

快生型大豆根瘤菌结瘤竞争研究 及其在田间自然分布调查

葛 诚 樊 蕙 徐玲玫 吴玉兰 陈月英

(中国农业科学院土肥所微生物室)

吴冈梵 傅连舜

(辽宁铁岭地区农科所)

本文报告了快、慢型大豆根瘤菌按一定比例混合后接种大豆品种“开育8号”、“吉林10号”的竞争结瘤比例。结果表明快生型大豆根瘤菌表现出较强的结瘤竞争能力,其结瘤比例为32.2—79.4%,随着接种物内快型菌比例的增加而增加。两个大豆表现出一致的趋势。对从中国河南、山西、宁夏、黑龙江、辽宁、江西、新疆、山东等8个省(区)24个点的47个大豆品种(次)的4251个根瘤的测定结果有29个品种(次)内有快生型大豆根瘤菌结瘤,比例与不同采样地点、不同品种有关。幅度为1—37.9%。不同的省(区)出现的频率有很大的不同,似有一定的区域性分布规律。2048血清型可能是在中国分布最广泛的一个快生型大豆根瘤菌类型。

1982年正式报道分离出快生型大豆根瘤菌以来^[1],许多学者对其生理生化特性、共生效应、遗传学、生态学及其它特性做了研究^[2,3,4,5]。结果表明,快生型大豆根瘤菌有许多与慢生型大豆根瘤菌相异的特性,在理论上和生产实践上均有重要的价值。1983年葛诚等曾对快、慢型大豆根瘤菌结瘤竞争做了初步试验,并测定了我国部分地区的少量栽培大豆根瘤,表明快生型大豆根瘤菌具有一定的结瘤竞争能力和在我国的土壤内有一定的分布比例^[6]。本文报告了按一定数量比例混合的快、慢型大豆根瘤菌接种栽培大豆,在其主根和侧根上快、慢型大豆根瘤菌的结瘤比例,以及对河南、山西等八个省(区)栽培大豆品种快生型大豆根瘤菌结瘤比例做了调查,报告如下。

材 料 和 方 法

大豆根瘤菌菌株:慢生型大豆根瘤菌株(*Bradyrhizobium japonicum*) 2028, 本所

* 本工作在胡济生研究员指导下进行,河南农科院贾凤菊、山西农科院马玉珍、宁夏农科院李力平、黑龙江农科院尹达龙、合江农科所张景岚、辽宁农科院马麟祥、江西农科院罗福根、新疆阿克苏农校李清林及山东济宁农科所等同志协助采瘤,在此一并表示感谢。

本文于1985年11月14日收到。

1974年分离,本组保存。快生型大豆根瘤菌株 (*Rhizobium fredii*) 2048,徐玲玫等1982年分离自辽宁^[7],本组保存。此二菌株分属不同的血清型,从血清学上可以完全将二者分开^[6]。

大豆 (*Glycine max*): 品种开育8号,引自辽宁省开源县农科所;吉林10号,引自吉林省农科院土肥所。

菌悬液制备:将上述两个大豆根瘤菌株接种在酵母膏——甘露醇根瘤菌培养基上,待生长丰满后,以无菌水刮下,制成菌悬液,并用振荡器充分振荡混匀。立即用平皿计数法计数菌悬液的含菌数,以10:1,1:1,1:10 (v/v) 的比例混合快、慢型大豆根瘤菌菌悬液,混合后的菌悬液含菌量约为 7.4×10^8 — 66×10^8 /ml,快、慢型大豆根瘤菌数量之比为1:3、1:30,1:300。

大豆接种:将予先在灭菌沙中催好芽的大豆幼苗(根长3厘米以上)根,蘸上述配比的快型:慢型的菌悬液接种,每个品种设接种1:3,1:30,1:300,单接种快生型和单接种慢生型及空白对照6个处理,每处理3次重复。将接种根瘤菌的幼苗置于水培器上生长。开始时水培器内置一般植物营养液,以后续加自来水。5月22日播种,7月4日收获。生长期间观察各处理最早现瘤时间,收获后用相应菌株抗血清测定全部植株所结根瘤内的菌系。

