

我国豇豆和绿豆根瘤菌的数值分类及 16S rDNA PCR-RFLP 研究

张勇法^{1,2}, 王风芹³, 陈文新^{1*}

(¹ 农业部农业微生物资源及其应用重点开放实验室 中国农业大学生物学院 北京 100094)

(² 西北农林科技大学生命科学学院 杨凌 712100) (³ 河南农业大学生命科学学院 郑州 450002)

摘要 对分离自中国 14 个不同省(自治区)的 79 株豇豆和绿豆根瘤菌及 12 株参比菌株进行了唯一碳、氮源利用, 抗生素抗性, 抗逆性和酶活性等 128 个表型性状的测定, 并用 MINTS 软件进行聚类分析。表型性状测定结果发现, 所有菌株都有极其广泛的碳、氮源利用谱, 大多数菌株可在较宽的 pH (pH 5.0~11.0) 值范围内生长, 大部分菌株能在 37℃ 高温条件下生长, 个别菌株能耐受 60℃ 高温较长时间 (20~45 min) 的热激。聚类分析结果表明, 全部供试菌株在 63.5% 的相似性水平上分为两大群: 一个群为慢生菌群, 另一群为快生和中慢生菌群, 在 79% 的相似性水平上分为 7 个亚群。在数值分类的基础上, 又将参比菌株增加到 22 株, 对 79 株待测菌株进行了 16S rDNA PCR-RFLP 分析, 16S rDNA PCR 产物经 *Hae* III、*Hinf* I、*Msp* I 和 *Alu* I 4 种内切酶酶切共产生 34 种遗传图谱类型, 经 GelCompar II 软件聚类后, 在 79% 的相似性水平上也可划分为 7 个亚群, 与数值分类的结果有很好的 consistency。

关键词 豇豆; 绿豆; 根瘤菌; 数值分类; 16S rDNA PCR-RFLP; 多样性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)06-0861-08

根瘤菌是一类广泛存在于土壤中的革兰氏阴性细菌, 它能够侵染豆科植物的根部或茎部形成共生体——根瘤(或茎瘤), 并在其中将空气中游离态的氮气转化成植物可以利用的化合态氮, 为宿主植物生长提供必需的氮素营养。根瘤菌与豆科植物的共生固氮作用是生物固氮中固氮效率最高的体系, 在我国“西部大开发”和农、林、牧业的可持续发展过程中可发挥重要作用^[1]。

豇豆(*cowpea*, *Vigna unguiculata* (L.) Walp) 和绿豆(*mung bean*, *Vigna radiata* (L.) Wilczek) 同属于豆科(*Leguminosae*), 蝶形花亚科(*Papilionoideae*), 豇豆属(*Vigna*), 是一年生草本植物。豇豆和绿豆都属于小杂粮, 生育期短, 适应范围广, 耐旱耐瘠, 能与大宗作物实行间作套种, 是我国种植业结构调整的特色作物, 富含植物蛋白、多种氨基酸和维生素及其它多种特殊营养素, 具有医、食双重功能, 是人类食物构成中的重要粮食品种, 是食品工业的重要原料和养殖业的重要饲料。

我国幅员辽阔, 自然生态条件复杂多样, 豆科植物种类繁多, 根瘤菌种质资源丰富多样。迄今为止, 豇豆和绿豆根瘤菌在根瘤菌系统发育中的确切分类地位还不明确。因此, 很有必要对我国豇豆和绿豆根瘤菌种质资源进行系统的调查研究, 以确定它们

在根瘤菌系统发育中的确切分类地位, 为豇豆及绿豆根瘤菌种质资源的保护、开发和利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养条件 共选取待测菌株 79 株, 参比菌株 22 株。待测菌株宿主为豇豆和绿豆, 分别采自山东、河南、河北、新疆、内蒙、湖北、江苏、浙江、安徽、江西、四川、广东、福建和云南等省(自治区), 供试根瘤菌的菌株代号、宿主植物名称及来源参图 1、图 2。

供试菌株均用 YMA(yeast-mannitol agar)培养基^[2], 菌体收集时用液体 TY 培养基^[3], 培养温度为 28℃。全部供试菌株均按照 Vincent 经典方法^[4]进行分离、纯化, 并镜检验证。

1.1.2 回接结瘤试验 参照文献 5 进行操作。

1.1.3 试剂和仪器 溶菌酶(Promega), 蛋白酶 K(Proteinase K, Merck), *Taq* 酶(TaKaRa), dNTPs(TaKaRa), 各种限制性内切酶(TaKaRa), DNA Marker(Sangon), 数值分类所用碳、氮源(Promega), 各种抗生素(Promega), 其他生化试剂均为国产分析纯或电泳纯。PCR 扩增仪(MJ Research PTC-200), 凝胶成像系统(AlphaImager™ Alpha Innotech)。

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20050019017)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62731854; Fax: 86-10-62734008; E-mail: wenxin_chen@263.net

