科学通报 2008 年 第 53 卷 第 23 期: 2903 ~ 2910
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

华南酸性低磷土壤中大豆根瘤菌高效株系的发现及应用

程凤娴*, 曹桂芹*, 王秀荣, 赵静, 严小龙, 廖红†

华南农业大学根系生物学研究中心, 广州 510642
* 同等贡献
† 联系人, E-mail: hliao@scau.edu.cn

2008-06-23 收稿, 2008-10-05 接受
国家重点基础研究发展计划(批准号: 2005CB120902)、美国麦氏(McKnight)基金会作物合作研究项目(批准号: 05-780)和国家自然科学基金(批准号: 30571111)资助项目

摘要 在大豆栽培历史不同的酸性缺磷土壤上, 从磷效率不同的两个大豆品系的根瘤中分离纯化出 12 株根瘤菌菌株. 16S rDNA 测序分析结果表明, 分离纯化出的 12 株根瘤菌菌株为慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)属的慢生根瘤菌菌株, 与对照大豆慢生型根瘤菌(*Bradyrhizboium japonicum*) USDA110 菌株相比, 具有较高的固氮酶活性. 选取其中固氮酶活性最高的 3 株根瘤菌株系混合制成的根瘤菌菌剂, 在华南地区典型的酸性缺磷土壤上进行田间实验, 结果表明, 不接种根瘤菌, 3 个供试大豆品系完全不能结瘤; 接种根瘤菌后, 供试大豆品系的结瘤率为 100%, 不仅能形成较多根瘤, 而且能显著提高大豆地上部生物量和产量, 改善植株氮、磷营养状况. 其中, 大豆品种华春 3 号的地上部干重、氮和磷含量分别比不接种提高了 154.3%, 152.4%和 163.2%. 研究结果表明, 本研究在华南酸性缺磷土壤中发现了土著的高效根瘤菌株系, 这些株系具有宿主范围广、高效结瘤、固氮效率高和耐酸、耐低磷的特点, 对华南地区酸性缺磷土壤具有较好的适应性; 土壤环境、宿主类型是筛选高效根瘤菌株系需考虑的关键因素, 综合选择不同酸度范围土壤、不同磷效率大豆品种可提高获得高效根瘤菌株系的几率; 增加氮营养、促进根系生长是酸性缺磷土壤上接种高效根瘤菌增加大豆磷吸收的可能机理; 在酸性缺磷土壤上接种高效根瘤菌, 能显著促进大豆生长、改善大豆氮、磷营养状况, 是提高该地区大豆种植水平、发展大豆生产的有效途径. 因此, 在实际生产中大力推广豆科作物接种高效根瘤菌技术具有重要的经济、环境和生态效益.

关键词
酸性土壤
低磷
大豆
根瘤菌

大豆是重要的粮食、油料、饲料和能源兼用作物, 富含蛋白质、脂肪、碳水化合物和各种维生素, 在人们生活中占有重要地位[1]. 在农业生产方面, 作为能进行生物固氮的豆科植物, 大豆是一种优良的轮作换茬和间套种作物, 具有培肥土壤、改良土壤结构、肥地养地等作用, 以及减少水土流失、增加土壤复种指数等显著的生态效应. 然而, 近年来我国大豆生产和需求间的矛盾日益突出. 随着大豆消费的增长以及养殖业的飞速发展, 国内大豆供求出现严重失衡. 从 2000 年起, 我国就已从传统的大豆出口国变成现今世界上最大的进口国[2]. 因此, 发展大豆生产不仅关系到国计民生和粮食安全问题, 而且还关系到我国社会经济建设和农业的持续发展.

作为大豆主要消耗地区的华南各省区, 大豆生产水平一直较低. 究其原因, 主要是由于该地区土壤不仅 pH 较低, 而且氮、磷等养分的有效含量都特别低, 不适宜大豆生长[3]. 豆科植物虽然具有生物固氮的能力, 但这种能力必须通过与根瘤菌共生形成根瘤才能实现. 接种根瘤菌, 在美国、巴西等大豆主产国作为大豆增产的主要措施, 已得到了大面积的推广应用[4]. 在我国北方, 大豆根瘤菌的使用也有报道[5]. 实践表明, 接种根瘤菌可增加根瘤菌的数量、提高根瘤菌和土壤微生物的活性、增强豆科作物的固氮能力、促进根系生长, 从而提高豆科作物的产量[6]. 但

接种的增产效果主要取决于根瘤菌的竞争结瘤能力和结瘤的固氮效率. 因此, 要想提高根瘤菌的应用效果, 关键是筛选到适应当地土壤环境, 具有较强竞争结瘤能力和高效固氮能力的根瘤菌株系[7]. 由于我国华南地区大豆种植不普遍, 大部分土壤土著根瘤菌丰度较低[8]; 而且土壤pH较低且严重缺磷, 北方常用的根瘤菌菌剂在南方地区适应性较差. 因此, 筛选适应酸性缺磷土壤的高效根瘤菌株系对发展华南广大地区大豆生产, 提高现有品种的产量, 从而为解决我国大豆供需危机具有深远意义.

