

高效亲和的花生寄主植物—根瘤菌株组合*

张学江 江木兰 姜荣文

(中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062)

摘 要

本文针对栽培花生,从大、小共生体双方研究了寄主植物—根瘤菌株组合的亲合性。结果指出:(1)在温室水培盆栽条件下,用菌株 147-3 接种的寄主植物结瘤、固氮能力育成品种>普通型;(2)血清学鉴定出 5 个不同血清型菌株,其竞争力或回收率与寄主品种、根瘤菌株和土著菌数密切相关;(3)在温室与田间条件下,不同花生寄主—根瘤菌株组合存在着广谱或特异共生亲和性与非亲和性的差异,并鉴定出高效、广谱亲和的品种徐州 68-4 和菌株 147-3;(4)强亲和的品种—菌株组合比非亲和组合或不接种(对照)显著增产($P < 0.05$)。统计 1987—1990 年 7 省共 205 个点的亲和组合接种与不接种对比产量的结果,其增产频率为 97%,平均增产 421.5kg/ha,增产率 15.1%。现已在我国推广应用 10.1 万公顷,获得明显的经济效益

关键词 花生,根瘤菌,亲和组合

在胡济生等^[1]首次肯定了花生根瘤菌在我国的增产效果之后,我国学者相继进行了花生根瘤菌诸方面的研究,并取得了重要进展^[2,3]。现在国际上既重视小共生体(根瘤菌)的研究,又开始重视大共生体(寄主植物)和大、小共生体双方结合的研究。国外报道了寄主品种,根瘤菌株和品种×菌株互作影响花生共生固氮作用^[9,10],并研究获得高效的品种 Robut (33-1)—菌株 NC92—一对亲和组合^[11]。国内未见报道花生品种的结瘤、固氮差异和寄主品种—菌株共生体亲和组合的资料。本文针对我国栽培花生 (*Arachis hypogaea* L.) 品种,从大、小共生体双方研究了品种—菌株亲和组合。这对阐明双边共生关系,发挥其共生固氮作用,具有理论意义和实践价值。

一、材料和方法

(一) 材料

1. 品种:普通型花生品种由本所品种资源室提供,育种品种由本所育种二室提供。其品种类型、名称见表 1。

2. 菌株:1986 年,从搜集、分离、纯化、回接寄主结瘤的 304 个菌株中选出有效结瘤、固氮的花生根瘤菌 (*Bradyrhizobium* sp. *Arachis*) M30、147-3、97-1 为本实验室新选菌株;32H1 为 1978 年引自北

* 辽宁省农业科学院土肥所宋玉清、陕西省微生物所涂安千、浙江省农业科学院微生物所明德南、河北省微生物所赵书彬等同志参加了田间试验,中国农业科学院土肥所姚瑞林、李健宝同志参加组织多点试验与推广工作,在此,一并致谢!

京农业大学,原自美国; NC92 为 1982 年从国际半干旱热带作物研究所 (ICRISAT, 印度) P. J. Dart 博士获得。

(二) 方法

1. 血清学实验: IgG 购自卫生部北京生物制品所,按文献[4]制备抗原、抗血清,作试管凝集和间接法荧光抗体 (FA) 反应,以鉴定菌株血清型和测定结瘤竞争力、回收率。

2. 温室实验: 无氮营养液水培法盆栽^[1],随机区组设计,重复 4 次,生长 40 天收获。品种类型的结瘤、固氮比较: 每个品种用同一菌株 147-3 接种,记载根瘤数;乙炔还原法^[11]测定固氮酶活性。品种—菌株组合,包括试验 I: 按 Caldwell 和 Vest^[14]提出的豆科寄主植物—根瘤菌共生固氮效力的分类描述,在无氮供应条件下将高效结瘤(正常根瘤、叶色深绿、植株健壮),一般有效结瘤(正常根瘤,叶色绿,植物生长中等),无效结瘤(形成根肿或类似根瘤,瘤白色,叶色黄,植株矮小)和不结瘤(无瘤,植株长势和叶色同无效结瘤,呈典型缺氮症状),分别划分为强(+++),中(++),弱(+),无(-)4 级共生;试验 II: 氮差法^[11]测定单株固氮量。

