

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52 (12): 1439–1448; 4 December 2012
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

黑木相思根瘤菌遗传多样性

窦雅静, 陆俊锬, 康丽华*, 王胜坤, 江业根, 廖绍波

中国林业科学研究院, 热带林业研究所, 广州 510520

摘要: 【目的】研究分离自广东、福建、江西等 15 个地点的 174 株黑木相思 (*Acacia melanoxylon*) 根瘤菌的遗传多样性。【方法】采用 16S rDNA 限制性片段长度多态性分析 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 和 16S rDNA 基因、持家基因 (*recA*、*atpD*、*glnII*) 系统发育分析的方进行研究。【结果】16S rDNA PCR-RFLP 分析中, 在 70% 的相似性水平上, 所有供试菌株分成 9 个类群; 16S rDNA 基因和持家基因系统发育分析结果基本一致, 34 株代表菌株主要分布在 α -变形菌纲 (*Alpha-Proteobacteria*) 的慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、根瘤菌属 (*Rizobium*)、中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*), 并与 *Bradyrhizobium liaoningense*、*Bradyrhizobium betae*、*Bradyrhizobium cytisi*、*Rizobium multihospitium*、*Mesorhizobium plurifarum* 亲缘关系较近。【结论】供试菌株被鉴定到属的水平, *Bradyrhizobium*、*Rizobium* 或 *Mesorhizobium* 为优势菌群, 证明了黑木相思根瘤菌具有丰富的遗传多样性。

关键词: 黑木相思, 根瘤菌, 遗传多样性, 16S rDNA PCR-RFLP, 16S rDNA, 持家基因

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 12-1439-10

生物固氮是指自然界中的一些微生物和蓝绿藻将大气中的不能被植物利用的氮气还原成可利用的氨的过程^[1]。根瘤菌与豆科植物形成的共生固氮体系是生物固氮的重要组成部分, 该固氮体系固定的氮素约占生物固氮总量的 65%^[2]。通过多相分类技术研究根瘤菌的遗传多样性及系统发育, 能深入了解根瘤菌的生物多样性, 发掘新的根瘤菌的种质资源, 选育高效菌株应用于农林生产。

黑木相思 (*Acacia melanoxylon* R. Br.) 为相思属 (*Acacia*) 含羞草科 (*Mimosaceae*) 树种, 是近年来我国南方引种的主要用材树种之一。黑木相思木材是优质的贴面板原料, 具有很高的经济价值。目前在我国黑木相思原木销售价是每立方米 3000 元

以上, 而且价格有不断上升趋势^[3]。随着市场需求增大, 黑木相思在华南地区的种植面积逐渐扩大, 但黑木相思相比马占相思 (*Acacia mangium* Willd.)、厚荚相思 (*Acacia crassicarpa* A. Cunn. ex Benth.) 等相思树种生长较为缓慢。因此, 通过接种根瘤菌来提高黑木相思的生长速度、苗木存活率具有重要的应用意义。

迄今为止, 国内外对根瘤菌遗传多样性的研究多偏重于与豆科作物、绿肥、牧草等共生的根瘤菌, 对于相思属豆科树种根瘤菌的研究主要在于生理生化特性^[4-5]、与宿主的共生结瘤能力^[6]、固氮特性^[7]、固氮效果^[8]、固氮酶活性^[9]、苗木接种效应及根瘤菌菌剂应用^[10-11]、抗逆性研究^[12-14]等方面, 在

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费项目“功能微生物在低碳林业中的应用研究”(201004075)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-87029270; E-mail: klh587@126.com

作者简介: 窦雅静 (1987-), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物方面研究。E-mail: malibeier0315@126.com

收稿日期: 2012-07-08; 修回日期: 2012-09-20

遗传多样性方面仅有部分关于与马占相思 (*A. mangium*)^[15-16]、厚荚相思 (*A. crassicarpa*) 和台湾相思 (*Acacia confusa* Merr.)^[17-18] 等根瘤菌的研究。黑木相思 (*A. melanoxylon*) 根瘤菌遗传多样性的研究尚未见有相关的报道。本研究采用 16S rDNA PCR-RFLP、16S rDNA 以及持家基因 (*recA*、*atpD*、*glnII*) 系统发育分析方法,对分离自我国华南地区 15 个地点的 174 株黑木相思根瘤菌进行了遗传多样性的初步研究,为进一步揭示黑木相思根瘤菌的系统发育地位提供可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:供试菌株为本实验室分离和保存的黑木相思根瘤菌,从华南地区 8 个市县 15 个不同采样点采集根瘤和分离,共 174 株;参比菌株由中国农业大学菌种保藏中心 (CCCAU) 提供。详细信息见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR 试剂及琼脂糖凝胶电泳试剂购于上海生工生物工程技术有限公司;PCR 扩增仪 (Eppendorf, 美国)。本研究使用的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.3 培养基:根瘤菌培养用 YMA 培养基 (pH = 7.0),成分为:甘露醇 10 g;谷氨酸钠 0.5 g;磷酸氢二钾 0.5 g;硫酸镁 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2 g;氯化钠 0.01 g;酵母膏 0.5 g。

1.2 供试根瘤菌纯化培养

将保存的供试根瘤菌接 YMA 平板培养基,28℃ 培养箱培养,挑取单菌落转接并保存于 YMA 斜面。

1.3 16S rDNA PCR-RFLP 分析

供试菌株的总 DNA 用上海生工生物工程技术有限公司生产的细菌总 DNA 提取试剂盒提取。16S rDNA PCR 扩增引物参见文献 [19]。PCR 反应体系 (25 μ L):10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, 引物 27F 和 1492R 各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, Dream Taq 1 U/ μ L, 加超纯水补足。PCR 反应条件:95℃, 预变性, 5 min; 30 个循环 (95℃, 变性, 1 min; 56.7℃, 退火, 30 s; 72℃, 延伸, 1 min); 72℃, 延伸, 10 min。

