

文章编号 :1003-8701(2004)04-0028-07

花生根瘤菌高效菌株的筛选 及固氮效应的研究

II.花生根瘤菌高效菌株的筛选及固氮效应田间试验

吴海燕,刘春光,张桂芝,孙淑荣

(吉林省农业科学院土壤肥料研究所,吉林 公主岭 136100)

摘 要: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,已经筛选出优良菌株及菌种与寄主之间的最佳组合,达到人工接种增产的目的。为验证优良菌株的增产稳定性,我们连续进行了盆栽试验与田间试验。结果表明,优选菌株具有一定的稳定性,盆栽试验与田间试验具有增产一致性。而且3种优良菌株中两种或两种以上组合接种效果更佳,这为引进优良菌种、组合接菌提供了理论依据。

关键词:花生根瘤菌;盆栽试验;田间试验;优良菌株

中图分类号: S565.2

文献标识码: A

有关我省大豆种植老区土著大豆根瘤菌的生态学特性及接种效果,我们已经进行了较为深入的研究,取得了一些研究成果。而花生现作为我国主要的油、粮两用作物,是营养比较全面的植物性食品^[1],年产达1 000多万t。花生根瘤菌也如同大豆-大豆根瘤菌共生体系一样,通过有效的共生固氮作用,可提供花生生育期中所需氮素的1/2左右^[2]。但这种共生固氮作用并不能完全保证发挥最大效果,往往是新种植花生的土壤中不含有效的根瘤菌或者含量很少,土壤中无效的根瘤菌在花生根部结瘤,其固氮效率很低。人工接种优良菌种可以保证形成大量有效根瘤,充分发挥共生固氮作用^[3]。我国早在40年代末就开始了花生根瘤菌的选育研究工作,国内多家单位在菌种的筛选、保藏条件、菌剂生产工艺和田间应用条件等方面进行了大量的研究^[4]。结果表明,花生根瘤菌有着比大豆根瘤菌更强的抗旱能力,具有一定的发展潜力。

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

供试土壤:沙壤土, 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(小四粒红)。

供试菌株:009、147-3、2644、2697、2656和硅酸盐细菌。

试验处理:试验设13个处理,4次重复,共52个盆,随机排列。1. 阴性对照+N₀PK;

收稿日期:2004-02-25

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

2.阴性对照+NPK ;3.阳性对照 009+NPK ;4. 147-3+NPK ;5. 2644+减氮 20%+PK ;6. 2644+NPK ;7. 2656+NPK ;8. 2697+NPK ;9. 2644+2656+NPK ;10. 2644+硅酸盐细菌+NPK ;11. 2644+N₀PK ;12. 2644+NP₀K ;13. 2644+NP₀K₀。

以上各处理 N、P、K 用量水平一致 ,N₀、P₀、K₀ 指氮、磷、钾用量为零。

盆栽采用 21 cm×24 cm 的盆钵 ,5 月 20 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。每一粒种子的接种量为 10⁷ 活细胞。

播种 90 d 后进行收获 ,同时进行结瘤数、瘤干重、株高和植株地上部干重及植株全氮的测定。

1.2 不同花生根瘤菌对花生生育性状及产量影响的田间试验

供试土壤 :沙壤土(理化性状同上)。

供试作物 :花生(小四粒红)。

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

试验处理 :试验设 13 个处理 ,4 次重复 ,随机区组排列 ,小区面积 20 m² ,共 52 个小区 ,总面积 1 040 m²。1. 阴性对照+N₀PK ;2. 阴性对照+NPK ;3. 阳性对照 009+NPK ;4. 147-3+NPK ;5. 2644+减氮 20%+PK ;6. 2644+NPK ;7. 2656+NPK ;8. 2697+NPK ;9. 2644+2656+NPK ;10. 2644+硅酸盐细菌+NPK ;11. 2644+N₀PK ;12. 2644+NP₀K ;13. 2644+NP₀K₀。

其中 N、P、K 用量水平一致 ,N₀、P₀、K₀ 指该用量为零。

5 月 16 日播种 ,菌剂拌种(每小区 15 g) ,拌种前加入极少量的钼酸铵和 2%羧甲基纤维素钠适量体积 ,花生为点播。

1.3 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^[5 6]进行。

1.4 花生生育期间根瘤菌固氮酶活性的测定和固氮量的估测

固氮酶活性测定条件 :气相色谱仪日立 163 型 ,用氢焰检测器 ,1 m 长不锈钢螺旋柱 2 根 ,内装 GDX-502 型担体 ,载气是 N₂ ,柱温 60℃ ,汽化室温度 90℃。气体流速为 N₂ 50 mL/min、H₂ 30 mL/min ;空气 300~400 mL/min。出峰时间 :乙烯为 40 s、乙炔为 50 s、纸速为 10×30 mm/min。

