

新疆干旱地区根瘤菌资源研究*

II. 根瘤菌抗逆性及生理生化反应特性

关桂兰 郭沛新 王卫卫 康金花

(中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所, 乌鲁木齐 830011)

从新疆干旱地区获得的根瘤菌对盐、碱、高温和抗菌素等不利条件有较强的抗逆性。测试菌中分别有 47% 和 32% 的菌株在 0.68 mol/L 和 0.86—1.03 mol/L NaCl 的 YMA 培养基上生长; 49% 菌株在 pH4 的 YMA 培养基上生长; 85% 在 pH10 的 YMA 培养基上生长; 43% 菌株在 43℃ 条件下生长; 55% 菌株 60℃ 处理 10 分钟后仍然能正常生长; 41%、26% 菌株分别耐 500 γ 、1000 γ 的链霉素。新疆根瘤菌除具备一般根瘤菌鉴定特性外, 测试菌中 50% 菌株利用柠檬酸; 68% 菌株液化明胶; 36% 菌株水解酪素, 与一般根瘤菌反应特性不一致。

关键词 根瘤菌资源; 抗逆性; 生理生化反应

干旱、高温、盐碱和温度变化剧烈为新疆干旱地区生态条件的显著特征。新疆地区根瘤菌长期生存在这样的环境中, 它们必然获得与环境相适应的属性。通过生态条件及生理生化实验, 结果表明新疆地区根瘤菌除具备一般根瘤菌鉴定特性外, 还具有抗逆品性及独特的生理生化反应特性, 现报道如下。

材料和方法

(一) 供试菌株

从新疆不同生态环境生长的 31 属 109 种豆科植物根瘤中分离出 373 株根瘤菌, 从中抽取已经回接寄主结瘤的菌株作为测试菌。

(二) 根瘤菌生态条件实验

耐盐实验, 不同 pH 实验, 耐高温实验, 耐抗菌素实验均以 YMA 为基本培养基, 按常规方法进行^[1]。

(三) 根瘤菌生理生化实验

3-酮基乳糖实验, B.T.B 实验, 明胶水解实验, 酪素水解等实验均以 YMA 培养基为基础, 按实际要求添加必要的特征反应试剂。石蕊牛奶、糖利用、柠檬酸利用等实验按常规细菌鉴定方法进行^[1-3]。

结果与讨论

干旱、高温是根瘤菌-豆科植物共生结瘤固氮的限制因素。一般来说, 低于 7℃ 或者高于 30℃ 根瘤菌不能侵染豆科植物, 不容易形成有效根瘤^[4]。土壤缺水一方面影响植物

本文于 1990 年 12 月 5 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

根毛的生长,从而减少根瘤菌感染机会,一方面根瘤菌在干燥土壤中繁殖受到限制,不易与豆科植物共生结瘤。但是,在高温、干旱地区根瘤菌的生长繁殖以及对寄主植物侵染和结瘤固氮作用均有别于一般生态地区。吐鲁番盆地是新疆地区典型的高温干旱地区,夏季气温最高可达 45—50℃。地温(0—20cm)达 35—40℃。年均降雨量 10mm。在这样生态条件下,发现多种根瘤菌-豆科植物共生体具有根瘤并有较高的乙炔还原活性,表明它们具有明显的抗干旱、高温特性(表 1)。而另一些根瘤菌在低温环境中也能生存与繁殖,并与豆科寄主植物共生结瘤固氮。在乌鲁木齐附近荒山,早春气温 8—13℃,地温(0—20cm) 6—11℃,发现短柄黄芪(*Astragalus pseudobrachyro*)和弯果葫芦巴(*Trigonella arcuata*)均能结瘤,测其乙炔还原活性分别为 20.5、13.2 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ (鲜瘤重) $\cdot \text{h}^{-1}$ 。夏初降雨量小,蒸发量大,土壤湿度仅为 6.5—10.2%(0—20cm)的条件下,发现短命豆科植物薄叶葫芦巴(*Trigonella fenuis*)结有粉红色小瘤,乙炔还原活性为 18.0 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ (鲜瘤重) $\cdot \text{h}^{-1}$ 。

表 1 吐鲁番地区豆科根瘤乙炔还原活性

Table 1 The acetylene reduction activities of leguminous nodule from Turpan Basin

气候条件 Climatic conditions ^[1]	采样日期 Sampling date	寄主 Host plant	乙炔还原活性 C ₂ H ₄ reduction activity ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
年平均温度 The annual average of temperature	1984.6.05	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	203
12—14℃	1984.6.05	<i>Caragana</i> sp.	0
7月 July: 30—34℃	1984.6.05	<i>Ammopiptanthus monglius</i>	21
1月 Jan.: -16—10℃	1984.6.07	<i>Sphaerophysa salsula</i>	471
年平均降雨量 The annual precipitation	1982.7.19	<i>Astragalus adsuroen.</i>	158
20—26mm	1983.6.16	<i>Vigna sinensis</i>	80
	1983.6.16	<i>Crotalaria juncea</i>	177
	1983.6.16	<i>Sophora alopecuroides</i>	60
	1983.6.16	<i>Hedysarum scoparium</i>	0

