

文章编号 :1003-8701(2003)06-0020-06

花生根瘤菌高效菌株的筛选 及固氮效应的研究

I.花生根瘤菌高效菌株的筛选及固氮效应的盆栽试验

吴海燕,孙淑荣,刘春光,张桂芝

(吉林省农业科学院土壤肥料研究所,吉林 公主岭 136100)

摘要:以吉林省扶余县三井子镇沙壤土为供试土壤,通过对花生根瘤菌的采集、菌株的分离、纯化和原寄主品种的回接等盆栽试验,筛选出适合吉林省不同花生品种的优良菌株(2644、2656、2697)及其组合(2644+2656、2644+2697),并对其进行生理生化特性鉴定。结果表明,2644为快生型根瘤菌,表现出相对较强的固氮酶活性,2656、2697为慢生型根瘤菌,也具有较弱的固氮活性。修正了花生根瘤菌无快生型或快生型固氮活性低的传统说法。同时这3种优良菌株中两种或两种以上组合接种效果更佳,是生产上推广应用的优选菌株,这为引进优良菌种和组合接菌提供了理论依据。

关键词:花生;根瘤菌;盆栽试验;优良菌株;固氮酶活性

中图分类号:S565.2

文献标识码:A

通过对花生根瘤菌的采集、菌株的分离和纯化以及对原寄主品种的回接等盆栽试验,选择长势、瘤数、瘤重和固氮酶活性以及产量等表现优异的菌株为优良高效菌株,筛选出菌种与寄主之间的最佳组合,达到人工接种增产的目的,从而为合理施用氮素化肥又能充分利用固氮作用达到高产提供依据。

1 材料与方法

1.1 不同花生根瘤菌对花生生育性状影响的盆栽试验

供试地点:试验地点设在扶余县三井子镇,供试土壤为沙壤土。耕层混合土壤样品的理化性状为:pH8.0、全氮0.144%、碱解氮110.2 mg/kg、全磷(P_2O_5)0.028%、速效磷(P_2O_5)12.10 mg/kg、全钾1.90%和速效钾(K_2O)100.30 mg/kg。

供试作物:花生(吕花1号、小4粒红)。

供试菌株:009、PGPR、硅酸盐细菌、147-3、2644、2697、2656、2689、2752。

试验处理:1.A+阴性对照(不接种);2.A+阳性对照(009);3.A+阳性对照(147-3);4.A+2644;5.A+2697;6.A+2656;7.A+2689;8.A+2752;9.A+2644+2656;10.A+2644+硅酸盐细菌;11.A+2644+PGPR;12.A+硅酸盐细菌;13.A+PGPR;14.A+NPK;15.A+减10%N+PK;

收稿日期:2003-08-25

作者简介:吴海燕(1968-),女,公主岭市人,硕士,主要从事土壤微生物研究。

16.B+阴性对照(不接种);17.B+阳性对照(009);18.B+阳性对照(147-3);19.B+2644;20.B+2697;21.B+2656;22.B+2689;23.B+2752;24.B+2644+2697;25.B+2644+硅酸盐细菌;26.B+2644+PGPR;27.B+硅酸盐细菌;28.B+PGPR;29.B+NPK;30.B+减 10%N+PK。

试验用两个花生品种(A 为吕花 1 号、B 为小 4 粒红),设 30 个处理,4 次重复,共 120 个盆,随机排列放置。各个处理磷钾用量一致,处理 15、30 为减氮 10%,其余处理氮肥用量相同。

盆栽采用 21 cm×24 cm 的盆钵,7 月 17 日播种,每盆播 3 粒(3 穴),花生出第 3 片叶后定苗,每盆留 1 株。

播种 60 d 后(9 月 17 日)进行收获,同时进行结瘤数、固氮酶活性、瘤干重和植株地上部干重的测定。

1.2 优选菌株 2644、2656、2697 生理生化特性鉴定

采用一般细菌常用鉴定方法^[1-2]进行。

1.3 花生生育期间根瘤菌固氮酶活性的测定和固氮量的估测

固氮酶活性的测定:在不同生育期挖取以根系为中心的 30 cm³ 土柱 3 株,将带瘤根系冲洗干净,立刻放入 600 mL 三角瓶中,置换入 10%乙炔,28℃保温培养 1.5 h,用气相色谱仪测定乙炔乙烯量。用纯乙烯标准曲线计算。

