

西藏根瘤菌新表观群的 DNA 同源性及 16S rDNA 全序列分析

王素英¹ 杨晓丽¹ 李海峰¹ 刘 杰²

(¹ 天津商学院生物技术与食品科学学院 天津 300134)

(² 中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘 要 在前期数值分类工作的基础上,对 7 株与 *Rhizobium* 关系较密切的分离自西藏部分地区豆科植物 *Trigonella* spp. 和 *Astragalus* spp. 的根瘤菌所形成的独立表观群,通过 DNA 同源性测定及 16S rDNA 全序列分析进行了分类地位的进一步确定。结果表明:该独立表观群菌株的(G+C)mol% 为 59.5% ~ 63.3%,群内菌株间 DNA 同源性在 74.3% ~ 92.3% 之间,中心菌株 XZ2-3 与相关 *Rhizobium* 种之间的 DNA 同源性在 0% ~ 47.4% 之间,是不同于 *Rhizobium* 内各种的新 DNA 同源群。另外,16S rDNA 全序列分析结果也表明,中心菌株 XZ2-3 占居 *Rhizobium* 系统发育分支中的一个独立亚分支,其与临近 *R. leguminosarum* USDA2370^T 和 *R. etli* CFN42^T 之间的序列相似性分别为 96.55% 和 96.62%。根据国际系统细菌学委员会提出的细菌种属分类标准,该独立表观群构成了一个不同于 *Rhizobium* 内各种的新种群。该研究结果丰富了现有根瘤菌分类系统,将为国际上现有 *Rhizobium* 的 14 个种中再添一个新的分类单元。

关键词 根瘤菌;DNA 同源性;16S rDNA 全序列;系统发育分析

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)01-0132-04

错综复杂的地形和变化多端的气候条件造就了西藏自治区生态环境的多样,也促成其植物种类远远超过我国大部分省区,仅报道的豆科植物已达 51 属 236 种^[1],约占 1981 年全世界豆科植物统计数的 10%^[2]。我们在调查该地区共生根瘤菌资源的基础上,根据形态、生态、酶反应、遗传等方面的特性对西藏林芝和拉萨地区的根瘤菌进行了数值分类研究,发现了一个新表观群^[3]。为了进一步研究新类群的系统发育地位,作者对其中心菌株 XZ2-3 进行了 16S rDNA 的全序列测定,并进行了群内菌株之间以及中心菌株与已知根瘤菌种模式菌株之间的 DNA 同源性分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:表 1 为本研究所用菌株。其中 7 个待测菌株为前期数值分类得到的独立表观群菌株。标准菌株由中国农业大学菌种保藏中心(CCBAU)提供。16S rDNA 全序列测定选用新表观群中心菌株 XZ2-3,寄主为毛果葫芦巴(*Trigonella pubescens*)。序列相似性分析过程中参比菌株的序列来自 GenBank。

表 1 供试菌株寄主及来源

Table 1 Hosts and sources of tested strains

Strains	Hosts	Sources
XZ2-3	<i>Trigonella pubescens</i>	Xizang, China
XZ46-5, XZ12-4, XZ44-1, XZ49-8	<i>Astragalus milingensis</i>	Xizang, China
XZ14-4	<i>Astragalus lucidus</i>	Xizang, China
XZ17-4	<i>Trigonella emodi</i>	Xizang, China
<i>R. mongolense</i> USDA1844 ^{T*}	<i>Medicago ruthenica</i>	Neimeng, China
<i>R. gallicum</i> USDA2918 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	France
<i>R. hainanense</i> 166	<i>Desmodium sinuatum</i>	Hainan, China
<i>R. leguminosarum</i> USDA2370 ^T	<i>Pisum sativum</i>	America
<i>R. etli</i> CFN42 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexico
<i>R. tropici</i> CIAT899 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	America

USDA: The United States Department of Agriculture; CFN: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México; CIAT: Rhizobium Collection, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia; T: type strain.

