

黄淮海地区优良大豆根瘤菌株的筛选与接种方式研究

李 涛^{1,2}, 关大伟², 李 俊², 曹凤明², 韦革宏¹, 冯瑞华²

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘 要:采用蛭石盆栽和土壤盆栽试验,从黄淮海 3 省 11 个地区的 22 株大豆根瘤菌中筛选与大面积种植的大豆品种阜豆 9765 相匹配的优良菌株,并在田间进行了根瘤菌 3 种接种方式的效果比较试验。以根瘤菌结瘤数量、植株干重、植株全氮量和占瘤率为指标,通过蛭石盆栽试验初筛获得与阜豆 9765 共生匹配效果好的根瘤菌 6 株;进一步的土壤盆栽复筛结果表明:菌株 *Bradyrhizobium japonicum* 4302 和 *Sinorhizobium fredii* 4822 在结瘤能力、固氮能力和竞争能力方面强于其它 4 株根瘤菌,说明 *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822 具有良好应用前景。在田间进行的根瘤菌拌种、喷施和种下接种的 3 种接种方式小区试验中,拌种处理在大豆植株干重、植株全氮量、占瘤率和产量等方面均显著高于另 2 个处理和对照,说明大豆根瘤菌的拌种方式更适用于黄淮海地区大豆种植。

关键词:筛选;根瘤菌;大豆;优良菌株;接种方式

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)04-0645-06

Screening of Superior Soybean Rhizobial Strains and Approach to Inoculation Methods for Region of HuangHuaiHai

LI Tao^{1,2}, GUAN Da-wei², LI Jun², CAO Feng-ming², WEI Ge-hong¹, FENG Rui-hua²

(1. College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi; 2. Institute of Agricultural Resources and Agricultural Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10081, China)

Abstract: The superior rhizobia strains matched well with the soybean (*Glycine max*) cultivar Fudou 9765 were screened from 22 strains of rhizobia, which were isolated from 11 regions in 3 provinces adopting vermiculite pot and soil pot. Subsequently, three inoculation methods were compared in field experiments. By vermiculite pot experiment, 6 strains were selected out according the number of nodules, dry weights and total N contents, and in the subsequent soil pot experiment the best two strains of *Bradyrhizobium japonicum* 4302 and *Sinorhizobium fredii* 4822 were selected by their performance of nitrogen fixing and competitive nodulation ability from the 6 strains. The field experiment about three inoculation methods of seed dressing, spraying and below the soybean seeds were conducted, and the method of seed dressing showed the best results than the other two treatments with higher plant dry-weight, total N content of plant, nodulation occupancy and seed yield. It indicated that the inoculation method of seed dressing was suitable for rhizobium application in Huanghuaihai region.

Key words: Rhizobium; Soybean; Superior strain; Inoculation method

大豆与大豆根瘤菌的共生固氮体系能为大豆提供生长所需氮素营养的 50% ~ 90%^[1], 充分利用生物固氮已使美国、巴西、阿根廷等大豆主产国获得了巨大的效益。这些国家以筛选优良大豆根瘤菌为首要前提, 并应用合适的根瘤菌接种方式保证接种效果。巴西从 20 世纪 60 年代开始实施优良大豆根瘤菌株筛选计划, 以菌株的固氮能力、与品种的匹配性和与土著菌的竞争能力作为筛选菌株的评价指标^[2-3], 目前巴西已成为大豆根瘤菌应用面积最大的国家^[4]。为了获得稳定的接种效果, 巴西

和阿根廷等国家还开展了接种方式对产量与固氮效果影响的研究, 试验结果揭示, 在不同的地区和生产模式下选择不同的接种方式才能获得稳定的效果^[5]。

黄淮海地区是我国重要的大豆产区, 大豆常年种植面积稳定在 $266.7 \times 10^4 \text{ hm}^2$ 左右, 面积和产量均占全国的 30% 以上^[6]。最新调查发现^[7], 根瘤菌剂在黄淮海大豆种植中几乎没有得到应用, 一方面是由于现有根瘤菌产品所用菌株与大豆品种的匹配性不强, 接种菌株的竞争结瘤能力较弱, 导致接

