

研究报告

攀枝花市银合欢根瘤菌遗传多样性

徐开未 张小平 陈远学* 周德海

(四川农业大学 资源环境学院 四川 成都 611130)

摘要:【目的】研究分离自四川攀枝花的银合欢根瘤菌的遗传多样性。【方法】采用联合 16S rDNA RFLP 和 IGS RFLP 的综合聚类分析(16S-IGS RFLP)、AFLP 及多位点持家基因(16S rDNA, *atpD*, *recA*)序列的联合分析对供试银合欢根瘤菌进行研究。【结果】31 株未知菌具有 15 种 16S-IGS 遗传图谱类型、27 种 AFLP 类型。16S-IGS RFLP 结果表明,没有未知菌与 *Bradyrhizobium* 的参比菌株聚在一起。在 71.4% 的相似水平上, 31 个未知菌按属的水平分成 3 个分支: S、M 和 R, 分别分布在 *Sinorhizobium* 属(28 株)、*Mesorhizobium* 属(2 株)和 *Rhizobium* 属(1 株)。S 分支的 28 个菌在 84% 的相似水平上, 16S-IGS RFLP 聚类图中构成 3 个群: 群 S1、群 S2、群 S3; 在 AFLP 聚类图中构成 9 个 AFLP 群: S1–S9。多位点基因序列表明, 代表菌株 SCAU215、SCAU231 分别与 *M. Plurifarium*、*R. huautlense* 亲缘关系最近。而分布于 *Sinorhizobium* 属 SCAU222 和 SCAU228、SCAU213、SCAU216 可能代表 *Sinorhizobium* 的 3 个新类群。【结论】攀枝花市银合欢根瘤菌遗传多样性丰富, 分布于 *Sinorhizobium*、*Mesorhizobium* 和 *Rhizobium* 三个属, 且优势类群为 *Sinorhizobium*。

关键词: 根瘤菌, 银合欢, 持家基因, 遗传多样性, 多位点基因序列分析

Genetic diversity of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in Panzhihua City

XU Kai-Wei ZHANG Xiao-Ping CHEN Yuan-Xue* ZHOU De-Hai

(College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: [Objective] Genetic diversity and relationship of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in Panzhihua City of Sichuan were analyzed. [Methods] We studied genetic diversity of these isolates with combined RFLP patterns of 16S rDNA and IGS (16S-IGS RFLP), AFLP fingerprinting, and constructed 16S rDNA, *atpD*, *recA* gene phylogenetic trees and phylogenetic tree based on the concatenated sequences of the three genes. [Results] Fifteen distinct 16S-IGS genotypes and 27 AFLP genotypes were distinguished among the 31 isolates based on 16S-IGS RFLP and AFLP, respectively. In 16S-IGS RFLP dendrogram, all isolates were not clustered with *Bradyrhizobium* reference strains, but were grouped into three groups such as genus level required at similarity level of 71.4% for *Sinorhizobium* (28 isolates, S group), *Mesorhizobium* (2 isolates, M group), *Rhizobium* (1 isolate, R group). At similarity of 84%, 28 *Sinorhizobium* strains were divided

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(No. 2012RZ0018); 国家自然科学基金项目(No. 31070004)

*通讯作者: Tel: 86-28-8629117; ✉: cyxue2002@aliyun.com

收稿日期: 2013-12-08; 接受日期: 2014-01-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-16

into three, nine clusters in 16S-IGS RFLP, AFLP dendrograms, respectively. Analyses of multi-locus housekeeping genes of 16S rDNA, *atpD* and *recA* indicated representative strains SCAU215, SCAU231 were closely related to *M. Plurifarium*, *R. huautlense*, nevertheless SCAU222 and SCAU228, SCAU213, SCAU216 might represent three new *Sinorhizobium* groups. **[Conclusion]** The rhizobia isolated from *L. leucocephala* in Panzhihua City had rich genetic diversity, these isolates were assigned as *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* was the predominant genus.

Keywords: Rhizobia, *Leucaena leucocephala*, Housekeeping genes, Genetic diversity, Multilocus sequence analysis

攀枝花市地处四川省最南端,金沙江与雅砻江汇合处,辖三区二县,属于典型南亚热带干热河谷气候,干、湿季节分明,土壤侵蚀严重,加之水土严重失调,土壤瘠薄承载力低,使这一地区造林很困难^[1-2]。攀枝花是国家实施“天然林保护”、“退耕还林”工程发源地之一,长江上游重要水源涵养区,水土保持区,长江中下游重要的生态屏障区。由于豆科树种银合欢具有速生、抗旱、耐贫瘠、耐干热的特点,成为该区“天然林保护”、“退耕还林”工程的重要先锋树种^[3-4]。目前对银合欢共生的根瘤菌的报道较少。Wang 等^[5]主要采用 16S rDNA RFLP 技术分析墨西哥银合欢根瘤菌遗传多样性,发现该区银合欢根瘤菌遗传多样性丰富,优势种群为 *Sinorhizobium*。Gao 等^[6]用数值分类方法对我国海南省热带根瘤菌进行研究时用了两株银合欢,发现这两个菌株也属 *Sinorhizobium*。Wang 等^[7]报道 6 株福建省的和 9 株广东省银合欢根瘤菌,却发现 *Mesorhizobium* 占的比例均最大。说明生态环境对银合欢(*Leucaena leucocephala*)根瘤菌的种群分布有较大影响。攀枝花银合欢从未接种根瘤菌。本人对部分攀枝花银合欢根瘤菌的前期研究工作^[8-9]表明,该区银合欢根瘤菌主要是 *Sinorhizobium*,但以前采用的 rDNA RFLP 技术进行的分群对优势种群 *Sinorhizobium* 的种或亚种未能很好分开,因此对其系统发育的研究还不够全面。为更加明确攀枝花这一特殊生境银合欢的亲缘关系和分子进化,本研究增补前期工作发表后继续纯化得到的菌株,采用对种或亚种分型好的技术 AFLP^[10-12],联合 16S rDNA 和 IGS rDNA RFLP 构建的综合聚类图

