

# 海南快生根瘤菌蛋白、多位点酶及质粒电泳

汪恩涛 王小波 劳华军 陈文新

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

**摘要** 在本室以前的研究中,海南快生根瘤菌具有分类上的多型性。其一部分归于已知各根瘤菌种,另有一部分菌株构成独立的表观群及相应的 DNA 同源群(亚群 I 和 IV)。本文采用不同的电泳方法,分析了海南快生根瘤菌和已知根瘤菌种的代表共 55 个菌株的全细胞蛋白、酯酶、过氧化物酶及质粒组成。结果表明:同一亚群的菌株间有相似的蛋白图谱,种群之间有较明显的差异,根瘤菌中普遍存在酯酶,酶带的数量和迁移率具有菌株专一性,更适合于菌株的鉴别。过氧化物酶只在部分菌株中观察到,亚群 I 与亚群 IV 的菌株均显示一条酶带,但二者之间的相对迁移率有明显差别。质粒电泳中,大多数海南快生菌中存在着大质粒,分子量范围是 20—4000Kb,同一亚群中的不同菌株间具有一定相似性,这些结果为海南快生型根瘤菌的分类提供了一些辅助证据。

**关键词** 根瘤菌,蛋白质电泳,多位点酶电泳,质粒电泳

1991 年,国际系统细菌学委员会根瘤菌分会提出了描述根、茎结瘤细菌新属新种的最低标准<sup>[1]</sup>。该标准以遗传学特征为重点,同时考虑到表型特征与共生特征。认为化学分类方法的使用,能使分类结果或结论更为可靠。本室以前的研究表明,海南快生菌在分类上具有多

型性<sup>[2]</sup>。此后,又进一步对 28 株海南快生菌,7 株海南慢生菌及 23 株已知根瘤菌种的参比菌一起进行了数值分类和 DNA-DNA 杂交分

---

1993-07-21 收稿

析<sup>[3]</sup>。数值分类中,上述菌株在65%的相似性水平上分为两大群。群I为快生菌群,包括全部海南快生菌及已知快生参比菌;群II为慢生菌群,包括了 *Bradyrhizobium japonicum* 的三株参比菌和海南慢生菌。群I在80%的相似性水平上又分出10个亚群,其中亚群I、III、V、VI、VII、IX、X为已知种,亚群II(含4株菌)、IV(含13株菌)和亚群VIII(含2株菌)为海南快生菌群。DNA-DNA杂交表明,上述海南快生菌分别构成不同于已知根瘤菌种的独立的DNA同源群。本试验中用全细胞可溶性蛋白电泳,质粒电泳和多位点酶(multilocus enzymes)电泳分析了海南快生菌的种群间及种群内菌株间的遗传差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养条件

试验中先后采用了55个菌株(表1),包括33个海南快生根瘤菌和已知根瘤菌各种的22个代表菌株。菌株的活化及培养条件同文献[4]。

### 1.2 全细胞可溶性蛋白电泳

按文献[4]方法进行。

### 1.3 质粒电泳

按照 Eckhardt 的细菌质粒DNA快速鉴定(RPG)法<sup>[5]</sup>。主要特点是胶内裂解菌体,以保证大质粒的完整。

在装有2ml TY培养基的试管里接种根瘤菌,120 r/min 28℃摇床培养至对数中后期。取OD<sub>420nm</sub>为1的培养液1ml,12000 r/min离心45秒,去除上清液。将菌体重新悬浮于1×TBE中,洗涤1次,离心收集。

0.6%的琼脂糖胶的制备,菌体的裂解,质粒的电泳均按 Eckhardt 的方法<sup>[5]</sup>。结束电泳后将凝胶放入溴化乙锭(10mg/ml)染液中,30—60分钟后转移到1mmol/L MgSO<sub>4</sub>中浸泡30分钟,紫外灯下检测照相。

### 1.4 多位点酶电泳

菌体培养、裂解、14%淀粉胶的制备及电泳条件均按 Young<sup>[6]</sup>的方法。过氧化物酶和酯酶染色按文献[7]的方法。采用拍照和绘图记录结果,并根据胶上显色结果计算相对迁移率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 全细胞可溶性蛋白电泳