本研究首先从不同酸度范围土壤、不同磷效率大豆品种中分离纯化出一系列根瘤菌株系, 然后分别在特殊设计的大试管纸培系统和酸性缺磷土壤上进行了接种验证, 以此为酸性缺磷土壤筛选和配制适应性较强的高效根瘤菌菌剂提供理论依据和应用材料.

1 材料与方法

(ⅰ) 根瘤菌的分离、纯化、测序及回接验证. 用于分离、纯化的根瘤分别采自广东省博罗县(东经 114.28°, 北纬 23.18°)和英德市实验田(东经 113.38°, 北纬 24.17°)磷效率不同的两个大豆品系 HN89 (磷高效)和HN113 (磷低效)[9]. 两实验点土壤基本理化性状见表 1. 其中博罗实验点具有 6 年大豆栽培历史, 土著根瘤菌丰度较高, 土壤微酸性, 有效磷含量相对较高; 英德实验点的土壤酸性较强、有效磷含量较低且从未种过大豆, 土著根瘤菌丰度较低[8]. 根瘤菌的分离纯化步骤参照文献[10], 具体如下: 取新鲜根瘤, 先放入 95%的乙醇中处理 3 min, 再放入 0.2% $HgCl_2$ 灭菌 5 min, 取出用无菌水冲洗 5~6 次. 然后在用火焰灭过菌的载玻片上切成两半, 用无菌镊子夹住半个瘤, 切口面向酸性 YMA 培养基表面划线, 倒置后在 28℃下培养. 待培养 6~7 d 后, 挑取菌落形态像根瘤菌的进行纯化, 得到纯的单菌落. 然后进行革兰氏染色, 在显微镜下从菌体形态上对分离菌株进行鉴定.

参照Yang等人[12]方法提取根瘤菌总DNA. 扩增反应体系(20 μL): 10×缓冲液 2 μL, dNTP (2 mol/L) 2 μL, 引物P1/P6(各 50 μmol/L) 0.5 μL, 模板DNA 50 ng, *Taq* 酶 2 U, 加超纯水补足. PCR反应条件: 94℃, 4 min; 94℃, 1 min, 56℃, 1 min, 72℃, 1 min, 35 个循环; 72℃, 5 min.

16S rDNA扩增引物选用*E. coli* 16S rRNA基因系列保守区域的两段引物P1 和P6[13,14], 正向引物P1 为 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT- 3′; 反向引物 P6: 5′-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-CACCCC-3′. PCR扩增产物在 1.0%的琼脂糖凝胶电泳用于序列测定. 测序引物为 342fc (5′-CTCCTACG-GGAGGCAG-3′). 测序反应在DNA序列分析仪中自动进行. 利用BioEdit软件对供试菌株和参比菌株先进行 16S rRNA基因序列的多序列比对, 再利用Mega4.0 软件, 采用Kimura-2 参数, 进行邻接法(Neighbor-Joining)分析, 1000 次重复, 生成系统发育树. 序列相似性所用参比菌株及其 16S rRNA基因部分序列在NCBI基因库(NCBI GenBank)中索取.

回接验证采用特殊设计的大试管纸培装置, 首先在试管中放入滤纸, 滤纸的长度达到试管长度的 2/3, 每一试管加入 90 mL低氮营养液, 管口用封皮膜封好, 在 121℃下灭菌 30 min. 营养液配方参照陈丹明等人[15]的方法, 具体为(g/L): $Ca(NO_3)_2\cdot 4H_2O$, 0.03, $MgSO_4\cdot 7H_2O$, 0.12, $CaCl_2\cdot 2H_2O$, 0.10, KH_2PO_4, 0.10, $Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$, 0.15, $C_6H_5O_7Fe\cdot 5H_2O$, 0.05, 微量元素 1 mL. 微量元素配方(g/L): H_2MoO_4, 0.02; $MnSO_4$, 1.81; H_3BO_3, 2.86; $CuSO_4\cdot 5H_2O$, 0.8; $ZnSO_4\cdot 7H_2O$, 0.22. 通过气相色谱(岛津气相色谱仪GC-14C, 岛津香港有限公司)用乙炔还原法对回接的大豆根瘤样品进行固氮酶活性的测定[16].

