

采用 PCR-RFLP 技术对费氏中华根瘤菌的遗传多样性研究

陈明周, 谢福莉, 周俊初

(华中农业大学, 农业部微生物重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 用西方大豆品种 Willimas 和中国大豆品种黑龙 33 从河南郑州花园口和山东潍坊多年种植大豆但未接种根瘤菌的土壤中捕集土著大豆根瘤菌。从分离株中选出 50 株费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*) 进行 16S rDNA 和 16S-23S rDNA IGS 的 PCR-RFLP 比较分析结果表明: 全部供试菌株的 16S rDNA 的 PCR 产物均为一条 1.5kb 的扩增带, 16S-23S rDNA IGS 的 PCR 产物也为一条 2.1kb 的带。用 *Hinf*I、*Msp*I、*Hae*III 3 种四碱基识别序列的限制酶作 RFLP 分析结果表明: 供试菌的 16S rDNA 酶切分析均产生相同的电泳谱带, 表现为相同的 16S rDNA 基因型; 但其 16S-23S rDNA IGS 的 RFLP 分析却有较明显的差异, 通过对酶切谱带的聚类分析, 自动生成的树状图谱将供试菌分为 6 个聚类群。

关键词: 费氏中华根瘤菌; 菌株; 聚类分析; PCR-RFLP; 遗传多样性

中图分类号: S154.381 文献标识码: A 文章编号: 0578-1752(2001)05-0572-04

Study on the Genetic Diversity of Sinorhizobium fredii Using PCR-RFLP Method

CHEN Ming-zhou, XIE Fu-li, ZHOU Jun-chu

(The Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Fifty strains of *S. fredii* were isolated and compared by using RFLP analysis of 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer (IGS) amplified by PCR. All strains produced by PCR amplification only one 1.5kb fragment of 16S rDNA and 2.1kb fragment of 16S-23S IGS. Three restriction endonucleases, *Hinf*I, *Msp*I and *Hae*III, were used to digest 16S rDNA and IGS DNA. No difference was revealed from 16S rDNA and six types were presented in IGS rDNA. The dendrogram was obtained by numerical analysis based on IGS types. The results revealed that 16S-23S rDNA IGS PCR-RFLP is a powerful tool for the study on genetic diversity of *Sinorhizobium fredii*.

Key words: *Sinorhizobium fredii*; Strains; Cluster analysis; PCR-RFLP; Genetic diversity

近年来, 以 PCR 技术介导的分子标记方法正逐渐应用于根瘤菌遗传多样性的研究中^[1-3]。但综合运用 16S rDNA 和 16S-23S rDNA IGS 的 PCR-RFLP 分析的报道较少^[4,5]。由于 16S rDNA 基因高度保守、难于反应种内菌株间的多样性。而 16S-23S rDNA IGS (intergenic spacer) 是位于 16S rDNA 和 23S rDNA 基因间的间隔区域, 与 16S rDNA 基因

比较, IGS 区域具有高度的变异性, 表现出长度和序列上的多态性。因此, 对于种以下的分类鉴定不失为一个很好的遗传标记。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株的分离和总 DNA 的提取

以中国大豆品种黑龙 33 和西方大豆品种

收稿日期: 2000-02-21

基金项目: 欧盟 INCO-DC ERBIC 项目(970191) 和教育部博士学科点基金项目(980401)

作者简介: 陈明周(1973-), 男, 河南固始人, 在读博士生, 主要从事根瘤菌多样性和生物固氮遗传学方面的研究。周俊初为本文通讯联系人。

Tel: 027-87282431; Fax: 027-87390770; E-mail: hzam@pubil.wh.hb.cn

Willimas 为捕获植物, 以两种土样(河南花园口、山东潍坊)悬液为接种剂来捕获根瘤菌, 抽提其总 DNA。各菌株编号见表。

1.2 PCR 扩增及其限制性内切酶酶切长度多态性分析(PCR-RFLP)

引物 PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 pH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC

A-3') 用来扩增; 用引物 pH r (5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3') 和 p23SR01 (5'-GGCTGCTTCTAAGCCAAC-3') 扩增 16S-23S IGS。PCR 扩增仪为 Thermolyne 公司的 Amplitron II。扩增产物用限制性内切酶 *MspI*, *HaeIII*, *Hinfl* (均购自华美公司) 消化 4h, 2.0% 琼脂糖凝胶检测。