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及产量影响的分析

不同花生根瘤菌对花生生育性状影响调查与测定结果列于表 1、3。

从表 1 盆栽试验结果看出 ,无论结瘤数、瘤干重 ,还是地上部植株干重、植株全氮产量都因处理不同而不尽相同。结瘤数、地上部植株干重、植株全氮产量最高均为处理 12 (不施磷肥 ,接种 2644) ,其次为处理 13(不施磷钾 接种 2644)。对地上部每株植株干重进行方差分析 ,结果见表 2。结果表明 ,处理间差异极显著 ,重复间差异不显著。LSD 法进行多重比较 ,表现最好为的处理 12(2644+NK) ,除了与处理 5(2644)相比差异显著 ,与处理 13 相比差异不显著外(2644+N) ,与其它 10 个处理相比 ,植株干重都达到了差异极显著水平。

表 1 不同菌株接种花生对其生育性状的影响盆栽试验结果

处理	株高 (cm)	结瘤数 (个/株)	瘤干重 (g/株)	地上部植株干重 (g/株)	地上部植株全氮 (N%)	植株全氮产量 (g/株)	固氮量 (g/株)	固氮量占植株 全氮比率(%)
1	24.7	67.5	0.19	2.5	0.051 2	0.128 0		
2	26.5	48.8	0.20	5.8	0.041 0	0.237 8		
3	30.1	88.5	0.22	5.8	0.041 5	0.240 7	0.002 9	1.2
4	23.8	49.3	0.37	5.8	0.043 0	0.249 4	0.011 6	4.7
5	25.0	66.3	0.21	5.2	0.047 6	0.247 5	0.009 7	3.9
6	31.8	50.8	0.42	8.3	0.041 7	0.346 1	0.108 3	31.3
7	27.5	157.8	0.40	5.9	0.053 3	0.314 4	0.076 6	24.4
8	26.6	96.3	0.55	4.6	0.043 6	0.200 6		
9	26.7	201.8	0.45	5.2	0.046 9	0.243 9	0.006 1	2.5
10	28.5	106.0	0.37	6.1	0.054 1	0.330 0	0.092 2	27.9
11	24.0	119.5	0.46	3.4	0.041 3	0.140 4		
12	27.3	244.8	0.47	11.3	0.039 1	0.441 8	0.204 0	46.2
13	32.6	241.5	0.45	9.7	0.038 7	0.375 4	0.136 7	36.7

注 :表中结瘤数、瘤干重、地上部植株干重和地上部植株全氮为 3 次重复平均数。

表 2 不同花生根瘤菌对花生植株干重影响方差分析结果

Source	D. Fsum	OF. SQ	Mean. SQ	F Ratio
Factor	12	276.3	23.0	5.0**
Rep	3	0.6	0.2	0.0
Error	36	149.0	4.1	
Total	51	426.0		

LSD(0.05)=2.9 ,LSD(0.01)=3.9

表 3 不同菌株接种花生对其生育性状的影响田间试验结果

处理	株高 (cm)	结瘤数 (个/株)	瘤干重 (g/株)	地上部植株干重 (g/株)	地上部植株全氮 (N%)	植株全氮产量 (g/株)	固氮量 (g/株)	固氮量占植株 全氮比率(%)
1	36.5	221.0	0.21	17.8	0.055 0	0.979 0		
2	39.3	272.0	0.21	23.9	0.043 2	1.032 5		
3	36.2	314.6	0.25	25.2	0.048 9	1.232 3	0.199 8	16.2
4	38.3	304.0	0.39	25.7	0.052 0	1.333 8	0.301 3	22.6
5	31.9	287.5	0.30	24.3	0.054 6	1.326 8	0.294 3	22.2
6	40.1	336.4	0.47	26.9	0.049 8	1.339 6	0.307 1	22.9
7	37.0	288.0	0.46	25.9	0.052 0	1.346 8	0.314 3	23.3
8	38.1	310.4	0.50	26.3	0.051 0	1.341 3	0.308 8	23.0
9	39.5	342.0	0.47	24.3	0.055 7	1.353 5	0.321 0	23.7
10	38.2	322.0	0.44	29.8	0.048 1	1.433 3	0.400 8	27.9
11	34.0	276.0	0.42	25.0	0.057 6	1.440 0	0.407 5	28.3
12	36.5	290.0	0.46	26.7	0.049 7	1.327 0	0.294 5	22.2
13	36.1	331.9	0.49	31.7	0.045 7	1.446 4	0.413 9	28.6

