

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (6) :616 - 623; 4 June 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.003

川中丘陵地区大豆根瘤菌遗传多样性与系统发育关系

熊峰, 陈远学, 张思兰, 游芳, 周欢, 徐开未*

四川农业大学资源环境学院, 四川 成都 611130

摘要: 【目的】研究分离自川中丘陵地区大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育。【方法】采用 16S rDNA PCR-RFLP 和 16S rRNA 基因、*glnII*、共生基因 (*nodC*) 系统发育分析的方法进行研究。【结果】供试未知菌的 16S rDNA 用 4 种限制性内切酶 (*Hae* III、*Hinf* I、*Msp* I 及 *Taq* I) 酶切后获得 5 种 16S 遗传图谱类型。16S rDNA PCR-RFLP 结果表明, 所有供试菌株在 83% 水平分为慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 和中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 两大类群, 而 75% 的菌株为中华根瘤菌。6 个代表菌株的 16S rDNA、*glnII* 和 *nodC* 三个位点基因的系统发育结果基本一致, 4 株与 *S. fredii* USDA205^T 相似度最高; 有 2 株分别与 *B. yuanmingense* CCBAU10071^T、*B. diazoefficiens* USDA110^T 相似度最高。4 个 *Sinorhizobium* 代表菌株 16S rDNA、*glnII* 序列相似度分别为 98.3% - 99.9%、98.2% - 100%, 但它们的 *nodC* 基因序列完全相同。【结论】川中丘陵地区大豆根瘤菌具有较丰富的遗传多样性, *S. fredii* 为优势种。

关键词: 大豆根瘤菌, PCR-RFLP, 16S rDNA, *glnII*, *nodC*, 遗传多样性

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209(2014)06-0616-08

川中丘陵位于长江上游, 属中亚热带季风气候, 丘陵广布、溪沟纵横、还有低丘河谷平坝; 该区旱地土壤以紫色土为主, 酸性、中性、石灰性紫色土均有分布, 此外还有黄壤、潮土等, 该区地形地貌和土壤类型多样^[1], 适合大豆的生产和种植, 是四川大豆的重要产区。

据报道四川春大豆品种 1267 个, 夏大豆品种 802 个^[2], 未统计秋大豆和冬大豆。四川作为一个人口大省, 对大豆需求量较大, 基本上各家农户均有种植, 因耕作栽培粗放、产量不高和无畅通的销售渠道, 种植面积不大, 以传统的“麦/玉 + 豆/苕”模式、田埂豆、地边豆、屋边豆和一些零星的荒地种豆为主, 主要满足自给自足和留种^[3-4]。因此该区大豆分布广, 资源丰富。有黄色、绿色、黄褐色、黑色大豆; 按播期分春、夏、秋、冬大豆, 但品种资源类型主要以春大豆和夏大豆为主。可见, 川中丘陵区应该孕育着丰富的大豆根瘤菌资源。

陈文新课题组对中国大豆根瘤菌的遗传多样性作了较系统的研究。发现大豆根瘤菌具有地理分布区域性, *Bradyrhizobium japonicum* 在中国的分布最广, *Sinorhizobium fredii* 分布也广泛, *B. elkanii* 在我国热带和亚热带地区分布较广^[5]。黄土高原、华北平原和河北省的大豆根瘤菌主要为 *Bradyrhizobium* 和 *Sinorhizobium* 两属的菌株, 但 *S. fredii* 为优势种^[6-8]。新疆盐碱地的大豆根瘤菌也以 *Bradyrhizobium* 和 *Sinorhizobium* 为主, *B. liaoningense* 和 *S. fredii* 为优势种^[9]。但作为南方大豆主产区之一的川中丘陵区大豆根瘤菌资源的综合考察和系统研究尚未见报道。本研究对分离自川中丘陵地区的大豆根瘤菌进行 16S rDNA PCR-RFLP, 多个位点基因: 16S rDNA、*glnII* 以及共生基因 (*nodC*) 进行系统发育分析, 揭示该区大豆根瘤菌的多样性和系统发育地位。近年来, 四川大豆生产发

基金项目: 四川省科技支撑计划项目 (2012RZ0018)

* 通信作者。Tel: +86-28-86290982; E-mail: xkwei@126.com

作者简介: 熊峰 (1987 -), 男, 四川成都人, 硕士, 主要从事生物固氮研究。E-mail: xtfxh@126.com

收稿日期: 2013-11-20; 修回日期: 2014-03-20

展迅猛,尤其在川中丘陵地区出现规模化、大面积连片种植,推广“玉/豆”种植新模式,产量水平有了一定提高,已经成为四川省主要粮食作物之一,播种面积在全国排名第6位,国家发改委将川渝大豆纳入国家十二五主要粮食作物,四川大豆引起了国家及省各级政府的重视^[3-4]。为此本研究还能为筛选适合川中丘陵区的高效大豆根瘤菌贮备优良的菌种资源。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

