

河南省豆科植物根瘤菌表型多样性研究^{*}

韦革宏¹, 刘虎岐², 孙科技¹, 郝鲜俊¹, 陈文新³

(1 西北农林科技大学 资源环境学院; 2 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 3 中国农业大学 生物学院, 北京 100094)

[摘 要] 在河南省根瘤菌资源调查的基础上, 选取 29 株快生根瘤菌和 34 株参比菌株, 进行了 102 项表型性状测定和聚类分析。结果表明: 不同地理来源、甚至同一地理来源或同种寄主的不同菌株在碳氮源利用、抗生素抗性、耐逆性等方面存在着较大的多样性。有 7 株菌对链霉素、青霉素和白霉素有较强的耐受性; 有 23 株和 25 株菌可分别耐受 2.0 g/L 的香酚兰和中性红; 有 2 株菌可在含 50 g/L NaCl 的 YMA 培养基上生长; 有 6 株菌在 pH 值 11 条件下能够生长。在 84% 的相似性水平上未知菌株构成了 2 个独立的表观群, 其中 Cluster 1 有 7 株菌, 中心菌株为 H038; Cluster 2 有 3 株菌, 中心菌株为 H026。

[关键词] 豆科植物; 根瘤菌; 表型性状; 表型多样性; 河南省

[中图分类号] Q 939.11⁺ 4.09

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)03-0071-05

河南省位于东经 110°21′~116°39′; 北纬 31°23′~36°32′。地势西高东低, 北、西、南三面山地环抱, 东部为辽阔平原, 属暖温带和北亚热带大陆性季风气候, 冬季寒冷少雨, 春季干旱, 风沙多, 夏季多雨且丰沛, 秋季晴和日照长, 生物资源丰富。据估计, 全世界豆科植物有近 2 万种, 而对其根瘤进行详细研究的不过 5%。目前, 对该省根瘤菌资源的系统调查和分类研究尚未见报到。本试验在广泛调查根瘤菌资源的基础上, 选用经分离纯化、回接原寄主的 29 株快生根瘤菌和 34 株模式参比菌株, 进行生理生化表型性状测定及数值分析, 研究根瘤菌的表型多样性, 为根瘤菌的自然选种或选育固氮竞争能力强的菌株提供了宝贵的种质资源及依据。

1 材料和方法

1.1 菌种

选用新分离纯化并经回接原寄主的快生根瘤菌 29 株和模式参比菌株 34 株。其中未知菌株编号、来源及寄主名称等见表 1, 模式参比菌株的选取参照文献[1]。

1.2 性状测定

性状测定项目及方法按文献[2]进行, 63 株菌株测定了包括惟一碳源利用、惟一氮源利用、抗生素敏感性、对染料和化学药物的耐受性、耐盐及酸碱

性、生长温度范围、石蕊牛奶反应等共 102 个项目。其中碳、氮源按 1.0 g/L 的终质量浓度加入。测试性状名称: D-果糖、D-密三糖、鼠李糖、棉籽糖、赤丝草醇、糖源、甜醇、肌醇、半乳糖、D-木糖、D-阿拉伯糖、D-核糖、树胶醛糖、密二糖、二硫苏糖、葡萄糖、阿冬糖醇、山梨醇、山梨糖、马尿酸钠、麦芽糖、乳糖、蔗糖、L-半胱氨酸、L-酪氨酸、L-正白氨酸、L-精氨酸、L-白氨酸、3,5-二溴酪氨酸、L-赖氨酸、2-鸟氨酸、甘氨酸、L-谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、红霉素 5, 50, 100 和 300 mg/L, 链霉素 5, 50, 100 和 300 mg/L, 青霉素 5, 50, 100 和 300 mg/L, 白霉素 5, 50, 100 和 300 mg/L, 新霉素 5, 50, 100 和 300 mg/L, 卡那霉素 5, 50, 100 和 300 mg/L, 庆大霉素 5, 50, 100 和 300 mg/L, 洁霉素 5, 50, 100 和 300 mg/L, 香酚兰 1.0 和 2.0 g/L, 孔雀石绿 1.0 和 2.0 g/L, 孟加拉红 1.0 和 2.0 g/L, 亚甲基兰 1.0 和 2.0 g/L, 甲苯胺兰 1.0 和 2.0 g/L, 去氧胆酸钠 1.0 和 2.0 g/L, 刚果红 1.0 和 2.0 g/L, 中性红 1.0 和 2.0 g/L, 氯化钠 10, 20, 30, 40 和 50 g/L, 亚硝酸钠 1.0 和 2.0 g/L, pH 4, 5, 9, 10 和 11, 温度 4 和 40℃, 石蕊牛奶产酸, 石蕊牛奶产碱, 石蕊牛奶胨化, 石蕊牛奶酸凝, 石蕊牛奶还原。

