

不同地域豇豆 (*Vigna unguiculata*) 根瘤菌的表型和遗传多样性

徐 莉¹, 杨江科^{1,*}, 张伟涛², 袁天英², 周俊初^{2,*}

(¹ 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074 ² 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要 豇豆根瘤菌既是豆科植物根际微生物的主要类群,也是重要的根瘤菌资源之一。通过最适碳/氮源、内源抗生素抗性和 NaCl 耐受性等表型特征和 16S-23S Intergenetic Region (IGS) RFLP 特征分析对分离自 8 个不同地域的 52 株供试豇豆根瘤菌的进行了表型和遗传多样性分析。供试菌株无论是在表型还是遗传型方面均具有丰富的多样性。根据 IGS RFLP 特征,供试豇豆慢生根瘤菌分为以下 4 个 IGS 类群 IGS- I 为豇豆根瘤菌的优势群体,在系统发育上相对独立 IGS- II 和 IGS- III 的菌株分别属于 *Bradyrhizobium japonicum* 和 *Bradyrhizobium liaoningense* IGS- IV 属于 *Bradyrhizobium elkanii*。豇豆快生型菌株则分别归为 IGS- V 和 IGS- VI 群,在分类地位上分别属于 *Sinorhizobium fredii* 和 *Rhizobium leguminosarum*。不同地域的菌株在多样性方面具有明显的差异。分离自湖北红安的菌株仅与黑龙江德都具有一定的相似性, Jaccard 系数为 0.25, 表现出地理隔离作用。来自黑龙江德都和广西武鸣的菌株的多样性最为丰富, 其 Simpson 指数和 Shannon-Wiener 指数分别为 0.667 和 1.243 与 0.593 和 0.961。

关键词 豇豆根瘤菌 表型 IGS 多样性

文章编号 1000-0933 (2007)09-3655-08 **中图分类号** Q938 Q945 **文献标识码** A

Phenotypic and genetic diversity of cowpea rhizobia

XU Li¹, YANG Jiang-Ke^{1,*}, ZHANG Wei-Tao², YUAN Tian-Ying², ZHOU Jun-Chu^{2,*}

¹ College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, 430074 Wuhan, China

² State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, 430070 Wuhan, China

Acta Ecologica Sinica, 2007, 27 (9) 3655 ~ 3662.

Abstract : Rhizobia are not only major microbial colonists of the rhizosphere of cowpea (*Vigna unguiculata*), but also important root nodule symbionts. The present study was conducted with 52 cowpea-nodulating isolates collected from eight regions of China, and included phenotypic characterisation of optimal carbon/nitrogen source, intrinsic antibiotic resistance and NaCl tolerance, as well as 16S-23S intergenic sequence (IGS) RFLP patterns. The strains tested showed abundant diversity. Slow-growing rhizobia were divided into four IGS RFLP groups. IGS- I the dominant rhizobia group, was phylogenetically divergent from other cowpea rhizobia and reference strains. IGS- II, IGS- III and IGS- IV correspond to *B. japonicum*, *B. liaoningense* and *B. elkanii* respectively. Fast-growing rhizobia appeared to belong to *Sinorhizobium fredii* (IGS- V) or *Rhizobium leguminosarum* (IGS- VI). Strain diversity varied between regions. Strains from Hongan, Hubei province, all belonged to *B. elkanii*, and the Jaccard similarity coefficient with strains from Dedu, Heilongjian province,

基金项目 国家科技部“973”重点基础研究资助项目 (001CB1089) 农学教学实验用微生物资源课题资助项目 (005DKA21208-6) 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室开放基金资助项目

收稿日期 2006-10-10 ; **修订日期** 2007-04-29

作者简介 徐莉 (1971 ~), 女, 湖北孝感人, 讲师, 主要从事应用微生物和生物技术等领域的研究.

*** 通讯作者** Corresponding author. E-mail : jiangke_yang@yahoo.com.cn ; zhoujunchu@mail.hzau.edu.cn

Foundation item The project was financially supported by Chinese “973” Key Basic Research Program (No. 00CB1089), Microbes Resource for Agronomy Teaching Project (No. 2005DKA21208-6) and Open Foundation of State Key Laboratory of Agricultural Microbiology

Received date 2006-10-10 ; **Accepted date** 2007-04-29

Biography XU Li, Lecture, main research interests focus on the field of applied microbiology and biotechnology.

was 0.25. By contrast, strains from Dedu had rich diversity (Simpson coefficient 0.66 and Shannon-Wiener coefficient 1.243), as did those from Lianyungang, Jiangsu Province (0.593 and 0.961).

