

研究报告

内蒙古根瘤菌的数值分类

高俊莲 段 勇 陈文新

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘要 对 63 株新分离的内蒙古根瘤菌与 6 株来自 *Rhizobium leguminosarum* 及 *Sinorhizobium meliloti* 的参比菌株一起进行了数值分类。结果表明:所有测试菌株在 67% 的相似性水平上分为三个表观群,群 I 包括 3 株 *Sinorhizobium meliloti* 的参比菌和 9 株新分离的内蒙古根瘤菌;群 II 包括 3 株 *Rhizobium leguminosarum* 参比菌和 37 株新分离的内蒙古根瘤菌;群 III 全部由 20 株新分离的内蒙古根瘤菌组成。在 78% 的相似性水平上,全部供试菌株分为 8 个亚群,大部分新分离的内蒙古根瘤菌聚在 6 个独立的亚群中。研究结果也说明内蒙古根瘤菌的分群与其寄主无明显的相关性。

关键词 内蒙古, 根瘤菌, 数值分类

分类号 Q939.11

根瘤菌是一类重要的细菌,根瘤菌分类研究领域非常活跃,其发展变化也非常迅速。1984 年,在《伯杰氏系统细菌学手册》(1)中,仅描述了两个属: *Rhizobium* 和 *Bradyrhizobium*, 四个种从 1984 年至今,根瘤菌又描述了三个新属: *Sinorhizobium*^[2], *Azorhizobium*^[3] 和 *Mesorhizobium*^[4], 及 15 个新种^[2,5~15]。

自 1980 年以来,陈文新领导的研究小组先后调查、采集、研究了新疆^[2,12]、海南^[16,17]等省根瘤菌。八五期间,又对我国三北地区(华北、西北、东北)的根瘤菌资源进行了调查、采集和分类研究^[18~20]。

内蒙古中西部地区地域辽阔,气候寒冷,干旱少雨,绝大多数地区处于干旱和半干旱状态。在这样的生态环境中生长的豆科植物抗逆性很强,但人们对与之共生的根瘤菌了解很少。本研究在对内蒙根瘤菌进行调查的基础上,对来自内蒙古中西部地区不同寄主的 63 株根瘤菌进行了数值分类研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

本实验共选用 69 株根瘤菌,其中 63 株为来自不同寄主植物的内蒙古根瘤菌,其余 6 株

为参比菌,分布于两个属的两个种: *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*。供试菌株使用前均进行了纯度检查。菌株编号、来源及寄主等见表 1。

1.2 性状分析

本实验共测定性状 130 项。其中唯一碳源的利用测定 34 项,包括:己二酸、D-苦杏仁苷、D-阿拉伯糖、葡萄糖酸钙、丙二酸钙、糊精、内消旋赤藓糖、果糖、D(+)-半乳糖、葡萄糖、肌醇、乳糖、苹果酸钠、麦芽糖、D-甘露糖、松三糖、蜜二糖、丙酮酸钙、棉籽糖、鼠李糖、D-核糖、水杨苷、乙酸钠、柠檬酸三钠、甲酸钠、D-葡萄糖酸钠、马尿酸钠、琥珀酸钠、D-山梨糖醇、淀粉、蔗糖、海藻糖、香草酸、木糖。唯一氮源的利用测定 15 项,包括: D-精氨酸、甘氨酸、L-甲硫氨酸、DL-脯氨酸、L-苏氨酸、DL-丙氨酸、L-精氨酸、L-(+)-天冬氨酸、L-胱氨酸、D-谷氨酸、L-(+)-谷氨酸、次黄嘌呤、L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-苯丙氨酸。抗生素抗性测定 32 项,8 种抗生素为: 氨苄青霉素、杆菌肽、氯霉素、红霉素、卡那霉素、新霉素、

国家自然科学基金资助“八五”重点项目

1997-06-28 收稿

多粘菌素、链霉素。每种抗生素设四个浓度：
5 μ g / ml, 50 μ g / ml, 100 μ g / ml, 300 μ g / ml。
染料抗性测7项,分别为俾士麦棕、溴百里酚
蓝、藻红、甲基绿、亚甲蓝、盐酸丫啶,染料浓
度均为0.1%。其它测定的项目有:耐盐性、初

始生长pH值、温度生长范围、石蕊牛奶反应、
硝酸盐还原、亚甲蓝还原、耐尔蓝还原、BTB
酸碱反应、氧化酶、过氧化氢酶、脲酶、L-苯丙
氨酸酶、肉汤生长等。所有性状测定方法同文
献[16]。