^{*} [收稿日期] 2001-07-03

[基金项目] 国家自然科学基金重点资助项目(39730010); 国家自然科学基金资助项目(30000005)

[作者简介] 韦革宏(1969-), 男, 甘肃兰州人, 副教授, 博士, 主要从事根瘤菌遗传多样性及其生态环境的研究。

1.3 聚类方法

物所的M N T S 软件包在 586 微机上完成, 聚类结果以树状图谱的方式表示^[3]。

采用平均连锁法(U P G M A), 用中国科学院生

表 1 未知供试菌株一览表

Table 1 List of tested unknown strains

菌株 Strains	寄主中文名 Chinese name of hosts	寄主学名 Name of hosts	采样地点 Point of collect	海拔/m Elevation	生境 Environment of grow th
H002	达呼里胡枝子	<i>L espedeza davurica</i>	卢氏(L ushi)	1 000	山坡(H illside)
H003	刺槐	<i>R obinia pseudoacacia</i>	卢氏(L ushi)	1 000	山坡(H illside)
H005	截叶铁扫帚	<i>L. caraganae</i>	卢氏(L ushi)	900	山坡(H illside)
H006	狭叶米口袋	<i>A mblytrop is stenophylla</i>	卢氏(L ushi)	900	山坡(H illside)
H007	鸡眼草	<i>Kumm erow ia striata</i>	卢氏(L ushi)	900	山坡(H illside)
H009	确山野豌豆	<i>V icia kioshanica</i>	卢氏(L ushi)	1 200	山坡(H illside)
H010	紫穗槐	<i>A m orpha fruticosa</i>	卢氏(L ushi)	1 200	山坡(H illside)
H011	大豆	<i>Glycine m ax</i>	卢氏(L ushi)	600	山坡(H illside)
H012	天蓝苜蓿	<i>M edicago lupulina</i>	卢氏(L ushi)	700	山坡(H illside)
H013	多花胡枝子	<i>L espedeza fl oribunda</i>	卢氏(L ushi)	800	山坡(H illside)
H014	苦参	<i>S ophora fl avescens</i>	卢氏(L ushi)	1 000	山坡(H illside)
H015	吉氏木兰	<i>I ndigof era kirilow ii</i>	老君山(L aojun mountain)	1 200	山坡(H illside)
H017	歪头菜	<i>V icia unijuga</i>	老君山(L aojun mountain)	800	山坡(H illside)
H018	刺槐	<i>R obinia pseudoacacia</i>	老君山(L aojun mountain)	800	山坡(H illside)
H020	山合欢	<i>A ibizzia kalkora</i>	老君山(L aojun mountain)	800	山坡(H illside)
H022	茫茫香豌豆	<i>L athyrus D avid ii</i>	老君山(L aojun mountain)	1 000	山坡(H illside)
H026	美丽胡枝子	<i>L espedeza fom osa</i>	老君山(L aojun mountain)	1 000	山坡(H illside)
H031	野大豆	<i>Glycine soja sieb</i>	老君山(L aojun mountain)	1 200	山坡(H illside)
H038	长萼鸡眼草	<i>Kumm erow ia stipulacea</i>	嵩山(Song mountain)	800	山坡(H illside)
H043	尖叶铁扫帚	<i>L espedeza hedysaroides</i>	嵩山(Song mountain)	800	山坡(H illside)
H046	绿豆	<i>Phaseolus m ungo</i>	嵩山(Song mountain)	900	田地(Crop land)
H049	细梗胡枝子	<i>L espedeza virgata</i>	嵩山(Song mountain)	1 000	山坡(H illside)
H051	刺槐	<i>R obinia pseudoacacia</i>	嵩山(Song mountain)	1 000	山坡(H illside)
H052	黄花草木犀	<i>M elilotus suaveolens</i>	嵩山(Song mountain)	800	山坡(H illside)
H053	毛叶米口袋	<i>Gueldenstaed tia paucifl ora</i>	嵩山(Song mountain)	600	山坡(H illside)
H057	大豆	<i>Glycine m ax</i>	新乡(X inxiang)	100	路边(Roadside)
H058	黄花草木犀	<i>M elilotus suaveolens</i>	新乡(X inxiang)	100	山坡(H illside)
H061	山合欢	<i>A ibizzia kalkora</i>	新乡(X inxiang)	300	山坡(H illside)
H063	尖叶铁扫帚	<i>L espedeza hedysaroides</i>	新乡(X inxiang)	200	山坡(H illside)

