

糖蜜草内生固氮菌 IS-PCR 和 16S rRNA 基因全序列分析

彭桂香¹, 王华荣², 张国霞², 侯伟², 袁清华², 谭志远²

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642;

2 广东省植物分子育种重点实验室, 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要:采用插入序列指纹图谱分析 (IS-PCR) 和 16S rRNA 基因全序列分析, 对来源于优良牧草——糖蜜草 *Melinis minutiflora* Beauv. 内生固氮菌进行研究. 结果表明, 糖蜜草中分离的内生固氮菌与产脂固氮螺菌模式菌株 DSM 1691 的插入序列指纹图谱存在着差异; 来源于糖蜜草的 4 株菌紧密地聚在一起, 与 GenBank 中已知产脂固氮螺菌 *Azospirillum lipoferum* 的 16S rRNA 基因全序列有 97% 的序列相似性. 初步确定糖蜜草中分离的内生固氮菌为一新类群的内生固氮菌.

关键词:糖蜜草; 内生固氮菌; 固氮螺菌

中图分类号: Q939.113

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 04-0073-04

Molecular study of endophytic nitrogen fixing bacteria isolated from *Melinis minutiflora*

PENG Gui-xiang¹, WANG Hua-rong², ZHANG Guo-xia²,
HOU Wei², YUAN Qing-hua², TAN Zhi-yuan²

(1 College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Endophytic diazotrophs isolated from molasses grass, *Melinis minutiflora*, were studied by insert sequence (IS)-PCR fingerprinting patterns and full length of 16S rRNA gene sequences. IS-PCR fingerprinting showed that different patterns appeared between isolates and the type strain DSM 1691 of *Azospirillum lipoferum*; 16S rRNA gene sequence analyses indicated that homology between isolates and known species *Azospirillum lipoferum* is 97%. These results suggested that isolates from molasses grass are possible a new group of endophytic diazotrophs closely related to *Azospirillum lipoferum*.

Key words: *Melinis minutiflora*; endophytic diazotrophs; *Azospirillum lipoferum*

生物固氮研究已有百余年历史, 但对联合固氮的发现和研究的起步较晚. 1975 年, Döbereiner 等^[1,2]报道了与禾本科植物联合共生的固氮菌—固氮螺菌 *Azospirillum*, 并提出根际联合固氮的概念. 继 Döbereiner 等的报道之后, 又相继从禾本科植物如甘蔗^[3,4]、水稻^[5]、玉米^[6,7]、卡那尔草 *Leptochloa fusca*^[8] 等植物组织中分离到内生固氮菌, 引起了人们

对禾本科植物生物固氮的极大关注. 糖蜜草种子发芽快、生命力强, 能忍受贫瘠土壤、干旱、低温阴雨等不良环境条件的影响, 可以作为贫瘠土壤的先锋物种进行种植^[9,10], 在广东水土流失地区已大面积推广种植. 以糖蜜草为材料, 来研究植物内生固氮菌的报道甚少. 利用插入序列指纹图谱多样性, 可以区分种类不同的细菌^[11]. 16S rRNA 基因能较好地反映

收稿日期: 2005-03-10

作者简介: 彭桂香 (1968-), 女, 讲师, 硕士. 通讯作者: 谭志远 (1968-), 男, 教授, 博士;

E-mail: zytan@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300001 和 30470002); 华南农业大学校长基金资助项目 (4100-K03113)

细菌系统发育关系,是目前应用于细菌系统发育分析中使用最多的一个基因.本文采用插入序列指纹图谱分析和16S rRNA基因全序列分析对来源于糖蜜草的内生固氮菌进行分子水平鉴定.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

TCMY41, TMCY055, TMCY243, TMCY244, TMCY255, TMCY0256, TMCY023, TMCY0551, TMCY0832, TMCY066, TMCY225, TMCY0552, TMCY0831, TMCY24, TMCY025 分离自生长瘠薄土壤的糖蜜草组织中;产脂固氮螺菌 *Azospirillum lipoferum* 模式菌株 DSM 1691 购自德国 DSMZ 菌株保存中心. DSM 1691 与 *Azospirillum lipoferum* 菌株号 ATCC 29707 是保存在2个菌种保藏中心的同一菌株.

