

内蒙古东部地区乌拉尔甘草 根瘤菌遗传多样性研究

高梦哲,袁晓霞,杨冰洁,申奥龙,李华,冀照君

(内蒙古民族大学生命科学与食品学院,内蒙古 通辽 028000)

摘要:为探究乌拉尔甘草共生根瘤菌的微进化历程,温室条件下种植乌拉尔甘草捕捉当地土壤中根瘤菌,分离得到根瘤菌21株,基于核心基因 *recA* 序列鉴定菌株的种属分别为豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*)、阿拉米根瘤菌 (*Rhizobium alarii*)、阳陵根瘤菌 (*Rhizobium yanglingense*)、菜豆根瘤菌 (*Rhizobium phaseoli*)、圆明园慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium yuanmingense*)、*Rhizobium* sp. I 和 *Bradyrhizobium* sp. II,其中 *Rhizobium* sp. I 为第一优势菌群, *Bradyrhizobium* sp. II 为第二优势菌群,群落结构相对单一,核苷酸多态性 (π) 较低(范围为 0.00205~0.01791,平均值为 0.010406),遗传距离 (D_{xy}) 较远(范围为 0.0688~0.1935,平均值为 0.1483),基因交流指数 (Nm) 较低(范围为 0.02~17.10,平均值为 3.048)。综上所述,内蒙古东部地区乌拉尔甘草根瘤菌遗传多样性较高,在进化历史上基因交流频率较低,具有较强的遗传稳定性。

关键词:根瘤菌;乌拉尔甘草;遗传多样性;内蒙古东部

中图分类号:S567.7⁺1; S154.34; Q948.12⁺2.3 **文献标志码:**A

Genetic diversity of rhizobia associated with *Glycyrrhiza uralensis* fish in eastern Inner Mongolia

GAO Mengzhe, YUAN Xiaoxia, YANG Bingjie, SHEN Aolong, LI Hua, JI Zhaojun

(College of Sciences and Food Engineering, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China)

Abstract: To investigate the microevolution of symbiotic rhizobia associated with *Glycyrrhiza uralensis*, the plant was cultivated aseptically in greenhouse to isolate rhizobia from the local soil. A total of 21 rhizobial strains were isolated and identified as *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium alarii*, *Rhizobium yanglingense*, *Rhizobium phaseoli*, *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Rhizobium* sp. I and *Bradyrhizobium* sp. II. And *Rhizobium* sp. I was the predominant group, followed by *Bradyrhizobium* sp. II based on the core gene *recA* sequences. The community structure was relatively simple, with low nucleotide diversity (π) observed (range: 0.00205~0.01791, mean: 0.010406). Genetic differentiation (D_{xy}) was high, with values ranging from 0.0688 to 0.1935 (mean: 0.1483). The gene flow index (Nm) exhibited low values (range: 0.02~17.10, mean: 3.048). In conclusion, the high genetic diversity and low frequency of gene exchange suggest that the rhizobia associated with *G. uralensis* in eastern Inner Mongolia exhibit strong genetic stability throughout their evolutionary history.

Keywords: rhizobia; *Glycyrrhiza uralensis*; genetic diversity; eastern Inner Mongolia

乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 是常见的多年生豆科中蒙药材植物^[1-3],可与根瘤菌形成共生固氮体系^[4],能够将空气中的氮气转化为宿主所需的氮素营养,解决瘠薄土壤中氮素缺乏的问题,

避免氮肥过量施用导致的土壤严重污染,根瘤菌共生固氮体系的形成将有助于提高乌拉尔甘草的产量,促进其有效成分的积累^[5-7]。

乌拉尔甘草在我国内蒙古、甘肃、新疆、宁夏等

收稿日期:2024-05-15

修回日期:2024-09-08

基金项目:国家自然科学基金(32170020,31860001);内蒙古自治区科技计划项目(2021GG0005);内蒙古自治区自然科学基金(2024JQ12,2022QN03030,2023MS03053);内蒙古自治区人才开发基金项目(RC201901)

