

花生根瘤菌在根瘤菌系统分类中的地位研究

张小平 陈 强 李登煜

(四川农业大学农学院应用微生物系 雅安 625014)

Kristina L

(赫尔辛基大学应用微生物及应用化学系 赫尔辛基 00014)

摘 要 用 12 株分类地位已知的代表菌为对照,采用现代细菌分类学方法,对从四川省 4 个花生生产区的天府 3 号和地方品种上分离的花生根瘤菌,从系统发育方面,探索了花生根瘤菌在根瘤菌系统中的分类地位。多聚酶链反应(PCR)扩增的 16S rRNA 的 4 种限制性内切酶长度多态(PCR-RFLP)以及 16S rRNA 部分碱基序列测定结果同时表明:四川花生根瘤菌与慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)相似性极高。由此推论它们在系统发育及进化方向上是基本一致的。该结果为研究花生根瘤菌的确切分类地位打下了基础。

关键词 花生根瘤菌, 16S rRNA, 分类

花生是重要的豆科经济作物,能与土壤中的根瘤菌共生结瘤固氮^[1]。根据根瘤菌与宿主之间的“互接种族”的传统分类标准,花生根瘤菌一直被归为分类地位不清楚的豇豆族杂群。随着研究的深入,发现的根瘤菌种类越来越多。同时许多研究表明,同一种豆科植物,能同时与多种不同的根瘤菌共生结瘤固氮^[2,3],导致“互接种族”混乱,因此“互接种族”已不适宜作为根瘤菌分类的唯一标准。近年来,应用现代细菌分类手段,结合系统发育及表型特征,对根瘤菌分类进行了较广泛研究,目前已发表的有 4 个属,包括 10 多个种^[2,4]。但是花生根瘤菌仍按“互接种族”关系处于豇豆族杂群,因此花生根瘤菌的分类地位是值得研究的问题。

由于细菌的 16S rRNA 基因具有相当的保守性,因此现代细菌分类学上以此作为重要依据之一。本实验通过对四川花生根瘤菌的 16S rRNA PCR-RFLP 及其部分碱基序列分析,探讨花生根瘤菌与 12 株已知根瘤菌之间的相互关系,为研究花生根瘤菌在根瘤菌系统分类中的地位提供了依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

从 4 个花生生产区分离的 22 株花生根瘤菌及 12 株分类地位已知的代表根瘤菌列于表 1。在 4 个采样点中仅宜宾曾进行过花生根瘤菌的人工接种^[1]。菌株经分离纯化后,用水培法进行了回接试验。

1.2 16S rRNA PCR-RFLP 分析

表1 供试菌株

Table 1 Bacterial strains used

菌株 Strains	宿主 Host	分离地点或来源 Region or source
spr 2-8	天府3号花生	四川洪雅
spr 2-9	天府3号花生	四川洪雅
spr 3-1	天府3号花生	四川雅安
spr 3-2	天府3号花生	四川雅安
spr 3-3	天府3号花生	四川雅安
spr 3-4	天府3号花生	四川雅安
spr 3-5	天府3号花生	四川雅安
spr 3-6	天府3号花生	四川雅安
spr 3-7	天府3号花生	四川雅安
spr 4-1	地方花生品种	四川雅安
spr 4-2	地方花生品种	四川雅安
spr 4-4	地方花生品种	四川雅安
spr 4-5	地方花生品种	四川雅安
spr 4-6	地方花生品种	四川雅安
spr 4-10	地方花生品种	四川雅安
spr 6-3	天府3号花生	四川宜宾
spr 7-1	天府3号花生	四川南充
spr 7-5	天府3号花生	四川南充
spr 7-7	天府3号花生	四川南充
spr 7-8	天府3号花生	四川南充
spr 7-9	天府3号花生	四川南充
spr 7-10	天府3号花生	四川南充
R. spU10324	金合欢	ATCC
B. j10324	大豆	中国
R. lo 1129	百脉根	中国
R. hu 1634	紫云英	赫尔辛基大学菌保室
R. fr 1337	大豆	赫尔辛基大学菌保室
R. et 1721	银合欢	赫尔辛基大学菌保室
R. le 1125	豌豆	赫尔辛基大学菌保室
R. me 1021	苜蓿	赫尔辛基大学菌保室
R. tr 1163	三叶草	赫尔辛基大学菌保室
R. sa 609	苜蓿豆	赫尔辛基大学菌保室
R. he 1713	热带豆科树	赫尔辛基大学菌保室
R. ga 540	山羊豆	赫尔辛基大学菌保室

