

罗汉松根瘤内生细菌的分离和特性*

黄宝灵 吕成群 唐东阶 柏学亮 熊 英 韦源莲

(广西大学 南宁 530004)

关键词:罗汉松,根瘤,细菌,分离特性,回接结瘤

中图分类号:Q939.11⁺4 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)05-0620-05

罗汉松 *Podocarpus macrophyllus*(Thunb.)D. Don 是裸子植物亚门罗汉松科一种,在我国主产长江以南各省,为用材及园林绿化的优良树种。种子和根可入药。关于罗汉松根际微生物的研究,梁秀棠^[1]、花晓梅^[2]曾报道其根与菌根真菌共生形成外生或内生菌根。国外有学者发现,几种其它的罗汉松科植物 *P. nubigenus* 等具有结瘤固氮现象^[3-6],但对其与细菌共生形成根瘤以及根瘤内生细菌的分离鉴定至今国内外尚未见报道。作者在广西的南宁、桂林、扶绥及广东的佛山等地进行野外调查,证明罗汉松在自然界中普遍具有结瘤现象。现将 1996 年 12 月在广西南宁市郊采集的罗汉松根瘤样品进行分离鉴定。

1 材料和方法

1.1 样品采集与菌种分离

从树龄约 13 年生的罗汉松连体侧根上采集结瘤量多的细根,自来水冲洗干净后,部分用于电子显微镜镜检,用 75%乙醇对其余根瘤进行表面消毒 1min,再用 0.1%的 HgCl 消毒 5min~6min。将根瘤连同细根置于灭过菌的研钵中研磨,加少量无菌水,研匀后加盖静置,澄清片刻。取上清液用划线法接种于 YMA 培养基上,在 28℃~30℃下培养 1 周^[7],获得细菌 LHS9601。

1.2 菌种的纯化与鉴定

将 LHS9601 菌菌落进行平板划线分离,再重复稀释分离 2 次,后用刚果红平板划线分离。接种斜面,进行革兰氏染色,光学显微镜及电子显微镜镜检。然后进行生理生化特性反应^[8],以区别土壤农杆菌^[7]。

1.2.1 细菌形态观察:用革兰氏染色和鞭毛银盐染色法。

1.2.2 刚果红吸色:28℃培养一周观察结果。

1.2.3 B.T.B 反应:在加入 0.5%溴麝香草酚蓝 YMA 培养基上接种一周后观察结果。

1.2.4 淀粉水解、明胶水解、石蕊-牛奶反应、碳源利用、氮源利用 均按常规方法,一周后测定结果。

1.2.5 温度实验:分别在 9℃、12℃、17℃、20℃、30℃、39℃和 41℃处理。

1.2.6 电子显微镜扫描:日本产 JEM-1200EX/S 透射电子显微镜扫描瘤体外观,检测细胞剖面及 24h 培养物。

以上实验均设 5 个以上重复和空白对照。

1.3 回接试验

采用试管封闭式水培法^[9]。选用 2.5cm×20cm 的试管,取 Jensen 培养液^[9]或土壤浸出液(新鲜黄心土:自来水 1:1 浸 2d,取上清液,10 层纱布过滤,适量装入试管中,98kPa 121℃高压灭菌 25min。

* 国家自然科学基金资助项目(30170033)

作者简介:黄宝灵(1957-),女,副研究员,主要从事森林生态学研究,联系电话 0771-3272191

收稿日期 2001-12-30,修回日期 2002-04-04

从树上采集新鲜罗汉松种子,自来水冲洗后阴干表面水珠,用 75% 乙醇消毒 2min ~ 3min,再用 0.1% 的 HgCl 消毒 8min ~ 10min;用灭菌的滤纸作桥,在超净工作台上,将种子接入盛有培养液的试管中,同时接入 LHS9601 菌液,置培养室中萌芽、生长,不定时观察结果。

Jensen 培养液用于从母树上分离所得菌种 LHS9601 的回接,土壤浸出液同时用于 LHS9601 菌和 LHS9701 菌(盆栽回接法回接结瘤幼苗分离所得菌株)的回接,约每 2 个月在超净工作台上加入灭菌的土壤浸出液。

回接与对照各 30 ~ 40 株。

1.4 互接种试验

1.4.1 与豆科植物互接:采用试管封闭式水培法将 LHS9601 菌接入大豆、花生、绿豆、豌豆、豆角、木豆、银合欢、台湾相思、大叶相思、黄槐和勒籽树等豆科植物幼苗根部。

