

几种豆科作物根瘤菌放氢现象的调查研究*

黎耀辉 岑英华 赵怀宇

(中国科学院武汉病毒研究所, 武昌)

张学江 周平贞

(中国农业科学院油料作物研究所, 武昌)

本文对蚕豆、豌豆、箭筈豌豆、紫云英、毛茛子、大豆、花生等七种豆科作物根瘤菌在自然条件下放氢的情况, 进行了调查。结果表明所采集的样品, 全部都能测出氢的释放; 其平均固氮相对效率为 0.754。这说明用于放氢大约需消耗 25% 的能量。

在培养条件下, 对二百多株根瘤菌菌种在结瘤情况下的放氢现象进行了测定, 找出了几株基本不放氢的菌种, 其中大豆根瘤菌有 182-2 和 113-2, 花生根瘤菌有 97-1 等, 对紫云英还没有找到不放氢的根瘤菌菌种。

用典型菌种对比试验和相关分析两种方法研究了干物质积累与固氮酶活力及放氢的关系。结果表明不论是用我们自己的试验数据还是用 Carter 和 Evans^[10] 的数据进行相关分析, 都一致证明干物质积累与固氮酶活力关系最为密切, 而放氢的影响是次要的。

依赖于 ATP 提供能量的固氮酶的放氢现象已有多年的研究^[1]。大豆根瘤菌的放氢现象, 早在 1957 年已被 Hoch 用质谱法证实^[2]。但是, 不离体根瘤菌放氢的普遍性及其对固氮过程相对效率的影响, 主要是 1976 年由 Schubert 和 Evans 提出探讨的^[3]。他们认为流向固氮酶的电子, 一般仅 40—60% 用于氮的固定, 而其余都用在放氢上; 只有少数含有氢酶的根瘤菌菌种, 可将固氮酶释放的氢进行再利用, 这样就表现不出放氢现象或放氢极少, 从而减少了能量的消耗^[4]。Schubert 和 Evans 据此推断, 应选育不放氢或少放氢的根瘤菌菌种, 以减少固氮过程中的能量浪费, 提高干物质积累。

本文针对上述问题, 进行了一些研究。

材料与方法

(一) 根瘤菌菌种

供试的大豆、花生根瘤菌来自中国农业科学

院油料作物研究所; 紫云英和桉麻根瘤菌菌种来自中国科学院武汉病毒研究所生物固氮组。培养基均用酵母粉甘露醇培养基^[5]。

(二) 植物材料和培养方法

在自然条件下调查豆科作物根瘤菌的放氢现象, 其植物样品采自武汉市郊区洪山公社、东西湖农场、华中农学院和湖北省农业科学院等地。接种根瘤菌的植株均在温室条件下用无菌培养法获得。接种大豆、花生采用水培法^[1], 紫云英、桉麻采用砂培法, 用 Rothamsted 无氮培养液^[6]。生长期间浇灌无氨水。

(三) 测定方法

采样前使植株至少接受自然光照四小时。采样取整株, 洗净后剪下带瘤根系, 立即放于 12 毫升血清瓶或 60 毫升三角瓶中, 用橡皮塞密封, 一小时后定时抽取瓶中气样测氢。测氢后随即注入 10% 乙炔, 转化一小时后测固氮酶活力。两项测

本文于 1979 年 4 月 21 日收到。

注: 本文在陈华癸教授的指导下写成。参加部分工作的还有林木兰、林济民、蔡金枝、蔡昌建、吴生堂、荣荣文等同志。

定均用国产 102G 型气相色谱仪进行。测氢用热导池检测器, TDX-01 作固定相, 柱长 0.5 米, 柱温 150℃, 氮作载气, 流量为 25 毫升/分。测定固氮酶活力用氢焰检测器, GDX-502 作固定相, 柱长 1 米, 柱温 50℃, 氮作载气。流量为 30 毫升/分。测定后按 Schubert 和 Evans 提出的公式[3] 计算固氮相对效率。即

$$\text{相对效率} = 1 - \frac{\text{空气中放 } H_2 \text{ (毫微克分子/小时/株)}}{C_2H_4 \text{ (固氮酶活力, 毫微克分子/小时/株)}}$$

结果和讨论

一、在自然条件下几种豆科作物根瘤菌放氢现象的调查

我们于 1977—1978 年在武汉市郊区采集了蚕豆、豌豆、箭筈豌豆、紫云英、毛苕子、大豆、花生等七种豆科作物根瘤菌共 224 株样品, 用气相色谱仪进行放氢和固氮酶活力的测定, 结果列于表 1。