固氮量估测:结瘤花生的氮素来源为土壤、肥料和固定的氮,不结瘤花生的氮素来源为土壤和肥料供应,因此用结瘤花生植株全氮减去不结瘤花生植株全氮可得花生根瘤菌的固氮量。

2 结果与讨论

2.1 优选菌株对花生生育性状影响结果比较分析

9 月 17 日收获供试的两种花生,其生育性状调查与测定结果列于表 1 和表 3。

表 1 不同菌株接种吕花 1 号对其生育性状的影响

处 理	结瘤数 (个/株)	瘤干重 (g/株)	地上部植株 干重(g/株)	固氮酶活性较对照增加率(%)			固氮酶活性 (nmol C ₂ H ₄ mg 鲜瘤 min)
				阴性对照	009	147-3	
1 阴性对照	164.0	0.18	8.05		30.0		0.26
2 阳性对照 009	107.3	0.13	6.20				0.20
3 阳性对照 147-3	138.8	0.22	10.03	42.3	85.0		0.37
4 2644	346.8	0.43	13.55	161.5	240.0	83.8	0.68
5 2697	187.0	0.19	8.63	11.5	45.0		0.29
6 2656	254.8	0.28	7.33		20.0		0.24
7 2689	96.0	0.14	6.65		15.0		0.23
8 2752	260.8	0.23	10.63	53.8	100.0	8.1	0.40
9 2644+2656	322.8	0.35	15.33	200.0	290.0	110.8	0.78
10 2644+硅酸盐细菌	245.5	0.20	12.08	80.8	135.0	27.0	0.47
11 2644+PGPR	260.8	0.25	12.10	84.6	140.0	29.7	0.48
12 硅酸盐细菌	192.8	0.25	7.85	3.8	35.0		0.27
13 PGPR	126.5	0.18	7.93		25.0		0.25
14 常规 NPK	187.5	0.23	8.53	15.4	50.0		0.30
15 减 10%N+PK	216.5	0.31	12.78	84.6	140.0	29.7	0.48

注:表中结瘤数、瘤干重、地上部植株干重为 4 次重复平均数(表 3 同)。

从表 1 结果看出,用全国各地筛选的花生根瘤菌对我省主要花生品种进行接种,无论结瘤数、瘤干重和固氮酶活性,还是地上部植株干重,都因菌种不同而不尽相同。在吕花 1 号花生品种上,表现最好的是 2644+2656 组合,其次为接种 2644 菌株。我们对植株

地上部分植株干重进行了方差分析,其结果见表2。表2结果表明,处理间差异极显著,重复间差异不显著。用LSD法多重比较,2644、2644+2656植株干重分别与阴性对照、阳性对照(009、147-3)相比差异达极显著。说明,在吕花1号花生品种上以2644+2656组合接菌表现较为突出。

表2 花生根瘤苗接种吕花1号效果方差分析结果

Source	D. Fsum	OF. SQ	Mean. SQ	F Ratio
Factor	14	427.96	30.56	12.41**
Rep	3	2.72	0.90	0.36
Error	42	103.40	2.46	
Total	59	534.09		

LSD(0.05)=2.23 LSD(0.01)=2.99

对瘤干重与固氮酶活性进行相关分析,结果表明,瘤干重与固氮酶活性间具有一定的相关性,瘤干重越重,固氮作用越强。而且结瘤数与固氮酶活性也有一定的关系,张宏等人的研究也阐述了这一规律^[3,4]。

