

宁夏沙坡头地区根瘤菌特性分析

I. 数值分类研究

李颖 阮小超* 陈文新

(中国农业大学生物学院,北京 100094)

摘要: 本实验分析了分离自宁夏沙坡头地区的 20 株根瘤菌和 26 株参比菌的 125 项生理生化性状,经数值分类表明,全部供试菌株在 84% 相似性水平上分为 12 个亚群,未知菌与各已知菌群差异明显,其中 13 个菌株分别组成 3 个亚群,其分类地位有待于进一步分析确定。

关键词: 根瘤菌; 数值分类

中图分类号: Q939; Q19

沙坡头位于宁夏中卫县境内,在植物地理分区上属于泛北植物区荒漠植物亚区的中亚东部之西、南部蒙古亚地区。这里具有典型的亚洲中部温带荒漠气候特征。在沙坡头地区的 79 科 590 种植物中,豆科植物的数量位居第四,占全部植物的 9.5%,它们在此地区的农业生产、土壤改良及防风固沙中起着重要作用。为充分了解沙漠地区根瘤菌资源,新疆协作组王卫卫等^[1]对沙坡头地区共生固氮资源进行了调查及根瘤样品室内分析,除新发现未见记载的能结瘤豆科植物 15 种外,还发现由于该地区的豆科植物多数从外地引种,加之气候干燥,沙土贫瘠,生态环境复杂,豆科植物自然结瘤率虽为 94.1%,但根瘤的固氮活性普遍不高。栽培时间短,水分条件差可能是沙坡头地区豆科植物共生固氮体系效能低下的主要原因。目前我国面临着大片土地荒漠化的危险,特别是西北地区,风沙大,且干旱少雨,大量种植培育旱生植物尤为重要。一些耐旱的豆科植物可在沙坡头地区顽强地生存下来,逐步适应了恶劣的环境,已被根瘤菌侵染且具有固氮活性,这无疑良好的自然资源。为提高沙坡头地区豆科植物共生体系的固氮效能,我们对此地区根瘤菌特性进行分析,除测定其形态、生理生化等表观性状外,还将逐步对它们的遗传性状进行分析,以便对其分类地位作出恰当的判断。

1 材料与方法

1.1 数值分类研究

1.1.1 材料 选取沙坡头地区新分离的未知根瘤菌 20 株、海南快生根瘤菌 3 株及其他参比菌 23 株,菌株名称、寄主名、菌株来源等信息见表 1 和表 2,未知菌由王卫卫等提供。

1.1.2 方法

①按李颖^[2]选取的性状,对菌株进行唯一碳源的利用、唯一氮源的利用、对抗生素

收稿日期: 1995-09-08

本研究得到国家自然科学基金重点资助。

* 现在中国农学会工作

表1 供试参比菌株一览表

Table 1 List of the reference strains

序号 No.	菌号 Strain No.	菌名 Strain name	来源 Source
1	NZP2213 ^T	<i>Rhizobium loti</i>	新西兰
2	NZP2227	<i>R. loti</i>	新西兰
3	NZP2234	<i>R. loti</i>	新西兰
4	H1	<i>R. meliloti</i>	黑龙江
5	USDA1002 ^T	<i>R. meliloti</i>	美国
6	102F28	<i>R. meliloti</i>	美国
7	USDA2370 ^T	<i>R. leguminosarum</i>	美国
8	162X68	<i>R. leguminosarum</i>	美国
9	127K17	<i>R. leguminosarum</i>	美国
10	BR853	<i>R. tropici</i>	巴西
11	CIAT899 ^T	<i>R. tropici</i>	巴西
12	HAMBI540 ^T	<i>R. galegae</i>	芬兰
13	HAMBI503	<i>R. galegae</i>	芬兰
14	A106	<i>R. huakuii</i>	湖北
15	CCBAU2609 ^T	<i>R. huakuii</i>	南京
16	USDA205 ^T	<i>R. fredii</i>	河南
17	2048	<i>R. fredii</i>	辽宁
18	USDA6 ^T	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	美国
19	B15	<i>B. japonicum</i>	辽宁
20	SEMIA566	<i>B. japonicum</i>	巴西
21	A1BS ^T	<i>R. tianshanenses</i>	新疆
22	6	<i>R. tianshanenses</i>	新疆
23	91X01	<i>R. tianshanenses</i>	新疆
24	112	<i>Rhizobium</i> sp.	海南
25	166	<i>Rhizobium</i> sp.	海南
26	H14	<i>Rhizobium</i> sp.	海南

