

鼎湖山及其周边地区栽培 豆科作物根瘤菌资源调查*

丁明懋 周丽霞 蚁伟民 易志刚

(中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

摘要: 调查了鼎湖山及其周边地区栽培豆科作物共 7 属 11 种 43 份的结瘤固氮状况, 这些豆科作物在不接种根瘤菌的情况下均可结瘤, 根瘤形状较为规则, 一般为圆形或椭圆形, 淡黄色至浅红色, 大小多在 1~6mm 之间。根瘤菌回接试验均可使宿主植物结瘤。对 29 份根瘤样品的固氮活性测定结果表明, 多数种类乙炔还原活性在 1~9 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 / (\text{g}\cdot\text{h})$ 之间, 乌豆固氮活性相对较高, 为 21.292~46.761 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 / (\text{g}\cdot\text{h})$ 。

关键词: 豆科作物; 根瘤固氮活性; 根瘤菌回接

Investigation on the Rhizobium Resource of Leguminous Crops in Dinghushan and its Around Areas

DING Ming-Mao ZHOU Li-Xia YI Wei-Min YI Zhi-Gang

(South China Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The nodulation and nitrogen fixation for 43 samples belonged to 11 species, 7 genus of Leguminous crops in Dinghushan and its around areas of Guangdong province were investigated by this paper, most of these investigating plants appeared to be nodulation. The shapes of nodule for these plants were round or ellipse with light yellow or pink colors, and the size of nodules ranged from 1 to 6 mm in the general condition. The nitrogenase activities of 29 Samples of nodules were measured by acetylene reduction, the nitrogenase activities of nodules for most leguminous crops ranged from 1 to 9 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 / \text{g fresh nodule}\cdot\text{h}$, the highest nitrogenase activities were 21.29~46.76 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 / (\text{g}\cdot\text{h})$ for the nodule samples of *Glycine soja* species.

Keywords: Leguminous crops; Nitrogenase activity; Rhizobial reinoculation

生物固氮可分为共生固氮、自生固氮和联合固氮三个方面, 共生固氮在生产中应用最广, 所起作用也最大, 尤其是在改良土壤、持续发展生产方面的作用越来越受重视^[1]。因此, 共生固氮资源的调查及其保护与开发利用的研究无论在理论研究还是生产应用方面均有重要意义。鼎湖山自然保护区在我国南亚热带有其代表性, 研究该区及其周边地区的共生固氮资源很有必要。鼎湖山自然保护区内自然林的共生固氮资源已有报道^[2,3], 但该区及其周边地区栽培作物的共生固氮资源的研究报道尚少见。本研究的目的是对鼎湖山及其周边地区栽培的豆科作物进行结瘤固氮调查, 及根瘤菌的分离、纯化与回接试验, 为根瘤菌的分类研究提供原始菌株, 为保护和开发利用这些地区的豆科作物固氮资源提供基础材料。

* 国家自然科学基金重点资助项目 (39730010) 的部分内容。

1 调查区概况

调查范围为鼎湖山所在的肇庆市郊以及邻近的高要、四会、德庆、云浮、新兴、郁南、罗定等县市，这些地区位于东经 $111^{\circ}03' \sim 112^{\circ}54'$ ，北纬 $22^{\circ}21' \sim 23^{\circ}41'$ 之间，自然地理条件以丘陵、山地为主；土壤类型较为复杂，有赤红壤、红壤、黄壤、石灰土、潮沙泥土等多种类型；属于南亚热带季风气候，年均温 $20.2 \sim 22.3^{\circ}\text{C}$ ，无霜期 $316 \sim 340$ 天，年降雨量 $1400 \sim 1750\text{mm}$ ^[4]；据资料记载^[4]及肇庆市农业局种植业科近年统计，这些地区种植的主要豆科作物有花生、大豆、豇豆、眉豆以及绿豆等，乌豆、赤小豆和葛等在一些地区也有种植。

2 材料与方法

2.1 根瘤采集。在豆科作物适当生育期挖取根瘤，进行编号并记录采集时间、地点、生境、根瘤大小形状等数据。同时采集植物标本，以便对其进行分类鉴定与确认。

2.2 固氮活性测定。采集到的新鲜根瘤装瓶，按中国科学院上海植物生理研究所固氮室改进的峰高比法测定根瘤固氮活性，单位为 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4 / (\text{g} \cdot \text{h})$ ^[5]，测试仪器为惠普 5890 气相色谱仪。

