

西藏根瘤菌的数值初步分类研究*

王素英¹ 许晓东² 蔡雪梅² 邓必清¹ 杨晓丽¹(天津商学院食品与生物工程系 天津 300132)¹ (中国科学院微生物研究所 北京 100080)²

摘要: 选取分离自西藏林芝和拉萨地区 11 种豆科植物的根瘤菌菌株 64 株, 并与 6 株 *Rhizobium leguminosarum*、*Sinorhizobium fredii* 和 *Mesorhizobium loti* 的参比菌株一起进行了 105 项表型特征的测定, 数值分类的结果表明, 除菌株 XZ8-6、XZ47-7 和 XZ18-1 外, 全部供试菌株在 80% 相似性水平上可分为 8 个表观群, 其中表观群 1、表观群 7 分别由 13 株和 7 株西藏根瘤菌组成, 是不同于已描述根瘤菌种的新表观群, 是否为新属种有待于进一步研究。

关键词: 西藏, 根瘤菌, 数值分类

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0005-05

NUMERICAL TAXONOMY OF RHIZOBIAL STRAINS ISOLATED
FROM XIZANG AUTONOMOUS REGIONWANG Su-Ying¹ XU Xiao-Dong² CAI Xue-Mei² DENG Bi-Qing¹ YANG Xiao-Li¹(Department of Food and Biological Technology, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300132)¹(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)²

Abstract: 64 rhizobial strains isolated from Xizang Autonomous Region were compared with 6 strains known species of *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium fredii* and *Mesorhizobium loti* by performing numerical analysis of 105 phenotypic features. Except for strains XZ8-6, XZ47-7 and XZ18-1, 67 strains were divided into 8 phenotypes at the similarity level of 80%. Phenotype 1 consists of 13 strains and phenotype 7 consists of 7 strains, Which were isolated from Xizang Autonomous Region. Phenotype 1 and 7 are different from known rhizobial species.

Key words: Xizang, Rhizobial strains, Numerical taxonomy

随着根瘤菌资源调查的深入和分子生物学方法在根瘤菌分类领域的应用, 在分类研究方面发展了以“互接种族”为主要依据的传统分类向综合分类技术尤其是以遗传信息分析为主要依据的系统发育分类的转变, 同时描述了大量的新属种^[1-3]。尤其是我国学者自 1980 以来一直致力于这方面的研究, 在广泛调查根瘤菌资源的基础上, 对来源于不同宿主、不同生境的菌株进行了生态特性、形态特性、酶反应特性、遗传特性等方面的详细记载, 并对其进行了系统的分类。本文报道了来源于西藏林芝和拉萨地区 5 个点的根瘤菌的分类研究。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本实验共选用 70 株根瘤菌, 其中 64 株为分离自不同宿主的西藏根瘤菌, 6 株为参比菌株, 它们分别属于 3 个已知属种, 即 *Rhizobium leguminosarum*、*Sinorhizobium fredii* 和

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39970017)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.39970017)

