

两个根瘤菌新群的系统发育学分析*

闫爱民 陈文新

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

提 要:在数值分类、SDS-PAGE 全细胞蛋白分析、DNA-DNA 杂交、16SrDNA PCR-RFLP 的基础上,测定了两个分离自干旱地区苜蓿、草木樨根瘤菌新群 1、2 的中心株 XJ96060、XJ96408 的 16SrDNA 全序列,并进一步将中心株和 31 株已知菌、3 株自黄土高原的根瘤菌进行了系统发育学分析。结果表明,供试菌株在系统发育树中基本分成 *Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、*Agrobacterium-Rhizobium*、*Rhizobium*、*Bradyrhizobium*、*Azorhizobium* 六个分枝。群 1、2 落入 *Sinorhizobium* 分枝。

关键词:根瘤菌, 16S rDNA 全序列测定, 系统发育学分析

中图分类号:Q939.11⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)01-0001-08

近年来,苜蓿根瘤菌的多样性渐渐为人们所知。苜蓿根瘤菌的越界结瘤也时有报道,如北京农业大学的高为民等用陈文新从新疆分离到的一株耐盐苜蓿根瘤菌,实现了在大豆上结瘤^[1],Eardly B D 等也得到了能在豌豆上结瘤的苜蓿根瘤菌^[2,3],Eardly B D 等利用多位点酶电泳对 232 株苜蓿根瘤菌进行了分类研究。通过对 15 种酶的电泳分析,并用其中 13 种酶的电泳结果作了聚类分析,将 *Sinorhizobium meliloti* 分为 A 和 B 两个亚群^[4]。Rome S 等利用表型和 16SrDNA 序列分析对分离自不同地理来源的几种一年生苜蓿植物的根瘤菌进行了分类研究,建立了一个新种 *Sinorhizobium medicae*^[5],rDNA 因其保守性被广泛用于系统发育和进化分析。Woese 总结 rDNA 的研究结果,把所有生物重新划分为古生菌(Archae),真核生物(Eukaryotes)和细菌(Bacteria)三域^[6~10]。16SrDNA 全序列已是发表新属、新种时表明新属、种系统发育位置的必须分子指标。1991 年,Young J P W 等用 16S rDNA 的部分序列(可变区域)对豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)、苜蓿根瘤菌(*S. meliloti*)、慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)及 α -亚纲中的其它菌株进行了系统发育学分析^[11]。Willems A 和 Collin M D 采用 16S rDNA 全序列分析对慢生大豆根瘤菌(*B. japonicum*)、豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)、热带根瘤菌(*Rhizobium tropici*)、山羊豆根瘤菌(*Rhizobium galegae*)、百脉根根瘤菌(*Rhizobium loti*)、苜蓿根瘤菌(*S. meliloti*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)以及相关菌株的相似性进行了聚类分析,得到了根瘤菌及相关菌株的系统发育树状图^[12,13]。1993 年,Yanagi M 和 Yamasato K 测定了弗氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)、新疆中华根瘤菌(*Sinorhizobium xinjiangensis*)、华葵根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)及 α -亚纲中的相关菌的 16S rDNA 全序列,比较了根瘤菌在 α -亚纲中的系统发育地位^[14]。已发表的鹰嘴豆根瘤菌

* 国家自然科学基金资助项目(39670017),中国-欧共体合作项目(IC18-CT96-0103)

作者简介:闫爱民(1972-),男,中国农业大学生物学院博士,现在德国工作

收稿日期:1998-03-24, **修回日期:**1998-06-04

(*Mesorhizobium ciceri*)^[15]、*Sinorhizobium saheli*、*Sinorhizobium teranga*^[16] 以及地中海根瘤菌(*Mesorhizobium mediterraneum*)^[17] 都测定了新种模式菌株的 16S rDNA 全序列, 确定了新种在系统发育中的地位。本文在数值分类、SDS-PAGE 全细胞蛋白分析、DNA-DNA 杂交、16SrDNA PCR-RFLP 的基础上, 两个分离自新疆干旱地区苜蓿、草木樨根瘤菌新群 1、2 的中心株 XJ96060、XJ96408 的 16SrDNA 全序列被测定, 以期确定这两个新群的系统发育地位。