2 结果与讨论

2.1 生理生化性状测定结果

未知菌株生理生化性状测定结果表明: 29 株菌均不能利用糖源作为惟一碳源; 97% 的菌株不能利用二硫苏糖醇, 只有 H011 可以利用。另外, 只有 H051 可利用山梨糖作为惟一碳源, 其余菌株均不能利用。马尿酸钠的利用率只有 4 8%, 仅有 H011, H022 和 H049 3 株菌尚可利用。在所有供试菌株中, H011 除了不能利用赤丝草醇、糖源、山梨糖这 3 种碳源外, 其余 20 种碳源均能利用, 利用率最高为 87%。表明 H011 的糖酵解途径较宽。惟一碳源利用反应了细菌能否产生代谢这种化合物的有关酶, 说明不同菌株产生的酶有所差异。

H003, H010, H011, H012, H013, H038 和 H046 7 株菌均能利用全部供试的 12 种氨基酸作为惟一氮源, 而 H002, H009, H049 和 H061 4 株菌都不能利用, 其余菌株有不同程度的利用。

在抗生素敏感性试验中, 供试的 8 种抗生素各分为 4 个质量浓度梯度。在低质量浓度试验中, 大部分菌株都可以保持生长, 但随质量浓度的升高, 能够生长的菌株呈递减趋势。其中在红霉素、新霉素、卡那霉素、庆大霉素和洁霉素 300 m g/L 下, 没有 1 株菌能够生长; 但在链霉素、青霉素和白霉素 300 m g/L 下, H006, H007, H011, H012, H046, H052 和 H063 均可以生长, 说明这 7 株菌对链霉素、青霉素和白霉素有较强的耐受性。

供试菌株对香酚兰和中性红的耐受性较强, 在

2.0 g/L 质量浓度下分别有 23 株和 25 株菌可以正常生长。但大部分菌株对孔雀石绿、孟加拉红和亚甲基兰这 3 种染料的耐受性不强, 只有 H011 和 H007 较为特殊, 其中 H011 可耐受 1.0 g/L 的孔雀石绿和孟加拉红, H007 仅耐受 1.0 g/L 的孔雀石绿。

供试菌株中有几株菌的耐盐性较强, 其中 H003, H007, H011, H038 和 H058 5 株菌在含 40 g/L NaCl 的 YMA 培养基上生长; H026 和 H043 能耐受 50 g/L 的 NaCl。

供试菌株耐碱性较强, 耐酸性较弱。在 pH 4 和 5 时所有菌株都不生长。在 pH 10 时, 有 9 株菌可生长; 在 pH 11 时, 有 6 株菌可生长。

在 4℃ 条件下进行培养, 所有供试菌株都停止生长, 说明它们不耐低温。在 40℃ 时, 有部分菌株仍可生长, 分别是 H006, H026, H038, H043 和 H063。

在石蕊牛奶反应中, 所有的供试菌株都未发生还原现象, 而石蕊牛奶产酸的有 10 株菌, 产碱的有 10 株菌, 脲化的有 1 株菌, 酸凝的有 8 株菌。

从上述分析可见, 供试菌株中存在着一些特殊菌株, 如分离自卢氏的大豆根瘤菌 H011 在碳氮源的利用、抗生素的抗性以及对化学药物的耐受性等方面都具有较强的特异性, 有待进一步研究。

2.2 聚类分析结果

根据生理生化性状测定结果, 以 UPGMA 法进行聚类分析, 其结果见图 1。全部菌株在 61% 的相似水平上归在一起。在 84% 的相似水平上将 34 株模式参比菌株能够按种的不同彼此很好的分开。从上至下依次为: 华葵根瘤菌 (*M. huakuii*)、*R. sp.*、菜豆根瘤菌 (*R. etli*)、杨凌根瘤菌 (*R. yanglingense*)、*R. gallicum*、海南根瘤菌 (*R. hainanense*)、*S. medica*、*S. arboris*、热带根瘤菌 (*R. tropici*)、*R. giardinii*、*R. sp.*、*R. huautlense*、*R. mongolense*、*M. loti*、天山根瘤菌 (*M. tianshanense*)、新疆中华根瘤菌 (*S. xinjiangense*)、地中海根瘤菌 (*M. mediterraneum*)、*M. plarifarum*、鹰嘴豆根瘤菌 (*M. ciceri*)、*M. amorphae*、多寄主中华根瘤菌 (*S. terangaie*)、萨赫尔根瘤菌 (*S. sahelii*)、*S. sp.*、豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*)、苜蓿根瘤菌 (*S. meliloti*)、弗氏中华根