谱,重新选择增补代表菌株,进行多位点基因序列联合分析(MSLA),以期更全面地揭示这一特殊生境银合欢根瘤菌尤其是优势种群的遗传多样性,进一步揭示其亲缘关系和为进化奠定基础。同时为该特殊生境的银合欢造林工程储备优良的菌种资源,具有积极的生态学意义。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究从攀枝花市的 4 个县(区) 9 个采集点采集银合欢根瘤,分离纯化获得的 31 个菌株见表 1。这些菌株已经回接试验证实是银合欢根瘤菌,分离和回接的方法同文献[8,13]。RFLP 分析所用的参比菌 13 个,见图 1。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取:总 DNA 的提取参照文献[8]的方法。

1.2.2 16S rDNA 和 IGS PCR RFLP 的联合聚类分析:以总 DNA 为模板,选用通用引物,用 P1 和 P6^[8], pHr 和 p23SR01^[9]分别扩增 16S rDNA、IGS rDNA。PCR 反应在 Bio-Rad MyCycler™ 型仪器上完成。扩增反应程序为:92 °C 3 min; 94 °C 1 min, 58 °C (IGS 为 60 °C) 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 8 min。用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 16S rDNA、IGS rDNA 扩增产物。

16S rDNA 和 IGS PCR-RFLP 选用 4 种限制性内切酶: *Msp* I、*Taq* I、*Hae* III 和 *Hinf* I。酶切反应体系: 5 μL PCR 扩增产物, 6 U 限制性内切酶, 37 °C (*Taq* I 为 65 °C) 保温 6–10 h, 用含 EB 的 3%

表1 供试菌株信息、16S-IGS rDNA RFLP、AFLP 及系统发育关系^a
Table 1 Bacterial strains tested, 16S-IGS rDNA RFLP, AFLP and phylogenetic affiliation^a

分离物 Isolates	来源 Source or regions	海拔 Elevation (m)	16S-IGS rDNA type	AFLP type	16S rDNA	<i>atpD</i>	<i>recA</i>	MLSA
SCAU212	攀枝花市东区矿区	1 440	1	A1				
SCAU312	攀枝花市东区矿区	1 440	1	A2				
SCAU213	攀枝花市仁和区金江镇	1 930	2	A3	Sm (99.6%) ^b	Sf (94.5%) Sx (94.5%)	Sa (94.9%)	Sa (97.4%)
SCAU317	攀枝花市仁和区金江镇	1 930	2	A4				
SCAU318	攀枝花市仁和区金江镇	1 930	2	A4				
SCAU214	攀枝花市仁和区大龙潭乡	1 360	3	A5				
SCAU215	攀枝花市仁和区大龙潭乡	1 360	4	A6	Mp (99.6%)	Mp (94.4%)	Mp (94.3%)	Mp (97.5%)
SCAU216	攀枝花市仁和区大龙潭乡	1 360	5	A7	Smi (99.7%)	Ss (95.6%)	Sa (92.2%)	Smi (96.7%)
SCAU217	攀枝花市仁和区大龙潭乡	1 360	5	A7				
SCAU218	攀枝花市仁和区大龙潭乡	1 360	6	A8				
SCAU320	攀枝花市盐边县桐子林镇	1 070	7	A9				
SCAU219	攀枝花市盐边县桐子林镇	1 070	7	A10				
SCAU313	攀枝花市盐边县桐子林镇	1 070	7	A11				
SCAU220	攀枝花市盐边县桐子林镇	1 070	8	A12				
SCAU321	攀枝花市盐边县桐子林镇	1 070	9	A13				
SCAU221	攀枝花市盐边县桐子林镇	1 070	9	A14				
SCAU222	攀枝花市东区银江镇	1 080	10	A15	Sf (99.8%) Sa (99.8%)	Ss (95.8%)	Sf (95.4%)	Sf (97.5%)
SCAU314	攀枝花市东区银江镇	1 080	11	A16				
SCAU223	攀枝花市东区银江镇	1 080	11	A17				
SCAU224	攀枝花市盐边县桐子林镇	1 100	12	A18				
SCAU315	攀枝花市盐边县桐子林镇	1 100	12	A19				
SCAU322	攀枝花市盐边县桐子林镇	1 100	12	A20				
SCAU323	攀枝花市盐边县桐子林镇	1 100	12	A21				
SCAU226	攀枝花市米易县白马镇	1 200	13	A22				
SCAU316	攀枝花市米易县弯丘乡	1 230	13	A23				
SCAU227	攀枝花市米易县弯丘乡	1 230	13	A23				
SCAU324	攀枝花市米易县弯丘乡	1 230	13	A23				
SCAU228	攀枝花市米易县弯丘乡	1 230	13	A24	Sf (99.8%) Sa (99.8%)	Ss (96.0%)	Sf (95.2%)	Sf (97.4%)
SCAU319	攀枝花市米易县昔街乡	1 250	14	A25				
SCAU230	攀枝花市米易县昔街乡	1 250	14	A26				
SCAU231	攀枝花市米易县昔街乡	1 250	15	A27	Rh (99.7%)	Rh (94.1%)	Rh (93.8%)	Rh (97.6%)

