

## 斜茎黄芪根瘤菌的 16S rDNA 和 23S rDNA PCR-RFLP 比较分析

高俊莲 陈文新

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

Zewdu Terefework Kristina Lindstrom

(芬兰赫尔辛基大学应用化学与微生物系 赫尔辛基 Fin-00014)

**摘要** 在表型性状数值分析和 AFLP 指纹图谱分析的基础上,选取 54 株斜茎黄芪根瘤菌的代表菌株及已知根瘤菌参比菌株,进行 16S rDNA 和 23S rDNA 的 PCR-RFLP 比较分析。结果表明斜茎黄芪根瘤菌具有极大的系统发育多样性,分别具有 24 个 16S rDNA 遗传图谱类型和 22 个 23S rDNA 遗传图谱类型,16S rDNA 与 23S rDNA PCR-RFLP 聚类分析树状图谱有较好的一致性,但也存在一些差异。在对较大类群的划分上,它们的结果与表型性状数值分析结果有较好的一致性。将 16S rDNA 和 23S rDNA PCR-RFLP 分析数据合并在一起进行分析时,得出 26 个综合遗传图谱类型和 1 个综合聚类分析树状图谱。很明显,16S rDNA 与 23S rDNA 的合并,能够得出更可靠的系统发育结论。

**关键词** 16S rDNA, 23S rDNA, PCR-RFLP, 斜茎黄芪, 根瘤菌

**分类号** Q939.11 **文献识别码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-02-0120-25

## 16S rDNA AND 23S rDNA PCR-RFLP COMPARATIVE ANALYSIS OF RHIZOBIA ISOLATED FROM *ASTRAGALUS ADSURGENS*

Gao Junlian Chen Wenxin

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

Zewdu Terefework Kristina Lindstrom

(Department of Applied Chemistry and Microbiology, Biocenter I, P.O. Box 56,  
University of Helsinki, Fin-00014, Finland)

**Abstract** 16S rDNA and 23S rDNA PCR-RFLP were applied to 54 rhizobial strains isolated from *Astragalus adsurgens* and reference strains of some recognized rhizobial species based on the results of numerical analysis of phenotypic characteristics and AFLP fingerprinting. The results showed there was a great phylogenetic diversity among the symbionts of *Astragalus adsurgens*. The RFLP analysis resulted in 24 and 22 different genotypes for 16S rDNA and 23S rDNA respectively. In general, dendrograms derived from 16S rDNA and 23S rDNA PCR-RFLP correlated well, with only a little difference. For some large groups, the results of 16S rDNA and 23S rDNA PCR-RFLP were in good agreement with that of numerical analysis of phenotypic characteristics. The combined data from 16S rDNA and 23S rDNA PCR-RFLP analysis described 26 genotypes and one dendrogram. Obviously, the combination of 16S rDNA and 23S rDNA can get more reliable phylogenetic conclusion.

**Key words** 16S rDNA, 23S rDNA, PCR-RFLP, *Astragalus adsurgens*, Rhizobia.

国家自然科学基金委与欧共体资助项目

This work were funded by European Union and the National Natural Science Foundation of China. (No.39670017), (No. IC18-CT96-0103)

1998-08-25收稿, 1999-01-11修回

16S rDNA PCR-RFLP 分析是目前广泛采用的一种研究细菌系统发育关系简便、快速的方法,其限制性酶切图谱类型多具有种的特异性<sup>[1]</sup>。23S rDNA 分子大小大约是16S rDNA 分子的两倍,贮存于其中的信息量更大,用于细菌系统发育研究的潜力更大。Terefework 等人<sup>[2]</sup>首先将23S rDNA PCR-RFLP分析技术引入根瘤菌系统发育研究中,他的研究表明,23S rDNA 与16S rDNA PCR-RFLP分析具有较好的一致性,前者的聚类分析树状图谱较后者的具更深的分支和更好的分辨率。

