

胡倡,李慧明,伍惠,等.解磷菌和根瘤菌复合接种对大豆和紫云英共生固氮的影响[J].华中农业大学学报,2020,39(4):38-45.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.04.006

解磷菌和根瘤菌复合接种对大豆和紫云英共生固氮的影响

胡倡,李慧明,伍惠,林会,李友国

农业微生物学国家重点实验室/华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070

摘要 从大豆根际及根瘤中分离获得 2 株具有较高解磷能力的细菌 PSB-1 和 HZP1,通过 Salkowski 比色法和钼锑钒比色法,对这 2 个菌株产生 IAA(indole-3-acetic acid,IAA)的能力和溶解无机磷的能力进行了测定,同时对紫云英和大豆进行接种,并对田间栽培的大豆进行了菌剂接种试验。结果显示:PSB-1 及 HZP1 均具有解磷及产 IAA 的特性;单接种解磷菌 HZP1 或 PSB-1 均有促进紫云英和大豆生长的作用;相比于单接种根瘤菌,将这 2 株解磷细菌分别与根瘤菌混合接种能进一步提高大豆和紫云英的地上生物量、根瘤鲜质量和根瘤数。田间试验结果显示,单独接种根瘤菌剂或解磷菌剂都有一定的增产效果,但双接种根瘤菌剂和解磷菌剂的增产效果不明显。

关键词 解磷菌;根瘤菌;大豆;紫云英;共生固氮;复合接种

中图分类号 S 182 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)04-0038-08

大豆(*Glycine max*)是一种重要的经济作物,其籽粒蛋白质含量高达 40%^[1],蛋白质含量与牛奶、牛肉、鸡蛋等动物蛋白相当,其蛋白质含量高进而被用作饲料和食品原料^[2]。大豆能与根瘤菌共生固氮,其共生固氮的效率较高^[3]。接种大豆根瘤菌剂能够提升大豆的结瘤数量,提高大豆的共生固氮效率,减少氮肥的使用。阿根廷大豆根瘤菌剂的接种面积在 90%以上^[4]。巴西根瘤菌剂的使用率达到 100%,年产量能占到全球的 28%以上^[5]。有研究表明,在豆科植物上仅接种根瘤菌无法最大效率促进植物生长,豆科植物接种根瘤菌的同时辅以根际促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria,PGPR)能提升豆科植物固氮效率^[6-7]。

植物根际促生菌是一类生活在植物根系附近、能够为植物提供营养元素或者抵抗病原菌的细菌总称^[8],主要有根瘤菌属、芽孢杆菌属、固氮螺菌属等^[9-10]。PGPR 菌株按功能主要分为固氮菌、解磷菌、产铁载体菌、产内源激素菌、病原拮抗菌 5 个种类^[11],其中解磷菌能够分泌酸性物质,有助于分解土壤中难溶性的磷矿物^[12],将其转变为可溶性的磷

素供植物吸收^[13]。豆科植物在共生固氮及生长发育过程中对磷的需求较高,磷缺乏时会导致豆科植物产量下降^[14]。因此,根瘤菌和解磷菌的复合接种有可能更好地提高豆科植物的生物量。

目前关于解磷菌的研究主要集中在单种菌剂对植物的促进作用^[15],而对解磷菌剂配合根瘤菌剂使用的相关研究较少。本研究利用解磷菌与根瘤菌组合构建复合接种剂,以期进一步促进豆科作物生长,提高共生固氮效率和作物产量。通过选择性平板对大豆根际及根瘤表面细菌进行分离,获得 2 株具有解磷能力的细菌并检测细菌的溶磷量及产 IAA 能力;利用耕种土壤对紫云英和大豆分别进行解磷菌和根瘤菌的单、双接种,考察单、双接种对植物的促生长效应;进一步将解磷菌剂与根瘤菌剂进行田间单接种及双接种应用,旨在为根瘤菌与解磷菌在田间单接种或复合接种应用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及分离

根瘤样品取自湖北省石首市大垸镇的大豆植

收稿日期:2019-10-13

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD0201006);国家自然科学基金项目(31670243);华中农业大学科技创新基金项目(2662017PY052,2662017PY121)

胡倡,硕士研究生.研究方向:生物固氮与菌植互作. E-mail: 1006451455@qq.com

通信作者:林会,博士,副教授.研究方向:生物固氮与菌植互作. E-mail: linhui@mail.hzau.edu.cn

株,根际土壤样品取自大豆根际土壤。

供试菌株:*Mesorhizobium huakuii* 7653R(简称7653R);*Sinorhizobium fredii* HH29(简称HH29);*Bradyrhizobium japonicum* USDA110(简称USDA110);*Sinorhizobium fredii* HH103(简称HH103)。

分离样品的处理:将大豆根系的泥土压碎并抖落,用灭菌镊子取约20个大豆根瘤,用无菌水漂洗6~7次,捣碎后于5 mL离心管中充分振荡混匀。稀释原液 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 并涂布于解无机磷培养基,28℃培养。大豆沿主根剪断浸入含有50 mL已灭菌水的三角瓶中,220 r/min振荡30 min作为原液,将原液稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 并涂布于解无机磷平板,28℃培养。解无机磷平板配方如下:葡萄糖10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 10 g, 补 ddH₂O 至1 L, 调 pH 6.8~7.0^[16]。

