

沙坡头地区根瘤菌 DNA 同源性及 16SrDNA 全序列*

李 颖 白 雨 陈文新

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘 要 数值分类和多位点酶电泳分析表明,分离自宁夏沙坡头地区的 12 株根瘤菌构成一个独立的表观群。对这一菌群进行了 DNA 同源性和群内中心菌株 16SrDNA 全序列分析。12 个菌株的 G + C mol% 在 56.4~62.2 范围内,群内 DNA 同源性为 72.3%~93.5%,大于 70% 属种内水平,中心株 N220 的 16SrDNA 全序列与参比菌株的序列比较,从模拟系统发育树看出,它与三株土壤杆菌、三株根瘤菌的 16SrDNA 序列同源性在 94.8%~99.2% 的相似性水平上构成一个分支,看来沙坡头地区这群根瘤菌是一个独立的新种群。

关键词 根瘤菌, DNA 同源性, 16SrDNA 序列

分类号 Q939-64 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0095-99

沙坡头位于宁夏中卫县境内,具有典型的亚洲中部温带荒漠气候特征。豆科植物在此地区的农业生产、土壤改良和防风固沙中起着重要作用。我们对这一地区内豆科植物根瘤菌进行了调查和分离,经纯化、回接鉴定后,将 20 株新分离菌株与 26 株参比菌株进行了数值分类^[1]。结果表明,有 12 株未知菌在 80% 的相似性水平上独立成群,并具有耐盐碱,耐 60℃ 高温等特点。之后,又对这些菌株进行了多位点酶电泳分析^[2],其结果与数值分类相吻合。为了进一步确定这些未知菌的分类地位,本试验根据目前国际上规定的“描述根、茎瘤菌新种属的最低标准”^[3],又研究了未知菌群内菌株间以及未知菌与各已知菌之间 DNA 同源性和未知菌群中心株的 16SrDNA 全序列。

1 材料和方法

1.1 材料

由于未知根瘤菌均为快生菌,因此选取已知参比菌 *Rhizobium*、*Sinorhizobium* 和 *Mesorhizobium* 三属的 12 个模式菌株与 12 个未知菌进行 DNA-DNA 杂交,菌株编号、来源等见表 1。选用未知菌群中心株 N220 测定其 16SrDNA 全序列,序列相似性分析所用其它参比菌株的信息来自 GenBank,索取号见文献[4]。

1.2 方法

1.2.1 G + C mol% 分析及 DNA - DNA 杂交试验 供试菌株活化后,接种于 TY 培养液,28℃,120 r/min 培养至对数生长期,离心收集菌体。参考 Marmur^[5]、Johnsor^[6]和林万明^[7]的方法提取 DNA 并调整其纯度和浓度,采用热变性法^[8]测定 T_m 值和 G + C mol%,以 *E. coli* K-12 作为参比,用注射器抽吸法剪切 DNA,采用复性速率法^[9]在 752C 分光

* 国家自然科学基金“八五”重点资助项目(No. 39130010)

收稿日期:1998-03-20,修回日期:1998-07-04

表1 实验菌株及来源

Table 1 Tested strains and their sources

| 菌号 | 菌名或寄主名 | 来源 |
|---------------|---------------------------------------|---------|
| Strain number | Name of strains or hosts | Sources |
| AIBS | <i>Mesorhizobium tianshanense</i> | 新疆 |
| CCBAU 2609 | <i>M. huakuii</i> | 南京 |
| NZP 2213 | <i>M. loti</i> | 新西兰 |
| USDA 1002 | <i>M. meliloti</i> | 美国 |
| USDA 3383 | <i>M. cicer</i> | 美国 |
| CIAT 899 | <i>Rhizobium tropici</i> | 巴西 |
| HAMBI 540 | <i>R. galegae</i> | 芬兰 |
| USDA 2370 | <i>R. leguminosarum</i> | 美国 |
| CFN 42 | <i>R. setli</i> | 巴西 |
| USDA 205 | <i>Sinorhizobium fredii</i> | 美国 |
| USDA 4101 | <i>S. teranga</i> | 美国 |
| USDA 4102 | <i>S. saheli</i> | 美国 |
| N185 | <i>Sophora japonica</i> (国槐) | 沙坡头 |
| N189 | <i>Caragana korshinskii</i> (柠条锦鸡儿) | 沙坡头 |
| N191 | <i>Caragana erinecea</i> (川西锦鸡儿) | 沙坡头 |
| N196 | <i>Caragana kansuensis</i> (甘肃锦鸡儿) | 沙坡头 |
| N207 | <i>Hedysarum scoparium</i> (花棒) | 沙坡头 |
| N210 | <i>Caragana rosea</i> (红花锦鸡儿) | 沙坡头 |
| N218 | <i>Sophora alopecuroides</i> (苦豆子) | 沙坡头 |
| N232 | <i>Medicago lupulina</i> (天蓝苜蓿) | 沙坡头 |
| N242 | <i>Medicago sativa</i> (紫花苜蓿) | 固原 |
| N245 | <i>Vicia sepium</i> (野豌豆) | 固原 |
| N206 | <i>Amorpha fruticosa</i> (紫穗槐) | 沙坡头 |
| N220 | <i>Glycyrrhiza aspera</i> (粗毛甘草) | 沙坡头 |

