

大豆根瘤菌的新类群*

徐玲玫 樊蕙 葛 诚

(中国农业科学院土肥所)

吴冈梵 傅连舜

(辽宁省铁岭地区农业科学研究所)

摘 要

1982年从辽宁省铁岭地区的野大豆根瘤中分离得到一个大豆根瘤菌新类群—超慢型大豆根瘤菌。此类群在栽培大豆上结瘤良好,但在豌豆、百脉根、紫云英、草木樨上不结瘤;在绿豆上能结瘤,不属135血清型。突出的特点是产碱能力强,培养5天后pH达到7.72—8.05,代时超长,被测定的2064菌株代时为25.9小时。

1982年从辽宁省铁岭地区14个县采集143份野生大豆根瘤材料,通过盆栽重新结瘤,分离得到不同类型的32个菌株,除了已经鉴定的13株为快生型大豆根瘤菌⁽¹⁾,一部分典型的慢生型大豆根瘤菌以外,另外还有12个菌株在大豆上结瘤良好,但有其它一些突出的特性。对这个大豆根瘤菌新类群做了初步鉴定,报告如下。

材 料 和 方 法

根瘤采集及分离。按文献报道⁽²⁾进行。

生物学特性鉴定。对此类群的大豆根瘤菌进行了革兰氏染色,肉汤培养,BTB反应,石蕊牛奶反应,3-酮基乳糖反应的鉴定。并测定了培养5天后的培养液的pH。菌株接种大豆(*Glycine max*)、豌豆(*Pisum sativum*)、百脉根(*Lotus corniculatus*)、紫云英(*Astragalus sinicus*)、草木樨(*Melilotus sp.*)、绿豆(*Phaseolus aureus*)等豆科植物,观察其共生效应。代时测定按1986年的方法^(1,3)。

血清学分析。抗血清制备按文献介绍⁽⁴⁾抗原分析按1984年的方法⁽⁵⁾。

试 验 结 果

1. 菌体和菌落特性。12个菌株的菌落如针尖大小,直径 ≤ 1 毫米。在YEM培养基上

* 吴玉兰, 陈月英同志参加部分工作。本文于1986年11月10日收到。This paper was received in Nov. 10, 1986.

需10—15天才能发育成无粘液。有的菌株在刚果红培养基上略微吸色。显微镜下与一般大豆根瘤菌类似, 老龄时有多形性。

2. 生理生化特性。初步鉴定结果见表1。

表1 大豆根瘤菌新类群生理生化特性

Table 1 Physiological-biochemical characteristics of new group of soybean rhizobia

菌株 Strain	革兰氏染色 Gram stain	肉汤生长 Growth in meat brotn	BTB反应 BTB reaction	石蕊牛奶 Litmus milk reaction	3-酮基乳糖 3-ketola- ctose pro- duction	回接大豆寄 主Reinocu- lation host	培养5天后 pH of culture for 5 days	代时(时) Genera- tion times(h)
2060	阴性	—	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	7.87	—
2061	阴性	+	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	8.02	—
2062	阴性	—	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	7.79	—
2063	阴性	+	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	7.87	—
2064	阴性	—	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	8.09	25.9
2065	阴性	—	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	7.93	—
2066	阴性	+	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	7.96	—
2067	阴性	—	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	7.88	—
2068	阴性	—	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	7.72	—
2069	阴性	—	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	7.94	—
2070	阴性	—	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	8.05	—
2071	阴性	—	深兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	7.95	—
<i>B. japonicum</i> 10324	阴性	—	兰色	兰紫色、不胨化	—	结瘤良好	6.84	* 平均 8.9
<i>R. fredii</i> USDA 205 2048	阴性	—	黄色	胨化	—	结瘤良好	5.18	2.9
	阴性	—	黄色	胨化	—	结瘤良好	6.62	3.5
<i>A. tumefaciens</i> T37	阴性	—	黄色	—	+	不结瘤	5.49	—

* 据Keyser H. H等测定7株慢型大豆根瘤菌平均代时为8.9时, 12株快型大豆根瘤菌平均代时为3.7小时⁽²⁾。
樊蕙等测定13株快型大豆根瘤菌平均代时为3.2小时⁽³⁾。

为了确认大豆寄主结瘤的即为原接种菌株, 取2060, 2061, 2065, 2067, 2069, 2070等菌株接种大豆后所结根瘤145个, 分别用其相应抗血清识别, 结果全部为阳性反应。证明确系由原接种菌株所结根瘤。

