



耐低氮大豆资源的苗期筛选与评价

孙浩楠¹, 曹霞¹, 朱贵爽¹, 李佳锴¹, 周磊¹, 吕叶², 邱红梅², 李志刚¹

(1. 内蒙古民族大学 农学院/科尔沁沙地生态农业国家民委重点实验室, 内蒙古 通辽 028000; 2. 吉林省农业科学院/大豆国家工程研究中心, 吉林 长春 130033)

摘要:为探究大豆苗期耐低氮资源鉴定的指标与方法, 筛选耐低氮大豆种质, 本试验以 234 份国内外大豆品种资源为试验材料, 设置低氮和正常氮 2 个氮水平, 在处理 24 d 时测定茎粗、株高、叶柄长、叶绿素相对含量等 12 个指标。结果表明: 大豆苗期各指标均值在 2 个氮水平下存在显著差异, 耐低氮系数的平均值范围为 0.48 ~ 1.38; 通过主成分分析将 12 个指标转化为 5 个主要成分, 累计贡献率达 85.37%, 并构建耐低氮大豆种质资源评价方程: $D = 0.48 D_1 + 0.21 D_2 + 0.13 D_3 + 0.11 D_4 + 0.08 D_5$; 基于耐低氮综合评价值 (D) 进行聚类分析将 234 份大豆品种分为 5 类, 分别为高耐低氮型、耐低氮型、中耐氮型、敏感型和高敏型, 筛选出高耐低氮资源, 包括荏前田豆、宝丰 11 和射阳半夏子等 8 份, 高敏型种质, 包括ラニホクシロメ、黔豆 1 号和 WDD01135 等 11 份。依据逐步回归分析得出株高、总干重、叶柄长、茎粗和地下干重 5 个性状的耐低氮系数可作为鉴定资源耐低氮性的主要指标。本研究构建的大豆耐低氮种质资源评价体系, 将为耐低氮大豆品种的鉴定与筛选奠定基础。

关键词: 大豆; 种质资源; 低氮; 正常氮; 耐低氮资源

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Screening and Evaluation of Low Nitrogen Tolerant Soybean Resources at Seedling Stage

SUN Haonan¹, CAO Xia¹, ZHU Guishuang¹, LI Jiakai¹, ZHOU Lei¹, LYU Ye², QIU Hongmei², LI Zhigang¹

(1. College of Agriculture, Inner Mongolia Minzu University/State Key Laboratory of Eco-agriculture of Horqin Sandy Land, Tongliao 028000, China; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences/Soybean National Engineering Research Center, Changchun 130033, China)

Abstract: In this study, the objective was to investigate the identification indexes and methods for low nitrogen tolerance in soybean seedlings and to screen soybean germplasm with low nitrogen tolerance. A total of 234 soybean varieties from both domestic and international sources were used as experimental materials. Two nitrogen levels, low nitrogen and normal nitrogen, were established, and 12 indexes including stem diameter, plant height, petiole length, and relative chlorophyll content were measured after 24 days of treatment. The results revealed significant differences in the mean values of each index between the two nitrogen levels during the seedling stage of soybean. The mean value of the low nitrogen tolerance coefficient ranged from 0.48 to 1.38. Principal component analysis was conducted to transform the 12 indexes into 5 main components, with a cumulative contribution rate of 85.37%. An evaluation equation for low nitrogen tolerant soybean germplasm resources was formulated: $D = 0.48 D_1 + 0.21 D_2 + 0.13 D_3 + 0.11 D_4 + 0.08 D_5$. Based on the comprehensive evaluation value (D) of low nitrogen tolerance, the 234 soybean varieties were classified into five categories using cluster analysis, namely high tolerance to low nitrogen, low tolerance to low nitrogen, medium tolerance to low nitrogen, sensitive, and highly sensitive types. Eight soybean resources with high tolerance to low nitrogen, such as Tiandou, Baofeng 11, and Sheyang Banxiazi, as well as 11 highly sensitive germplasms including RaNiKuKaRa, Qiantou 1, and WDD01135, were identified through screening. Stepwise regression analysis indicated that the low nitrogen tolerance coefficient of plant height, total dry weight, petiole length, stem diameter, and underground dry weight could be used as the main indicators for identifying low nitrogen tolerance in soybean resources. The objective of this research was to develop an assessment framework for soybean germplasm resources exhibiting low nitrogen tolerance. Moreover, the study aimed to establish a theoretical foundation for the identification and selection of soybean varieties displaying reduced sensitivity to nitrogen availability.

Keywords: soybean; germplasm resources; low nitrogen; normal nitrogen; low nitrogen tolerant resources

氮是植物进行正常生命活动必需的矿质元素, 也是提高作物产量的重要营养因子, 同时在蛋白质、核酸、叶绿素等代谢物的合成中也是十分必要的^[1]。近 50 年来, 我国氮肥的施用量高达过去的 3

收稿日期: 2022-05-25

基金项目: 国家民委科尔沁沙地生态开放项目 (MDK2022029); 国家重点研发计划 (2021YFD1201603); 内蒙古自治区自然科学基金 (2022MS03063); 内蒙古自治区自然科学基金 (2021LHMS03010)。

第一作者: 孙浩楠 (1999—), 男, 硕士研究生, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: 9440457@qq.com。

通讯作者: 李志刚 (1970—), 男, 博士, 教授, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: 13948651158@126.com;

邱红梅 (1982—), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事大豆种质资源研究。E-mail: qhm2001-2005@163.com。

倍,而我国的粮食仅增产 70%。氮肥的过度施用不仅造成资源的浪费,还导致了許多严峻的环境问题,如土壤酸化、温室气体排放以及水体的富营养化^[2-4]。虽然近年来已经通过限制化肥使用以及改良耕作方法来修复农田生态系统,但氮肥利用效率低的问题仍未被彻底解决。因此低氮高效作物品种的筛选与选育对农业可持续发展起着至关重要的作用^[5]。

