

中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides* ssp. *Sinensis*) 根瘤内 *Frankia* 菌的遗传多样性

陈立红, 于学梅, 姚贵敏, 闫 伟

(内蒙古农业大学, 农学院, 呼和浩特 010019)

摘要: 为了研究中国沙棘亚种共生菌 *Frankia* 的遗传多样性, 利用 PCR-RFLP 分子标记方法, 对从青海西宁到内蒙古库伦 17 个地点采集的 106 个中国沙棘根瘤样品进行遗传多样性分析。供试样品 *nifD-nifK* 基因间隔区 (IGS) 扩增产物分别用 3 种内切酶 (*Hinf* I、*Hae* III 和 *Mbo* I) 酶切, 共产生 21 条酶切谱带, 其中 17 条为多态性条带, 多态位点百分比 (PPL) 为 80.99%, 所有样品可被划分为 9 个基因型。结果表明中国沙棘根瘤内的 *Frankia* 菌有丰富的遗传多样性, 土壤质量较好地点的丰富度高于土壤质量较差地点, 海拔较高地区的丰富度高于海拔较低地区, 多数地点至少有 2 种不同基因型的 *Frankia* 菌。聚类分析显示 *Frankia* 菌不同基因型间的遗传距离在 4.88% ~ 55.96% 之间, 它们在不同地点的分布是不均匀的, 没有发现不同基因型菌间的亲缘关系与地点有相关性。中国沙棘根瘤中 *Frankia* 菌可分为两个基因型组, 组内基因型分布比较一致, 而组间有明显差异。

关键词: 中国沙棘; *Frankia*; PCR-RFLP; 遗传多样性

文章编号: 1000-0933(2008)09-4213-08 中图分类号: Q143, Q945, Q948 文献标识码: A

Genetic Diversity of *Frankia* in Nodules of *Hippophae rhamnoides* ssp. *Sinensis*

CHEN Li-Hong, YU Xue-Mei, YAO Gui-Min, YAN Wei

College of Agronomy, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010019, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(9): 4213 ~ 4220.

Abstract: To estimate the genetic diversity of *Hippophae rhamnoides* ssp. *Sinensis*-*Frankia* from root nodules, PCR-RFLP molecular marker was employed to compare 106 nodule samples of *H. rhamnoides* ssp. *Sinensis* individuals collected at seventeen sites from Kulun of Inner Mongolia to Xining of Qinghai Province, China. The PCR products of *nifD-nifK* intergenic spacer (IGS) were digested with *Hinf* I, *Hae* III and *Mbo* I. 21 discernible loci are obtained from 106 samples, and 80.99% are polymorphic of these loci (PPL = 80.99%). All samples are divided into 9 IGS types. Dendrogram analysis indicates the rich genetic diversity of *Frankia* from *H. rhamnoides* root nodules. The richness of genetic diversity in good soils is greater than in bad soils, and greater in high elevation regions than in low elevation regions. At least 2 genotypes are found at most sites. The genetic distances among different genotypes vary 4.88% — 55.96%, their distribution is nonhomogeneous, and the phylogenetic relationship among different *Frankia* genotypes is not found to correlate with sites. *Frankia* in nodules of *Hippophae rhamnoides* ssp. *Sinensis* can be divided into two genotype groups.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30760201); 内蒙古自然科学基金资助项目 (200711020306, 200408020511)

收稿日期: 2007-02-07; 修订日期: 2008-01-24

作者简介: 陈立红 (1969 ~), 辽宁省人, 博士, 副教授, 主要从事微生物分子生物学研究. E-mail: chenlihong@emails.imau.edu.cn

致谢: 感谢西安电子科技大学李志武教授对本文数据处理的帮助。

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30760201), Inner Mongolia Nature and Science Research Funding (No. 200711020306, 200408020511)

Received date: 2007-02-07; **Accepted date:** 2008-01-24

Biography: CHEN Li-Hong, Ph. D., mainly engaged in microbiological molecular biology. E-mail: chenlihong@emails.imau.edu.cn

The genotypic distribution in groups is relatively consistent, while the genotypic distribution between groups is obviously different.

