

rRNA 基因间隔区序列用于亲缘关系密切的根瘤菌种群鉴定及系统发育分析

彭桂香¹, 陈文新², 谭志远³

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 中国农业大学 生物学院, 北京 100094;

3 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要: 通过 rRNA 基因内转录间隔区的碱基序列分析, 对中华根瘤菌属 *Sinorhizobium*、慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 和中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium* 种间亲缘关系十分密切的菌株进行区分。结果表明, rRNA 基因间隔区序列能很好地区分种间亲缘关系十分密切的菌株。用 rRNA 基因间隔区序列构建的系统发育树与 rRNA 基因序列构建的系统发育树结果十分相似。

关键词: rRNA 基因间隔区序列; 根瘤菌; 系统发育

中图分类号: Q939.114

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2004) 04-0058-05

Identification and phylogenetic analysis of closely related rhizobium species by rRNA gene intergenic spacer sequence

PENG Gui-xiang¹, CHEN Wen-xin², TAN Zhi-yuan³

(1 College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

3 College of Agriculture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Phylogenetic closely related species from *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Mesorhizobium* were studied by analysis of rRNA gene intergenic spacer sequence. The results indicated that sequences of rRNA gene intergenic spacer would clarify the closely related species. The phylogenetic tree constructed by sequence of 16S-23S rRNA gene intergenic spacer is very similar with that of 16S rRNA gene sequence.

Key words: rRNA gene intergenic spacer sequence; rhizobium; phylogeny

根瘤菌在细菌的系统发育体系中位于变形杆菌门 Proteobacteria 中的 α -纲, 分布于根瘤菌目 Rhizobiales 5 个科的 7 个属中^[1-6]。近几年在 β -纲的 *Burkholderia*^[7, 8] 和 *Ralstonia*^[9, 10] 2 个属中也发现了根瘤菌。在中华根瘤菌属 *Sinorhizobium*、慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 和中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium* 中, 由于 16S rRNA 基因序列进化上的高度保守性, 属内种之间的系统发育地位亲缘关系十分密切, 用保守的 16S rRNA 基因序列区分不开。16S-23S rRNA 基因间隔区序列具有一定变异性, 可以作为精细的分子指标, 用于一些亲缘关系十分密切的种群

分类、鉴定和系统发育学研究^[11]。在医学上应用 rRNA 基因间隔区序列对于病原微生物进行分子标记和鉴定较多^[12-14]。已有报道利用 rRNA 基因间隔区序列对快生根瘤菌^[15] 和慢生根瘤菌^[16-18] 进行过研究, 我们对中慢生根瘤菌中亲缘关系十分密切种的 16S-23S rRNA 基因间隔区序列进行了测定, 用 rRNA 基因间隔区序列对快生根瘤菌属、慢生根瘤菌属、中华根瘤菌属和中慢生根瘤菌属及相关属、种进行分析, 构建了系统发育树, 获得了区分它们的精细分子指标, 用于其分子鉴定。

收稿日期: 2004-05-12

作者简介: 彭桂香(1968-), 女, 讲师, 硕士。通讯作者: 谭志远(1968-), 男, 教授, 博士。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300001 和 30270001); 华南农业大学校长基金资助项目(4100-K03113)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 供试菌株

紫穗槐中慢生根瘤菌 *Mesorhizobium amorphae* ACCC19665, 百脉根中慢生根瘤菌 *M. loti* NZP2213, 地中海中慢生根瘤菌 *M. mediterraneum* USDA3392 和 鹰嘴豆中慢生根瘤菌 *M. ciceri* USDA3378. 寄主和来源地见文献 [1].

1.2 菌体培养

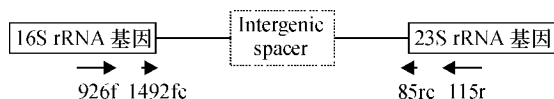
供试菌株经 Rhizobium-Medium (Yeast Mannitol) 斜面活化后, 接种于 5 mL Rhizobium-Medium 培养液中振荡培养. Rhizobium-Medium 培养基构成: Döbereiner-basic 溶液 (MgSO₄ 20.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, CaCl₂ 2.6 g/L, MnSO₄·2H₂O 1.0 g/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.2g/L) 10.0 mL/L, 6.6 g/L Fe-EDTA 溶液 (Na₂EDTA 3.72 g/L, FeSO₄·7H₂O 2.78 g/L) 10.0 mL/L; Yeast extract 0.5 g/L, Mannitol 10.0 g/L, 缓冲液 (KH₂PO₄ 146.2 g/L, K₂HPO₄ 187.1 g/L; pH 6.8, 单独灭菌) 1.5 mL/L, 乙醇 6.0 mL/L (过滤灭菌). 28 °C 培养, 镜检, 确定无杂菌污染后收集菌体.

