

# 高效大豆根瘤菌 R<sub>B-9</sub> 的选育及其接种增产效果

尹达龙 贾凤菊

(黑龙江省农业科学院土肥所)

## 摘 要

R<sub>B-9</sub>, 是选自高光效大豆材料 P77-78-0 的 0.3 毫米主根根瘤, 经与 B<sub>15</sub>、61A76 等相比较地进行水培初选和复选、盆栽和田间的接种试验, 以及较大面积的中间试验和大面积示范推广, 而选育出来的高效菌种。R<sub>B-9</sub> 经生化鉴定, 证明是典型的大豆根瘤菌。R<sub>B-9</sub> 在武等培养基上, 其生长速度比 B<sub>15</sub> 及 A110、61A76 等快一天左右, 但其余生化特性与已报导的其它慢生型大豆根瘤菌相类似。在黑龙江省不同土区测定结果, R<sub>B-9</sub> 接种的净固收率为 28.1--38.1%。R<sub>B-9</sub> 接种的大豆不仅结瘤早, 根瘤衰败晚, 而且比接种 B<sub>15</sub> 的根瘤多而大, 其固氮酶活性也强。单株固氮量比接种 B<sub>15</sub> 的及未接种的分别增加 41% 和 179.8%。R<sub>B-9</sub> 接种还可提高大豆蛋白质含量和土壤碱解性氮含量。

1981 年的小区试验和 1982、1983 两年 29 个点次中间试验结果, 其效果分别比对照增产 15.8% 和 16.3%, 比接种 B<sub>15</sub> 的增产 10% 和 9.5%。

## 一、前 言

国内外的研究证明, 大豆根瘤菌接种, 是提高其产量的经济有效的农业措施之一, 也是解决氮肥来源的措施。而选育高效菌种, 是提高接种效果的途径。所以根瘤菌的研究及高效菌株的选育受世界许多国家的重视。我国 50 年代大豆根瘤菌的选育及推广结果证明, 外来的与当地菌株相比, 根瘤菌在土壤中的存活率或对土壤微生物的影响, 一般地说来不如当地菌株, 而且有些菌种在室内培养基条件下保存过久, 其活力逐渐减退<sup>(4)</sup>。根瘤菌肥的有效部分大多又是活菌体, 菌肥在长途运输中的异常温度, 时间过长或保存不善等, 均影响其肥效。因此, 选育当地优良菌株并应用于生产上, 对发展我省大豆生产水平有其重要意义。

本文于 1986 年 11 月 30 日收到。

This paper was received in Nov. 30, 1986.

## 二、结果与讨论

### (一) RB-9 的选育

1. 菌株的分离: 1978 年, 从黑龙江省黑土、碳酸盐草甸黑钙土及草甸白浆土等三种土类自然结瘤田中, 对十二个大豆品种采瘤, 经高氮田 (亩施 200 斤纯氮) 培育, 共分离出 294 个菌株。

2. 水培初选及复选. 1979 年, 水培初选 80 个菌株, 与国内外优良菌株为对照进行砂培复选, 筛选出高固氮效应的特异菌株 RB-9。

3. 土培侵染力鉴定及水培固氮力测定: 以空白为对照, B<sub>15</sub> 为标准, 61A76 为参考, 在土培条件下鉴定了 RB-9 等 13 个菌株对“黑农 26”和“黑农 24”大豆的侵染力。结果, RB-9 在两个大豆品种上的侵染力, 分别比 B<sub>15</sub> 高 85.2% 和 58.8%, 居供试菌株之首 (表 1)。然后, 以 B<sub>15</sub> 为对照, 在水培条件下用“黑农 26”、“黑农 24”、“丰收 10 号”、“黑河 3 号”和“牡丰 5 号”等来自黑龙江省不同地区的大豆品种, 再次进行侵染力鉴定。结果, RB-9 接种的大豆株瘤数均比 B<sub>15</sub> 接种的多, 品种间增加的幅度为 0.8—9.25 倍, 平均为 B<sub>15</sub> 的 1.48 倍。“丰收 10 号”比较特殊以外, RB-9 接种的大豆单个瘤重也均有显著增加, 为 B<sub>15</sub> 的 1.32 倍 (表 2)。同时, 用《凯氏法》测定“黑农 26”、“黑河 3 号”、“黑农 24”的单株固氮量。结果, RB-9 接种的大豆固氮量均比接

