

大豆根瘤菌接种效应及竞争结瘤能力分析

王金生¹,丁 宁²,吴俊江¹,刘庆莉¹,张 鑫¹

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所/农业部大豆栽培重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:为了筛选获得竞争结瘤能力强且对大豆生长发育、产量有积极影响的大豆根瘤菌菌株,以前期分离、鉴定、纯化的10株根瘤菌菌株为材料,对高匹配性大豆品种进行了田间接种试验。于大豆盛花期测定根瘤菌的结瘤数量及固氮酶性能。同时,对接种供试菌株及分离获得的根瘤菌菌株进行BOX-PCR并比较不同菌株之间的BOX分子指纹图谱,以此获得供试菌株的田间占瘤率。于成熟期测定大豆的主要生育特征、产量构成因子。结果表明:大豆接种根瘤菌后在整个生长期,叶片表现为颜色深绿,质地鲜嫩;根瘤菌可以显著促进大豆根系结瘤,增加单株根瘤数目。接种处理I₄(即接种菌株112-1)的单株根瘤数最多,比不接种对照处理I₀多32.95%,差异显著。接种根瘤菌处理的根瘤干重均显著低于不接种对照处理。其中,接种处理I₄的根瘤干重最高。接种处理I₆的固氮酶活性最高,与接种处理I₄之间差异不显著;接种菌株的占瘤率为10%~90%,占瘤率变化幅度较大,平均占瘤率为50%。I₄处理占瘤率最高为90%,I₆处理(即接种菌株113-1)的占瘤率次之,为75%;菌株占瘤率与单株根瘤数呈极显著的正相关($r = 0.82^{**}$),单株瘤干重与菌株占瘤率、单株根瘤数、固氮酶活性均呈现负相关($r = -0.387, r = -0.50, r = -0.13$);I₆处理株高最高,I₄处理次之,两处理之间差异并不显著;I₂、I₄、I₆处理的单株荚数、单株粒数相对较高,3处理之间差异并不显著;I₄处理的大豆百粒重均显著高于其它菌液处理。根据接种根瘤菌对大豆结瘤固氮性能、产量等方面的影响,结合各根瘤菌株的竞争结瘤能力,筛选获得适于黑龙江哈尔滨地区大豆生产有广阔利用价值的高效大豆根瘤菌株112-1和113-1。

关键词:大豆根瘤菌;竞争结瘤;BOX-PCR
中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.05.0761

Analysis of the Inoculation Effect of Soybean Rhizobia and the Competitive Nodulation Ability

WANG Jin-sheng¹, DING Ning², WU Jun-jiang¹, LIU Qing-li¹, ZHANG Xin¹

(1. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Soybean Cultivation, Ministry of Agriculture, Harbin 150086, China; 2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to screen and gain *Bradyrhizobium japonicum* strains that have high-competitive nodulation ability, in the mean time, be good for growth and quality of soybean, 10 *Bradyrhizobium japonicum* strains which were being separating, identification and purification were used as materials to conduct field vaccination test with high-matching soybean. In the full-blossom period, testing the nitrogen fixation. At the same time, BOX-PCR was conducted with testing strains and new strains separated from the field, and BOX molecular fingerprint was compared, and calculated the rate of testing strains. Testing the mainly characters and yield components in the mature period. Result showed that: At the earlier stage, the leaves of inoculated soybean showed dark green and fresher, *Bradyrhizobium japonicum* could improve root nodules and the number of single nodules significantly. The number of single root nodules of I₄(the inoculation strain 112-1) was the most, compared with the non-inoculated control group of I₀, 32.95% and the difference was significant. The dry weight of nodule treated with rhizobia was significantly lower than that of non-inoculated control. Among them, the inoculation treatment I₄ had the highest dry weight. The inoculation treatment I₄ had the highest nitrogenase activity, and there was no significant difference with the inoculation treatment I₄. The incidence rate of the inoculation strain was between 10% and 90%, and the rate of the tumor rate varied greatly, with the average tumor rate of 50%. I₄ had a maximum rate of 90%, I₆(the inoculation strain 113-1) had the second-highest rate of 75%. The incidence of strain was a significant positively correlated with the number of single nodule ($r = 0.82^{**}$), there was a negative correlation between single tumor dry weight and rate, single root nodule and nitrogenase activity ($r = -0.387, r = -0.50, r = -0.13$). I₆ had the highest plant height, followed by I₄, the difference between the two treatments was not significant, I₂, I₄ and I₆ had relatively high single number of pod number and single grain number, and the difference between the three treatments was not significant, the hundred grain weight of soybean treated by I₄ was significantly higher than that of other bacteria dispose. According to the effect of inoculation rhizobia on nitrogen fixation and yield of soybean nodules, the competitive nodules of the rhizobium strains additionally, this research screened out the high-value and high-effect strains 112-1 and 113-1 that were appropriate for Harbin in Heilongjiang province.