试验结果指出, 这一类群的大豆根瘤菌的生物学突出特点, 是在BTB培养基上产碱能力强, 呈深兰色, 而一般慢生型大豆根瘤菌仅表现为兰色。液体培养基上生长5天后pH为7.72—8.05, 多数菌株的pH接近8.0, 而一般慢生型大豆根瘤菌(*Bj japonicum*) 在液体培养基上生长5天后的pH较这一类群低得多。据对国内外29株慢生型大豆根瘤菌的测定, 其pH为6.60—7.26, 多数为7.0±0.1 (未发表资料)。另一个突出特点是生长速度特慢, 代时超长。测定代时过程中往往因产碱造成自我抑制, 致生长曲线不典型。已测出的2064菌株的代时为25.9小时, 较一般慢生型大豆根瘤菌的代时要长得多。

3. 与其它豆科植物共生。将此12个菌株接种在豌豆、百脉根、紫云英、草木樨、绿豆等豆科植物上, 观察其结瘤情况。

此类群的大豆根瘤菌除了在绿豆上结瘤,并能测出固氮酶活性以外,在其它几种豆科植物上均不结瘤。这种特性与一般的大豆根瘤菌基本一致。

4. 血清学特性。

①大豆根瘤菌新类群之间的交叉凝集反应。12个菌株中制备了6个菌株的抗血清,经效价测定用2060和2070菌株的抗血清与其它各菌株的抗原做交叉凝集,结果见表2。

表2 大豆根瘤菌新类群菌株间交叉凝集

Table 2 Cross-agglutinations between strains of new group soybean rhizobia

抗血清 Antiserum	抗原和交叉凝集价 Antigen and cross-agglutination titre											
	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071
2060	6400	6400	0	6400	6400	6400	6400	6400	0	6400	6400	6400
2070	1600	1600	0	1600	1600	1600	1600	1600	0	1600	1600	1600

交叉凝集结果表明,这一类群的大豆根瘤菌株至少有2个血清型。其中2060、2061、2063、2064、2065、2066、2067、2069、2070、2071属同一血清型。2062及2068与其它各菌株无亲缘关系。但二者之间的关系如何,尚待进一步鉴定。

②与快生型大豆根瘤菌血清型之间交叉凝集。试验以2060、2070抗血清与1984年鉴定的8个快生型大豆根瘤菌血清型代表菌株的抗原做交叉凝集反应,以鉴定其血清学关系,结果列于表3。

表3 大豆根瘤菌新类群与快生型大豆根瘤菌之间交叉凝集

Table 3 Cross-agglutination between strains of new group of soybean rhizobia and *R. fredii*

抗血清 Antiserum	抗原和交叉凝集价 Antigen and cross-agglutination titre							
	2053	2054	2056	2048	2047	191	194	217
2060	0	0	0	0	0	0	0	0
2070	0	0	0	0	0	0	0	0

从表3可以看出,2060血清型与目前已有的中国快生型大豆根瘤菌在血清学上毫无共同关系。

③大豆根瘤菌新类群与慢生型大豆根瘤菌之间血清学关系鉴定。试验所用的慢生型大豆根瘤菌为已知的常见的11个血清型代表,反应结果见表4。

试验表明,2060血清型与慢生型大豆根瘤菌11个血清型无任何交叉凝集,自然也不属135血清型。Gross等对分离的超慢型大豆根瘤菌的血清学反应表明,大部分菌株皆为135血清型,且对根瘤菌噬菌体Rhj781敏感^[10]。超慢型大豆根瘤菌与慢生型大豆根瘤菌之间血清学亲缘关系还应该进一步研究。

④大豆根瘤菌新类群与其它根瘤菌种的血清学关系鉴定。试验用的抗原菌株除了大豆根瘤菌(包括*B. japonicum*和*R. fredii*)以外的根瘤菌种,还包括了沙打旺根瘤菌和紫云英根瘤菌,结果见表5。

表4 大豆根瘤新类群与慢生型大豆根瘤菌之间交叉凝集

Table 4 Cross-agglutinations between strains of new group of soybean rhizobia and *B. japonicum*

抗血清 Antiserum	抗原和交叉凝集价 Antigen and cross-agglutination titre										
	005	B15	113-2	2028	110	122	138	76	123	135	31
2060	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2070	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表5 大豆根瘤菌新类群与其它根瘤菌种之间的交叉凝集

Table 5 Cross-agglutinations between strains of new group soybean rhizobia and other species of rhizobia

