

快生型大豆根瘤菌 G113 的几个共生特性^{*}

张 宏 张桂芝 孙淑荣 关勤智 刘兴安

(吉林省农业科学院)

摘 要

快生型大豆根瘤菌 G113 是从吉林省、公主岭黑土上生长的野生大豆 G3 的根瘤中分离获得。野生大豆 G3 在有快慢生型大豆根瘤菌同时存在时,选择 G113 和其共生。G113 菌株和吉林 20 大豆共生优于轻碱土中的土著大豆根瘤菌。因此在轻碱土上、吉林 20 大豆接种 G113 菌株有增产趋势。

关键词 大豆根瘤菌 G113;共生特性

多年栽种大豆的土壤中存在有大量的土著大豆根瘤菌,吉林省的土壤中一般有 $10^4 \sim 10^5$ 细胞/1 克干土^[1]。因此在大豆根瘤菌接种时,接种菌的回收率经常是 5~20%^[12],不能达到接种增产的效果。1983 年^[2]曾在盆栽条件下加大接种菌的用量达 6×10^{10} 细胞/1 粒种子,在栽培大豆吉林 13 上接种回收率、菌株 113-2 是 59.0%、CB1809 57%、B15 10%和 RCR3407 是 2.6%。虽然加大接种量可以增加接入菌株的回收率,但并不是任何菌株在某一豆种上都有可能。显然大豆根瘤菌株和不同大豆品种之间的共生关系在解决大豆根瘤菌接种能否增产中起着重要作用。Means Ura Mae^[13]等曾提出接入菌的有效性受大豆品种影响。Kvien^[11]1981 年曾提出竞争性并非单一是数目问题、建议用比当地土著菌系更优越的菌系来接种。本研究目的是比较快生型大豆根瘤菌 G113 和慢生型大豆根瘤菌 B15、110 和轻碱土土著大豆根瘤菌株 515 在野生大豆 G3 和栽培大豆吉林 20 上的共生关系,以揭示不同大豆根瘤菌株在某一大豆品种上的感染特点和生产的关系。

材 料 与 方 法

(1)菌株来源:大豆根瘤菌株 G113 是从中国吉林省公主岭黑土、野生大豆 G3 的根瘤中分离获得。轻碱土土著大豆根瘤菌是将轻碱土采回,考虑菌株和豆种的关系种植吉林

^{*} 国家自然科学基金资助课题

本文于 1990 年 5 月 3 日收到。 This paper was received on May 3, 1990

3、吉林 13 和小金黄三个大豆品种的盆栽。在大豆开花盛期每一植株采集 5~10 个根瘤。一个瘤子分离一株大豆根瘤菌株,一般来说一个瘤子是由一个菌株形成^[13,14]。根瘤用 0.2% HgCl₂ 灭菌、无菌水冲洗 4~5 次,挤破根瘤,挑取内含物,划于装有 Ashby 无氮培养基的试管斜面。经过平板划线法进行纯化。土豆、石蕊牛乳培养基等纯度鉴定和结瘤(无菌砂栽)试验和按“一般细菌常用鉴定方法”^[3]进行一般生理生化鉴定。代时测定按樊惠等^[4]的方法用甘露醇酵母(YM)液体培养基经活性炭吸去颜色,接入培养菌、28°C 培养,用 721 型光电比色计测定菌数。大豆根瘤菌株 B15 和 110 自中国科学院应用生态研究所引进。

(2)免疫血清制备和根瘤的鉴别:用快生型大豆根瘤菌株 G113 制备兔子免疫血清^[13],大豆根瘤的血清鉴定是将采集的根瘤磨碎,取根瘤汁液和菌株 G113 免疫血清进行凝集反应。