Key Words: *Hippophae rhamnoides* ssp. *Sinensis*; *Frankia*; PCR-RFLP; Genetic diversity

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)是胡颓子科沙棘属的灌木或乔木。中国是沙棘分布面积最大、种类最多的国家^[1]。沙棘是非豆科固氮植物,其共生固氮菌为 *Frankia* 放线菌。沙棘根瘤固氮能力很高,1hm²沙棘林地沙棘根瘤可固氮 180kg,相当于 375kg 尿素的肥力,是大豆根瘤的 2 倍^[2~4]。在我国西北部荒漠化地区土壤有机质含量极少、严重缺氮,沙棘根瘤固氮起到培肥地力的重要作用^[5,6]。不同基因类型的 *Frankia* 有不同的侵染能力和固氮效率,探明沙棘共生菌 *Frankia* 的基因类型,可发挥沙棘在西部地区生态建设中的最大生态效益,也为沙棘与 *Frankia* 协同进化等方面研究奠定基础。

编码固氮酶的 *nif* 基因是 *Frankia* 菌基因组有特色的区域,是检测未分离 *Frankia* 菌株的一个较好基因标志,可用于 *Frankia* 菌株的分类及明确在属中的地位。因此,基于 *nif* 基因的分子生物学方法常被用于检测根瘤和土壤中的 *Frankia* 菌株^[7~10]。在 *nif* 基因区域,由于 *nifD-nifK* IGS 比 *nifH-nifD* IGS 片段长且更具可变性,且 *nifD-nifK* IGS 能更好地区分 *Frankia* 菌株间的差异,因此, *nifD-nifK* IGS 常被用来鉴别和分析 *Frankia* 菌株^[11~16]。如 Lumini 等用 *nifD-nifK* IGS 的 PCR-RFLP 方法分析 *Frankia* 菌株库的基因多样性^[13]。Nalin 等用 *nifD-nifK* IGS 的 *Hea* III 酶切检测 *Frankia* 在土壤不同深度的分布^[14]。Navarro 等用 *nifD-nifK* IGS 的序列对比分析方法证明,侵染裸孔木麻黄的 *Frankia* 菌株属于胡颓子侵染组而不是木麻黄侵染组的 *Frankia* 菌株^[15]。代玉梅等用 *nifD-nifK* IGS 的 PCR-RFLP 方法分析长白山赤杨根瘤内 *Frankia* 的基因多样性^[16]。这些研究都为实验提供了可靠的理论依据。

中国境内目前大规模种植及开发利用的沙棘植物为中国沙棘亚种(*Hippophae Rhamnoides* ssp. *Sinensis*),中国沙棘在中国“三北”地区造林、水土流失和荒漠化治理中起重要的作用。中国沙棘亚种沿青藏高原的东部,经黄土高原,直达大兴安岭的西南角,成西南—东北条带状分布区^[17]。本文利用分子标记方法摸清(1)中国沙棘根瘤共生菌 *Frankia* 的遗传多样性,(2)地理环境因素对 *Frankia* 遗传多样性的分布是否有影响。

1 材料与方法

1.1 根瘤的采集

按照中国沙棘亚种的分布区,选择沙棘密集的地点,从青海西宁到内蒙古库伦设 17 个采样点,跨东经 101.75°~121.75°、北纬 36.03°~42.72°、海拔 431~2250m。共采集颜色浅黄色的中国沙棘根瘤样品 106 个,用水清洗干净,按根瘤簇分装,置于 -72℃ 的超低温冰箱保存(表 1)。

1.2 根瘤 DNA 的提取

将根瘤清洗干净,选择单个根瘤去掉外皮层,每个根瘤加 300μL TCP 抽取缓冲液[100mmol/L Tris-HCl (pH=7.0),0.5mol/L NaCl,50 mmol/L EDTA (pH 8.0),2% CTAB,1% PVP]匀浆;匀浆液在 65℃ 温育 1h,6000r/min 离心 5min。上清液加入 300μL 氯仿:异戊醇(体积比 24:1)充分混匀,13000r/min 离心 20min,收集水相加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇 -20℃ 12h,然后 13000r/min 离心 15min,收集 DNA 沉淀,用 70% 乙醇漂洗,自然干燥,溶于含 Rnase 的 TE 缓冲液(pH7.5),存于 -20℃ 冷藏。

1.3 PCR 扩增

以 *Frankia* 特异性引物 FGPD807 (5'-CACTGCTACCGGTCGATGAA-3') 和 FGPK333 (5'-CCGGGCGAAG-TGGC T-3') 扩增 *nifD-nifK* IGS,扩增片段包括 *nifD* 3'端、IGS、*nifK* 5'端^[12]。PCR 反应体系为:5μL 10 × PCR Buffer,1μL 模板 DNA,引物各为 50μmol/L,dNTP 0.1mmol/L,2.5U Taq 酶,加 ddH₂O 补足至 50μL。扩增反应在 Whatman 公司扩增仪 T1-Thermocycler 上进行。扩增条件:95℃ 预变性 5min;94℃ 变性 40s,58℃ 退火 40s,72℃ 延伸 90s,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。取 5μL PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 采集地基本条件
Table 1 Site conditions of nodule samples collected

