

# 鸡眼草根瘤菌的 16S rDNA 全序列分析\*

韦革宏<sup>1 2</sup> 朱铭莪<sup>2</sup> 陈文新<sup>1 \* \*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学生物学院 北京 100094)(<sup>2</sup> 西北农林科技大学资源与环境科学系 杨凌 712100)

关键词 根瘤菌 鸡眼草根瘤菌 16S rDNA 全序列

中图分类号 Q939.09 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2001)01-0113-04

鸡眼草(*Kummerowia stipulacea*)是一类广泛分布于我国南北各省区的豆科植物。它可作为饲用牧草和绿肥,又可作为中药材,具有清热解毒、治疗腹泻之功效。在西北干旱半干旱地区的沙质土壤及山坡上都大量生长鸡眼草,它们在水土保持、防风固沙、绿化环境等方面起着重要作用<sup>[1]</sup>。但目前,人们还未曾对与鸡眼草共生的根瘤菌作过系统分类研究。我们在该地区野生豆科植物根瘤菌资源调查的基础上,进行了数值分类、SDS 全细胞蛋白电泳分析和 DNA-DNA 杂交,获得了一个新菌群<sup>[2]</sup>。为了进一步研究新菌群的系统发育地位,作者对其中心菌株 SH714 进行了 16S rDNA 的克隆及全序列测定。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

菌株 SH714 来源于陕西,寄主为鸡眼草(*Kummerowia stipulacea*)。基因克隆中使用的大肠杆菌菌株为 DH5 $\alpha$ ,质粒载体为 PUC18。

### 1.2 菌体培养及总 DNA 的提取

菌株用 TY 培养基 28 $^{\circ}$ C 振荡培养至对数生长期,10 000 r/min 离心收集菌体,用 10mmol/L Tris-HCl 洗涤三次,溶菌酶破壁,蛋白酶处理,酚/氯仿/异戊醇抽提,乙醇沉淀,风干,最后溶于 TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.6;1 mmol/L EDTA pH8.0)中<sup>[3]</sup>。

### 1.3 16S rDNA 的 PCR 扩增及克隆

以总 DNA 为模板,用引物 P<sub>1</sub> 5'-CGg gat ccA GAG TTTGAT CCT GGC TCA GAA CGA ACG CT-3' 引物 P<sub>6</sub> 5'-CGg gat ccT ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT CAC CCC-3' 经 PCR 反应扩增出 16S rDNA。用 *Bam* H I 对 PCR 产物及质粒载体 PUC18 进行酶切,混合, T<sub>4</sub>DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 粘端连接,过夜,将连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ 。蓝白斑筛选。

### 1.4 阳性克隆的筛选

将白菌落接种于含氨基青霉素(90 $\mu$ g/mL)及 40 $\mu$ L x-gal 和 4 $\mu$ L IPTG 的 LB 平板中。挑取白色菌落,将其扩大培养后用碱裂解法小量快速提取质粒 DNA。将提取的质粒 DNA 以 *Bam* H I 酶切,1% 琼脂糖电泳检测,以 PCR 产物及纯 PUC18 作对照。同时,以质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,验证克隆结果。

### 1.5 16S rDNA 的全序列测定

纯化质粒 DNA,以 ABT prism 377DNA 自动测序仪测定。测序引物:正向 T<sub>7</sub>5'-AAT ACG ACT

\* 国家自然科学基金重点资助项目(39730010)

\*\* 责任作者

作者简介:韦革宏(1969-),男,甘肃兰州人,西北农林科技大学副教授,博士,主要从事根瘤菌资源及其遗传多样性研究。

收稿日期 2000-01-21 修回日期 2000-05-18

CAC TAT AG-3' 反向 SP<sub>6</sub>5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'。

1.6 碱基序列分析方法

将测得的 16S rDNA 全序列与有关菌株的相应序列用 Sequp(0.5 version)软件进行录入。按照 Saitou 和 Nei 的方法进行聚类(PHYLIP 软件包)<sup>[4]</sup>得出系统发育树状图。序列相似性分析所用参比菌株的信息来自 GenBank, 索取号见文献<sup>[5]</sup>。

2 结果和讨论

2.1 16S rDNA PCR 扩增产物及其转化子

以总 DNA 为模板,PCR 反应扩增出 16S rDNA,以 PUC18 质粒为载体进行克隆,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 蓝白斑筛选,得到质粒转化子。将总 DNA、PCR 产物及转化子跑 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果见图 1。

