

AM 真菌与根瘤菌接种对菜豆生长的影响

李雅慧¹ 盖京苹² 陈清² 李志芳^{1*}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 设施蔬菜生长发育调控北京市重点实验室, 北京 100193; ² 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193)

摘要: 以泰国无筋地豆为试材, 在温室盆栽的条件下, 分别单接种丛枝菌根真菌 (AM)、单接种根瘤菌 (RH)、双接种丛枝菌根真菌和根瘤菌 (AM+RH), 以不接种为对照 (CK), 研究不同接种方式对菜豆植株生长、结瘤、单株总菜质量、AM 菌根侵染率、植株氮磷含量及吸收量、单株黄叶率等的影响。结果表明: 双接种 AM+RH 能显著促进菜豆植株的生长, 植株总干质量比单接种 AM、单接种 RH 和 CK 分别增加 34.3%、82.3% 和 57.9%; 双接种 AM+RH 可提高菜豆单株总菜质量, 促进菜豆植株对氮、磷元素的吸收, 全株吸磷量比单接 AM、单接 RH 和 CK 分别增加 42.1%、314.8% 和 325.4%, 全株吸氮量比单接种 AM、单接种 RH 和 CK 分别增加 36.8%、45.1% 和 43.4%; AM 真菌与 RH 具有协同促进的作用, 且 AM 真菌能有效提高菜豆的抗性, 减少叶片变黄的比率, 减轻了病害为害程度。

关键词: 丛枝菌根真菌; 根瘤菌; 菜豆; 盆栽; 生长; 氮磷养分吸收

豆科植物与根瘤菌 (RH) 共生固氮, 是自然界最为重要的生物固氮途径之一 (赵丹丹等, 2006)。豆科植物在幼苗期, 土壤中的根瘤菌通过

植株根毛侵入, 形成侵入线, 进到根的皮层, 刺激宿主皮层细胞分裂形成根瘤, 固定空气中的游离氮, 合成含氮化合物, 为豆科植物所利用。丛枝菌根真菌 (AM) 能侵染大多数植物的根系, 并促进植株对磷素的吸收利用, 改善土壤磷营养状况 (佟丽娜等, 2009)。AM 真菌也能明显促进豆科植物白三叶草对磷的吸收, 通过 AM 真菌与根瘤菌的协同作用, 增加白三叶草的结瘤和固氮能力, 从而促进作物的生长发育 (林先贵等, 1993)。近年来, 随着人们对丛枝菌根真菌、根瘤菌和豆科植物三者

李雅慧, 女, 硕士研究生, 专业方向: 蔬菜生态栽培, E-mail: liyahui91@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 李志芳, 女, 副教授, 硕士生导师, 专业方向: 有机农业及土壤肥力, E-mail: zhifangli7@cau.edu.cn

收稿日期: 2014-10-27; 接受日期: 2015-01-12

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目 (2012BAD14B04-2), 北京市果类蔬菜产业创新团队项目, 现代农业产业技术体系北京市叶类蔬菜创新项目 (2069999, blvt-08)

Abstract: Taking non salt and drought tolerant inbred lines of Chinese Cabbage [*Brassica campestris* L. spp. *pekinensis* (Lour) Olsson] SY-14-06 as material, extracted total RNA from root, and reverse transcribed cDNA. According to *SRK2F* gene sequence of *Brassica rapa*, primers were designed and 1 044 bp open reading frame (ORF) was cloned. The *SRK2F* protein contained 347 aminoacids, with a prediction molecular weight of 39.3 kD and PI of 4.88. We construct the procaryotic expressive plasmids pEASY-E1-SRK2F using pEASY-E1 vector. After transformation to *Transetta* (DE3), the expression of recombinant proteins were detected with SDS-PAGE. The structural analysis of *SRK2F* though Smart-embl showed that it contained silk threonine structural domain, which was located at the position of 4-260 aminoacid residues. The ClustalX2 comparison indicated that the *SRK2F* had close genetic relationship with *Arabidopsis thaliana*. Finally, purified this protein by affinity chromatography medium, which was known as Nickel ion metal affinity chromatography medium. Thus, gained the purified fusion protein.