1.2 菌体培养

供试菌株经 Nfb-Medium 斜面活化后,接种于5 mL Nfb-Medium 培养液中振荡培养. Nfb-Medium 培养基构成:苹果酸 5.0 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L, $CaCl_2$ 0.02 g/L, 溴百里酚蓝溶液(0.5 g 溴百里酚蓝溶解在100 mL 的0.2 mol/L KOH 溶液中)2.0 mL/L, 维生素溶液 1.0 mL/L (维生素 H 100.0 mg/L + 盐酸吡哆醇 200.0 mg/L), 微量元素溶液 2.0 mL/L ($CuSO_4$ 0.4 g/L + $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12 g/L + H_2BO_3 1.4 g/L + $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 1.0 g/L + $MnSO_4$ 1.5 g/L), Fe-EDTA 溶液(EDTA- Na_2 7.45 g/L + $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.57 g/L)4.0 mL/L, KOH 4.5 g/L, pH6.8, 固体培养基中加入 17 g/L 的琼脂,半固体培养基中加入 1.5 ~ 2.5 g/L 的琼脂. 28 °C 培养,镜检,确定无杂菌污染后收集菌体.

1.3 菌体收集及 DNA 提取

用 1.5 mL 离心管离心收集菌体(4 °C, 5 000 r/min, 8 min)后,用 TE (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 悬浮菌体,离心洗涤1次,收集菌体.具体提取方法见文献[12].

1.4 IS-PCR 指纹图谱及分析

IS-PCR(insertion sequence-based PCR)指纹图谱所用引物设计见文献[13,14],根据文献[14]研究结果,本文选用引物 J3 (5'-GCT CAG GTC AGG TGG CCT GG-3') 作为 IS-PCR 引物. PCR 反应体系为 50.0 μ L:10 $\times$ PCR buffer 5.0 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1.0 μ L, J3 引物(50.0 μ mol/L) 0.5 μ L, 去离子无菌水 41.5 μ L, 模板 DNA (20.0 ng/ μ L) 1.0 μ L, *Taq* polymerase(3 U/ μ L) 1.0 μ L. PCR 反应条件:97 °C 预变性 3 min, 35 个循环, 97 °C 50 s, 56 °C 50 s, 72 °C

60 s, 循环反应完成后, 72 °C 延伸 5 min. 反应完成后用 20 g/L 琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 4 °C 保存备用. 将保存的 IS-PCR 产物进一步用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 得到指纹图谱, 通过软件 GIS3.74 凝胶图像处理系统进行分析, 获得电泳图谱的相似性矩阵. 用 TREECONW 软件进行 UPGMA 聚类.

