

桂西北喀斯特常见豆科植物根瘤菌的遗传多样性*

刘璐^{1,2,3} 何寻阳^{1,2} 谢强⁴ 王克林^{1,2,*}

(¹中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态过程重点实验室, 长沙 410125; ²中国科学院环江喀斯特生态系统观测研究站, 广西环江 547100; ³中国科学院大学, 北京 100049; ⁴广西师范大学, 广西桂林 541004)

摘要 调查了桂西北喀斯特 24 种常见豆科植物的结瘤情况及特征, 并从 15 种宿主植物上获得 39 份根瘤样品, 提取根瘤基因组 DNA, 扩增 16S rDNA 和 *nifH* 基因, 构建系统发育树, 对根瘤菌遗传多样性进行了研究. 结果表明: 有 15 种豆科植物是结瘤的, 其中 14 种为蝶形花亚科, 1 种为含羞草亚科, 而云实亚科未发现结瘤. 一些本应结瘤的植物未发现根瘤, 可能与喀斯特土壤的保水性差有关. BLAST 和系统发育分析结果均显示, 来源于多种豆科植物的根瘤菌均归属于慢生根瘤菌属, 仅有 2 个亮叶崖豆藤样品的根瘤菌归属于中慢生根瘤菌属. 在系统发育树上, 来源于同一地点或同一宿主植物的根瘤序列均表现出一定的聚集性, 说明共生根瘤菌的种类可能受宿主植物及所处生态环境的共同影响.

关键词 系统发育树; 根瘤菌; 16S rDNA; *nifH*; 豆科植物; 喀斯特

文章编号 1001-9332(2015)12-3663-07 **中图分类号** Q939 **文献标识码** A

Genetic diversity of rhizobia isolated from common legumes in the Karst area, Northwest Guangxi. LIU Lu^{1,2,3}, HE Xun-yang^{1,2}, XIE Qiang⁴, WANG Ke-lin^{1,2} (¹Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; ²Huanjiang Observation and Research Station of Karst Ecosystem, Chinese Academy of Sciences, Huanjiang 547100, Guangxi, China; ³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ⁴Guangxi Normal University, Guilin 541004, Guangxi, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2015, 26(12): 3663–3669.

Abstract: Legumes, with a strong resistance to the adverse environmental conditions, are pioneer plants in degraded habitats, and play an important role in ecosystem restoration. In this study, the nodulation characteristics of 24 legumes were surveyed in the Karst area of Northwest Guangxi. A total of 39 nodule samples were collected from 15 legumes, the DNA was extracted and the 16S rDNA and *nifH* gene were amplified. A phylogenetic tree was then constructed to analyze the genetic diversity of rhizobia. The results showed that 15 legumes were nodulated, of which 14 belonged to the Papilionoideae, one to the Mimosaceae, and none to the Caesalpinoideae. No nodules were found on some legumes that were reported as nodulated, which might result from soil water stress in Karst. BLAST result and phylogenetic analyse indicated that most of the legumes were associated with rhizobia that belonged to the genus *Bradyrhizobium*, with the exception of two samples from *Callerya nitida* that were associated with the genus *Mesorhizobium*. In the phylogenetic tree, the sequences obtained from the same plot or the sequences from the same host species clustered together in most cases. This finding suggested that host selection and the ecological environment are the major factors that influence the genotype of rhizobia.

Key words: phylogenetic tree; rhizobia; 16S rDNA; *nifH*; legume; Karst.

根瘤菌是一类农业生产中常见的杆状细菌, 能与豆科植物形成共生固氮体系, 将空气中 N_2 转化成

NH_4^+ 供植物生长^[1]. 根瘤菌有 13 属 87 种, 即根瘤菌属 (*Rhizobium*)、中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*)、中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、固氮根瘤菌属 (*Azorhizobium*) 等. 它们能与绝大多数蝶形花亚科 (Papilionoideae)、含羞草亚

* 中国科学院“西部行动计划”项目 (KZCX2-XB3-10) 资助.

* * 通讯作者. E-mail: kelin@isa.ac.cn

2015-03-11 收稿, 2015-08-21 接受.

科 (Mimosaceae) 和 30% 的云实亚科 (Caesalpiniaceae) 植物形成共生^[2]. 根瘤菌/豆科植物共生体系是生物固氮中效率最高的, 该体系固定的氮素约占生物固氮总量的 65%^[3]. 为获得与生态环境及豆科植物相匹配的优质根瘤菌, 发掘新的适应性强、固氮效率高的根瘤菌种质资源, 促进农业生产和退化生态系统的重建, 根瘤菌资源的生物多样性和分类一直是研究热点^[4-6].

