



西北干旱半干旱地区 根瘤菌的多相分类及系统发育研究

Study on the Polyphase Taxonomy of Rhizobia Isolated from Legumes
Growing Northwest arid-semiarid Regions and Their Phylogeny

韦革宏



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS



西北干旱半干旱地区 梭梭属的多相分类及系统发育研究

Study on the Polyphase Taxonomy of *Elaeagnus* Isolated from Arid Areas
Growing Habitats and molecular Phylogeny and Their Phylogeny

张军武



西北科学出版社

WWW.NWSTPUBLISHING.HOME



西北干旱半干旱地区 根瘤菌的多相分类及系统发育研究

Study on the Polyphase Taxonomy of Rhizobia Isolated from Legumes
Growing Northwest arid-semiarid Regions and Their Phylogeny

韦革宏



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS

图书在版编目 (CIP) 数据

西北干旱半干旱地区根瘤菌的多相分类及系统发育研究 / 韦革宏—北京:高等教育出版社,2004

ISBN 7-04-013922-7

I. 西... II. 韦... III. ①干旱区-根瘤菌-细菌
分类-研究-西北地区②干旱区-根瘤菌-系统发育-
研究-西北地区 IV. Q939.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 108643 号

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-64054588
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100011	网 址	http://www.hep.edu.cn
总 机	010-82028899		http://www.hep.com.cn

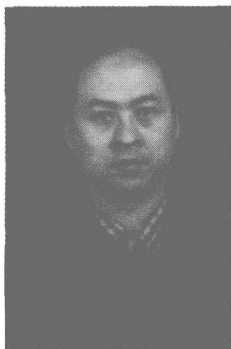
经 销 新华书店北京发行所
排 版 高等教育出版社照排中心
印 刷 高等教育出版社印刷厂

开 本	850 × 1168 1/32	版 次	2004 年 2 月第 1 版
印 张	6.25	印 次	2004 年 2 月第 1 次印刷
字 数	200 000	定 价	14.30 元
插 页	4		

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

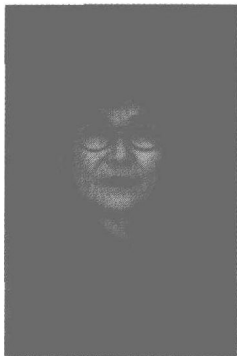
版权所有 侵权必究

作者简介



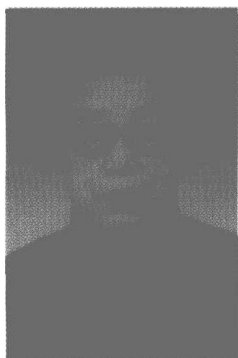
韦革宏,男,1969年8月生,现任西北农林科技大学资源环境学院副教授,硕士生导师。1991年毕业于西北农业大学农化系,2000年获博士学位,2001—2002年在以色列巴伊兰大学做博士后。2002年获全国优秀博士学位论文。主要从事西北地区根瘤菌资源多样性及其应用研究。主持教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金、国家自然科学基金、国家自然科学基金“九五”重点项目专题、横向合作课题、校优秀回国人员基金和青年基金各1项。发现了 *R. indigoferae*、*S. kummerowiae* 和 *R. loessense* 3个根瘤菌新种。发表论文30余篇,其中在国际性权威杂志《International Journal of Systematic Evolution Microbiology》发表论文3篇,该杂志被SCI收录,影响因子为2.837;在《微生物学报》、《生物工程学报》、《遗传学报》、《中国农业科学》和《生物多样性》等一级刊物上发表论文7篇。参加了陈文新院士主持的“中国豆科植物根瘤菌资源多样性、分类及系统发育研究”,该项目于2001年获国家自然科学基金二等奖;获杨凌示范区科技进步一等奖1项。

导师简介



朱铭莪,女,1937年10月生,1964年西北农学院土壤微生物研究生毕业。西北农林科技大学资源环境学院教授、博士生导师。曾任中国土壤学会第六、七届理事会土壤生物与生化专业委员会委员。主要从事土壤微生物与土壤生物化学研究。先后主持高校博士点基金“土壤酶动力学及热力学特征与土壤肥力关系研究”,国家自然科学基金“污染土壤的酶特征及酶诊断指标研究”等4项课题;还承担国家自然科学基金重点项目、国家攻关项目等7项课题的有关研究任务。获农业部科学技术进步一等奖1项,陕西省科技进步二等奖1项,陕西省科技成果二等奖1项,农业部科学技术进步三等奖1项,均为受奖人。在《微生物学报》、《土壤学报》、《西北农业学报》等专业刊物上发表论文30余篇。培养硕士研究生5名,博士研究生2名。