Key Words : cowpea rhizobia ; phenotype ; IGS ; genetic diversity

生物固氮不仅是生物圈氮素循环的重要环节,而且在维持土壤肥力、促进农业的可持续发展中具有重要的作用。通过对根瘤菌资源的收集、整理,可筛选出与豆科作物相匹配、高效结瘤固氮的根瘤菌,用于提高作物的产量和品质^[1]。

豇豆 [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] 是起源于非洲和亚洲的一种豆科植物,目前在世界范围内广泛栽培。在非洲及拉美国家,豇豆是低收入家庭主要的蛋白质来源^[2];在我国,豇豆不仅是人们日常食用的绿色蔬菜,而且在南部地区豇豆还是重要的绿肥作物和饲料。与豇豆共生的根瘤菌主要为慢生型根瘤菌。依据根瘤菌与豆科植物共进化所形成的宿主专一性的关系,豇豆根瘤菌在系统发育上称为“豇豆族”。该类根瘤菌宿主关系复杂、分类地位模糊^[3]。

根瘤菌具有优良的生态适应性,广泛存在于各种生态环境中。它们不仅是根际微生物区系的重要成员,而且也生活于水体中。其少数类群还能与非豆植物共生结瘤固氮,有些还能以内生菌的形式存在于水稻根内^[4,5]。另一方面,不同的地理环境、耕作制度、栽培品种等各种因素对根瘤菌的分布和多样性也具有明显的影响^[6]。

我国具有丰富多样的地理及生态环境。不同地域的土著根瘤菌必然具有特定的特征。通过开展不同生态区域豇豆根瘤菌多样性和系统发育的研究,不仅能收集、整理一批豇豆根瘤菌资源,而且能进一步深化根瘤菌生物与遗传多样性的基础知识,从而为确定其系统发育与分类地位提供证据。

1 材料与方法

1.1 采样点的设置与豇豆根瘤菌的分离

采样地选取东北平原的黑龙江德都 (126.17, N48.50) 和宝清县 (132.17, N46.33)、华北平原的河北邢台 (114.48, N37.05)、邯郸 (114.47, N36.6) 和石家庄 (114.48, N38.03)、江苏省连云港 (119.16, E34.59)、长江中下游地区的湖北红安 (114.61, N31.29) 和广西武鸣 (108.27, N23.17)。按 5 点取样法采集各点的土壤样本,并以豇豆品种早丰一号和鄂豇一号为捕获植物,以土样悬液接种无菌砂培的豇豆植株,于温室中生长约 30d 后采集根瘤,经 3% 的 NaClO₂ 表面消毒后,用平板划线法分离、纯化根瘤菌,挑取单菌落,转接并保存于 YMA 斜面。于无菌双层砂钵中进行根瘤菌的宿主回接试验,并通过比较接种供试根瘤菌植株与对照植株地上部分干重来确定供试菌株的共生有效性^[7]。随机挑选 52 株供试菌株进行多样性研究 (表 1)。

1.2 根瘤菌表型测定

(1) 所用碳源为 肌醇、果糖、山梨醇、葡萄糖、甘露醇、乳糖、糊精、蔗糖等;所用氮源为 赖氨酸 (Lys)、甲硫氨酸 (Met)、亮氨酸 (Leu)、脯氨酸 (Pro)、精氨酸 (Arg)、苯丙氨酸 (Phe)、色氨酸 (Trp) 和 KNO₃; 抗生素选用 氨苄青霉素 (Amp)、壮观霉素 (Spe)、链霉素 (Str)、四环素 (Tet)、卡那霉素 (Km)、新霉素 (Neo) 和利福平 (Rif)。所用碳/氮源均为国产分析纯试剂,抗生素为 Sigma 公司生产。

(2) 碳/氮源测定 采用 SM 培养基 (NaNO₃ 2.5 g, CaCl₂ 0.1 g, K₂HPO₄ 2.0 g, NaCl 0.1 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, FeCl₃ 0.01 g, 混合微量元素和维生素 100 μg, 加水至 1L, pH6.8)。在测定最适碳源时补加各种碳源至 0.1% 的浓度;在测定最适氮源时,将 NaNO₃ 用不同的氮源取代,并加入甘露醇 (%) 做碳源。根瘤菌内源抗性及 NaCl 耐受性试验均在 YMA 平板上进行,先制备含不同浓度的抗生素或 NaCl 平板,然后接种供试菌株,28 ℃ 培养,2 ~ 4d 后观察。

