

某些野生豆科植物共生根瘤菌的分类研究¹

张 磊

程丽娟 朱铭莪

陈文新

(西南农业大学 重庆 630716)

(西北农业大学)

(中国农业大学)

摘要

对来自吉林、内蒙古、山西、陕西、宁夏、甘肃和四川七省区的主要以野豌豆、苜蓿、草木樨、胡枝子等野生豆科植物为寄主的60株根瘤菌进行了126个性状的数值分析聚类。在86%的表观相似性水平上,除23株菌外,其余菌株聚成5个类群。在此基础上做了各类群中心菌株与*R. leguminosarum*和*S. meliloti*两模式菌株的DNA分子杂交,结果与数值分析聚类相符。可初步确定群Ⅰ、Ⅳ归入*R. leguminosarum*中,群Ⅱ、Ⅲ归入*S. meliloti*中。群Ⅴ的5个菌株“3-酮基乳糖产生”阳性,中心菌株与两模式菌株DNA分子同源性低于种水平(70%)。

关键词 野生豆科植物;根瘤菌;数值分类;DNA分子杂交

野豌豆(*Vicia*)和野生苜蓿(*Medicago*)两属豆科植物分布广泛,包含多种重要的绿肥和牧草,所以它们的共生根瘤菌的分类研究就显得十分有意义。但由于种种原因,有关根瘤菌分类的研究多集中在大豆、菜豆、豌豆等农业经济作物的根瘤菌上,野豌豆和苜蓿野生种类的根瘤菌的分类研究较少,在一定程度上限制了这些野生资源的利用。

按照根瘤菌的传统分类体系,野豌豆的共生根瘤菌在分类上应归入*Rhizobium leguminosarum*(豌豆根瘤菌)。苜蓿、草木樨的共生根瘤菌应归入*Sinorhizobium meliloti*(苜蓿根瘤菌)中。但近年的研究表明,原*R. leguminosarum*存在很大异质性,已从中分出*R. tropici A*、*R. tropici B*和*R. etili*3个新种^[1,2]。分类地位变动不大的*S. meliloti*也不断有能在大豆、豌豆上越界结瘤的报道^[3,4],表明*S. meliloti*存在寄主多样性。本研究采用表型特征的数值分类与DNA分子杂交相结合的方法,对野豌豆和苜蓿野生种类的共生根瘤菌进行分类,初步探索其多样性。为了探索关系,本研究还适当地加入了有关的农作物及其他属野生豆科植物的共生根瘤菌。

