

不同大豆品种苗期与土著根瘤菌、丛枝菌根真菌双共生相关指标的分析

崔战利¹, 杨会青², 李萍³, 曹宁¹, 汤晖⁴, 阮洪生¹, 张鸿雁¹

(1. 黑龙江八一农垦大学 生命科技学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 山西省晋城市城区凤鸣中学, 山西 晋城 048000; 3. 中国石油大庆石化公司检验中心, 黑龙江 大庆 163714; 4. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要:为了筛选与土著根瘤菌、丛枝菌根真菌(AMF)高效双共生的大豆品种,在盆栽条件下,研究了不同类型的7个大豆品种在苗期与土著根瘤菌、AMF形成双共生体系及大豆生物量的状况。结果表明:7个大豆品种的根系AMF侵染率、根际土壤AMF孢子数、根瘤数量有显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)差异;垦鉴豆43在V2和V4期与土著根瘤菌和AMF能较好地形成双共生体,根段AMF侵染率和单株根瘤数均较高,根瘤与丛枝菌根(AM)形成相互制约较小,而黑农35的AM对根瘤形成有较大的制约作用,根段AMF侵染率较高,单株根瘤数最低;AM和根瘤的形成对大豆生物量积累的反应或影响在7个品种中表现不一致,垦鉴豆43和抗线2号的AMF侵染率、根瘤数量和生物量积累相对较高。

关键词:大豆;土著根瘤菌;土著丛枝菌根真菌;双共生;生物量

中图分类号:S565.1, S154.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2014)01-0083-04

Related Indexes of Dual Symbiotic of Different Soybean Varieties with Indigenous Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia in Seedling

CUI Zhan-li¹, YANG Hui-qing², LI Ping³, CAO Ning¹, TANG Hui⁴, RUAN Hong-sheng¹, ZHANG Hong-yan¹

(1. Life Science and Technology College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Fengming Middle School of Jincheng City, Shanxi 048000, China; 3. Inspection Center of China Petroleum Daqing Petrochemical Company, Daqing 163714, China; 4. Life Science College, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: In order to screen soybean varieties possessed of efficient dual symbiosis system formed by indigenous rhizobia, indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for soybean production, the dual symbiotic systems of seven soybean varieties with both indigenous rhizobia and arbuscular AM fungi and status of soybean biomass at the seedling stage were studied under potting conditions in the paper. The results were that there were significant differences ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in mycorrhizal infection rate, spore number and root nodule number per plant of seven soybean varieties in the seedling. In V2 and V4 period, Kenjiandou 43 could form a better dual symbiosis with indigenous rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi, and had a little restraining effect between nodule and AM formation. But AM of HeiNong 35 had a greater inhibition on root nodules formation. The reaction or impact of starting up of mycorrhizal colonization and root nodule on the biomass of seven soybean varieties were inconsistent. Kenjiandou 43 and Kangxian 2 had more mycorrhizal infection rate of soybean roots, spore number and root nodule number per plant.

Key words: Soybean; Indigenous arbuscular mycorrhizal fungi; Indigenous rhizobia; Dual symbiosis; Biomass

豆科植物根际微生态系统中繁衍着大量的丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)和根瘤菌,它们在长期进化过程中与豆科植物形成了AMF—豆科植物—根瘤菌双共生(dual symbiosis)的关系^[1-2]。AMF可与地球上90%的维管植物形成丛枝菌根(AM)和根外菌丝网,AM在平衡养分循环、提高抗逆性和促进寄主植物的生长等方面起重要作用^[3-4]。固氮植物AM对固氮植物优良性状的发挥具有重要的生态学意义^[5]。

在AMF—豆科植物—根瘤菌双共生关系的建立过程中,豆科植物起主导作用^[6-8]。许多学者发现根瘤(root nodules, RNs)和AM在宿主植物体内

形成过程的信号传导途径上有着高度的相似性^[9-10];RNs和AM形成既相互促进^[11],又相互制约^[12]。目前因土著根瘤菌和根瘤菌人工接种剂的结瘤竞争问题一直没有得到很好的解决^[13],且与植物共生的AMF目前还不能完全人工纯化培养,仅通过接种根瘤菌和AM菌剂提高共生固氮能力尚不能实现。由此可见,筛选高效双共生体系的大豆品种,具有重要的现实意义,因此本研究通过盆栽试验分析7个不同类型大豆品种苗期与土著根瘤菌、AMF的双共生状况,为实现大豆生产的低耗高产奠定基础。

