

云南省德宏州含羞草 β -根瘤菌多样性及系统发育研究

刘晓云* 张芬 刘庆辉 郭晓叶 戴燕燕 王易鹏 刘桂霞

(河北大学 生命科学学院 河北省微生物多样性研究与应用重点实验室 河北 保定 071002)

摘 要: 【目的】通过对分离自云南德宏州的含羞草 β -根瘤菌进行遗传与表型多样性研究, 揭示我国含羞草 β -根瘤菌的物种多样性。【方法】应用 16S rDNA PCR-RFLP、全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳及 16S rDNA 全序列分析对分离得到的 60 株含羞草根瘤菌进行多样性研究。【结果】16S rDNA PCR-RFLP 及全细胞蛋白 SDS-PAGE 图谱分析将供试菌株分为 2 个遗传型群和 2 个表型群, 分别与贪铜菌属(*Cupriavidus*)和伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)参比菌株聚群。经 16S rDNA 全序列分析, 供试菌株被归到台湾贪铜菌(*Cupriavidus taiwanensis*)、含羞草伯克霍尔德菌(*Burkholderia mimosarum*)及结瘤伯克霍尔德菌(*Burkholderia phymatum*)等 3 个种群。【结论】云南德宏州的含羞草 β -根瘤菌主要为贪铜菌及伯克霍尔德菌类群, 其中贪铜菌占绝对优势, 且存在遗传和表型的丰富多样性, 该研究揭示了含羞草 β -根瘤菌的物种多样性并丰富了我国 β -根瘤菌菌种资源。

关键词: 根瘤菌, 遗传多样性, 16S rDNA PCR-RFLP, SDS-PAGE, 系统发育

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2011BAD17B04); 国家自然科学基金项目(No. 30570001)

*通讯作者: Tel: 86-312-5079696; 信箱: liuxiaoyunly@126.com

收稿日期: 2012-04-27; 接受日期: 2012-07-04

β -Rhizobia associated with *Mimosa* spp. from Dehong district of Yunnan province analyzed by 16S rDNA PCR-RFLP and SDS-PAGE

LIU Xiao-Yun* ZHANG Fen LIU Qing-Hui GUO Xiao-Ye
DAI Yan-Yan WANG Yi-Peng LIU Gui-Xia

(College of Life Sciences, Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: [Objective] Genetic and phenotypic diversity of β -rhizobia associated with *Mimosa* spp. in Dehong district of Yunnan province were performed to revealed the diversity of rhizobial resources in China. [Methods] 60 isolates were analyzed by 16S rDNA PCR-RFLP, total cell protein SDS-PAGE analysis and 16S rDNA sequencing. [Results] All the isolates were clustered two genetic groups and two phena groups respectively, by characterizing 16S rDNA PCR-RFLP and SDS-PAGE analysis. The strains in each group are in coinciding with between two methods. All strains clustered with type strain of *Cupriavidus*, and *Burkholderia*. From the phylogenetic tree of 16S rDNA sequence, the test strains were belonged to the species of *Cupriavidus taiwanensis*, *Burkholderia mimosarum* and *Burkholderia phymatum*. [Conclusion] At present study, we find that β -rhizobium from Dehong district were belonged to *Cupriavidus* and *Burkholderia* mainly. The *Cupriavidus* spp. were predominated in these strains. These records showed the diversity of Rhizobium from *Mimosa* spp. and enriching resources of β -rhizobium in China.

Keywords: Rhizobia, Genetic diversity, 16S rDNA PCR-RFLP, SDS-PAGE, Phylogeny

含羞草(*Mimosa* spp.)隶属于豆目(Fabales)、豆科(Fabaceae)、含羞草亚科(Mimosoideae), 为多年生草本植物, 原产自美洲热带地区, 在我国大陆多见于海南、云南、广西、福建等热带、亚热带地区。开花期为7-9月, 花呈粉红色, 较鲜艳, 可作为观赏植物; 另外, 含羞草也可用做药治疗蚊虫叮咬、风湿等病症^[1-2]。2001年9月, 台湾地区学者陈文明发表了分离自含羞草植物的 β -纲根瘤菌^[3], 继台湾诺尔斯通菌(*Ralstonia taiwanensis*)之后, Chen、Vandamme 及 Barrett 等学者对 *M. pudica*、

