

几种土壤中土著大豆根瘤菌的血清群和固氮活性*

张宏 张桂芝 孙淑荣 王晓明

(吉林省农科院土肥所)

摘 要

初步查明了吉林省5种土壤中的土著大豆根瘤菌的血清型,黑土和草甸黑土中以477—28菌血清群为主,白浆土中以477—694菌血清群为主,淡黑钙土中以35菌血清群为主,轻碱土中以快生型大豆根瘤菌113和516血清群为主。公主岭黑土和草甸黑土中有快生型大豆根瘤菌属113血清群。477血清型和国内2028(美USDA138)血清型相似,35血清型和美国USDA124血清型相似。

查明了土著大豆根瘤菌的固氮活性,淡黑钙土中较高,为25.763~26.938C₂H₄μmol/克干瘤/小时,黑土为24.827C₂H₄μmol/克干瘤/小时,草甸黑土为23.061C₂H₄μmol/克干瘤/小时,白浆土和轻碱土较低,分别为20.970C₂H₄μmol/克干瘤/小时和15.188C₂H₄μmol/克干瘤/小时。目前的大豆栽培品种多数和固氮活性较低的大豆根瘤菌共生。因此人工接种高固氮根瘤菌种仍有必要。

吉林省的土壤,主要有中部黑土、草甸黑土,西部淡黑钙土、轻碱土,东部白浆土。在这些土壤上种植大豆,进行大豆根瘤菌接种时所存在的问题,是接入菌和土著大豆根瘤菌的竞争结瘤问题。1983年用吉林黑土,在大豆盆栽条件下接种大豆根瘤菌,回收率只有5—22.2%,据国外报道回收率只有5—10%^[5,6,7,12],说明土著大豆根瘤菌的竞争能力很强。因此,在这种具有土著大豆根瘤菌的土壤上进行大豆根瘤菌接种,必须先研究土著大豆根瘤菌的特性,然后才能考虑选择什么样的菌株用来接种。本文是关于1984—1986年进行的几种土壤中土著大豆根瘤菌的血清群和固氮活性(C₂H₂)的调查报告。

材 料 和 方 法

本研究方法是不同土壤、不同大豆品种的根瘤中分离获得土著大豆根瘤菌,然后对这些土著大豆根瘤菌进行血清型鉴定和固氮活性测定。

(一) 大豆根瘤的采集和根瘤菌的分离

从榆树(黑土)、洮南、双辽(淡黑钙土)、蛟河(白浆土)、东丰、怀德(草甸黑土)、农安(轻碱土)等县7个点,采回土壤装盆,种植吉林13、吉林3、集体5、九农9、小金黄和早丰等6个大豆品种,在大豆开花盛期采取根瘤。在公主岭省农科院院内田间采取黑河、九农、吉林20、吉林19等31个大豆品种上的根瘤,每一豆种上5—10个瘤子,每一瘤子分离一株菌株,因为据Means等报道^[10],一个瘤子是由一种血清型菌种形成。

大豆根瘤菌的分离,是将新鲜根瘤用0.2%升汞灭菌5—6分钟,无菌水冲洗5—6

*中国科学院科学基金资助课题。参加工作的尚有赵贵彬、姚远同志。

次，放于灭菌培养皿内，挤破，挑取少些根瘤内含物，移于阿息毕 (Ashby) ^[14] 无氮培养基斜面上 28℃ 培养，获得菌株，平板划线纯化 1—2 次，用石蕊牛乳和土豆培养基纯度鉴定，从分离获得的 500 余株菌株中选出 295 株进行结瘤试验，369 株进行血清型鉴定。

(二) 免疫血清制备和大豆根瘤菌株的血清型鉴定

选用从黑土 (菌株 28 和 113)、淡黑钙土 (菌株 35)、白浆土 (菌株 694)、草甸黑土 (菌株 477)、轻碱土 (菌株 516) 中分离获得的 6 株大豆根瘤菌菌株制备兔子免疫血清，土著大豆根瘤菌的血清型鉴别采用载玻片凝集法 ^[11]。并用国内外已知血清型菌株 (中国农业科学院土肥所、美国 Beltsville 细胞培养和固氮研究室提供) 和用土著大豆根瘤菌制备的血清进行凝集反应，鉴别是否有相同血清型或属我省特有的血清型。

