单株根系来源的土著大豆慢生根瘤菌多样性

卜常松 张学江 江木兰 胡小加
(中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062)

摘要 本文对由 1 株大豆根瘤分离、鉴定的 12 个土著大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 菌株进行了种内多样性分析。在 YEM 琼脂培养基上观察菌落大小不同(直径 1.0 mm 至 0.5 mm)的菌株,有形成粘稠而半透明的 M 型菌落和稀薄而透明的 W 型菌落。以 ELISA 鉴定血清类型,分为 LL19 血清族(包括 Sz1-12s 血清组和 Sz1-19s 血清型及其他血清组)和非 LL19 血清族(包括 Sz1-13s 和 Sz1-21s 两血清型及未知血清型)。以 Digoxigenin 标记的 pMJ S₁₂ 为探针检测菌株染色体 DNA 的 EcoRI 消化产物的分子杂交谱,出现称为 型的 9.6 kb 和 型的 6.4 kb 两种类型的单一分子杂交带。HP5890A 气相色谱分析细胞脂肪酸,检出 8 种成分。其中, C_{14:1}、C_{18:1} 和 C_{14:0} 存在于所有供试菌株中,为不同于快生根瘤菌的 3 种主要成分,以此可将供试菌株分成 6 组不同菌株。

关键词 大豆慢生根瘤菌,多样性,血清型, pMJ S₁₂ 质粒,细胞脂肪酸

Diversity among the indigenous *Bradyrhizobium japonicum* strains from nodules on roots of the single soybean plant/ Bu Changsong Zhang Xuejiang Jiang Mulan Hu Xiaojia // CHINESE BIODIVERSITY. — 1996, 4(4): 201 ~ 206

Intraspecific diversity are analyzed for 12 indigenous strains isolated from nodules on roots of the single soybean plant and identified as *Bradyrhizobium japonicum* strains. Mucoid and translucent colony type M as well as watery and transparent colony type W were observed from different colony size (diameter 1.0 mm to 0.5 mm) formed by the strains on YEM agar. Serological types of the strains were identified by ELISA classified as serocluster LL19 (including Sz1-12s serogroup Sz1-19s serotype and others) and non-serocluster LL19 (including Sz1-13s serotype Sz1-21s serotype and unknown). The chromosomal DNA's EcoRI-digested products of the strains were hybridized to the digoxigenin-labeled probe, pMJ S₁₂ plasmid, producing two kinds of single DNA hybridization fragment in the strains, sized 9.6 kb and 6.4 kb, respectively. Accordingly the strains were classified as pattern and pattern. Up to eight kinds of fatty acid in the strains were determined by HP5890 A gas-chromatography. Among them, principal component analysis of C_{14:1}, C_{18:1} and C_{14:0} occurred in all *B. japonicum* strains tested, which was greatly different from the results of fast-growing rhizobia, was used to show that the strains could be divided into six groups.

Author's address Oil Crops Research Institute, Chinese Agriculture Academy of Sciences, Wuhan 430062

Key words *Bradyrhizobium japonicum*, diversity, serotype, pMJ S₁₂ plasmid, cellular fatty acid

生物多样性是当前生命科学中的活跃研究领域。80 年代以来,人们日益重视根瘤菌多样性的研究。在技术上,除了传统方法外,分子生物学手段已开始用于根瘤菌多样性研究^[1];在内容上,揭示了各种根瘤菌的种和种内菌株的丰富多样性,包括建立了公认的大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)^[2] 和大豆快生根瘤菌 (*Rhizobium fredii*)^[3]。

我国为大豆的起源地,土壤中存在丰富的大豆根瘤菌资源。因此,我国学者对大豆根瘤

菌的血清类群^[4,5]、质粒谱^[4,6]、内抗生素抗性^[7]和数值法分类^[8]等进行广泛研究。但是,到目前为止,中外学者对大豆慢生根瘤菌的多样性主要集中于大范围样本的不同来源菌株的分析和研究,还没有人以小范围样本的同一来源菌株做为研究对象。