M. diplotricha、*M. bimucronata*、*M. scabrella*、*M. casta* 和 *M. pigra* 等含羞草类植物的根瘤菌做了大量系统研究^[4-7]。研究一致发现, β -纲根瘤菌是与含羞草共生的优势类群, 其他如根瘤菌属(*Rhizobium*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)和中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)也与含羞草共生, 但均处于劣势。与含羞草共生的 β -纲根瘤菌隶属伯克霍尔德菌(*Burkholderia*)和贪铜菌(*Cupriavidus*), 这两个属的分布较有差异。伯克霍尔德菌是分离自巴西含羞草唯一共生的类群^[8], 比较其他研究,

随着采集地点纬度的增加, 巴西以北, 开始出现贪铜菌, 如来自哥斯达黎加岛、美国萨克斯州及我国台湾的研究^[4-7], 而且较伯克霍尔德菌(*Burkholderia*)逐步占据优势。不同的含羞草种类, 与其共生的 β -纲根瘤菌类群也有差异, 如中华根瘤菌属仅发现于含羞草(*Mimosa pudica*), 而含羞树(*M. pigra*)仅分布有伯克霍尔德菌。由于 β -纲根瘤菌是新发现的物种, 备受研究者关注和根瘤菌分类学者的重视, 因此与含羞草共生的根瘤菌得到了广泛研究。近年来其基因组测序研究已大规模开展, 台湾贪铜菌(*Cupriavides taiwanensis*)的全基因组序列给研究者展示了一个全新的简约化的共生基因结构, 而其他 β -纲根瘤菌的测序工作也在紧张进行之中。研究 β -纲根瘤菌, 不仅可以探究其存在的物种多样性, 还有望揭示其共生机制, 为非豆科植物固氮体系的构建提供科学依据。富有全世界生物多样性 50% 的中国, 具有优越的含羞草资源, 但与其共生的根瘤菌没有得到很好的研究, 仅有笔者前期对我国云南西双版纳含羞草根瘤菌的研究, 发现 β -纲根瘤菌是含羞草共生的主要类群^[9]。截至目前, 尚无系统的中文报道揭示这一特殊根瘤菌类群在我国的分布。

笔者在对云南含羞草根瘤菌的研究中, 获得较多含羞草根瘤菌菌株, 对分离自德宏的含羞草根瘤菌已进行了部分菌株的系统发育和种群组成及分布研究^[10], 但尚未对其他菌株及表型多样性及系统发育进行研究, 为了进一步揭示分离自德宏地区的含羞草根瘤菌的物种多样性, 并比较其他地区含羞草根瘤菌的多样性特征, 本研究选择分离自德宏州的 60 株含羞草根瘤菌进行多样性的分析和系统发育研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

分离自云南德宏州的含羞草根瘤菌 60 株, 参

比菌株 6 株, 分别隶属于贪铜菌属(*Cupriavidus*)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)和根瘤菌属(*Rhizobium*)。菌株信息见图 1。

1.2 试验方法

1.2.1 16S rDNA PCR-RFLP 分析: 收集菌体, 采用 GUTC 法^[11]提取基因组 DNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 样品贮藏于 -20°C 。根据 *Escherichia coli* 16S rRNA 基因序列保守区设计^[4], 选用引物对 fD1、rD1, 其序列如下:

正向引物 fD1: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCT CAG-3';

反向引物 rD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGC C-3'。

采用 *Hae* III (5'-GG/CC-3')、*Hinf* I (5'-G/ANTC-3')、*Msp* I (5'-C/CGG-3')和 *Alu* I (5'-AG/CT-3') 4 种限制性内切酶分别对供试菌株的 16S rDNA PCR 产物进行酶切, 酶切产物于 2% 的琼脂糖凝胶(含 EB)电泳(电压 5 V/cm) 2-3 h, 电泳结束后在紫外凝胶成像仪扫描照相并保存照片。

