

## 三个根瘤菌新群的DNA-DNA 杂交分析

阎爱民 陈文新

(中国农业大学生物学院)

**摘要** 从数值分类获得苜蓿、草木樨和锦鸡儿根瘤菌的3个新群。本实验对这3个新群内菌株及部分已知种参比菌株进行了DNA-DNA杂交分析和G+Cmol%测定。结果表明:三群中心菌株XJ96060, XJ96408, NM 019与其相应群内菌株的DNA同源性分别为71.7%~97.6%, 80.8%~98.7%, 82.7%~86.9%,均大于70%;各群的 $\Delta T_m$ 值分别为3.2, 2.8, 2.6,均小于5;与各已知种的DNA同源性分别为0~41.7%, 0~39.3%, 4.0%~44.7%,均低于70%;确证这3个新群为3个不同于已知种的、独立DNA同源群。此3群的G+Cmol%分别为60.3%~62.9%, 59.7%~62.4%, 60.2%~62.6%,属于快生型根瘤菌。

**关键词** 根瘤菌; DNA-DNA杂交; 新群

**分类号** Q939.114

### DNA-DNA Hybridization Analysis of Three New Rhizobia Groups

Yan Aimin Chen Wenxin

(College of Biology, CAU)

**Abstract** Three groups isolated from *Medicago sativa*, *Medicago sativa* spp., *Caragana* spp. were ascertained by the numerical taxonomy. The contents of G+Cmol% of all examined strains were measured, and DNA-DNA homologies among the strains within three groups as well as DNA-DNA homologies between centrostrain of three groups and reference strains of some known species were analyzed. The results showed that DNA-DNA homologies among strains within three groups were above 70% (71.7%~97.6%, 80.8%~98.7% and 82.7%~86.9% respectively);  $\Delta T_m$  of three groups were below 5 (3.2, 2.8 and 2.6 respectively). The DNA-DNA isogenesis index among centrostrains of three groups and type strains of known rhizobium species were much below 70% (0~41.7%, 0~39.3% and 4.0%~44.7% respectively). All these results indicate that three groups are the new DNA homologous groups and different from known rhizobium species. The contents of G+Cmol% of three groups are 60.3%~62.9%, 59.7%~62.4% and 60.2%~62.6% respectively, which shows that they are characteristic of the fast-growing root nodule bacteria.

**Key words** *Rhizobia*; DNA-DNA hybridization; new groups

干旱地区中生长的许多豆科植物对防风固沙起着重要的作用。目前对与这些豆科植物结瘤固氮根瘤菌的分类研究尚少<sup>[1,2]</sup>。近年来,苜蓿根瘤菌的多样性渐渐为人们所知。苜蓿根瘤菌的越界结瘤也时有报道。如从新疆分离到的1株耐盐苜蓿根瘤菌,已实现了在大豆上结瘤<sup>[3]</sup>。也发现了能在豌豆上结瘤的苜蓿根瘤菌<sup>[4,5]</sup>。利用多位点酶电泳法对232株苜蓿根瘤菌进行的分类研究表明,*Sinorhizobium meliloti*可以分为A和B两个亚群<sup>[6]</sup>。表型和16S rDNA序列分析的分类研

收稿日期: 1997-12-26 修回日期: 1999-12-01

国家自然科学基金资助项目(39670017)及中国-欧共体合作项目的一部分

陈文新,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

究表明,分离自不同地理来源的几种一年生苜蓿植物的根瘤菌为 1 个新种 *S. medicae*<sup>[7]</sup>。在细菌分类学研究中,DNA-DNA 杂交是确定新种的重要方法,根据国际细菌学分类委员会的建议,DNA-DNA 杂交同源性 70%, $\Delta T_m$  5 为确定新种的最低标准<sup>[8]</sup>。通过 DNA-DNA 杂交等分子分析确定的根瘤菌种属已有 6 属 19 种。本研究对数值分类产生的 3 个新群进行了 DNA-DNA 杂交分析,以期确定这 3 个分离自新疆内蒙干旱地区根瘤菌新群的分类地位。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