1 材料和方法

1.1 菌株

用于 16SrDNA 全序列测定的根瘤菌: 二个新群的代表菌株细菌 XJ96060、XJ96408, 其它用于系统发育学分析的菌株: 31 株已知菌, 3 株分自黄土高原的根瘤菌, 各菌株情况见表 1。

表 1 16SrDNA 全序列分析用菌株

Table 1 Strains used in the 16SrDNA full length sequence analysis

Strain number	Species	Hosts/or origin	Accession number
ATCC 15834	<i>A. rhizogenes</i>		X67224
ATCC 13335	<i>A. rubi</i>	<i>Rubus ursinus</i> var. <i>Loganobaccus</i>	X67228
LMG 196	<i>A. tumefaciens</i>		X67223
LMG 8750	<i>A. vitis</i>	<i>Vitis vinifera</i> , Australia	X67225
LMG 6465	<i>Az. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i> , stem, Senegal	X67221
USDA 205	<i>S. fredii</i>	<i>Glycine max</i> , Chengdou, China	X67231
HAMBI 540	<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i> , Finland	X67226
ATCC 14480	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Trifolium pratense</i>	X67227
NZP 2213	<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	X67229
NZP 4027	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> , Virginia, USA	X67222
CFN 299	<i>R. tropici</i> A	<i>Phaseolus</i> sp., Brazil	X67233
C-05-I	<i>R. tropici</i> B	<i>Phaseolus</i> sp., Brazil	X67234
I66	<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum</i> , Hainan, China	U71078
A-IBS	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> , Xinjiang, China	U71079
LMG 7837	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania cannabina</i> , Senegal	X68390
LMG 6463	<i>S. teranga</i>	<i>Sesbania rostrata</i> , Senegal	X68387
LMG 6138	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine hispida</i> , Japan	X66024
UPM-Ca7	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i> L., Spain	U07934
UPM-Ca36	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i> L., Spain	L38825
LMGG8443	<i>Bt. denitrificans</i>		X66025
IAM13154	<i>My. dimorpha</i>		D12786
IAM 13153	<i>My. bullata</i>		D12785
IAM 13584	<i>Ph. myrsinacearum</i>		D12789
IAM 13587	<i>Ph. rubiacearum</i>		D12790
IAM 14158	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> , China	D12791
IAM 14142	<i>S. xinjiangensis</i>	<i>Glycine max</i> , Xinjiang, China	D12796
IAM 14119	<i>Och. anthropi</i>		D12794
ATCC 49852	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i> , United States	U35000
ATCC 14483	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	U47303

续表 1

LMG7836	<i>M. plurifarum</i>	X68389
USDA1037	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i> (annual)
SH22623		<i>G. multiflora</i> , Gansu, China
SH19312		<i>G. pallidiflora</i> , Ningxia, China
SH2672		<i>G. multiflora</i> , Gansu, China
XJ96060		<i>Medicago sativa</i> , Xinjiang, China
XJ96408		<i>Melilotus</i> sp., Xinjiang, China

LMG: Culture Collection Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Gent, Belgium; IAM: Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Md.; NZP: Division of Scientific and Industrial Research, Palmerston North, New Zealand; USDA: Beltsville Rhizobium Culture Collection, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Md.

