

豆类-根瘤菌的共生 关系及其农业利用

陈 华 癸 編

上海市科学技术編译館

前 言

豆类和根瘤菌的共生固氮作用是自然界元素的生物循环的一个重要环节,而且对培肥土壤,提高农业生产也很重要。

豆类在农业上的利用(包括农业和畜牧业)是多方面的。例如:在耕作轮作制度中的豆类绿肥和豆类作物前茬的肥田作用、混播牧草中豆类的增产和放牧价值、豆类作物籽实和饲料中的高蛋白、高营养质量等等,这些都是以豆类共生固氮性能力为基础的。

关于豆类和根瘤菌共生关系的研究,不论在理论上或生产实践上,都取得了良好的结果,并已应用于实际生产中。

然而,关于这个课题不论是在科学理论或生产技术方面,都还有许多根本性的和关键性的问题没有得到解决。因此,关于豆类和根瘤菌的共生关系的研究仍是农业微生物学的一项重要课题。为了结合我国农业微生物学的研究,我们编译了本辑译丛。

本辑选译的文献都发表于1947~1962年。其中,有两篇是属于全面评价性质的(Allen和Allen 1958; Raggio和Raggio 1962),其它几篇则各自侧重于不同的问题和方面。

限于水平,谬误之处在所难免,祈读者多加指正。

陈华癸

目 录

1. 共生固氮作用的生物学	1
2. 豆科植物結瘤情况的調查	68
3. 豆科植物和根瘤菌的共生关系	77
4. 根瘤菌和豆科植物的共生关系以及細菌菌株对共生 关系的影响	97
5. 豆科植物在根瘤共生作用中的影响 寄主的决定因素和功能的比較研究	102
6. 根瘤菌固氮作用的生物学和化学	132
7. 影响豆科植物摄氮的若干因素	155
8. 根瘤菌的存活情况	169
9. 根瘤	181

共生固氮作用的生物学

Allen, E. K. Allen, O. N.

《Encyclopedia of Plant Physiology》8:48~118, 1958

根瘤菌和豆科植物

对于根瘤菌和豆科植物共生这一课题的研究,正如固氮作用在生产实践上所反映的,已有广泛的、全面的发展。关于这个课题有两部权威性的专著(Fred, Baldwin 和 McCoy 1932, Wilson 1940)。近年来还有许多专题评论(Allen 和 Allen 1950、1954, Allen 和 Baldwin 1955, Thornton 1954, Vincent 1954a, Virtanen 1947, Wilson 和 Burris 1947)。本文的第一部分讨论根瘤菌与豆科植物复合体的三个方面:1)作为共生微生物的根瘤菌;2)根瘤的形态发生学;3)共生关系在生产实际方面的作用。第二部分讨论双子叶植物中非豆科植物的根瘤形成和功能。

作为共生微生物的根瘤菌

根瘤菌是微生物界中十分特殊的一类,其特点可概括如下:1)在各种土壤中都有处于自由生活状态的根瘤菌,但是就地(从土壤中)探测的方法并不完善。2)在实验室中培养根瘤菌并不困难,它们在人工培养基上的生长和反应并无什么特异性,这些细菌的染色反应也无明显特点。3)尽管根瘤菌对培养的反应和生化反应是比较一致的,但按其生长速度和生长量可分为两大群,即“快生长型”和“慢生长型”。4)每一个根瘤菌菌株具有感染豆科植物单一族内的不同寄主的能力,关于它们和非豆科植物结合的报道(Bottomley 1915, Meluckie 1923, Phillips 1932, Sabet 1946)则未能证实(Bouwens 1943, Quispel 1954a, Schaede 1939b)。5)缺少事实证明这些微生物在无适宜的寄主植物的条件下,能在土壤或在纯培养或混合培养中直接或间接参与固氮作用(Clark 1936, P. W. Wilson 1937, Wilson 和 Burris 1947)。6)根瘤菌和通常的感染性微生物(病原菌)的习性不同,它不象植物病原菌那样危害寄主,反而能产生有益的共生关系。7)不论是何种寄主植物或何种根瘤菌菌株,在

豆科植物根上形成的根瘤,其特殊的組織格局几乎是相同的。8)已公认这些生物在农业生产中有其重要作用,因此进行大量培养并作为商品出售(Erdman 1948, Leonard 1944)。

在分类学上的地位

根瘤菌的分类学历史是复杂的(Fred、Baldwin 和 McCoy 1932)。它的进化渊源至今仍未清楚。

在 1888 年以前,研究者认为引起豆科植物产生根瘤的微生物是和当时被认为引起非豆科植物肿瘤的一些病原真菌类似。自从 Beijerinck(1888)証明了根瘤是由真細菌(当时命名为[Bacillus radicicola])引起的以后,这类微生物會有各种各样的科学名称(Breed 等 1948)。

目前,这类細菌組成根瘤菌属(*Rhizobium*) (科名: 根瘤菌科 [Rhizobiaceae])。这个科还包括另外两个属,即农杆菌属(*Agrobacterium*)和色杆菌属(*Chromobacterium*)。农杆菌属包含一些植物病原菌,如: 根瘤病农杆菌(*A. tumefaciens*), 发根病农杆菌(*A. rhizogenes*), 一些为害浆果的病原菌黑莓农杆菌(*A. rubi*)和一种腐生細菌即放射农杆菌(*A. radiobacter*)。最后一种菌常在根瘤上作为污染菌出現,虽然没有感染力和固氮能力,但在許多培养性状和生化反应上均和根瘤菌类似;在其他特征方面,这种細菌又和同属的致病种类相似。Bonnier(1953)鉴于根瘤菌属和农杆菌属的一些菌株在形态学上、生物化学上和免疫学上的共同性,建議把两属归并为一属。但从 Allen 和 Allen(1950、1954)所归納的两个属的主要区别来看,这个建議似乎不妥。本科的第三属色杆菌属包括土壤中自由生活的、产生紫色素的种类。后者和前两属的关系是不大的。

