

# 快生型大豆根瘤菌的 理化特性和共生效应\*

徐玲玖 樊惠葛 诚 吴玉兰 陈月英

(中国农业科学院 土壤肥料研究所)

吴冈梵 张仁双 傅连舜

(铁岭地区农业科学研究所)

## 提 要

从辽宁分离的快生型大豆根瘤菌在柠檬酸盐培养基上表现出两种类型。12株中7株在柠檬酸盐培养基上不生长,5株生长良好。但生长速度比*A. tumefaciens*慢些。所有菌株都不产生3-酮基乳糖。在石蕊牛奶上除1株以外,都产生血清环,3株产酸,8株产碱1株不明显。在耐盐方面一般能耐0.3 M—0.4 M NaCl,而能利用柠檬酸盐的菌株有4株能耐0.45 M NaCl的浓度。这些菌株和我国的栽培大豆品种铁丰18、开育8号、77—153等品种都能进行有效共生。但在干重、植株含氮量上均显著低于慢生型大豆根瘤菌。快型菌株和铁丰18、开育8号亲和性较好、77—153较差。111、121、123 A 分别接在豇豆(北京红)和绿豆(D0245—1)上,除111外其余两株都结瘤并有固氮酶活性。所有结瘤试验都用相应抗血清做了鉴定,证明确系由快生型大豆根瘤菌所结根瘤。另外一些理化特性鉴定正在进行。

## 材 料 和 方 法

### 菌株来源和供试植物

从1982年采自辽宁省14个县的143份野生大豆根瘤通过盆栽结瘤、重新分离、纯化、鉴定,得到12株快生型大豆根瘤菌。<sup>[1]</sup>

快生型大豆根瘤菌 USDA 191 系美国 H. H. Keyser 等分离自中国<sup>[2]</sup>, 引自北京农大植保系。

慢型大豆根瘤菌 B<sub>16</sub>、USDA<sub>110</sub>, 花生根瘤菌 1035 系国内外研究菌株, 本所微生物室保存。

\* 本工作在胡济生研究员指导下进行。

根癌农杆菌 T<sub>37</sub> (*A. tumefaciens*) : 引自中国科学院植物研究所。

供试植物品种: 大豆——铁丰 18、开育 8 号, 引自辽宁农科院土肥所和铁岭地区农科所。77—153 引自黑龙江省佳木斯农科所。

豇豆: 北京红, 引自中国农科院品资所。

绿豆: D<sub>0245-1</sub>, 引自中国农科院品资所。

### 快生型大豆根瘤菌的理化特性

BTB 反应: 接种在含有 0.5 % 的溴代麝香草酚兰的 YMA 培养基斜面上, 置 28°C 温箱中培养 3—7 天检查。

蛋白胨肉汤反应: 将分离物接种于蛋白胨肉汤培养基<sup>[3]</sup>内, 置 28°C 温箱 24—48 小时记录结果。

石蕊牛奶反应: 将菌直接接入石蕊牛奶培养基上<sup>[3]</sup>, 28°C 条件下 1, 3, 5, 7, 14 和 30 天观察并记录结果。

3—酮基乳糖的产生: 将含有乳糖的培养基制成平板<sup>[3]</sup>, 把菌点种在平板上, 28°C 培养 2 天长成明显的菌落, 然后在平板上注入 Benedict 氏试剂, 室温放置半小时以上, 菌落周围出现黄褐色沉淀为阳性, 无变化为阴性。

柠檬酸盐利用: 将菌悬液接种在 Simmons 柠檬酸盐斜面培养基<sup>[3]</sup>上, 28°C 培养 3 天开始观察结果。

耐盐性试验: 在 YMA 培养基中分别加入不同克分子浓度的 NaCl, 制成含有 0.1M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M 和 0.45 M 浓度的培养基。用菌悬液在培养基斜面上划线接种。28°C 培养 3—7 天观察, 并记录结果。