1.2 细菌溶磷量、IAA含量测定及16S rDNA鉴定

挑取单菌落接于5 mL LB中,28℃培养12 h作为一级种子液,按1%接种量重复此操作作为二级接种液。最后以1%接种量转入100 mL解无机磷培养基中。28℃培养60 h,用钼锑钒比色法测定发酵液中可溶性磷含量,对照加入等量无菌水的解无机磷培养基。标准曲线的制作及具体方法主要参照文献[17]进行。

挑取单菌落接于5 mL LB液体中,28℃过夜培养作为种子液,细菌在LB+L-色氨酸(0.5 g/L)液体培养基中生长12 h,培养液离心取上清液4 mL,加入等体积Salkowski比色液,黑暗静置30 min,以加入等量L-色氨酸的LB液体培养基为对照测定发酵液在530 nm处的吸光度。IAA标准曲线测定及相关溶液配制参考文献[18]进行。

提取细菌基因组并用16S通用引物27F/1492R进行PCR扩增,将获得的片段通过胶回收,之后连接T载体转化至大肠杆菌中。挑取相应单菌落进行PCR验证,挑选PCR验证正确的菌株,将菌株培养后送测序公司测序获得16S rDNA序列。

1.3 盆栽试验

1)大豆土壤盆栽试验。选颗粒饱满的中黄13大豆种子,75%乙醇消毒5 min,5%次氯酸钠消毒5 min,无菌水洗涤8~10次。铺于1%水琼脂平板

上,28℃正置催芽2~3 d。土壤取自湖北省石首市大垵镇。土壤性质如下:速效钾101.31 mg/kg,速效磷6.35 mg/kg,有机质含量12.66 g/kg,全氮0.18 g/kg,pH 7.30。将土壤过2 mm筛,催芽后的种子播种到装有未灭菌土壤的小盆中,装土量450 g左右,每钵播种2~3颗大豆种子。试验共设4个处理,每个处理6个重复,5 d后间苗。等到植物长出第1片真叶,离心并收集菌体,用无菌水调节OD₆₀₀至1.7~1.8。按照以下处理在植物根系附近接入对应的菌液。处理1:单接种*S. fredii* HH29菌液1 mL;处理2:单接种从大豆根瘤材料分离得到的解磷菌PSB-1 1 mL;处理3:接种按等质量混合的大豆根瘤菌和解磷菌PSB-1菌液1 mL,对照植株加入1 mL无菌水。对大豆根瘤菌*B. japonicum* USDA110采用从大豆根际土壤分离得到的解磷菌HZP1进行单接种和混合接种,在光照培养室(24~28℃,16 h光照/8 h暗期)生长,2 d浇1次灭菌蒸馏水。接菌28~30 d测定植物表型,包括植物鲜质量、根瘤数、根瘤质量、固氮酶活等。固氮酶活测定参见伍惠等^[19]的方法。

2)紫云英土壤盆栽试验。紫云英种子放在灭菌PA瓶中,75%乙醇5 min,5%(V/V)次氯酸钠表面消毒10 min,无菌水洗涤8~10次后用无菌水浸泡4~6 h,平铺在1%~2%的水琼脂平板上,20℃光照倒置催芽2~3 d后,将土壤过2 mm筛,催芽后的种子播种到装有250 g未灭菌的石首土壤与灭菌蛭石混合物($m_{\text{土壤}} : m_{\text{蛭石}} = 3 : 1$)的盆中。每钵4粒种子,试验共4个处理,每个处理5个重复。试验设计与大豆盆栽类似,菌种分别采用2种解磷菌PSB-1、HZP1和*M. huakuii* 7653R进行。在光照培养室(16 h光照/8 h暗期,18~22℃)生长,接菌方式及表型测定与大豆相同。

1.4 田间试验设计及菌剂制备、使用方法

湖北小区试验设在石首市大垵镇试验田,土壤同大豆盆栽试验。前茬小麦,土壤有效磷、有效钾含量低;播种前1 d翻耕,保持土壤湿墒。播种中黄13和荆豆134;大豆根瘤菌菌种为*B. japonicum* USDA110、*S. fredii* HH103;解磷菌菌种选择HZP1拌种。每个小区宽4.8 m、长5 m,小区间留0.4 m长走道,试验田四周至少1 m宽的保护行。每个小区开10行播种沟,每行播种200 g种子,待出苗后,按每10 cm保留1株的标准间苗。试验设5个处理,处理1(CK):不接菌剂,常规播种;处理2(R1),

接种 USDA110 菌剂, 拌种; 处理 3 (R2): 接种 HH103 菌剂, 拌种; 处理 4 (P): 接种 HZP1 菌剂, 拌种; 处理 5 (P+R), 按照 $m_{\text{USDA110}} : m_{\text{HH103}} : m_{\text{HZP1}} = 1 : 1 : 2$ 的比例进行菌剂拌种。每个处理 3 个重复, 随机排列。大豆成熟后, 收获并测定每个小区大豆产量。

