

豌豆根瘤菌的盐碱适应性鉴定^{*}

郭丽琢, 何亚慧

(甘肃农业大学 农学院, 兰州 730070)

摘要: 通过模拟试验, 研究了筛选自甘肃武威、临夏、庆阳、定西的 13 株豌豆族根瘤菌对酸碱和盐分的适应性。结果表明: 筛选菌株的盐碱忍耐能力因菌株而异, 菌株 D₂ 的耐盐能力最强, 其 OD_{600 nm} 在 2.5%、3.5%、4.5% 的 NaCl 浓度下, 比与其差异显著且紧邻的菌株的 OD_{600 nm} 分别高 77%、191% 和 112%, 是最低 OD_{600 nm} 值的 30.32 倍、20.76 倍和 67.68 倍; Q₃ 对 3.5% 和 4.5% NaCl 的忍耐能力最低。菌株 D₂ 的耐酸能力最强, pH=4 时, 其 OD_{600 nm} 显著大于其它 12 株菌株, 是最低值的 20 倍, 是其它 12 株平均值的 6.9 倍; 菌株 W₁ 的 OD_{600 nm} 在 pH=10 及 pH=11 时均为 13 株菌株的最大值, 比与其差异显著的菌株的平均值分别高 41% 和 135%, W₁ 的耐碱能力最强。

关键词: 豌豆; 根瘤菌; pH; NaCl

中图分类号: S529; S154.381

文献标识码: A

文章编号: 1005-3409(2009)05-0270-03

Adaptability of Pea Rhizobia to NaCl and pH

GUO Lizhuo, HE Yahuai

(Faculty of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: 13 strains pea Rhizobia screened from Wuwei, Linxia, Qingyang and Dingxi of Gansu province were used in analogue experiments to study the adaptability of Rhizobia to NaCl and pH. The results showed that D₂ survived well under 2.5%~4.5% NaCl concentration, while Q₃ was tolerant to lower NaCl concentration. Among those tested strains, D₂ had higher acid tolerance, while W₁ had higher alkaline tolerance.

Key words: pea; Rhizobia; pH; NaCl

根瘤菌豆科植物共生固氮体系是最强的生物固氮体系之一, 其固定的氮占生物固氮量的 65% 以上^[1-2]。接种适宜的根瘤菌可提高共生固氮的效率^[3], 减少化学氮肥的施用量, 节约不可再生资源的消耗, 缓解能源压力; 同时也可降低由于化学氮肥过量施用造成的生态环境污染^[4]。接种工作开展的前提是筛选出适宜的高效根瘤菌。高效菌株的筛选包括选择适应特殊寄主和特殊环境条件的特异菌株, 或适应多寄主和多种环境条件的广谱菌株^[5]。干旱、较强的碱性及高盐浓度, 使得西北地区根瘤菌的生存和固氮处于比较特殊的地理环境之中, 独特的生境致使该区根瘤菌的研究和开发明显区别于国内其它的生态类型区。由于 20 世纪 80 年代以来甘肃省豌豆族根瘤菌筛选工作的缺失^[6], 生产中缺乏适宜盐碱、干旱及高寒地区的接种菌株, 仅靠固氮效率较低的土著根瘤菌和宿主植物共生进行固氮, 限制了固氮潜力的充分发挥。本文在甘肃省豌豆族根瘤

菌分离和初步筛选的基础上, 进行了初筛菌株的盐碱抗性鉴定, 以初步评价从甘肃省不同生态类型区筛选的豌豆族根瘤菌的抗逆性能, 为复筛适应于甘肃生境的豌豆族根瘤菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为从甘肃不同生态类型区初步筛选出的 13 个豌豆族根瘤菌菌株。分别为来自武威市黄羊镇的 W₁、W₂、W₃, 来自临夏州和政县的 L₁、L₂, 来自庆阳环县的 Q₁、Q₂、Q₃、Q₄, 来自定西市安定区李家堡镇的 D₁、D₂、D₃、D₄。

1.2 方法

1.2.1 标准菌悬液的制备 取出保存的 13 株筛选菌株, 先接入 YMA 固体平板培养基活化培养, 再转入 YMA 液体培养基, 置于转速 120 r/min、温度 28℃ 的摇床中培养, 测定根瘤菌悬浮液的光密度值

* 收稿日期: 2009-07-10

基金项目: 甘肃省自然科学基金“甘肃省豌豆根瘤菌高效菌株的筛选及共生匹配性能研究”(3ZS061-A25-079)

