

禾谷类作物根表固氮螺菌的分类鉴定和分布

罗孝扬 曾宽容 蒋亚平 蔡昌建 周亿闰 杨宝玉 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

从小麦、玉米、谷子和甘蔗等作物根表分离获得具有固氮酶活的 *Azospirillum* 属细菌 58 株。根据这些菌在葡萄糖或核糖上不产酸, 在蔗糖蛋白胨中不发酵, 以及不需要生长素也能生长等特点, 将它们定为 *Azospirillum brasilense* 种。又根据它们还原硝酸盐、是否累积亚硝酸盐和产生与不产生 N_2O 的明显差异性, 将它们分成两群。从这两群菌在上述作物根表分布的状况看, 居于玉米和甘蔗根表的菌株, 全部属于第 I 群, 谷子根表的全部属于第 II 群, 小麦根表的则分属两群。玉米、谷子和甘蔗的根表固氮螺菌具有较强的专一性, 而小麦根表固氮螺菌的专一性较弱。

在累积大量的有关固氮螺菌资料的基础上^[1,4-7,12], Krieg 和 Döbereiner 对这类固氮细菌进行了分类^[7,10]。他们根据这类细菌的形态特征及生理生化特性^[2,3], 将这类固氮细菌归于新属 *Azospirillum*, 并依据其在葡萄糖或核糖上产酸和对生长素的要求与否, 又定名两个种: *A. lipoferum* 和 *A. brasilense*^[10]。关于固氮螺菌与禾谷类作物联合专一性问题, Baldani 和 Döbereiner 进行过研究^[12]。

我们从我国广西玉米研究所和湖北省农业科学院和华中农学院的玉米、谷子、甘蔗和小麦的根表上分离获得具有较高固氮酶活的菌株, 对其进行分类鉴定和分布的研究, 本文报道这方面的结果。

材 料 和 方 法

1. 菌株来源: 玉米、谷子和甘蔗根表固氮螺菌来自广西玉米研究所试验田; 小麦根表固氮螺菌分别来自湖北省农业科学院和华中农学院农场试验田。分别用“Ma”、“Mi”、“S”和“W”代表玉米、谷子、甘蔗和小麦根表上分离获得具有固氮酶活的固氮菌株。

2. 分离方法及培养条件^[11]。

3. 固氮酶活测定: 用乙炔还原法, 在气相色谱

谱上测定固氮酶活性, 以青霉素小瓶为单位每小时还原 C_2H_2 的量来计算^[11]。

4. 亚硝酸盐的测定^[11]。

5. N_2O 的气相色谱定性测定^[11,13]。

结 果

(一) 根系来源及其固氮酶活强度

从广西玉米研究所采集玉米杂交、自交和农家品系 354 个样品, 其中杂交品系 310 个, 自交品系 21 个, 农家品系 23 个。具有固氮酶活的杂交品系 158 个, 占杂交品系的 50.9%; 具有酶活的自交品系 6 个, 占自交品系的 28.6%; 农家品系具有酶活的仅 2 个, 占 9.2%。从湖北省农业科学院试验田和华中农学院共采集小麦品系 206 个, 其中具有固氮酶活的样品 147 个, 占样品的 71.4%, 42.2% 样品的酶活不超过 10 n mol/瓶/小时 。谷子和甘蔗各采自一个生产推广品系, 全部具有固氮酶活。从固氮酶活的强度看, 玉米杂交品系中有 3 个样品超过 200 n mol/瓶/小时 , 而自交品系

本文于 1981 年 5 月 25 日收到。

本工作得到陈华癸教授指导, 广西玉米研究所、湖北省农业科学院、华中农学院提供作物根系, 在此一并致谢。

表 1a 玉米各品系根表固氮酶活比较

Table 1a Comparison of nitrogenase activity in root of different maize sample

| 不同品系 Different cultivar | 样品数 Count of samp. | 固氮酶活 Nitrogenase activity (n mol C ₂ H ₄ /bottle/h) | | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|--|------|-----------|------|--------|-----|---|------|
| | | <100 % | | 100—200 % | | >200 % | | 有酶活总数 Total samp. of nitrog. act. | % |
| 杂交品系 Hybrid | 310 | 121 | 39 | 34 | 10 | 3 | 0.9 | 158 | 50.9 |
| 自交品系 Inbred | 21 | 3 | 14.3 | 3 | 14.3 | 0 | 0 | 6 | 28.6 |
| 农家品系 Local | 23 | 1 | 4.7 | 1 | 4.7 | 0 | 0 | 2 | 9.2 |