1.3 根瘤菌总 DNA 的提取

供试菌株在 YMA 液体培养基中培养至对数期后,离心收集菌体,经 STE 缓冲液洗涤后用 TE 缓冲液悬浮

菌体经 1% SDS 裂解菌体后,加入蛋白酶 E 至终浓度为 50 μg/ml,37 ℃ 保温至菌液透明 ;加入 5 mol/L NaClO₄至终浓度为 1 mol/L,混匀后加入等体积苯酚-氯仿反复抽提至界面无蛋白 ;取上清液,经乙醇沉淀、洗涤、干燥并溶解在低浓度 TE 中,通过 Beckman DU-800 分光光度计定量后贮存备用。

表 1 供试豇豆根瘤菌和参比菌株

Table 1 <i>Vigna unguiculata</i> rhizobia and reference strains				
菌株 Strains	宿主植物 Host plants	地理来源 Geographic origins	表型 Phenotypes	IGS RFLP patterns
XtZ4, XtZ5	<i>V. unguiculata</i>	河北邢台 Xt	I	1
XtE2, XtE4	<i>V. unguiculata</i>	河北邢台 Xt	I	6
XtE3	<i>V. unguiculata</i>	河北邢台 Xt	I	7
XtE6,	<i>V. unguiculata</i>	河北邢台 Xt	II	10
HdE1, HdE2, HdE4	<i>V. unguiculata</i>	河北邯郸 Hd	I	1
HdE3, HdZ3	<i>V. unguiculata</i>	河北邯郸 Hd	I	7
HdZ4	<i>V. unguiculata</i>	河北邯郸 Hd	I	6
LygZ1, LygZ3	<i>V. unguiculata</i>	江苏连云港 Lyg	I	1
LygZ2, LygZ4	<i>V. unguiculata</i>	江苏连云港 Lyg	I	8
LygE1, LygE2, LygE3	<i>V. unguiculata</i>	江苏连云港 Lyg	I	9
SjzZ1, SjzZ3	<i>V. unguiculata</i>	河北石家庄 Sjz	I	5
SjzZ2	<i>V. unguiculata</i>	河北石家庄 Sjz	I	1
SjzZ4	<i>V. unguiculata</i>	河北石家庄 Sjz	IV	27
SjzE2	<i>V. unguiculata</i>	河北石家庄 Sjz	IV	23
SjzE3	<i>V. unguiculata</i>	河北石家庄 Sjz	I	2
SjzE4	<i>V. unguiculata</i>	河北石家庄 Sjz	IV	26
SjzE5	<i>V. unguiculata</i>	河北石家庄 Sjz	IV	25
SjzE6	<i>V. unguiculata</i>	河北石家庄 Sjz	IV	28
DdZ3, DdE2	<i>V. unguiculata</i>	黑龙江德都 Dd	II	15
DdZ5	<i>V. unguiculata</i>	黑龙江德都 Dd	III	20
DdE3	<i>V. unguiculata</i>	黑龙江德都 Dd	II	16
DdE4	<i>V. unguiculata</i>	黑龙江德都 Dd	IV	29
DdE5	<i>V. unguiculata</i>	黑龙江德都 Dd	II	12
BqE1, BqE3, BqE4	<i>V. unguiculata</i>	黑龙江宝清 Bq	II	17
BqE2	<i>V. unguiculata</i>	黑龙江宝清 Bq	I	3
WmZ1	<i>V. unguiculata</i>	广西武鸣 Wm	I	4
WmZ2, WmZ4	<i>V. unguiculata</i>	广西武鸣 Wm	I	2
WmE2, WmE3	<i>V. unguiculata</i>	广西武鸣 Wm	II	10
WmE4	<i>V. unguiculata</i>	广西武鸣 Wm	I	7
WmE5	<i>V. unguiculata</i>	广西武鸣 Wm	II	11
WmE7	<i>V. unguiculata</i>	广西武鸣 Wm	IV	22
HaZ1, HaZ3, HaZ4, HaE4	<i>V. unguiculata</i>	湖北红安 Ha	III	18
HaE3, HaE5	<i>V. unguiculata</i>	湖北红安 Ha	III	21
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>				
USDA6 ^T	<i>Glycine max</i>	日本 Japan	II	14
USDA110, USDA122	<i>Glycine max</i>	美国 United States	II	13
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>				
2281 ^T	<i>Glycine max</i>	中国辽宁 China	II	16
<i>Bradyrhizoibum elkanii</i>				
USDA76 ^T , USDA86	<i>Glycine max</i>	美国 United States	III	19
USDA46	<i>Glycine max</i>	美国 United States	III	20
<i>Sinorhizobium fredii</i>				
USDA205 ^T	<i>Glycine max</i>	中国 China	IV	24
<i>Rhizobium leguminosarum</i>				
USDA2370 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	美国 United States	IV	30
<i>Mesorhizobium huakuii</i>				
USDA4779 ^T	<i>Astruglus sinicus</i>	中国 China	IV	31