1.2.2 SDS-PAGE 电泳分析: 收集菌体, 煮沸法制备蛋白样品, 根据提取菌体的重量配制成样品浓度为 40 g/L, 沸水 20 min, -20°C 保存备用。采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶不连续电泳, 其中浓缩胶 3%, 分离胶 15%。电泳后, 采用银染法^[12]染色, 染色完毕后照相保存照片备用。

1.2.3 16S rDNA 全序列分析: 模板的制备及 16S rDNA PCR 扩增均同 16S rDNA PCR-RFLP 分析, 扩增产物经检测后, 送华大基因测序公司进行 16S rDNA 测序。

2 结果分析

2.1 16S rDNA PCR-RFLP 结果分析

所有供试菌株, 经 *Hae* III、*Hinf* I、*Msp* I 和 *Alu* I 4 种酶切分别获得了 4、2、4 和 3 种酶

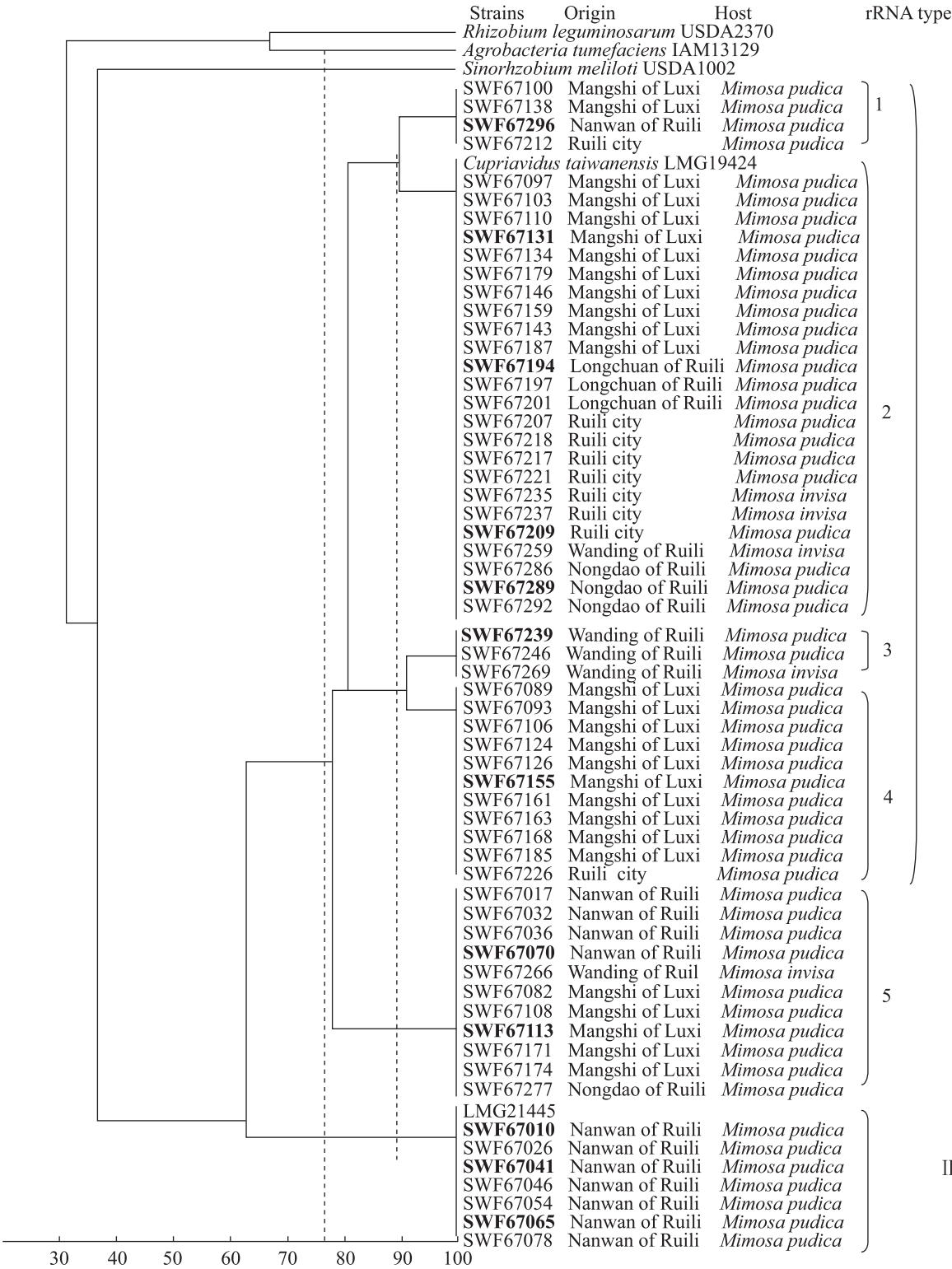


图 1 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析树状图

Fig. 1 The dendrogram of tested strains and reference strains based on 16S rDNA PCR-RFLP

图注：标尺为相似性。

Note: Yardstick for similarity.

切图谱; 菌株经 4 种酶切得到的 4 种不同的酶切图谱组合称为一个 16S rDNA 遗传图谱类型(16S rDNA type), 全部供试菌株共有 10 种 16S rDNA 遗传图谱类型。根据不同菌株间酶切图谱的差异, 将各类型的 16S rDNA PCR-RFLP 图谱转换为“1”和“0”的二元数据, 并采用 UPGMA 方法进行聚类分析, 得到所有供试菌株的聚类树状图, 见图 1。

从图 1 中可以看出全部供试菌株在 78% 的相似水平上可分为两群; 群 I 包括 SWF67100 等 53 株根瘤菌及贪铜菌属(*Cupriavidus taiwanensis*)的参比菌株 LMG 19424^T。该群在 92% 的相似性水平上分为 5 个亚群。第 II 群包括 SWF67010 等 7 株根瘤菌及伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)的参比菌株 *Burkholderia phymatum* LMG 21445^T。