作者简介:高梦哲(1998-),男,内蒙古通辽人,硕士研究生,研究方向为微生物学。E-mail:aojia19890613@163.com

通信作者:冀照君(1982-),男,河北张家口人,博士,教授,主要从事微生物学研究。E-mail:jjz808@163.com

地区均大面积种植^[8],不同类型土壤中生物因子和非生物因子存在较大差异,导致乌拉尔甘草共生根瘤菌的生物多样性较高。内蒙古东部地区奈曼旗是我国重要的中蒙药材种植产业振兴科技示范基地,大量种植乌拉尔甘草、蒙古黄芪等豆科药材,然而化肥的过度施用致使土壤板结,中蒙药材品质不断下降,开发和利用不同地区土壤中丰富的根瘤菌种资源,可为乌拉尔甘草的大面积种植选育出高效共生固氮优良菌株^[9]。Li 等^[10]从我国西北地区分离出野生甘草根瘤内的菌株,鉴定为根瘤菌属、中慢生根瘤菌、中华根瘤菌属,发现不同地区分离得到的根瘤菌在系统发育树上差异显著,显示出典型的生物地理分布特征。Mousavi 等^[11]对甘草根瘤核心基因进行多位点序列分析(MLSA),揭示了我国中部和西北地区甘草根瘤菌的多样性以及系统发育地位,包括中慢生根瘤菌(57株)、根瘤菌属(25株)、中华根瘤菌属(11株)、叶状杆菌属(6株)和农杆菌(16株)。我国北方地区的甘草主要与中慢生根瘤菌属、中华根瘤菌属、根瘤菌属等结瘤^[12]。饶小莉等^[13]研究表明内蒙古地区乌拉尔甘草的优势菌群均为中慢生根瘤菌属,但未提到根瘤的具体采集地点。还有研究发现甘草中慢生根瘤菌共生基因序列的一致性较高,宿主范围较窄,推测共生基因来自共同祖先^[14]。我国大部分地区根瘤菌具有较高的遗传多样性,菌群结构与地理隔离、土壤理化性质存在较强的相关性^[15-17],表明根瘤菌为了适应不同生境存在着共同进化的现象,在进化过程中不断发生遗传分化与遗传重组,其种属关系及结瘤固氮能力在进化过程中不断变化^[16,18]。因此,开发高效专一的根瘤菌菌种资源对我国乌拉尔甘草的绿色种植具有重要意义。

本研究采集内蒙古东部地区土样,实验室条件下种植乌拉尔甘草来捕捉土壤中存在的专一性根瘤菌菌株,探究乌拉尔甘草根瘤菌的系统发育地位和菌群结构,及其在分子进化过程中发生的遗传分化与基因交流现象,以期为内蒙古东部地区瘠薄土壤中种植的乌拉尔甘草选育出高效共生固氮根瘤菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为乌拉尔甘草种子,购自万草园种苗中心。

1.2 试剂与培养基

1×植物低氮营养液:FeC₆H₅O₇·5H₂O 0.075 g, Ca(NO₃)₂ 0.03 g, KCl 0.075 g, MgSO₄·7H₂O 0.06

g, K₂HPO₄ 0.136 g, CaSO₄ 0.46 g, 微量元素 1 mL, 定容至 1 000 mL, 15 磅灭菌 20 min。

微量元素储备液: H₃BO₃ 2.86 g, MnSO₄ 1.18 g, CuSO₄·5H₂O 0.8 g, ZnSO₄ 0.22 g, H₂MoO₄ 0.02 g, 定容至 1 000 mL, 15 磅灭菌 20 min。

0.8%水琼脂培养基: 琼脂粉 0.8 g, 去离子水 100 mL, 15 磅灭菌 20 min。

YMA 培养基: KH₂PO₄ 0.25 g, K₂HPO₄ 0.25 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.1 g, 甘露醇 10 g, 酵母粉 3.0 g, 定容至 1 000 mL, 固体培养基需额外加琼脂粉 15 g, 15 磅灭菌 20 min。

TY 培养基: 蛋白胨 5.0 g, 酵母粉 3.0 g, CaCl₂ 0.6 g, 定容至 1 000 mL, 固体培养基需额外加琼脂粉 15 g, 所有试剂和培养基均在 121℃、103.4 kPa 灭菌 20 min。

1.3 土壤样品的采集与处理

土壤样品于 2023 年 9 月采集自内蒙古奈曼地区蒙中药材种植产业振兴科技示范基地(42°34'45" N, 120°45'35"E)的 3 个随机采样点(作为 3 个生物学重复),取地表 10~15 cm 以下的土壤样品置于无菌袋中,在实验室无菌条件下取 10.0 g 土壤样品与 100 mL 无菌生理盐水均匀混合制成土壤悬浮液。

1.4 甘草种植与土壤悬浮液根部接种

选取颗粒饱满的乌拉尔甘草种子,95%乙醇处理 30 s 消除表面张力,弃掉乙醇,用 2.4%次氯酸钠处理 5 min,无菌水洗涤 5~7 次,将无菌种子分散于 0.8%水琼脂平板,28℃温箱中黑暗萌发 24 h。选取长度约 1 cm 的甘草芽种植于双层瓶的无菌蛭石中^[19],甘草芽周围接种 1.0 mL 土壤悬浮液,置于人工气候箱中。共设置 3 个生物学重复,每个生物学重复种植甘草 10 株,以不接种土壤悬浮液的甘草作为阴性对照组,甘草生长 45 d 后采集根瘤^[20-21]。

1.5 根瘤菌的分离纯化

根瘤用 0.85%生理盐水清洗后转移到无菌容器中,95%乙醇处理 30 s,然后用 2.4%次氯酸钠溶液处理 5 min,无菌水洗涤 5~7 次,将每个根瘤分别转移到无菌 EP 管内,加入 50 μL 无菌生理盐水,捣碎后吸取混合液划线于 YMA 固体培养基^[22-23],28℃恒温培养 72 h,挑取单菌落纯化 3 次,将纯化后的单菌落接入 YMA 液体培养基,恒温 28℃、转速 180 r·min⁻¹条件下振荡培养 72 h,将菌液与 60%的甘油 1:1 混合后冻存于-80℃。