本文针对单一大豆植株根系来源的土著大豆慢生根瘤菌株,试图在狭小范围内通过形态、生理特征鉴定和血清型、DNA 分子杂交谱及细胞脂肪酸分析,阐明其生物多样性,为更深入研究根瘤菌资源、遗传特性和分类提供基本数据。

1 材料和方法

1.1 菌株分离和鉴定

1993 年 8 月从河南砂姜黑土(S)上(大豆种植老区)、未人工接种的大豆品种中豆 19(Z)一株根系(1)的根瘤中,按文献^[9]分离、鉴定,选出 12 个土著大豆慢生根瘤菌(s),命名为 Sz1-Xs 系列菌株(X 表示菌株的顺序编号)。

1.2 血清学分析

按文献^[10],用本实验室保存的 8 个已知抗血清(113-2、USDA138、DH444、305、LL19、005、E545 和 CE224)和本实验新制备的 4 个分离菌株的抗血清(Sz1-12s、Sz1-13s、Sz1-19s 和 Sz1-21s),其抗血清效价均为 1 3200,分别对 Sz1-Xs 系列菌株制备的体抗原进行 ELISA 分析^[11]。ELISA 实验选用华美公司的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体。

1.3 DNA 分子杂交实验

1.3.1 DNA 分子杂交探针及制备 此探针来自 E. Coli S17-1 菌株上的 pMJS₁₂质粒,目的片断为 2.3 kb 的 Hind Ⅲ 区段,系从 *B. japonicum* 1~110 的特异性结瘤基因附近区域克隆所得,由美国明尼苏达大学 Sadowsky 教授赠送。

用 LB 液体培养基于 37℃ 培养过夜的 S17-1 菌株,碱法破裂细胞并提取 pMJS₁₂质粒 DNA;以地高辛(Digoxigenin) dUTP 为标记物,随机引物法制备 DNA 探针^[12]。

1.3.2 染色体 DNA 制备 菌株在蔗糖-酵母汁培养基上 28℃ 培养至对数生长期,破壁、变性沉淀蛋白质,消化 RNA,用无水乙醇沉淀 DNA^[12]。

1.3.3 分子杂交与检测 所制染色体 DNA 经 EcoRI 消化后,在 0.7% 琼脂糖凝胶上电泳,经 Southern Blot 转移到 NC 膜上。95℃ 变性 10 分钟后预杂交,然后与制备的探针杂交。免疫法检测杂交滤膜,拍照片保存。

本实验的探针标记、杂交及检测全部采用 Boehringer Mannheim 公司的 DNA 非放射性标记和检测盒(NO. 1093657)。

1.4 细胞脂肪酸分析

收取 YEM 琼脂培养基上对数生长期的菌株细胞湿重约 0.5 克,在乙醚-石油醚(1:2)中提取脂脂肪酸,于 KOH-甲醇溶液中皂化,衍生成脂肪酸甲酯^[13],用 HP5890A 气相色谱分离及 FID 检测。

2 结果和讨论

2.1 形态和生理特征

由一株大豆植株根瘤分离的 12 个供试菌株鉴定结果(表 1),符合文献^[2]描述的大豆慢生根瘤菌的形态、生理特征。菌落形态观察:不同菌株形成不同大小、粘稠度和透明度的菌落形态,出现有 8 个菌株形成粘稠而半透明的菌落,称为 M 型;有 4 个菌株形成稀薄而透明的菌落,称为 W 型。

表 1 大豆慢生根瘤菌的形态和生理特征

Table 1 Morphological and physiological character of *B. japonicum* strains

菌株 Strains	形态特征 Morphological character					生理特征 Physiological character				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sz1-6s	L	M	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-8s	S	W	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-9s	S	M	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-10s	S	W	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-11s	L	M	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-12s	S	M	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-13s	L	M	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-19s	S	M	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-20s	L	M	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-21s	S	W	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-22s	S	M	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+
Sz1-23s	S	W	-	SR	G ⁻	+	+	+	-	+