PCR 产物 3 种限制性内切酶 *Hae* III、*Hinf* I 及 *Msp* I 在 37℃ 酶切 10 h。酶切反应体系为 20 μ L:

17 μ L ddH₂O, 10 μ L 16S rDNA PCR 产物, 1 μ L (5 U/ μ L) 酶, 2 μ L 相应的 10 \times 酶切缓冲液。全部酶切产物与 2 μ L 上样缓冲液混匀后进行 3% 琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 2 h), UV 扫描, 文件以 tiff 格式保存。采用 Gelcompar II 图像分析软件进行谱带处理, 用平均连锁聚类法得到供试菌株的 UPGMA 树状图。

1.4 16S rDNA 序列分析

根据 16S rDNA PCR-RFLP 分析聚类结果, 选取代表菌株, 将其 16S rDNA PCR 产物经检测合格后送上海生工生物工程技术有限公司测序。将测序结果输入 GenBank, 通过 BLAST 程序进行在线比对, 并从 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, 然后用 MEGA5.1 软件采用邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育树, 自展值 (Bootstrap) 为 1000。

1.5 持家基因 (*recA*, *atpD*, *glnII*) 系统发育分析

持家基因 PCR 扩增引物参见文献 [20]。反应体系 (50 μ L) 为: ddH₂O 40 μ L; 10 \times Buffer 5 μ L; dNTP 1 μ L; 正向引物和反向引物各 1 μ L; DNA 模板 1 μ L; Dream Taq 1 U/ μ L。(1) *recA* 扩增条件: 95℃, 预变性, 3 min; 30 个循环 (94℃, 变性, 1 min; 54℃, 退火, 1 min; 72℃, 延伸, 1 min); 72℃, 延伸, 6 min。(2) *atpD* 扩增条件: 95℃, 预变性, 3 min; 30 个循环 (94℃, 变性, 1 min; 58℃, 退火, 1 min; 72℃, 延伸, 1 min); 72℃, 延伸, 6 min。(3) *glnII* 扩增条件: 95℃, 预变性, 3 min; 30 个循环 (94℃, 变性, 1 min; 55℃, 退火, 1 min; 72℃, 延伸, 1 min); 72℃, 延伸, 6 min。

PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 检测正确的 PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司测序。用 MEGA5.1 软件分别对测得的代表菌株的 3 个持家基因序列与相应的参比菌株序列进行比对, 比对后拼接 3 个持家基因序列, 拼接后用邻接法构建系统发育树, Bootstrap 为 1000。

2 结果

2.1 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析

16S rDNA 进行 PCR 扩增后, 均产生一条约 1.5 kb 的 DNA 片段。用 3 种限制性内切酶 (*Hae*

表 1 供试菌株及参比菌株

Table 1 The tested strains and reference strains

Origin	Host	Strains	RFLP type
Shixing County, Guangdong Province (广东省始兴县)	<i>A. melanoxylo</i> n Tree HL02	RITF11、RITF121、RITF131	D
	<i>A. melanoxylo</i> n Tree HL03	RITF23、RITF24、RITF211、RITF212、RITF221、RITF222、RITF24a	D
	<i>A. melanoxylo</i> n Tree VT01	RITF311、RITF321 RITF322	D E
Meixian county, Guangdong Province (广东省梅县)	<i>A. melanoxylo</i> n Tree VS04	RITF511、RITF512、RITF521、RITF522、RITF531、RITF532、RITF541、RITF542	D
	<i>A. melanoxylo</i> n Tree VX02	RITF61、RITF611、RITF62、RITF63、RITF613、RITF614、RITF651、RITF661、RITF671、RITF672、RITF681、RITF682	D
Huizhou City, Guangdong Province (广东省惠州市)	<i>A. melanoxylo</i> n Tree KZ01	RITF711、RITF712、RITF721、RITF741、RITF742	B
Ganzhou City, Jiangxi Province (江西省赣州市)	<i>A. melanoxylo</i> n	RITF801、RITF803、RITF804、RITF805、RITF806、RITF807、RITF808、RITF809、RITF810	D
Nursery in Huizhou City, Guangdong Province (广东省惠州市苗圃)	<i>A. melanoxylo</i> n	RITF902、RITF905、RITF907、RITF908、RITF909	B
Nursery in Sihui City, Guangdong Province (广东省四会市苗圃)	<i>A. melanoxylo</i> n	RITF1002、RITF1004、RITF1015、RITF1016、RITF1017、RITF1022、RITF1023、RITF1024	D
Zhongxi forest farm in Zhangzhou City, Fujian Province (福建省漳州市中西林场)	<i>A. melanoxylo</i> n	RITF1101、RITF1102、RITF1103、RITF1104、RITF1105、RITF1106、RITF1108、RITF1109、RITF1110、RITF1111、RITF1112、RITF1113、RITF1114、RITF1115、RITF1116、RITF1117、RITF1118	D
		RITF1201、RITF1202、RITF1205、RITF1207、RITF1209、RITF1210、RITF1211	I
Nursery in Zengcheng City, Guangdong Province (广东省增城市苗圃)	<i>A. melanoxylo</i> n	RITF1204	J
		RITF1206	K
		RITF1212、RITF1213、RITF1214、RITF1215、RITF1216、RITF1217、RITF1218、RITF1219、RITF1220	B
		RITF1311、RITF1312、RITF1313、RITF1314、RITF1315、RITF1321、RITF1322、RITF1323、RITF1324、RITF1327、RITF1328、RITF1329、RITF1332、RITF1333、RITF1334	D
		RITF1412、RITF1414、RITF1415、RITF1416、RITF1417、RITF1418、RITF1421、RITF1422、RITF1431、RITF1432、RITF1457、RITF1458、RITF1481、RITF1482、RITF1483、RITF1484、RITF14114、RITF14115、RITF14121、RITF14122、RITF14141、RITF14142	D
Yong'an county, Fujian Province (福建省永安市)	<i>A. melanoxylo</i> n Tree YL02	RITF1413、RITF1461、RITF1462、RITF1463、RITF1464、RITF1471、RITF1472、RITF1473、RITF1492、RITF1493、RITF14111	H
		RITF1491	F
		RITF14113	L
		RITF1541、RITF1542、RITF1551、RITF1552、RITF1553、RITF1554、RITF1555、RITF1556、RITF1558、RITF1563	D
<i>A. melanoxylo</i> n Tree YL03	<i>A. melanoxylo</i> n Tree YL03	RITF1564	B
		RITF1611、RITF1612、RITF1614、RITF1621、RITF1622、RITF1623、RITF1624、RITF1631、RITF1632、RITF1633、RITF1634、RITF1651、RITF1652、RITF1653、RITF1654、RITF1656、RITF1657、RITF1658	D

