

青藏高原东麓高山豆 [*Tibetia himalaica* (Baker) H. P. Tsui] 根瘤菌的遗传多样性

江华明^{1,2}, 赵珂¹, 刘松青^{1,3}, 刘新春⁴, 李仁全², 彭万仁², 张波¹, 张小平^{1*}

¹ 四川农业大学资源环境学院, 成都 611130

² 四川职业技术学院建筑与环境工程系, 遂宁 629000

³ 四川省水产学院, 成都 611730

⁴ 四川农业大学农学院, 成都 611130

摘要:【目的】分离纯化青藏高原东麓(四川甘孜藏族自治州)高山豆根瘤菌,揭示其遗传多样性。【方法】采用纯培养法从该地区高山豆植物根瘤中分离纯化根瘤菌;通过 BOXAIR、16S rDNA-RFLP 及 PCA (Principal Component Analysis) 来分析高山豆根瘤菌的遗传多样性;通过 16S rDNA 序列同源性确定菌株的系统发育地位;通过测定菌株的耐盐性、初始 pH 生长范围及生长温度范围来分析高山豆根瘤菌的抗逆性。【结果】从 8 个县 12 个采样点共分离纯化出 22 个菌株。22 个菌株在 16S rDNA PCR-RFLP 分析中聚成 4 个遗传群,在 BOX-PCR 分析中则聚成 9 个遗传群。高山豆根瘤菌 16S rDNA Simpson 遗传多样性指数 $D = 0.872$ 。22 个菌株分别属于 *Rhizobium* (11/22 株)、*Mesorhizobium* (4/22 株)、*Rhizobium-Agrobacterium* (7/22 株) 3 个属。生理性状测定试验表明,所有菌株均能在 1% NaCl 的 YMA 培养基上生长,大多数 (15/22 株) 菌株能在 4% NaCl 的 YMA 培养基上生长,其中,SCAU679、SCAU694、SCAU706 等 3 个菌株能在 7% NaCl 的培养基上生长,SCAU689 能在 8% NaCl 的培养基上生长;15/22 的菌株能在 pH4–11 的培养基上生长;16/22 的菌株能在 4–45℃ 条件下生长,所有菌株能在 60℃ (处理 10 min 后置 28℃) 条件下生长。【结论】青藏高原东麓(四川甘孜州)高山豆根瘤菌具有丰富的遗传多样性。大多数菌株对高盐、高温、低温及过酸过碱环境均具有很强的耐受能力。

关键词: 青藏高原东麓, 高山豆, 根瘤菌, 遗传多样性, 主成分分析(PCA), 系统发育

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 07-0710-03

在生物地球化学循环中,固氮生物是一类能在生物细胞内经过复杂的新陈代谢过程将 N_2 转化为 NH_3 的原核微生物,从而通过生物途径实现了氮元素在生物群落和无机环境之间的循环。全球每年自然固氮量的 90% (2.295×10^{11} kg) 是通过固氮微生物实现的^[1]。其中,根瘤菌与豆科植物的共生体系固氮能力强、固氮量大、抗逆性强,其共生固氮作用是生物固氮中效率最高的体系,约占生物固氮总量的 65%^[2]。因此,研究和开发利用根瘤菌与豆科植物的共生固氮体系具有巨大的生态、经济和社会价

基金项目: 国家自然科学基金 (31070004)

* 通信作者。Tel: +86-835-2882710; E-mail: zhangxiaopingphd@126.com

作者简介: 江华明 (1965–), 男, 四川蓬溪人, 博士研究生, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: jianghm06@163.com

收稿日期: 2012-12-16; **修回日期:** 2013-03-11

值。

青藏高原是地球上独具特色的一个地理单元, 具有独特的地质历史和自然条件, 具有丰富的生物多样性^[3]。青藏高原东麓是指青海、西藏以及四川三省区交界的广大地域。四川甘孜藏族自治州地处青藏高原东南缘(青藏高原向云贵高原和四川盆地的过渡地带), 大地貌属横断山系北段的川西高原区, 山川呈南北纵列式排列。该州气候主要属青藏高原气候, 随高差呈明显的垂直分布状态, 具有气温低、冬季长、降水少、日照足的特点。四川甘孜州是世界上自然生态最完整、气候垂直带谱与动植物资源垂直分布最多的地区之一, 也是我国重要的天然物种基因库。

高山豆属植物在我国约有 5 种, 主要分布于喜马拉雅山区及青藏高原。四川有 4 种, 在甘孜州均有分布。其中, 高山豆 *Tibetia himalaica* (Baker) H. P. Tsui (异叶米口袋) 为多年生草本植物, 生于海拔 3000–5000 m 的山区。茎叶为牛羊等家畜所喜食, 是早春恢复牲畜体力的良好饲料。根系发达, 保持水土能力强。全草有清热解毒、利尿的功能^[4]。由于高山豆的生存环境和分布范围特殊, 目前对高山豆根瘤菌的资源及多样性研究尚未见报道。

本研究从采集自四川甘孜州的高山豆根瘤中分离出根瘤菌, 测定了分离株的耐盐性、初始 pH 生长范围及生长温度范围等生理指标, 并采用 BOX-PCR、16S rDNA PCR-RFLP 及 16S rDNA 序列分析等方法, 研究了该区域高山豆根瘤菌的遗传多样性, 丰富了我国高寒山区豆科植物根瘤菌的多样性研究工作, 可为该区域的生态恢复与重建提供优良根瘤菌资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 根瘤样本的采集: 从四川甘孜州康定、道孚、炉霍、甘孜、新龙、理塘、稻城、雅江等 8 个县 12 个采样点采集高山豆植物根瘤及土壤样品, 并记录根瘤的形状及结瘤部位(表 1)。

1.1.2 分离和纯化高山豆根瘤菌: 高山豆根瘤菌的分离和纯化参照 Vincent^[5] 的方法。用无菌水浸泡清洗根瘤, 再用 75% 酒精和 0.1% HgCl₂ 分别对根瘤表面消毒 5 min 和 3 min, 在无菌培养皿中磨碎根

瘤, 取根瘤悬液在 YMA 平板上划线, 置 28℃ 恒温箱中培养 3–5 d, 挑取表面湿润、光滑、突起、有多糖产生的单菌落, 采用划线法纯化、革兰氏染色镜检, 纯菌株接种于 YMA 斜面, 28℃ 培养 3 d, 4℃ 短期保藏, 30% 甘油管中 –80℃ 长期保藏。

1.2 BOX-PCR 指纹分析

总 DNA 的提取参照 Little^[6] 的方法。提取的 DNA 保存于 –20℃ 备用。

BOX-PCR 指纹分析中, 引物为 BOXAIR: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'。反应体系 (25 μL) 为: 2 × PCR Mix 12.5 μL; BOXAIR 引物 (10 μmol/L) 0.5 μL; 模板 DNA (50 ng/mL) 1.0 μL; 双蒸水 11 μL; 扩增程序: 95℃ 初始变性 4 min; 95℃ 变性 1 min, 54℃ 复性 1 min, 65℃ 延伸 8 min, 循环 35 次; 65℃ 最终延伸 11 min。4℃ 保存。扩增产物经 2% 浓度的琼脂糖凝胶电泳 (80 V, 2 h) 检测, 凝胶 UV 成像系统成像, 以 JPG 形式保存。

