

黑木相思根瘤菌的系统发育分析及其结瘤效果研究

朱亚杰 陆俊锬 康丽华* 王胜坤 江业根

(中国林业科学研究院 热带林业研究所 广东 广州 510520)

摘要:【目的】针对采集自福建、广东的 34 株黑木相思根瘤菌进行分类研究,进一步确定其分类地位,丰富我国黑木相思根瘤菌种质资源。【方法】对选取的 34 株菌株测定了 16S rRNA 基因、持家基因 *atpD* 和 *glnII* 序列,以 14 株菌为代表菌株分析其系统发育情况。而且选取了部分菌株进行结瘤实验。【结果】16S rRNA 基因以及持家基因 *atpD* 和 *glnII* 的系统发育分析结果与 16S rRNA PCR-RFLP 分型结果基本一致,14 株代表菌株被分为 10 个不同的类群,其中有 2 个群组属于中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*),其余群组属于慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)。结瘤试验证明,相关的供试根瘤菌能与黑木相思、银合欢、南洋楹和网脉相思结瘤共生,显示出较广的宿主范围,且对黑木相思和银合欢的促生效果较明显。【结论】研究发现黑木相思根瘤菌具有丰富的遗传多样性和共生多样性。

关键词: 黑木相思, 根瘤菌, 16S rRNA 基因, *atpD*, *glnII*, 结瘤

Phylogenetic analysis of rhizobia nodulating with *Acacia melanoxylon* R. Br. and their nodulation effect on several woody legume plants

ZHU Ya-Jie LU Jun-Kun KANG Li-Hua* WANG Sheng-Kun JIANG Ye-Gen

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

Abstract: [Objective] Thirty four strains isolated from the root nodules of *Acacia melanoxylon* R. Br. in Fujian and Guangdong were studied about the taxonomic position in order to abundant germplasm resources of rhizobia. [Methods] 16S rRNA genes and housekeeping genes (*atpD* and *glnII*) of all 34 strains were sequenced, 14 type strains of which were used to perform phylogenetic analysis. Furthermore, some representative strains were chosen to perform nodule experiment. [Results] The results of phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and housekeeping genes (*atpD* and *glnII*) were mostly in agreement with which of 16S rRNA PCR-RFLP. And 14 type strains were divided into 10 groups, 2 of which belonged to *Mesorhizobium* and the others were *Bradyrhizobium*. In addition, nodule experiment suggested that the tested strains have a large rang of hosts because they could nodulate with *A. melanoxylon*, *Leucaena leucocephala*, *Albizia falcataria* and *Acacia aneura*.

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费项目(No. 201004075); 热带林业研究所基本科研业务费专项资金项目(No. RITFYWZX201207)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-20-87029270; 信箱: klh587@126.com

收稿日期: 2015-01-27; 接受日期: 2015-04-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-24

Moreover, the growth promoting effect of these stains was significant when inoculated on *A. melanoxylon* and *L. Leucocephala*. **[Conclusion]** This study illustrated genetic and symbiotic diversity of rhizobia isolated from the root of *A. melanoxylon*.

Keywords: *Acacia melanoxylon*, Rhizobia, 16S rRNA genes, *atpD*, *glnII*, Nodulation

全球的豆科植物种类繁多, 约 750 属, 20 000 种, 主要包括云实亚科(Caesalpinioideae)、蝶形花亚科(Papilionoideae)和含羞草亚科(Mimosoideae)^[1]。多数豆科植物能与根瘤菌形成结瘤共生体, 产生固氮作用, 为宿主植物提供充足的氮源。以往关于根瘤菌的研究主要针对蝶形花亚科中的农作物和牧草, 如花生(*Arachis hypogaea* Linn.)^[2]、大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]^[3]、毛苕蓿(*Medicago edgeworthii* Sirj.)^[4]等。近年关于木本豆科植物根瘤菌研究逐渐增多^[5]; 徐开未等^[6]研究了四川攀枝花的银合欢(*Leucaena leucocephala*)根瘤菌遗传多样性; Zhou 等^[7]发现了刺槐中慢生根瘤菌新种(*Mesorhizobium robiniae*); 还有针对马占相思(*Acacia mangium*)^[8]、厚荚相思(*Acacia crassicapa*)、卷荚相思(*Acacia cincinnata*)^[9]和台湾相思(*Acacia confusa*)^[10]等南方速生树种根瘤菌的遗传多样性研究。

黑木相思(*Acacia melanoxylon* R. Br.)是原产于澳大利亚的高大乔木, 属于含羞草亚科(Mimosaceae)金合欢属(*Acacia*)^[11-12]。它不仅是材质优良的家具材

