

黎武元, 黄诗宸, 林会. 根瘤菌和丛枝菌根真菌单双接种对不同品系大豆生长的影响[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 140-149.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.016

根瘤菌和丛枝菌根真菌单双接种 对不同品系大豆生长的影响

黎武元, 黄诗宸, 林会

农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室/华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为探索丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhiza fungi, AMF)和大豆根瘤菌单双接种效果及其与不同品系大豆的匹配性,采用蛭石混土作为基质在光照培养室(26℃, 16h光照/8h暗期,相对湿度75%)进行盆栽试验,探究根瘤菌与AMF单接种和双接种对我国大部分区域种植的10种不同品系大豆生长的影响。结果显示,根瘤菌*Bradyrhizobium japonicum* USDA110和菌根真菌*Rhizophagus irregularis*均能侵染10种品系大豆植株,形成共生结构。单接种根瘤菌和菌根真菌均能显著提高大豆地上部鲜质量,其中单接种根瘤菌能使品系大豆119、851、921植株地上部鲜质量增加102%~429%,单接种菌根真菌也能使大部分品系大豆地上部鲜质量增加39%~255%。根瘤菌和菌根真菌双接种条件下,菌根真菌的侵染共生表现出共生定殖延迟的现象;菌根真菌存在时,品系大豆985、851、115根系的单个根瘤体积增大,固氮酶活性增强。因此,相同接种方式对不同品系大豆影响不同,相同品系大豆经过不同接种方式处理,长势存在差异;985、115品系大豆采用双接种方式最佳,167、509、921、187品系大豆采用单接种根瘤菌方式效果最佳,119、909、045则可采用单接种根瘤菌或菌根真菌来提升产量。

关键词 大豆; 根瘤菌; 丛枝菌根真菌; 接种方式; 匹配性

中图分类号 S565.1; S154.39 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0140-10

大豆(*Glycine max* L.)是世界上最重要的作物之一,在世界油料作物市场上占有巨大份额,是人类消费和饲料的重要蛋白质来源^[1]。大豆在我国分布极为广泛,各个地区适宜种植的品系各有不同。长时间的自然选择和人工培养使我国积累了异常丰富的大豆资源^[2]。随着人口不断增长与经济的持续发展,我国大豆的供应一直处于极其紧张的状态,因此,如何提高单位面积大豆产量成为解决国内大豆供求紧张的关键。

近几十年,化肥已成为我国提高作物产量以及改变土壤营养的主要手段,但过量施用化肥会导致土壤凝结成块,破坏土质和土壤微生物群落,对土质造成不可逆的危害。氮肥的使用会使土壤酸化,加剧 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等营养元素的流失,造成土壤营养匮乏^[3]。

为了寻求新的可持续的农业增产方式,世界上

多个国家相继开展根瘤菌菌剂的研究,并且多个大豆出口国均实现了根瘤菌剂的大面积使用^[4]。其中,美国大豆产量占全球总产量的32%,根瘤菌剂使用面积占总种植面积的45%;大豆出口大国巴西只使用根瘤菌剂,不施用氮肥,每年平均增产40%;阿根廷、印度等国根瘤菌剂使用面积也达到35%~45%^[5]。我国根瘤菌剂虽然研发起步早,菌剂种类多,但近几年根瘤菌剂接种面积仅占总种植面积的2%,与大豆高产国家相差甚远。这其中存在着许多原因:(1)豆科植物与根瘤菌共生具有专一性,大豆品系更新速度快,与新品系匹配性高的根瘤菌周期筛选长,导致新品系与老菌株匹配性差,大豆增产效果不明显;(2)土壤中含有大量固氮效率低下的土著根瘤菌,会与农用根瘤菌相互竞争结瘤,影响接种效果;(3)根瘤菌抗逆性差,高温、低温、干旱等环境胁迫容易造成菌剂存活率低、菌剂活性下降^[6]。

收稿日期: 2024-03-28

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFA0904704)

黎武元, E-mail: lwy13627058173@163.com

通信作者: 林会, E-mail: linhui@mail.hzau.edu.cn

我国缺乏高效的根瘤菌优良菌种资源,加之不同区域品系大豆所适用的根瘤菌菌株相差较大,严重限制了我国根瘤菌应用水平的提升和大豆行业生产力的发展。因此,挖掘更多根瘤菌资源,筛选出与各区域主流种植品系大豆匹配性好的优良菌株,既能提高与大豆的共生固氮效率,也能更加有选择性、针对性地使用大豆根瘤菌进行接种,提供更加合理的品系大豆与根瘤菌菌株的匹配方案,为我国大豆增产提供现实应用的依据和指导。

丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhiza fungi, AMF)是一种营专性寄生于宿主植物的球囊霉门真菌,能够与绝大多数的陆地植物共生形成菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)[7]。研究表明,在菌根共生过程中,宿主植物将合成的约20%碳水化合物提供给AMF,作为回报,AMF向宿主供给各种矿物质元素,尤其是磷。研究结果显示,AMF可为宿主植物提供70%~100%的磷源[8]。因此,AMF在可持续农业中拥有十分广阔的前景:首先,AMF可提高植物对土壤矿物质元素吸收,降低磷肥使用率,提高作物产量;其次,AMF的根外菌丝能够帮助作物提高抗干旱胁迫的能力,节约水资源;再者,AMF可增强植物抗病能力,降低重金属元素对作物的伤害[9]。研究表明,多种AMF混合菌剂能够促进根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)与大豆的共生作用,增强结瘤固氮,提高大豆根瘤数44.5%~189.7%,进而促进大豆生长发育[10];AMF *Glomous mosseae*还能显著改善冀豆6号品系大豆根系上的根瘤分布和侧根根瘤数量,增强固氮酶活性和对磷的吸收效率[11]。

