

大青山油松根际固氮菌的多样性研究

牛艳芳^{1,2}, 王飞宇¹, 陈立红^{1*}, 闫伟²

(1. 内蒙古农业大学农学院, 内蒙古呼和浩特 010019; 2. 内蒙古农业大学林学院, 内蒙古呼和浩特 010019)

摘要 [目的]研究大青山油松树种根际固氮菌的多样性。[方法]对从大青山油松(*Pinus tabulaeformis*)根际土壤中分离的固氮菌进行16S rDNA扩增及序列测定,应用DNAMAN 6.0软件进行多序列比对,使用MEGA4软件构建系统发育树。[结果]大青山油松根际土壤中分离的46株固氮菌分属于*Pseudomonas*、*Bacillus*、*Phyllobacterium*、*Cupriavidus*、*Paenibacillus*、*Enterobacter*、*Agrobacterium*、*Arthrobacter*、*Naxibacter*、*Burkholderia*、*Ensifer*等11个不同的类群,其中*Pseudomonas*、*Bacillus*、*Arthrobacter*、*Phyllobacterium*为优势属种。系统分析表明,大青山油松根际土壤中固氮菌具有较丰富的多样性。[结论]该研究结果可为森林生态系统的可持续发展提供理论依据。

关键词 大青山;油松;固氮菌;16S rDNA

中图分类号 S718.8 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)22-001-03

Diversity of Nitrogen-fixing Bacteria from *Pinus tabulaeformis* in Daqing MountainsNIU Yan-fang^{1,2}, WANG Fei-yu¹, CHEN Li-hong^{1*} et al (1. Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010019; 2. College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010019)

Abstract [Objective] The aim was to study diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from *Pinus tabulaeformis* in Daqing Mountains. [Method] To amplify and sequence 16S rDNA gene of nitrogen-fixing bacteria isolated from *Pinus tabulaeformis* in Daqing Mountains, the alignment of 16S rDNA sequences was conducted by DNAMAN 6.0, and the Neighbor-joining phylogenetic tree was constructed by MEGA 4 software. [Result] The phylogenetic analysis showed that forty-six isolates from *P. tabulaeformis* belonged to eleven groups, which are *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Phyllobacterium*, *Cupriavidus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Naxibacter*, *Burkholderia*, *Ensifer*, and *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Phyllobacterium* are dominant groups. The results showed that the nitrogen-fixing bacteria from *P. tabulaeformis* in Daqing Mountains have rich diversity. [Conclusion] The results can provide theoretical basis for sustainable development of forest ecosystem.

Key words Daqing Mountains; *Pinus tabulaeformis*; Nitrogen-fixing bacteria; 16S rDNA

生物固氮是生物圈氮素的重要来源,对于陆地生态系统具有基础性作用^[1-3]。森林生态系统作为陆地生态系统的主体,在调节全球碳平衡和减缓全球气候变化进程中扮演着重要角色,具有其他生态系统无可替代的作用^[4]。由于近几十年的开发和利用,森林、草地、湿地生态系统均受到了不同程度破坏,造成面积缩小,生态系统失衡。

大青山位于内蒙古呼和浩特市和包头市一线北侧,属于阴山山脉中段,地处110°45'52"~111°32'12"E,40°37'41"~40°57'30"N。该区地处温带半干旱区,属于大陆性气候,海拔1 050~2 374 m。大青山是阴山山脉植物种数最丰富的一段山体,森林覆盖率为41.65%,土壤类型有淋溶灰褐土、粗骨土、山地栗钙土、灰褐土和草灌灰褐土等。森林植被包括针叶林和阔叶林,其中针叶林主要树种有油松、青海云杉、杜松,局部地区出现华北落叶松,阔叶林主要树种有白桦、辽东栎、蒙椴、山杨、山杏^[5-6]。内蒙古从东到西有大兴安岭—阴山山脉—贺兰山,这些地区温度、适度、降雨量、蒸发量、土壤类型和植被类型等生态条件复杂多变,而针叶树种落叶松和油松是这些山脉森林地带的主要树种,它们在维持和改善内蒙古生态环境中占据重要地位^[7-10]。笔者研究大青山油松树种根际固氮菌的多样性,旨在为森林生态系统的可持续发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 土样采集 试验地位于内蒙古大青山古路板林场人工油松林,地处111°50'40"E,40°58'12"N,坡度16°,海拔1 307 m。该区地处内陆北纬中温带,属于典型的大陆性半干旱季风气候。年平均降水量为350~450 mm,湿度0.3~0.6,年平均气温6℃,无霜期120 d。土壤主要为山地栗钙土,质地多为砂壤和轻壤土,pH在7.0左右。油松人工林的平均基径为9.50 cm,平均树高为549 cm,林龄为21 a^[11]。将土壤样品装入无菌的封口袋编号标记,带回后放置于4℃冰箱中冷藏。