料, 而且对寒冷、干旱、贫瘠等恶劣条件有较强的抗逆性, 还能与根瘤菌形成固氮共生体, 改良土壤^[13-14], 具有很高的经济价值和社会生态效益。目前, 黑木相思在我国福建南部、广西南部、广东和海南等地大面积种植^[15]。但是关于黑木相思根瘤菌的研究较少, 本课题组^[16]在 2012 年采用 16S rRNA PCR-RFLP 方法将分离自广东、江西、福建等 15 个地点的 174 株根瘤菌分为了 9 个 16S rRNA PCR-RFLP 类型。为了进一步确定这些根瘤菌的分类地位以及验证新种群的存在, 丰富黑木相思根瘤菌的种质资源, 本研究选取了 34 株供试菌株, 测定了其 16S rRNA 基因以及持家基因(*atpD* 和 *glnII*)序列, 并对部分菌株侵染不同宿主的结瘤效果进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 选取了分离自福建省永安市、漳州市, 广东省增城市、梅县和惠州市等 5 个地区的 34 株菌, 见表 1。

表 1 供试菌株及其来源

Table 1 The tested stains and their origins

供试菌株 Tested strains (RITF-)	宿主 Host	采样地点 Locations of collection	16S rRNA PCR-RFLP 类型 16S rRNA PCR-RFLP type
522	<i>Acacia melanoxylon</i> Tree VS04	Mei County, Guangdong Province	D ^[16]
651, 661, 671, 681	<i>Acacia melanoxylon</i> Tree VX02		
1102, 1109, 1118, 1112, 1115	<i>Acacia melanoxylon</i>	Zhongxi forest farm in Zhangzhou City, Fujian Province	
1323, 1328, 1324, 1432, 1431	<i>Acacia melanoxylon</i> Tree YL01	Nursery in Zengcheng City, Guangdong Province	
1551, 1552, 1554, 1556, 1542	<i>Acacia melanoxylon</i> Tree YL03	Yong'an City, Fujian Province	
1657, 1658, 1656, 1653, 1654, 1623, 1612, 1624, 1632	<i>Acacia melanoxylon</i> Tree YL04		
742, 721	<i>Acacia melanoxylon</i> Tree KZ01	Huizhou City, Guangdong Province	B ^[16]
1214, 1215, 1217	<i>Acacia melanoxylon</i>	Nursery in Zengcheng City, Guangdong Province	

1.1.2 仪器: PCR 扩增仪(GeneAmp® PCR System 9700), Applied Biosystems 公司; DYY-60 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; ZF-258 全自动凝胶成像分析系统, 上海嘉鹏科技有限公司。

1.1.3 试剂: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; PCR 扩增试剂、引物合成及序列测定, 上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 培养基和根瘤菌纯化

根瘤菌采用的 YMA 培养基, 纯化和保存方法均参照文献[16]。

1.3 DNA 提取

供试菌株总 DNA 用 TIAN GEN 的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取。电泳仪检测 DNA 的浓度和纯度。符合要求后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 DNA 溶液。

1.4 16S rRNA 基因、持家基因(*atpD* 和 *glnII*) 扩增反应及系统发育分析

16S rRNA PCR 引物采用通用引物(27F 和 1492R)^[17]。反应体系和反应条件参照文献[16,18]。

持家基因 *atpD* 和 *glnII* 的 PCR 扩增引物^[19]、反应体系及反应条件见表 2。两个持家基因的扩增长度分别为 528 bp 和 678 bp。

基因 PCR 扩增产物检测合格后, 由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 程序在线比对, 下载与待分析序列相近的已知菌株序列, 然后用 MEGA 5.2 软件构建系统发育树, Bootstrap 为 1 000。

1.5 回接和交叉结瘤试验

用半封闭试管法^[20]进行回接和交叉结瘤试验。

回接苗木采用黑木相思组培苗; 交叉结瘤采用的豆科树种为银合欢、南洋楹和网脉相思。苗木生长基质为 1×10^5 Pa 灭菌 45 min 的蛭石: 珍珠岩混合物(1:1, 体积比)。参照文献[21]浓硫酸处理种子。

每株试验苗木接种菌液为 5 mL。接种和未接种的苗木培养在中国林业科学研究院热带林业研究所的温室中, 培育周期为 3 个月。收获后, 观察苗木结瘤情况, 并测定植株的结瘤数和生物量。采用 SPSS 18.0 的多重比较法对数据进行差异显著性分析, 所有数据均为平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因序列系统发育树构建

根据测定的 34 株根瘤菌的 16S rRNA 基因序列和 16S rRNA-RFLP 结果, 本研究仅选取其中 14 株菌株为代表菌株用 MEGA 5.2 软件的邻接法(Neighbor-Joining method)模型构建系统发育树, 如图 1 所示。

从系统发育树中我们发现, 供试菌株 RITF661、RITF1556、RITF1658、RITF1432、RITF1542 等具有相同的 16S rRNA 基因序列, 与参比菌株 *Bradyrhizobium ganzhouense* RITF806^T 的相似性最高, 为 100%。供试菌株 RITF1109、RITF1115、RITF1217、RITF1328 和 RITF1623 彼此间的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%, 并与参比菌株 *B. ganzhouense* RITF806^T 和 *Bradyrhizobium rifense* CTAW71^T 分别有 99.9%和 99.8%的序列相似性。菌株 RITF522 和 RITF1632 与参比菌株 *B. ganzhouense*