表 1b 小麦根表固氮酶活的强度

Table 1b Comparison of nitrogenase activity in root of different wheat samples

| 样品数 Count of samp. | 固氮酶活 Nitrogenase activity (n mol C ₂ H ₄ /bottle/h) | | | | | | 有酶活总数 Total samp. of nitrog. act. | % |
|--------------------------|--|------|--------|------|------|-----|--|------|
| | <10 | % | 10—100 | % | >100 | % | | |
| 206 | 87 | 42.2 | 51 | 24.8 | 9 | 4.4 | 147 | 71.4 |

表 1c 谷子、甘蔗品系根表固氮酶活比较

Table 1c Comparison of nitrogenase activity in root of millet and sugar cane

| 品 系 Cultivar | 样 品 数 Count of samp. | 固氮酶活 Nitrogenase activity (n mol C ₂ H ₄ /bottle/h) | |
|-----------------|----------------------------|--|-----|
| | | > 200 | % |
| 谷子 Millet | 8 | 8 | 100 |
| 甘蔗 Sugar cane | 7 | 7 | 100 |

和农家品系的固氮酶活则没有一个样品超过 200n mol/瓶/小时。谷子和甘蔗两个生产推广品系,其固氮酶活都超过 200n mol/瓶/小时,其结果列入表 1a, b, c。

(二) 菌株来源及其固氮酶活

从玉米、谷子、小麦和甘蔗 575 个根系样品中,分离获得固氮酶活较高的固氮螺菌 58 株。这些菌株来自玉米杂交品系根表的有 15 株,小麦根表的 34 株,谷子的 6 株,甘蔗的 3 株。这些菌株纯培养的固氮酶活超过 500n mol/瓶/小时共有 44 株,其中来自玉米根表的 4 株、谷子的 5 株、小麦的 34 株、甘蔗的 1 株。其结果列入表 2

中。

(三) 作物根表固氮螺菌的形态特征和生理生化特性

1. 形态特征: 在葡萄糖肉汁蛋白胨琼脂上培养 24 小时(32℃),细胞为直的或弯曲(弧形),单生或二联生,大小为 0.6—1.0 × 1.0—2.5 μm; 运动,端生单毛^[11]。革兰氏染色阴性,培养 5 天后,细胞形成 1 个或 1 个半螺旋,大小约 0.8—1.0 × 2.0—5.0 μm。细胞中含有聚 β-羟基丁酸盐颗粒。

