



徐豆 24 大豆根瘤菌共生匹配性筛选及应用

李彦连¹, 王传雷², 徐保民³, 张修国⁴, 魏祥圣⁵, 杨升辉^{4,5}

(1. 济宁学院 生命科学与工程系, 山东 曲阜 273155; 2. 济宁市任城区科学技术局, 山东 济宁 272000; 3. 济宁市农业农村局, 山东 济宁 272000; 4. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271000; 5. 山东爱福地生物股份有限公司, 山东 济宁 272000)

摘要:为研究大豆与根瘤菌之间的共生匹配性、筛选具有应用潜力的大豆根瘤菌,在黄淮海地区主栽大豆品种徐豆 24 的种植田中捕捉、分离得到 32 株根瘤菌,筛选与徐豆 24 共生匹配的高效根瘤菌株,再通过田间回接试验,研究施肥及接种高效根瘤菌对徐豆 24 产量及品质的影响。经 *rpoB* 基因序列比较鉴定,这些根瘤菌分别分属于 *Sinorhizobium fredii*、*Bradyrhizobium elkanii* 和 *Bradyrhizobium japonicum* 种群。其中,*S. fredii* 的占有率达到了 75%。菌株共生匹配筛选结果确定 *S. fredii* 3 为与徐豆 24 相匹配的高效菌株。田间回接试验结果进一步证明 *S. fredii* 3 是试验地区的优势种,M2 处理(施底肥、接种 *S. fredii* 3、不追肥)的根瘤数、根瘤鲜重、产量和蛋白含量均最高。根瘤数和根瘤鲜重与产量和蛋白含量均呈正相关,其中,根瘤鲜重与产量达到了显著性正相关。土壤有效硼含量与 *S. fredii* 的群落分布的相关性最大,有效铁和有效钼含量是影响 *B. elkanii* 群落结构分布的最重要的理化因子。研究表明,*S. fredii* 3 菌株可作为黄淮海地区徐豆 24 的高效接种剂。

关键词:徐豆 24; 黄淮海; 根瘤菌; 共生匹配; 产量; 品质

Screening and Application of Suitable Symbiotic Combination Between Rhizobia and Soybean Cultivar Xudou 24

LI Yan-lian¹, WANG Chuan-lei², XU Bao-min³, ZHANG Xiu-guo⁴, WEI Xiang-sheng⁵, YANG Sheng-hui^{4,5}

(1. Department of Life Science and Engineering, Jining University, Qufu 273155, China; 2. Jining Rencheng Bureau of Science and Technology, Jining 272000, China; 3. Jining Bureau of Agriculture and Rural Affairs, Jining 272000, China; 4. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, China; 5. Shandong Aifudi Biotech. Co., LTD., Jining 272000, China)

Abstract: In order to study the symbiotic matching between the local soybean cultivar and rhizobial species, the main soybean variety Xudou 24 cultured in Huanghuaihai area was used in this experiment to trap rhizobia in the fields. We screened high efficient rhizobium strains matched with Xudou 24 symbiosis and studied the effects of fertilization and inoculation with efficient rhizobia on yield and quality of Xudou 24 by inoculated experiment in field. A total of 32 rhizobial strains were isolated from the trapping plants. These strains were identified as three populations belonging to the species *Sinorhizobium fredii*, *Bradyrhizobium elkanii* and *Bradyrhizobium japonicum* by *rpoB* gene sequence comparison, in which *S. fredii* was the dominant with 75% of nodule occupation. Through the symbiotic matching screening, strain *S. fredii* 3 was verified as a high-efficiency symbiont of Xudou 24. The field inoculation experiments further proved that the inoculation of *S. fredii* 3 could improve the growth and yield of Xudou 24 and the number of nodules, fresh weight of nodules, yield and protein content of the plant in M2 treatment (base fertilizer, inoculation with *S. fredii* 3, non-topdressing) were the highest. Further analysis found that the number of nodules and fresh weight of nodules were positively correlated with the yield and protein content. Among them, the fresh weight of nodules and yield reached a significant positive correlation. The content of soil available boron (AB) was the most related to the community distribution of *S. fredii*, and the content of available iron (AF_e) and available molybdenum (AM_o) were the most important physicochemical factors affecting the community structure distribution of *B. elkanii*. It is showed that *S. fredii* 3 could be a suitable candidate for inoculant of Xudou 24 in the Huanghuaihai area.

Keywords: Xudou 24; Huanghuaihai; Rhizobia; Symbiotic matching; Yield; Quality

根瘤菌与豆科植物形成的根瘤共生体是效率最高的生物固氮体系,正常结瘤的大豆所固定的氮素可满足其自身生长所需氮素的 68% 左右^[1]。通过发挥共生固氮作用,可以在减少化肥用量的前提

