

根瘤菌新类群代表菌株的 16S rDNA 全序列测定及其系统发育地位*

谭志远 陈文新

(中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094)

摘要 用双脱氧法测定了一个根瘤菌新类群代表菌株 SH2672 的 16S rDNA 全序列, 将此全序列与根瘤菌各已知种及相关种的 16S rDNA 全序列进行了比较及聚类分析, 得到系统发育树状图。在系统发育树状图中, 菌株 SH2672 与百脉根中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium loti*)、华葵中慢生根瘤菌 (*M. huakuii*)、天山中慢生根瘤菌 (*M. tianshanense*)、地中海中慢生根瘤菌 (*M. mediterraneum*)、鹰嘴豆中慢生根瘤菌 (*M. ciceri*) 共同构成一个分支, 与各已知种的模式菌株 16S rDNA 相似性分别为: 96.3%, 96.4%, 97.2%, 95.1%, 95.6%, 均在 95% 以上, 它们应归属于同一属。且分支内各种间 DNA 同源性低于 70%, 表明它们分别为不同的种, 菌株 SH2672 代表着一个新的根瘤菌种。

关键词 根瘤菌新类群, 16S rDNA 全序列测定, 系统发育地位

随着分子生物学技术的发展, 根瘤菌的分类研究在迅速发展。根瘤菌从以前的 2 属 4 种: 根瘤菌属 (包括豌豆根瘤菌、苜蓿根瘤菌和百脉根根瘤菌) 和慢生根瘤菌属 (大豆慢生根瘤菌) 发展到现在的 4 属 17 种^[1~4]。随着对根瘤菌研究的深入, 发现根瘤菌具有极大的多样性和与寄主关系的复杂性, 如同一株根瘤菌可以在不同种, 甚至不同属的植物上结瘤; 同一种植物可以与不同种、属的植物结瘤。“互接种族”分类的概念早已被打破, 以生理生化为主的分类体系正被以生理生化为基础结合分子生物学技术的分类体系所取代。目前以 DNA-DNA 杂交结合其它生理生化性状为划分种的标准, 种内 DNA-DNA 同源性应 $\geq 70\%$; 以 16S rDNA 序列的相似性为划分属的标准, 属内相似性不低于 95%^[5]。以前对来自黄土高原部分根瘤菌菌株的数值分类及 DNA-DNA 杂交研究, 发现三个新的根瘤菌类群^[5], 这三个新类群与已知根瘤菌种有较大的差异。作者进一步测定了其中一个新类群的代表菌株 SH2672 的 16S rDNA 的全序列, 以确定该类群在系统发育中的地位。

1 材料和方法

1.1 菌株

菌株 SH2672 来源于甘肃省的西峰地区, 寄主为米口袋 (*Gueldenstaedtia multiflora*)。

* 国家自然科学基金“八五”重点资助项目。

本文于 1996 年 9 月 17 日收到。

基因克隆中使用的大肠杆菌菌株为 DH5 α , 质粒载体为 pUC18。

1.2 DNA 的提取

总 DNA 的提取: 菌株用 TY 培养基培养至对数生长期, 5000r/min 离心收集菌体, 用 10mmol/L Tris-HCl 洗涤三次, 溶菌酶破壁, 蛋白酶处理, 酚/氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀, 风干, 最后溶于 TE (10mmol/L Tris-HCl pH7.6, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 中。