- 1 L/S:大/小菌落直径 > 0.5 至 1.0 mm/ 0.5 mm. Large/ small colony
2 M/W:菌落粘稠/ 稀薄. Colony mucoid/ watery
3 - :不吸收 YEM 培养基中 0.0025 %刚果红. Do not absorb Congo red
4 SR:菌体短杆状. The strains are short rods
5 G⁻:革兰氏负反应. Gram-negative
6 + :在 YEM 培养基中产生碱性反应. Producing an alkaline reaction in YEM
7 + :甘露醇、甘油为很好利用的碳源. Utilizing mannitol , glycerol as good carbon sources
8 + :可利用铵盐、硝酸盐作为氮源. Ammonium salts , nitrate can serve as N sources
9 - :不利用蛋白胨,在 BP 培养基中不生长. Peptone is not utilized and do not grow in BP (Beef extract and peptone broth)
10 + :接种到原捕获寄主大豆品种中豆 19 表现结瘤与固氮. Nodulation and N₂ fixation when inoculation on original soybean cultivar Zhongdou 19 as a trap host

表 2 大豆慢生根瘤菌的血清学反应 *

Table 2 Serological reaction of *B. japonicum* strain against antiserum

菌株 (抗原) Strain (Antigen)	抗血清 (抗体) Antiserum (Antibody)				
	LL19	Sz1-12s	Sz1-13s	Sz1-19s	Sz1-21s
LL19	卅	卅	-	卅	-
Sz1-6s	+	卅	-	-	-
Sz1-8s	+	-	-	-	-
Sz1-9s	卅	卅	-	-	-
Sz1-10s	卅	-	-	-	-
Sz1-11s	卅	卅	-	-	-
Sz1-12s	卅	卅	-	-	-
Sz1-13s	-	-	卅	-	-
Sz1-19s	卅	-	+	卅	-
Sz1-20s	卅	-	-	-	-
Sz1-21s	+	-	-	-	卅
Sz1-22s	卅	-	-	-	-
Sz1-23s	-	-	+	-	-

* 抗血清滴定度 Antiserum titer
卅 1 1600 , 卅 = 1 800 , + = 1 400 , - 负反应 Negative reaction.

2.2 血清型

血清学分析结果表明,供试菌株与实验室保存的 005、113-2、DH444、CE224、305、E545 和 US-DA138 等已知抗血清均不起反应,但从表 2 看出,有 7 个菌株与 LL19 抗血清呈明显(800 倍以上)阳性反应;与本实验新制备 4 个分离菌的抗血清比较,LL19 为供试菌株中占优势的血清型,其次是

Sz1-12s 也占一定的优势。根据表 2 结果作出的血清分型图示(图 1),供试菌株被划分为 LL19 血清族和非 LL19 血清族两类。前者包括彼此独立的 Sz1-12s 血清组和 Sz1-19s 血清型及其他血清组/型,后者包括 Sz1-13s 和 Sz1-21s 两个血清型以及不与所有测试抗血清反应的未知血清型。

国内外研究结果表明,在一定的地区或寄主品种上,有着某种或某些占优势的血清型菌株和不同血清型的多样性^[4、5、14、15]。我们的研究结果,指出在一株大豆根系来源的大豆慢生根瘤菌中有各含几个血清组/型的两类血清型,其中 LL19 血清族是一类占优势的血清型。同时,菌株间存在交叉反应情形。如 Sz1-6s 菌株并不能明显归于 LL19 血清族(血清学反应倍数只有 400 倍),但与属于该血清族的 Sz1-12s 抗血清呈明显阳性反应。

图 1 大豆慢生根瘤菌血清分型
Fig. 1 *B. japonicum* strain serotyping

2.3 DNA 分子杂交谱

供试 12 个菌株的染色体 DNA EcoRI 消化产物与 pMJ S₁₂ 探针杂交结果(图 2),出现 9.6 kb 和 6.4 kb 两种单一分子杂交带,分别称为 型和 型。

