



固氮根瘤菌与海南主栽菜用大豆的共生匹配性和促生效应

朱佳豪^{1,2}, 焦健³, 蒲怡², 林清喜⁴, 林杉^{1,2}

(1. 中国农业大学 三亚研究院, 海南 三亚 572024; 2. 中国农业大学 资源与环境学院, 北京 100193; 3. 中国农业大学 生物学院, 北京 100193; 4. 乐东绿盛农业开发有限公司, 海南 三亚 572500)

摘要:为筛选与海南主栽菜用大豆品种“六四”、“翠绿宝”和“铁豆”匹配性高且固氮能力强的大豆根瘤菌,本研究选择了8株分离自不同生态区的根瘤菌,采用低氮蛭石基质栽培方法进行培养和筛选,测定了茎叶干重、叶片 SPAD 值、根干重、根瘤干重、根瘤数量等指标,并对其进行结构方程模型分析和相关性分析,以评价不同根瘤菌对菜用大豆生长的影响。结果表明:(1)不同菜用大豆品种接种不同根瘤菌促生效应差异显著,接种 CCBAU 25435 对菜用大豆茎叶干重、叶片 SPAD 值等生长指标的提高效果显著,较不接种根瘤菌增加 80% 和 112%,与国际上广泛接种的高效固氮根瘤菌 USDA 110 相比无明显差异甚至略优;(2)叶片 SPAD 值、根干重、瘤干重对茎叶干重的形成有显著的正直接效应,其中叶片 SPAD 值的影响权重最高,根瘤数则通过前三者间接促进了茎叶干重的形成;(3)中效和高效结瘤固氮根瘤菌的根瘤数和瘤干重显著高于无效菌,而高效菌的单位瘤干重显著低于中效菌。本研究筛选得到的高效固氮根瘤菌为海南地区根瘤菌剂的开发应用提供了优质根瘤菌资源。

关键词:根瘤菌筛选;共生匹配性;固氮能力;结瘤性状;结构方程模型

Symbiotic Compatibility and Growth Promotion Effect of Nitrogen Fixing Rhizobia on Hainan Vegetable-type Soybean

ZHU Jiahao^{1,2}, JIAO Jian³, PU Yi², LIN Qingxi⁴, LIN Shan^{1,2}

(1. Sanya Institute of China Agricultural University, Sanya 572024, China; 2. College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 4. Ledong Lyusheng Agricultural Development Co., Ltd, Sanya 572500, China)

Abstract: In order to screen the soybean rhizobium with high compatibility and strong nitrogen fixing ability with the main vegetable soybean varieties Liusi, Cuilyubao and Tiedou in Hainan Province. In this study, 8 strains of rhizobium isolated from different ecological regions were selected for culture and screening using low nitrogen vermiculite substrate cultivation method. Stem and leaf dry weight, leaf SPAD value, root dry weight, root nodule dry weight, root nodule number and other indexes were determined, and structural equation model analysis and correlation analysis were conducted to evaluate the effects of different rhizobia on the growth of vegetable soybean. The results showed as follows: (1) There were significant differences in the growth promotion effects of different varieties of vegetable soybean inoculated with different rhizobia. The effects of inoculation with CCBAU 25435 on the stem and leaf dry weight, leaf SPAD value and other growth indexes of vegetable soybean were significantly increased by 80% and 112% compared with those without inoculation with rhizobia. There was no significant difference or even slightly better than the highly effective nitrogen-fixing rhizobium USDA 110 widely inoculated internationally. (2) Leaf SPAD value, root dry weight and nodules dry weight had significant positive and direct effects on the formation of shoot dry weight, among which leaf SPAD value had the highest influence weight, and nodules number indirectly promoted the formation of shoot dry weight through the first three factors. (3) The number of nodules and dry weight of nitrogen-fixing rhizobia of medium-effective and high-efficient nodules were significantly higher than those of ineffective bacteria, while the dry weight of unit nodules of efficient bacteria was significantly lower than that of medium-effective bacteria. This study revealed the relationship between root nodule traits and plant growth. The root nodule biomass was not strictly positive correlated with the nitrogen-fixation promoting effect, and the nodule number could better reflect the nitrogen-fixation promoting effect than the dry weight of the nodules. The screened efficient nitrogen-fixing rhizobia provided high-quality rhizobia resources for the development and application of rhizobia agents in Hainan area. The highly efficient nitrogen fixing rhizobia screened in this study provided high-quality rhizobia resources for the development and application of rhizobia agents in Hainan.

Keywords: screening of rhizobia; symbiotic compatibility; nitrogen fixation capacity; nodule traits; structural equation model

收稿日期:2023-01-12

基金项目:三亚崖州湾科技城管理局资助项目(SYND-2021-10);中国烟草总公司云南省烟草公司重点科技计划项目(202153000-0241032)。

第一作者:朱佳豪(1999—),男,硕士研究生,主要从事植物营养和生物固氮研究。E-mail:15622358744@163.com。

通讯作者:焦健(1988—),男,博士,副教授,主要从事生物固氮研究。E-mail:jiaojian@cau.edu.cn;

林杉(1963—),男,博士,教授,主要从事养分综合管理研究。E-mail:linshan@cau.edu.cn。

海南是中国冬季瓜菜重要的生产和供应基地。目前,海南冬季瓜菜种植面积稳定在 20 万 hm^2 ,总产量约 500 万 t,总产值约 220 亿元^[1]。菜用大豆(又称毛豆)不但富含人体必需的氨基酸和植物性蛋白质,又有较高的钾、镁元素含量,B 族维生素和膳食纤维也比较丰富,受到了人们的普遍喜爱。2021 年海南省菜用大豆栽培面积达 8 660 hm^2 ,总产量 10 万 t,并呈逐年增加和迅速发展的趋势^[2]。为了追求更高的产量和经济收益,化学氮肥过量施用成为普遍现象。一方面,造成资源浪费和环境污染^[3-4];另一方面,导致经济效益和产品品质降低^[5]。挖掘大豆生物固氮潜能,降低化学氮肥施用量是人们一直关注的焦点。

大豆-根瘤菌共生固氮量约占全球豆科作物固氮量的 77%^[6],每年向农业系统注入 4 000 万 t 氮^[7],可为大豆生长提供 50%~90% 的氮素^[8-9]。大豆接种根瘤菌已有 100 多年历史,该技术已在美国、巴西、阿根廷等大豆主产国获得广泛应用^[10]。接种高效固氮根瘤菌剂,不但可有效减少化学氮肥施用量,节约施肥成本,降低环境污染风险,而且能提高大豆产量和改善品质^[11]。根瘤固定的氮素能更有效地转移到大豆籽粒中,从而提高籽粒蛋白质含量和营养价值^[12-13]。