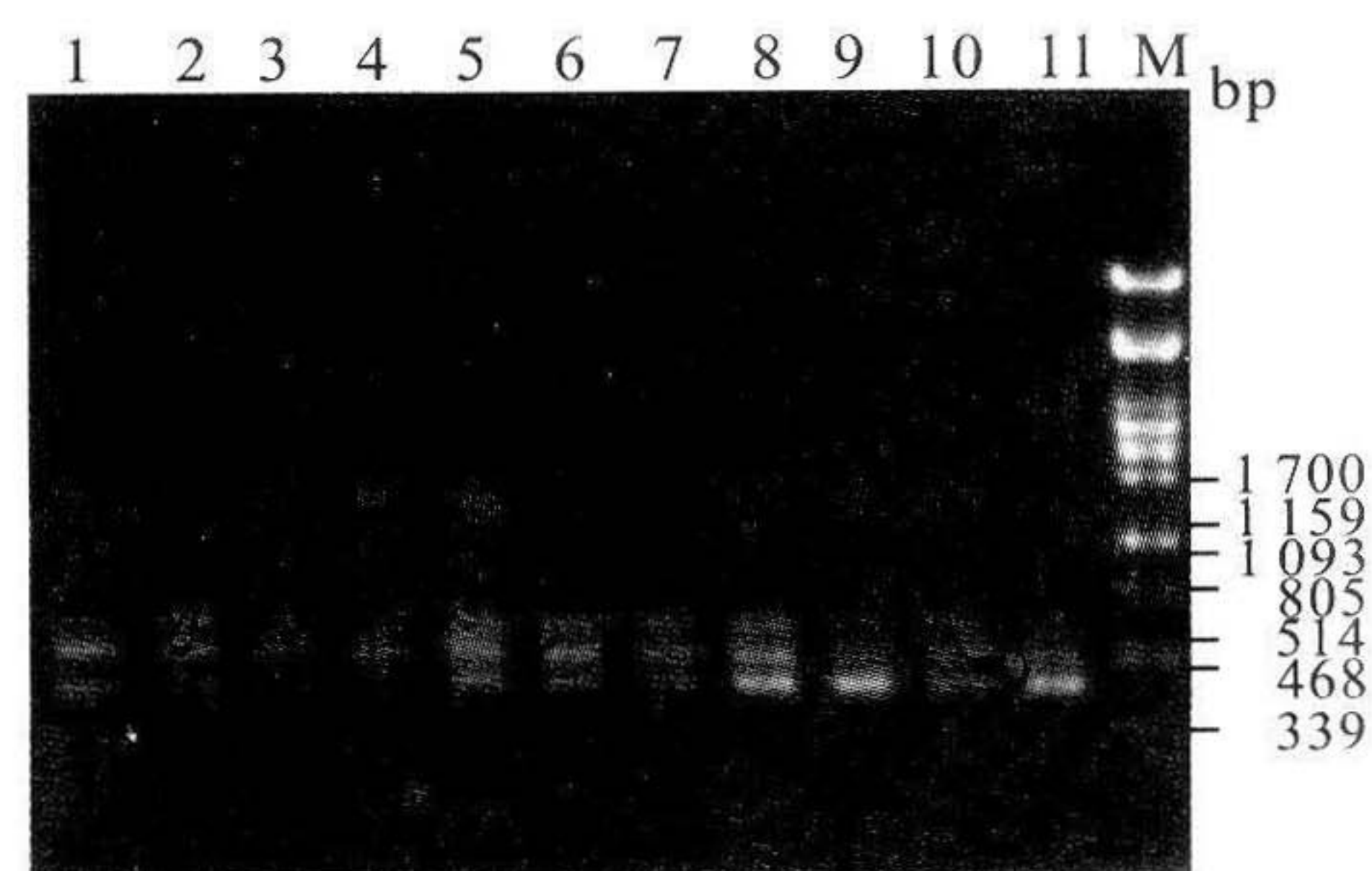
1.5 16S rRNA 基因扩增及序列分析

16S rRNA 基因采用通用引物 25f (5'-AAC TKA AGA GTT TGA TCC TGG CTC-3') 和 1492r [5'-TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T-3'] 进行扩增^[15]. PCR 反应体系和反应条件同 IS-PCR 扩增. 测序所用引物为 35fc (5'-CTK AAG AGT TTG ATC MTG GCT CAG ATT GAA CG-3')、342fc (5'-CTC CTA CGG GAG GCA G-3') 和 930fc (5'-GGT TAA AAC TYA AAK GAA TTG ACG GGG AC-3'). 序列分析采用软件 CLUSTALX 进行比对(alignment)后,再用软件 GeneDoc 进行人工比对和格式转换. 最后用 TREECONW 进行邻近法聚类分析并构建系统发育树.