1 材料和方法

1.1 供试菌株及其生境

见表1。

¹ 本研究为国家自然科学基金资助项目,批准号39130010。

表1 供试菌株及生境一览表

序号	供试菌株	寄主中文名	寄主学名	来源和生境(海拔高度:m)
1	NM029	大叶野豌豆	<i>Vicia pseudorobus</i> F.	呼和浩特
2	NM052	大叶野豌豆	<i>Vicia pseudorobus</i> F.	锡林浩特
3	J20	大叶野豌豆	<i>Vicia pseudorobus</i> F.	500-1100 针阔混交林
4	J136	大叶野豌豆	<i>Vicia pseudorobus</i> F.	500-1100 针阔混交林
5	SA365	野豌豆	<i>V. sepium</i> L.	陕南山区 2000
6	SA098	野豌豆	<i>V. sepium</i> L.	陕北干旱半干旱区
7	SA379	山野豌豆	<i>V. amoena</i> F.	陕南湿润山区
8	J135	山野豌豆	<i>V. amoena</i> F.	长白山针叶林, 1100-1350
9	NM119	山野豌豆	<i>V. amoena</i> F.	内蒙古大青山
10	NM002	长柔毛野豌豆	<i>V. villosa</i> Roth	呼和浩特
11	NM049	紫伦野豌豆	<i>V. geminiflora</i> Trautv.	锡林浩特
12	NM091	绵毛山野豌豆	<i>V. amoena</i> F. Var. <i>sericea</i> kitay	呼和浩特
13	NM100	绢毛山野豌豆	<i>V. amoena</i> F. Var. <i>sericea</i> kitay	呼和浩特
14	NM113	救荒野豌豆	<i>V. sativa</i> L.	呼和浩特
15	NM114	救荒野豌豆	<i>V. sativa</i> L.	呼和浩特
16	J131	广布野豌豆	<i>V. cracca</i> L.	吉林长白山 1350-1700 针叶林带
17	SA314	广布野豌豆	<i>V. cracca</i> L.	秦岭山脉 1000
18	SA381	广布野豌豆	<i>V. cracca</i> L.	陕南湿润盆地
19	SA384	蚕头菜	<i>V. unijuga</i> A. Br.	陕北山区 1600
20	Sz215	蚕头菜	<i>V. unijuga</i> A. Br.	陕北山区 2000
21	Sz275	蚕头菜	<i>V. unijuga</i> A. Br.	晋中 1700
22	Sz100	蚕豆	<i>V. faba</i> L.	秦岭山脉 2000
23	Sz305	宽苞野豌豆	<i>V. Latibracteolata</i> K. T. Fu	呼和浩特
24	NM009	豌豆	<i>Pisum sativum</i> L.	青藏高原东部
25	C215	豌豆	<i>Pisum sativum</i> L.	青藏高原东部
26	C246	豌豆	<i>Pisum sativum</i> L.	呼和浩特
27	NM112	家山黧豆	<i>Lathyrus sativus</i> L.	长白山湿地
28	J66	五脉山黧豆	<i>L. quinquenervius</i> (Miq.) Litv.	吉林长白山
29	J24	红三叶草	<i>Trifolium pratense</i>	吉林长白山
30	J109	红三叶草	<i>Trifolium pratense</i>	陕南湿润山区
31	SA356	扁豆	<i>Dolichos lablab</i> L.	陕南湿润山区
32	SA375	野大豆	<i>Glycine soja</i> sieb et Zucc.	陕北干旱半干旱区 900
33	Sh144	菜豆	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	陕北干旱半干旱区 1000
34	Sh181	菜豆	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	宁夏干旱半干旱区 1000
35	Sh197	菜豆	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	长白山脉
36	J122	菜豆	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	陕北干旱半干旱区 950
37	Sh140	黑豆	<i>P. mungo</i> L.	陕北干旱半干旱区 1000
38	Sh185	黑豆	<i>P. mungo</i> L.	陕北干旱半干旱区 1200
39	Sh223	黑豆	<i>P. mungo</i> L.	长白山脉
40	J1341	绿豆	<i>P. radiatus</i> L.	长白山脉
41	J1342	绿豆	<i>P. radiatus</i> L.	长白山脉
42	J153	绿豆	<i>P. radiatus</i> L.	长白山脉
43	Sh377	百脉根	<i>Lotus corniculatus</i> L.	秦岭山脉 1100
44	Sh362	紫云英	<i>Astragalus sinicus</i> L.	秦岭山脉 1750
45	Sh004	台欢	<i>Albizia Julibrissin</i> Durazz.	陕西中部 450
46	Sh3081	胡枝子	<i>Lepidodendron cylindrica</i> (Miq.)	秦岭山脉 1300
47	Sh3082	胡枝子	<i>Lepidodendron cylindrica</i> (Miq.)	秦岭山脉 1300
48	Sh055	达乌里胡枝子	<i>L. davurica</i> (Lam.) Schindl.	陕西中部干旱半干旱区 600
49	Sh002	小苜蓿	<i>Medicago minima</i> (L.) Grub.	陕西中部干旱半干旱区 500
50	Sh036	小苜蓿	<i>Medicago minima</i> (L.) Grub.	陕西中部干旱半干旱区 500
51	Sh009	苜蓿	<i>M. sativa</i> L.	陕西中部干旱半干旱区
52	Sh024	苜蓿	<i>M. sativa</i> L.	陕西中部干旱半干旱区
53	Sh011	天蓝苜蓿	<i>M. lupulina</i> L.	陕西中部干旱半干旱区
54	Sh114	天蓝苜蓿	<i>M. lupulina</i> L.	陕西北部干旱半干旱区
55	Sh237	天蓝苜蓿	<i>M. lupulina</i> L.	甘肃省庆阳地区 1300
56	Sh251	多型苜蓿	<i>M. polymorpha</i> L.	甘肃省西峰市 1250
57	Sh242	草木樨	<i>Melilotus suaveoleus</i> Ledeb.	甘肃省南部 1250
58	Sh019	草木樨	<i>M. suaveoleus</i> Ledeb.	陕西中部干旱半干旱区
59	Sh336	草木樨	<i>M. suaveoleus</i> Ledeb.	陕南湿润山区 1250
60	Sh089	白香草木樨	<i>M. album</i> Desr.	陕北干旱半干旱 1600
61	USDA1002	苜蓿	<i>Medicago sativa</i>	美 国
62	102-F28	苜蓿	<i>Medicago sativa</i>	美 国
63	USDA2370	野豌豆	<i>Viciae</i>	美 国
64	162X68	三叶草	<i>Trifolus</i>	美 国
65	127K17	菜豆	<i>Phaseoli</i>	美 国