收稿日期: 2002-03-21, 修回日期: 2002-05-10

Mesorhizobium loti, 菌株编号、宿主和地理来源见表 1。

表 1 供试菌株的宿主和地理来源

菌号	宿主	来源
X1-10	窄叶野豌豆 (<i>Vicia angustifolia</i>)	林芝八一镇山地灌木丛
X2-1 X2-3	毛果葫芦巴 (<i>Trigonella pubescens</i>)	林芝八一镇山地灌木丛
X3-1 X3-2	苏理木兰 (<i>Zindigofera souliei</i>)	林芝八一镇山地灌木丛
X4-2 X4-3 X4-4 X4-8	二色锦鸡儿 (<i>Caragana bicolor</i>)	林芝八一镇山地灌木丛
X5-1 X5-2 X5-3 X5-4 X5-5	紫雀花 (<i>Parochetus communis</i>)	林芝八一镇山地灌木丛
X6-2 X6-4 X6-7	毛果葫芦巴 (<i>Trigonella pubescens</i>)	林芝八一镇山地灌木丛
X8-6 X8-7	苏理木兰 (<i>Zindigofera souliei</i>)	林芝八一镇山地灌木丛
X9-7 X9-8 X9-9 X9-10	苏理木兰 (<i>Zindigofera souliei</i>)	林芝八一镇山地灌木丛
X11-6 X11-10	齿荚葫芦巴 (<i>Trigonella emodi</i>)	林芝八一镇耕地边缘
X12-1 X12-3 X12-4	米林黄芪 (<i>Astragalus milingensis</i>)	林芝八一镇耕地边缘
X13-4 X13-6 X13-7 X13-10	紫雀花 (<i>Parochetus communis</i>)	林芝八一镇耕地边缘
X14-2 X14-3 X14-4 X14-7 X14-9	光亮黄芪 (<i>Astragalus lucidus</i>)	林芝八一镇耕地边缘
X17-2 X17-3 17-4 17-5 X17-6	齿荚葫芦巴 (<i>Trigonella emodi</i>)	林芝八一镇耕地边缘
X18-1 X18-2 X18-3 X18-9	山野豌豆 (<i>Vicia amoena</i>)	林芝八一镇耕地边缘
X19-1 X19-6	天蓝苜蓿 (<i>Medicago lupulina</i>)	林芝八一镇河滩
X21-6	天蓝苜蓿 (<i>Medicago lupulina</i>)	林芝八一镇河滩
X22-8	窄叶野豌豆 (<i>Vicia angustifolia</i>)	林芝八一镇河滩
X41-1 X41-6 X41-7	假弯齿黄芪 (<i>Astragalus comptodontoides</i>)	拉萨菜地边缘
X44-1	米林黄芪 (<i>Astragalus milingensis</i>)	拉萨菜地边缘
X46-2 X46-5	米林黄芪 (<i>Astragalus milingensis</i>)	拉萨菜地边缘
X47-1 X47-2 X47-7	齿荚葫芦巴 (<i>Trigonella emodi</i>)	拉萨河滩
X49-5 X49-8	米林黄芪 (<i>Astragalus milingensis</i>)	拉萨河滩
X50-3 X50-6 X50-7	假弯齿黄芪 (<i>Astragalus comptodontoides</i>)	拉萨河滩
<i>R. leguminosarum</i> 162K68	一种三叶草 (<i>Trifolium</i> sp.)	美国
<i>R. leguminosarum</i> USDA2370	无记载	美国
<i>M. loti</i> NZP2213	百脉根 (<i>Lotus coniculaus</i>)	美国
<i>M. loti</i> NZP2217	一种百脉根 (<i>Lotus</i> sp.)	美国
<i>S. fredii</i> USDA194	大豆 (<i>Glycine soja</i>)	河南
<i>S. fredii</i> USDA205	大豆 (<i>Glycine soja</i>)	河南

1.2 试验方法和培养基

实验共测定表型性状 105 项，其中唯一碳源利用测定 33 项，包括：鼠李糖、乳糖、蔗糖、D-棉子糖、纤维二糖、海藻酸、淀粉、次黄嘌呤、水杨素、酒石酸钠、D-半乳糖、肌醇、马尿酸、L-山梨糖、D-果糖、柠檬酸钠、D-葡萄糖酸、棉子糖、麦芽糖、D-蜜糖、甲酸钠、葡萄糖、树胶醛糖、木糖、无水乙酸钠、D-松二糖、甜醇、D-泛酸钙、草酸钠、琥珀酸钠、苹果酸、去氧胆酸钠和己二酸。唯一氮源利用的测定 13 项，包括：天冬氨酸、L-谷氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、D-苯丙氨酸、DL-苯丙氨酸、L-甲硫氨酸、L-胱氨酸、DL-脯氨酸、L-精氨酸、L-赖氨酸、D-精氨酸和 L-苯丙氨酸。抗生素抗性测定共 24 项，6 种抗生素分别是杆菌肽、双氢链霉素、氨基青霉素、氯霉素、硫酸新霉素和卡那霉素，每种抗生素 4 个浓度：5μg/mL、50μg/mL、100μg/mL、300μg/mL。染料抗性测定共 7 项，它们是亚甲兰、甲基紫、盐酸丫啶、刚果红、藻红 B、俾士麦棕、溴百里香酚兰，染料浓度均为 0.1%。其它测定项目有耐盐性、初始生长 pH 值、温度生长范围、石蕊牛奶试验、硝酸盐还原、耐尔蓝还原、BTB 酸碱反应、酶活性、肉汤生长等，试验方法和培养基的配制见参考文献 [4,5]。

