

缺磷胁迫对大豆根瘤生长和结瘤固氮的影响

王树起^{1,2}, 韩晓增¹, 乔云发¹, 严 君¹, 李晓慧¹

(1. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 中国科学院 沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要:采用砂培培养方法研究了缺磷胁迫对大豆根瘤生长和结瘤固氮的影响。结果表明:缺磷胁迫抑制了大豆根瘤的生长,表现为根瘤干重下降,根瘤数量减少;缺磷胁迫显著降低了大豆的固氮能力,表现为根瘤固氮酶活性和豆血红蛋白含量降低;缺磷胁迫降低了大豆的固氮量,固氮量随磷水平的增加而增加,随着生育时期的推进,固氮量表现为先增加后降低再增加的趋势,无磷($0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与高磷($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)以及低磷($30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与高磷处理间均达到了 5% 的显著差异。因此,缺磷胁迫抑制了大豆的结瘤固氮作用,使大豆的固氮效率降低。

关键词:低磷胁迫;固氮酶活性;豆血红蛋白含量;固氮量;大豆

中图分类号:S153. 61 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841 (2009)06-1000-04

Nodule Growth, Nodulation and Nitrogen Fixation in Soybean(*Glycine Max* L.) as Affected by P Deficiency Stress

WANG Shu-qi^{1,2}, HAN Xiao-zeng¹, QIAO Yun-fa¹, YAN Jun¹, LI Xiao-hui¹

(1. Northeast Institute of Geography and Agricultural Ecology, CAS, Harbin 150081, Heilongjiang; 2. Institute of Applied Ecology, CAS, Shengyang 110016, Liaoning, China)

Abstract: Phosphorus deficiency stress is a serious problem in the soil, how to resolve the problem of crop production reduction resulted from P deficiency is becoming global hot research. In this paper, a sand experiment was conducted to study the effects of P deficiency stress on nodule growth, nodulation and nitrogen fixation in soybean(*Glycine max* L.) at glassroom condition. The results showed that P deficiency restrained nodule growth which embody in nodule dry weight declined and nodule number decreased than that of normal P supplying, meanwhile, P deficiency significantly decreased nitrogen fixation capacity of soybean which embody in nodule nitrogenase activity and leghemoglobin concentration remarkably decreased than that of normal P supplying. P deficiency reduced nitrogen fixation quantity which increased with phosphorus concentration, and the trend was rising first and then declining, finally going up with the growing stages of soybean. There is significant difference between no P($0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and high P($50\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) treatment, and low P and high P($30\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) treatment ($P<5\%$). Therefore, P deficiency restrained nitrogen fixation in soybean and then made the efficiency of nitrogen fixation declined.

Key words: Phosphorus deficiency; Nitrogenase activity; Leghemoglobin; Nitrogen fixation quantity; Soybean

大部分农田土壤中, 尽管土壤总磷含量较高, 但大多以作物不可直接利用的形态存在, 不施磷肥的土壤释放的磷几乎都不能满足作物快速生长对磷的需求。在农田生产过程中, 为保证作物产量施入到土壤中的磷肥, 第二生长季能够被作物利用的磷量很少, 因为土壤中的磷有 80% 以上被吸附、沉积或转化为有机形态, 不能被作物利用^[1], 因此, 世界上

30% 以上耕地作物产量受磷素限制。

根瘤菌的生长和根瘤的形成都必须有磷素的供应, 一方面磷素是细胞形成所必需的元素, 另一方面磷素供给能量。已有研究表明缺磷对豆科作物根瘤形成和生长的影响大于其对植物体生长的影响^[2-4]。根瘤在发育过程中能否成为有效根瘤, 取决于根瘤中是否具有 2 种新生成的蛋白, 即豆血红

收稿日期: 2009-02-28

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(KSCX1-YW-09-09, KSCX2-YW-N-002, KZCX2-YW-407); 国家科技支撑计划资助项目(2006BAD21B01)。

第一作者简介: 王树起(1968-), 男, 副研究员, 博士, 现主要从事植物营养和土壤生态方面的研究。E-mail: wsq-200131@sohu.com。

