

超慢型大豆根瘤菌及其研究

STUDY ON EXTRA SLOW-GROWING SOYBEAN RHIZOBIA

徐玲玫

(中国农业科学院土肥所)

1982年 Keyser H. H等与胡济生等发表的“从中国大豆上分离出快生型大豆根瘤菌”以来^[12], 使大豆根瘤菌领域的研究工作有了飞速的发展, 目前已在分类, 共生、生理生化、分子遗传学等方面有了重要的成果。^[2,3,4,6] 过去认为的典型的慢生型大豆根瘤菌也在自然分布, 血清组和氢酶表型、DNA 同源组测定, 分子遗传学等方面的研究上有了重大的进展。^[9,13,14,15] 除此之外, 就是发现和鉴定了大豆根瘤菌的新类群超慢型大豆根瘤菌。^[7,10] 新类群的出现使得对于大豆根瘤菌及整个根瘤菌特性的认识大大向前扩展了一步, 在理论上和实践上都有重大的意义。

超慢型大豆根瘤菌的发现

最早报道分离得到超慢型大豆根瘤菌的是美国内布拉斯加州立大学的 Gross, D. C 等(1979), 他们在该州的15个滨海地点采集的大豆根瘤中分离出若干大豆根瘤菌株, 其中一部分就是超慢型大豆根瘤菌, 并且发现超慢型(ESG)大豆根瘤菌分离地点具有类似的土壤环境条件。主要特点是碱性土壤、高传导性, 高钠含量和高铁、锰的含量, 表1为 ESG 菌株分离地的生态环境^[10]。

表1 超慢型大豆根瘤菌栖息地生态环境

Table 1 Ecotope of ESG isolation place

土壤pH范围 Soils pH range	土壤数日 No. of soils	ESG 菌株数 No. yielding ESG	传导性 (MS) Conductivity	饱和钠 (%) Sodium saturation	锰 (ppm) Manganese	铁 (ppm) Iron
7.2—8.3	16	15	0.04—0.32	0.32—12.70	5.1—18.7	3.2—14.8
5.5—6.9	6	0	0.02—0.03	0.02—0.93	15.4—39.3	13.3—72.2

徐玲玫等1982年从辽宁铁岭地区分离出超慢型大豆根瘤菌也是从风沙干旱盐碱土壤上得到的, 虽然未进一步测定土壤其它参数, 同样说明了 ESG 菌株生活环境具有一定的地理和自然特征。这种特征对于根瘤菌的存活, 进化有十分重要的研究价值。

本文于1987年12月30日收到。

This paper was received on Dec. 30, 1987.

超慢型大豆根瘤菌的生理生化

ESG大豆根瘤菌有许多不同于其它两个大豆根瘤菌类群的生理和生物化学特征,但是,有许多方面研究还仅仅是开始。目前,突出的是:

1. 代时

根瘤菌的世代时间是指其在甘露醇——酵母膏培养基上繁殖一代所需要的时间。一般来说, < 6 小时的为快生型, > 6 小时的为慢生型, 并由此有一系列相关的生理生化表型特征。快生型大豆根瘤菌多数为 3—4 小时, 慢生型大豆根瘤菌的代时多为 8—10 小时, 长的可达 14 小时。而超慢型大豆根瘤菌的代时则超过 14 小时, 可以认为亦有一系列相关的生理生化表型。从美国和中国分离的部分超慢型大豆根瘤菌的代时列在表 2。

2. 产酸碱能力。

根瘤菌在含糖培养基上生长改变培养基 pH, 是它们的一个重要生理特征, 与代谢途径和产物有关。一般来说, 快生型大豆根瘤菌在含糖培养基上产酸, 慢生型产碱 (亦有例外)。超慢型大豆根瘤菌则产碱明显, 其程度显著超过慢生型大豆根瘤菌, 这也是这个类群的突出特征之一。所测定的中国超慢型大豆根瘤菌产碱能力结果见表 3 [8]。

表 2 超慢型大豆根瘤菌的世代时间

Table 2 Doubling times of ESG.