喀斯特地貌在全球广泛分布, 约占陆地总面积的 12%, 是世界上主要的生态脆弱带之一^[7]. 我国西南岩溶区占全国岩溶类型总面积的近 1/3, 是世界三大喀斯特区中出露面积最大、喀斯特发育最强烈、景观类型最多、生态环境最复杂、人地矛盾最尖锐的地区^[8]. 巨大的人口和环境压力使该区生态环境受到严重破坏, 石漠化不断发生发展, 生态系统严重退化^[9]. 退化生态系统和植被恢复的关键是增加植被覆盖度, 保持水土, 改善土壤营养状况^[10]. 豆科植物具有抗逆性强、耐贫瘠的特性, 广泛分布于荒漠区、盐碱地等恶劣自然环境中, 在农业生产和生态环境保护中具有重要的经济和生态价值^[1,4]. 优良的豆科植物-根瘤菌共生固氮体系, 不但能有效提高土壤氮素养分, 增加土壤有机质, 提高土壤肥力, 同时还能保蓄水分, 防止水土流失^[1].

现有的研究多集中于对具有经济价值的豆科植物的研究, 其中以大豆/根瘤菌共生体系的研究最为系统^[2,11]. 陈文新等^[2]对中国大豆根瘤菌的遗传多样性进行了系统的研究, 发现大豆根瘤菌具有地理分布区域性, 东北地区主要为大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 及辽宁慢生根瘤菌 (*B. liaoningense*), 新疆地区主要为新疆中华根瘤菌 (*Sinorhizobium xinjiangense*) 和天山中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium tianshanense*), 华中地区主要为费氏中华根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*). 然而, 对于野生豆科固氮植物资源的调查、根瘤菌遗传多样性的研究较少见. 已有研究者对鼎湖山保护区、西北部分地区、贵州的部分豆科植物根瘤菌资源进行了调查, 但针对广西地区的研究尚未见报道^[12-14]. 因此, 本文选取桂西北喀斯特区域进行根瘤菌资源调查, 旨在了解根瘤菌在该地区的区域特异性, 丰富对根瘤菌遗传多样性地理分布的认识, 为筛选出适应喀斯特退化生境的先锋固氮植物-高效根瘤菌组合打下坚实基础, 为固氮共生体在生态恢复与重建中的应用提供理论依据与实践支持.

1 材料与方法

1.1 结瘤调查及根瘤采集

根据文献记载及广西植物志, 确定拟调查的植物名录 (表 1). 2011 年 7—8 月, 在桂西北的环江县、都安县、大化县对目标物种的结瘤情况进行了调查 (图 1). 每种目标植物随机调查 5 株, 在根附近轻刨 (大的植株需深挖 20 cm 左右), 如果均没发现根瘤, 则认为该种不结瘤. 对结瘤的植物采集根瘤, 选取个大、粉红色的根瘤剪下 (带点根, 以保证根瘤的完整), 装入 50 mL 离心管中, 贴好样品编号. 调查的同时, 记录植物形态和根瘤特征 (大小、颜色、形状、着生位置). 根瘤样品带回实验室后, 用蒸馏水将根瘤冲洗干净, 在滤纸上静置片刻, 放入预先装好半管硅胶的 50 mL 离心管中, 置于 4 °C 冰箱保存, 待分析.

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增

采用改进的 CTAB 法提取根瘤基因组 DNA, 16S rDNA 基因的扩增选用 27F/1492R (27F: AGAGTTTGATCTGGCTCAGAACGAACGCT; 1492R: TACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCC) 引物对, 固氮基因 *nifH* 的扩增选用 *nifH*-F/*nifH*-I (*nifH*-F: TACGGNAARGSGGNATCGGCAA; *nifH*-I: AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA) 引物对^[2]. 两种基因的扩增均采用 50 μL 体系, 其中 10×PCR 缓冲液 5.0 μL, dNTP 混合液 (10 mmol · L⁻¹) 5.0 μL, Taq 聚合酶 (2.5 U) 0.5 μL, 正反向引物 (2.5 μmol · L⁻¹) 各 2.5 μL, 模板 DNA (20~30 ng) 5.0 μL, 超纯水 (ddH₂O) 29.5 μL. 设不加模板 DNA 者为阴性对照. PCR 扩增程序如下: 94 °C 3 min; 30 个循环 (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min); 72 °C 5 min. 16S rDNA 基因扩增片段为 1.5 kb, *nifH* 基因扩增片段为 780 bp.

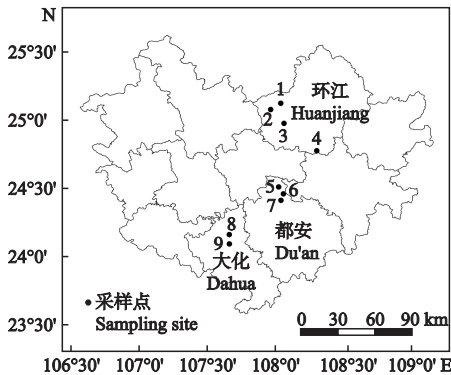


图 1 研究区域与采样点
Fig.1 Location of studied region and sampling plots.

