

研究报告

西部某些根瘤菌的数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 分析

阚凤玲 陈文新

(中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094)

摘要: 选用 61 株分离自我国西北地区的野豌豆、棘豆、苜蓿和草木樨根瘤菌和 4 株已知参比菌株,进行了营养利用、抗生素抗性和耐逆性等 132 个表型性状研究,通过 MINTS 软件分析,得到了数值分类树状图,发现全部供试菌株在 79% 的相似性水平上,分为 5 个群。对 57 株未知菌株和 10 株参比菌株进行了 16S rDNA PCR-RFLP 分析,发现共具有 20 个遗传图谱类型,聚类分析树状图表明所有菌株共分为 5 个系统发育分支,与数值分类结果有较好的一致性。

关键词: 根瘤菌, 数值分类, 16S rDNA PCR-RFLP

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0001-08

COMPARATIVE ANALYSIS OF NUMERICAL TAXONOMY AND 16S rDNA
PCR-RFLP OF FAST-GROWING RHIZOBIA ISOLATED FROM WESTERN CHINA

KAN Feng-Ling · CHEN Wen-Xin

(Department of Microbiology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: 61 strains of fast-growing rhizobia isolated from China's western (mainly from Qinghai province), and 4 representative strains were compared by performing numerical taxonomy. 132 phenotypic characteristics were analyzed. The results of numerical taxonomy constructed a dendrogram. It shows that all the strains examined clustered into five phenons at a similarity level of 79%. 16S rDNA PCR-RFLP were applied to 57 rhizobial strains (among the 61 strains) and 10 reference strains. The 16S rDNA-RFLP analysis described 20 different genotypic characteristics and form one dendrogram. For some large groups, the results of 16S rDNA-RFLP were agreement with that of numerical analysis of phenotypic characteristics.

Key words: Rhizobia, Numerical Taxonomy, 16S rDNA PCR-RFLP

青海等我国西部地区,降水量少、土壤干旱,土地的荒漠化、盐碱化较严重。不良生长环境,很可能孕育出一些独特的根瘤菌菌种资源。棘豆主要分布我国西部和北部,生于干旱山坡、沙丘或盐土上,是一种防风固沙的先锋植物;野豌豆是很好的饲料及绿肥,其中许多种还有药用价值;而苜蓿和草木樨是优质牧草。本论文选取我国西北部地区(青海省为主)的棘豆、野豌豆、苜蓿和草木樨根瘤菌为研究对象,对与之共生的根瘤菌进行表型性状研究及 16S rDNA PCR-RFLP 比较分析,以了解它们的生理生化特征和系统发育学关系;并发掘和保存我国西部新的、抗逆性强的根瘤菌种质资源,为合理利用这些资源,开发性状优良的根瘤菌菌株应用于国家西部大开发作准备。