分离地 Isolation place	美国内布拉斯加州 Nebraska					中国 辽 宁 Liaoning province				
菌 株 Strains	Rj10B·Rj12S Rj19FY Rj17W WA 5099—1—1					2062 2063 2064 2068 2069 2070				
代时 (小时) Generation time	19.8	20.7	20.1	22.6	24.1	30.3	23.3	28	41.9	23.3 24.4

表 3 大豆根瘤菌产酸产碱能力测定

Table 3 Determination of acid and alkaline production by soybean rhizobia

大豆根瘤菌 类 群 Groups of soybean rhizo- bia	超慢型大豆根瘤菌 (ESG) Extra-slow growing soybean rhizobia							快型大豆根瘤菌 (23株) Sino rhizobia	慢型大豆根瘤菌 (23株) Brady rhizobia
	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066		
	2067	2068	2069	2070	2071				
pH	7.87	8.01	7.73	7.37	8.47	7.93	7.91	5.06—6.66	6.7—7.24
	8.12	7.72	7.95	7.93	7.96				

3. 血清学特性

慢生型大豆根瘤菌目前已鉴定出 17 个血清型 (组)。这些血清型与寄主选择性, DNA 同源组, 胞外多糖成分等方面均有一定的联系 [9, 11]。是根瘤菌研究中应该测定的。

项目之一。超慢型大豆根瘤菌的血清型 Gross 等分析的结果认为除了一个属于 110 血清型外,其余的皆为 135 血清型^[10],而中国的辽宁菌株则不属于 135 血清型,并且看来与多数已知的快、慢型大豆根瘤菌血清型无任何交叉反应^[7]。由于目前得到的超慢型大豆根瘤菌株数量有限,研究还刚开始,血清学特性尚待进一步鉴定。

4. 其它特性。

目前的研究很不够,诸如酶学特性,碳利用,菌落特征,固有的抗菌素耐受性等方面都了解不多。这中间有许多特性肯定是值得研究的,例如从高 pH 土壤上分离得到的菌落为无粘液型,中国辽宁的超慢菌株亦为无粘液型等等。已进行的对多种碳源利用能力的测定中初步可以看出,它们有不同的代谢途径,利用碳水化合物的范围较快型和慢型要狭窄得多,而对有机酸类的利用要好得多(待发表资料)。这些特征过去由于将其归入慢生型大豆根瘤菌而较少涉及,是今后应该探讨的重要内容。

超慢型大豆根瘤菌的细胞成分分析

利用元素自动碳氮分析仪分析细菌细胞的 N、C 组成及 N/C 比值,是近年发展起来的一项测定技术。不同种类细菌的 N、C 组成及 N/C 比值有较大的差异,这种差异对于了解某类细菌的特性并在确定其分类位置上有一定的价值^[1,5]。大豆根瘤菌从其表型和生理生化、遗传特征上可以分为三个类群,最近葛诚、盛世淑等测定了三个类群大豆根瘤菌的 58 个菌株,结果表明,超慢型大豆根瘤菌与另外两群有较大的差异,细胞氮含量高而碳含量偏低, N/C 比值最高。三个类群大豆根瘤菌的 N、C 分析结果列在表 4^[8]。

表 4 快、慢、超慢型大豆根瘤菌的 N、C 含量及比值

Table 4 N and C content and ratio of three groups soybean rhizobia

菌 株 Strains	N %	C %	N %/C % × 100
快生型大豆根瘤菌 <i>Sino rhizobium</i> (测 23 株)	2.74—4.33	50.40—52.73	5.27— 8.52
慢生型大豆根瘤菌 <i>Brady rhizobium</i> (测 23 株)	5.41—9.71	42.68—50.32	11.43—20.94
超慢型大豆根瘤菌 Extra-slow-growing soybean rhizobib	9.12—11.62	42.56—46.1	20.56—25.46

* 快生型大豆根瘤菌 1988 年由陈文新定为中华根瘤菌属即 *Sino rhizobium* 发表在国际系统细菌学杂志上 1988.10 Vol. 38. No4. P392—397.

测定结果说明,三个类群的大豆根瘤菌细胞成分的 N、C 含量变化十分令人感兴趣, N 含量快型最低,约为 2—4 %, C 含量最高 > 50 %,而超慢型则 N 含量最高,均 > 9 %, C 含量最低, < 45 %。慢型的二者含量均居中。这种变化与其它表型如代时,菌