Keywords: *Bradyrhizobium japonicum*; Competitive nodulation; BOX-PCR

收稿日期:2017-04-28
基金项目:黑龙江省农科院院级科研项目专项资金(2017ZC06);国家重点研发专项(2017YFD0101306)。
第一作者简介:王金生(1981-),男,硕士,助理研究员,主要从事大豆耕作与栽培研究。E-mail:jinshengwang1981@163.com。
通讯作者:吴俊江(1970-),男,博士,研究员,主要从事大豆耕作与栽培技术研究。E-mail:nkywujj@126.com。

氮对大豆的生长发育和产量形成起着至关重要的作用,大豆的氮素营养相对于其它作物较为复杂。大豆根瘤菌通过与豆科植物的相互识别,侵染其根部,并形成根瘤,以此作为功能结构为豆科植物提供氮素营养,培肥地力^[1],增加植物产量和优化品质^[2-6]。接种根瘤菌后的大豆,根瘤菌的数量明显增加、根瘤菌和土壤微生物的活性均有所提高^[7-9]、固氮能力显著增强、根系生长旺盛^[10],从而能提高大豆的产量进而降低大豆生产成本^[11]。更为深远的是根瘤菌的利用改善了大豆的营养平衡,减少了化学氮肥大量投入而造成的流失以及对大气环境和水环境的破坏。因此,研究和开发适于大豆生产的根瘤菌资源,利用其与豆科植物的共生固氮体系有重要的现实意义。

宿主植物、根瘤菌和环境之间存在复杂的相互作用,是制约大豆根瘤菌共生固氮效率的主要因素。其中土壤环境是影响根瘤菌结瘤固氮的主要因素,其次为接种菌。交互作用中,接种菌对土壤的适用性及接种菌对大豆品种的有效性是影响共生固氮效果的主要因素,因此要想获得最佳的接种效果,必须对三者的关系进行充分考虑。前人研究常以有效性作为重要的指标对高效根瘤菌进行筛选^[12],但研究结果显示以此筛选出的根瘤菌,应用到实际生产当中并没有甚至没有发挥出其应有的共生固氮潜能^[13-14]。究其原因发现,虽然人工筛选获得的根瘤菌菌株优点突出,固氮性能较高,但与有效性差的土著根瘤菌株相比其竞争结瘤能力不强,从而造成了虽然人工接种优良菌株,但不能作为优势菌株侵染结瘤,接种效果不明显。这个问题使得研究人员认识到高效根瘤菌能否在大豆根系形成根瘤是接种根瘤菌有效性的前提条件,而满足这个条件的关键就是接种菌株的竞争结瘤能力强弱^[15-16]。因此,为使根瘤菌能在大豆生产得以充分利用,优良特性得以发挥,筛选有效性高且竞争结瘤能力强的优势大豆根瘤菌菌株势在必行。

目前,利用分子标记方法获得菌株基因组指纹图谱并利用图谱统计其根瘤菌菌株的占瘤率,以此评价供试菌株的竞争结瘤能力,在高效根瘤菌菌株的筛选中经常被很多研究者所采用^[17-20]。这些技术在保留目标细菌基因的前提下,排除其它无法预料的因素干扰,可完全用于检测基于初发基因的目标细菌^[21]。BOX-PCR 是根据 BOX 插入因子中的 boxA 亚单位设计引物,对微生物基因组 DNA 中的重复性片段及片段之间的序列进行扩增,最后经电泳检测片段的多态性获得指纹图谱信息的一种方

法^[22-23]。该技术方便、快捷,能够揭示细菌种及种以下水平上基因组间的差异,现已广泛应用于鉴别人工接种根瘤菌(初发菌株)与土著根瘤菌测定根瘤菌的占瘤率方面^[24-25]。

本研究以前期分离、鉴定获得的 10 株大豆根瘤菌菌株为材料进行盆栽接种试验,以接种不同菌株条件下大豆的结瘤数量、根瘤固氮酶活性、产量构成因子等指标评价根瘤菌菌株的接种效应。同时采用 BOX-PCR 分子生物学技术对接种根瘤菌菌株的竞争结瘤能力进行分析、鉴定、评价,以期筛选获得高效且竞争结瘤能力强的大豆根瘤菌菌株,为大豆根瘤菌剂的研发提供优良材料及大豆的高产优质栽培提供理论指导与技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试品种 供试品种为黑农 48,由黑龙江省农科院大豆研究所提供,室内发芽率 98%。经前期鉴定得出其与供试菌株均有较好的匹配性。

