

黄芪根瘤菌的分类研究*

王素英** 陈文新

(北京农业大学生物学院 北京 100094)

摘要 采用数值分类方法研究了分离自不同地区的黄芪属根瘤菌 36 株, 发现在 80% 的相似性水平上, 8 株菌形成了亚群 8, 7 株菌形成了亚群 9。DNA 同源性测定结果表明, 这两个亚群是不同于已知根瘤菌种的新的 DNA 同源群。其中心菌株 CA8561 和 JL84 的部分 16S rRNA 基因序列分析发现, CA8561 菌株与所有已知根瘤菌远缘, 形成了一个独立的系统发育分支。JL84 菌株在快生型根瘤菌属 (*Rhizobium*) 和土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 形成的系统发育分支中占据了一个独立的系统发育地位。

关键词 黄芪, 根瘤菌, 数值分类, DNA 杂交, 16S rRNA 基因序列分析

黄芪属 (*Astragalus*) 是豆科植物中最大的一属, 约有 1500~2000 种。Allen O. N. 和 Allen E. K. 报道过 80 余种结瘤的黄芪植物^[1]。其中对紫云英 (*A. sinicus*) 根瘤菌进行过详细研究, 已定名为华葵根瘤菌 (*Rhizobium huakuii*)^[2], 但对其它快生或慢生黄芪根瘤菌因缺乏系统的研究, 未提出合理的分类建议。为了进一步研究黄芪根瘤菌的分类地位, 在中国根瘤资源调查的基础上, 作者对分离自甘肃、宁夏、内蒙、山西、吉林等地区的 36 株黄芪根瘤菌进行了比较系统的分类研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

选用 70 株菌, 其中参比菌 34 株, 分属于 *Rhizobium* 和 *Bradyrhizobium*。黄芪根瘤菌 36 株, 分属于 14 种寄主。

1.2 方法

1.2.1 数值分类: 按参考文献 [3] 进行。采用平均连锁法聚类。

1.2.2 DNA 的 G + Cmol% 测定及同源性分析: 采用热变性法测定 DNA 的 G + Cmol%^[4], 采用复性速率法进行 DNA 同源性分析^[5]。

1.2.3 部分 16SrRNA 基因序列分析: 按参考文献 [6] 进行, 将扩增的中心的菌株 CA8561 和 JL84 的部分 16SrRNA 基因片段克隆到 PGEM-72f(+) 质粒上, 用 ABI 公司 370A 型 DNA 自动测序仪测序, 所得序列与已知根瘤菌及相关菌的相应序列进行比较, 按最小距

* 国家自然科学基金“八五”重点项目。

** 现在山西师范大学生物系。

本文于 1996 年 1 月 29 日收到。

离连锁法聚类以确定黄芪根瘤菌的系统发育地位。

表1 供试菌株

Table 1 Strains of bacteria examined and their origins

种 名 Species	菌 株 Strains	宿 主 Hosts	来 源 Origin
	NZP2213 ^T	<i>Lotus coniculus</i>	美国
<i>R. loti</i>	NZP2217	<i>Lotus</i> sp.	
	NZP2234	<i>Lotus</i> sp.	
	H1	<i>Melilotus albus</i>	黑龙江
<i>R. meliloti</i>	USDA1002 ^T	<i>Medicago sativa</i>	美国
	102F28	<i>Medicago sativa</i>	美国
	USDA2370 ^T	<i>Medicago sativa</i>	美国
<i>R. leguminosarum</i>	162K68	<i>Trifolium</i> sp.	美国
	127K17	<i>Phaseolus</i> sp.	美国
<i>R. tropici</i>	CIAT899 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	CNPBS
	BR853	<i>Leucaena leucocephala</i>	CNPBS
	C-05-1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	CNPBS
<i>R. galegae</i>	HAMBI540 ^T	<i>Galega orientalis</i>	芬兰
	HAMBI1185	<i>Galega</i> sp.	美国
	HAMBI503	<i>Galega</i> sp.	美国
<i>R. huakuii</i>	CCBAU2609 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	南京
	A106	<i>A. sinicus</i>	湖北
	PL-52	<i>A. sinicus</i>	湖南
<i>R. tianshanense</i>	AIBS ^T	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	新疆
	6	<i>G. uralensis</i>	新疆
	017A	<i>Sophora alopecuroides</i>	新疆
<i>B. japonicum</i>	USDA6 ^T	<i>Glycine max</i>	美国
	USDA110	<i>Glycine max</i>	美国
	USDA2110	<i>Glycine max</i>	美国
	USDA3045	<i>Lupinus</i> sp.	美国
<i>S. fredii</i>	2048	<i>Glycine soja</i>	辽宁
	USDA194	<i>Glycine soja</i>	河南
	USDA205 ^T	<i>Glycine soja</i>	河南
<i>Rhizobium</i> sp.	Rx22	<i>Glycine max</i>	新疆
	CCBAU108	<i>Glycine max</i>	新疆
	CCBAU110	<i>Glycine max</i>	新疆
<i>Rhizobium</i> sp.	112	<i>Centrosema pubescentis</i>	海南
	I66	<i>Desmodium sinuatum</i>	海南
	H14	<i>D. heterophyllum</i>	海南