导师简介



陈文新,女,1926年生,中国农业大学教授,中科院院士,国际根瘤菌/土壤杆菌分类委员会委员,“伯杰氏系统细菌学手册”编委。1952年毕业于武汉大学,1959年毕业于苏联季米里亚捷夫农学院研究生院,获副博士学位。1982—1983年在美国康乃尔大学做访问学者。近20多年来主持国家自然科学基金5项,“八五”和“九五”重点项目各1项,国家教委博士点基金2项及973项目部分内容。主持研究我国根瘤菌资源与分类,组织力量完成全国根瘤菌资源调查;新记载结瘤豆科植物300多种;发现一批抗逆性很强的根瘤菌种质资源;分离、保藏根瘤菌5000多株;发表根瘤菌新属2个,新种11个;有关根瘤菌研究在国内外学术刊物上发表论文80多篇,其中10多篇被SCI收录,被引用200多次;获国家自然科学二等奖1项,农业部科技进步一等奖2项,国家教委科技进步二等奖2项,农业部优秀教材一等奖1项。

前 言

根瘤菌(rhizobia)是一类广泛分布于土壤中的革兰氏阴性细菌。它能侵染豆科植物根部形成根瘤,将空气中的分子态氮转变成植物可以吸收利用的氨。据估计,全球每年生物固氮量达 1.75×10^8 t,为世界工业氮肥产量的4.37倍。根瘤菌与豆科植物的共生固氮作用是生物固氮中效率最高的体系,因此,研究根瘤菌与豆科植物的共生固氮作用是实现农业可持续发展的重大课题之一。根瘤菌的资源多样性及分类对于发掘新的根瘤菌种质资源,保藏并合理利用根瘤菌基因资源库,选育高效菌株用于农业生产有重要意义。目前世界上已知的豆科植物约16 000~19 000个种,其中只有15%的种作过结瘤调查,研究过其共生关系的仅有0.3%~0.4%。开展广泛的根瘤菌资源调查和进行深入的分类研究尤其显得重要。

豆科植物在防风固沙、水土保持中扮演着重要角色,它们既具有很强的抗逆能力,又能与根瘤菌共生,这种独特的进化优势使它们成为最恶劣环境——极地、火山灰、荒漠及各种贫瘠土壤上的先锋植物。据报道,在一些荒坡、荒地等没有豆科植物生长的新区,接种相适应的根瘤菌的豆科植物抗逆性增强,能茁壮地生长。因此,豆科植物根瘤菌的资源多样性研究和应用对西北干旱半干旱地区生态环境的改善和经济发展起着不可低估的作用。

本研究是在朱铭莪教授和中国农业大学陈文新院士的悉心指导和热情鼓励下完成的。整个研究过程无不凝聚着两位恩师的心血和汗水,她们严谨的学风、渊博的知识以及为科学事业献身的敬业精神使我终身受益。张一平教授、袁锋教授、郭蔼光教授、李生秀教授、薛泉宏教授、王益权教授、曲东教授等提出了不少好的建议,汪恩涛博士和谭志远博士协助进行了数据分析。在此,表示衷心的感谢。同时,感谢我的夫人孙玉璠女士对我的全力支持和照顾,使我全身心地投入到研究工作中。

本研究得到国家自然科学基金重点项目(39130010)、国家自然科学基金(30000005)和 973 课题(G2000018605)资助,本书的出版得到教育部、国务院学位委员会和高等教育出版社的大力支持,在此表示感谢!

因本人学识和水平有限,错漏之处在所难免,敬请批评指教。

韦革宏

2003 年 10 月 19 日于杨凌

郑 重 声 明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581698/58581879/

58581877

传 真：(010) 82086060

E - mail：dd@hep.com.cn 或 chenrong@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街 4 号

高等教育出版社法律事务部

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)64014089 64054601 64054588

策划编辑	潘 超
责任编辑	张庆波
封面设计	张 楠
责任绘图	朱 静
版式设计	史新薇
责任校对	朱惠芳
责任印制	韩 刚

目 录

第 1 章 根瘤菌分类研究的历史、现状和发展	1
一、根瘤菌的发现	2
二、根瘤菌分类研究的历史	3
三、根瘤菌分类研究的现状	9
四、根瘤菌分类研究的技术体系	19
五、确定根瘤菌新属,新种的最低标准	32
六、现代分析仪器在根瘤菌分类中应用的理论依据及现状	33
第 2 章 根瘤菌的表型分析和数值分类	37
一、材料与方法	38
二、结果与讨论	52
第 3 章 SDS - 全细胞可溶性蛋白电泳分析	57
一、材料与方法	57
二、结果与讨论	60
三、小结	67
第 4 章 DNA G + C 摩尔分数及 DNA 同源性分析	68
一、材料与方法	68
二、结果与讨论	72
三、小结	78
第 5 章 16 S rDNA 限制性片段长度多态性 (PCR - RFLP)	
分析	79
一、材料与方法	79