DNA 提取:挑取单个菌落,用 DNA 快速提取法^[5]获得 34 株供试菌的全量 DNA。

PCR 扩增:用 fDI 和 rDI(由英国 York 大学 Peter Young 博士提供)为引物,按 Leguerre G 描述的方法^[3]对全部供试菌株的 16S rRNA 进行了 PCR 扩增,取 5 μ l 扩增产物在 1%琼脂凝胶上电泳,检验了扩增片断长度及产量。

酶切、电泳和成像:各取 9 μ l PCR 扩增产物,分别用四种限制性内切酶(HaeIII、Cfo I、Hinf I 和 Rsa I)在 37 $^{\circ}$ C 下进行 1h 酶切反应,用 ϕ 174DNA 作分子量标记,将酶切反应物经 5%的琼脂凝胶电泳 4h(50V),获得全部供试菌的 16S rRNA 4 种酶切电泳图谱,紫外光照射下,用 P55 正负胶片成像。

PCR-RFLP 聚类图:将成像底片直接用 Gel-comper 扫描计算系统及 UPGMA 程序分析,获得供试菌株 16S rRNA PCR-RFLP 聚类图。

1.3 16S rRNA 部分碱基序列分析

PCR 扩增及纯化:该实验仅选用了两株花生根瘤菌 spr3-7 和 spr4-5 为代表,仍用 DNA 快速提取法^[5]提取全量 DNA。用 Y1 和 Y2 DNA 为引物^[6],对两株菌 16S rRNA 264bp 片断进行了 PCR 扩增^[6],扩增产物经过电泳切割,用 Bio-RAD DNA 纯化试剂盒(Promega)纯化,获得 16S rRNA 264bp 纯化片断。

克隆:用 Ready to go 系统(Promega),将 PCR 扩增的纯片断克隆至载体质粒 p^{GEM-T} 的 T7 位点(promega's in vitro systems technical manual),在含有 100 μ g/ml AP、160 μ g/ml X-gal 和 100 μ g/ml IPTG 的 LB 培养基中,筛选含重组质粒的白色转化子。用碱熔法提取转化子中的重组质粒,并纯化,重组质粒中的 16S rRNA 片断用限制性内切酶 Sac I 和 Apa I 同时切割经电泳检验,纯化后测序^[7]。

测序及聚类图:用 ABI 公司 370A 型 DNA 自动测序仪测序。将花生根瘤菌 spr 3-7 和 spr 4-5 16S rRNA 的部分碱基序列与国际生物数据库(Bio-data Base)中的其他细菌相比,用 PILEUP-UPGMA 程序分析,获得花生根瘤菌 16S rRNA 部分碱基序列与其他细菌之间的相似性聚类图。

2 结果和讨论

2.1 花生根瘤菌 16S rRNA 限制性内切酶长度多态与各已知根瘤菌株之间的相似性

用核蛋白体引物 rDI 和 fDI 对 34 株供试菌的 16S rRNA 进行 PCR 扩增后,其扩增产物用 1.0%琼脂凝胶电泳检查时,均产生约 1.5kb 的 DNA 带(以 λ DNA 作标记),该结果表明了根瘤菌与其他细菌的 16S rRNA 基因的分子量是基本一致的^[3]。

各供试菌株的 16S rRNA PCR 扩增产物,分别用 4 种限制性内切酶(HaeIII、Hinf I、Cfo I 和 Rsa I)切割,5%琼脂凝胶电泳后成像,用 Gel-comper 扫描计算系统处理,根据各酶切片断的大小(用 ϕ 174 作标记),归纳为 4 种酶切的 16S rRNA PCR-RFLP 带状图(图 1)。由图 1 可以看出,四川花生根瘤菌 16S rRNA 用 HaeIII、Hinf I、Cfo I 和 Rsa I 切割电泳后,几乎出现完全相同的带型,表明它们的酶切位点基本一致。将花生根瘤菌 16S rRNA 的酶切长度多态与供试的 12 株分类地位已知的各代表菌株比较,花生根瘤菌与慢生大豆根瘤菌属(*B. japonicum*)的代表菌株 Bj10324 完全吻合,而与其他根瘤菌的代表菌株之间差异明显。