表1 供试菌株一览表

菌 株	寄 主	来 源	菌 株	寄 主	来 源
<i>Sinorhizobium</i>			NM065	<i>Glycine max</i>	c
<i>meliloti</i>			NM067	<i>Vigna sinensis</i>	c
USDA 1002 ^T	<i>Medicago sativa</i>	a	NM069	<i>Astragalus complanatus</i>	c
102F28	<i>Medicago</i>	a	NM074	<i>Astragalus minianus</i>	c
H1	<i>Melilotus albus</i>	b	NM080	<i>Phaseolus coccineus</i>	c
<i>Rhizobium</i>			NM088	<i>Vicia amcena</i>	c
<i>leguminosarum</i>			NM091	<i>Vicia amcena</i>	c
USDA2370 ^T	<i>Pisum sativum</i>	a	NM093(a)	<i>Astragalus danicus</i>	c
127K17	<i>Phaseolus</i> sp.	a	NM095	<i>Hedysarum mongoliam</i>	c
162K68	<i>Trifolium</i> sp.	a	NM097	<i>Hedysarum fruticosum</i>	c
新分离菌株			NM100	<i>Vicia amoena</i>	c
NM001	<i>Medicago falcata</i>	c	NM102	<i>Medicago lupulina</i>	c
NM003	<i>Astragalus membraneus</i>	c	NM108	<i>Oxytropis bicolor</i>	c
NM004	<i>Onobrychis vicifolia</i>	c	NM109	<i>Melilotoides ruthenice</i>	c
NM006	<i>Medicago saliva</i>	c	NM111	<i>Coronilla vania</i>	c
NM007	<i>Melilotoides ruthenica</i>	c	NM113	<i>Vicia sativa</i>	c
NM008	<i>Vicia multicaulis</i>	c	NM116	<i>Vicia gigantea</i>	c
NM009	<i>Pisum salivum</i>	c	NM117	<i>Vicia unijuge</i>	c
NM011	<i>Vicia faba</i>	c	NM121	<i>Lathyrus quinquervius</i>	c
NM012	<i>Phaseolus vulgaris</i>	c	NM123	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	c
NM013	<i>Robinia pseudoacacia</i>	c	NM127	<i>Vicia cracca</i>	c
NM018	<i>Melilotus albus</i>	c	NM128	<i>Melilotogies ruthenice</i>	c
NM022	<i>Gueldensaedtia stenophylla</i>	c	NM129	<i>Vicia amoena</i>	c
NM024	<i>Medicago lupulini</i>	c	NM134	<i>Astragalus tataricus</i>	c
NM027	<i>Shaerophysa salsula</i>	c	NM137	<i>Vicia gigantea</i>	c
NM033	<i>Melilotoides ruthenice</i>	c	NM140	<i>Glycine soja</i>	c
NM037	<i>Astragalus tataricus</i>	c	NM142	<i>Kummerowia striata</i>	c
NM040	<i>Thermopsis lanceolata</i>	c	NM143	<i>Melilotus dentatus</i>	c
NM043	<i>Melilotoides ruhence</i>	c	NM145	<i>Vicia carcca</i>	c
NM044	<i>Medicago falcata</i>	c	NM154	<i>Phaseolus radiatus</i>	c
NM047	<i>Medicago lupulina</i>	c	NM155	<i>Vicia satifa</i>	c
NM050	<i>Vicia cracca</i>	c	NM158	<i>Oxytropis glabra</i>	c
NM052	<i>Vicia pseudovobus</i>	c	NM159	<i>Astragalus adsurgens</i>	c
NM053	<i>Vicia unijuga</i>	c	NM161	<i>Medicago saliva</i>	c
NM054	<i>Vicia costata</i>	c	NM163	<i>Phaseolus vulgaris</i>	c
NM062	<i>Caragana stenophylla</i>	c	NM169	<i>Oxytropis glabra</i>	c
NM063	<i>Caragana stenophylla</i>	c	NM170	<i>Astragalus adsurgens</i>	c

注: a 美国; b 黑龙江; c 内蒙古

1.3 聚类分析

性状编码、相似性计算、聚类分析及中心株确定等均按以前描述^[7]。选用简单匹配相似系数(Ssm)和平均连锁聚类方式(UPGMA)进行聚类。

2 结果与讨论

供试菌株聚类结果如图 1。全部供试菌株在 61% 的相似性水平上聚在一起。在 67% 的相似性水平上分为 3 群。据以往的经验这 3 个

大群相当于属水平的表观群。群 I 包括 *S. meliloti* 的参比菌和 9 株新分离的内蒙古根瘤菌,称之为 *Sinorhizobium* 表观群;群 II 包括 *R. leguminosarum* 参比菌和 37 株新分离的内蒙古根瘤菌,称之为 *Rhizobium* 表观群;群 III 包括 20 株新分离的内蒙古根瘤菌,可能是一个新的相当于属水平的表观群。全部供试菌株在 78% 的相似性水平上分为 8 个亚群。