T: 模式菌株 (Type strain)

和染料的抗性、初始生长温度和 pH 范围、石蕊牛奶反应及几种酶的活性等项分别测试, 具体方法按参考文献[3, 4]。

②将实验结果逐一记录。在所测试的130项性状中, 除5项为全同须去除外, 其余125项按正反应为“1”, 负反应为“0”的原则, 以菌株为行, 性状为列组合排列成46×125的数据矩阵。

③在长城286微机上, 用中科院微生物所编制的MINTS软件进行分析, 包括a: 以简单匹配系数(Ssm)计算菌株间的相似性; b: 以平均连锁(UPGMA)的方式聚类, 系统自动绘出树状谱; c: 以最大平均数法计算出未知菌群的中心菌株, 并找出未知菌群的鉴别特征。

1.2 未知菌群内中心菌株的形态观察 选取中心菌株(编号为N220)及与其亲缘关系较近的菌株(编号为N218), 分别在YMA斜面上活化3次, 每次培养18~24h, 观察前滴加适量无菌水, 28℃温箱中使菌体自然飘浮30min, 然后按文献^[5]介绍的负染法染色, 置JEM-100CX型透射电镜下观察并拍照。

表2 供试未知菌株一览表

Table 2 List of the unknown strains

序号 No.	菌号 Strain No.	寄主 Host	来源 Source
27	N169	<i>Vicia faba</i> 蚕豆	宁夏沙坡头
28	N181	<i>Glycyrrhiza</i> sp. 甘草	宁夏沙坡头
29	N182	<i>Glycine max</i> 大豆	宁夏沙坡头
30	N185	<i>Sophora japonica</i> 国槐	宁夏沙坡头
31	N186	<i>S. japonica</i> 国槐	宁夏沙坡头
32	N189	<i>Caragana korshinskii</i> 柠条锦鸡儿	宁夏沙坡头
33	N191	<i>C. erinecea</i> 川西锦鸡儿	宁夏沙坡头
34	N196	<i>C. kansuensis</i> 甘肃锦鸡儿	宁夏沙坡头
35	N197	<i>C. arborens</i> 树锦鸡儿	宁夏沙坡头
36	N202	<i>C. acanthophylla</i> 刺叶锦鸡儿	宁夏沙坡头
37	N206	<i>Amorpha fruticosa</i> 紫穗槐	宁夏沙坡头
38	N207	<i>Hedysarum scoparium</i> 花棒	宁夏沙坡头
39	N210	<i>C. rosea</i> 红花锦鸡儿	宁夏沙坡头
40	N218	<i>S. alopecuroides</i> 苦豆子	宁夏沙坡头
41	N220	<i>Glycyrrhiza aspera</i> 粗毛甘草	宁夏沙坡头
42	N232	<i>Medicago lupulina</i> 天蓝苜蓿	宁夏沙坡头
43	N242	<i>M. sativa</i> 紫花苜蓿	宁夏固原
44	N244	<i>M. lupulina</i> 天蓝苜蓿	宁夏固原
45	N245	<i>V. sepium</i> 野豌豆	宁夏固原
46	N247	<i>Astragalus</i> sp. 黄芪	宁夏固原