注：^a：SCAU213、SCAU215、SCAU228 三个菌株的单基因序列来自文献[8-9]。^b：百分数表示这个代表菌株与基因序列最相近模式菌株的序列相似度。

Note: ^a: Single gene sequence of three representatives SCAU213, SCAU215, SCAU228 came from references [8-9]. ^b: The percentages are sequence similarities to the closely related species or the closest type strain. Sm: *S. mexicanus* HAMBI 2910^T; Sf: *S. fredii* USDA205^T; Sx: *S. xinjiangense* IAM 14142^T; Sa: *S. americanum* LMG 22684^T; Ss: *S. saheli* LMG 7837^T; Smi: *S. meliloti* LMG 6133^T; Mp: *M. plurifarum* LMG 11892^T; Rh: *R. huautlense* SO2^T.

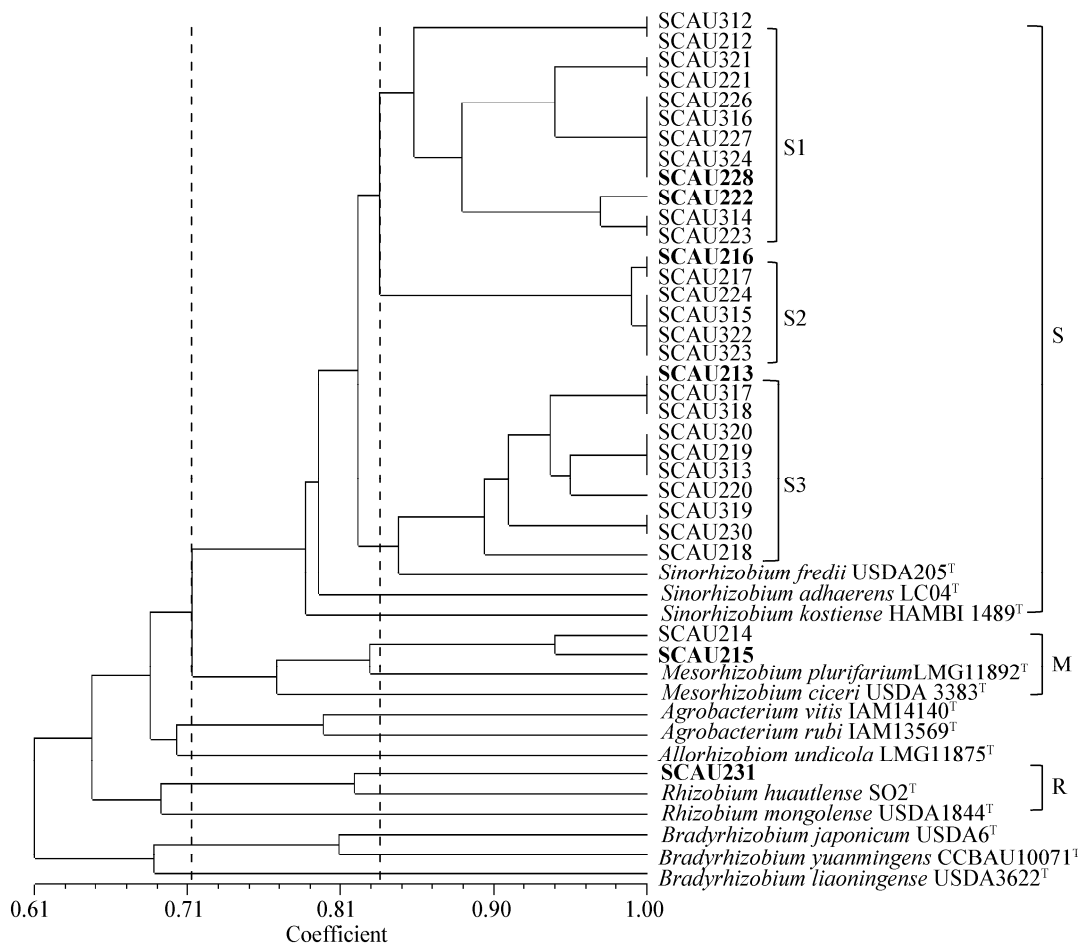


图 1 16S-IGS RFLP 聚类图

Figure 1 UPGMA dendrogram based on the cluster analysis of combined RFLP patterns of 16S rDNA and IGS of the *Leucaena rhizobia*

注：菌株名用粗体显示的菌株是序列分析用菌株。
Note: The strains in boldface were used for sequencing of the 16S rDNA or housekeeping genes in present studies.

琼脂糖凝胶进行电泳(80 V , 3.5 h) , 用凝胶成像系统记录成像 , 图像保存为 JPG 形式。按照每个菌株的酶切条带所在位置的不同划分酶切类型 , 只有 4 种酶切条带都分别相同的菌株划分至同一酶切类型。

分别用 16S 和 IGS 的 PCR 产物的 4 种内切酶酶切图谱结果合并在一起(以下称作 16S-IGS RFLP) , 用软件 NTSYS 2.1 中的平均连锁聚类法将 8 个内切酶酶切图谱结果转化为聚类树状图。