Key words: Chinese cabbage; *SRK2F*; Sequence analysis; Protein expression and purification

之间的作用关系认识更加明确,对这方面的研究也越来越重视,并期望在更多作物上发挥作用。本文以泰国无筋地豆为材料,研究接种丛枝菌根真菌和根瘤菌对盆栽菜豆生长及氮、磷元素吸收等的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菜豆 (*Phaseolus vulgaris* Linn.) 品种为泰国无筋地豆,购自四川鑫源种业有限公司;供试丛枝菌根真菌 (*Rhizophagus*) 为根内球囊菌 (*Glomus intraradices*, GI),由中国农业大学资源与环境学院提供;供试根瘤菌由中国农业大学生命科学学院根瘤菌资源库提供,编号为 CCBAU15710;供试土壤取自中国农业大学上庄试验站 0~20 cm 表层土,理化性质为:全氮含量 $0.57 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效磷 $6.17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效钾 $57.19 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,pH 值 8.35,有机质 $12.37 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.2 试验方法

试验于 2014 年 6 月 20 日至 8 月 4 日在中国农业大学资源与环境学院连栋玻璃温室内进行。

采用盆栽形式,将供试土壤混匀自然风干后过 2 mm 筛,经中国农业科学院原子能所伽马射线灭菌后分装到套有 12 号自封袋的花盆中,每盆 2 kg。菜豆种子播前进行灭菌处理,先用无菌水清洗 2 次,之后用 95% 酒精温和清洗 1 min,再用无菌水清洗 4 次,然后用 10% 次氯酸钠溶液处理 5 min,最后用无菌水清洗 5 次。6 月 20 日播种,每盆播 3 粒种子,待子叶完全展开时定苗,每盆 1 株。

试验设 3 个处理:双接种丛枝菌根真菌和根瘤菌 (AM+RH)、单接种丛枝菌根真菌 (AM)、单接种根瘤菌 (RH),以不接种为对照 (CK),每个处理 4 株,4 次重复。处理后置于 $1.75 \text{ m} \times 2.5 \text{ m}$ 的苗床上,随机排列。

接种 AM 真菌的处理:培养土装盆时在基质的 2/3 处平铺 100 g 菌剂 (孢子含量 $20 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$)。接种 RH 的处理:首先将根瘤菌在 YMA 液体培养基上振荡过夜,培养至 $\text{OD}_{600} > 0.6$ 时, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心浓缩并用无菌水重悬,根瘤菌浓度为 $1 \times 10^8 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$;在播种的同时每穴加 1 mL 根瘤菌菌液,即每盆 3 mL 菌液。

菜豆生长期称重浇水,保证土壤持水量为

最大持水量的 70%。菜豆生长后期感染了菜豆叶斑病,叶片染病变黄,及时进行了采收,生育期 45 d。

1.3 项目测定

在菜豆生长到 43 d 时,统计黄叶率,即黄叶数占植株总叶数的比率 (黄叶的标准为叶片全黄,部分干枯或全部干枯,易脱落);菜豆生长到 45 d 时,对整株菜豆进行采收,分别测定单株总鲜质量、单株总干质量、地下部根瘤数和根瘤直径、菌根侵染率、植株干质量及植株氮、磷含量。

地下部根瘤直径的测定:每株用游标卡尺随机测定 30 个根瘤的直径,取平均值;菌根侵染率的测定:选取收获后的接种 AM 真菌的植株,取其幼嫩根,剪成 1 cm 根段,用台盼蓝法染色,每株取 30 条根段制片镜检,参照 Rabie (1998) 的方法统计菌根侵染率,测定指标为侵染频率 (含有真菌结构的根系占整个根系的比例)、侵染强度 (整个根系中 AM 真菌形成的强度)、泡囊丰度 (菌根化了的根系中泡囊结构形成的丰富程度)、菌丝丰度 (菌根化了的根系中菌丝结构形成的丰富程度)。植株氮、磷含量及吸收量的测定:将采收后的菜豆植株烘干,植株地上部、地下部分开研磨粉碎,分别称取 0.3 g,利用 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 法消煮,钒钼黄吸光度法测定植物地上部、地下部含磷量;利用凯氏定氮法测定植物地上部、地下部含氮量,并计算植株氮、磷吸收量。

$$\text{植株吸磷量} = \text{植株含磷量} \times \text{植株干质量}$$

$$\text{植株吸氮量} = \text{植株含氮量} \times \text{植株干质量}$$

1.4 数据分析

采用 SAS 软件单因素完全随机法进行数据统计分析,采用 Microsoft Excel 2010 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同接种方式对盆栽菜豆植株生长及结瘤的影响