(续表1)

种 名	菌 株	宿 主	来 源
Species	Strains	Hosts	Origin
分 类 地 位 特 定 的 菌 株	NM093	<i>Astragalus danicus</i>	内蒙
	NM074	<i>A. mlinianus</i>	内蒙
	NM069	<i>A. complanatus</i>	内蒙
	NM003	<i>A. mongholicus</i>	内蒙
	NM026	<i>A. adsurgens</i>	内蒙
	JL23	<i>A. dahuricus</i>	吉林
	JL28	<i>A. membranaceus</i>	吉林
	JL84	<i>A. complanatus</i>	吉林
	SX034	<i>A. dahuricus</i>	山西
	SX042	<i>A. dahuricus</i>	山西
	SX058	<i>A. dahuricus</i>	山西
	SX044	<i>A. dahuricus</i>	山西
	G012	<i>A. scaberrimus</i>	甘肃
	G022	<i>A. complanatus</i>	甘肃
	G258	<i>A. scaberrimus</i>	甘肃
	G261	<i>A. scaberrimus</i>	甘肃
	G270	<i>Astragalus</i> sp.	甘肃
	G013	<i>Astragalus</i> sp.	甘肃
	G130	<i>A. adsurgens</i>	甘肃
	G156	<i>Astragalus</i> sp.	甘肃
	N211	<i>A. adsurgens</i>	宁夏
	N212	<i>A. lehmannianus</i>	宁夏
	N247	<i>A. ellipsoides</i>	宁夏
	X40	<i>A. adsurgens</i>	西藏
	X54	<i>A. membranaceus</i>	西藏
	X59	<i>A. adsurgens</i>	西藏
	CA8593	<i>A. membranaceus</i>	陕西榆林
	CA8594	<i>A. membranaceus</i>	陕西榆林
	CA8213	<i>A. adsurgens</i>	中国农科院试验地
	CA8561	<i>A. membranaceus</i>	中国农科院试验地
	SDW16	<i>A. adsurgens</i>	中国农科院畜牧所
	SDW27	<i>A. adsurgens</i>	中国农科院畜牧所
	E33	<i>A. coronilloides</i>	新疆
	CIAM0210	<i>A. cicer</i>	俄罗斯
	CIAM0211	<i>A. uliginosus</i>	俄罗斯
	CIAM0212	<i>A. falcatus</i>	俄罗斯

2 结果和讨论

2.1 数值分类

对所测定的 173 项表型数据,去除 24 项全同性状后,采用平均连锁法进行聚类,结果见图 1。从图 1 可以看出,全部供试菌株在 67% 的相似性水平上分成三大类群,群 I 及群 II 为快生型菌群,包括 *Rhizobium* 各种的参比菌株及全部的黄芪根瘤菌。群 III 为慢生型及中慢生型菌群,由 *Bradyrhizobium japonicum* 及 *R. tianshanense* 的参比菌株组成。在 80% 的相似性水平上,群 I 及群 II 含有 10 个独立的亚群,亚群 1~7 为 *Rhizobium* 各种的参比菌株,亚群 8~10 由黄芪根瘤菌组成。其中亚群 8 包括寄主为 *A. membranaceus* 的菌株 CA8561、X54、CA8593、CA8594 和 JL28,寄主为 *A. dahuricus* 的菌株 SX058 和 SX044,以及寄主为 *A. scaberrimus* 的菌株 G261,群内菌株的相似性为 82%,中心菌株为 CA8561;亚群 9 包括寄主为 *A. dahuricus* 的 JL23 和 SX042,寄主为 *A. complanatus* 的菌株 JL84 和 G022,寄主为 *A. miniatus* 的菌株 NM074 和寄主为 *A. mongholicus* 的菌株 NM003,群内菌株的相似性为 80%,中心菌株为 JL84。这两个亚群与快生型根瘤菌各种的表型区别见表 2。亚群 10 由寄主为 *A. adsurgens* 的 3 株菌 SDW16、SDW27 和 X40 组成,因菌株少,未做进一步分析。