1.2.3 AFLP 分析: 取 6 μL 供试 DNA 样品 , 用 *Eco*R I 和 *Mse* I 酶切 , 再用 T4 DNA 连接酶将酶切

片段与 *Mse* 和 *Eco* 连接 , 然后用 *Eco* 和 *Mse* 引物进行 PCR 扩增。酶切片段连接用的 2 个接头、PCR 扩增用的具有 2 个选择性碱基的 *Eco* 和 *Mse* 引物、以及酶切连接及 PCR 扩增程序等的方法同文献[12]。用 0.8%的琼脂糖凝胶检测 PCR 产物。取 4 μL PCR 产物与等体积的上样缓冲液混合 , 90 °C 变性 5 min , 用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、银染、固定、干燥 , 扫描凝胶。用软件 NTSYS 2.1 中的平均连锁聚类法将结果转化为 UPGMA 聚类树状图。

1.2.4 多位点基因序列分析: 根据 16S-IGS RFLP

和 AFLP 指纹图谱的聚类结果,选择分属于 *Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium* 代表菌株 6 个。选择 3 个位点的持家基因 16S rDNA、*recA* 和 *atpD* 序列进行系统发育树构建。部分代表菌株 (SCAU213, SCAU109, SCAU215) 的这 3 个基因的单基因序列在文献[3-4]中已报道。因此,在单基因序列分析中未包含这 3 个菌株。这 3 个基因序列扩增的通用引物、反应体系、扩增程序、测序、在 NCBI 上获取参比菌株的方法及基因序列号的获得方法、系统发育树的构建方法等同文献[8-9]。基因序列相似度的计算用软件 DNAMAN 6.0。

构建单基因的系统发育树时,为了便于分析,选择的 3 个基因的参比菌株是一致的。选择方法:将同一代表菌株的每个基因序列在 NCBI 上比对,选择与 3 个基因相似度高的模式菌株作为建树的参比菌株。当 3 个基因序列联合建树时,选择与单基因序列分析相同的参比菌株。

3 个基因联合系统发育树的构建:先将 16S rDNA、*atpD*、*recA* 3 个持家基因的序列分别用 MEGA 5 比对,以最小长度为标准剪齐,将剪齐后的序列保存为.doc 格式。以.seq 格式打开将 3 个序列按相同的基因顺序拼接在一起,用 MEGA 5 软件中的邻接法(Neighbor-Joining)进行联合系统发育树的构建,自展值(Bootstrap) 1 000。

2 结果与分析

2.1 16S-IGS rDNA PCR 联合 RFLP 分析

由于 16S rDNA 功能保守、进化缓慢、分子大小适中等众多优点,一直是原核生物分类与系统发育研究的首选指标^[7-11]。也正是由于 16S rDNA 的保守,IGS-RFLP 揭示根瘤菌的多样性比 16S rDNA RFLP 丰富^[14-16]。根瘤菌 16S 和 IGS 的 PCR 产物分别的酶切结果合并(16S-IGS RFLP)后构成的聚类图,显示的表观群分类结果相对更准确^[17-18]。本研究的 16S-IGS RFLP 的聚类图见图 1。从图 1 和表 1 知,31 个未知菌构成 15 个 16S-IGS 遗传图谱类型。从图 1 知,没有未知菌与 *Bradyrhizobium* 的

参比菌株聚在一起。在 71.4%的相似水平上,31 个未知菌分成 3 个分支:S、M、R。S 分支包括 28 个未知菌和 3 个参比菌(*S. fredii* USDA205^T、*S. adhaerens* LC04^T、*S. kostiense* HAMBI 1489^T)。M 分支包含 2 个未知菌和 2 个参比菌株(*M. phurifarium* LMG11892^T、*M. ciceri* USDA 3383^T)。R 分支仅含 1 个未知菌和 1 个参比菌(*R. huautlense* SO2^T)。在 84%的相似水平上,31 个未知菌可分为 5 个群。M 分支的 2 个菌形成群 M, R 分支的 1 个菌形成群 R, S 分支的 28 个菌构成 3 个群:群 S1、群 S2、群 S3。群 S1 包括 16S-IGS 遗传图谱类型 1、9、10、11、13 的 12 个菌株,群 S2 包括 16S-IGS 遗传图谱类型 5、12 的 6 个菌株,群 S3 包括 16S-IGS 遗传图谱类型 2、6、7、8、14 的 10 个菌株。可见,攀枝花银合欢根瘤菌遗传多样性丰富,其优势类群为 *Sinorhizobium*。

2.2 AFLP 指纹分析

AFLP 指纹图谱聚类结果见图 2,全部 31 个供试菌株在属水平上的分群结果与 16S-IGS RFLP 具有较好的一致性。从表 1 和图 2 可知,这 31 个菌株形成 27 个 AFLP 类型,在 84%的相似水平上,16S-IGS RFLP 位于 *Mesorhizobium* 和 *Rhizobium* 分支的菌株也分别构成 AFLP 表观群 M 和 R,位于 16S-IGS RFLP *Sinorhizobium* 的 28 个菌株,在 16S-IGS RFLP 聚类图分为 9 个表观群 S1-S9。群 S1 由 AFLP 类型 A1 和 A2,即 16S-IGS 遗传图谱类型 1 的两个菌株构成。群 S2 由 A3 和 A4,即 16S-IGS 2 的 3 个菌株构成。群 S3 包括 A8-A11 (16S-IGS 6、7)和 A25、A26 (16S-IGS 14)的 7 个菌株。群 S4 仅含 A7 (16S-IGS 5)的两个菌株。群 S5 包括 A18-A21 (16S-IGS 12)的 4 个菌株。群 S6 由 A13、A14 即 16S-IGS 9 的两个菌构成。群 S7 包括 A15-A17 (16S-IGS 10、11)的 3 个菌构成。群 S8 仅含 1 个菌株(A22,即 16S-IGS 13)。群 S9 包括 A23、A24,即 16S-IGS 13 构成。说明 AFLP 指纹分析对相关性较高菌株的分群具有较高的参考价

