

## 南洋楹根瘤菌的分离和特性

黄维南 蓝谷 蔡龙祥 邹小鲁

(福建亚热带植物研究所, 厦门 361006)

**摘要** 从南洋楹新鲜根瘤中分离得到根瘤菌菌株 8638, 再经稀释分离, 挑取不同形态的菌落, 经连续单菌落纯化, 获得 8638L、8638M 和 8638S 三株菌落型。对它们的形态特征、培养性状、生长速度、生理生化特性进行观测。并对它们回接南洋楹后的结瘤状况和共生固氮活性, 以及在自生条件下固氮酶和吸氢酶活性作了测定。

**关键词** 南洋楹; 根瘤菌; 特性

**中图分类号** Q935

## ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF RHIZOBIAL STRAINS FROM NODULES OF *ALBIZIA FALCATA* (L.) FOSBERG

Huang Weinan Lan Gu Cai Longxiang Zou Xiaolu

(Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361006)

**Abstract** The *Rhizobium* sp. strains 8638L, 8638M and 8638S were isolated from root nodules of *Albizia falcataria* which were Gram-negative rods with a subpolar flagellum, the cell sizes being  $0.53 \times 1.17$ ,  $0.66 \times 1.95$  and  $0.66 \times 2.03 \mu\text{m}$ , respectively. The growth of the three strains colonies in yeast-mannitol (YM) liquid medium had long doubling time (7.79, 10.16 and 8.7 h, respectively). They grew slowly on YM agar, and could produce alkali, but could not grow on medium with 5% NaCl and at  $39^\circ\text{C}$ . Physiological and biochemical characteristics of the three rhizobial strains were examined. The nodulation and nitrogenase activity in seedlings of *A. falcataria* inoculated with the strains isolated from nodules of the same tree species were tested, which provided satisfactory results. The strains were shown to have nitrogen fixing ability under self-growing condition.

**Key words** *Albizia falcataria*; Rhizobial strains; Characterization

南洋楹 (*Albizia falcataria* (L.) Fosberg) 是豆科速生乔木树种, 原产南洋群岛, 我国广东、广西、福建、海南、台湾等地均有栽培。有关南洋楹的结瘤固氮特性, 我们已有报道<sup>[1]</sup>, 本文仅报道从南洋楹根瘤中分离的根瘤菌, 经稀释分离和连续单菌落纯化后, 获得的三株菌落型的形态特征和生理生化特性。

## 1 材料和方法

**菌种的分离和纯化** 挖取本所种植的一年生南洋楹植株的新鲜根瘤, 洗净后, 按 J. M. 芬森特方法<sup>[2]</sup>进行根瘤表面消毒, 无菌水多次冲洗, 用无菌玻棒压碎, 吸取汁液接到改进的 YMA 试管斜面上<sup>[3]</sup>, 于 28 ℃ 培养。长出菌落后进行平板划线分离, 挑取单菌落在 YM 液体培养基中培养, 用含去污剂(0.01% 吐温 40)的溶液进行稀释分离。挑取不同形态的菌落, 经连续单菌落纯化, 获得 8638L、8638M 和 8638S 三株菌落型。

**形态特征和生长性状观测** 根瘤菌的革兰氏染色和鞭毛染色用草酸铵-结晶紫和银盐染色法<sup>[4]</sup>。耐盐性实验用基础培养液<sup>[2]</sup>加入 0.2%、0.5%、1.0% 和 1.5% 的 NaCl, 以不加盐的基础培养液为对照, 室温下摇床培养(频率 196 r min<sup>-1</sup>)。耐温性实验用 5℃、12℃、23℃、29℃、35℃ 和 39℃ 作为培养温度, 一周后观测其培养液混浊度及菌落生长。

**生长速度测试** 将在 YMA 试管斜面上生长 10 d 的待测菌制成菌悬液, 接种到盛有 30 ml 培养液的 300 ml 三角瓶中, 每瓶加 0.5 ml, 28℃ 摇床培养(频率 196 r min<sup>-1</sup>), 每隔一定时间取样, 用 721 分光光度计于 650 nm 测 OD 值, 作出生长曲线。用系列稀释法进行细胞计数, 根据  $G = \frac{t_2 - t_1}{3.3(\lg x_2 - \lg x_1)}$  公式计算该菌的增代时间<sup>[5]</sup>。

