

广东两种决明属 (*Cassia*) 植物根瘤菌的生物学特性

靖元孝 陈兆平

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

摘要 调查了广东地区 10 种 *Cassia* 植物结瘤状况, 仅山扁豆 (*C. mimosoides*) 和圆叶决明 (*C. rotundifolia*) 结瘤, 从山扁豆和圆叶决明各分离到 1 株根瘤菌并鉴定为慢生型。在所试的 10 种 *Cassia* 植物中, 2 株 *Cassia* 植物根瘤菌除了与山扁豆和圆叶决明结瘤外, 均不与其余 8 种 *Cassia* 植物结瘤; 同样, 3 株蝶形花科植物根瘤菌和 3 株含羞草科植物根瘤菌除了与山扁豆和圆叶决明结瘤外, 也均不与其余 8 种 *Cassia* 植物结瘤。此外, 2 株 *Cassia* 植物根瘤菌均能与所试 5 种蝶形花科和 4 种含羞草科植物结瘤。2 株 *Cassia* 植物根瘤菌在碳源利用、耐盐性、耐酸碱度及 5 种酶的活性等特性方面, 与 3 株蝶形花科植物根瘤菌和 3 株含羞草科植物根瘤菌极为相似。

关键词 根瘤菌; *Cassia*; *Cassia rotundifolia*; *Cassia mimosoides*

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RHIZOBIUM ISOLATED FROM TWO CASSIA SPECIES FROM GUANGDONG

Jing Yuanxiao Chen Zhaoping

(South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract Nodulation of ten *Cassia* species from Guangdong province was surveyed. It was shown that the nodules could appear only in *Cassia mimosoides* and *C. rotundifolia*. Two rhizobial strains were isolated each from *C. mimosoides* and *C. rotundifolia* and identified as slow-growing *Rhizobium*. Among ten *Cassia* species tested, the two rhizobial strains from *Cassia* failed to nodulate the other eight *Cassia* species, however, they are capable of nodulating *C. mimosoides* and *C. rotundifolia*. Likewise, three rhizobial strains from Mimosaceae and three from Papilionaceae were unable to nodulate other eight *Cassia* species except *C. mimosoides* and *C. rotundifolia*. Moreover, the two rhizobial strains from *Cassia* were able to nodulate four legumes of Mimosaceae and five legumes of Papilionaceae. The two isolates from *Cassia* were similar to three isolates from Mimosaceae and three from Papilionaceae in utilization of carbon sources, salt tolerance, pH tolerance and five enzyme activities.

Key words *Rhizobium*; *Cassia*; *Cassia rotundifolia*; *Cassia mimosoides*

苏木科植物全世界一千多种, 但与根瘤菌共生结瘤的只有 10-30%^[1]。 *Cassia* 是苏木科中最

大属, Allen 和 Allen^[2]在调查中发现 *Cassia* 能结瘤者只有 30%, 其中山扁豆和圆叶决明都能结瘤。柏学亮等^[3]在广西也发现山扁豆能结瘤, 但未见有关 *Cassia* 植物根瘤菌生物学特性的报道。本实验以从广东地区分离的山扁豆根瘤菌和圆叶决明根瘤菌为材料, 对其自生和共生特性进行研究, 并同其它热带豆科植物慢生型根瘤菌进行比较。

1. 材料和方法

实验菌株(见表1)

表1 供试菌株一览表

Table 1 A list of strains tested

菌株 Strains	原寄主植物 Host	寄主所属科 Family	菌株来源 Source from
MXCR	圆叶决明 (<i>Cassia rotundifolia</i>)	苏木科 (Caesalpinaceae)	本工作 This work
MXCM	山扁豆 (<i>C. mimosoides</i>)	苏木科 (Caesalpinaceae)	本工作 This work
CB627*	旋扭山绿豆 (<i>Desmodium intortum</i>)	蝶形花科 (Papilionaceae)	澳大利亚 Australia
MXSG	柱花草 (<i>Stylosanthes guianensis</i>)	蝶形花科 (Papilionaceae)	本实验室**
MXMA	大翼豆 (<i>Macroptilium atropurpureum</i>)	蝶形花科 (Papilionaceae)	本实验室**
MXAF	南洋楹 (<i>Albizia falcata</i>)	含羞草科 (Mimosaceae)	本实验室**
MXAC	台湾相思 (<i>Acacia confusa</i>)	含羞草科 (Mimosaceae)	本实验室**
MXAL	大叶合欢 (<i>Albizia lebeck</i>)	含羞草科 (Mimosaceae)	本实验室**

