

基于 GGE-biplot 的大豆根瘤菌抗逆性资源筛选

王金生¹,王 君²,吴俊江¹,刘庆莉¹,张 鑫¹,王红蕾³

(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. 黑龙江省德强生物股份有限公司,黑龙江 哈尔滨 150060; 3. 黑龙江省农业科学院 信息中心,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:为了准确评价大豆根瘤菌在干旱及酸碱环境中的稳定性和适应性,采用 GGE 双标图对黑龙江省不同生态区分离、鉴定、纯化的 7 个大豆根瘤菌菌株分别进行耐旱性、耐酸碱能力分析评价。结果表明:各供试菌株随着 PEG6000 浓度的增加,菌株生长量均呈现逐渐下降的趋势。GGE 双标图分析表明,耐旱性强且稳定性较好的菌株为 111-1;供试菌株在耐碱性上均有较大优势,菌株在 pH3.0 和 pH12.0 的环境条件下均能缓慢生长,并且均在 pH9.0 的环境条件下生长量最大。GGE 双标图分析得出,耐酸性且稳定性较好的菌株为 112-2,耐碱性且稳定性较好的菌株为 111-3。该结果对适于黑龙江地区不同环境条件下大豆根瘤菌的应用具有重要的指导意义。

关键词:大豆根瘤菌;耐旱性;耐碱性;GGE 双标图

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.06.0894

Screening the Resistance Resources of *Rhizobium japonicum* Based on GGE-biplot

WANG Jin-sheng¹,WANG Jun²,WU Jun-jiang¹,LIU Qing-li¹,ZHANG Xin¹,WANG Hong-lei³

(1. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Soybean Cultivation,Ministry of Agriculture, Harbin 150086, China; 2. Deqiang Biology Company Limited in Heilongjiang Province, Harbin 150060, China; 3. Information Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to evaluate the stability and adaptability of *Rhizobium japonicum* in drought and acid base environment, analysis the ability of 7 *Rhizobium japonicum* strains on drought, acid and alkali resistance through GGE-Biplot, the strains were separated, identified and purified from different ecological area in Heilongjiang province. The results showed that the growth of the strain gradually decreased with the increase of PEG6000 concentration. GGE-Biplot showed that 111-1 was with strong drought resistance and better stability. The tested strains had great advantage in acid alkali resistance, can grow slowly when pH3.0 and pH12.0, and have the most growth increment when pH9.0. GGE-Biplot also showed that 112-2 was with high acid resistance and good stability, as the mean while, 111-3 was with high alkali resistance and good stability. The results are of important meaning to the application of *Rhizobium japonicum* in different environmental conditions in Heilongjiang province.

Keywords: *Rhizobium japonicum*; Drought resistance; Acid and alkali resistance; GGE-Biplot

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]。大豆接种根瘤菌后,其土壤内根瘤菌的数量明显增加,同时根瘤菌和土壤微生物的活性均有所提高^[7-9]、大豆植株的固氮能力显著增强、根系生长旺盛^[10],从而降低大豆生产成本的同时显著提高大豆的产量^[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。

豆科植物与根瘤菌共生固氮作用一直以来是众多科研人员研究的重点。近几十年来,随着科研成果的不断涌现,以豆科植物与根瘤菌共生固氮体系为应用重点的各种根瘤菌肥应运而生。现如今根瘤菌剂作为一种有效提高豆科植物产量的微生物菌剂,已经得到了较为全面的开发,但根瘤菌剂的产业化和大规模推广应用却很落后^[12]。究其原因主要是由于宿主植物、根瘤菌和环境之间复杂的相互作用,制约着大豆根瘤菌的共生固氮效率^[13-14]。土壤环境是影响根瘤菌结瘤固氮的主要因素,为使根瘤菌能在大豆生产中得以充分利用,优良特性得以发挥,筛选适应特殊寄主和环境条件

收稿日期:2017-08-04
基金项目:黑龙江省农科院院级科研项目专项资金(2017ZC06);国家重点研发专项课(2017YFD0101306);国家现代农业产业技术体系资助专项(nycytx-004)。
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:nkywuuj@126.com。

