

金沙江干热河谷区胡枝子 (*Lespedeza Michx*) 根瘤菌多样性及其系统发育

彭贤超¹, 张小平^{1,*}, 徐开未¹, 黄昌学¹, K. Lindstrom²

(1. 四川农业大学资源环境学院, 雅安 625014;

2. Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki 00014 Finland)

摘要: 研究利用数值分类、BOXAIR-PCR 指纹图谱、16S rDNA PCR-RFLP、16S rDNA 和 GS II 序列分析等方法, 研究了分离自金沙江干热河谷区的 86 株胡枝子根瘤菌的多样性和系统发育, 结果表明金沙江干热河谷区胡枝子根瘤菌蕴涵丰富的生物多样性。通过数值分类, 供试未知菌株表现出极大的表型性状多样性, 能耐高温 (60 °C) 和低 pH (4.0), 在低温 (10 °C) 或者高 pH (9.0) 条件下生长很差, 耐盐性也很差。供试未知菌株的 16S rDNA 用 *Hae* III、*Msp* I、*Hinf* I 和 *Taq* I 酶切后具有 16 种遗传图谱类型, 其中 10 株供试未知菌的 16S rDNA 遗传图谱类型不同于所选用的已知参比菌株。BOXAIR-PCR 的分群结果分散, 很多在 16S rDNA PCR-RFLP 中具有相同遗传类型的菌株也表现较大差异, 表明了供试菌株在基因组水平上差异很大。序列分析结果表明, 6 株代表菌株分布于 *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、*Bradyrhizobium* 4 个属, 16S rDNA 序列与 GS II 序列分别构建的系统发育树在属水平上基本一致, 但 16S rDNA 序列的同源性比 GS II 高, 6 株代表菌株间 16S rDNA 序列的同源性在 87.5% ~ 99.5% 之间, GS II 序列的同源性在 79.4% ~ 89.8% 之间; 而代表菌株与亲缘关系最近的参比菌株间的 16S rDNA 序列的同源性为 99.9% ~ 100%, GS II 的同源性为 88.9% ~ 99.6%。

关键词: 数值分类; BOXAIR-PCR; 16S rDNA; PCR-RFLP; GS II 基因; 序列分析

文章编号: 1000-0933(2008)11-5469-13 中图分类号: Q143 文献标识码: A

Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from root nodules of *Lespedeza Michx* in arid-hot valley of Jinsha River

PENG Xian-Chao¹, ZHANG Xiao-Ping^{1,*}, XU Kai-Wei, HUANG Chang-Xue¹, K. Lindstrom²

1 College of Resource and Environment, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014;

2 Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Finland 00014

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(11): 5469 ~ 5481.

Abstract: The diversity and phylogeny of 86 rhizobial strains which isolated from the root nodules of *Lespedeza Michx* in arid-hot valley of Jinsha river in Sichuan, China, were studied by numerical taxonomy, BOXAIR-PCR fingerprinting, 16S rDNA PCR-RFLP, 16S rDNA and GS II sequences. The result of numerical taxonomy showed that there was a great phenotypic diversity among the isolates. The strains tested could grow normally at 60 °C or pH < 4.0 culture conditions. However, they could not grow at 10 °C or pH > 9.0. They were not endured salt tolerance. The same strains used in numerical taxonomy were analyzed by 16S rDNA PCR-RFLP with four kinds of restriction endonucleases (*Hae* III, *Msp* I, *Hinf* I and *Taq* I). The strains had 16 genotypes and 10 unique genotypes different from the reference strains. Based on

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30570062)

收稿日期: 2007-11-21; 修订日期: 2008-08-29

作者简介: 彭贤超 (1982 ~), 男, 四川犍为人, 硕士生, 主要从事土壤与环境微生物生态研究. E-mail: super4028@yahoo.com.cn

通讯作者 Corresponding author. E-mail: aumdwbs@sicau.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30570062)

Received date: 2007-11-21; Accepted date: 2008-08-29

Biography: PENG Xian-Chao, Master candidate, mainly engaged in soil and environmental microbial ecology. E-mail: super4028@yahoo.com.cn

the dendrograms generated by BOX-PCR, the strains were divided into 37 groups at the similarity of 82%, some strains belonged to one phenon in 16S rDNA PCR-RFLP are in different phenons in BOXAIR-PCR, which showed that there was a great diversity in genes among the stains. The results of analysis on 16S rDNA and GS II sequences indicated that six representatives of strains were classified into four groups on genus *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium*, and 16S rDNA sequencing homology was higher to GS II sequencing homology. GS II sequencing homology and 16S rDNA sequencing homology among six representatives of strains were respectively between 79.4%–89.8% and 87.5%–99.5%. Further, GS II sequencing homology and 16S rDNA sequencing homology between the representatives of strains and phylogenetically closest reference stains were respectively from 88.9% to 99.6% and from 99.9% to 100%.

Key Words: numerical taxonomy; BOXAIR-PCR; 16S rDNA; PCR-RFLP; GS II gene; sequences analysis

金沙江干热河谷主要包括四川省西昌以南的金沙江、雅砻江和安宁河河谷,河谷内海拔 800~2000m,河谷两侧的山地海拔 3000~5000m。这一地区暖冬长,气温日差很大,光热资源丰富,但年降雨量少,且主要集中在夏季,其它季节十分干旱,形成特殊的干热河谷景观,具有典型的热带河谷气候特征和山区立体气候特点^[1],是我国少有的生物资源富集区。同时,这一地区水土流失十分严重,土壤贫瘠,裸地面积大,是长江上游主要产沙区;植被以荒草地及灌丛草地为主,大部分是耐旱耐贫瘠的豆科草本和木本植物,其中胡枝子属豆科植物分布非常广泛。

胡枝子(*Lespedeza Michx*),属于豆科蝶形花亚科,我国有约 60 余种,广布于全国。胡枝子属植物大多能耐干旱,为良好的水土保持植物及固沙植物,可作饲料和绿肥,又为蜜源植物和药用植物,在工业、农业、林业、畜牧业、医药保健和环境保护等方面具有重要的应用价值,是固沙、固土和保水的先锋或伴生植物^[2,3]。

根瘤菌(rhizobia)是一类广泛分布于土壤中的革兰氏阴性细菌,在长期进化过程中,由于受寄主的选择和环境的胁迫,分别向不同的方向进化,形成了丰富的生物多样性(biodiversity)特征,通常用表型(phenotype)和遗传型(genotype)的多样性来表述。

在多样性研究的基础上,常常需要测定根瘤菌各遗传群的代表菌株的保守基因片段序列,进一步确定菌株的系统发育地位。研究者根据 16S rRNA 基因部分或全序列分析,对根瘤菌及相关细菌进行系统发育研究^[4,5],根据构建的系统发育树,来反映其系统发育关系。GS II 基因是控制生物固氮作用中氨同化过程的关键酶系合成的基因,具有高度的保守性,也是研究生物发育和进化的理想“分子钟”基因^[6]。

本研究利用数值分类(numerical Taxonomy)、BOXAIR-PCR 指纹图谱、16S rDNA PCR-RFLP 分析、16S rDNA 序列分析综合考察了自金沙江干热河谷区胡枝子分离的根瘤菌的多样性,及其在根瘤菌系统发育中的位置,旨在为确定胡枝子根瘤菌的系统分类地位提供科学依据,同时对丰富并合理利用胡枝子根瘤菌多样性的基因资源,选育和应用高效胡枝子根瘤菌剂以改善该地区的生态条件也具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 样品采集

