

不同地理环境下野豌豆根瘤菌的遗传多样性 与共生进化研究

张美玲,朱 博,李 旭,鞠文庭,韦革宏

(西北农林科技大学 生命科学学院 微生物研究中心,陕西 杨陵 712100)

【摘要】 **【目的】**研究西北部分地区不同地理环境下,野豌豆根瘤菌的遗传多样性及其共生进化间的关系。**【方法】**采用 16S rDNA PCR-RFLP 与 16S rDNA 全序列分析技术,对分离自陕西秦岭北麓红河谷、陕西南部汉中、甘肃沙漠绿洲带永昌混山窑、甘肃中部永登红城和新疆乌鲁木齐的 5 个不同地理环境(分别记做 A、B、C、D、和 E)的 42 株野豌豆根瘤菌,进行了遗传多样性和系统发育分析。**【结果】**测试根瘤菌共有 6 种基因型(I、II、III、IV、V 和 VI),基因型 I 根瘤菌在各个地理环境采样点均有分布,并且 A 地点分布的所有菌株均属于该基因型,基因型 II 菌株分布于 D 和 E 采样地点,基因型 III 菌株分布于 B、C 和 D 采样地点,基因型 IV 分布于 E 地点,基因型 V 和 VI 测试菌株均分布于 D 地点。由 16S rDNA 全序列分析可知,基因型 I 根瘤菌的代表菌株 CCNWSX0050 和基因型 IV 根瘤菌的代表菌株 CCNWGS0055 分别与 *Rhizobium leguminosarum* 的相似性为 99.8% 和 99.7%;基因型 III 根瘤菌的代表菌株 CCNWGS0062 与 *Sinorhizobium meliloti* 的相似性为 100.0%。**【结论】**中国西北地区野豌豆根瘤菌在分类学上属于 *Rhizobium leguminosarum* 根瘤菌和 *S. meliloti* 根瘤菌,野豌豆一根瘤菌的共生关系在不同地理环境中表现出差异性。

【关键词】 野豌豆根瘤菌;遗传多样性;共生进化;地理环境

【中图分类号】 Q78;S154.38⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)12-0192-07

Genetic diversity and co-evolution of *Vicia* rhizobia in different geographical environments

ZHANG Mei-ling, ZHU Bo, LI Xu, JU Wen-ting, WEI Ge-hong

(Center of Microbiology, College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study explored the genetic diversity and phylogenesis of *Vicia* Rhizobia in the northwest of China. **【Method】** 16S rDNA PCR-RFLP and 16S rDNA gene sequencing analysis were used to analyze the genetic diversity and co-evolution of the 42 vicia rhizobia grown in five different geographical sites in Shaanxi, Gansu and Xinjiang (the sites designated A, B, C, D and E). **【Result】** The RFLP analysis results of all strains indicated six bacterial genotypes designated I, II, III, IV, V and VI. Strains in site A belonged exclusively to the group of genotype I, which were found in all the sites. And genotype II strains were only found in sites D and E. Meanwhile sites B, C and D were of genotype III. Strains of genotype IV were restricted to E, and genotypes V and VI to site D. Sequencing analysis of 16S rDNA revealed CCNWSX0050 of genotype I and CCNWGS0055 of genotype II shared 99.8% and 99.7% sequence homology with *R. leguminosarum* respectively, and CCNWGS0062 of genotype III shared 100.0% sequence

* [收稿日期] 2008-01-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30670372);全国优秀博士学位论文作者基金项目(200254);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0953);西北农林科技大学拔尖人才支持计划

[作者简介] 张美玲(1983-),女,安徽淮北人,在读硕士,主要从事根瘤菌多样性研究。E-mail:zhml727@yahoo.com.cn

[通讯作者] 韦革宏(1969-),男,甘肃榆中人,教授,博士生导师,主要从事根瘤菌资源研究。E-mail:weigehong@yahoo.com.cn

homology with *S. meliloti*. 【Conclusion】 The results showed that rhizobia, forming symbiosis with natural *Vicia sepium* in the northwest of China, belong to *R. leguminosarum* and *S. meliloti*, and symbiotic relationships between host plants and rhizobia in different geographical environments show diversity and non-random associations.