2 结果与讨论

①46株根瘤菌经聚类分析得出树状谱(图1),全部菌株在60%的相似性水平上分为两群,群1为43株快生菌(*Rhizobium*),群2为3株慢生菌(*Bradyrhizobium*);在84%相似性水平上群1又分为11个亚群。1,2,3,4,5,6,8亚群内,各种已知参比菌按其亲缘关系的远近明显分开,它们依次为*R. loti*, *R. tianshanense*, *R. meliloti*, *R. huakuii*, *R. fredii*, *R. leguminosarum*, *R. tropici*;第7亚群为两株未知菌,它们是N181(寄主为甘草)和N185(寄主为国槐),第9亚群内,两株*R. galegae*(HAMBI503, HAMBI540)和分离自海南的3株快生根瘤菌(I66, H14, I12)相聚,海南快生根瘤菌曾做过研究^[3],在谭志远等^[6]的分析中,它们与*R. tropici*关系较密切。大部分未知菌(13株)在80%的相似性水平上相聚,在84%相似性水平上又可将它们分为两个亚群(第10,11亚群),7株聚为第10亚群,包括: N189(寄主为柠条锦鸡儿)、N191(寄主为川西锦鸡儿)、N218(寄主为苦豆子)、N220(寄主为粗毛甘草)、N247(寄主为黄芪)、N207(寄主为花棒)、N196(寄主为甘肃锦鸡儿);第11亚群有N210(寄主为红花锦鸡儿)、N232(寄主为天蓝苜蓿)、N242(寄主为紫花苜蓿)、N245(寄主为野豌豆)。此外,七株未知菌N182(寄主为大豆)、N197(寄主为树锦鸡儿)、N202(寄主为刺叶锦鸡儿)、N169(寄主为蚕豆)、N186(寄主为国槐)、N244(寄主为天蓝苜蓿)、N206(寄主为紫穗槐)未能与任何亚群相聚。

②表3列出了第10亚群与供试参比菌(*Rhizobium*)的鉴别特征。此亚群具有利用半乳糖醇、乙酸钠、木糖和不能利用苹果酸钠作为唯一碳源而生长等特性,与已知根瘤菌属

