

三叶草、猪屎豆和含羞草植物根瘤菌 16S rDNA PCR-RFLP 分析和数值分类研究

刘晓云^{1,2} 陈文新¹

(1. 中国农业大学 生物学院,北京 100094; 2. 西南林学院,昆明 650024)

摘要 采用 16S rDNA PCR-RFLP 分析和表型数值分类,对分离自三叶草(*Trifolium*)、猪屎豆(*Crotalaria*)和含羞草(*Mimosa*)3 属植物的根瘤菌进行了分类研究。16S rDNA PCR-RFLP 分析表明,在 80% 的相似性水平上,67 株待测菌株和 18 株参比菌株归属到慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)和根瘤菌属(*Rhizobium*)与中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)4 个系统发育分支。进一步对其中 56 株待测菌株和 14 株参比菌株进行表型性状数值分类研究,在 84% 的相似性水平上,得到 6 个独立的类群:群、和 为新群,没有与参比菌株聚在一起;群 包含慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*);群 含根瘤菌属(*Rhizobium*)2 个已知的代表菌株;群 含土壤杆菌属(*Agrobacterium*)2 个已知种的代表菌株。以上结果表明,分离自这 3 属植物的根瘤菌菌株具有表型和遗传型多样性,同时新发现分离自三叶草的根瘤菌的慢生和中慢生菌株;分离自含羞草的根瘤菌的慢生菌株和分离自猪屎豆的根瘤菌的快生菌株,此项研究也进一步证实这两种研究方法在菌株归群上的一致性。

关键词 根瘤菌; 16S rDNA PCR-RFLP 分析; 数值分类

中图分类号 Q 939.3

文章编号 1007-4333(2003)03-0001-06

文献标识码 A

16S rDNA PCR-RFLP analysis and numerical taxonomy for rhizobia Isolated from *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa*

Liu Xiaoyun^{1,2}, Chen Wenxin¹

(1. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Southwest Forestry, Kunming 650024, China)

Abstract Sixty-seven strains isolated from the root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* in comparison with 18 reference strains were analysed by 16S rDNA PCR-RFLP. At the similarity level of 80%, the examined strains were shown to belong to *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium*. The tested 56 strains and 14 reference strains were also studied by numerical taxonomy. Six clusters were formed at the similarity level of 84%, among which there are three new clusters, cluster, cluster and cluster, in which there are no recognized type strains. Cluster includes strain of *Bradyrhizobium japonicum*, cluster includes two type strains of species of *Rhizobium*, cluster might be *Agrobacterium*. The results showed that these examined strains distributed in many rhizobial genera, showing a great diversity of rhizobia symbioses with above mentioned legumes. We also discovered that slow growers and moderate slow growers of rhizobia form symbiosis with *Trifolium*, slow growers with *Mimosa* and fast growers with *Crotalaria*.

Key words rhizobia; 16S rDNA PCR-RFLP; numerical taxonomy

根瘤菌的现代分类采用多相分类方法,即采用多种分类技术对分类结果进行比较,获得各个分类结果的一致性,最终确定研究对象的分类地位。

16S rDNA PCR-RFLP 分析和表型特征数值分类用于对大量的根瘤菌菌株进行初步分群,种属关系及种的地位确定还需要做 16S rDNA 全序列分析和

收稿日期: 2002-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39730010)

作者简介: 刘晓云,博士研究生; 陈文新,中科院院士,教授,博士生导师,主要从事生物固氮与细菌分类研究, E-mail: wenxinchen@263.net

DNA-DNA 杂交及 G+C %mol 测定等研究。根瘤菌资源的不断挖掘和新技术的使用促进了根瘤菌分类的研究,已由 1984 年的 2 属 4 种增加到 2002 年的 7 属 34 种^[1]。

三叶草属 (*Trifolium*) 的白三叶 (*T. repens*) 是重要的豆科牧草,可作饲料、绿肥、堤岸防护草种、草坪以及蜜源和药材等用^[2]。猪屎豆属 (*Crotalaria*) 植物是重要的经济作物^[3],含有吡咯烷类生物碱 (pyrrolizidine alkaloids),不少种类可供药用,生物活性较强,又是较好的水土保持植物。含羞草属 (*Mimosa*) 植物可做覆盖植物^[4],有的种类全草可供药用。