(三) 固氮活性测定

将不同土壤中分离获得的大豆根瘤菌株 295 株进行灭菌沙栽，沙子中加入营养液 (硫酸镁 25 克，硫酸钾 3.7 克，磷酸氢二钾 15.6 克，磷酸二氢钾 6.8 克，柠檬酸铁 5.0 克，硝酸钙 3.0 克，磨细混均匀，取 1 克加水 1000 毫升)。重复 2—3 次，共 763 个沙栽，出苗后用棉花覆盖，灌以凉开水。开花期 (出苗后 6—8 星期) 拔取植株，将根系冲洗干净，剪取带根的瘤子，用乙炔还原法测定根瘤的固氮活性。

结果与讨论

(一) 几种土壤中土著大豆根瘤菌的血清型

血清的制备，选用了榆树黑土中分离的菌株 477，公主岭黑土中的 28，白浆土中的 694，淡黑钙土中的 35，黑土中分离的快生型 113 和轻碱土中的快生型 516 等 6 个大豆根瘤菌株，制备兔子免疫血清，6 个菌株的根瘤菌鉴定。结果见表 1。

表 1 6 个用以制备血清菌株的鉴定

菌株号	生长型	细胞大小 (μ)	G 染色	培 养 特 性					回接大豆
				土豆块	石蕊牛乳	肉汁蛋白胨	B. T. B 反	应	
477	慢生	0.7~0.8×1.4~3.0	负	不	长	微碱	清	碱	结瘤
28	慢生	0.7~0.8×1.5~3.8	负	不	长	微碱	清	碱	结瘤
694	慢生	0.7~0.8×1.5~2.8	负	不	长	微碱	清	碱	结瘤
35	慢生	0.7~0.8×1.0~2.1	负	不	长	微碱	清	碱	结瘤
113	快生	1~1.2×2~2.5	负	不	长	微碱乳清带	混浊	酸	结瘤
516	快生	1~1.8×2~2.8	负	不	长	微碱乳清带	混浊	酸	结瘤

从表 1 可看出：477、28、35 和 694 四个菌株为慢生型，G 染色为负，在土豆块上不生长，石蕊牛乳培养基上稍产碱不凝固，肉汁蛋白胨上不生长。B. T. B 反应为碱性，回接大豆都能结瘤，为纯的慢生型大豆根瘤菌。113 和 516 G 染色为负，在土豆块上不生长，石蕊牛乳培养基上微碱产生乳清带，肉汁蛋白胨上稍混浊，B. T. B 反应为酸性，回接大豆能形成根瘤，也为纯的快生型大豆根瘤菌株。用这 6 个菌株制备血清并将 6 种血清进行交叉凝集反应，结果见表 2。从表 2 可以看出：477、28、694 三个菌株接近于同一血清型，但在测定过程中发现，如菌株 95、135、163 等和 477 有血清凝集反应，而和 28 菌株血清却不起凝集反应。694 和 477 血清间亦有同样情况。S. M. Damirgi 等提出一个血清群

表2 6个血清型菌株交叉凝集反应

菌株	血清					
	477	28	694	35	113	516
477	3200	3200	1800	0	0	0
28	3200	3200	800	0	0	0
694	400	800	3200	0	0	0
35	0	0	0	3200	0	0
113	0	0	0	0	3200	0
516	0	0	0	0	0	3200

(group) 中可以有好几个血清型 (Serotypes)⁽¹³⁾, 因此暂且将477、28、694归为一个血清群, 归笼为477—28和477—694。35菌株血清则和菌株477、28和694都无交叉凝集反应, 113和516亦是。采用载玻片凝集法将制备成的血清进行369株土著大豆根瘤菌的血清型(群)鉴定, 结果见表3。从表3可以看出: 在黑土和草甸黑土中以477—28血清型为

表3

几种土壤中大豆根瘤菌的血清型

土类	采集地点	测定用菌株数(株)	血清型(群)											
			477—28		477—694		35		113		516		其它	
			株数	%	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%
黑土	榆树	40	34	85								6	15	
	公主岭	164	143	87				17	10.3					
淡黑钙土	洮南	68					68	100						
	双辽	41					41	100						
草甸黑土	东丰	29	20	68.8			9	31.03						
	怀德	18	12	66.6					6	33.3				
白浆土 轻碱土	蛟河	11	1	9.1	13	9.09								
	农安	13							8	50	8	50		