作者简介: 郭丽琢(1968-), 女, 河南洛阳人, 博士, 副教授, 主要从事旱地与绿洲农作制的研究和教学工作。E-mail: guolz@gsau.edu.cn

(OD_{600 nm}值)。全部供试菌株培养至菌液的 OD_{600 nm} 值 0.5 以上, 以较低 OD_{600 nm} 值菌液为基准, 将各菌液加无菌水稀释制成光密度值一致的菌悬液, 即为试验用的标准菌悬液。

1.2.2 试验设计 用 HCl 和 NaOH 调节液体 YMA 培养基的 pH 值, 制成初始 pH 分别为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 的酸碱梯度 YMA 培养基; 按 NaCl 浓度梯度 0.2%, 0.4%, 0.6%, 1.0%, 1.5%, 2.5%, 3.5% 和 4.5% 的处理, 调制成 8 个不同 NaCl 浓度的液体 YMA 培养基。

将上述酸碱度不同和 NaCl 浓度不同的 YMA 培养基置于 18×180 mm 的试管中, 将活化培养的标准菌液取 1 ml 接种于培养基中, 每处理重复 3 次, 置于 28℃摇床, 培养(80±6) h(摇床转速为 120 r/min), 用分光光度计测定其 OD_{600 nm} 值, 以观察期结束时菌悬液的 OD_{600 nm} 大小表示菌株在不同条件下的生长繁殖状况。

1.2.3 测定指标及方法 光密度值(OD_{600 nm} 值): 分光光度法。

1.2.4 数据处理及分析方法 利用 Excel 进行数据处理, 用 NPS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 供试菌株的盐分适应性

筛选菌株在 0.2%~4.5%的 NaCl 浓度梯度下耐盐生长的光密度值(OD_{600 nm}) 见表 1。从表 1 可以

表 1 筛选菌株对盐分的适应性(吸光度)

菌株	NaCl 浓度/ %							
	0.2	0.4	0.6	1.0	1.5	2.5	3.5	4.5
W ₁	0.3293d	0.2635c	0.0628c	0.0599d	0.0228fg	0.0251fg	0.0310e	0.0343d
W ₂	0.3154d	0.0517f	0.0472d	0.0437ef	0.0281ef	0.0197g	0.0301ef	0.0240de
W ₃	0.6702a	0.6047ab	0.5156a	0.1975b	0.1452c	0.0557d	0.0450cd	0.0203f
L ₁	0.2606de	0.2482c	0.0273ef	0.0321fg	0.0183g	0.0250fg	0.0279ef	0.0225ef
L ₂	0.1292f	0.1432d	0.1390b	0.1255c	0.1604c	0.2252c	0.1422b	0.1212c
Q ₁	0.4930c	0.0400g	0.0364de	0.0454de	0.0217fg	0.0408de	0.0322de	0.0191f
Q ₂	0.2477de	0.0337g	0.0306ef	0.0264g	0.0204fg	0.0227fg	0.0211fg	0.0314d
Q ₃	0.1273f	0.0917e	0.0478d	0.0426ef	0.3570b	0.3379b	0.0199g	0.0091g
Q ₄	0.0818f	0.0291g	0.0258f	0.0264g	0.0195g	0.0237fg	0.0342cde	0.0296de
D ₁	0.1846ef	0.1264de	0.0416d	0.0514de	0.0575d	0.0535d	0.0492c	0.2906b
D ₂	0.6078ab	0.6456a	0.5978a	0.5882a	0.5802a	0.5974a	0.4132a	0.6159a
D ₃	0.5519bc	0.2698c	0.1492b	0.1363c	0.0335e	0.0276f	0.0295ef	0.0281de
D ₄	0.2850d	0.4683b	0.1278b	0.0324fg	0.0658d	0.0302ef	0.0331de	0.0230ef

