

快生型大豆根瘤菌QB113的共生固氮及其对大豆的增产效果

张红缨 唐桂馥 薛德林 王书锦 张宪武

(中国科学院林业土壤研究所)

摘 要

从东北地区分离的快生型大豆根瘤菌 QB113 (fast-growing *R. japonicum* QB113) 在酵母—甘露醇液体培养基上生长时, 世代时间为3.22小时, 代谢过程产酸, 生理生化特性与国内报导的快生型大豆根瘤菌相类似。我们首次报导了快生型大豆根瘤菌对栽培大豆表现的良好共生固氮能力和增产效果。在实验室的无菌水培实验中, 铁丰18大豆接种 QB113, 种子产量比不接种的对照提高121.7%, 比接种快生型大豆根瘤菌USDA193的提高55.5%, 比接种慢生型大豆根瘤菌61A76的提高9.1%, 在黑龙江省尧达山南麓(白浆土地区)、北麓(黑土地区)的田间小区试验和大面积(20公顷)试验中, 对黑农26、合丰25、82—7799—2大豆进行同样的接菌处理, 接种QB113的种子产量比对照分别提高8.6%、10.0%和15.7%。结果说明快生型大豆根瘤菌QB113是可以与栽培大豆品种形成有效共生的。并且, 在生产应用中具有一定的价值和可观的前景。

到目前为止, 人工使田间栽培大豆品种结瘤的菌种都是慢生型大豆根瘤菌。1982, Keyser H. H. 等从中国大豆根瘤中分离出快生型大豆根瘤菌⁽¹⁾。第一次使人们认识到除传统的慢生型大豆根瘤菌外, 还存在快生型大豆根瘤菌。快生型大豆根瘤菌生长速度快, 利用碳源广泛, 很多菌株代谢过程产酸, 并具有较高的耐盐能力等特征。这种菌的发现和研究的, 在理论上和实践上都有重要的意义。因此, 引起了国内外生物固氮科学家的极大重视^(2,3,4,5,6,7,)。

Keyser H. H. 等分离的十几株快生型大豆根瘤菌, 可使美国的几个栽培大豆品种结瘤, 但均是无效共生。因此, 他们正在用遗传工程的方法, 拟在美国商品化的慢生型大豆根瘤菌中加入快生型大豆根瘤菌的快速生长特征。

目前, 快生型大豆根瘤菌在分类学中的地位尚未确定, 在田间栽培大豆上结瘤(即感染性)以及与慢生型大豆根瘤菌的竞争性尚不清楚, 能否应用于大田仍有不同的看法。本篇报告, 仅就从我们自己分离的一些快生型大豆根瘤菌中选出的一株, 即 *R. japonicum* QB113, 于实验室接种无菌水培大豆, 以及在田间小区和大面积试验所得结果进行报导。目的在于探索快生型大豆根瘤菌对栽培大豆品种的感染性、共生固氮的有效性, 以及其在生产应用中的价值和前途。

本文于1985年2月26日收到。

材料与 方法

(一) 材料

1. 供试菌株来源:

R. japonicum QB113、QB5、QB27、QBF₅₋₁系本所微生物二室1982年从东北地区分离、纯化、鉴定,得到的一批快生型大豆根瘤菌中的四株之一⁽¹¹⁾。

快生型大豆根瘤菌 USDA193系 Keyser H. H.等自中国大豆根瘤中分离而得。

慢生型大豆根瘤菌 B_{16-11c}系我室保存的高固氮活性菌株⁽¹⁰⁾。

慢生型大豆根瘤菌 61A76及 CB1809引自美国。

2. 供试大豆品种:

铁丰18引自辽宁省铁岭市农科所。

黑农26、合丰25系黑龙江省八五〇农场和宝清县当地生产品种。

82—7799—2系中国科学院八五〇农场基点大豆协作组的高光效大豆品种。

(二) 方法

1. 植株全氮测定:

凯氏定氮法⁽⁸⁾。

2. 植株根瘤固氮活性测定:

乙炔还原法⁽⁹⁾。

3. 实验室无菌水培实验:

在水培实验中,对铁丰18大豆品种采用接种快生型大豆根瘤菌 QB113、USDA193,接种慢生型大豆根瘤菌 61A76和不接菌四个处理。每一处理10盆。

4. 田间小区试验:

我们在黑龙江省八五〇农场白浆土地区进行了田间试验,小区面积为36米²。试验处理为接种快生型大豆根瘤菌 QB113,接种慢生型大豆根瘤菌 B_{16-11c}和不接菌处理;供试大豆品种为高光效大豆品种82—7799—2(中科院大豆攻关协作组试验品种)。每个处理重复三次,收获前进行取样考种(每一处理取样10株),并实打实收计产。

5. 大面积田间对比实验:

在黑龙江省瑷达山南麓(白浆土地区)和北麓(黑土地区),对QB113进行了大面积(20公顷)的田间对比实验,收获前进行取样考种(每一处理取样20株),并实打实收计产。

6. 生产示范实验:

在黑龙江省宝清县东明村专业种植户的90亩地块中,对合丰25大豆品种,进行了接种QB113和不接菌处理,重复二次。收获前取样考种,并实打实收计产。

试 验 结 果

一、快生型大豆根瘤菌QB113的主要生理生化特性及其对无菌水培大豆的共生固氮和增产效果

1. 快生型大豆根瘤菌QB113的主要生理生化特性:

经初步鉴定,快生型大豆根瘤菌QB113的主要生理生化特性见表1a。

从表1a结果可以看出, QB113菌株具有与国内外报导的快生型大豆根瘤菌类似的生理生化特性,生长在酵母—甘露醇液体培养基上⁽¹²⁾,世代时间为3.22小时,第4天后, pH下降到5.4,说明它的代谢过程产酸。而USDA193的世代时间为3.8小时,四天后pH为5.9⁽¹⁾。

2. QB113菌株对无菌水培大豆的共生固氮及其增产效果:

表1b列出了四种处理试验结果的大豆植株生物量、固氮量、种子产量和质量等有关数据。

表1b的试验结果表明,快生型大豆根瘤菌QB113不仅可以使铁丰18大豆结瘤,并形成有效共生,而且接种QB113的植株生物量、种子产量和质量均显著高于不接菌处理和接种USDA193处理。同时,种子产量比接种慢生型大豆根瘤菌61A76的提高9.1%,比接种USDA193的提高55.5%,但籽粒的蛋白质含量低于接种61A76处理。

二、快生型大豆根瘤菌QB113田间小区试验的共生固氮及增产效果

表2列出了田间小区的试验结果。

小区试验结果表明,快生型大豆根瘤菌QB113与大豆82—7799—2形成了有效共生

表4 黑土地区(宝清县东明村专业户)接种QB113的增产效果*

Table 4. Effect of QB113 inoculation in black soil area(peasant families of Dongming Village of Bao Qing county town)*

接 菌 处 理 Inoculated treatments	株 高 Plant height (cm)	茎 杆 重 Dry stem weight (g/mu)	根瘤固氮活性 ($\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{g}$ 鲜 瘤/h) Nodule nitrogenase activity(μM $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g fr nod.}/\text{h}$)	种子产量 Seed yield	
				斤/亩 Jin/mu	% percent
不接菌 Uninoculated control	71	88000	1192.2	441.4	100.0
接种(快生型QB113) Inoculated with fast-growing Type QB113	72	97000	3888.8	485.8	110.0

* 试验面积为6公顷(90亩),大豆品种为合丰25。考种为20株的平均值。于结荚期测定根瘤固氮活性。

• The experimental area is six hectare(90mu). Soybean variety is Hefeng 25. The results of this table is the means of 20 plants. Nodule nitrogenase activity was determined at the pod formation stage.

