

# 快生型大豆根瘤菌研究的新进展

葛 诚

(中国农业科学院土肥所微生物研究室)

自1982年正式报道从中国的土壤、根瘤样品中分离得到了不同于一般慢生型大豆根瘤菌的快生型大豆根瘤菌以来<sup>[1]</sup>,引起国内外许多学者的注意和重视,纷纷对快生型大豆根瘤菌的生理生化、共生效应、遗传特性及其他特性进行研究<sup>[2, 3, 4]</sup>。初步的研究结果表明,快生型大豆根瘤菌的许多特性与慢生型大豆根瘤菌的特性相去甚远。迄今为止所报道的快生型大豆根瘤菌都是从中国的土壤、根瘤样品中分离出来的,对快生型大豆根瘤菌的研究,在根瘤菌的分类、遗传、生态及生产应用等方面均有十分重要的意义。

1974年出版的伯杰手册(第八版)中将根瘤菌科(Rhizobiaceae)分为两个属,即根瘤菌属(Rhizobium)和土壤杆菌属(Agrobacterium)<sup>[5]</sup>,1980年在澳大利亚堪培拉举行的第四届国际固氮讨论会上,专家们就根瘤菌的分类问题进行了讨论,一致认为现行的第八版中将根瘤菌属分为7个互接种族的根瘤菌,即包括4个快生型根瘤菌种——豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)、苜蓿根瘤菌(*R. meliloti*)、菜豆根瘤菌(*R. pgsoli*)、三叶草根瘤菌(*R. trifolii*)和3个慢生型根瘤菌种——大豆根瘤菌(*R. japonicum*)、羽扇豆根瘤菌(*R. lupini*)及豇豆族根瘤菌(*R. spp*)的分类有许多不妥之处,鉴于现代科学的发展,建议舍去原来的豆科寄主与根瘤菌共生的互接种族概念,而根据数值分类, DNA 中 G+C(鸟嘌呤和胞嘧啶)含量测定、核酸杂交、核糖体 RNA 顺反子的相似性、血清学、细胞外胶体的成分、碳源代谢和利用、对噬菌体和抗生素的敏感性等方面将根瘤菌科重新分类<sup>[6, 7]</sup>。新的分类规定将根瘤菌科分为4个属,即根瘤菌属(Rhizobium),包括3个种,即豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)、(将原来的三叶草根瘤菌、菜豆根瘤菌、豌豆根瘤菌全部归到这一个种内。)、苜蓿根瘤菌(*R. meliloti*)和建立的一个种——百脉根瘤菌(*R. loti*);慢生型根瘤菌属(*Bradyrhizobium*),先设1个典型种即大豆根瘤菌(*B. japonicum*) (这个属的根瘤菌还包括了可以在豇豆族植物、羽扇豆等豆科植物上结瘤的慢生型根瘤菌);土壤杆菌属(*Agrobacterium*),包括根癌农杆菌(*A. tumefaciens*)、放射农杆菌(*A. radiobacter*)、发根农杆菌(*A. rhizogenes*)及悬钩子农杆菌(*A. rubi*);第4个为新属,即叶瘤菌属(*Phyllobacterium*),其典型种为 *Ph. mysinacearum*,目前对这一属的固氮能力尚有争论<sup>[8]</sup>。这种新的分类确定时一方面还来不及讨论将快生型大豆根瘤菌归到哪一类,另一方面对它的研究才刚刚开始,许多方面都是未知数。快生型

大豆根瘤菌可以与野大豆 (*Glycine soja*) 和栽培大豆 (*G. max*) 共生, 同于慢生型大豆根瘤菌, 但其代时一般都在 4 小时以下, 属快生型<sup>[1]</sup>。许多生理生化特性上与快生型根瘤菌既有类似点也有不同点。因此, 目前还不能确定其分类地位。Sadowsky 等初步认为快生型大豆根瘤菌除了与大豆共生外的许多特性均与慢生型大豆根瘤菌相异, 它也可能被归为一个新属<sup>[9]</sup>。因此, 尽快确定快生型大豆根瘤菌的分类地位是一件很有意义的工作。