1.6 根瘤菌总 DNA 提取及核心基因 *recA* 序列比对
将分离纯化得到的菌株分别接种于液体 YMA 培养基,28℃条件下 180 r·min⁻¹恒温振荡培养 3

d, 13 000 r · min⁻¹ 离心 3 min 收集菌体, 采用 GUTC 法提取根瘤菌总 DNA^[24], 扩增基因 *recA* 序列(约 600 bp), 引物为 *recA41-F* (5' -TTCGCAAGGGMTCGRT-SATG-3') 和 *recA640-R* (5' -ACATSACRCCGATCT-TCATGC-3'), PCR 反应体系 (50 μL): 2×Taq PCR Master Mix 25.0 μL, ddH₂O 21.0 μL, 上游引物 1.0 μL, 下游引物 1.0 μL, 模板 DNA 2.0 μL。PCR 反应条件: 95℃ 5 min; 94℃ 45 s, 54℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min^[25]。将 PCR 产物点样到 1.0% 的琼脂糖凝胶中, 150 V 电泳 30 min。UV 下观察检测扩增的片段, 将符合测序要求的产物送至深圳华大基因科技有限公司测序。

1.7 基于 *recA* 基因序列构建系统发育树

将测序结果中峰图正常的结果利用 Clusatal 软件比对去掉两端多余碱基序列, 采用 MEGA 11.0 软件对测序结果进行比对分析, 选取 Kimura-2-parameter 模型构建邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树状图, bootstrap 值设定为 1 000。基于基因 *recA* 构建的系统发育树探究该地区甘草根瘤菌菌株的分类地位及其亲缘关系^[26-28]。

1.8 根瘤菌群体遗传及核苷酸多态性分析

采用 STRUCTURE 软件的 LOCPRIOR 模型设置初始化 (burn-in) 值为 100 000, 迭代次数 (iterations) 为 1 000 000, 深入研究甘草根瘤菌菌株的遗传物质来源及菌群结构; 采用 DNAsp (DNA sequence polymorphism) 软件分析 *recA* 序列的核苷酸多态性, 包括单倍体数量 (h)、单倍体多样性 (Hd)、核苷酸多样性 (π)、 $\pi N/\pi S$ 比值 (πS 指同义突变位点上发生碱基替换的数量, πN 指非同义突变位点上发生碱基替换的数量)、核苷酸遗传分化距离平均值 (D_{xy}) 和基因交流指数 (Nm)^[20]。

2 结果与分析

2.1 甘草根瘤菌分离鉴定结果

实验室条件下捕捉内蒙古地区土壤中的甘草共生根瘤菌, 共分离得到 21 株, 菌株在 YMA 培养基上 28℃ 条件下培养 3 d 后, 可形成直径约为 2 mm 的单菌落。基于核心基因 *recA* 序列 (相似性高于 96%) 鉴定根瘤菌的种属关系, 共得到 21 株根瘤菌 (表 1), 归属于 5 个已知种群和 2 个未知种群, 分别为阿拉米根瘤菌 (*Rhizobium alamii*) 1 株、阳陵根瘤菌 (*Rhizobium yanglingense*) 2 株、菜豆根瘤菌 (*Rhizobium phaseoli*) 1 株、豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 3 株、圆明园慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium yuanmingense*) 3 株、根瘤菌新种 I (*Rhizobium sp. I*) 7

株、慢生根瘤菌新种 II (*Bradyrhizobium sp. II*) 4 株, 结果表明内蒙古东部地区乌拉尔甘草可以和土壤中 7 个根瘤菌种群建立共生固氮体系。

2.2 根瘤菌系统发育树的构建及亲缘关系

将分离得到的所有菌株与 Genbank 中已上传的模式菌株 *recA* 序列比对, 以 2 株伯克霍尔德模式菌株 (*Burkholderia caribensis* MWAP64 和 *Burkholderia mimosarum* PAS44) 作为外群, 构建系统发育树 (图 1), 21 株根瘤菌均分布在 *Rhizobium* (14 株) 和 *Bradyrhizobium* (7 株) 两个属的系统发育分支上, 其中 *Rhizobium sp. I* 有 7 株菌, 为第一优势菌群, *Bradyrhizobium sp. II* 有 4 株菌, 为第二优势菌群, 但已知 5 个根瘤菌种 *R. alamii*、*R. yanglingense*、*R. phaseoli*、*R. leguminosarum* 和 *B. yuanmingense* 分离得到的菌株数量相对较少, 推测内蒙古东部地区土壤中根瘤菌已知种的丰度较低或发生遗传变异进化为未知种 (图 1)。