对数值分类确定的 3 个新群进行 DNA-DNA 杂交分析。其中群 1 包括 29 株菌,群 2 包括 9 株菌,群 3 包括 3 株菌。另外还包括 10 株分离自锦鸡儿的根瘤菌以及已知种的模式菌株 17 株。菌株编号,来源及寄主名称见表 1。

表 1 供试菌株一览表

菌群	种名	菌株号	来源	寄主
已知菌	<i>Rhizobium. leguminos</i>	U SDA 2370 <sup>T</sup>	美国	<i>Pisum sativum</i>
	<i>R. mongolense</i>	U SDA 1844 <sup>T</sup>	美国农业部	<i>Medicago ruthenica</i>
	<i>R. giardinii</i>	U SDA 2914 <sup>T</sup> (H 152)	美国农业部	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. gallicum</i>	U SDA 2910 <sup>T</sup> (R 602)	美国农业部	<i>Ph. vulgaris</i>
	<i>R. etli</i>	CFN 42 <sup>T</sup>	巴西菌种保藏中心	<i>Ph. vulgaris</i>
	<i>R. galegae</i>	HAMB I540 <sup>T</sup>	芬兰	<i>Galega orientalis</i>
	<i>R. tropici</i>	C I A T 899 <sup>T</sup>	美国	<i>Ph. vulgaris</i>
	<i>R. hainanense</i>	CCBAU 57015 <sup>T</sup> (I66)	中国海南	<i>Oesmodium sinuatum</i>
	<i>Sinorhizobium. fredii</i>	U SDA 205 <sup>T</sup>	中国河南	<i>Glycine soja</i>
	<i>S. medicae</i>	U SDA 1037 <sup>T</sup> (A 321)	美国农业部	<i>Medicago</i> spp. (annual)
	<i>S. teranga</i>	U SDA 4101 <sup>T</sup>	塞内加尔	<i>Acaia laeta</i>
	<i>S. Saheli</i>	U SDA 4102 <sup>T</sup>	美国农业部	<i>Sesbania cannabine</i>
	<i>S. meliloti</i>	U SDA 1002 <sup>T</sup>	美国	<i>Medicago sativa</i>
	<i>Mesorhizobium. huakuii</i>	CCBAU 2609 <sup>T</sup>	中国南京	<i>Stragalus sinicus</i>
	<i>M. loti</i>	N Z P 2213 <sup>T</sup>	新西兰	<i>Lotus corniculatus</i>
	<i>M. tianshanense</i>	CCBAU 3306 <sup>T</sup> (A B S)	中国新疆	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
	<i>M. ciceri</i>	3383 <sup>T</sup>	美国农业部	<i>Ciceri arietinum</i> L.
菌群	菌株号		寄主	
未知菌				
菌群 1	XJ96060, XJ96070, XJ96073, XJ96068, XJ96061, XJ96065, XJ96062, XJ96071, XJ96069, XJ96086, XJ96097, XJ96100, XJ96067, XJ96090, XJ96103, XJ96095, XJ96483, XJ96077, XJ96310, XJ96489, XJ96542, XJ96552		<i>Medicago sativa</i>	
	XJ96322, XJ96342, XJ96394, XJ96420, XJ96382, XJ96700, XJ96328		<i>Melilotus</i> sp.	
菌群 2	XJ96075, XJ96092, XJ96099		<i>Medicago sativa</i>	
	XJ96318, XJ96321, XJ96336, XJ96370, XJ96402, XJ96408		<i>Melilotus</i> sp.	
菌群 3 及其他	NM 019, NM 063, NM 062, NM 178, XJ96113*, XJ96112*, XJ96124*, 锦鸡儿根瘤菌 XJ96827*, XJ96134*, XJ96811*, NM 020, NM 183, NM 218			