收稿日期: 2010-04-12

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资助项目 (nycyt-004); 中央级公益性科研院所科研业务费专项资助项目 (2010-34)。

第一作者简介: 李涛 (1985-), 男, 在读硕士, 研究方向为生物固氮。E-mail: nonotaotao@gmail.com。

通讯作者: 李俊, 研究员, 博士生导师。E-mail: jli@caas.ac.cn。

根瘤菌种效果不理想;另一方面是该区域土壤中存在大量的土著根瘤菌^[7],即使大豆种植中不接种根瘤菌,也可以形成一定数量的根瘤,以致人们怀疑根瘤菌接种的必要性。但相关研究表明,绝大多数土著根瘤菌所形成的根瘤的固氮效率不高,为大豆生长提供的氮素营养有限^[8]。由此可知,在黄淮海地区筛选并接种具有结瘤竞争能力和高效固氮性能的优良根瘤菌,对于充分发挥生物固氮作用十分必要。该文以黄淮海地区广泛应用的大豆品种阜豆 9765 为材料,选取代表性大豆根瘤菌株 29 株,采用蛭石、土壤两步筛选法,通过比较供试根瘤菌株的结瘤能力、固氮能力和竞争结瘤能力,从中筛选出与该品种相匹配的优良固氮菌株。同时进行不同接种方式的田间试验,探索适合土著根瘤菌丰富

地区的根瘤菌应用技术,以期为根瘤菌接种技术的推广和应用奠定基础,并为实现该地区大豆生产节本增效目标提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 选取从安徽、河南、山东 3 省 11 个地区大豆根瘤中分离、回接鉴定的 22 株大豆根瘤菌,以及 7 株大豆根瘤菌参比菌株,共计 29 株为供试菌株。其中,慢生大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 12 株、快生大豆根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) 17 株。它们的菌种名称、编号、分离宿主品种及来源列于表 1。

表 1 供试菌株一览表

Table 1 Rhizobial strains used in this study

菌株 Strain	分离地或来源 Origin or sources	分离宿主 Host plant	菌株 Strain	分离地或来源 Origin or sources	分离宿主 Host plant
<i>S. fredii</i> 4202	安徽濉溪	中黄 13	<i>S. fredii</i> 4543	河南博爱	豫豆 25
<i>B. japonicum</i> 4216	安徽宿州	中黄 13	<i>S. fredii</i> 4644	山东菏泽	中黄 13
<i>B. japonicum</i> 4226	安徽宿州	徐豆 9 号	<i>S. fredii</i> 4668	山东东平	中黄 35
<i>B. japonicum</i> 4230	安徽怀远	龙亢 9793-1	<i>S. fredii</i> 4669	山东东平	中黄 13
<i>B. japonicum</i> 4241	安徽蒙城	蒙 9801	<i>S. fredii</i> 4670	山东东平	中黄 13
<i>S. fredii</i> 4257	安徽蒙城	皖豆 24	<i>S. fredii</i> 4822	山东嘉祥	中黄 13
<i>S. fredii</i> 4261	安徽蒙城	皖豆 24	<i>S. fredii</i> 4823	山东嘉祥	中黄 13
<i>S. fredii</i> 4300	安徽阜阳	阜豆 9765	<i>B. japonicum</i> C223	河南	大豆
<i>B. japonicum</i> 4302	安徽阜阳	阜豆 9765	<i>B. japonicum</i> 113-2	湖北	大豆
<i>B. japonicum</i> 4303	安徽阜阳	阜豆 9765	<i>S. fredii</i> USDA191	上海	大豆
<i>S. fredii</i> 4305	安徽凤台	皖豆 24	<i>B. japonicum</i> 2178	黑龙江	627
<i>B. japonicum</i> 4321	安徽合肥	皖豆 24	<i>B. japonicum</i> 005	山东菏泽	大豆
<i>B. japonicum</i> 4324	安徽合肥	皖豆 24	<i>S. fredii</i> USDA205	河南郑州	/
<i>S. fredii</i> 4531	河南博爱	豫豆 25	<i>B. japonicum</i> C33	美国	/
<i>S. fredii</i> 4534	河南博爱	豫豆 25			