亚群 1 由 3 株 *S. meliloti*^[3] 的参比菌组成,群内相似性水平达 81%。

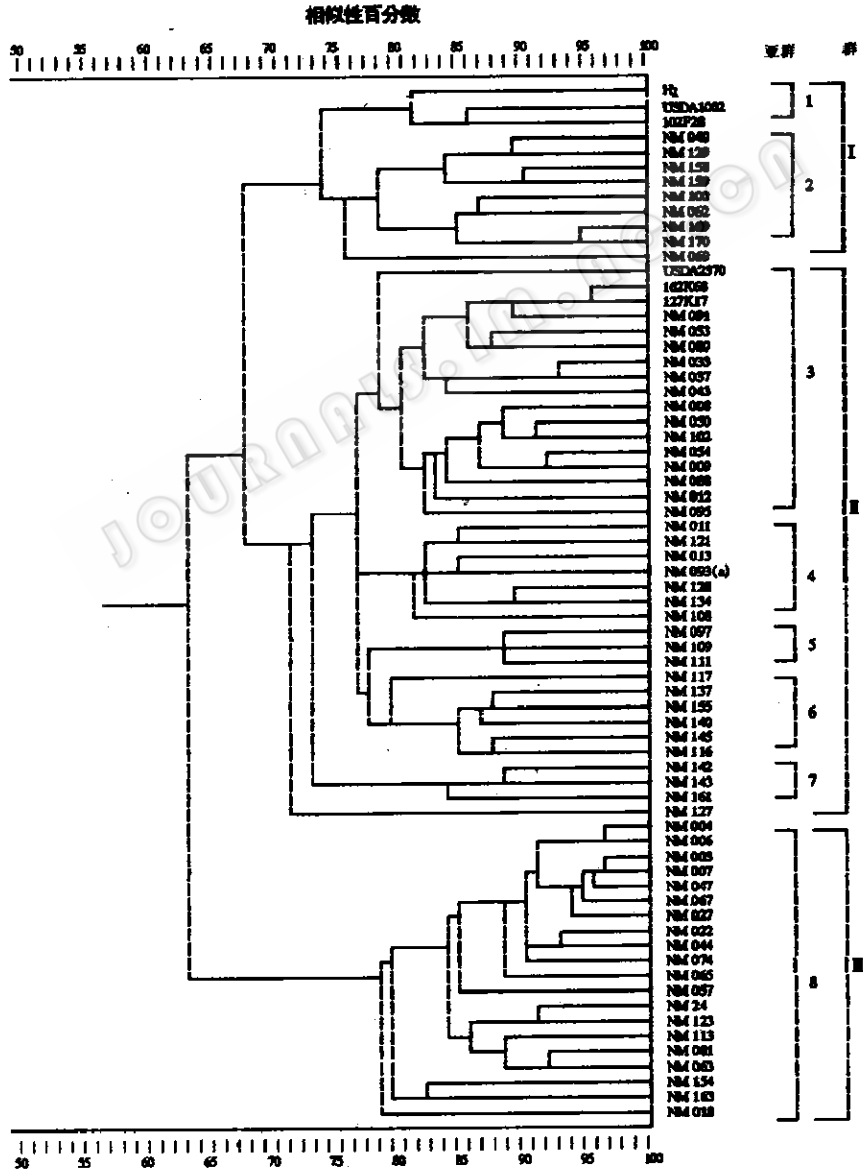


图1 内蒙古根瘤菌平均连锁聚类分析树状图谱

亚群2包括寄主为披针叶黄花(*Thermopsis lanceolata*)的菌株NM040, 寄主为山野豌豆(*Vicia amoena*)的菌株NM129, 寄主为小花棘豆(*Oxytropis glabra*)的菌株NM158, NM169, 寄主为斜茎黄芪(*Astragalus adsurgens*)的菌株NM159, NM170, 寄主为窄叶锦鸡儿(*Caragana stenophylla*)的菌株NM062, 群内相似性水平为78%, 中心菌株为NM159。

