

16S rDNA-RFLP分析新疆快生大豆根瘤菌的分类地位

彭桂香 陈文新

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘要: 采用 16S rDNA-RFLP 技术,对自新疆土壤中捕捉的 34 株快生大豆根瘤菌及相关已知种的模式菌株进行了比较分析。从酶切图谱类型和聚类结果表明,所有新分离的菌株与 *S. xinjiangensis* 的图谱类型基本一致,而与 *S. fredii* 的图谱类型有明显差异,与 *S. meliloti*, *S. saheli*, *S. medicae*, *S. teranga* 也不相同。34 株新分离的菌株全部与 *S. xinjiangensis* 菌株在 90% 的相似性水平上聚在一起。再一次肯定了 *S. fredii* 与 *S. xinjiangensis* 快生大豆根瘤菌属于两个不同的类群,为两个独立的种。我们还将用更多的分析方法进一步证实他们的分类地位。

关键词: 16S rDNA-RFLP, 新疆, 快生大豆根瘤菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)04-0237-05

16S rDNA-RFLP ANALYSIS OF THE FAST-GROWING SOYBEAN RHIZOBIAL STRAINS ISOLATED FROM XINJIANG REGIONS

PENG Gui-Xiang CHEN Wen-Xin

(College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: Thirty-four fast-growing soybean rhizobial strains isolated from Xinjiang Regions were analyzed by 16S rDNA-RFLP in comparison with several type and reference strains of related species. The results indicated that all 34 isolates shared the same patterns and above the similarity lever of 90% clustered with *S. xinjiangensis* strains, but were different with *S. fredii*, *S. meliloti*, *S. saheli*, *S. medicae* and *S. teranga*. It showed that *S. xinjiangensis* is different from *S. fredii* and should be assigned to a separated species according to the 16S rDNA-RFLP analysis. In order to make sure, the more analysis for the taxonomic position is under way.

Key words: 16S rDNA-RFLP, Xinjiang Region of China, Fast-growing soybean *Rhizobium*

长期以来,人们一直认为大豆只与一种慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* 结瘤固氮^[1]。1982 年 Keyser 等首先报道了快生大豆根瘤菌^[2,3]。1984 年 Scholla & Eikan 在 5 个菌株的 DNA/DNA 杂交基础上将其定为一个新种,种名为 *Rhizobium fredii*^[4]。1988 年陈文新等以

33 株快生大豆根瘤菌菌株的数值分类为基础,提出建立一个根瘤菌新属,中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 和一个新种,新疆中华根瘤菌 (*S. xinjiangensis*)。并作为此属的模式种,即

收稿日期:1999-03-26,修回日期:1999-09-20

弗氏中华根瘤菌(*S. fredii*)^[5]。1992年, Jarvis等根据快生大豆根瘤菌的16S rDNA的部分序列(260bp)分析将*Sinorhizobium fredii*重新定名为*Rhizobium fredii*^[6]。1993年, Yanagi和Yamasato测定了*S. fredii*和*S. xinjiangensis*的16S rRNA基因全序列, 由于这两个种的模式菌株16S rRNA基因全序列的高度一致, 认为它们应为同一个种^[7]。1994年, de Lajudie等根据SDS-PAGE全细胞蛋白电泳、细胞生理生化测定、DNA碱基组成、DNA-rRNA杂交及16S rRNA基因全序列分析结果, 恢复了*Sinorhizobium*属名, 同时将*R. meliloti*、*R. fredii*放在这一属中, 名称变为*S. meliloti*、*S. fredii*, 并增加2个新种*S. saheli*、*S. teranga*^[8]。

为了确证新疆快生大豆根瘤菌的系统发育地位, 我们扩大了菌株数量, 与相关已知根瘤菌一起进行16S rDNA-RFLP分析以分群。

1 材料与方法

1.1 大豆根瘤菌的捕捉

采集新疆石河子, 东湾和乌兰乌苏当年种植大豆的土样, 带回实验室后用无菌水制成土壤悬液。同时将表面消毒后的大豆种植于灭过菌的蛭石培养钵中, 再将土壤悬液加入培养钵中, 于28℃, 日光照条件下培养30d左右, 取瘤。