T 典型菌株 T typical strains

1.4 16S rRNA-23S rRNA IGS PCR-RFLP 分析

利用特异性引物 pHr (5'-TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT-3')和 p23SR01 (5'-GGC TGC TTC TAA GCC AAC-3')对供试菌株 16S rRNA 基因与 23S rRNA 基因间的 IGS 区段进行 PCR 扩增。反应总体积为 20 μl,反应体系程序为 初始变性 94 ℃ 4 min,94 ℃ 1 min,56 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,33 个循环 最后 72 ℃ 延伸 6 min。PCR 反应在美国 ABI 公司热循环仪 (720 型)上进行。

PCR 扩增产物分别用 *Hae*III、*Hha*I、*Hinf*I 和 *Msp*I 等限制性内切进行酶切。酶切产物以 100 bps DNA Ladder 作分子量标准,经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后,用 Kodak 凝胶成像系统记录数据。具体操作参照文献 [1]。

1.5 数据分析与处理

表型分析结果记录为“+/-”格式,即在含抗生素、NaCl 或不同氮/碳源的平板上生长者为“+”,不生长者为“-”。通过 NTSYS 软件将其进一步转化为“1/0”数字符,即“+”转化为“1”,“-”转化为“0”。凝胶图像先经计算机凝胶扫描成像系统摄取,经过均一化处理后转化为“0”和“1”数字符,即有条带处以“1”表示,无条带处以“0”表示。再通过 NTSYS Applied Biostatistics 软件进行相似性分析,并利用平均连锁法 (UPGMA) 进行聚类分析转化为树状图。

1.6 根瘤菌各类群相似性和多样性分析

利用 Jaccard 指数、Simpson 指数和 Shannon-Wiener 指数分析采自各地域的供试豇豆根瘤菌在 IGS 分群水平上的类群相似性和多样性 [1]。Jaccard 公式为 $S = C / (A + B - C)$,其中 A、B 为两地域根瘤菌的 IGS 类群数, C 为两地域共有 IGS 类群数;Simpson 指数公式 $D = 1 - \sum P_i^2$,其中 P_i 为 IGS 类群个体数占群落中总个体数的比例;Shannon-Wiener 指数公式 $H = - \sum P_i \ln P_i$,式中 $P_i = N_i / N$ 。

2 结果与分析

2.1 表型多样性分型

通过对供试菌株和参比菌株的最适碳/氮源利用状况,内源抗性和对 NaCl 的耐受性等表型特征的测定,表明供试菌株表现出了丰富的表型多样性,共产生 32 个特征数。在 NTSYS 软件辅助下,将特征数量化,并通过 UPGMA 算法对菌株进行聚类分析,将供试菌株与参比菌株聚为 4 大群 (表 1 和表 2) 其中群 I 由 27 株慢生根瘤菌组成,并可进一步分为 IA 和 IB 两小群。该群菌株具有较强的内源抗性,对 NaCl 具有较好的耐受性,能较好的利用甘露醇、蔗糖和葡萄糖,除 KNO₃ 外,部分菌株还能以 Lys、Met、Pro 和 Ser 为氮源。群 II 由 11 株供试菌株、参比菌株 *B. japonicum* 和 *B. liaoningense* 组成。它们的内源抗性和对 NaCl 的耐受性均较弱,最适碳/氮源分别为甘露醇和 KNO₃,但对其它碳/氮源的利用率低。群 III 主要来自湖北红安的菌株和参比菌株 *B. elkanii* 组成。在所有供试菌株中,该群菌株的内源抗性和 NaCl 的耐受性均最低,且利用碳/氮源能力最弱。群 IV 由 7 株快生豇豆根瘤菌与快生型的参比菌株 *Mesorhizobium*、*Sinorhizobium* 和 *Rhizobium* 等组成。在所有供试菌株中,该群的内源抗性和对 NaCl 耐受性均最高,碳/氮源的利用能力最强,除甘露醇和 KNO₃ 外,该群的大部分菌株对其它碳/氮源的利用率均较高。