作者简介: 张勇法(1974-)男, 河南濮阳人, 博士研究生, 主要从事根瘤菌多相分类及其系统发育研究。E-mail: zyf_1001@163.com

收稿日期: 2006-03-15 接受日期: 2006-04-11 修回日期: 2006-06-10

1.2 数值分类

1.2.1 生理、生化性状的测定 参照文献[5]的方法。

1.2.2 结果处理及分析方法 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”进行编码^[5]。编码后输入计算机,并去除全同性状。然后用 MINTS 软件(中国科学院微生物所研制)采用简单匹配系数(S_{sm})和平均连锁聚类方式(UPGMA),得出树状图(图1)。

1.3 16S rDNA PCR-RFLP 分析

1.3.1 DNA 提取:参照文献[6]中总 DNA 的快速提取方法,并略作修改。以已知浓度的 λ DNA 作为分子量标准,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 的大小和纯度。

1.3.2 16S rDNA 的 PCR 扩增

PCR 扩增所用正向引物 rD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和反向引物 rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因序列的第 8~27 和第 1524~1540 碱基位置^[7]。

PCR 扩增条件参照文献[8]略作修改:95℃ 3min,94℃ 1min,56℃ 1min30s,72℃ 2min,30 个循环,72℃ 10min。PCR 扩增结束以后电泳检测 PCR 扩增产物的大小(约 1.5kb)并估测其浓度。

1.3.3 酶切与电泳:参考文献[9]选 *Hae* III、*Hinf* I、*Msp* I 和 *Alu* I 4 种内切酶对 PCR 扩增产物进行酶切。2.5% 的琼脂糖凝胶电泳后,用自动凝胶成像系统拍照。

1.3.4 电泳图谱分析:使用 GelCompar II 软件对 4 种内切酶的酶切图谱采用平均连锁聚类方式(UPGMA)进行聚类分析,得到树状图。

2 结果和分析

2.1 数值分类结果和分析

2.1.1 数值分类聚类分析:从图1中可以看出,所有供试菌株在 63.5% 的相似性水平上分成两个大群,其中一群为慢生菌群,包括 *Bradyrhizobium* 属的 3 株参比菌株和 41 株待测菌株;另一群为快生和中慢生菌群,包括 *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、和 *Agrobacterium* 中的参比菌株及 35 株待测菌株。在 78.2% 的相似性水平上,可分为 7 个亚群(subgroups,5 株以上)。

亚群 1 包括 *Agrobacterium tumefaciens* IAM 13129^T 和 19 株待测菌株,说明这些菌株可能属于 *Agrobacterium*。这些菌株经过初步结瘤试验证明均

不能与原宿主结瘤,还有待重复结瘤试验或并对其中心菌株进行 16S rRNA 基因或 *nod*、*nif* 等与结瘤固氮相关基因的序列分析来确定其是否为土壤杆菌。

亚群 2 由参比菌株 *Rhizobium etli* CFN42^T 和 7 株待测菌株组成,说明 7 株菌应属于 *Rhizobium*。但只有 CCBAU 51379 与参比菌株相似性较高,达到 89%,其余 6 株菌与参比菌株相似性相对较低,其中 CCBAU 25220、CCBAU 25232 和 CCBAU 35256-1 在 85% 相似性水平上聚在一起。

亚群 3 由 2 株 *Rhizobium leguminosarum* 参比菌株(USDA 2370^T、127K17)和分离自湖北的 3 株豇豆根瘤菌组成,相似性为 83.5%。

亚群 4 由分离自浙江的 2 株绿豆根瘤菌(CCBAU 35015、CCBAU 35030)和 *Sinorhizobium* 属 3 株参比菌株组成,相似性为 83%,说明这 2 株菌应归属 *Sinorhizobium*。

亚群 5 由 2 株 *Bradyrhizobium japonicum* 已知参比菌株和 8 株待测菌株组成。其中 CCBAU 23236、CCBAU 43197、CCBAU 33041 与已知参比菌株 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T 和 B15 的相似性高达 85%,可能属于 *B. japonicum* 的不同菌株;而其余 5 株菌则可能为不同于 *B. japonicum* 的慢生根瘤菌。

亚群 6 全部由 14 株待测菌株组成。这些菌有很大的多样性,在 81% 的相似性水平上又分成 2 个小的分支:CCBAU 43031、CCBAU 43121、CCBAU 65066、CCBAU 61318 组成分支 1,都是豇豆根瘤菌;CCBAU 35186-1、CCBAU 35272、CCBAU 61313、CCBAU 61316、CCBAU 51117、CCBAU 51295、CCBAU 51357、CCBAU 51263、CCBAU 33068、CCBAU 43088 组成分支 2。

亚群 7 由已知参比菌株 *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T 和 13 株待测菌株组成。同样,这群菌也存在较大的多样性,在 88% 的相似性水平上也分成 2 个小的分支:其中 CCBAU 33012-1、CCBAU 33012-2、CCBAU 33011、CCBAU 35113、CCBAU 33137、CCBAU 51177、CCBAU 51254 和已知参比菌株 *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T 组成分支 1;CCBAU 33174、CCBAU 23011、CCBAU 23001、CCBAU 35256-2、CCBAU 51012、CCBAU 35121 组成分支 2。