收稿日期:2020-02-19

基金项目:山东省重点扶持区域引进急需紧缺人才项目(SF1804002003);济宁市重点研发计划(2019ZDGH017)。

第一作者简介:李彦连(1974-),男,硕士,副教授,主要从事植物学、植物生物学研究。E-mail: 490174551@qq.com。

通讯作者:杨升辉(1984-),男,博士,高级工程师,主要从事微生物资源多样性研究。E-mail: aa378912705@163.com。

下提高豆类作物产量 5% ~ 100%^[2]。因此,豆类-根瘤菌共生固氮体系的开发利用对农业可持续发展及减少化肥引起的环境污染有着重要意义。

大豆是发源于中国的最重要的豆科作物。中国土壤中能与大豆形成共生固氮体系的根瘤菌主要有慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)的 *B. elkanii*、*B. japonicum*、*B. yuanmingense*、*B. liaoningense*、*B. daqingense*、*B. huanghuaihaiense*、*B. diazoefficiens* 和中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)的 *S. fredii*、*S. xinjiangense*(已与 *S. fredii* 合并)^[3-4]等。根瘤菌在土壤中的生态适应性有一定的差异,东北地区属北温带,气候较寒冷,降水较丰富,土壤多为黑钙土,腐殖质含量高,大豆主要与 *B. japonicum* 和 *B. liaoningense* 共生固氮;华北地区土壤主要为碱性,气候较干燥,土壤较贫瘠,*Sinorhizobium* 属的大豆根瘤菌为该地区的优势菌群;华中和华南地区土壤主要为酸性,*B. japonicum* 和 *B. elkanii* 为大豆根瘤菌的优势种群;新疆地属温带和暖温带气候,气候干燥,土壤盐碱化较重,大豆主要与 *S. fredii* 和 *B. liaoningense* 结瘤^[5]。可见,*Sinorhizobium* 的菌株主要分布在碱性土壤环境中,而 *Bradyrhizobium* 的菌株主要分布于酸性土壤环境中,但碱性土壤中也能生存,它们具有不同的生态地理分布特征。大豆对根瘤菌也有一定的选择性,大豆品种与不同属的菌株的结瘤能及固氮能力差异性较大。*Bradyrhizobium* 和 *Sinorhizobium* 两属大豆根瘤菌与特定的大豆品种可正常结瘤固氮,而与其它大豆品种则不能有效匹配共生^[4,6]。可见,根瘤菌与大豆品种之间存在明显的共生特异性。

黄淮海地区是中国第二大大豆种植区,该区与大豆结瘤的根瘤菌有中华根瘤菌属和慢生根瘤菌属的不同种^[4]。然而,这 2 个属的根瘤菌菌株与该地大豆品种的共生匹配性,及适用于田间接种的根瘤菌菌株的系统研究及应用工作鲜有报道。这与黄淮海地区作为第二大大豆种植区所具有的根瘤菌接种应用的潜力是不相适应的。而徐豆 24 作为徐州农业科学研究所选育的适于黄淮海地区的高蛋白(粗蛋白含量 43.68%)大豆品种,目前还没有与之相匹配的高效根瘤菌菌株。因此,本研究选择黄淮海地区主推的徐豆 24,通过菌株分离、鉴定、接种试验筛选出与之共生匹配的高效根瘤菌株,再通过田间间接试验,研究施肥及接种根瘤菌对其产量及品质的影响,旨在提高大豆的生物固氮潜力,降低氮肥的施用量,为黄淮海地区根瘤菌推广应用提供理论指导及备选菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

徐豆 24 由徐州农业科学研究所提供,室内试验供试土壤采自山东爱福地生物股份有限公司试验田。

YMA 培养基(1 L):10 g 甘露醇,3 g 酵母粉,0.25 g KH_2PO_4 ,0.25 g K_2HPO_4 ,0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.1 g NaCl,1 000 mL 蒸馏水,pH7.0,固体培养基加 15 g 琼脂粉,121 °C 灭菌 30 min。

水琼脂种子发芽培养基:0.7% 水琼脂,121 °C 灭菌 30 min 后制备固体平板。

1.2 试验设计

1.2.1 温室共生匹配性试验 土著根瘤菌的测定:将试验点采集的土壤稀释 $10^2 \sim 10^7$ 倍,制成不同浓度的土壤浸提液。选择在水琼脂培养基上长势较一致的大豆种苗移栽到双层钵中,每株大豆接种 2 mL 土壤浸提液。每个土壤稀释度接种 4 株大豆,3 次平行试验。生长 30 d 后调查每株大豆的结瘤情况,得出试验点土著根瘤菌的数量(最大或然数),作为本底数据用于后续的结果分析。

根瘤菌不同种群占有率分析:将试验点土壤与无菌蛭石(1:1, V/V)混合成育苗基质,在双层钵中盆栽种植 10 株徐豆 24 种苗。同上条件下生长 30 d 后采集大豆的根瘤,用 YMA 培养基及标准方法^[7]从根瘤中分离、纯化根瘤菌。扩增所分离到根瘤菌的 *rpoB* 基因并测序,对序列进行 Blast (<https://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 分析,区分不同的根瘤菌种并鉴定占有率高的种群。

竞争力的筛选:在无菌蛭石的育苗基质中,将上述鉴定的所有的根瘤菌菌株分别接种徐豆 24。根据大豆植株的根瘤数、根瘤鲜重、叶绿素含量及地上干物质选出各种群中竞争力强的菌株。

共生匹配性筛选:在无菌蛭石和土壤-无菌蛭石混合育苗基质中,将选出的各种群中占瘤率高、竞争力强的菌株分别接种徐豆 24,进行共生匹配性筛选。根据大豆的根瘤数、根瘤鲜重、叶绿素含量及地上干物质重进一步筛选出与徐豆 24 具有共生匹配性的高效菌株。对所筛选的具有高效共生匹配性的菌株进行培养及发酵,并进行田间接种试验。

1.2.2 田间接种试验 将前期筛选出的共生匹配性强的菌株在山东爱福地生物股份有限公司试验田进行大豆接种试验。设 7 个处理,随机排列,3 次重复,小区面积为 20 m²。底肥基施复合肥(225 kg·hm⁻²,

N:P₂O₅:K₂O = 15:15:15),花期追肥追施尿素 (150 kg·hm⁻²),具体试验方案如表 1 所示。接种根瘤菌浓度为:原液 10⁹个·mL⁻¹。接种根瘤菌采用双接种方式:①原液拌种,每个小区用菌量 2 mL;②种子种下后,将原液稀释 10 倍,每穴加 1~2 mL,菌液加到每粒种子周围的土壤内。大豆种植密度为 2.00 × 10⁵株·hm⁻²,等行距(50 cm)条播。2019 年 6 月 25 日播种,10 月 12 日收获测产,同时检测籽粒的蛋白质和油分含量。在花期每个处理随机取样 10 株,3 次重复,测定根瘤数和根瘤鲜重,同时测定各处理土壤的理化性质。

表 1 田间试验方案
Table 1 Field experiment design

处理 Treatment	底肥 Base fertilizer	追肥 Top application	根瘤菌 Rhizobia
M1	1	0	0
M2	1	0	1
M3	1	1	0
M4	1	1	1
M5	0	1	1
M6	0	0	1
M7	0	0	0

0:未施肥或未接种根瘤菌; 1:施肥或接种根瘤菌。
0: Unfertilized or uninoculated rhizobia; 1: Fertilized or inoculated rhizobia.