采样地点为攀枝花(东区,西区,仁和区,盐边县,米易县),凉山州(会理县,会东县,宁南县,普格县,西昌市),选取颜色较深的根瘤放入装有无水氯化钙的小瓶中保存。根瘤宿主:截叶铁扫帚(*Lespedeza cuneata*)、多花胡枝子(*Lespedeza floribunda*)、美丽胡枝子(*Lespedeza formosa*)(表 1)。

1.2 菌株分离,纯化与回接

根瘤表面灭菌后用无菌镊子压破,挑取根瘤悬液在 YMA 平板上采用划线培养法分离;根瘤菌菌落表面光滑、突起、有多糖产生,纯化后革兰氏染色镜检阴性、无芽孢、短杆状,YMA 斜面接种保藏。

回接结瘤实验在无菌沙钵中进行,具体操作方法参照 Yang 等^[7]。

表 1 供试菌株

Table 1 Bacterial Strains tested

菌株 Strains	宿主 Host Plant	来源 Source	海拔 Elevation(m)	土壤类型 Soil type
SCAU41,42,43,44	<i>L. floribunda</i>	Xichuang, Liangshan	1440	Red-yellow soil
SCAU45,46	<i>L. cuntea</i>	East District, Panzhihua	1500	Red-yellow soil
SCAU48,49,50	<i>L. cuntea</i>	Renhe, Panzhihua	1670	Red-yellow soil
SCAU51,52	<i>L. cuntea</i>	Renhe, Panzhihua	1720	Red-yellow soil
SCAU53,54	<i>L. cuntea</i>	Yanbian, Panzhihua	1085	Dry-red soil
SCAU55,56,57	<i>L. cuntea</i>	Miyi, Liangshan	1085	Dry-red soil
SCAU58,59,60	<i>L. cuntea</i>	Renhe, Panzhihua	1380	sand soil
SCAU61,62,63	<i>L. cuntea</i>	Yanbian, Panzhihua	1150	Yellow soil
SCAU64,65,66	<i>L. cuntea</i>	Huili, Liangshan	1760	Red-yellow soil
SCAU67,68	<i>L. cuntea</i>	Huili, Liangshan	1770	Purple soil
SCAU69,70,71	<i>L. cuntea</i>	Huidong, Liangshan	1800	Purple soil
SCAU72,73	<i>L. cuntea</i>	Huidong, Liangshan	1650	Purple soil
SCAU74,75,76	<i>L. cuntea</i>	Huidong, Liangshan	2350	Yellow soil
SCAU77,78,79,80	<i>L. cuntea</i>	Huidong, Liangshan	1650	Red soil
SCAU81,82,83	<i>L. cuntea</i>	Huidong, Liangshan	750	Yellow sand soil
SCAU84,85,86,87,88	<i>L. cuntea</i>	Ningnan, Liangshan	1110	Red-yellow Soil
SCAU89	<i>L. cuntea</i>	Ningnan, Liangshan	930	Yellow sand soil
SCAU90,91,92,93	<i>L. cuntea</i>	Puge, Liangshan	1610	Purple soil
SCAU94,95,96	<i>L. cuntea</i>	Xichuang, Liangshan	2290	Red soil
SCAU97	<i>L. cuntea</i>	Xichuang, Liangshan	1440	Red-yellow Soil
SCAU98,99	<i>L. cuntea</i>	Xichuang, Liangshan	1430	Yellow sand soil
SCAU100,101	<i>L. cuntea</i>	Xichuang, Liangshan	1520	Purple soil
SCAU102,103	<i>L. cuntea</i>	Xichuang, Liangshan	1470	Purple soil
SCAU104,105,106	<i>L. cuntea</i>	Xichuang, Liangshan	1500	Purple soil
SCAU107	<i>L. cuntea</i>	Xichuang, Liangshan	1480	Purple soil
SCAU108,109,110	<i>L. cuntea</i>	Xichuang, Liangshan	1500	Dry-red soil
SCAU111,112,113,114	<i>L. formosa</i>	Huili, Liangshan	1730	Red soil
SCAU115,116	<i>L. formosa</i>	Huili, Liangshan	1800	Purple soil
SCAU117	<i>L. formosa</i>	Puge, Liangshan	1230	Yellow soil
SCAU118,119,120	<i>L. formosa</i>	Puge, Liangshan	1610	Purple soil
SCAU121,122,123	<i>L. formosa</i>	Xichuang, Liangshan	1430	Yellow sand soil
SCAU124,125,126,127	<i>L. formosa</i>	Xichuang, Liangshan	1500	Dry-red soil
<i>Azorhizobium. caulinodans</i> USDA4892 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	美国 USA		
<i>Mesorhizobium. ciceri</i> USDA3378 ^T	<i>Cicerarinum</i>	美国 USA		
<i>M. huakuii</i> CCBAU2609 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	CCBAU		
<i>M. loti</i> NAP2234	<i>Lotus corniculatus</i>	新西兰 New Zealand		
<i>M. phurifarium</i> LMG11892 ^T		比利时 Belgium		
<i>Rhizobium etli</i> CFN42 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	墨西哥 Mexico		
<i>R. leguminosarum</i> USDA2370 ^T	<i>Pisum sativum</i>	美国 USA		
<i>R. leguminosarum</i> 127K17	<i>Phaseolus</i> sp.	美国 USA		
<i>R. mongolense</i> USDA1844 ^T	<i>Glycine max</i>	美国 USA		
<i>R. tropici</i> ;typeB CIAT899 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	哥伦比亚 Colombia		
<i>Sinorhizobium. fredii</i> USDA205 ^T	<i>Glycine soja</i>	河南 Henan China		
<i>S. medicae</i> USDA1037 ^T	<i>Medicago truncatula</i>	美国 USA		
<i>S. meliloti</i> USDA1002 ^T	<i>Medicago sativa</i>	美国 USA		
<i>S. meliloti</i> 102F28	<i>Medicago sativa</i>	美国 USA		
<i>S. saheli</i> LMG7837 ^T (USDA4102)	<i>Sesbania cannabina</i>	美国 USA		
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA76 ^T	<i>Glycine max</i>	美国 USA		
<i>B. japonicum</i> USDA6 ^T	<i>Glycine max</i>	美国 USA		
<i>B. liaoningensis</i> USDA3622 ^T	<i>Glycine max</i>	美国 USA		
<i>B. yuanmingensis</i> CCBAU10071 ^T	<i>Lespedeza cuneata</i>	CCBAU		
<i>Allorhizobium. undicola</i> LMG11875 ^T	<i>Neptunia natans</i>	比利时 Belgium		

T: Type strain

1.3 供试菌株

从所采集的胡枝子根瘤中共分离得到 167 株根瘤菌,经过回接结瘤实验,其中 87 株成功结瘤,在实验过程中,SCAU47 因真菌污染被淘汰,最终采用了 86 株供试未知菌株(表 1);另外还选用了 20 株参比菌株,它们分属于 *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、*Bradyrhizobium*、*Azorhizobium* 和 *Allobacterium* 6 个属。