(3)灭菌砂栽:用普通河砂,洗净装瓶(500ml 玻璃瓶)加营养液(MgSO₄ · 7H₂O 25g, K₂SO₄ 37g, K₂HPO₄ 15.6g, KH₂PO₄ 6.8g, Ca(NO₃)₂ 3.0g, FeC₆H₅O₇ × H₂O 5.0g, 混合磨细,取 1g 加水 1000ml。)高压灭菌 122°C 15 磅,1 小时。种子用 0.20% HgCl₂ 灭菌和无菌水冲洗后播种。出苗后包上 2~3cm 厚的灭菌棉花和用凉开水灌溉以保持不被其它根瘤菌污染。

(4)田间接种试验:在轻碱土上设置 G113 和不接菌二个处理观察接种效果,1988 年在农安县,1989 年在双辽县的轻碱土上进行。

结果和讨论

(1)快生型大豆根瘤菌 G113 和轻碱土中土著大豆根瘤菌的分离和鉴定。从农安县轻碱土,吉林 3、吉林 13 和小金黄大豆上采集 23 个根瘤分离获得 23 株快生型大豆根瘤菌株。经过纯化、结瘤鉴定、选用其中四株(515、530、522 及 533)菌株进行了生理生化鉴定,结果见表 1。从表 1 看,这五株菌株,从其对 B. T. B 的反应,石蕊牛乳产生乳清带耐盐性、适宜的 pH 生长范围、对琥珀酸和苹果酸的利用和代时按照 Keyse^[10]的鉴定均属快生型大豆根瘤菌。

(2)快生型大豆根瘤菌 G113 对野生大豆 G₃的感染性。在灭菌砂栽条件下设置①接种 G113,②G113+慢生型 B15+110、③B15+113、三个处理,三次重复。混合接种的各菌株菌数比例为 1:1:1。在大豆花期采集根瘤。用快生型大豆根瘤菌株 G113 免疫血清鉴别根瘤中的根瘤菌,结果见表 2。

表 2 可以看出野生大豆 G₃在无快生型大豆根瘤菌 G113 存在时,可以和慢生型大豆根瘤菌 B15 和 110 共生。但当有快生型 G113 菌株存在时,则选择 G113 和其共生。在公主岭黑土田间条件下种植野生大豆 G₃,发现该豆种在田间也是选择快生型大豆根瘤菌和其共生。从两块黑土地内采集了野生大豆 G₃的根瘤 22 个,分离获得 22 株大豆根瘤菌,均为快生型,而从该野生大豆两旁种的野生大豆 G₁和 G₂的根上,采集的 8 个根瘤中。所获 8 个菌株均为慢生型大豆根瘤菌株,尽管三种野生大豆垄挨垄种,但一个大豆品种和快生型共生,二个和慢生型共生。这点表明大豆品种对大豆根瘤菌株有选择性。

表 1 快生型大豆根瘤菌主要培养生理生化特性

Table 1 Characterization of five fast growing strains of *R. japonicum*

测定项目 Test	G113	515	530	522	533
革兰氏染色 Gram stain	—	—	—	—	—
芽孢 Spore	—	—	—	—	—
聚落直径(cm) Colony dia (cm)	0.3	0.3	0.25	0.25	0.2
B. T. B 反应	酸	酸	酸	酸	酸
B. T. B reaction	acid	acid	acid	acid	acid
石蕊牛乳;Litmus milk:					
pH	碱 alkali	碱 alkali	碱 alkali	碱 alkali	碱 alkali
血清层 Serumzone	+	+	+	+	+
3-酮基乳糖 3-Ketolac tose produced	—	—	—	—	—
柠檬酸利用 Utilization of citrate	—	—	—	—	—
耐盐性(NaCl) Tolerance of NaCl	0.3M	0.3M	0.3M	0.3M	0.3M
抗链霉素: Resistance to streptomycin:					
10 µg	—	—	—	—	—
100 µg	—	—	—	—	—
pH 范围 Range of pH	6.2~12	6.2~12	6.2~12	6.2~12	6.2~12
糖类利用: Utilization of carbonhydrates:					
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+
蔗糖 Sacrose	+	+	+	+	+
琥珀酸 Succinate	+	+	+	+	+
甘油 Glycerol	+	+	+	+	+
苹果酸 Malate	+	+	+	+	+
菊糖 Junlin	—	—	—	—	—
木糖 Xylose	+	+	+	+	+
乳糖 Lactose	+	+	+	+	+
糊精 Dextrin	+	+	+	+	+
代时 Generation time	4.0	2.9	3.6	5.6	4.0
回接结瘤 Root nodules produced	+	+	+	+	+
乙炔还原(µmol C ₂ H ₄ /g 鲜瘤/h) Acetylene reduction	3.6	10.2	5.5	3.3	2.2
µ mol C ₂ H ₄ /g bresh nodule/h					