值, 分辨率比 16S-IGS rDNA RFLP 高; 同时也表明攀枝花银合欢根瘤菌遗传多样性丰富, 其优势种群为中华根瘤菌(*Sinorhizobium*)。

2.3 序列分析

根据 16S-IGS rDNA RFLP 及 AFLP 指纹图谱的聚类结果, 选择分属于 *Sinorhizobium*、*Mesorhizobium* 和 *Rhizobium* 代表菌株 6 个。选择染色体上 3 个不同位点的持家基因 16S rDNA、*atpD*、*recA* 进行单基因的序列和 3 个基因的联合序列构建系统发育树。由于其中的 3 个代表菌株 SCAU213、SCAU228、SCAU215 的这 3 个基因的系统发育地位在文献[8-9]中已报道, 为此只对另外 3 个代表菌株 SCAU216、SCAU222、SCAU231 进

行单基因的序列分析(图 3)。

多位点基因序列分析 (Multilocus sequence analysis, MLSA) 是对细菌染色体上不同位点的保守基因的序列进行比较分析, 以确定其亲缘关系和分类地位。目前已被用于根瘤菌种群的划分及种内遗传多样性和系统发育研究^[9,19-20]。本研究对选择的 6 个代表菌株, 3 个持家基因 16S rDNA、*recA*、*atpD* 进行 MLSA 分析。用 MEGA 5 先对每个持家基因的代表菌株和参比菌株的序列进行比对分析, 比对完成后删除序列两端不能完全对齐的碱基, 用这个方法, 获得 16S rDNA、*atpD*、*recA* 序列分别为 1 284、394、350 nt。然后每个菌株按 16S rDNA-*atpD*-*recA* 顺序获得构建联合系统发育树的 2 028 nt 序列。

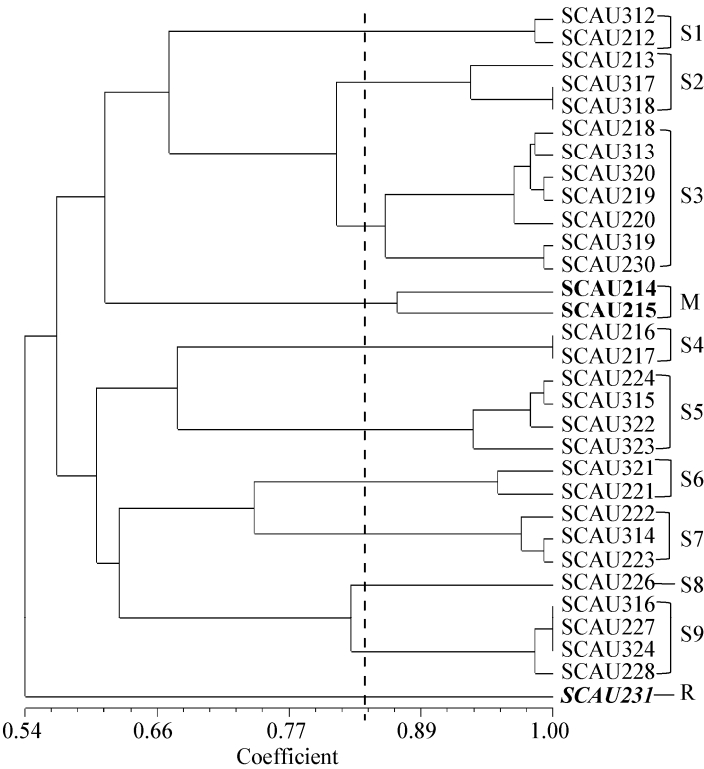


图 2 AFLP 指纹图谱聚类树状图

Figure 2 UPGMA dendrogram obtained from AFLP

注: 根据 16S-IGS RFLP 的结果, 属中慢生根瘤菌的用加粗显示, 根瘤菌属的用斜体显示。

Note: Based on 16S-IGS RFLP, the isolates in boldface were assigned to *Mesorhizobium*, in boldface and italics to *Rhizobium*, and the others to *Sinorhizobium*.