2.2 IGS RFLP 分析

以 pHr 和 p23SR01 为引物对供试菌株的 IGS 区段进行了 PCR 扩增,所有供试快生根瘤菌和慢生根瘤菌的 IGS 大小均在 1.9 ~ 2.1kb 之间。利用 *Hae*III、*Hha*I、*Hinf*I 和 *Msp*I 4 种限制性内切酶分别对 IGS 区段进行了酶切分析,酶切谱带显示出丰富的多样性 (图 1)。在 NTSYS 软件的辅助下,经 UPGMA 法生成了反映各菌株间相似性关系的系统发育树 (图 2)。由图 2 可见:供试豇豆根瘤菌具有丰富的多样性,在 80% 的相似性水平上,可分为 IGS-I、IGS-II、IGS-III、IGS-IV、IGS-V 和 IGS-VI 等 6 个类群。其中 IGS-I 为最大的一群,有 27 株供试豇豆根瘤菌,占供试总菌数的 51.9%。聚类分析结果表明该群在系统发育上与其它豇豆根瘤菌和参比菌株分离。IGS-II 属于 *B. japonicaum*,主要由来自广西武鸣的菌株组成。IGS-III 属于 *B. liaoningense*,主要由来自东北德都和宝清的菌株组成。IGS-IV 属于 *B. elkanii*,主要由来自湖北红安的菌株组成。IGS-V 属于 *S. fredii*,主要由来自河北石家庄的菌株组成;IGS-VI 由单一菌株 DdE4 组成,在系统发育上属于 *Rhizobium*

leguminosarum。

表 2 供试菌株及参比菌株的表型特征分型
Table 2 Phenotypes of cowpea rhizobia and the reference strains

项目 Item		群 I Cluster I $\phi^* = 27$		群 II Cluster II $\phi = 15$	群 III Cluster III $\phi = 10$	群 IV Cluster IV $\phi = 10$
		IA $\phi = 15$	IB $\phi = 12$			
内源抗性 Antibiotic resistance (g/ml)						
氨苄 Amp	50	+ (2) **	+ (1)	+ (0)	+ (1)	+
	100	+ (5)	+ (8)	-	-	+
链霉素 Str	20	+ (1)	+ (8)	+ (8)	+ (8)	+
	40	-	-	-	-	+ (1)
壮观霉素 Spe	20	+ (1)	+ (8)	+ (1)	+ (6)	+
	40	-	+ (6)	-	-	+ (8)
四环素 Tc	10	+ (3)	+	+ (3)	+ (1)	+
	20	-	+ (8)	-	-	+ (8)
卡那霉素 Km	20	+ (3)	+ (1)	+ (0)	+ (8)	+
	40	+ (1)	+ (1)	+ (8)	-	+ (8)
新霉素 Neo	20	+	+	+ (3)	+ (1)	+
	40	+ (1)	+ (0)	+ (8)	+ (8)	+
利福平 Rif	10	+	+	+ (1)	+ (1)	+
	20	+ (1)	+ (0)	+ (8)	+ (8)	+
碳源 Carbon source						
肌醇 Inositol		-	-	-	-	-
果糖 Fructose		-	-	-	-	+ (8)
山梨醇 Sorbitol		-	-	+ (8)	-	+ (1)
葡萄糖 Glucose		+ (0)	+ (1)	+ (3)	+ (8)	+
甘露醇 Mannitol		+	+	+	+	+
乳糖 Lactose		-	-	-	-	-
糊精 Dextrine		-	-	-	-	-
蔗糖 Sucrose		+	+	+ (3)	+ (6)	+
氮源 Nitrogen source						
赖氨酸 Lys		+ (0)	+ (1)	+ (1)	+ (6)	+ (8)
甲硫氨酸 Met		+ (8)	+ (4)	+ (1)	-	+ (8)
亮氨酸 Leu		-	-	-	-	+ (8)
脯氨酸 Pro		+ (6)	+ (4)	-	-	+ (1)
精氨酸 Trp		-	-	-	-	+ (8)
色氨酸 Ser		+ (1)	+ (8)	-	-	+ (6)
KNO ₃		+	+	+	+	+
NaCl (%)						
0.4		+	+	+	+	+
0.6		+	+	-	-	+
0.8		-	+ (8)	-	-	+