在葡萄糖肉汁蛋白胨琼脂平板上, 32℃ 下培养 24 小时的菌落圆形,直径为

表 2 各菌株固氮酶活比较

Table 2 Comparison of nitrogenase activity of pure bacterial cultures

| 第 I 群 Group I | | 第 II 群 Group II | |
|----------------|---|-----------------|--|
| 菌 株 Strains | 固氮酶活 n mol C ₂ H ₄ / bottle/h | 菌 株 Strains | 固氮酶活 n mol C ₂ H ₄ / bottle/h |
| Ma 6 | 829.7 | Mi 221 | 733.2 |
| Ma 99 | 328.0 | Mi 223 | 765.4 |
| Ma 201 | 377.7 | Mi 224 | 488.8 |
| Ma 231 | 598.2 | Mi 225 | 694.7 |
| Ma 232 | 617.5 | Mi 226 | 585.3 |
| Ma 233 | 250.8 | Mi 227 | 675.4 |
| Ma 234 | 199.4 | Mi 229 | 611.1 |
| Ma 237 | 450.2 | W 80-2 | 711.8 |
| Ma 241 | 199.4 | W 80-3 | 863.2 |
| Ma 242 | 521.0 | W 251-12 | 1454.4 |
| Ma 244 | 271.6 | W 251-13 | 326.4 |
| Ma 245 | 270.1 | W 259-1 | 598.2 |
| Ma 246 | 76.2 | W 259-4 | 804.0 |
| S 247 | 115.8 | W 259-6 | 771.8 |
| S 248 | 147.9 | W 261-2 | 887.6 |
| S 251 | 598.2 | W 261-3 | 900.5 |
| W 251-1 | 1151.3 | W 261-4 | 784.7 |
| W 251-2 | 1087.0 | W 261-5 | 797.6 |
| W 251-3 | 1138.5 | W 261-7 | 971.2 |
| W 251-4 | 1003.4 | W 261-8 | 720.4 |
| W 251-5 | 1247.8 | W 261-10 | 1099.9 |
| W 251-6 | 1138.5 | W 261-11 | 1183.5 |
| W 251-7 | 1016.3 | W 261-12 | 1048.4 |
| W 251-8 | 1093.4 | W 261-13 | 1080.6 |
| W 251-9 | 1196.4 | | |
| W 251-10 | 1144.9 | | |
| W 251-11 | 1202.8 | | |
| W 259-2 | 437.4 | | |
| W 259-5 | 977.7 | | |
| W 261-1 | 1003.4 | | |
| W 261-9 | 945.5 | | |
| W 59-1 | 871.5 | | |
| W 96-2 | 1363.6 | | |
| W 96-4 | 1041.9 | | |

时,液面形成白色菌膜,5天后菌膜加厚,变成粉红色。

2.生理生化特性:这类固氮螺菌都是在微好气条件下固氮。在葡萄糖或核糖上不产气,不产酸。蔗糖蛋白胨不发酵。不需要生长素。能利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、甘油、苹果酸钠、琥珀酸盐作为碳源和能源。能利用硫酸铵、硝酸钾、尿素、酵母膏、蛋白胨和胰蛋白胨作为氮源。它们都能在葡萄糖蛋白胨培养基上产氨。能把硝酸盐还原成亚硝酸盐(nr⁺),其中有些还具有亚硝酸盐还原酶(nir⁺),将亚硝酸盐还原成N₂O。它们的氧化酶和接触酶均为正反应。M. R., V. P. 和叫染均为负反应。

(四) 分类

根据以上所述的形态特征及生理生化特性,将58株固氮螺菌归属于*Azospirillum*属^[7]。由于这些菌在葡萄糖或核糖上不产酸,在蔗糖和蛋白胨(加石蜡油)上不发酵,在没有生长素的培养基上生长,将它们定为*A. brasiliense*种^[10]。又因它们在积累与不积累亚硝酸盐和产生与不产生N₂O^[5]的

表 3 两群菌株在四种作物根表上的分布

Table 3 Distribution of strains in two groups on the root of different plants

| 群 Group | 小 麦 Wheat | 玉 米 Maize | 谷 子 Millet | 甘 蔗 Sugar cane |
|------------|--------------|--------------|---------------|-------------------|
| I | 18 | 13 | 0 | 3 |
| II | 17 | 0 | 7 | 0 |

特性上有明显差异,又分成两群:第 I 群:具有硝酸盐和亚硝酸盐还原酶(nr⁺, nir⁺),产生N₂O,不积累亚硝酸盐;第 II 群:只具有硝酸盐还原酶,而不具有亚硝酸盐还原酶(nr⁺, nir⁻),不产生N₂O,积累亚硝酸盐。

1—2mm,表面光滑,反光,边缘整齐,无色,半透明,中心质浓,培养5天后菌落产生粉红色素,不渗透到基质中。

培养24小时的斜面,菌苔特征同菌落特征。葡萄糖肉汁蛋白胨液体培养24小

(五) 第 I 群和第 II 群菌株在小麦、玉米、谷子和甘蔗根表的分布

我们所获得的 58 株固氮螺菌, 属于第 I 群的有 34 株, 其中 13 株来自玉米根表, 3 株来自甘蔗, 18 株来自小麦。属于第 II 群的有 24 株, 其中 17 株来自小麦根表, 7 株来自谷子。其结果见表 3。

