

海南快生根瘤菌 I66 的部分 16S rRNA 序列测定*

汪恩涛 李英波 阎大来 冯继东 陈文新

(北京农业大学生物学院 北京 100094)

与豆科植物共生固氮的根瘤菌目前有 4 个属、10 个种。包括 *Rhizobium* (6 个种), *Sinorhizobium* (2 个种), *Azorhizobium* (1 个种) 和 *Bradyrhizobium* (1 个种)。其中多数是近年来采用现代分类技术分析后建立的, 而且新的类群还在不断被发现^[1,2]。在以前的根瘤菌数值分类及 DNA-DNA 杂交研究中, 我们确定了海南慢生型根瘤菌属于大豆慢生根瘤菌种 (*B. japonicum*)^[3]。而海南快生型根瘤菌的分类地位则较为分散。其中一些菌株属于已知各根瘤菌种, 另有 4 株银合欢根瘤菌和 13 株来自不同寄主的菌株分别构成具有独立的分类地位的两个菌群(第 2 群和第 4 群)(待发表)。为了进一步明确它们的分类地位, 我们依据国际系统细菌学委员会根瘤菌分委员会的建议^[4], 利用 Young 等^[5]建立的聚合酶链反应 (PCR) 及测序技术, 对第 4 群的代表菌株 I66 的部分 16S rRNA 基因片段进行了扩增和测序。

1 材料和方法

1.1 菌株和载体

试验菌株为 *Rhizobium* sp. I66。该菌株为第 4 菌群(海南快生根瘤菌)的中心菌株, 分离自波状叶山绿豆 (*Desmodium sinuatum*)。菌种的保存、活化及培养条件同文献[6]。载体为 M13mp18 噬菌体。受体菌为 *Escherichia coli* JM101。

1.2 酶和试剂

PCR 试剂盒及 DNA 聚合酶 Klenow 片段为华美生物工程公司产品。T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 Hinc I 为 Promega 公司产品。

1.3 DNA 提取

总 DNA 提取按文献[6]的方法进行。

1.4 引物制备

根据 Young 等^[5]的文献, PCR 的正向引物为 Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGGCGC-3') 和反向引物 Y2 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3')。引物在华美生物工程公司用 ABI 公司的 381A 型 DNA 合成仪合成。脱盐后溶于水中, 浓度为 50 pmol/ μ l。

1.5 PCR 操作程序

PCR 反应体系为 100 μ l, 加模板 DNA 20—40 ng, 引物 Y1 和 Y2 各加 50 pmol。反应程序为 94℃变性 45 秒, 62℃复性 45 秒, 72℃延伸 5 分钟。共进行 35 个循环。

1.6 回收 PCR 产物

将 PCR 产物置于 99℃10 分钟灭活 Taq 聚合酶后, 用 1 单位 DNA 聚合酶 Klenow 片段将扩增产物的末端补齐。按 Sambrook 等^[7]的方法, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后回收扩增片段, 溶于 5 μ l TE 缓冲液中。

* 本试验为国家自然科学基金资助课题的一部分。

本文于 1993 年 5 月 22 日收到。

1.7 基因克隆及其鉴定

M13mp18 双链 DNA 经 Hinc I 完全酶切后,按 Sambrook 等^[7]的方法与 PCR 产物进行连接后,按 Chung 和 Miller^[8]的方法转化 *E. coli* JM101 感受态细胞。对转化所得的白色噬菌斑,按 Sambrook 等^[7]的方法提取双链 M13 DNA,用 EcoRI+Hind III 酶切后电泳检查。

1.8 测序

按 Sambrook 等^[7]的方法提取重组的 M13 单链 DNA,用 ABI 公司 370A 型 DNA 自动测序仪测序。

1.9 数据处理

测得的序列资料与 Young 等^[5]报道的其他根瘤菌的相应序列进行比较并计算出各菌种之间的距离($D=N/T$,D 为距离,N 为不同碱基数,T 为被比较的碱基总数)。这里,总碱基数为 248,其中不包括 26—45 位之间的碱基序列,因为在不同的菌株间这段序列的碱基数目不同。根据计算结果,按最小距离法聚类并画出系统发育树状图。

2 结果

2.1 PCR 扩增的片段

PCR 产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳的结果(图略)表明,扩增的 16S rRNA 基因片段在 309bp 附近,与引物 Y1 和 Y2 所限定的片段长度相当。当条件掌握不严格时,在这条带的后面还可产生一条片段稍长的很弱的带。增大模板 DNA 浓度,严格反应条件,可以消除这条弱带。从凝胶中回收扩增 DNA 片段时,要将弱带去除。

2.2 基因克隆及其鉴定

回收的基因片段与 M13mp18 双链 DNA 连接后转化受体菌 *E. coli* 的感受态细胞。涂皿,37℃培养过夜。转化平板上见到 11 个蓝色噬菌斑,5 个白色噬菌斑。鉴定结果表明,白色噬菌斑均为阳性克隆。