本研究通过对车轴草属 (*Trifolium*)、猪屎豆属 (*Crotalaria*) 和含羞草属 (*Mimosa*) 3 属植物的根瘤菌 16S rDNA PCR-RFLP 分析和表型特征数值分类研究,初步划分了这 3 属植物根瘤菌的种群关系并确定其系统发育地位。

1 材料和方法

1.1 菌株

共选择待测菌株 67 株,参比菌株 18 株。待测菌株宿主为红三叶草 (*Trifolium pratense*)、白三叶草 (*T. repens*)、草莓三叶草 (*T. fragiferum*)、猪屎豆 (*Crotalaria pallida*)、含羞草 (*Mimosa pudica*) 和无刺含羞草 (*M. invisa*),分别采自江西、湖北、云南、安徽、四川和浙江等省。

1.2 16S rDNA PCR-RFLP 分析

DNA 的提取和 16S rDNA 的 PCR 扩增均参考文献^[5],选用 4 种限制性内切酶 Alu、Hae、Msp 和 Hinf,取适量 PCR 扩增产物分别用 4 种内切酶进行消化,消化产物在含 EB 的 3% 的琼脂糖凝胶板上水平电泳,电压为 150 V,时间为 3 h。4 种酶切电泳图谱在 UV 下检查、拍照。最后根据胶上的条带的有无,转换成“1”和“0”进行数值聚类,用简单匹配系数法 (Ssm) 计算各菌株间的相似性,平均连锁法 (UPGMA) 生成聚类树状图。

1.3 表型特征数值分类

进行表型特征聚类分析菌株共 70 株,其中待测菌株 56 株,参比菌株 15 株。共测定性状 128 个:

(1) 惟一碳源的利用,共测定了 45 种碳源:己二酸、D-苦杏仁苷、D-阿拉伯糖、D(+)-阿糖醇、葡萄糖酸钙、丙二酸钙、糊精、半乳糖醇、内消旋赤藓醇、果糖、D(+)-半乳糖、葡萄糖、肌醇、菊糖、乳糖、苹果酸钠、麦芽糖、D-甘露糖、松三

糖、密二糖、丙酮酸盐、棉子糖、鼠李糖、D-核糖、水杨苷、乙酸钠、柠檬酸钠、甲酸钠、马尿酸钠、琥珀酸钠、D-山梨糖醇、山梨糖、淀粉、蔗糖、丁香酸、酒石酸钠、海藻糖、香草酸、木糖、D-精氨酸、DL-天冬酰胺、甘氨酸、L-甲硫氨酸、DL-脯氨酸、L-苏氨酸。

(2) 惟一氮源的利用,共测定了 14 种含氮化合物: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、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-苏氨酸、D-缬氨酸。

(3) 对抗生素的抗性测定,对氨基青霉素、氯霉素、卡那霉素、新霉素、多粘霉素、红霉素和链霉素等 7 种抗生素,采用 5、50、100 和 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 4 种浓度测定。

(4) 对染料及化学药物的抗性测定:采用盐酸吡啶、俾士麦棕、溴百里酚蓝、刚果红、藻红、龙胆紫、亚甲蓝、甲基绿和中性红等 9 种染料和脱氧胆酸钠和亚硝酸钠 2 种化学药品。根据不同染料的溶解特性,将其溶解并加入 YMA 培养基中使终浓度为 0.1%。

其他为:(5) 耐盐性测定;(6) 耐酸碱性试验;(7) 生长温度范围测定;(8) 过氧化氢酶试验;(9) 脲酶测定;(10) L-苯丙氨酸脱氨酶测定;(11) 氧化酶测定;(12) BTB 产碱产碱反应;(13) 3-酮基乳糖的产生;(14) 石蕊牛奶反应;(15) 亚甲蓝还原反应;(16) 耐尔蓝还原反应;(17) 硝酸盐还原反应;(18) 肉汤生长反应试验。

测定方法均参考文献^[6];性状编码、聚类方法均按文献^[6]。平均连锁法聚类得出聚类分析树状图。

2 结果

2.1 16S rDNA PCR-RFLP 分析

85 株菌的菌号、宿主植物名称及 16S rDNA PCR-RFLP 分析聚类结果见图 1。

供试菌在 80% 的相似性水平上归属到 4 大群 (即系统发育分支) 中,除了 91X13 和 USDA194 以外,已知种的参比菌株均按各个属归群,群还可再分,亚群可作为初步划分的种群。

