

新疆土著大豆根瘤菌种群遗传结构的初步分析*

孟颂东** 关桂兰 黄锡坚***

(中国科学院新疆生态与地理研究所 乌鲁木齐 830011)

摘要:应用重复序列 REP (repetitive extragenic palindromic, 重复基因外回文) 和 ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus, 肠细菌重复基因间共有序列) 结合聚合酶链式反应 (ERP-PCR 和 ERIC-PCR) 对从新疆采集的 27 株土著大豆根瘤菌染色体进行指纹分析, 发现在相似水平 0.5 时可基本分为两大聚类群, 一个类群主要包括慢生型根瘤菌, 另一类群为快生型根瘤菌, 来自同一地区的根瘤菌株具有较高的遗传相似性。以上结果表明该技术是对大豆根瘤菌进行种群结构和遗传多样性分析的有效手段。

关键词:大豆根瘤菌, REP-PCR, ERIC-PCR, 遗传多样性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0010-05

PRIMARY ANALYSIS OF GENETIC DEVERSIY OF SOYBEAN RHIZOBIA POPULATIONS FROM XINJIANG

MENG Song-Dong GUAN Gui-Lan HUANG Xi-Jian

(Xinjiang Institute of Ecology and Geology, Chinese Academy of Science, Wulumuqi 830011)

Abstract: Repetitive (repetitive extragenic palindromic, REP, and enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC) sequences in conjunction with polymerase chain reaction technique (REP and ERIC PCR) were used to fingerprint the genomes of 27 isolates of indigenous soybean rhizobia from Xinjiang. The indigenous soybean rhizobia in Xinjiang can be clustered into relative genetic similarities of approximately 0.5, of which one group mainly includes all slow-growing rhizobia, another mainly includes all fast-growing stains. REP and ERIC PCR analysis demonstrate a substantial genetic variability within members of Xinjiang indigenous soybean rhizobial populations, which reveals that genetic similarities have certain geographical correlation, and isolates from the same site have relative higher similarities. The results show that REP and ERIC PCR analysis give effective means in genetic diversity and population structure analysis of soybean rhizobia.

Key words: Soybean rhizobia, REP-PCR, ERIC-PCR, Genetic diversity

REP 和 ERIC 重复序列广泛存在于土壤革兰氏阴性菌中, 是细菌中特有的序列, 已经用于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[1]、假单胞菌 (*Pseudomonads* spp.)、苜蓿根瘤菌 (*R. meliloti*)^[2] 和慢生型大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)^[3] 等遗传关系的研究, 为土壤细菌分子遗传分析、细菌分类及系统进化关系提供了强有力的手段。

我国干旱、半干旱地区占总国土面积的近一半, 土地辽阔, 气候、土壤条件复杂多样, 反映在根瘤菌上有很大的遗传多样性, 值得进行研究^[4,5]。本文尝试使用 REP 和 ERIC 重复序列分析对新疆土著大豆根瘤菌进行 DNA 多态性研究, 结果表明 REP 和 ER-

* “863” 子课题资助项目 (No. 963022)

** 现在中国科学院微生物研究所作博士后

*** 现在深圳市环境保护监测站工作

收稿日期: 2000-06-27, 修回日期: 2000-12-04

IC-PCR 技术可为大豆根瘤菌的不同类群划分提供一个有效手段。

1 材料与方法

1.1 土壤中土著大豆根瘤菌的分离

待大豆盛花期时分别从新疆三坪农场、玛纳斯、吉木萨尔、阜康、121 团、134 团、昌吉和乌鲁木齐市郊等 8 个大豆产区的采样地采集根瘤。根瘤用 95% 乙醇和 0.1% Hg-Cl₂ 消毒后碾碎, 将碾碎的根瘤挤出液接种到酵母-甘露醇培养基 (YMA) 上, 28℃ 培养, 长出菌落后进一步用含有刚果红的 YMA 平板纯化。同时对菌株进行革兰氏染色和显微镜观测, 根据菌株在 YMA 培养基上生长速度, 菌落大小及显微镜观测鉴别根瘤菌的快慢型^[4]。并对纯化的菌株进行回接实验^[4]。