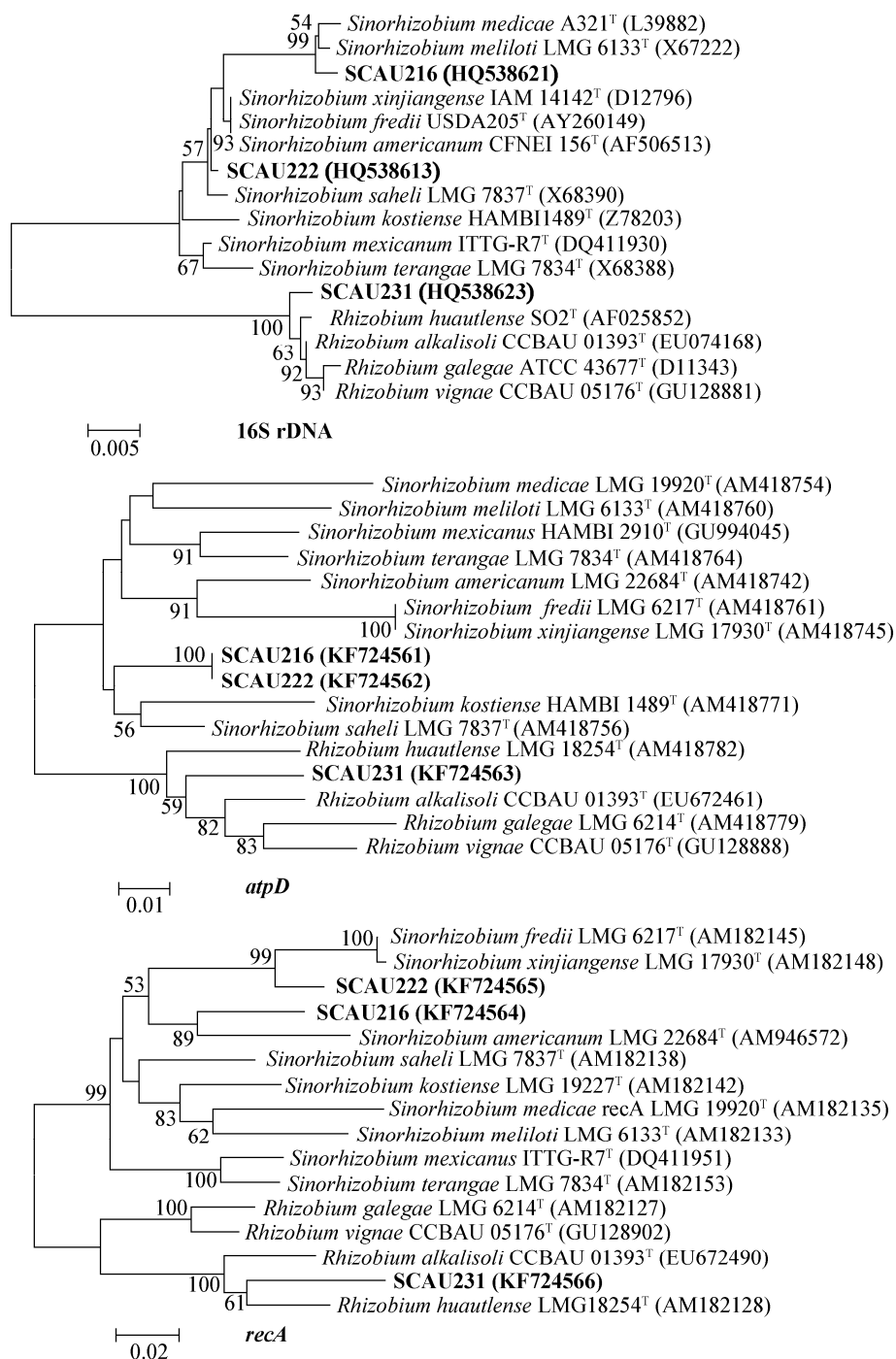


图3 16S rDNA、*atpD*、*recA* 单基因序列分别构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic trees of 16S rDNA, *atpD* and *recA* sequences

注：黑体为测序菌株；括号内为 GenBank 登录号；分支上数据表示树形可信度；比例尺显示水平线的长度，代表碱基替换数。下同。

Note: The boldfaces are strains for 16S rDNA, *atpD* and *recA* sequencing. GenBank accession numbers are in the parenthesis. The figures on the branches indicate the reliabilities. The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position. The same as bellow.

从图3可看出, 3个基因在属水平上与16S-IGS rDNA RFLP及AFLP的指纹图谱的聚类结果一致, 即分别属于 *Sinorhizobium*、*Sinorhizobium* 和 *Rhizobium*。但同一个代表菌株在3个持家基因分别构建的系统发育树上表现出3个基因在种水平并非一致。

从图3可知, 16S rDNA 基因序列分析表明, 代表菌株 SCAU216 与 *S. medica* 和 *S. meliloti* 两个种的模式菌株构成姊妹分支, 但与 *S. meliloti* LMG 6133^T 相似度(99.7%)最高; 在 *atpD* 中, SCAU216 与 SCAU222 以 99.2% 的相似度单独聚成一个分支, 这个分支又与 *S. kostiense* 和 *S. saheli* 两个模式菌株构成姊妹分支, 但两个代表均与 *S. saheli* LMG 7837^T 相似度最高, 分别为 95.6% 和 95.8%; 在 *recA* 中, 与 *S. americanum* LMG 22684^T 以 92.2% 的相似度聚在同一个分支; 在 16S rDNA-*atpD*-*recA* 序列联合构建的系统发育树(以下简称“联合树”, 图4)中, 与 *S. medicae* 和 *S. meliloti* 两个模式菌株构成姊妹分支, 3个基因序列及联合树分析表明, SCAU216 的这3个基因在种水平基因可能发生了横向水平转移, 或它代表 *Sinorhizobium* 的

一个新类群。代表菌株 SCAU222, 在 16S rDNA 中, 与图3中所示的5个模式菌株及 SCAU216 构成姊妹分支, 相似度最高(99.8%)的模式菌株有两个: *S. fredii*、*S. americanum*; 在 *recA* 中, 与 *S. fredii* 和 *S. xinjiangense* 形成姊妹分支, 但与 *S. fredii* LMG 6217^T 相似度最高, 为 95.4%; 在联合树中, SCAU222 与 *S. xinjiangense* 和 *S. fredii* 构成姊妹分支, 这些序列分析说明 SCAU222 的 *atpD* 可能发生了基因横向水平转移。代表菌株 SCAU231, 在 16S rDNA、*atpD*、*recA* 中, 均与图3中所选择的2个以上的模式菌构成姊妹支, 但均与 *R. huautlense* 模式菌的相似度最高(表1)。

