

大豆氮高效种质苗期筛选与鉴定

远月丽^{1,2}, 易媛媛³, 战勇⁴, 陈李森¹, 袁松丽¹, 黄毅¹, 肖之源¹, 张婵娟^{1*}, 周新安^{1*}

(1. 中国农业科学院油料作物研究所, 农业农村部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉, 430062;

2. 中国农业科学院研究生院, 北京, 100081;

3. 福建农林大学农学院作物抗性与化学生态学研究所, 福建 福州, 350000;

4. 新疆农垦科学院作物研究所/国家大豆产业技术体系石河子综合试验站/谷物品质与遗传改良兵团重点实验室, 新疆 石河子, 832000)

摘要: 氮高效利用种质资源的筛选与鉴定是大豆高产育种的重要前提。本研究以 78 份大豆种质资源为材料, 采用水培法, 分析正常氮(氮浓度为 7.5 mmol/L)和低氮(氮浓度为 0.75 mmol/L)条件下大豆生物量和耐低氮指数。根据地上部干重、总干重、耐低氮胁迫指数初步筛选出 3 份耐低氮材料(2011-X-559、2011-X-618、2011-X-639)、3 份低氮敏感材料(2011-X-472、2011-X-531、2011-X-547)和 2 份中间型材料(吉育 86、东农 53)。进一步复筛测定 8 份大豆种质材料的叶绿素含量、生物量、氮含量和根系形态构型等 17 个氮利用相关指标, 通过对性状指标的变异系数、相关性和主成分分析, 筛选出总干重、整株氮含量、整株总氮、总根长、根体积和根表面积 6 个指标可作为大豆苗期耐低氮评价关键指标, 并依此鉴定出耐低氮材料 2011-X-618 和低氮敏感材料 2011-X-531。本研究为大豆耐低氮机制解析和氮高效育种提供了优异种质资源和理论指导。

关键词: 大豆; 氮利用效率; 耐低氮胁迫指数; 生物量; 根构型

中图分类号: S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-9084(2022)03-0539-09

Distinguishing and evaluating high nitrogen-use-efficient soybean germplasm at seedling stage

YUAN Yue-li^{1,2}, YI Yuan-yuan³, ZHAN Yong⁴, CHEN Li-miao¹, YUAN Song-li¹, HUANG Yi¹,

XIAO Zhi-yuan¹, ZHANG Chan-juan^{1*}, ZHOU Xin-an^{1*}

(1. Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetics Improvement of Oil Crops of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430062, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Institute of Crop Resistance and Chemical Ecology, Agricultural College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China; 4. Crop Research Institute, Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation Sciences / Shihezi Comprehensive Test Station of National Soybean Industrial Technology System / Key Laboratory of Grain Quality and Genetic Improvement of the Corps, Shihezi 832000, China.)

Abstract: Distinguishing elite germplasm with high nitrogen-use-efficiency is critical to high-yield breeding in soybean. In this study, we employed hydroponic assay and evaluated biomass and tolerance index of low nitrogen stress of 78 accessions at two nitrogen levels, i.e. normal (7.5mmol/L) and low (0.75mmol/L). Based on performance of aboveground dry weight, whole-plant dry weight and low nitrogen tolerance index, 8 elite accessions, including 3 low-nitrogen-tolerant genotypes (2011-X-559, 2011-X-618, 2011-X-639), 3 low-nitrogen-sensitive genotypes (2011-X-472, 2011-X-531, 2011-X-547) and 2 intermediate genotypes (Jiyu 86, Dongnong 53), were distinguished. Furthermore, we focused on the 8 accessions and examined 17 traits, covering chlorophyll content, biomass, nitrogen percentage and root morphology. By means of variation coefficient, Pearson correlation and principal

收稿日期: 2021-04-09

基金项目: 国家重点研发计划(2020YFD1000903-10); 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08004005)

作者简介: 远月丽(1995-), 女, 硕士研究生, 主要从事大豆分子育种研究, E-mail: 15738397164@163.com

* 通讯作者: 张婵娟(1982-), 女, 助理研究员, 主要从事大豆分子育种研究, E-mail: zhangchanjuan@caas.cn;

周新安(1963-), 男, 研究员, 主要从事大豆遗传育种研究, E-mail: zhouocri@sina.com

component analysis, 6 traits (composing of dry biomass, total nitrogen percentage, total nitrogen accumulation, total root length, root volume and root surface area) could be considered as the main indicators for screening low nitrogen tolerant soybean germplasm at seedling stage. Consequently, a low nitrogen tolerant accessions 2011-X-618 and a low nitrogen sensitive accessions 2011-X-531 were further validated. We hoped to shed light on deciphering the mechanism of nitrogen use efficiency and provide excellent germplasm for high yield breeding in soybean.

Key words: soybean; nitrogen use efficiency; low nitrogen tolerance index; biomass; root morphology

氮是植物生长发育最重要的矿质元素之一,是植物叶绿体、核酸、蛋白质以及很多次生代谢产物的重要组成成分,施用氮肥能提高作物产量^[1,2]。现代农业生产的强化种植,使得耕地土壤中可被直接吸收利用的氮源日渐有限。为提高作物产量,氮肥施用量逐年增加,占肥料年消耗的60%左右。我国氮肥年施用量超过0.26亿吨,氮肥利用率仅30%左右,远低于世界平均水平^[3,4]。而且,大量施用化肥并未同比提高作物产量,高肥低效现象反而增加了农业生产成本,影响了农业可持续发展,造成不同程度的环境危害^[5]。