因此,将AMF和根瘤菌混合应用于大豆生产,既能增强根瘤菌剂的使用效果,又能节省种植成本,提高大豆产量,对促进农业可持续发展具有重大意义。但是,目前AMF和根瘤菌在大豆生产上的有效应用仍然存在许多需要解决的问题。例如AMF的侵染率在不同作物和不同菌种间存在较大差异,共生效率的差异也直接影响到AMF对宿主的促生效应[12]。此外,AMF和根瘤菌之间的相互作用、接种条件以及与品系大豆的匹配性等均能够显著影响到菌剂的使用效果[13],而目前的研究大多集中在根瘤菌与大豆的匹配性研究[14],对AMF和根瘤菌双共生与大豆的匹配性研究却并不多见,尤其对于AMF和根瘤菌菌剂与我国主要种植的大豆品系的匹配性研究更少。

为探究AMF *Rhizophagus irregularis*和大豆根

瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum* USDA110)双接种效果及其与不同品系大豆的匹配性,本研究选取大豆根瘤菌和AMF与不同区域的1个种品系大豆进行单、双接种试验,通过测定共生效应及大豆生长相关指标,研究2种共生菌对不同区域品系大豆生长发育的影响,筛选出匹配性良好的组合,以期为不同地域品系大豆使用相应高效的共生菌菌剂接种提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

根据前期研究基础,选择最佳基质组合($V_{\text{蛭石}}:V_{\text{土}}=4:1$)[15]培养大豆,基质来源于华中农业大学试验田,其中有机质为5.83 g/kg,总氮为1.45 g/kg,总磷为6.32 g/kg,有效磷为15.56 mg/kg,有效钾为123.74 mg/kg。本研究所用的10个大豆品种的基本信息列于表1(其中的数字为品系缩写),供试大豆品种为我国不同地域的主栽品种,由河南大学生命科学学院王学路教授提供。

供试AMF(*Rhizophagus irregularis*)接种剂和大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum* USDA110)均由华中农业大学农业微生物资源发掘与利用国家重点实验室保存(下文丛枝菌根真菌用AMF表示,大豆根瘤菌用Rh表示)。该接种剂包含AM真菌的孢子、菌丝、真菌侵染的根段以及根际土壤,每5 g接种剂约含有30个发育良好的孢子。

1.2 大豆盆栽试验设计

采集华中农业大学棉花试验田土壤,干燥后过2 mm筛,与蛭石按照 $V_{\text{蛭石}}:V_{\text{土}}=4:1$ 的比例混匀装袋,间歇灭菌3次后备用。采用直径为20 cm、深度为16 cm的塑料花盆灭菌备用。

10个品系大豆均设计4个处理组:(1)单接种AMF *R. irregularis*(+AMF),按照10%接种比例与灭好菌的土、蛭石混合物混匀并分装至花盆中;(2)单接种大豆根瘤菌 *B. japonicum* USDA110(+Rh);(3)双接种AMF和根瘤菌(+AMF+Rh);(4)不接种处理(空白对照):单接种根瘤菌空白对照CK1、单接种AMF空白对照CK2、双接种空白对照CK3。每种处理均含3个重复。使用营养液浇透土壤,并将灭好菌的大豆种子埋入基质(1~2 cm深即可)中,每盆埋2粒,7 d后间苗,留下长势一致的大豆苗(每盆1株);在根瘤菌处理组中,每株幼苗在间苗后第2天接种1 mL($OD_{600}=0.2$)的 *B. japonicum* USDA110 菌

表1 供试大豆信息
Table 1 Information of tested soybean

品系 Lines	种植区域 Planting area	适宜种植时间 Suitable planting time
BX10(985)	巴西 Brazil	5月下旬 Late May
Williams 82(851)	美国 America	5月下旬 Late May
冀豆 17(115) Jidou 17	河北 Heibei	6月上旬 Early June
天隆1号(167) Tianlongyihao	湖北 Hubei	5月下旬 Late May
晋豆 40(119) Jindou 40	山西 Shanxi	5月上旬 Early May
小黑豆(909) Xiaoheidou	陕西定边 Dingbian, Shaanxi	4月中旬 Mid April
六月先(045) Liuyuexian	安徽宣城 Xuancheng, Anhui	6月上旬 Early June
东农 50(509) Dongnong 50	黑龙江 Heilongjiang	5月上旬 Early May
小白毛(921) Xiaobaimao	四川郫县 Pixian County, Sichuan	4月下旬 Late April
BD2(187)	广东 Guangdong	3月下旬 Late March

液,并浇灌营养液,之后每隔3 d补充1次营养液,每盆每次1.5 L。将大豆置于光照培养室(26 °C, 16 h光照/8 h暗期,相对湿度75%)生长。

由于丛枝菌根真菌和根瘤菌对大豆根系的侵染共生分别受到土壤环境中的磷和氮浓度的影响,一般采用低磷营养液用于丛枝菌根共生盆栽,低氮营养液用于根瘤菌共生盆栽。单接种根瘤组的营养液组成为0.68 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.48 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.70 mmol/L KH_2PO_4 、0.40 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、5 mg/L 柠檬酸铁、1.0 mL Gibson微量元素;单接种AMF组的营养液组成将单接种根瘤组营养液中的 KH_2PO_4 浓度减至0.005 mmol/L,并加上0.4 mmol/L Na_2SO_4 、0.7 mmol/L KCl 、0.6 g/L NH_4NO_3 ;双接种组的营养液是将单接种AMF组的营养液中0.6 g/L NH_4NO_3 替换成0.005 mmol/L KNO_3 ;空白对照组的营养液与对应接种组一致。

1.3 样品收获与测定

在大豆苗生长至28 d进行植株的生长势比较和地上、地下部鲜质量测定。

对接种AMF的大豆植株采用墨水染色法^[16]和放大网格交叉法^[17]进行菌根共生结构观察,统计大豆菌根各类真菌共生指标,包括根内菌丝、丛枝、泡囊等共生结构形成比例和丰度。

对接种根瘤菌*B. japonicum* USDA110的大豆植株进行固氮酶活性测定以及根瘤数、根瘤质量的统计。根瘤的固氮酶活性测定采用乙炔还原法方法并使用气相色谱仪测定^[18],在测完固氮酶活性后,马上取出PA瓶中的根瘤,统计根瘤数和根瘤鲜质量。