1.2 菌株的分离和纯化

将捕捉到的大豆根瘤经0.1%HgCl₂消毒后, 用常规方法分离纯化并经回接大豆后, 得到了34株快生大豆根瘤菌。各菌株编号、来源及寄主名称见表1。

1.3 16S rDNA-RFLP分析

1.3.1 菌体培养、收集及DNA提取, PCR反应方法见文献[9]。

1.3.2 结果处理: 根据条带的有无, 记为“1”和“0”, 采用Mints软件, 选用简单匹配相似系数(Ssm)及平均连锁聚类方式(UPGMA)聚类。

2 结果与讨论

2.1 16S rDNA-RFLP分析酶切的电泳图谱

在4种酶切图谱中, *MspI*(识别位点为-C↑CGG-)和*HaeIII*(识别位点为-GG↑CC-)的酶切图谱比*HinfI*(识别位点为-G↑ANTC-)和*RsaI*(识别位点为-GT↑AC-)的酶切图谱条带多, 能更好地显示出各菌株的差异性。*MspI*和*HaeIII*都是识别由G和C组成的4碱基的DNA序列, 一般来说, 根瘤菌的G+C含量较高, 达到60%左右, 所以*MspI*和*HaeIII*的识别位点多, 能更好地反映出rDNA序列的差异性。

在*MspI*的酶切图谱中, 所有新分离菌株与*S. xinjiangensis*中的CCBAU 110和CCBAU 108是同一种酶谱类型, *S. meliloti*, *S. terranga*, *S. saheli*, *S. medicae*及*S. fredii*分别属于不同的酶谱类型。*HaeI*的酶切图谱与*MspI*的酶谱类型相似, 只是*S. saheli*, *S. medicae*与新分离的菌株及*S. xinjiangensis*的酶切图谱类型相同。

在*HinfI*的酶切图谱中, 所有从新疆新分离的菌株与*S. xinjiangensis*的CCBAU 110和CCBAU 108, *S. meliloti* USDA 1002, *S. saheli* USDA 4101, *S. medicae* USDA 1037, *S. fredii* USDA 194属于同一种酶谱类型, *S. terranga* USDA 4102, *S. fredii*的2048和USDA 205属于不同的酶谱类型。在*RsaI*酶切图谱中, 所有新分离的菌株与*S. xinjiangensis*的CCBAU 110和CCBAU 108, *S. meliloti* USDA 1002和*S. fredii* USDA 194的酶谱类型一致, 其余参比菌株的酶谱类型各不相同。

总之, 在这4种酶切图谱中, 所有新分离的菌株与*S. xinjiangensis*的图谱类型基本一致, *S. xinjiangensis*与*S. fredii*的图谱类型不同, 与*S. meliloti*, *S. saheli*, *S. medicae*, *S. terranga*也有差异。