1.1.2 供试大豆品种 选用安徽省阜阳市农业科学研究所选育、在黄淮海地区广泛种植的国审品种阜豆 9765 为供试品种,大豆种子由安徽阜阳市农科所提供。

1.1.3 供试土壤 以安徽省阜阳市农科所连续多年大豆种植试验田表土为供试土壤,土壤类型为水稻土,质地为壤土;其有机质含量 1.53%,速效氮 27.3 mg · kg⁻¹,速效磷 33.8 mg · kg⁻¹,速效钾 230 mg · kg⁻¹,pH 8.28。

1.1.4 试验小区概况 试验小区位于安徽阜阳市农科所大豆试验田,多年种植大豆,土著根瘤菌含量 10⁵ ~ 10⁶ 个 · g⁻¹,上茬作物为小麦。有机质

1.22%,速效氮 77.9 mg · kg⁻¹,速效磷 12.6 mg · kg⁻¹,速效钾 68.6 mg · kg⁻¹,pH 8.12。

1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液制备 将供试根瘤菌接种在 YMA 液体培养基中,在 28 ℃、110 r · min⁻¹的摇床中培养 *S. fredii* 菌株 48 h, *B. japonicum* 菌株培养 72 h,用液体 YMA 培养基调 OD = 0.9 (λ = 600nm),菌体浓度约为 2 × 10⁹ 个 · mL⁻¹ [9]。

1.2.2 蛭石盆栽初筛试验 选择大小相近的大豆种子,在 95% 的酒精中浸泡 30 s,用 0.1% 升汞灭菌 5 min,然后用无菌水清洗 5 ~ 6 次,播种在盛有灭菌蛭石的塑料盆 (15 cm × 13 cm) 中,每盆 5 颗种子,分

别接种供试根瘤菌悬液 1 mL,以不接种为对照,每个处理设 3 个重复。将植株置于白天 28~30℃、夜间 15~20℃、每天光照 8 h 的温室中培养。出苗后每盆留苗 3 株,培养 40 d 后收获。

1.2.3 土壤盆栽复筛试验 选取在蛭石盆栽初筛中表现良好的大豆根瘤菌 6 株,进行土壤盆栽复筛试验。将大豆种子播种在盛有 1 kg 土的花盆(15 cm×13 cm)中,每盆种 5 颗种子,接种根瘤菌液 1 mL,以不接种为对照,每个处理设 3 次重复。盆栽条件与管理同“1.2.2”,培养 40 d 后收获。

1.2.4 接种方式试验 选取 *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822 2 个菌株,进行 3 种接种方式田间小区试验。试验共设 7 个处理:2 个菌株×3 种接种方式,CK(不接种对照);每个处理 3 次重复,共 21 个小区,采用完全随机区组排列,小区面积 10 m²。试验采用拌种、种下接种和喷施接种 3 种接种方式。拌种是将种子与菌悬液混匀,用量为每小区 5 mL,阴干后种植。种下接种方式是将根瘤菌粉剂均匀散在垄沟里,用量为每小区 90 g^[10],覆土 2~3 cm,然后播种大豆种子。喷施方式接种是将根瘤菌液稀释后均匀喷施在垄沟里,用量每小区 5 mL,再进行播种。在结荚期采集 5 株大豆植株,测定根瘤数量、地上植株干重、地上植株全氮量和接种菌株占瘤率,在收获期测产。

1.2.5 接种效果测定 分别在蛭石盆栽和土壤盆栽收获时和小区试验大豆结荚期调查时测定根瘤数。同时取植株地上部分(以子叶叶痕处为划分标准),105℃杀青 15 min,65℃烘干至恒重,称地上植株干重并采用凯氏定氮法测定全氮量^[11]。

1.2.6 占瘤率的测定 将在土壤盆栽和小区试验中采集的大豆根瘤,分别置 40% 甘油的 EP 管中保存,每个处理选取代表性根瘤 45 个,按文献方法直接提取 DNA^[12],采用 BOX-PCR 指纹图谱法测定接种根瘤菌的占瘤率^[13]。