1.3 16S rDNA 的扩增和全序列测定

仔细查阅 GenBank 中根瘤菌已知种的 16S rRNA 基因全序列和文献资料^[6,7], 合成六个引物用于扩增 16S rRNA 基因全序列。正向引物 Primer 1: 5'-CGg gat ccA GAG TTT GAT CCT GGC TCA GAA CGA ACG CT-3' (对应于大肠杆菌的第 8~37 碱基位置), 反向引物 Primer 6: 5'-CGg gat ccT AGG GCT ACC TTG TTA CGA CTT CAC CCC-3' (对应于大肠杆菌的第 1479~1506 位置), 其中碱基字母小写的为 BamHI 的酶切位点。其它四个引物序列分别 (对应于大肠杆菌位置) 为: Primer 2: 5'-GCT AGT TGG TGG GGT AA-3', (247~263); Primer 3: 5'-CGT GCC AGC AGC CGC GGT-3', (514~531); Primer 4: 5'-TAG ATA CCC TGG TAG TCC-3', (799~806); Primer 5: 5'-CCG CAA CGA GCG CAA CCC-3', (1097~1115)。以总 DNA 为模板, 用引物 P1, P6 经聚合酶链反应扩增出 16S rDNA。用 BamHI 对 PCR 产物及质粒 pUC18 进行酶切后, 粘端连接, 转化大肠杆菌菌株 DH5 α , 蓝白斑筛选。提取质粒 DNA, 用 [α - P^{32}] dATP 进行标记, 使用六个引物, 进行 PCR 测序反应, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 定向测序^[8]。

1.4 碱基序列资料分析

将测得的 16S rRNA 基因序列与有关菌株的相应序列按照 Saitou 和 Masatoshi 的方法^[9]进行聚类 (PHYLIP 软件包)^[10], 得出系统发育树状图。各菌株的菌号及 16S rRNA 基因全序列在 GenBank 中的索取号 (accession number) 分别是: *Agrobacterium rubi* LMG 156 (X67228), *Agrobacterium tumefaciens* LMG 196 (X67223), *Agrobacterium rhizogenes* LMG 152 (X67224), *Agrobacterium vitis* LMG 8750 (X67225), *Sinorhizobium fredii* LMG 6217 (X67231), *Sinorhizobium meliloti* LMG 6133 (X67222), *Sinorhizobium xinjiangensis* IAM 14142 (D12796), *Sinorhizobium saheli* LMG 7837 (X68390), *Sinorhizobium teranga* LMG 6463 (X68387), *Rhizobium galegae* LMG 6215 (X67226), *Rhizobium leguminosarum* LMG 8820 (X67227), *Mesorhizobium loti* LMG 6125 (X67229), *Rhizobium tropici* B LMG 9518 (X67234), *Rhizobium tropici* A LMG 9517 (X67233), *Rhizobium etli* ATCC 14483 (U47303), *Mesorhizobium huakuii* IAM 14158 (D12791), *Mesorhizobium ciceri* UPM-Ca7 (U07934), *Mesorhizobium mediterraneum* UPM-Ca36 (L38825), *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138 (X66024), *Phyllobacterium myrsinacearum* IAM 13584 (D12789), *Phyllobacterium rubiacearum* IAM 13587 (D12790), *Mycoplana dinorpha* IAM 13154 (D12786), *Mycoplana bullata* IAM 13153 (D12785), *Ochrobacterum anthropi* IAM 14119 (D12794), *Azorhizobium caulinodans* LMG 6465 (X67221), *Bradyrhizobium elkanii* ATCC 49852 (U35000), *Mesorhizobium tianshanense* A-IBS (U71079), *Rhizobium hainanense* I66 (U71078), SH2672 (AF003376), *Bl. denitrificans* LMG8443