**生理生化实验** 3-酮基乳糖反应、石蕊牛奶反应、碳源利用、硝酸盐还原、柠檬酸盐利用、淀粉水解等实验, 均按常规方法<sup>[4]</sup>, 一周后测定结果。明胶水解实验是在基础培养基中加入 10% 浓度为 4% 的明胶液, 一周后加 0.5% 酸性汞检查水解圈<sup>[6]</sup>。

**菌株回接试验** 按前文方法<sup>[7]</sup>。

**根瘤菌自生培养条件** 用 CS<sub>7</sub> 培养基(固相)<sup>[8]</sup>或吸 H<sub>2</sub> 培养基(液相)<sup>[9]</sup>。

**固氮酶活性和吸氢酶活性测定** 按前文的方法<sup>[10]</sup>。

上述实验均设三个重复。

## 2 结果与讨论

### 2.1 根瘤菌的性状和形态特征

分离的三株菌落型, 在平板上培养, 菌落都较小。培养 10 d 后, 8638S 菌落的直径小于 1 mm, 圆形透明, 表面凸起; 8638M 的菌落灰白色, 表面微凸, 直径 1-1.5 mm; 8638L 生长较快, 直径 1.5-2.5 mm, 在斜面上形成的菌苔颜色略透明于其他两株菌落型, 菌苔和斜面粘着力较强, 不易从斜面上挑起, 在培养液或无菌水中易打散。而 8638M、8638S 则相反, 易挑起而不容易打散。8638L 的菌体呈短杆状, 细胞大小为 0.53×1.17 μm, 8638M 和 8638S 的菌体呈杆状, 大小分别为 0.66×1.95 μm 和 0.66×2.03 μm。三株菌落型的革兰氏染色均呈阴性, 都有一根亚极生鞭毛, 有荚膜, 无芽孢。

### 2.2 根瘤菌的抗逆性

三株菌落型的最适生长温度为 29℃-35℃, 在 39℃ 下都不能存活, 8638L 和 8638S 在 23℃ 以下不能生长, 8638M 在 23℃ 时勉强生长。

三株菌落型的耐盐性都较差, 加 0.5% NaCl 时都不能生长, 而加 0.2% NaCl 时 8638L 可以

生长, 8638M 和 8638S 则较勉强生长。

8638L 对 pH 的适应范围较广, 从 pH4.5-8.74 都能较好地生长, 而 8638M 和 8638S 对 pH 的适应范围在 4.5-7.2。三株菌落 8638L、8638M、8638S 的培养基在消毒前的 pH 为 4.65, 消毒后为 4.78, 而接菌后 7 d 分别为 6.38, 6.47 和 5.36。三株菌落型都较耐酸, 这可能是因为在生长过程中都能产碱, 不同程度地提高培养基的 pH 值, 而 pH 的提高程度也依赖于菌体的生长状况。

三株菌落型对所供试的抗菌素 (40 mg ml<sup>-1</sup> 庆大霉素、5.56 mg ml<sup>-1</sup> 链霉素) 较敏感, 都能形成抑制圈。

### 2.3 根瘤菌的部分生理生化特性

南洋楹根瘤菌对碳源的利用如表 1 所示, 8638L 在 10 种碳源中都能生长, 而 8638M 和 8638S 在葡萄糖中都不能生长。

产生 3-酮基乳糖是鉴别土壤杆菌的特征之一<sup>[4]</sup>, 表 2 表明三株菌落型均不产生 3-酮基乳糖。前人曾认为根瘤菌不能水解淀粉<sup>[4]</sup>, 而关桂兰等对新疆干旱区根瘤菌进行水解淀粉的实验表明, 约有 30% 的根瘤菌能水解淀粉<sup>[1]</sup>。我们的实验也说明南洋楹根瘤菌的三株菌落型都能水解淀粉, 而且都能水解明胶。

Jordan 和 Allen<sup>[12]</sup> 认为土壤杆菌利用柠檬酸盐, 而根瘤菌属则不利用柠檬酸盐, 但近年来国内外报道的银合欢、旋扭山绿豆、四棱豆等的根瘤菌都可以利用柠檬酸盐<sup>[13-15]</sup>。关桂兰等测试的 90 株根瘤菌中有 58 株能利用柠檬酸盐<sup>[1]</sup>。我们的试验结果也表明, 南洋楹根瘤菌的三株菌落型也都能利用柠檬酸盐。因此, 以利用柠檬酸盐作为划分根瘤菌属与土壤杆菌属的依据确应重新考虑。三株菌落型中只有 8638L 对硝酸盐的反应呈阳性, 而 8638M 和 8638S 为阴性, 表明 8638L 具有还原硝酸盐的能力。