表 供试菌株 16S-23S IGS PCR 扩增产物的限制性酶切图谱和 IGS 型

Table 16S-23S IGS types and restriction patterns revealed by PCR-RFLP of strains tested

菌株 ¹⁾ Strains	16S-23S IGS PCR-RFLP			IGS 型	菌株 Strains	16S-23S IGS PCR-RFLP			IGS 型
	<i>Hinfl</i>	<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>			<i>Hinfl</i>	<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	
HH2	a	a	a	A	HW14	a	a	b	C
HH3	b	a	b	D	HW15	a	a	a	A
HH4	a	a	a	A	HW18	a	a	b	C
HH9	a	a	a	A	HWG18	a	a	a	A
HH10	a	a	a	A	HW19	a	a	a	A
HH11	a	a	a	A	HW20	a	a	a	A
HH13	a	a	b	C	WH1	a	a	a	A
HH17	b	a	b	D	WH2	b	a	a	E
HH19	c	a	a	B	WH3	b	a	a	E
HH30	c	a	a	B	WH5	b	a	a	E
HH24	b	a	a	E	WH6	a	a	a	A
HH26	c	a	a	B	WH11	a	a	a	A
HH22	c	a	a	B	WH16	c	a	a	B
HH27	b	a	a	E	WHG20	b	a	a	E
HH34	a	a	a	A	WHG21	c	a	a	B
HH29	a	a	a	A	WW7	b	a	a	E
HHG31P	b	a	a	E	WW1	a	a	a	A
HHG35	b	a	a	E	WW5	a	a	a	A
HW2	a	a	a	A	WW12	b	a	a	E
HW3	a	a	a	A	WW13	b	a	a	E
HW4	b	a	a	E	WW14	a	a	a	A
HW5	a	a	a	A	WW4	b	a	a	E
HW1	a	a	a	A	WW2	a	a	a	A
HW8	a	a	a	A	WW3	b	a	a	E
HW13	b	a	c	F	WW6	b	a	a	E

¹⁾ 第 1 个字母代表宿主植物, 第 2 个字母代表地理来源, 第 3 个字母代表从 10 倍高稀释度下的土壤悬液中分离的菌株。数字代表菌株编号

The first letter represents host plant, the second letter represent strain source, the third letter represent strain isolated from high dilution soil solution. Number represent strain order

2 结果与分析

2.1 16S r DNA 和 16S-23S r DNA IGS RFLP 和 PCR-RFLP 酶切图谱分析

16S r DNA 均产生一条 1.5 kb 的扩增带, 每一种限制酶切图谱均相同, 未发现供试菌株的 16S r DNA 基因的种内差异。16S-23S r DNA IGS 扩增所

有菌株均产生一条 2.1 kb 的带, 由图 1 可以看出, 除 *MspI* 酶切均产生完全相同的酶切谱带以外, *HaeIII* 和 *Hinfl* 均产生不同的带型。根据上述 3 谱带类型, 可以将 50 个菌株分成 6 种 IGS 型(表), 其中 A 型占优势, 达供试菌总数的 46%, E 型占 30%, B 型占 12%, C 型占 6%, D 型占 4%, F 型最少只有一个菌株。

