

相思根瘤菌的抗逆性初步研究

Preliminary Study on *Rhizobia* sp. *Acacia* for Tolerance to Stresses

李兴芳 樊妙姬* 蒋艳明 凌云* 韦莉莉
Li Xingfang Fan Miaoji Jiang Yanming Ling Yun Wei Lili

(广西大学动物科学技术学院 南宁市大学路100号 530004)

(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, 100 Daxuelu, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要 对2株相思根瘤菌和2株大豆根瘤菌菌株进行 NaCl (NH₄)₂SO₄ pH值、高温和低温的耐受性实验,其中耐 (NH₄)₂SO₄的实验分别进行了相思根瘤菌在含 (NH₄)₂SO₄的平板上的耐受性和在浓度为 100mol/L、300mol/L、500mol/L、600mol/L的 (NH₄)₂SO₄中的结瘤试验。参试菌株均经过回接实验培养和镜检,培养基均为 YMA。结果表明,相思根瘤菌均能耐受的盐浓度为 0.5%~2.0%,能在 37℃和 pH值为 6~9 的条件下生长。在抗生素抗性方面,相思根瘤菌普遍抗氨卡青霉素,而对卡那霉素和链霉素敏感。相思根瘤菌的耐盐、耐高温和耐氨能力强于慢生大豆根瘤菌。

关键词 相思根瘤菌 耐盐性 生长温度 pH值耐受性 抗生素抗逆性 耐氨性
中图法分类号 Q939.114

Abstract Twenty one strains of *Rhizobium* sp. *Acacia* and two strains of soybean rhizobium were examined for tolerance to the stresses of NaCl, NH₄⁺, acid, alkali, high temperature and low temperature. The results showed that *Rhizobium* sp. *Acacia* strains can grow under wide range of temperature and pH. The tolerances of *Acacia* strains to NaCl, high temperature and NH₄⁺ are higher than soybean rhizobium and peanut rhizobium strains.

Key words *Rhizobium* sp. *Acacia*, salt tolerance, growth temperature, pH value tolerance, antibiotic resistance, ammonia tolerance

相思属 (*Acacia*) 树种是能与根瘤菌共生固氮的豆科树种,其固氮能力为每年 10~32 kg (N) · hm⁻¹[1]。近年来,我国从澳大利亚等国引进和种植的相思树树种主要有马占相思 (*A. mangium* Willd.)、大叶相思 (*A. auriculæformis* Benth.)、厚荚相思 (*A. crassiarpa* Benth.)、黑木相思 (*A. melanoxylon* R. Br.) 和灰木相思 (*A. implexa* Benth) 等,由于这些相思树种生长迅速,有耐贫瘠和一定的耐寒能力等特性,使之在我国热带和亚热带地区越来越受到重视[2]。特别是厚荚相思、大叶相思还可以耐盐碱、贫瘠和抗风,是沿海沙滩营造防护林的理想树种。由于我国南方种植相思树的地区土壤贫瘠,该树种在自然状态下表现出结瘤迟,结瘤少或不结瘤。为了促进其在贫瘠的土壤条件下快速地生长和提高其固氮能力等,

已有分离和接种黑木相思、灰木相思根瘤菌的报道[3],我们已分离纯化和筛选了高效结瘤固氮的马占相思、大叶相思和厚荚相思根瘤菌菌株,并种植了人工接种试验林(有待发表)。本文对从马占相思、厚荚相思、大叶相思分离的、已纯化的相思根瘤菌进行耐盐、温度、酸碱及氨等抗逆性的初步研究,以了解相思根瘤菌的生物多样性,为今后进行分子遗传学研究打基础;同时为筛选有实际应用前景的高效共生固氮、抗逆性强的菌株以及进一步用生物技术改造菌株提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

对2株从马占相思、厚荚相思、大叶相思分离的、经过回接实验的相思根瘤菌菌株和2株大豆根瘤菌菌株(表1)进行 NaCl (NH₄)₂SO₄ 不同 pH值、高温和低温的耐受性实验,其中耐 (NH₄)₂SO₄的实验分别进行了相思根瘤菌在含 (NH₄)₂SO₄的平板上的耐受性和不同浓度 (NH₄)₂SO₄中进行结瘤试验。参试菌

2003-07-14收稿,2003-08-18修回。

* 广西大学生物科学与技术学院 南宁 530005 (College of Biology Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China).

