

山蚂蝗属(*Desmodium*)植物根瘤菌生物学特性

靖元孝 莫熙穆

(华南师范大学生物系 510631 广州)

摘 要

从山蚂蝗属植物分离到9株根瘤菌并鉴定为慢生型。该类菌在酵母浸出物—甘露醇(YEM)培养基上产碱,代时6小时以上。这些根瘤菌不能利用蔗糖、苹果酸和柠檬酸,大部分菌不能利用无机氮源。所试根瘤菌耐盐能力差,生长pH范围窄(pH5—8),pH6生长最旺盛。这些菌种对所试4种抗生素敏感,其中MXD2、MXD3、MXD5、MXD7和MXD9对所试抗生素均无抗性,所有根瘤菌在10 μ g/ml结晶紫条件下仍能生长。

关键词:山蚂蝗属;根瘤菌;代时;酵母浸出物—甘露醇培养基

中图法分类号:Q945

0 前 言

山蚂蝗属植物主要生长在热带及亚热带地区。Date^[1]认为山蚂蝗属植物的根瘤菌为慢生型、寄主范围广但经常结无效瘤。黄文芳等^[2]报道了山蚂蝗属旋扭山绿豆根瘤菌的生物学特性。一般工作者在进行根瘤菌营养生理及外界条件对根瘤菌生长影响等研究时,多采用固体培养基来观察根瘤菌生长状况。本工作以从鼎湖山分离的山蚂蝗属植物的根瘤菌为材料,通过液体培养来定量观察根瘤菌的生长状况,对其生物学特性进行了研究。

1 材 料 和 方 法

1.1 菌种来源

异果山绿豆(*Desmodium heterocarpum*)根瘤菌 MXD1、异叶山绿豆(*D. heterophyllum*)根瘤菌 MXD2、排钱草(*D. pulchellum*)根瘤菌 MXD3、毛排钱草(*D. blurdum*)根瘤菌 MXD4、大叶山绿豆(*D. gange ticum*)根瘤菌 MXD5、拿身草(*D. caudatum*)根瘤菌 MXD6、葫芦茶(*D. tri-*

quetrum)根瘤菌 MXD7、显脉山绿豆(*D. reticulatum*)根瘤菌 MXD8 及糙毛假地豆(*D. heterocarpum* var *Stigosum*)根瘤菌 MXD9 均由作者从山蚂蝗属植物根瘤分离,旋扭山绿豆(*D. intortum*)根瘤菌 CB627 由本实验室提供,大豆根瘤菌 USDA191-4、PRC113-2 由中国农科院土肥所赠送。

1.2 山蚂蝗属植物根瘤菌的获取

1992年7月,在广东鼎湖山从9种山蚂蝗属植物分别采集健壮根瘤,经表面灭菌,划线分离纯化得单菌落,然后进行回接试验,待形成根瘤后,再次分离纯化,并用乙炔还原法测定根瘤固氮酶活性。

1.3 代时测定及酸碱反应

参考曹燕珍^[3]的方法。

1.4 碳源利用

以去掉甘露醇的 YEM 液体培养基为基本培养基,分别加入各种碳源使其终浓度为 1% (W/V),灭菌后分装各试管 5ml,用各菌悬液接种,并以不接种不加碳源为对照,27°C 摇床培养(105r/min),7天后用 721 分光光度计测光密度值。

1.5 氮源利用

将 YEM 培养基中酵母粉分别用不同氮源代替,氮源物质浓度均为 0.1% (W/V),灭菌后分装各试管 5ml,以不接菌和不加氮源为对照,摇床培养,7天后用分光光度计测光密度值。