的特异大豆根瘤菌菌株势在必行。黑龙江省是我国大豆种植面积最多、产量最大的省份,共有 13 个地区,77 个市、县,大豆种植遍及全省。各大豆产区生态条件、土壤环境均有不同,筛选出适合黑龙江地区生态环境定殖、与主栽品种相匹配、固氮效率高、抗逆性强的优良根瘤菌,建立一个高效的和适应性强的 大豆—根瘤菌共生固氮体系,研发大豆根瘤菌菌剂产品,推广应用到大豆实际生产中,对我国的大豆产业发展、农业产业结构调整以及农业生态环境保护工程建设十分重要。

1971 年 Gabriel^[15] 提出了双标图 (Biplot) 数据分析方法,用于分析环境因子对表型性状的影响。其模型分析的结果可以用图形直观地表达解析,可清楚地揭示数据的内在结构模式,现今已广泛的用于区域试验中评价参试品种的丰产性、稳定性和适应性以及试验点的鉴别力和代表性。以微生物培养条件模拟区域生态环境,单位时间生长量模拟区域产量,利用双标图数据分析方法评价菌株在特定环境下的抗逆性及稳定性,是双标图 (Biplot) 应用的一个拓展,同时也为微生物抗逆性的筛选提供了一个全新的方法。

本研究以前期分离、鉴定获得到的 7 株大豆根瘤菌菌株为材料进行菌种抗逆性鉴定试验,采用聚乙二醇 (PEG) 6000 模拟干旱的试验方法对其进行抗旱性分析、鉴定、评价;同时,利用基因环境互作数据处理方法进行耐酸、耐碱能力鉴定、评价,以期筛选获得优良的抗逆性根瘤菌菌株,为大豆根瘤菌剂的研发提供优良的菌株资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 试验菌株共计 7 株,分离、筛选自黑龙江大豆主产区主栽大豆品种根瘤 (表 1)。

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

菌株代号 Name of strains	来源地区 Original source	菌株代号 Name of strains	来源地区 Original source
111-1	双城 Shuangcheng	112-2	拜泉 Baiquan
111-2	阿城 Acheng	114-1	597 农场 597farm
113-1	绥化 Suihua	115-1	牡丹江 Mudanjiang
112-1	依安 Yian		

1.1.2 供试培养基和 PEG 材料 供试培养基采用 YMA 培养基:甘露醇 10 g;酵母膏 3.0 g;K₂HPO₄ 0.5 g;MgSO₄·7H₂O 0.2 g;CaCO₃ 3.5 g;NaCl 0.1 g;蒸馏水

1 000 mL;pH 6.8~7.2;聚乙二醇 6000 (PEG6000) 为进口分装产品,粉末状,易溶于水,化学式为 HO(CH₂CH₂O)_nH,n=158~204,浓度为质量体积百分比。

1.2 方法

1.2.1 接种菌悬液的制备 将根瘤菌接入 YMA 固体平板培养基活化培养,再转入 YMA 液体培养基,置于转速 120 r·min⁻¹、温度 28℃ 的摇床中培养,制备接种液。测定根瘤菌接种液的光密度值 (OD₆₀₀值)。调整接种液 OD₆₀₀值约为 0.3 左右。

1.2.2 菌株耐旱性测定 采用 PEG 6000 调节水势人工模拟干旱条件进行耐旱大豆根瘤菌的筛选,试验共设置 4 个处理,PEG 6000 水平分别为:0 (CK)、10%、20% 和 30%。其对应的水势分别为:0,-0.185,-0.559,-1.122 MPa。吸取 0.1 mL 接种液接入含有不同浓度 PEG6000 的 YMA 液体培养基中,28℃,120 r·min⁻¹摇床培养 6 d,分光光度计测其 OD₆₀₀值。各处理均设置 3 次重复。