1.1.2 供试菌株 试验菌株共计 10 株,分离、筛选自黑龙江各大豆主产区主栽大豆品种根瘤(表 1)。

1.1.3 供试土壤 供试土壤为哈尔滨市大豆产区 100 cm 以下深层黑土和粘土,土壤有机质 5.3 g·kg⁻¹、碱解氮 32.6 mg·kg⁻¹、速效磷 2.3 mg·kg⁻¹、速效钾 45.5 mg·kg⁻¹,pH6.42。

1.2 方法

1.2.1 接种菌悬液的制备 YMA 固体平板培养基活化供试菌株后转入 YMA 液体培养基,置于摇床培养(转速 120 r·min⁻¹、温度 28℃),测定根瘤菌含菌量 OD 值。接种浓度设为 0.6OD₆₀₀(OD₆₀₀表示细菌培养液在 600 nm 处的光吸收值,1OD 大约含有 10⁸菌细胞·mL⁻¹)。

1.2.2 接种方法 精选无病、饱满的种子用 95% 的乙醇表面灭菌后,1 kg 种子用 10 mL 菌悬液进行拌种混匀,对照 CK 用等量的清水与种子混匀,阴干后播种。

1.2.3 试验设计及处理 每盆装土 14 kg,以不接种处理为对照,共设 11 个处理(表 1),各处理重复 6 次(即 6 盆),在大豆盛花期和成熟期分别取样 3 盆。播种时每盆播种 10 粒,间苗时每盆留苗 5 株。

1.2.4 结瘤固氮性能测定 大豆盛花期剪取植株根部计数单株根瘤数,风干后天平称量单株瘤干重;利用乙炔还原法测定根瘤固氮酶活性^[26]。每处理取 3 盆,计算平均值。

表 1 处理设计及供试菌株代号、寄主植物及来源地区
Table 1 Arrangement of treatments and code, and original sources of the strains

处理 Treatment	菌株代号 Name of strains	来源地区 Original source
I ₀	—	—
I ₁	111-1	双城 Shuangcheng
I ₂	111-2	阿城 Acheng
I ₃	111-3	佳木斯 Jiamusi
I ₄	112-1	依安 Yian
I ₅	112-2	拜泉 Baiquan
I ₆	113-1	牡丹江 Mudanjiang
I ₇	114-1	597 农场 597farm
I ₈	114-2	852 农场 852farm
I ₉	115-1	绥化 Suihua
I ₁₀	115-2	海伦 Hailun

1.2.5 根瘤菌占瘤率测定 采用 BOX-PCR 分子生物学技术方法测定,具体如下:

(1)根瘤菌的分离、纯化:大豆盛花期从每一处理植株根部随机选取 20 个根瘤,0.85% 生理盐水中浸泡 5~6 h 后转移到无菌培养皿,95% 的酒精浸泡 5 min,3% NaClO 浸泡 5 min。然后转移至无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中,1 个根瘤 1 管,加 1 滴无菌水,用无菌枪头捣碎根瘤并吸取菌悬液在 YMA 平板培养基上划线培养单菌落。

(2)菌株 DNA 的提取:将菌株接种于 YMA 斜面培养基上,28℃ 培养 3~4 d,加入 1 mL 无菌水漩涡震荡后,将菌液倒入 1.5 mL 离心管中,13 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,弃上清,用 1×TE 缓冲液洗涤菌体 3 次,CTAB/NaCl 法快速提取总 DNA。用已知浓度的 DNA 为标准,利用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳确定样品 DNA 的浓度。

(3)BOX-PCR 引物:选用 BOX-A1R 引物进行 PCR 扩增。BOX-A1R 的序列是 5'-CTACGGCAAG-GCGACGCTGACG-3'。

(4)BOX-PCR 扩增体系及扩增反应程序:BOX-PCR 扩增体系为 25.0 μL 体系,包括模板 DNA 1.0 μL、10× Reaction buffer 2.5 μL、100% DMSO

2.5 μL、4× dNTP (10 mmol·L⁻¹) 2.0 μL、BSA (0.1%) 0.2 μL、BOX-A1R (10 pmol) 0.32 μL、MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 5.6 μL、TaqDNA polymerase (5 U) 1.0 μL,ddH₂O 补足至 25.0 μL。BOX-PCR 扩增程序如下:95℃ 预变性 2 min,(94℃ 变性 1 min,52℃ 退火 1 min,65℃ 延伸 8 min)30 个循环,65℃ 最终延伸 18 min,PCR 产物 40℃ 暂存 5 min。

(5)电泳:取 BOX-PCR 扩增产物 6 μL 与溴酚蓝混匀,用 DNA Marker 作参照,在 2% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 μL·mL⁻¹)80 V 电压电泳 6 h;电泳后用紫外凝胶扫描仪扫描、照相,以备分析。