豆科植物与根瘤菌共生固氮系统的有效建立是基于根瘤菌与豆科植物的相互识别与匹配^[14]。然而,根瘤菌遗传多样性决定了根瘤菌与豆科作物建立共生关系时,具有高度宿主专一性和品种匹配性^[15-16]。根瘤菌与豆科植物之间信号交换和相互识别过程的高度专一性^[17],决定了不同品种大豆和不同根瘤菌组合的固氮促生效果存在显著差异^[10,18-19]。在高效固氮根瘤菌筛选评价体系中,植株地上部生物量、全氮含量、叶片叶绿素含量(SPAD 值)和根系参数(根鲜/干重、根表面积)是评价植株氮素营养状况和根瘤菌固氮效果的重要指标^[9,20];根瘤数量、根瘤干重和根瘤大小则是衡量大豆结瘤能力和固氮效率的重要指标^[20-22]。以上指标可归为生长性状和结瘤性状两大类。通过建立结构方程模型可以解析两类指标间的关联规律,量化各指标对植物生物量的直接和间接影响,有助于提高对根瘤菌筛选评价体系的认识和理解,更好地筛选与品种相匹配的高效固氮根瘤菌。

针对海南岛主栽的 3 个菜用大豆品种,本研究从中国农业大学菌种保藏中心选择了 8 个分离自不同生态区根瘤菌菌种,采用低氮蛭石基质栽培方法进行筛选,通过测定大豆地上部生物量、叶片叶绿素含量、结瘤性状和根系参数,结合结构方程模型

分析实现以下 2 个目标:(1)筛选与海南主栽菜用大豆品种“六四”、“翠绿宝”、“铁豆”共生匹配性高且固氮能力强的大豆根瘤菌株;(2)揭示叶片叶绿素含量、根瘤性状(根瘤干重和根瘤数)和根系参数影响地上部生物量的路径和影响权重。研究旨在挖掘菜用大豆的生物固氮潜力,降低生产过程中氮肥的施用量,为海南省菜用大豆根瘤菌的筛选和应用提供理论指导和优良根瘤菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试根瘤菌来自中国农业大学菌种保藏中心,分别是盐碱性土壤中的相对优势菌 *S. fredii* (CCBAU 45436、25509),酸性土壤中广泛分布且在酸性土壤中占绝对优势的 *B. japonicum* (CCBAU 15354、25435)、*B. elkanii* (CCBAU 5727、43297、25573)、*B. diazoefficiens* (USDA 110)。其中,45436、25509、25435、5727、25573 分离自华北生态区,15354 分离自东北生态区,43297 分离自南方生态区;110 分离自美国佛罗里达州,为国际广泛接种的高效固氮根瘤菌。

1.1.2 供试品种 供试菜用大豆“六四”、“翠绿宝”和“铁豆”由海南省绿盛农业开发有限公司提供,为海南省主栽的菜用大豆品种。

1.2 试验设计

试验采用二因素试验设计,主因素为 8 个根瘤菌株,并设置不接种根瘤菌作为对照;副因素为 3 个菜用大豆品种,共 27 个处理,每个处理 7 次重复。在无菌人工气候室条件下,用低氮基质培养菜用大豆植株,将 8 个根瘤菌株分别接种于 3 个菜用大豆品种,每个品种设不接种根瘤菌为对照。培养期间,保证 3 个品种都同日播种和移栽,同日接种根瘤菌,同日收获并测定各项生长和结瘤指标,最后对菜用大豆接种不同根瘤菌的共生效应结果进行分析。

1.3 方法

1.3.1 低氮培养基配制 将稀释 20 倍的低氮营养液与蛭石按体积比为 1:5 充分拌匀,湿热(121 $^{\circ}\text{C}$)灭菌 90 min,将其分装入 250 mL 塑料杯中,将装去离子水的玻璃钵湿热(121 $^{\circ}\text{C}$)灭菌 30 min,然后用无菌纱布条将盛有蛭石的塑料杯和装无菌水的玻璃钵连接,组成双层钵,植株采用双层钵法培养。植物低氮营养液配方(1 L): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 9.2 g, KCl 1.5 g, MgSO_4 1.2 g, K_2HPO_4 2.72 g, 柠檬酸铁 1.5 g, 微量元素液 20 mL。微量元素液配方(1 L): H_3BO_3 2.86 g, MnSO_4 1.81 g,

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.80 g, ZnSO_4 0.22 g, H_2MoO_4 0.02 g。

1.3.2 根瘤菌悬液制备 将活化的大豆根瘤菌接种在酵母粉-甘露醇(YEM, Yeast-Extract Mannitol)液体培养基中,置于28℃、180 r·min⁻¹的摇床上培养至OD₆₀₀为0.5~2.0。根瘤菌扩繁培养后,将菌液进行离心(4 500 r·min⁻¹, 5 min, 25℃)收集菌体,用0.8%生理盐水稀释菌液至OD₆₀₀为0.2备用。YEM液体培养基配方(1 L):甘露醇10 g,酵母粉3 g, K₂HPO₄ 0.25 g, KH₂PO₄ 0.25 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.1 g, 蒸馏水1 L, pH6.8~7.0。

1.3.3 植株接种根瘤菌 挑选颗粒饱满的种子,对其进行表面消毒。将种子置于95%乙醇中浸泡30 s,弃废液;然后加入3% NaClO溶液中浸泡5 min,弃废液,最后用无菌水冲洗10次。消毒后的种子置于灭菌蛭石催芽(24℃, 12 h/12 h昼夜周期),保持蛭石处于湿润状态。发芽后的种子移栽到双层钵的蛭石中,每个种子接种1 mL生理盐水-根瘤菌悬浮液(OD₆₀₀ = 0.2),将根瘤菌菌液施到植株根部,覆盖蛭石完成接种,并用1 mL无菌水作对照处理。移栽和接种过程在超净工作台中进行,避免污染。移栽接种完成后,塑料杯封口后置于人工光照间内培养(24℃, 12 h/12 h昼夜周期),移栽后第4天用“十字法”剪开封口膜,植物生长期间向玻璃瓶中补充无菌去离子水。

表1 菜用大豆品种和根瘤菌菌种对大豆营养生长和结瘤影响的二因素方差分析(n=7)

Table 1 Two-factor variance analysis of the effects of soybean varieties and rhizobia strains on soybean vegetative growth and nodulation (n=7)

类型 Type	单株茎叶干重 Dry weight of stem and leaf per plant/g	SPAD 值 SPAD value	单株根干重 Dry root weight per plant/g	单株根瘤干重 Dry weight of nodulation per plant/mg	单株根瘤数 Nodulation number per plant	单株根瘤干重 Dry weight of nodulation/mg
品种 Cultivar	4.44*	91.09***	8.82***	42.26***	47.98***	8.47***
菌种 Strain	28.72***	147.45***	6.35***	100.15***	58.60***	71.84***
品种×菌种 Cultivar×Strain	2.95***	9.01***	2.26**	9.33***	2.34**	43.65***

注:*. P<0.05; **. P<0.01; ***. P<0.001。

Note: *. P<0.05; **. P<0.01; ***. P<0.001.