2.1.2 鉴别特征的选择:从上述聚类结果各亚群中找出出现频率 $\geq 95\%$ 的特征为该亚群的鉴别特征。即该亚群中 95% 以上的菌株均表现为正反应的记为“+”,均表现为负反应的记为“-”,出现频率介于 6%~95% 记为“d”(表1)。

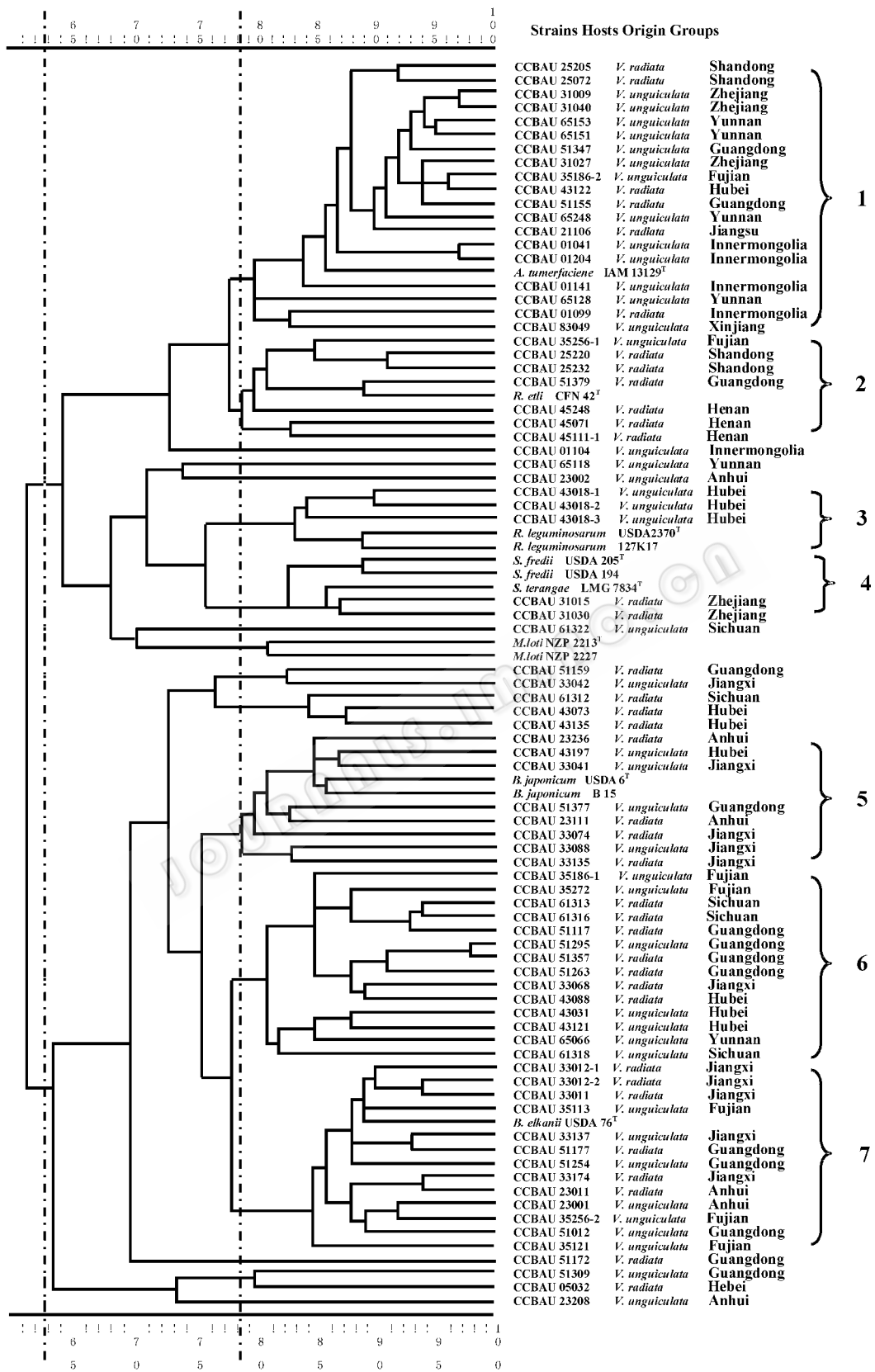


图 1 数值分类树状图 (UPGMA)

Fig.1 Dendrogram of strains isolated from cowpea and mung bean (using UPGMA method). Abbreviations : CCBAU , Culture Collection of Beijing Agricultural University ; NZP , Division of Scientific and Industrial Research , Palmerston , New Zeland ; USDA , the United States Department of Agriculture ; IAM , Institution of Applied Microbiology , the University of Tokyo , Tokyo , Japan ; LMG , Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetiecs , Rijksuniversiteit , B-9000 , Gent , Belgium ; IOC , Inst. Soil Crops , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing ; CFN , Centrodre Investigacion Sobre Fijacion de Nitrogeno , Universidad Nacional Autonoma de Mexico , Cuernavaca , Mexico . T , type strain .