注:(1)“Sh×××”表示来自陕、甘、宁的菌株, “NM×××”、“J×××”、“SX×××”、“C×××”分别表示来自内蒙古自治区、吉林省、山西省和四川省的菌株。

(2) USDA 1002 是 *S. meliloti* (苜蓿根瘤菌) 的模式菌株, 102-F28 为其参比菌株; USDA 2370 是 *R. leguminosarum* (豌豆根瘤菌) 的模式菌株, 162X68 和 127K17 为其参比菌株。菌株均存中国农业大学 CCBAU 菌库。

(3) 序号 1-30 菌株的寄主属于 *R. leguminosarum* 的正常寄生; 33-42 菌株的寄主均为 *Phaseolus* (菜豆属), 近来此属植物的共生根瘤菌已建立 3 个新种; 43-48 的菌株与其寄主所组成的共生体系国内外报道较少; 序号 49-60 各菌株的寄主属于 *S. meliloti* 的正常寄生。

1.2 方法

1.2.1 与豆科寄主或原寄主的回接试验

根瘤菌对豆科植物的共生关系有两个基本特性,一为感染力,即形成根瘤的能力,另一个是有效性,即共生固氮的能力。一个新分离的根瘤菌株为了最后确立其分类地位,必须在严格控制的条件下,回接到原寄主上,观察其感染力和有效性。本实验采用的方法是这样的:将供试根瘤菌原寄主或相关寄主的种子按一定方法处理种皮,再在0.1% $HgCl_2$ 中浸泡5分钟,无菌水洗净后发芽,小粒种子以试管水培,大粒种子用广口瓶水培,水培液为少氮培养液接种根瘤菌悬液。光照7000Lx(12小时/天),昼夜温差5~10℃。待现瘤且瘤呈粉红色,剪下根瘤称重,乙炔还原法测定固氮酶活性^[5]。

1.2.2 供试菌株的数值分析

1.2.2.1 供试菌株的表型性状测定 测定性状是根据中国农业大学生物学院根瘤菌分类工作室的根瘤菌数值分类数据库确定的,共126项,测定采用常规方法^[5]。

1.2.2.2 聚类方法和表观群中心菌株的确定 数据处理采用中科院微生物所的MINTS软件包^[5],根据中国农业大学生物固氮研究室的基础工作,在根瘤菌数值分类中,选用简单相似系数 S_{sm} 和平均连锁法最佳^[6],故在MINTS软件包中采用以上分析和聚类方式。数值分类的结果以树状图谱输出。根据树状图谱确定表观群,各表观群所有菌株中具有最大平均相似值的菌株即为此表观群的中心菌株。