1.4 数值分类实验方法

数值分类共测定了 117 项生理生化指标,其中:(1)唯一碳源利用 33 项:阿拉伯糖、蔗糖、丙二酸钠、酒石酸钠、七叶苷、果糖、乳糖、葡萄糖酸钠、麦芽糖、山梨酸、苹果酸、肌酸、蔗糖、L-脯氨酸、甘氨酸、乙酸钠、环糊精、L-天冬素、淀粉、L-精氨酸、柠檬酸钠、L-甲硫氨酸、草酸钠、己二酸、丙酮酸钠、核酸、鼠李糖、甘露糖、马尿酸钠、山梨醇、香兰素、海藻糖、木糖。(2)唯一氮源利用 13 项:L-脯氨酸、L-精氨酸、L-天冬素、L-半胱氨酸、L-谷氨酸、L-色氨酸、D-甲硫氨酸、D-缬氨酸、甘氨酸、L-苏氨酸、L-亮氨酸、L-酪氨酸、L-苯丙氨酸。(3)染料及化学药物的抗性测定 18 项,包括溴百里酚蓝、亚甲蓝、亚甲绿、俾士麦棕、中性红、甲基红、溴甲酚紫等 7 种染料和亚硝酸钠、脱氧胆酸钠 2 种化学药物,浓度为 0.1% 和 0.2%。(4)对抗生素的抗性测定 24 项,有氨卞青霉素、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、头孢霉素、林可霉素 6 种抗生素,浓度分别为 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 和 300 μ g/ml。(5)其它测定项目 29 项,包括亚甲蓝还原反应,石蕊牛奶反应(产酸、产碱、胨化、酸凝、还原),3-酮基乳糖测定,过氧化氢酶试验,脲酶测定,耐尔蓝还原反应, L-苯丙氨酸脱氨酶测定,肉汤生长试验,BTB 产酸产碱反应,耐酸碱测定(pH 调至 4.0、5.0、7.0、9.0、10.0),生长温度范围测定(4 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C (10min 处理)),耐盐性测定(0.1%、2%、3%、4%、5%)。

除生长温度测定外,均在 28 $^{\circ}$ C 培养。活化菌种用 YMA 培养基。唯一碳源利用采用 White 培养基^[8],并补充 Cs7 微量元素溶液^[9]。唯一氮源利用亦采用 White 培养基,但以供试氮源代替其中的硝酸钾,另外加入 10g/1000ml 的甘露醇作为碳源。

染料和化学药物的抗性测定,耐盐性测定,耐酸碱实验,生长温度范围测定,过氧化氢酶实验,L-苯丙氨酸酶测定,BTB 产酸产碱反应,3-酮基乳糖产生,石蕊牛奶反应,亚甲蓝还原反应,耐尔蓝还原反应,肉汤生长实验,氧化酶等测定按《一般细菌常用鉴定方法》进行^[10]。硝酸盐还原用修改的 Pohlman 方法^[11]。

1.5 BOXAIR-PCR 指纹分析

总 DNA 的提取参照 Little 的方法^[12]。

BOX-PCR 是 rep-PCR 的一种,本实验中 BOX-PCR 的引物为 BOXAIR:5'-CTACGGCAAGCGGACGCTGACG-3'。反应体系为:2 $\times$ PCR Mix 10 μ l;BOXAIR (30pmol/ μ l) 0.32 μ l;模板 DNA (50ng/ml) 1.0 μ l;双蒸水补足至 20 μ l。

扩增程序:95 $^{\circ}$ C 初始变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,52 $^{\circ}$ C 复性 1 min,65 $^{\circ}$ C 延长 8 min,循环 30 次;65 $^{\circ}$ C 延长 18 min。4 $^{\circ}$ C 保存。

扩增产物经 2% 浓度的琼脂糖凝胶电泳 (60V,4h) 检测,使用凝胶成像系统记录成像。

1.6 16S rDNA PCR-RFLP 指纹图谱分析

以总 DNA 为模板,选用来源于大肠杆菌 16S rRNA 基因序列保守区域的两段引物 P1 和 P6 来扩增 16S rDNA。正向引物 P1:5'-CGA GAG TTT GAT CCT GGC TCA GAA CGA ACG CT-3';反向引物 P6:5'-CGT ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT CAC CCC-3'。反应体系 (50 μ l):2 $\times$ PCR Mix 25 μ l;Primer 1 (50pmol/ μ l) 1.0 μ l;Primer 6 (50 pmol/ μ l) 1.0 μ l;模板 DNA (50ng/ μ l) 2.0 μ l;双蒸水补足至 50 μ l;矿物油 80 μ l 覆盖。

PCR 反应条件:92 $^{\circ}$ C 变性 3 min 之;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。4 $^{\circ}$ C 保存。

16S rDNA 扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,扩增片段长度为 1.5Kb 左右,将扩增产物保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

16S rDNA PCR-RFLP 选用了 4 种限制性内切酶,分别为 *Hae* III、*Msp* I、*Hinf* I 和 *Taq* I。酶切反应体系:

6 μ l PCR 扩增产物,5U 内切酶,10 $\times$ 酶切缓冲液 1 μ l,双蒸水补足至 10 μ l;37 $^{\circ}$ C (*Taq* I 为 65 $^{\circ}$ C)水浴保温 6~10hr,在含 EB 的 3% 浓度的琼脂糖凝胶板上水平电泳(80V,3hr),使用凝胶成像系统记录成像。

1.7 16S rDNA 序列分析

根据前面聚类分析的结果,选取若干代表菌株作为研究对象,测定了 16S rDNA 的序列。16S rDNA PCR 扩增反应同 1.6 节。

序列测定:PCR 产物送上海英骏公司测序,所测序列为 16S rDNA 全序列。

1.8 GS II 序列分析

中心菌株与 16S rDNA 序列分析所用菌株相同,测定 GS II 的序列。

PCR 扩增:以总 DNA 为模板,选用一对引物 GS II-1 和 GS II-2 来扩增 GS II。正向引物 GS II-1:5'-AAC GCA GAT CAA GGA ATT CG-3';反向引物 GS II-2:5'-ATG CCC GAG CCG TTC CAG TC-3'。反应体系(50 μ l):2 $\times$ PCR Mix 25 μ l;GS II-1(50pmol)1.0 μ l;GS II-2(50pmol)1.0 μ l;模板 DNA(50ng/ml) 2.0 μ l;双蒸水补足至 50 μ l;矿物油 80 μ l 覆盖。

PCR 反应条件:92 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;92 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min;循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。4 $^{\circ}$ C 保存。

GS II 扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,扩增片段长度为 600~700bp,将扩增产物保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