基金项目 国家自然科学基金(39970017)

作者简介 王素英(1964-),女,山西孟县人,教授,博士,从事微生物资源开发与系统发育分类研究。Tel: 86-22-26669496; Fax: 86-22-26675780; E-mail: wsyang@tjcu.edu.cn

收稿日期 2005-06-08,接受日期 2005-08-03,修回日期 2005-08-27

1.1.2 主要试剂和材料 :DNA 提取试剂和 PCR 反应试剂盒购自华美生物工程公司 ,PCR 扩增引物由上海生工生物工程技术有限公司合成 ,PCR 产物纯化试剂盒购自荷兰 QIAGEN 公司 ,PCR 测序反应试剂盒购自美国 Biosystem 公司。

1.2 DNA 提取

DNA 提取主要参考 Marmur^[4]和 Johnson^[5]的方法。

1.3 DNA (G + C)mol% 及 DNA-DNA 杂交

DNA (G + C)mol% 含量采用热变性方法^[6] ,DNA-DNA 杂交采用液相复性速率法^[7] 在 BIO-20 型紫外分光光度仪上测定。

1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增

以总 DNA 为模板 ,用引物 P1 5'-CGGGATCCAGAGTTTGA TCCTGGCTCAGAACGAAACGCT-3' ,引物 P6 5'-CGGGATCC TACGCTACCTTGTACGACTTCACCCG-3' ,经 PCR 反应扩增出 16S rDNA ,其扩增条件为 :94℃ 5min ;94℃ 2min ;56℃ 2min ,72℃ 3min ,30 个循环 ;72℃ 10min。

1.5 16S rDNA 测序

将上述 PCR 产物纯化后做为模板 ,用 dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit 进行测序反应 ,最后用 ABI Model 377 DNA 测序仪进行序列测定。

2 结果

2.1 新表观群内菌株的 DNA (G + C)mol% 含量和 DNA 同源性

由表 2 可以看出 ,新表观群各菌株的 T_m 值在 77.4℃ ~ 79.2℃ 之间 , ΔT_m 为 1.8℃ ,小于同种细菌不同菌株之间 T_m 值相差 5℃ 的规定^[8]。DNA (G + C)mol% 含量在 59.5% ~ 63.3% 之间 ,符合 *Rhizobium* 属的范围^[9] ,群内各菌株与中心菌株 XZ2-3 的 DNA 同源性在 74.3% ~ 92.3% 之间。另外表 3 的实验结果表明 ,XZ2-3 与同一系统发育分支上已知根瘤菌属种的同源性在 0% ~ 47.4% 之间 ,按照国际分类委员会细菌系统学分会的建议^[8] ,70% 的 DNA 同源性作为定种的界限 ,则从西藏林芝、拉萨地区分离的新表观群为一个新种群。

表 2 新表观群的 DNA 分析

Table 2 DNA analysis of the new phenotypic group

Strain	$T_m/^\circ\text{C}$	(G + C)mol%	DNA homology related strain XZ2-3/%
XZ2-3	77.9	60.6	100
XZ46-5	77.4	59.5	86.1
XZ12-4	78.3	61.4	74.3
XZ44-1	77.7	60.1	80.2
XZ49-8	79.2	63.3	76.1
XZ14-4	78.5	61.8	92.3
XZ17-4	78.1	61.1	84.5

表 3 XZ2-3 与已知种的 DNA 同源性

Table 3 The level of DNA homology between XZ2-3 and the type strains

Type strain	DNA homology/%	Type strain	DNA homology/%
USDA1844	23.6	USDA2370	47.4
USDA2918	10.8	CFN42	0
I66	0	CIAT899	5.9

2.2 XZ2-3 16S rDNA 全序列的相似性比较及系统发育

用 ABI Model 377 DNA 测序仪对纯化后的 16S rDNA PCR 产物进行序列测定 ,结果提交 GenBank ,申请得到的国际基因库接受号 (Accession No.) 为 DQ099745。将该序列与根瘤菌已知种及相关细菌种属的相应序列进行比较 ,转化为 PHYLIP 软件可以识别的形式后 ,用 DNADIST 应用程序计算各菌株之间的遗传距离 ,并按照 Satiou 和 Nei 的方法进行聚类分析^[9] ,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 (图 1)。

图 1 的结果表明 ,所有根瘤菌及其相关土壤根瘤杆菌在系统发育中基本分成 *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Agrobacterium-Rhizobium*、*Mesorhizobium*、*Azorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 6 个分支 ,其中西藏根瘤菌新表观群中心菌株 XZ2-3 与 *R. leguminosarum*、*R. etili* 亲缘关系最近 ,相似性分别为 96.55% 和 96.62% ,位于 *Rhizobium* 发育分支。由于该分支含有与 *R. tropicii* 亲缘关系密切的 *Ag. rhizogense* ,已有一些学者建议将这一分支进行细分。这与许多研究者的结果一致^[10]。