表2 新菌群 Tm 值和 G + C mol%

Table 2 Tm value and DNA G + C contents of the new group

| 菌株 | Tm/°C | G + C mol% |
|---------|----------|--------------------|
| Strains | Tm value | DNA G + C contents |
| N220 | 76.5 | 59.8 |
| N218 | 76.0 | 57.9 |
| N185 | 78.1 | 62.2 |
| N189 | 75.8 | 57.4 |
| N191 | 75.3 | 56.4 |
| N196 | 76.9 | 59.7 |
| N207 | 77.6 | 61.8 |
| N210 | 76.2 | 58.3 |
| N232 | 76.9 | 59.7 |
| N242 | 78.0 | 62.0 |
| N245 | 75.8 | 57.4 |
| N206 | 77.8 | 61.6 |

光度计上测定菌株间 DNA 同源性。

1.2.2 未知菌群中心菌株 16S rDNA 全序列测定 (1) 将未知菌群内中心菌株 N220 经液体培养并提取总 DNA 作为模板, 进行

PCR 引物的选择参照文献 [10] 和 [11], PCR 反应按下列条件进行: 94 °C 变性 1min, 53 °C 复性 1min, 72 °C 延伸 3min, 共 30 个循环, 最后一个循环 72 °C 延伸 10min, 在 Thermal Cycler PE-480 型仪器上完成。电泳检测 PCR 产物大小。(2) 回收纯化 PCR 产物, 切下目的片段, 经 Bio-Rad 试剂盒回收纯化。(3) 阳性克隆的获得: 纯化好的 PCR 产物和载体 pUC18 分别经 BamHI 酶切, 14 °C 粘端连接 4h, 连接产物用电转化法转入 *E. coli* DH5 α 细胞, 将转化液在 37 °C 温育 45min 后, 涂布于含有氨卞青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜, 挑取白色菌落经 Cracking 法筛选转化子, 用碱法小量提取质粒 DNA, BamHI 酶切后电泳检测, 同时以所提质粒 DNA 为模板, 按上述条件再次 PCR, 电泳检测 PCR 产物。(4) 大量提取、纯化质粒 DNA, 并测定。(5) 数据处理: 用 PHYLIP version 3.572c 软件包 [11] 对 N220 菌株 16S rDNA 全序列及参比菌株序列 (大部分取自 GenBank, 有三株菌信息来自本室) 进行分析, 绘出无根树状图。

2 结果和分析

2.1 Tm 值、G + C mol% 及 DNA 同源性

表 2 看出, 未知菌 Tm 值在 75.3 °C ~ 78.1 °C 之间, $\Delta T_m < 5^\circ\text{C}$; G + C mol% 在 56.4 ~ 62.2。以往的研究中发现, 根瘤菌 *Rhizobium*、*Sinorhizobium* 和新近提出的 *Mesorhizobium* [12] 各属中大部分菌株 G + C mol% 在 59 ~ 64, 而沙坡头根瘤菌 G + C mol% 水平略低于各已知种。未知菌群内 DNA 同源性在 72.3% ~ 93.5% 范围内 (表 3), 大于 70%, 属于种水平的同源群; 未知菌群中心株 (N220) 与各已知模式菌 DNA 同源性在 0% ~ 66.6% (表 4), 低于种水平。

表 3 N220 与群内各菌株之间 DNA 同源性

Table 3 The levels of DNA homology between N220 and the Members in the new group

| 菌株 | 同源性/% |
|---------|----------------------------|
| Strains | The levels of DNA homology |
| N185 | 81.3 |
| N189 | 89.4 |
| 191 | 93.5 |
| N196 | 79.8 |
| N207 | 82.0 |
| N210 | 77.1 |
| N218 | 82.6 |
| N232 | 74.6 |
| N242 | 72.3 |
| N245 | 73.5 |
| N206 | 79.4 |
| N220 | 100.0 |