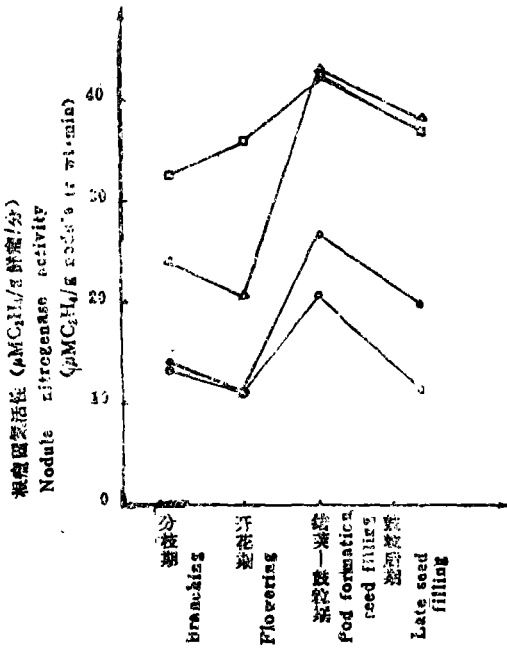


图 1 田间接种QB113植株不同生育期根瘤固氮活性。试验面积为20公顷大豆品种为黑农26。图中每点为4个重复的平均值。○—○土著根瘤菌所感染；●—●接种CB1809处理；△—△接种QB113 处理；□—□接种B_{16-11C} 处理。

Fig. 1. Nodule nitrogenase activities of plants inoculated with QB113 at different growth stages in the field. Field area is 20 hectares; Soybean variety is Henong 26. Each point represents mean of four replicates. ○—○ infected with indigenous *R. japonicum*; ●—● inoculated with CB1809; △—△ inoculated with QB113; □—□ inoculated with B_{16-11C}.

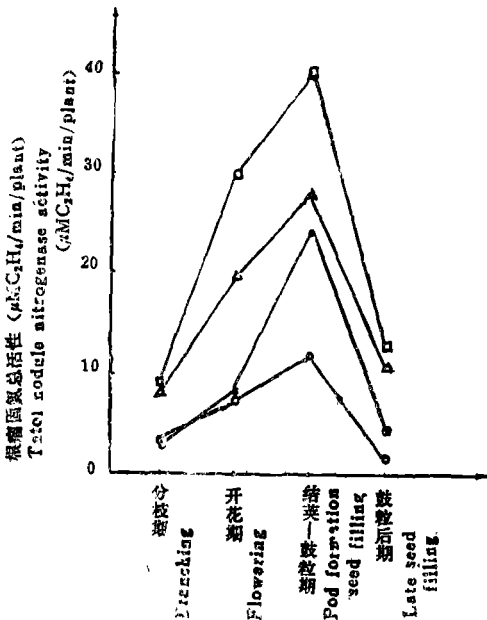
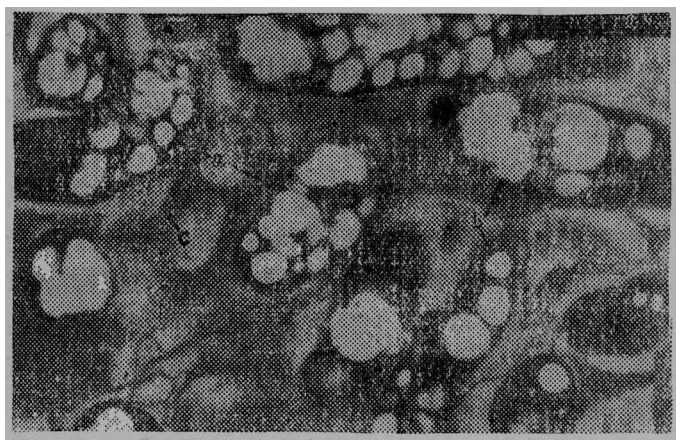


