

荷兰豆根瘤菌的分离、鉴定及其菌剂的研制和应用

杨 风 潘超美 王德琼 李幼菊 魏朝芬

(广东省土壤研究所, 广州 510650)

摘要 本文对南方出口蔬菜—荷兰豆的根瘤菌进行分离、鉴定及其菌剂的研制和应用的研究。结果表明, 所分离的菌株能适应本省的不同类型的土壤环境, 与荷兰豆中的多个品种结出有效根瘤, 盆栽试验结瘤率达到 100%, 大田应用在 90% 以上; 接种了该菌株, 能使荷兰豆植株较高大粗壮、分枝多、有效花多、结荚数增加、产品的质量提高, 大田应用的增产率可达 14%, 产品一级率可提高 10% 左右。大田试验结果表明, 施用该菌剂, 可减少氮肥的施用量, 降低生产成本, 从而提高荷兰豆生产的经济效益。

关键词 荷兰豆; 根瘤菌; 菌剂; 固氮

ISOLATION OF NODULE BACTERIA FROM *PISUM SATIVUM* AND THE APPLICATION OF NITRAGIN FROM THE ISOLATE

Yang Feng Pan Chaomei Wang Deqiong Li Youju Wei Chaofen

(Guangdong Institute of Soil Science, Guangzhou 510650)

Abstract An isolate from nodules of garden pea (*Pisum sativum* L.) was tested on different varieties of garden pea in various soil types. Effective nodules were produced by the nitragin prepared from the isolated nodule bacteria. The bacterial strain isolated was a strain of *Rhizobium* sp., and was effective on many varieties of garden pea in different types of soil environment in Guangdong Province. The nodulation rate reached 100% in pot experiment, and above 90% in field plots. After being inoculated with the bacterial strain, the garden pea grew more strongly and healthy with more branches, more effective flowers, and increased the number of pods with high quality. The application of this nitragin to the garden pea in the field increased pod yield by 14%.

Key words *Pisum sativum* L.; Nodule bacteria; Nitragin; Nitrogen fixation

荷兰豆是商品价值较高的蔬菜, 国内外市场需求日益增大, 我省荷兰豆种植面积不断扩大。包括荷兰豆在内的反季节蔬菜栽培, 是我省及相邻省份不少山区充分合理利用土地、小气候资源, 尽快脱贫致富的重要途径。

近几年来, 中国科学院广州分院和广东省科学院开展了“反季节蔬菜生产基地与高产优质栽培技术研究”(广东省科委“八·五”攻关项目), “荷兰豆根瘤菌的分离、鉴定及其菌剂的研究和应用”

(1990—1994年)便是其中的一部份。由于近年反季节栽培的荷兰豆品种多为引进的新品种,不少地区还属首次种植,种植土壤往往不含有适宜的根瘤菌,或根瘤菌数量很少,难以保证荷兰豆植株能形成大量有效的根瘤而充分发挥共生固氮的作用。因此,筛选荷兰豆的优良根瘤菌株,对于提高荷兰豆的产量和品质,降低生产成本,提高经济效益,是很有必要的。几年来,我们对荷兰豆根瘤菌进行了分离、纯化、回接、鉴定及菌剂的研制、生产、应用等一系列的研究试验,筛选出了适应本省土壤环境、同时对广泛种植的荷兰豆品种都有效的根瘤的菌株;用于生产的菌剂在大田试验和应用中均取得可喜的效果。

1 材料和方法

菌株的分离及鉴定 从本省几个荷兰豆(*Pisum sativum* L.)种植区廉江、化州、信宜、阳山等县及华南农业大学试验场等地采集带根瘤的植株,按根瘤菌常规方法进行分离纯化。通过沙盆回接试验,比较各分离菌株的结瘤固氮能力,依此进行菌株筛选。然后按一般细菌常用鉴定方法进行形态特征和生理特征等的测定^[1]。

盆栽试验 盆栽土壤采自植物园苗圃附近的生荒地,过筛和灭菌后装入中型花盆,设五个不同施氮水平处理。每个处理六个重复,三盆作观察用,三盆作取样用。每盆播五粒饶平二花荷兰豆种子,每盆各施1g农用磷钾肥(每盆约6kg土)。出苗后每隔一个月按上述施肥量各施氮、磷、钾肥一次。在荷兰豆盛荚期进行株高、株重及结荚数的检测。

菌剂的研制 菌剂的培养以酵母膏-甘露醇为一级种子培养基;二级种和生产用菌液的培养基用蔗糖代替甘露醇。一级种用试管斜面培养,二级种和生产用菌则采用三角瓶液体培养,pH6.5左右,在28—30℃下摇床振荡培养,用荧光显微镜检测法测定培养液中的活菌数。

根据有关资料,选择泥炭土为菌剂载体;参照国际现行的有关菌剂商品含菌标准^[2],将菌液与载体混和而制成菌剂。

田间接种效果实验 供试荷兰豆品种为饶平二花、台湾11号荷兰豆;采用菌剂拌种子的方法。选择广东省信宜县钱排镇两块水旱轮作地,海拔540m,土壤为谷底冲积水稻土,面积分别为0.02hm²和0.07hm²;合水镇两块水旱轮作地,海拔220m,土壤是河流冲积水稻土,面积分别为0.027hm²和0.053hm²。每块地分两个区,设种子拌菌和不拌菌,两区中间设2—3垄隔离带,每区单独计算产量。

按荷兰豆的各个生长时期的苗期、初花期、结荚期(初期、盛期、后期)等阶段采集根瘤,用乙炔还原法检测其根瘤的固氮活性。大面积单产量由蔬菜基地有关部门收购荷兰豆时作出产量统计。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离和筛选

由于本省耕地土壤普遍呈酸性,对根瘤菌的生长发育不利,加上荷兰豆的种植面积当时也不广,菌源有限。几年来我们对从信宜、廉江、华南农业大学试验场种植区采回的荷兰豆根瘤进行分离,所得的菌株经纯化及通过沙培盆栽回接试验,比较了不同来源菌株的固氮活性。其结果

见表 1。

从表 1 可见, 采自华南农大试验地的一株菌株, 具有较良好的结瘤与固氮能力, 因此被选择作为本试验研究的实验菌株; 经常规纯化、复壮后于 4℃ 左右保存待用。

2.2 菌株的鉴定

一般形态特征 该菌株在酵母膏-甘露醇琼脂培养基上的菌落呈正圆形、乳白色、半透明, 有石蜡状光泽, 露滴状隆起, 内部为微粒结构, 粘性大、生长快, 一般只需 2 d(28℃), 即可在琼脂平板上长成 2-4 mm 的单个菌落; 菌体杆状, 周身鞭毛, 菌体大小为 0.5-0.9 × 1.2-3.0 μm。

一般生理特征 该菌株为革兰氏阴性菌; 对碳源、氮源的利用及其他生理特征经北京农业大学生物学院鉴定结果为: 对碳源利用一般, 可以利用绵子糖、D-山李醇、甘露醇、DL-脯氨酸、蔗糖等; 而对 D-塔塔糖、草酸钠、D-阿拉伯醇、D-木糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、淀粉则不能利用。对氮源的利用有 L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-亮氨酸; 不能利用的有 L-胱氨酸、D-缬氨酸、甘氨酸、L-谷氨酸。其主要生理特征有: 发酵葡萄糖产酸; 氧化酶反应呈阳性; 苯丙氨酸脱氢酶反应呈阴性; 硝酸盐还原呈阳性; 肉汁脲培养基上不生长; 该菌株耐盐性强, 生长需氧量不高, 一般液体深层培养经振荡后生长良好。pH 最适范围为 6.5-7.5 之间; 本菌株不耐热, 一般 60℃ 以上就难存活。

该菌株对寄主植物的感染性与专一性 运用接种栽培法, 对分离纯化后的菌株进行结瘤试验。土壤经高温消毒, 荷兰豆种子经表面消毒后, 植于沙盆中, 用无菌水制成根瘤菌稀释液进行接种。结果 20 d 后结瘤率大于 90%, 40 d 后 100% 结瘤。可见该菌株感染力强。我们也作了荷兰豆根瘤菌与菜豆根瘤菌的互接试验, 即用荷兰豆的根瘤菌感染菜豆的根系, 用菜豆的根瘤菌感染荷兰豆的根系, 结果它们都不能互相感染。由于时间有限, 没有做更多的互感试验。在蔬菜基地大田试验中, 证实了这株荷兰豆根瘤菌同时能感染同属的台中 11 号荷兰豆和甜豆, 在其根上结出有效根瘤, 结瘤率及效果稍低于原寄主。

该菌株 1993 年由北京农业大学生物学院陈文新教授鉴定, 并收入他们的热带地区根瘤菌种资源库中。鉴定结果为根瘤菌 (*Rhizobium*) 的未知种。

2.3 根瘤菌剂的研制及生产

2.3 根瘤菌剂的研制及生产

菌液的培养 根据常规菌液生产程序, 一级菌种用酵母膏-甘露醇琼脂试管斜面培养; 二级菌种和生产用菌液则用食用白蔗糖代替甘露醇制成液体培养基培养。本研究用三角瓶装培养液, 接种后置于摇床上 (140 次/min), 在 28-30℃ 下进行培养, 并定时测定菌液的根瘤菌活菌数。结果表明, 菌液的活菌数与培养时间的长短有关, 以培养 44 h 的最多, 达 2.6×10^9 个/ml。据此, 我们选定菌液生产的培养时间为 40-48 h。

表 1 不同地区荷兰豆根瘤菌固氮活性的比较

Table 1 Nitrogen fixation activity of nodule bacteria in *Pisum sativum* from different areas

菌株来源 Strains from	平均根瘤鲜重 Av. nodule fresh weight per plant (g)	固氮活性 Nitrogen fixation activity	
		(mg N g ⁻¹ nodule d ⁻¹)	(mg N d ⁻¹ plant ⁻¹)
华农大试验地 *	2.98	0.4838	1.4417
廉江 Lianjiang	0.98	0.3910	0.3832
信宜 Xinyi	0.30	1.420	0.426

* Plot in South China Agricultural University

菌剂的质量 根瘤菌剂生产的质量标准, 各国的规定不尽相同, 澳大利亚规定, 每克菌剂的菌数至少含有 1×10^9 个活根瘤菌, 到失效期每克至少为 1×10^8 个; 加拿大则规定: 利用菌剂接种豆科作物时, 大粒种子上的活菌数至少为 1×10^5 个/粒; 而美国规定, 大粒种子每粒带菌应不少于 3.7×10^5 个。我们主要依据美国的标准进行荷兰豆根瘤菌剂质量的控制, 即按每 $1/15 \text{ hm}^2$ 用荷兰豆种 2.5 kg, 每公斤 3000 粒计, 施用根瘤菌数量至少为 $2.5 \times 3000 \times 3.7 \times 10^5 = 2.78 \times 10^9$ 个。

菌剂的生产 生产使用的载体为本省高要县产的泥炭土, 炭土比大约为 3:2, pH5.0 左右。将其粉碎至约 60 目, 用石灰调节其 pH 至 6.5-7.0, 然后按 80 g 泥炭土吸附 15 ml 根瘤菌生产液(每 ml 活菌数约 $1.5-2.5 \times 10^9$ 个)的比例制成菌剂, 并调节水分至 20-30% 左右, 为 $1/15 \text{ hm}^2$ 荷兰豆的施用量。经测定表明: 按上述生产的荷兰豆根瘤菌剂, 每克的活菌数含量为 10^8-10^9 个之间, $1/15 \text{ hm}^2$ 施用菌数为 30×10^9 个, 远远超过了上述的标准。

本研究采用具有半透性的聚乙烯薄膜包装袋包装菌剂, 这种包装袋可保持湿度和进行必要的气体交换。据测定, 菌剂在这种袋子中于 30-35 °C 室温下保持两个月, 其活菌数仍达到标准要求; 20-25 °C 则六个月仍有效。

2.4 根瘤菌剂的应用效果

盆栽试验 本试验旨在鉴定根瘤菌回接效果及在不同的土壤施氮水平下, 接种根瘤菌与不接种对荷兰豆生长与结荚的影响。结果表明, 接种了根瘤菌的荷兰豆植株都不同程度地形成了根瘤, 结瘤率为 100%; 从植株生长性状来看, 接种根瘤菌的植株较高大、粗壮, 分枝多, 结荚数明显增加。在相同的施氮水平下, 荷兰豆植株接种与不接种相比, 无论在株高、株重、结荚数等生物量都有显著提高, t 值 > 2.763 ($P=0.01$), 示生物学效应差异均达极显著水平, 在不同施氮水平中, 接种与不接种在株高、株重、结荚数上也都呈显著差异, t 值 > 2.447 ($P=0.05$) (表 2)。

表 2 不同施氮水平下接种与不接种根瘤菌对植株生长的影响

Table 2 Effects of inoculation with and without nodule bacteria on the growth of *Pisum sativum* at different nitrogen application levels

	每盆施氮水平 Nitrogen application per pot (g)							
	0.4 g		0.6 g		0.8 g		1.0 g	
	对照 Un	接种 Inoculated	对照 Un	接种 Inoculated	对照 Un	接种 Inoculated	对照 Un	接种 Inoculated
株高 Plant height (cm)	55.0	82.5	58.2	79.6	58.4	79.1	64.7	74.4
株重 Plant weight (g)	24.2	36.3	23.7	32.4	29.6	40.0	25.9	30.9
荚数 Pod number (个)	4.5	6.2	5.0	6.6	5.6	6.2	6.0	6.4

盛荚期统计, $n=15$. Un=uninoculated; Calculated at full podding stage, $n=15$

从表 2 还可见, 在不接种根瘤菌的情况下, 荷兰豆的株高、株重、结荚数等生物量, 随施氮量的增加而增加。但与此相反, 在接种根瘤菌的情况下, 荷兰豆的各生物量并没有随施氮量的增加而增加, 有的甚至减少, 说明氮肥的施用对接种了根瘤菌的植株生长影响不大, 对根瘤的固氮

能力有所抑制。这表明接种根瘤菌剂,可以减少氮肥的施用量,降低生产成本,提高经济效益。

大田试验结果 本田间试验选择了广东省反季节蔬菜基地信宜县合水镇和钱排镇。试验期为1991-1992年。从田间观测来看,接种根瘤菌的荷兰豆长势明显优于对照的。

表3表明,接种根瘤菌对提高荷兰豆植株的株高、株重、结荚数的效果都很显著,尤其是对株高与结荚的影响,在各个生长期均达到非常显著水平。不难看出,接种根瘤菌的荷兰豆植株,其生长后期(结荚盛期、结荚后期)的各生物量要比其生长前期明显增加,而对照植株生长后期与生长前期各生物量的差异就要小得多。前者生长后期比生长前期各生物量明显增加的原因,无疑与其根瘤逐步形成,根瘤的固氮能力逐步增加有关。表4的结果也证实了这点。

由表4可见,接种根瘤菌株的荷兰豆植株,无论是形成的根瘤数、根瘤重,还是根瘤的固氮能力,都远远高于由土著种感染的植株,其平均固氮量要比土著种感染的高15倍以上。这说明该菌种确实能与供试荷兰豆形成有效根瘤。而且,接种根瘤菌的植株,在整个结荚期中的单株根瘤数变化不大,但其根瘤的固氮能力是结荚后期 > 结荚盛期 > 结荚初期,这可能是由于土壤中氮素的不断消耗,因而刺激了根瘤固氮能力的相应提高。此外,单株根瘤重量在结荚后期有大幅度的增加,固氮能力明显提高,这就使得植株在生长后期,及时获得较多的氮素补充,因而促进其后期分枝的生长,有效分枝增加,继而结荚数相应增加,产量得以提高。

表3 荷兰豆根瘤菌剂对荷兰豆各生长期生物性状的影响

Table 3 Effects of nitragin from nodule bacteria in *Pisum sativum* on biological characters of the plant at various podding stages

	结荚期 Podding stage	株高 (cm) Plant height	株重 (g) Plant weight	结荚数(个/株) Pod number per plant
接种 Inoculated	初期 (A)	113.8**	52.7**	5.9**
	盛期 (B)	142.4**	105.5**	14.6**
	后期 (C)	183.0**	151.5*	27.9**
不接种 Uninoculated	初期 (A)	107.9	29.6	5.4
	盛期 (B)	132.5	53.4	8.2
	后期 (C)	159.1	62.6	17.3

A, B and C represent early, full and final podding stages, respectively.

* 示 0.05 显著水平; ** 示 0.01 显著水平

表4 荷兰豆不同生长期根瘤菌固氮活性的检测

Table 4 Nitrogen fixation activity of nodule bacteria in *Pisum sativum* at various podding stages

	结荚期 Podding stage	瘤重 Nodule weight g plant ⁻¹	固氮能力 N fixation activity		固氮量 ** N fixed kg N hm ⁻² a ⁻¹	平均固氮量 Av. N fixed kg N hm ⁻² a ⁻¹
			mg N g ⁻¹ nodule d ⁻¹	mg N d ⁻¹ plant ⁻¹		
接种 Inoculated	初期 (A)	0.99	1.0873	1.0764	41.25	71.04
	盛期 (B)	0.90	1.2252	1.1027	42.26	
	后期 (C)	1.59	2.1271	3.3821	129.62	
不接种 * Uninoculated	初期 (A)	0.22	0.1110	0.0244	0.94	4.68
	盛期 (B)	0.38	0.8781	0.3336	12.79	
	后期 (C)	0.07	0.1110	0.0078	0.30	

Abbreviations as in Tab. 3; * 土著种感染 Infected by autochthonous strains;

** 每 1/15 hm² 按 7000 株计。Counted as seven thousand plants in 1/15 hm²

表 5 是大田试验取得的荷兰豆产量数据, 因试验后期遇上大雪, 使荷兰豆受到冻害, 因此只统计至大雪前一天, 包括了结荚初期和盛期, 只有一区统计到结荚后期。从表 5 可见, 施用根瘤菌的荷兰豆各品种, 都比对照的增产, 平均增产达 16.37%, 而且所产荷兰豆的品质也相应提高, 豆荚的一级品率平均达 81.2%, 比对照的高 9.93%。此外, 施用根瘤菌还可提高荷兰豆的抗寒能力, 据观测, 大雪后对照地的荷兰豆植株全部死亡, 但经接种后的样地, 因植株较粗壮, 抗寒能力较强, 仍有一半以上存活。

大田推广应用效果 从 1991—1994 年, 我们利用该菌株培养生产了大田生产用的菌剂, 先后在本省新丰、阳山、廉江、信宜及江西大余、信丰、遂川等地荷兰豆种植区进行大面积的推广使用, 面积达三千多公顷; 从田间观测来看, 该菌剂在我省不同类型土壤中均能与荷兰豆共生形成有效根瘤, 结瘤率在 90% 以上。信宜县是推广应用最成功的一个点, 使用面积占全县种植面积的 80% 以上; 我们对信宜县钱排镇 15 个管理区的使用效果作了较全面的调查和产量统计(表 6)。

表 5 荷兰豆根瘤菌剂大田试验结果

Table 5 Pod yield of different varieties of *Pisum sativum* inoculated with nitragin of nodule bacteria in experiment fields

试验区 Site	品种 Plant variety	处理 Treatment	总产量 Pod yield (kg hm ⁻²)	增产率 Yield increase (%)	一级品率 Products of quality (%)
钱新 *	台湾11号	对照 (U)	3616.5		74.0
		种子拌菌 (I)	4285.5	18.50	81.0
钱上	饶平二花	对照 (U)	7221.0		75.0
		种子拌菌 (I)	8857.5	22.66	84.0
合水 *	台湾11号	对照 (U)	4080.0		67.5
		种子拌菌 (I)	4482.0	9.83	82.4
合水 *	饶平二花	对照 (U)	3412.5		68.5
		种子拌菌 (I)	3907.5	14.50	77.3
平均 Mean		对照 (U)	4582.5		71.3
		拌菌 (I)	5383.5	16.37	81.2

* 该试验地由于没有使用育苗袋育苗, 比钱上试验地迟 25 d 种植, 在盛荚期遇上大雪严寒引至严重减产。Pod yield was markedly decreased due to chilling injury at podding stage. I=Seed inoculated; U=Uninoculated

表 6 荷兰豆大田使用根瘤菌剂结果统计表

Table 6 Pod yield increase of *Pisum sativum* inoculated with nitragin of nodule bacteria at different village sites in the autumn of 1993

管理区 Site	使用菌剂 With nitragin		不使用菌剂 Without nitragin		增产率 Yield increase (%)
	面积 Area (hm ²)	平均产量 Av. yield (kg hm ⁻²)	面积 Area (hm ²)	平均产量 Av. yield (kg hm ⁻²)	
山口	10.67	1904.4	3.33	1656.0	15.0
龙湾	9.33	2378.4	2.00	2095.5	13.5
达垌	6.00	1480.5	2.00	1410.0	5.0
白乌	5.93	3215.1	1.33	2764.5	16.3
双合	2.67	1744.7	0.67	1605.0	8.7
钱上	6.00	2170.0	0.67	1951.5	11.2
钱排	5.67	1932.8	1.00	1747.0	10.5
钱新	8.67	2638.2	3.33	2209.5	19.4
西垌	5.07	1265.9	0.93	1203.8	5.1
梭垌	0.47	1094.6	0.13	1570.5	7.9
北内	4.73	1337.3	0.60	1261.5	6.0
竹云	4.60	1969.4	0.73	1750.5	12.5
响水	0.93	2373.5	0.13	1984.5	19.6
云开	2.33	4166.6	0.33	3376.5	23.4
合计 Total	74.33		17.67		
平均 Mean		2150.7		1878.0	14.5

1993 年秋植

表 6 表明的荷兰豆单位面积产量并不高, 这是因为在统计时将部分失收的面积也计算在内。使用根瘤菌剂秋植荷兰豆平均

增产 272.2 kg hm², 增收约 1088 元; 而根瘤菌剂的成本仅 30 元, 投入产出比为 1:36。如果将因使用根瘤菌剂而减少的氮肥施用量计算在内, 种植荷兰豆总体的投入也将减少, 效果更明显。

3 小结

本研究从本省几个荷兰豆种植区采集分离筛选出来的一株根瘤菌株, 经北京农业大学生物学院鉴定, 认为是 *Rhizobium* 的未知种, 分类位置尚不能确定。

本菌株适合于纯培养, 用改良的 YMA 培养基便可在液或固态中生长良好; 其生长对 pH、温度、通气量要求不严; 对碳、氮源的利用较广, 是一株很适合生产用的根瘤菌株。盆栽及大田试验表明, 该菌株能适应本省的不同类型的土壤环境, 与荷兰豆中的饶平二花品种、台中 11 号等能结出有效根瘤, 盆栽试验结瘤率达到 100%, 田间条件下在 90% 以上; 接种该菌株, 可使荷兰豆植株较高大粗壮、分枝多、有效花多、结荚数增加、产品的质量提高, 大田应用的增产率可达 14%, 产品一级率可提高 10% 左右; 此外, 大田试验结果表明, 接种根瘤菌可使植株较粗壮, 增强了荷兰豆植株的抗寒能力。施用本菌剂, 可以减少氮肥的施用量, 降低生产成本, 提高经济效益。

参考文献

- 1 土壤微生物研究会编. 土壤微生物实验法. 北京: 科学出版社, 1977
- 2 美国热带豆科作物固氮课题计划组. 豆科植物根瘤剂及其利用. 中国农业科技出版社, 1988
- 3 I. 斯普朗特. 刘永定译. 固氮生物生物学. 中国农业出版社, 1985