

花生根瘤菌自生固氮的研究

李季伦 吴柏和 曹增良

提 要

1.建立了研究根瘤菌豇豆族 1003 菌系 (*Rhizobium SP. cowpea strain* 1003) 自生固氮作用的简便方法。除选用甘露醇—酵母汁—洋菜 (YMA) 培养基原配方外, 另加 $5 \mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $0.4\text{mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 加以改进。在此培养基中生长的 1003 菌系, 其固氮酶活性约为每毫克 (mg) 菌体蛋白每小时 (h) 形成 50 毫微克分子 (nmol) 的乙炔 (C_2H_2)。培养基中的甘露醇可用阿拉伯糖, 葡萄糖和葡萄糖酸钠代替, 而蔗糖不利于该菌的生长和固氮。

2. 不同菌系在不同培养基上的固氮活性不同。1003 菌系在 YMA 培养基上的固氮活性 (13.7) 远比在 CS_7 培养基上的 (2.3) 为高。但与此相反, 生长在 YMA 上的 32HI 菌系的固氮活性 (0.4) 却远比其在 CS_7 的 (36.2) 为低。

3. 我们发现 CO_2 对固氮酶活性有重要影响。1—3% CO_2 可显著促进 1003 和 32HI 菌系的固氮活性, 比对照分别提高 1.5 和 2.5 倍。我们认为这可能是由于根瘤菌本身有固定 CO_2 的作用。供给有机碳基质是增加了可利用的碳源而未发现有 pH 值的改变。 CO_2 影响根瘤菌固氮活性的有关试验仍在进行中。

※ ※ ※ ※

自 Beijerinck 在 1888 年从豆科植物根瘤中分离出根瘤菌以来, 人们一直认为根瘤菌只在与豆科植物共生形成根瘤时才能固定空气中的氮素, 而脱离寄主植物, 在纯培养条件下生长的根瘤菌是没有固氮能力的。因此, 研究根瘤菌的固氮作用就必须进行植株结瘤试验, 这不仅需要光照温室设备, 而且又费时费工, 阻碍着根瘤菌研究的进展。过去虽有人试图研究根瘤菌自生固氮的问题, 但在 1975 年前, 都未获得成功。

1975 年春, 澳大利亚的 Scoweroft 和 Gibson (1) 和加拿大的 Child (2), 几乎同时发表了豇豆族根瘤菌的一个菌系, 32HI, 当靠近 (但不接触) 植物愈伤组织生长时, 表现出固氮活性, 首次显示了根瘤菌自生固氮的可能性。不久, 就在同年, 国际上有 5 个实验室, 分别报导了某些慢生型根瘤菌 (包括大豆根瘤菌和花生根瘤菌) 菌系, 能在完全脱离植物组织的纯培养条件下表现出固氮的活性 (3—7), 从此打破了共生根瘤菌不能自生固氮的传统概念。这在微生物界确实是一项重要的成就, 为研究根瘤菌的生理学和遗传学提供了简

便的方法(8—16)。

在我们选育高效花生根瘤菌的过程中,深感结瘤试验的不便,特别是花生的种子大,结瘤试验时间长,需要大容积的栽培器,占用温室面积多,对选种工作很不利。从1976年起我们着手研究花生根瘤菌的自生固氮问题,试图以自生固氮活性作为初筛的指标,选出自生固氮活性高的菌系后,再通过盆栽结瘤试验加以复筛。为此,需要解决:(1)建立测定根瘤菌自生固氮的简便方法,以便于大规模选育菌种;(2)研究根瘤菌自生固氮和共生固氮之间的相关性,以明确利用根瘤菌自生固氮的指标在菌种选育工作中的可靠性。本文是第一个问题的研究总结。

材 料 和 方 法

菌种: *Rhizobium sp.* 豇豆族1003菌系,由中国农科院土壤肥料研究所提供(此菌系40年代自美国引入,原编号为3c₁a₂); *Rhizobium sp.* 豇豆族32HI菌系,由美国Kettering研究所D.L. Keister博士供给。试验用菌种均经单菌落纯化并经结瘤试验,然后封藏在灭菌石腊油试管斜面中(培养基为YMA)。经转移到新鲜的试管斜面培养基上活化后作为试验的菌种。