2.3 根瘤菌分离与纯化。挖取的新鲜健壮根瘤，采用 Vincent^[6]所述方法分离纯化，经革兰氏染色呈阴性的菌落接种于 YMA 斜面保存并进行回接实验。

根瘤菌回接试验。回接用豆科作物的种子经消毒后先置于无菌的培养皿中发芽，待种子出芽后将其在相应的根瘤菌菌液中浸泡半小时，然后栽植于载体为灭过菌的蛭石—沙石混合物的小花盆内，放于温室中生长并定期添加无氮营养液，生长 $45 \sim 60$ 天时进行结瘤状况观测及其它相关测定。

3 结果与分析

3.1 豆科作物根瘤的形态特征

对鼎湖山及其周边地区 7 属 11 种 43 份豆科作物进行结瘤调查发现，在不接种根瘤菌的情况下这些地区的豆科作物多数均可结瘤。根瘤形状较为规则，以圆形或椭圆形为主，颜色为淡黄色或少有浅红色，大小多在 $1 \sim 6\text{mm}$ 之间（花生、绿豆、赤小豆为 $1 \sim 3\text{mm}$ ，豆角、眉豆、大豆为 $1.5 \sim 6\text{mm}$ ），由于不同生育期的豆科作物以及生境条件的不同，根瘤形状大小与颜色也有所变化，这在有些地区的豆科固氮资源调查中也出现过^[7-9]。也有观点认为根瘤的形状和颜色是由寄主植物决定的^[10]或与宿主植物有关^[11]，这尚有待进一步探讨。根瘤着生部位除花生在主根与侧根上均有外，其余各种豆科作物的根瘤多着生于侧根上（如表 1 所示）。

3.2 豆科作物根瘤的固氮活性

表中所列 7 种 29 份豆科作物根瘤样品乙炔还原能力的测定结果表明，豆科作物在开花至结实初期所结的根瘤基本上均为有效根瘤，具一定固氮活性，不同种的植物根瘤的固氮活性各不相同，大豆、花生、豇豆、眉豆、绿豆等豆科作物根瘤的固氮活性相差不大，固氮活性一般在 $1 \sim 9\mu\text{molC}_2\text{H}_4 / (\text{g} \cdot \text{h})$ 之间，乌豆固氮活性相对较高，为 $21.292 \sim 46.761\mu\text{molC}_2\text{H}_4 / (\text{g} \cdot \text{h})$ ，赤小豆相对较低，为 $1\mu\text{molC}_2\text{H}_4 / (\text{g} \cdot \text{h})$ 左右。

表 1 鼎湖山及其周边地区豆科作物共生固氮资源调查表

Table 1 Investigation on the symbiotic nitrogen-fixing resource of leguminous crops in Dinghushan and its around areas

