植物营养与肥料学报 2015,21(3): 644 -654 doi: 10.11674/zwyf.2015.0311
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer http://www.plantnutrifert.org

根瘤菌与促生菌双接种对大豆生长和土壤酶活的影响

刘 丽[1,2], 马鸣超[2,3], 姜 昕[2,3], 关大伟[2,3], 杜秉海[1], 曹凤明[2,3], 李 俊[2,3]*
(1 山东农业大学生命科学学院,山东省农业微生物重点实验室,山东泰安 271018; 2 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所,北京 100081; 3 农业部微生物产品质量安全风险评估实验室,北京 100081)

摘要:【目的】慢生大豆根瘤菌和胶质类芽孢杆菌单一菌株固氮或促生效果及机理已有较多研究,但两者双接种对作物的作用和增产机理尚未有所报道。本研究以慢生大豆根瘤菌 5136 与胶质类芽孢杆菌 3016 为研究对象,通过田间小区试验研究根瘤菌与促生菌不同施用模式对大豆生长和土壤酶活的影响,以期为开发新型高效复合菌剂提供理论依据。**【方法】**试验设对照(T1)、接种胶质类芽孢杆菌 3016 菌剂(T2)、接种慢生大豆根瘤菌 5136 菌剂(T3),胶质类芽孢杆菌 3016 和慢生大豆根瘤菌 5136 双接种(T4)和常规施肥(T5)5 个处理,分别于大豆不同生育期调查大豆的农艺性状和结瘤状况,测定土壤酶活性,用 BOX - PCR 技术监测慢生大豆根瘤菌 5136 的占瘤率。**【结果】**1)在大豆成熟期,双接种(T4)处理的大豆单株分枝数、单株粒数、收获指数和产量均为最高,分别比 T1 高 11.3%、9.7%、41.0% 和 9.3%,且单株空荚数最低,比 T1 降低了 44.0%。2)在花荚期,双接种(T4)处理的占瘤率为 25.4%,比 T3 处理高 8.0%,且单株根瘤数和单株根瘤干重均为最高,分别比 T1 高 41.6% 和 47.1%;说明双接种处理下,胶质类芽孢杆菌 3016 能够促进慢生大豆根瘤菌 5136 结瘤固氮。3)接种微生物菌剂均可不同程度地提高土壤酶活性,以双接种(T4)处理的效果最为显著,在大豆成熟期,土壤过氧化氢酶、脲酶和蔗糖酶活性均为最高,分别比对照高 12.9%、8.9% 和 9.4%。4)相关性分析表明,土壤酶活性与大豆收获指数显著正相关或极显著正相关($P<0.01$ 或 $P<0.05$),其中过氧化氢酶与产量显著正相关;单株根瘤数和单株根瘤干重均与收获指数和蔗糖酶活性呈极显著正相关,与产量呈显著正相关。**【结论】**慢生大豆根瘤菌和胶质类芽孢杆菌双接种可以促进大豆生长,显著增加大豆的单株分枝数、单株粒数、收获指数和占瘤率,降低单株空荚数,增加大豆产量,同时可显著提高相关土壤酶活性,是一种节本增效的农艺措施。

关键词: 慢生大豆根瘤菌; 胶质类芽孢杆菌; 复合双接种; 大豆; 占瘤率; 土壤酶活
中图分类号: S144.3; S565.1.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2015)03-0644-11

Effect of *Rhizobia* and PGPR co-inoculant on soybean characteristics and soil enzyme activities

LIU Li[1,2], MA Ming-chao[2,3], JIANG Xin[2,3], GUAN Da-wei[2,3], DU Bing-hai[2,3], CAO Feng-ming[2,3], LI Jun[2,3]*
(*1 College of Life Science, Shandong Agricultural University/Shandong Province Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Tai'an, Shandong 271018, China; 2 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3 Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Microbial Products, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China*)

Abstract:【Objectives】 The effects and mechanism on single inoculant of *Paenibacillus mucilaginosus* and *Bradyrhizobium japonicum* have been widely characterized, but few on the that of co-inoculant of them. A field experiment was carried out to reveal the effects of rhizobia and PGPR on soil enzyme activities, soybean growth and nodulation. **【Methods】** Five differents with fertilization measures in this field experiment were designed by T1

收稿日期: 2014-01-17 **接受日期:** 2014-06-17 **网络出版日期:** 2015-02-12
基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31200388);国家 863 计划(2013AA102802-04);现代农业产业技术体系建设专项支持项目(CARS-04);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2013-1)资助。
作者简介: 刘丽(1989—),女,山东临沂人,硕士,主要从事微生物生态方面的研究。E-mail: liuli__abc@163.com
* 通信作者 E-mail: li@caas.ac.cn

(CK), T2(inoculant of *Paenibacillus mucilaginosus* 3016), T3(inoculant of *Bradyrhizobium japonicum* 5136), T4 (co-inoculant of *P. mucilaginosus* 3016 and *B. japonicum* 5136) and T5(the regular fertilizer dose). Soil enzyme activities, soybean growth characteristics at different stages of soybean and the nodule occupancy of *B. japonicum* 5136 were studied. BOX – PCR was used to analyze the nodule occupancy of *B. japonicum* 5136.【**Results**】1) At maturation periods, soybean growth traits, branch number per plant, seeds per plant, harvest index and yield in the T4 treatment were the highest, and respectively increased by 11.3%, 9.7%, 41.0% and 9.3% relative to those in the T1 treatment. The empty pods per plant in T4 treatment was the lowest, and was 44.0% lower than that in the T1 treatment, indicating the prosperous effect of co-inoculant on improving soybean traits. 2) The nodule occupancy of *B. japonicum* 5136 in the T4 treatment was 25.4%, and 8.0% higher than T3 treatment. Nodules per plant, nodule dry matter per plant in the T4 treatment exhibited the highest values during the flowering and podding periods, and increased 41.6% and 47.1% relative to thosed in the T1 treatment, suggesting that *P. mucilaginosus* 3016 was helpful to nodulation of *B. japonicum* 5136. 3) *P. mucilaginosus* 3016 and *B. japonicum* 5136 could increase the activities of catalase, urease and invertase in soil. During maturation periods, the activity of these enzymes in T4 treatment was the highest, and were 12.9%, 8.9% and 9.4% higher than T1 treatment, respectively. 4) The soil enzyme activities were significantly and positive correlated ($P < 0.01$) or positive correlated ($P < 0.05$) with harvest index, and catalase activity was positive correlated with yield. Nodules per plant and nodule dry matter per plant were significantly positive correlated with harvest index and invertase activity, respectively, and was positive correlated with yield.【**Conclusions**】Co-inoculant of *P. mucilaginosus* 3016 and *B. japonicum* 5136 could significantly increase soybean branch number per plant, seeds per plant, harvest index, the yield and nodule occupancy, and reduce the empty pods per plant, and increase enzyme activities, indicating that the co-inoculant of *P. mucilaginosus* 3016 and *B. japonicum* 5136 is an optimal application measure in soybean cropping system.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*; *Paenibacillus mucilaginosus*; co-inoculant, soybean; nodule occupancy; soil enzyme activity