1.2 方法

1.2.1 16 SrDNA 全序列测定: DNA 提取采用酚/氯仿/异戊醇抽提法。菌株用 TY 培养基培养至对数生长期, 12 000r/min 离心收集菌体后, 用 10mmol/L Tris-HCl 洗涤三次, 溶菌酶破壁, 蛋白酶处理, 再用酚/氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀, 风干, 最后溶解 DNA 于 TE (10 mmol/L Tris. Cl, pH7.6, 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 中。16SrDNA 的扩增^[18]: 以总 DNA 为模板, 用正向引物 P1: 5' - CGg gat ccA GAG TTT GAT CCT GGC TCA GAA CGA ACG CT-3' (对应于大肠杆菌的第 8~37 碱基位置), 反向引物 P6: 5' -CGg gat ccT ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT CAC CCC-3' (对应于大肠杆菌的第 1479~1506 位置) 经 PCR 反应扩增出 16SrDNA, PCR 反应体积为 100 μ L, 其中含 4.5 μ L 的模板 DNA (约 200ng), 10 μ L 的 10 \times 反应缓冲液, 1 μ L 引物 P1 (约 20 ng), 1 μ L 引物 P6 (约 20 ng), 2 μ L 的 4 \times dNTP 混合物 (终浓度为 200 μ mol/L), 81 μ L 重蒸水, 0.5 μ L Taq 酶 (3U/ μ L, 预变性后立即加入), 80 μ L 石蜡油。PCR 反应条件按 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 第 1 个循环 (95 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 60 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min), 第 2~35 个循环 (95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min) 进行。PCR 产物克隆^[18]: 用 BamH I 对 PCR 产物及质粒 pUC18 进行酶切后, 粘端连接, 转化大肠杆菌菌株 DH5 α , 蓝白斑筛选。提取质粒 DNA (50 μ L, 浓度 \geq 0.3 μ g/ μ L) 由 ABI377 自动测序仪测序。

1.2.2 菌株系统发育学分析: 用 SeqPup (0.6 version)^[19] 软件进行序列录入, 转化为 PHYLIP 软件包 (3.572c version)^[20] 可以读取的文件格式。用 PHYLIP 软件包采用 SEQ-BOOT、DNADIST、NEIGHBOR、CONSENSE 应用程序进行序列随机取样 (1000 次), 相似性计算, 树状图产生^[21,22]。

2 结果和讨论

2.1 群 1、2 的中心株 XJ96060、XJ96408 的 16S rDNA 全序列

对获得的序列图谱进行分析处理, 因以双链作模板测序, 对相对方向的序列结果取其互补序列, 去掉重叠区域和引物区, 连接三个引物的测序结果得到两株菌的全序列 (共 1423bp)。图 1 和图 2 列出了 XJ96060 和 XJ96408 的 16S rDNA 全序列。

1	AACGAACGCT	GGCGGCAGGC	TTAACACATG	CAAGTCGAGC	GCCCCGCOGA
51	GGGGAGCGGC	AGACGGGTGA	GTAACGCGTG	GGAACTACC	CTTTTCTACG
101	GAATAACACA	GGGAAACTTG	TGCTAATACC	GTATGAGCCC	TTAGGGGGAA
151	AGATTTATCG	CGAAAGGATG	AGCCCGCGTT	GGATTAGCTA	GTTGCTAAGG
201	TAAAGGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCCATAGC	TGGTCTGAGA	GGATGATCAG
251	CCACATTGGG	ACTAAGACAC	GGCCCAAAC	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGG
301	GGAATATTGG	ACAATGGGGG	AAAGCCTGAT	CCAGCCATGC	CTGCTGAGTG
351	ATGAAGGTCT	TAAGGTTGTA	AAGCTCTTTC	GTGGGTGAAG	ATAATGACGG
401	TAACCGGAGA	AGAAGCCCCG	GCTAACTTCG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAAATA
451	CGAAAGGGGC	TAGCGTTGTT	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	GGCACGTAAG
501	CGGATTGATC	AGTGAAGGGG	GAAATCCCAA	AGGTCAACCC	TGGAAGTGCC
551	TTTGATACTG	GCAATCTTGA	GTCCAGAAGA	GGTGAGTGG	ATTCCGAGTG
601	TAGAGGTGAA	ATTCGTAGAT	ATTCGGAGGA	ACACCAGTGG	CGAAGGCGGC
651	ATACTGCTCT	GGAACTGACG	CTGAGGTGCG	AAAGCGTGGG	GAGCAAACAG
701	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA	ACGATGAATG	CCAGCCGTTA
751	GGCAGTATAC	TGTTCCGGTG	CGCAGCTAAC	GCATTAAACA	TTCCGCCTGG
801	GGAATACGGT	CGCAAGATTA	AAACTCAAAG	GAATTGACGG	GGGCCCGCAC
851	AAGCGGTGGA	GCATGTGGTT	TAATTGGAAG	CAACGCGCAG	AACCTTACCA
901	GCCCTTGACA	TGTCCAGGAC	CGGTCGCGGA	GATGTGACCT	TTCAGTTGCG
951	ATGGAAC-AC	AGGTG-CTGC	ATGGCTGTCTG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG
1001	TTGGGTAAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	TGCGCCCTTAG	TTGCCAGCAT
1051	TCAGTTGGGC	ATTCTAAGGA	GACTGCCGGT	GATAAGCOGA	GAGGAAGGTG
1101	GGGATGACGT	CAAGTCTTCA	TGGCCCTTAC	GGGCTGGGCT	ACACACGTGC
1151	TACAATGATG	GTGACAGTGG	GCAGCGAGAG	CGCGAGGTCTG	AGCTAATCTC
1201	CAAAAGCCAT	CTCAGTTCGG	ATTGCACTCT	GCAACTCGAG	TGCATGAAGT
1251	TGGAATCGCT	AGTAATCGCA	GATCAGCATG	CTGCGGTGAA	TACGTTCCCCG
1301	GGCCTTGATC	ACACCGCCCG	TCACACCATG	GGAGTTGGCT	CTACCCGAAG
1351	GTAGTGCGCT	AACCGCAAGG	AGGCAGCCGG	CCACGGTAGG	GTCAGCGACT
1401	GGGGTGAAGT	CGTAACAAGG	TA-		