1 材料与方法

1.1 菌株

在本实验中共涉及到 73 株菌,其中 12 株为已知参比菌株,61 株为未知菌株,分

离自我国西部的青海、甘肃、山西等省及内蒙古、西藏自治区，寄主分别是野豌豆、棘豆、苜蓿和草木樨。详细信息见表1。

表1 供试菌株一览表

菌株	寄主	来源	研究方法
CCBAU73292	<i>Vicia villosa</i>	甘肃安西县东郊	a, b
CCBAU73326	<i>Vicia sepium</i>	甘肃酒泉市泉湖乡	a, b
CCBAU73337	<i>Vicia villosa</i>	甘肃酒泉市泉湖乡	a, b
CCBAU73355	<i>Vicia villosa</i>	甘肃西峰乡	a, b
CCBAU73359	<i>Vicia faba</i>	甘肃酒泉市清水镇	a, b
CCBAU73374	<i>Vicia faba</i>	甘肃高台县北郊	a, b
CCBAU01039	<i>Oxytropis myrophylla</i>	内蒙古锡林浩特	a, b
CCBAU01135	<i>Oxytropis myrophylla</i>	内蒙古凉城县	a, b
CCBAU01169	<i>Oxytropis glabra</i>	内蒙古磴口县	a, b
CCBAU01180	<i>Oxytropis glabra</i>	内蒙古伊金霍勒旗	a, b
CCBAU01190	<i>Oxytropis glabra</i>	内蒙古伊金霍勒旗	a, b
CCBAU01211	<i>Oxytropis bicolor</i>	内蒙古准格尔旗	a
CCBAU01273	<i>Oxytropis psammocharis</i>	内蒙古	a, b
CCBAU01332	<i>Oxytropis ochrocephala</i>	内蒙古	a, b
CCBAU01348	<i>Oxytropis glabra</i>	内蒙古	a, b
CCBAU81022	<i>Vicia bungei</i>	青海西宁北川	a, b
CCBAU81040	<i>Vicia faba</i>	青海北川石头磊	a
CCBAU81043	<i>Vicia villosa</i>	青海北川石头磊	a, b
CCBAU81095	<i>Vicia sativa</i>	青海	a
CCBAU81102	<i>Melilotus suaveolens</i>	青海西宁西山	a, b
CCBAU81107	<i>Melilotus albus</i>	青海西宁西山	a, b
CCBAU81168	<i>Oxytropis</i> sp.	青海黄南泽库	a, b
CCBAU81180	<i>Medicago sativa</i>	青海海南同德巴滩	a, b
CCBAU81181	<i>Onobrychis viciaefolia</i>	青海海南同德巴滩	a, b
CCBAU81188	<i>Vicia sativa</i>	青海海南贵南	a, b
CCBAU81205	<i>Medicago lupulina</i>	青海海南共和	a, b
CCBAU81249	<i>Vicia angustifolia</i>	青海海西	a, b
CCBAU81258	<i>Vicia faba</i>	青海海西香日德	a, b
CCBAU81291	<i>Melilotus officinalis</i>	青海海西乌兰	a, b
CCBAU81319	<i>Oxytropis kansuenses</i>	青海海北	a, b
CCBAU81325	<i>Vicia faba</i>	青海	a, b
CCBAU81328	<i>Oxytropis ochrocephala</i>	青海海北祁连峨堡	a, b
CCBAU81347	<i>Vicia angustifolia</i>	青海北川石头磊	a, b
CCBAU81348	<i>Medicago lupulina</i>	青海北川石头磊	a, b
CCBAU81353-1	<i>Medicago lupulina</i>	青海北川石头磊	a, b
CCBAU81356	<i>Medicago lupulina</i>	青海北川石头磊	a, b
CCBAU81358	<i>Oxytropis glabra</i>	青海北川石头磊	a, b
CCBAU81368-1	<i>Medicago archiducis-nicolai</i>	青海海东湟源	a, b
CCBAU81368-2	<i>Medicago archiducis-nicolai</i>	青海海东湟源	a
CCBAU81379	<i>Medicago lupulina</i>	青海海南兴海	a, b
CCBAU81393-1	<i>Vicia faba</i>	青海海南贵德河阴	a, b
CCBAU81395	<i>Vicia angustifolia</i>	青海海南贵德河阴	a, b
CCBAU81401-1	<i>Medicago sativa</i>	青海海南贵德河阴	a, b
CCBAU81407	<i>Medicago lupulina</i>	青海湟中上新庄	a, b
CCBAU81422	<i>Vicia angustifolia</i>	青海化隆积石沙坝	a, b

续表

续表

菌株	寄主	来源	研究方法
CCBAU81434	<i>Vicia angustifolia</i>	青海循化孟达天池	a, b
CCBAU81440	<i>Oxytropis ochrocephala</i>	青海民和前河乡	a, b
CCBAU81462	<i>Vicia angustifolia</i>	青海海东互助	a, b
CCBAU81463	<i>Vicia amoena</i>	青海海东互助	a, b
CCBAU81471	<i>Vicia faba</i>	青海互助北山林场	a, b
CCBAU81492	<i>Melilotus dentatus</i>	青海西宁南川	a, b
CCBAU85201	<i>Medicago lupulina</i>	西藏	a, b
CCBAU85211	<i>Vicia sativa</i>	西藏	a, b
CCBAU85215	<i>Vicia sativa</i>	西藏	a, b
CCBAU8511-5	<i>Vicia crocea</i>	西藏	a, b
CCBAU03100	<i>Vicia faba</i>	山西沁源五龙川	a, b
CCBAU03144	<i>Vicia sepium</i>	山西阳曲黄寨	a, b
CCBAU03155	<i>Vicia sativa</i>	山西太原许坦	a, b
CCBAU03158-1	<i>Vicia faba</i>	山西太原许坦	a, b
CCBAU03224	<i>Vicia faba</i>	山西五台茅蓬	a, b
CCBAU03226	<i>Vicia bungei</i>	山西五台茅蓬	a, b
<i>Rhizobium leguminosarum</i>			
USDA2370 ^T	<i>Pisum sativum</i>	美国	a, b
162K68	<i>Trifolium</i> sp.	美国	a
127K17	<i>Phaseolus</i> sp.	美国	a
<i>Sinorhizobium meliloti</i>			
USDA1002 ^T	<i>Medicago sativa</i>	美国	a, b
102F28	<i>Medicago sativa</i>	美国	b
<i>Sinorhizobium fredii</i>			
USDA205 ^T	<i>Glycine soja</i>	美国	b
<i>Sinorhizobium medicae</i>			
USDA1037 ^T	<i>Medicago truncatula</i>	美国	b
<i>Mesorhizobium loti</i>			
NZP2213 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	新西兰	b
<i>Mesorhizobium huakuii</i>			
CCBAU2609 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	湖北	b
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>			
USDA6 ^T	<i>Glycine max</i>	美国	b
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
IAM13129 ^T		日本	b
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>			
IAM13570 ^T		日本	b