图 2 田间接种QB113植株不同生育期根瘤固氮总活性。试验面积为20公顷。大豆品种为黑农26。图中每点为4个重复平均值。○—○被土著根瘤菌所感染；●—●接种CB1809 处理；△—△接种QB113 处理；□—□接种B_{16-11C}处理。

Fig. 2. Total nodule nitrogenase activity of plant inoculated with QB113 at different growth stages in the field. Field area is 20 hectares. Soybean variety is Henong 26. Each point represents mean of four replicates. ○—○ infected with indigenous *R. japonicum*; ●—● inoculated with CB1809; △—△ inoculated with QB113; □—□ inoculated with B_{16-11C}.



照片 1 无菌水培实验中，接种QB113 植株根瘤的电子显微镜照片。放大 37,500 倍。a：类菌体；b： β -羟基丁酸盐颗粒。c：类菌体壁。

Photograph 1. An electron micrograph of the soybean nodule inoculated with QB113 in sterile liquid culture. $\times 37,500$. a: bacteroid. b: β -hydroxybutyrate particulate. c: bacteroid wall.

结合大面积田间对比实验，我们测定了大豆不同生育期的根瘤固氮活性，结果见图 1 和图 2。

图 1、图 2 结果表明，不同生育期，接种不同根瘤菌的植株，根瘤的固氮活性是不同的。但不同处理的根瘤固氮总活性的变化规律还是一致的，固氮总活性的高峰值出现在结荚一鼓粒期。在分枝期和开花期，接种 QB113 处理显著高于不接菌处理，同时也高于田间推广的慢生型品种 CB1809 处理，但低于接种高固氮活性的慢生型 B_{16-11C} 处理。从开花期到结荚一鼓粒期期间，接种 QB113 处理的根瘤固氮活性迅速上升，在结荚一鼓粒期时，达到最大值，并高于其它处理；到鼓粒后期活性普遍下降。

讨 论

1. 本文第一次报导了快生型大豆根瘤菌可以与田间栽培大豆品种形成有效共生，使大豆获得大面积增产效果。实验中，快生型大豆根瘤菌 QB113 对大豆铁丰 18、黑农 26、合丰 25、82—7799—2 品种表现了良好的亲

生，其根瘤的固氮活性和产量显著高于不接菌处理，而与接种高固氮活性的 B_{16-11C} 处理很接近。说明 QB113—大豆共生体系的共生固氮能力较强。

三、快生型大豆根瘤菌 QB113 大面积田间对比实验的共生固氮及其增产效果

试验结果如表 3、表 4 所列。

从表 3 和表 4 可以看出快生型大豆根瘤菌 QB113 对黑农 26 和合丰 25 也具有较好的感染性和有效性，接种 QB113 不仅可以提高植株的生物量、根瘤固氮活性，而且使大豆获得了增产（8.6—10.0%）。



照片 2 无菌水培实验中，接种 QB113 植株根瘤的扫描电镜照片放大 9,000 倍。

Photograph 2. A scanning electron micrograph of the soybean nodule inoculated with QB113 in sterile liquid culture. $\times 9,000$.

合性。瘤多色红,根瘤固氮活性、植株干重等特征显著高于不接菌处理。实验室无菌水培的结果也说明,快生型大豆根瘤菌 QB113 不仅感染性好,而且共生固氮有效性强。在大豆结荚期采集的根瘤,电子显微镜观察可以看到大量的类菌体和 β -羟基丁酸盐颗粒(见照片 1、照片 2)。

2. 在无菌水培实验中,我们发现,接种快生型大豆根瘤菌 QB113 植株在开花期以前,长势略差于接种慢生型大豆根瘤菌 61A76 处理。叶片绿色稍浅略呈黄色。这可能是由于开始根瘤固氮能力较低,不能满足植株生长需要所致。开花期以后,这种差异很快消失,而且赶上和超过了慢生型 61A76 处理。可见,大豆生殖生长期,根瘤固氮活性与提高产量关系很大。我们推断,如果能提高或延长这个时期的固氮作用,同时于苗期配合施用适量的启动氮肥,将会获得更大的增产效果。