1.3 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 rDNA 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'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAGAACGAACGCT-3'。其序列对应于 *E. coli* 第 8–37 碱基位置; 反向引物 P6: 5'-TACGGCTACC TTGTTACGACTTCACCCC-3'。其序列对应于 *E. coli* 第 1479–1506 碱基位置。反应体系 (30 μL): 2 × PCR Mix 15 μL; Primer 1 (10 μmol/L) 0.5 μL; Primer 6 (10 μmol/L) 0.5 μL; 模板 DNA (50 ng/μL) 0.5 μL; 双蒸水 13.5 μL。PCR 反应程序: 92℃ 变性 3 min; 94℃ 变性 1 min, 54℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 循环 30 次; 72℃ 最终延伸 10 min。4℃ 保存。16S rDNA 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳 (150 V, 30 min) 检测, UV 凝胶成像系统成像, JPG 形式保存。扩增片段长度为 1.5 kb 左右, 将扩增产物保存于 –20℃ 备用。

16S rDNA 片段选用了 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 (10 μL): 5 μL PCR 扩增产物, 5 U 内切酶, 10 × 酶切缓冲液 1 μL, 双蒸水补足至 10 μL。37℃ 水浴保温 6–10 h (*Taq* I 为 65℃ 恒温 12–14 h), 2% 琼脂糖凝胶 (含 EB) 电泳 (80 V) 2–3 h (酶切产物上样量 8 μL), UV 凝胶成像系统成像, JPG 形式保存。

表 1 高山豆根瘤菌供试菌株及参比菌株

Table 1 The Characteristics of strains isolated from *Tibetia himalaica* and reference strains

Strain	Host	Living part	Nodule shape	Origin	Position	Elevation (m)
SCAU667	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	elipsoid	Lucheng, Kangding (泸城,康定)	N 30°00'58.7" E 101°51'35.3"	3610
SCAU669	<i>Tibetia himalaica</i>	main root	elipsoid			
SCAU670	<i>Tibetia himalaica</i>	main root	elipsoid		N 29°56'06.0"	
SCAU671	<i>Tibetia himalaica</i>	main root	elipsoid	Lucheng, Kangding (泸城,康定)	E 101°57'34.8"	3190
SCAU672	<i>Tibetia himalaica</i>	main root	elipsoid			
SCAU674	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	spherical	Xinduqiao, Kangding (新都桥,康定)	N 30°09'01.4" E 101°29'47.0"	3500
SCAU675	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	spherical			
SCAU679	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	ellipsoid	Bamei, Daoфу	N 30°17'54.2"	
SCAU680	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	elipsoid	(八美,道孚)	E 101°31'45.3"	3730
SCAU681	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	elipsoid			
SCAU684	<i>Tibetia himalaica</i>	Lateral root	elipsoid	Bamei, Daoфу (八美,道孚)	N 30°32'32.5" E 101°26'32.4"	3450
SCAU685	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	elipsoid	Yade, Luhuo (雅德,炉霍)	N 31°27'21.0" E 100°34'21.2"	3270
SCAU688	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	spherical	Tuoba, Gangzi (拖坝,甘孜)	N 31°34'45.5" E 100°05'49.2"	3440
SCAU689	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	spherical			
SCAU691	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	elipsoid	Dagai, Xinlong (大盖,新龙)	N 31°24'54.9" E 100°10'09.7"	3280
SCAU694	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	elipsoid			
SCAU696	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	spherical	Mode, Litang (莫德,理塘)	N 30°09'53.3" E 100°19'31.7"	4120
SCAU700	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	elipsoid	Rubuchaka, Daocheng (茹布查卡,稻城)	N 29°01'34.0" E 100°19'27.1"	3750
SCAU701	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	elipsoid			
SCAU703	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	spherical	Leidazan, Yajiang (雷达站,雅江)	N 30°09'35.5" E 100°35'05.5"	4370
SCAU704	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	spherical			
SCAU706	<i>Tibetia himalaica</i>	lateral root	elipsoid	Xiongba, Litang (雄巴,理塘)	N 29°43'32.2" E 100°24'20.1"	3640
<i>M. austylicum</i> WSM2073 ^T	<i>Biserrula pelecinus</i>			Australia		
<i>M. huakuii</i> CCBAU 2609 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>			Nanjing, China (南京)		
<i>R. sullae</i> IS123 ^T	<i>Hedysarum coronarium</i>			Xinjiang, China (新疆)		
<i>S. meliloti</i> ATCC9930 ^T	<i>Medicago sativa</i>			USA		
<i>M. septentrionale</i> SDW 014 ^T	<i>Astragalus dsurgens</i>			Liaoning, China (辽宁)		
<i>M. temperatum</i> SDW018 ^T	<i>Astragalus dsurgens</i>			Liaoning, China (辽宁)		
<i>M. tianshanense</i> CCBAU 3306 ^T	<i>Glycyrrhiza allidiflora</i>			Xinjiang, China (新疆)		
<i>M. ciceri</i> ATCC5158 ^T	<i>Cicer arietinum</i>			Spain (北京)		
<i>M. amorphae</i> ACCC 19665 ^T	<i>Amorpha fruticosa</i>			Beijing, China (北京)		
<i>R. leguminosarum</i> USDA2370 ^T	<i>Pisum sativum</i>			USA		
<i>R. etli</i> CFN42 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>			CNPBS		
<i>R. leguminosarum</i> 127K17						
<i>Ag. tumefaciens</i> ATCC 23308 ^T	<i>Phaseolus</i> sp.			USA		
<i>Ag. rubi</i> ATCC13335 ^T						

1.4 供试菌株 16S rDNA 序列测定及系统发育分析

扩增全部 22 株供试菌株的 16S rDNA 片段(反应体系和程序同 1.3),扩增产物(1500 bp)经检测后送北京华大基因有限公司测定序列。

1.5 菌株生理特性分析

对 22 株根瘤菌分别进行耐盐性、初始 pH 生长范围及生长温度范围的测定。

耐盐性测定:在 YMA 培养基中加入 NaCl,使其终浓度分别为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%。对每个菌株在同一浓度的测定均设 9 个重复实验。以不含 NaCl 的 YMA 平板为阳性对照。接种、培养、观察和结果记录。

初始 pH 生长范围测定:在倒平板前,用灭菌的 HCl 和 NaOH 将 YMA 培养基的 pH 调至 4.0、5.0、9.0、10.0、11.0。对每个菌株在同一 pH 的测定均设 9 个重复实验。以 pH7.0 的 YMA 平板为阳性对照。接种、培养、观察和结果记录。

生长温度范围测定:将供试菌株接种到 YMA 平板上,以在 28℃ 生长的平板为阳性对照,分别在 4℃、10℃、37℃、45℃ 条件下培养,60℃ 则处理 10 min 后于 28℃ 培养。对每个菌株在同一温度条件的测定均设 9 个重复实验。接种、培养、观察和结果记录。

1.6 数据分析和处理

凝胶扫描成像系统摄取的凝胶图像经均一化处理后,按有条带处以“1”表示、无条带处以“0”表示,将其转化为“1”和“0”数字符,采用 Nei^[7]的方法计算材料间遗传相似系数(GS), $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$,其中, N_i 代表第 i 个品种的扩增带纹数目, N_j 代表第 j 个品种的扩增带纹数目, N_{ij} 代表第 i 、 j 个品种间共有的带纹数目。再通过 NTSYS2.10e 软件中的基于非加权成对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析,并转化为树状图谱;利用 NTSYS-pc (Version 2.10e) 软件进行 GS 相似性系数分析,并通过 EIGEN 程序进行主成分分析;将所测供试菌株 16S rDNA 序列提交 GenBank 数据库,获取序列号(Accession no. KC331056—KC331070)。采用 Blast search 在线分析及 DNAMAN 6.0 软件进行序列比对,找出各序列在 NCBI 数据库中最近缘种的模式