大豆是喜氮作物,大豆籽粒形成需要大量氮素营养供给,高蛋白品种对氮素需求更高。大豆根瘤共生固氮将分子态氮 N_2 转化为可被植物利用的氨,可满足豆科植物60%~70%的氮素需求^[6,7]。但在苗期,大豆根瘤数量少,植株尚不能或很少利用根瘤菌共生固氮供给的氮素,土壤和肥料中的氮素是大豆苗期主要氮素来源^[8]。但我国土壤普遍缺氮,过量施用化肥可能造成土壤酸化,流入江河湖海污染水资源^[5]。选育氮肥高效利用的农作物品种是解决我国农业生产中环境与资源间矛盾的关键^[9]。不同大豆品种的耐低氮能力存在差异,筛选氮高效利用种质资源、挖掘氮高效利用基因和培育氮高效品种是提高大豆氮利用效率、减少氮肥用量和提高大豆产量的有效途径。

近年来,国内在水稻^[10]、小麦^[11]、油菜^[12,13]、棉花^[14]、谷子^[15]和烟草^[16]等作物中开展了苗期氮高效利用材料的筛选与鉴定研究,将苗期株高、叶绿素含量、生物量、根系性状、氮积累量及氮吸收量等作为筛选指标,初步建立起氮高效评价指标体系。目前,大豆氮高效种质资源筛选研究相对有限。郝青南等^[8]将干重、地上部分氮积累量、生物量增加值和氮吸收量作为判断大豆苗期耐低氮的指标,筛选出耐低氮型品种。本研究采用营养液培养方法,对78份大豆资源材料进行苗期耐低氮表型鉴定,通过分析各材料地上部分干重和总干重耐低氮胁迫指数,初步筛选出氮高效、低氮敏感和中间型大豆材料共

8份,鉴定17个氮利用相关性状,筛选出耐低氮材料2011-X-618和低氮敏感材料2011-X-531,为大豆耐低氮机制解析和氮高效大豆新品种选育提供了优异种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

选取大豆种质资源78份(表3),由新疆农垦科学院作物研究所提供。

1.2 低氮处理方法

1.2.1 初筛实验 初筛实验在中国农业科学院油料作物研究所室外生长平台(带遮雨装置)进行,低氮处理参照郝青南等^[8]的方法。

挑选大小一致、无花斑、无虫眼的种子,用纸卷法发芽,6~7 d后幼苗长出真叶时,挑选长势一致的幼苗,移至水培盘中清水培养。采用规格为54 cm×36 cm的泡沫板作为种植浮床,以海绵为固定基质,行株距6 cm×5 cm、种植孔径2 cm。待幼苗第一片真叶完全平展(3 d左右),去掉幼苗子叶,将清水换成1/2 Hoagland 营养液生长4 d后,开始进行处理。实验设正常氮(normal nitrogen, NN)和低氮(low nitrogen, LN)两种处理,每种处理设3次重复。正常Hoagland 营养液为0.472 g·L⁻¹Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0.252 5 g·L⁻¹KNO₃, 0.04 g·L⁻¹NH₄NO₃, 0.068 g·L⁻¹KH₂PO₄, 0.246 5 g·L⁻¹MgSO₄·7H₂O, 0.004 6 g·L⁻¹Fe-EDTA, 0.000 83 g·L⁻¹KI, 0.006 2 g·L⁻¹H₃BO₃, 0.019 g·L⁻¹MnSO₄·H₂O, 0.008 6 g·L⁻¹ZnSO₄·7H₂O, 0.000 024 g·L⁻¹CuSO₄·5H₂O, 0.000 24 g·L⁻¹Na₂MoO₄·2H₂O, 0.000 027 g·L⁻¹CoCl₂·6H₂O。各试剂均为国产分析纯。低氮营养液含0.047 2 g·L⁻¹Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0.025 25 g·L⁻¹KNO₃, 0.004 g·L⁻¹NH₄NO₃,其它成分不变,缺少的Ca²⁺和K⁺分别用CaCl₂·2H₂O和K₂SO₄补足。正常氮营养液氮素含量为7.5 mmol/L;低氮营养液氮素含量为正常氮的1/10,即0.75 mmol/L。每个水培盘装7 L营养液,每三天更换一次营养液。处理18 d后,取样并进行生物量测定。

1.2.2 复筛实验 复筛在人工控制光温的温室内进行,光照周期为16 h长日照条件,温度控制在27±2℃,光照强度为30 000 LUX左右,相对湿度为65%~85%。

由于使用Hoagland营养液在温室进行低氮处理时,大豆叶片容易长褐斑,因此采用添加NH₄NO₃的B&D无氮营养液^[17]代替Hoagland营养液。复筛时正常氮营养液配方如表1所示,氮含量为7.5 mmol/L;低氮营养液氮素含量为正常氮的1/10,即0.75 mmol/L,其他营养物质含量不变。去掉子叶后,将材料在1/2正常氮营养液中的培养时间由初筛的4 d缩短为2 d,将处理时间由初筛的18 d缩短为12 d。其余实验方法与步骤同初筛。处理12 d后,进行相关指标测定。

1.3 测定指标

1.3.1 叶绿素含量与株高 复筛时,低氮和正常氮处理12 d后,使用便携式叶绿素仪SPAD-502Plus测定幼苗顶端第三片完全展开叶的叶绿素相对含量;使用直尺测量幼苗株高,所测株高为从子叶节至生长点的长度。设置3次重复,每个重复测定3株苗。

1.3.2 根构型相关性状 复筛时,低氮和正常氮处理12 d后,用剪刀在幼苗长有侧根的部位剪下,将根组织从幼苗分离,自来水冲洗干净,放入装有蒸馏水的透明根盘(25 cm×20 cm)中,将侧根逐一分开,用根系扫描仪(Epson V800)扫描获得TIF图片,使用WinRHIZO根系分析系统对扫描图像进行分析,获取总根长(TRL, cm)、根尖数(RTN)、根体积(RV, cm³)、根表面积(RSA, cm²)和根直径(RAD, mm)性状数据。设置3次重复,每个重复测定3株幼苗。