采集地点 Sites	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔(m) Elevation	环境条件 Environmental conditions
1 库伦 Kulun	121.75°	42.72°	431	D, S0, C0
2 宁城 Ningcheng	119.32°	41.62°	560	D, S0, C0
3 赤峰 Chifeng	118.87°	42.28°	579	D, S0, C0
4 滦平 Luanping	117.53°	40.95°	530	W, S1, C1
5 多伦 Duolun	116.48°	42.18°	1180	W, S0, C0
6 凉城 liangcheng	112.48°	40.52°	1350	D, S0, C0
7 哈达门 Hada Mountain	111.65°	40.82°	1050	D, S0, C0
8 内蒙古大学实验园 IMU Garden	111.65°	40.82°	1050	W, S1, C1
9 呼和浩特东郊 Huhhot Farm	111.65°	40.82°	1050	D, S0, C0
10 内蒙古农业大学果园 IMAU Garden	111.65°	40.82°	1050	W, S1, C0
11 白塔基地 Baita	111.65°	40.82°	1077	W, S1, C1
12 武川 Wuchuan	111.42°	41.11°	1600	W, S1, C1
13 包头环科院实验园 Baotou	110°	40.58°	1080	D, S0, C1
14 鄂尔多斯 Erdos	110°	39.83°	1584	D, S0, C0
15 杭锦 Hangjin	108.7°	39.83°	1367	D, S0, C0
16 甘肃省秦王川农业高科技示范基地 Lanzhou	103.73°	36.03°	1786	W, S1, C1
17 西宁九眼泉 Xining	101.75°	36.57°	2250	D, S0, C0

D: 土壤干旱; W: 土壤潮湿; S0: 土质差; S1: 土质好; C0: 自然植被; C1: 沙棘林 D: dry soil; W: wet soil; S0: poor soil; S1: fertile soil; C0: Natural vegetative cover; C1: *H. rhamnoides* cover

1.4 扩增产物的限制性酶切分析

采用乙醇沉淀法纯化 PCR 扩增产物。经纯化的产物用 *Hinf* I、*Hae* III 和 *Mbo* I 内切酶酶切, 酶切反应条件为: 3 μ l 扩增产物, 1 μ l 内切酶 (5U/ μ l), 2 μ l 10 $\times$ Buffer, 14 μ l ddH₂O, 37℃ 酶切 1h。酶切结束后, 加入 2 μ l 10 $\times$ loading buffer 终止酶切反应, 取 10 μ l 酶切产物在 2.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.5 聚类分析

根据电泳图谱上 DNA 带的数目和位置进行数值化 (小于 100bp 的 DNA 带不计算), 应用 POPGENE Version 1.31 软件计算多态性位点百分比 (PPL) 和 Nei's 遗传距离^[18], 根据遗传距离用 PHYLIP Version 3.5c 分析软件构建系统聚类图^[19], 由 TREEVIEW 输出系统聚类图^[20]。

2 结果与分析

引物 FCPD807 和 FGPK333 扩增出 106 个供试样品的 *nifD-nifK* IGS 片段, 扩增片段的大小约 1100bp。 *nifD-nifK* IGS 扩增产物用 *Hinf* I、*Hae* III 和 *Mbo* I 内切酶酶切, 酶切图谱如下:

Hinf I -RFLP 扩增产物用 *Hinf* I 酶切后得到 7 种酶切带型 (Hi0 ~ Hi6) (图 1)。

Hae III - RFLP 扩增产物用 *Hae* III 酶切后得到 4 种酶切带型 (Ha1 ~ Ha4) (图 2)。

Mbo I -RFLP 扩增产物用 *Mbo* I 酶切后得到 6 种酶切带型 (M1 ~ M6) (图 3)。

从酶切图谱可知, 3 种酶切共产生 21 条可分析条带, 其中多态性条带 17 条, 占 80.99%。经统计, 106 个供试样品可被划分为 9 个 IGS 型 (A ~ I) (表 2)。从表

