

豆科植物根瘤菌接种剂 生产与质量控制指南

中欧大豆根瘤菌接种剂研究组



黑龙江科学技术出版社

豆科植物根瘤菌接种剂 生产与质量控制指南

中欧大豆根瘤菌接种剂研究组

黑龙江科学技术出版社

中国·哈尔滨

图书在版编目(CIP)数据

豆科植物根瘤菌接种剂生产与质量控制指南/郭春景
编著. —哈尔滨:黑龙江科学技术出版社, 2006.5
ISBN 7-5388-5132-1

I. 豆... II. 郭... III. ①豆科-根瘤菌剂-生产-指南②豆科-根瘤菌剂-质量控制-指南
IV. TQ446.2-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 057859 号

责任编辑 赵春雁

封面设计 洪 冰

豆科植物根瘤菌接种剂生产与质量控制指南

DOUKEZHIMU GENLIJUN JIEZHONGJI SHENGCHAN YU ZHILIANG KONGZHI ZHINAN
中欧大豆根瘤菌接种剂研究组

出 版 黑龙江科学技术出版社

(150001 哈尔滨市南岗区建设街 41 号)

电话 (0451)53642106 电传 53642143(发行部)

印 刷 哈尔滨市工大节能印刷厂

发 行 黑龙江科学技术出版社

开 本 850×1168 1/32

印 张 6.25

字 数 108 000

版 次 2006 年 8 月第 1 版·2006 年 8 月第 1 次印刷

印 数 1-1 000

书 号 ISBN 7-5388-5132-1/TQ·42

定 价 10.00 元

《豆科植物根瘤菌接种剂生产 与质量控制指南》编委会

Dulce N. Rodriguez – Navarro¹, 杨苏声², 郭春景³, Jose E. Ruiz – Sainz⁴, Francisco Temprano¹, 谷志静², 魏巍², 王磊², James R. Ault⁵, David P. Sumpton⁵, Joao Rodrigues⁵, Jane Thomas – Oates⁵, 周俊初⁶, Ildefonso Bonilla M⁷, Clara L. Diaz⁸, and Herman P. Spaink⁸

1. 西班牙 塞维利亚市 Las Torres y Tomejil 农业研究和训练中心
P. O. Box 41200 – Alcala del Rio
2. 中国 北京市 100094 海淀区圆明园西路 2 号 中国农业大学
生物学院
3. 中国 黑龙江省 哈尔滨市 150001 中山路 204 号 黑龙江绿
丰生物有机肥料公司
4. 西班牙 塞维利亚市 Apdo 1095 – 41080 塞维利亚大学微生物学系
5. 英国 约克市 赫斯林顿 YO10 5DD 约克大学 化学系

6. 中国 武汉市 430070 狮子山街 1 号 华中农业大学
7. 西班牙 马德里市 28049 马德里自治大学 Cantoblanco 校区
科学学院生物系
8. 荷兰 莱登市 Wassenaarseweg 64, 2333AL 莱登大学 生物研
究所

前 言

本指南是欧盟的国际合作发展项目(INCO - DEV)“大豆根瘤菌剂的生产及其在中国持续农业生产中的应用”(ICA4 - CT - 2001 - 10056)的成果之一。这是欧盟连续资助的第二项目,由欧、中双方的大学与研究所共同完成。

在第一项目中,我们分离和研究了大量能在大豆上结瘤的根瘤菌菌株,而且学会如何共同工作和发展友谊。现在这些目标已经成功地实现了。在此期间,欧方研究人员首次与中国从事根瘤菌剂生产的企业技术人员接触,并很快了解到,欧、中双方之间的联系是互惠互利的。中国在传统的大豆栽培方面历史悠久,早在埃及金字塔第一块石料被开凿之前就已开始,而且丰富的大豆栽培经验和专长使中方很有资格参加这个科学对话。但是,正如事前所预料,尽管中国农业大学和华中农业大学的同事尽其所能来缓解语言障碍,但这个问题仍然严重地制约了我们之间的交流。令人遗憾的是,欧方科学家不会讲中文,也无法帮助描述有关根瘤菌与豆科植物共生关系的专有词汇。这些困难通过所有参加者的努力和理解,才得到克服。因此我们认为,编写一本两国语言(英文/中文)指南,或许能帮助本专业领域的其他人员克服交流的困难,并将其纳入连续进行的第二项目的研究任