收稿日期:2013-07-22

基金项目:黑龙江省教育厅面上项目(11541253)。

第一作者简介:崔战利(1964-),女,教授,主要从事微生物学和土壤微生物学教学与研究。E-mail: zhanlic@aliyun.com。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验以7个不同类型的大豆品种为材料,垦农5号、垦农21和垦鉴豆43为高异黄酮品种,黑农35为高油品种,垦农18为高蛋白品种,垦农4号为高油高蛋白品种,抗线2号对线虫具有抗性。采用盆栽试验,盆规格为15 cm(上口直径)×18 cm(高),试验用土为石灰性黑钙土(土壤取自大庆市农业高新技术园区黑龙江八一农垦大学实习试验基地,基本养分状况:碱解氮188.65 mg·kg⁻¹、有效磷30.97 mg·kg⁻¹、速效钾102.1 mg·kg⁻¹、有机质32.30 g·kg⁻¹、pH7.8),土壤风干后过5 mm土壤筛,每盆装土2 kg。

尿素(含N量为46%)、过磷酸钙(含P₂O₅为12%)、硫酸钾(含K₂O为50%)每盆拌入量分别为0.32,2.26,0.29 g。每盆播种10粒,出苗后14 d间苗,每盆保苗6株,每个品种6盆。

1.2 测定项目与方法

在V2和V4期取大豆植株及根际土壤样品,每次取样3盆,约100 g,装入塑料袋中风干保存,采用

湿筛倾析法测定土壤中AMF孢子数量^[14];大豆植株用清水洗净,吸去水分,取3株大豆植株测地上、地下鲜重,之后在85℃烘干至衡重,分别测定植株地上和地下部分的干重,计算根冠比;另取3株测定结瘤数并采用Trypan blue染色法进行根段染色及网格交叉法测定根段AMF侵染率^[11,15]。

1.3 数据处理

应用SAS 8.0、DPS v 7.05及Excel 2003进行数据处理和方差分析,采用Duncan法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 苗期不同大豆品种与土著根瘤菌及丛枝菌根真菌的双共生状况

由表1可知,在V2期,只有垦农5号大豆根段AMF侵染率显著高于黑农35,其他品种间差异均不显著($P > 0.05$)。而在V4期,AMF侵染率大幅度提高,黑农35、抗线2号、垦鉴豆43增幅较大;品种间差异更明显,垦鉴豆43极显著($P < 0.01$)高于垦农4号、垦农21和垦农18。两个时期垦鉴豆43、垦农5号AMF侵染率均较高,垦农18较低。

表1 苗期不同大豆品种与土著根瘤菌、AMF的双共生系统的状况

Table 1 The investigation on dual symbiosis of different soybean varieties with indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia at seedling

生育时期 Growth period	品种 Variety	侵染率 Infection rate/%	孢子数 Spore number per gram dry weight	单株根瘤数 Root nodule number per plant
V2	垦农4号 Kennong 4	19.17 ± 1.67 ab	11.7 ± 1.6 abAB	0.6 ± 0.1 dD
	垦农18 Kennong 18	18.06 ± 2.93 ab	15.4 ± 1.7 aA	1.7 ± 0.3 abBC
	黑农35 Heinong 35	17.78 ± 1.08 b	15.4 ± 1.4 aA	0.5 ± 0.1 dD
	抗线2号 Kangxian 2	18.06 ± 4.28 ab	7.2 ± 1.0 bB	1.4 ± 0.4 bcBCD
	垦农21 Kennong 21	20.83 ± 3.33 ab	11.8 ± 0.7 abAB	2.0 ± 0.7 abAB
	垦农5号 Kennong 5	23.61 ± 3.37 a	8.6 ± 0.7 bAB	0.7 ± 0.3 cdCD
	垦鉴豆43 Kenjiandou 43	22.78 ± 2.22 ab	10.0 ± 1.5 bAB	2.4 ± 0.2 aA
V4	垦农4号 Kennong 4	26.39 ± 4.28 cdeBC	5.8 ± 0.5 bcAB	1.0 ± 0.2 cdCD
	垦农18 Kennong 18	23.89 ± 3.15 eC	7.8 ± 0.3 aA	1.5 ± 0.2 bcABC
	黑农35 Heinong 35	35.56 ± 5.55 abAB	6.9 ± 0.8 abAB	0.3 ± 0.1 e D
	抗线2号 Kangxian 2	33.06 ± 5.55 bcABC	5.2 ± 0.8 cB	2.2 ± 0.5 aA
	垦农21 Kennong 21	25.00 ± 4.64 deBC	7.1 ± 0.9 abAB	0.8 ± 0.4 deCD
	垦农5号 Kennong 5	32.5 ± 3.00 bcdABC	6.9 ± 0.6 abAB	1.1 ± 0.2 cdBCD
	垦鉴豆43 Kenjiandou 43	41.67 ± 2.50 aA	6.3 ± 1.0 bcAB	1.9 ± 0.4 abAB