图 1 群 1 的中心株 XJ96060 的 16SrDNA 全序列

Fig.1 16SrDNA full length sequence of centro-strain(XJ96060)of Group1

2.2 各菌株间 16S rDNA 全序列相似性

为了比较各菌株间的 16S rDNA 全序列相似性,把各菌株序列转化为 PHYLIP(3.572c Version)可以识别的形式,用 DNADIST 应用程序求各菌株序列的遗传距离,然后转化为相似性,表 2 列出了各菌株的 16S rDNA 全序列的相似性。群 1 与各已知种的 16S rDNA 全序列相似性 83.25%~95.50%。群 1 和 *Sinorhizobium* 属中各种的 16S rDNA 全序列相似性 95.12%~95.50%,其中与 *S. saheli* 为 95.36%,与 *S. teranga* 为 95.30%,与 *S. xinjiangensis* 为 95.20%,与 *S. fredii* 为 95.12%,与 *S. medicae* 为 95.45%,与 *Smeliloti* 为 95.50%,群 2 和 *Sinorhizobium* 属中各种的 16S rDNA 全序列相似性 95.68%~99.15%,其中与 *S. saheli* 为 95.68%,与 *S. teranga* 为 96.13%,与 *S. xinjiangensis* 为 97.84%,与 *S. fredii* 为 97.55%,与 *S. medicae* 99.15%,与 *S. meliloti* 为 98.71%,