快生型大豆根瘤菌田间自然分布测定:在山西、河南、宁夏、山东、江西、辽宁、黑龙江等省(区)的大豆产区采取大豆不同品种的根瘤,一般在播后40天以上取瘤,将采下的同一品种根瘤置于根瘤保存液内待测^[8]。测定时洗去保存液,每个根瘤分别与5个不同血清型的快生型大豆根瘤菌的抗血清做凝集反应,记录各血清型出现的比例。

大豆根瘤菌抗血清:本试验所需的抗血清按文献介绍方法,分别免疫家兔制成,效价合格。根瘤凝集试验同1983年试验^[6]。

试验结果

1. 不同比例快、慢型大豆根瘤菌接种开育8号和吉林10号后的最早现瘤时间(见表1)

表1说明,在水培条件下,无论是接种快生型、慢生型或以不同比例接种快、慢型大豆根瘤菌的混合物,最早现瘤时间规律不明显。在开育8号上快型大豆根瘤菌的最早现瘤时间比慢型早1.3天,快、慢型混合接种也表现出快型比例增大时现瘤时间要早一些。但在吉林10号品种上的这种差别并不明显。最早现瘤时间与寄主一菌株的亲合性有密切关系,两个品种上最早现瘤时间的差异反映了这种亲合性上的差异。

2. 快、慢型大豆根瘤菌混合接种时其主、侧根上的结瘤比例

收获植株后将生长在主、侧根上的根瘤分别用抗血清测定,得到的主、侧根上快、慢型大豆根瘤菌菌株的结瘤比例列于表2。

试验结果表明,当快、慢型大豆根瘤菌按一定比例混合接种两个大豆品种时,两类

表 1. 快、慢型大豆根瘤菌接种寄主后的最早现瘤时间*

Table 1. The earliest time of nodule appearing after inoculation of soybean by fast and slow-growing rhizobium

大豆品种	试验处理	最早现瘤时间 (天)	大豆品种	试验处理	最早现瘤时间 (天)
Soybean cultivar	Test treatment F : S	The earliest time of nodule appearing (day)	Soybean cultivar	Test treatment F : S	The earliest time of nodule appearing (day)
开育 8 号	1 : 3	10	吉林 10 号	1 : 3	9.7
	1 : 30	13		1 : 30	12
	1 : 300	12.3		1 : 300	11.7
	2028 (S)	12		2028 (S)	13
	2048 (F)	10.7		2048 (F)	12.7

* 三次重复的平均。A mean of 3 replicats.

根瘤菌的菌株在主、侧根上的结瘤表现出相似的趋势, 即随着接种物内快生型大豆根瘤菌的比例增加, 其所结根瘤比例也相应增加。而慢生型大豆根瘤菌在两个品种上主、侧根上的结瘤比例却逐渐下降。快、慢型之比为 1 : 300 时, 在两个大豆品种主根上均为

表 2. 快、慢型大豆根瘤菌在结瘤上的竞争作用

Table 2. Competition between fast and slow-growing soybean rhizobia for nodulation on 2 soybean cultivars

大豆品种 Glycine max cv.	试验处理 Test treat- ment F : S	快、慢型大豆根瘤菌结瘤比例及数量(%) Nodulated number and by fast and Slow-growing soybean rhizobia					
		全部根瘤 Total nodules		主根根瘤 Nodules on taproot		侧根根瘤 Nodules on alteral root	
		F	S	F	S	F	S
开育 8 号 Kaiyu 8	1 : 300	30/52 (57.6%)	22/52 (42.3%)	8/22 (36.3%)	14/22 (63.6%)	22/30 (73.3%)	8/30 (26.6%)
	1 : 30	27/51 (52.9%)	15/51 (29.4%)	7/15 (46.6%)	8/15 (53.3%)	30/36 (83.3%)	7/36 (19.4%)
	1 : 3	62/78 (79.4%)	16/78 (20.5%)	22/32 (68.7%)	10/32 (31.2%)	40/46 (86.9%)	6/46 (13%)
	2028(S)	0/43	41/43*	0/14	12/14*	0/29	29/29
	2048(F)	61/81	0/61	33/33	0/33	28/28	0/28
吉林 10 号 Jilin 10	1 : 300	29/90*(32.2%)	60/90*(66.6%)	12/46*(36.3%)	32/46*(69.5%)	17/44 (38.6%)	28/44 (63.6%)
	1 : 30	41/93 (44%)	54/93 (58%)	16/42 (38%)	28/42 (66.6%)	25/51 (49%)	26/51 (50.9%)
	1 : 3	57/101(54.6%)	45/101(44.5%)	24/40 (60%)	17/40 (42.5%)	33/61 (54%)	28/61 (45.9%)
	2028(S)	0/54	54/54	0/26	26/26	0/28	28/28
	2048(F)	27/27	0/27	27/27	0/27		