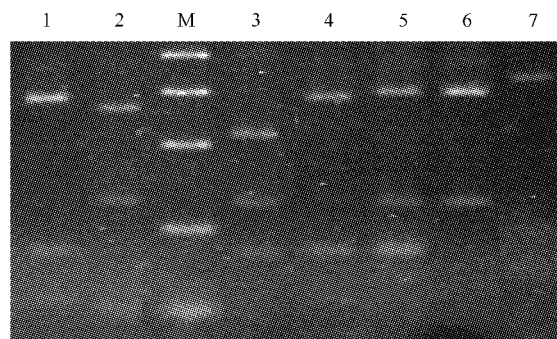


图 1 *nifD-nifK* IGS 扩增产物 *Hinf* I 酶切产物的电泳图谱

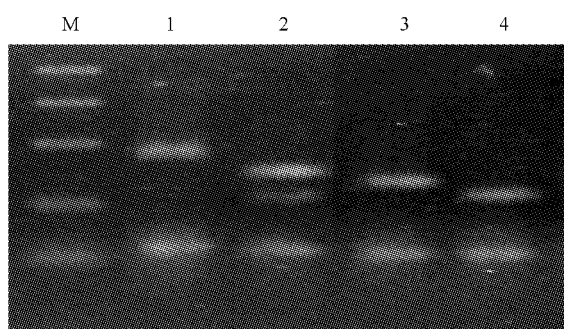
Fig. 1 RFLP patterns of *nifD-nifK* IGS digested with *Hinf* I

1. Hi1; 2. Hi3; 3. Hi4; 4. Hi5; 5. Hi6; 6. Hi2; 7. Hi0; M. DL2000

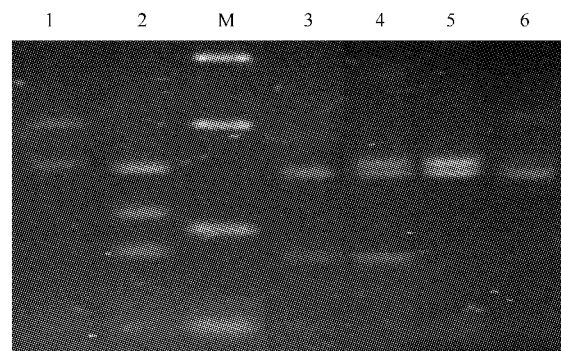
2 可知,在包头环科院实验园、甘肃省秦王川农业高科技示范基地 2 个地点,有 4 种基因型。在内蒙古农业大学果园、白塔基地和库伦 3 个地点,有 3 种基因型。在宁城、赤峰、滦平、多伦、哈达门、内蒙古大学实验园、武川和鄂尔多斯 8 个地点,有 2 种基因型。在内蒙古大学实验园和武川只发现 2 种基因型,也可能与样品数量少有关,只有 2 个样品。在凉城、呼和浩特东郊、杭锦和西宁九眼泉 4 个地点都只有 1 种基因型(A 型)。这表明中国沙棘根瘤共生菌 *Frankia* 有丰富的遗传多样性,在不同采样点沙棘根瘤内 *Frankia* 菌遗传多样性的丰富度不一样。

表 2 *nifD-nifK* IGS 扩增产物酶切带型Table 2 Restriction patterns of amplified *nifD-nifK* IGS from nodular *Frankia* strains

采集地点 Sites	样品数 No. of Samples	酶切图谱 Restriction enzymes patterns				参考文献 References
		Hinf I	Hae III	Mbo I	IGS 型 IGS-Types	
1	8	Hi1	Ha1	M1	A	本研究 This study
	1	Hi2	Ha2	M2	D	本研究
	2	Hi0	Ha2	M1	H	本研究
2	1	Hi1	Ha1	M1	A	本研究
	7	Hi1	Ha1	M3	B	本研究
3	2	Hi1	Ha1	M1	A	本研究/21
	2	Hi5	Ha4	M5	F	本研究/21
4	8	Hi1	Ha1	M1	A	本研究
	1	Hi2	Ha2	M2	D	本研究
5	12	Hi1	Ha1	M1	A	本研究
	5	Hi5	Ha4	M5	F	本研究
6	5	Hi1	Ha1	M1	A	本研究
7	1	Hi1	Ha1	M3	B	本研究/21
	1	Hi1	Ha1	M1	A	本研究/21
8	1	Hi1	Ha1	M1	A	本研究/21
	1	Hi3	Ha2	M3	C	本研究/21
9	5	Hi1	Ha1	M1	A	本研究
10	2	Hi1	Ha1	M1	A	本研究/21
	2	Hi4	Ha3	M4	E	本研究/21
	1	Hi3	Ha2	M3	C	本研究/21
11	1	Hi6	Ha2	M6	G	本研究/21
	2	Hi1	Ha1	M1	A	本研究/21
	2	Hi2	Ha2	M2	D	本研究/21
12	1	Hi2	Ha2	M2	D	本研究
	1	Hi1	Ha1	M1	A	本研究
	1	Hi1	Ha1	M1	A	本研究/21
13	2	Hi3	Ha2	M3	C	本研究/21
	1	Hi2	Ha2	M2	D	本研究/21
	2	Hi4	Ha3	M4	E	本研究/21
13	2	Hi2	Ha2	M2	D	本研究
	3	Hi1	Ha1	M1	A	本研究
15	1	Hi1	Ha1	M1	A	本研究
16	2	Hi4	Ha3	M4	E	本研究
	1	Hi3	Ha2	M3	C	本研究
	1	Hi1	Ha1	M1	A	本研究
16	1	Hi0	Ha4	M1	I	本研究
	1	Hi1	Ha1	M1	A	本研究
17	5	Hi1	Ha1	M1	A	本研究