通讯作者: 韩晓增, 研究员, 博士生导师。E-mail: hanxz@cern.ac.cn。

蛋白和固氮酶^[5]。豆血红蛋白维持豆科植物根瘤内较低氧压,并有效地把 O₂ 传递给类菌体的含铁血红蛋白,其浓度越高,根瘤的固氮酶活性也越强^[6]。豆科植物根瘤中的豆血红蛋白含量是反映根瘤固氮功能强弱的重要指标^[7-8]。同时,成熟的固氮根瘤中由于这种红色豆血红蛋白的存在而呈现红色。豆血红蛋白的含量与根瘤菌的有效程度呈正相关。因此,根瘤内的豆血红蛋白含量和存在状态被认为是固氮效率的重要特征。固氮过程的核心是固氮酶,固氮酶是某些微生物在常温常压下固氮成氨的主要催化剂,它能将生物体无法直接利用的分子氮(N₂)转化成可利用的铵态氮(NH₃)。固氮过程中所需要的能量是由三磷酸腺苷(ATP)直接提供^[5],作物生长过程中所能获得的磷水平势必影响固氮酶活性。因此研究低磷胁迫对大豆根瘤生长和结瘤固氮的影响,可为大豆对低磷胁迫的适应性机制和大豆的共生固氮理论提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

采用砂培方法进行,以黑农 35 为研究对象,以磷酸二氢钾(KH₂PO₄)作为磷源,设 3 个磷处理,分别为无磷(0 μmol·L⁻¹)、低磷(10 μmol·L⁻¹)和高磷(50 μmol·L⁻¹),4 次重复,随机排列。移栽时各处理接种根瘤菌合丰 25(由黑龙江省微生物研究所提供)悬液,菌浓度约为 10⁵ cells·mL⁻¹,4 d 后再接 1 次根瘤菌悬液,以后换为无根瘤菌营养液。

1.2 大豆培养与取样

大豆种子用 70% 乙醇灭菌,以无菌水冲洗 7~8 次,放入(25±1)℃ 恒温箱中,避光催芽,待主根长 4~5 cm,须根尚未长出时,移栽至砂培(PVC 塑料桶,直径×高 8 cm×20 cm,装砂 3 kg)中,每桶播种 2 粒、定苗 1 株,营养液培养,营养液(μmol·L⁻¹): K₂SO₄, 600; MgSO₄·7H₂O, 200; CaCl₂·2H₂O, 600; H₃BO₃, 5; ZnSO₄·7H₂O, 0.75; MnSO₄·H₂O, 1; CoSO₄·7H₂O, 0.2; CuSO₄·5H₂O, 0.2; Na₂MoO₄·H₂O, 0.03; Fe- NaEDTA, 10。移栽后定期浇灌营养液,每次用 0.01 mol·L⁻¹ HCl 或 0.01 mol·L⁻¹ NaOH 调营养液 pH 为 5.0~6.0。

分别于苗期、花期、鼓粒期、成熟期取样,调查根瘤数,然后将植株分成地上部、根和根瘤 3 部分,每部分测定鲜重,在 105℃ 杀青,80℃ 烘干至恒重,测定各部分干重,粉碎备用。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 固氮酶活性测定 取回的大豆植株放入装有营养液的不透光瓶中,密封。抽出瓶中空气体积 10% 的空气,再注入相同体积的 C₂H₂,反应 30 min 后取出反应气体,用气相色谱测定生成 C₂H₄ 的量^[9]。

1.3.1 豆血红蛋白含量测定 取一定量的新鲜根瘤,在 5℃ 的磷酸缓冲溶液(0.1 mol·L⁻¹, pH 6.8)中研磨匀浆,磷酸缓冲液的用量为根瘤体积的 4 倍左右。在 100 r·min⁻¹ 5℃ 下离心 15 min,弃掉沉淀物,上清液继续在 5℃ 39 000 r·min⁻¹ 力下离心 20 min,上清液在分光光度计(540 nm)下比色^[6]。

1.4 数据分析

采用 Excel 2003、SigmaPlot 2000 和 SPSS 14.0 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 缺磷胁迫对大豆根瘤干重的影响

