

潘亭亭,王 乐,姚红丽,等. 豌豆根瘤菌高效菌株的筛选[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):119–121.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.029

豌豆根瘤菌高效菌株的筛选

潘亭亭¹,王 乐¹,姚红丽¹,刘忠宽²,曹卫东³,刘朋飞¹,刘晓云¹

(1. 河北大学生命科学学院/河北省微生物多样性研究与应用重点实验室,河北保定 071002;

2. 河北省农林科学院农业资源环境研究所,河北石家庄 050051; 3. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所,北京 100081)

摘要:通过 18 株根瘤菌菌株的豌豆接种筛选试验,对植株干质量、结瘤数、株高以及开花结荚数等生长性状指标进行比较分析,发现菌株 Hbu610006、Hbu610015 的植株干质量相比空白对照分别增产 82.35%、79.41%,根瘤数分别比对照增加 67.43%、231.20%,其株高与对照相比,分别提高 15.02%、13.75%。此外,菌株 Hbu610006、Hbu610015 的开花结荚情况也较其他菌株表现突出。因此,筛选出 Hbu610006、Hbu610015 这 2 株能与花叶豌豆高效结瘤固氮的菌株。

关键词:花叶豌豆;根瘤菌;固氮;干质量;高效

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)11-0119-03

豌豆(*Pisum sativum* L.)多为一年生或多年生的攀缘或矮生草本植物,是家喻户晓的豆类粮食作物,又名蚕豆、青豆等。豌豆因富含蛋白质、脂肪、粗纤维以及维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 C 等多种营养成分,具有丰富多样的使用价值^[1-2],其栽培面积和产量仅次于大豆、花生和菜豆^[3]。根据联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations,简称 FAO)统计资料,2005 年全世界有 88 个国家生产干豌豆,栽培面积约为 658 万 hm²,总产量约为 1 126 万 t^[4]。中国是世界上第三大干豌豆生产国和第二大青豌豆生产国,干豌豆生产主要分布在云贵川、江浙、湖北和北方一些省(市)^[5]。但是我国与世界豌豆主产国相比,土壤产率较低^[2],如何提高我国豌豆的产量和质量成为当今亟须解决的难题。除选用良种及改进栽培技术是提高豌豆产量的重要途径^[6]外,豌豆生产中的肥料合理施用也是比较关键的环节。豌豆可以与相应的根瘤菌形成共生关系从而将空气中的游离态氮固定,满足自身营养所需,所以基本不需要施用氮素或少施氮肥。自然生长的豌豆具有根瘤着生,但其数量有限,而且固氮能力有限。接种适宜的根瘤菌可以大大提高豌豆的结瘤固氮能力,为自身生长提供必需的氮素营养,达到增产的目的^[7-9]。豌豆根瘤菌的多样性,为豌豆生产提供了可备选择的根瘤菌资源^[10-11]。Palmer 等研究表明,可耕种的土壤中的豌豆根瘤菌多样性比草地中的多样性要高^[12]。但是,根瘤菌的共生固氮效率既与参与固氮的根瘤菌和植物基因有关,又受到生态环境(如土壤环境与肥力、pH 值、温度等)的

影响^[13]。因此,筛选与植株匹配性较高、能高效固氮的菌株尤为关键。中国科学院南京土壤研究所根瘤菌组等通过豌豆根瘤菌拌种,发现人工接种根瘤菌能够明显改善豌豆的结瘤情况;一些根瘤菌菌株 R12、R20、R21、ACCC16101 与 ACCC16103,可以显著增加豌豆根瘤数量、根生物量及植株地上部分干质量,并获得接种用的菌株^[14-16]。张虎天等通过对豌豆-玉米间作体系接种根瘤菌,使土壤含氮量和植株氮素积累量最大,分别增加 37.4% 和 17.4%,并提高了体系中作物根际的细菌数量^[17]。本研究以沧州南大港盐碱土为植株主要生长介质,以花叶豌豆为研究对象,旨在筛选出与花叶豌豆高效固氮且耐盐碱的根瘤菌菌株,提高豌豆产量,改善土壤营养状况。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土壤为盐碱土,采自河北省沧州市南大港六分区 27 队,土壤理化性质见表 1。