(6)图谱数据处理:对比分离根瘤菌与初发菌株的 BOX-PCR 指纹图谱,达到 100% 相似水平时即可定为同一类 BOX 图谱类型(即初发菌株与分离菌株相同),统计数量。

1.2.6 产量构成因子测定 成熟期取样考种,测定株高、主茎节数、单株荚数、单株粒数、及百粒重。

1.3 数据分析

Excel 2003 和 SPSS 17.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同根瘤菌菌株对大豆结瘤固氮性能的影响

试验结果表明,大豆接种根瘤菌后在整个生长期,叶片表现为颜色深绿,质地鲜嫩;根瘤菌可以显著促进大豆根系结瘤,增加单株根瘤数目(图 1);接种处理 I₄ 的单株根瘤数最多,比不接种对照处理 I₀ 多 32.95%,差异显著(P<0.05),与接种处理 I₆、I₈、I₉、I₁₀ 的单株根瘤数差异并不显著,但显著高于其它接种处理;接种根瘤菌处理的根瘤干重均显著低于不接种对照处理 I₀。其中,接种处理 I₄ 的根瘤干重最高,与接种处理 I₁、I₂、I₉ 之间的根瘤干重差异并不显著,但均显著高于其它接种处理;接种处理 I₆ 的固氮酶活性显著高于其它各处理。I₂、I₄、I₅、I₇ 之间的固氮酶活性差异不大,低于 I₆ 处理,但显著高于其它处理。接种处理 I₈、I₉、I₁₀ 与不接种对照处理 I₀ 之间固氮酶活性差异并不显著(表 2)。



图 1 大豆接种根瘤菌后的表现差异
Fig. 1 Difference of inoculated soybean

表 2 不同大豆根瘤菌菌株对大豆结瘤固氮的影响

Table 2 Effects of different soybean rhizobium strains on nodulation and nitrogen			
处理 Treatment	单株根瘤数 Nodule number per plant	单株瘤干重 Dry weight per tumor	固氮酶活性 Nitrogenase activity
I ₀	122.3 d	0.0093 a	3.0360 d
I ₁	141.3 e	0.0084 b	3.1973 e
I ₂	149.0 bc	0.0074 b	3.2170 bc
I ₃	149.6 bc	0.0062 d	2.9413 e
I ₄	162.6 a	0.0085 b	3.2327 bc
I ₅	148.6 bc	0.0076 c	3.2570 b
I ₆	161.3 a	0.0063 d	3.4053 a
I ₇	149.3 bc	0.0062 d	3.2127 bc
I ₈	155.6 ab	0.0074 c	2.9907 de
I ₉	154.3 ab	0.0082 b	2.9970 de
I ₁₀	154.3 ab	0.0070 c	2.9930 de

I₀:不接种对照处理;I₁ ~ I₁₀:不同根瘤菌菌株接种处理。

I₀:The dispose without inoculated; I₁-I₁₀:The disposes inoculated different *Bradyrhizobium japonicum* strains.

2.2 不同大豆根瘤菌菌株的竞争结瘤能力鉴定

通过对盆栽试验的结瘤菌株进行分离,共保存获得 200 株结瘤菌株(图 2)。针对每个分离菌株采用 GUTC 裂解法提取 DNA,用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度(图 3),并以此为模板进行 BOX-PCR 扩增。接种菌株共有 10 种 BOX 分子指纹图谱,将接种菌株的图谱类型按字母顺序从 A ~ Z 命名(图 4),通过与接种菌株 BOX 图谱类型比较,获得每个接种菌株的占瘤率和 BOX 指纹图谱。

分析表 3 数据可知,接种菌株的占瘤率为 10% ~ 90%,占瘤率变化幅度较大,平均占瘤率为 50%。其中,I₄处理(即接种菌株 112-1)的接种菌株与结瘤菌株图谱一致的相对较多,其占瘤率最高为 90%;I₆处理(即接种菌株 113-1)的占瘤率其次为 75%(图 5);I₅处理(即接种菌株 112-2)的接种菌株与结瘤菌株图谱一致的相对较少,其占瘤率最低为 10%。说明接种菌株 112-1 和 113-1 与土著根瘤菌相比具有较强的竞争结瘤能力,而接种菌株 112-2 则竞争结