1.6 耐盐试验

改变 YEM 培养基中氯化钠含量,分别调至 0.05、0.1、0.2、0.3mo/L,摇床培养,用分光光度计测定光密度值。

1.7 pH 对根瘤菌生长的影响

采用 YEM 培养基,灭菌后用 S-3C 型酸度计调节一系列 pH 梯度,分装试管进行摇床培养,7天后用分光光度计测定光密度值。

1.8 抗生素本底抗性 & 结晶紫的抑菌作用

将各种试剂分别加入至已定量并已冷却至 50°C 的 YEM 培养基中混匀,各种试剂保持如下浓度($\mu\text{g/ml}$):结晶紫 10、20、100;青霉素 50、100、200;庆大霉素 7.5、15、30;链霉素 5、10、40;卡那霉素 5、10、20。将供试菌悬液接种于平板上,各菌均设 3 次重复,以未加以上试剂作对照,27°C 培养 7 天观察结果。

2 结果与分析

通过初次分离纯化及回接以后的再次分离纯化,从山蚂蝗属 9 株植物根瘤中得到 9 株根瘤菌,共生状态下固氮酶活性(单位: $\text{nmoles} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{鲜瘤} \cdot \text{h}^{-1}$)分别如下:MXD1:8.3; MXD2:7.5; MXD3:7.8; MXD4:7.1; MXD5:8.7; MXD6:9.1; MXD7:6.7; MXD8:9.2; MXD9:10.2。它们的生物学特性如下:

2.1 代时及酸碱反应

结果见表 1。Trinick^[4]认为快生型根瘤菌代时在 4 小时以下,在 YEM 培养基上产酸;而慢

生型根瘤菌代时在 6 小时以上,在 YEM 培养基上产碱.本实验结果表明山蚂蝗属植物根瘤菌代时均在 6 小时以上,代谢产碱,为慢生型根瘤菌.

2.2 碳源利用

结果见表 2. Graham^[5]认为快生型根瘤菌利用碳源范围比慢生型广,Elkan^[6]等进一步报道快生型根瘤菌能利用蔗糖、麦芽糖、乳糖等双糖,而慢生型不能利用.本实验结果表明所试根瘤菌均不能利用苹果酸、柠檬酸和蔗糖,利用乳糖能力较差.半乳糖、甘露醇是优良碳源(特别是甘露醇).

2.3 氮源利用

周俊初^[7]报导根瘤菌能利用有机氮和无机氮,但在氮源只含无机氮的培养基中一般生长不太好.本实验用 5 种不同氮源进行试验,结果(见表 3)表明山蚂蝗属植物根瘤菌大多数不能利用无机氮源 NH_4Cl 、 NaNO_3 , 均能利用有机氮源(其中酵母汁为优良氮源).

2.4 耐盐性

结果见表 4. 山蚂蝗属植物根瘤菌耐盐能力非常差,除 MXD6 外均不能耐 0.2mol/L 盐浓度,其中 MXD2. MXD 4. MXD 7 和 MXD9 在盐浓度为 0.05mol/L 条件下不能生长.

2.5 pH 对根瘤菌生长的影响

结果见表 5. 所试菌种均不能在 pH4. pH10 条件下生长. 山蚂蝗属植物根瘤菌在 pH6 条件下生长最旺盛,这与代谢产碱相适应,大部分在 pH8 条件下不能生长,表明其抗碱能力极差.而快生型大豆根瘤菌 191-4 在 pH9 条件下生长最旺盛,这与代谢产酸有关.

2.6 抗生素本底抗性 & 结晶紫的抑菌作用

结果见表 6. 根瘤菌对各种抗生素的自然抗性水平是可以作为菌种间存在差异的标记,在细微的识别鉴定上是有用处的. 实验结果表明山蚂蝗属植物根瘤菌对所试抗生素较敏感,其中 MXD2. MXD3. MXD5. MXD7 和 MXD9 对所试抗生素均无抗性. 结晶紫有抑菌作用,对革兰氏阳性菌的抑菌作用尤为明显. 本实验结果表明当结晶紫浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,根瘤菌仍能生长,但据报道在此浓度下,革兰氏阳性菌不能生长^[8].