注: T 为模式菌株。菌株编号以 XJ 为首的均来自新疆,以 NM 为首的均来自内蒙古。

\*: 做数值分类,做 SDS-PAGE 分析时加入的菌株。

## 1.2 菌体培养

供试菌株经 YMA 斜面活化后,接种于 200 mL TY 培养液中振荡培养<sup>[9]</sup>。28 培养至对数中期,镜检,确定无杂菌污染后收集菌体。

## 1.3 菌体收集及 DNA 提取

将培养至对数中后期的菌株,  $5\ 000\ r\cdot m\ in^{-1}$ , 15 min, 4 离心收集。用  $1\times TES$  悬浮菌体, 同样条件下离心洗涤 3 次。DNA 提取: 主要参考文献[10~ 12]的方法。DNA 纯度要求  $A_{260}/A_{280}/A_{230} = 1.0/0.515/0.450$ , 浓度要求:  $A_{260} > 2.0$ 。

## 1.4 $T_m$ , G + C mol % 测定

将待测的 DNA 样品用  $0.1\times SSC$  适当稀释(使  $A_{260} = 0.2\sim 0.5$ ), 装入石英比色杯, 塞好带有测温探头的塞子, 另一只带塞子的石英杯装入  $0.1\times SSC$  作对照。固定波长在 260 nm, 迅速升温, 估计到开始变性前 3~ 5 , 停止升温, 稳定 3~ 5 min, 然后一度一度地升温, 升温速率以  $0.5\sim 1.0\ ^\circ m\ in^{-1}$  为适<sup>[11]</sup>, 记录每一温度值所对应的吸光度 ( $A_{260}$ ), 直至升温后吸光值不再增加为止。以 *Escherichia coli* K-12 菌株的  $T_m$  值作参比, 以消除温度误差及其他实验误差。用 Excel 5.0 以  $A_{260}-T$  (温度) 作出变性曲线求出  $T_m$  值。用 G + C % 的计算公式:

$$G + C\% = 51.2 + 2.08 \times [T_m(x) - T_m(K)]^{[13]}$$

式中,  $T_m(x)$  为待测菌的  $T_m$  值,  $T_m(K)$  为 *E. coli* K-12 的  $T_m$  值。

## 1.5 复性速率法测定 DNA 样品的同源性<sup>[14]</sup>

用注射器抽吸法把 DNA 样品剪切为  $2\sim 5\times 10^5$  dD 之间小片段。用  $0.1\times SSC$  准确配制成  $A_{260} = 1.5\sim 2.0$  范围内的某一吸光值。分别取经剪切过的待测 DNA 样品(A, B)各 2 mL 分别装在 2 只试管里, 再取 A, B 各 1 mL 装在同一只试管里混匀为样品 M。A, B, M 3 个样品测试前分别置沸水浴中变性 15 min, 用预热的吸管吸取  $10\times SSC$  0.475 mL 分别加入上述变性样品中, 使其终浓度为  $2\times SSC$ , 稍加混匀, 继续变性 5 min, 立即上样。打开分光光度计, 校正仪器, 固定波长在 260 nm。打开控温仪, 预热盛有  $2\times SSC$  的比色杯, 使溶液温度稳定在最适温度( $T_{or}$ )。  $T_{or}$  值的计算公式<sup>[14]</sup>:  $T_{or} = 47.0 + 0.51 \times (G + C\%)$ 。待达到  $T_{or}$  值后, 留下一个盛有  $2\times SSC$  的比色杯作对照, 迅速弃去其余比色杯的  $2\times SSC$  溶液, 装入已变性好的 DNA 样品, 当溶液温度降到  $T_{or}$  值时, 开始记录相应的吸光度, 以此为零, 每隔 3 min, 取一次  $A_{260}$  值, 反应进行到非线性区域停止记录。一般线性区域在 0~ 45 min 范围内, 0~ 30 min 为测量段。用 Excel 5.0 以  $A_{260}-t$  (时间) 作复性趋势直线, 得直线的回归方程, 求得直线斜率, 取其绝对值即为 DNA 的复性速率(通常以  $V$  表示)。DNA 同源性(H), 据 De ley 等(1970)<sup>[13]</sup> 公式计算:

$$H = \frac{4V_m - (V_A + V_B)}{2\sqrt{V_A \times V_B}} \times 100\%$$

其中  $V_A, V_B, V_m$  分别表示样品 A, B, M 的复性速率, 在一般情况下,  $V_A$  或  $V_B > V_m > (V_A + V_B)/4$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的 $T_m$ 值, G + C mol % 及与相应中心菌株的 DNA-DNA 杂交同源性(表 2)