表 2 持家基因引物、反应体系及反应条件
Table 2 The primers of the housekeeping genes, reaction system of PCR and PCR procedures

目的基因 Target genes	引物 Primers (5'→3')	PCR 反应体系 Reaction system of PCR (50 μ L)	PCR 程序 PCR procedure
<i>atpD</i>	<i>atpD</i> 225F	2 \times PCR master mix 25 μ L; Primer F (10 μ mol/L) 1.5 μ L; Primer R (10 μ mol/L) 1.5 μ L; DNA template 1 μ L; ddH ₂ O 21 μ L	95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycles; 72 $^{\circ}$ C 10 min
	<i>atpD</i> 782R		
<i>glnII</i>	<i>glnII</i> 12F		
	<i>glnII</i> 689R		

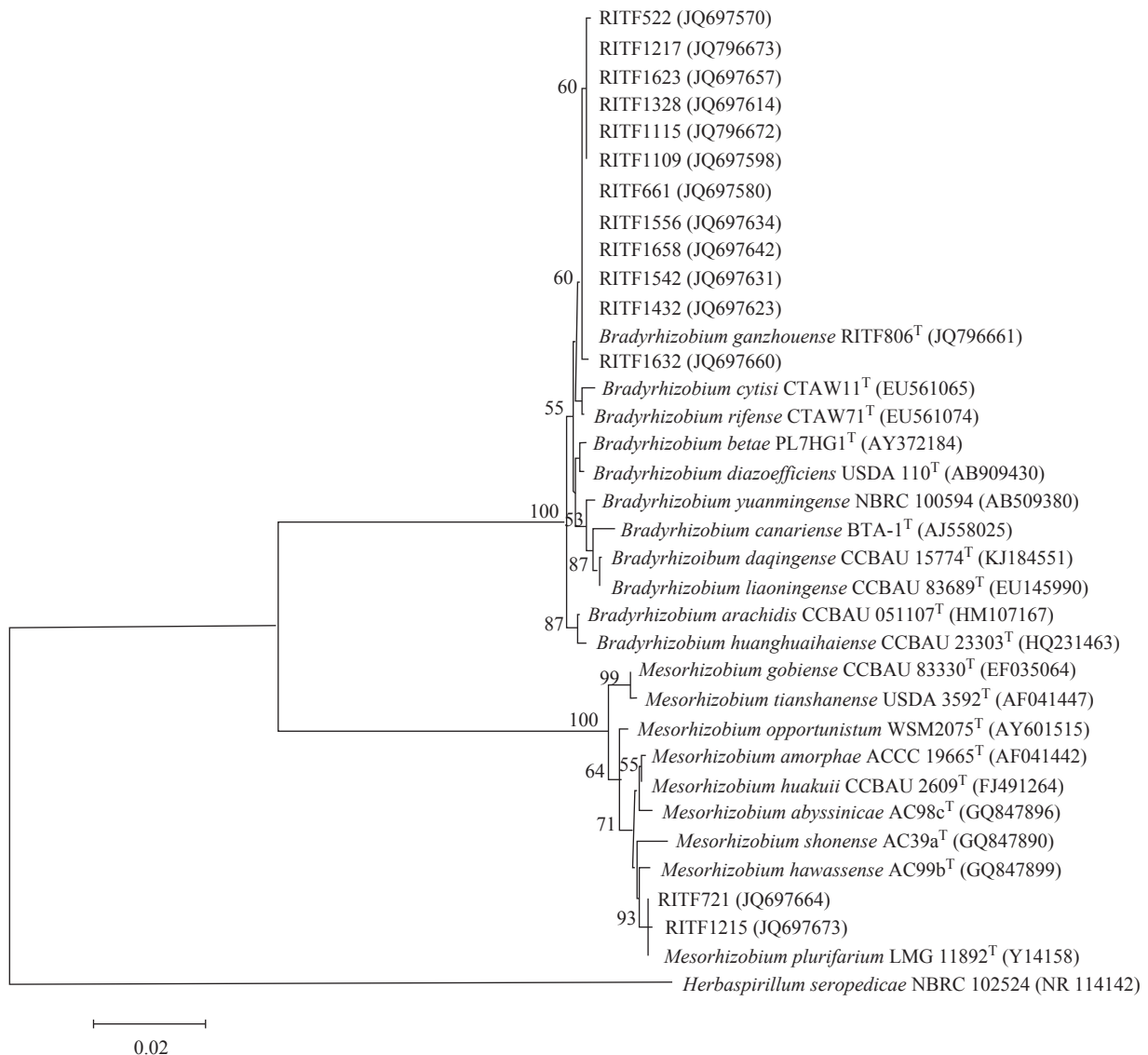


图 1 供试菌株 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of the tested strains

注: 括号内为 GenBank 登录号; 自展值为 1 000; 可信度 > 50% 的显示在分支上; 比例尺代表碱基替换数。

Note: GenBank accession numbers are shown in the parentheses. Bootstrap was 1 000. Bootstrap confidence levels greater than 50% are indicated at the inter nodes. The scale bar indicates 2% represents nucleotide substitutions per site.