注 :表中结瘤数、瘤干重、地上部植株干重和地上部植株全氮为 4 次重复平均数。

从表 3 的田间试验结果看出，接种不同花生根瘤菌对花生生育性状影响是不一样的，地上部植株干重、植株全氮产量以及固氮量最高的为处理 13(2644+N)。而且从中可以看出，由于共生固氮作用固定的氮量占植株全氮量的比率都在 16.2%以上，说明固氮效果是比较明显的。

花生成熟后，9 月 17 日进行收获，每一小区单打单收测产，同时每一处理随机取样 10 株进行考种，结果见表 4。从表 4 中可以看出，花生接种花生根瘤菌对有效荚果数、百粒重、种子含 N 量以及花生产量都明显好于阴性对照与施肥不接菌对照。其中表现最好

的是处理 13(2644+N) ,固氮量为 5.887 3 kg/小区 ,占种子全氮量的 50.1% ,其次表现较好的为处理 6(2644+NPK)和处理 12(2644+NK) ,固氮量分别占种子全氮量的 38.9%和 42.5% ,体现了生物固氮的价值。同时也说明了钾素在花生产量因素中具有一定的增产作用 ,这一结果与姜学玲^[7]的研究结果是一致的。也有人认为 ,花生的栽培 ,在施用 N、P、K 的基础上 ,施用钼肥可增产 20%~21%^[8] ,这可能是钼元素与固氮酶的组成有关。另外也有关于花生根瘤菌与稀土混合施用增产的报道^[9] ,这方面的研究有待于进一步深入。

表 4 不同花生根瘤菌对花生产量的影响田间试验结果

处理	有效荚果数 (个/株)	百粒重 (g)	种子含氮量 (N%)	产量 (kg/20 m ²)	产量 (kg/hm ²)	增产率 (%)
1	7.0	29.00	2.031 7	2.38	1 190.00	
2	8.2	30.06	2.431 7	2.41	1 204.80	1.26
3	12.5	36.86	2.876 4	2.45	1 210.05	2.95
4	16.0	41.62	3.151 7	2.53	1 264.95	6.30
5	9.7	34.67	2.805 0	2.42	1 210.05	1.69
6	7.8	39.54	3.514 2	2.73	1 350.00	14.71
7	15.4	30.75	2.998 7	2.43	1 215.00	2.11
8	17.6	40.66	3.071 2	2.60	1 298.55	9.25
9	14.2	38.13	3.614 2	2.58	1 290.00	8.41
10	12.0	40.78	3.804 2	2.68	1 339.95	12.61
11	17.4	40.42	3.050 3	2.47	1 234.95	3.78
12	16.0	43.70	3.988 0	2.72	1 360.05	14.30
13	18.6	45.60	4.256 4	2.76	1 380.00	15.97

对产量进行了方差分析(表 5)。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 ,处理 13、处理 12 和处理 6 较阴性对照产量差异极显著 ,处理 13、处理 6 较施肥不接菌产量差异极显著 ,较 009 产量差异显著 ,较 147-3 产量差异不显著。上述结果表明 ,不同花生根瘤菌对花生生育性状及产量的影响是不同的。但盆栽试验和田间试验结果基本上是一致的。这就是说 ,无论从每株结瘤数、瘤干重、每株植株干重、每株全氮产量 ,还是有效荚果数和百粒重等产量指标来看 ,接种 2644 或者 2644+2656 菌株表现比较突出 ,是生产上推广应用的优选菌株。

表 5 不同花生根瘤菌对花生产量影响方差分析结果

Source	D. Fsum	OF. SQ	Mean. SQ	F Ratio
Factor	12	0.896	0.074	2.684**
Rep	3	0.029	0.009	0.359
Error	36	1.001	0.027	
Total	51	1.927		

LSD(0.05)=0.239 ,LSD(0.01)=0.320

2.2 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^[10]。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^[11]。他们认为有利于光合作用的因素都利于固氮作用的进行,土壤持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。

