山东省根瘤菌表型多样性及数值分析

韦革宏¹ 郝鲜俊¹ 孙科技¹ 刘虎岐² 陈文新³

1 (西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

2 (西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌 712100)

3 (中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要: 在山东省根瘤菌资源调查的基础上, 选取 31 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、甚至同一地区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高的多样性。32% 的菌株可耐受 300 μg/mL 的新霉素, 39% 的菌株可耐受 300 μg/mL 的青霉素和洁霉素。2 株菌能耐受 4.0% 的 NaCl。13 株菌可以在 pH11 的条件下生长。在 87% 的相似水平上, 未知菌株形成 2 个独立的亚群, 第 1 亚群有 3 株菌, 中心菌株为 SD109; 第 2 亚群有 4 株菌, 中心菌株为 SD083。

关键词: 根瘤菌, 表型性状, 多样性, 山东省

中图分类号: Q939.114 文献标识码: A 文章编号: 1005-0094(2002)02-0208-05

Diversity of phenotypic features and numerical analysis of Rhizobia isolated from Shandong Province

WEI Ge-Hong¹, HAO Xian-Jun¹, SUN Ke-Ji¹, LIU Hu-Qi², CHEN Wen-Xin³

1 College of Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100

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

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

Abstract: Based on investigation of rhizobial resources of Shandong Province, 102 phenotypic features of 31 fast-growing rhizobia strains and 34 reference strains were analyzed and numerically classified. The results revealed huge diversity among strains isolated from different places. Strains with the same geographic resources and the same hosts differed in carbon and nitrogen nutrient utilization, resistance to antibiotics, and tolerance to salt, alkali and chemical dye. Thirty two percent of strains could resist 300 μg/mL Neomycin and 39 percent of strains could resist 300 μg/mL Penicillin and Jiemycin. Two strains could grow in medium with 4 % NaCl and 13 strains grew in pH 11 medium. Unknown strains were clustered into two new subgroups different from known species at the similarity level of 87%. Cluster 1 had three strains, of which SD109 was the central strain. Cluster 2 had four strains, and SD083 was the central strain.

Key words: Rhizobia, phenotypic feature, diversity, Shandong Province

山东省属暖温带季风气候, 四季变化明显, 地形复杂, 地貌类型多样。与环境相适应的豆科植物如鸡眼草属(*Kummerowia*)、胡枝子属(*Lespedeza*)、紫穗槐属(*Amorpha*)等生长良好。这些植物在培肥土壤、绿化环境、作为饲用牧草及医用等方面都有重要

作用。据估计全世界豆科植物有近 2 万种, 而详细对其根瘤进行过研究的不过 5%。目前, 对山东省根瘤菌资源的系统调查和分类研究尚未见报道。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 31 株菌和 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种质资源及依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

选用新分离纯化并经回接原寄主的快生根瘤菌 31 株与模式菌株 34 株。其中未知菌株编号、来源及寄主名称等见表 1,模式菌株的选取按 Tan *et al.* (1999) 的方法进行。

1.2 性状测定

性状测定项目及方法按韦革宏等(1999a)的方法进行,对 65 株菌株测定了包括唯一碳源利用、唯

一氮源利用、抗生素敏感性、对染料和化学药物的耐受性、耐盐及酸碱性和生长温度范围、石蕊牛奶反应共 102 项。其中碳、氮源按 0.1% 的终浓度加入。测试性状名称如下: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,二硫苏糖醇,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 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、300 μg/mL,链霉素 5 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、300 μg/mL,青霉素 5 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、300 μg/