菌株序列,再用 MEGA 5.0 中的 Clustal X 程序进行多序列比对,然后用 Neighbor-Joining 方法选择 Bootstrap 为 1000 个重复构建系统发育学进化树。

2 结果

2.1 供试菌株

本研究将共分离得到的 22 个根瘤菌菌株作为供试菌株,另外,选取了属于 *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、*Agrobacterium* 的参比菌株 14 个(表 1)。

2.2 BOX-PCR 指纹分析

2.2.1 UPGMA 聚类分析:以各菌株总 DNA 为模板,BOXAIR 为引物,对 22 株供试高山豆根瘤菌进行 BOX-PCR,在 2% 琼脂糖凝胶电泳板上得到 BOX-PCR 指纹图谱(图 1)。

将 22 株供试高山豆根瘤菌及 15 株参比菌株电泳图谱条带转换成“1”和“0”,采用 NTSYS 软件中的非加权成对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析,得到 BOX-PCR 聚类树状图(图 2)。

聚类结果显示,36 个菌株在 82% 相似系数水平上分为 9 个遗传群,其余 5 个菌株则各自单独分开。其中,22 个供试菌株分别聚在 8 个不同的遗传群中,而 SCAU679 则单独分开。在 8 个遗传群中,除 SCAU681 与 *R. sulae* IS123^T;SCAU703、SCAU706 与 *M. amorphae* ACCC 19665^T 聚群外,其余供试菌株均未与参比菌株聚群。聚在一起的一般都是地理分布很近的菌株,但来自同一地理环境同一个宿主的不同菌株也可能聚在不同的群中,如 SCAU679、SCAU680、SCAU681 均分离自同一个宿主,但分别聚在群 III、群 II 和群 VII 1 中;SCAU669、SCAU670、SCAU671、SCAU672 均分离自同一个宿主,但分别聚在群 I 1、群 V 和群 VI 中。

22 个菌株 BOX-PCR 电泳条带两两间的 GS 相似系数分布在 0.535714—1.00。其中,SCAU694、SCAU696、SCAU700 分别与 SCAU670、SCAU671、SCAU672、SCAU703 和 SCAU688 的相似系数最低,均为 0.535714,表明它们之间的亲缘关系较远。而 SCAU670 和 SCAU671、SCAU684 和 SCAU685 的相似系数均为 1.0,表明它们可能分别为同一个菌株。

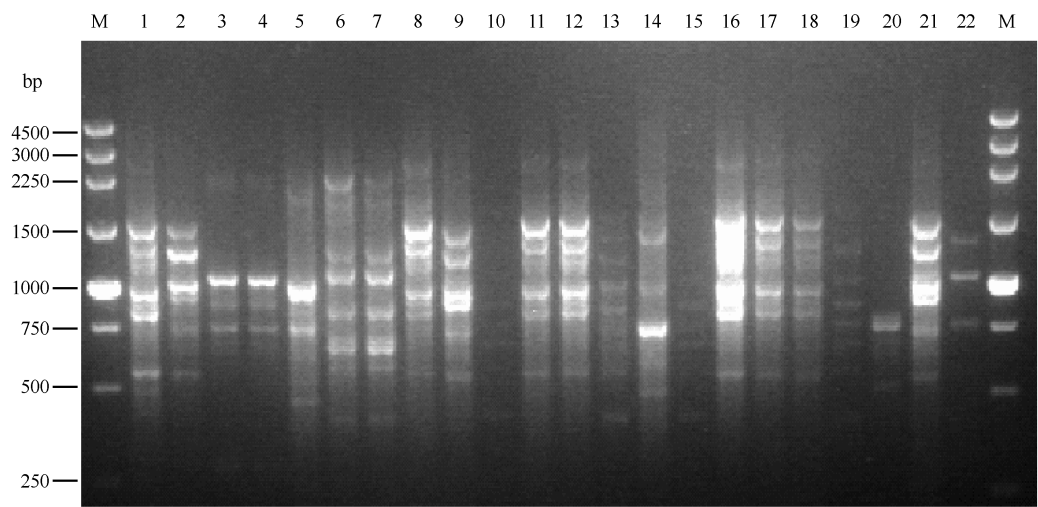


图 1. 高山豆根瘤菌 BOX - PCR 指纹图谱

Figure 1. BOX - PCR finger prints for Rhizobial in Tibetia himalaica. M; 250bp Marker. lane 1: SCAU667; lane 2 : SCAU669; lane 3: SCAU670; lane 4: SCAU671; lane 5: SCAU672; lane 6 : SCAU674; lane 7: SCAU675; lane 8: SCAU679; lane 9: SCAU680; lane 10: SCAU681; lane 11: SCAU684; lane 12: SCAU685; lane 13: SCAU688; lane 14: SCAU689; lane 15: SCAU691; lane 16 SCAU694; lane 17: SCAU696; lane 18: SCAU700; lane 19: SCAU701; lane 20: SCAU703; lane 21: SCAU704; lane 22: SCAU706.

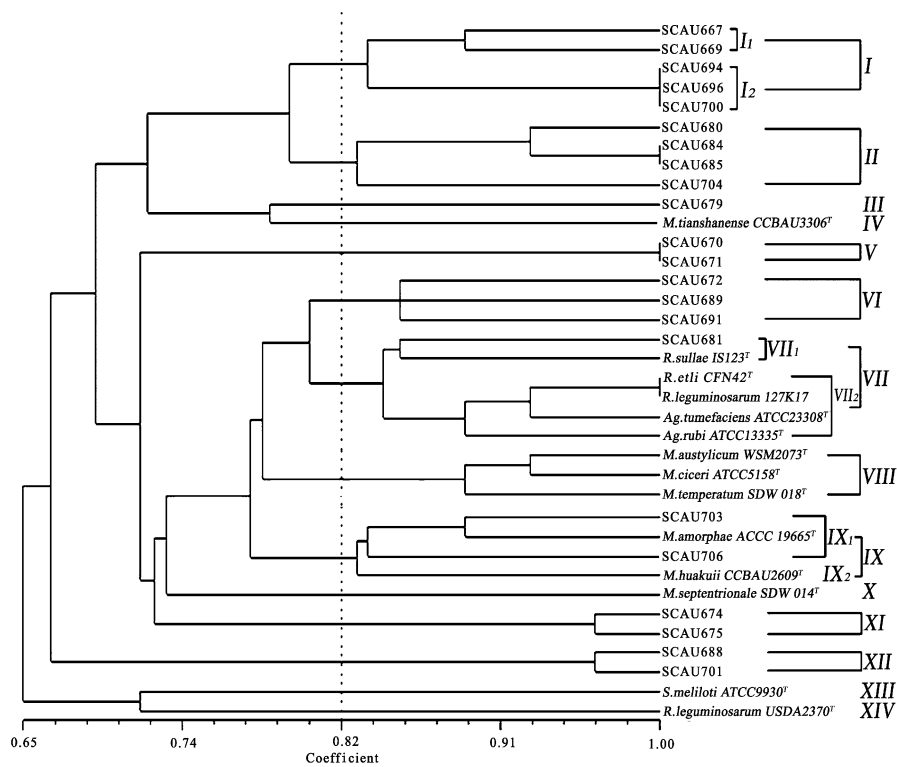


图 2. BOX-PCR 聚类分析图

Figure 2. The dendrogram based on BOX-PCR fingerprints.