二、结果与讨论	82
三、小结	88
第 6 章 16 S rDNA 全序列分析及 3 个新种的描述	90
一、材料与方法	90
二、结果与讨论	94
三、新种的确定及描述	103
四、小结	106
第 7 章 根瘤菌菌体及胞外多糖热分解特性研究	108
一、材料与方法	108
二、结果与讨论	111
三、小结	120
第 8 章 根瘤菌菌体的红外光谱特征分析	123
一、材料与方法	123
二、结果与讨论	125
三、小结	133
第 9 章 原生质体的融合研究	135
第一节 微生物原生质体的融合及其应用	135
一、原生质体融合的特点	135
二、融合子的选择方法	137
三、原生质体融合技术的发展和应 用	140
第二节 根瘤菌原生质体的形成,再生及融合研究	141
一、材料与方法	142
二、结果与讨论	145
三、小结	162
第 10 章 结论	164
参考文献	170
ABSTRACT	185

第1章

根瘤菌分类研究的历史、现状和发展

根瘤菌(rhizobia)是一类能侵染豆科植物根部形成根瘤,可进行生物固氮的革兰氏阴性细菌。它与豆科植物共生是已知固氮能力最强的生物固氮体系之一,并在农业生产中起着重要作用^[130,174]。从分离纯培养至今,根瘤菌的研究已有100多年的历史。由于根瘤菌与豆科植物的共生固氮具有重大的理论意义和应用前景,近1个世纪以来吸引了许多学者在固氮生物学、固氮生理学、固氮生物化学、固氮遗传学及应用方面开展了大量的研究工作,并取得了一系列的进展^[33]。根瘤菌的分类作为根瘤菌理论和应用研究的基础具有十分重要的意义,这主要表现在以下几个方面^[131]:①有利于人类保护根瘤菌基本的生态过程,保证其物种、生态系统的永续利用,合理管理好宝贵的根瘤菌资源。②有利于认识根瘤菌与生态系统之间的关系、根瘤菌与其他有关物种的亲缘关系及其自身的演化、系统发育过程。③为固氮生物学的研究提供物质基础。④获得的优良菌株可直接为农业生产服务。然而,根瘤菌分类的研究还明显不够全面和深入,目前世界上已知的豆科植物约750个属,16 000~19 000个种,我国已知有127个属,12 000多个种。在这些豆科植物中

只有 15% 的种做过结瘤调查,并且只有 0.3% ~ 0.4% 研究过其共生关系。同时,结瘤研究通常倾向于农业上意义较大的一些豆科植物。因此开展广泛的根瘤菌资源调查和进行深入的分类研究尤其显得重要^[132]。

随着科学的不断发展和新技术的不断应用,新的根瘤菌资源不断被挖掘和发现。根瘤菌的分类也从过去以互接种族为依据的传统分类逐步过渡到了以系统发育关系为依据的现代系统分类。特别是近十几年来,rRNA 基因测序技术的发展和运用使得根瘤菌的分类及其系统发育研究有了突破性进展,根瘤菌的分类学和系统发育学的研究也由于相互渗透变得越来越不可分割。现在对根瘤菌系统发育地位的研究已经成为其分类研究中必不可少的一部分内容^[107]。

根瘤菌分类的另一个重要发展是多相分类技术的应用。“多相分类”一词是由 Colwell(1970)^[13]首先提出的,主要是对微生物的表型、遗传型以及系统发育等各个方面的特征进行研究并加以综合分析,从而获得既系统全面又能客观反映其自然本质的结果。多相分类和系统发育的不断发展形成了现代细菌分类的一个新的里程碑^[107],根瘤菌的分类也由于多相分类方法的应用有了很大的进展^[124]。

