

# 分离自补骨脂等宿主根瘤的 24 株菌的数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 研究

郝云婕 王孟兆 刘 磊 韩素贞\*

(首都师范大学生命科学学院 北京 100037)

**摘要:** 采用数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 对分离自云南省豆科植物补骨脂(*Psoralea corylifolia*)、葛藤(*Pueraria lobata*)、杭子梢(*Campylotropis macrocarpa*)等宿主的 24 株菌及 10 株根瘤菌参比菌株进行了研究。数值分类结果表明,在 84%相似性水平上,所有的菌株可分为 3 群:群 III 为未知菌群,群 I 为慢生菌群,群 II 为快生和中慢生菌群。从依据 16S rDNA PCR-RFLP 分析建立的树状图来看,在 70%相似性水平上,所有的菌株可分为 5 个系统发育分支:分支 I 和 V 没有参比菌株,为未知分支;分支 II 为 *Agrobacterium-Sinorhizobium-Rhizobium*,分支 III 为 *Mesorhizobium*,分支 IV 为 *Bradyrhizobium*。数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 的结果部分一致,有 2 株菌与 *A. tumefaciens* IAM13129<sup>T</sup> 聚在一起。

**关键词:** 根瘤菌,数值分类,16S rDNA PCR-RFLP

## Numerical Taxonomy and 16S rDNA PCR-RFLP of Rhizobial Strains Isolated from *Psoralea corylifolia* etc

HAO Yun-Jie WANG Meng-Zhao LIU Lei HAN Su-Zhen\*

(Life Science College, Capital Normal University, Beijing 100037)

**Abstract:** 24 strains obtained from root nodules of *Psoralea corylifolia*, *Pueraria lobata*, and *Campylotropis macrocarpa* of Yunnan province were studied with numerical taxonomy and 16S rDNA PCR-RFLP. Results of numerical taxonomy indicated that all strains included 10 reference strains were divided into 3 groups at 84% similarity. Group III is an unknown group with no reference strains. Group I is slow-growing kind, and group II fast and middle-slow-grower. The dendrogram derived from 16S rDNA PCR-RFLP showed that all strains divided into five phylogenetic branches at the similarity of 70%. They are branches I and V with no reference strains, *Agrobacterium-Sinorhizobium-Rhizobium*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium*. Not all results of numerical taxonomy are accord with 16S rDNA PCR-RFLP, and 2 strains at the same group with *A. tumefaciens* IAM13129<sup>T</sup>.

**Keywords:** *Rhizobium*, Numerical taxonomy, 16S rDNA PCR-RFLP

我国云南省地处西南边陲, 气候类型多样、地形复杂, 其豆科植物种类繁多, 与豆科植物共生的根瘤菌资源也十分丰富。我们对国内外研究较少、分离自云南豆科植物补骨脂(*Psoralea corylifolia*)、葛藤(*Pueraria lobata*)和杭子梢(*Campylotropis macrocarpa*)等宿主的 24 株菌进行了数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 研究, 目的主要是考察该地区根瘤菌的表型和遗传多样性特征, 丰富和保存根瘤菌多样性的基因库, 发掘新的、优良的根瘤菌种质资源以及为进一步研究该地区补骨脂等宿主的根瘤菌的分类地位打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

取从云南采集的豆科植物补骨脂(*Psoralea corylifolia*)、葛藤(*Pueraria lobata*)、杭子梢(*Campylotropis macrocarpa*)、滇南杭子梢(*Campylotropis harmsii*)、多花杭子梢(*Campylotropis polyantha*)、光宿包豆(*Shuteria glabrata*)、含羞草决明(*Cassia mimosoides*)和鸡血藤(*Spatholobus suberectus*)等的新鲜根瘤, 用无菌水洗涤后放入 95% 酒精浸泡 5 min, 再用 0.1% 升汞消毒 5 min, 最后用无菌水冲洗 6 次。采用平板划线法分离、纯化菌株, 挑取单菌落,