不同大小写字母分别代表0.01和0.05水平的差异显著性,下同。

Different lowercase and capital letters indicate significant difference by the Duncan's method at 0.05 and 0.01 level, respectively. The same below.

在V2期,垦农18和黑农35根际土壤中AMF孢子数极显著($P < 0.01$)高于抗线2号,显著($P <$

0.05)高于垦农5号和垦鉴豆43;V4期,垦农18极显著($P < 0.01$)高于抗线2号,显著($P < 0.05$)高

于垦农 4 号和垦鉴豆 43, 黑农 35、垦农 21 和垦农 5 号显著 ($P < 0.05$) 高于抗线 2 号。V4 与 V2 期相比, 7 个品种根际土壤中 AMF 孢子数都有所下降, 黑农 35、垦农 4 号、垦农 18 下降幅度较大。

在 V2 期, 垦鉴豆 43 根瘤数最多, 极显著 ($P < 0.01$) 高于除垦农 21 外的其余 5 个品种, 其中垦农 18 和垦农 21 极显著 ($P < 0.01$) 高于黑农 35 和垦农 4 号; V4 与 V2 期比较, 多数品种根瘤数量增加不明显, 抗线 2 号根瘤数量增多, 极显著 ($P < 0.01$) 高于除垦农 18 和垦鉴豆 43 外的其余 4 个品种; 垦农 21 和垦鉴豆 43 下降幅度较大; 垦鉴豆 43 根瘤数在两

个时期均较高, 黑农 35 均较低。

2.2 不同大豆品种的苗期生物量

由表 2 可见, 在 V2 期, 各品种间, 地上、地下生物量无显著差异 ($P < 0.05$)。V4 与 V2 期相比, 无论地上、地下生物量的积累都明显增多, 垦农 21 地上干重积累速度最快, 极显著 ($P < 0.01$) 高于垦鉴豆 43 和黑农 35; 垦农 4 号地下干重积累速度最快, 显著 ($P < 0.05$) 高于除抗线 2 号以外的其余 5 个品种, 极显著 ($P < 0.01$) 高于垦农 5 号和黑农 35。黑农 35 地上、地下干重最低, 说明黑农 35 苗期生长较缓慢。

表 2 不同大豆品种苗期生物量

Table 2 Biomass of different soybean varieties at seedling (g)

品种 Varieties	V2		V4	
	地上干重 Shoot dry weight	地下干重 Root dry weight	地上干重 Shoot dry weight	地下干重 Root dry weight
垦农 4 号 Kennong 4	0.356 ± 0.047 aA	0.112 ± 0.011 aA	2.000 ± 0.365 abcAB	0.697 ± 0.142 aA
垦农 18 Kennong 18	0.355 ± 0.053 aA	0.088 ± 0.018 aA	1.925 ± 0.250 abcAB	0.480 ± 0.052 bcABC
黑农 35 Heinong 35	0.304 ± 0.047 aA	0.079 ± 0.005 aA	1.591 ± 0.158 cB	0.354 ± 0.009 cC
抗线 2 号 Kangxian 2	0.321 ± 0.096 aA	0.091 ± 0.030 aA	2.053 ± 0.101 abAB	0.602 ± 0.090 abAB
垦农 21 Kennong 21	0.324 ± 0.088 aA	0.082 ± 0.018 aA	2.295 ± 0.198 aA	0.474 ± 0.067 bcABC
垦农 5 号 Kennong 5	0.291 ± 0.020 aA	0.082 ± 0.009 aA	1.833 ± 0.226 bcAB	0.441 ± 0.075 bcBC
垦鉴豆 43 Kenjiandou 43	0.311 ± 0.007 aA	0.089 ± 0.010 aA	1.660 ± 0.249 bc B	0.484 ± 0.056 bcABC