表 1 桂西北地区部分豆科植物的结瘤情况
Table 1 Nodulation characteristics of legumes in Northwest Guangxi

科 Family	种 Species	植物形态 Plant morphology	根瘤特征 Nodule characteristics			
			颜色 Color	形状 Shape	大小 Size (mm)	着生部位 Position
含羞草亚科 Mimosaceae	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	灌木或小乔木	淡粉色	球形或棒状分叉	2~5	侧根
云实亚科 Caesalpiniaceae	藤金合欢 <i>A. sinuata</i>	灌木				
	任豆 <i>Z. insignis</i>	乔木				
	龙须藤 <i>B. championii</i>	藤本				
蝶形花亚科 Papilionoideae	喙荚云实 <i>C. minax</i>	藤本				
	皂荚 <i>G. sinensis</i>	小乔木				
	老虎刺 <i>P. punctatum</i>	攀援灌木				
蝶形花亚科 Papilionoideae	厚果崖豆藤 <i>M. pachycarpa</i>	藤本	褐色	球形	4~10	侧根
	亮叶崖豆藤 <i>C. nitida</i>	藤本	黄褐色	球形或棒状分叉	2~5	侧根
	美丽崖豆藤 <i>C. speciosa</i>	藤本	黄褐色	球形	2~6	侧根
	西南杭子梢 <i>C. delavayi</i>	灌木	黄褐色	球形	2~4	侧根
	藤黄檀 <i>D. hancei</i>	藤本	黄褐色	球形	2~4	侧根
	假木豆 <i>D. triangulare</i>	灌木	红褐色	球形	1~4	侧根
	中南鱼藤 <i>D. fordii</i>	攀援灌木	黄褐色	球形	2~5	侧根
	深紫木蓝 <i>I. atropurpurea</i>	灌木	淡粉色	棒状	2~5	侧根
	鸡眼草 <i>K. striata</i>	草本	黄褐色	球形	2~5	侧根
	截叶铁扫帚 <i>L. cuneata</i>	草本	黄褐色	球形	2~5	侧根
	野葛 <i>P. montana</i>	藤本	黄褐色	球形	1~4	侧根
	鹿藿 <i>R. volubilis</i>	草本	黄色	球形	2~6	侧根
	狸尾豆 <i>U. lagopodioides</i>	小灌	黄褐色	球形	1~4	侧根
	无患子叶崖豆藤 <i>M. sapindifolia</i>	小灌木	黄褐色	球形	2~5	侧根
	翅荚香槐 <i>C. platycarpa</i>	乔木				
	越南槐 <i>S. tonkinensis</i>	灌木				
	常春油麻藤 <i>M. sempervirens</i>	藤本				

1.3 系统发育分析

PCR 产物经纯化后送去测序,获得的序列用于构建系统发育树.在 NCBI 核酸数据库中,利用 BLAST 程序对获得的序列进行相似性检索,从中获得已知根瘤菌模式菌株及相关菌株的序列,并应用 ClustalX 1.83 软件进行多重序列比对分析.采用 MEGA 4.0 软件,通过 Neighbor-Joining 法构建系统发育树.本文中的所有序列已提交至 GenBank.

2 结果与分析

2.1 豆科结瘤固氮植物种类及根瘤特征

拟调查的目标植物共 24 种,全部为豆科植物,其中含羞草亚科 3 种、云实亚科 4 种、蝶形花亚科 17 种.调查的植物多为灌木或藤本.乔木有 4 种:香合欢 (*Albizia odoratissima*)、皂荚 (*Gleditsia sinensis*)、任豆 (*Zenia insignis*) 和翅荚香槐 (*Cladrastis platycarpa*);草本有 3 种:鹿藿 (*Rhynchosia volubilis*)、截叶铁扫帚 (*Lespedeza cuneata*) 和鸡眼草 (*Kummerowia striata*).调查结果显示,有 15 种植物结瘤,其中 14 种为蝶形花亚科,1 种为含羞草亚科,云实亚科未发

现结瘤.根瘤的颜色以黄褐色居多,香合欢、深紫木蓝 (*Indigofera atropurpurea*) 的根瘤为淡粉色,假木豆 (*Dendrolobium triangulare*) 的根瘤为红褐色.根瘤形状多为球形,香合欢和亮叶崖豆藤 (*Callerya nitida*) 的根瘤包括两种形态:球形或者棒形分叉.根瘤的大小(直径)介于 1~6 mm 之间,仅有厚果崖豆藤 (*Millettia pachycarpa*) 的根瘤较大,最大可达 10 mm.根瘤一般附着于侧根上,须根多的植株,根瘤数量也较多.