2.1.2 主成分分析:主成分分析能从不同方向、不同层面显示各菌株间的关系,使菌株的聚类更加直

观、更为合理^[8]。应用 NTSYS-pc (Versin 2. 10e) 软件对 36 个菌株 BOX-PCR 的相似系数进行主成分分

析,用 EIGEN 程序建立主成分之间的三维关系图(图3),前3个主坐标所能解释的相关性分别为22.18%、12.02%和9.75%。结果显示,主坐标分析和系统聚类分析所得结果基本一致;群Ⅳ、Ⅴ、Ⅷ、Ⅺ的组成在两种分析中完全一致。在PCA中,

SCAU667 与 SCAU684、SCAU685 聚成群Ⅲ; SCAU679、SCAU680、SCAU669 虽然在第三主成分上有差异,但在第一、二主成分上非常相似,因此构成群Ⅲ; SCAU689 与 SCAU688、SCAU701 聚成群Ⅺ; SCAU672 与 *M. tianshanense* CCBAU 3306^T聚成群Ⅳ。

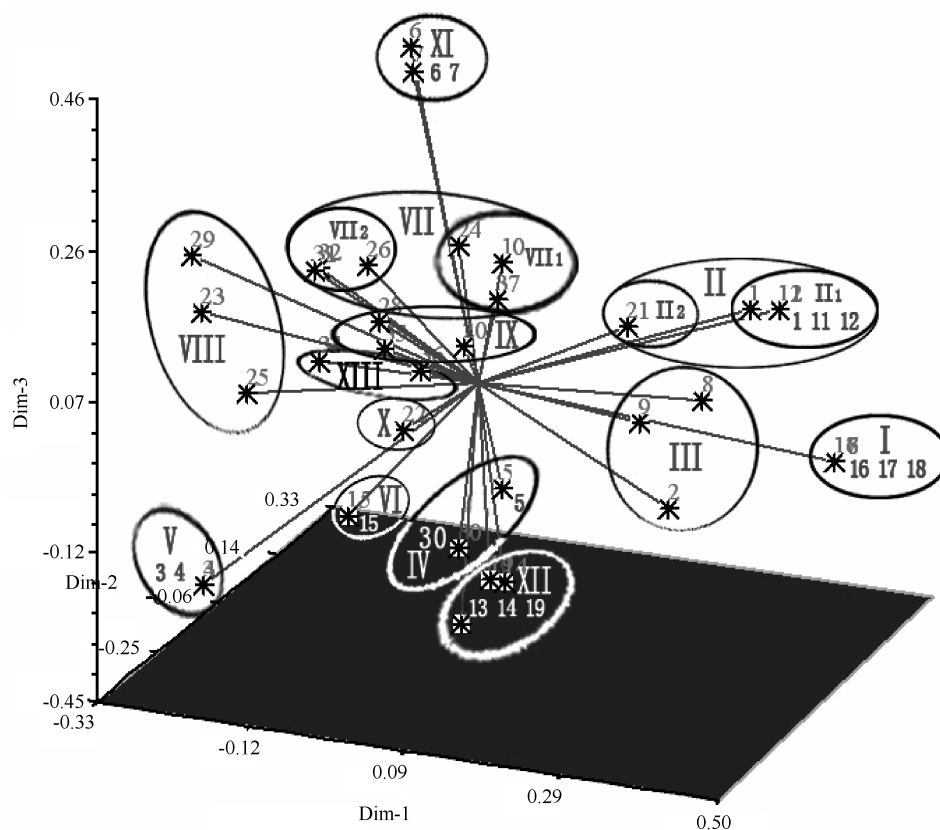


图3. 高山豆根瘤菌及参比菌株 BOXAIR -PCR 主成分分析三维图

Figure 3. The 3-d Principal component analysis for BOX-PCRof strains isolated from *Tibetia himalaica* and reference strains. I: 16 SCAU694; 17 SCAU696; 18 SCAU700 II: II₁: 11 SCAU684; 12 SCAU685; 1 SCAU667 II₂: 21 SCAU704; III: 8 SCAU679; 9 SCAU680; 2 SCAU669; IV: 5 SCAU672; 30 *M. tianshanense* CCBAU 3306^T V: 3 SCAU670; 4 SCAU671; VI: 15 SCAU691 VII: VII₁: 10 SCAU681; 37 *Ag. rubi* ATCC13335^T; 24 *M. huakuii* CCBAU 2609^T; VII₂: 26 *R. sullae* IS123^T; 31 *M. ciceri* ATCC5158^T; 32 *R. leguminosarum* USDA2370^T; VIII: 23 *M. austylicum* WSM2073^T; 29 *M. temperatum* SDW 018^T; 25 *M. tarimense* CCBAU 83306^T; IX: 20 SCAU703; 35 *M. amorphae* ACCC 19665^T; 28 *M. septentrionale* SDW 014^T; X: 22 SCAU706; XI: 6 SCAU674; 7 SCAU675; XII: 13 SCAU688; 19 SCAU701; 14 SCAU689; XIII: 33 *R. etli* CFN42^T; 34 *R. leguminosarum* 127K17; 36 *Ag. tumefaciens* ATCC 23308^T.

2.2 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析

2.2.1 UPGMA 聚类分析:以 P1 和 P6 为引物对 36 个菌株(22 个供试菌株和 14 个参比菌株)的 16S rDNA 进行特异性扩增,分别用 *Hae*III、*Msp*I、*Hinf*I 和 *Taq*I 对扩增的 1.5 kb 片段进行酶切,2% 琼脂糖凝胶(含 EB)电泳形成图谱(22 个供试菌株的 4 种限制性内切酶酶切图谱类型的组合见图 4)。对 36 个

菌株的 16S rDNA 扩增产物的酶切条带利用 UPGMA 进行聚类分析并生成树状图谱(图 4)。

聚类结果表明,在 84.8% 的相似性水平上,22 个高山豆根瘤菌菌株聚成 4 个类群,其中,类群 I 有 15 个菌株,包含 2 个亚群(I₁, I₂);类群 III 有 2 个菌株;SCAU704 则单独分开;类群 V 包括 2 个亚群: V₁ 有 3 个菌株, V₂ 仅有 SCAU703。聚在同一个