表2 亚群8、9和已知快生型根瘤菌各种的鉴别特征
Table 2 Differential characteristics of subgroup 8, 9 and seven species
of fast-growing rhizobial species

性 状 Characters	亚群 8 Subgroup 8	亚群 9 Subgroup 9	<i>R. loti</i>	<i>S. me- liloti</i>	<i>R. legumi- nosarum</i>	<i>R. tro- pici</i>	<i>R. ga- legae</i>	<i>R. hua- kuii</i>	<i>S. fre- dii</i>
唯一碳源利用									
D-阿拉伯糖醇	+	+	-	-	-	+	+	-	-
DL-苹果酸钠	+	+	-	-	-	-	-	-	-
蜜二糖	+	+	-	-	-	+	-	-	-
D-甘露糖	±	+	-	-	-	-	+	-	-
L-肌醇	±	+	-	-	-	+	-	-	-
D-木糖	±	+	-	-	-	+	+	-	-
唯一氮源利用									
甘氨酸	±	+	-	-	-	-	-	-	-
DL-盐酸鸟氨酸	±	+	-	-	-	-	-	-	-
D-谷氨酸	±	+	-	-	-	+	-	+	-
L-甲硫氨酸	±	+	-	-	-	+	+	+	-
D-缬氨酸	-	+	-	-	-	-	-	-	-
甲基绿	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10℃ 生长	-	+	-	-	-	-	-	-	-
肉汁胨生长	-	+	±	-	-	+	-	-	-
硝酸盐还原	-	+	±	-	-	-	-	±	-

