

快生型大豆根瘤菌在寄主细胞内的分化及存活性

曹燕珍 艾云灿

(华中农业大学生物固氮研究室,湖北)

摘要 在无菌条件下,用快生型大豆根瘤菌 ZA₁、ZA₁₁ 接种栽培大豆,从根系现瘤初期,中期,直至成熟期,发现由快生型大豆根瘤菌形成的根瘤含菌组织中,菌体形态分化不明显,随着瘤龄增长到一定时期,菌体的直径由 0.5 μ m 增至 0.9 μ m,繁殖率亦随瘤龄的增长而增长。

关键词 快生型大豆根瘤菌;寄主细胞;分化;存活性

本室以前的研究^[1,2]证明,在快生型紫云英、苜蓿、三叶草和苕子根瘤菌的成熟根瘤内的含菌组织细胞中,根瘤菌有两种形态,一种为已分化发育的类菌体,一般呈棒状、T状或Y状,它们不能生长繁殖;另一种为未经分化的杆状菌,与在培养基上生长的形态一样,它们能够生

长繁殖。而在慢生型的大豆根瘤含菌组织中,类菌体形态分化不明显,菌体的形状大小同在培养基上生长的类似,它们绝大多数都是能够生长繁殖的。

近年来才发现^[3-6]的快生型大豆根瘤菌在世代时间和产酸特征上,它们均与其它快生型

根瘤菌(如紫云英、三叶草根瘤菌等)类似,而从互接种族关系上来考察,它们却与慢生型大豆根瘤菌相同。在根瘤含菌组织中,它们的分化及存活性究竟怎样呢?是类似于前者还是后者,或是另有其特征?这是本文研究的目的,利用我室分离的快生型大豆根瘤菌 ZA₁、ZA₁₁^[3]及 USDA₁₉₁ 菌株(作为对照)进行了这项工作。

材料和方法

(一) 材料

1. 供试大豆品种:矮脚早,由中国农科院油料作物所供给。

2. 根瘤菌菌株及来源(表1):

表1 大豆根瘤菌菌株

菌株	特性	来源
ZA ₁	快生型	华农大生物固氮研究室
ZA ₁₁	快生型	华农大生物固氮研究室
USDA ₁₉₁	快生型	北京农业大学
113-2	慢生型	中国农科院油料作物研究所

3. 培养基:

(1) RSY 培养基^[4]

(2) YMb 培养基

(3) 无氮植物营养液^[7]

(4) 等渗溶液 (PDB)^[11]

(二) 方法

本实验采用的方法与文献[1]基本相同。

结果与讨论

(一) 根瘤菌菌株 ZA₁ 和 USDA₁₉₁ 在不同瘤龄时期的形态分化(图1,表2)

图1说明菌株 ZA₁ 和 USDA₁₉₁ 细胞随着瘤龄的增长,细胞宽度明显增加。

从表2可以看出 ZA₁、ZA₁₁、USDA₁₉₁ 所形成的根瘤含菌组织中,菌体细胞都呈杆状,无明显的形态分化,但随着瘤龄的增长,菌体细胞宽度明显增加,在80天瘤龄时,ZA₁ 和 ZA₁₁ 细胞直径达 0.9 μ m,USDA₁₉₁ 直径达 0.8 μ m(改变量 $\Delta x = 0.40\mu$ m)。

(二) 菌株 ZA₁、ZA₁₁ 和慢生型菌株 113-2在液体培养基(YMb)中形态变化的比较

为了深入了解快生型大豆根瘤菌在培养条件下的形态分化,我们以慢生型大豆根瘤菌 113-2 作为对照菌株进行比较试验。分别接种 ZA₁、ZA₁₁、113-2 在 YMb 中,28 $^{\circ}$ C 振荡培养