表 2 野生大豆 G₃ 对快生型大豆根瘤菌 G113 的选择共生Table 2 *G. soja* G₃ chooses *R. fredii* G113 to form symbiont

接 菌 Inoculum	根 瘤 Nodules			植株干重 (g/盆) Plant dry weight (g/pot)	G113 菌株形成根瘤数(个) No. ob nodules boumed by G113(No)		
	主根(个/盆) Main root (No/pot)	侧根(个/盆) Lateral root (No/pot)	鲜重(g/盆) Fresh weight (g/pot)		测定根瘤数 No. of nodules measured	和 G113 血清	和 G113 血清
						凝 聚	不 凝 聚
						Nodules	Nodules
						occupancy	occupancy
					of G113	of B15+110	
G113	8.6	10.0	0.113	0.71	35	35	0
G113+B15 +110	6.0	8.0	0.150	0.64	28	28	0
B15+110	7.3	16.8	0.131	0.65	28	0	28

Kvien(1981)^[11]的试验认为。在和当地土著大豆根瘤菌形成根瘤不好的大豆上,接种回收率也不一定高,说明接入菌和土著大豆根瘤的竞争性不一定起着重要作用。而寄主对根瘤菌的选择才起着主导作用,因此要使大豆根瘤菌接种达到增产,必须考虑研究该大豆品种对该菌株的共生特性、或选择性。

(3)根据 1984 年在五种土壤^[5]和 1987 及 1989 年对轻碱土中快慢生型大豆根瘤菌的调查,发现轻碱土中土著大豆根瘤菌以快生型为主。在农安县轻碱土上种植大豆,在开花盛期采集根瘤分离的大豆根瘤菌株,经过分离和简单的鉴定,均属快生型大豆根瘤菌。因此可以说轻碱土中的土著大豆根瘤菌是以快生型大豆根瘤菌为主。从前面表 1 轻碱化土中的四个土著大豆根瘤菌(515、530、522 及 533)中以菌株 515 的固氮活性较高,选作轻碱土土著大豆根瘤菌的代表株。

在接种吉林 20 大豆的效果比较试验中,设置接种 G113、接种 515 和不接种对照三个处理、重复三次。接种量为 10^7 细胞/粒。出苗后用 2~3cm 厚棉花包上。凉开水灌溉以防止其他根瘤菌的感染。出苗后 8 星期收获,调查根瘤数和株干重,结果见表 3。可以看出接种大豆根瘤菌不论是土著大豆根瘤菌 515,还是 G113,都比不接菌的大豆干物重增加 25~63%。G113 菌株和土著大豆根瘤菌 515 相比较还高出 32%,说明快生型大豆根瘤菌 G113 菌株和吉林 20 大豆的共生关系,比轻碱土中较好的土著大豆根瘤菌为好。

表 3 菌株 G113 和 515 在吉林 20 大豆上接种效果比较

Table 3 Comparison between strains G113 and 515 as inoculated on soybean CV. Jilin 20 in aseptic sand culture