注: 同一列后的小写字母表示 0.05 的差异显著水平, 下同。

将同一地区来源的菌株在各浓度下的 OD_{600 nm} 值平均(表 2), 以比较地区间菌株的耐盐性。由表 2

看出, 所有筛选菌株均可以在 4.5% NaCl 浓度的培养基上生长, 但其对盐分的适应性有所差异。D₂ 的 OD_{600 nm} 在所有的盐浓度下均为各处理中的最高值, 其 OD_{600 nm} 在 0.2%, 0.4%, 0.6%, 1.0%, 1.5%, 2.5%, 3.5%, 4.5% 的 NaCl 浓度下, 比与其差异显著且紧邻的菌株的 OD_{600 nm} 分别高 23% (Q₁), 38% (D₄), 301% (D₃), 198% (W₃), 63% (Q₃), 77% (Q₃), 191% (L₂), 112% (D₁), 是最低 OD_{600 nm} 值的 7.43(Q₄), 22.19(Q₄), 23.17(Q₄), 22.28(Q₄、Q₂), 31.70(L₁), 30.32(W₂), 20.76(Q₃) 和 67.68(Q₃) 倍, 可见, 菌株 D₂ 耐盐能力最强。W₃ 的 OD_{600 nm} 在 0.2%, 0.4%, 0.6% 的 NaCl 浓度下与 D₂ 无显著差异, 但在 1.0%, 1.5%, 2.5%, 3.5% 及 4.5% 的 NaCl 浓度下仅为 D₂ 的 34%, 25%, 9%, 1% 和 3%, 其 OD_{600 nm} 在 1.0%, 1.5%, 2.5% 及 3.5% 的 NaCl 浓度下位居 13 株筛选菌株的第 2、4、4 和 4 位, 在 4.5% 的 NaCl 浓度下其 OD_{600 nm} 值退居第 11 位, 可见, 在 3.5% 以下的 NaCl 浓度下, 其耐盐能力较强, 当 NaCl 浓度超过 4.5% 时, 其生长繁殖能力急剧降低。

菌株 Q₄ 在 0.2%~1.0% 的 NaCl 浓度范围内 OD_{600 nm} 值最低, NaCl 浓度为 1.5%~2.5% 时, 其 OD_{600 nm} 居于第 11~12 位; 菌株 Q₃ 在 3.5% 和 4.5% 的 NaCl 浓度下, 其菌悬液的 OD_{600 nm} 值最低, 仅为居于首位的 D₂ 的 5% 和 1%, 为其它 12 株筛选菌株 OD_{600 nm} 平均值的 27% 和 9%, 菌株 Q₃ 的耐盐能力最低。

可知, 定西菌株(D) 的 OD_{600 nm} 值除在 0.2% 的 NaCl 浓度下比居于首位的武威菌株(W) 低 7% 以外, 在

其它各 NaCl 浓度下均为 4 个地区之首,比 OD_{600 nm} 76%、42%、54% 和 233%,筛选自定西的菌株比较
值位于第二位的菌株分别高 23%、10%、101%、耐盐。

表 2 不同地区筛选菌株的耐盐性(吸光度)比较

菌株	NaCl 浓度/ %							
	0.2	0.4	0.6	1.0	1.5	2.5	3.5	4.5
W	0.4383	0.3066	0.2085	0.1004	0.0654	0.0335	0.0354	0.0262
L	0.1949	0.1957	0.0832	0.0788	0.0894	0.1251	0.0851	0.0719
Q	0.2375	0.0486	0.0352	0.0352	0.1047	0.1063	0.0269	0.0223
D	0.4073	0.3775	0.2291	0.2021	0.1843	0.1772	0.1313	0.2394

2.2 供试菌株的酸碱适应性

从表 3 可以看出,来自 4 个生态区的菌株均可以在初始 pH4~ 11 的培养基上生长,但其生长状况有所差异。60% 左右的菌株的 OD_{600 nm} 最大值出现在 pH6~ 7 的范围内;其余菌株的 OD_{600 nm} 最大值 3 株出现在 pH= 8 的培养条件下,1 株出现在 pH= 5 的条件下,但其 pH= 5 时的 OD_{600 nm} 仅比 pH= 6 时的 OD_{600 nm} 低 8%,表明筛选菌株生长的适宜 pH 范围为 6~ 8。

pH= 4 时,菌株 D₂ 的 OD_{600 nm} 显著大于其它 12 株菌株,是最低的 L₂ 的 20 倍,是其它 12 株平均值的 6.9 倍,菌株 D₂ 的耐酸能力最强;菌株 L₂ 的

OD_{600 nm} 最低且显著低于 13 株菌株中的 9 株,是这 9 株菌株平均值的 18%,L₂ 的耐酸能力最差。

菌株 W₁ 的 OD_{600 nm} 在 pH= 10 及 pH= 11 时均为 13 株菌株的最大值,比与其差异显著且紧邻的菌株的 OD_{600 nm} 分别高 24% (L₁) 和 43% (W₃),比最低的分别高 55% (D₄) 和 238% (Q₂),比与其差异显著的菌株平均值分别高 41% 和 135%,菌株 W₁ 的耐碱能力最强。

