

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(5):498-508; 4 May 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.004

凉山州新银合欢根瘤菌的共生有效性及遗传多样性

徐开未, 张小平, 陈远学*, 古飞越, 周德海, 唐成义

四川农业大学资源环境学院, 四川 成都 611130

摘要 【目的】研究分离自四川凉山州新银合欢根瘤菌的遗传多样性和共生有效性。【方法】采用 16S rRNA RFLP、BOX-PCR、AFLP、多位点持家基因序列的联合分析及无氮水培法对 33 株供试新银合欢根瘤菌的遗传多样性和共生有效性进行研究。【结果】分析表明 3 种方法在属水平的分群结果具有较好的一致性, 有 1 个 *Mesorhizobium* 属的菌株、3 个 *Bradyrhizobium* 属的菌株、3 个 *Rhizobium* 属的菌株、26 个相似度较高的菌株属 *Sinorhizobium*。16S rRNA-*recA-atpD-glnII* 序列联合构建的新银合欢根瘤菌系统发育树表明, SCAU203、SCAU211 可能分别是 *Rhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 的新类群, 另外 3 个代表菌株分别位于 *Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、*Bradyrhizobium* 分支, 分别与 *S. americanum*、*M. Plurifarium*、*R. huautlense* 亲缘关系最近。无氮水培接种试验筛选出 2 个共生固氮效果好、与不接种对照处理差异达显著水平的菌株 SCAU229 和 SCAU307, 有 3 个菌株不仅不具共生有效性, 甚至不利于宿主的生长, 其余 84% 的供试菌为低效或无效菌株。【结论】凉山州新银合欢根瘤菌具有丰富的遗传多样性, 分布于 4 个属: *Rhizobium*、*Bradyrhizobium*、*Mesorhizobium*、*Bradyrhizobium*, 79% 为 *Sinorhizobium* 属的菌株, 优势菌群为 *Sinorhizobium*。该区的新银合欢根瘤菌大多数的共生有效性差。

关键词: 银合欢, 根瘤菌, 持家基因, 遗传多样性, 多位点基因序列分析, 共生有效性

中图分类号: Q939 文章编号: 0001-6209(2014)05-0498-11

凉山州位于四川西南部, 地处四川盆地向青藏高原、云贵高原的过渡地带, 具西北高、东南低、切割强烈、高低悬殊、地质结构破碎的地貌特征, 辖有金沙江、雅砻江和安宁河 3 条干热干旱河谷, 位于长江上游核心地带, 是水土流失的严重地域, 也是实施退耕还林工程的重点区域。

银合欢 (*Leucaena leucocephala*) 为豆科 (*Leguminosae*) 含羞草亚科 (*Mimosoideae*) 银合欢属 (*Leucaena*), 多年生灌木或乔木, 是一种具有多种用途的热带优良植物, 原产于中美洲沿海地区, 广泛分

布于热带、亚热带地区。1961 年 8 月华南热带作物研究所从中美洲引进了少量的萨尔瓦多型银合欢种子, 经试种发现其生长势和产量等均优于普通银合欢, 将其定名为新银合欢^[1]。银合欢具有速生、抗旱、耐贫瘠、耐干热的特点。凉山州尤其是干热河谷恶劣的生态环境制约了许多树种的生长, “七五”期间引进筛选 K8 型新银合欢为主要造林树种, 仅在凉山州宁南县干热河谷带的种植面积就在 10 万亩以上^[2]。该植物已成为该区天然林保护、退耕还林工程的重要先锋树种。

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2012RZ0018); 国家自然科学基金(31070004)

* 通信作者。Tel: +86-28-86291117; Fax: +86-28-86290983; E-mail: cyxue2002@aliyun.com

作者简介: 徐开未(1971-), 女, 四川泸县人, 副教授, 博士, 主要从事生物固氮研究。E-mail: xkwei@126.com

收稿日期: 2013-09-04; 修回日期: 2013-12-25

根瘤菌—豆科植物形成的根瘤或茎瘤共生固氮是最强的固氮体系,具有固氮量大、抗逆能力强等优点,在农、林、牧业可持续发展,环境和生态的可持续利用中具有重要作用。凉山州新银合欢从未接种根瘤菌。目前对新银合欢共生的根瘤菌已有少量报道,本课题组研究了金沙江干热河谷新银合欢根瘤菌的表型多样性、用 rDNA RFLP、持家基因和共生固氮基因序列等揭示其遗传多样性^[3-4],但其中仅有 13 株分离自凉山州新银合欢^[3-4],而对凉山州新银合欢的根瘤菌有效菌株的筛选、遗传多样性缺乏更深入全面的认识。为此,在前期研究的基础上^[3-4],本研究重新分离获得 20 个菌株,用 16S rRNA RFLP、BOX-PCR、AFLP 和多位点基因序列联合分析技术,从不同角度研究凉山州这一特殊生境新银合欢根瘤菌的遗传多样性,进一步揭示其亲缘

关系和为进化奠定基础。同时初步筛选高效菌株,对该生境退化生态系统的植被恢复与重建工程具有积极的生态学意义。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验共 48 个菌株,其中 15 个为参比菌株(图 1),33 个未知菌分离自四川省凉山州的 4 个县 8 个乡镇的新银合欢属植物。33 个未知菌株全部用于 BOX-PCR 和 AFLP 指纹图谱分析;用于共生有效性分析的未知菌 20 株(其余 13 个未知菌已经回接试验证实能使原宿主结瘤^[3]);用于 16S rRNA RFLP 分析的有 22 个未知菌和 15 个为参比菌株。未知菌株编号、来源及研究方法见表 1。