瘤能力相对较弱。

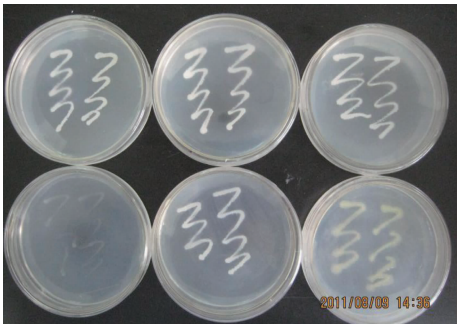


图 2 部分分离结瘤菌株

Fig. 2 Part of separated nodular strains

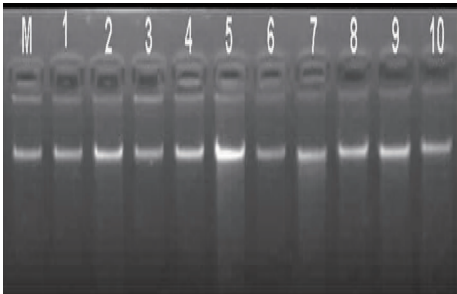
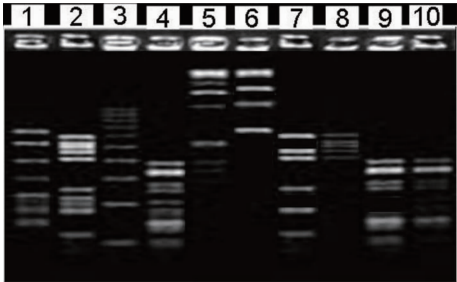


图 3 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度

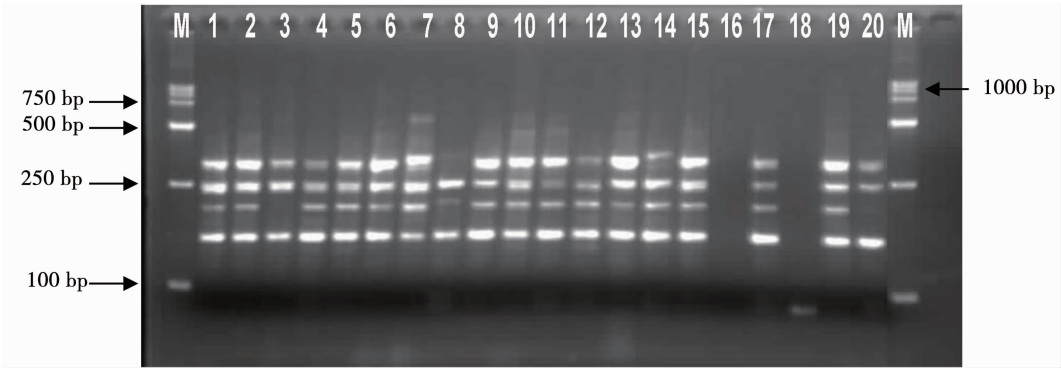
Fig. 3 Testing the concentration of DNA by 0.8%AGE



1;111-1(A);2;111-2(B);3;111-3(C);4;112-2(D);5;112-1(E);6;113-1(F);7;114-1(G);8;114-2(H);9;115-1(I);10;115-2(Z)

图 4 接种菌株 BOX 分子指纹图谱及命名

Fig. 4 Inoculated strains molecular fingerprint mapping and naming



M:Marker;1~2,4~7,9~15,17,19:接种菌株 113-1;3,8,20:接种土著菌株。

M:Marker;1-2,4-7,9-15,17,19 respectively represented inoculated strain 113-1;3;8;20:represented inoculated indigenous strains.

图 5 接种 113-1 菌株获得的结瘤菌株图谱

Fig. 5 Tumor strain map of inoculated strain 113-1

表 3 不同接种菌株对占瘤率及 BOX-PCR 图谱类型的影响

Table 3 Correlation analysis of nitrogen fixation index with material separated from different stains

不同菌株处理 Treatment	接种菌株图谱类型 Profile types of riginal strain	结瘤菌株图谱 Profile types of re-isolated strain	占瘤率 Occupancy rate/%
I ₁	A	A(7);其它(13)	35
I ₂	B	B(9);其它(11)	45
I ₃	C	C(9);其它(11)	45
I ₄	D	D(18);其它(2)	90
I ₅	E	E(2);其它(18)	10
I ₆	F	F(15);其它(5)	75
I ₇	G	G(11);其它(9)	55
I ₈	H	H(8);其它(12)	40
I ₉	I	I(9);其它(11)	45
I ₁₀	Z	Z(11);其它(9)	55

括号中数值代表类型图谱菌株个数。

The number in parentheses represent the number of type strains.