1.4 数据统计分析

采用SPSS(v25.0)统计软件对大豆植株的生物量、大豆根瘤数、根瘤质量、固氮酶活性以及真菌侵染率、丛枝、根内菌丝和泡囊等共生指标进行单因子方差分析,采用Duncan's法进行显著性检验,采用GraphPad Prism软件制作图表。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌接种不同品系大豆的共生表型

根瘤菌接种试验结果显示,*B. japonicum* USDA110能与所有品系大豆共生并正常结瘤(图1)。在单接种根瘤菌组中,几乎所有大豆根瘤数都在150以上(图1A),其中509、187品系根瘤数最多,分别达到244.8、255.6,与其他品系根瘤数存在显著差异,909品系根瘤数最低,只有60。在双接种组中,其他品系大豆根瘤数都在90以上,187品系达到174.3,909品系瘤数最少,只有42.3。

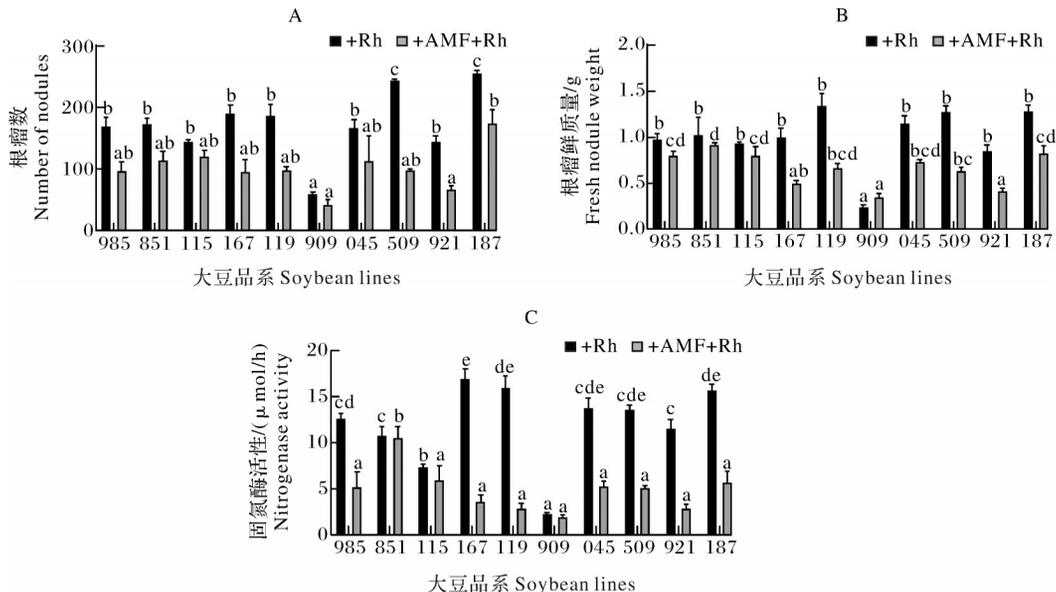
在单接种根瘤菌组中,绝大部分品系大豆的平均根瘤质量都在0.86 g以上,909品系的根瘤质量显著低于其他大豆根瘤质量(图1B)。在双接种组中,909、921这2个品系根瘤质量较低,其他品系大豆平均根瘤质量均高于0.5 g,909品系根瘤质量略有上升,985、851、115品系根瘤质量无显著变化,其余品系根瘤质量均有所下降。

固氮酶活性是衡量植株固氮能力的重要参数。由图1C可见,每个试验组根瘤都具有固氮活性,即所有根瘤都为有效根瘤,但不同接种方式对相同品系大豆根瘤固氮酶活性有不同程度影响,同一种接种方式对不同品系大豆也有不同程度影响。在单接

种根瘤菌组中,几乎所有品系大豆的固氮酶活性都超过 $7 \mu\text{mol/h}$,其中 167、119 中更是达到 $16 \mu\text{mol/h}$ 以上。在双接种组中,985、851、115 品系中固氮酶活性同样保持在 $10 \mu\text{mol/h}$ 以上,其他品系大豆中则出现一定水平的下降。

结合根瘤数、根瘤质量和固氮酶活性等数据可知,985、115、851 这 3 个品系大豆在双接种方式中的根瘤数虽然只有单接种根瘤菌方式的 60% 左右,但

是双接种的平均根瘤质量却达到单接种方式的 82% 以上,并且 985、115 品系大豆平均固氮酶活性显著升高。因此,在 2 种接种方式中根瘤质量、根瘤数以及固氮酶活性并不呈正相关,反而在双接种方式中根瘤质量更大、固氮酶活性更高。进一步表明,相比单接种根瘤菌方式,AMF 与根瘤菌的双接种能促进根瘤菌与这 3 种品系大豆的根系共生结瘤,提高单位水平根瘤质量和固氮酶活性,具有更强的固氮能力。



A:根瘤数;B:根瘤鲜质量;C:根瘤固氮酶活性;统计数据均为3个重复的平均值±均方差,柱子上数据不同字母表示在0.05水平差异显著。下同。A: Number of nodules; B: Fresh nodule weight; C: Nitrogenase activity. Data are the average \pm mean square deviation of 3 replicates. Different letters in the same column indicate that the difference is significant at level of 0.05. The same as below.

