

# rRNA 同源性分析与细菌系统分类

汪恩涛 陈文新

(北京农业大学生物学院)

目前,在系统分类学研究中最有用和最常用的分子钟是 rRNAs。rRNA 分子具有功能上的高度保守性,在所有细胞生物中都存在,其进化具有良好的时钟性质,其序列中不同的位置上变化的速度不同。上述性质使其可以用来测定几乎全部生物间的系统发育关系。对于形态简单,化石资料匮乏的原核生物来说,它们更是系统分类信息的主要来源。

## (一) rRNA 的一般性质

细菌细胞中含有三种 RNA,即信使 RNA(mRNA),转移 RNA(tRNA) 和核糖体 RNA(rRNA)。由于细菌 DNA 绝大部分都转录成 mRNA,所以, mRNA 同源性分析的结果与 DNA 同源性分析的结果相同,而且, mRNA 在细胞中的含量很少,不易分离,因此, mRNA 同源性分析做的较少。tRNA 分子种类较多,分子量较少(80 个核苷酸左右),在细菌总 RNA 中,它们约占 10%。虽然有研究表明在肠杆菌科细菌中 tRNA 分子有保守性<sup>[1]</sup>,但其同源性研究的较少。rRNAs 因其种类少,含量大(约占细菌 RNA 总量的 80%),分子大小适中,易于分离及其进化上的保守性等特点而在细菌系统分类研究中得到了广泛的应用。

1. 原核生物的核糖体:大多数原核生物的核糖体是非常相似的,但与真核生物的有很大差异<sup>[2]</sup>。原核生物的核糖体是 70S 的颗粒,在适当的条件下可解离成 50S 和 30S 两个亚基。50S 亚基含 75% 核酸和 25% 蛋白,30S 亚基含 50% 核酸和 40% 蛋白<sup>[3]</sup>。

原核生物的核蛋白数目相同,均为 50 余种,但它们的抗原性不同<sup>[4]</sup>,层析和电泳分离图谱也不同<sup>[5-7]</sup>。在进化过程中,原核生物保留了核糖体功能的同源性,即使 DNA 同源性很小的原核生物的核糖体亚单位间也可以形成有活性的互补杂合体<sup>[8]</sup>。原核生物和真核生物间则不能形成这种互补杂合体<sup>[3,9]</sup>。

原核生物核糖体中有三种 rRNA,沉降系数分别为 23S, 16S 和 5S。少数光合细菌在一短期内只有

23S rRNA<sup>[10]</sup>。23S 和 5S rRNA 存在于 50S 亚基中,16S rRNA 存在于 30S 亚基中<sup>[11]</sup>。23S, 16S 和 5SrRNA 的分子量依次为  $1.1, 0.55$  和  $0.04 \times 10^6$  道尔顿,链长依次为 3300, 1650 和 120 个核苷酸。

2. rRNA 基因的一般性质:大多数原核生物中含多个 rRNA 基因拷贝<sup>[12,13]</sup>,但也有少的,如 *Mycoplasma* 只含一个<sup>[14]</sup>。对于 5S, 16S 和 23S rRNA,其拷贝数是相同的,因为它们存在于同一个转录单位上,并一起转录成一个 30S 的前体 RNA<sup>[15,16]</sup>。原核生物中 rRNA 基因的含量是相对恒定的,约占 DNA 总量的 0.3—0.4%<sup>[17,18]</sup>。

在 rRNA 转录单位中,除了 23S, 16S 和 5S rRNA 基因外,还含有 1—2 个 tRNA 基因,它们的排列顺序是启动子, 16S rRNA, tRNA, 23S rRNA 和 5S rRNA<sup>[19,20]</sup>。

细菌 rRNA 的碱基组成相对恒定,与其总 DNA 相比较时,这一点尤其明显<sup>[21]</sup>。原核生物 rRNA 的 (G + C)mol% 均在 53% 左右。一般 16S 和 23S rRNA 的碱基组成相同,但也检测到一些差异。在已研究过的各种细菌 rRNA 中,约 1% 的核苷酸是甲基化的。

rRNA 的核苷酸序列总的看来是保守的,但其中有些部分进化快些,有些部分则更保守些。表 1 中列出的几个 rRNA 片段可以说明这一点<sup>[22]</sup>。