3. 田间试验: (1) 小区试验。设 3 个菌株(单一或等量混合菌株)接种和不接种共 4 个处理,4 次重复,拉丁方设计。接种用文献[6]生产的液体菌剂,种床法或直接拌种法接种^[7],每粒种子不少于 1×10^6 活菌数,分小区收获、测产; (2) 多点试验。1987—1990 年在辽宁、山东、河北、河南、陕西、浙江、四川等省设接种与不接种简单对比,每个对比点不设重复,其它均与小区试验相同。

二、结果与分析

(一) 花生品种类型的结瘤、固氮差异

从表 1 看出,育成品种的根瘤数和乙炔还原活性比普通型分别增加 41.8 个/株和 $15.2 \mu\text{mol}/\text{株}/\text{小时}$,达到显著水平,同一类型的不同品种的结瘤、固氮亦达到显著差异,品种徐州 68-4 的结瘤、固氮能力最强。我们已报道^[8],我国 4 个花生栽培种类型的结瘤能力为普通型 > 龙生型 ≥ 多粒型 = 珍珠豆型;国外报道^[9,10] 3 个类型的结瘤能力为普通型 > 多粒型 = 珍珠豆型。本项研究结果,育成品种 > 普通型。这些结果表明,寄主是影响共生固氮的重要因子。生产上推广品种多是育成品种。因此,通过寄主种质资源筛选和固氮育种途径,有可能获得结瘤多、固氮量高的品种,这也提示根瘤菌选择应针对花生不同品种,可使其发挥双方共生固氮潜力。

(二) 花生根瘤菌血清型与结瘤竞争力

由表 2 可见,供试菌株均只与对应抗血清反应,试管凝集法和 FA 间接法结果一致,证明这 5 个菌株均属互不交叉反应的非同源血清型。

用等量混合菌株接种,菌株间结瘤竞争力测定结果表明,温室与田间试验基本一致(表 3)。(1) 菌株 147-3 的竞争力最强。菌株间竞争力依品种、土著菌数的不同而不同。菌株 M30 在白沙 1016 品种上的竞争力最低,浙江乔司点土著菌数 6—96 个/克土,低于河北新乐点土著菌数 830—5710 个/克土^[7],前者抗血清反应根瘤数则多于后者; (2) 温室条件下结瘤回收率达到 88—100%,这是因为人工控制条件下无土著菌竞争的缘故。而田间条件下结瘤回收率只占 20—36%(已减去同源血清型的土著菌形成的根瘤数,表 3、4),但仍显著 ($P < 0.05$) 增产约 $444.0 \text{kg}/\text{ha}$ 。这与 Nambiar 等报道^[11,12]田间接种回收率 25—40%、平均增产 $360 \text{kg}/\text{ha}$ 的结果相近。可见,人工接种的菌株结瘤竞争力和回收

表 1 花生普通型品种与育成品种的结瘤、固氮比较(温室实验,接种菌株 147-3)

Table 1 Comparison of nodulation and N₂ fixation among virginia types and bred cultivars

类 型 Type	品 种 Cultivar	根瘤(数/株) Nodules/plant	乙炔还原活性 Acetylene reduction ($\mu\text{molC}_2\text{H}_2/\text{plant/h}$)
普 通 型	直丝花生	263.8a	93.1a
	当阳藤子	248.0a	96.0a
	麻城白果	175.6b	71.4b
	托克逊	165.8bc	52.2cd
	竹节根	162.8bc	52.5cd
	应山母猪豆	160.6bc	56.2bc
	广济小花生	159.2bc	44.5cde
	广济太平	151.0bc	35.5de
	荆门大豆泡	146.4bc	39.0de
	应山李店藤子	139.4c	27.5e
平 均	177.3b	56.4b	
育 成 品 种	徐州 68-4	331.2a	107.2a
	花 37	265.4b	96.0ab
	豫花 1 号	238.4bc	89.0b
	冀油 2 号	227.8c	72.0bc
	天府 3 号	227.8c	60.4cd
	鄂花 1 号	220.6c	62.4cd
	海花 1 号	219.4c	85.1b
	白沙 1016	200.8c	57.6cde
	中花 1 号	140.4d	44.8de
	83-15007-1	119.2d	41.9e
平 均	219.1a	71.6a	