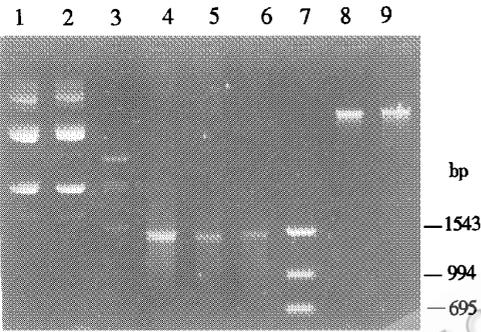


图 1 16S rDNA PCR 产物及转化子图谱

1. SHL042 转化子;2.SH714 转化子;3.PUC18; 4.SHL042 的 16S rDNA;5.SH714 的 16S rDNA; 6.SH714 的 16S rDNA;7.PCR Marker;8. SHL042 的总 DNA;9.SH714 的总 DNA。

2.2 SH714 的 16S rDNA 的全序列测定结果

用 ABI prism 377DNA 自动测序仪测定质粒转化子。因用双链作模板测序,对相对方向的序列结果应取其互补序列,去掉重叠区域和引物区,得到了 16S rDNA 的全序列。Genbank 的注册号为 AF054936。

2.3 16S rDNA 全序列的相似性比较及系统发育

将所测序列与根瘤菌已知种及相关种进行比较,按照 Saitou 和 Nei 的方法进行聚类分析,用 DRAWGRAM 和 DRAWTREE 应用程序,得到以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树,结果见图 2。

图 2 中,新菌群中心菌株 SH714 与新疆中华根瘤菌(*S. xinjiangensis*)、弗氏中华根瘤菌(*S. fredii*)、苜蓿中华根瘤菌(*S. meliloti*)、*S. medicae*、萨赫尔中华根瘤菌(*S. saheli*)和多寄主中华根瘤菌(*S. teranga*)亲缘关系较近,共同构成中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)

发育分支,与该分支内各已知种模式菌株的 16S rDNA 相似性分别为 97.4%、97.5%、96.8%、96.7%、97.2% 和 95.6% 均大于 95%。分支内各种间 DNA 同源性小于 70<sup>[2]</sup>。因此,分离自西北半干旱地区的鸡眼草根瘤菌属于 *Sinorhizobium* 属。

SH714 与 *Rhizobium* 属中各种的 16S rDNA 全序列相似性在 93.7%~95.2% 之间;与 *Mesorhizobium* 属中各种的相似性在 93.1%~94.8% 之间;与 *Bradyrhizobium* 属中各种的相似性在 86.7%~88.0% 之间。据大量资料证明,快生型根瘤菌与土壤杆菌在亲缘关系上比较近,16S rDNA 全序列的相似性比 *Bradyrhizobium* 属的高,在本实验中也有同样的结果。

发根土壤杆菌(*A. rhizogens*)与热带根瘤菌的两个生物型(*R. tropici*A,*R. triopici*B)豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)、菜豆根瘤菌(*R. etli*)、海南根瘤菌(*R. hananensis*)以及新发表的种 *R. mongolense* 和 *R. gallicum* 构成一个分支,相似性在 95.8% 以上。而且在系统发育上 *R. mongolense* 和 *R. gallicum* 与其它种亲缘关系较远,同时该分支内根瘤菌与发根土壤杆菌相互交叉。因此,已有一些学者建议将这一分支重新划分。

土壤杆菌属与根瘤菌属的种在系统发育上互有交叉。山羊豆根瘤菌(*R. galegae*)、*R. huatlense*、悬钩子土壤杆菌(*A. rubi*)、根癌土壤杆菌(*A. tumefaciens*)及葡萄土壤杆菌(*A. vitis*)构成一个分支。这一分支已引起了国际分类学者的关注,共属名正在定义中。

华葵根瘤菌(*M. huakuii*)、*M. amorphae*、中国科 *plumifera* 根瘤菌、百脉根根瘤菌(*M. lotii*)、鹰嘴豆根瘤菌

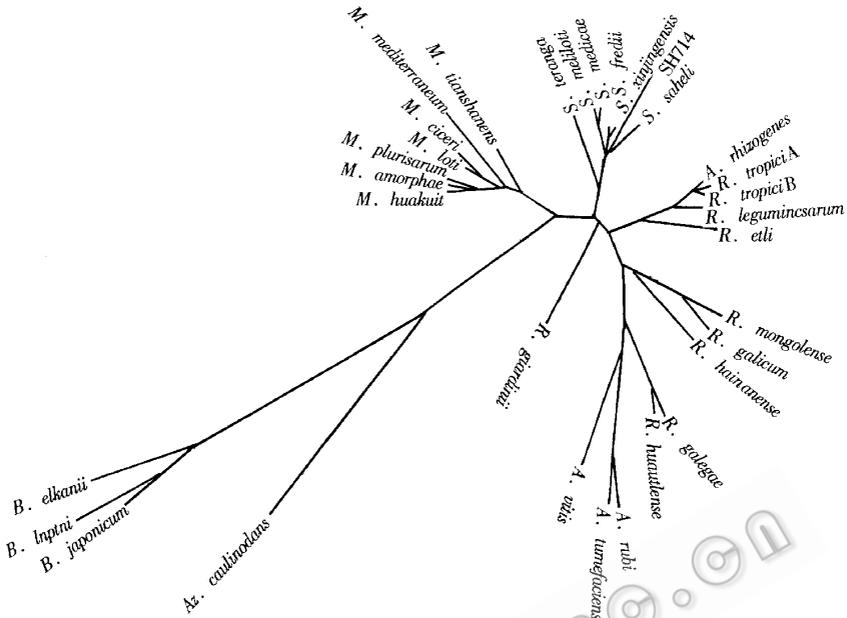


图 2 无根树状图( PHYLIP version 3.572c )

