

稻黄杆菌 M-Sm-1612 在水稻根内的电镜观察 及联合共生固氮的特性

黄世贞 唐龙飞 张伟光 刘中柱

(福建省农业科学院土壤肥料研究所,福州)

从水稻稻根分离到稻黄杆菌 (*Flavobacterium oryzae* sp. nov.) 菌株 M-Sm-1612, 此菌株带有抗链霉素标记。将 M-Sm-1612 回接稻苗, 用电子显微镜观察发现菌体进入水稻根组织内, 在皮层细胞里生长繁殖。证实这是一株水稻根内固氮菌。用乙炔还原法测定, 表明 M-Sm-1612 菌株具有与水稻的联合共生固氮作用。

七十年代以来, 作为生物固氮的一个分支——联合共生固氮的研究有较大进展, 目前已有许多关于水稻、小麦、玉米、甘蔗等作物联合固氮作用的报道^[1-4]。据报道这类固氮菌大多数在作物的近根区, 也有认为它们可以进入植物根内。对于水稻联合固氮作用的研究, 用最大有效数法测定水稻根表、根内异养固氮菌的数量, 国内外已有报道^[6], 但尚缺乏从稻根组织内直接找到固氮菌的依据。近几年来, 我们在进行水稻联合共生固氮研究工作中, 在不同的水稻品种根系筛选分离大量异养固氮菌的基础上^[3], 用乙炔还原法和 ¹⁵N₂ 示踪技术测定了 M-Sm-1612 菌株的固氮酶活性及其与培养时间、温度、氧分压的关系和它们对水稻植株的供氮作用^[7], 以 M-Sm-1612 回接水稻植株并从稻根中重新分离到, 这些研究表明它们与水稻有密切的关系。为了探索该菌是在水稻根表或是进入根组织内部这一问题, 而这个问题又与该菌的利用价值及如何应用于水稻生产有直接关系, 因此, 1980年我们进一步用 M-Sm-1612 菌株进行了接种水稻的电子显微镜观察研究, 并以 M-Sm-1612 培养物接

种盆栽水稻, 用乙炔还原法原位测定技术进行水稻-细菌系统的联合固氮特性的研究。本文报道这些研究的结果。

材料和方法

(一) 电镜观察

本研究采用水稻农业一号品种(来源于福建省农业科学院水稻研究所)和从农业一号稻根分离的稻黄杆菌 (*Flavobacterium oryzae* sp. nov.) M-Sm-1612 菌株(福建省农业科学院土壤肥料研究所 1976 年分离)。

将水稻农业一号种子用 75% 酒精表面消毒 20 分钟, 无菌水洗二遍, 用 35℃ 无菌水浸种催芽, 发芽后用 20% 双氧水消毒 15 分钟, 移入蘑菇瓶 Starkey 无氮琼脂培养基上^[8], 并同时在培养基上接种经活化的 M-Sm-1612 菌液。以同样经消毒处理, 但不接菌的稻苗为对照。在适宜的湿度和光照条件下培养。当苗长至三片叶时, 在无菌操作下取健康稻苗, 用无菌水洗涤 3—4 次后将稻根剪成 0.5—1cm 长的根段, 按常规方法在

本文于 1981 年 2 月 20 日收到。

承中国科学院微生物研究所周慧玲等同志进行菌种分类鉴定; 福州市工业科学技术研究所章连钧同志协助电镜观察; 本院李开本、王红梅和邱婉同志参加切片工作; 关文芬同志进行植株固氮酶活性的原位测定, 在此一并致谢。

5%戊二醛及2%锇酸(0—4℃)中固定。固定后的材料分别用不同浓度的酒精进行系列脱水,在Epon 812中包埋,在LKB-V型超薄切片机上以玻璃刀切片,切片经醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色^[7]。M-Sm-1612在Starkey无氮培养基上,在28℃培养72小时,菌体用磷钨酸负染^[8],然后在JEM-7型电子显微镜下观察。

(二) 与水稻联合固氮作用的测定

1. 以水稻农业一号品种进行盆栽试验,分别在水稻孕穗期和开花期接种M-Sm-1612培养物,用乙炔还原法原位测定技术测定水稻-细菌系统的联合固氮作用。

2. M-Sm-1612培养物的制备: 将M-Sm-1612活化后接种于Starkey无氮培养液,在28℃振荡培养48小时,然后吸附于园土、沸石培养基(园土、沸石和糖的比例为8:2:0.05, pH7.0, 15磅高压灭菌60分钟)。吸附后在无氧条件下培养5天,以新鲜培养物分别在水稻孕穗期和开花期接种。

3. 水稻-细菌系统的乙炔还原活性的原位测定: 用塑料袋将系统密闭,注入10%体积的乙炔气体,反应5、16、22、26和30小时分别抽取气样,用102G型气相色谱仪(上海分析仪器厂制造)测定乙烯的形成。

实验结果

(一) 电镜观察

纯培养的稻黄杆菌M-Sm-1612菌株是革兰氏阴性菌,在Starkey无氮培养基上28℃培养72小时在电镜下观察,细胞呈杆状,0.55×1.7—3.3μm,单个排列。从图1,2中可以看出菌体细胞质染色不均匀,菌体内可见数个色淡的颗粒状物质(图版I-1)。

在接种稻黄杆菌M-Sm-1612的水稻根横切片上观察,发现大量的菌体细胞位于根组织的皮层细胞里(图版I-2),由于菌体所处的空间位置不同,细胞呈杆状或圆形,0.6×0.92—1.49μm,菌体内同样可见颗粒状物质。其形态大小和特征(根据完整的杆状菌体)都与纯培养的M-Sm-1612相似。同时观察到在根皮层细胞内的菌体是数十个地群集在一起,甚至可以看到有的菌体细胞似乎即将分裂或正处于分裂状态,由此可以判断M-Sm-1612可以在稻根皮层细胞里生长、繁殖。而在根的表皮细胞里未发现菌体细胞。

