

我国中东部地区紫穗槐、紫荆、紫藤根瘤菌的数值分类及 16SrDNA PCR-RFLP 研究

刘 杰^{1,2}, 陈文新¹

(¹ 中国农业大学生物学院, 北京 100094; ² 山东农业大学生命学院, 泰安 271018)

摘要: 从分离自我国中东部地区紫穗槐、紫荆和紫藤 3 种宿主根瘤菌中, 选取 59 个菌株和 29 个参比菌株, 对它们进行了 135 个表型性状测定的数值分类分析和 16SrDNA PCR-RFLP 研究。试验结果表明, 数值分类聚类在 82% 相似性水平上、16SrDNA PCR-RFLP 聚类在 92% 相似性水平上均聚为 7 个群, 各宿主根瘤菌基本上按参比菌株各属归群。其中绝大多数紫穗槐根瘤菌归属于中慢生根瘤菌属, 而且在种水平上表现出一定程度的地理环境多样性, 紫荆根瘤菌基本上属于慢生根瘤菌属, 在分群方面未表现出明显的地区差异, 而紫藤根瘤菌则基本上归属于快生菌。其中来自江、浙地区的紫藤根瘤菌与来自其它地区的紫藤根瘤菌存在着明显的地理环境差异, 并且紫藤根瘤菌较其它 2 种宿主根瘤菌表现出较强的抗逆能力, 如能够耐某些高浓度(300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 的抗生素, 可在高盐环境(3% NaCl) 和强碱环境(pH 11.0) 下生长。这将为我国进行荒山造林、扩种豆科树种提供有意义菌种。另外, 数值分类结果亦表明, 以紫穗槐根瘤菌为代表的群 2、以紫荆根瘤菌为代表的群 5 和以紫藤根瘤菌为代表的群 7 在种水平上均独立成群, 预示着可能有新种的出现。

关键词: 豆科树 根瘤菌 数值分类 16SrDNA PCR-RFLP

Numerical Taxonomy and 16SrDNA PCR-RFLP of Root Nodule Bacteria Isolated from the Nodules of Leguminous Trees, *Amorpha fruticosa*, *Cercis racemosa* Oliv. and *Wisteria (sims)* Sweet

LIU Jie^{1,2}, CHEN Wen-xin¹

(¹ College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094;

² College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract: Fifty-nine rhizobial strains, isolated from root nodules of wood legume trees (*Amorpha fruticosa*, *Cercis racemosa* Oliv. and *Wisteria (Sims)* Sweet) in middle and eastern China, were studied by performing analysis of 135 phenotypic characteristics and 16SrDNA PCR-RFLP. At the 82% similarity level in numerical taxonomy or at the 92% similarity level in 16SrDNA PCR-RFLP, seven groups were clustered. The results indicated that most rhizobial strains from root nodules of *Amorpha fruticosa* belong to genera *Mesorhizobium*, and to a greater or lesser extent it also showed a geographical variation; Most rhizobial strains from root nodules of *Cercis racemosa* belong to genera *Bradyrhizobium*, but did not show the obvious difference among geographical origins; Most rhizobial strains from root nodules of *Wisteria sinensis* belong to fast-growing rhizobia, and there was an obvious geographical diversity among the strains from Jiangsu, Zhejiang province and other provinces. Meanwhile, most rhizobial strains from root nodules of *Wisteria sinensis* have high stress resistance. For example, some strains can grow on YMA medium with some higher concentration of antibiotics(300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), higher concentration of salt(3% NaCl) or higher alkaline environment(pH 11.0), respectively. In

收稿日期: 2002-09-04

基金项目: 国家 973 项目(2001CB108905) 和国家自然科学基金重点资助项目(39730010)

作者简介: 刘 杰(1963-), 男, 安徽霍山人, 在读博士研究生, 主要从事细菌分类、应用及微生物教学工作。陈文新为本文通讯作者, Tel: 010-62893749; E-mail: wenxin-chen@263.net

addition, the results also indicated that some strains in group 2, group 5 and group 7 of numerical taxonomy might be new taxa.

Key words: Leguminous tree; Rhizobia; Numerical taxonomy; 16SrDNA PCR-RFLP

长期以来人们一直将注意力集中在与农牧业生产关系密切的豆科作物与根瘤菌的共生体系研究方面。自 20 世纪 80 年代以来相继发表了若干与之有关的根瘤菌新属种^[1], 并且有许多优良菌株已作为接种剂应用到实际生产中。然而, 对大量豆科树种根瘤菌的分类研究却相对较少。直到最近 10 多年才开始引起人们的关注。我国的豆科树种超过 760 种, 固氮豆科树种和根瘤菌资源异常丰富^[2]。千百年来, 人们早就知道豆科树种能够促进与之混生的其它树种的生长, 并且它们也是整个生物共生固氮体系中的重要组成部分。因此, 广泛开展木本豆科植物根瘤菌的分类研究, 不仅可以丰富现有的根瘤菌分类系统, 而且还可作为我国的退耕还林、荒山造林等工程提供应用根瘤菌的理论基础和有意义的菌株。

紫穗槐(*Amorpha fruticosa*)是具有较强抗逆性和应用价值的乔、灌木树种, 作为引进品种在我国大部分地区均有广泛的种植。可作优质绿肥、家畜饲料等, 含有丰富的植物芳香油, 并且在防沙固沙、护堤、防尘中作用显著。汪恩涛^[3]曾对分离自我国西北地区的紫穗槐根瘤菌进行过研究, 将其中一大群表型和遗传型特异的菌株定为一个新种, 但同时也发现存在一定的遗传多样性。而紫藤(*Wisteria Sinensis* (Sims) Sweet)和紫荆(*Cercis racemosa* Oliv.)则是我国中、东、南部地区常见的豆科树种, 除具有较高的绿化和观赏价值外, 还有一定的医学研究价值。它们的种子或树皮均可作为中草药成分治疗多种疾病。目前对于这两种宿主根瘤菌的分类研究尚未见报道。