大豆既是重要的粮食作物,又是重要的油料和蛋白作物,在我国农业生产及社会经济生活中占有重要地位。当前我国高达 85% 的大豆都依赖进口[1],这严重制约了本土大豆产业的发展,因此,提高大豆产量和效益已成为我国大豆产业研究的热点之一。以根瘤菌菌剂为代表的微生物制剂因其具有培肥地力、节本增效、提高化肥利用率和农作物品质、降低农作物病害等多方面的独特作用,已成为发展绿色生态农业的不可替代的投入品。

传统的根瘤菌菌剂往往存在着环境适应性差、占瘤率低和接种效果不稳定等问题,制约了其应用和发展。近年来,根瘤菌剂已由单一菌种、单一功能向复合菌种、多功能方向发展,将大豆根瘤菌与其它有益微生物复合,会更有利于大豆根瘤菌的固氮作用,并已成为大豆根瘤菌剂和其它微生物制剂的研发方向。植物根际促生菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)可通过分泌植物激素、拮抗病原微生物或诱导植物产生系统抗性等方式促进植物生长,增加作物产量[2-3]。已有研究表明[4],PGPR 菌株与根瘤菌复合接种,能进一步促进根瘤菌结瘤固氮,并通过两者协同作用,提高土壤肥力和养分利用率。Elkoca 等[5]发现具有解磷作用的巨大芽孢杆菌 M – 3 与根瘤菌双接种能够提高鹰嘴豆的植株生物量、根瘤干重、固氮酶活性和作物产量; Atieno 等[6]将枯草芽孢杆菌 MIB600 分别与 2 株日本慢生根瘤菌 532c 和 RCR3407 混合接种,有效提高了根瘤鲜重和大豆生物量;韩光等[7]通过混合接种巨大芽孢杆菌、联合固氮菌和硅酸盐细菌,显著提高了紫花苜蓿瘤质量和土壤根瘤菌、固氮菌数量;Camacho 等[8]研究发现,芽孢杆菌 CECT 450 和根瘤菌复合接种能够促进大豆或豌豆的生长发育,刺激根瘤菌的种群数量及结瘤。

胶质类芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*)3016 是本课题组前期分离筛选的 1 株 PGPR 菌株,已研究证实它能够溶磷解钾,产生有机酸、氨基酸、激素等物质,改善植物营养,促进植株生长[9-11]。目前,对胶质类芽孢杆菌和大豆根瘤菌单一菌株促生或固氮作用及机理已有相关研究[12-14],但对两者

双接种对大豆的促生效果和增产机理尚未有所报道。本研究将以 *P. mucilaginosus* 3016 与日本慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)5136 为研究对象,通过田间小区试验研究根瘤菌与促生菌复合接种对大豆生长、结瘤状况和土壤酶活性的影响,旨在为开发新型高效复合菌剂提供理论依据,并为研究不同菌株之间的协同机制和菌株与植物的互作机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种 *P. mucilaginosus* 3016、*B. japonicum* 5136 均为本实验室保存;供试大豆品种为鲁豆 1 号;所用肥料为农大复合肥(N 15.0%、P_2O_5 15%、K_2O 15%);培养基成分参照文献[11];PCR 扩增所用的 Taq 酶、dNTPs 等分子生物学试剂均购于大连宝生物有限公司,其他试剂均为进口或国产分析纯;BOX-PCR 的引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 发酵液的制备 将 *P. mucilaginosus* 3016 和 *B. japonicum* 5136 分别接种到培养基茄子瓶斜面上,30℃分别培养 3 d、8 d,使菌体布满整个培养平面。刮取表面生长的菌苔,用无菌水混匀稀释至适宜浓度,即得菌株发酵液;稀释涂布平板法计算其有效活菌数。

1.2.2 试验设计 田间小区试验在泰安市农科院邱家店科研基地进行,试验地土壤为沙壤土,有机质含量 11.80 g/kg,全氮 0.77 g/kg,有效磷 11.14 g/kg,速效钾 50.84 mg/kg,pH 6.52。试验设 5 个处理,分别为对照(T1),接种 3016 菌剂(T2),接种 5136 菌剂(T3),3016 和 5136 复合双接种(T4)和常规施肥(T5),每处理 4 个重复。小区长 5.5 m,宽 2.4 m,共 20 个小区,随机区组排列。大豆种植行距 60 cm,株距 8～10 cm,每小区种植约 200 株。

P. mucilaginosus 3016 和 *B. japonicum* 5136 的接种方式均为发酵液拌种,前者有效活菌数为 3.2×10^9 cfu/mL,每千克种子拌种 100 mL;后者有效活菌数为 1.0×10^{10} cfu/mL,每千克种子拌种 30 mL。常规施肥处理施复合肥,施用量为 600 kg/hm^2。在大豆整个生育期内,各处理田间管理措施完全相同。

1.3 测定项目和方法

1.3.1 大豆农艺性状调查 根据大豆的生育特点,分别在花荚期(50 d)、鼓粒期(80 d)每小区选 10 株,测定大豆的株高及叶片叶绿素含量。叶绿素含量用手持叶绿素仪即时测定;在大豆成熟期(110 d)测定株高,并调查大豆的单株分枝数、单株荚数、单株空荚数、单株粒数,单株籽粒重和单株生物量及千粒重,每小区选 5 株。每个处理选取代表性的样点测定大豆产量。

1.3.2 大豆结瘤情况调查和占瘤率测定

1)大豆结瘤情况调查 在花荚期调查大豆结瘤情况,具体方法为:用铁锹在大豆根部将植株完整挖出,尽量避免破坏根瘤,将根系自植株根部节点剪下,用自来水轻轻冲洗干净,取下根系所有根瘤,记录单株根瘤数并测单株根瘤干重;采集 T3 和 T4 处理的大豆根系样品做占瘤率测定,根据根瘤大小及在主、侧根的分布,选择新鲜未损伤的代表根瘤,将其连同一小部分根一同剪下,置于装有 50% 灭菌甘油的塑料管中,4℃保存备用。