1.2 大豆根瘤菌理化特征测定

将分离的大豆根瘤菌部分理化特征进行测定: BTB 反应, 硝酸盐利用, 石蕊牛奶反应, 明胶水解, 水解纤维素, 水解淀粉, 碳水化合物利用。选择理化特征有一定差异的菌株作遗传多样性分析。

1.3 根瘤菌 DNA 多态性分析

1.3.1 PCR 引物和试剂: PCR 引物是根据 Bruijn^[2] 和 Judd^[3] 设计的 18 个 bp 的引物 REP 和 ERIC。

引物 1: REPIR-I (3'-CGGNCTANGCNGCNNNN-5')

REP2-I (5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3')

引物 2: ERIC1R (3'-CACITAGGGCTCCTCGAATGTA-5')

ERIC2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3')

引物由 Backman 公司 1000M 型 DNA 合成仪合成。PCR 所用试剂为华美生物工程公司产品。

1.3.2 PCR 扩增: 挑取少量 YMA 斜面培养 3 ~ 8d 的单菌落做菌落 PCR, 反应体系 (25μL) 如下: 50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl, pH9.0, 1% Triton X-100, MgCl₂ 1.5mmol/L, dNTP 250μmol/L, 引物 1.0μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1U。用引物 1 对 REP 进行扩增, 循环程序为 95℃ 预变性 4min, 循环依次为 94℃ 1min, 40℃ 1min, 65℃ 8min, 扩增 35 个循环, 最后 65℃ 16min。用引物 2 对 ERIC 进行扩增, 循环程序为 95℃ 预变性 4min, 循环依次为 94℃ 1min, 52℃ 1min, 65℃ 8min, 扩增 35 个循环, 最后 65℃ 16min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳并照相。

1.3.3 聚类分析: 将电泳相片放大, 自上而下水平比较菌株电泳条带, 在同一位置如果出现条带无论其强弱记作 1, 没有出条带记作 0, 以此将 PCR 电泳图谱转化为二维数据表格, 用 Statistica 分析软件采用平均连锁法分析, 获得新疆土著大豆根瘤菌 REP-PCR 和 ERIC-PCR 相似性聚类图。

2 结果

2.1 大豆根瘤菌 REP 和 ERIC-PCR 电泳图谱

共从新疆 8 个大豆产区采集并筛选出典型大豆根瘤菌 27 株, 其采集地和快慢型见表 1。

表 1 大豆根瘤菌菌株来源及快慢型

菌株编号	采集地	快慢型
1	三坪农场	慢生型
2	三坪农场	慢生型
3	三坪农场	慢生型
4	吉木萨尔	快生型
5	吉木萨尔	快生型
6	阜康	慢生型
7	阜康	快生型
8	121 团	快生型
9	121 团	快生型
10	昌吉三工镇	快生型
11	昌吉三工镇	快生型
12	昌吉三工镇	快生型
13	昌吉三工镇	慢生型
14	134 团	快生型
15	昌吉市郊	快生型
16	昌吉市郊	快生型
17	昌吉市郊	快生型
18	昌吉市郊	快生型
19	昌吉市郊	快生型
20	昌吉市郊	快生型
21	乌鲁木齐	快生型
22	乌鲁木齐	快生型
23	乌鲁木齐	快生型
24	乌鲁木齐	慢生型
25	乌鲁木齐	慢生型
26	乌鲁木齐	慢生型
27	乌鲁木齐	快生型