2.2 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳结果分析

将供试菌株的蛋白电泳条带转换为“1”和“0”的二元数据, 并采用 UPGMA 方法进行聚类分析, 得到所有供试菌株的聚类树状图(图 2)。

从图 2 中可以看出, 所有供试菌株在 84% 的相似性水平上聚为 2 个群。群 I 为包括 5 个不同遗传型的 *Cupriavidus* 群, 而群 II 为 *Burkholderia* 类群, 该聚群结果与 16S rDNA-RFLP 分析相同, 说明供试菌株中种群单一。*Cupriavidus* 群在 95% 的水平上分为 5 个群, 以 16S rDNA-RFLP 的 5 个群而聚群。群 1 为分离自云南省瑞丽市畹町地区的 SWF67269 等 3 株供试菌株, 为 16S rDNA-RFLP 分析中遗传亚群 3; 群 2 包括 SWF67209 等 23 株供试菌株, 为 16S rDNA-RFLP 分析中遗传亚群 2, 它们分别分离自云南瑞丽畹町、瑞丽市及瑞丽陇川、云南潞西芒市等地区; 群 3 包括 SWF6738 等 4 株供试菌株和台湾贪铜菌属(*Cupriavidus taiwanensis*)的参比菌株 LMG19424, 为 16S rDNA-RFLP 分析中遗传亚群 1, 供试菌主要来自于自云南潞西芒市; 群 4 包括 SWF67168 等 12 株供试菌株, 为 16S rDNA-RFLP 分析中遗传亚群 4, 主要分离自云南潞西芒市; 群 5 包括

SWF67017 等 11 株供试菌株, 为 16S rDNA-RFLP 分析中遗传亚群 5, 主要分离自瑞丽南畹, 畹町、芒市和弄岛。

群 II 为 *Burkholderia* 类群, 包括 SWF67010 等 7 株供试菌株及伯克霍尔德菌属的参比菌株 *Burkholderia phymatum* LMG 21445^T, 虽然群内菌株的蛋白图谱相似性高, 但也具有 6 个蛋白类型, 在 95% 相似水平上聚为一群, 可能为同一种群。

