

# 用 DNA 同源性的方法确定柃麻根瘤菌的分类地位\*

李广善\*\* 陈文新

(北京农业大学,北京 100094)

柃麻是豆科植物猪屎豆属(*Crotalaria* L.)中的一个种,种名为 *Crotalaria juncea*。它是一种夏季速生绿肥,在我国南北方均有分布,其茎秆可作麻,也可作燃料。目前,对与其共生固氮的柃麻根瘤菌研究不多,更未见其分类地位的报道。本室曾收集了 11 株柃麻根瘤菌进行过数值分类研究,发现慢生型柃麻根瘤菌和慢生型大豆根瘤菌聚在同一个表观群内,而和已知快生型根瘤菌有明显的差异。为探讨它们确切的分类地位,本实验对柃麻根瘤菌表观群中的代表菌株与已知根瘤菌各个种的模式菌株及其它相关菌株作了 DNA G + C mol% 和同源性的对比分析。

## 材料与 方法

### (一) 菌株

供试的 23 株细菌包括:第 1—5 号为快生型银合欢根瘤菌;第 6—11 号为黄花属中 4 个植物种的快生型根瘤菌;第 12—16 号为慢生型柃麻根瘤菌(其中第 14 号生长速度略快于其它 4 株,在 YMA 平板上,28℃,4—5 天长出单菌落)以及已知快、慢生型根瘤菌各个种的模式菌株(表 1)。

菌株在 YMA 平板中 28℃ 培养,经检验确系纯培养物。然后在 4℃ 冰箱保存备用。

### (二) DNA 的提取

供试菌株培养于产少量胞外多糖的 TY<sup>[1]</sup> 培养液中,摇瓶培养(200r/min)至对数生长的中、后期,离心(5000g, 10min)收集菌体。

DNA 提取、样品纯度测定、浓度要求,主要参考 Marmur<sup>[2]</sup>和 Johnson<sup>[4]</sup>的方法

### (三) 热变性法测定 DNA G + C mol%

主要参考 Marmur 等人<sup>[1]</sup>的方法。所用仪器由 TP-801 微机、752 型紫外分光光度计(上海产)和 G + C mol% 测定仪(上海产)组成。

*E. coli* K<sub>12</sub> 作为实验参考菌株,土壤杆菌 C<sub>31</sub> 作为内标记菌株,用来检测实验方法、仪器和

操作是否恰当。DNA G + C mol% 计算根据 Johnson<sup>[4]</sup> 和 De Ley<sup>[4]</sup> 的公式。

### (四) 复性速率法测定 DNA 同源百分数

所用仪器及对 DNA 样品的要求同(三)。两个菌株间 DNA 同源百分率根据 Johnson<sup>[4]</sup> 和 De Ley<sup>[7]</sup> 的公式计算。

### (五) 各群中心株和代表菌株的选取

计算每株菌与群内其它菌株的相似百分率的和,然后取其平均值,该群中均值最大的菌株为该群中心菌株<sup>[1]</sup>。群内均值最大和最小菌株即为该群的代表菌株。

## 结果与 讨论

### (一) G + C mol%

表 2 列出测定的全部菌株 G + C mol% 值,其中第 1—11 号及第 17—19 号均为快生型根瘤菌菌株,其 G + C mol% 的范围为 59.0—62.1,在文献报道的根瘤菌属(*Rhizobium*)的 G + C mol% (59—64)<sup>[11]</sup> 的范围内。而第 12、13、15、16 号以及第 20—22 号菌株均是慢生型根瘤菌,其 G + C mol% 为 61.8—64.6,也在慢生型根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)的 G + C mol% (61—65)<sup>[11]</sup> 的范围内。值得指出的是,第 14 号慢生型柃麻根瘤菌,其 G + C mol% 为 60.6 和其它慢生型柃麻根瘤菌也略有差异。第 23 号土壤杆菌 C<sub>31</sub> 菌株 G + C mol% 为 60.0,和文献报道的一致。

### (二) 慢生型柃麻根瘤菌的 DNA 同源性

我们从同一表观群的 11 株柃麻根瘤菌中选取 5 株慢生型柃麻根瘤菌作彼此之间的 DNA 同源性分析,数据见表 3、4。从表 3、4 可以看出:第 12、13、15 和 16 号 4 株慢生型柃麻根瘤菌 DNA