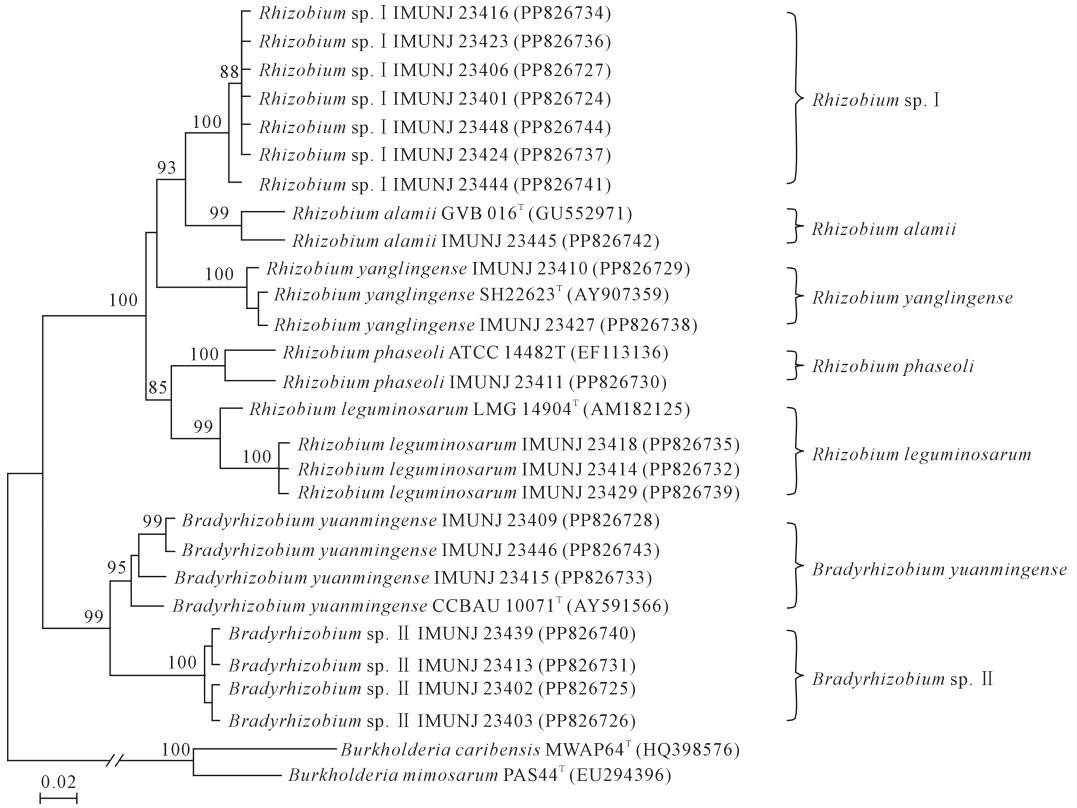
2.3 甘草根瘤菌种群结构及其进化祖先推测

通过 STRUCTURE 软件分析 21 株根瘤菌种群结构得到最佳亚群数量 (K) 为 3, 推测这些菌株的遗传物质由 3 个祖先 (I-III) 进化而来 (图 2)。大部分根瘤菌的遗传物质来源于单一祖先, 进化过程中未获取其他祖先的遗传物质, 遗传稳定性较强, 只有 4 株菌 (IMUNJ 23410、IMUNJ 23427、IMUNJ 23445、IMUNJ 23411) 获得了 2 个祖先的遗传物质, 表明这 4 株菌可能是遗传变异后的进化菌株 (图 2)。

表 1 根瘤菌种信息鉴定

Table 1 Identification of rhizobia species information

序号 No.	菌株名称 Strain name	宿主 Host plant	菌种 Specy
1	IMUNJ 23401	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium sp. I</i>
2	IMUNJ 23402	<i>G. uralensis</i>	<i>Bradyrhizobium sp. II</i>
3	IMUNJ 23403	<i>G. uralensis</i>	<i>Bradyrhizobium sp. II</i>
4	IMUNJ 23406	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium sp. I</i>
5	IMUNJ 23409	<i>G. uralensis</i>	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
6	IMUNJ 23410	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium yanglingense</i>
7	IMUNJ 23411	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium phaseoli</i>
8	IMUNJ 23413	<i>G. uralensis</i>	<i>Bradyrhizobium sp. II</i>
9	IMUNJ 23414	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
10	IMUNJ 23415	<i>G. uralensis</i>	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
11	IMUNJ 23416	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium sp. I</i>
12	IMUNJ 23418	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
13	IMUNJ 23423	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium sp. I</i>
14	IMUNJ 23424	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium sp. I</i>
15	IMUNJ 23427	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium yanglingense</i>
16	IMUNJ 23429	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
17	IMUNJ 23439	<i>G. uralensis</i>	<i>Bradyrhizobium sp. II</i>
18	IMUNJ 23444	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium sp. I</i>
19	IMUNJ 23445	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium alamii</i>
20	IMUNJ 23446	<i>G. uralensis</i>	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
21	IMUNJ 23448	<i>G. uralensis</i>	<i>Rhizobium sp. I</i>

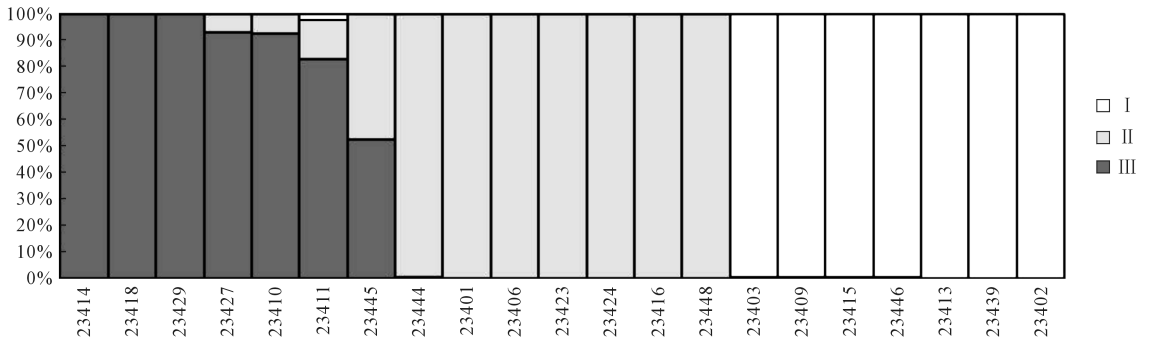


注:系统发育树分支节点的数字表示 bootstrap 值(≥70%);用于鉴定种属关系的模式菌株名称后用上标(T)表示;比例尺 0.02 表示核苷酸碱基差异为 2%。