2.2 根瘤菌遗传多样性

从 15 种宿主植物上采集到了 39 份样品,其中 3 份来源于厚果崖豆藤的样品未能获得 16S rDNA 和 *nifH* 基因序列,最终各自获得 36 条序列.16S rDNA 序列的 BLAST 结果显示(表 2),大部分序列与已知的慢生根瘤菌属的序列最相似(99%),仅有 2 条序列与中慢生根瘤菌属的序列最相似(99%).系统发育分析表明:在属的水平上,16S rDNA 和 *nifH* 基因的系统发育树高度一致.在 16S rDNA 和 *nifH* 基因的系统发育树中,样品 ISA4105 和 ISA3205 的序列均与中慢生根瘤菌属的参考菌株聚类在一起,表明结合 16S rDNA 和 *nifH* 基因可以很好地区分不同

表 2 样品信息、登录号及序列比对
Table 2 Information of samples, accession number, and sequence alignment

样品编号 Sample ID	宿主植物 Host species	采样点 Site	登 录 号		最相似序列 ^{a)} The most similar sequence ^{a)}	相似性 ^{b)} Similarity (%) ^{b)}
			Accession number			
			<i>nifH</i>	16S rDNA		
ISA3015	鸡眼草 <i>K. striata</i>	7	KP069483	KP069548	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (EU481825)	99
ISA3117	狸尾豆 <i>U. lagopodioides</i>	7	KP069484	KP069549	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (JQ911631)	99
ISA3205	亮叶崖豆藤 <i>C. nitida</i>	6	KP069485	KP069555	<i>Mesorhizobium amorphae</i> (JF913976)	99
ISA3306	野葛 <i>P. montana</i>	6	KP069486	KP069570	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>EPxn1</i> (AB367704)	99
ISA3516	鹿藿 <i>R. volubilis</i>	7	KP069489	KP069576	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (AY904772)	99
ISA3608	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	9	KP069490	KP069575	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i> (NR_114138)	99
ISA3709	截叶铁扫帚 <i>L. cuneata</i>	9	KP069491	KP069571	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (FJ390913)	99
ISA3816	鹿藿 <i>R. volubilis</i>	4	KP069492	KP069567	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (JQ911631)	99
ISA3906	野葛 <i>P. montana</i>	4	KP069493	KP069568	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>NBRC 101128</i> (AB681394)	99
ISA4015	鸡眼草 <i>K. striata</i>	5	KP069495	KP069572	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> (HQ704826)	99
ISA4105	亮叶崖豆藤 <i>C. nitida</i>	5	KP069496	KP069556	<i>Mesorhizobium</i> sp. <i>CCANP87</i> (HF931067)	99
ISA4207	中南鱼藤 <i>D. fordii</i>	5	KP069497	KP069561	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (JQ911628)	99
ISA4308	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	4	KP069499	KP069552	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>ARR598</i> (HE576468)	99
ISA4403	假木豆 <i>D. triangulare</i>	1	KP069500	KP069569	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>NBRC 101128</i> (AB681394)	99
ISA4506	野葛 <i>P. montana</i>	2	KP069501	KP069565	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>RSA104</i> (FJ264919)	99
ISA4601	西南杭子梢 <i>C. delavayi</i>	8	KP069502	KP069544	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>Wall28</i> (EF601950)	99
ISA4708	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	8	KP069503	KP069543	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>Wall28</i> (EF601950)	99
ISA4812	美丽崖豆藤 <i>C. speciosa</i>	8	KP069504	KP069558	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (JQ911628)	99
ISA4908	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	8	KP069505	KP069546	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>Wall28</i> (EF601950)	99
ISA5004	深紫木蓝 <i>I. atropurpurea</i>	8	KP069506	KP069562	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (JQ911628)	99
ISA5107	中南鱼藤 <i>D. fordii</i>	8	KP069507	KP069563	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (JQ911628)	99
ISA5208	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	8	KP069508	KP069545	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>Wall28</i> (EF601950)	99
ISA5313	无患子叶崖豆藤 <i>M. sapindifolia</i>	8	KP069510	KP069542	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>ARR598</i> (HE576468)	99
ISA5408	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	8	KP069511	KP069547	<i>Bradyrhizobium jicamae</i> (AB648992)	99
ISA5507	中南鱼藤 <i>D. fordii</i>	8	KP069512	KP069554	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>ARR598</i> (HE576468)	99
ISA5615	鸡眼草 <i>K. striata</i>	4	KP069514	KP069566	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>NBRC 101128</i> (AB681394)	99
ISA5716	鹿藿 <i>R. volubilis</i>	4	KP069516	KP069541	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>Wall28</i> (EF601950)	99
ISA5801	西南杭子梢 <i>C. delavayi</i>	4	KP069520	KP069551	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>ARR598</i> (HE576468)	99
ISA5908	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	4	KP069523	KP069553	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>ARR598</i> (HE576468)	99
ISA6001	西南杭子梢 <i>C. delavayi</i>	4	KP069525	KP069559	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (JQ911628)	99
ISA6104	深紫木蓝 <i>I. atropurpurea</i>	4	KP069528	KP069564	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (JQ911628)	99
ISA6204	深紫木蓝 <i>I. atropurpurea</i>	4	KP069530	KP069577	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>Pp3a-10</i> (AF514704)	99
ISA6304	深紫木蓝 <i>I. atropurpurea</i>	4	KP069533	KP069574	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>AG41</i> (KF113099)	99
ISA6401	西南杭子梢 <i>C. delavayi</i>	4	KP069535	KP069550	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>ARR598</i> (HE576468)	99
ISA6505	亮叶崖豆藤 <i>C. nitida</i>	4	KP069537	KP069560	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (JQ911628)	99
ISA6802	藤黄檀 <i>D. hancei</i>	3	KP069540	KP069573	<i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>DesT10</i> (DQ354608)	99