1.3.3 生物量测定 初筛时,低氮和正常氮处理18 d后,收获大豆幼苗,将根组织和地上部组织分别置于105℃烘箱杀青30 min,60℃烘干至恒重,用万分之一天平准确称量地上部分干重(SDW)和地下

部分干重(RDW),计算总干重(TDW)。设置3次重复,每个重复测定3株幼苗。

复筛时,低氮和正常氮处理12 d后,按照初筛时的方法称量每种材料的地上部干重和地下部干重,并计算总干重与根冠比(RSR)。

计算公式如下:

总干重=地下部分干重+地上部分干重;

根冠比=地下部分干重/地上部分干重。

1.3.4 氮含量测定 复筛时,将用于生物量测定的样品继续进行氮含量的测定。氮含量测定采用凯氏定氮法。氮含量测定完毕后同时计算整株氮含量(%)及整株总氮(mg)。

计算公式如下:

地上部总氮(mg)=植物地上部分干重(g)×地上部分氮含量(%)×1000;

地下部总氮(mg)=植物地下部分干重(g)×地下部分氮含量(%)×1000;

整株总氮(mg)=地上部总氮(mg)+ 地下部总氮(mg);

整株氮含量(%)=总氮量(mg)/(总干重(g)×1000)×100。

1.4 数据分析

采用Microsoft Office Excel(2013)和IBM SPSS Statistics20.0软件整理分析实验数据。

2 结果与分析

2.1 不同氮处理生物量差异

不同资源材料地上部分干重、地下部分干重和总干重变异系数在低氮处理条件下分别达到29.20%、30.40%和28.44%,在正常氮处理条件下分别为30.04%、28.08%和29.14%,表明不同资源材料的生物量在两种氮水平下均表现出很大的差异(表2)。

本实验计算比较耐低氮胁迫指数(表3),以地上部干重及总干重耐低氮指数均大于0.8为标准,

表1 大豆苗期水培实验正常氮营养液组分

Table1 Normal nitrogen nutrient ingredients for soybean seedling growth

大量元素	浓度/mmol·L ⁻¹	微量元素	浓度
Macronutrients	Concentration/(mmol·L ⁻¹)	Trace elements	Concentration/(μmol·L ⁻¹)
CaCl ₂	1	H ₃ BO ₃	2
KH ₂ PO ₄	0.5	ZnSO ₄	0.5
MgSO ₄	0.25	CuSO ₄	0.2
K ₂ SO ₄	0.25	CoSO ₄	0.1
Fe.citrate	0.05	Na ₂ MoO ₄	0.1
NH ₄ NO ₃	3.75	MnSO ₄	1

表2 78份大豆种质在正常氮和低氮条件下苗期生物量的差异

Table 2 Differences in seedling biomass of 78 soybean accessions under normal and low nitrogen conditions

性状	环境	最小值/g	最大值/g	标准差	均值/g	变异系数/%
Trait	Environment	Min	Max	SD	Mean value	CV
地上部干重	NN	0.48	2.34	0.29	0.98a	30.04
SDW	LN	0.38	1.53	0.20	0.70b	29.20
地下部干重	NN	0.12	0.48	0.06	0.22a	28.08
RDW	LN	0.12	0.43	0.07	0.22a	30.40
总干重	NN	0.59	2.82	0.35	1.21a	29.14
TDW	LN	0.50	1.95	0.26	0.93b	28.44

注:不同小写字母表示正常氮和低氮条件下的生物量差异达0.05显著水平

Note: Different lowercase letters indicate significant difference of biomass under normal and low nitrogen conditions at 0.05 level. SDW: shoot dry weight; RDW: root dry weight; TDW: total dry weight

表3 78份大豆种质及干重耐低氮胁迫指数

Table 3 Seventy-eight soybean accessions with their low nitrogen tolerant indexes of dry weight