在不接菌的稻根横切片上,根的表皮细胞和皮层细胞里均未观察到菌体细胞(图版I-3)。

(二) 与水稻联合固氮的特性

乙炔还原法原位测定水稻-细菌系统

表1 稻黄杆菌 M-Sm-1612 菌株与水稻联合固氮的特性

Table 1 The Characteristics of Nitrogen Fixation by Association of Strain M-Sm-1612 (*Flavobacterium oryzae* sp. nov.) with Rice

接种细菌培养物的时期 Time of inoculation of cultured bact.	乙炔反应时间(小时) Time of reaction with C ₂ H ₂ (h)	固氮酶活性 (n mol C ₂ H ₄ /g 植株鲜重) Nitrogenase activity (n mol C ₂ H ₄ /g Plant fresh weight)	
		接 种 Inoculation	对 照 Control
孕穗期 Booting stage of rice	24	230	124
	31	324	179
开花期 Flowering stage of rice	5	18	—
	16	49	—
	22	124	49
	26	186	93
	30	217	112

的固氮酶活性表明,不论在水稻孕穗期或开花期接种稻黄杆菌 M-Sm-1612,都与水稻植株形成联合固氮体系。接种 M-Sm-1612 培养物后植株的固氮活性是对照株的 1.8—2 倍,而且活性在 30 小时内,随着乙炔反应时间的增加而提高(表 1)。

讨 论

从水稻根部分离到稻黄杆菌 (*Flavobacterium oryzae* sp. nov.), 目前国内外尚未见报道,这是一种新的值得重视的水稻联合共生固氮菌。

以上电镜观察结果,从接种稻黄杆菌 M-Sm-1612 的稻根切片上,在其皮层细胞里发现大量菌体细胞并根据所观察到的菌体细胞的形态、大小和特征,对照纯培养的 M-Sm-1612,可以证实在稻根组织里的菌就是 M-Sm-1612。

对经过同样消毒处理但不接菌的稻根的切片观察,没有发现菌体细胞,因此可以排除水稻种子本身带菌的可能性,也就是说 M-Sm-1612 是在水稻生长过程中从外部侵入根组织内部。

乙炔还原法原位测定水稻-细菌系统的固氮酶活性表明 M-Sm-1612 与水稻的联合固氮作用,并且在孕穗期表现较高的活性,这与国内外关于有些水稻品种在孕穗期乙炔还原活性高于开花期的报道是相

符合的。1980 年我们报道了用乙炔还原法和 $^{15}\text{N}_2$ 技术测定稻黄杆菌 M-Sm-1612 和 St-Sm-9021 两个菌株与水稻结合后,它们的固氮活性大大提高的特性^[5]。在纯培养情况下,这两个菌株的固氮活性都低于贝氏自生固氮菌 N-9 (*Beijerinckia* sp., 我所 1973 年分离),可是与水稻结合后,它们的固氮活性却大大超过 N-9,约为 N-9 的 2—9 倍,而且它们所固定的氮可迅速地被水稻植株所利用。

M-Sm-1612 与水稻紧密结合进行联合固氮,电镜观察表明它可以进入水稻根内,这为它直接利用水稻的光合产物作为碳源将提供有利的条件。对于今后该菌的利用及其固氮性能的进一步改良提高,电镜观察的结果为之提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Dobeneiner, J. et al.: *Plant and Soil*, **37**: 181—196, 1972.
- [2] Dommergues, Y. et al.: *Soil Biol. Biochem.*, **5**: 83—90, 1973.
- [3] 刘中柱等: 福建农业科技, **4**: 21, 1979.
- [4] Watanabe, I. and L. W. Barraquio: *Nature*, **277**: 565, 1979.
- [5] 刘中柱等: 福建农业科技, **6**: 1, 1980.
- [6] Watanabe, I.: *Proceedings of Symposium on Paddy Soil*, Science Press, Beijing, 1980, 348—355.
- [7] 柯冲等: 科学通报, **10**: 463, 1979.
- [8] 王业勤等: 微生物学报, **3**: 331, 1980.

OBSERVATION OF *FLAVOBACTERIUM ORYZAE* SP. NOV. M-Sm-1612 IN RICE ROOTS UNDER ELECTRON MICROSCOPE AND THE CHARACTERISTICS OF NITROGEN FIXATION ASSOCIATED WITH RICE

Huang Shizhen Tang Longfei Zhang Weiguang Liu Chungzhu
(Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou)

A strain of *Flavobacterium oryzae* sp. nov. M-Sm-1612 with Streptomycin-resistance label (40 units/ml) were isolated from the rice roots of Agriculture Number One.

Strain M-Sm-1612 was reinoculated to the rice seedlings which had been sterilized and germinated under sterilized conditions. It was found under electron microscope that the bacteria entered the tissue of rice roots, then grew and reproduced in cortical cells of rice roots. This observation demonstrated that this

strain is a nitrogen-fixing bacterium in rice roots.

The rice plant was inoculated with M-Sm-1612 and the nitrogenase activity of the rice-bacteria system was measured by acetylene reduction method *in situ*. The result showed nitrogen fixation by association of bacteria with rice. It confirmed the result got with $^{15}\text{N}_2$. This is a new species of nitrogen-fixing bacteria which has the potency of associated symbiosis in nitrogen fixation with rice.