序号 NO.	植物种名 Species	采集地点 Site of collection	海拔 Elevation (m)	生境 Habitat	根瘤着生 部位 Nodule position	生育期 Period of duration	固氮酶活性* Nitrogenase activity	根瘤菌生长 型** Growth form	回接情 况 Reinoculated
1	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	高要	20	耕地, 栽培	主, 侧根	结实期	/	快生型	结瘤
2	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	云浮	30	耕地, 栽培	主, 侧根	结实期	7.090	快生型	结瘤
3	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	郁南	40	耕地, 栽培	主, 侧根	结实期	4.060	慢生型	结瘤
4	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	新兴	30	耕地, 栽培	主, 侧根	结实期	8.063	快生型	结瘤
5	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	罗定	40	耕地, 栽培	主, 侧根	结实期	5.702	慢生型	结瘤
6	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	德庆	40	耕地, 栽培	主, 侧根	结实期	5.571	快生型	结瘤
7	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	肇庆	30	耕地, 栽培	主, 侧根	结实期	5.828	/	/
8	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	四会	30	耕地, 栽培	主, 侧根	结实期	6.385	慢生型	结瘤
9	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	云安	50	耕地, 栽培	主, 侧根	结实期	/	慢生型	结瘤
10	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	高要	20	耕地, 栽培	侧根	结实期	15.545	快生型	结瘤
11	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	云浮	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	7.407	慢生型	结瘤
12	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	新兴	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	2.015	快生型	结瘤
13	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	罗定	40	耕地, 栽培	侧根	结实期	/	慢生型	结瘤
14	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	肇庆	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	7.478	慢生型	结瘤
15	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	德庆	40	耕地, 栽培	侧根	结实期	1.035	快生型	结瘤
16	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	云安	50	耕地, 栽培	侧根	结实期	/	快生型	结瘤
17	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	四会	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	1.292	慢生型	结瘤
18	眉豆 <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>cylindrica</i>	四会	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	2.625	快生型	结瘤
19	眉豆 <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>cylindrica</i>	新兴	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	0.502	慢生型	结瘤
20	眉豆 <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>cylindrica</i>	罗定	40	耕地, 栽培	侧根	结实期	/	快生型	结瘤
21	眉豆 <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>cylindrica</i>	肇庆	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	3.044	快生型	结瘤
22	绿豆 <i>Vigna radiata</i>	四会	30	耕地, 栽培	侧根	生长期	0.723	慢生型	结瘤
23	绿豆 <i>Vigna radiata</i>	罗定	40	耕地, 栽培	侧根	结实期	/	慢生型	结瘤
24	绿豆 <i>Vigna radiata</i>	云浮	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	5.916	慢生型	结瘤
25	绿豆 <i>Vigna radiata</i>	肇庆	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	2.341	快生型	结瘤
26	赤小豆 <i>Vigna umbellata</i>	四会	30	耕地, 栽培	侧根	生长期	1.212	慢生型	结瘤
27	赤小豆 <i>Vigna umbellata</i>	云安	50	耕地, 栽培	侧根	结实期	0.918	慢生型	结瘤
28	赤小豆 <i>Vigna umbellata</i>	郁南	40	耕地, 栽培	侧根	结实期	/	慢生型	结瘤
29	赤小豆 <i>Vigna umbellata</i>	罗定	40	耕地, 栽培	侧根	生长期	/	慢生型	结瘤
30	乌豆 <i>Glycine soja</i>	肇庆	30	耕地, 栽培	侧根	生长期	24.592	慢生型	结瘤
31	乌豆 <i>Glycine soja</i>	新兴	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	21.292	快生型	结瘤
32	乌豆 <i>Glycine soja</i>	云浮	30	耕地, 栽培	侧根	开花期	46.761	慢生型	结瘤
33	乌豆(紫花) <i>Glycine soja</i>	德庆	40	耕地, 栽培	侧根	开花期	21.444	快生型	结瘤
34	乌豆(白花) <i>Glycine soja</i>	肇庆	40	耕地, 栽培	侧根	结实期	22.588	快生型	结瘤
35	乌豆 <i>Glycine soja</i>	罗定	40	耕地, 栽培	侧根	生长期	/	快生型	结瘤
36	大豆 <i>Glycine max</i>	新兴	30	耕地, 栽培	侧根	结实期	8.147	快生型	结瘤
37	大豆 <i>Glycine max</i>	罗定	40	耕地, 栽培	侧根	结实期	8.980	快生型	结瘤
38	大豆 <i>Glycine max</i>	郁南	40	耕地, 栽培	侧根	结实期	8.851	慢生型	结瘤
39	扁豆 <i>Labiab purpureus</i>	云浮	30	耕地, 栽培	侧根	生长期	/	快生型	结瘤
40	狗爪豆 <i>Mucuna pruriens</i>	郁南	40	耕地, 栽培	侧根	生长期	/	慢生型	结瘤
41	豆薯 <i>Pachyrhizus erosus</i>	云浮	30	耕地, 栽培	侧根	生长期	/	慢生型	结瘤
42	葛 <i>Pueraria lobata</i>	罗定	40	耕地, 栽培	侧根	生长期	/	慢生型	/
43	葛 <i>Pueraria lobata</i>	郁南	40	耕地, 栽培	侧根	生长期	/	快生型	/

* 固氮酶活性: 微克分子乙炔/克新鲜根瘤·小时 nitrogenase activity: $\mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{g fresh nodule}\cdot\text{h}$
/: 未测定 no measured.