1.3 菌体收集及 DNA 提取

用 1.5 mL eppendorf 管离心收集菌体 (4 °C, 5 000 r/min, 8 min) 后, 用 TE (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 悬浮菌体, 离心洗涤 1 次. 加入 200 μL TE (pH 8.0), 5 μL 溶菌酶 (10 mg/mL), 振荡混匀 (37 °C 30 min). 再加入 200 μL N-十二烷基肌氨酸钠 (50 g/L) 溶解在 TE 中, 60 °C 振荡 30 min. 加入等体积的 Tris 饱和酚/氯仿 (1:1) 混匀 → 离心 → 取上清 → 上清加等体积异丙醇沉淀 DNA → DNA 用体积分数为 75% 乙醇洗涤 → 晾干 → 溶于 TE^[19].

1.4 PCR 引物和测序引物的设计

从 GenBank 中将根瘤菌目的 16S rRNA 基因和 23S rRNA 基因序列进行比对分析, 根据 16S rRNA 基因和 23S rRNA 基因序列高度保守性, 设计 2 对简并引物用于 PCR 扩增和序列测定. 正向引物 926f [5'-GGT TAA AAC T(C/T)A AA(G/T) GAA TTG ACG G-3', 对应大肠杆菌 16S rRNA 基因位置 901~926], 和反向引物 115r/23S [5'-CCG GGT T(T/G/C)C CCC ATT CCG-3', 对应大肠杆菌 23S rRNA 基因位置 97~115] 用于 16S-23S rRNA 基因间隔区扩增. 5'-末端 Cy-5 标记的测序引物为 1492fc [5'-AAG TCG TAA CAA GGT A(A/G)C CGT-3', 对应大肠杆菌 16S rRNA 基因位置 1471~1492] 和 85rc/23S [5'-CCC CAC GGC TT(A/T) TCG CA(A/G) CGT ATC AC-3', 对应大肠杆菌 23S rRNA 基因位置 59~85]^[11]. 各引物的相对位置示意图如下:



1.5 PCR 反应条件及序列测定

PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 56 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环. 72 °C 再延伸 5 min. PCR 产物经纯化后, 直接在 ALFexpress 自动测序仪 (Amersham pharmacia Biotech 生产) 上用 Cy-5 标记的 1492fc/16S 和 85rc/23S 两个引物分别从产物的两端进行测序. 菌株 ACCC19665 (*M. amorphae*), NZP2213 (*M. loti*), USDA3392 (*M. mediterraneum*) 和 USDA3378 (*M. ciceri*) 所测间隔区序列已被 GenBank 接受, 其索取号分别为 AY574918、AY574916、AY574919 和 AY574917.

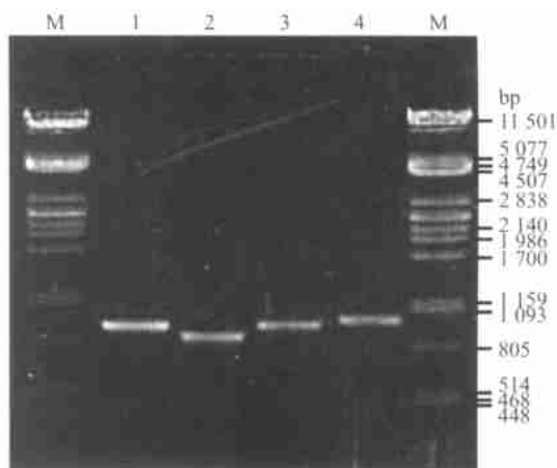
1.6 序列分析

将以上所测序列与 GenBank 中其他相关菌株 16S rRNA 基因序列及其相应间隔区序列采用 CLUSTALX 进行多序列比对. 再用 Treeconw 软件进行系统发育分析并构建系统发育树.