3. 从我们大面积田间实验的结果可以看出,接种快生型大豆根瘤菌 QB113 的植株根瘤固氮活性,在大豆不同生育期全过程的变化节奏,基本上与慢生型大豆根瘤菌 CB1809、B_{16-11c} 处理一致(图 1 和图 2),在大豆结荚鼓粒期有一高峰。以 QB113 菌株处理的根瘤固氮活性明显高于当地大豆根瘤菌(CK)的处理,也高于美国生产菌株 CB1809 处理,而略低于我们高固氮活性慢生型 B_{16-11c} 处理。但快生型大豆根瘤菌是 1982 年以后才被人们发现,它的潜力尚未被充分发掘。因此,我们认为,可以通过大量、细致的菌种搜集、分离、筛选工作,选育出高亲合性、高竞争能力、高固氮活性的快生型菌株,再将其与高光效大豆品种形成最佳组合,来达到进一步提高大豆产量、质量和经济效益的目的^[10]。

有关快生型大豆根瘤菌的研究工作刚刚起步,还有许多方面需要进行深入探讨和研究。

参 考 文 献

- [1] Keyser H. H. et al: 1982, Science, Vol. 215, No. 4540: 1631—1632
- [2] Yelton M. M. et al: 1983, J. of General Microbiology, Vol. 129, No. 5: 1537—1547
- [3] Masterson, R. V et al: 1982, J. of Bacteriology, Vol. 152, No. 2: 628—931
- [4] 徐玲玫等: 1983 土壤肥料, No. 2: 7—8
- [5] 徐玲玫等: 1984, 快生型大豆根瘤菌的理化特征和共生效应, 大豆科学, Vol. 3, No. 2: 101—109
- [6] 葛诚: 1984, 快生型大豆根瘤菌抗原分析, 大豆科学, Vol. 3, No. 3: 237—242
- [7] 葛诚: 1984, 快生型大豆根瘤菌在栽培大豆根瘤内的分布调查, 大豆科学, Vol. 3, No. 4: 313—317
- [8] Morris, C. F., R. B. Carson, D. A. Shearer, and W. T. Japkiewicz. 1968, Comparison of the automatic Dumas (Coleman Model 29A Nitrogen Analyzer II) and Kjeldahl methods for total nitrogen in agricultural materials. J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 51: 216—219
- [9] Burris, R. A. 1972, Nitrogen fixation—assay methods and techniques. Methods Enzymol. 24, 421—422
- [10] Zhang Xianwu (张宪武) et al: 1981, KEXUE TONGBAO (A Monthly J. of Science), Vol. 6, No. 6: 862—863
- [11] 王书锦等: 1985, 中国东北地区不同土壤类型中的快生型大豆根瘤菌的生态分布与鉴定, 生态学杂志, Vol. 5
- [12] Mark D. Stowers et al: 1984, Plant and Soil, Vol. 77, No. 1: 3—14

表 1a 快生型大豆根瘤菌 QB113 的生理生化特性
Table 1a. Physiological-biochemical characteristics of the fast-growing *R. japonicum* QB113*