培养基: (1) 甘露醇—酵母汁—洋菜(YMA)培养基。其成分为:甘露醇1%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, NaCl 0.02%, $CaCO_3$ 0.5%, 酵母汁(1:10) 10%, 洋菜2%; (2) CS₇培养基。其成分为: L—阿拉伯糖25mM, 琥珀酸钠25mM, 谷氨酰胺2mM, 肌醇5.6mM, KH_2PO_4 2.2mM, KCl 0.9mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.7mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.14mM, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 58μM, H_3BO_3 82μM, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 54μM, Na_2-EDTA 54μM, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.5μM, KI 6μM, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 98μM, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.4μM, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.4μM, 硫胺素-HCl 15μM, 烟酸41μM, 吡哆素-HCl 2.4μM, 洋菜1%, pH5.9。

培养基定容(8ml)分装在一定容(18×180mm, 38ml)试管内,加棉塞,于10磅30分钟高压灭菌后,摆成斜面,要求斜面长度一致(7cm)。

接种和培养条件: 菌种在YMA培养基上于27℃培养一周后,以无菌生理盐水洗下,摇匀,制成菌悬液,要求光密度A₆₈₀为0.5(比色杯光径1cm)。以菌悬液定量均匀接种在试管斜面培养基上(以直径2mm的接种环沾菌悬液接种,每只试管斜面上接种两环,均匀涂布)。培养温度为27℃。其它条件因试验要求而异。每种处理至少有5个重复。

固氮酶活性测定 固氮酶活性测定采用乙炔还原法。上海仪器厂100型气相色谱仪氢火焰检测器,2米GDX-502柱,柱温50℃。用峰高比法计算乙炔生成量(17)。

菌体蛋白含量采用改良的Lowry法(18)。菌体以20ml无菌生理盐水洗下,振荡分散均匀,取5ml菌液,4000rpm离心20分钟,弃上清液,再用生理盐水反复洗涤两次。菌沉淀中加0.5N NaOH 5ml,摇匀后,于100℃沸水浴中水解10分钟,冷却后取水解液1ml,加1ml碱性铜试剂(在0.5N NaOH溶液中,含有10%Na₂CO₃,0.1%酒石酸钾和0.05%CuSO₄,溶解后,过滤,装入棕色瓶中,常温下保存)摇匀,静置10分钟,加4ml Folin-Ciocaltean试剂(0.1N),迅速用力摇匀,置55℃水浴中保温5分钟,立即冷却,用72—1型分光光

度计于650nm波长下测光密度。以牛血清蛋白(50—300 μ g)作标准曲线。测出样品蛋白浓度,乘以20,即为该试管中的菌体蛋白量。

固氮酶活性以每毫克(mg)菌体蛋白每小时(h)形成的乙炔(C_2H_4)毫微克分子(nmol),即比活性来表示,简写为nmol C_2H_4 /mg蛋白/h。

结 果 与 讨 论

1003菌系在YMA培养基上的固氮活性

试验开始时,我们曾试用CS₇培养基培养1003菌系,发现其固氮活性很低。改用YMA培养基后,其固氮活性显著提高,两者相差将近3.5倍(13.7:3.9)(表1)。