** 广西大学微生物学专业 2002级硕士研究生 南宁 530005 (2003 Grade Master Degree Student, Dept. Microbiology, Guangxi Univ. Nanning, Guangxi, 530005, China)

表1 参试菌株

Table 1 Strains used in this test

菌株 Strains	宿主品种 Host	来源 Origin
<i>Sinorhizobium fredii</i> USDA205	大豆 <i>Glycine soja</i>	美国 U S A
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 22 ~ 10	大豆 <i>Glycine soja</i>	黑龙江 Heilongjiang, China
<i>R. sp. (A. mangium)</i>	M Z9904, M Z9908, M Z9913, M Z9917, M Z9918, M Z9919 马占相思 <i>A. mangium</i>	广西钦州市 Qin Zhou Guangxi, China
<i>R. sp. (A. crassicarpa)</i>	HJ2001, HJ2002, HJ2003, HJ2004, HJ2007, HJ2008, HJ2010, HJ2011 厚荚相思 <i>A. crassicarpa</i>	广西南宁市 Nanning Guangxi, China
<i>R. sp. (A. auriculaeformis)</i>	DY2004, DY2007, DY2008, DY2011, DY2012, DY2015, DY2020 大叶相思 <i>A. auriculaeformis</i>	广西南宁市 Nanning Guangxi, China

株均经过回接实验、镜检 所用培养基均为 YMA

1.2 耐盐试验

将试验菌株进行活化培养, 将培养的 10⁸~10⁹ cuf/ml 菌液接种到添加 NaCl 的平板上, NaCl 的终浓度分别是 0.5%、1.0%、2.0%、4.0% (W/V)^[4, 6], 28°C 培养观察 3~5 d 每个浓度重复 4 次。

1.3 生长温度试验

(1) 直接将菌株分别置于气温为 8°C、28°C、37°C、43°C 的环境下培养生长; (2) 分别将菌株在 55°C 下处理 20min 和 65°C 下处理 10min 后移到适宜条件下培养生长^[7]。每个处理重复 4 次, 其中 8°C、37°C、43°C 及 55°C 处理 20 min 和 65°C 处理 10 min 的试验观察 15 d

1.4 pH 值耐受试验

用 HCl 或 NaOH 调节培养基的 pH 值为 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 12.0, 其中 pH 值为 4.0 和 5.0 以液体培养基进行测试, 菌株的生长情况用测定 OD600 的方法检测^[5, 6]。

1.5 抗生素抗性试验

检测参试菌株的 Sm (链霉素)、Km (卡那霉素)、Tc (四环素)、Cm (氯霉素)、Am (氨基青霉素) 抗生素的抗性, 使用终浓度分别是 Sm 250^μg/ml Km 50^μg/ml Tc 15^μg/ml Cm 100^μg/ml Am 50^μg/ml

1.6 耐氨试验

(1) 在平板上的耐氨生长试验, 即将菌接种在终浓度分别为 100 mmol/L 300 mmol/L 500 mmol/L 600 mmol/L 800 mmol/L 和 1000 mmol/L 的 (NH₄)₂SO₄

(2) 分别配制 250 ml 瓶的 NH₄ 终浓度为 1.4 mmol/L 2.8 mmol/L 和 4.2 mmol/L 的豆科植物培养基^[6], 每瓶种 3 株大叶相思, 接种 1 ml 参试菌株菌液。

每个处理重复 3 次, 2 个月后观察植株结瘤情况。

2 结果与分析

2.1 耐盐性和生长温度耐性

相思根瘤菌菌株普遍都能耐受 0.5%~1.0% 的 NaCl, NaCl 为 2.0% 时, 大部分菌株能微弱生长 (表 2) 参试的 2 株菌株都能在 37°C 条件下生长, 有 2 株能在 8°C 下生长, 4 株能在 43°C 下生长 (表 2), 与根瘤菌生长的最适温度 25~30°C^[7] 相比, 相思根瘤菌表 2 相思根瘤菌菌株在不同浓度 NaCl 和生长温度下的生长情况

Table 2 The growth of the strains under the different concentration of NaCl and the different temperature

菌株 Strains	耐盐性 Salt tolerance				生长温度耐性 The heat resistant				
	0.5%	1.0%	2.0%	4.0%	8°C	37°C	43°C	55°C 20min	65°C 10min
R. R. japonicum 22~10	+++	+	-	-	-	+	-	-	-
S. fredii USDA205	+++	+++	+	-	-	+++	-	+++	+++
R. sp. (A. mangium)									
MZ9904	+++	+++	+	-	-	+++	-	+++	+++
MZ9908	+++	+++	+	-	-	+++	-	+++	+++
MZ9913	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-	+++
MZ9917	+++	+++	+	-	-	+++	-	-	-
MZ9918	+++	+++	+	-	-	+++	-	+	-
MZ9919	+++	+++	+	-	-	+++	-	+	-
R. sp. (A. auriculaeformis)									
DY2004	+++	+++	+	-	-	+++	-	+++	-
DY2007	+++	+++	+	-	-	+++	-	-	-
DY2008	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	++
DY2011	++	-	+	-	-	+	-	-	-
DY2012	++	+	+	-	-	+	-	+	-
DY2015	+++	+++	+	-	-	++	-	++	-
DY2020	+++	+++	+	-	-	++	-	-	-
R. sp. (A. crassicarpa)									
HJ2001	+++	+++	+	-	-	++	-	+++	+++
HJ2002	+++	+++	++	-	+	+++	+++	++	-
HJ2003	++	++	+	-	++	+++	+++	+++	-
HJ2004	+++	+++	+	-	-	++	-	+++	-
HJ2007	+++	+	-	-	-	+++	+	-	-
HJ2008	++	+	-	-	-	+	-	-	-
HJ2010	++	+	+	-	-	+++	+	+	-
HJ2011	+	+	-	+	-	+	-	-	-