菌 号 No. of strains tested	革兰氏染色 Gram stain	BTB反应 Bromothymol blue reaction	3-酮基乳糖 3-keto-l actose	石蕊牛奶反应 Litmus milk reaction	蛋白胨肉汤 peptone broth	耐盐性 (NaCl 克 分子浓度) Salt tolerance (NaCl concentration	明胶水解 Gelatin hydrolysis	纤维素水解 Cellulose hydrolysis	淀粉水解 Starch hydrolysis	柠檬酸 盐利用 Citrate utilization
USDA193	-	产 酸 Produce acid	-	无血清环、产酸 No serum ring Produce acid	+	0.3M	-	-	-	-
QB113	-	产 酸 Produce acid	-	形成血清环、产酸 Form serum ring, produce acid	+	0.3M	-	-	-	-
QB5	-	产 酸 Produce acid	-	形成血清环、产酸 Form serum ring, produce acid	+	0.3M	部分液化 Part liquefaction	-	-	-
QB27	-	产 酸 Produce acid	-	形成血清环、产酸 Form serum ring, produce acid	+	0.6M	-	-	-	-
QBF5-1	-	产 酸 Produce acid	-	形成血清环、产酸 Form serum ring, produce acid	+	0.2M	全部液化 Complete liquefaction	-	-	-

* USDA193是引自美国的快生型大豆根瘤菌。QB113及QB5, QB27, QBF5-1为我组分离出的快生型大豆根瘤菌株。
• USDA193 is the fast-growing *R. japonicum* that come from US. QB113, QB5, QB27, and QBF5-1 are the fast-growing *R. japonicum* isolated from our collections.

表 1b 接种快生型大豆根瘤菌QB113对大豆共生固氮和产量的影响*

Table 1b. The effect of fast-growing *R. japonicum* QB113 inoculation on the symbiotic nitrogen fixation and yield of soybean.*

接 菌 处 理 Inoculation treatments	株 高 Plant height (cm)	荚 数 (个/株) Pod number/ plant	百粒重 (克) seed weight (g)	株粒数 (个/株) seed number/ plant	生物量 干重/株 Plant dry wt (g/plant)	固氮量 (克/株) Nfixed/plant (g)		种子质量 Seed quality		种子产量 Seed yield	
						植株全 氮量 Total N/ plant	净固氮量 Net N fixed/plant	蛋白质 Protein content (%)	油 脂 Fat (%)	(克/株) g/plant	% percent
不接菌 (对照) Uninoculated control	47.2	23.8	10.3	51.0	28.5	0.63	0	28.4	21.9	9.2	100
接种 (快生型QB113) Inoculated with fast-growing type QB113	53.0	67.2	18.3	107.8	61.3	1.529	0.902	32.6	23.3	20.4	221.7
接种 (慢生型81A76) Inoculated with slow-growing type 81A76	56.0	74.6	13.7	113.8	53.0	1.729	1.102	39.5	19.1	18.7	203.3
接种 (快生型USDA193) Inoculated with fast-growing type USDA193	52.6	55.6	13.0	94.0	41.7	0.98	0.354	29.8	23.1	13.12	142.7

* 1. 植株在无菌水培液中生长138天后收获。(Plant were grown in sterile liquid culture solution in the greenhouse for 138 days.)

2. 每个处理10盆重复。(Every treatment contains ten replicates.)

3. 大豆品种为铁丰18 (Soybean variety is Tiefeng 18.)

表 2 接种快生型大豆根瘤菌QB113的田间小区试验结果*

Table 2. Experimental results of field-plot test of soybean plant inoculated with fast-growing R. japonicum QB113.*

接 菌 处 理 Inoculation treatments	株 高 plant weight (cm)	主 茎 节 数 (个/株) Nod number per plant	株 荚 数 (个/株) Pod number per plant	株 粒 数 (个/株) Seed number per plant	生 物 量 (克干重/株) Plant dry weight per plant	根瘤固氮活性 ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ /克 鲜瘤小时) Nitrogenase activity ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ /g nodule fr wt/ h)	种 子 产 量 Seed yield	
							斤/亩 Jin/mu	% percent
不接菌 (对照) Uninoculated control	79.9	14.3	21.4	45.2	16.6	1198.8	246.8	100.0
接种 (快生型QB113) Inoculated with fast-growing type QB113	76.4	15.2	24.5	45.5	18.4	4036.8	286.6	116.7
接种 (慢生型B10-11c) Inoculated with slow-growing type B10-11c	77.3	15.4	24.4	51.2	17.1	4876.2	288.4	116.9