供试作物为花叶豌豆(*Pisum sativum* L.),由河北省农林科学院农业资源环境研究所刘振宇赠与。供试菌种引自河北大学微生物多样性研究与应用重点实验室,共 18 株。

YMA 固体培养基的配方: K₂HPO₄ 0.25 g/L, KH₂PO₄ 0.25 g/L,甘露醇 10 g/L,酵母粉 0.8 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L,琼脂粉 14 g/L。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养 将供试菌种接种在 YMA 固体培养基上活化,然后将菌种接种到 YMA 固体斜面培养基上,28 ℃ 培养 3 d,用 100 mL 无菌水洗下菌体,装进无菌三角瓶中摇床振荡 15 min,利用分光光度计测其菌悬液的 $D_{600\text{nm}}$ 。当 $D_{600\text{nm}} > 0.5$ 后进行接种。

1.2.2 土壤处理 将土壤压碎去杂,按照 $V_{\text{土壤}}:V_{\text{沙}}=4:1$,将土壤和沙充分混匀,称取 1.0 kg 置于种植花盆(20 cm 口径)中,种植前适量浇水,使土壤浸润,保持一定湿度。

收稿日期:2016-12-26

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201103005-7);河北省生物学强势特色学科建设项目(编号:1050-503004);河北省生物工程重点学科建设项目(编号:1050-5030023)。

作者简介:潘亭亭(1990—),女,河北沧州人,硕士,研究方向为根瘤菌资源与多样性。E-mail:ptlyhyh@163.com。

通信作者:刘晓云,博士,教授,硕士生导师,从事微生物分子系统学与资源应用研究。E-mail:liuxiaoyunly@126.com。

表 1 土壤理化性质

来源地	经度	纬度	海拔 (m)	pH 值	有机质含量 (g/kg)	全氮含量 (g/kg)	有效磷含量 (mg/kg)	速效钾含量 (mg/kg)
南大港	117°55'E	38°49'N	3.9	8.21	12.34	1.19	7.46	226.05

1.2.3 种子处理 挑选饱满未破损的豌豆种子,依次用 95%乙醇浸泡 5 min,无菌水冲洗 5~7 次;用浓硫酸浸泡 2 min,无菌水冲洗 5~7 次;用 5%次氯酸钠浸泡 5 min,无菌水冲洗 5~7 次后,将种子均匀放置于装有润湿滤纸的无菌培养皿中,28℃避光发芽,每隔 12 h 换新鲜无菌水,当大部分豌豆芽长到 1.5~2.0 cm 时,选取萌芽整齐且胚根垂直的种子进行栽培。栽培前,用相应根瘤菌悬液浸泡发芽种子一段时间。

1.2.4 土壤筛选试验 将发芽的豌豆根部朝下,用无菌镊子夹取,植入花盆中,每盆种植 5 颗,再在豌豆种子处接入根瘤菌菌液 2 mL,并用塑料薄膜封闭盆口。每个处理设 5 个重复,以不接菌作为空白对照。然后将豌豆移置于温室中进行培养,待幼苗长出时,将塑料薄膜划开小口。每隔一段时间浇无菌水 1 次。待豌豆长出第 3 张叶时定苗,每盆 3 株。生育期的管理结合土培试验的要求和豌豆植株生长的需要,在合理的时期搭好支架,防止豌豆倒伏。

1.2.5 收获 待植株生长 48 d 后进行收获,同时进行结瘤数、株高(从子叶痕处至离生长点最近的展开叶顶端)、地上部分干质量(以第 1 张叶叶痕处为划分标准,植物样品先在烘箱中于 105℃杀青 2 h,然后于 65℃烘干至恒质量)、开花结实情况的统计测定。

1.3 数据处理与统计分析

通过统计软件 SPSS 13.0 对试验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),在满足方差齐性的情况下,利用 Tukey 检验进行多重比较,确定各因子水平内部不同水平平均值之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 接种不同根瘤菌对豌豆生长性状的影响