先前的表型性状数值分析<sup>[3]</sup>和 AFLP 指纹图谱分析<sup>[4]</sup>研究中,斜茎黄芪根瘤菌表现出了极大的表型性状多样性和遗传多样性。在此研究基础上,本文选取部分斜茎黄芪根瘤菌的代表菌株与已知根瘤菌参比菌一起进行16S rDNA 和23S rDNA PCR-RFLP比较分析,以初步确定斜茎黄芪根瘤菌的系统发育地位。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

在表型性状数值分析和 AFLP 指纹图谱分析的基础上,本研究选取 54 株菌株,其中 40 株为斜茎黄芪根瘤菌,14 株为已知根瘤菌参比菌株。详细信息见表 1。

### 1.2 DNA 的提取

细菌总 DNA 的提取方法同文献 [4]。

### 1.3 PCR 扩增

16S rDNA 和23S rDNA 的 PCR 扩增同文献 [2] 并略做修改。

### 1.4 酶切及电泳

选用四种限制性内切酶 AluI, MspI, HinfI 和 HaeIII<sup>[5]</sup>, 8~15  $\mu$ l 16S rDNA 或23S rDNA PCR 产物分别加入以上四种限制性内切酶, 37℃ 下酶切过夜。酶切产物在 100V 电压下跑 3% 或 4% 琼脂糖凝胶电泳大约 2~3h, 紫外灯下照像。Marker 采用 pGEM DNA marker。

### 1.5 电泳图谱分析

根据 Nei 和 Li<sup>[6]</sup>的分析方法, 菌株间 16S rDNA 或23S rDNA 的序列差异用其电泳图谱

中所共有的限制性片段所占的比值来估测, 根据这种比值可计算出菌株间的遗传距离, 然后采用 SPSS 分析软件中的 UPGMA 方法对所得遗传距离矩阵进行聚类分析, 即可得出反映菌株间系统发育关系的聚类分析树状图谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 扩增的 16S rDNA 和23S rDNA 的 RFLP 分析

16S rDNA 和23S rDNA 扩增产物分别用 4 种限制性内切酶 (AluI, MspI, HinfI, HaeIII) 酶切后, 经 3% 或 4% 琼脂糖凝胶电泳分离, 分别得出 7~11 种 16S rDNA 限制性内切酶切图谱类型 (图 1) 和 9~12 种 23S rDNA 限制性内切酶切图谱类型 (图 2)。54 株菌的 16S rDNA 和23S rDNA 四种限制性内切酶酶切图谱类型分

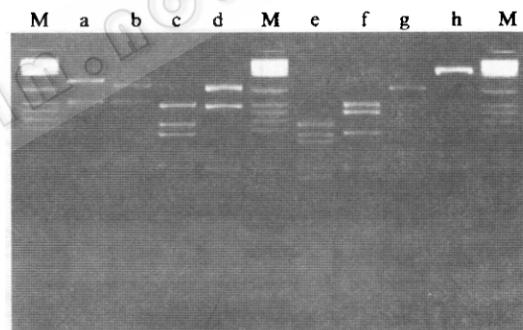


图1 16S rDNA HinfI 酶切电泳图谱  
16SrDNA扩增产物经HinfI酶切电泳后得出8种不同限制性酶切图谱类型, 图中字母代表不同的限制性酶切图谱类型, M =pGEM DNA marker

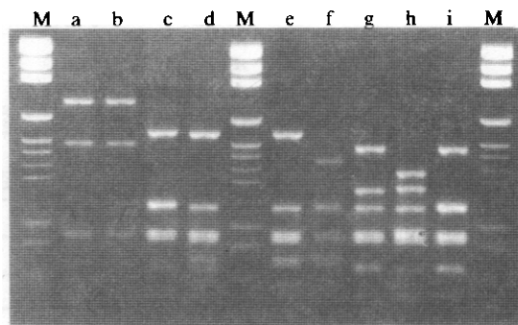


图2 23S rDNA AluI 酶切电泳图谱  
23SrDNA扩增产物经AluI酶切电泳后得出9种不同限制性酶切图谱类型, 图中字母代表不同的限制性酶切图谱类型, M =pGEM DNA marker