RITF806^T 的相似性为 99.8%。这些数据说明上述这些供试菌株在属分类上应属于慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)。

供试菌株 RITF721 和 RITF1215 之间的 16S rRNA 基因序列相似性为 99.9%，且与 *Mesorhizobium plurifarium* LMG 11892^T 的相似性最高，它们应属于中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)。

综上所述，在属分类水平上，供试菌株的 16S rRNA 基因系统发育分析的结果，与之前的 16S rRNA PCR-RFLP 聚类结果基本一致，但仍有部分差异，如菌株 RITF1217 的 16S rRNA PCR-RFLP 分型为 B 类，但是 16S rRNA 分类则属于慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)。

2.2 持家基因(*atpD* 和 *glnII*)部分序列建树分析

对代表菌株的持家基因(*atpD* 和 *glnII*)序列构建单基因系统发育树,发现菌株在属水平上分类与16S rRNA 基因和16S rRNA-RFLP 结果基本一致,但是单基因之间的系统发育结果在种水平差异较大。所以,本研究采用最大似然数法(Maximum likelihood method)对 *atpD* 和 *glnII* 的串联序列进行系统发育分析,如图2所示。

结果表明,代表菌株主要可以分为10个不同新类群,属于慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)的有8个群组:群1为菌株 RITF661,与参比菌株 *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107^T的相似性均为94.9%。群2包括菌株 RITF1109 和 RITF1115,它们具有相同的持家基因序列;群3有菌株 RITF1328 和 RITF1623,二者之间的序列相似性为100%;且群2和群3都与参比菌株 *Bradyrhizobium diazoefficiens* 的相似性最高,为95.0%。群4包括菌株 RITF1556 和 RITF1658,两株菌的持家基因序列基本一致,与参比菌株 *B. rifense* CTAW71^T的相似性是95.9%。菌株 RITF 522、RITF 1542、RITF1632 分别代表群5、群6、群7,与参比菌株 *B. rifense* CTAW71^T的相似性分别为94.9%、97.0%和96.2%。而菌株 RITF1432 与参比菌株 *B. ganzhouense* RITF 806^T的相似性均为96.5%,为群8。属于中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)的可分为2个群组,分别是群9(菌株 RITF1217 和 RITF721)和群10(菌株 RITF1215);其中群9持家基因序列相似性最近的参比菌株为 *Mesorhizobium shonense* AC39a^T(94.4%–94.5%的序列相似性),群10则与 *Mesorhizobium hawassense* AC99b^T具有较高的序列相似性(94.8%)。

通过比较分析可知,与16S rRNA PCR-RFLP 聚类分析和16S rRNA 基因系统发育分析相比,持家基因系统发育分析更为精确细致,可以把相似性很近的种群区分开。如16S rRNA 基因系统发育菌株中 RITF661 与 *B. ganzhouense* RITF806^T的相似性

为100%,但是在持家基因系统发育树中与 *B. ganzhouense* RITF806^T的相似性为94.0%。

但是这些新类群与亲缘关系最近的代表菌株之间的相似性均在95%左右。因此,目前无法断定这些菌株是否是新种,想要确定则还需要进一步进行DNA-DNA 杂交、脂肪酸分析和生理生化等多种分析。