表 1 数值分类各亚群及未聚群参比菌株的鉴别特征*

Table 1 Distinctive characteristics of each subgroup and individual reference stains*

Distinctive characteristics	Subgroups and individual reference strains										Distinctive characteristics	Subgroups and individual reference strains									
	1	2	3	4	5	6	7	a	b	1		2	3	4	5	6	7	a	b		
Application of sole carbon source										Application of sole nitrogen source											
IndoleaceticAcid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gly	d	-	-	-	-	-	-	-	-		
D - Arabinose	+	+	d	d	-	d	+	-	-	L - Met	-	-	d	-	-	-	-	-	-		
I(+)- Arabitol	+	+	+	+	-	+	d	+	-	L - Pro	+	d	d	d	-	-	-	+	-		
Calciumgluconate	d	-	-	d	d	d	+	-	-	L - Thr	+	-	-	-	-	-	-	+	-		
Calciummalonate	-	-	-	-	-	d	-	-	-	DL - Ala	+	+	d	d	-	-	-	-	+		
Dextrin	-	d	d	d	-	-	d	+	-	L - Arg	+	+	d	+	d	d	d	+	+		
Dulcitol	+	+	+	d	-	-	-	+	-	L - Asp	+	+	+	d	+	d	d	+	+		
Meso - erythritol	-	d	+	+	-	-	-	-	-	L - Cys	+	+	d	d	d	d	d	-	+		
Frutol	+	d	+	-	d	d	d	-	-	D - Glu	+	d	d	d	-	-	d	+	+		
I(+)- Galactose	+	+	+	+	-	-	d	+	+	I(+)- Glu	+	+	+	d	+	+	+	+	+		
Glucose	+	+	+	+	-	d	d	+	+	Hypoxanthine	+	+	+	+	d	+	+	+	+		
Inositol	+	+	+	+	d	-	-	+	+	L - Ile	+	+	+	+	d	+	+	+	+		
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L - Lys	+	+	d	+	d	+	+	+	+		
Lactose	+	+	+	+	-	d	-	-	+	L - Phe	+	+	+	+	d	+	+	+	+		
Malate	+	+	-	d	d	+	+	+	+	D - Thr	d	-	-	-	-	-	-	-	-		
Maltose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	L - Val	+	+	+	d	d	+	+	+	+		
D - Mannose	+	+	+	d	-	d	d	+	+	L - Trip	+	+	d	d	-	+	+	+	+		
Melezitose	d	-	-	-	-	-	-	-	-	L - His	+	+	d	d	-	-	-	+	+		
Melibiose	+	d	+	d	-	d	+	+	+	Chemical dyes											
Pyruvate	d	+	d	d	d	+	d	-	-	Bismark Brown	+	d	-	-	-	-	-	-	-		
Raffinose	+	+	+	d	-	d	-	-	-	Bromothymol blue	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Rhamnose	+	+	+	+	-	-	-	+	+	Congo Red	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
D - Ribose	d	d	d	d	-	-	-	+	+	Erythrosin B	d	-	-	-	-	d	d	-	-		
Salicin	+	-	-	d	-	-	-	-	-	Gentian Violet	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
SodiumAcetate	+	d	d	d	-	+	+	+	-	Nethylene Blue	+	d	-	-	-	d	+	-	-		
SodiumCitrate	+	+	d	d	d	d	d	-	-	Netlyl Green	d	d	-	-	d	d	d	-	-		
Sodiumformate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Neutral Red	-	-	-	-	d	+	+	-	-		
D - SodiumCitrate	+	-	-	d	d	+	+	-	-	Sodium Nitrite	+	+	d	d	-	-	-	-	-		
SodiumHippurate	-	-	d	d	-	d	+	-	-	Sodium deoxcholic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
SodiumSuccinate	+	+	d	d	d	+	+	+	+	Salt tolerance											
D - Sorbitol	d	+	+	+	-	-	-	-	+	NaCl (1%)	+	d	-	d	-	-	-	-	-		
Sorbose	-	d	-	d	-	d	d	-	-	NaCl (2%)	+	d	-	d	-	-	-	-	-		
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NaCl (3%)	d	-	-	-	-	-	-	-	-		
Sucrose	+	+	+	+	-	d	d	+	+	NaCl (4%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Syringicacid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NaCl (5%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
SodiumTartaric	-	-	d	-	d	d	d	-	-	Temperature											
Trehalose	+	+	+	d	-	-	-	+	+	4℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Vanillicacid	-	-	-	-	-	-	d	-	-	10℃	d	-	-	-	-	-	-	-	-		
Xylose	+	+	+	d	d	d	d	+	+	37℃	d	+	d	d	d	+	d	-	-		
DL - Asn	+	d	-	-	-	-	-	-	-	60℃(20min)	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Antibiotics * *										60℃(45min)	d	d	-	-	-	-	-	-	-		
Ampicillirf ^[a]	d	+	-	d	d	d	d	+	+	pH											
Ampicillirf ^[b]	d	d	-	-	-	-	d	-	+	pH 4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Ampicillirf ^[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	+	pH 5.0	+	+	+	-	d	+	+	-	+		
Ampicillirf ^[d]	-	-	-	-	-	-	-	-	+	pH 9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Chloramphenicof ^[a]	+	+	d	d	+	+	+	-	+	pH 10.0	+	+	-	+	d	d	d	-	+		
Chloramphenicof ^[b]	d	d	d	-	+	+	+	-	+	pH 11.0	+	+	-	+	d	-	-	-	-		
Chloramphenicof ^[c]	d	d	-	-	+	+	+	-	+	pH 12.0	+	d	-	d	-	-	-	-	-		
Chloramphenicof ^[d]	-	-	-	-	d	d	d	-	-	Litmus Milk Reaction											
Erythromycirf ^[a]	+	+	d	+	+	+	+	+	+	Acid Production	-	-	d	d	-	-	-	+	+		
Erythromycirf ^[b]	+	d	d	d	+	d	+	+	+	Alkali Production	-	-	-	-	+	+	+	-	-		
Erythromycirf ^[c]	+	d	-	-	d	d	+	+	+	Peptonization	+	+	d	+	-	-	-	+	+		
Erythromycirf ^[d]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Acid Cure	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
Kanamycirf ^[a]	+	+	d	d	+	+	+	+	+	Reduction	+	+	+	+	-	-	-	+	+		
Kanamycirf ^[b]	d	-	-	-	d	d	-	-	+	Others											
Kanamycirf ^[c]	-	-	-	-	d	d	-	-	+	Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Kanamycirf ^[d]	-	-	-	-	d	-	-	-	+	Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Neonycirf ^[a]	+	d	d	-	+	+	+	-	+	L - Phenylalaninase	d	-	-	-	-	-	-	-	-		
Neonycirf ^[b]	-	-	-	-	+	+	+	-	+	Oxidase	d	d	d	+	+	d	d	+	+		
Neonycirf ^[c]	-	-	-	-	d	+	+	-	-	Acid Production	+	+	+	+	d	d	-	+	+		
Neonycirf ^[d]	-	-	-	-	-	-	d	-	-	Alkali Production	-	-	-	-	+	+	+	-	-		
Bacitracirf ^[a]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3 - Keto - Lactose Production	d	-	-	-	-	-	-	-	-		
Bacitracirf ^[b]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Methylene Blue Reduction	+	+	d	d	-	-	d	+	+		
Bacitracirf ^[c]	+	+	+	d	+	+	+	+	+	Nile Blue Reduction	+	+	+	+	d	d	-	-	-		
Bacitracirf ^[d]	+	+	d	d	+	+	+	+	+	Nitrate Reduction	d	d	-	d	-	d	+	-	-		
Bacitracirf ^[e]	+	+	d	-	+	+	+	-	-	Growth in Peptone Broth	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
Streptomycirf ^[a]	+	+	+	d	d	d	+	+	+	Streptomycirf ^[c]	d	d	-	-	-	-	d	+	+		
Streptomycirf ^[b]	+	+	d	-	d	-	+	+	+	Streptomycirf ^[d]	d	-	-	-	-	-	d	+	+		