2.3 聚类结果

对各菌株的 16S rDNA 全序列进行遗传距离计算,计算次数设为 1000 次,对此 1000

表 2 各菌株 16S rDNA 全序列相似性

Table 2 Similarity of 16S rDNA full length sequence of strains

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
1. <i>A. rhizogenes</i>	93.04																																			
2. <i>A. rubi</i>	94.14	96.50																																		
3. <i>A. terre-faciens</i>	93.60	94.05	94.21																																	
4. <i>A. vitis</i>	88.96	89.03	88.53	88.59																																
5. <i>Ae. caudimolans</i>	95.15	93.32	94.09	93.43	89.13																															
6. <i>S. fredii</i>	94.83	94.30	94.52	96.29	89.47	93.98																														
7. <i>R. gladii</i>	97.77	92.29	93.41	92.88	89.45	94.37	95.66																													
8. <i>R. leguminosarum</i>	95.95	92.99	93.77	93.27	89.21	96.87	93.96	94.75	94.85	94.86																										
9. <i>M. loti</i>	99.29	93.11	94.22	93.19	88.62	95.09	94.66	97.40	92.53	93.18	95.46																									
10. <i>ChasU</i>	99.07	92.87	93.98	93.11	89.24	94.62	94.50	97.70	92.79	93.34	95.00	99.00																								
11. <i>S. melilotis</i>	94.31	95.98	96.81	94.76	88.99	94.70	95.76	93.98	92.27	92.75	94.38	94.06	93.68																							
12. <i>R. etnopsiA</i>	96.21	92.16	93.28	93.68	89.77	94.67	95.67	97.10	92.37	92.36	95.05	96.05	96.05	95.39																						
13. <i>R. etnopsiB</i>	92.31	92.90	93.14	91.83	88.22	94.54	92.96	91.71	96.45	95.71	94.68	91.98	91.90	93.44	92.68																					
14. <i>SH2012</i>	93.20	93.61	93.06	92.63	88.82	95.01	94.20	92.85	97.92	97.78	95.00	92.88	93.04	93.52	92.35	92.27																				
15. <i>R. lotumense</i>	93.69	95.30	95.83	94.15	88.85	93.78	95.17	93.25	92.12	92.60	93.76	93.43	93.04	98.07	94.70	93.53	93.37																			
16. <i>S. 2572</i>	93.67	92.21	93.08	92.62	88.71	97.48	93.01	93.33	94.14	94.94	96.74	93.44	93.36	93.05	93.48	93.67	94.61	92.42																		
17. <i>M. iroshikense</i>	87.17	85.46	85.49	84.82	87.41	87.15	86.73	87.29	87.77	87.61	87.21	87.31	87.46	86.12	87.75	86.73	87.29	86.14	87.41	86.77																
18. <i>SH2023</i>	92.59	92.23	91.66	91.91	88.85	93.89	93.09	92.32	96.78	97.61	94.12	92.27	92.43	92.30	92.01	95.59	97.24	92.31	93.80	93.10	88.33															
19. <i>S. alabai</i>	92.28	93.03	92.14	92.30	89.42	93.44	93.65	92.01	97.18	97.25	93.19	92.19	92.35	92.54	91.04	94.61	96.94	92.55	93.26	94.36	87.51	98.06														
20. <i>S. lenzaga</i>	88.40	86.45	86.48	86.49	87.16	88.47	88.27	87.77	87.29	88.52	87.97	88.28	88.94	86.93	88.02	87.21	88.44	86.94	89.05	87.88	96.83	88.10	88.20													
21. <i>B. japonicus</i>	93.52	92.21	92.91	92.73	89.98	96.37	93.51	93.09	95.55	95.75	95.47	98.28	93.61	92.93	95.31	96.37	95.69	96.20	94.92	87.87	95.51	95.05	89.84													
22. <i>M. ciceri</i>	92.61	91.76	91.52	90.83	91.71	94.47	91.88	92.53	92.72	94.13	93.70	92.94	93.10	91.95	92.30	92.01	93.19	92.12	93.36	93.85	88.36	92.52	93.15	87.89	95.72											
23. <i>M. mediterraneanum</i>	93.25	92.11	92.11	91.64	90.00	95.15	92.35	92.75	96.36	92.21	94.54	92.93	93.09	92.17	92.22	93.45	95.29	92.10	94.91	94.45	86.77	95.95	95.34	86.87	95.74	94.05										
24. <i>B. dentifera</i>	92.84	91.85	91.85	91.37	89.56	94.91	92.01	92.33	95.12	95.77	94.30	92.52	92.68	91.98	91.80	93.20	95.05	91.48	95.14	94.21	86.59	95.71	95.09	86.70	95.51	93.96	99.79									
25. <i>Mp. dimorpha</i>	95.15	92.91	92.25	92.61	89.10	94.92	94.92	93.72	94.80	96.43	99.43	94.83	92.93	92.99	92.80	92.58	96.45	98.21	92.57	94.90	93.91	88.09	93.20	97.54	88.62	96.74	93.97	96.20	95.97							
26. <i>Mp. bellina</i>	86.00	85.40	85.72	85.92	87.85	85.43	87.28	86.24	84.27	84.06	84.33	85.82	86.26	87.20	87.07	83.54	84.42	85.21	84.96	84.75	85.40	84.36	86.64	87.25	85.56	85.06	94.01	95.30								
27. <i>Phopisicoccus</i>	86.67	86.60	86.26	85.36	88.80	88.26	87.15	86.22	88.06	88.82	87.82	87.14	87.22	86.77	86.29	87.38	88.21	86.51	88.73	89.86	94.99	87.72	89.73	93.02	89.31	90.30	87.14	87.57	88.78	88.41	85.34					
28. <i>M. luteolus</i>	96.48	91.95	93.08	92.51	88.65	94.68	94.04	96.57	93.65	94.36	95.06	96.33	96.42	93.72	95.88	93.00	93.73	93.33	94.28	93.87	88.68	93.68	93.78	89.72	94.51	93.88	93.48	93.07	94.07	94.98	86.26	88.54				
29. <i>S. melilotis</i>	94.98	92.19	92.98	92.95	88.25	97.35	93.72	94.51	93.58	93.92	98.57	94.91	94.44	93.59	94.72	93.40	93.74	92.89	95.92	95.99	87.50	93.64	92.70	88.14	94.54	92.28	93.75	93.51	93.87	97.84	94.36	86.74	94.83			
30. <i>S. zingibargensis</i>	94.89	91.68	92.62	92.62	88.07	97.55	93.47	94.27	93.82	93.76	98.71	94.83	94.53	93.42	84.56	93.24	93.57	85.68	95.13	86.95	93.47	92.54	87.60	94.38	92.57	93.59	93.34	93.71	97.84	84.24	86.55	94.52	99.15			
31. <i>Ch. anthracis</i>	92.64	90.56	91.24	90.55	87.99	95.12	91.20	92.25	90.60	90.68	95.00	92.34	92.09	91.05	92.34	90.56	90.64	90.18	95.36	95.39	88.76	91.01	90.53	88.85	90.81	90.88	91.10	90.83	91.13	95.20	83.25	84.92	92.53	95.45	94.45	
32. <i>B. albari</i>																																				
33. <i>R. ale</i>																																				
34. <i>S. melilotis</i>																																				
35. <i>XN6408</i>																																				
36. <i>XN6500</i>																																				