表 1 供试菌株
Bacterial Strains tested

isolate	source or region	elevation/m	method
SCAU290	Hulukou Town Ningnan County LP	790	a b c d
SCAU291	Hulukou Town Ningnan County LP	790	a b c d
SCAU292	Hulukou Town Ningnan County LP	790	a b c d
SCAU293	Jinxing Town Ningnan County LP	920	a b c d
SCAU194	Jinxing Town Ningnan County LP	920	b c
SCAU294	Hulukou Town Ningnan County LP	720	a b c d
SCAU195	Hulukou Town Ningnan County LP	720	b c
SCAU196	Hulukou Town Ningnan County LP	720	b c
SCAU295	Hulukou Town Ningnan County LP	1280	a b c d
SCAU197	Hulukou Town Ningnan County LP	1280	b c e
SCAU296	Hulukou Town Ningnan County LP	1280	a b c d
SCAU297	Hulukou Town Ningnan County LP	1280	a b c d
SCAU199	Dachong Town Huidong County LP	720	b c
SCAU298	Dachong Town Huidong County LP	720	a b c d
SCAU299	Dachong Town Huidong County LP	720	a b c d
SCAU300	Pisha Town Ningnan County LP	1170	a b c d
SCAU301	Pisha Town Ningnan County LP	1170	a b c d
SCAU302	Pisha Town Ningnan County LP	1170	a b c d
SCAU303	Pisha Town Ningnan County LP	1170	a b c
SCAU202	Pisha Town Ningnan County LP	1170	b c e
SCAU304	Pisha Town Ningnan County LP	1170	a b c
SCAU203	Pisha Town Ningnan County LP	1170	b c e
SCAU204	Pisha Town Ningnan County LP	1110	b c
SCAU305	Pisha Town Ningnan County LP	1110	a b c d
SCAU306	Puji Town Puge County LP	1190	a b c d
SCAU307	Puji Town Puge County LP	1190	a b c d
SCAU205	Puji Town Puge County LP	1190	b c
SCAU308	Puji Town Puge County LP	1190	a b c d
SCAU309	Xiaoliao Town Xichang City LP	1480	a b c d
SCAU310	Xiaoliao Town Xichang City LP	1480	a b c d
SCAU209	Xiaoliao Town Xichang City LP	1480	b c e
SCAU211	Xiaoliao Town Xichang City LP	1480	b c e
SCAU311	Xiaoliao Town Xichang City LP	1480	a b c d

LP: Liangshan Prefecture; a: 16S rRNA PCR-RFLP; b: BOX-PCR; c: AFLP; d: Symbiotic efficiency; e: Concatenated sequence analysis of 16S rRNA-recA-atpD-glnII.

1.2 根瘤菌的分离与回接结瘤试验

将采回的根瘤进行表面消毒后,无菌镊子压碎根瘤,在加有刚果红的 YMA 平板上划线接种,28℃ 条件下培养。随时观察生长情况,将不同时间出现的具有典型根瘤菌菌落特征的菌落在 YMA 平板上进行多次稀释平板分离和纯化,纯化后进行革兰氏染色镜检为阴性、短杆状、无芽孢的转接于 YMA 斜面,28℃ 培养好后于 4℃ 冰箱保藏备用,并用 25% 左右的甘油 -70℃ 超低温冰箱保藏。

回接试验用水培法,在光照室进行。选择粒大、饱满的原宿主种子表面消毒后,28℃ 催芽,待主根长到 2 cm - 3 cm 左右,须根未长出移栽入 250 mL 的无氮营养液水培器。同时接种供试菌的菌悬液 1 mL。菌悬液制作:各取斜面菌试管一支,加入无菌水 4 mL,刮洗菌苔,制成菌悬液,将根沾上菌悬液,插入水培器小孔内,每瓶 1 株。用无菌移液管每瓶加 1 mL 菌液。然后种子周围用原来孔内的棉花塞紧,防止尘埃落入瓶内,造成污染。光照室(控温 22 - 24℃,光照强度 2700 - 3000 lux,日照时间 12 - 14 h)培养 56 d。培养期间及时补充营养液。各处理重复 3 次。收获后称子叶以上部分干重,计数总瘤数。利用 EXCEL2010 和 SPSS15.0 软件进行数据统计分析。差异显著性检验用 LSD 法($P = 0.05$)。

1.3 总 DNA 的提取

总 DNA 的提取,见文献[3]。

1.4 16S rRNA RFLP

以总 DNA 为模板,用通用引物 P1 和 P6^[3] 扩增 16S rDNA。PCR 反应用 Bio-RAD MyCycler™ 仪器。扩增反应程序及产物检测方法同^[3]。

16S rRNA 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℃ (*Taq* I 为 65℃) 保温 6 - 10 h,用含 EB 的 3% 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。

1.5 BOX-PCR

用 BOXAIR 引物(5'-CTACGGCAAGCGACGCTGACG-3')。扩增反应体系:2 × PCR Mix 10 μL, BOXAIR 引物(30 pmol/μL) 0.32 μL。扩增反应程序同文献[5]。PCR 产物用 2% 琼脂精凝胶 60 V 电

泳分离 4 h,凝胶成像系统扫描。

1.6 AFLP 分析

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* 引物与文献^[5] 同。取 5 - 8 μL 供试 DNA 样品,用 *Eco*R I 和 *Mse* I 酶切,用 T4 DNA 连接酶将酶切片段与 *Eco* 连接头和 *Mse* 连接头连接后,用 *Eco* 和 *Mse* 引物进行 PCR 扩增。酶切连接及 PCR 扩增程序按陈强等^[5] 的方法进行。初步检测 PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶。取 4 μL 的 PCR 产物与等体积的上样缓冲液混合,90℃ 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。

1.7 多位点基因序列的联合分析

选择 4 个位点的持家基因 16S rRNA、*recA*、*atpD* 和 *glnII* 序列进行联合系统发育树构建。部分代表菌株 4 个基因的单个基因序列在文献[3 - 4] 已作报道。其余菌株的 4 个基因序列扩增的通用引物、反应体系、扩增程序、测序、在 NCBI 上获取代表菌株的方法及基因序列号的获得方法等同文献[3 - 4]。

4 个基因联合系统发育树的构建:先将 16S rRNA、*atpD*、*recA*、*glnII* 4 个持家基因的序列分别用 MEGA5 比对,以最小长度为标准剪齐,将剪齐后的序列保存为 FASTA 格式。以记事本格式打开将 4 个序列拼接在一起,用 MEGA5 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) 1000。

1.8 电脉指纹图谱的处理

16S rRNA RFLP、BOX-PCR 和 AFLP 的电脉图谱转化成计算机可识别的数值“0”和“1”,用软件 NTSYS2.1 中的平均连锁聚类法将结果转化为 UPGMA 聚类树状图。

2 结果

2.1 供试菌株的共生有效性

本研究用无氮水培法初步检测了 20 个供试菌的共生有效性(表 1)。从表 1 知,供试的 20 个菌株中,有一个菌株(SCAU309) 不与原宿主结瘤,但菌落特点极似根瘤菌,其余 19 个菌株处理的平均结瘤量为 8.3 个/株。仅有 2 个(10%) 菌株与原宿主共生有效性好,其植株干重比 CK 增 36% 以上,达极显