* a : *M. loti* NZP 2213^T ; b : *M. loti* NZP 2227 ; + : ≥95% strains with distinctive characteristics ; - : ≤5% strains with distinctive characteristics ; d : 6% ~ 95% strains with distinctive characteristics . * [a] = 5μg/mL ; [b] = 50μg/mL ; [c] = 100μg/mL ; [d] = 300μg/mL ; [e] = 400μg/mL .

由表 1 可以看出 ,豇豆和绿豆根瘤菌在生理生化、抗逆性等许多方面都具有多样性 :所有菌株都有极其广泛碳氮源利用谱 ,大多数菌株可在较宽的 pH 值范围内生长 ,有些菌株可抗高浓度(300μg/mL)抗生素 ,大部分菌株能在 37℃ 高温条件下生长 ,个别菌株能耐受 60℃ 高温较长时间(20 ~ 45min)的热激。这些表型特征的测定不仅为豇豆和绿豆根瘤菌种质资源的开发和合理利用奠定了一定的基础 ,还为进一步研究其生理生化机制提供了理论依据。

2.2 16S rDNA PCR-RFLP 结果和分析

2.2.1 16S rDNA PCR 产物的酶切图谱类型 :79 株待测菌株与 22 株已知参比菌株的 16S rDNA PCR 产物经 *Alu* I、*Hae* III、*Hinf* I、*Msp* I 酶切后分别产生 12、13、14、16 种带型 ,这 4 种酶组合在一起所得到的 16S rDNA 遗传图谱类型共有 34 种。

