



# 一株耐干燥大豆根瘤菌菌株的筛选与固氮效果评价

王鹏辉<sup>1,2</sup>, 姜 昕<sup>1,2</sup>, 马鸣超<sup>1,2</sup>, 关大伟<sup>1,2</sup>, 曹凤明<sup>1,2</sup>, 刘 尧<sup>3</sup>, 康耀卫<sup>4</sup>, 李 俊<sup>1,2</sup>

(1. 中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所, 北京 100081; 2. 农业农村部微生物产品质量安全风险评估实验室, 北京 100081; 3. 科技部科技评估中心, 北京 100081; 4. 肇庆学院 生命科学学院, 广东 肇庆 526061)

**摘 要:**为解决干燥环境致使大豆种子根瘤菌包衣后根瘤菌快速死亡,降低根瘤菌使用效果,极大程度限制根瘤菌应用的问题,本研究以分离自我国不同大豆主产区的 100 株大豆根瘤菌为供试材料,选用目前广泛使用的商业化菌株 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 和 *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 为参比菌株,采用玻璃珠干燥法和蛭石盆栽试验,筛选耐干燥且生物固氮性能优良的大豆根瘤菌菌株,并对菌株进行耐干燥筛选和固氮性能评价。玻璃珠干燥法筛选试验结果显示:经过 24 h 干燥后,根瘤菌菌株 5873 在玻璃珠上的存活率达到 0.44%,显著高于其它菌株,表明该菌株能够耐受干燥胁迫。经 16S rDNA 序列系统发育分析和 ANI 计算,初步确定菌株 5873 属于日本慢生大豆根瘤菌(*B. japonicum*)。进一步采用蛭石盆栽试验验证菌株 5873 的共生匹配性和与大豆品种宿主的选择性,并评价其结瘤固氮效果。结果显示:菌株 5873 与供试的 9 个大豆品种都能结瘤,表明该菌株具有广谱的结瘤匹配性。其中滇豆 5 号、徐豆 18 和冀豆 17 接种根瘤菌 5873 后,大豆植株的干重、全氮含量、叶绿素含量与不接种对照相比均显著提高,表现出明显的促生效果。本研究筛选获得一株耐干燥且生物固氮能力优良的大豆根瘤菌菌株 5873,可作为根瘤菌包衣专用菌种,也为大豆根瘤菌包衣技术在黄淮海和南方地区的应用提供了菌株资源保障。

**关键词:**耐干燥;大豆根瘤菌;主栽大豆品种;匹配性

## Screening of Drought-Tolerant Soybean Rhizobium and Its Symbiotic Compatibility Verification

WANG Peng-hui<sup>1,2</sup>, JIANG Xin<sup>1,2</sup>, MA Ming-chao<sup>1,2</sup>, GUAN Da-wei<sup>1,2</sup>, CAO Feng-ming<sup>1,2</sup>, LIU Yao<sup>3</sup>, KANG Yao-wei<sup>4</sup>, LI Jun<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Agricultural Resources and Agricultural Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10081, China; 2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Microbial Products (Beijing), Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China; 3. National Center of Science and Technology Evaluation, MOST, Beijing 100081, China; 4. College of Life Science, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China.)

**Abstract:** In order to solve the problem that the dry environment of soybean seeds that coated on the surface might lead to the rapid death of rhizobium, which limited the application prospect of rhizobium. In this study, 100 strains of soybean rhizobia isolated from different soybean producing areas in China were used as test materials, and the commercial strains *B. diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* USDA6 were used as reference strains. The superior drought-resistance and nitrogen fixation strain were screened by the glass bead-drying method and vermiculite potting experiments. After drying for 24 h, the survival rate of strain 5873 was 0.44%, which was significantly higher than other soybean rhizobium and the control strains USDA110 and USDA6, indicating that the strain had better drought-tolerant characteristic. Analysis based on the 16S rDNA sequence phylogenetic analysis and ANI calculation showed the strain 5873 belonged to the *Bradyrhizobium japonicum*. The vermiculite potting experiments showed that the strain 5873 could nodulate with the nine main soybean varieties, which proved that the strains 5873 have extensive-host advantage in symbiotic nodulation. However, compared with the non-inoculation control, the nitrogen fixation ability were significantly different among different varieties. The dry weight, total nitrogen and chlorophyll of the plants that treated with rhizobium increased, especially Diandou 5, Xudou 18 and Jidou 17. In this study, a soybean rhizobium strain with good resistance to drying and biological nitrogen fixation was screened and obtained. It can be used as a coating material for subsequent production, this study also provides a guarantee for the application of soybean rhizobium coating technology in Huanghuaihai and southern China.