1.3 方法

1.3.1 土著根瘤菌定量测定 采用最大或然数 (MPN) 法^[7] 计算单位质量土壤中所包含的根瘤菌数。取约 5 g 土壤悬浮在 30 mL 无菌生理盐水中,充分混合 3 h,取 2 mL 浸提液,依次以 10 倍梯度的稀释度稀释至 10⁻⁷。取大豆种子,95% 乙醇浸泡 30 s,次氯酸钠-水溶液(1:5, V/V)消毒 5 min 后,无菌水洗涤 7 次,于种子发芽培养基上 25 ℃ 黑暗中发芽,种植于容积为 1 L 的装有无菌蛭石的钵中,蛭石以低氮营养液均匀润湿。取各稀释度的土壤浸提液 2 mL,分别接种到种子周围,以未使用土壤浸提液的植株为空白对照。每个稀释度 3 个重复,采用双层钵法种植,下层容器装入适量的无菌去离子水,人工温室条件下生长 30 d,每天光照 16 h,光照强度为 460 Lx,温度 25 ℃,黑暗 8 h,温度 22 ℃。30 d 后检查并记录植株结瘤情况,结瘤记为“+”,不结瘤记为“-”。根据植株结瘤数,计算单位重量土壤中根瘤菌的数量。

1.3.2 根瘤菌分离及纯化 依据 Vincent^[7] 的方法,将采集的根瘤分别置于 5 mL 的 Eppendorf 管中,加入 3 mL 0.8% 生理盐水,4 ℃ 浸泡根瘤 2~3 h 使根瘤泡胀,洗净后倒去残余生理盐水。在无菌操作条件下,用 3 mL 95% 乙醇处理 30 s,倒去残液,次氯酸钠溶液 3 mL 消毒 5 min,消毒期间用枪头吸打数次使消毒液与根瘤充分接触均匀,弃去残液,用无菌水洗涤 6~7 次,以免根瘤表面有残留消毒液,将消毒后的根瘤转移到 200 μL Eppendorf 管中。向离心管中加入约 30 μL 无菌水,用 200 μL 枪头捣碎根瘤,吸取 10 μL 菌液于 YMA 平板中划线,28 ℃ 倒置培养。待长出圆形菌落,将菌落挑至新的 YMA 板中划线纯化 1~2 次,将纯化好的单菌落转接于 YMA 液体中,28 ℃,180 r·min⁻¹ 摇床培养,待长至对数生长期收集 1 mL 菌体,菌株可短期内保存于 4 ℃ 的 YMA 斜面。

1.3.3 根瘤菌 DNA 提取 参照 Terefework 等^[8] 的异硫氰酸胍(GUTC)法(略有改动)小量提取所收集根瘤菌的菌体 DNA。步骤如下:将收集到的根瘤菌菌体用 0.8% 的生理盐水离心洗涤 2 次;去除上清,加入 800 μL 提取液,震荡混匀菌体,使细胞壁破碎裂解,室温静置约 5 min,再加入 60 μL 的硅藻土悬浮液,震荡混匀,震荡约 2 h,最好室温放置过夜;12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,小心去除上清,再加入 800 μL GUTC 洗涤缓冲液,振荡悬浮菌体,12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,弃去上清,重复洗涤 2~3 次;用 700 μL 75% 乙醇洗涤 1 次,12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min;弃去上清后,将沉淀物置于真空干燥器中,加热温度 50 ℃,运行时间 50 min,加热时间 40 min,直至硅藻土变白;将硅藻土 DNA 沉淀用 100 μL TE 缓冲液重悬,60 ℃ 保温 20 min 以促进 DNA 溶解,13 000 r·min⁻¹ 离心 5 min;小心收集上清至新的离心管中,加入 1 μL RNA 酶溶液(10 mg·mL⁻¹),37 ℃ 水浴保温 30 min 以去除 RNA;使用 Nanodrop 仪器(NanoPhotometer™ Pearl S/N:3430)检测 DNA 纯度和浓度,超纯水调零,DNA 双联检测。A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8~2.0,表明 DNA 纯度合格;<1.8,说明存在蛋白污染;>2.0,说明 RNA 污染。DNA 浓度 ≥ 100 ng·μL⁻¹,样品总量不低于 1 ng·μL⁻¹,则可以进行基因组测序,DNA 溶液于 -20 ℃ 保存备用。

1.3.4 根瘤菌 *rpoB* 基因扩增 分别扩增所分离的全部根瘤菌的 *rpoB* 基因^[9]。*rpoB* 基因扩增引物:*rpoB*-F (5'-TCGCAGTTCATGGACCAGG-3'); *rpoB*-R (5'-GTAGCCGTTCCAGGGCATG-3')。PCR 反应体系

(50 μL):10 \times PCR Buffer,5.0 μL ;dNTP(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),1.0 μL ;rpoB(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),1.0 μL ;rpoB(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),1.0 μL ;Taq 聚合酶(5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,GenStar 2 \times Taq PCR StarMix),0.5 μL ;模板 DNA(20 ~ 50 ng),1.0 μL ;ddH₂O 补足至 50 μL 。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min,30 个循环;65 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 18 min。PCR 产物经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测,送华大基因实验室测序。得到的序列采用 Blast 分析,与 GenBank 数据库中的相应序列做比较,区分出不同的根瘤菌种并鉴定占有率高的种群。比较时采用 97.7% 相似性作为种的界限,即序列相似性 \geq 97.7% 的菌株为同一个种^[10]。