根瘤菌属中現在已經被承认的只有 6 个种,即: 苜蓿根瘤菌(*R. meliloti*)、三叶草根瘤菌(*R. trifolii*)、豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)、菜豆根瘤菌(*R. phaseoli*)、大豆根瘤菌(*R. japonicum*)和羽扇豆根瘤菌(*R. lupini*)。属于不同种的菌株可以相互感染一定的豆科植物群。这些年来这些細菌-植物群通称为互接种族(crossinoculation groups)。对于另外 16 个互接种族(Fred、Baldwin 和 McCoy 1932)的根瘤菌尙未有种名。实际上,大豆、羽扇豆和异质性的豇豆族的植物群的根瘤菌的易感的亲緣关系,动搖了大豆根瘤菌和羽扇豆根瘤菌的分类学地位。因此,目前根瘤菌属中只有 4 个种的分类学地位是比较落实的。

形态上,根瘤菌是呈革兰氏負反应的好气性有机营养的杆菌,寬 0.5~0.9

微米,长1.2~3.0微米。鞭毛的位置和数目虽有不同,但通常都能游动(Conn和Elrod 1947, Pietschmann 1942)。关于根瘤菌的形态有两个方面曾引起研究者的特别重视: 1)老杆菌的环带状或液泡状的内部构造和 2)在特定的培养条件下的X状、Y状、星状或棒槌状的多形态体。后者通常称为类菌体。

这些年来,人们曾集中较大精力研究根瘤菌的生活史。由于证明了根瘤菌细胞质中的稳定态的脂肪体靠染色性质的差异会产生环带状形态, Lewis (1938)否定了关于这种环带状形态能证明由孢子、胚子和类似形体构成的复杂生活史的各种见解。他认为有些研究者将细胞自溶后放出来的脂肪体误认为孢子或孢子了。最近, Bisset 和 Hale (1951)在这个问题上又翻了案,他们认为环带状杆菌是孢子囊,孢子囊放出微小的游动细胞,游动细胞通过接合作用而完成了生活史。Bisset (1952)还有个特别的见解,认为有些(不是所有的)根瘤菌菌株产生耐高温的孢子。在这个前提下,同时也由于有些菌株有革兰氏正反应的趋向,因此,他认为根瘤菌是芽孢杆菌科(Bacillaceae)中高度特化的成员,紧靠着多粘杆菌(*Bacillus polymyxa*)群。

在某些人工培养基中,以及在多种植物的根瘤内会出现根瘤菌的多形态体(类菌体)。这些细胞呈革兰氏染色负反应,无鞭毛。可能是 Hiltner (1898)首先将它们认为孢子囊,并提出这种微生物代表真细菌和真菌的过渡型的见解。绝大多数的现代研究者都认为它们是不能繁殖的、无活性的、或退化的类型(Almon 1933)。

由于它们的分枝状和棒槌状形态, Jacobs 在 1949 年建议将根瘤菌归属于棒状杆菌属(*Corynebacterium*)。Jensen (1952)似乎也认为根瘤菌属可能起源于游动植物病原性的棒状杆菌。

最近, Stapp 和 Knösel (1954)根据 Feulgen 染色法和电子显微镜检查加以推论,认为至少有些类菌体的结构是有性繁殖的,其间3、4个杆菌聚集成星状形态,它们的细胞核在星的中心融聚,此后,单个细胞分裂成短杆菌。他们还证明在根癌病农杆菌和放射农杆菌中也有同样现象,从而加强了根瘤菌属和农杆菌属在分类学上的亲缘关系的论据。

细 胞 学

在富于糖类物质的洋菜培养基上,根瘤菌产生粘液状鞘膜,用 Barlow 氏染色法很易显示。培养了 24~48 小时的幼年细胞能以革兰氏对照染色法均匀染色。在较老的培养体中和在根瘤涂片中,细胞质内通常有 2~3 个,也常常有 5~8 个折光性强的颗粒体,从而使细胞呈液泡状; Lewis (1938)提出了这

些顆粒是新生的脂肪性內含物。沒有糖原和酵母核朊。這些內含物不能用染色物質的專門染料着色，可能會被誤認為細胞核。Milovidov (1935) 首先應用 Feulgen 試驗研究根瘤菌有無核物質。羽扇豆根瘤菌和三葉草根瘤菌的幼年培養體顯示擴散的、不局限於一定位置的正反應。Schaefer (1941) 在豌豆族培養體的桿菌塗片上和羽扇豆屬、*Neptunia* spp. 的根瘤切片上証實了上述 Milovidov 的報道。兩位研究者都証實胸腺核苷酸(thymonucleic acid) 的存在，但認為這種胸腺核苷酸不包含在具體的核中；兩人也一致認為類菌體中缺乏胸腺核苷酸。

Uher (1937) 採用了 Feulgen 技術和 Heidenhain 的蘇木精染色法進行研究，聲稱在有些(但不是所有的)根瘤菌類型的根瘤切片和紅三葉草的塗片中染出了細胞核。他描述了類似高等細胞有絲分裂的梭形物和有絲分裂的球形物，記載了由於兩個細胞結合而產生的雙核，並且說這種雙核和分裂過程所產生的雙核是可區別的。所有的類菌體則都是無核的。