Note: The number of branch nodes in the phylogenetic tree indicates the bootstrap value (≥70%). The type strains used to identify the species relationship are indicated by superscript (T). Scale bar 0.02 indicates a nucleotide base difference of 2%.

图 1 基于核心基因 *recA* 序列构建的乌拉尔甘草根瘤菌系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of rhizobia associated with *Glycyrrhiza uralensis* fisch based on core gene *recA* sequences



注:推测出的祖先分别用 I、II、III 表示并填充不同灰度,横坐标为菌株编号(省略数字编号前的“IMUNJ”,其编号见表 1),纵坐标表示每株根瘤菌获得某祖先遗传物质的百分比。

Note: The presumed ancestors are represented by I, II, III and filled with different grayscale. The horizontal axis represents the strain number (omitting the “IMUNJ” before the numerical number, as shown in Table 1), and the column of each individual is filled based on the ratio of each ancestor’s single nucleotide allele. The vertical axis represents the percentage of each strain.

图 2 基于核心基因 *recA* 推测的乌拉尔甘草根瘤菌种群结构

Fig.2 Structure of rhizobia associated with *Glycyrrhiza uralensis* fisch based on core gene *recA*.

2.4 甘草根瘤菌核酸多态性分析结果

根瘤菌菌株的单倍体多样性(*Hd*)、核苷酸多样性(π)、种间遗传距离(*Dxy*)和基因交流(*Nm*)存在显著差异(表 2、表 3)。根瘤菌种 *R. yanglingense*、*B.*

yuanmingense 和 *Bradyrhizobium* sp. II 的 *Hd* 值最高(1.000), *Rhizobium* sp. I 和 *R. leguminosarum* 的 *Hd* 值相对较低,分别为 0.952 和 0.667。不同种属根瘤菌的 π 与 πS 值比较相近,表明核苷酸多态性主要

是由于基因 *recA* 发生同义突变所导致。其中,菌种 *Rhizobium* sp. I、*R. leguminosarum* 和 *B. yuanmingense* 的 π 值相对较高,分别为 0.01085、0.01791、0.01369; *R. yanglingense* 和 *Bradyrhizobium* sp. II 的 π 值相对较低,分别为 0.00205 和 0.00753。菌种 *Bradyrhizobium* sp. II 分别与 *Rhizobium* sp. I 和 *R. leguminosarum* 之间的 D_{xy} 值(分别为 0.1917 和 0.1935)最

高;而菌种 *Bradyrhizobium* sp. II 与 *B. yuanmingense* 之间的 D_{xy} 值(0.0688)最低,不同属根瘤菌之间的遗传距离(D_{xy})远大于属内菌株的核苷酸多样性(π),同一属内不同种根瘤菌的遗传距离(D_{xy})也高于核苷酸多样性(π)。根瘤菌不同种的菌种间 Nm 值均较低,表明乌拉尔甘草根瘤菌进化过程中出现的基因流频率较低。

表 2 根瘤菌的核酸多态性

Table 2 Nucleic acid polymorphisms of rhizobia

菌种 Strain	片段长度 Length/bp	S	Eta	h/Hd	π	πS	πN	$\pi N/\pi S$
<i>Rhizobium</i> sp. I	487	13	15	6/0.952	0.01085	0.01918	0.00759	0.395725
<i>R. yanglingense</i>	487	1	1	2/1.000	0.00205	0.00803	0.00000	0.000000
<i>Bradyrhizobium</i> sp. II	487	6	6	4/1.000	0.00753	0.01848	0.00383	0.207251
<i>R. leguminosarum</i>	487	13	13	2/0.667	0.01791	0.01633	0.01884	1.153705
<i>B. yuanmingense</i>	487	10	10	3/1.000	0.01369	0.04719	0.00186	0.039415
总计 Total		164	197	18/0.660	0.12607	0.33268	0.05627	0.169142

注:表中呈现出不同菌种的多态性位点数(S)、单倍型数(Eta)、单倍型多样性(h/Hd)、核苷酸多样性(π)、同义位点多样性(πS)、非同义位点多样性(πN)以及非同义/同义多样性比值($\pi N/\pi S$)等参数。

Note: This table shows the number of polymorphic sites (S), the number of haplotypes (Eta), haplotype diversity (h/Hd), nucleotide diversity (π), synonymous site diversity (πS), nonsynonymous site diversity (πN), and the nonsynonymous/synonymous diversity ratio ($\pi N/\pi S$) for different species.