根瘤生物量间接表明根瘤固氮能力的大小,根瘤生物量越大,表明根瘤的固氮能力相对较强,从图 1 可以看出,不同磷处理间大豆根瘤的干重存在差异,特别是高磷(50 μmol·L⁻¹)处理与无磷(0 μmol·L⁻¹)处理相比,根瘤的干重差异达到 5% 的差异显著水平,而无磷处理与低磷(30 μmol·L⁻¹)处理间差异不显著,表明 30 μmol·L⁻¹ 的磷水平还不能满足大豆根瘤正常生长发育的需求,只有满足大豆对磷素的需求,才能保证大豆根瘤的正常生长。

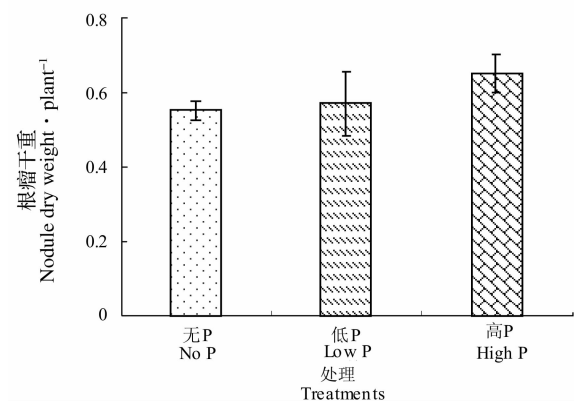


图 1 缺磷胁迫对大豆根瘤干重的影响

Fig. 1 Effect of P deficiency stress on nodule dry weight

2.2 缺磷胁迫对大豆根瘤数量的影响

不同磷处理对大豆根瘤数量有显著影响(图 2)。随着营养液中磷浓度的增加,除苗期外,根瘤

数量显著增加,表现出明显的促进作用,表明施磷对大豆根瘤的形成有显著的促进作用,因此,缺磷胁迫显著抑制大豆根瘤的形成,降低大豆根瘤的固氮作用。从不同时期大豆根瘤的形成情况来看,从苗期到花期再到鼓粒期,大豆根瘤的数量呈现出先明显增加后逐渐减少的趋势,高峰出现在花期。方差分析结果表明,除苗期外,无磷($0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、低磷($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和高磷($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)间均表现出显著差异,达5%的差异显著水平,表现为高磷>低磷>无磷。

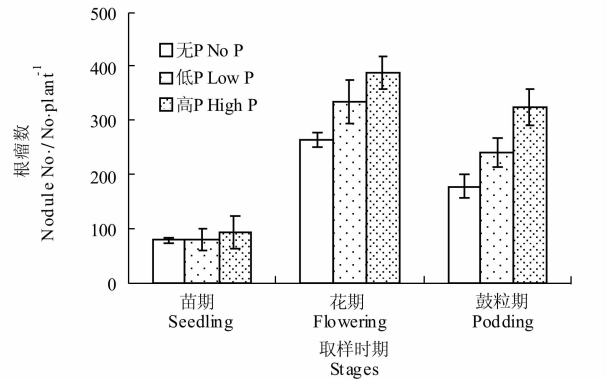


图2 缺磷胁迫对大豆根瘤数量的影响
Fig. 2 Effect of P deficiency stress on nodule number

2.3 缺磷胁迫对大豆根瘤固氮酶活性的影响

不同磷处理对大豆根瘤固氮酶活性有显著影响(图3)。从总固氮酶活性来看,随着营养液中磷浓度的增加,总固氮酶活性显著增加,随着反映时间的延长,各处理间差异有增大的趋势,表明施磷增加了大豆根瘤固氮酶活性,提高大豆的固氮效率。方差分析表明,无磷($0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、低磷($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和高磷($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各处理间差异均达到了5%的显著水平,表现为高磷>低磷>无磷。

2.4 缺磷胁迫对大豆根瘤豆血红蛋白含量的影响

大豆苗期和花期根瘤的豆血红蛋白含量测定结果见图4。从苗期到花期,大豆根瘤豆血红蛋白含量随着营养液中磷浓度的增加而增加,苗期这种趋势更为明显,说明缺磷胁迫降低了大豆根瘤中豆血红蛋白的含量,施磷使大豆根瘤的固氮效率提高,固氮量增加,但从花期的测定结果来看,当营养液中磷浓度达到一定水平时,再提高磷的浓度,对豆血红蛋白含量的影响不大,表明当满足了大豆对磷素的需求后,再提高施磷水平,对大豆根瘤固氮效率并没有显著影响。从苗期到花期,豆血红蛋白含量呈增加的趋势,表明随着大豆的生长发育,根瘤的固氮效率提高,固氮量增加。结果表明,无磷和低磷及高磷处

