



中华苜蓿根瘤菌噬菌体的分离及主要壳蛋白基因 *g23* 的系统进化分析

于浩^{1,2}, 刘俊杰^{2*}, 范国权³, 王光华^{2*}

¹ 黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江 大庆 163319

² 中国科学院黑土区农业生态重点实验室, 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081

³ 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086

摘要:【目的】揭示苜蓿根瘤菌噬菌体的形态学特征及主要壳蛋白 *g23* 基因的分布地位, 为根瘤菌噬菌体的生态学研究提供数据支持。【方法】以中华苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* USDA1002^T)为宿主, 采用双层平板法分离土壤环境中的苜蓿根瘤菌噬菌体, 利用电子显微镜观察纯化的噬菌体形态特征; 提取噬菌体 DNA, PCR 扩增编码噬菌体壳蛋白的 *g23* 基因, 构建系统进化树, 以形态学鉴定和分子生物学相结合的方法, 明确分离获得的苜蓿根瘤菌噬菌体 *g23* 基因的系统进化地位。【结果】分离获得了 3 株噬菌体, 头部均呈二十面体, 直径大小为 81–86 nm, 尾部有收缩尾鞘, 长度大约为 54–70 nm。克隆测序结果显示, 获得的 3 株噬菌体 *g23* 基因株间相似度较高, 但与可培养的 ExoT-、SchizoT-、T-、PseudoT-evens 相似度较低。系统进化分析表明, 获得的 3 株噬菌体不隶属于目前已划分的不同环境噬菌体 *g23* 基因的分类类群中。【结论】3 株噬菌体均属于肌尾噬菌体科的裂性噬菌体, 与目前获得的所有噬菌体 *g23* 基因相似性较低, 属于新的侵染中华苜蓿根瘤菌的噬菌体株。

关键词: 中华苜蓿根瘤菌, 根瘤菌噬菌体, *g23* 基因, 系统进化

根瘤菌(*Rhizobia*)是一类广泛分布于土壤中的革兰氏阴性细菌, 它可以侵染植物根部形成根瘤, 固定空气中的分子态氮形成氨。根瘤菌固氮不仅提高作物产量, 节约氮肥, 降低生产成本, 而且能够提高土壤肥力、改善土壤结构。根瘤菌-豆科植物共生体系是生物固氮中效率最高的, 固定的

氮素约占生物固氮总量的 65%, 在农业生产中起着重要的作用^[1]。紫花苜蓿作为重要的豆科牧草, 随着我国农业结构的调整, 其种植面积不断增加, 对苜蓿根瘤菌共生体系的研究有助于减少对工业氮肥的依赖, 对环境可持续发展有积极意义。

噬菌体是侵染细菌的病毒, 是地球上数量最

基金项目: 国家自然科学基金(41301259)

*通信作者: 刘俊杰, Tel: +86-451-86602745, Fax: +86-451-86603736, E-mail: liujunjie@iga.ac.cn; 王光华, E-mail: wanggh@iga.ac.cn

收稿日期: 2016-07-01; 修回日期: 2016-09-20; 网络出版日期: 2016-10-27

多的生命体,仅在海洋生态系统中数量就高达 10^{30} 以上。噬菌体在自然生态系统中广泛存在,其数量一般是宿主细菌的10倍左右,被认为是地球上数量最多的病毒类型^[2]。噬菌体侵染根瘤菌后可导致根瘤菌的退化与死亡,从而导致固氮效率和作物产量的下降^[3-4]。研究表明噬菌体通过直接和间接的作用对根瘤菌产生了影响,噬菌体通过对根瘤菌的侵染产生了大量的无效根瘤菌^[5],侵染作用直接导致了根瘤菌数量明显下降^[6]。然而,目前关于噬菌体与宿主间侵染关系和噬菌体的遗传基因特征研究较少。原因在于,到目前为止在噬菌体中没有发现诸如细菌的16S rRNA基因保守序列可以设计引物,解析噬菌体基因多样性^[7]。其次,由于以目标菌株为诱饵,从环境中直接分离噬菌体和噬菌体纯化过程中发生的侵染能力退化原因^[8],导致噬菌体的研究进展相对滞后于宿主细菌。

最近研究表明,某些噬菌体家族的结构和功能蛋白质氨基酸片段序列高度保守,利用这些保守片段氨基酸序列设计简并性引物,可以通过PCR扩增不同家族噬菌体基因序列,用于研究噬菌体的基因多样性^[9]。目前报道较多的是g23基因,该基因编码肌尾噬菌体科T4型噬菌体主要壳蛋白^[10]。利用引物MZIA1Bis和MZIA6,采用PCR技术从海洋^[10]、湖泊^[11-12]、稻田^[13-17]和旱地黑土^[18]等环境中已经扩增出许多噬菌体的g23基因,并发现不同环境中获得的g23基因差别很大^[19],表明g23基因对T4型噬菌体的分子学鉴定具有很好的指示作用。鉴于此,本文以苜蓿根瘤菌模式菌株USDA1002^T(16S rRNA基因核苷酸登录号X67222)为宿主,采用双层平板培养法从土壤环境中分离根瘤菌噬菌体,利用电镜观察噬菌体形态特征,采用PCR-克隆测序技术,解析噬菌体g23