对快生型大豆根瘤菌的特性除了已经发表的以外, 近年对其生理生化特性进行了深入的研究。Sadowsky 的工作表明, 快生型大豆根瘤菌是革兰氏阴性, 不形成芽孢的杆菌对数末期形成的细菌细胞易膨大表现出明显的多形性, 菌落直径可达 1—5 毫米。经重复划线, 某些快生型大豆根瘤菌能产生第二类菌落<sup>[9]</sup>, 这种现象在 Stowers 的工作中也出现过, 他在对快生型大豆根瘤菌的鉴定时从菌株 USDA 214 中经重复划线得到两个不同的菌株, 命名为 214 A 和 214 B。两个菌株有完全相同的营养和生化特性, 但 214 A 在含 BTB 的 MM-M 琼脂培养基上形成白色不透明的菌落, 在液体培养基上代时为 5.4 小时, 但 214 B 在同样的培养基上形成淡黄色菌落, 在液体培养基上的代时则为 2.9 小时, 两个菌株用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳则无法区别。共生特性上则有很大的不同。如 214 A 不能在绿豆上结瘤, 214 B 虽然结瘤差, 但可以在绿豆上结瘤, 对大豆的共生也有较大的差异<sup>[10]</sup>。这种特性究竟是怎样形成的, 抑或是快生型大豆根瘤菌的不稳定性, 需要深入研究。

慢生型大豆根瘤菌在石蕊牛奶上一般不胨化, 产碱使石蕊牛奶变兰, 但快生型大豆根瘤菌表现出多样性。Sadowsky 证明在 USDA II 株快生型中有 4 个菌株胨化产酸, 3 个菌株胨化产碱, 1 个菌株不胨化只产碱, 3 个菌株只胨化 pH 无变化<sup>[9]</sup>, 徐玲玫等从辽宁分离的 12 株快生型大豆根瘤菌中有 11 株胨化牛奶, 1 株不胨化, 胨化牛奶的菌株中 3 株产酸, 8 株产碱<sup>[11]</sup>。对碳源的利用方面, 慢生型大豆根瘤菌一般比较狭窄, 快生型大豆根瘤菌则广泛得多。Graham 的工作指出, 一般快生型根瘤菌能够利用 20 种碳源中的 18 种, 慢生型的仅能利用 8 种, 尤其是不能利用卫茅醇和柠檬酸盐, 对双糖的利用很差或不能利用。Stowers 的工作证实所测定的 20 种碳源, 快生型大豆根瘤菌几乎全部可以利用, 在多数碳源培养基上产酸, 但在琥珀酸盐、苹果酸盐、延胡索酸盐、柠檬酸盐及丙酮酸盐上产碱<sup>[10]</sup>。樊蕙等(1984)的工作表明, 所测定的 20 种碳源中, 快生大豆根瘤菌可以利用其中的 19 种, 说明快生型大豆根瘤菌不仅能利用己糖, 五碳酸、三碳糖, 而且能利用乳糖、麦芽糖和蔗糖等双糖<sup>[12]</sup>。不能利用菊糖的结果与 Sadowsky 报道的一致<sup>[9]</sup>。这些试验虽然测定的碳源都不尽相同, 但却说明了快生型大豆根瘤菌具有多种糖酵解的途径。

区分快生型和慢生型根瘤菌的一个重要的酶是 6-磷酸葡萄糖脱氢酶, 此酶是戊糖磷酸化途径的关键酶, 而此酶在快生型根瘤菌是起作用的, 在慢生型则不起作用。一般测定其还原活性。Stowers 测定的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的还原活性 (NADP) 为 10—54 nM mol/分/毫克蛋白<sup>[10]</sup>, Sadowsky 用同样的慢生型大豆根瘤菌得到的还原活性为 50—181 nM mol/分/毫克蛋白<sup>[9]</sup>, 二者之间的结果相差较大, 可能系试验条件不同

所致。但所测慢生型大豆根瘤菌几乎都测不出还原活性来。氢酶与根瘤固氮过程中能量损耗有关,慢生型大豆根瘤菌不同菌株差别很大<sup>[13]</sup>, Sadowsky 测定了 11 株快生型大豆根瘤菌中的 9 株,均未发现氢酶活性,所测 9 株全部放氢。此结果与徐玲玫等报道的一致<sup>[11]</sup>。

