

## 黄土高原地区优良大豆根瘤菌的筛选与接种方式研究

张红侠,冯瑞华,关大伟,李俊,曹凤明

(中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所,北京 100081)

**摘要:**采用蛭石和土壤盆栽试验,从黄土高原地区 17 个大豆品种上采集根瘤,对根瘤进行分离纯化、回接验证和遗传多样性分析,根据遗传多样性分析结果、分离宿主和分离地点,选出代表菌株用于筛选与黄土高原地区面积种植最大的大豆品种晋豆 25 相匹配的优良菌株,并在田间进行了根瘤菌喷施、拌种和种下接种不同接种方式效果比较试验。以瘤数、瘤干重、植株干重、植株全氮量为指标,通过蛭石盆栽试验初筛获得与晋豆 25 共生匹配效果好的根瘤菌 10 株;其进一步的耐旱试验和土壤盆栽复筛结果表明:菌株 *Bradyrhizobium liaoningense* 4345 和 *Sinorhizobium fredii* 4338 在结瘤能力、固氮能力、竞争能力和耐旱性能方面最好,揭示 *B. liaoningense* 4345 和 *S. fredii* 4338 具有良好应用前景。在田间进行的根瘤菌 3 种接种方式小区试验中,*B. liaoningense* 4345 喷施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,*S. fredii* 4338 拌种和喷施较好,表明黄土高原地区大豆根瘤菌的适宜接种方式是喷施和拌种。

**关键词:**筛选;根瘤菌;大豆;耐旱;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)06-0996-07

## Screening of Superior Soybean Rhizobial Strains and Analyzing of Different Inoculation Methods in Loess Plateau Region of China

ZHANG Hong-xia, FENG Rui-hua, GUAN Da-wei, LI Jun, CAO Feng-ming

(Institute of Agricultural Resources and Agricultural Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10081, China)

**Abstract:** Ten superior rhizobia strains matched well with the soybean (*Glycine max*) cultivar Jindou 25 were screened from 20 rhizobia varieties that isolated from Loess Plateau region according to nodule numbers, nodule dry weights, plant dry weights and total N contents by vermiculite and soil pot experiments. Subsequently, three inoculation methods were adopted in field experiments and two strains of *Bradyrhizobium liaoningense* 4345 and *Sinorhizobium fredii* 4338 were selected by their performance of nitrogen fixing and competitive nodulation ability from the 10 strains in drought resistant and soil pot experiments. Spraying showed better effects in plant dry weight, nodulation competitiveness, seed yield and total N content than the other two treatments for *B. liaoningense* 4345. Moreover, seed dressing showed the best effects in plant dry weight, nodulation competitiveness, seed yield and total N content for *S. fredii* 4338 in the field experiment. The results indicated that the inoculation methods of spraying and seed dressing were suitable for rhizobium application in Loess Plateau region.

**Key words:** Screening; Rhizobium; Soybean; Drought-resistant; Superior strain; Inoculation method

接种适宜的根瘤菌可提高共生固氮的效率<sup>[1]</sup>,减少化学氮肥的施用量,节约不可再生资源的消耗,缓解能源压力;同时也可降低由于化学氮肥过量施用造成的生态环境污染<sup>[2]</sup>。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%<sup>[3]</sup>,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。阿根廷绝大多数农场种植大豆时接种根瘤菌,其中,50%的农场每年都接种,40%每 2 a 接种,只有 10%的农场长期不接种根瘤菌<sup>[4]</sup>。这些国家以筛选优良大豆根瘤菌为首要前提,应用合适的根瘤菌接种

方式保证接种效果。高效菌株的筛选包括选择适应特殊寄主和特殊环境条件的特异菌株,或适应多寄主和多种环境条件的广谱菌株<sup>[5]</sup>。此外,为了获得稳定接种效果,巴西和阿根廷等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效果<sup>[6]</sup>。

黄土高原地区主要包括山西、陕西、甘肃、宁夏大部以及豫西、青海部分地区,是我国重要的大豆产区,大豆种植面积占全国的 10%左右。是我国大豆生产技术相对落后而又极具发展前景的区域。

收稿日期:2010-06-28

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资助项目(nycytx-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:张红侠(1982-),女,硕士,研究方向为生物固氮。E-mail:zhanghongxia2004@126.com。