1.3.5 根瘤数和根瘤鲜重测定 大豆根瘤数 = $(a \times 10) + (b \times 5) + (c \times 1) + (d \times 0)$ / 总大豆植株数量^[11]。其中,a:大豆植株主根系上根瘤的数量;b:大豆植株次生根上根瘤的数量;c:大豆植株上散生根瘤的数量;d:没有根瘤的大豆植株的数量。

1.3.6 产量、蛋白质和油分含量测定 在成熟期取 6 m^2 测产,折算成公顷产量^[12]。实际产量 = $(100 - MC) / (100 - 13.5) \times$ 测定产量。其中,MC 是大豆

种子在测量时的含水率,13.5 是大豆种子在收获时的标准含水率。

采用 FOSS 近红外谷物品质分析仪(Infratec TM1241,FOSS)测定大豆子粒的蛋白质和油分含量。

1.3.7 土壤理化性质测定 参照 Houba 等^[13-14] 方法测定土壤理化性质,包括全氮、有机质、有效氮、速效磷、速效钾、电解质、pH、有效铁、有效硼、有效钼、水溶性钙离子。

1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 2010、SPSS 19.0、Orgin 75 和 CANOCO 5.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 温室条件下大豆与根瘤菌的共生匹配性筛选

2.1.1 试验地土壤中土著根瘤菌 结果如表 2 所示:徐豆 24 生长土壤中的土著根瘤菌的数量为 $1.0 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^5$ 个 $\cdot\text{g}^{-1}$,平均根瘤菌的数量为 $(1.23 \pm 0.40) \times 10^5$ 个 $\cdot\text{g}^{-1}$ 。可见,试验点的土壤中的土著根瘤菌的数量比较低,有必要对该试验点土壤的土著根瘤菌进行筛选鉴定。

表 2 徐豆 24 种植土壤中土著根瘤菌的数量

Table 2 Numbers of indigenous rhizobia in soil of Xudou 24

重复 Repeat	稀释梯度 Dilution gradient						结瘤数 Nodule number	平均根瘤菌数量 Average number of rhizobium/($\times 10^5$ 个 $\cdot\text{g}^{-1}$)
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		
1	++++	++++	++++	+- -	- + - -	- - - -	15	
2	++++	++++	++++	+ - + +	- - - -	- - - -	15	1.23 \pm 0.4
3	++++	++++	++++	+ + - +	- - - +	- - - -	16	

+ :结瘤; - :不结瘤。
+ ;Nodule; - : No nodule.

2.1.2 较强占有率和竞争力根瘤菌筛选 从徐豆 24 生长土壤中分离、纯化到 32 株根瘤菌,经 rpoB 基因鉴定,分属于 Sinorhibizobium fredii、Bradyrhizobium elkanii 和 Bradyrhizobium japonicum 种群。其中,S. fredii 为 24 株,占 75%,菌株分别编号为 S. fredii 1 ~ 24;B. elkanii 为 5 株,占 15.63%,分别编号为 B. elkanii 1 ~ 5;B. japonicum 为 3 株,占 9.37%,分别编号为 B. japonicum 1 ~ 3。因此,得出 S. fredii 较 B. elkanii 和 B. japonicum 有较高的占有率。

将 32 株根瘤菌分别单独接种徐豆 24,发现在 S. fredii、B. elkanii 和 B. japonicum 属中编号为 S. fredii 3、B. elkanii 2 和 B. japonicum 2 的 3 株菌所

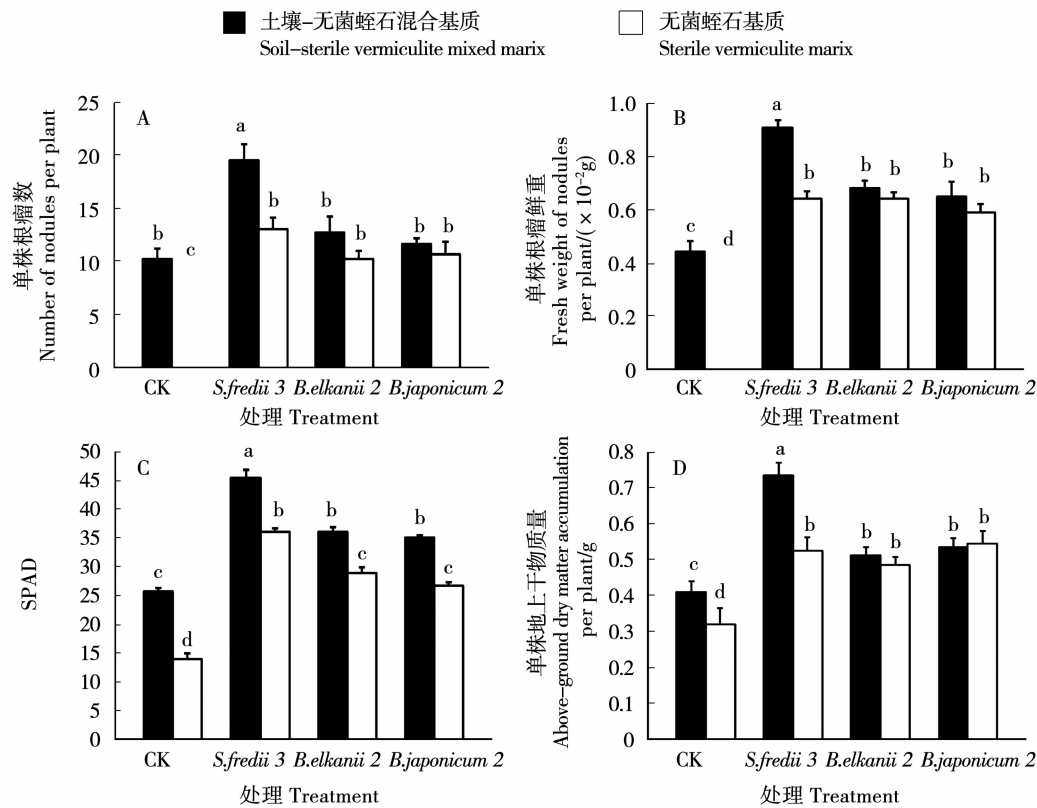
形成的根瘤数、根瘤鲜重、叶绿素含量及地上干物质重均优于同属的其它菌株。因此,S. fredii 3、B. elkanii 2 和 B. japonicum 2 是各属中竞争力较强的菌株。