基因序列组成及进化地位,为根瘤菌噬菌体基因多样性研究提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株及土壤病毒溶液:供试菌株中华苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* USDA1002^T)由中国农业大学农业部农业微生物资源及其应用重点开放实验室提供。供试土壤采自中国科学院东北地理与农业生态研究所试验田(45°41'N, 126°38'E),混匀后取5g新鲜土壤与5mL NA(葡萄糖15g,酵母粉1g,胰蛋白胨5g,牛肉浸膏3g, pH 7.2)液体培养基混合,置于50mL离心管涡旋混匀,30℃静置过夜,混合液12000×g离心15min,上清用0.22 μm滤膜过滤,收集过滤液为土壤病毒溶液。

1.2 噬菌体的获得、纯化和浓缩

噬菌体的侵染实验参照文献^[20]方法进行。将过滤后的土壤病毒液1.0mL与0.2mL对数生长期的宿主菌液混合,然后注入5mL YMA (KH₂PO₄ 0.25g, K₂HPO₄ 0.25g, MgSO₄·7H₂O 0.20g, pH 7.0)液体培养基中振荡培养48h,12000×g离心15min,上清液经0.22 μm滤膜过滤后获得根瘤菌噬菌体原液。取1.0mL噬菌体原液与0.2mL对数生长期的宿主菌液混匀,室温放置15min,再与6mL冷却至47℃的琼脂浓度为0.4%的YMA半固体培养基混匀,倒入已凝固的YMA固体培养基平板上制成双层平板,待上层培养基凝固后,置于28℃培养箱中倒置培养24-48h,双层平板出现噬菌斑,即获得苜蓿根瘤菌噬菌体。采用重复挑取单个噬菌斑连续与目的宿主细菌悬液培养的方法进行噬菌体纯化。即从长出噬菌斑平板中挑取1个

较大的,边缘光滑的噬菌斑溶于 2 mL 过夜培养的根瘤菌悬液($OD_{600} \approx 0.6$), 30 °C、220 r/min 振荡培养 6 h, 8000 r/min 离心 10 min, 上清用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 双层琼脂平板培养重新获得噬菌斑。如此重复 5 次即可得到纯化的噬菌体。在双层平板上挑取纯化后的单个噬菌斑溶于 SM [0.1 mol/L NaCl, 8 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mmol/L Tris-HCl, 0.005% (W/V)甘油, pH 7.0] 溶液中, 置于 4 °C 冰箱中静置过夜, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液 1 mL 接种于 50 mL 预培养的对数生长期的宿主菌中, 振荡培养 12 h, 即获得噬菌体的大量培养液。向富集得到的噬菌体液中加入 12%的氯仿, 涡旋 5 min, 静置 1 h 取上清, 上清过 0.22 μm 滤膜, 滤液中加入 PEG 8000 和 NaCl 到终浓度为 10%和 0.6%, 混匀, 置于 4 °C 冰箱静置 24 h 后, 12000 \times g 离心 30 min, 弃上清, 用 300 μL SM 缓冲液悬浮沉淀, 加入 100 μL 1 mol/L KCl。冰浴 30 min, 离心后, 上清即为噬菌体的浓缩液。

1.3 噬菌体的电镜观察

参照文献[21]的研究方法, 取 10 μL 含噬菌体浓缩颗粒的液体滴于铜网上, 自然沉淀 20 min, 用干净滤纸从侧面吸去多余液体, 将铜网浸入 10 μL 0.2%的磷钨酸(PTA)中对噬菌体染色 10 s, 滤纸吸去多余染色液, 将铜网铺在干净的滤纸片上, 待样品干燥后用透射电子显微镜(JEM-1400, JEOL)观察噬菌体形态。

1.4 噬菌体 DNA 提取

噬菌体 DNA 的提取方法参照文献[22]。向噬菌体浓缩液中加入 DNase 和 RNase 酶, 浓度分别达到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后, 在 37 °C 水浴条件下培养 4–5 h 以消解游离的宿主 DNA 和 RNA。混合液 85 °C 水浴 15 min, 以灭活 DNase 和 RNase 酶活性, 然后再向离心管中分别加入 38 μL 的 10% SDS,

7.5 μL 的 1 mol/L Tris-HCl, 15 μL 的 0.5 mol/L EDTA 和 2 μL 的蛋白酶 K (10 mg/mL)。混匀后在 55 °C 条件下水浴 30 min, 然后再加入 140 μL 的 5 mol/L NaCl 和 150 μL 的 CTAB/NaCl 溶液, 65 °C 水浴 10 min。噬菌体 DNA 采用 PCI 溶液和 CIA 溶液萃取, 萃取的水相加入 0.6 倍体积的异戊醇溶液, 放在冰上冰浴 1 h, 再在 12000 \times g、4 °C 条件下离心 20 min 获得 DNA 沉淀, DNA 沉淀经 70% 乙醇洗净后, 干燥、溶于 TE 缓冲液中。

1.5 *g23* 基因 PCR 扩增、纯化及克隆测序

采用简并引物 MZIA1bis (5'-GATATTTGIG GIGTTCAGCCCIATGA-3')和 MZIA6 (5'-CGCGGTT GATTTCCAGCATGATTTTC-3')^[10]扩增 *g23* 基因片段。PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环。将 PCR 产物全部注入 2%的琼脂糖凝胶孔中进行电泳, 切下 PCR 产物的目的条带, 将切下的凝胶采用 QIAEX Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN)试剂盒进行 DNA 回收和纯化, 然后将纯化后的 PCR 产物连接到质粒 pMD18-T (TaKaRa, 大连)上, 导入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 上, PCR 反应鉴定阳性克隆, 将阳性克隆提交测序公司测序。

