

尖峰岭抗逆性根瘤菌的筛选及其 16S rDNA 序列的测定

彭玉红¹, 焦如珍^{1*}, 牟新涛^{2**}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091;

2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

摘要: 为了探讨木本豆科植物根瘤菌对不良环境的抵抗能力, 对分离自海南尖峰岭国家自然保护区的 9 株根瘤菌进行了初步研究。结果发现: 9 株根瘤菌最适生长 pH 值均为 7, 最适 NaCl 含量均为 $10.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 菌株 CAF224 的最适生长温度为 37°C , 菌株 CAF416、CAF438 和 CAF279 的最适温度为 20°C 和 28°C , 其余 5 株为 28°C 。9 株根瘤菌均可在 pH 值 4 和 11、 $20.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl、 37°C 条件下生长, 其中 CAF224 和 CAF276 菌株耐受 pH 值 3; CAF226 可以在 $40.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl 培养基中生长; CAF276 可耐受 20 min 50°C 、10 min 60°C 高温。不同宿主、不同生态条件下的根瘤菌株具有不同的抗逆性, 通过综合分析, 筛选出 4 株高抗菌株 (CAF226、CAF276、CAF224、CAF414)。16S rDNA 序列系统发育分析表明: 9 菌株在系统进化树上与 GenBank 中序列号为 EF054889 的 *Rhizobium tropici* Clone H12 (热带根瘤菌) 聚为一族, 相似度为 99.4%, 初步确定 9 株根瘤菌为热带根瘤菌。

关键词: 尖峰岭; 耐盐性试验; pH 范围; 抗逆性; 16S rDNA 序列; 热带根瘤菌

中图分类号: S711

文献标识码: A

A Preliminary Study on Screening Adversity Resistance of *Rhizobium* Strains in Jianfengling Reserve and the 16S rDNA Determination

PENG Yu-hong, JIAO Ru-zhen, MOU Xin-tao

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: In order to identify the resistance abilities of woody Legume *Rhizobium*, 9 strains isolated from roots nodules of different legume plants in the Jianfengling National Nature Reserve, Hainan Province, were preliminary studied. Results show that the optimal pH and NaCl concentration for growth are respectively 7 and $10.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for all the 9 isolates, but the temperatures are varied, the optimal growth temperature for CAF224 is 37°C , for CAF416, CAF438 and CAF279 is between 20°C - 28°C , and for the other 5 strains is 28°C . All the 9 isolates can grow under pH 4 - 11, $20.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl, and at 37°C , of which the isolates CAF224 and CAF276 could tolerate pH 3, while CAF226 could grow at $40.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl; CAF276 could survive the high temperature of 50°C for 20 min. and 60°C for 10 min. The *Rhizobium* strains from different hosts and under different ecological conditions demonstrate different adversity resistances. 4 strains have higher resistances, which are CAF226, CAF276, CAF224 and CAF414. A phylogenetic analysis based on 16S rDNA gene sequences reveals that the 9 strains gather

收稿日期: 2009-03-03

基金项目: 国家科技基础条件平台项目“林业微生物菌种资源标准化整理、整合及共享试点”子项目(编号 2005DKA21207)

作者简介: 彭玉红, 女, 山东德州人, 从事土壤微生物多样性研究。

* 通讯作者: 焦如珍, 副研究员, E-mail: jiaorzh@caf.ac.cn

** 现为南非比勒陀利亚大学博士生。

a cluster with *Rhizobium tropici* Clone H12 (GenBank EF054889) with a similarity of 99.4%. The 9 strains presented here are tentatively identified as *Rhizobium tropici* Martinez-Romero *et al.*

Key words: Jianfengling; salt tolerance; pH scope; adversity resistance; 16S rDNA sequences; *Rhizobium tropici* Martinez-Romero *et al.*

海南是典型支的热带雨林气候,豆科植物丰富,据统计海南省木本豆科植物约39属158种,其中苏木亚科(Caesalpinioideae)10属39种;含羞草亚科(Mimosoideae)6属18种;蝶形花亚科(Papilionaceae)23属101种(海南植物志,1965)。大多数乔木豆科植物根系庞大,具有适生范围广、抗逆性强、耐瘠薄、易栽培、生长迅速、生物量高、热值高等优点,有些可作为优质薪材,有些可用于化工业生产,有些灌木豆科植物可以入药;另外,有些豆科植物具有很高的观赏价值,可应用于旅游景区发展旅游业^[1],如:长眉红豆(*Ormosia balansae* Drake)、荔枝叶红豆(*Ormosia semicastrata* Hance f. *litchifolia*)是著名的观果园林绿化树种,其木材可以做家具;蝶形花亚科的假地豆(*Desmodium heterocarpon*(L.) DC.)和葫芦茶(*Desmodium triquetrum*(Linn.) DC.)为小灌木,主要生长于山谷水旁灌丛或林中,全株均可入药;马占相思(*Acacia mangium* Willd.)是速生的多用途树种,兼用材、薪材、纸材、饲料和改良土壤于一身,适应性强、生长迅速、干形通直,可迅速美化环境,涵养水源,其生态效益、经济效益、社会效益相当显著,在我国海南、广东、广西、福建等省有引种。豆科植物的根部具有根瘤,能固定和利用大气中的游离氮素,对土壤的改良、土壤肥力的提高和植被的建立都有重要意义。