图1 不同接种方式大豆根瘤生物量

Fig. 1 Root nodule biomass of soybean under different inoculation methods

2.2 AMF接种不同品系大豆的共生表型

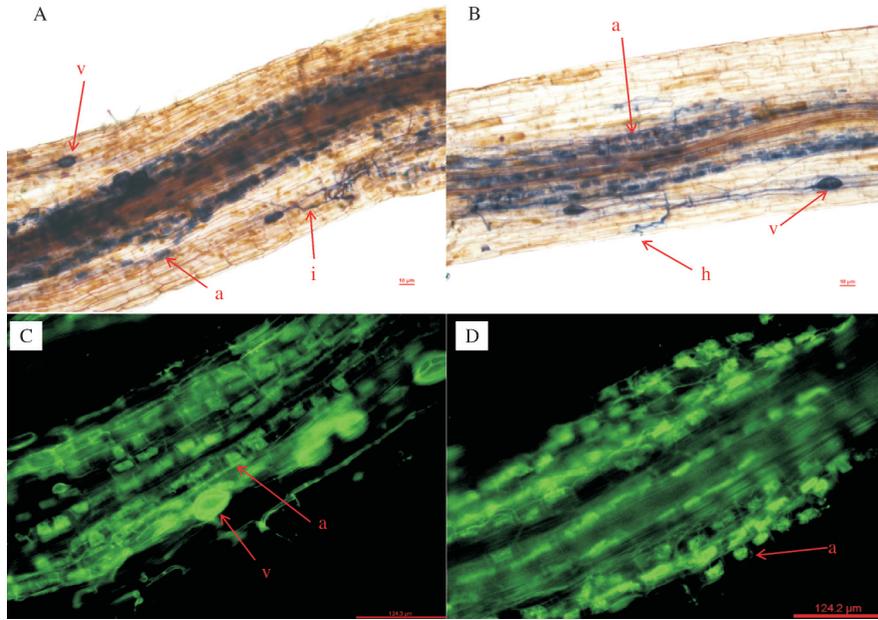
菌根染色结果显示,AMF能够侵染10个品系大豆,均能形成根内菌丝、饱满的丛枝以及泡囊结构(图2),表明*R. irregularis*与10个品系大豆均能形成良好的共生关系。单接种AMF时各品系大豆侵染率均能达到88%以上,其中115品系大豆的侵染率达到95%;双接种时各品系大豆的侵染率也在73%以上,其中985品系侵染率达到83%,比单接种时略有下降(图3A)。丛枝是菌根重要的共生结构,是宿主植物与AMF营养交换场所,丛枝丰度代表着宿主植物与真菌间关系的“亲密”程度。结果显示,单接种AMF组丛枝丰度均无显著性差异,均在11%~25%;双接种组内,除187、909、045、167丛枝丰度在20%以下,其他所有品系大豆丛枝丰度都在20%以上(图3B)。与单接种AMF相比,851、115、119、045、921品系大豆的丛枝丰度在双接种组中有一定

程度的上升,这显示该5种品系大豆受到双接种模式正向影响,其他品系的丛枝丰度均无差异。单接种AMF时各个品系大豆菌根内菌丝与泡囊的形成比例均显著高于双接种组(图3C、D)。

分析各品系大豆菌根共生指标,与单接种AMF相比,虽然双接种时多数品系大豆的根内菌丝和泡囊丰度显著下降,但是侵染率下降并不显著,而且双接种时851、115、119、045、921品系大豆菌根中的丛枝丰度还有一定程度的上升,说明根瘤菌和AMF的双接种可增强AMF在这些品系大豆中的共生效率,表明AMF与根瘤菌的双接种模式在一些品系大豆中具有更适配性。

2.3 根瘤菌与AMF的单双接种对大豆植株生长的影响

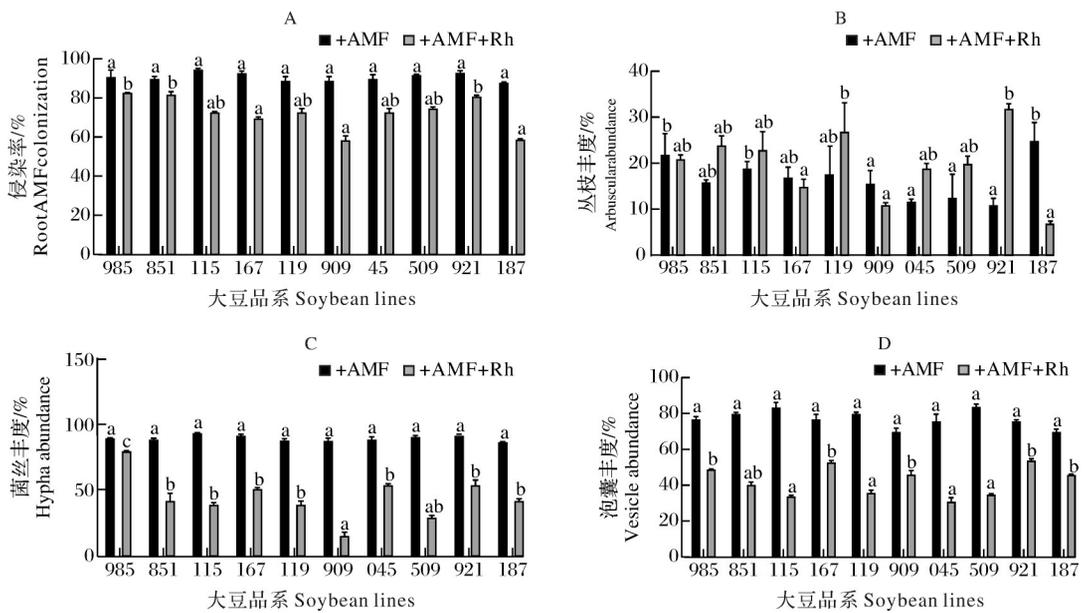
观察不同接种方式的品系大豆植株长势,大部分植物地上部分长势良好(图4)。同一地域不同品



A、B:Parke墨水染色;C、D:WGA488染色;图中红色箭头指向AM真菌在大豆根部的结构,其中,a:丛枝;h:附着胞;i:根内菌丝;v:泡囊。A、B: Parker ink staining; C、D: WGA488 staining. The red arrow in the picture points to the structure of AM fungi at the root of soybean.a: Arbuscule; h: Hyphopodium; i: Internal hypha; v: Vesicle.

图2 菌根共生结构染色观察

Fig.2 Staining map of mycorrhizal symbiotic structures



A: 侵染率;B:丛枝丰度;C:菌丝丰度;D:泡囊丰度。A: Root AMF colonization; B: Arbuscule abundance; C: Hyphe abundance; D: Vesicle abundance. Data statistics are the average \pm mean square deviation of 3 replicates.