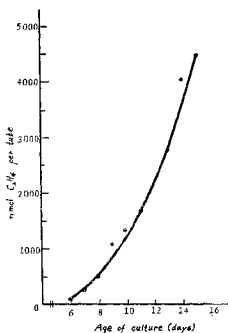


图1 1003菌系在YMA培养基上的固氮活性历程。

表1 1003菌系分别在YMA和CS₇培养基上的固氮酶活性*

培养基	细胞密度	相对比活性
	A ₆₈₀	nmol C_2H_4 /A ₆₈₀ /h
YMA	0.90	13.7
CS ₇	0.46	3.9

* 接种后,于27℃培养8天后,换加反口胶塞,并注入10% C_2H_2 ,再继续培养10天后,测定菌体密度,固氮酶相对比活性以A₆₈₀为底计算。

1003菌系在YMA培养基上,其固氮酶活性可维持10天以上(图1),其最终比活性可达13.5nmol C_2H_4 /mg蛋白/小时。

微量Mo和NH₄⁺对固氮酶活性的影响

我们考虑到固氮酶含有Mo,在YMA培养基中加入微量的Mo(5 μ M $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$),可明显提高1003菌系的固氮活性,其固氮酶比活性达到24.3nmol C_2H_4 /mg蛋白/小时(表2)。

表2 Mo对1003菌系固氮酶活性的影响*

培养基	菌体蛋白(mg)	比活性 nmol C_2H_4 /mg蛋白/h
YMA	1.48	13.5
YMA + Mo	1.60	24.3

* 接种后,即加胶塞并注入10% C_2H_2 ,27℃下培养15天后,分析固氮酶比活性。乙炔于第5天开始出现。

在YMA + Mo培养基中，再加入微量的 NH_4^+ ($0.4\text{mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 可进一步提高固氮酶活性，其比活性可达 50.3nmol/mg蛋白/小时 (表3)

表3 NH_4^+ 对1003菌系固氮酶活性的影响*

培 养 基	菌 体 蛋 白 (mg)	比 活 性 $\text{nmol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4/\text{mg蛋白/h}$
YMA + Mo	0.89	24.1
YMA + Mo + NH_4	1.24	50.3

* 接种后，即加胶塞并注入 C_2H_4 ， 27°C 下培养11天后，分析比活性。

不同碳源对1003菌系固氮酶活性的影响

YMA培养基中的甘露醇可被葡萄糖、阿拉伯糖或葡萄糖酸钠所代替，不致影响1003菌系固氮酶活性。但蔗糖却不利于该菌的生长和固氮，在蔗糖培养基上生长的1003菌系甚至不表现固氮酶活性 (表4)。

表4 不同碳源对1003菌系生长和固氮的影响**

碳 源*	菌 体 蛋 白 (mg)	比 活 性 $\text{nmol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4/\text{菌体蛋白/h}$
1% 甘 露 醇	0.89	24.1
1% 阿 拉 伯 糖	1.36	24.9
1% 葡 萄 糖	0.95	22.4
1% 葡萄糖酸钠	1.05	23.1
1% 蔗 糖	0.36	0

* 除碳源不同外，其它成分均和YMA + Mo培养基者相同。

** 接种后即加胶塞并注入乙炔， 27°C 培养11天后分析。

不同菌系在不同培养基上固氮酶活性的差异

据国外报导 (3,8)，32HI菌系在YMA上不表现固氮活性。我们的试验发现1003菌系在YMA上却表现出比较高的固氮活性 (表1)。我们进一步将1003和32HI菌系分别接种在YMA和 CS_2 培养基上进行了对比试验。结果发现，这两个菌系在不同培养基上所表现的固氮活性是不同的 (表5)。在YMA培养基上，1003菌系的固氮酶比活性 (13.7) 远比32HI的固氮酶比活性 (0.4) 高。但在 CS_2 培养基上，则恰好相反，32HI菌系的固氮酶比活性 (36.2) 远比1003菌系的固氮酶比活性 (2.3) 高。根据我们盆栽结瘤和田间试验的观察，这两个菌系结瘤固氮的能力都较强 (未发表资料)。因此，单用YMA或单用 CS_2 作为以固氮酶活性为指标的初筛的培养基，势必会造成漏筛。看来，要想获得自生固氮活性和共生固氮活性相一致的结果，还必须选用适宜的培养基，这种培养基的组成似乎应尽量和寄主植物所提供的有效营养物质相一致。目前我们正采用花生苗浸提液试作培养基，研究不同菌系在这种培养基上的固氮活性，并结合盆栽结瘤试验测根瘤活性，比较自生固氮活性与共生固氮活性之间的相关性。如能获得正相关，则自生固氮的研究方法就可作为选育高效菌系的初筛手