抗血清 Antiserum	抗原和交叉凝集价 Antigen and cross-agglutination titre										
	R. legumi- nosarum		R. trifolii 560-540- 5919 10004 82 89		R. loti A B		R. phaseo- li 127k17 2667		R. meliloti 1029 933 galus 33 103		R. astral- is 3G4b 20 沙16
2060	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2070	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

反应表明, 2060血清型与参试的9种根瘤菌的16个菌株皆无交叉反应。

小结和讨论

1. 多年来一直认定大豆根瘤菌是一个种, 即代时为6小时以上的慢生型大豆根瘤菌。随着研究的深入, 1982年正式报道了从中国的大豆根瘤里分离出快生型大豆根瘤菌^[6], 此类群表型上的突出特点为代时短(<6小时, 多数为3—4小时), BTB培养基上产酸, 结合其他特性, 1984年 Scholla等提出将其定为根瘤菌属(*Rhizobium*)中的一个种(*R. fredii*)^[7]。说明与大豆共生的并非一种共生体。就慢生型大豆根瘤菌而言, 根据DNA同源率的测定, 已将其分为三个DNA同源组。分别以I、I_a和II代表, 三个同源组各包括了一些血清型^[8]。这又说明了在慢生型大豆根瘤菌这个种内也是比较复杂的, 其表型也并非是一致的, 很值得深入研究。

2. 从辽宁铁岭14个县的野大豆根瘤内分离的这个新类群的初步鉴定可以看出, 其突出的特点是产碱能力较强, 代时超长, 血清学特性也比较特殊。Gross等曾在美国分离了这种类型的大豆根瘤菌, 其代时为15.7—30.1小时, Gross和Arunakumari等认为代时≥14小时的为超慢型大豆根瘤菌(ESG)^[9, 10], 我们测定的这个类群中的1株代时为25.9小时, 说明也是超慢型大豆根瘤菌。在此之前未见到国内报道过这种类群的大豆根瘤菌。若以在大豆上结瘤的这3个类群来说, 超慢型与快生型恰在两个极端, 而将超慢型大豆根瘤菌归于 *B. japonicum* 并不一定恰当。目前对这个类群的研究很少, 对其各方面的特性了解不多, 值得进一步去研究, 而且肯定会丰富和发展根瘤菌学的各个领域。

3. 中国是大豆和大豆根瘤菌的起源地, 拥有极为丰富的大豆根瘤菌资源, 也有许

多需要深入探讨的理论和实践问题。由于种种原因, 过去对大豆根瘤菌的研究比较薄弱。因此, 极有必要给予重视和加强。

参 考 文 献

- (1) 徐玲玫等, 1984, 大豆科学, vol.3(2): 101—109.
- (2) 徐玲玫等, 1983, 土壤肥料, No.2: 7—8.
- (3) 樊蕙等, 1986, 大豆科学, vol.5(1): 57—64.
- (4) 中国农科院土肥所生物固氮组, 1979, 农业科技通讯, No.4: 24—25.
- (5) 葛诚等, 1984, 大豆科学, vol.3(2): 237—242.
- (6) Keyser H. H et al, 1932, Science, 215, 1631—1632.
- (7) Scholla M. H. et al, 1984, Int. J. of Syst. Bact., 34(4): 484—486.
- (8) Hollis A. B. et al, 1981, J. Gen. Microbiol. 123: 215—222.
- (9) Arunakumari A. et al, 1986, App. l Envir. Microbiol. 51(1): 6—11.
- (10) Gross D. S. et al. 1979, J. of Microbiol. 114: 257—266.

A NEW GROUP OF SOYBEAN RHIZOBIA

Xu Lingmei Fan Huei Ge Cheng

(Soils & Fert. Inst., Chinese Academy of Agr. Sci. Beijing)

Wu Ganfan Fu Lianshuen

(Fieling Agr. Inst., Liaoning)

Abstract

A new group of soybean rhizobia-extra-slow-growing soybean rhizobia was obtained from wild soybean (*Glycine soja*) nodules in Liaoning province. It nodulated cultivated soybean excellently and could form effective association with mung bean (*Phaseolus aureus*), but not nodulated on pea (*Pisum sp.*), minketch (*Lectus sp.*), sweetclover (*Melilotus sp.*) and astragalus (*A. sinicus*). The new group did not belong to 135 serogroup. Its ability of alkaline production was especially strong, after cultivation 5 days. PH reched 7.72—8.09. They have an extra-long generation time, for example strain 2064 has a doubling time of approximately 25.9h.