图3 不同接种方式下AMF共生表型统计

Fig.3 Symbiotic phenotypes of AM fungi inoculated in different ways

系大豆采用相同接种方式的植株长势有差异,同一品系大豆采用不同接种方式长势也有差异。例如,同为长江流域的167品系大豆在单接种根瘤菌后长势较差,但在单接种AMF和双接种条件下长势明显

增强;909品系单接种根瘤菌和双接种的情况下长势较差,但是采用单接种AMF时长势有一定的增强;119品系在单接种AMF的条件下具有较好的长势,而在其他条件下长势一般。

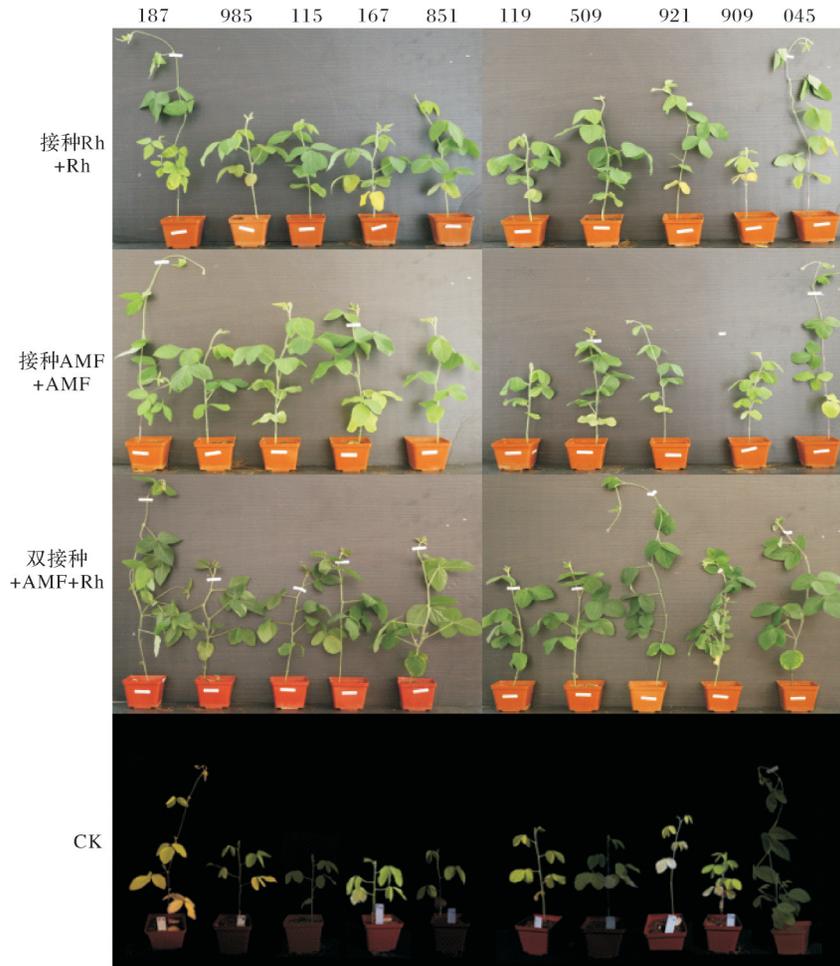


图4 不同接种方式下10个品系大豆植株长势

Fig.4 Growth vigor of 10 soybean lines inoculated with different inoculums

根瘤菌与AMF的单双接种方式下地上部鲜质量统计结果(表2)显示,与不接种空白对照组相比,所有单接种根瘤菌组的大豆地上部鲜质量均有不同程度增加,其中851、921品系大豆相对增量最高,分别增加322%和429%,其余品系的大豆地上部鲜质量的增量也保持在53%~102%;而单接种AMF的大部分品系大豆的地上部鲜质量都有不同程度的上升,其中851、921品系大豆相对增量最高,分别增加125%和255%,985、167、119、909、045品系的增量也在100%~150%,而其余品系则略有下降。双接种试验组中,只有985、851、115、119品系大豆有相对增加,其中985、115品系大豆相对增量最高,分别为130%和110%,其他品系大豆地上部鲜质量下降。

对根瘤菌与AMF的单双接种方式结果进行比较分析可知,985、851、119品系的地上部鲜质量在3个接种方式中都有提高,115品系的地上部鲜质量则在双接种和单接种根瘤菌的方式中有显著提升,167、509、187品系的地上部鲜质量只在单接种根瘤菌中

有所提升,另外2种接种方式对它们没有影响。909、045、921品系地上部鲜质量在双接种中略有下降,在其他2种单接种方式中都有提高。

由表3可见,与空白对照组相比,851品系地下部鲜质量在3个接种方式中均显著提高;985、119品系地下部鲜质量在单接种AMF和双接种方式中显著提高,在单接种根瘤菌组中无显著变化;045、921品系在2种单接种方式中地下部鲜质量显著提高而双接种方式则无明显变化;167品系地下部鲜质量只在单接种方式中显著上升,509品系只在单接种AMF方式中显著上升,而其余品系大豆的地下部鲜质量在3种方式中没有增加反而减少。

由此可见,不同接种方式与不同品系大豆匹配性存在较大差异。从品系匹配性方面来看,985、851、119品系使用3个接种方式都能增加地上部鲜质量和地下部鲜质量,即这三者与根瘤菌和AMF的匹配性较好,其中985、115品系采用双接种方式地上部和地下部鲜质量增加效果最佳。长江流域地区大豆

表2 不同接种方式下大豆地上部鲜质量

Table 2 Fresh weight of soybean above-ground parts with different inoculums g/plant