1.2.3 供试菌株的遗传学分析

提取模式菌株和中心菌株的DNA,分别测定G+C mol% 和DNA分子杂交同源性^[7]。

2 结果与讨论

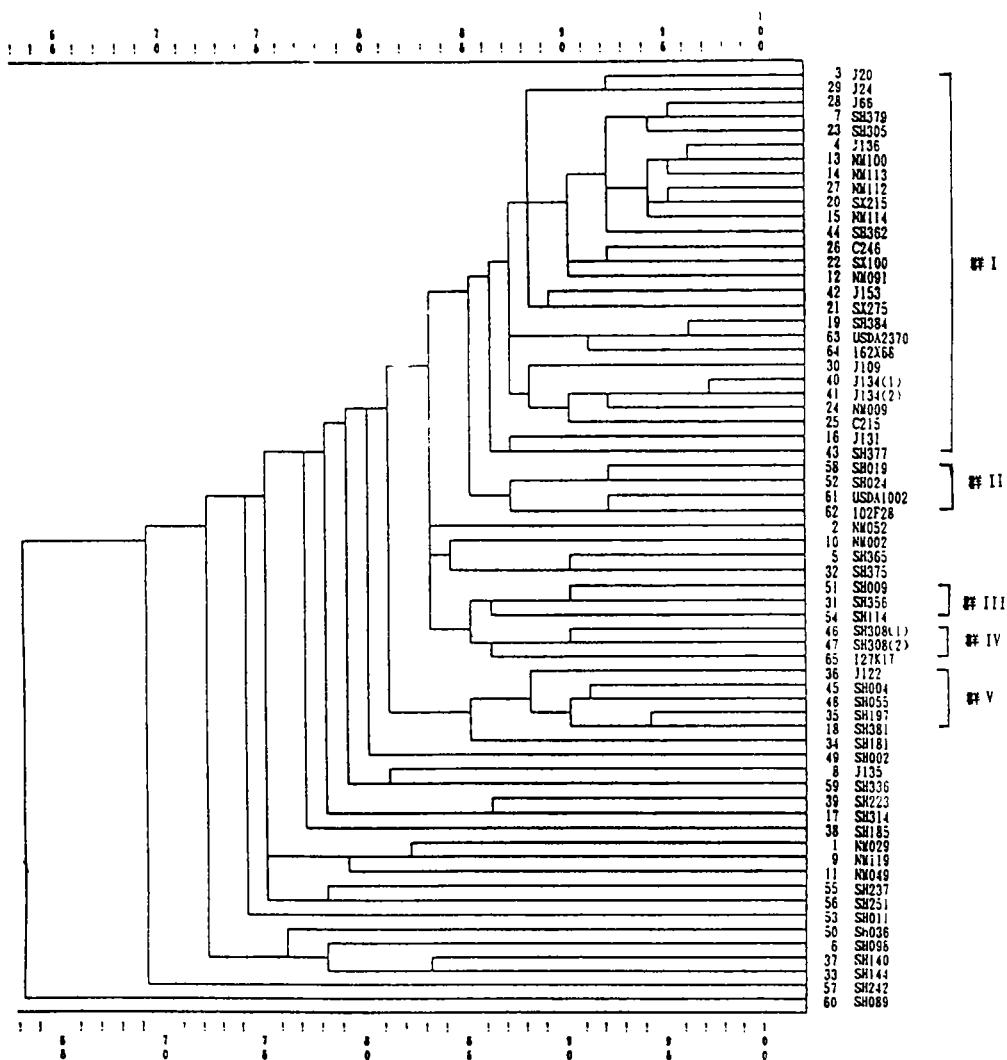
2.1 部分供试菌株的回接和固氮酶活性测定

大部分根瘤菌在原寄主上现瘤的时间在14~30天这一常规现瘤时段内。而从扁豆、百脉根、合欢、胡枝子、紫云英分离的根瘤菌回接现瘤时间较长,35~74天不等。均有一定的固氮酶活性。

2.2 供试菌的表型性状测定的聚类结果

树状图谱(图1)中,已知的 *R. leguminosarum* 的模式菌株 USDA2370 与其参比菌株 162×68 毗邻,已知的 *S. meliloti* 模式菌株 USDA1002 与其参比菌株 102F28 紧接,说明对其它菌株的126个性状测定的结果是可信的。以上两模式菌株在86%相似性水平上分开,所以对树状图谱也采用86%这一相似性水平将供试菌株分为群I一群V 5个表观群:群I含 *R. leguminosarum* 的模式菌株和一个参比菌株共27株菌,群II含 *S. meliloti* 的模式和参比菌共4株菌,群III含3株未知菌,群IV含 *R. leguminosarum* 的另一参比菌共3株菌,群V包含5株未知菌。

有23株未聚入群内(菌株sh365和sh375、菌株sh223和sh314分别聚为两个小群,但因只有两菌株,未将它们定群),其中13个菌株的寄主是野豌豆(*Vicia*)、豌豆(*Pisum*)和菜豆(*Phaseolus*),为 *R. leguminosarum* 的菌株的正常寄主范围,说明野豌豆、豌豆和菜豆的根瘤菌存在异质性。未聚入的另外10株根瘤菌的寄主是苜蓿(*Medicago*)、草木樨(*Melilotus*)、野大豆(*Glycine soja*),均是 *S. meliloti* 的正常寄主范围,说明以上寄主的根瘤菌同样存在异质性。最近美国学者Peter Berkam就将从我国内蒙古取样分离的苜蓿根瘤菌定了一个新种。



