

超慢生大豆根瘤菌 DNA G+C 含量和 DNA 同源性测定

李 俊 葛 诚 徐玲玫 樊 蕙 崔 阵

(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)

摘要 用热变性温度法和液相复性速率法分别测定了超慢生大豆根瘤菌(ESG, extra-slow-growing soybean rhizobia) DNA G+C mol% 及与其它根瘤菌间的 DNA 同源性。结果表明, ESG 的 DNA G+C mol 含量在 59.2—63.5% 之间, 且不同地区不同血清型的 ESG 代表菌株 DNA 同源率在 70% 以上, 说明它们是遗传型一致的类群。ESG 与在大豆上结瘤的快生大豆根瘤菌(*Rhizobium fredii* USDA205) 同源率为 14.8%, 与慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*) 三个 DNA 同源组的同源率分别为 20.5%, 30.0%, 19.4%。测定结果还表明, ESG 与其它根瘤菌遗传学的亲缘关系也很远。

关键词 超慢生大豆根瘤菌, DNA 同源性

1979 年 Gross 等^[1]首次报道了从美国内布拉斯加州的高 pH 值土壤生态环境中分离出 ESG, 随后徐玲玫等^[2,3]从中国辽宁盐碱土壤的野大豆根瘤和栽培大豆根瘤中也分离到 ESG, 并对它们进行了生理生化和共生特性等方面的研究, 认为 ESG 是不同于慢生大豆根瘤菌和快生大豆根瘤菌的新类群。为进一步探讨 ESG 与大豆的另外二类共生根瘤菌及其它根瘤菌的遗传学亲缘关系, 对 ESG 进行了 DNA G+C mol% 及与其它根瘤菌 DNA 同源性测定, 结果如下。

1 材料和方法

1.1 菌株及其培养

供试的超慢生大豆根瘤菌、慢生大豆根瘤菌、快生大豆根瘤菌、土壤杆菌等菌株及其来源见表 1。

除 ESG 培养基的碳源改为阿拉伯糖的改良 YEM 培养基以外, 其余根瘤菌均用 YEM 培养基培养, 摇瓶培养(180—200r/min)至对数中、后期, 离心(3 000—4 000r/min 15min)洗涤收集菌体 3—5g, 供提取 DNA 用。

1.2 DNA 的提取

按 Marmur^[4]、Johnson^[5]等人的方法进行。用 TES (50 mmol/L Tris, 5mmol/L EDTA-Na₂, 50mmol/L NaCl, pH 8.0—8.2) 代替 SE (0.15mol/L NaCl, 0.1mol/L EDTA-Na₂, pH 8.0) 除去胞外多糖和脱蛋白效果更佳。用异丙醇作选择沉淀提取

• 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 3 月 5 日收到。

DNA, 较易达到理想的纯度。DNA 纯度检查合格后, 进行测定。

表 1 试验菌株及来源

Table 1 Test strains and source

根瘤菌 Rhizobia	菌株 Strains	来源 Source
超慢生大豆根瘤菌 ESG	2060, 2061, 2062, 2064, 2067, 2068, 2044, 2080, 2260, 2261, 2281, 2279, 2309, 2312, DE454, DE544	SFI(CAAS)
快生大豆根瘤菌 (<i>Rhizobium fredii</i>)	USDA205 ^T	CCBAU
慢生大豆根瘤菌 (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>)	ATCC10324 ^T , 61A76, USDA110	USDA
豌豆根瘤菌豌豆生物型 (<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>)	ATCC10004 ^T	USDA
豌豆根瘤菌三叶草生物型 (<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>)	540 80	SFI(CAAS)
豌豆根瘤菌菜豆生物型 (<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>)	127K17	SFI(CAAS)
百脉根根瘤菌 (<i>R. loti</i>)	ATCC33669 ^T	CCBAU
苜蓿根瘤菌 (<i>R. meliloti</i>)	ATCC9930 ^T	NAU
沙打旺根瘤菌 (<i>R. sp. (astragalus)</i>)	SHA16	SFI(CAAS)
华菱根瘤菌 (<i>R. huakuii</i>)	CCBAU2609 ^T (=103)	CCBAU
热带根瘤菌 (<i>R. tropici</i>)	ATCC49672 ^T (CIA T899)	Mexico
山羊豆根瘤菌 (<i>R. galegae</i>)	540 ^T	CCBAU
羽扇豆根瘤菌 (<i>B. sp. (lupinus)</i>)	G13	ACCC
田菁茎瘤菌 (<i>Azorhizobium caulinodans</i>)	ORS571 ^T	SFI(CAAS)
根癌土壤杆菌 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	T37	IB (Academia Sinica)

注: SFI(CAAS), 中国农科院土肥所; ACCC, 中国农业微生物菌种保藏中心; CCBAU, 北京农业大学菌种保藏组; NAU, 南京农业大学; IB, 中国科学院植物所; USDA, 美国农业部; T, 模式菌株。

Note: SFI(CAAS), Soils and Fertilizers Institute, Chinese Academy of Agricultural Science; ACCC, Agricultural Culture Collection of China; CCBAU, Culture Collection of Beijing Agricultural University; NAU, Nanjing Agricultural University; IB, Institute of Biology, Academia Sinica; USDA, United States Department of Agriculture, Beltsville, Md.; T—type strains.