讨 论

根据 58 株根表固氮螺菌的形态特征及其生理生化特性, 将它们归属于 *Azospirillum brasilense*, 又依据它们对亚硝酸盐的累积与否分成两群。属于第 I 群的有 34 株, 其中 18 株来自小麦根表, 3 株来自甘蔗, 13 株来自玉米。属于第 II 群的 24 株。其中 17 株来自小麦, 7 株来自谷子。这一点说明, 这类固氮细菌在玉米、谷子和甘蔗等作物根系中有明显的专一性, 而小麦根系中, 第 I 群和 II 群菌株各占一半, 它们的专一性程度又明显不同于前者。关于这类固氮菌的专一性问题, 有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Bulow, J. F. W. von and J. Dobereiner: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 72: 2389—2393, 1975.
- [2] Burris, R. H. et al.; In "Genetic Engineering for Nitrogen Fixation", ed. by A. Hollander, Plenum press, New York., pp. 445—450, 1977.
- [3] Day, J. M. and J. Dobereiner: *Soil Biol. Biochem.* 7: 45—50, 1976.
- [4] Dobereiner, J. et al.: *Soil Biochem.* 5: 157—159, 1973.
- [5] Dobereiner, J. and J. M. Day: In "Nitrogen Fixation by Free living Microorganisms", ed. by W. D. P. Stewart, vol. I, 39—56, 1976.
- [6] Dommergues, N. R. et al.: *Soil Biochem.*, 5: 83—89, 1973.
- [7] Krieg, N. R.; In "Genetic Engineering for Nitrogen Fixation", ed. by A. Hollander, pp. 463—472, 1977.
- [8] Neyra, C. A. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 23: 300—305, 1977.
- [9] Pedersen, W. L. et al.: *App. Environ. Microbiol.*, 35(1): 129—135, 1978.
- [10] Tarrand, J. J. et al.: *Can. J. Microbiol.* 241: 967—980, 1978.
- [11] Group of Biological Nitrogen Fixation: *Acta Microbiologica Sinica* 19(2): 160—165, 1979.
- [12] Vera Lucia D. Baldani and J. Dobereiner: *Soil Biol. Biochem.*, 12: 433—439, 1980.

CLASSIFICATION AND DISTRIBUTION OF *AZOSPIRILLUM* ASSOCIATED WITH ROOTS OF CEREALS

Luo Xiaoyang Ceng Kuanrong Jiang Yaping Cai Changjian

Zhou Yigui Yang Baoyu Wang Zifang

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Fifty-eight strains of nitrogen fixing bacteria were isolated from rhizoplane of maize wheat, millet and sugar cane. Nitrogenase activities of these bacteria in pure culture were 76.2-1454.4 n mol/bottle/h. These strains of nitrogen fixing bacteria were found to belong to genus *Azospirillum* based on morphological, physiological and biochemical properties. They were not capable of using glucose as a sole carbon source for growth in nitrogen-free semisolid medium. No acidification of glucose or ribose medium occurred. No fermentation ability for pepton sugar was present. Vitamins were not required for growth. They were classified into species *Azospirillum brasilense*. It contained two groups depending on ability to denitrify nitrite: Group I. The strains in this group possessed assimilatory and dissimilatory nit-

rate and nitrite reductase (nr^+ , nir^+) produced N_2O . Nitrite was not accumulated. Group II. The strains in this group producing no N_2O only possessed assimilatory and dissimilatory nitrate reductase (nr^+ , nir^-). Nitrite was accumulated. The strains found in the roots of maize and sugar cane belonged to group I. The strains found in the roots of millet belonged to group II. But half of the strains associated with roots of wheat belonged to group I. another half to group II. The results in our experiments showed that the bacteria associated with roots of maize, millet and sugar cane possessed strong specificity, but the bacteria on the roots of wheat presented poor specificity. Further research on the specificity of *Azospirillum* is necessary.