Voets (1949) 採用 Robinow 的改良 HCl-Giemsa 染色法研究三葉草和苜蓿根瘤菌的細胞核，他聲稱觀察到從一個細胞核到四個細胞核的發展過程，具有四個細胞核的母細胞分裂成為雙核的子細胞，每一個游動細胞含有一個核；但是他發表的照片是不能令人信服的。

Palacios-de-Borao (1949) 根據三葉草屬(*Trifolium*)、豌豆屬(*Pisum*)、菜豆屬(*Phaseolus*)、草木犀屬(*Melilotus*) 和洋槐屬(*Robinia*) 的根瘤菌的电子顯微鏡照相和微化學測定，着重指出細胞中含有不同密度的物質或區域。在幼年培養體中，兩端密度最大，成為球狀，隨著老化逐漸變成液泡狀態。在菜豆根瘤菌的 17 天的培養體中，細胞中有無數液泡，在細胞內占了很大地盤，因而密度大的物質呈網狀，或螺旋狀。這些內部變化並不伴有細胞體積和形態的變化。

迄今為止關於根瘤菌細胞學這一方面的研究，仍以 Baylor 等(1945)最為詳盡。用各種研究細胞核的細胞學試劑處理根瘤菌培養體和從豌豆、大豆和草木犀根瘤中直接分離出來的菌體，然後用光學和电子顯微鏡檢查，在光學顯微鏡下染出了 Feulgen 正反應的形態。Mirsky 和 Pollister (1942) 用溶解核蛋白的方法使細胞質中產生了淨明的區域。採用 Knaysi 和 Mudd (1943) 的技術來改變細胞質的密度可以使細胞核(如果存在的話)成為密度大的形態。將根瘤菌暴露於四氧化銨蒸氣中，經過不同的時間會使細胞產生逐步的變化。暴露時間短，兩端密度高；暴露時間長，則沿細胞的縱軸有螺旋狀的高密度帶。然而，用丙酮處理後，所有高密度形態都消失了。

因此, Baylor 等(1945, 254 頁)總結說:“若这些形体是类脂性质的, 这就不会是細胞核, 或者就是丙酮溶解了类脂性质的核膜, 导致了細胞核物质在細胞中的分散作用”。

Lewis (1941) 提出了考查具体的核是否存在的三项标准: 1) 在每一个細胞中都要有一个可以和細胞质区別的顆粒形体; 2) 在細胞核和細胞分裂过程中这个形体要表現遺傳学的連續性; 3) 必須証明这形体不是細胞的內含物、液泡、芽孢雛形、細胞质体或人为形态。就根瘤菌來說, 还不能符合这些标准; 然而, 假定根瘤菌和其他細菌一样地具有細胞核构造看来是合乎邏輯的。

Bisset 和 Hale(1951), Bisset(1952) 对 5 个菌株的實驗室儲备培养进行了同样的研究, 基本上得到和上述相同的形态学和細胞学特征; 然而他們对剛从栽培的和野生的豆科植物分离出来的菌株的研究結果則和通常的描述不符合。他們采用单宁酸紫染細胞壁結構的方法和 HCl-Giemsa 染細胞核的方法, 并且和电子显微术結合起来研究, 得出的結論是: 环带状的杆菌含有变形的細胞橫壁和少数单細胞核的球状游子。后者是由母細胞壁破裂而从細胞腔中釋放出来的。两游子接合产生了双核的、有鞭毛的杆菌。Bisset 还描述了抗性很强的內生孢子阶段。Bisset 的見解深化了早年研究者一再提出的关于完整而簡化的生活史的学說(如 Löhnis 和 Hansen 1921, Bewley 和 Hutchinson 1920, Thornton 和 Gangulee 1926 以及 Gibson 1928)。尽管 Lewis(1938) 极力否定这种見解, 显然, 用現代技术来进一步研究这方面的根瘤菌細胞学是應該的。

我們迄今仍不了解类菌体(根瘤菌的形态变异)的功能。在含有生物礆、糖甙、高酸度(Fred 1932)、維生素 B₁ (Naundorf 和 Nilsson 1943, Nilsson 等 1938b, 1939b)、血液 (Heumann 1952b, 1952c) 的培养基中和在多种植物的有效根瘤中都能誘发这些形体。Itano 和 Matsuura(1938) 观察到咖啡碱、吡啶、馬錢子碱、硝酸馬錢子碱、和喹噁化合物是使紫云英属(*Astragalus*)、菜豆属和三叶草属的根瘤菌产生球形、卵圆形和不規則形体的最有效的化合物, 但这些化合物沒有刺激生长的效应。三叶草或大豆根瘤菌和固氮菌生活在一起曾誘导出巨大菌体和类菌体(Naundorf 和 Nilsson 1942, 1943)。

各种植物种类的根瘤中的类菌体形态是各有特征的。在豌豆中呈 X 形, Y 形和 T 形; 在三叶草中的典型形态是梨形和棒槌形; 在草木犀属和苜蓿中則以伸长的、弯曲的或分枝的形态占优势。在羽扇豆、大豆和豇豆的根瘤中通常沒有类菌体形态。多数研究者认为类菌体是单細胞的, 但 Bisset(1952) 描述了多节的、多細胞的分枝类型。

关于类菌体形成的一种解释是细胞分裂跟不上细胞质增长的速度。Heumann (1952c) 报道过类菌体是能够活跃地分裂的；然而别人的证据否定了类菌体是能繁殖的、对感染过程起作用的或引起根瘤形成的生活细胞 (Almon 1933, Müller 和 Stapp 1925, Spieher 1954)。利用吡啶橙荧光色素效应可以测定微生物的活性。Spieher (1954) 计算了在羽扇豆和扁豆 (*Ornithopus* spp.) 的活跃根瘤中约有 97~98% 根瘤菌是活的；这些根瘤分别含有 1.7~4.5% 和 0.3~0.62% 类菌体。有关类菌体形成和共生作用关系的学说将在以后讨论。在铁-锰-胡萝卜-马铃薯洋葱培养基上产生的豌豆和三叶草的幼年根瘤菌的星形结构，可能不属于类菌体范畴，因为它们活跃地参加繁殖过程 (Stapp 和 Knösel 1954)。