本树状谱由中科院微生物所 MINTS 数值分类系统自动生成

文件名: zl2SMA 菌株数: 65 性状数: 126 聚类时间: 05-17-1995 14:43:55

相似性系数: 1. $S_{sm} = (a + b) / (TOTAL - NC)SM$

聚类方式: 3. 平均链锁聚类方式 Average Linkage Clustering (UPGMA)

图 1 树状图谱

2.3 中心菌株 G + Cmol% 测定和 DNA 分子杂交结果

群 I 中心菌株是 SX215, 群 III 是 Sh356, 群 V 是 Sh055, 群 II、IV 含有模式菌株或参比菌株, 菌株较少, 未作中心菌株选择。考虑到群 I 包含菌株数较多, 随机选取 J24、J134₂ 一并提取 DNA, 为了确定 Sh375 与 Sh365 这样的小群的分类地位, 也随机提取 Sh375 的 DNA 测定。

对以上各未知菌株和模式菌株分别测定的 G + Cmol% 值, 均在根瘤菌属 (*Rhizobium*) 的

$G+C\text{mol}\%$ 范围内(60~64%)。进一步做 DNA 同源性测定, 即选取各表观群中心菌株的 DNA 分别与模式菌株的 DNA 杂交。DNA 同源性是国际公认的根瘤菌定种标准, DNA 同源性($H\%$) $\geq 70\%$ 的菌株属于同一种^[8]。所以测定 DNA 同源性不仅可以进一步检验数值分类表观群的划定是否适当, 而且可以进一步确定表观群的相互关系和分类地位。

DNA 分子同源性测定结果见表 2。

表 2 DNA/DNA 杂交结果

已 知 菌	未 知 菌	SX215	J134 ₂	J24	Sh375	Sh055	Sh356
R. leguminosarum USDA2370		75	76.8	69.6	76.2	47.6	
S. meliloti USDA1002					48	84	

分析 DNA 同源性结果, 可肯定群 I 菌株应归入 *R. leguminosarum* 中, 群 IV 含有 *R. leguminosarum* 的参比菌, 这样本研究中群 I、IV 应归入 *R. leguminosarum* (豌豆根瘤菌)。其中大部分菌株的寄主是野豌豆(*Vicia*)、豌豆(*Pisum*)、蚕豆(*Vicia*)、山黧豆(*Lathyrus*)、三叶草(*Trifolium*), 为 *R. leguminosarum* 的正常寄主。*Sh362* 的寄主是紫云英(*Astragalus sinicus* L.), 归入这一群原因不明。*Sh377*、*Sh308* 的寄主是百脉根(*Lotus*)胡枝子(*Lepispedeza*), 这两寄主的根瘤菌分类未见报道。*J134*、*J153* 的寄主是绿豆(*Phaseolus radiatus*)。这些菌的聚群说明 *R. leguminosarum* 根瘤菌存在寄主多样性。

群 II 含有 *S. meliloti* 的模式和参比菌株, 群 III 的中心菌株 *Sh356* 与 *S. meliloti* 模式菌株杂交同源性为 84%, 说明群 III 与群 II 一样可归入 *S. meliloti*。除 *Sh356* 的寄主为扁豆(*Dolichos lablab* L.)外, 其它 4 株待测菌的寄主均为苜蓿和草木樨。扁豆的根瘤菌分类地位在现有分类体系中未定。

群 V 是在本研究参照体系中分类地位待定的一群。既不与 USDA2370 同源, 也不与 USDA1002 同源, 说明这群菌株不属于 *R. leguminosarum* 和 *S. meliloti*。加上紧接的、能够与群 V 在 85% 水平相聚的菌株 *Sh181*, 即群 V + *Sh181*, 是本研究 65 株菌中仅有的能在葡萄糖培养基上产生 3-酮基乳糖的 6 株菌。“3-酮基乳糖产生”是在区分根瘤菌与农杆菌(*Agrobacterium*)时常用的特征, 根瘤菌一般为阴性。群 V + *Sh181* 的寄主主要是菜豆, 加一个野豌豆(*Vicia*)、一个合欢(*Albizzia Julibrissin Durazz*)。合欢的共生根瘤菌至今未肯定分类地位。近年菜豆的根瘤菌已分出 3 个新种: *R. tropiciA*、*R. tropiciB*、*R. etli*, 还保留有 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, 说明了菜豆的根瘤菌有很大的遗传异质性。至于群 V + *Sh181* 应属于哪个种, 有待进一步研究。