从分布在川中丘陵的遂宁、广安、南充、资阳、内

江5个市区采集大豆根瘤,分离纯化得到28株大豆根瘤菌,并经回接试验证实全部为大豆根瘤菌,详细信息见表1。16S rDNA RFLP分析所用的参比菌14个,见图1。

1.2 总DNA提取

供试菌株经YMA斜面活化后,接种于5 mL YMA液体培养基中,28℃,180 r/min摇床培养至对数生长期(快生菌株一般培养2-3 d,慢生菌株培养5-7 d)。按照参考文献[11]的方法提取总DNA,并用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA纯度及浓度。

表1 供试菌株

Table 1. Tested strains

| strains | original source | types of restriction map | | | | 16S rDNA Genotypes |
|----------|---|--------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------------|
| | | <i>Hae</i> III | <i>Hinf</i> I | <i>Msp</i> I | <i>Taq</i> I | |
| SCAU s24 | Yanjiang District, Ziyang City (资阳市雁江区) | a | a | a | a | I |
| SCAU s1 | Yanjiang District, Ziyang City (资阳市雁江区) | a | a | a | a | I |
| SCAU s25 | Xichong County, Nanchong City (南充市西充县) | a | a | a | a | I |
| SCAU s17 | Jialing District, Nanchong City (南充市嘉陵区) | a | a | a | a | I |
| SCAU s20 | Jialing District, Nanchong City (南充市嘉陵区) | a | a | a | a | I |
| SCAU s8 | Jialing District, Nanchong City (南充市嘉陵区) | a | a | a | a | I |
| SCAU s9 | Dongxing District, Neijiang City (内江市东兴区) | a | a | a | a | I |
| SCAU s10 | Dongxing District, Neijiang City (内江市东兴区) | a | a | a | a | I |
| SCAU s11 | Dongxing District, Neijiang City (内江市东兴区) | a | a | a | a | I |
| SCAU s12 | Dongxing District, Neijiang City (内江市东兴区) | a | a | a | a | I |
| SCAU s13 | Dongxing District, Neijiang City (内江市东兴区) | a | a | a | a | I |
| SCAU s14 | Daying County, Suining City (遂宁市大英县) | a | a | a | a | I |
| SCAU s15 | Daying County, Suining City (遂宁市大英县) | a | a | a | a | I |
| SCAU s16 | Daying County, Suining City (遂宁市大英县) | a | a | a | a | I |
| SCAU s4 | Daying County, Suining City (遂宁市大英县) | a | a | a | a | I |
| SCAU s18 | Linshui County, Guang'an City (广安市邻水县) | a | a | a | a | I |
| SCAU s19 | Linshui County, Guang'an City (广安市邻水县) | a | a | a | a | I |
| SCAU s7 | Linshui County, Guang'an City (广安市邻水县) | a | a | b | a | II |
| SCAU s2 | Xichong County, Nanchong City (南充市西充县) | a | a | c | a | III |
| SCAU s21 | Jialing District, Nanchong City (南充市嘉陵区) | a | a | c | a | III |
| SCAU s22 | Jialing District, Nanchong City (南充市嘉陵区) | a | a | c | a | III |
| SCAU s23 | Yanjiang District, Ziyang City (资阳市雁江区) | b | a | c | b | IV |
| SCAU s3 | Dongxing District, Neijiang City (内江市东兴区) | b | a | c | b | IV |
| SCAU s5 | Guangan District, Guang'an City (广安市广安区) | b | b | d | b | V |
| SCAU s26 | Linshui County, Guang'an City (广安市邻水县) | b | b | d | b | V |
| SCAU s27 | Guangan District, Guang'an City (广安市广安区) | b | b | d | b | V |
| SCAU s28 | Guangan District, Guang'an City (广安市广安区) | b | b | d | b | V |
| SCAU s29 | Guangan District, Guang'an City (广安市广安区) | b | b | d | b | V |

1.3 16S rDNA PCR-RFLP 分析

16S rDNA PCR 扩增引物为细菌通用引物 P1 和 P6^[11]。PCR 反应体系(50 μL): 2 × PCR Mix 25 μL, 引物 P1 和 P6 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 加超纯水补足至 50 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 30 次; 72℃ 最终延伸 10 min。

PCR 产物用 4 种限制性内切酶 *Hae* III、*Hinf* I、

Msp I 及 *Taq* I 在 37℃ (*Taq* I 为 65℃) 酶切 6-8 h。反应体系为 10 μL: 5 μL 16S rDNA PCR 产物, 5 U 酶, 1 μL 相应的 10 × 酶切缓冲液, 3.5 μL ddH₂O。酶切产物用含 EB 的 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳(80 V, 3 h), 使用凝胶成像系统拍照。对图谱分析后用 NTSYS 软件进行聚类, 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,采用 PCR 产物直接测序,由上海生工生物工程技术有限公司完成。将测得序列提交 GenBank 数据库,使用 Blast 软件进行在线比对,并从 GenBank 数据库中下载与待分析序列相近的已知模式菌株的 16S rDNA 序列。序列比对和系统发育的构建都采用 MEGA5 软件完成。序列比对采用 Clustal W,系统发育的构建采用邻接法 (Neighbor-joining method) 构建发育树,自展值 (Bootstrap) 为 1000,分支上树形可信度大于 50 的显示。