(ⅱ) 田间验证实验. 在广东省湛江市遂溪县

表 1 3 个不同实验点土壤基本化学性质 a)

实验点	pH	有机质(%)	全氮/g·kg^{-1}	全磷/g·kg^{-1}	全钾/g·kg^{-1}	碱解氮/mg·kg^{-1}	速效磷/mg·kg^{-1}	速效钾/mg·kg^{-1}
英德	4.30	1.19	0.81	0.42	4.62	66.40	4.11	97.80
博罗	5.34	1.64	1.14	0.54	6.54	98.56	15.39	98.87
遂溪	5.02	1.07	0.63	0.42	1.07	73.50	0.94	93.60

a) pH 用 2.5∶1 的水土比测定; 有机质用 $K_2Cr_2O_7$-H_2SO_4 法测定; 全氮用凯氏法测定; 全磷用 H_2SO_4-$HClO_4$ 法消煮、钼锑抗比色法测定; 全钾用 NaOH 熔融、火焰光度计测定; 碱解氮用扩散法测定; 速效磷用 0.03 mol/L NH_4F-0.025mol/L HCl 浸提、钼锑抗比色法测定; 有效钾用 1 mol/L NH_4OAc 浸提, 火焰光度计测定. 具体测定方法参考文献[11]

大华糖业有限公司实验示范区(东经 110.24°, 北纬 21.39°)进行. 供试土壤为典型的酸性缺磷土壤(理化性状见表 1), 没有大豆种植历史. 实验为双因素随机区组设计, 包括根瘤菌和大豆品系两个影响因子. 根瘤菌包括接种与不接种 2 个水平, 供试大豆品系有 3 个, 共 6 个处理. 重复 3 次, 共 18 个小区, 每个小区面积为 10 m^2. 本实验采用我们分离出来的, 回接根瘤固氮酶活性最高的 3 株根瘤菌株系, BDYD1, BXBL9 和BXYD3 混合制成的根瘤菌菌剂进行接种处理. 根瘤菌菌剂的制备参照王继华等人[17]的方法, 以草炭和草木灰混合物(1∶1, 质量比)为载体.

供试材料选用华春 2 号、华春 3 号和华春 4 号 3 个大豆品种(系). 其中, 华春 2 号和华春 3 号分别是 2006 年和 2007 年华南农业大学育成的国审品种; 华春 4 号为新育品系, 目前正在参加国家大豆新品种区域实验. 起垄栽培, 播种密度为 40 cm×10 cm (行距×株距). 播种、灌溉、杂草及病虫害按大豆常规管理执行. 实验分两次采样. 第一次取样时间是在开花结荚期, 每个小区取代表性植株 1 株, 测定其地上部生物量及氮、磷含量, 株高、结荚数、根瘤个数和根瘤干重等指标. 第二次取样在成熟期, 根据不同材料的成熟时间分批采样, 然后根据小区进行产量估测.

(ⅲ) 数据处理. 实验中所有的数据均用 Microsoft Excel 2003 (Microsoft Company, 美国)和 SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, 美国)等统计软件进行双因素方差分析和多重比较分析.

2 结果与分析

2.1 根瘤菌的分离、纯化及鉴定

从生长在广东博罗、英德两个实验点的 2 个大豆品系根瘤中一共获得了 45 个分离物样品. 经纯化、镜检和结瘤实验筛选出了 12 株待测菌株, 编号为: BXBL2, BXBL4, BXBL9, BDBL4, BDBL5, BXYD1, BXYD3, BXYD5, BXYD9, BDYD1, BDYD2 及 BDYD4. 其中, BX 和 BD 代表分别从大豆品系 HN89 和 HN113, BL 及 YD 代表分别从博罗和英德实验点分离纯化出来的根瘤菌株系. 结果表明, 有 7 个根瘤菌株系来自高磷效大豆品系 HN89, 其中又有 4 个来自土壤酸性极强, 有效磷含量极低, 土著根瘤菌丰度较低的英德实验点. 说明高磷效大豆品系与根瘤菌的亲和能力较强, 特别是在酸性、缺磷土壤上与根瘤菌的亲和能力远高于磷低效的大豆品系.

从 GenBank 数据库中获取了 11 个参比菌株的序列. 利用 BioEdit 软件对供试菌株和参比菌株先进行 16S rRNA 基因序列的多序列比对, 再利用 Mega 4.0 软件, 采用 Kimura-2 参数, 进行邻接法(Neighbor-Joining)分析, 1000 次重复, 得到反映待测大豆根瘤菌菌株与参比菌株之间进化与发育关系的系统发育树(图 1). 结果表明所分离纯化的根瘤菌菌株与埃氏慢生根瘤菌(*Bradyrhizboium elkanii*, *B. elkanii*)的代表性菌株聚为一类, 属于慢生型根瘤菌, 序列之间的差异均小于 1%. 所分离的菌株可进而分为群Ⅰ和群Ⅱ两个亚群,主要以根瘤菌地区来源不同聚为不同的群, 群Ⅰ主要是从英德地区分离的根瘤菌; 群Ⅱ主要是从博罗地区分离的根瘤菌.

