

西北地区甘草根瘤菌的表型多样性研究*

杨亚珍¹ 韦革宏^{1,2**} 万晓红¹ 陈春¹

(西北农林科技大学资源环境学院 杨凌 712100)¹

(黄土高原土壤侵蚀与旱作农业国家重点实验室 杨凌 712100)²

摘要: 选用分离自西北干旱、半干旱地区的甘草根瘤菌 68 株和 34 株参比菌株, 进行了 113 项表型性状测定, 结果表明: 不同地理来源、同一地理来源、甚至同一植株不同根瘤菌株在碳氮源利用、抗生素敏感性、抗逆性等方面存在着差异。部分菌株具有较强的耐盐耐碱能力, 其中有 5 株和 1 株菌分别能耐受 50g/L、60g/L 的 NaCl; 有 43% 的菌株能在初始 pH12 的 YMA 培养基上生长。从数值分类树状图谱发现, 在 85.5% 的相似水平上供试菌株构成了 3 个表观群。群 I 有 27 株菌, 除 4 株来自陕西外, 其余均来自新疆。群 II 有 4 株菌, 皆来自陕西。群 III 有 8 株菌, 6 株来自陕西, 2 株来自宁夏, 它们与 *R. hainanense* 聚在一起。而群 I、群 II 没有与参比菌株聚在一起, 可能是新的表观群, 其分类地位需进一步确定。

关键词: 甘草, 根瘤菌, 表型多样性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 02-0020-06

PHENOTYPIC FEATURE DIVERSITIES OF RHIZOBIA ISOLATED FROM *GLYCYRRHIZA* LINN IN NORTHWEST ARID-SEMIARID REGION OF CHINA

YANG Ya-Zhen¹ WEI Ge-Hong^{1,2} WAN Xiao-Hong¹ CHEN Chun¹

(College of Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, 712100)¹

(State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau, Yangling, 712100)²

Abstract: 113 phenotypic features of 68 strains isolated from *Glycyrrhiza* Linn, growing in northwest arid-semiarid region of China, were analyzed. 34 reference strains were included for comparison. The result showed that there were great diversities among strains isolated from different geographic origin, the same geographic origin, and the different root nodules of the same root in carbon and nitrogen nutrient utilization, resistance to antibiotics, endurance to salt, alkali. Some strains had the properties of endurance to salt and alkali. 5 strains and 1 strain could endure 50g/L, 60g/L NaCl respectively. 20% and 43% strains could grow in YMA medium with pH5, pH12. Numerical taxonomy showed that the strains formed 3 groups at 85.5% similarity level. Group I contained 27 strains, 23 strains isolated from Xinjiang, 4 isolated from shannxi. Group II had 4 strains isolated from shannxi. Group III (6 strains isolated from shannxi, 2 isolated from Ningxia) were clustered into *R. hainanense*. Group I and group II may be new groups, which were not clustered into the reference strains, and there taxonomic status must be confirmed by further measurements.

Key words: *Glycyrrhiza* Linn, Rhizobia, Phenotypic feature diversities

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30000005)

Project Granted by Chinese National Science Fund (No.30000005)

教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金 (No.200254)

国家 973 课题 (G2000018605)

** 联系人 电话: 029-7036106, E-mail: weigehong@yahoo.com

收稿日期: 2003-06-23, 修回日期: 2003-11-30

甘草是我国西北地区广泛分布的一类豆科植物, 号称“众药之王”, 有“十方九草”之说。它能与根瘤菌共生, 固定大气中的氮, 提高土壤肥力; 可以防风固沙, 防止土壤退化; 还可以作为绿肥和饲料, 是值得深入研究与开发利用的经济植物。已有研究表明, 甘草与根瘤菌的共生关系有助于提高药材的产量和质量^[1]。目前, 对甘草根瘤菌的多样性研究工作尚无系统的报道, 其分类地位尚未确定。本研究采用数值分类方法, 初步考察西北干旱半干旱地区甘草根瘤菌的分类地位及其多样性, 为发掘和利用性状优良的根瘤菌种质资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 本试验共选用 102 株快生型根瘤菌, 其中 68 株未知甘草根瘤菌分别来自新疆、甘肃和陕西, 另外 34 株参比菌为已知根瘤菌。未知菌株编号、宿主和地理来源见表 1。