著水平; 结瘤量 10 - 11 个/株。另外还有 3 个菌株 (SCAU290、SCAU306、SCAU310) 不仅不具共生有效性, 甚至显著不利于植株的生长, 其植株的干重甚至比 CK 低 28% - 52%, 差异达显著或极显著水平, 其结瘤量 8.7 - 12.0 个/株。其余 15 个菌株, 植株干重与 CK 的差异不显著, 结瘤量 5.0 - 15.0 个/株。

本研究表明, 共生有效性好的菌株结瘤量是中等水平, 结瘤量过低或过高的菌株的有效性差; 但结瘤量中等的菌株也有无效菌株甚至是明显不利于植物生长的菌株。植株的干重与结瘤量呈正相关 ($r = 0.196$), 但未达显著水平。综上, 菌株的有效性不宜仅用结瘤量来衡量。

表 2 供试菌株共生有效性及 16S rRNA RFLP 限制性酶切图谱类型

Table 2 Symbiotic traits and 16S rRNA RFLP characteristics of rhizobia isolated from *L. leucecephala* in Liangshan Prefecture

isolates No.	symbiotic trait		PCR-RFLP of 16S	
	plant shoot dry weight (g/plant) ^{a, b}	No. of nodule (per plant)	16S rRNA RFLP pattern ^c	16S rRNA genotype ^d
SCAU307	63.8 ± 10.4 ^{+ **}	10 ± 4.6 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU299	62.4 ± 8.6 ^{+ **}	11.0 ± 4.0 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU305	57.0 ± 10.9 ^{ns}	6.3 ± 4.2 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU291	53.2 ± 7.5 ^{ns}	4.3 ± 2.3 ^{ns}	aaaa	i
SCAU300	52.2 ± 8.1 ^{ns}	7.7 ± 3.8 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU294	50.7 ± 11.4 ^{ns}	15.3 ± 7.6 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU295	50.3 ± 2.4 ^{ns}	7.3 ± 1.5 ^{+ *}	aaaa	i
CK	45.8 ± 2.9 ^{ns}	0.0 ± 0.0	-	-
SCAU292	44.8 ± 6.5 ^{ns}	8.3 ± 3.2 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU296	42.9 ± 6.4 ^{ns}	7.3 ± 3.1 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU302	40.6 ± 3.3 ^{ns}	11.3 ± 4.5 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU298	39.3 ± 6.6 ^{ns}	13.0 ± 4.0 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU311	38.3 ± 8.4 ^{ns}	11.3 ± 1.2 ^{+ *}	cacb	ii
SCAU308	38.0 ± 5.1 ^{ns}	5.7 ± 2.5 ^{ns}	aaaa	i
SCAU301	35.9 ± 8.6 ^{ns}	5.7 ± 3.1 ^{ns}	aaaa	i
SCAU309	35.0 ± 4.4 ^{ns}	0.0 ± 0.0 ^{ns}	bbbb	iii
SCAU297	34.8 ± 6.4 ^{ns}	5.0 ± 2.0 ^{ns}	aaaa	i
SCAU293	34.7 ± 4.8 ^{ns}	6.0 ± 3.0 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU306	33.0 ± 7.0 ^{- *}	12 ± 5.2 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU290	32.2 ± 2.2 ^{- *}	8.7 ± 3.5 ^{+ *}	aaaa	i
SCAU310	20.8 ± 4.0 ^{- *}	9.7 ± 4.7 ^{+ *}	cacb	ii

^a Data presented as average ± standard deviation from three replicates. ^b + **, - * and ns indicates an increase, a decrease or a non-significant difference in plant shoot dry weight according to the LSD test (* at 0.05 level), respectively. ^c Each letter refers to a restriction pattern obtained with enzymes *Hae*III, *Hin*fl, *Msp*I and *Taq*I, respectively. ^d The 16S rRNA genotypes of *Leucaena* rhizobia represent combination of restriction patterns obtained by enzymes used (*Hae*III, *Hin*fl, *Msp*I and *Taq*I). CK: uninoculated control.

2.2 16S rRNA PCR-RFLP 分析

供试的 33 个菌株中, 有 11 个菌株的 16S rRNA PCR-RFLP 文献 [3] 已作报道。本研究对余下的 22 个菌株进行 16S rRNA PCR-RFLP 分析。

用引物 P1 和 P6 扩增供试菌株的 16S rRNA, 均产生一条约 1.5 kb 的 DNA 片段。扩增产物分别用 4 种限制性内切酶 (*Hae*III、*Hin*fl、*Msp*I 和 *Taq*I) 酶切后, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后成像, 部分酶切结果如图 1 所示。供试 22 个菌株, 分别得到 3 种 *Hae*III、2 种 *Hin*fl、3 种 *Msp*I、2 种 *Taq*I 限制性内切酶酶切图谱类型。4 种限制性内切酶酶切图谱类型的

组合见表 2 和图 1。从表 2 和图 1 可以看出, 分离自凉山州的 22 株菌具有 3 种 16S rRNA 遗传图谱类型, 且其中大部份菌株 (19 个, 86%) 属 i 型。

为了更全面地反映凉山州新银合欢根瘤菌 16S rRNA PCR-RFLP, 将前期分离到的在文献 [3] 已报道 16S rRNA PCR-RFLP 的 11 个菌株, 与参比菌株一起建立聚类分析树状图 (图 1)。结果表明, 33 个凉山州新银合欢根瘤菌分成 5 个 16S rRNA 遗传图谱类型, 所有菌株在 67% 的相似水平上分成快生根瘤菌和慢生根瘤菌 2 个分支。绝大多数菌株 (30 株, 91%) 形成快生根瘤菌分支, 且大多数 (26 株,