图 2 大豆慢生根瘤菌 DNA 分子杂交谱
Fig. 2 DNA hybridization patterns of *B. japonicum* strains
从左到右,菌株分别为 Sz1-6s、Sz1-8s、Sz1-9s、Sz1-10s、Sz1-11s、Sz1-12s、Sz1-13s、Sz1-19s、Sz1-20s、Sz1-21s、Sz1-22s、Sz1-23s。左方标度为 /Hind 对照
Strains from left to right :Sz1-6s, Sz1-8s, Sz1-9s, Sz1-10s, Sz1-11s, Sz1-12s, Sz1-13s, Sz1-19s, Sz1-20s, Sz1-21s, Sz1-22s and Sz1-23s. The right mark is /Hind control

Sadowsky 等人^[16]用 pMJ S₁₂ 探针与田间分离的大豆慢生根瘤菌 123 血清族菌株染色体 DNA EcoRI 消化产物杂交,各菌株均出现单一杂交带,其大小有 8.7 kb、7.7 kb、6.1 kb、4.6 kb。本实验结果,各菌株也都出现单一杂交带,大小有 9.6 kb 和 6.4 kb。这说明本研究的一株大豆根系来源的大豆慢生根瘤菌染色体 DNA 在所检测的区域有差异,但差异较小(只有两种不同的单一杂交带),它不仅小于快生根瘤菌的共生 (Sym) 质粒上的差异^[4、6],也小于 Sadowsky 等人的研究结

果^[16]。

2.4 细胞脂肪酸组成

细胞脂肪酸分析结果(表 3),共检测出 8 种不同的脂肪酸。其中,C_{14:1}、C_{18:1}存在于

表 3 大豆慢生根瘤菌细胞脂肪酸组成(%)

Table 3 Cellular fatty acid composition of *B. japonicum* strains (%)

菌株 Strains	主要成分 Principal component				其他 Other			
	C _{14:0}	C _{14:1}	C _{18:1}	C _{12:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:3}
Sz1-6s	16.79	4.08	69.05	ND	ND	10.08	ND	ND
Sz1-8s	3.14	33.31	35.54	6.37	4.14	5.63	3.48	8.38
Sz1-9s	1.52	55.42	20.45	0.92	2.54	5.60	7.55	ND
Sz1-10s	4.92	19.24	34.22	4.78	1.17	9.30	1.57	24.80
Sz1-11s	9.27	10.47	63.31	3.78	ND	13.10	ND	ND
Sz1-12s	12.76	23.60	55.70	7.93	ND	ND	ND	ND
Sz1-13s	6.26	15.26	61.89	4.40	ND	12.11	ND	ND
Sz1-19s	4.36	16.36	59.00	6.30	ND	14.21	ND	ND
Sz1-20s	9.56	28.93	39.48	6.46	ND	12.87	2.70	ND
Sz1-21s	3.34	35.34	33.61	8.39	2.94	8.63	2.38	5.36
Sz1-22s	37.18	20.05	30.59	ND	ND	12.17	ND	ND
Sz1-23s	7.66	30.68	36.06	7.24	1.90	8.74	ND	7.71

ND—未测出 DN is not detectable

图 3 大豆慢生根瘤菌细胞脂肪酸主要成分分析二相图(%)

Fig. 3 Two dimensional plot of principal component analysis for *B. japonicum* strains

图中数字表示 Sz1-Xs 系列菌株的编号

Arabic numerals in the figure indicate Sz1-Xs strain series number

所有菌株中,且含量较大;C_{14:0}也存在于所有菌株中,但含量较低,只有在 Sz1-22s 菌株中含量达 37.18%,位于各组分之首。以此 C_{14:1}、C_{18:1}和 C_{14:0}三种主要脂肪酸含量作 C_{18:1}/C_{14:1}(图 3A)和 C_{18:1}/C_{14:0}(图 3B)二相图,看出各菌株在细胞脂肪酸组成方面的相近关系,大致可分为 6 组不同菌株,显示了以脂肪酸组成为依据的单一大豆植株根系来源的大豆慢生根瘤菌的多样性。