本试验选用分离自我国中东部地区的紫穗槐、紫荆和紫藤根瘤菌为研究对象, 采用大量表型特征分析的数值分类方法和系统发育研究手段, 对 3 种宿主根瘤菌的分类地位进行研究, 并期从中发现和保存表型特异的根瘤菌种质资源。

1 材料与方法

1.1 菌株选取和准备

全部供试菌株共 88 株。其中用于数值分类测定的 70 株菌中有 15 株参比菌株, 55 株待测菌株。用于 16SrDNA PCR-RFLP 分析的 82 株菌中, 参比

菌株 21 株, 待测菌株 61 株。全部供试菌株均经间接结瘤、划线和基内混菌分离、纯化, 并镜检纯度合格。菌株代号、来源及宿主名称见表 1。

1.2 生理生化性状测定

在数值分类分析测定中共选取了 135 项生理、生化性状进行测定, 包括 46 种碳源、14 种氮源的利用(终浓度为 0.1%)、8 种不同浓度抗生素的抗性测定; 8 种染料和 2 种化学药物的耐受性试验(在 YMA 中的终浓度为 0.1% w/v)以及不同生长温度和 pH 值范围, 不同浓度的耐盐性试验, 过氧化氢酶、脲酶、L-苯丙氨酸酶、氧化酶的酶活性测定, 产酸、产碱、产 3-酮基乳糖反应, 石蕊牛奶反应, 肉汤利用, 亚甲基蓝、耐尔蓝和硝酸盐还原反应测定。测定方法见参考文献 [4]。

1.3 16SrDNA-RFLP 分析

1.3.1 总 DNA 的提取 参照文献 [5] 中总 DNA 的快速提取方法, 并略作修改。

将活化根瘤菌接种于 5 ml YMA 液体培养基中, 28℃、130 rpm 培养至对数生长期后期, 离心收集菌体, 并用生理盐水洗涤菌体 3 次, 往菌体中加入异硫氰酸胍(GUTC)缓冲液 800 μ l [4 mmol·L⁻¹ GUTC, 40 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5), 5 mmol·L⁻¹ CDTA (反式-1, 2-环己二胺四乙酸)], 振荡混匀并于室温下放置 15 min, 加入 50~60 μ l 硅藻土/TE Buffer (w/v = 1:1), 充分混匀, 室温下放置 15 min; 13 000 rpm 离心 5 min, 弃掉上清液, 再往沉淀中加入 500 μ l GUTC 缓冲液充分混匀, 室温下放置 15 min, 13 000 rpm 离心后, 用 700 μ l New Wash Buffer [60% 乙醇, 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5), 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 400 mmol·L⁻¹ NaCl] 洗涤沉淀 2 次, 离心后沉淀用 600 μ l 70% 乙醇洗涤 1 次, 13 000 rpm 离心 5 min, 真空干燥沉淀物, 最后用 100 μ l 0.1 × TE 缓冲液悬浮该沉淀物, 并于 55~65℃ 下保温 10 min, 离心提取上清液即为大小 20 kb 左右的总 DNA 溶液。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 的大小和纯度, 以已知浓度的 λ DNA 作为分子量标准。

1.3.2 PCR 扩增 50 μ l 反应体系中含 TaqDNA 聚合酶 (Promega 生产) 2.5 U, KCl 10 mmol·L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 8 mmol·L⁻¹, Tris-HCl (pH 9.0) 10

mmol·L⁻¹, Mg²⁺ 2 mmol·L⁻¹, dNTP 0.2 mmol·L⁻¹, 正、反向引物各 50 ng(引物序列参考文献 [6]) 模板 DNA 50 ng, 用 ddH₂O 补足 50 μl。PCR 扩增条件: 94℃ 变性 2 min, 56℃ 退火 2 min, 72℃ 延伸 3 min, 35 个循环后于 72℃ 保温 10 min。最后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小(约 1.5 kb) 和估测浓度大小。

