

用 AFLP 技术和 16S rDNA PCR-RFLP 分析 毛苜蓿根瘤菌的遗传多样性*

冯瑞华

(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)

摘 要 采用选择性扩增片段长度多态性(简称 AFLP)DNA 指纹技术对采自我国云南省与西藏交界的高山地区的野生型豆科植物毛苜蓿根际土样分离的 291 株毛苜蓿(*Medicago edgeworthii*)根瘤菌进行遗传多样性的研究。从 AFLP 图谱中,揭示出毛苜蓿根瘤菌有较显著的遗传多样性,从 291 株中选择出 90 个代表株用计算机进行树状图的分析。结果表明,所分析的菌株在 79% 的相似性水平上聚类成 3 个群。对这 90 个代表株进行多聚酶链反应(PCR)扩增的 16S rDNA 的 4 种限制性内切酶长度多态(简称 16S rDNA PCR-RFLP)分析,得出 2 个不同的 16S rDNA PCR-RFLP 类型的菌株。分别选出这 2 个类型的代表菌株与各种根瘤菌的参比菌株进行 16S rDNA PCR-RFLP 分析,再进行树状图的分析,初步得出了它们在根瘤菌系统分类中的地位。分析结果表明:毛苜蓿根瘤菌与根瘤菌属中的 *Rhizobium mongolense* 的相似性很高。

关键词 AFLP, 16S rDNA PCR-RFLP, 毛苜蓿根瘤菌

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)04-0339-45

紫苜蓿(*Medicago sativa*)是世界上最多产的,营养丰富的并且分布广泛的牧草豆科作物之一,在我国分布也非常广泛。它的共生体根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)被重新定名为苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)^[1]。苜蓿属(*Medicago*)在世界上有 60 多个不同的品种,我国有几十种,并且有几种独特的野生品种,毛苜蓿(*Medicago edgeworthii*)就是其中的一种有开发潜力的新的牧草作物,它的一些优良的遗传特性有可能用于改良紫苜蓿。因此,在发掘新的牧草植物资源的同时,对它的共生体根瘤菌资源进行研究具有重要的意义。

近几年基于 PCR 的多种 DNA 指纹图谱新技术已广泛应用于根瘤菌遗传多样性的分析中^[2-4],而 AFLP 是最近 2~3 年发展起来的一种新的 DNA 指纹图谱技术^[5],随后也发展起来成为又一应用于细菌分类的新技术^[6]。本研究将这一新技术应用到根瘤菌的分类研究。采用这一新技术及 16S rDNA PCR-RFLP 分析,对 291 株毛苜蓿根瘤菌进行遗传多样性研究,探讨这一野生型牧草豆科植物其共生体的基因组的多样性背景以及与其他根瘤菌种的遗传关系,进而确定它的分类系统发育地位,为将来应用这一新的牧草植物奠定基础。

* 联合国教科文组织的短期进修基金资助

作者简介:冯瑞华(1962-),女,陕西临潼人,中国农业科学院土壤肥料研究所助理研究员,硕士,1997 年赴美国农业部农业研究中心研修,主要从事农业微生物学的研究

收稿日期:1999-03-29,修回日期:1999-08-27

1 材料和方法

1.1 菌株及其培养

从我国云南省与西藏交界的海拔 3000~3800m 的高山地区的 5 个地区的 3 种土壤的野生型豆科植物毛苕蓿根际土样中分离的毛苕蓿根瘤菌 291 株(毛苕蓿作寄主捕捉), 各种的参比根瘤菌株 18 株。由于实验菌株量大, 不在这里详细列出, 只列代表株及参比菌株(见表 1)。实验菌株经纯化及原寄主回接确认, 所有菌株均用 MAG 培养基培养^[7]。