2.3 16S rDNA 全序列分析

以 16S rDNA 多态性的分析为基础, 选择不同聚群和不同采集点的代表菌株 SWF67041、SWF67070、SWF67010、SWF67065、SWF67209、SWF67289、SWF67239、SWF67194、SWF67155、SWF67131、SWF67113 和 SWF67296 共 12 株(图 1 中粗体标注)进行 16S rDNA 全序列测序, 序列提交 GenBank, 获得序列号分别为 JQ900242-JQ900252 和 FJ947097。采用邻接法进行系统发育树的构建, 见图 3。

由图 3 可知, 供试菌株分别聚到 3 个系统发育群中, 来自于瑞丽南畹河的菌株 SWF67010 与瘤状伯克霍尔德菌(*Burkholderia phymatum* STM815^T)序列相似性达到 99.9%; 菌株 SWF67041 和 SWF67065 两株菌序列相似 100%, 与含羞草伯克霍尔德菌(*Burkholderia mimosarum*)相似性为 100%, 也来自于瑞丽南畹河; 来自于潞西芒市、瑞丽市和瑞丽畹町的 4 株菌株 SWF67113、SWF155、SWF67239 和 SWF67209 与台湾贪铜菌(*Cupriavidus taiwanensis*)菌株 LMG19424^T序列相似性达到 100%, 而来自于瑞丽南畹、瑞丽弄岛、潞西芒市和瑞丽陇川的 SWF67070、SWF67296、SWF67289、SWF67131 和 SWF194 等 5 株菌与台湾贪铜菌(*Cupriavidus taiwanensis*)菌株 LMG19425 相似性达到 99.9%。因此, 德宏含羞草根瘤菌主要为 β -根瘤菌类群, 与以上 3 个 β -根瘤菌种群具有较近的亲缘关系。