(X66025)。

2 结果和讨论

2.1 序列测定结果

菌株 SH2672 的 16S rDNA 全序列(1447bp)见图 1。

AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG AACGAACGCT GGCGGCAGGC TTAACACATG CAAGTCGAGG
GCCCCGCAAG GGGAGCGGCA GACGGGTGAG TAACGCGTGG GAACATACCC TTTCCTGCGG
AAATACTCCG GGAAACTGGA ATTAATACCG CATAACCCCT ACGGGGGA AAA GATTTATCGG
GGAAGGATGG GCCCGCGTTG GATTAGCTAG TTGGTGGGGT AAAGGCCTAC CAAGGCGACG
ATCCATAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACATTGGGA CTGAGACACG GCCCAAACCTC
CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCCATGCC
GCGTGAGTGA TGAAGGCCCT TGGGTTGTAA AGCTCTTTCA ACGGAGAAGA TAATGACGGT
AACCGTAGAA GAAGCCCCGG CTAAC TTCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GAAGGGGGCT
AGCGTTGTTT GGAATTACTG GCGGTAAAGC GCACGTAGGC GGATGTTTAA GTTAGGGGTG
AAATCCAGG GCTCAACCCT GGAAGTGCCT TTAATACTGG GTATCTCGAG TCCGGAAGAG
GTGAGTGGA TTCCGAGTGT AGAGGTGAAA TTCGTAGATA TTCGGAGGAA CACCAGTGGC
GAAGGCGGCT CACTGGCTCG GTACTGACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG
ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA CGATGAAGCT TAGCCGTTGG CAAGTTTACT
TGTCGGTGGC GCACGTAACG CATTAAGCAT TCCGCCTGGG GAGTACGGTC GCAAGATTAA
AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCGCACAA GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTCGAAGCA
ACGCGCAGAA CCTTACCAGC CCTTGACATC CCGGTCGCGG TTTCCAGAGA TGGATTCTTT
CAGTTCCGCT GGCCGGTGAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT
TGGGTAAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT CGCCCTTAGT TGCCAGCATT AAGTTGGGCA
CTCTAAGGGG ACTGCCGGTG ATAAGCCGAG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT
GGCCCTTACG GGCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGTGG TGACAGTGGG CAGCGAGACA
GCGATGTCGA GCTAATCTCC AAAAGCCATC TCAGTTCGGA TTGCACTCTG CAACTCGAGT
GCATGAAGTT GGAAGCGCTA GTAATCGCAG ATCAGCATGC TGCGGTGAAT ACGTTCCCGG
GCCTTGTA CAACGCCCCGT CACACCATGG GAGCTGGTTA TACCCGAAGG TATTGTGCTA
ACCGCAAGGA GGCAGGCGAC CACGGTAGGG TCAGCGACTG GGGTGAAGTC GTAACAAGGT
AGCCGTA

图1 新类群代表菌株SH2672的16S rDNA全序列

Fig.1 The full-length 16S rDNA sequences of representative strain SH2672

2.2 16S rDNA 序列的相似性比较和系统发育

将所测序列与根瘤菌已知种及相关种进行比较,得出 16S rDNA 相似性矩阵(图 2),聚类采用 Saitou 和 Nei 的方法进行^[9],用 DRAWTREE 软件(PHYLIP version 3.572c)^[10]得到系统发育的无根树状图(图 3)。图 3 中,新类群代表菌 SH2672 与百脉根中慢生根瘤菌(*M. loti*)、华癸中慢生根瘤菌(*M. huakuii*)、天山中慢生根瘤菌(*M. tianshanense*)、地中海中慢生根瘤菌(*M. mediterraneum*)和鹰嘴豆中慢生根瘤菌(*M. ciceri*)亲缘关系较近,共同构成一个分支,与该分支内各已知种模式菌株的 16S rDNA 相似性分别为: 96.3%,96.4%,97.2%,