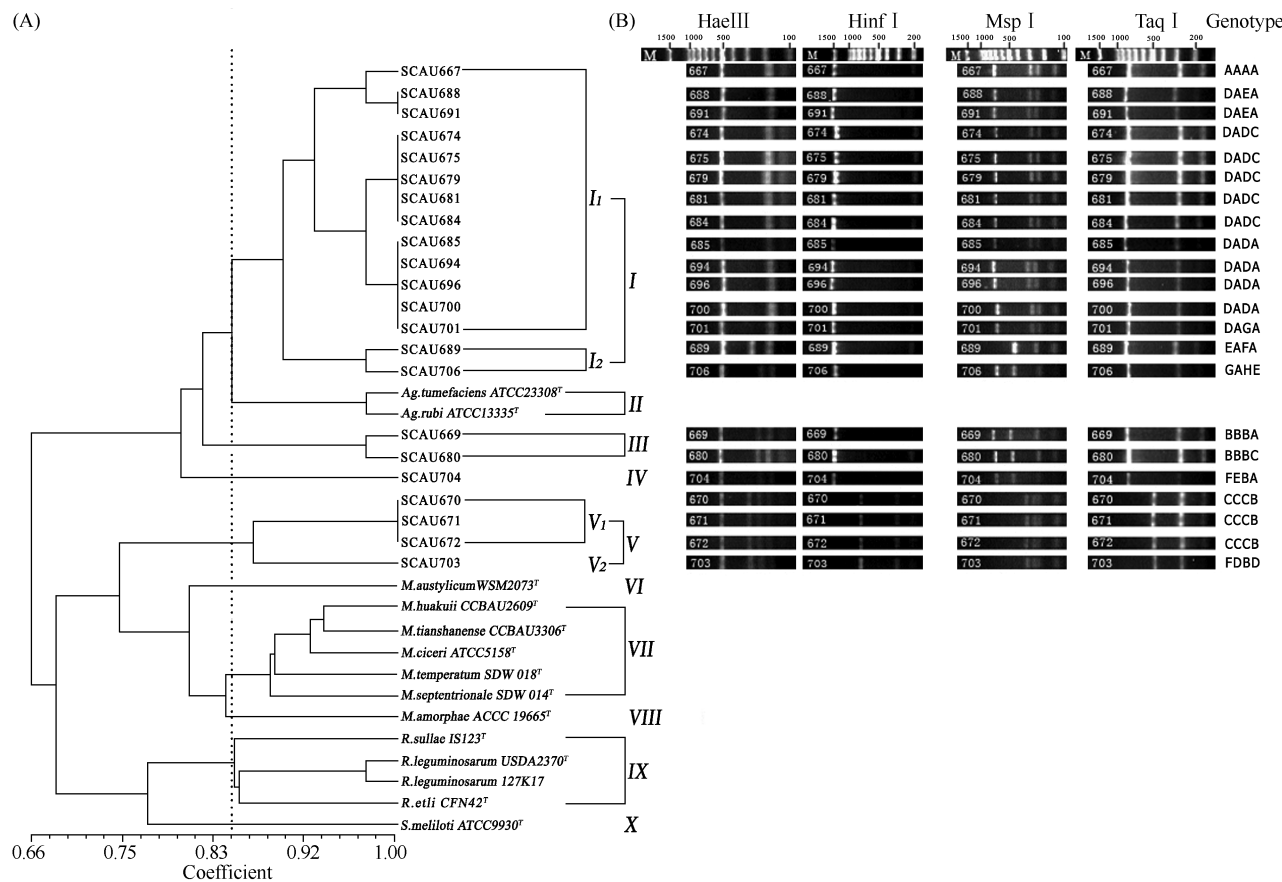


图 4. 高山豆根瘤菌 16S rDNA PCR-RFLP 聚类及供试菌株酶切图谱类型的组合

Figure 4. The dendrogram based on 16S rDNA PCR-RFLP (A) and the finger prints digested by *Hae*III, *Hinf*I, *Msp*I and *Taq*I(B).

(亚)群的菌株生长环境的海拔大多相近(500 m 以内),但也有高差近 1000 m 的类型,如 SCAU685 (3270 m)与 SCAU696(4120 m),土壤环境也差异较大(表 2)。

将采用 UPGMA 法进行聚类分析的结果转换为协表征矩阵,对协表征矩阵和相似系数矩阵的相关性进行 Mantel 检验。结果表明,2 种矩阵显著相关,相关系数 $r = 0.918$, $P = 0.005$,说明聚类结果能较准确地反映菌株之间的遗传关系。

22 个供试菌株 4 种酶酶切后共形成 12 种基因型(图 4),通过 Simpson 指数公式 $D = 1 - \sum P_i^2$ (P_i 为 16S rDNA 某基因型个体数占总个体数的比例,即第 i 个等位基因变异出现的频率)计算出高山豆根瘤菌遗传多样性指数 $D = 0.872$,表明该地区高山豆根瘤菌具有丰富的遗传多样性。

2.2.2 主成分分析:应用 NTSYS-pc(Versin 2.10e) 软件对 36 个菌株 16S rDNA-PCR 的相似系数进行主成分分析,用 EIGEN 程序作主成分之间的三维关

系图(图 5),前 3 个主成分所能解释的相关性分别为 40.2%、14.08% 和 9.95%。22 个供试菌株的主成分分析和 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析结果基本上一致:类群 I_{11} 、 I_{12} 及 V_1 在主成分分析和聚类分析结果中完全一致,共 16 个菌株。但在 PCA 中,SCAU703 和 SCAU669、SCAU680 聚成群 III; SCAU689、SCAU706 和 SCAU704 聚成群 IV。供试菌株在两种分析结果中均未与参比菌株聚在一起,表明 22 个供试菌株与 14 个参比菌株有较大的遗传差异性。

2.3 高山豆根瘤菌 16S rDNA 序列测定和系统发育分析

将 22 个菌株的 16S rDNA 扩增产物送北京华大基因科技股份有限公司进行测序。根据 BOXAIR、16S rDNA-RFLP 及 PCA 的综合分析,选择其中 15 个代表菌株的 16S rDNA 序列与从 GenBank(NCBI) 中获得的参比菌株(表 1) 的序列进行多重序列比对,用 SeqPup (0.5version) 软件进行录入,数据经编

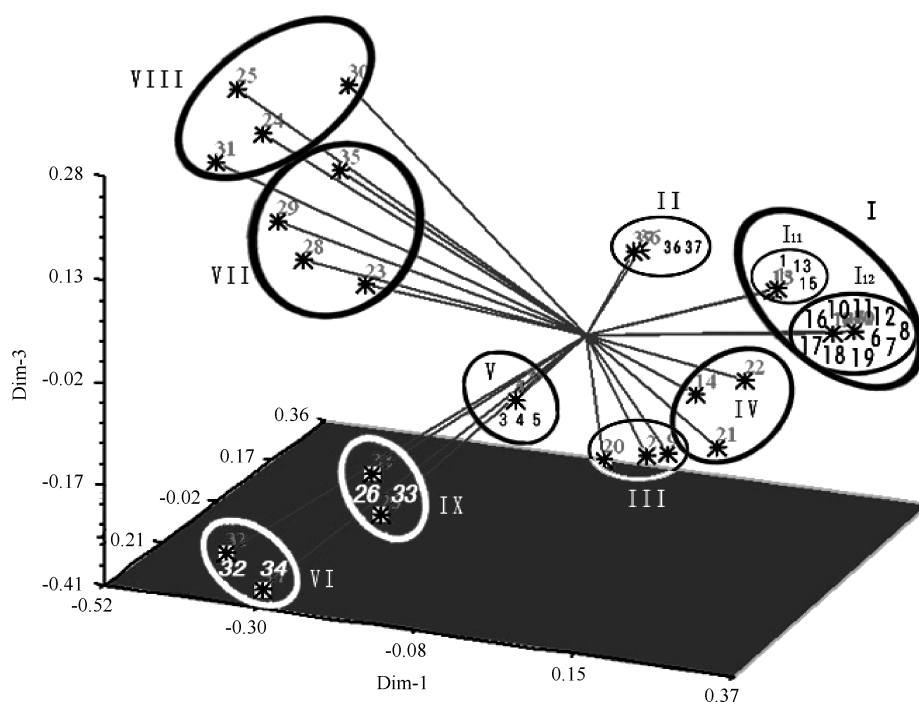


图 5. 高山豆根瘤菌及参比菌株 16S rDNA-PCR 主成分分析三维图

Figure 5. The 3-d PCA for 16S rDNA-PCR of strains isolated from *Tibetia himalaica* and reference strains.

