

# 接种根瘤菌对豌豆根际细菌数量 动态变化及产量的影响

马 剑<sup>1</sup>, 黄高宝<sup>2\*</sup>, 高亚琴<sup>1</sup>, 王晓娟<sup>1</sup>

(1. 甘肃农业大学资源与环境学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学农业生态工程研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘 要:** 采用根箱法对豌豆接种根瘤菌, 用尼龙筛网将根系及离根不同水平距离的土壤分层隔开, 研究豌豆根际细菌的动态变化以及与产量的关系。结果表明: (1) 接种匹配性好的根瘤菌剂可以提高土壤中根际细菌数量与豌豆产量, 接种 ACCC 16103 根瘤菌豌豆单株产量相对不接种提高 30.6%, 根际细菌数量增加了 117.5%, 而接种 ACCC 16101, 豌豆单株产量下降 6.8%, 根际细菌数量在盛花期和结荚期低于不接种, 仅成熟期高于不接种。(2) 根际细菌数量表现明显的根面聚集现象。(3) 盛花期豌豆根际细菌数量是决定豌豆高产的主要因素之一, 豌豆的产量与结荚期根际细菌数量呈显著正相关关系( $r=0.768$ ), 与盛花期根际细菌数量呈极显著正相关关系( $r=0.865$ ), 与成熟期根际细菌数量呈正相关关系( $r=0.414$ ), 但未达到显著水平。

**关键词:** 豌豆; 根瘤菌; 根际细菌

**中图分类号:** S 154.38<sup>+1</sup> **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009) 06-0007-04

自然界生物固氮中, 根瘤菌与豆科植物共生体系固氮能力最强, 年固氮量占生物固氮总量的 60% 以上<sup>[1]</sup>, 可以避免工业固氮、过量施用化肥造成的负面影响, 因此接种根瘤菌剂、豆科植物的间作成为一种普遍推广的农业技术。1904 年, 德国微生物学家 Lorenz Hiltner 提出了根际概念, 他将根际定义为根系周围、受根系生长影响的土体。100 多年来, 根际研究方兴未艾, 根际概念也不断得以丰富和完善<sup>[2~4]</sup>。根际是土壤—植物生态系统物质交换的活跃界面, 植物—微生物的互作关系维系和主宰着陆地生态系统的功能<sup>[3]</sup>。根际微生物种类、数量直接影响土壤的生物化学活性及土壤养分的组成与转化<sup>[3]</sup>, 可以直接反映土壤肥力<sup>[9]</sup>。土壤微生物中细菌占总量的 70%~90%, 细菌在土壤生物过程和土壤肥力形成中占据着重要或突出的地位<sup>[7,9]</sup>。人们研究了水稻<sup>[9]</sup>、草地<sup>[10,11]</sup> 等植物根际细菌的动态变化、垂直分布<sup>[11,12]</sup>, 豆科植物的间作体系中细菌产生的根际效应显著高于单作<sup>[3,13]</sup>, 但豌豆根际细菌的动态、水平变化及与产量的关系的研究较少。本试验采用根箱法<sup>[14~19]</sup> (图 1) 对豌豆接种根瘤菌, 探索豌豆根际细菌的动态、水平变化以及产量的关系, 为人工调控根际微环境以及利用有益微生物提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 黄绵土基本理化性状 有机质 12.08 g/kg, pH 8.16, 全氮 0.813 g/kg, 速效氮 30.41 mg/kg, 全磷 1.36 g/kg, 速效磷 12.06 mg/kg, 全钾 19.14 g/kg, 速效钾 180.3 mg/kg。

1.1.2 供试作物 燕农 2 号豌豆。

1.1.3 供试菌株 引自中国农业科学院农业微生物菌种保藏中心(以下简称为 ACCC) 的豌豆根瘤菌 ACCC 16101(B1)、ACCC 16103(B2)。

### 1.2 根箱设计及豌豆生长条件

根箱结构: 20 cm × 20 cm × 35 cm (图 1)。本试验在根箱中用尼龙筛网将根系与土壤分层隔开, 尼龙网用直径为 2 mm 的自行车辐条固定, 以分割土壤微区, 尼龙网孔径 400 目(30~35 μm), 可以防止根系穿透, 而保证水分和养分在各层间自由移移。在根箱结构中的中间层, 又称中央室、根室(Central Compartment, CC), 宽 8 mm, 豌豆播种及根系生长在此区域。中央室左右两侧分割 5 个固定有尼龙网的微区, 分别认定为距根际 2、4、6、8、10 mm 和 >10 mm 的根际土壤。每箱装土 12.8 kg, 施过磷酸钙 21.4 g, 硫酸钾 6.95 g。

