

BOX-PCR 技术在微生物多样性研究中的应用

杨凤环¹ 李正楠² 姬惜珠² 冉隆贤^{1*}

(1. 河北农业大学林学院 保定 071001)

(2. 河北农业大学山区研究所 保定 071000)

摘要: 近年来在微生物多样性研究中, 利用微生物基因组中广泛分布的短重复序列设计引物, 选择性地扩增重复序列之间的不同基因区域, 以得到大小不等的 DNA 扩增片段的方法日渐增多。以 BOX 插入因子(细菌基因组重复序列)为基础的 PCR 技术, 具有操作简单快捷, 可重复性强, 容易获得较为丰富的扩增条带等特点, 最初主要应用于细菌的多样性研究。目前研究发现用 BoxA1R 引物对微生物中的真菌、放线菌进行选择性的扩增, 也能够达到很好的遗传及多样性分析的目的。本文综述了 BOX-PCR 指纹图谱分析技术的特点和一般步骤; 结合作者对植物内生细菌的 BOX-PCR 指纹图谱分析体系的优化, 对 BOX-PCR 技术的改进进行了总结; 并对该技术在微生物菌株多样性研究领域的应用现状和前景进行了阐述。

关键词: BOX-PCR, 微生物, 多样性研究

Applications of BOX-PCR Technique in Diversity Study of Microorganisms

YANG Feng-Huan¹ LI Zheng-Nan² JI Xi-Zhu² RAN Long-Xian^{1*}

(1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

(2. Mountainous Areas Research Institute, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000)

Abstract: In recent years, the molecular methods using short tandem repeats sequences in microbial genome to design primers and amplify the sequences have been continuously reported. The PCR based on the BOX elements is a simple, fast, highly reproducible method for comparing patterns of the amplified bands, and it was applied in studies on the classification of bacteria originally. Researchers found that it could be used as well for analysis of the genetic diversities of fungi and streptomyces using BOXA1R primer to amplify the BOX elements. This paper reviewed the characteristics and the general procedure of BOX-PCR fingerprinting. The system optimization of BOX-PCR fingerprinting for endophytic bacteria and BOX-PCR technology improvements are summarized. Its applications and prospect on diversity research of different microorganisms are discussed as well.

Keywords: BOX-PCR, Microorganism, Diversity study

在微生物分类学研究中, 由于有些重要分类特征的种间重叠和环境影响, 一些遗传关系较近的

种、属及菌株往往难以确认, 存在很多同名异种、异名同种的现象, 传统的分类学方法很难达到准确

地对微生物进行鉴定及多样性分析的目的。随着分子生物学技术的不断发展,许多学者发现原核生物中的 16S rDNA 序列具相对保守性,不受环境条件及营养物质的影响,在此基础上建立的 PCR 技术已经广泛应用到微生物的分类及多样性研究中。

Rep(repetitive sequence),即细菌重复序列,包括REP(Repetitive Extragenic Palindromic,基因外重复回文因子),ERIC(Enterobacterial Repetitive Inter-genic Consensus,肠杆菌基因间重复一致序列)和BOX插入因子等^[1]。BOX-PCR指纹图谱分析技术,是根据BOX插入因子设计引物,扩增微生物基因组DNA的重复性片段,补充散布的重复序列,使不同大小的DNA片段与位于这些片段之间的序列得到扩增,最后经琼脂糖凝胶电泳检测其多态性的一种微生物鉴定方法^[2]。随着微生物检测技术的不断发展,BOX-PCR技术在微生物的多样性研究中已得到应用。