2)*B. japonicum* 5136 占瘤率的测定

①根瘤菌的分离纯化 将根瘤用无菌水冲洗干净,用 95% 乙醇浸泡 30 s,0.1% 升汞浸泡 5 min,无菌水冲洗 6 次,在平皿中用镊子挤压出汁,沾取汁液在 YMA 平板上三区划线,30℃培养直至长出菌落;采用稀释涂布和平板划线法进一步纯化,镜检,挑取单菌落,接入 YMA 斜面保存备用。

②根瘤菌 DNA 的提取 将供试根瘤菌接种到装有 10 mL TY 培养液的试管中,30℃,200 r/m 摇床培养 3～5 d,收集全部菌液至 10 mL 离心管中,1000 r/m 离心 4 min,收集菌体。用 1×TE 洗涤菌体并将其转移至 2 mL EP 管中,用 Bead-beater 法[15]提取根瘤菌总 DNA。

③BOX-PCR BOX-PCR 的引物序列为:BOXA1R 5′-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3′,反应条件和体系参照文献[16],琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.3.3 土壤样品采集和酶活性测定 分别在大豆播种前(0 d)、在花荚期(50 d)、鼓粒期(80 d)和成熟期(110 d)用蛇形 5 点采样法,采集 5—20 cm 土样,用于土壤酶活性的测定。播种前在小区内随机取样,大豆生育期采集大豆根际土壤样品。

土壤过氧化氢酶活性的测定采用高锰酸钾滴定法,以 1 g 干土 20 min 内消耗的 0.02 mol/L $KMnO_4$ 体积数表示;土壤脲酶活性采用苯酚钠-次氯酸钠比色法,结果以 24 h 后 1 g 土壤中 NH_3-N 的 mg 数表示;土壤蔗糖酶活性用 3,5-二硝基水杨酸比色法,结果以 24 h 后 1 g 干土生成葡萄糖的 mg 数

表示[17]。

1.4　数据分析

用 Excel 和 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析,采用单因素方差 ANOVA 分析和 Duncan 新复极差法分析差异显著性($P < 0.05$);用 Quantity One4.6.2 软件对 BOX – PCR 结果进行占瘤率分析。

2　结果与分析

2.1　不同处理对大豆生长的影响

2.1.1 对株高和叶片叶绿素含量的影响　植株株高和叶片叶绿素是衡量植物在生长阶段是否健壮的重要标志之一。从表 1 可以看出,大豆鼓粒期和成熟期的株高反低于花荚期,原因是随着大豆的成熟,部分植株茎秆弯曲变形或叶片脱落。在这 3 个时期,双接种处理(T4)的株高均高于其他处理,T2 和 T3 处理的大豆株高在生育后期亦略优于 T5,说明菌剂对大豆的促生作用时间较长,可影响整个生长期。

大豆叶片叶绿素含量在花荚期和鼓粒期均呈 T4 > T2、T3、T5 > T1 的趋势,基本与株高的表现相一致,其中花荚期 T4 处理的叶绿素含量显著高于其他处理,此时期是大豆开花并准备结荚,从营养生长向生殖生长转化的关键时期,此时的叶绿素含量差异较为明显。鼓粒期各处理的叶片叶绿素含量差异不显著,主要是此时期大豆主要生长荚果。

表 1　不同处理对不同时期大豆株高和叶片叶绿素含量的影响

Table 1　Effects of different treatments on soybean plant height and chlorophyll contents at different stages

处理 Treatment	株高 Plant height(cm)			叶绿素含量 Chlorophyll content(mg/dm^2)	
	花荚期 Flowering & Podding	鼓粒期 Pod filling	成熟期 Maturing	花荚期 Flowering & Podding	鼓粒期 Pod filling
T1	68.76 ± 2.15 c	53.81 ± 1.01 b	61.75 ± 2.83 a	26.35 ± 0.96 d	19.41 ± 0.91 a
T2	73.03 ± 1.18 b	56.90 ± 2.74 a	62.85 ± 3.70 a	28.84 ± 0.93 b	20.13 ± 1.39 a
T3	72.59 ± 0.91 b	57.25 ± 3.12 a	61.73 ± 1.86 a	27.86 ± 0.65 bc	20.81 ± 1.36 a
T4	74.85 ± 0.54 a	59.04 ± 1.61 a	63.25 ± 0.50 a	29.41 ± 1.01 a	21.19 ± 0.77 a
T5	71.95 ± 2.25 b	56.54 ± 1.22 a	61.59 ± 0.53 a	27.36 ± 1.00 cd	20.96 ± 0.77 a

注(Note): 同列数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatments at the 5% level.

2.1.2 对大豆成熟期农艺性状的影响　大豆成熟期的单株分枝数以 T4 处理最高并显著高于 T1,其他处理间差异不显著(表 2);单株荚数以 T4 和 T5 处理最多,显著高于 T1 和 T2;单株空荚数 T4 处理最少,比 T1 降低了 44.0%,显著低于其他处理,说明在本试验条件下 T4 处理的荚果结籽效果最好,其他处理差异不显著;单株粒数也以 T4 处理最大,比 T1 增加 9.7%,显著高于其他处理;T3、T4 和 T5 处理的千粒重差异性不显著,但均显著高于 T1 和 T2,说明接种根瘤菌菌剂可提高籽粒的千粒重,且双接种的效果略好,但与施化肥处理(T5)相差不大。综合比较成熟期大豆的农艺性状可知,T1 处理的大豆植株弱小,单株分枝少,结荚少且果荚空瘪无粒数较多,使大豆籽粒干瘪、量少;双接种处理(T4)的大豆植株生长健壮,单株分枝多,结荚多且果荚籽粒饱满、量多,表现出显著的优良性状,说明双接种对大豆成熟期农艺性状的改善效果更为显著。

2.1.3 对大豆收获指数和产量的影响　收获指数(Harvest Index, HI, 籽粒重/生物量)反映作物群体光合同化物转化为经济产品的能力,是评价作物品种产量水平和栽培成效的重要指标。收获指数有着较高的遗传力,同时也受到环境条件的制约。由不同处理大豆的收获指数和产量(表 3),可以看出,T4 处理的收获指数高达 0.55,显著高于其他处理;T2 处理显著高于 T1 和 T5,T3 显著高于 T1,说明接种菌剂均有利于收获指数的提高,且以双接种处理效果更好。T4 处理大豆的增产效果最为明显,产量显著高于 T1 和 T2;T3 处理的产量略高于常规施肥(T5),但显著高于对照(T1)。双接种处理的大豆产量可达 2391.36 kg/hm^2,增产率 9.3%。