表 1 菌株

菌株	寄主	来源	16S rDNA遗传 图谱类型	23S rDNA遗传 图谱类型	16S rDNA和23S rDNA遗传图谱类型
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA6 <sup>1</sup>	<i>Glycine max</i>	美国	1	1	10
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA76 <sup>1</sup>	<i>Glycine max</i>	美国	6	6	9
<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 <sup>1</sup>	<i>Pisum sativum</i>	美国	14	16	2
<i>Rhizobium galegae</i> HAMB1540 <sup>1</sup>	<i>Galega orientalis</i>	芬兰	16	18	13
<i>Sinorhizobium fredii</i> USDA205 <sup>1</sup>	<i>Glycine soja</i>	河南	17	19	19
<i>Sinorhizobium meliloti</i> USDA1002 <sup>1</sup>	<i>Medicago sativa</i>	美国	17	19	19
<i>Sinorhizobium teranga</i> USDA4101 <sup>1</sup>	<i>Acacia laeta</i>	塞内加尔	14	16	2
<i>Sinorhizobium saheli</i> USDA4102 <sup>1</sup>	<i>Sesbania cannabina</i>	塞内加尔	15	17	24
<i>Mesorhizobium huakuii</i> CCBAU2609 <sup>1</sup>	<i>Astragalus sinicus</i>	湖北	23	22	6
B071	<i>Lespedeza cuneata</i>	北京	2	2	12
USDA3204	<i>Lespedeza stipulacea</i>	美国	6	6	9
JL84	<i>Astragalus complanatus</i>	吉林	11	13	7
SX042	<i>Astragalus dahuricus</i>	山西	11	13	7
CA8593	<i>Astragalus membranaceus</i>	陕西	9	11	4
SDW014	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	3	3	5
SH152	<i>Astragalus adsurgens</i>	陕西	3	3	5
SDW072	<i>Astragalus adsurgens</i>	北京	3	3	5
SDW068	<i>Astragalus adsurgens</i>	内蒙	3	3	5
SDW048	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	3	3	5
SDW032	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	3	3	5
SDW073	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	3	3	5
SDW044	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	3	3	5
SDW074	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	3	3	5
SDW040	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	4	7	1
SDW046	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	4	7	1
SDW010	<i>Astragalus adsurgens</i>	新疆	4	8	11
SDW017	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	4	4	14
NM159	<i>Astragalus adsurgens</i>	内蒙	4	8	11
SDW27	<i>Astragalus adsurgens</i>	北京	4	7	1
SH286	<i>Astragalus adsurgens</i>	陕西	4	8	11
SDW018	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	5	5	3
SDW016	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	5	5	3
SDW138	<i>Astragalus adsurgens</i>	陕西	5	5	3
SDW049	<i>Astragalus adsurgens</i>	山西	5	5	3
SDW038	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	5	5	3
SDW023	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	5	5	3
MN026	<i>Astragalus adsurgens</i>	内蒙	5	5	3
SDW045	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	7	9	26
SX211a	<i>Astragalus adsurgens</i>	山西	8	10	21
SDW027	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	9	11	4
SDW052	<i>Astragalus adsurgens</i>	山西	10	12	16
SDW251a	<i>Astragalus adsurgens</i>	山西	24	12	17
SDW004	<i>Astragalus adsurgens</i>	新疆	10	12	16
SDW019	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	10	12	16
NM349	<i>Astragalus adsurgens</i>	内蒙	18	12	18
SDW16	<i>Astragalus adsurgens</i>	北京	11	13	7
SDW058	<i>Astragalus adsurgens</i>	内蒙	12	14	25
SDW062	<i>Astragalus adsurgens</i>	北京	13	15	15
NM115	<i>Astragalus adsurgens</i>	内蒙	14	16	2
NM170	<i>Astragalus adsurgens</i>	内蒙	17	19	19
SDW056	<i>Astragalus adsurgens</i>	内蒙	19	20	23
X59	<i>Astragalus adsurgens</i>	西藏	20	11	8
NM179	<i>Astragalus adsurgens</i>	内蒙	21	21	22
SDW024	<i>Astragalus adsurgens</i>	辽宁	22	16	20