以 27 株新疆土著大豆根瘤菌和一株快生型标准株 A76 和一株慢生型标准株 USDA110 为模板, 用 REP 或 ERIC 为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物电泳图谱分别见图 1 和图 2, REP-PCR 扩增产物片段分子量在 300bp 至约 2kb 之间, ERIC-PCR 扩增产物片段分子量约在 200bp 至 1.5kb 之间。为了检验两对引物的有效性, PCR 扩增重复了两次, 两次扩增结果电泳图谱一致, 证明以 REP 和 ERIC 为引物分析大豆根瘤菌 DNA 多态性实验重复性好。电泳图谱显示出大豆根瘤菌共有的谱带, REP-PCR 扩增多数菌株在约 400bp 和 2000bp 处出现扩增片段, ERIC-PCR 则多在 400bp 和 1500bp 处出现扩增片断。

2.2 聚类分析

对 REP-PCR 和 ERIC-PCR 电泳图谱二维生成数据进行比较, 发现二对引物 PCR 扩增数据并不完全相同, 二者在对根瘤菌遗传相似性分析结果有一些差别, 为了最大可能地对大豆根瘤菌进行遗传多样性分析, 将二者 PCR 数据结合在一起进行聚类分析。以 Statistica 分析软件对二维数据表

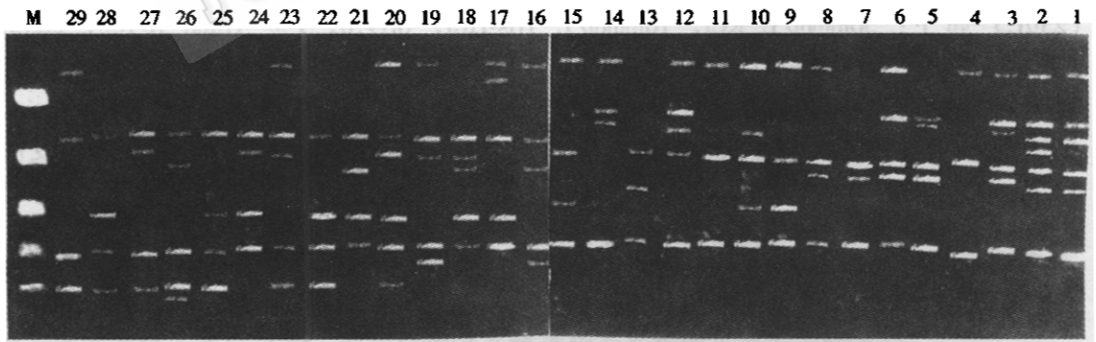


图 1 大豆根瘤菌 REP-PCR 电泳图谱

以 REP 为引物对大豆根瘤菌进行菌落 PCR, 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳; 电泳图谱上方的数字表示不同的大豆根瘤菌菌株编号, 编号 1 为慢生型大豆根瘤菌标准株 USDA110, 编号 2~28 为从新疆分离的 27 株大豆根瘤菌, 编号 29 为快生型大豆根瘤菌标准菌株 A76, M 为 DNA marker, 左边的数字为 marker 的分子量 (bp)