1.2.7 数据处理和分析 采用 Excel 软件分析试验数据。依据大豆植株根瘤菌总数和地上植株干重量化结果,采用 QUARTILE 方法分别将供试菌株初步划分为高效、中效和低效 3 个级别,具体划分标准为高效菌株为大于或等于样品的 75%;小于 25% 的为低效菌株,而介于 25% 和 75% 之间的则为中效菌株^[13]。

2 结果与分析

2.1 优良大豆根瘤菌株的筛选

2.1.1 大豆根瘤菌蛭石盆栽初筛 供试的 29 株大豆根瘤菌蛭石盆栽初筛中,依据菌株在阜豆 9765 根部结瘤的数量和大豆植株地上干重结果(图 1),按 QUARTILE 方法,初步确定 *B. japonicum* 4302、*B. japonicum* 4321、*S. fredii* 4305、*S. fredii* 4822 等 16 个菌株与阜豆 9765 具有较好的匹配性。进一步对这 16 株根瘤菌接种后的植株全氮量测定,结果(图 2)显示接种根瘤菌的植株全氮量与不接种对照(CK)相比,差异均达极显著($P < 0.01$)水平,其中以菌株 *B. japonicum* 4302、*B. japonicum* 4321、*S. fredii* 4543、*S. fredii* 4822、*S. fredii* USDA205、*B. japonicum* 2178 接种后植株含氮量位于前列,表明其固氮能力较强,确定这 6 株根瘤菌为土壤盆栽复筛的试验菌株。

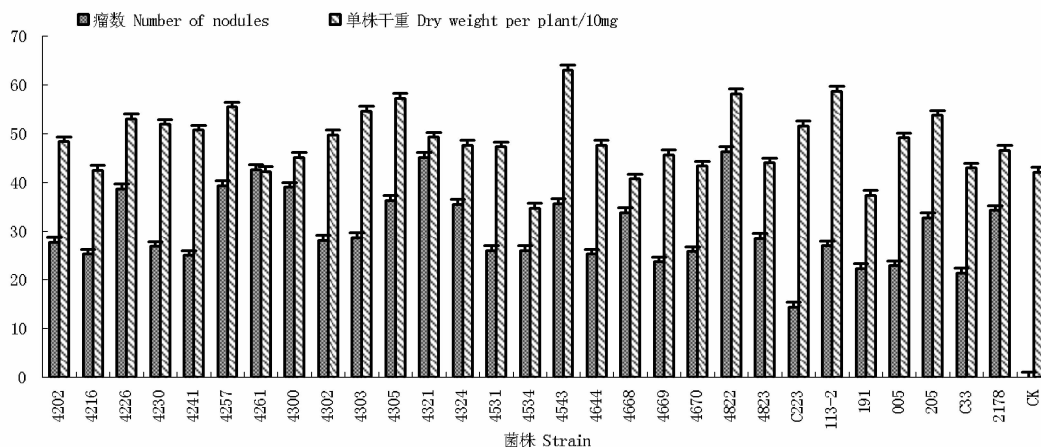


图 1 蛭石试验接种后阜豆 9765 根瘤数和植株干重

Fig.1 Number of nodules and dry weights of Fudou9765 inoculated different strains in vermiculite experiment