表 1 供试菌株一览表

Table 1 Strains used in this study

Strains	Original host	Origin or source	Restriction pattern of 16S rDNA digested with			
			Mbo I	Hha I	Msp I	Hinf I
1-2 ^a 3-1 ^a 3-3 ^a 3-4 ^a 3-10 ^a 4-1 ^b , 4-2 ^b 4-4 ^b 4-12 ^b 4-14 ^b 5-1 ^b 5-2 ^b , 5-7 ^b 5-8 ^b 5-12 ^b 5-18 ^b 5-19 ^b 5-20 ^b , 5-21 ^b 6-1 ^b 6-2 ^b 6-6 ^b 6-9 ^b 6-10 ^b , 6-15 ^b 8-4 ^b	<i>Medicago edgeworthii</i>	云南, 德钦	a	a	a	a
2-1 ^a 2-2 ^a 2-3 ^a 7-1 ^b 7-3 ^b 7-5 ^b 7-6 ^b , 7-7 ^b	<i>M. edgeworthii</i>	云南, 德钦	b	b	a	a
10-1 ^b 10-3 ^b 10-5 ^b 10-8 ^b 10-9 ^b , 10-10 ^b	<i>M. edgeworthii</i>	云南, 尼西	b	b	a	a
11-2 ^a 11-6 ^a 11-9 ^a 11-13 ^a 11-15 ^a , 11-17 ^a 12-2 ^a 12-4 ^a 12-15 ^a	<i>M. edgeworthii</i>	云南, 中甸	a	a	a	a
12-10 ^a 12-14 ^a 12-17 ^a 12-22 ^a 14-1 ^a , 14-2 ^a 14-5 ^a 14-8 ^a 16-4 ^a 16-8 ^a , 16-13 ^a	<i>M. edgeworthii</i>	云南, 中甸	b	b	a	a
18-5 ^c 19-2 ^c 19-4 ^c 19-7 ^c 19-15 ^c , 19-18 ^c 19-27 ^c 23-1 ^c 23-3 ^c 23-13 ^c , 23-14 ^c 23-17 ^c 24-3 ^c 25-3 ^c 25-7 ^c	<i>M. edgeworthii</i>	云南, 个扎	a	a	a	a
26-3 ^a 27-1 ^c 28-1 ^c 28-4 ^c 28-8 ^c 28-9 ^c 28- 10 ^c 30-1 ^c 30-4 ^c 30-6 ^c 30-14 ^c , 31-3 ^c 31-6 ^c	<i>M. edgeworthii</i>	云南, 奔子栏	a	a	a	a
26-7 ^a	<i>M. edgeworthii</i>	云南, 奔子栏	b	b	a	a
Reference Strains	<i>Glycine max</i>	USDA	c	c	b	b
<i>B. japonicum</i> USDA 6						
<i>B. elkanii</i> USDA 76	<i>Glycine max</i>	USDA	c	c	c	c
<i>S. fredii</i> USDA 205	<i>Glycine soja</i>	USDA	d	a	d	d
<i>S. meliloti</i> USDA 1002	<i>Medicago sativa</i>	USDA	d	a	e	d
<i>S. saheli</i> USDA 4893	<i>Sesbania cannabina</i>	USDA	e	a	f	d
<i>S. teranga</i> USDA 4894	<i>Acacia laeta</i>	USDA	f	a	f	d
<i>R. leguminosarum</i> 2370	<i>Pisum sativum</i>	USDA	c	a	a	e
<i>Meso. loti</i> USDA 3471	<i>Lotus corniculatus</i>	USDA	f	a	g	f
<i>R. galegae</i> USDA4128	<i>Galega orientalis</i>	USDA	g	a	h	e
<i>Meso. ciceri</i> USDA3383	<i>Cicer arietinum</i>	USDA	f	d	i	d
<i>Meso. Mediterraneum</i> USDA 3392	<i>Cicer arietinum</i>	USDA	f	a	j	d
<i>Meso. haukuii</i> USDA4779	<i>Astragalus sinicus</i>	USDA	f	a	g	g
<i>Meso. tianshanense</i> USDA 3592	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	USDA	f	d	j	h
<i>R. mongolense</i> USDA1844	<i>Medicago ruthenica</i>	USDA	a	a	a	a

				续表 1			
<i>R. tropici</i> USDA 9030	<i>Phaseoli vulgaris</i>	USDA	c	e	e	e	
<i>B. liaoningense</i> USDA 3622	<i>Glycine max</i>	USDA	c	c	k	b	
<i>R. etli</i> USDA 9032	<i>P. vulgaris</i>	USDA	c	e	e	i	
<i>R. giardinii</i> USDA 2914	<i>P. vulgaris</i>	USDA	h	a	l	e	

Note 1. Strains were marked a b and c letters which represented three types of soil of isolation sites. They were clay loam , sandy loam and loam , respectively.

