

# 我国蚕豆根瘤菌的数值分类及其 16S rDNA PCR-RFLP 研究\*

路敏琦<sup>1</sup> 李俊<sup>1\*\*</sup> 李力<sup>1</sup> 姜昕<sup>1</sup> 陈强<sup>2</sup>

(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)<sup>1</sup> (四川农业大学资源环境学院 雅安 625000)<sup>2</sup>

**摘要:** 对分离自我国 11 个省 24 个地区 49 株蚕豆根瘤菌及 11 株参比菌株进行了唯一碳源、氮源、抗生素、耐逆性和酶活性等 138 个表型性状测定, 并用 MINTS 软件进行聚类分析。结果表明, 全部供试菌株在 59% 的相似水平上聚在一起, 在 80% 的相似水平上可分为 6 个群。其中群 4 与参比菌株聚在一起, 而其他 5 个群均由未知菌组成。进一步对 36 株菌进行了 16S rDNA PCR-RFLP 分析, 在 85% 相似水平上供试菌可分为 4 个群和 1 个独立的分支, 其聚群结果与数值分类结果有较好的一致性。表型及遗传型分析结果表明, 我国蚕豆根瘤菌具有极大的多样性。

**关键词:** 蚕豆根瘤菌, 多样性, 表型及遗传型特征

**中图分类号:** Q939.114 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0026-06

## Numerical Taxonomy and 16S rDNA PCR-RFLP of Nodule Bacterial Isolated from Root Nodules of Broadbean (*Vicia faba* L.) in China\*

LU Min-Qi<sup>1</sup> LI Jun<sup>1\*\*</sup> LI Li<sup>1</sup> JIANG Xin<sup>1</sup> CHEN Qiang<sup>2</sup>

(Soil and Fertilizer Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081)<sup>1</sup>

(College of Resources and Environmental Science, Sichuan Agriculture University, Yaan 625000)<sup>2</sup>

**Abstract:** 49 rhizobia strains, isolated from root nodules of broadbean (*Vicia faba* L.) in 11 provinces of China were studied by analysis of 138 phenotypic characteristics. All the strains collected together at the boundary of 59% similarity. At the similarity of 80% there were 6 groups which were all composed of strains isolated from the root nodules of broadbean except the cluster 4 included one reference strain. Based on the results of numerical taxonomy, 25 strains as the representation of the broadbean rhizobia with 11 reference strains were selected to PCR-RFLP of 16S rDNA analysis. The strains were clustered into 4 groups at the similarity of 85% with another 1 unattached embranchment. The cluster status of 16S rDNA PCR-RFLP was in good agreement with that of numerical taxonomy on the similarity level of 80%. Overall the results demonstrated a high phenotypic and phylogenetic diversity of rhizobia strains nodulating broadbean.

**Key words:** *Rhizobia* sp. *Vicia faba* L., Diversity, Phenotypic and phylogenetic characteristics

蚕豆 [broadbean (*Vicia faba* L.)] 作为一类重要的豆科植物在我国种植历史悠久、地域广阔。它既可食用、饲用又可药用, 具有重要的经济价值。对它的共生体——蚕豆根瘤菌, 国内外虽有不少的研究<sup>[1,2]</sup>, 但对我国这一分布广泛的蚕豆根瘤菌资源的多样性研究尚未见文献报道。随着分子生物学技术的发展和运用, 采用 PCR 扩增某些特殊基因区的 RFLP 分析技术已成为根瘤菌遗传多样性研究中普遍采用的方法, 其中 16S rDNA PCR-RFLP 分析是细菌分类中广泛采用的方法。已经证明, 该技术不仅是细

\* 国家 973 项目资助 (No. 001CB1089)