表 2 大豆成熟期的农艺性状

Table 2 Soybean characters at maturing stage

处理 Treatment	单株分枝数 Branch per plant (No./plant)	单株荚数 Pods per plant (pod/plant)	单株空荚数 Empty pods per plant (No./plant)	单株粒数 Seeds per plant (grain/plant)	千粒重 1000-seed weight (g)
T1	3.98 ± 0.28 b	75.55 ± 0.78 c	1.75 ± 0.13 b	142.58 ± 2.17 c	164.53 ± 1.67 b
T2	4.25 ± 0.17 ab	76.88 ± 1.18 bc	1.73 ± 0.22 b	146.90 ± 1.25 bc	164.73 ± 1.57 b
T3	4.30 ± 0.22 ab	78.78 ± 1.66 ab	1.53 ± 0.17 b	149.33 ± 3.69 b	168.25 ± 0.94 a
T4	4.43 ± 0.17 a	79.10 ± 1.42 a	0.98 ± 0.22 a	156.48 ± 4.07 a	169.10 ± 0.62 a
T5	4.28 ± 0.15 ab	79.80 ± 1.22 a	1.73 ± 0.21 b	145.15 ± 3.21 bc	169.19 ± 1.84 a

注(Note):同列数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatments at the 5% level.

表 3 不同处理大豆的收获指数和产量

Table 3 Soybean harvest index and yield under different treatments

处理 Treatment	收获指数 Harvest index	产量(kg/hm^2) Yield	增产率(%) Increase rate
T1	0.39 ± 0.0067 d	2187.12 ± 32.65 c	
T2	0.47 ± 0.0090 b	2256.66 ± 50.44 bc	3.2
T3	0.45 ± 0.0091 bc	2345.00 ± 57.35 ab	7.2
T4	0.55 ± 0.0131 a	2391.36 ± 51.70 a	9.3
T5	0.45 ± 0.0216 c	2321.59 ± 78.76 ab	6.1

注(Note):同列数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatment at the 5% level.

2.2 不同处理对大豆结瘤和占瘤率的影响

2.2.1 大豆的结瘤状况 花荚期是大豆生育最旺盛的时期,此时大豆结瘤固氮往往达到最高峰,调查该时期的大豆结瘤情况并加以比较,可以分析大豆生长前期共生固氮的营养供应状况。由表 4 可知,双接种(T4)处理的单株根瘤数和单株根瘤干重均显著高于其他处理,比根瘤菌单接种(T3)处理分别高 24.5% 和 25.0%,同时,T2 处理显著高于 T1 和 T5 处理,说明促生菌 *P. mucilaginosus* 能够有效促进 *B. japonicum* 在大豆根部结瘤。

2.2.2 *B. japonicum* 5136 的占瘤率 分别在 T3 和 T4 处理的大豆采集根瘤约 500 个,对根瘤进行分离纯化,各得到 155 株和 126 株大豆根瘤菌,提取各菌株 DNA,进行 BOX – PCR,部分菌株的电泳图谱如图 1 所示。两处理各菌株的 BOX – PCR 电泳图谱均呈现较多条带,数量在 11 ~ 18 之间,片段大小分布在 0.2 ~ 3.0 kb 之间,不同菌株间的差异明显,表现出较为丰富的多样性。其中,菌株 2 与 *B. japonicum* 5136 的图谱条带完全一致,可以判定为同

表 4 大豆花荚期结瘤情况调查表

Table 4 Soybean nodule characters at flowering and podding stage

处理 Treat.	单株根瘤数 Nodules per plant (No./plant)	单株根瘤干重 Nodule weight per plant (g/plant, DW)
T1	198.50 ± 11.67 c	0.51 ± 0.04 c
T2	230.50 ± 12.80 b	0.65 ± 0.05 b
T3	225.75 ± 7.86 b	0.60 ± 0.07 b
T4	281.13 ± 10.40 a	0.75 ± 0.02 a
T5	200.63 ± 7.49 c	0.49 ± 0.06 c

注(Note):同列数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatments at the 5% level.

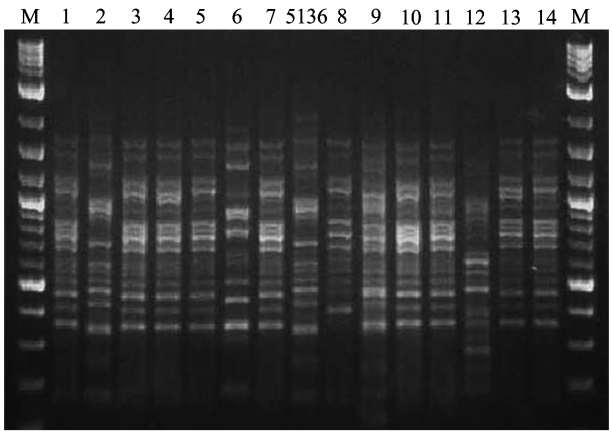

图 1　部分菌株的 BOX – PCR 电泳图谱

Fig. 1　BOX – PCR fingerprinting of tested strains

[注(Note): M 为 2–log DNA Ladder represents 2–log DNA Ladder.]

一菌种,说明 *B. japonicum* 5136 在大豆根部能够有效定殖,且 BOX – PCR 可有效检测。综合分析全部供试菌株的电泳图谱,T3 和 T4 处理分别有 27 和 32 株与 *B. japonicum* 5136 的条带完全一致,所以 T4 处理 *B. japonicum* 5136 的占瘤率为 25.4%,比 T3 处理(占瘤率 17.4%)高出 8.0%,说明接种 *P. mucilaginosus* 有利于提高优良菌株 *B. japonicum* 5136 的占瘤率。

2.3　不同处理对土壤酶活性的影响

2.3.1 过氧化氢酶活性　土壤过氧化氢酶活性与好氧微生物数量和土壤肥力密切相关。从图 2 可以看出,过氧化氢酶活性基本呈现花荚期先降低,鼓粒期后升高,成熟期再降低的趋势,在大豆不同生育时期各处理表现不同。播种前各处理的过氧化氢酶活性基本一致;花荚期 T3 处理的过氧化氢酶活性最高,

