

金沙江河谷地区豆科树种根瘤菌耐干热研究

曾 小红, 伍建榕, 马焕成, 郭瑞超, 张丽芬, 肖 斌

(西南林学院 生态工程研究所, 昆明 650224)

摘 要: 本实验在人工设置高温和模拟干旱条件下, 对分离自金沙江河谷地区的 12 株豆科树种根瘤菌菌株进行耐干热分析。结果显示, 12 株供试菌株对于干热表现出不同的耐受性, 大部分菌株如: P5- 1、P5- 6、P5- 8、P6- 11、Y8- 12、P5- 5、Y6- 13、P5- 7 能忍受 40℃ 的高温; 在人工模拟干旱的高渗环境中, 也有部分菌株( P5- 1、P5- 2、P5- 6、P5- 7) 表现出极强的耐受能力。通过本次的耐性研究, 发现菌株 P5- 1、P5- 6、P5- 7 不仅能在 40℃ 的高温下生长而且在  $-8.71 \times 10^5$  Pa, 35℃ 的条件下也能很好的存活。

关键词: 根瘤菌; 耐干热性; 模拟干热

中图分类号: Q948

文献标识码: A

文章编号: 1005-3409(2006)04-0075-03

Study on Drought-hot Tolerance of Rhizobia Strains of Legume Isolated from Jinshajiang River Dry-hot Valley

ZENG Xiao-hong, WU Jian-rong, MA Huan-cheng, GUO Rui-chao, ZHANG Li-fen, XIAO Bin  
(Ecology Engineering Institute, Southwest Forestry College, Kunming 650224, China)

**Abstract:** In this study, 12 strains isolated from the root nodules of woody legumes in the various regions of Jinshajiang River dry-hot valley were used to study the drought-hot tolerance by adding Polythylene glycol 6 000 to YME brouth medium and controlling the temperature. The results indicated that: the 12 strains had different tolerance ability to drought-hot, such as P5- 1, P5- 6, P5- 8, P6- 11, Y8- 12, P5- 5, Y6- 13, P5- 7, and lots of stains could resistant temperature 40℃ such as P5- 1, P5- 2, P5- 6, P5- 7. In the brouth medium which adding PEG, there were a lot of strains had indicated the strong tolerance ability. From this study of resistance, P5- 1, P5- 6, P5- 7 not only could grow at temperature 40℃ but also in the condition of  $-8.71 \times 10^5$  Pa and 35℃.

**Key words:** rhizobia; tolerance to drought-hot; dry-hot simulation

干热河谷是中国西南地区横断山区一种非常特殊的气候类型,“干”和“热”是该地区的气候特点<sup>[1]</sup>。在干热河谷的植被恢复工程中,干旱和高温是树木生长存活的重要制约因素。

豆科树种具有较高的经济价值,对不良环境抗逆力强,在改良土壤、提高土壤肥力、保持水土和改善生态环境中占有重要地位。这些作用与它的结瘤固氮性能密切相关<sup>[2]</sup>。与豆科植物共生固氮的根瘤菌也常遭遇此不利环境条件。据陈文新等<sup>[3]</sup>报道,大部分在豆科植物上结瘤的根瘤菌,如大豆根瘤菌、豌豆根瘤菌和三叶草根瘤菌对高渗环境都极为敏感,而在不利生长的逆境条件下分布的根瘤菌菌株却表现出与环境良好的适应性。在高温干旱地区根瘤菌的生长繁殖以及对寄主植物侵染和结瘤固氮作用均有别于一般的生态地区<sup>[4]</sup>。陈文新<sup>[5]</sup>、黄玲<sup>[6]</sup>等对新疆干旱地区根瘤菌资源的调查发现,新疆地区根瘤菌的生长繁殖及对寄主植物侵染结瘤和固氮作用明显不同于其他生态区,不仅能在高温、干旱、盐碱等不利条件下很好的生长繁殖,而且还能侵染寄主并使之结瘤固氮,表现出对环境的良好适应性。

从对新疆干旱地区根瘤菌研究的情况看来,在干热河谷地区的根瘤菌的抗干热能力应该比其他一般的生态地区,或即使是从干热河谷地区采集到的根瘤菌,也会因不同的寄主或不同的菌株使其菌株间的抗性存在着差异性。本文通过该次试验试图对金沙江干热河谷地区采集到的部分豆科树种根瘤菌的抗干热能力进行初步的研究,并试图从中筛选出耐旱的菌株,从而为干热河谷区的植树造林服务。