品系 Lines	接种 Rh Inoculation of Rh		接种 AMF Inoculation of AMF		双接种 Co-inoculation	
	CK1	+Rh	CK2	+AMF	CK3	+AMF+Rh
985	6.10±2.19abc	9.64±1.57b	4.14±1.16ab	5.68±0.43c	4.55±0.70e	10.13±0.44a
851	3.03±0.89bce	11.54±2.83ab	4.20±1.62ab	8.53±0.86ab	8.70±1.30abcde	11.39±0.17a
115	5.10±0.90abce	9.88±0.83b	5.95±1.36ab	5.17±0.15c	5.40±1.70de	10.76±1.50a
167	7.42±1.14a	12.64±3.06ab	5.97±2.57ab	5.96±0.84c	9.41±0.59abcd	7.53±0.40b
119	8.60±1.20a	17.52±3.65a	5.13±0.74ab	8.44±0.91ab	7.85±1.67bede	10.58±0.88a
909	2.64±1.73ce	3.12±1.16c	5.04±2.05ab	6.32±0.85c	6.61±2.15de	4.80±1.05c
045	6.90±1.30ab	11.22±0.89b	6.82±0.40a	10.03±0.20a	11.31±1.79ab	10.36±0.28a
509	8.20±1.21a	12.54±2.09ab	6.88±1.19a	6.62±0.51bc	12.41±1.60a	10.22±0.24a
921	1.68±0.93e	7.46±1.23bc	1.90±0.37b	6.62±0.78bc	6.96±1.60cde	7.06±0.50bc
187	7.16±2.35ab	11.12±2.04b	6.66±1.52a	5.44±0.97c	11.07±0.72abc	10.17±1.17a

注:同列数据不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$),下同。Note: Different letters in the same column of data indicate that the difference is significant between the treatments($P<0.05$).The same as below.

表3 不同接种方式下大豆地下部鲜质量

Table 3 Fresh weight of soybean underground parts with different inoculums g/plant

品系 Lines	接种 Rh Inoculation of Rh		接种 AMF Inoculation of AMF		双接种 Co-inoculation	
	CK1	+Rh	CK2	+AMF	CK3	+AMF+Rh
985	11.70±2.50abcd	10.32±2.32bcd	7.80±1.58ab	11.94±0.70ab	6.46±1.49a	12.41±0.19a
851	6.23±1.43cde	10.28±2.43bcd	7.70±3.12ab	13.00±1.64ab	9.93±1.70a	12.75±1.42a
115	11.40±1.60bcd	10.18±1.11bcd	10.18±2.51a	7.26±0.71c	8.76±3.13a	10.60±0.05ab
167	12.38±2.67abcd	14.24±2.12ab	9.00±4.52ab	7.27±0.56c	8.06±1.24a	7.56±0.77c
119	18.72±3.55a	17.94±2.79a	8.73±0.47ab	12.24±1.39ab	9.91±0.97a	10.58±0.45ab
909	5.18±3.45de	5.58±1.53d	8.08±2.68ab	10.05±0.95bc	7.65±2.33a	4.62±1.09d
045	9.28±0.96bcde	12.72±2.85abc	8.20±0.83ab	13.67±1.02a	8.75±2.92a	8.69±0.77bc
509	13.60±1.37ab	11.60±1.47bc	8.53±0.95ab	12.27±1.09ab	10.52±1.69a	10.20±0.71ab
921	3.80±2.09e	7.24±1.23cd	2.77±0.33b	8.01±1.14c	7.65±1.38a	6.87±1.17cd
187	12.58±3.55abc	8.52±0.95bcd	7.74±0.83ab	7.62±1.07c	9.83±1.17a	8.43±1.18bc

品系167、东北区品系大豆509、华南区品系大豆921、东南区大豆187单接种根瘤菌时地上部鲜质量均提高50%以上,这些品系单接种根瘤菌时效果最佳。119、909、045则在采用单接种根瘤菌或菌根真菌时,地上、地下部分鲜质量均有明显提升。

3 讨论

豆科植物的根际在长期的进化过程中形成了根瘤菌-豆科植物-AMF的共生关系^[19]。三者的共生体系已成为自然界中一种普遍的现象,在自然生态系统和生产应用中发挥着重要的作用^[20]。利用根瘤菌、菌根真菌与大豆的共生改善大豆的氮磷营养,促进大豆生长,提高产量是发展大豆生产的有效途径。

本研究发现我国不同地域种植的10个品系大豆都能较好地与大豆根瘤菌*B. japonicum* USDA110结瘤固氮,但是不同品系大豆在根瘤菌单接种及根瘤菌、菌根真菌双接种时,形成根瘤的生物量出现了较

大差异。研究表明,大豆能够通过调控根系的发育来形成更具适应性的根构型从而提高自身的养分吸收能力^[21]。大豆的浅根型具有更加优越的空间分布特点,对于氮磷的吸收有显著的优势,浅根型植株在与根瘤菌共生过程中,比深根型具有更强结瘤效果^[22];根瘤菌也能够显著影响大豆的根构型,使其更加趋向浅根型的变化,增加养分吸收效果^[23];同时也有研究表明,AMF能够促进根瘤菌在大豆侧根的生瘤生物量和固氮酶活性^[11]。因此,推测在985、851等品系中,根瘤菌能够通过改变大豆的根构型,使其更加趋向浅根型。同时AMF对磷元素的吸收能促进根瘤菌的共生,增强氮元素的吸收利用,使得双接种方式中大豆根系的单位区域上根瘤的体积大小和固氮酶活性远高于单接种方式。

菌根侵染结果显示,这10个品系大豆均能够与AMF共生,但是单接种AMF组共生指标显著高于双接种组;双接种各品系大豆根系中的AMF定殖率

较低,此时菌根真菌与大豆只进行到共生中期,表现为“延迟定殖”;而单接种组内菌根真菌与大豆已进行至共生后期,丛枝开始退化,储存营养的泡囊数量更多。这与Xie等^[24]的研究中AMF与根瘤菌的双接种共生效应比单接种AMF更强的结果有差异,可能是由于所接物种或者接种方式的不同所导致。此外,根瘤菌和AMF在与植物共生过程中均需要获取碳素营养,两者会存在竞争关系^[25]。因此,推测在双接种组中植物无法提供给2种内生菌足够的能量,根瘤菌与AMF竞争大豆提供的光合作用产物,从而导致双接种组中菌根定殖率显著降低。丁效东等^[11]研究表明双接种的大豆在接种后56 d侵染率最高(80%以上)。这表明AMF在大豆共生时期作用效果不同,可能在大豆开花期(接种后56 d)的作用比三叶期(接种后28 d)更加明显。