目前,国内外对热带、亚热带的某些木本豆科植物的根瘤菌展开了初步研究,de Lajudie^[2-3]对塞内加尔(Senegal)相思树种根瘤菌通过16S rDNA序列分析、DNA杂交等试验方法筛选到了适宜中华根瘤菌(*Sinorhizobium teranga* corrig. De Lajudie *et al.*)和聚成U族的根瘤菌。国内对木本豆科植物根瘤菌的研究起步晚,对其抗逆性的研究报道则更少^[4-6];所以,调查海南尖峰岭地区木本豆科植物根瘤菌的多样性,筛选和评价抗逆性强的根瘤菌菌株,对扩大根瘤菌的应用范围,提高根瘤菌固氮效率和指导引种具有重要的意义。本文通过测定各处理条件下根瘤菌光密度值($OD_{600\text{ nm}}$)^[7],对根瘤菌的抗逆性进行了定量研究,以期筛选到对可持续林业具有重要作用的高效抗逆性根瘤菌菌株。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 主要仪器与试剂 主要仪器有:生化培养箱、恒温摇床、高速冷冻离心机、PCR仪、凝胶成像系统(法国 Vilber INFINITY 3000)等。DNA Marker和PCR扩增试剂盒购自 TaKaRa公司。

1.1.2 采集地概况 采集地为海南尖峰岭自然保护区海拔800 m处,土壤为砖黄壤。植被发育保护完善,物种资源丰富。

1.1.3 根瘤的采集 2006年4月选定木本豆科植物植株,挖出其须根,挑选新鲜、个大、饱满的根瘤装入装有干燥变色硅胶的离心管,密封并编号。每株植物根瘤装一管,同时对根瘤的形状、大小、颜色、着生部位以及豆科植物名称、经纬度、生长时期、生境、海拔、土壤类型等进行详细记录^[8]。

1.1.4 根瘤菌的分离及筛选 干燥的根瘤带回实验室后,在蒸馏水中浸泡至吸胀为止,75%乙醇3 鷄 5 min和0.1% HgCl₂ 1 鷄 3 min进行表面灭菌,无菌水冲洗5 鷄 6次,然后在无菌条件下用灭菌的手术刀将根瘤切开,并用灭菌的镊子挤出汁液,最后接种于YMA培养基上,于28 ℃下进行培养。采用稀释平板划线法,挑取单菌落,革兰氏染色,镜检,最后接入试管斜面中保藏备用。若不纯,继续进行YMA平板划线,直至纯化为止^[9-10]。分离纯化后保存。供试菌株编号及宿主情况见表1。

表1 菌株编号及宿主

菌株编号	共生宿主	菌株编号	共生宿主
CAF224	长眉红豆	CAF438	马占相思
CAF226	长眉红豆	CAF336	假地豆
CAF414	荔枝叶红豆	CAF276	葫芦茶
CAF415	荔枝叶红豆	CAF279	葫芦茶
CAF416	荔枝叶红豆		

1.1.5 培养基 YMA培养基:甘露醇10 g, MgSO₄ 0.2 g, 酵母浸出粉1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, CaSO₄ 0.2 g, NaCl 0.1 g, Na₂MoO₄(1%) 1 mL, MnSO₄(1%) 1.0 mL, 柠檬酸铁(1%) 1 mL,用蒸馏水定容至1 000 mL, pH值7.0 鷄 7.2, 121 ℃ 30 min高压灭菌。

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, pH 值 7.5。

1.2 抗逆性研究

1.2.1 菌株活化及接种母液的配制 将供试菌株活化 3 次后, 接入灭菌的 YMA 培养液中, 置于 28 摇床培养(48 ±6) h。根瘤菌在培养液中的繁殖数量采用分光光度计比色法测定, 测定指标用 600 nm 波长的光密度值($OD_{600\text{ nm}}$)表示, 将培养液均加无菌水调释至 $OD_{600\text{ nm}} = 0.5$ 的菌液浓度, 作为其它处理培养的接种母液^[11]。