1 材料与方法

1.1 供试菌株(见表 1)

从金沙江干热河谷区的攀枝花市、元谋等不同林分中采集豆科树种的根瘤,经分离、纯化所得的菌株,再经人工液体培养回接实验确定为根瘤菌(其中钝叶黄檀未做回接实验)。

1.2 抗性实验

1.2.1 温度实验

以甘露醇酵母汁培养基(YMA)为基本培养基。将各根瘤菌菌株接种到 YMA 培养基中,于不同温度下恒温培养。温度设定为 28℃、35℃、40℃三个温度级,每个温度设三个

\* 收稿日期: 2005-11-02

基金项目: 云南省自然科学基金(编号 203305)

作者简介: 曾小红(1979-),女,重庆人,硕士生,主要从事植物生理生态方面的学习与研究;通讯作者: 马焕成。

重复。第 5 天和第 10 天观察菌落出现的情况。

表 1 供试菌株来源

寄主植物	菌株号	采集地	土壤类型	海拔/m
台湾相思	P5- 1	PQ( 攀枝花青松山)	砂壤土	1100
台湾相思	P5- 2	PQ( 攀枝花青松山)	砂壤土	1100
台湾相思	P5- 6	PG(攀枝花公园)	中壤土	1700
台湾相思	P5- 8	PG(攀枝花公园)	轻壤土	1700
台湾相思	P6- 11	PL( 攀枝花凉风坳)	轻壤土	1700
银合欢	P5- 4	PQ( 攀枝花青松山)	轻壤土	1100
银合欢	Y8- 12	YR( 元谋热经所)	轻黏土	1100
银合欢	Y8- 16	YR( 元谋热经所)	轻壤土	1100
山毛豆	P5- 5	PQ( 攀枝花青松山)	中壤土	1100
山毛豆	Y6- 13	YR( 元谋热经所)	轻壤土	1100
山毛豆	Y8- 14	YR( 元谋热经所)	轻壤土	1100
钝叶黄檀	P5- 7	PG(攀枝花公园)	轻黏土	1700

1.2.2 高温干旱实验

用聚乙二醇 6 000( PEG6 000) 人工模拟干旱条件<sup>[7,8]</sup>。在甘露醇酵母汁的液体培养基( YMB) 中加入不同量的 PEG, 使培养液的最终浓度( w/v) 分别为 5%, 10%, 20%, 30% 等 4 个水平, 每个水平各设 3 个重复。在 35℃ 的条件下, 各水平的渗透势分别为处理 1-  $0.34\times 10^5$  Pa, 处理 2-  $1.13\times 10^5$  Pa, 处理 3-  $4.04\times 10^5$  Pa, 处理 4-  $8.71\times 10^5$  Pa<sup>[7]</sup>。同时, 设不加 PEG 在 28℃ 条件下培养的对照实验。

取各经活化好的各根瘤菌菌株 1~ 2 环接种到各不同 PEG 水平的 YMB 液体培养基中( 20 ml/ 20× 18 mm 试管) , 于 35℃ 条件下震荡培养, 5 天后吸取菌液用 752 型紫外分光光度计和 1 cm 比色杯, 在 420 nm 波长比浊。测定其吸光度值( A) , 与对照菌株的  $A_{420\text{ nm}}$  比较, 以  $A_{420\text{ nm}}$  表示其在各干旱条件下的生长繁殖状况。测定前用相应浓度 PEG 的 YMB 营养液对仪器进行调零。

各菌株在不同 PEG 渗透势条件下的吸光度值数据用 SPSS 的方差分析程序( ANOVA) 进行分析, 用 LSD 检验进行显著性分析(  $P<0.05$ ) 。

2 结果与分析

2.1 温度对各豆科树种根瘤菌菌株生长的影响

表 2 各根瘤菌菌株在不同温度下的生长状况

菌落数 菌株号	28℃		35℃		40℃	
	第 5 天	第 10 天	第 5 天	第 10 天	第 5 天	第 10 天
P5- 1	6	6	1	0	4	3
P5- 2	6	6	1	1	0	0
P5- 6	6	6	4	3	2	3
P5- 8	6	5	6	5	2	1
P6- 11	5	5	5	5	6	5
P5- 4	6	5	6	5	0	0
Y8- 12	6	6	6	5	1	1
Y8- 16	6	5	6	5	0	0
P5- 5	6	6	5	5	4	1
Y6- 13	6	5	4	3	3	3
Y8- 14	6	6	2	2	1	0
P5- 7	6	6	4	4	6	4