续表 1

Origin	Host	Strains	RFLP type	
CCBAU	<i>Oryza sativa</i>	<i>Agrobacterium umefaciens</i> IAM13129	F	
	hairy-root of apple trees	<i>Agrobacterium rhizogense</i> IAM13570 ^T		
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium etli</i> CFN42 ^T		
	<i>Indigo fera</i> spp.	<i>Rhizobium indigoferae</i> CCBAU71042 ^T	F	
	<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	G	
	<i>Kummerowia stipulacea</i>	<i>Sinorhizobium kumerowiae</i> CCBAU 71714 ^T 、		
	<i>Sesbania pachycarpa</i>	<i>Sinorhizobium saheli</i> LMG7837 ^T 、		
	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Sinorhizobium medicae</i> USDA1037 ^T		
	<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110、		D
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA6 ^T 、		
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i> B15、		
		<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> USDA3622 ^T 、		
	CCBAU	<i>Bradyrhizobium elkani</i> USDA76 ^T	C	
		<i>Bradyrhizobium iriomotense</i> LMG24129 ^T 、		
		<i>Bradyrhizobium huanghuaiense</i> 、		
		<i>Bradyrhizobium daqingense</i>	D	
		<i>Lepedeza</i>		<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU10071 ^T
		<i>Beta vulgaris</i>		<i>Bradyrhizobium betae</i> PL7HG1 ^T
		<i>Cytisus triflorus</i>		<i>Bradyrhizobium cytisi</i> CTAW11 ^T
		<i>Pachyrhizus erosus</i>	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> PAC48 ^T 、	C
<i>Bradyrhizobium jicamae</i> LMG24556 ^T				
<i>Lablab purpureus</i>		<i>Bradyrhizobium lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	A	
<i>Lupinus</i> spp.	<i>Bradyrhizobium canariense</i> BTA-1 ^T			
<i>Aeschynomene indica</i>	<i>Blastobacter denitrificans</i> LMG 8443 ^T			
<i>Lotus corniculatus</i>	<i>Mesorhizobium loti</i> NZP2213 ^T			
<i>Astragalus sinicus</i>	<i>Mesorhizobium huakuii</i> CCBAU2609			
<i>Amorpha fruticosa</i>	<i>Mesorhizobium amorphae</i> ACCC19665 ^T			
<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	<i>Mesorhizobium tianshanense</i> A-1BS ^T			

CCCBU = Culture Collection of Beijing Agricultural University. ^T: type strain

III、*Hinf* I 及 *Msp* I) 对 PCR 产物酶切。综合分析 3 种限制性内切酶的酶切结果得到酶切图谱聚类分析图,在 70% 的相似性水平上全部菌株聚成 12 个类群 (RFLP type),见表 1。其中,群 A、C、G 全部由参比菌株组成;群 B、E、H、I、J、K、L 全部由供试菌株组成;群 D 由 *Bradyrhizobium* 属 7 株参比菌株和 131 株供试菌株组成;群 F 由 1 株供试菌株和 3 株 *Rhizobium* 属、2 株 *Agrobacterium* 属参比菌株组成。结果表明,黑木相思根瘤菌具有丰富的遗传多样性,其中,*Bradyrhizobium* 属菌株为优势菌。

2.2 16S rDNA 基因序列分析

根据 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析结果挑选出 34 株代表菌株进行 16S rDNA 序列测定和系统发育分析,并在 Genbank 数据库中比对相似序列。选取 23 株参比菌株,采用邻接法构建系统发育树 (图 1)。如图所示,*Mesorhizobium*、*Rhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 各属的参比菌株构成 3 个系统发育分支。