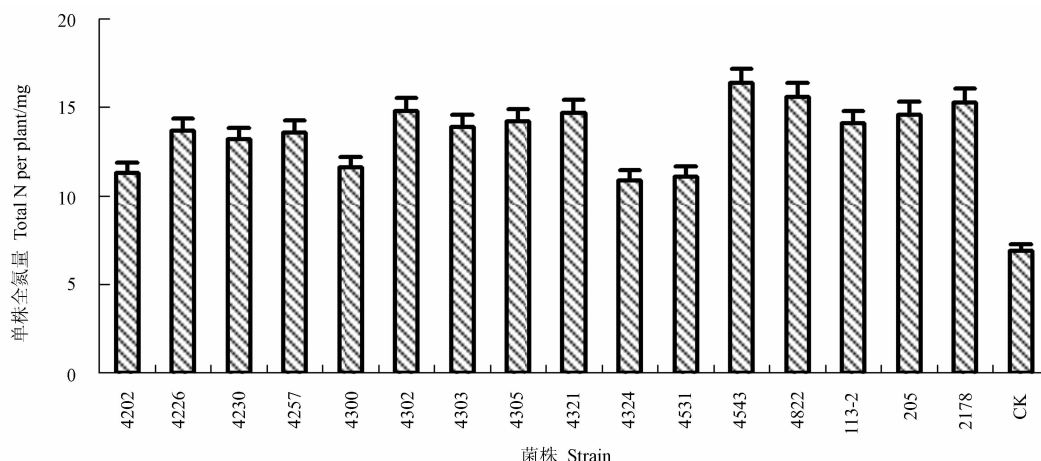


图2 蛭石试验接种后阜豆 9765 植株全氮量

Fig. 2 Total N of Fudou9765 inoculated with different strains in vermiculite experiment

2.1.2 根瘤菌株土壤盆栽复筛 将初筛试验获得的 6 株大豆根瘤菌接种阜豆 9765, 进行有土著根瘤菌存在的土壤盆栽复筛试验。复筛结果(图 3)显示, 与对照(CK)相比, 所有接种菌株均能提高阜豆 9765 根部的结瘤数量, 其中以 *B. japonicum* 2178 菌株的结瘤数最多, 比对照增加 98.50%, 其次是 *S. fredii* 4822 和 *S. fredii* USDA205, 分别增加 88.72% 和 66.17%, 即使是根瘤数增加最少的菌株 *S. fredii* 4543 也达到 24.06%; 同时结果还表明, 在同一宿主品种上, 各菌株竞争结瘤的能力存在差异。

进一步采用 BOX-PCR 方法测定接种根瘤菌株的占瘤率, 由于同一菌株的 BOX-PCR 电泳图谱相同, 通过比较其图谱异同即可得出该菌株的占瘤率。复筛的 6 株菌接种阜豆 9765 的占瘤率测定结果见图 3。菌株 *B. japonicum* 4302 和菌株 *S. fredii* 4822 的占瘤率均达到 30% 以上, 而另 4 株菌的占瘤率在 11.11% ~ 16.67% 之间; 结果表明在土壤存在大量土著根瘤菌 (10^5 个/克) 的情况下, *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822 具有较强的竞争结瘤的能力。

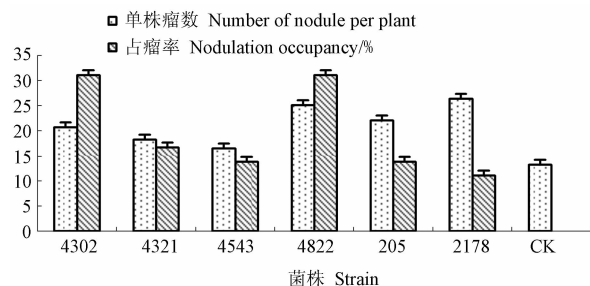


图3 土壤试验接种菌株的根瘤数和占瘤率

Fig. 3 Number of nodules and nodulation occupancy of inoculated strains in soil experiment

6 株根瘤菌接种阜豆 9765 后其植株干重与对照相比, 均能提高植株干重且差异均达显著 ($P < 0.05$) 水平(图 4), 以 *B. japonicum* 4302、*S. fre-*

dii 4822 和 *B. japonicum* 2178 的增幅最大, 高出对照 34% 以上; 且这 3 株菌接种的植株干重也明显高于其它处理。不同菌株接种对大豆植株全氮含量的影响同样存在显著差异(图 4), 其中 *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822 含氮量最高, 每植株分别为 17.5 mg 和 17.3 mg, 显著高于其它菌株和对照 ($P < 0.05$), 其次是 *B. japonicum* 2178、*S. fredii* USDA205 和 *B. japonicum* 4321, 而 *S. fredii* 4543 则低于对照。以上结果表明在土壤环境中供试菌株间的固氮效率存在明显差异。

经过蛭石盆栽初筛和土壤盆栽复筛, 菌株 *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822 与阜豆 9765 有很好的结瘤匹配和固氮能力, 同时又表现出比土著根瘤菌更强的竞争能力, 因此, *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822 即为筛选获得的优良菌株。