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物

用引物 926f 和 115r/23S 分别对 4 株菌的 rRNA 基因间隔区序列进行扩增, 扩增产物用 11 g/L 琼脂糖电泳, 结果如图 1. 图 1 中可见, 菌株 USDA3378、



M: λDNA/pstI marker; 1~4: 分别为菌株 USDA3378, ACCC19665, NZP2213, USDA3392 的 rRNA 基因间隔区 PCR 产物

M: marker, λDNA digested with pstI; 1-4: products of rRNA gene intergenic spacer amplified from strain USDA3378, ACCC19665, NZP2213, USDA3392, respectively

图 1 rRNA 基因间隔区 PCR 产物琼脂糖电泳

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis pattern of rRNA gene intergenic spacer amplified by PCR

ACCC19665、N/ZP2213 和 USDA3392 的 rRNA 基因间隔区 PCR 产物大小并不完全一致,表现出差异性. 菌株 ACC19665 的 rRNA 基因间隔区片段稍少,菌株 USDA3392 的 rRNA 基因间隔区片段较大,而菌株 USDA3378 和 N/ZP2213 的 rRNA 基因间隔区片段大小接近.

2.2 序列分析及系统发育

16S-23S rRNA 基因间隔区的长度因不同的属、种和菌株的不同而不同. 如慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium* rRNA 基因间隔区序列长度一般为 800~900 bp, 内含异亮氨酸和丙氨酸 tRNA 基因; 而快生根瘤菌

Rhizobium rRNA 基因间隔区序列长度变化较大,一般为 600~1350 bp, 内含异亮氨酸和丙氨酸 tRNA 基因; 但枯草杆菌 *Bacillus subtilis* rRNA 基因间隔区就缺乏 tRNA 基因序列^[20]. 我们获得 4 株中慢生根瘤菌 ACCC19665 (*M. amorphae*)、N/ZP2213 (*M. loti*)、USDA3392 (*M. mediterraneum*)和 USDA3378 (*M. ciceri*)的 rRNA 基因间隔区序列分别为 823 bp、883 bp、925 bp 和 872 bp, 其序列长度变化范围不如快生根瘤菌大. 4 株中慢生根瘤菌 rRNA 基因间隔区内也含有异亮氨酸和丙氨酸 tRNA 基因(图 2). 图 2 中的序列