表 1 南洋楹根瘤菌对碳源的利用

Table 1 Utilization of carbon source by rhizobial strains from nodules of *A. falcata*

碳源 Carbon source	菌株 Strains		
	8638L	8638M	8638S
葡萄糖 Glucose	+	-	-
果糖 Fructose	+	+	
半乳糖 Galactose	+	+	+
树胶醛糖 Gum aldose	+	+	+
鼠李糖 Rhamnose	+	+	+
木糖 Xylose	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	
山梨糖 Sorbose	+	+	+
糊精 Dextrin	+	-	+

+: 生长 Growth; -: 不生长 No growth

表 2 南洋楹根瘤菌的部分生理生化特性

Table 2 Some physiological and biochemical characteristics of rhizobial strains from nodules of *A. falcata*

	菌株 Strains		
	8638L	8638M	8638S
3-酮基乳糖反应 3-keto-lactose test	-	-	-
水解淀粉 Starch hydrolysis	+	+	+
水解明胶 Gelatin hydrolysis	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	-	-
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	+	+
石蕊乳反应 Litmus milk test	变蓝, 退色	变蓝, 退色, 透明	变蓝, 退色, 透明

+: 有反应 Reaction; -: 不反应 No reaction.

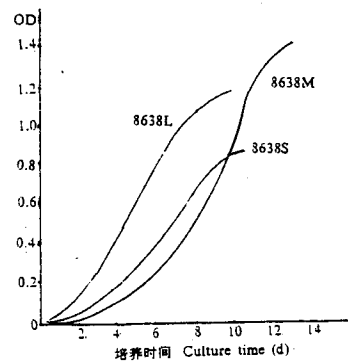


图 1 南洋楹根瘤菌的生长曲线

Fig. 1 The growth of rhizobial strains from nodules of *A. falcata*

## 2.4 根瘤菌的生长速度

南洋楹根瘤菌的生长速度如图1所示。计算三株菌落型的增代时间, 8638L、8638M和8638S分别为7.79 h、10.16 h和8.7 h。前人曾以根瘤菌的生长速度为主要依据将其划分为快生型或慢生型, Vincent认为增代时间2-4 h, 3-5 d形成直径为2-4 mm的菌落者属快生型; 增代时间6-8 h, 7-10 d形成直径小于1 mm的菌落者为慢生型<sup>[6,17]</sup>。曾在《固氮生物学》中介绍了Jordan的分类法<sup>[18]</sup>, 认为慢生型根瘤菌靠一枚极生或亚极生鞭毛运动, 在甘露醇或其它碳化物的无机培养基上生长时产碱, 不生成3-酮基糖苷。根据上述特征, 我们分离的三株菌落型属慢生型。但是这种按生长速度将根瘤菌分为快、慢生型, 有时也有一定的局限性<sup>[19]</sup>。

## 2.5 根瘤菌的回接试验

根瘤菌纯化后, 在液体培养基中振荡培养7 d, 将菌液分别接种于预先在无菌条件下培育的南洋楹幼苗的试管中, 接种后14 d已出现根瘤, 接菌的植株结瘤率达100%, 而不接菌的对照植株均不结瘤。培养3个月后, 根瘤的生长和共生固氮活性如表3所示。

表3 南洋楹根瘤菌回接后的结瘤固氮

Table 3 Nodulation and nitrogenase activity in seedlings of *A. falcataria* inoculated with rhizobial strains isolated from nodules of the same species

接种的菌株 Strains	宿主株数 No. of host	结瘤株数 No. of plants nodulated	结瘤率 Nodulation rate (%)	根瘤鲜重 Fresh weight of nodules (g/plant)	固氮酶活性 Nitrogenase activity ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_2 \text{ g}^{-1}\text{FW h}^{-1}$ )
Control	15	0	0		
8638L	16	16	100	0.92	3.556
8638M	16	16	100	0.83	6.129
8638S	16	16	100	1.03	5.045