生 理 学

在本节开始时应该提出，根瘤菌的培养、生理和生化特征是与它们和寄主植物的共生能力无关的 (Jordan 1952b, P. W. Wilson 1937)。同样，在新从根瘤分离的根瘤菌和在培养基上培养的同一菌株之间也从未发现在化学成分、呼吸活性和有关特性上有明显的差别 (Thorne 和 Burris 1940)。

将根瘤压碎制成悬液，并接种在酵母汁甘露醇洋葱平面上能获得最好的根瘤菌分离体。直接从土壤中分离根瘤菌是不可能的，虽然 Allen 和 Baldwin (1931a) 以及 Bystryi (1941) 都报道过成功的经验。Bystryi 采用的是含 1:30,000 结晶紫的培养基和 Budinov (1907) 化学营养 (Chemotropic) 技术相结合的方法。

快生长型根瘤菌通常在 5~7 天以内出现菌落，菌落多呈混浊、白色和粘稠状；慢生长型根瘤菌的菌落通常在 9 天或更长的时间内才出现，菌落呈白色和紧密状。在培养基中增加各种糖类、含氮化合物和植物浸提液能减少两种类型的生长率和生长量的差别 (Fred, Baldwin 和 McCoy 1932, Georgi 和 Ettinger 1941, Itano 和 Matsuura 1934, Neal 和 Walker 1935)。大多数根瘤菌的最适生长温度为 25~30°C，但苜蓿根瘤菌的最适温度则为 35°C。

石蕊牛奶和含 1:20,000 刚果红的 Ashby 培养基是区别根瘤菌和类似细菌的最有效的培养基。一般而论，石蕊牛奶反应对于鉴定根瘤菌的纯度比鉴定种类更为可靠。除苜蓿根瘤菌外，快生长型菌株多半在石蕊牛奶中呈碱性反应并产生较宽厚的乳清层。苜蓿根瘤菌的一些菌株则在石蕊牛奶产生酸性反应和酸性乳清层。慢生长型，例如羽扇豆根瘤菌、大豆根瘤菌、豇豆根瘤菌和接近的种类，在石蕊牛奶中呈碱性反应但不产乳清层。根瘤菌都不能胰化

或凝固牛乳。根瘤菌在石蕊牛奶中的各种反应是产生得很慢的,要在25~30°C中培养几周后才能判断。在 Ashby 刚果红洋菜上,根瘤菌菌落呈混浊、白色或无色;而和根瘤菌不易区别的农杆菌的菌落则能吸收染料,呈粉红色至红色。甘露醇甘油磷酸钙洋菜 (Hofer 1941, Sarles 等 1935) 对于区别根瘤菌和放射农杆菌及类似细菌特别有效。在这种培养基上,根瘤菌形成湿润的菌落而并不变成褐色;放射农杆菌和其他种类则产生隆起的粘稠菌落,菌落带有褐色晕环和同心的白色磷酸三钙沉淀物。Allen 和 Allen (1950) 的文章还概述了鉴定根瘤菌和区别类似细菌的其他有效培养基。

关于采用各种植物浸提液来培养根瘤菌的研究 (Albrecht 和 McCalla 1937a, Allison 1927, Clark 1936, Itano 和 Matsuura 1936b, Schmidt 1947), 最成功的是酵母汁。对于酵母汁所以令人满意,曾提出下述原因,即: 1) 含有有效的、必要的蛋白质裂解产物 (特别是氨基酸), 从而供给维生素以外的氮源和能源物质 (Jardon 1952b); 2) 提供细菌吸收在消耗氧中所必须具备的特定物质; 3) 各种维生素和生长辅助因素具有刺激效应 (Nilsson 等 1938a、1938b、1939a、1939b); 4) 含有必要的微量元素 (Steinberg 1938); 5) 对氧化还原电位的缓冲作用适合于根瘤菌的生长 (Allyn 和 Baldwin 1930、1932)。似乎酵母汁也在呼吸过程中起着强烈的给氢体的作用 (Thorne、Neal 和 Walker 1936, Thorne 和 Walker 1936b)。很可能, 这些解释中没有一个是唯一的答案。

在含酸白菜水的各种培养基中, Albrecht 和 McCalla 的葡萄糖钙培养基 (1937a) 以及 Campbell 和 Hofeer 的甘油磷酸钙培养基 (1943) 看来是最好的。在这两种培养基上各种根瘤菌都能旺盛生长, 并产生中量到低量的粘液物质。

几乎所有根瘤菌都易于利用单糖和双糖, 而利用三糖、多糖、醇类和糖酸类的能力则要弱些。根据 Burris、Phelps 和 Wilson (1942) 的意见氧化各种多羟醇的能力决定于适应酶 (adaptive enzymes), 而氧化糖类的能力则决定于结构酶 (constitutive enzymes)。三叶草、豌豆和苜蓿根瘤菌通常能利用葡萄糖中的 60~80% 的碳变为 CO_2 ; 剩下的变为粘液和细胞物质 (Georgi 和 Wilson 1933)。细胞外的多糖粘液物质的化学构造为葡萄糖-1:4-葡萄糖-1:4-葡萄糖甙 (Haworth 和 Stacey 1948)。尽管 Anderson (1933) 发现大豆和豌豆根瘤菌不能利用自己的粘液物质的提纯制品* 做为碳源, 但 Burris 和 Wilson (1942) 用瓦布尔呼吸计技术却证明了在某种三叶草和苜蓿根瘤菌的内生呼吸过程中能氧化自己的粘液物质。Demolon 和 Rozowska (1951) 将热过的根瘤菌粘液