河北小区试验地设在石家庄农科院堤上试验基地, 土壤为上层褐土, 前茬小麦, 肥力中等, 土壤理化性质: 速效钾 281.66 mg/kg, 速效磷 21.03 mg/kg, 有机质含量 21.72 g/kg, 全氮 0.15 g/kg, pH 7.56。播种冀豆 12 和冀豆 17。每个小区有 4 行, 行间距 0.5 m, 每行 6 m。每个小区播种 480~500 粒大豆种子。待出苗后, 按每 10 cm 保留 1 株的标准间苗。菌种为大豆根瘤菌 *S. fredii* HH29 及解磷菌 PSB-1。试验设 4 个处理, 每个处理 3 个重复。试验设计与产量测定同湖北小区试验基本一致, 但菌种选择不同。

草炭先用孔径 0.3 mm 筛初筛, 再用孔径 0.2 mm 筛复筛, 之后将 450 g 草炭 + 50 g 磷矿粉装袋并混匀, 121 °C 灭菌 60 min。将活化好的大豆根瘤菌菌株和解磷菌 HZP1 接种于 250/500 mL 三角瓶的 BSE 培养液中, 解磷菌 PSB-1 接入 LB 液体培养基中。根瘤菌采用 28 °C 摇床培养 2~4 d, 解磷菌培养 1~2 d 至其 OD_{600} 约为 1.8, 将培养好的菌液 150 mL 混入 500 g 草炭中制成草炭菌剂。测定菌剂相

关参数。田间试验采用拌种的方法: 将粘合剂阿拉伯树胶粉 7 g 溶于 40~50 mL 水中, 用液体粘合剂将固体菌剂调成糊状, 按每 100 g 菌剂拌种 1 kg 大豆种子, 混匀后, 铺于报纸上晾干。当天完成播种。

1.5 数据分析与处理

利用 Microsoft Office Excel 2007 进行数据统计, 显著性分析采用 SPSS-ANOVA 进行。

2 结果与分析

2.1 解磷菌的分离和鉴定

利用解无机磷选择性培养基从大豆中黄 13 根瘤材料分离得到 1 株解磷菌 PSB-1; 从大豆根际土壤中分离得到 1 株解磷菌 HZP1。将扩增的 16S rDNA 序列经过测序和 NCBI Blast 序列比对分析, 得知 HZP1 为巨大芽胞杆菌属 (*Bacillus megaterium*) 细菌, PSB-1 为肠杆菌属 (*Enterobacter*) 细菌。

2.2 PSB-1 和 HZP1 解磷能力的测定

通过钼锑钒比色法测定培养 60 h 发酵液中可溶性磷含量 (表 1), 结果显示: 接种 PSB-1 和 HZP1 与接入等量灭菌水 (CK) 相比, 发酵液中可溶性磷含量分别增加了 7.31 和 4.84 倍, 达到 307.44 和 193.72 mg/L。以加入等量的 L-色氨酸 LB 液体为对照, 测得 2 种细菌均有产生 IAA 的能力。12 h 发酵液中 HZP1 和 PSB-1 产 IAA 分别达到 73.56、32.76 mg/L。

表 1 2 种 PGPR 菌株的溶磷量及 IAA 含量 ($n=3$)

Table 1 The phosphate solubilizing capacity of two PGPR strains ($n=3$)

菌株 Strain	A_{700}	可溶性磷含量/(mg/L) Content of soluble P	与对照相比增加倍数 Increase in multiples compared with control	$A_{530 \text{ nm}}$	IAA 含量/(mg/L) Content of IAA
CK	0.186±0.009	42.61±1.776	0	0	0
PSB-1	1.494±0.049	307.44±9.557	7.31±0.085	0.612±0.019	32.76±0.85
HZP1	0.982±0.040	193.72±7.884	4.84±0.301	1.534±0.011	73.56±0.51

2.3 PSB-1、HZP1 与根瘤菌双接种对大豆结瘤及生长的影响

为了模拟田间试验环境, 采用了未灭菌土壤种植大豆, 并检测解磷菌 PSB-1 和 HZP1 及其与根瘤菌混合接种对大豆结瘤固氮的影响, 将冀豆 17 幼苗分别单接种解磷菌 PSB-1、根瘤菌 HH29 及双接种 HH29+PSB-1。接菌 28 d 后, 统计植株共生表型。结果显示, 双接种 HH29+PSB-1 时, 植株根瘤数和根瘤鲜质量相对于 CK 显著增加, 比单接种 HH29 时植株根瘤数、根瘤鲜质量和地上部鲜质量分别增

加 14.37%、26.94% 和 31.23% (表 2)。双接种 HH29+PSB-1 对根瘤固氮酶活无显著影响。结果表明: 将解磷菌 PSB-1 与根瘤菌双接种可以促进大豆结瘤, 提高结瘤数和根瘤鲜质量, 进而促进大豆生长, 提高大豆生物量。

将大豆中黄 13 分别单接种解磷菌 HZP1、根瘤菌 USDA110 及双接种 USDA110+HZP1, 统计植株共生表型, 结果 (表 3) 显示: 双接种 USDA110+HZP1 比未接种大豆的固氮酶活、根瘤数及根瘤鲜质量显著增加。双接种时大豆植株地上生物量也有