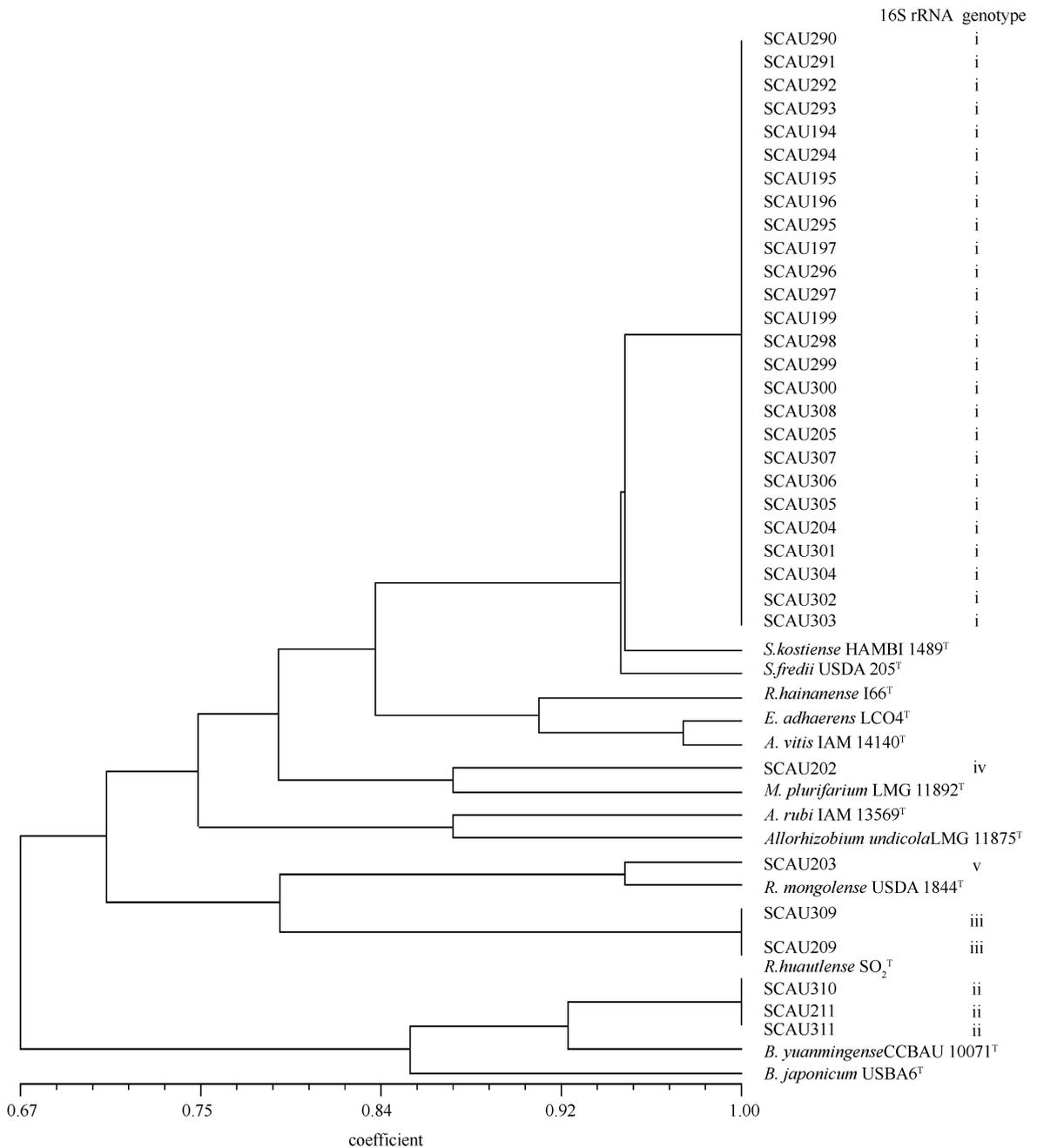


图 1. 16S rRNA PCR-RFLP 聚类图

Figure 1. UPGMA dendrogram constructed based on the RFLP analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes of the *Leucaena* rhizobia using 4 restriction endonucleases (*Msp*I, *Hinf*I, *Hae*III and *Taq*I).

79%) 与供试 *Sinorhizobium* 参比菌构成 1 个分支。仅 1 个菌株 (SCAU202A) 属 *Mesorhizobium*, 各有 3 个菌株分属于 *Bradyrhizobium* 和 *Rhizobium*。可见, 凉山州新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*)。

虽 79% 的未知菌属 *Sinorhizobium*, 且它们的 4 种酶切图谱完全相同, 均属 16S rRNA 遗传图谱

类型 i, 但它们分离自凉山州的 3 个县, 海拔高度 720 m - 1280 m 的范围内的新银合欢。因 16S rRNA 基因的相似性很高, 无法很好地区分该属内不同的种, 即 16S rRNA PCR-RFLP 分辨率低, 没能很好地体现其多样性。于是选择更能体现属内种间多样性的另一个分子标记方法 BOX-PCR 进行分析。

2.3 BOX-PCR 指纹分析

如图 2 所示, BOX-PCR 的分群结果与 16S rRNA PCR-RFLP 在属水平上一致。33 个未知菌在 56% 相似水平将 *Rhizobium* 菌株分开, 形成分支 1; 64% 的相似水平将 *Mesorhizobium* 菌株分离出来, 形成分支 2; 75% 的相似水平又将 *Bradyrhizobium* 分开; 而属 *Sinorhizobium* 的 26 个菌株的 16S rRNA 遗传图谱类型完全相同, 但在 BOX-PCR 分析中形成 4 个 BOX-PCR 遗传图谱类型 (I, II, III, IV), 在 BOX-PCR 指纹图谱聚类树状图中分成两个分支 (分支 4 和 5)。在相似度为 97% 时, 分成了 8 个 BOX 表观群, 比 16S rRNA RFLP 表现出的遗传多样性丰富。分支 5 的 23 个菌株中有 22 个的 BOX 指纹图谱相同, 属 BOX 遗传图谱 I 型, 这些菌株分离自不同县不同海拔高度, 而 BOX-PCR 也未能将其分开, 于是再选择 AFLP 分子标记技术研究它们的遗传多

样性。

2.4 AFLP 指纹分析

AFLP 的指纹图谱见图 3, 其 AFLP 指纹图谱聚类结果见图 4, 全部 33 个供试菌株在属水平上的分群结果与 16S RFLP 和 BOX 是一致的。全部菌株在 97% 的相似水平上分成 26 个 AFLP 群。26 个中华根瘤菌 (根据 16S rRNA RFLP 的分群结果), 具有 24 个 AFLP 遗传图谱类型, 分成 20 个 AFLP 表观群, 说明凉山州新银合欢根瘤菌的优势菌群中华根瘤菌 (*Sinorhizobium*) 具有丰富的遗传多样性。同时也表明 AFLP 指纹分析对相关系数较高菌株的分群具有较高的参考价值, 分辨率比 16S rRNA RFLP 和 BOX-PCR 高。

