

黄土高原根瘤菌数值分类及 DNA-DNA 杂交

谭志远* 朱铭義 程丽娟

(西北农业大学农化系 杨陵 712100)

汪恩涛 李 颖

(北京农业大学生物学院 北京 100094)

黄土高原位于我国内陆,气候比较干旱,生长的植被较少,水土流失严重,而有些豆科植物如锦鸡儿(*Caragana sinica*)、苦豆子(*Sophora alopecuroides*)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)、苦马豆(*Swainsonia salsula*)、洋槐(*Robinia pseudoacacia*)等却能很好生长。这些豆科植物的生长,在防风固沙、保持水土、绿化环境、作为饲用牧草等方面起着很重要的作用。但人们对于黄土高原野生豆科植物根瘤菌的研究尚很少。为此,作者在地处黄土高原的陕西、宁夏及甘肃的部分地区进行了广泛的根瘤菌资源调查。在此基础上,对分离的部分菌株进行了数值分类和 DNA 同源性分析。

1 材料和方法

1.1 菌种

选用新分离纯化并经回接原寄主结瘤的菌株 35 株与已知参比菌 32 株,共 67 株菌进行分析。各菌株编号、来源及寄主名称见表 1。

1.2 生长速度测定

见文献[1]。

1.3 性状测定

对 67 株菌进行了革兰氏染色、耐盐性、生长温度、生长的 pH 值范围、过氧化氢酶、脲酶、L-苯丙氨酸脱氨酶、氧化酶、细胞色素氧化酶、YMA 培养基上产酸产碱反应、3-酮乳糖产生、石蕊牛奶反应、亚甲基蓝还原、耐甲基蓝还原、硝酸盐还原、肉汤生长等的鉴定。唯一碳源试验选用葡萄糖、乳糖、阿拉伯糖、赤鲜糖、塔格糖、果糖、山梨糖、糊精、肌醇、丙二酸钙、丙酮酸钠、草酸钠等 66 种含碳化合物,唯一氮源试验选用尿素、硝酸铵、氯化铵、苯丙氨酸、精氨酸、甘氨酸等 30 种含氮化合物。碳、氮源的浓度均为 0.1%。抗生素敏感性选用氨苄青霉素、金霉素、杆菌肽、氯霉素、强力霉素、红霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、青霉素、多粘菌素、链霉素、土霉素、四环素共 14 种,均采用 5、50、100、300 µg/ml。对染料和化学药物的耐受性采用刚果红、藻红 B、甲基绿、尼罗蓝等 17 种染料和 2 种化学药物(脱氧胆酸钠和亚硝酸钠),以 0.1% (W/V) 的终浓度加入 YMA 培养基中。测定方法均同文献[2]。