1.4.2 与同科属植物互接:采用试管封闭式水培法,将 LHS9601 菌接种到与罗汉松同一科属的植物竹柏幼苗根部,另将竹柏根瘤内生细菌(关于该菌的分离鉴定另文报道)接种罗汉松幼苗。

1.4.3 与不同科属植物互接:采用泥土盆栽法接种马尾松播种苗,即将黄心土分装于小牛皮纸袋,98kPa 121℃ 灭菌 1h,放置 24h 后再重复灭菌 1 次,待冷却后,倾于经 0.1% 高锰酸钾表面消毒的小花盆中。每盆播经消毒的马尾松种子 100 粒,对照与接种处理各 2 个重复。

1.5 固氮酶活性测定

采用日本产 GC-9A 气相色谱仪,用乙炔还原法测定纯培养体及回接结瘤幼苗的固氮酶活性^[9]。

纯培养体固氮酶活性测定方法:参照湖北省微生物研究所生物固氮组方法^[11],用点接法将纯培养体接种于已灭菌的盛有 10mL 固体无氮培养基的 100mL 血清瓶内,塞胶塞,在 28℃ 下培养 48h 后,按常规方法测定由乙炔还原成乙烯的数量,设不接菌种为对照,三个重复。

回接结瘤幼苗的固氮酶活性测定方法:将用试管封闭式水培法回接结瘤的幼苗置于已灭菌的 100mL 血清瓶内,每瓶 5 株,塞上胶塞,注入 12% 乙炔 1mL,在 28℃ 下培养 4h 后,按常规方法测定由乙炔还原成乙烯的数量;用同法培养不接菌种无瘤的幼苗为对照,三个重复。

2 结果

2.1 培养性状和形态特征

从罗汉松根瘤上分离到的内生细菌经纯化后,在平板上生长 2 d,菌落圆形,边缘整齐,表面凸起,呈半透明且多粘质,有光泽,直径约 2mm ~ 4mm;在光学显微镜下观察,该菌为短杆状细菌,革兰氏染色阴性;电子显微镜检测可见,瘤体扫描表面有不规则凸起,瘤径约 1.0mm ~ 1.5mm (图 1),瘤体解剖有细菌溢出,侵染细胞中有类菌体(版图 I-1)。类菌体大多呈圆杆状,无分枝,类菌体外有明显类菌体膜包围(版图 I-2)。20 h 培养物镜检有鞭毛,无芽孢,并可见聚 β-羟基丁酸颗粒(版图 I-3)。

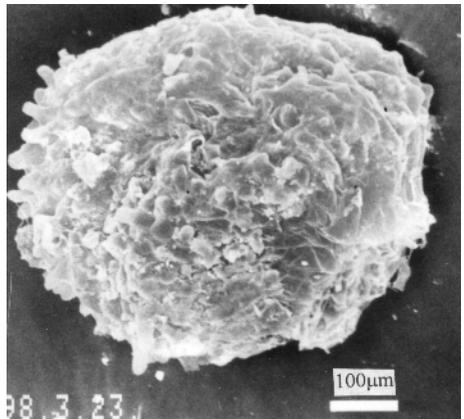


图 1 根瘤表面形态

2.2 部分生理生化特征

2.2.1 生理生化特性:该菌在 YMA 培养基上第一天内生长

少,第 2 天开始大量生长,继续培养时产生丰富的半透明胞外多糖。其部分生理生化特性见表 1。

2.2.2 温度试验:该菌在 9℃ 不生长,在 12℃ ~ 17℃ 生长较差,在 20℃ ~ 39℃ 生长良好,但在 41℃ 即死亡。

2.2.3 碳源和氮源试验:在供试的 9 种糖中,蔗糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、麦芽糖和果糖能被该菌利用,其中在甘露糖和麦芽糖中生长最好。不产气,在半乳糖、乳糖、木糖中生长差或不生长。能利用硝酸

钾、尿素、丝氨酸、精氨酸,而在甘氨酸、蛋白胨、色氨酸、硫酸铵、酪氨酸中生长不良或不生长。

2.2.4 乙炔还原反应 测出纯培养体及回接结瘤幼苗具固氮酶活性,详见表 2。

表 1 罗汉松根瘤内生细菌 LHS9601 部分生理生化特性

项 目	特 征
刚果红试验	不吸色
B.T.B 反应	微变黄,产酸
石蕊-牛乳反应	还原、微产酸、有血清环
淀粉水解反应	不水解
明胶水解反应	不水解

表 2 纯培养体及回接结瘤幼苗的固氮酶活性

样品	乙炔还原活性($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{瓶}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)			
	重复 1	重复 2	重复 3	空白
纯培养体	167.8	80.5	87.6	0
结瘤幼苗	28.6	19.6	16.6	15.1