表 1 几种豆科作物根瘤菌在自然条件下的放氢情况

作物	采样数	相对效率	标准差
蚕豆	32	0.594	±0.203
豌豆	14	0.591	±0.244
箭筈豌豆	38	0.847	±0.063
紫云英	49	0.780	±0.119
毛苕子	49	0.709	±0.168
大豆	28	0.869	±0.117
花生	14	0.890	±0.072
平均		0.754	

在所测 224 个样品中, 基本上都能测出氢的释放, 所测七种豆科作物根瘤菌平均固氮相对效率是 0.754 (即平均有 25% 的能量用于放氢)。这个结果较 Evans 等总结的数据稍高^[8], 他们认为许多豆科作物根瘤菌在自然情况下固氮相对效率是 0.52—0.70。

二、几种豆科作物根瘤菌菌种的放氢情况

我们收集了大豆、花生、紫云英、桤麻

等四种豆科作物根瘤菌进行了 365 菌次测定, 结果列于表 2。

表 2 四种豆科作物根瘤菌的放氢情况

作物	菌株来源	测定菌次	放氢的菌数	基本不放氢的菌 (相对效率 > 0.95)
大豆	自然分离	88	58	30
	人工诱变	90	57	33
	合计	178	115	63
花生	自然分离	19	16	3
	人工诱变	69	61	8
	合计	88	77	11
桤麻		47	31	11
紫云英		52	52	0

结果表明: 放氢菌种远比不放氢或基本不放氢的菌种为多。根据我们多次测定结果查明: 固氮相对效率高的大豆根瘤菌菌种有 182-2 (相对效率 0.95—1) 和 113-2 (相对效率 0.92—1); 花生根瘤菌有 97-1, 这些都属当前国内推广的优良菌种。在桤麻根瘤菌中, 有 C_{133} 和 B_2 , 而紫云英却未找到一株不放氢的菌种。

三、大豆干物质积累与固氮酶活力及放氢的相关分析

Schubert 和 Evans^[3,4] 等从根瘤菌放氢耗能的理论出发, 论述了筛选不放氢菌种的重要性, 随后, 他们以放氢的大豆根瘤菌菌种 USDA 31 和不放氢的菌种 USDA 110 作对比试验, 结果后者比前者干物质积累提高 24%^[9]; 他们又以放氢的豇豆根瘤菌菌种 176 A27 和不放氢的菌种 176 A28 作对比试验, 后者比前者干物质积累提高了 11%^[9]。我们用基本不放氢的大豆根瘤菌菌种与放氢的菌种作类似的对比试验, 结果列于表 3。

从表 3 看来, 基本不放氢的菌种比放氢的菌种干物质积累似有增加倾向, 这与 Schubert 和 Evans 的结果大体上一致, 但我

们认为这种典型对比试验的说服力是不强的。在另一次试验中(表 5)就看不出基本不放氢菌种(如 113-2 和 182-2)确比放氢菌种(如 71-1 和 305)优越。此外,即或这些菌种表现出确有差异,那也只能说明它们的综合生产能力存在着差异,而不能确认放氢就是引起干物质积累差异的主要原因,因为这些菌种,除在放氢这一点外,还有许多其他性能也存在着差别,究竟其中哪一个性能与干物质积累关系最为密切,还必须收集大量有关数据,用统计学的方法进行相关分析,才能得出比较客观的结论。

表 3 放氢根瘤菌与基本不放氢根瘤菌对大豆干物质积累的影响*

干物质 大豆品种	菌种	基本不放氢菌种		放氢菌种		不接种
		113-2	182-2	305	71-1	
泰兴黑 矮脚早		2.33	2.25	2.37	1.99	1.11
		1.90	1.84	0.68	1.67	0.76
平 均		2.15	2.05	1.53	1.86	0.94

* 水培: 每盆三株, 重复三次, 表中数字为每株干物质重(克)。

为此,我们于 1977 和 1978 两年,用大豆根瘤菌作了两批水培试验(结果见表 4 和表 5),并将 1978 年 Carter 和 Evans^[10] 等用 Portage 大豆所作的 24 个根瘤菌菌种接种试验数据,加以改算整理(表 6),然后对这三批试验结果分别作相关分析(表 7),从表 6 和表 7 结果可以看出,不仅我们自己所作的两个试验相关分析结果相互一致,而且用 Carter 和 Evans 的数据进行统计分析,也与我们的结果一致。这些分析充分说明,固氮酶活力与干物质积累关系最为密切,而扣除了放氢的净酶活力,并没有进一步提高相关系数;放氢与干物质积累,照推理应为负相关,但三批试验结果却有显正值的倾向,这是因为在缺乏氢酶或