图2 *nifD-nifK* IGS 扩增产物 *Hae* III 酶切产物的电泳图谱Fig. 2 RFLP patterns of *nifD-nifK* IGS digested with *Hae* III

1. Ha3; 2. Ha4; 3. Ha1; 4. Ha2; M. DL2000

图3 *nifD-nifK* IGS 扩增产物 *Mbo* I 酶切产物的电泳图谱Fig. 3 RFLP patterns of *nifD-nifK* IGS digested with *Mbo* I

M3; 2. M4; 3. M5; 4. M6; 5. M2; 6. M1; M. DL2000

A 型存在于所有的采样点,共 69 个样品,占 65.09%;D 型存在于 6 个采样点(库伦、滦平、白塔基地、武川、包头环科院实验园、鄂尔多斯),共 8 个样品。C 型存在于 4 个采样点(内蒙古大学实验园、内蒙古农业大学果园、包头环科院实验园、甘肃省秦王川农业高科技示范基地),共 5 个样品。E 型存在于 3 个采样点(内蒙古农业大学果园、包头环科院实验园、甘肃省秦王川农业高科技示范基地),共 6 个样品。C 型和 E 型除在内蒙古大学实验园外,在其他 3 个采样点都是同是存在,这可能与在内蒙古大学实验园的样品数量少有关(只有 2 个样品,其中一个为 A 型,另一个为 C 型),被发现于中西部采样点。B 型存在于中东部的 2 个采样点(宁城、哈达门),共 8 个样品。F 型存在于东部的 2 个采样点(赤峰、多伦),共 7 个样品。G、H、I 型仅发现于白塔基地、库伦和甘肃省秦王川农业高科技示范基地,分别为 1 个、2 个和 1 个样品。B~I 8 个类型只占 34.91%。这表明不同 IGS 型在不同采样点的分布是不均匀的,有些基因型分布广泛,有些分布有区域性(表 2、3)。

表 3 不同 IGS 型菌株的比率

Table 3 Percentage of different IGS types strains

IGS 型 IGS-types	A	B	C	D	E	F	G	H	I
样品数 No. of samples	69	8	5	8	6	7	1	2	1
百分率 Percentage(%)	65.09	7.55	4.72	7.55	5.66	6.60	0.94	1.89	0.94

根据电泳图谱上 DNA 带的有或无以 1 或 0 计数,计算不同 IGS 型间的遗传距离和遗传相似性,并构建系统聚类图(图 4)。从图可以看出,9 个 IGS 型可分成两个大组,A、B、E、F、H 在一个组内,C、D、G、I 在另一个组内,也就是说 A、B、E、F、H 型之间亲缘关系近,而 C、D、G、I 型之间亲缘关系近,不同 IGS 型间的遗传距离在 4.88%~55.96%之间(表 4)。在同一地点有遗传关系很远的 IGS 型,如 C 型和 E 型经常同时存在,但它们之间的遗传距离最远,为 55.96%;在不同地点有遗传关系较近的 IGS 型,如 F 型存在于东部采样点,而 E 型存在于中西部采样点,它们之间的遗传距离为 27.19%。没有发现不同基因型 *Frankia* 菌的亲缘关系与采样地点有相关性。

3 讨论

本研究采用的 106 个样品来源于从内蒙古库伦到青海西宁 17 个地点,经度从 121.75°到 101.75°,纬度从 42.72°到 36.03°,最远的两个采样地点库伦与西宁九眼泉之间相距约 3000km。这些地点的气候条件、土壤和植被类型都有差异,设想地理环境因素会影响 *Frankia* 菌多样性的分布。研究结果表明在包头环科院实验园、甘肃省秦王川农业高科技示范基地的中国沙棘根瘤内有 4 种基因型,在内蒙古农业大学果园、白塔基地和库伦有 3 种基因型,这些地点除库伦外土壤质量均较好。在宁城、赤峰、滦平、多伦、哈达门、内蒙古大学实