本文于 1989 年 12 月 30 日收到。

\* 国家自然科学基金资助项目。

\*\* 现在工作单位:中国科学院植物研究所,北京。

表 1 菌株目录

菌株序号	菌株	宿主植物	地区来源	提供单位
1	<i>Rhizobium</i> sp. 42	<i>Leucaena leucocephala</i>	海南省	北京农大固氮室
2	<i>Rhizobium</i> sp. 38-1	<i>Leucaena leucocephala</i>	海南省	北京农大固氮室
3	<i>Rhizobium</i> sp. 44	<i>Leucaena leucocephala</i>	海南省	北京农大固氮室
4	<i>Rhizobium</i> sp. CB81	<i>Leucaena leucocephala</i>	澳大利亚	北京农大固氮室
5	<i>Rhizobium</i> sp. 38-2	<i>Leucaena leucocephala</i>	海南省	北京农大固氮室
6	<i>Rhizobium</i> sp. 103	<i>Astragalus sinicus</i>	南京	南京农大
7	<i>Rhizobium</i> sp. CA8561	<i>Astragalus membranaceus</i>	北京	中国农科院土肥所
8	<i>Rhizobium</i> sp. CA8593	<i>Astragalus membranaceus</i>	北京	中国农科院土肥所
9	<i>Rhizobium</i> sp. S16	<i>Astragalus adsurgens</i>	北京	中国农科院土肥所
10	<i>Rhizobium</i> sp. CA8213	<i>Astragalus adsurgens</i>	北京	中国农科院土肥所
11	<i>Rhizobium</i> sp. K	<i>Astragalus aliginosus</i>	黑龙江	北京农大固氮室
12	<i>Bradyrhizobium</i> sp. S-2	<i>Crotalaria juncea</i>	湖北	中国科学院病毒所
13	<i>Bradyrhizobium</i> sp. C-100	<i>Crotalaria juncea</i>	安徽	中国科学院病毒所
14	<i>Bradyrhizobium</i> sp. S3-4	<i>Crotalaria juncea</i>	山西	山西省农科院
15	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SX111	<i>Crotalaria juncea</i>	山西	北京农大固氮室
16	<i>Bradyrhizobium</i> sp. S-12	<i>Crotalaria juncea</i>	山西	山西省农科院
17	<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar. <i>Viciae</i> st rain USDA 2370 <sup>T</sup>	?	美国	美国农业部
18	<i>Rhizobium meliloti</i> USDA 1002 <sup>T</sup>	?	美国	美国农业部
19	<i>Rhizobium loti</i> ATCC 33669 <sup>T</sup>	?	美国	美国农业部
20	<i>Bradyrhizobium</i> sp. USDA 3045 <sup>R</sup>	<i>Lupinus</i> sp.	美国	美国农业部
21	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110 <sup>R</sup>	<i>Glycine max</i>	美国	美国农业部
22	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA6 <sup>T</sup>	<i>Glycine max</i>	美国	美国农业部
23	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 <sup>R</sup>			北京农大固氮室
24	<i>Escherichia coli</i> K12 <sup>R</sup>			北京农大固氮室

注：“T”为模式菌株；“R”为参考菌株。

表 2 测试菌株 DNA 中 G + C 的含量

菌株	G + C mol%	菌株	G + C mol%	菌株	G + C mol%
1	59.0	9	60.4	17	60.9
2	61.7	10	60.9	18	60.0
3	62.1	11	60.9	19	60.5
4	60.9	12	62.1	20	62.7
5	60.9	13	61.8	21	63.9
6	60.5	14	60.6	22	64.6
7	60.9	15	62.4	23	60.0
8	59.1	16	62.5	24	51.2

注：表中结果为 3 次测定的平均值。

第 24 号菌株为 *E. coli* K12<sup>R</sup> 其 G + C mol% 为 51.2<sup>[4]</sup>。

同源值为 90.4—94.9%，平均值为 92.9%，标准误差 1.83%，是一个 DNA 同源性很高的菌群。而生长较快的桉麻根瘤菌第 14 号与上述 4 株慢生

型桉麻根瘤菌 DNA 同源值为 70.1—73.0%，平均值为 71.6%，标准误差 1.19%。说明慢生型桉麻根瘤菌生长速度虽然略有差异，但仍在同一个同源群内。

从 5 株慢生型桉麻根瘤菌中选出代表菌株第 14 号和第 15 号，分别与根瘤菌属中的苜蓿根瘤菌 (*R. meliloti*) 模式菌株第 18 号、豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarium*) 模式菌株第 17 号、百脉根根瘤菌 (*R. loti*) 模式菌株第 19 号、其它快生型根瘤菌以及慢生型根瘤菌属中的大豆根瘤菌 (*B. japonicum*) 模式菌株第 22 号、大豆根瘤菌参考菌株第 21 号、前羽扇豆根瘤菌模式菌株第 20 号进行了 DNA 同源性分析，结果列表 5。从表 5 可看出：1. 慢生型桉麻根瘤菌与根瘤菌属中三个种的根瘤菌的 DNA 同源水平很低 (0—9.2%)；2. 它们与慢生型根瘤菌属的模式及参考菌株的 DNA 同源值为 75.3—85.2%，属于一个种的同源性水平；