通讯作者:冯瑞华,副研究员,硕士生导师。E-mail:thfeng@caas.ac.cn。

该区是水土流失严重的半干旱区,土著根瘤菌的数量相对较少,结瘤能力弱。为了能使根瘤菌接种长期有效,菌种需具备在不良土壤环境中存活的性能,故选种时除考虑根瘤菌的高侵染性和高固氮能力外,还应选育耐旱、耐酸、耐盐碱、耐高温等优良性状的菌株。可根据根瘤菌使用地区的土壤条件,有针对性地选择高效、抗逆性强的菌株接种,将增加根瘤菌的接种效果。

该试验以黄土高原地区广泛应用的大豆品种晋豆 25 为材料,选取代表性的 26 株大豆根瘤菌株,采用蛭石初筛、耐旱性筛选和土壤复筛的筛选模式,通过比较供试根瘤菌株的结瘤能力、固氮能力、竞争结瘤和耐旱能力,从中筛选出与品种和环境相匹配的优良菌株。同时进行不同接种方式的田间

试验,探索适合黄土高原干旱地区的根瘤菌应用技术,旨在为根瘤菌接种技术的推广和应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 从山西和陕西的 11 个地区、17 个大豆品种采集根瘤,经分离、纯化并回接验证的大豆根瘤菌 20 株,以及参比菌株 6 株。其中,属于 *Bradyrhizobium japonicum* 6 株、*Bradyrhizobium liaoningense* 1 株、*Sinorhizobium fredii* 19 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

Table 1 Strains used in this study

菌株 Strains	分离地或来源 Origins or sources	分离宿主 Host plant	菌株 Strains	分离地或来源 Origins or sources	分离宿主 Host plant
<i>S. fredii</i> 4337	山西汾阳	晋豆 25	<i>S. fredii</i> 4392	陕西黄陵	晋豆 23
<i>S. fredii</i> 4338	山西汾阳	晋豆 25	<i>B. japonicum</i> 4361	山西汾阳	晋豆 39
<i>S. fredii</i> 4362	山西汾阳	晋豆 39	<i>S. fredii</i> 2078	山西洋源	农家品种
<i>B. japonicum</i> 03090	山西怀仁	大豆	<i>S. fredii</i> 4377	山西汾阳	晋豆 34
<i>S. fredii</i> 4397	陕西黄陵	晋豆 25	<i>S. fredii</i> 4394	陕西黄陵	晋豆 25
<i>S. fredii</i> 4422	陕西延安	汾豆 79	<i>S. fredii</i> 4330	山西汾阳	晋豆 25
<i>S. fredii</i> J19-6	山西介休	大豆	<i>S. fredii</i> 4481	山西汾阳	晋豆 29
<i>S. fredii</i> SR2a	山西寿阳	大豆	<i>B. japonicum</i> 113-2	湖北	大豆
<i>S. fredii</i> 4335	山西汾阳	晋豆 25	<i>S. fredii</i> USDA191	上海	大豆
<i>S. fredii</i> S20-11	山西寿阳	大豆	<i>B. japonicum</i> 2178	黑龙江	627
<i>B. liaoningense</i> 4345	山西汾阳	晋豆 34	<i>B. japonicum</i> 005	山东菏泽	大豆
<i>S. fredii</i> 4429	陕西延安	汾豆 78	<i>S. fredii</i> USDA205	河南郑州	/
<i>S. fredii</i> 71080	陕西黄龙	大豆	<i>B. japonicum</i> C33	美国	/

1.1.2 供试大豆品种 大豆品种晋豆 25 由山西省农科院经济作物研究所育成和提供。

1.1.3 供试土壤 为山西省农科院汾阳经济作物研究所连续多年大豆种植试验田地表土,土壤类型为褐土;其有机质含量 2.02%,速效氮 43.15 mg · kg<sup>-1</sup>,速效磷 28.67 mg · kg<sup>-1</sup>,速效钾 86.03 mg · kg<sup>-1</sup>,pH 8.28。

1.1.4 试验小区概况 试验小区位于山西汾阳市经济作物研究所大豆试验田,多年种植大豆,土著根瘤菌含量 104 ~ 105 个 · g<sup>-1</sup>,上茬作物小麦。有机质 1.67%,速效钾 83.7 mg · kg<sup>-1</sup>,速效氮 59.6 mg · kg<sup>-1</sup>,速效磷 27.4 mg · kg<sup>-1</sup>。