序列测定:PCR 产物送上海英骏公司测序,所测序列为 GS II 全序列。

2 结果与分析

2.1 数值分类

对供试菌株 117 个生理生化指标的测定结果分析菌株的表型多样性。数据记录处理后用 NTSYS2.1 软件分析得到供试菌株的聚类图(图 1)。

由图 1 可以看出,所有菌株在 73% 的相似水平上聚在了一起,参比菌株按种属关系很好的区分开来。在 75% 的相似水平上,所有供试菌株分为 3 个表观群:分支 I 是慢生菌群,包括了 59 株供试未知菌株,它们与 *Bradyrhizobium* 参比菌株聚在一起;分支 II 属于快生和中慢生菌群,在 85.6% 的相似水平上又进一步被分为五个表观群:群 6 独自成群,包含 3 株未知菌株,分布在群 2、群 3、群 4 和群 5 中的参比菌株都按照种属关系成群,除群 4 仅有参比菌株属于 *Azorhizobium* 的 USDA4892 外,24 株供试未知菌株分别属于 *Mesorhizobium* (6 株)、*Rhizobium* (17 株)和 *Sinorhizobium* (1 株);分支 III 是单独的一株,LMG11875,隶属于 *Allobacterium*。说明金沙江干热河谷区所采集到的胡枝子根瘤菌株的表型多样性非常丰富。

从供试未知菌株具体的生理生化表现上看,与金沙江干热河谷的地理及气候特征是相适应的。大多数未知菌株在 pH4、pH5 的培养基平板上生长良好,而不能在 pH9、pH10 的平板上生长;绝大多数未知菌株能耐高温(60 $^{\circ}$ C 处理 10min)而在低温下不能生长;几乎所有的未知菌株都不能在含盐 1% 平板上生长,耐盐性很差。分支 I 和分支 II 的菌株主要通过唯一碳源或氮源的利用、BTB 产酸产碱的反应、石蕊牛奶反应等加以区分开来;而对于其它生理生化特性的表现则决定了分支内群的划分。

2.2 BOXAIR-PCR 指纹分析

将 BOX-PCR 的电泳图谱(图 2)转化成“1”和“0”,通过 NTSYS2.1 计算各菌株间的相似性,采用平均连锁聚类法(UPGMA)将结果转化为树状图,得到 BOXAIR-PCR 聚类树状图(图 3)。

从图 3 中可以看出,全部供试菌株产生的指纹图谱类型很多,在 82% 的相似性水平上分为 37 个群,除一部分供试未知菌株与参比菌株聚在一起外,其余都独自成群,聚在一起的都是地理分布很近的菌株,很多在数值分类中聚于同一表观群的菌株也有了较大差异,表明了供试菌株在基因组上差异很大。

2.3 16S rDNA PCR-RFLP 酶切图谱分析

利用 *Hae* III、*Msp* I、*Hinf* I 和 *Taq* I 4 种限制性内切酶分别对 16SrDNA 扩增产物进行酶切,经 3% 琼脂

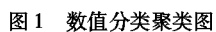


Fig. 1 Dendrogram according to numerical taxonomy

糖凝胶电泳分离后成像,部分酶切结果如图 4 所示。

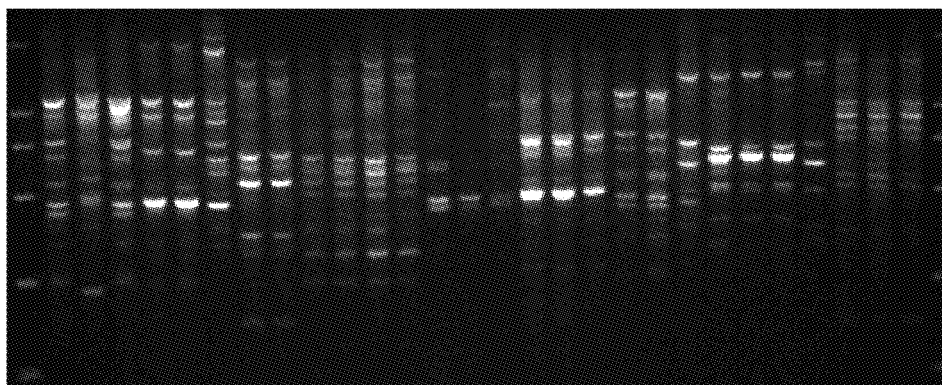


图 2 部分供试未知菌株的 BOXAIR-PCR 指纹图谱

Fig. 2 The fingerprints of BOXAIR-PCR electrophoresis from some of isolated rhizobial strains

From left to right the strains are respectively: Marker (50bp), SCAU69, SCAU70, SCAU71, SCAU72, SCAU73, SCAU74, SCAU75, SCAU76, SCAU77, SCAU78, SCAU79, SCAU80, SCAU81, SCAU82, SCAU83, SCAU84, SCAU85, SCAU86, SCAU87, SCAU88, SCAU89, SCAU90, SCAU91, SCAU92, SCAU93, SCAU94, SCAU95, SCAU96, Marker(50bp)

表 2 供试菌株 16S rDNA PCR-RFLP 限制性酶切图谱类型

Table 2 16S rDNA genotypes of the strains tested

菌株编号 Strains No.	16S rDNA 限制性酶切图谱类型 16S rDNA genotypes digested by Restriction enzyme				16S rDNA 遗传 图谱类型 Genotypes No.
	<i>Msp</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I	
USDA4892T	a	a	a	a	1
CCBAU2609 ^T , SCAU48, 49, 50	b	a	b	a	2
SCAU102, 103	b	a	c	a	3
LMG11892 ^T	b	a	c	b	4
SCAU45, 46	c	a	d	b	5
127K17, SCAU97, 115, 116	c	a	e	d	6
CFN42 ^T	c	b	d	c	7
USDA1844 ^T , SCAU98, 99	c	b	d	e	8
SCAU100, 101	c	g	d	e	9
SCAU81, 82, 83	d	a	d	d	10
SCAU89	d	a	e	a	11
SCAU90, 91, 92, 93	d	a	e	c	12
CIAT899 ^T , SCAU51, 67, 68	d	a	e	d	13
USDA1002 ^T , 102F28	d	a	f	b	14
USDA76T	e	c	g	e	15
USDA6 T, SCAU52, 64, 65, 66, 94, 95, 96, 104, 105, 106, 117, 118, 119, 120	e	c	h	e	16
SCAU41, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 107, 124, 125, 126, 127	e	e	h	e	17
CCBAU10071 ^T , SCAU58, 59, 60, 61, 62, 63, 71, 72, 73, 84, 85, 86, 87, 88, 111	f	c	f	e	18
SCAU42, 43, 44, 53, 54, 55, 56, 57, 69, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 121, 122, 123	f	e	f	e	19
USDA3378 ^T	g	a	b	a	20
LMG11875 ^T	h	b	d	b	21
USDA4102 ^T	I	a	f	b	22
SCAU70	j	a	f	b	23
图谱类型种类数 Total of genotypes	10	7	7	5	23