回接实验证明, 12 个根瘤菌株系中, 只有 9 个株系能回接形成根瘤. 用乙炔还原法对回接的大豆根瘤样品进行了固氮酶活性测定. 结果表明, 所分离菌株的固氮酶活性大多在 6~15 $\mu molC_2H_4 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ 之间(图 2). 据报道, 华南地区大豆根瘤固氮酶活性在 0.784~14.259 $\mu molC_2H_4 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ 之间[18]. 可见, 我们所分离的根瘤菌菌株的固氮酶活性相对较高, 具有较高的固氮效率.

由图 2 结果可知, 从不同地区分离的根瘤菌固氮酶活性存在显著差异. 从英德地区分离的菌株固氮酶活性较高, 如菌株BDYD1, BXYD3 的固氮酶活性显著高于对照菌株大豆慢生根瘤菌(*B. japonicum*) USDA110. 从博罗地区分离的根瘤菌固氮酶活性相对较低, 可能是由于博罗地区土壤经过了多年的人工栽培种植, 土壤中溶解氧和无机氮达到一定浓度时, 不仅抑制新酶的合成, 而且降低已存在酶的活性, 最终导致根瘤菌的固氮酶活性降低[19]. 但从博罗地区分离的根瘤菌株系中也有固氮酶较高的, 如 BXBL9 的固氮酶活性就显著高于对照菌株大豆慢生根瘤菌(*B. japonicum*) USDA110.

2.2 田间验证结果.

如图 3 所示, 接种混合菌株配制的根瘤菌菌剂不仅增加了植株的根瘤数, 而且还显著促进了大豆地上部和根部的生长.

(ⅰ) 接种根瘤菌对不同大豆品系生长的影响. 生物量在大田调查中被广泛用作表示固氮能力高低的指标. 接种根瘤菌显著促进了大豆地上部和根部的生长(地上部干重: $F_I = 23.81^{***}$, 根干重: $F_I = 29.94^{***}$), 使 3 个供试大豆品系的地上部和根部生物

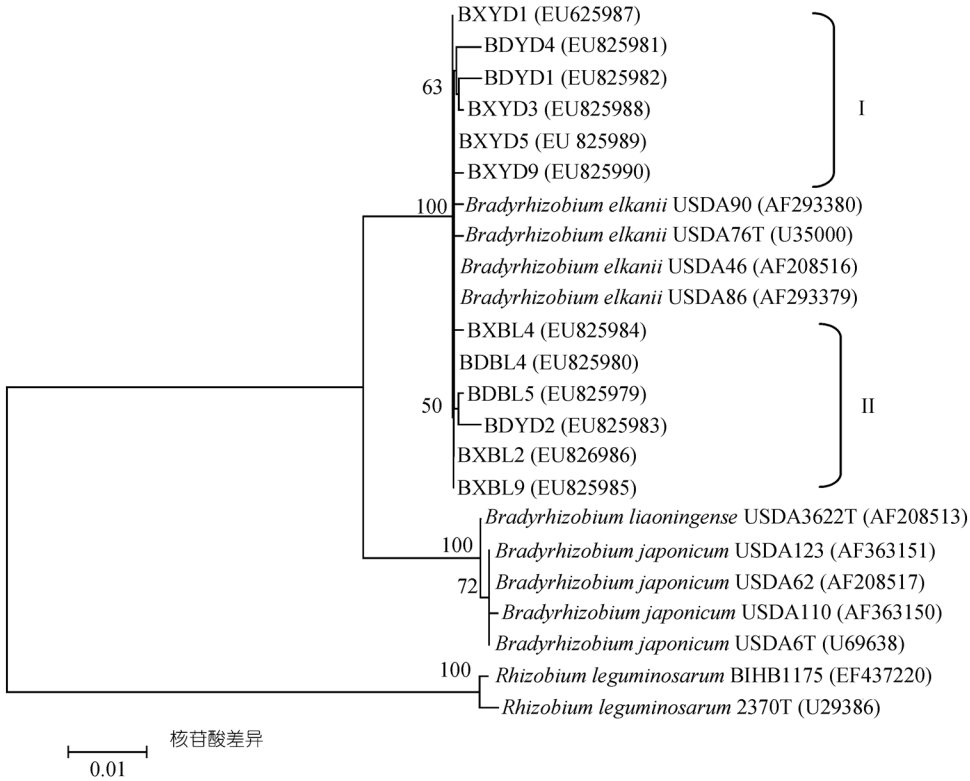


图 1 供试菌株 16S rDNA 部分序列分析及其系统发育树状图

罗马数字 I，II 表示所分离的根瘤菌聚为不同的群. 图中分叉点的数字为靴值(仅显示大于 50 的数值). 各菌株后面括号里是 16S rRNA 基因全序列在基因库中的登录号