1	AACGAACGCT	GGCGGCAGGC	TTAACACATG	CAAGTCGAGC	GCCCCG-AA
51	GGGAGCGGC	AGACGGGTGA	GTAACGCGTG	GGAATCTACC	CTTTTCTACG
101	GAATAACGCA	GGGAAACTTG	TGCTAATACC	GTATGAGCCC	TTCGGGGAA
151	AGATTTATCG	GGAAAGGATG	AGCCCGCGTT	GGATTAGCTA	GTTGGTGGGG
201	TAAAGGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCCATAGC	TGGTCTGAGA	GGATGATCAG
251	CCACATTGGG	ACTAAGACAC	GGCCCAAACT	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGG
301	GGAATATTGG	ACAATGGGCG	CAAGCCTGAT	CCAGCCATGC	CGCGTGAGTG
351	ATGAAGGCC	TAGGGTTGTA	AAGCTCTTTC	ACCGGTGAAG	ATAATGACGG
401	TAACCGGAGA	AGAAGCCCCG	GCTAACTTCG	TGCAGCAGC	CGCGGTAATA
451	CGAAGGGGGC	TAGCGTTGTT	CGGAATTACT	GGCGGTAAG	CGCACGTAGG
501	CGGATTGTTA	AGTGAAGGGT	GAAATCCCAA	GGCTCAACCC	TGGAAGTCC
551	TTTCATACTG	GCAATCTAGA	GTCCAGAAGA	GGTGAGTGGA	ATTCCGAGTG
601	TAGAGGTGAA	ATTCGTAGAT	ATTCCGAGGA	ACACCAGTGG	CGAAGCGGGC
651	TCACTGGTCT	GGAAGTACG	CTGAGGTGCG	AAAGCGTGGG	GAGCAACACG
701	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA	ACGATGAATG	TTAGCCGTCC
751	GGCAGTTTAC	TGTTCCGTGG	CGCAGCTAAC	GCATTAACA	TTCCGCCTGG
801	CGAGTACGGT	CGCAAGATT	AAACTCAAAG	GAATTGACGG	GGGCCCGCAC
851	AAGCGGTGGA	GCATGTGGTT	TAATTCGAAG	CAACGGGAG	AACCTTACCA
901	GCCCTTGACA	TCCCGATCGC	GGATACGAGA	GATCGTATCC	TTCAGTTCGG
951	GATCGGAGAC	AGGTG-CTGC	ATGGCTGTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG
1001	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	TGCGCCTTAG	TTGCCAGCAT
1051	TCAGTTGGGC	ATTCTAAGGG	GACTGCCGGT	GATAAGCCGA	GAGGAAGGTG
1101	GGGATGACGT	CAAGTCTTCA	TGGCCCTTAC	GGGCTGGGNT	ACACACGTGC
1151	TACAATGATG	GTGACAGTGG	GCAGCGAGAC	CGCGAGGTGG	AGCTAATCTC
1201	CAAAAGCCAT	CTCAGTTCCG	ATTGCANTCT	GCAANTCGAG	TGCATGAAGT
1251	TGGAATCGCT	AGTAATCGCA	GATCAGCATG	CTCGGTGAA	TACGTTCCCG
1301	GGCCTTGTAC	ACACCGCCCG	TCACACCATG	GGAGTTGGTT	CTACCCGAAG
1351	GTAGTGGCGT	AACCGCAAGG	AGGCAGCTAA	CCACGGTAGG	GTCAGCGACT
1401	GGGGTGAAGT	CGTAACAAGG	TAG		