表 1 菌株一览表  
Table 1 List of strains studied

菌号 Strain	宿主 Host	来源 Origin
651290	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651291	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651301	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651300	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651304	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651310	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651322	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651323	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651320	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651321	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651352	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651371	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
651372	<i>Psoralea corylifolia</i>	云南
650141	<i>Pueraria lobata</i>	云南
650490	<i>Pueraria lobata</i>	云南
650491	<i>Pueraria lobata</i>	云南
650870	<i>Campylotropis macrocarpa</i>	云南
651840	<i>Campylotropis harmsii</i>	云南
651841	<i>Campylotropis harmsii</i>	云南
651181	<i>Campylotropis polyantha</i>	云南
654170	<i>Shuteria glabrata</i>	云南
654251	<i>Shuteria glabrata</i>	云南
653320	<i>Cassia mimosoides</i>	云南
650200	<i>Spatholobus suberectus</i>	云南
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IAM 13129 <sup>T</sup>		日本
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6 <sup>T</sup>	<i>Glycine max</i>	美国
B15		中国
<i>B. elkanii</i> USDA 76 <sup>T</sup>	<i>Glycine max</i>	美国
<i>B. yuanmingense</i> USDA 10073 <sup>T</sup>	<i>Glycine max</i>	美国
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 102F28	<i>Medicago sativa</i>	美国
USDA 1002 <sup>T</sup>		美国
<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 <sup>T</sup>	<i>Pisum sativum</i>	美国
162K68		
<i>Mesorhizobium ciceri</i> USDA 3378 <sup>T</sup>	<i>Cicer arietinum</i>	美国

T : Type strain

CCBAU: Culture Collection of Beijing Agricultural University, China.

USDA: The United States Department of Agriculture, USA.

IAM: Institution of Applied Microbiology, the University of Tokyo, Japan.

选取 24 株革兰氏染色阴性的杆菌、10 株参比菌进行研究。参比菌分属 *Agrobacterium*、*Bradyrhizobium*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium* 和 *Sinorhizobium* 五个属。菌株及其宿主和来源见表 1。所有菌株都用 YMA 培养基<sup>[1]</sup>培养, 培养温度为 28 ℃。

### 1.2 表型测定与数值分类

测试了 34 个菌株 110 个表型特征, 包括碳源和氮源利用、对抗生素和染料的抗性、pH 范围和 NaCl 耐受浓度以及一些酶活性<sup>[1]</sup>。将测定结果转换为二进制数据, 根据单匹配系数法(Ssm)考察它们的相似性, 采用无加权平均连锁法(UPGMA)进行聚类, 聚类的结果用树状图表示<sup>[2]</sup>。

### 1.3 16S rDNA PCR-RFLP

按文献[3]提取所有菌株总 DNA 作模板, 选用位于 *E. coli* 16S rRNA 基因序列保守区域 8~27 和 1524~1540 的两段序列为引物(P1 和 P6)<sup>[4]</sup>, 进行 16S rDNA 扩增<sup>[5]</sup>。10 μL~15 μL 扩增产物用限制性内切酶 *Msp*, *Hinf*, *Rsa* 和 *Hae* 消化<sup>[6]</sup>, 酶切片段用 3% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测<sup>[7]</sup>。对应每一个酶切电泳图谱照片, 凡是电泳图谱上不同菌株间迁移速率相同的带被认为是同个性状; 相应的, 对应

于每一个菌株, 在此位置上有带的编码为“1”, 无带的编码为“0”, 这样使所有酶切图谱带的的数据转换为计算机能接受的数值, 输入 MINTS 分析软件进行分析, 得树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 表型测定与数值分类

根据生长速度, 可将供试菌分为快生型(培养 3 d 菌落直径大于 3 mm 以上)和慢生型(培养 7 d 菌落直径小于 1 mm)两种类型。24 株未知供试菌中, 有 17 株是快生型, 7 株是慢生型。所有菌株均能在 pH11.0 的 YMA 培养基上生长。6 株快生菌和 2 株慢生菌可在 40℃ 生长。快生菌中有 3 株能耐 2% 的 NaCl, 有 1 株能耐 1% 的 NaCl; 而慢生菌在含 1% NaCl 的 YMA 上都不能生长。在 36 种测试碳源中, 快生菌和慢生菌均能利用其中的 35 种。在 12 种供试氮源中, 快生菌中所有菌株能利用其中的 9 种, 慢生菌中所有菌株能利用其中的 8 种。13 株快生菌对红霉素的抗性达 300 μg/mL, 其中有 4 株对青霉素的抗性达 300 μg/mL, 4 株对氯霉素的抗性达 300 μg/mL, 有 2 株对链霉素的抗性达 300 μg/mL; 7 株慢生菌对氯霉素的抗性达 300 μg/mL, 对新霉素