亚群1和亚群2及一株寄主为扁茎黄芪(*A. complanatus*)的不成群菌株NM069在73%的相似水平上组成了群1。

亚群3包括3株*R. leguminosarum*的参比菌株和14株新分离的内蒙古根瘤菌, 即寄主为山野豌豆(*V. amena*)的菌株NM088, NM091, 歪头菜(*V. unijuga*)的NM053, 红花菜豆(*Phaseolus coccineus*)的NM080, 细叶扁蓿豆(*Melilotoides ruthenice*) NM033, NM043, 皱黄芪(*A. tataricus*) NM037, 多茎野豌豆(*V. multicaulis*) NM008, 广布野豌豆(*V. cracca*) NM050, 天蓝苜蓿(*Medicago lupulina*) NM102, 肋脉野豌豆(*V. costata*) NM054, 豌豆(*Pisum sativum*) NM009, 菜豆(*P. vulgaris*) NM012, 蒙古岩黄芪(*Hedysarum mongolicum*) NM095, 群内相似性水平为78%。

亚群4由7株来自不同寄主植物的根瘤菌组成, 它们分别是: NM011(蚕豆*V. faba*) NM121(山黧豆*Lathyrus quinquervius*), NM113(刺槐*Robinia pseudoacacia*), NM093(a)(丹黄芪*A. danicus*), NM128(扁蓿豆*M. ruthenice*), NM134(皱黄芪*A. tataricus*), NM108(二色棘豆*Oxytropis bicolor*), 群内相似性水平为81%, 中心株为NM128。这是一个新的表观群, 与*Rhizobium*属的表型相似性较高, 在77%聚在了一起。

亚群5由3株来自不同寄主植物的内蒙古根瘤菌组成, 它们分别是菌株NM097(木岩黄芪*Hedysarum fruticosum*), NM109(扁蓿豆*M. ruthenice*), NM111(小冠花*Coronilla varia*), 群内相似性水平为81%。

亚群6由6株新分离的内蒙古根瘤菌组

成, 其中5株根瘤菌的寄主植物均为野豌豆属, 分别是菌株NM117(歪头菜*V. unijuga*), NM137(大野豌豆*V. gigantea*), NM155(救荒野豌豆*V. sativa*), NM145(广布野豌豆*V. cracca*), NM116(大野豌豆*V. gigantea*), 而菌株NM140的寄主为野大豆(*Glycine soja*), 群内相似性水平为79%, 中心菌株为NM155。该亚群可能为*Rhizobium*属内的一个新的表观群, 它与*R. leguminosarum*表型相似性较高, 在76%聚在了一起。

亚群7由3株内蒙古根瘤菌组成, 分别是菌株NM142(鸡眼草*Kummerowia striata*), NM143(细齿草木樨*Melilotus dentatus*), NM161(紫花苜蓿*Medicago saliva*)。

亚群3、4、5、6、7及未归群菌株NM127(广布野豌豆*V. cracca*)组成群II, 群II内相似性水平为70%。

亚群8单独构成群III, 包括20株来自不同寄主的根瘤菌, 它们分别是红豆草(*Onobrychis viciifolia*) NM004, 紫花苜蓿(*M. saliva*) NM006, 蒙古黄芪(*A. membranaceus*) NM003, 扁蓿豆(*M. ruthenice*) NM007, 天蓝苜蓿(*M. lupulina*) NM047, NM024, 豇豆(*Vigna sinensis*) NM067, 苦马豆(*Shaerophyssa salsula*) NM027, 窄叶米口袋(*Gueldensaedtia stenophylla*) NM022, 黄花苜蓿(*M. falcata*) NM001和NM044, 细弱黄芪(*A. miniatum*) NM074, 大豆(*Glycine max*) NM065, 大叶野豌豆(*V. pseudovobus*) NM052, 葫芦巴(*Trigonella foenum-graecum*) NM123, 救荒野豌豆(*V. sativa*) NM113, 柠条锦鸡儿(*Caragana stenophylla*) NM063, 绿豆(*Ph. radiatus*) NM154, 菜豆(*Ph. vulgaris*) NM163, 白花草木樨(*M. albus*) NM018。亚群内的相似性水平为79%, 中心菌株为NM007。该亚群可能是平行于*Sinorhizobium*和*Rhizobium*属的一个新的属水平的表观群, 要确定其确切的分类地位, 还需进行DNA-DNA杂交和16SrRNA的基因全序列分析等进一步分析。