1.6 数据分析

对获得的基因序列, 利用 EMBOSS Transeq Program (<http://www.ebi.ac.uk>)翻译成氨基酸序列后, 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行氨基酸序列比对, 检测是否是目的基因序列并进行同源性分析。用 ClustalX 1.81 软件将本研究获得的 *g23* 基因同来源于不同环境的细菌病毒相关基因(已上传于 GenBank)进行同源性分析^[23], 并用 MEGA 5.1 软件绘制系统进化树^[24]。用于本研究构建系统进化树的参考噬菌体 *g23* 基因包括已报道的首

苜蓿根瘤菌噬菌体 *Meliloti* phage Φ M12 *g23* 基因^[25]、可培养的 T-evens、PseudoT-evens、SchizoT-evens 和 ExoT-evens 的 *g23* 基因和来自海洋^[10]、南极湖^[11]、贝加尔湖^[12]、湿地^[26]、稻田^[17]及旱地^[18]不同生态系统中获得的 *g23* 基因。本研究获得的 *g23* 基因序列提交至 NCBI 数据库的登陆号为 KX456215-KX456217。

2 结果和分析

2.1 苜蓿根瘤菌噬菌体的分离与纯化

通过土壤悬浮液与苜蓿根瘤菌液共培养和双层平板分离得到 3 株噬菌体。挑取单个噬菌斑经过 5 次双层平板分离纯化后, 得到单一均匀的噬菌斑。3 株噬菌体的噬菌斑均为圆形、清晰透明、边缘光滑、不存在同心圆噬菌斑现象, 呈现出裂

性噬菌体的噬菌斑特征。噬菌斑直径分别约为 0.7、1.2 和 2.0 mm。3 株噬菌体分别命名为 *Meliloti* USDA1002^T phage SMM-1 (图 1-A1)、*Meliloti* USDA1002^T phage SMM-2 (图 1-A2)和 *Meliloti* USDA1002^T phage SMM-3 (图 1-A3)。

2.2 苜蓿根瘤菌噬菌体形态

纯化后噬菌体经负染后, 在透射电镜下的形态如图 1-B 所示。3 株苜蓿根瘤菌噬菌体的形态均为蝌蚪状, 头部呈二十面体立体结构, SMM-1、SMM-2 和 SMM-3 头部直径分别为(85±6)、(81±4)和(86±5) nm。3 株噬菌体均含有 1 个无弯曲的长尾, 长度分别约为(62±3)、(54±5)和(70±5) nm (图 1-B1、B2、B3)。根据国际病毒分类委员会制定的噬菌体分类标准, 3 株噬菌体均属于有尾噬菌体目(Caudovirales), 判断可能属于肌尾噬菌体科(Myoviridae)噬菌体。

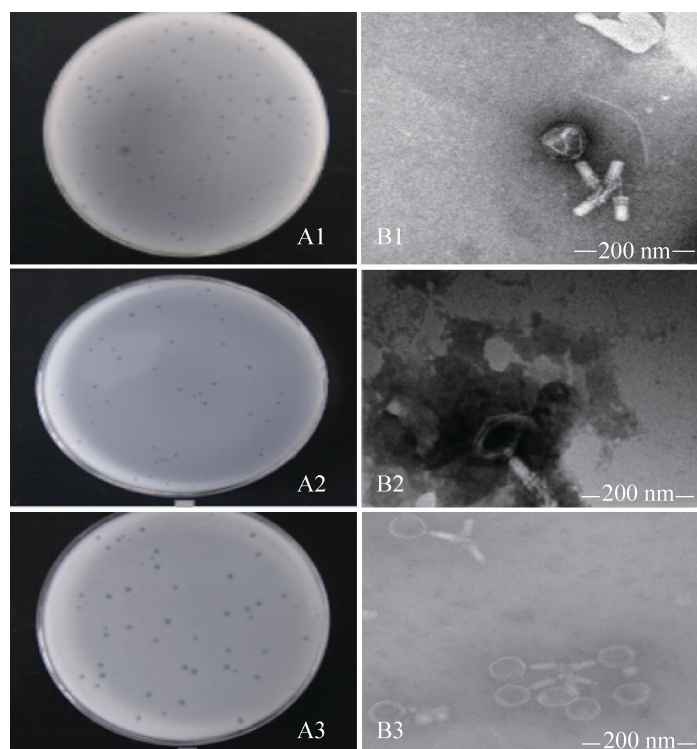


图 1. 中华苜蓿根瘤菌 USDA1002^T 噬菌体噬菌斑(A)及噬菌体形态电镜照片(B)

Figure 1. Plaques (A) and morphological characteristics of rhizobiophages observed under transmission electronic microscope (B). 1-3: indicate *Meliloti* USDA1002^T phage SMM-1, -2 and -3, respectively.

