

分离自杭子梢等 3 个宿主的根瘤菌的表型分析*

韩素贞^{1,2} 陈文新¹

(中国农业大学生物学院 北京 100094)¹

(首都师范大学生物系 北京 100037)²

摘要: 对 86 株分离自杭子梢、决明和菜豆的根瘤菌及 20 株已知参比菌进行了数值分类和全细胞蛋白 SDS-PAGE 的表型分析。在数值分类聚类中, 所有供试菌在 68% 的相似性水平上分为两群。群 I 为快生和中慢生根瘤菌, 群 II 为慢生根瘤菌。群 I 在 85% 的相似性水平上又可分为 3 个亚群, 群 II 在 76% 的相似性水平上分为 3 个亚群。蛋白电泳结果表明, 群 I 在 68% 的相似性水平上, 分为 4 个亚群, 其中亚群 1 和亚群 2 相当于数值分类中的亚群 1, 亚群 3 和亚群 4 与数值分类中的亚群 2 和亚群 3 相对应; 群 II 在 59% 的相似性水平上分为 3 个亚群, 分别与数值分类中的亚群 3、亚群 1 和亚群 2 大致对应。这说明两种方法在分类上得到的结果比较接近。正在通过进一步的实验确定两种方法一致的未与已知菌株聚在一起的亚群的分类地位。研究结果还表明, 三种宿主的根瘤菌存在着多样性。

关键词: 根瘤菌, 数值分类, 全细胞蛋白 SDS-PAGE, 多样性

中图分类号: Q939.11

文献标识码: A

文章编号: 0253-2654 (2003) 02-0004-07

PHENOTYPIC ANALYSIS OF RHIZOBIA ISOLATED FROM THREE HOSTS

HAN Su-Zhen^{1,2} CHEN Wen-Xin²

(Department of Biology of Capital Normal University, Beijing 100037)¹

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

Abstract: 86 strains of rhizobia isolated from root nodules of *Campylotropis*, *Cassia* and *Phaseolus* were classified by numerical taxonomy and SDS-PAGE of whole cell proteins. 20 reference strains were included for comparison. The

* 国家自然科学基金重点资助项目 (No. 39730010)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39730010)

收稿日期: 2002-04-25, 修回日期: 2001-06-25

strains formed 2 groups by numerical taxonomy at 68% similarity. Group I contained all of fast and medium-slow growing strains and group II slow growing strains. Group I and II were divided into three subgroups at 85% and 76% similarity respectively. The result of SDS-PAGE of whole cell proteins indicated that group I might be divided into four subgroups and group II three subgroups at 68% and 59% similarity respectively. In group I, subgroup 1 and 2 corresponded to subgroup 1 of numerical taxonomy, subgroup 3 and 4 to the other two subgroups 2 and 3 of numerical taxonomy respectively. In group II, three subgroups corresponded basically to subgroup 3, 1 and 2 of numerical taxonomy. It showed that we could get close results by these two methods. The common subgroups of the two methods, which did not cluster with the established, were being identified by further study. The results also suggested that diversity existed among the rhizobia of the three hosts.

Key words: Rhizobia, Numerical Taxonomy, SDS-PAGE of Whole Cell Proteins, Diversity

杭子梢为灌木或半灌木, 主要分布于我国西南部, 较耐干旱, 是水土保持的重要树种, 对土壤有改良作用。决明为灌木状草本, 在我国各地都有栽培, 种子可入药, 有清肝明目等功用。菜豆为草本, 在我国常年栽种, 除了嫩荚可以食用外, 果实也有药用价值。分离自杭子梢和决明的根瘤菌国内外研究很少, 目前尚未确定分类地位。分离自菜豆的根瘤菌被定名为豌豆根瘤菌菜豆生物型 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*)^[1], 随着对它的遗传多样性的了解, 人们从这个生物型中命名了4个新种^[2-4]。我国地形复杂, 气候多样, 但对分离自菜豆的根瘤菌的遗传多样性研究尚未开展。

数值分类是多元方差分析理论与计算机相结合的产物。它的应用, 使对大量细菌进行大量表型性状的分析比较成为可能, 对菌株同源群的划分特别有效^[5]。1964年Graham^[6]首先用该法分析了根瘤菌及相关的种。此后, 数值分类广泛应用于根瘤菌的分类研究^[7]。全细胞蛋白 SDS-PAGE 分析可以区分同一条件下培养的细胞蛋白组分, 通过聚类, 同样可以对大量根瘤菌菌株进行初步分群^[9,10]。