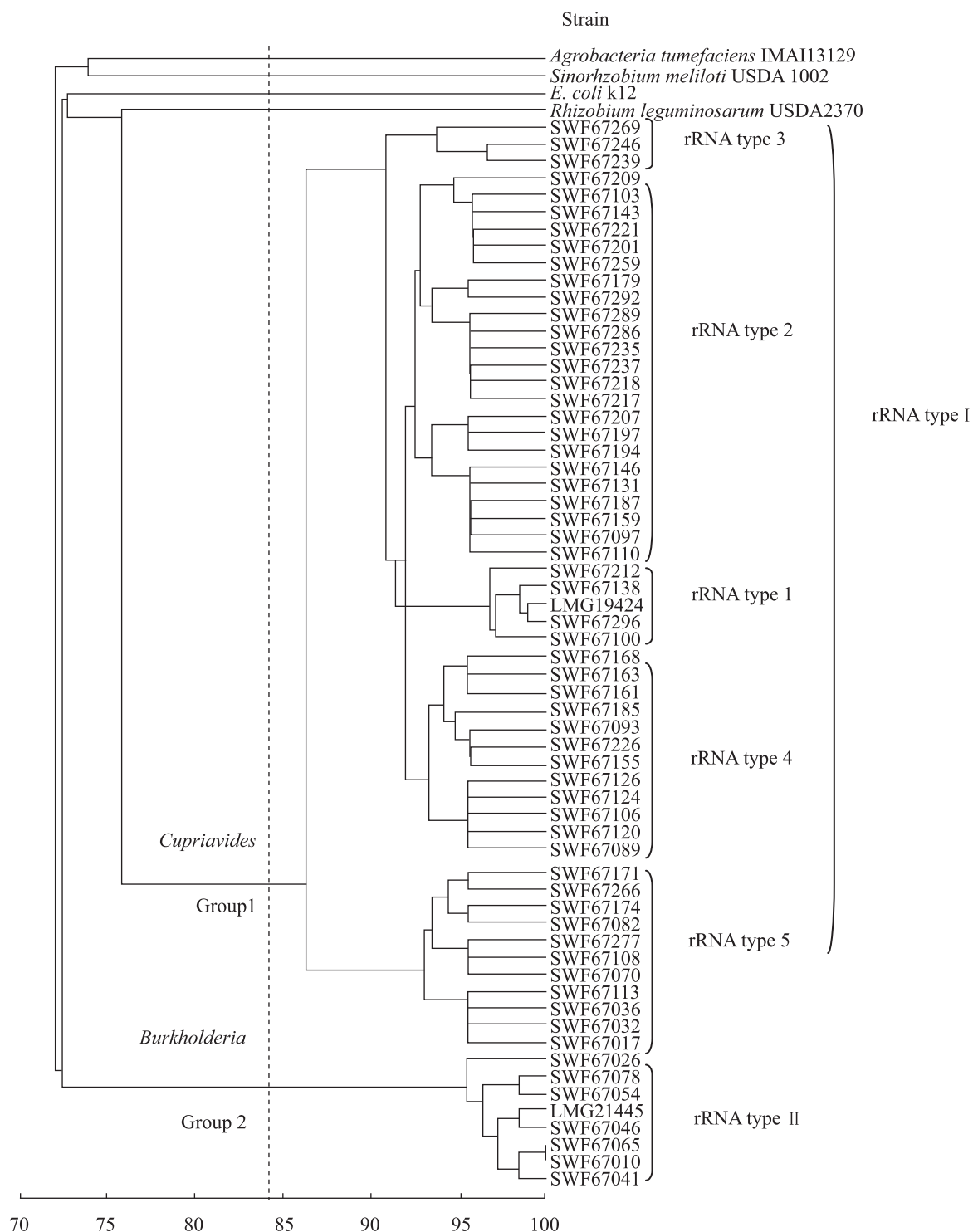


图 2 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳聚类分析树状图

Fig. 2 The dendrogram of tested strains and reference strains based on SDS-PAGE

图注: 标尺为相似性。

Note: Yardstick for similarity.