图2 群2的中心株XJ96408的16SrDNA全序列

Fig.2 16SrDNA full length sequence of centro-strain(XJ96408)of Group2

次的计算结果进行一致化运算,并用DRAWGRAM应用程序,根据遗传距离作图,图3给出了各菌株以16S rDNA全序列为基础的聚类图。

从图3可以看出,所有菌株在系统发育树中基本分成 *Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、*Agrobacterium-Rhizobium*、*Rhizobium*、*Azorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 六个分枝。

固氮根瘤菌属 *Az. caulinodans* 构成一个独立的分枝。

慢生根瘤菌属独自构成一个分支,包括慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)和埃尔坎慢生根瘤菌(*B. elkanii*)。

天山中慢生根瘤菌(*M. tianshanense*)、分自黄土高原的根瘤菌SH2627、*M. plurifarium*、百脉根中慢生根瘤菌(*M. loti*)、鹰嘴豆中慢生根瘤菌(*M. ciceri*)、地中海中慢生根瘤菌(*M. mediterraneum*)及华癸中慢生根瘤菌(*M. huakuii*)亲缘关系较近,共同构成中慢生根瘤菌属分支。

土壤杆菌属与根瘤菌属的种在系统发育上互有交叉。发根土壤杆菌(*A. rhizogens*)

与热带根瘤菌的两个生物型(*R. tropici* A, *R. tropici* B)、豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)及菜豆根瘤菌(*R. etli*)构成一个分支。山羊豆根瘤菌(*R. galegae*)和 *A. vits*, 另两株分自黄土高原的根瘤菌 SH22623、SH19312 及 *A. tumefaciens*、*A. rubi* 构成另一分枝。

S. saheli、*S. teranga*、新疆中华根瘤菌(*S. xinjiangensis*)、弗氏中华根瘤菌(*S. fredii*)及苜蓿中华根瘤菌(*S. meliloti*)、*S. medicae* 构成中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)发育分支, 群 1、2 则落在这一发育分支中, 结合 16SrDNA 相似性的计算结果, 可以看出群 1、2 属于 *Sinorhizobium* 属。

群 1、2 的菌株为分离自新疆干旱地区的苜蓿、草木樨植物根瘤菌, 群 2 菌株分离自新疆石河子地区的乌兰乌苏, 东湾等地。群 1 的菌株分离自新疆吐鲁番干旱地区, 该地区海拔为 -95 m ~ -76 m。土壤的酸碱度为 pH8.6 ~ 9.1, 最高温度 47.6 ℃, 年平均降水量为 16.4 mm, 年平均蒸发量为 3000 mm, 可以认为新疆干旱地区的苜蓿、草木樨植物根瘤菌在系统发育地位上属于 *Sinorhizobium* 分枝。