提高,比未接种植株增加 12.92%。与单接种根瘤数 24.21%和 5.89%。单独接种 USDA110 比未接种 USDA110 相比较,双接种 USDA110+HZP1 植株 24.21%和 5.89%。单独接种 USDA110 比未接种植株地上鲜质量没有明显增加,但其根瘤数和根瘤鲜质量、根瘤数和根瘤鲜质量分别增加 17.39%、鲜质量略有提高。

表 2 双接种 PSB-1 与 HH29 在大豆上接种效应 (n=5)

Table 2 The symbiotic nitrogen-fixing phenotype of soybean inoculated with PSB-1 and HH29 (n=5)

处理 Treatment	地上部鲜质量/g Shoot fresh weight per plant	根瘤数 Nodule number per plant	根瘤鲜质量/g Nodule fresh weight per plant	固氮酶活/($\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$) Nitrogenase activity	地上部干质量/g Shoot dry weight
CK	2.62±0.57a	13.00±4.08b	0.070±0.03b	8.92±2.85a	0.54±0.10a
HH29	3.65±0.67a	34.8±3.77ab	0.193±0.05ab	5.67±1.24a	0.76±0.14a
PSB-1	3.47±0.86a	27.3±8.62ab	0.195±0.06ab	5.46±1.06a	0.67±0.19a
HH29+PSB-1	3.79±0.23a	39.8±8.65a	0.245±0.06a	6.52±1.37a	0.79±0.10a

注:同列数据后标注相同字母表示无显著性差异($P<0.05$),下同。Note:Same lowercase letter means no significant difference at 5% level, the same as follows.

表 3 HZP1 接种大豆的共生表型 (n=4)

Table 3 The symbiotic nitrogen-fixing phenotype of soybean inoculated with HZP1 (n=4)

处理 Treatment	株高/cm Plant height	地上部鲜质量/g Shoot fresh weight per plant	固氮酶活/($\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$) Nitrogenase activity	根瘤鲜质量/g Nodule fresh weight per plant	根瘤数 Nodule number per plant
CK	21.60±1.51ab	2.63±0.39ab	15.59±4.14b	0.12±0.02b	25.75±8.78b
USDA110	19.00±0.79b	2.53±0.31b	23.29±7.76ab	0.17±0.03a	32.00±6.08ab
HZP1	20.20±2.75b	2.78±0.29a	18.22±8.23ab	0.18±0.06a	33.25±15.07ab
HZP1+USDA110	23.90±2.92a	2.97±0.28a	26.96±6.46a	0.18±0.01a	39.75±12.61a

2.4 PSB-1、HZP1 与根瘤菌双接种对紫云英结瘤及生长的影响

为了检测 2 种解磷菌单独接种与双接种对其他豆科植物的促生效果,进行了盆栽接种试验。对紫云英分别单接种解磷菌 PSB-1、根瘤菌 7653R 及双接种 7653R+PSB-1。培养 28 d 后,未接种的对照植株叶片明显较黄,单接种 PSB-1、根瘤菌 7653R 及

双接种的植株生长情况较好(图 1 A),统计结果显示:单独接种解磷菌 PSB-1 和根瘤菌 7653R 能够明显提高紫云英的地上部生物量,相比对照植株,其根瘤数、根瘤鲜质量均有显著增加,固氮酶活无显著变化。双接种 7653R+PSB-1 比单接种 7653R 时,紫云英地上部鲜质量提高 48.8%,其根瘤鲜质量增加 37.27%(表 4)。

表 4 双接种 PSB-1 与 7653R 在紫云英上接种效应 (n=5)

Table 4 The symbiotic nitrogen-fixing phenotype of *Astragalus sinicus* inoculated with HZP1 in Hubei soil (n=5)

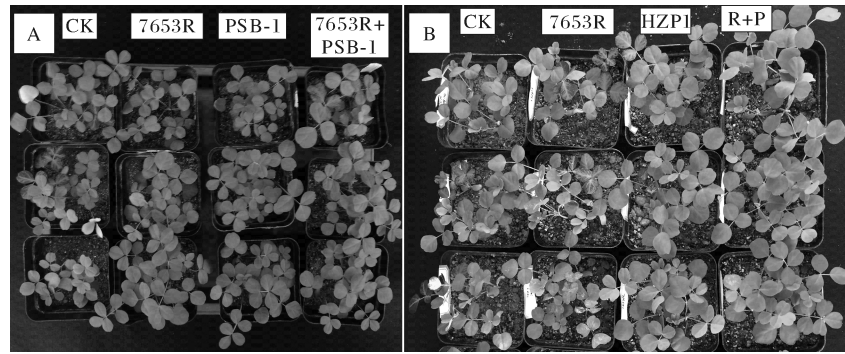
处理 Treatment	地上部鲜质量/g Shoot fresh weight per plant	根瘤数 Nodule number per plant	根瘤鲜质量/mg Nodule fresh weight per plant	固氮酶活/($\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$) Nitrogenase activity
CK	0.34±0.0171a	28.50±5.802a	6.88±1.672a	20.10±5.044a
7653R	0.42±0.050ab	39.75±4.787b	14.30±2.284b	12.16±1.974a
PSB-1	0.50±0.022b	40.00±7.393b	16.63±2.419bc	10.13±2.636a
7653R+PSB-1	0.63±0.060b	38.00±1.414ab	19.30±2.130c	11.09±2.591a