a) 16S rDNA 序列的最相似序列 The most similar sequence to 16S rDNA sequence; b) 16S rDNA 序列与最相似序列之间的相似性 The similarity between 16S rDNA sequence and the most similar sequence.

属的根瘤菌;而在种的水平上,16S rDNA 和 *nifH* 基因的聚类存在一定的差异,如 ISA3015 的 16S rDNA 序列与埃氏慢生根瘤菌 (*B. elkanii*) 聚在一起,而 *nifH* 序列与圆明慢生根瘤菌 (*B. yuanmingense*) 聚在一起,表明仅靠 16S rDNA 和 *nifH* 基因无法分辨慢生根瘤菌属的不同种,需要补充一些持家基因。

一般将 16S rDNA 序列同源性达 97% 以上的菌株定为一个种^[15],即一个操作分类单元 (OTU)。按 97% 的相似性划分 OTU,16S rDNA 序列可以分成 3

个 OTU (图 2)。同样地,按 97% 相似性,*nifH* 基因序列分成 12 个 OTU。由此可见,16S rDNA 比 *nifH* 基因更保守,利用固氮基因 *nifH* 研究根瘤菌遗传多样性时,不能以 97% 相似性作为划分 OTU 的标准,否则会高估根瘤菌的遗传多样性。经分析发现,当以 87% 的序列相似性对 *nifH* 基因序列划分 OTU 时,得到的 OTU 数量与 16S rDNA 序列按 97% 相似性划分的 OTU 数量相同。因此,对于 *nifH* 基因,本研究建议按 87% 相似性划分 OTU。

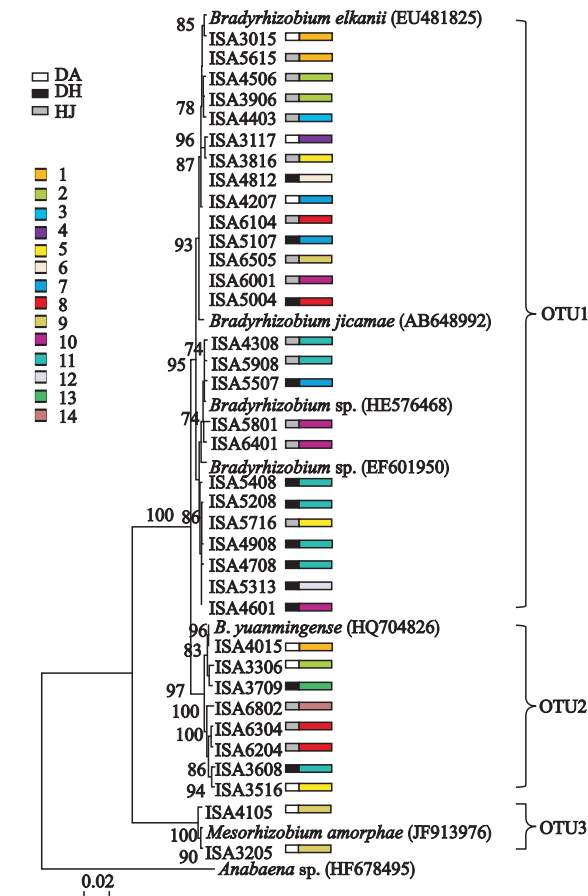


图 2 基于邻接法构建的 16S rDNA 基因系统发育树

Fig.2 Neighbor-joining tree of 16S rDNA sequences.