别有24种和22种不同的组合,每一种组合称为一个16S rDNA或23S rDNA遗传图谱类型(表1)。

已知根瘤菌的参比菌株中, *Sinorhizobium saheli*, *Rhizobium galegae*, *Mesorhizobium huakuii*, *Bradyrhizobium japonicum* 的模式菌株都具有独特的16S rDNA遗传图谱类型。但是 *Sinorhizobium meliloti* 的模式菌株 USDA1002 与 *Sinorhizobium fredii* 的模式菌株 USDA205 及1株斜茎黄芪根瘤菌 NMI70 共有相同的16S rDNA遗传图谱类型; *Rhizobium legumi-*

*nosarum* 的模式菌株 USDA2370 与 *Sinorhizobium teranga* 的模式菌株 USDA4101 及1株斜茎黄芪根瘤菌 NMI15 也共有相同的16S rDNA遗传图谱类型; *Bradyrhizobium elkanii* 的模式菌株与1株胡枝子根瘤菌 USDA3204 共有相同的16S rDNA遗传图谱类型。

斜茎黄芪根瘤菌的16S rDNA遗传图谱类型具有极大的多样性,而且大多数都不同于已知根瘤菌参比菌的16S rDNA遗传图谱类型。具有相同的16S rDNA遗传图谱类型3的9株斜茎黄芪根瘤菌,在先前的表型性状数值分