16S rDNA-RFLP分析酶切的部分电泳图谱见图1和图2。

2.2 聚类结果

我们将以上4种酶谱类型根据条带的有无, 转换成数值后, 进行聚类分析, 结果见图3。

图3中, 34株新分离的菌株全部与*S. xinjiangensis*菌株在90%的相似性水平上聚在一起; 成为一个明显区别于另一快生大豆根瘤

表1 供试菌株一览表

序号	种名	菌号	寄主	采集地	菌株来源
1		CCBAU830801	<i>Glycine max</i>	A	CCBAU
2		CCBAU830804	<i>Glycine max</i>	A	CCBAU
3		CCBAU830817	<i>Glycine max</i>	A	CCBAU
4		CCBAU830846	<i>Glycine max</i>	A	CCBAU
5		CCBAU830839	<i>Glycine max</i>	A	CCBAU
6		CCBAU830818	<i>Glycine max</i>	A	CCBAU
7		CCBAU830830	<i>Glycine max</i>	A	CCBAU
8		CCBAU830823	<i>Glycine max</i>	A	CCBAU
9		CCBAU830827	<i>Glycine max</i>	A	CCBAU
10	<i>Sinorhizobium xinjiangensis</i>	CCBAU108	<i>Glycine max</i>	Xinjiang	CCBAU
11	<i>Sinorhizobium xinjiangensis</i>	CCBAU110 ^T	<i>Glycine max</i>	Xinjiang	CCBAU
12	<i>Sinorhizobium xinjiangensis</i>	Rx22	<i>Glycine max</i>	Xinjiang	CCBAU
13	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1002 ^T	<i>Medicago sativa</i>	USDA	CCBAU
14		CCBAU830835	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
15		CCBAU830831	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
16		CCBAU830811	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
17		CCBAU830808	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
18		CCBAU830821	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
19		CCBAU830814	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
20		CCBAU830805	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
21		CCBAU830826	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
22		CCBAU830825	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
23		CCBAU830803	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
24		CCBAU830815	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
25		CCBAU830813	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
26		CCBAU830802	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
27		CCBAU830829	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
28		CCBAU830833	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
29		CCBAU830810	<i>Glycine max</i>	B	CCBAU
30		CCBAU830807	<i>Glycine max</i>	C	CCBAU
31		CCBAU830838	<i>Glycine max</i>	C	CCBAU
32	<i>Sinorhizobium teranga</i>	USDA4101 ^T	<i>Acacia laeta</i>	Senegal	USDA
33	<i>Sinorhizobium saheli</i>	USDA4102 ^T	<i>Sesbania cannabine</i>	Senegal	USDA
34	<i>Sinorhizobium medicae</i>	USDA1037 ^T	<i>Medicago spp.</i>	France	USDA
35	<i>Sinorhizobium fredii</i>	USDA194	<i>Glycine soja</i>	Henan	USDA
36	<i>Sinorhizobium fredii</i>	USDA2048	<i>Glycine soja</i>	Liaoning	USDA
37	<i>Sinorhizobium fredii</i>	USDA205 ^T	<i>Glycine soja</i>	Henan	USDA
38		CCBAU830833	<i>Glycine max</i>	C	CCBAU
39		CCBAU830844	<i>Glycine max</i>	C	CCBAU
40		CCBAU830842	<i>Glycine max</i>	C	CCBAU
41		CCBAU830812	<i>Glycine max</i>	C	CCBAU
42		CCBAU830816	<i>Glycine max</i>	C	CCBAU
43		CCBAU830806	<i>Glycine max</i>	C	CCBAU
44		CCBAU830809	<i>Glycine max</i>	C	CCBAU