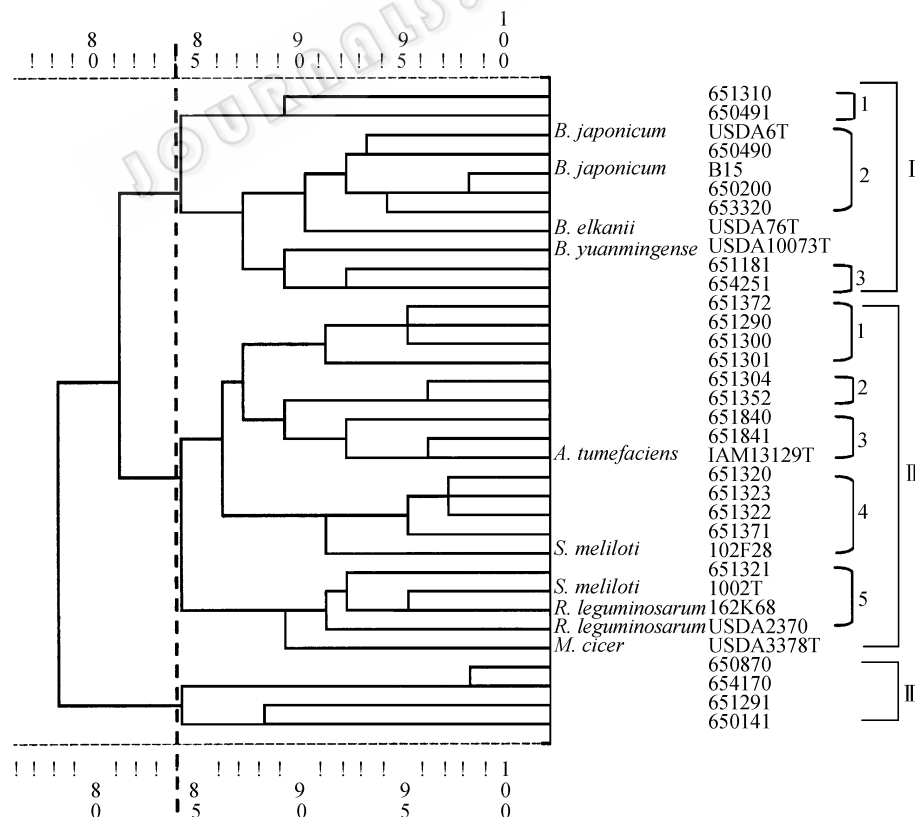


图 1 供试菌的数值分类

Fig. 1 Dendrogram showing the phenotypic similarities among the isolates and strains

的抗性达 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 其中有 5 株对红霉素的抗性达 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 有 2 株对青霉素抗性达 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 有 2 株对卡那霉素的抗性达 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 有 2 株对链霉素的抗性达 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1 数值分类结果

从图中可以看出, 全部供试菌株在 84% 的相似水平上可分为 3 群: 为未知菌群, 为慢生菌群, 为快生和中慢生菌群。在 89% 相似性水平以上, 除 *Sinorhizobium meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> 外, 其它参比菌株都能按种区分开来。

群 在 90% 的相似性水平上主要分为两个亚群。亚群 1 包括 2 个菌株, 1 株分离自补骨脂, 1 株分离自葛藤; 亚群 2 包括 6 个菌株, 1 株分离自葛藤, 1 株分离自鸡血藤, 1 株分离自含羞草决明, 3 株为参比菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76<sup>T</sup>、*B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> 和 *B. japonicum* B15。亚群 3 包括 2 个菌株, 1 株来自多花杭子梢, 1 株来自光宿包豆, 它们均没有与参比的已知菌聚在一起, 有可能是其它慢生菌种或新种, 需其它分类学试验进一步确认。