## 1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液制备 将供试根瘤菌接种在固体 YMA 斜面上活化,然后转接在 YMA 液体培养基中,

28℃,150 r · min<sup>-1</sup>,摇床培养,菌株培养 3 ~ 4 d,用液体 YMA 培养基调至统一 OD 值( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ),使菌体浓度达 10<sup>9</sup> · mL<sup>-1</sup>。

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(17 cm × 15 cm)中,每盆 6 颗种子,分别接种供试根瘤菌悬液 2 mL,以不接种为对照,每处理设 4 次重复。随机排列区组。将植株置于白天 25 ~ 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 颗,培养 40 d 后收获。

1.2.3 耐旱水平试验 用聚乙二醇 6000 (PEG 6000) 人工模拟干旱条件,在 YMA 液体培养液中加入 PEG 6000 使其浓度(W/V)分别为:15%、25%、

35%,各浓度设3次重复。

1.2.4 耐旱性测定 将供试菌株分别挑取1环接种到5 mL YMA 液体培养液中,28℃,150 r·min<sup>-1</sup>摇床中振荡培养4 d 制成接种液,吸取0.1 mL 接种液接入不同的 PEG 6000 浓度 YMA 液体培养基中,28℃,150 r·min<sup>-1</sup>,摇床培养7 d,然后混匀取样,并对浊度大的菌悬液作适当稀释,用 TU1810 紫外分光光度计测 OD<sub>420</sub> 值,用 OD<sub>420</sub> 的大小表示其在各水平下的生长繁殖情况。

1.2.5 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10株,进行土壤盆栽复筛试验。将大豆种子播种在盛有1.5 kg 土的花盆(17 cm × 15 cm)中,每盆种6颗种子,接种根瘤菌液2 mL,以不接种为对照,每个处理设4个重复。盆栽条件与管理同“1.2.2”,培养40 d 后收获。

1.2.6 接种方式试验 选取 *B. liaoningense* 4345 和 *S. fredii* 4338 2个菌株,进行田间小区3种接种方式试验。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13.3 m<sup>2</sup>。试验采用的3种接种方式分别为拌种、喷施和种下接种。拌种方式是将种子与菌悬液混匀,用量每小区6 mL,阴干后种植。喷施方式接种是将根瘤菌液稀释后均匀喷散在垄沟里,用量每小区6 mL,再进行播种。种床接种方式是将根瘤菌与草炭拌匀成粉剂,然后均匀散在垄沟里,用量每小区90 g<sup>[9]</sup>,覆土2~3 cm,然后播种大豆种子。在结荚期采集5株大豆植株,测定根瘤数、瘤干重、地上

植株干重、地上植株全氮量,在收获期测产。

1.2.7 接种效果测定 分别在蛭石盆栽和土壤盆栽收获时测定根瘤数。同时取植株地上部分(以第1片叶叶痕处为划分标准),105℃杀青1 h,75℃烘干至恒重,称地上植株干重,采用凯氏定氮法测定全氮量<sup>[10]</sup>。

1.2.8 占瘤率的测定 将在土壤盆栽中采集的大豆根瘤,分别置40%甘油的EP管中保存,每个处理选取代表性根瘤48个,按文献方法直接提取DNA<sup>[11]</sup>,采用BOX-PCR指纹图谱法测定接种根瘤菌的占瘤率<sup>[12]</sup>。

### 1.3 数据分析

采用 Excel 和 SPSS 软件分析试验数据。

## 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26株大豆根瘤菌蛭石盆栽初筛中,依据菌株在晋豆25根部结瘤的数量、瘤干重、大豆植株地上干重结果,初步选出菌株4345、4338等17个菌株进行地上植株全氮量测定,结果显示接种根瘤菌的植株全氮量与CK相比有不同程度的提高。所测菌株除4335外,含氮量都大于CK,含氮量比CK提高29.47%~2.11%。其中以菌株4345、4338、C33、2178接种后植株含氮量位于前列,表明其固氮能力较强(表2)。综合各个指标,选出与晋豆25结瘤固氮好的10株根瘤菌为下一步土壤盆栽复筛的试验菌株。

