

厚荚相思树根瘤菌 HJ06 菌株的 16S rDNA 全序列和 *nifA* 基因片段分析

吕成群^a, 黄宝灵^a, 庄培亮^a, 武波^b

(广西大学, a. 林学院; b. 生命科学与技术学院, 南宁 530005)

摘要: 对厚荚相思 (*Acacia crassicaarpa*) 根瘤菌 HJ06 菌株的 16S rDNA 全序列和 *nifA* 基因片段进行了测定。结果表明, HJ06 菌株在以 16S rDNA 序列构建的系统发育树状图中位于根瘤菌属 (*Rhizobium*) 分支中, 与根瘤菌属各个种的相似性达 95% 以上; 从 HJ06 菌株克隆出的 585 bp *nifA* 基因片段与 *Klebsiella pneumoniae* 的同源性达到 99.3%, 与 *Klebsiella oxytoca* 的 NifF, NifL, NifA, NifB 蛋白基因的同源性为 97.8%。

关键词: 厚荚相思; 根瘤菌; 16S rDNA 全序列; 系统发育; *nifA* 基因

中图分类号: Q523.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)01-0019-06

16S rDNA and *nifA* Gene Sequence Analysis of *Rhizobium* Strain HJ06 Isolated from *Acacia crassicaarpa*

Lü Cheng-qun^a, HUANG Bao-ling^a, ZHUANG Pei-liang^a, WU Bo^b

(a. Forestry College, Guangxi University; b. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: The determination of full-length 16S rDNA sequence and *nifA* gene segments of root nodule bacterium strain HJ06 isolated from *Acacia crassicaarpa* showed that strain HJ06 had above 95% similarity with the genus *Rhizobium*. The *nifA* gene segments of HJ06 have 99.3% isogenesis with *nifA* genes of *Klebsiella pneumoniae* and 97.8% isogenesis with genes of NifF, NifL, NifA and NifB proteins of *K. oxytoca*.

Key words: *Acacia crassicaarpa*; *Rhizobium*; 16S rDNA sequencing; Phylogenetic analysis; *nifA* gene

相思树是热带亚热带豆科树种, 除台湾相思外, 其余大多从澳大利亚、马来西亚等地引入我国。相思树种生长快、产量高, 有根瘤、具固氮作用, 可改良土壤, 木材用途广, 在我国热带、南亚热带地区越来越受到重视^[1], 目前已逐渐发展成为华南地区短周期工业用材林的当家树种之一^[2]。因此, 有必要开展对相思树种根瘤菌的生物学特性研究。过去对根瘤菌的研究大多集中在与农业关系密切的豆科作物、牧草的共生体上, 对大量的豆科树种根瘤菌的研究相对较少^[3]。而有关厚荚相思根瘤菌的 16S rDNA 全序列测定和分析、*nifA* 基因的研究目前尚

未见有报道。本文在前期研究工作的基础上, 对该树种根瘤菌的代表菌株 HJ06 的 16S rDNA 全序列和 *nifA* 基因进行分析, 以探讨厚荚相思根瘤菌的系统发育学地位及 *nifA* 基因的同源性。

1 材料和方法

1.1 菌株

供试的根瘤菌菌株 HJ06 分离自厚荚相思 (*Acacia crassicaarpa* A. cunn. ex Benth) 根瘤, 基因克隆中的大肠杆菌菌株为 JM109, 质粒载体为 pGEM-3Zf。

1.2 根瘤菌 DNA 提取

参照 Wen & Tsong 的快速提取法^[4]提取根瘤菌 DNA。菌株用 YMA 液体培养基在 28℃ 振荡培养至对数生长期, 10 000×g 离心收集菌体, 用 1×TE (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 缓冲液洗涤 2 次, 用裂解液 (40 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L NaAc, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS) 破壁, 再用 5 mmol/L NaCl 沉淀, 上清液用等体积的苯酚、苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1)、氯仿各抽提 1 次。2 倍体积无水乙醇、0.1 倍体积 3 mmol/L KAc 沉淀, 真空干燥, 最后溶于 1×TE 缓冲液中。

1.3 16S rDNA 的扩增

引物分为正向引物 F27 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和反向引物 R1492 (5'-TACGTTACCTTGTTACGACTT-3')。