根瘤菌与菌根真菌都能在共生过程中为大豆生长发育提供一定的氮磷养分,能够显著提升大豆地上部生物量。大豆地上部鲜质量能够直观地反映其生长状态,本研究结果显示,单接种根瘤菌均能显著提高10个品系大豆的地上鲜质量,单接种AMF能提高大多数品系大豆地上部与地下部鲜质量,皆源于2种共生菌的共生作用。然而,在根瘤菌和AMF双接种情况下,除了985、851品系(引自国外)和国内115、119品系地上部与地下部鲜质量显著提高,其余品系均无明显作用。表明在三叶期(28 d),植物光合作用产物的不足导致2种共生菌的竞争性强于协作性,进而使此时期大豆地上部鲜质量的增加有限。本研究中不同品系大豆与2种共生菌的共生效果在不同时期有所不同。在三叶期(28 d),985、851品系(引自国外)在2种共生菌的协同作用下地上部鲜质量明显提高,而其他品系大豆可能要等到开花期(56 d)2种共生菌的作用效果才会显现。同时,AMF在共生过程中不仅对宿主植物有着营养元素的支持,也在植物抗病虫害和提高植物抗逆性等方面发挥作用。这些作用并不会体现在地上部鲜质量的变化中,而是表现在植物防御系统的增强、土壤根系分泌物的浓度变化调控等方面^[26],为植物生长提供更有利的条件。另一方面,除了接种方式之外,接种时间、菌种接种次序都有可能影响双接种效果。大部分双接种采用在大豆播种前同时接入根瘤菌和AMF的方法,也有先接入AMF再于发芽期接入根瘤菌或先接入根瘤菌之后再接入AMF的方法。而本研究采用的是先接入AMF之后再接入根瘤菌的接种次序,

这可能就是在双接种方式中,一些国外品系大豆的地上部鲜质量的增量远远高于国内大多数品系大豆的原因。另外,不同根瘤菌与AMF的匹配性不同所产生的效果也不尽相同。有研究表明,不匹配的AMF不但会削弱根瘤菌给植物生长发育所产生的效果^[27],还可能增加无效根瘤菌的生长^[28]。本研究中大部分国内品系大豆的双接种组出现了类似现象。

综上,根瘤菌、AMF与大豆间涉及复杂的多重共生关系,根瘤菌和AMF双接种能够显著提高大豆植株固氮酶活性和生长性状。本研究中根瘤菌与菌根真菌的双接种模式下不同品系大豆的地上部鲜质量、根瘤数、瘤质量、固氮酶活性及菌根共生侵染程度表现不一,尤其是大多数国内品系大豆与2种共生菌的匹配性不佳。因此,为进一步探寻广匹配性根瘤菌和AMF双接种方式与不同区域品系大豆的最优组合,需要在2类菌种的接种次序、接种时间、接种剂量以及匹配性等方面进行更深入的研究,以期在根瘤菌、AMF与大豆中筛选出能够促进大豆增产的优良组合应用于大豆产业。

参考文献 References

- [1] 周冠华,刘冬竹,曹智,等.新形势下增加大豆进口来源保障油料供给研究[J].中国粮食经济,2020(4):69-71.ZHOU G H, LIU D Z, CAO Z, et al. Study on increasing soybean import sources to ensure oil supply under the new situation[J]. China grain economy, 2020(4):69-71 (in Chinese).
- [2] 刘学勤.世界大豆地域分化、遗传解析及演化关系的研究[D].南京:南京农业大学,2015.LIU X Q. A Study on geographic differentiation, genetic dissection and phylogenetic relationship of the world soybean[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [3] 陆宇燕,李丕鹏.氮肥污染的危害[J].沈阳师范大学学报(自然科学版),2014,32(1):1-5.LU Y Y, LI P P. Effects of application of nitrogen fertilizer on pollutions [J]. Journal of Shenyang Normal University (natural science edition), 2014, 32(1):1-5 (in Chinese with English abstract).
- [4] 徐传瑞.高效固氮大豆根瘤菌的筛选和鉴定[D].武汉:华中农业大学,2004.XU C R. Screening and identification of highly efficient soybean rhizobia [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2004 (in Chinese with English abstract).
- [5] 管凤贞,邱宏端,陈济琛,等.根瘤菌菌剂的研究与开发现状[J].生态学杂志,2012,31(3):755-759.GUAN F Z, QIU H D, CHEN J C, et al. *Rhizobium* inoculants: research progress and development status [J]. Chinese journal of ecology, 2012, 31(3):755-759 (in Chinese with English abstract).