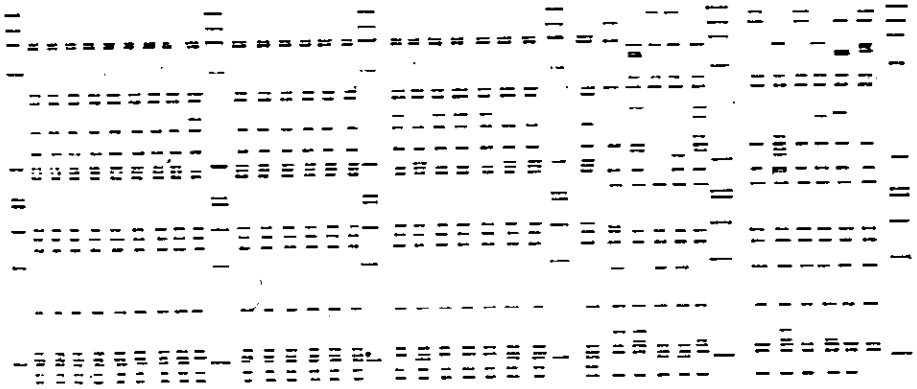


图1 四种酶(HaeIII, Rsa I, Hinf I 和 Cfo I)切的供试菌株的16S rRNA PCR-RFLP 带状图

从左到右菌株的次序为: ϕ 174(分子量标准)spr2-8, spr2-9, spr3-1, spr3-2, spr3-3, spr3-4, spr3-5, spr3-6, spr3-7, ϕ 174, spr4-1, spr4-2, spr4-5, spr4-6, spr4-10, ϕ 174, spr6-3, spr7-1, spr7-5, spr7-7, spr7-8, spr7-9, spr7-10, ϕ 174, Bj10324, R. sa609, R. spU1001, R. he1713, R. et1721, R. lo1129, ϕ 174, R. le1125, R. hu1634, R. fr1337, R. me1024, R. ga540, ϕ 174.

Fig. 1 Restriction patterns of PCR amplified fragment of 16S rRNA genes digested with HaeIII, Rsa I, Hinf I and Cfo I