蛋白质是基因的直接产物,其组成反映了细菌的遗传背景。因此,蛋白电泳是细菌化学分类的常用方法之一。本试验中SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析了供试菌株的可溶性蛋白。电泳结果反映出,同一根瘤菌种的代表菌株之间具有基本相同的蛋白质组成,不同种间蛋白组成有所不同。根据电泳照片及其460nm扫描结果确定的各供试菌群的一些主要蛋白带总结于表2中。从表2可见,亚群II的4个菌株和亚群IV的13个菌株不同于已知根瘤菌种。这一结果为这两个菌群分类上的独立地位提供了佐证。

### 2.2 质粒电泳

文献记载,快生根瘤菌中普遍存在着大质粒,而慢生根瘤菌中尚未发现大质粒。根瘤菌的质粒DNA有分子量大,拷贝数少,易被剪切等特点,给质粒DNA的提取带来一定的困难。因此,本实验采用在凝胶上直接裂解菌体,分离质粒的RPG法<sup>[4]</sup>。

试验中,大多数快生根瘤菌都分离出了大质粒(图版I)。参考菌株Rm41中分离到三条质粒带,已知它们的分子量分别为60、200和1250Kb。以此作为分子量对照,估计出供试菌株质粒的分子量范围在20—3880Kb之间,并按其大小分为三类,分子量大于200Kb的为巨大质粒,分子量在100—200Kb间的为大质粒,分子量小于100Kb的为小质粒。

从图1中可见,亚群I中除H3有一条质粒带外,S43、H7、H8均未分离出质粒;亚群III(*R. loti*)从海南分得的三个菌株都含有二条质

表1 供试菌株一览表

亚群*	序号	菌株	菌名或寄主名	菌株来源
I	1	USDA1002 <sup>T</sup>	<i>Rhizobium meliloti</i>	美国
	2	H1	<i>R. meliloti</i>	黑龙江
	3	102F28	<i>R. meliloti</i>	美国
	4	Rm41	<i>R. meliloti</i>	
I	5	S43	<i>Leucaena leucocephala</i> (银合欢)	海南
	6	H7	<i>Leucaena</i> sp.	海南
	7	H8	<i>Leucaena leucocephala</i>	海南
	8	H3	<i>Leucaena</i> sp.	海南
	9	S62	<i>Cassia mimosoides</i> (山扁豆)	海南
II	10	ATCC33669 <sup>T</sup>	<i>R. loti</i>	加拿大
	11	I 22	<i>Sesbania cannabina</i> (红杆田菁)	海南
	12	I 24	<i>Calopogonium mucunoides</i> (毛夏豆)	海南
	13	I 93	<i>Alysicarpus vaginalis</i> (灰叶)	海南
N	14	I 2	<i>Stylosanthes guyanensis</i> (西卡柱花草)	海南
	15	I 12	<i>Centrosema pubescens</i> (蝴蝶豆)	海南
	16	I 32	<i>Desmodium triquetrum</i> (葫芦茶)	海南
	17	I 64	<i>Tephrosia candida</i> (山毛豆)	海南
	18	I 20	<i>Desmodium gyroides</i> (圆叶舞草)	海南
	19	S25	<i>Tephrosia candida</i>	海南
	20	I 66	<i>Desmodium sinuatum</i> (波状叶山绿豆)	海南
	21	H14	<i>Desmodium heterophyllum</i> (异叶山绿豆)	海南
	22	I 54	<i>Acacia sinuata</i> (藤金合欢)	海南
	23	I 33	<i>Zornia diphylla</i> (丁葵草)	海南
	24	I 27	<i>Macroptilium lathyroides</i> (紫花豆)	海南
	25	I 65	<i>Arachis hypogaea</i> (花生)	海南
26	I 36	<i>Uraria crinita</i> (长穗猫尾草)	海南	
V	27	103 <sup>T</sup>	<i>R. huakuii</i>	南京
	28	A106	<i>R. huakuii</i>	湖北
	29	PL-52	<i>R. huakuii</i>	湖北

