

根瘤菌与烯效唑互作对大豆生长及固氮的影响

张明会,王碧莹,李 双,李 可,陈 阳,何 斌,孙冬梅

(黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院,黑龙江 大庆 163319)

摘 要:以根韦氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)和埃尔坎慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium elkanii*)为研究材料,以0.001~100 mg·L⁻¹浓度的烯效唑培养两种根瘤菌,探究烯效唑对根瘤菌生长的影响。结果表明:供试烯效唑浓度范围内大于10 mg·L⁻¹时抑制根瘤菌数量,烯效唑浓度为1 mg·L⁻¹时对根瘤菌数量具有促进作用。大豆以1 mg·L⁻¹浓度烯效唑浸种,每2.5 kg土壤拌有30 mL对数生长期的根瘤菌菌液,在花期测定大豆叶片与根系的SOD、POD、CAT酶活力、丙二醛含量(MDA)及大豆根系脲含量,确定根瘤菌与烯效唑互作对大豆生长及共生固氮的影响。结果显示:与根瘤菌处理相比,根瘤菌与烯效唑互作可降低大豆植株中MDA含量达40%~60%,提高大豆根系脲含量达5%~8.4%,但对测定的3种酶活性影响不显著。试验结果证实了根瘤菌与烯效唑互作可提高大豆固氮能力,降低MDA含量。

关键词:韦氏中华根瘤菌;埃尔坎慢生根瘤菌;烯效唑;大豆

中图分类号:S565.1;Q939.9 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2018.01.0112

Effect of Uniconazole and Rhizobium Interaction on Growth and Nitrogen Fixation in Soybean

ZHANG Ming-hui, WANG Bi-ying, LI Shuang, LI Ke, CHEN Yang, HE Bin, SUN Dong-mei

(Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: Taking strains of *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* as the research materials, the concentration of uniconazole from 0.001 to 100 mg·L⁻¹ were used to determine the influence of uniconazole interacting with those two strains. The results showed that the amount of *S. fredii* and *B. elkanii* was inhibited when the concentration of uniconazole was higher than 10 mg·L⁻¹, but the amount of these two strains was promoted when the concentration of uniconazole was 1 mg·L⁻¹. Soybean seed was presoaked by uniconazole with 1 mg·L⁻¹ and 30 mL Rhizobium liquid in logarithmic growth phase was mixed with soil per 2.5 kg. The enzyme activities of SOD, POD and CAT, the MDA level in soybean leaf and root, the ureide content in root were assayed in flowering-podding phase to reflect the effects of those two strains and uniconazole interaction on soybean. The results confirmed that those two strains and uniconazole interaction were effectively reduced the MDA level about 40%-60% in soybean roots and leaves, the ureide content in soybean root were increased 5%-8.4%, however, the three enzyme activities were not significantly affected. The experimental results confirmed that Rhizobium interacting with uniconazole could increase nitrogen fixation ability of soybean and reduce MDA content.

Keywords: *Sinorhizobium fredii*; *Bradyrhizobium elkanii*; Uniconazole; Soybean

大豆的生长离不开对环境中氮素的吸收,而其与根瘤菌(*Rhizobium*)的共生固氮作用是生物固氮中固氮效率最高的体系^[1],共生固氮是大豆的主要固氮手段,如何提高大豆的固氮能力一直是大豆增产增收的关键问题。方法之一是大豆的调控,如:不同大豆品种间,生育期短的大豆品种根瘤固氮酶活性高于生育期长的品种^[2];而不同学者研究了植物生长调节剂对大豆的影响,如:DTA、CC和SOD_M浸种可增加大豆根系干重,调节根系体积^[3],烯效唑(uniconazole, S₃₃₀₇)浸种能够增加大豆根系中柱鞘直径、增加根系木质部及韧皮部截面积,有利于大豆根系的生长发育^[4],但植物生长调节剂与大豆

固氮的关系鲜有报道。其二是对根瘤菌的调控,如:不同根瘤菌与不同大豆间,其结瘤、根瘤干重和固氮酶活性等有明显差异^[5]。目前研究人员对大豆共生固氮研究正日趋完善,但多数研究集中于根瘤菌或植物生长调节剂单方面对大豆的调控,植物生长调节剂与根瘤菌互作对大豆共生固氮体系的影响,在目前国内外研究中还未见详细报道。