- [6] 王艳霞,解志红.根瘤菌诱变育种在根瘤菌-豆科植物共生体系中的研究进展[J].生物技术进展,2019,9(2):101-107. WANG Y X, XIE Z H. Advances on *Rhizobium* mutagenesis in *Rhizobium*-legume symbiosis system [J]. Current biotechnology, 2019, 9 (2) : 101-107 (in Chinese with English abstract).
- [7] BIDARTONDO M I, READ D J, TRAPPE J M, et al. The dawn of symbiosis between plants and fungi [J]. Biology letters, 2011, 7(4): 574-577.
- [8] GOMEZ-ROLDAN V, FERMAS S, BREWER P B, et al. Strigolactone inhibition of shoot branching [J]. Nature, 2008, 455(7210): 189-194.
- [9] NOGALES A, ROTTIER E, CAMPOS C, et al. The effects of field inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi through rye donor plants on grapevine performance and soil properties [J/OL]. Agriculture, ecosystems & environment, 2021, 313: 107369 [2023-05-03]. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107369>.
- [10] 刘云龙.丛枝菌根真菌对大豆生长及N₂O排放的影响及其机制[D].北京:中国农业科学院,2021. LIU Y L. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on soybean growth and N₂O emissions [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [11] 丁效东,张林,李淑仪,等.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[J].植物营养与肥料学报,2012,18(3):662-669. DING X D, ZHANG L, LI S Y, et al. Effects of inoculations of *Glomus mosseae* and/or *Bradyrhizobium japonicum* on formation and distribution of nodules and phosphorus uptake of soybean [J]. Plant nutrition and fertilizer science, 2012, 18 (3) : 662-669 (in Chinese with English abstract).
- [12] 杨国玲,邓璐璐,陈康,等.低磷条件下接种丛枝菌根真菌对大豆生长和磷吸收的影响[J].华南农业大学学报,2021,42(4):42-50. YANG G L, DENG L L, CHEN K, et al. Effects of inoculating arbuscular mycorrhizal fungi on growth and phosphorus uptake of soybean under low phosphorus conditions [J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(4): 42-50 (in Chinese with English abstract).
- [13] PIVATO B, OFFRE P, MARCHELLI S, et al. Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant [J]. Mycorrhiza, 2009, 19(2): 81-90.
- [14] 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 (in Chinese with English abstract).
- [15] 谢丽萍,黄诗宸,许张珂,等.大豆与丛枝菌根真菌共生建立及菌根检测方法的探究[J].华中农业大学学报,2021,40(2):148-155. XIE L P, HUANG S C, XU Z K, et al. Establishment of symbiosis between soybean and arbuscular mycorrhizal fungi and exploration of mycorrhizal detection methods [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40 (2): 148-155 (in Chinese with English abstract).
- [16] 覃晓娟,陈廷速,李冬萍,等.香蕉根系丛枝菌根(AM)真菌染色方法比较[J].基因组学与应用生物学,2017,36(6):2447-2451. QIN X J, CHEN T S, LI D P, et al. Comparison of staining methods on arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in banana roots [J]. Genomics and applied biology, 2017, 36(6): 2447-2451 (in Chinese with English abstract).
- [17] MCGONIGLE T P, MILLER M H, EVANS D G, et al. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi [J]. New phytologist, 1990, 115(3): 495-501.
- [18] HARDY R W, HOLSTEN R D, JACKSON E K, et al. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation [J]. Plant physiology, 1968, 43(8): 1185-1207.
- [19] 赵忠,王真辉.菌根真菌与根际微生物间的关系及其对宿主植物的影响[J].西北林学院学报,2001,16(1):70-75. ZHAO Z, WANG Z H. The relationships between mycorrhizal fungi and microbe of rhizosphere and their influences on host plant [J]. Journal of Northwest Forestry College, 2001, 16(1): 70-75 (in Chinese with English abstract).
- [20] BIRÓ B, KÖVES-PÉCHY K, VÖRÖS I, et al. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions [J]. Applied soil ecology, 2000, 15(2): 159-168.
- [21] 刘灵,廖红,王秀荣,等.不同根构型大豆对低磷的适应性变化及其与磷效率的关系[J].中国农业科学,2008,41(4):1089-1099. LIU L, LIAO H, WANG X R, et al. Adaptive changes of soybean genotypes with different root architectures to low phosphorus availability as related to phosphorus efficiency [J]. Scientia agricultura sinica, 2008, 41(4): 1089-1099 (in Chinese with English abstract).
- [22] 贺莹. GmCRN1在大豆根构型建成和结瘤中的功能研究[D].福州:福建农林大学,2020. HE Y. Functional analysis of GmCRN1 in root architecture modification and nodulation of soybean [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [23] 曹爱琴,严小龙.不同供磷条件下大豆根构型的适应性变化[J].华南农业大学学报,2001,22(1):92. CAO A Q, YAN X L. Adaptation of soybean root architecture under different P conditions [J]. Journal of South China Agricultural University, 2001, 22(1): 92 (in Chinese).
- [24] XIE M M, CHEN S M, ZOU Y N, et al. Effects of *Rhizophagus intraradices* and *Rhizobium trifolii* on growth and N assimilation of white clover [J]. Plant growth regulation, 2021, 93

- (3):311-318.
- [25] 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(386):1481-1487.
- [26] JUNG S C, MARTINEZ-MEDINA A, et al. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses [J]. *Journal of chemical ecology*. 2012, 38(6):651-664.
- [27] SHOCKLEY F W, MCGRAW R L, GARRETT H E. Growth and nutrient concentration of two native forage legumes inoculated with *Rhizobium* and *Mycorrhiza* in Missouri, USA [J]. *Agroforestry systems*, 2004, 60(2):137-142.
- [28] VALDENEGRO M, BAREA J M, AZCÓN R. Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for re-vegetation and biological reactivation in a semi-arid Mediterranean Area [J]. *Plant growth regulation*, 2001, 34(2):233-240.

Effects of single or co-inoculation of rhizobium and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of different lines of soybean

LI Wuyuan, HUANG Shichen, LIN Hui

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

Abstract A pot culture method with vermiculite mixed soil as substrate under greenhouse conditions was used to study the effects of single or double inoculation of rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of 10 soybean lines planted in most regions of China to investigate the dual inoculation effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and soybean rhizobia and their matching with different soybean lines. The results showed that both rhizobium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 and mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* infected 10 lines of soybean plants, forming a symbiotic structure. Single inoculation of rhizobia or mycorrhizal fungi significantly increased the aboveground fresh weight of soybean. Among them, single inoculation of rhizobia increased the aboveground fresh weight of soybean line 119, 851, and 921 by 102% to 429%, and single inoculation of mycorrhizal fungi increased the aboveground fresh weight of most soybean lines by 39% to 255%. The symbiotic colonization of mycorrhizal fungi showed a delayed phenomenon under the dual inoculation conditions of rhizobia and mycorrhizal fungi. The single nodule volume of soybean line 985, 851, and 115 increased, and the nitrogenase activity was enhanced when mycorrhizal fungi were present. Therefore, the same inoculation method had different effects on different lines of soybeans, and the same line of soybeans had differences in growth after being treated with different inoculation methods. Soybean line 985 and 115 had the best effect with dual inoculation method, soybean line 167, 509, 921, and 187 had the best effect with single inoculation method, while single inoculation of rhizobia or mycorrhizal fungi in soybean line 119, 909, and 045 can be used to increase yield.

Keywords soybean; rhizobium; arbuscular mycorrhizal fungi; inoculation mode; matching

(责任编辑:张志钰)