豆血红蛋白是一种类似于肌红蛋白的一种在根瘤里通过根瘤菌和豆科植物共生联合发展起来的一种特有的合成蛋白,其功能是促进氧在低氧压下的扩散,以调节根瘤在固氮中的需要而又不致对氧十分敏感的固氮酶钝化。大豆根瘤的豆血红蛋白含有 4 种主要的组份,分别用 Lba, Lbc<sub>1</sub>, Lbc<sub>2</sub> 和 Lbc<sub>3</sub> 表示,另外还有一些特性更少的次要组份。Fuchsman 用等电聚焦电泳技术从 5 个商业上重要的栽培大豆品种的根瘤浸出液中得到的豆血红蛋白 4 种主要组份全部存在,而且非常一致<sup>[14]</sup>。以后他又比较了从田间生长的,在遗传学上各不同的选出来的超过 60 个大豆品种及引种的代表,以及 18 种野生大豆的代表,全部用慢生型大豆根瘤菌感染的根瘤的豆血红蛋白的结果是一致的。在温室用慢生型大豆根瘤菌 USDA 110 和快生型大豆根瘤菌 USDA 201 分别接种栽培大豆 Beeson 和野大豆 PI 407217,对根瘤的豆血红蛋白的组份分析结果也与上述结果一致<sup>[15]</sup>。这些结果说明快、慢型大豆根瘤菌均能使大豆和野大豆达相同的豆血红蛋白基因,樊蕙等(1984)测定了 3 株快生型大豆根瘤菌接种栽培大豆“开育 8 号”所形成根瘤的豆血红蛋白含量与慢生型大豆根瘤菌 USDA 110 菌株形成根瘤的豆血红蛋白含量的比较,结果表明快生型大豆根瘤菌接种形成的红蛋白量并不低于慢型菌接种所形成的量<sup>[12]</sup>。

快生型大豆根瘤菌发现以来,对其与栽培大豆的共生效应做了许多研究。开始的报告,如 Keyser 等认为除了与野生大豆和未经驯化的大豆(“北京”品种)共生有效外,快生型大豆根瘤菌与美国共生时一般无效<sup>[1]</sup>,但在后来的研究中发现情况并不完全如此。Stowers 报道,快生型大豆根瘤接种美国大豆时结瘤较差,植株干重比慢生型相差很多,但接种亚洲型大豆时其结瘤量和植株干重均与慢生型大豆根瘤相当,而接种豇豆(品种 VITA-3)则结瘤量大大超过慢生型大豆根瘤菌<sup>[10]</sup>。DuTeau 等的温室试验结果表明,大多数北美大豆品种与 USDA 191 表明出有效结瘤,而其他所有的快生型菌株共生试验时结无效瘤<sup>[16]</sup>,McLoughlin 的报道亦证实 USDA 191 与 7 个美国商业大豆品种共生时部分有效,而与 Williams 品种上形成有效共生<sup>[17]</sup>。最近,加拿大的 Hattori(1984)的研究结果指出,USDA 191 有比过去报道的更广的寄主范围,而且在一些商业上的大豆品种的有效性与慢生型大豆根瘤菌一样。用 USDA 191 接种大豆 Maple Arrow(亲本为 Harosoy 63 和 Swedish 系 840-7-30)30 天后测定的乙炔还原活性与慢生型大豆根瘤菌 61A76 接种的无统计学差异<sup>[18]</sup>。徐玲玫等(1984)测定的从辽宁分离的快生型大豆根瘤菌在中国栽培大豆上的共生效应表明,部分菌株在“铁丰 18”和“开育 8 号”大豆共生表现出有效共生,在植株含氮量和干重上与慢生型大豆根瘤相当,无统计学差异<sup>[11]</sup>,樊蕙等最近的重复试验也与上述结果一致<sup>[12]</sup>。这些试验结果都说明快生型大豆根瘤菌的某些菌株有在生产上直接应用的可能性。但是还需要进一步筛选和在田间实际试验中去考查这些菌株的有效性。