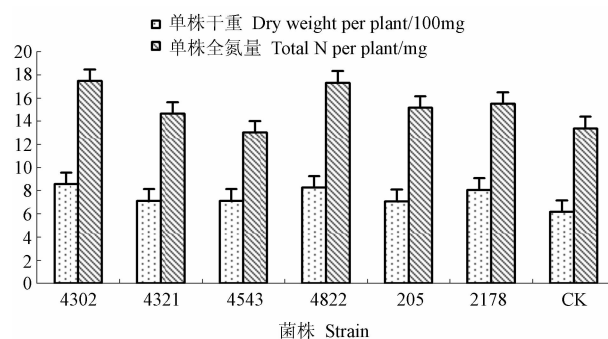


图4 土壤试验接种后阜豆 9765 植株干重和植株全氮量

Fig. 4 Inoculation effects of rhizobial strains on dry weight and total N of Fudou 9765 in soil experiment

2.2 接种方式研究

以 *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822 为接种菌株, 采用拌种、种下接种和喷施接种 3 种方式进行田间小区试验, 在阜豆 9765 结荚期取样测定根瘤数、占瘤率、地上植株干重和地上植株全氮量, 在收获期测定产量, 试验结果汇于表 2。

表 2 不同接种方式对共生固氮和产量的影响

Table 2 Different inoculation methods effect on symbiotic nitrogen fixation and seed yield

处理 Treatment		单株瘤数 Number of nodules per plant	占瘤率 Nodulation occupancy/%	单株干重 Dry Weight per plant/g	单株全氮量 Total N per plant/g	产量 Yield/kg·hm ⁻²
<i>B. japonicum</i> 4302	拌种 SD	109	26.67	17.576a	0.495a	3187.5ab
	喷施 SP	89	15.56	16.741ab	0.460b	2754.0c
	种下接种 IBSS	89	13.33	16.191abc	0.444bc	2887.0c
<i>S. fredii</i> 4822	拌种 SD	90	28.89	16.676ab	0.451b	3291.5a
	喷施 SP	106	17.78	14.727cd	0.424d	2881.5c
	种下接种 IBSS	95	11.11	15.231bcd	0.431cd	3085.5b
	CK	92	/	14.553d	0.407e	2880.5c

表中小写字母表示各处理同一性状平均数的多重比较结果($P<0.05$)。
Small letter in this table show multiple comparisons results of the average of the same traits of treatments.
SD:seed dressing;SP:spraying;IBSS:inoculation below the soybean seeds.

根瘤数量调查结果显示,*B. japonicum* 4302 拌种处理和 *S. fredii* 4822 的喷施处理的根瘤数量最高,分别比对照高 18% 和 15%,但差异不显著,其余各处理与对照相差不大。从占瘤率结果可知,2 株根瘤菌拌种方式的占瘤率均最高,其次是喷施处理,种下接种的占瘤率最低。试验结果表明接种方式对植株根瘤数量影响不大,但对菌株占瘤率有很大的影响,其中拌种方式有利于菌株占瘤率的提高。

大豆接种根瘤菌后,各处理的植株干重较对照有所增加。菌株 *B. japonicum* 4302 3 种接种方式都与对照差异显著,增幅最大的是拌种处理,比对照提高 21%,增幅最小的是种下接种处理,比对照提高 11%,但 3 种接种方式处理间差异不显著。菌株 *S. fredii* 4822 拌种处理与另外 2 个处理和对照间差异显著,增幅达到 15%;而喷施、种下接种处理比对照虽有增加,但差异不显著。以上结果表明拌种方式较另外 2 种接种方式更有利于大豆的生长。

接种根瘤菌对于植株含氮量有很大的提高,且与对照相比差异显著。菌株 *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822 3 种接种方式中拌种处理增幅最大,且与另外 2 种处理差异显著,分别比对照提高 22% 和 11%。菌株 *B. japonicum* 4302 3 种接种方式中种下接种处理增幅最小,比对照增加 9%。菌株 *S. fredii* 4822 3 种接种方式中喷施处理增幅最小,比对照增加 4%。结果表明,拌种处理在共生固氮方面比喷施处理和种下接种处理更具优势。

