

快生型大豆根瘤菌的理化特性 和共生效应(二)

樊 蕙 徐玲玫 葛 诚 吴玉兰 陈月英

(中国农科院土肥所微生物室)

吴冈梵 张仁双 傅连舜

(辽宁铁岭农业科学研究所)

摘 要

对从辽宁省分离的快生型大豆根瘤菌的鉴定表明,其代时为2.5—4.0小时。对碳源的利用范围较广;13株快生型大豆根瘤菌除了可以利用已糖、五碳糖、三碳糖以外,而且能够利用乳糖、麦芽糖和蔗糖等双糖。在多数基质上产酸,在丙酮酸钠、苹果酸钠培养基上产碱。不利用菊糖。

快生型大豆根瘤菌不与三叶草、草木樨、紫云英、豌豆、蚕豆、花生等豆科植物结瘤共生。可在豇豆、绿豆上结瘤。在与栽培大豆“开育八号”共生时,部分菌株接种后的植株干重、全氮量及固氮酶活性与慢生型大豆根瘤菌相当。所测菌株全部放氢。对三株快生型大豆根瘤菌接种大豆,其根瘤的豆血红蛋白含量不低于慢生型大豆根瘤菌。

1984年继续对从辽宁野生大豆根瘤中分离的13株快生型大豆根瘤菌进行了生理生化和共生效应的鉴定。报告如下:

材 料 和 方 法

(一) 供试菌株

13株快生型大豆根瘤菌,本组1982年从辽宁分离^[1]。

慢生型大豆根瘤菌B₁₅、USDA110为国内外研究菌株,本所微生物室保存。

快生型大豆根瘤菌USDA191,引自北京农大植保系。

三叶草根瘤菌株540—80;苜蓿根瘤菌株苜9,紫云英根瘤菌株3144,花生根瘤菌株1035,百脉草根瘤菌株B,菜豆根瘤菌株2677。从上均为国内外研究菌株,本所微生物室保存。

本文于1985年4月27日收到。

(二) 供试植物

大豆品种“开育八号”，引自辽宁省开源农科所

绿豆品种“D0245—1”，引自本院品资所。

菜豆引自本院蔬菜所。

花生品种“684”，引自山东泰安。

紫云英、红三叶草、大翼豆、百脉根、豌豆等品种由本所微生物室牧草根瘤菌组提供。

草木樨由本所绿肥室提供。

代时测定：

采用甘露醇—酵母膏液体培养基 (pH7.0)。定量接入各菌株的种子液调整光密度，使起始浓度一致。置于28℃下恒温振荡培养。定时取样测定其光密度。作出生长曲线，以光密度增加一倍的时间确定为菌体的代时。然后继续培养四天，再测定培养液的 pH 值。

碳源利用：

分别采用 MM-M 培养基*和改进的 Trinick 培养基**接种用菌液每毫升约含 10^3 — 10^4 个菌。待用碳源配成浓度为 1% 溶液，抽滤灭菌后备用。

将融好的培养基内定量接入菌液，迅速地倒入留有四个“井”的培养皿（约 20ml/皿），凝固后将碳源分别注满培养皿的“井内”。设不接菌只加碳源为对照。然后置于28℃下培养 5—7 天。观察培养皿内菌落的生长情况及产酸、碱的变化。

栽培大豆共生效应：

采用无菌沙培，种子用 75% 酒精消毒 5 分钟，接种物为 13 株快生型大豆根瘤菌。以慢生型大豆根瘤菌 USDA110 和 B₁₅ 为对照，重复六次。植株生长 45—55 天分批收获。分别测定其干重，全氮量，固氮酶活性、放氢和豆血红蛋白含量。根据放氢量计算菌株的相对固氮效率***。豆血红蛋白的测定采用 Drabkin 法〔4〕，以不同浓度的兔血红蛋白为标准进行计算。