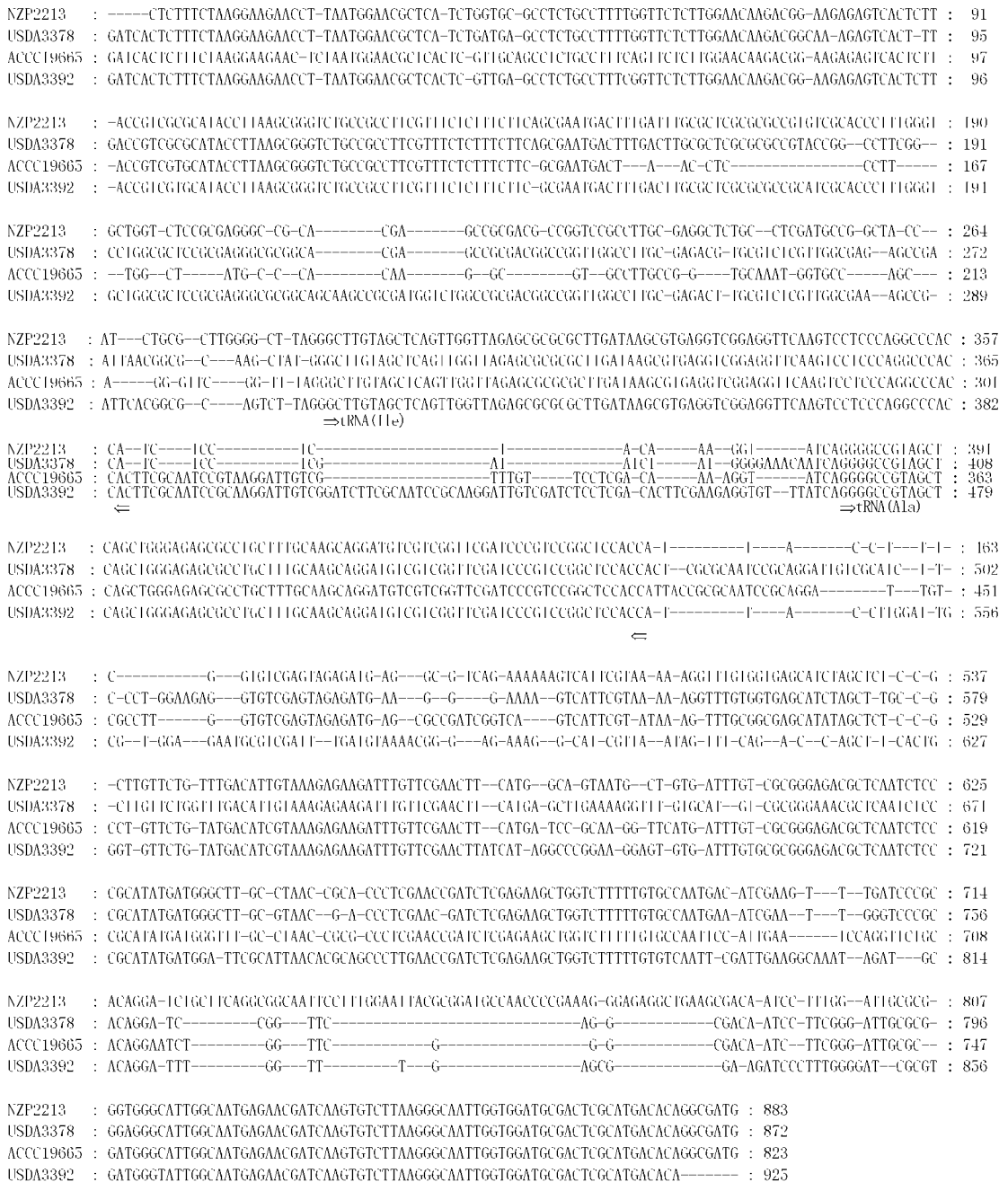


图 2 四株中慢生根瘤菌 ACCC19665 (*M. amorphae*)、N/ZP2213 (*M. loti*)、USDA3392 (*M. mediterraneum*)和 USDA3378 (*M. ciceri*)的 rRNA 基因间隔区序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of four *Mesorhizobium* strains ACCC19665 (*M. amorphae*), N/ZP2213 (*M. loti*), USDA3392

(*M. mediterraneum*) and USDA3378 (*M. ciceri*)

对比显示,有几个可变区可适合各菌株的特异探针设计,这也为以后对这些菌株的鉴定和检测奠定了基础.我们将所测序列与 GenBank 中根瘤菌相关属、种的 rRNA 基因间隔区序列进行聚类分析,结果见图 3.

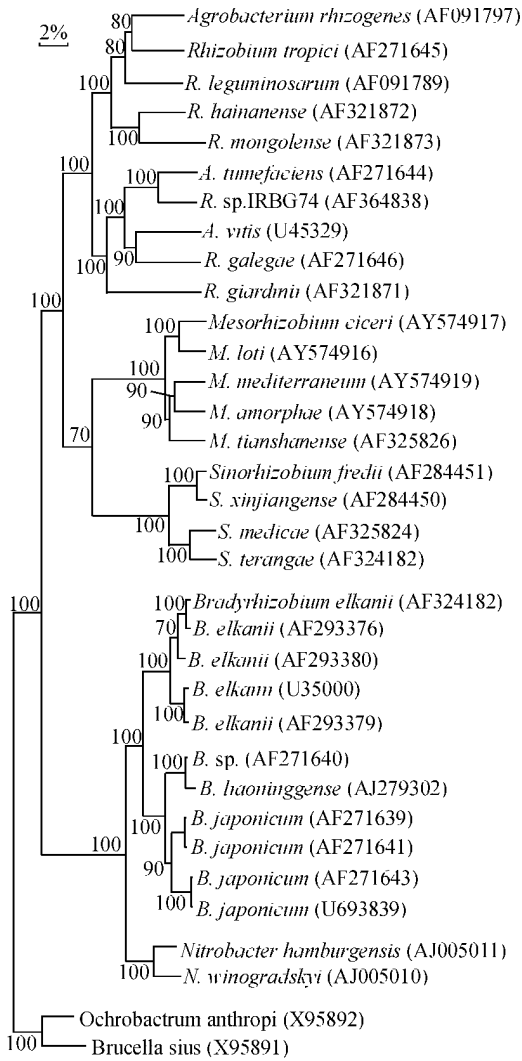


图 3 rRNA 基因间隔区构建的根瘤菌及相关属、种的系统发育图(括号中的数字为各序列在 GenBank 中索取号)