1.4 聚类分析

性状编码、相似性系数计算、聚类方法、中心菌株的确定等均按以前描述^[2]。相似性系数用 Ssm,

* 本研究为陈文新教授主持的国家自然科学基金资助重点项目一部分。

现为北京农业大学生物学院博士生。

本文于 1994 年 1 月 10 日收到。

类平均连锁法 (UPGMA) 聚类。

表 1 供试菌株一览表

菌株	寄主	来源	菌株	寄主	来源
新分离菌株			<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
sh190012	<i>Amorpha fruticosa</i>	宁夏	162X68 (biovar <i>trifolii</i>)		美国
sh15003	<i>A. fruticosa</i>	陕西	USDA2370 ^T (biovar <i>viciae</i>)		美国
sh28301	<i>A. fruticosa</i>	甘肃	127K17 (biovar <i>phaseoli</i>)		美国
sh283012	<i>A. fruticosa</i>	甘肃	<i>R. loti</i>		
sh10901	<i>A. fruticosa</i>	陕西	NZP2227 <i>Lotus</i> sp.		
sh2462	<i>Cornilla varia</i>	甘肃	NZP2234 <i>Lotus</i> sp.		
sh246012	<i>Cornilla varia</i>	甘肃	NZP2213 ^T <i>Lotus corniculatus</i>		新西兰
sh17113	<i>Cornilla varia</i>	陕西	<i>R. tropici</i>		
sh1718	<i>Cornilla varia</i>	陕西	C-05-1 <i>Phaseolus vulgaris</i>		巴西
sh27422	<i>Gueldenstaedtia multiflora</i>	甘肃	BR853 <i>Leucaena leucocephala</i>		巴西
sh22623	<i>G. multiflora</i>	甘肃	CIAT899 ^T <i>Phaseolus vulgaris</i>		美国
sh226022	<i>G. multiflora</i>	甘肃	<i>R. galegae</i>		
sh13020	<i>G. multiflora</i>	陕西	HAMBII185 <i>Galega</i> sp.		英国
sh0172	<i>G. multiflora</i>	陕西	HAMBII503 <i>G. officinalis</i>		美国
sh1081	<i>G. multiflora</i>	甘肃	HAMBII540 ^T <i>G. orientalis</i>		芬兰
sh2751	<i>G. multiflora</i>	甘肃	<i>R. fredii</i>		
sh2671	<i>G. multiflora</i>	甘肃	2408 <i>Glycine soja</i>		辽宁
sh2672	<i>G. multiflora</i>	甘肃	USDA194 <i>G. soja</i>		河南
sh2851	<i>G. multiflora</i>	甘肃	USDA205 ^T <i>G. soja</i>		河南
sh28512	<i>G. multiflora</i>	甘肃	<i>Sinorhizobium xinjiangensis</i>		
sh0232	<i>G. multiflora</i>	陕西	CCBAU110 ^T <i>Glycine max</i>		新疆
sh21321	<i>Caragana pruinosa</i>	宁夏	CCBAU108 <i>G. max</i>		新疆
sh215214	<i>C. microphylla</i>	宁夏	Rx22 <i>G. max</i>		新疆
sh18611	<i>C. intermedia</i>	陕西	<i>R. meliloti</i>		
sh1456	<i>Amphicarpaea trisperma</i>	陕西	USDA1002 ^T		美国
sh27121	<i>A. trisperma</i>	甘肃	102F28 <i>Medicago sativa</i>		
sh28931	<i>A. trisperma</i>	甘肃	H1 <i>Melilotus albus</i>		黑龙江
sh0975	<i>A. trisperma</i>	甘肃	<i>R. huakuii</i>		
sh1701	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	陕西	A106 <i>Astragalus sinicus</i>		湖北
sh1707	<i>G. uralensis</i>	陕西	CCBAU2609 ^T <i>A. sinicus</i>		南京
sh19312	<i>G. pallidiflora</i>	宁夏	PL-52 <i>A. sinicus</i>		湖北
sh19352	<i>G. pallidiflora</i>	宁夏	<i>R. sp.</i>		
sh1124	<i>Sophora viciifolia</i>	陕西	I12 <i>Centrosema pubescens</i>		海南
sh2773	<i>S. viciifolia</i>	甘肃	I66 <i>Desmodium smuatu</i>		海南
sh0211	<i>S. viciifolia</i>	陕西	H14 <i>D. heterophyllum</i>		海南
参比菌株			<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		
<i>Rhizobium tianshanense</i>		海南	B15 <i>Glycine max</i>		辽宁
6 <i>Glycyrrhiza uralensis</i>		海南	USDA6 ^T <i>G. max</i>		美国
A-1BS ^T <i>G. uralensis</i>		海南	USDA110 <i>G. max</i>		

T: 模式菌株。

1.5 DNA G+C mol%及DNA-DNA 同源性测定

菌体培养与收集、DNA的提取按文献[3]。DNA G+C mol%测定采用热变性法^[4]。以 *Escherichia coli* K12 作为参考菌株,按 DeLey^[5]的公式进行计算。DNA 同源性测定采用初始复性速率法^[6]。

2 结果和讨论

2.1 数值分类结果

供试菌株的聚类结果见图1。图1中,全部供试菌株在63%的相似性水平上聚在一起,在72%的相似性水平上分为三群。其中第Ⅰ群为快生菌,第Ⅱ群处在快、慢生菌之间,第Ⅲ群为慢生菌。