0: 表示死亡; 1~ 2: 表示生长; 3~ 4: 表示生长良好; 5~ 6: 表示生长很好。

一般情况下, 根瘤菌最适生长的温度为 25~ 30℃, 只有少数苜蓿根瘤菌菌株在 42.5℃ 下生长<sup>[9]</sup>。在本次的试验研究中, 在 35℃ 的温度条件下, 所有的菌株在第 5 天的时候都能生

长, 到第 10 天时, 除了菌株 P5- 1 已经出现死亡, 其他的菌株都能很好的生长或弱生长。当温度升高到 40℃ 时, 大部分菌株还是表现出生长良好或弱生长, 如: 菌株 P5- 1、P5- 6、P5- 8、P6- 11、Y8- 12、P5- 5、Y6- 13、P5- 7; 其中菌株 P5- 1 在 35℃ 的温度下生长的并不好, 但当温度达到 40℃ 时菌株反而表现出良好的生长, 出现了反弹现象。其他的菌株除了菌株 Y8- 14 在 35℃ 还能微弱的生长外, 都不能在 40℃ 的温度条件下生长。与根瘤菌是最适温度相比, 干热河谷地区豆科树种的根瘤菌对高温的耐性相对要高的多。

2.2 在 35℃ 高温下不同 PEG 处理对根瘤菌菌株生长的影响

表 3 不同 PEG 处理后根瘤菌菌株的生长情况(以吸光度值 A 表示)

菌株号	对照	35℃			
		处理 1	处理 2	处理 3	处理 4
P5- 1	2.1350	1.3230	1.4560	0.2725*	0.2460*
P5- 2	1.2170	1.1430	1.1070	0.0965* *	0.3565* *
P5- 6	1.4115	1.4595*	1.8170*	0.1455*	0.3810
P5- 8	1.9030	1.3085*	1.3100*	0.2935* *	0.1645* *
P6- 11	1.3345	1.5120	1.2590	0.4815*	0.2730*
P5- 4	1.2370	1.1360	0.6635*	0.2745*	0.1265*
Y8- 12	1.0820	1.3480	1.1015	0.3230*	0.0930*
Y8- 16	1.6810	1.3015*	0.4615* *	0.2985* *	0.0825* *
P5- 5	0.7230	1.0585*	0.6470	0.2560*	0.1415*
Y6- 13	1.0075	1.4895	1.3725	0.3085* *	0.1785* *
Y8- 14	1.5135	1.4145	0.3345* *	0.1030* *	0.0800* *
P5- 7	1.3785	1.5485	1.3795	0.8445*	0.4635*

\* 表示对照和处理间差异显著(  $P<0.05$ ); \* \* 表示对照和处理间差异极显著(  $P<0.01$ ) 。

从表 3 可以看出: 随着 PEG 用量的增加, 各菌株的生长逐渐减弱, 除了菌株 P5- 6 在处理 4 没有达到显著性差异外, 其他的菌株在各处理下与对照相比吸光度值都达到了显著水平。

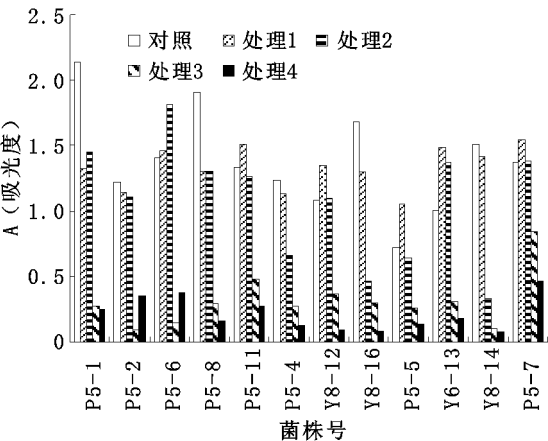


图 1 不同 PEG 处理下根瘤菌菌株吸光度大小

从图 1 可以看出, 各菌株在处理 1 和处理 2 条件下都能生长。在处理 1( -  $0.34\times 10^5$  Pa, 35) 中, 菌株 P6- 11、Y8- 12、P5- 5、Y6- 13、P5- 7 生长的比对照菌株还好; 在处理 2( -  $1.13\times 10^5$  Pa, 35) 中, 菌株 P5- 1、P5- 6 比在处理 1 的条件下繁殖的还好。这说明培养液的 -  $0.34\times 10^5$  Pa 和 -  $1.13\times 10^5$  Pa 的渗透势对根瘤菌菌株生长的影响不大, 而且, 适量的高温干旱反而对根瘤菌菌株的生长有促进作用。这可能是由于金沙江干热河谷地区豆科树种根瘤菌与寄主植物长期生