1.2.2 pH 值试验 用 HCl 和 NaOH 调释 YMA 培养液 pH 值, 分装试管, 每管 4 mL, 灭菌后制成 pH 值为 3、4、5、7、9、10、11 和 12 的 YMA 培养液。取接种母液分别接至不同 pH 值梯度处理的 YMA 培养液中, 将初始浓度调整到 $OD_{600\text{ nm}} = 0.1$, 各 3 次重复。置于 28 摇床, 培养 72 h ($160\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 用分光光度计测其 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。以培养基中菌体生长的光密度 $OD_{600\text{ nm}} = 0.1$ 所对应的 pH 值为该菌株所能耐受的 pH 值。记录菌株耐受的 pH 值的 OD 值^[2]。

1.2.3 耐盐试验 配制 7 个不同 NaCl 浓度的 YMA 培养液: 0.1、4.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分装试管, 灭菌。将接种母液分别接至不同 NaCl 浓度的 YMA 培养液中, 接种及培养方法同 1.2.2。以培养基中菌体生长的光密度 $OD_{600\text{ nm}} = 0.1$ 所对应的 NaCl 浓度作为该菌株所能耐受的 NaCl 浓度。以不接种根瘤菌为对照, 测其 $OD_{600\text{ nm}}$ 值, 各处理均 3 次重复。

1.2.4 温度试验 选用 NaCl 浓度 $0.1\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, pH 值 7 的 YMA 培养液作为基础培养基, 分装试管, 灭菌。调整温度分别为 10、20、28、37、45、50、60, 接种方法同 1.2.2。置于不同温度的水浴锅中培养 7 d, 其中 50 高温处理 20 min、60 高温处理 10 min 之后放置于 28 水浴培养以测其对短时高温的耐受性, 测其 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。

1.3 16S rDNA 的克隆与测序

1.3.1 供试菌株总 DNA 的提取 菌株用 LB 培养基培养至对数生长期, $12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心收集菌体, 用 TE(pH 值 8.0) 悬浮细胞, 溶菌酶破壁, 蛋白酶 K 处理, CTAB/NaCl 盐析, 酚/氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀, 风干, 最后溶于 TE(pH 值 8.0) 中备用^[12-16]。

1.3.2 16S rDNA 的 PCR 扩增、克隆及测序 以总 DNA 为模板, 正向引物 P0: 5'-gag att tga tcc tgg ctc ag-3 反向引物 P6: 5'-cta cgg cta cct tgt tac ga-3 (上

海生工合成), 经 PCR 扩增出 16S rDNA; PCR 产物纯化回收后与质粒 PMD18-T 载体进行连接, 转化大肠杆菌 DH5, 筛选得到转化子; 提取质粒 DNA 验证后, 送上海生工测序。

1.4 数据处理

数据处理采用 Excel、Spss 16.0 和 Mega 4.0 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌抗逆性分析

2.1.1 根瘤菌 pH 值试验 由表 2、3 可以看出: 不同菌株相同 pH 值、同一菌株不同 pH 值条件下其培养液的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值存在显著差异, 菌株 pH 值生长范围广, 9 株根瘤菌都可以在 pH 值为 4 到 11 液体培养基中生长。在 pH 值为 7 时所有菌株的生长势均最高且菌株间差异不大, 而随着 pH 值的降低酸性的增加, 菌株间的生长势差异变大: pH 值为 4 时 CAF226 的生长势为 0.901, 而 CAF336 的为 0.442。CAF224、CAF276 这 2 个菌株可以在酸性(pH 值为 3)培养基上生长; 在 pH 值 > 7 的碱性处理中, 所有供试菌株均可耐受 pH 值 11 的强碱环境。从表 3 还可以看出, 菌株与 pH 值存在明显的交互作用。

表 2 根瘤菌在不同 pH 值处理条件下的生长势 ($OD_{600\text{ nm}}$)

菌株编号	pH 值							
	3	4	5	7	9	10	11	12
CAF224	0.155	0.813	0.787	1.214	0.579	0.808	0.289	-
CAF226	-	0.901	1.004	1.190	1.020	0.874	0.823	-
CAF414	-	0.467	0.634	0.901	0.670	0.710	0.260	-
CAF415	-	0.827	1.065	1.170	0.992	0.984	0.873	-
CAF416	-	0.707	0.855	1.010	0.821	0.820	0.734	-
CAF279	-	0.694	0.668	0.918	0.900	0.813	0.819	-
CAF276	0.127	0.538	0.620	1.519	1.387	1.143	0.468	-
CAF438	-	0.585	0.660	1.010	0.717	0.648	0.705	-
CAF336	-	0.442	0.555	0.845	0.633	0.514	0.327	-