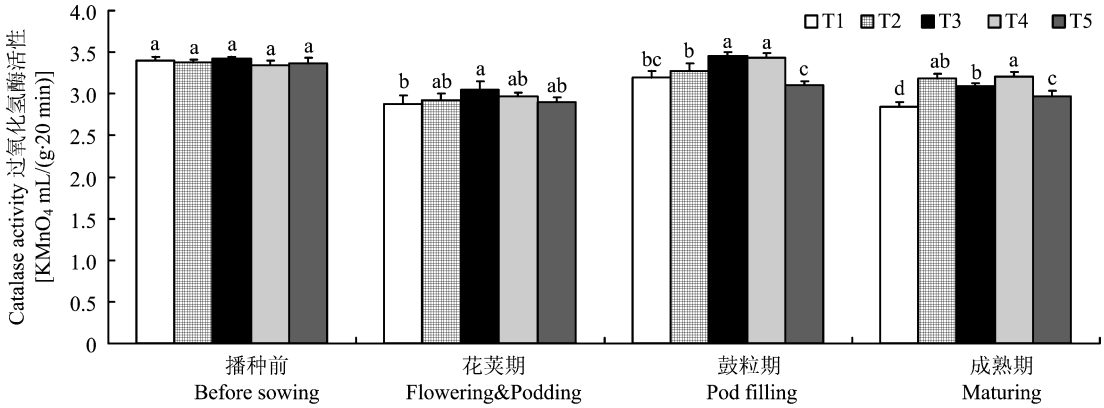

图 2　不同处理对不同时期土壤过氧化氢酶活性的影响

Fig. 2　Effects of different treatments on catalase activity at different stages

[注(Note): 柱上不同字母表示处理间差异达 5%　Different letters above the bars mean significant among treatments at the 5% level.]

显著高于对照处理(T1),其他处理间差异不显著;鼓粒期 T3 和 T4 2 个处理的过氧化氢酶活性显著高于其他处理,分别比对照高 8.1% 和 7.1%;成熟期呈现出 T4 > T2 > T3 > T5 > T1 的趋势,双接种的 T4 处理最高,比对照增加 13.0%。单接种 T2 和 T3 处理的过氧化氢酶活性也显著高于对照(T1)和常规施肥(T5)。可见,接种 *P. mucilaginosus* 和 *B. japonicum* 均可有效提高土壤过氧化氢酶活性,其中以双接种效果最为显著。

2.3.2 脲酶活性　由图 3 可知,各处理脲酶活性整体变化幅度较大,在大豆生育期内降低,可能由于大豆植株本身与根瘤菌共生固氮所致。花荚期各处理脲酶活性明显低于播种前,但 2 个时期内各处理间差异不显著;鼓粒期的脲酶活性 T2 和 T4 处理显著高于其他处理,以双接种 T4 处理最高,但与单接种 T2 差异不显著;成熟期 T4 处理的脲酶活性最高,优于单接种处理 T2 和 T3,且显著高于对照(T1)和常规施肥(T5)。大豆各生育期,常规施肥(T5)的脲酶活性均低于其他处理,可能是由于化学肥料对微生物数量和活性的影响所致。

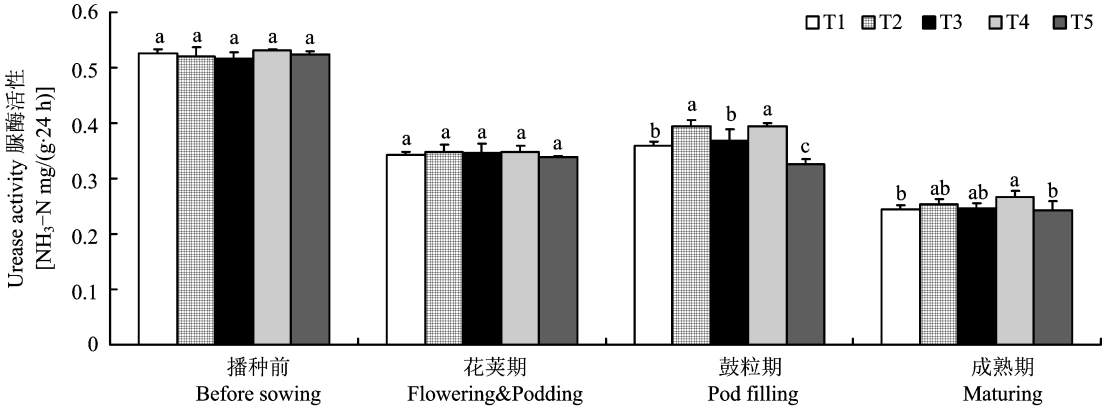

图3 不同处理对不同时期土壤脲酶活性的影响

Fig. 3 Effects of different treatments on urease activity at different stages

[注(Note):柱上不同字母表示处理间差异达5% Different letters above the bars mean significant among treatments at the 5% level.]

2.3.3 蔗糖酶活性 大豆整个生育期的土壤蔗糖酶活性总体变化不大(图4),但各时期不同处理间存在一定的差异。花荚期T2、T3和T4处理的蔗糖酶活性显著高于T1和T5;鼓粒期T3和T4处理显著高于T1、T2和T5,以双接种T4处理的土壤蔗糖酶活性最高;成熟期T4处理蔗糖酶活性可达1.84 Glucaose mg/(g·24h),比对照(T1)增加10%,并显著高于其他处理。由此可见,接种 *P. mucilaginosus* 和 *B. japonicum* 均有利于土壤蔗糖酶活性的提高,以双接种效果更为显著。

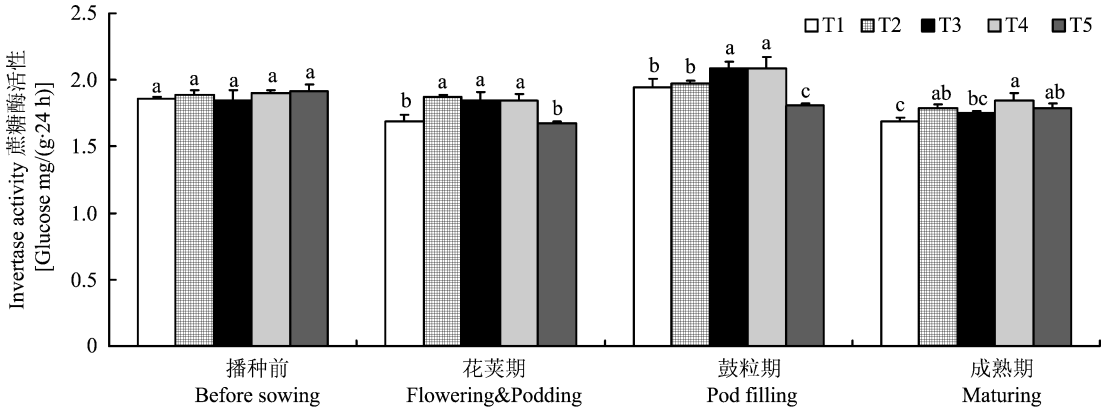

图4 不同处理对不同时期土壤蔗糖酶活性的影响

Fig. 4 Effects of different treatments on invertase activity at different stages

[注(Note):柱上不同字母表示处理间差异达5% Different letters above the bars mean significant among treatments at the 5% level.]