本研究采用数值分类和全细胞蛋白 SDS-PAGE 的表型分析, 初步考察来自杭子梢、决明和菜豆的根瘤菌的分类地位和多样性以及两种分群方法是否可以相互印证。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本试验共选用菌株 106 株, 其中参比菌 20 株, 分别属于 *Agrobacterium*、*Bradyrhizobium*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium*、*Sinorhizobium* 和 *Allorhizobium* 6 个属; 供试菌 86 株, 来源于云南、四川、江西、安徽、湖北、天津、山西、陕西、甘肃、内蒙古自治区和青海省, 宿主植物为菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 以及决明 (*Cassia*) 和杭子梢 (*Campylotropis*) 两个属中的部分种 (见表 1)。

表 1 供试菌株一览表

菌 株	寄 主	来 源	菌 株	寄 主	来 源
CCBAU43159	<i>Campylotropis delawayi</i>	湖北	CCBAU43188	<i>Cassia tora</i>	湖北
CCBAU65052	<i>Campylotropis delawayi</i>	云南	CCBAU33061	<i>Cassia tora</i>	江西
CCBAR65053	<i>Campylotropis delawayi</i>	云南	CCBAU33115	<i>Cassia tora</i>	江西
CCBAU65054	<i>Campylotropis delawayi</i>	云南	CCBAU33162	<i>Cassia tora</i>	江西
CCBAU65108	<i>Campylotropis delawayi</i>	云南	CCBAU33215	<i>Cassia tora</i>	江西
CCBAU65161	<i>Campylotropis delawayi</i>	云南	CCBAU23158	<i>Cassia tora</i>	安徽
CCBAU65162	<i>Campylotropis delawayi</i>	云南	CCBAU23216	<i>Cassia tora</i>	安徽
CCBAU65163	<i>Campylotropis delawayi</i>	云南	CCBAU23221	<i>Cassia tora</i>	安徽
CCBAU65164	<i>Campylotropis delawayi</i>	云南	CCBAU65260	<i>Cassia nomane</i>	云南

