

根瘤菌多样性和系统发育研究的多相分类体系及其进展*

李琼芳¹ 张小平^{2* * *}

(西南科技大学生命科学与工程学院 绵阳 621010) (四川农业大学资源与环境学院 雅安 625014)

摘要 近年来对新的根瘤菌资源的不断发掘及现代分子生物学技术的发展和运用使根瘤菌分类研究有了突破性进展。多相分类通过综合获取信息,多种方法相互印证、互为补充,推进了根瘤菌的表型、遗传型和系统发育三方面的发展,从而较全面地反映根瘤菌的生物多样性特征,是根瘤菌多样性研究工作中常常采用的技术手段。文中主要阐述了根瘤菌多相分类体系中的主要方法及现代根瘤菌系统发育地位的研究和进展。

关键词 根瘤菌,多相分类,系统发育

中图分类号:Q939.114 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0782-05

Progress of Polyphasie Taxonomy of Rhizobial Diversity and Phylogeny*

LI Qiong-Fang¹ ZHANG Xiao-Ping^{2* * *}

(College of Life Science, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000)

(College of Agronomy, Sichuan Agriculture University, Yaan 625014)

Abstract In recent years it has made great development on the taxonomy and phylogeny with the discovery of new rhizobia resource and application of molecular methods. Polyphasie taxonomy have driven each of the three (the morphological, the physiological, and the phylogeny) epochs of rhizobia taxonomy and to show the diversity of rhizobia overall. Polyphasie taxonomy have been seemed as the most frequently used technique and methods. This paper presents a review of the main methods of the polyphasie taxonomy system and the phylogeny of rhizobia.

Key words Rhizobia, Polyphasie taxonomy, Phylogeny

根瘤菌(rhizobia)因其能与豆科植物共生并高效固氮而受到科学家的额外关注。研究根瘤菌与豆科植物的共生固氮作用,有利于实现农业、环境和生态可持续利用与发展。根瘤菌虽然极可能有共同的起源,但在长期进化过程中,由于受宿主的选择和环境的胁迫,分别向不同的方向进化,形成了丰富的生物多样性特征,因此根瘤菌的多样性是当今世界生物固氮研究领域的一个热点,它的研究又体现了多学科的交叉、渗透和综合。近年来,对新的根瘤菌资源的不断发掘及现代分子生物学技术的发展和运用,根瘤菌分类研究有了突破性进展。根瘤菌的新属、种不断建立,目前已经确定的根瘤菌有 9 属 43 个种,主要分布于 α -proteobacteria 亚纲,此外在 β -proteobacteria 亚纲也发现了根瘤菌^[1~3]。虽然在确定根瘤菌新的种属时仍然需要作

根瘤菌与不同宿主的交叉结瘤试验,但以“互接种族”为依据的传统分类已经被现代分类体系所代替。现代根瘤菌分类系统建立的基础是系统发育(phylogeny)。通过对根瘤菌系统发育的研究,可以揭示根瘤菌及其相关细菌的亲源关系和自身的进化过程,从而为确定根瘤菌的系统分类地位提供科学依据。

本文将着重阐述根瘤菌的现代多相分类体系中的主要方法及并介绍在此基础上建立起来的根瘤菌系统发育地位的研究。

1 根瘤菌的多相分类体系

Colwell 等^[4]首次提出了多相分类(polyphasie taxonomy)的概念,从根瘤菌的表型、遗传型和系统发育方面综合获取信息,多种方法相互印证、互为

* 国家自然科学基金项目(No. 39970029)。

* * 通讯作者 Tel 0835-2882710, E-mail: zxp@sicau.edu.cn

收稿日期:2006-11-03,修回日期:2007-03-20

补充,从而较全面地反映根瘤菌的生物多样性特征。因此多相分类被认为是现代细菌分类发展的重要里程碑之一,也是根瘤菌多样性研究工作中常常采用的技术手段。

1.1 表型分群的方法

根瘤菌的表型分群是指将根瘤菌在形态结构、化学组成、血清学反应及其生理功能等方面的特异性,通过数值分类、全细胞可溶性蛋白电泳、多位点酶电泳、细胞脂肪酸组成分析等技术进行菌株的初步分群,并可揭示其生物多样性。