表 1 未知供试菌株一览表
Table 1 List of tested unknown strains

菌株 Strains	寄主名称 Name of host	采样地点 Sample site	海拔(米) Elevation (m)	寄主环境 Host inhabitation	土壤类型 Soil type
SD003	刺槐 <i>Robinia pseudoacacia</i>	栖霞 Qixia	400	溪边 Brookside	砂土 Sand
SD005	毛胡枝子 <i>Lespedeza tomentosa</i>	艾山 Aishan	500	山沟 Valley	砂土 Sand
SD019	长萼鸡眼草 <i>Kummerowia stipulacea</i>	福山 Fushan	10	海边 Seaside	污泥 Sludge
SD020	长萼鸡眼草 <i>K. stipulacea</i>	烟台 Yantai	30	路边 Roadside	壤土 Loam
SD023	紫穗槐 <i>Amorpha fruticosa</i>	烟台 Yantai	20	路边 Roadside	砂土 Sand
SD024	红花菜豆 <i>Phaseolus coccineus</i>	福山 Fushan	20	农田 Farmland	砂土 Sand
SD027	野豌豆 <i>Vicia sepitum</i>	福山 Fushan	20	路边 Roadside	砂土 Sand
SD035	山豆花 <i>Lespedeza tomentosa</i>	文登 Wendeng	100	山坡 Hillside	壤土 Loam
SD043	毛胡枝子 <i>Lespedeza tomentosa</i>	昆嵛山 Kunyu Mountain	350	山坡 Hillside	砂土 Sand
SD049	紫穗槐 <i>Amorpha fruticosa</i>	崂山 Laoshan Mountain	200	山坡 Hillside	砂土 Sand
SD051	山合欢 <i>Libizzia kalkora</i>	崂山 Laoshan Mountain	200	山坡 Hillside	壤土 Loam
SD059	刺槐 <i>Robinia pseudoacacia</i>	崂山 Laoshan Mountain	200	山坡 Hillside	砂土 Sand
SD062	歪头菜 <i>Vicia unijuga</i>	崂山 Laoshan Mountain	200	山坡 Hillside	砂土 Sand
SD064	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	石臼 Shijiu	200	路边 Roadside	砂土 Sand
SD065	长萼鸡眼草 <i>Kummerowia stipulacea</i>	石臼 Shijiu	200	路边 Roadside	砂壤 Sandy loam
SD066	达呼里胡枝子 <i>Lespedeza davurica</i>	石臼 Shijiu	200	路边 Roadside	砂土 Sand
SD069	紫穗槐 <i>Amorpha fruticosa</i>	石臼 Shijiu	200	路边 Roadside	砂土 Sand
SD072	绿豆 <i>Phaseolus mungo</i>	石臼 Shijiu	20	路边 Roadside	砂壤 Sandy loam
SD076	刺槐 <i>Robinia pseudoacacia</i>	临沂 Linyi	80	路边 Roadside	壤土 Loam
SD080	苳芒香豌豆 <i>Lathyrus davidii</i>	蒙山 Mengshan Mountain	600	路边 Roadside	壤土 Loam
SD081	长萼鸡眼草 <i>Kummerowia stipulacea</i>	蒙山 Mengshan Mountain	100	路边 Roadside	砂壤 Sandy loam
SD083	紫穗槐 <i>Amorpha fruticosa</i>	蒙山 Mengshan Mountain	500	山坡 Hillside	壤土 Loam
SD084	刺槐 <i>Robinia pseudoacacia</i>	蒙山 Mengshan Mountain	200	山坡 Hillside	壤土 Loam
SD086	美丽胡枝子 <i>Lespedeza formosa</i>	蒙山 Mengshan Mountain	300	山坡 Hillside	壤土 Loam
SD087	合欢 <i>Albizzia julibrissin</i>	蒙山 Mengshan Mountain	200	山坡 Hillside	壤土 Loam
SD089	黄檀 <i>Dalbergia hupean</i>	蒙山 Mengshan Mountain	400	山坡 Hillside	壤土 Loam
SD092	歪头菜 <i>Vicia unijuga</i>	蒙山 Mengshan Mountain	400	山坡 Hillside	壤土 Loam
SD093	紫藤 <i>Wisteria sinensis</i>	蒙山 Mengshan Mountain	800	山坡 Hillside	壤土 Loam
SD097	绿豆 <i>Phaseolus mungo</i>	平邑 Pingyi	150	路边 Roadside	砂壤 Sandy loam
SD108	歪头菜 <i>Vicia unijuga</i>	泰山 Taishan Mountain	1400	路边 Roadside	砂土 Sand
SD109	达呼里胡枝子 <i>Lespedeza davurica</i>	泰山 Taishan Mountain	800	路边 Roadside	砂土 Sand

mL,白霉素 5 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、300 μg/mL,新霉素 5 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、300 μg/mL,卡那霉素 5 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、300 μg/mL,庆大霉素 5 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、300 μg/mL,洁霉素 5 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、300 μg/mL,百里香酚兰 0.1%、0.2%,孔雀石绿 0.1%、0.2%,孟加拉红 0.1%、0.2%,亚甲基兰 0.1%、0.2%,甲苯胺兰 0.1%、0.2%,去氧胆酸钠 0.1%、0.2%,刚果红 0.1%、0.2%,中性红 0.1%、0.2%,氯化钠 1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%,亚硝酸钠 0.1%、0.2%,pH 4.0、pH 5.0、pH 9.0、pH 10.0、pH 11.0,4℃、40℃,石蕊牛奶产酸、石蕊牛奶产碱、石蕊牛奶脓化、石蕊牛奶酸凝、石蕊牛奶还原。