收稿日期: 2009-05-20  
基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD88B17); 甘肃省自然科学基金 3ZS 061-A 25-079  
作者简介: 马 剑(1974—), 男, 甘肃庄浪人, 在读硕士, 主要从事根际微生态方面的研究。E-mail: jz\_majian@163.com。  
\* 通讯作者: 黄高宝, 男, 甘肃天水人, 教授, 博导, 主要从事多熟种植、保护性耕作、节水农业和宏观农业的教学与研究工作。E-mail: Huanggb@gau.edu.cn。  
(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

土样% =  $\frac{\text{土样烘干重}}{\text{土样鲜重}} \times 100\%$

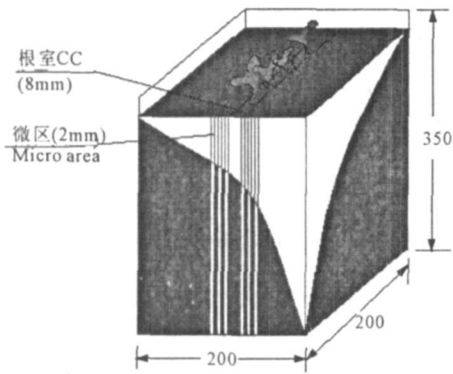


图 1 根箱示意图 (mm)

Fig. 1 Rhizobox schematic illustration

播种时,先活化菌株,待菌株充分生长,OD 值 $\geq 0.5$  (波长 660nm) 时备用接种。豌豆种子用 95%乙醇表面灭菌后,将菌液(每一粒种子的接种量为  $10^8$  个活细胞)与米糊、种子混匀,阴干后播下。

试验设 1 个豌豆品种,2 个根瘤菌剂(代号分别为 B1、B2),1 个不接种为对照(CK),3 个处理,3 次重复,共 36 个根箱。每个根箱播种 8 粒种子,出苗 6 d 后定植至 4 株。根箱放置在甘肃农业大学定西旱农生态综合实验站。该站属中温带半干旱区,平均海拔 2 000 m,年均太阳辐射 591.9 kJ /cm<sup>2</sup>,日照时数 2 476.6 h,年均气温 6.4℃, $\geq 0^\circ\text{C}$  积温 2 933.5℃, $\geq 10^\circ\text{C}$  积温 2 239.1℃;无霜期 140 d。多年平均降水 390.9 mm,年蒸发量 1 531 mm。播种前,将根箱内浇透水分,之后在豌豆生长的苗期和鼓粒期补水三次(每次补水量为田间持水量的 70%左右),其它管理同大田作物。

1.3 土壤细菌分离和计数

1.3.1 培养基种类 细菌:用牛肉膏蛋白胨琼脂培养。

1.3.2 分离培养方法 分别称取各土样 10g,加入 90ml 无菌水,置 70r /min 的摇床上振荡 15 min,使土粒均匀分散成为土壤悬液,然后静置数分钟,吸取 1ml 土壤悬液置 9ml 无菌水中稀释,配成  $10^{-1}$  稀释液,依次按 10 倍法稀释,根据预试结果确定每种菌培养的适宜浓度,进行正式接种培养。细菌采用涂抹法接种,即取 0.1 ml 适宜浓度土壤稀释液加入已制备好的各种培养基,用接种环均匀涂抹在培养基表面,每处理 2 个重复,置适温下 (28℃) 培养,5d 后观测结果。