表 1 供试菌株¹⁾

Table 1 List of bacterial strains tested

菌株 Strains	宿主 Hosts	来源 Origin	菌株 Strains	宿主 Hosts	来源 Origin
<i>Rhizobium leguminosarum</i>			CCBAU21244	<i>W. sinensis</i> Sweet	江苏 Jiangsu
USDA2370 ^T	<i>Pisum sativum</i>	美国 USA	CCBAU31079	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
162K68	<i>Trifolium</i> sp.	美国 USA	CCBAU31125	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
<i>R. elii</i> CFN42 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	墨西哥 Mexico	CCBAU31169	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
<i>R. hainanense</i> CCBAU57015 ^T	<i>Desmodium sinuatum</i>	北京 Beijing	CCBAU31218	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
<i>R. tropici</i> : typeA : CFN299 ^T	<i>P. vulgaris</i>	墨西哥 Mexico	CCBAU31222	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
<i>R. mongolense</i> USDA1844 ^T	<i>Medicago luthenica</i>	美国 USA	CCBAU31237	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
<i>Sinorhizobium fredii</i>			CCBAU31273	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
USDA205 ^T	<i>Glycine soja</i>	美国 USA	CCBAU31278	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
USDA194	<i>G. soja</i>	美国 USA	CCBAU31301	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
<i>S. arboris</i> HAMB1 1552 ^T	<i>Acacia senegal</i>	芬兰 Finland	CCBAU31314	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
<i>S. kostiensis</i> HAMB1 1489 ^T	<i>A. senegal</i>	芬兰 Finland	CCBAU31319	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
<i>S. meliloti</i> USDA1002 ^T	<i>Medicago sativa</i>	美国 USA	CCBAU31322	<i>W. sinensis</i> Sweet	浙江 Zhejiang
<i>Mesorhizobium loti</i>			CCBAU25093	<i>W. sinensis</i> Sweet	山东 Shandong
NZP2213 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	新西兰 New Zealand	CCBAU25236	<i>W. sinensis</i> Sweet	山东 Shandong
NZP2227	<i>Lotus</i> sp.	新西兰 New Zealand	CCBAU43107	<i>W. sinensis</i> Sweet	湖北 Hubei
<i>M. amorphae</i>			CCBAU410088	<i>W. sinensis</i> Sweet	湖南 Hunan
ACCC19665 ^T	<i>Amorpha fruticosa</i>	北京 Beijing	CCBAU25203	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
ACCC19660	<i>A. fruticosa</i>	北京 Beijing	CCBAU25039	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
N206	<i>A. fruticosa</i>	北京 Beijing	CCBAU25049	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
<i>M. tianshanense</i> CCBAU3306 ^T	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	北京 Beijing	CCBAU25069	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
<i>M. plurifarium</i> LMG11892 ^T	<i>Acacia Senegal</i>	比利时 Belgium	CCBAU25083	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>			CCBAU25114	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
USDA6 ^T	<i>G. max</i>	美国 USA	CCBAU25141	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
USDA110	<i>G. max</i>	美国 USA	CCBAU25198	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
B15	<i>G. max</i>	辽宁 Liaoning	CCBAU25211	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
<i>B. elkanii</i> USDA76 ^T	<i>G. max</i>	美国 USA	CCBAU25219	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
<i>B. liaoningensis</i> USDA3622 ^T	<i>G. max</i>	美国 USA	CCBAU25228	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			CCBAU25239	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
<i>A. IAM13129</i> ^T		日本 Japan	CCBAU25261	<i>A. fruticosa</i>	山东 Shandong
<i>A. rhizogenes</i> IAM13570 ^T		日本 Japan	CCBAU45010	<i>A. fruticosa</i>	河南 Henan
<i>A. vitis</i> IAM14140 ^T		日本 Japan	CCBAU45161	<i>A. fruticosa</i>	河南 Henan
<i>A. rubi</i> IAM13569 ^T		日本 Japan	CCBAU45181	<i>A. fruticosa</i>	河南 Henan
CCBAU 23082	<i>C. racemosa</i> Oliv.	安徽 Anhui	CCBAU45189	<i>A. fruticosa</i>	河南 Henan
CCBAU 23083	<i>C. racemosa</i> Oliv.	安徽 Anhui	CCBAU45210	<i>A. fruticosa</i>	河南 Henan
CCBAU 23151	<i>C. racemosa</i> Oliv.	安徽 Anhui	CCBAU45246	<i>A. fruticosa</i>	河南 Henan
CCBAU 23165	<i>C. racemosa</i> Oliv.	安徽 Anhui	CCBAU45255	<i>A. fruticosa</i>	河南 Henan
CCBAU 23212	<i>C. racemosa</i> Oliv.	安徽 Anhui	CCBAU45257	<i>A. fruticosa</i>	河南 Henan
CCBAU 43068	<i>C. racemosa</i> Oliv.	湖北 Hubei	CCBAU45259	<i>A. fruticosa</i>	河南 Henan
CCBAU 43130	<i>C. racemosa</i> Oliv.	湖北 Hubei	CCBAU410002	<i>A. fruticosa</i>	湖南 Hunan
CCBAU 43142	<i>C. racemosa</i> Oliv.	湖北 Hubei	CCBAU410121	<i>A. fruticosa</i>	湖南 Hunan
CCBAU 43187	<i>C. racemosa</i> Oliv.	湖北 Hubei	CCBAU410172	<i>A. fruticosa</i>	湖南 Hunan
CCBAU 43219	<i>C. racemosa</i> Oliv.	湖北 Hubei	CCBAU410244	<i>A. fruticosa</i>	湖南 Hunan
CCBAU 21218	<i>W. sinensis</i> Sweet	江苏 Jiangsu	CCBAU410254	<i>A. fruticosa</i>	湖南 Hunan
CCBAU 21224	<i>W. sinensis</i> Sweet	江苏 Jiangsu	CCBAU30006	<i>A. fruticosa</i>	河北 Hebei
CCBAU 21235	<i>W. sinensis</i> Sweet	江苏 Jiangsu	CCBAU28301	<i>A. fruticosa</i>	陕西 Shanxi
CCBAU21239	<i>W. sinensis</i> Sweet	江苏 Jiangsu	CCBAU283012	<i>A. fruticosa</i>	陕西 Shanxi

¹⁾ CCBAU : Culture Collection of China Agricultural University ; USDA : The United States Department of Agriculture ; NZP : Division of Scientific and Industrial Research , Palmerston , New Zealand ; LMG : Collection of the Laboratorium voor Microbiologieen Microbiële Genetic , Rijksuniversiteit , B-9000 , Gent , Belgium ; IAM : Institution of Applied Microbiology , The University of Tokyo , Japan ; ACCC : Agricultural Center of Culture Collection , Chinese Academy of Agriculture Sciences , Beijing , China ; CFN : Centre Investigation Sobre Fijacion de Nitrógeno , Universidad Nacional Autónoma de Mexico , Cuernavaca , Mexico ; HAMB1 : Culture Collection of the Department of Microbiology , Faculty of Agriculture and Forestry , University of Helsinki , Helsinki , Finland ; T : type strain

1.3.3 酶切及电泳 根据文献 [7] 选取 4 种限制性内切酶(Hae III、Hinf I、Msp I、Alu I), 每种酶切反应 10 ul 体系中含 5 μl PCR 扩增产物, 5U 内切酶及相应的缓冲液, 37℃ 酶切 3 h。全部酶切产物与 3 μl 上样缓冲液混匀后点样, 用 3.0% 琼脂糖凝胶电泳在 100V 恒压电泳 4 h。

1.4 结果处理及分析方法

对数值分类中的生理生化性状测定结果按阳性反应记为“1”,阴性反应记为“0”,不确定反应记为“N”,编码后输入计算机,并去除全同性状。对于16SrDNA-RFLP,将相同电泳谱带合并后,将在同一位置上有谱带的记为“1”,无谱带的记为“0”输入计算机。然后将这两种实验数据用MINTS软件(中国科学院微生物所研制)按平均连锁(UPGMA)聚类法进行聚类,得出树状图。

对于数值分类中所得各群的鉴别特征的选择,

则按在一个群内某一性状特征出现频率 $\geq 95\%$ 作为鉴别特征。性状特征出现频率高于95%的菌株记为“+”,低于6%的菌株记为“-”,介于6%~95%之间的记为“d”。

