

# 快生型大豆根瘤菌抗原分析\*

葛诚 徐玲玫 樊蕙 吴玉兰 陈月英

(中国农业科学院土壤肥料研究所)

吴国梵 张仁双 傅连舜

(铁岭地区农业科学研究所)

## 提 要

用交叉凝集试验对从辽宁省分离的快生型大豆根瘤菌及 USDA 保存的中国快生型大豆根瘤菌进行了抗原分析以及分析了它们与其他互接种族根瘤菌之间的关系。结果证明两组快生型大豆根瘤菌都有 5 个血清型。其中有 2 个型是共同的。快型大豆根瘤菌和一些其他根瘤菌有低滴度反应与 1 株苜蓿菌株有高滴度反应。但不与慢型大豆根瘤菌起反应。

自 1982 年美国 H.H. Keyser 等发表了从中国分离的快生型大豆根瘤菌[1]以来,引起许多学者的重视[2,3]。1983 年徐玲玫等报道了从辽宁省 15 个不同地区的野生大豆根瘤中分离得到 12 株快生型大豆根瘤菌[4]。本文报告了用交叉凝集试验分析了快生型大豆根瘤菌之间的抗原关系,从辽宁省分离的快生型大豆根瘤菌与 H.H. Keyser 等从中国分离的快型大豆根瘤菌之间的关系以及分析了辽宁省快型大豆根瘤菌与其它豆科植物互接种族根瘤菌、农杆菌之间的亲缘关系。结果如下。

## 材 料 和 方 法

大豆根瘤菌种、其他豆科植物互接种族根瘤菌种及农杆菌菌株及来源见表 1。

表 1 菌 株 及 其 来 源

菌 种	菌 株	来 源
快 生 型 大 豆 根 瘤 菌	021A, 026, 047, 066, 078A, 079A, 081, 083, 104A, 111, 121, 123A,	徐玲玫等分离自辽宁省

\* 本工作是在胡济生研究员指导下进行

续表 1

菌 种	菌 株	来 源
快生型大豆 根 瘤 菌	191, 192, 193, 194, 201, 205, 206, 208, 214, 217, 257	H.H.Keyser 等分离自中国。 引自北京农大植保系
慢生型大豆 根 瘤 菌	005, B15, 113—2, 2028, 61A76, 311B110, 311B122, 311B123, 311B135, 311B71a	国内外研究菌株。本组保藏
其他豆科植 物互接种族 根 瘤 菌	R.leguminaserum 1—2 R.phaseoli F46 R.meliloti 9 R. astragali 3144 R.trifolii 540—80 Cowpea rhizobia 009 THA 201	国内外研究菌株。引自农业微 生物保藏中心及本所牧草根瘤菌 组
土 壤 杆 菌	A.tumefaciens T37 A.radiobacter 1,150	引自中国科学院 植物研究所

上述菌株按文献介绍方法，制成抗原，免疫家兔，效价达到 3200 以上时，心脏放血。收集血清后加入防腐剂备用。

凝集试验按常规方法进行，以发生 (++) 以上的凝集计算效价[5]。

## 试 验 结 果

一、辽宁省快型大豆根瘤菌菌株间交叉凝集结果。见表 2。

从交叉凝集反应中可以看出，辽宁省 12 株快生型大豆根瘤菌大约分为 5 个血清型 ① 021 A 型，仅 021 A (分自康平) 本身凝集，与其它各菌株皆无共同抗原成分。② 026 型，有菌株 026 (分自康平)、066 (分自义县)、111 (分自喀左县)，其交叉凝集价完全相同。虽然分离自不同地点，但三个菌株的抗原结构一致。从地理分布上看，在辽宁省北部。③ 047 型，有菌株 047 (分自营口)、081 (分自义县)、083 (分自义县)、123A (分自盖县)，除了 123 A 以外，其余 3 株交叉凝集价完全相同，123 A 与 081、083 抗原成分有差异，但与 047 完全相同，故仍归于这一型。地理分布在辽宁省中部。④ 078 A 型，有菌株 078 A (分自义县)、079A (分自义县)、104A (分自义县)，其交叉凝集价完全相同。⑤ 121 型，有菌株 121 (分自盖县)。

从交叉凝集中还可以看出，5 个血清型之间除了个别的有些交叉 (078 A、079 A 与 121 800 倍)，其它的基本不发生交叉凝集，低滴度的交叉通过抗血清的稀释完全可以消除。

二、USDA 快型大豆根瘤菌菌株间交叉凝集结果

表 2 辽宁省快生型大豆根瘤菌菌株间交叉凝集结果

交叉凝集价 抗原 抗血清	021 A	026	047	066	078 A	079 A	081	083	104 A	111	121	123 A
021 A	6400	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0
026	0	6400	0	6400	0	0	0	0	0	6400	0	0
047	0	0	6400	0	0	0	6400	6400	0	0	0	0
066	0	6400	0	6400	0	0	0	0	0	6400	0	0
078 A	0	0	200	0	6400	6400	100	0	6400	0	800	0
079 A	0	0	0	0	6400	6400	0	0	6400	0	800	0
081	0	0	6400	0	0	0	6400	6400	0	0	0	0
083	0	0	6400	0	0	0	6400	6400	0	0	0	0
104 A	0	0	0	0	6400	6400	0	0	6400	0	0	0
111	0	6400	100	6400	0	0	0	0	0	6400	0	0
121	0	0	0	0	200	100	0	0	0	0	6400	0
123 A	0	0	6400	100	0	0	3200	800	0	0	0	6400

USDA 快型大豆根瘤菌即 H.H.Keyser 从我国黑龙江、辽宁、山西、河南、山东等地分离的快型大豆根瘤菌。它们之间的交叉凝集结果见表 3。

表 3 USDA 快型大豆根瘤菌株间交叉凝集结果

交叉凝集价 抗原 抗血清	191	192	193	194	201	205	206	208	214	217	257
191	3200	0	0	0	0	0	800	0	0	0	0
192	0	6400	0	0	100	6400	0	6400	0	0	0
193	0	0	6400	0	0	6400	0	6400	0	0	6400
194	0	0	100	6400	0	0	0	0	0	200	100
201	0	0	200	0	3200	100	200	0	0	0	0
205	0	0	6400	0	800	6400	0	6400	0	0	800
206	6400	0	200	0	0	0	6400	200	6400	0	0
208	0	0	6400	0	0	6400	0	6400	0	0	6400
214	1600	0	0	0	0	0	6400	0	6400	0	0
217	0	0	0	0	0	0	800	0	0	6400	0
257	0	0	6400	200	0	6400	0	6400	0	0	6400

从交叉凝集结果可以看出，11株快生型大豆根瘤菌也可分为 5 个血清类型：①191

型, 包括191、206、214、其中206、214交叉凝集价完全相同, 而191稍有反常。②193型, 包括菌株192、193、205、208、257, 其中192和257的交叉凝集也有不完全相同之处, 其余3个菌株完全相同。③201型, 包括菌株201。④217型, 包括菌株217。⑤194型, 包括菌株194。

5个血清型之间交叉凝集价没有超过800, 也可以通过稀释抗原消除非特异反应。

### 三、辽宁省快型大豆根瘤菌与USDA快型大豆根瘤菌之间的交叉凝集

两组快型大豆根瘤菌之间的交叉凝集结果见表4。

它们之中的026型与193型几乎完全交叉。也是两个组菌株当中包含菌株比较多的血清型。从辽宁省分离的快生大豆根瘤菌026型分离地点不同, USDA快生型大豆根瘤菌193型包含菌株的地点虽然不很了解, 但它包含的多菌株与026型类似。说明这个血清型可能是存在于我国土壤中范围比较广的一个血清型。另外是047型与201型交叉, 但不普遍。

表4 从辽宁分离的快型大豆根瘤菌与USDA快型大豆根瘤菌之间的抗原分析

交叉凝集价 抗原 抗血清	021 A	026	047	066	078 A	079 A	081	083	104 A	111	121	123 A
191	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
192	0	0	0	800	0	0	0	0	0	0	0	0
193	0	6400	0	6400	0	0	0	0	0	6400	0	0
194	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0
201	0	100	3200	200	0	0	200	800	0	200	0	0
205	0	3200	0	6400	0	0	0	0	0	6400	0	0
206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
208	0	3200	0	6400	0	0	0	0	0	6400	0	0
214	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
217	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
257	0	6400	0	6400	0	0	0	0	0	6400	0	0

### 四、快生型大豆根瘤菌与其他豆科植物互接种族根瘤菌及农杆菌之间的关系

用不同互接种族的根瘤菌菌株及两株农杆菌制成抗血清, 分别与12株快生型大豆根瘤菌的抗原进行交叉凝集, 试验结果见表4。

试验结果表明, 除了苜蓿根瘤菌9号菌株的抗血清与026型发生特异的反应以外, 12株快生型大豆根瘤菌的抗原还与豌豆根瘤菌、羽扇豆根瘤菌、豇豆根瘤菌以及农杆菌的二个抗血清发生非特异的低滴度交叉反应, 而与慢生型的大豆根瘤菌则不发生任何交叉反应。说明快生型大豆根瘤菌从菌体抗原结构上个别类型与苜蓿根瘤菌的1株很接近, 与本族的慢型大豆根瘤菌却相去甚远。从血清学上很容易把二者分开。

表 5 快型大豆根瘤菌与其他根瘤菌种及农杆菌交叉凝集结果

交叉凝集价 抗血清	抗原	021 A	026	047	066	078 A	079 A	081	083	104 A	111	121	123 A
	<i>R.leguminosarum</i> 1-2	0	400	400	400	0	0	100	0	0	200	0	0
	<i>R.phaseoli</i> F46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>R.trifolii</i> 540-80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>R.astragali</i> 3144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>R.meliloti</i> 9	0	6400	800	6400	0	0	0	400	0	3200	0	0
	1029	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Slow-growing <i>R.japonicum</i>	005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	113-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2028	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>R.lupini</i> G13	0	0	100	0	100	0	200	0	0	0	0	0
Cowpea type rhizobia	201	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0
	009	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	<i>Agrobacteria tumefaciens</i> T37	0	200	0	200	0	0	0	0	0	100	0	0
	<i>A.radiobacter</i> 1.150	400	0	100	0	0	0	0	200	0	0	800	200

小 结 和 讨 论

1. 从辽宁省不同地区分离的 12 株快生型大豆根瘤菌经交叉凝集分析可以确定有 5 个血清型。H.H.Keyser 等从中国分离的 11 株快生型大豆根瘤菌经交叉凝集分析亦可确定有 5 个血清型。两组快生型大豆根瘤菌中有两个一致的血清型。其中 026 型与 193 型既来自几个不同的地区，又都包含了比较多的菌株。说明它可能是一个在中国土壤内存在广泛的血清型菌株。在此基础上对部分地区田间栽培大豆根瘤内快型菌结瘤菌系的调查分析证明了这一点[6]。

2. 来自不同地区的快型大豆根瘤菌有较多的血清型，反映了土壤、气候、进化的因素。Robert F.M. 等(1982)分离收集了遍及摩洛哥的豌豆根瘤菌共 28 株，发现其菌体抗原有很高的异质性[8]，与本文结果是一致的。快型大豆根瘤菌的血清分型为研究它们的生理生化特性及分类学、生态学奠定了基础。

3. 不同接种族根瘤菌之间的菌体结构是不同的。Graham 曾根据交叉凝集的结果把几个互接种族根瘤菌分成三个类群：①*R.leguminosarum*、*R.phaseoli* 和 *R.trifolii* 为一组。② *R.japonicum*、*R.lupini* 和 Cowpea type rhizobia 为一组。③ *R.meliloti* 与

*Agrobacteria* 为一组[8]。后来用数值分类, DNA 中G+C 百分含量等方面进行的工作与上述分类是一致的[9]。从目前的快生型大豆根瘤菌与其它互接种族之间的交叉凝集结果可以看出, 它们不与本族的大豆根瘤菌抗血清反应, 但与快型根瘤菌、其它慢型根瘤菌及农杆菌的部分抗血清都有一些交叉反应, 尤其是与其中 1 株苜蓿根瘤菌 9 号菌株有高滴度的交叉凝集, 对此结果尚需进一步研究。血清学反应的结果似更说明快型大豆根瘤菌属于一种中间类型。对它们生理生化及共生效应的鉴定[10]与血清学结果一致, 亦与 Trinick(1980)的工作[11]相一致。

### 参 考 文 献

- [1] keyser H.H. et al: 1982, Science vol.215, No. 4540, 1631—1632.
- [2] Yelton, M.M. et al: 1983, J. of General Microbiology, vol. 129, No.5, 1537—1547.
- [3] Masterson, R.V et al: 1982, J. of Bacteriology, vol. 152, No.2, 928—931.
- [4] 徐玲玖等: 1982, 土壤肥料, No.2, 7—8.
- [5] 山东土肥所根瘤菌组: 1976, 大豆根瘤菌免疫血清的制备及其应用研究, 油料作物科技, 1976, No.4.
- [6] 葛 诚等: 快生型大豆根瘤菌在栽培大豆根瘤内的分布 (待发表)
- [7] Robert, F.M et al: 1982, Annales de Microbiologie vol. 133A, No.3, 461—470.
- [8] Graham, P.H: 1963, Antonie van leeuwenhoek, 29, 281—291.
- [9] Kenneth, L. Giles et al edited: International review of Cytology supplement 13 Biology of the Rhizobiaceae, P.1.—13.
- [10] Trinick: M.J. 1980, J. of Appl. Bacteriology, 49, 39—53.

### ANALYSIS OF ANTIGENS FOR FAST-GROWING *R. japonicum*

Ge Cheng Xu Lingmei Fan Huei Wu Yulan Chen Yueying

(Soils & Fertilizers Institute, Chinese Academy of Agr.Sci., Beijing)

Wu Ganfan Zhang Renshuang Fu Lianshuen

(Tieling Agricultural Institute, Liaoning)

### Abstract

An analysis of antigens for fast-growing *R. japonicum* derived from Liaoning Province and USDA was made by means of cross agglutination and their affinities with other Rhizobial groups were studied. There are five serogroups in fast-growing *R. japonicum* derived from Liaoning and USDA. Two serogroups in these groups are the same.

Antigens of fast-growing *R. japonicum* from Liaoning would be agglutinated with antisera of other Rhizobial groups in a low titre, but in a high titre with those of the *Rhizobium meliloti* strains. There was no cross-reaction between fast and slow-growing *R. japonicum*.