1.3 聚类分析

采用中国科学院微生物所的 MINTS 软件包中的 UPGMA 法。聚类结果以树状图谱的方式表示(韦革宏等,1999b)。

2 结果与讨论

2.1 生理生化性状测定结果

2.1.1 唯一碳源利用 唯一碳源利用反映了细菌能否产生代谢此种化合物的有关酶。23 种碳源利用测定结果表明 31 株菌均不能利用山梨糖作为唯一碳源,97% 的菌株不能利用二硫苏糖醇,但 SD109 可利用,其寄主为达呼里胡枝子,生长于泰山海拔 800 m 处。另外,90% 的菌株不能利用糖源,而 SD003、SD020 和 SD027 可以利用。大多数菌株可利用麦芽糖、山梨醇、蔗糖、阿冬糖醇、树胶醛糖和半乳糖作为唯一碳源。SD023 寄主为紫穗槐,只能利用甘露醇作为其碳源,而对供试的 23 种碳源都不能利用,说明 SD023 的糖酵解途径较窄。而 SD003、SD027 和 SD109 能利用 23 种供试碳源中的 19 种碳源化合物。

2.1.2 唯一氮源利用 60% ~ 70% 的菌株能利用 L-精氨酸、L-白氨酸、L-谷氨酸和天冬氨酸作为唯一氮源。90% 的菌株不能利用 L-酪氨酸,而 SD003、SD035 和 SD109 可利用 L-酪氨酸。SD109 可全部利用供试的 12 种氨基酸。SD003 除不能利用 L-半胱氨酸,SD089 除不能利用 L-酪氨酸外,二者可利用 11 种氨基酸。而有些菌株利用氨基酸的范围却相当窄,其中 SD019 和 SD020 只能利用一种氨基酸,

分别为 L-白氨酸和 L-谷氨酸。

2.1.3 对抗生素的敏感性

大多数菌株对供试的 8 种 5 μg/mL 的抗生素不敏感。32% 的菌株可耐受 300 μg/mL 的新霉素,39% 的菌株可耐受 300 μg/mL 的青霉素和洁霉素,表明部分供试菌株对抗生素的耐受能力较强。其中 SD086 对 300 μg/mL 的青霉素、白霉素、新霉素和洁霉素均不敏感。

全部未知供试菌株不在含 0.1% 的孟加拉红和亚甲基兰的 YMA 培养基上生长。除 SD003 可在 0.1% 的孔雀石绿及 SD003 和 SD086 能在 0.2% 的甲苯胺兰中生长良好外,其余菌株均受抑制,其中 81% 的菌株在 0.1% 的甲苯胺兰中也不能生长。但供试菌株对百里香酚兰、去氧胆酸钠、刚果红、中性红的耐受性较强,其中 90% 的菌株能耐受 0.2% 的中性红,65% 的菌株能耐受 0.2% 的百里香酚兰。

2.1.4 耐盐性及耐酸碱性

Mchammd 等认为耐盐性强的根瘤菌也较能耐受干旱条件(Mchammd & Akhavan-kharazation,1991)。大部分供试菌株不耐盐,在含有 2% NaCl 的 YMA 培养基上,90% 的菌株不能生长,但 SD003 和 SD109 能耐受 4% 的 NaCl。其中 SD109 寄主为达呼里胡枝子,胡枝子属内很多植物在畜牧业、医药保健业等方面,具有很好的应用价值(赵可夫,李法曾,1999)。

供试菌株耐碱性较强,但耐酸性较弱。在 pH10 时,有 15 株菌可生长;在 pH11 时,有 13 株菌可生长;在 pH4 和 pH 5 时所有供试菌株都不生长。

2.1.5 生长温度范围及石蕊牛奶反应

在 4℃ 时,所有供试菌株都不生长。在 28℃ 时,都生长很好。在 40℃ 时,有 28% 的菌株可正常生长。石蕊牛奶反应中,供试菌株产酸的有 3 株菌,产碱的有 9 株菌,石蕊牛奶脓化的有 8 株菌,石蕊牛奶还原的有 11 株菌。

SD086 在抗生素、化学染料、耐盐性等方面具有较强的耐受性,是一株特异性较强的优良菌株,应对其作进一步的研究。

2.2 聚类分析

由图 1 可见,全部供试菌株在 55% 的相似性水平上聚在一起。除 SD086 外,其余菌株在 60% 的相似性水平上聚在一起,此结果与上述生理生化性状测定中 SD086 具有较强的耐受性相一致,说明 SD086 与其余供试菌株差异较大。在 67% 的相似