群 1 的  $T_m$  值在 76.0~ 79.2 之间, 其变化 ( $\Delta T_m$ ) 为 3.2 , 小于 5 。 DNA 的 G +

Cmol% 在 60.3% ~ 62.9% 之间, 属于快生型根瘤菌的范围(59% ~ 64%)。另外, 这一群的  $\Delta G + Cmol\%$  变化为 2.6%, 符合种内  $\Delta G + Cmol\% \leq 3\%$  的标准<sup>[15]</sup>。从 DNA-DNA 杂交分析可以看出: DNA-DNA 杂交结果在 71.7% ~ 97.6% 之间, 群内同源性大于 70%, 符合种内水平。

表 2 菌株的  $T_m$  值, G+ Cmol% 及与相应中心菌株的 DNA-DNA 杂交同源性(H) %

菌群	菌株	$T_m$ ( )	G+ Cmol%	H, %	菌群	菌株	$T_m$ ( )	G+ Cmol%	H, %
群 1	XJ96060	79.0	61.6	100	群 2	XJ96408	78.3	61.6	100
	XJ96483	78.4	62.7	97.6		XJ96370	78.4	62.4	98.7
	XJ96552	77.2	61.9	97.4		XJ96099	78.2	59.9	95.8
	XJ96065	79.0	60.4	96.4		XJ96318	78.0	61.6	92.8
	XJ96086	76.8	61.2	94.1		XJ96075	78.8	62.4	92.3
	XJ96322	77.6	61.7	92.5		XJ96321	78.1	62.4	89.9
	XJ96489	79.1	61.8	91.0		XJ96420	77.5	60.5	87.3
	XJ96062	79.2	60.5	90.4		XJ96336	76.0	60.4	81.5
	XJ96382	79.1	61.8	89.7	XJ96092	78.0	59.7	80.8	
	XJ96328	78.1	60.7	89.6	群 3 及其他锦鸡儿根瘤菌				
	XJ96342	78.0	60.5	89.1		NM 019	76.9	60.2	100
	XJ96077	78.1	60.7	88.4		NM 020	77.0	62.2	72.9
	XJ96061	77.5	60.7	88.1		NM 062	79.1	61.8	82.7
	XJ96420	77.2	60.9	86.4		NM 063	79.5	62.6	86.9
	XJ96068	76.2	61.8	86.4		NM 178	77.4	62.1	74.1
	XJ96700	77.5	61.7	85.4		NM 183	77.9	64.1	60.0
	XJ96070	79.0	61.6	83.2		NM 218	76.3	62.0	62.9
	XJ96097	76.2	60.3	81.4		XJ96112	77.6	63.5	56.6
	XJ96067	79.0	61.6	81.3		XJ96113	75.0	60.3	54.9
	XJ96542	76.1	60.6	81.2		XJ96124	77.0	60.2	62.2
XJ96100	79.0	61.5	80.2	XJ96134		75.0	61.3	56.2	
XJ96090	76.5	61.4	80.1	XJ96811	75.0	59.3	64.0		
XJ96310	76.0	61.4	77.8	XJ96827	77.2	62.7	66.5		
XJ96103	78.0	60.5	77.4						
XJ96394	77.4	62.9	75.6						
XJ96069	79.0	61.6	75.1						
XJ96073	79.0	61.6	73.6						
XJ96071	79.1	61.8	73.5						
XJ96095	77.5	60.5	71.7						

群 2 内菌株的  $T_m$  在 76.0 ~ 78.8 之间,  $\Delta T_m$  为 2.8, 小于 5。菌株的 G+ Cmol% 在 59.7% ~ 62.4% 之间, 属于快生型根瘤菌的范围(59% ~ 64%),  $\Delta G + Cmol\%$  为 2.7%, 符合种内  $\Delta G + Cmol\% \leq 3\%$  的标准。从 DNA-DNA 杂交分析可以看出: DNA-DNA 杂交结果在 80.8% ~ 98.7% 之间, 群内同源性大于 70%, 为同种水平。