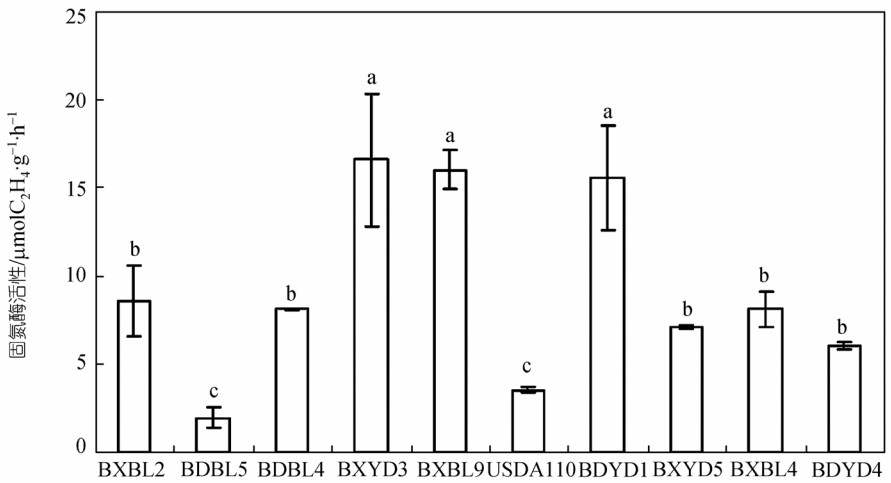


图 2 回接实验中根瘤固氮酶活性测定的结果

BX, BD 代表分别从大豆品系 HN89 和 HN113; BL, YD 代表分别从博罗和英德实验点分离纯化出来的根瘤菌株系

量都有不同程度的增加(表 2). 与不接种根瘤菌的对照相比, 接种根瘤菌能显著提高大豆的地上部和根部干重, 经接种处理的华春 2 号、华春 3 号和华春 4 号的地上部干重与对照相比分别提高了 67.12%, 154.46%和 49.53%, 根部干重分别提高了 164.88%, 70.37%和 26.04%. 并且不同品种对接种根瘤菌菌剂的反应也具有显著的基因型差异(地上部干重: F_G = 13.9***; 根干重: F_G = 8.67**). 其中华春 3 号品系对



图 3　接种根瘤菌对华春 3 号大豆根瘤及植株生长的影响

接种根瘤菌地上部反应最为敏感、华春 2 号根部反应最为敏感；华春 4 号较差，接种和不接种处理地上部和根部干重差异不显著(表 2).

根瘤菌接种处理对大豆产量的影响达到极显著水平($F_I = 31.59^{***}$). 接种根瘤菌对 3 个供试大豆品系都有明显的增产效果，经接种处理的华春 2 号、华春 3 号和华春 4 号的产量分别比对照增产了 46.21%, 49.33%和 40.57%(表 2)，其增产因素主要表现在接种处理大豆的结荚数显著高于不接种处理(表 2).

(ii) 接种根瘤菌对不同大豆品系氮、磷营养状况的影响. 植株地上部氮含量的多少是衡量根瘤菌接种效果的有效指标，直接反映了根瘤菌-大豆共生固氮体系固氮能力的差异[20]. 图 4 结果表明，接种根瘤菌能显著提高 3 个大豆品系的地上部氮、磷含量(含氮量: $F_I = 28.80^{***}$，含磷量: $F_I = 38.39^{***}$)，并且不同品系对接种根瘤菌菌剂的反应也具有显著的基因型差异(含氮量: $F_G = 16.91^{***}$，含磷量: $F_G = 25.00^{***}$). 接种根瘤菌的华春 2 号、华春 3 号和华春 4 号的地上部含氮量与不接种对照相比分别提高了 58.11%, 152.43%和 53.54%. 并且，华春 2 号和华春 3 号大豆品种地上部氮含量提高的幅度高于华春 4 号.

此外，接种根瘤菌的华春 2 号、华春 3 号和华春 4 号的地上部含磷量与不接种对照相比分别提高了 55.81%, 163.36%和 56.66%. 其中，接种根瘤菌对改善华春 3 号地上部磷营养状况的效果最为显著. 同时

表 2　酸性缺磷土壤中接种根瘤菌处理对不同大豆品系生长的影响 a)