2.5 多位点基因序列的联合分析

多位点基因序列分析 (Multilocus Sequence Analysis, MLSA) 是对细菌的染色体上不同位点的多

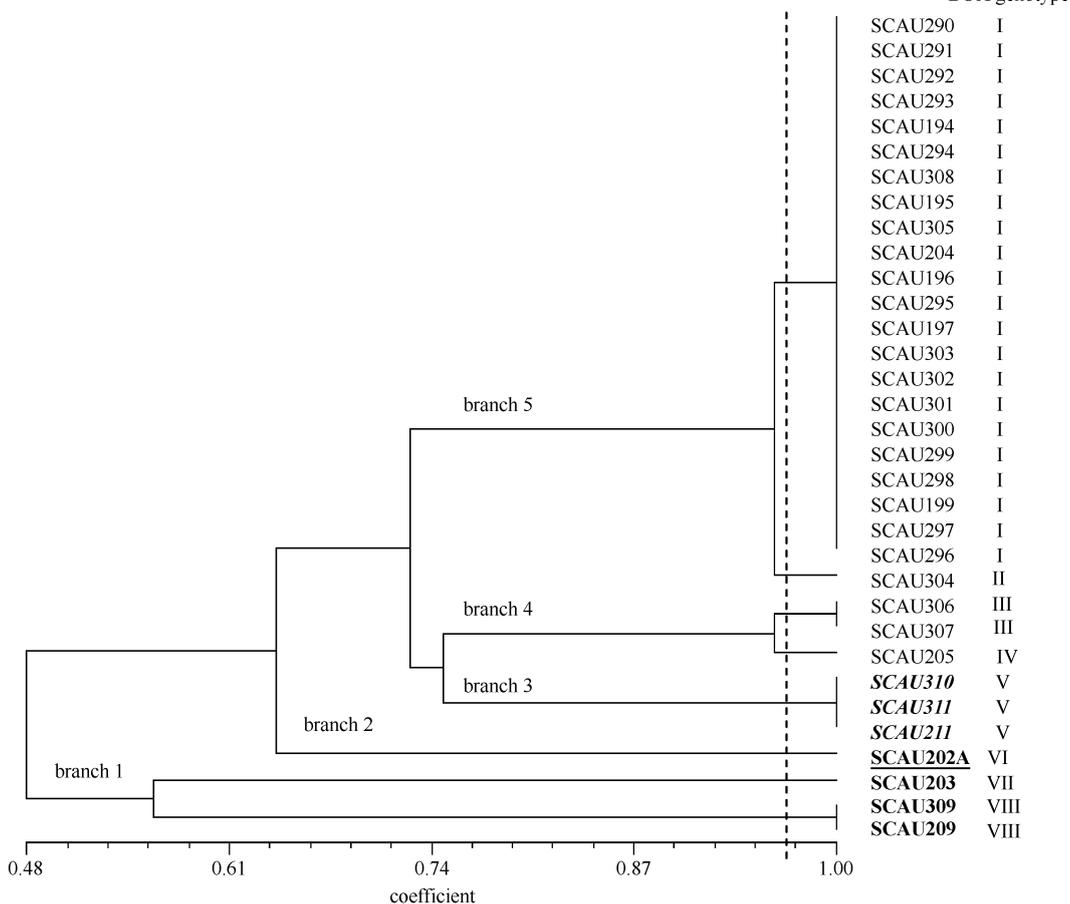


图 2. BOX-PCR 指纹图谱聚类树状图

Figure 2. UPGMA dendrogram derived from BOX-PCR. Based on 16S RFLP, the isolates in boldface and underline were assigned to *Mesorhizobium*, in boldface and italics to *Bradyrhizobium*, in boldface to *Rhizobium*, and the others to *Sinorhizobium*.

个保守基因序列的同源性分析,以确定各种细菌的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^[4,6-7]。

根据 16S rRNA RFLP、BOX-PCR 及 AFLP 指纹图谱的聚类结果,选取分属于 *Sinorhizobium*、*Bradyrhizobium*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium* 代表菌株 5 个,选染色体上的 16S rRNA、*recA*、*atpD*、*glnII* 4 个不同位点的持家基因进行 MLSA 分析。4 个基因的联合系统发育树构建的参比菌株的选择:将同一代表菌株的每个基因序列在 NCBI 上比对,选择与 4 个基因相似度高的模式菌株作为建树的参比菌株。与代表菌株 SCAU209 的 16S rRNA、*recA*、*atpD*、*glnII* 序列相似度最高的种是 *R. huautlense*,但 *R. huautlense* 模式种无 *glnII* 基因序列的报道,于是联合系统发育树构建中,选择与 SCAU209 的 4 个基因相似度最高的 *R. huautlense* CCBAU65679 代替该种的模式菌株进行联合建树(图 5)。用 Mega5 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 rRNA、*recA*、*atpD*、*glnII* 序列分别为 1319、387、406、507 nt。然后每个菌株按 16S rRNA-*recA*-*atpD*-*glnII* 的顺序获得联合系统发育树构建的 2619nt 序列。从图 5 可知,5 个代表菌株的属水平如前述的 16S rRNA RFLP、BOX-PCR 及 AFLP 指纹图谱的聚类结果。代表菌株 SCAU197 与 *S. americanum* LMG 22684^T 以 97.4% 的相似度聚在一起。SCAU202 与 *M. plurifarium* ORS 1032^T 的相似度最高(96.2%)。SCAU211 与所选择的 5 个 *Bradyrhizobium* 模式菌株构成姊妹分支,说明 SCAU211 可能是 *Bradyrhizobium* 的一个新类群。两个 *Rhizobium* 代表菌株形成两个分支,SCAU209 与 *R. huautlense* CCBAU65679 以 99.6% 相似度聚在一起。SCAU203 却与另外 3 个模式菌 *R. gallicum* KACC 10719^T、*R. yanglingense* CCBAU71623^T、*R. mongolense* USDA 1844^T 形成姊妹分支,SCAU203 也可能是 *Rhizobium* 的一个新类群。

3 讨论

凉山州新银合欢根瘤菌遗传多样性丰富,但 *Sinorhizobium* 为优势类群,33 个供试菌株中,有 1 株属于 *Mesorhizobium*、3 株属于 *Bradyrhizobium*、3 株属

