

## 根际微生物附着大豆根表影响因素的研究

莫继先, 王志刚, 徐伟慧, 肖静, 孙剑秋

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:**在实验室条件下,研究了pH、温度、盐浓度和接种量4个因素对根际微生物(RM)附着大豆根表的影响。结果表明:不同pH、温度和NaCl浓度对根际微生物附着大豆根表有一定的影响,分别在pH 7~8、24~33℃和NaCl 30~60 mmol·L<sup>-1</sup>时RM附着量达到最佳,最大值出现在pH 7.5、30℃和NaCl 50或60 mmol·L<sup>-1</sup>,RM附着量与接菌量之间的线性回归方程为 $y = 1.0021x + 0.2982$ ,相关系数 $R^2 = 0.9925$ ,表明RM的附着量与菌的接种量之间呈显著正相关。

**关键词:**大豆;根际微生物;附着;根表

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)02-0330-03

## Factors Affecting Attachment of Rhizosphere Microorganisms to the Soybean Root Surface

MO Ji-xian, WANG Zhi-gang, XU Wei-hui, XIAO Jing, SUN Jian-qiu

(College of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Under laboratory conditions, we studied the effect of pH, temperature, NaCl concentration and rhizosphere microorganisms (RM) inoculum size on the attachment of RM to the soybean root surface. Under the selected range of pH, temperature and NaCl concentration, the attachment of RM all showed an increasing and then decreasing trend, and peaked at pH 7.5, 30°C and 50 or 60 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, respectively. The linear regression equation about attachment of RM and inoculum size was  $y = 1.0021x + 0.2982$ , the correlation coefficient was  $R^2 = 0.9925$ , it showed the attachment of RM was significant positive correlated with inoculum size.

**Key words:** Soybean; Rhizospheric microorganism; Attachment; Root surface

植物根部与根际微生物(Rhizosphere microorganisms, RM)之间的相互作用对土壤生态环境起到重要的调节作用,植物根表及周围存在不同种类和数量的微生物群落<sup>[1]</sup>,在这个微环境中,微生物与植物之间可以形成共生、内生、拮抗和寄生等关系<sup>[2]</sup>,而这些关系主要取决于土壤微生物种类、土壤营养物质成分和土壤环境因素<sup>[3]</sup>。RM与植物之间的关系主要是由于RM附着在植物根表或周围后发挥的作用,RM竞争性附着植物根表的能力已经被认为是不同RM种类的重要生理特征<sup>[4]</sup>,而这种附着的过程也被认为是感染或结瘤的第一步<sup>[5]</sup>。

植物根表可以定居微生物一般是通过复杂的生态和生理因素共同作用的结果,这些定居的微生物中包含了目前研究较多的植物根际促生菌(PGPR)家族,如根瘤菌、根际霉菌和植物根际促生菌等,这些菌种大量定居在植物根表或根际周围,

对于宿主抗病性、抗干旱、提高农作物产量等具有重要的调节作用<sup>[6]</sup>;而具有固氮、溶磷、产生植物激素和分泌抗生素等功能的PGPR已经开始用于生物肥料的生产<sup>[7]</sup>。目前研究的热点集中在PGPR生理生化特征等,对于RM附着大豆根表的机理及其影响因素的研究很少。该研究在实验室条件下,分别测定不同pH、温度、盐浓度和接种量条件下大豆根表的RM附着量,以探讨各条件对RM附着大豆根表的影响,为研究RM与大豆高产之间的关系奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

大豆品种为合丰25,种植所用土壤取自齐齐哈尔大学试验田;TY-半固体培养基:蛋白胨10.0g、酵母膏5.0g、葡萄糖1.0g、NaCl 5.0g、蒸馏水

收稿日期:2011-01-06

基金项目:黑龙江省教育厅科技项目(11551539)。

第一作者简介:莫继先(1982-),男,讲师,从事微生物工程方面的研究工作。E-mail:mistermo@126.com。

1 000 mL、琼脂 0.5%、pH 7.5; pH 7.5、25 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液;其它常规试剂为分析纯。

## 1.2 实验方法

将长势良好、生长到开花期的大豆根系取出,去除根系表面的土壤,随机取 10 处根须末端,每处 1 cm 长,分别放在 Ep 管中用 25 mmol·L<sup>-1</sup>、pH 7.5 的磷酸盐缓冲液震荡冲洗根须表面的 RM,取出根须,用蒸馏水洗净待用。

Ep 管中的 RM 经 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,用 25 mmol·L<sup>-1</sup>、pH 7.5 的磷酸盐缓冲液重悬后混合,利用平板菌落计数法计数,并稀释成 10<sup>8</sup> ~ 10<sup>3</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> 10 倍梯度细胞浓度,待用。

配置 TY 半固体培养基, pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 共 10 个不同值,将 10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> RM 1 mL 与 1 cm 根须末端接种到 10 mL 培养基中共培养,摇床混合 1 min,静止培养 48 h 后,利用平板菌落计数法分别测定根须表面附着的微生物数量。