辑后用 Clustal X 和 Treeconw 软件包分析,构建出以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树状图(图 6),并使用 DNAMAN 计算各测试菌株间 16S rDNA 序列的相似性值^[9-10]。15 个代表菌株在系统发育树状图中分成 3 个遗传群: SCAU670、SCAU671、SCAU672 与 *Mesorhizobium australicum* WSM2073^T 聚群; SCAU689 与 *Rhizobium etli*CFN 42^T 聚群; SCAU669、SCAU704、SCAU706 与 *Rhizobium* sp. G2-7 聚群;其余 8 个菌株与 *Rhizobium-Agrobacterium* 聚群。这与供试菌株 16S rDNA PCR-RFLP 聚类结果基本一致。

2.4 高山豆根瘤菌抗逆性分析

对 22 个菌株分别进行耐盐性、初始 pH 生长范围及生长温度的测定,并对其宿主植株根际土壤的酸碱度和含水量进行检测,结果见表 2。

16/22 的菌株既能在 4℃ 又能在 45℃ 的恒温条件下生长,2/22 的菌株能在 10-37℃ 的恒温条件下生长,4/22 的菌株只能在 10-28℃ 的恒温条件下生长,所有菌株能在 60℃ (处理 10 min 后置 28℃) 条件下生长。表明供试根瘤菌对温度的适应范围较宽,对温度的耐受性表现出较大的多样性。15/22 的菌株能在 pH4-11 的培养基上生长。所有菌株

均能在 1% NaCl 的 YMA 培养基上生长,大多数 (15/22) 菌株能在 4% NaCl 的 YMA 培养基上生长,其中,SCAU679、SCAU694、SCAU706 等 3 个菌株能在 7% NaCl 的培养基上生长,SCAU689 能在 8% NaCl 的培养基上生长。

3 讨论

16S rDNA-RFLP 分析是一种简便快速的方法,其限制性酶切图谱类型具有种甚至菌株的特异性,目前在根瘤菌种内遗传多样性和种间系统发育关系研究中广泛应用^[11]。

BOX-PCR 则利用了根瘤菌基因组中存在的重复序列来反映菌株间的遗传差异。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^[12]。22 个高山豆根瘤菌菌株在 16S rDNA PCR-RFLP 分析中聚成 4 个类群,在 BOX-PCR 分析中则聚成 9 个类群,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,因此,和 16S rDNA PCR-RFLP 结果相比较,BOX-PCR 指纹图谱分析揭示的遗传信息更为丰富^[13]。采用两种方法对 22 个高山豆根瘤菌菌株和 14 个参

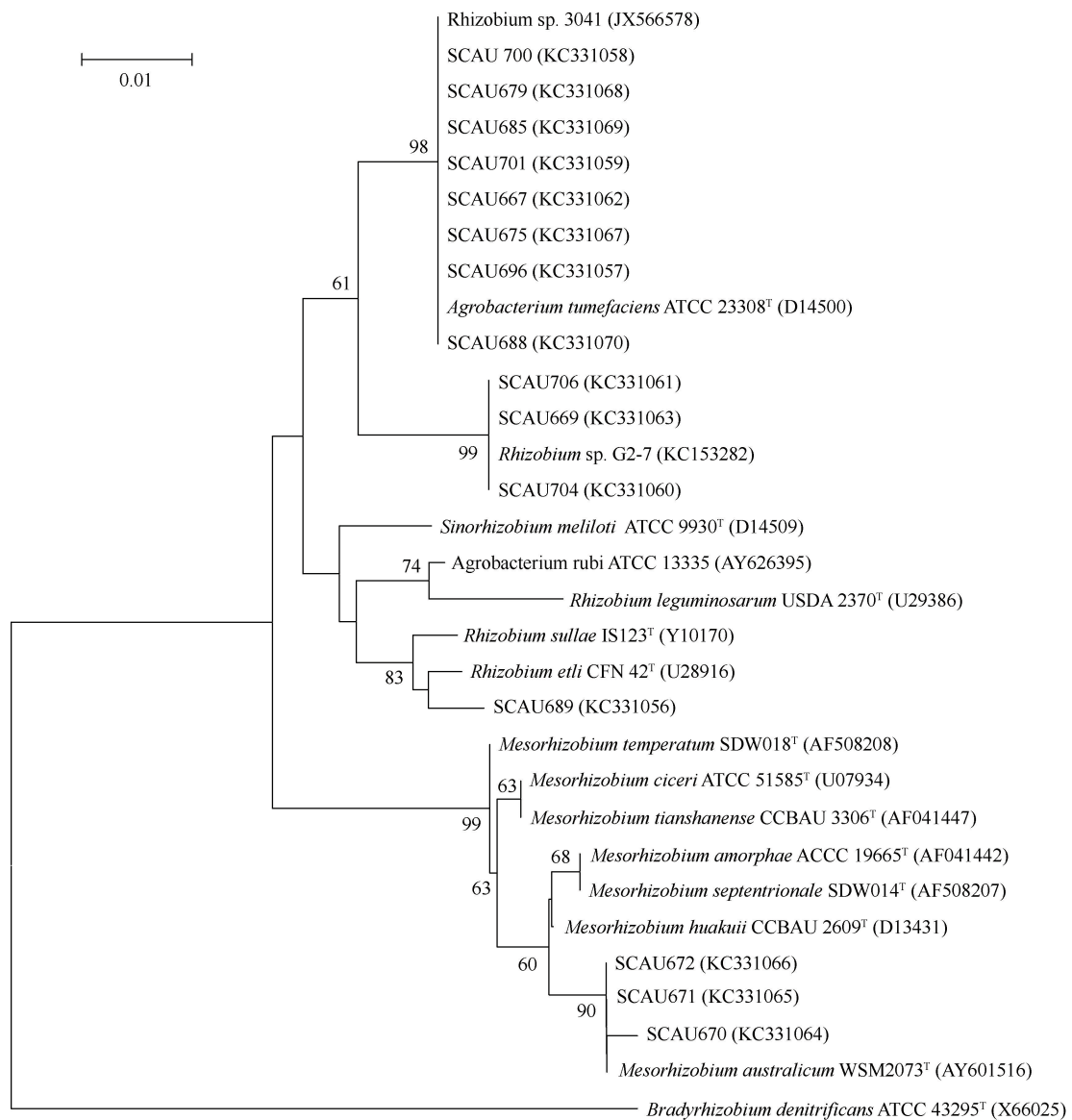


图 6. 供试菌株 16S rDNA 系统发育树状图

Figure 6. Phylogenetic tree analysis of 16S rDNA of rhizobial bacteria. The tree was constructed by neighbor-joining (NJ) using the Kimura2-parameter model available in the MEGA4.0 software, based on the sequences of actinomycetes partial 16S rDNA gene and the reference strains. The scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position. Number in parentheses represent the sequence accession numbers in GenBank.