接种根瘤菌后,各处理小区产量结果显示:菌株 *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822 3 种接种方式中拌种处理产量最高,且都与另外 2 个处理和对照差异显著,分别比对照提高 11% 和 14%;种下接种对产量影响很小,与对照相仿或略有增加;相比之下,喷施处理效果最差,菌株 *S. fredii* 4822 的产量与对

照持平,而菌株 *B. japonicum* 4302 的产量还有所下降。再综合各接种方式对植株干重和植株全氮量的影响,可知拌种是该地区适宜的根瘤菌接种方式。

3 讨论

已有研究表明,竞争能力对菌株共生固氮作用影响很大,竞争能力强的菌株才能充分发挥根瘤菌接种的效果^[14],该试验研究证实了这一观点。高占瘤率的菌株 *B. japonicum* 4302 虽然在蛭石盆栽中接种效果一般,但在土壤盆栽中却表现出优良效果;而低占瘤率的菌株 4543 和 4321 虽然在无菌蛭石中固氮效果好,但在含有土著根瘤菌的土壤环境中则处于劣势地位,导致这 2 个菌株在初筛和复筛结果不一致。由此看来,在针对土著根瘤菌多的地区筛选高效菌株时,菌株的竞争能力应作为筛选的首选指标。

接种方式一直是根瘤菌应用过程中的关键环节,不同接种方式对根瘤菌接种效果影响大。虽然国内外的学者进行了很多研究,但看法不尽相同^[4,15-19]。从研究的结果来看,在安徽地区 3 种接种方式都有一定的固氮效果,但 3 种接种方式之间存在明显差异,其中拌种方式固氮效果最好。其原因可能是在安徽地区土壤环境复杂和土著根瘤菌丰富的情况下,喷施和种下接种都无法使根瘤菌快速占领结瘤位点^[20]。这与沈辉等^[17]在黑龙江的研究结果一致。

4 结论

通过蛭石初筛和土壤复筛试验获得的优良菌株 *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822,接种阜豆 9765 可显著提高植株生物量、全氮量和产量,且具有较强竞争能力,在黄淮海地区推广应用前景良好。

在 3 种接种方式中,拌种方式在株菌 *B. japonicum* 4302 和 *S. fredii* 4822 上均表现出良好的接种效果,与喷施和种下接种差异显著,初步认为拌种是安徽地区的根瘤菌接种的适宜方式,该结果有待于在黄淮海其它省份进一步验证。