表2 晋豆25初筛试验结果

Table 2 Results of first round screening on Jindou 25

菌株 Strains	地上植株干重 Dry weight per plant/g	比对照提高 Percentage of dry weight increase/%	总瘤数 Nodules per plant	瘤干重 Nodules dry weight per plant/mg	地上植株全氮量 Total N content per plant/mg
2178	0.665*	32.73	8.5*	16.08*	1.16
113-2	0.670*	33.73	11.4**	14.42*	1.09
4345	0.638*	27.35	17.8**	25.75*	1.23
4338	0.629*	25.55	16.9**	23.50*	1.15
4362	0.610*	21.78	4.3	5.67	0.97
03090	0.614*	22.85	9.8*	15.42	1.12
4397	0.600*	19.76	3.4	ND	0.98
4422	0.613*	22.36	5.2	10.33	1.02
C33	0.618*	23.35	7.7*	14.25*	1.19
J19-6	0.598	19.36	5.5	6.83	1.01
SR2a	0.592	18.16	13.7**	14.67*	1.04
4335	0.590	17.76	6.1	3.12	0.94
S20-11	0.589	17.56	11.2**	11.42*	1.03
USDA 191	0.588	17.37	16.4**	10.13	1.00
4392	0.587	17.17	3.5	ND	ND
4361	0.586	16.97	3.2	4.58	ND

(续表 2)

菌株 Strains	地上植株干重 Dry weight per plant/g	比对照提高 Percentage of dry weight increase/%	总瘤数 Nodules per plant	瘤干重 Nodules dry weight per plant/mg	地上植株全氮量 Total N content per plant/mg
2078	0.585	16.77	1.7	ND	ND
005	0.581	15.97	11.8**	14.58*	1.05
4337	0.573	14.37	3.4	ND	ND
USDA 205	0.571	13.97	20.2**	15.25*	1.07
4377	0.570	13.77	4.0	3.08	ND
4394	0.555	10.78	0.5	ND	ND
4330	0.549	9.58	0.5	ND	ND
71080	0.548	9.38	1.3	ND	ND
4429	0.530	5.79	3.2	ND	ND
4481	0.477	32.73	1.7	ND	ND
CK	0.501	—	0	—	0.95

以上数据均为 4 个重复的平均值,均值比较采用 Duncan 法,\*表示在  $P < 0.05$  水平差异显著,\*\*表示在  $P < 0.01$  水平差异极显著,ND 表示数据未测。

Values presented were means of four repeated experiments. \* indicated significant difference ( $P < 0.05$ ) between strains by Duncan test, \*\* indicated very significant difference ( $P < 0.01$ ); ND indicates data were not detected.

2.1.2 耐旱性试验结果 从表 3 可以看出,随着 PEG 6000 浓度的增加,根瘤菌 OD 值减小,在浓度为 35% 时,都能够生长。6 株慢生大豆根瘤菌,菌株 4345 在 PEG 6000 浓度为 35% 时 OD 值最大,其次为菌株 2178、03090、113-2、005、C33;4 株快生大豆根瘤菌,菌株 4338 在 3 种浓度中 OD 值均最大,PEG 6000 浓度 35% 时 OD 值仍达 0.624,其次为 SR2a,PEG 6000 的浓度从 25% 到 35% 时,菌株 USDA 205 的 OD<sub>420</sub> 值急剧下降。可见,不同菌株耐旱能力差距较大。

2.1.3 根瘤菌株土壤盆栽复筛 将初筛试验获得的 10 株大豆根瘤菌接种晋豆 25,进行土壤盆栽复筛试验。复筛结果见表 4。

表 3 大豆根瘤菌在不同浓度 PEG 6000 的生长状况

Table 3 Effects of different concentration of PEG 6000 on soybean rhizobium growth

菌株 Strains	OD <sub>420</sub> values			
	0	15%	25%	35%
4345	1.201	0.971	0.598	0.242
SR2a	1.845	1.630	1.016	0.455
S20-11	1.791	0.748	0.360	0.151
4338	1.924	1.663	1.251	0.624
03090	1.309	0.909	0.571	0.204
005	1.625	0.672	0.281	0.121
205	2.282	1.420	1.107	0.251
C33	1.767	0.819	0.465	0.104
2178	1.524	0.838	0.578	0.213
113-2	1.345	1.010	0.525	0.162