Key words: *Vicia* rhizobia; genetic diversity; co-evolution; geographical environment

根瘤菌与豆科植物共生关系的研究,从早期的“宿主专一性”和“互接种族”,发展到后来借助分子生物学手段阐明的系统进化地位和复杂相关性方面^[1],而其中很少涉及地理环境因素。为更科学地了解自然界的共生关系,必须考虑环境因素的影响。地理区域不同,会造成某些豆科植物与不同的根瘤菌结瘤固氮;而同一地理环境中,一种根瘤菌可能与多种豆科植物共生固氮,由于共生基因横向转移的普遍存在^[2],根瘤菌必须经历宿主与环境的双重选择^[3]。所以在研究豆科植物的共生根瘤菌时,研究环境的作用具有很重要意义。

在已知的共生菌-宿主共生进化模式假说理论中^[4],一种观点认为,共生进化中自然界倾向于选择具有多种寄主范围的广谱共生菌,因为共生菌的寄主范围越广,在环境中细菌与寄主间的共生几率越大^[5],但该假说忽略了广谱共生菌之间共生竞争能力的差异;另一种观点认为,竞争力的差异表明共生体系中可能存在一种机制,使有机体优先选择提供最大优势的共生伙伴,并排除不太合适的共生伙伴,这样共生关系进化的选择,可能更倾向于造成种群内共生多样性的单一化^[6]。目前,对于根瘤菌-豆科植物共生进化模式的研究还一直没有定论。

虽然存在以上两种相互矛盾的理论观点,但是

有关自然条件下共生进化的研究工作并不多见^[5]。野豌豆(*Vicia sepium*)是一种在中国广泛分布的自然野生豆科植物^[7],其共生根瘤菌主要属于 *R. leguminosarum*^[8]。但是,国内对其共生根瘤菌的遗传多样性和共生进化的报道还较少。因此,本试验以不同地理环境中的野豌豆根瘤菌为研究对象,分析测试菌株 16S rDNA 的序列特征,并通过代表菌株确定其系统进化地位,讨论在不同环境中野豌豆与共生根瘤菌遗传多样性的差异,为根瘤菌的地区相关性共生进化理论发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 根瘤采集于陕西秦岭北麓红河谷(A)、陕西南部汉中(B)、新疆乌鲁木齐(C)、甘肃沙漠绿洲带永昌混山窑(D)和甘肃中部永登红城(E) 5个地理环境不同的采样地点,寄主植物为野豌豆种(*Vicia sepium*)。将根瘤用无菌水洗涤后,体积分数 95%酒精浸泡 30 s,再用 1 g/L 升汞消毒 5 min。采用平板划线法分离、纯化菌株,挑取单菌落。革兰氏染色,镜检,斜面保藏^[9]。共得 42 株测试菌株(表 1)。

表 1 供试野豌豆根瘤菌的编号及采样地概况

Table 1 Numbering of tested *Vicia* rhizobia and the geographical conditions of the sample sites

编号 Code	菌株编号 Strain No.	采样地点 Sample site	海拔/m Height	编号 Code	菌株编号 Strain No.	采样地点 Sample site	海拔/m Height	编号 Code	菌株编号 Strain No.	采样地点 Sample site	海拔/m Height
1	CCNWSX0039	A	1 000	15	CCNWSX0053	A	2 450	29	CCNWSG0062	D	2 217
2	CCNWSX0040	A	1 000	16	CCNWSX0054	A	2 450	30	CCNWSG0063	D	2 217
3	CCNWSX0041	A	1 000	17	CCNWNX0048	B	676	31	CCNWSG0064	D	2 217
4	CCNWSX0042	A	1 000	18	CCNWNX0049	B	676	32	CCNWSG0065	D	2 217
5	CCNWSX0043	A	1 689	19	CCNWNX0050	B	676	33	CCNWSG0066	D	2 217
6	CCNWSX0044	A	1 689	20	CCNWNX0051	B	676	34	CCNWSG0069	D	2 217
7	CCNWSX0045	A	1 689	21	CCNWNX0052	B	676	35	CCNWNX0056	E	2 362
8	CCNWSX0046	A	2 250	22	CCNWNX0053	B	676	36	CCNWNX0057	E	2 362
9	CCNWSX0047	A	2 250	23	CCNWXJ0097	C	2192	37	CCNWSG0054	E	1 817
10	CCNWSX0048	A	2 250	24	CCNWXJ0098	C	1450	38	CCNWSG0055	E	1 817
11	CCNWSX0049	A	2 450	25	CCNWXJ0100	C	1650	39	CCNWSG0056	E	1 817
12	CCNWSX0050	A	2 450	26	CCNWSG0059	D	2 217	40	CCNWSG0057	E	1 817
13	CCNWSX0051	A	2 450	27	CCNWSG0060	D	2 217	41	CCNWSG0058	E	1 817
14	CCNWSX0052	A	2 450	28	CCNWSG0061	D	2 217	42	CCNWSG0067	E	1 817