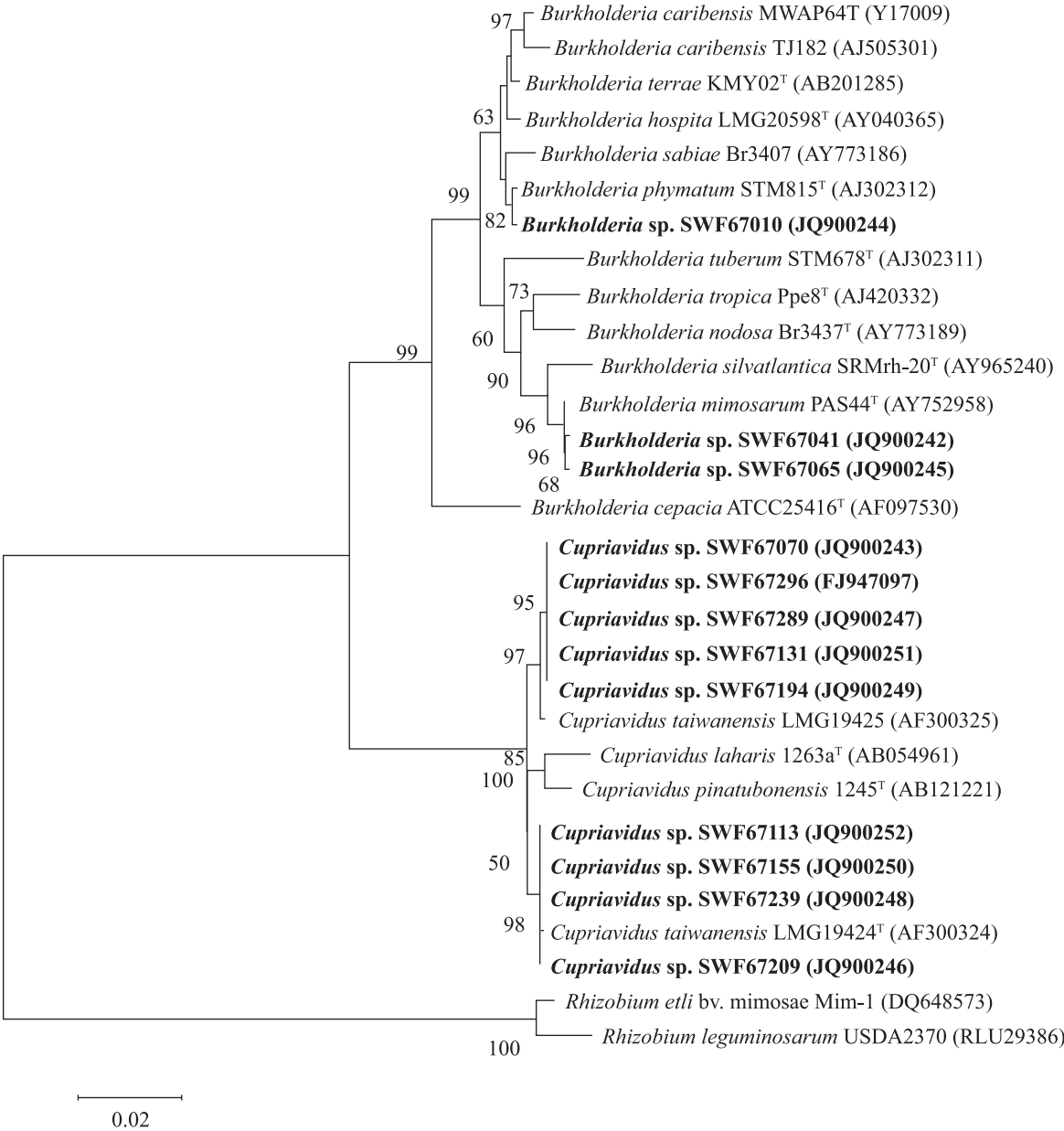


图3 以 16S rDNA 序列为基础建立的系统发育树图

Fig. 3 The dendrogram of tested strains and reference strains based on 16S rDNA sequence

图注: 标尺为遗传距离; 分支点数字为自举值; 括号内为该菌株 GenBank 序列号.

Note: Yardstick for genetic distance. Branch point number for bootstrap. GenBank serial numbers are shown in brackets.

3 结论与讨论

3.1 讨论

研究采用 16S rDNA 多态性、全细胞蛋白指纹图谱和 16S rDNA 序列分析对供试菌株进行研

究, 3 种方法所获结果较为一致。16S rDNA 多态性和全细胞蛋白指纹图谱分析均将供试菌株仅分为两群, 每一群内的菌株在两种方法中也比较一致, 说明属群内的种群较为单一, 但 16S rDNA 多态性分析在属群水平上, 全细胞蛋白图谱分析

在种群或菌株水平上。贪铜菌在属群的划分上聚为一群,具有 5 个不同的遗传类型,这 5 个类型在种群相似性 84%的水平上又聚在一起,说明可能为一个种群,现今有关含羞草 β -根瘤菌的种群研究发现,分离自含羞草归属于贪铜菌属的根瘤菌仅有一个种群,即台湾贪铜菌属(*Cupriavidus taiwanensis*)。根据测序结果,也可知该种群与台湾贪铜菌的序列相似性为 100%,进一步验证了分型结果。供试菌株中的伯克霍尔德菌在全细胞蛋白及 16S rDNA 多态性分析中,也聚为一群,但却与测序结果有差异。测序结果表明,伯克霍尔德菌分别与该属内的两个根瘤菌种的序列相近,这可能是由于这两个种的表型特征较为相似。此外,全细胞蛋白分析只是提供可能存在的种群,还需要依赖其他的方法进行验证。因此除了初步分群之外,还需要序列分析,或者进一步进行 DNA 同源性分析才能最终确定菌株所处的分类地位。

本研究揭示了 β -根瘤菌是来自德宏州含羞草根瘤的主要类群,该结果与世界上其他地区的含羞草根瘤菌种群分布类似,说明 β -根瘤菌是热带、亚热带地区含羞草根瘤菌的主要类群。 α -根瘤菌在本研究中未被发现,在我国西双版纳州含羞草根瘤菌的研究中有少量出现^[12],而世界其他地区也多有发现,但均处于与含羞草共生的根瘤菌的种群劣势地位,如 Chen 等^[4]和 Barrett 等^[7-8]的研究。 β -根瘤菌的两个类群在德宏州的分布也存在差异,在几个根瘤采样地点中,伯克霍尔德菌均来自于瑞丽南畹;来自我国西双版纳的研究也表明,伯克霍尔德菌在西双版纳的分布没有贪铜菌属广。纵观含羞草根瘤菌种群的研究发现,贪铜菌属根瘤菌较伯克霍尔德菌分布更为广泛,通过土壤指标对含羞草根瘤菌不同种群结瘤能力的研究,发现在土壤低氮条件下,伯克霍尔德属根瘤菌具有更强的竞争结瘤能力^[13],说明土壤