**Keywords:** Drought-tolerant; Soybean rhizobium; Major soybean cultivar; Compatibility

大豆作为一种重要的共生固氮作物,每年固定的大气氮约占豆科作物固定氮总量的 77%<sup>[1]</sup>,其中与大豆共生的根瘤菌可为豆科作物提供 50% ~ 90% 的氮素营养<sup>[2]</sup>。因此,拓展大豆根瘤菌的应

收稿日期:2019-06-10

基金项目:国家重点研发计划(2018YFD0201000,2016YFF0201801);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04);国家农产品质量安全风险评估项目(GJFP2019033)。

第一作者简介:王鹏辉(1993-),男,硕士,主要从事生物固氮相关研究。E-mail:82101172010@caas.cn。

通讯作者:姜昕(1969-),女,博士,研究员,主要从事农业资源利用研究。E-mail:jiangxin@caas.cn。

用、充分发挥根瘤菌在大豆种植中的固氮作用,不仅可有效的减少化学氮肥的施用<sup>[3]</sup>,也将促进大豆生产节本增效和产业的绿色发展。

目前北美地区采用新型的根瘤菌包衣技术,延长了包衣后大豆种子表面根瘤菌的存活时间<sup>[4]</sup>,使得大豆根瘤菌接种方式由传统的拌种改为售前包衣,消除了播前拌种的环节,大大提高了接种效率<sup>[5]</sup>,其发展也使得根瘤菌剂在美国、阿根廷等大豆主产国的应用面积达到了 50% ~ 100%<sup>[6]</sup>。由于将根瘤菌包衣在大豆种子表面,所处的干燥环境条件极易导致根瘤菌死亡<sup>[7-8]</sup>,所以包衣后的大豆种子不能长时间的储存和运输,影响了使用效果<sup>[9]</sup>,这是目前我国仍主要采用播前拌种的方式接种根瘤菌的原因之一。而播前拌种的方法费时费力、与大面积机械化播种操作不配套,极大地制约了我国大豆根瘤菌的推广与应用。因此,筛选出具有耐干燥特性的优良大豆根瘤菌菌株,不仅可为根瘤菌包衣提供菌株资源,也可为我国大豆根瘤菌应用推广提供新途径。

本研究以分离自我国不同大豆产区的 100 株大豆根瘤菌为供试材料,选用目前广泛使用的商业化菌株 *B. diazoefficiens* USDA110 和 *B. japonicom* US-

DA6 为参比菌株,采用玻璃珠干燥法和蛭石盆栽试验作为筛选和评价方法,以期从中获得具有耐干燥特性且生物固氮性能良好的菌株,为建立新型根瘤菌包衣技术提供菌株资源保障,同时也可解决我国干旱地区根瘤菌应用的问题,对推动我国大豆根瘤菌高效应用、实现我国大豆产业绿色发展具有重要意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 供试菌株

供试的 100 株大豆根瘤菌由本实验室前期分离和保存。分离地点分别为内蒙古、东北三省为主的春大豆区(28 株),黄淮流域的夏大豆区(27 株),长江流域的春、夏大豆区(5 株),两广、云南南部的大豆多熟区(10 株),以及干旱半干旱地区的局部春大豆区等地区(30 株)。其中,对照菌株为 *B. diazoefficiens* USDA110、*B. japonicom* US-DA6。

##### 1.1.2 供试大豆

试验所用的 9 个大豆品种的名称、来源、类型及其特性见表 1。这些大豆品种为我国各大豆产区的主栽品种,由不同地区相应单位提供。其中,滇豆 5 号是根瘤菌 5873 的分离宿主。

表 1 供试大豆品种  
Table 1 Soybean cultivars tested

大豆品种 Soybean cultivar	大豆来源 Source	类型 Type	适宜种植地区 Suitable planting region	适宜种植期 Suitable planting period
中黄 13 Zhonghuang 13	北京	春播/夏播	地域较广、主要在黄淮海	5 月上旬/6 月下旬
徐豆 18 Xudou 18	安徽	夏播	山东、黄淮海等	6 月上旬
滇豆 5 号 Diandou 5	云南	春播	云贵川及湖北大区	5 月上旬
中黄 39 Zhonghuang 39	北京	春播	两广及湖南、江西等	2 月下旬至 4 月上旬
圣豆 15 Shengdou 15	山东	春播	东北地区	5 月上旬
冀豆 17 Jidou 17	河北	春播/夏播	西北、河北、河南及山东	4 月下旬/6 月下旬
中黄 901 Zhonghuang 901	北京	春播	内蒙古等	5 月上旬
克山 1 号 Keshan 1	黑龙江	春播	东北、内蒙古等地	5 月上旬
黑河 43 号 Heihe 43	黑龙江	春播	黑龙江省及内蒙古	5 月上旬