大豆[*Glycine max* (Linn.) Merr.]原产自中国,是重要的粮食、油料作物,也是一种不可多得的富含蛋白质的作物^[6]。对于一些高蛋白大豆品种,对氮素的需求较高^[7]。大豆获取氮素的形态可分为铵态氮和硝态氮 2 种,铵态氮通常由大豆根瘤菌固定空气中的氮形成,根瘤菌共生固氮可满足大豆一生中 60% 左右的氮素需求^[8-9]。但是在大豆苗期,根部发育不完全、大豆根瘤数量较少,共生固氮的量也较少。因此,土壤中的氮是大豆苗期氮素的主要来源,通常以硝态氮 NO₃⁻ 的形式被吸收,由亚硝酸还原酶(Nitrite Reductase, NR) 还原成 NO₂⁻ 并运送到叶绿体,还原型 Fd 将其还原成 NH₄⁺ 后通过谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT) 循环被同化为氨基酸,此循环中谷氨酰胺合成酶(Glutamine Synthetase, GS) 参与催化,谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH) 也能参与氨的同化过程。通常,在氮供应不足条件下,上述参与氨基酸合成的各种酶的活性也会受到影响^[10]。近年来我国针对氮肥过度使用引发的环境问题推出了减肥增效政策,减少化肥施用量,提高化肥利用率,所以进行大豆耐低氮品种的筛选是关键^[11]。由于各大豆品种的耐低氮能力不同,对种质资源进行精准鉴定,筛选及培育新型耐低氮品种是降低氮肥施用量和提高大豆产量的有效方法^[12]。

到目前为止,水稻^[13]、小麦^[14]、玉米^[15]等作物均有耐低氮的相关研究^[16-20],初步构建了作物耐低氮评价体系。李俊杰等^[14]利用 118 份不同基因型小麦在两种氮水平下进行苗期水培试验,筛选出 2 份高耐低氮型小麦和 3 份耐低氮型小麦。张楚等^[17]以 9 份不同基因型苦荞为试材,采用苗期水培方式,测定不同氮水平下的农艺性状和生理特性等指标,筛选出株高、茎粗、叶面积、根冠比、叶绿素含量、最大荧光(Maximum Fluorescence, Fm)、根系超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD) 活性及

氮利用效率 8 个指标可以作为苦荞耐低氮能力的筛选指标。刘芯欣等^[21]以 260 份大豆种质资源为试材进行苗期盆栽试验,通过主成分分析和聚类分析筛选出 17 份高耐低氮大豆品种,并使用逐步回归分析方法筛选出总干重、地下干重、地上部鲜重、第 2 片复叶 SPAD 值(Soil and Plant Analyzer Development, SPAD2) 和第 1 片复叶 SPAD 值(SPAD1), 5 个大豆苗期耐低氮评价指标;远月丽等^[22]以 78 份大豆种质资源进行水培试验,通过多元分析筛选出总干重、整株氮含量、整株总氮、总根长、根表面积和根体积 6 个大豆苗期耐低氮评价的关键指标,并筛选耐低氮资源 2011-X-618 和敏感材料 2011-X-531。本试验对 234 份大豆品种资源进行苗期耐低氮鉴定,比较分析 2 个氮水平下品种资源的性状差异,对各性状的耐低氮系数进行多元统计分析、逐步回归分析和聚类分析等,鉴定评价种质资源的苗期耐低氮能力及筛选苗期耐低氮鉴定的关键指标,为氮高效大豆品种的遗传改良、选育及产业的发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验以 234 份大豆种质资源为试验材料(附表 1),其中包括国内种质资源 142 份和国外种质资源 92 份,均由中国农业科学院作物科学研究所邱丽娟老师团队提供。

1.2 试验设计

试验于 2022 年 6 月在吉林省农业科学院公主岭院区试验基地内进行,采取裂区设计,主区设低氮和正常氮处理,副区为品种资源,3 次重复。试验采用盆栽方法,以高压灭菌的蛭石和珍珠岩 2: 1 混合为栽培介质,选取大小均匀、无病斑无虫眼的大豆种子,用 75% 的乙醇对其表面进行消杀处理后播种。供试资源同时完成播种,直播 3 粒待第一片真叶完全展开后间苗至 1 株。播种时喷清水保湿,出苗后分别加入含氮营养液和无氮营养液(表 1),后期需水时补充相应氮处理营养液。为防止根瘤的产生,使用苜蓿霉素和卡那霉素溶液以 1: 0. 1 的比例混入营养液中,进一步灭菌、抑制大豆根瘤的产生进而减少试验误差。处理 24 d 后,测量植株的叶绿素含量、类黄酮指数和氮平衡指数,之后测量株高、茎粗、叶柄长、主茎节数、节间长以及干物质量。

表 1 大豆苗期盆栽试验两种氮处理的营养液组分

Table 1 Nutrient composition of two nitrogen treatments in soybean seedling pot experiment

处理	组分	用量	处理	组分	用量
Treatment	Component	Content/(mg·L ⁻¹)	Treatment	Component	Content/(mg·L ⁻¹)
正常氮处理	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	472. 000	低氮处理	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	47. 200
Normal-N treatment	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0	Low-N treatment	CaCl ₂ ·2H ₂ O	264. 432
	KNO ₃	252. 500		KNO ₃	25. 250
	K ₂ SO ₄	0		K ₂ SO ₄	195. 807
	CO(NH ₂) ₂	40. 000		CO(NH ₂) ₂	4. 000
	KH ₂ PO ₄	68. 000		KH ₂ PO ₄	68. 000
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246. 500		MgSO ₄ ·7H ₂ O	246. 500
	Fe-EDTA	4. 600		Fe-EDTA	4. 600
	KI	0. 830		KI	0. 830
	H ₃ BO ₃	6. 200		H ₃ BO ₃	6. 200
	MnSO ₄ ·H ₂ O	19. 000		MnSO ₄ ·H ₂ O	19. 000
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8. 600		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8. 600
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0. 024		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0. 024
	Na ₂ MO ₄ ·2H ₂ O	0. 240		Na ₂ MO ₄ ·2H ₂ O	0. 240
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0. 027		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0. 027

1.3 测定项目及方法

1.3.1 农艺性状及生物量 于第 4 片复叶展开期测定大豆植株的农艺性状,使用直尺测定株高 (Plant Height, PH):子叶节至生长点的长度;叶柄长 (Petiole Length, PL):第 2 复叶叶柄长度;使用游标卡尺测定茎粗 (Stem Diameter, SD):主茎第 1 节间的直径;主茎节数 (Main Stem Node, MSN):从子叶节到主茎顶端的节数;节间长 (Internode Length, IL):株高/主茎节数。将植株在子叶痕处剪断,区分为地上部和根部组织,根部清洗干净后烘箱 105 ℃ 杀青 30 min 后,60 ℃ 烘干直至恒重,用精度为万分之一分析天平分别精准的称量地上干重 (Shoot Dry Weight, SDW) 和地下干重 (Root Dry Weight, RDW),并且计算植株总干重 (Total Dry Weight, TDW)、根冠比 (Root Shoot Ratio, RSR) 和耐低氮系数^[21],公式如下:

总干重 = 地上部干重 + 地下部干重

根冠比 = 地下部干重 / 地上部干重

耐低氮系数 = 低氮处理下性状值 / 正常氮处理下性状值

1.3.2 叶绿素含量、类黄酮指数和氮平衡指数 使用多酚-叶绿素仪 (Dualex-4) 测定第 2 复叶的叶绿素相对含量 (Chlorophyl, CHI)、类黄酮指数 (Flavonoid, FLA)、氮平衡指数 (Nitrogen Balance Index, NBI),每片叶测定 3 次取平均值。

1.4 数据分析

使用模糊隶属函数法将 234 份大豆种质资源的各农艺性状值定义于 [0, 1] 的区间内,公式为 $X = (X_i - X_{imin}) / (X_{imax} - X_{imin})$,其中 X 为隶属函数值, X_i 为指标 i 的测定值, X_{imax} 和 X_{imin} 分别为指标 i 的最大值和最小值。

数据模糊隶属函数化处理后,进行主成分得分计算,公式为 $D = V_1 F_1 + V_2 F_2 + \cdots + V_n F_n$,其中 V_n 为主成分因子的权重值, F_n 为主成分得分, D 值为各品种耐低氮综合评价值。

使用 Microsoft Office Excel 2021 对各农艺性状数据进行统计、处理,使用 DPS3. 0、IBM SPSS Statistics 26、Origin 2021、R 语言等软件进行差异性、相关性、主成分以及聚类分析。

2 结果与分析

2.1 大豆种质资源苗期性状的统计分析

如表 2 所示,在两个氮水平下 12 个指标均发生一定程度的变异,除类黄酮指数外,其余 11 个生理形态指标在两种氮处理下的变异系数均大于 10%,且低氮处理下的变异系数普遍大于正常氮处理,表明低氮下种质资源表现出更大的差异。此外耐低氮系数的变异在 9. 83% ~ 40. 30%,说明供试材料间的耐低氮特性存在遗传差异,选用的种质资源具有代表性。除了叶绿素含量的耐低氮系数最大值

小于1,其他性状指标的耐低氮系数最大值均大于1,表明低氮下存在茎粗、叶柄长、株高、地上干重、总干重等不减少的资源,这类资源对低氮的耐受性更高。

234份大豆种质资源在正常氮和低氮水平下,12个指标均发生了显著变化,基于耐低氮系数可以看出,低氮处理下整体差异主要表现为叶绿素含量和氮平衡指数下降、生物量减少及根冠比变大。在低氮处理下,各性状表现出不同幅度的下降。降低的幅度依次为:氮平衡指数(52.57%)>叶绿素含

量(49.85%)>地上干重(31.47%)>总干重(26.06%)>叶柄长(21.71%)>株高(18.24%)>茎粗(13.78%)>主茎节数(13.55%)>地下干重(11.25%)>节间长(4.92%),这表明大豆的生长发育会受氮素供应水平的降低而减缓。并且对于各性状的影响存在差异,其中氮平衡指数减少最大,而节间长度的减少最小。氮平衡指数反映的是氮素供应水平,氮平衡指数绝对值越大,氮素供应越多,所以低氮处理时,多数资源的氮平衡指数减少。

表2 大豆品种资源苗期各耐低氮指标变异分析

Table 2 Variation analysis of low nitrogen resistance indexes of soybean variety resources at seedling stage

性状 Trait	正常氮处理 Normal N treatment			低氮处理 Low N treatment			耐低氮系数 Low N resistance coefficient		
	平均值 Mean	范围 Range	变异系数 CV/%	平均值 Mean	范围 Range	变异系数 CV/%	平均值 Mean	范围 Range	变异系数 CV/%
茎粗 SD/mm	3.47 ± 0.42 A	2.20 ~ 4.46	11.98	3.00 ± 0.36 B	2.15 ~ 4.09	12.01	0.87 ± 0.11	0.61 ~ 1.22	12.24
叶柄长 PL/cm	12.21 ± 2.53 A	5.47 ~ 19.40	20.73	9.56 ± 2.56 B	4.40 ~ 20.30	26.79	0.80 ± 0.20	0.43 ~ 1.66	25.36
主茎节数 MSN	6.34 ± 0.64 A	4.33 ~ 8.00	10.05	5.48 ± 0.64 B	4.00 ~ 7.67	11.67	0.87 ± 0.12	0.57 ~ 1.43	13.85
株高 PH/cm	23.03 ± 3.60 A	17.07 ~ 43.85	15.66	18.83 ± 4.32 B	10.43 ~ 35.33	22.95	0.83 ± 0.18	0.45 ~ 1.50	21.50
节间长 IL/cm	3.62 ± 0.46 A	2.39 ~ 5.84	12.75	3.44 ± 0.61 B	2.09 ~ 6.26	17.86	0.95 ± 0.14	0.68 ~ 1.52	14.73
叶绿素值 CHI	29.97 ± 3.70 A	20.68 ~ 39.03	12.34	15.03 ± 3.08 B	7.28 ~ 25.95	20.48	0.51 ± 0.11	0.30 ~ 0.97	21.53
类黄酮指数 FLA	1.49 ± 0.16 B	1.11 ~ 1.94	10.54	1.58 ± 0.16 A	1.04 ~ 1.96	10.10	1.07 ± 0.10	0.66 ~ 1.43	9.83
氮平衡指数 NBI	20.48 ± 3.50 A	13.26 ~ 31.58	17.08	9.71 ± 2.52 B	4.31 ~ 19.70	25.92	0.48 ± 0.14	0.24 ~ 1.09	28.65
地上干重 SDW/g	1.93 ± 0.50 A	0.69 ~ 3.46	26.05	1.32 ± 0.44 B	0.44 ~ 3.31	33.64	0.72 ± 0.29	0.24 ~ 2.43	40.30
地下干重 RDW/g	0.70 ± 0.18 A	0.21 ~ 1.27	25.65	0.62 ± 0.17 B	0.26 ~ 1.82	27.84	0.92 ± 0.25	0.38 ~ 2.13	27.55
根冠比 RSR	0.38 ± 0.11 B	0.16 ~ 0.80	27.83	0.49 ± 0.11 A	0.22 ~ 0.98	22.56	1.38 ± 0.43	0.46 ~ 3.43	31.35
总干重 TDW/g	2.63 ± 0.61 A	0.99 ~ 4.29	23.09	1.94 ± 0.57 B	0.71 ~ 4.14	29.48	0.76 ± 0.25	0.29 ~ 2.09	32.33

注:同行不同大写字母表示在0.01水平显著。
Note: Different uppercase letters indicate significant at 0.01 level, and different lowercase letters indicate significant at 0.05 level.

2.2 大豆种质资源苗期各性状的相关性分析

分别对两种氮水平下测定的12个指标进行相关性分析,如图1a所示,低氮处理下叶绿素含量与氮平衡指数、地下干重和总干重呈极显著正相关,与地上干重呈显著正相关,与类黄酮含量呈极显著负相关,与其他形态性状无显著相关;株高与茎粗、叶柄长、主茎节数、节间长、地上干重、地下干重和总干重呈极显著正相关,与根冠比呈极显著负相关;地上干重与茎粗、叶柄长、主茎节数、株高、节间长、氮平衡指数、地下干重和总干重均呈极显著正相关,与叶

绿素含量呈显著正相关,与类黄酮指数和根冠比呈极显著负相关;地下干重与茎粗、叶柄长、主茎节数、株高、叶绿素含量、氮平衡指数、地上干重、根冠比和总干重均呈极显著正相关。在正常氮水平(图1b)下各性状的相关性与低氮水平下基本一致,此外,叶绿素含量还与茎粗和地上干重呈极显著正相关。结果表明,叶绿素、氮平衡指数等与生物量显著正相关,不受氮浓度影响。但低氮下叶绿素、氮平衡指数与总干重的相关系数值均减小,表明低氮下叶绿素含量与总干重的变化趋势不完全一致。

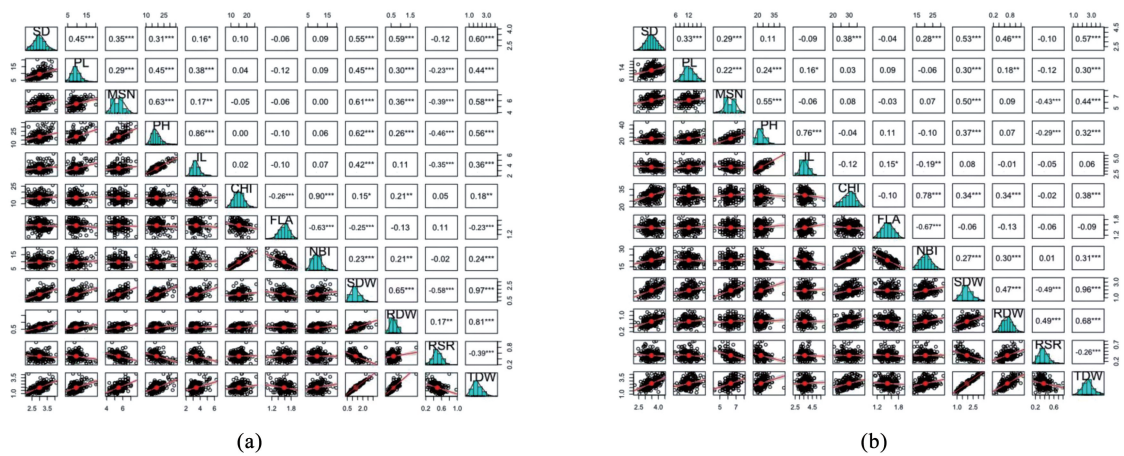


图 1 大豆品种资源苗期性状在低氮水平 (a) 和正常氮水平 (b) 的相关性分析

Fig.1 Correlation analysis of seedling traits of soybean varieties at low N level (a) and normal N level (b)

2.3 大豆种质资源苗期性状耐低氮系数的主成分分析

通过主成分分析将多个单一指标转化为少量综合性指标,得到的指标既能保持原有的数据特征,又涵括相对独立的信息,对耐低氮系数进行主成分分析能够更精准地评价大豆的耐低氮能力,依据累计贡献率大于85%的原则,将原有12个单一指标转换为5个综合指标。前5个主成分的特征值分别为4.88,2.11,1.30,1.11和0.85,累积贡献率达85.37%(表3),表明以上5个主成分所包含的信息反映了12个性状指标的大部分信息,可以作为评价大豆的耐低氮性的综合指标。

第1主成分的特征值为4.88,贡献率为40.67%,除根冠比和类黄酮指数荷载值为负外,其余性状的荷载值均为正(图2),其中荷载值较大的

性状主要有株高、地上干重和总干重,荷载值分别为0.39、0.41和0.41;第2主成分的特征值为2.11,贡献率为17.54%,其中荷载值绝对值较大的性状是叶绿素和氮平衡指数,荷载值分别为-0.55和-0.60;第3主成分的特征值为1.30,贡献率为10.81%,其中荷载值较大且为正的性状是地下干重和根冠比,荷载值分别为0.67和0.71;第4主成分的特征值为1.11,贡献率为9.25%,其中荷载值较大且为正的性状是叶柄长和节间长,荷载值分别为0.52和0.58;第5主成分的特征值为0.85,贡献率为7.11%,其中荷载值较大且为正的性状是茎粗和类黄酮指数,荷载值分别为0.35和0.60。通过主成分分析可知,地上干重、总干重、株高、叶绿素含量和氮平衡指数在综合评价指标里的权重较大,是考量耐低氮性的核心指标。

表 3 大豆品种资源综合指标的主成分分析

Table 3 Principal component analysis of comprehensive index in soybean variety resources

性状 Trait	主成分 Principal component				
	1	2	3	4	5
茎粗 SD	0.24	0.29	-0.10	-0.14	0.35
叶柄长 PL	0.26	0.08	0.06	0.52	0.30
主茎节数 MSN	0.33	0.15	0.03	-0.13	0.12
株高 PH	0.39	0.12	-0.01	0.30	-0.12
节间长 IL	0.28	0.03	-0.03	0.58	-0.34
叶绿素 CHI	0.16	-0.55	-0.01	0.04	0.47
类黄酮 FLA	-0.15	0.43	-0.09	0.10	0.60
氮平衡 NBI	0.20	-0.60	0.02	0.00	0.18
地上干重 SDW	0.41	0.03	-0.09	-0.30	-0.07
地下干重 RDW	0.24	0.13	0.67	-0.20	-0.01
根冠比 RSR	-0.23	-0.03	0.71	0.16	0.10
总干重 TDW	0.41	0.06	0.07	-0.31	-0.07
特征值 Eigen value	4.88	2.11	1.30	1.11	0.85
百分率 Contribution ratio/%	40.67	17.54	10.81	9.25	7.11
累计百分率% Cumulative contribution ratio/%	40.67	58.21	69.02	78.27	85.37

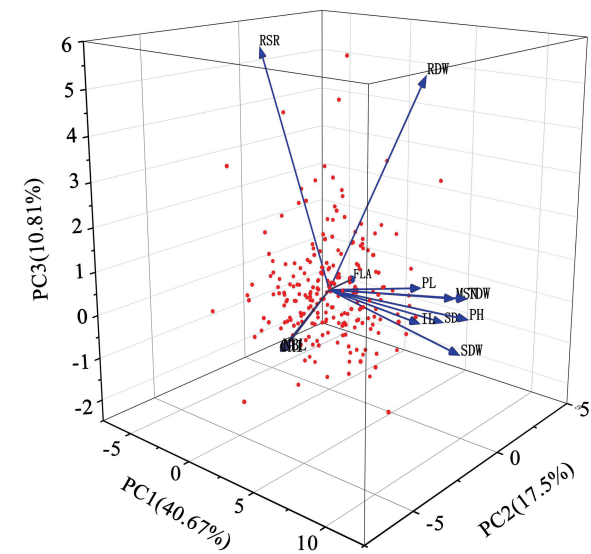


图2 大豆品种资源综合指标的主成分分析
Fig.2 Principal component analysis of comprehensive index in soybean variety resources

通过得到的12个性状的特征值计算各品种的主成分得分,以及各主成分贡献率的权重(分别为0.48,0.21,0.13,0.11和0.08),并依据各综合指标值和权重,计算出耐低氮综合评价D值,根据D值的大小对品种资源的耐低氮性进行综合评价。234份大豆品种资源的综合得分D平均值为0.524,D值越大则表明品种的耐低氮性越好。其中,排名靠前的大豆品种分别是荏前田豆、宝丰11、射阳半夏子、西港黄豆和苏州五月毛(甲),D值分别为1.029,1.023,1.021,0.971和0.958。这些资源在低氮下,株高、地上干重、总干重均增加,表明它们的生物量积累没有收到低氮的影响。排名靠后的大豆品种分别是ラニホクジロメ、黔豆1号、WDD01135、黔豆1号-1和WDD01118,D值分别为0.129,0.193,0.194,0.198和0.210。这类资源在低氮下,株高、地上干重、总干重均极显著减少,表明它们对低氮处理高度敏感。

2.4 基于主成分综合得分D值的聚类分析

采用欧式距离法^[23]将234份来自各地的大豆品种的综合评价D值进行聚类分析,结果如图3所示,将234份大豆品种划分成为高耐低氮(I)、耐低氮(II)、中耐氮(III)、敏感(IV)和高敏(V)5个类群,

D值范围分别为0.909~1.029、0.791~0.888、0.464~0.750、0.286~0.475和0.129~0.283。对上述5个类群各品种资源的各项指标耐低氮系数均值进行单因素方差分析,如表4所示,各指标均存在显著差异,类群I、类群II的大部分指标均优于其他3个类群,说明高耐低氮型和耐低氮型品种有较高的耐低氮能力。

第I类为高耐低氮型品种,包含荏前田豆、宝丰11和射阳半夏子等8份品种,耐低氮能力最强,该类品种在低氮处理下的叶柄长、主茎节数、株高、节间长和生物量略有增加,叶绿素含量有所降低,类黄酮指数和根冠比略有降低;第II类为耐低氮型品种,包含小粒红、牛腰齐和中吉602等12份品种,耐低氮能力较强,该类品种在低氮处理下茎粗略有降低,叶柄长、主茎节数、株高、节间长和生物量不减少;第III类是中耐氮型品种,包含铁豆48、RX-5-2-1和徐1214-11等119份品种,耐低氮能力中等,该类品种在低氮处理下的类黄酮指数略有增加,叶绿素值和氮平衡指数有所降低;第IV类是低氮敏感型品种,包含中黄42、川豆8号和绥农16等84份品种,耐低氮能力较弱,该类品种在低氮处理下的类黄酮指数略有增加,叶柄长、主茎节数、株高、节间长和生物量有所降低;第V类是低氮高敏型品种,包含ラニホクジロメ、黔豆1号和WDD01135等11份品种,耐低氮能力最弱,该类品种在低氮处理下的株高、叶柄长、主茎节数和生物量最低,受低氮抑制最严重。

2.5 234份大豆耐低氮指标筛选

以耐低氮综合评价D值为因变量,234份种质资源的12个性状的耐低氮系数作为自变量,建立线性逐步回归模型并构建回归方程:

$$Y = -0.50 + 0.45 X_4 + 0.18 X_{12} + 0.20 X_2 + 0.31 X_1 + 0.10 X_{10}$$

在方程中 X_4 、 X_{12} 、 X_2 、 X_1 和 X_{10} 分别是株高、总干重、叶柄长、茎粗和地下干重,5个性状均正向影响主成分得分;直接通径系数分别为0.46,0.26,0.23,0.19和0.15,在回归方程中的r和R²分别是0.997和0.994,说明上述方程中的5个自变量可以解释99.38%的因变量变异,回归方程的F值为7502.493,方程达到极显著水平,说明株高、总干重、叶柄长、茎粗和地下干重5个性状可作为评价大豆耐低氮性的综合评价指标。

表4 不同类群耐低氮系数及综合评价值D

Table 4 Low nitrogen resistance coefficient of different groups and comprehensive evaluation value D		I	II	III	IV	V
类群 Group						
耐低氮系数	茎粗 SD	0.96 abA	0.98 aA	0.90 bA	0.82 cB	0.71 dC
Low N resistance coefficient	叶柄长 PL	1.16 A	1.01 B	0.86 C	0.68 D	0.60 D
	主茎节数 MSN	1.10 aA	1.02 bA	0.91 cB	0.80 dC	0.71 eD
	株高 PH	1.28 aA	1.18 bA	0.87 cB	0.70 dC	0.57 eD
	节间长 IL	1.23 A	1.18 A	0.98 B	0.87 C	0.81 C

表 4 (续)

类群 Group	I	II	III	IV	V
叶绿素值 CHI	0.66 A	0.54 B	0.49 B	0.51 B	0.50 B
类黄酮指数 FLA	0.89 B	1.05 A	1.08 A	1.07 A	1.01 aA
氮平衡指数 NBI	0.76 A	0.53 B	0.46 B	0.48 B	0.50 B
地上干重 SDW	1.56 A	1.04 B	0.79 C	0.55 D	0.36 E
地下干重 RDW	1.27 aA	1.15 aAB	1.00 bB	0.78 cC	0.60 dC
根冠比 RSR	0.91 dC	1.16 cdBC	1.33 bcAB	1.50 abAB	1.69 aA
总干重 TDW	1.44 A	1.06 B	0.83 C	0.60 D	0.42 E
耐低氮综合评价值 D	0.976 A	0.830 B	0.591 C	0.382 D	0.221 E

注:同行不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著,不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Note: Different uppercase letters indicate significant difference at 0.01 level, and different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

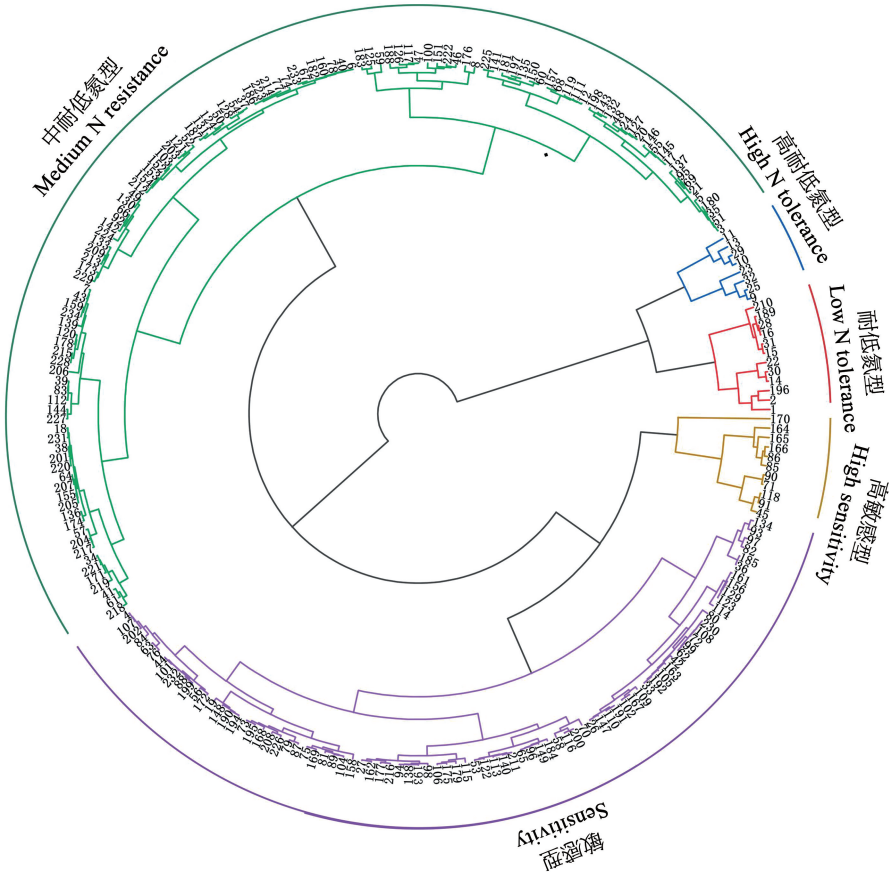


图 3 234 份大豆品种聚类图
Fig. 3 Cluster diagram of 234 soybean varieties

3 讨论

大豆的氮素利用机制比其他作物复杂,其可通过根部根瘤菌共生固氮,但仅靠根瘤菌进行共生固氮远不能满足大豆对氮素的需求,也就无法获得高产,以及更高的蛋白质含量。因此在大豆生产中想获得高产和优质,就需要更高的氮肥投入,但是氮肥的过量施用同时会抑制根瘤的生长,影响最终的产量。且大豆苗期主要利用的是土壤中氮素,我国大部分地区土壤氮含量较低,只通过肥料氮的施入,并不能改变土壤的氮含量,因此筛选耐低氮且低氮高效的大豆种质资源十分必要,可以实现在较

低氮肥投入下取得较高的产量。
目前,许多作物已经建立了成熟的耐低氮评价体系^[24],其中多以植株生物量^[25]、含氮量^[26]和形态指标^[27]作为评价耐低氮的标准,但标准尚未统一。大豆的耐低氮筛选体系也还在不断摸索和优化中。SPAD 值可以反映作物叶片中的叶绿素含量,已应用于大豆的耐低氮鉴定中^[22],也广泛地应用于其他作物的耐低氮鉴定中。关于叶绿素相对含量,前人多采用叶绿素测定仪进行测定,本试验使用多酚测定仪在测定相对叶绿素含量的基础上,还完成了对类黄酮指数和氮平衡指数的测定。类黄酮在非生物胁迫下响应,可以保护脂质和膜蛋白

不受氧化损伤^[28]以及清除、抑制活性氧的生成,缓解细胞损伤^[29],也可作为信号分子激活多种信号级联反应^[30],可以有效提高植物应对胁迫的抗性和耐性^[31],在本试验中,在低氮处理下的类黄酮含量显著提升,这说明在大豆遭遇低氮胁迫时类黄酮不断合成积累;氮平衡指数可以直观地观测大豆植株体内氮素高低状态,可作为实时判断作物氮素营养的指标^[32]。本试验中,低氮处理下的氮平衡指数呈现显著下降趋势,且与叶绿素含量呈极显著正相关,与糜子的氮肥减量试验^[33]结论相一致,即氮平衡指数与叶绿素含量均能够较好地反映施氮水平;该指标也广泛地应用于小麦^[34]、水稻^[35]等关于施氮水平对产量的影响关键指标的筛选中。

本试验综合现有的大豆耐低氮能力评价指标以及其他作物对氮素响应的指标最终选取测定茎粗、叶柄长、主茎节数、株高、节间长、叶绿素含量、类黄酮指数、氮平衡指数、地上干重、地下干重、根冠比和总干重 12 个指标,进行统计分析。结果表明低氮处理显著降低了茎粗、叶柄长、主茎节数、株高、节间长、叶绿素含量、氮平衡指数、地上干重、地下干重和总干重。其中,氮平衡指数、叶绿素含量和地上干重降幅较大,分别为 52.57%、49.85% 和 31.47%。显著增加了类黄酮含量和根冠比,增幅为 5.75% 和 23.40%。对两种氮处理下的各苗期性状进行相关性分析,结果表明在所测的苗期指标之间均具有相关性,确保了耐低氮品种筛选指标的合理性;使用耐低氮系数进行主成分分析和逐步回归分析,筛选大豆耐低氮评价指标,结果表明株高、总干重、叶柄长、茎粗和地下干重可作为大豆苗期耐低氮筛选的主要评价指标。刘芯欣等^[21]也将总干重和地下干重作为大豆苗期耐低氮筛选的主要评价指标,这一点与本试验结果一致,但本试验结果表明大豆表型性状也可作为苗期耐低氮筛选指标,分析原因可能是由于参试种质资源基因型差异所导致的。由于参试样本量较大,利用连盈等^[36]的 5 类群划分的标准可以更精准有效地对大豆耐低氮能力进行评价。本试验通过聚类分析将 234 份大豆种质资源划为 5 类,分别为高耐低氮型品种、耐低氮型品种、中耐氮型品种、低氮敏感型品种和低氮高敏型品种。筛选出高耐低氮品种 8 份,该 8 份高耐低氮型种质资源在低氮胁迫下仍有较高的株高、节间长和总干重,耐低氮系数较高,耐低氮综合评价值 *D* 处于 234 份大豆种质资源的前列,这些品种可以在减少氮肥投入的情况下维持相当的作物产量。

4 结论

本试验分析 234 份大豆种质资源在低氮和正常氮两种氮处理下的 12 个苗期性状,试验结果表明低氮胁迫处理下,大部分农艺性状、生物量明显下降,

通过逐步线性回归方法构建回归方程,明确株高、总干重、叶柄长、茎粗和地下干重 5 个指标可作为大豆苗期耐低氮筛选的重要指标。基于主成分得分 *D* 值的聚类分析筛选出荏前田豆、宝丰 11、射阳半夏子、西港黄豆和苏州五月毛(甲)、矮脚黄、考察豆(8)和泸定乌眉豆共 8 份高耐低氮品种,可作为大豆耐低氮品种选育的参考资源。

参考文献

[1] KUSANO M, FUKUSHIMA A, REDESTIG H, et al. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(4): 1439-1453.

[2] SINHA E, MICHALAK A M, BALAJI V. Eutrophication will increase during the 21st century as a result of precipitation changes [J]. Science, 2017, 357(6349): 405-408.

[3] WEI H, YORDANOV Y S, GEORGIEVA T, et al. Nitrogen deprivation promotes Populus root growth through global transcriptome reprogramming and activation of hierarchical genetic networks[J]. New Phytologist, 2013, 200(2): 483-497.

[4] SHAH J M, BUKHARI S A H, ZENG J, et al. Nitrogen (N) metabolism related enzyme activities, cell ultrastructure and nutrient contents as affected by N level and barley genotype[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(1): 190-198.

[5] LIU Q, WU K, SONG W, et al. Improving crop nitrogen use efficiency toward sustainable green revolution[J]. Annual Review of Plant Biology, 2022, 73: 523-551.

[6] WEN B, LI C, FU X, et al. Effects of nitrate deficiency on nitrate assimilation and chlorophyll synthesis of detached apple leaves [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 142: 363-371.

[7] 罗教芬. 大豆种质资源抗盐碱鉴定[J]. 大豆科学, 1993, 12(1): 39. (LUO J F. Identification of saline-alkali resistance of soybean germplasm resources [J]. Soybean Science, 1993, 12(1): 39.)

[8] HERRIDGE D F, PEOPLES M B, BODDEY R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems[J]. Plant and soil, 2008, 311: 1-18.

[9] CORDOVA S C, CASTELLANO M J, DIETZEL R, et al. Soybean nitrogen fixation dynamics in Iowa, USA [J]. Field Crops Research, 2019, 236: 165-176.

[10] XIAO Y, ZHAO G, LI T, et al. Soil salinization of cultivated land in Shandong Province, China—Dynamics during the past 40 years [J]. Land Degradation & Development, 2019, 30(4): 426-436.

[11] 关焱, 宇万太, 李建东. 长期施肥对土壤养分库的影响[J]. 生态学杂志, 2004(6): 131-137. (GUAN Y, YU W T, LI J D. Effect of long-term fertilization on soil nutrient pool[J]. Journal of Ecology, 2004(6): 131-137.)

[12] 丁洪, 郭庆元, 刘昌智. 不同熟期大豆品种吸收和利用氮肥的差异[J]. 中国油料, 1994(2): 7-10. (DING H, GUO Q Y, LIU C Z. Differences in nitrogen uptake and utilization by soybean cultivars at different maturity stages[J]. Chinese Oilseeds, 1994(2): 7-10.)

[13] 吴婷, 李霞, 黄得润, 等. 应用东乡野生稻回交重组自交系分析水稻耐低氮产量相关性状 QTL[J]. 中国水稻科学, 2020, 34(6): 499-511. (WU T, LI X, HUANG D R, et al. Application of Dongxiang wild rice backcross recombination inbred line to analyze the correlation of rice yield with low nitrogen tolerance[J]. China Rice Science, 2020, 34(6): 499-511.)

[14] 李俊杰,杜蒲芳,石婷瑞,等.不同基因型小麦苗期耐低氮性评价及筛选[J].中国农业科技导报,2021,23(7):21-32. (LI J J, DU P F, SHI T R, et al. Evaluation and screening of low nitrogen tolerance of different genotypes of wheat seedlings [J]. China Agricultural Science and Technology Bulletin, 2021, 23(7): 21-32.)

[15] 王祎,汤继华,付延磊,等.不同氮水平下玉米苗期根系形态和氮吸收量的 QTL 定位[J].植物营养与肥料学报,2017,23(4):942-956. (WANG Y, TANG J H, FU Y L, et al. QTL mapping of root morphology and nitrogen uptake of maize seedlings under different nitrogen levels[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2017, 23(4): 942-956.)

[16] 马建华,孙毅,王玉国,等.不同氮浓度对高粱幼苗形态及生理特征的影响[J].华北农学报,2015,30(1):233-238. (MA J H, SUN Y, WANG Y G, et al. Effects of different nitrogen concentrations on the morphology and physiological characteristics of sorghum seedlings [J]. North China Agricultural Journal, 2015, 30(1): 233-238.)

[17] 张楚,张永清,路之娟,等.苗期耐低氮基因型苦荞的筛选及其评价指标[J].作物学报,2017,43(8):1205-1215. (ZHANG C, ZHANG Y Q, LU Z J, et al. Screening and evaluation index of low-nitrogen tolerant tartary buckwheat at seedling stage [J]. Journal of Crops, 2017, 43(8): 1205-1215.)

[18] 张楚,张永清,路之娟,等.低氮胁迫对不同苦荞品种苗期生长和根系生理特征的影响[J].西北植物学报,2017,37(7):1331-1339. (ZHANG C, ZHANG Y Q, LU Z J, et al. Effects of low nitrogen stress on seedling growth and root physiological characteristics of different tartary buckwheat varieties[J]. Journal of Northwest Botany, 2017, 37(7): 1331-1339.)

[19] 顾炽明,韩配配,胡琼,等.甘蓝型油菜苗期氮效率评价[J].中国油料作物学报,2018,40(6):851-860. (GU C M, HAN P P, HU Q, et al. Evaluation of nitrogen efficiency at seedling stage of *Brassica napus*[J]. Chinese Journal of Oil Crops, 2018, 40(6): 851-860.)

[20] 翟鑫娜,张云帅,刘毅强,等.马铃薯耐低氮材料的筛选[J].江苏农业科学,2022,50(6):82-87. (ZHAI X N, ZHANG Y S, LIU Y Q, et al. Screening of potato materials with low nitrogen tolerance[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2022, 50(6): 82-87.)

[21] 刘芯欣,侯云龙,杜楠琳,等.大豆耐低氮资源的苗期鉴定与筛选[J].植物遗传资源学报,2023,24(2):408-418. (LIU X X, HOU Y L, DU N L, et al. Identification and screening of soybean low nitrogen tolerant resources at seedling stage[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24(2): 408-418.)

[22] 远月丽,易媛媛,战勇,等.大豆氮高效种质苗期筛选与鉴定[J].中国油料作物学报,2022,44(3):539-547. (YUAN Y L, YI Y Y, ZHAN Y, et al. Screening and identification of soybean nitrogen efficient germplasm at seedling stage[J]. Chinese Journal of Oil Crops, 2022, 44(3): 539-547.)

[23] MURTAGH F, CONTRERAS P. Algorithms for hierarchical clustering: An overview [J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: Data Mining and Knowledge Discovery, 2012, 2(1): 86-97.

[24] 钟思荣,龚丝雨,张世川,等.作物不同基因型耐低氮性和氮效率研究进展[J].核农学报,2018,32(8):1656-1663. (ZHONG S R, GONG S Y, ZHANG S C, et al. Research progress on low nitrogen tolerance and nitrogen efficiency of different crop genotypes[J]. Journal of Nuclear Agriculture, 2018, 32(8): 1656-1663.)

[25] 秦璐,韩配配,常海滨,等.甘蓝型油菜耐低氮种质筛选及绿肥应用潜力评价[J].作物学报,2022,48(6):1488-1501. (QIN L, HAN P P, CHANG H B, et al. Screening of low nitrogen tolerant rapeseed germplasm and evaluation of green manure application potential [J]. Crop Journal, 2022, 48(6): 1488-1501.)

[26] MUCHOW R C, DAVIS R. Effect of nitrogen supply on the comparative productivity of maize and sorghum in a semi-arid tropical environment II. Radiation interception and biomass accumulation[J]. Field Crops Research, 1988, 18(1): 17-30.

[27] 张久坤,齐阳阳,李立竹,等.利用BSA法定位大豆全基因组株高QTL及候选基因分析[J].华北农学报,2020,35(S1):1-10. (ZHANG J K, QI Y Y, LI L Z, et al. QTL mapping and candidate gene analysis of soybean genome-wide plant height using BSA method [J]. North China Agricultural Journal, 2020, 35(S1): 1-10.)

[28] SAFFARI Y, SADRZADEH S M H. Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage *in vitro* [J]. Life Sciences, 2004, 74(12): 1513-1518.

[29] MARTINEZ V, MESTRE T C, RUBIO F, et al. Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors oxidative damage protection under abiotic stress [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 838.

[30] AGATI G, CEROVIC Z G, PINELLI P, et al. Light-induced accumulation of ortho-dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques[J]. Environmental and Experimental Botany, 2011, 73:3-9.

[31] 葛诗蓓,张学宁,韩文炎,等.植物类黄酮的生物合成及其抗逆作用机制研究进展[J].园艺学报,2023,50(1):209-224. (GE S B, ZHANG X N, HAN W Y, et al. Research progress in the biosynthesis of plant flavonoids and their anti stress mechanism [J]. Journal of Horticulture, 2023, 50(1): 209-224.)

[32] 朱娟娟,梁银丽.不同水氮处理对玉米氮素诊断指标的影响[J].作物学报,2011,37(7):1259-1265. (ZHU J J, LIANG Y L. Effects of different water and nitrogen treatments on nitrogen diagnostic indexes of maize [J]. Crop Journal, 2011, 37(7): 1259-1265.)

[33] 王英,刘景辉,武俊英等.控释氮肥减量对糜子干物质积累、光合特性及产量的影响[J].灌溉排水学报,2023,42(6):10-18. (WANG Y, LIU J H, WU J Y, et al. Effects of controlled release nitrogen fertilizer reduction on dry matter accumulation, photosynthetic characteristics, and yield of millet [J]. Journal of Irrigation and Drainage, 2023, 42(6): 10-18.)

[34] 陈梅,王远,陈贵,等.施氮水平对超高产杂交稻氮平衡指数及产量的影响[J].土壤,2021,53(4):700-706. (CHEN M, WANG Y, CHEN G, et al. Effect of nitrogen application level on nitrogen balance index and yield of super high yield hybrid rice [J]. Soil, 2021, 53(4): 700-706.)

[35] 孙德祥,马冬云,王晨阳,等.不同水氮处理对豫麦49-198籽粒抗氧化物含量的影响[J].作物学报,2014,40(11):2046-2051. (SUN D X, MA D Y, WANG C Y, et al. Effects of different water and nitrogen treatments on antioxidant content in Yumai 49-198 grains [J]. Journal of Crops, 2014, 40(11): 2046-2051.)

[36] 连盈,卢娟,胡成梅,等.低氮胁迫对谷子苗期性状的影响和耐低氮品种的筛选[J].中国生态农业学报(中英文),2020,28(4):523-534. (LIAN Y, LU J, HU C M, et al. Effects of low nitrogen stress on seedling traits of foxtail millet and screening of low nitrogen tolerant varieties [J]. Chinese Journal of Ecological Agriculture, 2020, 28(4): 523-534.)