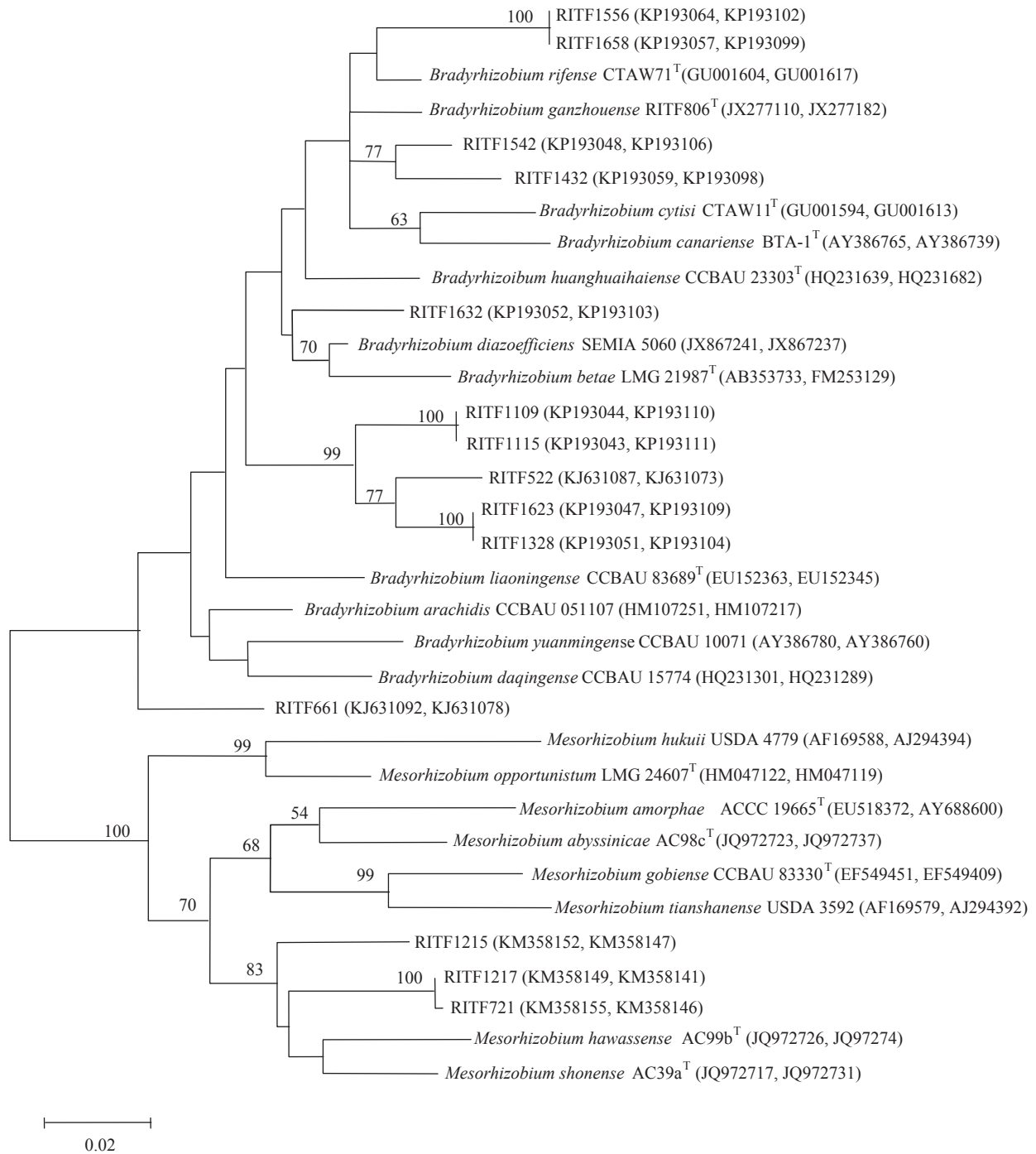
2.3 根瘤菌回接和交叉结瘤分析

根据上述的结果,选取了部分代表菌株进行结瘤试验,并测定结瘤数和生物量。从表3中可以看出,供试的根瘤菌都能与黑木相思、银合欢、南洋楹和网脉相思形成有效的根瘤,但是与原宿主黑木相思形成的结瘤数相对较多。从生物量来说,菌株接种后对黑木相思和银合欢生物量增加较显著;对南洋楹和网脉相思接种后的影响没有显著变化。菌株 RITF522 对黑木相思和银合欢的促进效果最显著,生物量比不接种处理分别增加了110.1%和59.8%。菌株 RITF1115 促使南洋楹的生物量比不接种处理增加了26.3%,显著高于其他菌株的处理效果。而菌株 RITF1658 对网脉相思生物量的促进效果较好,比不接种处理增加了118.0%。

3 结论

据以往研究发现,16S rRNA 基因比较保守,系统发育显示出的离散性较小,一般只能用于属水平的区分;而持家基因与其相比具有更高的序列分歧,同时又具有作为进化信号的相对保守性,因此持家基因的多序列位点分析(MLSA)常被用于更精确的种群分析^[22]。而 *atpD* 和 *glnII* 是根瘤菌的功能性保守基因,可作为根瘤菌种群分类的分子信号^[23]。因此,本研究在之前16S rRNA PCR-RFLP 研究的基础上,采用16S rRNA 基因和持家基因(*atpD* 和 *glnII*)系统发育分析对其中部分根瘤菌进行了分类研究,再次证明了黑木相思根瘤菌具有丰富的遗传多样性。

前人研究表明在种水平上相思树种根瘤菌主

图 2 *atpD* 和 *glnII* 基因串联系统发育树**Figure 2 Phylogenetic tree of the isolates based on the partial sequences of *atpD* and *glnII* genes**

注: 括号内为 GenBank 登录号; 自展值为 1 000; 可信度>50%的显示在分支上; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数。

Note: GenBank accession numbers are shown in the parentheses. Bootstrap was 1 000. Bootstrap confidence levels greater than 50% are indicated at the inter nodes. The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position.

表3 不同供试菌株侵染对黑木相思、银合欢、南洋楹和网脉相思的结瘤数和生物量的影响
Table 3 Nodule number and biomass of *A. melanoxylon*, *L. leucocephala*, *A. falcataria* and *A. aneura* inoculated by tested strains