2.3 PCR 扩增片段的序列

取 1 个阳性克隆提取单链 DNA 进行测序。测得的序列与文献[5]中报道的其它根瘤菌的相应序列均列于图 1 中。在本次试验中,共扩增并测定了 I66 的 260 个碱基(不包括引物)。与已知序列相对照,I66 与有关细菌共有大量的保守区域。其二级结构(略)也与有关细菌相同。这些表明,我们测得的序列是可信的,准确的。与其他快生根瘤菌一样,I66 在 22 到 45 碱基构成的茎-环结构片段中,比慢生根瘤菌少几个碱基。与 *Rhizobium* 属的两个种相比,I66 这一段基因中的碱基取代多发生于茎上,且多为成对的变化。即碱基依然互补,形成稳定的茎环结构,以保证其正常行使功能。

2.4 聚类分析

表 1 中列出了根据图 1 中所列序列资料计算出的各菌间的遗传距离。根据这些遗传距离,采用最近链锁法进行聚类得到的系统发育树状图见图 2。

表 1 I66 菌株与有关菌株的遗传距离矩阵*

序号	细菌种	1	2	3	4	5	6
1	<i>Rhizobium</i> sp. I66	0	8	7	25	35	26
2	<i>Rhizobium meliloti</i>	3.2	0	7	20	34	26
3	<i>R. leguminosarum</i>	2.8	2.8	0	24	32	29
4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10.1	8.1	9.7	0	36	36
5	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	14.1	13.7	12.9	14.5	0	18
6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	10.5	10.5	11.7	14.5	7.3	0

*表中左下角为碱基取代百分比,右上角为取代碱基数(不包括 26 到 45 位之间的碱基序列)。

<i>Rhizobium</i> sp. 166	AGGCTTAACA CATGCAAGTC GAGCG. CCCC. GCAA. GGG. AGCGGCAGA
<i>Rhizobium meliloti</i>	-----
<i>R. leguminosarum</i>	-----
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-----A-----T-----
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	-----A-GG-----TTC-----T C--T-----
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-----GG-GT A----TAC-T C-----
<i>Rhizobium</i> sp. 166	CGGGTGAGTA ACGCGTGGGA ATCTACCTTT TGCTACGGAA TAACGCAGGG
<i>Rhizobium meliloti</i>	-----C--T-----
<i>R. leguminosarum</i>	-----C--GA-----
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-----G-G CC--G-----G-T-C---
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	-----CG-G--C--CAG-T-----C-----
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-----CG-----G-T-----C--A-----
<i>Rhizobium</i> sp. 166	AAACTTGTC TAATACCGTA TGTGTCCTTC GGGAGAAAGA TTTATCGGCA
<i>Rhizobium meliloti</i>	-----A-C-----G-----G-
<i>R. leguminosarum</i>	-----TC
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	----G-AAT-----C--AC-C--A--G-----GG
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	-----G-----G--AC---GAA A-----G---CTG
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-----G--AA-C--A C--G-----C-G
<i>Rhizobium</i> sp. 166	AGAGATGAGC CCGCGTTGGA TTTGCTAGTT GGTGGGGTAA AGGCCTACCA
<i>Rhizobium meliloti</i>	-AG-----
<i>R. leguminosarum</i>	-AG-----
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TAT-----
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	-AG--CG--CT-----A--T--TC---
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-A--CG--CT-----A--T--TC---
<i>Rhizobium</i> sp. 166	AGGCGACGAT CCATAGCTGG TCTGAGAGGA TGATCAGCCA CATTGGGACT
<i>Rhizobium meliloti</i>	-----
<i>R. leguminosarum</i>	-----
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-----
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	-----AG-----
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-----AG-----
<i>Rhizobium</i> sp. 166	GAGACACGGC CCAA
<i>Rhizobium meliloti</i>	-----
<i>R. leguminosarum</i>	-----
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-----
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	-----
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-----

‘.’表示碱基缺失

图1 166及有关细菌种的16S rRNA部分序列

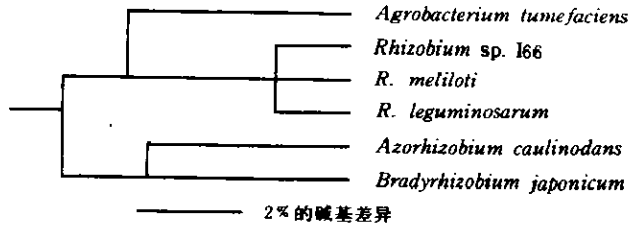


图 2 I66 与有关细菌的系统发育关系

3 讨论

本试验中扩增的片段是 Young 等^[5]从 EMBL 基因数据库中已发表的 16S rRNA 序列中筛选的一段相对可变的片段,可为比较菌株间的亲缘关系提供较多的信息。所采用的两个引物分别与这段序列中非常保守的两个片段互补,以保证能够准确扩增出所需片段。引物 Y1 对应于 *E. coli* 16S rRNA 序列的 20 到 43 位点,可准确互补于 *Agrobacterium tumefaciens* 和 *Rhizobium meliloti* 的相应位置。引物 Y2 对应于 *E. coli* 16S rRNA 序列的 361 到 338 位点,是非常保守的,可与广泛的细菌和叶绿体的 16S rRNA 相应序列完全互补。

