

# 不同来源的快生型大豆根瘤菌质粒组成的多样性

葛 诚 徐玲玫 樊 蕙

(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京)

江木兰 张学江

(中国农业科学院油料作物研究所, 武汉)

快生型大豆根瘤菌是亚洲特有的固氮资源, 在我国分布广泛。近几年对它的研究进展迅速, 表现了重要的理论价值和实用意义<sup>[1-4]</sup>。但是对不同地理和品种来源的快生型大豆根瘤菌的分布频率和质粒分析研究较少。尤其是质粒组成, 以往的研究仅局限于少数菌株<sup>[5,6]</sup>。作者从我国不同地区的大豆品种上采瘤进行分离鉴定, 比较了分离频率和菌株的质粒图。

## 材料和方法

### (一) 分离地点, 大豆品种和土壤特性

从黑龙江省佳木斯市、山西省太原市、河南省商丘市及湖北省武汉市, 分别代表大豆的三大种植区, 采取 5 个大豆品种, 其中河南和河北有 1 个共同的品种的根瘤, 进行常规分离。

### (二) 根瘤采集, 保存和菌液分离

在上述采样点于大田播后 40 天以上的未接种地块, 按行采取大豆植株, 每行取 10 株以上, 取下根瘤略风干, 装入内有硅胶的小瓶, 带回实验室分离。分离、纯化和回接大豆寄主均按文献报道进行<sup>[7]</sup>。

### (三) 质粒分析

表 1 大豆根瘤采样地, 土壤性质及大豆根瘤菌分离频率

地 点	大豆品种	土 类	土壤性质				分离频率		分 型	
			全氮 (%)	磷(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (%)	钾(%)	pH	根瘤数	得到的菌株数	快生型 (株)	慢生型 (株)
佳木斯市	红丰 3 号	草甸黑土	0.161	0.156	0.194	6.2	130	100	0	100
佳木斯市	合丰 25 号	暗 上	0.152	0.140	0.172	6.9	128	100	0	100
太 原 市	晋豆 4 号	城 土	0.122	0.157	2.158	8.5	100	74	74	0
商 丘 市	鄂豆 2 号	沙丘黄土	0.081	0.051	未测	8.3	125	118	42	76
武 汉 市	鄂豆 2 号	石灰冲积土	0.114	0.151	未测	8.1	140	130	75	55
武 汉 市	猴子毛	暗 上	0.114	0.151	未测	8.1	143	128	42	86

将分离得到的快生型大豆根瘤菌株分别在 YEM 斜面上培养 3 天, 然后每只斜面用 9ml 无菌水洗下菌苔, 振荡打匀后, 吸取 50μl 接入装有 500μl 液体 TY 培养基的 Eppendorf 管内, 28℃ 摇床培养 48—72 小时, 用 Eckhardt 技术进行并内裂解垂直电泳<sup>[8]</sup>, 样井为 3mm 宽, 10mA 电流 1 小时后, 转 40 mA 3.5 小时。电泳结束后将凝胶在溴化乙锭浸泡 30 分钟。然后在紫外检测仪下观察并照相。

对照菌株 Rm41 有 3 条质粒带, 大小分别为 1250, 200 和 50kb<sup>[9]</sup>。根据在电场条件下质粒电泳的速率与其分子量大小的关系, 计算出分析菌

株质粒分子量大小。根据质粒带的多少、位置和分子量, 将所分析的菌株划分为不同的质粒组<sup>[10]</sup>, 并进行不同地区和品种来源的菌株质粒组比较。

## 结 果

### (一) 不同地区和品种来源根瘤快、慢生型大豆根瘤菌的分离频率

本文于 1990 年 3 月 5 日收到。

国家自然科学基金资助项目。

本项目在进行中得到法国农业科学院第戎农业研究中心的 N. Amarger 研究员的帮助, 特此致谢。

表 2 太原快生型大豆根瘤菌株质粒组(晋豆 4 号)

组别	代表菌株	每组菌株数	质粒数	质粒大小 (kb)
1	B422	6	1	210
2	B132	18	1	234
3	B464	16	1	275
4	B141	10	1	324
5	B321	3	1	389
6	B343	2	1	437
7	B354	1	1	550
8	B163	2	2	282, 83
9	B333	2	2	275, 135
10	B261	3	2	575, 135