1.1.1 数值分类(Numerical Taxonomy):数值分类的原理源于法国植物学家 Adanson 提出的“等权”原则。数值分类优点在于借助电子计算机对大量表型数据进行数学比较,避免了人为分析的主观性,结果较为公正,同时以相似性 80% 作为种群划分的标准,分析得出的树状图则揭示了同一表观群内菌株的表型一致性以及存在于不同表观群菌株间表型性状的差异性。因此,数值分类法是现代细菌分类的基本技术之一,广泛用于细菌的表型多样性研究。

在根瘤菌多样性和分类研究中,数值分类法常被用于初步分群。自从 Grahall 首次将数值分类应用于根瘤菌分类研究以来,数值分类法被广泛应用于根瘤菌的表型多样性研究中^[5,6]。

1.1.2 全细胞可溶性蛋白电泳(SDS-PAGE of Water-soluble Cellular proteins):用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳对可溶性蛋白质的组成成分进行分析,可以得到反映生物基因组成的蛋白质图谱信息,这是蛋白质电泳分析用于细菌表型多样性及分类研究的理论基础。根瘤菌的表型多样性,也可以通过分析蛋白质电泳图谱的多态性反映出来。由于根瘤菌的蛋白质组成复杂,蛋白质多态性分析可以获得的信息量很大,进行比较后即可得到菌株蛋白质图谱的多样性特征。

随着细菌培养条件和电泳条件的标准化,凝胶扫描及凝胶分析软件(如 Gel-compar 凝胶分析系统)的普遍应用,SDS-PAGE 方法具有了快速简便、重复性好的优点,分析结果与其它分类方法如数值分类、DNA-DNA 杂交等的结果有较好的一致性。因此,在根瘤菌表型多样性分析中,SDS-PAGE 已普遍用于揭示根瘤菌种间和种内的差异^[7]。

1.1.3 多位点酶电泳(Multilocus enzyme electropho-

resis, MLEE):

多位点酶又称同工酶,由细菌中不同位点的基因编码。多位点酶电泳技术(MLEE)通过电泳将细胞内的同工酶分离,继而用各类酶的特异底物显色,最后比较其电泳迁移率得到酶谱带型的多态性。因此,多位点酶电泳可以用来评估细菌群体基因的结构和多样性。

在根瘤菌分类及多样性研究工作中,多位点酶电泳已被证明是一种对大量未知菌株进行初步分群的有效方法。Martinez-Romer 等^[8]采用多位点酶电泳对 *R. leguminosarum* biovar Phaseoli 进行初步分群,得到明显的两群(I型和II型),结合 DNA-DNA 杂交、16S rRNA 序列分析及一些表型特征的分析结果,最终确定了一个新种 *R. tripic*。Nour 等^[9]和 Wang E T 等^[10]用多点酶电泳接合其它方法,确定了 *R. ciceri* 和 *R. mediteraneum* 及 *M. amorphae* 3 个新种。

多位点酶电泳的局限性在于不能正确定量,此外,不同的酶稳定性也不尽相同,对样品的统一性要求很高。

1.1.4 细胞脂肪酸组成分析(Analysis of whole Cell Fatty Acids):脂肪酸是脂类和脂多糖的主要组分,主要分布于细菌细胞膜上。不同的属、种甚至不同的菌株之间其脂肪酸碳链的长度、双键的位置、取代基团等都存在差异,脂肪酸分析可以准确地反映根瘤菌间的差别。目前,脂肪酸分析技术已经相当成熟,从提取、纯化、气相色谱分析及数据处理均高度自动化,因此,脂肪酸分析技术在细菌分类鉴定中被广泛使用,并已开发出了基于脂肪酸分析技术的气相色谱 Shedock 微生物鉴定系统(MIS),使细菌脂肪酸分析更加快捷、准确。张小平等的分析结果将供试菌株按种属分开,与 16S rRNA 序列分析结果较好地吻合^[11]。FAME 也已被广泛地应用于根瘤菌的多样性研究工作中^[12]。