与其它豆科植物的共生效应：

以 13 株快生型大豆根瘤菌接种红三叶草等 10 种豆种植物，分别以不接种和接种各豆科寄主相应的根瘤菌为对照。生长 35 天收获，观察结瘤情况。并对其中部分根瘤用相应的抗血清鉴定结瘤菌株与接种菌株的一致性。

* MM-M 培养基配方^{〔1〕}：K₂HPO₄ 0.5g；MgSO₄·7H₂O 0.8g；NaCl 0.02g；FeCl₃·6H₂O 0.01g；酵母膏 1g；琼脂 18g 加 1/40000BTB，pH 调至 6.8 左右。

** 修改的 Trinick 培养基配方^{〔3〕}：N₂HPO₄ 0.45g；MgSO₄·7H₂O 0.01g；KNO₃ 0.6g；维生素 B₁ 0.2mg；生物素 0.2mg；琼脂 18—20g；FeCl₃ 0.02g 和 CaCl₂ 0.1g（单独灭菌）；无离子水 1000ml，加 1/40000BTB，pH~6.5。

*** 相对效率 = $1 - \frac{\text{放 H}_2 \text{ nM/克鲜瘤} \cdot \text{时}}{\text{C}_2\text{H}_4 \text{ nM/克鲜瘤} \cdot \text{时}}$

实 验 结 果

1. 快生型大豆根瘤菌的代时

表 1 快生型大豆根瘤菌的代时*
Table 1. Generation time of fast-growing *R. japonicum*

菌 株 Strain	2054	2055	2048	2047	2049	2056	2057	2050	2051	2058	2052	2053	2059	USDA 191
代 时 Generation time	2.9	2.6	3.5	3.3	4.0	2.5	2.5	3.2	3.9	2.8	3.7	3.3	2.9	3.5
培养 4 天的 pH pH of culture for 4 days	5.4	6.0	6.1	5.0	5.3	5.9	6.2	5.6	5.4	6.0	5.7	5.5	6.6	5.1

* 表中数据为三次测定的平均值
Values are means of determinations made in 3 replicate cultures

从表 1 可以看出：从辽宁分离的快生型大豆根瘤菌繁殖一代的时间为 2.4—3.8 小时，这是典型的快生型根瘤菌繁殖一代的时间。所测菌株在液体培养基中培养四天后均产酸。

2. 快生型大豆根瘤菌碳源利用特性

所测 13 株快生型大豆根瘤菌对其中的 17 种碳源利用良好。在大部分基质上产酸；在

表 2 快生型大豆根瘤菌对碳源的利用
Table 2. Utilization of carbon sources by fast-growing strains of *R. japonicum*

碳 源 Carbon source	利用碳源的菌株数 Number of strains utilizing carbon source	最终表现下列 pH 的菌株数 Number of strains showing the following final pH		
		Acid	Alkaline	Nochange
D-甘 露 醇	13	5	0	8
D-葡 萄 糖	13	12	0	1
D-半 乳 糖	13	13	0	0
山 梨 醇	13	7	2	4
D-果 糖	13	12	0	1
D-甘 露 已 糖	13	11	0	2
L-鼠 李 糖	12	7	1	4
卫 茅 醇	2	0	2	0
D-木 糖	13	11	0	2
L-阿 拉 伯 糖	13	13	0	0
乳 糖	13	4	2	7
麦 芽 糖	13	9	0	4
蔗 糖	13	13	0	0
棉 子 糖	13	8	0	5
菊 糖	0	0	0	0
糊 精	4	0	4	0
苹 果 酸 钠	13	0	13	0
丙 酮 酸 钠	13	0	13	0

苹果酸钠、丙酮酸钠上产碱。少数菌株可以利用糊精和卫茅醇。所有菌株均不利用菊糖,结果列于表2。测定的慢生菌株 USDA110、B₁₅ 均不能利用麦芽糖、乳糖、卫茅醇、菊糖等碳源。在蔗糖上稍能生长。