群 在 90% 的相似性水平上主要分为 5 个亚群。亚群 1 包括 4 个菌株, 均分离自补骨脂。亚群 2 包括 2 个菌株, 也均分离自补骨脂。亚群 3 包括 1 株土壤杆菌参比菌 *Agrobacterium tumefaciens* IAM13129<sup>T</sup> 以及 2 株均分离自滇南杭子梢的菌, 它们有可能属于土壤杆菌, 有待结瘤试验、*nif* 基因检测或其它分类鉴定试验进一步确认。亚群 4 包括 5

个菌株, 4 株分离自补骨脂, 1 株为参比菌株 *Sinorhizobium meliloti* 102F28。亚群 5 包括 4 个菌株, 1 株分离自补骨脂, 3 株为参比菌株 *S. meliloti* USDA 1002<sup>T</sup>、*Rhizobium leguminosarum* USDA 2370 和 *R. leguminosarum* 162K68。其中的亚群 1、亚群 2 均没有与参比的已知菌聚在一起, 有可能为其它菌或新种。

群 包括 4 株菌, 其中 1 株来自杭子梢, 2 株来自光宿包豆, 1 株来自葛藤。因为没有参比菌, 这群菌株是否为根瘤菌需要进一步的试验如 16S rRNA 序列分析来确定。

2.3 16S rDNA PCR-RFLP

从图 2 可以看出, 在 70% 的相似性水平上, 可以分为 5 个系统发育分支: 分支 和 没有参比菌株, 为未知分支; 分支 为 *Agrobacterium*–*Sinorhizobium*–*Rhizobium*, 分支 为 *Mesorhizobium*, 分支 为 *Bradyrhizobium*。

在 89% 的相似性水平上, 又可主要分为 10 个亚分支。第 1、2 和 3 亚分支属于分支 , 其中亚分支 2 和 3 包括了数值分类群的亚群 2 和未知群 中的部分菌株。亚分支 4、5 和 6 属于 *Agrobacterium*–*Sinorhizobium*–*Rhizobium* 分支, 亚分支 4 中菌株 651840 和 651841 以 100% 的相似性与 *A. tumefaciens* IAM13129<sup>T</sup> 聚在一起, 与数值分类结果一致, 因此可以初步确认它们是土壤杆菌属的菌种。亚分支 7、8 和 9 属于 *Bradyrhizobium* 分支, 其中亚分支 7 的 4 株菌 651372、651290、651300 和 651301 间的相似

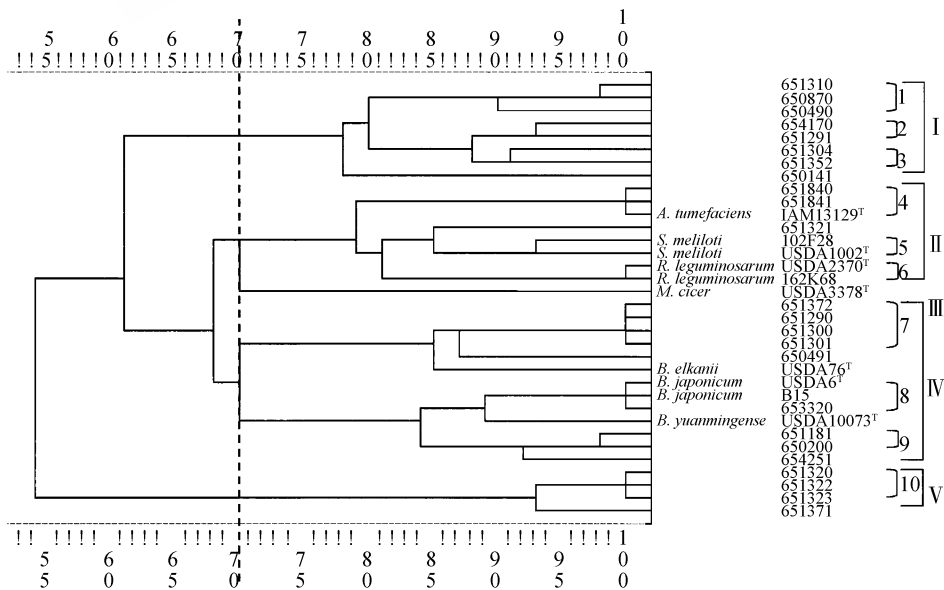


图 2 供试菌的 16S rDNA PCR-RFLP 树状图

Fig. 2 Dendrogram showing the preliminary phylogenies of four groups from PCR-RFLP data of 16S rRNA gene

性达到 100%，是数值分类中群 的第 1 亚群；亚分支 8 的 653320 以 100% 的相似性与 *B. japonicum* USDA6<sup>T</sup> 和 B15 聚在一起，因此可初步确认它属于慢生菌；亚分支 9 没有参比菌，651181、654251 和 650200 3 株菌以 92% 的相似性聚在一起。亚分支 10 以 93% 的相似性聚在一起，与数值分类群 中的亚群 4 一致。

### 3 讨论

从数值分类和 16S rRNA PCR-RFLP 的结果来看，分离自补骨脂等宿主根瘤的菌株有很多是根瘤菌，但这些根瘤菌的分类地位如何，还需要更多的试验来证实；也有的菌株不是根瘤菌，它们与根瘤菌的关系如何，怎样与根瘤环境相适应，在共生固氮中起什么作用，还有待进一步的研究。

#### 3.1 分离自补骨脂等宿主的根瘤菌具有复杂的共生特性

长期以来一直认为根瘤菌分类与宿主密切相关，从某一或某些宿主分离的根瘤菌应属同一个种，该类宿主也只与该种根瘤菌结瘤固氮，即“宿主专一性”。但这种传统分类依据的“互接种族”(即一种根瘤菌只与一种或数种植物共生)关系逐渐被遗传物质的交换重组、基因横向转移等现象的发现而否定。根瘤菌与豆科植物共生关系的建立是细菌、植物及环境三方相互作用的结果<sup>[8]</sup>。根瘤菌分布的多样性不只是细菌与植物间的简单交流，更是环境因素与自身遗传特性相互作用共进化的结果<sup>[9]</sup>。

本研究中再一次表明了根瘤菌复杂的共生特性。从数值分类的结果看，从同一宿主分离到的根瘤菌可以聚到不同的群里，如分离自补骨脂的根瘤菌中，有 1 株菌(651310)聚在慢生菌群(与 *Bradyrhizobium* 的相似性达到 84%)，有 4 株菌与 *S. meliloti* 的相似性达到 95%；不同宿主的根瘤菌也可聚在同一群里，群 的亚群 2 是由分离自葛藤、鸡血藤和含羞草决明的根瘤菌组成的。

#### 3.2 数值分类的结果与 16S rDNA-RFLP 结果部分相似

*Agrobacterium-Sinorhizobium-Rhizobium* 分支中，亚分支 4 中菌株 651840 和 651841 以 100% 的相似性与 *A. tumefaciens* IAM13129<sup>T</sup> 聚在一起，与数值分类结果一致，因此可以初步确认它们是土壤杆菌属的菌种。*Bradyrhizobium* 分支中，亚分支 9 没有参比

菌，651181、654251 和 650200 三株菌以 92% 的相似性聚在一起，与数值分类群 的亚群 2 一致。亚分支 10 以 93% 的相似性聚在一起，与数值分类群 中的亚群 4 一致。

但是，两种分析方法也有不一致的地方，如亚分支 7、8 和 9 属于 *Bradyrhizobium* 分支，其中亚分支 7 的 4 株菌 651372、651290、651300 和 651301 间的相似性达到 100%，是数值分类中群 的第 1 亚群。

两种方法结果差异主要有以下原因：首先，每种分析方法都有其适用范围，各有优点和局限性：数值分类对众多的表型性状进行统计学分析有优势；16S rDNA-RFLP 则是直接依据核酸分子携带的遗传水平信息进行分析，表型数值分类与 16S rDNA-RFLP 遗传分析的结果若互相验证，则结论的可靠性增强，可进一步进行 16S rDNA 序列测定分析系统发育关系或杂交定种等。其次，由于每种分析都含有人为操作的外在因素，尤其是数值分类，许多性状差异需要人为判定，某些表型性状的出现呈过渡状态，时机掌控不好会增加结果分析时的统计学差异；相比之下，依据基因的遗传分析相对客观，因此近年来较为流行。但是，目前发现并确认了遗传基因交换重组和基因横向转移等现象，如侯卫国等人<sup>[10]</sup>通过研究结瘤基因的进化分析，证明慢生根瘤菌的结瘤基因主要是通过直系遗传的，同时可能因适应宿主及环境需要进行一定程度的平行转移。基因横向转移使研究者对遗传基因分子标记的选择、数量以及结果的评判标准逐渐出现分歧，又降低了遗传分析的可靠性。