2 结果与分析

2.1 数值分类结果

从图1可以看出,参与数值分类的供试菌株在82%相似性水平上可分为7个群(3个菌株以上为1个群)。

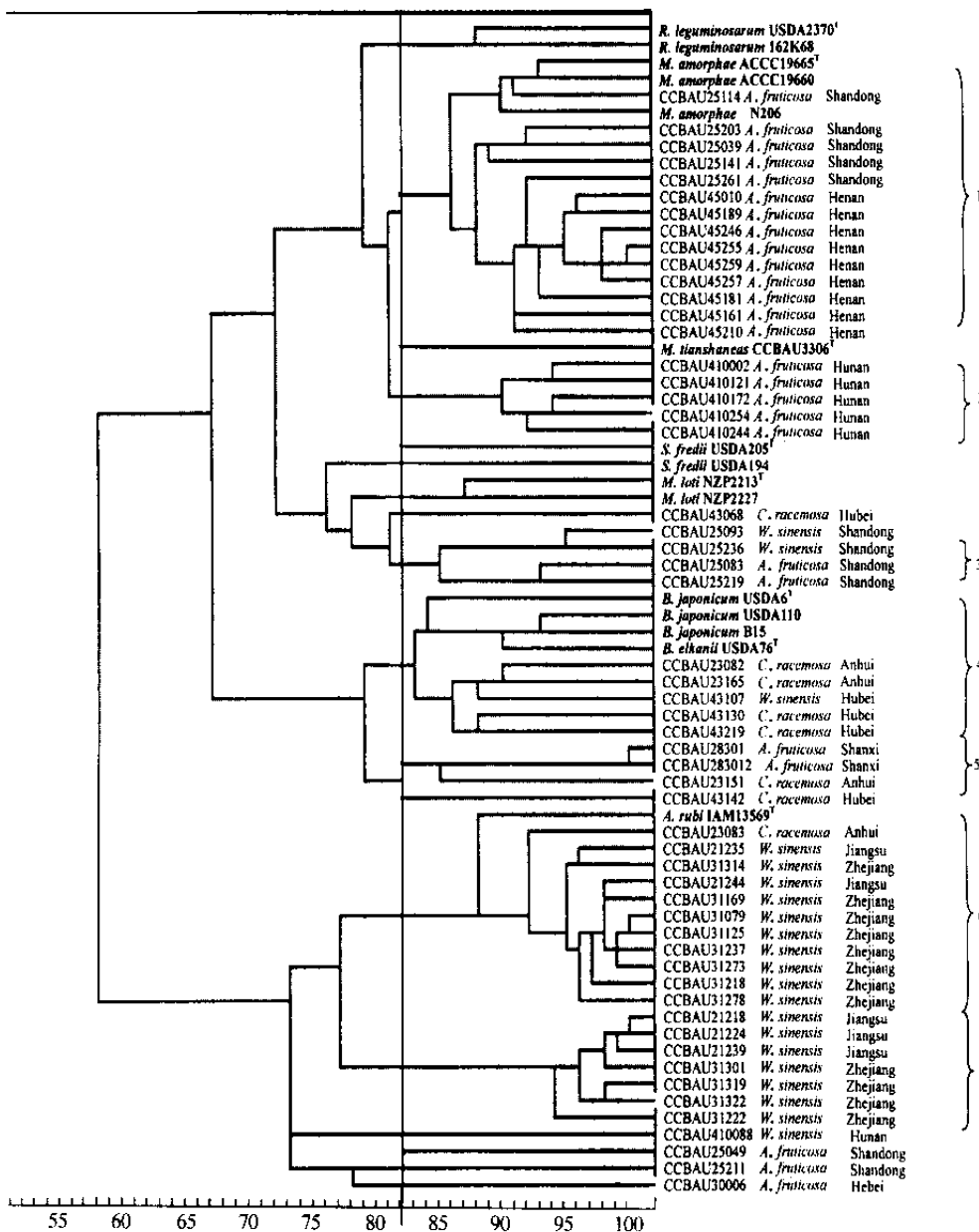


图 1 数值分类树状图

Fig.1 Dendrogram of strains tested

群 1 由 14 株分离自山东、河南的紫穗槐根瘤菌与中慢生根瘤菌参比菌株 *M. amorphae* (AC-CC19665^T, ACCC19660, N206) 聚在一起。而群 2 则由 5 株分离自湖南的紫穗槐根瘤菌独立成群。

群 3 分别由 2 株来自山东的紫藤根瘤菌 CCBAU25093、CCBAU25236 和 2 株紫穗槐根瘤菌 CCBAU25083、CCBAU25219 共同组成, 而该群在 78% 相似性水平上与中慢生根瘤菌的参比菌株 *M. loti* NZP2213^T 和 *M. loti* NZP2227 聚在一起。

群 4 由 4 株分离自安徽、湖北地区的紫荆根瘤菌 CCBAU23082、CCBAU23165、CCBAU43130、CCBAU43219 及 1 株来自湖北的紫藤根瘤菌 CCBAU43107 与 4 株慢生根瘤菌的参比菌株 *B. japonicum* (USDA6^T, USDA110, B15) 和 *B. elkanii* USDA76^T 组成。而群 5 则由 2 株来自陕西的紫穗槐根瘤菌 CCBAU28301、CCBAU283012 (曾做过初步分类^[3]) 和另外 2 株来自安徽、湖北的紫荆根瘤菌 CCBAU23151、CCBAU43142 独立组成一群。

群 6 和群 7 中除 1 株为紫荆根瘤菌外, 其余均

为紫藤根瘤菌。其中群 6 由 10 株分离自江苏、浙江地区的紫藤根瘤菌、1 株来自安徽的紫荆根瘤菌与 1 株土壤杆菌的参比菌株 *A. rubi* IAM13569^T 所组成, 群 7 则完全由 7 株来自江苏、浙江的紫藤根瘤菌独立组成。