注: T: type strain, CCBAU: Culture Collection of Beijing Agricultural University, NZP: Division of Scientific and Industrial Research, Palmerston North, New Zealand, USDA: The United States Department of Agriculture, IAM: Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

a 参与性状分析和数值分类的菌株, b 参与 16S rDNA PCR-RFLP 分析的菌株

1.2 方法

1.2.1 数值分类: ①性状测定: 对 61 株未知菌株和 3 株 *Rhizobium leguminosarum* 及 1 株 *Sinorhizobium meliloti* 共 65 株菌进行了 132 项生理生化性状的测定。进行了耐盐性、生长温度、生长的 pH 值范围、过氧化氢酶、脲酶、L-苯丙氨酸酶、氧化酶, YMA 培养基上产酸、产碱反应, 3-酮乳糖产生, 石蕊牛奶反应, 亚甲蓝还原, 耐尔蓝还原, 硝酸盐还原, 肉汤生长等项测定。唯一碳源利用选用了 41 种含碳化合物, 唯一氮源利用选用了 18 种含氮化合物, 碳、氮源的浓度均为 0.1%。抗生素抗性选用了 8 种抗生素, 均采用 5、50、100、300 μg/mL 浓度实验。对染料和化学药物的耐受性采用 9 种染料和两种化学药物, 以 0.1% (W/V) 终浓度加入 YMA 培养基中。测定方法均同文献[1]。

②聚类分析: 聚类分析性状编码, 聚类方法均同文献[1]。采用简单匹配系数 (Ssm) 和平均连锁聚类方式 (UPGMA)。

1.2.2 16S rDNA PCR-RFLP分析: ①DNA的提取及PCR扩增细菌总DNA的提取方法和16S rDNA的PCR扩增同文献[2]。②酶切和电泳: 选用4种限制性内切酶 *Hae* III、*Hin* II、*Msp* I和*Rsa* I^[3], 5~15 μ L 16S rDNA PCR产物分别加入以上4种限制性内切酶, 37 $^{\circ}$ C酶切3~4h。酶切产物80V电压3%琼脂糖凝胶电泳3~5h。③电泳图谱分析: 根据Nei和Li^[4]的分析方法, 菌株间16S rDNA的序列差异用其电泳图谱中所有的限制性片段所占的比值来估测, 根据这种比值可以计算出菌株间的遗传距离, 然后采用UPGMA方法对所得遗传距离矩阵进行聚类分析, 即可得出反映菌株间系统发育关系的聚类分析树状图谱。

2 结果与讨论

2.1 表型性状的数值分类分析

2.1.1 数值分类结果及菌株的一般性状分析: 对测定的132项表型性状数据, 去除20项全同性状, 采用平均连锁法进行聚类分析。获得它们的数值分类树状图(见图1)。