3. 快生型大豆根瘤菌与栽培大豆的共生效应

13株快生型大豆根瘤菌接种“开育八号”品种的大豆,测定其植株干重、全氮量、固氮酶活性及放氢量,并与慢生型菌株 USDA110 及 B₁₅ 进行了比较。

表3说明快生型大豆根瘤菌接种“开育八号”大豆可以形成有效共生。其中2056、2057、2058等菌株在植株干重、全氮量上均与慢生型大豆根瘤菌株 USDA110、B₁₅ 相近,差异不显著($p=0.05$)。

表3 快生型和慢生型大豆根瘤菌接种试验比较*

大豆品种: 开育八号

Table 3. Comparison of inoculation of fast-growing and slow growing *R. japonicum*

Soybean cultivar: Kai Yu

菌株 Strain	植株干重(g) Plant top dry weight (of 4 plants)	5%显著水准 5%Level of probability	菌株 Strain	全氮量 Total N mgN/plant	5%显著水准 5%Level of probability	菌株 Strain	固氮酶活性 Nitrogenase activity $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ nodules $\cdot \text{h}^{-1}$	5%显著水准 5%Level of probability
2056	4.79	a	2057	20.10	a	USDA 110	9708	a
2057	4.61	ab	2058	18.68	b	2056	8551	b
2058	4.37	abc	B ₁₅	17.90	bc	2048	7956	b
B ₁₅	4.21	abc	2059	17.60	c	2053	7136	c
USDA 110	4.08	bcd	USDA 110	17.24	c	2058	6185	de
2050	3.97	cd	2059	16.02	d	2051	5847	de
2048	3.89	cde	2051	15.23	de	2057	5541	de
2059	3.86	cde	2050	14.77	ef	B ₁₅	5312	e
2051	3.59	de	2048	14.34	ef	2050	4149	f
2053	3.31	e	2053	13.93	f	2059	3880	f

* 5个菌株所结根瘤与接种菌株的抗血清符合率低于90%,故数据未列入。

快生型菌株的固氮酶及放氢量测定结果列于表4。可以看出所测快生型菌株全部放氢,说明其氢酶活性低或无氢酶活性^[5, 1]。相对效率均较有氢酶菌株USDA110为低。相对效率为0.5—0.8之间。

对2056、2057、2059三株快生型菌和USDA110慢生型菌的根瘤豆血红蛋白进行了测定和比较,结果见表5。

初步测定说明接种后植株地上部的干重、全氮量表现好的菌株,其所形成根瘤的豆血红蛋白的含量也较高。而且快生型菌株2056、2057根瘤的豆血红蛋白较USDA110的

豆血红蛋白含量略增加或接近。而 2059 接种的植株干重、全氮量和豆血红蛋白含量均低于 2056、2057 和 USDA110。

表 4 快生型和慢生型菌株接种的根瘤的放氢和相对效率

Table 4. H_2 evolution and relative efficiency of nodules of plants inoculated by fast growing and slow-growing *R. japonicum*

菌 株 Strain	固 氮 酶 活 性 Nitrogenase activity nMol $C_2H_4 \cdot g^{-1} \text{nodules} \cdot h^{-1}$	净 放 H_2 量 Net H_2 evolution nMol $H_2 \cdot g^{-1} \text{nodules} \cdot h^{-1}$	相 对 效 率 Relative efficiency
2056	8551	1694	0.80
2057	5541	1827	0.67
2053	7136	2446	0.68
2059	3880	1047	0.73
2058	6185	1846	0.70
2048	7956	2421	0.70
2051	5847	2775	0.53
2050	4149	1697	0.60
B16	5312	2548	0.53
USDA110	9708	0	1.00

表 5 不同菌株接种的植株干重、全氮量及豆血红蛋白含量的比较

Table 5 Dry weight Total N and Leghemoglobin content of plants inoculated by different Strains

菌 株 Strain	植 株 干 重 Plant top dry weight (g/plant)	全 氮 量 total nitrogen (mg/plant)	豆 血 红 蛋 白 含 量 Leghemoglobin (mg/g·nodules)
2056	1.35	19.29	11.56
2057	1.21	19.23	9.81
2059	1.03	16.17	7.18
2110	1.25	18.50	10.00