本文以烯效唑和根瘤菌为研究材料,从调节大豆生长和根瘤菌两个方面入手,一方面以纯培养根瘤菌中加入烯效唑来确定根瘤菌对烯效唑的耐受性,探讨二者互作的可行性;另一方面通过根瘤菌与烯效唑互作测定大豆相关酶活性及根系脲含

收稿日期:2017-10-11
基金项目:保护地无公害蔬菜生产生物保障体系的开发应用(1254CGZH32);黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2017-Y64)。
第一作者简介:张明会(1991-),男,硕士,主要从事微生物研究。E-mail:1109710173@qq.com。
通讯作者:孙冬梅(1970-),女,教授,博士,主要从事微生物资源开发与利用研究。E-mail:7981004@qq.com。

量的变化,确定互作体系对共生固氮作用的影响。研究旨在明确根瘤菌与植物生长调节剂互作对大豆共生固氮的调控作用,丰富相关理论体系。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆根瘤菌:韦氏中华根瘤菌 *S. fredii* (45436) 和埃尔坎慢生根瘤菌 *B. elkanii* (W18-26) 由黑龙江八一农垦大学国家杂粮工程技术研究中心惠赠;烯效唑 S_{3307} 购自凯瑞农化工产品有限公司,粉剂,有效含量 96.5%;大豆品种为绥农 90 由黑龙江八一农垦大学作物栽培试验室惠赠。根瘤菌培养基为 YMA 培养基。

1.2 方法

1.2.1 根瘤菌与烯效唑互作对根瘤菌的影响 两种根瘤菌分别在液体 YMA 培养基中 28℃ 恒温培养至对数期(OD_{600} 约为 0.900),参照烯效唑田间施用浓度,将两种根瘤菌菌液稀释至 1.0×10^{-6} ,涂布于含 100,10,1,0.1,0.01 和 0.001 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度的烯效唑的 YMA 平板上,对照为不加烯效唑,28℃ 恒温培养 3 d 测定菌落数,每组 3 次重复。

将根瘤菌接入 6 个不同烯效唑浓度的 YMA 液体培养基中,对照为不加烯效唑。摇床培养,分别测量 2,4,6,8,10,12,24,48,72,96 h 时 OD_{600} 的吸光值。

1.2.2 根瘤菌与烯效唑互作对大豆重量与根系酰胺含量的影响 种植大豆盆栽,共设计 6 组处理,分别是处理 1:清水浸种,不使用根瘤菌与烯效唑;处理 2:烯效唑浸种,不使用根瘤菌;处理 3:清水浸种 + *Sinorhizobium fredii*;处理 4:清水浸种 + *Bradyrhizobium elkanii*;处理 5:烯效唑浸种 + *Sinorhizobium fredii*;处理 6:烯效唑浸种 + *Bradyrhizobium elkanii*;每个处理 5 组重复。其中,200 粒大豆种子通过 1 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度烯效唑 100 mL 浸种 4 h,200 粒大豆种子通过清水浸种 4 h;两种根瘤菌于 YMA 液体培养基中 28℃ 培养至对数期(菌液 $OD_{600} = 0.92$,活菌数约 1.0×10^8);采用内径 20 cm,高 14.5 cm 的花盆种植,每盆放入土壤 2.5 kg,加入根瘤菌盆栽土壤中每盆拌入 30 mL 根瘤菌菌液 + 30 mL 蒸馏水,不加根瘤菌盆栽土壤中每盆拌入 60 mL 蒸馏水。大豆每盆 4 穴,每穴 2 粒,出苗 10 d 每穴留 1 株,每盆共留 4 株。大豆生长至花荚期取样,测定大豆根系与地上部分的干重鲜重,参照徐志伟等^[6]的酰胺测定方法测定大豆根系酰胺含量变化。

1.2.3 大豆根系与叶片酶活力的测定 盆栽大豆

生长至花荚期取复叶记录重量,立即放于液氮中速冻,大豆根系洗盆取样,小心吸干表面水分后记录重量,于液氮中速冻后与叶片一同放于 -70℃ 超低温冰箱保存待测。过氧化物酶(POD)活性的测定采用愈创木酚法,过氧化氢酶(CAT)活性的测定采用紫外吸收法,超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用 NBT(氮蓝四唑)光化还原法^[7],丙二醛含量(MDA)的测定采用 TBA 显色法^[8]。各组处理同 1.2.2,每组处理 3 次重复。

1.3 数据分析

应用 Excel 2003 计算与绘图,DPS 7.05 版软件进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌与烯效唑互作对根瘤菌的影响