1.2 固氮菌的分离与纯化 采用阿须贝培养基(葡萄糖10 g、KH₂PO₄ 0.2 g、MgSO₄·7H₂O 0.2 g、NaCl 0.2 g、CaSO₄ 0.2 g、CaCO₃ 5 g、琼脂15 g、蒸馏水1 000 mL,pH 7.0~7.2)分离和纯化土壤样品中的固氮菌。称取10 g土样,放入装有90 mL无菌水的加有玻璃珠的三角瓶中,在摇床上150 r/min,振荡20 min,依次制成10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 3个不同稀释度的土壤悬液,分别接种到培养皿中,用无菌玻璃棒涂布均匀,28℃下恒温培养6~7 d。将培养出来的固氮菌菌落采用划线法进行分离,约4~5代后即可分离到纯种的固氮菌。将纯化后的固氮菌保存在试管中,置于4℃冰箱中备用^[12-15]。

1.3 固氮菌基因组DNA的提取 在1.5 mL灭菌的离心管中加入500 μL TE溶液,用无菌牙签刮取培养皿上的单菌落溶于TE溶液中。在每个离心管中加入50 mg/mL的溶菌酶3 μL,充分混匀,在37℃下作用2 h。在每个离心管中再加入5 mol/L NaCl 30 μL和20%的SDS 30 μL,充分混匀,在65℃下作用1 h。加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),充分混匀,在12 000 r/min离心10 min,此后收集上清液约

基金项目 国家自然科学基金项目(31260173)。**作者简介** 牛艳芳(1977-),女,内蒙古包头人,博士研究生,研究方向:林木生物技术。*通讯作者,副教授,博士,从事土壤微生物和林木生物技术研究。**收稿日期** 2016-06-20

400 μL 于新的灭菌离心管中。加入 2 倍体积的无水乙醇,充分混匀,12 000 r/min 离心 5 min , 收集沉淀。用 70% 的乙醇洗涤沉淀,之后将乙醇倒掉,用无菌滤纸吸干离心管中的水分,风干后再溶于 50 μL 的 ddH_2O 中,保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下。

1.4 固氮菌 16S rDNA 的扩增 以固氮菌基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物 27f(5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') 和 1 492r(5' - GGTTACCTGTTACGACTT - 3') 扩增 16S rDNA。PCR 反应体系为:12.5 μL Dream Taq Green PCR Master Mix (2 \times), 1.0 μL 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物 27f, 1 μL 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物 1492 r, 1.0 μL 模板 DNA, 添加 9.5 μL ddH_2O 补足至 25 μL 。PCR 扩增条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min ; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s , 45 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s , 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 60 s , 共 35 个循环;最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 。取 5 μL PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测^[16]。

1.5 系统发育树的构建 PCR 产物由上海生工生物工程有限公司进行测序,将测定的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中 BLAST 同源序列,利用 DNAMAN 软件进行多序列比对并人工校对,利用 MEGA 4.0 软件计算 Kimura's two - parameter 遗传距离,并构建 Neighbor - Joining (NJ) 自展一致系统发育树,自展重复总数为 1 000^[17]。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 的扩增 采用阿须贝无氮培养基对采自大青山油松根际土壤中的固氮菌进行分离。根据菌落形态、大小和颜色以及菌体形态和大小等特征,分离出 57 株固氮菌。以细菌通用引物 27f 和 1 492r 对分离菌株的 16S rDNA 基因片段进行扩增,所得片段大小约为 1.5 kb(图 1)。

