

两个黄芪根瘤菌新类群代表菌株的 16S rDNA 序列分析

辛玉华 陈文新*

(中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094)

摘 要 对黄芪根瘤菌两个新类群中心菌株 CA8561 和 JL84 进行了 16S rDNA 全序列测定,并进行了系统发育学分析。结果表明,CA8561 位于 *Rhizobium* 分支中,JL84 位于 *Sinorhizobium* 分支中。

关键词 根瘤菌,16S rDNA 全序列测定,系统发育分析

中图分类号:Q939.11+4 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)05-0521-05

随着细菌分类学的发展,以生理生化为主的分类体系已被以生理生化为基础结合分子生物学技术的多相分类所取代。目前以 DNA-DNA 杂交结合其它生理生化性状为划分种的标准,种内 DNA-DNA 同源性 $\geq 70\%$;以 16S rDNA 序列的相似性为划分属的标准,属内相似性不低于 95%^[1]。近年来,多相分类的应用使根瘤菌分类得到了巨大发展,已由 1984 年的两属四种发展到六属 32 种。黄芪属是豆科植物中最大的一属,Allen O. N. 和 Allen E. K. 报道过 80 余种结瘤的黄芪植物^[2],王素英等对 36 株黄芪根瘤菌进行了数值分类, DNA-DNA 杂交研究,发现了两个新的根瘤菌类群^[3],本文对这两个菌群的中心菌株 CA8561 和 JL84 进行了全序列分析,以确定这两个新群的系统发育学地位。

1 材料和方法

1.1 菌株

用于 16S rDNA 全序列测定的菌株为两个新群的中心菌株 CA8561 和 JL84。基因克隆中的大肠杆菌菌株为 DH5 α ,质粒载体为 pUC18。

1.2 DNA 提取

菌株用 TY 培养基培养至对数生长期,12 000r/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,再用酚/氯仿/异戊醇抽提,乙醇沉淀,风干,最后溶于 TE(10 mmol/L Tris·Cl pH7.6,1 mmol/L EDTA pH8.0)中^[4]。

1.3 16S rDNA 的扩增

以总 DNA 为模板,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),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 碱基)经 PCR 扩增出 16S rDNA。用限制性内切酶 *Bam*HI 对 PCR 产物及质粒 pUC18 进行酶切连接后,转化大肠杆

* 通讯作者

作者简介:辛玉华(1970-),女,硕士,中国科学院微生物研究所助理研究员,主要从事细菌分类工作。

收稿日期:2001-10-07,修回日期:2002-04-15

菌 DH5 α 蓝白斑筛选得到转化子。提取质粒 DNA ,由中科院微生物研究所技术中心进行手工测序^[4]。

1.4 系统发育学分析

用 PHYLIP 软件包中 DNADIST 程序计算得出各菌株间相似性 ,用 Clustal X 及 Treecov-nw 得出系统发育树状图。各菌株菌号及其 16S rDNA 全序列在 GenBank 中的索取号分别为 *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138(X66024) *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76(U35000) *Afipia felis* ATCC 53690(M65248) *Azorhizobium caulinodans* LMG6465(X67221) *Mesorhizobium huakuii* IAM14158(D12797) *Mesorhizobium amorphae* ACCC19665(AF041442) *Mesorhizobium loti* ATCC33669(D14514) *Mesorhizobium plurifarium* LMG11892(Y14158) *Mesorhizobium mediterraneum* UPM-Ca36(L38825) *Mesorhizobium ciceri* UPM-Ca7(U07934) *Mesorhizobium tianshanense* A-IBS(U71079) *Sinorhizobium xinjiangensis* IAM14142(D12796) *Sinorhizobium fredii* USDA205(D14516) *Sinorhizobium saheli* LMG7837(X68390) *Sinorhizobium meliloti* LMG6133 (X67222) *Sinorhizobium teranga* LMG6463 (X68387) *Rhizobium tropicii* II B LMG9517 (X67234) *Rhizobium galegae* ATCC43677(D11343) *Rhizobium huautilense* SO2(AF025852) *Rhizobium gallicum* R602sp(U86343) *Rhizobium hainanense* I66(U71087) *Rhizobium mongolense* USDA1844(U89817) *Rhizobium etli* CFN42(U28916) *Allorhizobium undicola* LMG11875 (Y17047) *Rhizobium giardinii* H152(U86344) *Agrobacterium rhizogenes* LMG152(X67224) *Agrobacterium vitis* LMG8750(X67225) *Agrobacterium tumefaciens* LMG196(X67223) *Agrobacterium rubi* LMG156(X67228) *Blastobacter aggregatus* ATCC43293(X73041) *Phyllobacterium myrsinacearum* IAM13584(D12789) *Ochrobacterum anthropi* IAM14119(D12794) *Mycoplasma dimorpha* IAM13154(D12786) *Bartonella bacilliformis* ATCC # 35685(Z11683) *Sinorhizobium arboris* LMG14919(Z78204) *Sinorhizobium kostiense* LMG15613(Z78203) *Rhizobium leguminosarum* LMG9518(X67233) *Mesorhizobium chaconense* PR5(AJ278249) *Agrobacterium albertimagini* AOL15(AF316615) *Rhizobium yanglingense* CCBAU71623(AF003375) *Rhizobium tropicii* IAM14206(D12798) *Methylobacterium nodulans* ORS2060(AF220763)