\*\* 通讯作者 Tel: 010-68975891, E-mail: jli@caas.ac.cn

收稿日期: 2005-01-18, 修回日期: 2005-02-06

菌快速鉴定的方法, 而且也是细菌分类中一种简便快速的方法<sup>[3]</sup>。

本研究采用数值分类方法结合 16S rDNA PCR-RFLP 技术对分离自我国 11 个省 24 个地区 49 株蚕豆根瘤菌进行分析研究, 以期发现并保存表型及遗传型特异的根瘤菌资源, 同时研究蚕豆根瘤菌的分类地位。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

供数值分类的菌株共 60 株, 其中参比菌株 11 株, 未知菌株 49 株; 用于 16S rDNA PCR-RFLP 的菌株共 36 株, 其中参比菌株 11 株, 待定菌株 25 株。采样地点和寄主植物及参比菌株见图 1。

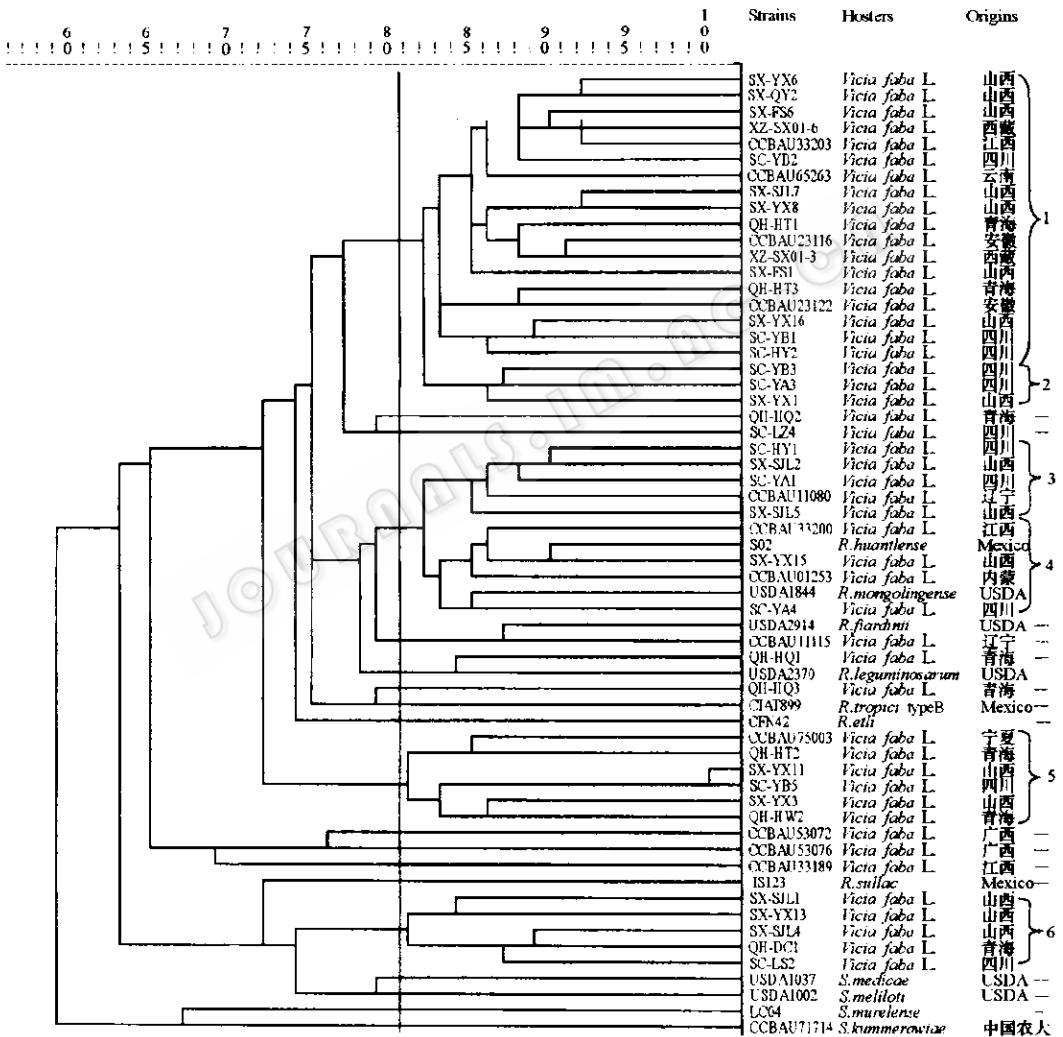


图 1 数值分类树状图 (UPGMA)