2.2 各群的鉴别特征

从表 2 可以看出, 这 3 种寄主的根瘤菌对碳源、氮源的利用极其广泛, 并且在生理生化及抗逆性等方面也极具多样性。在耐抗生素方面, 群 4、群 5、群 6 和群 7 的菌株要比群 1、群 2、群 3 菌株耐受抗生素的种类多, 其中群 7 菌株对氨基青霉素、杆菌肽和多黏菌素的耐受性可高达 300 μg·ml⁻¹; 群 6 菌株可在含 3% NaCl 的培养基上正常生长; 群 4、群 6 和群 7 的菌株可生长在强碱环境下 (pH 11.0); 另外, 群 6 菌株具有产 3-酮基乳糖阳性反应; 群 6、群 7 菌株均可利用肉汤生长; 群 4 和群 5 菌株具有明显的 BTB 产碱反应。总的来说, 具有某些高抗逆特性的菌株大多集中在第 6 群和第 7 群之中。

表 2 数值分类各群及已知种的鉴别特征¹⁾

Table 2 Distinctive characteristics of subgroups and known rhizobial species in numerical taxonomy

鉴别特征 Distinctive characteristics	1	2	3	4	5	6	7	A	B	C	D	E	F	鉴别特征 Distinctive characteristics	1	2	3	4	5	6	7	A	B	C	D	E	F
唯一碳源利用														氯霉素 Chloramphenicol (5 μg·ml ⁻¹)	-	d	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
己二酸 adipate	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	氯霉素 Chloramphenicol (50 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	d	d	+	-	-	-	-	-	-	
D-苦杏仁苷 D-amylgdalin	+	-	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	氯霉素 Chloramphenicol (100 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	d	d	d	-	-	-	-	-	-	
D-阿拉伯糖 D-arabinose	-	-	d	-	+	d	-	-	-	-	-	-	-	氯霉素 Chloramphenicol (300 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	
IX (+) 阿糖醇 IX (+) arabinol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	红霉素 Erythromycin (5 μg·ml ⁻¹)	+	+	+	d	d	+	+	+	-	+	+	+	
葡萄糖酸钙 Calcium gluconate	-	-	-	d	+	d	d	-	-	-	-	-	-	红霉素 Erythromycin (50 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	
丙二酸钙 Calcium malonate	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卡那霉素 Kanamycin (5 μg·ml ⁻¹)	d	+	+	d	-	+	+	-	+	-	+	+	
糊精 Dextrin	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	卡那霉素 Kanamycin (50 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	
半乳糖醇 Dulcitol	-	+	d	-	d	d	+	+	+	+	-	-	+	新霉素 Neomycin (5 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	
内消旋赤藓糖 Meso-erythritol	d	+	-	d	+	d	+	+	+	+	+	-	+	多黏菌素 Polymyxin (5 μg·ml ⁻¹)	d	d	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
果糖 Fructose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	多黏菌素 Polymyxin (50 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	+	+	d	+	-	-	-	-	-	
肌醇 Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	多黏菌素 Polymyxin (100 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	d	+	d	d	-	-	-	-	-	
菊糖 Inulin	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	多黏菌素 Polymyxin (300 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	d	d	d	d	-	-	-	-	-	
乳糖 Lactose	d	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	链霉素 Streptomycin (5 μg·ml ⁻¹)	-	-	+	d	d	d	+	-	-	-	+	+	
苹果酸钠 Malate	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	链霉素 Streptomycin (50 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	-	d	d	+	-	-	-	+	-	
D-甘露糖 D-Mannose	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	链霉素 Streptomycin (100 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	+	-	
蜜二糖 Melibiose	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	链霉素 Streptomycin (300 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
丙酮酸钠 Pyruvate	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	化学染料耐受性													
棉子糖 Raffinose	d	-	d	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	俾士麦棕 Bismark brown	-	d	d	-	-	+	d	-	-	-	+	-	
鼠李糖 Rhamnose	d	-	d	d	-	+	+	+	+	+	-	+	+	溴百里酚蓝 Bromothymol blue	d	-	d	-	-	d	+	-	-	-	+	+	
D-核糖 D-Ribose	d	+	-	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+	刚果红 Congo red	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
水杨素 Salicin	-	d	d	d	-	d	d	-	+	+	-	-	-	藻红 Berythrosin	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
乙酸钠 Sodium acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	亚甲基蓝 Methylene blue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
柠檬酸钠 Sodium citrate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	甲基绿 Methyl green	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	
草酸钠 Sodium formate	-	-	-	d	+	d	-	-	-	-	-	-	-	中性红 Neutral red	-	-	-	d	d	-	d	-	-	-	-	-	
葡萄糖酸钠 Sodium gluconate	-	-	-	+	+	d	d	-	-	-	-	-	-	脱氧胆酸钠 Sodium deoxycholate	d	-	d	d	+	+	+	-	+	+	+	+	
马尿酸钠 Sodium hipurate	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	亚硝酸钠 Sodium nitrite	-	-	d	d	-	+	+	+	+	+	+	+	
山梨糖醇 Sorbitol	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	耐盐性													
山梨糖 Sorbinose	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1% NaCl	-	d	-	d	-	+	+	-	+	+	-	-	
蔗糖 Sucrose	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2% NaCl	-	d	-	d	-	+	-	-	+	+	-	-	