DA: 都安 Du'an; DH: 大化 Dahua; HJ: 环江 Huanjiang. 1) 鸡眼草 *K. striata*; 2) 野葛 *P. Montana*; 3) 假木豆 *D. triangulare*; 4) 狸尾豆 *U. lagopodioides*; 5) 鹿藿 *R. volubilis*; 6) 美丽崖豆藤 *C. speciosa*; 7) 中南鱼藤 *D. fordii*; 8) 深紫木蓝 *I. atropurpurea*; 9) 亮叶崖豆藤 *C. nitida*; 10) 西南杭子梢 *C. delavayi*; 11) 香合欢 *A. odoratissima*; 12) 无患子叶崖豆藤 *M. sapindifolia*; 13) 截叶铁扫帚 *L. cuneata*; 14) 藤黄檀 *D. hancei*. 下同 The same below.

2.3 地理环境和宿主植物对根瘤菌遗传多样性的影响

由图 2 可知,OTU1 和 OTU2 中的序列均来源于多种宿主植物,说明同一种根瘤菌能与多种豆科植物结瘤.同时,同一宿主植物也可与多种根瘤菌形成共生关系,如从亮叶崖豆藤的根瘤中同时分离到了慢生根瘤菌和中慢生根瘤菌,这表明某些宿主植物与根瘤菌的共生专一性不太严格.另外,从图 3 可看出,来源于同一地区的根瘤序列表现出一定的聚集性:来源于都安地区的序列主要聚集在 Cluster 1 中,来源于大化地区的序列主要聚集于 Cluster 4 中,而来源于环江地区的序列主要聚集于 Cluster 2 和 Cluster 3 中;来源于同一宿主植物的根瘤序列也表现出一定的聚集性,如来源于香合欢的多条序列 (ISA4308/4708/5208/5408 等).该结果表明,共生根

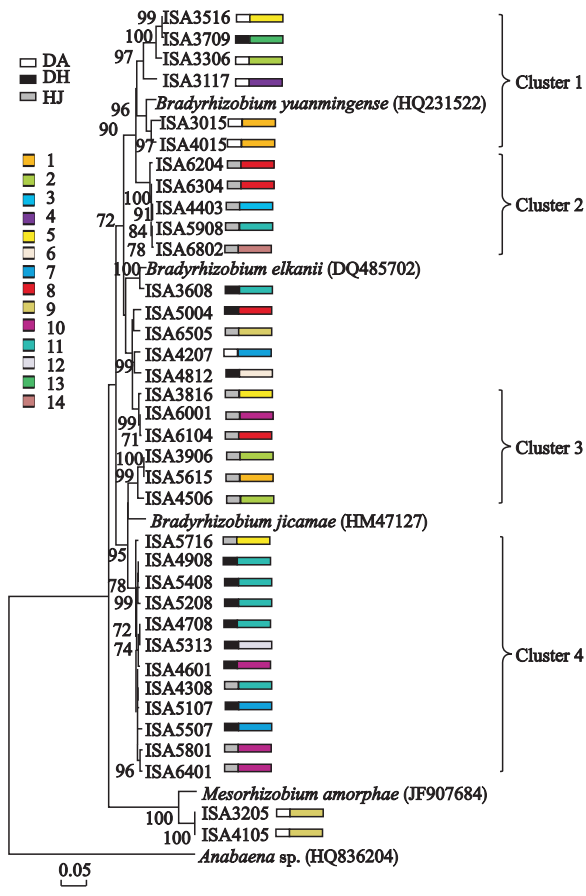


图 3 基于邻接法构建的 nifH 基因系统发育树

Fig.3 Neighbor-joining tree of nifH gene sequences.

瘤菌的种类可能受地理环境和宿主植物的共同调控.

3 讨 论

3.1 桂西北喀斯特豆科结瘤固氮植物资源

近 30 年来,陈文新等^[2]对中国根瘤菌资源进行了广泛的调查和采集,共调查结瘤豆科植物 119 属 500 种.在《中国根瘤菌》^[2]中,藤金合欢 (*Acacia sinuata*)、龙须藤 (*Bauhinia championii*)、老虎刺 (*Pterolobium punctatum*)、越南槐 (*Sophora tonkinensis*)、常春油麻藤 (*Mucuna sempervirens*) 和翅荚香槐均记载为结瘤植物,但本研究中并未发现这些植物结瘤.豆科植物能否结瘤固氮是十分复杂的问题,一方面决定于根瘤菌和宿主植物本身的遗传性,另一方面受生态环境的影响^[14].因此,可以结瘤固氮的豆科植物也不是处处可见根瘤,这还与水分、极端高温等环境条件有关^[16].在干燥的土壤中,由于豆科植物的根毛发育受阻,从而导致感染受到限制,同时缺水也严重影响根瘤的固氮作用.桂西北的多数地区属喀斯特地貌类型,土壤的保水性差,土壤干旱、