表 3 根瘤菌的遗传分化(D_{xy})和基因交流指数(Nm)Table 3 Genetic differentiation (D_{xy}) and exchange index (Nm) of rhizobia

菌种 Strain	<i>Rhizobium</i> sp. I	<i>Bradyrhizobium</i> sp. II	<i>R. yanglingense</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>B. yuanmingense</i>
<i>Rhizobium</i> sp. I		0.0300	8.6000	4.4900	17.01
<i>Bradyrhizobium</i> sp. II	0.1917		0.1000	0.0400	0.09
<i>R. yanglingense</i>	0.1016	0.1807		0.0500	0.02
<i>R. leguminosarum</i>	0.1272	0.1935	0.1023		0.05
<i>B. yuanmingense</i>	0.1742	0.0688	0.1674	0.1756	

注:左下角为不同种间的遗传距离(D_{xy})值,右上角为不同种之间的基因交流(Nm)值。

Note: Data in the lower left corner are the genetic differentiation (D_{xy}) values, and data in the upper right corner are the gene exchange index (Nm) values between different species.

3 讨论

有研究证实温室条件下捕捉与田间采集的根瘤菌具有相似的拓扑结构^[29-30],内蒙古东部地区大面积人工种植的乌拉尔甘草根部未采集到根瘤,因此采集土壤并在实验室条件下种植乌拉尔甘草来捕捉根瘤菌,共分离得到根瘤菌 21 株,分别归属为 5 个已知种群 *Rhizobium leguminosarum*、*Rhizobium alarii*、*Rhizobium yanglingense*、*Rhizobium phaseoli*、*Bradyrhizobium yuanmingense* 和 2 个未知种群 *Rhizobium* sp. I、*Bradyrhizobium* sp. II,其中 *Rhizobium* sp. I 为第一优势种群,*Bradyrhizobium* sp. II 为第二优势种群,遗传多样性较高。谷峻等^[12]研究发现,我国北方地区 20 株甘草根瘤菌产生 14 种遗传型,同样

也表现出丰富的遗传多样性。杨亚珍^[31]从西北干旱地区乌拉尔甘草和光果甘草根瘤中共分离出 68 株菌,经系统发育地位分析发现这些菌株分别归属于根瘤菌属、中慢生根瘤菌属、土壤杆菌属、中华根瘤菌属、慢生根瘤菌属,遗传多样性较高;然而,饶小莉等^[13]从乌拉尔甘草根瘤中共分离出 54 株菌,16S rRNA 基因序列鉴定全部归属为中慢生根瘤菌属,却表现出较低的遗传多样性;这些结果表明乌拉尔甘草在不同的土壤中所结根瘤菌的种类也存在较大差异,这可能与土壤中菌群结构和营养类型等因素有关。

乌拉尔甘草根瘤菌的种群结构较为单一,大部分菌株的遗传物质都是从单一祖先进化而来,只有 4 株根瘤菌融合了 2 个祖先的遗传物质,这表明乌

拉尔甘草根瘤菌在进化过程中发生遗传重组概率相对较小,即使在自生状态下受到土壤因子胁迫、共生状态下受到宿主选择作用^[32],根瘤菌仍然能够保持较高的遗传稳定性。根瘤菌不同种之间基因交流系数(Nm)值较低,也充分证明了根瘤菌之间发生基因交流的频率相对较低,遗传物质信息相对保守。Mousavi 等^[11]针对我国中部和西北部地区的甘草根瘤菌进化研究结果发现,中慢生根瘤菌与宿主甘草等豆科植物共进化过程中也会获得其他菌株的遗传物质。

本研究表明,乌拉尔甘草根瘤菌的核苷酸多样性(π)和同义替换的核苷酸多样性(πS)较为接近,且除 *R. leguminosarum* 外,其余菌种 $\pi N/\pi S$ 值均较低,同样也证明了根瘤菌在进化历程中碱基非同义替换很少发生,表现出较高的遗传稳定性,这一结果与锦鸡儿属植物根瘤菌的 π 、 πS 值变化规律一致^[33]。所有分离得到的乌拉尔甘草根瘤菌种 π 值均较低,即使是 π 值最高的 *R. leguminosarum* 种内 π 值也仅为 0.01791,相比而言,种间的 D_{xy} 值相对较高,说明根瘤菌种内遗传分化频率低,种间保持着较高遗传距离;而 *Bradyrhizobium* sp. II 与 *B. yuanmingense* 之间的 D_{xy} 值最低(0.06879),表明这两个种在进化过程中遗传距离相对较近。*B. yuanmingense* 和 *Rhizobium* sp. I 之间的 Nm 值最高 17.01,其余根瘤菌种间 Nm 值均较低,表明 *B. yuanmingense* 和 *Rhizobium* sp. I 即使归属为不同的根瘤菌属,但仍然可能存在较为频繁的基因交流现象。Zhang 等^[20]研究结果与本研究结果较为相似,其通过比较宁夏、新疆、甘肃等地区的鹰嘴豆中慢生根瘤菌基因交流频率,同样发现甘肃和宁夏地区根瘤菌菌群相似性较大,且具有较高的基因交流(Nm)值和较低的遗传分化(D_{xy})距离。然而 Yao 等^[34]研究根瘤菌系统发育和进化分析发现,基因突变和垂直转移是根瘤菌的主要进化过程,核心基因和共生基因发生横向转移和重组的频率较低。