回接及交叉接种试验: 用砂培和水培两种方法进行。砂培设 3 次重复, 水培设 4 次重复。盛花期收获测定鲜瘤重、固氮酶活性、植株干重和含氮量。回接试验以分离得到的快生型大豆根瘤菌分别作接种物, 不接菌及慢性型大豆根瘤菌为对照。交叉接种试验用 111、121、123 A 作接种物, 不接菌及接种 USDA 191, 花生根瘤菌 1035 为对照。

血清学测定: 随机取快生型大豆根瘤菌接种在大豆、豇豆、绿豆上所结的根瘤 20 个 (豇豆和绿豆少于 20 个), 分别制成瘤体抗原, 与相应抗血清 (稀释到效价前 1—2 个滴度) 做凝集反应, 37°C 温育过夜, 第二天记录结果。

## 试 验 结 果

菌落形态: 12 株快生型野生大豆根瘤菌菌落为乳白色, 不透明, 略呈扁平。

革兰氏染色: 全部为阴性。

理化特性:

1. 在 BTB 培养基上产酸, 2—3 天培养基完全变黄。

2. 在肉汤培养基上 8 株不生长, 4 株可以生长。

3. 石蕊牛奶反应: 除 066 以外, 所有分离物都形成血清环。但胨化程度不同。

026、047、081、021 A—1 等与对照菌株 USDA 191 一样, 血清环高达 7—10 mm。066

在石蕊牛奶中不胨化，产弱碱，与对照一样。其余菌株有 3 株产酸，8 株产碱。

4. 3—酮基乳糖的产生及柠檬酸盐的利用：全部快生型大豆根瘤菌都不产生3—酮基乳糖，仅对照菌 *A. tumefaciens* 在菌落周围产生黄褐色沉淀，在柠檬酸盐利用上，12 株分离物中有 5 株在不同程度上能利用柠檬酸盐。*A. tumefaciens* 在 Simmon's 培养基上 24 小时以后培养基变黄，3 天左右变为兰色。而快生型大豆根瘤菌中能利用柠檬酸盐的 5 株则利用较慢，多数 7 天左右使培养基变黄，14 天或 14 天以上培养基变兰。

表 1 快生型大豆根瘤菌理化特性

项目 菌号	革兰氏 染色	BTB 反应	3—酮基 乳 酮	石 蕊 牛 奶 反 应	蛋 白 胨 肉 汤	耐 盐 性 (NaCl克分 子浓度)	回 接 试 验	菌 株 新编号
026	—	产 酸	—	形成血清环，产碱	—	0.4 M	+	2048
047	—	产 酸	—	形成血清环，产酸	—	0.4 M	+	2047
066	—	产 酸	—	不形成血清环，产碱	—	0.3 M	+	2049
081	—	产 酸	—	形成血清环，产酸	—	0.4 M	+	2050
083	—	产 酸	—	形成血清环，不明显	—	0.4 M	+	2051
111	—	产 酸	—	形成血清环，产碱	—	0.3 M	+	2052
121	—	产 酸	—	形成血清环，产碱	—	0.3 M	+	2053
021 A—1	—	产 酸	—	形成血清环，产酸	—	0.3 M	+	2054
078 A	—	产 酸	—	形成血清环，产碱	+	0.45M	+	2056
079 A	—	产 酸	—	形成血清环，产碱	+	0.45M	+	2057
104 A	—	产 酸	—	形成血清环，产碱	+	0.45M	+	2058
123 A	—	产 酸	—	形成血清环，产碱	+	0.45M	+	2059
USDA191	—	产 酸	—	形成血清环，产酸	—	0.4 M	+	
USDA110	—	产 碱	—	不形成血清环，产碱	—	不 耐	+	
T 37		产 酸	+	有血清环，牛奶 棕黄色	+			