1.2.3 菌株耐酸碱碱性测定 用 HCl 和 NaOH 调节制备 pH 分别为 3.0,4.0,5.0,6.0,8.0,9.0,10.0,11.0,12.0 的 YMA 培养液。吸取 0.1 mL 接种液接入不同 pH 梯度处理的 YMA 培养液中,28℃,120 r·min⁻¹摇床培养 6 d,分光光度计测其 OD₆₀₀值,检测不同 pH 梯度处理下供试菌株的生长情况。各处理均设置 3 次重复。

1.3 数据分析

采用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 进行统计分析。GGE Biplot 5.2 软件进行大豆根瘤菌生长量在不同环境下的 GGE-biplot 分析,分析 G + GE 的效应,其中 G 是表型的主效应,GE 是表型与环境互作的效应,通过图示化的结果分析不同大豆根瘤菌菌株在试验环境上的表现,挖掘抗逆性较强的优势菌株。

2 结果与分析

2.1 菌株耐旱性测定

如图 1 所示,各供试菌株随着 PEG6000 浓度的增加,菌株生长量均呈现逐渐下降的趋势,不同 PEG6000 浓度处理菌株生长量下降幅度不同,10% 处理平均降幅为 9.9%,20% 处理平均降幅为 35.19%,30% 处理降幅最大,达到 63.04%,说明随着干旱程度的增加,对菌株生长的抑制作用逐渐增大。对比 PEG6000 浓度为 30% 时,各菌株的下降幅度发现菌株 111-1 和 114-1 的降幅分别为 47.29% 和 36.95%,均显著低于其它各供试菌株,说明这 2 株根瘤菌菌株相对其它供试菌株更能够耐受一定程度的干旱。

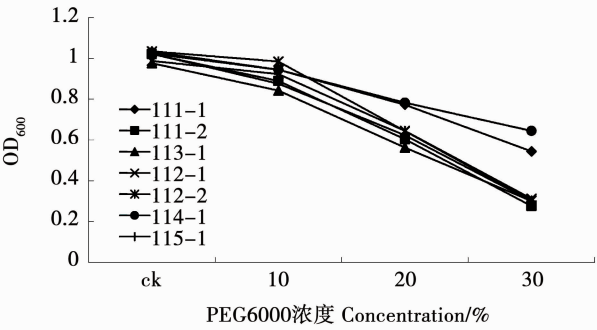


图1 不同 PEG6000 浓度胁迫对大豆根瘤菌生长的影响
Fig.1 Effect of different PEG6000 concentrations on Rhizobia growth

在 GGE 双标图分析中,AEA 代表了菌株的某一特定性状平均值,在 AEA 的投影,箭头所示方向

为正,即各个菌株在 AEA 轴上的投影点越靠右,其菌株特性越强。在 AEC 纵轴右边的菌株,其特性值大于平均值,而在 AEC 纵轴左边的菌株,其特性值小于平均值;AEA 纵轴代表了菌株的稳定性,AEA 横轴上垂线的长短显示菌株稳定性的大小,此值越接近于 0,稳定性越好。第 1 主成分 PC1 解释了 69.8% 的效应,第 2 主成分 PC2 解释了 20.7% 的效应,PC1 和 PC2 共解释 G 与 GE 互作效应的 90.5%,据此分析推断具有较大的可靠性。根瘤菌菌株耐旱性顺序为 114-1 > 111-1 > 112-2 > 115-1 > 112-1 > 111-2 > 113-1,其中 111-1 的稳定性表现最好。综合比较而言,耐旱性强且稳定性较好的菌株为 111-1(图 2)。

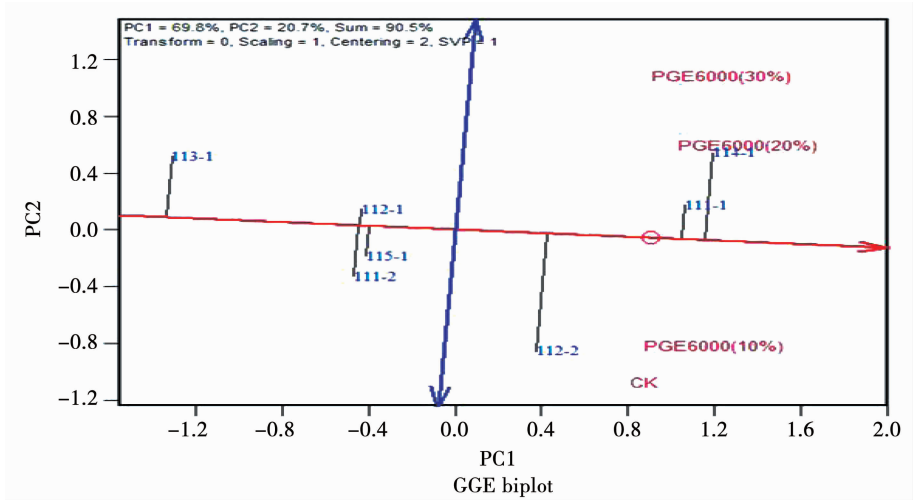


图2 基于 GGE 双标图分析比较参试菌株耐旱性表现及其稳定性
Fig.2 Comparisons of tested strains for drought stress tolerance and its stability based on GGE-biplot analysis

2.2 菌株耐酸碱性测定

2.2.1 耐酸性 通过对比发现:供试菌株在耐酸性上均有较大优势,菌株在 pH3.0 和 pH12.0 的环境条件下均能缓慢生长。并且均在 pH9.0 的环境条件下生长量最大(图 3)。

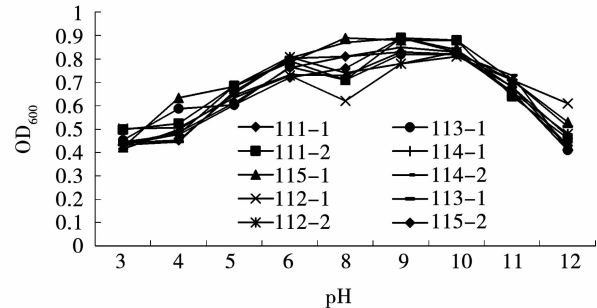


图3 供试菌株不同 pH 条件下的生长对比图
Fig.3 The growth comparison of the different pH conditions of the tested strains

在双标图 4 中,第 1 主成分 PC1 解释了 49.8% 的效应,第 2 主成分 PC2 解释了 27.2% 的效应,PC1 和 PC2 共解释 G 与 GE 互作效应的 76.3%,据此分析推断可靠性较大。把各个方向上距离最远的点用直线连接起来,构成了一个五边形,通过中心对 5 条边做 5 条垂线,将双标图分为 5 个扇区,品种在 5 个扇区都有分布,位于五边形顶角的品种是扇区内个环境下生长量最高的品种。由此可知,菌株 111-2 在 pH3 和 pH5 的环境条件下生长量最大,而 115-1 在 pH4 和 pH6 的环境条件下生长量最大。由双标图 5 可以得出根瘤菌菌株耐酸性顺序为 111-2 > 112-2 > 115-1 > 112-1 > 113-1 > 114-1 > 111-1,其中 111-2、112-2、115-1 耐酸性性状值(OD600)大于平均耐酸性性状值。菌株的稳定性顺序为 114-1 > 112-2 > 111-1 > 113-1 > 111-2 > 112-1 > 115-1。综合比较而言,耐酸性强且稳定性较好的菌株为 112-2。

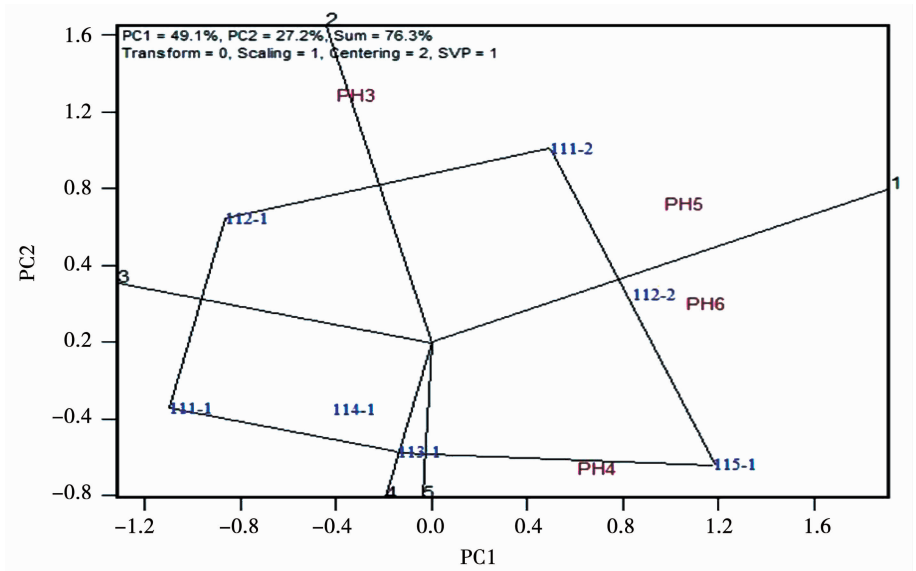


图 4 根瘤菌菌株耐酸性在 4 个酸性环境中的分组

Fig. 4 The tested strains were resistant to acid in groups of 4 acid environments

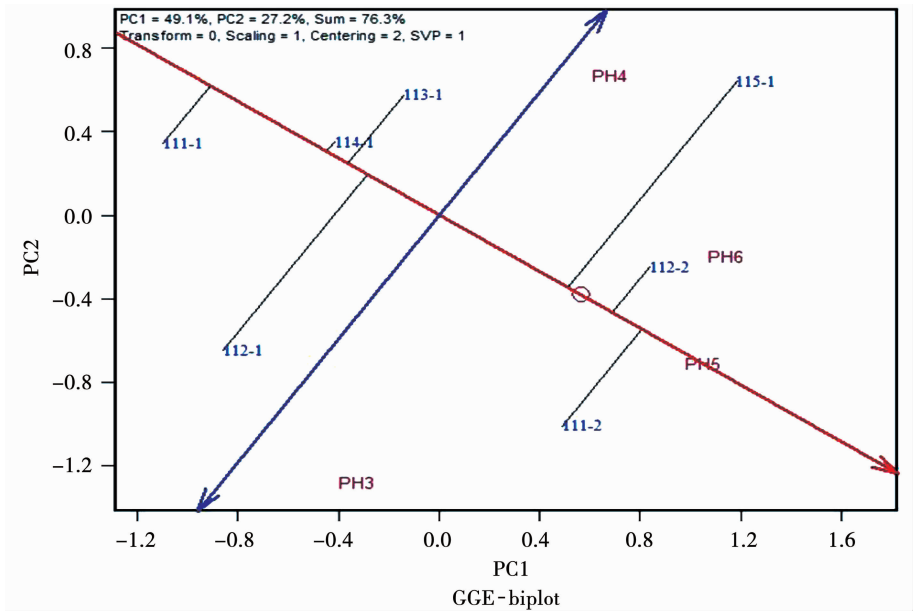


图 5 基于 GGE 双标图分析比较供试菌株耐酸性表现及其稳定性

Fig. 5 Comparisons of tested strains for acid stress tolerance and its stability based on GGE-biplot analysis

2.2.2 耐碱性 如图 6 所示,第 1 主成分 PC1 解释了 49.4% 的效应,第 2 主成分 PC2 解释了 23.3% 的效应,PC1 和 PC2 共解释 G 与 GE 交互效应的 82.7%,推断可靠性较大。菌株 111-3 在 pH8,9,10 的环境条件下生长量最大,而 112-1 在 pH11 和 pH12 的环境条件下生长量最大。由双标图 7 可以

得出根瘤菌菌株耐碱性顺序为 111-3 > 111-1 > 111-2 > 112-1 > 114-1 > 112-2 > 113-1,其中 111-3、111-1、111-2 耐碱性性状值(OD600)大于平均耐碱性性状值。菌株的稳定性顺序为 111-3 > 113-1 > 112-2 > 111-1 > 114-1 > 111-2 > 112-1。综合比较而言,耐碱性强且稳定性较好的菌株为 111-3。

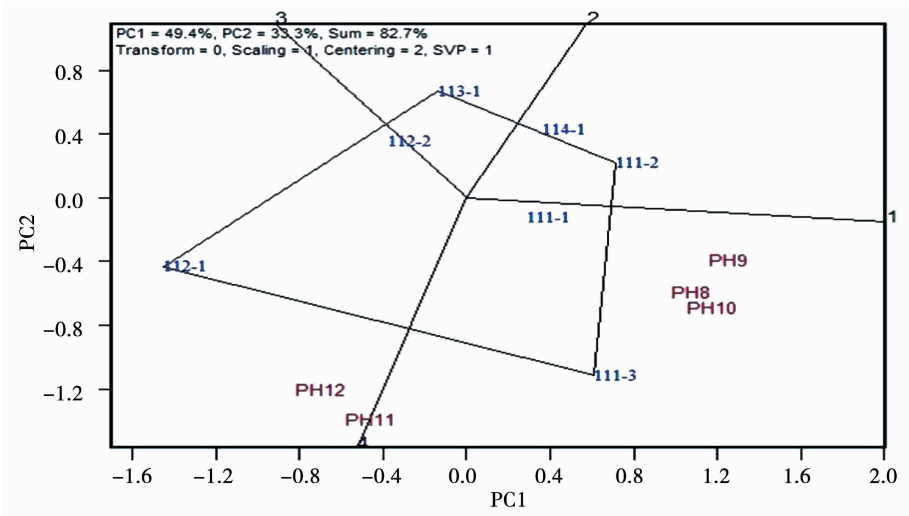


图 6 根瘤菌菌株耐碱性在 5 个碱性环境中的分组
Fig. 6 The tested strains were resistant to alkali in groups of 5 alkaline environments

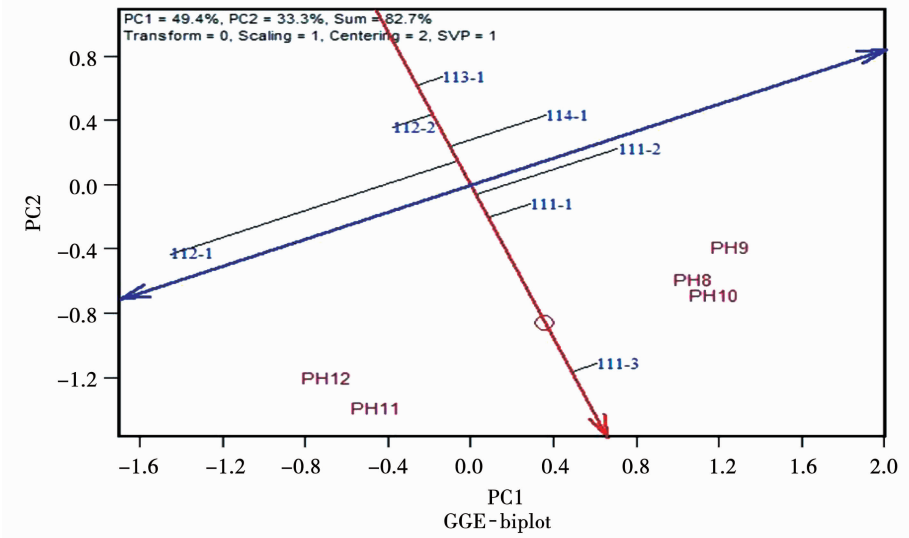


图 7 基于 GGE-biplot 分析比较供试菌株耐碱性表现及其稳定性
Fig. 7 Comparisons of tested strains for alkali stress tolerance and its stability based on GGE-biplot analysis

3 结论与讨论

GGE 双标图数学模型方法可以在考虑菌株总体效应(G)和菌株×环境交互效应(GE)的同时对菌株基因型进行评价。由于其具有极大的直观性和便利性,现如今已广泛适用于所有二向数据资料的分析方面^[16]。

本研究利用 GGE 双标图法对 7 株不同来源地的大豆根瘤菌的耐旱性及耐酸碱性数据进行了分析,将菌株生长与环境的各种关系更加直观地展现出来,能更清晰鉴别筛选出抗逆性较强的大豆根瘤菌菌株。GGE 模型的初步应用结果表明,它可以较好地分析菌株的抗逆性鉴定数据材料,以图示的方

式明确多环境试验中某条件下表现最好且稳定的菌株。通过双标图分析可知,耐旱性和稳定性较好的菌株为 111-1,耐酸性强且稳定性较好的菌株为 112-2,耐碱性强且稳定性较好的菌株为 111-3,耐旱性及耐酸碱性兼顾的菌株本研究中并没有出现,原因可能由于供试菌株较少,筛选范围有所局限所致。在今后的试验中还需要进一步加大抗逆性资源的筛选工作,拓宽基因资源,为大豆根瘤菌剂的开发提供优良的菌株材料。在各环境设定区,均发现具有较好适应性的优异菌株材料,因此在根瘤菌的开发与利用中不应苛求菌株具有全面优异的特性。在实际生产中只要对菌株特殊适应性方面细致掌握,同时结合当地具体环境条件做到专菌专

用,同样会起到较好的应用效果。

试验中发现所有供试菌株在 PEG6000 水平为 30% 条件下均可以缓慢生长,并没有出现预想中的停止生长或逆生长,因此本试验没能测定出供试菌株临界生长的干旱条件,这与其它学者相关研究和其他种属植物根瘤菌菌株耐旱性水平有较大差异^[17],原因可能由于试验设计上干旱设置处理较少,水平跨度不大所致,也可能由于菌株对当地干旱环境的长期适应协同进化的结果。原因还需做进一步研究才能确定。与此同时,本试验中供试菌株在耐酸碱性上均有较大优势,菌株在 pH3 和 pH12 下都能缓慢生长,这与其它学者的相关同类研究结果差异较大,初步推断认为,菌株和环境的协同进化是其产生即耐酸又耐碱的主要原因。对于具有“双高”抗逆性的菌株的生理生化及抗逆性机理需要进一步的研究。

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 H C, Wen D L, Luo X P, et al. Effect of Rhizobium inoculation on nitrogen fixation of leguminous green manure[J]. Yunnan Nongye Keji,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]. 北京:科学时报,2000-04-17. (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]. Beijing:Science Times,2000-04-17.)

[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. (Duan 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. Nodulation and nitrogen-fixation in soybean-rhizobium[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] Stachelin 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,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]. Crop Journal,2007(4):36-37.)

[12] 朱铁霞,徐安凯,胡自治,等. 接种根瘤菌和施磷肥对公农 1 号紫花苜蓿的影响[J]. 中国草地学报,2009,31(5):60-63. (Zhu T X, Xu A K, Hu Z Z, et al. Effects of inoculation of *Rhizobium* and application of phosphate fertilizer on alfalfa ‘Gongnong No. 1’ [J]. Chinese Journal of Grassland,2009,31(5):60-63.)

[13] 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.)

[14] 马霞,王丽丽,李卫军,等. 不同施氮水平下接种根瘤菌对苜蓿固氮效能及种子生产的影响[J]. 草业学报,2013,22(1):95-102. (Ma X, Wang L L, Li W J, et al. Effects of different nitrogen levels on nitrogen fixation and seed production of alfalfa inoculated with rhizobia [J]. Acta Prataculturae Sinica,2013,22(1):95-102.)

[15] Gabriel K R. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis [J]. Biometrika, 1971,58:453-467.

[16] Vincent J M. A manual for the practical study of root-nodule [M]. Oxford: IBP Handback,1970:164.

[17] 裴晓峰,关大伟,李俊,等. 耐旱大豆根瘤菌的筛选及其接种效应[J]. 大豆科学,2012,31(3):420-424. (Pei X F, Guan D W, Li J, et al. Screening of drought tolerance rhizobium and its influence on soybean [J]. Soybean Science,2012,31(3):420-424.)