瘤菌 (*S. fredii*)、*S. kostiense*、*A. undicola* 和山羊豆根瘤菌 (*R. galegae*)。同一种的两个不同菌株具有较高的相似程度, 如 CCBU 2609 和 A 106 同属于华葵根瘤菌, 其相似性水平达 90%; I66 与 H14 同属于海南根瘤菌, 其相似性水平达 94%。这些结果与现行的分类结果相一致, 说明本试验在生理生化性状测定及数值分析方面的可靠性。

根据参比菌株的聚类情况, 并按照 Sneath 等^[4]的建议, 相似性在 80% 以上者可归入同一种。H002 与 CFN 42 的表型相似性水平达 88%, 可初步认为 H002 应归入 CFN 42 所在的菜豆根瘤菌 (*R. etli*); H063 与 U SDA 1037 的相似性为 87%, 可初步归入 *S. medica*; H061, H002 与 U SDA 3306 的相似性大于 89%, 应属于天山根瘤菌 (*M. tianshanense*)。

未知菌株在 84% 的相似性水平上构成了 2 个独立的表观群, 与已知参比菌株具有明显的差异。第一亚群 (Cluster1) 有 7 个菌株, 分别为 H003, H007, H038, H011, H012, H046 和 H052, 寄主分别为刺槐、鸡眼草、长萼鸡眼草、大豆、天蓝苜蓿、绿豆和黄花草木犀, 中心菌株为 H038。第二亚群 (Cluster2) 有 3 个菌株, 分别为 H006, H026 和 H058, 分别来自狭叶米口袋、美丽胡枝子和黄花草木犀, 中心菌株为 H026。这两个亚群具体的分类地位需要通过遗传学分析进一步确定。除上述两个亚群外, H005 和 H053 两菌株的相似性为 87%, 其余菌株在 84% 的相似水平上未聚合在一起, 各自独立。

在分析中可以看到, 来自同一寄主的不同菌株在表型特征上也会有较大差异, 其分类地位与寄主来源没有必然的联系。如采集于嵩山的 H052 与新乡的 H058, 寄主均为黄花草木犀。H052 属 Cluster1, 而 H058 属 Cluster2。

与豆科植物结瘤固氮的根瘤菌一般分为快生型和慢生型两大类, 多年来, 陆续发现在某些属、种的豆科植物上既有快生型, 也有慢生型根瘤菌与之共生^[5]。在对河南省 29 株豆科植物根瘤菌生理生化表型性状测定及数值分析中可以看出, 绝大多数菌株之间存在着较大的差异, 说明河南省根瘤菌具有表型多样性这一特征。