2.2 DNA 碱基组成及同源性测定结果

在数值分类基础上,根据黄芪根瘤菌的聚类结果,选取亚群 8 和亚群 9 的菌株进行了

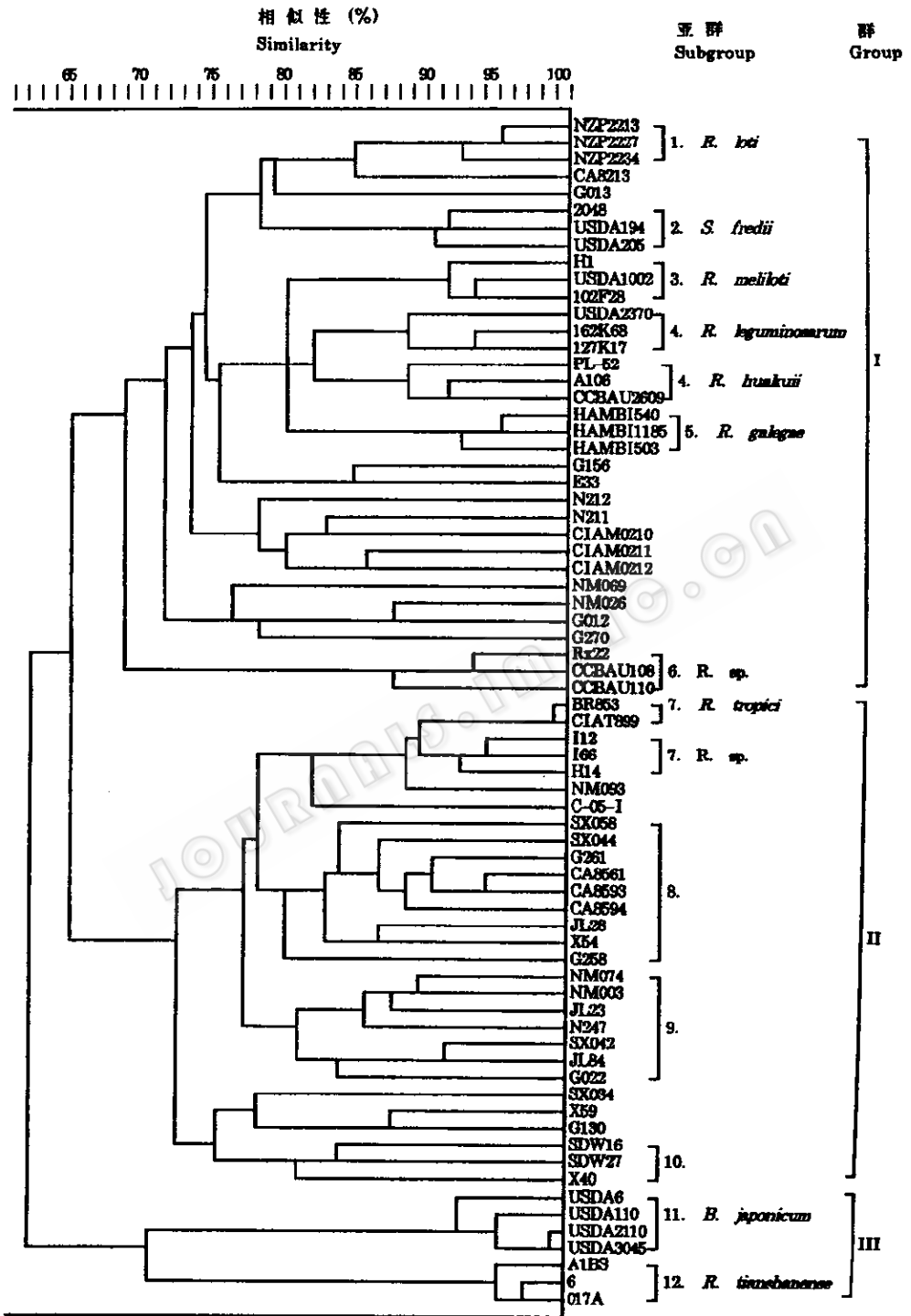


图1 黄芪根瘤菌数值分类树状谱

Fig. 1 Dendrogram of rhizobial strains isolated from the *Astragalus* spp.

DNA 碱基组成的测定和群内菌株之间的 DNA 同源性测定,同时分析了两亚群中心菌株 CA8561 和 JL84 与已知根瘤菌各种模式菌株之间的 DNA 同源性,结果见表 3~6。

从表 3 可以看出,所有被测菌株的 DNA 的 G+C mol% 在根瘤菌范围之内 (59%~

表3 亚群8和亚群9菌株的DNA碱基组成

Table 3 DNA G+C mol% of strains in subgroup 8 and 9

亚群8菌株 Subgroup 8	G+C mol%	亚群9菌株 Subgroup 9	G+C mol%
SX058	65	NM074	64
SX044	65	NM003	65
G261	59	JL23	62
CA8561	63	N247	59
CA8593	59	SX042	61
CA8594	61	JL84	65
JL28	61	G022	60
X54	63		

表4 亚群8内菌株间的DNA同源性(%)

Table 4 DNA homology among strains of subgroup 8

	G261	CA8561	X54	SX044	SX058	CA8593	JL28	CA8594
G261	100	89.4	87.8	92.1	72.8	98.2	70.8	73.2
CA8561		100	100	86.0	74.0	70.0	79.3	89.4
X54			100	70.0	99.4	75.9	96.2	94.2
SX044				100	87.6	69.0	86.0	89.9
SX058					100	100	99.4	76.3
CA8593						100	100	72.1
JL28							100	72.5
CA8594								100

表5 亚群9群内菌株间的DNA同源性(%)

Table 5 DNA homology among strains of subgroup 9

	NM003	NM074	N247	SX042	JL84	G022	JL23
NM003	100	72.7	100	98.1	71.6	100	70.5
NM074		100	100	70.0	100	70.3	72.9
N247			100	70.2	97.9	96.5	83.3
SX042				100	97.9	88.3	72.1
JL84					100	70.3	73.4
G022						100	74.1
JL23							100

65%)。同时 DNA 杂交试验结果表明,除 CA8593 菌株与 SX044 菌株的 DNA 同源性为 69% 外,亚群 8 和亚群 9 群内菌株间的 DNA 相关性 $\geq 70\%$,且其中心菌株 CA8561 和 JL84 与已知根、茎瘤菌各种的模式菌株之间的 DNA 同源性分别是 0~56.0% 和 0~54.9%,说明