菌株不同，利用程度亦有差异。结果见表 2。

表 2 快生型大豆根瘤菌柠檬酸盐利用试验

菌 号	试验次数 及时间 试验结果	第 一 次 试 验				第 二 次 试 验			
		3 天	7 天	14 天	21 天	3 天	7 天	14天	21天
021A-1 (2054)		+	黄 绿	黄 色	黄 色	+	绿 黄 色	黄 色	黄 色
078 A (2056)		+	黄 色	兰 色	兰 色	+	黄 色	黄 色	黄 色
079 A (2057)		+	黄 色	兰 色	兰 色	+	黄 色	黄 色	黄中带兰
104 A (2058)		+	黄 色	兰 色	兰 色	+	黄 色	黄 色	黄中带兰
123 A (2059)		+	黄 色	兰 色	兰 色	+	黄 色	黄 色	黄 色
026 (2048)		—	—	—	—	—	—	—	—

菌号、 试验次数及时间 试验结果	第一次试验				第二次试验			
	3天	7天	14天	21天	3天	7天	14天	21天
066 (2049)	—	—	—	—	—	—	—	—
081 (2050)	—	—	—	—	—	—	—	—
083 (2051)	—	—	—	—	—	—	—	—
111 (2052)	—	—	—	—	—	—	—	—
121 (2053)	—	—	—	—	—	—	—	—
047 (2047)	—	—	—	—	—	—	—	—
T 37	+兰色	兰色	兰色	兰色	黄色	兰色	兰色	兰色
USDA 191	—	—	—	—	—	—	—	—
USDA 110	—	—	—	—	—	—	—	—
B 15	—	—	—	—	—	—	—	—

• +表示生长，有的菌株虽然未使培养基变兰，但菌苔生长丰满

回接试验和血清学测定

部分菌株在铁丰18和开育8号大豆品种上表现有效共生,对77—153品种则较差。在前两个品种上根瘤大部分集中在主根上，079 A、078 A、121、111等在植株干重、含氮量、固氮酶活性都比USDA 191好，与慢型对照菌株USDA 110、B 15无显著差异，但在植株叶色上，快型菌比慢型菌叶色要黄得多。所有快生型大豆根瘤菌在铁丰18品种上都放氢。全部快型菌株接种77—153大豆表现不好。结瘤少而小，并且多在侧根上或主根下部，有的重复不结瘤。其植株干重显著低于对照菌和空白对照。快生型大豆根瘤菌对三个品种的共生效应见表3、4、5。

表 3 快生型大豆根瘤菌共生效应 (大豆品种：铁丰18)

菌号	植株干重 X ( )	5 %显著 水准	菌号	植株含氮量 X (mg)	5 %显著 水准	菌号	固氮酶活性 μM/克鲜瘤小 时 ( X )	5 %显著 水准	放 氢
B 15	3.13	a	USDA110	52.45	a	078 A	4.316	a	+*
SUDA110	3.13	a	B 15	51.85	ab	079 A	2.618	b	+
078 A	3.10	a	104 A	48.11	ab	USDA 110	2.422	bc	+
121	3.07	ab	121	46.58	abc	B15	1.87	cd	+
079 A	3.03	ab	078 A	46.46	abc	121	1.453	de	+
111	2.93	abc	079 A	45.48	bc	066	1.26	efg	+
104 A	2.93	abc	083	40.32	cd	111	1.12	efg	+
021 A-1	2.90	abc	123 A	39.93	cdf	123 A	0.851	efgh	+

菌 号	植株干 重 $\bar{X}$ (g)	5 %显著 水 准	菌 号	植株含氮量 $\bar{X}$ (mg)	5 %显著 水 准	菌 号	固氮酶活性 $\mu$ M/克鲜瘤小 时 ( $\bar{X}$ )	5 %显著 水 准	放 氢
083	2.80	abcd	111	36.05	def	191	0.677	fgh	+
CK	2.77	abcd	021A-1	32.31	efg	026	0.583	fgh	+
123 A	2.60	bcde	CK	31.18	efgh	081	0.509	gh	+
066	2.47	cde	066	31.09	fgh	021A-1	0.433	gh	+
047	2.33	de	026	29.78	gh	083	0.385	gh	+
191	2.27	def	191	29.12	gh	047	0.150	h	+
026	2.26	f	047	25.55	i	104 A**	$\bar{X}$ 0.512		+
081	1.8	f	081	20.55					