2 结果与分析

2.1 IS-PCR 指纹图谱结果

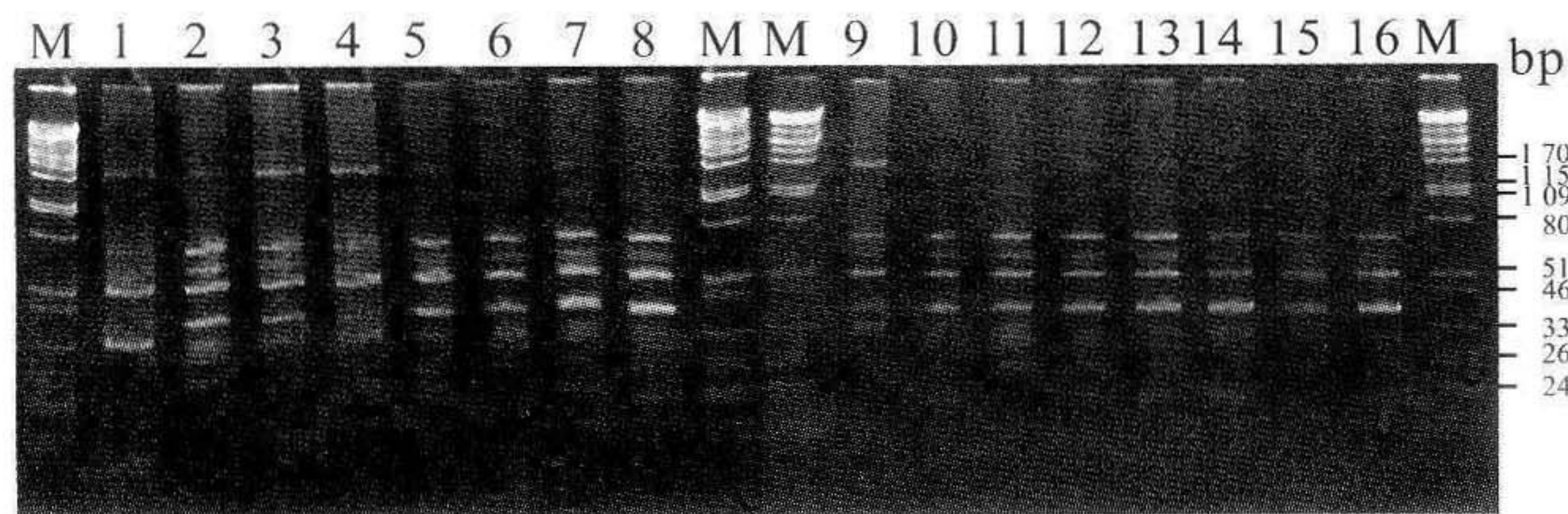
图1是用琼脂糖电泳进行 IS-PCR 产物检测及多样性的初步判断. 由图1可见,糖蜜草中内生固氮菌 IS-PCR 指纹图谱基本一致. 进一步采用高分辨率聚丙烯酰胺进行凝胶电泳分析(图2),可以更清晰地区分 IS-PCR 指纹图谱类型. 糖蜜草中内生固氮菌的指纹图谱基本一致,但与已知的产脂固氮螺菌模式菌株 DSM 1691 有差异. 菌株的聚类结果及相似性见图3. 糖蜜草中的分离物在 77% 的相似性水平上聚类成群,与产脂固氮螺菌模式菌株 DSM 1691 在 68% 的相似性水平上聚在一起.



1:TMCY0256, 2:TMCY243, 3:TMCY055, 4:TMCY041, 5:TMCY0552, 6:TMCY244, 7:TMCY066, 8:TMCY225, 9:TMCY0832, 10:TMCY24, 11:TMCY025, M:marker

图1 糖蜜草内生固氮菌 IS-PCR 指纹图谱

Fig. 1 IS-PCR fingerprinting patterns of endophytic diazotrophs isolated from molasses grass



M: marker, 1: *A. lipoferum* DSM 1691, 2: TMCY0256, 3: TMCY41, 4: TMCY0552, 5: TMCY244, 6: TMCY066, 7: TMCY225, 8: TMCY243, 9: TMCY055, 10: TMCY023, 11: TMCY255, 12: TMCY0551, 13: TMCY0831, 14: TMCY025, 15: TMCY24, 16: TMCY0832

图 2 糖蜜草菌株 IS-PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig. 2 IS-PCR fingerprinting patterns of endophytic diazotrophs isolated from molasses grass on polyacrylamide electrophoresis

2.2 序列分析及系统发育

从糖蜜草分离物中选取 TMCY244、TMCY243、TMCY41、TMCY0552 共 4 个菌株进行 16S rRNA 基因全序列分析,结果见图 4。来源于糖蜜草菌株 TMCY41