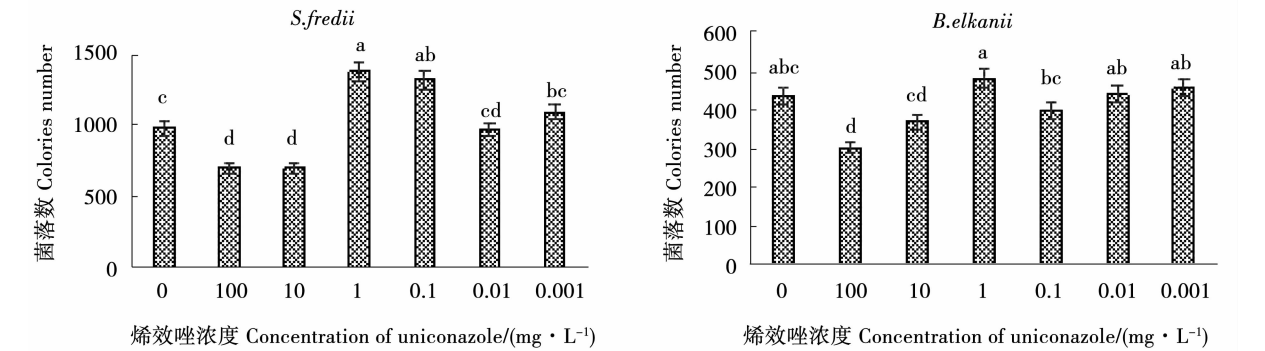
平板涂布试验中,当烯效唑浓度为 100 和 10 $mg \cdot L^{-1}$ 时,平板上 *S. fredii* 的菌落数较不加入烯效唑组有显著性降低,当烯效唑浓度为 1 和 0.1 $mg \cdot L^{-1}$ 时,*S. fredii* 的菌落数较不加入烯效唑组有显著性提高,当烯效唑浓度为 0.01 和 0.001 $mg \cdot L^{-1}$ 时,*S. fredii* 的菌落数与不加入烯效唑组无显著性差异;当烯效唑浓度为 100 $mg \cdot L^{-1}$ 时,平板上 *B. elkanii* 的菌落数较不加入烯效唑组有显著性降低,烯效唑浓度为 1 $mg \cdot L^{-1}$ 时,平板上的 *B. elkanii* 菌落数目与不加入烯效唑、烯效唑浓度为 0.01 和 0.001 $mg \cdot L^{-1}$ 的 3 组无显著性差异,但较烯效唑浓度为 100,10 和 0.1 $mg \cdot L^{-1}$ 的 3 组有显著提高(图 1)。

液体培养试验中,含有 100 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度烯效唑的培养基中 *S. fredii* 的菌体含量较其它 6 组出现降低,含有 10,1,0.1,0.01 和 0.001 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度烯效唑的培养基中 *S. fredii* 的菌体含量较不含烯效唑一组无明显变化;在含有 10 和 1 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度烯效唑的培养基中,*B. elkanii* 的菌体含量较含有 100,0.1,0.01 和 0.001 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度烯效唑培养基中 *B. elkanii* 的菌体含量有明显升高(图 2)。

2.2 根瘤菌与烯效唑互作对大豆重量与根系酰胺含量的影响

2.2.1 鲜重 花荚期测定大豆鲜重,其中清水浸种 + *Bradyrhizobium elkanii* 的地上部分鲜重较不做任何处理有显著性提高,其余各组间无明显差异;烯效唑浸种 + *Sinorhizobium fredii* 的根系鲜重较不做任何处理有显著性提高,其余各组间无明显差异(图 3)。

2.2.2 干重 烘干后测定干重,各组间地上部分干重和各组间根系干重均无显著性差异(图 3)。



图中不同大小字母表示不同处理间差异达到1%和5%水平显著,下同。
Different capital and lowercase letters in the picture mean significant difference among treatments at the 1% and 5% level respectively, the same below.