* CB627 为参比菌株 CB627 was used as representative strain

** Indicates that the strains were obtained from our laboratory

结瘤调查 1994年3月、6月、9月、12月分别在广州和鼎湖山对10种 *Cassia* 植物结瘤状况进行调查。挖开表土采集着生在新生根上的根瘤, 并分离纯化根瘤菌。

结瘤实验 见参考文献[4]。植物种子进行表面灭菌, 催芽待根长至1cm时, 用根瘤菌悬液浸泡发芽种子半小时, 然后种植到砂盒中, 进行无菌培养。2个月后收获植株, 用凯氏定氮法测定含氮量, 乙炔还原法测定根瘤固氮酶活性。

代时及酸碱反应 见参考文献[4]。接种根瘤菌到装有 YEM 液体培养基的三角瓶内, 27℃摇床培养, 8h后用分光光度计测定光密度值, 持续测72h。以培养时间为横坐标、光密度值为纵坐标绘制生长曲线, 光密度值增加一倍的时间为平均代时。6d后终止培养并用酸度计测定 pH 值。

碳源利用 见参考文献[5]。以去掉甘露醇的 YEM 液体培养基为基本培养基, 分别加入各种碳源使其终浓度为 1%(W/V)。灭菌后分装各试管 5ml, 然后接种各菌悬液, 并设置不接菌、不加碳源两种对照, 27℃摇床培养, 6d后用分光光度计测光密度值。

耐盐实验 见参考文献[5]。改变 YEM 培养基中氯化钠含量, 分别调至 0.05、0.1、0.2、0.3mol/L, 培养 6d 后用分光光度计测光密度值。

耐酸碱度 见参考文献[5]。采用 YEM 培养基, 灭菌后用 S-3C 型酸度计调节一系列 pH 梯度, 培养 6d 后用分光光度计测光密度值。

5种酶的酶活性定性测定 脲酶、氧化酶、过氧化氢酶的定性测定方法参见《一般细菌常用鉴

定方法》^[6], β -半乳糖苷酶定性测定见参考文献^[7], 青霉素酶定性测定参见 Foley^[8]的方法。

2 结果

对广东地区 10 种 *Cassia* 植物结瘤状况进行了调查, 结果(见表 2)表明: 仅山扁豆和圆叶决明有瘤, 其余 8 种 *Cassia* 植物均无结瘤。这一结果与 Allen 和 Allen^[2]、柏学亮等^[3]及 Whitty 等^[9]对 *Cassia* 植物结瘤状况进行调查所得结果一致。

圆叶决明是一种半直立、多年生亚灌木状草本, 主要分布在巴西、澳大利亚、西非等地, 牛羊极喜食^[10], 广东八十年代从澳大利亚引进。山扁豆是一种一年生或多年生亚灌木状草本, 分布于我国东南部、南部至西南部。本种常生长于荒地上, 耐旱又耐瘠, 是良好的覆盖植物和改土植物, 同时又是良好的绿肥。

从山扁豆和圆叶决明根瘤各分离到 1 株根瘤菌, 编号分别为 MXCM 和 MXCR, 然后进行根瘤菌共生和自生特性的研究。

2.1 共生特性

MXCM、MXCR 分别回接到对应宿主植物山扁豆和圆叶决明后, 结果(见表 3)表明: 接种根瘤菌的植株生长明显优于不接种对照组, 无论干重还是含氮量, 接种根瘤菌比不接种对照组高。