表 1 代时及酸碱反应(起始 pH7.45)

	菌种								
	MXD1	MXD2	MXD3	MXD4	MXD5	MXD6	MXD7	MXD8	MXD9
代时(小时)	6.9	7.2	6.5	6.6	6.2	6.2	6.8	7.5	7.3
7 天后 pH	7.90	7.85	8.12	8.05	8.2	8.15	8.10	7.75	7.80

表 2 碳源利用(培养 7 天后的的光密度值)

	碳源									
	苹果酸	柠檬酸	蔗糖	乳糖	木糖	山梨醇	甜醇	果糖	半乳糖	甘露醇
MXD1	0	0	0	0.32	0.95	0	0	1.05	1.05	1.75
MXD2	0	0	0	0.37	0.54	0	0	0.84	1.57	2.42
MXD3	0	0	0	0.27	0	0	0	0	1.62	3.12
MXD4	0	0	0	0	2.22	0.22	0	0	1.17	4.12
MXD5	0	0	0	0.21	0	0	0	0.39	0.97	1.54
MXD6	0	0	0	0.47	0	0	0	1.6	2.47	2.42
MXD7	0	0	0	0	0	0	1.38	0	1.88	2.83
MXD8	0	0	0	0.31	1.07	0.32	0	0	1.67	1.37
MXD9	0	0	0	0.32	0	0	0	0	1.33	2.83
CB627	0	0	0	0.31	0.52	0	0	0.70	0.97	1.52
113-2	0	0	0	0.46	0	1.43	0.26	0.70	1.28	1.78
191-4	0	0	3.57	3.07	0	3.37	0	0	1.67	5.20

表 3 氮源利用(培养 7 天后的的光密度值)

	菌种									
	MXD1	MXD2	MXD3	MXD4	MXD5	MXD6	MXD7	MXD8	MXD9	CB627
NH ₄ C1	0	0	1.05	1.08	0	0	0	0	0	0
NaNO ₃	0	0	0	0.55	0	0.43	0	0	0	0
谷氨酸钠	0.70	0.56	0.53	1.10	0.65	1.40	0.70	0.48	0.46	0.57
酵母汁	2.8	0.76	1.5	4.3	0.90	3.10	1.35	1.78	1.10	1.20
蛋白胨	0.94	0.60	0.28	0.85	0.11	1.30	0.55	0.88	0.47	0.95

表 4 耐盐性(培养 7 天后的的光密度值)

	NaCl 浓度(mol/L)				
	正常*	0.05	0.1	0.2	0.3
MXD1	1.50	1.19	0.42	0	0
MXD2	0.88	0	0	0	0
MXD3	0.81	0.23	0	0	0
MXD4	1.50	0	0	0	0
MXD5	1.05	0.94	0	0	0
MXD6	2.18	1.36	1.34	0.80	0
MXD7	1.50	0	0	0	0
MXD8	2.38	0.60	0	0	0
MXD9	2.80	0	0	0	0
CB627	1.50	1.33	0.54	0	0

*表示 YEM 培养基中所含氯化浓度(0.0017mol/L)

表 5 pH 对根瘤菌生长的影响(培养 7 天后的光密度值)

	pH 值						
	4	5	6	7	8	9	10
MXD1	0	0.80	2.75	2.19	1.10	0	0
MXD2	0	0.065	1.40	0.56	0	0	0
MXD3	0	3.60	2.60	0.15	0	0	0
MXD4	0	4.0	5.40	2.40	0	0	0
MXD5	0	0.78	1.55	1.10	0	0	0
MXD6	0	1.15	3.05	2.30	0.22	0	0
MXD7	0	0.95	2.30	2.40	0.92	0	0
MXD8	0	0	0.66	0.63	0	0	0
MXD9	0	3.10	3.55	0.83	0	0	0
CB627	0	0.93	1.62	1.30	0.53	0	0
191-4	0	0	0	1.60	3.60	4.45	0