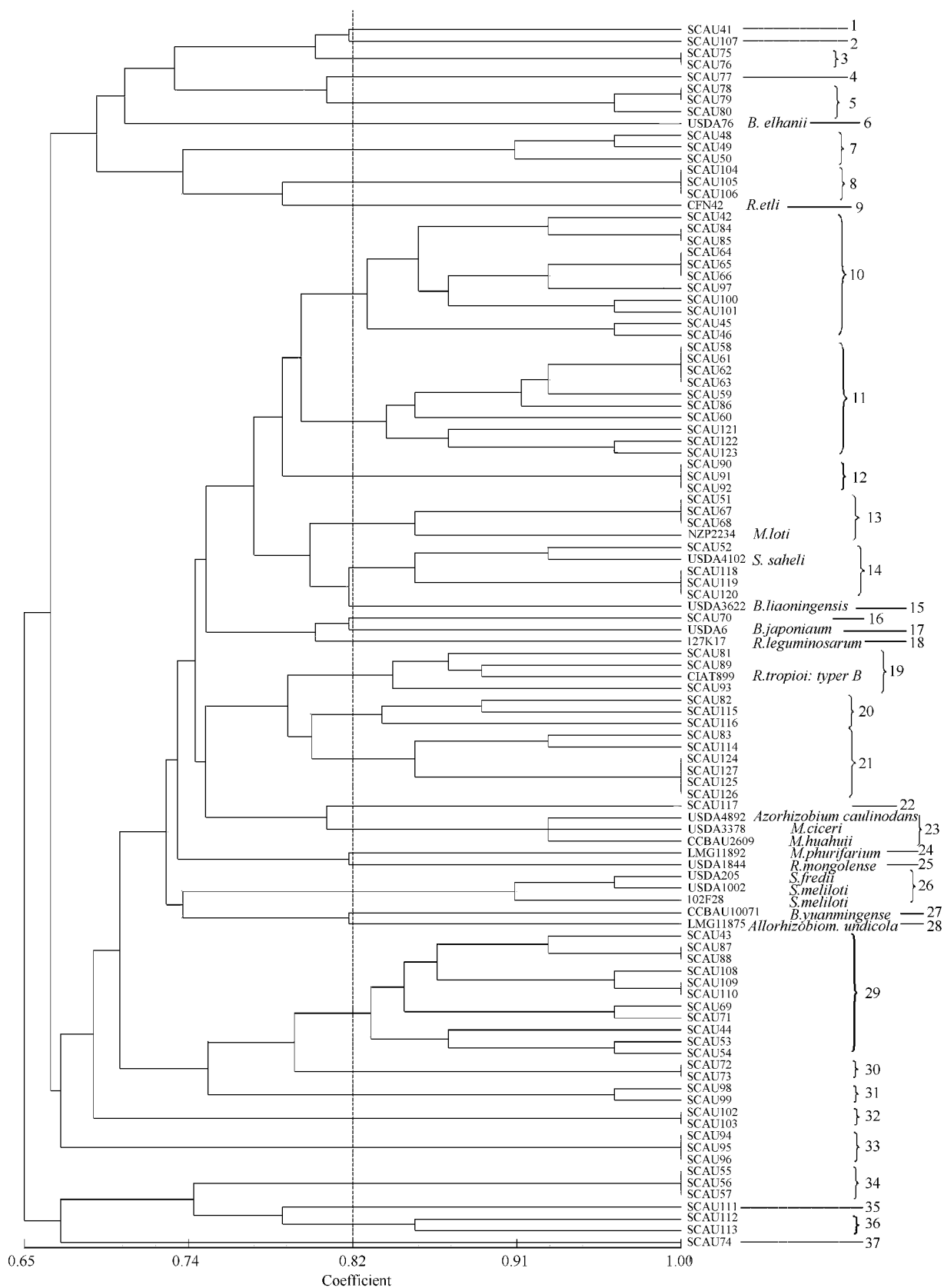
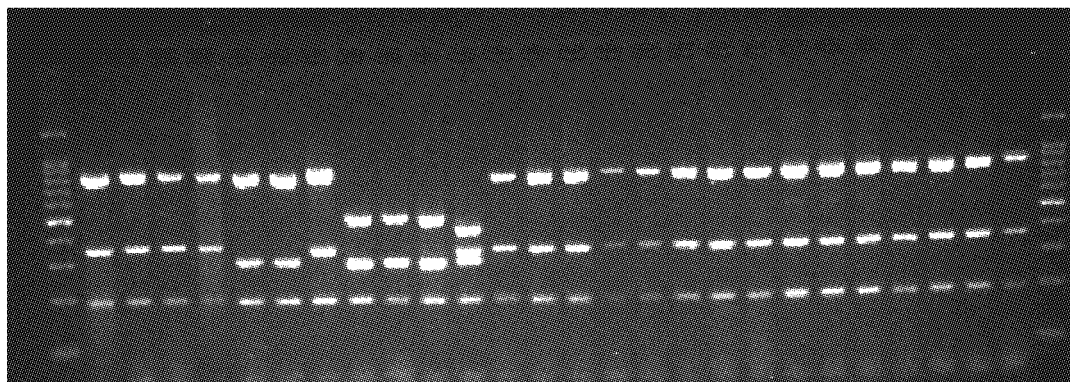


图3 供试根瘤菌 BOXAIR-PCR 树状图

Fig. 3 The dendrogram of isolated rhizobial strains based on the fingerprints of BOXAIR-PCR

图4 部分供试菌株的 *Taq* I 酶切图谱Fig. 4 Fingerprints of 16S rDNA PCR-RFLP products digested by *Taq* I

From left to right the strains are respectively: Marker(50bp), SCAU41, SCAU42, SCAU43, SCAU44, SCAU45, SCAU46, SCAU47, SCAU48, SCAU49, SCAU50, SCAU51, SCAU52, SCAU53, SCAU54, SCAU55, SCAU56, SCAU57, SCAU58, SCAU59, SCAU60, SCAU61, SCAU62, SCAU63, SCAU64, SCAU65, SCAU66, Marker(50bp)

4种限制性内切酶酶切图谱类型的组合见表2。从表2可以看出,供试根瘤菌株共有23种16S rDNA遗传图谱类型,分离自金沙江干热河谷区的86株供试未知菌株具有15种遗传图谱类型,其中9种供试未知菌株的16S rDNA遗传图谱类型不同于所选用的已知参比菌株的模式种。

某些来自同一宿主植物的根瘤菌其遗传图谱类型也有差异,如分离自截叶铁扫帚的3株菌SCAU69、SCAU70、SCAU71的16S rDNA遗传图谱类型分别为19、24和18;分离自多花胡枝子的两株菌SCAU41、SCAU42的16S rDNA遗传图谱类型分别为18、19;分离自红花胡枝子的两株菌SCAU111、SCAU112的16S rDNA的遗传图谱类型分别为18和19。

2.4 16S rDNA 序列分析

在综合前面的多样性分析的基础上,选取了SCAU69、SCAU70、SCAU93、SCAU100、SCAU103和SCAU127为代表菌株,其16S rDNA的遗传图谱类型分别为19、23、12、9、3和17。代表菌株的16S rDNA序列在GenBank序列登录号分别为EU255297(1365bp)、EU255298(1360bp)、EU255299(1348bp)、EU255300(1357bp)、EU255301(1358bp)、EU255302(1297bp)。利用DNAMAN对代表菌株和参比菌株的16S rDNA序列进行Neighbor-joining分析,生成反映供试菌株与参比典型菌株系统发育关系的聚类图5。

由图5可知:所有供试菌株在系统发育上分为了亲缘关系很远的两大分支,*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*的菌株分别聚在一起。其中,SCAU93与*R. giardinii* R-4385序列完全一致,SCAU103和*M. plurifarium* ORS3369、SCAU127与*B. japonicum* USDA124的同源性也高达99.9%。此外,SCAU70与*S. teranga* LMG11859聚在一起,差异为0.007;SCAU100与*R. gallicum*亲缘关系最近,差异为0.008;而SCAU69与亲缘关系最近的*B. yuanmingense* LMTR28差异也有0.004。

