

## 研究报告

## 相思树种根瘤菌的生物学特性\*

吕成群<sup>1,2</sup> 黄宝灵<sup>2</sup> 韦原莲<sup>2</sup> 武波<sup>3</sup> 叶建仁<sup>1</sup>(南京林业大学森林资源与环境学院 南京 210037)<sup>1</sup> (广西大学林学院 南宁 530001)<sup>2</sup>(广西大学生物技术实验中心 南宁 530004)<sup>3</sup>

**摘要:** 对相思树种根瘤菌的生物学特性进行了较为系统的研究, 结果表明: 从广西不同地点的相思树种分离、纯化的 15 株根瘤菌均具有典型的根瘤菌的个体形态和菌落特征, 生理生化指标接近, 与厚荚相思幼苗共生结瘤, 可分为快生菌和慢生菌, 多数相思树种根瘤菌能利用无机氮, 除黑木 1 号不能利用乳糖外, 其余菌株均能利用供试的 5 种单糖和 3 种双糖作为碳源, BTB 反应除杂交 1 号、台湾 1 号和直干 4 号菌株产碱外, 其余菌株均产酸。

**关键词:** 相思树种, 根瘤菌, 生物学特性

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0001-05

# BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE INDIGENOUS RHIZOBIA ISOLATED FROM GACACIAG SPP. IN GUANGXI

LÜ Cheng-Qun<sup>1,2</sup> HUANG Bao-Ling<sup>2</sup> WEI Yuan-Lian<sup>2</sup> WU Bo<sup>2</sup> YE Jian-Ren<sup>1</sup>(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037)<sup>1</sup>(Forestry College, Guangxi University, Nanning 530001)<sup>2</sup>(Biotechnology Research Center, Guangxi University, Nanning 530004)<sup>3</sup>

**Abstract:** The paper is about the systematic studies of biological characteristics of indigenous rhizobia isolated from *Acacia* spp. The results showed that there were typical characteristics of rhizobia in 15 stains rhizobia isolated and purified from *Acacia* spp. in Guangxi province. Their physiological and biochemical characteristics were similar. The nodules could appeared in *Acacia crassiorpa* seedlings inoculated with these rhizobia. Among these rhizobia there were fast-growers and slow-growers rhizobia. Most of them could utilized inorganic nitrogen sources. Both five monosaccharides and three disaccharides could be utilized as carbon sources except Heima 1 could not utilized lactose. Most of rhizobia produced acid except Zajiao 1, Taiwan 1 and Zhigan 4 stains produced alkali in BTB reaction.

**Key words:** *Acacia* spp., Rhizobia, Biological characteristics

我国栽培的相思 (*Acacia* spp.) 树种, 除台湾相思原产我国台湾外, 其余均从国外引种。由于相思树种生长快, 耐瘠薄, 有根瘤, 具固氮作用, 可改良土壤, 木材用途广, 在我国热带、南亚热带地区越来越受到重视<sup>[1]</sup>。近年来, 经良种选育, 相思树种已逐渐发展成为华南地区短周期工业用材林的当家树种之一。而集约经营的短周期工业用材林对土壤的持续生产力影响极大, 如何利用生物固氮, 促进相思林木生长, 保持和改良林地土壤肥力成为当前生产中急待解决的问题。因引种时间短, 相思树种与广西新引种区土壤中土著根瘤菌的共生特性、相思树种根瘤菌的生物学特性的研究至

\* 广西“十五”林业科技研究项目 (No. 林科学 2002-19)

收稿日期: 2002-08-26, 修回日期: 2002-12-20

今尚无报道。因此,作者在不同立地条件下,从6种相思林分中采集和分离到25株根瘤菌株,并根据其生长性状,筛选出有代表性的15株菌株,在相同条件下研究其生物学特性,为相思树种根瘤菌的生产应用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 根瘤菌的采集、分离和纯化

从广西的6种相思林分中,按上、中、下坡采集新鲜、饱满的根瘤,自来水冲洗干净,在无菌条件下,用75%的乙醇溶液浸泡1 min,无菌水冲洗4次后,用0.1%酸性氯化汞溶液浸泡5 min,无菌水冲洗6次,然后置于灭菌的研钵中,用无菌玻棒将瘤压碎,取汁液至加有刚果红的YMA培养基<sup>[2]</sup>平板上划线,28℃恒温培养至菌落出现后,再进行1~2次稀释,挑取典型菌落纯化及鉴定,所得菌株及宿主植物见表1。

表1 菌株及宿主植物一览表

菌株	宿主植物	采集地点及坡位
马占1号	马占相思 ( <i>Acacia mangium</i> )	三塘、下坡
马占2号	马占相思 ( <i>A. mangium</i> )	三塘、下坡
马占3号	马占相思 ( <i>A. mangium</i> )	三塘、下坡
马占4号	马占相思 ( <i>A. mangium</i> )	三塘、下坡
马占5号	马占相思 ( <i>A. mangium</i> )	芭蕉弄、上坡
马占6号	马占相思 ( <i>A. mangium</i> )	芭蕉弄、上坡
厚荚1号	厚荚相思 ( <i>A. crassocarp</i> )	芭蕉弄、中坡
厚荚2号	厚荚相思 ( <i>A. crassocarp</i> )	芭蕉弄、中坡
厚荚3号	厚荚相思 ( <i>A. crassocarp</i> )	芭蕉弄、中坡
厚荚4号	厚荚相思 ( <i>A. crassocarp</i> )	芭蕉弄、下坡
厚荚5号	厚荚相思 ( <i>A. crassocarp</i> )	芭蕉弄、下坡
厚荚6号	厚荚相思 ( <i>A. crassocarp</i> )	芭蕉弄、下坡
厚荚7号	厚荚相思 ( <i>A. crassocarp</i> )	芭蕉弄、下坡
厚荚8号	厚荚相思 ( <i>A. crassocarp</i> )	芭蕉弄、上坡
厚荚9号	厚荚相思 ( <i>A. crassocarp</i> )	芭蕉弄、上坡
杂交1号	杂交相思 ( <i>A. mangium</i> × <i>A. auriculiformis</i> )	三塘、中坡
杂交2号	杂交相思 ( <i>A. mangium</i> × <i>A. auriculiformis</i> )	三塘、中坡
台湾1号	台湾相思 ( <i>A. confusa</i> )	林科院、路旁
黑木1号	黑木相思 ( <i>A. melanoxylon</i> )	三塘、中坡
直干1号	直干型大叶相思 ( <i>Straight-stem A. auriculiformis</i> )	三塘、中坡
直干2号	直干型大叶相思 ( <i>Straight-stem A. auriculiformis</i> )	三塘、中坡
直干3号	直干型大叶相思 ( <i>Straight-stem A. auriculiformis</i> )	三塘、中坡
直干4号	直干型大叶相思 ( <i>Straight-stem A. auriculiformis</i> )	三塘、中坡
直干5号	直干型大叶相思 ( <i>Straight-stem A. auriculiformis</i> )	三塘、中坡
直干6号	直干型大叶相思 ( <i>Straight-stem A. auriculiformis</i> )	三塘、中坡

### 1.2 结瘤实验

将厚荚相思种子浸泡于85℃的热水中,并让其自然冷却,吸胀后,随机取吸胀的种子分别用75%乙醇溶液和0.1%酸性氯化汞溶液进行表面消毒,在无菌培养皿中28℃催芽,待根长至1cm时,按照试管封闭式接种法<sup>[2]</sup>接种,每菌株接种20株苗木,定期观察结瘤情况,90 d后收集根瘤,用乙炔还原法<sup>[2]</sup>测定各菌株的固氮酶活性;设不接种的苗木为对照。

1.3 代时测定

参照曹燕珍<sup>[3]</sup>的方法, 接种根瘤菌到装有 YEM 液体培养基的三角瓶内, 28℃摇床培养 10 h 后, 每隔 2 h 用 721 型分光光度计测定光密度值, 以培养时间为横坐标, 光密度值为纵坐标绘制生长曲线, 以光密度值倍增的时间为菌株世代时。

1.4 生理生化实验

3-酮基乳糖反应, 牛肉膏蛋白胨实验, 石蕊牛奶反应, 利用碳源实验, 利用氮源实验, 明胶水解实验, 淀粉水解实验, 柠檬酸盐生长实验按常规方法<sup>[4]</sup>; B.T.B 反应参照黄维南等方法<sup>[5]</sup>, 在 1,000 mL YMA 培养液中加入 0.5% 溴麝香草酚蓝溶液 5mL, 接种一周后观察结果, 以不接种为对照。

以上实验均设空白对照, 3 次重复, 部分实验 8 次重复, 无菌操作。

2 结果与分析

2.1 共生特性

将 15 株菌株接种到厚荚相思幼苗后, 结果 (表 2) 表明, 供试菌株均能与厚荚相思有效结瘤, 说明相思植物根瘤菌的共生专一性不是很强, 但从结瘤率及结瘤速度情况看出, 不同菌株的共生特性及固氮酶活性有明显的差异, 其中, 结瘤率最大者 (厚荚 5 号) 比最低者 (台湾 1 号) 大 5.8 倍, 固氮酶活性最高者 (直干 3 号) 比最低者 (厚荚 8 号) 大 83.9 倍。

2.2 生长特性

分离得到的菌株在 YMA 平板上生长, 菌落圆形, 乳白色或半透明, 边缘整齐, 表面凸起, 具光泽。在分离培养过程中, 发现各菌株之间的生长速度存在很大的差异, 部分菌株在 2 d 内能形成良好的典型菌落, 而一些菌株则需要 6~7 d 或更长时间才能形成。按其生长速度可将根瘤菌分为快生菌和慢生菌, 快生根瘤菌平均代时为 2~4 h, 从根瘤分离时, 3~4 d 可在平板上看到单个菌落; 慢生根瘤菌平均代时为 6~8 h, 从根瘤分离时, 7~10 d 才能在平板上看到单个菌落<sup>[6]</sup>。结合生长代时测定, 证实相思根瘤菌确实存在快生菌和慢生菌两种类型, 其中台湾 1 号和直干 4 号为慢生菌, 其余为快生菌。各菌株生长特性见表 3。

表 2 相思树种根瘤菌的共生特性

菌株	结瘤速度				根瘤 颜色	固氮酶 活性
	20 d		90 d			
	单株瘤数	结瘤率	单株瘤数	结瘤率		
马占3号	1.0	5.0	1.4	55.56	红色	1350
马占5号	1.0	5.0	1.8	77.78	红色	1920
马占6号	0	0	1.7	58.82	红色	5400
厚荚1号	0	0	1.8	72.73	红色	150
厚荚5号	1.8	27.8	2.7	82.38	红色	272
厚荚6号	0	0	1.7	58.33	红色	1140
厚荚8号	0	0	2.3	40.00	白色	109
杂交1号	2.5	42.1	2.5	80.00	红色	4740
杂交2号	1.5	25.0	2.8	66.67	红色	2950
台湾1号	0	0	2.5	14.29	红色	1310
黑木1号	0	0	2.1	53.85	红色	1170
直干1号	1.0	5.0	2.0	61.54	红色	843
直干2号	1.0	6.0	1.0	25.00	红色	441
直干3号	0	0	1.0	17.65	红色	9142
直干4号	1.0	11.1	1.9	64.71	红色	1700

固氮酶活性单位: nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg<sup>-1</sup>瘤重·h<sup>-1</sup>

表 3 相思树种根瘤菌的生长特性

菌株	代时	菌落形成 (d)
马占 3 号	3.0	2~3
马占 5 号	4.1	3~4
马占 6 号	5.1	4~5
厚荚 1 号	2.0	2
厚荚 5 号	3.9	2~3
厚荚 6 号	2.1	2
厚荚 8 号	2.7	2
杂交 1 号	4.0	4~5
杂交 2 号	4.5	4~5
台湾 1 号	6.6	6~7
黑木 1 号	3.5	3~4
直干 1 号	2.5	3
直干 2 号	6.4	4~5
直干 3 号	3.3	3~4
直干 4 号	6.6	6~7

2.3 生理生化特性

各菌株的生理生化特性见表 4。从表 4 可知, 所有供试菌株的 3-酮基乳糖反应, 明胶液化, 淀粉水解和牛肉膏蛋白胨生长均呈阴性, 说明相思树种根瘤菌细胞内缺少利用上述各种物质的酶。此试验结果与黄维南<sup>[5]</sup>、关桂兰<sup>[7]</sup>、丁彦怀<sup>[8]</sup>的一致。而所有供试菌株的柠檬酸盐利用均呈阳性, 这与黄维南<sup>[5]</sup>、关桂兰<sup>[7]</sup>和李洪泉<sup>[9]</sup>的结果相一致, 表明相思树种根瘤菌具有利用柠檬酸盐的能力。在 BTB 试验, 杂交 1 号、台湾 1 号和直干 4 号等 3 个菌株产碱, 其余均产酸。在石蕊牛奶反应中, 仅厚荚 6 号和直干 3 号产酸, 其余均产碱。

周俊初<sup>[10]</sup>报道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。而靖元孝<sup>[11]</sup>的试验认为, 山蚂蝗属 (*Desmodium*) 植物根瘤

菌大多数不能利用无机氮源  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{NaNO}_3$ 。在本试验中, 相思树种根瘤菌均能利用  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 而对  $\text{KNO}_3$  的利用却反应不一, 这说明同为相思树种根瘤菌, 但在生理特征上仍有差异 (表 4)。

表 4 相思树种根瘤菌的部分生理生化特性

菌株	3-酮基乳糖	淀粉水解	柠檬酸盐利用	BTB 反应	牛肉膏蛋白胨	石蕊牛奶反应	刚果红吸色	明胶水解	铵盐利用	硝酸盐利用
马占 3 号	-	-	+	产酸	-	产碱具血清环	-	-	+-	+-
马占 5 号	-	-	+	产酸	-	产碱具血清环	-	-	+	+-
马占 6 号	-	-	+	产酸	-	产碱具血清环	-	-	+	-
厚荚 1 号	-	-	+	产酸	-	产碱具血清环	-	-	+	+
厚荚 5 号	-	-	+	产酸	-	产碱具血清环	-	-	+	+
厚荚 6 号	-	-	+	产酸	-	产酸具血清环	-	-	+	+
厚荚 8 号	-	-	+	产酸	-	产碱具血清环	-	-	+	+-
杂交 1 号	-	-	+	产碱	-	产碱不具血清环	-	-	+	+
杂交 2 号	-	-	+	产酸	-	产碱不具血清环	-	-	+	-
台湾 1 号	-	-	+	产碱	-	产碱不具血清环	-	-	+	-
黑木 1 号	-	-	+	产酸	-	产碱具血清环	-	-	+	-
直干 1 号	-	-	+	产酸	-	产碱具血清环	-	-	+-	+-
直干 2 号	-	-	+	产酸	-	产碱具血清环	-	-	+	+-
直干 3 号	-	-	+	产酸	-	产酸具血清环	-	-	+	+
直干 4 号	-	-	+	产碱	-	产碱具血清环	-	-	+-	+-

Graham<sup>[12]</sup>认为快生根瘤菌利用碳源范围比慢生菌广, Elkan<sup>[13]</sup>等进一步报道快生根瘤菌能利用蔗糖、麦芽糖、乳糖等双糖, 而慢生根瘤菌利用碳源范围较窄, 一般不能利用蔗糖、麦芽糖、乳糖等双糖。我们的结果中 (表 5), 除黑木 1 号不能利用乳糖外, 其余菌株均能利用供试的 5 种单糖和 3 种双糖。

### 3 结论

表 5 相思树种根瘤菌的碳源利用情况

菌株	葡萄糖	甘露醇	果糖	木糖	半乳糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖
马占 3 号	+	+-	+	+	+	+	+	++
马占 5 号	++	+	++	+	++	+	+-	+
马占 6 号	++	+	++	+	+	+	+-	+
厚荚 1 号	++	+-	+++	++	++	+++	+++	+++
厚荚 5 号	+	+-	++	+	+	+	++	+
厚荚 6 号	+++	+	++	++	+-	++	++	+
厚荚 8 号	+-	+-	++	+	+	++	++	++
杂交 1 号	+++	+	++	++	+	+	++	+
杂交 2 号	+	++	++	+	+	++	+	++
台湾 1 号	++	+	+	+	++	+	+-	+
黑木 1 号	+	++	++	+	++	+	-	+
直干 1 号	++	++	+	+	+	+	+	++
直干 2 号	++	++	++	+	+	+	+	+
直干 3 号	+++	+++	++	+	++	+-	+	+
直干 4 号	++	++	++	+	++	+	+-	+

+++ 生长良好, ++ 生长较好, + 生长一般, +- 生长差, - 不生长

供试的菌株均具有典型的根瘤菌的个体形态和菌落特征, 生理生化指标接近, 接种厚荚相思幼苗均能结瘤, 因而证明 15 个菌株均为来自相思树种的根瘤菌。从测定的各项结果表明, 15 个菌株均有差异, 因此, 可以认定所分离的 15 个菌株为不同的相思树种根瘤菌菌株。

从广西不同地点分离、纯化的 15 株相思树种根瘤菌, 经代时和在平板上菌落形成天数的测定, 可以分为快生菌和慢生菌两种类型, 此属首次报道。其中台湾 1 号、直干 4 号为慢生菌, 其余为快生菌。

15 株相思树种根瘤菌均能利用磷酸氢二铵, 除杂交 2 号、台湾 1 号、黑木 1 号外, 其余菌株均能利用硝酸钾, 表明多数相思树种根瘤菌能利用这两种无机氮。

本试验结果, 除黑木 1 号不能利用乳糖外, 其余菌株均能利用供试的 5 种单糖和 3 种双糖。表明相思树种慢生根瘤菌, 也能利用供试的 8 种糖作为碳源。

经 BTB 实验, 慢生菌台湾 1 号、直干 4 号产碱, 大部分快生菌产酸, 仅杂交 1 号例外产碱, 究其原因尚待研究。在石蕊牛奶反应中, 慢生菌均产碱, 快生菌除厚荚 6 号、直干 3 号产酸, 其余也均产碱, 这与丁彦怀<sup>[8]</sup>报道的苜蓿快生根瘤菌和李洪泉<sup>[9]</sup>报道的头序甘草快生根瘤菌在石蕊牛奶反应产碱的结果一致。

从本结果看, 广西有丰富的相思树种根瘤菌, 这为广西既具有热带亚热带的酸性土壤又有盐碱的海涂提供了开发利用的根瘤菌资源。

### 参考文献

- [1] 洪菊生主编. 澳大利亚桉叶树研究. 北京: 林业出版社, 1993. 157 ~ 234.
- [2] 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 239 ~ 246.
- [3] 曹燕珍, 胡正嘉, 黄诚金, 等. 华中农业大学学报, 1986, 5 (2): 149 ~ 156.
- [4] 中国科学院微生物研究所. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978. 135 ~ 194.
- [5] 黄维南, 蓝谷, 黄绳全, 等. 亚热带植物通讯, 1997, 26 (2): 12 ~ 17.
- [6] 尤崇杓主编. 生物固氮. 北京: 科学出版社, 1987. 184 ~ 213.
- [7] 关桂兰, 郭沛新, 王卫卫, 等. 微生物学报, 1992, 32 (5): 346 ~ 352.
- [8] 丁彦怀, 石男民, 马麟祥. 辽宁大学学报 (自然科学版), 1994, 21 (1): 85 ~ 90.
- [9] 李洪泉, 程玉鹏, 王继华, 等. 黑龙江大学自然科学学报, 2001, 18 (3): 111 ~ 116.
- [10] 周俊初, 曹燕珍. 华中农业大学学报, 1987, (3): 44 ~ 57.
- [11] 靖元孝, 莫照穆. 华南师范大学学报 (自然科学版), 1994, (4): 25 ~ 31.
- [12] Graham P H, Parker C A. Plant and Soil, 1964, 20: 383 ~ 396
- [13] Elkan G H, Kuyencull L D. In: Broughton W J. Nitrogen Fixation. Volume 2. Rhizobium. Clarendon press. Oxford, 1982. 147 ~ 166