主, 在榆树黑土和东丰草甸黑土中未发现有快生型大豆根瘤菌, 在公主岭黑土和怀德草甸黑土中均发现有快生型大豆根瘤菌, 而且均为113血清型。在淡黑钙土上, 不论是在洮南的还是双辽的淡黑钙土中都是以35血清型为主。在蛟河以477—694血清型为主。在轻碱土中分离的16株全部是快生型的, 分属于113菌株血清型和516菌株血清型。大豆根瘤菌血清型的分布和豆种关系不密切, 因为所测定用的369株菌株基本上都是从吉林3、吉林13、小金黄、集体5、九农9和早丰等6个豆种上分离获得的, 而和土壤类型有关。在黑土、草甸黑土上接近, 而在淡黑钙土和轻碱土上则完全不同, 尤其是轻碱土上分离获得的全部是快生型的。据Mark D. Stowers等报道⁽⁸⁾, 快生型大豆根瘤菌, 一般来说, 比慢生型的耐盐。可能由于这个缘故, 在轻碱土上以快生型113和516血清型为主。H. H. Keyser 1984年在美国12个州, 从323个根瘤中分离了922个菌株⁽⁸⁾。W. H. Wright等1930年在美国4个州用了156株菌株⁽¹⁵⁾。B. E. Caldwell 1970年在美南部土壤用350个根瘤⁽⁴⁾。测定土壤中大豆根瘤菌的血清型, 本试验采用了369个瘤子中分离的369株菌株。初步查明, 我省5种土壤中, 具有3种(477—28, 477—694, 35)慢生型和2种(113和516)快生型大豆根瘤菌血清型。慢生型477、35菌株血清和国内外已知的不同血清型代表菌株进行凝集反应, 发现菌株477和国内2028血清型相同, 菌株35和美国USDA124血清型相近似, 见表4。菌株35血清型在国内还是首次发现, 分布在淡黑钙土地区。

表4 国内外不同血清型代表菌株和477、35血清的凝集反应

菌株	血清	
	477	35
005	0	0
B15	0	0
2028	1600	0
USDA 31	0	0
USDA123	0	0
USDA110	0	0
USDA122	0	0
USDA96	0	0
USDA 4	0	0
USDA130	0	0
USDA124	0	800
USDA125	0	0
USDA 76	0	0
USDA135	0	0
477	2200	0
35	0	1600

(二) 几种土壤中土著大豆根瘤菌的固氮活性

从5种土壤中分离获得菌株500余株, 经过平板划线纯化, 石蕊牛乳和土豆斜面的鉴定, 选出295株用灭菌砂栽进行结瘤和共生固氮活性的测定, 以观察5种土壤中土著大豆根瘤菌的共生固氮活性, 砂栽用玻璃罐头瓶, 重复2—3次, 共748个灭菌砂栽, 生育期用凉开水灌溉。大豆品种采用吉林13、吉林3、吉林20、小金黄、集体3和早丰等, 生长60—75天。采取根瘤, 用乙炔还原法测定固氮活性, 结果见表5。从表5可以看出: 不同土壤中土著大豆根瘤菌株的共生固氮活性, 淡黑钙土上较高, 25.763—26.938 $C_2H_4\mu mol/克干瘤/小时$ 。其次黑土为24.712—24.942 $C_2H_4\mu mol/克干瘤/小时$, 草甸黑土为21.942—24.176 $C_2H_4\mu mol/克干瘤/小时$, 白浆土上为20.970

表5 5种土壤中土著大豆根瘤菌的固氮活性

土壤	地点(县)	测定用菌株数(株)	固氮活性
			$C_2H_4\mu mol/克干瘤/小时$
淡黑钙土	农安	18	26.938
	洮南	32	25.763
草甸黑土	东丰	20	24.176
	怀德	11	21.942
黑土	榆树	22	24.942
	公主岭	104	24.712
白浆土	蛟河	9	20.970
轻碱土	农安	5	15.188

$C_2H_4\mu mol/克干瘤/小时$, 轻碱土上为15.188 $C_2H_4\mu mol/克干瘤/小时$ 。土著大豆根瘤菌的固氮活性, 以淡黑钙土和黑土上较高, 在轻碱土和白浆土上较低。

几个豆种和5种不同土壤中土著大豆根瘤菌间的共生固氮活性整理于表6。从表6可以看出: 不论何种土壤中的土著大豆根瘤菌, 34株和吉林3号大豆共生固氮良好, 在3种豆种中最高, 平均为29.818 $C_2H_4\mu mol/克干瘤/小时$ 。共生固氮活性的强弱受寄主大豆品种的影响, 国外也提出选择固氮高的大豆基因型⁽³⁾和选出高效固氮大豆新品系⁽²⁾。吉林3号大豆从本试验来看, 是一个固氮高的大豆基因型。