Bradyrhizobium 分支包括 RFLP type 为 D 的 22

株代表菌株和 1 株 RFLP type 为 E 的代表菌株 RITF322。序列分析结果表明,菌株 RITF322 与菌株 RITF63、RITF512、RITF1002、RITF1110、RITF1621 具有相同的序列,与参比菌株 *Bradyrhizobium betae* PL7HG1^T和 *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T相似性最高,为 99.5%;菌株 RITF11、RITF211、RITF801、RITF1313、RITF1558 序列相似性为 100%,且与参比菌株 *Bradyrhizobium betae* PL7HG1^T和 *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T关系最近,相似性为 99.6%;菌株 RITF806、RITF807、RITF1022、RITF1023、RITF1024、RITF1111、RITF1622、RITF1631 也与 *Bradyrhizobium betae* PL7HG1^T和 *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T相似性最高,在 98.8% - 99.4% 之间;菌株 RITF1416、RITF1417、RITF1482、RITF14115 与 *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T聚在一起,相似性分别为 99.4%、99.6%、98.9% 和 99.4%。*Bradyrhizobium* 分支各菌株之间的相似性大于 98%,与 *Rhizobium* 属、*Mesorhizobium* 属各菌株间相似性为 87% - 88%。

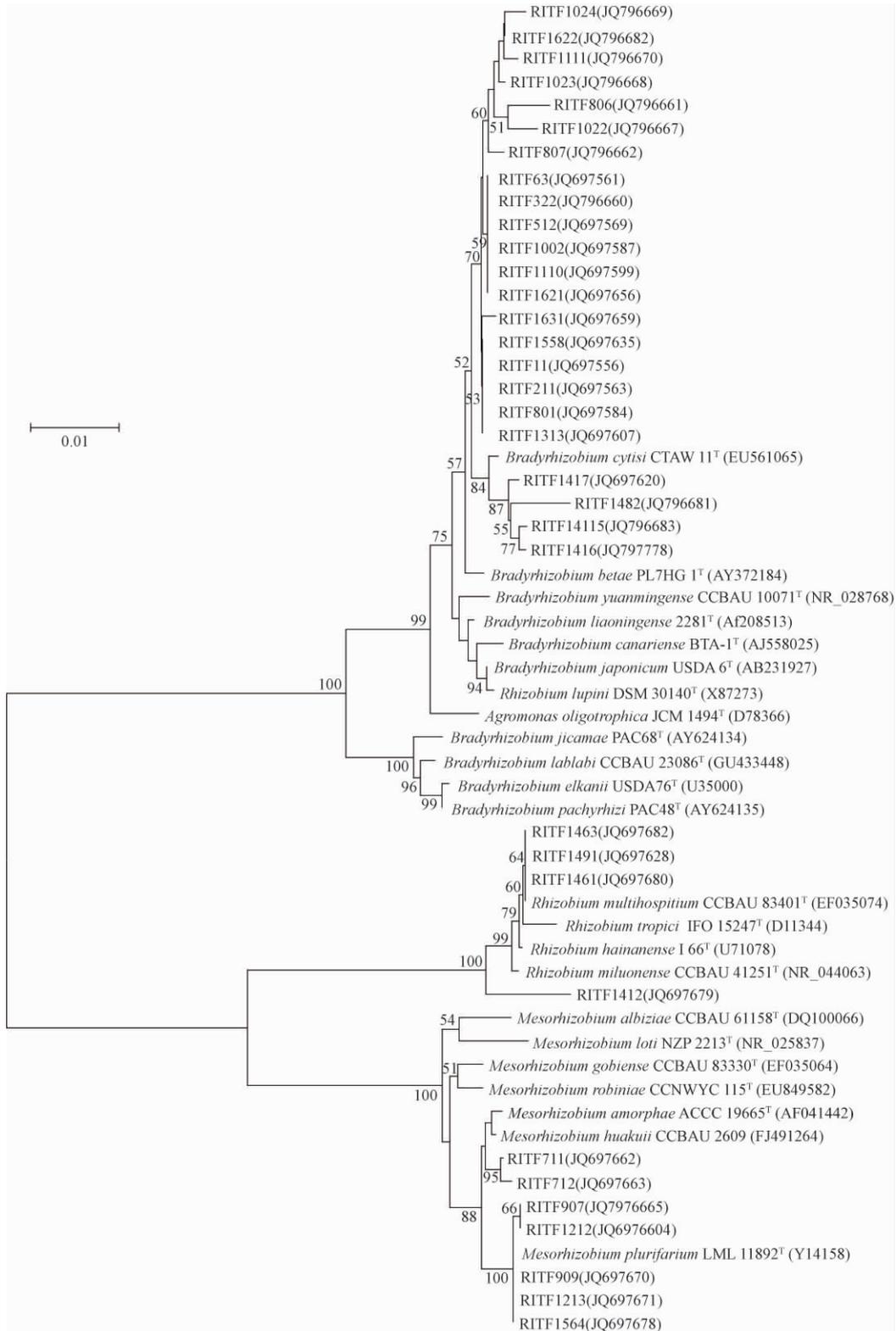


图 1 代表菌株 16S rDNA 基因系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of the representative isolates. The tree was constructed using the neighbor-joining method. Numbers at the nodes are bootstrap percentages for 1000 samplings; values below 50% are not shown. GenBank accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates 1% nucleotide substitutions per site.

