

DOI:10.11686/cyxb2024505

http://cyxb.magtech.com.cn

侯文璐, 康文娟, 陆保福, 等. 不同共生效应根瘤菌株对紫花苜蓿光合特性和呼吸代谢的影响. 草业学报, 2025, 34(11): 66-80.

HOU Wen-lu, KANG Wen-juan, LU Bao-fu, *et al.* Effects of rhizobial strains with different symbiotic effects on the photosynthetic characteristics and respiratory metabolism of alfalfa. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(11): 66-80.

不同共生效应根瘤菌株对紫花苜蓿光合特性和呼吸代谢的影响

侯文璐, 康文娟*, 陆保福, 韩宜霖, 关键, 王晶晶

(甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为探究紫花苜蓿-根瘤菌共生系统结瘤固氮对紫花苜蓿的光合特性、呼吸代谢以及植株生物量积累的影响,以根瘤菌株LL2和QL5分别侵染‘甘农9号’紫花苜蓿,比较接种根瘤菌后紫花苜蓿的结瘤固氮能力、植株表型、光合特性和呼吸代谢等指标的差异。结果表明:1)接种根瘤菌株LL2后植株单株有效根瘤数(7个)、固氮酶活性($0.29 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)、豆血红蛋白含量($0.76 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)显著高于接种根瘤菌株QL5处理,前者紫花苜蓿的地上干重、株高、叶面积均显著提升,说明根瘤菌株LL2是‘甘农9号’紫花苜蓿的高效匹配菌株,QL5是低效匹配菌株。2)接种高效根瘤菌株LL2后植株的气体交换参数、叶绿素含量、叶绿素荧光参数、光合产物显著高于接种低效根瘤菌株QL5处理。3)接种根瘤菌株LL2后植株的ATP含量、ATP合成酶、己糖激酶、异柠檬酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性显著高于接种根瘤菌株QL5处理,呼吸速率显著小于QL5处理。4)地上干重与蒸腾速率(相关系数为0.72)、淀粉含量(0.83)、ATP合成酶活性(0.72)呈显著正相关($P<0.05$),与呼吸速率呈负相关(0.66);结瘤固氮能力与净光合速率(0.83)、可溶性糖含量(0.79)呈极显著正相关($P<0.01$),与叶绿素(a+b)含量(0.76)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性(0.85)呈显著正相关($P<0.05$),与呼吸速率呈负相关。5)接种高效匹配根瘤菌株LL2的植株单位光照时间下产生的单位干重($0.06 \text{g}\cdot\text{h}^{-1}$)显著高于接种根瘤菌株QL5的处理($0.03 \text{g}\cdot\text{h}^{-1}$)。综上,高效匹配根瘤菌株LL2可通过提高结瘤和固氮能力促进植株对氮素的固定,为植株光合和呼吸提供更多的氮素能源,进而增加光合产物,降低呼吸速率,促进植株代谢循环,最终积累更高的生物量。

关键词:紫花苜蓿;根瘤菌;共生固氮;光合特性;能量;呼吸代谢

Effects of rhizobial strains with different symbiotic effects on the photosynthetic characteristics and respiratory metabolism of alfalfa

HOU Wen-lu, KANG Wen-juan*, LU Bao-fu, HAN Yi-lin, GUAN Jian, WANG Jing-jing

Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China

Abstract: In order to explore the effects of nodulation and nitrogen fixation on the photosynthetic characteristics, respiratory metabolism, and plant biomass accumulation of alfalfa (*Medicago sativa*) plants in alfalfa-rhizobium symbiotic system, two *Sinorhizobium meliloti* strains, LL2 and QL5, were used to infect the *M. sativa* cultivar ‘Gannong No. 9’, and the differences in nodulation and nitrogen-fixation ability, the phenotype, photosynthetic characteristics, and respiratory metabolism of alfalfa plants after inoculation with LL2 and QL5 were compared. The

收稿日期:2024-12-23;改回日期:2025-02-17

基金项目:苜蓿燕麦高产种质创新和品种选育子课题(03324007)和财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-34)资助。

作者简介:侯文璐(2001-),女,甘肃定西人,在读硕士。E-mail: 3262639782@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: kangwj@gsau.edu.cn

results showed that: 1) Compared with plants inoculated with *S. meliloti* QL5, those inoculated with *S. meliloti* LL2 formed significantly more effective nodules per plant (7), and the nodules showed significantly higher nitrogenase activity ($0.29 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and leghemoglobin content ($0.76 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). The aboveground dry weight, plant height, and leaf area of alfalfa plants were greater in those inoculated with *S. meliloti* LL2 than in those inoculated with QL5, indicating that *S. meliloti* LL2 was a well-matched strain for *M. sativa* ‘Gannong No. 9’ and *S. meliloti* QL5 was a poorly matched strain. 2) The values of gas exchange and the contents of chlorophyll and chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic products were significantly higher in plants inoculated with the high-efficiency strain LL2 than in those inoculated with the low-efficiency strain QL5. 3) The adenosine triphosphate (ATP) content and the activities of ATP synthase, hexokinase, isocitrate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase were significantly higher, and the respiration rate was significantly lower, in plants inoculated with strain LL2 than in those inoculated with strain QL5. 4) There was a significant positive correlation between aboveground dry weight and transpiration rate (correlation coefficient, 0.72), starch content (0.83), and ATP synthase activity (0.72) ($P<0.05$); and a negative correlation between the aboveground dry weight and respiration rate (0.66). The nodule nitrogen-fixation ability was extremely significantly positively correlated with net photosynthetic rate (0.83) and soluble sugar content (0.79) ($P<0.01$); significantly positively correlated with chlorophyll (a+b) content (0.76) and glucose 6-phosphate dehydrogenase activity (0.85) ($P<0.05$); and negatively correlated with the respiratory rate. 5) The dry weight per unit light time was significantly higher in plants inoculated with the highly efficient rhizobium strain LL2 ($0.06 \text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) than in plants inoculated with QL5 ($0.03 \text{g}\cdot\text{h}^{-1}$). In summary, the well-matched, efficient rhizobial strain promoted nodulation and nitrogen fixation, providing a nitrogen source for enhanced photosynthesis capacity and respiration. This increases the production of photosynthetic products, reduces the respiration rate, and promotes plant metabolism, leading to increased biomass accumulation.

Key words: alfalfa; rhizobium; symbiotic nitrogen fixation; photosynthetic characteristics; energy; respiratory metabolism

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是豆科 (Leguminosae) 苜蓿属多年生牧草, 在我国广泛栽培^[1], 是畜牧业发展不可或缺的优质饲料来源^[2]。氮是植物生存的必需元素, 豆科植物在农业系统中的一个优势是能够通过与其固氮微生物的共生关系, 满足自身大部分的氮素需求^[3]。根瘤菌能够侵染豆科植物 (如紫花苜蓿) 的根部并形成根瘤, 固定植物不能直接利用的大气氮, 为豆科植物提供氮营养^[4]。同样, 植物为根瘤的生长和固氮作用提供能量, 共生固氮过程中固定 1 分子氮需要消耗 16 分子三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP), 这一过程耗能非常大^[5]。根瘤菌能促进苜蓿植株生长, 增加苜蓿产量, 改善品质^[6], 减少化学氮肥的使用, 提高土壤肥力, 实现节能环保^[7], 充分挖掘其固氮潜力对农业的可持续发展至关重要。

光合作用是固氮强度的决定因素之一, 豆科牧草的光合作用可为根瘤菌共生固氮提供养分和能量, 光合作用控制植株的形态建成、根瘤形成发育和共生固氮作用^[8]。在紫花苜蓿与根瘤菌的共生固氮过程中, 根瘤可以固定大气中植物不能直接利用的氮, 为豆科植物提供氮素营养, 而植物的生长、根瘤的生长和固氮均需消耗光合作用的产物—碳水化合物和呼吸作用产生的能量, 植物呼吸也消耗光合作用的产物^[9-10]。光合作用是作物生产的主要驱动力, 而光合作用和呼吸作用之间的平衡是植物生物量积累的原因^[11]。那么接种根瘤菌后紫花苜蓿的光合特性和呼吸代谢有何变化, 根瘤生长和固氮所引起的光合特性和呼吸代谢有何特征, 值得研究。目前, 我国苜蓿生产中接种根瘤菌的研究主要集中在苜蓿和根瘤生长特性和固氮能力上, 而对接种根瘤菌后光合特性和呼吸代谢对苜蓿生长发育的影响研究鲜有报道。

前人研究发现根瘤菌株 LL2 与 ‘甘农 9 号’ 紫花苜蓿呈高效匹配性, QL5 与甘农 9 号紫花苜蓿呈低效匹配性^[12], 但是研究主要集中在苜蓿和根瘤生长特性和结瘤固氮方面。因此, 本试验以甘农 9 号紫花苜蓿为材料, 比

较接种不同共生效应根瘤菌株后紫花苜蓿植株的光合性能、呼吸代谢以及结瘤固氮能力,分析中华根瘤菌株 LL2 和 QL5 与紫花苜蓿共生过程中根瘤的生长和固氮对共生组合光合特性和呼吸代谢的影响差异,以及共生状态下光合和呼吸之间的耦合对植株生物量积累的影响,以期为促进共生状态下紫花苜蓿的光合利用率,进而为提高苜蓿产量提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试紫花苜蓿品种为甘农 9 号(*M. sativa* ‘Gannong No. 9’),根瘤菌株为中华根瘤菌株 LL2(*Sinorhizobium meliloti* LL2,分离自陇中苜蓿根瘤)和中华根瘤菌株 QL5(*S. meliloti* QL5,分离自清水苜蓿根瘤),均由甘肃农业大学草业生态系统教育部重点实验室提供。