## 2.6 固氮酶和吸氢酶活性

三株菌落型分别接种于CS<sub>7</sub>培养基上(50 ml三角瓶盛10 ml固体培养基), 在28℃条件下培养5 d, 培养瓶塞换翻口橡皮塞, 抽气充氮3次, 注入3 ml C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, 继续诱导4 d后, 测定固氮酶活性, 结果表明三株菌落型均具有自生固氮能力。

豆科植物共生体系中氢酶遗传信息主要来自根瘤菌。将三株菌落型分别培养在马铃薯汁培养基<sup>[20]</sup>或吸氢培养基上, 进行自生条件下吸氢酶的诱导, 结果表明, 三株菌落型在固、液相条件下均可测出吸氢活性。

可见, 南洋楹根瘤菌的三株菌落型除了形态大小和增代时间有些差异, 以及8638L能耐碱、能利用葡萄糖、对硝酸盐反应呈阳性外, 其他生理生化特性(耐温性、耐盐性、耐酸性、对抗菌素反应、3-酮基乳糖反应、水解淀粉和明胶、柠檬酸盐利用、石蕊牛奶反应等)基本相似, 在共生条件下都有固氮能力, 在自生条件下均具有固氮酶和吸氢酶活性, 它们可能都是从同一株南洋楹根瘤菌自发衍生的。

## 参考文献

- 1 黄维南等. 南洋楹的结瘤固氮研究. 亚热带植物通讯, 1987, (2):5-10
- 2 J. M. 芬森特. 根瘤菌实用研究手册. 上海: 上海人民出版社, 1974, 1-18
- 3 黄维南, 董本仙, 刘承宪. 根瘤菌与植物离体细胞培养物结合时的固氮活性. 实验生物学报, 1980, 13(3):287-295

- 4 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978, 35-128
- 5 钱存柔等. 微生物学基础知识与实验指导. 北京: 科学出版社, 1979, 66-70
- 6 方中达. 植病研究法. 北京: 农业出版社, 1979, 177-199
- 7 蔡龙祥, 蓝谷, 黄维南. 银合欢和苏门答腊金合欢根瘤菌的分离和回接. 亚热带植物通讯, 1985, (2):4-10
- 8 黄维南. 根瘤菌的自生固氮作用. 尤崇杓等主编. 生物固氮. 北京: 科学出版社, 1987, 214-223
- 9 孙金华, 陈秉俭, 宋鸿遇. 紫云英根瘤菌 109 菌株氢酶诱导表达. 植物生理学报, 1986, 12:370-378
- 10 黄维南, 蔡克强, 邹小鲁. 大叶相思的结瘤固氮和吸氢酶活性. 亚热带植物通讯, 1990, (1):1-6
- 11 关桂兰等. 新疆干旱地区根瘤菌资源及生理生化特性. 中国科学院固氮学术会议交流资料, 1987, 1-25
- 12 Jordan D C, Allen O N. 根瘤菌科. 布坎南 R E, 吉木斯 N E 编著. 伯杰细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984, 340-341
- 13 林德球. 旋扭山绿豆快生型根瘤菌高度抗碱及共生固氮. 微生物学报, 1989, 29(5):354-359
- 14 蓝谷, 蔡龙祥, 黄维南. 四棱豆根瘤菌的分离及特性. 亚热带植物通讯, 1990, (2):17-21
- 15 Trinick M J. Relationship amongst the fast growing rhizobia of *Leucaena leucocephala* and *Mimosa* spp. J Appl Bacteriol, 1980, 49:39-53
- 16 Vincent J M. Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In: Quispel A ed. The Biology of Nitrogen Fixation. North Holland Publishing Co, Amsterdam, 1974, 266-341
- 17 Vincent J M. *Rhizobium* general microbiology. In: Hardy R W F, Silvec W S eds. A Treatise on Dinitrogen Fixation. Printed in USA, 1977, 277-366
- 18 曾定. 固氮生物学. 厦门: 厦门大学出版社, 1987, 130-134
- 19 吴定强, 黄维南. 豇豆根瘤菌 330 菌落型的固氮效力及其特性的研究. 植物生理学报, 1981, 7(2):143-150
- 20 黄维南, 童本仙, 刘承宪等. 马铃薯培养基中的根瘤菌自生固氮活性. 植物生理学报, 1981, 7(2):151-160