2. USDA , United States Department of Agriculture.

1.2 DNA 提取

基因组 DNA 用美国 Qiagen 公司的 QIAamp Tissue 试剂盒提取。

1.3 引物及 DNA 聚合酶

所采用的引物均由美国宾夕法尼亚州的 Cybersyn , Inc , Lenni 合成。用于 PCR 扩增反应的 DNA 聚合酶为美国 Perkin Elmer 公司的 ampliTag。

1.4 仪器

所有的 PCR 扩增反应均在 Perkin Elmer Model 480 热循环仪上进行。

1.5 AFLP 分析

本实验采用简化的 AFLP 程序。基因组的酶切、连接和扩增按文献^[8]所述的方法进行,不同的是 AFLP 中第二个扩增反应的引物 3' 端为含有 3 个选择性核苷酸。由于实验菌株多,而采用一组引物中的一种(ACA),PCR 产物在水平电泳槽(210mm×310mm)上用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.6 16S rDNA PCR-RFLP 分析

1.6.1 PCR 扩增:用引物 fD1 和 rD1^[9]进行 16S rDNA 片断的扩增。PCR 以应的总体积为 80 μ L,分别含有 2~10ng 的纯基因组 DNA,10mmol/L 16S rDNA PCR 缓冲液(50mmol/L KCL,1% Triton-X100,10mmol/L Tris pH 9.0),1.5mmol/L MgCl₂,20mmol/L (每种)dATP,dCTP,dTTP(Amersham Life Science,美国),1pM 的引物 fD1 和 rD1,6.4U 的 Tag DNA 聚合酶。反应为 35 个循环,每一循环的程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,51 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,最后一个循环 72 $^{\circ}$ C,延伸 3 min,扩增结束后,取 10 μ L PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳以检查扩增效果。

1.6.2 限制性片断多态性分析:16S rDNA PCR 扩增产物分别用 *Mbo* I, *Hha* I, *Msp* I 和 *Hinf* I(Amersham Life Science 美国)4 种限制性内切酶消化,37 $^{\circ}$ C 过夜。酶反应总体积为 20 μ L,分别含有 10 μ L PCR 反应产物,5U 的内切酶和 2 μ L 的 10X 内切酶反应缓冲液。酶解产物用水平凝胶电泳检查,凝胶为 1% 的琼脂糖与 1% 的 Synerge(Sigma 产品)混合物。

1.7 AFLP 和 16S rDNA PCR-RFLP 结果分析

凝胶电泳结果在紫外光线下拍摄为正片或负片,将图片进行扫描存于计算机中。用 DNA Proscan 公司(美国)的 Proscore 软件,计数片断长度(位置)。对应每个酶切电泳图谱照片,凡是电泳图谱上不同菌株间迁移速率相同的带(片断长度一样)被认为是同一性状,相应与每个菌株,在此位置上有扩增带的编码为“1”,无扩增带的编码为“0”,转换成计算机接受的数值,通过平均连锁聚类法将结果转化为树状图谱。

2 结果和讨论

2.1 AFLP 分析

本实验用 AFLP 分析了 291 株毛苜蓿根瘤菌,其 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳出现 91 个带谱,其分子量大小范围在 4.5~0.3 kb(限于篇幅未给出其 DNA 指纹图谱)。从 AFLP 图谱中,揭示出大多数毛苜蓿根瘤菌株间基因组存在着较显著的多样性。根据 AFLP 的电泳指纹图谱,选择出作为 291 株毛苜蓿根瘤菌的代表株 90 个用计算机进行分析,绘制出树状图(见图 1)。从图 1 中看出,所分析的 90 株菌株在 79% 的相似性水平上分为 3 个群。群 1 由 15 个菌株组成,在 81% 的相似性水平上分为 2 个亚群;群 2 由 69 个菌株组成,在 90% 的相似性水平上分为 11 个亚群;群 3 由 6 个菌株组成,在 85% 的相似性水平上分为 2 个亚群。同时可以看出各群与亚群的菌株间基因组的遗传多样性分布与菌株的地理来源和土壤类型之间没有一定的联系。