大豆品系	地上部干重(g/株)		根干重(g/株)		产量(kg/公顷)		结荚数(个/株)	
	CK	接种	CK	接种	CK	接种	CK	接种
华春 2 号	10.39±1.64b	17.36±2.85a	0.25±0.05b	0.66±0.03a	2034.94±150.85b	2975.40±265.12a	19.67±3.71a	37.67±7.22a
华春 3 号	7.88±1.24b	20.04±2.13a	0.25±0.04a	0.43±0.08a	1631.48±139.59b	2436.30±172.13a	18.33±3.67a	39.67±10.14a
华春 4 号	4.60±0.22a	6.87±1.54a	0.23±0.01a	0.28±0.05a	1353.17±79.00b	1902.15±135.04a	11.33±1.76a	10.33±1.76a
F 值								
G	13.90***		8.67**		13.89***		6.88*	
I	23.81***		29.94***		31.59***		7.80*	
G×I	3.81ns		6.90*		0.71ns		2.31ns	

a) 表中的数据为 3 个重复的平均值及其标准误差，同一性状同一大豆品系数据后字母相同为 *t* 检验差异不显著(P<0.05); *F* 值为双因素方差分析的结果. 其中, G 代表大豆基因型; I 代表是否接种根瘤菌菌剂; G×I 代表基因型和接种处理的交互作用. *, P <0.05; **, 0.001< P <0.01; ***, P < 0.001; ns 表示差异不显著

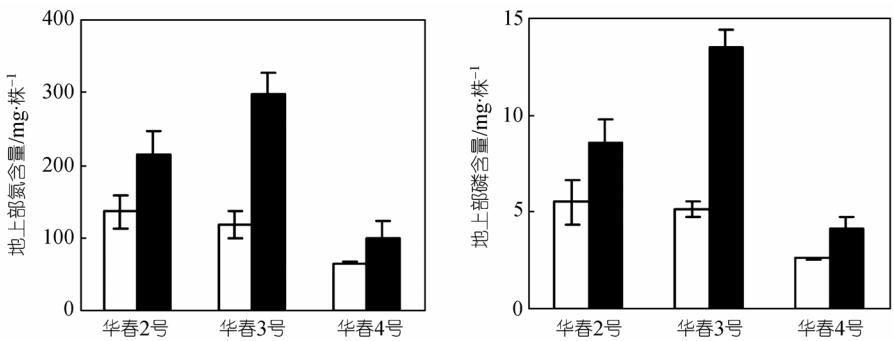


图 4　酸性缺磷土壤中接种根瘤菌对不同大豆品系地上部氮、磷含量的影响

空白柱代表不接种根瘤菌的对照，黑色柱代表接种根瘤菌的处理

大豆基因型与接种处理之间存在显著的交互作用($F_{G\times I} = 9.01^{**}$), 进一步说明不同大豆品系接种根瘤菌对地上部磷营养状况的影响差异显著.

(iii) 接种根瘤菌对不同大豆品系根瘤共生性状的影响. 接种根瘤菌能显著提高大豆的结瘤能力. 实验结果表明, 我们制作的根瘤菌菌剂对 3 个供试大豆品系均具有较好的侵染结瘤能力, 单株根瘤个数为 8.7~18.3 个, 根瘤干重在 40.6~142.8 mg 之间. 由于实验地块从未种植过豆科作物, 对照区大豆结瘤率为 0; 而接种根瘤菌后的大豆植株结瘤率达 100%. 说明在高温多湿的南方酸性土壤上接种大豆根瘤菌是非常必要的.

表 3 酸性缺磷土壤中接种根瘤菌处理对不同大豆品系根瘤生长的影响

大豆品系	根瘤个数(个/株)		根瘤干重(mg/株)	
	CK	接种	CK	接种
华春 2 号	0.0	18.3±8.3	0.0	142.8±65.2
华春 3 号	0.0	12.7±6.1	0.0	40.6±26.0
华春 4 号	0.0	8.7±2.9	0.0	79.9±42.8
F 值 a)				
G	0.62ns		1.18ns	
I	13.88**		10.25**	
G×I	0.62ns		1.18ns	

a) *F* 值为双因素方差分析的结果. 其中, G 代表大豆基因型; I 代表是否接种根瘤菌菌剂; G×I 代表基因型和接种处理的交互作用. *, $P<0.05$; **, $0.001< P <0.01$; ***, $P < 0.001$; ns 表示差异不显著

3 讨论

3.1 华南酸性低磷土壤中大豆根瘤菌高效株系的发现及其意义

华南地区纬度低、温热多雨, 而且大多数土壤为酸性红壤, 缺磷现象特别严重[3]. 据报道, 在酸性土壤上, 特别是在土壤pH低于 5.0 的情况下, 豆科作物很难结瘤[21]. 因此我们在培育耐酸性、磷高效大豆新种质的同时, 也需要筛选耐酸、耐低磷的高效根瘤菌菌株. 不同的根瘤菌种类对环境的影响具有不同的忍耐能力, 与中性土壤相比, 从酸性土壤中分离出的根瘤菌具有更强的耐酸能力[22]. 本实验分别在大豆栽培历史不同的酸性缺磷土壤上, 从磷效率不同的两个大豆品系的根瘤中, 有目的地从酸性缺磷土壤中筛选耐酸、耐低磷的大豆根瘤菌. 经过多次在酸性YMA培养基平板上的分离、纯化, 得到 12 株大豆根瘤菌纯株系. 经 16S rDNA测序分析, 这 12 株根瘤菌菌株为慢生根瘤菌属的慢生根瘤菌菌株. 通过回接验证实验与固氮酶活性测定, 其中 3 个菌株BDYD1, BXBL9 和BXYD3 的固氮酶活性显著高于对照菌株大豆慢生根瘤菌(*B. japonicum*) USDA110 (图 2), 属于固氮活性较高的高效根瘤菌株系. 田间实验证明, 我们分离筛选出根瘤菌能侵染多个大豆品系, 具有固氮效率高, 竞争性和适应性强的特点. 如果在华南地区广泛使用, 不仅可以增加宿主自身的氮素营养, 提高作物的产量, 增加土壤氮素, 培肥地力, 而且能有效地减少化肥, 特别是氮肥的使用, 改善生态环境质量, 有利于维护生态平衡, 具有极其重大的意义.