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by rRNA gene intergenic spacer sequence of *Rhizobium* species and closely related species (GenBank accession number showed in parentheses)

图 3 中, *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Mesorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 分别聚类成群,得到 bootstrap 分析 100%支持. 属内各种分别聚类成亚群,得到 bootstrap 分析 70%以上支持. 为了便于比较,我们将相关菌的 16S rRNA 基因序列进行分析,得到 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树状图(图 4),相应的属、种分别聚类成群,得到 bootstrap 分析 54%以上支持. 由 rRNA 基因序列构建的各种、属间亲缘关系与图 3 中 rRNA 基因间隔区序列构建的种、属间亲缘关系十分类似. 说明 rRNA 基因间隔区序列不仅可以用于区分种间亲缘关系十分密切的菌株,还可以应用于构建种、属间系统发育树.

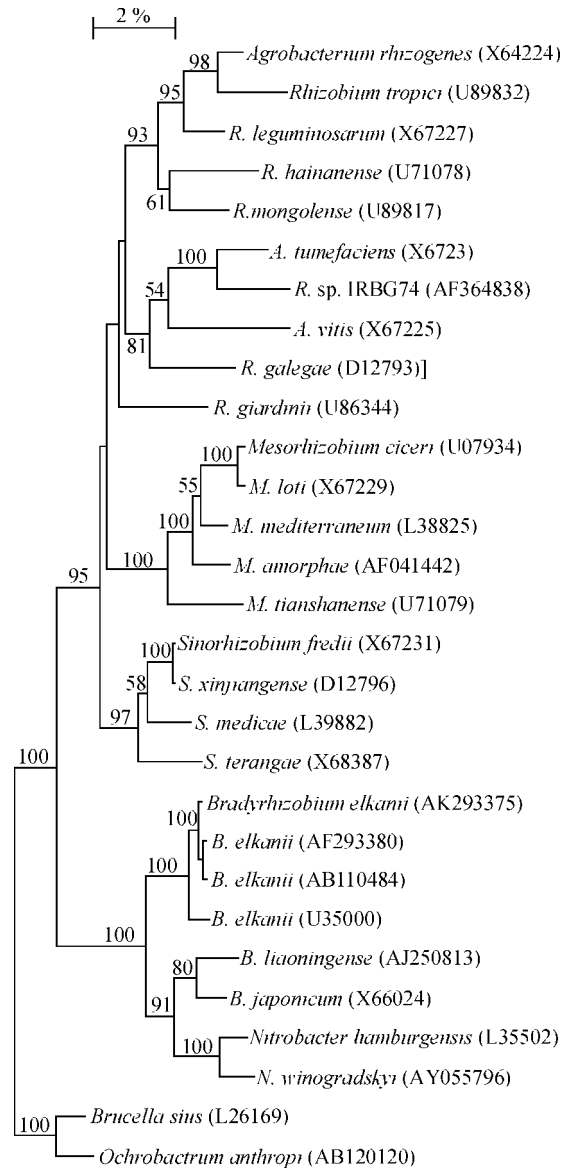


图 4 16S rRNA 基因构建的根瘤菌及相关属、种的系统发育图(括号中的数字为各序列在 GenBank 中索取号)

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed by 16S rRNA gene sequence of *Rhizobium* species and closely related species (GenBank accession number showed in parentheses)

3 讨论

由于 rRNA 基因序列在不同细菌个体中的差异及个体内拷贝数不同,如慢生根瘤菌一般只有 1 个拷贝^[21],快生根瘤菌一般多于 1 个拷贝, rRNA 基因间隔区又具有可变性,间隔区的 PCR 产物能否直接用于测序?通过文献检索证实, rRNA 基因间隔区序列在同一菌株内不同拷贝之间也是保守的,如大肠杆菌 7 个拷贝之间间隔区序列只有 2~12 bp 差异^[22]; *Rhizobium* sp. IRBG74 的 4 个拷贝之间间隔区序列只有 2~9 bp 差异^[11], rRNA 基因间隔区序列差异性主要表现在不同菌株之间. 基于这些结果,我们可以直接对 rRNA 基因间隔区 PCR 产物进行测序.