2.4 相关性分析

2.4.1 大豆农艺性状与土壤酶活性的相关分析 对成熟期大豆的农艺性状和土壤酶活性进行相关性分析,结果(表5)发现,单株空荚数与土壤过氧化氢酶($r = -0.583^*$, $P < 0.05$)和脲酶($r = -0.554^*$, $P < 0.05$)呈显著负相关。其他性状与土壤酶活之间均呈现正相关,其中,收获指数、单株粒数与酶活间的相关性最高,相关系数均达到显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)水平;其次为单株分枝数和单株空荚数,与2种酶活性的相关性达到显著水平;产量与过氧化氢酶活性相关性显著($r = -0.542^*$, $P < 0.05$);单株荚数和千粒重与土壤酶活性的相关性不显著。综上结果可见,土壤酶活性主要影响大豆的分枝、结荚及籽粒收获成熟等指标,对大豆的生长起到重要作用。

表 5　大豆农艺性状与土壤酶活之间的相关性(r)

Table 5　Correlations between soybean characteristics and soil enzyme activity at maturing stage

项目 Item	单株分枝数 Branch per plant	单株荚数 Pods per plant	单株空荚数 Empty pods per plant	单株粒数 Seeds per plant	千粒重 1000-seed weight	收获指数 Harvest index	产量 Yield
过氧化氢酶 Catalase	0.592*	0.298	−0.583*	0.645**	0.180	0.801**	0.542*
脲酶 Urease	0.431	0.236	−0.554*	0.538*	0.119	0.592*	0.401
蔗糖酶 Invertase	0.587*	0.499	−0.444	0.579*	0.408	0.751**	0.408

注(Note): *—$P<0.05$; **— $P<0.01$.

2.4.2 结瘤情况与土壤酶活性的相关性分析　由表 6 可知,土壤酶活性与大豆单株根瘤数和单株跟瘤干重均呈正相关。其中蔗糖酶与单株根瘤数($r=0.70^{**}$, $P<0.01$)、单株根瘤干重($r=0.701^{**}$, $P<0.01$)之间呈极显著正相关,说明蔗糖酶活性可能是影响结瘤和根瘤质量的一个重要的因子。

表 6　大豆结瘤情况与土壤酶活性之间的相关性(r)

Table 6　Correlations between soybean nodulation and soil enzyme activity at flowering and podding stage

项目 Item	过氧化氢酶 Catalaset	脲酶 Urease	蔗糖酶 Invertase
单株根瘤数 Nodules per plant	0.24	0.258	0.704**
单株根瘤干重 NDW per plant	0.384	0.414	0.701**

注(Note): NDW —Nodule dry weight. *—$P<0.05$; **— $P<0.01$.

2.4.3 大豆性状与结瘤情况的相关性分析　大豆-根瘤菌的共生体系可为植株提供氮素营养,对大豆的农艺性状与结瘤情况进行相关性分析,有利于了解根瘤对大豆植株的营养供应贡献率。由表 7 可知,单株根瘤数和单株根瘤干重与大豆性状间的相关性表现一致,两项结瘤指标均与大豆单株空荚数、单株粒数和收获指数呈极显著相关($P<0.01$),与单株分枝数和产量呈显著相关($P<0.05$),与单株空荚和千粒重相关性不显著,可见,根瘤的数量和质量是影响大豆生理性状的一个重要因素,与大豆分枝、结荚、产量和收获指数等密切相关。

3　讨论

P. mucilaginosus 和 *B. japonicum* 凭借良好的溶磷、解钾及固氮功能在微生物肥料中备受关注[18]。*P. mucilaginosus* 能够释放出土壤中的难溶性钾,改善植物营养及生长条件,并通过产生有机酸、氨基酸、激素等物质促进植物的生长,还可产生胞外多糖等物质增强植物非特异性免疫能力,有些菌株还具备溶磷和固氮功能[19-20]。*B. japonicum* 是一种较早被人类应用和研究的固氮微生物,可通过与豆科作物共生结瘤,从而为宿主提供氮素,提高土壤肥力,增加作物产量,改善作物品质[21]。目前,关于这 2 种细菌单一接种对作物的促生效果的研究相对较多,孟庆英等[22]施用 *B. japonicum* 增加了大豆的株高、主攀节数、单株荚数和单株粒数,并有效增加大豆产量;吴洪生等[23]施用 *P. mucilaginosus* 增加了花生有效根瘤、单株结荚数、百果重和出仁率,实现花生增产 17.93%。本研究采用拌种方式,结果进一步证实了 *P. mucilaginosus* 和 *B. japonicum* 双接种对大豆的结瘤固氮和促生的复合效果。双接种不仅能提高大豆的株高,而且增加大豆单株分枝数、单株荚数,降低单株空荚数,提高单株粒数和千粒重,从而显著提高收获指数和大豆产量,使大豆增产 9.3%,明显优于常规施肥处理。接种 *P. mucilaginosus* 和 *B. japonicum* 可促进花荚期和鼓粒期大豆叶片叶绿素的合成,这两个时期既是大豆光合作用最强也是生长发育的重要时期,无论是单接种还是双接种,其作用均好于常规施肥,这也在一定程度上体现了 *P. mucilaginosus* 和 *B. japonicum* 对大豆的增效作用。另外,双接种还能促进大豆结瘤,使 *B. japonicum* 5136 的占瘤率提高了 8.0%,这与前人的研究结果一致[4]。

表 7 大豆性状与结瘤之间的相关性(r)

Table 7 Correlations between soybean characteristics and nodulation

项目 Item	单株分枝数 Branch per plant	单株荚数 Pods per plant	单株空荚数 Empty pods per plant	单株粒数 Seeds per plant	千粒重 1000-seed weight	收获指数 Harvest Index	产量 Yield
单株根瘤数 Nodules per plant	0.479*	0.211	−0.804**	0.794**	0.253	0.897**	0.543*
单株根瘤干重 NDW per plant	0.563*	0.215	−0.642**	0.690**	0.136	0.810**	0.495*

注(Note): NDW—Nodule dry weight. *—$P<0.05$; **—$P<0.01$.