由以上结果的分析可以看出, ①供试63株

新分离的内蒙古根瘤菌中,有一少部分(14株)与 *R. leguminosarum* 参比菌聚在一起,其余大部分菌株独立成群,分别构成几个不同水平的新的表观群,如亚群 2 是 *Sinorhizobium* 属内相当于种水平的一个新的表观群。而亚群 4、5、6、7,是 *Rhizobium* 属内种水平上的新的表观群;亚群 8 是平行于 *Sinorhizobium* 和 *Rhizobium*, 相当于属水平的新的表观群。这些新表观群的确切分类地位还有待于遗传学分类方法的进一步确定。②内蒙古根瘤菌表观群的划分与寄主之间无明显的对应关系,如来自苜蓿、草木樨等寄主的 9 株菌,并没有与 *S. meliloti* 聚在一起,而是分布于不同的亚群;菌株 NM102 与参比菌 *R. leguminosarum* 聚在一起,菌株 NM143 和 NM161 聚在亚群 7 中, NM006、NM047、NM044、NM024、NM001 和 NM018 都聚在了亚群 8 中,说明苜蓿根瘤菌具有表型特征的多样性。另一方面,与 *R. leguminosarum* 聚在一起的菌株也并非都来自豌豆族寄主,其中 9 株菌分别来自野豌豆属,另有 5 株菌分别来自扁蓿豆属、苜蓿属、黄芪属、岩黄芪属。

致谢: 内蒙古农牧学院张国贤老师完成了根瘤菌的采集、分离纯化和回接工作;中国农业大学生物学院李颖老师帮助进行了聚类分析,特此一并致谢。

参 考 文 献

[1] Jordan D C. Rhizobiaceae. in N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984, 234~256.

- [2] Chen W X, Yan G H, Li J L. Int J syst Bacteriol, 1988, 38:392~397.
- [3] Dreyfus B, Garcia J L, Gillis M. Int J Syst Bacteriol, 1988, 38:89~98.
- [4] Jarvis B D W, Van Berkum P, Chen W X et al. J Syst Bacteriol, 1997, 47(4):895~898.
- [5] Londstrom K. Int J Syst Bacteriol, 1989, 39:365~367.
- [6] Martinez Romero E Segovia L. et al. Int J Syst Bacteriol, 1991, 41:417~426.
- [7] Chen W X, Li G S, Qi Y L, et al., Int J Syst Bacteriol, 1991, 41:275~280.
- [8] Kuykendall L D, Saxena B, Devine T E, et al. Can J Microbiol, 1992, 38:501~515.
- [9] Segovia L Young J P W, Martinez-Romero. Int J Syst Bacteriol, 1993, 43:374~377.
- [10] De lajudie P, Willems A, Pot, B. et al., Int J Syst Bacteriol, 1994, 44:715~733.
- [11] Nour S M Fernandez M P, Normand P. et al. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44:511~522.
- [12] Chen W X, Wang E T, Wang S Y, et al. Int. J. Syst. Bacteriol. 1995, 45:153~159
- [13] Nour S M, Cleyet-Marel J C, Normand P, et al. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45:640~648.
- [14] Xu L M, Ge C, Cui Z, et al. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45:706~711.
- [15] Rome S Fernandez M P. Brunel B et al. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46:972~980.
- [16] 孙建光, 章凡, 王昌平等. 微生物学报, 1993, 33:135~143.
- [17] Gao J L, Sun J G, Li Y, et al., Int J Syst Bacteriol, 1994, 44:151~158.
- [18] 谭志远, 朱铭茂, 程丽娟等. 微生物学报, 1995, 35:223~228.
- [19] 李颖, 阮小超, 陈文新. 中国农业大学学报, 1996, 1(1):15~20.
- [20] 李颖, 阮小超, 陈文新. 中国农业大学学报, 1997, 2(1):31~36.

NUMERICAL TAXONOMY OF RHIZOBIAL STRAINS ISOLATED FROM INNER MONGOLIA AUTONOMOUS REGION

Gao Junlian Duan Yong Chen Wenxin

(College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Sixty-three rhizobial strains isolated from Inner Mongolia Autonomous Region were

compared with 6 representatives of recognized *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species by performing a numerical analysis of 130 phenotypic characteristics. The results showed that all tested strains were clustered into 3 phena at 67% similarity level. Phenon I includes 3 representatives of *Sinorhizobium meliloti* and 9 rhizobial strains from Inner Mongolia; Phenon II was composed of 3 representatives of *Rhizobium leguminosarum* and 37 strains from Inner Mongolia; Phenon III were 20 strains from Inner Mongolia. All tested strains were clustered into 8 subphenon at the similarity of 78%. Most newly isolated rhizobial strains fell in 6 distinctive subphenon. There is no correlation between the distribution of strains in the phenon and their hosts.

Key words Inner Mongolia, Rhizobia, Numerical taxonomy