1.5 *glnII* 和 *nodC* 系统发育分析

PCR 扩增引物见参考文献 [12] 和 [13]。反应体系 (30 μ L) 为:2 \times PCR Mix 15 μ L; 正向引物和反向引物各 0.5 μ L; DNA 模板 1 μ L; ddH₂O 13 μ L。(1) *glnII* 扩增条件:92 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min。(2)

nodC 扩增条件: 92 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 53 $^{\circ}$ C 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 8 min。

PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。用 PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司直接测序。用 MEGA5 软件分别对测得的代表菌株 *glnII* 基因序列和 *nodC* 基因序列与相应的模式菌株序列进行比对, 比对后采用邻接法构建各个基因的系统发育树, Bootstrap 为 1000。

菌株间序列相似性的计算用 DNAMAN6.0 软件进行。

2 结果

2.1 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析

供试菌株及参比菌株在进行 16S rDNA PCR 扩

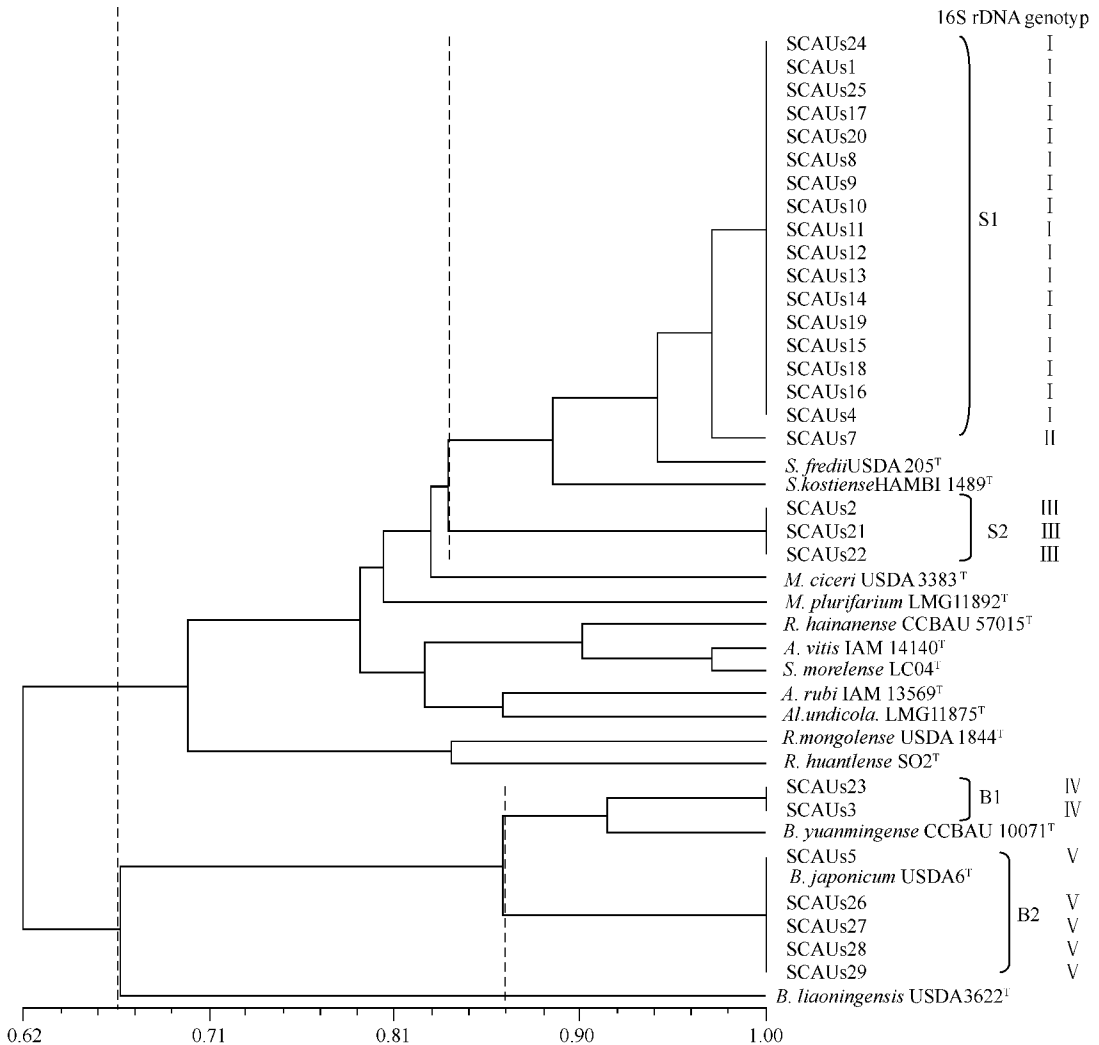


图 1. 16S rDNA PCR-RFLP 聚类结果

Figure 1. UPGMA dendrogram obtained from 16S rDNA. PCR-RFLP.

