

## 花生根瘤菌的抗逆性初步研究\*

李 力 曹凤明 徐玲玫 李 俊 葛 诚

(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)

**摘要:** 对 39 株花生根瘤菌(其中 6 株为引进菌株)和 9 株参比菌株进行干旱、NaCl、pH 及低温的耐受性实验。结果表明我国花生根瘤菌资源中存在着耐盐、酸较强的菌株,且耐受性水平差异较大;在 8℃ 条件下供试菌株未见生长;花生根瘤菌有着比大豆根瘤菌更强的抗干旱能力,抗干旱能力同耐盐能力之间没有明显的关系。另外,菌株的抗逆性同共生特性、分离地之间也未见有明显的关系。

**关键词:** 花生根瘤菌, 抗逆性

**中图分类号:** Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-042-06

### PRELIMINARY STUDY ON PEANUT *RHIZOBIA* OF CHINA FOR TOLERANCE TO STRESSES

LI Li CAO Fen-Ming XU Ling-Mei LI Jun GE Cheng

(Soils & Fertilizers Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081)

**Abstract:** 39 strains of peanut rhizobia [*Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*)], 33 of which were isolated from nodules of 20 peanut cultivars in 16 types of soil in 11 provinces of China, were compared for their growth or survival abilities under the stresses of NaCl, acid, alkali, low temperature, and desiccation with 9 reference strains of known species. The results show that there are some peanut rhizobia isolated from China with superior tolerance to NaCl, acid, and desiccation but their endurance abilities differ greatly, and not any studied strain shows discernable growth under the low temperature of 8℃. Under the water potential of  $-1.5\text{kJ kg}^{-1}$  peanut rhizobia seem to survive more quantity than soybean rhizobia, and their abilities of surviving the desiccation have no necessary relation to their salt-tolerance ability. Further more, it also seems that rhizobia strain's stress-tolerant capability has no essential correlation with its symbiotic capability and sampling site.

**Key words:** peanut rhizobia, tolerance to stresses

花生(*Arachis hypogaea* L.)原产南美,在中国的引进栽培已有五百多年的历史,现作为我国主要的油、食两用作物年产量达一千多万吨。花生根瘤菌[*Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*)]通过有效的共生固氮作用,可提供花生生育期中所需氮素的 1/2 左右。我国早在 40 年代末就开始了我国花生根瘤菌的选育研究工作,国内多

家单位的研究集中在菌种的筛选、保藏条件,菌剂生产工艺,田间应用条件等方面进行了大量的研究<sup>[1]</sup>,累计应用面积曾达一千万亩以上。但对花生根瘤菌在耐受盐、酸、碱条件等抗逆性方

\* 中国-欧盟合作项目(No. ERB3514PL950967)

Project of China-EU (No. ERB3514PL950967)

收稿日期: 1999-01-13, 修回日期: 1999-06-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

面的研究报道很少,即使报道也多为某一区域性的研究,而花生根瘤菌在干旱土壤中的存活及在低温下生长的能力则未见报道。本文从我国花生主产区进行花生根瘤菌广泛的分离,在已完成数值分类、rep-PCR及结瘤共生性能筛选的基础上选取部分具有代表性菌株进行耐受NaCl、pH、低温、干旱等抗逆性研究,对丰富花生根瘤菌的生物多样性,筛选有田间应用前景的高效共生固氮、抗逆性强的菌株以及为进-

步的遗传学研究均具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株

选取代表不同土壤类型、花生品种及气候条件的 39 株花生根瘤菌(其中 6 株为引进菌株)和 9 株参比菌株进行 NaCl、不同 pH、低温的耐受性实验(见表 1);再从其中选取 USDA 10324、USDA205、147-3、2644、2661、2689、2697、2764

表1 供试菌株一览表

菌株	宿主品种	分离地、来源*及土壤类型	说明**
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2519	花生中花4	湖北沙阳,潮沙土	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2524	花生中花2	湖北武昌,石灰冲积土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2553	花生鲁花9	山西临沂,褐土	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2560	花生鲁花9	山西临沂,褐土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2571	花生海花2	山西临沂,浅草甸土	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2576	花生海花2	山西临沂,浅草甸土	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2584	花生吕花1	山西汾阳,草甸褐土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2642	花生吕花1	吉林松原,淡黑钙土	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2644	花生吕花1	吉林松原,淡黑钙土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2652	花生粤油9	广东广州,红壤	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2655	花生粤油9	广东广州,红壤	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2661	花生87-77	广东东莞,冲积土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2672	花生粤油59	广东东莞,赤红壤	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2682	花生粤油59	广东东莞,赤红壤	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2684	花生粤油5	江西上饶,砂质壤	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2685	花生粤油5	江西上饶,砂质壤	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2689	花生粤油5	江西南昌,红壤	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2693	花生粤油5	江西南昌,红壤	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2697	花生农家品种	河北卢龙,潮土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2700	花生95-5029	湖南长沙,水稻土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2710	花生湘花4	湖南长沙,水稻土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2712	花生长沙兔子	湖南长沙,冲积土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2717	花生海花1	山东泰安,褐土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2722	花生海花1	山东泰安,褐土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2724	花生大白沙	山东泰安,棕壤	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2726	花生大白沙	山东泰安,棕壤	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2737	花生农家品种	北京平谷,潮土	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2739	花生农家品种	北京平谷,潮土	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2741	花生海花1	陕西南郑,潮土	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2742	花生海花1	陕西南郑,潮土	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2746	花生海花1	陕西南郑,湿潮土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2752	花生海花1	山东郛城,潮土	