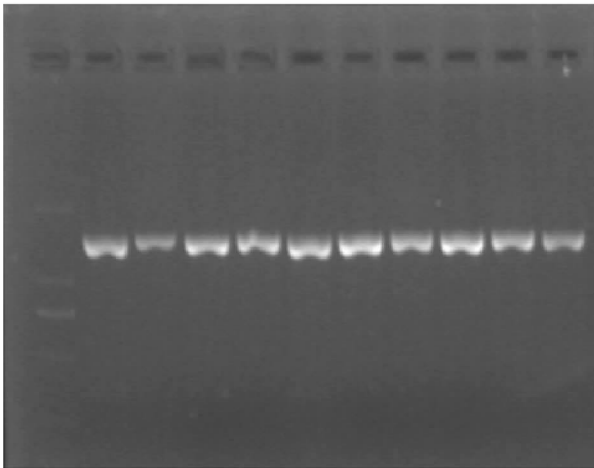


图 1 固氮菌 16S rDNA PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig. 1 The amplified products of 16S rDNA gene from nitrogen - fixing bacteria strains

2.2 16S rDNA 系统发育分析 应用 DNAMAN 6.0 软件对分离出的菌株和从 GenBank 数据库中下载与待分析序列相近的已知种模式菌株的 16S rDNA 序列进行多序列比对,然后使用 MEGA4.0 软件采用邻接法 (Neighbor - joining method) 构建部分分离的固氮菌菌株与相关菌株的 16S rDNA 基因序列的系统发育树。从图 2 可以看出,呼和浩特大青山油松根际土壤中固氮菌具有非常丰富的多样性,它们分布于 11

个系统发育分支上。菌株 QS7、QS19、QS30、QS32、QS33、QS36、QS39、QS41、QS50、QS53 等菌株与菌株 *Pseudomonas* sp. Ats6 和 *Pseudomonas* sp. 3 - 7 聚在一起;菌株 QS25、QS55 和菌株 *Enterobacter* sp. D22 聚在一起;菌株 QS14 和菌株 *Naxibacter* sp. 6981 聚在一起;菌株 QS15 和菌株 *Burkholderia* sp. 5AT11 聚在一起;菌株 QS1、QS6、QS24、QS261 和菌株 *Cupriavidus necator* ss1 - 6 - 6 聚在一起;菌株 QS2、QS54、QS332 和菌株 *Phyllobacterium sophorae* CCBAU 03415 聚在一起;菌株 QS3 和菌株 *Ensifer* sp. S16 聚在一起;菌株 QS4、QS27 和菌株 *Agrobacterium tumefaciens* Ch3 聚在一起;菌株 QS31 和菌株 *Arthrobacter* S3. TSA. 019 聚在一起;菌株 QS12、QS26 与菌株 *Paenibacillus* sp. C - 19 - 1 聚在一起;菌株 QS23、QS29、QS35、QS37 与菌株 *Bacillus* sp. DU190 (2010) 聚在同一分支上。

2.3 大青山油松根际固氮菌群落结构分析 利用阿须贝培养基从大青山油松根际土壤中共分离出固氮菌 57 株,经 16S rDNA 序列鉴定出 46 株固氮菌。其中, *Pseudomonas* 有 11 株,占 23.91%; *Bacillus* 有 7 株,占 15.22%; *Arthrobacter* 有 7 株,占 15.22%; *Phyllobacterium* 有 5 株,占 10.87%; *Paenibacillus* 有 4 株,占 8.7%; *Cupriavidus* 有 4 株,占 8.7%; *Enterobacter* 有 3 株,占 6.52%; *Agrobacterium*、*Naxibacter*、*Burkholderia*、*Ensifer* 等 4 个属的固氮菌 5 株,占 10.87%。在大青山油松根际土壤中 *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Phyllobacterium*、*Arthrobacter* 为优势属,其数量从多到少依次为: *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Arthrobacter*、*Phyllobacterium*。