图1 两种根瘤菌平板涂布菌落生长情况
Fig. 1 Colony growth of *S. fredii* and *B. elkanii* on flat plate

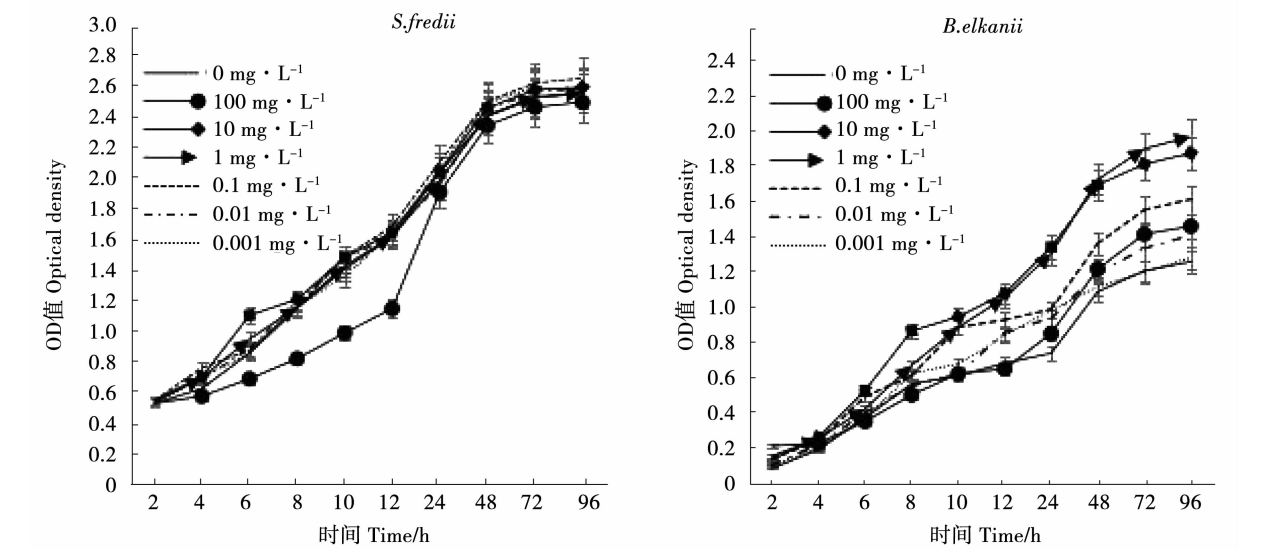


图2 两种根瘤菌液体培养生长情况
Fig. 2 Growth situation of *S. fredii* and *B. elkanii* with liquid culture

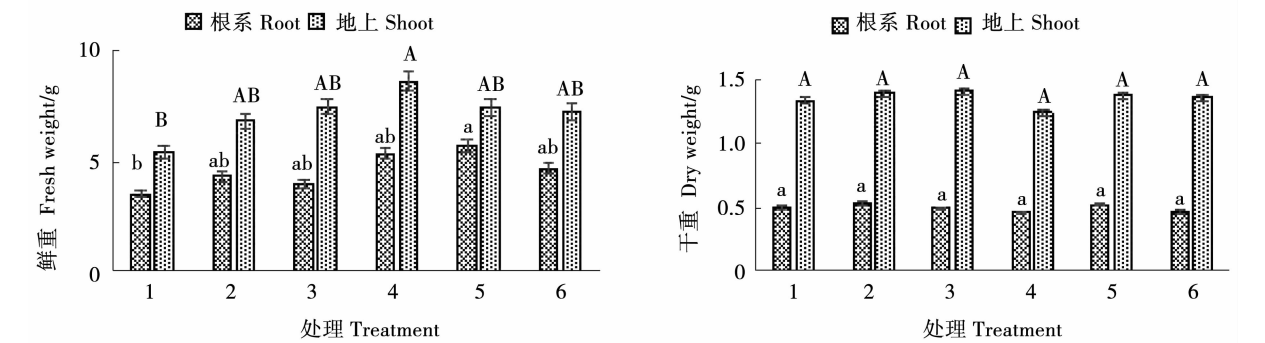


图3 各处理大豆鲜重与干重情况
Fig. 3 Soybean fresh weight and dry weight of different treatments

2.2.3 酰脲含量 测定大豆根系酰脲含量,发现烯效唑浸种 + *Sinorhizobium fredii* 的根系酰脲含量较清水浸种处理、只用烯效唑浸种和只添加 *Sinorhizobium fredii* 出现显著性提高;烯效唑浸种 + *Bradyrhizobium elkanii* 的根系酰脲含量较不处理、只用烯效唑浸种和只添加 *Bradyrhizobium elkanii* 出现显著性提高(图4)。