1.2 方法

1.2.1 菌悬液制备 将纯化的大豆根瘤菌接种在 YMA 液体培养基中(甘露醇 10 g、七水合硫酸镁 0.2 g、氯化钠 0.1 g、磷酸二氢钾 0.5 g、酵母膏 0.5 g、pH6.8~7.2),置于 30 ℃、180 r·min<sup>-1</sup>的摇床上培养至 OD<sub>600</sub>约为 0.5。

1.2.2 耐干燥菌株筛选 将制备好的菌悬液进行系列梯度稀释,并平板计数。选用直径约 0.5 cm 的玻璃珠模拟大豆种子,吸取 2 mL 菌悬液于装有 10 粒玻璃珠的离心管中,使得玻璃珠表面充分粘取菌液。将玻璃珠分装于无菌的玻璃皿中,置于无菌操作台干燥 24 h。将上述干燥处理后的玻璃珠置于 10 mL 的离心管中,取 2 mL 无菌水加入离心管,使得玻璃珠上的菌体被充分洗脱下来,将洗脱的菌液进行菌落计数,并计算其存活率。存活率即为干燥后的菌落数比干燥前的菌落数。

1.2.3 菌株系统发育分析 取已筛选出的 1~2 株耐干燥大豆根瘤菌菌株进行后续评价试验。利用细菌的 16S rRNA 通用引物 27F/1492R (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'; 1492R 5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3'),对筛选的耐干燥大豆根瘤菌进行 PCR 扩增,16S rDNA 产物送至宝瑞通生物科技(北京)有限公司测序。从 GenBank 数据库中下载模式菌株的 16S rDNA 序列,与已知的根瘤 16S rRNA 序列进行聚类分析,采用 MEGA6 软件建立系统发育树。

1.2.4 耐干燥菌株与大豆共生匹配和固氮性能研究

(1)盆栽试验:选择大小相近的大豆种子,在 95%的酒精中浸泡 1 min,用 5% 次氯酸钠灭菌 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(23.5 cm×14.0 cm)中,每盆 5 颗种子,将植株置于白天 28~30 ℃、夜间 15~20 ℃、每天光照不少于 8 h 的温室中培养。出苗后每盆留苗 3 颗,在大豆长出第一片真叶时,每株植物各接种

1 mL菌悬液,以不接种为对照,3 次重复。

(2)固氮酶活性测定:将生长到花期(50 d 左右)的大豆植株根部放在 100 mL 的反应瓶中,采用乙炔还原法测定大豆根瘤固氮酶活性<sup>[10]</sup>。

固氮酶活(nmol·mg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>): $U = n / (m \cdot t)$   
式中: $U$ :根瘤固氮酶活 nmol·mg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>;  $n$ :乙烯含量 nmol;  $m$ :根瘤鲜重 mg;  $t$ :反应时间 h。

(3)植株干重测定:将生长到花期的地上部分大豆植株置于 105 ℃的烘箱中杀青 30 min,80 ℃条件下烘干至恒重,用天平测量其质量<sup>[11]</sup>。

(4)全氮含量测定:将生长到花期的大豆植株地上部分烘干后,用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 法消煮至澄清,采用凯氏定氮法测定全氮含量<sup>[12]</sup>。

全氮含量(g·kg<sup>-1</sup>): $W = [c \cdot (V_2 - V_1) \times 0.014] / [m \cdot (V_3 / V)] \times 1\,000$

式中: $W$ :植株全氮含量 g·kg<sup>-1</sup>;  $c$ :硫酸标准溶液的浓度 0.01 mol·L<sup>-1</sup>;  $V_1$ :空白滴定消耗标准液量 mL;  $V_2$ :试剂滴定消耗标准液量 mL;  $V_3$ :上机测试液量 10 mL;  $m$ :样品质量 g;  $V$ :消煮后定容液量 100 mL; 0.014:氮的毫摩尔质量 g·mmol<sup>-1</sup>。

(5)叶绿素含量测定:大豆植株生长到四叶期,采用 SPAD-502 叶绿素仪测定叶绿素含量<sup>[13]</sup>。

1.3 数据分析

利用 Excel 2010、MEGA 6 等软件绘制图表;利用 SPSS 19.0 统计软件分析处理数据。

2 结果与分析

2.1 耐干燥大豆根瘤菌的筛选结果

通过玻璃珠干燥 24 h 后,大多数菌株在干燥的过程中死亡。将干燥胁迫后仍有存活的菌株 USDA110、USDA6、5873、5038、5665 进行重复试验。结果显示:在同等条件下,筛选的 5873 菌株存活率达到 0.44%,高于其它菌株(表 2)。因此,将 5873 菌株确定为后续研究的目标菌株。