增后,均得到一条约 1.5 kb 的 DNA 片段。选择 4 种限制性内切酶 (*Hae* III、*Hinf* I、*Msp* I 及 *Taq* I) 对 PCR 产物进行酶切,分别得到 2、2、4、2 种限制性内切酶酶切图谱类型,这四种酶组合在一起,其中每一种组合称为一个 16S rDNA 遗传图谱类型,共得到 5 种 16S rDNA 遗传图谱类型,见表 1。

从图 1 可以看出,所有菌株在 66% 相似水平分为中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 和慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 两大类群。其中,21 个供试快生大豆根瘤菌,分属 3 个 16S 遗传图谱类型 (I-III),与 *Sinorhizobium* 属聚在一起,在 83% 的相似水平,*Sinorhizobium* 菌株聚为两个表观群 S1、S2。供试慢生大豆根瘤菌 7 株,分属两种 16S 遗传图谱类型 (V, VI),分别与参比菌株 *B. yuanmingense* CCBAU10071^T 和 *B. japonicum* USDA6^T 聚在一起,在约 87% 的相似水平构成两个表观群: B1 和 B2。可见,川中丘陵地区大豆根瘤菌为 *Sinorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 的菌株,*Sinorhizobium* 为优势菌群。

2.2 16S rDNA 序列分析

根据 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析结果,选择

6 个代表菌株进行 16S rDNA 序列测定和系统发育树构建。在 MEGA5 中将序列用 Clustal-W 比对后剪齐得到 1375bp 的序列构建的 16S rDNA 系统发育树见图 2。由图 2 可见,所有供试菌株在系统发育上分为 *Bradyrhizobium* 和 *Sinorhizobium* 两大分支。在 *Sinorhizobium* 分支内代表菌株 SCAUs2、SCAUs7、SCAUs4 和 SCAUs1 间的相似度 98.3% - 99.9%; SCAUs4、SCAUs2 和 SCAUs1 三个菌株的相似度最高,为 99.9%; SCAUs7 和 SCAUs1 间的相似度最小,为 98.3%。但这 4 个代表菌株均与 *S. americanum*、*S. fredii*、*S. xinjiangense* 的 3 个模式菌株聚在一起,4 个代表菌株均与 *S. americanum*、*S. fredii* 两个种 (因这两个模式菌株的 16S rDNA 序列相似度为 100%) 的模式菌株相似度最高,为 98.2% - 99.8% (表 2)。*Bradyrhizobium* 分支内 SCAUs3 与模式菌株 *B. liaoningense* USDA3622^T 和 *B. yuanmingense* CCBAU10071^T 均以 99.5% 相似性聚在一起形成姊妹分支; SCAUs5 与相似度最高的模式菌株 *B. diazoefficiens* USDA110^T 以 99.5% 的相似度聚在一起。

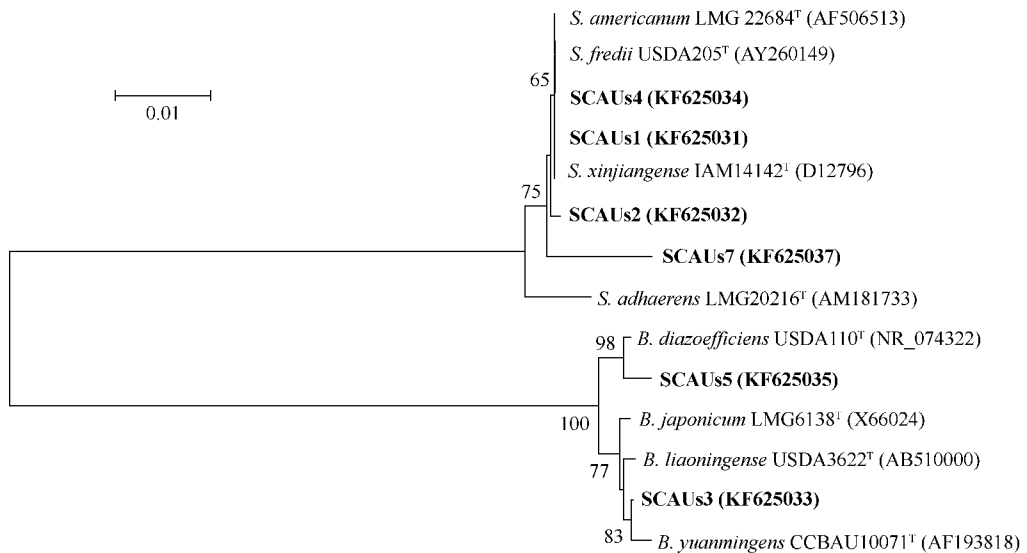


图 2. 代表菌株的 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of the representative isolates. The tree is bootstrapped with 1000 subreplicates and the confidence levels are indicated at the internodes. The scale bar represents 1% substitution per site. The sequence accession numbers are presented in parentheses.

