

豆科树种根瘤菌与四种豆科植物的接种试验*

韩素芬 陈景荣 谢文娟

摘要 从 51 种豆科树种(含羞草亚科 5 属,蝶形花亚科 18 属)根瘤中分离获得的 66 个菌株与 4 种豆科植物(刺槐、合欢、大豆、豌豆)进行接种试验,幼苗经 50 d 培养,刺槐、合欢、大豆、豌豆的结瘤率分别为 100%、87.9%、69.7%、25.8%。其中有 12 个菌株可同时在这 4 种豆科植物上结瘤,29 个菌株可同时在刺槐、合欢和大豆上结瘤,4 个可同时在刺槐、合欢和豌豆上结瘤,说明豆科树种根瘤菌具有较广泛的共生寄主范围。各菌株与不同豆科植物的亲合力、结瘤特性和固氮能力有较明显差异。观察还进一步证实根瘤的形状和颜色是由寄主植物决定的。

关键词 豆科树种根瘤菌、豆科植物、接种试验

自 1888 年 Beijerinck 分离获得了第一个根瘤菌纯培养以来,根瘤菌与豆科(Leguminosae)植物共生体系一直是生物固氮研究中最活跃的领域。在这共生固氮体系中,豆科植物可为根瘤菌提供能源和固氮酶适合的环境,是自然界生物固氮最有效的形式¹⁾。根据国际农业资料年鉴(1974 年)记载,根瘤菌与豆科植物共生固氮量每年可达 5 500 万 t,约占整个生物固氮量的一半,在生物固氮中占有重要的地位。一百多年来,在农牧业生产中,人们采用两种途径,一是扩大豆科作物、牧草的种植面积,通过自然结瘤固氮;二是筛选优良的根瘤菌株,采用人工接种来提高结瘤固氮能力。这两种方式,其经济效益和生态效益都十分明显,尤其第二种方法,更为显著¹⁾。但对根瘤菌与豆科树种共生体系研究甚少,直到最近 10 多年才开始引起人们的关注,目前在进行豆科树种固氮资源调查,分离和收集豆科树种根瘤菌株,探索为什么有些豆科树种不结瘤的原因^{1,2)}。对于其它方面还很少研究,根瘤菌更少用于林业生产中。本试验采用 23 属 51 种豆科树种根瘤中分离到的 66 个菌株与 4 种豆科植物(刺槐、合欢、大豆、豌豆)进行接种试验,研究豆科树种根瘤菌的共生寄主范围,并为扩大豆科树种根瘤菌的应用范围提供依据。

1 材料与方方法

1.1 材料

1.1.1 种子 选刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)、合欢(*Albizia julibrissin* Durazz.)、大豆(*Glycine max* L.)、豌豆(*Pisum sativum* L.)饱满种子。

1996—07—09 收稿。

韩素芬副教授,陈景荣,谢文娟(南京林业大学 南京 210037)。

* 本文属 1992 年国家自然科学基金资助项目“固氮豆科树种和豆科树种根瘤菌资源研究”的部分内容。

1) 周湘泉. 农业微生物研究论文集(1980~1990). 南京农业大学, 1991, 63~95.

1. 1. 2 根瘤菌 从各豆科树种根瘤中分离获得的 66 个纯培养根瘤菌菌株^[3]。
1. 1. 3 培养瓶 用 84 液消毒, 自来水冲洗后晾干, 加入用蒸馏水配制 NF 无氮培养液, 牛皮纸封口后备用。
1. 2 方法
1. 2. 1 根瘤菌培养 将冰箱中保存的各菌株转移到新配制的 YEM 斜面培养基, 28℃ 恒温培养待用。
1. 2. 2 无菌苗培养 按韩素芬、李东方法进行^[4]。种子用 0. 1% 升汞表面灭菌(刺槐、合欢为 10 min, 大豆、豌豆为 3 min)。
1. 2. 3 接菌培养 当胚根长 3~5 cm 时, 用各根瘤菌悬液浸根 5 h, 移苗于培养瓶 NF 液中, 置于 25℃ 左右培养室, 每日光照 12 h, 根部保持在黑暗环境, 培养 50 d 左右, 观察根部的结瘤情况。