从图1可以看出, 全部供试菌株在65%的相似性水平上聚在了一起, 在79%的相似性水平上, 分为5个种群: 群1包括了20株未知菌株和*Rhizobium leguminosarum*种的3株参比菌株, 这表明本实验的结果是可信的; 在20株未知菌株中, 3株的寄主是棘豆, 2株来自矩镰菜苜蓿, 其它15株菌都来自野豌豆属(*Vicia*)植物, 来源包括青海、甘肃、山西、内蒙古和西藏。本群很可能属于*Rhizobium leguminosarum*种。群2由7株根瘤菌组成, 包括2株草木樨根瘤菌和1株红豆草根瘤菌, 其它5株的寄主是野豌豆属植物, 群3除了2株棘豆和4株野豌豆根瘤菌外, 主要由苜蓿和草木樨根瘤菌组成, 其中包括1株*Sinorhizobium meliloti*的参比菌株, 群4和群5都分别由4株菌组成。群2、4、5中都不含已知参比菌株, 所以它们的分类地位尚难估测。在下一步的实验中增选了*Sinorhizobium*属、*Mesorhizobium*属及*Agrobacterium*属的几个种的菌株作为参比菌株。

2.1.2 鉴别特征的选择: 从已分群的菌株中找出出现频率 $\geq 95\%$ 的特征为鉴别特征, 即该群95%以上的成员均表现为正反应的特征记为“+”, 均表现负反应的特征记为“-”, 出现频率介于6%~95%的特征记为“d”(见表2)。

通过对菌株的耐逆性等表型性状的分析, 可以看出: 我国西北地区(主要是青海省)的野豌豆、棘豆、苜蓿和草木樨根瘤菌的耐盐、耐碱能力很强。大部分菌株都能在含2% NaCl的YMA培养基上生长, 有的菌株甚至能耐5% NaCl, 如苜蓿根瘤菌CCBAU81356。而且绝大多数菌株可以在pH10.0和pH11.0的YMA培养基上生长。这可能与我国西北地区的生态环境有很大的关系。对这些抗逆性强的根瘤菌种质资源进行发掘、研究和保存, 为合理利用和开发性状优良的根瘤菌菌株奠定了基础。

2.2 16S rDNA PCR-RFLP分析

2.2.1 16S rDNA PCR-RFLP图谱分析: 16S rDNA PCR扩增产物分别用4种限制性内切酶(*Hae* III、*Hin* II、*Msp* I和*Rsa* I)酶切后, 经3%琼脂糖凝胶电泳分离, 分别得到6、9、11、12种限制性内切酶酶切图谱类型。67株菌的16S rDNA 4种限制性内切酶酶切图谱类型有20种不同的组合, 每一种组合称为一个16S rDNA遗传图谱类型。