表 1 框中部分为进化较快的部分,其余部分则较保守。古细菌 (*Halobacterium*) 与其它细菌的差异要大一些。

3. 细菌 rRNA 的高级结构:由于缺乏原子解析的结构信息, rRNA 高级结构的分析只能借助于计算机技术进行推理<sup>[23]</sup>。现已知,在 16S 和 23S rRNA 中, 60—70% 的碱基参与形成氢键<sup>[24,25]</sup>,邻近的 10—30 个核苷酸可以互补形成基环结构<sup>[4]</sup>,其基环的数目可以用计算机来推测<sup>[26,27]</sup>。总的看来,原核生物 rRNA 的空间构型是一致的,这方面更明确地显示出 rRNA

表 1 细菌 16S rRNA 序列片段<sup>[22]</sup>

细菌名称	序 列				
<i>Escherichia coli</i>	GAU	UGGAGUC	UGCAACUC	GACUCCA	UGA
玉米叶绿体	GAU	UGCAGGC	UGCAACUC	GCCUGCA	UGA
<i>Bacillus subtilis</i>	GAU	UGUAGGC	UGCAACUC	GCCUACA	UGA
<i>B. stearothermophilus</i>	GAU	UGCAGGC	UGCAACUC	GCCUGCA	UGA
<i>Halobacterium volcanii</i>	GAU	UGAGGGC	UGCAACUC	GCCCUCU	UGA

的保守性。例如,真细菌与古细菌的 16S rRNA 在序列上有较大差异,但它们在核糖体蛋白结合的位点处的二级结构是相同的。

综上所述, rRNA 的保守性表现在其碱基组成,碱基序列,高级结构及功能等多重层次上。rRNA 保守与进化的二重性,使其能够做为分子钟而用于细菌系统进化研究。

## (二) rRNA 同源性比较的一般方法

rRNA 同源性分析方法有三大类,即序列分析,寡核苷酸编目和 rRNA-DNA 杂交。

1. rRNA 序列测定: Lane et al(1985)<sup>[28]</sup>阐述了一种用于细菌系统分类的快速 rRNA 序列测定法,即修改的 Sanger 双脱氧链终止法。其原理是以 rRNA 为模板,以一个或多个寡核苷酸链做引物(与 rRNA 分子上的一段保守区域互补的 15—20 个核苷酸),用反转录酶合成反转录 DNA。反应系统由四支反应管组成,分别用来测定 A、T、C、G 四种碱基,反应底物为 A、T、C、G 所对应的四种核苷酸,其中一种含放射性标记。在相应的反应管中分别加入双脱氧 A、T、C、G 核苷酸做终止剂,它们随机地参加到延长的 DNA 链上相应的位置上,从而终止该链的继续延长。反应进行到预定时间后,四个管的反应物同时进行电泳分离,电泳结果用放射性自显影显示,再从自显影图谱上直接读出 rRNA 序列。

得到的序列资料经计算机处理可得不同 rRNA 分子间的同源性,并由此构建系统树。

2. 寡核苷酸编目:十几年以前,测定完整的 rRNA 序列还很困难,所以,人们花了十几年时间用寡核苷酸编目法对 rRNA 同源性进行比较<sup>[29]</sup>。

寡核苷酸编目法是采用已知碱基专一性的核酸酶(如对鸟苷专一的 T<sub>1</sub>核酸酶)彻底消化 RNA,消化产物用层析和电泳做双向分离,放射自显影记录结果,得到初级指纹图,再对初级指纹图上的每一个点进行序列分析,最后依字母顺序和链的长短将供试 rRNA 的所有寡核苷酸开列出一个目录式清单,即进行编目。并据此计算不同 rRNA 间的相似系数( $S_{AB}$ ):

$$S_{AB} = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$$

式中  $N_A$ ,  $N_B$  分别为 A 样品和 B 样品中长度为 L (一般为 6) 个核苷酸以上的寡核苷酸残基数目,  $N_{AB}$  是两样品中相同的寡核苷酸残基数。最后用  $S_{AB}$  值构建系统树<sup>[29]</sup>。

3. rRNA-DNA 杂交:在 rRNA-DNA 杂交中, rRNA 仅与负责其合成的那条 DNA 单链互补,又由于 RNA 为单链,其分子间不相互结合,因此,变性 RNA 与变性 DNA 混合时, RNA 即与其互补 DNA 链形成杂交双链。RNA 分子与异源 DNA 杂交时,也可以在其互补的同源区域形成杂交双链,这种杂交双链的稳定性与其同源程度成正相关。

在 rRNA-DNA 杂交中,有两个参数可以利用,一是结合率,即 100 $\mu$ g 单链 DNA 上结合的 rRNA  $\mu$ g 数,二是 rRNA-DNA 杂交双链的热解链中点温度 [ $T_m(c)$ ]。结合率(%)与 rRNA 同源性没有直接关系,  $T_m(c)$  值则与同源性直接相关。

Mordarski<sup>[30]</sup> 和 Johnson<sup>[31]</sup> 分别于 1985 年总结了 rRNA-DNA 杂交的方法,归纳起来有两大类,即固相-液相杂交和液相-液相杂交。

固相-液相杂交是将变性 DNA 固定在固相支持物上,再与溶液中的标记 rRNA 杂交。DNA 的固定方式有琼脂包埋,硝酸纤维膜结合及重氮化纸结合等。现最常用的是硝酸纤维膜结合<sup>[32,33]</sup>,该方法的优点是单链 DNA 在高盐浓度下与硝酸纤维结合,在低盐浓度下又可方便地将 DNA 洗脱下来,杂交后的滤纸片可直接在液闪计数器上计数放射性。rRNA 的标记常用放射性同位素 <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H 或 <sup>125</sup>I。

固相-液相杂交又分为直接杂交和竞争杂交两类。直接杂交即将一定量的标记 rRNA 与一定量的固定的单链 DNA 在杂交液中杂交,杂交后的滤纸片经过洗涤及 RNase 处理即可用于测定 rRNA 的结合量和杂交分子的热稳定性 [ $T_m(c)$ ]。这种方法适于各类细菌的分类研究<sup>[34,35]</sup>。竞争杂交以同源的标记 rRNA 与固定的单链 DNA 杂交,同时加入过量的异源非标记 rRNA,以此测定未标记的 rRNA 与同源 rRNA 的相对竞争能力,相对竞争力越强,竞争 rRNA 与标记 rRNA 的同源性越高。

液相-液相杂交用标记 rRNA 与溶液中的单链 DNA 杂交。在此情况下,由于变性 DNA 有自我复性,反应体系中要求较多的变性 DNA<sup>[36]</sup>。根据最后杂交分子的收集方法,液相-液相杂交又分为酸沉淀法<sup>[31]</sup>, S<sub>1</sub> 酶-DE-81 滤纸法<sup>[30]</sup>及羟基磷灰石法<sup>[37,38]</sup>等。最后根据收集的双链核酸中的放射性强度计算出杂交率。

## (三) rRNA 同源性分析在细菌分类学中的应用

在细菌分类的发展史中, rRNA 同源性分析的应用具有重要意义,它使得细菌系统进化关系有了科学的实验依据,而不再单凭想象和推断。

1. rRNA-DNA 杂交: De Ley 及其同事们在 rRNA-DNA 杂交方面做了大量工作,使这一技术成了研究细菌属间关系及建立新属的一项有效的和必要的手段。经过近 20 年的努力,他们分析了大量的菌株,并在此基础上将革兰氏阴性菌分成了四群,由于每群都高于科的水平,故称之为超科<sup>[39]</sup>(图 1)。