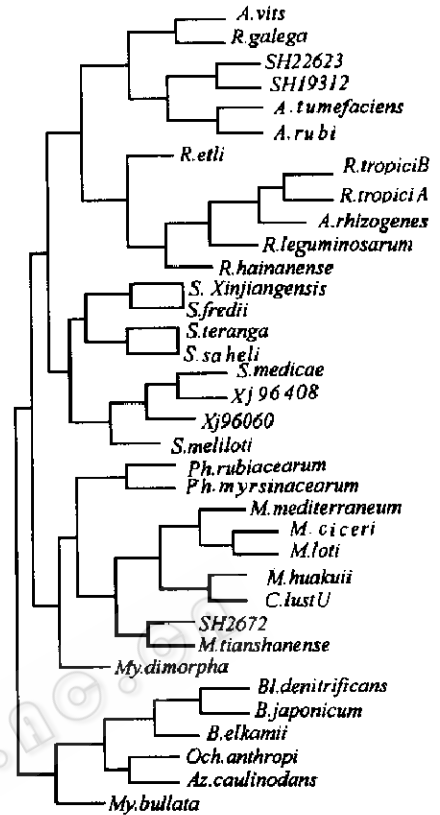


图 3 16S rDNA 全序列分析聚类结果

Fig. 3 Dendrogram of 16SrDNA full length sequence analysis

参 考 文 献

- [1] Gao W M, Yang S S. *Microbiology*, 1995, 141: 1957~1962.
- [2] Eardly B D, Hannaway D B, Bottomley P L J, et al. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50: 1422.
- [3] Eardly B D, Young J P W, Selander R K. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 1809~1815.
- [4] Eardly B D, Materon L A, Smith N H, et al. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 56: 187~194.
- [5] Rome S, Fernandez M P, Brunel B, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46(4): 972.
- [6] Iwabe N, Kuma K I, Hasegawa M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 9355~9359.
- [7] Winker S, Woese C R. *Syst Appl Microbiol*, 1991, 14: 305~310.
- [8] Woese C R. *Microbiol Rev*, 1987, 51: 221~227.
- [9] Woese C R, Kandler O, Wheelis M L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 4576~4579.
- [10] Woese C R, Kandler O, Wheelis M L. *Nature*, 1991, 351: 528~529.
- [11] Young J P W, Downer H L, Eardly B D. *J Bacteriol*, 1991, 173(7): 2271~2277.
- [12] Willems A, Collin M D. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 96: 241~246.
- [13] Willems A, Gillis M, Collins M D. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43: 305~313.
- [14] Yanagi M, Yamasato K. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 107: 115~120.
- [15] Nour S M, Fernandez M P, Normand P, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44: 511~522.
- [16] De Lajudie, Willems P A, Pot B, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44: 715~733.

- [17] Nour S M, Cleyet-Marel J C, Normand P, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45(4):640~648.
- [18] Tan Zhiyuan, Xu Xiaodong, Wang Entao, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(3):874.
- [19] Gilbert D G, SeqPup program, Distributed by the author. Bloomington: Department of Biology, Indiana University. 1996. version 0.6.
- [20] Felsenstein J, PHYLIP-(Phylogeny Inference Package). Distributed by the author. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1993. version 3.572c.
- [21] 徐毅,周培谨.微生物学报,1996,36(2):79~86.
- [22] 徐毅,周培谨.微生物学报,1996,36(4):241~249.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF TWO RHIZOBIA NEW GROUPS

Yan Aimin Chen Wenxin

(China Agriculture University, Biological College, Beijing 100094)

Abstract: On the basis of numerical taxonomy, SDS-PAGE whole-cell protein analysis, 16S rDNA PCR-RFLP and DNA-DNA hybridization, the full length of 16SrDNA of two strains (XJ96060, XJ96408) were sequenced and compared with the 16S rDNA sequences of other members of the alpha 2 subclass of the Proteobacteria available from GenBank. An unrooted tree was produced to determine the phylogenetic relationships of two groups. The results showed that all strains were clustered into 6 branches, they were *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Agrobacterium-Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*. Group1, 2 fell into *Sinorhizobium* branch.

Key words: Rhizobia, 16SrDNA sequencing, Phylogenetic analysis

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39670017)

敬告读者

《微生物学报》是中国自然科学核心期刊(名列生物类期刊第4~6位)。据中国科技信息研究所最新出版的《中国科技期刊引证报告》(CJCR)中报道,1998年我刊的影响因子为0.359,名列生物类期刊第八位。

另据中国科学引文数据库1998年最新数据统计,在被引频次最高的中国科技期刊500名排行表中,本刊名列第68位,并连续五年(1994~1998)入围中国科技期刊《引文频次百名表》。