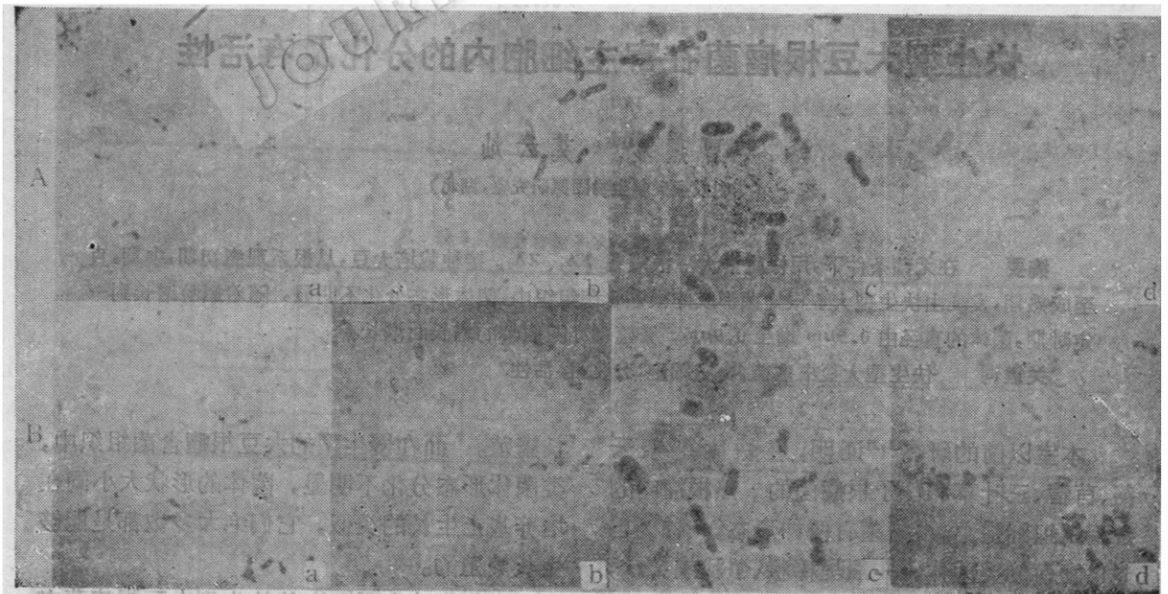


图1 菌株 ZA₁(A) 和菌株 USDA₁₉₁(B) 在不同瘤龄含菌细胞中的形态($\times 1320$)
(a,30天 b,60天 c,80天 d,120天)

表2 ZA₁、ZA₁₁、USDA₁₉₁ 不同瘤龄含菌细胞中的菌体大小*测定

菌株	不同瘤龄(天)根瘤细胞中菌体大小 (μm)					
	15	30	45	60	80	120
ZA ₁	2.0×0.5	1.6×0.7	1.6×0.7	1.6×0.7	1.6×0.9	1.5×0.6
ZA ₁₁	2.0×0.5	1.6×0.7	1.6×0.7	1.6×0.7	1.6×0.9	1.5×0.6
USDA ₁₉₁	2.0×0.4	1.6×0.7	1.6×0.7	1.6×0.7	1.6×0.8	1.5×0.6

表3 菌株 ZA₁、ZA₁₁、113-2 在 Ymb 培养条件下的细胞大小*测定

菌株	不同培养时间内 (h) 细胞的大小 (μm)							
	12	24	48	72	96	120	144	168
ZA ₁	2.2×0.3	1.6×0.4	1.7×0.5	1.7×0.6	1.7×0.7	1.7×0.7	1.6×0.5	1.6×0.5
ZA ₁₁	2.2×0.3	1.7×0.4	1.7×0.5	1.7×0.6	1.7×0.7	1.7×0.7	1.6×0.5	1.6×0.5
113-2	1.2×0.3	1.2×0.3	1.2×0.3	1.2×0.4	1.4×0.4	1.6×0.5	1.5×0.5	1.5×0.5