此后,经多年的研究,该图又有所发展,同时也建立了一些新属。如第四超科中亚极生鞭毛的慢生根瘤菌已成立了一个新属 *Bradyrhizobium*<sup>[40]</sup>,另外还新增了新属 *Phyllobacterium*<sup>[41]</sup>, *Azorhizobium*<sup>[41]</sup>, 以及 *Sinorhizobium*<sup>[41]</sup>。从而使第四超科有了较大变

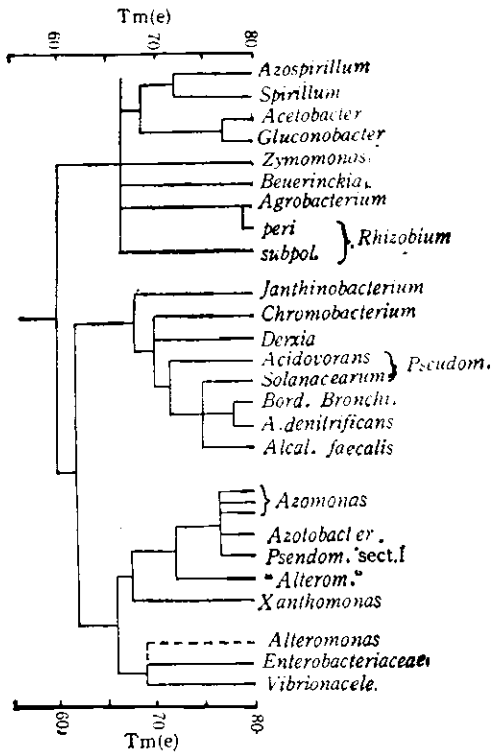


图1 革兰氏阴性菌 rRNA 同源性总图[以  $T_m(e)$  表示]  
*Alteromonas* 属的确切位置不定, 该属的种分为两个不同的遗传群。

化(图2)。

rRNA-DNA 杂交结果表明, 该技术可以了解细菌间的远缘关系, 澄清过去分类中的错误, 且可以确定一些新分类单元的分类地位。

Johnson 等<sup>[44]</sup> 检测了氧化酶阴性的莫拉氏菌属各种及其它一些属、种间的核酸同源性, 当 DNA 同源性低至 0 时, 其相应的 rRNA 同源性仍高达 69% (表 2)。Moore & McCarthy<sup>[45]</sup>, Palleroni 等<sup>[46]</sup> 也都得到了类似的结果。这种现象是 rRNA 保守性的体现, 并为边缘关系的测定提供了可能。

与检测远缘关系的能力相反, 该方法对于亲缘关系很近的菌群无法区分。Pace & Campbell<sup>[47]</sup> 测定的

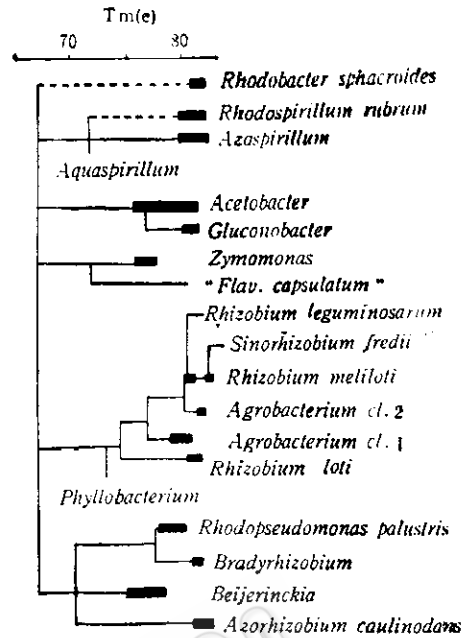


图2 简化的第四 rRNA 超科的 rRNA 同源性(依据 Jarvis 等 1986; Drefus 等 1988; 及 Chen 等 1988 年的资料)

脱硫弧菌属的 rRNA 同源性中, *Desulfovibrio vulgaris* 与 *D. desulfuricans* 同源性为 97%, 二者不能用 rRNA 同源性相区分。