表 1 结果表明,不同大豆种植区不同大豆品种的根瘤中分离出快、慢生型大豆根瘤菌的频率是不同的。佳木斯的根瘤样品中未分离出快生型。商丘和武汉的根瘤中都分离出两种,而太原

表 3 武汉快生型大豆根瘤菌株质粒组(鄂豆 2 号)

组别	代表菌株	每组菌株数	质粒数	质粒大小 (kb)
1	DE461	1	1	389
2	DE124	3	2	309, 191
3	DE563	1	2	355, 200
4	DE412	1	2	575, 54
5	DE267	3	3	234, 151, 91
6	DE343	7	3	380, 178, 155
7	DE261	2	3	513, 117, 15
8	DE214	2	3	>1000, 468, 50
9	DE263	2	3	851, 219, 195
10	DE534	1	4	151, 72, 54, 28
11	DE3422	5	4	331, 182, 100, 16
12	DE123	2	4	309, 170, 37, 14
13	DE354	1	4	380, 263, 182, 34
14	DE243	1	4	389, 182, 43, 16
15	DE543	2	4	537, 339, 166, 59
16	DE345	3	4	631, 282, 182, 28
17	DE213	1	4	955, 234, 209, 85
18	DE331	3	4	>1000, 468, 78, 21
19	DE244	4	4	>1000, 575, 145, 54
20	DE5411	2	5	339, 178, 123, 54, 22
21	DE424	4	5	537, 339, 89, 78, 69
22	DE3342	3	5	661, 263, 170, 126, 29
23	DE154	2	5	955, 316, 209, 59, 7
24	DE254	3	5	>1000, 380, 178, 60, 12
25	DE562	1	6	537, 245, 174, 69, 49, 31
26	DE145	2	6	>1000, 537, 79, 66, 23, 17

的根瘤中则未分离出慢生型。从土壤类型看,碱性土壤样品分离出快生型大豆根瘤菌的频率很高。同一土壤上快生型大豆根瘤菌的分离频率可因品种而异。武汉的根瘤样品来自鄂豆 2 号的分离频率为 57%, 而从猴子毛品种上分离频率仅为 32%。

(二) 快生型大豆根瘤菌的质粒组

将从 3 省 4 个大豆品种来源的快生型大豆根瘤菌株进行垂直电泳, 做质粒分析。计算每个菌株的质粒分子量, 然后根据质粒带的数量和分子量, 将菌株归入不同的质粒带组, 现列出太原和武汉(鄂豆 2 号)来源的快生型大豆根瘤菌株的质粒组成(表 2、3)。

上述结果表明, 不同来源的快生型大豆根瘤菌株组成了多个质粒带组。太原菌株中 1—2 条质粒的菌株占 90.4%, ≥3 条的仅为 9.5%, 武汉菌株(鄂豆 2 号) 1—2 条质粒的菌株占 9.6%, 而 ≥3 条的却达到 90.3%, 表现出较大的差异。不同来源菌株的质粒图例见图 1、2。

讨 论

快生型大豆根瘤菌是亚洲特有的固氮资源, 除了已报道的从中国大陆分离的以外, 从我国台湾省和越南也有分离报道<sup>[12, 13]</sup>。但其分布是有一定规律的。葛诚等曾对 8 个省(区)的 47 个大豆品种的 4251 个根瘤进行了调查, 表明山西、河南、宁夏的根瘤中含快生型为多, 似与大豆的起源地有关<sup>[14]</sup>。本文的实际采瘤分离结果仍表明, 山西、河南根瘤中分离频率高, 碱性土壤中分离的机率更高。

对快生型大豆根瘤菌的质粒过去仅分析了少

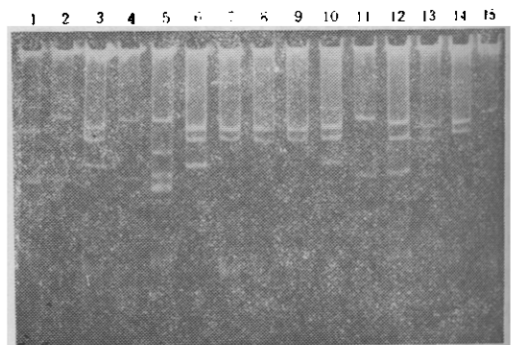


图 1 从湖北省分离的快生型大豆根瘤菌质粒图 (1 为对照菌株 Rm41; 2—15 为不同菌株)