2.3 菌株占瘤率与植物生长和结瘤率的关系

通过对大豆根瘤菌供试菌株结瘤固氮性能指标的相关性分析,可以看出菌株占瘤率与单株根瘤数呈极显著的正相关($r = 0.82^{**}$),说明竞争结瘤能力强的根瘤菌菌株可以有效提高大豆植株的结

瘤数量。单株瘤干重与菌株占瘤率、单株根瘤数、固氮酶活性均呈现负相关($r = -0.387, r = -0.50, r = -0.13$)。综合以上说明竞争结瘤能力强的根瘤菌菌株在提高植株结瘤数量的同时可以增加根瘤的含水量以提高其固氮酶活性(表4)。

表 4 不同大豆根瘤菌分离物结瘤固氮性能指标的相关性分析

Table 4 Effects of different strains disposal on soybean yield factor

生物学特性 Morphological characters	单株根瘤数 Nodule number per plant	固氮酶活性 Nitrogenase activity	单株瘤干重 Dry weight per tumor
占瘤率 Occupancy rate/%	0.82 ^{**}	0.32	-0.38
单株根瘤数 Nodule number per plan	-	0.26	-0.50
固氮酶活性 Nitrogenase activity	-	-	-0.13

*、**: $P \leq 0.05$ 和 $P \leq 0.01$ 的显著水平。

*, **: $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$ significant level.

2.4 不同大豆根瘤菌菌株对产量构成因子的影响

通过表5可以看出:对株高而言,除I₅处理外接入根瘤菌液处理的株高均显著高于清水对照处理。其中,I₆处理株高最高,I₄处理次之,两处理之间差异并不显著,但均显著高于其它处理;各处理的主茎节数之间差异并不显著,说明一定浓度的根瘤菌液通过促进节间生长来增加株高。

接入根瘤菌液处理的单株荚数、单株粒数均显著高于清水对照处理。其中,I₂、I₄、I₆处理的单株荚数相对较高且3处理之间差异并不显著,但均显著

高于I₉、I₃、I₅、I₈菌液处理,与其它菌液处理之间差异不大。I₄处理的单株粒数相对较高,与I₃、I₂、I₆菌液处理之间差异并不显著,但显著高于其它处理。除I₁₀处理外,接入根瘤菌液处理的大豆百粒重均显著高于清水对照处理。其中,I₄处理的大豆百粒重均显著高于其它菌液处理。综合以上说明,I₄处理菌株(112-1)的应用在有效增加大豆植株株高的同时,可以显著增加有效荚数进而增加单株粒数,同时还可以增加百粒重。

表5 不同大豆根瘤菌菌株菌液处理对大豆产量构成因子的影响

Table 5 Effects of Different soybean rhizobium strains on soybean yield components

处理 Treatment	株高 Plant height/cm	主茎节数 Main stem node number	单株荚数 Pod number per plant	单株粒数 Seed number per plant	百粒重 100-seed weight/g
I ₀	82.52 d	16 a	23 d	62 f	21.21 f
I ₁	90.25 b	16 a	28 ab	68 d	21.85 e
I ₂	89.27 bc	15 a	29 a	78 ab	23.33 b
I ₃	89.75 bc	16 a	27 bc	78 ab	23.34 b
I ₄	94.53 a	16 a	29 a	79 a	23.76 a
I ₅	82.67 d	15 a	26 c	75 c	23.66 c
I ₆	94.75 a	15 a	29 a	78 ab	23.11 b
I ₇	89.53 bc	15 a	28 ab	68 d	23.14 b
I ₈	88.67 c	16 a	26 c	68 d	22.13 d
I ₉	90.15 b	15 a	27 bc	66 de	23.14 b
I ₁₀	90.17 b	15 a	28 ab	76 bc	21.31 f

3 结论与讨论

本研究中大豆接种根瘤菌后,在整个生长过程中,叶片表现为颜色深绿、株高升高、单株根瘤数目增加,国内学者也得出了相似结论^[27-28]。

诸多研究表明,接种根瘤菌可显著改善豆科作物的生长性能,显著提高豆科作物单株根瘤数和根瘤鲜干重^[29]。本研究中,接种根瘤菌处理的单盆根瘤数均高于清水对照处理。但根瘤干重均低于清水对照处理。相比于前人研究结果略有不同,造成这种现象的原因可能由于盆栽条件下土壤氮素过低,间接影响了大豆植株的结瘤固氮能力^[30]。所有处理之间固氮酶活性差异较大,这与以往的相关研究结果不同,可能由于分离菌株的地域差异较大,菌株与生态环境协同进化而致。

与对照 I₀相比,处理 I₄、I₆的单株根瘤数显著增加,其接种菌株 112-1、113-1 的占瘤率对比其它菌株也相对较高,表明其在供试土壤中竞争结瘤能力较强。I₄处理的产量构成因子同样也相对较高。由此可见,本研究中竞争结瘤能力强的根瘤菌株其增产能力也相对较强。这与其它相关研究的结果有所不同^[29],可能由菌株自身能力差异所致。

菌株占瘤率与单株根瘤数呈极显著的正相关,说明竞争结瘤能力强的根瘤菌菌株可以有效提高大豆植株的结瘤数量。这与其它相关研究的结果相同^[25]。单株瘤干重与菌株占瘤率、单株根瘤数、固氮酶活性均呈现负相关。综合以上说明竞争结瘤能力强的根瘤菌菌株在提高植株结瘤数量的同时可以增加根瘤的含水量以提高其固氮酶活性。