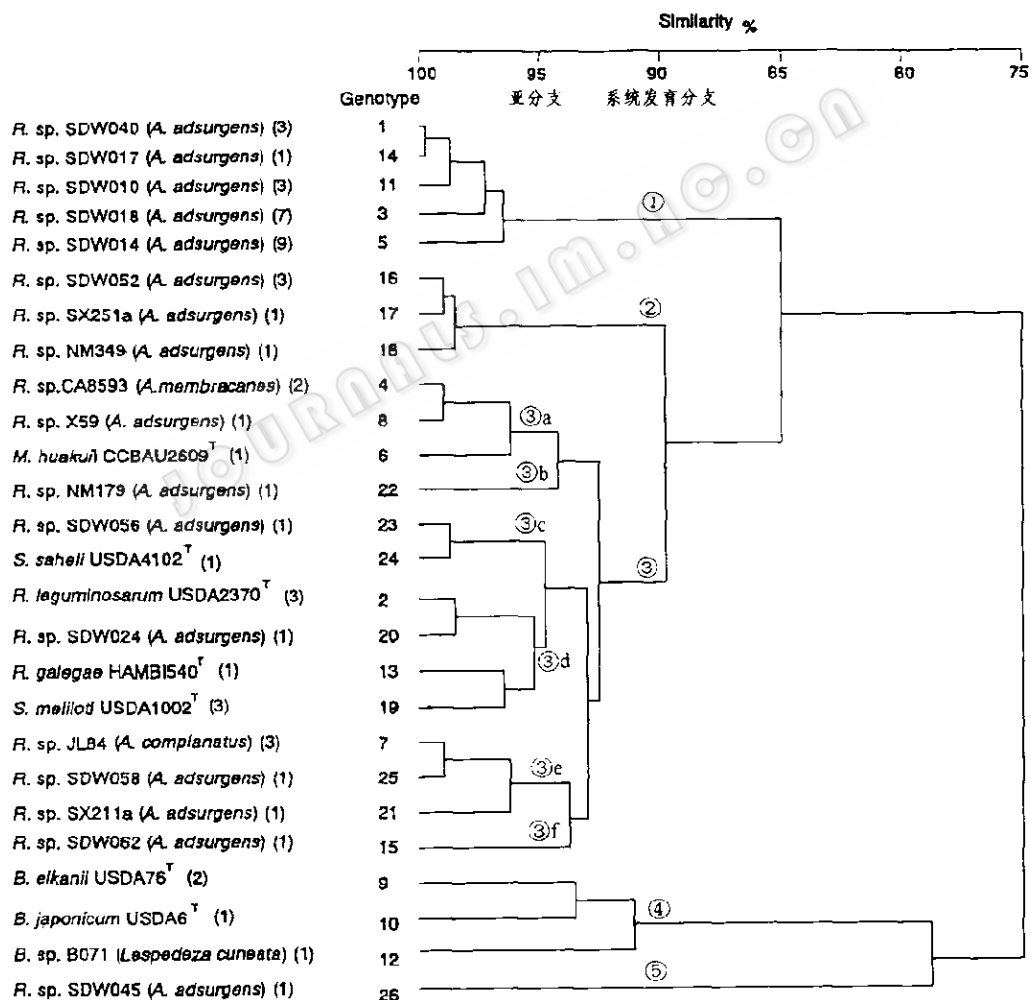


图3 16S rDNA和23S rDNA PCR-RFLP聚类分析树状图

括号内的数字表示具有相同遗传图谱类型的菌株数

析<sup>[3]</sup>中,这9株菌中有7株聚在表观群3中;具有相同16S rDNA遗传图谱类型4的7株斜茎黄芪根瘤菌,在表型性状数值分析中,分布于表观群2和3中;具有相同的16S rDNA遗传图谱类型5的另7株斜茎黄芪根瘤菌,在表型性状数值分析中有5株聚在表观群18中;具有相同的16S rDNA遗传图谱类型10的3株斜茎黄芪根瘤菌,在表型性状数值分析中聚在表观群8中。某些斜茎黄芪根瘤菌与来自黄芪属其它种寄主植物的根瘤菌共有相同的16S rDNA遗传图谱类型。如SDW16与1株背扁黄芪(*A. complanatus*)根瘤菌JL84和1株达乌里黄芪(*A. dahuricus*)根瘤菌SX042共有16S rDNA遗传图谱类型11,在表型性状数值分析中,这3株菌分布于相邻的两个表观群8和9中,它们之间的表型相似性达80%;SDW027与1株膜荚黄芪(*A. membracanes*)根瘤菌CA8593具有相同的16S rDNA遗传图谱类型9,在表型性状数值分析中,这2株菌分布在2个相距较远的表观群7和14中。其余10株斜茎黄芪根瘤菌SDW058, SX211a, SDW056, SX251a, NM349, SDW062, SD024, X59, NM179, SDW045分别具有独特的16S rDNA遗传图谱类型,在表型性状数值分析中这10株菌不均匀分布于5个表观群(7, 8, 10, 14, 5)。由以上分析可以看出,16S rDNA PCR-RFLP分析结果与表型性状的数值分析结果有较好的一致性,尤其在较大类群的划分上,两种方法可以相互印证,但也存在一些差异。

总体而言,23S rDNA和16S rDNA PCR-RFLP分析结果具有较好的一致性,但也存在一些差异(表1)。如7株具有相同16S rDNA遗传图谱类型4的斜茎黄芪根瘤菌却分布于3个不同的23S rDNA遗传图谱类型(4, 7, 8);而5株具相同23S rDNA遗传图谱类型12的斜茎黄芪根瘤菌则分布于3个不同的16S rDNA遗传图谱类型(10, 18, 24)中。

## 2.2 建立在16S rDNA和23S rDNA PCR-RFLP分析基础上的系统发育关系

将菌株间的16S rDNA或23S rDNA遗传图谱类型比较结果转化为遗传距离,采用平均连锁法进行聚类分析,得出16S rDNA或23S

rDNA PCR-RFLP聚类分析树状图谱。可以更直观地反映斜茎黄芪根瘤菌的系统发育关系。为了能够得到更可靠,更准确的系统发育结论,通常将两种rDNA分子所含信息叠加在一起进行分析<sup>[2,7]</sup>。本研究中将菌株间的16S rDNA和23S rDNA PCR-RFLP的遗传距离合并在一起进行分析,得出26个综合的遗传图谱类型(表1)和一个综合的聚类分析树状图谱(图3)。在90%的相似性水平上,综合的树状图谱分为5个系统发育分支。