1.2 试验方法

试验采用营养液沙培法。挑选颗粒饱满且大小均一的紫花苜蓿种子,用碘伏溶液灭菌 3 min,并用无菌水清洗多次,再用氯化钠-吐温溶液(sodium chloride-tween solution, ST)(0.9% 无菌氯化钠溶液、0.5% 吐温 80)浸泡 1 min 后用无菌水冲洗,用滤纸吸干水分,将细沙洗干净并灭菌烘干(120 °C 高温灭菌 30 min)。于 2024 年 3 月将灭菌后的种子均匀播种至装有灭菌沙和珍珠岩(比例 1:3)的等量网眼培养杯(直径 9 cm、高 12 cm)中,并摆放在长、宽、高分别为 25、15 和 10 cm 的水培盒中,每盒 6 杯,每杯播种 20 粒种子,置于甘肃农业大学草业学院人工气候室内(参数设置为光照强度 $360 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,相对湿度 60% 左右,16 h 光照,8 h 黑暗,光照和黑暗条件下温度分别为 25 和 20 °C)培养幼苗。

菌悬液的制备及接菌:将保存于-80 °C 下的中华根瘤菌株 LL2 和 QL5 通过平板划线法分别接入酪蛋白胰酶琼脂(tryptone yeast, TY)固体培养基(胰蛋白胨 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;酵母粉 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;CaCl₂·6H₂O $1.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;琼脂 $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;蒸馏水 1000 mL;pH 7.0)中活化培养,挑单菌落转入酵母麦芽(yeast malt agar, YMA)液体培养基(MgSO₄·7H₂O $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;K₂HPO₄·3H₂O $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;NaCl $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;甘露醇 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;酵母粉 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;蒸馏水 1000 mL;pH 7.0),于摇床 28 °C、180 r·min⁻¹培养 18 h 后,在 4 °C、10000 r·min⁻¹下离心 10 min,弃上清液后加入等量无菌水冲洗下菌体,振荡摇匀配置成等体积且 OD₆₀₀ 为 0.5(浓度为 $10^9 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)的菌悬液。

在幼苗生长至第 14 天时,用移液枪向每株幼苗根处浇灌 5 mL 菌悬液,单独接种等量无菌水作为对照(CK)。所有处理均设置 4 个水培盒作为重复。接种后每盆浇灌 300 mL Hoagland 无氮营养液,3 d 更换一次。

待紫花苜蓿生长至 45 d 左右采样,测定结瘤固氮、表型、光合、呼吸等指标。

1.3 测定内容及方法

1.3.1 结瘤固氮指标的测定 单株有效根瘤数:随机取 10 株苜蓿,冲洗干净杂质后计算单株有效根瘤数[显微镜(三镨泰达 TD-4KHU,中国)下呈淡粉色的为有效根瘤],各处理重复 3 次。

单颗根瘤重:随机选出 10 株紫花苜蓿植株,洗净根部后摘下根瘤并用滤纸吸干上面的水珠,并快速放在电子天平上称量单株苜蓿根瘤鲜重,各处理 3 次重复。

固氮酶活性:采用乙炔还原法^[13]。快速切下根瘤,称取鲜重,放置于 8 mL 青霉素瓶中,盖紧瓶塞并密封,使用微量注射器(高鸽 1000 μL ,中国)抽取 0.8 mL 空气,并注入 0.8 mL 乙炔气体,反应 2 h。然后使用 100 μL 微量注射器吸取 50 μL 瓶内气体注入气相色谱仪(Agilent 7890B,美国)测量,各处理重复 3 次。

豆血红蛋白含量:参考前人的测量方法^[14]。取新鲜根瘤,在 4 °C 的磷酸缓冲溶液($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 6.8)中研磨成匀浆,磷酸缓冲溶液的量为根瘤体积的 4 倍左右,4 °C 离心 15 min,取上层清液离心 20 min,再取上清液,在波长 540 nm 条件下用分光光度计(TU-1901,北京)比色测定吸光值,各处理 3 次重复。

1.3.2 表型指标的测定 地上生物量:随机取 10 株植株的地上部分,装入信封 105 °C 杀青 30 min,70 °C 烘干至恒重,称干重,各处理重复 3 次。

株高:用卷尺测量,各处理重复 10 次。

叶面积:随机取紫花苜蓿植株从上往下数第3片叶片,通过数码相机(Canon EOS R50,日本)获取已知面积的叶片图像,用ImageJ软件计算叶面积,各处理10次重复。

茎叶比:茎叶分离,烘干后测定干重并计算茎叶比,茎叶比=叶干重/茎干重,各处理重复3次。

1.3.3 光合相关指标的测定 光合参数:使用德国GFS-3000便携式光合-荧光测量系统测定净光合速率(net photosynthetic rate, P_n)、蒸腾速率(transpiration rate, T_r)、气孔导度(stomatal conductivity, G_s)和胞间CO₂浓度(intercellular CO₂ concentration, C_i)。各处理重复3次。

叶绿素含量:参照邹琦^[15]的方法,采用丙酮乙醇混合液提取法,取苜蓿新鲜叶片,测定苜蓿叶绿素a(chlorophyll a, Chl a)含量、叶绿素b(chlorophyll b, Chl b)含量及叶绿素(a+b)[chlorophyll (a+b), Chl (a+b)]含量,并计算叶绿素a/b。各处理3次重复。

光合产物:使用苏州格锐思生物科技有限公司试剂盒测定可溶性糖(soluble sugar, SS)、淀粉(starch, Sta)、蔗糖(sucrose, Suc)含量。各处理3次重复。

叶片叶绿素荧光参数:待紫花苜蓿叶片暗适应60 min后,利用德国叶绿素荧光成像系统-IMAGING-PAM测定PS II潜在光化学效率(PS II potential photochemical efficiency, F_v/F_o)、PS II最大光化学效率(PS II maximum photochemical efficiency, F_v/F_m)、光化学淬灭系数(photochemical quenching coefficient, q_p)、非光化学淬灭系数(non-photochemical quenching coefficient, q_n)、光化学量子产量(photochemical quantum yield, Φ_{PSII})、表观电子传递效率(apparent electron transfer efficiency, ETR)。各处理重复3次。

1.3.4 呼吸相关指标的测定 呼吸速率:在黑暗条件下,使用德国GFS-3000便携式光合-荧光测量系统测量紫花苜蓿叶片呼吸速率(respiration rate, R_d)。各处理重复3次。

使用苏州格锐思生物科技有限公司试剂盒测定ATP含量和三磷酸腺苷合成酶(adenosine triphosphate synthetase, ATPase)活性。各处理3次重复。

呼吸途径关键酶活性:使用苏州格锐思生物科技有限公司试剂盒测定己糖激酶(hexokinase, HK)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、异柠檬酸脱氢酶(isocitric dehydrogenase, IDH)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGDH)活性。各处理3次重复。

1.4 数据处理

采用Excel 2019软件对数据进行整理,使用SPSS 26.0对数据进行单因素方差分析和独立样本T检验,使用R语言进行Mantel相关性分析,通过Origin 2024作图。

2 结果与分析

2.1 根瘤结瘤固氮能力及其植株表型

2.1.1 结瘤固氮能力 由图1可以看出,接种根瘤菌LL2后甘农9号紫花苜蓿的单株有效根瘤数(7个)、固氮酶活性($0.29 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)和豆血红蛋白含量($0.76 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)均显著高于接种根瘤菌QL5处理(4个、 $0.21 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 $0.66 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $P<0.05$),分别是接种QL5处理的1.75、1.38和1.15倍。接种根瘤菌LL2和QL5后植株单颗根瘤重无显著差异。

2.1.2 植株表型 甘农9号紫花苜蓿接种根瘤菌后显著增加了地上干重、株高、叶面积和茎叶比($P<0.05$,图2)。接种LL2的紫花苜蓿植株地上干重、株高、叶面积分别为 $0.59 \text{g}\cdot 10 \text{plants}^{-1}$ 、25.90 cm、 1.88cm^2 ,较CK($0.40 \text{g}\cdot 10 \text{plants}^{-1}$ 、15.90 cm、 1.04cm^2)分别增加了47.50%、62.89%、80.77%,接种QL5的地上干重、株高、叶面积分别为 $0.49 \text{g}\cdot 10 \text{plants}^{-1}$ 、20.86 cm、 1.55cm^2 ,较CK分别增加了22.50%、31.19%、49.04%。接种处理之间,接种菌株LL2后植株的地上干重、株高和叶面积均显著高于接种QL5,前者这三项指标分别是后者的1.20、1.24、1.21倍。

