

慢生根瘤菌 16S-23S rDNA IGS 的 RFLP 分析*

李俊 曹凤明 李力 樊蕙 杨苏声**

(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)

摘要 本文对慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 3 个已知种及从 10 种豆科植物中分离的 32 株慢生根瘤菌进行了 16S-23S rDNA IGS 的 RFLP 分析。IGS 的 PCR 产物电泳只出现一条 rDNA 片段,但表现在长度上菌株间有一定差异,大小在 930~1050bp 之间,可大致划分为 IGSa、IGSb 和 IGS_c 3 种。用 4 种四碱基识别序列的限制性内切酶 AluI、HaeIII、HinfI 和 MspI 酶解 IGS rDNA,综合得到 26 种 IGS-RFLP 类型。每一种酶可产生 6~12 种不同的酶切图谱。结果表明这一方法能很好区分、鉴别慢生根瘤菌,也支持该技术是一种快速、简单、准确及重复性好的微生物鉴定手段。

关键词 慢生根瘤菌, 16S-23S rDNA IGS, RFLP

分类号 Q939 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0184-188

GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF BRADYRHIZOBIUM STRAINS BY PCR-RFLP ANALYSIS OF 16S-23S rDNA INTERGENIC SPACERS (IGS)*

Li Jun Chao Fengming Li Li Fan Hui Yang Susheng**

(Key Laboratory of Plant Nutrition, Soils and Fertilizers Institute, CAAS, Beijing 100081)

Abstract Characterization of 32 bradyrhizobial strains was performed by 16S-23S rDNA intergenic spacer (IGS) RFLPs. These strains were isolated from nodules of 10 species of leguminous plants and several strains of three known *Bradyrhizobium* species were included. The IGS regions of all strains were amplified with primers FGPS1490 and FGPL132' and yielded single bands (IGS rDNA) ranging from 930 to 1050 bp as estimated by comparison with marker. The majority sizes of IGS rDNA were between 930 bp and 970bp. Four 4-base-cutting restriction endonucleases, AluI, MaeIII, HinfI, and MspI, were used to digest the IGS rDNA. Six to 12 distinct restriction patterns, with one to five restricted fragments per pattern, were detected with each enzyme. Twenty-six different combinations of restriction patterns, representing 26 rDNA IGS types or genotypes, were recorded among 32 bradyrhizobial strains. The results supported that this technique is a powerful tool for the genotypic identification of *Bradyrhizobium* strains.

Key words Bradyrhizobia, 16S-23S rDNA IGS, RFLP

16S-23S rDNA IGS (Intergenic Spacer) 是指位于 16S rRNA 基因和 23S rRNA 基因之间的间

隔区域。与 16S 和 23S rRNA 基因比较,其间的 IGS 区域具有更高的变异性^[1],表现出长度和序列

* 欧盟合作项目 ERBIC18CT960103, 由欧共体提供资助。

The research was funded by the European Community Project, INCODC contract n° ERBIC18CT960103.

** 联系人: 中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094

1998-09-15 收稿, 1999-02-12 修回

上的多态性。近年来已逐渐用于微生物种水平以下的鉴定、分类,结果都证明 IGS 是一个良好的遗传标记^[2~4]。由于 16S-23S rDNA IGS 的 RFLP 分析具有快速、简单、准确及重复性好等的优点,已被引起重视。这一分析方法是选用一对包含 16S-23S rDNA IGS 区域在内的两端某一段保守序列为引物,PCR 扩增得到 IGS 的 rDNA 片段,用限制性内切酶消化进行 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism 限制性片段长度多态性)分析,即根据电泳后比较酶切片段的长度和数目,达到区分鉴别菌种的目的^[5]。

目前,根瘤菌的 16S-23S rDNA IGS 的

RFLP 分析国内外尚未见更多的文献报道^[3,6]。本研究选择从不同植物根瘤中分离的慢生根瘤菌进行 16S-23S rDNA IGS 的 RFLP 分析,探讨该技术在这类根瘤菌中的鉴别、分类效果以及更为广泛的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及其培养:供试的 32 株慢生根瘤菌列在表 1。包括 5 株属于已知慢生根瘤属 (*Bradyrhizobium*) 3 个种的菌株,以及现还未正式命名的慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium* spp.) 27