1) 不同字母 a、b、c、d、e 表示在 $P = 0.05$ 水平下显著差异。

表 2 5 个花生根瘤菌体抗原的交叉反应(试管凝集法/FA 间接法)

Table 2 Somatic antigen antiserum cross reaction of five Bradyrhizobium strains (test tube agglutination/FA-indirect method)

抗体(抗血清) Antibody (Antiserum)	抗原(菌株) Antigen (Strain)				
	M30	147-3	97-1	32H ₁	NC92
	凝集价/荧光强度 Agglutination titre/fluorescence intensity				
M30	12800/+++	0/-	0/-	0/-	0/-
147-3	0/-	12800/-	0/-	0/-	0/-
97-1	0/-	0/-	3200/++	0/-	0/-
32H ₁	0/-	0/-	0/-	3200/++	0/-
NC92	0/-	0/-	0/-	0/-	3200/++

率与品种、菌株和土著根瘤菌有紧密关系,且直接影响接种效果。这对根瘤菌选择及其应用具有指导意义。

表 3 等量混合菌株结瘤竞争力测定 (FA 间接法)

Table 3 Determination of nodulation competition of Bradyrhizobium strains mixed with equal number of rhizobial cells (FA-indirect method)

根瘤样品来源 Source of nodules	供试根瘤数(个) Nodules tested	抗血清反应根瘤数(个) Nodules reacted with antiserum				
		M30	147-3	NC92	97-1	Total
温室实验						
品种 I	M30 + 147-3	25	11	14		25
(徐州 68-4)	NC92 + 97-1	25			13	25
	4MS ¹⁾	25	5	7	10	26 ²⁾
	CK	0	0	0	0	0
	合计	75	16	21	23	76
品种 II	M30 + 147-3	25	3	21		24
	NC92 + 97-1	25			11	24
	4MS	25	2	8	8	22
	CK	0	0	0	0	0
	合计	75	5	29	19	70
田间实验 (品种为天府 3 号)						
试验点 I	M30 + 147-3	25	3	11		14
	NC92 + 97-1	25				11
	4MS	25	2	8	7	16
	CK	25	1	5	4	8
	合计	100	6	24	2	49
试验点 II	M30 + 147-3	25	3	4	13	7
	NC92 + 97-1	25			4	7
	4MS	25	2	3	2	9
	CK	25	2	1	0	4
	合计	100	7	8	6	27

1) 4MS = M30 + 147-3 + NC92 + 97-1;

2) 其中有 1 个根瘤分别与抗血清 M30 和 147-3 起反应(发明亮荧光)。

表 4 等量混合菌株接种花生结瘤回收率与产量效应(品种天府 3 号)

Table 4 Nodulation recoveries and yield responses of the peanut to inoculation with Bradyrhizobium strains mixed with equal number of rhizobial cells

接种/不接种 Inoculation/uninoculation	结瘤回收率 Nodulation recovery (%)	产量 Yield (kg/ha)	增产 Yield increase (kg/ha)
试验点 I (浙江乔司)			
M30 + 147-3	32	2610.0	579.0*
NC92 + 97-1	36	2476.5	445.5*
4MS ¹⁾	32	2479.5	448.5*
CK	0	2031.0	
试验点 II (河北新乐)			
M30 + 147-3	16	2991.0	229.5
NC92 + 97-1	24	3213.0	451.5*
4MS	20	3057.0	295.5*
CK	0	2761.5	