3.2 土壤环境、宿主种类是筛选高效根瘤菌株系的关键因素

根瘤菌的结瘤固氮过程一般在中性或偏碱, 即pH为 6.5~8.0 的土壤中效率较高[23]. 田间实验结果表明, 我们筛选出的根瘤菌菌株不但在pH 5.0, 有磷含量低于 1.0 mg/kg的酸性缺磷土壤上的结瘤固氮能力很强, 而且在pH只有 3.8 的新开垦红壤也能很好结瘤(廖红等人, 未发表), 对宿主的适应性也较广. 3 个供试大豆品系的结瘤率均为 100%, 单株根瘤个数为 8.7~18.3 个, 根瘤干重在 40.6~142.8 mg之间(表 3). 究其原因, 可能是我们在筛选根瘤菌时, 同时兼顾了土壤环境和宿主适应性两个方面. 在土壤环境方面, 鉴于酸性缺磷是华南地区土壤的普遍特性, 我们选择了两个实验点, 包括代表极端酸性、有效磷极低土壤的英德实验点和代表微酸性、有效磷含量相对较高土壤的博罗实验点(表 1)作为分离纯化根瘤菌的取样点. 在宿主适应方面, 我们选择了磷效率、来源地均差异较大的两个大豆品系, 其中HN89 是自巴西引进的磷高效品系, 对酸性缺磷土壤具有较好的适应性; HN113 是广东本地品系, 磷效率较低[9]. 然后, 再根据回接实验根瘤固氮酶活性的高低, 选择固氮效率较高的候选菌株. 因此, 我们所试用的根瘤菌株系具有高效、耐酸、耐低磷和宿主适应范围广的特点.

3.3 增加氮营养、促进生殖生长是接种根瘤菌增加大豆产量的可能机理

磷是植物生长必需的大量元素之一, 对豆科作物的生长和结瘤固氮有促进作用. 这就是传统教科书上的豆科作物“以磷增氮”效应[24]. 但是关于接种根瘤菌对豆科作物磷营养状况的影响却少有报道. Kuang等人[25]研究表明, 接种根瘤菌确实能改善大豆的磷营养. 本研究结果表明, 接种根瘤菌对于磷的吸

收具有一定的促进作用. 接种根瘤菌能显著提高 3 个供试大豆品系的地上部磷含量, 其中华春 3 号的地上部含磷量与不接种对照相比提高了 163.36% (图 3). 究其原因, 可能是接种根瘤菌能够增加大豆的氮营养, 促进了大豆营养生长, 特别是根系的生长, 从而有利于根系对土壤中磷的吸收.

同时, 接种根瘤菌, 对大豆生殖生长的影响也较大. 虽然接种根瘤菌能显著促进大豆生长, 但对株高的影响不显著(数据未显示). 然而, 接种根瘤菌对供试大豆结荚数的影响却极大(表 3), 说明通过根瘤固氮所提供的氮营养, 不会像化学氮肥一样, 仅仅促进植物的营养生长, 使其难以向生殖生长转化而造成贪青徒长的现象; 而是能够有效控制大豆的营养生长, 促进其向生殖生长转化, 从而显著提高大豆的产量.

3.4 接种高效根瘤菌是发展华南地区酸性缺磷土壤大豆生产的重要措施

土壤酸性、缺磷是限制豆科作物生产的重要因素[26]. 据统计, 全世界约有 43%的耕地缺磷, 而我国有 2/3 的耕地缺磷[27], 其中大部分分布在华南地区, 属于酸性缺磷土壤. 在这些地区, 由于大豆种植不普遍, 土壤常年处于高温多雨状态, 土著根瘤菌丰度较低[8]. 人工接种根瘤菌是增强大豆结瘤固氮能力, 增加氮素营养, 提高大豆产量的有效措施[28]. 本研究结果证明, 如果不接种根瘤菌, 3 个供试大豆品系完全不能结瘤; 接种根瘤菌后, 不仅能形成较多根瘤, 而且还能显著提高大豆的地上部生物量和产量, 改善植株氮、磷营养状况(表 2 和 3; 图 3 和 4). 其中, 接种根瘤菌后, 华春 3 号的地上部干重、氮和磷含量分别比不接种提高 154.3%, 152.4%和 163.2%. 本研究所用的根瘤菌菌剂同时还在云南、四川等实验点试用, 接种后均能够显著提高大豆的生物量, 改善大豆的氮、磷营养状况(数据未显示). 可见, 接种高效根瘤菌是发展华南地区土壤酸性缺磷上大豆生产的重要措施. 因此, 在生产中大力推广豆科作物接种根瘤菌技术具有重要的经济、环境和生态效益.