1.1.2 引物 选用来源于 *E. coli* 16 S rDNA 基因序列保守区域的两段引物 P₁ 和 P₆, P₁: 5'-CGg gat ccA GAG TTT GAT CCT GGC TCA GAA CGA ACG CT-3', P₆: 5'-CGg gat ccT ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT CAC CCC-3', 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.3 主要试剂 dNTP、*Taq* 酶、10× buffer、Mg²⁺、限制性内切酶 *Hae* III、*Hinf* I 和 *Msp* I, 均为宝生物工程(大连)有限公司产品。琼脂糖等电泳检测试剂, 均由沃尔森生物有限公司提供。16S rDNA 的测序工作, 由上海英俊公司生物工程公司完成。

1.2 菌体培养和 DNA 提取

将 42 株菌接种于 TY 液体培养基中, 28 °C 振荡培养至对数期, 8 000 r/min 收集菌体, 10 mmol/L Tris-HCl 洗涤, 溶菌酶破壁, 蛋白酶处理后, 酚/氯仿/异戊醇(V(酚): V(氯仿): V(异戊醇))=25: 24: 1) 抽提, 乙醇沉淀, 风干, 最后溶于 TE (10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)) 缓冲液中^[10]。

1.3 16S rDNA PCR 扩增

以提取的总 DNA 为模版, P₁ 和 P₆ 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系包括: 模板 DNA (25 ng/μL) 2.5 μL、10× buffer 5 μL、Mg²⁺ (25 mmol/L) 3 μL、dNTPs (25 mmol/L) 4 μL、引物 (10 mmol/μL) 1 μL、*Taq* 酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 补 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min^[11], 4 °C

条件下保存扩增产物。将扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶在 0.5×TBE 电泳缓冲液中电泳, 并在紫外凝胶成像仪上观察、照像。

1.4 RFLP 酶切分析

根据文献[12]的方法, 选用 3 种限制性内切酶 *Hae* III、*Hinf* I 和 *Msp* I 对 16S rDNA PCR 扩增产物进行酶切, 各反应体系均为 10 μL, 其中含 3 μL PCR 产物, 5 U 限制性内切酶及其相应的缓冲液, 37 °C 酶切 4 h。具体酶切位点为: *Hinf* I: 5'-G/ANTC-3'; *Hae* III: 5'-GG/CC-3'; *Msp* I: 5'-C/CGG-3'。全部酶切产物与 2.5 μL 反应终止液 10× Loading buffer 混匀, 用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 4 h), UV 扫描, 以 TIFF 格式保存。

1.5 16S rDNA 全序列分析

根据 RFLP 图谱分析结果, 从每种基因型中选择代表菌株进行测序, 将测序结果与模式菌株的序列比较, 按照 Satiou 和 Nei 的方法进行聚类分析^[13], 用 Clustal X、Bioedit 和 Treeconw 程序, 进行序列同源性对齐排列和编辑, 最后构建出以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树。再用 DNAMAN 计算代表菌株与亲缘关系最近的模式株 16S rDNA 序列间的相似性值。构建系统发育树的模式菌株 16S rDNA 全序列, 均来自 GenBank。

2 结果与分析

2.1 野豌豆根瘤菌菌株 16S rDNA PCR 的扩增

以提取的总 DNA 为模板, 进行测试菌株的 16S rDNA PCR 扩增, 得到分子大小均约为 1.5 kb 产物片段, 部分菌株的 16S rDNA 电泳图谱见图 1。