1.3.3 涂抹法计数方法 菌落数量 = 菌落平均数  $\times$  稀释倍数  $\times 20$  /干土%

2 结果与分析

2.1 根际细菌的生育时期变化

在豌豆生长过程中,其根际的细菌数量都是逐渐增加,在结荚期细菌数量达到峰值,然后逐渐下降,但 CK 成熟期根际细菌数量下降明显,接种 B1 成熟期根际细菌数量高于盛花期(见表 1)。即接种 B1:结荚期  $3.37 \times 10^7 \text{ U/g}$   $>$  成熟期  $3.20 \times 10^7 \text{ U/g}$   $>$  盛花期  $3.01 \times 10^7 \text{ U/g}$ ;接种 B2:结荚期  $8.27 \times 10^7 \text{ U/g}$   $>$  盛花期  $7.56 \times 10^7 \text{ U/g}$   $>$  成熟期  $3.53 \times 10^7 \text{ U/g}$ ;对照 CK:结荚期  $4.35 \times 10^7 \text{ U/g}$   $>$  盛花期  $3.93 \times 10^7 \text{ U/g}$   $>$  成熟期  $0.65 \times 10^7 \text{ U/g}$ 。豌豆三个生育时期根际细菌数量的平均数为:B2  $6.46 \times 10^7 \text{ U/g}$   $>$  B1  $3.19 \times 10^7 \text{ U/g}$   $>$  CK  $2.97 \times 10^7 \text{ U/g}$ ,相对 CK 分别增加了 117.5%和 7.4%。未接种根瘤菌的豌豆根际细菌数量在盛花期与结荚期达到显著水平,而接种的未达到显著水平;最大根际细菌数量出现在接种 B2 豌豆的结荚期  $8.27 \times 10^7 \text{ U/g}$ 。

豌豆生长的同一生育时期,不同处理的豌豆根际细菌之间具有不同的显著差异水平。在盛花期 B2 $>$ CK $>$ B1,它们之间都达到极显著水平;在结荚期 B2 $>$ CK $>$ B1,B2 与 B1、CK 均达到极显著水平,CK 与 B1 达到显著水平;在成熟期 B2 $>$ B1 $>$ CK, B2、B1 与 CK 达到极显著水平,B2 与 B1 达到显著水平。

表 1 不同处理豌豆各生育时期根际细菌数量变化 ( $\times 10^7$  菌数/克)

Table 1 The variability of pea rhizosphere bacteria numbers in different treatments ( $\times 10^7 \text{ U/g}$ )

| 处理<br>Treat ment | 生育时期 Growing stage     |                           |                     |
|------------------|------------------------|---------------------------|---------------------|
|                  | 盛花期<br>Flowering stage | 结荚期<br>Seed pumping stage | 成熟期<br>Mature stage |
| B 1              | 3.01 <sub>c</sub>      | 3.37 <sub>b</sub>         | 3.20 <sub>b</sub>   |
| B 2              | 7.56 <sub>a</sub>      | 8.27 <sub>a</sub>         | 3.54 <sub>a</sub>   |
| CK               | 3.93 <sub>b</sub>      | 4.35 <sub>b</sub>         | 0.64 <sub>c</sub>   |

注: \* 表中数据为每次取样 3 个重复的平均值,同一列数据,相同的字母差异性不显著(大写  $P < 0.01$ ,小写  $P < 0.05$ ),下同。

Note : The data represent the mean values of replicates , values in each column followed by the same letter do not differ significantly (Capital letters mean  $P < 0.01$  and small letter mean  $P < 0.05$ ) . They are the same as below .

2.2 细菌的水平变化特征

从图 2~图 4 可以看出豌豆根际细菌的水平变化特征表现明显的根面聚集现象。盛花期、结荚期

和成熟期根际细菌的水平变化均呈“高一低一回升一下降”的趋势,但不同菌剂接种豌豆其根际细菌水平变化的高低点略有不同:接种B1的第一低点位于4~6 mm处,回升点位于6~8 mm处;接种B2的第一低点位于6~8 mm处,回升点位于8~10 mm处;对照CK的第一低点位于2~4 mm处,回升点位于8~10 mm处。

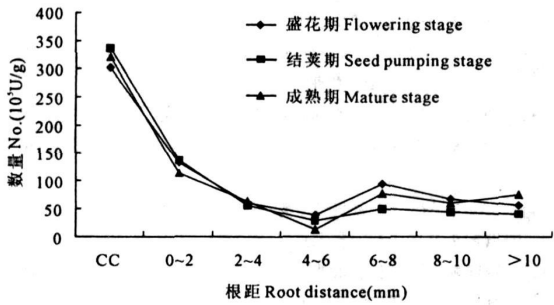


图 2 接种B1豌豆不同生育时根际细菌水平变化特征  
Fig. 2 The horizontal variability of pea rhizosphere bacteria numbers after inoculated B1 rhizobia in different development stage

mm处根际细菌数量)值为: $B2(7.9) > CK(4.73) > B1(2.27)$ 。

2.3 接种对豌豆产量的影响

豌豆接种根瘤菌剂就产量而言,增产作用差异较大。从表2可以看出,接种根瘤菌B2豌豆单产相对于对照增产了30.6%,而且产量之间差异达到显著水平;接种B1菌剂未表现出增产结果;这说明豌豆与根瘤菌剂B2之间有较强的匹配性。豌豆的产量与结荚期根际细菌数量呈显著正相关关系( $r = 0.768$ ),与盛花期根际细菌数量呈极显著正相关关系( $r = 0.865$ ),与成熟期根际细菌数量呈一定的正相关关系( $r = 0.414$ ),但未达到显著水平,这说明成熟期根际细菌数量对豌豆产量的影响不大。