#### 1.2 性状测定

对供试菌株进行了唯一碳源利用、唯一氮源利用、抗生素敏感性、对染料和化学药物的耐受性、耐盐性、生长温度范围、生长 pH 范围及多种生理生化反应共 138 项表

型性状测定。具体测定方法及内容参考文献 [4]。

### 1.3 数值分类

对数值分类中生理生化性状测定按结果阳性记为“1”，结果阴性记为“0”，不确定的记为“N”，进行编号后输入计算机中，除去全同性状，用 MINTS 软件按平均连锁 (UPGMA) 聚类法进行聚类<sup>[5]</sup>，得到树状图。

### 1.4 总 DNA 提取

供试菌株经 YMA 斜面活化后，接种于 5mL TY 液体培养基中，28℃，180r/min 摇床培养 1~2d，取 1.5mL 菌液于 EP 管中，13,000r/min 离心收集菌体，参考陈强<sup>[6]</sup> (2002) 的方法提取总 DNA，并用已知浓度的 λ-DNA 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳估测所提取的 DNA 浓度，使用前调至 50ng/μL。

### 1.5 PCR 扩增

选用来源于 *E. coli* 16S rDNA 基因序列保守区域的两段引物 P1 和 P6<sup>[7]</sup>。50μL 的 PCR 反应体系中：10 × Reaction buffer 5μL，dNTP (10mmol/L) 1μL，P1、P6 (50pmol) 各 0.5μL，TaqDNA 聚合酶 (2.5U/μL) 0.5μL，模板 DAN 1μL，补足超纯水至 50μL。PCR 扩增条件：94℃ 初始变性 3min，94℃ 变性 1min，57℃ 退火 1min，72℃ 延伸 3min，30 个循环后 72℃ 最后延伸 5min。

### 1.6 RFLP 分析

选取 *Hae*III, *Hinf*I, *Msp*I, *Alu*I, *Mbo*I 及 *Rsa*I 6 种酶<sup>[8,9]</sup>，每个酶切反应中加入 10μL PCR 产物，5U 酶，37℃ 酶切 4h，酶切产物与 2μL 上样缓冲液混匀后点样，3% (含 EB) 琼脂糖凝胶 100V 电泳 4h。电泳结束后，用紫外凝胶扫描仪扫描、照相，以 TIFF 格式保存。图象信息采用 GelcomparII (version3.5) 软件分析，用平均连锁法聚类，最后绘成供试菌株的 UPGMA 树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 鉴别特征

由表 1 可以看出供试蚕豆根瘤菌在生理生化，抗逆行等方面具有多样性，对碳、氮源利用极为广泛。一些菌株甚至可以抗高浓度 (300μg/mL) 的抗生素，少数菌可耐受 40℃ 的高温。大多数菌可以在较宽的 pH 值范围内生长 (pH4.0~11.0)，比王庆等人<sup>[10]</sup> (2004) 对四川蚕豆根瘤菌生物学特性测定的 pH 值生长范围 (5.0~10.0) 更大一些。这主要是由于本实验中选取的代表菌株地理来源更为广泛，包括青海高寒地区，土壤的酸碱程度不同，故测得的蚕豆根瘤菌 pH 值生长范围较宽。对这些表型特征的测定为开发和合理利用蚕豆根瘤菌资源奠定了良好的基础。