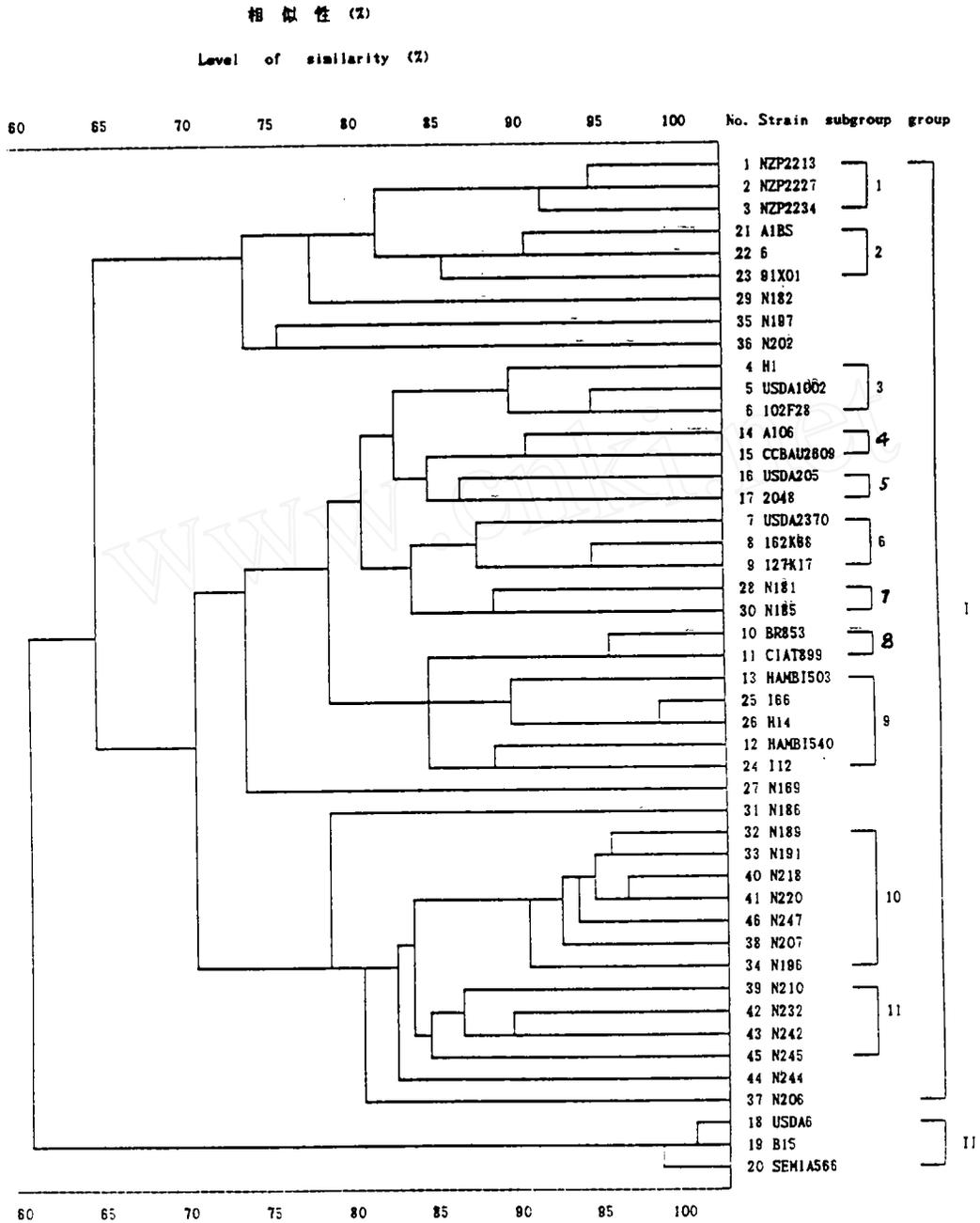


图1 宁夏沙坡头地区瘤菌数值分类树状谱

Fig. 1 The dendrogram showing the relationships among rhizobia isolated from Shapotou region in Ningxia autonomos region and reference strains

(*Rhizobium*) 的各个种群不尽相同。它们分别来自不同的寄主, 但却紧密相聚, 这很可能与共处的生态环境有关。以往的研究结果^[6]也曾证明, 影响根瘤菌与其寄主植物共生固氮

表3 第10亚群与 *Rhizobium* 各种的鉴别特征Table 3 Distinctive features of the *Rhizobium* species and subgroup 10

性状 Characters	<i>R. loti</i>	<i>R. tian</i>	<i>R. meli</i>	<i>R. hua</i>	<i>R. fre</i>	<i>R. leg</i>	<i>R. tro</i>	<i>R. gale</i>	亚群10
碳源利用 Carbon source utilization									
D-阿拉伯糖 D-arabinose	—	—	—	+	—	d	+	d	+
半乳糖醇 Dulcitol	—	d	—	—	—	—	—	d	+
乳糖 Lactose	—	d	—	—	—	+	+	+	+
苹果酸钠 Sodium malate	+	d	d	+	+	+	+	+	—
鼠李糖 Rhamnose	—	—	+	d	d	+	+	+	+
D-核糖 D-ribose	—	—	—	—	—	+	+	d	+
乙酸钠 Sodium acetate	—	—	—	—	—	—	—	—	+
柠檬酸钠 Sodium citrate	—	—	—	+	+	d	+	+	+
丁香酸 Syringic acid	—	d	—	+	—	—	—	—	—
香草酸 Vanillic acid	—	—	+	+	+	+	+	+	—
木糖 Xylose	—	—	d	—	—	—	—	—	+
DL-脯氨酸 DL-proline	d	—	+	—	d	d	—	—	+
氮源利用 Nitrogen source utilization									
甘氨酸 Glycine	—	d	+	+	+	d	d	+	+
抗生素抗性 Tolerance of antibiotic									
红霉素 Erythromycin (5 μ g·mL ⁻¹)	—	+	+	—	—	—	—	d	+

+: 95% 以上的菌株为正反应 at least 95% of the strains are positive,

—: 95% 以上菌株为负反应 at least 95% of the strains are negative,

d: 介于两者之间 less than 95% but more than 5% of the strains are positive or negative.