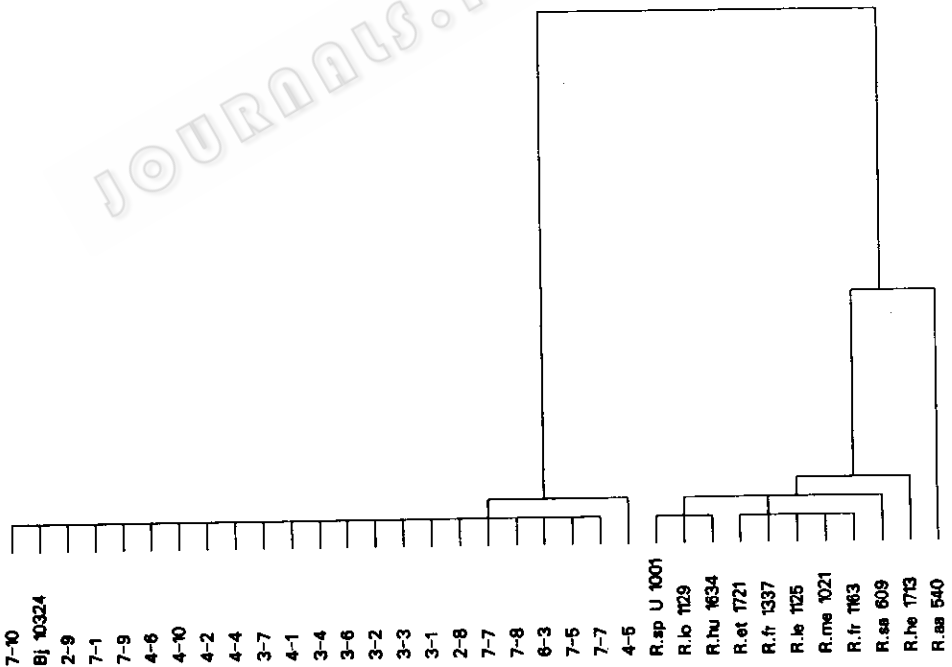


图2 供试22个花生根瘤菌株及12个已知根瘤菌代表菌株的16S rRNA PCR-RFLP的UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram based on PCR-RFLP analysis of peanut rhizobia and reference strains

					50	
	B. BTA11	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGGCGT	AGCAATACGT	CAGCGGCAGA
	B. USDA110	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGGCGT	AGCAATACGT	CAGCGGCAGA
	BNZP2257	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGGCGT	AGCAATACGT	CAGCGGCAGA
	B. USDA59	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGGCGT	AGCAATACGT	CAGCGGCAGA
	spr3-7	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGGCGT	AGCAATACGT	CAGCGGCAGA
	Rhodops	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGGCGT	AGCAATACGT	CAGCGGCAGA
	spr4-5	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGGCGT	AGCAATACGT	CAGCGGCAGA
	Nitrobacter	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGGCGT	AGCAATACGT	CAGCGGCAGA
	B. elkanii	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGGCGT	AGCAATATGT	CAGCGGCAGA
	Aflipia	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGGCGT	AGCAATACGT	CAGCGGCAGA
	R. leg	AGGCTTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGCC..	CGCAAGGG	GAGCGGCAGA
						100
	B. BTA11	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TGGTTCGGAA	CAACACAGGG
	B. USDA110	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TGGTTCGGAA	CAACACAGGG
	BNZP2257	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TGGTTCGGAA	CAACACAGGG
	B. USDA59	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TGGTTCGGAA	CAACACAGGG
	spr3-7	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TGGTTCGGAA	CAACACAGGG
	Rhodops	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TGGTTCGGAA	CAACACAGGG
	spr4-5	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TGGTTCGGAA	CAACACAGGG
	Nitrobacter	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TGGTTCGGAA	CAACACAGGG
	B. elkanii	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TGGTTCGGAA	CAACACAGGG
	Aflipia	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TGGTTCGGAA	CAACACAGGG
	R. leg	CGGGTGA GTA	ACGCGTGGGA	ACGTACCTTT	TACTACGGAA	TAACGCAGGG
						150
	B. BTA11	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAGCCCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGCCG
	B. USDA110	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAGCCCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGCCG
	BNZP2257	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAGCCCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGCCG
	B. USDA59	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAGCCCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGCCG
	spr3-7	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAGCCCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGCCG
	Rhodops	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAGCCCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGCCG
	spr4-5	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAGCCCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGCCG
	Nitrobacter	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAGCCCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGCCG
	B. elkanii	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAGCCCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGCCG
	Aflipia	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAG..CCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGCCG
	R. leg	AAACTTGTGC	TAATACCGGA	TAAGCCCTTA	CGGGGAAAGA	TTTATCGGTA
						200
	B. BTA11	AAAGATCGGC	CGCGCTCTGA	TTAGCTAGTT	GGTAGGGTAA	TGGCCTACCA
	B. USDA110	AAAGATCGGC	CGCGCTCTGA	TTAGCTAGTT	GGTAGGGTAA	TGGCCTACCA
	BNZP2257	AAAGATCGGC	CGCGCTCTGA	TTAGCTAGTT	GGTAGGGTAA	TGGCCTACCA
	B. USDA59	AAAGATCGGC	CGCGCTCTGA	TTAGCTAGTT	GGTAGGGTAA	TGGCCTACCA
	spr3-7	AAAGATCGGC	CGCGCTCTGA	TTAGCTAGTT	GGTAGGGTAA	TGGCCTACCA
	Rhodops	AAAGATCGGC	CGCGCTCTGA	TTAGCTAGTT	GGTAGGGTAA	TGGCCTACCA
	spr4-5	AAAGATCGGC	CGCGCTCTGA	TTAGCTAGTT	GGTAGGGTAA	TGGCCTACCA
	Nitrobacter	AAAGATCGGC	CGCGCTCTGA	TTAGCTAGTT	GGTAGGGTAA	TGGCCTACCA
	B. elkanii	AAAGATCGGC	CGCGCTCTGA	TTAGCTAGTT	GGTAGGGTAA	TGGCCTACCA
	Aflipia	AAAGATCGGC	CGCGCTCTGA	TTAGCTTGT	GGTAGGGTAA	TGGCCTACCA
	R. leg	AAAGATCGGC	CGCGCTTGG	TTAGCTAGTT	GGTGGGGTAA	AGGCCTACCA
						250
	B. BTA11	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
	B. USDA110	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
	BNZP2257	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
	B. USDA59	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
	spr3-7	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
	Rhodops	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
	spr4-5	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
	Nitrobacter	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
	B. elkanii	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
	Aflipia	AGGCGACGAT	CAGTAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
	R. leg	AGGCGACGAT	CCATAGCTGG	TCTGAGAGGA	TGATCAGCCA	CATTGGGACT
						300
	B. BTA11	GAGACACGGC	CCAA			
	B. USDA110	GAGACACGGC	CCAA			
	BNZP2257	GAGACACGGC	CCAA			
	B. USDA59	GAGACACGGC	CCAA			
	spr3-7	GAGACACGGC	CCA.			
	Rhodops	GAGACACGGC	CCAA			
	spr4-5	GAGACACGGC	CCAA			
	Nitrobacter	GAGACACGGC	C...			
	B. elkanii	GAGACACGGC	CCAA			
	Aflipia	GAGACACGGC	C...			
	R. leg	GAGACACGGC	CCAA			