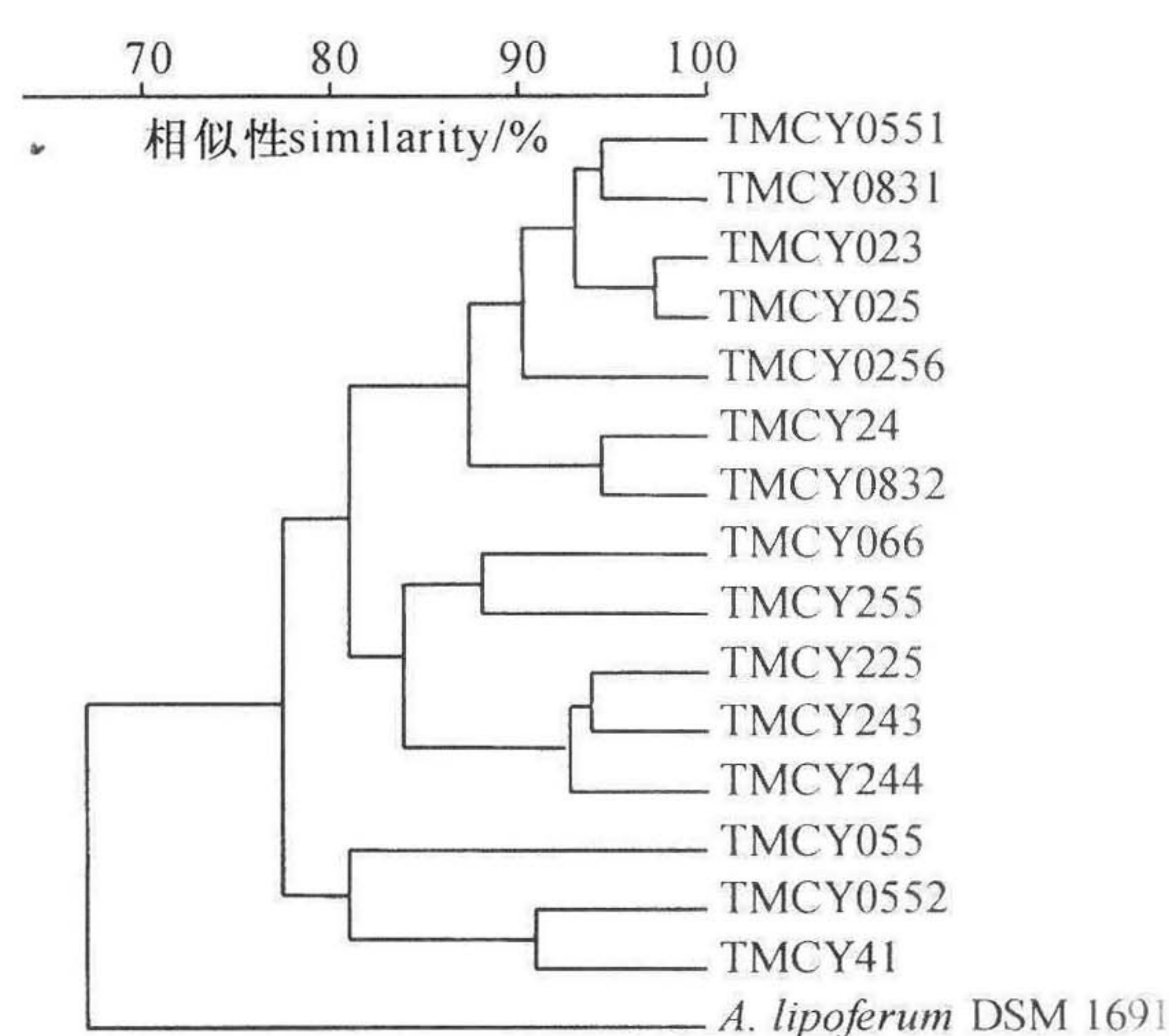


图 3 糖蜜草分离物 IS-PCR 指纹图谱相似性聚类

Fig. 3 Dendrogram obtained by UPGMA method showing the similarity level of IS-PCR patterns of molasses grass's isolates