* 个别根瘤反应不明显, 未计入在内。

The nodules for indistinct reaction in serology was not counted

** 发生快、慢型大豆根瘤菌的双侵染。

Dual occupancy of nodule with fast and slow-growing soybean rhizobia.

慢生型结瘤占优势，都超过60%。

另外，从两个品种的结瘤比例比较也可以看出，接种同一比例的混合物时，开育8号根上快生型大豆根瘤菌的结瘤比例要大于吉林10号，这也表现出了寄主——菌株亲合性的差异。

测定中也出现了在一个根瘤内同时有快、慢型大豆根瘤菌混合感染的情况，在所测定的混合接种产生的465个根瘤当中，双侵染仅为8个，比Trinick报道的比例要低[9]。

3. 快生型大豆根瘤菌在栽培大豆品种根瘤内的分布调查

对黑龙江、辽宁、宁夏、山西、河南、山东、江西、新疆等8个省（区）的大豆产区采集的根瘤测定结瘤菌系中快生型大豆根瘤菌的比例，结果见表3（为简明起见，略去每个省（区）测试的点和大豆品种）。

表 3. 快生型大豆根瘤菌在 8 省（区）的出现频率

Table 3. Summary of fast-growing soybean rhizobia serogroup distribution in 8 provinces and autonomous regions

省（区） Provincies or autonomous regions	采 样 点 数 No. of sampling locations	品 种 数 No. of soybean cultivars	血清型及结瘤数 Serogroup and No. of nodules by fast-growing soybean rhizobia					品种内出现快型 大豆根瘤菌的比例 % of fast-growing soybean rhizobia in soybean cultivars	快型菌结瘤的幅度 % of fast-growing soybean rhizobia
			2054	2048	2047	2056	2053		
山西 Shanxi	8	16	13/1298	196/1298	7/1298	3/1298	12/1298	14/16(87.5%)	3—37.5%
河南 Henan	2	8	19/694	81/694	20/694	0/694	1/694	8/8 (100%)	6—22.8%
山东 Shandong	2	6	0/392	4/392	0/392	1/392	0/392	1/6 (16.6%)	12.5%
辽宁 Liaoning	2	4	0/376	0/376	0/376	0/376	0/376	0/4	0
黑龙江 Heilongjiang	3	4	0/472	0/472	0/472	0/472	0/472	0/4	0
江西 Jiangxi	2	3	2/294	1/294	0/294	0/294	0/294	1/3 (66%)	1—1.7%
宁夏 Ningxia	4	4	2/425	47/425	26/425	4/425	1/425	4/4 (100%)	5.9—37.9%
新疆 Xinjiang	1	2	0/200	0/200	0/200	0/200	0/200	0/2	0

在所测定的从宁夏贺兰山农场采集的本地大豆根瘤样品中，有1个根瘤的抗原与2054、2048、2056和2053的抗血清均发生反应，在试验中从未出现过这种现象，对此需要进一步研究才能阐明其本质。

从表3可以看出，在采集的8省（区）的21个点的47个大豆品种（次）的根瘤，用已知的5个血清型的快生型大豆根瘤菌的抗血清测定，有29个品种（次）内有快生型大豆根瘤菌结瘤，其比例与不同采样地、不同品种有关，其幅度为1—37.9%。不同的省（区）出现的频率不同，山西省分布较广，其次为河南、宁夏、向东、北、南逐渐减少