表3 不同菌株接种小4粒红对其生育性状的影响

处 理	结瘤数 (个/株)	瘤干重 (g/株)	地上部植株 干重(g/株)	固氮酶活性较对照增加率(%)			固氮酶活性 (nmol C ₂ H ₄ mg 鲜瘤 min)
				阴性对照	009	147-3	
16 阴性对照	198.8	0.16	8.95				0.28
17 阳性对照 009	145.8	0.17	6.20				0.27
18 阳性对照 147-3	120.3	0.12	5.90				0.25
19 2644	207.3	0.17	7.10	7.1	11.1	20.0	0.30
20 2697	226.3	0.27	7.10	7.1	11.1	20.0	0.30
21 2656	155.3	0.20	7.05				0.27
22 2689	130.0	0.15	6.55	3.6	7.4	16.0	0.29
23 2752	202.8	0.19	7.98	35.7	40.7	52.0	0.38
24 2644+2697	230.0	0.21	9.18	42.9	48.2	60.0	0.40
25 2644+硅酸盐细菌	245.5	0.20	4.51				0.15
26 2644+PGPR	186.8	0.18	6.66	32.1	37.0	48.0	0.37
27 硅酸盐细菌	143.0	0.18	5.53			4.0	0.26
28 PGPR	193.3	0.25	7.73	3.6	7.4	16.0	0.29
29 常规 NPK	178.8	0.25	7.23				0.21
30 减 10%N+PK	255.5	0.30	11.23				0.21

从表3可以看出,在小4粒红花生品种上,接种表现较好的处理为减氮10%+磷钾肥,说明在适当范围内少施氮肥,十分有利于花生的生长发育。罗文熹、于国华等人的研究也阐述了这一结论,他们认为氮素化肥能抑制根瘤数目的增加和固氮酶活性的表达,其抑制程度与氮肥用量呈正相关,抑制时间发生在生育前期^[5]。但氮素化肥的施用有利于生殖生长的进行,对产量增加作用很明显^[6]。表现次好的为2644+2697。我们对植株干重进行了方差分析,结果见表4。结果表明,处理间差异极显著,重复间差异不显著。用LSD法进行多重比较,减氮10%+磷钾肥和2644+2697处理的植株干重与其它处理差异达极显著,说明对小4粒红花生品种来说,除减氮10%处理以外,接种2644+2697的组合效果比较良好。

表4 花生根瘤苗接种小4粒红效果方差分析结果

Source	D. Fsum	OF. SQ	Mean. SQ	F Ratio
Factor	14	149.88	10.70	18.41**
Rep	3	0.24	0.08	0.14
Error	42	24.41	0.58	
Total	59	174.54		

LSD(0.05)=1.08 LSD(0.01)=2.99

研究结果表明,不同花生根瘤菌对不同品种的花花生生长发育影响不尽相同。对吕花 1 号来说,表现较好的是 2644+2656 组合。对小 4 粒红来说,表现较好的为 2644+2697 组合。而且从花生生育期观察,接种这两组根瘤菌,不但色深、叶茂和植株高大粗壮,而且主根瘤多,瘤体大。同时发现在众多的处理中,减氮 10%+磷钾对小 4 粒红品种表现十分突出,说明适当少施氮肥,有利于花生的生长发育。通过盆栽试验,从众多花生根瘤菌中筛选出优良菌种 2644、2656 和 2697,特别是其中两种菌的组合效果更佳,这为以后进一步深入到大田试验示范打下了良好的基础。

2.2 优选菌株 2644、2656、2697 生理生化特性鉴定

表 5 优选花生根瘤菌主要生理生化特性鉴定结果

项 目	菌 种		
	2697	2656	2644
革兰氏染色	-	-	-
3-酮基乳糖	-	-	-
B. T. B 反应	碱	碱	碱
菌体大小	1.32-2.8 × 0.6-0.9 μm	1.408-4.2 × 0.7-0.8 μm	2.0-2.5 × 1.0-1.129 μm
聚荡直径(cm)	0.25	0.25	0.20
肉汁蛋白胨	-	-	-
耐盐性	0.2 mol/L	0.3 mol/L	0.2 mol/L
石蕊牛乳	稍碱	稍碱	酸(有乳清带)
柠檬酸利用	-	-	-
抗链霉素 10 μg	-	-	-
100 μg	-	-	-