1 BOX-PCR 技术的原理及特点

目前,在细菌的基因组中已发现存在 10 种以上可用于基因指纹分析鉴定的短重复序列,其中以 REP 和 ERIC 应用较多,后来在细菌重复序列中发现了 BOX 插入因子,大小为 154 bp,由保守性不同的 box A(57 bp)、box B(43 bp)和 box C(50 bp)等亚单位组成,其中只有 box A 存在细菌菌株、种、属水平的分布差异及进化过程中表现出多拷贝和高保守性,Versalovic 等^[3,4]根据 BOX 片段中的 box A 亚单位设计寡核苷酸引物,使重复序列之间的不同基因区域得以选择性扩增,得到大小不等的 DNA 扩增片段,进而对 PCR 产物进行电泳图谱分析获得分类学信息。BOX-PCR 指纹图谱分析技术与 REP-PCR 和 ERIC-PCR 技术相似,但操作更为简单快捷,容易获得较为丰富的扩增条带,不需要菌株、种的特异性 DNA 探针,只需要一条单引物就能够完成大量菌株的 DNA 多态性分析,扩增的结果可直接进行琼脂糖电泳检测。

2 BOX-PCR 技术的一般步骤

BOX-PCR 技术的一般分析过程包括以下 3 个步骤^[3]:基因组 DNA 的提取(Extraction of genomic DNA),以 BoxA1R 为引物进行选择扩增(Selective amplification),凝胶电泳分析(Gel analysis)。在微生

物的 BOX-PCR 分析过程中,采用的引物统称为 BoxA1R,其序列根据扩增的微生物基因组的不同有所差异,目前研究中较为通用的为:5'-CTAC GGCAAGGCGACGCTGACG-3'^[3],适用于大多数细菌、真菌及链霉菌等微生物。

3 BOX-PCR 技术的改进及体系优化

许多学者在 BOX-PCR 技术的应用过程中,对其进行了不断的完善:针对不同微生物基因组的 BOX 插入因子而设计引物:如炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)的 BOXA1R 为:5'-ACGTGGTTTGAAG AGATTTTCG-3'^[5]、自生固氮细菌的 BOXA1R 为:5'-CCTCGGCAAGGCGACGCTGACG-3'^[6]、沙门氏菌属(*Salmonella*)的 BOXA1R 为:5'-CATCGGCAA GGCGACGCTGACG-3'^[7]等。BOX-PCR 技术的反应体系及反应条件也随不同的微生物进行了调整。此外,Marta 用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术检测 BOX-PCR 扩增产物,发现聚丙烯酰胺凝胶对于 1 kb 以下的片段有很高的分辨率^[1],但操作较复杂,所以目前应用最多的还是琼脂糖凝胶电泳技术。

本文作者针对植物内生细菌的 BOX-PCR 技术的反应体系进行了优化,从实验的结果(图 1)可知,

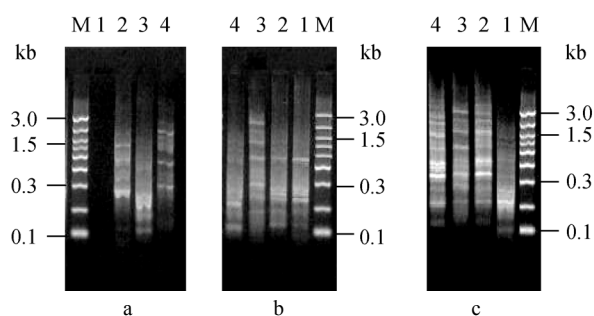


图 1 BOX-PCR 反应体系的优化

Fig. 1 The system optimization of BOX-PCR for endophytic bacteria

a 为 dNTP 浓度的筛选:M: Marker DL3000; 1、2、3、4 分别为 0.4 mmol/L、0.3 mmol/L、0.2 mmol/L、0.1 mmol/L dNTP

b 为引物浓度的筛选:M: Marker DL3000; 1、2、3、4 分别为 30 pmol、40 pmol、50 pmol、60 pmol 引物浓度

c 为 Taq 酶浓度的筛选:M: Marker DL3000; 1、2、3、4 分别为 1.5 U、2.0 U、2.5 U、3.0 U Taq 酶浓度

a Determination of optimal concentration of dNTP: M: Marker DL3000; 1, 2, 3, 4 stand for 0.4 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.1 mmol/L dNTP concentration, respectively

b Determination of optimal concentration of primer: M: Marker DL3000; 1, 2, 3, 4 stand for 30 pmol, 40 pmol, 50 pmol, 60 pmol primer concentration, respectively

c Determination of optimal concentration of Taq: M: Marker DL3000; 1, 2, 3, 4 stand for 1.5 U, 2.0 U, 2.5 U, 3.0 U Taq concentration, respectively