2 结果与分析

2. 1 接种豆科植物的结瘤情况

66 个根瘤菌株与 4 种豆科植物接种结瘤情况见表 1。66 个菌株能在刺槐、合欢、大豆、豌豆根系结瘤的菌株数分别为 66、58、46、17 个, 结瘤率分别为 100%、87. 9%、69. 7%、25. 8%。其中 12 个菌株可同时在这 4 种植物上结瘤, 它们具有较广泛的共生寄主范围。而 92-72-2, 93-140, 92-1-6 这 3 个菌株仅在刺槐根系结瘤, 表明它们的寄主范围相对较窄。同种豆科树种从不同地区根瘤中分离到的菌株, 其共生寄主也存在差异, 在南京刺槐上分离的根瘤菌 87-1-1 菌株在这 4 种接种植物上均可结瘤, 而从徐州刺槐上分离的 92-1-6 菌株只在刺槐上结瘤, 截叶胡枝子、马棘、葛藤不同来源的根瘤菌株也有这种现象。从同一根瘤中分离到的生长快慢不同的菌株, 其共生寄主有的相同, 有的不相同。92-58-1(快生), 92-58-2(慢生) 均可在刺槐、合欢、大豆上结瘤; 92-64-1(快生)、92-64-2(慢生) 可在刺槐和合欢上结瘤。而 92-78-1(快生) 在刺槐、合欢、大豆上结瘤; 92-78-2(慢生) 只在刺槐和合欢上结瘤。这些都说明各豆科树种根瘤菌株与不同豆科植物的亲合力存在差异, 表现结瘤能力的多样性。

表 1 各根瘤菌株与 4 种豆科植物接种结瘤情况

寄主植物	根瘤菌			接种植物			
	采集地	菌株号	生长速度	刺槐	合欢	大豆	豌豆
含羞草亚科 Mimosoideae							
金合欢属 <i>Acacia</i>							
台湾相思 <i>A. richii</i> A. Gray	南京	89-22	中等	+++	+++	++	+
黑荆树 <i>A. mearnsii</i> Willd	南京	89-36	慢生	+++	+	++	—
金合欢 <i>A. farnesiana</i> (L.) Willd	福州	92-124	快生	+++	+++	—	—
娟毛相思 <i>A. holosericea</i>	南京	89-31	慢生	+++	—	+	—
银合欢属 <i>Leucaena</i>							
银合欢 <i>L. leucocephala</i> (Lam.) De Wit	南京	84-23	中等	+++	+	+	+++
雨树属 <i>Samanea</i>							
雨树 <i>S. saman</i> (Jacq.) Merr.	南京	84-14	慢生	+++	+++	+	—
合欢属 <i>Albizia</i>							
红荚合欢 <i>A. procera</i> (Roxb.) Benth.	南京	84-21	慢生	+++	+++	+	+++
华楹 <i>A. chinensis</i> (Osbeck) Merr.	南京	84-5	慢生	+++	+	+++	—

(续表)