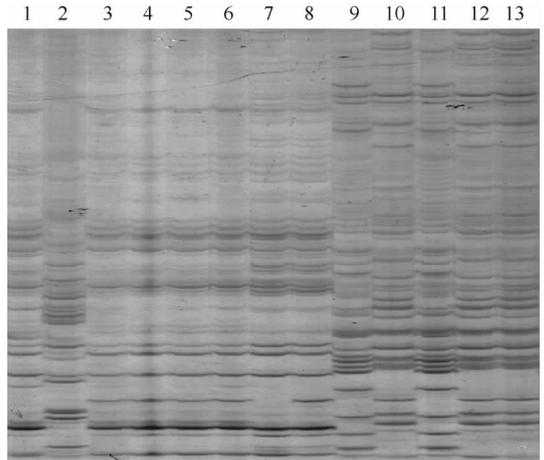


图 3. 部分供试菌株的 AFLP 指纹图谱

Figure 3. AFLP fingerprints for the part of tested isolates. Lane1 - 13: SCAU304, SCAU310, SCAU203, SCAU204, SCAU305, SCAU303, SCAU307, SCAU205, SCAU308, SCAU309, SCAU310, SCAU209, SCAU311.

于 *Rhizobium*, 26 个(79%) 菌株属于 *Sinorhizobium* 属的菌株。这与我们前期工作报道的四川攀枝花市银合欢根瘤菌类似^[3],已报道的 20 个攀枝花市银合欢根瘤菌中,分别仅有 1 株 *Mesorhizobium* 和 1 株 *Rhizobium* 属的菌株,18 株属于 *Sinorhizobium* 属的菌株,未发现 *Bradyrhizobium* 属的菌株。Wang 等^[8]已报道过广东 9 个和福建 6 个银合欢根瘤菌,广东省有 9 个菌株分布在 3 个属: *Mesorhizobium* (5 株)、*Sinorhizobium* (3 株)、*Bradyrhizobium* (1 株); 福建省的 6 株分布在 3 个属: *Mesorhizobium* (3 株)、*Agrobacterium* (2 株)、*Sinorhizobium* (1 株); 可见,广东、福建省的银合欢根瘤菌以 *Mesorhizobium* 属的菌株占优势。Wang 等^[9]报道的 150 株来自墨西哥的银合欢根瘤菌中,有 95 株属 *Sinorhizobium*, 无 *Bradyrhizobium* 属的菌株。综上,银合欢根瘤菌与生态环境的关系密切,可能如 Tian 等^[10]、Li 等^[11]、Zhang 等^[12] 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,且银合欢根瘤菌中 *Sinorhizobium* 菌株分布更广泛。

凉山州新银合欢根瘤菌以 *Sinorhizobium* 为优势菌群,而广东、福建省的银合欢根瘤菌以 *Mesorhizobium* 菌株占优势。可见,共生固氮效果好的优良菌株筛选应从当地生境中进行选择。本研究的从 20 个供试菌株中筛选出 2 个共生固氮效果好、与未接种对照(CK) 差异达显著水平的菌株 SCAU229 和 SCAU307。从表 1 和前面的分析知,有

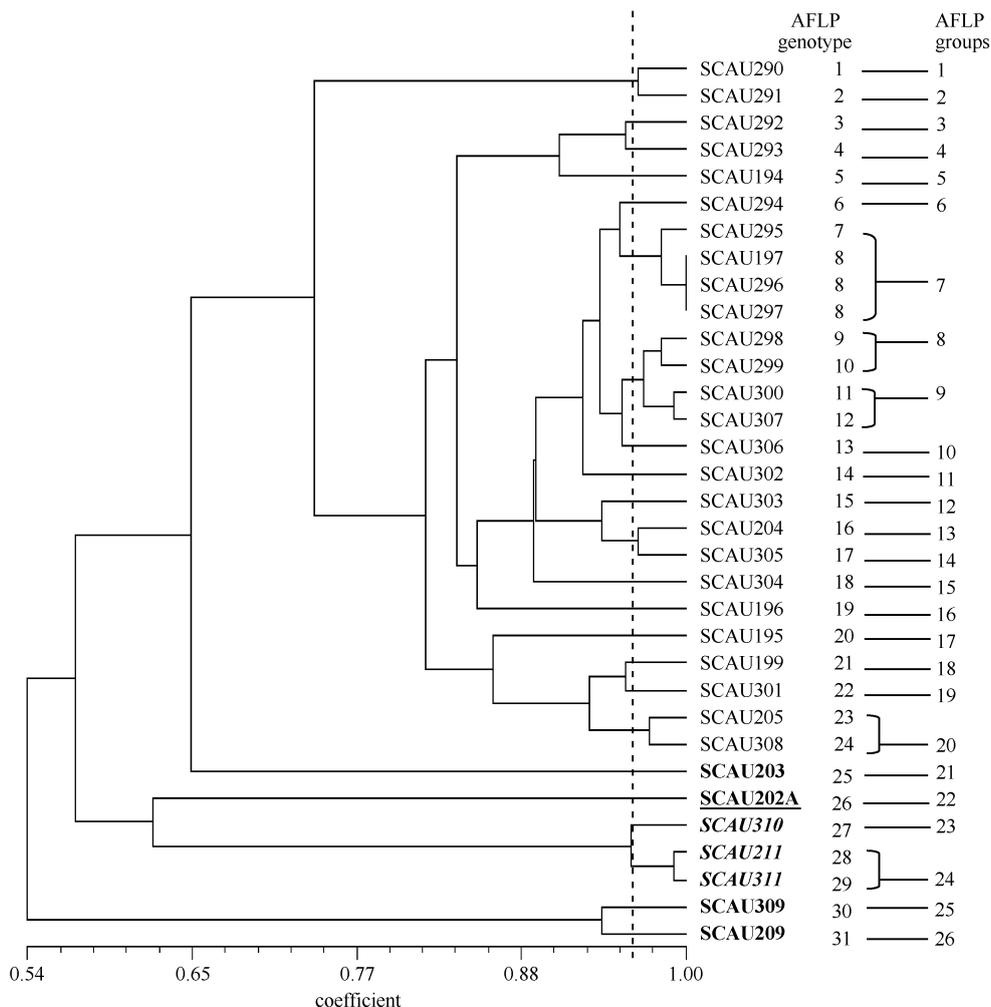


图 4. AFLP 指纹图谱聚类树状图

Figure 4. UPGMA dendrogram obtained from AFLP. Based on 16S RFLP, the isolates in boldface and underline were assigned to *Mesorhizobium*, in boldface and italics to *Bradyrhizobium*, in boldface to *Rhizobium*, and the others to *Sinorhizobium*.