同上述方法,分别在 6 ~ 45℃、每 3℃ 为 1 个梯度的温度下测定大豆根须表面附着的微生物数量;分别在 0 ~ 100 mmol·L<sup>-1</sup>、每 10 mmol·L<sup>-1</sup> 为 1 个梯度的 NaCl 浓度下测定大豆根须表面附着的微生物数量;分别在 1 × 10<sup>8</sup>、1 × 10<sup>7</sup>、1 × 10<sup>6</sup>、1 × 10<sup>5</sup>、1 × 10<sup>4</sup>、1 × 10<sup>3</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> 的接种量下测定大豆根须表面附着的微生物数量。

## 1.3 数据分析

利用 Excel 2003 和 IBM SPSS Statistics 19.0 进行数据处理与分析。

## 2 结果与分析

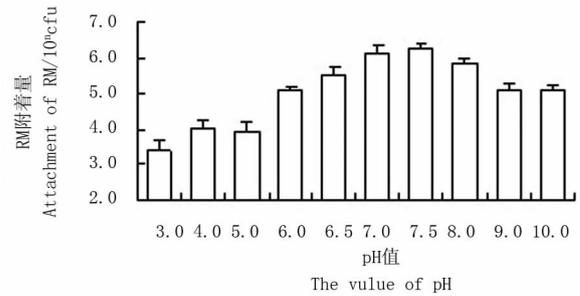
### 2.1 不同 pH 对 RM 附着大豆根系的影响

在 30℃ 的条件下,测定了不同 pH 值对 RM 附着大豆根表的影响,结果如图 1。由于实验所选的土壤是北方近盐碱地土壤,所以在 pH 呈酸性或弱酸性时对 RM 的影响较大,而碱性或弱碱性的条件比较适合 RM 附着大豆根表,并且在 pH 7 ~ 8 时呈最大附着量,最大值达到 1.778 × 10<sup>6</sup> cfu (pH 7.5)。

### 2.2 不同温度对 RM 附着大豆根系的影响

在 pH 7.5 的条件下,测定了不同温度对 RM 附着大豆根表的影响,结果如图 2。随着温度的升高,大豆根表附着的微生物数量不断增加,温度与附着的 RM 数量呈正相关,在 30℃ 时达到最大值 7.413 × 10<sup>6</sup> cfu;而后 RM 的数量开始随温度的升高呈现

下降趋势,即温度与 RM 附着量呈负相关。RM 附着大豆根表的最佳温度为 24 ~ 33℃。



图中数据为  $\overline{\log_{10}^{RM}} \pm SD$ , 下同。

Values in figure are  $\overline{\log_{10}^{RM}} \pm SD$ , the same below.

图 1 30℃ 时各 pH 条件下 RM 在大豆根系表面的附着量

Fig. 1 The number of RM attached to the surface of soybean root under different pH at 30°C

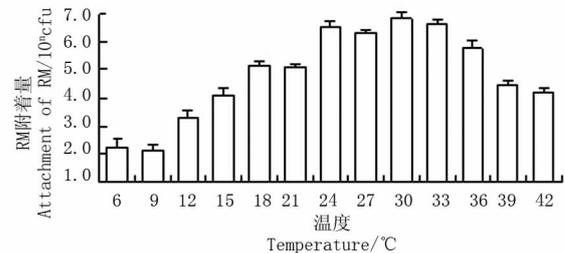


图 2 pH 7.5 时各温度条件下 RM 在大豆根系表面的附着量

Fig. 2 RM attached number on the surface of soybean root under different temperature at pH7.5

### 2.3 不同盐浓度对 RM 附着大豆根系的影响

由图 3 可知,与 pH 和温度相比,盐浓度对 RM 附着大豆根系的影响要小一些。TY 半固体培养基 pH 为 7.5,当 NaCl 浓度为 0 ~ 60 mmol·L<sup>-1</sup> 时, RM 附着量随着盐浓度的增加而增加,而当 NaCl 浓度增大到 100 mmol·L<sup>-1</sup> 时,附着量逐渐下降,说明高浓度盐对 RM 有抑制作用。在供试盐浓度范围内,当 NaCl 浓度在 30 ~ 60 mmol·L<sup>-1</sup> 时, RM 附着量较大,并且在 NaCl 浓度为 50 和 60 mmol·L<sup>-1</sup> 时达最高附着量 (2.754 × 10<sup>6</sup> cfu)。

### 2.4 不同接种量对 RM 附着大豆根系的数量影响

由图 4 可知,在 RM 接种量为 1 × 10<sup>3</sup> ~ 1 × 10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> 浓度范围内,随着接种量的增加, RM 附着量相应增加。RM 附着量与菌的接种量之间呈显著正相关,相关系数  $R^2 = 0.992$ 。