脂肪酸分析技术可以对大量菌株进行比较与聚群,并且提供菌株的描述性信息。培养基、接种量、菌种活力、菌龄、培养温度等都会影响细菌脂肪酸的组成。因此,这项技术对细菌培养条件标准化要求非常高。

1.1.5 脂多糖分析(LPS):脂多糖(Lipopolysaccharide)分布于根瘤菌细胞的外膜上,由磷脂直接与多糖连接而成,与根瘤菌——豆科植物共生体的形成直接相关。不同的根瘤菌株,其糖的种类和排列

有差异,通过凝胶电泳和银染技术即可反映出这些差异。因此,LPS技术能揭示根瘤菌的表型多样性^[13]。

1.2 遗传型分群的方法

虽然表型特征是细菌遗传特性的表现形式,通过表型分析比较可以综合地反映根瘤菌的表型多样性,但终究难以全面反映根瘤菌的全部遗传特征。以数值分类为例,即使把数值分类测试项目增加至300项左右,其结果仍只能反映细菌基因组5%~20%的遗传信息^[14]。由于核酸是储存、传递遗传信息的物质基础,分析核酸的变化可直接揭示生物体之间的亲缘关系,建立以系统发育关系为基础的分类系统,因此在根瘤菌的分类研究性时,常常从根瘤菌基因组、一些特殊基因片段应用多种分子生物学方法进行检测。

1.2.1 基因组水平指纹图谱分析 1)基因组物理结构分析 细菌全基因组DNA序列分析由于提供所研究菌株的全部遗传信息,因此是研究系统发育的最准确和最可靠的方法。对大量的菌株分析全基因组DNA序列耗资甚巨,不太现实,郑君芳等^[15]采用I-CeuI对64株根瘤菌总DNA进行酶切的方法,用脉冲场凝胶电泳进行分离,通过判别基因组结构的重要参数,即 α 操纵子的数量及其在基因组上的位置,来确定和比较根瘤菌的基因组结构,进而确定其系统发育关系,其结果与16S rRNA分子聚群结果大致相符,但与现行的根瘤菌分类体系所得结果有较大差异。从另一侧面说明根瘤菌的分类体系仍然需要多种方法的相互补充。

2)随机扩增DNA片段的多态性分析(RAPD): RAPD分析技术创立于1990年^[16]。它是利用随机排列碱基顺序的寡核苷酸单链(通常为10个碱基)为引物,对所研究菌株的基因组DNA进行扩增,扩增产物经电泳分离和染色后,检测DNA片段的多态性。

3)AFLP指纹分析技术(Amplified Fragment Length Polymorphism,简称AFLP):即扩增长度多态性,是1992年由荷兰科学家Zaabeau和Vos发展起来的一种检测DNA多态性的方法。其主要特点是对基因组DNA进行双酶切,与双连接头连接后再用与之配对的双引物进行选择性地扩增,PCR产物用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染或放射性自显影得到不同长度的DNA指纹图谱,然后将图谱扫描后

的信息输入计算机,用相关软件分析即可得到聚类树状图。AFLP结合荧光标记发展成的FAFLP技术^[17],使AFLP反应可以在测序仪器上完成,数据更加标准化,既便于不同菌株间AFLP指纹图谱的比较和建立参比菌株的AFLP指纹图谱信息库,也增加了AFLP的稳定性和可靠性。

4)rep-PCR指纹分析技术(rep-PCR fingerprinting):在细菌基因组中,广泛存在着的一类如REP、ERIC、BOX等短的重序列,分散存在于细菌染色体基因组的基因间,含有多个拷贝,长度小于200bp。在不同的菌株的染色体上,重复序列的位置不一定相同,因而根据其保守序列设计引物,以总DNA为模板进行PCR扩增,通过电泳条带比较分析,能揭示菌株间染色体基因组存在的遗传差异性。

5)稳定小分子RNA图谱(Low Weight Molecular RNA,简称LWM RNA):稳定小分子RNA是一类在细菌进化早期就出现、具有相同功能、又广泛分布于活的生物体中的tRNA的稳定小分子(LWM RNAs)。虽然LWM RNAs获得的遗传信息量不大,但稳定,又能反映种属差异,因而已应用于根瘤菌的分类研究中^[18,19]。

1.2.2 特殊基因扩增片段酶切图谱分析 原核生物的rRNA由5S、16S和23S三个亚单位构成。16S、23S rDNA及16S-23S rDNA基因间隔区序列(IGS)的多态性分析(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis,简称为ARDRA)具有种的特异性。ARDRA技术普遍应用在根瘤菌的遗传多样性和分类研究中,多用于种、属水平的分群^[20]。

在ARDRA分析的基础上,常常需要测定根瘤菌各遗传群的代表菌株的保守基因片段序列,进一步确定菌株的系统发育地位。在根瘤菌分类中,16S rDNA序列是最早被用于揭示根瘤菌系统发育的保守基因。最初测定的是16S rDNA中约300bp可变区部分。目前,由于测序技术已经完全成熟,人们常常采用16S rDNA全序列构建根瘤菌系统发育树。16S rRNA全序列的测定,已经成为根瘤菌遗传多样性和分类研究中不可或缺的内容。但是近年来发现根瘤菌中存在嵌合的16S rRNA基因,即同一株根瘤菌中存在不同种属来源的16S rRNA,中生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)的种之间有整段16S rRNA基因相

互转移的证据^[21, 22]。这些发现说明仅仅依据 16S rRNA 的根瘤菌系统发育是不全面的,更客观更科学地理解根瘤菌的系统发育和进化关系应建立在多个基因序列分析乃至全基因组序列分析的基础上。

随着测序技术的发展,23S rRNA 序列分析也会越来越多地被用于反映根瘤菌的系统发育关系。van Berkum 等人^[23]分析了几乎全部的根瘤菌和农杆菌的代表菌株 2.2kb 长度的 23S rRNA 序列,得出的系统发育关系与 16S rRNA 序列分析的结果有很好的-致性,并指出如果将两种分子的信息同时应用 23S rRNA 序列中还包含高度变异区,其序列有种间、甚至菌株间的特异性,可以用于根瘤菌鉴定的原位杂交探针,在根瘤菌生态研究中具有很大意义,会-更可靠。

谷氨酰胺合成酶(GSs)催化由铵和谷氨酸合成谷氨酰胺的生物学过程,是生物固氮作用中氨同化过程的关键酶系。谷氨酰胺合成酶主要有两种形式:GS I 和 GS II,几乎所有的根瘤菌都有这两种酶,但 *Azorhizobium caulinodans* 只有 GS I,GS I 和 GS II 基因具有高度的保守性,是研究生物发育和进化的理想“分子钟”基因。Turner and Young^[24]分析了 16 种根瘤菌代表菌株的 GS I 和 GS II 基因序列,结果表明,由 GS I 序列分析获得的系统发育结论与 16S rRNA 序列具有很好的一致性。虽然 GS I 和 GS II 被证明是理想的“分子钟”基因,但在根瘤菌的进化与发育研究中,目前应用还不多。

此外,根瘤菌的结瘤基因(*nod*)和固氮基因(*nif*)的分布特性和序列分析也可以揭示根瘤菌的遗传多样性^[25, 26]。许多研究都证明了根瘤菌之间基因的转移和重组。因此,采用单一基因建立的根瘤菌系统发育树可能导致偏见。近年来,许多学者正试图用其它“分子钟”基因研究根瘤菌的系统发育,可用于建立根瘤菌系统发育的其它保守基因序列包括延伸因子 EF-G、质子转移 ATP 合成酶(*atpD*)、*recA*、*DnaK* 或 *hsp70* 基因等,也曾被尝试过用于建立根瘤菌系统发育,但对其研究还不系统。随着研究的不断深入,根瘤菌的系统发育树将得到不断的改进和完善。

1.2.3 DNA 同源性分析和 G + C mol% 的测定:在表型和遗传分析的基础上,DNA 同源性分析和 G + C mol% 的测定已成为细菌分类鉴定种的基本方法,并已成为描述细菌分类单元的一个标准。国际系

统细菌学委员会规定,DNA 同源性 $\geq 70\%$ 、热解链温度差 $\Delta T_m \leq 5^\circ\text{C}$ 为细菌种的界限。在根瘤菌分类中,DNA 杂交和 G + C mol% 测定亦是建立新种、属的必要标准之一。

由上可以看出多相分类技术的采用使根瘤菌分类更加系统化和完整化,这种分类体系有助于人们理解根瘤菌自身的进化和发育过程,以及根瘤菌与相关物种之间的亲缘关系。

2 依据系统发育关系的现代根瘤菌分类体系

系统发育(Phylogeny)是指生物种族的进化历史,亦即生物体在整个进化谱系所处的位置及其与其它生物体之间的亲缘关系。根瘤菌系统发育,就是研究根瘤菌的进化历史,及其与变形杆菌门中其它细菌的亲缘关系。

最早报道根瘤菌系统发育地位的是 De Ley^[27]。根据 rRNA-DNA 杂交结果,他将革兰氏阴性细菌分为 4 个超科,根瘤菌属(*Rhizobium*)与布鲁氏菌属(*Brucella*)、叶瘤菌属(*Phyllobacterium*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、枝原体属(*Mycoplasma*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)一同属于第四超科。De Ley 推测它们有共同的祖先,该结果与以后根瘤菌的系统发育研究有相似的地方。Woese 在 1987 年用 16S rRNA 序列构建整个生物界生物的系统发育树时,也确定了根瘤菌在整个原核生物界的系统发育地位^[28],当时根瘤菌位于真细菌的紫细菌门(*purplebacteria* P) α -亚门的 α -2 亚群。

Chen 与 Moulin 等分别在 β -纲发现了根瘤菌,根瘤菌的系统发育又补充了新的分支^[1-3]。

至此, α -纲现有 4 个系统发育分支,*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* 与 *Agrobacterium* 构成一个系统发育分支,*Bradyrhizobium* 和 *Rhodopseudomonas* 构成另一分支,*Azorhizobium* 和 *Xanthobacter* 也构成一分支,*Methylobacterium* 构成了第 4 分支,*Burkholderia* 和 *Ralstonia* 分散构成根瘤菌的第 5 和第 6 分支。

《伯杰系统细菌学手册》第二版将近年来的研究成果进行了总结和肯定,并建立了以系统发育为主的根瘤菌最新分类系统。其中,根瘤菌科(*Rhizobiaceae*)上升为目(Order),6 个属的根瘤菌分别位于根瘤菌目(*Rhizobiales*)的 4 个科(Family)中:

根瘤菌科 Rhizobiaceae (Rhizobium , Agrobacterium , Allorhizobium , Sinorhizobium) 叶瘤菌科 Phyllobacteriaceae (Mesorhizobium , Phyllobacterium) 丝微菌科 Hyphomicrobiaceae (Azorhizobium) 慢生根瘤菌科 Bradyrhizobiaceae (Bradyrhizobium)

自从 De Ley 首次采用根瘤菌的系统分类学方法以来,随着新方法的不断引入,特别是根瘤菌多相分类技术的应用,根瘤菌的系统分类得到了迅猛发展,新属新种不断发现。到目前为止,根瘤菌已有 9 属 43 种。