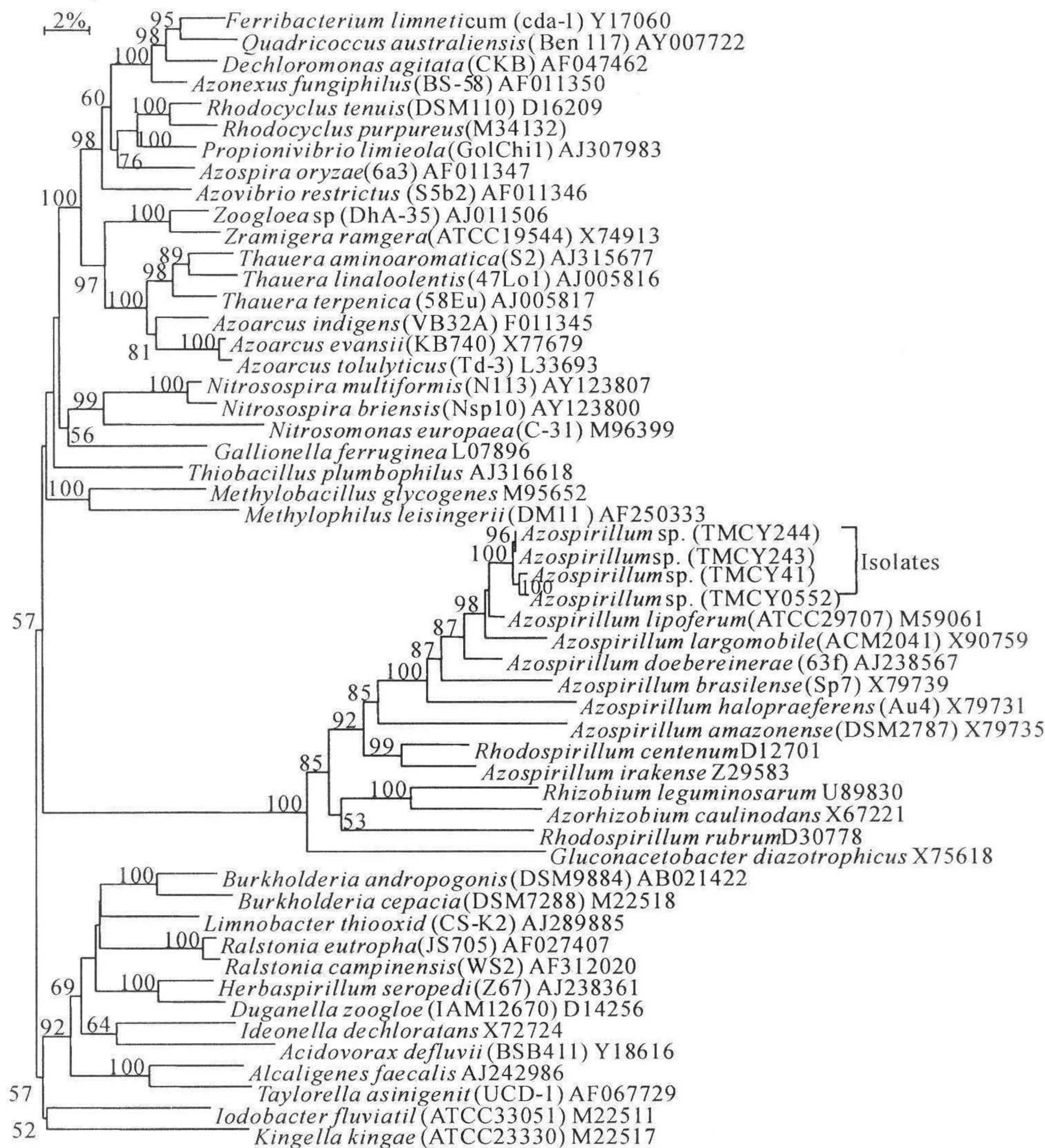


图 4 糖蜜草分离物及相关菌株的系统发育关系(括号内为菌株号)

Fig. 4 The relationship among isolates of molasses grass and closely related species (strains numbers indicated in the parenthesis)

和 TMCY244 具有 99% 的序列相似性. 图中各已知菌株能很好地归到相应的分支中, 来源于糖蜜草的 4 株菌紧密地聚在一起, 位于固氮螺菌属 *Azospirillum* 中, 与 GenBank 中已知产脂固氮螺菌 *A. lipoferum* 16S rRNA 基因全序列有 97% 的相似性, 处于同一个分支中.