寄主植物	根瘤菌			接种植物			
	采集地	菌株号	生长速度	刺槐	合欢	大豆	豌豆
合欢 <i>A. julibrissin</i> Durazz.	南京	84-18	慢生	+++	++	+	+++
阔叶合欢 <i>A. lebeck</i> (L.) Benth	厦门	92-123	中等	++	+++	-	-
<i>Serialbizzia</i>							
阿哥楹 <i>S. acle</i>	南京	89-37	慢生	+++	+	+	-
蝶形花亚科 Papilionoideae							
红豆树属 <i>Ormosia</i>							
木荚红豆 <i>O. xylocarpa</i> Chun ex L.	福建	92-35	中等	+++	+++	+	-
花榈木 <i>O. henryi</i> Prain	黄山	93-149	快生	+++	+	+	-
槐属 <i>Sophora</i>							
马蹄针 <i>S. davidii</i> (Franch) Pavilini	南京	87-2	中等	+++	+++	-	-
苦参 <i>S. flavescens</i> Ait.	南京	92-82	中等	+++	+	-	-
马鞍树属 <i>Maackia</i>							
毛叶怀槐 <i>M. amurensis</i> Rupr. et Maxim.	南京	92-73	快生	+++	+++	+	-
刺槐属 <i>Robinia</i>							
刺槐 <i>R. pseudoacacia</i> L.	南京	87-1-1	中等	+++	++	+	+++
	射阳	92-1-4	中等	+++	-	++	-
	徐州	92-1-6	中等	+++	-	-	-
	定陶	92-1-8	中等	+++	+++	-	+
	青岛	92-1-11	中等	+++	+++	-	-
	洛阳	92-1-13	中等	+++	+++	-	-
	黄山林校	92-1-14	中等	+	+++	+	-
无刺槐 <i>R. pseudoacacia</i> f. <i>inermis</i> (Mirbel) Rehd.	泰安	92-92	中等	+++	+++	+++	+
红花刺槐 <i>R. pseudoacacia</i> f. <i>decaisneana</i>	南京	89-50	中等	+++	++	+++	-
崖豆藤属 <i>Millettia</i>							
香花崖豆藤 <i>M. dielsiana</i> Harms ex Diels.	祁门	93-140	快生	++	-	-	-
鸡血藤 <i>M. reticulata</i> Benth.	福建	92-112	慢生	+++	+++	++	-
紫藤属 <i>Wisteria</i>							
紫藤 <i>W. sinensis</i> (Sims) Sweet	南京	84-8	中等	+++	+++	-	+
鱼藤属 <i>Derris</i>							
边荚鱼藤 <i>D. marginata</i> (Roxb.) Benth.	福建	92-111-1	慢生	+++	+++	+	-
黄檀属 <i>Dalbergia</i>							
降香黄檀 <i>D. odorifera</i> T. Chen	南京	87-11	中等	+	+	-	-
黄檀 <i>D. hupeana</i> Hance	南京	92-46	慢生	+++	+++	+	-
藤黄檀 <i>D. hance</i> Benth	福建	92-113	慢生	+++	+++	++	+++
槐蓝属 <i>Indigofera</i>							
华东木蓝 <i>I. fortunei</i> Craib	南京	92-58-1	快生	+++	+	+	-
	南京	92-58-2	慢生	+++	+++	+	-
马棘 <i>I. pseudotinctoria</i> Matsum.	祁门	93-143	中等	+++	+++	++	+++
	黄山	93-148	中等	+++	+++	-	-
	黄山	93-158	中等	+++	+++	+	+++
	黄山	93-154	中等	+++	+++	++	-
庭藤 <i>I. decora</i> Lindl.							
锦鸡儿属 <i>Caragana</i>							
黄刺条 <i>C. frutex</i> (Linn.) K. Koch	青岛	92-101	快生	+++	-	+	-
红花锦鸡儿 <i>C. rosea</i> Turcz.	泰安	92-93	中等	+++	+++	-	-
锦鸡儿 <i>C. sinica</i> (Buc hoz) Rehd.	南京	92-61	中等	+++	+++	-	+
树锦鸡儿 <i>C. arborescens</i> (Amm.) Lam	哈尔滨	94-161	中等	+++	+	+	-
紫穗槐属 <i>Amorpha</i>							
紫穗槐 <i>A. fruticosa</i> L.	南京	84-17	中等	+++	+++	+	-

(续表)

寄主植物	根瘤菌			接种植物			
	采集地	菌株号	生长速度	刺槐	合欢	大豆	豌豆
木豆属 <i>Cajanus</i>							
木豆 <i>C. cajan</i> (L.) Millsp.	南京	93-131	慢生	+++	++	+++	-
葛藤属 <i>Pueraria</i>							
葛藤 <i>P. lobata</i> (Willd.) Ohwi	青岛	92-99	慢生	+++	+	+++	-
	祁门	93-142	中等	+++	-	+++	+
越南葛藤 <i>P. montana</i> (Lour.) Merr.	福建	92-108	慢生	+++	-	++	+
刺桐属 <i>Erythrina</i>							
刺桐 <i>E. orientalis</i> (L.) Murr.	福州	92-115-1	慢生	+++	+++	+	-
油麻藤属 <i>Mucuna</i>							
常春油麻藤 <i>M. sempervirens</i> Hemsl.	福州	92-116	中等	+++	+++	-	+++
山蚂蝗属 <i>Desmodium</i>							
小槐花 <i>D. caudatum</i> (Thunb.) DC.	南京	92-56	慢生	+++	+++	++	+++
山蚂蝗 <i>D. racemosum</i> (Thunb.) DC.	南京	92-65	慢生	+++	+	+	-
假地豆 <i>D. heterocarpum</i> (L.) DC.	福建	92-114	中等	+++	+++	+	-
铁马鞭 <i>L. pilosa</i> (Thunb.) Sieb. et Zucc	南京	92-78-1	快生	+++	+++	+	-
	南京	92-78-2	慢生	+++	+	-	-
	祁门	93-144	中等	+++	+++	+	-
胡枝子属 <i>Lespedeza</i>							
胡枝子 <i>L. bicolor</i> Tarcz.	南京	92-72	慢生	+++	++	+	-
	泰安	92-90	中等	+++	++	+	-
美丽胡枝子 <i>L. formosa</i> (Vog.) Koehne	南京	92-63	中等	+++	+++	+	-
截叶胡枝子 <i>L. cuneata</i> (Dum. - Cours) G. Don	南京	92-64-1	中等	+++	+++	-	-
	南京	92-64-2	慢生	+++	+++	-	-
	青岛	92-104	慢生	+++	+++	+	-
细梗胡枝子 <i>L. virgata</i> (Thunb.) DC.	南京	92-76	慢生	+++	++	++	-
阴山胡枝子 <i>L. inschonica</i> (Maxim.) Schindl.	南京	92-77-2	中等	+++	-	-	-
多花胡枝子 <i>L. floribunda</i> Bge.	青岛	92-97	慢生	+++	+++	-	-
绿叶胡枝子 <i>L. buergeri</i> Miq.	黄山	93-159	慢生	+++	+++	+	+
杭子梢属 <i>Campylotropis</i>							
杭子梢 <i>C. macrocarpa</i> (Bge.) Rehd.	南京	92-59	中等	+++	+++	+	+++