1.3 聚类分析

选用简单匹配系数 (Ssm) 和平均连锁聚类 (UPGMA) 方法进行聚类。

2 结果与讨论

2.1 数值分类结果

对 70 株供试根瘤菌菌株共测定 105 项表型性状, 去除 10 项全同性状后进行聚类分析, 结果见图 1。

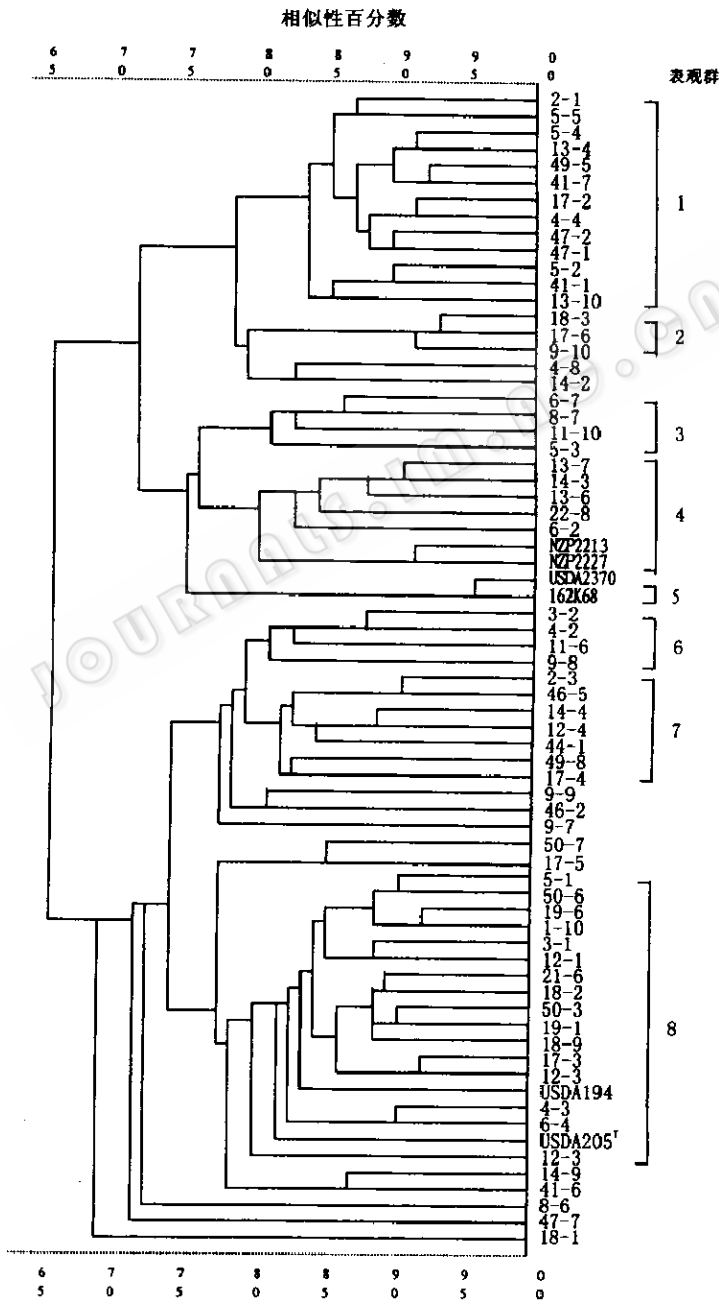


图 1 林芝地区八一镇根瘤菌数值分类树状图谱

从聚类图可以看出,除菌株 XZ8-6、XZ47-7 和 XZ18-1 外,全部供试菌株在 80% 相似性水平上可分为 8 个表观群,其中表观群 4 由已知种 *Mesorhizobium loti* 的参比菌株和 5 株西藏根瘤菌组成,表观群 5 为已知种 *Rhizobium leguminosarum*,表观群 8 由已知种 *Sinorhizobium fredii* 的参比菌株和 16 株西藏根瘤菌组成,除此之外,其它表观群全部由西藏根瘤菌组成,参照其他研究者表观群确定时的菌株数^[6,7],可认为表观群 1 和表观群 7 为不同于已知快生型根瘤菌的新类群。其中表观群 1 的菌株分离自 *T. pubescens*、*P. communis*、*A. milingensis*、*A. comptodontoides*、*T. emodi* 和 *C. bicolor*,表观群 7 的菌株分离自 *T. pubescens*、*A. milingensis*、*A. lucidus* 和 *T. emodi*。这两个表观群分类位置的最终确定,需对其中心菌株进行 16S rRNA 基因序列的测定,根据测定结果分析它们与已描述根瘤菌的亲缘关系,并进一步测定中心菌株与已知根瘤菌属种的 DNA 同源性。