3 结论

采用不同的选择性培养基在厌氧和好氧条件下, 从糖蜜草中分离了 15 株内生固氮菌, 采用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳对 IS-PCR 多态性指纹图谱检测, 通过软件 GIS3.74 凝胶图像处理系统进行聚类分析, 已初步确定这些菌株聚在同一类群中. 进一步选取 4 株菌进行 16S rRNA 基因全序列分析, 表明 4 株菌紧密地聚在同一类群中, 与 IS-PCR 多态性指纹图谱聚类结果一致. 与 GenBank 中已知产脂固氮螺菌 *A. lipoferum* 有 97% 的序列相似性. 初步确定糖蜜草中分离的内生固氮菌为一新类群的内生固氮菌. 是否为固氮螺菌属中的一个新种, 则需要进行 DNA-DNA 杂交, 生理生化实验等进一步研究.

参考文献:

- [1] DÖBEREINER J, DAY J M. Associative symbioses and nitrogen-fixing sites[A]. NEWTON W E, NYMAN C J. International Symposium on Nitrogen fixation[C]. Washington: Washington State University, 1975. 518 - 538.
- [2] DÖBEREINER J, MARRIEL I E, NERY M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck[J]. Can J Microbiol, 1976, 22: 1 464 - 1 473.
- [3] BODDEY R M, URQUIAGA S, REIS V, et al. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane[J]. Plant and Soil, 1991, 137: 111 - 117.
- [4] LOIRET F G, ORTEGA E, KLEINER D, et al. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp from sugarcane[J]. J Appl Microbiol, 2004, 97: 504 - 511.
- [5] GILLIS M, VAN T V, BARDIN R, et al. Polyphasic taxonomy in genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp nov for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45: 274 - 279.
- [6] ESTRADA P, MAVINGUI P, COURNOYER B, et al. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp associated with maize plants cultivated in Mexico[J]. Can J Microbiol, 2002, 48: 285 - 294.
- [7] DONG Y, INIGUEZ A L, AHMER B M, et al. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3): 1 783 - 1 790.
- [8] REINHOLD B, HUREK T, FENDRIK I, et al. *Azospirillum halopraeferens* sp nov, a nitrogen-fixing organism associated with roots of kalar grass, *Leptochloa fusca* (L) Kunth[J]. Int J Sys Bacteriol, 1987, 37: 43 - 51.
- [9] 李煜祥, 叶秀珍. 糖蜜草 *Melinis minutiflora* Beauv 幼穗分化发育及花和果实形态的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(1): 38 - 43.
- [10] GOHOLE L S, OVERHOLT W A, KHAN Z R, et al. Effects of molasses grass, *Melinis minutiflora* volatiles on the foraging behavior of the cereal stemborer parasitoid, *Cotesia sesamiae* [J]. J Chem Ecol, 2003, 29(3): 731 - 745.
- [11] WEINER M, DACKO J, OSEK J. Insertion element IS₃ PCR-based method for molecular analysis of enterotoxigenic *escherichia coli* isolated from sucking piglets with diarrhoea[J]. Bull Vet Inst Pulawy, 2004, 48: 241 - 246.
- [12] 彭桂香, 陈文新, 谭志远. rRNA 基因间隔区序列用于亲缘关系密切的根瘤菌种群鉴定及系统发育分析[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(4): 58 - 62.
- [13] HUREK T, WAGNER B, REINHOLD-HUREK B. Identification of N₂-fixing plant and fungus associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 4 331 - 4 339.
- [14] 王春连, 章琦, 周永力, 等. 我国长江以南地区水稻白叶枯病原菌遗传多样性分析[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(2): 131 - 136.
- [15] TAN Z, HUREK T, VINUESA P, et al. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 3 655 - 3 664.

【责任编辑 周志红】