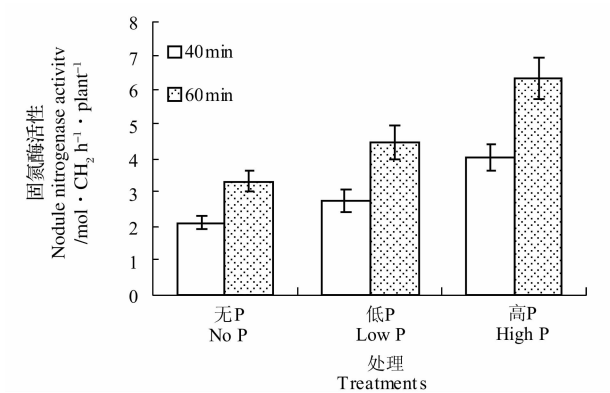


图3 缺磷胁迫对大豆根瘤固氮酶活性的影响
Fig. 3 Effect of P deficiency stress on nodule nitrogenase activity

理间存在显著差异,达5%的显著水平,而低磷和高磷间差异不显著。

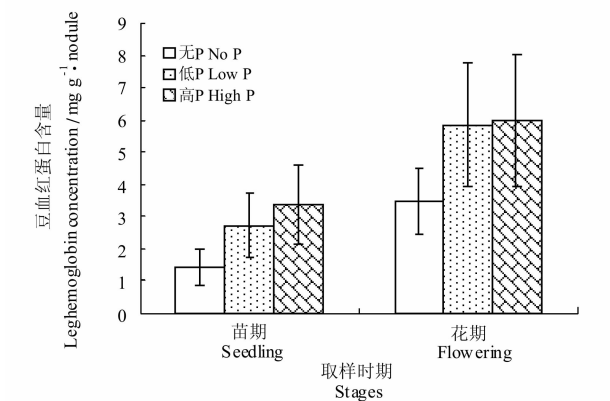


图4 缺磷胁迫对大豆根瘤豆血红蛋白含量的影响
Fig. 4 Effect of P deficiency stress on leghemoglobin concentration

2.5 缺磷胁迫对大豆固氮量的影响

营养液中的供磷水平直接影响大豆固氮量(见图5),从图5可知,随着营养液中磷水平的增加,大豆固氮量随之增加,无磷($0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下,固氮含量最低,随着磷浓度的增加,固氮量也随之增加,当达到正常供磷($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)水平时,固氮量达到最高,在无磷和低磷($30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理间,固氮量差异不大,而由低磷到高磷水平,固氮量增加幅度较大,由此说明,当大豆植株刚刚受到缺磷胁迫时,对大豆固氮影响最大,所以当大豆植株出现缺磷现象时,应当立即补充磷素营养,以维持大豆较高的固氮能力。方差分析表明,营养液中磷浓度低于 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,再降低营养液中的磷浓度,对大豆固氮影响不大,无磷和低磷处理间无显著差异,但无磷与高磷以及低磷和高磷处理间则存在显著差异,差异达到了5%的显著水平。大豆不同时期固氮量的

变化为:由苗期到花期,固氮量呈增加趋势,由花期到鼓粒期呈降低趋势,而由鼓粒期到成熟期,固氮量又有所增加。

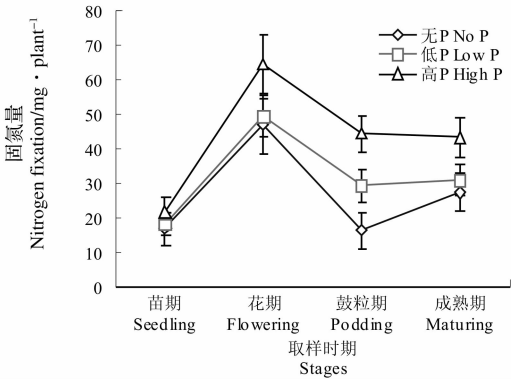


图 5 缺磷胁迫对大豆固氮量的影响
Fig. 5 Effect of P deficiency stress on nitrogen fixation of soybean