T: 模式菌株, USDA: 美国农业部, CCBAU: 北京农业大学菌种库, A: 东湾, B: 乌兰乌苏, C: 石河子

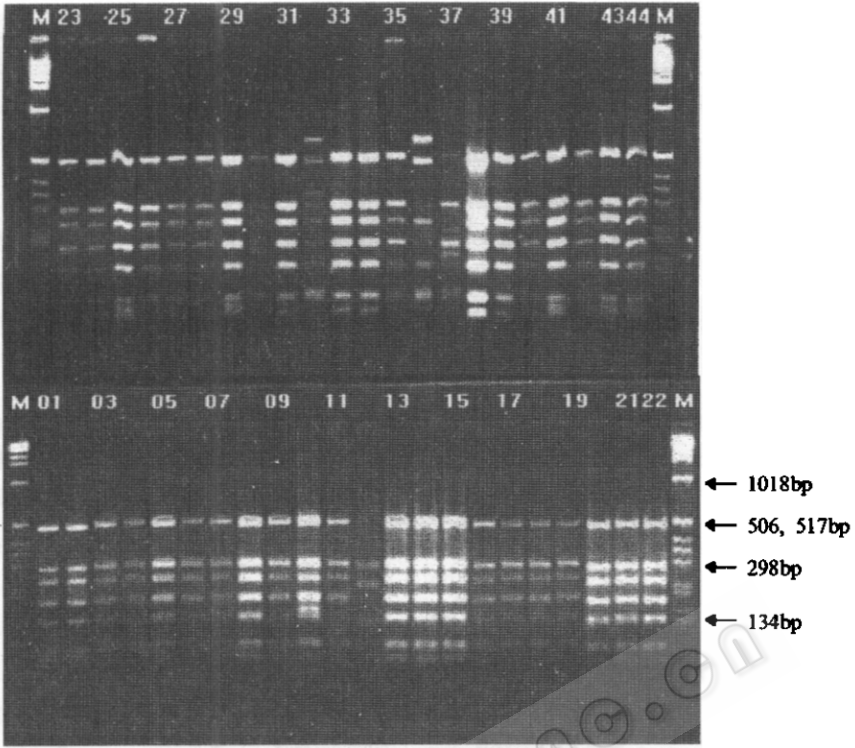


图1 各样品的 *Hae*III酶切电泳图谱(4%琼脂糖凝胶,泳道序号与表1的序号相同)
 M: 1kb DNA size standard(依次为75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090,12216bp, GIBCO-BRL产品)

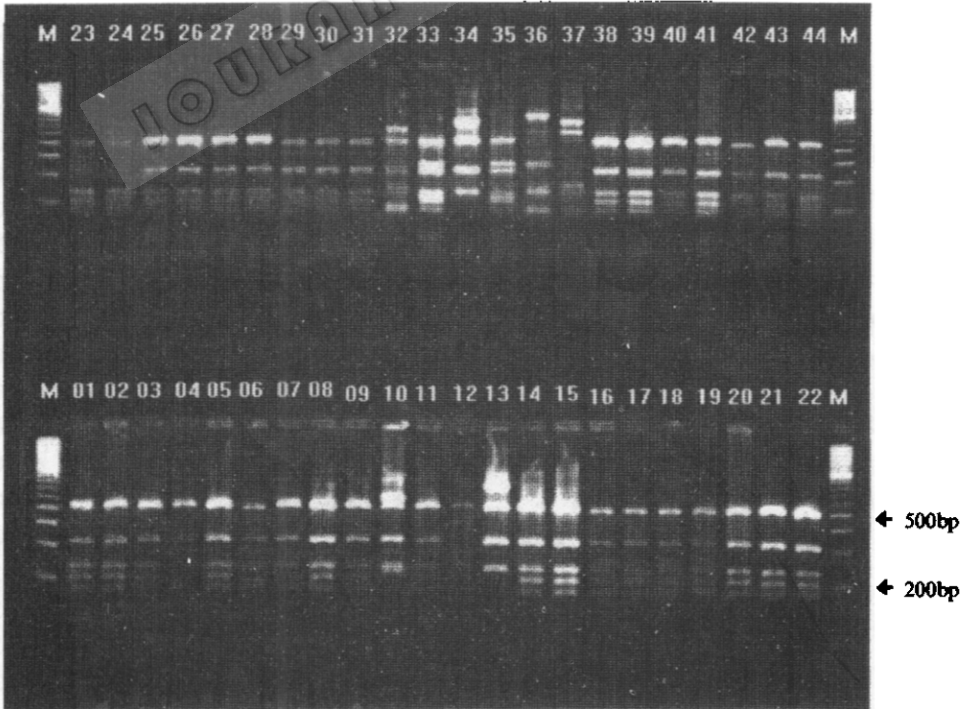


图2 各样品的 *Msp*I酶切电泳图谱(4%琼脂糖凝胶,泳道序号与表1的序号相同)
 M: 100bp PCR ladder marker(依次为100bp, 200bp, 300bp.....2000bp, Promega产品)