表 3 慢、中慢生型桫麻根瘤菌 DNA 同源百分数

DNA 同源百分率 (H%) 菌号	菌号				
	12	13	14	15	16
12	100	92.8	70.5	94.3	90.4
13		100	71.5	94.5	90.6
14			100	70.1	73.0
15				100	94.9
16					100

注: 表中数据为 2—3 次测定结果的平均值, 相对误差小于 5%。

表 4 慢生型桫麻根瘤菌群各菌株 DNA 同源性平均值和标准误差

	菌株序号				
	12	13	14	15	16
同源平均值(%)	87.3	87.4	71.6	88.5	87.2
同源标准误差(%)	10.63	10.59	1.19	12.24	9.71

注: 该群代表菌株为第 14 和 15 号菌。

3. 桫麻根瘤菌第 14 号菌株与慢生型根瘤菌的模式及参考菌株的 DNA 同源性稍低, 为 56.1—66.5%。

我们用 DNA 同源百分率对根瘤菌菌株分析的结果与数值分类的研究结果相吻合。由上面结果可以认为, 慢生型桫麻根瘤菌独立成群, 而且和慢生型大豆根瘤菌有种内同源性; 与快生型根瘤菌同源水平很低。因此, 应将慢生型桫麻根瘤菌归为慢生型大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)。

表 5 桫麻根瘤菌代表株和其他根瘤菌模式(参考)株或代表株 DNA 同源性比较

菌号	菌号														
	4	5	6	7	9	11	14	15	17 <sup>T</sup>	18 <sup>T</sup>	19 <sup>T</sup>	20 <sup>R</sup>	21 <sup>R</sup>	22 <sup>T</sup>	23 <sup>R</sup>
14	4.8	0	6.5	8.4	32.1	23.6	100	70.1	0	0	7.1	66.5	47.8	56.1	20.9
15	0	0	0	0	10.8	0.3	70.1	100	0	1.9	9.2	75.3	82.4	85.2	0

注: 表中数据为 2—3 次测定结果的平均值, 相对误差小于 3.5%。

“T”为模式菌株; “R”为参考菌株。

### 参 考 文 献

- [1] Jordan, D. C.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.1 (ed. Krieg, N. R. et al.), The William and Wilkins Company, Baltimore, pp. 234—256, 1984.
- [2] Carall, W. R.: *Soil Sci.*, **37**: 117—135, 1934.
- [3] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, **3**: 208—218, 1961.
- [4] Johnson, J. L.: *Methods in Microbiology*,

Vol. 18 (ed. Gottschalk), Academic Press, London, pp. 1—74, 1985.

- [5] Marmur, J. and P. Doty: *J. Mol. Biol.*, **5**: 109—118, 1962.
- [6] De Ley, J.: *J. Bacteriol.*, **101**: 738—754, 1970.
- [7] De Ley, J. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **12**: 133—142, 1970.
- [8] Lockhart, W. R. et al.: *Methods for Numerical Taxonomy*. Methods of American Society for Microbiology, New York, 1970.

## CLASSIFICATION OF THE SLOW-GROWING RHIZOBIA ISOLATED FROM THE NODULES OF *CROTALARIA JUNCEA* BY DNA HOMOLOGY

Li Guangshan\*    Chen Wenxin\*\*

(Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

The DNA G + C mol% and DNA homologies of the four slow-growing and one middle growing rhizobia from the nodules of *Crotalaria juncea* and eighteen other rhizobia were comparatively determined by the methods of the thermal denaturation and the reassociation rate of DNA, respectively. The results showed that: 1. The slow-growing strains from the nodules of *Crotalaria juncea* and *Bradyrhizobium japonicum* were belonged to a high level group of DNA homology (75.3—85.2); 2. The classification results obtained from DNA homo-

logy and numerical taxonomy were identical (unpublished data). So we propose that the slow-growing rhizobia from *Crotalaria juncea* should be included in the species, *Bradyrhizobium japonicum*.

### Key words

Rhizobia: *Crotalaria juncea*; G + C mol%; Genotype group

\* Present address: Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100044, China.

\*\* Correspondence author