Rhizobium 分支包括 RFLP type 为 H 的代表菌株 RITF1461、RITF1463、RITF1491 和 RFLP type 为 D 的代表菌株 RITF1412。菌株 RITF1461、RITF1463、RITF1491 具有相同的序列,与参比菌株 *Rhizobium multihospitium* CCBAU 83401^T 聚群,相似性为 100%; 菌株 RITF1412 与参比菌株 *Rhizobium miluonense* CCBAU 41251^T 亲缘关系最近,相似性为 98.7%。

Mesorhizobium 分支包含代表菌株 RITF711、RITF712、RITF907、RITF909、RITF1212、RITF1213、RITF1564,共 7 株,与 16S rDNA PCR-RFLP 聚类结果一致,RFLP type 为 B。其中,菌株 RITF907、RITF909、RITF1212、RITF1213、RITF1564 与 *Mesorhizobium plurifarum* LMG 11892^T 亲缘关系最近,相似性均为 100%; 菌株 RITF711、RITF712 与 *Mesorhizobium huakuii* CCBAU 2609 相似性最高,分别为 99.8% 和 99.6%。

16S rDNA 序列分析结果与 16S rDNA PCR-RFLP 分析聚类结果在属水平上基本一致,种水平上差异较大。在 16S rDNA PCR-RFLP 中,菌株 RITF322 独立分型,16S rDNA 序列分析中,RITF322 与 *Bradyrhizobium* 属各菌株聚为一群,且与菌株 RITF63、RITF512 等具有相同的序列; 16S rDNA PCR-RFLP 结果中, *Bradyrhizobium* 供试菌株与 *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU10071^T 关系最近,但 16S rDNA 序列分析结果表明,与 *Bradyrhizobium* 供试菌株亲缘关系最近的为 *Bradyrhizobium betae* PL7HG1^T 和 *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T。

2.3 持家基因 (*recA*、*glnII* 和 *atpD*) 部分序列系统发育分析结果

根据 16S rDNA 序列分析和 16S rDNA PCR-RFLP 结果,对 34 株代表菌株进行了持家基因 (*recA*、*glnII* 和 *atpD*) 部分序列系统发育分析。邻接法构建的系统发育树如图 2 所示。

结果表明,持家基因的系统发育分析结果与 16S rDNA 系统发育分析结果基本一致。代表菌株 RITF1416、RITF1417、RITF14115、RITF1482 聚在一起,与参比菌株 *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T 相似性分别为 94.7%、94.7%、94.2%、94.5%; 代表菌株 RITF1461、RITF1463、RITF1491 具有相同的序列,与参比菌株 *Rhizobium multihospitium* CCBAU 83401 相似性最高为 99.2%; 代表菌株 RITF907、

RITF909、RITF1212、RITF1564 与参比菌株 *Mesorhizobium plurifarum* LMG 11892^T 相似性在 91.1% - 93.8% 之间。

持家基因的系统发育分析的序列离散度 (sequence divergence) 更高,能够区分关系较近的菌株。代表菌株 RITF11、RITF211、RITF63、RITF801、RITF806、RITF807、RITF1313、RITF1621、RITF1631 与 *Bradyrhizobium betae* PL7HG1^T 相似性最高,为 94.0% - 95.1%; 菌株 RITF1558 与 *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T 相似性最高,为 93.3%。而在 16S rDNA 分析结果中,这些菌株与参比菌株 *Bradyrhizobium betae* PL7HG1^T 和 *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T 具有相同的相似性。

部分持家基因聚类结果与 RFLP 及 16S rDNA 序列分析结果不太一致。菌株 RITF1213 与 *Mesorhizobium plurifarum* ICMP 13640 关系最近,但在持家基因系统发育树中,菌株 RITF1213 单独聚群。菌株 RITF1412 在 16S rDNA 序列分析中与 *Rhizobium* 聚群,但在 RFLP 分析和持家基因序列分析中位于 *Bradyrhizobium* 属。持家基因序列分析中与 *Bradyrhizobium* 属供试菌株亲缘关系最近的参比菌株与前述两种聚类方法得出的结果有所不同: 菌株 RITF322、RITF512、RITF1002、RITF1022、RITF1023、RITF1024、RITF1110、RITF1111、RITF1412、RITF1622 与参比菌株 *Bradyrhizobium liaoningense* LMG 18230T 亲缘关系最近,相似性在 94% - 95% 之间; 菌株 RITF711、RITF712 与 *Mesorhizobium amorphae* ACCC 19665T 关系最近,相似性分别为 92.3%、92.1%。

3 讨论

本研究采用 16S rDNA PCR-RFLP、持家基因 (*atpD*、*recA* 和 *glnII*) 系统发育分析等方法对分离自我国华南地区 (广东、福建、江西) 15 个不同地点的 174 株黑木相思根瘤菌纯培养进行了遗传多样性研究。这亦是首次关于黑木相思根瘤菌遗传多样性的研究。

结合 16S rDNA PCR-RFLP、16S rDNA 序列分析和持家基因系统发育分析结果,174 株供试菌株被鉴定到属的水平。其中,132 株属于 *Bradyrhizobium* 属,在系统发育分析中与 *B. cytisi*、*B. betae*、*B.*