表 1 未知菌株一览表

菌号	寄主学名	寄主中文名	来源
NWXG001, NWXG002, NWXG003, NWXG004, NWXG005, NWXG006, NWXG007, NWXG008, NWXG009, NWXG010, NWXG011, NWXG012, NWXG013, NWXG014, NWXG015, NWXG016, NWXG017, NWXG018, NWXG019, NWXG020, NWXG021, NWXG022, NWXG023	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	乌拉尔甘草	新疆巴楚县
NWXG024, NWXG025, NWXG026, NWXG027, NWXG028, NWXG029, NWXG030, NWXG031, NWXG032, NWXG033, NWXG034, NWXG035, NWXG036, NWXG037	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	光果甘草	新疆紫泥泉
NWXG038, NWXG039, NWXG040, NWXG041, NWXG042, NWXG043, NWXG044, NWXG045, NWXG046	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	光果甘草	新疆查汗采开乡
NWXG047, NWXG048, NWXG049	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	乌拉尔甘草	新疆和静县城郊
NWXG050	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	乌拉尔甘草	新疆哈尔莫墩乡
NWSHG001, NWSHG002, NWSHG003, NWSHG004,	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	乌拉尔甘草	陕西省黄龙县
NWSHG005, NWSHG006	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	乌拉尔甘草	陕西省子午岭
NWSHG007, NWSHG008, NWSHG009, NWSHG010	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	乌拉尔甘草	陕西环县
NWSHG011, NWSHG012, NWSHG013, NWSHG014, NWSHG015	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	乌拉尔甘草	陕西榆林
NWNG001, NWNG002, NWNG003	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	乌拉尔甘草	宁夏银川

1.2 方法

1.2.1 性状分析: 实验共测定表型性状 113 项, 其中唯一碳源利用 20 项; 唯一氮源利用 12 项; 抗生素敏感性 32 项; 染料抗性测定 20 项; 其它测定项目有耐盐性、初始 pH、温度生长范围、石蕊牛奶实验、硝酸盐还原、耐尔蓝还原、BTB 酸碱反应、过氧化氢酶、尿酶、肉汤生长等, 实验方法和培养基的配制见参考文献[2, 3]。

1.2.2 聚类分析: 采用平均连锁法 (UPGMA) 进行聚类, 结果以树状图谱方式表示^[4]。

2 结果与分析

2.1 生理生化测定结果

分离自新疆的菌株对所选的 20 种碳源利用率较低, 其中 36% 的菌株不能利用全部碳源。分离自陕西和宁夏的菌株对碳源利用率较高, 几乎所有菌株能够利用除马尿酸钠、糖原、二硫苏糖醇以外的全部碳源。说明不同地理来源的菌株在碳源利用方面存在着较大差异。

68% 的未知菌株对所选氨基酸均不能利用, 但分离自新疆的 NWGX005、NWGX017、NWGX018、NWGX023、NWGX026、NWGX049 这 6 株菌可以利用所选氨基酸的绝大部分作为唯一氮源。

在含 50 μ g/mL 白霉素的 YMA 培养基上, 分离自新疆 16% 的菌株和分离自陕西 78% 的菌株能够生长; 来自新疆 8% 的菌株和陕西 60% 的菌株能在含 5 μ g/mL 庆大霉素的 YMA 培养基上生长; 分离自宁夏的 3 株菌全部不能在白霉素、庆大霉素的 YMA 培养基上生长。可见不同地理来源的菌株在白霉素和庆大霉素的敏感性方面存在着差异。

未知菌株对 pH 适应范围较宽。初始 pH4 和 pH5 时分别有 4% 和 18% 的菌株能够在 YMA 培养基上生长; 初始 pH7~10 时全部菌株均能生长; 初始 pH11 时, 85% 的菌株能够生长; 初始 pH12 时, 43% 的菌株能够生长。一般认为, 菌株耐酸碱能力与其分离地的土壤性质有很大关系。但本实验发现, 部分从碱性土壤中分离的菌株也具有良好的耐酸能力, 如 NWGX017、NWGX018、NWGX049 能在 pH4 的 YMA 培养基上生长。

所有未知菌株在耐盐方面差异较大, 大部分菌株能在含 20g/L NaCl 的 YMA 培养基上生长, 有 38% 的菌株能耐受 30g/L 的 NaCl, 有 5 株菌能耐受 50g/L 的 NaCl, 仅有 NWGX032 这 1 株菌能耐受 60g/L 的 NaCl。对这些具有耐盐性状的菌株, 有必要对其耐盐机制做进一步的研究。

2.2 数值分类结果

从数值分类树状图 (图 1) 可以看出, 同一种的两个不同参比菌株具有较高的相似程度, 如: *R. hainanense* 中的 H14 和 I66, 相似性高达 98%; USDA2918 和 FL27 相似性为 95%; USDA3306 和 6 相似性为 93%。这些结果与现行的分类结果相一致, 说明本实验在生理生化性状测定及数值分类方面的测定结果是可靠的。