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1. <i>A. rhizogenes</i>																													
2. <i>A. rubi</i>	93.8																												
3. <i>A. tumefaciens</i>	94.6	98.6																											
4. <i>A. vitis</i>	94.4	94.8	95.4																										
5. <i>Az. caulnodans</i>	89.8	89.9	89.5	89.3																									
6. <i>S. fredii</i>	95.7	94.6	95.3	94.5	89.9																								
7. <i>R. galegae</i>	95.1	94.9	95.2	96.2	89.7	94.1																							
8. <i>R. leguminosarum</i>	98.1	93.4	94.2	93.9	90.1	95.0	95.9																						
9. <i>M. loti</i>	93.7	93.6	93.1	93.3	89.7	95.1	93.7	93.3																					
10. <i>S. melliloti</i>	96.1	94.3	94.9	94.1	89.9	98.8	94.1	95.2	95.6																				
11. <i>R. tropici</i> A	99.4	93.8	94.6	93.9	89.6	95.6	94.8	97.8	93.4	95.9																			
12. <i>R. tropici</i> B	99.3	93.6	94.5	94.1	89.9	95.6	94.9	98.0	93.5	95.6	99.1																		
13. <i>R. hainanense</i>	96.5	93.3	94.1	93.9	89.8	95.2	95.4	96.9	92.6	95.3	96.4	96.3																	
14. SH2672	93.1	94.3	94.5	93.2	89.2	95.2	93.5	92.5	96.3	95.3	92.9	92.9	93.4																
15. <i>M. tianshanense</i>	93.7	94.9	94.4	93.9	89.7	95.5	94.6	93.1	97.4	95.4	93.4	93.5	92.7	97.2															
16. <i>S. saheli</i>	94.9	94.3	94.7	94.1	89.4	98.1	93.7	94.4	95.1	97.3	94.7	94.5	94.4	94.9	95.3														
17. <i>S. teranga</i>	94.6	94.1	94.3	94.1	90.0	97.9	93.7	94.1	94.3	97.4	94.7	94.5	94.1	94.0	93.9	94.5	97.8												
18. <i>B. japonicum</i>	87.9	87.1	87.2	86.5	88.5	88.6	87.9	88.1	88.6	88.6	87.9	88.0	88.4	88.1	88.0	88.7	87.9												
19. <i>M. ciceri</i>	93.2	93.0	92.6	92.9	89.1	94.4	93.2	92.8	98.2	94.3	92.9	93.0	92.2	95.1	96.4	94.2	93.3	88.2											
20. <i>M. mediterraneum</i>	93.2	93.4	92.9	93.3	90.1	94.1	93.6	92.8	96.7	93.8	92.9	93.1	91.7	94.5	96.4	93.9	94.6	87.9	97.9										
21. <i>Bl. denitrificans</i>	89.1	88.2	88.2	87.5	88.1	89.4	88.6	88.7	88.4	88.6	88.7	88.9	88.5	88.4	88.7	89.6	88.7	97.4	88.4	88.6									
22. <i>My. dimorpha</i>	94.4	94.7	94.4	90.9	96.9	94.1	94.0	95.9	96.1	94.1	93.8	95.9	96.4	96.7	95.6	88.6	95.1	95.0	89.9										
23. <i>My. bullata</i>	93.9	93.7	93.3	92.5	91.2	95.6	92.7	93.8	93.9	95.0	94.2	94.1	93.6	93.5	94.2	94.9	94.9	89.1	92.8	92.9	89.8	96.1							
24. <i>Ph. myrsinacearum</i>	94.1	93.1	93.1	92.8	90.6	96.0	92.6	93.8	96.7	95.6	93.7	93.9	92.9	93.9	95.1	95.6	94.9	88.4	95.8	95.1	88.5	96.1	94.7						
25. <i>Ph. rubiacearum</i>	93.8	93.0	92.9	92.6	90.4	95.9	92.4	93.4	96.6	95.5	93.4	93.6	92.6	93.8	95.0	95.7	94.7	88.2	95.6	95.0	88.4	95.9	94.6	99.9					
26. <i>M. huakuii</i>	93.9	94.1	93.6	93.9	90.4	95.9	94.1	93.3	98.2	95.5	93.6	93.7	92.9	96.4	97.9	95.9	94.8	88.6	97.4	97.5	89.3	97.1	94.9	96.6	96.5				
27. <i>S. xinjiangensis</i>	95.8	94.6	95.2	94.6	89.9	99.8	94.2	95.1	95.2	98.9	95.7	95.4	95.3	95.4	95.3	98.3	98.1	88.9	94.6	94.4	89.6	97.1	95.8	96.2	96.1	96.1			
28. <i>Och. anthropi</i>	87.9	88.0	88.1	88.3	88.4	87.9	89.2	88.1	87.3	87.1	88.0	88.1	88.4	86.6	87.4	87.3	87.4	87.1	87.0	87.4	88.1	88.4	87.7	87.4	87.1	87.9			
29. <i>B. elkamii</i>	87.6	87.6	87.6	87.0	88.6	89.1	87.9	87.4	88.8	89.8	88.6	87.9	87.1	88.4	89.0	89.4	90.1	95.5	88.0	89.6	95.3	89.5	90.1	88.7	88.6	89.4	89.3	87.1	
30. <i>R. elii</i>	96.4	92.9	93.7	93.1	89.4	95.3	93.9	96.6	93.7	95.4	96.2	96.1	96.0	93.4	93.7	95.1	94.6	89.0	92.9	92.9	89.4	94.8	94.9	93.6	93.5	94.0	95.5	87.9	88.8