表 3 豆科植物-根瘤菌共生体特性

Table 3 Characteristics of legume hosts inoculated with rhizobial strain

	山扁豆 <i>C. mimosoides</i>		圆叶决明 <i>C. rotundifolia</i>	
	接种根瘤菌 Inoculated	不接种对照 Uninoculated	接种根瘤菌 Inoculated	不接种对照 Uninoculated
鲜瘤重 (g/株) Fresh nodule weight (g/plant)	0.1	0	0.2	0
干重 (g/株) Dry weight (g/plant)	0.53	0.19	0.45	0.17
含氮量 N content (%)	2.72	1.16	2.33	1.24
全氮量 (mg/株) Total N content (mg/plant)	14.4	2.2	10.5	2.1
固氮酶活性 N_2ase activity*	8.32	0	8.93	0

实验结果为 6 株植物的平均值 Average values of 6 plants

* 单位为 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}$ 鲜瘤 h^{-1} , $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}$ fresh nodule h^{-1}

MXCM、MXCR 除了与各自对应的宿主结瘤外, 还观察了它们与其它热带豆科植物的共生结瘤状况, 结果(见表 4)表明: MXCM、MXCR 能与所试的 5 种蝶形花科和 4 种含羞草科植物结瘤。然而, 在所试的 10 种 *Cassia* 植物中, MXCM 和 MXCR 除了与山扁豆和圆叶决明结瘤外,

表 2 10 种 *Cassia* 植物结瘤状况
Table 2 Nodulation of 10 *Cassia* species

种名 Species	结瘤状况 Nodulation	采集地点 Spot
粉花山扁豆 (<i>C. nodosa</i>)	-	鼎湖山 Dinghushan
美丽山扁豆 (<i>C. spectabilis</i>)	-	鼎湖山 Dinghushan
槐叶决明 (<i>C. sophora</i>)	-	鼎湖山 Dinghushan
腊肠树 (<i>C. fistula</i>)	-	广州 Guangzhou
望江南 (<i>C. occidentalis</i>)	-	广州 Guangzhou
黄槐 (<i>C. surattensis</i>)	-	广州 Guangzhou
决明 (<i>C. tora</i>)	-	鼎湖山 Dinghushan
双荚决明 (<i>C. bicapsularis</i>)	-	广州 Guangzhou
山扁豆 (<i>C. mimosoides</i>)	+	鼎湖山 Dinghushan
圆叶决明 (<i>C. rotundifolia</i>)	+	广东乐昌 Lechang, Guangdong

+: 结瘤 Nodulation; -: 不结瘤 No nodulation

不能同其余 8 种 *Cassia* 植物结瘤。

表 4 MXCM、MXCR 与热带豆科植物结瘤反应

Table 4 Nodulation response of tropical legumes inoculated with strains MXCM and MXCR

宿主 Host		菌株 Strain	
科名 Family	种名 Species	MXCM	MXCR
含羞草科 Mimosaceae	楹树 <i>Albizzia chinensis</i>	+	+
	南洋楹 <i>A. falcata</i>	+	+
	大叶合欢 <i>A. lebeck</i>	+	+
	台湾相思 <i>Acacia confusa</i>	+	+
蝶形花科 Papilionaceae	柱花草 <i>Stylosanthes guianensis</i>	+	+
	山毛豆 <i>Tephrosia candida</i>	+	+
	异果山绿豆 <i>Desmodium heterocarpum</i>	+	+
	圆叶舞草 <i>Desmodium gyroides</i>	+	+
苏木科 Caesalpinaceae	蝴蝶豆 <i>Centrosema pubescens</i>	+	+
	圆叶决明 <i>Cassia rotundifolia</i>	+	+
	山扁豆 <i>C. mimosoides</i>	+	+
	美丽山扁豆 <i>C. spectabilis</i>	-	-
	粉花山扁豆 <i>C. nodosa</i>	-	-
	槐叶决明 <i>C. sophora</i>	-	-
	望江南 <i>C. occidentalis</i>	-	-
	双荚决明 <i>C. bicapsularis</i>	-	-
	腊肠树 <i>C. fistula</i>	-	-
	黄槐 <i>C. surattensis</i>	-	-
决明 <i>C. tora</i>	-	-	