参考文献

- [1] 李阜棣. 共生固氮与根瘤菌在持续农业和环境保护中的意义 [M]. 武汉: 武汉出版社, 1998. (Li F D. The significance of symbiotic nitrogen fixation with rhizobia in the sustainable agriculture and environmental protection [M]. Wuhan: Wuhan Press, 1998.)
- [2] Marta A, Dulce N R-N, Francisco J T. Soybean inoculation: Dose, N fertilizer supplementation and rhizobia persistence in soil [J]. Field Crops Research, 2009, 113: 352-356.
- [3] Lilian M, Fabio L M, Beatriz G D, et al. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados [J]. Field Crops Research, 2002, 73: 121-132.
- [4] Alves B J R, Boddey R M, Urquiaga S. The success of BNF in soybean in Brazil [J]. Plant and Soil, 2003, 252: 1-9.
- [5] Bogino P, Banchio E, Bonfiglio C, et al. Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. strain in soils containing indigenous rhizobia [J]. Current Microbiology, 2008, 56: 66-72.
- [6] 王彩洁, 徐冉, 张礼凤, 等. 黄淮海地区大豆推广品种的状况与育种发展趋势 [J]. 山东农业科学, 2006 (5): 14-16. (Wang C J, Xu R, Zhang L F, et al. The situation of promotion soybean variety and trend of breeding development in region of Huang-Huai [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2006 (5): 14-16.)
- [7] 关大伟, 李俊, 曹凤明. 黄淮大豆产区土壤养分状况与根瘤菌应用现状及对策 [J]. 大豆科技, 2009 (2): 9-11. (Guan D W, Li J, Cao F M. The status of soil nutrients and the current situation and countermeasures of rhizobium application [J]. Soybean Technology, 2009 (2): 9-11.)
- [8] 江木兰, 张学江, 徐巧珍, 等. 大豆-根瘤菌的固氮作用 [J]. 中国油料作物学报, 2003, 25 (1): 50-53, 58. (Jiang M L, Zhang X J, Xu Q Z, et al. Nodulation and nitrogen-fixation in soybean-rhizobium [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25 (1): 50-53, 58.)
- [9] 曾昭海. 紫花苜蓿高效根瘤菌筛选及田间鉴定方法研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003: 95. (Zeng Z H. Study on the screening of high-efficient *Sinorhizobium meliloti* for *Medicago sativa* L. cultivars and the identification in field [D]. Beijing: China Agricultural University, 2003: 95.)
- [10] 窦新田, 周俊初. 大豆基因工程根瘤菌田间结瘤和共生固氮效应 [J]. 生物技术, 1991, 1 (3): 26-29. (Dou X T, Zhou J C. The effect of symbiotic nitrogen fixation of gene engineering rhizobium strains in soybean in the field [J]. Biotechnology, 1991, 1 (3): 26-29.)
- [11] 戴小密, 刘彦杰, 叶小梅, 等. 接种大豆根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) 遗传工程菌株 LMG101 对大豆的增产效应 [J]. 中国农业科学, 2003, 36 (1): 66-70. (Dai X M, Liu Y J, Ye X M, et al. Soybean yield response to inoculation with genetically engineered strain LMG101 of *Sinorhizobium fredii* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36 (1): 66-70.)
- [12] 陈强, 张小平, 陈文新, 等. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法 [J]. 微生物学通报, 2002, 29 (6): 63-67. (Chen Q, Zhang X P, Chen W X, et al. Isolation of DNA from the root nodule of legume plant [J]. Microbiology, 2002, 29 (6): 63-67.)
- [13] Jia R Z, Tian C F, Man C X, et al. Screening of high effective alfalfa rhizobial with a comprehensive protocol [J]. Annals of Microbiology, 2008, 58 (4): 1-9.
- [14] 缪礼鸿, 周俊初. 根瘤菌竞争结瘤的研究进展 [J]. 华中农业大学学报, 2003, 22 (1): 84-87. (Miao L H, Zhou J C, Advance on the study of the nodulation competition of rhizobia [J]. Journal of Huazhong Agricultural University 2003, 22 (1): 84-87.)
- [15] 卢林纲. 黑龙江省大豆根瘤菌复合颗粒肥的研制及其应用技术 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005: 21-27. (Lu L G. Developing *Bradyrhizobium japonicum* mixed pellet fertilizer and its application in Heilongjiang Province [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005: 21-27.)
- [16] Maria J A, Silvina L. Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 282: 115-123.
- [17] 沈辉, 周俊初, 吴魁斌, 等. 大豆根瘤菌基因工程菌株 NH32 田间竞争结瘤能力初报 [J]. 微生物学研究与应用, 1993 (1): 15-18. (Shen H, Zhou J C, Wu K B, et al. The preliminary report for competitive nodulation ability in field of the genetically engineered strain of soybean *Rhizobium* NH32 [J]. Microbiology Research and Application, 1993 (1): 15-18.)
- [18] 张学江, 姚瑞林, 江木兰. 花生根瘤菌数量效应与种床接种效果 [J]. 中国油料, 1991 (2): 56-59. (Zhang X J, Yao R L, Jiang M L. Responses of peanut to rhizobium numbers and seed bed inoculation [J]. China Oil, 1991 (2): 56-59.)
- [19] 唐颖, 卢林纲, 隋文志, 等. 根瘤菌不同接种方式对大豆根瘤分布及产量的影响 [J]. 现代化农业, 2002 (4): 13-14. (Tang Y, Lu L G, Sui W Z, et al. Effect of yield and distribution of nodules in response to rhizobium inoculation methods [J]. Modernization Agriculture, 2002 (4): 13-14.)
- [20] Nadia N, Weaver R W. Number of Rhizobia and delayed inoculation influence nodulation of clovers [J]. Plant and Soil, 1994, 158: 135-139.