在第Ⅰ群中,按照 Sneath^[7]的建议和已知菌株的聚类情况,在82%的相似性水平上,将供试的快生菌分成12个亚群,其中第1、2、3、4、5、6、8、10共8个亚群,均为已知菌种,它们依次是:豌豆根瘤菌、弗氏根瘤菌、苜蓿根瘤菌、新疆中华根瘤菌、华癭根瘤菌、百脉根根瘤菌、山羊豆根瘤菌、热带根瘤菌。其中热带根瘤菌 C-05-1 菌株与该种另两个菌株没有聚在一个亚群中。这与化学分类的研究结果相吻合,化学分类中它们分属于两个化学型^[8]。第7、9、12为3个新的亚群。第7亚群的4株菌中,有3株菌的寄主为紫穗槐 (*Amorpha fruticosa*),1株菌来自狼牙刺 (*Sophora viciifolia*),中心菌株为 sh190012 (寄主紫穗槐)。第9亚群中共有9株菌,中心菌株 sh22623,寄主为米口袋 (*Gueldenstaedtia multiflora*),其余8株菌来自小冠花 (*Cornilla varia*) (4株)和三籽两型豆 (*Amphicarpaea trisperma*) (4株)。第12亚群有5株菌,寄主为小叶锦鸡儿 (*Caragana microphylla*)、粉刺锦鸡儿 (*Caragana pruinosa*)、刺果甘草 (*Glycyrrhiza pallidiflora*) 和狼牙刺,中心菌株为 sh19312 (寄主为刺果甘草)。第11亚群中的三株菌是来自海南的快生根瘤菌,已进行过研究^[9]。

第Ⅱ群处在第Ⅰ、Ⅲ群之间,有13、14两个亚群。其中第13亚群的两株菌是新疆中、慢生根瘤菌的代表菌株,已定名为 *R. tianshanense*^[10],寄主有铃当刺、苦马豆、锦鸡儿、甘草、苦豆子等植物。第14亚群的13个菌株均为新分离菌株,寄主以米口袋 (*Gueldenstaedtia multiflora*) 为主,其余寄主为甘草、紫穗槐、狼芽刺、中间锦鸡儿 (*Caragana intermedia*),中心菌株为 sh2672 (寄主为米口袋)。

第Ⅲ群为慢生根瘤菌群,有15、16两个亚群。第15亚群有3株菌,寄主均为米口袋,中心菌株为 sh0172。第16亚群为大豆慢生根瘤菌。

2.2 DNA 分析

在数值分类的基础上,作者分析了第7、9、12、14、15各新亚群内菌株的 DNAG+C mol%含量和菌株间的DNA同源性,以及这几个亚群与已知种的DNA同源性。

第7亚群包括 sh190012、sh10901、sh15003、sh2773 共4个菌株,它们的 DNAG+C mol%含量依次为 61.7、59.5、62.4、61.0,处于 *Rhizobium* 属的范围内 (59.1—65.6)。中心菌株 sh190012 与菌株 sh10901、sh15003、sh2773 的DNA同源性依次为 77.5%、78.2%、86.2%。而 sh190012 与第6亚群中 *R. loti* 模式菌株 NZP2213 的DNA同源性为 72.5%。按照国际细菌分类委员会的建议, DNA 同源性大于等于 70% 为种的界线^[11]。所以,第6、7两个亚群为同一个种,即第7亚群属于 *R. loti* (百脉根根瘤菌)。

第9亚群 DNA G+C mol% 含量为 59.1—62.6,处于 *Rhizobium* 属的范围。中心菌株 sh22623 与该亚群内各菌株的DNA同源性为 71.3—88.1%。该菌株与已知种的模式菌株的DNA同源性在 21.7—59.0% 间,小于 70%。所以,该亚群可能为一个新的根瘤菌种。

第12亚群菌株的 DNA G+C mol% 也在 *Rhizobium* 属的范围内 (59.5—62.6)。其中心菌株 sh19312 与该亚群内其它菌株的DNA同源性在 72% 以上,与已知种模式菌株的DNA同源性为 2.1—63.2%,与第9亚群中心菌株 sh22623 的DNA同源性为 52.6%。这些结果表明,第12亚群也是不同于已知各根瘤菌种的一个新类群。

第14亚群是本研究中最大的一个亚群。它们的代时为 5.1—6.5h。中心菌株 sh2672 与亚群内各菌株的DNA同源性大于 70%,而与已知慢生根瘤菌的模式菌株 USDA6、快生大豆根瘤菌的代表菌株