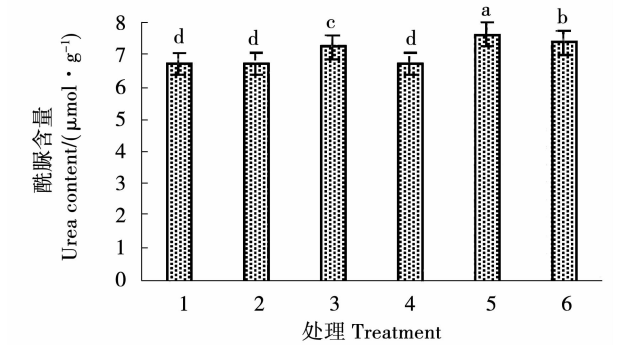


图4 各处理大豆根系脲含量

Fig. 4 Soybean root urea content of different treatments

2.3 根瘤菌与烯效唑互作对大豆根系与叶片酶活力的影响

2.3.1 SOD 测定大豆叶片与根系中单位蛋白的SOD酶活性,根系中烯效唑浸种 + *Sinorhizobium fredii* 的酶活性较清水浸种处理和只添加 *Sinorhizobium fredii* 处理无明显差异,较只添加烯效唑组有显著性提高,烯效唑浸种 + *Bradyrhizobium elkanii* 的酶活性较只添加烯效唑和只添加 *Bradyrhizobium elkanii* 处理无显著性差异,较清水浸种处理出现显著性降

低;叶片中,烯效唑浸种 + *Sinorhizobium fredii* 的酶活性较清水浸种处理和只添加烯效唑处理出现显著性升高,但与只添加 *Sinorhizobium fredii* 无明显差异,烯效唑浸种 + *Bradyrhizobium elkanii* 的酶活性较清水浸种处理和只添加烯效唑处理无明显差异,较只添加 *Bradyrhizobium elkanii* 出现显著性降低(图5a)。

2.3.2 POD 测定单位蛋白 POD 酶活性发现,根系中烯效唑浸种 + *Sinorhizobium fredii* 与清水浸种处理、只添加烯效唑和只添加 *Sinorhizobium fredii* 4组间的 POD 酶活性无显著性差异,烯效唑浸种 + *Bradyrhizobium elkanii* 与清水浸种处理、只添加烯效唑和只添加 *Bradyrhizobium elkanii* 4组间的 POD 酶活性也无显著性差异;叶片中烯效唑浸种 + *Sinorhizobium fredii* 的 POD 酶活性较清水浸种处理、只添加烯效唑和只添加 *Sinorhizobium fredii* 的3组出现显著性升高,烯效唑浸种 + *Bradyrhizobium elkanii* 的 POD 酶活性较清水浸种处理和只添加 *Bradyrhizobium elkanii* 无明显差异,较只添加烯效唑处理的 POD 酶活性出现显著性升高(图5b)。