表 4 N220 与各模式菌之间 DNA 同源性

Table 4 The levels of DNA homology between N220 and the type strains

| 菌株 | 同源性/% |
|-----------|----------------------------|
| Strains | The levels of DNA homology |
| A1BS | 55.8 |
| CCBAU2609 | 0.0 |
| CIAT899 | 38.9 |
| HAMBI540 | 8.1 |
| NZP2213 | 17.1 |
| USDA205 | 60.2 |
| USDA1002 | 66.6 |
| USDA2370 | 0.0 |
| USDA4101 | 58.6 |
| USDA4102 | 41.6 |
| USDA3383 | 1.8 |
| CFN42 | 6.1 |

2.2 16S rDNA 全序列

以下为菌株 N220 16S rDNA 全序列测定结果, 共计 1430 个碱基:

AACGAACGCTGGCGGCAGGCTCAACACATGCAAGTCGAACGCCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGT
 GAGTAACGCGTGGGAACATACCCTTTCCTGCGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATTAATACCGCATA
 GCCCTACGGGGAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGCCCGGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
 GGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACG
 CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG
 CCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGG
 AGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGA
 ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCAGAGCTCAACTCTG
 GAACTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAA
 ATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTG
 CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGC
 CGTCGGGCAGTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCG
 AAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAG
 CAACGCGCAGAACCTTACCAGCTCTTGACATTCGGGGTTTGGGCAGTGGAGACATTGTCTTCAGTTG
 GCTGGCCCCAGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGAT
 AAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCT
 ACAATGGTGGTGACAGTGGGGCAGCGAGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTC
 GGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGG
 TCAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGT
 GCGCTAACCGCAAGGAGGCAGCTAACACCGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA
 GCCGT

N220 与其他已知参比菌株的 16S rDNA 全序列经用 PHYLIP version 3.572c 软件计算相似性并绘出树状图(图 1), 在此树状图中包括五个主要分支, 右上分支内 N220 同三

株土壤杆菌 (*A. rubi*, *A. tumefaciens* *A. viti*) 和一株山羊豆根瘤菌 (*R. galegae*) 及 SH19312 (寄主为 *Glycyrrhiza pallidiflora*)、SH22623^[4] (寄主为 *Gueldenstaeditia multiflora*) 处在一个分支上, 与它们的相似性分别为 98.4%、99.2%、94.8%、95.0%、96.4% 和 95.9%, 亲缘关系较近; 左上分支由 *Rhizonium* 属的五个菌株和一株土壤杆菌构成; 左下分支是 *Mesorhizobium* 属的六个菌株, 其中 SH2672 是本室新测定的菌株^[4]; 右下分支有 *Sinorhizobium* 属的五个菌株, 右中分支内菌株除了两株慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium*) 外, 一株 *Azorhizobium caulinodans* 和其它参比菌与以上各属相距较远。

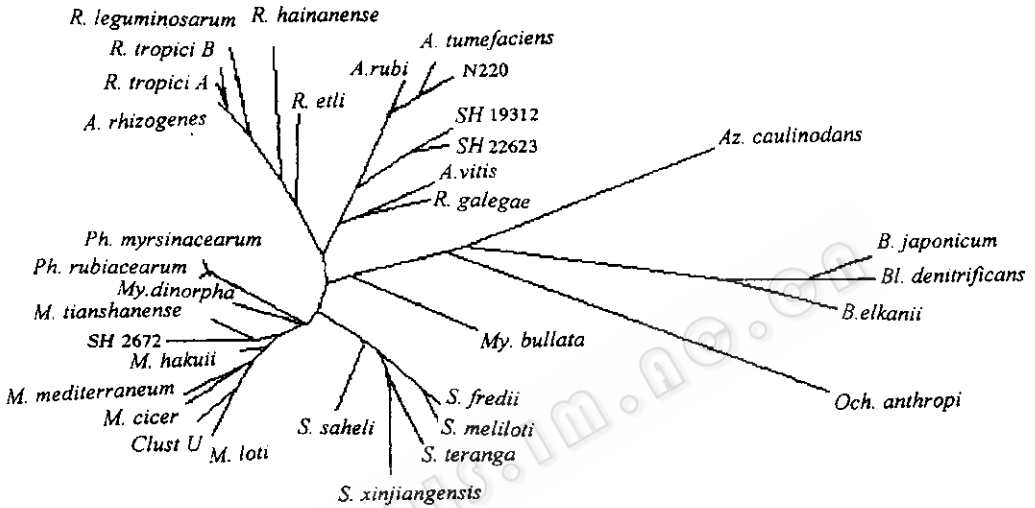


图 1 树状图 (PHYLIP, version 3.572)

Fig. 1 Unrooted tree (PHYLIP, version 3.572c)

Abbreviations: R. = *Rhizobium*, S. = *Sinorhizobium*, M. = *Mesorhizobium*, Az. = *Azorhizobium*,
A. = *Agrobacterium*, B. = *Bradyrhizobium*, My. = *Mycoplasma*, Och = *Ochrobactrum*,
Pg. = *Phyllobacterium*, Bl. = *Blastobacter*.