3 结论

本研究表明 ,西藏豆科植物毛果葫芦巴 (*Trigonella pubescens*) 米林黄芪 (*Astragalus milingensis*) 光亮黄芪 (*Astragalus lucidus*) 和齿荚葫芦巴 (*Trigonella emodi*) 根瘤菌构成的独立表观群具有较高的 DNA 同源性 ,群内菌株的 DNA 同源性 $\geq 74.3\%$,中心菌株 XZ2-3 与已知参比菌模式菌株的 DNA 同源性 $\leq 47.4\%$ 。16S rDNA 全序列分析测定了 XZ2-3 代表的新菌群与已知根瘤菌相关菌种的遗传距离 ,揭示了它们之间的亲缘关系 ,根据国际系统细菌学委员会提出的细菌种属分类标准 ,结合新表观群的数值分类结果 ,可以认为分离自西藏地区的这些菌株构成根瘤菌的一个新种。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院青藏高原科学考察队. 西藏植物志. 北京: 科学出版社, 1985.
- [2] Allen ON, Ethelk A. The Leguminosae, A Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation. Wisconsin: The University of Wisconsin Press, 1981.
- [3] 王素英, 邓必清, 邵汝梅, 等. 西藏根瘤菌的数值分类研究. 微生物学通报, 2002, 29(6): 5-9.
- [4] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *J Mol Biol*, 1961, 3: 208-218.