综上,通过结瘤固氮指标和植株表型说明LL2是甘农9号紫花苜蓿的高效匹配菌株,QL5是低效匹配的菌株。

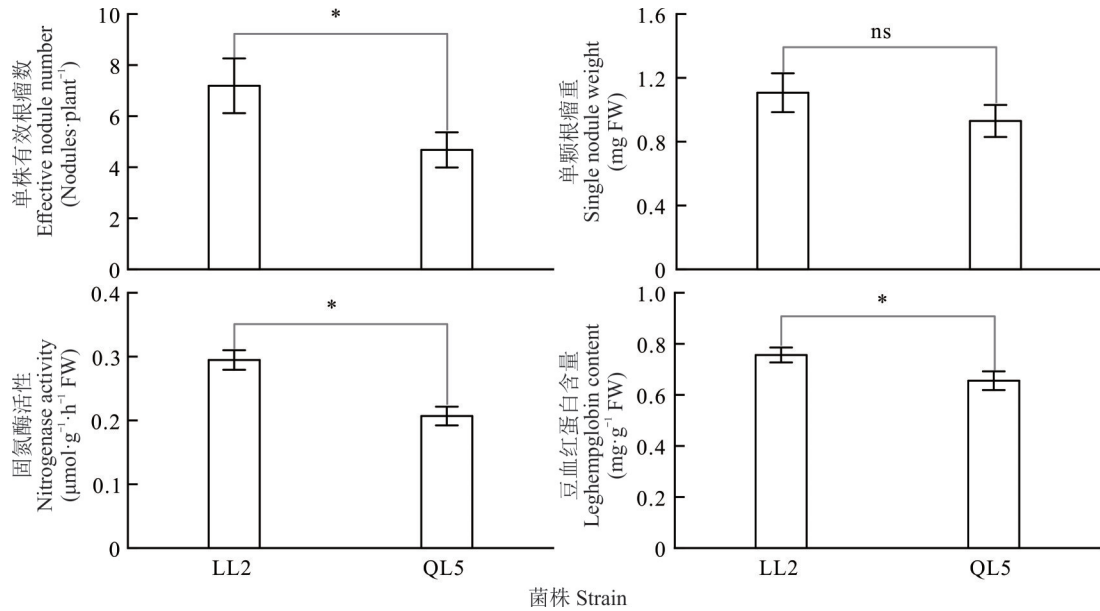


图1 根瘤菌对紫花苜蓿植株结瘤固氮能力的影响

Fig. 1 Effects of rhizobium on nodulation and nitrogen fixation ability of alfalfa plants

*: $P < 0.05$; ns: 不显著 Not significant.

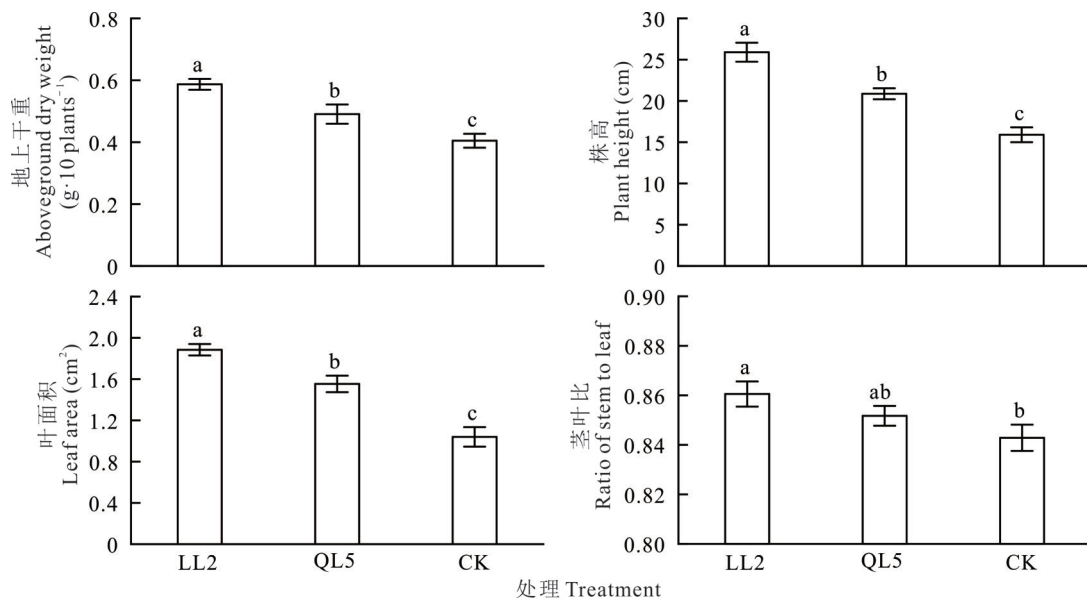


图2 根瘤菌对紫花苜蓿植株生长性状的影响

Fig. 2 Effects of rhizobium on plant growth traits of alfalfa

不同小写字母代表不同处理间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。Different lowercase letters represent significant differences among different treatments ($P < 0.05$), the same below.

2.2 光合能力

2.2.1 气体交换参数 如图3所示,接种根瘤菌后甘农9号紫花苜蓿叶片 P_n 、 T_r 、 G_s 较 CK 显著增加 ($P < 0.05$), C_i 显著降低 ($P < 0.05$)。接种 LL2 菌株的 P_n ($19.63 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、 T_r ($14.72 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 和 G_s ($211.70 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 较 CK ($7.79 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、 $6.01 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、 $121.24 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 分别提高了 151.99%、144.93% 和 74.61%; 接种 QL5 菌株的 P_n ($11.71 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、 T_r ($10.65 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 和 G_s ($151.71 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 较 CK 分别提高了 50.32%、77.20% 和 25.13%。 C_i 在接种 LL2 和 QL5 后分别较 CK 降低了 21.86% 和 44.48%。接种 LL2 菌株的植株叶片 P_n 、 T_r 、 G_s 是接种 QL5 菌株的 1.68、1.38、1.40 倍,说明接种

LL2 菌株后植株光合能力强于接种 QL5 菌株的处理。

2.2.2 叶绿素含量 如图 4 所示,甘农 9 号紫花苜蓿接种根瘤菌后光合色素含量发生了显著变化,接种后叶片 Chl a、Chl b 和 Chl (a+b) 含量均显著增加 ($P < 0.05$), Chl (a/b) 较 CK 显著降低 ($P < 0.05$)。接种 LL2 和 QL5 后, Chl a 含量较 CK 分别提高了 16.43% 和 11.12%; Chl b 含量较 CK 分别提高了 82.17% 和 62.21%; Chl (a+b) 含量 (2.40 和 $2.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 分别是 CK ($1.76 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 的 1.36 和 1.26 倍。LL2 接种处理的叶绿素含量均显著高于 QL5。