2.1.2 茎叶干重和整体长势 不考虑供试大豆品种时,与不接菌对照相比,除菌株45436外,所有供试菌株均显著提高了大豆茎叶干重(图1);其中,接种菌株25435和110后,大豆茎叶干重的增加值最大,增幅分别为80%和68%,其次为菌株15354和43297。尽管同一大豆品种对不同菌株的响应存在较大差异,但其响应趋势保持基本一致。针对“六四”和“翠绿宝”而言,除菌株45436外,接种其他菌株均显著提高了茎叶干重,增幅介于33%~126%。然而,对于“铁豆”,其中3个菌株并未显著提高茎

1.3.4 测定项目及方法 植株生长第18天后,用叶绿素仪(SPAD-502 PLUS, Japan)每3 d测定倒二叶位叶片叶绿素含量间接值(SPAD值)。第40天试验结束时,将植株沿根部水平面剪断,将根瘤从根系中分离,分别测定和记录茎叶和根的鲜重,统计各植株结瘤数量,根瘤统计后用吸水纸吸干表面水分,用天平测定根瘤的鲜重。然后将植株置于105℃烘箱中杀青30 min,80℃条件下烘干至恒重,用天平测定茎叶、根系和根瘤的干重。

1.4 数据分析

应用统计分析软件SPSS Statistics 26进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和二因素方差分析(two-way ANOVA)和相关性检验(Pearson);应用AMOS 24软件进行结构方程模型分析,解析多因素复杂自变量对因变量的影响权重;应用Origin 2021软件绘制图件。

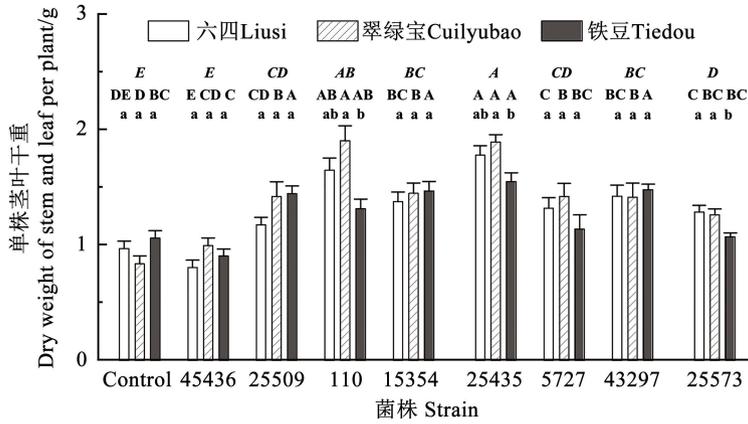
2 结果与分析

2.1 接种根瘤菌对菜用大豆生长和结瘤的影响

2.1.1 品种和根瘤菌菌种间互作方差分析 二因素方差分析结果表明,菜用大豆品种和根瘤菌菌种均显著影响了大豆茎叶干重、叶片SPAD值、根干重、瘤干重、根瘤数和单位瘤干重,并且品种和根瘤菌菌种间存在显著交互作用(表1)。

叶干重(图1)。上述结果可从收获时植物生长状况得到很好的验证,大豆叶片颜色发黄,代表植物缺氮越严重,限制了大豆的生长(图2)。

因此,针对菜用大豆品种“六四”和“翠绿宝”,有2株根瘤菌(25435和110)表现出了最佳固氮促生效果,另外5株根瘤菌促生效果次之(图3);针对“铁豆”品种,有5株根瘤菌(25435、43297、15354、25509和110)表现出了最佳固氮促生效果,另外两株根瘤菌的促生效果次之。



注:不同斜体大写字母表示不同菌株间差异显著 (n = 21), 不同正体大写字母表示同一品种不同菌株间差异显著 (n = 7), 不同小写字母表示同一菌株不同品种间差异显著 (n = 7), 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

Note: Different capital letters in italics indicate significant differences between different strains (n = 21), different capital letters in normal body indicate significant differences between different strains of the same variety (n = 7), different lowercase letters indicate significant differences between different strains of the same variety (n = 7), and the significance level is $P < 0.05$.

图1 接种根瘤菌对3个品种菜用大豆茎叶干重的影响

Fig. 1 Effects of inoculating rhizobia on shoot dry weight of three soybean varieties

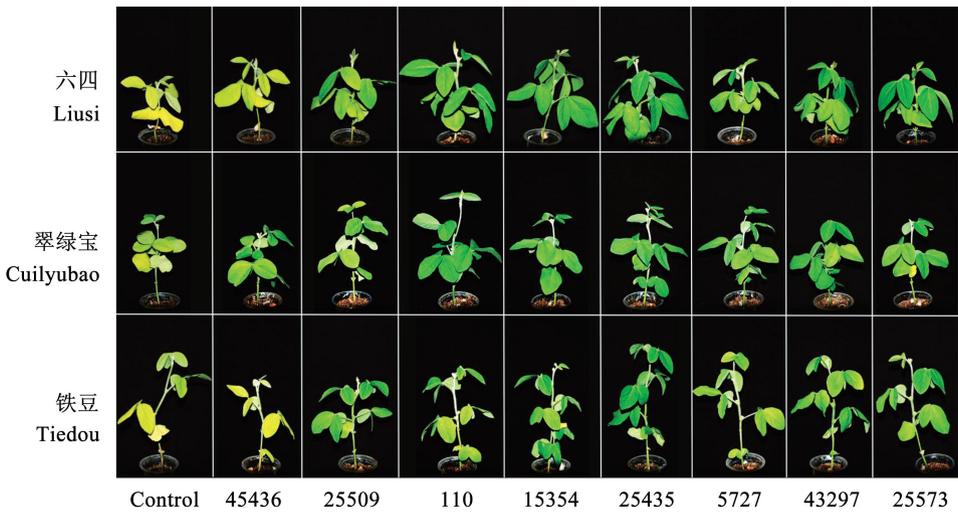
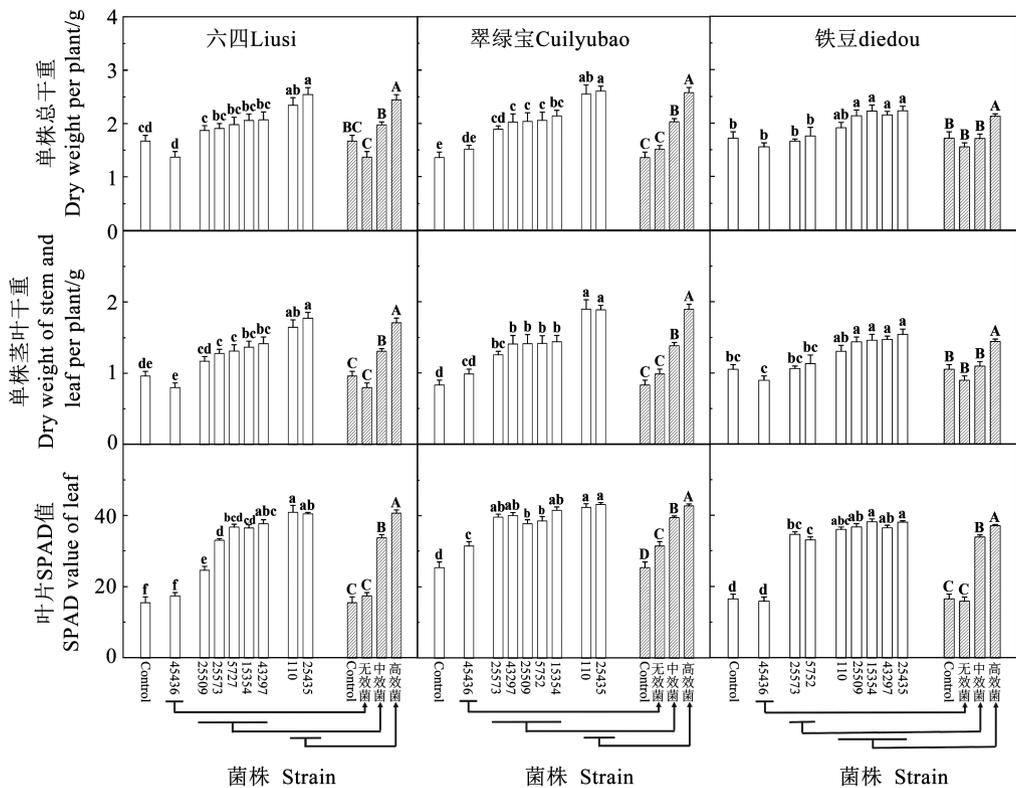