表1 供试菌株一览表

菌株	分离宿主	分离地	来源
<i>B. japonicum</i>			
ATCC10324 ^T	大豆(<i>Glycine max</i>)		美国农业部(USDA)
USDA110, USDA135	大豆(<i>Glycine max</i>)		美国农业部(USDA)
<i>B. elkanii</i> USDA76 ^T	大豆(<i>Glycine max</i>)		美国农业部(USDA)
<i>B. liaoningense</i> 2281 ^T	大豆(<i>Glycine max</i>)		本组
<i>B. sp.</i> HAMB11132	扁富牧草(<i>Ornithopus compressus</i>)		NZP
<i>B. sp.</i> HAMB11133	树状羽扇豆(<i>Lupinus arboreus</i>)		NZP
<i>B. sp.</i> HAMB11136	狭叶羽扇豆(<i>Lupinus angustifolius</i>)		ATCC
<i>B. sp.</i> HAMB11662	锰相思树(<i>Acacia mangium</i>)		泰国(Thailand)
<i>B. sp.</i> HAMB11732	锰相思树(<i>Acacia mangium</i>)		泰国(Thailand)
<i>B. sp.</i> HAMB12118	梗百脉根(<i>Lotus pedunculatus</i>)		澳大利亚(Australia)
<i>B. sp.</i> HAMB12120	拟刺桐(<i>Erythrina speciosa</i>)		美国农业部(USDA)
<i>B. sp.</i> HAMB12121	梗百脉根(<i>Lotus pedunculatus</i>)		
<i>B. sp.</i> (<i>Arachis</i>)			
2524	花生(<i>Arachis hypogaea</i>)中花2号品种	湖北,武昌	本组
2576	花生海花2号品种	山西,太原	本组
2584	花生晋花1号品种	山西,汾阳	本组
2592	花生晋花2号品种	山西,汾阳	本组
2642	花生吕花1号品种	吉林,松原	本组
2682	花生企石2号品种	广东,东莞	本组
2714	花生长沙土子品种	湖南,长沙	本组
2724, 2726	花生大白沙品种	山东,泰安	本组
2742	花生海花1号品种	陕西,南郑	本组
2764	花生8130品种	山东,即墨	本组
009	花生品种		IOC(CAAS)
Spr1-2	花生天府3号品种	四川,梅山	四川农大
Spr7-10	花生天府3号品种	四川,南充	四川农大
283A	花生		以色列(Israel)
MAR411,	花生		赞比亚(Zimbabwe)
MAR1510	非洲硬皮豆(<i>Macrotyloma africanum</i>)		赞比亚(Zimbabwe)
NC92	花生		玻利维亚(Bolivia)
<i>B. sp.</i> USDA4362	田皂角(<i>Aeschynomene</i>)		美国农业部(USDA)

注: IOC(CAAS), 中国农科院油料作物所, 武汉; Spr, 四川花生根瘤菌; ATCC, 美国模式菌株菌保中心; NZP, 新西兰北帕尔梅斯菌保中心; MAR, 津巴布韦马龙德拉土壤肥力研究室; HAMB1, 芬兰赫尔辛基大学应用化学和微生物系菌保中心; T, 模式菌株

株。它们是分别从10种不同的豆科中分离并通过原寄主回接确认为根瘤菌。所有菌株都经过平板划线和镜检确认纯培养后选用,用常规的YEM培养基培养。

1.1.2 引物、DNA聚合酶及限制性内切酶:所用的IGS双引物序列^[3]为FGPS1490(5'-TG-CGGCTGGATCACCTCCTT-3')和FGPL132'(5'-CCGGGTTTCCCCATTCCG-3'),由芬兰赫尔辛基大学合成并提供使用。用于PCR扩增反应的DNA聚合酶为芬兰生物制品公司生产的DynaZyme。4种四碱基识别序列的限制性内切酶AluI、HaeIII、HinfI和MspI为Promega公司产品。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增:用于PCR扩增的细菌总DNA采用快速提取法进行^[7]。按文献[2]的要求加入PCR各个组份,并根据其提供的PCR循环程序在PTC-200型(基因公司生产)扩增仪上进行扩增,循环结束后,取2μL PCR产物进行1.5%琼脂糖电泳检查扩增效果。IGS rDNA片段的大小可根据与已知大小的Marker比较得到。