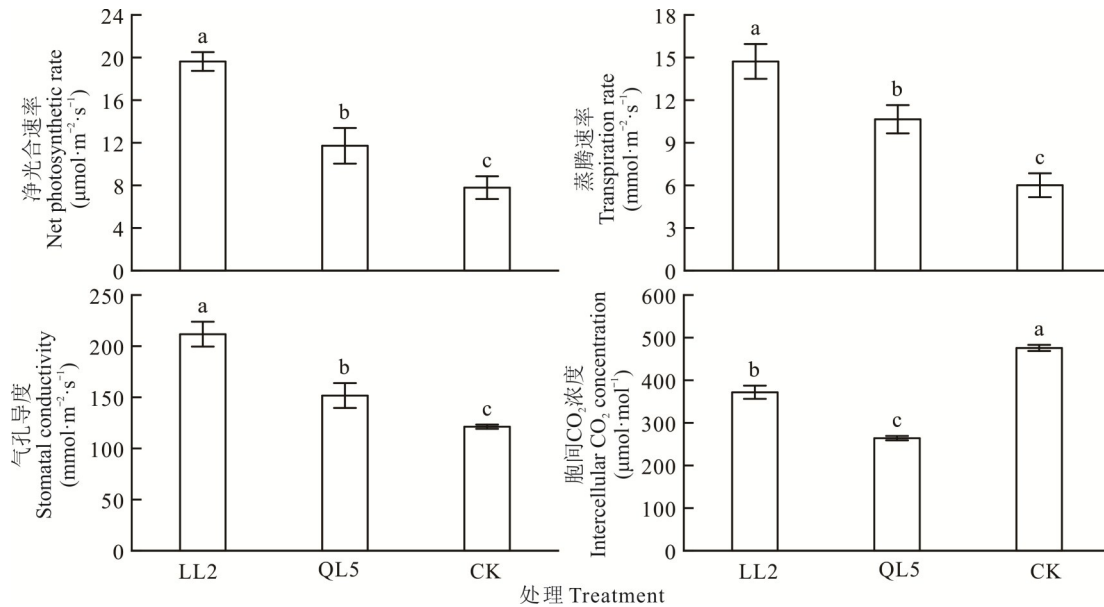


图 3 根瘤菌对紫花苜蓿气体交换参数的影响

Fig. 3 Effects of rhizobium on gas exchange parameters of alfalfa

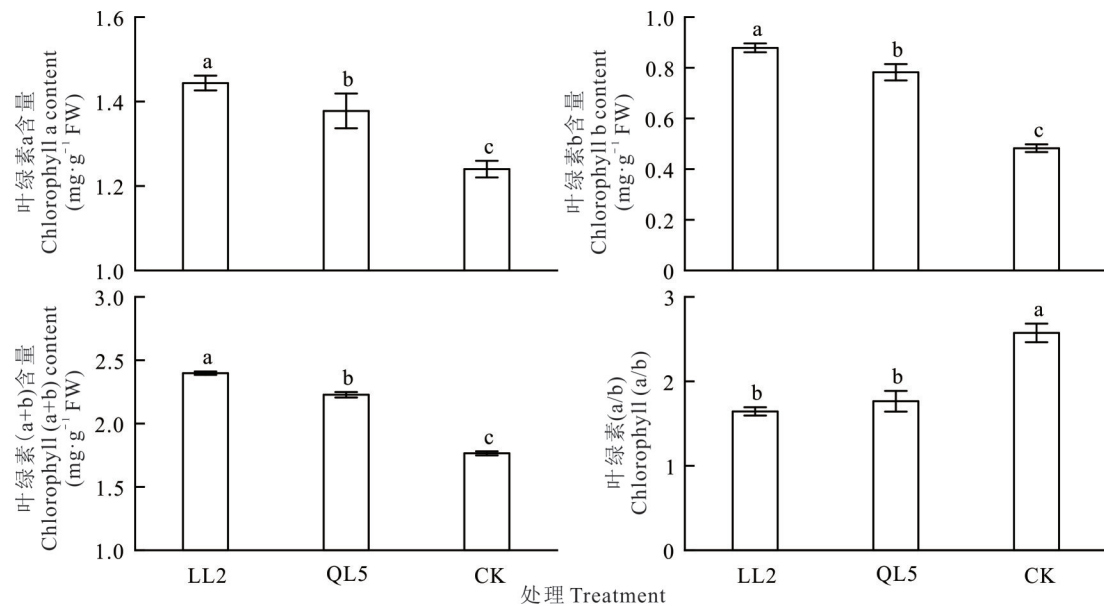


图 4 根瘤菌对紫花苜蓿叶绿素含量的影响

Fig. 4 Effect of rhizobium on chlorophyll content of alfalfa

2.2.3 叶绿素荧光参数 由图 5 可得,甘农 9 号紫花苜蓿接种根瘤菌后叶绿素荧光参数发生了明显变化,接种后 F_v/F_o 、 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 、ETR 显著增加 ($P < 0.05$), q_N 显著降低 ($P < 0.05$)。接种 LL2 和 QL5 后, F_v/F_o 分别是 CK

的1.40和1.21倍;表观电子传递效率分别是CK的1.45和1.12倍。接种LL2菌株处理植株叶片的 F_v/F_o 、 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 和ETR均显著高于QL5处理,尤其是 F_v/F_o 和ETR分别高出QL5处理15.69%和29.64%。

2.2.4 光合产物 如图6所示,接种根瘤菌后甘农9号紫花苜蓿的光合产物发生了明显变化。接种根瘤菌增加了植株SS、Suc、Sta含量,接种LL2后的SS($11.13 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)、Suc($9.33 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)和Sta含量($11.73 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)较CK(8.96 、 5.79 、 $6.67 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)分别显著提高了24.17%、61.27%、75.84%;接种QL5后的SS($9.68 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)、Suc($6.46 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)和Sta含量($7.99 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)较CK分别提高了8.01% ($P < 0.05$)、11.72%、19.71%。接种菌株LL2后植株叶片的SS、Suc、Sta含量显著高于接种QL5处理,前者分别是后者的1.15、1.44和1.47倍。接种LL2菌株处理植株积累的光合产物高于QL5菌株处理。

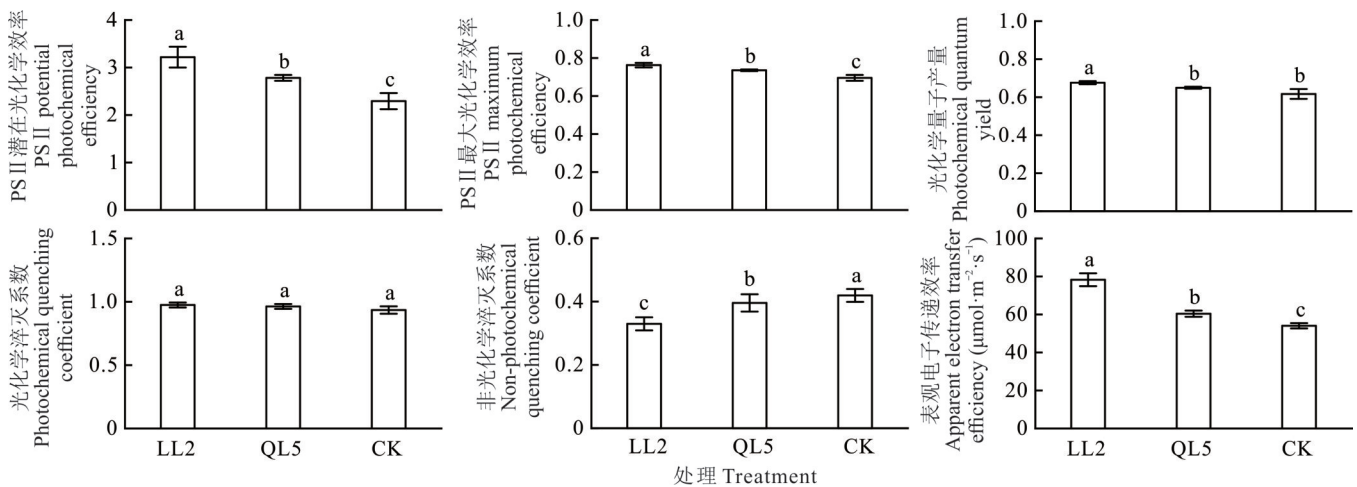


图5 根瘤菌对紫花苜蓿叶绿素荧光参数的影响

Fig. 5 Effects of rhizobium on chlorophyll fluorescence parameters of alfalfa

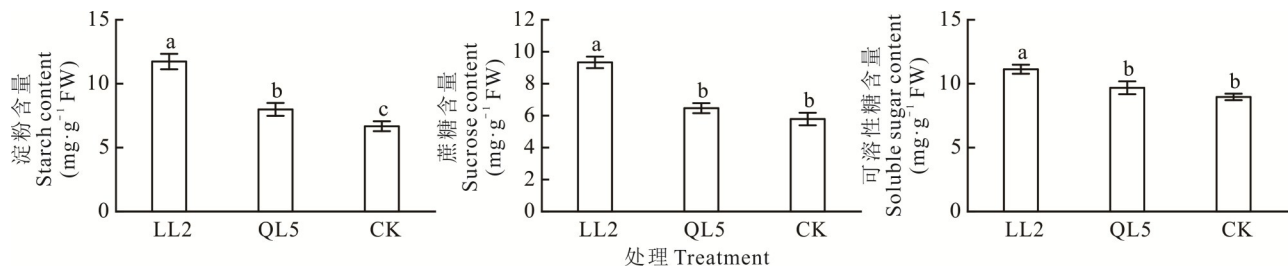


图6 根瘤菌对紫花苜蓿光合产物的影响

Fig. 6 Effects of rhizobium on photosynthetic products of alfalfa

2.3 呼吸能力

2.3.1 能量代谢和呼吸速率 三磷酸腺苷(ATP)是生物体内能量转换最基本的载体,是生物体内最直接的能源,ATPase又称线粒体呼吸链复合体V,是线粒体氧化磷酸化的终极反应。甘农9号紫花苜蓿接种根瘤菌后能量代谢发生了明显变化(图7),接种LL2和QL5后ATP含量和ATPase活性显著增加($P < 0.05$),ATP含量分别是 14.18 和 $13.07 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$,较CK($10.01 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)分别增加了41.67%和30.56%;ATPase活性分别为 13.07 和 $10.80 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$,较CK($8.49 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)分别增加了53.90%和27.23%。LL2处理的ATPase活性显著高于QL5处理,是其1.21倍。接种根瘤菌后甘农9号紫花苜蓿的呼吸速率显著低于CK($P < 0.05$),接种LL2和QL5后植株的呼吸速率分别为 3.86 和 $7.44 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,较CK($10.38 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)分别下降了62.80%和28.33%。

2.3.2 呼吸代谢途径关键酶 由图8可知,甘农9号紫花苜蓿接种根瘤菌后呼吸代谢途径关键酶发生了显著

变化,接种后 PK、IDH、SDH、6PGDH 活性显著增加($P < 0.05$),HK、G6PDH 活性显著降低($P < 0.05$)。接种 LL2 后的 PK、IDH、SDH、6PGDH 活性分别是 $186.21 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $1.42 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $135.70 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $19.36 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,较 CK ($118.71 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $0.29 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $67.67 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $10.82 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)分别提高了 56.87%、384.47%、100.54%、78.97%;接种 QL5 后的 PK、IDH、SDH、6PGDH 活性分别是 $177.44 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $0.67 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $129.62 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $16.09 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,较 CK 分别提高了 49.47%、128.88%、91.54%、48.80%。接种 LL2 后植株的 HK 和 G6PDH 活性分别是 $152.22 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $3.77 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,较 CK ($196.44 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $6.41 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)分别降低 22.51% 和 41.20%;接种 QL5 后植株的 HK 和 G6PDH 活性分别是 $114.40 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $2.66 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,较 CK 分别降低了 41.75% 和 58.49%。LL2 菌株接种处理的 HK、IDH、G6PDH、6PGDH 活性均显著高于 QL5 菌株,前者酶活性分别是后者的 1.33、2.12、1.42、1.20 倍。

