中分离到的固氮细菌分离物直接采用 ERIC-PCR 的方法, 在分子水平上进行分类并通过 16S rRNA 序列测定加以鉴定, 结果比常规的生理生化鉴定方法准确, 检测速度快, 节省了实验时间。

### 参 考 文 献

[1] 陈晓琴, 陈强, 张世熔. 流沙河流域土壤自生固氮菌数值分类及 BOX-PCR 研究. 农业环境科学学报, 2006,

25(增刊): 528-532.

- [2] 陈晓琴. 流沙河流域土壤自生固氮菌生物多样性研究. 四川农业大学硕士论文, 2007.
- [3] Sharples GJ, Lloyd RG. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res*, 1990(18): 6503-6508.
- [4] Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: A novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol*, 1991, 5(4): 825-830.
- [5] 栾敏. 土壤自生固氮菌的分离鉴定及生物固氮与促进植物生长. 南京农业大学硕士论文, 2007.
- [6] 高平平, 赵义, 赵立平. 焦化废水处理系统微生物群落结构动态的 ERIC-PCR 指纹图谱分析. 环境科学学报, 2003, 26(6): 705-710.
- [7] 姚美玲. ERIC-PCR 对畜禽舍气载耐药大肠杆菌来源及向周边环境传播的检测. 山东农业大学硕士论文, 2007.
- [8] 陈晶, 杨海凌, 陈向东. 自生固氮菌的生态分布及其对农药抗性的研究. 氨基酸和生物资源, 2009, 31(1): 19-24.
- [9] 沈萍, 范秀荣, 李广武, 等. 微生物实验. 北京: 高等教育出版社, 1996.
- [10] 张执新. 西北干旱半干旱地区甘草根瘤菌遗传多样性研究. 西北农林科技大学硕士论文, 2006.
- [11] 马溪平, 邱媛, 徐成斌, 等. 制药废水处理系统微生物群落动态变化的 ERIC-PCR 指纹图谱分析. 辽宁大学学报, 2008, 35(2): 158-161.
- [12] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统: 实验设计, 统计分析与数据挖掘. 北京: 科学出版社, 2007.
- [13] 余建福, 韦革宏, 丁小平, 等. 陕西太白尾矿废弃地豆科植物根瘤菌 16S rDNA PCR-RFLP 及全序列分析. 西北植物学报, 2007, 27(3): 502-508.
- [14] 关统伟, 赵珂, 夏占峰, 等. 新疆于田盐池放线菌群落结构. 微生物学通报, 2009, 36(4): 515-521.
- [15] 龚明福, 赵夏博, 郑贺云, 等. 南疆连作棉田几种有益细菌的动态变化规律. 微生物学通报, 2009, 36(4): 505-510.