接下页表格

接上页表格

菌株	寄主	来源	菌株	寄主	来源
CCBAU65192	<i>Campylotropis delavayi</i>	云南	CCBAU61386	<i>Cassia nomane</i>	四川
CCBAU65193	<i>Campylotropis delavayi</i>	云南	CCBAU61390	<i>Cassia nomane</i>	四川
CCBAU65194	<i>Campylotropis delavayi</i>	云南	CCBAU61391	<i>Cassia nomane</i>	四川
CCBAU65195	<i>Campylotropis delavayi</i>	云南	CCBAU33227	<i>Phaseolus vulgaris</i>	江西
CCBAU65237	<i>Campylotropis delavayi</i>	云南	CCBAU232023	<i>Phaseolus vulgaris</i>	安徽
CCBAU65238	<i>Campylotropis delavayi</i>	云南	CCBAU23213	<i>Phaseolus vulgaris</i>	安徽
CCBAU65155	<i>Campylotropis prainii</i>	云南	CCBAU33033	<i>Phaseolus vulgaris</i>	江西
CCBAU65156	<i>Campylotropis prainii</i>	云南	CCBAU33053	<i>Phaseolus vulgaris</i>	江西
CCBAU65157	<i>Campylotropis prainii</i>	云南	CCBAU33056	<i>Phaseolus vulgaris</i>	江西
CCBAU65158	<i>Campylotropis prainii</i>	云南	CCBAU33154	<i>Phaseolus vulgaris</i>	江西
CCBAU65201	<i>Campylotropis prainii</i>	云南	CCBAU33148	<i>Phaseolus vulgaris</i>	江西
CCBAU65202	<i>Campylotropis prainii</i>	云南	CCBAU33173	<i>Phaseolus vulgaris</i>	江西
CCBAU30130	<i>Campylotropis macrocarpa</i>	天津	CCBAU43213	<i>Phaseolus vulgaris</i>	湖北
CCBAU30206	<i>Campylotropis macrocarpa</i>	天津	CCBAU43184	<i>Phaseolus vulgaris</i>	湖北
CCBAU30233	<i>Campylotropis macrocarpa</i>	天津	CCBAU43160	<i>Campylotropis delavayi</i>	湖北
CCBAU23195	<i>Phaseolus vulgaris</i>	安徽			
CCBAU81433	<i>Phaseolus vulgaris</i>	青海	<i>Agarobacteria tumefaciens</i>		
CCBAU03136	<i>Phaseolus vulgaris</i>	山西	IAM13129 ^T		日本
CCBAU03286	<i>Phaseolus vulgaris</i>	山西	<i>A. rubi</i>		
CCBAU03029	<i>Phaseolus vulgaris</i>	山西	IAM13569 ^T		日本
CCBAU03244	<i>Phaseolus vulgaris</i>	山西	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		
CCBAU71181	<i>Phaseolus vulgaris</i>	陕西	USDA6 ^T	<i>Glycine max</i>	美国
CCBAU71197	<i>Phaseolus vulgaris</i>	陕西	B15	<i>Glycine max</i>	
CCBAU73083	<i>Phaseolus vulgaris</i>	甘肃	<i>Bradyrhizobium elkani</i>		
CCBAU73381	<i>Phaseolus vulgaris</i>	甘肃	USDA76 ^T	<i>Glycine max</i>	美国
CCBAU73353	<i>Phaseolus vulgaris</i>	甘肃	<i>Mesorhizobium loti</i>		
CCBAU01367	<i>Phaseolus vulgaris</i>	内蒙古	NZP2213	<i>Lotus corniculatus</i>	新西兰
CCBAU01163	<i>Phaseolus vulgaris</i>	内蒙古	<i>Mesorhizobium huakuii</i>		
CCBAU01012	<i>Phaseolus vulgaris</i>	内蒙古	CCBAU2609 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	中国
CCBAU65416	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	A106	<i>Astragalus sinicus</i>	中国
CCBAU65408	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>		
CCBAU65300	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	AIBS	<i>Glycyrrhiza apallradiflora</i>	新疆
CCBAU65275	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	6	<i>Glycyrrhiza apallradiflora</i>	新疆
CCBAU65266	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	<i>Mesorhizobium ciceri</i>		
CCBAU65265	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	USDA3378 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	美国
CCBAU65257	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	<i>Rhizobium etli</i>		
CCBAU65250	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	CFN42 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	墨西哥
CCBAU65214	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
CCBAU65150	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	USDA2370	<i>Pisum sativum</i>	美国
CCBAU65122	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	<i>Rhizobium gallicum</i>		
CCBAU65121	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	USDA2918	<i>Phaseolus vulgaris</i>	美国
CCBAU65104	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	<i>Rhizobium giardinii</i>		
CCBAU65075	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	USDA2914	<i>Phaseolus vulgaris</i>	美国
CCBAU65027	<i>Phaseolus vulgaris</i>	云南	<i>Rhizobium tropici</i>		
CCBAU65034	<i>Cassia leschenaultiana</i>	云南	CIAT899 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	哥伦比亚
CCBAU65035	<i>Cassia leschenaultiana</i>	云南	<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
CCBAU65036	<i>Cassia leschenaultiana</i>	云南	USDA1002 ^T	<i>Medicago sativa</i>	美国
CCBAU65037	<i>Cassia leschenaultiana</i>	云南	102F28	<i>Medicago sativa</i>	美国
CCBAU30142	<i>Cassia nomane</i>	云南	USDA205 ^T	<i>Medicago sativa</i>	美国
CCBAU23169	<i>Cassia occidentalis</i>	云南	<i>Allorhizobium</i>		
CCBAU43109	<i>Cassia tora</i>	湖北	LMG11875 ^T	<i>Neptunia natans</i>	比利时

T: Type strains, CCBAU: Culture Collection of Beijing Agricultural University, NZP: Division of Scientific and Industrial Research, Palmerston, New Zealand, 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 Microbiële Genetica, Rijksuniversiteit, B-9000, Gent, Belgium, CIAT: CIAT Rhizobium Collection of Colombia