续表 5

碳源种类	生长情况			pH 变化		
	2697	2656	2644	2697	2656	2644
琥珀酸	不生长	不生长	生长	-	-	产酸
蔗糖	生长	生长	生长	产碱	产碱	产酸
果糖	生长	生长	生长	中性偏碱	中性偏碱	产酸
甘油	生长	生长	生长	中性偏碱	中性偏碱	产酸
纤维二糖	生长	生长	生长	产碱	产碱	产酸
木糖	生长	生长	生长	产酸	产酸	产酸
鼠李糖	生长	生长	生长	产碱	产碱	产酸
半乳糖	生长	生长	生长	产碱	产碱	产酸
麦芽糖	生长	生长	生长	产碱	产碱	产酸
菊糖	生长	生长	生长	产碱	产碱	-
糊精	生长	生长	生长	产碱	产碱	产酸
阿拉伯糖	生长	生长	生长	中性	中性	产酸
回接种瘤	+	+	+			
耐 pH	5~9	5~10	5~10.5			
代时	7	8	4			

采用一般细菌常用鉴定方法进行鉴定,结果见表 5。结果表明,2644、2656 和 2697 均为革兰氏阴性菌,不产生 3-酮基乳糖,不利用柠檬酸盐在肉汁蛋白胨中不生长。菌体圆形或卵圆形,比大豆根瘤菌小。2644 具有快生型根瘤的主要特征,并且具有较高的固氮活性。而以往的研究认为,花生根瘤菌无快生型,或者说即使有快生型固氮活性也很低。本项研究结果填补了这方面的空白。在 B. T. B 反应中产酸,在石蕊牛乳中产酸,并形成乳清带;耐 pH 为 5.0~10.5,耐 0.3 mol/L 的 NaCl;生长速率快,繁殖一代一般为 3~4 h,在含糖培养基上产酸。2656、2697 为慢生型根瘤菌,在石蕊牛乳中稍产碱不形成乳清带;耐 0.2~0.3 mol/L 的 NaCl,耐 pH 为 5~10;繁殖速率相对较慢,繁殖一代一般为 8~10

h;在含糖培养基上产碱。对碳源的利用,除 2644 不利用菊糖,2656、2697 不利用琥珀酸外,对所试验的其它单糖、双糖及有机酸均能很好地利用,表明了它们有广泛的碳源利用能力。

2.3 花生根瘤菌共生固氮增产机理初探

研究结果表明,花生生育期间根瘤的形成苗期较少,随着植株的不断生长,根瘤数目和瘤重不断增加,一直到开花盛期达到最高峰。根瘤数目的增加主要是侧根上根瘤数目的增加。因此侧根上的根瘤是很重要的,而且根瘤数是在开花盛期大量增加的。因此要求接种的菌株必须在根际占优势 60 d 以上,不然不能形成大量的根瘤,也不能获得较好的接种增产效果。

共生固氮活性的动态变化苗期较低,随着花生生长而逐渐增加,到开花盛期达到高峰,然后开始下降。这一规律同结瘤特性是一致的,说明花生根瘤菌只有在寄主植物形成有效根瘤后才能进行固氮,否则固氮作用很微弱。有关固氮机理研究报道比较少,罗葆兴等曾经探索了不结瘤花生品系在实际生产中的利用问题,指出花生接种根瘤菌是一项提高产量的经济有效的措施,但必须注意研究根瘤菌的专化性、有效性和竞争性,真正发挥根瘤菌固氮的增效作用^[7]。但影响固氮作用的因素不是单方面的,根瘤菌共生固氮活性也不是绝对的,改善条件有可能提前固氮活性高峰,延长固氮活性的时期,从而提高花生产量。有研究认为,影响花生根瘤菌固氮作用的因素有光合作用强度、土壤水分和湿度、土壤酸碱度、土壤化合态氮以及其它矿质元素和微量元素等^[8]。他们认为有利于光合作用的因素都利于固氮作用的进行,土壤含水量为田间持水量的 60%~80%、pH6.0~7.2 利于固氮作用等。详细的机理有待于进一步研究和探讨。

3 结论

筛选出优良菌种 2644、2656 和 2697,并对其进行生理生化特性鉴定。结果表明,2644 为快生型根瘤菌,表现出相对较强的固氮酶活性,2656、2697 为慢生型根瘤菌,修正了花生根瘤菌无快生型或者快生型固氮酶活性低的传统观点。