2.2 16S rDNA PCR-RFLP 分析

用引物 rD1 和 rD1 对 291 株毛苜蓿根瘤菌中的 90 个代表株进行 16S rDNA 扩增,其扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查,均产生约 1.5kb 的 DNA 带(以 λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III 作分子量标记),该结果表明毛苜蓿根瘤菌与其它根瘤菌的 16S rDNA 的分子量是相同的。扩增产物分别用 4 种限制性内切酶(*Mbo* I, *Hha* I, *Msp* I, *Hinf* I) 酶切,90 个代表株得到 2 种不同的 16S rDNA PCR-RFLP 图谱(图略)。分别选出这两种类型菌株的代表株与 18 株根瘤菌的参比菌株一起进行 16S rDNA PCR-RFLP 分析。结果是酶切图谱有 19 类型,分别用字母 a—i 标识(见表 1)。从酶切图谱类型可以看出,一种类型的毛苜蓿根瘤菌的 RFLP 图谱与根瘤菌属的 *Rhizobium mongolense*^[10] 相同,而与其他根瘤菌的代表菌株之间差异明显。

为了更直观地反映毛苜蓿根瘤菌 16S rDNA PCR-RFLP 与各根瘤菌的参比菌株之间的相似性水平,将酶切图谱用计算机进行分析,获得聚类图(见图 2)。如图所示,毛苜蓿根瘤菌与根瘤菌属的各参比菌株在 89% 的相似性水平上聚类成一群,而不是聚类在中华根瘤菌属群里。它的一种 RFLP 类型的代表株 4-2 和 23-13 与 *R. mongolense* 聚类在一起,而另一种 RFLP 类型的代表株 7-6 和 14-5 独立成一个分支,在 95% 的相似性水平上与另一种类型的代表株聚类成亚群。

毛苜蓿是苜蓿属中的一种有开发潜力的野生品种,对它的共生体根瘤菌的研究未见有报道。本文就是采用 AFLP DNA 指纹分析这一新技术对 291 株毛苜蓿根瘤菌进行了遗传多样性的研究。研究结果表明,毛苜蓿根瘤菌有着明显的遗传多样性。AFLP 是一种高分辨力和重复性好的 DNA 指纹图谱技术^[5],可应用于种和种下水平以及菌株之间的分类鉴定。通常是将 PCR 产物用 5% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测,但用在细菌类的原核生物的分类、鉴定及多样性研究中,操作起来就显得复杂和费时。而本文所采用了简化的 AFLP 方法^[8,11],该法具有较快速、简单和经济的优点,适合于根瘤菌的遗传多样性研究。

由于 16S rDNA PCR-RFLP 分析能够快速鉴定大量菌株在种、属水平上的遗传关系,并与 16S rDNA 序列分析、DNA-rRNA 杂交等分析结果有很好的^[4]一致性,所以为了确定