+: 结瘤 Nodulation; -: 不结瘤 No nodulation

此外, 本文还研究了其它热带豆科植物根瘤菌与 10 种 *Cassia* 植物共生结瘤情况, 结果(见表 5)表明: 所试的 3 株蝶形花科植物根瘤菌和 3 株含羞草科植物根瘤菌也象 2 株 *Cassia* 植物根瘤菌一样, 除了与山扁豆和圆叶决明结瘤外, 也均不能同其余 8 种 *Cassia* 植物结瘤。

表 5 热带豆科植物根瘤菌与 10 种 *Cassia* 植物结瘤反应

Table 5 Nodulation response of 10 *Cassia* species inoculated with rhizobial strains from tropical legumes

宿主 Host	菌株 Strain					
	CB627	MXSG	MXMA	MXAF	MXAC	MXAL
圆叶决明 <i>C. rotundifolia</i>	+	+	+	+	+	+
山扁豆 <i>C. mimosoides</i>	+	+	+	+	+	+
美丽山扁豆 <i>C. spectabilis</i>	-	-	-	-	-	-
槐叶决明 <i>C. sophora</i>	-	-	-	-	-	-
腊肠树 <i>C. fistula</i>	-	-	-	-	-	-
望江南 <i>C. occidentalis</i>	-	-	-	-	-	-
黄槐 <i>C. surattensis</i>	-	-	-	-	-	-
决明 <i>C. tora</i>	-	-	-	-	-	-
双荚决明 <i>C. bicapsularis</i>	-	-	-	-	-	-
粉花山扁豆 <i>C. nodosa</i>	-	-	-	-	-	-

+: 结瘤 Nodulation; -: 不结瘤 No nodulation

2.2 生理生化特性

代时与酸碱反应 Trinick^[11]认为慢生型根瘤菌代时在6h以上,在YEM培养基上代谢产碱。本实验结果表明:所试菌株代时均在6h以上,代谢产碱,属慢生型根瘤菌。

碳源利用 Elkan^[12]认为慢生型根瘤菌利用碳源范围较窄,一般不能利用蔗糖、麦芽糖、乳糖等双糖。本实验结果(见表6)表明:所试菌株能利用甘露醇、半乳糖等5种碳源物质,不能利用苹果酸、柠檬酸和蔗糖,而利用麦芽糖能力较差。

表6 碳源利用(培养6d后的O.D.值)

Table 6 Utilization of carbon source (O.D. after incubation for six days)

碳源 C source	菌株 Strain							
	MXCR	MXCM	CB627	MXSG	MXMA	MXAF	MXAC	MXAL
甘露醇 Mannitol	3.12	3.35	2.12	2.35	1.98	2.34	2.23	2.54
半乳糖 Galactose	1.93	2.02	1.54	1.68	1.34	1.56	1.72	1.75
葡萄糖 Glucose	2.13	2.15	1.83	1.90	1.68	1.93	1.95	2.01
果糖 Fructose	1.57	1.63	1.42	1.45	1.33	1.58	1.55	1.57
甘油 Glycerol	1.43	1.47	1.08	1.12	0.98	1.23	1.20	1.25
麦芽糖 Maltose	0.12	0.13	0.08	0.085	0.07	0.08	0.07	0.06
蔗糖 Sucrose	0	0	0	0	0	0	0	0
苹果酸 Malate	0	0	0	0	0	0	0	0
柠檬酸 Citric acid	0	0	0	0	0	0	0	0

耐盐性 实验表明:所试菌株在0.1mol/L盐浓度生长受到较大影响,而在0.2mol/L盐浓度不能生长。

耐酸碱度 实验表明:所试菌株均不能在pH4、pH9条件下生长,而在pH6条件下生长最旺盛(见表7)。

5种酶的活性测定 结果表

明:所试菌株的过氧化物酶、氧化酶、脲酶和青霉素酶均呈阳性,而 β -半乳糖苷酶呈阴性,这与慢生型根瘤菌特征相一致。

表7 耐酸碱度(培养6d后的O.D.值)

Table 7 pH tolerance (O.D. after incubation for six days)

pH	菌株 Strain							
	MXCR	MXCM	CB627	MXSG	MXMA	MXAF	MXAC	MXAL
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0.93	0.97	0.85	0.74	0.58	0.90	0.56	0.65
6	2.83	2.45	2.13	1.98	1.84	2.10	1.92	1.75
7	2.48	2.32	2.04	1.85	1.73	1.97	1.76	1.53
8	0.84	0.82	0.75	0.69	0.71	0.80	0.65	0.56
9	0	0	0	0	0	0	0	0