快生型大豆根瘤菌除了可以与野生大豆和栽培大豆品种共生外,还可以在豇豆 (*Vigna unguiculata*)、绿豆 (*Phaseolus aureus*) 上结瘤,并能测出固氮酶活性,但不与三叶草 (*Trifolium pratense*)、紫云英 (*Astragalus sinicus*)、苜蓿 (*Medicago sativa*)、草木樨 (*Melilotus* sp)、银合欢 (*Leucaena* sp)、豌豆 (*Pisum sativum*)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)、花生 (*Arachis hypogaea*)、百脉根 (*Lotus corniculatus*) 等豆科植物结瘤和共生,可在大翼豆 (*Macroptilium atropurpureum*)、田菁 (*Sesbania* sp) 上结瘤,但形成无效共生<sup>[1, 12]</sup>。在与栽培大豆两种共生时与慢生型大豆根瘤菌的结瘤竞争也是探讨快生型大豆根瘤菌的特性及在生产应用可能性的一个重要方面,葛诚等(1984)的初步试验说明在盆栽条件下,当快生型与慢生型大豆根瘤菌混合接种时,快生型可以形成较多的根瘤<sup>[19]</sup>, Cleyet-Marel 等用6个大豆根瘤菌(其中5个慢生型,1个快生型)接种大豆时发现快生型菌株比慢生型菌有更强的竞争性<sup>[20]</sup>。而 Mcloghlin 等在盆栽试验中以 USDA 201、205、208 等3株快生型大豆根瘤菌与慢型的 USDA 110、122 以等量比例接种时,在“北京”大豆上快型菌有更大竞争性,而慢生型菌在“J130”大豆品种上占据全部根瘤,但在用塑料生长袋的试验时,多数根瘤是由慢生型形成的。在盆栽土培试验里(土壤不消毒),以10个快生型大豆根瘤菌接种“北京”品种和“J130”大豆时,结果 USDA 257、193 和 206 快型菌在“北京”品种上形成的根瘤超过65%，“J130”大豆的根瘤全是由土著大豆根瘤菌形成。竞争关系上的顺序排列是 USDA 257>193>206<sup>[21]</sup>。作者进一步将此竞争试验用于美国中西部含有大量野生大豆根瘤菌的两种土壤里,快生型大豆根瘤菌在“北京”品种上,两种土壤里均可形成超过60%的根瘤,但在“J130”品种上快型菌没有竞争性<sup>[17]</sup>。葛诚等最近以快生型:慢生型为1:3、1:30、1:300的比例接种中国栽培大豆“开育8号”和“吉林10号”大豆的盆栽试验里,快型大豆根瘤菌表现出较强的结瘤竞争能力,其结瘤比例为32.2—78.2%,随着接种物内快型菌的比例增加而增加,在两个大豆品种上均表现出一致的趋势。结瘤竞争特性是一个接种菌株可否应用的重要方面,竞争性强弱受许多因素影响,对快生型大豆根瘤菌的结瘤竞争能力还需要进一步试验研究,初步的试验结果表明的这种较强的结瘤竞争能力,为进一步应用奠定了基础。

对快生型大豆根瘤菌的遗传学研究在分类和生产应用上均有重要的价值。已经有一些对快生型大豆根瘤菌的质粒分析等方面的报道<sup>[2, 3]</sup>,最近 Atherly 等亦证明只有快生型大豆根瘤菌在多数情况下固氮和结瘤基因(Nif 和 Nod)是在同一个质粒上,现在已经把快生型大豆根瘤菌 USDA 191 和 193 的共生质粒转移到了根癌农杆菌(*A. tumefaciens*)上,并在大豆植株上形成了无效根瘤,这两个菌株的共生质粒在其他的大豆根瘤菌株及菜豆根瘤菌(*R. phaseoli*)和三叶草根瘤菌(*R. trifolii*)里是不稳定的。USDA 193 的共生质粒在豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)和苜蓿根瘤菌(*R. meliloti*)里是稳定的,但未把其寄主扩大到大豆,说明虽然转移是成功的,但未能实现表达<sup>[23]</sup>。Appelbaum 等测定了快生型大豆根瘤菌的质粒,9个菌株除了含1—3个小的质粒以外还含有2个最大的450 Mdal 质粒(巨大质粒),USDA 257 仅有1个较