2.3 噬菌体 DNA 提取, *g23* 基因的 PCR 扩增、纯化及克隆分析

苜蓿根瘤菌噬菌体的总 DNA 的提取如图 2-A 所示, 3 株噬菌体 DNA 浓度均大于 50 ng/ μ L, 条带亮度和纯度可用于 PCR 扩增。PCR 扩增产物如图 2-B 所示, 由于 MZIA1bis 和 MZIA6 引物专一性并不强, 3 株噬菌体的 PCR 产物均出现非特异性条带, 而 *g23* 基因目的条带的位置在 300–700 bp^[17], 本研究将 PCR 扩增产物片段大小在 600 bp 左右的产物进行切胶回收(图 2-C)。回收产物经克隆测序后, 每株噬菌体各取 5 个阳性克隆进行测序分析(图 2-D), 将翻译获得的氨基酸序列经 BLASTp 对比分析发现, 从 3 株噬菌体获得的氨基酸序列均属于肌尾噬菌体科 gp23 蛋白, 且重复样品中的 5 株阳性克隆测序结果相同, 表明来源于同 1 株噬菌体, 从而证明本研究噬菌体的纯化效果好。

2.4 苜蓿根瘤菌噬菌体 *g23* 基因的系统进化分析

获得的 3 株噬菌体的核苷酸序列长度均为

462 bp, 株间最大有 7 个核苷酸存在差异, 相似度为 98% (SMM-1 与 SMM-2)和 99% (SMM-1, -2 与 SMM-3)。3 株噬菌体与文献报道的苜蓿根瘤菌噬菌体 *Meliloti* phage Φ M12 *g23* 基因的相似度仅为 54%。噬菌体氨基酸序列在 NCBI 网站上 BLASTp 比对后发现, 3 株噬菌体均与北极冰川环境中获得的 *g23* 克隆 PR066 (AFN73152)相似度最大, 达到 72%; 与海洋、湖泊、湿地、稻田和旱地黑土不同生态系统中的 *g23* 基因的相似性范围分别为 34% (AAZ17589-Clone-3754)–57% (AAZ17574-Clone-37323)、22% (ACZ73358)–66% (ACZ73376)、28% (C.laW-Jul28-7)–58% (C.anW-May28-5)、38% (PS-QF-Jun25-1)–62% (PS-AC-Jun25-5)和 23% (BLSoil-DH-7)–61% (BLSoil-LS-7)之间; 而与可培养的 T-evens、PseudoT-evens、SchizoT-evens 和 ExoT-evens 的 T4 型噬菌体相似性为 30%–57%。

图 3 为本研究获得的 3 株苜蓿根瘤菌噬菌体和 Brewer 等^[26]报道的 *Meliloti* phage Φ M12 *g23* 基因, 与海洋、湖泊和湿地的环境中获得的 *g23* 基

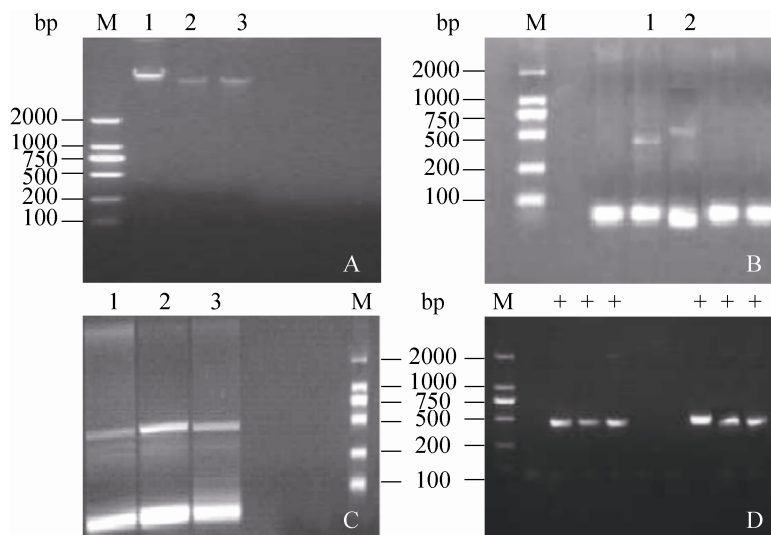


图 2. 根瘤菌噬菌体总 DNA (A)、PCR 扩增(B)、胶纯化(C)和克隆(D)图谱

Figure 2. Profiles of extracted DNA (A), PCR amplification (B), gel purification (C) and positive clone (D) of rhizobiophages. Lane 1–3: indicated *Meliloti* USDA1002^T phage SMM-1, 2 and 3, respectively. M: marker.