表6 各亚群中心菌株与模式菌株之间的DNA同源性(%)

Table 6 DNA homology between cestrostrains of subgroups and type strains of known rhizobial species

种 名 Species	菌 株 Strains	CA8561	JL84
<i>R. huakuii</i>	CCBAU2609	0	0
<i>S. fredii</i>	USDA205	0	54.9
<i>R. tropici</i>	CIAT899	13.3	0
<i>S. meliloti</i>	USDA1002	34.9	0
<i>R. leguminosarum</i>	USDA2370	0	0
<i>R. loti</i>	NZP2234	34.5	0
<i>R. galegae</i>	HAMBI540	56.0	34.0
<i>R. tianshanense</i>	A1BS	26.5	0
<i>B. japonicum</i>	USDA6	50.7	0
<i>A. caulinodans</i>	ORS571	3.8	19.6

亚群 8 和亚群 9 是两个新的 DNA 同源群。待收集到足够的相关菌株, 可定为两个新种。

2.3 亚群 8 和亚群 9 的系统发育地位

数值分类和 DNA 杂交结果表明, 部分黄芪根瘤菌形成的亚群 8 和亚群 9 与已知根瘤菌各种相比, 不仅具有明显的表型差异, 而且具有遗传本质的差别。为了确定它们在根瘤菌中的系统发育地位, 对其中心菌株 CA8561 和 JL84 进行了 16S rRNA 部分基因测序, 所得序列与文献^[7~9]报道的其它根瘤菌及相关的土壤杆菌的部分 16S rRNA 序列相比较, 按最小距离连锁法进行聚类, 结果见图 2。

从图 2 可以看出, 已命名的根瘤菌及亲缘关系接近的土壤杆菌从系统发育的角度可分为三大分支, 固氮根瘤菌 (*Azorhizobium*) 和慢生型根瘤菌 (*Bradyrhizobium*) 各占一大分支, 快生型根瘤菌 (*Rhizobium*) 和土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 的相关种类占据一大分支。亚群 8 的中心菌株 CA8561 与所有已知根、茎瘤菌及土壤杆菌的亲缘关系都非常远, 形成了一个新的系统发育分支。亚群 9 的中心菌株 JL84 位于慢生型根瘤菌与土壤杆菌形成的系统发育分支中, 占据了一个独立的系统发育地位。

3 结论

采用数值分类、DNA 杂交和 16S rRNA 部分序列分析的方法, 对 36 株未定名的快生型黄芪根瘤菌进行分析, 可得出如下结论: 部分黄芪根瘤菌聚成不同于已知根、茎瘤菌的两个表观群, 即亚群 8 和亚群 9。CA8561 菌株为亚群 8 的中心菌株, JL84 菌株为亚群 9 的中心菌株。DNA 杂交结果表明, 亚群 8 和亚群 9 是新的 DNA 同源群, 在种的水平上明显区别于已命名的根、茎瘤菌。部分 16S rRNA 序列分析揭示了菌株 CA8561 和菌株 JL84 所代表的亚群 8 和亚群 9 与已知根、茎瘤菌及相关土壤杆菌的亲缘关系, 即亚群 8 形成一个新的系统发育分支, 亚群 9 在快生型根瘤菌和土壤杆菌形成的系统发育分支中占据一个独立的系统发育地位。