1.2 数值分类

1.2.1 性状测定: 对供试菌进行了 129 项表型性状的测定^[8]。

1.2.2 聚类: 性状编码、聚类方法等按文献 [8] 描述, 用平均连锁法(UPGMA)聚类。

1.3 全细胞蛋白 SDA-PAGE 分析

快生、慢生根瘤菌分别用超声波^[9,10]和煮沸法^[11]制备蛋白样品, 除了分离胶的浓度为 12.5% 外, 其他试剂的配制、制胶、电泳、结果统计分析和聚类均按文献 [9, 10] 操作。

2 结果

2.1 数值分类结果

对供试菌株所测定的 129 项表型性状数据, 去除 12 项全同性状, 采用平均连锁法进行聚类, 获得了数值分类树状图 (图 1, 图中不包括未聚群的供试菌)。

从图上可以看出, 在 67% 的相似性水平上, 供试菌分为两大群: 群 I 和群 II。群 I 为快生和中慢生根瘤菌, 群 II 为慢生根瘤菌。

群 I 在 85% 的相似性水平上主要分为 3 个亚群: 亚群 1 包括 25 株供试菌, 21 株来自杭子梢, 4 株来自菜豆。21 株分离自杭子梢的根瘤菌除 1 株来自湖北外, 其余皆来自云南; 4 株分离自菜豆的根瘤菌中, 2 株来自陕西, 1 株来自青海, 1 株来自甘肃。亚群 2 有 8 株菌, 2 株来自菜豆, 4 株来自决明, 2 株为土壤杆菌参比菌株 IAM13129 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和 IAM13569 (*A. rubi*)。其中的未知菌株皆来自云南。亚群 3 有 9 株菌, 皆分离自菜豆。这一群菌, 除 1 株来自内蒙外, 其余皆来自云南。亚群 1 和亚群 3 没有与已知参比菌株聚在一起, 可能是新的表观群。

群 II 在 76% 的相似性水平上主要分为 3 个亚群。亚群 1 包括 8 个菌株, 7 株分离自决明, 1 株分离自菜豆, 来自四川、云南、江西、安徽和湖北。亚群 2 包括 13 株菌, 6 株分离自菜豆, 3 株分离自决明, 1 株分离自杭子梢, 主要来自江西和湖北; 其余 3 株为参比菌株 USDA6 (*Bradyrhizobium japonicum*)、USDA76 (*B. elkanii*) 和 B15 (*B. japonicum*); 亚群 3 包括 6 株菌, 4 株分离自决明, 2 株分离自菜豆, 来自江西和安徽。亚群 1 和亚群 3 没有与已知菌聚在一起, 可能是新的表观群。

2.2 全细胞蛋白 SDS-PAGE 结果

将从每株菌的电泳图谱上得到的 85 个数据用平均连锁法进行聚类, 结果见树状图 (图 2 和图 3)。

从图 2 可以看出, 供试的 76 株快生菌和中慢生菌 (数值分类中的群 I) 在 68% 的相似性水平上, 主要可分为 4 个亚群。亚群 1 和亚群 2 相当于数值分类的亚群 1, 亚群 3 和亚群 4 分别与数值分类中的另外两个群相当。亚群 3 与数值分类中的亚群 2 相比少了已知种 *A. tumefaciens* IAM 13129 和 *A. rubi* IAM 13569。亚群 4 有一半的菌株与数值分类中的亚群 3 相同。数值分类中未曾聚群的菌株在这里也是彼此分开的。这些结果和数值分类的结果比较一致。

从图 3 可以看出, 供试的 27 株慢生菌 (数值分类中的群 II) 在 59% 的相似性水平上, 也可以分为 3 个亚群, 它们基本上分别与数值分类中的亚群 3、亚群 1 和亚群 2 相对应。

无论是数值分类还是全细胞蛋白电泳的分群结果,都表明25株来自杭子梢的根瘤菌有1株是慢生菌,其余24株是快生菌。在数值分类中,24株快生菌中有21株聚在群I中的亚群1,3株没有聚群。在全细胞蛋白电泳中,来自杭子梢的根瘤菌聚在亚群1和亚群2。这两种分群方法都表明快生根瘤菌有可能是新的分类单元,它们确切的分类地位有待进一步用DNA同源试验考察确定。