1.3 热变性法测定 ESG DNA G+C mol%

按 Marmur^[6]、林万明^[7]、葛诚^[8]的方法进行。所用仪器由 752-C 型紫外分光光度计(上海产)和 G+C mol% 测定装置组成。以 *E. coli* K12 作实验参考菌株, 用以检测实验方法、仪器和操作是否恰当。DNA G+C mol% 计算根据 Johson^[5]和 De ley^[9]的公式。

1.4 复性速率法测定 DNA 同源百分数

按 Johson^[5]、林万明^[7]、李银太^[10]的方法进行。选用 ESG5 个不同地区来源的不同血清型代表菌株 2062、2068、2080、2309、DE544 为试验菌株^[3]与其它参比菌株进行 DNA

同源率测定。所用仪器及对 DNA 样品要求同上,两个菌株间 DNA 同源百分数根据 Joh-son^[5]、De Ley^[11]的公式计算,每组杂交重复 2—3 次。

2 结果

2.1 ESG DNA G+C mol%测定

表 2 列出所测定的 ESG 菌株 DNA G+C mol%值,其范围在 59.2—63.5 之间,且变幅小(小于 4%)。

2.2 ESG 之间及与其它根瘤菌间 DNA 同源率测定

2.2.1 5 株 ESG 代表菌株间同源性:从表 3 中可知道,所测的 5 株 ESG 菌株间同源率都在 70%以上,它们的 G+C mol%值也很接近(见表 2),表明它们在基因组水平上是一致的类群,此结果与其生理生化、共生特性等方面一致的表现特征是相符的。

2.2.2 ESG 与其它根瘤菌之间同源性:从表 4 可知道,超慢生大豆根瘤菌与快生大豆根瘤菌 USDA205,慢生大豆根瘤菌三个 DNA 同源组(ATCC10324(DNA I)、USDA110(DNA Ia)、61A76(DNA II))的平均同源率分别为 14.8%,20.5%,30.0%,19.4%,同源水平很低。同时还表明 ESG 与其余有关的根瘤菌 DNA 同源水平也很低。

表 2 ESG 菌株的 DNA G+C 含量

Table 2 DNA G+C mol% of ESG

菌株 Strains	G+C mol%	菌株 Strains	G+C mol%
2060	61.9	2260	59.2
2061	62.7	2261	60.6
2064	61.4	2279	61.5
2067	62.1	2281	63.4
2068	61.0	2309	61.7
2044	60.9	2312	63.5
2080	61.2	DE454	60.5
2062	61.8	DE544	60.2

注:表中结果为 2—3 次测定的平均值。

Note: The DNA G+C mol% values are the means of the values from two or three replications.

表 3 5 株 ESG 代表菌株 DNA 同源性

Table 3 DNA homology among five ESG strains

菌株 Strains	DNA 同源率 DNA homology(%)				
	2062	2080	2068	2309	DE544
2062	100				
2080	90.9	100			
2068	93.4	92.3	100		
2309	71.6	86.6	73.2	100	
DE544	90.4	82.2	72.1	85.6	100

注:表中数据为 2—3 次测定结果的平均值。

Note: The values are the means of the values from two or three replications.