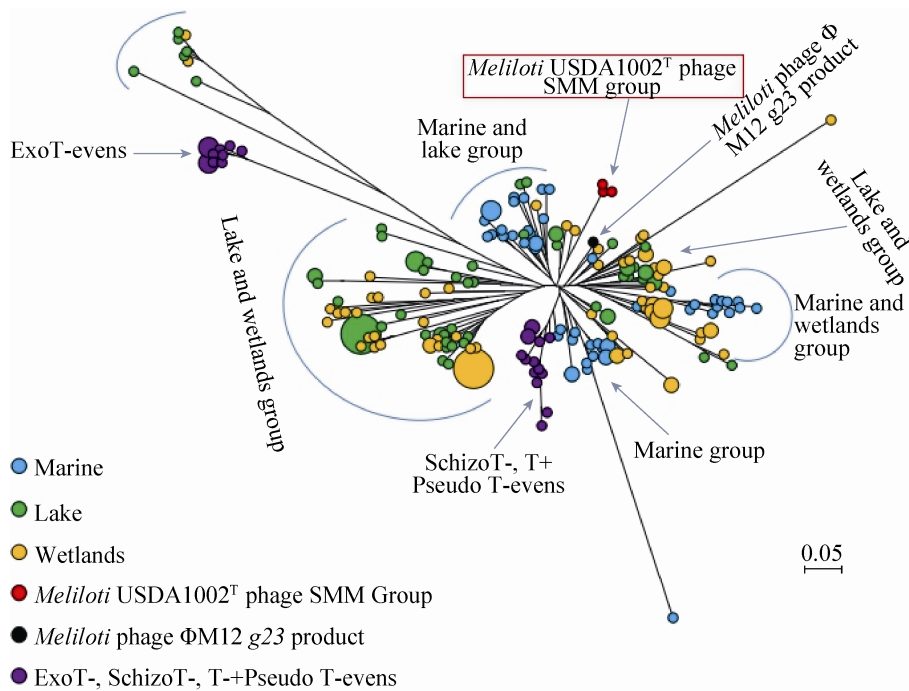


图 3. 3 株噬菌体和 *Meliloti* phage Φ M12 *g23* 基因与海洋、湖泊和湿地 *g23* 基因构建的系统进化树

Figure 3. Unrooted phylogenetic tree of *g23* amino acid sequences of three rhizobiophages and *Meliloti* phage Φ M12^[26] with those obtained from marine waters^[10], lake waters^[11] and wetlands^[25].

因构建的系统进化发育树。由图可知, 3 株苜蓿根瘤菌噬菌体和 *Meliloti* phage Φ M12 *g23* 基因未分布在培养获得的 T-evens、PseudoT-evens、SchizoT-evens 和 ExoT-evens 的 *g23* 类群中。获得的 3 株苜蓿根瘤菌噬菌体与未分类的湖泊克隆 (ACT78899、ACT78896 和 ACT78889) 和湿地克隆 (C.anS-Jul28-8 和 C.laW-Jul28-7) 聚在独立的分支中, 而 *Meliloti* phage Φ M12 *g23* 基因和湿地克隆 (C.anW-Jul28-15) 聚在独立的分支中, 但 Bootstrap 值均低于 50, 说明本研究获得的苜蓿根瘤菌噬菌体的 *g23* 基因不属于海洋、湖泊、湿地中的任一类群中, 亲缘关系较远。此外, 进一步与中国东北旱地和稻田环境中的 *g23* 基因构建的系统进化树分析发现(图 4), 3 株苜蓿根瘤菌噬菌体分别与旱地黑土 *g23* 克隆 (BLSoil-HB-14) 和稻田 *g23* 克隆 (PS-AC-Jun25-5) 分布在独立的分支中 (Bootstrap

值 < 50), 而 *Meliloti* phage Φ M12 *g23* 基因单独分布在独立的分支中, 说明 3 株获得的噬菌体 *g23* 基因与中国旱地和稻田环境中的 *g23* 基因相似度较低, 独立于目前已获得的 *g23* 基因分类系统中。

3 结论和讨论

根瘤菌噬菌体广泛存在于土壤环境中, 通过对寄主的裂解可导致根瘤菌的退化与死亡, 对共生固氮体系产生显著影响。Gerretsen 等^[27]首次从根瘤中分离得到侵染根瘤菌的噬菌体, 尽管根瘤菌噬菌体与宿主间的侵染和进化关系还不清楚, 但对根瘤菌噬菌体转导作用的研究结果表明, 噬菌体在宿主菌之间的遗传物质交换方面起到了重要的桥梁作用^[28-29]。Abebe 等^[4]对噬菌体、根瘤菌以及豆科作物三者之间的关系研究发现, 根瘤菌