影响 BOX-PCR 反应的因素主要有 dNTPs 用量、引物浓度、模板 DNA 浓度、Taq 酶等, 其中 dNTP 用量、引物浓度和 Taq 酶的用量影响 BOX-PCR 反应产物的多态性和产生谱带的清晰度, 其他因素则影响其重复性。在最后确定 25 μ L 的 PCR 反应体系中, DNA 模板用量 < 100 ng, 10 \times buffer 2.5 μ L, dNTP 0.2 mmol/L, 引物 50 pmol, 2.0 U Taq 酶, 补双蒸水至 25 μ L。由于 PCR 扩增受到许多因素的影响, 因此筛选并固定该反应参数对于获得稳定清晰的电泳结果十分必要, 实验条件的优化和采用统一的 PCR 反应条件是微生物 BOX-PCR 指纹图谱分析的关键。

4 BOX-PCR 技术在微生物多样性研究中的应用

4.1 细菌多样性研究

4.1.1 固氮细菌: 固氮细菌在土壤及植物体内的氮素循环中具有重要作用, 目前固氮细菌的群落结构及分类鉴定研究成为固氮微生物研究的热点^[8,9], BOX-PCR 指纹图谱分析在固氮菌的多样性研究中已有应用^[10,11]。在与毛毡苔 *Drosera villosa* 共生的固氮细菌的多样性研究中, Albino 等对检测到的固氮酶铁蛋白基因(*nifH*)的 34 株细菌用 BOX-PCR 指纹图谱进行比较, 能够表明这 34 株菌具有明显的多样性, 对于相同的菌再进行 16S rRNA 分析, 测序后发现同属的不同菌株位于 BOX-PCR 指纹图谱聚类分析的一个以上的组中, 表现极低相似性^[12]。Lin 等对来自中国不同地区的两个鸡眼草品种根结处分离到的 63 种细菌进行分析, BOX-PCR 获得了较丰富的扩增谱带(在 0.5 kb~4.5 kb 处产生 30 多条条带), 除一些特殊菌株外, 分析结果与 16S rDNA RFLP、16S-IGS RFLP 分析基本一致^[13]。DNA 同源性分析一直是多相分类方法中建立新种的重要标准^[14]。随着核酸测序技术的发展, 16S rDNA 序列分析被认为是细菌分类鉴定研究的最新标准, 但在实际工作中大量的菌株都进行杂交或测序是不现实的。从以上的研究结果看出, BOX-PCR 技术适用于分析大量的固氮细菌菌株或分离株, 较好地揭示了不同菌株间的差异, 与 16S rDNA 序列分析具有较好的一致性, 因此适用于固氮细菌的多样性分析研究, 并为进一步分类鉴定提供理论指导。

4.1.2 植物病原细菌: 迄今已鉴定出的细菌中, 约有 300 种左右可引起农作物、林木及牧草等植物的

细菌性病害。我国 2003 年在浙江发现猩猩木叶片发生的一种细菌性病害的症状与 *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsetticola* 引起的叶斑病症状极为相似, 分离到的菌株都属于地毯草黄单胞菌, Li 等利用 BOX-PCR 技术将 3 个病原菌菌株与印度猩猩木叶斑病病原黄单胞杆菌致病型菌株 LMG849 进行比较分析, 凝胶电泳可以清楚地观察到产生在 200 bp 与 2500 bp 之间的条带, 3 个菌株表现了同样的图谱, 与 LMG849 存在明显不同^[15]。Louws 对收集到的 *C. michiganensis* 不同亚种的菌株进行指纹图谱分析, 结果显示 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 至少可分为 4 种类型, 在 1000 bp 周围区域产生了明显的 DNA 多态性, 可作为每个类型划分的依据^[16]。