1.2.2 RFLP分析:取8μL PCR产物,按要求分别用上述四种限制性内切酶酶解;选用4%的

琼脂糖凝胶电泳进行不同大小片段DNA分离,电泳结束后凝胶置溴化乙锭溶液染色30min;电泳结果在紫外光线下用专用软件扫描存入计算机,或用热敏相纸打印,及用Polaroid 55型相纸一次拍照成像。通过比较菌株的酶切图谱,即片段长度(位置)和片段数量的多少来确定每种酶切图谱类型。综合四种酶切图谱及IGS rDNA大小,得出IGS的RFLP类型。

2 结果

2.1 IGS大小

以双引物FGPS1490和FGPL132'的PCR扩增得到的32株慢生根瘤菌16S-23S IGS rDNA电泳仅出现一条带,与λ-DNA的SinI酶切作为Marker比较,IGS大小在930~1050bp之间(图1A)。可明显区分为三种长度的IGS,即IGS a(约930bp)、IGS b(约970bp)和IGS c(约1050bp)。实验中还发现在a、b二种类型中存在其IGS长度的细微差异。IGS a型占的比例大,包括Bradyrhizobium属3个已知种及其它多数B. sp.菌株,可能是慢生根瘤菌的主要类型。IGS c型仅存在于B. sp. USDA4362一个菌株中,表明这一从田皂角(Aeschynomene)

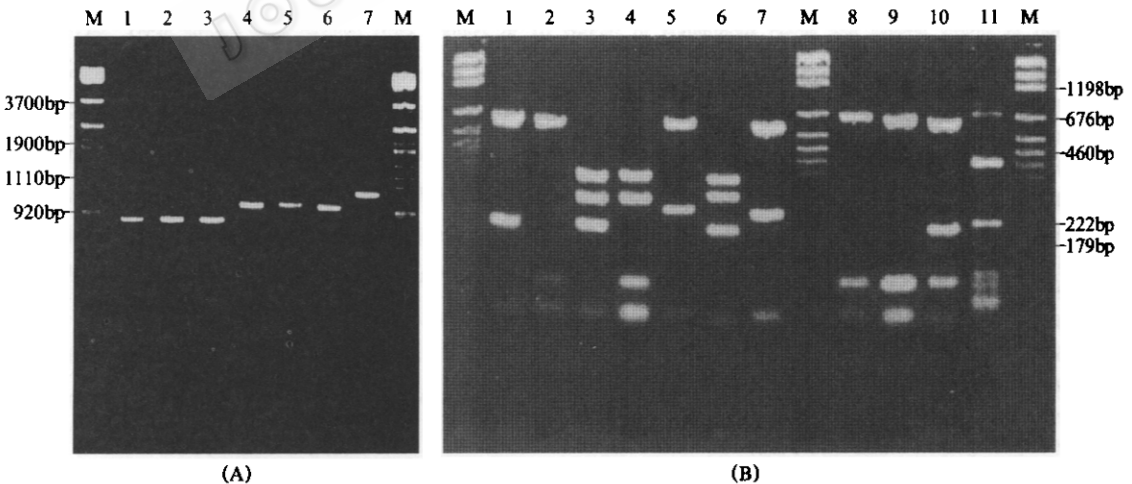


图1 慢生根瘤菌16S-23S IGS rDNA大小(图1A)和IGS rDNA的HaeIII酶切图谱(图1B)。

图1A: 1. *B. japonicum* ATCC10324; 2. *B. sp. (Arachis)* 2682; 3. *B. sp. (Acacia mangium)* HAMB1732; 4. *B. sp. (Arachis)* 2584; 5. *B. sp. (Arachis)* 009; 6. *B. sp. (Arachis)* 2742; 7. *Btai* USDA4362. M. SinI酶切λ-DNA