瘠薄,岩石裸露率高^[9],影响了豆科植物根系的发育,因此本应结瘤的植物也未采集到根瘤。另外,喀斯特地貌多石少土,部分植物的根系位于岩缝中,增加了结瘤调查的难度,导致调查过程中可能遗漏了一些根瘤。因此,这些有争议的结瘤植物需要进一步的证实。

3.2 慢生根瘤菌为该地区的优势共生固氮菌

慢生根瘤菌广泛分布于各种类型的土壤中,能够与多种宿主植物形成共生关系^[17-18]。本研究,从 36 份样品 14 种宿主植物根瘤中分离到的序列,与已知慢生根瘤菌属的菌株相似性极高,表明慢生根瘤菌为该地区的优势共生固氮菌。聂刚等^[1]对神木地区根瘤菌遗传多样性进行了研究,从 6 种宿主植物中分离到中慢生根瘤菌属、剑菌属和根瘤菌属的菌株。黄莉莉等^[19]发现,华东地区木本豆科植物根瘤菌 41.5% 菌株属于中慢生根瘤菌属,其他菌株属于根瘤菌属和慢生根瘤菌属。而本研究中分离到的序列 90% 以上为慢生根瘤菌属,且根瘤菌遗传多样性很低。有研究表明,同一植株的根瘤中可能定殖有 2~3 种根瘤菌^[20]。本研究将部分样品的 PCR 产物连接到 T 载体上,挑选多个克隆子去测序,结果表明每个根瘤样品中仅有一种根瘤菌。另外,对该地区土壤固氮菌的研究同样表明慢生根瘤菌属为绝对优势固氮菌(数据未发表)。这些结果均说明该地区的根瘤菌遗传多样性低,且以慢生根瘤菌为主。该地区根瘤菌种类的高特异性,可能是根瘤菌与豆科植物共生体长期共同进化的结果。

3.3 环境和宿主植物对根瘤菌的选择作用

在不同区域,存在同一宿主植物与不同根瘤菌结瘤的现象^[21]。如大豆在中国东北地区主要与慢生大豆根瘤菌结瘤,而在新疆则主要与辽宁慢生根瘤菌及弗氏中华根瘤菌结瘤^[22-23]。本研究中,野葛、西南杭子梢均与慢生根瘤菌共生,而在重庆缙云山野葛与根瘤菌属的菌株共生^[24];在云南景东县西南杭子梢与快生根瘤菌共生^[25]。这表明野生豆科植物的根瘤菌也具有地理分布区域性。不同的地理区域,土壤条件存在明显差异,如土壤的酸碱性能对竞争结瘤产生重要影响^[26],并将最终影响共生的根瘤菌种类。另外,在进化的过程中,豆科植物会通过某种机制优先选择能够与之建立有效根瘤并能高效固氮的根瘤菌^[27]。桂西北喀斯特土壤具有高钙、偏碱等特征。该区域根瘤菌特异性高是否与此有关有待更深入的研究。今后需要采集更多的样品,同时结合土壤条件来确认影响根瘤菌生物地理分布的因子。

参考文献

- [1] Nie G (聂刚), Chen W-M (陈卫民), Wei G-H (韦革宏). Genetic diversity of rhizobia isolated from shrubby and herbaceous legumes in Shenmu arid area, Shaanxi, China. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2014, **25**(6): 1674-1680 (in Chinese)
- [2] Chen W-X (陈文新), Wang E-T (王恩涛), Chen W-F (陈文锋), et al. Rhizobia in China. Beijing: Science Press, 2011 (in Chinese)
- [3] Pan M-H (潘明洪), Ling Y (凌瑶), Jing W (景文), et al. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from white clover in Sichuan Province. *Acta Prataculturae Sinica* (草业学报), 2014, **23**(5): 143-152 (in Chinese)
- [4] Wang J-H (王金华), Wang M-Y (王明月), Zhang W-X (张武先), et al. Symbiotic effect of 4 *Trifolium pretense* and leguminous rhizobia of rocky desertification area. *Journal of West China Forestry Science* (西部林业科学), 2014, **43**(5): 53-57 (in Chinese)
- [5] Ji Z-J (冀照君), Wang F-M (王非梦), Wang S-G (王素阁), et al. Symbiotic matching between soybean cultivar Luhuang No.1 and different rhizobia. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2014, **25**(12): 3573-3579 (in Chinese)
- [6] Gao L-F (高丽锋), Deng X (邓馨), Wang H-X (王洪新), et al. Diversity and resistance of rhizobia isolated from *Caragana intermedia* in Maowusu sandland. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2014, **15**(1): 44-48 (in Chinese)
- [7] Yue Y-M (岳跃民), Wang K-L (王克林), Zhang B (张兵), et al. Uncertainty of remotely sensed extraction of information of Karst rocky desertification. *Advances in Earth Science* (地球科学进展), 2011, **26**(3): 266-274 (in Chinese)
- [8] Ouyang Z-Y (欧阳自远). On the comprehensive management, development and breaking away from poorness of the ecologically fragile Karst area in Southwest China. *World Sci-tech R&D* (世界科技研究与发展), 1998, **20**(2): 53-55 (in Chinese)
- [9] Song T-Q (宋同清), Peng W-X (彭晚霞), Du H (杜虎), et al. Occurrence, spatial-temporal dynamics and regulation strategies of karst rocky desertification in southwest China. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2014, **34**(18): 5328-5341 (in Chinese)
- [10] Hu C-J (胡婵娟), Guo L (郭雷). Advances in the research of ecological effects of vegetation restoration. *Ecology and Environmental Sciences* (生态环境学报), 2012, **21**(9): 1640-1646 (in Chinese)
- [11] Xiong F (熊峰), Chen Y-X (陈远学), Zhang X-L (张思兰), et al. Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the hilly area of central Sichuan in China. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2014, **54**(6): 616-623 (in Chinese)
- [12] Ding M-M (丁明懋), He D-Q (何道泉), Yi W-M (蚁伟民), et al. A survey on the nitrogen-fixing le-