表 1 不同菌株在不同大豆品种上的侵染力

Table 1 Infectivities of R. strains on the soybean varieties

大豆品种 R. strains	黑农 26 (Heinong 26)		黑农 24 (Heinong 24)	
	根瘤数 No. of noduls <sup>+</sup>	增长率 (%) Increment <sup>‡</sup>	根瘤数 No. of noduls <sup>+</sup>	增长率 (%) Increment <sup>‡</sup>
3 I 110	52.0	25.9	27.0	
3 I 122	70.3	70.0	26.0	
3 I 123	64.3	55.7	24.0	
3 I 135	52.0	22.9	12.0	
3 I 138	45.0	9.0	22.0	
3 I 142	5.0		19.5	
3 I 143	31.3		29.8	
3 I 712	68.5	65.9	25.0	
3 I 716	39.2		—	—
SM 35	83.0	105.3	49.0	44.1
SM 31	—	—	9.0	
CB 1809	28.0		—	—
RB-9	76.5	85.2	54.0	58.8
61A76	62.0	50.1	32.0	
B <sub>15</sub>	41.3	0	31.0	0
CK	0	0	0	0

<sup>+</sup>: No. of noduls/plant

<sup>‡</sup>: AS Compared with B<sub>15</sub>, the increments of noduls inoculated with different strains.

种 B<sub>15</sub> 的高，分别高 1.9、1.4 和 19.6 毫克，平均为 B<sub>15</sub> 的 1.41 倍(表 3)。从而选定 RB-9 为最佳菌株，继续参加接种效果及生化鉴定。

表 2 RB-9 在不同大豆品种上的浸染力

Table 2 Infectivities of RB-9 on the soybean varieties.

品种名 Varieties	株 瘤 数 No. of noduls/Plant		RB-9 : B <sub>15</sub>	单 个 瘤 重 weight/nodul (mg)		RB-9 : B <sub>15</sub>
	RB-9	B <sub>15</sub>		RB-9	B <sub>15</sub>	
黑农 26 Heinong 26	69.6	44.3	157.1 : 100	13.1	10.8	121.3 : 100
黑农 24 Heinong 24	36.6	20.0	183.0 : 100	18.0	13.0	138.5 : 100
丰收 10 号 Fengshou 10	77.0	40.0	192.5 : 100	10.0	14.8	67.6 : 100
黑河 3 号 Heihe 3	8.2	7.6	107.9 : 100	37.4	23.0	162.6 : 100
牡丰 5 号 Mufeng 5	24.4	24.2	100.9 : 100	15.6	11.6	134.5 : 100

表 3 RB-9 在大豆不同品种上的固氮效应

Table 3 Nitrogen fixation effects of RB-9 on the soybean varieties

项 目 Item	大豆品种 Soybean varieties	处 理 Treatments		
		CK	B <sub>15</sub>	RB-9
植株总氮量 Amount of total N plant (mg)	黑农 26 Heinong 26	10.656	39.182	46.880
	黑河 3 号 Heihe 3	22.290	23.700	28.260
	黑农 24 Heinong 24	8.976	22.550	42.156
	黑农 26 Heinong 26	0	28.4	30.3
* 根瘤固氮量 * Nitrogen fixated by nodules. (mg)	黑河 3 号 Heihe 3	0	13.9	15.3
	黑农 24 Heinong 24	0	13.6	33.2

\* 为接菌植株与不接菌植株的总氮量之差。  
Differences on amount of total N between inoculated and uninoculated.