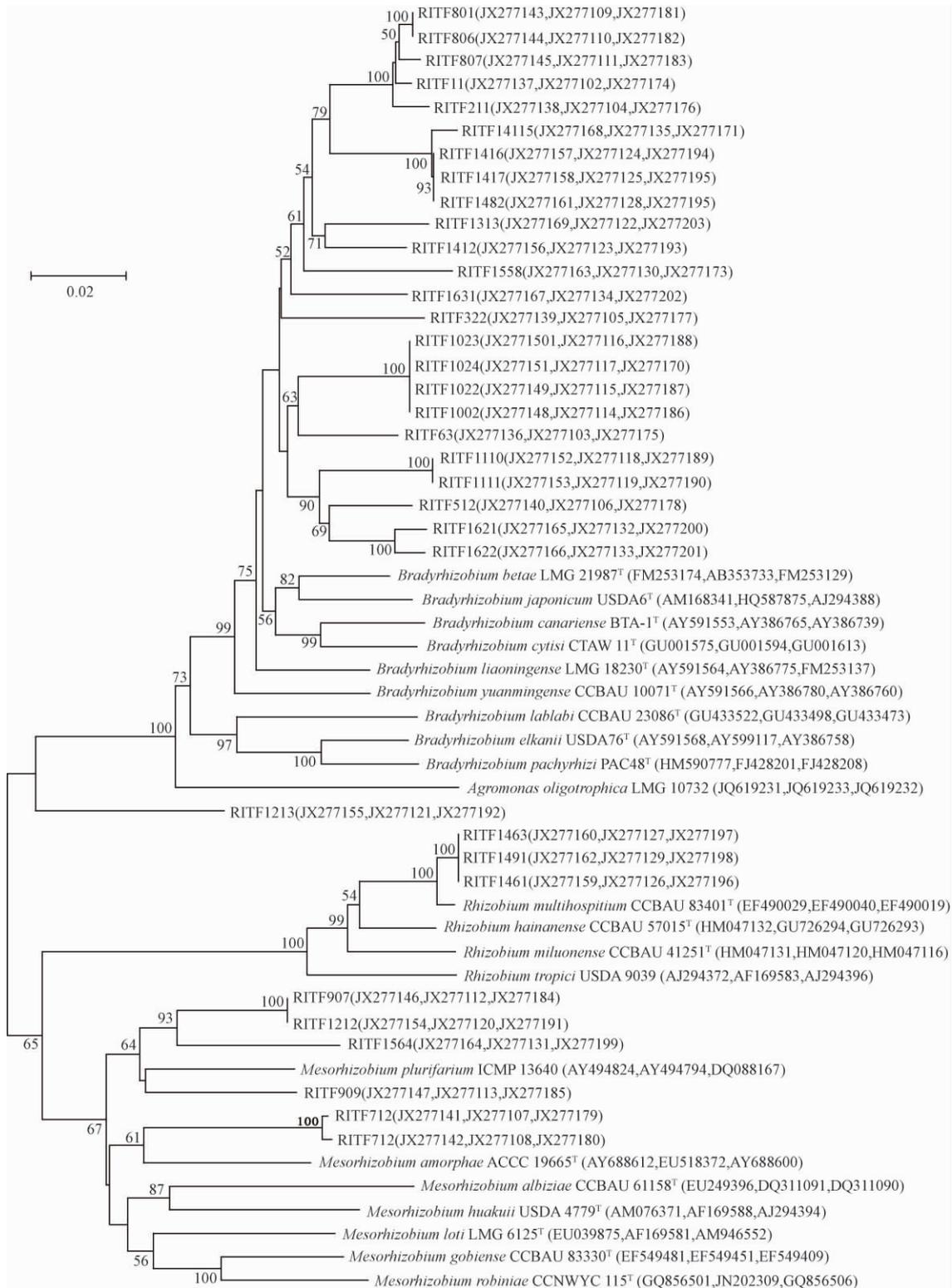


图2 持家基因 *recA*、*glnII* 和 *atpD* 拼接后的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of concatenated sequences of *recA*, *glnII* and *atpD*. The tree was constructed using the neighbor-joining method. Numbers at the nodes are bootstrap percentages for 1, 000 samplings; values below 50% are not shown. GenBank accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates 2% nucleotide substitutions per site.

liaoningense 关系最近; 20 株属于 *Mesorhizobium* 属, 相近的菌株为 *M. plurifarum* 和 *M. amorphae*。*Rhizobium* 属包含 12 株供试菌株, 亲缘关系相近的菌株为 *R. multihospitium*。在 *Bradyrhizobium* 属及 *Mesorhizobium* 属中, 部分菌株的持家基因拼接序列与亲缘关系最近的菌株序列相似性小于 95%, 可能是新的种群, 需要进行共生基因系统发育分析、(G + C) mol% 含量测定与 DNA 同源性分析等分析方法来进一步确认其分类地位。

16S rDNA PCR-RFLP 分析与 16S rDNA 和持家基因序列分析结果具有一定的差异。造成这些差异的原因可能为: (1) 16S rDNA PCR-RFLP 用于大量菌株的快速分群, 在数据处理过程中可能因为人为的判断而产生误差。(2) 同一株菌株中可能存在 16S rDNA 基因的不同拷贝, 序列不完全一样, 导致酶切结果与序列分析结果的不一致。(3) 16S rDNA 序列分析可以鉴定到属, 但基因的横向转移及基因重组会影响亲缘关系的远近^[21]。(4) 16S rDNA 核糖体基因高度保守, 只能鉴定到属及容易鉴别的种, 不能区分关系比较近的种或菌株, 尤其是 *Bradyrhizobium* 属, 种间多样性极为复杂, 不同种的 16S rDNA 序列非常相似, 很难区分^[22]。