* 菌株数 The number of studied strains ; + 示正反应 all strains are positive ; - :示负反应 all strains are negative
* * 表现正反应的菌株数 Numerical value in parentheses is the number of the strain with positive reaction

2.3 不同地域分离豇豆根瘤菌菌株的相似性和多样性指数

在 IGS 类群水平上考察了自不同供试地域分离的豇豆根瘤菌的相似性和多样性,结果见表 3。由表 3 可见 来自黑龙江德都和广西武鸣的菌株的多样性最为丰富,其 Simpson 指数和 Shannon-Wiener 指数分别为 0.667 和 1.243 与 0.593 和 0.961。来自湖北红安的菌株在系统发育上相对独立,仅与黑龙江德都具有一定

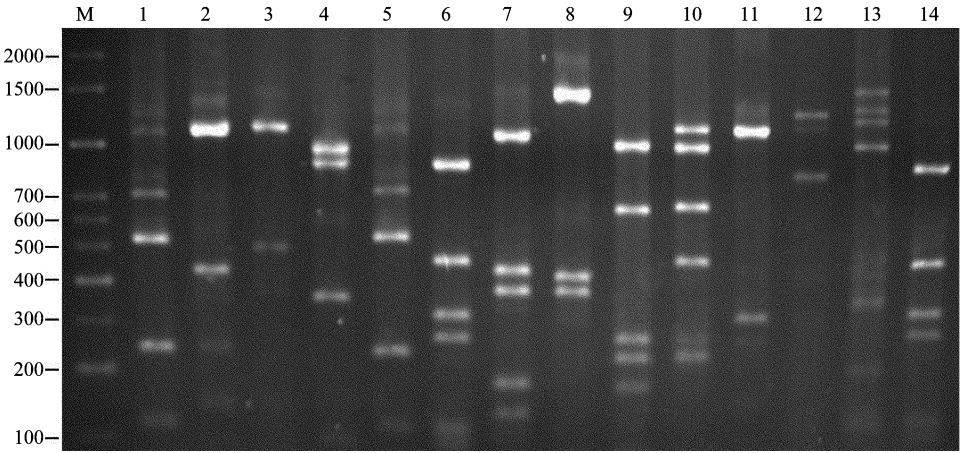


图1 由 *Hae*III 产生的代表菌株和参比菌株 16S-23S IGS RFLP 图谱

Fig. 1 16S-23S IGS RFLP fingerprints of representatives and reference strains produced by *Hae*III

M : Marker ; 1 : HdE1 , 2 : WmE2 , 3 : XtE2 ; 4 : WmE3 ; 5 : HaZ1 ; 6 : DdE4 ; 7 : BqE1 ; 8 : 2281 ; 9 : USDA6 ; 10 : SjzZ4 ; 11 : USDA205 ; 12 : USDA75 ; 13 : USDA4779 ; 14 : USDA2370

的相似性,其 Jaccard 系数为 0.25,所有分离自该地的菌株均属于 IGS-IV 群,表明该地域具有严格的地理分隔作用。分离自河北邯郸和江苏连云港的菌株同样表现出很低多样性,它们均属于 IGS- I 群。

表 3 各地域豇豆根瘤菌 IGS 类群的相似性指数和多样性指数

Table 3 Similarity and diversity of cowpea rhizobia from different regions

地域 Regions	Jaccard 指数								Simpson 指数	Shannon -Wiener 指数
	邢台 Xt	邯郸 Hd	连云港 Lyg	石家庄 Sjz	武鸣 Wm	宝清 Bq	德都 Dd	红安 Ha		
邢台 Xt									0.278	0.451
邯郸 Hd	0.50								0.000	0.000
连云港 Lyg	0.50	1.00							0.000	0.000
石家庄 Sjz	0.50	0.50	0.50						0.495	0.687
武鸣 Wm	1.00	0.33	0.33	0.67					0.593	0.961
宝清 Bq	0.33	0.50	0.50	0.33	0.25				0.375	0.563
德都 Dd	0.20	0.25	0.25	0.00	0.16	0.20			0.667	1.243
红安 Ha	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25		0.000	0.000