* 长×宽

7天,从培养12小时起,定时测定细胞大小(表3)。

表3可以看出,快生型大豆根瘤菌菌株 ZA₁、ZA₁₁ 与慢生型大豆根瘤菌菌株 113-2 的菌体大小有明显的区别,在12—120小时内, ZA₁ 和 ZA₁₁ 菌体的长度由 2.2 μm 逐渐变为 1.7 μm,而菌体宽度则由 0.3 μm 增至 0.7 μm (增加 0.4 μm)。113-2 菌体的长度由 1.2 μm 增至 1.6 μm,而菌体宽度则由 0.3 μm 增至 0.5 μm (仅增加 0.2 μm)。

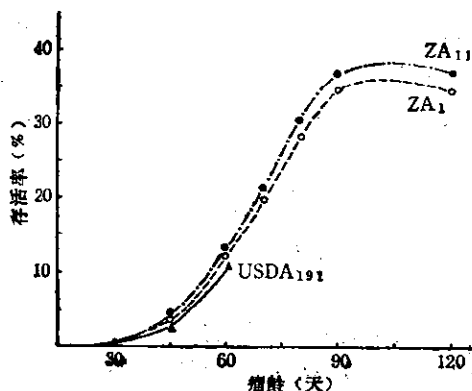


图2. 快生型大豆根瘤菌 ZA₁、ZA₁₁、USDA₁₉₁ 在不同瘤龄时的含菌原生质体中的存活率

表4 快生型大豆根瘤菌在不同瘤龄时含菌原生质体中活菌数百分率

瘤龄(天)	接种菌株在每个原生质体中活菌数百分率*		
	ZA ₁	ZA ₁₁	USDA ₁₉₁
15	0	0	0
20	0.001	0.001	0.001
25	0.007	0.005	0.010
30	0.10	0.10	0.09
35	0.1	0.1	0.1
40	2.4	2.5	2.1
45	2.8	3.1	2.7
50	9.1	8.8	9.1
60	12.0	12.9	11.9
70	15.1	13.2	—
80	24.8	24.9	—
90	34.1	36.1	—
120	34.0	36.4	—

* 为原生质体(每次取30—40个)直接测数的平均数和平板测数平均数的百分率^[4]

(三) 菌株 ZA₁、ZA₁₁ 及 USDA₁₉₁ 在不同瘤龄含菌细胞中的存活率

以菌株 USDA₁₉₁ 作为对照,比较研究了菌株 ZA₁ 和 ZA₁₁ 在根瘤含菌细胞中的存活率。

这三个菌株分别接种无菌砂培大豆(矮脚早)。从瘤龄 15 至 120 天内,定期取样,进行了存活率的测定(表 4, 图 2)。

表 4 和图 2 说明,含菌原生质体中细菌的存活率随瘤龄的增长而增长,可以分为三个阶段:即 15—35 天,这一瘤龄期内的存活率低于 0.1%; 35—90 天瘤龄期内的存活率明显上升,从 0.1% 逐渐达到 36%; 90—120 天瘤龄期内的存活率,处于较高水平的稳定期,当根瘤衰败时,则存活率出现下降的趋势。为了确切地获得这一实验结果的规律性,我们在同样条件下,重复了两次实验,获得了相一致的结果。

(四) 不同瘤龄根瘤原生质体中的活菌数与根瘤乙炔还原活性的相关性

随着大豆植物的生长,我们发现大豆根瘤不同瘤龄的单个原生质体中的活菌数和乙炔还原活性与植物生长的盛衰呈一定的相关性。

1. 不同瘤龄的根瘤乙炔还原活性: ZA_1 、 ZA_{11} 和 $USDA_{11}$ 不同瘤龄的根瘤乙炔还原活性(表 5)。

表 5 不同瘤龄期的根瘤乙炔还原活性

菌株	乙炔还原活性 (n mol C_2H_4 /g/h)				
	瘤龄(天)				
	15	30	66	90	120
ZA_1	1924.6	6949.9	9852.2	2258.8	36.1
ZA_{11}	2179.2	7589.8	7491.5	1186.1	47.1
$USDA_{11}$	1581.6	7014.8	8681.8	—	—

