

分子生物学新方法在根瘤菌分类中的应用

韦革宏 朱铭莪

(西北农业大学资环系, 陕西杨凌 712100)

摘 要 随着分子生物学技术的发展, 一些全新的方法应用于根瘤菌分类, 使根瘤菌分类的研究得到了迅速发展, 从过去的传统分类过渡到了以遗传特征和系统发育为主要依据的现代系统分类。研究在参考大量文献的基础上, 概述了全细胞可溶性蛋白电泳、多位点酶电泳、DNA G+C 摩尔百分含量测定及 DNA-DNA 杂交、限制性片段长度多态性分析、随机扩增产 DNA 片段的多态性、基因外回文重复序列 PCR 扩增技术及 16S rDNA 序列分析确定根瘤菌系统发育等 7 种分子生物学方法的原理、特点, 以及在根瘤菌分类研究中的应用现状和前景。

关键词 分子生物学, 根瘤菌分类, 生物技术

分类号 S154.381

根瘤菌与豆科植物共生体系是生物固氮体系中能力最强的一种, 据估计豆科植物的固氮量约占全球生物固氮量的 65%。一百年来根瘤菌与豆科植物共生固氮研究一直受到重视。根瘤菌分类自 1932 年 Fred 根据“互接种族”的关系将全部根瘤菌定义为一个属 6 个种以来, 1964 年 Graham 通过数值分类证明当时的已有根瘤菌应分为两个属。此后分子生物学技术引入根瘤菌分类, 以“互接种族”为依据的分类体系被彻底否定, 目前总共已发表的根瘤菌有 6 个属 19 个种。本文拟对应用比较广泛的几种分子生物学方法在根瘤菌分类研究中的应用现状作以介绍。

1 全细胞可溶性蛋白电泳

蛋白质是基因表达的产物, 关系密切的细菌在蛋白质组成上有一定的相似性, 这是蛋白质电泳分析用于细菌分类的理论基础。通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可将细菌中各种蛋白组分进行分离, 并借助计算机对电泳图谱进行聚类分析。Noel 和 Brill^[1]用可溶性蛋白 SDS-PAGE 分析了威斯康辛的大豆根瘤菌, 发现不同血清组中的大多数菌株可以由该方法相区分开。Robert^[2]采用双向电泳技术分析了三叶草根瘤菌、大豆根瘤菌、百脉草根瘤菌、豇豆根瘤菌、田菁根瘤菌和羽扇豆根瘤菌等在内的 57 株根瘤菌的全细胞可溶性蛋白电泳, 发现慢生根瘤菌相互关系较密切, 但与快生菌有明显差异。汪恩涛等^[3]对 40 多株根瘤菌进行了全细胞可溶性蛋白电泳分析, 结果表明快、慢生根瘤菌间有明显差异, 快生根瘤菌种间有明显差异。De La jodie P^[4]用全细胞可溶性蛋白电泳聚类分群, 结合 DNA-DNA 杂交及 16S rDNA 全序列分析, 发表两个新种 *S. teranga* 和 *S. saheli* 许晓东等^[5]对 17 株天山根瘤菌及 8 个已知根瘤菌种的模式菌株进行 SDS-PAGE 全细胞蛋白电

收稿日期 1998-05-11

课题来源 国家自然科学基金资助项目, 39130010

作者简介 韦革宏, 男, 1969 年生, 讲师, 在读博士

在根瘤菌分类中, RFLP 分析通常采用多种限制性内切酶与各个特定 DNA 探针进行 Southern 杂交相结合的方法, 结果由计算机聚类 K aijala 等^[12]利用 RFLP 技术分析了山羊豆根瘤菌菌株 (*R. galega*) 的酶切片段的多态性 D em eas^[13]采用限制性内切酶对豌豆根瘤菌三叶草生物型的总 DNA 进行酶切, 用探针进行 Southern 杂交研究, 揭示了豌豆根瘤三叶草生物型的遗传多样性 Kuykendall 等^[14]用 *EcoRI*、*SaI*、*HindIII* 3 种酶切慢生大豆根瘤菌的总 DNA, 用探针进行 Southern 杂交, 结果发现一个新种——*Bradyrhizobium elkanii* Laguerre 等^[15]直接用限制性内切酶对根瘤菌的 16 S DNA 的 PCR 产物进行酶切, 对根瘤菌的已知种进行了快速鉴定。Nour 等^[9]对鹰嘴豆根瘤菌的 16 S DNA 与 23 S DNA 间隔区 GS 进行了 RFLP 分析, 发现鹰嘴豆根瘤菌具有表型及遗传多样性。RFLP 技术的缺陷主要是克隆可表现基因组 DNA 多态性的探针较为困难, 同时要对探针进行同位素标记, 但随着可标记多态性探针的增多, RFLP 技术将会在根瘤菌分类研究中得以更广泛的应用。

5 随机扩增 DNA 片段的多态性

随机扩增 DNA 片段多态性分析 (RAPD) 是 W illiam s 等^[16]提出的一种运用随机引物扩增, 寻找多态性 DNA 片段的遗传标记技术。该技术在操作上简单易行, 不需要克隆制备、同位素标记及 Southern 印迹等预备性工作, 所需 DNA 样品量少, 引物没有特异性, 分析速度快, 短期内即可获得大量的遗传标记, 而且克服了多位点酶电泳条带少和 RFLP 操作技术复杂的弊端。因此, 近年来已在根瘤菌多样性分析和分类研究中得到应用。Harrison^[17]利用 21 个随机引物对三叶草根瘤菌的 DNA 进行了扩增, 得到的扩增产物电泳图谱能有效地进行菌株的区分, 并且还从培养的细胞或根瘤组织中直接扩增出了有意义的谱带。Selenska-pobell 等^[18]用 RAPD 技术对山羊豆根瘤菌 (*R. galega*) 进行了分析, 并对岩黄芪 (*halsari*) 根瘤菌、山羊豆根瘤菌 (*R. galega*)、苜蓿根瘤菌 (*M. meliloti*) 进行了研究, 表明 RAPD 分析结果与 RFLP 一致, 且鉴定效果更好。

6 基因外回文重复序列 PCR 扩增技术

基因外回文重复序列 (REP) 存在于绝大多数细菌中, 其在不同的菌株、种甚至属间都具有高度的保守性。研究者已设计出相应的引物, 利用 PCR 技术扩增出具有种和菌株特异性的指纹图谱, 因而可用于细菌菌株的标记、种的鉴定和种内遗传性的研究, 其准确性和可靠性已为其他的分类方法所证实^[19]。REP-PCR 技术具有不需要种和菌株专一性的探针, 不需要进行 Southern 杂交, 只需少量的细菌细胞便可进行 PCR 扩增等优点。目前, 该技术在根瘤菌分类中也得到了应用, 但国内这方面的报道较少。De Bruijn^[20]用 REP-PCR 作了 *R. meliloti* 基因的指纹图谱, 他以 *R. meliloti* 的染色体 DNA 为模板, 以 REP 特异的引物进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 用 EB 染色, 发现 REP-PCR 能反映 *R. meliloti* 种内菌株之间的微小差异。Judd 等^[21]运用 REP 标记对慢生型大豆根瘤菌血清群 123 菌株进行区分, 发现血清群 123 菌株的 REP 谱带高度相似, 血清群 127 菌株的谱带表现出较大的差异。运用 REP 标记对血清群 123 菌株进行的系统发育分类与 RFLP 标记的结果吻合。张小平等^[22]利用 REP 1R-1 和 REP 2-1 为引物对 22 株四

泳, 结果在 82% 的相似性水平上, 各已知种能相互区分开, 17 株天山根瘤菌独自成群。该方法虽是菌株快速聚类分群的有效方法, 但它不能得到菌群间的鉴别特征, 必须另外做生理生化鉴别特征。