(二) RB-9 的接种效果

1. RB-9 接种对大豆结瘤的影响：“黑农 26”的根瘤增衰图(图 1)中可以看到，对照区(施磷，下同)不仅开始的结瘤少，而且从三叶期至花荚期，仅日增 1.56—1.9 个根瘤，接着是以日减 2.6 个根瘤的速度衰败。而接种 RB-9 的大豆，开始结的瘤数就高于对照的 1.8 倍，并以 2.3 倍于对照的速度增加根瘤量，尤其是花期，是以日增 3.9 个的速度增加，花荚期的根瘤数与对照有了更为显著的差异。到荚鼓期以后，根瘤以日减 3.8 个的速度衰败。同时也可以看到，RB-9 接种的大豆整个生育时期的根瘤量显著高于接种 B<sub>15</sub> 的大豆。从开始结瘤起至花荚期，接种 RB-9 的结瘤数始终高于 B<sub>15</sub> 的 1.2

倍左右,而其后的衰败势还低,以至鼓粒期的根瘤量仍为  $B_{15}$  的 1.3 倍。说明接种  $RB-9$  的大豆结瘤多,而且其固氮期也长。

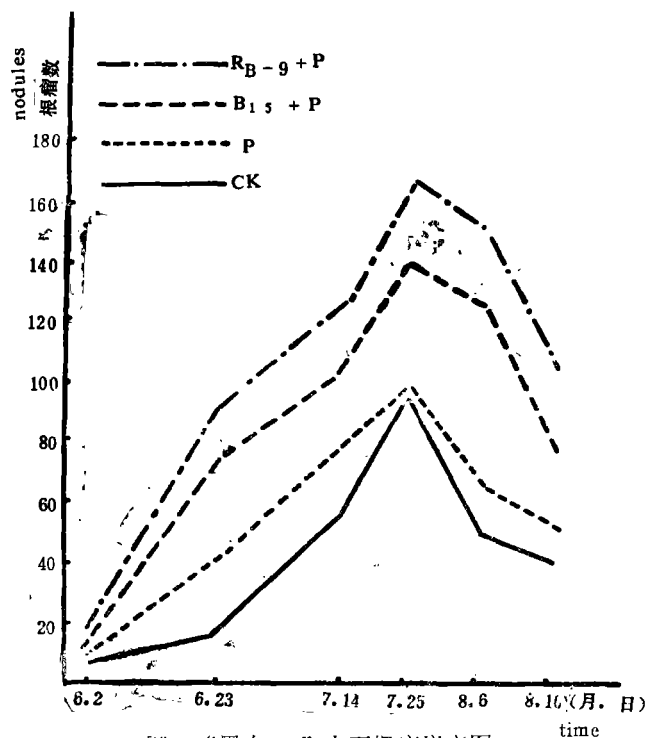


图 1 “黑农 26” 大豆根瘤增衰图

Fig.1 The increase of nodulos and its decline of “Heinong 26”

3. 接种  $RB-9$  对土壤肥力的影响: 从表 4 可以看出, 同样经过大豆生长发育所消耗, 接种  $RB-9$  的土壤中, 如破皮黄、白浆土和黑土中的碱解氮含量, 分别比对照高 0.24、3.39 和 3.53 毫克/100 克土。说明, 接种  $RB-9$  可提高土壤肥力。

4. 接种  $RB-9$  对大豆品质的影响: 从表 5 可以看出, 除 “黑农 26” 比较特殊以外, 其它供试品种如 “合交 8 号”、“丰收 22”、“黑河 3 号” 和 “明 506” 的种子蛋白含量均有显著提高, 提高幅度为 1.03—2.38%。

5. 接种  $RB-9$  对大豆的生长及其产量的影响: 大豆各生育期植株干重及叶面积指数的调查表明, 接种  $RB-9$  可促进大豆的生长及干物质积累(表 6), 从而为大豆高产打下基础。1981 年田间小区试验结果, 接种  $RB-9$  比对照增产 15.8% (亩增收 51.7\*\* 斤), 1982、1983 两年 29 个点次的中间试验结果, 比对照及接种  $B_{15}$  分别增产 16.3% (亩增收 37.5\*\* 斤) 和 9.5% (亩增收 23.2\*\* 斤) (表 7)。

### (三) $RB-9$ 的生化鉴定

$RB-9$  的鉴定 (同时参加鉴定的大豆根瘤菌菌株还有: 79H6、Ti-1、A 110、61A76 和  $R_4$ , 均以纯化后的菌种为鉴定材料) 结果如下:

1. 形态特征. 在 1000 倍万能显微镜下观察结果, 其长 × 宽为  $3.8-4\mu \times 0.7-0.9\mu$  的短一中杆状 (见显微摄影照片 a)。