表 5 说明,在 15—66 天瘤龄期时,随着瘤龄的增加,根瘤乙炔还原活性亦随之增长; 66 天瘤龄以后,乙炔还原活性逐渐减弱,如 ZA_1 在 66 天瘤龄时的乙炔还原活性为 9852.2 n mol C_2H_4 /g/h 达最高峰,至 120 天瘤龄时,则乙炔还原活性降低到 36.1 n mol C_2H_4 /g/h。

2. 菌株 ZA_1 形成的根瘤乙炔还原活性与根瘤细胞原生质体中活菌数的相关性。

从图 3 可见,在 15—66 天瘤龄期时,细菌

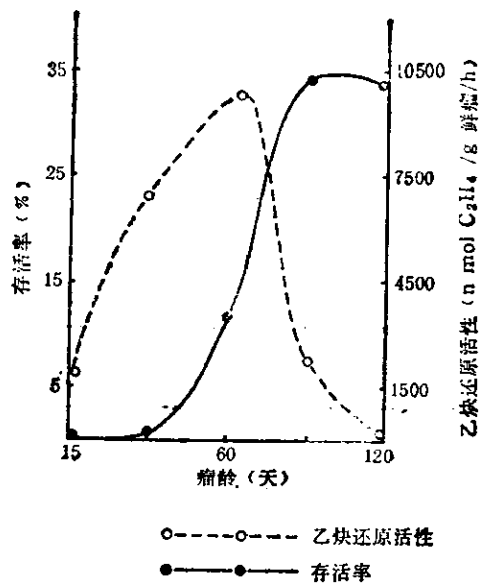


图 3 菌株 ZA_1 在不同瘤龄的原生质体中的存活率与根瘤乙炔还原活性的相关性

的存活率与乙炔还原活性成正相关。此时正是大豆生长的旺盛时期,大豆-根瘤菌共生体旺盛固氮。植物为根瘤菌提供了丰富的营养,而根瘤菌大量繁殖,固定空气中的氮气,为植物提供氮素养料,两者相互促进,表现为明显的活菌数与乙炔还原活性的正相关性。当大豆盛花期(60 天左右)以后,由于共生体系能量分配和生理的变化,根瘤菌逐渐停止合成固氮酶,原有固氮酶也逐渐耗损,因而乙炔还原活性急剧下降,但根瘤菌的存活率并不随之下落。这一现象同以紫云英根瘤作材料所获得的结果有某些类似之处^[1]。在其它的根瘤菌研究中,也曾发现,植物发育后期,根瘤鲜重和类菌体量同乙炔还原活性不呈正相关^[2]。其原因还有待深入研究。

小 结

我们的试验结果证实,快生型大豆根瘤菌在寄主细胞内的分化及存活性的规律与我室过去^[1]研究慢生型大豆根瘤菌在寄主细胞内的分化及存活性的规律是一致的。

快生型大豆根瘤菌的生长速度和许多生理生化性状^[3,5,6,8]与其它快生型根瘤菌(如紫云英、三叶草、苜蓿、苕子等)具有共同特性;可是,它

们在各自相应的寄主细胞内,其形态分化及存活性的规律却又迥然不同。同是快生型根瘤菌,为何存在着这么大的差异?虽然,目前尚无资料足以阐明这一问题的实质,可以设想这种差异是受寄主因子所制约的。

参 考 文 献

- [1] 曹燕珍等: 中国科学(B辑), 3: 237—243, 1984。
[2] Zhou jun chu: *Planta*, 163: 473—482, 1985。
[3] 曹燕珍等: 华中农业大学学报, 5(2): 149—156,

1986。

- [4] Keyser, H.H. et al.: *Science*, 215:1631—1632, 1982。
[5] Yelton, M.M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 129: 1537—1547, 1983。
[6] Stowers, M. D. and A.R. T. Eaglesham: *Plant and Soil*, 77:3—14, 1984。
[7] 陈华癸主编: 微生物学实验, 农业出版社, 119—122, 1962。
[8] 徐玲玫等: 大豆科学, 3: 102—108, 1984。
[9] Sen, D. and Weaver, R. W.: *Pl. Sci. Lett.* 18: 315—318, 1980。