表 4 晋豆 25 土壤盆栽试验结果

Table 4 Results of pot plant test on Jindou 25

菌株 strains	总瘤 Nodules per plant	地上植株干重 Dry weight per plant/mg	干重提高 Percentage of dry weight increase/%	地上植株全氮 Total N content per plant/mg	全氮提高 Percentage of total N increase/%
4338	13.5a	781.83ab	21.92	1.38	36.63
2178	12.6a	689.83bc	7.58	1.31	29.70
C33	12.2a	782.42ab	22.01	1.37	35.28
USDA205	1.1b	727.25abc	13.41	1.26	24.75
S20-11	2.5b	698.96abc	8.99	1.23	21.78
4345	16.6a	834.677a	30.16	1.43	41.57
005	10.5a	735.00abc	14.62	1.31	29.70
SR2a	11.7a	735.83abc	14.75	1.30	28.77
113-2	16.8a	782.96ab	22.1	1.41	39.75
03090	14.8a	744.67abc	16.13	1.34	32.50
CK	0.3b	641.25c	—	1.01	—

以上数据均为 4 个重复的平均值,均值比较采用 Duncan 法,字母不同表示在  $P < 0.05$  水平差异显著。

Values presented were means of four repeated experiments. Different letters (a, b, c) indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between treatments by Duncan test.

土壤盆栽 CK 结瘤极少,仅在侧根末端有个别的小瘤,可能由于山西地区气候干旱,土著根瘤菌

偏少且结瘤能力弱所致。相反,接种试验根瘤数明显较高,除菌株 USDA205 和 S20-11 外,总瘤数都大

于10个,与CK差异达到显著水平,其中菌株113-2,4345,03090和4338的总瘤数在所有测试菌株中位于前4位。

晋豆25接种上述菌株后,地上部分干物质产量与CK差异很大。菌株4345与CK达到极显著差异,地上干重提高30.16%;菌株C33,113-2和4338与对照达到显著差异水平。其它各菌株对地上部分干物质影响依次为菌株03090 > SR2a > 005 > USDA205 > S20-11 > 2178,干重比CK提高16.13%~7.58%。

地上植株的含氮量位于前4位的仍然是菌株4345,113-2,4338和C33,比对照分别提高41.57%,39.75%,36.63%和35.28%,其它菌株提高也超过20%。根据结瘤固氮效果,选择菌株4345和4338进行占瘤率测定,菌株4345部分瘤子的占瘤率BOX-PCR图谱见图1。泳道1是接种菌株4345产生的BOX-PCR图谱,2~16是从瘤子提取的DNA产生的BOX-PCR图谱。2株菌的占瘤率都为100%。表明土著根瘤菌很少且结瘤竞争力弱,接种菌占据了优势。

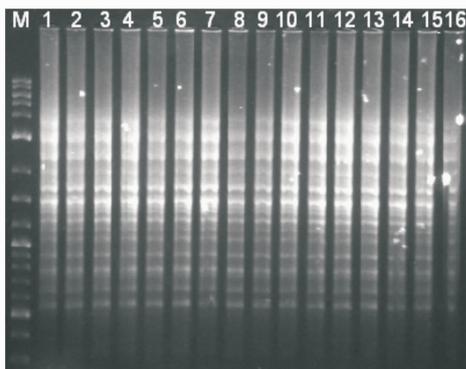


图1 通过BOX-PCR测定的菌株4345的占瘤率图谱

Fig.1 Fingerprint patterns of nodule occupancy of strain 4345 by BOX-PCR

经过蛭石盆栽初筛和土壤盆栽复筛,菌株4345和4338与晋豆25有很好的结瘤匹配和固氮能力,因此菌株4345和4338即为筛选获得的优良菌株。

## 2.2 接种方式研究

以菌株4345和4338为接种菌株,采用喷施、拌种和种下接种3种接种方式进行田间小区试验,在晋豆25结荚期取样测定根瘤数、瘤干重、地上植株干重和地上植株全氮量,在收获期测定产量,试验结果见表5。

对菌株4345来说,喷施后的瘤数分别是拌种和种下接种的2.5倍和2.6倍;瘤干重分别是二者的3.1倍和2.9倍;地上植株全氮量提高21.1%和22.1%。拌种后的瘤干重和地上植株干重低于种下接种,其余指标高于种下接种,但差异不明显。

对菌株4338来说,拌种接种方式的地上干重和全氮都位于第1位,地上植株干重分别比喷施和种下接种提高19.4%和26.8%;地上植株全氮提高18.2%和22.0%;瘤数位于第2位。喷施的瘤数、瘤干重最大,瘤干重是拌种和种床接种的3.2倍和2.5倍。而种下接种仅瘤干重位于第2位,其它指标均排在最后。