注: “-”表示无菌生长。

表 3 不同根瘤菌在不同 pH 值处理条件下的生长势 ($OD_{600\text{ nm}}$) 方差分析结果

变异来源	总方差	自由度	均方差	F	显著性概率
校正模型	35.137	70	0.502	65.852	0.000
干扰项	77.674	1	77.674	1.019E4	0.000
菌株之间差异	2.693	8	0.337	44.160	0.000
不同 pH 值	27.900	7	3.986	522.890	0.000
菌株与 pH 值的交互作用	3.849	55	0.070	9.180	0.000
误差	1.105	145	0.008		
总和	114.096	216			
总离差	36.242	215			

2.1.2 耐盐试验 表 4 表明: 所有菌株耐受 NaCl

的能力强,均可以在含 $20.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl 的培养基中生长, CAF226、CAF416、CAF438、CAF336 和 CAF276 可以在 $30.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 NaCl 浓度 YMA 培养液中生长, CAF226 耐盐能力较高,可以耐受 $40.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 NaCl。从表 5 可以看出:不同菌株相同 NaCl 浓度、相同菌株不同 NaCl 浓度条件下其培养液的 $OD_{600 \text{ nm}}$ 值存在显著差异,菌株与 NaCl 浓度还存在明显的交互作用。

表 4 不同 NaCl 浓度对不同根瘤菌菌株生长势 ($OD_{600 \text{ nm}}$) 的影响

菌株	NaCl 浓度 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)						
	0.1	4.0	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0
CAF224	0.736	0.852	1.264	0.267	-	-	-
CAF226	0.925	1.206	1.298	0.715	0.726	0.783	-
CAF414	0.779	0.943	1.162	0.364	-	-	-
CAF415	0.196	0.512	0.883	0.364	-	-	-
CAF416	0.678	0.691	1.040	0.529	0.438	-	-
CAF438	0.401	0.732	1.226	0.764	0.150	-	-
CAF336	0.378	0.769	1.112	0.326	0.209	-	-
CAF276	0.508	0.798	1.372	0.151	0.161	-	-
CAF279	0.437	1.062	0.976	0.959	-	-	-

注:“-”表示无菌生长。

表 5 不同根瘤菌菌株与 NaCl 浓度下的生长势 ($OD_{600 \text{ nm}}$) 方差分析结果

变异来源	总方差	自由度	均方差	F	显著性概率
校正模型	36.279	62	0.585	63.307	0.000
干扰项	42.664	1	42.664	4.616E3	0.000
菌株之间差异	3.332	8	0.416	45.060	0.000
不同 NaCl 浓度	28.461	6	4.743	513.206	0.000
菌株与 NaCl 浓度的交互作用	4.486	48	0.093	10.111	0.000
误差	1.165	126	0.009		
总和	80.107	189			
总离差	37.443	188			

表 4 表明:根瘤菌菌株的最适 NaCl 浓度为 $10.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,而常规的根瘤菌培养基 YMA 的 NaCl 浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[17],说明这 9 株实验菌株更适宜较高的 NaCl 浓度,因此,今后进一步研究此 9 株根瘤菌时,应将此培养基盐浓度提高到 $10.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.1.3 温度试验 大多数根瘤菌最适温度是 28 和 31 ℃,很少能在 37 ℃ 的高温中生长^[16]。由表 6、7 可以看出:不同菌株相同温度其培养液的 $OD_{600 \text{ nm}}$ 值存在显著差异,不同温度同一菌株其培养液的 $OD_{600 \text{ nm}}$ 值也存在显著差异;菌株与温度存在明显的交互作用。本试验中,供试根瘤菌均可在 37 ℃ 条件下生长,其中 CAF224 的最适生长温度为 37 ℃; CAF224、CAF226、CAF414、CAF415、CAF438 和

CAF276 可以在 45 ℃ 的高温中生长,而 CAF224、CAF414 对温度的适应范围较宽,在 10 ℃ 低温下其生长速度仍然较快,这说明尖峰岭地区根瘤菌对温度的适应性范围较广,而且多数都耐高温,这可能与当地的气候和植株耐高温有关。由于供试菌株采集于热带地区,所以对根瘤菌进行了 50 ℃ 20 min 和 60 ℃ 10 min 的短时高温刺激的初步研究,结果表明:多数菌株不同程度的耐受短时的高温刺激,CAF276 可以耐受 50 ℃ 20 min 和 60 ℃ 10 min 的短时高温刺激。