表 2 耐干燥大豆根瘤菌筛选结果  
Table 2 Screening results of drought-resistant soybean rhizobium

菌株编号 Strain number	干燥前菌浓度 Concentration of bacteria before drying/(CFU·mL <sup>-1</sup> )	干燥 24 h 后菌浓度 Concentration of bacteria after drying 24 h/(CFU·mL <sup>-1</sup> )	存活率 Survival rate/%
5873	5.4×10 <sup>8</sup>	1.2×10 <sup>4</sup>	0.44%
5038	9.1×10 <sup>8</sup>	1.3×10 <sup>4</sup>	0.27%
USDA6	15.0×10 <sup>8</sup>	1.4×10 <sup>4</sup>	0.18%
USDA110	5.5×10 <sup>8</sup>	1.5×10 <sup>3</sup>	0.05%
5665	5.8×10 <sup>8</sup>	1.3×10 <sup>3</sup>	0.04%

2.2 耐干燥大豆根瘤菌株的系统发育分析

对筛选的耐干燥菌株 5873 的 16S rDNA 进行系统发育分析,结果表明菌株 5873 与 *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> 亲缘关系较近(图 1)。运用软件 OrthoANIu 对菌株 5873 的全基因组与 *B. japonicum* USDA6、*B. diazoefficiens* USDA110 的全基因组分别进行 ANI

计算。结果显示:5873 的全基因组序列与模式菌株 *B. japonicum* USDA6 的 ANI 值为 99.95,高于国际上公认的、应用最广的参比菌株 *B. diazoefficiens* USDA110 的 ANI 值(90.13),初步确定菌株 5873 属于 *B. japonicum*。

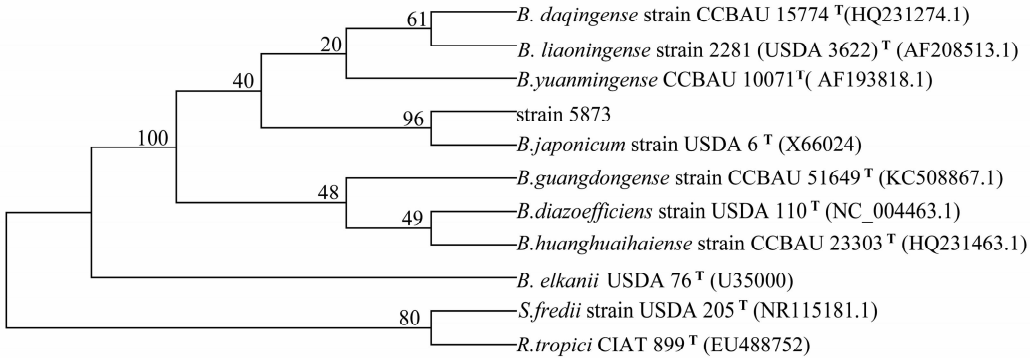


图 1 菌株 5873 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of 5873 based on 16S rDNA analysis