** 根瘤菌生长型: 7天以内菌落长成为快生型, 7天以后菌落长成为慢生型。

growth form: colony appeared in 7 days = fast growth form; colony appeared behind 7 days = slow growth form

栽培豆科作物的生长习性、生理生态特征等有明显的不同, 以及调查的时间不一, 调查时植物的生长状况各异, 植物生长的环境、土壤等均存在一定差异, 这些因素都会影响到固氮活性的变化。因而在调查次数和样品数不够多的情况下, 很难说明某种栽培豆科作物根瘤固氮活性的高或低, 只能表明具有固氮活性。但就我们调查区内相同生长期的豆科作物而言, 乌豆固氮活性相对较高。

3.3 根瘤菌生长特性及回接结瘤情况

豆科作物的根瘤菌分为快生型与慢生型两种, 从表中资料可见, 花生、豇豆两种作物的快生型和慢生型根瘤菌各占一半, 绿豆、赤小豆根瘤菌以慢生型较多, 眉豆和乌豆则多为快生型根瘤菌。一般认为快生型根瘤菌在抗生素抗性等方面具有优势^[12]。

利用所分离到的豆科作物的根瘤菌进行回接实验, 回接植株均可以结瘤, 回接成功率几为 100%, 这表明所分离纯化出来的菌株为根瘤菌, 可作为根瘤菌分类研究的原始菌株, 同时也说明豆科作物的根瘤菌感染寄主植物的能力较强, 通过接种根瘤菌可以提高植物的结瘤能力, 进而提高植物的固氮能力及产量, 在生产实践中有重要意义。

4 结语

4.1 鼎湖山及其周边地区的栽培豆科作物, 在开花至结实期内一般均可找到根瘤, 且多为有效根瘤, 从这些根瘤中分离纯化出来的根瘤菌回接结瘤能力较强。

4.2 豆科作物根瘤菌的固氮活性除了受植物遗传特性的控制外, 还与诸多的生态环境因子有关^[13,14], 所以认定某一豆科植物根瘤固氮活性的高低, 需要较多的观测研究。但在本研究中, 在同一区域内、在相同的季节及植物生育期内进行的调查结果表明, 乌豆比其他几种作物根瘤的固氮活性相对要高, 值得进一步研究或生产应用中加以重视。

参 考 文 献

- [1] Hamdi Y. A. Application of Nitrogen-Fixing Systems in Soil Improvement and Management. FAO Soil Bulletin 49, FAO Rome, 1982, p. 188
- [2] Ding Ming-mao, Yi Wei-min, Liao Lan-yu. Survey of nodulation and nitrogenase activity of legume trees in the forest of Dinghushan Biosphere Reserve. Nitrogen Fixing Tree Research Report (NFTRR), 1993, 11: 4~5
- [3] 丁明懋, 何道泉, 蚁伟民等. 鼎湖山自然林豆科固氮植物资源的调查研究. 生物多样性, 1993, 1(1): 2~8
- [4] 广东省农业区划委员会编. 广东省农业资源要览. 广州: 广东人民出版社, 1988, 403~444
- [5] 中国科学院上海植物生理研究所固氮室. 固氮研究中乙炔定量测定方法的简易化. 植物学报, 1974, (4): 382~384
- [6] Vincent. J. M. . A Manual for the Practical of Root-nodule Bacteria. BP Handbook No. 15 Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970
- [7] 王卫卫, 关桂兰. 沙坡头地区豆科植物共生固氮资源初步调查. 干旱区研究, 199. 4, 11 (4): 13~18
- [8] 王卫卫, 关桂兰, 郭沛新等. 甘肃天水地区豆科植物共生固氮资源调查. 干旱区研究, 1995, (1): 7~10
- [9] 关桂兰, 王卫卫, 杨玉锁. 新疆干旱地区固氮生物资源. 科学出版社, 1991

- [10] 韩素芬, 陈景荣, 谢文娟. 豆科树种根瘤菌与四种豆科植物的接种试验. 林业科学研究, 1997, (6): 610~615
- [11] 贺学礼, 韦革宏, 赵丽莉. 陕西豆科固氮植物资源调查及生态分布. 陕西农业科学, 1996, (1): 35
- [12] Sudowsky, M. J. Et al. . Possible Involvement of a Megaplusmid in Nodulation of Soybeans by Fast-growing Rhizobia from China. Appl. Environ. Microbiol, 1983, 46: 906~911
- [13] 丁明懋, 蚁伟民, 廖兰玉等. 生态条件对马占相思结瘤固氮的影响. 热带亚热带植物学报, 1994, 2 (2): 15~21
- [14] 廖兰玉, 丁明懋, 蚁伟民等. 不同生态条件下大叶相思根瘤固氮活性的研究. 热带亚热带生态系统研究, 1984, (2): 152~156