PCR 扩增总体积 100 μl, 其中: 10×PCR Buffer 10 μl, 2.5 mmol/L dNTP 8 μl, 10 μmol/L 引物 F27 5 μl, 10 μmol/L 引物 R1492 5 μl, 模板 DNA 100 ng, 5 U *Taq* 酶 1 μl, ddH₂O 补至总体积 100 μl。

反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 再以 96℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

1.4 *nifA* 基因的扩增

PCR 扩增 *nifA* 基因的正向引物 P1: 5'-ACGGTGCTGGTACGCGGC-3', 反向引物 P2: 5'-TTCGCGCACGTTTCCCGG-3'。

PCR 扩增总体积 25 μl, 其中: 10×Buffer 2.5 μl, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μl, 10 pmol/L 引物 P1 1.25 μl, 10 pmol/L 引物 P2 1.25 μl, 模板 DNA 100 ng, 5 U *Taq* 酶 0.2 μl, ddH₂O 补至总体积 25 μl。

反应条件: 94℃ 预变性 6 min, 再以 94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 6 min。

1.5 DNA 克隆及测序

电泳回收 PCR 产物, 回收的 DNA 片段与载体连接, 用电脉冲法转化大肠杆菌 JM109, 在加有 X-gal、Amp 和 IPTG 的 LA 抗性选择培养基平板上选择白色转化子。挑取白色转化子, 接种在加有 Amp (50 μg ml⁻¹) 的 10 ml LB 液体培养基中, 置于 37℃ 摇床培养过夜。然后重新提取质粒, 验证白色

转化子是否含有 PCR 扩增产物。提取质粒 DNA 送上海基康生物公司测序。

1.6 16S rDNA 序列分析

将所测定的 HJ06 菌株的 16S rDNA 全序列输入生物技术信息网 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 进行序列分析及同源性比较, 用 ClustalX 和 Treecovnw 软件绘制系统发育树状图。序列相似性所用参比菌株及相应的索取号来自 GenBank。

1.7 *nifA* 基因序列分析

将所测定的 HJ06 菌株的 *nifA* 基因序列输入生物技术信息网 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 进行序列分析及同源性比较, 序列相似性所用参比菌株来自 GenBank, 索取号分别为: *Klebsiella pneumoniae* (X13303)、*K. pneumoniae* (X02616)、*K. oxytoca* (D00339)。