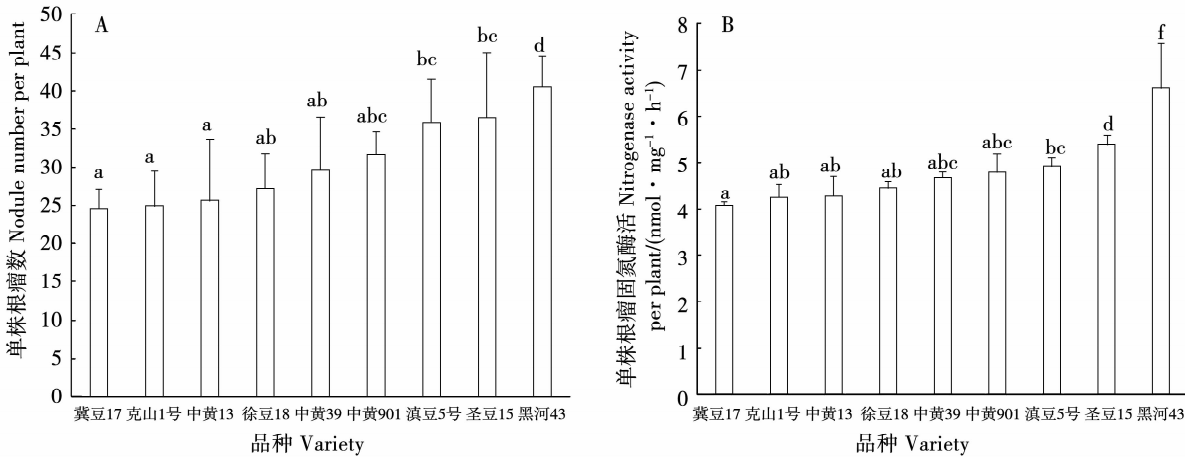
2.3 耐干燥大豆根瘤菌固氮效果评价试验

2.3.1 大豆根瘤菌 5873 与不同大豆品种的匹配性

(1)根瘤数量:由图 2A 可知,菌株 5873 与所有的供试大豆品种都能结瘤,各品种根瘤数量为 24.6 ~ 40.6 个·株<sup>-1</sup>,具有广谱的匹配性,但不同的大豆品种之间根瘤数量存在差异。其中黑河 43 的根瘤数最多,显著高于其它品种,其它大豆品种如冀豆 17、克山 1 号、中黄 13、徐豆 18、中黄 39 和中黄 901 等无显著差异。

(2)根瘤的固氮酶活性:由图 2B 可知,各大豆品种的根瘤固氮酶活性为 4.08 ~ 6.61 nmol·mg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>,品种间存在差异。其中,黑河 43、克山 1 号显著高于其它品种,冀豆 17、徐豆 18、中黄 13、滇豆 5 号、圣豆 15 和中黄 39 的固氮酶活性都无显著差异。

根瘤数量和根瘤固氮酶活性是衡量根瘤菌与大豆宿主之间匹配性的重要指标<sup>[14]</sup>。通过分析本研究中这两个指标可以发现,菌株 5873 具有广谱的匹配性,但与不同大豆品种的匹配性存在差异。



A:根瘤个数;B:根瘤固氮酶活性。不同小写字母表示  $P < 0.05$  水平差异显著。

A: Nodule numbers; B: Nitrogenase activity. Different lowercase indicates there is significant difference at  $P \leq 0.05$  level.

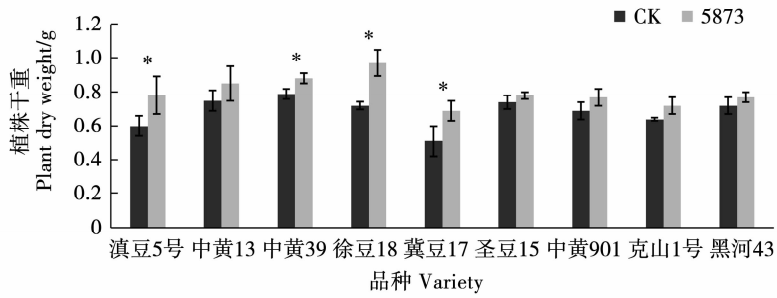
图 2 不同大豆品种根瘤数和根瘤固氮酶活性

Fig. 2 Nodules number and nodule nitrogenase activity of different soybean varieties

2.3.2 不同大豆品种对大豆根瘤菌 5873 的选择性

(1)植株干重:由图 3 可知,各品种接菌处理的植株干重均高于其不接菌对照,提高幅度为 6.48% ~ 36.18%,说明菌株 5873 可以有效促进大豆生长,但

不同品种间存在较大的差异。其中,滇豆 5 号、中黄 39、徐豆 18 和冀豆 17 品种的接菌处理与对照差异达到显著水平,其它品种未达到差异显著水平。



\*表示  $P < 0.05$  水平差异显著。下同。  
\* indicates there is significant difference at  $P < 0.05$  level. The same below.

图3 不同大豆品种的株干重

Fig.3 Dry weighe of different soybean varieties

(2)叶绿素含量:由图4可知,各个品种接菌处理的叶绿素含量均高于对照,提高幅度为7.63%~39.06%,说明菌株5873能够提高大豆的叶绿素含量,但不同品种间存在较大的差异。其中,滇豆5号、徐豆18、冀豆17、圣豆15和中黄901接菌处理的叶绿素含量显著高于对照,其它3个品种未达到显著差异水平。

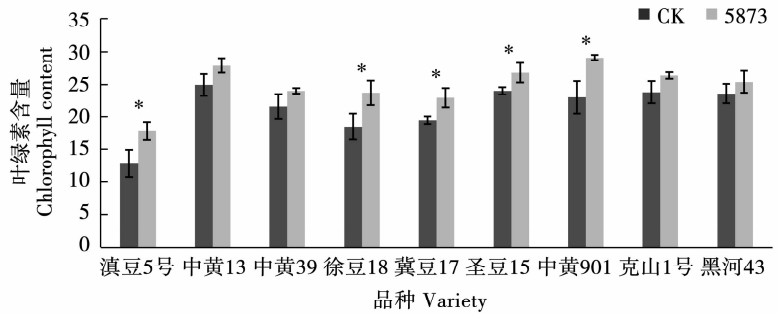


图4 不同大豆品种的叶绿素含量

Fig.4 Chlorophyll content of different soybean varieties

(3)全氮含量:由图5可知,各品种接菌处理的全氮含量均高于相对应品种的对照,提高幅度为13.76%~67.06%,说明菌株5873能够提高大豆的全氮含量,但不同品种间存在较大的差异。其中除中黄13、中黄901和黑河43的接菌处理与对照未达到显著水平,其它品种都达到差异显著水平。