氢酶活力不强的固氮系统中,放氢与固氮酶活力之间存在着显著正相关,固氮酶活力对干物质积累的影响掩盖了放氢的影响所致。

表 4 1977 年大豆水培试验结果(大豆品种猴子毛)

菌 号	放 H ₂ 毫微克分 子/时·株	固氮酶活力 毫微克分 子/时·株	净酶活力 (酶活力-放 氢)	干重 克/株
71-1101	359	895	536	1.12
71-1102	278	676	398	1.49
71-1103	311	1904	1593	1.73
71-1104	371	1931	1560	1.58
71-1105	306	2238	1932	1.61
71-1106	323	1901	1578	1.44
71-1108	342	1943	1701	1.37
71-1109	288	2291	2003	1.70
71-11010	252	2575	2322	1.67
71-11012	308	2389	2081	1.58
71-181	237	2189	1952	1.66
71-182	386	2821	2435	1.60
71-183	23	444	421	0.90
71-188	225	2016	1791	1.42
71-187	137	1252	1115	1.31
71-186	186	1830	1644	1.66
71-185	224	2015	1791	1.63
71-184	220	1917	1697	1.29
71-183 A	207	1791	1584	1.60
71-182 A	223	1663	1440	1.51
111-384	155	616	461	0.85
71-1102A	213	1925	1712	1.71
71-1101A	196	1957	1761	1.42
71-184 A	138	1519	1380	1.48
B ₁ ,84	300	600	300	1.10
B ₁ ,85	383	1378	995	1.33

通过以上相关分析,并参考典型菌种对比试验结果,可以看出在干物质积累方

表 5 1978 年大豆水培试验结果 (大豆品种矮脚早)

菌号	放 H ₂ 毫微克分子/时·株	固氮酶活力 毫微克分子/时·株	净酶活力 (酶活力-放氢)	干重 克/株	菌号	放 H ₂ 毫微克分子/时·株	固氮酶活力 毫微克分子/时·株	净酶活力 (酶活力-放氢)	干重 克/株
71-1	1473	3372	1899	0.90	343	18	3129	3110	0.74
B ₁₅	424	3441	3017	0.54	344	65	5500	5435	0.75
113-2	21	5913	5892	0.77	345	20	4986	4966	0.55
182-2	25	6693	6668	0.72	346	1400	4083	2683	0.54
305	25	397	372	0.55	347	24	6231	6207	0.62
132-2	249	1664	1415	0.53	348	23	6469	6446	0.68
136-6	317	4569	4252	0.70	349	24	6734	6710	0.66
188-1	21	357	336	0.47	350	25	55.4	30	0.45
191-3	43	5053	5010	0.72	351	24	72.5	49	0.40
192-1	26	193	167	0.39	354	1457	9908	8451	0.67
197	19	1737	1718	0.62	355	1230	8809	7579	0.55
200-2	47	398	351	0.42	356	2520	16467	13947	0.90
323	16	4661	4645	0.81	357	2045	9092	7047	0.89
331	47	4269	4222	0.50	358	269	8070	7801	0.77
340	18	5714	5696	0.67	359	1085	8473	7388	0.83
341	19	2421	2402	0.57	360	1654	13536	11882	0.76
342	110	5220	5110	0.77	361	1758	5741	3982	0.76

表 6 Portage 大豆试验的改算结果^[10]