2.2.2 16S rDNA PCR-RFLP 聚类结果 :使用 GelCompar II 软件对 4 种内切酶的酶切图谱采用平均连锁聚类方式(UPGMA)进行聚类分析 ,得到树状图(图 2)。

在 79% 的相似性水平上全部菌株基本上按照 *Bradyrhizobium*、*Mesorhizobium*、*Agrobacterium*、*Rhizobium*、*Sinorhizobium* 属的不同而分为 5 个大的分支。在 91% 的相似性水平上全部菌株分为 7 个群 ,此时在 79% 的相似性水平上划分的 *Mesorhizobium* 分支不能聚群(图 2)。群 I 对应于数值分类表观群中的亚群 6 的第 2 个发育分支。群 II 对应于数值分类结果表观群中的亚群 7。群 III 包括了数值分类结果表观群中的亚群 5、亚群 6 的第 2 个发育分支以及未聚群的菌株 CCBAU 23208、CCBAU 43073、CCBAU 51172 和 CCBAU 43135。群 IV 对应于数值分类结果表观群中的亚群 1。群 V 对应于数值分类结果表观群中的亚群 3。群 VI 包含在数值分类结果表观群中的亚群 2 中。群 VII 对应于数值分类结果表观群中的亚群 4。

可见 ,16S rDNA PCR-RFLP 聚类结果与数值分类聚类结果较为一致 ,说明本研究的结果是可靠的。

3 讨论

3.1 豇豆和绿豆根瘤菌在根瘤菌多相分类和系统发育研究中的地位

早期的根瘤菌分类是以互接种族(Cross-inoculation groups)为主要依据的。豇豆族是一个杂

族^[10] ,包括豇豆属、胡枝子属、猪屎豆属、葛属、链荚豆属、刺桐属、落花生属、山蚂蝗属、柱花草属和木蓝属等多个属的豆科植物。

本研究中 ,分离自豇豆和绿豆根瘤的 79 株菌 ,在数值分类中归到不同的表观群中 ,其中 *Bradyrhizobium* 属 41 株、*Agrobacterium* 属 19 株、*Rhizobium* 属 10 株和 *Sinorhizobium* 属 2 株 ,另有 5 株未与已知参比菌株聚群 ,*Mesorhizobium* 属中不含待测菌株。说明豇豆和绿豆根瘤菌存在着极大的表型多样性 ,16S rDNA PCR-RFLP 分析的结果也很好地证明了这一结论。

以前的研究发现 ,豇豆和绿豆根瘤菌主要是慢生菌(*Bradyrhizobium*) ,但也发现有少数的快生菌^[11] ,但未做分类鉴定。在快生待测菌株中 ,分离自浙江豇豆根瘤的 CCBAU 31015 和 CCBAU 31030 在数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 分析都与 *Sinorhizobium* 已知参比菌株聚在一起 ,说明这两株菌属于 *Sinorhizobium* ,这是以前文献从未报道过的一个新的发现。

Germano 等^[12]对分离自 33 种豆科植物根瘤的 119 株根瘤菌采用 16S rDNA PCR-RFLP、23S rDNA PCR-RFLP 和 16S-23S rDNA ITS PCR-RFLP 分析进行了多相分类和系统发育研究 ,研究中所用的 7 株豇豆根瘤菌全部为慢生根瘤菌 ,分别归属于 *Bradyrhizobium japonicum*、*Bradyrhizobium elkanii* 和未定种的慢生根瘤菌群中。在 Abaidoo 等^[13]的研究中 ,11 株豇豆根瘤菌也全都归到了 *Bradyrhizobium* 中。

Wolde-meskel 等^[14]对分离自 15 种木本和 3 种草本豆科植物根瘤的 195 株根瘤菌采用 16S rDNA PCR-RFLP、23S rDNA PCR-RFLP、16S-23S rDNA ITS PCR-RFLP 和 16S rRNA 基因全序列分析进行了多相分类和系统发育研究 ,其中分离自豇豆根瘤的菌株分别属于 *Rhizobium etli*、*Rhizobium galeage*、*Bradyrhizobium yuanmingense* 和未定种 *Bradyrhizobium* sp.。

3.2 土壤杆菌在根瘤菌多相分类和系统发育研究中的地位与争议

Agrobacterium 在根瘤菌分类和系统发育研究中 ,几乎总是和 *Rhizobium* 同处于一个发育分支 ,两个属的各个种之间也总是相互交织在一起 ,其分类地位和命名是近年来颇具争议的热门话题^[15~18]。