菌株 Q₁ 的 OD_{600 nm},在 pH= 4 时仅显著低于 D₂,在 pH= 10 时与最大的 Q₃ 间无显著差异,在 pH= 11 时仅显著低于 W₁、D₃ 和 Q₃,菌株 Q₁ 具有较强的耐酸碱能力。

表 3 筛选菌株对酸碱的适应性(吸光度 OD_{600 nm})

菌株	pH= 4	pH= 5	pH= 6	pH= 7	pH= 8	pH= 9	pH= 10	pH= 11
W ₁	0.0256de	0.5998bcd	1.0561a	0.7159ab	0.5884c	0.6985abc	0.6323a	0.6306a
W ₂	0.0469c	0.6745ab	1.0189ab	0.8876a	0.6058bc	0.7017abc	0.5830ab	0.3839cd
W ₃	0.0260de	0.7579a	0.9250ab	0.8142a	0.6840abc	0.7374abc	0.4140de	0.4396bc
L ₁	0.0242de	0.5457cde	0.6575de	0.6079c	0.5848c	0.6219cd	0.5018bcde	0.3057de
L ₂	0.0111g	0.6166bc	0.7072cd	0.7074ab	0.6494bc	0.6337cd	0.5381abc	0.2599ef
Q ₁	0.0807b	0.6789ab	0.5006ef	0.5074cd	0.6972abc	0.6255cd	0.5415ab	0.4011cd
Q ₂	0.0333cd	0.4537e	0.4385f	0.5133cd	0.6720abc	0.6385cd	0.4236cde	0.1866g
Q ₃	0.0145fg	0.6317bc	0.7559bcd	0.7234ab	0.8201a	0.8180a	0.5365abc	0.5346ab
Q ₄	0.0143fg	0.6735ab	0.8083bcd	0.7093ab	0.6334bc	0.7294abc	0.5183abcd	0.1913g
D ₁	0.0201ef	0.6106bcd	0.8916abc	0.7179ab	0.6980abc	0.7863ab	0.6495a	0.2487efg
D ₂	0.2214a	0.6114bc	0.6900cd	0.6330bc	0.5950bc	0.5113d	0.4996bcde	0.2201fg
D ₃	0.0137g	0.5075de	0.6442de	0.4149d	0.6335bc	0.6562bc	0.5653ab	0.5917a
D ₄	0.0772b	0.5356cde	0.4981ef	0.4230d	0.4222d	0.3226e	0.4090e	0.0462h

3 讨论与结论

高盐浓度常常是生产中影响根瘤菌侵染、结瘤和根瘤固氮能力的主要因素,在盐类对豆科植物共生固氮的影响方面,目前主要考察的是重金属盐和能造成土壤盐碱化的钠盐等^[7]。盐浓度影响豌豆族根瘤菌的存活和结瘤能力,随着 NaCl 浓度的增加,菌株存活能力降低或不能存活,有效结瘤能力降低或不能侵染结瘤,影响效果因菌株而异^[8-9]。分离自

甘肃不同生态区的菌株耐盐能力不同,菌株 D₂ 的耐盐能力最强,Q₃ 的耐盐能力最低。氢离子浓度直接影响细菌的酶活性,不利的土壤 pH 影响根瘤菌存活,抑制感染及豆科植物与根瘤菌间的共生^[7]。姜云植等人分离、筛选的豌豆族根瘤菌总体在中性偏碱范围(pH7~ 8)侵染、结瘤及促生作用较大,但 112 及 115 菌株在 pH 5 时的结瘤状况与 pH7~ 8 时没有显著差异,2210 菌株在 pH9 时的结瘤状况优于

(下转第 277 页)

and Design, 1988, 15: 461-488.

[29] Frankhauser P. Aspects fractals des structures urbaines[J]. L'Espace Geographique, 1990, 19: 45-69.

[30] Frankhauser P. La Fractalité des Structures Urbaines [M]. Paris: Economica, 1994.

[31] Batty M, Longley P A, Fotheringham A S. Urban growth and form: scaling, fractal geometry and diffusion-limited aggregation[J]. Environment and Planning A, 1989, 21: 1447-1472.