从表5看出,CK产量最低,不同菌株和接种方式比CK产量提高幅度较大,在0.5%~5.82%之间。对于菌株4345,与CK相比,不同接种方式下产量提高顺序为喷施 > 拌种 > 种床接种,分别是5.82%,2.84%和1.79%;喷施比拌种和种床接种提高2.8%和4.0%。对于菌株4338,与CK相比,不同接种方式产量提高顺序为拌种 > 喷施 > 种床接种,分别为4.56%,3.17%和0.5%,拌种比喷施和种床接种提高1.3%和4.0%。

表5 不同接种方式对共生固氮和产量的影响

Table 5 Effects of different inoculation methods on symbiotic nitrogen fixation and seed yield

菌种 Strains	处理 Treatment	单株瘤数 Nodules per plant	瘤干重 Nodule dry weight per plant/mg	单株干重 Dry weight per plant/mg	单株全氮量 Total N content per plant/mg	小区产量 Yield/g
<i>B. liaoningense</i> 4345	拌种	8.0ab	30.0	6.81	24.64	1037
	喷施	20.3a	92.0	7.81	29.83	1067
	种床接种	7.8ab	32.1	6.94	24.43	1026
<i>S. fredii</i> 4338	拌种	10.5ab	25.1	7.57	27.21	1054
	喷施	15.9ab	79.3	6.34	23.03	1040
	种床接种	7.9ab	32.2	5.97	22.31	1013
	CK	2.4b	3.1	5.61	21.49	1008

以上数据均为四个重复的平均值,均值比较采用Duncan法,字母不同表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Values presented were means of four repeated experiments. Different letters (a, b) indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between treatments by Duncan test.

### 3 讨论

根瘤菌-大豆共生体系能否高效的固氮除了与双方的基因有关外,还与土壤、环境条件等密切相关。由于我国各地的土壤条件和大豆品种千差万别,只有依据各地的土壤条件和适宜大豆品种进行高效根瘤菌筛选,才能充分发挥大豆-根瘤菌共生体间的固氮效率<sup>[13]</sup>。在无菌蛭石中进行筛选,温度、湿度以及光照都可以人工控制。在人工控制条件下,不同的大豆品种接种不同菌株后,地上植株干重、瘤干重、瘤数及固氮量差异较为明显。与蛭石相比,土壤条件要复杂得多,土壤接种不同根瘤菌后,菌株间的表现会有一定差异。因此,该研究将瘤干重、地上植株干重和总固氮量作为重要的指标来对菌株进行蛭石初筛,并在土壤中验证其高效性和竞争结瘤能力。研究结果表明,不同的根瘤菌在同一土壤、同一大豆品种上的匹配能力不同。

土著根瘤菌的数量可以影响接种根瘤菌的占瘤率,是影响根瘤菌接种效果的关键因素。多数土壤中都含有一定数量的土著根瘤菌,虽然其结瘤固氮能力很低,但由于它们非常适应当地的环境条件,竞争能力较强,能够优先侵染,因此,要使接种根瘤菌达到比较好的接种效果,筛选竞争结瘤能力强、固氮能力高的根瘤菌非常重要<sup>[14]</sup>。在山西等干旱地区,受干旱的环境条件的影响,虽然土壤中根瘤菌数量很多,但在大豆根上结瘤的根瘤数量并不多。实际生产中,根瘤菌的有效性受到土壤生态环境、宿主植物和土著根瘤菌等环境因子的影响<sup>[1,5]</sup>,要充分发挥高效共生固氮根瘤菌在农业实践中的经济价值和生态效益,就必须综合以上 3 方面条件,针对不同的土壤类型及大豆品种,选用大量来源不同的根瘤菌进行共生固氮试验,筛选出与之共生匹配最佳的根瘤菌,并通过根瘤菌剂的生产应用,以达到增产优产的效果。

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占瘤率和接种效果均有较大影响。虽然国内外的学者进行了很多研究,但看法不尽相同<sup>[15-18]</sup>。Maria 等认为种下接种根瘤菌占瘤率最高<sup>[16]</sup>;唐颖研究根瘤菌不同接种方式对大豆根瘤分布及产量的影响,结果表明,液体菌剂拌种与颗粒菌肥作种肥施用导致大豆结瘤部位不同,液体菌剂拌种根瘤多集中于根上层,施用颗粒菌肥根瘤多集中于根下层,施用颗粒菌肥在大豆生长后