2.1.3 大豆与根瘤菌的共生匹配性筛选 在温室盆栽试验条件下,将 S. fredii 3、B. elkanii 2 和 B. japonicum 2 菌株分别接种徐豆 24,研究结果如图 1 所示,土壤 - 无菌蛭石混合基质处理的根瘤数、根瘤鲜重、叶绿素含量及地上干物质重高于无菌蛭石基质处理,是因为在有土壤条件下接种根瘤菌可以为大豆植株提供一定的营养物质。在无菌蛭石基质盆栽试验中,接种 S. fredii 3、B. elkanii 2 和

B. japonicum 2 的根瘤数、根瘤鲜重、叶绿素含量及地上干物质重均显著高于不接种处理。在接种 *S. fredii* 3、*B. elkanii* 2 和 *B. japonicum* 2 的 3 个处理中,接种 *S. fredii* 3 处理的叶绿素含量显著高于 *B. elkanii* 2 和 *B. japonicum* 2 处理,但 3 个处理间的根瘤数、根瘤鲜重及地上干物质重差异不显著。无菌蛭石条件下,接种 *S. fredii* 3、*B. elkanii* 2 和 *B. japonicum* 2 对徐豆 24 结瘤固氮和植物生长发育有一定的促进作用,表明 *S. fredii* 3、*B. elkanii* 2 和

B. japonicum 2 均能与徐豆 24 有效共生。

在土壤-无菌蛭石混合基质盆栽试验中,接种 *S. fredii* 3 处理的根瘤数、根瘤鲜重、叶绿素含量及地上干物质重均极显著高于接种 *B. elkanii* 2 和 *B. japonicum* 2 处理及对照。说明在土壤环境中,其它生物因素(如土著根瘤菌)存在时,*S. fredii* 3 较 *B. elkanii* 2 和 *B. japonicum* 2 有较强的匹配竞争及共生结瘤能力。因此,*S. fredii* 3 是本研究筛选出的与徐豆 24 共生匹配的高效菌株。



不同字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。
Different letters indicate there is significant difference between different treatments ($P < 0.05$). The same below.

图1 大豆与根瘤菌的共生匹配分析

Fig. 1 Analysis on symbiotic matching of soybean and rhizobia

2.4 田间根瘤菌接种应用

2.4.1 根瘤菌的群落结构组成 在徐豆 24 开花期,对 7 个处理的根瘤分离鉴定得到 216 株根瘤菌,经 *rpoB* 基因序列比较鉴定,分属于 *S. fredii*、*B. elkanii*、*Bradyrhizobium huanghuaihaiense* 和 *B. japonicum* 种群。其中,*S. fredii* 共 165 株,*B. elkanii* 共 43 株,*B. huanghuaihaiense* 共 6 株,*B. japonicum* 共 2 株。进一步证明 *S. fredii* 是试验地区的优势种群。

2.4.2 接种根瘤菌对大豆根瘤、产量及品质的影响 由表 3 可知,各处理的根瘤数量和根瘤鲜重,以 M2 处理最高,M1 处理次之,M7 处理最低,M1 与 M2 处理差异不显著,二者均极显著高于 M7 处理。

比较各处理的大豆产量,M2 处理最高,达到 $3\,853.29\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$,显著或极显著高于 M4 和 M7 处理,分别较 M4 和 M7 处理增产 7.18% 和 44.42%。M2 处理的产量分别较 M3 处理和 M1 处理高 341.32 和 $591.81\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。在不施底肥的 M5、M6 和 M7 处理中,接种根瘤菌处理(M5、M6)的大豆产量明显高于不接种处理(M7)。

蛋白质的含量以 M2 处理最高,M1 处理次之,M7 处理最低。播前施底肥(M1、M2、M3 和 M4)处理之间差异不显著,但均显著或极显著高于不施底肥(M5、M6 和 M7)处理。油分含量以 M3 处理最高,M1 处理最低,各处理间的油分含量差异不明显(表 3)。