一、根瘤菌的发现

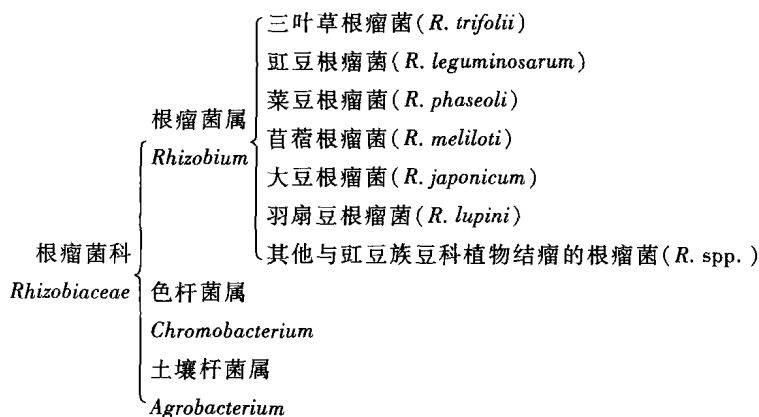
1838 年,法国学者 J. B. Bousingault 根据田间试验结果指出,豆科植物的营养生理和禾本科植物不同,三叶草和豌豆可以从空气中获得氮素营养。后来 Lachmann (1858) 和 M. C. Ворнин (1886) 发现豆科植物根瘤中含有微生物,并且指出根瘤的形成是微生物侵入植物的结果,但当时未把根瘤的形成和固氮联系起来。1886 年 9 月,德国学者 H. Hellriegel 在柏林的一次科学大会上发表研究报告,断言豆科植物只有形成根瘤才能固定大气中的氮素。两年后他和合作者 H. Wilfarth 就这一问题发

表了长达 200 多页的详尽报告,以丰富的试验资料确证了他的结论,自此澄清了他们的前辈从 19 世纪初以来关于豆科植物氮素营养来源的分歧见解^[133]。这期间法国学者 J. B. Bousingault 的长期研究工作也为阐明豆科植物氮素营养来源做出了积极努力。1888 年,荷兰学者 M. W. Beijerinck 用植物叶片汁加入天冬酰胺、蔗糖和明胶缓冲液配制的培养基从豌豆根瘤中第一次成功地分离得到了根瘤菌的纯培养并将其命名为 *Bacillus radicola*^[4]。一年后,波兰学者 Prazmowski 用根瘤菌纯培养接种豆科植物,形成了根瘤,并将之改称为 *Bacterium radicola*。1889 年, Frank 建议将可在豆科植物根上结瘤的细菌属名改为 *Rhizobium*^[27],并一直沿用至今。当时 Frank 认为感染所有豆科植物根瘤的都是同一种根瘤菌,并取名为豆类根瘤菌 (*R. leguminosarum*)。后来知道不止一种,它们有不同的宿主专一性,形态和生理特性也有差异^[178]。

二、根瘤菌分类研究的历史

(一) 早期的根瘤菌分类研究系统

早期的根瘤菌分类一直是以互接种族为主要依据的。所谓互接种族的概念是指在同一类群豆科植物中可以互相利用其根瘤菌形成根瘤,称这一类群植物为互接种族 (cross - inoculation group)。1926 年, Dangeard 主要根据宿主的种类和互接种族的关系,结合一些形态和生理性状,将根瘤菌分为若干种^[178]。1932 年, Fred 等人又在此分类基础上,列出了 16 属豆科植物,分为 6 个互接种族,将其根瘤菌定为 6 个种,以其代表植物属的学名作为追加词。另外有一群慢生根瘤菌能与豇豆、山蚂蝗、柱花草等大量热带豆科植物共生结瘤的未给予定名。这样, Fred (1932) 首次提出了下列根瘤菌分类系统^[46]:



上述分类系统中各种的主要特征见表 1.1。

表 1.1 Fred(1932 年) 根瘤菌分类系统中根瘤菌属各种的主要特征

种	石蕊牛奶 血清环 产酸	生长速度	宿主	互接种族
<i>R. trifolii</i>	+ -	快	<i>Trifolium</i>	三叶草族
<i>R. leguminosarum</i>	+ -	快	<i>Pisum lens</i> <i>Lathyrus Vicia</i>	豌豆族
<i>R. phaseoli</i>	+ -	快	<i>Phaseols vulgaris</i>	菜豆族
<i>R. meliloti</i>	+ +	快	<i>Medicago</i> <i>Melilotus</i>	苜蓿族
<i>R. japonicum</i>	- -	慢	<i>Glycine max</i>	大豆族
<i>R. lupini</i>	- -	慢	<i>Lupinus</i> <i>Ornithopus</i>	羽扇豆族
<i>R. spp.</i>	不定 不定	慢	<i>Vigna Desmodium</i> <i>Arachis Centrosema</i> <i>Stylosanthes</i> 等	豇豆族

注:豇豆族根瘤菌主要是结瘤于热带豆科植物的慢生型根瘤菌。