图1B: 1. *B. sp. (Arachis)*(1-4, 8-10): 1:2642(b'); 2. 2746(a); 3. 2682(d); 4. 2714(e); 5. *B. japonicum* USDA110(b); 6. *liaoningense* 2281(c); 7. *B. japonicum* USDA135(b); 8. 2584(a'); 9. 2742(a'); 10. Spr7-10(f); 11. *Btai* USDA4362(g). M. PGEM Marker

分离的菌株与其它慢生根瘤菌间可能存在较大的遗传差异。饶有兴趣的是花生根瘤菌存在 IGS a、IGS b 二种,发现从我国山西省的几株花生根瘤菌皆属于 IGS b 型,提示花生根瘤菌中存在的 IGS 异质性。

2.2 IGS 的 RFLP 分析

所用的 32 株慢生根瘤菌 16S-23S IGS rDNA 的上述四种酶切图谱共产生 26 种不同的 RFLP 类型(表 2)。除 6 个菌株外,都有其各自 IGS-RFLP 类型。结果发现从不同宿主分离的菌

株都有可鉴别的 IGS-RFLP 类型,IGS RFLP 类型与不同宿主的慢生根瘤菌密切相关。来自同一宿主不同地点菌株可以有相同或不同的 IGS-RFLP 类型,如来自吉林的花生根瘤菌 2642 与 2 株从山东花生根瘤中分离的花生根瘤菌 2724 和 2726 有相同的 IGS 类型;同样的结果存在于赞比亚分离的花生根瘤菌 MAR411、来自以色列的花生根瘤菌 283A 以及从中国分离的花生根瘤菌 2764 中。这些表明在一定的遗传背景下,可用 IGS 来区分、鉴定慢生根瘤菌。

表2 慢生根瘤菌的16S-23S rDNA IGS的酶切图谱和其RFLP类型

菌株	IGS 大小	rDNA IGS四种酶的酶切图谱				IGS 类型
		AluI	HaeIII	HinfI	MspI	
<i>B. japonicum</i>						
ATCC10324 ^T	a	a	a	a	a	1
USDA110	a	b	b	a	b	2
USDA135	a	b	b	a	c	3
<i>B. elkanii</i> USDA76 ^T	a	c	c	a	d	4
<i>B. liaoningese</i> 2281 ^T	a	d	c	a	e	5
<i>B. sp.</i> HAMB1132	a	j	c	b	d	6
<i>B. sp.</i> HAMB1133	a	d	g	b	c	7
<i>B. sp.</i> HAMB1136	a	k	a	a	a	8
<i>B. sp.</i> HAMB12118	a	d	b	b	e	9
HAMB12121						
<i>B. sp.</i> HAMB11662	a	c	c	f	j	10
<i>B. sp.</i> HAMB11732	a	c	c	d	c	11
<i>B. sp.</i> HAMB12120	a	e	a	a	a	13
<i>B. sp.</i> (<i>Arachis</i>)						
2524	a	f	b	a	e	14
2642, 2724, 2726	a	e	b [*]	b	a	15
2682	a	e	d	b	a	16
2714	a	e	e	a	g	17
Spr1-2	a	h	c	e	d	18
2764, MAR411, MAR1510, 283A	a	e	a	a	f	19
2584, 2592	b	g	a [*]	e	f	20
2576	b	e	a [*]	d	f	21
009	b	i	f	d	i	22
2742	b	h	a	a	g	23
Spr7-10	b	c	f	b	g	24
NC92	b	e	a	b	a	25
<i>B. sp.</i> USDA4362	c	l	g	g	h	26