3 讨论

据报道在已进行了结瘤状况调查的豆类植物中,蝶形花科植物有瘤者约占98%,含羞草科植物有瘤者约占60-70%,而苏木科植物只占10-30%。因此,Lim和Burton^[13]认为寻找苏木科植物结瘤能力差异的原因是一个重要的研究课题。

本研究调查了广东地区10种*Cassia*植物结瘤状况,只有山扁豆和圆叶决明结瘤。从山扁豆和圆叶决明分离到的2株根瘤菌在碳源利用、耐盐性、耐酸碱度及5种酶的活性等特性方面,与

3株蝶形花科植物根瘤菌和3株含羞草科植物根瘤菌都极为相似。

共生结瘤实验表明：山扁豆根瘤菌和圆叶决明根瘤菌除了与各自对应的宿主结瘤外，还能与所试的5种蝶形花科和4种含羞草科植物共生结瘤，但都不能同另外8种 *Cassia* 植物结瘤。

从2株 *Cassia* 植物根瘤菌的共生和自生特性可以得出以下结论：1) 两株 *Cassia* 植物根瘤菌与3株蝶形花科植物根瘤菌和3株含羞草科植物根瘤菌属于慢生型根瘤菌的同一菌群；2) 两株 *Cassia* 植物根瘤菌共生专一性不强、宿主范围广。但是，在所试的10种 *Cassia* 植物中，为什么共生专一性不强、宿主范围广的两株 *Cassia* 植物根瘤菌只同山扁豆和圆叶决明共生结瘤？是否可以推测导致大部分 *Cassia* 植物不结瘤的原因可能是由于植物分泌的凝集素 (Lectin) 或类黄酮 (Flavone) 等信号物质不能与根瘤菌相互识别所致？这一问题有待今后进一步研究。

参考文献

- 1 Allen E K, Allen O N. Recent advances in Botany. 9th International Botany Congress. University of Toronto Press, 1991, 585-588
- 2 Allen E K, Allen O N. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants (ed by Nutman P S). Cambridge University Press, 1976, 113-122
- 3 柏学亮, 唐东阶等. 广西含羞草和云实科一些植物结瘤状况的调查. 广西植物, 1987, 7(1): 61-65
- 4 曹燕珍, 胡正嘉等. 快生型大豆根瘤菌的研究 I: 快生型大豆根瘤菌的分离及其生理生化特性. 华中农业大学学报, 1986, 5(2):149-156
- 5 靖元孝, 莫照穆. 山蚂蝗属 (*Desmodium*) 植物根瘤菌生物学特性. 华南师范大学学报, 1994, (4): 8-13
- 6 中国科学院微生物研究所细菌分类组编. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978, 135-179
- 7 周德庆主编. 微生物学实验手册. 上海科学技术出版社, 1986, 155-156
- 8 Foley J M. Screening bacterial colonies for penicillinase production. Nature, 1962, 195:287-288
- 9 Whitty P W et al. Molecular separation of genera in Cassiinae (Leguminosae), and analysis of variation in the nodulating species of *Chamaecrista*. Molecular Ecology, 1994, 3:507-515
- 10 Strickland R W et al. Morphological and agronomic attributes of *Cassia rotundifolia* Pers., *C. pilosa* L. and *C. trichopoda* Benth., potential forage legumes for northern Australia. Aust J Exp Agric, 1985, 25:100-108
- 11 Trinick M J. Nitrogen Fixation. Volume 2: Rhizobium (ed by Brogton W J) Clarendon Press. Oxford, 1982, 76-147
- 12 Elkan G H, Kuyendull L D. Nitrogen Fixation. Volume 2: Rhizobium (ed by Brogton W. J) Clarendon Press. Oxford, 1982, 147-166
- 13 Lim G, Burton J C. Nitrogen Fixation. Volume 2: Rhizobium (ed by Brogton W J) Clarendon Press. Oxford, 1982, 29