R. tian; *R. tianshanenses*; *R. meli*; *R. meliloti*; *R. hua*; *R. huakuii*; *R. fre*; *R. fredii*;

R. leg; *R. leguminosarum*; *R. tro*; *R. tropici*; *R. gal*; *R. galegae*.

的因素十分复杂,除了两者原有的遗传因素外,生态环境也有可能成为生物生存的重要调节因素,在沙坡头的这种特殊的生境中,不论是根瘤菌还是它们的寄主,均经自然选择,不断适应了干旱气候,出现了新的特征,如比较耐盐碱和高温,反映出它们与已知菌群在生活习性上的具体差异。苜蓿、大豆根瘤菌早已分别确定了它们的分类地位,最近,分离自新疆的锦鸡儿、甘草、苦豆子等植物的根瘤菌也被定名为 *R. tianshanense*^[7],从实验聚类分析的结果看出,没有一株未知菌聚在已知菌群内,从而说明,来自相同寄主但不同生态环境的菌株,确定其分类地位比较复杂,生境相同但来自不同寄主的菌株也许会在生理代谢上产生一致的性状。沙坡头地区根瘤菌很有可能出现新种群,尚需通过 DNA-DNA 杂交、16SrRNA 序列分析等实验进一步证明。

③以最大平均数法确定第 10 亚群的中心株为 N220,此亚群的根瘤菌为好氧、革兰氏染色阴性的无芽孢杆菌,经电镜观察,中心菌株和与其相似程度较高的菌株(N218)分别为周生鞭毛和单端极生鞭毛,菌体大小为 0.46~0.63 \times 1.08~1.33 μ m。菌株最适生长温度为 25~28 $^{\circ}$ C,其生长代时为 2~4 h,在 YMA 平板上培养 48 h 后,菌落直径可达 1.5~2.0 mm;全部菌株均可在 60 $^{\circ}$ C 高温处理 10 min 和 pH 10 的碱性条件以及含 4% NaCl 的培养

基上生长;淀粉、精氨酸不能作为其生长的唯一碳源,但可利用乙酸钠、柠檬酸钠、琥珀酸钠、DL-脯氨酸为唯一碳源而生长;次黄嘌呤、L-甲硫氨酸、L-胱氨酸等可作为唯一氮源而被利用;红霉素含量 $\geq 50 \mu\text{g/mL}$ 、卡那霉素含量 $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ 、氯霉素 $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ 和含量为0.1%的溴百里酚兰可抑制菌株生长;此亚群的菌株在温度 $\leq 10^\circ\text{C}$ 时均不能生长。

由于第7亚群和第11亚群的菌株较少,待增加菌株数量后再作详细分析。

数值分类对于菌株初步分群具有重要的参考价值。本实验运用最新选择的生理生化性状^[2]对沙坡头地区的根瘤菌进行数值分类分析,已知参比菌的聚类结果表明,在130项性状中,仅有5个因全同没有参加聚类,说明这些性状对于区别根瘤菌的不同菌群是可行的。

参 考 文 献

- 1 王卫卫等.沙坡头地区豆科植物共生固氮资源初步研究.干旱区研究,1994,11(4):13~18
- 2 李颖,牛天贵,陈文新.压缩根瘤菌分类属性空间的聚类方法研究.北京农业大学学报,1995,21(2):115~125
- 3 Gao J L, et al. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from hainan Province China. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(1): 151~158
- 4 White L O. The taxonomy of the crown gall organism agrobacterium tumefaciens and its relationship to rhizobia and other agrobacteria. J Gen Microbiol, 1972, 72: 565~574
- 5 黄立编.电子显微镜生物标本制备技术.江苏科学技术出版社,1982,217~220
- 6 谭志远等.黄土高原根瘤菌数值分类及DNA-DNA杂交.微生物学报,1995,35(3):223~228
- 7 Winxin Chen, 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

Characteristics of Rhizobia Isolated from Shapotou Region in Ningxia Autonomous Region of China

I. Study on Numerical Taxonomy

Li Ying Ruan Xiaochao Chen Wenxin
(College of Biology, CAU, Beijing 100094)

Abstract: Twenty rhizobia isolated from Shapotou region in Ningxia autonomous region and 26 reference species of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* were characterized by numerical taxonomy. The results based on 125 phenotypical features showed that all tested strains were divided into 12 subgroups at 84% similarity level. 13 new isolates were different from the reference strains and divided into 3 subgroups.

Key words: rhizobia; numerical taxonomy