群的 25 株菌中有 22 株未知菌与参比菌株 USDA110、B15 和 USDA6 聚在一起,说明该群归属于慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 系统发育分支,测试菌株宿主来源于白三叶草、草莓三叶草、猪屎豆和含羞草 4 种植物。群内在 90% 的相似性水平上构成 4 个独立的亚群,亚群 1 和亚群 2 中有参比菌株,而亚群 3 和亚群 4 中没有参比菌株。

群的 28 株菌中 22 株未知菌与参比菌株 USDA2370、162K68、127K17、CFN42、2048 和 USDA205 聚

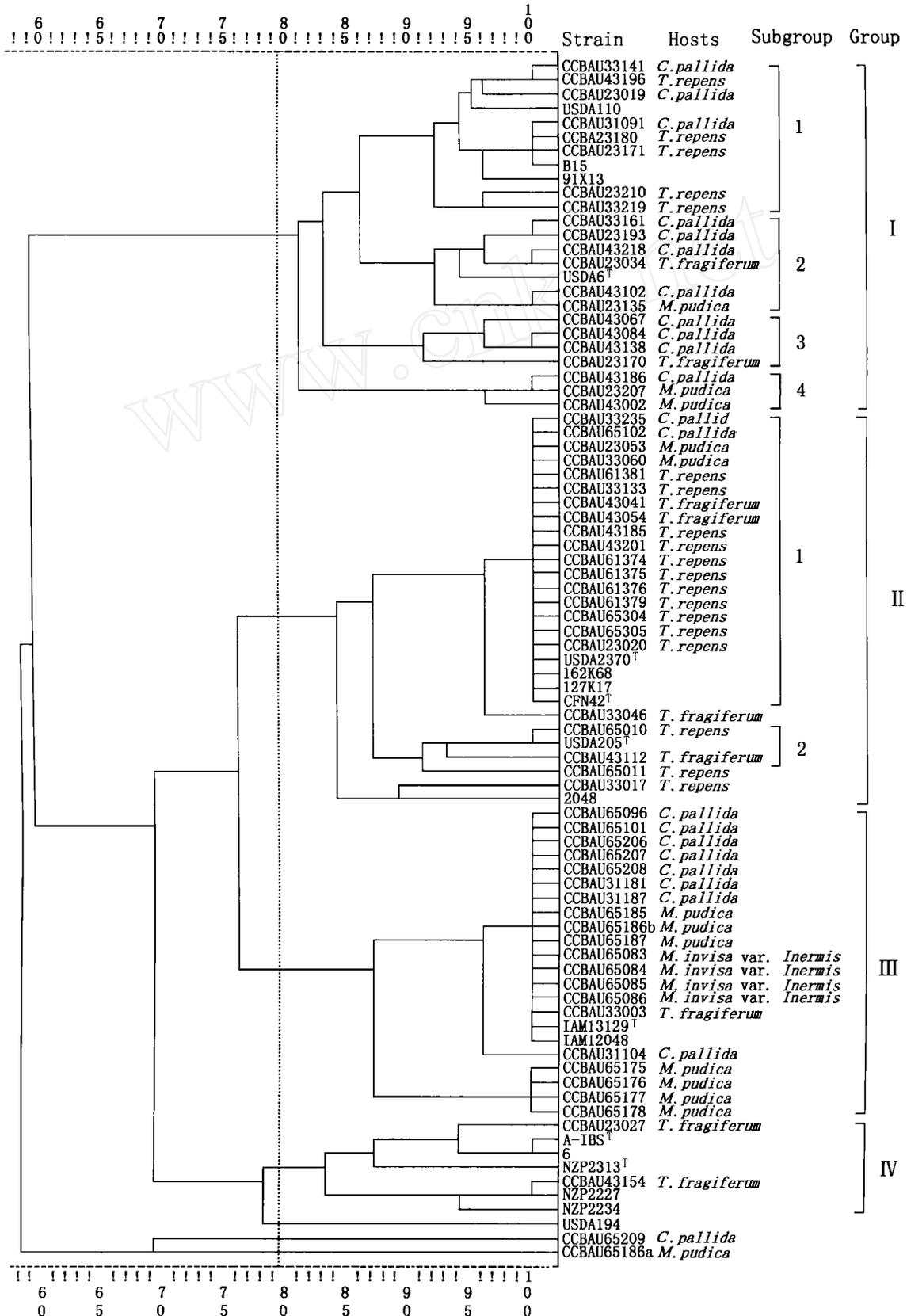


图 1 85 株根瘤菌的 16S rDNA PCR - RFLP 分析结果聚类树状图

Fig. 1 Dendrogram constructed based on 16S rRNA PCR-RFLP analysis

在一起,说明该群归属于根瘤菌属(*Rhizobium*)和中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)系统发育分支,测试菌株宿主也为白三叶草、草莓三叶草、猪屎豆和含羞草4种植物,群内在90%的相似性水平分为2个独立的亚群,亚群1为根瘤菌属系统发育分支,亚群2为中华根瘤菌属系统发育分支。其他2株菌未成群。

