

# 分离自鸡眼草和木蓝的根瘤菌分类研究\*

韦革宏<sup>1</sup> 陈文新<sup>2</sup> 朱铭莪<sup>1</sup>

(1 西北农业大学资环系 杨凌 712100) (2 中国农业大学生物学院 北京 100094)

**提 要** 采用数值分类方法对分离自鸡眼草(*Kummerowia*)和木蓝(*Indigofera*)的根瘤菌及已知参比菌株进行聚类分析,发现在 83% 的相似性水平上形成 2 个不同与已知菌种的新类群。以 SDS 全细胞蛋白电泳技术快速聚类分群扩大菌株数,在 86% 的相似性水平上,分离自鸡眼草的 24 株菌形成第 1 类群,分离自木蓝的 20 株菌形成第 2 类群。DNA 同源性测定结果表明,这 2 个类群中心菌株 SH713 和 SHL042 与 13 个已知根瘤菌种的 DNA 同源性均小于 61%。因此,分离自鸡眼草和木蓝的根瘤菌分别构成 2 个独立的根瘤菌新种群。

**关键词** 鸡眼草,木蓝,根瘤菌,数值分类,全细胞蛋白电泳,DNA 同源性

分类号 Q939.09 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(1999)05-0387-95

近年来,随着豆科植物根瘤菌资源的不断开发和现代分类技术的应用,使根瘤菌的分类研究得到了迅速的发展,同时,各种方法的应用又从多角度、多方位揭示了根瘤菌丰富多样的特征。数值分类是采用大量生理生化性状的测定,借助计算机进行聚类分群,并可得到菌群间的鉴别特征和表型特征的描述<sup>[1]</sup>。蛋白质是基因表达的产物,关系密切的根瘤菌在蛋白质组成上有一定的相似性,这是蛋白质电泳分析用于根瘤菌分类的理论基础。根瘤菌细胞中可溶性蛋白种类较多,通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,可将细胞中的各种蛋白组分进行分离,并对电泳图谱进行聚类分析<sup>[2]</sup>。DNA G+C mol% 及 DNA 同源性的测定已成为分类鉴定中的基本方法,是一个能反映属、种间亲缘关系的遗传型特征。在根瘤菌分类中,其被公认为是建立新种的必要标准之一<sup>[1]</sup>。

本试验在陕甘宁地区野生豆科植物根瘤菌资源调查的基础上,对国内外未曾作过分类研究的分离自鸡眼草和木蓝的根瘤菌,应用数值分类方法进行分析,然后再进一步采样,以 SDS-全细胞蛋白电泳技术快速聚类分群扩大菌株数,并进行 DNA 分析,初步确定其分类地位。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株来源

未知菌株分离自黄土高原—陕西及甘肃的豆科植物鸡眼草属和木蓝属的根瘤, YMA 平板纯化、回接原寄主后,保存备用。

参比菌株是目前 *Int J Syst Bacteriol* 上正式发表的 13 个快生根瘤菌,各菌株种名、宿主及来源见表<sup>[3]</sup>。

\* 国家自然科学基金重点资助项目(No. 39130010)

收稿日期:1998-05-25,修回日期:1998-10-12

表 1 参比菌株一览表

Table 1 List of the reference strains

种名 Species	菌株 Stains	宿主 Hosts	来源 Origins
<i>R. leguminosarum</i>	USDA2370 <sup>T</sup> 127K17	<i>Medicago sativa</i> <i>Phaseolus</i> sp.	美国 美国
<i>R. tropici</i>	CIAT899 <sup>T</sup> BR853	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Leucaena leucocephala</i>	CNPBS CNPBS
<i>R. hainanensis</i>	I66 <sup>T</sup> H14	<i>Desmodium sinuatum</i> <i>D. heterophyllum</i>	海南 海南
<i>R. etli</i>	CFN42 <sup>T</sup>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	CNPBS
<i>R. galegae</i>	HAMB1540 <sup>T</sup> HAMB11185	<i>Galega orientalis</i> <i>Galega</i> sp.	芬兰 美国
<i>R. ciceri</i>	USDA3383	<i>Ciceri arietinum</i>	美国
<i>S. fredii</i>	USD205 <sup>T</sup> USDA194	<i>Glycine soja</i> <i>Glycine soja</i>	河南 河南
<i>S. meliloti</i>	USDA1002 <sup>T</sup> 102F28	<i>Medicago sativa</i> <i>Medicago sativa</i>	美国 美国
<i>S. saheli</i>	USDA4102 <sup>T</sup>	<i>Sesbania cannabine</i>	美国
<i>S. teranga</i>	USDA4101 <sup>T</sup>	<i>Acacia laeta</i>	塞内加尔
<i>M. huakuii</i>	CCBAU2609 <sup>T</sup> A106	<i>Astragalus sinicus</i> <i>A. sinicus</i>	南京 湖北
<i>M. loti</i>	NZP2213 <sup>T</sup> NZP2227	<i>Lotus coniculatus</i> <i>lotus</i> sp.	新西兰 新西兰
<i>M. tianshanense</i>	AIBS <sup>T</sup> 6	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> <i>G. uralensis</i>	新疆 新疆