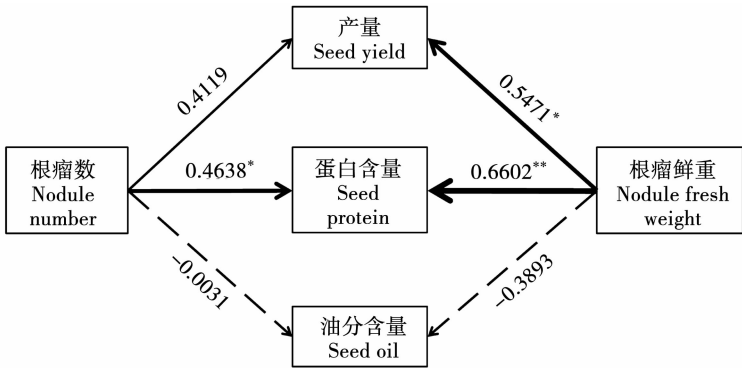
表 3 接种根瘤菌对大豆根瘤、产量及品质的影响

Table 3 Effect of rhizobial inoculation on soybean nodule,yield and quality

处理 Treatment	根瘤数 Nodules number per plant	单个根瘤鲜重 Fresh weight per nodule (×10 ⁻² g)	产量 Yield /(kg·hm ⁻²)	蛋白质含量 Protein content /(g·kg ⁻¹)	油分含量 Oil content /(g·kg ⁻¹)
M1	32.33 ± 1.53 a	0.93 ± 0.07a	3261.48 ± 24.31 c	4.311 ± 0.033 ab	2.139 ± 0.031 a
M2	33.67 ± 1.15 a	0.95 ± 0.07 a	3853.29 ± 147.58 a	4.331 ± 0.040 a	2.142 ± 0.033 a
M3	25.33 ± 2.08 c	0.82 ± 0.01b	3511.97 ± 59.32 b	4.289 ± 0.024 ab	2.164 ± 0.021 a
M4	25.67 ± 2.08 c	0.83 ± 0.03 b	3595.30 ± 105.32 b	4.304 ± 0.079 ab	2.156 ± 0.023 a
M5	27.00 ± 1.00 bc	0.82 ± 0.01 b	2923.81 ± 123.04 d	4.246 ± 0.004 b	2.143 ± 0.037 a
M6	29.00 ± 2.65 b	0.82 ± 0.01 b	2864.63 ± 208.97 de	4.247 ± 0.017 b	2.158 ± 0.026 a
M7	24.00 ± 1.00 c	0.78 ± 0.04 b	2668.18 ± 62.39 e	4.163 ± 0.039 c	2.156 ± 0.024 a

2.4.3 大豆主要性状相关分析 对大豆花期的根瘤数和根瘤鲜重与产量、蛋白质和油分含量进行的相关分析结果如图 2 所示:大豆的根瘤数($r = 0.4119$)和根瘤总鲜重($r = 0.5471$)与大豆产量均呈正相关,其中,根瘤鲜重与大豆产量达到了显著

正相关;大豆的根瘤数($r = 0.4638$)和根瘤鲜重($r = 0.6602$)与大豆的蛋白质含量均呈显著正相关,其中,根瘤鲜重与大豆的蛋白含量达到极显著正相关;根瘤数和根瘤鲜重与大豆的油分含量均呈负相关,相关系数分别为 -0.0031 和 -0.3893 。



每个路径箭头的宽度与它们之间关系的强度成正比,虚线和实线分别表示负相关和正相关;*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

The width of each path arrow is directly proportional to the strength of the relationship between them. The dashed and solid lines indicate negative and positive correlations respectively; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

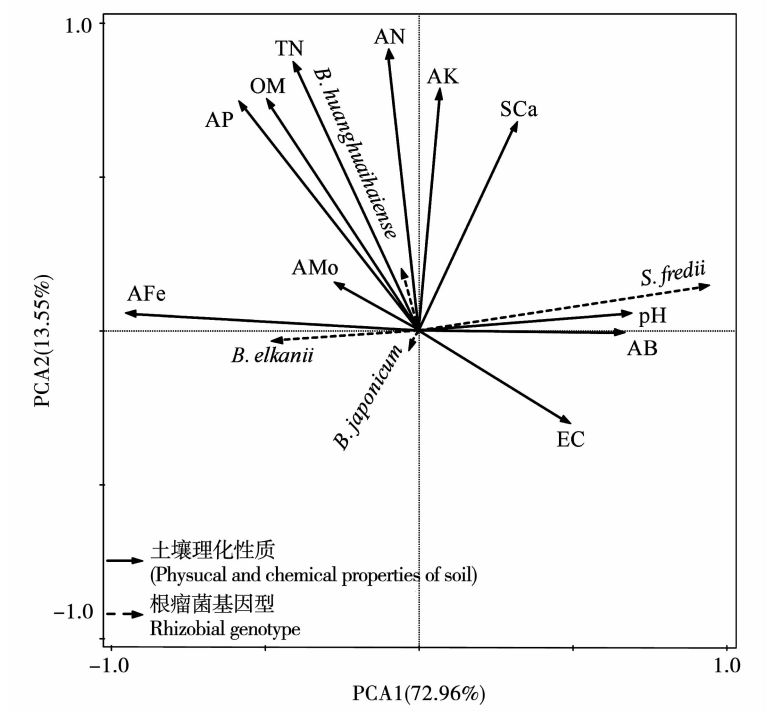
图 2 根瘤数和根瘤鲜重与大豆产量、蛋白质和油分含量的相关分析

Fig. 2 The correlation analysis of nodule number and nodule fresh weight with soybean yield, protein and oil content

2.4.4 大豆根瘤菌与土壤理化性质的关系 对田间大豆根瘤菌群落结构分布与大豆花期的土壤理化性质进行 PCA 分析的结果如图 3 所示:第 1 主坐标的特征值为 0.729 6,第 2 主坐标的特征值为 0.135 5。它们解释了土壤理化性质对根瘤菌群落结构分布变异度的 86.52%。

土壤中有效硼(AB)、电解质(EC)、水溶性钙离

子(SCa)、pH 和速效钾(AK)的含量与 *S. fredii* 的群落分布存在显著的正相关关系,灰色关联系数分别为 0.780 4、0.706 3、0.704 9、0.698 9 和 0.683 5。其中,土壤中有效硼的含量与 *S. fredii* 的群落分布的相关性最大。土壤中有效铁(AFe)含量(0.851 8)、有效钼(AMo)含量(0.703 5)是影响 *B. elkanii* 群落结构分布的最重要的理化因子。



TN:全氮; OM:有机质; AN:有效氮; AP:速效磷; AK:速效钾; EC:电解质;
AFe:有效铁; ABO:有效硼; AMo:有效钼; SCA:水溶性钙离子。
TN: Total nitrogen; OM: Organic Matter; AN: Available nitrogen; AP: Avail-
able phosphorus; AK: Available potassium; EC: Electrolyte; AFe: Available Fe;
AB: Effective boron; AMo:Effective molybdenum; SCA: Water soluble calcium ion.