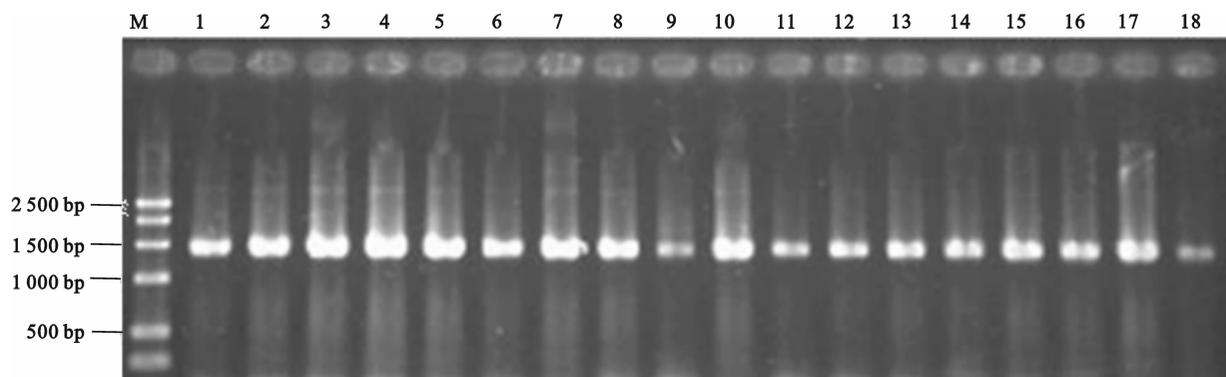


图 1 部分野豌豆根瘤菌 16S rDNA PCR 扩增产物的电泳结果

1~18. 测试菌株编号; M. DNA marker 13

Fig. 1 16S rDNA map amplified products by PCR of part of tested *Vicia rhizobia*

1-18. Code of the tested rhizobia; M. DNA marker 13

2.2 野豌豆根瘤菌 16S rDNA-RFLP 酶切的电泳图谱

42 株测试菌株共产生 6 种电泳图谱,6 种 16S rDNA 基因型组合图谱(以下简称基因型)如图 2 所示。测试菌株的 RFLP 分析类型如表 2 所示。由表 2 可知,基因型 I (b β I) 由 32 株测试菌株组成(16 株来自 A 采样地点,5 株来自 B 采样地点,1 株来自 C 采样地点,4 株来自 D 采样地点,6 株来自 E 采样

地点);基因型 II (c α I) 由 3 株测试菌株组成(2 株来自 D 采样地点,1 株来自 E 采样地点);基因型 III (b γ II) 由 4 株测试菌株组成(1 株来自 B 采样地点,2 株来自 C 采样地点,1 株来自 D 采样地点);基因型 IV (a β II) 只有 1 株测试菌株(来自 E 采样地点);基因型 V (b β V) 和基因型 VI (b β IV) 均只有 1 株测试菌株(均来自 D 采样地点)。

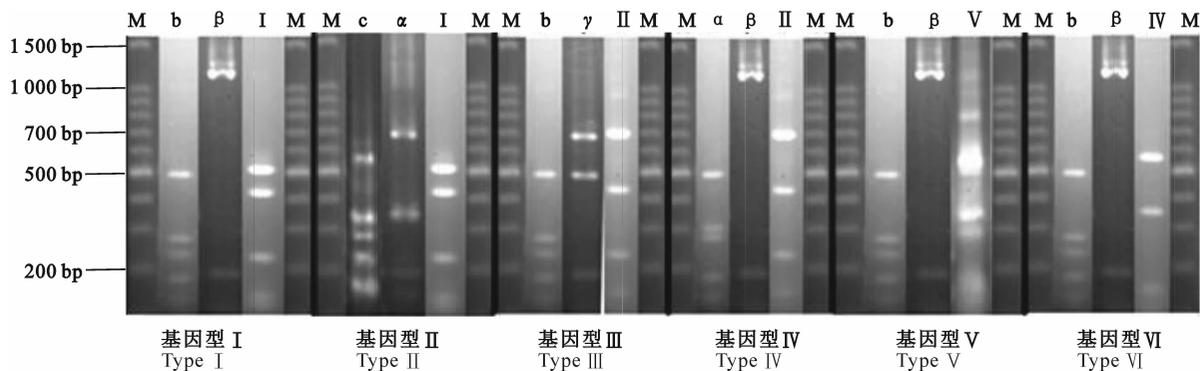


图 2 野豌豆根瘤菌的 16S rDNA-RFLP 酶切组合图谱

M, 100 bp Ladder; a, b, c. *Hae* III 酶切电泳图谱类型; α , β , γ . *Hinf* I 酶切电泳图谱类型; I, II, IV, V. *Msp* I 酶切图谱类型; 表 2 同