\* +表示测出放氢。  
\*\* 三重复中有一个重复无活性，所列为平均值。

表 4                      快生型大豆根瘤菌共生效应                      (大豆品种：开育8号)

菌 号	植株干重 $\bar{x}$ (g)	5 %显著 水 准	菌 号	植株全氮量 $\bar{X}$ (mg)	5 %显著 水 准	菌 号	固氮酶活性 $\bar{X}$ $\mu$ M/克鲜瘤小时	5 %显 著水准
USDA110	2.44	a	USDA110	71.22	a	104 A	21.17	a
B 15	2.41	ab	B 15	59.15	b	USDA191	20.9	a
079 A	2.40	abc	079 A	50.06	b	USDA110	18.95	a
104 A	2.29	abcd	121	36.49	c	079 A	17.57	a
066	2.24	abcde	021A-1	32.16	cd	021A-1	10.21	b
123 A	2.20	bcde	066	32.04	cd	111	9.94	b
121	2.18	bcde	123 A	30.02	cde	B 15	9.21	b
111	2.17	cde	USDA191	29.56	cde	121	8.41	b
CK	2.15	de	111	29.49	cde	066	8.3	b
047	2.13	de	104 A	28.20	cde	123 A	7.72	b
021A-1	2.12	de	047	24.07	de	047	6.38	b
USDA191	2.02	e	CK	22.08	e			

表 5

快生型大豆根瘤菌共生效应

(大豆品种: 77—153)

菌 号	植株干重 X (g)	5 % 显 著 水 准	固氮酶活性 $\mu\text{M}/\text{克鲜瘤小时}$			
			重 复 I	重 复 II	重 复 III	重 复 IV
CK	2.21	a	—	—	—	—
B 15	2.04	a	8.29	10.19	8.73	10.58
USDA110	2.03	a	18.52	11.75	14.09	8.31
047	1.69	b	9.67	5.24	无活性	无瘤
079 A	1.67	b	11.82	2.88	33.84	21.61
123 A	1.66	b	2.03	0.62	0.81	2.91
121	1.65	b	1.80	6.27	无瘤	无活性
USDA191	1.63	b	14.46	14.97	18.46	23.53
021 A-1	1.57	b	16.65	4.95	9.73	无活性
111	1.57	b	4.99	无瘤	1.56	1.66
066	1.55	b	无活性	1.80	无活性	无活性
104 A	1.52	b	无瘤	6.98	无瘤	13.33

为鉴定侵染结瘤的菌株是否是接种的分离物, 做了血清学反应, 结果见表 6、7。

表 6

砂培回接试验根瘤测定结果

(大豆品种: 铁丰 18)

接 种 菌 株	021A-1	026	047	066	078A	079A	083	104A	111	121	123A	血 对	清 照	盐 对	水 照
测 定 结 果 (反应数/测定数)	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	0/20			0/20

表 7

水培回接试验根瘤测定结果

(大豆品种: 开育 8 号)

接 种 菌 株	021A-1	066	047	111	104A	121	123A	079 A	USDA 191	血 对	清 照	盐 对	水 照
测 定 结 果 (反应数/测定数)	17*/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	0/20			0/20

\* 3 个根瘤太小, 无反应。

血清学反应结果说明, 所结根瘤全部是接种菌株。

为了统一新分离的根瘤菌号, 将从辽宁分离的快生型大豆根瘤菌株按本所根瘤菌序列编号, 新菌号列在表 1。

交叉接种试验

用快生型大豆根瘤菌 111、121、123 A 接种北京红豇豆和 D 0245—1 绿豆上, 以 USDA 191 和 1035 (花生根瘤菌) 作对照, 结果列在表 8。