务中。

在第二项目中,同一个研究组与中、欧双方的相关企业共同完成了快生大豆根瘤菌与大豆共生关系的进一步研究,并由双方的大学与研究所,以及生产根瘤菌剂企业的技术人员共同完成了这本指南的编写。

本指南主要针对中国专门从事根瘤菌剂生产的企业技术人员,目的在于提高他们在基础和应用方面的知识水平,而这些知识是直接或间接与根瘤菌接种剂的生产有关的。我们相信,本指南的部分内容对大学的教学是有益的,而且可以提高那些在毕业后想在本领域工作的人的知识水平。

本指南较少涉及根瘤菌与豆科植物共生的分子生物学机理,而主要集中在生物学方面。我们认为,读者无需经过遗传学、分子生物学、生物化学或分子结构化学的特殊培训就能容易理解。虽然本指南适用于任何根瘤菌与豆科植物的共生,但它侧重于快生或慢生大豆根瘤菌与大豆之间的共生,其中包括这类共生在中国的特殊信息。为了使预期的读者对象容易阅读和接受,我们没有详尽地罗列参考文献。我们相信,查阅指南所列的参考文献,加上国际互联网,足以涵盖本指南的相关领域。

当然,我们缺少编写这本英-中双语指南的经验。需要克服的主要问题与专业知识无关,但涉及双语正文的编辑与写作。我们很想知道,本指南能否得到中国生产根瘤菌接种

剂的企业的好评和接受。如果是这样,参加本项目的研究组之间的进一步合作将使该指南得到进一步完善。

最后,我们要感谢欧盟国际合作发展项目(INCO - DEV)对本项目的资助,使我们确立了欧洲与中国的大学 and 研究所之间富有成果的合作。在本项目合作研究的七年中,始终得到欧盟的支持,而且我们也为能够发展我们自己所特有的、成功的共生关系而感到骄傲。

编 者

序 言

豆科植物能将全球相当比例的氮气(N_2)转化成氨、硝酸盐和有机氮等化合态氮,因而对农业生产和环境具有巨大的潜在效益。这些植物不仅是蛋白质和油料的优良来源,而且由于能与根瘤菌共生,可以通过生物固氮提高植物和土壤的氮素含量。豆科植物共生至少每年能产生 7 千万吨氮,其中约一半来源于寒带和温带地区,而其余来源于热带地区(Brockwell 等,1995)。

根瘤菌目(*Rhizobiales*)包括多种能与植物共生的细菌的属,如根瘤菌属(*Rhizobium*)、中间根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、固氮根瘤菌属(*Azorhizobium*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)和叶瘤杆菌属(*Phyllobacterium*)。前 5 个属能与豆科植物的成员形成根瘤或茎瘤的共生联合体,将大气中的氮固定成氨,供宿主植物利用。根瘤菌虽然是独特的既能异养自生又能在植物根中内生的微生物,但它们在土壤细菌总数中所占的比例相对较小。从数量来看,根瘤菌属和慢生根瘤菌属仅占全部或根圈土壤细菌种群数量的 0.1% ~ 8%,而且,仅占其生物量的 0.01% ~ 0.14%(Brockwell 等,1995)