表 2 接种不同根瘤菌豌豆的产量  
Table 2 The yields of peas in different treatments

| 测定指标<br>Investigation item             | 处理 Treatment      |                   |                   |
|----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                        | CK                | B1                | B2                |
| 单株产量(g/株)<br>Yield per plant (g/plant) | 2.00 <sub>b</sub> | 1.93 <sub>b</sub> | 2.69 <sub>a</sub> |
| 相对于对照增产(%)<br>Yield increase           |                   | -6.8              | 30.6              |

3 结果与讨论

1) 在其它种植条件相同的情况下,接种根瘤菌剂可以提高土壤中根际细菌数量。土壤微生物对土壤肥力的形成、植物营养的转化起着极其重要的作用<sup>[1]</sup>,它揭示土壤的现状和趋向,是评价土壤肥力的重要生物学指标<sup>[11,17]</sup>。刘永秀<sup>[18]</sup>等研究认为:在豆科作物间作系统中,豆科作物固定的氮转移给非固氮作物的形式多样,且转移数量以首先进入根际微生物分解作用后的间接转移为主;在轮作种植体系中,土壤微生物群落变化与下茬作物的生长发育密切相关。这为农业生产中推广接种根瘤菌剂提供了依据,但接种根瘤菌剂的效益机理以及对细菌类型、土壤微生物的生物多样性的影响有待更进一步研究。

2) 从整个生育时期来看,接种对豌豆根际细菌数量动态变化趋势没有影响。从盛花期到结荚期根际细菌数量增加,在结荚期达到峰值,然后下降;这与前人在大豆<sup>[9]</sup>,水稻<sup>[9]</sup>、烤烟<sup>[19]</sup>根际细菌数量变化趋势一致。从结荚期到成熟期,接种的豌豆根际细菌数量下降幅度较小(B1:3.37→3.20,B2:8.27→3.54×10<sup>7</sup> U/g),未接种的豌豆则恰恰相反(4.35→0.64×10<sup>7</sup> U/g),这可能由于接种根瘤菌剂刺激了豌豆产生了大量的可溶性根系分泌物,为根瘤菌提供

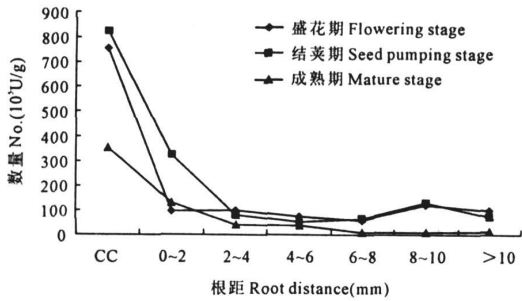


图 3 接种B2豌豆不同生育时期根际细菌水平变化特征  
Fig. 3 The horizontal variability of pea rhizosphere bacteria numbers after inoculated B2 in different development stage

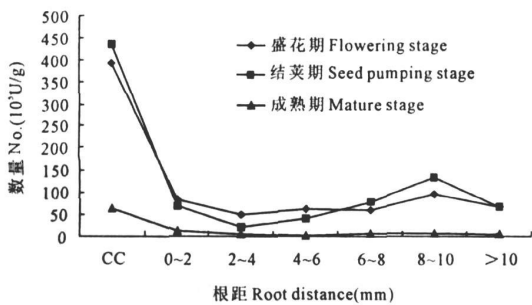


图 4 对照CK豌豆不同生育时期根际细菌水平变化特征  
Fig. 4 The horizontal variability of pea rhizosphere bacteria numbers in different development stage

不同根瘤菌剂接种豌豆,CC处的细菌数量与其它各根距处的细菌数量差异达显著水平,盛花期根际细菌的R/S(R为CC处根际细菌数量,S为0~2

了丰富的有效性碳源和能源。根瘤菌剂 B1 在成熟期,其根际细菌数量水平变化不同于 B2 和对照,在盛花期、结荚期根际细菌数量水平变化与 B2 和对照表现一致,可能是与根瘤菌剂 B1 的抗旱性较强有关。

3) 盛花期豌豆根际细菌数量是决定豌豆高产的主要因素之一,成熟期根际细菌数量对豌豆产量的影响不显著。在农业生产中如何提高该时期的细菌数量,对于减少化肥用量,降低环境污染,实现农业可持续发展具有积极的作用。