2 多位点酶电泳

酶是生物代谢过程中的一种特殊蛋白, 因此, 特定酶的存在及组成, 可以反映细菌的代谢途径等方面的信息。70 年代, 酶电泳技术作为分类和鉴定手段已成功地应用于高等植物。Young J P W^[6]将酶电泳方法引入根瘤菌群体多样性及分类研究中, 他利用 3 种酶分析了豌豆根瘤菌群体、菜豆根瘤菌群体、三叶草根瘤菌群体及苜蓿根瘤菌群体的遗传多样性。Eardly B D 等^[7]利用多位点酶电泳方法将苜蓿根瘤菌分为两个亚群, 其结果与 DNA-DNA 杂交结果高度一致。Leorezo segovia 等^[8]用多位点酶电泳方法将豌豆根瘤菌的菜豆生物型 (*R. legum inosarum biovar phsaeoli*) 分为明显的两群, 结合其他的分析结果, 分别命名为两个新种——热带根瘤菌 (*R. tropici*) 和菜豆根瘤菌 (*R. etli*)。Nour S M 等^[9]用多位点酶电泳结合其他技术对鹰嘴豆根瘤菌进行研究, 发表了新种——鹰嘴豆根瘤菌 (*R. ciceri*) 和地中海根瘤菌 (*R. mediterraneum*)。

3 DNA G+ C 摩尔百分含量测定及 DNA-DNA 杂交

DNA 的 G+ C 摩尔百分含量及 DNA-DNA 同源性测定已成为细菌分类鉴定中的基本方法, 并作为描述细菌分类单元的一个标准。一般来说, DNA G+ C 摩尔百分含量在种内变化不超过 3%, 属内变化不超过 10%。DNA-DNA 的同源性是界定细菌种的主要手段, 国际系统细菌学委员会规定^[10], DNA 同源性 $\geq 70\%$, 杂交分子的热解链温度差 $\Delta T_m \leq 5^\circ\text{C}$ 为细菌种的界限。在根瘤菌分类中, DNA 杂交已被公认为是建立新种、属的必要标准之一。陈文新等^[11]采用 DNA 杂交方法研究了与紫云英共生的根瘤菌, 将这些菌形成的独立 DNA 同源群命名为一个新种——华葵根瘤菌 (*M. Huakuii*)。

测定 DNA G+ C 摩尔百分含量的方法主要有热变性温度法、活力密度法、高压液相色谱法等, 以热变性温度法最为常用。DNA 杂交的方法可分为液相杂交和固相杂交两种基本类型, 常用的有液相复性速率法、固相滤膜法等。这两种方法各有利弊, 液相复性速率法操作简便, 测定速度快, 但需要的 DNA 量大, 而且结果易受到外界因素的影响。固相滤膜法可通过图谱的形式表明 DNA 的同源性, 但操作较复杂, 且需要用同位素进行标记。

4 限制性片段长度多态性分析

限制性片段长度多态性分析 (RFLP), 是 80 年代中期发展起来的以生物基因组 DNA 序列变异为基础来研究不同基因组间差异的一项新技术。这实际上是对 DNA 序列分析的一种简化, 利用限制性内切酶在特定位点上将 DNA 切割成长度不同的片段, 电泳分离后, 对得到的图谱进行分析比较, 从而得出分类结果。作为一种遗传标记, RFLP 具有以下优点: ① 直接研究基因的组成, 其变异不受显隐性关系、环境条件和发育阶段的影响, 具有稳定遗传和变异性的特点。② 反应的是整个基因组的遗传信息, 而且每个 RFLP 标记检测方便, 区分能力强。

川土著慢生花生根瘤菌染色体 DNA 进行了 REP-PCR 扩增, 并对电泳结果的指纹图谱进行聚类分析, 结果表明了花生根瘤菌的遗传多样性

7 16S rDNA 序列分析确定根瘤菌系统发育

16S rDNA 约有 1 500 多个核苷酸, 包括几个高度保守的区域和几个高变区域。对 16S rDNA 进行序列分析主要采用 rRNA 寡核苷酸编目法, 16S rDNA 反转录法, 16S rDNA 的直接测序法 3 种。目前在根瘤菌分类研究中应用较多的是 16S rDNA 的直接测序: 提取总 DNA, 加入特定的引物, PCR 扩增出 16S rDNA 片段, 扩增产物被纯化后用限制性内切酶切割, 再与特定载体质粒相连接, 进行克隆, 所得转化子进行测序^[23]。

