中国农业大学学报 1997,2(1):31～36
Journal of China Agricultural University

宁夏沙坡头地区根瘤菌特性分析[①]:

Ⅰ. 多位点酶电泳酶谱分析

李 颖[②] 阮小超 陈文新
(生 物 学 院)

摘 要 本试验对分离自宁夏沙坡头地区的 17 株根瘤菌和 16 株已知参比菌进行了 16 种多位点酶电泳分析。将所得数据做聚类分析表明，分离自沙坡头地区的根瘤菌中，有 12 株相似性较高，不同于已知参比菌，而独立成群，这与数值分类结果吻合。其分类地位需进一步研究确定。试验发现，异柠檬酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、黄嘌呤脱氢酶、磷酸葡萄糖变位酶、葡萄糖磷酸异构酶、超氧化物歧化酶等酶谱更有利于区分不同的根瘤菌种群。

关键词 根瘤菌；多位点酶电泳
中图分类号 Q939；Q55

Characteristics of Rhizobia Isolated from Shapotou Region in Ningxia Autonomous Region of China:

Ⅰ. Analysis of Multilocus Enzyme Electrophoresis Patterns

Li Ying Ruan Xiaochao Chen Wenxin
(College of Biology)

Abstract Seventeen strains of rhizobia isolated from Shapotou region in Ningxia Autonomous Rogion and 16 reference strains of rhizobium species were analysed by electrophoresis of 16 multilocus enzymes. Based on clustering analysis. There were 12 new isolates differred from the reference strains. This result is in accordance with that of the numerical taxonomy and composed as a separate group at 90% similarity. The electrophoretic patterns of isocitrate dehydrogenase (ICDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PG), glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6P), xanthine dehydrogenase(XDH), phosphoglucose isomerase(PGI), phosphoglucomutase (PGM) and superoxide dismutase (SOD) were rather useful to classification of rhizobia.

Key words rhizobia; electrophoresis of multilocus enzyme

收稿日期： 1995-09-08
①国家自然科学基金资助重点项目39130010
②李颖，北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区)，100094

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

早在 70年代，同工酶作为一种筛选工具或鉴定标志就应用于植物育种。80年代以来，微生物学工作者也多次运用此项技术探讨了不同微生物种群遗传多样性等问题。如：较系统地总结多位点酶电泳技术在细菌研究中的应用[1]，引入根瘤菌的研究[2]，对15种多位点酶在 51 株菜豆根瘤菌显现的酶谱的分析[3]，对苜蓿根瘤菌自然群体的遗传结构的分析[4]等。另外，Esperanza Martinez-Romero 等[5]在确定热带根瘤菌分类地位时，首先分析了 8 种多位点酶酶谱；1991 年国际细菌系统学杂志发表了“描述根、茎瘤菌新种属的最低标准”[6]，建议在根瘤菌的分类研究中应用多位点酶分析技术。

本研究对宁夏沙坡头地区根瘤菌已完成数值分类分析[8]，现根据国际细菌分类委员会的建议，运用多位点酶电泳技术对这些菌株做进一步分析。

1 材料与方法

1.1 材料 选取已知根瘤菌参比菌 16 株及分离自宁夏沙坡头地区的根瘤菌 17 株，菌株名称、寄主名等信息见表1。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的提取 菌株接种于 YMA(yeast extract-mannitol-agar) 斜面，28 ℃培养 24～48 h，转接于 100 mL YM(yeast extract-mannitol)液体培养基中，28℃ 振荡培养 24～48 h，离心收集菌体 (5 000 $r \cdot min^{-1}$，15～20 min)，用 0.01 mol L^{-1} Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0) 洗涤菌体三次，加入细胞体积 1.0～1.5 倍的 0.01 mol L^{-1} Tris-HCl 缓冲液，样品置冰浴中，超声波破碎菌体 2 min(每 15 s 间歇一次)，10 000 $r \cdot min^{-1}$离心 5 min，上清液即为粗酶液，将粗酶液分装于 0.5 mL Eppendorf 管中，置－70℃冰箱保存备用。

1.2.2 电泳 按 14% 制备淀粉凝胶板，水解淀粉为 Sigma 公司产品，各种酶凝胶缓冲液的配制、采用模具及方法见参考文献[7]，用新华 3 号滤纸条蘸取粗酶液逐一点样。