续表 2

Continue

鉴别特征 Distinctive characteristics	1	2	3	4	5	6	7	A	B	C	D	E	F	鉴别特征 Distinctive characteristics	1	2	3	4	5	6	7	A	B	C	D	E	F
酒石酸钾钠 Tartrate	-	-	-	d	+	-	-	+	-	-	-	-	-	3% NaCl	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
海藻糖 Trehalose	d	d	+	d	-	+	+	+	+	+	+	-	+	4% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
木糖 Xylose	d	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	-	+	5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-精氨酸 D-Arginine	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	生长 pH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DL-天冬酰胺 DL-Asparacone	-	-	d	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	pH5.0	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
甘氨酸 Glycine	-	-	-	-	-	d	d	-	-	-	+	-	-	pH9.0	d	-	+	d	-	+	+	-	+	+	+	+	
DL-脯氨酸 DL-Prolin	d	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	pH 10.0	-	-	d	-	+	+	-	+	-	-	-	-	
L-苏氨酸 L-Arginine	-	-	-	-	-	+	d	-	-	-	-	+	+	pH11.0	-	-	-	d	-	+	+	-	+	-	-	-	
唯一氮源利用														生长温度													
DL-丙氨酸 DL-Alanine	-	-	d	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	10℃	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	+	-	
L-精氨酸 L-Arginine	-	-	+	d	d	+	+	-	-	+	+	+	+	40℃	-	d	-	d	-	d	-	-	-	+	+	-	
L-胱氨酸 L-Cystine	d	-	-	d	+	+	+	-	+	+	-	+	+	60℃	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	
D-谷氨酸 D-Glutamic acid	-	-	-	-	d	+	+	-	-	+	-	+	+	氧化酶 Oxidase	d	d	d	d	d	d	+	-	+	+	+	+	
L-甘氨酸 L-Glycine	-	-	d	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	过氧化氢酶 Catalase	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	
次黄嘌呤 Hypoxanthine	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-	+	d	+	-	-	+	-	-	-	-	
L-异亮氨酸 L-iso-leucine	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	脲酶 Urease	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L-赖氨酸 L-Lysine	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3-酮基乳糖产生 3-Keto-lactose production	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
L-甲硫氨酸 L-Methionine	-	-	d	d	d	+	+	-	-	+	-	+	+	耐尔蓝还原 Nile blue reduction	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	d	-	-	d	+	+	+	-	-	+	+	+	+	亚甲蓝还原 Methylene blue reduction	d	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	
D-苏氨酸 D-Threonine	+	+	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	肉汤生长 Growth in peptone broth	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
D-缬氨酸 D-Valine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BTB 产酸 Acid production	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
抗生素抗性														BTB 产碱 Alkali production	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
氨基青霉素 Ampicillin(5 μg·ml ⁻¹)	-	d	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	石蕊牛奶产酸 Litmus milk acid production	d	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
氨基青霉素 Ampicillin(50 μg·ml ⁻¹)	-	d	-	d	+	d	+	-	-	-	-	-	-	石蕊牛奶产碱 Litmus milk alkali production	d	+	-	d	d	-	-	-	-	-	-	+	
氨基青霉素 Ampicillin(100 μg·ml ⁻¹)	-	d	-	-	d	d	+	-	-	-	-	-	-	石蕊牛奶酪化 litmus milk peptonization	d	d	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	
氨基青霉素 Ampicillin(300 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-	-	石蕊牛奶酸凝 Litmus milk acid coagulation	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-		
杆菌肽 Bacitracin(50 μg·ml ⁻¹)	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	石蕊牛奶还原 Litmus milk reduction	d	d	d	-	-	+	-	-	+	+	+	+	
杆菌肽 Bacitracin(100 μg·ml ⁻¹)	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+														
杆菌肽 Bacitracin(300 μg·ml ⁻¹)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+														

¹⁾A- *R. leguminosarum*(USDA2370); B- *R. leguminosarum*(162K68); C- *S. fredii*(USDA205); D- *S. fredii*(USA194); E- *M. loti*(NZP2213); F- *M. loti*(NZP2227) 数字 1-7 数值分类聚类
¹⁾A- *R. leguminosarum*(USDA2370); B- *R. leguminosarum*(162K68); C- *S. fredii*(USDA205); D- *S. fredii*(USA194); E- *M. loti*(NZP2213); F- *M. loti*(NZP2227); figure 1-7 : the groups in numerical taxonomy

2.3 16SrDNA PCR-RFLP 聚类结果

在此方法中增加了未参加数值分类分析的 2 株紫荊根瘤菌 CCBAU23212、CCBAU43187 和 4 株紫穗槐根瘤菌 CCBAU25069、CCBAU25198、CCBAU-25228、CCBAU25239。此外,依据数值分类的试验结果分析,在该试验中均采用了已知根瘤菌各属内各种模式菌株作参比,以期初步判断待测菌株在系统发育上的关系。

从图 2 中看出,16SrDNA PCR-RFLP 谱带聚类在 80%相似性水平上可分为 3 个大群。群 I 基本上是由紫藤根瘤菌组成,而且其中分布着 *Rhizobium*、*Sinorhizobium* 和 *Agrobacterium* 等 3 个属的参比菌株。群 II 基本上是由紫穗槐根瘤菌组成,并且与 *Mesorhizobium* 的参比菌株聚在一起。而群 III 则是由 9 株 3 种宿主根瘤菌(其中紫荊根瘤菌有 6 株)与 *Bradyrhizobium* 的参比菌株聚为一群。在 92%相似性水平上,这 3 大群也可划分为 7 个亚群(3 个菌株以上为 1 个亚群)。

亚群 1 和亚群 3 的待测菌株除 1 株紫荊根瘤菌 CCBAU43068 外完全与数值分类聚类中的群 6 和

群 7 相同。只不过亚群 1(在数值分类聚类中为群 7)是与参比菌株 *R. leguminosarum* USDA2370^T、*R. mongolense* USDA1844^T、*R. hainanense* CCBAU-57015^T、*R. tropici* typeA : CFN299^T 以及 *A. rhizogenes* IAM13570^T 聚在一起,而该群在数值分类中则是一独立群。亚群 3 与数值分类聚类的群 6 的组成完全相同。

亚群 2 由 3 株 *Sinorhizobium* 的模式菌株所组成。

亚群 4 则由绝大多数紫穗槐根瘤菌(所选 30 株紫穗槐根瘤菌中有 24 株落入该亚群,其中包括 CCBAU25069、CCBAU25228、CCBAU25239 等 3 株未参与数值分类的菌株)与参比菌株 *M. plurifarium* LMG11892^T、*M. amorphae* ACCC19665^T 聚为一群。而在数值分类聚类中该亚群分为 3 个群。