2.3 优选菌株 2644、2656 和 2697 生理生化特性鉴定

表 6 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	酸
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
聚蒗直径(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 6

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	不长	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
回接结瘤	+	+	+			
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 6。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 具有快生型根瘤菌的主要特征,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 5~10.5,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 和 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 和 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。

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 和 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长发育影响不同。在第 I 报中报道的对吕花 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、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和共生固氮酶活性等生理指标方面,明显优于其它处理。而对小四粒红来说,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,在生产上应用时要经过试验,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%+磷钾肥对小四粒红花生品种表现较为突出。

优选菌株具有一定的稳定性,盆栽试验与田间试验具有增产一致性,而且 3 种优良菌株中两种或两种以上组合接种效果更佳,这为引进优良菌种、组合接菌提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 邱庆树,李正超,等.花生的营养价值[J].中国食物与营养,2001,(3):49-51.
- [2] 李力,等.花生根瘤菌的抗逆性初步研究[J].微生物学通报,2000,27(1):42-47.
- [3] 姚瑞林.花生根瘤菌的应用技术及其肥效(一)[J].花生科技,1989,(2):16-18.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 姜学玲.钾肥在花生生产中的作用[J].花生科技,1989,(1):26-27.
- [7] 袁笑娟.钼肥在花生生产中的作用[J].花生科技,1990,(4):32.
- [8] 李健宝.花生根瘤菌高效菌剂的研究[J].花生科技,1990,(1):33-34.
- [9] 罗葆兴.花生根瘤菌与固氮[J].花生科技,1991,(1):6-9.
- [10] 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 High Efficient Strains of Nodule Bacteria on Peanut and Study on Nitrogen Fixation

II. Screening of High Efficient Strains of Nodule Bacteria on Peanut and Field Test of Effect of Nitrogen Fixation

WU Hai-yan, LIU Chun-guang, ZHANG Gui-zhi, et al.

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

Abstract: Through collecting of nodule bacteria on peanut, separation and purification of

bacteria strains, and experiment of inoculating pot cultivated plants of former host varieties, the best strains of bacteria have been screened out. The best combinations of bacteria and host were achieved and crop yield was increased by artificial inoculation. In order to examine the stability of effect of the best strains, successive field test and experiments on pot cultivated plants were carried out. Results showed that the best strains of bacteria were stable. Crop production in field test and pot cultivated plants were all increased. More effects were achieved if a combination of two or more bacteria strains inoculated. This provided a theoretical foundation for introducing fine bacteria and combine inoculation.

Key words: *Rhizobium arachis hypogaea*; Experiments on pot-cultivated plants; Field test; Superior strain

(上接第 15 页)

参考文献：

- [1] 王余龙,王坚刚. 不同类型的水稻品种间根系性状差异[J]. 作物学报, 2002, 28(6): 749-755.
- [2] 王安国,等. 水稻地膜打孔育苗技术[J]. 垦植与稻作, 2003, 3(3): 25-26.
- [3] 郑建华,杨聚宝. 浅析节水农业与抗旱节水型水稻育种[J]. 福建稻麦科技, 2002, 40(4): 27-30.
- [4] 苏萍,何美芹. 寒地稻田覆膜节水增产技术研究[J]. 垦植与稻作, 2002, 4(4): 9-11.

Study on High Efficiency and Water-Saving Cultural Technique for Rice Planting by Putting Plastic Membrane with Holes in Deep Soil

HAN Guo-fu, ZHANG Zhong-dao, LIU Wen, et al.
(*Rice Office of Lishu County, Lishu 136500, China*)

Abstract: Laying impoisonous polyethylene membrane of 2 μm thick in the deep soil 30 to 40 cm far from the ground. After planting, we make 0~10 holes per m^2 according to the soil texture and percolation, i.e. we make no hole in the bottom membrane if the soil is sandy and water can percolate easily, and we make proper amount of holes if the soil is clayey and water can't percolate easily. Perfect result has been achieved through experiment and improvement last for three years. Comparing with the control, this practice can cut water use by 60.3% and the fertilizer use by 32.2%. At the same time, total roots increased 22.2% and roots in tilth top soil increased 32%, each plant produced extra 3.9 effective tillering and 17.2% of effective ears, rice matured 5 days earlier and average yield increased 20%.

Key words: Deep layer of rice field; Laying bottom membrane; Water-saving; Early maturity; High yield