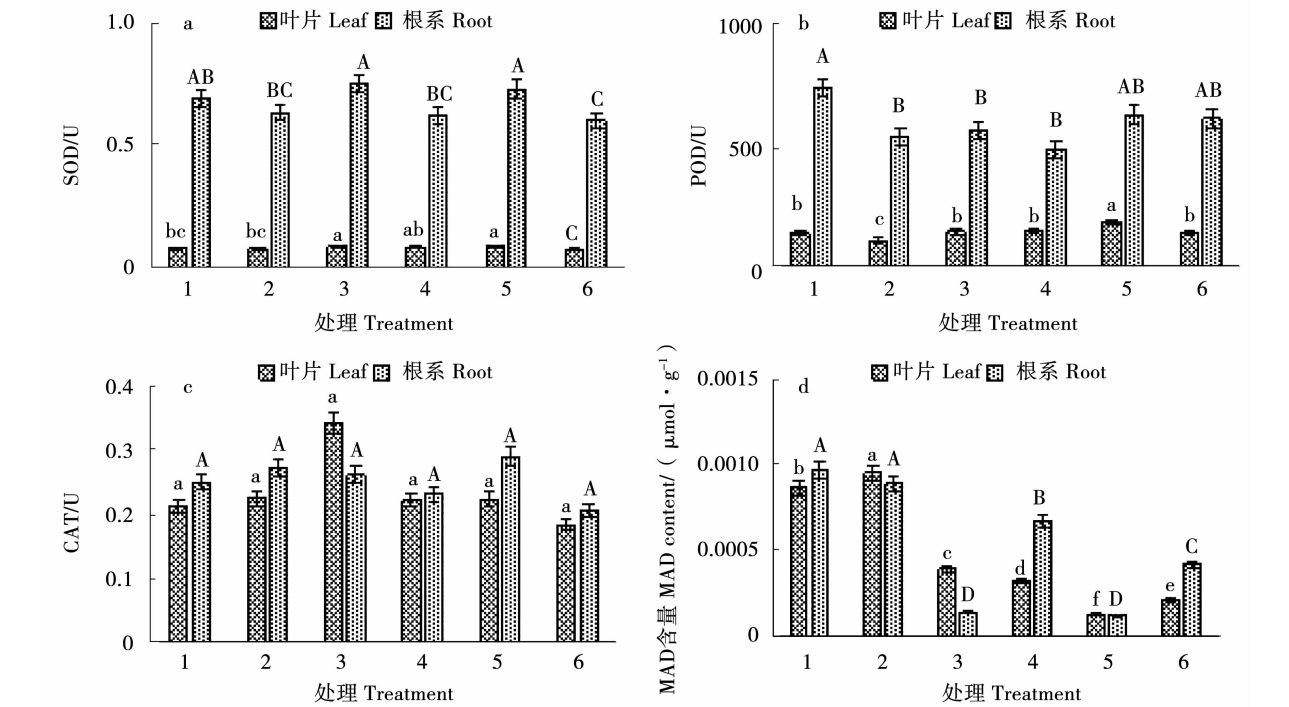


图5 单位蛋白的SOD(a)、POD(b)和CAT(c)酶活性及MDA(d)含量比较

Fig. 5 Soybean SOD(a), POD(b) and CAT(c) enzyme activities and its MDA(d) content

2.3.3 CAT 测定单位蛋白的CAT发现,各组间大豆根系的CAT酶活性和各组间大豆叶片的CAT酶活性无显著性差异(图5c)。

2.3.4 MDA 测定单位蛋白的MDA含量可知,根系中烯效唑浸种 + *Sinorhizobium fredii* 的MDA含量

较清水浸种处理和只添加烯效唑2组出现显著性降低,较只添加 *Sinorhizobium fredii* 的MDA含量无显著性差异,烯效唑浸种 + *Bradyrhizobium elkanii* 的MDA含量较不处理、只添加烯效唑和只添加 *Bradyrhizobium elkanii* 3组出现了显著性降低;叶片中烯

效唑浸种 + *Sinorhizobium fredii* 的 MDA 含量较清水浸种处理、只添加烯效唑和只添加 *Sinorhizobium fredii* 3 组出现显著性降低,烯效唑浸种 + *Bradyrhizobium elkanii* 的 MDA 含量较不处理、只添加烯效唑和只添加 *Bradyrhizobium elkanii*3 组也出现了显著性的降低(图 5d)。

3 结论与讨论

Chen 等^[9]证实,植物生长调节剂可以对根瘤菌产生调控作用,本试验选用烯效唑加入纯培养的根瘤菌中,结果证实 1 mg·L⁻¹ 的烯效唑也可促进根瘤菌的生长,与 Chen 等^[9]的研究结果相一致。宋胜等^[10]的研究表明,0 ~ 50 mg·L⁻¹ 浓度烯效唑浸种,随着烯效唑浓度升高,大豆 POD、SOD、CAT 酶活性升高,MDA 含量降低;闫艳红等^[11]也指出,适当浓度的烯效唑浸种降低了丙二醛(MDA)含量。本试验选用最适烯效唑浓度 1 mg·L⁻¹ 与根瘤菌互作后测定大豆酶活,其中 POD 和 CAT 酶活性无明显变化,而 *B. elkanii* 与烯效唑互作处理根系的 SOD 酶活性较只添加 *B. elkanii* 组出现降低,叶片 SOD 酶活性较清水浸种处理组出现降低,这也是与他人研究不一致的地方,但对比相同重量样品的 SOD 酶活性并未出现该差异,分析可能与分泌的蛋白变化有关,具体原因还有待进一步研究;对比各组 MDA 含量,发现根瘤菌与烯效唑互作处理的 MDA 含量明显降低,故推测烯效唑与根瘤菌互作对大豆抗逆能力的提高主要来源于 MDA 含量的降低。董守坤等^[12]指出,酰胺是大豆与根瘤菌共生固氮中的氮代谢产物,是氮素贮藏和运输的主要形式;房春红等^[13]也说明了酰胺含量与大豆固氮酶活性呈显著正相关。试验中证实 *S. Fredii* 和 *B. elkanii* 与烯效唑互作的处理中根系的酰胺含量较其它组都有显著性升高,证明了根瘤菌与烯效唑互作可提高大豆根瘤固氮能力。因而,生产实践中,适当浓度的烯效唑与根瘤菌互作可促进根瘤菌生长,提高大豆根系酰胺含量,降低 MDA 含量。