2.3 回接试验

LHS9601 回接可使罗汉松幼苗结瘤(图 2)。在试管封闭式水培法中,从种子萌芽到出现第一个瘤约需 6 个月时间,回接 1 年检查结瘤率为 28.6%。

回接幼苗所结瘤的形态与自然结瘤植株一致。经对盆栽法回接结瘤幼苗根瘤内生细菌进行分离鉴定得 LHS9701 菌,其生理生化特性与 LHS9601 菌一致;再经试管封闭式水培法回接罗汉松幼苗,也获得了形态一致的结瘤植株。

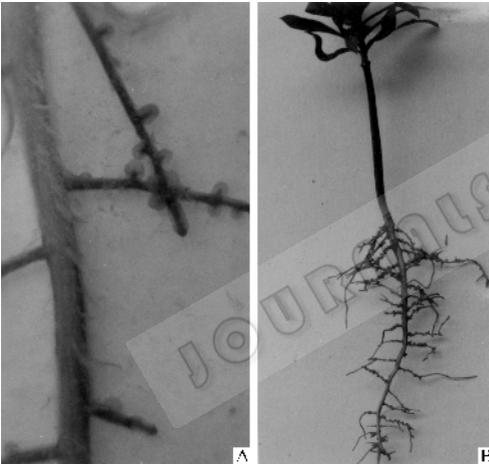


图 2 在封闭试管中回接结瘤(A)和在花盆中的回接结瘤(B)

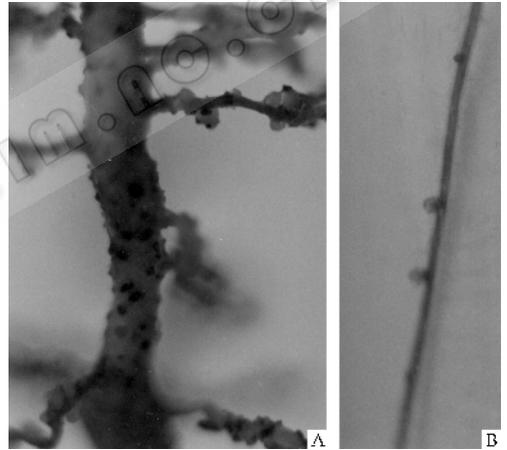


图 3 LHS9601 菌接种竹柏幼苗结瘤(A)以及竹柏内生菌接种罗汉松幼苗结瘤(B)

2.4 互接种试验

在与豆科植物互接种试验中,培养 2~6 个月,所接豆科植物均不能有效结瘤。

用 LHS9601 菌接种于竹柏幼苗,约 8 个月时开始结瘤(图 3-A);用竹柏根瘤内生细菌 LHS9801 接种于在试管中培养半年的罗汉松幼苗,约 4 个月时开始出现瘤结构,其表现形态与自然结瘤的罗汉松植株及竹柏植株的一致(图 3-B),结瘤率达 40%。

与亲缘关系较远的马尾松幼苗接种,试验结果见表 3。该试验结果表明,马尾松人工接种罗汉松根瘤内生细菌,可促使少量结瘤(图 4)并对苗木生长具一定的促进作用。

表 3 马尾松人工接种罗汉松根瘤内生细菌的侵染结瘤及苗木生长情况

处理	结瘤率(个/株)	结瘤量	苗木平均高/cm	干重(g/株)
接种	6.8	9.3	7.8	0.60
对照	0.0	0.0	6.2	0.44

3 讨论

根据前述试验结果,罗汉松根瘤内生细菌 LHS9601 具有豆科植物根瘤菌的一般特征并具固氮酶活性^[10],可与土壤农杆菌区分,但是它又不能与供试的 11 种豆科植物结瘤,表现出与豆科植物根瘤菌的远缘关系。因此,该菌是否是一个新的结瘤细菌分类单元,其分类地位有待深入研究。

罗汉松幼苗与竹柏根瘤内生细菌互接种能结瘤,为进一步确认某些裸子植物与细菌共生结瘤是一种自然的正常的共生现象提供科学依据。由于裸子植物是全球性的主要用材树种,此共生现象值得进一步的发掘和探讨。