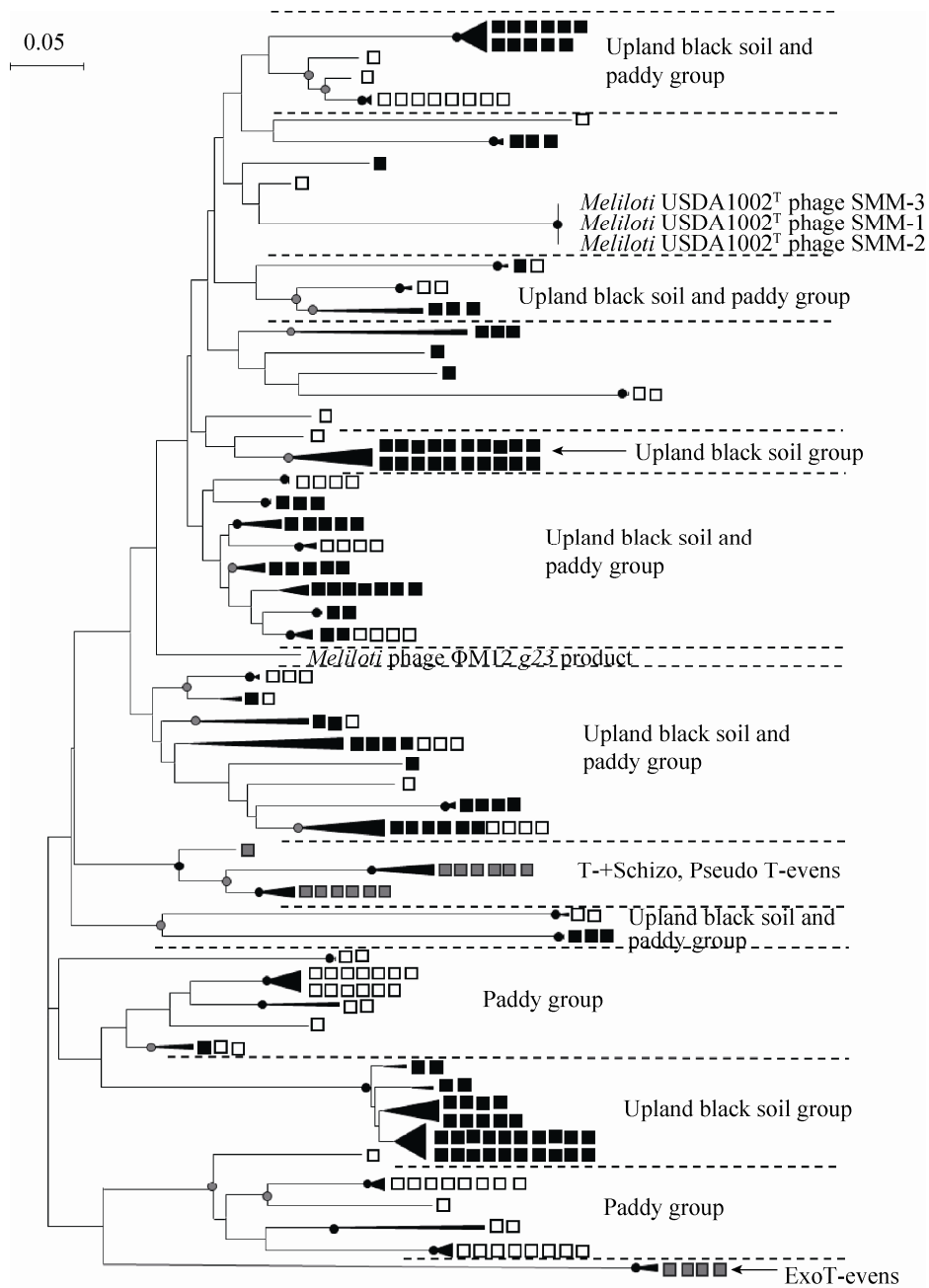


图 4. 3 株噬菌体和 *Meliloti* phage Φ M12 *g23* 基因与中国东北旱地和稻田环境中的 *g23* 基因构建的系统进化树
 Figure 4. Neighbor-joining phylogenetic tree of *g23* gene sequences of three rhizobiophages and *Meliloti* phage Φ M12^[26] with those obtained from upland black soil^[18] and paddy field^[17] in Northeast China. The black and white squares represent clones obtained from upland black soil and paddy field in NE China, and the grey square represent the cultivable bacteriophages of T-evens, PseudoT-evens, SchizoT-evens and ExoT-evens, respectively.

被噬菌体侵染后，有效根瘤菌数量明显降低、结瘤量减少、固氮作用减弱、作物产量也呈明显下降的趋势。我国学者徐恒等^[30]从我国部分大豆产

区分离得到 7 株侵染大豆根瘤菌的噬菌体，这些噬菌体均是 dsDNA 病毒，电镜观察呈现 4 种不同形态，以上的研究结果表明噬菌体对根瘤菌有影

响, 但关于噬菌体与根瘤间的侵染关系和根瘤菌噬菌体的遗传基因特征研究较少。

微生物基因多样性分布特征是微生物生态学研究的重要内容之一, 利用噬菌体某些家族中结构和功能基因的保守氨基酸序列设计引物, 研究不同环境中噬菌体基因多样性成为微生物生态学研究的热点。Filée 等^[10]首次揭示 *g23* 基因可以作为有效划分肌尾噬菌体科 T4 型噬菌体类群的分子标记以来, 大量的针对环境噬菌体的研究结果显示, 噬菌体基因多样性丰富, 其分布受到地理分割和生态进程的双重影响^[17]。然而, 鉴于噬菌体与细菌间侵染关系的专一性并不强, 一种噬菌体可以侵染多种细菌宿主而一种细菌也可被多种噬菌体侵染, 所以单纯依靠分子生物学的研究方法也无法明确噬菌体与宿主间的相互关系。为此, 通过纯培养获得噬菌体株, 利用形态学鉴定与分子生物学相结合的方法可明晰噬菌体与宿主间的侵染关系及揭示其在复杂生态系统中的功能。

细菌病毒按照形态特征划分为 21 种类型, 其中具有尾部特征的被归为有尾噬菌体目(Caudovirales)。90%以上分离获得的可培养噬菌体为有尾噬菌体^[31]。有尾噬菌体目按尾部特征可分为肌尾噬菌体科(Myoviridae)、长尾噬菌体科(Siphoviridae)和短尾噬菌体科(Podoviridae)^[32]。通常在电镜观察条件下, 长尾噬菌体尾部长且弯曲, 而肌尾噬菌体相对短且不弯曲(因为具有伸缩结构)。本研究获得 3 株裂性噬菌体电镜观察显示均呈现出肌尾噬菌体科噬菌体的特征。另外, 采用针对肌尾噬菌体科 T4 型噬菌体的特异引物扩增并获得 *g23* 基因, 从而从形态和分子角度证明获得的 3 株噬菌体属于肌尾噬菌体科噬菌体。

获得的 3 株噬菌体 *g23* 基因的株间相似度为 98%–99%, 与文献报道的首蓿根瘤菌噬菌体

Meliloti phage ΦM12 *g23* 基因的相似度仅为 54%, 与可培养的 T-evens、PseudoT-evens、SchizoT-evens 和 ExoT-evens 的 *g23* 基因相似性仅为 30%–57%, 说明本研究所获得的噬菌体完全不同于目前分离获得的 *g23* 基因类群, 属于新的噬菌体类群。本研究通过培养获得的 3 株噬菌体株间相似性较高, 可能是因为噬菌体对首蓿根瘤菌的特异选择性导致的。有研究证明土壤噬菌体的宿主范围非常广, 但通过特异宿主在实验室进行分离培养后, 噬菌体所侵染的宿主范围变窄, 噬菌体反复侵染特异宿主后可能会降低噬菌体侵染其他宿主的能力^[33]。Vos 等^[34]也证明了噬菌体存在“局部适应性(Local adaptation)”现象, 噬菌体容易感染来自同一块土壤的细菌, 而对其他土壤中的细菌感染能力弱。

本研究获得的噬菌体 *g23* 基因与海洋、湖泊、湿地、稻田和旱地黑土不同生态系统中的 *g23* 基因的相似性范围仅为 22%–66%, 表明 3 株噬菌体与环境中的 *g23* 基因亲缘关系较远, 不属于任何目前已知的 *g23* 基因分类类群。Brewer 等^[26]对中华首蓿根瘤菌噬菌体 *Meliloti* phage ΦM12 *g23* 的全基因组测序分析也得到相同的结果, 其 *g23* 基因组成完全不同于目前通过 PCR 扩增获得的 *g23* 基因类群, 说明细菌病毒存在巨大的遗传基因多样性, 通过特异宿主分离培养的方法可获得新的噬菌体株。此外, 李伟等^[35]通过 *g20* 基因和 *pol* 基因对以鱼腥藻(*Anabaena* PCC7120)为宿主的噬菌体基因分类进行研究, 首次确定了可培养的噬菌体 *g20* 基因和 *pol* 基因的归属范围。以上的研究证明以目的菌株为“诱饵”, 分离培养侵染该宿主的噬菌体株, 以编码噬菌体结构或功能的保守蛋白为特异扩增引物, 可揭示其与宿主间的侵染关系, 解析噬菌体相关基因的系统分类地位, 明确噬菌体在环境中发挥的作用。

致谢

感谢中国农业大学农业部农业微生物资源及其应用重点开放实验室提供的中华苜蓿根瘤菌 (*Sinorhizobium. meliloti* USDA1002^T) 菌株。

参考文献

- [1] Chen DM, Zeng SH, Sui XH, Hu YG, Chen WX. Screening of high efficient symbiotic rhizobium on *Alfalfa. Pratacultural Science*, 2002, 19(6): 27–31. (in Chinese)
陈丹明, 曾昭海, 隋新华, 胡耀高, 陈文新. 紫花苜蓿高效共生根瘤菌的筛选. *草业科学*, 2002, 19(6): 27–31.
- [2] Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*, 2005, 13(6): 278–284.
- [3] Hashem FM, Angle JS. Rhizobiophage effects on nodulation, nitrogen fixation, and yield of field-grown soybeans (*Glycine max* L. Merr.). *Biology and Fertility of Soils*, 1990, 9(4): 330–334.
- [4] Abebe HM, Sadowsky MJ, Kinkle BK, Schmidt EL. Lysogeny in *Bradyrhizobium japonicum* and its effect on soybean nodulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(10): 3360–3366.
- [5] Evans J, Barnett YM, Vincent JM. Effect of a bacteriophage on colonisation and nodulation of clover roots by paired strains of *Rhizobium trifolii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1979, 25(9): 974–978.
- [6] Vidor C, Miller RH. Relative saprophytic competence of *Rhizobium japonicum* strains in soils as determined by the quantitative fluorescent antibody technique (FA). *Soil Biology and Biochemistry*, 1980, 12(5): 483–487.
- [7] Wang GH, Liu JJ, Kimura M. Genetic diversity of major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages in natural environments—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(6): 732–739. (in Chinese)
王光华, 刘俊杰, Kimura M. 自然环境中 T4 型噬菌体 *g23* 基因多样性研究进展. *微生物学报*, 2011, 51(6): 732–739.
- [8] Zhang QY. Advances in studies on biodiversity of cyanophages. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 545–559. (in Chinese)
张奇亚. 噬藻体生物多样性的研究动态. *微生物学通报*, 2014, 41(3): 545–559.
- [9] Rohwer F, Edwards R. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(16): 4529–4535.
- [10] Filée J, Tétart F, Suttle CA, Krisch HM. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(35): 12471–12476.
- [11] López-Bueno A, Tamames J, Velázquez D, Moya A, Quesada A, Alcami A. High diversity of the viral community from an Antarctic lake. *Science*, 2009, 326(5954): 858–861.
- [12] Butina TV, Belykh OI, Maksimenko SY, Belikov SI. Phylogenetic diversity of T4-like bacteriophages in Lake Baikal, East Siberia. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 309(2): 122–129.
- [13] Jia ZJ, Ishihara R, Nakajima Y, Asakawa S, Kimura M. Molecular characterization of T4-type bacteriophages in a rice field. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(4): 1091–1096.
- [14] Fujii T, Nakayama N, Nishida M, Sekiya H, Kato N, Asakawa S, Kimura M. Novel capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages in a Japanese paddy field. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(5): 1049–1058.
- [15] Nakayama N, Asakawa S, Kimura M. Comparison of *g23* gene sequence diversity between *Novosphingobium* and *Sphingomonas* phages and phage communities in the floodwater of a Japanese paddy field. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(2): 179–185.
- [16] Wang GH, Hayashi M, Saito M, Tsuchiya K, Asakawa S, Kimura M. Survey of major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages in Japanese paddy field soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(1): 13–20.
- [17] Liu JJ, Wang GH, Wang Q, Liu JD, Jin J, Liu XB. Phylogenetic diversity and assemblage of major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages in paddy field soils during rice growth season in Northeast China. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2012, 58(4): 435–444.
- [18] Liu JJ, Wang GH, Zheng CY, Yuan XH, Jin J, Liu XB.