由表 1 可知,双接种 AM+RH 处理的菜豆植株地上部干质量、地下部干质量及总干质量均显著高于其他处理,地上部干质量比单接种 AM、单接种 RH 和 CK 分别增加了 29.2%、86.6% 和 61.3%;地下部干质量比单接种 AM、单接种 RH 和 CK 分别增加了 58.0%、69.5% 和 47.9%;植株总干质量比单接种 AM、单接种 RH 和 CK 分别增加了 34.3%、

82.3% 和 57.9%。说明双接种比单接种更能促进菜豆植株的生长。

双接种 AM+RH 与单接种 RH 相比,能显著促进菜豆结瘤,无论是结瘤数还是根瘤直径,都有了显著提高。说明接种 AM 真菌能协助根瘤菌侵染菜豆且促进了根瘤的生长(表 1)。

表 1 不同接种方式对盆栽菜豆植株生长及结瘤的影响

接种方式	地上部干质量/g	地下部干质量/g	植株总干质量/g	单株根瘤数/个	根瘤直径/mm
双接种 AM+RH	5.00 a	1.39 a	6.38 a	623 a	1.68 a
单接种 AM	3.87 b	0.88 b	4.75 b	0 c	0 c
单接种 RH	2.68 c	0.82 b	3.50 bc	120 b	0.84 b
不接种 (CK)	3.10 bc	0.94 b	4.04 bc	0 c	0 c

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著($\alpha=0.05$),下表同。

2.2 不同接种方式对盆栽菜豆单株总荚质量的影响

菜豆生长 45 d 时测定单株总荚鲜质量,在相同生育期下,双接种 AM+RH 处理的菜豆单株总荚质量高于单接种 AM、单接种 RH 和 CK,且与 CK 相比差异显著;单株总荚干质量也表现出相似的结果(表 2)。说明双接种 AM+RH 有助于增加菜豆早期豆荚质量。

表 2 不同接种方式对盆栽菜豆单株总荚质量的影响

接种方式	单株总荚鲜质量/g	单株总荚干质量/g
双接种 AM+RH	4.508 a	0.535 a
单接种 AM	2.985 ab	0.315 ab
单接种 RH	1.325 ab	0.141 ab
不接种 (CK)	0.055 b	0.010 b

2.3 接种根瘤菌对盆栽菜豆 AM 真菌侵染率的影响

双接种 AM+RH 处理的盆栽菜豆菌根侵染率比单接种 AM 高,无论是侵染频率还是侵染强度,均高于单接种 AM;且双接种 AM+RH 后,根系形成了更多的泡囊和菌丝,其中泡囊丰度与单接种 AM 处理差异显著(表 3)。丰富的泡囊有利于菌根的

繁殖和再侵染,菌丝的增多有助于植物吸收营养元素。该试验结果说明根瘤菌对菌根真菌侵染菜豆有一定的促进作用。

表 3 接种根瘤菌对盆栽菜豆 AM 真菌侵染率的影响

接种方式	侵染频率/%	侵染强度/%	泡囊丰度/%	菌丝丰度/%
双接种 AM+RH	100.0 a	53.9 a	23.5 a	36.2 a
单接种 AM	90.8 a	26.3 a	5.3 b	19.3 a

2.4 不同接种方式对盆栽菜豆植株磷素含量及吸收的影响

菜豆植株地上部、地下部的含磷量及吸磷量均表现为双接种 AM+RH > 单接种 AM > 单接种 RH > CK,双接种 AM+RH 处理植株地上部含磷量比单接种 AM、单接种 RH 和 CK 分别增加了 6.0%、134.1% 和 187.8%,地下部含磷量分别增加了 19.0%、115.9% 和 148.4%,全株吸磷量分别增加了 42.1%、314.8% 和 325.4%。