不同花生根瘤菌对不同品种的花生生生长发育影响不同。对吕花 1 号花生品种来说,表现较好的是接种 2644+2656 组合,在每株结瘤数、瘤干重和地上部植株干重等各项生育指标以及地上部植株全氮含量、共生固氮酶活性等生理指标方面,明显优于其它处理。而对小 4 粒红来说,表现较好的处理为 2644+2697 组合。说明花生-花生根瘤菌之间也存在“互接种族”现象,在生产上应用时要有充分的试验,不能盲目接种。

速效氮肥适量少施,有利于花生-花生根瘤菌的共生固氮作用,促进花生生长发育。在众多处理中,减氮 10%+磷钾肥对小 4 粒红花生品种表现较为突出。

参考文献:

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京:科学出版社,1978.
- [2] 中国科学院南京土壤研究所微生物研究室. 土壤微生物研究法[M]. 北京:科学出版社,1985.
- [3] 张宏,张桂芝,等. 黑土中土著大豆根瘤菌的固氮活性、结瘤性状和固氮量估测[J]. 大豆科学,1986,5(1):47-56.
- [4] Felix, J F. Obaton M. Messiaen C-M. and Salsac L. Nitrate reductase and nitrogenase activities of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from different geographic locations. *Plant and soil*. 1981, 63(3): 427-437.
- [5] 罗文熹,于国华,等. 花生根瘤菌固氮酶活性与氮素种肥和子粒蛋白质含量的关系[J]. 中国油料,1990,(1):59-63.

- [6] 张 宏,张桂芝,等.施用硫酸和硝酸对大豆根瘤菌共生固氮量和产量的影响[J].吉林农业科学,1985(3):1-6.
- [7] 罗葆兴.花生根瘤菌与固氮[J].花生科技,1991,(1):6-9.
- [8] 姚瑞林.花生根瘤菌的应用技术及其肥效[J].花生科技,1989,(3):15-17.

Screening of Superior Nodule Bacteria Strains in Peanut and Their Nitrogen Fixation

I. Efficiency performance in pot culture experiment

WU Hai-yan, SUN Shu-rong, LIU Chun-guang, ZHANG Gui-zhi

(Soil and Fertilize Institute Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Sand soil from Sanjins town of Fuyu county, Jilin province, was used as the experimental Soil. Through some pot culture experiments and field experiments such as collection of peanut nodule bacteria, strain separation and purification, and returning inoculation of original host varieties, some good strains and their combinations that suit different peanut varieties of Jilin province were selected, and the yield increasing mechanism of peanut-peanut root nodule symbiosis nitrogen fixation was clarified preliminarily.

Superior nodule bacteria varieties of 2644, 2656 and 2697 were selected, and through pot culture experiments, their physiological and chemical characteristics were identified. The results show that 2644 was quick-growing type of nodule bacteria, demonstrating comparatively strong nitrogen-fixating ferment activity. 2656 and 2697 were slow-growing types of nodule bacteria, with a relatively strong nitrogen fixation activity. The above results rectified the conventional opinion that peanut nodule bacteria do not have a quick-growing type or the quick-growing type has a lower nitrogen-fixating ferment activity. At the same time, a better effect could be obtained when two or more than two of the three superior strains were combined together. They were better-selected strains suitable for application in peanut production. This provides theoretical foundation for the introduction of superior nodule bacteria varieties and inoculation combination.

Key words: Rhizobium arachis hypogaea; Pot culture experiment; Superior strain; Symbiosis nitrogen fixation

养奶牛 奔小康

本场为国有农场,下设4分场,省级重点奶牛繁育基地,农牧局批准授权面向全国常年供北京黑白花(荷兰斯坦)高产奶牛:小母牛1500元左右,头胎怀牛4000元左右,产奶带胎牛(现产奶50斤以上)4500元左右,普系清、档案全,特殊高产牛以质论价,负责检疫、检胎、路途护理,来人不要带现金购牛,购牛在10头以上专车免费为您安全送到家。启程前请直接与本场取得联系,专车接站。不到本场不谈牛,防止车站有人利用推销奶牛欺骗,下车后见场长身份证和农场17020白色长安新星车为无缝接洽,谨防假冒!

信誉重如山 满意再付款

太原北郊山西省国营云河奶牛总场(原军区农场)

场 长:贺富旺 畜牧师:王 银

电 话:0350-6076544(日夜热线) 手 机:(0)13934006167(24小时提供奶牛技术服务)