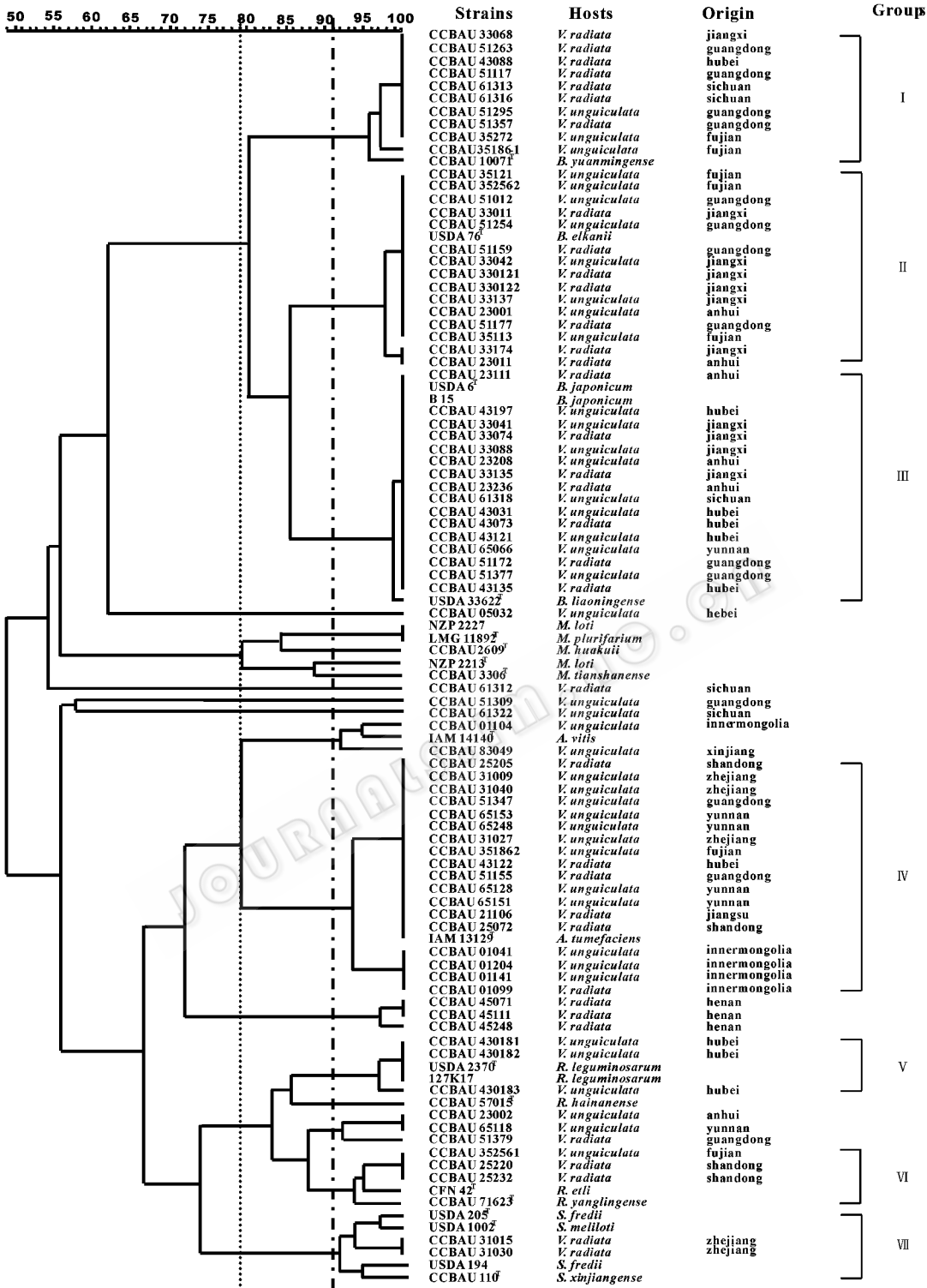


图 2 16S rDNA PCR-RFLP 聚类结果(UPGMA)

Fig.2 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA PCR-RFLP(using UPGMA method).

在根瘤菌多相分类和系统发育研究中,土壤杆菌的来源以及能否单独结瘤问题,也是一个由来已久、颇具争议的问题。最近,Mhamdi 等^[19]用 *gus A* 基因标记从菜豆根瘤分离得到的 *Agrobacterium* 菌株,通过一系列的结瘤试验证明:*Agrobacterium* 菌株

单独回接菜豆不能结瘤,而与从菜豆根瘤分离、回接结瘤的 *Rhizobium* 属根瘤菌混合回接菜豆可以结瘤,并且在所结的根瘤中可以检测到 *Agrobacterium* 和 *Rhizobium* 的共同存在。这一研究结果表明,人们经常从豆科植物的根瘤中分离到土壤杆菌并不是操作

中的污染,而是土壤杆菌能够在与之亲缘关系较近的根瘤菌协助下进入根瘤,并在根瘤中定植、生长。

3.3 本研究有待进一步深入研究的问题

本研究所用待测菌株大部分都是慢生根瘤菌,快生根瘤菌(*Rhizobium* 和 *Sinorhizobium*)菌株数量较少,中慢生根瘤菌发育分支未发现待测菌株。因此,需要进一步扩大菌株数量,尤其快生和中慢生菌株的数量进行更深入的研究,以便进一步验证本研究中快生根瘤菌的种属分布,并探索豇豆和绿豆根瘤菌在快生根瘤菌其它种以及中慢生根瘤菌属中是否有分布。