将紫云英分别单接种解磷菌 HZP1、根瘤菌 7653R 及双接种 7653R+HZP1,培养 28 d 后,接种 HZP1 及双接种的植株相较于对照植株长势要好(图 1 B)。统计结果显示:双接种 7653R+HZP1 有显著的促生效应,地上、地下生物量显著增加,相对未接种植株增加了 78.04%和 29.63%,比单接种 7653R 植株鲜质量增加 55.32%。此外,双接种

7653R+HZP1 显著促进紫云英的结瘤及固氮。双接种植株根瘤数、根瘤质鲜量和固氮酶活比单接种根瘤菌 7653R 植株分别提高 45.30%、107%、92.18%(表 5)。

2.5 菌剂的田间应用

为检测 PSB-1 和 HZP1 在大田中的应用效果,分别在河北石家庄和湖北石首进行大豆拌种田间小



A:PSB-1 与 7653R 接种表型; B:HZP1 与 7653R 接种表型。A:Phenotype of PSB-1 and *M. huakuii* 7653R inoculated; B:Phenotype of HZP1 and *M. huakuii* 7653R inoculated.

图 1 2 种 PGPR 在紫云英上接种的表型

Fig.1 The phenotype of *Astragalus sinicus* inoculated with two PGPR strains

表 5 HZP1 接种紫云英后共生固氮表型 ($n=4$)

Table 5 The symbiotic nitrogen-fixing phenotype of *Astragalus sinicus* inoculated with HZP1 ($n=4$)

处理 Treatment	地上部鲜质量/g Shoot fresh weight per plant	根鲜质量/g Root fresh weight	固氮酶活/ ($\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$) Nitrogenase activity	根瘤鲜质量/mg Nodule fresh weight per plant	根瘤数 Nodule number per plant
CK	$0.41\pm 0.04\text{c}$	$0.81\pm 0.13\text{b}$	$11.90\pm 3.39\text{b}$	$16.07\pm 3.36\text{b}$	$39.00\pm 7.94\text{b}$
7653R	$0.47\pm 0.03\text{bc}$	$0.91\pm 0.06\text{ab}$	$20.52\pm 7.12\text{a}$	$17.40\pm 3.08\text{b}$	$35.67\pm 2.89\text{b}$
HZP1	$0.61\pm 0.08\text{ab}$	$0.99\pm 0.07\text{a}$	$15.46\pm 1.57\text{ab}$	$27.83\pm 3.37\text{a}$	$60.33\pm 10.26\text{a}$
7653R+HZP1	$0.73\pm 0.03\text{a}$	$1.05\pm 0.04\text{a}$	$22.87\pm 0.71\text{a}$	$33.27\pm 8.00\text{a}$	$56.67\pm 12.01\text{a}$

区试验。在制作菌剂 7 d 后,测定菌剂相关性显示,根瘤菌剂有效活菌数在 10^8 以上,部分能达到 10^9 ,pH 6.5~6.9,PGPR 菌剂有效活菌数数量级为 10^7 ,PSB-1 菌剂能达到 10^8 ,PSB-1 和 HZP1 2 菌剂 pH 值分别为 5.97 和 6.03。2 种菌剂含水量为 28%~30%,粒径 0.18 mm。将大豆种子与制备好的菌剂拌种后播种。

在大豆初花期对湖北石首试验小区进行调查,结果显示:中黄 13 大豆接种根瘤菌 USDA110 和 HH103 均能显著促进其结瘤,根瘤菌与 HZP1 双接种也能促进大豆结瘤,但相比于单接种根瘤菌在瘤数、瘤质量上并没有进一步提高(表 6)。在荆豆 134 大豆接种根瘤菌的结瘤数和瘤质量与不接种对照植株无显著差异,地上部鲜质量略有提高。

表 6 湖北石首大豆田间小区试验固氮表型 ($n=5$)

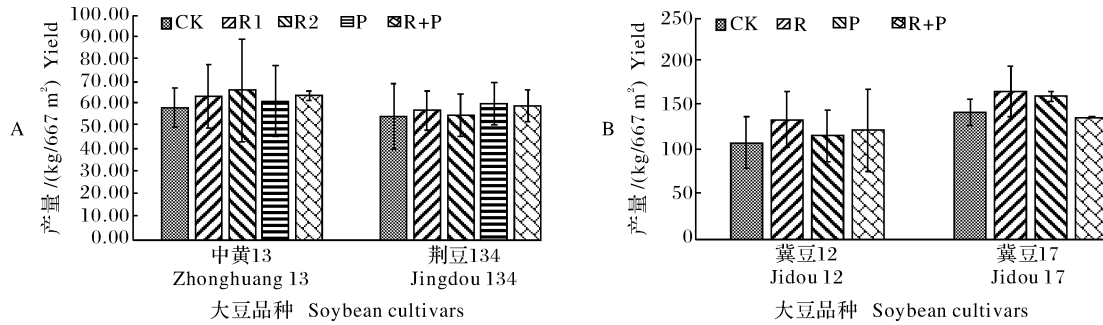
Table 6 The phenotype of field test of soybean inoculated rhizobium and HZP1 in Shishou City,Hubei Province ($n=5$)