目 录

序言	(1)
1 氮素循环和生物固氮(BNF)、生物固氮的经济和生态效益	(1)
2 固氮微生物	(6)
3 根瘤菌与豆科植物的共生	(6)
4 结瘤过程	(11)
5 大豆根瘤菌及其在中国的多样性	(14)
6 中国的大豆栽培	(17)
7 接种的有效性	(22)
8 接种剂生产	(25)
8.1 对接种需求的评定	(25)
8.2 商业接种剂的类型	(27)
8.3 接种剂的载体及其灭菌	(29)
8.4 包装	(34)
9 根瘤菌接种剂的质量控制(QC)	(34)
10 菌株筛选	(38)
10.1 从根瘤中分离根瘤菌菌株	(38)
10.2 从根瘤分离物鉴定根瘤菌菌株	(40)
10.2.1 植物试验和共生参数的评价	(40)

10.2.2 用于鉴定根瘤菌菌株的遗传学特征	(42)
11 竞争结瘤与鉴别根瘤菌菌株的方法	(44)
11.1 培养特征	(45)
11.2 标记系统	(46)
12 培养基	(50)
12.1 细菌培养基	(50)
12.2 结瘤试验所用的植物营养溶液	(54)
13 根瘤菌菌种的保存	(56)
14 田间试验	(58)
15 最大概率数(MPN)法估算土著根瘤菌种群	(60)
16 有用的地址	(64)
参考文献	(66)

Index of contents

Introduction	(88)
1 The Nitrogen Cycle and Biological Nitrogen Fixation (BNF)	
Economic and ecological advantages of BNF	(90)
2 Nitrogen – fixing microorganisms	(96)
3 The Rhizobium – legume symbiosis	(98)
4 The nodulation process	(102)
5 Soybean microsymbionts and their diversity in China	(107)
6 Soybean cultivation in China	(110)
7 Effectiveness of inoculation	(118)
8 Inoculant production	(120)
8.1 Assessing the need for inoculation	(120)
8.2 Types of commercial inoculants	(122)
8.3 Inoculant carriers. Sterilization of carriers	(125)
8.4 Packaging	(131)
9 Quality Control (QC) of rhizobial inoculants	(132)
10 Strain Selection	(135)
10.1 Isolation of rhizobial strains from nodules	(136)
10.2 Authentication of nodule isolates as rhizobial strains	(138)

10.2.1	Plant testing and evaluation of symbiotic parameters	(138)
10.2.2	Genetic traits used to identify rhizobial strains	(142)
11	Competition for nodulation. Methods for identifying rhizobial strains	(144)
11.1	Growth characteristics	(145)
11.2	Marker systems	(147)
12	Culture Media	(152)
12.1	Bacterial culture media	(152)
12.2	Plant nutrient solutions for nodulation assays	(157)
13	Preserving rhizobial cultures	(158)
14	Field Experiments	(161)
15	Most Probable Number (MPN) method for estimating the indigenous rhizobia population	(164)
16	Useful addresses	(168)
	References	(170)

1 氮素循环和生物固氮(BNF)、生物固氮的经济和生态效益

在地球上氮的储备极为丰富。已知全世界的总氮量超过 10^{16} 吨,但 94% 的氮存在于大气层(图 1)。氮素循环包括全球表面每年约 3×10^9 吨氮的转化。然而氮的转化(例如固氮)不完全依靠生物固氮。在全球固定的氮素中,生物固氮占 60%,闪电固氮约占 10%(Sprent 和 Sprent,1990)。生物固氮是少数原核微生物所特有的功能,我们把这类微生物统称为固氮生物。固氮生物催化还原大气中的氮气(N_2)生成氨(以铵的形式存在),现在已知能利用铵盐的生物较广泛。除可以直接被微生物和植物直接吸收利用外,还能通过进一步的转化而为动物利用。因此,生物固氮是陆地生态系统和水生生态系统中氮素的重要来源(Arp,2000)。

化肥工业也能提供大量的化学固定态氮。已知全球每年通过合成氨固定的氮约为 9 500 万吨(Socolow,1999)。全球从气态氮固定而生产的化肥产量约占世界上所固定氮素的总供应量的 25%。全球氮肥施用的年增长速度从 1965 年的 2 000 万吨(N)上升为 1979 年的 6 000 万吨(N)。从 1986 年至 1995 年,年增长速度保持在 7 500 ~ 8 500 万吨(N)(国际化肥工业协会, <http://www.fertilizer.org>)。由此可见,无论在发达国家还是在发展中国家,氮肥的施用都是严重的。