3 个菌株不仅不具共生有效性,甚至显著不利于宿主的生长,其余 84% 的供试菌为低效或无效菌株,由此可见,生产用菌株的筛选、匹配性和有效性的研究尤其重要。

对于根瘤菌的遗传多样性的研究,指纹图谱的方法是常用技术^[5,11-14]。本研究用了 16S rRNA RFLP、BOX-PCR 和 AFLP 技术。基于基因组水平的 AFLP 和 BOX-PCR 技术比持家基因的 RFLP 的分辨率高,这与前人的研究一致^[14-15]。本研究认为 AFLP 比 BOX-PCR 技术具有更高的分辨能力。同样的 33 个供试菌株,分别有 8 个 BOX、31 个 AFLP 遗传图谱类型;在 97% 的相似水平上二者分别形成 8 个 BOX、26 个 AFLP 表现群;33 个菌株产生 25 条 BOX-PCR(400 - 1600 bp 范围)、118 条 AFLP(100 -

1000 bp) 指纹条带;再结合图 3 和图 4,本研究的 BOX-PCR、AFLP 指纹图谱的聚类,在属和种水平具有较好的一致性,也具有较好的属种水平的分辨能力,但在同种或同一亚种不同菌株间的差异分型方面,AFLP 比 BOX-PCR 更可靠,是高分辨率的分开型方法。

SCAU211 和 SCAU203 可能分别是 *Bradyrhizobium* 和 *Rhizobium* 的新类群。在 16S rRNA-*recA*-*atpD*-*glnII* 序列联合构建的新银合欢根瘤菌系统发育树中,SCAU203 与 *Rhizobium* 的 3 个种的模式菌株构成姊妹分支;SCAU211 与 *Bradyrhizobium* 的几个种的模式菌也构成姊妹分支,SCAU211 的 16S rRNA、*recA*、*atpD*、*glnII* 4 个基因的序列在文献[3-4]中已报道,与 SCAU211 的 4 个基

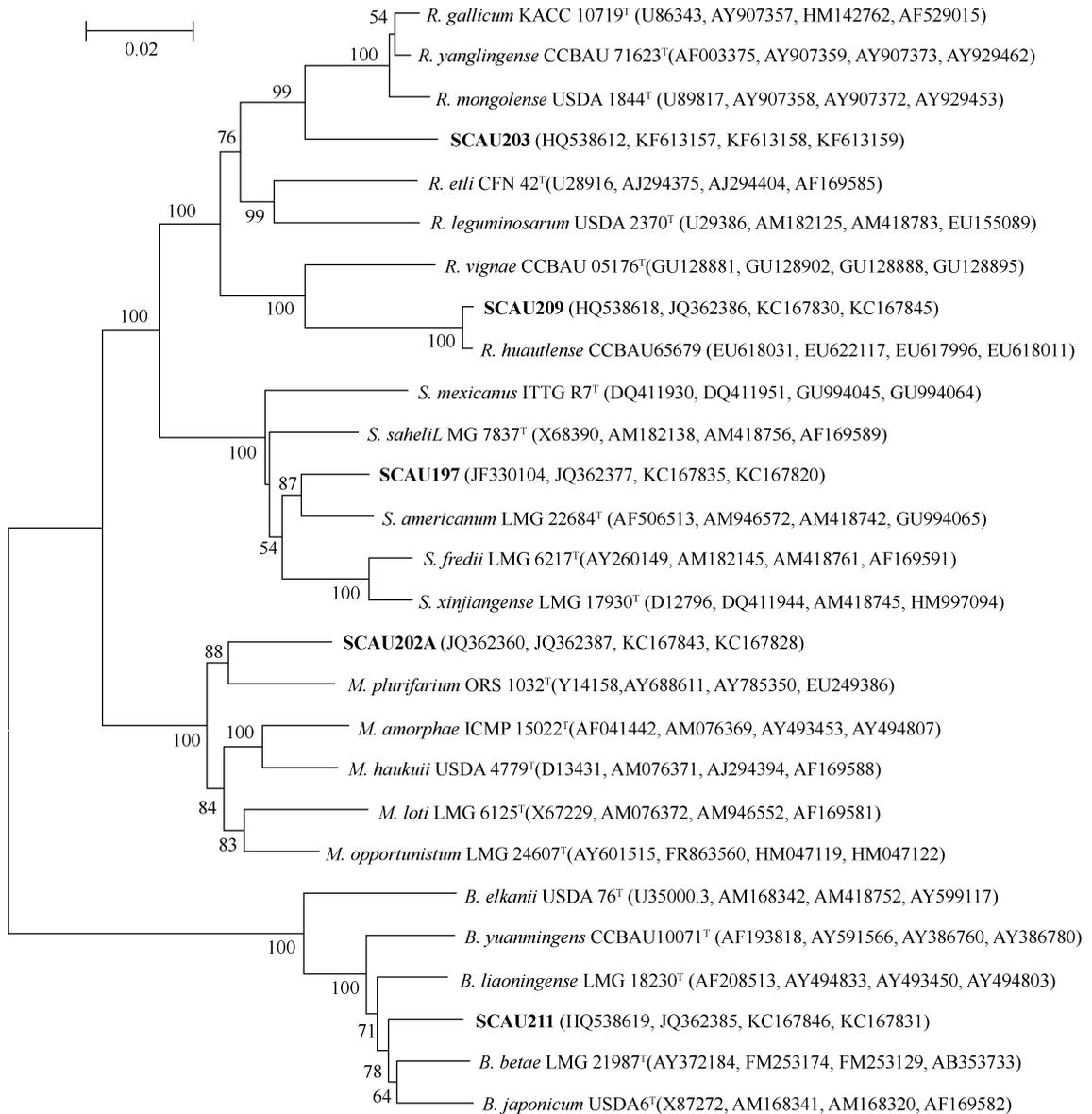


图 5. 以 16S rRNA-recA-atpD-glnII 序列联合构建的系统发育树

Figure 5. Phylogenetic tree based on the concatenated sequences of 16S rRNA (1319 nt), *recA* (387 nt), *atpD* (406 nt) and *glnII* (507 nt) sequences. GenBank accession numbers in boldface were newly determined as a result of this study. Bootstrap confidence levels $\geq 50\%$ (1000 replicates) are indicated at the internodes. The scale bar represents 2% nucleotide substitutions.