在 85.5% 的相似水平上, 参比菌株能够按种的不同彼此很好的分开, 未知菌株主要分为三个表观群。群 I 包括 27 株菌, 除 4 株来自陕西外, 其余均来自新疆。其中 14 株菌分离自光果甘草, 13 株菌分离自乌拉尔甘草; 群 II 有 4 株菌, 皆来自陕西的黄龙县; 群 III 中, 来自陕西的 6 株菌和来自宁夏的 2 株菌与 *R. hainanense* 中的 2 株参比菌聚在一起。根据参比菌株的聚类情况, 并参照 Sneath^[5] 等的建议, 相似性在 80% 以上者可归入同一种, 可初步认为这些菌株同属于 *R. hainanense*。群 I 和群 II 没有与已知参比

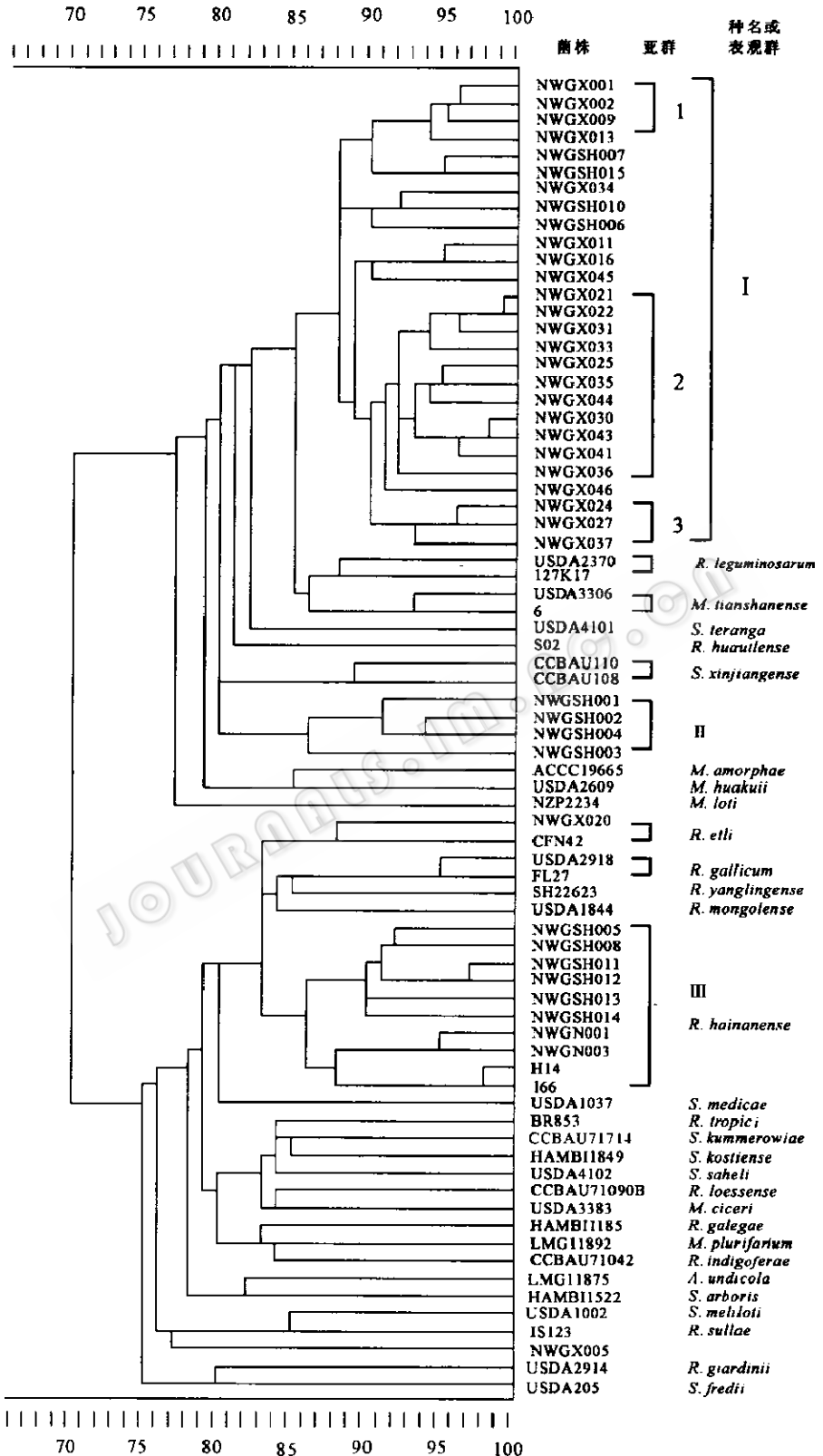


图 1 数值分类树状图

菌株聚在一起，可能是新的表观群，其分类地位需经 DNA 同源性实验进一步确定。

从数值分类树状图还可以看出甘草根瘤菌具有很大的表型多样性。光果甘草根瘤菌和乌拉尔甘草根瘤菌并未按寄主种类分开，部分光果甘草根瘤菌和乌拉尔甘草根瘤菌聚在一起。绝大部分菌株根据地理来源聚在一起，来自新疆的 23 株菌聚在群 I 中，它们之间的相似性很高，而与分离自其它地区的菌株相似性较低；分离自陕西的菌株大多数聚在群 II 和群 III 中；分离自宁夏的 2 株菌聚在群 III 中。