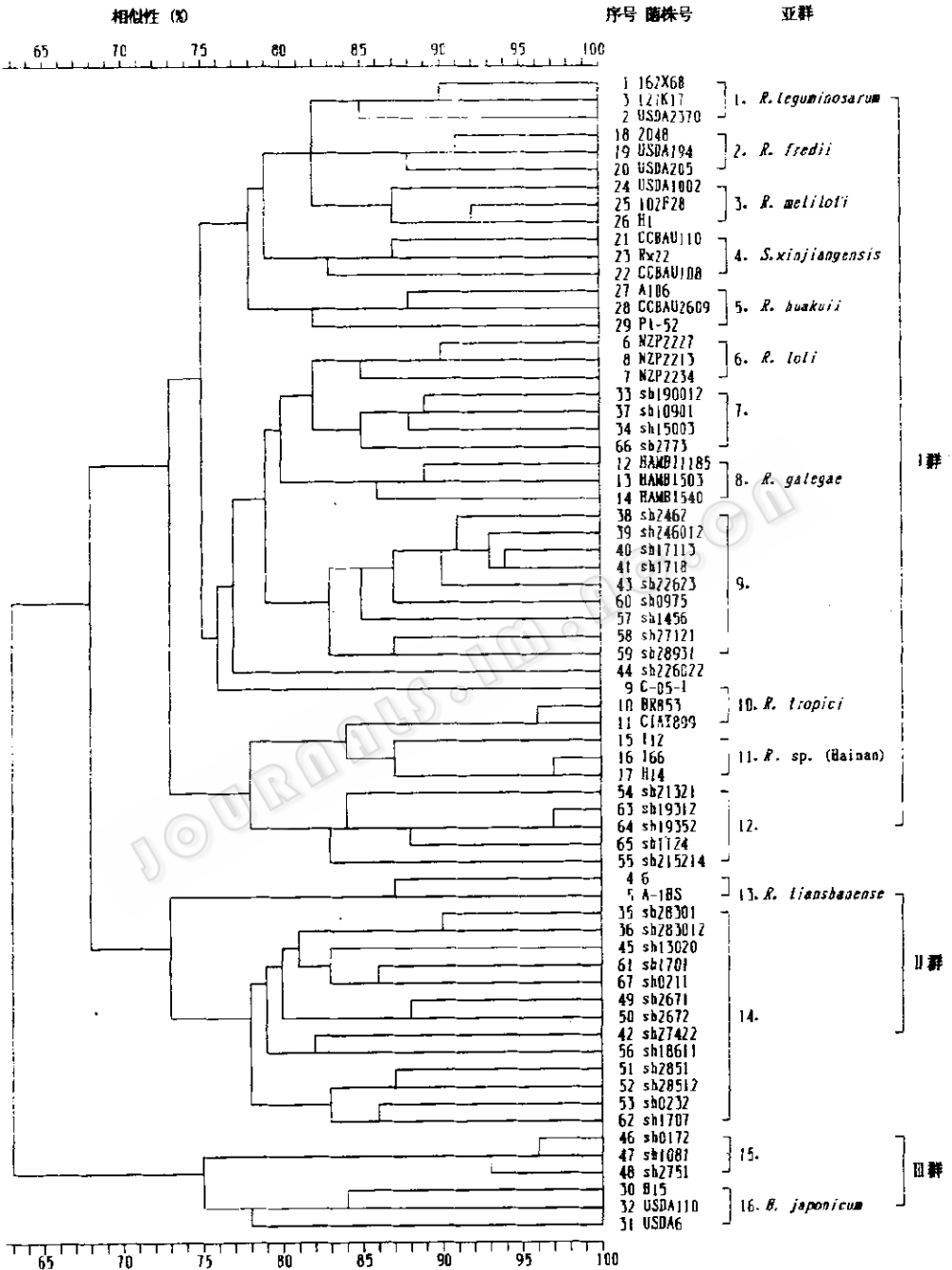


图1 数值分类树状图 (由中国科学院微生物所MINTS数值分类系统生成)

CCBAU110、第15亚群的中心菌株 sh0172 及第13亚群的代表菌株 A-1BS 的 DNA 同源性依次为 25%、41.2%、52% 和 34%。这表明这一群可能为一个新的根瘤菌种。如前所述,与第14亚群同属第1群的第13亚群的代时为 5—13h^[10]。这两群菌均属中、慢生型根瘤菌。16SrRNA 序列分析也表明,在系统发育上,该菌群与快生根瘤菌和慢生根瘤菌的距离相当于属水平的差异(待发表)。