材料 Accession	耐低氮胁迫指数 LNTI		材料 Accession	耐低氮胁迫指数 LNTI		材料 Accession	耐低氮胁迫指数 LNTI	
	SDW	TDW		SDW	TDW		SDW	TDW
2011-X-547	0.42	0.52	新大豆9号 Xindadou 9	0.65	0.69	合丰56 Hefeng 56	0.81	0.85
2011-X-626	0.48	0.62	嫩02030-3 Nen02030-3	0.65	0.69	中黄45 Zhonghuang 45	0.81	0.81
2011-X-472	0.5	0.53	垦1102 Ken1102	0.65	0.71	2011-X-471	0.82	0.86
2011-X-486	0.52	0.53	2011-X-474	0.66	0.7	嫩02031-12 Nen02031-12	0.82	0.85
2011-X-629	0.53	0.57	2011-X-653	0.67	0.72	石大豆1号 Shidadou 1	0.82	0.86
黑农62 Heinong 62	0.54	0.58	绥00-1193 Sui00-1193	0.68	0.78	新大豆14号 Xindadou 14	0.82	0.86
2011-X-654	0.54	0.65	黑龙55 Heilong 55	0.69	0.71	长2011-M1316 Chang2011-M316	0.83	0.91
2011-X-572	0.54	0.61	2011-X-522	0.7	0.75	黄白荚 Huangbaijia	0.83	0.85
抗线虫6号 Kangxianchong 6	0.55	0.59	吉育86 Jiyu 86	0.7	0.75	新大豆2号 Xindadou 2	0.83	0.87
2011-X-531	0.56	0.58	2011-X-489	0.71	0.8	东农0126 Dongnong 0126	0.84	0.88
黑农66 Heinong 66	0.56	0.57	11#754	0.72	0.79	黑农44 Heinong 44	0.84	0.87
绥农31 Suinong 31	0.57	0.6	2011-X-503	0.73	0.74	21-28#754	0.85	0.94
东农49 Dongnong 49	0.59	0.68	嫩01006-1 Nen01006-1	0.74	0.86	2011-X-553	0.85	0.88
石大豆2号 Shidadou 2	0.59	0.69	黑农50 Heinong 50	0.76	0.78	2011-X-551	0.86	0.89
垦1105 Ken 1105	0.6	0.65	2011-X-493	0.76	0.8	科索 Kesuo	0.86	0.87
新大豆3号 Xindadou 3	0.61	0.66	2011-X-581	0.77	0.81	2011-X-622	0.86	0.82
2011-X-645	0.62	0.57	2011-X-470	0.77	0.79	黑农64 Heinong 64	0.86	0.88
2011-X-638	0.62	0.62	吉育201 Jiyu 201	0.77	0.98	2011-X-568	0.87	0.91
2011-X-542	0.63	0.71	2011-X-523	0.77	0.77	2011-X-491	0.87	0.94
2011-X-573	0.63	0.68	长19 Chang 19	0.78	0.83	2011-X-559	0.89	0.83
2011-X-478	0.63	0.69	黑农63 Heinong 63	0.78	0.81	东农52 Dongnong 52	0.91	0.96
2011-X-576	0.63	0.65	浅灰荚 Qianhuijia	0.79	0.84	合辐08-1 Hefu08-1	0.91	0.97
2011-X-617	0.63	0.68	2011-X-476	0.79	0.84	哈90-33-5 Ha90-33-5	0.93	0.98
新大豆8号 Xindadou 8	0.64	0.68	2011-311-16	0.8	0.87	2011-X-618	0.94	1
20M-X-484	0.64	0.68	2011-X-529	0.8	0.84	2011-X-490	0.96	1.01
2011-X-628	0.64	0.67	东农53 Dongnong 53	0.8	0.86	2011-X-639	1	1.11

注:耐低氮胁迫指数=低氮水平下性状表型值/正常氮水平下性状表型值

Note: Low nitrogen tolerance index (LNTI) = Phenotypic traits under low nitrogen condition/phenotypic traits under normal nitrogen condition

初步筛选3份耐低氮材料2011-X-559、2011-X-618、2011-X-639,以地上部干重及总干重耐低氮指数均小于0.6为标准,筛选出3份低氮敏感材料

2011-X-472、2011-X-531、2011-X-547及2份中间型材料吉育86、东农53。

2.2 苗期耐低氮材料筛选指标

2.2.1 变异分析 低氮处理后,17个性状指标均发生了显著变化,具体表现为地上部干重、总干重、氮含量、总氮量、株高和叶绿素含量显著降低;地下部干重和根冠比显著增加;根构型指标除根直径显著降低外,其他性状指标均显著增加(表4)。不同氮素水平下,大豆苗期株高、根尖数、根体积、根表面积等的变异系数都大于12%,表明耐低氮性在不同材料间差异大(表4)。在正常氮处理下,17个性状变异系数范围为4.06%~24.58%,其中以株高、根尖数、地上部干重、地下部干重和总干重较大;在低氮胁迫下,各指标变异系数范围为4.51%~26.13%,其中以根尖数、株高、根体积、根表面积和总根长较大;比较耐低氮胁迫指数,各指标变异系数范围为4.45%~17.37%,其中以地上部总氮、株高、整株总氮、地下部总氮和根体积较大(表4)。

2.2.2 相关性分析 为进一步筛选出评价大豆耐低氮能力的指标,对所测定的17个指标进行相关性

分析。在正常氮条件下,各指标间表现出明显的相关性,植株总干重与根体积呈极显著正相关($r = 0.949^{**}$);整株氮含量与地上部氮含量呈极显著正相关($r = 0.954^{**}$);整株总氮与总干重呈极显著正相关($r = 0.971^{**}$);总根长与根表面呈极显著正相关($r = 0.872^{**}$);根体积与整株总氮呈极显著正相关($r = 0.913^{**}$)。在低氮条件下,各指标间表现出明显的相关性,植株总干重与地上部干重呈极显著正相关($r = 0.987^{**}$);整株氮含量与总干重呈极显著负相关($r = -0.898^{**}$);整株总氮与地上部总氮呈极显著正相关($r = 0.939^{**}$);总根长与根表面积呈显著正相关($r = 0.829^{*}$);根表面积与根体积呈极显著正相关($r = 0.925^{**}$);根体积与总干重呈显著正相关($r = 0.725^{*}$)(表5)。