表 6 根瘤菌在不同温度梯度下的生长势 ($OD_{600 \text{ nm}}$)

菌株	温度 /						
	10	20	28	37	45	50 (20 min)	60 (10 min)
CAF224	0.384	0.346	0.534	0.705	0.152	-	0.248
CAF226	-	0.612	0.887	0.438	0.114	-	0.410
CAF414	0.466	0.495	0.890	0.595	0.193	0.145	-
CAF415	-	0.363	0.569	0.546	0.264	-	0.410
CAF416	-	0.579	0.545	0.463	-	-	0.314
CAF438	-	0.552	0.523	0.457	0.345	-	0.335
CAF336	0.392	0.456	0.542	0.439	-	-	-
CAF276	-	0.265	0.440	0.349	0.140	0.198	0.309
CAF279	-	0.558	0.549	0.383	-	-	0.360

注:“-”表示无菌生长。

表 7 不同根瘤菌在不同温度梯度下的生长势 ($OD_{600 \text{ nm}}$) 的方差分析

来源	总方差	自由度	均方差	F	显著性概率
校正模型	11.131	62	0.180	33.641	0.000
干扰项	17.911	1	17.911	3.356E3	0.000
菌株之间差异	0.387	8	0.048	9.065	0.000
不同温度	7.772	6	1.295	242.725	0.000
菌株与温度的交互作用	2.972	48	0.062	11.602	0.000
误差	0.672	126	0.005		
总和	29.714	189			
总离差	11.804	188			

2.2 根瘤菌耐酸、耐碱、耐盐、耐高温耐低温能力的综合分析

表 8 表明:9 株根瘤菌的抗逆性均较强,筛选得到 4 株多抗性菌株:CAF226 的多抗性最强,耐 $40.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl、耐酸 (pH 值 4)、耐高温 (60 ℃ 10 min) 的不良环境;CAF276 耐酸 (pH 值 3)、耐碱 (pH 值 11)、耐高温 (45 ℃ 和 50 ℃ 20 min、60 ℃ 10 min);CAF224、CAF414 均可耐 10 ℃ 的低温处理,而且 CAF224 也耐酸 (pH 值 3)、耐碱 (pH 值 11),在这样的酸碱环境中仍能生长,CAF414 也耐碱 (pH 值 11) 和耐高温。

表8 多抗性菌株根瘤菌耐酸、耐碱、耐盐、耐高温、耐低温能力的综合筛选分析

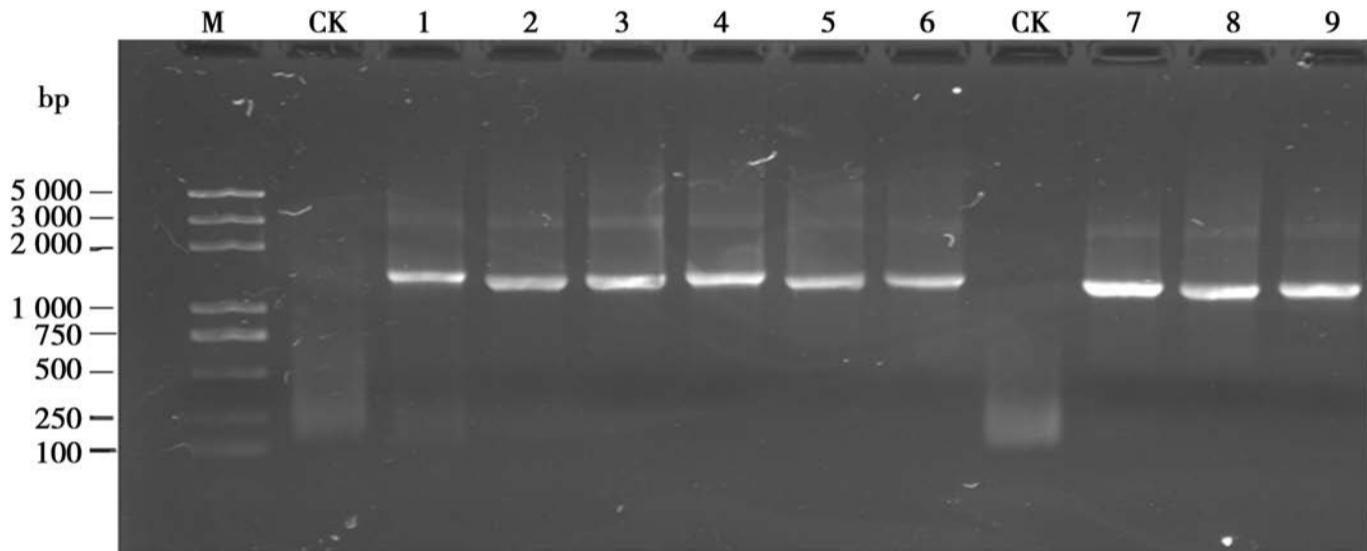
菌株编号	NaCl/(g·kg ⁻¹)		耐酸		耐碱	耐高温			耐低温
	30.0	40.0	pH值3	pH值4	pH值11	45	50	60	10
CAF226	+	+	-	+	+	+	-	+	-
CAF276	+	-	+	+	+	+	+	+	-
CAF224	-	-	+	+	+	+	-	+	+
CAF414	-	-	-	+	+	+	+	-	+