2.3 glnII 基因序列的系统发育研究

谷氨酰胺合成酶 (GS) 是氮同化过程中的一个关键酶,具有功能保守性。GS 有 3 种类型: GSI、GSII 和 GSIII。GSI 分布于原核生物中,GSII 主要存在于真核

生物和少数细菌中 (包括根瘤菌), GSIII 和前两者差异较大,仅在少数细菌中发现^[14-15]。本研究对供试菌株的 *glnII* 基因部分序列进行了测序,获得约 600 bp 的序列长度,采用邻接法 (Neighbour-joining) 建了该

基因的系统发育树(图3)。从图3可知, SCAUs1、SCAU2、SCAU4、SCAU6、SCAU7 位于 *Sinorhizobium* 系统发育分支内和参比菌株 *S. fredii* USDA205^T 聚在一起, 相似性为 98.2% - 100%。

SCAU1、SCAU2 和 *S. fredii* USDA205^T *glnII* 序列的相似性 100%。SCAU3 与参比菌株 *B. yuanmingensis* CCBAU10071^T 相似性最高, 为 96.8%。SCAU5 与 *B. japonicum* USDA6^T 形成一个分支, 相似性为 97.6%。

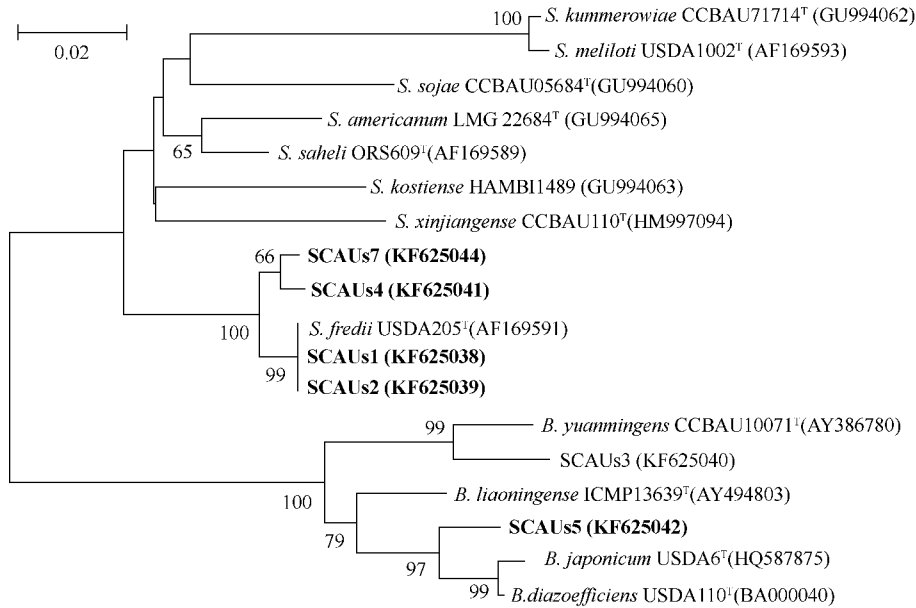


图3. 以 *glnII* 基因序列构建的根瘤菌系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of the isolates and the reference strains based on the sequences of *glnII* genes. The tree is bootstrapped with 1000 subreplicates and the confidence levels are indicated at the internodes. The scale bar represents 2% substitutions per site. The sequence accession numbers are presented in parentheses.

2.4 *nodC* 基因序列的系统发育研究

本研究对供试菌株的 *nodC* 基因进行了测序, 测序长度均大于 900 bp, 采用邻接法构建系统发育树

见图4。 *Sinorhizobium* 的4个代表菌株 SCAUs7、SCAU4、SCAU2、SCAU1, 菌株间的 16S rDNA 序列、*glnII* 序列均有差异(除 SCAUs2 和 SCAUs1 的