2 结果和分析

2.1 16S rDNA PCR 扩增及序列测定结果

菌株 HJ06 PCR 扩增所得 1.5 kb 左右的 16S rDNA 片段电泳检测结果见图 1, 测定的全序列 (1 445 bp) 结果见图 2。

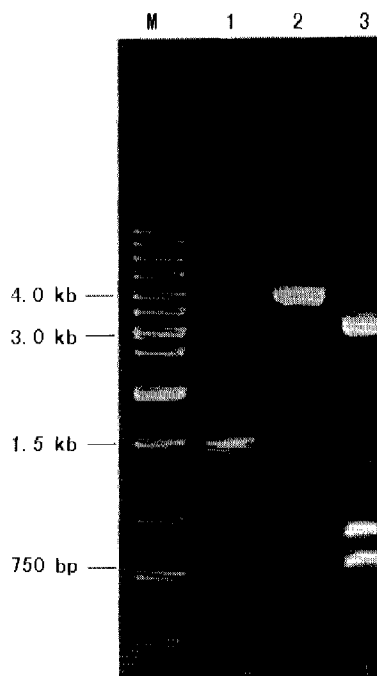


图 1 16S rDNA 扩增、连接及 *EcoR* I 酶切结果

Fig. 1 The result of 16S rDNA PCR, link and *EcoR* I enzyme digestion
M. 1 kb Markers; 1. 16S rDNA 扩增片段 16S rDNA PCR segment; 2. 重组质粒 Recombinant plasmid; 3. 重组体质粒 / *EcoR* I Recombinant plasmid / *EcoR* I.

```

1   AGAGTTTGAT CATGGCTCAG AACGAACGCT GGCGGCAGGC TTAACACATG CAAGTCGAGC
61  GCCCCGCAAG GGGAGCGGCA GACGGGTGAG TAACGCGTGG GAATCTACCT TTTGCTACGG
121 AATAACGCAG GGAAACTTGT GCTAATACCG TATGTGCCT TCGGGAGAAA GATTTATCGG
181 CAAGAGATGA GCCCGCGTTG GATTAGCTAG TTGGTGGGGT AAAGGCCTAC CAAGGCGACG
241 AACCATAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACATTGGGA CTGAGACACG GCCCAAACCTC
301 CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCCATGCC
361 GCGTGAGTGA TGAAGGCCCT AGGGTTGTAA AGCTCTTCA CCGGAGAAGA TAATGACGGT
421 ATCCGGAGAA GAAGCCCCGG CTAACTTCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GAAGGGGGCT
481 AGCGTTGTTC GGAATTACTG GBCGTAAAGC GCACGTAGGC GGATCGATCA GTCAGGGGTG
541 AAATCCCAGG GCTCAACCCT GGAAGTGCCT TTGATACTGT CGATCTGGAG TATGGAAGAG
601 GGGAGTGGAA TTCCGAGTGT AGAGGTGAAA TTCGTATATA TTCGGAGGAA CACCAGTGGC
661 GAAGGCGGCT AACTGGTCCT TTTCTGACGC TGAGGTGCGG AAGCGTGGGG AGCAAACAGG
721 ATTACATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAG CGATGAATGT TAGCCGTCGG GCAGTATACT
781 GTTGGGGGGC GCATTTAACG CATTAAACAT TCCGCCTGGG GAGTACGGTC GCAAGATTAA
841 AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC
901 AACGCGCAA ACCTTACCAG CCCTTGACAT CCTGTGTTAC CACTAGAGAT AGTTGGTCCA
961 CTTCCGTGGC GCAGAGACAG GTGCTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTG TGAGATGTTG
1021 GGTAAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTCG CCCTTAGTTG CCAGCATTTA GTTGGGCACT
1081 CTAAGGGGAC TGCCGGTGAT AACCCGAGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA GTCCTCATGG
1141 CCCTTACGGG CTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGTGGTG ACAGTGGGCA GCGAGCACGC
1201 GAGTGTGAGC TAATCTCCAA AAGCCATCTC AGTTCGGACT GCACTCTGCA ACTCGAGTGC
1261 ATGAAGTTGG AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG CGGTGAATAC GTTCCCGGGC
1321 CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGGGA GTTGGTTTTA CCCGAAGGTA GTGCGCTAAC
1381 CGCAAGGAGG CAGCTAACCA CGGTAGGGTC AGCGACTGGG GTGAAGTCGT AACAAGGTAA
1441 CCGTA

```

图 2 HJ06 16S rDNA 全序列

Fig. 2 Full-length 16S rDNA sequence of strain HJ06

2.2 HJ06 菌株 16S rDNA 全序列的相似性和系统发育

通过系统发育学分析得出各菌株间相似性及系统发育树状图(图 3)。从图 3 中可以看出在系统发育树中土壤杆菌属(*Agrobacterium*)与根瘤菌属(*Rhizobium*)的不同种在系统发育上互有交叉。已知的根瘤菌属、种隶属于 α 变形杆菌纲(Alphaproteobacteria)的 6 个属中,包括:根瘤菌属(*Rhizobium*),中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*),中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*),慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*),固氮根瘤菌属(*Azorhizobium*)

和另类根瘤菌属(*Allorhizobium*)^[5]。本研究得出的系统发育图基本与这一分类结果相符合,可以将根瘤菌及土壤杆菌分成七个分支。菌株 HJ06 位于土壤杆菌属与根瘤菌属交叉的这一分支中,并与 *R. genosp.*、*R. tropici* 和 *Agrobacterium rhizogenes* 构成一个小分支。HJ06 与 *Agrobacterium*、*Rhizobium* 属各种的相似性分别为 98.72% (*Rhizobium genosp.*)、98.32% (*R. tropici*)、97.78% (*A. rhizogenes*)、96.82% (*R. leguminosarum*)、96.56% (*R. etli*)、95.57% (*R. gallicum*)、95.42% (*R. mongolense*)、95.33% (*R. yanglingense*)、95.05% (*R. indigoferae*)、