续表

菌株	宿主品种	分离地、来源*及土壤类型	说明**
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2755	花生8130	山东即墨, 黑土	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2764	花生8130	山东即墨, 棕壤	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2774	花生冀油3	河北旺县, 草甸土	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 147-3	花生 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	湖北, IOC	A
<i>B. sp. (Arachis)</i> Spr1-2	花生 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	四川, SAU	
<i>B. sp. (Arachis)</i> 283A	花生 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	以色列, HAMBI	
<i>B. sp. (Arachis)</i> MAR1510	非洲硬皮豆 ( <i>M. africanum</i> )	赞比亚, HAMBI	
<i>B. sp. (Arachis)</i> MAR411	花生 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	赞比亚, HAMBI	
<i>B. sp. (Arachis)</i> NC92	花生 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	玻里韦亚, HAMBI	
<i>B. liaoningense</i> 2281 <sup>T</sup>	大豆 ( <i>Glycine soja</i> )	辽宁, SFI	
<i>B. japonicum</i> ATCC10324 <sup>T</sup>	大豆 ( <i>Glycine max</i> )	日本, USDA	
<i>B. elkanii</i> USDA76 <sup>T</sup>	大豆 ( <i>Glycine max</i> )	美国, USDA	
<i>S. fredii</i> USDA205 <sup>T</sup>	大豆 ( <i>Glycine max</i> )	河南, USDA	
<i>R. galeag</i> 540 <sup>T</sup>	山羊豆 ( <i>Galega officinalis</i> )	芬兰, HAMBI	
<i>R. loti</i> ATCC 33669 <sup>T</sup>	百脉根 ( <i>Lotus corniculants</i> )	USDA	
<i>R. bv. viciae</i> ATCC 10004 <sup>T</sup>	蚕豆生物型 ( <i>Pisum sativum</i> )	美国, USDA	
<i>S. meliloti</i> ATCC9930 <sup>T</sup>	苜蓿 ( <i>Medicago sativa</i> )	美国, USDA	
<i>S. fredii</i> 2048	大豆 ( <i>Glycine soja</i> )	辽宁, SFI	

\* IOC 中国农业科学院油料作物所, SFI 中国农业科学院土肥所, SAU 四川农业大学, ATCC 美国模式菌株菌保中心, USDA 美国农业部, MAR 津巴布韦马龙德拉土壤肥力研究室, HAMBI 芬兰赫尔辛基大学应用化学和微生物系菌保中心, 菌号上方带“T”为该种的模式株

\*\* A 水培及盆栽(田间)实验表明具有较好的共生特性

共 8 株菌进行干旱条件下的存活实验。

供试的花生根瘤菌都经过原寄主品种回接试验确认, 并通过镜检及平板划线证实其纯度。本实验所有的测定项目均重复 3 次。

## 1.2 干旱耐受性试验的供试土

供试土取自北京平谷已多年种植花生的河滩地。土样容重、粒度分析及土壤类型等物化特性分析结果见表 2。

表2 供试土壤的物化特性

pH	有机质 (%)	碱解N (mg/kg)	速效K (mg/kg)	速效P (mg/kg)	容重 (g/cm <sup>3</sup> )	土壤类型
6.3	1.15	136	62	109	1.33	壤质砂土

## 1.3 耐盐、pH 及低温生长试验

供试菌株经 MGYA<sup>[2]</sup>活化后, 制成浓度为  $10^8 \sim 10^9$  cfu/mL 的悬液, 用 36 头接种器接种至各 MGYA 供试平板。耐盐试验 NaCl 的终浓度为 (W/V) 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%; pH 耐受试验 pH 分别为 4、5、9、10、11。耐盐、pH 试验中快生菌株 3~5d 观察结果, 慢生根瘤菌 5~7d 观察结果; 低温生长试验 8℃ 培养 15d 观察结果。