2. 寡核苷酸编目: 在核酸测序技术成熟之前, rRNA 寡核苷酸编目分析使细菌系统进化研究得到了突破性的进展。Woese<sup>[48]</sup> 总结了几百个寡核苷酸编目分析的结果, 提出了一个总的生物进化树。除了确定细菌各大类群间的系统进化关系外, 该方法的另一突出贡献是为第三生命形式——古细菌分类地位的确立提供了有力证据, 并最终导致了古细菌门的建立<sup>[49]</sup>。寡核苷酸编目分析表明, 古细菌, 真细菌和真核生物有共同的祖先, 但进化路线各不相同<sup>[48, 50]</sup>。

研究表明, 寡核苷酸编目分析对于细菌远缘关系的确定是一种有力的手段。Clausen 等<sup>[51]</sup> 用这种方法比较了 *Filibacter limicola* 16S rRNA 与有关细菌属、

表2 23S rRNA 同源性

菌 种	<i>Moraxella lwoffii</i> 17986	
	DNA 同源性(%)	23S rRNA 同源性(%)
<i>Moraxella lwoffii</i> 17986	100	100
<i>Achromobacter metalcaligenes</i> 17909	37	94
<i>Bacterium anitratum</i> B5w <sup>T</sup> 17903	27	92
<i>Moraxella osloensis</i> D-1	0	69
<i>Neisseria catarrhalis</i> N-5	2	66

种间的同源性。结果表明,该属细菌虽然是革兰氏阴性的滑行细菌,但它却不是人们认为的不产孢子的 *Flexibacteriaceae* 科的成员。其系统分类地位属于革兰氏阳性的 *Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina ureae* 及无芽孢的 *Planococcus citreus* 群。这一结果也得到了一些表型性状的证实。

3. rRNA 序列分析: 1987 年, Woese 在其名为 “Bacterial Evolution”<sup>[121]</sup> 的长篇文章中对细菌系统分类研究做了总结,系统阐述了细菌系统分类的历史、方法及最近的成果。他高度评价了 rRNA 序列分析技术,指出快速发展的核酸定序能力是生物学中的一场革命,且必将在人们对生物进化及其与其它生物学科的关系的认识方面产生现实的和长远的影响。细胞本质上是一份历史的记录,获得阅读它的能力(通过核酸测序)必然会改变我们对全部生物学的看法。这场革命对微生物学的影响最大,因为直到分子测序技术出现,细菌进化才成了一个可以进行试验研究的科学领域<sup>[122]</sup>。

Woese<sup>[122]</sup> 总结了 rRNA 序列分析资料,将生物界分为三大部分:真细菌,古细菌和真核生物(图 3),

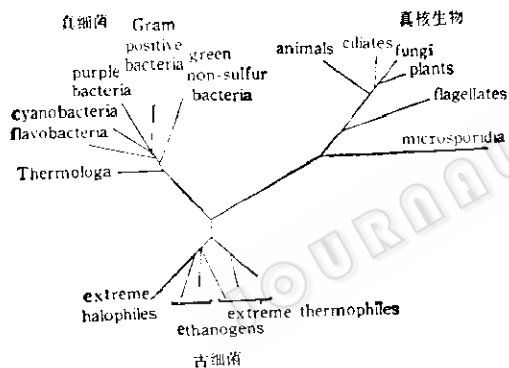


图 3 由 rRNA 序列确定的总系统树

这与寡核苷酸编目法所得结果大同小异。真细菌门又分了 10 个部分<sup>[121]</sup>。Woese<sup>[121]</sup> 的这一篇文章可以说细菌系统分类学趋于成熟的标志。

与寡核苷酸编目分析类似, rRNA 序列分析的应用范畴也适于远缘关系的确定。Dewhirst 等<sup>[133]</sup> 比较了属于 *Proteobacteria* 的  $\beta$  组细菌的 16S rRNA 的序列同源性。该细菌以前被称为“紫细菌及其近亲”, 相当于 De Ley 提出的第三 rRNA 超科。全部序列采用计算机比较, 得出相似系数并建立系统树。