侵染菌株 Inoculated strains	<i>A. melanoxylon</i>		<i>L. leucocephala</i>		<i>A. falcataria</i>		<i>A. aneura</i>	
	结瘤数量 Number of nodules	生物量 Biomass (mg/plant)	结瘤数量 Number of nodules	生物量 Biomass (mg/plant)	结瘤数量 Number of nodules	生物量 Biomass (mg/plant)	结瘤数量 Number of nodules	生物量 Biomass (mg/plant)
CK	0±0 D	22±6 C	0±0 D	105±24 B	0±0 C	53±13 A	0±0 C	40±9 AB
522	11±4 AB	47±11 A	3±3 ABC	168±35 A	4±3 A	56±11 A	3±3 AB	38±11 AB
661	11±6 A	36±14 ABC	2±1 BCD	157±29 A	3±2 AB	58±12 A	2±2 ABC	42±12 AB
721	12±6 A	30±9 ABC	2±2 BCD	144±18 A	2±3 ABC	60±17 A	3±2 AB	46±9 AB
1115	11±5 AB	40±12 AB	1±2 CD	159±29 A	3±2 AB	67±11 A	1±1 BC	49±14 AB
1328	6±3 BC	36±16 ABC	4±3 AB	162±20 A	3±3 AB	52±12 A	3±2 AB	49±14 AB
1432	1±2 CD	23±6 C	1±1 BCD	134±30 AB	1±1 BC	59±9 A	4±1 A	52±9 AB
1556	6±4 BC	29±17 BC	6±3 A	140±37 AB	2±2 ABC	63±13 A	2±1 ABC	32±10 B
1623	5±2 CD	45±14 AB	1±1 CD	165±20 A	4±3 AB	65±10 A	3±2 AB	48±10 AB
1658	12±4 A	46±11 AB	4±2 AB	138±31 AB	3±2 AB	59±9 A	2±1 AB	88±125 A

注：同列中不同字母间差异显著 $P < 0.01$ 。

Note: The significant difference among different letters in the same column was 0.01.

要有 *Bradyrhizobium yuanmingense*、*Bradyrhizobium liaoningense*^[24]、*B. ganzhouense*、*Rhizobium mulithospitium*^[25]、*Sinorhizobium arboris* 和 *S. kostiense*^[26]等。但本研究发现选取的根瘤菌与其中的慢生根瘤菌持家基因序列相似性大部分都低于95%，供试菌株有可能代表了不同的种群，这也丰富了相思属根瘤菌的种质资源，为今后的菌肥制作提供了优良的菌株资源。

本研究发现黑木相思根瘤菌同一类群可以分布于不同的采样点，如群3在广东省增城市苗圃和福建省永安市都有分布。而同一采样点也可能分布不同类群的根瘤菌，如广东省梅县有群1和群5两种类群，福建省永安市有群3、群4和群7三种类群。这说明地域性也会影响根瘤菌的遗传多样性。陈文新等^[27]对大量豆科植物根瘤菌进行分类研究，包括大豆、菜豆(*Phaseolus vulgaris* Linn.)、胡枝子属(*Lespedeza* Michx.)和紫穗槐(*Amorpha fruticosa* Linn.)等，证明了根瘤菌与豆科植物的共生关系会因地域性的差异而具有多样性。

在结瘤试验中，选取的根瘤菌都可以与4种不同的木本豆科植物形成结瘤，说明黑木相思根瘤菌具有较广泛的共生范围。而且，黑木相思根瘤菌与不同豆科树种形成的结瘤数、结瘤形状和颜色都有一定的差异，说明根瘤的特性与宿主种类是密不可分的，这与韩素芬等^[28]、聂刚等^[29]、牛焕琼等^[30]的研究相一致。

本研究为根瘤菌与豆科树种共生固氮研究提供了参考资料和种质资源，同时可以从这些菌株中筛选优良菌株制作微生物菌肥，使不同的菌株之间进行相互协作，为林木生长提供更充足的氮源，通过生物固氮获得更大的社会、经济效益。

致谢：感谢中国林业科学研究院热带林业研究所曾炳山研究员提供的黑木相思组培苗，感谢广东省林业科学研究院胡德活研究员提供的南洋楹种子，以及感谢张迪同学在数据处理中对我的耐心帮助！

参 考 文 献

- [1] Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, et al. Bacterial associations with legumes[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2015, 34(1/3): 17-42
- [2] Zhang XP, Chen Q, Li DY, et al. The taxonomic position of