根据 Vincent 报道,根瘤菌对各种盐离子最高耐受浓度是 CaCl_2 0.14mol/L, KCl 0.32mol/L, NaCl 0.6mol/L, LiCl 0.4mol/L。三叶草根瘤菌耐受钠离子和钾离子最高浓度是 0.3mol/L, 苜蓿根瘤菌为 0.5—0.6mol/L^[6]。对新疆各种根瘤菌 51 菌株进行抗盐实验。结果表明测试菌中 47% 根瘤菌菌株能在含有 0.68mol/L NaCl 的 YMA 培养基上生长, 32% 的菌株在含有 0.86—1.03mol/L NaCl 的 YMA 的培养基上生长(表 2)。苜蓿根瘤菌对 Na_2SO_4 表现出更强的耐受性, 13 株苜蓿根瘤菌中有 10 株在含有 2.36mol/L 的 Na_2SO_4 的 YMA 培养基上生长。这些特性与该地区土壤含盐量高, 特别是 Na_2SO_4 含量高有一定的相关性。

根瘤菌生长最适 pH 值为 6—7, 有些根瘤菌为 4.5—9.5, 苜蓿根瘤菌比较耐碱(Jordan 1984)^[7]。对新疆各种根瘤菌做氢离子浓度实验结果表明, 新疆根瘤菌对 pH 适应

表 2 根瘤菌在不同浓度氯化钠 YMA 培养基生长状况

Table 2 *Rhizobium* strains growth on YMA medium with different concentration of sodium chloride

NaCl 浓度 Concentration of NaCl (mol/L)	根瘤菌 <i>Rhizobium</i> strains	测试菌的百分数 Percentage of examined strains
0.68	R152, R116, R263, R266, R115 R001, R327, R189, R196, R271 R276, R165, R267, R375, R003 R164, R334, R092, R240, R119 R053, R278, R063, R305	占 51 株菌的 47% 47% of 51
0.86—1.03	R116, R115, R189, R196, R276 R335, R003, R164, R240, R119 R171, R053, R298, R305	占 51 株菌的 32% 32% of 51

注: 28℃ 培养。

Incubation temperature: 28℃.

分别从 19 属 24 种豆科植物根瘤分离的菌株。

These strains were isolated from 24 species of 19 genera of legume.

范围较宽, 测试菌的 85% 能在 pH 10 的 YMA 培养基上生长, 49% 能在 pH4 的 YMA 培养基上生长。在 pH4—10 范围内均能生长的占 60% (表 3)。新疆草木樨根瘤菌对 pH 有特殊的耐受性, 能在 pH12 的 YMA 培养基上生长。

据报道根瘤菌最适生长温度为 25—30℃, 只有少数苜蓿根瘤菌菌株在 42.5℃ 下生长 (Jordan 1984)^[7]。我们用各种根瘤菌 88 株进行生长温度实验。结果表明, 该地区根瘤菌对温度适应范围较宽。测试菌中 43% 的菌株能在 43℃ 正常生长。无孢子微生物一般在 60℃ 处理 2—3 分钟全部被杀死^[8]。对新疆根瘤菌 88 株于 60℃ 处理 10 分钟后, 移到 28℃ 条件下培养仍有 55% 菌株能正常生长 (表 4)。

根瘤菌对广谱抗菌素是敏感的。革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌一般均被抗菌素所抑制, 根瘤菌也不例外。而新疆根瘤菌对抗菌素有较强的耐药性, 测试菌中 41% 的菌株耐受 500r 链霉素, 26% 的菌株可耐受 1000r 链霉素。

根据上述根瘤菌生态条件的实验结果, 证明了新疆干旱地区有很多根瘤菌对高温、盐碱和抗菌素等不利环境因子表现出很强的耐受性, 表明它们在长期适应环境的过程中形成了独特的抗逆境的遗传属性。

根瘤菌科内不论快生型根瘤菌属还是慢生型根瘤菌属, 均不产生三酮基乳糖, 而土壤杆菌属产生三酮基乳糖 (Jordan 1984)^[7]。用新疆根瘤菌 88 株进行乳糖和柠檬酸利用实验。结果表明, 测试菌株均不产生三酮基乳糖, 而有 50% 的菌株可以利用柠檬酸, 与 Trinick 等报道的银合欢 (*Leucaena glauca*) 根瘤菌利用柠檬酸相一致^[9]。牛奶石蕊反应是根瘤菌另一特性反应。Jordan, Allen (1974)^[10] 描述的根瘤菌模式种, 苜蓿根瘤菌使牛奶变酸, 产生血清环, 其余模式种都使牛奶变碱产生血清环。新疆根瘤菌 88 株做牛奶石蕊反应, 观察 45 天。实验菌株全部产血清环, 使牛奶变酸的占测试菌株的 66% (表 5)。用 53 株根瘤菌做 B.T.B 反应实验, 测试菌中 96% 产酸, 表明新疆干旱地区的根瘤菌