土壤酶是一类存在于土壤中具有催化能力的生物活性物质,参与生物化学过程和养分循环,影响土壤中碳的转化、循环和微生物丰度,是影响土壤微生态环境的重要因素,也是反映土壤肥力的一个重要指标[15,24]。土壤酶主要通过不同微生物类群的生理代谢产生,能够表征相应功能微生物的存在和活性[25],研究土壤各种酶活性的变化可对研究环境变化时微生物的响应机制提供新的思路[26]。其中,过氧化氢酶是参与土壤中物质和能量转化的一种重要氧化还原酶,可促进 H_2O_2 分解为水和氧气,降低对生物体和土壤的毒害作用,是生物防御体系的关键酶之一,其活性与土壤呼吸作用及土壤微生物活动密切相关[27]。脲酶主要来源于植物和微生物,是一种专性水解尿素的酰胺酶,其活性通常与土壤微生物数量、有机质含量、全氮和速效磷含量呈正相关,可在一定水平上反映土壤的供氮水平与能力[28]。蔗糖酶参与碳水化合物的转化,是一种能使高分子量的蔗糖分解成葡萄糖和果糖的水解酶,可为植物和微生物提供充分的能源,其活性可反应土壤有机碳积累与转化规律[29]。试验结果表明,接种 *P. mucilaginosus* 和 *B. japonicum* 后,土壤酶活性有所提升,其作用可影响大豆整个生长期,这可能是由于接种的细菌改善了土壤的微环境,一定程度上激活了土壤中有益的土著微生物,使其胞外酶释放含量增多[30]。其中,双接种与单接种和常规施肥相比效果更为显著,特别是鼓粒期和成熟期,这说明两种细菌可能直接通过某种互作机制进一步发挥作用,也可能是由于 PGPR 能够促进大豆根系的生长发育,结合 *B. japonicum* 与大豆植株的共生固氮效果,使发达的根系产生更丰富的根系分泌物,从而更有利于土壤酶活性的提高。试验发现,大豆生长前期双接种处理的土壤酶活性与其他处理并不显著,这可能是由于作物生长前期施用化肥的效果更快,抵消了有益微生物的作用。

有关土壤酶活性与其他指标的相关性方面,国内外学者对玉米、小麦等作物已有较多研究,如杜广红等[31]发现不同施肥处理下,土壤脲酶和纤维素酶与玉米和小麦的产量均呈显著正相关,说明土壤酶活性可在一定程度上促进作物对养分的吸收进而反映土壤肥力状况;而 Dick 等[32]通过小麦 - 休耕体系的长期定位试验则发现土壤脲酶、磷酸酶活性等与有机碳和全氮显著正相关,但与产量没有显著关系,推测土壤酶活性因受 pH 等多种因素的影响,只是土壤肥力的部分反映。目前,关于根瘤菌与 PGPR 不同施用方式下土壤酶活性与大豆农艺性状和结瘤的相关性的报道还相对较少。实际上,大豆农艺性状、占瘤率和土壤酶活性各部分并不是孤立的,从系统的整体看,三者之间具有复杂的联系,因此本研究从上述三方面进行了相关性分析,以期为进一步解释内在的深层机制提供参考。结果表明,过氧化氢酶与单株粒数和收获指数呈极显著相关($P<0.01$),与单株分枝数、单株空荚数和产量显著相关($P<0.05$)。脲酶与单株空荚数和收获指数呈显著相关。蔗糖酶与收获指数极显著相关,与单株分枝数和单株粒数显著相关。可见,土壤酶活性主要影响到大豆分枝、结荚及籽粒收获成熟等指标,对大豆的生长发育起到重要作用,这与杜广红等[31]的研究结果相似;蔗糖酶与单株根瘤数和单株根瘤干重之间呈极显著正相关,说明蔗糖酶可影响结瘤和根瘤质量,这可能与蔗糖酶催化产生的葡萄糖和果糖可为根瘤的形成提供营养物质有关;单株根瘤数和单株根瘤干重两个结瘤因子与大豆农艺性状的相关性基本一致,均与大豆单株空荚数、单株粒数和收获指数呈极显著相关,与单株分枝数和产量呈显著相关,说明结瘤可影响大豆分枝、结荚、产粒和收获,结瘤的数量和质量是影响大豆生长发育的一个重要

因子，这可能是由于根瘤的固氮作用所致。综上可知，土壤酶活性、大豆农艺性状和结瘤情况之间相互作用、密切相关，其具体机理还需进一步试验验证。

4　结论

P. mucilaginosus 3016 和 *B. japonicum* 5136 均对大豆有一定的促生增效作用，而两者双接种具有增进大豆结瘤固氮和促生的复合功效，且能够显著改善土壤过氧化氢酶、脲酶和蔗糖酶活性，提高植株株高、叶绿素、单株分枝、单株粒数、单株荚数、千粒重等农艺性状，增加占瘤率和有效根瘤的数量；双接种比对照增产 9.3%，大豆产量可达 2391.36 kg/hm^2，是节本增效的有效措施。本研究结果对微生物肥料的菌种组合及其生产实践具有重要的指导意义。

参 考 文 献：

[1] 农业部市场与经济信息司. 2011 年中国农产品市场分析报告[M]. 北京：中国农业出版社，2011.
Ministry of Agriculture Market and Economic Information Division. 2011 Chinese agricultural market analysis report [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011.

[2] Piromyou P, Buranabanyat B, Tantasawat *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 Soil Biololgy, 2011, 47(1): 44-54.

[3] Beneduzi A, Peres D, Vargas L K *et al*. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil[J]. Applied Soil Ecology, 2008, 39: 311-320.

[4] Hayat R, Ali S, Amara U *et al*. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review [J]. Annals of Microbiology, 2010, 60: 579-598.

[5] Elkoca E, Kantar F, Sahin F. Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilising bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea[J]. Journal of Plant Nutrition, 2008, 31: 157-171.

[6] Atieno M, Herrmann L, Okalebo R *et al*. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum* [J]. World Journal of Microbiology& Biotechnology, 2012, 28: 2541-2550.