另外,需要用其它分子生物学方法(如 rep-PCR、AFLP 等)对这些菌株进行分析,进一步揭示它们的遗传多样性。对与已知参比菌株聚群的待测菌株,要进行 16S rRNA 基因序列测定或 DNA-DNA 杂交来确定它们的确切分类地位。

在 16S rDNA PCR-RFLP 分析中,CCBAU 45071、CCBAU 45111-1 和 CCBAU 45248、形成一个小分支,未与任何参比菌株聚群,在数值分类分析中与其它参比菌株关系也比较远,可能是一个新的种群,需要扩大菌株数量做进一步研究。

参 考 文 献

[1] 陈文新. 豆科植物-根瘤菌固氮体系在西部大开发中的作用. 草地学报, 2004, 12(1): 1-2.

[2] Bergersen FJ. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. *Austr J Biol*, 1961, 14: 349-360.

[3] Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol*, 1974, 84(1): 188-198.

[4] Vincent JM. A Manual for the Pratical Study of Root-nodule Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.

[5] Chen WX, Yan GL, Li JL. Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov.. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, 38(4): 392-397.

[6] Chen WP, Kuo TT. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(9): 2260.

[7] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacterio*, 1991, 173(2): 697-703.

[8] van Berkum P, Beyene D, Eardly BD. Phylogenetic relationships

among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int J Syst Evol Microbiol*, 1996, 46(1): 240-244.

[9] Laguerre G, Mavingui P, Allard MR, et al. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(6): 2029-2036.

[10] Thies JE, Bohlool BB, Singleton PW. Subgroups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilium atropurpureum*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(5): 1540-1545.

[11] Zablotowicz RM, Focht DD. Physiological characteristics of cowpea rhizobia: evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 41(3): 679-685.

[12] Germano MG, Menna P, Mostasso FL, et al. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(1): 217-229.

[13] Abaidoo RC, Keyser HH, Singleton PW, et al. *Bradyrhizobium* spp. (TGx) isolates nodulating the new soybean cultivars in Africa are diverse and distinct from bradyrhizobia that nodulate North American soybeans. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(1): 225-234.

[14] Wolde-meskel E, Terefe-work Z, Frostegard A, et al. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55(4): 1439-1452.

[15] Young JM. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzard and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzard and Jones 2001) comb. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(1): 149.

[16] Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, et al. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1988 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51(1): 89-103.

[17] Farrand SK, van Berkum PB, Oger P. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(5): 1681-1687.

[18] Broughton WJ. Rose by other name: Taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *J Bacteriol*, 2003, 185(10): 2975-2979.

[19] Mhamdi R, Mrabet M, Laguerre G, et al. Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Can J Microbiol*, 2005, 51: 105-111.

Numerical taxonomy and 16S rDNA PCR-RFLP analysis of rhizobial strains isolated from root nodules of cowpea and mung bean grown in different regions of China

ZHANG Yong-fa^{1,2}, WANG Feng-qin³, CHEN Wen-xin^{1*}

(¹ Key Laboratory of Agro-Microbial Resource and Application, Ministry of Agriculture, College of Biological Sciences, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

(² College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

(³ College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract Seventy-nine rhizobial strains, isolated from root nodules of cowpea (*Vigna unguiculata*) and mung bean (*Vigna radiata*) grown in different regions of China, were studied by a fuzzy cluster analysis of 128 phenotypic characteristics. The phenotypic characterization of these strains showed that most of these strains had high stress resistance. For instance, most of them could grow from pH 5.0 to pH 11.0. Over 85% of these strains could grow well on YMA plate at 37°C and several of them even could grow after a 45 minutes hot shock at 60°C. Some strains had a tolerance to high concentration of Bacitracin (400 µg/mL). The result of the fuzzy cluster analysis showed that all the strains were clustered into 2 groups, slow growers and fast growers, at the similarity level of 63.5%. At the similarity level of 79%, there were 7 subgroups further separated.

Based upon the result of the numerical taxonomy, these strains together with 22 reference strains were analyzed by the 16S rDNA PCR-RFLP. Thirty-four genotype profiles were obtained from the fingerprinting of the 16S rDNA PCR-RFLP. These strains were analyzed by GelCompare II software and clustered into 7 groups at the similarity level of 91%, which were consonant with the 7 subgroups clustered at the similarity level of 79% in numerical taxonomy.

The results of numerical taxonomy and 16S rDNA PCR-RFLP analysis showed that all of the seventy-nine rhizobial strains isolated from root nodules of cowpea and mung bean were clustered into four genera: *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium*, respectively.

An individual clade without any reference strains, which was composed of CCBAU 45071, CCBAU 45111-1 and CCBAU 45248, might be a new species of *Rhizobium*.

Overall, the study results demonstrated a high phenotypic and phylogenetic diversity of rhizobial strains nodulating cowpea and mung bean grown in different geographic regions of China.

Keywords: Cowpea; Mung bean; Rhizobia; Numerical taxonomy; 16S rDNA PCR-RFLP; Diversity