

大豆三类共生体生理生化特性 变化规律研究 I^{*}

李 俊 葛 诚 徐玲玫 崔 阵 樊 蕙

(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)

摘 要

本文报道了从我国 15 个省(区)分离的大豆三类共生体 54 个菌株的部分生理生化特性及其变化的研究结果。菌株的世代时间测定表明,26 株快生菌株为 2.6~4.7hr,12 株慢生菌株多数为 8.5~12.0hr,16 株超慢生菌株在 18.2~39.6hr 之间;改变碳源对代时有影响,但仍在各自的代时范围内,证明世代时间是大豆根瘤菌菌株间比较稳定的重要表型特征之一;在 YEM 培养基上快生菌株产酸,超慢生菌株产碱能力比慢生菌株强,碳源不同使其产酸碱能力发生变化;三类共生体中都存在尿酶、硝酸还原酶、过氧化氢酶和 β -半乳糖苷酶的活性,快生菌株这些酶活性较强,超慢生菌株较弱,慢生菌株基本介于二者中间。

关键词 大豆三类共生体;快生大豆根瘤菌;慢生大豆根瘤菌;超慢生大豆根瘤菌

目前在大豆根部结瘤的共生体报道有三个类群,根据其世代时间及其它特性分别称为快生(*Sinorhizobium fredii* 或 *Rhizobium fredii*)^[9,12],慢生(*Bradyrhizobium japonicum*)^[11]和超慢生大豆根瘤菌(ESG, extra - slow - growing soybean rhizobia)^[2,10]。已进行的研究表明快生、慢生、超慢生这三类大豆根瘤菌间存在许多显著差异,但它们均能与栽培大豆和野生大豆结瘤固氮又说明彼此间有联系,并已总结出大豆三类共生体间的初步变化规律^[5]。有关大豆根瘤菌的研究报道大多数是针对某一类群共生体进行的,而很少从大豆三类共生体的角度去研究并探讨其变化规律。本研究对来源于我国 15 个省(区)的大豆三类共生体 54 个菌株进行了世代时间、产酸碱能力、更换碳源后代时的变化测定,以及尿酶、过氧化氢酶、硝酸还原酶、 β -半乳糖苷酶的生化测定,观察大豆三类共生体在这些方面的异同及其变化。试验结果报告如下。

* 国家自然科学基金资助项目。
本文于 1993 年 8 月 3 日收到。
This paper was received on Aug. 3, 1993.

材 料 和 方 法

一、供试菌株

大豆三类共生体菌株 54 株,具分离地区和寄主品种代表性。其中从辽宁等 4 省分离的 ESG16 株。来源于 10 省区的 *B. japonicum*12 株 *S. fredii* 26 株是从 15 个省区(市)分离的。菌株分离、纯化并回接确定为大豆根瘤菌后,根据分离物在平板或斜面上生长速率、BTB 反应及血清学反应等初步区分为三个类群的^[2]。参见表 1。

表 1 大豆三类共生体菌株、分离地及分离寄主品种

Table 1 Test strains, their isolation location, and original soybean cultivars

菌 株 Strains	分 离 地 Isolation location	分离的寄主品种 Original soybean cultivars
超慢生大豆根瘤菌 (ESG) 2044 等 16 个菌株	辽宁、山西、黑龙江、湖北	<i>G. Soja</i> , Walliams 及农家品种
慢生大豆根瘤菌 (<i>B. japonicum</i>) 002 等 12 个菌株	贵州、山东、湖北、辽宁、山西、宁夏、黑龙江、江西、安徽、河南	<i>G. max</i> , <i>G. soja</i> , 铁丰 3 号, 627, 83-19, 赣晚大豆, 阜 76-5
快生大豆根瘤菌 (<i>S fredii</i>) 2048 等 26 个菌株	辽宁、江苏、山西、宁夏、黑龙江、江西、山东、新疆、广东、安徽、河北、河南、湖北、上海市、陕西	<i>G. soja</i> , <i>G. max</i> , 晋大 3 号, 农家黄豆, 鲁豆 2 号, 晋豆 83, 中豆 19, 83-19, 猴子毛

菌株的培养除 ESG 需用阿拉伯糖代替 YEM 培养基中的甘露作碳源外,其余均用 YEM 培养基。

二、方法

1. 世代时间测定:按文献^[3]的方法进行,以 USDA205 为对照。通用代时测定是在 YEM 培养基(去钙)中进行,测定 54 个大豆三类共生体菌株的代时。培养 4 天后,用 pH 计测定菌液的 pH 值。