期根瘤数量及干重均显出优势,且大豆产量高于液体菌剂拌种处理<sup>[18]</sup>。从研究的结果来看,在汾阳地区 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,其中菌株 4345 采用喷施效果最好。原因可能是一方面菌液喷施提高菌液覆盖面积并增加含水量,在干旱土壤中会使菌种抗逆和生存能力增强,前期种子上的菌液快速侵染幼根;另一方面,由于土壤松软,播种受气温回升及雨水增多等因素影响,一部分根瘤菌向下生长移动,筛选的菌株 4345 根瘤菌本身具有较好的耐旱性,可以在土壤中存活一定时间,随着植株根系发育伸长,下部根可以接触到下面的菌剂,进一步形成根瘤。所以喷施保证了前期和后期的根瘤形成和生物固氮,从而结瘤固氮能力高于其它接种方式,植株氮源充足,产量较高。

菌株 4338 的研究结果与菌株 4345 并不相同,菌株 4338 拌种地上植株干重、全氮量和产量最高,喷施根瘤数和瘤干重最高。这可能与菌株的特异性有关,因此,为得到黄土高原地区最有效的接种方式,还需要增加试验次数以便进一步的验证。

### 4 结论

通过蛭石初筛和土壤复筛获得的优良耐旱菌株 *B. liaoningense* 4345 和 *S. fredii* 4338,接种晋豆 25 可显著提高植株生物量、全氮量和产量,具有较强竞争能力,在黄土高原地区推广应用前景良好。在喷施、拌种和种下接种 3 种接种方式中,菌株 *B. liaoningense* 4345 喷施效果最好;*S. fredii* 4338 拌种地上植株干重、全氮量和产量最高,喷施根瘤数和瘤干重最高。2 个菌株均是种下接种最差。可见,不同菌株的适宜接种方式不同,喷施和拌种是黄土高原地区的根瘤菌接种的适宜方式。

### 参考文献

- [1] 李友国,周俊初. 影响根瘤菌共生固氮效率的主要因素及遗传改造[J]. 微生物学通报, 2002, 29 (6): 86-89. (Li Y G, Zhou J C. The main factors affect the efficiency of symbiotic nitrogen fixation of rhizobium and genetic transformation [J]. Microbiology, 2002, 29 (6): 86-89.)
- [2] 陈文新,陈文峰. 发挥生物固氮作用减少化学氮肥用量[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6 (6): 3-6. (Chen W X, Chen W F. Exertion of biological nitrogen fixation in order to reducing the consumption of chemical nitrogenous fertilizer [J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2004, 6(6): 3-6.)
- [3] 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.)
- [4] 韩天富. 阿根廷大豆生产和科研概况[J]. 大豆科学, 2007, 26(2): 264-269. (Han T F. Overview of soybean production and research in Argentina[J]. Soybean Science, 2007, 26(2): 264-269.)
- [5] 陈文新, 汪恩涛, 陈文峰. 根瘤菌-豆科植物共生多样性与地理环境的关系[J]. 中国农业科学, 2004, 37(1): 81-86. (Chen W X, Wang E T, Chen W F. The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and legumes and their geographical environments [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(1): 81-86.)
- [6] 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.
- [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] 陈文新. 土壤中影响根瘤菌存活的因素[J]. 土壤学进展, 1986(5):17-20. (Chen W X. Factors affecting the survival of rhizobia in soil [J]. Advances in Soil Science, 1986(5):17-20.)
- [9] 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.)
- [10] 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.)
- [11] 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, 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, 6: 63-67.)
- [12] 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.
- [13] 陈文新, 李阜棣, 闫章才. 我国土壤微生物学和生物固氮研究的回顾与展望[C]. 院士论坛. 世界科技研究与发展报, 北京, 2002, 4:6-12. (Chen W X, Li F D, Yan Z C. Retrospect and prospect of soil microbiology and biological nitrogen fixation researches in China [C]. Academician Forum. World Scientific and Technological Research and Development, Beijing, 2002, 4: 6-12.)
- [14] Angela S, Essitsch, Kate J, et al. The *celbB* marker gene [M]. Molecular Microbial Ecology Manual, 1998: 1-15.
- [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研究[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] 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.)