图 3 大豆根瘤菌群落结构与土壤理化性质的 PCA 分析
Fig. 3 PCA analysis of soybean rhizobial community structure
and soil physical and chemical properties

3 讨论

本研究对徐豆 24 的根瘤进行分离、纯化及 *rpoB* 基因序列分析。在温室条件下将根瘤菌鉴定为 *S. fredii*、*B. elkanii* 和 *B. japonicum* 3 个种群,田间条件下鉴定为 *S. fredii*、*B. elkanii*、*B. huanghuaihaiense* 和 *B. japonicum* 4 个种群,温室和田间环境下捕捉的根瘤菌的群落结构基本一致。因此,温室和田间的诱捕过程在物种水平上并不影响根瘤菌的组成,尤其是优势类群,这种现象在 van Cauwenberghe^[15] 研究中已经得到了证实。

Zhang 等^[4] 采用遗传分型、16S rRNA 基因及持家基因系统发育分析方法鉴定了黄淮海平原的 309 株大豆根瘤菌,发现 *S. fredii* 种群的占有了 68.28%。Li 等^[16] 采用 16S rRNA 基因及持家基因对河北省大豆根瘤菌的遗传多样性进行了分析,分离到的根瘤菌均属于 *Sinorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 2 个属,且 *S. fredii* 是优势种群。本研究通过对黄淮海地区主推大豆徐豆 24 的根瘤进行分离和鉴定,温室和田间条件下均证明 *S. fredii* 是试验地区

的优势种群,占有率分别为 75% 和 76.39%。

国内外研究以大豆^[17-18]、豇豆^[19]、鹰嘴豆^[20] 和紫花苜蓿^[21] 为材料,证实接种根瘤菌能增加豆类作物的产量。Hungria 等^[22] 通过多年的田间试验分析了基施氮肥和生物固氮对大豆的增产作用,不施氮肥时接种根瘤菌可显著提高大豆结瘤固氮作用,较对照平均增产 127 kg·hm⁻²;而当施入 200 kg·hm⁻² 氮肥时,产量不仅没增加,还明显抑制了大豆的生物固氮作用。Alam 等^[23] 研究得出,大豆在不施氮肥条件下接种根瘤菌(BARIR Gm901)能显著增加大豆的根瘤数、有效荚数和产量。本研究通过田间接种试验,研究施底肥、接种 *S. fredii* 3、追肥对徐豆 24 的产量和品质影响。结果表明,在播前施一定量的底肥,再接种 *S. fredii* 3 时大豆产量最高,达到 3 853.29 kg·hm⁻²,分别较同时施底肥、追肥和接种根瘤菌处理和不施肥、不接种根瘤菌处理增产 7.18% 和 44.42%。施底肥并接种根瘤菌处理较施底肥、追肥处理的大豆产量高 341.32 kg·hm⁻²,表明接种根瘤菌可替代一定的追肥。施底肥、不接种根瘤菌、不追肥处理的大豆产量为 3 261.48 kg·hm⁻²,

极显著低于施底肥并接种根瘤菌处理,进一步说明大豆接种高效根瘤菌的重要性。在不施底肥的 3 个处理中,接种根瘤菌的追肥和不追肥处理的大豆产量明显高于不施肥且不接种根瘤菌处理,说明在没有施底肥而是接种根瘤菌的情况下,在大豆花期需要有一定量的追肥。因此,施用一定量的底肥,满足大豆在形成根瘤之前的营养需要,再接种高效的根瘤菌,提高大豆的生物固氮作用,能够保证大豆获得高产。

生物和非生物因素都能影响豆科作物对土壤中根瘤菌的选择^[24-25]。当土壤中土著根瘤菌较少时,大豆接种的根瘤菌可以为大豆植株提供生长所需的氮素^[26]。然而,接种的根瘤菌与土著根瘤菌之间存在一定的竞争,导致接种的根瘤菌占有率下降^[27]。非生物因素方面,根瘤菌的群落结构多样性和稳定性受土壤中有有机质含量^[28]、盐碱度^[29]、pH^[30]、有效氮含量^[31]、有效磷含量^[32]、有效钾含量^[27]和其它营养物质含量(如铁、铜和锌)^[33]的影响。本研究得出土壤有效硼的含量与 *S. fredii* 群落分布的相关性最大,有效铁和有效钼含量是影响 *B. elkanii* 群落结构分布的最重要的理化因子。因此,接种根瘤菌应该首先要考虑试验点的高效根瘤菌菌株及当地土壤环境因素,才能高效发挥大豆-根瘤菌共生固氮作用。

4 结 论

温室和田间环境下捕捉的大豆根瘤菌的群落结构基本一致,*Sinorhizobium fredii* 是黄淮海地区大豆根瘤菌的优势种群。其中,*S. fredii* 3 是与徐豆 24 相匹配的高效菌株。施一定量的底肥(225 kg·hm⁻², N:P₂O₅:K₂O = 15:15:15)并接种 *S. fredii* 3,可增加大豆的根瘤数、根瘤鲜重、产量及蛋白含量。大豆的根瘤数和根瘤总鲜重与产量和蛋白含量均呈正相关,其中,根瘤鲜重与产量和蛋白含量达到了显著或极显著正相关。*S. fredii* 的群落结构分布与土壤中的有效硼、电解质、水溶性钙离子、pH 和速效钾含量存在显著正相关性。其中,有效硼的含量与 *S. fredii* 的群落结构分布的相关性最大。有效铁和有效钼含量是影响 *B. elkanii* 群落结构分布最重要的理化因子。

参考文献

[1] Herridge D F, Peoples M B, Boddey R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems[J]. Plant and

Soil, 2008, 311(1-2):1-18.

[2] Solomon T, Pant L M, Angaw T. Effects of inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains on nodulation, nitrogen fixation, and yield of soybean (*Glycine max* L. Merrill) varieties on nitisols of Bako, western Ethiopia[J]. International Scholarly Research Network Agronomy, 2012;1-8.

[3] Yang S H, Chen W H, Wang E T, et al. Rhizobial biogeography and inoculation application to soybean in four regions across China [J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 125(3): 853-866.

[4] Zhang Y M, Li Y, Chen W F, et al. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(18): 6331-6342.