或没有。同一品种在不同的地点其结瘤情况有很大差异, 这种差异与土壤内根瘤菌区系分布有关^[10]。5 个不同的血清型在大豆根瘤内出现的比例亦很不相同。在全部 29 个有

快生型大豆根瘤菌结瘤的品种(次)中, 共测出 470 个根瘤系快生型菌所结, 其中各血清型出现的频率见图 1。

图 1 说明, 2048 血清型结瘤率最高, 在田间出现的频率占全部 5 个血清型的 70%, 可能是在我国分布较广泛的一个快生型大豆根瘤菌类型。2056 和 2053 血清型则出现的频率最低, 仅为 1.7—2.9%, 这种趋势与各点多个品种测定时的趋势是一致的。

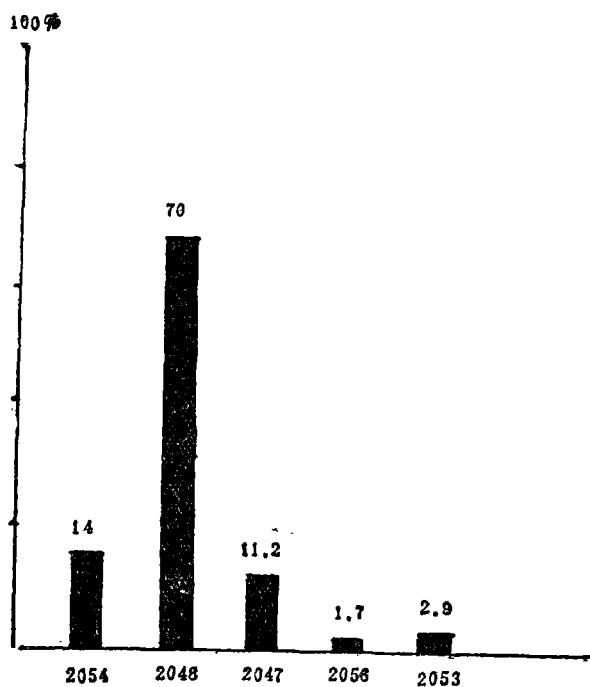


图 1 不同血清型在田间出现的频率
Frequency appearing of different serogroup in field

小结和讨论

1. 在本试验条件下表明快生型大豆根瘤菌具有较强的竞争能力。在开育 8 号、吉林 10 号上, 当与慢生型大豆根瘤菌以不同比例混合接种时, 随着接种

物内快型菌比例的增加, 其在寄主根部结瘤量亦随之增加, 而慢型菌的结瘤则随之减少, 两个品种的趋势一致。Trinick 用从扁豆 (*Lablab*) 中分离的快生型菌株 NGR 234 与慢生型菌株 CB756 对豇豆混合接种时, 其结瘤比例除了与起始浓度有关外, 与寄主生活的温度条件有关^[9]。而 McLoughlin 用快、慢型大豆根瘤菌做的竞争研究指出, 生长袋里快、慢型混合接种时, 结瘤的主要菌系是慢型。而在土培试验里, 3 个快生型大豆根瘤菌株在“北京”品种上形成的根瘤超过 65%, 但在“J130”大豆品种上则以慢型结瘤为主^[11,12]。这种试验结果的差异与试验条件, 尤其是与寄主亲合性有关。菌株竞争能力的高低受一些条件制约, 对此还应进一步深入研究。

2. 水培条件下, 快生型与慢生型大豆根瘤菌及混合接种的最早现瘤时间未表现出明显规律性。快生型并不比慢生型结瘤晚, 在开育 8 号上快生型比慢生型提早 1.3 天现瘤。一般来说, 最早现瘤时间与菌株竞争能力有较大关系, 因此, 试验还应继续在不同条件下进行。

3. 对田间栽培大豆品种根瘤内快生型大豆根瘤菌的分布调查表明, 快生型大豆根瘤菌在我国分布较为广泛。不同的省(区)出现的频率差异很大。栽培大豆起源于野生大豆, 栽培大豆起源于我国是举世公认的, 而野大豆的世界分布仅限于东亚北回归线以北