图2 接种根瘤菌后菜用大豆“六四”、“翠绿宝”和“铁豆”长势的情况

Fig. 2 Growth of soybean Liusi, Cuilyubao and Tiedou after rhizobia inoculation

2.1.3 不同根瘤菌分组情况和其对菜用大豆促生效果 综合考虑接种根瘤菌后大豆茎叶干重、叶片 SPAD 值和总干重单因素方差分析结果, 将 8 个根瘤菌菌株大致划分为 3 个组别, 分别为无效、中效和高效结瘤固氮组(图 3)。针对“六四”和“翠绿宝”, 无效组菌株为 45436, 中效组包括菌株 25509、25573、5727、15345、43297, 高效组包括菌株 25435

和 110; 针对“铁豆”而言, 无效组菌株为 45436, 中效组菌株为 25573 和 5727, 高效组菌株为 110、25509、15345、43297 和 25435。总体而言, 3 个品种大豆接种无效、中效和高效菌株后, 植株总干重、茎叶干重和叶片 SPAD 值呈显著增加的趋势; 其中, 接种无效组菌株与不接菌对照之间, 植株总干重、茎叶干重和叶片 SPAD 平均值不存在显著差异(图 3)。



注:不同小写字母表示同一品种下不同菌株间差异显著($n=7, P<0.05$),不同大写字母表示不同类型根瘤菌间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different strains of the same variety ($n=7, P<0.05$), and different capital letters indicate significant differences between different types of rhizobia ($P<0.05$).

图3 接种根瘤菌对3个品种菜用大豆总干重、茎叶干重和叶片SPAD值的影响

Fig. 3 Effects of inoculating rhizobia on total dry weight, shoot dry weight and leaf SPAD of three soybean varieties

2.2 接种不同类型根瘤菌对菜用大豆结瘤性状和根系生长的影响

二因素方差分析结果表明,大豆品种和根瘤菌分组类型均显著影响了根瘤数、瘤干重、单位瘤干重、根干重和地上地下部干重比值,并且存在显著交互作用(表2)。总体而言,地上地下部干重比值随固氮促生效应的提高而显著增加,接种根瘤菌一定程度上降低了根干重(表3)。具体到不同类型根

瘤菌的结瘤性状,接种高效菌和中效菌的根瘤数显著高于无效菌,且二者之间不存在显著差异(表3);对于“六四”和“铁豆”而言,瘤干重和单位瘤干重存在中效菌>高效菌>无效菌的趋势,而对于“翠绿宝”而言,接种中效菌的瘤干重显著高于无效菌和高效菌,其单位瘤干重则存在无效菌>中效菌>高效菌的趋势,其中接种无效菌单位瘤干重甚至达到中效菌和高效菌的3~5倍之多(表3)。

表2 菜用大豆品种和根瘤菌分组类型对大豆结瘤性状和根系生长的二因素方差分析

Table 2 Two-factor variance analysis of soybean varieties and rhizobia group types on nodulation traits and root growth of soybean

类型 Type	单株根瘤数 Nodulation number per plant	单株根瘤干重 Dry weight of nodulation per plant/mg	单位根瘤干重 Dry weight of per nodulation/mg	单株根干重 Dry root weight per plant/g	地上地下 干重比值 S/R
品种 Cultivar	19.06***	9.61***	73.87***	6.39**	32.12***
分组类型 Grouping type	81.46***	96.04***	34.11***	17.68***	71.19***
品种×类型 Cultivar×Grouping type	1.70**	14.06***	96.81***	4.58**	3.57**

注: * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

Note: * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

表3 接种不同类型根瘤菌对菜用大豆“六四”、“翠绿宝”和“铁豆”结瘤性状和根系生长的影响

Table 3 Effects of inoculation with different types of rhizobia on nodulation traits and root growth of Liusi, Cuilyubao and Tiedou

品种 Cultivar	分组类型 Grouping type	单株根瘤数 Nodulation number per plant	单株根瘤干重 Dry weight nodulation per plant/mg	单位根瘤干重 Dry weight per nodulation /mg	单株根干重 Dry root weight per plant/g	地上地下 干重比值 S/R
六四 Liusi	不接菌	-	-	-	0.75 ± 0.05 aA	1.25 ± 0.06 cB
	无效菌	12 ± 3 bAB	5.86 ± 1.44 cB	0.47 ± 0.03 cB	0.57 ± 0.04 bcA	1.41 ± 0.03 cB
	中效菌	75 ± 3 aA	163.76 ± 7.02 aA	2.27 ± 0.12 aAB	0.51 ± 0.02 cA	2.00 ± 0.05 bAB
	高效菌	73 ± 5 aA	92.69 ± 6.38 bA	1.35 ± 0.07 bB	0.65 ± 0.03 abA	2.35 ± 0.07 aB
翠绿宝 Cuilyubao	不接菌	-	-	-	0.53 ± 0.04 abB	1.60 ± 0.08 cA
	无效菌	17 ± 2 bA	91.00 ± 8.23 bA	5.82 ± 0.55 aA	0.44 ± 0.02 bB	1.90 ± 0.13 bcA
	中效菌	71 ± 4 aA	124.94 ± 5.16 aB	1.86 ± 0.08 bB	0.52 ± 0.01 abA	2.16 ± 0.05 bA
	高效菌	79 ± 5 aA	84.21 ± 5.69 bA	1.08 ± 0.05 cB	0.60 ± 0.03 aA	2.83 ± 0.14 aA
铁豆 Tiedou	不接菌	-	-	-	0.66 ± 0.06 aAB	1.62 ± 0.06 bcA
	无效菌	5 ± 1 bB	5.42 ± 0.38 cB	1.04 ± 0.07 cB	0.65 ± 0.02 aA	1.38 ± 0.06 cB
	中效菌	47 ± 4 aB	121.50 ± 6.79 aB	2.50 ± 0.13 aA	0.49 ± 0.02 bA	1.82 ± 0.08 bC
	高效菌	45 ± 2 aB	90.30 ± 3.96 bA	2.01 ± 0.08 bA	0.59 ± 0.01 abA	2.12 ± 0.04 aB

注:数字后不同小写字母表示同一品种下不同类型根瘤菌间差异显著($P < 0.05$);不同大写字母表示同一类型根瘤菌下不同品种间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters after the number indicated that there were significant differences among different types of rhizobia under the same variety ($P < 0.05$); Different capital letters indicated that there were significant differences among different varieties under the same type of rhizobia ($P < 0.05$).