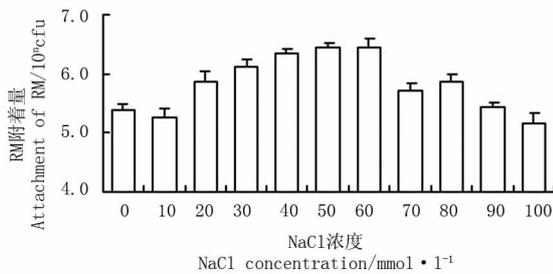


图3 不同盐浓度条件下 RM 在大豆根系表面的附着量

Fig. 3 RM attached number on the surface of soybean root under different NaCl concentrations

### 3 结论与讨论

该实验研究了 4 种条件下 RM 在大豆根系表面的附着量,其中 pH、温度和盐浓度的结果反映出 RM 附着大豆根表存在最佳条件,间接说明土壤环境的因素可以直接影响 RM 附着大豆根表的能力;实验室条件下菌的接种量与 RM 附着量之间呈显著正相关。

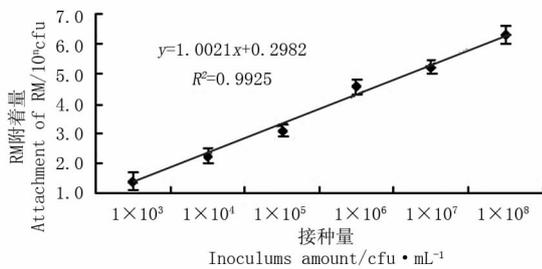


图4 不同接种量条件下 RM 在大豆根系表面的附着量

Fig. 4 RM attached number on the surface of soybean root under different inoculum size amount

在实际的土壤环境中,影响 RM 附着根表的因素很多,主要包括 pH、温度、盐浓度、含水量、含氧量、各种营养物质含量等,同时 RM 和大豆自身的因素也影响其附着能力<sup>[8]</sup>,Williams 等<sup>[9]</sup>在研究根瘤菌附着大豆根表时发现,Acidic Exopolysaccharide (EPS)基因在影响 RM 附着大豆根表和促进根表形成生物膜的过程中起到关键作用,同时认为甘露聚糖可以介导 RM 大量附着在大豆表面,并形成大量的根瘤;Kos 等<sup>[10]</sup>也发现微生物的自凝集作用和其附着在不同物质表面之间也存在一定的关联。

在后续的研究中应着重研究更多的环境因素对 RM 附着大豆根表的影响以及大豆 RM 的生物多样性及分子生物学方面的内容,如研究基因结构与

RM 附着大豆根表之间的关系、根表渗透液对 RM 附着大豆根表的影响等,从分子机理方面进一步探索 RM 附着大豆根表的原因。

### 参考文献

- [1] Albareda M, Dardanelli M S, Sousa C, et al. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 259(1): 67-73.
- [2] 刘占良,翟红,刘大群. 植物根际的微生物互作及其在植物病害生物防治中的应用 [J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(S1): 183-186. (Liu Z L, Zhai H, Liu D Q. Microbial interaction in the rhizosphere and its involvement in biological control of plant diseases [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2003, 26(S1): 183-186.)
- [3] 李勇,黄小芳,丁万隆. 根系分泌物及其对植物根际土壤微生态环境的影响 [J]. 华北农学报, 2008, 23(S1): 182-186. (Li Y, Huang X F, Ding W L. Root exudates and their effects on plant rhizosphere soil micro-ecology environment [J]. Acta Agriculture Boreali-Sinica, 2008, 23(S1): 182-186.)
- [4] Smith G B, Wollum A G. Bacterial culture history affects the attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to host *Glycine max* roots [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1991, 37(10): 730-736.
- [5] Bohlool B B, Schmidt E L. Lectins: A possible basis for specificity in the rhizobium-legume root nodule symbiosis [J]. Science, 1974, 185(7): 269-271.
- [6] 胡江春,薛德林,马成新,等. 植物根际促生菌 (PGPR) 的研究与应用前景 [J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1963-1966. (Hu J C, Xue D L, Ma C X, et al. Research advances in plant growth-promoting rhizobacteria and its application prospects [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(10): 1963-1966.)
- [7] 刘淑琮,冯妍,于洁. 植物根际促生菌的研究进展及其环境作用 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48(11): 2882-2887. (Liu S C, Feng X, Yu J. Research progress of plant growth-promoting rhizobacteria and its environmental effects [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2009, 48(11): 2882-2887.)
- [8] 陈宏宇,李晓鸣,王敬国. 抗病性不同大豆品种根面及根际微生物区系的变化—II. 连作大豆 (重茬) 根面及根际微生物区系的变化 [J]. 植物营养与肥料学报, 2006, 12(1): 104-108. (Chen H Y, Li X M, Wang J G. Change of microflora in the rhizoplane and rhizosphere of different disease resistance soybean cultivars II. Chang of microflora in the rhizoplane and rhizosphere of soybean under continuous cropping condition [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2006, 12(1): 104-108.)
- [9] Williams A, Wilkinson A, Krehenbrink M, et al. Glucmannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(13): 4706-4715.
- [10] Kos B, Šuškovi J, Vukovi S, et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(6): 981-987.