4. 三种 rRNA 同源性分析方法的比较: 三种方法得到的 rRNA 同源性之间有相关性。Schleifer & Stackbrandt<sup>[144]</sup> 总结了寡核苷酸编目与 rRNA-DNA 杂交之间的关系, 指出在  $T_m(e)$  高于 70℃ (相当于  $S_{AB} = 0.45$ ) 时,  $T_m(e)$  与  $S_{AB}$  有线性关系, 在这一界限以下, 二者间的线性关系消失。这证明了 De

Smedt & De Ley<sup>[152]</sup> 的观点, 他们认为,  $T_m(e)$  低于 65℃ 时, rRNA-DNA 杂交不能得出有价值的结论。也就是说, rRNA-DNA 杂交不适于亲缘关系太远的菌间的亲缘性分析。

在 Woese<sup>[122]</sup> 总结的 rRNA 序列分析与寡核苷酸编目分析之间的关系中,  $S_{AB}$  值与序列相似百分值之间有一定的相关性, 但不是线性关系, 且二者间的关系不能从理论上推算 (因为各点上变化的相对速率不能预测)。两个值间的关系也不很准确, 尤其在  $S_{AB}$  值小于 0.4 时。

寡核苷酸编目法可以界定大多数主要的细菌门, 但不能解决它们之间或它们的亚门之间的分支次序, 也不能确定快速进化的亲缘线的分支次序。

在前述 Dewhirst 等<sup>[133]</sup> 的工作中, 一些结果对上述三种方法间的联系提供了材料。它们的研究中, *Chromobacterium* 属内一些种间的差异较大, 这与 rRNA-DNA 杂交结果<sup>[166]</sup> 相符。 *N. gonorrhoeae*, *K. denitrificans*, *K. kingae* 及 *Chr. violaceum* 间的密切关系也与 rRNA-DNA 杂交结果<sup>[157]</sup> 相符。Dewhirst 等<sup>[133]</sup> 研究的这一群菌在寡核苷酸编目分析中被分成三个亚群<sup>[152]</sup>, 而在序列分析中, 这些菌都属于  $\beta$ -2 群中。两种方法所得的结果有差异。Dewhirst 等<sup>[133]</sup> 的结果亦为 Rossau 等<sup>[157]</sup> 的 rRNA-DNA 杂交结果所证实。

5. rRNA 同源性分析的特点: 总的说来, rRNA 同源性分析适于远缘菌群间的亲缘性分析, 但 rRNA-DNA 杂交法适于相对较近的菌群间, 如科、属之间的比较, 寡核苷酸编目法和序列分析法适于更远缘乃至整个生物界的比较。由于寡核苷酸编目法只利用了 rRNA 序列上 40% 的信息, 也由于核酸快速定序技术的发展, 寡核苷酸编目法正在被序列分析法所取代。

在分析亲缘性较近的菌群时, rRNA 同源性分析的结果常与 DNA-DNA 杂交结果相一致。Schleifer & Stackbrandt<sup>[144]</sup> 及 Grimont<sup>[158]</sup> 曾对 rRNA-DNA 杂交与 DNA-DNA 杂交做过比较。DNA 同源性高于 60% 的菌株间, rRNA-DNA 杂交双链的  $T_m(e)$  值相差低于 2℃, 而 DNA 同源性 20—30% 的菌株间,  $T_m(e)$  的差值达 6℃。

rRNA 同源性分析得到的细菌系统分类与现有的传统分类在很多地方不一样。

首先, rRNA 同源性水平在不同的属内差异非常大。如肠杆菌科的属内同源性很高, 梭状芽孢杆菌属内的同源性差异则很大。Johnson & Francis<sup>[159]</sup> 研究发现, 以 50% 同源性为界时, 梭状芽孢杆菌属可分为三个 rRNA 同源群。这种巨大差异几乎与蓝细菌群内的差异相当。对此, 有人用“异时进化” (heterochronous evolution) 做了解释, 即不同的菌群或性状起源的时间不同。梭状芽孢杆菌是起源很早的一个菌群, 在漫

长的进化过程中积累了很多差异,但它们都保留了厌氧生长和产芽孢这些古老性状。也有人认为这类异质属的形成是由于人们在长期研究过程中仅凭个别性状而未对菌株做彻底分析就把它们大量放置在这些属中所致。