3 讨论

传统上,豇豆根瘤菌是由多种慢生根瘤菌组成的混杂群体。随着多样性研究的深入,研究工作者逐渐发现在豇豆根瘤菌中以一定的比例存在着快生型的根瘤菌^[0,11]。本研究中也成功地分离到快生型根瘤菌,其占豇豆根瘤菌群体的比例为 13.5%,并在分类地位上分属于 *S. fredii* 和 *R. leguminosarum*。另一方面,慢生根瘤菌在表型和遗传型上仍表现出丰富的多样性,并在 80% 的 IGS 相似性水平上分为 4 个类群。IGS- II、IGS- III 和 IGS-IV 则在系统发育上分别属于 *B. japonicum*、*B. liaoningense* 和 *B. elkanii*。IGS- I 为供试豇豆根瘤菌的优势群体,它无论在表型、还是在遗传型特征上均明显区别于其它供试慢生根瘤菌和分离自大豆的参比菌株。表明豇豆根瘤菌的优势群体仍具有明显的宿主特征。

通常,根瘤菌的分布与多样性受地理因素和生态因素的影响明显^[2]。本试验分离自湖北红安、河北邯郸和江苏连云港的菌株多样性较低,分别属于 IGS-IV 和 IGS- I 等单一的 IGS 群。尤其是分离自湖北红安的菌株多样性及与其它地域菌株的相似性均很低,在系统发育上明显表现出独立性。湖北红安位于大别山南麓,具有明显的地理隔离特征,从而使该地域的菌株在系统发育地位上区别于其它地域的菌株。耕作制度、栽培品