* 在培养基中加提纯的粘液物质制品——译者注

物质加在明胶培养基中,得到了刺激生长的效果。Mezzadrolì 和 Sgarzi(1935)从理論上提出了 0.05~0.1% 喹寧或馬錢子碱和 0.05~0.5% 咖啡碱可以做为某些根瘤菌的碳源的可能性。

一般而論,快生长型根瘤菌对碳源的要求沒有慢生长型根瘤菌那样挑剔。前者偏好甘露醇和蔗糖;后者偏好阿拉伯糖和木糖(Fred、Baldwin 和 McCoy 1932)。生长慢的根瘤菌利用甘露醇、甘露糖、甘油、乳糖、蔗糖和丁四醇的能力很弱,或者完全不能利用(Neal 和 Walker 1935)。在生长快的类型中,苜蓿根瘤菌菌株产酸的能力一般較强;大豆、豇豆和羽扇豆根瘤菌无例外地产生和保持碱性反应,在阿拉伯糖和木糖培养基中,經較长时期的培养,这种碱性反应常轉变为酸性反应。菜豆根瘤菌在麦芽糖培养基中只产生微碱性或无变化。迄今为止所有試驗都証明根瘤菌不能在糊精培养基中产生酸性反应。Kobus(1952)报道了由糖产生酸的性能和抗結晶紫之間的相关性。产生碱性反应的,生长慢的根瘤菌对 1:150,000 結晶紫敏感;生长快的产酸菌株能抗 1:1,000 以上的結晶紫溶液。

同样的,根瘤菌利用氯化物的能力也有很大的出入。根瘤菌在缺氮的合成培养基上生长很慢(Thorne 和 Walker 1936a, West 和 Wilson 1939a, Wilson 和 Wilson 1942),但是如在 Wilson 和 Wilson(1942)培养基中加氨基酸(Jordan 1952b)或在 Laird 5 号培养基(1932)中,快生长菌株却可以順利生长。到最适生长約需 5~10 ppm 氮(Laird 和 West 1938);培养基中加氮到 108 ppm,根瘤菌的繁殖和呼吸强度都有所提高(Walker、Anderson 和 Brown 1933、1934)。大多数菌株能利用銨盐和硝酸盐。硝酸盐緩慢地还原为亚硝酸盐。Allison 和 Doetsch (1951)的研究并未証实 J. K. Wilson (1947)关于在酸性基质中硝酸还原产生气体的报道,虽然在前者的研究中 33 个菌株内有 30 个能还原硝酸盐为亚硝酸盐。Jensen (1951)报道,在肉汁培养基中根瘤菌不能从丙酮酸肟产生亚硝酸。

石川(1953)最近发表了从 29 个豆科植物属中分离出的 103 个菌株的較為詳細的生理属性。一般而論,研究結果和前人的研究結果相符合,而其价值在于試驗了很多新的菌株。

人們一向重視根瘤菌利用氨基酸的能力。Nielsen (1940)記載了豌豆根瘤菌易同化 39 种氨基酸中的 32 种,但在培养基中含有脂肪酸系統的氨基酸高于氨基丁酸时,生长是比較緩慢的。Jordan (1952b)用清洗过的苜蓿根瘤菌(包括遺傳性相似的变种)的細胞进行仔細的試驗,发现不同菌株利用各种氨基酸的能力是不同的。根瘤菌在植物中継代后的突变型菌落有时也产生

利用氨基酸能力的变化。半胱氨酸、胱氨酸、双羧苯氨酸、组氨酸、蛋氨酸和苯基丙氨酸都能激发生长；没有一种试验过的维生素、嘌呤和吡啶能够激发生长。由于苜蓿根瘤菌能够利用这么多的氨基酸，因而被认为需要一组氨基酸来产生具有代谢活性的氨，而这些氨基酸又是和氨基转移的机制相联系的。在赖氨酸和酪氨酸培养基中，没有一个菌株能在细胞中积累游离氨基酸，也不能分泌额外的氨基酸。

根瘤菌能够从蛋白胨(Steinberg 1938)和一些植物浸提物，如种子汤和幼芽汤(Clark 1936, Itano 和 Matsuura 1936a、1936b)、霉菌组织(Virtanen、Nordlund 和 Hollo 1934)、固氮菌的浸提物(Allison 和 Minor 1940, Demolon、Rozowska 和 Jacobelli 1950, Naundorf 和 Nilsson 1943, West 和 Wilson 1939a)、各种根瘤菌的浸提物(Allison 和 Minor 1940, West 和 Wilson 1939a)、豆科植物根瘤的浸提物(Itano 和 Matsuura 1936b、1936c、1937)、天然腐植酸(Allison 和 Hoover 1936)、茎秆(Bjälve 和 Nilsson 1938)和其它物质(Allison 和 Hoover 1934, Allison 和 Minor 1938, Thorne 和 Walker 1934、1936a、1936b)中得到它们所需的特定的营养因素。

根瘤菌对生物素的需要情况可分为三类(Wilson 和 Wilson 1942)：1)大多数菌株在缺乏生物素的条件下生长得很差，只有最大生长量的 1/10 左右，但不断移植可以不断生长；2)少数菌株在没有生物素条件下接近最大生长量；3)少数菌株没有生物素就不能生长。生长快的根瘤菌在加生物素后常常刺激生长，生长慢的菌株则无影响(West 和 Wilson 1939b、1940)。分别隶属于 8 个互接种族的 25 个不同的菌株必须有生物素才能开始生长(Bjälve、Nilsson 和 Burström 1938)。可是，Jardan(1952b)观察到清洗过的苜蓿和草木犀属根瘤菌细胞的开始生长不仅不需要生物素，而且在没有生物素的条件下生长量最大。由于三叶草根瘤菌 Wisconsin 205 号既需要生物素而又不能合成生物素(Wilson 和 Wilson 1942)，它常被用来做为生物素的微生物学测定法的试验微生物。