NM 019, NM 062, NM 063 数值分类中在 85% 的相似水平上聚为一群(群 3), 这 3 株菌的  $T_m$  分别为 76.9, 79.1, 79.5,  $\Delta T_m$  为 2.6, 小于 5。G+ Cmol% 分别为 60.2%, 61.8%, 62.6%, 属于快生型根瘤菌的范围(59% ~ 64%),  $\Delta G + Cmol\%$  为 2.4%, 符合种内  $\Delta G + Cmol\% \leq 3\%$  的标准。DNA-DNA 杂交结果为 82.7%, 86.9%, 群内同源性大于 70%。为了进一步研究分自同一属寄生锦鸡儿根瘤菌和群 3 菌株的亲源关系, 我们把其他数值分类中在

85%的相似水平上未聚入群3锦鸡儿根瘤菌菌株和SDS-PAGE全细胞蛋白分析加入的锦鸡儿根瘤菌一起与群3的中心株NM 019进行了DNA杂交分析。结果表明:NM 178在数值分类中在83%的相似水平上和群3聚群,在SDS-PAGE全细胞蛋白分析中在69%的相似水平上与NM 019聚群,此菌株的 $T_m$ 为77.4, G+Cmol%为62.1%,与NM 019的DNA-DNA杂交值为74.1%,可认为此菌株也属于群3 DNA-DNA杂交同源群。NM 020, NM 183和NM 218在数值分类中在75%的相似水平上和NM 019聚群,在SDS-PAGE全细胞蛋白分析中在69%的相似水平上与NM 019聚群,这3菌株的 $T_m$ 分别为77.0, 77.9和76.3。G+Cmol%分别62.2%, 64.1%和62.0%,与NM 019的DNA-DNA杂交值为72.9%, 60.0%, 62.9%。可以认为NM 183, NM 218不属于群3 DNA-DNA杂交同源群,而NM 020属于群3 DNA-DNA杂交同源群。XJ96811, XJ96113, XJ96112, XJ96124, XJ96827, XJ96134在SDS-PAGE全细胞蛋白分析中在79%的相似水平上与NM 019聚群。这6菌株的 $T_m$ 分别为75.0, 75.0, 77.6, 77.0, 77.2, 75.0; G+Cmol%分别59.3%, 60.3%, 63.5%, 60.2%, 62.7%, 61.3%。其与NM 019的DNA-DNA杂交值分别为64.0%, 54.9%, 56.6%, 62.2%, 66.5%, 56.2%,均小于70%,不属于群3 DNA-DNA杂交同源群。可以看出从内蒙地区分离的7株锦鸡儿根瘤菌有5株菌的DNA同源性大于70%。而从新疆分离的6株锦鸡儿根瘤菌和NM 019的DNA同源性则较低,和群3不为一个DNA同源群。这说明从同一属寄主植物锦鸡儿分离的根瘤菌可能因生态条件的差异而表现其多样性。