## 1.4 耐受干旱试验

Trotman 等认为根瘤菌在土壤水势为

$-1.5 \text{ kJ kg}^{-1}$  的干旱条件下, 其存活数量会显著地下降<sup>[3]</sup>, 因此本实验将供试沙土的干旱度设定为  $-1.5 \text{ kJ kg}^{-1}$ , 根据文献<sup>[4]</sup>中的方程及土壤物理特性计算得知此时土壤相对含水量为 3.3%。供试土样 121℃ 灭菌 1h, 2d 后再次灭菌, 105℃ 烘干, 置干燥器中备用。活化好的供试菌株 YEM 液体培养 48h, 按照设定土壤水势条件滴加在装有 100g 土样的供试小瓶内, 混和均匀, 密封放置在干燥避光处, 并于 0d, 10d, 20d, 30d, 60d 分别测定其活菌数(以上均为无菌操作)。

2 结果与讨论

2.1 对 NaCl、pH耐受力及低温条件下生长结果

表 3 中的结果表明我国的花生根瘤菌资源中存在着耐盐、酸较强的菌株,且菌株间的耐受性差异较大。

表3 供试菌株在不同NaCl、pH及低温下的生长情况

菌株*	NaCl				pH					低温
	0.5%	1.0%	2.0%	4.0%	4	5	9	10	11	8℃
<i>B. liaoningense</i> 2281 <sup>T</sup>	+	-	-	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. japonicum</i> ATCC10324 <sup>T</sup>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. elkanii</i> USDA76 <sup>T</sup>	++	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>R. galeag</i> 540 <sup>T</sup>	+++	+	-	-	-	++	++	+	-	-
<i>R. loti</i> ATCC 33669 <sup>T</sup>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>R. bv. viciae</i> ATCC 10004 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>S. meliloti</i> ATCC9930 <sup>T</sup>	+++	+	+	-	-	++	++	+	-	-
<i>S. fredii</i> 2048	++	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> MAR411	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> MAR1510	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> NC92	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 283A	+	-	-	-	-	+	++	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> Spr1-2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 147-3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2519	++	+	+	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2524	+	+	-	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2553	-	-	-	-	-	+++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2560	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2571	+	-	-	-	-	+++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2576	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2584	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2642	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2644	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2652	++	+	-	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2655	+	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2661	+	+	-	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2672	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2682	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2684	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2685	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2693	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2697	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2700	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2710	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2712	++	+	-	-	-	+++	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2717	+	+	-	-	-	+++	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2722	-	-	-	-	-	+++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2724	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2726	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2737	+	+	-	-	-	+++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2739	+	+	-	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2741	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2742	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2746	+	+	-	-	-	++	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2752	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2755	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2764	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-
<i>B. sp. (Arachis)</i> 2774	-	-	-	-	-	+++	+++	+	-	-

未见菌落生长, + 微弱生长, ++ 菌落生长较好, +++ 菌落生长接近或达到阳性对照生长水平

耐盐实验结果表明,我国的花生根瘤菌在耐盐能力方面差异较大。在分离自我国的 36 株花生根瘤菌中只有 *B. sp. (Arachis)* 2519 一株可在 2%NaCl 的平板上生长;5 株在 1%NaCl 的平板上生长,约占 14%;14 株不能耐受 0.5% NaCl 浓度,约占 40%;来自国外的 4 株花生根瘤菌中没有一株可耐受 1%NaCl。参比菌株中,山羊豆根瘤菌 540、中华根瘤菌 2048、苜蓿根瘤菌 ATCC9930 及大豆根瘤菌 USDA76 具有较高耐盐能力,这同以前的研究结果一致<sup>[2]</sup>。

在耐酸方面,所有供试菌株在 pH4 时都不生长,在 pH5 的条件下都生长,但生长水平差异较大。来自国内的 36 株花生根瘤菌中有 26 株菌生长达到生长较好及接近阳性对照水平,约占 67%,国外的 4 株花生根瘤菌生长较差。参比菌株中(包括国外的花生根瘤菌)生长较好,只有山羊豆根瘤菌和苜蓿根瘤菌。表明我国的花生根瘤菌资源中存在着丰富的耐酸菌株。

供试的花生根瘤菌中,有 18 株在 pH9 条件下能生长,约占 50%;在 pH 为 10 的条件下所有

的菌株都不生长。同参比菌株及其他已知根瘤菌相比<sup>[5]</sup>,花生根瘤菌对碱较敏感。

在 8℃ 的低温培养 15d 后,参照菌株和供试的花生根瘤菌菌株都未见生长。

具有较好共生特性的菌株在耐盐、酸及碱的能力上同共生特性表现一般的菌株未见有明显的区别,未发现共生特性同耐盐、酸及碱能力之间有明显相关性,这二者之间的关系尚需进一步研究。