表 3 根瘤菌在不同 pH YMA 培养基生长状况

Table 3 The growth of rhizobia strains on YMA medium with different pH

培养 pH The pH of incubation	生长菌株 Growing strains	测试菌的百分数 Percentage of examined strains
4	R270, R263, R266, R115, R286 R292, R015, R244, R189, R243 R363, R196, R227, R185, R271 R165, R092, R339, R099, R119 R171, R190, R289	占 60 株菌的 49% 49% of 60
10	R270, R082, R116, R177, R291 R332, R266, R115, R286, R001 R015, R327, R011, R244, R292 R189, R243, R296, R363, R196 R160, R275, R185, R271, R276 R165, R176, R179, R267, R340 R017, R003, R342, R334, R092 R119, R171, R190, R289, R305	占 60 株菌的 85% 85% of 60
4—10	R334, R092, R119, R171, R190 R290, R305, R271, R165, R170 R267, R017, R126, R189, R243 R363, R196, R227, R185, R285 R015, R244, R292, R270, R266 R115	占 60 株菌的 60% 60% of 60

注: 28℃ 培养。

Incubation temperature: 28℃.

分别从 25 属 35 种豆科植物根瘤分离的菌株。

These strains were isolated from 35 species
of 25 genera of legume.

表 4 根瘤菌对高温的耐受性

Table 4 Tolerance for high temperature of rhizobia strains

处理温度 Treatment by temperature	存活菌株 Survival strains	测试菌的百分数 Percentage of examined strains
55℃ 20 min	R001, R009, R011, R087, R015 R118, R126, R165, R160, R176 R189, R243, R231, R257, R291 R313, R298, R305	占 86 菌株的 62% 62% of 86
60℃ 10 min	R082, R011, R015, R001, R118 R126, R165, R160, R176, R189 R231, R234, R291, R298, R305	占 86 菌株的 55% 55% of 86

注: 根瘤菌生长在 YMA 培养基上。

Rhizobia strains growth on YMA medium.

分别从 18 属 42 种豆科植物根瘤分离的菌株。

These strains were isolated from 42 species of 18 genera of legume.

表 5 根瘤菌牛奶石蕊反应

Table 5 The reaction of litmus-milk by rhizobia strains

菌株 Strains	颜色 Colour	pH	血清带 Serum zone	菌株 Strains	颜色 Colour	pH	血清带 Serum zone
R168	红 red	5.0	+	R118	红 red	5.0	+
R173	蓝 blue	8.0	+	R115	蓝 blue	9.0	+
R291	红 red	5.0	+	R185	蓝 blue	8.8	+
R001	红 red	6.0	+	R276	红 red	5.0	+
R210	蓝 blue	8.5	+	R316	蓝 blue	8.5	+
R338	红 red	5.0	+	R326	红 red	6.0	+
R162	红 red	5.0	+	R324	蓝 blue	8.0	+
R266	红 red	5.0	+	R331	红 red	6.0	+
R188	红 red	6.0	+	R342	蓝 blue	8.0	+
R270	红 red	6.0	+	R175	蓝 blue	8.5	+
R096	红 red	6.0	+	R252	红 red	5.5	+
R011	红 red	6.0	+	R114	红 red	5.0	+
61A76*	蓝 blue	9.0	+				

* *R. japonicum* 作标准株。* *R. japonicum* as standard.

表 6 根瘤菌水解酪素和液化明胶情况

Table 6 The hydrolyzation of casein and liquefaction of gelatin by rhizobia strains

菌株 Strains	水解酪素 Hydrolyzation of casein	液化明胶 Liquefaction of gelatin	菌株 Strains	水解酪素 Hydrolyzation of casein	液化明胶 Liquefaction of gelatin
R171	-	-	R181	++	+++
R168	-	-	R318	+++	++
R173	-	++	R326	-	++
R311	-	-	R324	+	++
R291	-	+	R083	+++	+++
R259	++	+	R286	-	+
R145	-	-	R198	-	+
R001	+	+	R011	-	+
R270	+++	+++	R196	-	+
R210	-	-	R336	-	+
R302	-	+	R162	++	++
R266	+	+	R063	+++	++
R185	-	+	R268	-	+
R276	-	++	R096	-	-
R114	-	-	R252	-	++
R254	+	++	R118	-	-
R340	-	+	R155	-	+
R123	+++	+++	R240	-	-
R231	-	-	R295	-	-
R275	++	+++	R018	-	+
61A76*	-	-			

* *R. japonicum* 作标准株。*R. japonicum* as standard.