马尾松是我国南方的主要用材树种,又由于其耐贫瘠和干旱,生命力强而被誉为造林先锋树种,但幼年生长缓慢。本次互接种试验结果表明,人工接种罗汉松根瘤内生细菌能对马尾松幼苗根系产生某种刺激而形成瘤状结构,促进马尾松幼苗的生长,从而预示罗汉松根瘤内生细菌在林业生产中具有良好的应用前景。



图 4 马尾松幼苗接种 LHS9601 结瘤

致谢 本文承蒙中国农业大学生物学院陈文新教授审阅并提出宝贵意见,特致谢忱。

参 考 文 献

- [1] 梁秀棠.土壤学报,1994,31(增刊):134~140.
- [2] 花晓梅.土壤学报,1994,31(增刊):141~155.
- [3] Grez Z R, Bosque, 1988, 9, 2, 93~96.
- [4] Bevege D I. Division of Soils Divisional Report, CSIRO, 1978, No.26, 19.
- [5] Khan A G, Valder P G. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, 1972, 97(1):35~41.
- [6] Silvester W B, Bennett K J. Soil Biology and Biochemistry, 1972, 5(1):171~179.
- [7] Vincent J H. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Oxford of Edinburgh: Blackwell Scientific Publication, 1970.
- [8] 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,1978.35~182.
- [9] 上海植物生理学会.植物生理学实验手册.上海:上海科学技术出版社,1985.239~250.
- [10] 陈文新.微生物学通报,1985,12(1):28~32.
- [11] 湖北省微生物研究所生物固氮组.微生物学报,1979,19(2):160~165.

Isolation and Characteristics of Bacteria in the Nodule Structure from *Podocarpus macrophyllus*

Huang Baoling Lu Chengqun Tang Dongjie Bai Xueliang Xiong Ying Wei Yuanlian
(Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: One bacteria endophyte were isolated from the root nodules of *Podocarpus macrophyllus* (Thunb.) D. Don. The bacteria has the ordinary characteristics of *Rhizobium* of leguminous plants.

after identification. It made nodulation on its host after inoculation strains. So did on *Podocarpus nagi* (Thunb.) Zoll. et Mor. ex Zoll. seedling which is of the same family and genus with *Podocarpus macrophyllus* (Thunb.) D. Don. Both strain and host seedling have C_2H_4 reduction activity. But it can not made nodulation on 11 kind of offering tests of leguminous plants after inoculation strains. According to its characteristics the bacteria thus appears to be a member of a distinct *Rhizobium* lineage. Its phylogenetic relationship position remain to be research.

Key words : *Podocarpus macrophyllus* (Thunb.) D. Don. , Root nodules , Bacteria , Isolation and characteristics , Nodulation after inoculation strains

图 版 说 明

Explanation of Plate

1. 侵染细胞中的类菌体 2. 类菌体膜 3. 培养菌体电镜观察。

1. Rod-shaped bacteroids in infected cells. 2. The rod-shaped bacteroids membrane. 3. Electron microscopic observations of the bacterial bodies.

《微生物学报》2003 年征订启事

《微生物学报》创刊于 1953 年,双月刊,每册 144 页,双月 4 日出版,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所共同主办,中国科学院微生物研究所承办。

《微生物学报》是以微生物学基础研究和应用基础研究及高技术创新为主的综合性学术刊物,为促进学术交流、为我国的经济建设服务。

报道内容:我国普通微生物学,工业、农业、医学、兽医微生物学,病毒学,免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的高水平的研究成果。设有研究论文、研究简报和小型综述等栏目。

读者对象:国内外从事微生物学研究的科研人员、高级管理人员和大专院校师生。

《微生物学报》是中国自然科学核心期刊,被国内外著名的文摘刊物和数据库收录。多次被评为优秀科技期刊,深受国内外广大读者的好评。2001 年入选“国家期刊方阵”。

编辑部地址:100080 北京中关村北一条 13 号 电话(010)62630422

E-mail:gesg@sun.in.ac.cn; actamicro@sun.im.ac.cn

总发行处:北京报刊发行局

订购处:全国各邮电局

国外总发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱 邮政编码:100044)

中国标准刊号:ISSN 0001-6209 邮发代号 2-504 国外发行代号:BM67
CN11-1995/Q

定价 28 元/册

本刊承接广告业务,欢迎相关企业发布广告,辟有彩页、黑白版及插页,图文并茂,价格合理。广告经营许可证:京东工商广字 0034 号