比菌株进行聚类结果较为一致,均显示:除少数供试菌株与参比菌株聚在一起外,其它供试菌株都独自成群,表明大多数供试菌株和参比菌株间有较大的遗传差异,高山豆根瘤菌具有丰富的遗传多样性。是否预示着有潜在的新种,尚需进行功能基因的分析。22个高山豆根瘤菌菌株分属 *Mesorhizobium*、*Rhizobium*,分布在海拔 3190–4370 m 的高差范围内(表 1),植株小生境和土壤环境也有较大差异,这表明处于不同环境的同一种宿主植物,可以与不同遗传性状、不同种甚至不同属的根瘤菌建立共生关系。

这与陈强等^[14]的研究结果一致。SCAU679、SCAU680、SCAU681 等 3 个菌株和 SCAU669、SCAU670、SCAU671、SCAU672 等 4 个菌株(分属 *Rhizobium*、*Mesorhizobium*)均分别来自同一地理环境中的同一个宿主,但在 2 种聚类分析结果中均聚在不同的群中,因此,从同一环境同株宿主植物分离的菌株可分别聚在不同的遗传群。SCAU694 和 SCAU696 在两种聚类分析中均聚在同一个遗传群,

但 SCAU694 与生长在海拔 3280 m 的高山豆植株共生,而 SCAU696 与生长在海拔 4120 m 的高山豆植株共生。上述结果表明,根瘤菌的分类聚群与宿主之间没有明显的对应关系^[15-16]。进一步表明根瘤菌与豆科植物的共生关系是菌株、植物和环境相互作用的结果^[2]。

表 2. 高山豆根瘤菌抗逆性状测定

Table 2. Phenotypic characteristics of isolates of *Tibetia himalaica*

Strains	Max[NaCl]/%	pH range	T/℃	pH of soil	Soil moisture/%
SCAU667	2	4 – 11	4 – 45	6. 31	38. 64
SCAU669	2	4 – 11	4 – 45	4	99
SCAU670					
SCAU671	1	5 – 8	10 – 28	4	99
SCAU672					
SCAU674	4	5 – 8	10 – 37	6. 10	28. 60
SCAU675	3	5 – 8	10 – 37	6. 10	28. 60
SCAU679	7 ^D	4 – 11	4 – 45	6. 13	44. 84
SCAU680	4	4 – 11	4 – 45	6. 13	44. 84
SCAU681	4	4 – 11	4 – 45	6. 13	44. 84
SCAU684	4	4 – 11	4 – 45	6. 36	30. 47
SCAU685	4	4 – 11	4 – 45	6. 93	21. 49
SCAU688	6 ^D	4 – 11	4 – 45	7. 07	30. 49
SCAU689	8	4 ^D – 9	4 – 45	7. 07	30. 49
SCAU691	5	4 – 11	4 – 45	6. 21	13. 72
SCAU694	7 ^D	4 – 11	4 – 45	6. 21	13. 72
SCAU696	5	5 – 11	4 – 45	5. 98	49. 72
SCAU700	5	4 – 11	4 – 45	7. 03	41. 20
SCAU701	4	4 – 11	4 – 45	7. 03	41. 20
SCAU703	3	5 – 8	10 – 28	5. 68	27. 19
SCAU704	5	4 – 11	4 – 45	5. 68	27. 19
SCAU706	7 ^D	4 – 11	4 – 45	6. 21	13. 72

D: Delayed growth and small colonies; 4℃ : cultured for 30d.

16S rDNA 序列分析是能较精确地揭示根瘤菌的系统进化关系的一个重要手段^[17]。16S rDNA 序列比对结果表明,22 个高山豆根瘤菌株分别属于 *Rhizobium* (11/22 株)、*Mesorhizobium* (4/22 株)、*Rhizobium-Agrobacterium* (7/22 株) 3 个属。在系统发育树状图中,属 *Rhizobium* 的 SCAU675、SCAU679、SCAU685、SCAU681、SCAU688、SCAU701 也 与 *Agrobacterium* 聚在一起,表明根瘤菌属与土壤杆菌属在种的系统发育上互有交叉,这与 Kwon 等的研究结果相一致^[18]。

一般认为,根瘤菌的最适生长温度为 25 – 30℃,只有少数苜蓿根瘤菌菌株在 42. 5℃ 下生长,极少数根瘤菌 4℃ 条件下生长^[19],根瘤菌在 60℃ 条件下处理 5 min 即全部被杀死^[20]。

对高山豆供试菌株生长温度测定结果显示,16/22 株菌(属 *Rhizobium*)既能在 4 – 45℃ 的恒温条件下生长,所有菌株能在 60℃ (处理 10 min 后置

28℃) 条件下生长。表明高山豆供试菌株耐低温和高温的能力普遍都很强。另外,4/22 株菌(属 *Mesorhizobium*)能在 10 – 28℃ 的恒温条件下生长,2/22 株菌(属 *Rhizobium*)能在 10 – 37℃ 的条件下生长。表明高山豆根瘤菌适应高寒环境的能力是宿主植物、无机环境因子对菌株长期自然选择的结果,在相同环境条件下根瘤菌适应能力的高低是由其遗传差异性决定的。

根瘤菌生长的最适 pH 为 6 – 7。22 个高山豆根瘤菌菌株的宿主植物生长的土壤 pH 在 4 – 7. 07 之间,均属酸性、中性偏酸环境,而所有菌株均能在 pH4 或 5 的培养基上生长,其中,15/22 株菌能在 pH4 – 11 的培养基上生长,这一方面表明了高山豆根瘤菌与酸性土壤条件的相关性。另一方面,又表现出高山豆根瘤菌大多具有既耐酸又耐碱的能力。这表明植物内生菌耐酸碱能力不仅与无机环境有关,还可能与宿主植物的生理活动有关。

SCAU669、SCAU670、SCAU671、SCAU672 均分离自同一个植株,该植株生长的土壤 pH = 4,但 SCAU669(属 *Rhizobium*) 能耐受 pH4-11 的生长环境,而 SCAU670、SCAU671、SCAU672 (均属 *Mesorhizobium*) 只能在 pH5 - 8 的培养基上生长,表明同一宿主不同菌株的耐酸碱能力也有明显差异,这种差异性可能与根瘤菌产酸或产碱的生理特性所决定,分泌酸的根瘤菌对偏碱的条件耐受性较强^[21]。

在影响微生物生长的胁迫因素中,盐分被认为是最具危害性的非生物类胁迫因素之一^[22]。高山豆根瘤菌所有菌株均能在 1% NaCl 的 YMA 培养基上生长,大多数(15/22)菌株能在 4% NaCl 的 YMA 培养基上生长,其中,SCAU679、SCAU694、SCAU706 等 3 个菌株能在 7% NaCl 的培养基上生长,SCAU689 能在 8% NaCl 的培养基上生长。表明与同一宿主共生的根瘤菌在不同环境中的耐盐能力具有菌株的差异性。另外,耐盐性较弱的 SCAU669(2%)、SCAU670(1%)、SCAU671(1%)、SCAU672(1%)共生植株生长土壤的含水量为 99%,而耐盐性较强的 SCAU679、SCAU694、SCAU706、SCAU689 共生植株生长土壤的含水量分别为 44.84%、13.72%、13.72%、30.49%,这在一定程度上表明根瘤菌的耐盐性与宿主植物生长土壤的含水量有关,土壤的含水量越低(越干旱),菌株的耐盐能力越强。