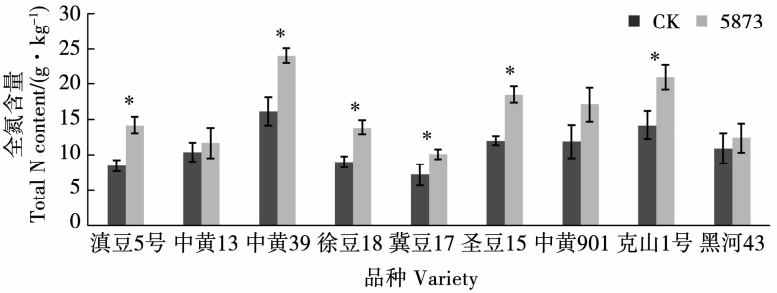


图5 不同大豆品种的全氮含量

Fig.5 Total N content of different soybean varieties

综合以上3个指标,接种根瘤菌对滇豆5号、徐豆18和冀豆17具有显著的促生作用,3个品种接种处理的植株干重比对照分别增加了29.28%、34.26%和36.18%,叶绿素含量较对照分别增加了39.06%、28.11%和17.44%,全氮含量较对照分别增加了67.06%、54.44%和40.28%。菌株5837可作为后续根瘤菌包衣专用菌株,为大豆根瘤菌包衣技术在滇豆5号、徐豆18和冀豆17的应用提供了菌株资源保障。

### 3 讨论

在研究生物抗逆性尤其是干旱胁迫研究中,很多学者采用聚乙二醇(PEG 6000)进行人工模拟干旱条件研究<sup>[15]</sup>。但在实际情况下,干旱条件的含水

量下降是一个缓慢的过程,而 PEG 6000 处理却是迅速造成了渗透压下降,与实际情况不符,因此 PEG 6000 处理不能完全模拟干旱条件。本研究采用玻璃珠干燥法进行耐干燥大豆根瘤菌的筛选,这一方法更接近自然干燥条件,筛选的结果更加准确可靠。

大豆与根瘤菌的共生关系是自然进化的结果<sup>[16]</sup>,它们之间的匹配是一个相互识别的过程。而滇豆 5 号作为 5873 菌株的分离宿主,在回接试验中表现较好,所以对高效根瘤菌株匹配性研究非常重要。马中雨等<sup>[17]</sup>研究表明,不同大豆品种的遗传背景是影响大豆与根瘤菌共生固氮的主要因素之一。试验中,同一株大豆根瘤菌接种到不同大豆品种上,表现出不同的共生固氮能力。本研究中,接种根瘤菌的大豆植株,其叶绿素含量、全氮含量、干重均高于对照,国内学者也得出相似的结果<sup>[18]</sup>。

邸伟等<sup>[19]</sup>研究显示,根瘤菌与大豆共生固氮效率越高,其固氮酶活性、全氮含量越高,而伍慧等<sup>[20]</sup>提出,由于不同品种的大豆,可能存在氮素同化吸收差异问题,即使根瘤固氮酶活高的品种,其宿主实际获得的氮素不一定高。Suzaki 等<sup>[21]</sup>在综述中指出,豆科植物普遍存在结瘤自调控(AON)现象,植物会通过限制根瘤的数量来避免消耗过多能量。在本研究中,大豆品种黑河 43 接种 5873 菌株后,其根瘤数和固氮酶活性显著高于其它品种,但植株干重、叶绿素含量及全氮含量提高幅度均不是最高。原因可能是不同大豆品种的遗传背景和生长周期等都不同,其氮素同化、结瘤自控能力存在差异,导致过多的根瘤及较高的固氮酶活消耗了地上部分的营养和能量。此外,固氮酶活的测定易受到反应时间、测量误差等外界因素的干扰。因此,虽然根瘤数、根瘤固氮酶活性是评价根瘤菌与宿主共生固氮能力和匹配性强弱的重要指标,但根瘤数量的多少、根瘤菌固氮酶活性的高低并不能完全评价共生固氮效率及匹配性的强弱,需要协同其它指标共同评价。