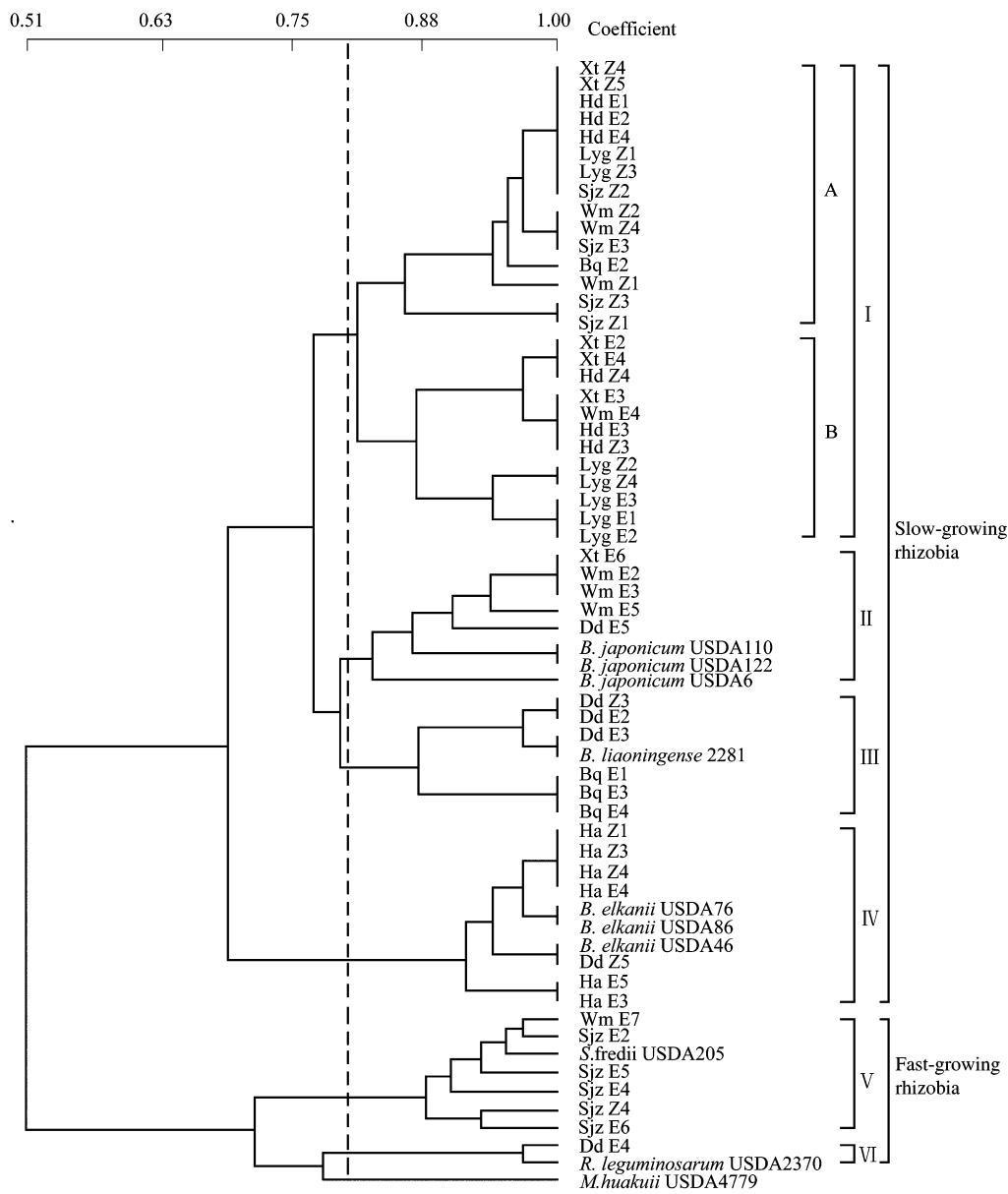


图2 供试菌株及参比菌株 IGS RFLP 分析树状图

Fig. 2 UPGMA dendrogram generated from the IGS RFLP fingerprints of cowpea rhizobia and reference strains

种和洪涝等因素均能促使根瘤菌发生较大范围的迁移与融合,从而使特定地域的菌株多样化。当不同地域的菌株之间发生长期频繁的交流后,这些地域的菌株在组成和多样性上可能趋同^[3]。河北邯郸和江苏连云港等的菌株相多样性均较低,但与其它地域菌株之间的相似性则较高,可能反映出了这一现象。

本试验通过对分离自不同地域豇豆根瘤菌表型和遗传多样性研究,表明我国主要地域的豇豆根瘤菌不仅具有丰富的多样性,而且其分布具有明显的地域特征。通过对分离自不同宿主豇豆根瘤菌的深入研究将有利于阐明宿主植物、栽培品种等因素对豇豆根瘤菌多样性的影响。

References :

[1] Zilli J é, Valisheski R R, Filho F R F, et al. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeast Brazil. Brazil J. Microbiol. , 2004, 35 :281 – 287.

[2] Horax R, Hettiarachchy N S, Chen P, et al. Functional properties of protein isolate from cowpea (Vigna unguiculata L. Walp.) . J. Food Sci. ,

2004, 69 (1) :119—121.

[3] Allen O N, Allen E K. The Leguminosae :A source book of characteristics, uses and nodulation. Madison, Wisconsin, USA :The University of Wisconsin Press, 1981.

[4] Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. Appl. Environ. Microbiol. , 2000, 66 :5437—5447.

[5] Wang F Q, Wang E T, Zhang Y F, Chen W X. Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China. Syst. Appl. Microbiol. , 2006, 29 (6) :502—517.

[6] Hunter P J, Petch G M, Calvo-Bado L A, et al. Differences in microbial activity and microbial populations of peat associated with suppression of damping-off disease caused by *Pythium sylvaticum*. Appl. Environ. Microbiol. , 2006, 72 (0) :6452—6460.

[7] Vincent J M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In International Biological Programme handbook. Oxford :Blackwell Scientific Publications, Ltd. ,1970. 73—97.

[8] Florence D B, Anne W, Renata C, et al. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small Senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. Appl. Environ. Microbiol. , 2000, 66 :3987—3997.

[9] Ma K P. Measurement of Biodiversity. In :Qian Y Q ed. Principle and methods of biodiversity studies. Beijing :Chinese Scientific & Technological Press, 1994. 141—165.

[0] Bender G L, Plazinski J, Rolfe B G. Asymbiotic acetylene reduction by a fast-growing cowpea rhizobium Strain with nitrogenase structural genes located on a symbiotic plasmid. Appl. Environ. Microbiol. , 1986. 51 (4) :868—871.

[1] Lindete M V M, Maria C N, Norma G R. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the northeast region of Brazil. Soit Biol. Biochem. , 1997, 29 :1005—1010.

[2] Peng G X, Tan Z Y, Wang E T, et al. Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang Region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 2002, 52 :457—462.

[3] Yang J K, Xie F L, Zhou J C. Genetic diversity of peanut rhizobia isolated from Jiangnan Plain and the adjacent area. Acta Ecologica Sinica, 2003, 23 :504—511.

参考文献：

[9] 马克平. 生物多样性的测定. 钱迎倩主编. 生物多样性研究的原理与方法. 北京 中国科学技术出版社, 1994. 141 ~ 156.

[3] 杨江科, 谢福莉, 周俊初. 江汉平原及其周边地区花生根瘤菌的遗传多样性研究. 生态学报, 2003, 23 :504 ~ 511.