因相似度最高模式菌分别是 *B. japonicum* USDA 6^T (相似度 99.6%)、*B. liaoningense* USDA 3622^T (95.1%)、*B. betae* LMG 21987^T (96.1%)、*B. canariense* LMG 22265^T (96.0%)；可见，以 SCAU211 为代表的新银合欢根瘤菌可能是 *Bradyrhizobium* 属的新类群；同时发现，这 4 个位点的持家基因普遍发生着基因横向水平转移现象，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 Tian 等^[10]报道的大豆根瘤菌中，基因重组(包括横向基

因转移)在根瘤菌的核心基因组的进化中发挥了主导作用类同。当然，这两个类群是否为新种，还需要后续工作如 DNA-DNA 杂交、交叉结瘤、表型多样性等试验结果进一步确定。

参考文献

- [1] Liu G, He H. The present and prospect to develop *Leucaena* in China. *Pratacultural Science of China*, 1988, 2: 56-60. (in Chinese)
刘国道, 何华玄. 我国银合欢的发展现状与前景. 中

- 国草业科学, 1988, 2: 56-60.
- [2] Liu L, Wu Z, Huang W, Cai Y. Nutritional value evaluation of *Leucaena leucocephala* produced from different seasons and areas in Sichuan province. *Feed and Husbandry*, 2009, 1: 24-26. (in Chinese)
刘利平, 王之盛, 黄文明, 蔡义民. 四川省不同产地和季节银合欢的营养价值评价. 饲料与畜牧, 2009, 1: 24-26.
- [3] Xu KW, Penttinen P, Chen YX, Chen Q, Zhang X. Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river valley area in Panxi, Sichuan, China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97: 783-793.
- [4] Xu KW, Penttinen P, Chen YX, Zhou L, Zhou T, Zhang X, Hu C, Liu F. Polyphasic characterization of rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* from Panxi, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29: 2303-2315.
- [5] Chen Q, Chen W, Zhang X, Li D, Lindstrom K. Genetic diversity of rhizobial isolated from *Pueraria* spp. in Sichuan, China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37 (11): 1641-1646. (in Chinese)
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, 2004, 37 (11): 1641-1646.
- [6] Aserse AA, Räsänen LA, Assefa F, Hailemariam A, Lindström K. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35: 120-131.
- [7] Degefu T, Wolde-meskel E, Frostegårda Å. Phylogenetic diversity of Rhizobium strains nodulating diverse legume species growing in Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36: 272-280.
- [8] Wang FQ, Wang ET, Zhang YF, Chen WX. Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, 29: 502-517.
- [9] Wang ET, Martínez-Romero J, Martínez-Romero E. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 711-724.
- [10] Tian CF, Zhou YJ, Zhang YM, Li QQ, Zhang YZ, Li DF, Wang SW, Wang J, Gibert LB, Li YR, Chen WX. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(22): 8629-8634.
- [11] Li QQ, Wang ET, Zhang YZ, Zhang YM, Tian CF, Sui XH, Chen YW, Chen YX. Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei Province, China. *Microbial Ecology*, 2011, 61: 917-931.
- [12] Zhang YM, Jr. YL, Chen WF, Wang ET, Tian CF, Li QQ, Zhang YZ, Sui XH, Chen WX. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain. *Applied Environmental Microbiology*, 2011, 77(18): 6331-6342.
- [13] Gu J, Zhang J, Jia R, Chen Y. Genetic diversity and phylogeny of bradyrhizobia associated with *Desmodium* spp.. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(10): 1310-1317. (in Chinese)
谷峻, 张静苗, 贾瑞宗, 陈文新. 山蚂蝗慢生根瘤菌的遗传多样性及系统发育研究. 微生物学报, 2011, 51(10): 1310-1317.
- [14] Peng X, Zhang X, Xu K, Huang C, Lindstrom K. Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from root nodules of *Lespedeza Michx* in arid-hot valley of Jinsha River. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28 (11): 5469-5481. (in Chinese)
彭贤超, 张小平, 徐开未, 黄昌学, Lindstrom K. 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. 生态学报, 2008, 28(11): 5469-5481.
- [15] Li QF, Zhang XP, Zou L, Chen Q, Fewer DP, Lindström K. Horizontal gene transfer and recombination shape mesorhizobial populations in the gene center of the host plants *Astragalus luteolus* and *Astragalus ernestii* in Sichuan, China. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70: 227-235.

Symbiotic efficiency and genetic diversity of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in Liangshan Prefecture

Kaiwei Xu , Xiaoping Zhang , Yuanxue Chen* , Feiyue Gu , Dehai Zhou , Chengyi Tang
College of Resource and Environment , Sichuan Agricultural University , Chengdu 611130 , Sichuan Province , China

Abstract [Objective] We analyzed the symbiotic efficiency and genetic diversity of rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in Liangshan Prefecture of Sichuan Province. [Methods] We studied genetic diversity of these isolates with 16S rRNA RFLP , BOX-PCR and AFLP fingerprinting , and constructed phylogenetic tree based on the concatenated sequences of the four housekeeping genes 16S rRNA , *recA* , *atpD* and *glnII*. The nodulation ability and the symbiotic efficiency of the isolates were tested by plant inoculation assay on their original host plant. [Results] Genetic diversity and phylogenetic tree indicate that 26 isolates were assigned as *Sinorhizobium* , 3 *Bradyrhizobium* , 3 *Rhizobium* and 1 *Mesorhizobium*. SCAU203 might represent a new *Rhizobium* group , SCAU211 might represent a new *Bradyrhizobium* group , the other three representative strains were located in three phylogenetic branches and closely related to *S. americanum* , *M. plurifarium* and *R. huautlense* , respectively. In the nodulation and symbiotic efficiency assay , only 2 of the 20 isolates promoted the growth of *L. leucocephala* , but 3 isolates had a growth slowing effect on the host , while the other isolates (84%) were ineffective on symbiotic nitrogen fixation. [Conclusion] The majority of rhizobia isolated from *L. leucocephala* in Liangshan Prefecture were ineffective on symbiotic nitrogen fixation.

Keywords: *Leucaena leucocephala* , rhizobia , housekeeping genes , genetic diversity , multilocus sequence analysis , symbiotic efficiency

(本文责编: 张晓丽)