大概苜蓿根瘤菌能合成生物素(Nielsen 和 Johansen 1941)和泛酸(McBurney、Bollen 和 Williams 1935)。Billen 和 Liehstein(1949)证明三叶草根瘤菌中的天冬氨酸脱羧酶系统能产生少量 β -丙氨酸，后者对合成泛酸有重要意义。West 和 Wilson (1939a)认为在含有适当的还原糖和无机盐的培养基中，三叶草根瘤菌可以合成它所必需的各种有机物质，它不需要植物组织浸提物，如有后者存在，也只能起刺激作用。三叶草根瘤菌能合成维生素 B_1 ，而维生素 B_1 为其生长所必需(West 和 Wilson 1939a)，但并不是所有根瘤菌都

必需要維生素 B_1 (Bjälve 等 1939, Nilsson 等 1938b, 1939b)。三叶草根瘤菌的維生素 B_1 含量約和酵母菌的含量相等(West 和 Wilson 1939a);三叶草根瘤菌也合成不少維生素 B_2 。最近, Burton 和 Lochhead(1952) 报道說苜蓿根瘤菌因其能合成大量維生素 B_{12} 而与分別属于 6 种根瘤菌的 70 个不同菌株有明显的区别, 有一个菌株产生的維生素 B_{12} 在 1,000 微克/毫升以上。Levin 等(1954)用眼虫 (*Euglena*) 和 *Ochromonas* spp. 进行生物測定, 証实了豌豆、苜蓿和三叶草根瘤菌能在培养条件下合成維生素 B_{12} 。排泄到細胞外的和細胞内含有的維生素的比例, 在苜蓿根瘤菌最少为 1:2, 在三叶草根瘤菌最少为 3:1。

根瘤菌合成維生素的能力 (Burton 和 Lochhead 1952, P. W. Wilson 1937), 或利用某些生长因素的能力 (Jordan 1952b) 均与固氮能力无关。

关于根瘤菌对各种无机盐类的需要情况并无詳尽的科学資料。鉄盐似乎是必需的 (Itano 和 Tsuji 1938, Lilly 和 Leonian 1945, Thorne 和 Walker 1936a)。少量鉄盐也有好处 (Itano 和 Matsuura 1937)。

尽管大多数的意見都认为根瘤菌不形成芽孢, 这些細菌的生活力和对恶劣环境的抗性却是很强的。可注意的是, Edwards (1923) 用含有木灰的培养基培养白三叶草、苜蓿和紅三叶草根瘤菌, 培养基盛在三角瓶中, 瓶口用蜡封閉, 在室温下分別保藏了 10 年 (白三叶草和苜蓿) 和 16 年后, 仍能产生优良的根瘤。Stapp (1924) 报道, 3 个野豌豆根瘤菌培养体在封閉的玻璃管中經過了 16 年 (室温) 还保持着活力。在用蜡封閉的三角瓶中, 12 个用 Ashby 氏洋菜培养基的培养体保存了 11 年 (室温) 还是活的 (Jones 1927)。保存在用木栓塞紧的二嘴的布来克培养瓶 (Blake bottle) 中的一个苜蓿根瘤菌培养体, 經過 15 年还是活的。Reid、Fred 和 Baldwin (1935) 观察到, 在灭菌土壤中保存了 12 年 (室温) 的 40 个菌株, 除豌豆根瘤菌外, 其它都还活着, 其中只有大豆根瘤菌的一些菌株对寄主的关系起了变化 (和經連續移植保存下来的同一菌株相比)。在密封玻璃管的干奶粉中, 另一些菌株經两年后 (10°C) 失去了活力。Albrecht 和 McCalla (1937b) 发现豇豆和大豆根瘤菌在水中保持 9~12 月后还是活的。Appleman 和 Sears (1946) 的研究結果, 68 个低压冻干菌株經 3.5~4 年都沒有降低生活力或結瘤性能。J. K. Wilson (1937) 报道, 从已經干燥了一年的根瘤中分离出了根瘤菌。Riede 和 Bucherer (1939) 从貯藏了 15 年的根瘤中成功地分离出了大豆根瘤菌。虽然这些培养体的結瘤能力是降低了, 但它們的固氮能力却保持住了, 或者經继代后恢复了。Hedlin 和 Newton (1948) 报道了通气条件、水分和养分对于在泥炭和土壤基质中保

存了5个月的根瘤菌的生长和存活的影响。根据 Bisset(1952) 的意见, 苜蓿根瘤菌的存活能力很明显是由于它们有形成芽孢的习性。为了证实根瘤菌产生抗性芽孢, Bisset 进行了羽扇豆和苜蓿根瘤菌的加热处理试验, 先经 80°C 30 分钟, 再经 100°C 5 分钟, 结果根瘤菌仍然存活, 并在它们的寄主根上结瘤。这些贮藏存活试验对 Bisset 的芽孢理论(1952)提供了旁证。

遗传性的分离和变异

根瘤菌分离的、可滤过的突变体吸引着人们进行不断地研究。Israily 和 Starygin(1930) 最先描述了根瘤菌的粗糙型(R型), 并以其培养特征与正常的光滑型(S型)对照。以后, Israily 和 Leonowitsch(1933) 将野豌豆根瘤菌培养于含少量昇汞的培养基中, 他发现从一个粗糙的, 称为 a 型 R 的 R 变体(Variant)诱发出另一个变异, 称为 b 型 R。这两种变体都能产生根瘤。从 b 型 R 产生的根瘤只能得到 b 型 R 变体。从正常的 S 型和 a 型 R 菌株形成的根瘤, 再行分离接种能够产生出两种变异来, 但以接种的一种占优势。根据凝集反应和结瘤试验 a 型 R 被认为是介于正常型和 b 型 R 的中间类型(Israily 和 Artemjewa 1936)。Almon 和 Baldwin(1933) 得到 6 种不同类型的变异菌落, 它们产生粘液物质和色素的性能各有不同。这些类型是从根瘤、滤过的食菌体溶菌物、根瘤菌培养体的滤过物、在培养基上生长的单细胞培养体以及保存在灭菌土壤中的培养体等不同来源获得的。每一个菌落类型都能产生一种或几种其它变异类型。这些变异类型都不能产生根瘤, 但在两个实例中, 当变异型恢复为正常型后, 也伴随着恢复了结瘤能力。有证据证明在各种异常型和母菌株之间是有血清学联系的。

在保存培养体中也常有异常型的出现。Jensen(1942) 报道了苜蓿根瘤菌的一些菌株在马铃薯汁洋菜上培养了 18 个月 after 产生了异常的菌落类型, 这种菌落类型在外表上象富于粘液的三叶草根瘤菌菌落。从苜蓿(*Medicago sativa*) 和野苜蓿(*M. falcata*) 分离出的两个菌株产生有皱褶的菌落。这些异常型的石蕊牛奶反应和母株相同, 而且, 仍旧保持着结瘤能力; 从血清学试验也看不出起了什么抗原构造的变化。Nutman(1946a) 在三叶草根瘤菌的有效菌株和无效菌株的保存培养体中都观察了菌落类型的变异。Vincent(1954a) 报道了三叶草根瘤菌的保存培养体中出现了 4 种菌落类型的变化。McCalla(1937) 描述了根瘤菌在缺钙培养基上产生了颜色的变异。Bisset(1952) 报道, 耐热的根瘤菌经煮沸后立即移植产生了橙黄色的变异。

食菌体对于导致根瘤菌的变异和突变似乎起着重要的作用。Israily 和

Leonowitch (1933) 从野豌豆根瘤菌食菌体溶菌物和抗食菌体的大豆根瘤菌的滤过液中(通过 Berkefeld 过滤器)得到了培养性状正常但失去结瘤能力的根瘤菌。由于他们没有发现羽扇豆和大豆根瘤菌的食菌现象和分离现象,因此认为这些根瘤菌和近似的慢生长型根瘤菌在正常情况下就是属于 R 型的。Kleezkowska (1950) 发现三叶草根瘤菌的抗食菌体突变菌株不及母菌株稳定。在洋菜培养基上这些特性保持了三年。关于突变是否对固氮作用有不良影响,各菌株之间的差别很大,可是,在植物中经过一次继代,几乎所有的突变菌株都恢复正常菌落的特性。有些突变菌株的固氮性能是稳定的,或者终于会稳定下来;另有些突变菌种则尽管经过了多次平面培养或多次在植物中继代仍旧没有固氮能力。Krasilnikov (1941) 的独特报道值得注意,无结瘤能力的三叶草根瘤菌菌株,在结瘤能力很高的菌株的滤过液中生长 1~7 个月,产生了有结瘤能力的突变。

上述连续性变异,可能是自然突变和选择适应相结合的结果。Jordan (1952a) 用 X 射线、紫外线、硝酸铀和重氮甲烷处理三叶草根瘤菌的寄生性菌株* 和有效菌株而人为地引起突变。X 射线的作用最强。用 X 射线照射后,一个寄生性菌株产生 4 种突变型菌落;一个有效菌株产生 2 种突变型。经证实,从一个无效母菌株产生的三个粗糙类型菌落的固氮功能也起了突变。这些突变型形成的根瘤血红胍(按 virtanen 测定法)值相当高,并经无菌盆栽法考查证明有效。经过两次在植物中继代,有效性提高了。另一突变型菌落并没有产生固氮功能的变化。看来,固氮功能的变异和菌落型发生的变异是彼此独立进行的(Kleezkowska 1950, Jordan 1952a)。Jordan 进一步宣称他得到了产生需生长素的根瘤菌突变体的初步研究结果。

根瘤的形态发生

虽然,根瘤是根瘤菌和豆科植物相互作用的场所。从起源来说,根瘤有两种类型。外生型的感染局限于皮层的薄壁组织,除维管束以外,根的中柱组织和根瘤形成无关。相反,内生型根瘤的组织完全是从中柱鞘的再生分化而形成的(Allen 和 Allen 1940, Arora 1954)。Bond (1948a) 认为后者是较为罕见的。

在整个形态上根瘤也有两种类型。有效根瘤主要长在主根上,个体较大,表面光滑或有皱纹,中心粉红色或红色;无效根瘤通常分散在第二级侧根上,而且数量很多,个体较小,表面光滑,中心白色带绿。不论外生型或内生型根

* 指无效菌株

瘤都可以是有效根瘤或无效根瘤。

在各种根瘤类型的形成过程中，所有根瘤菌菌株都有下列共同属性：1) 有感染能力；2) 形成一个感染场所，并在寄主組織中大量繁殖；3) 在局部范围内散开；4) 刺激寄主組織并引起反应。因此，从根受感染到根瘤形成，决定于两个相互制约的因素：① 入侵菌株的感染能力；② 寄主組織的感受能力。同一植物根上可以同时产生有效的和无效的两种根瘤，可是同一根瘤之中难得含有一个以上的根瘤菌菌株 (Dunham 和 Baldwin 1931, Vincent 1944)。生长期长的和具有新生小侧根的植物受感染期比生长期短的一年生植物长。