上述研究结果充分表明,乌拉尔甘草根瘤菌的分子进化历程虽然受到宿主选择作用、环境条件、地理隔离等因素的共同影响^[35],但仍然具有较为稳定的遗传过程,尽管有 4 株根瘤菌继承了 2 个祖先的遗传物质,但大部分根瘤菌在进化过程中发生遗传分化和基因交流的频率较低。有研究表明,高效共生固氮根瘤菌的选育不仅能够促进甘草的生长,还能够提高甘草中甘草酸等有效成分的含量^[7],根瘤菌共生固氮作用调控甘草中有效成分的合成代谢分子机制有待进一步深入研究。

4 结 论

内蒙古东部地区土壤中捕捉并分离得到 21 株乌拉尔甘草根瘤菌,系统发育与亲缘关系分析发现这些根瘤菌分别归属于 5 个已知种 *R. alarii*、*R. yanglingense*、*R. phaseoli*、*R. leguminosarum*、*B. yuanmingense* 和 2 个未知种 *Rhizobium* sp. I、*Bradyrhizobium* sp. II, 其中 *Rhizobium* sp. I 为优势种群,表现出较高的遗传多样性。根据单一菌群结构推测 21 株根瘤菌的遗传物质源于 3 个祖先,在进化过程中发生遗传分化和基因交流频率较低,表现出较高的遗传稳定性,表明根瘤菌在土壤中能够稳定遗传,这为乌拉尔甘草高效根瘤菌的选育奠定了理论基础。

参 考 文 献:

- [1] NAZARI S, RAMESHRAD M, HOSSEINZADEH H. Toxicological effects of *Glycyrrhiza glabra* (licorice): a review[J]. *Phytotherapy Research*; PTR, 2017, 31(11): 1635-1650.
- [2] WANG H Q, SONG W, TAO W W, et al. Identification wild and cultivated licorice by multidimensional analysis[J]. *Food Chemistry*, 2021, 339: 128111.
- [3] YANG R, WANG L Q, YUAN B C, et al. The pharmacological activities of licorice[J]. *Planta Medica*, 2015, 81(18): 1654-1669.
- [4] MARGARET-OLIVER I, LEI W, PARADA M, et al. *Sinorhizobium fredii* HH103 does not strictly require KPS and/or EPS to nodulate *Glycyrrhiza uralensis*, an indeterminate nodule-forming legume[J]. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(2): 87-102.
- [5] 耿业业, 王桂荣, 张远帆, 等. 氮、磷对根瘤菌液处理下甘草根瘤生长及固氮活力的影响[J]. *中兽药学*, 2022, 20(5): 1089-1094. GENG Y Y, WANG G R, ZHANG Y F, et al. Effects of N and P on root nodules growth and nitrogen fixation of *Glycyrrhiza uralensis* fisch. treated with rhizobium solution[J]. *Central South Pharmacy*, 2022, 20(5): 1089-1094.
- [6] 杨亚珍, 韦革宏, 万晓红, 等. 西北地区甘草根瘤菌的表型多样性研究[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(2): 20-25. YANG Y Z, WEI G H, WAN X H, et al. Phenotypic feature diversities of *Rhizobia* isolated from *Glycyrrhiza linn* in northwest arid-semiarid region of China[J]. *Microbiology*, 2004, 31(2): 20-25.
- [7] 丁晓霞, 马生军, 陈文峰, 等. 接种根瘤菌对甘草主要活性成分含量的影响及多元统计分析[J]. *中国农业科技导报*, 2023, 25(3): 212-220. DING X X, MA S J, CHEN W F, et al. Effects of rhizobia inoculated on content of main active ingredients in licorice and multivariate statistical analysis[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2023, 25(3): 212-220.
- [8] BAI H Y, BAO F, FAN X R, et al. Metabolomics study of different parts of licorice from different geographical origins and their anti-inflammatory activities[J]. *Journal of Separation Science*, 2020, 43(8): 1593-1602.
- [9] 李洪泉, 程玉鹏, 王继华, 等. 头序甘草(*Clycirrhiza pallidiflora Maxim*)根瘤菌的分离和鉴定[J]. *黑龙江大学自然科学学报*,