3 讨论

本实验证实, 从沙坡头地区新分离的根瘤菌 DNA 同源性较高。从 DNA-DNA 杂交结果看出, 群内同源性大于 70%, 中心菌株 N220 与已知参比菌同源性均低于 70%, 虽然与 *M. meliloti* (USDA1002) 同源性为 66.6%, 但两者 16Sr DNA 全序列相似性仅为 92.4%, 低于属的水平。在图 1 中看出, N220 菌株所定位的分支中, 包括了三株土壤杆菌和四株根瘤菌, 从它们的 16Sr DNA 全序列与参比菌株比较后所得到相似性矩阵表 (略) 中得知, 分支内 N220 与 5 个种间相似性大于 95%, 与 *A. vitis* 的相似性为 94.8, 接近 95%, 根据目前界定的种内 DNA 同源性应大于或等于 70%, 属内 16S rDNA 序列相似性不低于 95% 的标准^[3], 沙坡头根瘤菌群代表了一个新种, N220 则为这个新种群的代表菌株。目前正将其与各模式菌的原寄主进行互接试验。近年来的很多研究结果都打破了以互接种族为依据的分类模式, 证实了根瘤菌的多样性, 并肯定生态环境对菌株的生理和遗传特性具有重要影响。在沙坡头这

一新种群内, 寄主分别来自适应贫瘠沙土地生长的锦鸡儿、国槐、甘草、苜蓿、苦豆子、野豌豆、紫穗槐和花棒, 但它们耐干旱和耐盐碱的特点值得重视。

致谢 在完成本实验过程中, 得到中国农业大学农业生物技术国家重点开放实验室赵银锁副教授和马旅雁博士的帮助和指导, 在此深表谢意。

参 考 文 献

- [1] 李 颖, 阮小超, 陈文新. 中国农业大学学报, 1996, 1(5) : 5~20.
- [2] 李 颖, 阮小超, 陈文新. 中国农业大学学报, 1997, 2(1) : 31~36.
- [3] Graham P H *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 2(1) : 31~36.
- [4] 谭志远, 陈文新. 微生物学报, 1997, 37(6) : 411~416
- [5] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, 3208~218.
- [6] Johnson J L, *Microbiology*, 1985, 18 : 1~74.
- [7] 林万明. 分析微生物学专辑, 北京: 科学出版社, 1988. 88~89.
- [8] De Ley J. *J Bacteriol*, 1970, 101 : 738~754.
- [9] De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. *Eur J Biochem*, 1970, 12 : 133~142.
- [10] Yanagi M, Yamasato K, *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 107 : 115~120.
- [11] Chen WenXin, Tan ZhiYuan, Gao Junlian *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(3) : 870~873.
- [12] Jarvis B D W, P van Berkum, W X Chen *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(3) : 895~898.
- [13] Martinez-Romero E, Caballero-Mellado. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1996, 15(3) : 113~140.

STUDIES ON DNA-DNA HYBRIDIZATION AND 16S rDNA SEQUENCE OF RHIZOBIA ISOLATED FROM SHAPOTOU DESERT SOIL IN NINGXIA AOTONOMOUS REGION OF CHINA

Li Ying Bai Yu Chen Wenxin

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

Abstract Based on the previous studies on numerical taxonomy and multilocus enzymes electrophoresis patterns of the 12 rhizobial strains isolated from Shapotou region, the contents of G + C mol%, DNA-DNA relatedness and 16SrDNA sequence of the representative strain were tested. The DNA G + C content of the members of this group ranged from 56.4 to 62.2. The values of DNA-DNA hybridization within the group were above 70%, and relatedness between representative strains of this group and known rhizobial species was below 66.6%. The full-length of 16S rDNA sequence of representative strain N220 was compared with the type strains of all known rhizobia species and related bacteria by the PHILIP version 3.572c composed a unrooted phylogenetic tree, the strain N220, *R. galega*, two unnamed rhizobial strains (SH19312, SH22623) and three *A-grobacterium* strains constituted a branch in this tree. The similarity values of 16S rDNA sequence between strain N220 and other strains in this branch were above 95%.

Key words Rhizobia, DNA homology, Sequencing of 16S rDNA