其次, rRNA 同源性研究结果还表现出与某些传统分类的安排不相吻合。传统上受到重视的形态指标与系统进化无关,如付球菌,芽孢八叠球菌和微球菌均为革兰氏阳性球菌, rRNA 同源性分析却表明它们分别与 *Rhodospseudomonas capsulata*, *Bacillus pasteurii* 和 *Arthrobacter* 有亲缘关系<sup>[50]</sup>。

细胞分裂方式也与系统进化无关。 *Rhodomicrobium* 靠芽殖分裂,但它与非芽殖的紫色非硫菌有亲缘关系。没有胞壁的支原体原来曾被看成是一个独立的纲或门,但它们却与梭状芽孢杆菌的一个特殊群有 rRNA 亲缘性。 *Mycoplasma* 和 *Acholeplasma* 都没有细胞壁,但它们可能分别从梭状芽孢杆菌的祖先进化而来<sup>[50]</sup>。

所有产孢子的细菌都有共同的起源,但无芽孢的 *Eubacterium*, *Lactobacillus* 和 *Streptococcus*<sup>[50]</sup> 及革兰氏阴性的丝状滑行细菌 *Filibacter limicola*<sup>[51]</sup> 都是芽孢杆菌的近亲。

rRNA 同源性分析为原核生物的系统进化研究提供了一条可行之路并已取得了诸多成果,这些成果可谓细菌分类学的重大突破。

rRNA-DNA 杂交法适于确定属及属上的分类单元间的亲缘关系,是一种相对简单、快速和节约的技术。但当同源性过低 [ $T_m(c) < 65^{\circ}\text{C}$ ] 时,杂交法测定无意义。

寡核苷酸编目法比 rRNA-DNA 杂交法适用的范围广些。它做为一种过渡性的技术在细菌系统进化研究中发挥了重要的作用,现正为 rRNA 序列分析法所取代。序列分析法适于各种水平,尤其是远缘关系的研究。

目前,系统分类与传统分类单元的不统一仍不能完全解决,但系统分类研究已取得了重大突破。相信随着分类技术和理论观念的发展,会合理解决这一分歧的。

## 参 考 文 献

1. Brenner D J et al.: *Nature* (London), 227: 448—451, 1970.
2. Taylor M M and R Storck: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 52: 958—965, 1964.
3. Wittmann H: *Eur. J. Biochem.*, 61: 1—13, 1976.
4. Pace N R: *Bacteriol. Rev.*, 37: 562—603, 1973.
5. Bock, A: Analysis of Ribosomal Proteins by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. In G. G. Chalk (ed.), *Methods in Microbiology*, Vol. 18. Academic Press, pp. 109—122, 1985.