T :Type strains CNPBS Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do solo.

## 1.2 性状测定

性状测定项目及方法按文献 [4] 进行,共测定了包括唯一 C、N 源试验,抗生素敏感性以及对染料和化学药物的耐受性等共 133 个项目。每个试验均设三个重复及阳性和阴性对照。

## 1.3 全细胞蛋白电泳

**1.3.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的制备** 浓缩胶浓度为 3%,分离胶浓度为 12.5%。以熔化的琼脂密封胶板的边缘和底部,胶厚 0.4mm。

**1.3.2 蛋白质样品的制备** 采用改进的方法,供试菌株经 YMA 斜面活化后,接地 5mL TY 液体培养基内,28℃ 振荡培养至对数期,12000r/min 离心 3min,转入 1.5mL Eppendorf 管中,用 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤后,加入 0.5mL 的上样缓冲液 (SDS 500mg, β-巯基乙醇 1mL,甘油 3mL,溴酚蓝 4mg,1mol/L Tris-HCl (pH6.8) 2mL,加水至 10mL),煮沸 10min,-20℃ 反复冻融 3 次,临上样前,沸水浴 2min,12000 r/min 离心 3min,上清液点样。

**1.3.3 电泳** 电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸 (pH8.3)。点样后 80V 电压电泳,待溴酚蓝指示剂到达分离胶前沿,电压增至 300V,将电泳槽放入 4℃ 的冰箱。由于每块胶只能点 20 个

样品,先选取已作过数值分类的菌株与新采集株进行电泳,初步确定各菌株归群,再放在同一块胶上电泳,以便于比较。

1.3.4 染色 采用银染法,具体步骤见文献[5]。

#### 1.4 聚类分析

数值分类是根据供试菌株的生长情况,形成典型菌落者,记为“1”,否则记为“0”。蛋白电泳是根据条带的有无,将数据分别转换成“1”和“0”,不同胶上的条带,以同一参比菌株各条带的  $R_f$  值为标准进行比较。以平均连锁法(UPGMA)聚类,系统自动生成树状谱。

#### 1.5 DNA G+C mol%及 DNA 同源性测定

菌体培养与收集, DNA 的提取按文献[6]。DNA G+C mol%采用热变性法, DNA 同源性测定采用初始复性速率法[7]。

## 2 结果和讨论

### 2.1 数值分类

图1中,全部供试菌株在66%的相似性水平上聚在一起。在83%的相似性水平上,已知参比菌不同种之间能彼此很好的分开,它们依次为弗氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)、萨赫尔中华根瘤菌(*S. saheli*)、百脉根根瘤菌(*Rhizobium loti*)、天山根瘤菌(*R. tianshanense*)、华癸根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)、苜蓿根瘤菌(*S. meliloti*)、豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)、多寄主中华根瘤菌(*S. teranga*)、热带根瘤菌(*R. tropici*)、海南根瘤菌(*R. hainanensis*)、菜豆根瘤菌(*R. etli*)、山羊豆根瘤菌(*R. galegae*)和鹰嘴豆根瘤菌(*R. ciceri*)。此标准符合 Sneath[8]的建议,其中 *R. tropici* 与 *R. hainanensis* 相似性达到86%,说明二者的表型性状相似程度高,这与谭志远等[9]和王素英等[3]的研究结果相吻合。以上这些参比菌株的分类结果与现行的分类体系一致,从而证明本次数值分类结果的可靠性。