2.3 接种不同类型根瘤菌对菜用大豆叶片 SPAD 值的影响

生长至 25 d 前,接种高效根瘤菌的叶片 SPAD 值显著低于不接菌的对照处理(图 4),接种中效和无效根瘤菌的叶片 SPAD 值介于二者之间。至 25 d 时,各处理间叶片 SPAD 值不存在显著差异。此后,不接菌和接种无效根瘤菌的大豆叶片 SPAD 值逐渐降低,而接种高效和中效根瘤菌的大豆叶片 SPAD 值则显著增加,且二者差异达极显著水平(图 4)。

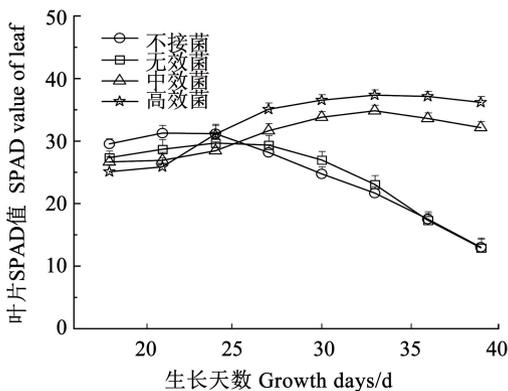


图4 接种不同类型根瘤菌后菜用大豆“六四”叶片 SPAD 值动态变化

Fig.4 Dynamic changes of SPAD value of Liusi leaves after inoculation with different types of rhizobia

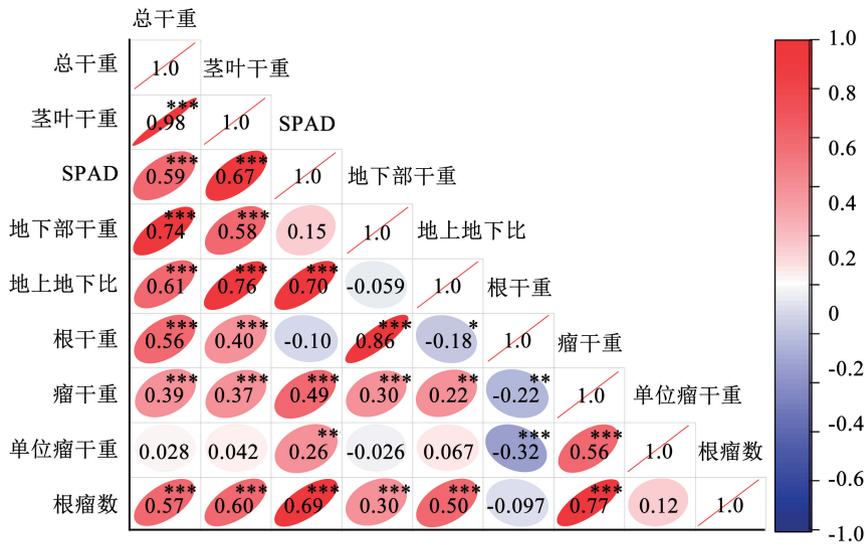
2.4 茎叶、根系和根瘤相关性分析和影响因子权重溯源

2.4.1 菜用大豆主要生长和结瘤指标相关性分析

大豆总干重、茎叶干重与 SPAD 值、地下部干重、地上地下部干重比值、根干重、瘤干重和根瘤数存在极显著正相关关系(图 5);而根干重与瘤干重、单位瘤干重、地上地下部干重比值呈显著负相关关系。随着根瘤数和瘤干重的增加,茎叶干重和叶片 SPAD 值显著增加(图 6)。

2.4.2 菜用大豆茎叶干重结构方程模型解析其影响因子权重

结构方程模型表明,叶片 SPAD 值、根干重、瘤干重和根瘤数对茎叶干重的解释率达到 97%(图 7)。其中,叶片 SPAD 值、根干重和瘤干重对茎叶干重增加的直接贡献最大,其标准化直接效应系数分别为 0.79, 0.63 和 0.33 ($P < 0.001$)。根瘤数对叶片 SPAD 值、瘤干重和根干重的标准化直接效应系数分别为 0.69, 0.75 ($P < 0.001$) 和 0.29 ($P < 0.05$)。而瘤干重对根干重和叶片 SPAD 的标准直接效应系数分别为 -0.42 和 -0.32 ($P < 0.001$)(图 7)。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。方格内数字为相关系数,颜色深浅代表相关性强弱(红色为正相关,蓝色为负相关)。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. The number in the square is the correlation coefficient, and the depth of the color represents the strength of the correlation (red indicates positive correlation, while blue negative correlation).

图5 3个品种菜用大豆生长指标和结瘤指标的相关性色阶图 (n = 189)

Fig. 5 Color scale diagram of correlation between growth indexes and nodulation indexes of three soybean varieties (n = 189)

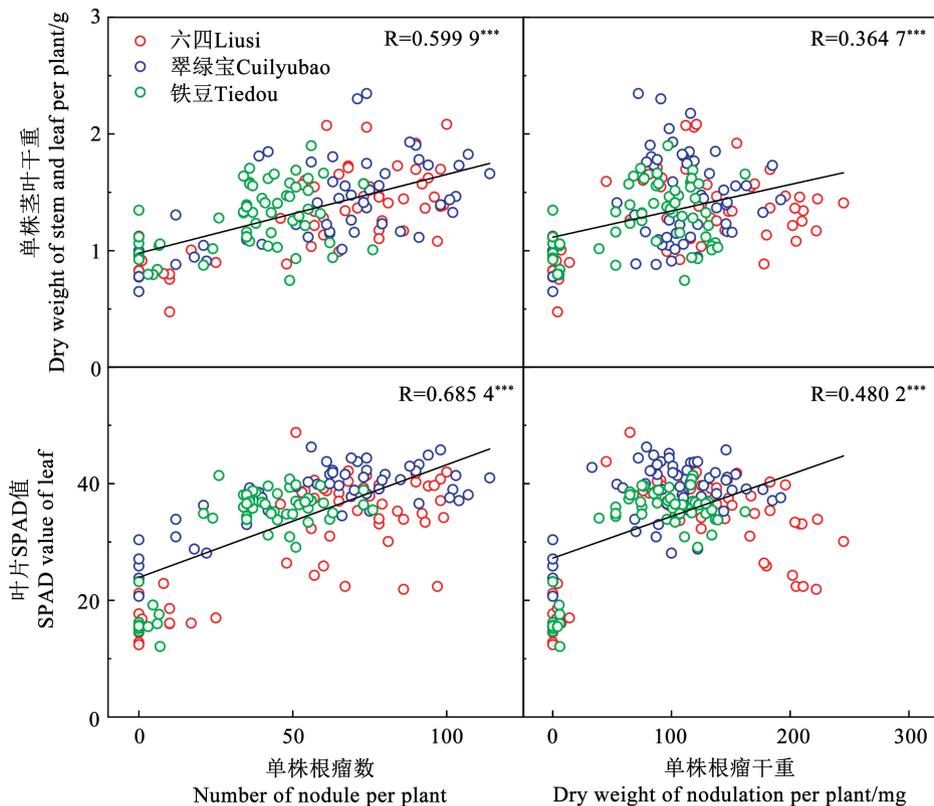
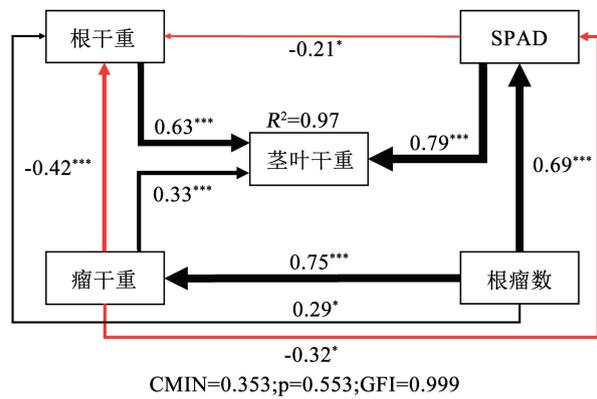