## 2.2 部分已知种模式株的 $T_m$ 值, G+Cmol%及与新群中心株的DNA-DNA杂交分析(见表3)

表3 各新群中心菌株与已知种的DNA-DNA杂交同源性(H) %

模式株种名	菌号	$T_m$ (°C)	G+C mol%	与XJ96060 的H, %	与XJ96408 的H, %	与NM 019 的H, %
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	3383 <sup>T</sup>	78.8	60.3	0	0	24.1
<i>M. huakuii</i>	CCBAU 2609 <sup>T</sup>	78.6	60.7	13.2	5.8	20.1
<i>M. loti</i>	NZP2213 <sup>T</sup>	76.7	61.2	0	7.5	4.0
<i>M. tianshanense</i>	CCBAU 3306 <sup>T</sup> (A BS)	79.8	59.1	25.9	34.5	44.2
<i>Rhizobium hainanense</i>	CCBAU 57015 <sup>T</sup> (I66)	79.0	59.5	38.2	39.3	31.0
<i>R. galegae</i>	HAMB I540 <sup>T</sup>	79.1	59.5	41.7	16.0	33.8
<i>R. tropici</i>	CIA T 899 <sup>T</sup>	78.9	61.2	28.7	26.4	34.2
<i>R. mongolense</i>	USDA 1844 <sup>T</sup>	78.6	62.1	31.2	14.6	21.8
<i>R. etli</i>	CFN 42 <sup>T</sup>	79.0	60.4	36.9	21.3	39.7
<i>R. gallicum</i>	USDA 2910 <sup>T</sup> (R 602)	79.4	60.5	23.7	19.7	33.0
<i>R. giardinii</i>	USDA 2914 <sup>T</sup> (H 152)	77.5	59.7	35.9	21.5	22.6
<i>R. legum inosarum</i>	USDA 2370 <sup>T</sup>	79.5	60.4	26.8	18.5	44.7
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA 1002 <sup>T</sup>	77.3	62.7	28.7	22.6	14.4
<i>S. saheli</i>	USDA 4102 <sup>T</sup>	79.8	60.4	39.1	27.6	14.8
<i>S. fredii</i>	USDA 205 <sup>T</sup>	78.0	62.4	40.8	34.5	36.8
<i>S. medicae</i>	USDA 1037 <sup>T</sup> (A 321)	79.8	61.4	34.3	23.7	19.7
<i>S. teranga</i>	USDA 4101 <sup>T</sup>	79.0	59.8	20.6	28.5	29.6
群1	XJ96060	79.0	61.6	100	31.1	32.8
群2	XJ96408	78.3	61.6	31.1	100	27.9
群3	NM 019	76.9	60.2	12.9	25.6	100

注: 同源性小于等于0均以0表示; 同源性大于等于100均以100表示。

由表 3 可以看出, 已知种模式株的  $T_m$  值在 76.7~79.8 之间,  $G+Cmol\%$  在 59.1%~62.7% 之间。群 1 中心株与各模式株的 DNA-DNA 杂交值在 0~41.7% 之间, 其中与 *R. mongolense*, *S. meliloti*, *S. saheli*, *S. fredii*, *S. medicae*, *S. teranga* 模式株的 DNA-DNA 杂交值分别为 31.2%, 28.7%, 39.1%, 40.8%, 34.3% 和 20.6%; 群 2 中心株与各模式株的 DNA-DNA 杂交值在 0~39.3% 之间, 其中与 *R. mongolense*, *S. meliloti*, *S. saheli*, *S. fredii*, *S. medicae*, *S. teranga* 模式株的 DNA-DNA 杂交值分别为 14.6%, 22.6%, 27.6%, 34.5%, 23.7%, 28.5%。群 3 中心株与各模式株的 DNA-DNA 杂交值在 4.0%~44.7% 之间。

根据国际细菌学分类委员会的建议,  $\Delta T_m \leq 5$ , DNA-DNA 杂交同源性  $\geq 70\%$  为种的界线规定, 群 1 和 2 的菌株群内  $\Delta T_m \leq 5$ , DNA-DNA 杂交值  $\geq 70\%$ , 而其中心株与各模式株的 DNA-DNA 杂交值  $\geq 70\%$ , 因此可以确证群 1 和 2 是不同于已知种的 2 个新的 DNA-DNA 杂交同源群, 即新种群, 进一步深入研究可定新种。群 3 菌株 NM 019, NM 062, NM 063 的  $\Delta T_m$  为 2.6, 小于 5,  $\Delta G+Cmol\%$  为 2.4%, 符合种内  $\Delta G+Cmol\% \leq 3\%$  的标准。DNA-DNA 杂交群内同源性大于 70%, 其中心株 NM 019 与各模式株的 DNA-DNA 杂交值在 4.0%~44.7% 之间, 小于 70%, 但由于菌株数量较少, 还需进一步扩大菌株再研究。