代谢过程中多数产酸。采用不同种豆科植物根瘤分离的根瘤菌 45 株对 12 种糖利用的实验结果表明, 该地区根瘤菌均能利用单糖、双糖和多糖。对碳水化合物没有明显的选择性。Jordan, Allen (1974) 描述根瘤菌不液化明胶或缓慢液化明胶, 不水解脲素, 不利用淀粉^[10]。但是新疆根瘤菌在测试菌中 68% 的菌株液化明胶, 36% 的菌株水解脲素, 35% 的菌株利用淀粉(表 6)。通过上述各种根瘤菌生理生化实验, 证明了新疆干旱地区根瘤菌, 除了具备一般根瘤菌鉴定特性外, 还具有某些特殊生理生化特性。

新疆干旱地区根瘤菌明显特征是在高温、低温、干旱、盐碱等不利条件下能生存、生长和繁殖, 并能侵染豆科寄主植物使其共生结瘤固氮。表现了它们的抗逆性。通过试管、盆栽等方法自然筛选固氮活性高、侵染力强并且有较强抗逆性的根瘤菌菌株, 进行田间试验, 结果表明它们有明显的增产效果。接种苜蓿根瘤菌的苜蓿增产 30% 以上。接种草木樨根瘤菌的草木樨增产 40% 以上。接种大豆根瘤菌的大豆增产 10% 以上。接种甘草根瘤菌的甘草根可以增产 30% 以上。我们获得的根瘤菌株中 90% 还未进行开发利用。其中, 有些根瘤菌分泌桃红色素和金黄色素, 有些分泌大量粘多糖, 还有些在低温下产生蛋白酶等一些特殊生物学性状。在食品、酶制剂等工业中也有开发应用的可能性。

从新疆干旱地区不同生态条件下生长的引属 109 种豆科植物根瘤分离得到的 373 株根瘤菌, 基本上代表了这个地区的根瘤菌种群, 很多菌株是由未报道过的结瘤豆科植物根瘤中分离的。它丰富了我国和世界的根瘤菌种源, 对根瘤菌研究有重要价值。我们的大量实验证明了新疆地区根瘤菌具有独特的生理生化特性和生态学特征, 表明了它们具有独特的遗传学性状, 这方面的工作有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院南京土壤研究所微生物室编著: 土壤微生物研究法, 科学出版社, 北京, 第 90—138 页, 1985。
- [2] 周德庆主编: 微生物研究法, 上海科学技术出版社, 上海, 第 137—163 页, 1983。
- [3] 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, 科学出版社, 北京, 第 35—36 页, 1978。
- [4] 尤崇构等主编: 生物固氮, 科学出版社, 北京, 第 163—184; 1987。
- [5] 文振旺: 新疆土壤地理, 科学出版社, 北京, 第 190 页, 1965。
- [6] Hardy, R. W. F. & W. S. Silver: A Treatise on Dinitrogen Fixation Section, John Wiley New York, pp. 277—366, 1977。
- [7] Krieg, N. R. & J. G. Holt (ed): Bergey's Manual Systematic Bacteriology, Volume 1, Williams of Wilkins Baltimore, pp. 235—244, 1984。
- [8] Graham, P. H. et al.: *J. Bacteriol.*, 86: 1353—1354, 1963。
- [9] Trinick, M. J.: *J. Appl. Bacteriol.*, 49: 39—53, 1980。
- [10] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons (ed): The Williams of Wilkins Company Baltimore, pp. 261—266, 1974。

STUDIES ON THE *RHIZOBIUM* RESOURCES IN XINJIANG ARID AREA

II. THE RESISTANCE AND PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL FEATURES OF RHIZOBIA

Guan Guilan Guo Peixin Wang Weiwei Kang Jinhua

(Xinjiang Institute of Biology, Pedology and Desert Research, Chinese Academy of Sciences, Ürümqi 830011)

The rhizobia got in Xinjiang arid area were highly resistant to salinization, high temperature and antibiotic, etc. Among tested strains, 47% were able to grow in YMA medium with 0.68 mol/L NaCl and 32% grown with 0.86—1.03 mol/L NaCl; 49% of the strains were able to grow on YMA with pH 4 and 85% grown with pH 10; 43% of the strains were able to grow under 43°C and 55% were tolerant to 60°C for 10 minutes; 41% were good resistance to 500 γ streptomycin and 26% to 1000 γ . Some strains were possessed of special properties in physiological and biochemical reactions, as follow: 50% of strains were able to use citrate; 68% could liquify gelatin; 36% could hydrolyze casein.

Key words *Rhizobium* resources; Resistance; Physiological and biochemical reaction