以往研究表明, 相思属树种根瘤菌在属的水平上具有较丰富的遗传多样性。研究发现, 与相思树种共生的根瘤菌分别位于 *Mesorhizobium* 属和 *Bradyrhizobium* 属和 *Rhizobium* 属, 其中 *Bradyrhizobium* 为优势菌群^[17, 23-25]; Joubert^[27] 发现相思属树种根瘤菌在 *Sinorhizobium* 属和 *Agrobacterium* 属也有分布; 另外, 杨群^[23]、Ngom^[15]、徐开未^[26] 也分别发现了属于 *Burkholderia* 属、*Ochrobactrum* 属和 *Herbaspirillum* 属的菌株。本研究结果与以往的研究结果相一致, 黑木相思主要与 *Mesorhizobium* 属、*Bradyrhizobium* 属和 *Rhizobium* 属菌株共生结瘤。相思属树种根瘤菌在种的水平上主要归属于 *B. japonicum*^[18, 21]、*B. Canariense*^[25]、*B. elkanii*^[28]、*B. yuanmingense*^[16]、*M. plurifarum*^[16]、*R. tropici*^[29-30] 等。本研究中除了发现上述的种以外, 还发现黑木相思的根瘤菌中还有 *B. cytisi*、*B. betae*、*B. liaoningense*、*R. multihospitium*。

本研究还发现, 根瘤菌的种类与其地理来源之间具有一定的相关性, 在不同采样地点, 优势菌群有所差异。在广东梅县 (树 VS04、树 VX02、树

YL04)、江西省赣州市、广东四会市苗圃、福建漳州市中西林场、广东始兴县 (树 HL03) 福建永安 (树 YL01、树 YL03、树 YL04) 等 10 个采样点, *Bradyrhizobium* 属为优势种群; 在广东惠州 (树 KZ01)、广东惠州市苗圃、广东省增城市苗圃 3 个采样点, *Mesorhizobium* 为优势种群; 福建永安 (树 YL02) 和广东省增城市苗圃采样点, 黑木相思根瘤菌遗传多样性较丰富, 其中, 福建永安 (树 YL02) 采样点, *Bradyrhizobium* 属和 *Rhizobium* 属为主要菌群; 广东省增城市苗圃采样点 *Mesorhizobium* 菌株占一半比例。之前大部分的报道中, *Bradyrhizobium* 属为与相思树种结瘤的优势菌群^[6, 28, 31], 也有报道 *Rhizobium* 属为优势菌群^[18, 31], 本研究结果与其相一致, 另外发现在广东惠州市苗圃和广东惠州 (树 KZ01) 采样点 *Mesorhizobium* 属为优势菌群, 这是第一次报道 *Mesorhizobium* 属根瘤菌为与相思属树种结瘤的优势菌群。土壤因子与根瘤菌的关系有待今后进一步研究。

致谢 感谢中国林业科学院热带林业研究所曾炳山研究员、陈祖旭高工和嘉汉林业有限公司康汉华总工、陈考科工程师野外采集根瘤样品, 感谢中国农业大学生物学院隋新华副教授和王蕊、郑文涛同学在数据处理过程中的悉心指导和无私帮助!

参考文献

- [1] 陈强, 陈文新, 张小平, 李登煜, Lindstrom K. 四川省葛藤属根瘤菌的遗传多样性研究. 中国农业科学 (*Scientia Agricultura Sinica*), 2004, 37 (11): 1641-1646.
- [2] 陈文新, 汪恩涛. 中国根瘤菌. 北京: 科学出版社, 2011.
- [3] 谢季元, 张汉永. 广种黑木相思, 大有经济生态效益. 梅州日报, 2007, 12-12.
- [4] 焦如珍, 彭玉红. 海南岛热带木本豆科植物根瘤菌的溶磷作用. 林业科学 (*Scientia Silvae Sinicae*), 2010, 46 (10): 1-5.
- [5] 吕成群, 陆俊锟, 黄宝灵, 孙以树, 李小华. 喀斯特生境台湾相思根瘤菌的生物学特性研究. 微生物学通报 (*Microbiology China*), 2008, 35 (2): 215-219.
- [6] Rodríguez-Echeverría S, Le Roux JJ, Crisóstomo JA, Ndlovu J. Jack-of-all-trades and master of many? How does associated rhizobial diversity influence the colonization success of Australian *Acacia* species?. *Diversity and Distributions*, 2011, 17 (5): 946-957.