[7] 韩光，张磊，邱勤，等. 复合型 PGPR 和苜蓿对新垦地土壤培肥效果研究[J]. 土壤学报，2011，48(2)：405-411.
Han G, Zhang L, Qiu Q *et al*. Effects of PGPR and alfalfa on soil building of newly-reclaimed land[J]. Acta Pedologica Sinica, 2011, 48(2): 405-411.

[8] Camacho M, Santamarta C, Temprano F *et al*. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in Phaseolus vulgaris L.[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47: 1058-1062.

[9] Ma M C, Wang Z Y, Li L *et al*. Complete genome sequence of *Paenibacillus mucilaginosus* 3016, a bacterium functional as microbial fertilizer[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(10): 2777-2778.

[10] 王璇，马鸣超，关大伟，等. 胶质类芽胞杆菌 PCR 快速检测方法[J]. 微生物学报，2011，51(11)：1485-1493.
Wang X, Ma M C, Guan D W *et al*. Rapid identification for *Paenibacillus mucilaginosus* by PCR[J]. Acta Microbiology Sinica, 2011, 51(11): 1485-1493.

[11] 常文智，马鸣超，李力，等. 施用胶质类芽孢杆菌对土壤生物活性和花生产量的影响[J]. 中国土壤与肥料，2014，(1)：84-89.
Chang W Z, Ma M C, Li L *et al*. Effects of Paenibacillus mucilaginosus on soil biological activity and yield of peanut[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2014, (1): 84-89.

[12] Guan D W, Ma M C, Ma Z Y *et al*. Analysis of two *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic matching for nodulation by primary proteomic[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(8): 1377-1383.

[13] Wu J G, Wang J F, Zhang X H *et al*. A gyrB-targeted PCR for rapid identification of *Paenibacillus mucilaginosus* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87: 739-747.

[14] Li J, Xiao W L, Ma M C *et al*. Proteomic study on two *Bradyrhizobium Japonicum* strains with different competitiveness for nodulation[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2011, 10(7): 1072-1079.

[15] Petric I, Philippot L, Abbate C *et al*. Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 "Soil quality-method to directly extract DNA from soil samples" [J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(3): 454-460.

[16] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19: 6823-6831.

[17] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京：农业出版社，1986. 274-340.
Guan S Y. Soil enzyme and its research method [M]. Beijing: Agriculture Press, 1986. 274-340.

[18] 李俊，沈德龙，林先贵. 农业微生物研究与产业化进展[M]. 北京：科学出版社，2011. 49-50.
Li J, Shen D L, Lin X G. Agricultural microbiology research and industrialization progress [M]. Beijing: Science Press, 2011. 49-50.

[19] Sheng X F, He L Y. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52: 66-72.

[20] Basak B B, Biswas D R. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on

potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols[J]. Plant and Soil, 2009, 317: 235-255.

[21] 江木兰, 张学江, 徐巧珍, 等. 大豆 - 根瘤菌的固氮作用[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(1): 50-54.
Jiang M L, Zhang X J, Xu Q Z *et al*. Nodulation and nitrogen-fixation in soybean-rhizobium[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25(1): 50-54.

[22] 孟庆英, 张春峰, 于忠和, 等. 根瘤茵对大豆根际土壤微生物及大豆农艺性状的影响[J]. 大豆科学, 2012, 31(3): 498-500.
Meng Q Y, Zhang C F, Yu Z H *et al*. Effects of rhizobia on rhizosphere soil microoganisms and agronomic characters of soybean[J]. Soybean Science, 2012, 31(3): 498-500.

[23] 吴洪生, 郭勋斌, 刘怀阿, 等. 钾细菌制剂在花生上的应用研究[J]. 广西农业生物科学, 2003, 22(2): 119-121.
Wu H S, Guo X B, Liu H A *et al*. . Study on effect of *Bacillus mucilaginosus* preparation on peanut[J]. Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science, 2003, 22(2): 119-121.

[24] You Y M, Wang J, Huang X M *et al*. Relating microbial community structure to functioning in forest soil organic carbon transformation and turnover[J]. Ecology and Evolution, 2014, 4(5): 1-15.

[25] Baldrian P. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis[J]. Plant Soil and Environment, 2009, 55(9): 370-378.

[26] Cusack D F, Silver W L, Torn M S *et al*. Changes in microbial community characteristics and soil organic matter with nitrogen additions in two tropical forests[J]. Ecology, 2011, 92: 621-632.

[27] 黄继川, 彭智平, 于俊红, 等. 施用玉米秸秆堆肥对盆栽芥菜土壤酶活性和微生物的影响[J]. 植物与营养肥料学报, 2010, 16(2): 348-353.
Huang J C, Peng Z P, Yu J H *et al*. Impacts of applying corn-straw compost on microorganisms and enzyme activities in pot soil cultivated with mustard[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16(2): 348-353.

[28] 刘恩科, 赵秉强, 李秀英, 等. 长期施肥对土壤微生物量及土壤酶活性的影响[J]. 植物生态学报, 2008, 32(1): 176-182.
Liu E K, Zhao B Q, Li X Y *et al*. Biological properties and enzymatic activity on arable soils affected by long-term different fertilization systems[J]. Journal of Plant Ecology, 2008, 32(1): 176-182.

[29] 严君, 韩晓增, 王树起, 等. 不同形态氮素对种植大豆土壤中微生物数量及酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2010,16(2): 341-347.
Yan J, Han X Z, Wang S Q *et al*. Effects of different nitrogen forms on microbial quantity and enzymes activities in soybean field[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16(2): 341-347.

[30] 曹丹, 宗良纲, 肖峻, 等. 生物肥对有机黄瓜生长及土壤生物学特性的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(10): 2587-2592.
Cao D, Zong L G, Xiao J *et al*. Effects of bio-fertilizer on organically cultured cucumber growth and soil biological characteristics[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(10): 2587-2592.

[31] 杜广红, 周晓琳, 马鸣超, 等. 不同施肥处理对土壤生物活性和作物产量的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2012,(5): 22-26.
Du G H, Zhou X L, Ma M C *et al*. Effects of different fertilizing treatments on soil microbiological properties and crop yield[J]. Soils and Fertilizers Sciences in China, 2012,(5): 22-26.

[32] Dick R P, Rasmussen P E, Kerle E A. Influence of long-term residue management on soil enzyme activities in relation to soil chemical properties of a wheat-fallow system[J]. Biology and Fertility of Soils, 1988, 6: 159-164.