表 1 数值分类各群及已知菌的鉴别特征

鉴别特征	各群及已知种										鉴别特征	各群及已知种																																						
	1	2	3	4	5	6	A	B	C	D		E	F	G	1	2	3	4	5	6	A	B	C	D	E	F	G																							
唯一碳源利用 (Application of sole carbon source)																										L-色氨酸 L-Tryptophan	+	+	+	+	d	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
阿拉伯糖 (Arabinose)	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	L-精氨酸 L-Arginine	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D(+)-阿糖醇 D(+)-arabitol	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L-组氨酸 Histidine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-葡萄糖酸钙 d-Sodium gluconate	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	甘氨酸 Gly	+	+	+	+	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
糊精 Dextrin	d	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d-精氨酸 d-Arginine	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

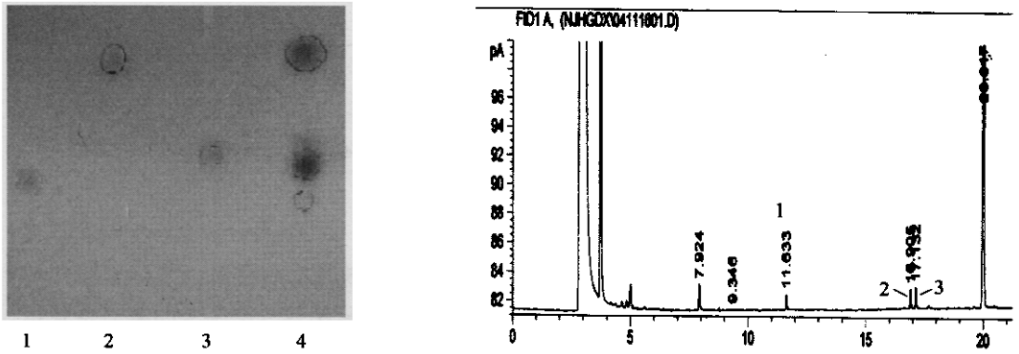


图1 PS-238的单糖组分分析

1 葡萄糖, 2 鼠李糖, 3 甘露糖, 4 多糖酸水解液

1 鼠李糖, 2 甘露糖, 3 葡萄糖

### 2.3 红外光谱

由红外光谱显示多糖在  $3,400 \sim 3,200\text{cm}^{-1}$  的宽峰为 O-H 的伸缩振动,  $3,100 \sim 2,800\text{cm}^{-1}$  的峰为糖类 C-H 的伸缩震动, 这两组峰是糖类的特征吸收峰,  $1,457\text{cm}^{-1}$  为羧酸 O-H 的弯曲振动吸收峰,  $1,738\text{cm}^{-1}$  为羧酸 C=O 的伸缩振动吸收峰,  $1,647\text{cm}^{-1}$  为酮的吸收峰,  $1,116\text{cm}^{-1}$  为羟基 C-O 的伸缩振动吸收峰 (图略)。

### 2.4 PS-238 水溶液的流变学特性

1.0% 的 PS-238 水溶液粘度随着剪切速率的增大而降低 (图 2), 当转速降低时粘度又可回升, 呈现典型的假塑流体特征<sup>[6]</sup>。在相同的剪切速率下, 表观粘度与溶液浓度正相关, 表现出良好的增稠效果。且剪切速率越小, 这种趋势越显著。可能是由于随着多糖浓度增加溶液剪切稀化程度加剧造成的 (图 3)。