- [7] 蒋艳明, 凌云, 秦建丽, 侯远瑞, 韦莉莉, 栾桂龙, 樊妙姬. 马占相思根瘤菌结瘤固氮特性的分析. 广西农业生物科学 (*Journal of Guangxi Agric. and Biol. Science*), 2005, 24 (3): 215-219.
- [8] 丁明惫, 蚁伟民, 廖兰玉, 傅声雷, 余作岳. 生态条件对马占相思结瘤固氮的影响. 热带亚热带植物学报 (*Journal of Tropical and Subtropical Botany*), 1994, 2 (2): 15-21.
- [9] 蔡克强, 邹小鲁. 台湾相思结瘤固氮与吸氢酶活性研究. 亚热带植物通讯 (*Subtropical Plants Science*), 1993, 22 (1): 1-6.
- [10] 侯远瑞, 邓艳, 林莹, 樊妙姬, 苏建苗. 根瘤菌浸根处理对相思苗木接种的效应初报. 广西林业科学 (*Guangxi Forestry Science*), 2004, 33 (2): 88-89.
- [11] 康丽华. 相思苗木接种根瘤菌的研究. 林业科学研究 (*Forest Research*), 1998, 11 (4): 43-349.
- [12] Thrall PH, Broadhurst LM, Hoque MS, Bagnall DJ. Diversity and salt tolerance of native *Acacia* rhizobia isolated from saline and non-saline soils. *Austral Ecology*, 2009, 34 (8): 950-963.
- [13] Chaudhry T, Khan A, Rajak R. Role of symbiotic micro-organisms in sustainable plant growth on heavy metal contaminated industrial sites. India: Scientific Publishers, 2002: 270-279.
- [14] 李莉, 吕成群, 伍荣善, 黄宝灵, 吴庆梅, 秦慧晶. 杂交相思根瘤菌的抗逆特性. 林业科技开发 (*China Forestry Science and Technology*), 2010, 24 (1): 32-35.
- [15] Ngom A, Nakagawa Y, Sawada H, Tsukahara J, Wakabayashi S, Uchiumi T, Nuntagij A, Kotepong S, Suzuki A, Higashi S, Abe M. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *The Journal of general and applied microbiology*, 2004, 50 (1): 17-27.
- [16] 王凤芹, 张勇法, 刘杰, 宋安东, 刘全军, 陈文新. 合欢、金合欢和银合欢根瘤菌系统发育研究方法比较. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48 (1): 1-7.
- [17] 李东, 黄莉莉, 韩素芬. 23 株豆科木本植物根瘤菌 16S rDNA 序列分析. 南京林业大学学报 (自然科学版) [*Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*], 2008, 31 (6): 117-120.
- [18] Lu JK, Kang LH, He XH, Xu DP. Multilocus sequence analysis of the Rhizobia from five woody legumes in southern China. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5 (30): 5343-5353.
- [19] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, 1991: 115-175.
- [20] Islam MS, Kawasaki H, Muramatsu Y, Nakagawa Y, Seki T. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada kosunensis* from Iriomote Island in Japan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2008, 72 (6): 1416-1429.
- [21] Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilps SA, Young JPW. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2001, 51 (6): 2037-2048.
- [22] Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992, 42 (1): 166-170.
- [23] 杨群. 厚荚相思树种根瘤菌的多样性研究. 广西大学学位论文, 2010.
- [24] 张希涛, 康丽华, 马海滨, 江业根. 具有溶磷能力的相思根瘤菌 16S rDNA 序列分析. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2007, 35 (24): 7427-7429.
- [25] Rodríguez-Echeverría S, Crisóstomo J A, Freitas H. Genetic diversity of rhizobia associated with *Acacia longifolia* in two stages of invasion of coastal sand dunes. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73 (15): 5066-5070.
- [26] 徐开未. 攀西干热河谷豆科树根瘤菌的遗传多样性及系统发育研究. 四川农业大学学位论文, 2011.
- [27] Joubert C. Rhizobia associated with Australian *Acacia* species (*Acacia mearnsii*, *Acacia dealbata* and *Acacia decurrens*) in South Africa as determined by sodium dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. Dissertation of University of Pretoria, 2002.
- [28] Dupuy N, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Vandenbruaene I, Maestrojuan G, Dreyfus B, Kersters K, Collins MD, Gillis M. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree. *Acacia albida*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44 (3): 461-473.
- [29] 彭玉红, 焦如珍, 牟新涛. 尖峰岭抗逆性根瘤菌的筛选及其 16S rDNA 序列的测定. 林业科学研究 (*Forest Research*), 2010, 23 (4): 530-536.
- [30] Lafay B, Burdon JJ. Small-subunit rRNA genotyping of

rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. . *Applied and environmental microbiology*, 2001, 67 (1) : 396-402.

- [31] Lin DX, Chen WF, Wang FQ, Hu D, Wang ET, Sui XH, Chen WX. *Rhizobium mesosinicum* sp. Nov. ,

isolated from root nodules of three different legumes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2009, 59 (8) : 1919-1923.

Biodiversity of Rhizobia associated with *Acacia melanoxylon* grown in South China

Yajing Dou, Junkun Lu, Lihua Kang*, Shengkun Wang, Yegen Jiang, Shaobo Liao
Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China

Abstract: [Objective] This study aimed to investigate the genetic diversity of 174 isolates of symbiotic bacteria associated with *Acacia melanoxylon* obtained from 15 sampling sites in Guangdong, Fujian and Jiangxi provinces of China. [Methods] The 16S rDNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) and phylogenetic analyses of the 16S rDNA and housekeeping genes (*recA*, *glnII* and *atpD*). [Results] In the 16S rDNA PCR-RFLP analysis, 9 rDNA types were identified among the 174 isolates; Phylogenetic analyses based on 16S rDNA and housekeeping gene sequences indicated that 34 representative isolates belonged to the genus *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* in *Alpha-Proteobacteria*, and the most closely related strains are *Bradyrhizobium liaoningense*, *Bradyrhizobium betae*, *Bradyrhizobium cytisi*, *Rhizobium multihospitium* and *Mesorhizobium plurifarium*. [Conclusion] All of the isolates could be identified to general, and *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* or *Mesorhizobium* could be the dominant microsymbiont. The microsymbionts associated with *Acacia melanoxylon* showed relative genetic diversity.

Keywords: *Acacia melanoxylon*, rhizobia, genetic diversity, 16S rDNA PCR-RFLP, 16S rDNA, housekeeping gene

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Special Fund for Forestry-scientific Research in the Public Interest "Applied research of functional microbes in low carbon forestry" (201004075)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-87029270; E-mail: klh587@126.com

Received: 8 July 2012/Revised: 20 September 2012

微生物学一直是生命科学中领先的学科

微生物学学科的研究对象决定了它有如下两方面的显著特点:

微生物作为最简单的生命体而成为生命科学研究不可替代的基本材料,由此也奠定了微生物学在生命科学中的基础地位;

微生物极其丰富的生物多样性决定了它们具有代谢产物多样性,同时又与人类、动植物和环境有着密切的相互作用,使得微生物学也成为应用领域里十分活跃的一门学科。

摘自《国家自然科学基金1999年度项目指南》