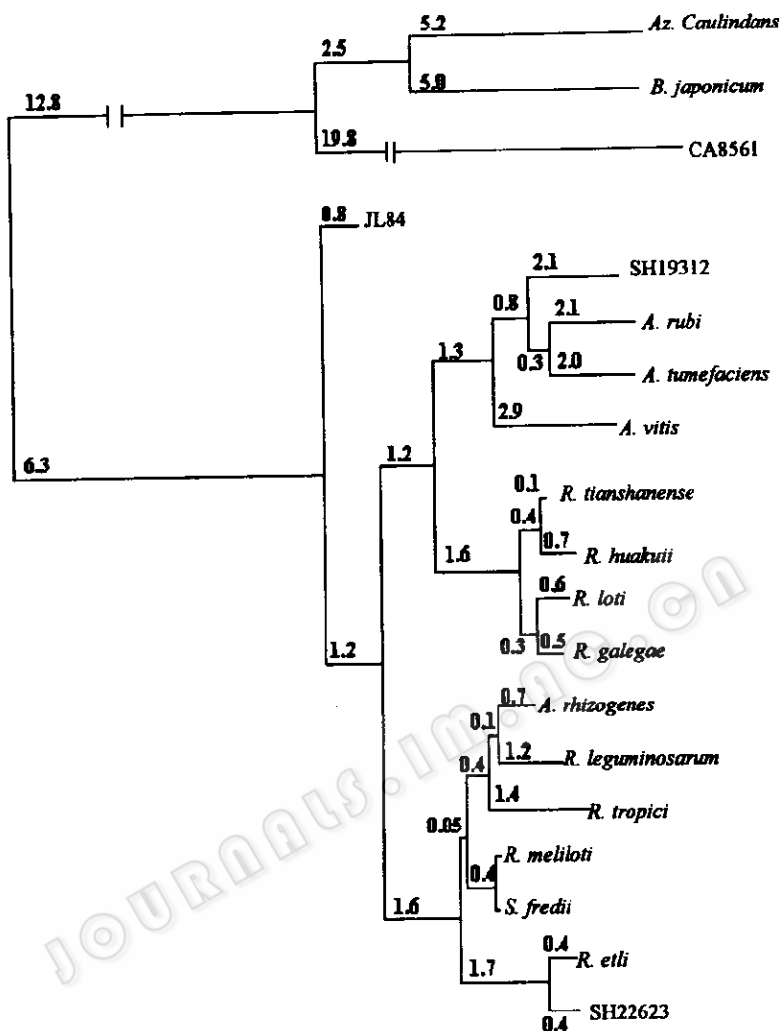


图2 菌株CA8561 JL84及有关细菌的系统发育关系
(菌株 SH19312和SH22623分别是甘草和米口袋分离的根瘤菌)

Fig. 2 Phylogenetic tree derived from the partial 16S rRNA gene sequences of strains CA8561, JL84 and its relatives

参 考 文 献

- [1] Allen O N, Allen E K. The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation. Wisconsin: The University of Wisconsin Press, 1981.
- [2] Chen W X, G S Li, Qi Y L et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, '41: 275~280.
- [3] 陈文新, 祁幼林, 李季伦, 等. 微生物学报, 1988, 28(2): 102~108.
- [4] 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海: 上海科学技术出版社, 1990. 85~92.

- [5] De Ley J, Cateir H, Reynaerds A. *Eur J Biochem*, 1970, 12: 133~142.
[6] 汪恩涛, 李英波, 闫大来, 等. *微生物学报*, 1994, 34: 248~253.
[7] Willems A, Collins M D. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43: 305~313.
[8] Yang gi M, Yamasato K. *FEMS Micoribiol Lett*, 1993, 107: 115~120.
[9] Young J P W, Dwner H L, Eardly B D. *J Bacteriol*, 1991, 173: 2271~2277.

A STUDY ON TAXONOMY OF RHIZOBIA ISOLATED FROM *ASTRAGALUS* SP.

Wang Suying Chen Wenxin

(College of Biological Sciences, Beijing Aricultural University, Beijing 100094)

Abstract Thirty-six strains isolated from root nodule of *Astragalus* spp., in comparison with 31 reference strains of *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Sinorhizobium* species, and some other strains isolated from legumes in Xinjiang and Hainian Province, were classified by performing numerical taxonomy, DNA-DNA hybridization and partial 16S rRNA gene sequencign. Results of herichical analysis showed most of trains isolated from *Astragalus* spp. fell into subgroups 8 and 9, Also the DNA homolgy among strains of subgroups 8 and 9 are more than 70%, with the exception of strains CA8593 and SX044, and the DNA homology between strain CA8561, JL84 and type strains of all described rhizobial species are less than 56%. These results indicated that these two subgroups 8 and 9 were unique DNA homologous groups, distinguishing from all described rhizobial species. Sequencing of partial 16S rRNA gene showed that cetrostrain CA8561 of subgroup 8 is phylogenetically far from all know species of *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* and *Agrobacterium*, and it is a unique geneline. The cetrostrain JL84 of subgroup 9 has a unique position in the phylogenetic branch consisted of species of *Rhizobium* and *Agrobacterium*.

Key words *Astragalus*, Rhizobia, Numerical taxonomy, DNA-DNA hybridization, Partial 16S rRNA ssequencing