落大小,含糖培养基上产酸碱能力等亦是一个逐渐变化的趋势,由量变引起质变。但是三个类群又都可以在大豆上结瘤与固氮。所以,这种变化规律及其机制十分值得深入研究。

超慢型大豆根瘤菌的共生效应

超慢型大豆根瘤菌的共生效应研究得同样是不够的。徐玲玫等曾对中国辽宁菌株做了几种不同的豆科植物的共生试验,将12株超慢型大豆根瘤菌株接种在栽培大豆(*Glycine max*)、豌豆(*Pisum sativum*)、百脉根(*Lotus sp.*)、紫云英(*Astragalus sinicus*)、草木樨(*elilotus sp.*)、绿豆(*Phaseolus aureus*)等豆科植物上,结果除了在大豆上结瘤良好并可在绿豆上结瘤,且可测出固氮酶活性,在其它几种豆科植物上均不结瘤^[7]。Gross等所进行的在大豆上的共生效应试验证明,超慢型大豆根瘤菌有中等强度的固氮酶活性,放氢也是中等效率^[10],但是他们发现有的菌株如Rj23A可以形成高固氮率的根瘤,因此在考虑作为碱性土壤的接种菌株资源时,这些超慢型大豆根瘤菌是有其重要地位的。

结 语

超慢型大豆根瘤菌发表至今不到十年时间,过去一直认为它们不过是慢生型大豆根瘤菌的一个组成部分,研究并不深入。近年来,由于根瘤菌分类的进展,就慢生型大豆根瘤菌而言,DNA—DNA杂交已证明至少可分为三个不同的同源组^[11],说明慢生型大豆根瘤菌本身也不止一个种,超慢型的分类地位怎样,就更值得探讨了。另外一方面,无论是表型特征、生理生化、细胞成分、遗传学特性上具有十分显著差异的快生型大豆根瘤菌、慢生型大豆根瘤菌、超慢型大豆根瘤菌,它们都可以在大豆、野大豆上良好结瘤,程度不等地固氮,这对于根瘤菌的进化、侵染、识别、分类及分子生物学等方面无疑都是需要深入探讨的秘密。甚至可以推想,这种规律仅仅是在大豆根瘤菌上才有抑或在其它根瘤菌种上也有类似的规律呢?如果也是这样,可能对理论和实践都有很大的推进。如果不是这样,深入研究也必然会带来许多新的信息。除此之外,超慢型大豆根瘤菌作为特殊生态环境栖息的一个类群,在大豆根瘤菌的新资源来源上,亦应作为一个重要的方面。总之,超慢型大豆根瘤菌的发现和给我们带来了许许多多的新研究课题,值得去努力探索。(参考文献转244页)

species where they were used as crossing parents.

The results observed have shown that there is normal meiosis behavior at metaphase I in all parents and most F_1 hybrids, the chromosome configuration is 20 bivalents (ring and rod).

Most of the configurations are ring bivalent and few of them are rod bivalent in eleyen parents in a few PMC. The bivalents often have desynapsis. There is no univalent at metaphase I, the meiosis behavior is normal at anaphase I and second meiosis. The micronuclei in tetrads has not been observed. Number of bivalent of ring and rod is different at metaphase I in different cross parent and the affinity for crossing between different parents is different.

The difference of meiosis behavior among thirteen crossing combination were observed. The chromosome pairing was not stable, where number of bivalent range from 18 to 20. A few bivalent hat desynapsis, but number of bivalent is 5—20, the highest number of bivalent of desynapsis is 15. A lagging chromosome at anaphase and a few micronuclei in tetradspore were observed.

Key words: Chromosome meiosis Behavior Soybean

(接 308 页)

参 考 文 献

- [1] 盛世淑等, 1984, 微生物学通报, No. 2: 80—82
- [2] 葛 诚等, 1985, 大豆科学, Vol. 4(2): 159—163
- [3] 葛 诚, 1986, 国外农业科技, No. 1: 5—9
- [4] 葛 诚, 1986, 中国油料, No. 2: 69—73
- [5] 盛世淑等, 1986, 微生物学通报, No. 4: 153—158
- [6] 葛 诚等, 1987, 应用微生物, No. 1(7): 177—121
- [7] 徐玲玫等, 1987, 大豆科学, Vol. 6(2): 127—131
- [8] 葛 诚等, 1988, 中国农业科学
- [9] Cregan P. B. et al. 1986, Crop Science 26(5): 911—916
- [10] Gross D. S. et al. 1979, Jof Gen. Microbiol. 114: 257—266
- [11] Hollis A. B. et al. 1981, Jof Gen. Microbiol. 123: 215—222
- [12] Keyset H. H. et al. 1982, Science 215, 1631—1632
- [13] Keyser H. H. et al. 1984, Appl. and Environ. Microbiol. 47(4): 613—615
- [14] Stanley. J. et al. 1985, Jof Bacteriol. 163(1): 148—154
- [15] Thomas H. A. et al. 1984, Jof Bacteriol. 159(3): 857—862