亚群 5 是由 *Bradyrhizobium* 的 4 个模式菌株单独成群。

亚群 6 由数值分类聚类群 4 中的 5 株待测菌株独立组成,并且该亚群在 89%相似性水平上与亚群 5 聚在一起。

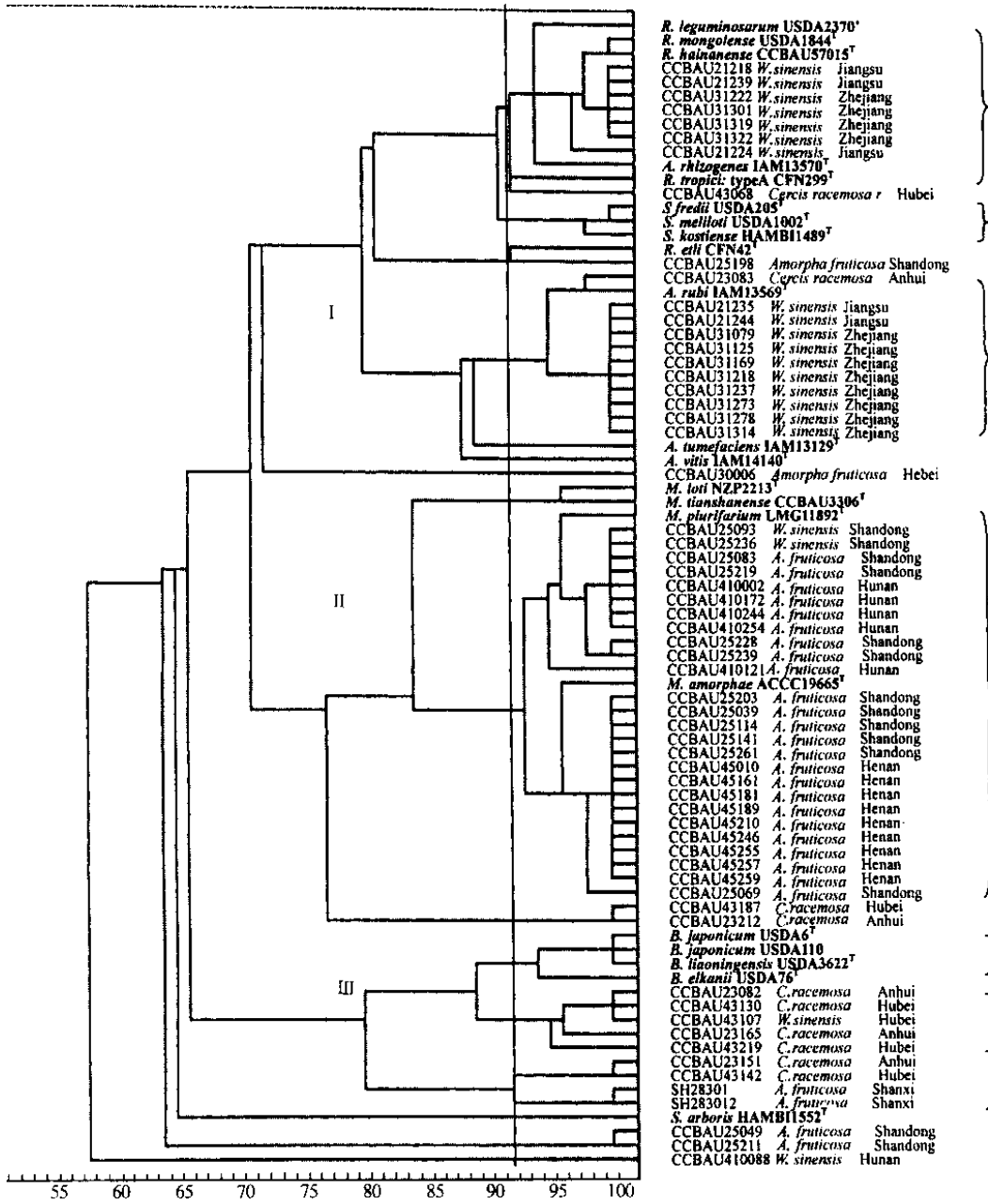


图 2 16SrDNA-RFLP 聚类数图

Fig.2 Phylogenetic tree derived from 16SrDNA PCR-RFLP

亚群 7 的 4 株菌与数值分类聚类群 5 完全相同,也为一独立群。而该亚群在 80%相似性水平上与亚群 5、亚群 6 聚在一起。

3 讨论

Sneath^[8]曾提出数值分类中相似性在 80%左右的表现群一般相当于种群。本试验结果表明,数值分类中的试验菌株在 82%相似性水平上被划分为 7

个群,所选参比菌株基本上按种群分开。在以遗传特征测定为主的 16SrDNA PCR-RFLP 聚类结果中,试验菌株在 80%相似性水平上明显分为快生、中生和慢生三大菌群,各参比菌株按属分群的状况更为明显,而在 92%相似性水平上,所分 7 个亚群的组成与数值分类各群相对应。说明这两种从不同角度进行分类的试验结果得到比较好的相互印证。另一方面,尽管豆科树种根瘤菌存在较大的多样性,并且

具有较为广泛的共生宿主范围^[1,9]。从本试验结果来看,紫穗槐、紫荆和紫藤 3 种宿主的根瘤菌总体说在属水平上各自聚群情况较为一致,但也存在一定的交叉现象。其中绝大多数紫穗槐根瘤菌属于中慢生根瘤菌菌群,紫荆根瘤菌基本属于慢生菌,而紫藤根瘤菌则与快生根瘤菌和土壤杆菌的关系较为密切。