1) 4MS = M30 + 147-3 + NC92 + 97-1。

* 显著差异 ($P < 0.05$)。

表 5 温室水培盆栽条件下品种—菌株组合的共生亲和性

Table 5 Symbiotic compatibility of cultivar-strain combinations in greenhouse under water culture condition

品 种 Cultivar	菌 株 Strain				
	M30	147-3	97-1	32H1	NC92
海花 1 号	+++	+++	++	-	++
鄂花 4 号	+	+++	++	+	+++
中花 1 号	+	+++	+++	-	+++
豫花 1 号	+++	+++	+++	-	+++
83-15007-1	++	+++	+++	-	++
花 37	+	+++	+++	+	+++
冀油 2 号	+++	+++	+++	-	+++
徐州 68-4	+++	+++	+++	+++	+++
天府 3 号	++	+++	+++	+	+++
白沙 1016	+	+++	+++	+	+++

(三) 花生寄主—根瘤菌共生亲和性

试验 I (表 5) 表明, 不同品种—菌株组合表现出强(+++)、中(++)、弱(+)、无(-) 4 级共生, 证明品种—菌株共生体的亲和性(+++或++)和非亲和性(+或-) 的差异。其中, 有对供试菌株广谱亲和的寄主品种徐州 68-4 和其它相对特异亲和的品种, 亦有对供试品种广谱亲和的 147-3、相对广谱亲和的 97-1 和 NC92 及特异亲和或非亲和的 M30 和 32H1 等菌株。试验 II 表明(图 1), 不同品种—菌株组合的固氮差异: 亲和组合远远高于非亲

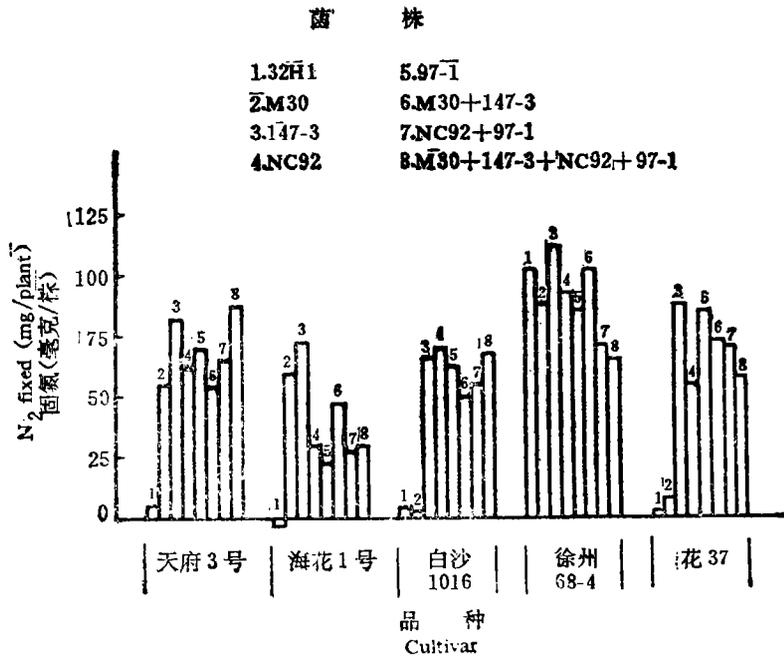


图 1 品种—菌株组合的固氮差异(温室水培盆栽)

Fig. 1 N₂ fixation by cultivar-strain combinations (water culture in greenhouse)

和组合。其中,徐州 68-4—147-3 组合的固氮作用最强,特异非亲和的白沙 1016、花 37 分别与 32H1、M30 的组合固氮很低,甚至不固氮。可见,此两个试验结果一致,而且亲和与非亲和组合的固氮高低与上述结瘤竞争力大小(表 3)也相一致。这种不同寄主品种、菌株和品种×菌株互作影响花生固氮,国外也有类似报道^[10]。花生寄主—根瘤菌共生亲和性与非亲和性的差异,为选择高效亲和的品种—菌株组合和研究双边固氮遗传提供了可能性和种质材料,也为提高田间的接种效果提供了科学依据,并具有实际应用价值。