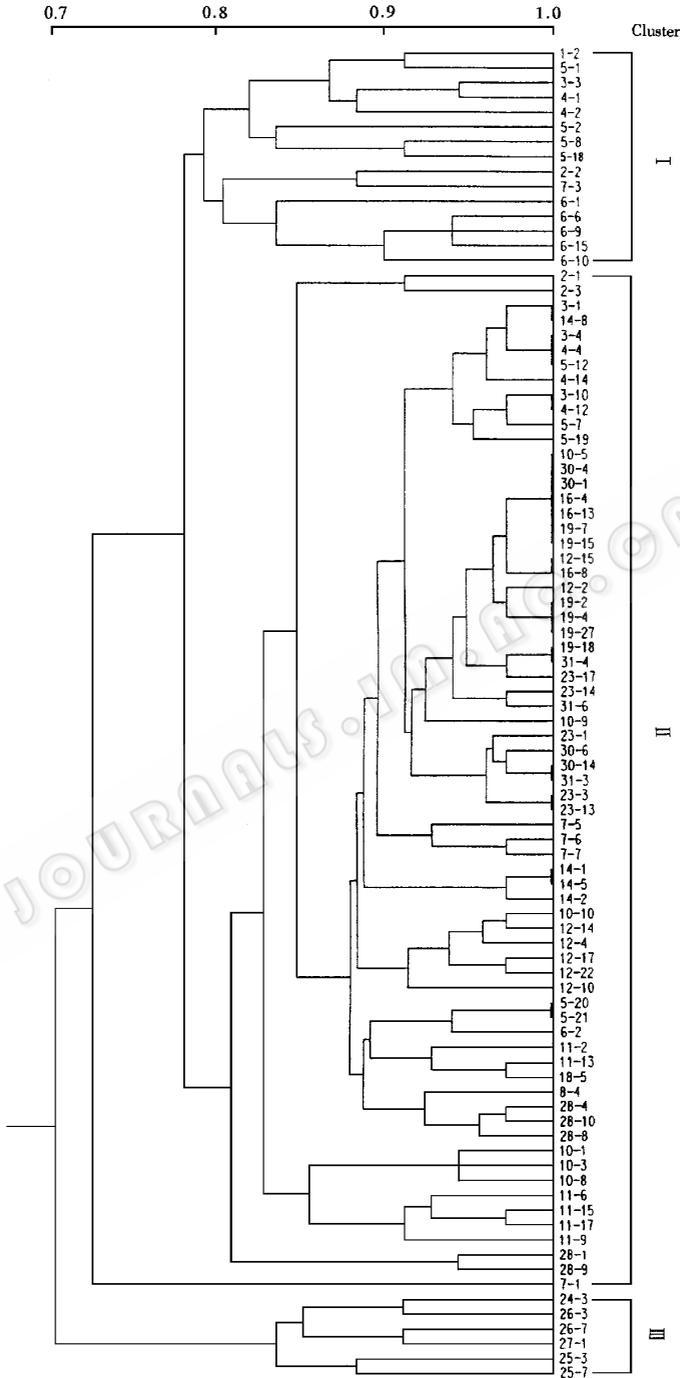


图 1 采用平均连锁法绘制的 AFLP 分析结果树状图(在 79%相似性上进行分群)

Fig.1 UPGMA dendrogram generated from the AFLP analysis the cluster divided at the Similarity of 79%

毛茛菪根瘤菌在根瘤菌分类系统发育的地位,在用 AFLP 方法研究的基础上,将 291 株中

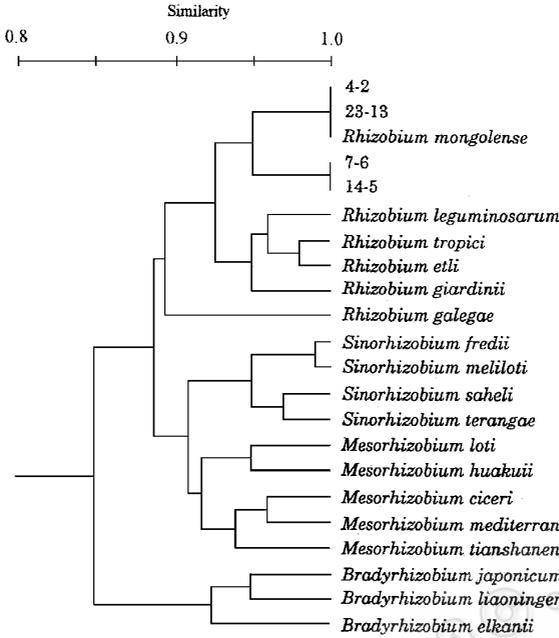


图 2 毛苜蓿根瘤菌的代表株和根瘤菌参比菌株的 16S rDNA PCR-RFLP 分析结果树状图

Fig.2 UPGMA dendrogram generated from the 16S rDNA PCR-RFLP analysis of representative isolates of *Medicago edgeworthii* and reference strains