- peanut rhizobia[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1996, 36(3): 227-233 (in Chinese)
- 张小平, 陈强, 李登煜, 等. 花生根瘤菌在根瘤菌系统分类中的地位研究[J]. *微生物学报*, 1996, 36(3): 227-233
- [3] Peng GX, Chen WX. 16S rDNA-RFLP analysis of the fast-growing soybean rhizobial strains isolated from Xinjiang regions[J]. *Microbiology China*, 2000, 27(4): 237-241 (in Chinese)
- 彭桂香, 陈文新. 16S rDNA-RFLP 分析新疆快生大豆根瘤菌的分类地位[J]. *微生物学通报*, 2000, 27(4): 237-241
- [4] Feng RH. Genetic diversity of rhizobia of *Medicago edgeworthii* by AFLP and RFLP analysis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(4): 339-345 (in Chinese)
- 冯瑞华. 用 AFLP 技术和 16SrDNA PCR-RFLP 分析毛苕蓿根瘤菌的遗传多样性[J]. *微生物学报*, 2000, 40(4): 339-345
- [5] Chen WF, Liu J, Chen WX. Resources and taxonomy of rhizobia from tree legumes[J]. *Science Technology and Engineering*, 2004, 4(11): 954-959 (in Chinese)
- 陈文峰, 刘杰, 陈文新. 木本豆科植物根瘤菌资源及多样性研究进展[J]. *科学技术与工程*, 2004, 4(11): 954-959
- [6] Xu KW, Zhang XP, Chen YX, et al. Genetic diversity of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in Panzhihua City[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(6): 1132-1141 (in Chinese)
- 徐开未, 张小平, 陈远学, 等. 攀枝花市银合欢根瘤菌遗传多样性[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(6): 1132-1141
- [7] Zhou PF, Chen WM, Wei GH. *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(11): 2552-2556
- [8] Wei YL, Huang BL, Lü CQ, et al. Biological characteristics of rhizobia in *Acacia mangium*[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2006, 21(5): 120-124 (in Chinese)
- 韦原莲, 黄宝灵, 吕成群, 等. 马占相思根瘤菌生物学特性的研究[J]. *西北林学院学报*, 2006, 21(5): 120-124
- [9] Zhang H. Primary studies on rhizobia isolated from root nodules of *Acacia crassicapa* and *Acacia cincinnata*[D]. Nanning: Doctoral Dissertation of Guangxi University, 2005 (in Chinese)
- 张慧. 厚荚相思和卷荚相思树种根瘤菌的初步研究[D]. 南宁: 广西大学博士学位论文, 2005
- [10] Sha HX, Wu JR. Study on diversity of rhizobia and drought resistance of *Acacia confuse* of Taiwan in dry-heat valley region[A]/Abstract of the academic annual meeting of mycological society of China[C]. Beijing: Mycological Society of China, 2012 (in Chinese)
- 沙桦欣, 伍建榕. 干热河谷地区台湾相思树种(*Acacia confuse*) 根瘤菌的多样性及抗旱性研究[A]/2012年中国菌物学会学术年会会议摘要[C]. 北京: 中国菌物学会, 2012
- [11] Hu W, Chen Y, Lin LS, et al. Fast extraction of genome DNA from *Acacia melanoxylon*[J]. *Journal of Huaqiao University (Natural Science)*, 2009, 30(1): 71-74 (in Chinese)
- 胡薇, 陈宇, 林来水, 等. 黑木相思基因组 DNA 的快速提取[J]. *华侨大学学报: 自然科学版*, 2009, 30(1): 71-74
- [12] Lourenço A, Baptista I, Gominho J, et al. The influence of heartwood on the pulping properties of *Acacia melanoxylon* wood[J]. *Journal of Wood Science*, 2008, 54(6): 464-469
- [13] Searle SD. *Acacia melanoxylon*: a review of variation among planted trees[J]. *Australian Forestry*, 2000, 63(2): 79-85
- [14] Ruan SN, Lin SZ, Weng J, et al. Geographic variation of cold resistance of *Acacia melanoxylon* provenances[J]. *Journal of Sanming University*, 2011, 28(5): 70-76 (in Chinese)
- 阮少宁, 林思祖, 翁剑, 等. 黑木相思种源耐寒性的地理变异[J]. *三明学院学报*, 2011, 28(5): 70-76
- [15] Chen QE. The mid-term evaluation of superior pedigree of *Acacia melanoxylon* in the east and south of Fujian Province[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2013 (in Chinese)
- 陈启恩. 福建东南部黑木相思优良家系中期评价[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2013
- [16] Dou YJ, Lu JK, Kang LH, et al. Biodiversity of Rhizobia associated with *Acacia melanoxylon* grown in South China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(12): 1439-1448 (in Chinese)
- 窦雅静, 陆俊焜, 康丽华, 等. 黑木相思根瘤菌遗传多样性[J]. *微生物学报*, 2012, 52(12): 1439-1448
- [17] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(12): 5685-5689
- [18] Lu JK, Dou YJ, Zhu YJ, et al. *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 6): 1900-1905
- [19] Islam MS, Kawasaki H, Muramatsu Y, et al. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72(6): 1416-1429
- [20] Zhou XQ, Han SF. Studies on symbiotic system of nodule bacteria and tree legumes- I. Nodulation, isolation and reciprocal cross inoculation[J]. *Journal of Nanjing Institute of Forestry*, 1984(2): 32-42 (in Chinese)
- 周湘泉, 韩素芬. 豆科树种根瘤菌共生体系的研究- I. 结瘤观察、分离、回接和交叉接种[J]. *南京林学院学报*, 1984(2): 32-42
- [21] Lin SS, Cai HQ, Lai ZX, et al. Effects of the treatments of thick vitriol and boiled water on the seed germination of *Acacia crassicarpa* seed[J]. *Seed*, 2005, 24(8): 34-36, 40 (in Chinese)
- 林珊珊, 蔡汉权, 赖钟雄, 等. 浓硫酸与沸水浸泡对厚荚相思种子离体萌发的影响[J]. *种子*, 2005, 24(8): 34-36, 40
- [22] Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(3): 1043-1047
- [23] Wang FQ, Zhang YF, Liu J, et al. Comparison of phylogeny analysis methods for rhizobia isolated from *Albizia* spp., *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(1): 1-7 (in Chinese)
- 王凤芹, 张勇法, 刘杰, 等. 合欢、金合欢和银合欢根瘤菌系统发育研究方法比较[J]. *微生物学报*, 2008, 48(1): 1-7
- [24] Weir BS, Turner SJ, Silvester WB, et al. Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 5980-5987
- [25] Lu JK, Kang LH, He XH, et al. Multilocus sequence analysis of the Rhizobia from five woody legumes in southern China[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5(30): 5343-5353
- [26] Nowak P, Soupas L, Thomas-Oates J, et al. *Acacia senegal* and *Prosopis chilensis*-nodulating rhizobia *Sinorhizobium arboris* HAMB1 2361 and *S. kostiense* HAMB1 2362 produce tetra- and pentameric LCOs that are N-methylated, O-6-carbamoylated and partially sulfated[J]. *Carbohydrate Research*, 2004, 339(6): 1061-1067