2.2.3 主成分分析 对17个性状耐低氮胁迫指数进行主成分分析。主成分分析结果表明,3个主成分的累积贡献率可以达到81.25%,说明这3个成分

表4 8份大豆材料苗期各指标的变异情况

Table 4 Variation of each index of 8 soybean accessions at seedling stage

性状 Trait	正常氮 Normal nitrogen (NN)			低氮 Low nitrogen (LN)			耐低氮胁迫指数 LNTI		
	均值 Mean	范围 Range	变异 CV/%	均值 Mean	范围 Range	变异 CV/%	均值 Mean	范围 Range	变异 CV
SDW	0.58a	0.46~0.73	16.58	0.36b	0.31~0.41	10.37	0.64	0.51~0.76	11.18
RDW	0.16b	0.12~0.19	16.36	0.23a	0.18~0.27	12.29	1.48	1.31~1.62	7.09
TDW	0.73a	0.57~0.91	16.32	0.59b	0.49~0.67	10.92	0.82	0.67~0.94	9.9
RSR	0.27b	0.25~0.29	6.2	0.63a	0.58~0.66	4.51	2.33	2.09~2.58	6.24
SNC	5.19a	4.85~5.59	4.06	2.39b	2.04~2.85	12.66	0.46	0.40~0.54	10.62
RNC	2.54a	2.23~2.91	9.69	1.43b	1.28~1.58	7.06	0.56	0.48~0.65	10.67
NC	4.63a	4.34~4.96	4.11	2.02b	1.77~2.32	10.64	0.44	0.38~0.49	8.64
SWN	29.92a	24.35~37.08	15.27	8.6b	7.99~9.47	6.36	0.29	0.22~0.37	17.37
RWN	3.92a	2.83~4.89	15.11	3.22b	2.89~3.42	6.58	0.84	0.70~1.02	12.25
TN	33.84a	27.17~41.18	14.84	11.82b	10.89~12.75	5.18	0.36	0.28~0.44	15.17
SPAD	37.58a	35.03~40.24	4.58	22.15b	20.39~26.82	10.93	0.59	0.53~0.68	8.98
PH	25.27a	15.63~35.61	24.58	15.17b	11.50~20.67	24.18	0.61	0.47~0.74	16.2
TRL	1024.56b	798.39~1212.23	12.96	1583.5a	1238.81~1897.19	12.87	1.55	1.39~1.69	6.59
RSA	111.12b	89.75~132.98	12.97	159.59a	132.15~206.46	13.58	1.44	1.25~1.60	8.88
RAD	0.35a	0.31~0.38	7	0.32b	0.28~0.35	7.42	0.92	0.85~0.99	4.45
RV	0.97b	0.79~1.17	15.65	1.29a	1.09~1.80	18.01	1.34	1.12~1.54	11.98
RTN	1926.88b	1368.44~2392.33	19.93	3476.75a	2466.17~5221.83	26.13	1.8	1.46~2.18	11.7

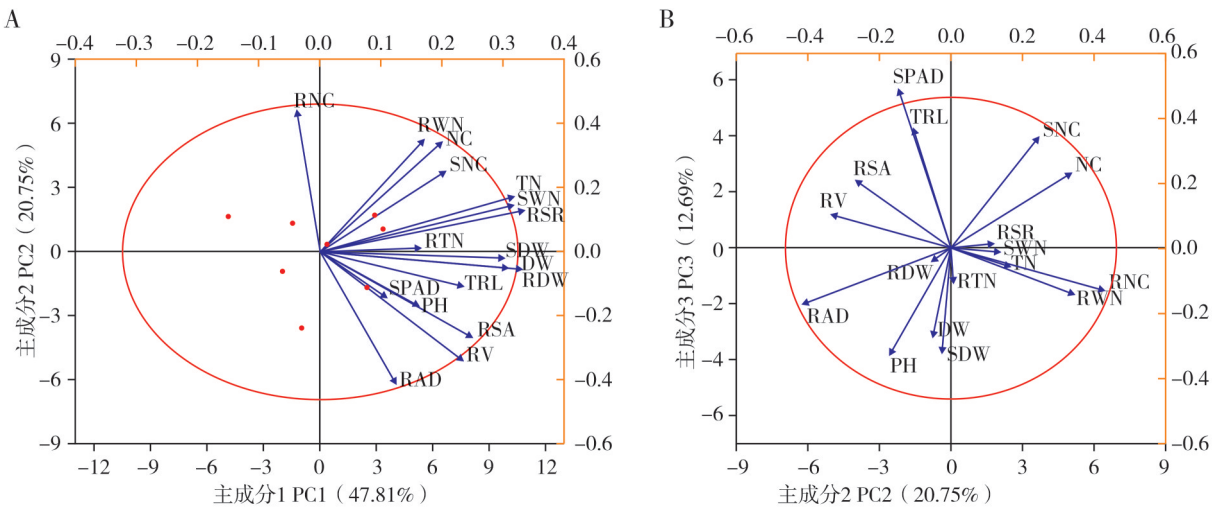
注:SDW:地上部干重;RDW:地下部干重;TDW:总干重;RSR:根冠比;SNC:地上部氮含量;RNC:地下部氮含量;NC:整株氮含量;SWN:地上部总氮;RWN:地下部总氮;TN:整株总氮;SPAD:叶绿素含量;PH:株高;TRL:总根长;RSA:根表面积;RAD:平均根直径;RV:根体积;RTN:根尖数。同行中不同小写字母表示差异达0.05显著水平

Note: SDW: shoot dry weight; RDW: root dry weight; TDW: total dry weight; RSR: root shoot ratio; SNC: shoot nitrogen content; RNC: root nitrogen content; NC: nitrogen content; SWN: shoot whole nitrogen; RWN: root whole nitrogen; TN: total nitrogen; SPAD: chlorophyll content; PH: plant height; TRL: total root length; RSA: root surface area; RAD: root average diameter; RV: root volume; RTN: root tips number. Different lowercase letters in same line indicate significant difference at 0.05 level

表5 8份大豆材料苗期各表型性状在正常氮水平(对角线上方)和低氮水平(对角线下方)的 Pearson 相关系数
Table 5 Pearson correlation coefficients of traits of 8 soybean accessions at seedling stage under normal (above the diagonal) and low (below the diagonal) nitrogen conditions