2 结果和讨论

2.1 序列测定结果

菌株 CA8561 和 JL84 的 16S rDNA 全序列见图 1 和图 2。图 1 为 CA8561 的 16S rDNA 全序列(1424bp) ,图 2 为 JL84 的 16S rDNA 全序列(1427bp)

2.2 16S rDNA 序列的相似性比较和系统发育

通过系统发育学分析得出各菌株间相似性及系统发育树状图(图 3)。从图 3 中可以看出在系统发育树中根瘤菌及土壤杆菌分成 *Sinorhizobium*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium*、*Agrobacterium* *Bradyrhizobium*、*Azorhizobium* 和 *Methylobacterium nodulans* 七个分支。由于土壤杆菌属(*Agrobacterium*)与根瘤菌属(*Rhizobium*)的种在系统发育上互有交叉 ,曾经有些学者建议将两属打破界限 ,重新划分^[5-7]。中心菌株 CA8561 位于此分支中 ,并与 *R. gallicum*、*R. mongolense*、*R. yanglingense*、*R. etli* 和 *R. hainanense* 构成一个小的分支。CA8561 与该属各种的相似性分别为 99.50%(*R. gallicum*)、99.14%(*R. mongolense*)、98.70%(*R. yanglingense*)、98.70%(*R. etli*)、98.70%(*R. hainanense*)

1 AACGAACGCT GCGGCAGGC TTAACACATG CAAGTCGAGC GCCCCGCAAG GGGAGCGGCA GACGGGTGAG TAACGCGTGG GAACGTACCC
91 TTTACTACGG AATAACGCAG GGAACTTGT GCTAATACCG TATGTGCCCT TCGGGGAAA GATTATCGG TAAGGGATCG GCGCCGTTG
181 GATTAGCTAG TTGGTGGGGT AAAGGCCTAC CAAGGCGACG ATCCATAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACATTGGGA CTGAGACACG
271 GCCCAAATC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCCT
361 AGGGTTGTAA AGCTCTTTCA CCGGAGAAGA TAATGACGGT ATCCGGAGAA GAAGCCCGG CTAACCTCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC
451 GAAGGGGCT AGCGTTGTTC GGAATTACTG GCGTAAAGC GCACGTAGGC GGACATTAA GTGAGGGGTG AAATCCCAGA GCTCAACTCT
541 GGAAGTGCCT TTGATACTGG GTGTCTGGAG TATGGAAGAG GTGAGTGGAA TTCCGAGTGT AGAGGTGAAA TTCGTAGATA TTCGGAGGAA
631 CACCAGTGGC GAAGGCGGCT CACTGGTCCA TTA CTGACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGG AGCAAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC
721 ACGCCGTAAA CGATGAATGC TAGCCGTCGG CAAGTATACT GTTCGGTGGC GCAGCTAAGC CATTAAACAT TCCGCTGGG GAGTACGGTC
811 GCAAGATTAA AACTCAAAGG AATTGACGGG GCGCCGCACA AGCGTGGAG CATGTGTTT AATTCGAAGC AACGCGCAGA ACCTTACCAG
901 CCTTGACAT GCCCGCTAC CTACAGAGAT GTAGGTTCC CTTCGGGAC CGGACACAG GTGCTGCATG GCTGTGCTCA GCTCGTGTG
991 TGAGATGTTG GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCTCG CCTTAGTTG CCAGCATTTA GTTGGGCACT CTAAGGGGAC TGCCGGTGAT
1081 AAGCCGAGAG GAAGGTGGG ATGACGTCAA GTCCTCATGG CCCTTACGG CTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGTGGTG ACAGTGGGCA
1171 GCGAGCACGC GAGTGTGAGC TAATCTCAA AAGCCATCTC AGTTCGATT GCACTCTGCA ACTCGAGTGC ATGAAGTTGG AATCGCTAGT
1261 AATCGCGGAT CAGCATGCCG CGGTGAATAC GTTCCCGGG CTGTACACA CCGCCCTCA CACCATGGGA GTTGGTTTTT CCCGAAGGTA
1351 GTGCGCTAAC CGCAAGGAGG CAGCTAACCA CGGTAGGTC AGCGACTGG GTGAAGTCGT AACAAGGTAG CCGT