(四) 花生品种—菌株亲和组合的增产效果

温室水培盆栽试验(表 5 和图 1)表现强亲和的品种—菌株组合,田间小区试验(表 6)除品种白沙 1016—菌株 NC92 组合表现非显著增产(175.5kg/ha)外,均表现显著增产(273.0—955.5kg/ha),平均增产 511.5kg/ha,增产率为 18.3%;中等亲和组合(菌株 NC92、97-1 分别接种品种为海花 1 号)表现增产,但未达到显著水平;特异非亲和的白沙 1016/花 37—M30 组合表现无增产效果。

表 6 亲和与非亲和品种—菌株组合的产量效应

Table 6 Yield responses of compatible and incompatible cultivar-strain combinations (kg/ha)

研究单位 Institution	品 种 Cultivar	接 种 Inoculation			不 接 种 Uninoculation	增 产 Yield increase		
		M30	NC92	97-1		M30	NC92	97-1
1.	海花 1 号 白沙 1016	3655.5	3523.5	3570.0	3325.5	330.0*	198.0	2445
		2526.0	2751.0	3090.0		-49.5	175.5	514.5*
	M30	147-3	97-1	M30	147-3	97-1		
2.	徐州 68-4	2874.0	3052.5	2727.0	2454.0	420.0*	598.5*	273.0*
3.	天府 3 号	3033.0	3370.5	3310.5	2415.0	618.0*	955.5*	895.5*
4.	花 37	3186.0	3619.5	3585.0	3183.0	3.0	436.5*	402.0*

1) 辽宁省农科院土肥所; 2. 陕西省微生物所; 3. 浙江省农科院微生物所; 4. 河北省微生物所。

* 显著差异 ($P < 0.05$)。

统计 1987—1990 年在辽宁、山东、河北、河南、陕西、浙江和四川等 7 省共 205 个点亲和组合的接种与不接种对比结果(图 2), 2 个点平产, 4 个点减产, 增产点次占 97%, 平

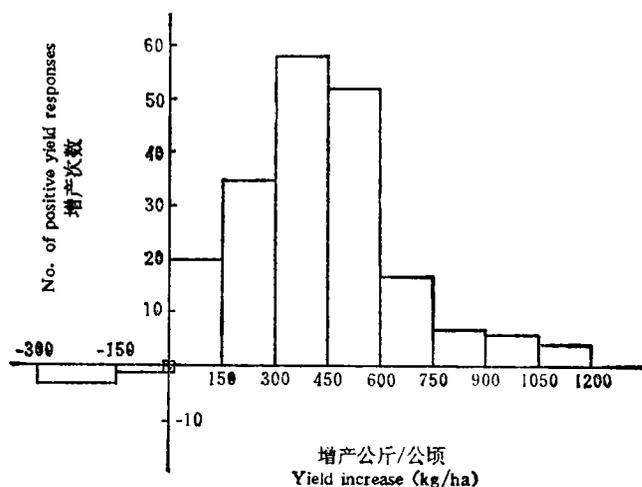


图 2 花生品种—根瘤菌株亲和组合的产量效应

Fig. 2 Responses of compatible peanut cultivar-Bradyrhizobium combinations

均接种产量为 3207.0kg/ha, 比不接种增收花生果 421.5kg/ha, 增产 15.1%。国外有一例报道^[1], 一对品种 Robut 33-1—菌株 NC92 亲和组合, 平均增产 360kg/ha, 增产率 11%。

据统计, 在“七·五”期间已推广亲和组合接种的花生面积 6.8 万公顷, 1991—1992 年为 3.3 万公顷, 总计 10.1 万公顷。新增花生总产量 25744.4 吨, 创收入共 3014.3 万元。国外迄今尚未能达到这样大面积的增产效果。