注：“+”表示生长，“-”表示不能生长；50 为处理 20 min 后转入 28 培养，60 为处理 10 min 后转入 28 培养。

2.3 序列测定结果

供试菌株扩增出的 DNA 片段条带单一，大小约为 1 500 bp 左右(图 1)。将菌株的 16S rDNA 序列

与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比对，运用软件 MEGA4.0 按 bootstrap 的 UPGMA 法构建系统发育树(图 2)。



M: marker; CK 为阴性对照; 1. CAF224; 2. CAF226; 3. CAF276; 4. CAF416;
5. CAF415; 6. CAF414; 7. CAF336; 8. CAF438; 9. CAF279

图1 16S rDNA PCR 扩增结果

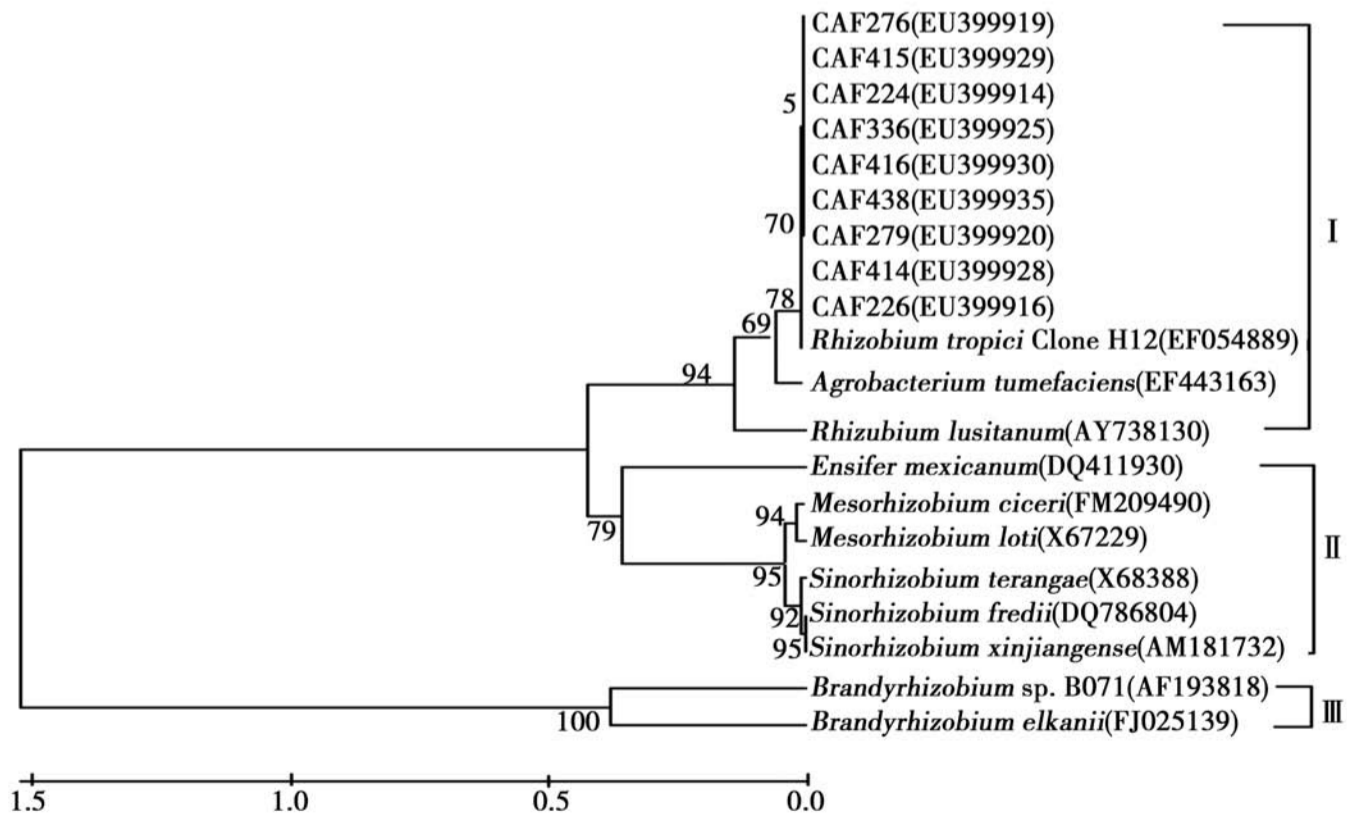


图2 16S rDNA 部分序列系统发育树状图(MEGA version 4.0 UPGMA 法)

系统进化树分为 3 支: 9 株供试根瘤菌与热带根瘤菌 (*Rhizobium tropici* Martinez-Romero et al.)、根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和 *Rhizobium lusitanum* 聚为 一支, 其中供试菌株与热带根瘤菌

Rhizobium tropici Clone H12 的亲缘关系最近; 第 一支由墨西哥剑菌 (*Ensifer mexicanum*)、鹰嘴豆中间根瘤菌 (*Mesorhizobium ciceri*)、百脉根中间根瘤菌 (*Mesorhizobium loti*)、适宜中华根瘤菌 (*Sinorhizobium ter-*

angae)、费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)和新疆中华根瘤菌(*Sinorhizobium xinjiangense*)构成;第 分支由埃氏慢生根瘤菌和 *Brandythizobium* sp. B071 组成。从图 2 可知:供试菌株与 分支的亲缘关系较远。通过系统发育树初步可以证明,此 9 株供试菌属于根瘤菌属。

供试菌与亲缘关系较近的热带根瘤菌 H12 和根癌土壤杆菌的 16S rDNA 相似性构成矩阵(表 9), 每一个菌株后括号内为其序列提取号。从表 9 中看出:热带根瘤菌与 9 株供试菌株的相似度为 99.4%, 表明菌株与 *Rhizobium tropici* 的亲缘关系最近,初步确定 9 株供试菌株均为热带根瘤菌。

表 9 供试菌株与热带根瘤菌、根癌土壤杆菌的 16S rDNA 相似性矩阵

序号	菌株编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	CAF226 (EU399916)	100										