由表 2 可知,接种根瘤菌菌株对豌豆干质量、结瘤数及株高影响均极显著。由表 3 可知,接种不同的根瘤菌菌株均对豌豆干质量有影响,在供试的 18 株菌中,豌豆干质量增幅明显的为 Hbu610006、Hbu610015,相比空白对照分别增产 82.35%、79.41%,差异达显著水平;接种不同根瘤菌对豌豆结瘤数影响显著,与对照相比,均有不同程度的增加,其中表现较好的有 Hbu610005、Hbu610015 等 8 株,分别比对照增加 235.77%、231.20%等,与其他多数菌株具有显著差异;对株高影响较大的为 Hbu610018、Hbu610002,比空白对照分别增加 16.82%、15.64%,其次为 Hbu610006、Hbu610003、Hbu610015、Hbu610007,分别比对照增加 15.02%、14.12%、13.75%、13.47%。

2.2 接种不同根瘤菌菌株对豌豆开花、结荚的影响

由表 4 可知,接种不同的根瘤菌菌株对豌豆开花、结荚的影响不同。与对照相比,接种根瘤菌均在不同程度上增加了豌豆开花、结荚的数量,其中 Hbu610006 和 Hbu6100015 表现较好。Hbu610015 的平均结荚数为 1.1 个/株,且 42.86%的果荚荚长达到 4.0 cm,其花苞数也达到 0.8 个/株。Hbu610006

表 2 不同根瘤菌菌株对豌豆生长性状影响的方差分析

变量	F 值	P 值
干质量	7.52	<0.01
结瘤数	30.37	<0.01
株高	2.66	<0.01

表 3 接种不同根瘤菌菌株后地上部分干质量、株高和结瘤数

菌株号	地上部分干质量 (g/株)	地上部分株高 (cm/株)	结瘤数 (个/株)
Hbu610001	0.39±0.02cde	27.23±0.74abc	23.5±1.33bc
Hbu610002	0.45±0.03bcd	28.25±0.55a	16.0±1.26de
Hbu610003	0.42±0.03bcde	27.88±0.93ab	33.5±2.60a
Hbu610005	0.50±0.02b	25.37±0.45bcd	36.7±2.39a
Hbu610006	0.62±0.01a	28.10±0.54ab	18.3±1.17de
Hbu610007	0.38±0.02cde	27.72±1.09ab	33.1±1.73a
Hbu610008	0.43±0.04bcde	25.94±0.48abcd	36.0±1.22a
Hbu610009	0.40±0.02bcde	25.40±0.45bcd	33.9±1.58a
Hbu610010	0.37±0.03de	27.00±0.75abcd	18.6±1.30d
Hbu610011	0.43±0.04bcde	26.80±0.64abcd	33.7±1.92a
Hbu610012	0.38±0.03cde	26.40±0.78abcd	19.8±1.23cd
Hbu610013	0.40±0.02bcde	27.10±0.99abcd	32.5±1.83a
Hbu610014	0.42±0.04bcde	26.92±0.61abcd	26.9±1.81b
Hbu610015	0.61±0.02a	27.79±0.23ab	36.2±1.51a
Hbu610016	0.36±0.04de	24.45±0.87d	18.0±1.42de
Hbu610017	0.46±0.03bcd	26.47±0.80abcd	20.7±1.21cd
Hbu610018	0.34±0.04e	28.54±0.76a	13.7±0.75ef
Hbu610019	0.47±0.02bc	26.20±0.70abcd	20.8±1.05cd
CK	0.34±0.01d	24.43±0.36cd	10.93±0.55f

注:根据 Tukey 检验,同列数据后不同小写字母表示不同处理间在 0.05 水平上差异显著。

的果荚大小比较均一,豆荚长大多为 2~3 cm,其平均花苞数达到 1.0 个/株左右。而且,由表 3 可知,Hbu610006、Hbu610015 的植株干质量增幅明显,Hbu610015 的根瘤数比对照明显增加,Hbu610006、Hbu610015 的株高仅次于 Hbu610018、Hbu610002(除 Hbu610003 略高于 Hbu610015)。可见,植株的开花结荚数与干质量、结瘤数等性状表现一致,可作为筛选高效菌株的辅助参考指标。