在更换碳源的代时测定试验中,限定培养基配方源自文献^[8](碳源为甘油 4.0g/升和谷氨酸钠 1.1g/升),阿拉伯糖培养基为仅在 YEM 中用阿拉伯糖替代甘露醇作碳源。对三类共生体中分布较广泛的 10 个菌株进行测定,同时也测定菌体在不同碳源培养基上的 pH 值。

2. 尿酶、硝酸还原酶测定:按文献^[11]中的方法进行。

3. 过氧化氢酶、β-半乳糖苷酶试验:按 Smibert 等^[13]方法进行,但需换碳源以适于大豆三类共生体的生长。

试 验 结 果

一、世代时间、pH 值及四种酶的生化反应测定

结果见表 2。

表 2 大豆三类共生体理化特性测定

Table 2 Physiological and biochemical traits of the three groups of soybean *rhizobia*

菌 株 Strains	代 时 (hr) Generation time	培养 4 天后 pH of culture for 4 days	尿 酶 Urease	H ₂ O ₂ 酶 Oxidase	硝酸还原酶 Nitrate reductase	β-半乳糖苷酶 β-galactosidase
ESG						
2044	29.40	7.77	++	+	+	+
2060	23.60	7.86	+	+	+	+
2061	31.40	7.70	+	+	+	++
2062	29.20	7.78	+	+	+	++
2064	26.20	8.08	+	+	+	+
2067	31.60	7.60	++	+	+	+
2068	39.60	8.04	++	+	+	++
2080	31.30	7.88	++	+	+	++
2260	18.20	7.62	++	++	+	+
2261	18.60	7.57	++	++	+	++
2279	24.40	7.64	+	+	+	+
2281	28.20	7.76	+	+	+	++
2309	29.60	7.63	++	++	+	+
2312	36.60	7.68	+	+	+	++
DE454	34.20	7.66	++	++	+	+
DE544	20.50	7.90	++	+	+	++
<i>B. japonicum</i>						
002	9.86	7.12	+	++	++	+
005	10.60	7.10	+	++	++	+
113-2	9.10	6.98	+	++	++	+
2040	11.50	7.12	++	++	++	+
2088	9.80	7.11	++	++	++	+
2228	10.25	7.02	+	++	++	+
2242	8.65	7.10	++	++	++	+
2287	10.50	7.22	++	++	++	+
2319	9.70	7.02	++	+	++	+
2325	16.40	7.45	++	++	+	+
C223	11.20	7.29	+	++	++	+
10324	8.80	7.08	++	++	++	+
<i>S. fredii</i>						
2044	3.58	6.32	++	++	++	+++
2049	3.70	5.65	++	++	++	+++
2059	2.88	6.58	++	++	++	+++
2075	3.20	4.47	++	++	++	+++
2078	3.90	6.34	++	++	++	+++
2092	2.60	6.07	++	++	++	+++
2201	3.45	6.37	++	+++	++	+++
2205	3.60	6.54	++	++	++	+++
2241	3.70	5.91	+	+++	++	++
2245	3.30	5.93	++	++	++	+++
2251	3.00	5.82	+	+++	++	+++
2265	4.25	6.50	++	+++	++	++

(续表 2)

菌株 Strains	代时 (hr) Generation time	培养 4 天后 pH of culture for 4 days	尿 酶 Urease	H ₂ O ₂ 酶 Oxidase	硝酸还原酶 Nitrate reductase	β-半乳糖苷酶 β-galactosidase
2268	4.25	6.77	++	++	++	+++
2271A	3.70	5.43	++	++	++	+++
2300	4.05	6.50	+	++	++	+++
2307	3.50	6.43	++	++	++	+++
2336	3.80	6.61	++	++	++	+++
2341	3.70	5.59	++	++	++	+++
2350	3.95	6.45	+	++	++	++
C331	3.80	6.20	++	++	++	+++
DE145	4.10	6.60	++	++	++	++
DH532	2.60	5.62	++	+	++	+++
Gd306	3.55	5.95	++	++	++	+++
USDA191	3.40	5.50	+	++	++	+++
USDA205	2.70	5.72	++	++	++	+++
USDA257	4.70	6.43	++	+	++	+++

注:代时和 pH 值为 2~3 次结果平均值。

Note: Generation time and pH were the mean values of two or three replications.