验园、武川和鄂尔多斯有 2 种基因型,在凉城、呼和浩特东郊、杭锦和西宁九眼泉只有 1 种基因型(A 型),这些地点除滦平、内蒙古大学实验园和武川外,土壤质量较差。在内蒙古大学实验园和武川只发现 2 种基因型,也可能与样品数量少有关,只有 2 个样品。这些显示根瘤中 *Frankia* 菌的丰富度与土壤质量有关,在土壤质量较好的地区多样性高,在土壤质量较差的地区多样性偏低,在多数地点至少有 2 种不同基因型的 *Frankia* 菌。Navarro 在研究中发现与裸孔木麻黄共生 *Frankia* 菌株的分布与土壤类型有关^[22]。

表 4 不同 IGS 型间 Nei's 遗传距离
Table 4 Nei's genetic distance of different IGS types

IGS 型 IGS-Types	A	B	C	D	E	F	G	H	I
A	****								
B	0.0488	****							
C	0.5596	0.4796	****						
D	0.4796	0.5596	0.2719	****					
E	0.4796	0.5596	0.5596	0.4796	****				
F	0.2719	0.3365	0.4796	0.4055	0.2719	****			
G	0.4796	0.5596	0.4055	0.1001	0.3365	0.2719	****		
H	0.4055	0.4796	0.4796	0.4055	0.4055	0.2113	0.4055	****	
I	0.4055	0.4796	0.3365	0.1542	0.5596	0.4796	0.2719	0.2113	****

从西宁九眼泉到库伦 17 个采样点的海拔高度基本上是由高到低的趋势,可分为:海拔高度 I (>1500m),海拔高度 II (1500~1000m)和海拔高度 III (<1000m)。海拔高度 I 的采样点有西宁九眼泉、甘肃省秦王川农业高科技示范基地、有鄂尔多斯和武川,共采集 17 个样品,发现有 5 种基因型(A、C、D、E、I);海拔高度 II 的采样点杭锦、包头环科院实验园、白塔基地、内蒙古农业大学果园、呼和浩特东郊、内蒙古大学实验园、哈达门、凉城和多伦,共采集 40 个样品,发现共有 8 种基因型(A、B、C、D、E、F、G、I);海拔高度 III 的采样点有滦平、赤峰、宁城和库伦,共采集 49 个样品,发现共有 5 种基因型(A、B、D、F、H)。这说明中国沙棘根瘤内 *Frankia* 菌遗传多样性的丰富度与海拔高度也有关,海拔较高地区的丰富度高于海拔较低地区。

不同基因型在不同采样点的分布是不均匀的,有些基因型分布广泛,有些基因型分布有区域性。如 A 型存在于所有的采样点,占 65.09%,显然它是与沙棘共生的优势 *Frankia* 菌类型,在改良黄土高原贫瘠土壤中作用最大;D 型虽然少,只有 8 个样品,但存在于地理因素不同的 6 个采样点(库伦、滦平、白塔基地、武川、包头环科院实验园、鄂尔多斯,经度 121.75°~108.75°,纬度 42.72°~39.83°),这显示 A 型和 D 型的适应能力强,腐生能力强,因而生境非常广泛;也有可能它们分化的早,在环境中存在的时间较长。C 型和 E 型被发现于中西部采样点,B 型和 F 型仅发现中东部采样点。这些说明地理环境因素可能对不同基因型分布的影响不一样,对有些基因型的影响较大(B、C、E、F 型),或许是它们分布的限制因素;而对另一些基因型的影响则很小(A、D 型)。也有可能地理环境因素并不影响 *Frankia* 菌在土壤中的分布,而是影响了菌与寄主植物形成根瘤共生体的能力。Nalin 报道在土壤不同深度,不同基因型 *Frankia* 菌株的分布也是不均匀的^[23]。

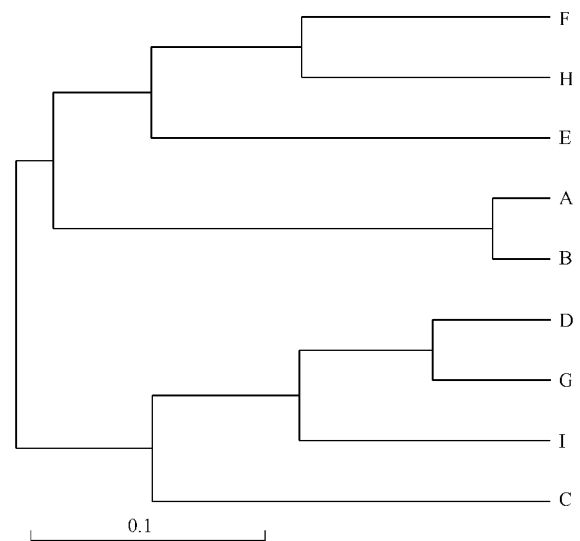


图 4 不同 IGS 型间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图
Fig. 4 UPGMA dendrogram for different IGS types based on Nei's genetic distance