群有22株菌,未知菌与参比菌株 IAM13129 和 IAM12048 聚在一起,说明该群归属于土壤杆菌属(*Agrobacterium*)系统发育分支,测试菌株宿主为草莓三叶草、猪屎豆、含羞草和无刺含羞草。

群有7株菌,2株未知菌与参比菌株 A-1BS、6、ZP2213、NZP2227 和 NZP2234 聚在一起,说明该群归属于中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)系统发育分支,测试菌株宿主仅为草莓三叶草。

其余有2株菌 CCBAU65209 和 CCBAU65186a 在此相似性水平上未成群。以上属群划分的结果十分清楚,说明16S rDNA PCR-RFLP分析法是一种比较好的划分属群的方法。

2.2 数值分类

70株菌的菌号、宿主植物名称及表型性状聚类结果见图2。供试菌在80%相似性水平上分为6个主要类群。

群有6株菌,宿主为猪屎豆和草莓三叶草,其中没有参比菌株,与16S rDNA PCR-RFLP分析聚类结果群慢生根瘤菌的亚群3较一致,可能为一个新的分类单元。

群有7株菌,6株未知菌与参比菌株 USDA110 聚在一起,说明该群可能为慢生大豆根瘤菌种群,测试菌株宿主为白三叶草、猪屎豆和含羞草,该群也位于16S rDNA PCR-RFLP分析聚类结果群慢生根瘤菌属。

群有6株菌,4株未知菌与参比菌株 162K68 和 CFN42 聚在一起,测试菌株宿主仍为白三叶草、猪屎豆和含羞草,该群的菌株分散位于16S rDNA PCR-RFLP分析聚类结果的群根瘤菌属和中华根瘤菌属的亚群1。

群有4株菌株,宿主为白三叶草、草莓三叶草和含羞草,没有参比菌株,该群也位于16S rDNA PCR-RFLP分析聚类结果的群中的亚群1,可能为一个新的分类单元。

群有15株菌,12株未知菌与参比菌株 IAM13129 和 IAM12048 聚在一起,宿主为白三叶草、猪屎豆、含羞草和无刺含羞草,该群位于16S rDNA

PCR-RFLP分析聚类结果的群土壤杆菌属。

群有3株菌,宿主为白三叶草、草莓三叶草和猪屎豆,其中没有参比菌株,该群也位于16S rDNA PCR-RFLP分析聚类结果的群土壤杆菌属,可能为一个新的分类单元。其他29株菌在此相似水平上未成群。

3 讨论

本研究分离自三叶草的根瘤菌全部归群,分别归属于根瘤菌的3个系统发育分支,分别为快生根瘤菌属、中华根瘤菌属、中慢生根瘤菌属和慢生根瘤菌属系统发育分支;而分离自猪屎豆的根瘤菌分散于根瘤菌属和慢生根瘤菌属2个系统发育分支;分离自含羞草的根瘤菌也分散于根瘤菌属(*Rhizobium*)和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)。以上结果表明,三叶草、猪屎豆和含羞草这3属植物的根瘤菌存在很大的遗传多样性和表型多样性。