[5] Tian C F, Zhou Y J, Zhang Y M, et al. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(22): 8629-8634.

[6] Man C X, Wang H, Chen W F, et al. Diverse rhizobia associated with soybean grown in the subtropical and tropical regions of China [J]. Plant and Soil, 2008, 310(1-2): 77-87.

[7] Vincent J M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria[M]. London: Blackwell Scientific, 1970.

[8] Terefework Z, Kaijalainen S, Lindström K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galegaorientalis* and *Galegaofficinalis*[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 91(2-3): 169-180.

[9] Mousavi S A, Österman J, Wahlberg N, et al. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2014, 37(3):208-215.

[10] Zhang X X, Guo H J, Jiao J, et al. Pyrosequencing of *rpoB* uncovers a significant biogeographical pattern of rhizobial species in soybean rhizosphere[J]. Journal of Biogeography, 2017, 44: 1491-1499.

[11] Nif T. Legume inoculation trials procedures [K]. University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, USA: Nif Tal Project, 1979.

[12] Birru A. Agricultural field experiment management manual part III [J]. Addis Ababa, Ethiopia: Institute of Agricultural Research, 1979: 35-42.

[13] Houba V J G, Novozamsky I, Huybregts A W M, et al. Comparison of soil extractions by 0.01 M CaCl₂, by EUF and by some conventional extraction procedures [J]. Plant and Soil, 1986, 96:433-437.

[14] Simonis A D, Setatou H B. Determination of available phosphorus in soils from northern Greece by the electro-ultrafiltration (EUF) and other methods of soil analysis [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1996, 27(3-4):695-711.

[15] Van Cauwenberghe J, Lemaire B, Stefan A, et al. Symbiont abundance is more important than pre-infection partner choice in a Rhizobium-legume mutualism [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2016, 39(5): 345-349.

[16] Li Q Q, Wang E T, Zhang Y Z, et al. Diversity and biogeography

of rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei province, China[J]. Microbial Ecology, 2011, 61(4): 917-931.

[17] Getachew Z, Abera G, and Beyene S. Rhizobium inoculation and sulphur fertilizer improved yield, nutrients uptake and protein quality of soybean(*Glycine max* L.) varieties on Nitisols of Assosa area, Western Ethiopia[J]. African Journal of Plant Science, 2017, 11(5): 123-132.

[18] Qin L, Zhao J, Tian J, et al. The high-affinity phosphate transporter GmPT5 regulates phosphate transport to nodules and nodulation in soybean[J]. Plant Physiology, 2012, 159(4): 1634-1643.

[19] Kyei-Boahen S, Savala C E N, Chikoye D, et al. Growth and yield responses of cowpea to inoculation and phosphorus fertilization in different environments [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 646.

[20] Nawaz F, Khan N, Shah J A, et al. Yield and yield components of chickpea as affected by various levels of FYM and rhizobium inoculation[J]. Pure and Applied Biology, 2017, 6(1): 346.

[21] Elsheikh E A E, Elnesairy N N B, Mahdi A A M, et al. Effect of *Sinorhizobium* inoculation and chicken manure on nodulation and forage yield of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) under irrigation in a semi-arid environment [J]. University of Khartoum Journal of Agricultural Sciences, 2006, 14(2):182-197.

[22] Hungria M, Franchini J C, Campo R J, et al. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield[J]. Canadian Journal of Plant Science, 2006, 86(4): 927-939.

[23] Alam F, Bhuiyan M A H, Alam S S, et al. Effect of *Rhizobium* sp. BARIRGm901 inoculation on nodulation, nitrogen fixation and yield of soybean (*Glycine max*) genotypes in gray terrace soil[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2015, 79(10): 1660-1668.

[24] Rangin C, Brunel B, Cleyet-Marel J C, et al. Effects of *Medicago truncatula* genetic diversity, rhizobial competition, and strain effectiveness on the diversity of a natural *Sinorhizobium* species community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(18):5653-5661.

[25] Albareda M, Rodríguez-Navarro D N, Temprano F J. Soybean inoculation: Dose, N fertilizer supplementation and rhizobia persistence in soil[J]. Field Crops Research, 2009, 113(3): 352-356.

[26] Thies J E, Singleton P W, Bohlool B B. Modeling symbiotic performance of introduced rhizobia in the field by use of indices of indigenous population size and nitrogen status of the soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(1): 29-37.

[27] Sanz-sáez Á, Heath K D, Burke P V, et al. Inoculation with an enhanced N₂-fixing *B. radyrhizobium japonicum* strain (USDA 110) does not alter soybean (*Glycine max* Merr.) response to elevated [CO₂] [J]. Plant, Cell and Environment, 2015, 38(12): 2589-2602.

[28] Yan J, Han X Z, Ji Z J, et al. Abundance and diversity of soybean-nodulating rhizobia in black soil are impacted by land use and crop management[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(17): 5394-5402.

[29] Youseif S H, El-Megeed F H A, Ageez A, et al. Phenotypic characteristics and genetic diversity of rhizobia nodulating soybean in Egyptian soils [J]. European Journal of Soil Biology, 2014, 60: 34-43.

[30] Giongo A, Ambrosini A, Vargas L K, et al. Evaluation of genetic diversity of *Bradyrhizobia* strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields[J]. Applied Soil Ecology, 2008, 38(3): 261-269.

[31] Wongphatcharachai M, Staley C, Wang P, et al. Predominant populations of indigenous soybean-nodulating *Bradyrhizobium japonicum* strains obtained from organic farming systems in Minnesota[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(5): 1152-1164.

[32] Han L L, Wang E T, Han T X, et al. Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the saline-alkaline soils of Xinjiang, China[J]. Plant and Soil, 2009, 324(1-2): 291-305.

[33] Giri B, Kapoor R, Mukerji K G. Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by Arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues [J]. Microbial Ecology, 2007, 54(4): 753-760.