* a与a'之间, b'与b之间存在细微差异

16S-23S IGS rDNA 的上述每一种酶切图谱有 6~12 条之多,分别用字母 a~l 标识(见表 2、图 1B)。每种酶产生的多种不同图谱表明 IGS 具有较高的变异性,即其保守性不强。除 *B. sp. USDA4362* 四种酶切图谱都与其它慢生根瘤菌不同外,观察到每一酶对某些菌株有其独特酶切图谱,如 IGS rDNA 的 *AluI* 酶切图谱中的 a(ATCC10324)、f(*B. sp. 2524*)、i(009)、j(HAMBI1136)、和 *HaeIII* 酶切图谱(图 1B)中的 d(2682)、e(2714)等,可用于括号所标示菌株的鉴定。

还需说明的是能与花生结瘤的 *B. sp. (Arachis)* 菌株,其 IGS-RFLP 表现出复杂性(表 2),暗示花生根瘤菌遗传多样性的存在。这与我们已进行的数值分类和 rep-PCR 分析的结果吻合(待发表)。

2 讨论

Laguette 等^[3]用本文采用的引物扩增 *B. japonicum* 菌株的 16S-23S IGS 区域得出其 rDNA 大小在 900~1000bp 之间,同样的结果在木本豆科慢生根瘤菌得到证实,发现绝大多数菌株 IGS 的 PCR 产物为 930bp,唯一菌株的 IGS rDNA 稍大约为 970bp^[6]。我们的测定结果与之一致。仅是从田皂角中分离的 USDA4362 的 IGS rDNA 要更大些,它的酶切图谱也表现特殊。与 *Rhizobium leguminosarum* 等快生根瘤菌的 IGS(1160~1400bp)相比,慢生根瘤菌的 IGS 要小些^[3]。最近发现 IGS 在快生和慢生根瘤菌中存在的拷贝数不同,如 *B. japonicum* 中仅存在一个 rRNA 操纵子^[9],而 *Rhizobium* 属至少有三个拷贝^[2]。

慢生根瘤菌间长度上的差异是由于 IGS 内部所含的 tRNA 的种类和数目差异所致,是长期进化和选择的结果^[1,3]。因而可根据 IGS-

RFLP 或其序列所揭示的信息绘制遗传距离图,比较菌株间或种间的亲缘关系或系统发育。以 16S rRNA 为依据得出的从不同宿主分离的慢生根瘤菌系统发育趋向 *B. japonicum*,而 RAPD 和 rep-PCR 等手段却揭示出丰富的多样性,许多科学家认为 IGS 可以作为慢生根瘤菌系统发育的更精细和更高分辨力的遗传标记^[1,4,6]。

目前 IGS 在微生物的区分、鉴别及分类中得到越来越多的应用。不仅对细菌效果好,也已在放线菌及真菌的鉴定、分类中得到应用^[4],本文的结果也证明 IGS 是慢生根瘤菌鉴别的良好遗传标记。

致谢 本试验部分工作是在芬兰赫尔辛基大学 Professor Lindstrom 实验室完成的。感谢她和 T. Zewdu 对本工作的指导和帮助,同时感谢四川农大张小平教授和陈强老师提供了四川花生根瘤菌。

参 考 文 献

[1] Gurtler V, Vilma A S. Microbiology, 1996, 142:3~16.
 [2] Jensen M A, John A W, Neil S. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(4):945~952.
 [3] Laguette G, Patrick M, Marie-Reine A et al. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(6):2029~2036.
 [4] Yoon J, Sung T L, Yong-La P. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48:641~650.
 [5] 张灵霞,庄玉辉. 微生物学通报,1998, 25(1): 52~54.
 [6] Vinuesa P, Rademaker J W, de Bruijn F J et al. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(6):2096~2104.
 [7] Nick G, Lindstrom K. Appl Environ Microbiol, 1994, 17:265~273.
 [8] Kundig C, Beck C. J bacteriol, 1995, 177(17):5151~5154.
 [9] 吕爱民,陈文新. 微生物学通报,1997, 24(6): 362~364.

本 刊 声 明

凡本刊刊出的稿件,除在本刊发表出版使用外,还将以《光盘版》等形式出版使用,作者如不同意,敬请来稿时声明。