同时,仅就供试未知菌株而言,其相互间的16S rDNA序列同源性低(表3),SCAU69与SCAU93的同源性仅有87.9%,此外,SCAU69与SCAU70来自同一株截叶铁扫帚,同源性也只有88.7%。

表3 16S rDNA 同源性系数表
Table 3 16S rDNA homology matrix

SCAU69	100%					
SCAU70	88.7%	100%				
SCAU93	87.9%	95.9%	100%			
SCAU100	88.6%	95.0%	94.9%	100%		
SCAU103	87.9%	95.7%	95.5%	93.1%	100%	
SCAU127	99.5%	89.1%	88.5%	89.2%	88.3%	100%

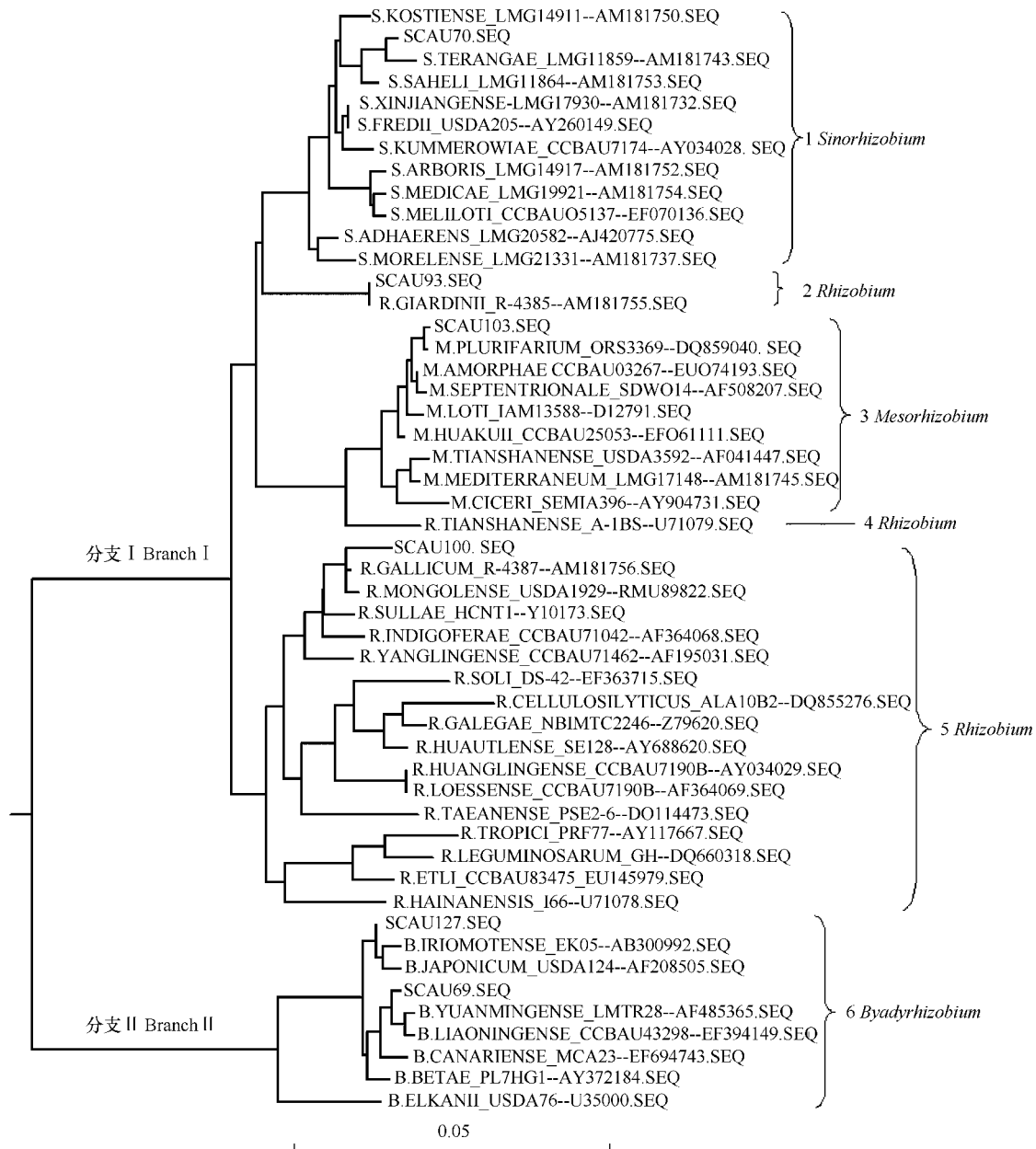


图5 供试根瘤菌 16S rDNA 序列分析聚类图

Fig. 5 The dendrogram of rhizobial strains tested by Neighbor-joining method of 16S rDNA sequences; Kimura-2 distances were derived from a distance matrix to construct an optimal rooted tree using the neighbour-joining method; Numbers in parentheses are the accession numbers of the sequences

表4 GS II 基因同源性系数表
Table 4 GS II gene homology matrix

SCAU69	100%					
SCAU70	82.7%	100%				
SCAU93	81.7%	87.9%	100%			
SCAU100	79.4%	87.0%	89.8%	100%		
SCAU103	83.0%	88.9%	85.3%	84.5%	100%	
SCAU127	89.8%	87.7%	86.2%	85.1%	88.7%	100%