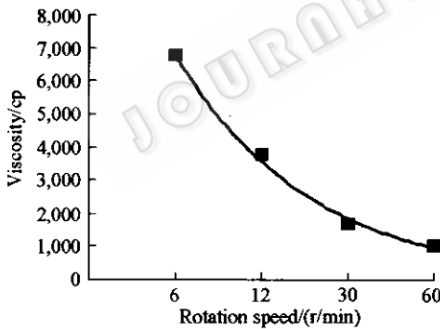


图2 剪切速率对 PS-238 水溶液表观粘度的影响

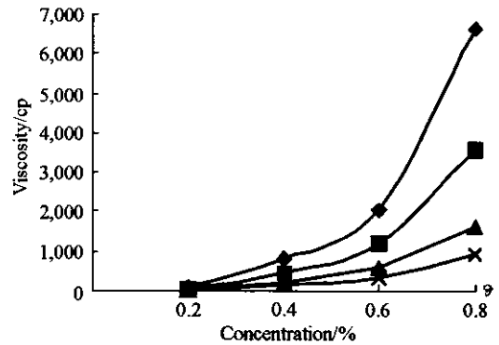


图3 PS-238 浓度对表观粘度的影响

◆ 6r/min, ■ 12r/min,  
▲ 30r/min, × 60r/min

### 2.5 PS-238 水溶液的特性

**2.5.1 温度对 PS-238 溶液表观粘度的影响:** 不同水浴温度下 ( $20^{\circ}\text{C} \sim 100^{\circ}\text{C}$ ) 测得其表观粘度, 如图 4, 在  $150^{\circ}\text{C}$  以内多糖溶液的粘度值基本稳定, 冷却后, 溶液粘度仍能恢复, 表明在高温下多糖溶液不会降解。它的结构类似物结冷胶的水溶液对温度敏感, 在高温和低温下均能形成性能不同的凝胶<sup>[7]</sup>, 而相比于黄原胶而言, 耐温极限值提高了近  $30^{\circ}\text{C}$ , 这一特征对于石油开采中作为采油驱动剂的使用是难能可贵的。

存在特殊性。同时从树状图上可以看出，地理来源相同的蚕豆根瘤菌并未完全聚在一个聚类群中，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。

### 2.3 RFLP 的聚类结果

16S rDNA PCR 扩增结果，所有供试菌株均产生大小约 1.5kb 的片段。用 6 种限制性内切酶对 PCR 产物酶切，对 6 种酶的酶切结果综合分析后得到酶切图谱聚类分析树状图 (图 2)。在 85% 相似水平上全部供试菌株聚成 4 个聚类群，菌株 CCBAU33200 独立成一支，与 *R. etli* CFN42 接近。群 1 包括 *R. leguminosarum* USDA2370 及 17 株未知菌，这 17 株菌分别来自 9 个不同地区；群 2 包括 *R. huantlense* SO2<sup>T</sup> 及 4 株未知菌，分别来自山西、四川和青海；群 3 由 *R. mogolingense* USDA1844、*R. sullae* IS123 和 1 株分离自山西的蚕豆根瘤菌组成；群 4 由 *R. tropici* type B CIAT899 和两株分离自四川和青海的蚕豆根瘤菌组成。

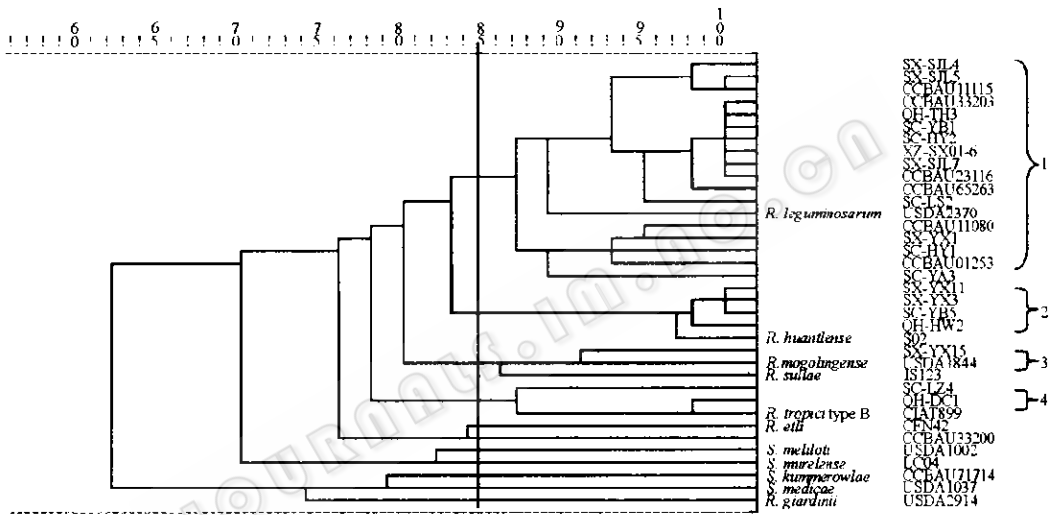


图 2 16S rDNA PCR-RFLP 聚类结果 [GelcomparII (version3.5) 软件]