( *M. Ciceri* ) 地中海根瘤菌( *M. mediteraraneum* )、天山根瘤菌( *M. tianshanense* )亲缘关系较近,共同构成中慢生根瘤菌属( *Mesorhizohium* )分支,相似性在 96.7% 以上。

慢生根瘤菌属独自构成一个分支,包括慢生大豆根瘤菌( *B. japonicum* )、埃尔坎慢生根瘤菌( *B. elkanii* )及 *B. lupini* 相似性在 95.8% 以上。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 西北植物研究所. 黄土高原植物志. 第 2 卷. 北京: 中国林业出版社, 1992. 315~495.
- [ 2 ] 韦革宏, 陈文新, 朱铭莪. 微生物学报, 1999, 39( 5 ) 387~395.
- [ 3 ] 林万明. 分析微生物学专辑. 北京: 科学出版社, 1988. 88~89.
- [ 4 ] 谭志远, 陈文新. 微生物学报, 1997, 37( 6 ) 411~416.
- [ 5 ] Saitou N, Masatoshi N. *Molecular Biology Evolution*. 1987, 4( 4 ) 406~425.

## ANALYSIS ON 16S rDNA SEQUENCE OF RHIZOBIA ISOLATED FROM KUMMEROWLA SP. \*

Wei Gehong<sup>1, 2</sup> Zhu Ming<sup>2</sup> Chen Wenxin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(<sup>2</sup>Department of Resource and Environment Science, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract** : Based on the previous studies on numerical taxonomy, SDS-PAGE of whole-cell protein and DNA hybridization, the rhizobial strains isolated from *Kummerowia* sp. in semi-arid area of North-west constituted a new subgroup, the 16S rDNA sequence of representative strain SH714 were tested. The unrooted phylogenetic tree was produced. In this tree the strain SH714 with

*Sinorhizobium xinjiangensis*, *S. fredii*, *S. meliloti*, *S. medicae*, *S. saheli* and *S. teranga* constituted a branch of *Sinorhizobium*. Within this branch, the similarity value of 16S rDNA sequence between strain SH714 and *S. xinjiangensis*, *S. fredii*, *S. meliloti*, *S. medicae*, *S. saheli* and *S. teranga* were 97.4%, 97.5%, 96.8%, 96.7%, 97.2% and 95.6% respectively, the values were more than 95%, this indicated that these known species should belong to the same genus. The values of DNA homology between type strains of these species were less than 70%. Thus, the strain SH714 represented a new rhizobial species, and there were some diversity between SH714 and known rhizobial species in phenotypic feature and composition of protein.

**Key words:** Rhizobia, *Kummerowia* sp., Sequencing of 16S rDNA

\* Key Project of Chinese National Natural Science Fund (39730010)

\* \* \* \* \*

## 电穿孔、电融合可在同一台仪器中实现

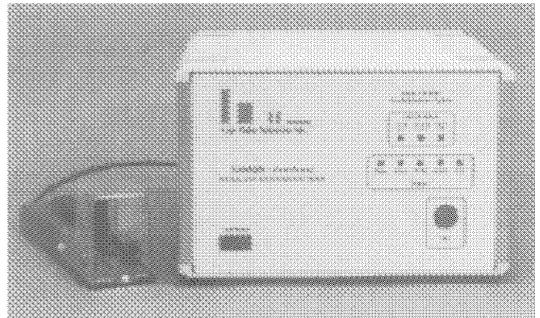
Cyto Pulse Sciences, Inc<sup>TM</sup>——电穿孔仪,电融合仪的专业厂家。

特点:

- 方波输出 提高细胞的存活率和基因表达效率
- 可根据需要调整方波的宽度和间度

用途:

- \* 动物胚胎的克隆
- \* 核移植的克隆
- \* 植物原生质体的融合
- \* 电穿孔 植物、动物、细菌、酵母、真菌



常用型号 PA-2000 和 PA-4000,另有各种型号,可供选择。

详情请看 [www.cytopulse.com](http://www.cytopulse.com) 网站

中国独家总代理

## 毕龙转基因

地址 北京中关村北一条丙 13 号 传真 (010) 62532114

电话 (010) 82625664, 62532114, 62549040, 13910414020