表6

5种土壤中的土著大豆根瘤菌在3种大豆上的共生固氮活性

品 种	不同土壤中土著大豆根瘤菌固氮活性								总测定 菌株数 (株)	平均 固氮活性
	淡黑钙土		草甸黑土		黑 土		白浆土轻碱土			
	双 辽	洮 南	东 丰	怀 德	榆 树	公主岭	蛟 河	农 安		
吉 林13	18.352	14.239	15.748	21.470	18.233	—	23.637	10.437	32	17.503
吉 林3	32.239	42.663	34.677	28.888	29.270	30.520	20.177	20.177	34	29.813
吉 林20	—	22.596	11.745	17.412	20.090	28.753	19.200	15.634	42	19.347

关于在大豆种植老区,不同土著大豆根瘤菌株的固氮活性,我们调查了一块地内25个大豆品种的根瘤菌的固氮活性。在鼓粒期每品种采集根瘤5—10个,每个瘤子分离一株,共获得109株,经纯化和简单鉴定后,在灭菌条件下接种大豆吉林20、吉林18,用乙炔还原法测定根瘤固氮活性,结果见表7。从表7可以看出:在同一块土中,土著大豆根瘤菌株间的共生固氮活性变化幅度很大,最高达 $68.20\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$,最低 $3.16\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$,相差21倍。土著大豆根瘤菌的固氮活性在 $20\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 以下的占64.5%,而在 $50\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 以上的较少,为7.2%。从调查看多数大豆品种是和固氮活性较低的大豆根瘤菌共生。这与Cresan.P.B1986年报道美国的大豆品种所喜欢的大豆根瘤菌品系是固氮作用弱的自然现象相一致^[11]。从这自然现象出发,如何利用大豆根瘤菌来提高大豆的共生固氮活性,以期达到增产的目的,还是有潜力的。

表7 同一块地中不同菌株的固氮活性

固氮活性	菌株数 (株)	占测定 总菌数(%)
3.16~9.80	32	33.3
10.44~13.00	80	51.2
20.28~29.00	14	11.5
31.36~38.93	8	8.3
44.50~49.00	5	5.2
50.00~56.20	2	2.0
62.40~68.20	5	5.2

从表7可以看出,固氮活性在 $3.16\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 至 $13.00\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 的占64.5%,而在 $50\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 以上的较少,为7.2%。从调查看多数大豆品种是和固氮活性较低的大豆根瘤菌共生。这与Cresan.P.B1986年报道美国的大豆品种所喜欢的大豆根瘤菌品系是固氮作用弱的自然现象相一致^[11]。从这自然现象出发,如何利用大豆根瘤菌来提高大豆的共生固氮活性,以期达到增产的目的,还是有潜力的。

依据本试验中500多个根瘤样品的固氮活性测定来看,最高能达 $68.20\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$,而多数是在 $30.00\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 以下。因此我们认为,在选育细菌配料用的优良大豆根瘤菌株时,其固氮活性标准应在 $30\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 。

小 结

(一)初步查明我省几种土壤中土著大豆根瘤菌的血清群,黑土(榆树、公主岭)和草甸黑土(东丰、怀德)以477—28血清群为主,白浆土中以477—694血清群为主,淡黑钙土中以35血清群为主,轻碱土中以快生型大豆根瘤菌113和516血清型为主,在公主岭黑土和怀德草甸黑土中有快生型大豆根瘤菌属113血清型。

(二)土著大豆根瘤菌477血清型和国内的2028(美USDA138)血清型相同,35血清型和美国USDA124血清型相同。

(三)初步查明我省几种土壤中土著大豆根瘤菌的共生固氮活性,在淡黑钙土中较高,为 $25.763\text{—}26.938\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 。其次为黑土 $24.712\text{—}24.942\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$,草甸黑土为 $21.942\text{—}24.176\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 。白浆土和轻碱土较低,分别为 $20.970\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 和 $15.188\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 。

(四)在同一块地内土著大豆根瘤菌菌株间的固氮活性差异很大,最低为 $3.166\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$,最高达 $68.200\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$,相差近21倍,而多数是在 $20\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$,占64.5%。少数在 $50\text{C}_2\text{H}_4\mu\text{mol}/\text{克干瘤}/\text{小时}$ 以上,占7.2%。