- 2001, 18(3): 111-116.
- LI H Q, CHENG Y P, WANG J H, et al. Isolation and identification of rhizobia from *Glycyrhiza pallidiflora* maxim[J]. Journal of Natural Science of Heilongjiang University, 2001, 18(3): 111-116.
- [10] LI L, SINKKO H, MONTONEN L, et al. Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 79(1): 46-68.
- [11] MOUSAVI S A, LI L, WEI G H, et al. Evolution and taxonomy of native mesorhizobia nodulating medicinal *Glycyrrhiza* species in China [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2016, 39(4): 260-265.
- [12] 谷峻, 陈文新. 中国北方地区甘草根瘤菌表型及遗传多样性研究 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1321-1327.
- GU J, CHEN W X. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia associated with *Glycyrrhiza* spp. grown in northern regions of China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(7): 1321-1327.
- [13] 饶小莉, 张敏, 沈德龙, 等. 内蒙古乌拉尔甘草根瘤菌的遗传多样性分析[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(5): 21-24.
- RAO X L, ZHANG M, SHEN D L, et al. Genetic diversity analysis of Ural licorice rhizobia in Inner Mongolia [J]. Journal of Microbiology, 2008, 28(5): 21-24.
- [14] GNAT S, MALEK W, OLENSKA E, et al. Phylogeny of symbiotic genes and the symbiotic properties of rhizobia specific to *Astragalus glycyphyllos* L [J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0141504.
- [15] LIU L, CHEN X, HU S J, et al. Genetic diversity and distribution of rhizobia associated with soybean in red soil in Hunan Province [J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(5): 1971-1980.
- [16] YANG W Q, KONG Z Y, CHEN W M, et al. Genetic diversity and symbiotic evolution of rhizobia from root nodules of *Coronilla varia* [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(1): 49-55.
- [17] 张红侠, 冯瑞华, 李俊, 等. 黄土高原地区大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1466-1473.
- ZHANG H X, FENG R H, LI J, et al. Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the regions of Loess Plateau in China [J]. Acta microbiologica Sinica, 2010, 50(11): 1466-1473.
- [18] 江华明, 赵珂, 刘松青, 等. 青藏高原东麓高山豆 [*Tibetia himalaica* (Baker) H.P. Tsui] 根瘤菌的遗传多样性 [J]. 微生物学报, 2013, 53(7): 710-722.
- JIANG H M, ZHAO K, LIU S Q, et al. Genetic diversity of rhizobial bacteria nodulating *Tibetia Himalaica* in eastern Qinghai-Tibet plateau [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(7): 710-722.
- [19] RASHID M H O, SCHÄFER H, GONZALEZ J, et al. Genetic diversity of rhizobia nodulating lentil (*Lens culinaris*) in Bangladesh [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(2): 98-109.
- [20] ZHANG J J, PENG S S, SHANG Y M, et al. Genomic diversity of chickpea-nodulating rhizobia in Ningxia (north central China) and gene flow within symbiotic *Mesorhizobium muleiense* populations [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2020, 43(4): 126089.
- [21] BOIVIN S, AIT LAHMIDI N, SHERLOCK D, et al. Host-specific competitiveness to form nodules in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar viciae [J]. The New Phytologist, 2020, 226(2): 555-568.
- [22] WEKESA C S, FURCH A C U, OELMÜLLER R. Isolation and characterization of high-efficiency rhizobia from western Kenya nodulating with common bean [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 697567.
- [23] KADBULLAYEVA T, CROSSBIE D B, MARÍN M. *Mesorhizobium norvegicum* sp. nov., a rhizobium isolated from a *Lotus corniculatus* root nodule in Norway [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(1): 388-396.
- [24] 陈强, 张小平, 李登煜, 等. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法 [J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 63-67.
- CHEN Q, ZHANG X P, LI D Y, et al. Isolation of DNA from the root nodule of legume plant [J]. Microbiology, 2002, 29(6): 63-67.
- [25] YAO L J, SHEN Y Y, ZHAN J P, et al. *Rhizobium taibaishanense* sp. nov., isolated from a root nodule of *Kummerowia striata* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(2): 335-341.
- [26] AZEVEDO H, LOPES F, SILLA P, et al. A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis [J]. BMC Genomics, 2015, 16 (S5): S10.
- [27] YOUSEIF S H, ABD EL-MEGEED F H, AGEEL A, et al. Phylogenetic multilocus sequence analysis of native rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Egypt [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2014, 37(8): 560-569.
- [28] DAI J, LIU X, WANG Y. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from *Caragana microphylla* growing in desert soil in Ningxia, China [J]. Genetics and Molecular Research: GMR, 2012, 11(3): 2683-2693.
- [29] JI Z J, LIU T Y, ZHANG J X, et al. Genetic divergence among *Bradyrhizobium* strains nodulating wild and cultivated *Kummerowia* spp. in China [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2019, 42(2): 223-231.
- [30] 杨雪颖, 张执欣, 杨亚珍, 等. 甘草根瘤菌的 16S rDNA 全序列测定及系统进化分析 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(4): 707-711.
- YANG X Y, ZHANG Z X, YANG Y Z, et al. Determination and phylogenetic analysis of whole 16s rDNA sequence in *Glycyrrhizarhizobia* [J]. Acta botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(4): 707-711.
- [31] 杨亚珍. 西北干旱地区甘草根瘤菌的表型多样性及系统发育 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- YANG Y Z. Phenotypic feature diversities of rhizobia isolated from *Glycyrrhiza* linn in northwest arid-semiarid region of China [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2004.
- [32] JI Z J, YAN H, CUI Q G, et al. Competition between rhizobia under different environmental conditions affects the nodulation of a legume [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2017, 40(2): 114-119.
- [33] JI Z J, YAN H, CUI Q G, et al. Genetic divergence and gene flow among *Mesorhizobium* strains nodulating the shrub legume *Caragana* [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2015, 38(3): 176-183.
- [34] YAO Y, WANG R, LU J K, et al. Genetic diversity and evolution of *Bradyrhizobium* populations nodulating *Erythrophleum fordii*, an evergreen tree indigenous to the southern subtropical region of China [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(19): 6184-6194.
- [35] HEATH K D, BURKE P V, STINCHCOMBE J R. Coevolutionary genetic variation in the legume-rhizobium transcriptome [J]. Molecular Ecology, 2012, 21(19): 4735-4747.