## 2.2 耐受干旱实验结果

过去的研究认为土壤干旱条件严重地影响根瘤菌的存活。土壤水势概念比土壤含水量更能说明土壤中有效水分的含量,影响微生物的存活及生物学特性。因此国外有不少学者在研究根瘤菌在干旱条件下存活时用土壤水势表示土壤干旱度<sup>[3]</sup>,国内至今未见到这方面的报道。本实验条件下,从图 1 中可看出几乎所有供试菌株在设定的土壤干旱条件下随着时间的推移,其数量会不同程度地下降,这同以前的研究结果一致<sup>[3]</sup>;所有菌株的数量在 60d 时下降至检测不出的水平。

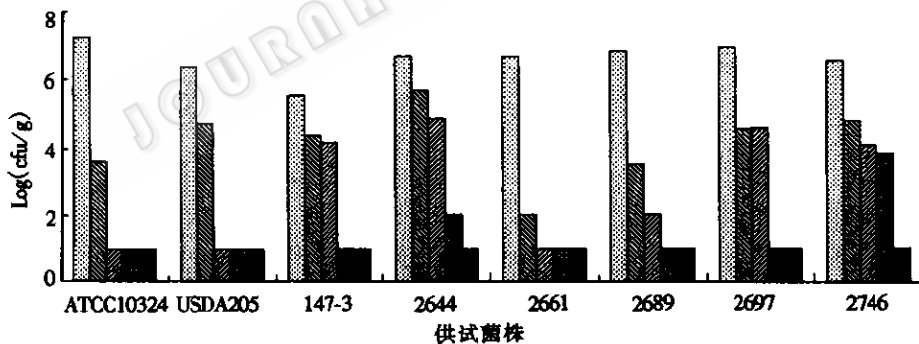


图1 供试菌株的数量变化随时间的变化

□ 0d, ▨ 10d, ▩ 20d, ■ 30d, ■ 60d

在干旱条件处理 20 时,大部分供试菌株的数量下降超过 3 个数量级,花生根瘤菌 2661、大豆根瘤菌 (USDA205 及 USDA10324) 对干旱较敏感,20d 时已检不出来;花生根瘤菌 147-3、2644、2746、2697 的活菌数下降程度明显小于其它菌株,表现出较好的干旱耐受性。在干旱处理 20d 时只有 2644、2746 还保持着相对数量

的活菌数量,其它菌株的数量已下降至检测不出的水平,表明菌株间的抗旱能力差异较大。

据 Bushby 等的报道快生根瘤菌对干旱条件的耐受性远低于慢生根瘤菌,可相差达 2 个数量级<sup>[6]</sup>。但本实验的结果表明快生根瘤菌和慢生根瘤菌在干旱的耐受性方面没有明显差别,同 Pena-Cabriaes 等的结论相一致<sup>[7]</sup>,其差异

尚需进一步研究。

实验中还发现供试的 6 株花生根瘤菌同两株大豆根瘤菌相比,在 20d 时有 5 株花生根瘤菌的活菌数下降的数量级低于慢生大豆根瘤菌,这似乎表明花生根瘤菌的干旱耐受性优于大豆根瘤菌。

Mohammad. R. M.<sup>[8]</sup>等一些学者认为耐盐性强的根瘤菌菌株也较能耐受干旱条件。但在本实验中,较耐受干旱条件的 147-3、2644、2697 及 2746 中只有 2746 有较高的耐盐水平,而对于干旱敏感的 2661 具有较高耐盐能力。这说明耐盐能力同耐受干旱能力之间不一定一致。

通常认为菌株耐受酸、碱的能力同其分离地有很大的关系。但本实验中,尽管不少在碱性土壤中分离得到菌株具有良好的耐碱能力,不少在酸性土壤中分离得到菌株也具有良好的耐碱能力(如 2710、2684 等),反之亦然(如 2576、2584 等),但也有不少菌株并无此相关

性,其内在关系仍需深入研究。

致谢 参加工作的还有本组的樊蕙同志,特致谢。

## 参 考 文 献

- [1] 周平贞,胡济生. 土壤学报,1990,27(4):26~35.
- [2] 崔峰,徐玲玫,樊蕙等. 大豆科学,1992,11(4):359~362.
- [3] Trotman A P, Weaver R W. Soil Sci Soc Am J, 1995, 59:466~470.
- [4] Yuan F M. A Case Study-Physical Soil Schematization for the SWAPS model, 1997, 39~40.
- [5] 王素英,陈文新. 微生物学通报,1994,24(2):67~72.
- [6] Bushby H V A, Marshall K C. Soil Biol Biochem, 1977, 9:143~147.
- [7] Pena-Cabriaes J J, Alexander M M. Soil Sc. Soc Am J, 1979, 43:962~966.
- [8] Mohammad R M, Akhavan-Kharazian M, Capbell W F *et al.* Plant and soil, 1991, 161:127~134.