1. 世代时间:26 株 *S. fredii* 代时在 2.6~4.7hr 之间,多数为 3~4hr(短于 3hr 占 4 株,长于 4hr 有 5 株);所测 *B. japonicum* 12 个菌株代时为 8.65~16.40hr,多数为 8.5~12.0hr,仅 2325 菌株代时较长,达 16.40hr;16 株 ESG 代时超长,大于 18hr,其范围是 18.20~39.60hr,变化幅度较大。

2. 在 YEM 培养液中 pH 值:26 株快生菌株全部产酸,pH 值范围 4.47~6.77,多数为 5.50~6.50(pH 值小于 5.5 和大于 6.5 的分别为 2 株和 6 株);12 株慢生菌株大都产碱,pH 值为 6.98~7.54,其中代时长的菌株 2325 的产碱能力较其它慢生菌株强;16 株 ESG 都产碱,pH 值范围在 7.57~8.08 之间,产碱能力明显比慢生菌株强。

3. 四种酶的生化反应:表 2 中正号(+)说明大豆三类共生体都存在这些酶,而正号的多少表明酶活性的强弱。ESG 的 H₂O₂ 酶活性、还原硝酸盐能力在三类共生体中最弱;快生菌株的四种酶活性表现最强;慢生菌株除 β-半乳糖苷酶活性与 ESG 一样弱外,H₂O₂ 酶和硝酸还原酶的酶活性介于另二类共生体之间,但尿酶的酶活性三类共生体差异却不大。

二、大豆三类共生体不同碳源条件下代时及 pH 测定

1. 代时变化:从表 3 中可以看出, *S. fredii* 和 *B. japonicum* 菌株在三种培养基中,代时以甘露醇作碳源的培养基 I 中最短,其次是用甘油和谷氨酸钠作碳源的培养基 II 最短,代时最长的是以阿拉伯糖作碳源的培养基 III,但这二类共生体在三种培养基上代时变化不大;ESG 则是在培养基 III 上代时最短,培养基 I 上最长,不同碳源的培养基上代时变化幅度较大。

2. pH 值变化:与在 YEM 上产酸、碱情况比较,三类共生体菌株在培养 I 和 III 上 pH 值不同。快生菌株在培养基 III 上产更多量的酸,在培养 I 上则产碱;慢生菌株在培养基 I 上产更多的碱,在培养基 III 上则产少量酸;超慢生菌株在培养基 I 上产碱与培养基 I 上相

当,在培养基Ⅲ上产碱能力减弱。碳源的不同使菌株的产酸、碱能力发生变化。

表 3 不同碳源对大豆三类共生体代时及 pH 的影响

Table 3 Effect of various carbon sources on generation time and pH of culture of three groups of soybean *rhizobia*

菌 株 Strains	代 时 Generation time			培养 4 天后 pH pH of culture for 4 days		
	培 养 基 (medium)			培 养 基 (medium)		
	I	Ⅰ	Ⅱ	I	Ⅰ	Ⅱ
<i>S. fredii</i>						
USDA205	2.70	3.75	4.05	5.72	7.28	4.20
2048	3.58	3.80	4.30	6.23	7.26	4.98
<i>B. japonicum</i>						
10324	8.8	9.20	12.40	7.07	7.78	6.76
005	10.6	14.32	13.60	7.10	8.06	6.94
ESG						
2060	23.60	46.20	19.30	7.86	7.53	7.16
2062	29.20	32.60	19.80	7.78	7.70	7.15
2068	39.60	44.60	25.80	8.18	7.71	7.21
2080	31.30	34.20	21.60	7.97	8.08	6.95
2309	29.60	45.80	25.20	7.63	7.65	7.07
DE544	20.50	35.40	18.60	7.90	7.64	7.28

注:培养基 I、Ⅰ、Ⅱ 分别为 YEM、Bishop^[8]、阿拉伯糖培养基。
Note: Culture media I, Ⅰ, and Ⅱ stand for YEM, Bishop^[8], and Arabinose media, respectively.

小 结 和 讨 论

1. 本研究对大豆三类共生体 56 个菌株代时测定结果与以前报道的代时范围一致^[9,10,11]。快生菌株 2.5~6.0hr,慢生菌株 6.0~14.0hr,ESG 大于 14.0hr。
所测的 12 株慢生菌株中 2325 的代时大于 14.0hr,代时超长,产碱能力也较强。其原因是它们可能就属超慢生菌株,或者是属于慢生和超慢生之间的过渡类型。
2. 更换碳源的代时测定结果说明不同的碳源对三类共生体菌株代时确有影响。但都还在各自的代时范围内。世代时间作为大豆快生、慢生、超慢生根瘤菌的一个主要表型特征是比较稳定的;碳源的改变还使其产酸、碱能力发生变化。
大豆三类共生体在三种碳源上代时测定结果表明菌株代时的长短主要可能是由细胞内部代谢途径不同^[7],快生菌株利用碳源范围广,具多种糖酵解途径,且在多数碳源上产酸^[14],因而在三种碳源的培养基上快生菌株代时变化不大。由于 ESG 利用碳源范围窄,对碳源要求严格^[2,4],在不同碳源范围上测定的代时变化幅度较大。慢生菌株利用碳源范围居中,在三种碳源上代时变化也居中。
3. 四种酶的生化反应表明在快生和慢生大豆根瘤菌中存在,与以前报道一致^[15],