虽然有效和无效根瘤在組織学上和功能上都有区别，但是对于有效根瘤的研究较为詳尽。由于有效根瘤在固氮过程中的作用，因而它被认为是共生关系的正常結構。

感 染 阶 段

根瘤菌通常是从根毛侵入豆科植物根的 (Bieberdorf 1938, Fred, Baldwin 和 McCoy 1932)，但也可从表皮或皮层細胞的破口 (Bieberdorf 1938, McCoy 1929) 以及小根部位出現的組織的破口 (Allen 和 Allen 1940, Arora 1954, McCoy 1929) 侵入。Schaefer (1940) 指出 *Neptunia oleracea* (一种沒有根毛的水生植物) 的表皮細胞是唯一的入侵途徑。

入侵部位总是在靠近根毛尖端的一个折光性很强的点上，但这个点在入侵过程中所起的作用現在还不清楚。根毛弯曲 (形成拐杖样子) 是根瘤菌入侵的前奏，可是根毛弯曲并不一定导致根瘤的形成 (Bhaduri 1951, McCoy 1932)。細菌进入根毛以后，形成一絲状物 (侵入綫) 向着基础細胞推进。

侵入綫通常只一根，但 McCoy (1929) 也观察到伸入菜豆根的表皮細胞的侵入綫是分枝的，侵入綫多半包含不止一行細菌。Thornton (1930b) 观察到苜蓿 (*Medicago sativa*) 根瘤的形成过程有时有两根或更多的受感染的根毛成为几条侵入綫，共同形成一个根瘤。Bieberdorf (1938) 在大豆上見到一根根毛的两边各自受到根瘤菌的入侵而形成两条侵入綫。

根毛中侵入綫向內直綫挺进这一現象表明侵入綫可能对根毛細胞的基部有某种趋化性。根瘤菌从根毛頂端侵入到表皮細胞內壁所需的時間很不一致。Wilson (1917) 报道在大豆約需 5 小时，其間距离大約有 70~80 微米 (Bieberdorf 1938)；在羽扇豆約需 17 小时 (Milovidov 1928)；在豌豆大致需要两天 (Prazmowski 1890)；而紅三叶草从根瘤菌入侵根毛开始到皮层細胞再生只要 24 小时 (陈华癸和 Thornton 1940)。

侵入綫通常到达根的皮层后就分枝发展。由于侵入綫很象无隔膜の菌絲,有些早期的研究者认为根瘤是由一种菌絲状真菌引起的。也有人认为侵入綫是粘菌絲,而其中的根瘤菌則被誤认为是粘菌的孢子。自从 Beijerinck 在 1888 年分离出結瘤的微生物以后,人們才認識清楚侵入綫只是根瘤菌在植物細胞中挺进的途徑。

侵入綫侵入根的皮层組織的深度随植物种类和入侵位置而异。在大豆主根中,侵入綫只达到皮层薄壁細胞的第五、第六层;在側根中,由于皮层細胞的抵抗力較弱,侵入綫可直达中柱鞘細胞层(Bieberdorf 1938)。在黄花苜蓿中侵入綫直綫前进的特点使 Peirce (1902)設想侵入綫的发展有趋化性。在所有实例中还没有发现过侵入綫能够进入根的中柱的内皮层或中柱鞘以內(Bieberdorf 1938, Bond 1948a, Harris 等 1949, McCoy 1929, Thornton 1930b, Wipf 和 Cooper 1940)。

除少数例外(Dangeard 1926, Lechtova-Trnka 1931, Milovidov 1928),根瘤菌对根的皮层的入侵是属于細胞內(intracellular)性质的。有些早期工作者将侵入綫描述成为粘液綫或菌胶团綫,它是由排列成鏈状的杆菌分泌的粘液质鞘形成的(Beijerinck 1894, Dangeard 1926, Dawson 1900, Frank 1879, Peirce 1902)。Burrill 和 Hansen (1917)則认为所謂侵入綫实际上是一根管道,杆菌在这管道內移动。显微化学的証据支持后一見解。McCoy (1932)証明,侵入綫在經過寄主細胞的細胞质时,菌胶团綫为一纖維素和类纖維素的鞘套所包围,但在侵入綫的尖端及經過細胞間の細胞間质时却没有这种鞘套。1941 年, Schaepe 用旋光計再度証实了鞘套胶粒的管道結構。在豌豆(*Pisum sativum*)和蚕豆(*Vicia faba*)的根瘤中,鞘套和寄主細胞細胞壁在旋光下具有相同的双色性,它們的染色性质也相似。

Schaepe (1940)认为这种鞘套构造是染色作用的人为現象,这現象反映了植物細胞质沿着感染路綫所起的微量化学变化,这种变化是根瘤和寄主細胞交互作用的結果。这种論断的根据为,在沒有染色的新鮮組織中看不到有組織的絲状物。他还认为侵入綫是植物的产物,而不是微生物的产物,这一假說和植物产生抵抗入侵細菌的机械防御的見解是相符的(McCoy 1932, Moeller 1892)。

在侵入綫和細胞壁交接处常常扩张成为漏斗状。当根瘤菌向邻近的細胞挺进时,常在两細胞壁之間形成沒有鞘套的菌胶团。McCoy (1932)认为根瘤菌是通过寄主細胞壁的小孔(即通过細胞間の胞間連絲)从一个寄主細胞达到另一个寄主細胞的。与此相关联的見解是,侵入綫在和細胞壁交接处成为漏