根据参比菌株的聚类情况,在83%的相似性水平上新分离菌聚为2个类群。第1类群有5株菌,寄主均为木蓝属,其中SH364和SHL042来自陕西的多花木蓝(*I. amblyantha*),SH260来自甘肃的多花木蓝,另外两株菌SH385和SHL064分别来自陕西的苏木蓝(*I. crlesii*)和波氏木蓝(*I. potanini*)。中心菌株为SHL042。第2类群有5株菌,寄主为鸡眼草,地理来源均为陕西。中心菌株为SH713。同时从树状图上可以看出,寄主与地理来源相同的个别菌株,也并未聚在第1和第2类群中,如SH369分离自陕西的多花木蓝,在表型上与第1类群其它菌株相似性比较低。SH712、SH269和SH150寄主均为鸡眼草,却与第2类群其它菌株的相似性不高。说明,根瘤菌的表型特征不仅受到寄主的影响,同时也受到地理来源、生态环境条件的影响。

### 2.2 各类群之间的鉴别特征

从表2各类群的鉴别特征统计结果中可以看出,第1、2类群的菌株不能在柠檬酸钠、海藻糖作为唯一C源的培养基上生长,而绝大多数已知菌却能生长。第2类群的菌株及 *M. loti*、*S. saheli* 不能利用木糖、苹果酸钠和蔗糖作为唯一C源,而第1类群的菌株及 *R. galegae*、*R. hainanensis*、*M. tianshanense* 能利用。第1类群的菌株对氨基青霉素(50mg/L)很敏感,而其它菌不敏感,当氨基青霉素浓度增至300mg/L时,第2类群的菌

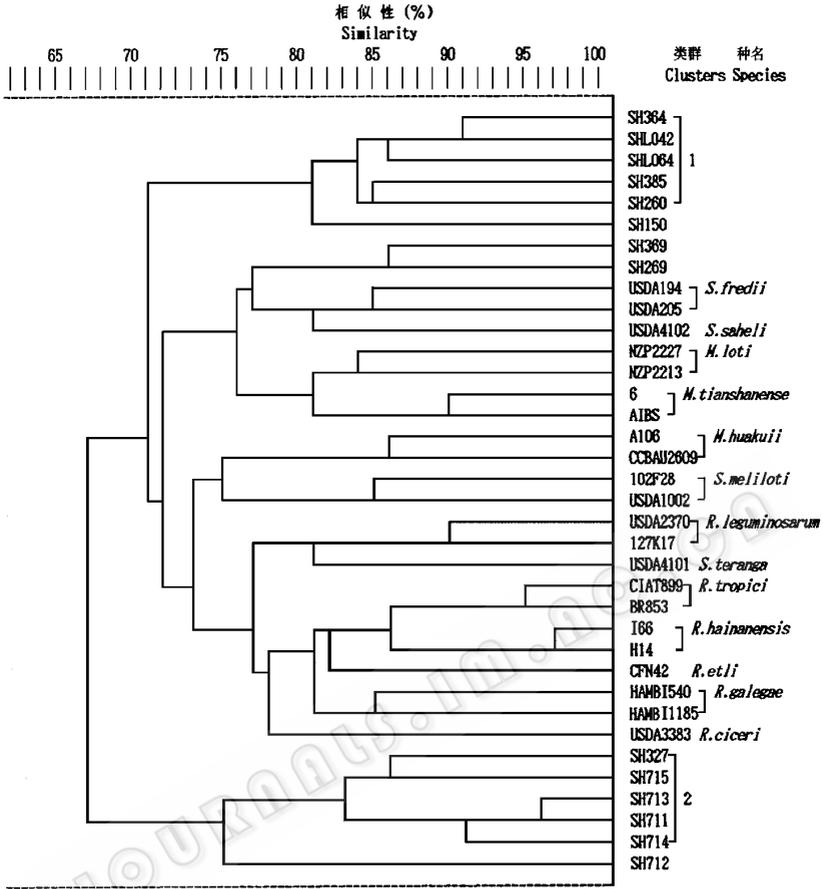


图 1 数值分类树状图

Fig. 1 Dendrogram of numerical taxonomy of rhizobial strains

株及 *S. fredii*、*M. huakuii* 不能耐受。第 1、2 类群的菌株及 *M. huakuii*、*R. tropici*、*R. hainanensis* 不能在含 0.1% 的甲基绿培养基上生长, 而其它已知菌能生长。以上表观特征的差异表明 2 个新类群之间以及新类群与已知根瘤菌各种在 C、N 源利用, 抗生素抗性, 耐逆性等方面存在着多样性。