的 90 个代表株进行了 16S rDNA PCR-RFLP 分析及与参比菌株进行了比较分析。得出毛苜蓿根瘤菌不属于中华根瘤菌属,而属于根瘤菌属,且与 *R. Mongolense* 相似性很高。但毛苜蓿根瘤菌两种 RFLP 类型的菌株是否与 *R. Mongolense* 是一个种,有待于进行 16S rDNA 全序列分析和 DNA-DNA 杂交分析,最后确定它的分类地位。值得一提的是,毛苜蓿根瘤菌的交叉结瘤实验表明,它们不与 *Medicago sativa*、*Medicago ruthenica*(*R. Mongolense* 的寄主)和 *Phaseoli vulgaris* 结瘤。

致谢 本试验是在美国农业部农业研究中心的 Dr. Peter van Berkum 的实验室完成的,供试菌株由该实验室提供。感谢 Dr. Peter van Berkum 和 K. Lee Nash 对本工作的指导和帮助。同时感谢中国农业科学院土壤肥料研究所葛诚先生对本文的指教。

参 考 文 献

[1] de Lajudie P, Willens A, Pot B, et al. *Int J Syst Bacteriol* ,1994 **44** :715~733.
 [2] de Bruijn F. *Appl Environ Microbiol* ,1992 **58** :2180~2187.
 [3] Selenska-Pobell S., Evguenieva-Hackenberg E, Radeva G, et al. *J Appl Bacteriol* ,1996 **80** :517~528.
 [4] Laguerre G, Allard M R, Revoy F, et al. *Appl Environ Microbiol* ,1994 **60** :56~63.
 [5] Vos P, Hogers R, Reijans M, et al. *Nucleic Acids Res* ,1995 **21** :4407~4414.
 [6] Janssen P, Coopman R, Huys G, et al. *Microbiol* ,1996 **142** :1881~1893.
 [7] van Berkum P. *Appl. Environ. Microbiol* ,1990 **56** :3835~3841.
 [8] Mueller U G., Lipari S E, Milaroom M G. *Moleculer Ecology* ,1996 **5** :119~122.
 [9] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A. *中国科学报* 1992 年 7 月 17 日综合第 3 版 <http://journals.im.ac.cn>

- [10] van Berkum P , Beyene D , Bao G P , et al . *Int J Syst Bacteriol* ,1998 **48** :13~22 .
[11] Agathe Clerc , Charles Manceau , Xavier Nesme . *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64** (4) :1180~1187 .

GENETIC DIVERSITY OF RHIZOBIA OF *MEDICAGO EDGEWORTHII* BY AFLP AND RFLP ANALYSIS*

Feng Ruihua

(Soil and Fertilizers Institute , CAAS , Beijing 100081)

Abstract : Two hundred and ninety one isolates of rhizobia sampled from root nodules of *Medicago edgeworthii* which came from Yun Nan Province in china were analyzed by amplified restriction fragment polymorphisn(AFLP) technique . According to the AFLP banding patterns , the results showed most of these isolates were genetically diversity . Ninety isolates were selected as representing the diversity among the 291 isolates . The 90 isolates were clustered into three groups at the level of similarity of 79% by computer analysis of the data . Additional representative isolates and reference strains were identified by restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis of PCR-Amplified 16S rDNA . Two different 16S rDNA PCR-RFLP types were found , which indicated that the isoltes were phylogenetically closely related to *Rhizobium mongolense* .

Key words : AFLP , 16S rDNA PCR-RFLP , Rhizobia of *Medicago edgeworthii*

* Author Received UNESCO Short-term Fellowship in Biotechnology

“ 固定化细胞法生产丙烯酰胺技术 ” 通过审查验收

在国家科技部生物工程开发中心的组织和大力支持下 , 由中国科学院微生物研究所承担的“九五”国家重点科技攻关项目“固定化细胞法生产丙烯酰胺技术” , 经过科研人员的努力工作 , 现已圆满完成合同计划所规定的内容和指标。近日该攻关项目已通过国家科技部审查验收。

中国科学院微生物所业务处