2.3 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可以看出：第 I、II 类群的菌株几乎对乳糖、果糖、山梨醇、麦芽糖、赤丝草醇、盐酸氨基葡萄糖和丙氨酸均不能利用，而第 III 类群有 89% 以上的菌能够利用它们作为唯一碳氮源；第 I 类群的菌株对白霉素、青霉素比较敏感，第 II 和第 III 类群的菌株对其不敏感。第 I 类群的菌株对中性红、去氧胆酸钠、百里香酚兰的耐受能力较低，第 II 和第 III 类群的菌株对它们的耐受能力较高；第 I 类群的菌株全部不能在 pH5 和 pH12 时生长，第 II 类群的菌株全部能够生长，第 III 类群的菌株仅有 56% 的菌株能够在 pH12 时生长。这些鉴别特征是它们独立成群的主要依据。

表 2 各类群之间的鉴别特征

鉴别特征	类群 I	类群 II	类群 III
乳糖	-	-	89%
果糖	-	-	89%
山梨醇	-	-	90%
麦芽糖	4%	-	+
赤丝草醇	4%	-	90%
盐酸氨基葡萄糖	4%	-	+
丙氨酸	-	-	89%
白霉素 (50μg/mL)	11%	+	+
青霉素 (5μg/mL)	11%	+	+
青霉素 (100μg/mL)	-	+	44%
中性红 (1g/L)	21%	+	+
去氧胆酸钠 (2g/L)	39%	+	+
百里香酚兰 (1g/L)	29%	+	+
百里香酚兰 (2g/L)	7%	+	+
pH 5	-	+	+
pH 12	-	+	56%

注：+ 正反应，- 负反应，% 正反应的菌株占其所在类群菌株的百分数

3 讨论

近年来生物多样性越来越受到人们的关注，而甘草根瘤菌生物多样性的研究国内外尚未见报道。本研究结果表明：西北干旱半干旱地区甘草根瘤菌中存在具有特殊生理生化特征（如有较强耐盐、碱能力）的菌株；这一地区甘草根瘤菌具有很大的表型多样性，但与寄主种类没有必然联系；不同采样地点的甘草根瘤菌之间存在着多样性；同一采样地点的根瘤菌在很大程度上受地域、生态环境影响而聚为一群，但它们在耐

盐性、对 pH 的耐受性、对碳、氮源的利用、对抗生素的敏感性等方面均存在着一定的差异，这与何正国^[6]研究结果一致。同一植株不同根瘤的菌株之间也存在着多样性，一般认为一个根瘤中通常只含有一株根瘤菌的类菌体，不同的根瘤则有可能来自不同的菌株^[7]。例如 NWGX002 和 NWGX005 是来自同一植株的不同根瘤，但它们在碳源利用、对抗生素的敏感性等方面存在着差异。

西北地区特殊生态环境中的根瘤菌，在其长期适应环境的过程中获得了抗逆性的基因。对这些菌株做进一步的研究，找到其抗性相关基因，并把这些具有抗性基因的菌株回接寄主，培育出既具有抗性，又适应干旱荒漠环境的寄主植物，将具广阔前景。

致谢 感谢中国农业大学陈文新院士提供参比菌株。

参 考 文 献

- [1] 李洪泉, 程玉鹏, 王继华, 等. 黑龙江大学学报, 2001, 18 (3): 111 ~ 115.
- [2] White L O. J Gen Microbiol, 1972, 72: 565 ~ 574.
- [3] 孙建光, 周荣柏. 微生物学通报, 1993, 33 (2): 135 ~ 143.
- [4] 汪恩涛, 陈文新, 李季伦, 等. 微生物学通报, 1987, 14: 86 ~ 89.
- [5] Sneath P H A, Solal R B. Numerical taxonomy, The principles and practice of numerical classification. W H Freeman and Co. San Francisco, 1973. 13 ~ 18.
- [6] 何正国, 周俊初, 李阜棣, 等. 华中农业大学学报, 1997, 16 (3): 211 ~ 219.
- [7] 黄大昉主编. 农业微生物基因工程. 北京: 科学出版社, 2001.