在大豆一定生理期内,叶绿素含量可作为衡量植物在生长阶段是否健壮的重要标志之一<sup>[22]</sup>。孟庆英等<sup>[23]</sup>认为接种大豆根瘤菌对大豆叶片的叶绿素含量无明显影响,而陈丽华等<sup>[24]</sup>研究表明,叶片中氮素的含量在一定程度上可以反映叶片光合作用的能力,即叶片氮素含量越高,其叶绿素含量亦越高。刘丽等<sup>[25]</sup>则认为大豆在从营养生长转为生殖生长的关键时期需要较强的光合作用,其叶绿素差异较为明显。然而,在本研究中有些大豆品种接菌处理的叶绿素含量显著高于对照组,但其全氮含

量与对照差异却不显著。这可能是由于大豆品种的遗传背景不同,或是大豆生长时间短根瘤固氮所导致,也可能叶绿素含量与全氮含量确无显著的相关性,具体原因可能还需要进一步的探索。

在大豆主产区的土壤中,竞争结瘤能力强、固氮能力弱的土著根瘤菌大量存在。这直接导致接种的根瘤菌占瘤率降低而影响了菌剂的应用效果<sup>[26-27]</sup>。陈文新等<sup>[28]</sup>也提出,根瘤菌与豆科植物的共生关系是环境-宿主-细菌共同作用的结果。本研究是在灭菌的蛭石条件下,对不同大豆品种与根瘤菌 5873 进行试验。还需进一步结合适宜滇豆 5 号、徐豆 18 和冀豆 17 种植的土壤,做竞争结瘤试验和地域生态适应性研究,以全面评价所筛选菌株 5873 的应用范围和前景。

## 4 结 论

本研究初步筛选出了具有耐干燥特性的大豆根瘤菌 *B. japonicum* 5873,该菌株不仅能与大豆品种广谱结瘤,而且具有良好的固氮促生能力,特别是对滇豆 5 号、徐豆 18 和冀豆 17 的结瘤固氮效果尤为显著。本试验初步建立了耐干燥根瘤菌与大豆主栽品种的匹配关系,这不仅为做竞争结瘤试验和地域生态适应性研究提供了材料,也为大豆根瘤菌包衣技术在黄淮海和南方地区的应用提供了菌株资源保障。

## 参考文献

- [1] Herridge D F, Peoples M B, Boddey R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems [J]. Plant and Soil, 2008, 311(1-2):1-18.
- [2] 柏宇,关大伟,李力,等. 耐高氮优良大豆根瘤菌株的筛选与鉴定[J]. 大豆科学, 2014, 33(6):861-865. (Bai Y, Guan D W, Li L, et al. Screening and characterization of superior nitrogen-tolerance soybean rhizobia [J]. Soybean Science, 2014, 33(6): 861-865.)
- [3] Mus F, Crook M B, Garcia K, et al. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(13):3698-3710.
- [4] Streeter J G. Factors affecting the survival of *Bradyrhizobium* applied in liquid cultures to soya bean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(4): 1282-1290.
- [5] Hartley E J, Gemell L G, Deaker R. Some factors that contribute to poor survival of rhizobia on preinoculated legume seed [J]. Crop and Pasture Science, 2012, 63(9):858-865.
- [6] 李俊,沈德龙,林先贵. 农业微生物研究与产业化进展[M]. 北京:科学出版社, 2011:289. (Li J, Shen D L, Lin X G. Agricultural microbial research and industrialization progress [M]. Beijing: Science Press, 2011:289.)