表 8 快生型大豆根瘤菌与豇豆、绿豆共生效应

豇 豆				绿 豆				
菌 号	植株干重 $\bar{X}$ (g)	5 %显著 水 准	菌 号	固氮酶活性 $\mu\text{M}/\text{克鲜瘤小时}$	菌 号	植株干重 $\bar{X}$ (g)	菌 号	固氮酶活性 $\mu\text{M}/\text{克鲜瘤小时}$
1035	2.09	a	1035	$9.04 \pm 6.77$	1035	$0.70 \pm 0.14$	1035	$16.29 \pm 10.79$
123 A	1.87	ab	121	$12.92 \pm 2.79$	CK	$0.66 \pm 0.05$	121	$5.66 \pm 3.97$
USDA191	1.77	abc	123 A	$1.52 \pm 1.76$	123 A	$0.57 \pm 0.08$	123 A	$7.75 \pm 2.69$
121	1.43	bc	USDA191	$23.47 \pm 7.35$	USDA191	$0.55 \pm 0.1$	USDA191	$25.90 \pm 0.92$
111	1.27	c	111	不 结 瘤	121	$0.47 \pm 0.26$	111	不 结 瘤
CK	1.26	c	CK	不 结 瘤	111	$0.43 \pm 0.06$	CK	不 结 瘤

从表 8 可以看出，除 111 外，121、123 A 和 USDA 191 在两种寄主上都可结瘤，多在主根或主根下部，3 株快生型大豆根瘤菌结瘤均比 1035 差。但根瘤能测到固氮酶活性。

血清学测定

采下豇豆和绿豆根瘤用相应快生型大豆根瘤菌抗血清做凝集反应，结果除 USDA 191 有 3 个根瘤未起反应外，其余全部根瘤均与相应抗血清反应，说明确系快生型大豆根瘤菌所结根瘤。

小 结 和 讨 论

1. 通过理化特性的鉴定，回接试验和血清学反应结果证明所分离的 12 个菌株确系快生型大豆根瘤菌。另外一些鉴定正在进行中。
2. 12 株快生型大豆根瘤菌与中国栽培大豆铁丰 18、开育 8 号、77—153 的共生效应表现了品种亲和性的差异。在同一品种上不同菌株对大豆的共生效应亦不同。如在铁丰 18 大豆上植株干重、含氮量、固氮酶活性均有一部分菌株显著高于对照。但是，也有一部分菌株低于对照，形成无效共生。在开育 8 号上亦同。然而全部快生型菌株与 77—153 共生时或者结瘤、干重、固氮酶活性很低或者有的重复不结瘤。H.H.Keyser 等对从中国分离的快生型大豆根瘤菌与 9 个美国栽培大豆品种所做的盆栽试验中全部是无效共生<sup>[2]</sup>，可能与品种亲和性差异有关。有少数菌株如 079 A，121 等虽然从测定结果看，植株干重、含氮量和慢生型大豆根瘤菌相当，但植株叶色发黄，有待进一步研究。
- 快生型大豆根瘤菌可以越界在豇豆族植物上结瘤，与国外研究一致<sup>[4]</sup>。
3. 伯捷手册第八版<sup>[5]</sup>规定，对柠檬酸盐的利用是根瘤菌属和土壤杆菌属的分属特征之一。但从辽宁分离的 12 株快生型大豆根瘤菌中有 5 株能在 Simmon's 柠檬酸盐培养基上生长。但生长速度比 *A. tumefaciens* 生长速度慢。后者 3—5 天可使培养基变兰，

但 5 株快生型大豆根瘤菌 5—7 天菌苔生长相当丰满, 14 天或 14 天以上才使培养基变兰, 另外 7 株快生型大豆根瘤菌则完全不生长。1980 年 M.J. Trinick 报道了快生型的银合欢 (*Leucaena*) 根瘤菌 29 株中的 27 株、含羞草 (*Mimosa*) 根瘤菌 12 株中的 12 株及 1 株金合欢 (*Acacia*) 根瘤菌、2 株田菁 (*Sesbania*) 根瘤菌及 1 株扁豆 (*Lablab*) 根瘤菌可以利用柠檬酸盐<sup>[7]</sup>。快生型大豆根瘤菌部分菌株可以利用柠檬酸盐是第一次发现。对根瘤菌的分类有一定价值。同时鉴定表明, 快生型大豆根瘤菌的石蕊牛奶反应差别很大, 这种特性亦与 Trinick 报道的热带豆科植物根瘤菌的特性是一致的<sup>[6]</sup>。