处理 Treatment	中黄 13 Zhonghuang 13			荆豆 134 Jingdou 134		
	地上部鲜质量/g Shoot fresh weight per plant	根瘤鲜质量/g Nodule fresh weight per plant	根瘤数 Nodule number per plant	地上部鲜质量/g Shoot fresh weight per plant	根瘤鲜质量/g Nodule fresh weight per plant	根瘤数 Nodule number per plant
CK	$40.74\pm 1.65\text{b}$	$0.74\pm 0.01\text{b}$	$50.44\pm 3.43\text{b}$	$31.92\pm 6.47\text{a}$	$0.62\pm 0.03\text{a}$	$42.28\pm 9.09\text{a}$
R1	$52.27\pm 3.90\text{a}$	$0.99\pm 0.15\text{a}$	$72.33\pm 18.01\text{a}$	$36.71\pm 6.04\text{a}$	$0.51\pm 0.07\text{a}$	$36.78\pm 12.56\text{a}$
R2	$50.08\pm 1.20\text{a}$	$0.95\pm 0.01\text{a}$	$60.19\pm 10.61\text{ab}$	$35.41\pm 2.38\text{a}$	$0.55\pm 0.05\text{a}$	$36.26\pm 16.63\text{a}$
P	$50.32\pm 1.62\text{a}$	$0.78\pm 0.16\text{ab}$	$52.67\pm 7.78\text{ab}$	$31.20\pm 1.59\text{a}$	$0.66\pm 0.09\text{a}$	$42.00\pm 8.77\text{a}$
P+R	$37.90\pm 5.14\text{b}$	$0.85\pm 0.03\text{a}$	$62.00\pm 4.17\text{ab}$	$31.27\pm 1.53\text{a}$	$0.58\pm 0.04\text{a}$	$39.00\pm 13.18\text{a}$

注:CK;不接菌剂; Note:CK;No-inoculants; R1;USDA110 R2;HH103; P;HZP1; P+R;USDA110+HH103+HZP1.

湖北田间小区测产结果显示:对于中黄 13,接种根瘤菌 USDA110 和根瘤菌 HH103 比不使用菌剂 CK 处理产量提高 8.5% 和 13.1%。单接种 HZP1 时大豆产量略有增加,混合根瘤菌和解磷菌 HZP1 双接种比不接种对照增产 4.8%(图 2A)。对于荆豆 134,根瘤菌剂 HH103 增产 5% 左右,解磷

菌 HZP1 产量增加 9% 左右;双接种相比于对照组增产 9%。双接种相较于单接种根瘤菌和解磷菌在田间的应用效果并不明显(图 2A)。单接种解磷菌的效果反而比较突出,原因可能是该地区的可溶性磷含量较低,接入解磷菌剂后能提高土壤中的有效磷含量,促进大豆植株生长。



A: 湖北石首田间试验 Field test of soybean in Shishou City, Hubei Province; B: 河北石家庄田间试验 Field test of soybean in Shijiazhuang City, Hebei Province; CK: 不使用菌剂处理; R: 根瘤菌剂 HH29; R1: 根瘤菌剂 USDA110; R2: 根瘤菌剂 HH103; P: 解磷菌剂; P+R: 解磷菌和根瘤菌混合菌剂。CK: No inoculants; R: Rhizobium HH29; R1: Rhizobium USDA110; R2: Rhizobium HH103; P: Phosphate solubilizing bacteria inoculants; P+R: The mix of rhizobium and phosphate solubilizing bacteria inoculants.

图 2 不同地区解磷菌菌株及根瘤菌田间应用效果

Fig.2 Demonstration effect of field application of phosphate-solubilizing bacteria strains and rhizobium in different areas

同样,在大豆初花期对河北石家庄进行田间小区试验调查,结果显示:冀豆 12 和冀豆 17 接种根瘤菌剂均能显著增加根瘤鲜质量与根瘤数,冀豆 12 双接种 HH29+PSB-1 比单独接种根瘤菌时植株地上部鲜质量增加 7.2%,但是根瘤数及根瘤鲜质量比单

接种根瘤菌并无提高(表 7)。测产结果显示,与 CK 未接种处理的冀豆 12 产量相比,根瘤菌剂 HH29 草炭拌种使大豆产量增加 24%,双接种 PSB-1 和 HH29 使大豆产量增加 12%。单独接种 PSB-1 时,在冀豆 17 上接种根瘤菌剂大豆产量比 CK 增加 16%

表 7 河北石家庄田间小区固氮表型调查表 (n=5)

Table 7 The phenotype of field test soybean inoculated rhizobium and PSB-1 in in Shijiazhuang City, Hebei Province (n=5)