起初, 对 16S rDNA 序列的分析只限于部分序列(可变区域), 后由于部分序列包含的信息量较少, 分析结果与全序列的不太一致, 国际细菌学会委员会建议最好应用 16S rDNA 的全序列分析确定根瘤菌的系统发育地位。在根瘤菌分类中, 16S rDNA 的全序列分析被认为是确定新属的一个必要标准。W illem s 和 G illis^[24]采用 16S rDNA 的全序列分析对已发表的根瘤菌种及相关菌株进行了聚类分析, 得到了系统发育树状图。以后发表的地中海根瘤菌 (*R. mediterraneum*)^[10] 天山根瘤菌 (*M. tian shanense*)^[25] 等都测定了模式菌株的 16S rDNA 全序列, 确定了新种在系统发育中的地位。Young J P W^[26]又总结了前人的研究结果, 以 16S rDNA 全序列资料为依据, 构建了根瘤菌和一些相关细菌的系统发育树状图(见图 1)。

综上所述, 可以看出多相分类方法的应用使根瘤菌的分类更加系统化、完整化。在多相分类中使用各种不同的方法目的是从多角度、多方位深入系统地认识根瘤菌的现象和实质。这些方法包括了确定细菌系统发育关系的方法, 将大量菌株进行比较分群的方法, 以及进一步提供遗传特征和表型特征的方法等, 各种方法之间有相似之处又各有其特点。研究者要根据自己的目的和材料特点, 选择合适的测定方法。随着分子生物学技术的不断发展和人类对生命本质认识的深入, 今后将有更多、更简便、更准确的方法出现。