2.2.2 建立在16S rDNA PCR-RFLP分析基础上的系统发育关系: 将菌株间16S rDNA遗

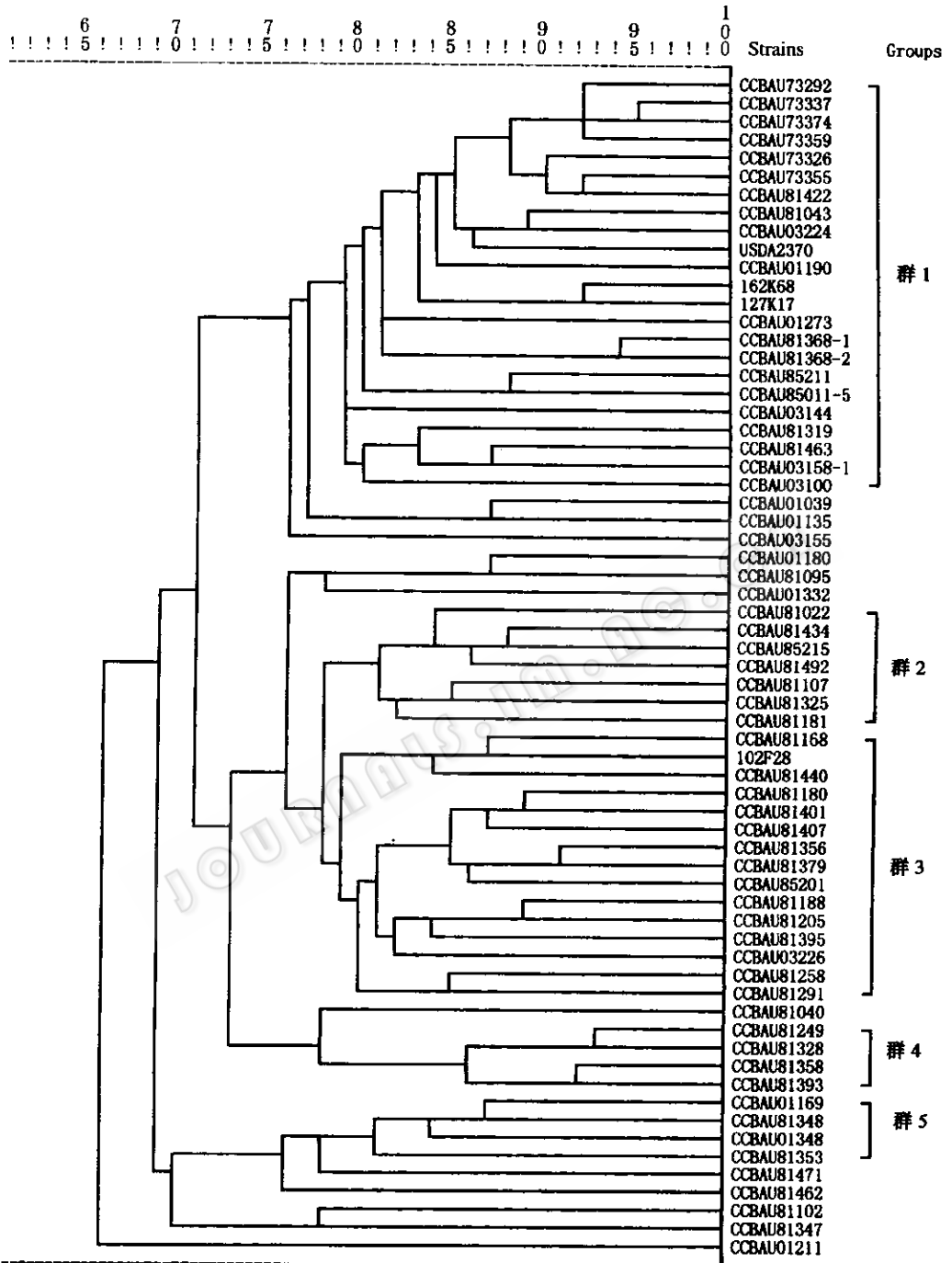


图1 数值分类树状图

传图谱类型比较结果转化为遗传距离，采用平均连锁法进行聚类分析，得出 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析树状图谱（见图 2）。

表2 已知种和新群的鉴别特征

鉴别特征	群1	群2	群3	群4	群5	A	B
碳氮源利用							
dextrin	d	d	d	+	d	-	-
ducitol	d	d	d	d	d	+	-
d-ribose	d	d	+	+	-	+	+
sodium acetate	d	+	+	+	-	d	+
glycine	d	+	d	+	-	d	+
l-aspartic acid	-	d	-	+	d	-	-
hypoxanthine	+	+	+	+	+	+	-
d-threonine	-	d	d	+	d	d	-
抗生素抗性							
bacitracin (100 μ g/mL)	d	+	+	+	+	d	-
bacitracin (300 μ g/mL)	-	d	d	-	+	-	-
chloramphenicol (50 μ g/mL)	d	d	d	+	d	-	-
erythromycin (100 μ g/mL)	-	d	+	+	+	-	+
erythromycin (300 μ g/mL)	-	d	d	+	+	-	-
kanamycin (5 μ g/mL)	+	d	+	-	+	d	+
streptomycin (5 μ g/mL)	d	+	d	-	d	d	-
化学药物和染料抗性							
bromothymol (0.1%)	d	d	d	+	+	d	-
methyl green (0.1%)	d	d	d	+	d	-	-
耐盐性							
sodium chloride (1%)	d	+	+	+	+	-	+
sodium chloride (2%)	d	+	d	d	+	-	+
sodium chloride (3%)	-	d	d	+	+	-	-
sodium chloride (4%)	-	d	d	+	d	-	-
sodium chloride (5%)	-	d	d	+	d	-	-
生长 pH 范围							
pH5.0	-	d	d	+	d	-	-
pH10.0	d	+	d	+	+	-	-
pH11.0	d	+	d	+	+	-	-
litmus milk acid coagulation	-	-	d	+	d	-	-
litmus milk acid production	d	-	d	+	d	-	+
litmus milk alkali production	d	d	d	-	d	+	-
methylene blue reduction	d	+	d	+	-	+	+
growth in peptone broth	-	+	d	+	+	-	+