综上所述,由于技术的进步,根瘤菌的系统发育和分类系统在不断地调整,越来越向更反映其自然本质的分子和进化的方向发展。可以预言,随着研究的不断深入,新的根瘤菌属种将会得到描述,根瘤菌的系统发育关系将会得到进一步确证。

参考文献

- [1] Moulin L, Munive A, Dreyfus B, *et al.* Nature, 2001, **411**: 948 ~ 950.
- [2] Chen W M, Laevens S, Lee T M, *et al.* Int J Syst Evol Microbiol, **51**: 1729 ~ 1735.
- [3] Chen W M, Moulin L, Bontemps C. J Bacteriol, 2003, **185**(24): 7266 ~ 7272.
- [4] Colwell R R. J Bacteriol, 1970, **104**: 410 ~ 433.
- [5] 袁天英, 杨成运, 张伟涛, 等. 湖北农业科学, 2006 **45**(5): 593 ~ 596
- [6] 路敏琦, 李俊, 李力, 等. 微生物学报, 2006, **32**(6): 26 ~ 31
- [7] Diouf A, de Lajudie P, Neyra, *et al.* Int J Syst Evol Microbiol, 2000, **50**: 159 ~ 170.
- [8] Martinez-Romero E, Segovia L, Martins F, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1991, **41**: 417 ~ 426.
- [9] Nour S, J C Cleyet Marel, P Normand, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1995, **45**: 640 ~ 658.
- [10] Wang E T, Van Berkum P, Sui X H, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1999, **49**: 51 ~ 65.
- [11] Zhang X P, Nick G, Kaijalainen S, *et al.* System Appl Microbiol, 1999, **22**: 378 ~ 386.
- [12] van Berkum P, Fuhrmann JJ. Can J Microbiol, 2001, **47**(6): 519 ~ 525.
- [13] Thomas-Oates J, Bereszczak J, Edwards E Gill A, *et al.* Syst Appl Microbiol, 2003, **26**(3): 453 ~ 65.
- [14] Gillis M, Vandamme P, De Vos P, *et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology(2nd edition) Springer-Verlag New York. 2001, pp. 43.
- [15] 郑君芳, 刘桂荣, 朱万孚, 等. 中国科学(C 辑), 2003, **33**(6): 515 ~ 524
- [16] Williams J G, Kubelik A R, Rafalski J A, *et al.* Nucleic Acids Res, 1990, **18**: 6531 ~ 6535.
- [17] Terefeork Z, Kaijalainen S, Lindstrom K. J Biotechnol, 2001, **91**(2-3): 169 ~ 80.
- [18] Rivas R, Velazquez E, Willems A, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 5217 ~ 5222
- [19] Velazquez E, Martinez-Romero E, Rodriguez-Navarro D N. *et al.* 2001, Appl Environ Microbiol. **67**(2): 1008 ~ 1010.
- [20] Peng G X, Tan Z Y, Wang E T, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 2002, **52**: 457 ~ 462.
- [21] Sullivan J T, Partrick H N, Lowther W L, *et al.* Natl Acad Sci, 1995, **92**: 8985 ~ 8989.
- [22] Sullivan J T, Eardly B D, van Berkum P, *et al.* Microbiol, 1996, **62**: 2818 ~ 2825.
- [23] van Berkum P, Terefeork Z, Paulin L, *et al.* J Bacteriol, 2003, **185**(10): 2988 ~ 98.
- [24] Turner S L, Young J P W. Mol Biol and Evol, 200, **17**: 309 ~ 319.
- [25] 高俊莲, 孙建光, 陈文新. 微生物学杂志, 2006 **26**(4): 1 ~ 5.
- [26] 吕成群, 黄宝灵, 庄培亮, 等. 热带亚热带植物学报, 2006, **14**(1): 19 ~ 24.
- [27] De Ley J. Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria, Angers. Vol. 1. Gilbert-clayey, Tours, France, 1978. pp. 347 ~ 357.
- [28] Woese C R. Microbiol Rev, 1987, **51**: 221 ~ 269.