## 参考文献:

- [1] 陈文新,李阜棣,闫章才.我国土壤微生物学和生物固氮研究的回顾与展望[J].世界科技研究与发展,2002,24(4):6—12.
- [2] 陆雅海,张福锁.根际微生物研究进展[J].土壤,2006,38(2):113—121.
- [3] 柴强,黄鹏,黄高宝.间作对根际土壤微生物和酶活性的影响研究[J].草业学报,2005,14(5):105—110.
- [4] 陈华癸.土壤微生物学[M].上海:上海科学技术出版社,1981,1—9.
- [5] Schippers B. Interaction of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices[J]. Ann Rev Phytopathol, 1987, 25(3):339—358.
- [6] 郭永霞,李彩华,靳学慧.农业措施对大豆根际土壤微生物区系的影响[J].中国农学通报,2006,22(10):234—237.
- [7] 蔡晓布,彭岳林,薛会英,等.不同施肥方式对西藏中部退化土

壤微生物的影响研究[J].中国生态农业学报,2004,12(1):108—110.

- [8] 陈俊蓉,洪伟,吴承祯,等.不同桉树土壤微生物数量的比较[J].亚热带农业研究,2008,4(2):146—150.
- [9] 段红平,张乃明.超高产水稻根际微生物类群数量初探[J].中国农学通报,2007,23(2):285—289.
- [10] 张崇邦.羊草草原土壤细菌数量动态与生态因子之间关系的研究[J].微生物学通报,2001,28(2):1—4.
- [11] 陈秀蓉.陇东典型草原草地退化与微生物相关性及其优势菌系统发育分析与鉴定[D].兰州:甘肃农业大学,2003.
- [12] 齐文娟.黄河源区高寒草地土壤微生物数量动态及其与土壤养分关系研究[D].兰州:甘肃农业大学,2007.
- [13] 刘均霞,陆引罡,远红伟,等.玉米、大豆间作对根际土壤微生物数量和酶活性的影响[J].贵州农业科学,2007,35(2):60—66.
- [14] 王光华,金剑,潘相文,等.不同氮肥对大豆根圈土壤酶和氮营养分布的影响[J].大豆科学,2003,22(3):213—217.
- [15] 曾曙才,苏志尧,陈北光,等.植物根际营养研究进展[J].南京林业大学学报,2003,27(6):79—83.
- [16] 金剑,王光华,刘晓冰,等.根箱法解析大豆苗期根际养分分布及吸收特征[J].中国科学院研究生院学报,2007,24(2):193—200.
- [17] 蔡燕飞,廖宗文,董春,等.番茄青枯病的土壤微生态防治研究[J].农业环境保护,2002,21(5):417—420.
- [18] 刘永秀,张福锁.根际微生态系统中豆科植物—根瘤菌共生固氮及其在可持续农业发展中的作用[J].中国农业科技导报,1999,1(4):28—33.
- [19] 湛方栋,陆引罡.烤烟根际微生物群落结构及其动态变化的研究[J].土壤学报,2005,42(3):488—494.

## Effect of inoculated peas with rhizobium on the number of pea rhizobacteria dynamic changes and yields

MA Jian<sup>1</sup>, HUANG Gao bao<sup>2\*</sup>, GAO Ya qin<sup>1</sup>, WANG Xiao juan<sup>1</sup>

(1. College of Resources and Environmental Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Institute of Agro ecological Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** Rhizosphere bacteria dynamic changes and the relations between rhizosphere bacteria and yields were studied by root box method which divided stratifiedly the root system and soil at different distances from the root. The results show that: (1) Inoculated peas with better matching rhizobium can increase the rhizosphere bacteria of soil and yield of peas. Compared with CK treatment, the yield of peas in inoculated ACCC 16103 increases by 30.6% and the number of pea rhizosphere bacteria increases by 117.5%. The number of rhizosphere bacteria is less than CK in flowering stage and seed pumping stage, but more than CK in mature stage and the yield of pea declines by 6.8%. (2) The rhizosphere bacteria shows obviously accumulated in root surface. (3) The number of pea rhizosphere bacteria in flowering stage is one of the main factors to determine the pea yield, and there is significantly positive correlation ( $r = 0.768$ ) between the number of pea rhizobacteria in flowering stage and pea yield, and there is positively correlation ( $r = 0.4140$ ) between the number of pea rhizobacteria in mature stage and pea yield, but does not reach significant level.

**Key words:** pea; rhizobium; rhizosphere bacteria