比较图 1 和图 2 可以看出 16S rDNA PCR-RFLP 分析与数值分类分析具有很好的—致性。而且未知菌均与 *Rhizobium* 属的参比菌有很高的相似性，初步认为蚕豆根瘤菌归属于 *Rhizobium* 属。

### 3 讨论

本研究对分离自我国 11 个省 24 个地区的蚕豆根瘤菌进行了数值分类及 16S rDNA PCR-RFLP 分析，两种分析方法得到的结果均显示出在不同地理位置，同一寄主植物中分离到的根瘤菌表型性状及遗传性状具有多样性，说明了根瘤菌与寄主植物及生态环境三者之间的复杂关系。由于生态环境的特殊性，使得此环境中与豆科植物共生的根瘤菌在表型性状也表现出其特异性。在长期的自然选择中，其遗传性也必然发生了变化，从而导致种群的多样性。这也证实了环境条件对根瘤菌分类地位的影响大于寄主专一性的影响。

Laguerre G 等人 (1994) 发现 *CofI*、*HinII*、*Nde II* (*Mbo I*) 及 *MspI* 或者是 *CofI*、*HinII*、*RsaI* (*AfaI*) 及 *MspI* 这两种组合酶用于 16S rDNA PCR-RFLP 分析，能准确地反

映快生根瘤菌种间的遗传多样性和系统发育关系。但在本实验 16S rDNA PCR-RFLP 分析中 *RsaI* 对各供试菌的酶切图谱几乎完全一致(都产生出 500bp 和 800bp 两条片段), 不适于蚕豆根瘤菌 16S rDNA PCR-RFLP 分析。用 *HaeIII* 代替 *CofI* (由于条件限制未购买到 *CofI*) 得到酶切图谱带型差异较明显。因此认为 *HaeIII*, *Hinfl*, *MboI* 及 *MspI* 这一组合对蚕豆根瘤菌 16S rDNA PCR-RFLP 分析是必需的。

致谢 本研究的前期采集蚕豆瘤及分离根瘤菌工作得到山西省农业科学院土壤肥料研究所史清亮老师的帮助, 特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] 熊俊莲, 吴礼树, 赵竹青, 等. 华中农业大学学报, 1996, 15 (5): 447 ~ 449.
- [2] Trinchant J C, Guerin V, Rigaud J. Role of Oxalate American Society of Plant Physiologists Plant Physiol, 1994, 105 (2): 555 ~ 561.
- [3] Laguerre G, Allard M R, Revoy F, et al. Appl Env Microbiol, 1994, 60: 56 ~ 63.
- [4] Chen W X, Yan G H, Li J L. Int J Syst Bacteriol, 1988, 38: 392 ~ 397.
- [5] Chen W X, Wang E T, Wang S Y, et al. Int J Syst. Bacterial, 1995, 45: 153 ~ 159.
- [6] 陈 强, 张小平, 李登煜, 等. 微生物学通报, 2002, 29 (6): 63 ~ 66.
- [7] Chen W X, Tan Z Y, Gao J L, et al. Int Syst Bacteriol, 1997, 47: 870 ~ 873.
- [8] Laguerre G, Allard M R, Revoy F, et al. Gen Appl Env Microbio, 1994, 1: 56 ~ 63.
- [9] 李 俊, 樊 蕙, 李 力, 等. 应用与环境生物学报, 2003, 9 (1): 59 ~ 62.
- [10] 王 庆, 方 平. 涪陵师范学院学报, 2004, 20 (5): 89 ~ 90.