处理 Treatment	株高(cm) Plant height (cm)	根瘤(个/株) Nodules (No. /plant)			株干重 Dry weight of plant		
		主根 Main root	侧根 Lateral root	总数 Sum	g/盆 g/pot	%	增加% Increase %
CK	18.28	0	0	0	3.4	100	—
515	21.33	10.7	94.3	105.0	4.2	123	100
G113	26.28	10.6	90.3	101.0	5.56	163	132

(4)田间接种快生型大豆根瘤菌 G113 的效果调查。由于在灭菌砂栽(盆栽)条件下,快生型大豆根瘤菌 G113 接种在吉林 20 大豆上,好于轻碱土土著大豆根瘤菌株 515,因此试图将 G113 菌株在轻碱土大豆大田中接种。设置接种 G113 和不接种对照二个处理。1988 年在农安县,1989 年在双辽县进行,二年的结果见表 4 和表 5。在农安县试验面积为 440m²、吉林 20 大豆,结果接种 G113 菌株增产 21.5%。1989 年在双辽试验面积为 4320m²结果子实产量增加 13.3%,株全重增加 21.1%。在轻碱土上田间接种快生型 G113 大豆根瘤菌株有提高吉林 20 大豆产量的趋势。表明该菌株 G113 和吉林大豆较好的共生性。

表 4 吉林 20 大豆上接种 G113 菌株的效果 (农安县 1988 年)

Table 4 Effect of inoculating G113 on soybean Jilin 20 in field experiment in Nonan (1988)

处理 Treatment	生育期根瘤数(个/株) Nodules of flowering stage				籽实产量 Seed yield		百粒重(g) 100 seed weight (g)
	主根 Main root (No. /plant)	侧根 Lateral root (No. /plant)	总数 Sum (No. /plant)	鲜重(g) Fresh weight(g)	产量公斤 /220m ²	增加% Increase %	
CK	15	53	68	0.15	36.0	100	17.4
G113	14	165	175	0.175	43.7	121.5	17.8

表 5 吉林 20 大豆上接种 G113 菌株的效果 (双辽县 1988 年)

Table 5 Effect of inoculating G113 on soybean Jilin 20 in field experiment in Shuangliao (1988)

处理 Treatment	株高(cm) Plant height (cm)	荚数(个/株) Pods (No. /plant)	植株全重 Weight of whole plant		籽实产量 Seed yield		百粒重(g) 100 seed weight(g)
			g/10 株 g/10 plants	%	g/4m ²	%	
CK	63.18	34.34	425	100	600	100	17.36
G113	66.46	37.93	515	121.1	680	113.3	18.40

轻度碱化土壤 0~30cm 层的 pH 为 8.0~9.0 左右。一般慢生型大豆根瘤菌在 pH9 时失去活动能力、因此土著大豆根瘤菌比较单纯。对快生型为主的轻碱化土,选育比土著大豆根瘤菌优良的菌株来接种大豆,可以达到接种增产。但在土著大豆根瘤菌较复杂的黑土、草甸黑土、淡黑钙土等土壤上,如何选育优良大豆根瘤菌株供接种使用,需要进一步研究。很多研究工作者曾提出,加大接种菌数^[8,9]。有提出,用抗药性菌株同时用化学药剂抑制土著大豆根瘤菌的竞争^[15,17];有提出,接种大豆根瘤菌时,接种假单孢杆菌、增加接入菌的结瘤率^[8,18];有的选用和土著大豆根瘤菌共生结瘤不好的大豆品种,来解决土著大豆根瘤菌的竞争^[16],或采用分子生物来构建理想的高效菌株^[7]等等。但通过本研究,我们认为,不论采用那一种方法。在解决具有丰富土著大豆根瘤菌的土壤上栽种大豆的接种问题时,需要注意到该菌株和栽培大豆的共生特性,和不同土壤中土著大豆根瘤菌的状况而采用相应的措施。