在病原流行病学和生物体内寄生病菌间的相互作用研究中, BOX-PCR 能够区别 *X. axonopodis* 的基因型, 也是区别 *C. michiganensis* 亚种的有效工具, 同时具有区别个体菌株的能力, 且 BOX-PCR 指纹图谱与表型分类具有很高的一致性。此外, 应用以 BOX A1R 为引物的 BOX-PCR 特异性扩增对魔芋软腐病菌^[17] (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)、甜菜叶斑病菌^[18] (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola*) 及小麦苗枯病菌^[19] (*Clavibacter fangii*) 等植物病原菌的遗传进行多样性研究, BOX 重复序列的扩增条带清晰, 对大多数病原菌具有较高的分辨率, 适用于大多数植物病原细菌菌株的多样性分析。

4.1.3 其他细菌: BOX-PCR 指纹图谱分析技术在类鼻疽杆菌 (*Burkholderia pseudomallei*)^[20]、荧光假单胞杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和恶臭假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida*)^[21]、伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*)^[22]、紫色无硫细菌 (purple nonsulfur bacteria)^[23]、坂崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*)^[24] 等其他细菌上也有应用的报道。

4.2 真菌多样性研究

葡萄树上的艾斯卡综合症是由 *Phaeoacremonium* 和 *Phaeomoniella* 引起的一种复杂的病害, Alves 等应用 BOX-PCR 结合 REP、ERIC-PCR 技术对从感病的葡萄树上分离到的病原真菌进行分子检测, 指纹图谱分析与 MSP-PCR 获得的结果进行比较, BOX-PCR 与 REP-PCR、ERIC-PCR 显示的条带能够清楚地进行种间区分, 也可揭示种内的差异。系统聚类图的分析显示, *Phaeomoniella chlamydos-*

pora 和 *Phaeoacremonium* 的 3 个种有明显的遗传距离, *Phaeoacremonium aleophilum* 和 *P. angustius* 位于同一个簇中, 表明这 2 个种之间关系紧密, 而 *P. viticola* 与它们的亲缘关系较远; 另外 *Phaeoacremoniella chlamydospora* 与其余的种遗传关系有很大的距离^[25], 由此可见 BOX-PCR 与 REP、ERIC-PCR 结合的 rep-PCR 可以达到鉴定这 2 个属中的种和菌株的目的。

Götz 等对从转溶解酵素 T4 基因和未转基因马铃薯根部获得的内生真菌进行了研究, 以观察内生真菌是否受溶解酵素 T4 的影响, 其中采用 BOX-PCR 指纹图谱分析技术对分离到的内生真菌的特性进行检测, 18S rRNA 的 DGGE 表明从根部分离到的 *Verticillium dahliae* 中有 20 株菌株显示相同的迁移率, BOX-PCR 分析显示它们之间仅有微小的差别; 该文还对分离到的 *Cylindrocarpum destructans* 和 *Colletotrichum coccodes* 菌株进行检测, 所有相同种的 DGGE 显示同样的迁移率, BOX-PCR 分析结果也表明, 同种的 8 个菌株都表现同样的指纹图谱, 其中 *C. destructans* 观察到 7 个不同的条带, *Col. coccodes* 有 4 个不同的条带^[26]。

以上的结果说明了 BOX 插入因子在真菌的基因组中也具有高度的保守性, BOX-PCR 指纹图谱分析技术能够分析真菌种类的多样性, 可作为真菌鉴定方法的有效补充。