注: + 示株平均根瘤数少于 5 个; ++ 示株平均根瘤数 5~10 个; +++ 示株平均根瘤数多于 10 个; - 示不结瘤。第一个单菌落出现时间 4 d 以内为快生, 5~6 d 为中等; 7 d 以上为慢生。

2.2 接种豆科植物的生长状况

经根瘤菌接种的豆科植物在无氮培养液经一段时间(约一个月左右)培养后, 苗的生长出现差异(见表 2)。凡未结瘤的植株因缺氮逐渐变黄, 直至最终枯萎。结瘤的植株又可出现三种情况, 部分菌株接种到植物根系后, 虽可形成根瘤, 由于根瘤形成较晚, 数量少, 或数量多瘤很小, 多数着生在侧根上, 由于固氮量少或较晚, 植物也因缺氮逐渐发黄最终枯萎。多数菌株接种植物后可结瘤固氮, 由于结瘤或固氮时间较晚, 在植物生长中, 有一时期明显因缺氮而发黄, 而后由于根瘤的固氮作用又返青。有少数菌株在接种植物上形成根瘤较早, 数量较多或根瘤较大, 多数根瘤着生在主根和第一、二级侧根上, 植物生长良好, 始终保持绿色。89-37, 92-58-1 菌株在大豆根系虽结瘤不多, 但根瘤大, 生长也一直保持良好。这少数菌株比较优良, 可用作进一步筛选优良菌株的材料。

观察还表明 66 个菌株在刺槐根上形成根瘤开始为球形, 经生长后多数为黄褐色棒状; 58

表 2 不同菌株接种后的植物生长状况

寄主 植物	生 长 情 况			根 瘤 形 态
	绿 黄 枯萎	始 终 绿 色	绿 黄 绿	
刺槐	92-123、92-72、92-1-6、	84-21、84-18、93-149、87-	除以上外的其余菌株	开始形成根瘤为球形,逐渐生长为棒状,黄褐色
	92-1-13、92-1-14、93-	1-1、92-1-11、93-158、92-		
	140、92-112、87-11、92-	92、92-115-1		
	99、92-65、93-159、92-63、 92-59			
合欢	未结瘤 9 个菌株。89-36、	84-21、92-111-1、92-46、	除以上外的其余菌株	开始形成根瘤为球形,逐渐生长为珊瑚状,白色
	92-82、94-161、92-78-2、	93-148、93-154、92-116、		
	92-90	92-56、92-65、93-144、92- 64-2、92-104、92-97		
大豆	未结瘤菌株 21 个。84- 14、92-73、92-46	89-37、92-1-4、92-58-1、 93-131、92-76	除以上外的其余菌株	根瘤始终为球形,深黄褐色
豌豆	未结瘤菌株 49 个。92-1- 8、92-61	84-23、84-18、92-113、93- 158、92-56	除以上外的其余菌株	根瘤为指状或细棒状,浅黄色

注:表中 92-123 等数码为结瘤的菌株号。

个菌株在合欢上形成的根瘤开始也为球形,而后为白色珊瑚状;在大豆根系上结瘤的 46 个菌株形成的根瘤始终为球形,深黄褐色;在豌豆上结瘤的 17 个菌株形成的根瘤均为浅黄色指状。同一菌株如 89-22 在刺槐、合欢、大豆、豌豆根上的根瘤分别为黄褐色棒状、白色珊瑚状、深黄褐色球形、浅黄色指状。由此可见,不同根瘤菌株在同种植物根系上形成根瘤形态基本相似,而同一菌株在不同的豆科植物根系上形成不同形态的根瘤。这更进一步证实了我们以前认为根瘤的形状和颜色是由寄主植物决定的观点^[5]。