表 2 各类群之间的鉴别特征

Table 2 Distinctive features of the clusters

鉴别特征 Distinctive features	SF	MH	SM	RL	RT	ML	RG	RH	MT	ST	SS	RE	RC	cluster 1	cluster 2
D-阿拉伯糖 <i>D</i> -arabinose	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	±	-
丙二酸钙 Calcium malonate	-	±	-	±	+	-	-	-	-	-	+	+	-	±	-
柠檬酸钠 Sodium citrate	±	+	±	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
D-山梨糖醇 <i>D</i> -sorbitol	+	±	+	±	+	±	±	+	+	+	+	+	+	±	-
海藻糖 Trehalose	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(续表 2)

鉴别特征 Distinctive features	SF	MH	SM	RL	RT	ML	RG	RH	MT	ST	SS	RE	RC	cluster 1	cluster 2
木糖 Xylose	±	+	+	±	+	-	+	+	±	+	-	+	+	+	-
苹果酸钠 Maulate	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
蔗糖 Sucrose	±	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
L(-)谷氨酸 L(-)Glutamic acid	±	+	±	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	±	+
氨苄青霉素(500mg/L) Ampicillin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
氨苄青霉素(300mg/L)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
链霉素(50mg/L) Streptomycin	+	-	±	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
甲基绿(0.1%) Methyi green	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
石蕊牛奶酪化 Litmus milk peptonization	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	±

+ :Positive reaction ; - :Negative reaction ; ± :Partially positive or negative.

SF = *S. fredii* ; MH = *M. huakuii* ; SM = *S. meliloti* ; RL = *R. leguminosarum* ; RT = *R. tropici* ; ML = *M. loti* ;  
RG = *R. galegae* ; RH = *R. hainanensis* ; MT = *M. tianshanense* ; ST = *S. teranga* ; SS = *S. saheli* ; RE = *R. etli* ; RC =  
*R. ciceri*.

### 2.3 全细胞蛋白电泳

在数值分类研究的基础上,对木蓝和鸡眼草的根瘤又做了进一步的采集,并进行根瘤菌的分离、纯化、回接原寄主,然后应用 SDS-全细胞蛋白电泳技术进行聚类分析,以扩大两个新类群的菌株数。

图 2 是 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,供试菌株电泳图谱的部分照片。从图中可见,在蛋白质组分上供试菌株显示出较大的遗传多样性。同时,本次试验采用改进的蛋白质样品制备方法及灵敏度较高的银染技术,获得了理想的电泳结果,图谱条带清晰可见。

根据每个菌株电泳图谱条带的差异,以平均连锁法聚类分析,聚类结果见图 3(进行了两次聚类,删除未聚入两个新类群的菌株)。图 3 中,全部供试菌株在 66% 的相似性水平上聚在一起。在 86% 的相似性水平上,已知参比菌不同种之间能彼此很好的分开,未知菌聚为 2 个大类群。第 1 类群有 24 株菌,寄主均为鸡眼草。其中有 5 株菌(SH713、SH714、SH715、SH711 和 SH327)已做过数值分类,结果表明它们代表一个新的根瘤菌类群,全细胞蛋白电泳中,它们仍聚为同一类群,二者聚类结果一致,仅仅是蛋白电泳聚类中相似性达 92%,而数值分类相似性 84%。第 2 类群菌株扩大到 20 株,大多数菌株寄主为木蓝属中的多花木蓝(*I. amblyantha*),个别菌株寄主为苏木蓝(*I. carlesii*)和波氏木蓝(*I. potanini*)。其中有 5 株菌(SHL042、SHL064、SH260、SH385 和 SH364)做过数值分类。全细胞蛋白电泳与数值分类聚类结果相同,表明它们属于一个新的根瘤菌类群。