- 未见生长; + 微弱生长; ++ 生长良好; +++ 与正对照生长的完全一样。
- No growth; + Weak growth; ++ Good growth; +++ The same as the positive control.

菌对温度适应范围较宽。参试的根瘤菌在 55℃处理 20 min 以后移到 28℃条件下培养，其中快生大豆根瘤菌 USDA205 和 8 株相思根瘤菌能够较好的生长，有 4 株微弱生长，而慢生大豆根瘤菌 22~ 10 和 9 株相思根瘤菌不能生长；65℃处理 10 min 后有快生大豆根瘤菌 USDA205 和 5 株相思根瘤菌能够生长，说明有的菌株耐热性较高^[5]。而无芽孢或孢子的微生物一般在 60℃处理 2~ 3 min 能全部被杀死^[5]。根瘤菌在 60℃处理 5 min 即全部被杀死^[5,7]。

2.2 耐酸碱性

相思根瘤菌在 pH 值为 6~ 8 的条件下都能生长良好，其中有 1 株菌株 (DY2004~ DY2007, DY2008, DY2015, DY2020, HJ2002, HJ2003, HJ2007, HJ2008, HJ2010, HJ2011) 可以在 pH 值为 4 的液体培养基中生长，与文献 [8] 报道的相符。23 株菌株在 pH 值为 4 的液体培养基中均不能生长。与根瘤菌生长的最适 pH 值为 6~ 7，有的根瘤菌在 pH 值为 4~ 1 能生长^[4,5,7]的报道相比，相思根瘤菌生长的适应 pH 值范围较宽。

2.3 抗生素的抗性

从表 3 可以看出，参试菌株均能抗 Amp，多数相

表 3 相思根瘤菌对抗生素的抗性

菌株 Strains	Sm	Km	Cm	Amp	Tc
<i>B. japonicum</i> 22~ 10	-	-	+++	++	+++
<i>S. fredii</i> USDA205	+++	-	+	+++	-
<i>R. sp. (A. mangium)</i>					
M Z9904	-	-	-	++	-
M Z9908	+	-	-	++	-
M Z9913	-	-	++	+++	-
M Z9917	-	-	++	++	-
M Z9918	+	-	-	++	-
M Z9919	+	-	+	++	-
<i>R. sp. (A. auriculaeformis)</i>					
DY2004	-	-	+++	+++	-
DY2007	-	-	+++	+++	-
DY2008	-	-	-	+++	-
DY2011	-	-	+	+++	+
DY2012	-	-	+++	++	+++
DY2015	-	-	+++	+++	-
DY2020	-	-	+++	++	-
<i>R. sp. (A. crassicarpa)</i>					
HJ2001	-	-	+++	+++	+++
HJ2002	-	-	+++	+++	+++
HJ2003	-	-	+++	+++	+
HJ2004	-	-	+++	+++	+++
HJ2007	-	-	+++	+++	+++
HJ2008	-	-	+++	+++	++
HJ2010	-	-	+++	+++	++
HJ2011	-	-	++	+++	+

思根瘤菌能够抗 Cm 生长快的显示出对 Tc 敏感，而一些生长慢的菌株表现对 Tc 抗性。所有菌株均对 Km 敏感。

2.4 耐氨性

从表 4 看，相思根瘤菌菌株大部分能在含 100 mmol/L 和 300 mmol/L (NH₄)₂SO₄ 的 YMA 培养基条件下生长或微弱生长，但在 500 mmol/L 的情况下只有 8 个菌株微弱生长，其他的菌株均不能生长。在 600 mmol/L 的情况下只有 5 个菌株微弱生长。另一方面，当 NH₄⁺ 浓度达到 75× 10⁻⁶ 时，所有相思根瘤菌菌株均能在其寄主相思品种上结瘤，与文献 [6] 的报道不一致，说明相思根瘤菌的耐氨能力较强。