营养元素含量对根瘤菌不同种群的分布具有较大的影响。

β -根瘤菌主要分离自含羞草类植物,但研究者也同时发现 β -根瘤菌还可以与含羞草科的阿拉豆、落腺豆木、银合欢和牧豆树结瘤,也可与蝶形花科的披针叶黄花、锦鸡儿、大翼豆及澳洲珊瑚豆、相思树和鹿藿属等多种豆科植物共生^[14-15];新近研究还发现瘤状伯克霍尔德菌(*B. phymatum*)与菜豆(*P. vulgaris*)能够结瘤^[16],因此有关 β -根瘤菌的共生演化引起研究者巨大的兴趣,通过共生基因序列分析发现 β -根瘤菌的结瘤和固氮基因具有不同的来源,与 α -根瘤菌具有较近的亲缘关系^[10,17]。随着 β -根瘤菌的研究扩展,可望进一步揭示 β -根瘤菌的进化问题。

3.2 结论

本研究中待测菌株归属到 β -变形杆菌纲的贪铜菌属(*Cupriavidus*)和伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*),其中归到贪铜菌属的菌株具有 5 个遗传类型和 5 个表观类型;而伯克霍尔德菌属的菌株之间遗传图谱及蛋白表型非常接近,与瘤状伯克霍尔德菌(*Burkholderia phymatum*)和含羞草伯克霍尔德菌(*Burkholderia mimosarum*)亲缘关系近。

根据供试菌株的种群数量特征,说明云南德宏州分布的含羞草 β -根瘤菌以贪铜菌属为主要种群,而伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)次之。

参 考 文 献

- [1] 陈德昭,吴德邻,陈邦余,等. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 15-16.
- [2] 李良. 神秘奇趣含羞草[J]. 西南园艺, 2002(2): 48.
- [3] Chen WM, Laevens S, Lee TM, et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient[J]. International Journal of Systematic and

- Evolutionary Microbiology, 2001, 51(5): 1729–1735.
- [4] Chen WM, Moulin L, Bontemps C, et al. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(24): 7266–7272.
- [5] Chen WM, James EK, Chou JH, et al. β -Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan[J]. New Phytologist, 2005, 168(3): 661–675.
- [6] Barrett CF, Parker MA. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2005, 28(1): 57–65.
- [7] Barrett CF, Parker MA. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 1198–1206.
- [8] Bontemps C, Elliott GN, Simon MF, et al. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes[J]. Molecular Ecology, 2010, 19(1): 44–52.
- [9] Liu XY, Wu W, Wang ET, et al. Phylogenetic relationships and diversity of β -rhizobia associated with *Mimosa* species grown in Sishuangbanna, China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(2): 334–342.
- [10] Liu XY, Wei S, Wang F, et al. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in Southern China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 80(2): 417–426.
- [11] 陈强, 张小平, 李登煜, 等. 用 AFLP 技术检测慢生型花生根瘤菌竞争结瘤的研究[J]. 生态学报, 2003, 23(10): 2189–2194.
- [12] 郭尧军. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(1): 32–37.
- [13] Geoffrey N, Elliott, Chou JH, et al. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions[J]. Environmental Microbiology, 2008, 11(4): 1462–2920.
- [14] Garau G, Yates RJ, Deiana P, et al. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(1): 125–134.
- [15] Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, et al. Legumenodulating betaproteobacteria: diversity, host range and future prospects[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24(11): 1276–1288.
- [16] Talbi C, Delgado MJ, Girard L, et al. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(13): 4587–4591.
- [17] Chen WM, de Faria SM, Stralioetto R, et al. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa* nodulating strains from South America[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7461–7471.