Young 等^[6,9]采用这一对引物扩增了变形杆菌纲的许多种、属的部分 16S rRNA 序列,并用扩增产物进行了直接测序。结果表明,用这段序列构建的系统发育关系与用 16S rRNA 全序列测定及 16S rRNA-DNA 杂交结果吻合的相当好。所以,用这段序列的同源性来揭示细菌种、属间的亲缘关系是一种简便的方法^[4]。

本试验中采用了 Young 等选出的引物及 PCR 程序,用国产试剂盒准确地扩增出了所需的 16S rRNA 片段。但根据本实验室的具体技术条件,没有直接对扩增产物进行测序,而是用 M13 噬菌体进行克隆后以单链 DNA 进行测序。测序长度可达 500 多个碱基。这样做虽然多了一些操作步骤,但测序的成功率更高,重复性也很好。

在我们以前的数值分类和 DNA 同源性分析中,I66 与来自海南不同豆科寄主的 I2(*Stylosanthes guyanensis*), I12(*Centrocema pubescens*), I32(*Desmodium triquetrum*), I20(*D. gyrroides*), H14(*D. heterophyllum*), I64, S25(*Tephrosia candida*), I54(*Acacia sinuata*), I33(*Zornia diphylla*), I27(*Macroptilium lathyroides*), I65(*Arachis hypogaea*), 和 I36(*Uraria crinita*) 共 13 个根瘤菌菌株一起,构成一个不同于所有已知根瘤菌种、属的独立的表观群和 DNA 同源群。在数值分类中,这 13 株菌在 82% 水平上聚成一群(第 4 群),与 *Rhizobium* 各种的表观相似性为 65—78%,与慢生根瘤菌的相似性为 61%。在 DNA 同源性分析中,该菌群的 5 个代表菌株(I12, I20, I36, I54 和 I66)间的同源性为 75% 以上,与已知根瘤菌各种、属的模式菌株的同源性低于 36%(待发表)。根据国际系统细菌学委员会的建议,以 DNA 同源性 70% 为细菌种的分界线。则 I66 所代表的海南快生根瘤菌群应为一个新种。

在本试验中得到的 16S rRNA 序列资料(表 1, 图 1)中, I66 与 *Rhizobium leguminosarum* 和 *R. meliloti* 在这段序列中的碱基差异分别为 7 个和 8 个。与这两个种的遗传距离分别为 2.8 和 3.2。与 *R. leguminosarum* 和 *R. meliloti* 两个已知种间的差异相当。而与 *Agrobacterium*, *Azorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 三个属的差异较大,分别相差 25, 35 和 26 个碱基。遗传距离分别为 10.1, 14.1 和 10.5。依据遗传距离得到的系统发育树状图(图 2)表明了这一结果。上述结果充分表明 I66 所代表的菌群是 *Rhizobium* 属的一个种。新种的命名及描述待按照国际系统细菌学委员会根瘤菌分委员会的要求^[4], 完成互接种试验等进一步的研究后另文发表。

参 考 文 献

- [1] 汪恩涛, 陈文新. 微生物学通报, 1992, 19: 34—38.
- [2] Martinez-Romero E, Segovia E L, Mercante F M *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41: 417—426.
- [3] 孙建光, 章芑, 王昌平, 等. 微生物学报, 1993, 33: 135—143.
- [4] Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41: 582—587.
- [5] Young J P W, Downer H L, Eardly B D. *J Bacteriol*, 1991, 173: 2271—2277.
- [6] 李广善, 陈文新. 微生物学报, 1992, 32: 151—154.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Chung C T, Miller H. *Nucleic Acid Res*, 1988, 16: 3580.
- [9] Jarvis B D W, Downer H L, Young J P W. *Int J Syst Bacteriol*, 1992, 42: 93—96.

PHYLOGENY OF A FAST-GROWING RHIZOBIAL GROUP ISOLATED FROM HAINAN PROVINCE

Wang Entao Li Yingbo Yan Dalai Feng Jidong Chen Wenxin

(College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Based on the former researches of numerical taxonomy and DNA-DNA hybridization, a distinct group of fast-growing rhizobia was constructed including 13 strains isolated from a various range of leguminous plants from Hainan Province. This paper reported the partial 16S rRNA sequencing of the representative strain, I66, of this rhizobial group by polymerase chain reaction (PCR) and cloning in phage M13. The sequence obtained from this research was compared with those of relative bacteria that have been published. The distance was calculated and a phylogenetic tree was drawn based on the sequence data. The differences in the compared fragment were 7, 8, 25, 35 and 26 bases between I66 and *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Azorhizobium caulinodans*, and *Bradyrhizobium japonicum*, respectively. These results indicated that the Hainan group represented by I66 was a new species of *Rhizobium*.

Key words *Rhizobium*, Polymerase chain reaction, 16S rRNA sequencing