Jarvis 等人^[17]对 6 种快生根瘤菌研究表明,C_{16:0}、C_{17:0}、C_{18:0}和 C_{19:0}4 种细胞脂肪酸成分均存在于此 6 种根瘤菌中,尤其以 C_{19:0}、C_{16:0}和 C_{18:0}含量最高,显然,本研究的大豆慢生根瘤菌脂肪酸的主要成分与快生根瘤菌大相径庭。因此,本实验结果不仅说明了大豆慢生根瘤菌在细胞脂肪酸组成方面的异质性,而且说明了大豆慢生根瘤菌具有区别于快生根瘤菌的脂肪酸组成的共同特性。

看来,细胞脂肪酸分析不仅有益于研究快生根瘤菌多样性和分类^[17],可能还有益于研究慢生根瘤菌多样性及快、慢生根瘤菌的分类。

参 考 文 献

- 1 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-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* , 1991 , **41** :582 ~ 587
- 2 Jordan D C. Family , Rhizobiaceae Conn. 1938 , 321^{AL}. In: Krieg N R, Holt J G (eds.) , *Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology* , 1984 , **1** :234 ~ 242
- 3 Jarvis B D W, Downer H L, Young J P W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* , 1992 , **42** :93 ~ 96
- 4 Jiang Mulan, Zhang Xuejiang, Hu Xiaojia et al. The diversity of serological reaction and plasmid profiles in *Sino/ Bradyrhizobium* strains isolated from different soybean hosts. *Improvement of Soil Fertility*, IFS, 1993 , 213 ~ 219
- 5 江木兰,宋玉萍,张学江. 中国土壤中大豆根瘤菌优势类群以及与寄主共生关系的多样性. 植物营养和肥料学报, 1995 , **1** :65 ~ 70
- 6 葛诚,徐玲玫,樊惠等. 不同来源的快生型大豆根瘤菌及其质粒组成的多样性. 微生物学报, 1991 , **31** :325 ~ 328
- 7 Li Fudi, Cao Yanzhen et al. Diversity of soybean rhizobia isolated from three varieties in soil of Jilin Province. In: Dou X T (ed.) , *Current Developments in Soybean-Rhizobium Symbiotic Nitrogen Fixation.* , 239 ~ 246
- 8 Chen W X, Yan G H, Li J L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* , 1988 , **38** :392 ~ 397
- 9 Vincent M J 著,上海植物生理研究所固氮室译. 根瘤菌实用研究手册. 上海:人民出版社, 1970
- 10 中国农业科学院土壤肥料研究所固氮组. 根瘤菌免疫血清的制备. 农业科技通讯, 1979 , **3** :24 ~ 25
- 11 Fuhrmann J, A G Wollum. The simplified enzymelinked immunosorbent assay for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. *Appl. Environ. Microbiol.* , 1985 , **49** :1010 ~ 1013
- 12 萨姆布鲁克 J, E F 旨里奇, T 曼龙阿蒂斯著. 分子克隆实验指南(第二版). 北京:科学出版社, 1992
- 13 Sawada H, Y Takikawa, H Leki. Fatty acid methyl ester profiles of genus *Agrobacterium*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* , 1992 , **58** :46 ~ 51
- 14 Keyser H H, D F Weber, S L Uratsu. *Rhizobium japonicum* serogroup and hydrogenase phenotype distribution in 12 states. *Appl. Environ. Microbiol.* , 1984 , **37** :854 ~ 858
- 15 Fuhrmann J. Serological distribution of *B. japonicum* as influenced by soybean cultivar and sampling location *Soil Biol. Biochem.* , 1989 , **21** :1079 ~ 1081.
- 16 Sadowsky M J, P B Cregan, H H Keyser. DNA hybridization probe for use in determining restricted nodulation among *B. japonicum* Serocluster 123 field isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* , 1990 , **56** :1768 ~ 1774
- 17 Jarvis B D W, S W Tighe. Rapid identification of *Rhizobium* species based on cellular fatty acid analysis. *Plant and Soil*, 1994 , **161** :31 ~ 41