参 考 文 献

- [1] 任守让、张宏、宋明芝、赵贵彬,1983,土壤 第 15 卷 2 期 55—58
- [2] 张宏、赵贵彬、马淑时、张桂芝、王晓明,1985,作物学会,大豆研究会,第三次学术讨论会论文集
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著,1978,一般细菌常用鉴定方法,科学出版社
- [4] 樊惠、徐玲玫、葛诚等,1986,大豆科学 5(1) 57—63
- [5] 张宏、张桂芝、孙淑荣等,1988,微生物学杂志,第 8 卷 2 期 23—29
- [6] 姚惠琴、朱增炎、曹景勤等,1983,土壤学报 第 20 卷 1 期
- [7] 杨苏声、李季伦等,1989,土壤学报,第 20 卷 2 期
- [8] Fuykhiko Nishijima etl. 1988. Plant and Soil 111 149—158
- [9] James meade etl. 1985 Appl Environ. Microbiol Vol. 49 No. 4 899—903
- [10] Keyes H. H. etl. 1982. Science 215 1631—1632
- [11] Kvien. C. S. etl. 1981. Agron. J. Vol. 73, 900—905
- [12] Kvien, C. S. etl. 1985, Agron. J. Vol. 77 No. 3 484—489
- [13] Means Ura Mae, etl. 1961. Soil science society proceeding Vol. 25. 105—108
- [14] Moawad H. etl. 1984. Appl. Environ microbiol Vol 48. No. 1 5—9
- [15] Nandita Singh etl. 1988. Plant and Soil 111 147—148
- [16] P. B. Cregan etl. 1986. Crop science Vol. 26 No. 5 911—916
- [17] R. Rai J. 1985. J. Agric. Sci. cannl 104 341—344
- [18] S. M. S Badr El—Din etl. 1988 Plant and Soil Vol. 108 No. 1 117—124

SOME SYMBIOTIC CHARACTERISTICS OF *RHIZOBIUM FREDII* G113

Zhang Hong Zhang Guizhi Sun Shurong Guan Qinzhi Lu Xingan

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling)

Abstract

Rhizobium fredii or *Sinorhizobium fredii* G113 was isolated from a nodule of *Glycine soja* 3 in black earth of Gongzhuling, Jilin Province. It was identified to be *Rhizobium fredii* or *Sinorhizobium fredii* by the method recommended by the both "The general method for identification of bacteria".

This study indicated that strain G113 was more competitive on nodulation than *Bradyrhizobium japonicum* B15 and 110 on *Glycine soja* 3. When strain G113 absent, *Glycine soja* 3 can be nodulated by strains B15 and 110, But when mixed the three strains B15, 110 and 110, *Glycine soja* 3 was 100% nodulated by G113.

163 indigenous isolates from 163 nodules of soybean cultivars in light saline—alkali soil in 1984, 1987 and 1989 were identified to be *R. fredii* by generation time, nodulation and nitrogen

fixation activity. Among which strain 515 was the most active on nitrogen fixation, and this result also showed that the fast growing *R. japonicum* is the main type in the light—saline alkali soil.

An experiment of strain G113 and strain 515 under aseptic condition was carried out. The result showed that the plant dry weight of the soybean CV. Jilin 20 was increased by inoculating both G113 and 515 and ranged from 23—63%. The dry weight of the soybean plant inoculated with G113 was 32% larger than that inoculated with strain 515. At means that strain G113 was more effective or appropriate than indigenous strain 515 on soybean cv. Jilin 20. Field inoculation of strain G113 on light saline—alkali soil showed that seed yield of soybean cv. Jilin 20 was increased by 21.5% in Nongan county in 1988, and by 13.3% in Shuangliao county in 1989. 100 seeds weight tended to increase in both place.

These results also showed that the increase of yield in light saline—alkali soil will be achieved by inoculating a strain of *R. fredii* which is more effective than the indigenous one.

Key words *Rhizobium fredii* G113

* Project supported by National Science Foundation