注: A *R. leguminosarum*, B *S. meliloti*

在 90% 的相似性水平上, 树状图谱分为 5 个系统发育分支。分支 1 与数值分类中的群 1 基本相同, 但除了群 1 的菌株外, 还包括了群 3 的 5 株菌 CCBAU81188、81258、81395、81440 和 CCBAU03226, 这 5 株菌有 4 株野豌豆根瘤菌和 1 株棘豆根瘤菌, 群 3 中另外 1 株棘豆根瘤菌 CCBAU81168 在 RFLP 分析中未成群 (群 3 中共有 15 株菌, 其中有 2 株棘豆、4 株野豌豆根瘤菌, 其他的都是苜蓿和草木樨根瘤菌)。分支 1 由遗传图谱类型同为 1 的 21 株菌和 1 株遗传图谱类型为 14 的菌株构成, 包括已知参比菌株 *Rhizobium leguminosarum* USDA2370, 这一分支很可能是 *Rhizobium* 属的系统发育分支。

分支 2 主要由数值分类中的群 3 和群 5 组成, 它们的遗传图谱类型都是 2, 其中还包括 *Sinorhizobium* 属 3 个已知种的 4 株参比菌株, 所以这一分支很可能是 *Sinorhizobium* 的系统发育分支。

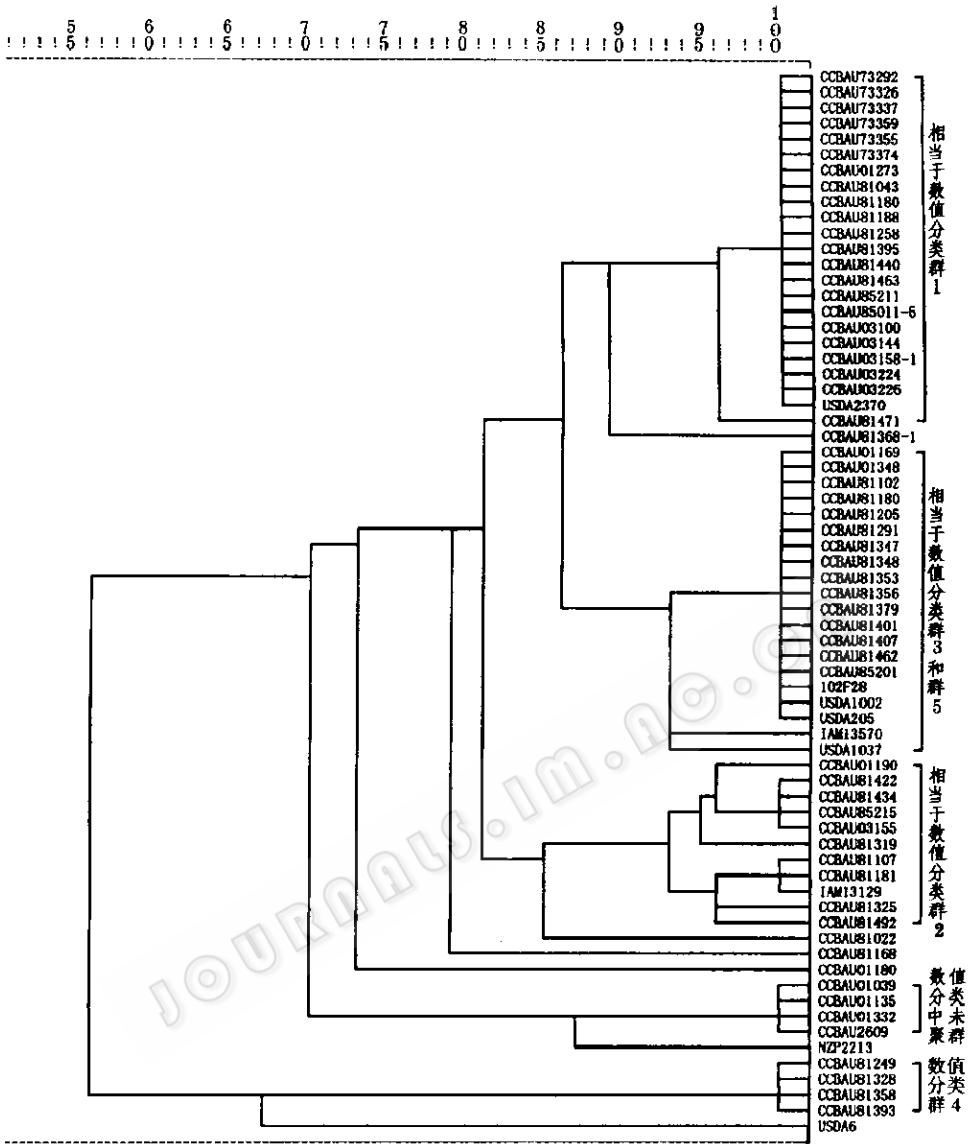


图 2 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析树状图

分支 3 是一个杂合群，它的遗传图谱类型比较多样，主要由数值分类中的群 2 组成，还包括群 1 的 3 株菌 CBAU01190、CCBAU81319、CCBAU81422，并含有一株 *Agrobacterium* 的参比菌株，这一分支很可能是 *Agrobacterium* 的系统发育分支。

分支 4 是在数值分类中未聚群的 3 株菌组成的分支，它们的生长速度中慢，在 YMA 培养基上产酸，这一分支还包括了标准菌株 *Mesorhizobium huakuii* CCBAU2609，而且与 *Mesorhizobium loti* NZP2213 的关系也很近，分支 4 可能属于 *Mesorhizobium* 系统发育分支。

分支 5 完全由数值分类的群 4 组成，它的系统发育地位未知。

综上所述，数值分类与 16S rDNA PCR-RFLP 分析的结果大致相同，但也存在差别：首先，在数值分类中未聚群的菌株有 CCBAU01039、CCBAU01135 等 13 株，而在 16S