图 1 新类群中心菌株 CA8561 的 16S rDNA 全序列

Fig.1 The full-length of 16S rDNA sequence of representative strain CA8561

1 AACGAACGCT GCGGCAGGC TTAACACATG CAAGTCGAGC GCCCCGCAAG GGGAGCGGCA GACGGGTGAG TAACGCGTGG GGATCTACCC
91 TTTTCTACGG AATAACGCAG GGAACTTGT GCTAATACCG TATAAGCCCT TCGGGGAAA GATTATCGG GAAAGGATGA GCGCCGTTG
181 GATTAGCTAG TTGGTGGGGT AAAGGCCTAC CAAGGCGACG ATCCATAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACATTGGGA CTGAGACACG
271 GCCCAAATC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGAGTGA TGAAGGCCCT
361 AGGGTTGTAA AGCTCTTTCA CCGGTGAAGA TAATGACGGT AACCGGAGAA GAAGCCCGG CTAACCTCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC
451 GAAGGGGCT AGCGTTGTTC GGAATTACTG GCGTAAAGC GCACGTAGGC GGACATTAA GTGAGGGGTG AAATCCCAGA GCTCAACTCT
541 GGAAGTGCCT TTCATACTGG GTGTCTAGAG TATGGAAGAG GTGAGTGGAA TTCCGAGTGT AGAGGTGAAA TTCGTAGATA TTCGGAGGAA
631 CACCAGTGGC GAAGGCGGCT CACTGGTCCA TTA CTGACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGG AGCAAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC
721 ACGCCGTAAA CGATGAATGT TAGCCGTCGG GCAGTTTACT GTTCGGTGGC GCAGCTAAGC CATTAAACAT TCCGCTGGG GAGTACGGTC
811 GCAAGATTAA AACTCAAAGG AATTGACGGG GCGCCGCACA GCGGTGGAGC ATGTGTTTA ATTCGAAGCA ACGCGCAGAA CCTTACCAGC
901 CCTTGACATC CCGATCGCGG ATTACAGAGA TCTTTTCTT CAGTTCGGCT GGATCGGAGA CAGGTGCTGC ATGGCTGTGC TCAGCTCGTG
991 TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCCACAACG AGCGCAACCC TCGCCCTTAG TTGCCAGCAT TTAGTTGGG ACTCTAAGG GACTGCCGGT
1081 GATAAGCCGA GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAC GGGCTGGGT ACACACGTGC TACAATGGTG GTGACAGTGG
1171 GCAGCGAGAC CGCAGGTCG AGCTAATCTC AAAAGCCAT CTCAGTTCGG ATTGCACCT GCAACTCGAG TGCATGAAGT TGAATCGCT
1261 AGTAATCGCA GATCAGCATG CTGCGGTGAA TACGTTCCG GCCTTGTA ACACGCCCC TCACACCATG GGAGTTGGTT TTACCGAAG
1351 GTAGTGCCT AACCGCAAGG AGCGACTTAA CCACGTAGG GTCAGCGACT GGGGTGAAGT CGTAAACAAGG TAGCCGT