中国沙棘源于青藏高原,经青海、甘肃、陕西、山西、河北、内蒙古和东北而逐渐扩展开来,在地理上呈现自西南向东北的演进方向。在中国沙棘的天然分布区内,根据中国沙棘性状的差异,可分为干旱、半干旱生态-地理群和半干旱半湿润生态-地理群^[24]。本研究结果表明从西宁到库伦的不同采样地带,中国沙棘根瘤中 *Frankia* 菌不同基因型的分布发生了变化。从西宁到内蒙古大学实验园地带的各采样点 *Frankia* 菌的基因型分布比较一致,包括 A、C、D、E、G、I 基因型,称为基因型组 I;从哈达门到库伦地带的各采样点 *Frankia* 菌的基因型分布也比较一致,包括 A、B、D、F、H 基因型,称为基因型组 II;而两个基因型组之间 *Frankia* 菌的基因型分布有明显差异。可以看出中国沙棘根瘤内 *Frankia* 菌的两个基因型组与中国沙棘的两个生态—地理群基本吻合。

从 PCR-RFLP 聚类分析表明,遗传距离最远的基因型(C 型和 E 型)经常同时存在,遗传距离较近的基因型(F 型和 E 型)存在于距离最远的两个地点,在本研究中没有发现不同基因型菌的亲缘关系与采样地点有相关性。由于 PCR-RFLP 分子标记方法在系统发育分析方面有一定局限性,还不能得出确切的结论。要深入研究 *Frankia* 各种基因型的亲缘关系和系统发育,下一步要进行 *Frankia* 的分离与纯培养,并应用 DNA 序列对比分析等其它分子生物学方法进行验证。

Frankia 菌与沙棘形成的共生体根瘤进行生物固氮,有助于沙棘在恶劣生境中存活并发挥其作用。土壤中 *Frankia* 菌的数量越多,寄主植物形成的根瘤越多,植株长势越好。可以在沙棘种植区进行人工接种适合本地区的 *Frankia* 菌,让沙棘在恶劣生境中存活并发挥其最大的作用。因此,摸清了不同基因型 *Frankia* 菌在不同地区的分布、各种基因型菌的固氮能力和与寄主植物形成根瘤的能力,在“三北”地区的水土保持、小流域治理、生态自然修复、退耕还林还草工程及三北防护林工程等有重要意义。

4 结论

- (1) 中国沙棘根瘤共生菌 *Frankia* 有丰富的遗传多样性,其丰富度与土壤质量有关,在土壤质量较好的地区多样性高,在土壤质量较差的地区多样性偏低;其丰富度与海拔高度也有关,海拔较高地区的丰富度高于海拔较低地区;在多数地点至少有 2 种不同基因型的 *Frankia* 菌。
- (2) *Frankia* 菌不同基因型间的遗传距离在 4.88% ~ 55.96% 之间,它们在不同地点的分布不均匀,有些基因型分布广泛,有些基因型分布有区域性,没有发现不同基因型 *Frankia* 菌的亲缘关系与采样地点有相关性。
- (3) 从西南向东北走向,可把中国沙棘根瘤中 *Frankia* 菌分为两个基因型组,组内 *Frankia* 菌的基因型分布比较一致,而组间有明显差异。

References:

- [1] Li G Q, Tang D R, Zhao Y Q. Resources and utilization of *Hippophae* genus. *Hippophae*, 2000, 13(2):20—26.
- [2] Zhang J K, Lin W. Formation and Nitrogen-fixing ability of *Hippophae rhamnoides* L. nodules. *Hippophae*, 1995, 8(3):9.
- [3] Oremus P A J. A quantitative study of nodulation in *Hippophae rhamnoides* L. in a coastal dune area. *Plant and Soil*, 1979, 52(1):59.
- [4] Akkermans A D L. Nitrogen fixation and nodulation of *Alnus* and *Hippophae* under natural condition. These der Rijks University. Leiden, 1971.
- [5] Zhang J D. Mixed planted model of *Populus davidiana* Dode and *Hippophae rhamnoides* L. in the middle region of Gansu Province. *Hippophae*, 2003, 16(2):13—14.
- [6] Tai Y L. Development of *Hippophae* resources, Improvement of soil and water conservation and ecology construction in the “Sanbei” regions. *Hippophae*, 2000, 13(1):10—14.
- [7] Nalin R, Domenach A M, Normand P. Molecular structure of the *Frankia* spp. *nifD-K* intergenic spacer and design of *Frankia* genus compatible primer. *Molecular Ecology*, 1995, 4:483—491.
- [8] Simonet P, Grosjean M C, Misra A K, et al. *Frankia* genus specific characterisation by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57, 3278—3286.
- [9] Lumini E, Bosco M. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Identification and Host Range of Single-Spore Isolates of the Flexible *Frankia* sp. Strain UFI 132715. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62, 3026—3029.
- [10] Courmoyer B, Normand P. Characterization of a spontaneous thiostrepton-resistant *Frankia alni* infective isolate using PCR-RFLP of *nif* and *gln* II genes. *Soil Biol. Biochem.*, 1994, 26:553—559.

- [11] Normand P, Simonet P, Bardin R. Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Molecular Gen. Genet.*, 1988, 213:238—246.
- [12] Jamann S, Fernandez M P, Normand P. Typing method for N₂-fixing bacteria based on PCR-RFLP; application to the characterization of *Frankia* strains. *Molecular Ecology*, 1993, 2: 17—26.
- [13] Lumini E, Bosco M. Polymerase chain reaction-restriction fragment size polymorphisms for assessing and increasing biodiversity of *Frankia* culture collections. *Canadian Journal of Botany*, 1999, 77:1261—1269.
- [14] Nalin R, Normand P, Simonet P. Polymerase chain reaction and hybridization on DNA extracted from soil as a tool for *Frankia* spp. population distribution studies in soil. *Canadian Journal of Botany*, 1999, 77:1239—1247.
- [15] Navarro E, Nalin R, Gauthier D. The nodular microsymbionts of *Gymnostoma* spp. are *Elaeagnus*-infective strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63:1610—1616.
- [16] Dai Y M, He X Y, Zhang C G, *et al.* Characterization of genetic diversity of *Frankia* strains in nodules of *Alnus nepalensis* (D. Don) from the Hengduan Mountains on the basis of PCR-RFLP analysis of the *nifD-nifK* IGS. *Plant and Soil*, 2004, 267: 207—212.
- [17] HU J Z. Strategic Thought on Regionalization of Plantation and Development of *Hippophae* in Three North Areas of China. *Research of Soil and Water Conservation*, 2006, 13: 4—7.
- [18] Yeh F C, Yang R C, Royle T B J, *et al.* POPGENE V1.31. <http://www.ualberta.ca/~fyeh>, 1997.
- [19] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1993.
- [20] Page R D M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.*, 1996, 12:357—358.
- [21] Chen L H, Yan W, Liang J H, *et al.* Genetic Diversity of *Frankia* Strains from *Hippophae rhamnoides* L. Nodules in Inner Mongolia. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, 26(12):2458—2462.
- [22] Navarro E, Jaffre T, Gauthier D, *et al.* Distribution of *Gymnostoma* spp. Microsymbiotic *Frankia* strains in New Caledonia is related to soil type and to host-plant species. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 1781—1788.
- [23] Nalin, R, Normand P, Domenach A M. Distribution and N₂-fixing activity of *Frankia* strains in relation to soil depth. *Physiologia Plantarum*. 1997, 99: 732—738.
- [24] Huang Q. Geographical variation of *Hippophae rhamnoides* ssp. *Sinensis*. *Hippophae*, 2003,16(1): 8—13.

参考文献:

- [1] 李根前,唐德瑞,赵一庆. 沙棘属植物资源与开发利用. *沙棘*,2000,13(2): 20~26.
- [2] 张吉科,林纬. 沙棘根瘤的形成与固氮能力, *沙棘*. 1995,8(3): 3~9.
- [5] 张建得. 甘肃中部地区青杨沙棘混交模式, *沙棘*. 2003,16(2): 13~14.
- [6] 邵源临. 搞好沙棘开发 促进三北地区水土保持生态建设. *沙棘*,2000,13(1): 10~14.
- [17] 胡建忠. “三北”地区沙棘属植物的区域化种植开发探讨. *水土保持研究*,2006,13: 4~7.
- [21] 陈立红,闫伟,梁金慧等. 内蒙古沙棘共生菌 *Frankia* 的遗传多样性. *西北植物学报*,2006,26(12):2458~2462.
- [24] 黄铨. 中国沙棘的地理变异. *沙棘*,2003,16(1): 8~13.