续表 1

V	30	B-6-1	<i>Lotus</i> sp. (百脉根)	新疆
	31	A-2-BS	<i>Lotus</i> sp.	新疆
VI	32	HAMBI540 <sup>T</sup>	<i>R. galegae</i>	芬兰
	33	HAMBI1185	<i>R. galegae</i>	美国
	34	HAMBI503	<i>R. galegae</i>	英国
	35	S38	<i>Leucaena diversifolia</i> (异叶银合欢)	海南
VII	36	H33	<i>Desmodium triquetrum</i>	海南
	37	H31	<i>Pueraria phaseoloides</i> (爪哇葛藤)	海南
	38	S68	<i>Stylosanthes hamata</i> (柱花草)	海南
	39	S71	<i>Stylosanthes guyanensis</i>	海南
	40	1 39	<i>Uraria lagopodioides</i> (狸尾草)	海南
VIII	41	USDA2370 <sup>T</sup>	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	美国
	42	1-3	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	北京
	43	127K17	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i>	美国
	44	162X68	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i>	美国
IX	45	USDA205 <sup>T</sup>	<i>R. fredii</i>	河南
	46	USDA194	<i>R. fredii</i>	河南
	47	2408	<i>R. fredii</i>	辽宁
X	48	CCBAU110	<i>R. sp. (Glycine)</i>	新疆
	49	CCBAU108	<i>R. sp. (Glycine)</i>	新疆
	50	CCBAU105	<i>R. sp. (Glycine)</i>	新疆
	51	CIAT899 <sup>T</sup>	<i>R. tropici</i>	
	52	C-05-1	<i>R. tropici</i>	
	53	BR. 847	<i>R. tropici</i>	
	54	BR. 853	<i>R. tropici</i>	
	55	1 30	<i>Desmodium biantum</i> (毛排钱草)	海南

\* 根据数值分类结果<sup>[3]</sup>

表2 各菌群主要蛋白带的相对迁移率

M	种 群								M	种 群							
	Rm	Rt	Rh	Rg	Rl	Rf	I	IV		Rm	Rt	Rh	Rg	Rl	Rf	I	IV
08	-	-	-	-	-	-	+	-	51	-	-	-	-	+	-	-	+
09	-	-	-	-	-	-	-	-	55	+	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	+	56	-	-	+	+	+	-	-	-
12	-	+	+	-	-	-	-	+	57	-	-	-	-	-	-	-	+
13	-	-	-	-	-	+	-	-	60	-	-	-	+	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	+	62	-	-	-	-	-	+	-	-
16	-	-	-	+	-	-	-	-	63	-	-	-	-	+	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	64	-	-	-	-	-	-	-	+
18	-	-	-	-	-	-	+	+	65	+	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	+	-	-	-	-	67	-	-	-	-	-	-	+	-
20	-	+	-	-	-	-	-	-	68	-	-	+	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	+	-	-	69	+	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	+	+	-	-	-	70	-	-	-	+	+	-	-	-
25	-	+	-	-	-	+	-	-	74	-	-	-	+	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	+	-	75	-	-	-	-	-	-	+	-
27	-	+	+	+	+	+	-	+	76	-	-	-	-	-	+	-	-
31	-	-	+	+	-	-	-	-	77	-	-	-	-	-	-	+	-
33	-	+	-	-	-	-	-	-	78	-	-	-	-	-	+	-	-
34	-	-	-	+	+	-	-	+	81	-	+	-	-	-	+	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	+	82	+	-	-	-	-	-	+	-
38	-	-	-	-	+	-	-	+	84	-	-	-	-	-	-	-	+
39	-	+	-	-	-	-	-	-	85	-	-	-	-	-	-	+	-
40	-	-	+	-	-	-	+	-	88	-	+	-	-	+	-	+	-
42	-	-	-	+	+	-	+	+	89	-	-	-	+	-	-	-	+
46	+	-	-	-	+	-	-	-	90	-	-	-	-	-	+	+	-
47	-	-	-	-	-	+	+	-	91	+	-	+	-	-	-	-	+
49	-	+	+	-	-	-	-	-	94	+	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	+	+	-	95	-	-	+	+	+	-	+	-

M: 相对迁移率,以溴酚兰迁移距离为100

Rm: *R. meliloti*, Rt: *R. loti*, Rh: *R. huakuii*, Rg: *R. galegae*, Rl: *R. leguminosarum*, Rf: *R. fredii*, I: 亚群 I, IV: 亚群 IV

"+"95%以上菌株都具有的带, "-"菌株中的出现频率低于95%的带

粒带,带很浅且分子量相近,DNA 碎片很多,说明其DNA 易断。亚群IV中有12个菌株至少含有一条大质粒。亚群VI中的两个菌株H33和H31均未分离到质粒;*R. tropici*种的四个菌株都含有二条质粒带,其中大的一条分子量相同,

较小的那条带除C-05- I外其它三个菌的分子量相同;慢生菌I 30中未分离到质粒带。ATCC33669和NZP2213为分别来自加拿大和新西兰的同一菌株,二者间质粒数目不同,其原因待查。

上述结果表明,海南快生根瘤菌与其它快生根瘤菌一样,普遍具有大质粒。各亚群内菌株间质粒情况具有一定的相似性,不同亚群间存在一定区别。

### 2.3 多位点酶电泳

**2.3.1 过氧化物酶:**从所测的33个菌株中15个菌株的过氧化物酶电泳结果来看(图版Ⅱ),亚群Ⅰ的四个菌株S43,H7,H8,H3均有一条过氧化物酶带,迁移率范围为0.213—0.273;亚群Ⅳ的14株海南快生根瘤菌中有8个菌株(I36,I27,I33,S25,I64,I32,I12,I2)各含有1条过氧化物酶带,迁移率范围是0.373—0.468。供试菌株的其他海南快生根瘤菌中未观察到过氧化物酶带。海南慢生根瘤菌I30具有两条过氧化物酶带。由试验观察到的结果来看,亚群Ⅰ与亚群Ⅳ间菌株过氧化物酶带的迁移率大小有差别,亚群Ⅰ的迁移率较小,而亚群Ⅳ的迁移率较大。*R. huakuii*的模式菌株103具有两条过氧化物酶带,迁移率分别为0.229和0.308,与亚群Ⅳ有明显差别。*R. tropici*的寄主包括了亚群Ⅰ的寄主银合欢,其代表菌株CIAT899有一条过氧化物酶带,迁移率为0.418,与亚群Ⅰ不同,而与亚群Ⅳ的酶带相近。

试验中一部分菌株没有显示出过氧化物酶带,这并不一定说明这些菌株没有过氧化物酶。而可能反映了本试验条件下菌株间酶活性或酶的其他性质方面的差异。但就本试验的结果来看,还是能够说明海南菌群Ⅰ和亚群Ⅳ之间及这两群菌与已知菌之间存在差别。这为亚群Ⅰ和亚群Ⅳ是两个独立的分类群提供了一个佐证。

**2.3.2 酯酶(EST):**酯酶是具有多态性的一组多位点酶。图1为供试菌株的酯酶电泳图谱。从图1中可见,亚群Ⅰ的4个菌株存在2—4条酯酶带,按迁移率大小分为两组,在0.2—3.5之间一组;0.6—0.78之间为另一组。*R. loti*的3个菌株有3—4条带,迁移范围与亚群Ⅳ类似,但它们在0.19,0.28和0.65附近的3条酶带为共有带。亚群Ⅳ中的13个菌株显示出1—5条酶带,虽然多数菌株在0.25和0.45两个位

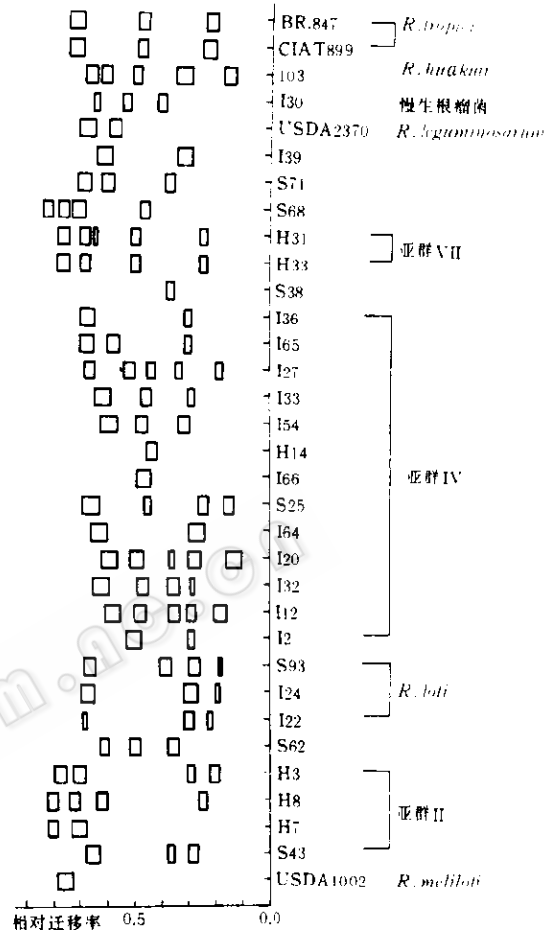


图1 酯酶电泳图谱(1.4%淀粉胶, 溴酚蓝为前沿指示剂)

置附近有共同的带,但总的看来群内菌株间有较大差异。亚群Ⅳ中的两个菌株H33和H31有4—5条带,其中4条是二者共同的。*R. tropici*的两个菌株CIAT899和BR.847具有三条相同的酶带。其它代表菌株等的图谱也是各不相同的。从上述结果可以看出,根瘤菌中存在大量酯酶。不同亚群之间的酯酶组成存在着一定的差异,但其谱带分布在有的亚群内的菌株间规律性也不强,同一亚群内各菌株间存有较大差异。在三次平行的电泳中,个别菌株的酯酶的数目有差异。有关资料表明,酯酶受菌体生

理状态的影响很大。有鉴于此,Young 等<sup>[4]</sup>将酯酶做为分类的辅助特征。本文得到的结论也是如此。

由于多位点酶是基因产物,因此生物个体间多位点酶的差异较为直接地反映了其遗传基础的差异。Martinez-Romero 等<sup>[8]</sup>主要根据与代谢有关的 8 种多位点酶电泳结果,将原属于 *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* 的菜豆根瘤菌和银合欢根瘤菌分为两个型,并分别将它们建议为两个根瘤菌新种。这一工作得到了国际系统细菌学委员会根瘤菌分会的首肯<sup>[1]</sup>。我们在本试验中采用的两个酶不是 Martinez-Romero 等分析的酶。今后将在此基础上进一步分析有关代谢的酶类,完善根瘤菌分类方法。

综上所述,本试验的三方面内容可以得出如下结论:(1)可溶性蛋白电泳结果表明,海南两个快生根瘤菌群不同于各已知根瘤菌种。(2)海南快生根瘤菌普遍具有大质粒,数目 1—

3 个不等,种群内具有一定的相似性。(3)过氧化物酶和酯酶电泳可以为根瘤菌分类提供辅助特征。

### 参 考 文 献

- [1] Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H, et al. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991, **41**:582—587.
- [2] 汪恩涛,李小红,陈文新. *微生物学通报*, 1993, **20**(2): 67—73.
- [3] Gao J L, Sun J G, Li Y, et al. *Int J Syst Bacteriol.* 1994, **44**:151—158.
- [4] 汪恩涛,陈文新,李季伦,等. *微生物学通报*, 1987, **14**(2):86—89.
- [5] Eckhardt T. *Plasmid.* 1978, **1**:584—588.
- [6] Young J P W. *J Gen Microbiol.* 1985, **131**:2399—2408.
- [7] 胡能书,万贤国. *同工酶技术及其应用*, 湖南科学技术出版社, 1985, 74—75.
- [8] Martinez-Romero E, Segovia E L, Mercante F M, et al. *Int J Syst Bacteriol.* 1991, **41**:417—426.

## GENOTYPIC DIVERSITY OF HAINAN FAST-GROWING RHIZOBIA ASSESSED BY ELECTROPHORESIS OF SOLUBLE PROTEINS, PLASMIDS AND POLYLOCUS ENZYMES

Wang Entao Wang Xiaobo Lao Huajun Chen Wenxin

(Department of Microbiology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract** The fast-growing rhizobia isolated from Hainan were divided into several groups based on numerical taxonomy and DNA-DNA hybridization in our former researches. Some of them belonged to known *Rhizobium* species, others constructed distinctive groups including subgroup I (4 strains), N (13 strains), and VI (2 strains). This paper reports the soluble protein patterns, large plasmid profiles and esterase-superoxidase polymorphisms revealed by electrophoresis. The results showed that the protein patterns were very similar among strains belonged to the same species, and varied among different species. The agarose gel electrophoresis revealed most of fast-growing strains isolated from Hainan had 1 to 3 large plasmids. Although the profiles of superoxidase only appeared in part of tested strains, it confirmed the differentiation between subgroup I and N by their different migrations. Esterases varied in both numbers and migration and showed strain-specificities.

**Key words** rhizobia, electrophoresis, protein patterns, plasmid profiles, multilocus enzymes