表 4 相思根瘤菌菌株在不同浓度 (NH₄)₂SO₄ 的生长情况

Table 4 The growth of the strains under the different concentration of (NH₄)₂SO₄

菌株 Strains	耐氨性 Tolerance of (NH ₄) ₂ SO ₄			
	100 (mmol/L)	300 (mmol/L)	500 (mmol/L)	600 (mmol/L)
<i>B. japonicum</i> 22~ 10	+	+	-	-
<i>S. fredii</i> USDA205	+	-	-	-
<i>R. sp. (A. mangium)</i>				
M Z9904	+	+	-	-
M Z9908	+	+	-	-
M Z9913	+	+	-	-
M Z9917	+	+	-	-
M Z9918	+	+	-	-
M Z9919	+	+	-	-
<i>R. sp. (A. auriculaeformis)</i>				
DY2004	+++	+	-	-
DY2007	+++	+	+	-
DY2008	+++	+	+	-
DY2011	+	+	-	-
DY2012	+	+	-	-
DY2015	+++	+	+	+
DY2020	+++	+	+	+
<i>R. sp. (A. crassicarpa)</i>				
HJ2001	+++	+	-	-
HJ2002	+++	+	+	+
HJ2003	+++	+	+	+
HJ2004	+++	+	+	-
HJ2007	+	+	-	-
HJ2008	+	+	-	-
HJ2010	+	+	-	-
HJ2011	+	+	+	+

3 结束语

本研究对相思根瘤菌进行的抗逆性分析，得出相思根瘤菌均能耐受较高的盐浓度，一般在 0.5%~ 2.0%，而慢生大豆根瘤菌和花生根瘤菌耐盐的一般

(下转第 324 页 Continue on page 324)

高的分级分别为: < 46 mg/kg 46~ 90 mg/kg和> 90 mg/kg;壤土土壤速效钾临界值 51. 4 mg/kg,甘蔗产量 (y) 与土壤速效钾含量 (x) 函数关系: $y = 12653. 2 + 1154. 3x - 3. 4x^2, r = 0. 803 (> r_{0.01} = 0. 641)$; 土壤速效钾含量低、中和高的分级分别为: < 52 mg/kg 52~ 110 mg/kg和> 110 mg/kg 粘土土壤速效钾临界值 60 mg/kg,甘蔗产量 (y)与土壤速效钾含量 (x) 函数关系: $y = 57904. 8 - 311. 1x + 6. 6x^2, r = 0. 853 (> r_{0.01} = 0. 354)$, 土壤速效钾含量低、中和高分级分别为: < 60 mg/kg 60~ 120 mg/kg和> 120 mg/kg

(3) 甘蔗施钾量在 150~ 300 kg/hm²范围内,甘蔗产量随施钾量增加而增加;当施钾量达 450 kg/hm²

时, 出现甘蔗施钾效益递减

参考文献

- 1 谢建昌,周健民, R Hardter等. 钾与中国农业. 南京: 河海大学出版社, 2000. 72~ 125.
- 2 张肇元,谭宏伟,周清湘等. 广西土壤钾素状况与平衡施肥研究. 北京: 中国农业出版社, 1998. 49~ 58.
- 3 谢建昌,范钦桢,郑文钦等编译. 钾的土壤测试与作物反应. 南京: 江苏科学技术出版社, 1987. 1~ 5.
- 4 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析. 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 6.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 314页 Continue from page 314)

浓度为 0. 1% NaCl^[5]。相思根瘤菌生长的温度和 pH 值范围较宽,能在 37℃和 pH 值为 6~ 9 的条件下生长。在抗生素抗性方面,相思根瘤菌普遍抗氨基青霉素,而对卡那霉素和链霉素敏感。

参考文献

- 1 Nutman P J. Field experiment on nitrogen fixation by nodulated legumes. In: Nutman PS ed. Symbiotic Nitrogen Fixation Plants, London. 1976. 211~ 237.
- 2 洪菊生主编. 澳大利亚阔叶树研究. 北京: 中国林业出版社, 1993. 157~ 234.
- 3 康丽华,李素翠. 相思苗木接种根瘤菌的研究. 林业科学研究, 1998, 11(4): 343~ 349.
- 4 李力,曹凤明,徐玲玫等. 花生根瘤菌的抗逆性初步研

究. 微生物通报, 2000, 27(1): 42~ 47.

- 5 关桂兰,王卫卫,杨玉锁著. 新疆干旱地区固氮生物资源. 北京: 科学出版社, 1991.
- 6 尤崇杓,姜涌明,宋鸿遇. 生物固氮. 北京: 科学出版社, 1987.
- 7 Jordan D C. Family II *Rhizobiaceae* Conn 1938 in Kiney N R. In: Holt J G (ed). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1th. The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1984. 235~ 244.
- 8 康丽华,李素翠. 相思根瘤菌耐酸的研究和耐酸性菌株的筛选. 林业科学研究, 1998, 11(6): 581~ 585.

(责任编辑: 邓大玉)