表中数据为 2 次测定平均值

4. 快生型大豆根瘤菌与其它豆科植物的共生试验

快生型大豆根瘤菌除与大豆共生外,可在豇豆、绿豆及大翼豆上结瘤。对所结根瘤全部用相应菌的抗血清进行识别,均为接种菌株形成的根瘤。试验结果列于表 6。

四、结 果 和 讨 论

1. 所测13株快生型大豆根瘤菌繁殖一代的时间为2.4—3.9小时。从辽宁分离的13株菌除了其它一些不同于慢生型大豆根瘤菌的特性外,其代时确属快生型。试验中测定的USDA191的代时与Keyser等测定值一致。

2. Vincent认为:快生型根瘤菌较慢生型根瘤菌利用碳源的范围更广泛;它具有多种糖酵解的途径^[7]。Graham指出,一般快生型根瘤菌能利用20种碳源中的18种;而一般慢生型大豆根瘤菌仅能利用8种^[3]。Stowers报道了快生型大豆根瘤菌在所测的20种碳源上几乎都可以利用,在多数碳源培养基上产酸;在琥珀酸盐、苹果酸盐、柠檬酸盐上产碱^[2]。本试验所用碳源与Stowers所用的虽不完全一致,但趋势完全一致。快生大豆根瘤菌不仅能利用己糖、五碳糖、三碳糖,而且能利用乳糖等双糖。在苹果酸钠、丙酮酸钠上产碱。说明快生型大豆根瘤菌确实有多种糖酵解途径。不利用菊糖的结果与Sadovsky一致^[8]。

表 6 快生型大豆根瘤菌交叉接种试验结果

Table 6. Cross inoculation test of fast growing *R. japonicum*

寄 主 植 物 Host plant	快 生 型 根 瘤 菌 Fast-growing <i>R. japonicum</i>		相应的根瘤菌 Compatible Rhizobium
	试 验 菌 株 数 Number of strains	结 瘤 菌 株 数 Number of nodulating strains	
红三叶草 (<i>Trifolium pratense</i>)	13	0	结 瘤
草木樨 (<i>Melilotus</i> sp)	13	0	结 瘤
紫云英 (<i>Astragalus sinicus</i>)	13	0	结 瘤
绿豆 (<i>Phaseolus aureus</i>)	13	12*	结 瘤
豌豆 (<i>Pisum sativum</i>)	13	0	结 瘤
大翼豆 (<i>Macroptilium atropurpureum</i>)	13	13	结 瘤
百脉根 (<i>Lotus corniculatus</i>)	13	0	结 瘤
菜豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	13	0	结 瘤
花生 (<i>Arachis hypogaea</i>)	6	0	结 瘤
豇豆 (<i>Vigna unguiculate</i>)	3	2	结 瘤

* 接种2052的三个重复中只有一个结瘤,故该株未计算在内

* Only one of the three replicates get a nodule, So this strain (2052) is not included.

3. 快生型大豆根瘤菌与栽培大豆品种共生,经两年盆栽试验证明:与“开育八号”“铁丰18号”共生时,部分菌株在植株干重、含氮量及固氮酶活性均与慢生型大豆根瘤菌株USDA110、B₁₅相当。这与Duteau、McLoughlin的报道^[9, 10]及最近Hattori^[11]

的报导一致。快生型大豆根瘤菌形成根瘤的豆血红蛋白的主要组份与慢生型大豆根瘤近的一致^[12]。本文报告了快生型菌株接种后植株干重、全氮量表现好的菌株所结根瘤的豆血红蛋白含量不低于慢生型大豆根瘤菌的根瘤。这个结果证明了快生型大豆根瘤菌有直接应用于生产的可能性。