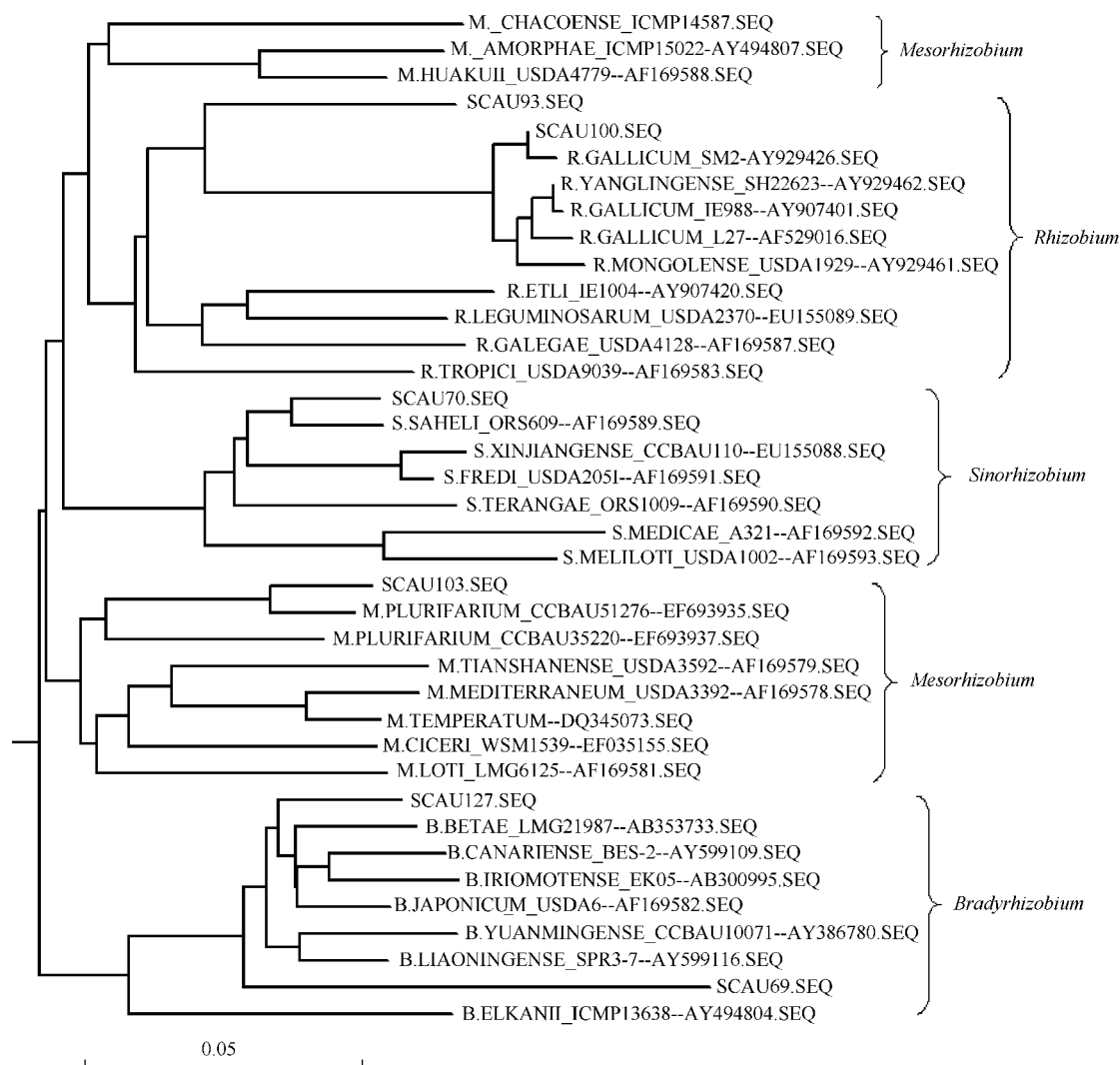


图6 供试根瘤菌 GS II 基因序列分析聚类图

Fig. 6 The dendrogram of rhizobial strains tested by Neighbor-joining method of GS II gene sequences. Kimura-2 distances were derived from a distance matrix to construct an optimal rooted tree using the neighbour-joining method. Numbers in parentheses are the accession numbers of the sequences

2.5 GS II 序列分析

代表菌株 SCAU69、SCAU70、SCAU93、SCAU100、SCAU103 和 SCAU127 的 GS II 序列在 GenBank 上的序列登录号分别为 EU278611 (561bp)、EU278612 (604bp)、EU278613 (530bp)、EU278614 (530bp)、EU278615 (539bp)、EU278616 (610bp)。利用 DNAMAN 对所选菌株和参比典型菌株的 GS II 序列进行 Neighbor-joining 分析,生成反映供试菌株与参比典型菌株系统发育关系的聚类图 6。

由图 6 可知,GS II 序列所构建的系统发育树与 16S rDNA 序列在属水平的分群上基本一致。序列同源性上,SCAU69 与 SCAU127 都与 *B. japonicum*_USDA6 相近,同源性分别为 95.9% 和 88.9%;SCAU70 和 *S. saheli*_ORS609 相近,同源性为 96.8%;SCAU93 与 *R. galegae*_USDA4128 相近,同源性为 89.4%;SCAU100 与 *R. gallicum*_SM2 相近,同源性为 99.6%;SCAU103 与 *M. plurifarium*_CCBAU51276 相近,同源性为 96.7%。

仅就供试未知菌株而言(表 4),其 GS II 序列同源性非常低,均在 90% 以下,SCAU69 和 SCAU100 的同源性甚至仅有 79.4%。

3 讨论

生物多样性是指生物物种的多样化及其变异的程度及广度,是物种多样性、遗传多样性和生态多样性 3 个层次的综合表述。表型和遗传分析技术最终反映的是根瘤菌的遗传多样性,而根瘤菌的系统发育研究和种群的确立则能够揭示根瘤菌的物种多样性。

本研究利用数值分类、BOXAIR-PCR 指纹图谱、16S rDNA PCR-RFLP 分析、16S rDNA 序列、GS II 基因序列分析考察了分离自金沙江干热河谷区的胡枝子根瘤菌的多样性及系统发育。

从表型上看,金沙江干热河谷区的胡枝子根瘤菌在 85.6% 的相似性水平上分为 6 个群,其中大部分菌株(68.6%)属于 *Bradyrhizobium*,该地区根瘤菌在表型上有极大的多样性。有研究认为,宿主植物和地理环境是影响根瘤菌分布与多态性的两个重要因素^[13]。本研究发现,截叶铁扫帚地理分布广,其根瘤中分离的菌株分布于四个属,差异很大;而从多花胡枝子和美丽胡枝子根瘤中仅分离到了 *Bradyrhizobium*。从菌株的地理分布上看,在 93% 相似性水平上聚在一起的菌株基本上都来自于同一采样点,如 SCAU77、SCAU78、SCAU79 分离自同一植株;然而就相对较低(85.6% 以下)的相似水平上看,分类上相近的菌株在地理上并不相近;分离自不同地域,乃至不同宿主的根瘤菌也能聚在一起,表现出相近的生理性状,如分离自凉山州 *L. floribunda* 的 SCAU41 与分离自攀枝花 *L. cuneata* 的 SCAU62 相似性水平达 93%;从同一宿主分离的菌株分别可聚在不同的表观群,如分离自同一植株的 SCAU43、SCAU44 分别分属于 *Bradyrhizobium*、*Mesorhizobium*,即同一宿主植物可以与不同属的菌株共生结瘤。上述结果表明,根瘤菌的分类聚群与宿主间也存在没有明显的对应关系的情况,这与汪恩涛^[14]、孙建光^[15]、谭志远^[16]等的研究结果一致。

16S rDNA PCR-RFLP 分析结果表明,大量来自同一采集地点的菌株具有相同的遗传类型,但某些来自同一宿主植物的菌株其遗传类型却有差异(如 SCAU69、SCAU70 和 SCAU71;SCAU41 和 SCAU42;SCAU111 和 SCAU112);同时,许多来自不同的采集地点甚至不同宿主的菌株却具有同样的遗传类型(如遗传图谱类型 16、17、18、19)。这些再次证明根瘤菌的分类聚群与宿主、地域之间可以没有明确的对应关系。

BOX-PCR 指纹图谱对基因组进行分析,产生了大量遗传类型,具有菌株的特异性^[17],与数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 结果相比较,BOXAIR-PCR 指纹图谱分析揭示的遗传信息更丰富。在数值分类同一表观群内的菌株很多都分布于几个不同的 BOXAIR-PCR 群中,很多在 16S rDNA PCR-RFLP 中具有相同遗传类型的菌株也有较大差异,但除了少数供试未知菌株与参比菌株聚在一起外,其它供试未知菌株都独自成群,而且聚在一起的都是地理分布很近的菌株,这说明 BOXAIR-PCR 指纹图谱分析更适合于群水平上的遗传多样性研究,这与刘洋等对华北及西北地区岩黄芩根瘤菌的 BOX-PCR 分析的研究结果一致^[18]。