表 6 抗生素本底抗性及结晶紫的抑菌作用

		菌株									
		MXD1	MXD2	MXD3	MXD4	MXD5	MXD6	MXD7	MXD8	MXD9	CB627
青霉素	50	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
	100	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
	260	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
庆大霉素	7.5	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
	15	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
卡那霉素	5	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	10	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
链霉素	5	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	10	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
结晶紫	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	20	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“+”表示生长;“-”表示无生长

3 讨论

山蚂蝗属植物根瘤菌在 YEM 培养基上产碱、代时在 6 小时以上,属慢生型根瘤菌.这些根瘤菌耐盐能力差、pH 生长范围窄(pH5-8)、对抗生素敏感.

结晶紫是一种有抑菌作用的染料,当其浓度为 10 μ g/mL 时,革兰氏阳性菌不能生长而根瘤菌仍能生长.因此在分离根瘤菌时,除了将根瘤用乙醇和升汞进行表面灭菌外,还可以在 YEM 培养基中加入 10ug/ml 的结晶紫,从而避免分离过程中革兰氏阳性菌的污染.

本工作在做碳源利用、氮源利用、耐盐性及 pH 对生长影响等实验时,采用 YEM 液体培养基培养根瘤菌并通过测定光密度值来表示根瘤菌生长量.作者认为如此做有以下特点:首先实验结果定量化,其次可避免固体培养基中琼脂所含杂质对根瘤菌营养生理实验带来的干扰,从而增加了实验结果的可靠性.

参考文献

- 1 Date R A. In: Vincent J M, Whitney A S and Bose J. Exploiting the Legume-Rhizobium Symbiosis Tropical Agriculture. College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication 145, Department of Agronomy and Soil Science, University of Hawaii. 1977, 293-311
- 2 黄文芳等. 旋扭山绿豆快生型根瘤菌 DI51 菌株的研究. 华南师范大学学报(自然科学版), 1991, (2): 45-50
- 3 曹燕珍等. 快生型根瘤菌的研究 I: 快生型大豆根瘤菌的分离及其生理生化性状. 华中农业大学学报, 1986, 5(2): 149-156
- 4 Trinick M J. In: Brogton W J. Nitrogen Fixation. Volume 2. Rhizobium. Clarendon press. Oxford. 1982, 76-147
- 5 Graham P H and Parker C A. Diagnostic feature in the characterization of the root-nodule bacteria of legume. Plant and Soil. 1964, 20: 383-396
- 6 Elkan G H and Kuyendull L D. In: Brogton W J. Nitrogen Fixation. Volume 2. Rhizobium. Clarendon press. Oxford. 1982, 147-166
- 7 周俊初、曹燕珍. 快生型根瘤菌营养生理的研究. 华中农业大学学报, 1987, (3): 44-57
- 8 武汉大学、复旦大学生物系微生物学教研究编. 微生物学. 北京: 人民教育出版社, 1979, 137-138.

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RHIZOBIA ISOLATED FROM *DESMODIUM SPP.*

Jing yuanxiao Mo Ximu

(Dept. of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631 PRC)

Abstract

Nine Rhizobium strains were isolated from *Desmodium* spp. and identified as slow-growing Rhizobia. They produced alkali in yeast extract mannitol (YEM) medium and the generation time was more than six hours. These Rhizobia could not utilize inorganic nitrogen sources. All Rhizobia had poor tolerance to salt. They were capable of growth at pH values between 5 and 8 and grew well at pH6. Rhizobia of *Desmodium* spp. were sensitive to four antibiotics and MXD2, MXD3, MXD7 and MXD9 were not resistant to any antibiotics. These Rhizobia could grow at 10 $\mu\text{g/ml}$ crystal violet .

Key words : *Desmodium*; Rhizobia ; generation time; yeast extract mannitol medium