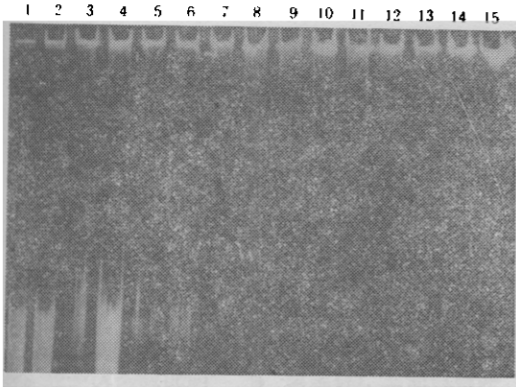


图2 从山西省分离的快生型大豆根瘤菌质粒图  
(1—6为 *B. japonicum*; 7—14为从太原分离的快  
生型大豆根瘤菌株; 15为 Rm41)

量菌株,如 Heron, Appelbaum 等研究的均是1982年 Keyser 等发表的11株<sup>[5,6]</sup>,国内宁林夫等也只进行了少量菌株质粒分析<sup>[11]</sup>。而菌株质粒分析表明对其内在遗传结构的了解,近几年有更深入的进展,Moza 等在西班牙的两个点分离45株驴喜豆根瘤菌,通过质粒图分析将它们分成19个质粒组,认为组成的多样性与地理来源没有关系<sup>[10]</sup>。本文分析了186个菌株的质粒组成,表明4个来源(5个品种)的快生型大豆根瘤菌质粒组

为10—26个,太原菌株和武汉菌株的质粒图有相当大的区别。并为进一步研究奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] 葛 诚等: 国外农业科技,(1): 5—9,1986。
- [2] 葛 诚: 中国油料,(2): 69—72,1986。
- [3] 葛 诚等: 应用微生物,(1): 7—12,1987。
- [4] Chen, W. X. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38(4): 392—397, 1988。
- [5] Heron, D. S. et al.: *J. of Bacteriol.*, 160(3): 1051—1065, 1984。
- [6] Appelbaum, E. R. et al.: *ibid.*, 163(1): 385—388, 1985。
- [7] Vincent, J. M.: *A Manual for the Study of Root Nodule Bacteria*, Blackwell, Oxford, 1970。
- [8] Eckhardt, T.: *Plasmid*, 1: 584—588, 1978。
- [9] Kondorosi, A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 188: 433—439, 1982。
- [10] Moza, T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(5): 1262—1267, 1988。
- [11] 宁林夫等: 微生物学报, 26(3): 271—276, 1986。
- [12] Young, C. C. et al.: *Biol. Fert. Soils*, 5: 350—354, 1988。
- [13] Kimou, A. et al.: *ibid.*, 7: 259—262, 1989。
- [14] 葛 诚等: 大豆科学,5(4): 327—333, 1986。

## **SINORHIZOBIUM FREDII STRAINS FROM DIFFERENT GEOGRAPHICAL ORIGINS AND THE DIVERSITY OF THEIR PLASMID PROFILES\***

Ge Cheng Xu Lingmei Fan Hui

(Soils and Fertilizers Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Jiang Mulan Zhang Xuejiang

(Institute of Oil Crops, CAAS, Wuhan)

Two kinds of soybean rhizobia were obtained from different soybean cultivars grown in 4 provinces in China. The isolates from Henan (Shangqiu) and Hubei (Wuhan) provinces were both *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*. Whereas those from Shanxi (Taiyuan) province were all *Sinorhizobium fredii* and Heilongjiang (Jiamusi) province all *Bradyrhizobium japonicum*. The symbiosis of the *Sinorhizobium fredii* strains with their original hosts and the North American soybean cultivars were significantly different. A great diversity in number and size of plasmids was obtained in 186

*Sinorhizobium fredii* strains examined, which were from 4 origins. And the strains from each origin may be put into 10—26 groups according to their plasmid profiles. There appeared to be a certain relationship between the plasmid profiles and geographical origins of the strains.

### **Key words**

Soybean; Plasmid; *Sinorhizobium*

\* The Project Supported by National Science Foundation of China.