各种电泳缓冲液及电泳条件见文献[7]，以溴酚蓝作为电泳前沿指示剂。

1.2.3 染色 各种酶染液配方及染色方法见参考文献[7]。实验所分析酶的种类为以下 16 种：6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PG)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6P)、磷酸葡萄糖变位酶(PGM)、磷酸葡萄糖异构酶(PGI)、乙醇脱氢酶(ADH)、半乳糖脱氢酶(GaDH)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、过氧化物酶(PX)、黄嘌呤脱氢酶(XDH)、异柠檬酸脱氢酶(ICDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、亮氨酸氨肽酶(LAP)、过氧化氢酶(CAT)、酯酶(EST)、苹果酸酶(ME)和苹果酸脱氢酶(MDH)。

1.2.4 记录及统计分析 根据染色后出现的谱带，计算每株菌每种酶的 *Rf* 值。将对应 *Rf* 值有酶带的记为“1”，反之记为“0”，以菌株为行，*Rf* 值为列，组和成数据矩阵，在长城 286 微 机上用简单匹配系数(Ssm)计算菌株间相似性，用平均连锁的聚类方式聚类 ，所有计算在 MINTS 软件支持下自动运行。

2 结果分析

本实验选取 16 株已知参比菌(每种两株)和 17 株未知菌，对它们 16 种多位点酶活性

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进行分析，所有酶的 Rf 值在 −0.11 至 0.89 之间，得出 33×246 的数据矩阵，经聚类分析表明有 12 株未知菌独立成群，不同于所用参比菌。同时发现大部分已知菌按现有分类地

表 1　供试菌株一览表

序　号		菌　号	菌　名	来　源
参比菌	1	NZP2213^T	*Rhizobium loti*	新西兰
	2	NZP2227	*R. loti*	新西兰
	3	H1	*R. meliloti*	黑龙江
	4	USDA1002^T	*R. meliloti*	美国
	5	USDA2370^T	*R. leguminosarum*	美国
	6	162X68	*R. leguminosarum*	美国
	7	BR853	*R. tropici*	巴西
	8	CIAT899^T	*R. tropici*	巴西
	9	HAMBI540^T	*R. galegae*	芬兰
	10	HAMBI503	*R. galegae*	芬兰
	11	PL-52	*R. huakuii*	湖北
	12	CCBAU2609^T	*R. huakuii*	南京
	13	USDA205^T	*R. fredii*	河南
	14	2048	*R. fredii*	辽宁
	15	AIBS^T	*R. tianshanense*	新疆
	16	91X01	*R. tianshanense*	新疆
未知菌	17	N169	*Vicia faba* 蚕豆	宁夏沙坡头
	18	N181	*Glycyrrhiza* sp. 甘草	宁夏沙坡头
	19	N182	*Glycine max* 大豆	宁夏沙坡头
	20	N185	*Sophora japonica* 国槐	宁夏沙坡头
	21	N189	*Caragana korshnshii* 柠条锦鸡儿	宁夏沙坡头
	22	N191	*Caragana erinecea* 川西锦鸡儿	宁夏沙坡头
	23	N196	*Caragana kansuersis* 甘肃锦鸡儿	宁夏沙坡头
	24	N197	*Caragana arbrescens* 树锦鸡儿	宁夏沙坡头
	25	N206	*Amorpha fruticosa* 紫穗槐	宁夏沙坡头
	26	N207	*Hedysarum scoparium* 花棒	宁夏沙坡头
	27	N210	*Caragana rosea* 红花锦鸡儿	宁夏沙坡头
	28	N218	*Sophora alopecuroides* 苦豆子	宁夏沙坡头
	29	N220	*Glycyrrhiza aspera* 粗毛甘草	宁夏沙坡头
	30	N232	*Medicago lupulina* 天蓝苜蓿	宁夏沙坡头
	31	N242	*Medicago sativa* 紫花苜蓿	宁夏固原
	32	N245	*Vicia sepium* 野豌豆	宁夏固原
	33	N247	*Astraglus* sp. 黄芪	宁夏固原

T：模式菌株

位相聚，也有少数菌株没有归入其应处的位置，分析原因可能是由于某些酶在菌株间变化不大，如在本实验中的过氧化物酶；有些酶的谱带偏少，不能充分体现出菌株间的异质性。对于全部菌株来说，除苹果酸酶、乙醇脱氢酶、亮氨酸氨肽酶的谱带偏少外，其他酶谱带较

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

多，酶带染色效果较好，尤其 G6P，6PG，PGM，PGI，ICDH，XDH 和 SOD 等酶谱上同种的两株参比菌的谱带类似(图 1)。仅以已知菌的 ICDH，6PG，PGI，G6P，SOD，PGM 酶谱说明)，如第 1 号和第 2 菌为 *R. loti*，它们在 ICDH，SOD，PGI，PGM 等酶谱上的 *Rf* 值相同；第 3 号和第 4 号菌为 *R. meliloti*，它们在 ICDH，G6P，SOD，6PG，PGI，PGM 等酶谱上的 *Rf* 值相同；其他的参比菌 *R. leguminosarum*(5，6 号)；*R. tropici*(7，8 号)；*R. huakuii*(11，12 号)；*R. fredii*（13，14 号）也都分别在几种酶谱上出现了相同的 *Rf* 值。此外，从上述酶谱看，已知菌群与未知菌群间差异明显，因此推测以上几种酶谱在对根瘤菌的分类中比较有利。取上述 7 种酶的 *Rf* 值所对应的 115 个数据进行聚类分析表明(图 2)，全部菌株在 86% 相似性水平上相聚，除两株 *R. tianshanense*(编号为 15，16)以外，其余各种参比菌均

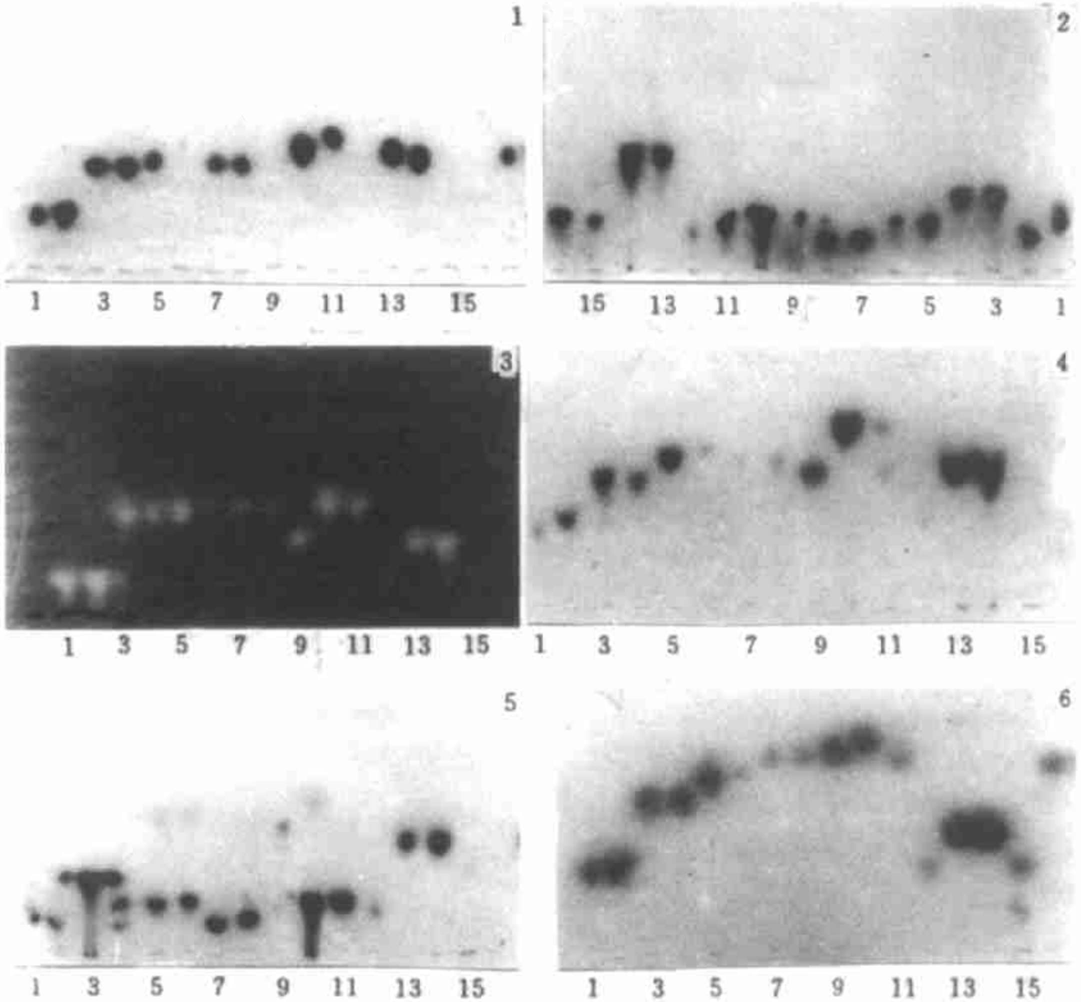

图 1　部分多位点酶电泳酶谱

1. 异柠檬酸脱氢酶(ICDH)　2. 葡萄糖 6-磷酸脱氢酶(G6P)
3. 超氧化物歧化酶 SOD)　4. 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PG)
5. 磷酸葡萄糖异构酶(PGI)　6. 磷酸葡萄糖变位酶(PGM)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

按现有分类地位相聚。第 1，2,3,4,5,6,8 群分别为 *R. loti*，*R. huakuii*，*R. leguminosarum*，*R. tripici*，*R. galegae* 和 *R. fredii*，*R. meliloti*。有 12 株未知菌在 90%相似水平上独立构成第 7 群，它们分别是 N185(寄主为国槐)、N210(寄主为红花锦鸡儿)、N247(寄主为黄芪)、N232(寄主为天蓝苜蓿)、N242（寄主为紫花苜蓿)、N245(寄主为野豌豆)、N207(寄主为花棒)、N218(寄主为苦豆子)、N220(寄主为粗毛甘草)、N189(寄主为柠条锦鸡儿)、N196(寄主为甘肃锦鸡儿)、N191(寄主为川西锦鸡儿)。此结果与数值分类[8]结果相吻合。但在 92%相似水平上 12 株未知菌又可分为 3 个亚群，与数值分类结果相比，亚群之间菌株所处位置有交叉。

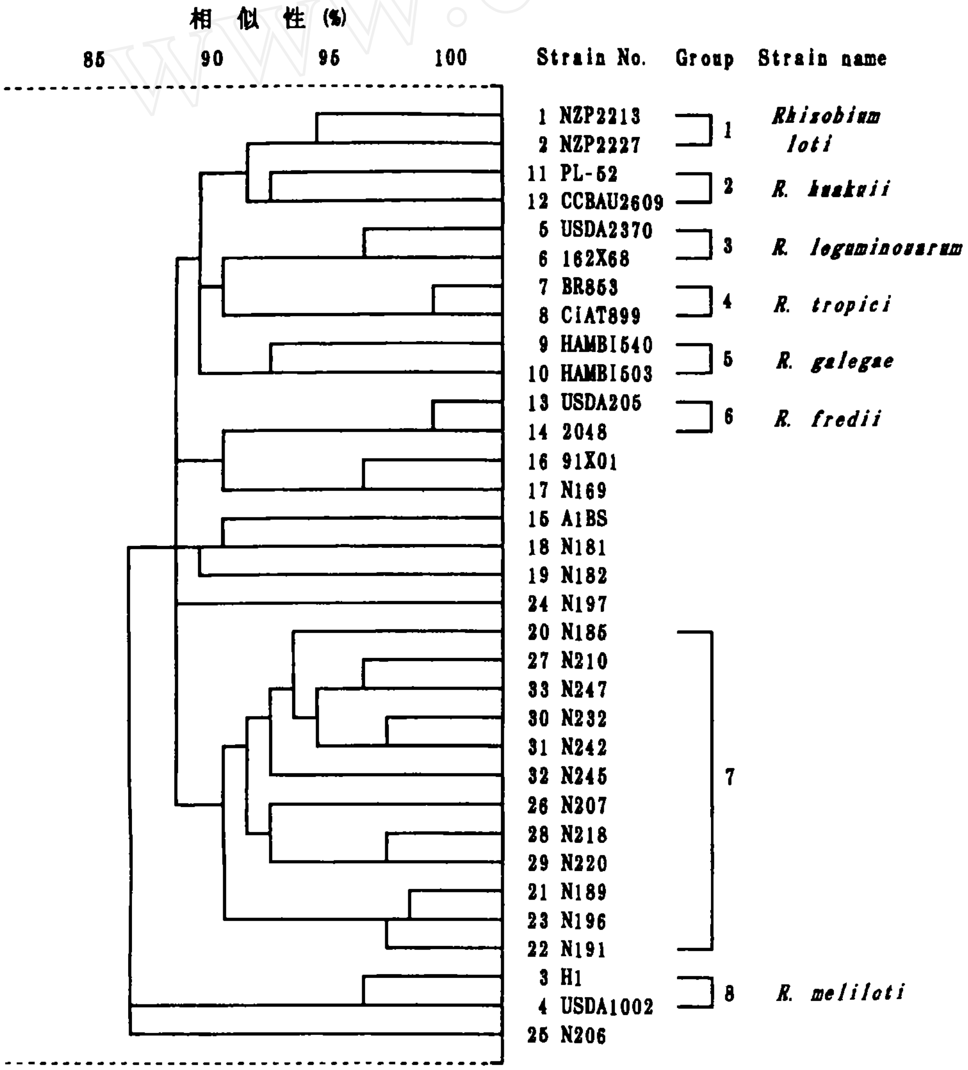

图 2　沙坡头地区根瘤菌多位点酶电泳聚类结果

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

本实验采用的方法虽适用于多种动植物和微生物种质资源的鉴定、分类、遗传结构等方面的研究。但此技术仍有一定的局限性，诸如不能正确定量，对于多位点酶的稳定性来说，不同的酶对外界条件的反应不同，有些比较稳定，如实验中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、磷酸葡萄糖变位酶、黄嘌呤脱氢酶、超氧化物歧化酶等，它们在对根瘤菌的分析中更有利于区分不同的种群，而有些则受外界因素影响较大，不稳定，在实验中表现为亮氨酸氨肽酶、苹果酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶等。因此，在进行多位点酶电泳分析时，每种酶最好重复 2～3 次或更多，尽量避免人为误差，样品制备应统一，排除影响酶活的各种可能因素，达到最佳效果。

实验中所选用未知根瘤菌的寄主锦鸡儿、花棒、甘草、苦豆子等均为旱生植物，它们在沙漠旱区的防风固沙、土壤改良中起着重要作用。通过实验再一次证明，不论是苜蓿根瘤菌，还是锦鸡儿根瘤菌，虽然寄主不同，由于受干旱缺水的生境影响与自然选择，促使它们逐渐适应了较恶劣的生态环境，旱区的根瘤菌在代谢过程中有共同之处。对于良好的旱生资源，如能进一步改造它们，提高其共生固氮能力，将对人类改造沙漠有益。

经多位点酶电泳分析表明，沙坡头地区根瘤菌与已知菌群有明显不同，其代谢可能体现了旱生菌群的特点，关于其分类地位尚需通过 DNA-DNA 杂交及 16S rRNA 序列分析等实验确定，但此分析与数值分类结果基本吻合，说明它们有可能成为新的菌群，应继续增加菌株进行深入研究。

参考文献

1 Selander R K et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl Environ Microbiol, 1986, 51(5): 873～884

2 Young J P W. Rhizobium Population Genetics: Enzyme Polymorphism in Isolates from Peas, Clover, Beans and Lucerne Grown at the Same Site. J Gen Microbiol, 1985, 131: 2399～2408

3 Pinero D, et al. Genetic Diversity and Relationships among Isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(11): 2825～2832

4 Eardly B D, et al. Genetic Structure of Natural Populations of Nitrogen－Fixing Bacterium *Rhizobium meliloti*. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(1): 187～194

5 Esperanza Martinez－Romero et al. Rhizonium tropici, a Novel Species Nodulating Phaseolus vulgaris L. Beans and Leucaena sp. Trees. Int J Syst Bacteriol, 1991, 41(3): 417～426

6 Graham P H, et al. Proposed Minimal Standards for the Description of New Genera and Species of Root－and Stem－Nodulating Bacteria. Int J Syst Bacteriol, 1991, 41(4): 582～587

7 张维强，唐秀芝 编著. 同工酶与植物遗传育种，北京农业大学出版社，1993

8 李 颖，阮小超，陈文新. 宁夏沙坡头地区根瘤菌特性分析:I. 数值分类研究. 中国农业大学学报，1996，1(5):15～20

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net