4.3 放线菌多样性研究

2004 年, Lanoot 等采用 BOXA1R-rep-PCR 对 451 株 *Streptomyces* spp. 标准菌进行了系统的分类和鉴定, 在不同的引物测试中, (GDT)₅、REP、ERIC 只在 0.1 kb~0.7 kb 间产生极少的清晰条带, BOXA1R 引物测试在 0.2 kb~2.0 kb 间产生了明晰且可重复的条带; 结果也表明, 350 个链霉菌菌株的 BOX-PCR 指纹图谱和 DNA-DNA 同簇关系的数据间具高度的相关性^[27]。Davelos 等将 BOX-PCR 技术应用于草原土壤中链霉菌遗传组成和多样性的空间变化研究中, 采用 BOXA1R 引物对从不同深度的土壤中分离到的链霉菌菌株进行了 BOX-PCR 扩增和电泳分离, PCR 产物在 300 bp~3000 bp 位置有多条特定的电泳带, 在相似性 90% 的情况下分成了 102 个不同的基因组, 其中 77 株有特定的图谱, 充分表明了处于同一位置的菌株比不同位置的具有更高的相关性^[28]。

BOX-PCR 基因指纹分析获得的分类信息来自于完整的基因组, 能在种及菌株水平上反映出链霉菌属的基因型、系统发育和分类关系^[29], 分辨率高、稳定、可重复性高, 是一种快速而有效的 DNA 指纹技术, 因此可作为检测链霉菌菌株多样性的方法。

5 小结及展望

BOX-PCR 技术可有效地区分种、属及菌株间的遗传差异, 尤其是不同的菌株间易产生清晰的特异性条带, 但对于有些相似种会产生相同的条带, 在今后的工作中, 可针对不同的微生物进一步优化其扩增体系, 将 BOX-PCR 技术与其他 PCR 技术如 ERIC-PCR、REP-PCR、PCR-DGGE 等结合使用, 综合分析微生物的种类及多样性, 优势互补更能达到准确鉴定不同微生物的目的。该技术的不足同 ERIC-PCR、REP-PCR 一样, 其稳定性受多种因素的影响, 如不同批次电泳、使用不同的 PCR 仪、凝胶成像仪、染料及染色效果等对复杂多带谱的 BOX-PCR 结果有一定影响^[30]。尽管对 BOX-PCR 技术的稳定性存在一些争议, 但只要在稳定的实验条件下, BOX-PCR 技术仍然是一种对大量菌株进行多样性研究的有效手段。

BOX 重复序列, 在微生物基因组中分布广泛, 具有一定的保守性, 目前主要应用于细菌的 DNA 多态性分析中, 在真菌和链霉菌等其他微生物研究中应用较少, 但试验表明, BOX-PCR 指纹分析技术也可以反映出菌株间基因组存在的差异, 它的快速性、灵敏性、可重复性和可靠性, 使得其在微生物分类鉴定、菌株的分型、亲缘关系和分子微生物生态学研究中有广阔的应用前景。BOX-PCR 技术也一定会对微生物种群变异的检测、种群结构的动态变化和植物病害生物防治菌筛选技术的深入研究起到重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Marta T, Artur A, Maria JS, *et al.* BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp.. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, **88**(2): 173–179.
- [2] 刘佳妍, 金莉莉, 王秋雨. 细菌基因组重复序列 PCR 技术及其应用. *微生物学杂志*, 2006, **26**(3): 90–93.
- [3] Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based