图2 根瘤菌、土壤杆菌及相关种的16S rDNA相似性

Fig.2 Similarity values of 16S rDNA sequences among rhizobia, agrobacteria, and related bacteria

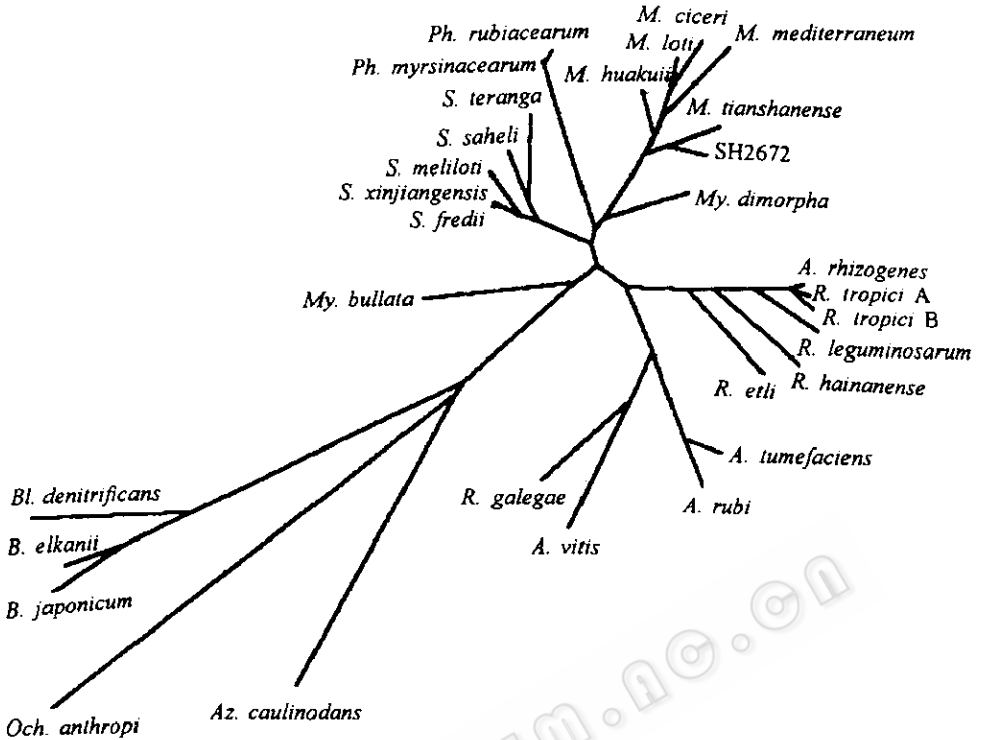


图3 无根树状图(PHYLIP, version 3.572c)

Fig.3 Unrooted tree(PHYLIP, version 3.572c)

Abbreviations: R.=Rhizobium; My.=Mycoplana; S.=Sinorhizobium; Och.=Ochrobactrum;
A.=Agrobacterium; Az.=Azorhizobium; Ph.=Phyllobacterium; B.=Bradyrhizobium,
M.=Mesorhizobium; Bl.=Blastobacter.