2. 接种  $RB-9$  对大豆根瘤固氮的影响: 在盆栽条件下, 用 102 型气相色谱仪测定结果, 接种  $RB-9$  比  $B_{15}$  的 “黑农 26” 开花期的固氮量增加 108.1%, 结荚期增加 85.2%; “合交 8 号” 结荚期的固氮量增加 313.5%。1981—1984 年在田间试验条件下, 以《大田有效根瘤固氮活动估测法》测定结果, 接种  $RB-9$  表现结瘤多、根瘤大、根瘤固氮量高、固氮活性强。与对照相比, 大豆单株固氮量三叶期增加 4 倍, 开花前期、盛花期、初荚期、鼓粒期和黄叶期分别增加 87.5、165.2、137.5、124.2、133.3%。花荚期结瘤多是单株固氮量高的主要原因。

表 4 R<sub>B-9</sub> 接种对土壤碱解氮含量的影响

Table 4 Effect of R<sub>B-9</sub> inoculation on the alkali-hydrolysis N of the soil

	土壤类型	大豆品种	土壤碱解氮含量		
			Content in soil (mg/100g soie)		
			种豆前 Before growing soybean	种豆后 After growing soybean	
	Soil types	Soybean varieties		接种的 Inoculated	未接种的 Uninoculated
盆栽	破皮黄 Erose soil	黑农 26 Heinong 26	9.11	11.74	11.50
Pot outlure	白浆土 Planosol	合丰 8 号 Hefeng 8	22.44	24.44	21.05
田间试验 Field exp.	黑土 Black soil	黑农 26 Heinong 26	16.06	10.90	7.37

表 5 R<sub>B-9</sub> 接种对大豆品质的影响

Table 5 Effect of R<sub>B-9</sub> inoculation on the quality of soybean seeds

处理	品种 Varieties	黑农 26 Heinong 26		合丰 8 号 Hefeng 8		丰收 22 Fengshou 22		颍河 3 号 Heihe 3		明 506 Ming 506	
		蛋白 脂肪 Protein Fat (%)		蛋白 脂肪 Protein Fat (%)		蛋白 脂肪 Protein Fat (%)		蛋白 脂肪 Protein Fat (%)		蛋白 脂肪 Protein Fat (%)	
		Tretment									
R <sub>B-9</sub>		41.06	19.40	44.31	17.79	41.74	17.71	42.59	18.19	46.27	17.56
CK		41.67	19.05	41.93	17.92	39.64	18.46	39.21	18.41	45.24	17.36

表 6 R<sub>B-9</sub> 接种对大豆植株生长的影响

Table 6 Effect of R<sub>B-9</sub> inoculation on the plant growth of soybean

处 理	第三复叶期		开 花 期		结 荚 期		鼓 粒 期	
	The third trifoliate period		Flowering period		Pod setting period		Seed filling period	
	Treatments							
	A <sup>+</sup> (g)	B <sup>‡</sup>	A <sup>+</sup> (g)	B <sup>‡</sup>	A <sup>+</sup> (g)	B <sup>‡</sup>	A <sup>+</sup> (g)	B <sup>‡</sup>
P (CK)	0.89	0.537	2.84	1.044	9.51	2.155	13.05	2.779
B <sub>15</sub> +P	0.97	0.519	3.52	1.320	10.85	3.107	13.05	3.089
R <sub>B-9</sub> +P	0.96	0.551	3.64	1.384	12.01	2.476	14.80	3.445