从图4可知, 代表菌株 SCAU213、SCAU228、SCAU215 的 MLSA 与 16S-IGS rDNA RFLP 及 AFLP 的指纹图谱的聚类结果在属水平也是一致的。从图4和表1可以看出, 代表菌株 SCAU213 与 *S. americanum* LMG 22684^T 以 97.3% 的相似度(16S rDNA-*atpD*-*recA* 联合系列)聚在一起。SCAU228 与 SCAU222 相似度高(99.9%), 并与 *S. fredii* USDA205^T 和 *S. xinjiangense* IAM 14142^T 形成姊妹分支。

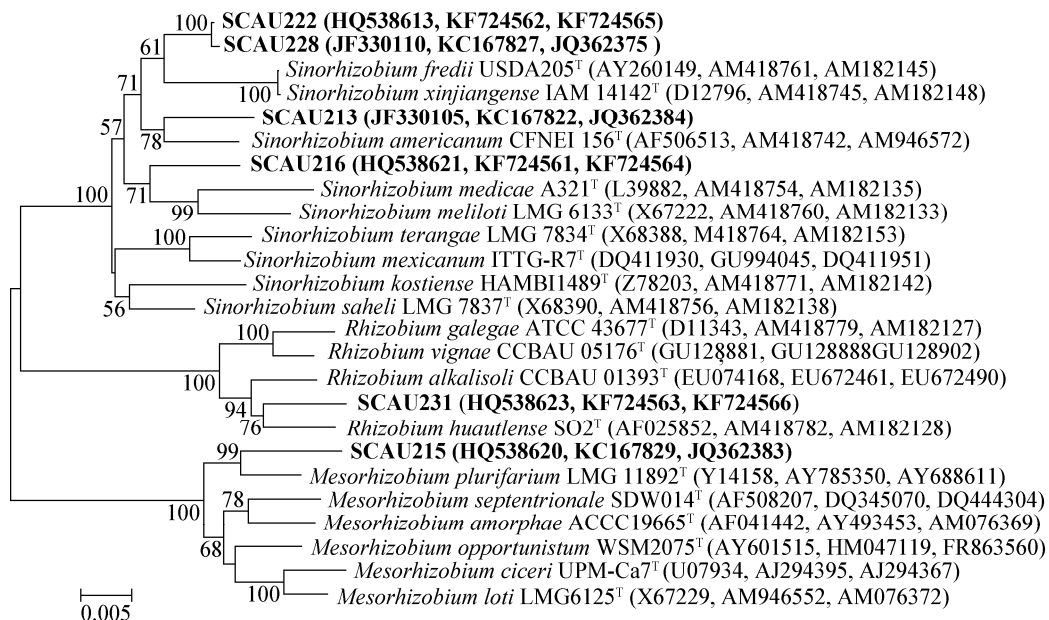


图4 以16S rDNA-*atpD*-*recA* 序列联合构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on the concatenated sequences of 16S rDNA, *atpD* and *recA* sequences

3 讨论

攀枝花市银合欢根瘤菌遗传多样性较丰富,发现 3 个属 *Sinorhizobium*、*Mesorhizobium* 和 *Rhizobium* 的菌株。供试的 31 个菌株,采自攀枝花的 4 个县(区)的 9 个采样点,仅有 2 个为 *Mesorhizobium* 菌株、1 个为 *Rhizobium* 菌株,无 *Bradyrhizobium* 菌株,有 28 个(90%)属于 *Sinorhizobium* 菌株。可见,*Sinorhizobium* 为攀枝花银合欢根瘤菌的优势类群。这与前期工作报道的四川凉山州银合欢根瘤菌类似^[8],已报道的 21 个凉山州银合欢根瘤菌中,分别有 14、3、2、2 株属于 *Sinorhizobium*、*Rhizobium*、*Mesorhizobium*、*Bradyrhizobium*。Wang 等^[7]报道 6 株福建省银合欢根瘤菌,有 3、2、1 株分别属 *Mesorhizobium*、*Agrobacterium*、*Sinorhizobium*;报道 9 株广东省银合欢根瘤菌,有 5、3、1 株分别属 *Mesorhizobium*、*Sinorhizobium*、*Bradyrhizobium*。Gao 等^[6]报道的 2 株海南省银合欢根瘤菌属于 *Sinorhizobium*。可见,广东、福建省的银合欢根瘤菌以 *Mesorhizobium* 菌株占优势,海南的可能以 *Sinorhizobium* 为优势种群。Wang 等^[5]报道的 150 株墨西哥银合欢根瘤菌中,有 95 株属 *Sinorhizobium*,也未发现 *Bradyrhizobium* 菌株。综上,银合欢根瘤菌与生态环境的关系密切,可能与前人^[17,21-23]研究的大豆根瘤菌相似,即具有一定的生物地理学分布规律,*B. japonicum* 分布最广泛,中国的盐碱地土壤中大豆的优势根瘤菌为 *S. fredii*。上述分析表明银合欢根瘤菌中 *Sinorhizobium* 菌株分布范围更广。

对于攀枝花市银合欢根瘤菌不普遍存在的 *Rhizobium*、*Mesorhizobium* 菌株,其代表菌株 SCAU231 的 16S rDNA、*recA*、*atpD* 相似度最高的模式菌株是一致的,为 *R. huautlense* SO2^T; SCAU215 的 16S rDNA、*recA*、*atpD* 相似度最高的模式菌株也是一致的,为 *M. plurifarum* LMG11892^T,因此,SCAU231 和 SCAU215 不存在 16S rDNA、*recA*、*atpD* 基因的横向水平转移现

象(表 1)。但对于优势种群 *Sinorhizobium* 的菌株则不同。SCAU222 和 SCAU228 的 16S rDNA、*atpD*、*recA*、16S rDNA-*atpD-recA* 联合序列的相似度均高,分别为 100%、99.8%、99.4%、99.9%,它们在联合树中聚在一起,代表攀枝花市银合欢根瘤菌 *Sinorhizobium* 一个种;在联合树中,这两个菌株与 *S. fredii* USDA205T 和 *S. xingjiangense* IAM 14142 T 形成姊妹分支,而这两个模式菌株的相似性为 100%;从表 1 知,虽 SCAU222 和 SCAU228 的 16S rDNA-*atpD-recA* 联合序列最相似的模式菌为 *S. fredii* USDA205T,但相似性不超过 97.5%(表 1),可见,SCAU222 和 SCAU228 可能代表 *Sinorhizobium* 的一个新类群。SCAU213、SCAU216 的 3 个基因序列最相似的模式菌株都不同(表 1),它们的持家基因普遍发生着基因横向水平转移,这两个菌株可能代表 *Sinorhizobium* 的两个新类群。基因水平转移可能在其核心基因组的进化中起着重要作用,这与基因重组(包括横向基因转移)在大豆根瘤菌的核心基因组的进化中发挥了主导作用观点较一致^[21]。Li 等^[11]研究四川黄芪根瘤菌,在 16S rDNA 和 *glnA* 的两个基因系统发育树中,均表现为 SCAU7、SCAU27 等 3 个代表菌株聚在一起构成 1 个分支,与 *M. cicer* 和 *M. loti* 两个种的模式菌构成姊妹分支,但均与 *M. loti* 的相似度均更高;而在 *glnII* 基因系统发育树中,SCAU7、SCAU27 聚在一起与 *M. cicer* 的模式菌构成 1 个分支。Zhou 等^[24]进行新种鉴定,2013 年发表了一个新种 *M. sangaii* 其模式菌株为 SCAU7^T。因此上述可能的新类群的判断具有一定的科学性。但它们是否是新种,还有待后续工作如交叉结瘤、表型多样性、DNA-DNA 杂交等试验证实。

参考文献

- [1] 张建平. 攀枝花市土地退化过程[J]. 山地学报, 1997, 14(4): 308-310.
- [2] 郑毅. 菌根技术在干热河谷地区植被恢复中的应用前景[J]. 四川理工学院学报, 2006, 19(1): 97-100.
- [3] 方海东, 纪中华, 杨艳鲜, 等. 金沙江干热河谷新银合

- 欢人工林物种多样性研究[J]. 水土保持研究, 2005, 12(1): 135-137.
- [4] 刁阳光, 刘庆刚, 林新贵, 等. 金沙江干热河谷新银合欢种源选择初步研究[J]. 四川林勘设计, 2010(1): 31-33, 37.
- [5] Wang ET, Martínez-Romero J, Martínez-Romero E. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils[J]. Molecular Ecology, 1999, 8: 711-724.
- [6] Gao JL, Sun JG, Li Y, et al. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan province, China[J]. International Journal of Systematic and Bacteriology, 1994, 44: 151-158.
- [7] Wang FQ, Wang ET, Zhang YF, et al. Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29: 502-517.
- [8] Xu KW, Penttinen P, Chen YX, et al. Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river valley area in Panxi, Sichuan, China[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 783-793.
- [9] Xu KW, Penttinen P, Chen YX, et al. Polyphasic characterization of rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* from Panxi, China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29: 2303-2315.
- [10] Aserse AA, Räsänen LA, Aseffa F, et al. Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Crotalaria* spp., *Indigofera* spp., *Erythrina brucei* and *Glycine max* growing in Ethiopia[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2012, 65: 595-609.
- [11] Li QF, Zhang XP, Zou L, et al. Horizontal gene transfer and recombination shape mesorhizobial populations in the gene center of the host plants *Astragalus luteolus* and *Astragalus ernestii* in Sichuan, China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70: 227-235.
- [12] 陈强, 陈文新, 张小平, 等. 四川省葛藤属根瘤菌的遗传多样性研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1641-1646.
- [13] 周涛, 陈远学, 邹依霖, 等. 四川高效大豆根瘤菌的筛选及初步应用研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(1): 227-233.
- [14] Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms[J]. Applied Environmental Microbiology, 1993, 59: 945-952.
- [15] Kwon SW, Park JY, Kim JS, et al. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences[J]. International Journal of Systematic Evolutionary, 2005, 55(P11): 263-270.
- [16] Chemining' wa GN Vessey JK. The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38: 153-163.
- [17] Li QQ, Wang ET, Zhang YZ, et al. Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei Province, China[J]. Microbial Ecology, 2011, 61: 917-931.
- [18] Han TX, Wang ET, Han LL, et al. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with wild legumes native to Xinjiang, China[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2008, 31: 287-301.
- [19] Aserse AA, Räsänen LA, Aseffa F, et al. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35: 120-131.
- [20] Degefu T, Wolde-meskel E, Frostegårda Å. Phylogenetic diversity of *Rhizobium* strains nodulating diverse legume species growing in Ethiopia[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36: 272-280.
- [21] Tian CF, Zhou YJ, Zhang YM, et al. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(22): 8629-8634.
- [22] Zhang YM, Li Y Jr, Chen WF, et al. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain[J]. Applied Environmental Microbiology, 2011, 77(18): 6331-6342.
- [23] 陈文新, 汪恩涛. 中国根瘤菌[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 342-349.
- [24] Zhou S, Li Q, Jiang H, et al. *Mesorhizobium sangaii* sp. nov., isolated from the root nodules of *Astragalus luteolus* and *Astragalus ernestii*[J]. International Journal of Systematic Evolutionary, 2013, 63: 2794-2799.