图 3 花生根瘤菌 (spr 3-7, spr 4-5) 与其他对照细菌的 16S rRNA 的部分碱基序列

Fig. 3 Alignment of sequences of parts of the 16S rRNA genes of peanut rhizobia (spr 3-7 and spr 4-5) and reference strains

为了更直观地反映花生根瘤菌 16S rRNA PCR-RFLP 与各代表根瘤菌之间的相似性水平,将图 1 结果用 UPGMA 程序处理,获得聚类图(图 2)。如图 2 所示,四川花生根瘤菌与慢生大豆根瘤菌 Bj10324 聚为一大类,而供试的其他代表菌株基本上聚为独立一类。由此表明:四川花生根瘤菌的 16S rRNA PCR-RFLP 与慢生大豆根瘤菌相似性极高。

由于 16S rRNA 片断较小,仅 1.5kb,经酶切后的较小片断很不容易在电泳时获得清晰的带。因此加大琼脂的量为 5%,使 DNA 缓慢移动,在长时间(4h)和低压(50V)的条件下,获得了清晰的带。但是在操作过程中,应将琼脂与缓冲液充分混合融化,温度不低于 90℃时在玻璃盒中制凝胶板,电泳时最好在电泳槽下放一个磁力搅拌器,使槽内缓冲液温度始终均匀,否则带呈倾斜状。

2.2 花生根瘤菌 spr 3-7 和 spr 4-5 部分碱基序列与其他根瘤菌之间的相似性

花生根瘤菌 spr 3-7 和 spr 4-5 的 16S rRNA 部分碱基顺序测定结果如图 3 所示,图 3 表示的其他细菌的 16S rRNA 部分碱基顺序从国际生物数据库中获得。

为了反映花生根瘤菌 16S rRNA 部分碱基顺序与其它细菌之间的相似性,将图 3 结果用 PILEUP-UPGMA 程序处理获得相似性聚类图(图 4)。图 4 结果表明:用 Y1 和 Y2 作引物,PCR 扩增的花生根瘤菌 spr 3-7 和 spr 4-5 的 16S rRNA 片断(264bp)的碱基排列顺序与慢生大豆根瘤菌 USDA 59 及红假单胞菌的相似性水平最高,与快生豌豆根瘤菌的遗传距离最远。慢生大豆根瘤菌与红假单胞菌 16S rRNA 的同源性,在以前