分支①由5个遗传图谱类型(1, 14, 11, 3, 5)的23株斜茎黄芪根瘤菌组成,这5个遗传图谱类型很可能代表同一属内的几个新种。

分支②由3个遗传图谱类型(16, 17, 18)的5株斜茎黄芪根瘤菌组成,它们可能代表同一属内几个不同的新种。

分支③是一个杂合群,由7个遗传图谱类型(8, 15, 20, 21, 22, 23, 25)的斜茎黄芪根瘤菌和已知参比菌*Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium galegae*, *Sinorhizobium saheli*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium huakuii*的模式菌株等组成,在95%的相似性水平上该分支分为6个亚分支。其中亚分支③a由1株遗传图谱类型8的斜茎黄芪根瘤菌X59和1株膜荚黄芪(*A. membracans*)根瘤菌CA8593及*Mesorhizobium huakuii*的模式菌株CCBAU 2609组成,其中的斜茎黄芪根瘤菌X59很可能代表一个新种;③b仅由1株斜茎黄芪根瘤菌NM179组成,该菌株可能代表一个独特的新种;亚分支③c由1株斜茎黄芪根瘤菌SDW056和*S. saheli*的模式菌株USDA4102聚在一起,该菌株可能代表*Sinorhizobium*中的一个新种;亚分支③d中,1株斜茎黄芪根瘤菌SDW024与*R. leguminosarum*, *R. galegae*, *S. meliloti*的模式菌株聚在一起,但它与*R. leguminosarum*的系统发育关系更近,相似性高达98%,该菌株可能代表*Rhizobium*属中的一个新种;亚分支③e,由具不同综合遗传图谱类型(21, 25)的两株斜茎黄芪根瘤菌SS211a, SDW58及1株背扁黄芪(*A. complanatus*)根瘤菌JL84组成,这两个遗传图谱

类型可能代表两个新种; 亚分支③f 仅由 1 株斜茎黄芪根瘤菌 SDW062 组成, 该菌株可能代表一个独特的新种。

分支④为 *Bradyrhizobium* 分支, 由 *B. japonicum*, *B. elkanii* 及 1 株截叶胡枝子根瘤菌 B071 组成。

分支⑤仅由一株斜茎黄芪根瘤菌 SDW045 组成, 该菌株很可能代表一个新属。

以上 5 大系统发育分支中, 4 个分支中都有斜茎黄芪根瘤菌的分布, 说明斜茎黄芪根瘤菌具有极大的系统发育多样性。

本研究中发现, 综合的聚类分析树状图谱中大的系统发育分支的划分与 16S rDNA 和 23S rDNA 树状图谱中的划分基本一致, 而亚分支的划分则不大一致。某些亚分支的划分与 16S rDNA 树状图谱中的划分一致, 另一些亚分支的划分则与 23S rDNA 树状图谱中的划分一致, 但它包含了 16SrDNA 和 23S rDNA 所揭

示的全部系统发育信息。综合的聚类分析树状图谱较 16S rDNA 和 23S rDNA 树状图谱所揭示的菌株间的差异更大。很明显, 综合的聚类分析树状图谱所包含的系统发育信息更多, 它所反映的系统发育关系更可靠。

## 参 考 文 献

- [1] Vandamme P, Pot B, Gillis M, *et al.* Microbiol Rev, 1996, 60: 407~438.
- [2] Terefework Z, Nick G, Suomalainen S *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1998, 48: 349~356.
- [3] 高俊莲, 邱玉慧, 陈文新. 微生物学杂志, 1998, 18: 9~16.
- [4] 高俊莲, 陈文新, Terefework Z 等. 应用与环境生物学报 (已投稿)
- [5] Laguerre G, Allard M R, Revoy F, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 56~63.
- [6] Nei M, Li W H. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269~5273.
- [7] Ludwig W, Rossello-Mora R, Aznar R *et al.* System Appl Microbiol, 1995, 18: 164~188.