致谢 感谢潘强、涂攀峰、高翔、陈娜等参加了生物实验部分工作. 感谢华南农业大学谭志远教授等对本项目的指导和帮助.

参考文献

1 陈应志, 邱丽娟. 中国大豆良种推广应用现状及发展战略. 大豆通报, 2005, 4: 1—5
2 杨文钰, 雍太文, 任万军, 等. 发展套作大豆, 振兴大豆产业. 大豆科学, 2008, 27(1): 1—7
3 徐青萍, 罗超云, 廖红, 等. 大豆不同品种对磷胁迫反应的研究. 大豆科学, 2003, 22(2): 108—114
4 陈文新, 李季伦, 朱兆良, 等. 发挥豆科植物根瘤菌共生固氮作用减少化学氮肥用量. 见: 中国科学院科学发展报告课题组, 主编. 2007 科学发展报告. 北京: 科学出版社, 2007
5 郭春景, 杨旭升, 陈锡时. 大豆根瘤菌与黑龙江省主栽大豆品种共生匹配的研究. 大豆通报, 2004, 2(5): 6—8
6 马彦卿. 微生物复垦技术在矿区生态重建中的应用. 采矿技术, 2001, 1(2): 66—68
7 李友国, 周俊初. 影响根瘤菌共生固氮效率的主要因素及遗传改造. 微生物学通报, 2002, 29(2): 86—89
8 曹桂芹. 酸性红壤中大豆高效根瘤菌的筛选及其固氮效果的研究. 硕士学位论文. 广东: 华南农业大学, 2007. 50—52
9 赵静, 付家兵, 廖红, 等. 大豆磷效率应用核心种质的根构型性状评价. 科学通报, 2004, 49(13): 1249—1257
10 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996. 93—95
11 鲍士旦, 主编. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000. 201—286
12 Yang J, Xie F, Zou J, et al. Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in China. Soil Biol Biochem, 2005, 37: 141—153[DOI]
13 Yanagi M, Yamasato K. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol Lett, 1993, 107: 115—120[DOI]
14 Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. Int J Sys Bacteriol, 1995, 45: 240—245
15 陈丹明, 曾昭海, 隋新华, 等. 紫花苜蓿高效共生根瘤菌的筛选. 草业科学, 2002, 19(6): 27—31
16 赵斌, 何绍江. 微生物实验技术. 北京: 科学出版社, 2002

17 王继华, 程玉鹏, 孙洪涛, 等. 快生型大豆根瘤菌菌剂的制备及接种效果分析. 哈尔滨师范大学(自然科学学报), 2000, 16(6): 92—96
18 周丽霞, 蚁伟民. 广东省豆科植物结瘤固氮及根瘤菌资源的初步研究及生物多样性. 生物多样性, 2003, 11(4): 309—321
19 Vriezen J A, de Bruijn F J, Nüsslein K. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen and temperature. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(11): 3451—3459 [DOI]
20 徐传瑞, 章建国, 周俊初. 大豆根瘤菌的分离和筛选. 华中农业大学学报, 2004, 23(6): 635—638
21 Howieson J, Ballard R. Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia-some contemporary thoughts. Soil Biol Biochem, 2004, 36(8): 1261—1273[DOI]
22 Hungria M, Vargas M A T. Environmental factors affecting N_2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field Crops Res, 2000, 65(2): 151—164[DOI]
23 刘兆红. 豆科牧草与根瘤菌共生固氮作用知识简介. 青海草业, 2007, 16(3): 59—61
24 杨俊丰. 豌豆施磷肥对其固氮作用的影响. 甘肃农业科技, 1992, 4: 30—31
25 Kuang R B, Liao H L, Yan X, et al. Phosphorus and nitrogen interactions in field-grown soybean as related to genetic attributes of root morphological and nodular traits. J Integr Plant Biol, 2005, 47(5): 549—559[DOI]
26 Yan X L, Wu P, Ling H Q, et al. Plant nutriomics in China: an overview. Ann Bot, 2006, 98: 473—482[DOI]
27 李继云, 刘秀娣, 周伟, 等. 有效利用土壤营养元素的作物育种新技术研究. 中国科学B辑, 1995, 25(1): 41—48
28 刘志恒. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2003