地区,我国是野生大豆资源最丰富的国家。徐豹等对我国野生大豆种子蛋白 Ti 和 SP₁ 各等位基因频率及分布研究中发现有一定的地理分布规律。这种规律提示我国的野生大豆可能起源地是长江以北及黄河流域^[13]。我们用野生大豆根瘤菌中分离的快生型大豆根瘤菌的几个血清型对栽培大豆根瘤的初步测定结果也说明快生型大豆根瘤菌的地理分布有一定的规律性,即山西、河南、宁夏的土壤中分布较广,几乎所测的点上的大豆根瘤中均有快型菌结瘤,与徐豹等人的工作相吻合。

4. 5个不同血清型在8个省(区)的出现频率表明,2048血清型分布最广,这种差异的生态学意义值得进一步研究^[14]。

参 考 文 献

- [1] Keyser H. H. et al: 1982, *Science*, 215 (4540): 1631—1632.
- [2] Sadowsky M. J. et al: 1983, *International J. of Syst. Bact.* 33 (4): 716—722.
- [3] Stowers M. D. et al: 1984, *Plant and Soil* 77(1): 3—14.
- [4] Yelton M. M. et al: 1983, *J. of General Microbiology* 29 (5): 1537—1547.
- [5] Masterson R. V. et al: 1982, *J. of Bacteriology*, 152 (2): 928—931.
- [6] 葛诚等: 1984, *大豆科学*, 3(4): 313—317.
- [7] 徐玲玫等: 1983, *土壤肥料*, No.2: 7—8.
- [8] 葛诚等: 1984, *中国油料*, No.3: 45—48.
- [9] Triaick M. J.: 1983, *Plant and Soil*, 73(1): 105—115.
- [10] 葛诚等: 1982, *中国油料*, No.3: 56—59.
- [11] McLoughlin T. J. et al: 1983, *The Abstracts of the fifth International symposium on Nitrogen Fixation* No.422.
- [12] McLoughlin T. J. et al: 1984, *Program and Abstracts of world soybean research conference*, No.027.
- [13] 徐豹等: 1984, 中国野生大豆 (*G. soja*) 种子蛋白的电泳分析: Ti 和 SP₁ 各等位基因频率、地理分布与大豆起源地问题, 哈尔滨大豆学术讨论会单行材料.
- [14] Keyser H. H. et al: 1984, *Appl. Env. Micro.* 47(4): 613—615.

COMPETITION BETWEEN FAST AND SLOW-GROWING *R.*
JAPONICUM FOR NODULATION OF GLYCINE MAX AND
DISTRIBUTION OF THE FAST-GROWING *R. JAPONICUM*
IN 8 PROVINCES OF CHINA

Ge Cheng Fan Huei Xu Lingmei Wu Yulan Chen Yueying
(Soil and Fent. Inst., Chinese Academy of Agr. Sci. Beijing)

Wu Ganfan Zhang Renshuang Fu Lianshun
(Tieling Agr. Inst., Liaoning)

Abstract

This paper reported the competitive nodulation ratio of fast and slow-growing *R. japonicum* which were mixed by certain ratio and inoculated on soybean cultivars "Ka-yu 8" and "Jilin 10". The result showed that fast-growing *R. japonicum* present great competitive ability on nodulation. The nodulation ratio of fast-growing *R. japonicum* reached 32.2—78.2% The nodulation ratio with high fast-growing *R. japonicum* number increase the inoculation effect. The trend is consistent on two soybean cultivars. A survey was conducted on 4251 nodules of 47 soybean cultivars from 21 soybean field locations in Henan, Shanxi, Ningxia, Heilongjiang, Liaoning, Jiangxi, Xinjiang, Shandong provinces. The results showed that fast-growing *R. japonicum* nodulated on 29 soybean cultivars. The nodulation proportion of the fast-growing *R. japonicum* in soybean has relationship with collecting locations and soybean cultivars. The range of nodulation was 1—37.9%. The frequency of fast-growing *R. japonicum* have significant difference in different provinces. It seems that the distribution of serotype 2048 was more extensive than other types in Chinese soil.