4. 对快生型大豆根瘤菌的耐盐性测定说明, 从辽宁分离的菌株都能在 0.3 M NaCl 培养基上生长, 有 4 株可以耐受 0.45 M NaCl, 高于 Yelton、杨苏生等测定的 USDA191 能耐受 0.4 M NaCl 的报道<sup>[4]</sup>。快生型大豆根瘤菌的抗逆性可能与它本身代谢过程产酸和寄主生活的风沙盐碱自然条件有关。这一特性为遗传学提供了良好的材料。

5. 快生型大豆根瘤菌是中国的资源。它本身不同于一般大豆根瘤菌的特性在分类学、根瘤菌进化、遗传学等方面有重要的价值。目前对它的研究才开始不久, 它的分类地位还无法确定<sup>[7]</sup>, 另外还有许多方面需要深入进行探讨和研究。

### 参 考 文 献

- [1]. 徐玲玫等: 1983, 野生大豆根瘤菌分离初报, 土壤肥料, No. 2: 7—8。
- [2]. Keyser H.H. et al: 1982, Science, Vol. 215, No. 4540: 1631—1632。
- [3]. 中国科学院微生物所细菌分类组编著: 1978, 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社。
- [4]. Yelton M.M. et al: 1983, J. of General Microbiology, Vol. 129, No. 5: 1537—1547。
- [5]. Buchanan et al: 1974, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology eighth edition。
- [6]. Trinick M.J: 1980, J. of Appl. Bacteriology 49: 39—53。
- [7]. Jordan D.C: 1982, Int. J. Syst. Bacterid. 32: 136—139。



## PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND SYMBIOTIC RESPONSE OF THE FAST-GROWING *R. japonicum*

Xu Lingmei Fan Hui Ge Cheng Wu Yulan Chen Yueueng

(*Soils and Fertilizers Research Institute, Chinses  
Academy of Agricultural Scieneses*)

Wu Gangfan Zhang Renshuang Fu Lianshun

(*Tieling Institute of Agricultural Sciences*)

### Abstract

There are two types of fast-growing Rhizobia isolated from nodules of wild soybean(*Glycine soja*)growing in Liaoning Province on the Simmon's medium, in which 7 out of 12 strains didn't grow and the other 5 grew well, but their rates were slower than that of *A. tumefaciens*. All strains didn't produce 3-keto-lactose from lactose oxidation. Three strains showed acid reactions and eight strains showed alkaline reactions in litmus milk, but one strain (083) wasn't distinguishable. All fast-growing *R. japonicum* tested, except strain 066, formed serum ring. Twelve fast-growing *R. iaponicum* grew in concentrations of up to 0.3--0.4 M NaCl, but four of them utilized citrate could tolerate concentrations of 0.45 M NaCl. These isolates formed effective nitrogen-fixing associations with Chinese soybean cultivars such as Tiefeng 18, Kaiyu 8, 77—153 and so forth. However, dry weight and total nitrogen of above-ground portion were significantly lower than that of slow-growiag *R. japonicum*. The affinity between fast-growing rhizobia and Kaiyu 8, Tiefeng 18 was significant, but most of them didn't nodulate or formed ineffective nodules with soybean cultivar 77-153.

*Vigna unguiculata* and *Phaseolus aureus* inoculated with fast-growing rhizobia 111, 121, 123 A individually, except strain 111, other two strains (121, 123 A) all produced nodules having activity of nitrogenase. All nodules of plants in pot culture test were identified with corresponding antisera. The result of our experiment showed that nodules of *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, *Phaseolus aureus* were formed by fast-growing rhizobia.