参 考 文 献

- (1)中国科学院南京土壤研究所微生物室:土壤微生物研究法,科学出版社,1985,205—206。
- (2)夏亦莽:能高效固氮的大豆新品系nTS—382,译自《Farmeo Journal》,1984,11,76,《国外农学——大豆》1985,4,9。
- (3)A.M.Gostick, D.J.Hume. Selecting for high-nitrogen-fixing soybean genotypes. Canadian Journal of Plant Science, 1985,65(4)1110。
- (4)B.E.Caldwell and E.E. Hartwig 1970. Serological distribution of soybean and root nodule bacteria in Soil of Southeastern U.S.A. Agron.J. Vol62, 621—622。
- (5)C.S. Kvier, C.E.Ham,J.W. Lambert, 1981. Recovery of introduced Rhizobium japonicum strains by soybean genotypes. Agron.J. 73.900—905。
- (6)G.E.Ham, V.B.Cardwell and H. W. Johnson 1971. Evaluation of Rhizobium japonicum inoculants in Soils Containing naturalized Populations of Rhizobia. Agron. J. 63: 301—303。
- (7)G.Vest, D.F.Weber and C. Sloger 1973. Nodulation and nitrogen fixation and uses. Monograph 16.American Society for Agronomy, Madison, Wis.
- (8)H.H. Keyser, D.F. Weber and S.L.Uratsn, 1984. Rhizobium japonicum serogroup and hydrogenase Phenotype distribution in 12 States. Appl. Environ Microbiol Vol47, No 4, 613—615。
- (9)Mark D. Stowers and Allan R.J. Eaglesham 1984. Physiological and Symbiotic Characteristic of fast-growing Rhizobium japonicum. Plant and Soil, 77, 3—14。
- (10)Means, Ura Mae, Herbert W. Johnson and Lewis W.Erd—man 1961. Competition between bacterial Strains effecting nodulation in soybeans. Sci. Soc. Amem Proc.25: 105—108。
- (11)P. B. Cregan and H. H. Keyser, 1986. Host restriction of nodulation by Bradyrhizobium japonicum strain. USDA123 in soybean. Crop Science vol 26, No 5, 911—916。
- (12)R.W. Weaver and L.R. Frederick 1974. Effect of inoculum rate of Competitive nodulation of Glycine Max. L Merrill. Field Studies Agron.J. 66: 233—236。
- (13)S.M. Damirgi L.R. Frederick and Z.C. Anderson 1967 serogroups of Rhizobium japonicum in soybean nodules as affected by soil types Agron.J. 59, 10—12。
- (14)Waksman 1932 Principles of Soil Microbiology, Second Edition P.109。
- (15)W.H. Wright, W.B. Sarles and E.G. Halts 1930. A study of Rhizobium japonicum isolated from various Soils. J. of Bacteria. 19: 39。

RHIZOBIUM JAPONICUM SEROGROUPS AND NITROGEN FIXATION ACTIVITY DISTRIBUTION IN SEVERAL SOIL TYPES

Zhang Hong et al

(*Jilin Academy of Agricultural Science Gongzhuling*)

ABSTRACT

The main serogroups of indigenous slow and fast-growing *Rhizobium japonicum* in 5 types of Soil are strain 477—28 serogroup in Black soil and Meadow black soil, Strain 477—694 Serogroup in Baijing soil and strain 35 serogroup in light chernozem and fast growing *Rhizobium japonicum* strains 113 and 516 Serogroups in light alkali—saline soil.

Strain 477—28 serogroup is the same as the strain 2028 serogroup, and strain 35 serogroup is the same as the strain USDA 124 serogroup.

This research showed that the N_2 fixing activity (C_2H_2 reduction rate) of indigenous *Rhizobium japonicum* were: 25.763—26.938 $C_2H_4\mu mol/gD. W nod/h$ in chernozem, 24.827 $C_2H_4\mu mol/g D.W nod/h$ in Black soil, 23.061 $C_2H_4\mu mol/gD. W nod/h$ in meadow black soil, 20.970 $C_2H_4\mu mol/gD. W nod/h$ in Baijing Soil and 15.188 $C_2H_4 \mu mol/g.D. W nod/h$ in light alkali—shine soil.

This research also showed that the soybean cultivars life to symbiotically associate with those nodule bacteria that have low nitrogen fixing capacity.

* The Project Supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences