

一株大豆根系来源的不同类型土著 *B. japonicum* 菌株的共生特性

卜常松 江木兰 胡小加 张学江*

(中国农业科学院油料作物研究所 武汉 430062)

摘 要

本文对未接种的大豆单株根系来源的不同类型 *B. japonicum* 菌株共生效率进行了评价。结果表明,供试 12 个菌株与 6 个大豆品种都形成有效共生,但不同菌株、品种和菌株—品种组合间均存在极显著($P < 0.01$)差异,表现共生亲和的多样性。菌株结瘤竞争力越强,其共生固氮效率越高。讨论了这些来自同一大豆植株根系的不同菌株类型共生效率的意义,指出大多数 W 型菌落、非 LL19 血清族、II 型 DNA 杂交谱和 R 型脂肪酸组成的菌株的共生效率均优于相应的 M 型、LL19 血清族、I 型和 D 型菌株。

关键词 单株大豆;土著慢生根瘤菌类型;共生特性

土著大豆根瘤菌是我国在生产上应用根瘤菌接种以提高大豆产量的一个限制因子。因此,人们重视研究大豆—根瘤菌共生特性^[1-5]。但是,单一大豆植株根系来源的不同土著 *B. japonicum* 菌株类型的共生特性方面研究尚无报道。本文从这样的小样本范围内阐明大豆品种—菌株的结瘤、固氮差异,讨论其不同菌株类型的共生特性的意义,这对深入研究我国大豆根瘤菌资源的生物多样性与利用具有参考价值。

1 材料和方法

1.1 菌株

供试 12 个菌株列于表 1,由本实验室提供。系从未人工接种的大豆品种中豆 19 一株根瘤中分离、鉴定的不同类型土著大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)^[6]。

1.2 品种

矮脚早、泰兴黑、猴子毛、中豆 19、秋豆 1 号和 6207 共 6 个大豆品种均由本所大豆研究室提供。

1.3 共生特性鉴定

一支 YMA(酵母粉甘露醇琼脂培养基)斜面试管 28℃ 生长 9 天的菌株,稀释成菌悬液接种大豆,于网室水培法^[7]盆栽鉴定品种—菌株共生特性。

1.3.1 结瘤与固氮

表 1 供试菌株和类型

菌 株	类 型*			
	菌落类型	血清族	DNA 杂交谱	脂肪酸组成
SZ-23S	W	LL19 ⁻	II	R
8S	W	LL19 ⁻	II	R
21S(21S 血清型)	W	LL19 ⁻	II	R
12S(12S 血清型)	M	LL19 ⁺	II	D
20S	M	LL19 ⁺	II	R
13S(13S 血清型)	M	LL19 ⁻	II	D
10S	W	LL19 ⁺	I	R
22S	M	LL19 ⁺	I	D
19S(19S 血清型)	M	LL19 ⁺	I	D
11S	M	LL19 ⁺	II	D
9S	M	LL19 ⁺	I	D
6S	M	LL19 ⁺	I	D

* W-菌落稀薄, M-菌落粘稠; LL19⁻-非 LL19 血清族, LL19⁺-LL19 血清族; II-6.4Kb 杂交节, I-9.6Kb 杂交节; R-细胞脂肪酸主要成分分析双相图相近的菌株, D-细胞脂肪酸主要成分分析双相图疏远的菌株。

设 *B. japonicum* 菌株 12 株, 分别接种 6 个不同品种, 并设不接种对照, 共 78 个处理, 4 次重复, 随机区组设计。大豆生长 40 天后收获, 称取烘干地上部植株干重; 同时, 还称取其中用已知血清型的 4 个菌株(表 1)接种的大豆根瘤干重, 用文献[9]方法测定植株全氮和植株酰脲含量。固氮作用计算:

固氮值(mg/株) = [接种植株全氮(%) × 接种植株干重(g/株) - 对照植株全氮(%) × 对照植株干重(g/株)] × 1000

酰脲值(mg/株) = 接种干重(g/株) ÷ 称样 0.5g × 定溶 50ml ÷ 取样 0.2ml × 仪器读数(nmole) × 酰脲分子量 158(mg/nmole)

酰脲差值(mg/株) = 接种植株酰脲值 - 对照植株酰脲值

1.3.2 竞争力与固氮

收获上述设计的已知血清型的 4 个菌株分别接种、及其等量混合后接种原寄主品种中豆 19 根系根瘤各 50 个, 共 250 个根瘤。取每个根瘤压碎汁(约 5ml/根瘤)与该 4 个菌株相对应的抗血清反应, 用 ELISA 法^[8]测定各接种菌株的回收率, 比较它们的结瘤竞争力和固氮作用。

2 结果与分析

2.1 不同菌株、品种和菌株-品种组合的共生特性

不同来源的菌株与不同品种的共生特性有着明显差异^[3]。本实验用同一根系来源的 *B. japonicum* 菌株接种不同品种, 结果列于表 2。

从表 2 看, 根瘤干重、地上部植株干重、固定氮和酰脲差值共 4 个参数测定结果, 证明供试同一起来源的 4 个血清型菌株与不同品种的共生特性, 也有明显差异。其中, 在供试的 6 个品种中, 菌株 SZ1-21S 与 5 个品种的共生特性均表现较强的结瘤、固氮能力, 但与另一品种秋豆

1 号的共生特性则表现较差。这是因为品种不同和菌株—品种组合不同的原因。

表 2 已知血清型菌株接种大豆的结瘤、固氮作用及相关分析

品种	菌株	根瘤干重 (mg/株)	地上部干重 (g/株)	固定氮 (mg/株)	酰脲差值 (mg/株)
矮脚早	SZ1-12S	0.13	1.24	4.3	0.76
	13S	0.11	0.91	4.5	0.62
	19S	0.05	0.52	3.2	0.52
	21S	0.15	1.27	6.8	0.90
泰兴黑	SZ1-12S	0.18	1.61	8.2	1.50
	13S	0.22	1.58	12.7	1.60
	19S	0.21	2.12	21.1	2.46
	21S	0.34	2.43	38.9	3.38
猴子毛	SZ1-12S	0.18	2.35	50.8	3.30
	13S	0.28	2.41	53.4	5.40
	19S	0.18	2.35	46.8	7.28
	21S	0.24	2.74	60.1	11.60
中豆 19	SZ1-12S	0.31	1.82	45.1	20.62
	13S	0.20	1.31	17.2	3.42
	19S	0.16	1.35	18.3	5.40
	21S	0.20	1.50	35.6	12.41
秋豆 1 号	SZ1-12S	0.28	2.33	37.9	4.10
	13S	0.31	2.51	53.9	12.60
	19S	0.18	1.96	31.7	2.88
	21S	0.21	2.01	30.8	2.02
6207	SZ1-12S	0.18	1.22	15.3	1.06
	13S	0.12	1.05	5.3	0.56
	19S	0.15	1.16	12.5	0.86
	21S	0.22	1.45	27.5	2.74
根瘤干重		1			
地上部干重		0.7717**	1		
固定氮		0.7007**	0.8823**	1	
酰脲差值		0.6472**	0.6870**	0.8361**	1

相关分析证明,根瘤干重、植株干重、固定氮和酰脲差值之间均呈极显著($P<0.01$)正相关关系。为叙述简便,表 3 以植株干重作为鉴定不同菌株、品种和菌株—品种组合的共生特性的参数。结果表明:不同品种、菌株和品种—菌株组合极显著($P<0.01$)地影响其共生效应。其中,在供试 6 个品种中,猴子毛和秋豆 1 号的地上植株干重最大;在供试 12 个菌株中,均比不接种对照极显著地增加地上植株干重(平均值),以 SZ1-23S 表现最好,其次是 SZ1-8S 和 SZ1-21S;在供试 72 对品种—菌株组合中,菌株 SZ1-23S、SZ1-21S 分别与品种秋豆 1 号、猴子毛表现为最佳组合,品种×菌株互作因子形成品种—菌株组合的共生亲和多样性。

2.2 竞争力与固氮作用

不同来源的菌株之间有明显的结瘤竞争力差异^[2]。本实验用同一根系来源的 *B. japon*

nicum 4 个已知血清型菌株接种原寄主品种中豆 19, 接种回收率的测定结果列表 4。

表 3 *B. japonicum* (12 个菌株) 接种大豆 (6 个品种) 的共生效应
(地上植株干重 g/株)

菌株	品 种						平均
	矮脚早	泰兴黑	猴手毛	中豆 19	秋豆 1 号	6207	
SZ1-23S	1.16	1.97	1.95	1.77	3.12	1.89	1.98
8S	1.44	2.07	2.47	2.06	2.04	1.34	1.90
21S	1.27	2.43	2.74	1.50	2.01	1.45	1.90
12S	1.24	1.61	2.35	1.82	2.33	1.22	1.76
20S	0.62	1.50	2.33	1.26	2.64	1.95	1.72
13S	0.91	1.58	2.41	1.31	2.51	1.05	1.63
10S	0.61	2.02	2.28	1.93	1.87	1.18	1.60
22S	0.87	1.71	2.29	1.67	2.15	1.14	1.59
19S	0.52	2.12	2.35	1.35	1.96	1.16	1.57
11S	0.61	1.61	1.97	1.70	2.10	1.13	1.50
9S	1.15	1.84	1.62	1.50	1.62	1.05	1.46
6S	1.17	1.67	1.76	1.48	1.72	0.91	1.45
CK	0.25	1.07	1.18	0.83	1.36	0.88	1.06
平均	0.91	1.78	2.13	1.55	2.11	1.26	
品种间	$F_{0.01} = 100.00^{**}$						$LSD_{0.01} = 0.18$
菌株间	$F_{0.01} = 11.67^{**}$						$LSD_{0.01} = 0.26$
品种 × 菌株	$F_{0.01} = 3.33^{**}$						$LSD_{0.01} = 0.63$

表 4 4 个已知血清型菌株的结瘤回收率

菌株	供试根瘤数	抗血清反应根瘤数/回收率 (%)			
		SZ1-12S	SZ1-13S	SZ1-19S	SZ1-21S
SZ1-12S	50	50/100	0/0	0/0	0/0
SZ1-13S	50	0/0	50/100	0/0	0/0
SZ1-19S	50	0/0	0/0	50/100	0/0
SZ1-21S	50	0/0	0/0	0/0	50/100
4MS*	50	22/44	6/12	6/12	12/24

* 4 个菌株等量混合

从表 4 看出, 供试 4 个已知血清型菌株的结瘤竞争力差异为 $SZ1-12S(44\%) > SZ1-21S(24\%) > SZ1-13S = SZ1-19S(12\%)$ 。

将此 4 个 *B. japonicum* 菌株在中豆 19 上的结瘤竞争力 (表 4) 与地上植株干重、固定氮及酰胺差值等固氮参数 (表 2) 作比较, 两者之间呈现一致趋势, 即菌株结瘤竞争力越强, 其共生固氮效率越高。这与文献报道的研究是一致的^[2,10]。

3 讨论

既然同一大豆根系来源的 *B. japonicum* 菌株类型有不同的共生特性,那么这些不同菌株类型与共生效率之间关系如何?

根据本文试验数据,比较不同类型菌株的共生特性(表 5)看出,菌落类型、血清族、DNA 杂交谱和脂肪酸组成与接种后地上植株干重之间均呈相关关系(分别为 $r = 0.7108, P < 0.01; r = 0.7416, P < 0.01; r = 0.6748, P < 0.05; r = 0.7271, P < 0.01$),证明 W 型菌落、非 LL19 血清族、II 型 DNA 杂交谱和 R 型脂肪酸组成的大多数菌株共生效率均优于相应的 M 型、LL19 血清族、I 型和 D 型菌株。

Fuhrman 报道^[11]W 型菌落的菌株比 M 型菌株共生效率低,与本文结果相反。Sadowsky 等人^[12]用 P^{MJS12} 探针已成功地预测 123 血清组菌株的结瘤限制性,本文亦用此

探针杂交结果未发现不是 123 血清型菌株的限制结瘤。诚然,土壤中优势土著菌株并非就是最好的。我们的研究表明^[6],从一株大豆根系来源的土著 *B. japonicum* 菌株中,LL19 血清族是一类占优势的菌株,但本研究中,其共生有效性却低于非 LL19 血清族菌株。菌株脂肪酸主要成分的不同引起其共生效率的明显差异,如 R 型优于 D 型(表 5),这还是本文第一次提出。不同菌株类型与共生固氮效率的关系,尚需进一步研究和验证。如果获得与共生特性有关的标记(包括大、小共生体两方面),则对认识共生固氮遗传、菌株—品种选择、鉴定具有重要意义。

表 5 不同菌株类型的共生特性
(地上植株干重 g/株)

菌株类型	供试菌株数	共生特性	t 测试
菌落类型			3.25**
W	4	1.85	
M	8	1.59	
血清族			3.37**
LL19 ⁻	4	1.85	
LL19 ⁺	8	1.58	
NDA 杂交谱			3.00**
II	7	1.77	
I	5	1.53	
脂肪酸组成			3.29**
R	5	1.82	
D	7	1.57	

参 考 文 献

- [1] 江木兰等,中国土壤中大豆根瘤菌优势类群以及与寄主共生关系的多样性,植物营养和肥科学报,1995,1(2):65-70。
- [2] 张学江等,广谱高效的大豆根瘤菌 113-2,中国油料,1986,27(1):62-67。
- [3] 张学江等,大豆——根瘤菌混交性与亲和性,大豆科学,1987,6(1):63-69。
- [4] 张学江等,大豆共生固氮遗传和育种,见:李阜楙等主编,生命科学和土壤学中几个领域的研究进展,农业出版社,1993,160-165。
- [5] 樊惠等,大豆根瘤菌优良菌株与春大豆品种的亲和性研究,大豆科学,1992,11(2):139-145。
- [6] 卜常松等,单株根系来源的土著大豆慢生根瘤菌多样性,生物多样性,1996,4(4):201-206。
- [7] 周平贞等,豆科植物结瘤试验——水培法介绍,中国油料,1979,19(2):60-63。
- [8] 姜荣文等,应用 ELISA 鉴定根瘤菌血清型和测定大田接种回收率,微生物学通报,1989,16(6):322-325。
- [9] Peoples M.B. et al, Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated Legumes in the field. Tomworth, NSW, Australia. 1989, p.1-89。
- [10] Keyser H.H. et al, Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53:2631-2635。
- [11] Fuhrman J. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56:224-229。
- [12] Sadowsky M.J. et al, Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56:1768-1774。