段, 此项工作正在进行中。

表5 1003和32HI菌系分别在YMA和CS₇培养基上的固氮活性*

菌 系	培 养 基	菌体蛋白 (mg)	比 活 性 (nmol · C ₂ H ₄ /mg蛋白/h)
1003	YMA	0.85	13.7
	CS ₇	0.75	2.3
	YMA	0.88	0.4
32HI	CS ₇	0.63	36.2

* 接种后即加胶塞培养7天后注入乙炔, 再继续培养14天后, 测固氮酶比活性。

CO₂对固氮酶活性的影响

从表6中可以看出: 试管斜面经接种并在棉塞试管中培养8天(通气培养)后, 换加胶塞并注入乙炔者(I), 其固氮酶比活性(5.9)不如一开始就加胶塞培养8天(密闭培养)后, 再注入乙炔(II)的固氮酶比活性(10.6)高。密闭培养8天后, 将试管中残留气体抽空, 再注入混合气体(20% O₂, 10% C₂H₂和70% Ar)者(III), 其固氮酶比活性(12.2)并不比不抽空换气者(II)固氮酶比活性(10.6)高多少。因此, 可以不必采用抽空换气的麻烦操作手续。而在接种后立即加胶塞并同时注入乙炔者(IV)与抽空换气者(II)和不换气者(I)相比, 其固氮酶的比活性(13.7)都略高, 并可缩短试验时间8天, 可作为常规试验方法。

表6 不同气体条件对1003菌系固氮酶活性的影响*

培 养 条 件	菌体蛋白 (mg)	比 活 性 (nmol C ₂ H ₄ /mg蛋白/h)
I、接种后, 加棉塞培养8天(通气培养)后, 换反口胶塞, 注入10%乙炔, 再继续培养10天	2.78	5.9
II、接种后, 即加胶塞, 培养8天(密闭培养)后, 注入乙炔, 再培养10天	2.20	10.6
III、接种后即加胶塞, 培养8天后, 抽空换气(20% O ₂ , 10% C ₂ H ₂ , 70% Ar), 再培养10天	2.18	12.2
IV、接种后即加胶塞, 同时注入乙炔, 培养10天	1.46	13.7

* 培养基为YMA, 培养温度27℃

从表6中也可看出, 凡是接种后即加胶塞(密闭)培养的(II、III、IV)都比接种后加棉塞(通气)培养的(I)固氮酶活性高。这说明固氮酶活性不仅受O₂量的影响, 也可能受CO₂浓度的影响。因为在通气培养条件下, 试管内外的气体有所交换, 基本上处于动态平衡。但在密闭培养的情况下, 由于菌的呼吸作用, O₂逐渐被消耗, 而CO₂有积累, 造成一个低O₂高CO₂的环境, 这或许正是有利于固氮酶的形成和作用的条件。

为了证明 CO_2 对固氮酶活性的影响,我们在菌生长后,用抽空残留气体,再换入含不同浓度的 CO_2 混合气体的方法,研究不同浓度 CO_2 对固氮活性的影响,发现高浓度(1—3%)的 CO_2 对1003和32HI菌系的固氮酶活性确有促进作用(表7、表8)。

表7 CO_2 对1003菌系固氮酶活性的影响*

CO_2 浓 度	菌 体 蛋 白 (mg)	比 活 性 ($\text{nmol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4/\text{mg蛋白/h}$)
0	1.51	12.9
0.03%	1.38	15.4
1%	1.25	23.0
3%	1.33	22.7
3% + 30% O_2	1.67	10.8

* YMA + Mo培养基。

接种后即加胶塞培养5天后,抽空,分别注入下列混合气体,继续培养6天后分析测定。

附混合气体配方:

CO_2 浓度	CO_2 (%)	O_2 (%)	N_2 (%)	C_2H_2 (%)
0	0	20	73	7
0.03%	—	93%空气	—	7
1%	1	20	72	7
3%	3	20	70	7
3% CO_2 + 30% O_2	3	30	60	7