图 2 新类群中心菌株 JL84 的 16S rDNA 全序列

Fig.2 The full-length of 16S rDNA sequence of representative strain JL84

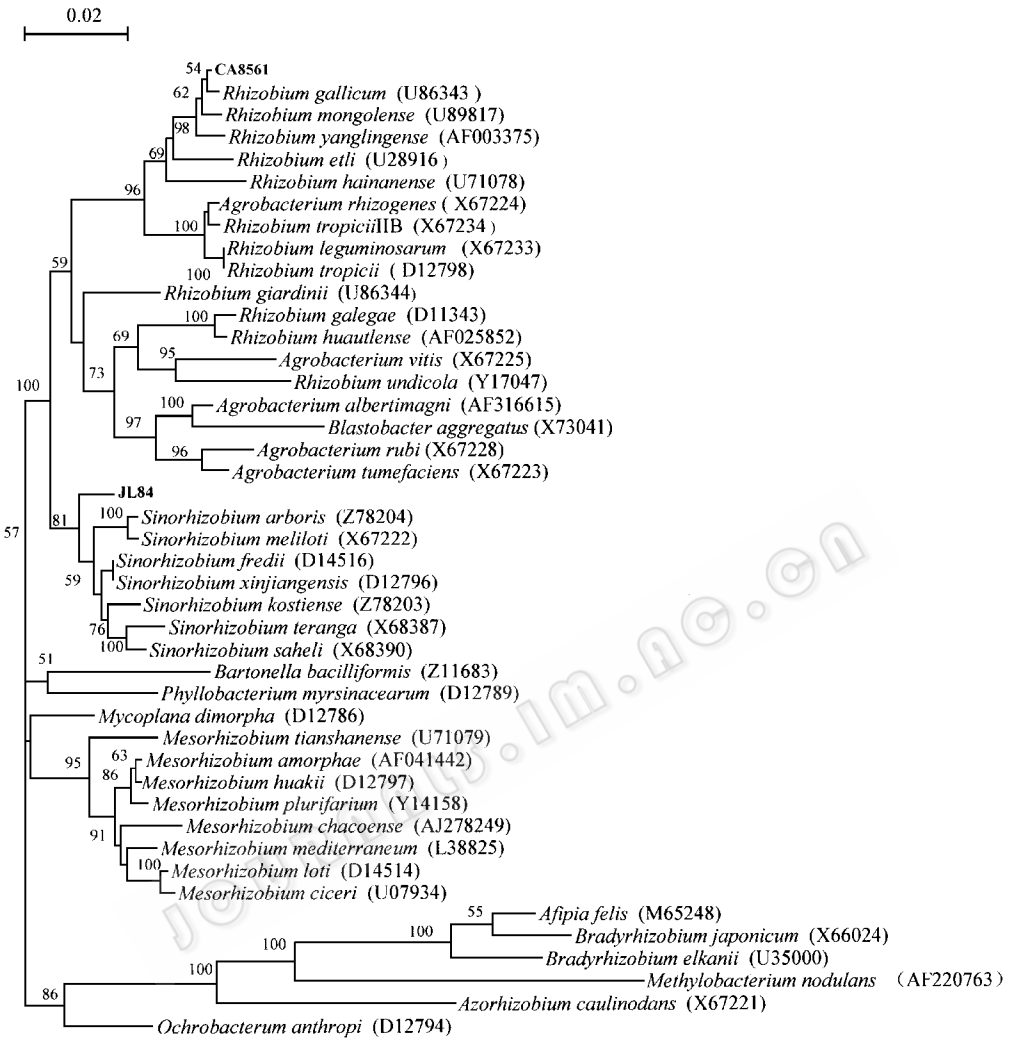


图 3 根瘤菌系统发育树状图

Fig.3 Dendrogram of rhizobial phylogeny

gense) 97.97%(*R. etli*) 97.61%(*R. hainanense*) 97.07%(*R. leguminosarum*) 97.06%(*R. tropicii*) 97.16%(*A. rhizogenes*) 94.87%(*R. giardinii*) 97.31%(*R. huautlense*) 96.85%(*R. galegae*) 95.18%(*R. undicola*) 93.78%(*A. vitis*) 94.65%(*A. tumefaciens*)和 93.80%(*A. rubi*)