2	CAF276 (EU399919)	99.8	100									
3	CAF415 (EU399929)	99.8	99.9	100								
4	CAF438 (EU399935)	99.8	99.9	99.9	100							
5	CAF224 (EU399914)	99.8	99.9	99.9	99.9	100						
6	CAF336 (EU399925)	99.8	99.9	99.9	99.9	99.9	100					
7	CAF279 (EU399920)	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100				
8	CAF414 (EU399928)	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	100			
9	CAF416 (EU399930)	99.8	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8	100		
10	<i>A. tumefaciens</i> (EF443163)	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.5	93.5	93.6	100	
11	<i>R. tropici</i> (EF054889)	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	93.7	100

3 结论与讨论

(1) 9 株试验菌株均为热带根瘤菌,其最适 pH 值为 7,最适盐分含量为 NaCl 10.0 g · kg⁻¹,比传统根瘤菌培养基 YMA 中的 NaCl 0.1 g · kg⁻¹ 高出很多;9 个试验菌株均可耐受 20.0 g · kg⁻¹ 的 NaCl,CAF226 更耐盐,可在含 40.0 g · kg⁻¹ NaCl 的培养基中生长,说明试验菌株都具有耐盐性,这可能与海南尖峰岭土壤的含盐量较高有关^[24]。

(2) 9 个试验菌株均可在 pH 值 4 至 11 范围内生长,CAF224、CAF276 更可在 pH 值 3 的培养基中生长,说明这 9 株分离自尖峰岭自然保护区的热带根瘤菌对酸碱环境适应性强。这与韦原莲等^[5]从马占相思上分离的根瘤菌不能在 pH 值 4 的环境中生长,黄宝灵^[6]报道的相思根瘤菌所有菌株都不能在 pH 值 4 的培养基上生长存在显著不同,可能与菌株分离地条件有关。

(3) 9 个试验菌株均能在 37 ℃ 下生长良好,CAF224、CAF414、CAF336 可以在 10 ℃ 下生长,CAF224、CAF226、CAF414、CAF415、CAF438、CAF276 可以耐受 45 ℃ 的高温,CAF414、CAF276 可以耐受 50 ℃ 20 min 高温刺激,CAF224、CAF226、CAF415、CAF416、CAF438、CAF279 可以耐受 60 ℃ 10 min 的短时高温刺激,试验菌株对高温的耐受性与其生长环境相适应。