Fig. 2 16S rDNA-RFLP rDNA types of *Vicia* rhizobia

M, 100 bp Ladder; a, b, c. types of *Hae* III; α , β , γ . Types of *Hinf* I digested map; I, II, IV, V. Types of *Msp* I digested map; Table 2 is same

表 2 供试野豌豆根瘤菌的编号及 RFLP 分析类型

Table 2 RFLP analysis results of the tested rhizobia

编号 Code	16S rDNA PCR-RFLP 图谱 Patterns			编号 Code	16S rDNA PCR-RFLP 图谱 Patterns		
	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Msp</i> I		<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Msp</i> I
1	b	β	I	22	b	γ	II
2	b	β	I	23	b	γ	II
3	b	β	I	24	b	γ	II
4	b	β	I	25	b	β	I
5	b	β	I	26	b	β	V
6	b	β	I	27	c	α	I
7	b	β	I	28	c	α	I
8	b	β	I	29	b	γ	II
9	b	β	I	30	b	β	I
10	b	β	I	31	b	β	IV
11	b	β	I	32	b	β	I
12	b	β	I	33	b	β	I
13	b	β	I	34	b	β	I
14	b	β	I	35	b	β	I
15	b	β	I	36	b	β	I
16	b	β	I	37	b	β	I
17	b	β	I	38	a	β	II
18	b	β	I	39	b	β	I
19	b	β	I	40	b	β	I
20	b	β	I	41	c	α	I
21	b	β	I	42	b	β	I

由表 3 可知,与野豌豆共生根瘤菌的 6 种 16S rDNA 基因型中, A 地点的测试菌株丰富度最低, 只有 1 种基因型, 其菌株优势度为 1.00; B 地点的测

试菌株丰富度为 2, 分别为基因型 I (菌株优势度为 0.83) 和基因型 III (菌株优势度为 0.17) 根瘤菌; C 地点的测试菌株丰富度也是 2, 分别为基因型 I (菌

株优势度为 0.33)和基因型 III(菌株优势度为0.67)根瘤菌;D 地点的测试菌株丰富度最高,共 5 种基因型,分别为基因型 I(优势度为 0.44)、基因型 II(优势度为 0.22)、基因型 III(优势度为 0.11)、基因型 V(优势度为 0.11)和基因型 VI根瘤(优势度为 0.11);

表 3 野豌豆根瘤菌 16S rDNA 的基因型丰富度及菌株优势度

Table 3 Number, richness and dominance of each 16S rDNA type

采样地点 Sample site	优势度 Dominance						丰富度 Richness
	基因型 I Type I	基因型 II Type II	基因型 III Type III	基因型 IV Type IV	基因型 V Type V	基因型 VI Type VI	
陕西红河谷 A	1.00	—	—	—	—	—	1
陕西南部汉中 B	0.83	—	0.17	—	—	—	2
新疆乌鲁木齐 C	0.33	—	0.67	—	—	—	2
甘肃永昌混山窑 D	0.44	0.22	0.11	—	0.11	0.11	5
甘肃永登红城 E	0.75	0.125	—	0.125	—	—	3

2.3 野豌豆根瘤菌 16S rDNA 全序列的相似性比较及系统发育分析

根据 16S rDNA RFLP 分析结果,从不同基因类型中选择 CCNWS0062、CCNWS0055 和 CCNWSX0050 3 个代表菌株,测定其 16S rDNA 基因全序列;29 株其他模式菌株的 16S rDNA 基因序列均在 GeneBank 中的索取查找,构建的系统发育树如图 3 所示。CCNWS0055、CCNWS0062、*R. legumiosarum* USDA2370、CCNWSX0050 和 *S. meliloti* LMG6133 5 株根瘤菌的 16S rDNA 序列碱基差异如图 4 所示。从图 3 和图 4 可以看出,测试菌株 CCNWS0062 与模式菌株 *S. meliloti* LMG6133 的亲缘关系最近,且二者的 16S rDNA 序列无碱基差异,序列相似性为 100.0%。测试菌株 CCNWSX0050、CCNWS0055 与模式菌株 *R. legumiosarum* USDA2370 的亲缘关系最近,两株菌与模式菌株 *R. legumiosarum* USDA2370 的差异碱基数分别为 3 和 4,序列相似性分别为 99.8% 和 99.7%。由图 3 还可知,基因型 I 代表菌株 CCNWSX0050 和基因型 IV 代表菌株 CCNWS0055 的亲缘关系很近,但它们与基因型 III 代表菌株 CCNWS0062 分别位于不同的系统发育分支中,彼此间的亲缘关系较远。结果表明,与野豌豆种豆科植物(*Vicia sepium*)共生结瘤的两种类型根瘤菌,在进化关系上相距较远。