从 2 个新类群的聚类结果看,分离自鸡眼草和木蓝的根瘤菌无论是在生理生化性状上,还是在蛋白组分上与已知根瘤菌在表型特征上都表现出较大的差异性。

### 2.4 DNA 分析

在全细胞蛋白电泳聚类的基础上,测定了 2 个新类群菌株的 DNA G + C mol% 含量

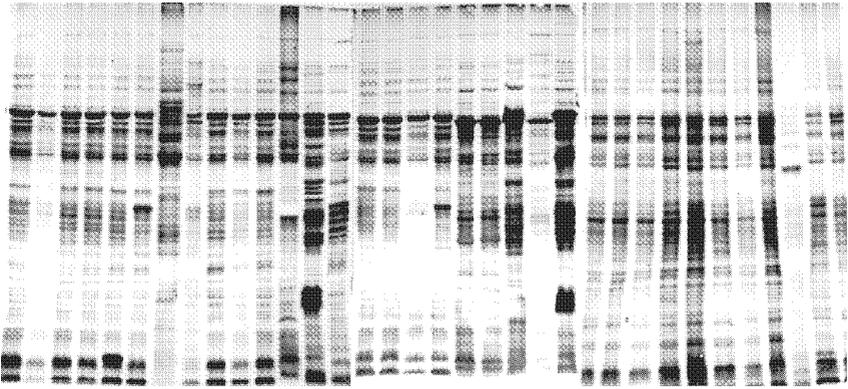


图2 部分菌株 SDS-全细胞蛋白电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of whole-cell protein electrophoresis patterns of partial strains

从左→右依次为:SH6848、USDA4101、SH6864、SH6863、SHL042、SH6843、USDA4102、CFN42、SH385、SH6845、SH6718、I66、HAMB1540、A106、SHL042、SH260、F28、SH6840、AIBS、6、USDA3383、USDA1002、127K17、SH713、SH734、SH7480、SH726、SH747、SH727、SH725、SH7401、BR853、SH715

和 DNA 同源性, 以及中心菌株 SH713 和 SHL042 与 13 个已知种模式菌株的 DNA 同源性。其结果见表 3 和表 4。

表3 2 个新类群菌株的 DNA 分析结果

Table 3 DNA analysis of the strains in the two new clusters

第 1 类群 Cluster 1			第 2 类群 Cluster 2		
菌株 Strains	G + C mol%	与 SH713 的同源性/% Homology with SH713	菌株 Strains	G + C mol%	与 SHL942 的同源性/% Homology with SHL042
SH713	61.6	100	SH6864	59.8	92.1
SH738	59.8	83.7	SH6863	60.4	90.6
SH734	60.2	90.2	SH6846	59.7	86.5
SH7480	61.2	88.7	SH6843	60.4	88.6
SH7391	60.5	85.4	SH6860	59.2	84.5
SH711	60.4	87.6	SH6862	59.0	80.6
SH327	59.5	89.9	SH6861	59.9	85.4
SH7463	59.7	90.2	SHL064	59.0	86.7
SH7481	60.4	91.3	SH385	61.0	94.9
SH726	60.5	94.0	SH6710	59.1	90.4
SH723	61.2	90.4	SH6718	59.3	94.3
SH7400	61.3	89.9	SHL042	60.1	100
SH727	60.4	90.2	SH6845	60.1	82.5
SH725	61.2	87.6	SH260	60.3	90.3
SH715	61.8	89.6	SH364	60.3	88.6
SH714	59.1	93.2	SH6849	59.7	87.2
SH741	59.7	86.5	SH6841	60.4	84.1
SH735	60.3	84.3	SH6865	60.2	90.3
SH7321	60.4	91.0	SH6848	60.4	90.2
SH7390	59.8	90.5	SH6840	59.9	87.6
SH7381	61.2	87.7			
SH743	60.3	86.8			
SH747	60.4	90.2			
SH7401	61.2	87.6			

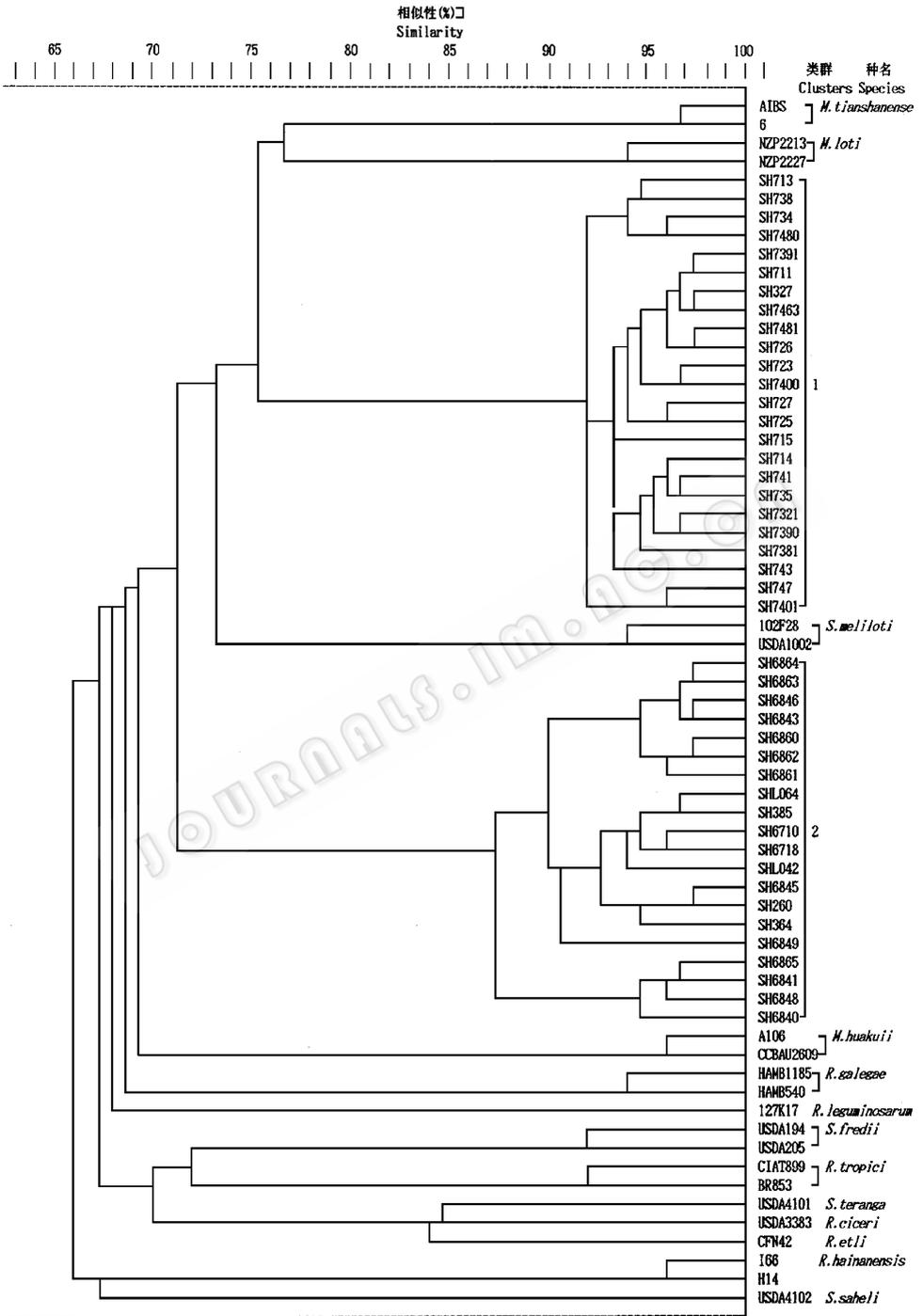


图 3 全细胞蛋白电泳聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram of whole-cell protein electrophoresis of rhizobial strains

表 4 新类群中心菌株与已知种模式菌株的 DNA 同源性

Table 4 The homologies of DNA between the central strains of new clusters and type strains of known species

模式菌株 Type strains	中心菌株 Centrak straubis	
	SH713	SHL042
AIBS	42.9	53.9
NZP2213	24.8	44.8
USDA1002	57.9	55.3
CCBAU2609	28.7	40.7
HAMBI540	18.9	37.4
127K17	49.4	53.7
USDA205	49.3	39.8
CIAT899	58.9	3.08
USDA4101	37.8	55.2
USDA3383	54.2	53.8
CFN42	59.8	58.9
I66	60.2	59.5
USDA4102	56.6	57.0

第 1 类群,各菌株的 G+C mol% 含量为 59.5~61.8 处于 *Rhizobium* 属范围(59.0~66.5)。中心菌株 SH713 与群内其它菌株的 DNA 同源性在 83.7%~94% 之间,按照国际细菌学会分类委员会建议, DNA 同源性 70% 作为定种的界线<sup>[4]</sup>,表明它们属于同一种群。表 2 可见,中心菌株 SH713 与 13 个已知种模式菌株的 DNA 同源性在 18.9%~60.2% 之间,小于 70%。因此,根据数值分类、全细胞蛋白电泳及 DNA 同源性分析,分离自鸡眼草的根瘤菌构成了一个不同于已知种的新种群。

第 2 类群,各菌株 G+C mol% 含量为 59.0~61.0,中心菌株 SHL042 与群内其它菌株的 DNA 同源性在 80.6%~94.9% 之间,与 13 个已知种模式菌株的 DNA 同源性在 3.08%~59.5%。所以分离自木蓝的根瘤菌也应为一个新的根瘤菌种群。

以上结果可以看出,分离自豆科植物鸡眼草和木蓝的根瘤菌构成 2 个独立的表现群和 DNA 同源群,它们应为 2 个新的根瘤菌种群。通过对这 2 个种群的 16S rDNA 基因的限制性酶切片段长度多态性(RFLP)的分析,也表明它们与已知种存在着很大的遗传多样性(待发表)。

据估计全世界豆科植物有近 2 万种,而详细对其根瘤进行过研究的不过 5%,其中本试验选用的豆科植物鸡眼草和木蓝的根瘤菌,目前国内外从未对其作过分类研究工作。另一方面,鸡眼草和木蓝即是优良的饲料植物又可作为中药材,具有清热解毒,治疗腹泻之功效。因此,鸡眼草和木蓝根瘤菌的进一步深入研究,将会对其根瘤菌剂的研制和应用产生一定的理论和经济价值。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H. *Int J Syst Bacteriol*, 1991 **41**: 582~587.  
 [ 2 ] 谭志远, 陈文新. 应用与环境生物学报, 1998 **4**(1): 65~69  
 [ 3 ] 王素英, 陈文新. 微生物学报, 1997 **37**(5): 335~343.

- [ 4 ] Chen W X , Li G S , Qi L Y *et al.* *Int J Syst Bacterial* , 1991 **A1** :275~280.
- [ 5 ] Sammons D W , Adams L D , Nishizawa E E. *Eletrophorpesis* , 1981 **2** :135.
- [ 6 ] Marmur J. *J Mol Biol* , 1961 **3** :208~218.
- [ 7 ] De Ley J , Cattor H , Reynaerts A. *Eur J Biochem* , 1970 **12** :132~142.
- [ 8 ] Sneath P H A. *J Gen Microbiol* , 1957 **17** :217~226.
- [ 9 ] 谭这 朱铭莪 程丽娟等. *微生物学报* , 1995 **35** ( 3 ) :223~228.

## A STUDY ON TAXONOMY OF RHIZOBIA ISOLATED FROM *KUMMERWIA* SP. AND *INDIGOFERA* SP.

Wei Gehong<sup>1</sup> Chen Wenxin<sup>2</sup> Zhu Ming<sup>1</sup>

( 1 Dept Resource and Environment , Northwest Agricultural University , Yangling 712100 )

( 2 College of Biological Science , China Agricultural University , Beijing 100094 )

**Abstract** The rhizobial strains isolated from *Kummerowia* and *Indigofera* and the known reference strains were classified by performing numerical taxonomy. New isolated strains were divided into two new clusters at 83% similarity level. Based on the numerical taxonomy , additional isolates in each cluster were studied by using SDS-PAGE of whole-cell protein. Twenty - four strains isolated from *Kummerowia* fell into cluster 1. Twenty strains isolated from *Indigofera* fell into cluster 2. The results of G + C mol% and DNA homology analysis showed that the DNA homologies between the central strain SH713 and SHL042 and the 13 type strains were less than 61% . Thus , the rhizobial strains from *Kummerowia* and *Indigofera* were two new individual species of *Rhizobium* .

**Key words** *Kummerowia* , *Indigofera* , Rhizobia , Numerical taxonomy , SDS-PAGE whole-cell protein , DNA homology