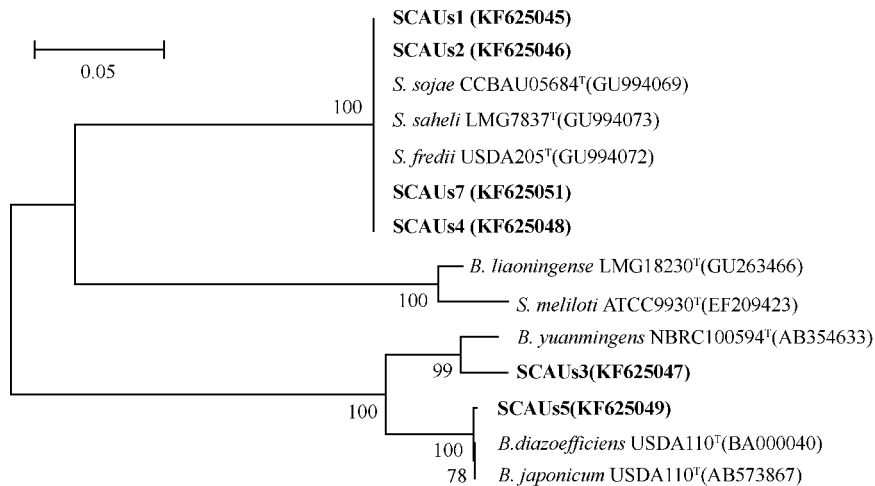


图4. 以 *nodC* 基因序列构建的根瘤菌系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree of the isolates and the reference strains based on the sequences of *nodC* genes. The tree is bootstrapped with 1000 subreplicates and the confidence levels are indicated at the internodes. The scale bar represents 5% substitutions per site. The sequence accession numbers are presented in parentheses.

glnII 基因外), 但其 *nodC* 基因序列完全相同, 与 *S. fredii*、*S. sojae* 和 *S. saheli* 的模式菌株亲缘关系最近, 相似性均达到 100%。SCAU5 与 *B. japonicum* 和 *B. diazoefficiens* 的模式菌株的相似性最高, 为

99.8%, 这两个模式菌株的 *nodC* 序列相似性 100%。SCAU3 和最高相似度的模式菌株 *B. yuanmingensis* CCBAU10071^T 构成一个亚分支, 相似性为 96.8%。

表 2. 代表菌株与其基因序列相似度最高的模式菌株的同源性

Table 2. Phylogenetic affiliation of the representative rhizobia and the closest type strains

| strains | 16S rRNA (1375bp) | <i>glnII</i> (505bp) | <i>nodC</i> (584bp) |
|---------|---|--|--|
| SCAU51 | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (99.6%) ^a | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (100%) | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (100%) |
| | <i>S. americanum</i> LMG 22684 ^T (99.6%) | | <i>S. saheli</i> LMG7837 ^T (100%) <i>S. sojae</i> CCBAU05684 ^T (100%) |
| SCAU52 | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (99.8%) | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (100%) | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (100%) |
| | <i>S. americanum</i> LMG 22684 ^T (99.8%) | | <i>S. saheli</i> LMG7837 ^T (100%) <i>S. sojae</i> CCBAU05684 ^T (100%) |
| SCAU54 | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (99.6%) | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (98.8%) | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (100%) |
| | <i>S. americanum</i> LMG 22684 ^T (99.6%) | | <i>S. saheli</i> LMG7837 ^T (100%) <i>S. sojae</i> CCBAU05684 ^T (100%) |
| SCAU57 | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (98.2%) | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (98.2%) | <i>S. fredii</i> USDA205 ^T (100%) |
| | <i>S. americanum</i> LMG 22684 ^T (98.2%) | | <i>S. saheli</i> LMG7837 ^T (100%) <i>S. sojae</i> CCBAU05684 ^T (100%) |
| SCAU55 | <i>B. diazoefficiens</i> USDA110 ^T (99.5%) | <i>B. japonicum</i> USDA6 ^T (97.6%) | <i>B. japonicum</i> USDA6 ^T (99.8%) |
| | <i>B. yuanmingensis</i> CCBAU10071 ^T (99.5%) <i>B. liaoningense</i> USDA3622 ^T (99.5%) | | <i>B. diazoefficiens</i> USDA110 ^T (99.8%) <i>B. yuanmingensis</i> CCBAU10071 ^T (96.7%) |

^a The percentages are sequence similarities to the closely related species or the closest type strain

3 讨论

本研究通过 16S rDNA PCR-RFLP 和 3 种基因序列分析对川中丘陵地区的 28 株大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育的研究结果表明, 该地区大豆根瘤菌为 *Sinorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 菌株; 75% 的菌株属 *Sinorhizobium*, 以 *S. fredii* 为优势种; 25% 的 *Bradyrhizobium* 菌株, 分别与 *B. yuanmingense* CCBAU10071^T、*B. diazoefficiens* USDA110^T 相似度最高; 未发现 *Mesorhizobium*、*Rhizobium* 菌株。

据报道, 黄土高原地区大豆根瘤菌以 *S. fredii* 为优势种, 慢生大豆根瘤菌仅占 10%^[6]。华北平原大豆根瘤有 2 属 *Bradyrhizobium* 和 *Sinorhizobium*, *S. fredii* 占 68%, 还发现可能有 4 个新种^[7]。河北省大豆根瘤菌属于 *Rhizobium* 菌株不到 0.5%, 约 64% 菌株属 *Sinorhizobium*, 其中 *S. fredii* 占 41%; 约 36% 的菌株属 *Bradyrhizobium*, 其中 35% 的菌株属 *B. japonicum*、15% 的菌株属 *B. yuanmingense*、7% 的菌株属 *B. elkanii* 菌株^[8]。新疆盐碱地的大豆根瘤菌也以 *Bradyrhizobium* 和 *Sinorhizobium* 为主, 均占 47.3%, 仅 5.4% 为 *Rhizobium*; 且 *B. liaoningense* 和 *S. fredii* 为优势种, 仅约有 1% *B. yuanmingense* 菌