表 1 不同固氮菌类群所占比例

Table 1 Percentage of different nitrogen - fixing bacteria groups

固氮菌类群 Groups of nitrogen - fixing bacteria	菌株数 Number of strains	百分比 Percentage %
<i>Pseudomonas</i>	11	23.91
<i>Arthrobacter</i>	7	15.22
<i>Bacillus</i>	7	15.22
<i>Paenibacillus</i>	4	8.70
<i>Phyllobacterium</i>	5	10.87
<i>Cupriavidus</i>	4	8.70
<i>Enterobacter</i>	3	6.52
<i>Ensifer</i>	1	2.17
<i>Agrobacterium</i>	2	4.35
<i>Naxibacter</i>	1	2.17
<i>Burkholderia</i>	1	2.17

3 结论

结合菌体形态学特征和系统发育分析,从大青山油松根际土壤中分离出 46 株固氮菌,它们分布于 11 个系统发育分支上。其中,11 株属于 *Pseudomonas*, 7 株属于 *Bacillus*, 7 株属于 *Arthrobacter*, 5 株属于 *Phyllobacterium*, 其余 18 株分属于 *Cupriavidus*、*Paenibacillus*、*Enterobacter*、*Agrobacterium*、*Naxibacter*、*Burkholderia*、*Ensifer* 等 7 个不同的属。大青山油松根际土壤中固氮菌具有较丰富的多样性,其中 *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Arthrobacter*、*Phyllobacterium* 属于优势类群。