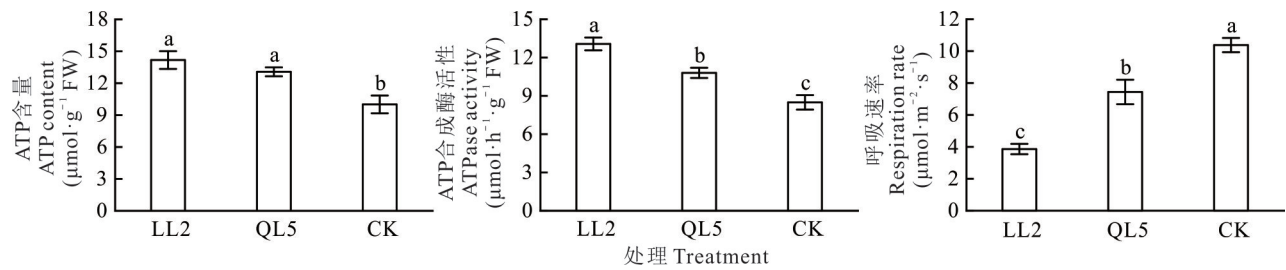


图 7 根瘤菌对紫花苜蓿呼吸速率和能量代谢的影响

Fig. 7 Effects of rhizobium on respiration rate and energy metabolism of alfalfa

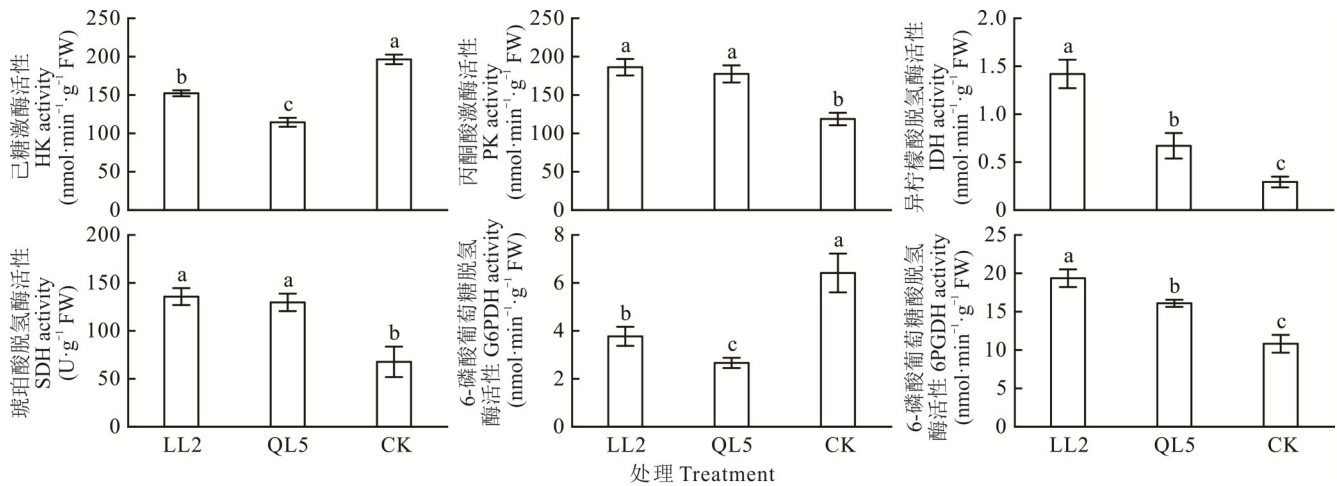


图 8 根瘤菌对紫花苜蓿呼吸代谢途径关键酶活性的影响

Fig. 8 Effects of rhizobium on key enzyme activities in the respiratory metabolic pathway of alfalfa

2.4 光合呼吸指标与生物量的综合分析

2.4.1 相关性分析 对供试甘农 9 号紫花苜蓿的生物量、结瘤固氮能力、光合特性及呼吸代谢进行 Mantel 分析,用地上干重(aboveground dry weight, GDW)来代表植株生物量,用单株有效根瘤数、固氮酶活性、豆血红蛋白含量代表植株的结瘤固氮能力(N),如图 9 所示。地上干重与 T_r 、Suc 含量、Sta 含量、ATPase 活性呈显著正相关,相关系数分别为 0.72、0.78、0.83、0.72($P < 0.05$),与呼吸速率呈负相关,相关系数为 0.66;结瘤固氮能力与 P_n 、SS 含量呈极显著正相关,相关系数分别为 0.83、0.79($P < 0.01$),与 Chl (a+b) 含量、G6PDH 活性呈显著正相关,相关系数分别为 0.76、0.85($P < 0.05$),与呼吸速率呈负相关。

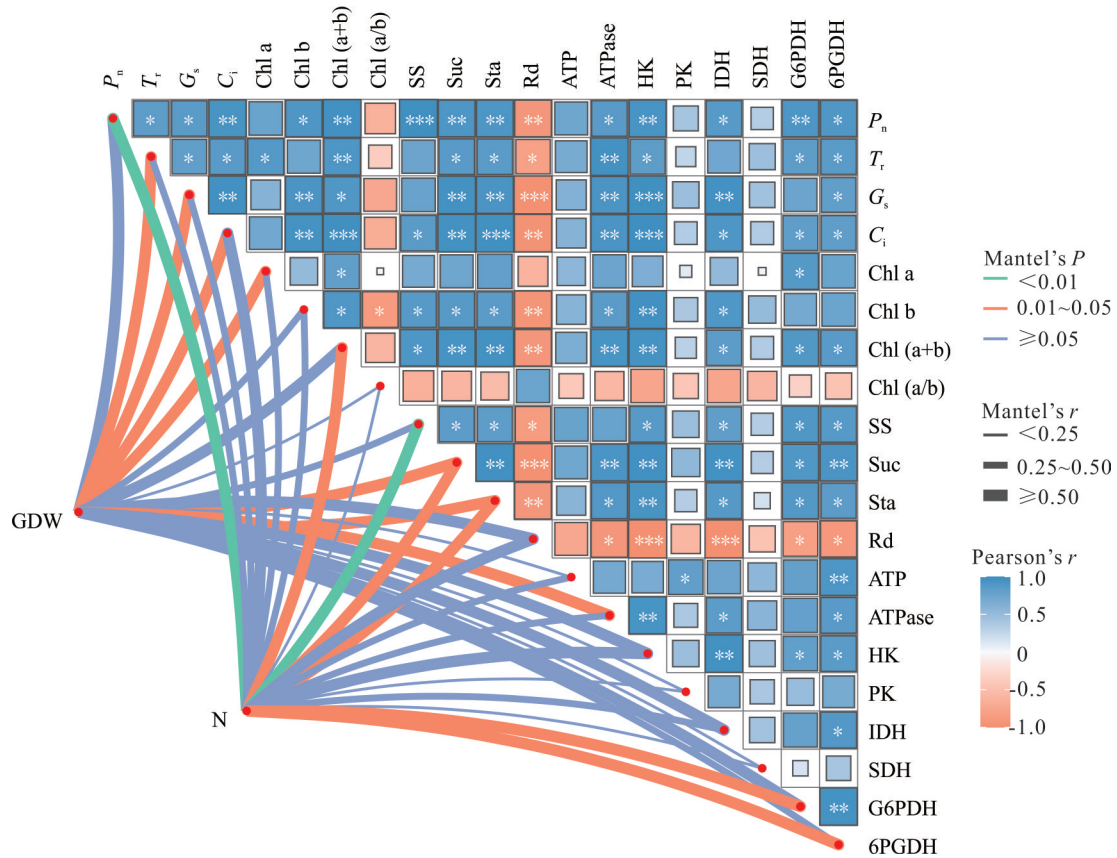


图9 紫花苜蓿生物量和结瘤固氮能力与光合和呼吸的相关性分析

Fig. 9 Correlation analysis of alfalfa biomass and nodulation nitrogen fixation capacity with photosynthesis and respiration

GDW: 地上干重 Aboveground dry weight; N: 单株有效根瘤数、固氮酶活性和豆血红蛋白含量 Effective nodule number per plant, nitrogenase activity and leghemoglobin content; P_n : 净光合速率 Net photosynthetic rate; T_r : 蒸腾速率 Transpiration rate; G_s : 气孔导度 Stomatal conductance; C_i : 胞间 CO_2 浓度 Intercellular CO_2 concentration; Chl a: 叶绿素 a Chlorophyll a; Chl b: 叶绿素 b Chlorophyll b; Chl (a+b): 叶绿素 (a+b) Chlorophyll (a+b); Chl (a/b): 叶绿素 (a/b) Chlorophyll (a/b); SS: 可溶性糖 Soluble sugar; Suc: 蔗糖 Sucrose; Sta: 淀粉 Starch; Rd: 呼吸速率 Respiration rate; ATP: 三磷酸腺苷 Adenosine triphosphate; ATPase: 三磷酸腺苷合成酶 Adenosine triphosphate synthase; HK: 己糖激酶 Hexokinase; PK: 丙酮酸激酶 Pyruvate kinase; IDH: 异柠檬酸脱氢酶 Isocitric dehydrogenase; SDH: 琥珀酸脱氢酶 Succinate dehydrogenase; G6PDH: 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 Glucose-6-phosphate dehydrogenase; 6PGDH: 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-phosphogluconate dehydrogenase. 下同 The same below.