处理 Treatment	冀豆 12 Jidou 12			冀豆 17 Jidou 17		
	地上部鲜质量/g Shoot fresh weight per plant	根瘤鲜质量/g Nodule fresh weight per plant	根瘤数 Nodule number per plant	地上部鲜质量/g Shoot fresh weight per plant	根瘤鲜质量/g Nodule fresh weight per plant	根瘤数 Nodule number per plant
	CK	133.38±42.34a	0.27±0.14a	53.13±20.16a	101.33±3.22a	0.07±0.02a
HH29	109.34±12.70a	0.34±0.19b	73.93±17.21a	99.64±22.51a	0.57±0.46b	105.33±52.99b
PSB-1	100.81±18.98a	0.23±0.02a	64.83±9.62a	103.47±4.89a	0.15±0.13a	55.80±37.80ab
HH29+PSB-1	112.13±25.13a	0.23±0.11a	54.86±14.64a	106.71±21.88a	0.14±0.11a	62.33±47.92ab

左右,单接种解磷菌 PSB-1 大豆产量增加 13%。双接种相较于单接种根瘤菌和解磷菌在田间的应用效果并不明显(图 2 B)。

的地上部鲜质量。相比单接种根瘤菌,混合接种能促进大豆和紫云英结瘤和固氮,表明解磷菌能通过改善植物磷营养,促进根瘤的形成和发育,提高固氮效率,可作为促生菌配合不同根瘤菌剂使用,提高大豆的产量,证实了根瘤菌与促生菌混合接种的优势^[22]。

3 讨论

关于解磷菌早在 20 世纪初就有相关研究,最早于 1990 年加拿大的一家公司将青霉菌制成菌肥^[20],随后相关解磷微生物的报道持续增多。解磷菌剂应用范围较广泛,在玉米、辣椒、番茄等植株上均有应用^[21],本研究在大豆根际及根瘤中分离获得 2 株解磷能力较强的细菌 HZP1 和 PSB-1,且都能产生 IAA。紫云英和大豆单接种盆栽试验结果显示解磷菌 HZP1 和 PSB-1 均有促进植物生长的作用,能显著提高植株地上部鲜质量,说明这 2 株解磷菌可作为优质的解磷促生菌资源应用于菌剂生产中。将这 2 株解磷细菌与不同类型的根瘤菌混合接种进行盆栽试验时,均能进一步提高大豆和紫云英

在田间试验中,双接种根瘤菌剂及解磷菌剂相较于单接种根瘤菌剂并没有进一步促进大豆结瘤,提高大豆产量。通过检测解磷菌剂的活菌数发现,解磷菌剂相比于根瘤菌剂活菌数低了一个数量级,加上田间环境的复杂性,使得解磷菌剂与根瘤菌剂双接种未能发挥相应的作用。后续可以通过优化解磷菌的发酵培养基以获得更高的活菌数,提高解磷菌剂配合根瘤菌剂的应用效果,同时对解磷菌的应用方式及与根瘤菌剂用量等相关条件进行深入研究。在速效磷较少的湖北土壤中单接种解磷菌剂的应用效果较好。这可能与湖北石首土壤中有有效磷含量

较低有关,解磷菌剂的加入能提高土壤中有效磷的含量,增强大豆对磷的吸收。因此,解磷菌剂在使用时应该注意结合当地土壤土质。此外,种植土壤中土著根瘤菌的数量也会影响到根瘤菌剂的使用效果^[23],因此,在含根瘤菌数量较少的河北土壤中接种根瘤菌剂,冀豆 17 和冀豆 12 的产量、结瘤数、根瘤鲜质量显著增加。