图 1 数值分类树状图
Fig.1 Dendrogram of numerical taxonomy of rhizobial strains

性水平上分为 2 个大群。在 86% 的相似性水平上, 已知参比菌株不同种之间能彼此很好地分开, 它们依次为菜豆根瘤菌(*Rhizobium etli*)、海南根瘤菌(*R. hainanense*)、*R. sp.*、*R. gallicum*、华癸中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium haukuui*)、杨凌根瘤菌(*Rhizobium yanglingense*)、热带根瘤菌(*R. tropici*)、*R. giardinii*、*R. huautlense*、*R. mongolense*、萨赫尔中华根瘤菌(*Sinorhizobium saheli*)、山羊豆根瘤菌(*Rhizobium galegae*)、*Sinorhizobium sp.*、*S. medica*、*S. arboris*、多寄主中华根瘤菌(*S. terangae*)、新疆中华根瘤菌(*S. xinjiangense*)、天山根瘤菌(*Mesorhizobium tianshanense*)、百脉根中华根瘤菌(*M. loti*)、豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、弗氏中华根瘤菌(*S. fredii*)、*S. kostiense* 和鹰嘴豆中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium ciceri*)。其中 *Sinorhizobium medica* 和 *S. arboris* 在 86% 的相似性水平上聚在一起, 说明二者的表型性状相似程度较高。而 I 66 和 H14 同属于海南根瘤菌, 其相似性水平达 94% ; USDA3306 和 6 同属于天山根瘤菌, 其相似性水平达 95%。说明同一个种的不同菌株相似程度很高。以上已知参比菌株的分类结果与现行的分类体系一致(Tan *et al.* ,1999), 从而证明本次数值分类结果的可靠性。

根据参比菌株的聚类情况, 并按照 Sneath & Sokal (1973) 的建议, 相似性在 80% 以上者可归入同一种。SD087、SD092 和 CFN42 的表型相似水平大于 89% , 可初步认为 SD087 和 SD092 应归入 CFN42 所在的菜豆根瘤菌; SD059 与 USDA4101 的相似性达 87.5% , 其可初步归入 USDA4101 所属的多寄主中华根瘤菌; SD069 应属于新疆中华根瘤菌。

在 87% 的相似性水平上, 部分新分离菌聚为 2 个独立的亚群(cluster 1 和 cluster 2)。Cluster 1 中有 3 株菌 SD003、SD109 和 SD089 , 寄主分别为刺槐、

达呼里胡枝子和黄檀。中心菌株为 SD109。Cluster 2 中有 4 株菌 SD019、SD083、SD043 和 SD080 , 寄主分别为长萼鸡眼草、紫穗槐、毛胡枝子和苳芒香豌豆, 中心菌株为 S083。可见寄主不同、地理来源不完全相同的菌株具有很高的相似性。Cluster 1 和 Cluster 2 分别构成了两个不同于已知参比菌株的新表观群。所以有必要通过 DNA 杂交等遗传学实验进一步确定它们的分类地位。

从树状图上可以看出, 地理来源相同而寄主不同的菌株如 SD066、SD069 其相似性程度较低。而寄主相同、地理来源和生态环境不同的菌株 SD003 和 SD083 其相似性程度也不高。说明供试菌株的表型性状不仅与寄主有关, 而且与地理来源和生态环境有关。同时也说明山东省根瘤菌在性状上表现出复杂性和多样性。这也许是由于山东省地形复杂、地貌类型多样、生态环境不同所致。

参考文献

韦革宏, 陈文新, 朱铭莪, 1999a. 陕甘宁地区根瘤菌数值分类与 DNA 同源性分析. 应用与环境生物学报, 5(1): 73 ~ 78

韦革宏, 陈文新, 朱铭莪, 1999b. 分离自鸡眼草和木兰的根瘤菌分类研究. 微生物学报, 39(5): 387 ~ 395

赵可夫, 李法曾(主编), 1999. 中国盐生植物. 北京: 科学出版社, 183 ~ 185

Mchammd R M and M Akhavan-Kharazation, 1991. Nitrous Oxide emissions from agricultural soils of the Boreal and Parkland regions of Alberta. *Plant and Soil*, 161: 127 ~ 134

Sneath P H A and R B Sokal, 1973. The principles and practice of numerical classification. *Numerical Taxonomy*, 1: 13 ~ 18

Tan Z Y, E T Wang, G X Peng, M E Zhu, E Martínez-Romero and W X Chen, 1999. Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1457 ~ 1469

(责任编辑 : 闫文杰)