长期以来, 一直认为根瘤菌分类与寄主密切相关, 从某一寄主或某些寄主分离的根瘤菌应该属于一个根瘤菌菌种。而从本研究的结果可以看出, 供试群 1 的 22 株苜蓿根瘤菌、7 株草木樨根瘤菌, 群 2 的 3 株苜蓿根瘤菌、6 株草木樨根瘤菌和 *S. meliloti*, *S. medicae*, *R. mongolense* 不是一个 DNA 同源群。群 3 的 3 株锦鸡儿根瘤菌和各已知种也不是同一个 DNA 同源群。从这些菌株的地理来源来看, 群 1 的 29 株菌有 17 株菌分离自吐鲁番干旱地区, 4 株菌分离自东湾山地, 8 株菌分离自石河子地区的沙湾, 乌兰乌苏。群 2 的 9 株菌有 3 株菌分离自吐鲁番干旱地区, 2 株菌分离自东湾山地, 4 株菌分离自石河子地区的沙湾, 乌兰乌苏。新疆吐鲁番地区海拔为 -95~ -76 m, 土壤酸碱度为 8.6~9.1, 最高温度 47.6, 年平均降水量为 16.4 mm, 年平均蒸发量为 3000 mm。东湾为一山区, 不宜农作物种植, 石河子地区的沙湾、乌兰乌苏等地过去为盐碱化较严重的地区。正是因为这种生态条件的差异而使得分离自该地区的苜蓿、草木樨根瘤菌表现出多样性。群 3 的 3 株菌分离自内蒙干旱地区, 而分离自新疆的 6 株锦鸡儿根瘤菌, 由于地理来源不同, 和群 3 也归不到一个 DNA 同源群。这些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也表现特异。这进一步证实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。

本研究的结果表明, 根瘤菌尤其是一些特殊生态环境下的豆科植物根瘤菌, 在遗传型上具有多样性, 对这类固氮生物资源的调查和分类研究对开发利用抗逆性菌株有重要的意义。

## 参 考 文 献

- 1 Chen Wenxin, Wang Entao, Wang Suying, et al Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp nov, a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(1): 153~ 159
- 2 Tan Zhiyuan, Xu Xiaodong, Wang Entao, et al Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(3): 874~ 879
- 3 Gao Weimin, Yang Shusheng A *Rhizobium* strain that nodules and fixes nitrogen in association with

- alfalfa and soybean plants *Microbiology*, 1995, 141: 1957~ 1962
- 4 Eardly B D, Hannaway D B, Bottomley P L J. Characterization of rhizobium from ineffective alfalfa nodules: ability to nodulate bean plants [*Phaseolus vulgaris* (L.) *savi*]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50: 1422~ 1427
  - 5 Eardly B D, Young J P W, Selander R K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp strain or191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, base on partial sequence of the 16sRNA and *nifH* genes *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 1809~ 1815
  - 6 Eardly B D, Materon L A, Smith N H, et al Genetic structure of natural population of the nitrogen-fixing bacterium *M. elioti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 56: 187~ 194
  - 7 Rome S, Fernandez M P, Brunel B, et al *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46(4): 972~ 980
  - 8 Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H, et al Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulation bacteria *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41: 582~ 587
  - 9 Chen H K, Shu M K. Nodule on the rootnodule bacteria of *Alfalfa sinensis* L. *Soil Sci*, 1944, 58: 291~ 293
  - 10 Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms *Mol Biol*, 1961, 3: 208~ 218
  - 11 Johnson J L. Determination of DNA base composition, DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acid *Methods Microbiology*, 1985, 18: 1~ 74
  - 12 林万明 细菌DNA中G+C%含量测定和核酸分子在细菌分类鉴定中的应用 见:程光胜,朱厚础,周方编著 分析微生物学专辑 北京:科学出版社 1988, 88~ 89
  - 13 De Ley, Cattoir J H, Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates *Eur J Biochem*, 1970, 12: 133~ 142
  - 14 Gillis M. The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation rates *Eur J Biochem*, 1970, 12: 143~ 153
  - 15 Stackebrandt E, Liesack W. Nucleic acid and classification. In: Goodfellow M, Donnell A G O, eds *Handbook of new bacterial systematics* London: Academic Press Ltd, 1993, 151~ 194