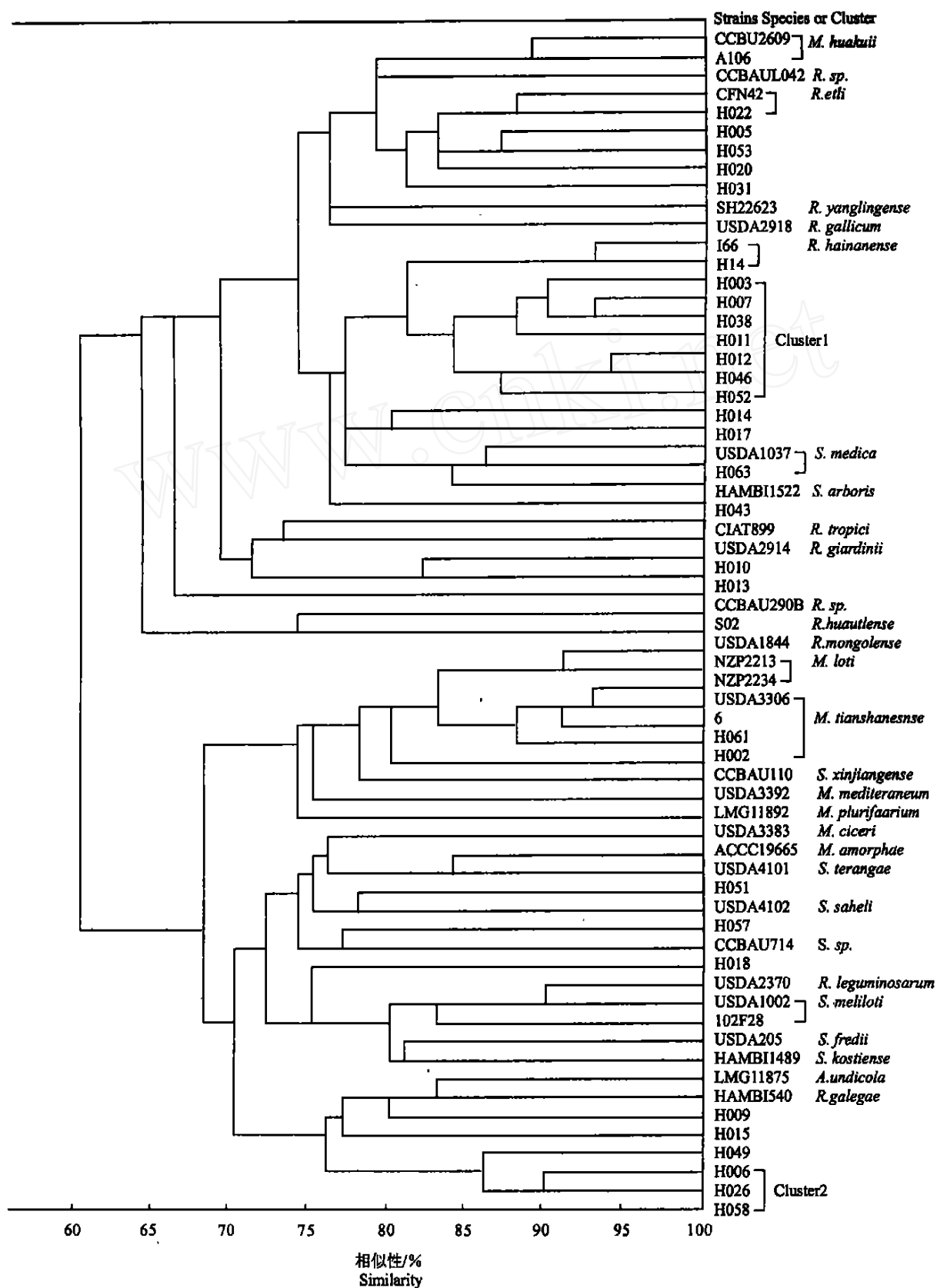


图 1 数值分类树状图

Fig. 1 Dendrogram of numerical taxonomy of rhizobial strains

[参考文献]

- [1] Tan Z Y, Wang E T, Peng G X, et al Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China[J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49: 1457- 1469
- [2] 韦革宏, 陈文新, 朱铭裁 陕甘宁地区根瘤菌数值分类与DNA 同源性分析[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(1): 73- 78
- [3] 韦革宏, 陈文新, 朱铭裁 分离自鸡眼草和木兰的根瘤菌分类研究[J]. 微生物学报, 1999, 39(5): 387- 395
- [4] Sneath P H A, Sokal R B Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification W. H. Freeman and Co., San Francisco. 1973, 13- 18
- [5] 西北植物研究所 黄土高原植物志[M]. 第2卷 北京: 中国林业出版社, 1992 315- 495

Phenotypic feature diversities of rhizobia isolated from pulses in Henan Province

WEI Ge-hong¹, LIU Hu-qí², SUN Ke-jí¹, HAO Xián-jun¹, CHEN Wen-xin³

(1 College of Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry;

2 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: Based on the investigation of rhizobial resources of Henan province, 29 fast-growing rhizobia strains and 34 reference strains were analyzed with 102 phenotypic features and numerically classified. The result showed that there was huge diversity among strains isolated from different places, even the same geographic resources and the same hosts, in carbon and nitrogen nutrient utilization, resistance to antibiotics, endurance to salt, alkali and chemical dye. 7 strains had properties resistant to streptomycin, penicillin and biamycin with the higher consistency. 23 strains and 25 strains can endure 20 g/L Bromothymol Blue and Neutral Red respectively. 2 strains can grow in YMA medium with 50 g/L NaCl. 6 strains grow in medium with pH 11. Unknown strains were clustered into two new subgroups different from known species at the similarity of 84%. Cluster 1 had seven strains, H038 was the central strain. Cluster 2 had three strains, H026 was the central strain.

Key words: pulses; rhizobia; phenotypic feature; phenotypic diversity; Henan province