接种 AM 真菌后菜豆植株的磷含量及吸磷量与不接种对照相比,差异显著;而单接种 RH 与不接种对照相比,菜豆植株的磷含量及吸磷量几乎没有差异;双接种 AM+RH 处理的菜豆植株全株吸磷量高于单接种 AM 处理,且差异显著(表 4)。综上所述,接种丛枝菌根真菌促进了菜豆植株对磷的吸收,在本试验条件下虽然根瘤菌对促进菜豆植物磷的吸收影响不明显,但根瘤菌能促进 AM 真菌更好地发挥作用,双接种更有利于菜豆对磷的吸收。

2.5 不同接种方式对盆栽菜豆植株氮素含量及吸收的影响

如表 5 所示,单接种 RH 处理的菜豆植株地上部含氮量最高,且与其他处理差异显著。而双接种 AM+RH 处理的菜豆植株地下部氮含量最高,比单接种 AM、单接种 RH 和 CK 分别增加了 4.2%、16.4% 和 14.6%,双接种促进了地下部植株对氮素的吸收。双接种 AM+RH 处理的菜豆植株地上部吸

表 4 不同接种方式对盆栽菜豆植株磷含量及吸磷量的影响

接种方式	地上部含磷量/ $g \cdot kg^{-1}$	地下部含磷量/ $g \cdot kg^{-1}$	地上部吸磷量/ $mg \cdot 株^{-1}$	地下部吸磷量/ $mg \cdot 株^{-1}$	全株吸磷量/ $mg \cdot 株^{-1}$
双接种 AM+RH	2.13 a	3.13 a	10.56 a	4.33 a	14.89 a
单接种 AM	2.01 a	2.63 a	8.08 a	2.41 b	10.48 b
单接种 RH	0.91 bc	1.45 b	2.40 b	1.19 c	3.59 c
不接种 (CK)	0.74 c	1.26 b	2.30 b	1.21 c	3.50 c

表 5 不同接种方式对盆栽菜豆植株氮含量及吸氮量的影响

接种方式	地上部含氮量/g·kg ⁻¹	地下部含氮量/g·kg ⁻¹	地上部吸氮量/g·株 ⁻¹	地下部吸氮量/g·株 ⁻¹	全株吸氮量/g·株 ⁻¹
双接种 AM+RH	181.7 c	199.1 a	0.91 a	0.28 a	1.19 a
单接种 AM	186.1 c	191.1 a	0.71 a	0.16 b	0.87 b
单接种 RH	253.7 a	171.0 a	0.68 a	0.14 b	0.82 b
不接种 (CK)	216.2 b	173.7 a	0.67 a	0.16 b	0.83 b

氮量、地下部吸氮量和全株吸氮量均最高，全株吸氮量比单接种 AM、单接种 RH 和 CK 分别增加了 36.8%、45.1% 和 43.4%，且差异显著。说明双接种促进了菜豆植株的生长，提高了植株对氮素的吸收。单接种 RH 均低于单接种 AM 的地下部含氮量、地上部含氮量、地上部吸氮量、地下部吸氮量及全株吸氮量，出现这种现象，可能因为菜豆感染了叶斑病，接种菌根后菜豆抗病能力提升，植株生长及吸收氮素的能力强于感病下接种根瘤菌的菜豆。

2.6 接种 AM 真菌对盆栽菜豆单株黄叶率的影响

双接种 AM+RH 和单接种 AM 处理的菜豆黄叶率分别为 1.08% 和 0，显著低于单接种 RH (36.78%) 和 CK (36.65%)，说明 AM 真菌在促进菜豆健壮生长的同时能有效提高菜豆的抗性，减少叶片变黄的比率，减轻了病害为害程度。