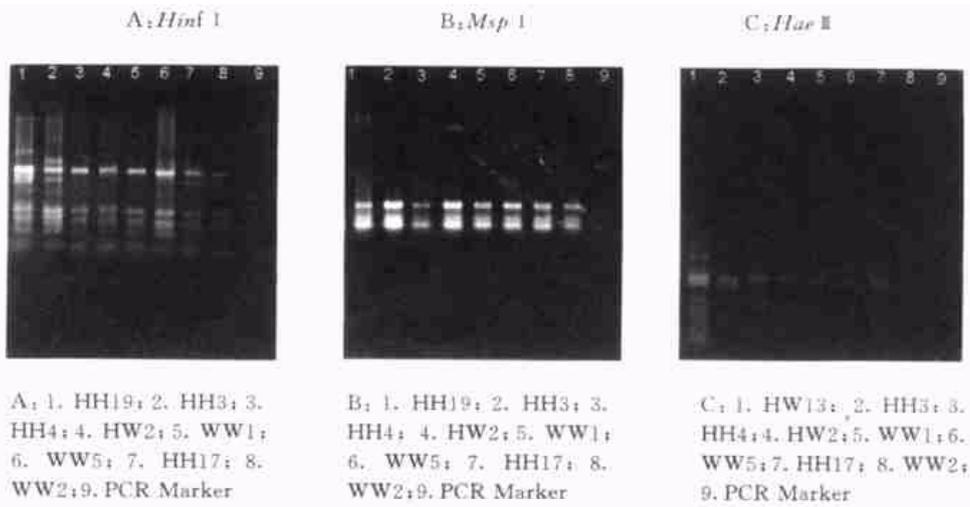


图 1 部分供试菌株的 16S-23S rDNA IGS PCR 扩增产物的酶切图谱
 Fig. 1 Restriction patterns of PCR-amplified fragments of 16S-23S rDNA IGS

2.2 对 IGS-RFLP 的聚类分析

根据供试菌 IGS-RFLP 的不同图谱类型进行聚类分析生成树状图(图 2)。由图 2 可见, 所有供试

菌株在 67% 的同源水平上聚为一群, 在 86% 的相似水平上 6 种 IGS 型各自独立成群。从地理分布情况来看, 除群 F 外, 自河南花园口分离的菌株在其它

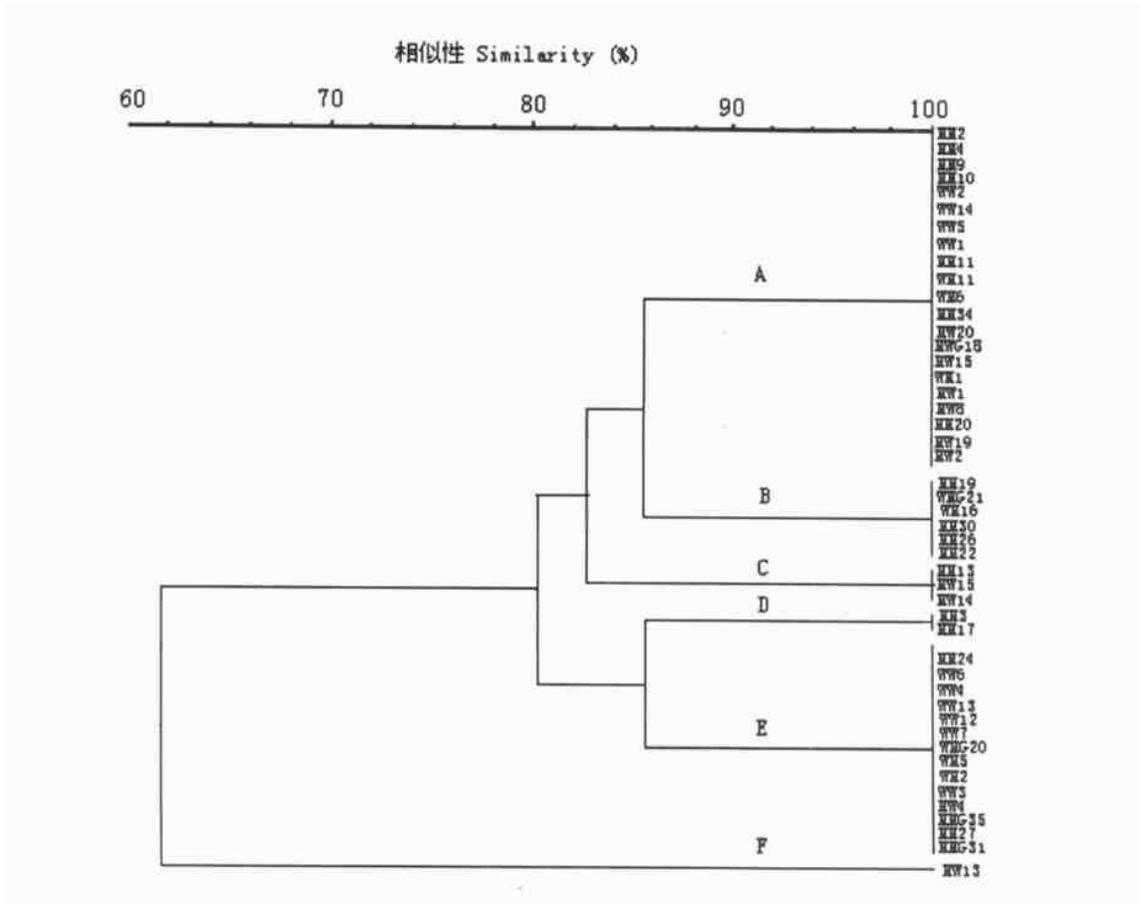


图 2 供试菌 IGS PCR-RFLP 谱带相似性聚类图
 Fig. 2 UPGMA dendrogram based on the similarity of IGS PCR-RFLP strains tested