- Specific assemblages of major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages isolated from upland black soils in Northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(9): 1980–1984.
- [19] Liu JJ, Yu ZH, Wang XZ, Jin J, Liu XB, Wang GH. The distribution characteristics of the major capsid gene (*g23*) of T4-type phages in paddy floodwater in Northeast China. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2016, 62(2): 133–139.
- [20] Nakayama N, Okumura M, Inoue K, Asakawa S, Kimura M. Abundance of bacteriophages of common heterotrophic bacteria in the floodwater of a Japanese paddy field. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2007, 53(5): 595–605.
- [21] Børsheim KY, Bratbak G, Heldal M. Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(2): 352–356.
- [22] Wilson WH, Joint IR, Carr NG, Mann NH. Isolation and molecular characterization of five marine cyanophages propagated on *Synechococcus* sp. strain WH7803. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(11): 3736–3743.
- [23] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [24] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [25] Zheng CY, Wang GH, Liu JJ, Song CC, Gao HX, Liu XB. Characterization of the major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages in the wetlands of northeast China. *Microbial Ecology*, 2013, 65(3): 616–625.
- [26] Brewer TE, Stroupe ME, Jones KM. The genome, proteome and phylogenetic analysis of *Sinorhizobium meliloti* phage ΦM12, the founder of a new group of T4–superfamily phages. *Virology*, 2014, (450/451): 84–97.
- [27] Gerretsen FC, Gryn A, Sack J, Sohngen NL. Das vorkommen eines bakteriophagen in den wurzelknöllchen der leguminosen. *Zentr. Bakt. Parasitenk. II*, 1923, 60: 311–316.
- [28] Casadesús J, Olivares J. General transduction in *Rhizobium meliloti* by a thermosensitive mutant of bacteriophage DF2. *Journal of Bacteriology*, 1979, 139(1): 316–317.
- [29] Martin MO, Long SR. Generalized transduction in *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 1984, 159(1): 125–129.
- [30] Xu H, Wang ZF, Cen YH. Isolation and characterization of seven soybean rhizobiophages. *Chinese Journal of Virology*, 1993, 9(1): 93–99. (in Chinese)
徐恒, 王子芳, 岑英华. 7株大豆根瘤菌噬菌体的分离及生物学特性的检测. *病毒学报*, 1993, 9(1): 93–99.
- [31] Ackermann HW. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 2007, 152(2): 227–243.
- [32] Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 2003, 154(4): 245–251.
- [33] Ali FS, Loynachan TE, Hammad AMM, Aharchi Y. Polyvirulent rhizobiophage from a soybean rhizosphere soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30(14): 2171–2175.
- [34] Vos M, Birkett PJ, Birch E, Griffiths RI, Buckling A. Local adaptation of bacteriophages to their bacterial hosts in soil. *Science*, 2009, 325(5942): 833.
- [35] Li W, Li RR, Jing RY, Zhang HJ, Hu PF, Wang LY. Isolation and phylogenetic analysis of related genes of cultivable cyanophages in Daqing Wetland. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(5): 824–834. (in Chinese)
李伟, 李睿瑞, 荆瑞勇, 张海军, 胡鹏飞, 王丽艳. 大庆湿地可培养噬藻体的分离及其相关基因的系统进化分析. *微生物学报*, 2016, 56(5): 824–834.

Isolation and phylogenetic analysis of major capsid gene (*g23*) of bacteriophages infecting *Sinorhizobium meliloti*

Hao Yu^{1,2}, Junjie Liu^{2*}, Guoquan Fan³, Guanghua Wang^{2*}

¹ College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang Province, China

² Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

³ Virus-free Seedling Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Abstract: [Objective] In order to provide scientific data for studying the ecology of phage infecting *Sinorhizobium meliloti*, we examined morphological characteristics of rhizobiophages and their phylogenetic status of the major capsid protein *g23*. **[Methods]** Rhizobiophages were isolated by the double-layer plate method with host *Sinorhizobium meliloti* USDA1002^T. The morphological characteristic of rhizobiophages were studied by transmission electron microscope. Meanwhile, rhizobiophage DNA was extracted, and the *g23* that encodes the major capsid protein of bacteriophages was chosen as objective gene in PCR amplification. **[Results]** Three rhizobiophages were isolated, all had an icosahedral head with approximately 81 to 86 nm in diameter and a long contractile tail with 54 to 70 nm in length. Basic local alignment search tool searches in website of national center for biotechnology information (NCBI) revealed that the *g23* amino acid sequences obtained in this study had high identity with each other, but had very lower identity with those from T-evens, PseudoT-evens, SchizoT-evens and ExoT-evens. Phylogenetic analysis showed that the isolated *g23* sequences formed a unique clade with those clones obtained from different ecosystem. **[Conclusion]** All results indicated that the isolated rhizobiophages belong to family Myoviridae, a new group of T4 phages, which had lower identity with the *g23* clones obtained in different environment.

Keywords: *Sinorhizobium meliloti*, rhizobiophage, *g23*, phylogenetic analysis

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41301259)

*Corresponding author. Junjie Liu, Tel: +86-451-86602745, Fax: +86-451-86603736, E-mail: liujunjie@iga.ac.cn; Guanghua Wang, E-mail: wanggh@iga.ac.cn

Received: 1 July 2016; Revised: 20 September 2016; Published online: 27 October 2016