虽然 DNA-DNA 杂交是定种的一项主要指标, 但 rRNA 基因序列同源性非常高 (> 99%) 时, 系统发育的分子指标就很难界定 2 个种的相对位置. 在 rRNA 基因序列构建的树状图中, 一些亲缘关系密切的属、种如 *Nitrobacter* 和 *Bradyrhizobium*、*M. ciceri* 和 *M. loti*、*S. fredii* 和 *S. xinjiangense* 获得较好的显示. *M. ciceri* 和 *M. loti* 16S rRNA 基因有 99.4% 的同源性, 而它们的 rRNA 基因间隔区序列只有 80% 的同源性; *S. fredii* 和 *S. xinjiangense* 16S rRNA 基因有 99.8% 的同源性, 它们的 rRNA 基因间隔区序列只有 95% 的同源性. 更多 rRNA 基因间隔区序列的获得, 也可为我们提供不同种或不同菌株间的特定分子标记 (探针). 一般地, 当我们研究亲缘关系较远的种 (菌株) 时, 可用保守区序列的同源性进行比较而确定它们的系统发育地位; 当研究亲缘关系较近的种时, rRNA 基因间隔区序列作为一项精细的分子指标, 可以补充因 rRNA 基因序列同源性高, 而不能界定系统发育位置关系十分密切的种 (菌株).

参考文献:

- [1] CHEN W X, YAN G H, LI J L. Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen nov [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, 38: 392—397.
- [2] de LAJUDIE P, LAURENT-FULELE E, WILLEMS A, et al. Description of *Alorhizobium undicola* gen nov sp nov, for nitrogen fixing bacteria efficiently nodulating *Neptunia natans* in Senegal [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48: 1 277—1 290.
- [3] JARVIS B D W, van BERKUM P, CHEN W X, et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen nov [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47: 895—898.
- [4] JORDAN D C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen nov. A genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1982, 32: 136—139.
- [5] DREYFUS B, GARCIA J L, GILLIS M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen nov, sp nov, a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata* [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, 38: 89—98.
- [6] SY A, GIRAUD E, JOURAND P, et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183: 214—220.
- [7] MOULIN L, MUNIVE A, DREYFUS B, et al. Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria [J]. *Nature*, 2001, 411: 948—950.
- [8] SAWADA H, KUYKENDALL L D, YOUNG J M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2003, 49: 155—179.
- [9] CHEN W M, MOULIN L, BONTEMPS C, et al. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185: 7 266—7 272.
- [10] CHEN W M, LAEVEENS S, LEE T M, et al. *Ralstonia taiwanensis* sp nov isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 1 729—1 735.
- [11] TAN Z, HUREK T, VINUESA P, et al. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 3 655—3 664.
- [12] 王 玲, 张才军. 结核分支杆菌的实验诊断新技术 [J]. *临床荟萃*, 2003, 18 (5): 293—296.
- [13] 陈 舸, 严延生. 肺炎支原体分子基因检测及分型研究的新方法 [J]. *海峡预防医学杂志*, 2002, 8 (3): 33—35.
- [14] 周 惠, 屈良鹄, 陈月琴, 等. 肠炎沙门氏菌 2 种 rDNA 16S-23S 基因间隔区序列分析 [J]. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1997, 36 (5): 74—77.
- [15] de OLIVEIRA V M, COUTINHO H L C, SOBRAL B W S, et al. Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 28: 137—141.
- [16] van BERKUM P, FUHRMANN J J. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50: 2 165—2 172.
- [17] VINUESA P, RADEMAKER J L W, de BRUIJN F J, et al. Characterization of *Bradyrhizobium* spp strains by RFLP analysis of amplified 16S rDNA and rDNA intergenic spacer regions [A]. MARTINEZ-ROMERO E, HERNANDEZ G. Highlights of nitrogen fixation research [C]. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. 275—279.
- [18] WILLEMS A, COOPMAN R, GILLIS M. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 623—632.
- [19] REINHOLD-HUREK B, HUREK T. Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus sensu lato* and description of three new genera and new species *Azovibrio restrictus* gen nov sp nov, *Azospira oryzae* gen nov sp nov and *Azonexus fungiphilus* gen nov sp nov [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50: 649—659.
- [20] FOX K F, FOX A, NAGPAL M, et al. Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella* spp pathogenic for humans by carbohydrate profiles [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 3 217—3 222.
- [21] KUENDING C, BECK C, HENNECKE H, et al. A single rRNA gene region in *Bradyrhizobium japonicum* [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177: 5 151—5 154.
- [22] PERNA N T, PLUNKETT G, BURLAND V, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Nature*, 2001, 409 (6 819): 529—533.

【责任编辑 周志红】