3 讨论

从本研究结果可以看出,归属于 *R. legumiosarum* 的基因型 I 测试菌株,在 5 个采样地点均有分布,而归属于 *S. meliloti* 的基因型 III 测试菌株,只在 3 个采样点有分布,表明系统发育分类上属于不同

E 地点的测试菌株丰富度为 3,分别为基因型 I(优势度为0.75)、基因型 II(优势度为 0.125)和基因型 IV(优势度为 0.125)根瘤菌。由此可知,5 个采样地点中,D 地点的丰富度最大。此外,不同基因型根瘤菌共生结瘤具有地区差异性。

种属的根瘤菌,在不同地理环境中的分布有差异。属于 *R. legumiosarum* 的根瘤菌株中,基因型 I 测试菌株(CNWSX0050)在 5 个地点均有分布,基因型 IV 测试菌株(CCNWS0055)仅在 1 个采样点有分布,并且分布较少,表明同一属种的不同基因型根瘤菌,受环境的影响也表现出地区分布的差异性,这与陈文新等^[3]研究结果一致。

本研究中,属于 *R. legumiosarum* 的基因型 I 测试菌株、基因型 IV 测试菌株与属于 *S. meliloti* 的基因型 III 测试菌株的差异性分布表明,影响生态分布的共生基因与作为主要分类依据的染色体基因是非平行进化关系,共生基因的横向转移在根瘤菌中广泛存在。环境不仅选择、限制着根瘤菌的分布,而且地理区域的多态性和可变性,也可能影响着根瘤菌—豆科植物的共生多样性。

本研究中,基因型 I 菌株在各个采样地点均大量分布;基因型 II 菌株仅在甘肃永昌和永登分布,并分布较少;基因型 III 菌株在陕西汉中、新疆乌鲁木齐、甘肃永昌均有分布。基因型 I (*R. legumiosarum*) 菌株、基因型 IV 菌株(*R. legumiosarum*)与基因型 III 菌株(*S. meliloti*)在环境中的分布式特点表明,不同种根瘤菌间(乃至同种根瘤菌不同基因型间)存在着共生竞争及共生竞争力的差异,根瘤菌共生竞争力的差异可能源于进化选择^[6],即有机体更优先的共生作用可以提供最大优势的共生伙伴,并倾向于排除不太合适的共生伙伴;而不是选择可以貌似提供更多共生机会的广谱共生根瘤菌。这与 Devine^[6]提出的共生进化理论一致。根据该理论可知,共生进化将更倾向于支持种群内根瘤菌—豆科植物共生关系的专一化趋向。

环境的多样性影响着寄主植物与共生细菌间共

生关系的多样性,但这种影响是否可以作为造成共生进化多样化的一个原因,还有待于进一步研究。而这种多样性在长期进化过程中即具体生态环境下,未必可以一直保持^[5],自然选择更倾向于寄主在多种共生根瘤菌中,选择可以提供最大共生收益的一种或一类细菌作为优势菌,最终寄主作用导致共生进化关系的专一化趋势是完全可能的。

4 结 论

(1)与中国西北地区野豌豆共生固氮的主要根

瘤菌,在系统分类学上属于 *R. leguminosarum* 根瘤菌和 *S. meliloti* 根瘤菌种,其中属于 *R. leguminosaru* 的野豌豆根瘤菌有 2 种基因型,属于 *S. meliloti* 野豌豆根瘤菌只有 1 种基因型。