综上表明, 不论是野豌豆、野生苜蓿, 还是作为经济作物的豌豆、菜豆及豆科绿肥, 其根瘤菌在种的归属上存在较大的异质性、多样性。同时 *R. leguminosarum* 和 *S. meliloti* 种内菌株也存在较大的寄主多样性。以上两方面内容均有待深入研究, 这将有助于解决根瘤菌分类中的一些难题, 更好地了解和利用野生豆科植物资源。

(下转第 295 页)

综上所述可作出如下结论, 即用³²P 标记的玉米联合固氮菌 m-112 细胞同单质磷素营养一样, 能在很短时间里进入根组织, 经输导组织进入茎基、叶鞘和叶片组织中, 并在其中定居增殖和表达出明显的固氮酶活性。由植株自显影可清晰看到³²Pm-112 菌株在植株各器官运行轨迹, 证明了植物体有自身的微生物区系, 并与植物生长发育呈互惠关系。利用³²P 同位素研究联合固氮菌在植株内的分布, 测定植株各器官的放射强度和植株自显影与菌株回接结果, 规律是一致的, 证明这一试验研究方法是精确可靠的。试验结果给叶际固氮^[6-8]以及从小麦茎杆、种子和水稻种子中分离得到联合固氮菌提供了依据^[9-11], 并开拓了固氮领域。

参 考 文 献

- [1] Б. М. Церемисов: Сельскохозяйственная биология, 1988, 6:43-49.
- [2] Kielo Haahtelä, et al., Plant and Soil, 1988, 106(2), 239-248.
- [3] 李凤汀等, 利用¹⁵N 稀释法研究小麦接种肺炎克氏菌联合固氮作用, 微生物学报, 1989, 29(3):200-203。
- [4] 刘荣昌等, 小麦接种联合固氮菌增产效果研究, 华北农学报, 1989, 4(3):74-80。
- [5] F. M. Scher et al. Canadian J. Micro., 1984, 30(2):151-157.
- [6] M. C. Bhurat et al. Agric. Sci., 1968, 38(2), 319-325.
- [7] 刘荣昌等, 植物叶际固氮与农业生产, 微生物学杂志, 1985, 5(1):56-59。
- [8] Ruinem, J., Nature, 1956, 177:220-221.
- [9] 刘荣昌等, 小麦种子固氮菌的筛选与鉴定, 河北省科学院学报, 1984, (1):115-121。
- [10] Т. А. Калинская, идр, Известия Академии Наук СССР, серия биологическая, 1981, 4:617-621.
- [11] Kavimandan, S. K., et al, Microbiology abstract section A, 1978, 13(10):69.



(上接第 291 页)

参 考 文 献

- [1] L. segovia et al, Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *Phaseoli* Type 1 strains as *Rhizobium etili* sp. nov., Int. J. Syst. Bact. 1993, 43:374-377.
- [2] E. Matinez-Romero et al, *Rhizobium tropici*, a Novel species Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees, Int. J. Syst. Bact. 1991, 41:417-42.
- [3] B. D. Eardly et al, Characterization of *Rhizobium* from Ineffective *Alfalfa* Nodules: Ability to Nodulate bean Plants (*Phaseolus vulgaris* (L.) var.), A and E. Microbiol. 1985, 1422-1427.
- [4] B. D. Eardly et al, Phylogenetic position of *Rhizobium* sp strain Or181, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, Based on partial sequences of the 16S rRNA and nifH genes. A. and E. Microbiol, 1992, 1422-1427.
- [5] 孙建光等, 河南省根瘤菌资源考察及分类, 微生物学报, 1984, 33(2):135-143。
- [6] 陈文新, 路传好, 根瘤菌数值分类方法探讨, 微生物学通报, 1986, 13(3):133-141。
- [7] 林万明, 分析微生物专辑, 科学出版社, 1988。
- [8] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (第一版), 1994.