* 表中数据为10株的平均值，根瘤固氮活性在鼓粒期测定，大豆品种为82-7799-2。

* The results of this table are means of ten replicates. Nodule nitrogenase activity were determined at the stage of seed filling. Soybean variety is 82-7799-2

表 3 白浆土地区 (850农场) 接种QB113的增产效果*

Table 3. Effect of QB113 inoculation on the yield of soybean in planosol area(850 Farm Station).*

接 菌 处 理 Inoculation treatments	株 高 Plant height(cm)	主 茎 节 数 (个/株) Nod number per plant	底 荚 高 (厘米) Base pod height (cm)	株 荚 数 (个/株) Pod number per plant	株 粒 重 (克/株) Seed weight per plant	百粒重 (克) 100 seed weight (g)	无 效 荚 数 (个/株) Ineffective pod number per plant	实 际 产 量 Actual seed yield	
								斤/亩 Jin/mu	% percent
不 接 菌 (对 照) Uninoculated control	80.6	11.7	18.3	15.3	4.5	16.0	0.8	329.8	100.0
接 种 (快 生 型QB113) Inoculated with fast-growing type QB113	84.4	13.6	22.8	17.9	4.9	16.3	1.0	358.1	108.6
接 种 (慢 生 型61A76) Inoculated with slow-growing type 61A76	89.5	13.0	19.8	15.2	4.1	16.1	0.7	322.9	97.9
接 种 (慢 生 型CB1809) Inoculated with slow-growing type CB1809	88.0	14.0	19.9	15.8	4.6	16.5	0.5	339.5	102.9
接 种 (慢 生 型B10-11c) Inoculated with slow-growing type B10-11c	86.3	13.8	17.8	18.8	6.25	17.7	0.98	394.7	119.7

* 各试验处理为100亩，收获前五点取样，各考种20株的平均值。实际产量为实打实收的平均值。大豆品种为黑农26。
* Every experimental treatment is 100 mu. Samples were collected at five points-before harvest. The average of 20 plants are shown in Table 3.
The actual yield is the means of all plants. Soybean variety is Heiung 26.

**EFFECT OF THE FAST-GROWING *RHIZOBIUM JAPONICUM*
QB113 SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION AND YIELD OF SOYBEAN**

Zhang Hongying Tang Guifu Xie Delin

Wang Shujin Zhang Xianwu

(Institute of Forestry & Soil Science, Academia Sinica)

Abstract

Fast-growing *R. japonicum* QB113 was isolated from nodules of wild soybean (*Glycine soja*) growing in northeast china. In yeast extract mannitol liquid medium its mean generation time was 3.22 hours and it produced acid. Its physiological-biochemical characteristics were similar to other fast-growing *R. japonicum* reported. For the first time it was reported that *R. japonicum* QB113 showed both good infectiveness and effectiveness with common commercial cultivars of soybean in the greenhouse and field experiments. In sterile liquid culture experiment, seed yield of Tiefeng 18 inoculated with QB113 increased 121.7% than that of control, and 55.5% than that of plants inoculated with fast-growing *R. japonicum* USDA193, and 9.1% than that of plant inoculated with slow-growing *R. japonicum* 61A76. The same treatments were conducted on Heinong 26, Hefeng 25, 82—7799—2 soybean varieties in field experimental plot, and 20 hectare in the South (planosol area) and North (black soil area) of Wan Da mountain, Heilongjiang Province. The seed yield of plant inoculated with QB113 increased 8.6%, 10.0% and 15.7% respectively than that of uninoculated. The results of our experiments showed that the fast-growing *R. japonicum* QB113 can form effective symbiosis with the soybean cultivar, and proposed to a definite valuable prospects in increasing the yield of soybean production.