4. 对快生型大豆根瘤菌生理生化特性二年的研究及国外同类工作^[1,2,8]表明, 其生理生化特性与慢生型大豆根瘤菌相去甚远, 更接近于其他快生型根瘤菌, 但其共生特性与慢生型大豆根瘤菌相似, 而且不在红三叶草、草木樨、紫云英、豌豆、菜豆上结瘤。最近 Lim 等证明, 快生型大豆根瘤菌外多糖和脂多糖的成分中既有其它快型根瘤菌中没有的成分, 又有慢型大豆根瘤菌没有的成分^[13]。Scholla 等用 DNA 杂交技术测定快型大豆根瘤菌与其他根瘤菌种同源百分率的结果表明, 其与 *Rhizobium* 中典型种菌株 DNA 同源水平平均仅为 19%, 与大豆、羽扇豆、豇豆等慢型根瘤菌的 DNA 同源水平平均为 21%^[14]。因此, 给快生型大豆根瘤菌规定一个恰当的分类地位是十分必要的。对此尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 徐玲玖等: 1984, 大豆科学 Vol.3, No.2: 101—109.
- [2] Stowers M. D. et al: 1984, Plant and Soil, Vol. 77, No. 1: 3—14.
- [3] Trinick M. J. et al: 1980, J of Appl Bacteriology, 49, 39—53.
- [4] Wilson D. O. et al: 1983, Analytical Biochemistry, 6, 27—30.
- [5] 徐玲玖等: 1983, 土壤肥料, No. 2: 7—8.
- [6] Keyser H. H. et al: 1982, Science Vol. 215, Vol. 4540, 1631—1632.
- [7] Broughton W. J. 1982, Nitrogen Fixation Vol. 2 Rhizobium
- [8] Sadowsky M. J et al: 1983, Int. J. Syst. Bacteriology Vol. 33, No. 4, 716—722.
- [9] Dutau N. M. et al: 1984, Program and Abstracts world soybean research conference-Ⅱ, No. 110.
- [10] Mcfoughin T. J. et al: 1984, Program and Abstracts world soybean research conference-Ⅱ, No. 111.
- [11] Hattori J. et al: 1984, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 48, No. 1, 234—235.
- [12] Fuchsman W. H. et al: 1984, 同[9] No. 27.
- [13] Lim S. T. et al: 1984, Microbiol. Lett. 22 (1): 53—56.
- [14] Scholla M. H. et al: Int. J. of Syst. Bacteriol. 34 (3): 283—286.

PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND SYMBIOTIC RESPONSE OF FAST-GROWING R. JAPONICUM 2

Fan Huei, Xu Lingmei, GeCheng, Wu Yulan, Chen Yueying
(*Soil and Ferti. Inst, Chinese Academy of Agr. Sci., Beijing*)

Wu Ganfan, Zhang Renshuang, Fu Lianshuen
(*Tieling Agri. Inst, Liaoning*)

Abstract

Examination of the fast-growing R. japonicum, which was isolated from wild soybean nodules in Liao Ning province, shows that the generation time is from 2.5—4.0 hours. A lot of kinds of carbon sources can be utilized as energy for the fast growing R. japonicum. Besides hexoses, pentose and triose, 13 strains can utilize lactose, maltose and sucrose as carbon sources. The fast-growing R. japonicum produced acid with the most of the carbon sources, alkali reactions were observed on the medium pyruvate and sodium dl malate. None of them could utilize inulin.

The fast-growing R. japonicum does not have symbiotic characteristics with Trifolium, Melilotus, Astragalus sinicus, Pisum sativum, Phaseolus vulgaris, Arachis hypogaea, but with Vigna unguiculata and Phaseolus aureus. Forming symbiosis with soybean cultivar (Kai Yu), Dry weight, total nitrogen and activity of nitrogenase of plants inoculated by a part of the strains of the fast-growing R. japonicum and slow-growing R. japonicum are similar.

Hydrogen evolution can be found for all of the strains. Determination of the leghemoglobin in nodules inoculated by three fast-growing R. japonicum shows that the content of leghemoglobin in fast-growing ones are not less in the slow-growing ones.

The examination of physiological-biochemical characteristics and symbiotic response for 13 strains isolated from the wild soybean nodules in Liao Ning province is continued in 1984.