(4) 本研究筛选出 CAF226、CAF276、CAF224 和

CAF414 四菌株均为多重抗逆性的高效固氮热带根瘤菌。

(5) 本试验从长眉红豆、荔枝叶红豆、马占相思、假地豆、葫芦茶 5 种不同的木本豆科植物的根瘤中分离的菌株其 16S rDNA 的相似性高达 99.8%,均属于热带根瘤菌。这说明不同宿主的根瘤菌具有相似的遗传特性,但不同宿主的热带根瘤菌菌株间的抗逆性有明显差异,即使分离自同一宿主的不同菌株间也存在显著差异,根瘤菌菌株抗逆性差异充分说明了菌株生物多样性、菌株收集、筛选的重要性和必要性。

(6) 热带根瘤菌能否在逆境中与相应的宿主有效结瘤固氮^[19-20]以及固氮活性^[21-23]的强度,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 张炎周,周立江.豆科植物在退耕还林中的应用[J].四川林勘设计,2002(2):1-7
- [2] de Lajudie P, Willems A. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and Description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium sahari* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. [J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 715-733
- [3] de Lajudie P, Anne Willems, Giselle Nick. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48: 369-382
- [4] 康丽华,李素翠.相思根瘤菌耐酸性研究及耐酸菌株的筛选[J].

- 林业科学研究, 1998, 11(6): 581 - 585
- [5] 韦原莲, 黄宝灵, 吕成群, 等. 马占相思根瘤菌生物学特性的研究 [J]. 西北林学院学报, 2006, 21(5): 120 - 124
- [6] 黄宝灵, 吕成群, 韦原莲, 等. 相思树种根瘤菌的若干抗逆特性 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(1): 29 - 32
- [7] 关桂兰, 王卫卫, 杨玉锁. 新疆干旱地区固氮生物资源 [M]. 北京: 科学出版社, 1991
- [8] 杨文权, 郭军康, 冯春生, 等. 宁夏豆科植物根瘤菌资源调查及其生态分布 [J]. 干旱地区农业研究, 25(5): 176 - 181
- [9] 张执欣, 陈卫民, 韦革宏, 等. 甘肃省部分地区豆科植物根瘤菌资源调查 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(2): 77 - 82
- [10] 韦革宏, 龚明福, 吕双庆. 中国帕米尔高原根瘤菌—豆科植物共生资源调查 [J]. 西北植物学, 2005, 25(8): 1618 - 1622
- [11] 师尚礼, 刘建荣, 张 勃, 等. 甘肃寒旱区苜蓿根瘤菌抗逆性评价 [J]. 草地学报, 2007, 15(1): 1 - 6
- [12] 李 东, 黄莉莉, 韩素芬. 23 株豆科木本植物根瘤菌 16S rDNA 序列分析 [J]. 南京林业大学学报, 2007, 31(6): 117 - 120
- [13] 陈文峰, 陈文新. 豆科树种刺槐、黄檀、合欢根瘤菌的数值分类及 16S rDNA-PCR RFLP 研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(1): 53 - 58
- [14] 刘 杰. 我国中东部地区紫穗槐、紫荆、紫藤根瘤菌的数值分类及 16S rDNA PCR-RFLP 研究 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(1): 17 - 25
- [15] Odee D W, Sutherland JM, Makatiani E T, *et al.* Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions [J]. *Plant and Soil*, 1997(188): 65 - 75
- [16] Doignon-Bourcier R, Willems A, Coopman R, *et al.* Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small Senegalese legumes by 16S - 23s rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyse [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 3987 - 3997
- [17] 周宇光. 中国菌种目录 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007
- [18] 黄成敏, 龚子同. 海南岛尖峰岭地区山地土壤发生特性 [J]. 山地学报, 2000, 18(3): 193 - 200
- [19] Michiels J, Verreth C, Vanderleyden J. Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium strains* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 1206 - 1212
- [20] Graham P H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions [J]. *Can J Microbiol*, 1992, 38: 475 - 484
- [21] Bordeleau L M, Prevost D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments [J]. *Plant Soil*, 1994, 161: 115 - 124
- [22] Brockwell J, Pilka A, Holliday R A. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales [J]. *Aust J Exp Agric*, 1991(31): 211 - 219
- [23] Hungria M, Franco A A. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. [J]. *Plant Soil*, 1993, 149: 95 - 102