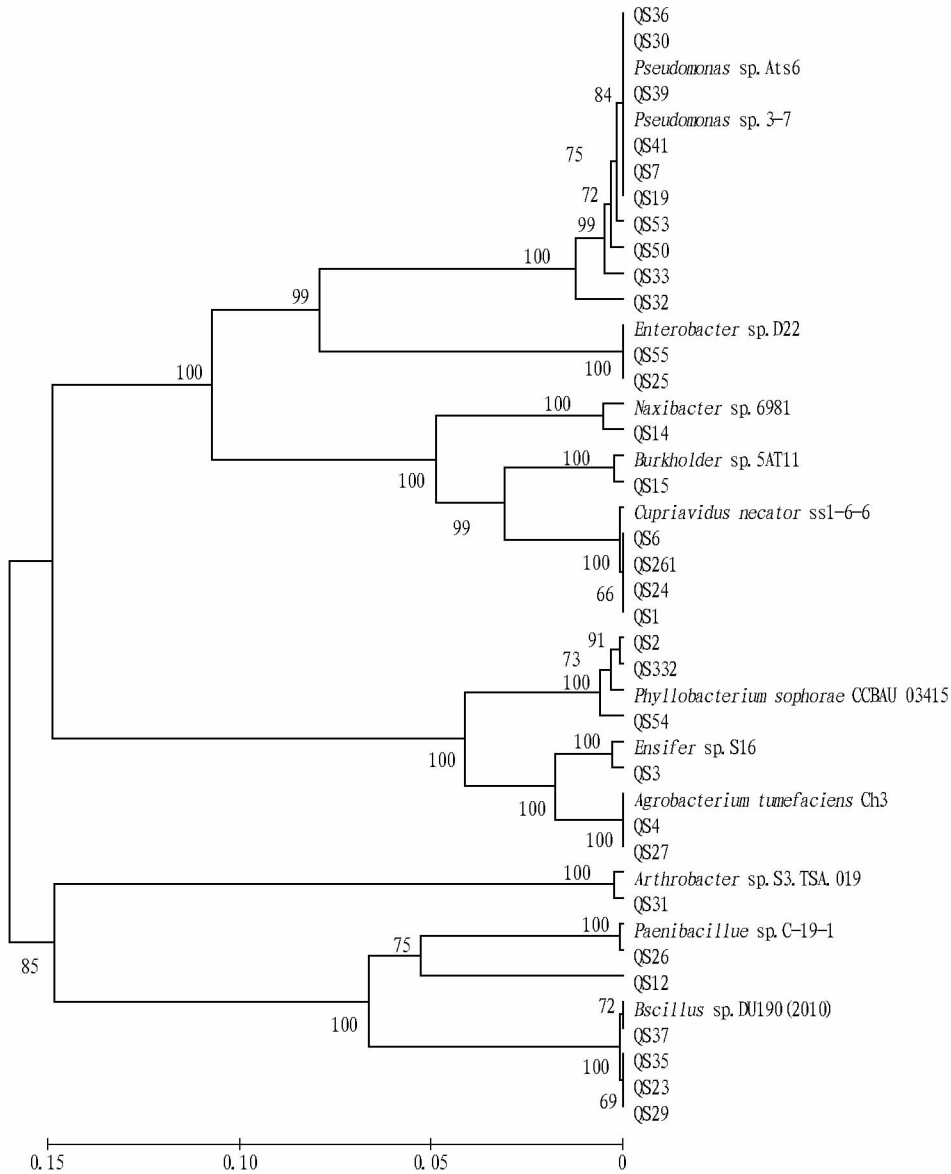


图2 固氮菌基于16S rDNA序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences from nitrogen-fixing bacteria strains

参考文献

- [1] 张卫峰, 马林, 黄高强, 等. 中国氮肥发展、贡献和挑战[J]. 中国农业科学, 2013, 46(15): 3161-3171.
- [2] EVANS H J, BURRIS R H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years[C]//STACEY G, BURRIS R H, EVANS H J, et al. Biological nitrogen fixation. New York, London; Chapman & Hall, Inc., 1992.
- [3] 王绍友, 李季伦. 固氮酶催化机制及化学模拟生物固氮研究进展[J]. 自然科学进展, 2000, 10(6): 481-490.
- [4] 陈奋飞, 庄捷, 王逸群. 我国林木固氮的研究现状和前景展望[J]. 湖南林业科技, 2006, 33(4): 4-7.
- [5] 雍世鹏, 张全如, 赵一之, 等. 论阴山山脉生物多样性的特性及其保护途径[J]. 西部资源, 2005, 30(2): 13-15.
- [6] 樊斌. 阴山山脉对内蒙古中部地区气象要素影响初探[J]. 内蒙古气象, 2010(1): 35-37.
- [7] 魏强, 张秋良, 代海燕, 等. 大青山不同林地类型土壤特性及其水源涵养功能[J]. 水土保持学报, 2008, 22(2): 111-115.
- [8] 陈晓燕, 田有亮, 包志刚, 等. 大青山主要植被类型土壤物理特性的研究[J]. 水土保持通报, 2009, 29(5): 30-34.
- [9] 代海燕, 张秋良, 张翠霞, 等. 内蒙古大青山主要植被类型综合生态效益的评价[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(5): 98-109.
- [10] 田海芬, 刘华民, 王伟, 等. 大青山山地植物区系及生物多样性研究[J]. 干旱区资源与环境, 2014, 28(8): 172-177.
- [11] 王素英, 王海荣, 方亮, 等. 大青山不同森林结构与根际土壤微生物数量变化研究[J]. 内蒙古林业科技, 2010, 36(2): 20-26.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] 丁延芹, 王建平, 刘元, 等. 几株固氮芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(6): 690-697.
- [14] 凌娟, 董俊德, 张燕英, 等. 一株红树林根际固氮菌的分离、鉴定以及固氮活性测定[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 149-153.
- [15] 沈萍, 陈向东. 微生物学试验[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [16] 田国杰, 王晗, 陈立红. 内蒙古赤峰地区主要树种根际固氮菌的分离和鉴定[J]. 内蒙古林业科技, 2016, 42(1): 21-26.
- [17] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4.0[J]. Molecular biology and evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.