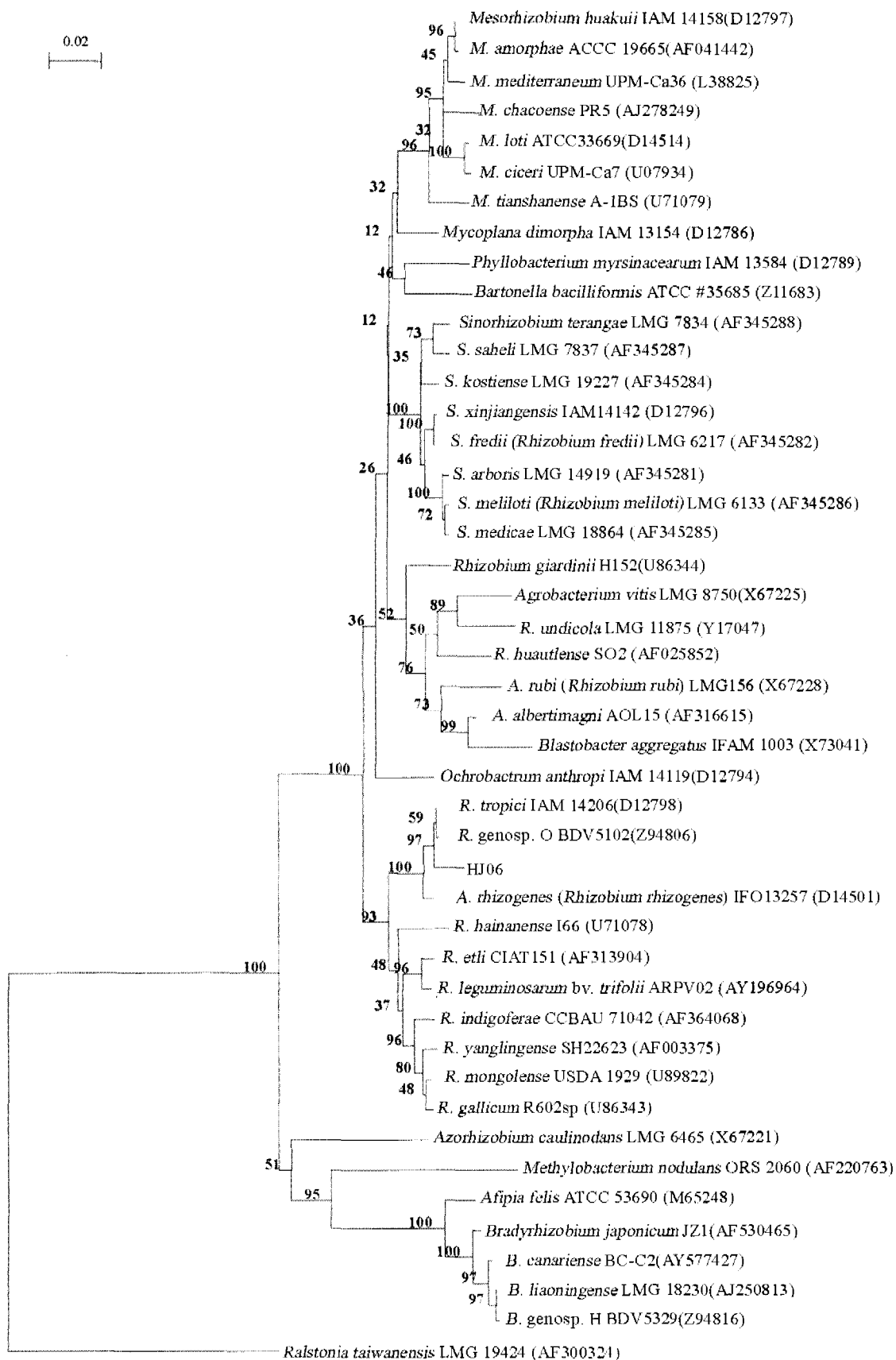


图 3 根瘤菌系统发育树状图

Fig. 3 Dendrogram of rhizobial phylogeny

95.22% (*R. hainanense*)、94.78% (*A. albertimagni*)、93.52% (*A. rubi*)、92.35% (*R. undicola*)、93.14% (*A. vitis*)、94.14% (*R. huautlense*)、95.92% (*R. giardinii*)。