图6 3个品种菜用大豆茎叶干重和叶片SPAD与瘤干重和根瘤数的相关性散点图 (n = 189)

Fig. 6 Scatter diagram of correlation between shoot dry weight and leaf SPAD with dry weight and nodule number of three soybean varieties (n = 189)



注: 矩形方框为观察变量, 单向箭头表示变量之间因果关系, 起始为因, 指向为果。单向箭头黑线表示促进作用, 红线表示抑制作用, 粗细程度表示影响大小, 单向箭头上的数字表示标准化直接效应系数。R²: 表示所有路径对茎叶干重的解释率; CMIN: 卡方值; p: 显著性概率; GFI: 良适性适配指标。

Note: The rectangular box is the observation variable, and the one-way arrow indicates the causal relationship between variables, starting from the cause and pointing to the effect. The black line is the promoting effect, the red line is the inhibiting effect, the thickness is the degree of influence, and the number on the arrow is the standardized direct effect coefficient. CMIN: Chi square value; p: Probability of significance; GFI: Goodness-of-fit index.

图7 大豆茎叶干重结构方程模型的路径和系数

Fig. 7 Path and coefficient of soybean shoot dry weight structural equation model

3 讨论

本项研究结果表明, 除菌株 45436 外, 接种其它 7 种根瘤菌均提高了 3 个品种菜用大豆的茎叶干重 (图 2 和图 3), 大豆生物量的差异反映了根瘤菌与共生植物的匹配性和固氮促生能力的差异^[19, 23-24]。而不同根瘤菌和大豆品种间共生匹配性和固氮促生能力存在显著差异 (图 1 和图 2), 这与前人研究报道相吻合^[10, 18-19, 25-26]。

叶片叶绿素含量 SPAD 值是反映植株氮素营养状况的重要指标^[27-28]。当生长介质缺氮时, 叶片 SPAD 值则能准确表征根瘤固氮效率^[29], 这从大豆茎叶干重、叶片 SPAD、根瘤数及根瘤干重四者间呈显著正相关关系 (图 6), 获得很好的验证。一般而言, 接种根瘤菌能够改善宿主植物的氮素营养状况, 进而提高了光合性能^[30]。然而, 在大豆生长前期, 接种根瘤菌的叶片 SPAD 值显著低于不接菌的对照处理 (图 4), 表明此时根瘤固氮能力尚未完全建成, 新根瘤的完全激活会导致暂时性的氮缺乏^[31], 并且根瘤生长发育、固氮过程以及氮同化需要消耗大量光合产物, 以提供根系结瘤所增加的呼吸负担和氮同化所需的碳骨架, 因而暂时限制了地上部生长^[29, 32]。当大豆生长至 27 d 后, 接种高效和中效菌的叶片 SPAD 值随着生育期延长不但显著增加, 而且显著高于不接菌和接种无效菌的叶片 (图

4)。显示出高效和中效菌侵染结瘤后, 能持续为植株提供氮素和改善氮素营养状况, 促进植株生长^[33-34], 而不同类型根瘤菌固氮效率的变化和差异可通过叶片 SPAD 值的动态变化表征。

尽管茎叶干重、叶片 SPAD 值、根干重、瘤干重、根瘤数等参数间均呈显著正相关关系 (图 5), 结构方程模型可以更好地定量化解析存在复杂相互作用的自变量对因变量茎叶干重的影响权重^[35]。本研究的结果表明, 叶片 SPAD 值、根干重和瘤干重是茎叶干重形成的直接驱动因素 (图 7), 根瘤数则通过促进根瘤 (瘤干重) 和根系 (根干重) 生长、提高叶片 SPAD 值, 间接促进茎叶干重的增加。虽然根瘤固氮为植物提供了氮源, 但由于根瘤是较强的碳水化合物汇^[31], 其与茎叶和根系在植物体内营养物质分配方面构成了一定程度的竞争关系^[32], 这能从瘤干重对叶片 SPAD 和根干重显示出负效应 (图 7) 得到很好的验证。并且结瘤固氮过程消耗了大量碳源和能源, 进而可能造成对植株其它部位的生长发育的抑制作用^[29]。

将根瘤菌分组分析后发现, 接种中效菌的植株虽然根瘤干重显著高于无效菌和高效菌 (表 3), 而高效菌的固氮促生效果显著高于无效菌和中效菌; 无效菌结瘤多为极小或极大的畸形根瘤并且数量少, 固氮促生效果表现差 (图 2、图 3 和表 3)。结瘤固氮是植物体内的高耗能过程, 根瘤固氮消耗的碳是植物从土壤中吸收等量氮的 2~3 倍, 植物能通过复杂的结瘤自动调节信号回路严格控制根瘤的形成, 精确控制根瘤碳的输入, 以避免碳源的过量消耗^[36-38]。因此, 根瘤性状与固氮促生效果并非严格线性对应, 根瘤生物量最高, 其对应植株地上部性状并非最佳^[23], 因为根瘤生物量的增加可能导致植物体内物质和能源消耗的增加, 从而降低固氮促生效果。与此同时, 固氮效率也调节着根瘤的发育, 低固氮率会导致根瘤生长的停止^[38]。

通过进一步分析结瘤性状与促生效果的差异和联系后发现 (图 3 和表 3), 高效菌和中效菌的根瘤数量和干重处于供试菌株的较高水平。其中高效菌的结瘤性状表现为根瘤数量多而单位根瘤干重相对小; 中效菌表现为根瘤数量多且单位根瘤干重大; 无效菌表现为根瘤数量少而单位根瘤干重极小或极大。而具体到大豆品种, 菜用大豆“六四”和“铁豆”接种无效菌的单位瘤干重极小, “翠绿宝”的则表现为极大 (表 3)。据此认为根瘤数量和根瘤干重反映了根瘤菌与植物的共生匹配性, 二者与共生匹配性呈正相关关系, 其中根瘤数量较根瘤干重更能反映固氮促生效果, 根瘤数越多, 固氮促生效果越好; 单位根瘤干重一定程度反映了根瘤固氮能力, 根瘤菌并非通过增加单个根瘤质量来提高固氮潜力, 质量适中的根瘤能更加高效地利用碳源完成