本研究新发现分离自三叶草的根瘤菌的慢生和中慢生菌株;分离自猪屎豆的根瘤菌的快生菌株和分离自含羞草的根瘤菌的慢生菌株。分离自三叶草的根瘤菌的研究资料不多,1974年,在《伯杰氏细菌鉴定手册》第8版中,确定为三叶草根瘤菌(*Rhizobium trifolii*),主要是以宿主范围为依据来对根瘤菌进行分类^[8]。1984年, Jordan 在《伯杰系统细菌学手册》^[9]中,根据 Graham 的数值分类结果将三叶草根瘤菌定为豌豆根瘤菌的1个生物型(*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*),近年对其分类研究未见新的报道。根据前人的研究,分离自猪屎豆的根瘤菌具有慢生和快生根瘤菌菌株^[10,11],至今分离自猪屎豆的根瘤菌只确定了1个种,为结瘤甲基杆菌(*Methylobacterium nodulans*)^[4],该种能利用甲醇生长,是目前报道惟一能与豆科植物结瘤的甲基杆菌属的种。目前对于分离自含羞草根瘤菌的分类研究不多,只确定了1个生物型 *R. etli* bv. *mimosae*^[12]。在今后的研究中,这3种植物根瘤菌的种属关系还有待进一步研究,对归于土壤杆菌(*Agrobacterium*)系统发育分支的菌株尚需要经过固氮基因(*nif*)或结瘤基因(*nod*)杂交和结瘤实验作进一步确认是否为根瘤菌。

16S rDNA PCR-RFLP分析一般用于根瘤菌属群的划分,而表型特征聚类分析一般用于种群的划分,从2种方法对这3种植物根瘤菌的属群和种群划分的结果,可以看出大多数的菌株归群是相互一

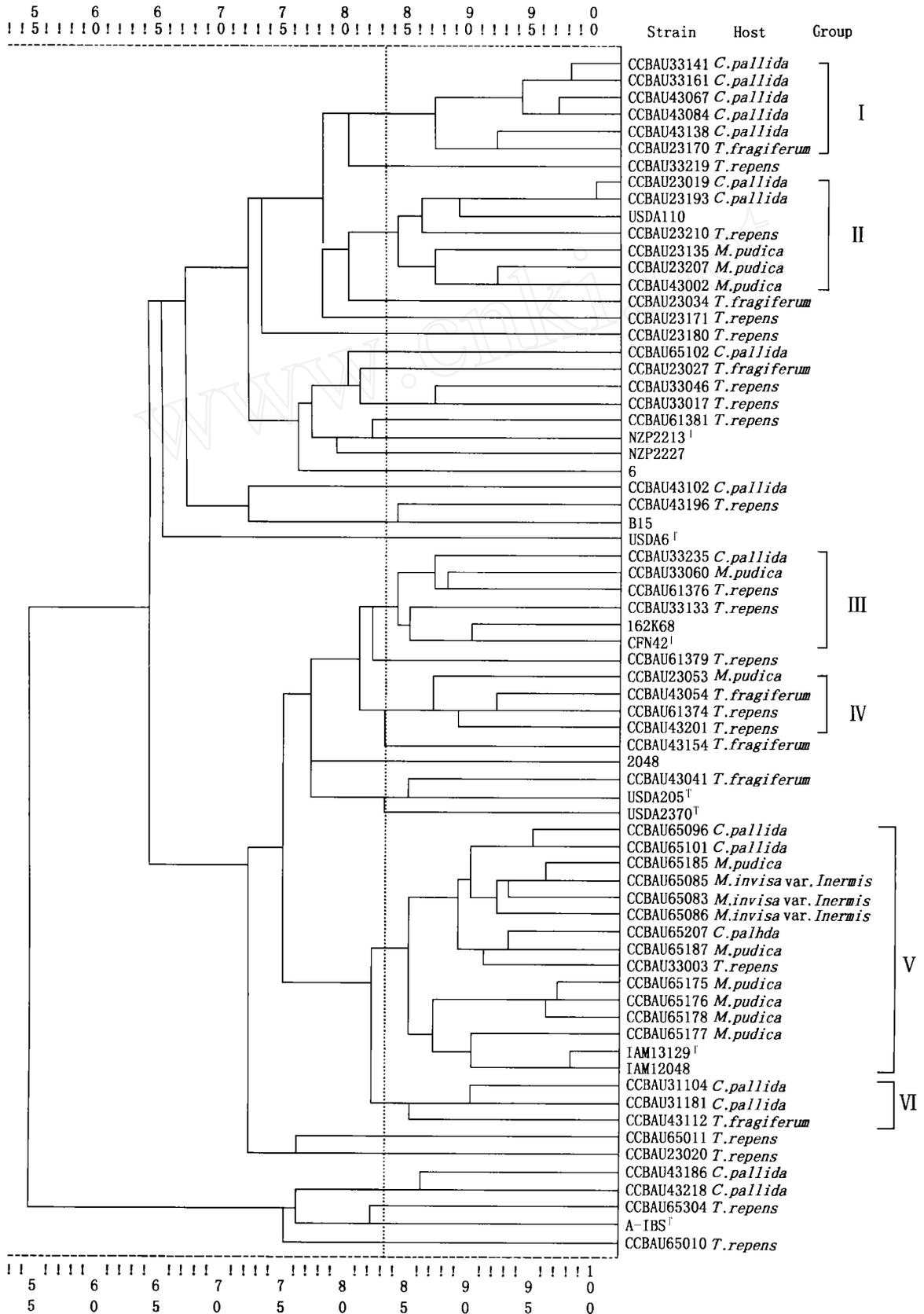


图 2 70 株根瘤菌的数值分类树状图

Fig. 2 Dendrogram showing the phenotypic similarities among the isolates and strains