目前的根瘤菌系统发育关系主要是建立在 16S rRNA 基因序列基础上的。由 16S rDNA 序列分析结果可知,6 株代表菌株属于 *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、*Bradyrhizobium* 4 个属,在同源性上与最相近的参比菌株差异性均小于 1%。主要是 16S rRNA 基因较为保守,种间变化较小。

GS II 序列是理想的“分子钟”基因^[6],但在根瘤菌的进化与发育研究中,目前应用还很少。GS II 序列分析所得到的系统发育结果与 16S rDNA 相比,各代表菌株所在的属并未发生改变,但与 SCAU69、SCAU70 和 SCAU93 在序列同源性上聚在一起的参比菌株有了一些差异。同时,GS II 序列与参比菌株的序列同源性相对 16S rDNA 低得多,且各种内的参比菌株之间的 GS II 序列同源性也很低。GS II 序列的系统发育结论与 16S rDNA 不一致,可能是为适应宿主和环境的需要,GS II 基因在根瘤菌间进行了一定程度的平行转移和重组,Herrera-cervera 和 Turner-Young 的研究结果也证明了这点^[19,20]。

仅就供试未知菌株而言(表 3、表 4),其 16S rDNA 序列或 GS II 序列相互间的同源性均低,甚至 SCAU69 和 SCAU100 的 GS II 序列同源性仅有 79.4%,来自同一株截叶铁扫帚 SCAU69 与 SCAU70,16S rDNA 和 GS II 序列同源性也分别只有 88.7% 和 82.7%。但均表现为 16S rDNA 序列同源性比 GS II 序列的高,因 16S rRNA 基因比 GS II 保守。同时,表明金沙江干热河谷区胡枝子根瘤菌蕴涵丰富的生物多样性。

综上,金沙江干热河谷地区胡枝子根瘤菌多样性极为丰富,本研究丰富了根瘤菌多样性的基因库,对保藏

并合理利用胡枝子根瘤菌多样性的基因资源,选育和应用高效胡枝子根瘤菌剂以改善该地区的生态条件也具有重要意义,为进一步确定胡枝子根瘤菌的系统分类地位提供了科学依据。

References:

- [1] He Y B, Lu P Z, Zhu T. Causes for the formaion of dry-hot valleys in Hengduan Mountain-yunnan Plateau. *Resources Science*, 2000, 22(5) :69 — 72.
- [2] Commission Editorial of Chinese Flora, Chinese Academy of Sciences. *Flora of China*. Beijing: Science Press, 1995. 41. 177 — 193.
- [3] Sun Q Y, Lan C Y, Huang M H, *et al.* Natural colonized plants on tailings of Lead-Zinc mine. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(9) :1457 — 1462.
- [4] Young J P W, Downer H L, Eardly B D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTail by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.*, 1991, 173: 2271 — 2277.
- [5] Willems A, Collins M D. Phylogenetic analysis of rhizobium and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *J. Syst. Evol. Bacteriol.*; 1993, 43:305 — 313.
- [6] Pesole G, Gissi C, Lavane C, Saccone C. Glutamine synthetase gene evolution in bacteria. *Mol. Biol. Evol.*, 1995, 12:189 — 197.
- [7] Yang J, Xie F, Zou J, *et al.* Polyphasic Characteristics of Bradyrhizobia isolated from Nodules of Peanut (*Arachis hypogaea*) in China. *Soil Biology&Biochemistry*, 2005, 37:141 — 153.
- [8] White L O. The taxonomy of the crown gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to rhizobia and other agrobacteria. *J Gen Microbiol*, 1972, 72: 565 — 574.
- [9] Pagen J D, Child J J, Scowcroft W R, Gibson A H. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. *Nature*, 1975, 256: 406 — 407.
- [10] Microbiological Institute, Chinese Academy of Sciences. Commonly used identification methods of general bacteria. Beijing: Science Press, 1978. 176 — 177.
- [11] Pohlman G C. Change produced in nitrogenous compounds by *Rhizobium meliloti* and *R. japonicm*. *Soil Sci*, 1931, 31: 385.
- [12] Little M C. Process for Purification of DNA on Diatomaceous Earth. United States Patent No. 5, Rad Laboratories Inc, Hercules, Calif, 1991, 5, 075, 430.
- [13] 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(3) :504 — 511.
- [14] Wang E T, Li X H, Chen W X. Diversity of fast-growing rhizobia isolated from root nodules of leguminous plants in Hainan. *Microbiology*, 1993, 20 (2) : 67 ~ 72 .
- [15] Sun J G, Zhang F, Wang C P, Chen W X. Resource investigation and taxonomy of rhizobia isolated from root nodules of leguminous plants in Hainan. *Acta Microbiol Sin*, 1993, 33 (2) : 135 ~ 143.
- [16] Tan Z Y, Chen W X. SDS PAGE of whole cell protein of new rhizobial groups and 16s rDNA sequencing of their representatives. *Chin J Appl Environ Biol*, 1998, 4 (1) : 66 ~ 70.
- [17] Selenska-Pobell S L. Giova and N. Petrova strains-specific fingerprints of *Rhizobim galegae* Generated by PCR with arbitrary and repetitive Primers. *J Appl. Bacteriol*, 1995, 79:425 — 431.
- [18] Liu Y, Sui X H, Chen W X. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from root nodules of *Hedysarum* spp. grown in the northern and northwestern regions of China. *Acta Ecologica Sinica*, 2005(5) :1088 — 1094.
- [19] Herrera-cervera J A, Sanjuan-pinilla J M, Olivares J, Sanjuan J. Cloning and identification of conjugative transfer origins in the *Rhizobium meliloti* genome. *J. Bacteriol.* 1998, 180: 4583 — 4590.
- [20] Turner S L, Young J P W. The glutamine synthetase of *Rhizobium*: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol. Biol. Evol.* 2007(17) :309 — 319(in press).

参考文献:

- [1] 何永彬, 卢培泽, 朱彤. 横断山——云南高原干热河谷形成原因研究. *资源科学*, 2000, 22(5) :69 ~ 72.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. *中国植物志*. 北京: 科学出版社, 1995, 41. 131 ~ 159.
- [3] 孙庆业, 蓝崇钰, 黄铭洪等. 铅锌尾矿上自然定居植物. *生态学报*, 2001, 21(9) :1457 ~ 1462.
- [10] 中国科学院微生物研究所. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978. 176 ~ 177.
- [13] 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. *生态学报*, 2003, 23(3) :504 ~ 511.
- [14] 汪恩涛, 李小红, 陈文新. 海南省快生根瘤菌的多型性. *微生物学通报*, 1993, 20(2) : 67 ~ 72.
- [15] 孙建光, 章凡, 王昌平, 陈文新. 海南省根瘤菌资源考察及分类. *微生物学报*, 1993, 33(2) :135 ~ 143.
- [16] 谭志远, 陈文新. 根瘤菌新类群的全细胞蛋白电泳及 16S rDNA 全序列分析. *应用与环境生物学报*, 1998, 4(1) :65 ~ 69.
- [18] 刘洋, 隋新华, 陈文新. 华北及西北地区岩黄芩根瘤菌的表型及遗传多样性. *生态学报*, 2005(5) :1088 ~ 1094.