3 结论与讨论

豆科植物根际微生态系统中同时繁衍着大量的 AM 真菌和根瘤菌，它们在长期进化过程中与豆科植物形成了 AM 真菌—豆科植物—根瘤菌三重共生的关系 (赵丹丹等, 2006)。三者之间的相互作用对植物生长、改善土壤环境等方面有诸多的益处，因此引起了人们的广泛关注。目前在蚕豆 (李淑敏等, 2004)、大豆 (董昌金, 2004; 佟丽娜等, 2009; 丁效东等, 2012)、白三叶草 (林先贵等, 1993; 章淑群等, 2012) 等豆科植物中进行许多相关研究，结果表明 AM 真菌和根瘤菌可促进植株生长，改善氮磷营养。

本试验以盆栽菜豆为材料，研究双接种 AM 真菌和根瘤菌对菜豆生长的影响。结果表明 AM 真菌促进了根瘤菌对菜豆的侵染，增加了单株根瘤数且提高了每个根瘤的固氮能力。同时根瘤菌也促进了 AM 真菌的侵染，提高了菌根侵染率。说明根瘤菌和 AM 真菌在侵染菜豆过程中是相互促进的，

且 AM 真菌对根瘤菌侵染菜豆的促进作用更大。双接种对菜豆的生长有明显的促进作用，显著提高了植株地上部和地下部生物量，并明显促进了植株对氮、磷元素的吸收。

无论是露地栽培还是保护地栽培，菜豆均易发生病害，病害种类多且发生普遍 (赵建方等, 2003; 张西银等, 2009)，本试验在温室中进行，环境开放，未做隔离防护处理，感染了菜豆叶斑病，虽然这是本试验的不足之处，有待改进，但也因此更接近于实际生产，有一定的实际应用价值。本试验结果表明，接种 AM 真菌能明显降低植株黄叶率，这可能是由于接种 AM 真菌后促进了植物对氮、磷元素的吸收，改善了植株的营养状况，使植株生长更加健壮，提高了对病害的抵抗能力，从而减少了植株黄叶率。前人的研究也证实了这一点 (慕康国等, 2000; 郭衍银等, 2003)。

根瘤菌能够与豆科植物建立共生关系，通过固氮酶的作用将空气中的 N₂ 还原为可被作物吸收利用的 NH₃，对作物产生增产效果 (董昌金, 2004)。但根瘤菌的固氮效率受根瘤菌基因组、宿主基因组和土壤环境因子等多方面因素的影响 (马霞等, 2013)。在本试验中，单接种根瘤菌处理能够显著提高植株地上部的含氮量，说明根瘤菌对植物氮素吸收起到了促进作用；但接种根瘤菌后对植株的干质量没有明显的促进作用，其中一个重要原因可能是试验期间菜豆感染了病害，从而间接影响了接种根瘤菌的效果。

本试验中，两种单接种方式对植株生长和结荚的作用与不接种处理相比均无显著效果，但是双接种处理在染病情况下发挥了根瘤菌和 AM 真菌二者的优势，明显促进了植株的生长、结荚，并降低了黄叶率；单接种根瘤菌对菜豆的抗病性无增强作用，而接种 AM 真菌能够提高植株的抗病性，二者共用能在菜豆生长及抗病中综合发挥更好的效果，AM 真菌和根瘤菌双接种的方式对探索减少农药化

肥的使用方面有重要的意义。

综上所述, AM 真菌及根瘤菌在侵染菜豆的过程中, 能够相互促进彼此对菜豆的侵染。AM 真菌侵染率的提高增加了菜豆对土壤中磷元素的吸收, 而根瘤菌的侵染能力增强, 也加大了其对菜豆氮营养的供应能力。氮、磷营养供应充足, 使得菜豆植株生长发育得更好, 最终使得产量得到提升。因此, AM 真菌与根瘤菌双接种在菜豆的生产实际中有非常好的应用前景。

参考文献

- 丁效东, 张林, 李淑仪, 冯固. 2012. 丛枝菌根真菌与根瘤菌接种对大豆根瘤分布及磷素吸收的影响. 植物营养与肥料学报, 18 (3): 662-669.
- 董昌金. 2004. 根瘤菌与 AM 真菌双接种对大豆植株生长的影响. 湖北农业科学, (5): 41-44.
- 郭衍银, 徐坤, 王秀峰, 朱艳红. 2003. 矿质营养与植物病害机理研究进展. 甘肃农业大学学报, 12 (4): 385-393.
- 李淑敏, 李隆, 张福锁. 2004. 丛枝菌根真菌和根瘤菌对蚕豆吸收磷和氮的促进作用. 中国农业大学学报, 9 (1): 11-15.