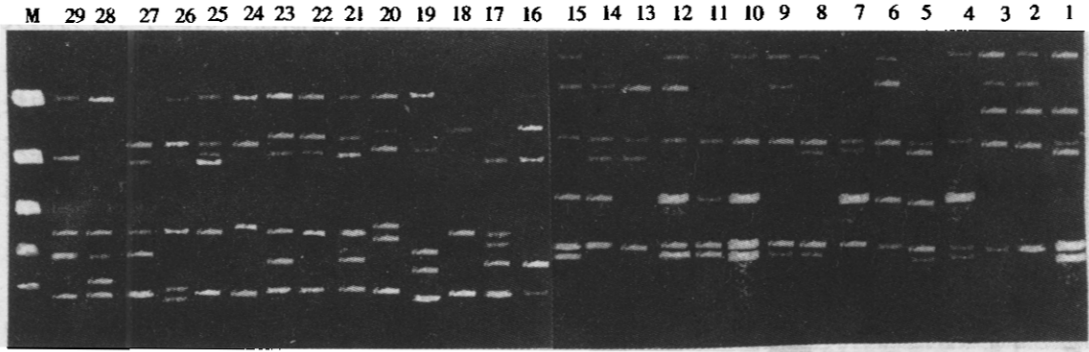


图 2 大豆根瘤菌 ERIC-PCR 电泳图谱

以 ERIC 为引物对大豆根瘤菌进行菌落 PCR，扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。电泳图谱上方的数字表示不同的大豆根瘤菌菌株编号，编号 1 为慢生型大豆根瘤菌标准株 USDA110，编号 2~28 为从新疆分离的 27 株大豆根瘤菌，编号 29 为快生型大豆根瘤菌标准菌株 A76，M 为 DNA marker，左边的数字为 marker 的分子量 (bp)

格采用平均连锁法分析，获得新疆 27 株土著大豆根瘤菌 REP-PCR 和 ERIC-PCR 相似性聚类图。聚类分析结果见图 3。

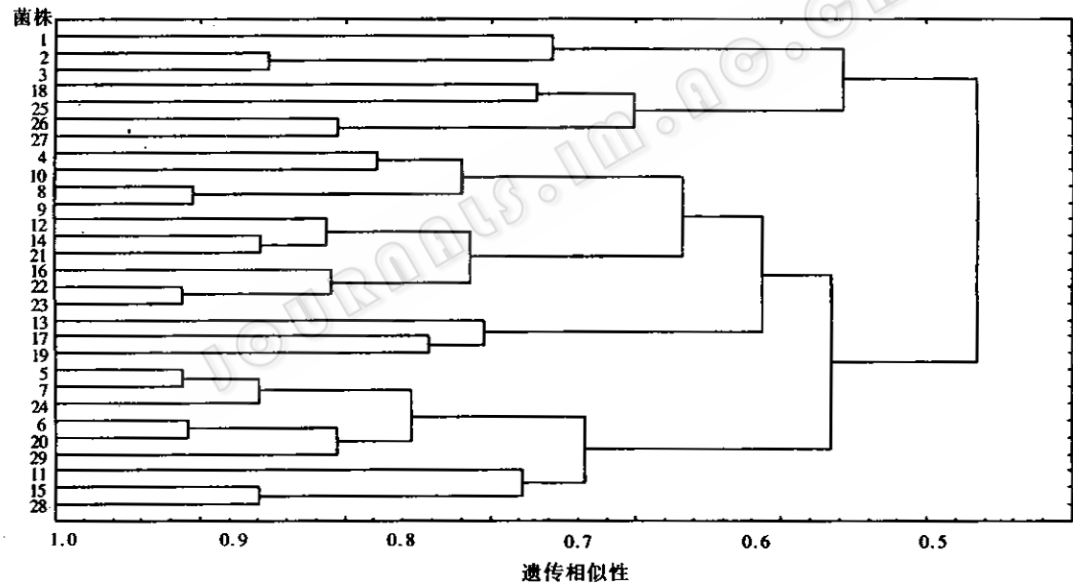


图 3 新疆大豆根瘤菌 REP 与 ERIC-PCR 电泳图谱聚类分析图

聚类分析由 REP 与 ERIC-PCR 数据之和绘制，图中数字表示大豆根瘤菌菌株编号，编号 1 为慢生型大豆根瘤菌标准株 USDA110，编号 2~28 为从新疆分离的 27 株大豆根瘤菌，编号 29 为快生型大豆根瘤菌标准菌株 A76

2.3 种群结构分析

从图 3 可以看出新疆土著大豆根瘤菌具有复杂的遗传多样性，来自同一地区的根瘤菌株具有较高的遗传相似性，如菌株 25、26、27 采自乌鲁木齐，菌株间遗传相似性也非常高，类似的还有采自阜康的菌株 6 和 7，采自 134 团的菌株 9 和 14，采自昌吉的菌株 10、12、16 和 21，采自乌鲁木齐的菌株 24 和 28 等，遗传相似性与菌株地域性有一定的相关性。但也有少量同一地区的菌株遗传相似性相对较低，如采自吉木萨尔的菌株 4 和 5。