致的。有些菌株,在16S rDNA PCR-RFLP分析中聚群而在数值分类中未聚群,这与2种方法存在的差异有关。表型特征的测定受菌株的生长和培养等条件影响,在不同的生长时期有不同的特征表现,因此要求在对数生长期取菌,以取得测定标准的一致性,但在实际操作中,不能达到完全一致;再者测定用的药品质量也直接影响结果的判断,在判断菌株是否生长也存在一些主观因素。而在16S rDNA PCR-RFLP分析中,由于供试菌株数量较大,酶切的电泳图谱受电压、电流的影响,条带会产生一些歪斜,在不同的凝胶板上,电泳迁移率不能达到完全一致,在比对各个菌株的相同分子量的条带时,会产生一些不可避免的误差,这些都影响结果的读取,因此需要采用其它方法对这些菌株做进一步研究。

对根瘤菌种群的划分与其宿主的关系,研究工作者非常重视。因为传统的分类是以宿主范围作为划分种群的依据。本研究以这3种植物根瘤菌的归群为依据,考察了根瘤菌种群的划分与宿主和根瘤菌采集地域的相互关系,发现它们三者之间并无直接关系,但是也存在一些问题值得思考。由16S rDNA PCR-RFLP分析结果来看,来自同一宿主植物的根瘤菌有的可归在同一类群,有的可归在不同的类群,三叶草根瘤菌分别归在3个类群中,含羞草根瘤菌归在2个类群中,猪屎豆根瘤菌也归在2个类群中;而来自不同宿主植物的根瘤菌可归在同一类群,如部分三叶草、猪屎豆和含羞草3种植物根瘤菌都归在慢生根瘤菌属。说明三叶草、猪屎豆和含羞草根瘤菌具有遗传多样性,同时说明根瘤菌种的划分与宿主没有专一关系。来自于江西、湖北、安徽、四川和浙江等5省的菌株,因生态条件差异不是很大,从分类结果分析看不出有什么大的影响,云南的根瘤菌菌株在归群上表现出一些特殊性,发现分离自云南的根瘤菌都有快生菌株,几乎没有慢生菌株,

是否与云南特殊的自然环境有关系,有待今后研究。

参 考 文 献

- [1] 刘晓云,陈文峰,陈文新. 根瘤菌的系统发育及其分类研究进展[J]. 微生物通报,2002,(5):73~76
- [2] 贾慎修,祝廷成,黄文惠,等. 中国饲用植物志[M]. 北京:农业出版社,1987,321~337
- [3] 崔鸿宾,张振万,徐即然,等. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1998,42:344~379
- [4] Sy A, Graud E, Jourand P, et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes[J]. J Bacteriol,2001,183:214~220
- [5] 陈德昭,吴德邻,陈邦余,等. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1988,39:15~16
- [6] 闫爱民,陈文新. 三个根瘤菌新亚群的16S rDNA PCR-RFLP分析[J]. 高技术通讯,1998,8:50~53
- [7] 陈文新,祁幼林,李季伦,等. 根瘤菌数值分类[J]. 微生物学报,1988,28:102~108
- [8] 布坎南 R E, 吉本斯 N E, 等编. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1974. 第八版
- [9] Jordan D C. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. 1984. 234~256
- [10] Samba R T, de Lajudie P, Gillis M, et al. Diversity of rhizobia nodulating *Crotalaria* spp. from Senegal[J]. Symbiosis, 1999,27:259~268
- [11] Doignon-Bourcie F, Willems A, Coopman R, et al. Genotypic Characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses[J]. Appl Envir Microbiol,2000,66:3987~3997
- [12] Wang E T, Rogel M A, Garcia-delos Sabtos A, et al. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*[J]. Int J Syst Bacteriol,1999,49:1479~1491