- [7] Thilakarathna M S, Raizada M N. A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 105: 177-196.
- [8] Damasceno R, Roggia I, Pereira C, et al. Rhizobia survival in seeds coated with polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibres [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2013, 59(11):716-719.
- [9] Romina D G P, Gabriela M, Lenise R M, et al. Beneficial rhizobacteria immobilized in nanofibers for potential application as soybean seed bioinoculants [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176930.
- [10] 刘立雪. 大豆根瘤菌与宿主共生能力差异的遗传学研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2017:26-27. (Liu L X. Genetic analysis of the variation in the symbioses between *Sinorhizobium* and soybeans [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017:26-27.)
- [11] 孟庆英, 张立波, 张春峰, 等. 根瘤菌对大豆生理及农艺性状的影响[J]. *黑龙江农业科学*, 2015(1):27-29. (Meng Q Y, Zhang L B, Zhang C F, et al. Effect of rhizobia on physiology and agronomic characters of soybean[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2015(1):27-29.)
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2000. (Bao S D. *Soil and agricultural chemistry analysis* [M]. 3rd ed. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2000.)
- [13] 申晓慧, 姜成, 张敬涛, 等. 不同氮肥水平下大豆叶片光谱反射率与叶绿素含量的相关性研究[J]. *大豆科学*, 2012, 31(1):73-75. (Shen X H, Jiang C, Zhang J T, et al. Correlation between spectrum reflectance and chlorophyll content of soybean leaves under different nitrogen level[J]. *Soybean Science*, 2012, 31(1):73-75.)
- [14] 伍惠, 钟喆栋, 王学路, 等. 与黑龙江大豆主栽品种匹配的优良根瘤菌筛选与鉴定[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(1):39-46. (Wu H, Zhong Z D, Wang X L, et al. Screening and identification of elite rhizobia matched with main cultivars of soybean in Heilongjiang province[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(1):39-46.)
- [15] 裴晓峰, 关大伟, 李俊, 等. 耐旱大豆根瘤菌的筛选及其接种效应[J]. *大豆科学*, 2012, 31(3):420-424. (Pei X F, Guan D W, Li J, et al. Screening of drought-tolerance rhizobium and its influence on soybean [J]. *Soybean Science*, 2012, 31(3):420-424.)
- [16] 陈文新, 汪恩涛. 中国根瘤菌[M]. 北京: 科学出版社, 2011. (Chen W X, Wang E T. *Chinese rhizobia* [M]. Beijing: Science Press, 2011.)
- [17] 马中雨, 李俊, 张永芳, 等. 大豆根瘤菌与大豆品种共生匹配性研究[J]. *大豆科学*, 2008, 27(2):221-227. (Ma Z Y, Li J, Zhang Y F, et al. Symbiotic matching between soybean rhizobium and soybean cultivars [J]. *Soybean Science*, 2008, 27(2):221-227.)
- [18] 陈雯莉, 李阜棣, 周俊初. 用叶绿素含量评价快生型大豆根瘤菌的共生有效性[J]. *华中农业大学学报*, 1996(1):46-51. (Chen W L, Li F D, Zhou J C, et al. Use of chlorophyll assay for the effectiveness ranking of strains of *rhizobium fredii* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1996(1):46-51.)
- [19] 邱伟. 大豆根瘤固氮酶活性与固氮量的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010. (Di W. Study on nodule nitrogenous activities and amount of nitrogen fixation of soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2010.)
- [20] 伍惠, 钟喆栋, 樊伟, 等. 8株优良大豆根瘤菌与不同地区27个大豆主栽品种的匹配性研究[J]. *大豆科学*, 2017, 36(3):405-418. (Wu H, Zhong Z D, Fan W, et al. Symbiotic compatibility among eight elite soybean rhizobia strains and twenty-seven soybean cultivars from different planting regions [J]. *Soybean Science*, 2017, 36(3):405-418.)
- [21] Suzuki T, Yoro E, Kawaguchi M. Leguminous plants: Inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria [J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2015, 316:111-158.
- [22] 刘丽, 马鸣超, 姜昕, 等. 根瘤菌与促生菌双接种对大豆生长和土壤酶活的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(3):644-654. (Liu L, Ma M C, Jiang X, et al. Effect of rhizobia and PGPR co-inoculant on soybean characteristics and soil enzyme activities [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2015, 23(3):644-654.)
- [23] 孟庆英, 张立波, 张春峰, 等. 根瘤菌对大豆生理及农艺性状的影响[J]. *黑龙江农业科学*, 2015(1):27-29. (Meng Q Y, Zhang L B, Zhang C F, et al. Effect of rhizobia on physiology and agronomic characters of soybean [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2015(1):27-29.)
- [24] 陈丽华, 李杰, 刘丽君, 等. 大豆蛋白质的积累动态及其与产量形成的关系[J]. *东北农业大学学报*, 2002, 33(2):116-124. (Chen L H, Li J I, Liu L J, et al. The relationship between protein accumulation regulation and yield formation in soybean [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2002, 33(2):116-124.)
- [25] 刘丽, 马鸣超, 姜昕, 等. 根瘤菌与促生菌双接种对大豆生长和土壤酶活的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(3):644-654. (Liu L, Ma M C, Jiang X, et al. Effect of rhizobia and PGPR co-inoculant on soybean characteristics and soil enzyme activities [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2015, 23(3):644-654.)
- [26] Bogino P, Erika B, Carlos B, et al. Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. strain in soils containing indigenous rhizobia [J]. *Current Microbiology*, 2008, 56(1):66-72.
- [27] 王金生, 丁宁, 吴俊江, 等. 大豆根瘤菌接种效应及竞争结瘤能力分析[J]. *大豆科学*, 2017, 36(5):761-767. (Wang J S, Ding N, Wu J J, et al. Analysis of the inoculation effect of soybean rhizobia and the competitive nodulation ability [J]. *Soybean Science*, 2017, 36(5):761-767.)
- [28] 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.)