菌种	放 H ₂ ^[1] (微克分子/时·盆)	固氮酶活力 ^[2] (微克分子/时·盆)	净酶活力 (酶活力-放氢)	干重 克/盆	菌种	放 H ₂ (微克分子/时·盆)	固氮酶活力 (微克分子/时·盆)	净酶活力 (酶活力-放氢)	干重 克/盆
USDA ₁₂₂	0.00	53.58	53.58	12.2	USDA ₁₂₀	22.03	65.18	43.15	10.3
USDA ₁₃₄	0.00	60.24	60.24	14.2	USDA ₁₂₄	12.85	37.38	24.53	11.4
311b110	0.55	54.87	54.32	11.1	Lamb ₁₋₂	11.83	37.37	25.54	11.1
WA ₅₀₅₉₋₁₋₁	3.77	47.85	44.08	10.8	USDA ₁₆	20.49	61.48	44.99	11.9
USDA ₁₃₅	15.84	67.23	51.39	12.4	Hill ₁	10.91	27.29	16.68	9.6
USDA ₃₁	10.80	43.40	32.60	6.9	USDA _{71A}	22.32	54.00	31.68	11.3
USDA ₃	14.22	56.56	42.34	11.7	USDA ₄	24.73	61.09	36.36	14.0
USDA _{66A}	15.34	57.53	42.19	11.1	USDA ₁₂₃	13.70	29.02	15.32	10.3
USDA ₁₁₇	23.45	79.06	55.61	9.7	USDA ₃₈	25.07	52.55	27.48	10.7
G ₁	0.34	1.27	0.93	4.4	WA ₅₀₈₄	14.72	33.35	18.63	11.1
USDA ₆₂	21.98	45.42	23.44	11.2	WA ₅₀₃₆₋₁₋₂	13.86	31.68	17.82	11.7
USDA ₁₂₆	6.29	20.91	14.62	6.2	USDA ₇₄	0.00	0.00	0.00	5.3

由 Carter 和 Evans^[10]表 1 中数据改算而得：

- 1) 由 Carter 和 Evans 表 1 中在空气中放 H₂ 微克分子/时·鲜瘤克乘以鲜瘤克/盆而得。
- 2) 由 Carter 和 Evans 表 1 中 C₂H₄ 微克分子/时·鲜瘤克乘以鲜瘤克/盆而得。

面，固氮酶活力与放氢这两个因素比较起来，酶活力的影响是主要的，将它作为筛选

根瘤菌的主要依据是比较恰当的，而放氢只作为一个参考指标。

表 7 三批试验材料的相关分析

相关系数 r 试验	干物质与放氢	干物质与酶活力	干物质与净酶活力	酶活力与放氢
1977 年试验 $n = 26$	0.23*	0.57**	0.53**	0.34†
1978 年试验 $n = 34$	0.50**	0.67***	0.55**	0.67***
Carter 和 Evans 的试验 $n = 24$	0.35†	0.71***	0.65***	0.51**

† 机率小于 10%, * 机率小于 5%, ** 机率小于 1%, *** 机率小于 0.1%。

参 考 文 献

- [1] Bulen, W. A. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 53: 532—539, 1965.
- [2] Hoeh, G. E. et al.: *Nature*, 179: 430—431, 1957.
- [3] Schubert, K. R. and H. J. Evans: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 73: 1207—1211, 1976.
- [4] Evans, H. J. and L. E. Barber: *Science*, 197(4301): 332—339, 1977.
- [5] 周平贞等: 中国油料, 第二期, 1979.
- [6] 陈华癸主编: 微生物学实验, 农业出版社, 1962.
- [7] Bethlenfalvay, G. J. and D. A. Phillips: *Plant Physiol.*, 60(3): 419—421, 1977.
- [8] Evans, H. J. et al.: *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation*, ed. Hollaender A., New York, USA, 1977, pp. 333—352.
- [9] Schubert, K. R. et al.: *Plant Physiol.*, 61(3): 398—401, 1978.
- [10] Carter, K. R. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 24: 307—311, 1978.

A SURVEY OF HYDROGEN EVOLUTION FROM
LEGUMINOUS ROOT NODULES

Li Yao-hui Chin Ying-hua Zhao Huai-yu

(Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Zhang Xue-jiang Zhou Ping-zhen

(Institute of Oil Crops Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan)

A survey of H_2 -evolution of nodule root system of broad bean, pea, vetch, astragalus, hairy vetch, soybean and peanut grown in field condition were carried out. It showed that all samples analysed released H_2 in different extent. Mean relative efficiency of energy utilization for nitrogen fixation was 0.754, or approximately 25% energy wasted in H_2 -evolution.

Among nearly two hundred strains of rhizobia tested, several non- H_2 -releasing strains (i.e. the relative efficiency > 0.95) were found, among them were soy-

bean rhizobial strains 182-2 and 113-2 and peanut strain 97-1. None of the astragalus rhizobial strain tested is non- H_2 -releasing strains.

Comparison between non- H_2 -releasing strains, and H_2 -releasing strains, and statistical analysis of 3 sets of experimental data (including a set of Schubert and Evans data) has shown that dry matter accumulation of soybean-rhizobia symbiotic system is highly correlated with nitrogenase activity, while the effect of H_2 -evolution on dry matter accumulation is of minor importance.