95.1%, 95.6%, 均在 95% 以上。分支内各种间 DNA-DNA 同源性低于 70%^[5], 根据 Martinez-Romero E. (1996) 等建议的分类标准^[2], SH2672 所在的这一分支应归属于同一个属, 此属已在发表之中, 属名为中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium*)^[14], 菌株 SH2672 所代表的根瘤菌类群为该属的一个新种。新疆中华根瘤菌 (*Sinorhizobium xinjiangensis*)、弗氏中华根瘤菌 (*S. fredii*)、苜蓿中华根瘤菌 (*S. meliloti*)、萨赫尔中华根瘤菌 (*S. saheli*)、多寄主中华根瘤菌 (*S. teranga*) 构成一个分支, 此分支由 De Lajudie P. 等 (1994) 提出^[9], 分支内各种群间 16S rDNA 相似性在 97.8% 以上。发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*)、热带根瘤菌的两个生物型 (*R. tropici* A, *R. tropici* B)、豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*)、菜豆根瘤菌 (*R. etli*) 和海南根瘤菌 (*R. hainanense*) 共同构成了一个分支, 分支内种群间的相似性在 96% 以上。葡萄土壤杆菌 (*A. vitis*) 与山羊豆根瘤菌 (*R. galegae*) 亲缘关系较近, 它们与根瘤土壤杆菌 (*A. tumefaciens*)、悬钩子土壤杆菌 (*A. rubi*) 共同构成一个分支, 种群间的 16S rDNA 相似性在 94.9% 以上。土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 与根瘤菌属 (*Rhizobium*) 的种在系统发育上互有交叉, 已有一些学者建议将两属打破界线, 重新划分^[11~13]。慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 的两个种 (*B. japonicum*, *B. elkanii*) 在 95% 的相似性水平上构成一个分支。

参 考 文 献

- [1] Jordan D C. Bergey's Manual Systematic Bacteriology. Baltimore: The William and Wilkins Co, 1984. 234~242.
- [2] Martínez-Romero E, Caballero-Mellado. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1996, 15(3): 113~140.
- [3] Nour S M, Cleyet-Marel J C, Normand P *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45(4): 640~648.
- [4] Xu L M, Ge C, Cui Z *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45(4): 706~711.
- [5] 谭志远, 朱铭莪, 程丽娟, 等. 微生物学报, 1995, 35(3): 223~228.
- [6] Miyoko Y, Yamasato K. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 107: 115~120.
- [7] Jongsik Chun, Goodfellow M. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45(2): 240~245.
- [8] 萨母布鲁克 J, 弗里奇 M F, 曼尼阿蒂斯 T 著(金冬雁, 等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992. 602~633.
- [9] Saitou N, Masatoshi N. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406~425.
- [10] Felsenstein J, PHYLIP-(Phylogeny Inference Package). Distributed by the author. Seattle: Department of Genetics, University of Washington. 1993. version 3.572c.
- [11] De Lajudi P, Willems A, Bruno P *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44(4): 713~733.
- [12] Willems A, Collins M. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43(2): 305~313.
- [13] Sawada H, Leki H, Oyaizu H *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43(6): 694~701.
- [14] Jarvis B D, van Berkum W P, Chen W X *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 41(3): (in press).

SEQUENCING THE 16S rDNA OF REPRESENTATIVE STRAIN OF NEW RHIZOBIAL GROUP AND DETERMINING OF ITS PHYLOGENETIC RELATIONSHIP

Tan Zhiyuan Chen Wenxin

(College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract The full-length 16S rDNA sequence of representative strain SH2672 were sequenced by the dideoxy-mediated chain-termination method. This sequence was compared with that of type strains of all known rhizobia and related bacteria. An unrooted phylogenetic tree was produced. In this tree, strain SH2672, *Mesorhizobium loti*, *M. huakuii*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum*, and *M. ciceri* constituted a branch. Within this branch, the similarity values of 16S rDNA sequences between strain SH2672 and *M. loti*, *M. huakuii*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum* and *M. ciceri* were 96.3%, 96.4%, 97.2%, 95.1% and 95.6% respectively. All similarity values was more than 95%, this indicated that these species should belong to the same genus. The values of DNA-DNA homology between type strains of these species were less than 70%, which showed that strain SH2672 (representative strain of new group) represented a new rhizobial species.

Key words New rhizobial group, Sequencing the 16S rDNA, Phylogenetic relationship