第15亚群包括3株菌 sh0172、sh1081 和 sh2751。其 DNAG+Cmol% 值依次为 62.3、59.1、59.0。它们与慢生根瘤菌模式菌株 USDA6 的 DNA 同源性依次为 15.5%、61.2% 和 36.3%。中心菌株 sh0172 与 sh1081 和 sh2751 的 DNA 同源性分别为 85.2% 和 80.2%,与第14亚群的中心菌株 sh2672 的 DNA 同源性为 52.0%。表型分析和 DNA 分析均表明,第15亚群可能代表了一个新的慢生根瘤菌种。但此次研究中的菌株较少,这两群菌间的关系还需增加菌株进一步研究后才能确定。

本研究中,数值分类和 DNA 同源性分析结果表明,供试的黄土高原野生豆科植物根瘤菌多数不能归入已知各根瘤菌种,而是构成一些独立的类群。原因可能有两点:(1)本文中包括的米口袋、甘草、三籽两型豆、小冠花、狼牙刺、紫穗槐和锦鸡儿等植物的根瘤菌,以前很少有人对它们做过分类研究;(2)与黄土高原本身的生态、气候条件有关。不同的生态环境,存在着不同的植被。而在不同环境中与豆科植物共生的根瘤菌,也可能存在着差异。对这些新类群的确切分类地位有待进一步的研究来确定。本研究及上面提到的一些研究结果表明,根瘤菌尤其是野生豆科植物根瘤菌,在表型和遗传型上具有多样性。广泛的资源调查与分类研究必将大大促进对这类固氮生物资源的认识 and 了解,为其分类和进化等领域的理论研究和根瘤菌应用研究提供材料。

致谢 西北农业大学叶素先生参加了野外采集,李志芳先生参加了部分菌株的分离和纯化,贺学礼先生参加了野外采集和植物鉴定工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 陈文新, 吴柏和, 曹增良, 等. 土壤肥料, 1984, 16 (3): 4—7.
- [2] Chen W X, Li G S, Qi Y L et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41 (2): 275—280.
- [3] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, 3: 208—218.
- [4] Marmur J, Doty P. *J Mol Biol*, 1962, 5: 109—118.
- [5] De Ley J. *J Bacteriol*, 1970, 101: 738—754.
- [6] De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. *Eur J Biochem*, 1970, 12: 133—142.
- [7] Holt J G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 1*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1984. 5—7.
- [8] Martinez-Romero E, Segovia L, Mercante M F et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41 (3): 417—426.
- [9] Gao J L, Sun J G, Li Y et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44 (1): 151—158.
- [10] Chen W X, Wang E T, Wang S Y et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45 (1): (待发表).
- [11] Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41 (4): 582—587.
- [12] 汪恩涛, 陈文新. 微生物学通报, 1992, 19 (1): 34—38.
- [13] Segovia L, Young J P W, Martinez-Romero E et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43 (2): 374—377.

NUMERICAL TAXONOMY AND DNA-DNA HYBRIDIZATION OF RHIZOBIAL STRAINS ISOLATED FROM THE LOESS PLATEAU OF CHINA

Tan Zhiyuan Zhu Mingge Cheng Lijuan

(Department of Agrochemistry, Northwest Agricultural University, Yangling 712100)

Wang Entao Li Ying

(College of Biology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Thirty-five new rhizobial isolates from the loess plateau of China and 32 known strains representing all known species of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* were characterized by numerical taxonomy and DNA analysis. New strains were mainly isolated from the nodules of genera *Amorpha*, *Cornilla*, *Amblytropis*, *Caragana*, *Amphicarpaea*, *Glycyrrhiza*, and *Sophora*. The results of numerical taxonomy based on 208 phenotypical features showed that all tested strains were divided into 3 groups above 72% similarity level. They were fast growing rhizobia, slow-growing rhizobia and a moderate-slow-growing group (generation time was above 5 hr). Most of new isolates fell in 5 distinctive subgroups, differing from all known species of root nodule bacteria. Three of the 5 new subgroups belonged to *Rhizobium*, One of them belonged to *Bradyrhizobium*. Another moderate-slow-growers were similar with a proposed new species, *R. tianshanense*. The analysis of DNA-DNA hybridization indicated that one (subgroup 7) of the 3 fast growing subgroups belonged to *Rhizobium loti*, and the others were new DNA homologous groups, differing from all known species. The exact taxonomic positions of these new subgroups will be determined by further studies.

Key words Loess plateau, *Rhizobium*, Numerical taxonomy, DNA-DNA hybridization.