I₆处理株高最高,I₄处理次之,两处理之间差异并不显著,但均显著高于其它处理;各处理的主茎

节数之间差异并不显著,说明一定浓度的根瘤菌液通过促进节间生长来增加株高。这与其它相关研究的结果相同。

I₄处理的单株荚数、单株粒数及大豆百粒重显著高于清水对照处理的同时也显著高于其它菌液处理。说明 I₄处理菌株(112-1)的应用在有效增加大豆植株株高的同时,可以显著增加大豆有效荚数进而增加单株粒数,同时还可以增加百粒重。

参考文献

[1] 俞艳春,文定良,罗心平,等. 接种根瘤菌对豆科绿肥的固氮效果研究[J]. 云南农业科技,2006(2):21-22. (Yu Y C,Wen D L,Luo X P,et al. Effect of rhizobium inoculation on nitrogen fixation of leguminous green manure[J]. Yunnan Agricultural Science and Technology,2006(2):21-22.)

[2] 陈文新. 建议将豆科植物根瘤菌共生固氮体系的应用纳入西部大开发规划[N]. 科学时报,2000-04-17(1). (Chen W X. It is suggested that the application of symbiotic nitrogen fixing system of legume rhizobia be included in the western development plan[N]. Science Times,2004-04-17(1).)

[3] 陈文新,汪恩涛,陈文峰. 根瘤菌-豆科植物共生多样性与地理环境的关系[J]. 中国农业科学,2004,37(1):81-86. (Chen W X,Wang E T,Chen W F. The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and legumes and their geographical environments[J]. Scientia Agricultura Sinica,2004,37(1):81-86.)

[4] 赵宇枢,段玉玺,王媛媛,等. 辽宁省大豆根瘤菌资源抗逆性及生防潜力研究[J]. 大豆科学,2009,28(1):113-117. (Zhao Y S,Duan Y X,Wang Y Y,et al. Stress resistance and biocontrol potential of soybean rhizobia resources isolated from Liaoning province[J]. Soybean Science,2009,28(1):113-117.)

[5] 江木兰,张学江,徐巧珍,等. 大豆-根瘤菌的固氮作用[J]. 中国油料作物学报,2003,25(1):50-54. (Jiang M L,Zhang X J,Xu Q Z,et al. Inheritance of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* lesion expansion in *B. napus* L[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2003,25(1):50-54.)