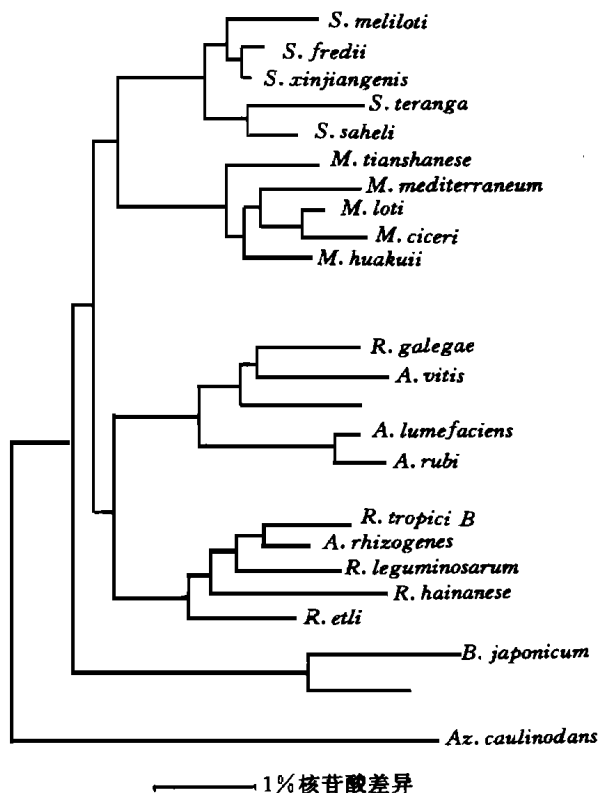


图 1 根瘤菌系统发育树状图

参 考 文 献

- 1 Noel K D, Brill W J. Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol* 1980 40: 931~ 938
- 2 Robert G P. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify rhizobium strains. *Appl Environ Microbiol* 1980 39: 414~ 422
- 3 汪恩涛, 陈文新, 李季伦, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳在根瘤菌鉴定中的应用. *微生物学通报*, 1987 41: 86~ 89
- 4 De La Juidie P, Williams A, Pot B, et al. Polyphasic taxonomy of rhizobia: identification of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov. *Sinorhizobium saheli* sp. nov. and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1994 44: 715~ 733
- 5 许晓东, 陈文新. 天山根瘤菌 (*R. tianshanense*) 全细胞蛋白电泳和多位点酶电泳分析. *微生物学通报*, 1996 23(3): 131~ 134
- 6 Young J P W. *Rhizobium* population genetics: enzymic polymorphism in isolates from peas, clover, beans and lucerne grown at the same site. *J Gen Microbiol* 1985 131: 2399~ 2408
- 7 Eardly B D, Mattern L A, Smith N H, et al. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 1990 56: 187~ 194
- 8 Leonore Segovia Y, Young J P W, Martinez-Ramirez E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseolus type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1993 43: 374~ 377
- 9 Nour S M, Cleyet-Mummairel J C, Nom P, et al. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995 45: 640~ 648
- 10 Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root and stem nodule bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 1991 41: 582~ 587
- 11 Chen W X, Li G S, Qi Y L, et al. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Albizia sinensis*. *Int J Syst Bacteriol* 1991 41: 275~ 280
- 12 Kaijäläinen S, Lindström K. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galga* strains. *J Bacteriol* 1989 171(10): 5561~ 5566
- 13 Demezas D H, Reardon T B, Watson J M, et al. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* br. trifolii strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. *Appl Environ Microbiol* 1991 57: 3489~ 3495
- 14 Kuykendall L D, Saxena B, Devine T E, et al. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *J Microbiol* 1992 38: 501~ 505
- 15 Laguerre G, Allard M R, Revoy F, et al. Rapid identification of *Rhizobium* by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 1994 60: 56~ 63
- 16 Williams J G K, Kubelk A R, Livak K D, et al. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990 18: 6531~ 6535
- 17 Harrison S P, Mytton L R, Skot L, et al. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphism using random primers. *J Microbiol* 1992 38: 1009~ 1015
- 18 Selenska-Pobell S, Evgueniev-Hackenberg E, Radeva G, et al. Characterization of *Rhizobium hedyari* by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. *Journal of Applied Bacteriology* 1996 80: 517~ 528
- 19 Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991 19: 6823~ 6831
- 20 De Bruijn R J. Use of repetitive REP sequences and the Polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1992 58(7): 2180~ 2187

- 21 Judd A K, Schreider M, Sadowsky M J et al Using of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *B radyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains Appl Environ Microbiol 1993 59(6): 1702~ 1708
- 22 张小平, 李登煜, Nick G isell 等. 慢生花生根瘤菌的遗传多样性研究. 应用与环境生物学报, 1998, 41(1): 70~ 73
- 23 Fox G E, Woitzky J D, Jureshuk P. How close is close 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int J Syst Bacteriol 1992 42 166~ 170
- 24 Williams A, Gillis M, Collins M D. Phylogenetic analysis of *Rhizobium* and *Agrobacterium* based on 16S rRNA gene Sequences Int J Syst Bacteriol 1993 43 305~ 313
- 25 Tan Zhiyuan, Xu Xiaodong, Wang Entao et al Phylogenetic and Genetic Relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia Int J Syst Bacteriol 1997 47(3): 874~ 879
- 26 Young J P W. Taxonomy of rhizobia In: International symposium on diversity and taxonomy of rhizobia Wuhan China China Agricultural Science Press 1996 3~ 10

Applications of Molecular Biological Methods on Taxonomy of Rhizobia

Wei Gehong Zhu Ming

(Department of Resource and Environmental Science, Northwest
Agricultural University, Yangling Shaanxi 712100)

Abstract With the development of molecular biological techniques, some new molecular biological methods are applied to the taxonomy of rhizobia. These methods advance to the rapid development of the research of taxonomy of rhizobia from the traditional taxonomy in the past to the modern systematic taxonomy based on genetic characteristics and phylogenetic relationships. This paper reports on the basis of a large amount of literatures, introduces the basic concepts, principles, characteristics, and their application at the present and in the future on taxonomy of rhizobia of some new molecular biological methods such as whole cell protein electrophoresis, multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), DNA G+C mol%, DNA-DNA hybridization, restriction fragment length polymorphism (RFLP), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR), 16S rDNA sequencing.

Key words molecular biology, taxonomy, rhizobia, biological techniques