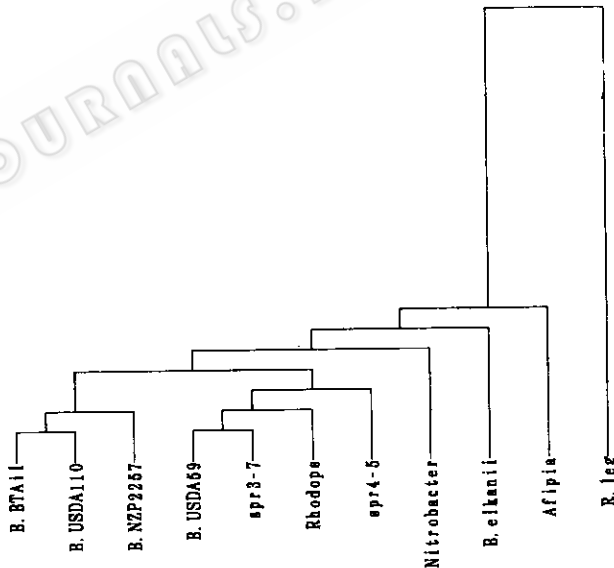


图 4 花生根瘤菌 (spr 4-5, spr 3-7) 与其他对照细菌的 16S rRNA 部分碱基 (264bp) 序列的相似性聚类图

Fig. 4 Dendrogram showing relationships between two peanut rhizobia strains (spr 3-7 and spr 4-5) and reference strains based on their partial 16S rRNA sequences

The comparison was done by the PILEUP program of GCG packet using the UPGMA algorithm.

已有报道^[6],说明目前已知根瘤菌属种间的关系还需调整。

16S rRNA 分析能充分地反映细菌系统发育及进化规律。建立在系统发育方法上的现代根瘤菌分类体系中,16S rRNA 的同源性是重要依据之一。四川花生根瘤菌 16S rRNA 的 PCR-RFLP 及部分碱基排列顺序与慢生大豆根瘤菌之间高度的相似性,反映了花生根瘤菌与慢生大豆根瘤菌在系统发育及进化方向上基本是一致的。这一结果对进一步研究花生根瘤菌在根瘤菌系统中的确切分类地位提供了重要依据。广泛地收集不同生态地区和不同花生品种上的根瘤菌株综合系统发育及表型特征研究,是解决花生根瘤菌确切分类地位的有效手段。

致谢 北京农业大学陈文新教授、四川农业大学黄怀琼教授、郭万柱教授以及四川农业科学院郑林用副研究员对此项工作给予热心的指导和帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 黄怀琼. 土壤肥料, 1986, 4: 14~17.
- [2] Jordan D C. Family III. Rhizobiaceae. In: Krieg N R *et al* ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 1. Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 1984. 234~242.
- [3] Laguerre G, Allard M, Revoy F *et al*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(1): 56~63.
- [4] 陈文新. 根瘤菌研究进展. 见: 李卓隽等主编. 生命科学和土壤学中几个领域的研究进展. 北京: 农业出版社, 1993. 137~140.
- [5] Sobral B, Atherly A G. *Bio Techniques*, 1989, 7: 938.
- [6] Young J P W, Downer H L, Eardly B D. *J Bacteriol*, 1991, 173(7): 2271~2277.
- [7] Weisbury W G, Barns S M, Pelletier D A. *J Bacteriol*, 1991, 173(1): 697~703.

THE TAXONOMIC POSITION OF PEANUT RHIZOBIA

Zhang Xiaoping Cheng Qiang Li Dengyu

(Department of Applied Microbiology, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014)

Kristina L

(Department of Applied Chemistry and Microbiology, P.O. Box 27, University of Helsinki, Finland 00014)

Abstract Twenty two rhizobial strains isolated from two peanut cultivars and four different sites in Sichuan province, and twelve strains representing presently recognized *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* were used for studying the taxonomic position of peanut rhizobia by restriction fragment length polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA genes (PCR-RFLP) and partial sequencing of 16S rRNA genes. The results indicated that Schuan peanut rhizobia were closely related to *Bradyrhizobium japonicum*.

Key words Peanut rhizobia, 16S rRNA, Taxonomy