- [27] Chen WX, Wang ET, Chen WF. The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and legumes and their geographical environments[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(1): 81-86 (in Chinese)
陈文新, 王恩涛, 陈文峰. 根瘤菌-豆科植物共生多样性与地理环境的关系[J]. 中国农业科学, 2004, 37(1): 81-86
- [28] Han SF, Chen JR, Xie WJ. Experiment on the inoculation test between rhizobia from woody legumes and four leguminous species[J]. Forest Research, 1996(6): 610-615 (in Chinese)
韩素芬, 陈景荣, 谢文娟. 豆科树种根瘤菌与四种豆科植物的接种试验[J]. 林业科学研究, 1996(6): 610-615
- [29] Nie G, Wei GH, Zhang HC, et al. Investigation of Rhizobium of leguminous plants in Shaanxi Province[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2005, 14(5): 32-35 (in Chinese)
聂刚, 韦革宏, 张宏昌, 等. 陕西豆科植物根瘤菌资源调查[J]. 西北农业学报, 2005, 14(5): 32-35
- [30] Niu HQ, Wang YL, Liu YJ. Study on nodulation of several legume's nursery stock and its effect on stock's growth[J]. Forest Inventory and Planning, 2009, 34(4): 26-29 (in Chinese)
牛焕琼, 王亚丽, 刘英杰. 几种豆科树种苗木结瘤及对其生长的影响研究[J]. 林业调查规划, 2009, 34(4): 26-29

科技信息摘录

屠呦呦口述：参与 523 项目始末

从我们课题组来说，青蒿提取物在临床上 30 例都有效，说明鼠疟、猴疟与临床表现出很好的相关性，这是很重要的一点。所以我们主抓植物化学，进一步对青蒿提取物去粗存精。由于课题组内大家是分头研究，分工去做，所以即使我们去海南做临床的时候，组内同志也没有停止工作。1972 年 11 月，我们就分离出抗疟有效单体——青蒿素。

过去的抗疟药都是奎宁类的，容易产生抗药性。我们 1973 年的主要工作，就是确定青蒿素到底是什么物质。我们做了化学元素分析、光谱数据分析，最后证明它不是奎宁类物质，而是一种全新结构的化合物，就放心了。在这基础上，我们后来还跟上海有机所协作。

当时中国科学院生物物理所，能够用物理方法 X-衍射来确定化合物立体结构。有几个年轻人对小分子比较感兴趣，我们正好跟他们合作，把提取好的东西给他们做。就这样，1975 年底就把青蒿素的立体结构解决了。

我们与生物物理所联合写了一个简报，希望快点把事情报道出去。因为当时“文革”的环境下，研究结果不太容易发表。那时候我们不谈“抗疟”，只谈发现了一个新的分子结构，作了个通报。后来经过向卫生部报告批准，1979 年这项成果发布在《化学学报》上，题目是《青蒿素的结构与反应》。

当时全国掀起了研究青蒿素的高潮。山东、云南已经做了一些工作，但也不是那么顺利。那时发现云南青蒿也不是很合适，后来找到四川的质量比较好。后来“523”办公室又发文，让中医研究院组织全国多家研究团队来参观我们单位，我们的实验室对外开放，给大家介绍研究成果。我们当时也愿意这样，当时提倡“全国大协作”，大协作也会把工作促进得快一些，比如说找到四川的青蒿比北京的好，那对于研究工作就方便一点。

“文革”时期我们找不到药厂，但我们需要药厂配合，后来经审批给我们一个附属工厂。于是我们每年把四川的青蒿买回来在药厂提取，其他单位也都根据自己的情况来做。一直到 1978 年，我们一共做了 529 例临床病例，全国差不多 40 个单位参加，病例数达到五千多例——大协作当然有大协作的好处。

后来我们拿到新药证书——新药证书只发给中药研究所一家单位，因为我们做了 26 个发现。

1981 年 10 月，世界卫生组织在北京召开国际青蒿素会议，我是第一个作报告的，报告了《青蒿素的化学研究》。大家都很赞赏。从那次会议以后，青蒿素被世界所认可了。

——摘自《中国生物技术信息网》2015-10-23
<http://www.biotech.org.cn/information/137169>