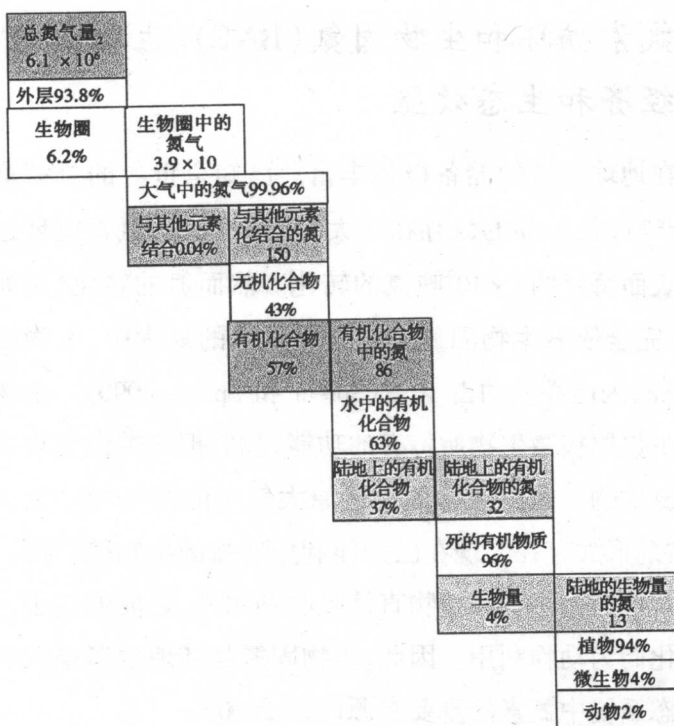


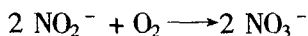
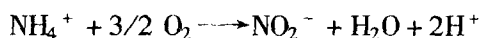
图 1 全球的氮的分布(吨 $\times 10^{10}$)

由于氮的蒸发和反硝化微生物的作用,生物圈会有大量的氮损失。因此,生物固氮是一个重要的生物学过程,它不仅部分地补偿生态系统的氮素损失,而且可以防止氮素的耗尽。固氮(生物固氮和非生物固氮)与其相反过程(反硝化作用和氮挥发)之间的平衡是决定生物圈内可供生物利用的纯氮含量的关键。图 2 显示生物圈的氮素循环过程。

同化型硝酸盐还原 硝酸盐还原酶将硝酸盐还原为氨，并使之结合为生物分子的过程。

反硝化作用 硝酸盐还原为 N_2O 或 N_2 的过程，其产生的化合物通常可挥发到大气中。

有机氮的矿化作用 生物大分子通过降解生成铵盐(氨化作用)，然后再氧化生成硝酸盐(硝化作用)的过程。



硝酸盐异化 硝酸盐通过无氧呼吸作用还原为氨的过程。

硝化作用 氨氧化为亚硝酸盐或硝酸盐的过程。氨是从死的有机物质或生物的分泌物降解产生的。

固氮作用 通过固氮酶系统还原大气中的氮(N_2)生成 NH_4^+ 的过程。

为植物提供氮素的常规方法包括：(i)在土壤施入氮肥；(ii)在种子上接种(包裹)固氮细菌。

日益增长的化肥需求已经被联合国粮农组织(FAO)列入关于全世界作物产量和地区的预报中(“2015 年和 2030 年的化肥需求”，粮农组织，罗马，2000)。为了达到粮农组织规划的产量，全球每年化肥的消耗将从目前的 13 800 万吨($\text{N} + \text{P}_2\text{O}_5 + \text{K}_2\text{O}$)增加到 2030 年的 16 700 万吨和 19 900 万吨之间。这意味着化肥消耗的年增长率为每年 0.7% ~ 1.3%，比 1970 年至 2000 年的每年 2.3% 平均增长率要有所下降。