	SDW	RDW	TDW	RSR	SNC	RNC	NC	SWN	RWN	TN	SPAD	PH	TRL	RSA	RAD	RV	RTN
SDW		0.923**	0.997**	-0.187	-0.426	-0.390	-0.454	0.972**	0.717*	0.969**	-0.221	0.669	0.542	0.853**	0.490	0.950**	-0.091
RDW	0.931**		0.951**	0.200	-0.368	-0.394	-0.464	0.908**	0.786*	0.918**	-0.123	0.527	0.427	0.761*	0.541	0.889**	-0.286
TDW	0.987**	0.977**		-0.107	-0.419	-0.396	-0.462	0.971**	0.741*	0.971**	-0.203	0.648	0.525	0.844**	0.507	0.949**	-0.133
RSR	0.257	0.591	0.406		0.131	0.006	-0.034	-0.159	0.191	-0.122	0.383	-0.420	-0.401	-0.287	0.245	-0.158	-0.545
SNC	-0.873**	-0.732*	-0.827*	0.008		0.359	0.954**	-0.203	-0.162	-0.204	0.299	-0.493	-0.446	-0.520	0.014	-0.470	-0.107
RNC	-0.853**	-0.924**	-0.899**	-0.567	0.664		0.586	-0.325	0.253	-0.266	0.542	-0.089	-0.118	-0.257	-0.232	-0.329	0.350
NC	-0.923**	-0.828*	-0.898**	-0.141	0.984**	0.783*		-0.246	-0.105	-0.236	0.356	-0.397	-0.367	-0.487	-0.087	-0.480	0.085
SWN	-0.074	0.094	-0.003	0.446	0.545	-0.076	0.434		0.741*	0.997**	-0.157	0.595	0.470	0.788*	0.535	0.907**	-0.128
RWN	0.856**	0.899**	0.890**	0.491	-0.665	-0.670	-0.718*	0.137		0.792*	0.217	0.543	0.397	0.660	0.420	0.742*	-0.061
TN	0.230	0.395	0.305	0.568	0.256	-0.299	0.139	0.939**	0.468		-0.117	0.606	0.474	0.795*	0.536	0.913**	-0.124
SPAD	-0.300	-0.081	-0.210	0.489	0.649	-0.058	0.524	0.801*	-0.182	0.652		-0.433	-0.748*	-0.512	0.551	-0.235	-0.397
PH	0.814*	0.680	0.770*	0.011	-0.742*	-0.798*	-0.791*	-0.158	0.435	0.009	-0.124		0.810*	0.910**	0.064	0.822*	0.161
TRL	0.042	0.030	0.037	-0.033	-0.259	-0.119	-0.243	-0.557	-0.137	-0.545	-0.182	0.299		0.872**	-0.398	0.610	0.549
RSA	0.507	0.495	0.510	0.180	-0.527	-0.485	-0.552	-0.290	0.374	-0.130	-0.116	0.609	0.829*		0.098	0.919**	0.197
RAD	0.780*	0.787*	0.797*	0.376	-0.443	-0.607	-0.512	0.462	0.871**	0.713*	0.116	0.514	-0.258	0.323		0.482	-0.737*
RV	0.717*	0.706	0.725*	0.286	-0.597	-0.629	-0.645	-0.044	0.644	0.183	-0.041	0.698	0.555	0.925**	0.658		-0.116
RTN	-0.505	-0.593	-0.552	-0.483	0.217	0.501	0.303	-0.507	-0.654	-0.679	-0.234	-0.185	0.732*	0.318	-0.670	-0.019	

注:**表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关;*表示在 0.05 水平(双侧)上显著相关
Note: ** and * represent significant difference at 0.01 and 0.05 level (bilateral), respectively



注:A、B分别表示17个性状耐低氮胁迫指数在主成分1和主成分2的投影及在主成分2和主成分3的投影。点表示8份大豆材料的位置,线代表量化各性状对主成分贡献的大小和方向的向量

Note: A and B represent the projections of low nitrogen tolerance index of 17 traits on principal component 1 and principal component 2, principal component 2 and principal component 3, respectively. The dots indicate the position of 8 soybean accessions, and the lines represent vectors that quantify the magnitude and direction of trait contribution to the principal component

图1 大豆幼苗17个氮利用相关性状的主成分分析

Fig. 1 Principal component analysis of 17 traits related to nitrogen use efficiency at soybean seedling stage

具有较强的代表性(图1)。主成分1的方差贡献率为47.81%,在主成分1中,除了地下部氮含量为负向载荷外,其余性状均为正向载荷,其中向量值较大的性状包括根冠比、地下部干重、整株总氮、地上部总氮、总干重和地上部干重,可概括为“生物量因

子”;主成分2可以反映所有变异的20.75%,与主成分2较相关的性状包括地下部氮含量、地下部总氮、整株氮含量、根表面积、根体积和平均根直径,可概括为“根系形态因子”;主成分3可以解释全部变异的12.68%,与主成分3较相关的性状有叶绿素含

量、总根长和地上部氮含量(图1)。

结合各性状指标的变异系数、相关性分析和主成分分析,将总干重、整株氮含量、整株总氮、总根长、根表面积和根体积6个指标作为苗期间接判定大豆耐氮能力的依据。

2.3 氮高效及低氮敏感大豆资源精准鉴定

不同大豆材料苗期总干重、整株氮含量和整株总氮性状的耐低氮指数均小于1,而总根长、根体积和根表面积性状的耐低氮指数均大于1,分布于1.13到1.73范围之间,表明在低氮胁迫条件下大豆会通过促进根系的生长来获取更多的氮素(表6)。其中,2011-X-618的整株总氮、总根长、根表面积、

根体积4个指标的耐低氮指数在8个材料中均表现为最大值,总干重、整株氮含量2个指标的耐低氮指数分别位于第2、4位。2011-X-531总干重、整株总氮、根体积3个指标的耐低氮指数在8个材料中均表现为最小值,整株氮含量、总根长、根表面积3个指标的耐低氮指数分别位于第6、7、7位。