3 小结与讨论

(1) 通过 66 个豆科树种根瘤菌与豆科树种刺槐、合欢以及豆科作物大豆、豌豆的接种试验,其中有 12 个菌株可同时在这 4 种植物上结瘤,有 29 个菌株可同时在刺槐、合欢和大豆上结瘤,4 个菌株可同时在刺槐、合欢和豌豆上结瘤,而且有少数菌株在大豆、豌豆上结瘤和生长都良好。尽管各根瘤菌株与不同的豆科植物的亲合力、结瘤特性和固氮能力存在差异,然而,从总的来看,我们认为豆科树种根瘤菌具有较广泛的共生寄主。根据“互接种族”关系,过去将豆科树种归属豇豆族^[5,6]。本试验已证实它们的共生寄主已超出了豇豆族豆科植物范围,因而它们具有更广的应用前景。

(2) 本试验采用的 66 个豆科树种根瘤菌与刺槐、合欢的结瘤率达到了 100% 和 87.9%,说明这 2 种豆科树种的特异性不强,特别是刺槐,除了可与豆科树种根瘤菌结瘤外,南京农业大学微生物室提供的大豆、三叶草、苜蓿、百脉根瘤菌以及我们在南京土壤分离的豌豆、蚕豆和豇豆根瘤菌也可使刺槐结瘤,因而我们认为刺槐是鉴别根瘤菌较好的寄主植物。

(3) 从 66 个根瘤菌株与 4 种豆科植物接种结瘤观察中, 更确认根瘤的形状和颜色是由寄主的遗传特性确定的。

(4) 在观察中, 我们还发现刺槐根系在形成根瘤过程中有某些根段根毛密集丛生成团, 随后就在根毛丛生处逐渐形成根瘤这种特殊的形态变化。而其它 3 种寄主植物在根瘤形成中, 并无此现象。因此, 刺槐在形成根瘤的过程中, 发生的根系形态变化与根瘤菌侵染、结瘤、固氮之间究竟有什么特殊联系, 还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 周湘泉, 韩素芬. 豆科树种根瘤菌共生体系研究进展. 林业科学, 1989, 25(3): 243 ~ 251.
- 2 韩素芬, 周湘泉. 我国豆科树种结瘤情况. 南京林业大学学报, 1990, (3): 84 ~ 90.
- 3 韩素芬. 固氮豆科树种和豆科树种根瘤菌资源研究. 林业科学, 1996, 32(5): 434 ~ 440.
- 4 韩素芬, 李东. 刺槐根瘤发育过程外部形态和结构的观察. 南京林业大学学报, 1993, (2): 35 ~ 39.
- 5 周湘泉, 韩素芬. 豆科树种根瘤菌共生体系的研究. 结瘤观察、分离、回接和交叉接种. 南京林学院学报, 1984, (2): 32 ~ 42.
- 6 Basak M K, Goyal S K. Studies on tree legumes. Plant and Soil, 1980, 56(1): 33 ~ 39, 39 ~ 51.

Experiment on the Inoculation Test between Rhizobia from Woody Legumes and Four Leguminous species

Han Sufeng Chen Jingrong Xie Wenjuan

Abstract 66 rhizobial strains, isolated from root nodules of 51 species of woody legumes (5 genera in subfamily Mimosoideae and 18 genera in subfamily Papilionoideae) were inoculated with two tree legumes (*Robinia pseudoacacia*, *Albizia julibrissin*) and two herbaceous legumes (*Glycine max*, *Pisum sativum*). 50 days after cultivation of legume seedlings, the nodulation rates of the locust, silk tree, soybean and pea were 100%, 87.9%, 69.7% and 25.8% respectively. Among all the rhizobial strains 12 were nodulated on all of the 4 leguminous species, 29 on locust, silk tree and soybean, and 4 on locust, silk tree and pea simultaneously. It has been shown that the root nodule bacteria of woody legumes have a wide range of hosts, but each rhizobial strain makes a great difference in affinity with different legumes, nodulation characters and nitrogen-fixing capacity. It seems that the host plant usually determines the shape and color of the nodules.

Key words rhizobia from woody legumes, leguminous plant, inoculation test