rDNA PCR-RFLP 分析中未聚群的菌株只有 CCBAU81368-1、CCBAU81168、CCBAU01180 和 USDA6 等 4 株菌。在数值分类中未聚群的菌株 CCBAU81102、81347 和 CCBAU462, 在 RFLP 分析时与群 3 和群 5 一起组成了分支 2; 而在数值分类中未成群的菌株 CCBAU01039、01135 和 CCBAU01332, 在 RFLP 分析时也形成了一个系统发育分支 4。这也证明了数值分类分群比 RFLP 分析分群更精细, 数值分类在相似性 80% 左右时的群相当于种群, 而 16S rDNA PCR-RFLP 分析的分群更近似于属水平上的群。除此之外, 数值分类群 1 与 16S rDNA PCR-RFLP 分析的分支 1、数值分类的群 2 与 16S rDNA PCR-RFLP 分析的分支 3 虽然大致相同, 但是也有差别。所以, 细菌分类要采用多相分类的方法, 每种方法都有其优点及局限性, 对多相分类的结果综合考虑才能更接近真实情况。这些菌株确切的分类地位还需要进一步的实验才能证实。

由本研究的结果可以看出, 数值分类亚群 5 在 16S rDNA PCR-RFLP 分析树状图中, 与亚群 3 组成了 *Sinorhizobium* 系统发育分支, 所以亚群 5 很可能是属于 *Sinorhizobium* 属的未知种群; 而数值分类的亚群 4, 在 16S rDNA PCR-RFLP 分析中, 也具有独特的系统发育地位, 它的确切分类地位还有待于进一步的实验证实。

数值分类是一种很好的菌株大量分群的方法, 这已被很多实验所证明^[1,5]。16S rDNA PCR-RFLP 分析近年来也被广泛应用于细菌的大量分群^[2,3,6]。本实验所采用的这两种方法的分群结果有较好的一致性, 说明本研究所获得的结果是可信的, 同时也说明 16S rDNA PCR-RFLP 分析是一种简便、快捷、有效的根瘤菌大量分群的方法。

参 考 文 献

- [1] Chen W X, Yan G H, Li J L, *et al.* Int. J. Syst. Bacteriol., 1988, 38: 392 ~ 397.
- [2] 高俊莲. 微生物学通报, 1999, 26 (2): 120 ~ 125.
- [3] Laguerre G, Allard M R, Revoy F, *et al.* Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60: 56 ~ 63.
- [4] Nei M, Li W H. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269 ~ 5273.
- [5] Gao J L, Sun J G, Li Y, *et al.* Int. J. Syst. Bacteriol., 1994, 44 (1): 141 ~ 158.
- [6] Wang E T, van Berkum P, Beyene D, *et al.* Int. J. Syst. Bacteriol., 1998, 48 (3): 687 ~ 699.