固氮反应,其固氮能力较大根瘤和小根瘤更强,以上观点与已有研究报道基本吻合^[10,28-29]。

根瘤菌和豆科植物建立共生体系通过结瘤和固氮两个过程完成,涉及复杂的互作调节机理,并受环境因素的显著影响^[39]。早期研究发现豆科植物具有宿主专一性,即仅限与某种特定的根瘤菌结瘤固氮,后期采用分子生物学的方法进一步发现根瘤菌与豆科植物的共生关系主要由二者共生基因所决定^[40]。根瘤菌基因组的基因可分为环境适应基因、结瘤基因和固氮基因,对应根瘤菌的适应性、结瘤性和固氮性 3 个特征,只有三者有效结合才能实现豆科植物与根瘤菌在特定环境条件下共生固氮效果的最大化^[7]。

4 结论

综上所述,本研究发现:(1)不同根瘤菌和不同大豆品种间的共生匹配性和固氮效率存在显著性差异,而大豆植株接种高效根瘤菌能显著改善植物氮素营养状况并促进大豆生长,其茎叶干重、叶片 SPAD 值和根瘤数均显著提高,其中 CCBAU 25435 接种效果与国际广泛使用的高效菌 USDA 110 相当甚至某些植株参数略优,为海南地区根瘤菌的应用提供了菌质资源;(2)叶片 SPAD 值、根干重和瘤干重直接促进了植株地上部生物量的形成,其中叶片 SPAD 值权重最高,根瘤数则是以间接的方式促进植株地上部生物量的形成;(3)根瘤菌侵染结瘤和根瘤发育会限制大豆植株前期地上部的生长,随生长时间延长(约 27 d)根瘤菌的固氮促生效应显现,并且高效固氮根瘤菌有根瘤数多且根瘤大小适中的结瘤特点。

参考文献

[1] 关广晟,柳晓磊. 海南自贸港冬季瓜菜产业高质量发展的建议 [EB/OL]. (2021-12-8) [2022-12-1]. http://hnrh.hinews.cn/html/2021-12/08/content_58475_14234770.htm. (GUAN G S, LIU X L. Suggestions for high-quality development of winter melon and vegetable industry in Hainan Free Trade Port [EB/OL]. (2021-12-8) [2022-12-1]. http://hnrh.hinews.cn/html/2021-12/08/content_58475_14234770.htm.)

[2] 海南省农业农村厅办公室. 海南省农业农村厅办公室关于推介发布 2022 年农业主推技术的通知 [EB/OL]. (2022-3-17) [2022-12-1]. https://agri.hainan.gov.cn/hnsnyt/xxgk/tzgg/xztz/202203/t20220318_3157326.html. (Office of Hainan Provincial Department of Agriculture and Rural Affairs. Notice of the Office of Hainan Provincial Department of Agriculture and Rural Affairs on promoting and releasing 2022 agricultural main technologies [EB/OL]. (2022-3-17) [2022-12-1]. https://agri.hainan.gov.cn/hnsnyt/xxgk/tzgg/xztz/202203/t20220318_3157326.html.)

[3] 蔡祖聪,颜晓元,朱兆良. 立足于解决高投入条件下的氮污染问题[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(1): 1-6. (CAI Z C, YAN X Y, ZHU Z L. A great challenge to solve nitrogen

pollution from intensive agriculture[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer[J], 2014, 20(1): 1-6.)

[4] 巨晓棠,谷保静. 我国农田氮肥施用现状、问题及趋势[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(4): 783-795. (JU X T, GU B J. Status-quo, problem and trend of nitrogen fertilization in China[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2014, 20(4): 783-795.)

[5] 盖志佳. 氮肥密度互作对大豆产量影响的生理机制研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017: 90-100. (GAI Z J. Effects of fertilizer-N and density interaction on soybean yield and studies on physiological mechanism [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017: 95-100.)

[6] 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.

[7] CHEN W F, WANG E T, JI Z J, et al. Recent development and new insight of diversification and symbiosis specificity of legume rhizobia; Mechanism and application [J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 131(2): 553-563.

[8] 柏宇,关大伟,李力,等. 耐高氮优良大豆根瘤菌株的筛选与鉴定[J]. 大豆科学, 2014, 33(6): 861-864. (BO Y, GUAN D W, LI L, et al. Screening and characterization of superior nitrogen-tolerance soybean rhizobia[J]. Soybean Science, 2014, 33(6): 861-864.)

[9] 刘颖,张佳蕾,李新国,等. 豆科作物氮素高效利用机制研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2022, 44(3): 476-482. (LIU Y, ZHANG J L, LI X G, et al. Research progress on nitrogen efficient utilization mechanism of leguminous crops [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2022, 44(3): 476-482.)

[10] 伍惠,钟喆栋,樊伟,等. 8 株优良大豆根瘤菌与不同地区 27 个大豆主栽品种的匹配性研究[J]. 大豆科学, 2017, 36(3): 405-418. (WU H, ZHONG Z D, FAN W, et al. Symbiotic compatibility among eight elite soybean rhizobia strains and twenty-seven soybean cultivars from different planting regions [J]. Soybean Science, 2017, 36(3): 405-418.)

[11] 周涛,陈远学,邹依霖,等. 四川高效大豆根瘤菌的筛选及初步应用研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(1): 227-233. (ZHOU T, CHEN Y X, ZOU Y L, et al. Screening and preliminary application of high efficient soybean rhizobia strains in Sichuan province [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2012, 18(1): 227-233.)

[12] MINCHIN F R, SUMMERFIELD R J, NEVES M C P. Carbon metabolism, nitrogen assimilation, and seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) grown in an adverse temperature regime [J]. Journal of Experimental Botany, 1980, 31(5): 1327-1345.

[13] 夏玄. 氮素营养对大豆结瘤固氮及相关调控物质影响的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018: 5-10. (XIA X. Study on the effect of nitrogen nutrition on soybean nodulation and nitrogen fixation and related regulation substances [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018: 5-10.)

[14] 曾庆飞,韦兴迪,韦鑫,等. 贵州岩溶山区野生天蓝苜蓿根瘤菌资源发掘、固氮特性及其多样性研究[J]. 草地学报, 2022, 30(7): 1891-1899. (CENG Q F, WEI X D, WEI X, et al. Research on resource exploration, nitrogen fixation characteristics and diversity of rhizobia of medicago lupulina in Karst Mountainous Area of Guizhou [J]. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(7): 1891-1899.)

[15] WALKER L, LAGUNAS B, GIFFORD M L. Determinants of host range specificity in legume-rhizobia symbiosis [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 585749.