- 林先贵, 郝文英, 施亚琴, 吴铁航. 1993. VA 菌根和根瘤菌双接种对白三叶草生长的影响. 中国草地, (3): 20-25.
- 马霞, 王丽丽, 李卫军, 宋江平, 何媛, 罗明. 2013. 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. 草业学报, 22 (1): 95-102.
- 慕康国, 赵秀琴, 李健强, 刘西莉. 2000. 矿质营养与植物病害关系研究进展. 中国农业大学学报, 5 (1): 84-90.
- 佟丽娜, 李淑敏, 孟令波. 2009. 双接种对大豆利用不同有机磷源的影响. 东北农业大学学报, 40 (10): 37-42.
- 章淑群, 罗科, 刁明昆, 陈强, 刘子芳. 2012. 接种根瘤菌和菌根真菌对三叶草生长及对土壤 Pb^{2+} 吸收的影响. 四川环境, 31 (4): 34-38.
- 张西银, 刘发明, 董勤成. 2009. 保护地菜豆主要病害发生特点及综合防治技术. 安徽农学通报, 15 (15): 108-109.
- 赵丹丹, 李涛, 赵之伟. 2006. 丛枝菌根真菌—豆科植物—根瘤菌共生体系的研究进展. 生态学杂志, 25 (3): 327-333.
- 赵建方, 陈洪美, 申锋, 李士平, 范广华, 刘俊展. 2003. 鲁北地区菜豆病害种类、发生频率及绿色控制措施. 植保技术与推广, 23 (5): 19-22.
- Rabie G H. 1998. Induction of fungal disease resistance in *Vicia faba* by dual inoculation with *Rhizobium leguminosarum* and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycopathologia, 141: 159-166.

Effects of Inoculations of *Glomus mosseae* and/or *Rhizobium* on Potted Bean Growth

LI Ya-hui¹, GAI Jing-ping², CHEN Qing², LI Zhi-fang^{1*}

(¹College of Agronomy & Biotechnology, China Agricultural University, Beijing City Key Laboratory of Growth and Development Regulation for Protected Vegetable Crops, Beijing 100193, China; ²College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Under greenhouse condition, common bean (*Phaseolus vulgaris* Linn.) ‘Taiguowujindidou’ was sowed in pots to estimate the effects of different inoculation ways on bean’s plant growth, nodulation, total pod weight of single plant, AM colonization rate, nitrogen and phosphorus contents and absorption of bean plant. When seeding, the beans were inoculated with *Glomus mosseae* (AM), rhizobia (RH), *Glomus mosseae* and rhizobia (AM+RH), and the beans without inoculation were taken as the control (CK). The results indicated that dual inoculation (AM+RH) could obviously promote the plant growth of beans. Compared with inoculation with *Glomus mosseae* (AM), rhizobia (RH) and none (CK), the plant total dry weight of the beans inoculated with AM+RH increased 34.3%, 82.3% and 57.9%, respectively. Besides, the dual inoculation could increase the total pod weight of single plant and promote bean’s absorption of nitrogen and phosphorus. The phosphorus absorption of total plant was increased by 42.1%, 314.8% and 325.4%, respectively than that by AM, RH and CK. While, the nitrogen absorption of total plant was increased by 36.8%, 45.1% and 43.4%, respectively than that by AM, RH and CK. The *Glomus mosseae* and rhizobia had synergistic effect on common bean, and the *Glomus mosseae* could effectively improve bean’s resistance, reduce the yellow leaf ratio, and thus decrease the occurrence of diseases.

Keywords: *Glomus mosseae*; Rhizobia; Beans; Pot; Growth; Nitrogen and phosphorus nutrient absorption