表 4 接种不同根瘤菌后豌豆开花、结荚的数量

菌株号	花苞数 (个/株)	豆荚数 (个/株)	菌株号	花苞数 (个/株)	豆荚数 (个/株)
Hbu610001	1.0	0.5	Hbu610012	1.0	0.4
Hbu610002	0.8	0.3	Hbu610013	0.6	0.6
Hbu610003	1.1	0.6	Hbu610014	1.2	0.5
Hbu610005	0.9	0.7	Hbu610015	0.8	1.1
Hbu610006	1.0	0.7	Hbu610016	0.8	0.5
Hbu610007	0.7	0.5	Hbu610017	0.9	0.5
Hbu610008	0.8	0.6	Hbu610018	1.2	0.2
Hbu610009	1.1	0.4	Hbu610019	0.9	0.7
Hbu610010	1.2	0.3	CK	0.4	0.1
Hbu610011	0.9	0.7			

3 结论与讨论

根瘤菌与豆科植物的共生具有宿主多样性与专一性的特点。接种不同的根瘤菌后,与豌豆共生匹配性能较好的菌株,使豌豆在不同的生长性状方面表现出明显的优势。本试验中,接种高效的根瘤菌 Hbu610006 和 Hbu610015 后,使豌豆干质量、根瘤数等增加,结荚开花数增多,成熟期提前,最终表现出增产的效果,这与 Liu 等的研究结果^[18]一致。在探究根瘤菌竞争结瘤机制的研究中,肖文丽研究发现,与大豆共生固氮能力较强的菌株 4534 比共生能力较差的菌株 4222 产生更多的蛋白响应,这些蛋白主要是代谢相关蛋白、转运蛋白和鞭毛蛋白等^[19]。

河北省沧州市属于滨海盐碱地区,可耕种土地极少,大部分为盐碱耕地。据 2006 年统计^[20],黄骅轻度盐碱耕地 2.46 万 hm²,占耕地总面积的 27.01%,中度盐碱耕地 1.14 万 hm²,占耕地总面积的 12.55%,重度和极度盐碱耕地 5 260 hm²,占耕地总面积的 5.77%,其中绝大多数属于中、低产田,若这些土地能被充分利用,将是增加粮食总产量的宝贵土壤资源^[21-24]。将根瘤菌接种到花叶豌豆根部,可通过固氮作用为植物提供所需要的氮素。此外,根瘤菌通过分泌有机酸、氨基酸、酶等可增加植物对营养物质的吸收,促进植物生长^[25];通过分泌植物激素、维生素、铁载体等可提高植物的生物量^[26]。在本试验中,为充分发挥高效根瘤菌的共生固氮在农业生产实践中的经济价值和生态效益,选择盐碱土种植豌豆,通过豌豆与适宜根瘤菌的相互作用,豌豆植株可获得生长所需的大部分氮素,长势良好,并能增加土壤中根瘤菌及其他微生物的数量,明显改善土壤营养状况。在豌豆根瘤菌对酸碱和盐分的适应性研究中,谢军红等也指出,菌株的盐碱忍耐能力因菌株而异^[16]。在花叶豌豆结瘤试验中,发现不同根瘤菌菌株对豌豆的干质量、开花结荚情况影响不同。因此,将豌豆-根瘤菌的共生固氮作用与盐碱土营养匮乏巧妙、有力地结合在一起,能够充分利用前者的优势,改善盐碱土的耕种情况,提高盐碱土的经济价值,为农业生产带来可观收益。

从供试菌株对豌豆生长性状影响的综合指标来看,Hbu610006 和 Hbu610015 的表现优于其他菌株,与供试豌豆品种匹配性较好,可作为与花叶豌豆高效共生的菌株。

参考文献:

- [1] 惠斯特勒 R J,贝密勒 J N,帕斯卡尔 E F. 淀粉的化学与工艺学 [M]. 王锥文,阎大拴,杨家顺,译. 北京:中国食品工业出版社,1987:21-24.
- [2] 杨晓明,任瑞玉. 国内外豌豆生产和育种研究进展[J]. 甘肃农业科技,2005(8):3-5.
- [3] 龙静宜. 食用豆类种植技术[M]. 北京:金盾出版社,2002.
- [4] The United Nations Alliance of civilizations (UNAOC) [J]. International Understanding,2016(2):60-61.
- [5] 宗绪晓,王志刚,关建平,等. 豌豆种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京:中国农业出版社,2005.
- [6] 金虹. 豌豆蛋白质提取工艺的优化[J]. 湖北农业科学,2010,49(9):2199-2201.
- [7] Joseph S, Pow D, Dawson K, et al. Feeding biochar to cows: An innovative solution for improving soil fertility and farm productivity

- [J]. Pedosphere,2015,25(5):666-679.
- [8] 马剑,黄高宝,高亚琴,等. 接种根瘤菌对豌豆根际细菌数量动态变化及产量的影响[J]. 干旱地区农业研究,2009,27(6):7-10.
- [9] Arshad M, Shaharoon B, Mahmood T, et al. Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.) [J]. Pedosphere,2008,35(5):611-620.
- [10] Yan H Q, Yu K F, Shi Q, et al. Coral reef ecosystems in the South China Sea as a source of atmospheric CO₂ in summer[J]. Science Bulletin,2011,56(7):676-684.
- [11] Chen J L, Liu J, Zhang Y L, et al. Establishment and application of both FLP and Cre site-specific recombination systems at the same position in the genome [J]. Science Bulletin,2000,45(5):456-460.
- [12] Palmer K M, Young J P. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae populations in arable soils than in Grass soils [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2000, 66(6):2445.
- [13] 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[J]. 微生物学通报,2002,29(6):86-89.
- [14] 中国科学院南京土壤研究所根瘤菌组. 苕子根瘤菌优良菌株的筛选[J]. 土壤,1974(5):205-209.
- [15] Deng J J, Zhang Y L, Hu J W, et al. Autotoxicity of phthalate esters in tobacco root exudates; effects on seed germination and seedling growth [J]. Pedosphere,2017,27(6):1073-1082.
- [16] 谢军红,黄高宝,郭丽琢,等. 豌豆根瘤菌高效菌株的筛选及共生匹配性研究[J]. 甘肃农业大学学报,2009,44(1):102-106.
- [17] 张虎天,郭丽琢,柴强,等. 接种根瘤菌对豌豆/玉米体系根际细菌数量及氮营养的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2011,46(1):30-33,38.
- [18] Liu L Z, Gong Z Q, Zhang Y L, et al. Growth, cadmium accumulation and physiology of marigold (*Tagetes erecta* L.) as affected by arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Pedosphere,2011,21(3):319-327.
- [19] 肖文丽. 大豆根瘤菌竞争结瘤机理及其主要影响因子的初步研究[D]. 北京:中国农业科学院,2010.
- [20] 岳耀杰,张峰,张国明,等. 滨海盐碱地利用变化与优化研究——以黄骅市“台田-浅池”模式为例[J]. 资源科学,2010,32(3):423-430.
- [21] 王遵亲,祝寿泉,俞仁培,等. 中国盐渍土[M]. 北京:科学出版社,1993:400-515.
- [22] 石玉林. 中国 1:100 万土地资源图土地资源数据集[M]. 北京:中国人民大学出版社,1991.
- [23] 全国土壤普查办公室. 中国土壤[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [24] 李志杰,孙文彦,马卫萍,等. 盐碱土改良技术回顾与展望[J]. 山东农业科学,2010(2):73-77.
- [25] Xie P, Hao X L, Herzberg M, et al. Genomic analyses of metal resistance genes in three plant growth promoting bacteria of legume plants in Northwest mine tailings, China [J]. Journal of Environmental Sciences,2015,27(1):179-187.
- [26] Zhao K F, Song J, Fan H, et al. Growth response to ionic and osmotic stress of NaCl in salt-tolerant and salt-sensitive maize [J]. Journal of Integrative Plant Biology Crop Protection,2010,52(5):468-475.