参考文献

[1] 王宏光,孙殿君,马忠强,等. 大豆根瘤菌 HD001 的分离鉴定及结瘤能力检测[J]. 大豆科学. 2014, 33(3): 280-384. (Wang H G, Sun D J, Ma Q, et al. Isolation and identification of rhizobium HD001 and its nodulation capacity test in soybean germplasm[J]. Soybean Science, 2014, 33(3): 280-384.)

[2] 陈慧,邸伟,姚玉波,等. 不同大豆品种根瘤固氮酶活性与固氮量差异研究[J]. 核农学报, 2013, 27(3): 379-383. (Chen H, Di W, Yao Y B, et al. Study on the difference of nodule nitro-

genase activity and amount of nitrogen fixation of different soybean varieties[J]. Journal of Nuclear Agricultural Science, 2013, 27(3): 379-383.)

[3] 冯乃杰,阎秀峰,郑殿峰,等. 两种植物生长调节剂浸种对大豆根系解剖结构的影响[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(7): 687-692. (Feng N J, Yan X F, Zheng D F, et al. Effect of PGRs seed soaking on anatomical structure in soybean root[J]. Plant Physiology Communications, 2010, 46(7): 687-692.)

[4] Svenson S E. Uniconazole and benzylaminopurine influence flowering and growth of *acalypha hispaniolae* Urb[J]. HortScience, 1994, 29(7): 736-736.

[5] 房春红. 根瘤菌与大豆、土壤间相互适应性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007. (Fang C H. Studies on adaptability of rhizobium to soybean and soil[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2007.)

[6] 徐志伟,刘承宪. 豆科植物中酰胺含量的测定[J]. 植物生理学通讯, 1986(4): 60-62. (Xu Z W, Liu C X. Determination of urea content in leguminous plants[J]. Plant Physiology Communications, 1986(4): 60-62.)

[7] 朱翠英,付喜玲,孙明岳,等. 桃自然休眠期间抗氧化系统酶(CAT、POD、SOD)活性变化[J]. 山东农业大学学报, 2015, 46(6): 808-811. (Zhu C Y, Fu X L, Sun M Y, et al. Changes in the activity of antioxidant enzymes(CAT, POD, SOD) during the dormancy of nectarine buds[J]. Journal of Shandong Agricultural University, 2015, 46(6): 808-811.)

[8] 张志良,瞿伟菁. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 274-277. (Zhang Z L, Qu W J. Experimental guidance of plant physiology [K]. Beijing: Higher Education Press, 2003: 274-277.)

[9] Chen W H, Zheng D F, Feng N J, et al. Effect of plant growth regulator GA3 and PIX on cell growth and structure of *Rhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2014, 8(4), 1723-1734.

[10] 宋胜,冯乃杰,郑殿峰. 烯效唑浸种对大豆种子萌发及保护性酶系的影响[J]. 大豆科学, 2008, 27(2): 259-266. (Song S, Feng N J, Zheng D F. Effects of seed soaking with uniconazole on germination and anti-oxidant enzyme of soybean[J]. Soybean Science, 2008, 27(2): 259-266.)

[11] 闫艳红,李波,杨文钰. 烯效唑浸种对大豆苗期抗旱性的影响[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(4): 480-485. (Yan Y H, Li B, Yang W Y. Effects of uniconazole soaking on drought tolerance of soybean seedling[J]. Chinese Journal of Oil Crop Science, 2009, 31(4): 480-485.)

[12] 董守坤,马春梅,李姚,等. 大豆植株中酰胺含量变化动态研究[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(5): 549-552. (Dong S K, Ma C M, Li Y, et al. Study on the change of ureides content in soybean plant[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2005, 36(5): 549-552.)

[13] 房春红,陈秀双,刘杰,等. 大豆固氮酶活性与酰胺含量的关系[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(3): 9-12. (Fang C H, Chen X S, Liu J, et al. Relation between ureide content and nitrogenase activity in soybean[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, 39(3): 9-12.)