各群均有分布。在树状图的 6 个类群中, 自两个土样中分离的菌株在大多数群中均有交叉分布, 即来自同一土壤中的菌株即可以分属于不同的群。来自河南花园口土壤和大豆品种黑龙 33 的菌株表现出更大的多样性。

3 讨论

对 IGS 基因型的聚类分析结果还表明, 费氏中华根瘤菌的多样性与环境因子和宿主植物有关。已有一些报道认为, 表型分类难于和遗传特征的分类统一, 并认为表型差异要比遗传差异大得多。本研究结果表明, 两种比较方法在总体趋势上是一致的, 多数菌株均能在两种树状图谱中聚在一起, 而且从地理来源看, 自河南花园口土壤分离的菌株表现更大的多样性; 从宿主来源看, 自大豆品种黑龙 33 分离的菌株也表现了更大的多样性。但因为本试验所用捕捉宿主相对较少, 所以得到的快生型根瘤菌类型不多(酶切图谱相当一致), 表现的多样性有限。

References:

- [1] He Z G, Zhou J C, Li F D, et al. Then comparative study on biological and molecular characteristics of 16 strains of *Sinorhizobium fredii*[J]. J. Huazhong Agricultural University, 1997, 16(3): 212—219. (in Chinese)
何正国, 周俊初, 李阜棣, 等. 16 株快生型大豆根瘤菌生物学与分子生物学特性的比较研究[J]. 华中农业大学学报, 1997, 16(3): 212—219.
- [2] Harrison S P, Jones D G, Young J P W. *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between population from diverse locations[J]. J. Gen. Microbiol. 1989, 135: 1061—1069.
- [3] Demezas D H, Reardon T B, Watton J M, et al. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strains, revealed by allozym and restriction fragment length polymorphism analysis[J]. Appl. Environ Microbiol. 1991, 57(2): 3489—3495.
- [4] Laguerre G, Patrick M, Marie-reine A, et al. Typing of *Rhizobia* by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars[J]. Appl. Environ Microbiol. 1996, 62(6): 2029—2036.
- [5] Nick G, Lindstrom K. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomic DNA of *rhizobium gallegae* strains and to identify the DNA obtained by sonicating the laticultures and root nodules[J]. Syst. Appl. Environ Microbiol. 1994, 17: 265—273.

欢迎订阅 2002 年《农业图书情报学刊》

《农业图书情报学刊》1989 年创刊。是由中国科协主管, 中国农业科学院科技文献信息中心、中国农学会主办, 中国农学会科技情报分会与农业图书馆分会承办的学术性、技术性、实用性专业期刊。办刊宗旨是宣传党和政府的有关图书情报政策, 探讨农业图书情报领域的新理论、新技术、新方法, 报道国内外农业图书情报业的发展趋势, 交流工作经验, 传播最新信息, 提高人员素质, 促进我国农业图书情报事业的发展。

本刊贯彻理论与实践相结合、普及与提高并重的办刊方针, 辟有“情报研究”、“科学管理”、“信息产业化”、“信息技术”、“信息资源”、“信息服务”、“理论研究”、“文献计量学”、“信息教育”、“世界之窗”、“期刊编辑”、“档案管理”、“书刊评介”等栏目。自创刊以来, 已形成了自己的特色, 深受全国农业系统图书、情报、编辑、资料、档案工作者及有关院校师生及科研人员的欢迎。

《农业图书情报学刊》双月刊, 16 开本, 80 页。国内外公开发行。国内统一刊号: CN11-2711/G2; 国际标准刊号: ISSN1002-1248; 每期定价: 10 元, 全年定价: 60 元。

地址 北京中关村南大街 12 号

邮编 100081

电话 (010) 68919879