ESG 也存在这四种酶。三类共一体的四种酶活性 *S. fredii* 较强, ESG 则较弱, *B. japonicum* 基本上介于快生、超慢生菌株之间。

4. 本研究与前人已做的工作^[5,6]均表明, 在大豆上结瘤和固氮的三类共生体在世代时间、细胞成分、生理生化特性上有较大的差异; 最近的研究表明, 超慢生类群与快生、慢生大豆根瘤菌的 DNA 同源率平均分别为 14.8% 和 23.3%, 且与根瘤菌其它属种的 DNA 同源率亦很低(李俊等 1994)^[16], ESG 应为新的分类单元。然而这些不同的特性又有一定的变化规律, 对这些规律的探索, 无论在理论上和实践中都有十分重要的价值, 有必要深入进行下去。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物所细菌分类组, 1978, 《一般细菌常用鉴定方法》, 第 159~162 页, 科学出版社, 北京
- [2] 徐玲玫等, 1987, 大豆科学, 6(2): 127~131
- [3] 徐玲玫等, 1986, 大豆科学, 5(1): 57~64
- [4] 徐玲玫等, 1990, 微生物学报, 30(3): 193~200
- [5] 葛诚, 1989, 农牧情报研究, 1: 13~21
- [6] 葛诚等, 1988, 中国农业科学, 21(3): 70~78
- [7] 曾定, 1987, 固氮生物学, 第 137~143 页, 厦门出版社, 厦门
- [8] Bishop, P. E. et al., 1976. Plant Physiol. 57: 542~546
- [9] Chen, W. X. et al., 1988. Int. Syst. Bacteriol. 38(4): 392~397
- [10] Gross, D. S. et al., 1979. J. Gen. Microbiol. 114: 257~266
- [11] Jordan, D. C. 1980, Int. J. Syst. Bacteriol. 32(1): 136~139
- [12] Jarvis, B. W. et al., 1992. Int. J. Syst. Bacteriol. 42(1): 93~96
- [13] Smibert, R. M. et al., 1981. Manual of Methods for General Bacteriology (ed. Gerhardt P.), pp413~415, American Society for Microbiology & Washington D. C.
- [14] Stowers, M. D. et al., 1984. Plant and Soil. 77(1): 3~14
- [15] Sadowsky, M. J. et al., 1983, Int. J. Syst. Bacteriol. 33(4): 716~722
- [16] 李俊等, 1994 年, 微生物学报, (2)

PHYSIOLOGICAL—BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE THREE GROUPS OF SOYBEAN RHIZOBIA (I) *

Li Jun Ge Cheng Xu Lingmei Cui Zhen Fan Hui

(The Institute of Soil and Fertilizer, Chinese Academy
of Agricultural Science, Beijing, 100081)

Abstract

Fifty—four strains of the three groups of soybean *rhizobia* were examined for their

* The Project Supported by National Science Foundation of China.

physiological and biochemical traits. The range of generation times and pH on YEM for 4 days of the three groups of soybean *rhizobia*; 26 fast isolates from 2.6—4.7 hr and their pH of 4.47—6.77; the large majority of 12 slow isolates from 8.5—12.0 hr and their pH of 6.98—7.45; and 16 ESG strains from 18.2—39.6 hr and their pH of 7.57—8.08. The three groups of soybean *rhizobia* varied in their growth rate and pH after the carbon source was replaced, but their generation times were still within divided range. The result indicated that the durable time of the three groups of soybean *rhizobia* was one of the stable features of phenotypes. Although the three groups of soybean *rhizobia* were positive for urease, oxidase, nitrate reductase, and β -galactosidase, the fast isolates had greater activities than the other two groups, whereas ESG had the lowest activities.

Key words Three groups of soybean *rhizobia*; Fast-growing soybean *rhizobia*; Slow-growing soybean *rhizobia*; Extra-slow-growing soybean *rhizobia* (ESG)

讣 告

“大豆科学”杂志原编委,黑龙江省农科院生物技术研究中心主任、尹光初研究员因病医治无效,于1994年3月13日病逝,享年58岁。

尹光初先生是湖南洞口县人,1963年毕业于北京大学生物系。先后从事小麦、水稻及大豆等作物的组织培养、基因工程及遗传进化研究。曾任黑龙江省生物工程学会付理事长、省遗传学会理事、省科顾委委员、省自然科学基金委委员、中国植物学会植物组织培养专业委员会委员,是我国生物技术领域杰出的科技工作者。

大豆科学编辑部
一九九四年四月八日