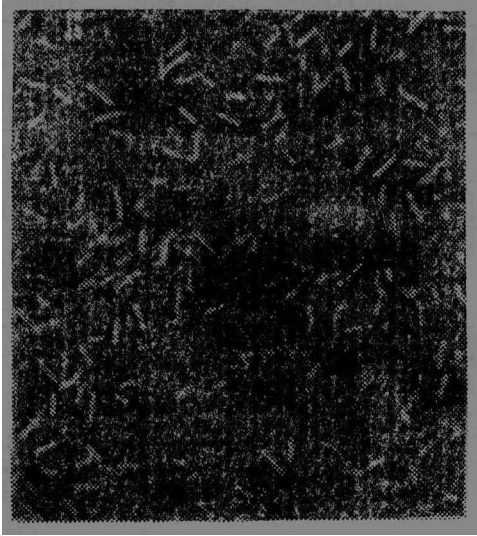
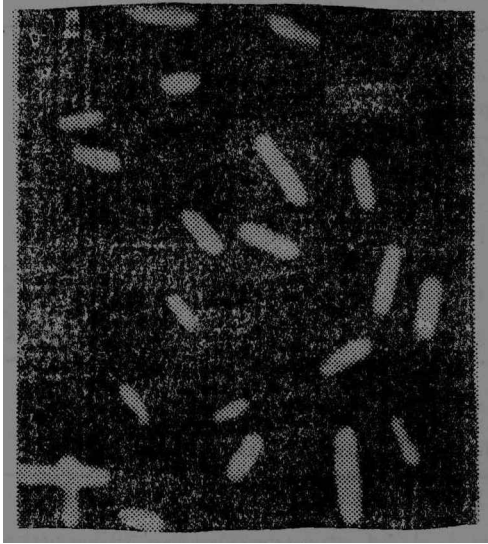
+: 干物重 (Weight of dried plant); ‡: 叶面积指数 (Leaf area index).

2. 在大豆根瘤中的类菌体形状：为长杆状（见显微摄影照片 b）。
3. 菌落形态：在甘露醇培养基上培养的 R<sub>B-9</sub> 菌落为乳白色。
4. 28℃刚果红及孟加拉红吸色反应结果：无吸收或微红色。
5. 在酵母、甘露醇琼脂培养基上的生长表现：缓慢。在 28℃ 条件下，一般生长 5—6 天(B<sub>15</sub>、61A76 等生长 6—7 天)。细菌胶少。
6. 革兰氏染色反应：阴性。
7. 马铃薯培养基上的生长情况：不生长。
8. 对柠檬酸培养基无反应，呈阴性。

表 7  $R_{B-9}$  在不同土壤地区接种的增产效果  
Table 7 Effect of  $R_{B-9}$  inoculation on seed yield in the different soil regions\*

处 理 Treatments	黑 土 Black soil	碳酸盐草甸土 Carbonate meadow soil (kg/ha)	白浆土 Planoso <sup>1</sup>	平均产量 Mean yield	增 产 Increment (%)
$R_{B-9}+P$	2030.3	1783.5	2165.3	2003.0	16.3
$B_{15}+P$	1884.0	1624.5	1978.5	1829.0	6.2
P (CK)	1858.5	1448.3	1858.5	1721.9	0
$R_{B-9}-B_{15}$	170.0	159.0	186.8	173.9	9.5

\* 表格内的数字均为 1982、1983 两年 29 个地点的平均数。  
The data in table were mean values of 29 places/times in 1981 and 1982.



9. 在石蕊牛乳上无反应。

10. 在 BTB 培养基上生长良好，产碱结果使溴香草酚兰指示剂变兰色。

11. 在肉汤培养基中不利用牛肉膏和蛋白胨中的氮素，所以不生长。

12. 血清学反应：将  $R_{B-9}$  菌株制备成抗原免疫家兔，效价 3200 以上为合格。

在水培中取下接种  $R_{B-9}$  结瘤的根瘤 20 个，抗血清效价 500，凝聚反应全部呈阳性 (\*\*\*)，其它菌回接产生的根瘤菌抗原对照为阴性 (-)，说明  $R_{B-9}$  抗原是纯的。在此基础上，测定  $R_{B-9}$  在不同地区的回收率。结果是：黑河地区 (55.1—65.3%)、宾县 (48.0—68.0%)、海伦 (31.0—58.6%)、江川农场 (44.4—48.3%)、德都县花园农场 (43.2—44.2%)、明水、肇州等盐碱土区 (39.3—41.4%)、通河县 (44.0%) 和黑龙江省农业科学院院内试验地 (34.0—51.0%) 等平均回收率为 42.4—52.4%，扣除土壤中自然  $R_{B-9}$  菌种的回收率 14.3%，接种  $R_{B-9}$  的净回收率为 28.1—38.1%，说明  $R_{B-9}$  的竞争力是很强的。

13. 结瘤试验：用“黑农 26”定株水培结果，接种  $R_{B-9}$  的比 79H6 提前 6 天结瘤，比标准  $B_{15}$  提前 9 天结瘤。按其顺序排列结果是： $R_{B-9}$ 、79H6、A110、 $B_{15}$ 、61A76、 $R_4$ 。快生型 Ti-1 和 Ha-1 对“黑农 26”不结瘤。