对试验结果进一步分析可以看到,对于紫穗槐根瘤菌来说有一大部分菌株(数值分类聚类群 1、群 2、群 3 及 16SrDNA PCR-RFLP 聚类亚群 4)的表型性状和遗传特征与中慢生根瘤菌相符,而个别紫穗槐根瘤菌菌株 CCBAU28301 和 CCBAU283012 则属于慢生根瘤菌(这 2 株来自陕西的紫穗槐根瘤菌曾在汪恩涛³的试验中被归为慢生菌群,但尚未定种)。另外,尽管在 16SrDNA PCR-RFLP 中绝大多数紫穗槐根瘤菌在 92% 相似性水平上被聚为一个亚群,但数值分类在种水平上的聚类结果表明,群 2 中的 5 株紫穗槐根瘤菌(CCBAU410002、CCBAU410121、CCBAU410172、CCBAU410254、CCBAU410244)独立成群,有可能为不同于 *Mesorhizobium* 内已知种的新种,这尚需对其做进一步核酸分析后才能确定。另外从菌株的来源看,这群紫穗槐根瘤菌(即数值分类群 2)均来自湖南省,而其它菌株则分别来自山东、河南等省份,表明我国中东部地区的紫穗槐根瘤菌的种可能存在地域环境上的差异。对于紫荆根瘤菌来说,两种试验结果表明,分离自我国安徽和湖北两省的紫荆根瘤菌绝大多数(10 株测定菌株中有 6 株)属于慢生根瘤菌,而且它们在分群上没有表现出明显的地理区域性特征。但是,其中某些菌株(如数值分类聚类群 5 或 16SrDNA PCR-RFLP 聚类亚群 7)极有可能出现不同于 *Bradyrhizobium* 已知种的新种。

本试验结果亦表明,来自我国江苏、浙江地区的紫藤根瘤菌是较为特殊的一群快生菌。其中一部分菌株(数值分类聚类群 6 和 16SrDNA PCR-RFLP 聚类亚群 3)与土壤杆菌的关系密切,而另一部分菌株(数值分类聚类群 7 和 16SrDNA PCR-RFLP 亚群 1)在数值分类中为一独立群,但该菌群在 16SrDNA PCR-RFLP 中却与 *Rhizobium*、*Sinorhizobium* 和 *Agrobacterium* 已知种关系密切。这也反映出可能会有快生型的新种在紫藤根瘤菌中产生。另外从表型特征上看,大多数紫藤根瘤菌菌株表现出表型性状的多样性,然而它们的某些抗性特征却表现突出,如耐盐、耐碱、耐某些高浓度的抗生素和化学物质

等。这些高抗特性可能与这些菌株的生存环境有关。从分离环境来看,它们大多数分离自生长于荒山山巅、山坡上的紫藤根瘤之中,土壤条件较差,多为砂壤、黄壤或岩石,营养贫乏,虽降雨量多,却常年不积水。也许正是这种环境赋予了这些紫藤根瘤菌某些抗逆特性。而从另一个角度来说,它们却是一群具有荒山造林应用潜力的菌株。除此之外,还有 2 株来自山东的紫藤根瘤菌 CCBAU23059、CCBAU25236 与 2 株紫穗槐根瘤菌一起(即数值分类聚类群 3)在种的水平上与中慢生根瘤菌 *M. loti* NZP2213^T、NZP2227 聚在一起。另有 1 株来自湖北的紫藤根瘤菌 CCBAU43107 与紫荆根瘤菌一起(数值分类聚类群 4)在种的水平上与慢生根瘤菌的 4 个参比菌株聚在一起。这同样说明来自山东、湖北与来自江、浙地区的紫藤根瘤菌之间也存在着较大的差异。

此外,针对部分紫藤根瘤菌表现出某些土壤杆菌表型特征的现象,笔者又再次对所选菌株进行了回接结瘤试验。在 55 d 接种幼苗培养期内,发现数值分类聚类群 7 的菌株回接所形成的根瘤个大且数量多,瘤型及颜色与韩素芬报道的一致^[9],为球状或棒状分叉,呈褐红色,而数值分类聚类群 6 的菌株所形成的根瘤则个小、数量少且大多数根瘤表面呈白色或青色,但瘤型呈球状,不像土壤杆菌所引起的典型根瘤。对于这群紫藤根瘤菌,目前正在进行 Nod 基因和 Nif 基因探针杂交以及其它分子生物学研究手段予以进一步确定。

References

- [1] 刘晓云,陈文峰,陈文新.根瘤菌的系统发育及其分类研究进展.微生物学通报,2002,29(5):73-76.
Liu X Y, Chen W F, Chen W X. The phylogeny and taxonomic process of rhizobia. *Journal of Microbiology*, 2002, 29(5):73-76. (in Chinese)
- [2] 韩素芬,周湘泉.我国豆科树种结瘤情况.南京林业大学学报,1990,14(3):84-90.
Han S F, Zhou X Q. A nodulation survey of tree legumes in China. *Journal of Nanjing Forestry University*, 1990, 14(3):84-90. (in Chinese)
- [3] Wang E T, Van Berkum P, Sui X H, Beyene D, Chen W X, Martinez-Romere E. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soil and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, 49:51-65.
- [4] Chen W X, Yan G H, Li J L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. *Int. J. Syst. Bacte-*

riol. 1988, 38 : 392 - 397.

- [5] 高俊莲 陈文新, Terework Z, Lindstrom K. 应用 AFLP 技术对斜茎黄芪根瘤菌遗传多样性的研究. 应用与环境生物学报, 1999, 5(4): 387 - 395.
Gao J L, Chen W X, Terework Z, Lindstrom K. Study on genotypic diversity of the Rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* by AFLP fingerprinting. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* 1999, 5(4): 387 - 395. (in Chinese)
- [6] Chen W X, Tan Z Y, Gao J L, Li Y, Wang E T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47(3): 870 - 873.
- [7] Laguerre G, Allard M R, Revoy F, Amarger N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60 : 56 - 63.
- [8] Sneath P H A. Bacterial Classification II. Numerical taxonomy. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1984, Vol. 1.
- [9] 韩素芬 陈景荣 谢文娟. 豆科树种根瘤菌与四种豆科植物的结瘤试验. 林业科学研究, 1996 - 1997, 9(6): 610 - 615.
Han S F, Chen J R, Xie W J. Experiment on the inoculation test between Rhizobia from woody legumes and four leguminous species. *Forest Research*, 1996 - 1997, 9(6): 610 - 615. (in Chinese)
- [10] 韩素芬. 固氮豆科树种和豆科树种根瘤菌资源的研究. 林业科学, 1996, 32(5): 434 - 440.
Han S F. A study on natural resources of nodulating tree legumes and strains of rhizobia. *Scientia Silvae Sinicae*, 1996, 32(5): 434 - 440. (in Chinese)

(责任编辑 孙雷心)