新疆土著大豆根瘤菌种群结构以快生型为主, 菌株遗传相似性在 0.5 时可分为两大类群: 类群 1 包含 6 株菌, 多为慢生大豆根瘤菌, 除菌株 25 为快生型外其余均为慢生型; 类群 2 包含 21 株菌, 多为快生大豆根瘤菌, 除菌株 6 和 13 为慢生型外其余均为快生型。在相似水平 60% 时慢生大豆根瘤菌可进一步分为 2 个聚群: 聚群 1 和 2, 快生大豆根瘤菌进一步分为 3 个聚群: 聚群 3、4 和 5, 其中聚群 3 和 5 是快生大豆根瘤菌的主要类群 (见图 4)。

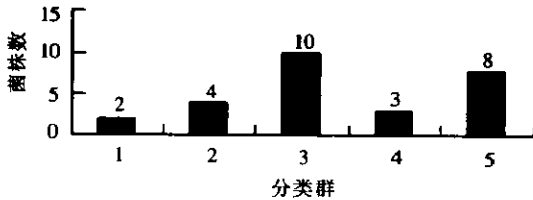


图 4 新疆 27 株大豆根瘤菌在 0.6 相似性水平菌株分类群

3 讨论

REP 和 ERIC-PCR 技术可以为大豆根瘤菌的不同类群划分提供一个有效手段, 能够有效区分表型十分接近的同一种根瘤菌的种下类群。对 REP-PCR 和 ERIC-PCR 电泳图谱二维生成数据进行比较, 发现二对引物 PCR 扩增数据并不完全相同, 二者在对根瘤遗传

相似性分析结果有一些差别, 表明对于遗传接近的菌株, 使用不同的引物进行 RAPD 分析, 分析结果可能有一定差别^[6]。

通过遗传相似性分析发现多数新疆土著慢生型与快生型大豆根瘤菌遗传相似性低于 50%, 原因可能是慢生型与快生型根瘤菌无论在鞭毛着生方式、碳氮源利用、生长速度、胞外多糖组成或血清学特点, 还是共生基因 *sym* 存在位置、DNA GC%、DNA 杂交分析等^[7]都存在明显差异, REP 和 ERIC 能区分多数快慢生型大豆根瘤菌, 说明快慢生型大豆根瘤菌基因组中重复序列 REP 和 ERIC 的分布与数量有所不同。

由于新疆地域广阔, 地理环境条件复杂多样, 许多绿洲农业区之间为沙漠、戈壁隔离。因于受长期的地域隔离, 每一绿洲农业生态系统相对独立, 不同地区根瘤菌间很少有机会接触, 很难有遗传物质的交换。而在同一地区小范围内的生态系统中菌株间可能通过转化、转导及接合交换遗传物质^[8], 因此形成同一地区内遗传相似性很高, 而与其它地区的菌株远缘是完全有可能的。

参考文献

- [1] Hulton C S J, Higgins C F, Keister D L. *Mol Microbiol*, 1991, 5: 825 ~ 834.
- [2] Bruijn F J. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 2180 ~ 2187.
- [3] Judd A K, Seime der M, Sadowsky M J, *et al.* *Appl. Environ. Microbiol*, 1993, 59: 1702 ~ 1708.
- [4] 关桂兰, 王卫卫, 杨玉锁. 新疆干旱地区固氮生物资源. 北京: 科学出版社, 1991, 5 ~ 28.
- [5] 许晓东, 陈文新. 微生物学通报, 1996, 23 (3): 131 ~ 135.
- [6] Harrison S P, Mytton L R, Skot L, *et al.* *Can J Microbiol*, 1992, 38: 1009 ~ 1015.
- [7] Chen W X, Li G S, Qi L, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 38: 392 ~ 397.
- [8] Dowling D N. *Annu Rev Microbiol*, 1986, 40: 131 ~ 157.