S. kostiense、*S. saheli*、*S. teranga*、*S. xinjiangensis*、*S. fredii*、*S. meliloti*、*S. arboris* 和中心菌株 JL84 亲缘关系较近,构成中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)分支。JL84 与该属各种的相似性分别为 97.91%、97.91%、97.99%、98.85%、98.56%、97.62%和 97.47%。

M. tianshanense、*M. plurifarium*、*M. huakii*、*M. amorphae*、*M. chacoense*、*M. mediterraneum*、*M. ciceri* 和 *M. loti* 构成一个独立分支,形成中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)。

两株慢生根瘤菌独自构成一个分支,包括 *Bradyrhizobium japonicum* 和 *Bradyrhizobium elkanii*。

固氮根瘤菌属 *A. canlinodans* 构成一个独立分支。

以前描述的根瘤菌(*Rhizobia*)都属于 *Proteobacteria* 门 α -亚纲中三个不同的系统发育分支 最近 Sy 等发现了第四个根瘤菌分支 *Proteobacteria* 门 γ -亚纲 *Methylobacterium*(甲基杆菌属)系统发育分支 ,此分支新种 *Methylobacterium nodulans* 能利用甲醇生长 ,这在根瘤菌中是独一无二的。^[8]。

参 考 文 献

[1] 谭志远 陈文新. 微生物学报 ,1997 ,37 :411 ~ 416.

[2] Allen O N , Allen E K. The leguminosae :A source book of characteristics , Uses , and Nodulation . Wisconsin :The University of Wisconsin Press ,1981 .

[3] 王素英 陈文新. 微生物学报 ,1997 ,37 :335 ~ 343.

[4] Sambrook J , Fritsh F F , Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual . 2nd ed . New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989 .

[5] De Lajudi P , Willems A , Bruno P , et al . *Int J Syst Bacteriol* ,1994 ,44 :713 ~ 733 .

[6] Willems A , Collins M. *Int J Syst Bacteriol* ,1993 ,43 :305 ~ 313 .

[7] Sawada H , Leki H , Oyaizu H , et al . *Int J Syst Bacteriol* ,1993 ,43 :694 ~ 701 .

[8] Sy A , Giraud E , Jourand P , et al . *J Bacteriol* 2001 ,183 :214 ~ 220 .

16S rDNA Sequence Analysis of Representative Strains of Two Rhizobial
New Groups Isolated from *Astragalus* spp .

Xin Yuhua Chen Wenxin

(Department of Microbiology , College of Biological Sciences , China Agricultural University , Beijing 100094 ,China)

Abstract : The full-length 16S rDNA sequences of representative strain CA8561 and JL84 of two Rhizobial new groups isolated from *Astragalus* spp . were sequenced . An unrooted tree was produced to determine their phylogenetic relationship . The result showed that CA8561 fell into *Rhizobium* branch and JL84 fell into *Sinorhizobium* branch .

Key words : *Rhizobium* , 16S rDNA sequencing , Phylogenetic analysis

书 讯

贾盘兴研究员编著的《嗜菌体分子生物学——基础知识和技能》一书已由科学出版社出版。该书介绍了各种噬菌体的结构、转录、复制、基因表达及在基因工程中的应用等方面的新进展。全书共分 11 章 ,包括 :单链 RNA 噬菌体、双链 RNA 噬菌体、丝状噬菌体、ΦX174、T4、T7、Φ29、PRD1、Mu 等。每章后都附有参考文献。

本书可供综合性大学、师范院校、医学和农学院校有关专业的师生、研究人员参考。

本书定价 46 元 ,现在购买可 7 折优惠。需要此书者可与作者联系 ,电话 (010)