6. Hori H and S Osawa: *J. Bacteriol.*, 133: 1989—1995, 1978.
7. Osawa S et al.: *J. Bacteriol.*, 107: 168—178, 1971.
8. Nomura M et al.: *Nature* (London), 218: 793—799, 1968.
9. Traub P and M Nomura: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 59: 777—784, 1968.
10. Marrs B and S Kaplan: *J. Mol. Biol.*, 49: 297—317, 1970.
11. Kurland C G: *Ann. Rev. Biochem.*, 41: 377—408, 1972.
12. Kenerley M E et al.: *J. Bacteriol.*, 132: 931—949, 1977.
13. Kennell D E: *J. Mol. Biol.*, 34: 85—103, 1968.
14. Ryan J L and H J Morowitz: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 63: 12828—12829, 1969.
15. Dunn J J and F W Studier: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70: 3296—3300, 1973.
16. Ginsberg D and J A Steitz: *J. Biol. Chem.*, 250: 5647—5654, 1975.
17. Nomura M: *Bacteriol. Rev.*, 34: 228—277, 1970.
18. Nomura M: *Federation Proceedings. Federation of American Society for Experimental Biology*, 31: 18—20, 1972.
19. Lund E et al.: *The Cell*, 7: 165—177, 1976.
20. Brosius J et al.: *J. Mol. Biol.*, 148: 107—127, 1981.
21. Johnson J D and J Horowitz: *Biochim. Biophys. Acta*, 247: 262—279, 1971.
22. Fox G E: Chapter 5 The Structure and Evolution of Archaeobacterial Ribosomal RNA, In the *Bacteria*, Vol. VIII. Academic Press, p270, 1985.
23. Noller H F: *Ann. Rev. Biochem.*, 53: 119—162, 1984.
24. Cox R A: *Biochem. J.* 117: 101—118, 1970.
25. Hartman K A and G J Thomas Jr: *Science* 170: 740—741, 1970.
26. Comy E et al.: *Nucleic Acid Res.*, 12: 53—65, 1984.
27. Jacobson A B et al.: *Nucleic Acid Res.*, 12: 45—52, 1984.
28. Lane D J et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 32: 6955—6959, 1985.
29. Stackebrandt E et al.: 16s Ribosomal RNA Oligonucleotide Cataloguing. In G. G. Chalk (ed.), *Methods in Microbiology*, Vol. 18. Academic Press, pp. 75—107, 1985.
30. Mordasky M: Detection of Ribosomal Nucleic Acid Homologies, In M. Goodfellow and D. E. Minnikin (eds.), *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic Press, pp. 41—66, 1985.
31. Johnson J L: DNA Reassociation and RNA Hybridization of Bacterial Nucleic Acid, See 99, pp. 33—74, 1985.
32. Gillespie D and S Spiegelman: *J. Mol. Biol.*, 12: 829—842, 1965.
33. De Ley, J and J De Smedt: *Antonie van Leeuwenhoek*, 41: 287—307, 1975.
34. Gillis M and J De Ley: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30: 7—27, 1980.

(下转第 369 页)

35. Midgley J E M: Hybridization of Microbial RNA and DNA, In J. R. Norris and D. E. Ribbons (eds.), *Methods in Microbiology*, Vol. 5A, Academic Press, pp. 331—360, 1971.
36. Maxwell I H et al.: *Nucleic Acid Res.*, **5**: 2033—2038, 1978.
37. Brenner D J et al.: *Anal. Biochem.*, **28**: 447—459, 1969.
38. Lachance M A: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **30**: 433—436, 1980.
39. De Ley J: Modern molecule methods in bacterial taxonomy: evaluation, application prospects, In *Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 347—357, 1978.
40. Jordan D C: Family III *Rhizobiaceae*, Conn 1938, In N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. The William and Wilkins Co. Baltimore, pp. 234—244.
41. Dreyfus B et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**: 89—98, 1988.
42. Chen W X et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**: 392—393, 1988.
43. Jarvis B D W et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 129—138, 1986.
44. Johnson J L et al.: *J. Bacteriol.*, **101**: 568—573, 1970.
45. Moore R L and B J McCarthy: *J. Bacteriol.*, **94**: 1066—1074, 1967.
46. Palleroni N J et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**: 333—339, 1973.
47. Pace B and L Campbell: *J. Bacteriol.*, **106**: 717—719, 1971.
48. Woese C R: *Scientific American* **144**: 98—122, 1981.
49. Murray, R. G. E.: *Kindom Procaryotae* Murray, 1968, 252AL, See 42, pp. 35—36.
50. Fox G E et al.: *Science*, **209**: 457—463, 1981.
51. Clausen V et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **131**: 2659—2663, 1985.
52. Woese C R: *Microbiol. Rev.*, **51**: 221—271, 1987.
53. Dewhirst F E et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**: 258—266, 1989.
54. Schleifer K H and E Stackebrandt: *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**: 143—187, 1983.
55. De Smedt J and J De Ley: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**: 222—240, 1977.
56. De Ley J et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**: 154—168, 1978.
57. Rossau R et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 323—332, 1986.
58. Grimont P A D: *Can. J. Microbiol.*, **34**: 541—546, 1988.
59. Johnson J L and B S Francis: *J. Gen. Microbiol.*, **88**: 229—244, 1975.