#### 3.3 分离自杭子梢的根瘤菌与土壤杆菌同种

近年来，从豆科植物根瘤中分离出的一批“根瘤菌”，分类的结果是“土壤杆菌”的现象时有发生。韩素贞<sup>[11,12]</sup>发现从菜豆、杭子梢和决明根瘤中分离出的 88 株根瘤菌中有 33 株与悬钩子土壤杆菌 (*A. rubi*) 同种。在本研究中，从滇南杭子梢根瘤中分离的 2 株菌与根癌土壤杆菌 (*A. tumefaciens* IAM13129<sup>T</sup>) 聚在一起，相似性达到 100%。Del Papa<sup>[13]</sup>曾从热带豆科植物中分离到 *Agrobacterium* 菌株；Mhamdi 等<sup>[14]</sup>研究了从突尼斯菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 中分离到的 160 株根瘤菌，其中有 16% 属于 *Agrobacterium*，从它们的 DNA 中扩增不出 *nifH* 和 *nodC* 基因片段，共生基因探针实验得不到杂交信号，

结瘤实验表明它们不能和菜豆结瘤固氮。Tiwary<sup>[15]</sup>在蚕豆(*Vicia faba*)根瘤里分离到了 2 株 *A. tumeficiens* 的新的生物型。

对于这些现象, 国内外至今还缺乏深入研究, 其原因和机理不清。综合国内外学者的猜测, 其可能原因是: 1) 由于共生质粒的横向转移, 确实存在含有结瘤固氮基因的土壤杆菌; 也有可能后期质粒丢失; 2) 土壤杆菌是一种广泛存在的豆科植物内生菌; 3) 土壤杆菌为根瘤菌的伴生菌, 它与根瘤菌混合侵染豆科植物根毛, 由于生长速度快最后形成优势种。

本研究中从滇南杭子梢分离的菌株与根瘤菌的关系还有待深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Gao JL, Sun JG, Li Y, *et al.* Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan province, China. *Int J of Syst Bacteriology*, 1994, **44**(1): 151–158.
- [2] Sy A, Giraud E, Jourand P, *et al.* Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol*, 2001, **183**(1): 214–220.
- [3] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *J Mol Biol*, 1961, **3**: 208–218.
- [4] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 1991, **173**(2): 697–703.
- [5] van Berkum P, Beyene B, Eardly BD. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int J Syst Bacteriol*, 1996, **46**(1): 240–244.
- [6] Laguerre G, Allard M, Revory F, *et al.* Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(1): 56–63.
- [7] Wang ET, van Berkum P, Beyene D, *et al.* *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int J Syst Bacteriol*, **48**(3): 687–699.
- [8] 陈文新. 根瘤菌资源多样性与系统发育. 中国农业大学学报, 2004, **9**(2): 6–7.
- [9] 杨江科, 谢福莉, 周俊初. 江汉平原及其周边地区花生根瘤菌遗传的遗传多样性. 生态学报, 2003, **23**(3): 504–511.
- [10] 侯卫国, 连 宾. 慢生根瘤菌属结瘤基因的进化及遗传分析. 遗传, 2007, **29**(1): 118–126.
- [11] 韩素贞, 陈文新. 分离自杭子梢等 3 个宿主的根瘤菌的表型分析. 微生物学通报, 2003, **30**(2): 4–11.
- [12] Han SZ, Wang ET, Chen WC. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylobacter* and *Cassia* grown in China. *System Appl Microbiol*, 2005, **28**(3): 265–276.
- [13] Del Papa MF, Balagué LJ, Sowinski SC, *et al.* Isolation and characterization of alfalfa - nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(4): 1420–1427.
- [14] Mhamdi R, Lafuerre G, Aouani ME, *et al.* Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, **41**(1): 77–84.
- [15] Tiwary BN, Prasad B, Ghosh A, *et al.* Characterization of two novel biovar of *Agrobacterium tumefaciens* isolated from root nodules of *Vicia faba*. *Curr Microbiol*, 2007, **55**(4): 328–333.

## 新辟栏目介绍

## 生物实验室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度, 深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果, 交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室, 以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。