表 4 ESG 与其它根瘤菌之间 DNA 同源性

Table 4 DNA homology between ESG and other rhizobia

参照菌株 Strains	参照菌株与 ESG 血清型菌株同源性(%) Homology with ESG strains					平均同 源性(%) Mean homology
	2062	2068	2080	2309	DE544	
USDA205 ^T	16.7	11.4	12.5	13.8	19.4	14.8
ATCC10324 ^T (DNA I)	14.0	19.0	25.4	35.0	9.1	20.5
USDA110(DNA Ia)	14.0	31.0	30.0	38.4	36.7	30.0
61A76(DNA I)	23.0	7.3	25.8	29.6	14.0	19.4
540-80	3.3	6.8	12.4	8.5	10.1	8.2
ATCC10004 ^T	28.2	31.2	26.9	13.9	7.2	21.5
127K17	9.5	21.0	21.1	15.8	10.5	15.6
ATCC33669 ^T	12.0	5.8	8.2	12.9	5.8	8.9
ATCC9930 ^T	6.0	9.2	9.5	0.0	9.7	6.8
SHA16	8.7	18.7	7.4	12.4	15.5	12.5
CCBAU2609 ^T	8.0	0.0	8.4	7.5	9.4	6.7
ATCC49672 ^T	5.3	10.6	0.0	2.0	8.0	6.5
540 ^T	6.7	7.3	6.1	4.8	7.5	6.5
G13	8.7	14.2	3.2	14.7	14.5	11.0
ORS571	0.0	10.0	9.4	0.0	2.5	4.4
T37	5.0	3.8	6.0	4.4	0.0	3.8

注:表中结果为 2—3 次测定的平均值。

Note: The values are the means of the values from two or three replications.

3 讨论

在大豆根部结瘤固氮的共生体根据其世代时间、生理生化特性等可分为快生、慢生和超慢生,已有的研究将快生和慢生大豆根瘤菌分在不同的分类单元。本文结果表明超慢生大豆根瘤菌与大豆的另外两类共生体 DNA 同源率很低,遗传学关系很远。且与它们表型特征上较大的差异相一致。

已进行的研究表明超慢生大豆根瘤菌的表型特征、细胞成分 N、C% 含量和 N、C 比值与其它根瘤菌有较大差异^[19]。DNA 同源率与其它根瘤菌也相差很远,在分类上应属于不同的分类单元。要确定其确切的分类地位,还需做进一步的工作^[14]。

已有的研究证明快生、慢生和超慢生大豆根瘤菌不仅都能在大豆寄主根部正常结瘤,而且均可正常固氮^[2,3],这种豆科寄主与不同类群根瘤菌共生于一个系统的现象值得深入研究。其实质的揭开对于根瘤菌的起源、进化、共生侵染都有十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Gross D C, Vidaver A K, Klucas R V. *J Gen Microbiol*, 1979, 114:257—266.
- [2] 徐玲玫,樊 惠,葛 斌,等.微生物学报,1990,34(3):193—200.

- [3] 徐玲玫,樊 蕙,葛 诚,等.大豆科学,1987,6(2):127—131.
- [4] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, 3:208—218.
- [5] Johnson J L. Determination of DNA base composition, DNA reassociation and DNA hybridization of bacterial nucleic acid. In: Gottschalk G ed. *Methods in Microbiology*, Vol 18. London: Academic press, Inc(London), Ltd. 1985. 1—74.
- [6] Marmur J, Doty P. *J Mol Biol*, 1962, 5:109—118.
- [7] 林万明,李银太,郭兆彪.热变性温度法测定 G+C mol%,复性速率液相分子杂交方法.见:林万明主编.细菌分子遗传学分类鉴定法.上海:上海科学技术出版社.1990.85—92;161—166.
- [8] 葛 诚,徐玲玫,樊 蕙.中国农业科学,1990,23(2):45—50.
- [9] De Ley J. *J Bacteriol*, 1970, 101:738—754.
- [10] 李银太,郭兆彪,林万明.中华微生物学和免疫学杂志,1985,5(1):37—40.
- [11] De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. *Eur J Biochem*, 1975, 12:133—142.
- [12] Hollis A B, Kloos W E, Elkan G H. *J Gen Microbiol*, 1981, 123:215—222.
- [13] 葛 诚,樊 蕙,徐玲玫,等.中国农业科学.1988,21(3):70—78.
- [14] Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41:582—587.

DETERMINATION OF DNA G+C mol% AND DNA HOMOLOGY BETWEEN EXTRA-SLOW-GROWING SOYBEAN RHIZOBIA AND OTHER RHIZOBIA

Li Jun Ge Cheng Xu Lingmei Fan Hui Cui Zhen

(Soils and Fertilizers Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract The DNA G+C mol% for extra-slow-growing soybean rhizobia (ESG) and DNA homology for ESG strains and other rhizobia were carried out by thermal denaturation temperature (T_m) and reassociation rate of DNA, respectively. The results showed that: (1) DNA G+C mol% of the sixteen ESG strains isolated from root nodules of *Glycine max* and *G. soja* was 59.2—63.5% and the DNA homology among five representative strains of ESG was greater than 70% (range, 72.1 to 93.4%), which indicated that these strains were in one genetic group. (2) DNAs from 5 ESG representative strains had very low mean homology (range, 3.8 to 30.0%) with 16 other reference rhizobial strains. The results indicated that ESG was genetically distinct from other recognized rhizobia.

Key words Extra-slow-growing soybean rhizobia, DNA homology