参 考 文 献

1. 胡济生等, 1956: 花生根瘤菌的培养及其增产效果。土壤学报, 第 4 卷 2 期, 185—195 页。
2. 陈华癸、樊庆奎主编, 1987: 中国共生固氮研究五十年。南京农业大学出版社。
3. 周平贞、胡济生, 1990: 我国花生根瘤菌技术应用与研究进展。土壤学报, 第 27 卷 4 期, 353—360 页。
4. 北京医学院微生物学教研组编, 1980: 实验免疫学。人民卫生出版社。
5. 周平贞等, 1979: 豆科植物结瘤试验—水培法介绍。中国油料, 第 2 期, 60—62 页。
6. 张学江等, 1990: 花生根瘤菌液体菌剂与接种效应。中国油料, 第 4 期, 83—86 页。
7. 张学江等, 1991: 花生根瘤菌数量效应与种床接种效果。中国油料, 第 2 期, 56—59 页。
8. Jiang Rongwen, et al., 1988: Preliminary study of symbiotic nitrogen fixing potentials of Chinese groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm. in “Nitrogen Fixation: Hundred Years After, Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation” (Bothe, H. et al, eds.), p. 828, Stuttgart; New York: Fischer.
9. Wynne, J. C. et al., 1982: Host plant factors affecting nitrogen fixation of the peanut. in “Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture” (Graham, P. H. and Harris, S. C. eds.), pp. 67—75, CIAT, Cali, Colombia.
10. Wynne, J. C. et al., 1983: Effect of host plant, Rhizobium strain and host x strain interaction on symbiotic variability in peanut. Peanut Science, 10:110—114.
11. Nambiar, P. T. C. et al., 1984: Response of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to Rhizobium inoculation. Oleagineux, 39:149—155.
12. Nambiar, P. T. C. et al., 1984b: Studies on competition, persistence and methods of application of a groundnut Rhizobium strain, NC92. Peanut Science 11:83—87.
13. Bergersen, F. J., 1980: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. John Wiley & Sons.
14. Caldwell, B. E. and Vest, H. G., 1977: Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: The macrosymbiont. in “A Treatise on Dinitrogen Fixation”, Section III. Biology (Hardy, R. W. F. and Silver, W. S. eds.), pp. 557—576.

HIGHLY EFFICIENT-COMPATIBLE HOST PLANT— *BRADYRHIZOBIUM* STRAIN COMBINATIONS OF THE PEANUT (*Arachis hypogaea* L.)

Zhang Xuejiang, Jiang Mulan and Jiang Rongwen

(Institute of Oil Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062)

Summary

The both sides of macro- and micro-symbionts were studied for host plant—*Bradyrhizobium* strain compatibility of the cultivated peanut. The results showed that (1) Bred cultivar was better than virginia type in nodulation and N_2 fixation when the host plants were inoculated with strain 147-3 in greenhouse under condition of water culture. (2) Five serotype strains were determined by using agglutination in test tube and FA-indirect method.

Nodulation competition and recovery were closely related to host cultivar. *Rhizobium* strain and indigenous *rhizobium* population. (3) The different host plant—*Bradyrhizobium* strain combinations varied in the widely/sepecifically symbiotic compatibility and imcompatibility. A widely compatible cultivar, Xuzhou 68-4 with highly efficient nodulation and N fixation by strains tested, was identified, and a strong compatible strain 147-3 with broad host range was also identified in greenhouse and field experiments. (4) The strong compatible cultivar—strain combinations produced significantly ($P < 0.05$) higher pod yields than the imcompatible combinations or uninoculated control. of 205 site trials for inoculation compatible combinations in the different parts of China from 1987—1990, the frequency of yield increase was 97%, the average yield increased by 421.5kg/ha, 15.1%, compared with uninoculated control.

Key words Peanut, *Bradyrhizobium*, Compatible combination