由图2可以看出,与正常氮条件下相比,材料2011-X-618在低氮胁迫下植株地上部变化较小,叶片轻微变黄,根系极为发达;而2011-X-531在低氮胁迫下植株矮小,与正常氮条件下表型差异较大,其根系相比正常氮条件下发达程度变化较小。因此,对比8个大豆材料的6个性状耐低氮胁迫指数,并结合两个氮素水平下性状表现值,可以初步认为2011-X-618为大豆苗期耐低氮材料,2011-X-531为大豆苗期低氮敏感型材料。

3 讨论

一般植物耐低营养筛选的环境有土培、沙培和水培等,水培的优点在于它能准确地控制营养介质,快速筛选大批量的基因型。为缩短筛选时间、加快筛选速度,本试验采用水培法在苗期进行筛选。筛选浓度也很重要,如果浓度太低,极不耐低氮的基因型会逐渐枯萎,浓度太高则会加重筛选压力,优良基因型的遗传优势得不到充分发挥。本实验所采用的低氮浓度是经预实验后确定的,浓度与郝青南等^[8]采用的一致。

在氮高效型品种筛选过程中,应尽量减少环

表6 8份大豆材料耐低氮胁迫指数比较
Table 6 Comparison of low nitrogen tolerance index of 8 soybean accessions

材料 Accession	总干重 TDW	整株 氮含量 NC	整株 总氮 TN	总根长 TRL	根表 面积 RSA	根体积 RV
吉育 86 Jiyu 86	0.94a	0.48a	0.46a	1.53ab	1.47a	1.41ab
2011-X-618	0.88a	0.43b	0.47a	1.73a	1.60a	1.50a
2011-X-559	0.85ab	0.47ab	0.40a	1.50ab	1.41ab	1.32ab
2011-X-547	0.84ab	0.39c	0.32b	1.72a	1.55a	1.54a
2011-X-639	0.82ab	0.43b	0.35ab	1.38b	1.25b	1.14b
东农 53 Dongnong 53	0.79ab	0.40bc	0.32b	1.49ab	1.44ab	1.39ab
2011-X-472	0.77ab	0.49a	0.38a	1.61a	1.48a	1.37ab
2011-X-531	0.67b	0.42b	0.28b	1.42b	1.26b	1.13b

注:同列数据后不同小写字母表示在0.05水平上的差异显著性
Note: Different small letters in same column indicate significant difference at 0.05 level



注:NN: 氮浓度为7.5 mmol/L的营养液;LN: 氮浓度为0.75 mmol/L的营养液
Note: NN: 7.5 mmol/L nitrogen in nutrient solution, LN: 0.75 mmol/L nitrogen in nutrient solution

图2 不同氮浓度处理下氮利用效率差异大豆材料植株表型
Fig. 2 Phenotype of soybean accessions with different nitrogen use efficiency under nitrogen stress

境、养分以及病虫害等因素的影响,因此筛选指标的确定尤为重要。由于缺氮会导致植物体一系列的表型性状发生直接或间接的变化,所以选择与缺氮密切相关且容易被测定的表型性状作为初级筛选指标,或可提高氮高效利用基因型的筛选效率。陆潭及王金生等在耐低钾大豆品种筛选及大豆营养高效利用型品种筛选中均将生物量作为重要的筛选指标^[18,19]。本实验中,两种氮素水平下不同基因型生物量表现出很大的差异,因此本研究选择将植株干重作为初步筛选指标。

植物根形态构型具有可塑性,植物可以通过调节自身根的形态和构型来适应外界的环境条件,并影响植物种内和种间的竞争关系^[20,21]。植物对土壤中氮素的获取很大程度上取决于其根系形态。有报道显示低氮胁迫显著影响根系形态特征^[22]。近年来,在小麦和玉米等作物中均有根构型与氮效率相关的报道^[23,24]。大豆中已有关于根构型与磷效率研究相关的报道,发现土壤中磷的有效性等环境因素对根构型具有调节作用;具有较好根形态构型的大豆基因型有利于从土壤中吸收有效磷和其它养分^[25-27]。尹元萍等^[28]利用根系形态构型成功筛选磷高效大豆基因型。在大豆中,关于根构型与氮利用效率相关报道较少。本实验结果表明,低氮胁迫条件下大豆幼苗通过增加根体积、根表面积、总根长和根尖数等根系性状从营养液中获取更多的氮素,用于植株的生长发育。本研究结果也显示,在低氮条件下,大豆幼苗的生物量与根体积、平均根直径呈显著相关,植株根体积与根表面积呈极显著正相关,根表面积与总根长、平均根直径与植株总氮呈显著相关。这些结果说明,可以将根体积、根表面积和总根长作为重要筛选指标。

4 结论

大豆苗期耐低氮筛选指标的确定还没有相应的报道,建立科学快速高效的氮高效资源筛选方法和技术指标显得十分必要。水稻、玉米和小麦等作物已经建立了苗期氮高效评价指标体系。本实验综合这些作物评价氮高效的指标以及大豆本身固有的氮素利用特点,测定相关性状指标,通过主成分分析及相关性分析,将总干重、整株氮含量、整株总氮、总根长、根表面积、根体积六个指标作为苗期耐低氮大豆资源的精细鉴定指标,并通过耐低氮胁迫指数来修正环境因素的影响和不同材料自身生物性状背景的差异。参照上述指标综合评价,筛选

出氮高效材料 2011-X-618 和低氮敏感型材料 2011-X-531。

参考文献:

- [1] Xu G H, Fan X R, Miller A J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2012, 63: 153-182. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105532.
- [2] Bi Y M, Kant S, Clark J, et al. Increased nitrogen-use efficiency in transgenic rice plants over-expressing a nitrogen-responsive early nodulin gene identified from rice expression profiling[J]. *Plant Cell Environ*, 2009, 32 (12): 1749-1760. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02032.x.
- [3] Wang Y Y, Cheng Y H, Chen K E, et al. Nitrate transport, signaling, and use efficiency[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, 69: 85-122. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042817-040056.
- [4] 巨晓棠, 谷保静. 我国农田氮肥施用现状、问题及趋势[J]. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(4): 783-795. DOI: 10.11674/zwyf.2014.0401.
- [5] 蒋志敏, 王威, 储成才. 植物氮高效利用研究进展和展望[J]. *生命科学*, 2018, 30(10): 1060-1071. DOI: 10.13376/j.cbbs/2018128.
- [6] Herridge D F, Peoples M B, Boddey R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems[J]. *Plant Soil*, 2008, 311 (1/2): 1-18. DOI: 10.1007/s11104-008-9668-3.
- [7] Córdova S C, Castellano M J, Dietzel R, et al. Soybean nitrogen fixation dynamics in Iowa, USA [J]. *Field Crops Res*, 2019, 236 (15): 165-176. DOI: 10.1016/j.fcr.2019.03.018.
- [8] 郝青南, 王程, 陈水莲, 等. 大豆苗期氮高效和氮敏感资源的筛选研究[J]. *大豆科学*, 2011, 30(6): 910-915, 920.
- [9] 关焱, 宇万太, 李建东. 长期施肥对土壤养分库的影响[J]. *生态学杂志*, 2004, 16(6): 131-137.
- [10] 陈晓昕, 从夕汉, 杜弘杨, 等. 氮浓度对中粳型水稻苗期物质及氮利用率的影响[J]. *农业科技通讯*, 2020, (12): 52-55. Doi: CNKI: SUN: KJTX.0.2020-12-019.
- [11] 胡成梅, 连盈, 程鹏飞, 等. 小麦苗期性状与耐低氮性的遗传相关分析[J]. *中国农业大学学报*, 2020, 25(4): 11-22. DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2020.04.02.
- [12] 顾焱明, 韩配配, 胡琼, 等. 甘蓝型油菜苗期氮效率评价[J]. *中国油料作物学报*, 2018, 40(6): 851-860.
- [13] 王建强, 韩配配, 李银水, 等. 不同氮效率油菜苗期根系形态及养分累积差异研究[J]. *中国油料作物学报*, 2019, 41 (5): 758-764. DOI: 10.19802/j.issn.1007-9084.2018222.

- [14] 王准, 汪苏洁, 张西岭, 等. 棉花耐低氮和氮敏感种质筛选及验证[J]. 棉花学报, 2020, 32(6): 538–551.
- [15] 陈二影, 杨延兵, 秦岭, 等. 谷子苗期氮高效品种筛选及相关特性分析[J]. 中国农业科学, 2016, 49(17): 3287–3297. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2016.17.004.
- [16] 钟思荣, 陈仁霄, 陶瑶, 等. 不同烟草基因型氮素吸收效率与利用效率差异[J]. 中国烟草科学, 2017, 38(4): 58–63. DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2017.04.009.
- [17] Broughton W J, Dilworth M J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans [J]. Biochem J, 1971, 125(4): 1075–1080. DOI: 10.1042/bj1251075.
- [18] 陆潭, 陈华涛, 张威, 等. 耐低钾大豆品种筛选及低钾胁迫下 Lee 68 的差异表达基因分析[J]. 大豆科学, 2020, 39(4): 489–499.
- [19] 王金生, 闫晓艳, 吴俊江, 等. 大豆营养高效利用型品种筛选[J]. 大豆科学, 2020, 39(5): 696–702.
- [20] Fan J B, Zhang Y L, Turner D, et al. Root physiological and morphological characteristics of two rice cultivars with different nitrogen-use efficiency [J]. Pedosphere, 2010, 20(4): 446–455. DOI: 10.1016/S1002-0160(10)60034-3.
- [21] Forde B G. Nitrogen signaling pathways shaping root system architecture: an update [J]. Curr Opin Plant Biol, 2014, 21: 30–36. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.06.004.
- [22] Rasmussen I S, Dresbøll D B, Thorup-Kristensen K. Winter wheat cultivars and nitrogen (N) fertilization—Effects on root growth, N uptake efficiency and N use efficiency [J]. Eur J Agron, 2015, 68: 38–49. DOI: 10.1016/j.eja.2015.04.003.
- [23] 陈旭, 杨习文, 李文, 等. 不同氮素利用效率小麦苗期的根系形态数量性状分析[J]. 麦类作物学报, 2021, 41(2): 174–182. DOI: 10.7606/j.issn.1009-1041.2021.02.07.
- [24] 王祎, 汤继华, 付延磊, 等. 不同氮水平下玉米苗期根系形态和氮吸收量的 QTL 定位[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(4): 942–956.
- [25] 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(自然科学版), 2001, 22(1): 92. DOI: 10.3969/j.issn.1001-411X.2001.01.026.
- [26] 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. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2008.04.019.
- [27] 张彦丽. 不同磷效率大豆基因型根形态构型对低磷胁迫的响应[J]. 中国农学通报, 2010, 26(14): 182–185.
- [28] 尹元萍, 张雅琼, 申毓晗, 等. 利用根系形态构型筛选磷高效大豆基因型[J]. 分子植物育种, 2015, 13(5): 999–1008. DOI: 10.13271/j.mpb.013.000999.

(责任编辑:胡志勇)