- [16] ANDREWS M, ANDREWS M E. Specificity in legume-rhizobia symbioses [J]. International of Journal of Molecular Science, 2017, 18(4): 705.
- [17] 郭先武. 根瘤菌的结瘤基因与结瘤因子[J]. 生物技术通报, 1998(4): 17-22. (GUO X W. Nodulation genes and nodulation factors of rhizobia[J]. Biotechnology Bulletin, 1998(4): 17-22.)
- [18] 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, 26(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, 26(2): 221-227.)
- [19] 冀照君, 王菲梦, 王素阁, 等. 鲁黄1号大豆与根瘤菌的共生匹配性[J]. 应用生态学报, 2014, 25(12): 3573-3579. (JI Z J, WANG F M, WANG S G, et al. Symbiotic matching between soybean cultivar Luhuang No. 1 and different rhizobia[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(12): 3573-3579.)
- [20] 赵宇宾, 关大伟, 邢鹏飞, 等. 芽孢杆菌与根瘤菌复合包衣对大豆结瘤固氮能力的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2022(7): 222-227. (ZHAO Y B, GUAN D W, XING P F, et al. Effect of composite coating of *Bacillus* and rhizobia on nitrogen-fixing ability of soybean nodulation[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2022(7): 222-227.)
- [21] 邵玮玮, 于淑婷, 王丽, 等. 根瘤菌剂和种衣剂拌种对不同品种大豆结瘤能力和产量的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2022(6): 188-194. (SHAO W W, YU S T, WANG L, et al. Effects of rhizobium agent and seed coat agent on nodulation ability and yield of different soybean varieties[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2022(6): 188-194.)
- [22] 朱巍巍, 韩晓增, 芦思佳, 等. 硝态氮对大豆根瘤性状的影响[J]. 大豆科学, 2010, 29(5): 845-847. (ZHU W W, HAN X Z, LU S J, et al. Effect of nitrate nitrogen on nodulation characters of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Soybean Science, 2010, 29(5): 845-847.)
- [23] 王晓丽, 秦杰, 王敏, 等. 山西大豆根瘤菌的分离、鉴定及共生匹配性筛选[J]. 生物技术通报, 2022, 38(3): 59-68. (WANG X L, QIN J, WANG M, et al. Isolation, identification and symbiotic matching of soybean rhizobia from Shanxi province [J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(3): 59-68.)
- [24] 李彦连, 王传雷, 徐保民, 等. 徐豆24大豆根瘤菌共生匹配性筛选及应用[J]. 大豆科学, 2020, 39(4): 612-620. (LI Y L, WANG C L, XU B M, et al. Screening and application of suitable symbiotic combination between rhizobia and soybean cultivar Xudou 24[J]. Soybean Science, 2020, 39(4): 612-620.)
- [25] 常单娜, 马晓彤, 周国朋, 等. 不同根瘤菌与紫云英主栽品种的共生匹配性[J]. 草业学报, 2022, 31(12): 171-180. (CHANG D N, MA X T, ZHOU G P, et al. Symbiotic compatibility of different rhizobia strains with important Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus*) cultivars [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(12): 171-180.)
- [26] 王敏, 秦杰, 杨万明, 等. 晋大88高匹配性强耐盐根瘤菌筛选[J]. 大豆科学, 2021, 40(3): 385-393. (WANG M, QIN J, YANG W M, et al. Screening of salt-tolerant and well symbiotic matching soybean rhizobia strains for Jinda 88 [J]. Soybean Science, 2021, 40(3): 385-393.)
- [27] 王世宁, 谢雪果, 袁雷, 等. 基于垂直方向的色素辣椒氮素诊断敏感叶位筛选[J]. 干旱区资源与环境, 2022, 36(9): 194-201. (WANG S N, XIE X G, YUAN L, et al. Screening of sensitive leaf positions for nitrogen diagnosis of pigment pepper based on vertical direction [J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2022, 36(9): 194-201.)
- [28] 张俊杰, 王楠, 李硕, 等. 一种花生高效复合微生物菌剂及其应用[J]. 花生学报, 2022, 51(2): 86-92. (ZHANG J J, WANG N, LI S, et al. An efficient composite microbial agent and its application on peanut [J]. Journal of Peanut Science, 2022, 51(2): 86-92.)
- [29] 马家斌, 于晓波, 吴海英, 等. 接种根瘤菌对西南地区大豆光合性能和固氮能力的影响[J]. 中国油料作物学报, 2020, 42(1): 102-108. (MA J B, YU X B, WU H Y, et al. Effects of inoculation of different rhizobium on photosynthetic characteristics and nitrogen fixation of soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2020, 42(1): 102-108.)
- [30] 潘佳, 范燕, 李荣, 等. 甘农3号和陇东苜蓿高效共生根瘤菌菌株的筛选[J]. 草业科学, 2016, 33(8): 1536-1549. (PAN J, FAN Y, LI R, et al. Screening of high efficient symbiotic rhizobium for *Medicago sativa* cv. Gannong No. 3 and *M. sativa* cv. Longdong [J]. Pratacultural Science, 2016, 33(8): 1536-1549.)
- [31] JEUDY C, RUFFEL S, FREIXES S, et al. Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses [J]. New Phytology, 2010, 185(3): 817-828.
- [32] 王晓丽, 王敏, 岳爱琴, 等. 氮素营养和根瘤菌接种对大豆结瘤固氮和生长的影响[J]. 华北农学报, 2022, 37(1): 95-102. (WANG X L, WANG M, YUE A Q, et al. Effects of nitrogen nutrition and rhizobium inoculation on nodulation and nitrogen fixation and growth of soybean [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2022, 37(1): 95-102.)
- [33] 周相娟, 梁宇, 沈世华, 等. 接种根瘤菌和遮光对大豆固氮和光合作用的影响[J]. 中国农业科学, 2007, 40(3): 478-484. (ZHOU X J, LIANG Y, SHEN S H, et al. Effects of rhizobial inoculation and shading on nitrogen fixation and photosynthesis of soybean [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(3): 478-484.)
- [34] 李佳欢, 希娜, 漫静, 等. 苜蓿根瘤菌接种数量与方式对接种效果的影响[J]. 草地学报, 2022, 30(3): 743-749. (LI J H, XI N, MAN J, et al. Effects of Rhizobial population and inoculation method on the efficiency of alfalfa rhizobium inoculation [J]. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(3): 743-749.)
- [35] 吴明隆. 结构方程模型: Amos 实务进阶 [D]. 重庆: 重庆大学出版社, 2013. (WU M L. Structural equation modeling—Tips for practical application [D]. Chongqing: Chongqing University Press, 2013.)
- [36] FERGUSON B J, INDRASUMUNAR A, HAYASHI S, et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(1): 61-76.
- [37] CAO H, PENG W, NIE M, et al. Carbon-nitrogen trading in symbiotic nodules depends on magnesium import [J]. Current Biology, 2022, 32: 1-13.
- [38] LARRAINZAR E, GIL-QUINTANA E, ARRESE-LGOR C, et al. Split-root systems applied to the study of the legume-rhizobial symbiosis: What have we learned? [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2014, 56(12): 1118-1124.
- [39] 吴月, 隋新华, 戴良香, 等. 慢生根瘤菌及其与花生共生机制研究进展[J]. 中国农业科学, 2022, 55(8): 1518-1528. (WU Y, SUI X H, DAI L X, et al. Research advances of bradyrhizobia and its symbiotic mechanisms with peanut [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(8): 1518-1528.)
- [40] PERRET X, STAEHELIN C, BROUGHTON W J. Molecular basis of symbiotic promiscuity [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 180-201.