在数值分类中,21株分离自决明的根瘤菌有6株是快生菌,其余15株为慢生菌。其中13株慢生菌分别聚在群II的亚群1、2和3中,有2株没有聚群。亚群2还包括已知参比菌USDA6 (*B. japonicum*)、USDA76 (*B. elkanii*)和B15 (*B. japonicum*)。聚在亚群1和亚群3的菌株可能是新的分类单元,这些结果有待进一步考察。全细胞蛋白电泳结果与数值分类结果基本吻合。

40株分离自菜豆的根瘤菌,在数值分类中,30株为快生菌,其中有14株分别聚在亚群1、2和3中,其余16株单独分散,没有聚群。亚群3不与任何已知参比菌聚群,有可能是一个新群,它的确切分类地位有待DNA同源分析来决定。10株分离自菜豆的慢生根瘤菌,1株聚在群II的亚群1中,6株聚在亚群2中,2株聚在亚群3中,1株不成群。全细胞蛋白电泳的结果基本上也是这样。

3.2 分离自杭子梢、决明和菜豆的根瘤菌的多样性

近十年来,随着对分离自菜豆的根瘤菌的多样性的了解,人们开始对它们产生了重新分类的兴趣。目前已从分离自菜豆的根瘤菌中,命名了4个新种,*R. tropici* 和 *R. etli*^[3]分离自非洲和中美洲,*R. gallicum*和*R. giardinii*^[4]分离自欧洲。有人认为,分离自菜豆根瘤菌的多样性与基因横向转移和环境条件如pH、氮素的含量等因素有关^[12,13]。

本试验中,分离自菜豆的40株菌,有快生和慢生之分;在数值分类中,4株快生菌与分离自杭子梢的根瘤菌聚在群I的亚群1,3株快生菌与分离自决明的根瘤菌聚在亚群2,3株慢生型与分离自决明的根瘤菌聚在群II的亚群1和亚群3。来自北方内蒙古自治区的快生根瘤菌和来自南方云南的快生根瘤菌都聚到了群I的亚群3,来自云南的快生根瘤菌聚到了不同的群中。这说明,我国分离自菜豆的根瘤菌也有着多样性。分离自杭子梢和决明的根瘤菌也有同样的情况。

3.3 两种方法的相互印证

数值分类可以很好地将快生与慢生根瘤菌的菌株区分开来,并且可在种的水平上分群,还可以得到各个群的鉴别特征。虽然工作量大,但仍是一种可靠的分群方法。

全细胞蛋白电泳操作方法简单,如果严格控制操作条件,得到的结果与数值分类有很好的 consistency;加上可以用计算机应用软件处理蛋白指纹图谱,是一种快速、较可信的分群方法。在本研究中,用这两种方法对根瘤菌进行表型分析,得到的群基本上是相对应的,结果比较一致。

参 考 文 献

- [1] Jordan D C. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984, I: 234 ~ 242.
- [2] Martínez-Romero E, Segovia L, Martins F M, et al. Int J Sys Bacteriol, 1991, 41 (3): 417 ~ 426.
- [3] Segovia L, Young J P W, Martínez-Romero E. Int J Sys Bacteriol, 1993, 43 (2): 374 ~ 377.
- [4] Amarger N, Macheret V, Laguerre G. Int J Sys Bacteriol, 1997, 47 (4): 996 ~ 1006.
- [5] Sneath P H A, Bacterial classification II. Numerical Taxonomy. In: George M. Garrity (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1992, 111 ~ 112. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- Bacteriology, Volume I. 2nd Edition, New York: Springer-Verlag, 2001, 39~42.
- [6] Graham P H. J Gen Microbiol, 1964, 35: 511~517.
- [7] Chen W C, Li G S, Qi Y L, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1991, 41 (2): 275~280.
- [8] 汪恩涛, 陈文新, 李季伦, 等. 微生物学通报, 1987, 14: 86~89.
- [9] 许晓东, 陈文新. 微生物学通报, 1996, 23 (3): 131~134.
- [10] 陈文新, 齐幼林, 李季伦, 等. 微生物学报, 1988, 28 (2): 102~108.
- [11] Pot B, Vandamme P, Kersters K. In Goodfellow M., O'Donnell A G (ed.), Chemical Methods in Prokaryotic Systematics, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK 1994, 493~521.
- [12] Anyango B, Wilson K J, Beynon J L, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 4016~4021.
- [13] Caballero-mellado J, Martínez-Romero E. Symbiosis, 1999, 26: 111~121.