3 讨论

缺磷对大豆固氮功能的影响机制至今还不完全清楚,有研究发现,在磷转换试验中,大豆缺磷特殊固氮酶活性增强,这种反应要比植株生长对缺磷的反应快^[10]。苗淑杰等^[11]研究发现,无外磷条件下,乙炔诱导固氮酶活性降低出现单峰曲线变化趋势,而在 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷条件下,出现了双峰曲线变化趋势,这说明磷能降低乙炔诱导固氮酶活性降低程度,这在苜蓿对磷素的反应试验中也获得了相似的结论^[9]。在根瘤形成后,降低营养液中的供磷水平,根瘤中豆血红蛋白含量降低,这与缺磷根瘤固氮酶活性降低的结论相符^[12]。也有研究发现,固氮酶活性降低是因为缺磷时根瘤细胞中的需能反应受到限制的缘故,缺磷根瘤中 ATP 含量为充足磷的 70% ~ 75%^[13]。在缺磷胁迫条件下,大豆根瘤的固氮酶活性和豆血红蛋白含量均受到显著抑制,随着磷浓度的增加,根瘤固氮酶活性呈增加趋势,而且随着反映时间的延长,各磷处理间的差异有增大的趋势,表明施磷对提高大豆的固氮效率有显著的促进作用。

4 结论

缺磷胁迫抑制了大豆根瘤的生长,根瘤干重下降,根瘤数量减少;缺磷胁迫显著降低了大豆的固氮能力,表现为固氮酶活性和豆血红蛋白含量降低,从而降低了大豆的固氮效率;缺磷胁迫降低了大豆的

固氮量,固氮量随磷水平的增加而增加,随着生育时期的推进,固氮量表现为先增加后降低再增加的趋势,无磷与高磷以及低磷与高磷处理间均达到了 5% 的显著差异。

参考文献

[1] Holford C R. Soil phosphorus; its measurement, and its uptake by plants [J]. Australia Journal of Soil Research, 1997, 35: 227-239.

[2] Israel D W. Investigation of the role phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation [J]. Plant Physiology, 1987, 84: 835-840.

[3] Jakobsen I. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*) [J]. Physiologia Plantarum, 1985, 64: 190-196.

[4] Ohwaki Y, Sugahara P. Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Plant Soil, 1997, 189: 49-55.

[5] 董钻. 大豆产量生理 [M]. 北京: 中国农业出版社. 1999. (Dong Z. Yield physiology of soybean [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1999.)

[6] 左元梅, 刘永秀, 张福锁. 与玉米混作改善花生铁营养对其根瘤形态结构及豆血红蛋白含量的影响 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 29(1): 33-38. (Zuo Y M, Liu Y X, Zhang F S. Effects of improvement of iron nutrition by mixed cropping with maize on nodule microstructure and leghemoglobin content of peanut [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2003, 29(1): 33-38.)

[7] Felix D D. A functional relationship between leghaemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of the two proteins in legume root nodules [J]. Annals of Botany, 1995, 75(1): 49-54.

[8] Rachid S, Thomas R S. N_2 fixation response to drought in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Annals of Botany, 1998, 82(2): 229-234.

[9] Tang C, Hinsinger P J, Devron J, et al. Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of *Medicago truncatula* L. [J]. Annals of Botany, 2001, 88: 131-138.

[10] Israel D W. Symbiotic dinitrogen fixation and host-plant growth during development of and recovery from phosphorus deficiency [J]. Physiologia Plantarum, 1993, 88: 294-300.

[11] 苗淑杰, 乔云发, 韩晓增. 两种形态氮源条件下磷对大豆结瘤固氮的影响 [J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 250-255. (Miao S J, Qiao Y F, Han X Z. Effect of P deficiency on nodulation and function in soybean under two different N sources [J]. Soybean Science, 2006, 25(3): 250-253, 258.)

[12] Miao S J, Han X Z, Qiao Y F. Effects of seedling and nutrient solution phosphorus on nodulation and nodule function in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Plant Soil and Environment, 2007, 53(2): 65-71.

[13] Sa T M, Israel D W. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules [J]. Plant Physiology, 1991, 97: 928-935.