2.4.2 变异系数 对接种不同共生效应根瘤菌株 LL2、QL5 处理组合的生物量、光合、呼吸等指标进行变异系数计算。由表 1 可知, LL2 处理下变异系数为 1.04%~65.78%, IDH 活性变异系数 (65.78%) 最大, 其次是呼吸速率 (45.77%)、 P_n (43.18%); QL5 处理下变异系数为 0.52%~41.33%, G6PDH 活性变异系数 (41.33%) 最大, 其次是 IDH 活性 (39.19%)、SDH 活性 (31.40%), 说明接种根瘤菌对呼吸代谢途径关键酶活性影响最大。两个处理之间, 除 G6PDH 活性、 C_i 、HK 活性之外的其余 27 个指标的变异系数均是 LL2 处理大于 QL5 处理。说明 LL2 菌株对甘农 9 号紫花苜蓿的生物量、光合和呼吸代谢途径及其关键酶活性的影响大于 QL5 菌株。

2.4.3 植物生产简单模型 为了分析接种根瘤菌对紫花苜蓿生物量的影响, 建立了紫花苜蓿地上干重 (dry weight, DW) 增加的数学模型。该模型是基于光合作用产生的干重与呼吸作用消耗干重的差异, 这个模型的描述使用了公式 (1)^[16], 如下:

$$\frac{d_{DW}}{d_t} = A_{hv}(PAR) \times 3.6 \times 10^{-7} \times M_{CO_2} \times S(DW) \times t_{light} - R_d \times 3.6 \times 10^{-7} \times M_{CO_2} \times \frac{1}{h_{leaf}} \times \frac{1}{\rho_{H_2O}} \times FW(DW) \times t_{light+dark} \quad (1)$$

$$A_{hv}(PAR) = A_{hv \max} \frac{PAR}{PAR + K_A} \quad (2)$$

表 1 不同根瘤菌接种处理生物量、光合和呼吸指标的变异系数

Table 1 Coefficient of variation of biomass, photosynthesis and respiration in different inoculation treatments

指标 Index	LL2			QL5		
	平均值	标准差	变异系数	平均值	标准差	变异系数
	Average value	Standard deviation	Coefficient of variation (%)	Average value	Standard deviation	Coefficient of variation (%)
GDW	0.50	0.09	18.37	0.45	0.04	9.60
PH	20.90	5.00	23.92	18.38	2.48	13.49
LA	1.46	0.42	28.87	1.29	0.25	19.79
RLS	0.85	0.01	1.04	0.84	0.01	0.52
P_n	13.71	5.92	43.18	9.75	1.96	20.14
T_r	10.37	4.36	42.01	8.33	2.32	27.84
G_s	166.47	45.23	27.17	136.48	15.23	11.16
C_i	423.80	51.99	12.27	369.97	105.83	28.60
Chl a	1.34	0.10	7.59	1.31	0.07	5.27
Chl b	0.68	0.20	29.12	0.63	0.15	23.73
Chl (a+b)	2.08	0.32	15.19	2.00	0.23	11.58
Chl (a/b)	2.11	0.46	22.04	2.17	0.40	18.65
F_v/F_o	2.76	0.46	16.81	2.54	0.25	9.66
F_v/F_m	0.73	0.03	4.58	0.72	0.02	2.78
q_N	0.37	0.04	11.97	0.41	0.01	2.90
q_P	0.95	0.02	2.08	0.95	0.01	1.49
Φ_{PSII}	0.65	0.03	4.59	0.63	0.02	2.58
ETR	66.18	12.12	18.31	57.23	3.17	5.53
SS	10.04	1.08	10.78	9.32	0.36	3.85
Suc	7.56	1.77	23.45	6.13	0.34	5.54
Sta	9.20	2.53	27.49	7.33	0.66	8.97
R_d	7.12	3.26	45.77	8.91	1.47	16.50
ATP	12.09	2.09	17.24	11.54	1.53	13.25
ATPase	10.78	2.29	21.23	9.65	1.16	11.98
HK	174.33	22.11	12.68	155.44	41.00	26.38
PK	148.07	29.36	22.14	152.46	33.75	19.83
IDH	0.86	0.56	65.78	0.48	0.19	39.19
SDH	98.64	30.97	33.45	101.69	34.02	31.40
G6PDH	5.09	1.32	25.94	4.54	1.88	41.33
6PGDH	15.09	4.27	28.31	13.45	2.64	19.61

PH: 株高 Plant height; LA: 叶面积 Leaf area; RLS: 茎叶比 Stem-leaf ratio; F_v/F_o : PS II 潜在光化学效率 PS II potential photochemical efficiency; F_v/F_m : PS II 最大光化学效率 PS II maximum photochemical efficiency; q_N : 非光化学淬灭系数 Non-photochemical quenching coefficient; q_P : 光化学淬灭系数 Photochemical quenching coefficient; Φ_{PSII} : 光化学量子产量 Photochemical quantum yield; ETR: 表观电子传递效率 Apparent electron transfer efficiency.

$$S(DW) = S_{\max} \frac{DW}{DW + K_s} \quad (3)$$

$$FW(DW) = K_{FW} DW \quad (4)$$

式中: $A_{nv}(PAR)$ 是光合 CO_2 同化速率与光强的关系; 3.6×10^{-7} 是单位从 “ $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ” 到 “ $mol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ ” 的转

换系数; M_{CO_2} 是 CO_2 的摩尔质量 ($44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$); $S(DW)$ 是受光照射下的总叶面积与干重的关系, t_{light} 是栽培的光照持续时间 (16 h); R_d 为平均暗呼吸速率, 取常数; $1/h_{\text{leaf}}$ 为叶片厚度, 根据文献 [17] 苜蓿叶片厚度约为 0.0183 cm , ρ_{H_2O} 为水分密度, 约 $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $FW(DW)$ 是鲜重与干重的关系, $t_{\text{light+dark}}$ 是栽培的光照和黑暗总持续时间 (24 h); $A_{\text{bv max}}$ 是最大光合 CO_2 同化速率, K_A 为对应于 $0.5 A_{\text{bv max}}$ 时的光强, S_{max} 为最大面积, K_s 是 $0.5 S_{\text{max}}$ 时的干重, K_{FW} 是 FW 与 DW 的比例系数。

从表 2 可以看出, 接种根瘤菌后, 植株单位光照时间下产生的单位干重显著大于 CK, 且 LL2 处理植株单位光照时间下产生的单位干重显著大于 QL5 处理 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 不同共生效应根瘤菌株接种后植株光合作用的变化

光合作用是植物干物质积累和产量形成的基础, 能够反映植株生产性能的高低^[18]。根瘤菌感染豆科植物根系可固定大气中游离的 N_2 , 将其转化为植物可直接吸收利用的铵态 N, 保证了 N 素的可持续供应, 使得植株叶面积增大, 叶绿素含量升高, 从而提升光合能力, 促进了紫花苜蓿的生长, 增加株高^[19]。孟捷等^[20]研究发现紫花苜蓿接种根瘤菌后其 P_n 、 T_r 、 G_s 和叶绿素含量增加, C_i 降低。本研究中发现接种高效根瘤菌株 LL2 后植株的 P_n 、 T_r 、 G_s 较接种低效 QL5 处理显著增加, T_r 、 G_s 与地上干重呈显著正相关。周相娟等^[21]研究发现在正常光照条件下, 接种根瘤菌能显著提高紫花苜蓿叶片的叶绿素含量和叶绿素荧光参数。李馨园等^[22]发现氮素供应充足的植株 Chl (a/b) 要比氮素供应不充足的植株低。本试验中接种根瘤菌株 LL2 苜蓿叶片 Chl a、Chl b 和 Chl (a+b) 含量显著高于接种菌株 QL5 处理, Chl a 与地上干重呈显著正相关, 这与前人研究结果一致; 接种高效根瘤菌株 LL2 的植株 Chl (a/b) 最小, 这可能是由于接种了根瘤菌株 LL2 的植株光合系统 II 的捕光色素蛋白复合物中富含更多的叶绿素 b 成分, 而捕光色素蛋白复合物的高含量增强了生物体捕获光能的能力, 从而促进了光合作用。接种根瘤菌株 LL2 (*S. meliloti* LL2) 后 F_v/F_o 、 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 、ETR 显著高于接种 QL5 处理, 这与光合特性和叶绿素含量的变化表现一致。马家斌等^[23]研究发现, 大豆 (*Glycine max*) 接种根瘤菌后, 随着植株地上部光合作用能力的提高, 更多的光合产物被转运至根瘤, Suc 和 SS 含量增加。本试验中, 紫花苜蓿植株中的 SS、Suc、Sta 含量在接种根瘤菌株 LL2 后增加最显著, Sta、Suc 含量与地上干重呈显著正相关, 这与前人研究结果一致。

大量研究表明, 在相同的环境条件下, 不同豆科植物可与同一根瘤菌共生固氮, 同一豆科植物也可以与多种根瘤菌进行共生固氮^[24]。不同根瘤菌与苜蓿品种的共生表型匹配性存在差异。接种匹配性好的根瘤菌可以增进紫花苜蓿的产量和品质。本研究接种高效匹配根瘤菌株 LL2 处理的气体交换参数、叶绿素含量、叶绿素荧光参数、光合产物显著高于接种低效匹配根瘤菌株 QL5 处理, 分析其原因可能是前者处理可以生成更多的有效根瘤, 且其固氮酶活性和豆血红蛋白含量显著高于后者, 能够固定大气中更多的氮利用到植株的叶绿素和光合作用中, 使得光合作用增强、光合产物增加。

3.2 不同共生效应根瘤菌株接种后植株呼吸作用的变化

呼吸作用释放能量, 是植物进行各种生理代谢的基础, 对植物的生长发育有重要意义^[25], 植物体内的能量主要以 ATP 的形式储存^[26]。ATPase 大量分布在线粒体内膜、叶绿体类囊体、质膜上, 在光合作用和呼吸作用过程中催化能量物质 ATP 的合成^[27-28]。吴艳芬等^[29]发现, 在接种中华根瘤菌后大豆植株叶片的 ATPase 活性增加, 且变化趋势与 P_n 变化趋势一致。本试验中, 接种根瘤菌株 LL2 后, 植株 ATPase 活性和 ATP 含量显著高于接种

表 2 单位光照时间下产生的单位干重

Table 2 Dry weight per unit light time

处理 Treatment	$A_{\text{bv}}(PAR)$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	$S(DW)$ (cm^2)	$FW(DW)$ (g)	d_{DW}/d_t ($\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$)
LL2	11.74	35.14	0.28	$0.06 \pm 0.01a$
QL5	9.58	27.86	0.24	$0.03 \pm 0.01b$
CK	9.08	15.26	0.20	$0.01 \pm 0.00c$

$A_{\text{bv}}(PAR)$: 光合 CO_2 同化速率 (光合有效辐射) Photosynthetic CO_2 assimilation rate (photosynthetically active radiation); $S(DW)$: 总叶面积 (干重) Total leaf area (dry weight); $FW(DW)$: 鲜重 (干重) Fresh weight (dry weight); d_{DW}/d_t : 单位干重/单位光照时间 Dry weight per unit/light time per unit.