[32] Batty M, Longley P A. Fractal Cities: A Geometry of Form and Function[M]. London: Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers, 1994.

[33] White R, Engelen G. Cellular automata and fractal urban form: a cellular modeling approach to the evolution of urban land-use patterns[J]. Environment and Planning A, 1993, 25: 1175-1199.

[34] White R, Engelen G, Uljee I. The use of constrained cellular automata for high-resolution modeling of urban land dynamics[J]. Environment and Planning B: Planning and Design, 1997, 24: 323-343.

[35] Benguigui L, Czamanski D, Marinov M, et al. When and where is a city fractal[J]. Environment and Planning: Planning and Design, 2000, 27: 507-519.

[36] 李后强, 艾南山. 具有黄金分割特征和分形性质的市场网络[J]. 经济地理, 1992, 12(4): 1-51.

[37] 刘继生, 陈彦光. 城市地理分形研究的回顾与前瞻[J]. 地理科学, 2000, 20(2): 166-171.

[38] 陈彦光, 刘继生. 城市土地利用结构和形态的定量描述: 从信息熵到分数维[J]. 地理研究, 2001, 20(2): 146-152.

[39] 刘明华, 陈彦光. 城市土地利用形态及其空间结构的分维描述方法[J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2001, 14(2): 209-213, 219.

[40] 况颐, 陈彦光. DLA 和 DBM 模型与城市生长的分形模拟: 关于城市分形形态模拟方法的一个理论探讨[J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2001, 14(3): 303-308.

[41] 陈彦光, 黄昆. 城市形态的分形维数: 理论探讨与实践教益[J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2002, 15(1): 62-67.

[42] 张宇, 王青. 城市形态分形研究: 以太原市为例[J]. 山西大学学报, 2000, 23(4): 365-368.

[43] 杨山. 发达地区城乡聚落形态的信息提取与分形研究: 以无锡市为例[J]. 地理学报, 2000, 55(6): 671-678.

[44] 李江. 组团式城市外部空间形态分形特征研究[J]. 经济地理, 2004, 24(1): 64-66.

[45] 冯健. 杭州城市形态和土地利用结构的时空演化[J]. 地理学报, 2003, 58(3): 343-353.

[46] 赵晶, 徐建华, 梅安新. 上海市土地利用结构和形态演变的信息熵与分维分析[J]. 地理研究, 2004, 23(2): 137-146.

[47] 姜世国, 周一星. 北京城市形态的分形聚集特征及其实践意义[J]. 地理研究, 2006, 25(2): 204-213.

[48] 邬建国. 景观生态学: 格局、过程、尺度与等级[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.

(上接第 272 页)

pH7~8^[8]。甘肃复杂的生态气候条件, 造就了豌豆族根瘤菌耐酸碱能力的多样性, 既有较好抗酸性的菌株 D₂ 和较好抗碱性的菌株 W₁, 又具有耐强酸强碱复合功能的菌株 Q₁。

参考文献:

[1] Peoples M B, Herridge D F, Ladha J K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production[J]. Plant and Soil, 1995, 174: 1-28.

[2] Vance C P. Enhanced agriculture sustainability through biological nitrogen fixation[C]//Legocki A, Phouler B H. Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture. Berlin: Berlin Heidelberg, 1997: 179-186.

[3] 李友国, 周俊初. 影响根瘤菌共生固氮效率的主要因素及遗传改造[J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 86-89.

[4] 陈文新, 陈文峰. 发挥生物固氮作用减少化学氮肥用量[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(6): 3-6.

[5] 陈文新, 汪恩涛, 陈文峰. 根瘤菌-豆科植物共生多样性与地理环境的关系[J]. 中国农业科学, 2004, 37(1): 81-86.

[6] 宁国赞, 刘惠琴, 马晓彤. 豌豆根瘤菌优良菌种筛选及应用的研究[J]. 中国草地, 1997(2): 48-51.

[7] 慈恩, 高明. 环境因子对豆科共生固氮影响的研究进展[J]. 西北植物学报, 2005, 25(6): 1269-1274.

[8] 姜云植, 张梅芳. 豌豆族根瘤菌菌株分离筛选及某些因素对结瘤的影响[J]. 广西农学院学报, 1992, 11(2): 30-36.

[9] 刁治民, 王德贤, 张学功. 青海豌豆与蚕豆根瘤菌的初步研究[J]. 青海农林科技, 1996, 1: 11-15.