大部分根瘤菌对高盐、过高过低 pH 和高温低温等因素都比较敏感,这些因素会影响根瘤菌的固氮能力和豆科植物产量的提高^[23],而生长在高寒地区的根瘤菌在长期的自然选择过程中,形成了与自然环境条件相适应的耐高盐、耐过酸过碱和耐高温低温的类型,因此,研究高寒地区豆科植物根瘤菌的遗传多样性和抗逆性,能为选育具有较强抗性基因的菌种提供资源,为进一步在可持续发展农业中应用这些根瘤菌提高豆科植物的产量和储藏量奠定基础。

参考文献

- [1] Aneta Dresler-Nurmi, David P. Fewer, Leena A. Räsänen, Kristina Lindström. The diversity and evolution of rhizobia. *Microbiol Monographs*, 2009, 8: 3-41.
- [2] Chen W, Wang E, Chen W. The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and legumes and their geographical environments. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(1): 81-86. (in Chinese)
- 陈文新,汪恩涛,陈文峰. 根瘤菌 - 豆科植物共生多样性与地理环境的关系. *中国农业科学*, 2004, 37(1): 81-86.
- [3] 高以倍,李明森. 横断山区土壤. 北京: 科学出版社, 2000.
- [4] 傅立国,陈潭清,郎楷永,洪涛,林祁,李勇. 中国高等植物(第 7 卷). 青岛:青岛出版社,1998,7:386.
- [5] Vincent JM. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. Oxford: *Blackwell Scientific*, 1970.
- [6] Little MC. Process for purification of DNA on diatomaceous Earth. United States Patent: No. 50754305, Rad Laboratories Inc, Hercules, Calif, 1991, 12-08.5, 075, 430.
- [7] Neil M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [8] Li J, Luan F, Li Z. Tracing of the origin and the spreading track of silkworm white muscardine in southwestern Anhui. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(1):143-152. (in Chinese)
- 李佳丽,栾丰刚,李增智. 安徽西南部家蚕白僵病病原及传播途径追踪. *中国农业科学*, 2011, 44(1): 143-152.
- [9] Thomsen J, Gibson T, Plewnik F. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24: 4867-4882.
- [10] Van-de-Peer Y, De WR. Treecon for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the microsoft windows environment. *Computer Applications In the Biosciences*, 1994, 10: 569-570.
- [11] Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 1996, 6: 407-438.
- [12] Selenska-Pobell S L, Giova, Petrova N. Strains-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* Generated by PCR with arbitrary and repetitive Primers. *Journal of Applied*

- Bacteriology, 1995, 79: 425-431.
- [13] Peng X, Zhang X, Xu K, Huang CK. Lindström. Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from root nodules of *Lespedeza Michx* in arid-hot valley of Jinsha River. *Acta Ecologia Sinica*, 2008, 28 (11): 5469-5481. (in chinese)
彭贤超, 张小平, 徐开未, 黄昌学. K. Lindström. 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.
- [14] Chen Q, Chen W, Zhang X, Li D, Lindström K. Genetic diversity of rhizobia 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, K. Lindström. 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.
- [15] Wang ET, Li XH, Chen WX. Diversity of fast-growing rhizobia isolated from root nodules of leguminous plants in Hainan. *Microbiology*, 1993, 20(2): 67-72.
- [16] Tan ZY, Chen WX. SDS PAGE of whole cell protein of new rhizobial groups and 16S rDNA sequencing of their representatives. *Chinese Journal of Applied and Environment Biology*, 1998, 4 (1): 66-70.
- [17] Gaunt MW, Tumer SL, Rigottier GL, RigOer. GOis L, Lloyd-Macgilp SA, Young JPW. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobial. *International journal of Systematic and Evolutionary Micobiology*, 2001, 51, 2037-2048.
- [18] Kwon SW, Park JY, Kim JS, Kang JW, Cho YH, Lim CK, Parker MA, Lee GB. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 263 - 270.
- [19] Guan G, Guo P, Wang W, Kang J. Studies of the rhizobium resources in Xinjiang arid area. II. The resistance and physiological and biochemical features of rhizobial. *Acta Microbiologica Sinica*, 1992, 32(5): 346-352. (in Chinese)
关桂兰, 郭沛新, 王卫卫, 康金花. 新疆干旱地区根瘤菌资源研究 II. 根瘤菌抗逆性及生理生化反应特性. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1992, 32(5): 346-352.
- [20] 关桂兰, 王卫卫, 杨玉锁. 新疆干旱地区固氮生物资源. 北京: 科学出版社, 1991.
- [21] Yang J, Zhou Q, Zhou J. Effect of pH on nodulation of soybean rhizobia from Weifang and Huayuankou soils. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12 (4): 639-640. (in chinese)
杨江科, 周琴, 周俊初. pH 对土壤中土著快、慢生大豆根瘤菌结瘤的影响. 应用生态学报, 2001, 12(4): 639-640.
- [22] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62 (2): 504-544.
- [23] Brockwell J. Manipulation of rhizobial microflora for improving legume productivity and soil fertility. *Plato Soil*, 1995, 174: 43-180.

Genetic diversity of rhizobial bacteria nodulating *Tibetia Himalaica* in eastern Qinghai-Tibet plateau

Huaming Jiang^{1,2}, Ke Zhao¹, Songqing Liu^{1,3}, Xinchun Liu⁴, Renquan Li², Wanren Peng², Bo Zhang¹, Xiaoping Zhang^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Resource and Environmental Sciences, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

²Sichuan Vocational and Technical college, Suining 629000, China

³Sichuan School of Fisheries, Chengdu 611730, China

⁴Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: [**Objective**] Genetic diversity of the rhizobial bacteria nodulating *Tibetia himalaica* in the eastern part of Qinghai-Tibet Plateau (Ganzi State, Sichuan) were evaluated. [**Methods**] The pure culture method was used for isolating the rhizobial strains from the nodules. BOXAIR, 16S rDNA sequences, 16S rDNA PCR-RFLP and Principal Component Analysis (PCA) were used to determine the genetic diversity and phylogenetic relationships. The growth in different salt contents, pH and temperatures were tested. [**Results**] In total 22 strains were isolated from 12 samples in 8 counties. The strains tested were classified into 4 clusters in 16S rDNA PCR-RFLP, and 8 clusters were formed in BOXAIR. The 16S rDNA Simpson genetic diversity index was $D = 0.872$. The strains tested were closely related to *Rhizobium* (11/22 strains), *Mesorhizobium* (4/22 strains) and *Rhizobium-Agrobacterium* (7/22 strains). All strains could regularly grow in YMA medium amended with 1 % NaCl, and 15/22 strains could grow in 4 % NaCl. SCAU679, SCAU694 and SCAU706 could adapt to 7 % NaCl, while SCAU689 could tolerate 8 % NaCl. Among the strains tested, 15 strains could grow in the pH range from 4.0 to 11; 16 isolates grew well from 4 to 45 °C, and all of 22 strains could grow at 28 °C after treatment at 60 °C for 10 min. [**Conclusion**] This study revealed the high genetic diversity of the rhizobia isolated from *Tibetia himalaica* in the eastern part of Qinghai-Tibet Plateau. The strains tested were adapted to high salt, different range of temperatures and pH.

Keywords: Qinghai-Tibet plateau, *Tibetia himalaica*, rhizobial, genetic diversity, PCA (Principal component analysis), phylogeny

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070004)

* Corresponding author. Tel: +86-835-2882710; E-mail: zhangxiaopingphd@126.com

Received: 16 December 2012 / Revised: 11 March 2013