长在高温干热的生态环境中的结果。这种菌株的生长状况在黄明勇等<sup>[8]</sup>对土著花生的耐旱性研究及杨苏声等<sup>[10]</sup>对快生大豆根瘤菌的耐盐性研究中都有相似的报道。

而当培养液的渗透势升高到 $-4.04 \times 10^5$  Pa 和 $-8.71 \times 10^5$  Pa 后各菌株的存活量呈明显的下降,各菌株生长的都不好或几乎不生长;但菌株 P5-2、P5-6 在 $-8.71 \times 10^5$  Pa 的高渗透条件下其吸光度反而比 $-4.04 \times 10^5$  Pa 的略有回升。这种现象在 Vicent<sup>[11]</sup> 和 Fuhuramann<sup>[12]</sup> 对根瘤菌的研究及黄明勇等<sup>[8]</sup> 对金沙江土著花生根瘤菌的耐旱性研究中都有报道。Rensburg<sup>[13]</sup> 认为这是由于中间相对湿度使细胞部分失水,从而对其功能酶造成损伤,而在更低水势情况下,存活率提高是由于酶的正常功能受到保护所致。

从不同地区来看,攀枝花和元谋的部分豆科树种根瘤菌菌株,在不同的 PEG 处理下,即使是从同一种寄主植物的根瘤上分离得到的根瘤菌,其对高温干旱的耐受能力也是不尽相同的。如菌株 P5-1、P5-2、P5-6、P5-8 都是从攀枝花不同地区台湾相思的根瘤中分离得到的菌株,但却表现出对干热的不同抗性;P5-2、P5-6 在高渗透条件下生长的明显比 P5-1 和 P5-8 要好。除了同一寄主植物的根瘤菌菌株在耐旱能力上存在较大的差异性,即使是从同一土壤环境中分离的不同菌株耐旱性上也表现出明显的不同,如菌株 P5-1 和 P5-2 来自砂壤土,来自轻壤土的菌株 P5-8、P6-11、P5-4、Y8-16、Y6-13、Y8-14 及来自轻黏土的 Y8-12、P5-7 这些菌株分别都是从同样的土壤类型中,它们对高温干旱的适应性都不相同。

攀枝花和元谋两地的采集点从土壤类型、海拔高度及当地的气候条件来看,土壤多为轻壤土,海拔除了攀枝花公园及凉风坳两地海拔为 1 700 m 其余均为 1 100 m;而两地的气候都属于干热高温少雨的气候特点。从植物生长方面来说,高温干热的条件是不利于植物生长的。但是当植物长期在此生长并适应了当地的生态环境后,所表现出来的对不利因素的抗逆性是巨大的。从本次攀枝花和元谋两地部分豆科树种根瘤菌对干热的不同的适应能力来看,金沙江干热河谷区采集到的部分豆科树种上分离得到的根瘤菌菌株对高温干热的耐受性表现出多样性特点,且因寄主植物对当地生态的长期适应结果而表现出巨大的抗干旱高温的特点。

参考文献:

- [1] 马焕成. 干热河谷造林新技术[M]. 云南: 云南科技出版社, 2001. 1- 8.
- [2] 韩素芬. 我国豆科树种结瘤情况的补充资料[J]. 南京林业大学学报, 1995, 19(4): 89- 91.
- [3] 陈文新. 土壤中影响根瘤菌存活的因素[J]. 土壤学进展, 1986, (5): 17- 20.
- [4] 关桂兰, 郭沛新, 王卫卫, 等. 新疆干旱地区根瘤菌资源研究: 根瘤菌抗逆性及生理生化反应特性[J]. 微生物学报, 1992, 32(5): 346- 352.
- [5] 陈文新. 新疆地区豆科根瘤菌特性的分析(一)[J]. 土壤肥料, 1984, (3): 4- 7.
- [6] 黄玲, 石玉瑚, 吴祖银. 新疆部分豆科植物根瘤菌的某些耐性试验[J]. 微生物学通报, 1990, 17(3): 130- 133.
- [7] Burlyn E M, Merrill RK. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000[J]. Plant Physiol. 1973, 51: 914- 916.
- [8] 黄明勇, 张小平, 李登煜, 等. 金沙江干热河谷区土著花生根瘤菌耐旱性初步研究[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(3): 263- 266.
- [9] Krieg, N R, J G Holt (Ed). Bergey's Manual Systematic Bacteriology[M], Volume 1, Tilliams of Wilfins Baltimore, 1984. 235- 244.
- [10] 杨苏声, 李季伦. 快生型大豆根瘤菌的耐盐机制和结瘤性状[J]. 北京农业大学学报, 1988, 14(2): 143- 148.
- [11] Vicent JM, Thompson JA, Donovan KO. Death of root nodule bacteria on drying[J]. Aust J Agric Res., 1962, 13: 258- 27.
- [12] Fuhuramann J, Davey C B, Wollum A G. Dessication tolerance of Clover Rhizobia in sterile soils[J]. Soil Sci Am J. 1986, 50: 639- 644.
- [13] Van Rensburg HJ, Strijdom BW. Survival of fast and slow growing rhizobium ssp. Under conditions of relatively mild dessication[J]. Soil Biol Biochem, 1980, 12: 353- 356.

### 3 讨 论

本次的实验结果表明:金沙江干热河谷区豆科树种根瘤菌对高温干热的环境条件表现出耐受力的多样性和特异性。供试的 12 个菌株中,表现出耐高温( $40^{\circ}\text{C}$ )的菌株有 P5-1、P5-6、P5-8、P6-11、Y8-12、P5-5、Y6-13、P5-7。在用 PEG 人工模拟干热条件试验中,菌株 P5-1、P5-2、P5-6、P5-7 在 $-8.71 \times 10^5$  Pa 的渗透势水平仍能生长发育的较好。耐高温和高渗透的这些菌株的存在说明,干热河谷地区豆科树种根瘤菌存在有丰富的抗逆菌株。这些豆科树种根瘤菌的寄主都是在干热河谷地区存在了较长的时间,对干热高温的条件已经有了适应的能力。而这些根瘤菌菌株能在干热高温等不利条件下生存、生长并繁殖,这种特有的抗逆性的存在,从生态条件来说是金沙江干热河谷地区特有的生态环境,而形成了该地区豆科树种根瘤菌特有的抗逆能力,这也是干热河谷各生态环境中逆性因素对根瘤菌长期自然选择的结果。对本实验中筛选出的比较耐干旱的菌株仍需要做进一步的共生结瘤实验,从而找出较耐干旱的优良的共生体系。

从菌株的生长形式来看,本次实验所用的根瘤菌菌株在不同的生长形式:一种是随着温度的升高和溶液渗透势的降低而菌株(P5-8、Y8-16、Y8-14)的生长存活能力也随之而降低;一种是在溶液渗透势降低的过程中,菌株(P5-2、P5-6)在经过一个致死渗透势( $-4.04 \times 10^5$  Pa)后菌株的存活数量又增高;第三种是部分菌株(P6-11、Y8-12、P5-5、Y6-13、P5-7)在 $-0.34 \times 10^5$  Pa 的渗透条件下生长的比对照(不加 PEG、常温下培养)生长的还要好。这种菌株生长模式的不同在黄明勇等<sup>[8]</sup>对土著花生根瘤菌的耐旱性的研究中有相似的报道。

通过目前我们对金沙江河谷地区的根瘤菌的筛选,可以得到一些比较耐高温干旱的菌株,如菌株 P5-1、P5-6、P5-7,这三株菌株在 $40^{\circ}\text{C}$ 高温及在 $-8.71 \times 10^5$  Pa、 $35^{\circ}\text{C}$ 的条件下都能生长繁殖。从我们对干热河谷地区生长的豆科树种上筛选出了这些耐高温干旱的菌株,对于在干热地区的农林业生产活动的提高是很有帮助的,可以直接运用于生产中,或者再通过现代分子生物学实验手段构建出我们实际生产需要的高效菌株,从而提高干热地区农林业生产种植的效率。