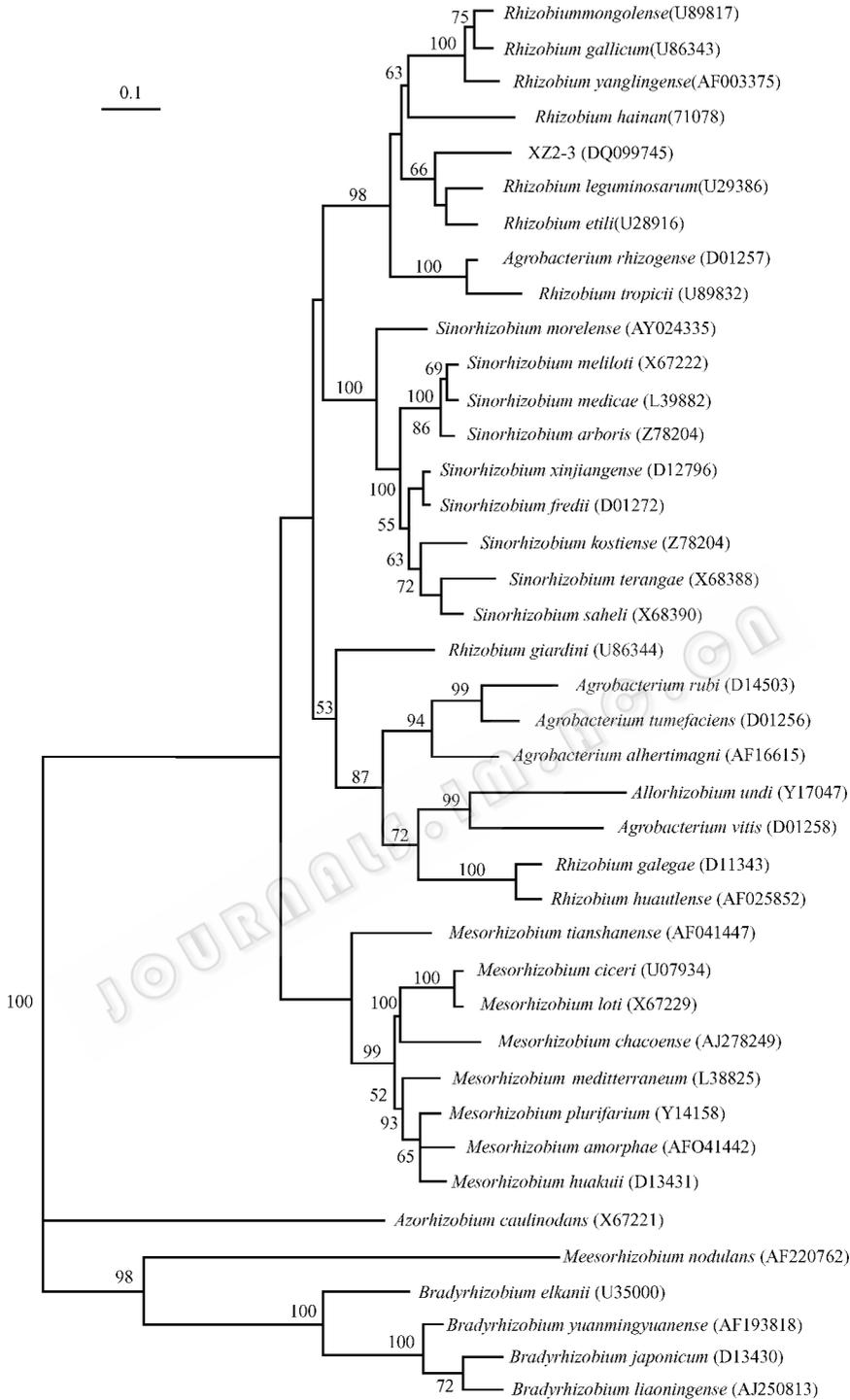


图 1 16S rDNA 全序列的系统发育树状图

Fig. 1 The phylogenetic tree derived from the full-length 16S rDNA sequence. XZ2-3 refers to the center strain of new phenotypic group constituted of rhizobia isolated from Xizang region. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 1% sequence divergence.

- [5] Johnson JL. Determination of DNA base composition, DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acid. *Methods in Microbiol*, 1985, **18**: 1 - 74.
- [6] 林万明. 分析微生物学. 北京: 科学出版社, 1988.
- [7] Deley J. Phylogeny of prokaryotes taxon. *INRA Angers*, 1974, **23**: 291 - 300.
- [8] Young JPW, Johnson AWB. The evolution of specificity in the legume-rhizobium symbiosis. *Trends Ecol Evol*, 1989, **4**(6): 331 - 349.
- [9] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**(4): 406 - 425.
- [10] 韦革宏, 朱铭毅, 陈文新. 鸡眼草根瘤菌的 16S rDNA 全序列分析. *微生物学报*, 2001, **41**(1): 113 - 116.

Analysis of DNA homology and 16S rDNA sequence of rhizobia, a new phenotypic subgroup, isolated from Xizang Autonomous Region of China

WANG Su-ying^{1*}, YANG Xiao-li¹, LI Hai-feng¹, LIU Jie²

(¹ College of Biotechnology and Food Sciences, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

(² Department of Microbiology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Based on the studies of numerical taxonomy, the seven rhizobial strains isolated from the root nodules of leguminous plants *Trigonella* spp. and *Astragalus* spp. growing in the Xizang Autonomous Region of China constituted a new phenotypic subgroup, where wide phenotypic and genotypic diversity among legume crops had been reported due to complex terrain and various climate. The new phenotypic subgroup were further identified to clarify its taxonomic position by DNA homology analysis and 16S rDNA gene sequencing. The mol% G + C ratio of the DNA among members of the new subgroup ranged from 59.5 to 63.3 mol% as determined by T(m) assay. The levels of DNA relatedness, determined by using the DNA liquid hybridization method, among the members of the new subgroup were between 74.3% and 92.3%, while level of DNA relatedness between the central strains XZ2-3 of the new subgroup and the type strains of known species of *Rhizobium* was less than 47.4%. These results indicated that the new phenotypic subgroup is a DNA homological group different from described species of *Rhizobium*. Therefore, this new phenotypic subgroup was supposed to be a new species in the genus of *Rhizobium* since the strains in the same species generally exhibit levels of DNA homology ranging from 70 to 100%. A systematic identification method-16S rDNA gene sequence comparison was carried out to determine the phylogenetic relationships of the new subgroup with the described species of *Rhizobium*. The GenBank accession number for the 16S rDNA sequence of the central strain XZ2-3 of the new subgroup is DQ099745. The full-length 16S rDNA gene sequence were sequenced by chain terminator techniques and analyzed with PHYLIP. The phylogenetic trees were constructed by using the programs DRAWTREE. The phylogenetic analysis indicated that new subgroup occupy a independent sub-branch in phylogenetic tree. The sequence similarities between the center strain XZ2-3 and the closest relatives, strain *R. leguminosarum* USDA2370^T and *R. etli* CFN42^T, were 96.55% and 96.62% respectively. Both the 16S rDNA sequence data and the DNA relatedness data suggested that the new phenotypic subgroup isolated from the root nodules of leguminous plants *Trigonella* spp. and *Astragalus* spp. obtained from the Xizang Autonomous Region of China represents a new rhizobial species in the genus of *Rhizobium* according to the minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria.

Keywords: Rhizobia; DNA homology; 16S rDNA sequence; Phylogenetic analysis