3 结论与讨论

本文中 7 个不同类型大豆品种在苗期与土著根瘤菌、AMF 形成双共生体的程度存在较大差异。在 V2 期 7 个供试品种间大豆根系 AMF 侵染率差异普遍不显著 ($P > 0.05$), 根际土壤中 AMF 孢子数和根瘤数差异显著 ($P < 0.05$)。在 V4 期品种间的根系 AMF 侵染率、根际土壤中 AMF 孢子数和根瘤数差异均显著 ($P < 0.05$)。Tajini 等^[18]对 6 个不同基因型菜豆接种球囊霉和根瘤菌的研究结果也表明, 不同基因型菜豆的 AMF 侵染率存在显著差异 ($P < 0.05$)。

AM 与 RNs 形成之间可能存在相互制约的关系。Catford 等^[19]通过对分根系统的一侧施用脂几丁质寡糖, 发现另一侧根的结瘤情况明显减少, 更重要的是 AMF 的侵染率仅为没有施用脂几丁质寡糖对照的 50%, 他认为植物的这种自动调节机制同时控制两个共生系统, 其中的一个系统的自动调节机制影响另一个共生体系。从本文结果可见, 大豆苗期不同品种间这种调节作用的强度是不一致的。垦鉴豆 43 在 V2、V4 期根瘤数量、大豆根段 AMF 侵染率均较高, 说明垦鉴豆 43 与土著根瘤菌、AMF 在

苗期能较好地形成双共生体; 抗线 2 号表现也较好; 而黑农 35 AM 的形成似乎对 RNs 形成有较大的制约作用。V4 与 V2 期相比, 7 个品种根际土壤中 AMF 孢子数都有所下降, AMF 侵染率增加, 其原因可能是随着大豆生长根系分泌物中有关促进孢子萌发和菌丝生长的信号分子增加^[2,16], 并且此时 AMF 产孢力也较低甚至还未开始产孢^[17]。唐明^[16]认为 AMF 的产孢数量主要取决于真菌本身和宿主植物的生物学特性以及土壤类型, 不同宿主植物根系形态结构及根系分泌物的种类、数量和性质都会影响植物根际土壤中的孢子密度。V4 与 V2 期比较, AMF 侵染率增加幅度较大, 根瘤数量增加幅度很小, 其原因之一可能是 AMF 对大豆根系的侵染发生早而对苗期 RNs 形成产生一定制约作用^[19]。但这并不能简单地得出苗期高 AMF 侵染率对 RNs 形成和固氮植物优良性状的发挥是不利的结论, 还需要深入研究。

大豆品种的不同特性对双共生系统也有影响。异黄酮是根瘤形成中大豆根系产生的信号分子, 同时异黄酮对 AM 的形成也有促进作用^[11]。虽然垦农 5 号、垦鉴豆 43 和垦农 21 均为籽粒高异黄酮品

种,但高异黄酮对3个品种的双共生系统的影响却不一致。这可能由于籽粒异黄酮含量高,并不意味着根系分泌物中异黄酮含量也高,Antunes等^[2]研究表明三重共生引起香豆酚减少,大豆中最丰富的异黄酮类—大豆苷元的积累在AMF的存在下减少;另一个可能原因是高异黄酮品种向土壤分泌高含量异黄酮诱导根瘤菌产生过量结瘤因子而制约了RNs和(或)AM的形成^[18]。

生物量的积累通常用于双共生体系发育优异与否的衡量指标之一^[1-3,5,11]。在V2期,各品种间地上、地下生物量无显著差异。在V4期,各品种的地上、地下生物量、根段AMF侵染率和根瘤数存在显著差异,且苗期大豆地上、地下生物量与根段AMF侵染率和根瘤数并不总是呈正相关,AM和RNs形成对地上、地下生物量的响应或影响也不一致,在植株生长过程中AM和RNs的形成可以为大豆提供营养,从而提高大豆生物量,同时大豆生物量提高也会促进AM和RNs的形成,但AM和RNs的形成也可能会消耗大豆营养物质,从而降低大豆生物量,生物量最后结果可能受多因素的影响,不能作为选育双共生系统的唯一早期依据。