小的质粒而无巨大质粒，分子杂交的结果证明 7 个快生型大豆根瘤菌的 *Nif* 和 *Nod* 基因都是在一个单独的质粒上[23]，这些结果为进一步遗传操作和研究创造了条件。

快生型大豆根瘤菌是中国特有的固氮源，葛诚等对从河南、宁夏等地采取的 7 个栽培大豆品种的根瘤用抗血清鉴定，确定有 4 个品种内有快生型大豆根瘤菌结瘤，结瘤比例因品种而异[19]。最近对从中国河南、山西、宁夏、黑龙江、辽宁、江西、新疆、山东等 8 个省（区）21 个点的 47 个大豆品种（次）的 4362 个根瘤的测定，有 29 个品种（次）内有快生型大豆根瘤菌结瘤，其比例与不同采样地点，不同品种有关，幅度为 1—37.9%，不同的省（区）出现的频率有很大的不同。这种分布一方面说明快生型大豆根瘤菌在中国分布广泛，另一方面说明其分布有一定的规律性。对这种分布的内在规律需要通过更多的测定才能揭示出来。

快生型大豆根瘤菌从正式报道到现在不过才几年的时间，但是国内外的研究进展很快，我们应该利用它是中国特有的固氮资源的有利条件，加快研究工作的步伐，加快开发利用的步伐。

### 参 考 文 献

- [1] Keyser H. H. et al: 1982, *Science*, Vol. 215, No. 4540: 1631—1632.
- [2] Masterson R. V. et al: 1982, *J. of Bacteriology*. Vol. 152, No. 2: 928—931.
- [3] Yelton M. M. et al: 1983, *J. of General Microbiology*. Vol. 129, No. 5: 1537—1547.
- [4] 徐玲玫等: 1983, *土壤肥料*, No. 2: 7—8.
- [5] Buchanan et al: 1974, *Berey's Manual of Determinative Bacteriology* eighth edition.
- [6] Jordan D. C: 1982, *Int. J. Syst. Bacteriology*. 32: 136—139.
- [7] Jarvis B. D. W. et al: 1982, *Int. J. Syst. Bacteriology*: 378—380.
- [8] *Berey's Manual of Determinative Bacteriology* ninth edition: 234—255.
- [9] Sadowsky M. J. et al: 1983, *Int. J. Syst. Bacteriology*. Vol. 33, No. 4: 716—722.
- [10] Stowers M. D. et al: 1984, *Plant and Soil*, Vol. 77, No. 1: 3—14.
- [11] 徐玲玫等: 1984, *大豆科学* Vol. 3, No. 2: 101—109.
- [12] 樊蕙等: 快生型大豆根瘤菌的理化特性和共生效应(续一)(待发表).
- [13] 樊蕙: 1984, *中国油料*, No. 1: 75—77.
- [14] Fuchsman W. H.: 1983, *Crop Science*, Vol. 23, No. 1: 165—166.
- [15] Fuchsman W. H. et al: 1984, *Program and Abstracts world soybean research conference-III* No. 027.
- [16] Duteau N. M. et al: 1984, *Program and Abstracts world soybean research conference-III* No. 100.
- [17] McLoughlin T. J. et al: 1984, *Program and Abstracts world soybean research conference-III* No. 111.
- [18] Hattori J. et al: 1984, *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 48, No. 1: 234—235.
- [19] 葛诚等: 1984, *大豆科学*, Vol. 3, No. 4: 313—317.
- [20] Cleyet-Marel J. C. et al: 1983, *Abstracts of the Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation* No. 313.
- [21] McLoughlin T. J. et al: 1983, *Abstracts of the Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation* No. 422.
- [22] Atherly A. G. et al: 1984, *Program and Abstracts world soybean research conference-III* No. 148.
- [23] Appelbaum E. R. et al: 1983, *Abstracts of the Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation* No. 670.