### 三、结 论

从接种效果及生化鉴定看出, RB-9 是个增产效果好的大豆根瘤菌。其生长特点: RB-9 属慢生型, 但其生长速度比较快, 易于培养, 易于纯化, 适用于菌肥生产。在菌肥生产的菌液制备程序中, 比 B<sub>15</sub> 或 61A76 生长快 1—2 天。另外, 因 RB-9 菌剂的施用方法简便(拌种)、价格低廉(一市斤肥价为 0.7 元)、施用量少(亩施量为 0.5 市斤)、接种增产效果平均亩增收 37.5 斤。经 1984 年大面积示范推广, 1985 年的推广面积已达 10 万亩。

### 参 考 文 献

- [1] 杉原进, 1979, 《农业と科学》11: 1—4
- [2] 金野隆光, 1980, 《农业と科学》2: 1—4
- [3] 中国农业科学院油料所根瘤菌组, 1980, 《应用微生物》6: 9—15
- [4] 黄隆广, 1980, 《土壤通报》6: 39—45
- [5] 张宪武, 1980, 《应用微生物》3: 1—3
- [6] 付德雄, 1981, 《国外科技》7: 40—41
- [7] 中国农业科学院土壤肥料研究所, 1978, 《土壤肥料》3: 31—39
- [8] 中国农业科学院油料所, 1976, 《油料作物科技》4: 30—26
- [9] 山东农科院土肥所, 1982, 《山东农业科学》2: 36—39
- [10] R. W. F. Hardy et al. 1973, Soil Biol. Biochem. 5(47—81)
- [11] F. J. Bergersen, Aust. J., 1970, Biol. Sci. 23(1015—1025)
- [12] Corby, H. D. L., International Biological programme 7(169—173)
- [13] Bohlood, R. B. and E. L. Schonidt, 1974, Science 185, 269
- [14] Ecbkos, B. II, 1984, 《大豆文摘》3: 840495

### SELECTION OF HIGH EFFICIENCY R. JAPONICUM RB-9 AND ITS INOCULATION EFFECTS

Yin Dalong Jia Fengju

(Soil and Fertilizer Institute, Heilongjiang Academy  
of Agricultural Sciences)

#### Abstract

RB-9 is a strain of R. japonicum that was isolated in 1978 from 0.3 mm nodules on the taproots of P 77-78-0 which was a soybean strain of high photosynthetic efficiency.

RB-9 was selected by means of liquid cultures, pot cultures, field experiments, demonstration tests and extension on large area in compa-

parison with other fine *R. japonicum* strains, for example, B<sub>15</sub> selected from the North East of China and A110, 61A76 introduced from USA since 1978 to 1984. Its popularized area has reached 6667 hectare up to 1985. The physiological and biochemical characteristics were similar to other slow-growing *R. japonicum* reported. But its growth rate on midium in vitro was faster than that of B<sub>15</sub> or A110 and 61A76.

The results from experiments in different regions of Heilongjiang province showed that the net rate of recovery inoculated with RB-9 reached from 28.1% to 38.1%.

As compared with B<sub>15</sub>, the results from experiments inoculated with RB-9 demonstrated that: the nodules on the soybean roots were not only produced earlier but also the vitality last longer, there were more and bigger nodules on the roots, the activity of nitrogenase in soybean nodules was also higher. The amount of nitrogen fixation per plant of soybean inoculated with RB-9 was increased 179.8% and 41.0% than uninoculated and inoculated with B<sub>15</sub>, respectively. Protein content of soybean seed and alkaline hydrolysis nitrogen content in the soil inoculated with RB-9 were increased than those of uninoculated.

The results from plot experiments in 1981 and large area intermediate experiments in 29 regions and/or times in 1982 and 1983 showed that the soybean seed yield inoculated with RB-9 was increased 15.8% (increased 428.2 kg/ha.) and 16.3% (281.2 kg/ha.) than that of uninoculated, and increased 10.7% (275.2 kg/ha.) and 9.5% (174.7 kg/ha.) than that of inoculated with B<sub>15</sub>, respectively.