参考文献

- [1] Azcón-Aguilar C, Azcón R, Barea J M. Endomycorrhizal fungi and *Rhizobium* as biological fertilizers for *Medicago sativa* in normal cultivation[J]. *Nature*, 1979, 279:325-327.
- [2] Antunes P M, de Varennes A, Rajcan I, et al. Accumulation of specific flavonoids in soybean (*Glycine max* L. Merr.) as a function of the early tripartite symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38: 1234-1242.
- [3] 申鸿, 刘于, 李晓林, 等. 丛枝菌根真菌 (*Glomus caledonium*) 对铜污染土壤生物修复机理初探 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2005, 11(2): 199-204. (Shen H, Liu Y, Li X L, et al. Influence of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus caledonium*) on maize seedlings grown in copper contaminated soil [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2005, 11(2): 199-204.)
- [4] 赵丹丹, 李涛, 赵之伟. 丛枝菌根真菌-豆科植物-根瘤菌共生体系的研究进展 [J]. *生态学杂志*, 2006, 25(3): 327-333. (Zhao D D, Li T, Zhao Z W. Research advances in arbuscular mycorrhizal fungi legumes-rhizobia symbiosis [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2006, 25(3): 327-333.)
- [5] 李淑敏, 李隆, 张福锁. 丛枝菌根真菌和根瘤菌对蚕豆吸收磷和氮的促进作用 [J]. *中国农业大学学报*, 2004, 9(1): 11-15. (Li S M, Li L, Zhang F S. Enhancing phosphorus and nitrogen uptake of faba bean by inoculating arbuscular mycorrhizal fungus and *Rhizobium leguminosarum* [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2004, 9(1): 11-15.)
- [6] Han T X, Tian C F, Wang E T, et al. Associations among rhizobial genomic species, nod genes, and host plants based on the analysis of symbiosis of indigenous rhizobia and wild legumes native to Xinjiang [J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59: 311-323.
- [7] Han T X, Wang E T, Han L L, et al. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with wild legumes native to Xinjiang, China [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2008, 31: 287-301.
- [8] Mosse B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1973, 11: 171-196.
- [9] Galleguillos C, Aguirre C, Barea J M, et al. Growth promoting effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wildtype and its genetically modified derivative) on a non-legume plant species in specific interaction with two arbuscular mycorrhiza fungi [J]. *Plant Science*, 2000, 159: 57-63.
- [10] Shimoda Y, Han L, Yamazaki T, et al. Rhizobial and fungal symbioses show different requirements for calmodulin binding to calcium calmodulin-dependent protein kinase in *Lotus japonicus* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24: 304-321.
- [11] 董昌金, 赵斌. 丛枝菌根真菌与根瘤菌互作及类黄酮对互作效果的影响 [J]. *应用生态学报*, 2004, 15(9): 1585-1588. (Dong C J, Zhao B. Interaction between AM fungi and *Rhizobium* and effects of flavonoids on it [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(9): 1585-1588.)
- [12] van Brussel A A, Tak T, Boot K J, et al. Autoregulation of root nodule formation: signals of both symbiotic partners studied in a split root system of *Vicia sativa* subsp. *nigra* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15: 341-349.
- [13] 陈文新, 汪恩涛. 中国根瘤菌 [M]. 北京: 科学出版社, 2011: 400-402. (Chen W Y, Wang E T. *China rhizobium* [M]. Beijing: Science Press, 2011: 400-402.)
- [14] Daniels B A, Skipper H D. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil [M]. St. Paul: The American Phytopathology Society Press, 1982: 29-35.
- [15] Tisserant B, Gianinazzi S, Gianinazzi-pearson V. Relationships between lateral root order, arbuscular mycorrhiza development, and the physiological state of the symbiotic fungus in *Platanus acerifolia* [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1996, 74: 1947-1955.
- [16] 唐明. 菌根真菌提高植物耐盐性 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 49. (Tang M. Salt tolerance of plant induced by arbuscular mycorrhizal fungi [M]. Beijing: Science Press, 2010: 49.)
- [17] Sun S B, Wang J J, Zhu L L, et al. An active factor from tomato root exudates plays an important role in efficient establishment of mycorrhizal symbiosis [J]. *Plos One*, 2012, 7: 1-7.
- [18] Tajini F, Suriyakup P, Vailhe H, et al. Assess suitability of hydroaerobic culture to establish tripartite symbiosis between different AM fungi species, beans, and rhizobia [J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9: 1-11.
- [19] Catford J G, Staehelin C, Lerat S, et al. Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with nod factors [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54: 1481-1487.