表8 CO_2 对32HI菌系固氮酶活性的影响

CO_2 浓 度	菌 体 蛋 白 (mg)	比 活 性 ($\text{nmol} \cdot \text{C}_2\text{H}_4/\text{mg蛋白/h}$)
0	0.91	9.9
0.03%	0.94	16.3
0.5%	0.85	21.2
1%	0.84	25.1
3%	0.95	29.1

* 培养基CS₂,

接种后即加胶塞培养7天,抽空,分别注入含不同浓度 CO_2 的混合气体,再继续培养14天

早在1940年Wilson (19) 就报导过增加 CO_2 浓度可促进结瘤苜蓿的固氮,并认为这是由于 CO_2 提高了植株的光合作用所致。其后,Mulder和Van Veen (20) 也发现以含4%

CO₂的空气通入豆科植物的略酸性的水培液中,可促进结瘤和固氮,而通入中性水溶液中则没有效果,他们认为CO₂被植物固定成有机酸,有利于同化氨形成氨基酸。Bergersen (21) 用离体的大豆根瘤作试验也证实了CO₂可以促进根瘤的固氮作用。Hardy (22) 进一步进行田间试验指出,在大豆行间不断通入800—1200ppm CO₂显著促进大豆的固氮效能,可较对照高达5倍,他们也归结为高浓度CO₂提高植株光合效率,为根瘤固氮提供更多的有效能源。Lowe和Evans (22) 发现CO₂对纯培养根瘤菌的生长是必需的。Keister和Rao (15) 证明在纯培养条件下,CO₂对根瘤菌本身的固氮活性有明显促进作用,但他们认为是由于降低培养基的pH值,因而有利于固氮酶的活性,但我们采用的YMA培养基中含有0.5%CaCO₃,缓冲性能强,增加CO₂并未发现有pH值的改变,因此我们认为根瘤菌本身可能具有固定CO₂的作用,增加可利用的碳素而促进了固氮。为此我们正着手采用¹⁴C CO₂标记和放射自显影的方法进行追踪,进一步阐明CO₂促进固氮的作用实质。

参 考 文 献

1. Scowcroft, W. R. and A. H. Gibson, *Nature* 253 : 351—352, (1975)
2. Child, J. J. , *Nature* 253 : 350—351, (1975)
3. Pagan, J. D., J. J. Child, W. R. Scowcroft and A. H. Gibson, *Nature* 256 : 406—407, (1975)
4. Kurz, W. G. W. and T. A. LaRue, *Nature* 256 : 407—409, (1975)
5. McComb, J. A., J. Elliott and M. J. Dilworth, *Nature* 256 : 409—410 (1975)
6. Tjepkema, J. and H. J. Evans, *Biochem. Biophys. Res. Comm* 65 : 625—628 (1975)
7. Keister, D. I., *J. Bacteriol.* 123 : 1265—1268, (1975)
8. Evans, W. R. and D. I. Keister, *Can. J. Microbial.* 22 : 949—952 (1976)
9. Keister, D. I. and W. R. Evans, *J. Bacteriol.* 129 : 149—156 (1976)
10. Gibson, A. H., W. R. Scowcroft, J. J. Child and J. D. Pagan,
11. Scowcroft, W. R., A. H. Gibson and J. D. Pagan, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 73 : 516—523 (1976)
12. Bergersen, F. J. and G. L. Turner, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 73 : 524—531 (1976)
13. Bergersen, F. J., G. L. Turner, A. H. Gibson and W. F. Dudaman, *Biochem. Biophys. Acta*, 444 : 164—174, (1976)
14. Bergersen, F. J. In : *Recent Developments in Nitrogen Fixation*, Eds. W. Newton, J. R. Postgate and C. Rodriguez-Barrueco, Academic press, pp. 309—320, (1977)
15. Keister, D. I. and V. Range Rao, In : *Recent Development in Nitrogen Fixation*, Eds. W. Newton, J. R. Postgate and C. Rodriguez-