- [6] 马中雨,李俊,张永芳,等. 大豆根瘤菌与大豆品种共生匹配性研究[J]. 大豆科学,2008,27(2):221-227. (Ma Z Y, Li J, Zhang Y F, et al. Symbiotic matching between soybean rhizobium and soybean cultivars [J]. Soybean Science, 2008, 27(2): 221-227.)
- [7] Marinkovic J. Effect of bean inoculation with *Rhizobium phaseoli* on soil microbial activity[J]. Zemljista Biudva (Serbia and Montenegro), 2006, 55(1): 61-66.
- [8] Prasad J, Ram H. Effect of zinc, copper and rhizobium inoculation on microbial population in soil and yield of greengram (*Phaseolus radiatus*) [J]. International Journal of Tropical Agriculture, 1992, 10(2): 157-160.
- [9] 王静,马玉珍,史清亮. 大豆根瘤菌与光合细菌混合接种效果[J]. 土壤肥料, 1997(2): 41-42. (Wang J, Ma Y Z, Shi Q L. Inoculation effect of mixed inoculation of soybean rhizobia and photosynthetic bacteria[J]. Soil Fertilizer, 1997(2): 41-42.)
- [10] Staehelin C, Charon C, Boller T, et al. Medicago truncatula plants overexpressing the early nodulin gene enod40 exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhanced formation of arbuscules[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2001, 98(26): 15366-15371.
- [11] 谭娟. 接种俄罗斯大豆根瘤菌对大豆生长和产量的影响[J]. 作物杂志, 2007(4): 36-37. (Tan J. Effects of inoculation with Russian soybean rhizobia on soybean growth and yield[J]. Crops, 2007(4): 36-37.)
- [12] 缪礼鸿,周俊初. 根瘤菌竞争结瘤的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(1): 84-89. (Miao L H, Zhou J C. Advance on the study of the nodulation competition of rhizobia[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2003, 22(1): 84-89.)
- [13] Janice E T. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(1): 19-28.
- [14] Streit W, Kosch K, Werner D. Nodulation competitiveness of rhizobium leguminosarum by phaseoli and rhizobium tropici strains measured by glucuronidase (GUS) gene fusions[J]. Biology and Fertilizer of Soils, 1992, 14: 140-144.
- [15] Dudeja S S. Persistence of Bradyrhizobium sp. (caianus) in a sandy loam[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1989, 21(5): 709-713.
- [16] 陈翠翠,马元武,冯永君,等. MADS-box 家族蛋白在植物开花、结实及根瘤形成中的多功能调节作用[J]. 华北农学报, 2008, 23(S2): 80-83. (Chen C C, Ma Y W, Feng Y J, et al. Multifunctional regulation of MADS-box family proteins in plant blooming, fruit mature and nodule formation[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2008, 23(S2): 80-83.)
- [17] Denton M D, Reeve W G, Howieson J Q, et al. Competitive abilities of common field isolates and a commercial strain of *Rhizobium leguminosarum* by *bifolii* for clover nodule occupancy[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(8): 1039-1048.
- [18] 王浩,绳志雅,隋新华,等. 用 *gfp* 基因标记法研究大豆根瘤菌在大豆根部定殖结瘤情况[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(2): 1-4. (Wang H, Sheng Z Y, Sui X H, et al. Adoption of *gfp* marker gene method to study soybean *Rhizobium* and the state of nodulation residence on soybean root[J]. Journal of Microbiology, 2006, 26(2): 1-4.)
- [19] 李杰,陈丽华,李希巨,等. 一种应用 *luxAB* 基因标记大豆根瘤菌的新方法[J]. 大豆科学, 2003, 22(3): 172-175. (Li J, Chen L H, Li X C, et al. A new method to label soybean rhizobia using *luxAB* gene[J]. Soybean Science, 2003, 22(3): 172-175.)
- [20] 曾昭海,陈文新,胡跃高,等. 应用 RAPD 分子标记技术研究苜蓿根瘤菌的田间竞争结瘤能力[J]. 生态学报, 2004, 24(7): 1341-1345. (Zeng Z H, Chen W X, Hu Y G, et al. Study on competitive nodulation ability of *Rhizobium meliloti* in field test by using RAPD molecular marker method[J]. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(7): 1341-1345.)
- [21] Koeuth T, Versalovic J, Lupski J R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria[J]. Genome Research, 1995, 5(4): 408-418.
- [22] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA-sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [23] 刘佳妍,金莉莉,王秋雨. 细菌基因组重复序列 PCR 技术及其应用[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(3): 90-93. (Liu J Y, Jin L L, Wang Q Y. Repetitive-element PCR of bacteria and its application[J]. Journal of Microbiology, 2006, 26(3): 90-93.)
- [24] 肖猛,刘晓云,刘桂霞,等. BOX-PCR 分子标记对补播紫花苜蓿共生根瘤菌田间竞争结瘤能力的研究[J]. 华北农学报, 2011, 26(1): 187-190. (Xiao M, Liu X Y, Liu G X, et al. Study on competitive nodulation ability of *Rhizobia* in symbiosis with reseeded *Medicago sativa* in field test by using BOX-PCR molecular marker method[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2011, 26(1): 187-190.)
- [25] 郭丽梅,杨永,张世晨,等. 半无叶型豌豆根瘤菌接种效应及其竞争结瘤能力分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 2942-2952. (Guo L M, Yang Y, Zhang S C, et al. Effects and competitive nodulation ability of inoculation with *Rhizobium leguminosarum* strains on a semi-leafless pea [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(14): 2942-2952.)
- [26] Hard Y R W F, Holsten R D, Jackson E K, et al. The acetylene ethylene assay for nitrogen fixation laboratory and field evaluations [J]. Plant Physiology, 1968, 43(8): 1185-1207.
- [27] 李艳杰. 接种大豆根瘤菌对大豆生长及产量的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2013(1): 50-52. (Li Y J. Effects of rhizobia inoculation on soybean growth and yield[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2013(1): 50-52.)
- [28] 冯丽华,张景岚,樊惠,等. 优良大豆根瘤菌田间增产效果初报[J]. 生物技术, 1994, 4(3): 29-32. (Feng L H, Zhang J L, Fan H, et al. Yield increase of soybean by inoculation of high efficient soybean rhizobia[J]. Biotechnology, 1994, 4(3): 29-32.)
- [29] Mishra P K, Bisht S C, Mishra S, et al. Coinoculation of *Rhizobium leguminosarum*-PRL with a cold tolerant *Pseudomonas* sp. improves iron acquisition, nutrient uptake and growth of field pea (*Pisum sativum* L.) [J]. Journal of Plant Nutrition, 2012, 35(2): 243-256.
- [30] Chemining'wa G N, Ngeno J, Muthomi J W, et al. Effectiveness of indigenous pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) in cultivated soils of central Kenya [J]. Journal of Applied Biosciences, 2012, 57: 4177-4185.