- PCR (rep-PCR). *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 1994, **5**: 25–40.
- [4] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR, *et al.* Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**(24): 6823–6831.
- [5] Kim W, Hong YP, Yoo JH, *et al.* Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **207**(1): 21–27.
- [6] 陈晓琴, 陈强, 张世熔, 等. 流沙河流域土壤自生固氮菌数值分类及 BOX-PCR 研究. *农业环境科学学报*, 2006, **25**(增刊): 528–532.
- [7] Anjali T, Tripathi AK, Verma SC, *et al.* Application of PCR fingerprinting techniques for identification and discrimination of *Salmonella* isolates. *Current Science*, 2001, **80**(8): 1049–1052.
- [8] Kirchhof G, Reis VM, Baldani JJ, *et al.* Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil*, 1997, **194**(1): 45–55.
- [9] Kloss M, Iwannek KH, Fendrik I, *et al.* Enrichment of diazotrophic bacteria from rice soil in continuous culture. *Plant and Soil*, 1986, **90**(1–3): 151–164.
- [10] Cleveland CC, Townsend AR, Schimel DS, *et al.* Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycle*, 1999, **13**(2): 623–645.
- [11] 刘洋, 隋新华, 陈文新. 华北及西北地区岩黄芩根瘤菌的表型及遗传多样性. *生态学报*, 2005, **25**(5): 1088–1094.
- [12] Albino U, Saridakis DP, Ferreira MC, *et al.* High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. *Plant and Soil*, 2006, **287**(1–2): 199–207.
- [13] Lin DX, Man CX, Wang ET, *et al.* Diverse *Rhizobia* that nodulate two species of *Kummerowia* in China. *Archives of Microbiology*, 2007, **188**(5): 495–507.
- [14] Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, *et al.* Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1987, **37**: 463–464.
- [15] Li B, Xie GL, Swins J. Differentiation of *Xanthomonads* causing the bacterial leaf spot of poinsettia in China from the pathotype strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsetticola*. *Journal of Zhejiang University Science*, 2005, **6B**(6): 451–453.
- [16] Louws FJ, Bell J, Medina-Mora CM, *et al.* Rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 1998, **88**(8): 862–868.
- [17] 修建华, 姬广海, 王敏, 等. 魔芋软腐病菌分子鉴定与遗传多样性. *微生物学报*, 2002, **32**(1): 26–32.
- [18] 尹燕妮, 张晓梅, 葛云英, 等. 内蒙古糖甜菜叶斑病菌的多样性分析. *植物保护*, 2005, **31**(6): 32–36.
- [19] 尹燕妮, 张晓梅, 葛云英, 等. 江苏省小麦苗枯病菌的遗传多样性初析. *南京农业大学学报*, 2006, **29**(1): 44–48.
- [20] Currie BJ, Gal D, Mayo M, *et al.* Using BOX-PCR to exclude a clonal outbreak of melioidosis. *BMC Infection Disease*, 2007, **7**(6): 68.
- [21] Mercado-Blanco J, Ruz-Carrillo AR, Rodríguez-Jurado D, *et al.* Suppression of verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp.. *Biological Control*, 2004, **30**(2): 474–486.
- [22] Seo ST, Tsuchiya K. Genotypic characterization of *Burkholderia cenocepacia* strains by rep-PCR and PCR-RFLP of the *fliC* gene. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **245**(1): 19–24.
- [23] Oda Y, Wanders W, Huisman LA, *et al.* Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(7): 3467–3477.
- [24] Proudly I, Bougle D, Coton E, *et al.* Genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* isolates by PFGE, BOX-PCR and sequencing of the *fliC* gene. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, **104**(1): 26–34.
- [25] Alves A, Henriques I, Fragoeiro S, *et al.* Applicability of rep-PCR genomic fingerprinting to molecular discrimination of members of the genera *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella*. *Plant Pathology*, 2004, **53**(5): 629–634.
- [26] Götz M, Nirenberg H, Krause S, *et al.* Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS Microbial Ecology*, 2006, **58**(3): 404–413.
- [27] Lanoot B, Vancanneyt M, Dawyndt P, *et al.* BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, **27**(1): 84–92.
- [28] Davelos AL, Xiao K, Samac DA, *et al.* Spatial variation in *Streptomyces* genetic composition and diversity in a prairie soil. *Microbial Ecology*, 2004, **48**(4): 602–612.
- [29] 张建丽, 刘志恒. 链霉菌的 rep-PCR 基因指纹分析. *微生物学报*, 2004, **44**(3): 281–285.
- [30] Laguerre G, Patrick M, Marie-reine A, *et al.* Typing of *Rhizobia* by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(6): 2029–2036.