Barrueco, Academic press, pp: 419—430 (1977)

16. Pagan, J. D., W. R. Scowcroft, W. F. Dudaman and A. H. Gibson, *J. Bacteriol.*, 129: 718—723 (1977)

17. 上海植生所 乙烯测定法 植物学报第16卷4期 (1974)

18. Schacterle, C. R. and R. L. Pollack, *Anal. Biochem.*, 51: 654—655 (1973)

19. Wilson, P. W., *The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation* (The University of Wisconsin Press, Madison) pp: 114—141 (1940)

20. Mulder, E. G. and W. L. Van Veen, *Plant Soil* 13: 265 (1960)

21. Bergersen, F. J., *Ann. Rev. Plant physiol.* 22: 121—140, (1970)

22. Hardy, R. W. F. and U. D. Havelka, In: *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*, Ed. P. S. Nutman, Cambridge University press, pp: 421—439 (1976)

23. Lowe, R. H. and H. J. Evans, *Soil Science*, 94: 351—356 (1962)

STUDIES ON THE NITROGEN FIXATION BY FREE—LIVING RHIZOBIUM SP. COWPEA STRAINS 1003 AND 32 HI

Li Ji-lun, Wu Bai-he, Cao Zeng-liang

Abstract

1. A Simple method for detecting nitrogenase activity of free-living *Rhizobium Sp.* cowpea strain 1003 on a modified yeastmannitol-agar (YMA) is herein described. In addition to the original components of YMA, the modified YMA medium contains $5 \mu\text{M}$ of $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.4 mM of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The specific activity of nitrogenase of *Rhizobium* cowpea strain 1003 grown on this medium has found to be about $50 \text{ n mol of C}_2\text{H}_4$ formed per hour per mg of protein. In this medium, mannitol can be replaced by arabinose, glucose or sodium gluconate. Sucrose, however, is not a good carbon source for growth and nitrogenase activity of strain 1003.

2. Different strains grown on different media exhibit different

specific activities of nitrogenase. The specific activity of nitrogenase of strain 1003 grown on YMA medium (13.7) is much higher than that grown on CS₇ medium (2.3). But, on the contrary, the specific activity of nitrogenase of strain 32HI grown on YMA is much lower (0.4) than that grown on CS₇ (36.2).

3. CO₂ was found to exert a significant influence on the activity of nitrogenase. 1—3%CO₂ in gas phase over the agar medium increased the specific activity of the enzyme to about 1.5 to 2.5 times as much as the case of CO₂-free control. The effect of CO₂ on nitrogenase activity may be due to the supply of organic carbon substrate (by CO₂ fixation) rather than by changing of pH. Further investigations on the mechanism of the CO₂ effect on nitrogenase activity of free-living rhizobium are still in progress.

乙烯利对玉米矮化和产量的影响 (摘要)

韩雅珊 刘兴海 郑广迁

The effect of ethrel on the growth and yield of corn

Han Ya-shan, Liu Xing-hai, Zheng Guang-qian

在玉米栽培实践中,常需控制植株高度,以塑造理想的株型。如套种玉米的苗期和移栽玉米的育苗期要求控制徒长,培育矮化苗。在多风或肥水高、密度大的高产区,期望有株矮,穗低,高产不倒的株型。为探寻乙烯利对玉米矮化和产量的影响,我们于1977—79年,在玉米的不同生育期分别用不同浓度的乙烯利进行处理,主要结果如下:

一、浸种对玉米植株性状的影响:用0.1%、0.5%和1.0%的乙烯利将种子浸渍6—8小时,取出晾干后播种。出苗两周后在田间即可观察到处理植株的高度随着处理浓度的增加而逐渐降低,即植株的矮化程度随浓度的提高而增大。由于此时节间尚未伸长,因而药剂浸种所引起的矮化,主要是叶片和叶鞘的缩短。而且处理植株的冠根总条数也比对照有所增

本文承郑丕尧教授指正及参加部分工作,特此致谢。