2.2 亚群 1 和亚群 7 的鉴别特征

表 2 表观群 1 的鉴别特征*

特征	1	2	3	4	特征	1	2	3	4
D-棉子糖	-	+	+	-	木糖	-	+	+	-
纤维二糖	-	+	+	+	草酸钠	+	-	-	-
淀粉	-	+	+	-	L-谷氨酸	-	-	+	+
D-半乳糖	+	+	+	-	苯丙氨酸	-	-	+	+
肌醇	-	-	+	-	L-胱氨酸	-	-	+	-
L-山梨糖	-	-	+	+	L-赖氨酸	+	-	+	+
柠檬酸钠	-	+	+	+	杆菌肽 (5μg/mL)	-	-	+	-
棉子糖	-	+	+	+	肉汤生长	-	+	+	+
麦芽糖	-	+	+	+	脲酶	-	-	+	-
甲酸钠	-	+	-	-					

* 表中 1, 2, 3, 4 分别代表表观群 1、*R. leguminosarum*、*S. fredii* 和 *M. loti*

表 3 表观群 7 的鉴别特征*

特征	1	2	3	4	特征	1	2	3	4
次黄嘌呤	+	-	-	-	D-苯丙氨酸	+	-	+	-
肌醇	+	-	+	-	L-胱氨酸	+	-	+	-
山梨糖	-	-	+	+	L-精氨酸	+	-	+	+
柠檬酸钠	-	+	+	+	L-赖氨酸	+	-	+	+
棉子糖	-	+	+	+	L-苯丙氨酸	+	-	+	+
甲酸钠	+	+	-	-	杆菌肽 (5μg/mL)	+	-	+	-
木糖	+	+	+	-	刚果红	+	-	+	+
树胶醛糖	+	+	+	-	俾士麦棕	+	-	-	-
草酸钠	+	-	-	-	3.0% NaCl	+	-	-	-
天冬氨酸	+	+	+	-	pH10.0	+	-	-	-
L-谷氨酸	+	-	+	+	肉汤生长	-	+	+	+
苯丙氨酸	+	-	+	+	亚甲兰还原	-	+	+	-
甘氨酸	+	-	-	-	脲酶	-	-	+	-

* 表中 1 代表表观群 7; 2、3、4 的含义与表 2 相同

参考文献 [7] 的方法,对某一测定项目而言,80%~100% 的菌株生长,记为“+”,20% 的菌株生长记为“-”,亚群 1 和亚群 7 与已知根瘤菌属种之间的不同生长特性即为鉴别特征(见表 2、3)。

3 结论

(1) 西藏根瘤菌的聚类结果表明,同一宿主的根瘤菌分布于不同的表观群,同一地区的根瘤菌也分布于不同的表观群,而综观生态环境差别较大的不同地域根瘤菌的分类研究结果,人们倾向于根瘤菌的聚类与地域有关的观点。由此看来,根瘤菌的系统发育进化与哪些外部因素有关,需更多的研究证据去证实。

(2) 西藏根瘤菌的许多菌株表现出较强的抗逆性,如表观群 7 的菌株在含 3.0% NaCl 的 YMA 平版上正常生长,在 pH10.0 条件下正常生长等。由此看来,对西藏

根瘤菌抗逆性的详细考察,可为不同生态环境条件下根瘤菌剂的应用提供优良的菌株。

致谢 数值分类树状谱由中国农业大学食品学院牛天贵副教授帮助完成,特此致谢!

参考文献

- [1] Jarvis B D W, Bekum P Va, Chen W X, *et al.* Int Syst Bacteriol, 1997, **47**: 895 ~ 898.
- [2] Jordan D C. Int Syst Bacteriol, 1982, **32**: 136 ~ 139.
- [3] 王素英. 微生物学通报, 1997, **24** (1): 44 ~ 47.
- [4] White L O. J Gen Microbiol, 1972, **72**: 565 ~ 574.
- [5] 孙建光, 章 芃, 王昌平, 等. 微生物学通报, 1993, **33**: 135 ~ 143.
- [6] 高俊莲, 段 勇, 陈文新. 微生物学通报, 1998, **25** (3): 125 ~ 130.
- [7] 曹凤明, 徐玲枚, 李 力, 等. 微生物学通报, 1999, **26** (6): 421 ~ 425.