株^[9]。陈文新院士课题组对中国大豆根瘤菌的遗传多样性研究认为, *B. japonicum* 在中国的分布最广, 其次是 *S. fredii*, *B. elkanii* 在我国热带和亚热带地区分布较广, 仅在新疆发现两株 *Mesorhizobium* 的大豆根瘤菌, 还发现一些分类地位不确定的 *Rhizobium* 菌株^[5]。本研究发现约 7%、18% 的川中丘陵区的大豆根瘤菌分别是 *B. yuanmingense*、*B. diazoefficiens* 菌株。USDA 110 被广泛应用, 它与 *B. japonicum* 的模式株 USDA6^T 不相似, 不应属于同一个种, 因此, 它的分类地位一直未确定, 直至今年 Delamuta 等将 USDA 110 及相关菌株进行了分类学研究, 确定 USDA 110 为新种, 并命名为 *B. diazoefficiens*^[13], 但这两个种的模式菌株 *nodC* 序列相似性为 100%。从表 2 知, 代表菌株 SCAU55 的 16S 序列与 *B. diazoefficiens* USDA 110^T 相似性最高 (99.5%), 与 *B. japonicum*、*B. liaoningense* 模式菌的相似性分别为 98.9%、99.0%。因此, 川中丘陵区的 *B. diazoefficiens* 大豆根瘤菌与上述文献报道的 *B. japonicum* 不同, SCAU55 的 16S 序列最相似的模式菌株为 *B. liaoningense*, 而不是 *B. japonicum*。

代表菌株 3 个基因的序列相似性分析的结果具有较好的一致性, 综合 3 个基因序列分析 (表 3) 发现, 属于 *Sinorhizobium* 属的 4 个代表菌株 SCAU51、

SCAU_s2、SCAU_s4 和 SCAU_s7 均与 *S. fredii* 的相似性最高,为 *S. fredii* 菌株。从图 2、图 3、图 4 及表 2 可知,但 *S. fredii* 种内不同菌株间的系统发育关系有所差异,如 SCAU_s1、SCAU_s2、SCAU_s4 和 SCAU_s7 的 16S rDNA 序列相似度为 98.2% - 99.9%,其中 SCAU_s4、SCAU_s2 和 SCAU_s1 三个菌间的相似度最高(99.9%);但 *glnII* 序列的相似度,SCAU_s1 与 SCAU_s2 为 100%、SCAU_s1 与 SCAU_s4 为 98.8%;而这 4 个代表菌株的 *nodC* 序列相似度 100%,说明在这一生态环境中,优势种 *S. fredii* 菌株间的共生基因水平转移现象普遍。*Bradyrhizobium* 属的菌株 SCAU_s5 在持家基因 *glnII* 和共生基因 *nodC* 基因的系统发育中均与 *B. diazoefficiens* 和 *B. japonicum* 模式菌形成姊妹分支,*glnII* 基因序列与 *B. japonicum* USDA6^T 的相似性最高,而在从 16S rRNA 基因系统发育中与 *B. diazoefficiens* USDA110^T 聚在一起,且分支距离较短,自检值高(98),说明该菌株存在持家基因水平转移现象。同时,图 2、图 3、图 4 及表 2 也表明,研究区的大豆根瘤菌在属种水平上是以垂直进化为主。

本研究区以 *S. fredii* 为优势种群(21 株),慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium* 较少(7 株),且慢生根瘤菌中的多数(5 株)分离自广安市。川中丘陵地区大豆根瘤菌的这种分布可能与其地理分布有关,采样地区除了广安市以中性紫色土为主外,其余 4 个市区以石灰性紫色土为主,pH 相对较高,因此快生根瘤菌明显多于慢生根瘤菌。本研究结果与 Han 等^[9] 的结果较一致,即在较高 pH 条件下,大豆根瘤菌以 *S. fredii* 菌株为主。同时,四川大豆种植主要以农户的自留种即地方品种为主,而四川大豆的地方品种多^[2],但川中丘陵区大豆根瘤菌以 *S. fredii* 为优势种,还有少数菌株为 *B. yuanmingense*、*B. diazoefficiens*。可见,大豆品种对川中丘陵区大豆根瘤菌的分类地位影响不大,这可能是因为四川春大豆品种的多样性指数较小、夏大豆的多样性指数也较小有关^[2]。本研究不仅揭示了川中丘陵区大豆根瘤菌的多样性,而且还为已成为四川省主要粮食作物之一的大豆的规模化、大面积连片种植^[4]中,高效共生菌株的筛选奠定了良好的基础。

参考文献

[1] 四川省农牧厅,四川省土壤普查办公室. 四川土壤. 四川: 四川科学技术出版社, 1997.