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%^[6], 因此可以确定菌株 HJ06 为隶属于 *Rhizobium* 属的种。

中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 的 8 个种 *S. medicae*、*S. meliloti*、*S. fredii*、*S. terangae*、*S. saheli*、*S. kostiense*、*S. arboris*、*S. xinjiangensis* 构成一个分支。

Mesorhizobium amorphae、*M. huakuii*、*M. mediterraneum*、*M. ciceri*、*M. loti*、*M. chacoense*、*M. tianshanense* 7 种构成一个独立分支, 形成中慢生根瘤菌属。

4 种慢生根瘤菌构成慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 分支, 包括 *B. genosp.*、*B. liaoningense*、*B. canariense*、*B. japonicum*。

固氮根瘤菌属 (*Azorhizobium*) 的 *A. caulinodans* 构成一个独立分支。

最近的研究发现了第四个根瘤菌分支

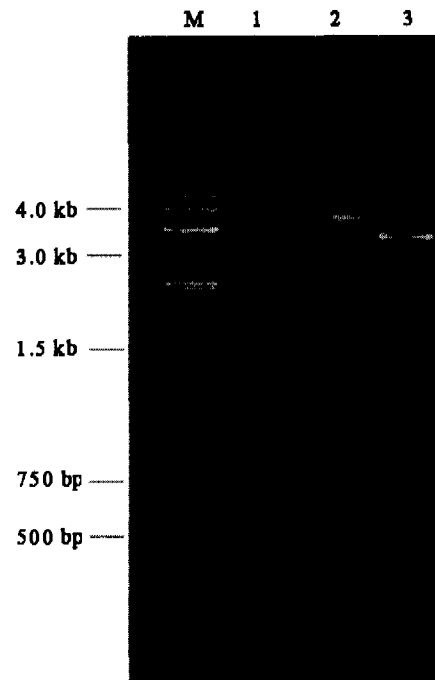


图 4 *nifA* 基因的扩增、连接及 *EcoR* I 酶切结果

Fig. 4 The result of *nifA* PCR, link and *EcoR* I enzyme digestion

M. 1 kb marker; 1. HJ06 DNA 扩增片段 HJ06 DNA PCR segment; 2. 重组质粒 Recombinant plasmid; 3. 重组体质粒 / *EcoR* I Recombinant plasmid / *EcoR* I.

```

CTCACTATAG GGC GAATTGG GCCCGACGTC GCATGCTCCC GGCCGCCATG GCGGCCGCGG
GAATTCGATT /TTCGCGCAC GTTTC CCGGC CAGCTGTACT CCATCAGCAG GCGAGTCGCC
CCATCGCTGA TGC GCAGCGT TCGCCCCTGG CTGTGGGCGA TTTTTCGCAC CAGAAAGTGC
GCCAGCTCGG CGATATCCTC CTGGCGCTCG CGCAGCGGCG GCAGCGCGAT AGGTATTACG
TTCAGGCGGT AGTATAGATC CTCGCGGAAA TGACCCAGCT GCACCTCCTC TTCCAGATGG
CGGTTGGTCG CCGCGATAAT GCGCACGTTG ACCCGCAGGG TTTCGTCGCC GCCGACGCGC
TCCATCTCCC CCTCTTGCA G AATACGCAGT AGCTTAGCCT GAAACGAGGC GCTGCTTTTCG
CCGATCTCAT CGAGGAATAA GGTGCCGCCG TCCGCCAGCT CAAAGCGGCC TTTCCGCTGG
CTCACCGCGC CGGTAAACGC GCCTTTCTCA TGACCAAACA GCTCGCTCTC CAGCAGGTTG
TCCGGCAGCG CCGCGCAGTT AAATTTGACG AACGCCGCGG CGGCGCGCGG AGAATTATGG
TGGATGGCGT TGGCGATGAG CTCTTTCCCG GTGCCGCTCT CGCCGCGTAC CAGCACCGT/
AATCACTAGT GAATTCGCGG CCGCCTGCAG GTCGACCATA TGGGAGAGCT CCCAACGCGT
TGGATGCATA GCTTGAGTAT TCTATAGTGT CACCTAAATA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA
TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA
AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATGGCGTGG
CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTCGTGC

```

图 5 HJ06 菌株 *nifA* 基因片段序列

Fig. 5 Sequence of HJ06 *nifA* DNA segment

Proteobacteria 门 α - 亚纲 *Methylobacterium* (甲基杆菌属) 系统发育分支, 此分支新种 *Methylobacterium nodulans* 能利用甲醇生长, 这在根瘤菌中是独一无二的^[7]。

另类根瘤菌属 (*Allorhizobium*) 仅 *R. undicola* 一种, 在系统发育树中处于土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 与根瘤菌属 (*Rhizobium*) 的交叉分支中。

2.3 HJ06 菌株 *nifA* 基因片段 PCR 扩增结果和分析

从 HJ06 菌株中扩增出 585 bp 左右的 *nifA* 基因 PCR 产物, 电泳结果如图 4。 *nifA* 基因 DNA 片段序列见图 5。

用 BLAST 程序对 HJ06 的 *nifA* 基因片段 DNA 序列和 GenBank 中已登录的 *nifA* 基因 DNA 序列进行核苷酸同源性比较, 结果发现 HJ06 的 *nifA* 基因片段 DNA 序列分别与 *Klebsiella pneumoniae* (X13303)、 *Klebsiella pneumoniae* (X02616) 的同源性达到 99.3%; 与 *Klebsiella oxytoca* (D00339) 的 NifF, NifL, NifA, NifB 蛋白基因的同源性为 97.8%。

nif 基因系指在结构和功能上与自生固氮的肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的 20 个 *nif* 基因具有同源性的基因。 *nifA* 基因作为固氮基因的正调节基因, 已经从 10 多种固氮微生物中克隆出来并完成了序列测定^[8], 但厚荚相思根瘤菌的 *nifA* 基因克隆和序列测定尚属首次。

参考文献

[1] Lü C Q(吕成群), Huang B L(黄宝灵), Wei Y L(韦原莲), et al.

Biological characteristics of the indigenous rhizobia isolated from *Acacia* spp. in Guangxi [J]. Microbiology(微生物学通报), 2003, 30(4):1-5.(in Chinese)

[2] Lü C Q(吕成群), Huang B L(黄宝灵), Wei Y L(韦原莲), et al. Comparative effects of different *Acacia* rhizobia inoculated on *Acacia crassicarpa* seedlings [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci)(南京林业大学学报 自然科学版), 2003, 27(4):15-18.(in Chinese)

[3] Chen W F(陈文峰), Chen W X(陈文新). Numerical taxonomy and 16S rDNA-PCR RFLP of nodule bacteria isolated from root nodules of leguminous trees, *Robinia* spp., *Dalbergia* spp. and *Albizia* spp. [J]. Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报), 2003, 9(1):53-58.(in Chinese)

[4] Wen P C, Tsong T K. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA [J]. Nucl Acids Res, 1993, 21(9):2260-2263.

[5] Liu X Y(刘晓云), Chen W F(陈文峰), Chen W X(陈文新). The developments of phylogenesis and taxonomy of *Rhizobia*: A review [J]. Microbiology(微生物学通报), 2002, 29(5):73-76.(in Chinese)

[6] Tan Z Y(谭志远), Chen W X(陈文新). Sequencing the 16S rDNA of representative strain of new rhizobial group and determining of its phylogentic relationship [J]. Acta Microbiol Sin(微生物学报), 1997, 37(6):411-416.(in Chinese)

[7] Xin Y H(辛玉华), Chen W X(陈文新). 16S rDNA sequence analysis of representative strains of two rhizobial new group isolated from *Astragalus* spp. [J]. Acta Microbiol Sin(微生物学报), 2002, 42(5):521-525.(in Chinese)

[8] Gao C J(高成江), Shen S S(沈思师), Jin R Z(金润之). Identification and functional analysis of *nifA* from *Mesorhizobium huakuii* 159 [J]. Acta Microbiol Sin(微生物学报), 2000, 40(3):257-263.(in Chinese)