- gume resources in the Dinghushan natural forests. *Biodiversity Science* (生物多样性), 1999, **1**(1): 2–8 (in Chinese)
- [13] Zhao L-F (赵龙飞), Deng Z-S (邓振山), Yang W-Q (杨文权), *et al.* Investigation of leguminous plants and rhizobial resources in some regions of Northwest China. *Agricultural Research in the Arid Areas* (干旱地区农业研究), 2009, **27**(6): 33–39 (in Chinese)
- [14] Li X-Y (李先源), Zhang L (张 磊), Cao W (曹伟). Investigation of the nodulation and nitrogen-fixing resource of legume in Guizhou Province. *Journal of Southwest China Normal University* (西南师范大学学报), 2004, **29**(3): 445–450 (in Chinese)
- [15] Liu C-L (柳春林), Zuo W-Y (左伟英), Zhao Z-Y (赵增阳), *et al.* Bacterial diversity of different successional stage forest soils in Dinghushan. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2012, **52**(12): 1489–1496 (in Chinese)
- [16] Li F-L (李芳兰), Zhu L-H (朱林海), Bao W-K (包维楷). Effects of environmental stress on seedlings root growth and nodulation of leguminous shrubs in the dry valley of Minjiang River. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2009, **20**(8): 1825–1831 (in Chinese)
- [17] Wang H, Man CX, Wang ET, *et al.* Diversity of rhizobia and interactions among the host legumes and rhizobial genotypes in an agricultural-forestry ecosystem. *Plant and Soil*, 2009, **314**: 169–182
- [18] Zhang YF, Wang ET, Tian CF, *et al.* *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, **285**: 146–154
- [19] Huang L-L (黄莉莉), Zhang Y (张 宇), Han S-F (韩素芬), *et al.* Analysis of 16S rDNA PCR-RFLP fingerprint of 53 woody legume rhizobia strains isolated from east of China. *China Forestry Science and Technology* (林业科技开发), 2009, **23**(4): 69–71 (in Chinese)
- [20] Parker MA. Case of localized recombination in 23S rRNA genes from divergent *Bradyrhizobium* lineages associated with neotropical legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**: 2076–2082
- [21] Aguilar OM, Riva O, Peltzer E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**: 13548–13553
- [22] Han LL, Wang ET, Han TX, *et al.* Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the saline-alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant and Soil*, 2009, **324**: 291–305
- [23] Man CX, Wang H, Chen WF, *et al.* Diverse rhizobia associated with soybean grown in the subtropical and tropical regions of China. *Plant and Soil*, 2008, **310**: 77–87
- [24] Zhang L, Gu JP, Wei SQ, *et al.* Mechanism of acid tolerance in a rhizobium strain isolated from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, **57**: 514–524
- [25] Jia F-Q (贾风勤), Yang B-L (杨比伦), LA P (腊萍). Investigation on resources of nitrogen-fixing leguminous tree species and rhizobia in Jingdong County of Yunnan Province. *Journal of Southwest Forestry University* (西南林学院学报), 2009, **29**(4): 13–18 (in Chinese)
- [26] Yang SS, Bellogin RA, Buendia A, *et al.* Effect of pH and soybean cultivars on the quantitative analyses of soybean rhizobia populations. *Journal of Biotechnology*, 2001, **91**: 243–255
- [27] Heath KD, Tiffin P. Stabilizing mechanisms in a legume-rhizobium mutualism. *Evolution*, 2009, **63**: 652–662

作者简介 刘 璐,女,1987年生,博士研究生.主要从事土壤微生物研究. E-mail: liulu19870826@sina.com

责任编辑 肖 红