[2] Zhou XA, Peng YH, Wang GX, Chang RZ. Preliminary studies on the centres of genetic diversity and origination of cultivated soybeans in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 1998, 31(3): 37-43. (in Chinese)

周新安, 彭玉华, 王国勋, 常汝镇. 中国栽培大豆遗传多样性和起源中心初探. 中国农业科学, 1998, 31(3): 37-43.

[3] Zhang MR, Wu HY, Wu X, Li H, He SM, Tang ZR, Xiang RG, Wang Z. Development status, problems and countermeasures of the major producing areas of soybean in Sichuan. *Soybean Science & Technology*, 2009, 5: 6-7. (in Chinese)

张明荣, 吴海英, 吴迅, 李华, 贺声明, 唐自然, 向荣光, 王志. 四川大豆主产区产业现状、存在的问题及发展对策. 大豆科技, 2009, 5: 6-7.

[4] Zhang MR, Wu HY, Liang JQ, He ZM, Wang R. Current situation and future development of soybean production in Sichuan during 2011. *Soybean Science & Technology*, 2012, 4: 44-47. (in Chinese)

张明荣, 吴海英, 梁建秋, 何泽明, 王荣. 2011 年度四川大豆生产情况调研及发展对策. 大豆科技, 2012, 4: 44-47.

[5] 陈文新, 汪恩涛. 中国根瘤菌. 北京: 科学出版社, 2011.

[6] Zhang H, Feng R, Li J, Guan D, Cao F. Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the regions of Loess Plateau in China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(11): 1466-1473. (in Chinese)

张红侠, 冯瑞华, 李俊, 关大伟, 曹凤明. 黄土高原地区大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育. 微生物学报, 2010, 50(11): 1466-1473.

[7] 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.

[8] 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.

[9] Han LL, Wang ET, Han TX, Liu J, Sui XH, Chen WF, Chen WX. Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the saline-alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant Soil*, 2009, 324: 291-305.

[10] Adhikari D, Kaneto M, Itoh K, Suyama K, B. Pokharel B, K. Gaihre Y. Genetic diversity of soybean-nodulating rhizobia in Nepal in relation to climate and soil properties. *Plant Soil*, 2012, 357: 131-145.

[11] 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

- [12] Vinuesa P, Silva C, Werner D, Martínez-Romero E. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 34: 29-54.
- [13] Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E, Hungria M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, ijs.0.049130-0.
- [14] Wang F, Zhang Y, Liu J, Song A, Liu Q, Chen W. Comparison of phylogeny analysis methods for rhizobia asolated from *Albizia* spp. and *Leucaena leucocephala*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (1): 1-7. (in Chinese)
王风芹, 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, 2008, 48 (1): 1-7.
- [15] Gao J, Sun J, Chen W. Genetic diversity of glutamine synthetase of rhizobia isolated from *Astragalus Adsurgens*. *Biotechnology Bulletin*, 2007, 1: 124-127. (in Chinese)
高俊莲, 孙建光, 陈文新. 斜茎黄芪根瘤菌谷氨酰胺合成酶基因多样性研究. 生物技术通报, 2007, 1: 124-127.

Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the Hilly Area of Central Sichuan in China

Feng Xiong, Yuanxue Chen, Silan Zhang, Fang You, Huan Zhou, Kaiwei Xu*

Faculty of Resource and Environmental, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] We investigated the genetic diversity and phylogeny of 28 rhizobial isolates from root nodules of soybean growing in the Hilly Area of Central Sichuan in China. [Methods] We used 16S rDNA PCR-RFLP and phylogenetic analyses of the 16S rDNA, *glnII* and symbiotic genes (*nodC*). [Results] Five 16S rDNA genotypes among the isolates were distinguished with restriction endonucleases *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I and *Taq* I. In the 16S rDNA PCR-RFLP analysis, all the isolates are divided into *Bradyrhizobium* group and *Sinorhizobium* group at the 83% level, and *Sinorhizobium* strains accounted for 75% of the isolates. The phylogenetic analyses of 16S rDNA, *glnII* and *nodC* show that 4 representative strains SCAUs1, SCAUs2, SCAUs7 and SCAUs4 were closely related to *S. fredii* USDA205^T while the other 2 representative strains SCAUs3 and SCAUs5 were closely related to *B. yuanmingense* CCBAU10071^T and *B. diazoefficiens* USDA110^T. The 16S rDNA, *glnII* and *nodC* sequence similarity of 4 *Sinorhizobium* representative strains were 98.3% - 99.9%, 98.2% - 100% and 100%, respectively. [Conclusion] Soybean rhizobia isolated from the Hilly Area of Central Sichuan in China has rich genetic diversity, *S. fredii* was the predominant genus.

Keywords: Soybean rhizobia, PCR-RFLP, 16S rDNA, *glnII*, *nodC*, genetic diversity

(本文责编: 张晓丽)