(2)中国西北地区野豌豆根瘤菌,根据 16S rDNA-RFLP 分析可以分为 6 种基因型,每种基因型的地理分布表现出各自的独特性;同时,特定的地理环境中分布的野豌豆根瘤菌基因型也表现出地区差异性。不同地理环境中,野豌豆根瘤菌基因型的丰富度为 1~5。

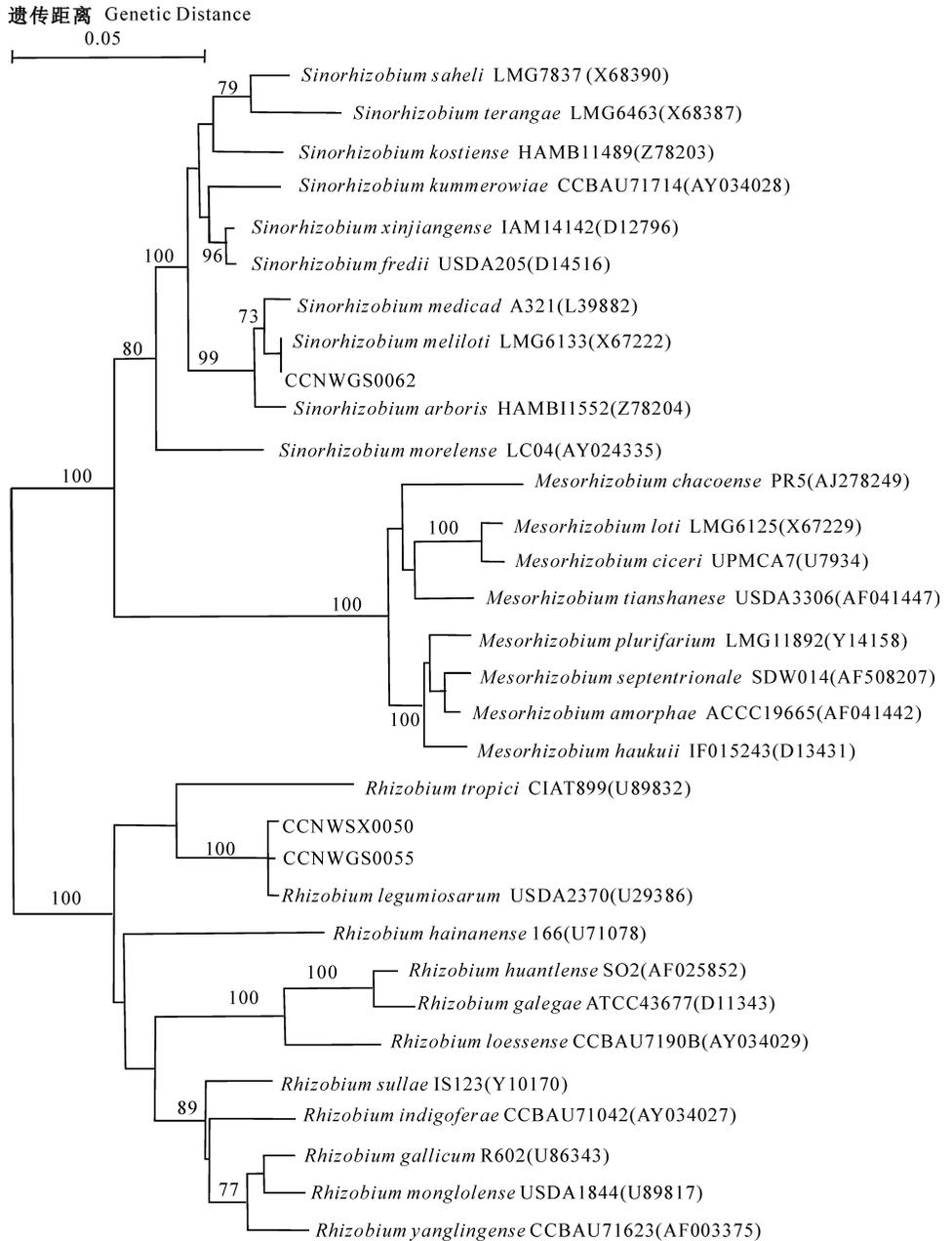


图 3 3 株野豌豆根瘤菌与其他模式菌株的系统发育树(分支上数字表示树形可信度)

Fig. 3 Phylogenetic relation diagram of the three *Vicia* rhizobia (the reference strains figures on the branches stand for the reliabilities)