菌株 QL5 处理, ATPase 与地上干重呈显著正相关。这可能是接种高效匹配根瘤菌后, 紫花苜蓿光合作用增强, 生产更多的光合产物运入植株和根瘤, 作为呼吸的底物进入呼吸代谢循环中, 氧化释放大量电子和能量, 释放的能量贮存在生成的 ATP 中。在呼吸代谢循环中转化为植物呼吸底物, 氧化释放大量电子和能量, 能量释放到高能成键成分中储存, 形成 ATP。

呼吸速率的大小可反映植物的新陈代谢活动, 较强的呼吸速率可以产生更多的能量, 使植物有足够能量来维持生长^[30], 但是过高的呼吸速率会加快植物消耗有机物质, 如果光合积累的有机物质不能满足呼吸的消耗, 就会影响植物的生长发育。本试验中, 呼吸速率与地上干重呈负相关, 接种根瘤菌处理的呼吸速率显著小于对照, 这可能是因为对照既缺乏根瘤菌接种又未施加氮肥, 植株生长迟滞, 叶片小, 光合效率减弱, 植株体内的能量少, 所以需要加大呼吸来产生更多的能量供植株生长发育, 而接种根瘤菌株 LL2 后, 氮供应充足, 呼吸速率正常进行, 无需消耗更多的光合底物来进行呼吸作用。呼吸代谢途径中的一些酶是调控代谢重要的限速酶, 在植物体内主要有糖酵解 (glycolysis, EMP)、三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA) 和磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway, PPP) 这 3 条呼吸代谢途径, 光合作用产生的有机物最终会进入这 3 种途径中进行代谢循环。吴艳芬等^[29]研究发现, 大豆在单接种根瘤菌后, 植株叶片 SDH 活性增加, 这可能是因为根瘤体内根瘤菌发育成类菌体, 为呼吸作用提供能源。本研究在每条呼吸途径中选用 2 个呼吸关键酶, 对其在接种根瘤菌后甘农 9 号紫花苜蓿生长发育过程中叶片的酶活性进行分析, 接种根瘤菌后 EMP-TCA 和 PPP 途径中酶活性前期低于对照, 中后期显著高于对照, 这可能是接菌后植株光合作用增强, 生成的糖类等光合产物含量升高, 逐渐进入呼吸代谢并积累, 使得酶活性缓慢提高, 增加了共生植物的呼吸代谢^[31]。从图 9 可以看出, 接种根瘤菌株 LL2 后紫花苜蓿叶片 EMP 中的 HK 活性、TCA 中的 IDH 活性和 PPP 中的 G6PDH、6PGDH 活性显著高于接种 QL5 菌株处理, 说明 3 条呼吸代谢途径均是接种菌株 LL2 处理大于接种 QL5 处理, 且 EMP 和 TCA 中的关键酶活性远大于 PPP 关键酶活性, 说明本试验中紫花苜蓿发育过程中呼吸代谢途径以 EMP-TCA 途径为主。

3.3 不同共生效应根瘤菌株接种后植株结瘤固氮能力、生物量与光合和呼吸的关系

植物借助光合作用, 将太阳能转化为化学能并储存在光合作用的产物—碳水化合物内, 在豆科植物与根瘤菌的共生固氮过程中, 这些光合产物充当了能源的角色^[32]。当光合产物以蔗糖形态被输送到根瘤并成为类菌体的有效代谢基质后, 为根瘤的固氮活动提供了必要的能量^[33]。共生体系中的植物光合作用对根瘤固氮具有直接影响, 光合作用强度越大, 产生的光合产物就越多, 进而为固氮过程提供的能源也就越充足。反之, 根瘤的固氮作用也影响植株的光合作用和呼吸代谢。

研究发现, 根瘤的数量、单个根瘤的重量和大小是影响单株根瘤总重量增加的主要因素, 根瘤性状特别是根瘤生物量与固氮能力有关^[34]。接种根瘤菌后紫花苜蓿植株根瘤的固氮酶活性和豆血红蛋白含量会显著增加^[35]。根瘤固氮酶活性是其固氮能力和固氮潜力大小的体现^[36], 而豆血红蛋白作为根瘤内一种关键成分, 能够有效地调控类菌体周边氧气的浓度, 从而增强根瘤的固氮效率, 根瘤固氮酶活性与豆血红蛋白含量之间存在显著的正相关性^[37]。本试验中, 接种高效匹配根瘤菌株 LL2 处理的单株有效根瘤数、固氮酶活性、豆血红蛋白含量显著高于接种低效匹配菌株 QL5 处理, 前者的固氮作用高于后者, 气体交换参数、叶绿素含量、光合产物、ATPase、呼吸途径关键酶活性也强于后者。光合作用影响植物的物质代谢和能量转化, 葡萄糖作为呼吸的底物, 主要由光合产物水解产生, 比如 Sta 和 Suc, 接种根瘤菌后光合能力增强, 使得能向植物体输送的光合产物也增多, Suc 和 Sta 含量的增加为呼吸代谢循环提供了更多的能源。地上部生物量比对照显著增加, 这说明光合产物的增量大于植株及其根瘤呼吸所消耗的部分, 使接菌后紫花苜蓿生物量增加。此外, 接种根瘤菌株 LL2 的变异系数大于菌株 QL5, 说明高效菌株 LL2 对植株的生长发育增益更明显。通过建立生物量与光合和呼吸的生产模型发现接种根瘤菌处理的植株单位光照时间下产生的单位干重显著高于不接菌处理, 其中接种高效匹配性根瘤菌株 LL2 对紫花苜蓿单位干重的增加效果更显著, 该生产模型可以供收割茎秆和叶片的牧草计算产量作参考。甘农 9 号紫花苜蓿接种根瘤菌株 LL2 共生组合可作为高产组合在栽培育种工作中加以利用。

4 结论

与低效匹配根瘤菌株相比,紫花苜蓿品种接种高效匹配根瘤菌株 LL2 后,可通过增加有效根瘤数、固氮酶活性和豆血红蛋白含量提高植株氮素的固定量,为植株光合和呼吸提供更多的氮素能源,从而产生更多的光合产物,降低呼吸速率,促进植株代谢循环,最终积累更高的生物量。

参考文献 References:

- [1] Wang Z, Chang W, Li J C, *et al.* Effects of alfalfa green manure on the yield, nitrogen absorption, and nitrogen translocation of feed maize. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(8): 63–73.
王峥, 常伟, 李俊诚, 等. 紫花苜蓿还田对饲料玉米产量和氮素吸收转运的影响. *草业学报*, 2024, 33(8): 63–73.
- [2] Diao C, Wang W X. The trade pattern of alfalfa importation into China and its influencing factors. *Pratacultural Science*, 2023, 40(9): 2424–2434.
刁婵, 王文信. 中国苜蓿草进口贸易格局及其影响因素. *草业科学*, 2023, 40(9): 2424–2434.
- [3] Wilkinson H, Coppock A, Richmond B L, *et al.* Plant-environment response pathway regulation uncovered by investigating non-typical legume symbiosis and nodulation. *Plants*, 2023, 12(10): 1964.
- [4] Wang D, Yang S, Tang F, *et al.* Symbiosis specificity in the legume: Rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 2012, 14(3): 334–342.
- [5] Lu B F, Kang W J, Shi S L, *et al.* Nitrogen fixation system of legume-rhizobia and its carbon-nitrogen interaction. *Chinese Journal of Grassland*, 2023, 45(11): 119–135, 144.
陆保福, 康文娟, 师尚礼, 等. 豆科植物—根瘤菌固氮系统及其碳氮互作. *中国草地学报*, 2023, 45(11): 119–135, 144.
- [6] Han K, Sun Y, Zhang K, *et al.* Effect of different rhizobium on productivity of *Medicago sativa* L. *Acta Agrestia Sinica*, 2018, 26(3): 639–644.
韩可, 孙彦, 张昆, 等. 接种不同根瘤菌对紫花苜蓿生产力的影响. *草地学报*, 2018, 26(3): 639–644.
- [7] Zhang Q X, Zhu A M, Zhang Y X, *et al.* Effects of different rhizobium inoculation on growth of *Medicago* and nodule in sandy land. *Grassland and Turf*, 2019, 39(1): 7–15.
张庆昕, 朱爱民, 张玉霞, 等. 接种不同根瘤菌对沙地苜蓿结瘤及生长状况的影响. *草原与草坪*, 2019, 39(1): 7–15.
- [8] Li Y L, Chen P, Fu Z D, *et al.* Research progress on regulation of root nodule formation and development of legume by light signals and photosynthetic products. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2023, 31(1): 21–30.
李易玲, 陈平, 付智丹, 等. 光信号和光合产物调控豆科植物根瘤形成发育的研究进展. *中国生态农业学报*, 2023, 31(1): 21–30.
- [9] Marie-Christine Morère-Le P, Clochard T, Limami A M. NPF and NRT2 from *Pisum sativum* potentially involved in nodule functioning; Lessons from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plants*, 2024, 13(2): 322.
- [10] Govindjee. Advances in photosynthesis and respiration: Focus on plant respiration. *Photosynthesis Research*, 2005, 85(2): 255–259.
- [11] Yurkevich M, Kurbatov A, Ikkonen E. Effect of secondary paper sludge on physiological traits of *Lactuca sativa* L. under heavy-metal stress. *Plants*, 2024, 13(8): 1098.
- [12] Kang W J. Biotype division and transcriptomic analysis of alfalfa rhizobia. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2019.
康文娟. 紫花苜蓿根瘤菌生物型划分及其转录组学分析. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.
- [13] Lu B F, Kang W J, Shi S L, *et al.* The study on dynamics of nitrogen fixation efficiency of alfalfa-rhizobia symbiosis. *Chinese Journal of Grassland*, 2024, 46(6): 36–48.
陆保福, 康文娟, 师尚礼, 等. 紫花苜蓿与根瘤菌共生过程中固氮效率的动态研究. *中国草地学报*, 2024, 46(6): 36–48.
- [14] Wang T, Wang Z J, Zhang Y H, *et al.* Study on relationship between soybean leghemoglobin content and yield. *Soybean Science*, 2020, 39(1): 45–51.
王田, 王志杰, 张云鹤, 等. 大豆根瘤豆血红蛋白含量与产量关系研究. *大豆科学*, 2020, 39(1): 45–51.
- [15] Zou Q. Plant physiology experiment instruction. Beijing: China Agriculture Press, 2003: 110–114.
邹琦. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 2003: 110–114.
- [16] Yudina L, Sukhova E, Gromova E, *et al.* Effect of duration of LED lighting on growth, photosynthesis and respiration in lettuce. *Plants*, 2023, 12(3): 442.
- [17] Zhang Y Y, Hu D D, Ma C H, *et al.* Leaf structure and photosynthetic properties of alfalfa in response to bacteria and

- phosphorus addition. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(8): 133–144.
- 张盈盈, 胡丹丹, 马春晖, 等. 苜蓿叶片结构和光合特性对菌磷添加的响应. *草业学报*, 2024, 33(8): 133–144.
- [18] Liu H F, Zhuang H M, Han H W, *et al.* Effects of different exogenous substances on photosynthetic characteristics and dry matter accumulation of tomato seedlings. *Molecular Plant Breeding*, (2024-11-18)[2024-12-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20241115.1634.010.html>.
- 刘会芳, 庄红梅, 韩宏伟, 等. 不同外源物喷施对番茄穴盘苗光合特性及干物质积累的影响. *分子植物育种*, (2024-11-18)[2024-12-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20241115.1634.010.html>.
- [19] Liu S X, Wei G J, Jing R Y, *et al.* Effects of sinorhizobium SD101 inoculation and shading on nitrogen fixation and photosynthesis of *Medicago sativa* L. *Crop Journal*, 2018(5): 156–161.
- 刘淑霞, 魏国江, 荆瑞勇, 等. 接种中华根瘤菌SD101和避光对紫花苜蓿固氮和光合作用的影响. *作物杂志*, 2018(5): 156–161.
- [20] Meng J, Ma H, Li H J, *et al.* Effects of rhizobia on photosynthetic characteristics and the growth of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2021, 44(4): 241–247.
- 孟捷, 马红, 李会军, 等. 2种根瘤菌对新牧1号苜蓿光合特征和生长的影响. *新疆农业大学学报*, 2021, 44(4): 241–247.
- [21] Zhou X J, Liang Y, Shen S H, *et al.* Effects of rhizobial inoculation and shading on nitrogen fixation and photosynthesis of soybean. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007(3): 478–484.
- 周相娟, 梁宇, 沈世华, 等. 接种根瘤菌和遮光对大豆固氮和光合作用的影响. *中国农业科学*, 2007(3): 478–484.
- [22] Li X Y, Wang S Y, Wang S R, *et al.* Effect of rhizobium combined with *Pamibacillus mucilaginosus* on soybean chlorophyll fluorescence characteristics, yield and quality. *Soybean Science*, 2014, 33(4): 541–544, 549.
- 李馨园, 王守义, 王淑荣, 等. 根瘤菌配施胶质类芽孢杆菌对大豆叶绿素荧光特性、产量及品质的影响. *大豆科学*, 2014, 33(4): 541–544, 549.
- [23] Ma J B, Yu X B, Wu H Y, *et al.* Effects of inoculation of different rhizobium on photosynthetic characteristics and nitrogen fixation of soybean. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2020, 42(1): 102–108.
- 马家斌, 于晓波, 吴海英, 等. 接种根瘤菌对西南地区大豆光合性能和固氮能力的影响. *中国油料作物学报*, 2020, 42(1): 102–108.
- [24] Gao Y Z, Ren J. Advances and prospects in plant root nodule symbiotic nitrogen fixation. *Scientia Sinica Vitae*, 2025, 55(1): 131–145.
- 高英志, 任健. 植物根瘤共生固氮研究进展与展望. *中国科学: 生命科学*, 2025, 55(1): 131–145.
- [25] Zhan J, Liu D W, Li L, *et al.* Responds of respiration related enzymes activity to waterlogging stress occurred at germination stages of peanut. *Journal of Peanut Science*, 2019, 48(4): 63–66, 74.
- 湛斌, 刘登望, 李林, 等. 花生种子发芽期呼吸酶活性对淹水的响应. *花生学报*, 2019, 48(4): 63–66, 74.
- [26] Yu C, Li G L, Sun Y Q, *et al.* Characteristics of respiratory metabolism in growth and development of sugar beet taproot. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(12): 3377–3386.
- 于超, 李国龙, 孙亚卿, 等. 甜菜块根生长发育中呼吸代谢的特性研究. *作物学报*, 2023, 49(12): 3377–3386.
- [27] Falhof J, Pedersen J T, Fuglsang A T, *et al.* Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Molecular Plant*, 2016, 9(3): 323–337.
- [28] Zhou S J, Zhang M, Wang P. Response of plant plasma membrane H⁺-ATPase to environmental stress factors: A review. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2021, 27(2): 485–494.
- 周思婕, 张敏, 王平. 植物质膜H⁺-ATP酶对环境胁迫因子的响应研究进展. *应用与环境生物学报*, 2021, 27(2): 485–494.
- [29] Wu Y F, Liu Q M, Liu W H, *et al.* Effects of inoculation of AMF and rhizobium on photosynthetic and respiratory metabolism and growth of intercropping glycine max. *Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2022, 40(2): 231–241.
- 吴艳芬, 刘秋鸣, 刘卫欢, 等. AMF与根瘤菌对间作大豆光合与呼吸代谢的影响. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 40(2): 231–241.
- [30] Chen X J, Xu Z S, Zhao B P, *et al.* Effects of salt stress on root respiratory metabolism, antioxidant enzyme activities, and yield of oats. *Chinese Journal of Ecology*, 2021, 40(9): 2773–2782.
- 陈晓晶, 徐忠山, 赵宝平, 等. 盐胁迫对燕麦根系呼吸代谢、抗氧化酶活性及产量的影响. *生态学杂志*, 2021, 40(9): 2773–2782.

- [31] Fan Q S, Lou W J. Physiological and biochemical studies on symbiotic nitrogen fixation between rhizobium and leguminosae. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1984(3): 58–66.
樊庆笙, 娄无忌. 根瘤菌—豆科植物共生固氮的生理生化研究. *南京农业大学学报*, 1984(3): 58–66.
- [32] Dehigaspitiya P, Milham P, Ash G J, *et al.* Exploring natural variation of photosynthesis in a site-specific manner: evolution, progress, and prospects. *Planta*, 2019, 250(4): 1033–1050.
- [33] Wang J K. Mechanism and regulation of high temperature at the early stage of grain filling on changes in carbon and nitrogen metabolism of japonica rice grains. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
王军可. 灌浆初期高温影响粳稻籽粒碳氮代谢变化的机理及其调控. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [34] Hwang S, Ray J D, Cregan P B, *et al.* Genetics and mapping of quantitative traits for nodule number, weight, and size in soybean (*Glycine max* L. [Merr.]). *Euphytica*, 2014, 195(3): 419–434.
- [35] Lu B F, Kang W J, Shi S L, *et al.* Differences in fatty acid and central carbon metabolite distribution among different tissues of alfalfa-rhizobia symbiotic system. *Agronomy*, 2024, 14(3): 511.
- [36] Ma C, Liu C, Yu Y, *et al.* GmTNRP1, associated with rhizobial type-III effector NopT, regulates nitrogenase activity in the nodules of soybean (*Glycine max*). *Food and Energy Security*, 2023, DOI: 10.1002/fes3.466.
- [37] Hoya J A, Hargrove M S. The structure and function of planthemoglobins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 1(46): 371–379.