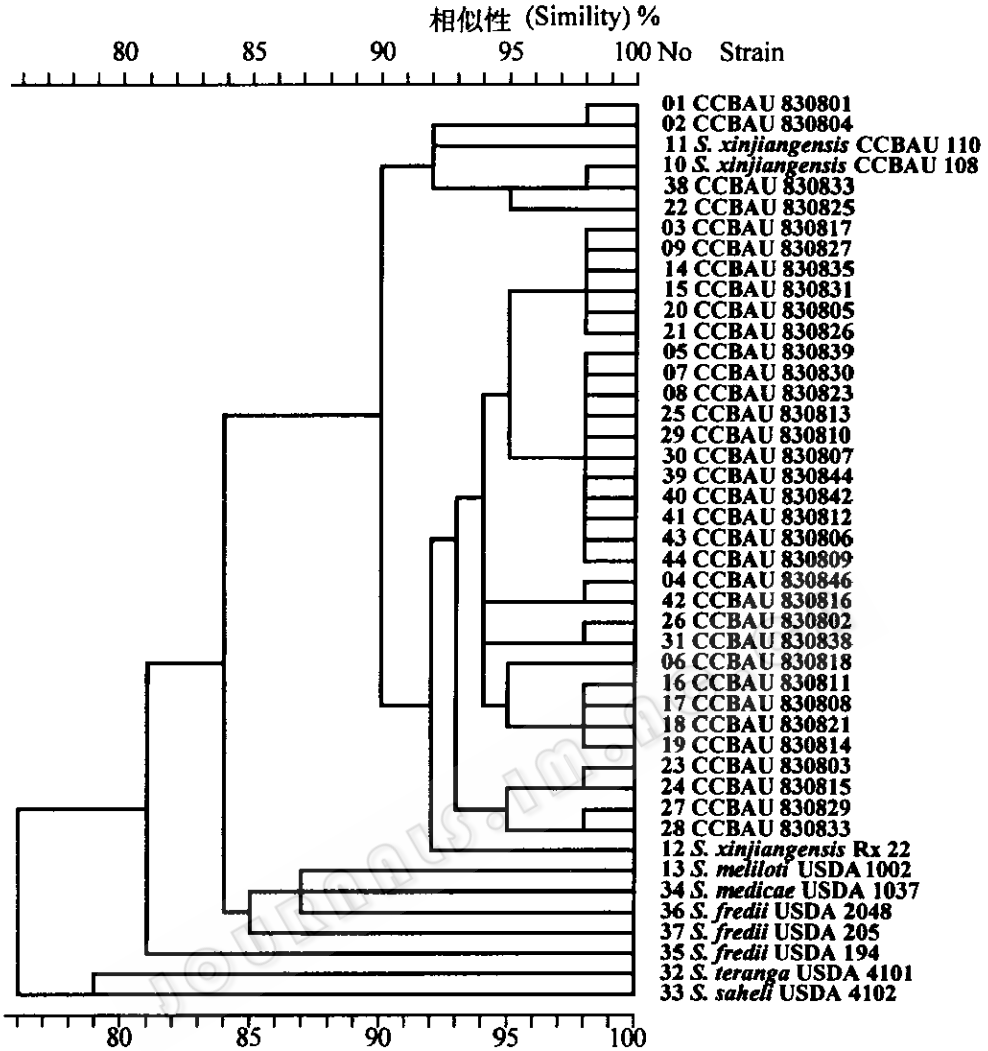


图3 新疆大豆根瘤菌及相关模式菌株和参比菌株的RFLP聚类分析

菌种 *S. fredii* 的种群。与其它同属的已知种差异更大。对于 *S. xinjiangensis*, 我们还将用其它有效分析方法进一步证实此分类结果。

参 考 文 献

- [1] Jordan D C. Rhizobiaceae. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984, 234~256.
- [2] Keyser H H, van Berkum P, Weber D F. *Plant Physiol*, 1982, 70:1626~1630.
- [3] Kerser H H, Bohlool B B, Hu T S *et al.* *Science*, 1982, 215:1631~1632.
- [4] Scholla M H, Elkan G H. *Int J Syst Bacteriol*, 1984, 34:484~486.
- [5] Chen W X, Yan G H, Li J L. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, 38(4):392~397.
- [6] Jarvis B D W, Downer H L, Young J P W. *Int J Syst Bacteriol*, 1992, 42:93~96.
- [7] Yanagi M, Yamasato K. *FEMS Microbiol Lett*. 1993, 107:115~120.
- [8] de Lajudie P, Willems A, Pot B *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44:715~733.
- [9] 闫爱民, 陈文新. *高技术通讯*, 1998, 8(9):50~54.