参考文献 References

- [1] 张志民,董文恒,田光吉,等.提高大豆蛋白质含量的途径与措施[J].中国种业,2017(3):22-23. ZHANG Z M, DONG W H, TIAN G J, et al. Method and measures to improve the protein content of soybean[J]. China seed industry, 2017(3):22-23(in Chinese).
- [2] 孙向东,兰静,任红波,等.黑龙江省大豆与进口大豆品质比较[J].黑龙江农业科学,2017(7):51-58. SUN X D, LAN J, REN H B, et al. Comparison on qualities between Heilongjiang Province soybeans and imported soybeans[J]. Heilongjiang agricultural sciences, 2017(7):51-58(in Chinese with English abstract).
- [3] 张秋磊,林敏,平淑珍.生物固氮及在可持续农业中的应用[J].生物技术通报,2008(2):1-4. ZHANG Q L, LIN M, PING S Z. Biological nitrogen fixation and its application in sustainable agriculture[J]. Biotechnology bulletin, 2008(2):1-4(in Chinese with English abstract).
- [4] SERVICE R F. Agbiotech, a growing threat down on the farm[J]. Science, 2007, 316(5828):1114-1117.
- [5] ALVES B, BODDEY R M, URQUIAGA S. The success of BNF in soybean in Brazil[J]. Plant and soil, 2003, 252(1):1-9.
- [6] PARK Y, MUN B, KANG S, et al. *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones [J/OL]. PLoS One, 2017, 12(3): e01732033 [2019-05-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5345817/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0173203.
- [7] KOZIEL M, GEBALA B, MARTYNIUK S. Response of soybean to seed inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and with mixed inoculants of *B. japonicum* and *Azotobacter chroococcum* [J]. Polish journal of microbiology, 2013, 62(4):457-460.
- [8] KLOPPER J W, LEONG J, TEINTZE M, et al. Enhanced plant-growth by siderophores reduced by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Nature, 1980, 286(5776):885-886.
- [9] 赵伟进,党赛,何建清. 2006—2016 年我国植物根际促生菌研究文献分析[J]. 安徽农学通报, 2018, 24(17):161-162. ZHAO W J, DANG S, HE J Q. Literature analysis of plant growth promoting rhizobacteria in China from 2006 to 2016[J]. Anhui agricultural science bulletin, 2018, 24(17):161-162(in Chinese with English abstract).
- [10] 麦靖雯,黎瑞君,张巨明.植物根际促生菌研究综述[J]. 现代农业科技, 2018(12):179-180. MAI J W, LI R J, ZHANG J M. Research summary on plant growth promoting rhizobacteria [J]. Modern agricultural science and technology, 2018(12):179-180(in Chinese with English abstract).
- [11] LOBO C B, JUÁREZ TOMÁS M S, VIRUEL E, et al. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies[J]. Microbiological research, 2019, 219:12-25.
- [12] GOSWAMI D, THAKKER J N, DHANDHUKIA P C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review[J/OL]. Cogent food & agriculture, 2016, 2(1):1127500 [2019-05-13]. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>.
- [13] 杜雷,王素萍,陈钢,等.一株高效解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2017(3):136-141. DU L, WANG S P, CHEN G, et al. Isolation and identification of efficient phosphate-solubilizing bacterial strain and its phosphate-solubilizing capacity[J]. Soil and fertilizer sciences in China, 2017(3):136-141(in Chinese with English abstract).
- [14] NYOKI D, NDAKIDEMI P A. Yield response of intercropped soybean and maize under rhizobia (*Bradyrhizobium japonicum*) inoculation and P and K fertilization[J]. Communications in soil science and plant analysis, 2018, 49(10):1168-1185.
- [15] 郜春花,卢朝东,张强.解磷菌剂对作物生长和土壤磷素的影响[J]. 水土保持学报, 2006, 20(4):54-56, 109. GAO C H, LU C D, ZHANG Q. Effects of phosphate liberation bacteria on crop growth and phosphate in soil[J]. Journal of soil and water conservation, 2006, 20(4):54-56, 109(in Chinese with English abstract).
- [16] PIROMYOU P, BURANABANYAT B, TANTASAWAT P, et al. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand[J]. European journal of soil biology, 2011, 47(1):44-54.
- [17] 陶涛,叶明,刘冬,等.无机解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力研究[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2011, 34(2):304-308. TAO T, YE M, LIU D, et al. On isolation and identification of inorganic phosphobacteria and its phosphate-solubilizing capacity[J]. Journal of Hefei University of Technology (natural science edition), 2011, 34(2):304-308(in Chinese with English abstract).
- [18] GLICKMANN E, DESSAUX Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied and environmental microbiology, 1995, 61(2):793-796.
- [19] 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 [J]. Soybean

- science, 2017, 36(3): 405-418 (in Chinese with English abstract).
- [20] LEGGETT M, GLEDDIE S, HOLLOWAY G. Phosphate-solubilizing microorganisms and their use[M]. Cham: Springer, 2001: 299-318.
- [21] 林燕青, 吴承祯, 洪伟, 等. 解磷菌的研究进展[J]. 武夷科学, 2015, 31(1): 161-169. LIN Y Q, WU C Z, HONG W, et al. Research progress of phosphate-solubilizing microorganisms[J]. Wuyi science journal, 2015, 31(1): 161-169 (in Chinese with English abstract).
- [22] MIRZA B S, MIRZA M S, BANO A, et al. Co-inoculation of chickpea with *Rhizobium* isolates from roots and nodules and phytohormone-producing *Enterobacter* strains[J]. Australian journal of experimental agriculture, 2007, 47(8): 1008-1015.
- [23] THILAKARATHNA M S, RAIZADA M N. A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions[J]. Soil biology and biochemistry, 2017, 105: 177-196.

Effects of co-inoculation of phosphate-solubilizing bacteria and rhizobium on symbiotic nitrogen fixation of soybean and *Astragalus sinensis*

HU Chang, LI Huiming, WU Hui, LIN Hui, LI Youguo

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Two phosphate solubilizing bacterial strains, PSB-1 and HZP1, were isolated from soybean nodules and rhizosphere soil. The ability of these two strains to produce IAA (indole-3-acetic acid IAA) and the ability to dissolve inorganic phosphorus were measured by Salkowski colorimetry and molybdenum antimony-phosphonium colorimetry. Soybean and *Astragalus sinensis* were co-inoculated. Results showed that both two phosphate solubilizing strain produced IAA. The legume growth-promoting effects of the phosphate solubilizing strains and rhizobium inoculum were investigated in unsterilized soil and soybean planting field. Inoculation with HZP1 or PSB-1 promoted the growth of *Astragalus sinensis* and soybean. Co-inoculation of phosphorus-solubilizing strains with rhizobium further increased the shoot biomass, fresh weight of nodules and the number of nodules of soybean and *Astragalus sinensis*. The results of field tests showed that inoculation with rhizobium or phosphate dissolving agents alone had a certain effect of increasing yield but double inoculation with rhizobium and phosphate dissolving bacteria did not increase the yield significantly.

Keywords phosphate solubilizing bacteria; rhizobium; *Glycine max*; *Astragalus sinensis*; symbiotic nitrogen fixation; co-inoculation

(责任编辑:张志钰)