

耐酸铝根瘤菌的筛选及其对大豆 – 根瘤菌共生体系的影响

李秀平^{1,2}, 陈淑珍², 黄琮斌¹, 年海², 梁诗华¹, 程艳波², 牟英辉²

(1. 广东农工商职业技术学院, 广东 广州 510507; 2. 华南农业大学 农学院/国家大豆品种改良中心广东分中心, 广东 广州 510642)

摘要:为解决华南大豆种植所面临的土壤酸化问题,筛选出耐酸铝高效根瘤菌,通过回接试验找出适合华南酸性土壤环境的根瘤菌及其共生固氮体系。利用菌株活化培养法分离来自广东增城和惠州地区的 20 个栽培大豆上的根瘤菌,通过分光光度计检测在酸铝条件下的培养的菌株,筛选出耐性菌株 YX30 号,并对其生长特性以及接种后对大豆生长的影响。结果表明:在 pH4.5 及 pH6.0 条件下含一定浓度铝的营养液中,接种 YX30 号根瘤菌后,铝浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时耐酸铝品种华夏 1 号、PI416937 仍能结瘤,桂夏 1 号和 Young 不能结瘤。在 pH4.5 和 pH6.0 条件下,营养液铝浓度达到 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,大豆地上部干重均为负增长,铝明显的抑制了大豆的生长;低铝浓度(25 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下,结瘤数均、固氮酶活性、地上部干重及氮含量均高于对照,酸性环境中低浓度的铝能促进结瘤,提高地上部干重和含氮量。

关键词:大豆;酸铝;根瘤菌;共生;固氮

中图分类号:S565.1;S157.4 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2018.01.0105

Screening for Al-tolerant Rhizobium and Its Effects on Soybean-Rhizobium Symbiosis System

LI Xiu-ping^{1,2}, CHEN Shu-zhen², HUANG Cong-bin¹, NIAN Hai², LIANG Shi-hua¹, CHENG Yan-bo², MU Ying-hui²

(1. Guangdong AIB Polytechnic College, Guangdong 510507, China; 2. College of Agriculture/Guangdong Branch of National Center for Soybean Improvement, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to solve the soil acidification problem of soybean planting in south China, the superior aluminum-tolerant rhizobia strains were screened by inoculation test, and find the special suitable rhizobial strains or Legume-rhizobium symbiotic nitrogen (N_2) fixation (SNF) for acid soil in south China. The nodules of 20 cultivation soybeans which grew in Zengcheng and Huizhou of Guangdong province were isolated by using technique of strains activated culture method. The tolerance of aluminum was detected by spectrophotometer. The growth characteristics of aluminum-tolerant rhizobium were analyzed by using the method of inoculation. The effects of acid on growth and nodulation of the cultivated-soybean were explored by inoculating with aluminum-tolerant strains. The growth of YX30 strain on pH6.0 group was faster than the pH4.5 group under the same Al concentration. Four soybean genotypes inoculated with rhizobium of YX30 were cultured with different Al concentration at pH6.0 and pH4.5, respectively. Results indicated that when the Al concentration reached 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the resistant genotype could nodulate while the sensitive genotype failed. As the concentration of Al increased, the number of nodules decreased. A concentration of 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al in the medium led to the negative growth of the dry weight of the plant shoots at both pH4.5 and pH6.0. In the medium with lower Al concentration(25 and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), nodule numbers were more than their controls at both pH4.5 and 6.0, activity of the N fixation enzyme, dry weight and N content of the shoots were higher than their corresponding controls. Although Al is an inhibited factor in acid environment, low concentration of Al could enhance nodulation, and increase the dry weight and N content of the shoots.

Keywords: Soybean; Acid-aluminum; Rhizobium; Symbiosis; Nitrogen fixation

中国南方地区约有 $2.03 \times 10^5 \text{ hm}^2$ 土壤的 pH 低于 5.0,酸性土壤总面积约占全国土地面积的 21%。近年随着大量化学肥料的施用,更加剧了土壤的酸化^[1]。酸性土壤中, Al^{3+} 活性高是限制作物生长的重要因素之一。酸铝明显的影响了南方土壤中大豆土著根瘤菌的数量,抑制微生物的生长和

发育^[2-3]。酸铝条件下慢生根瘤菌的生长受抑制作用更为显著^[4-5]。

酸铝对豆科作物 – 根瘤菌的共生作用产生不良影响主要表现出抑制根瘤菌的存活或生长;影响结瘤过程、根瘤功能及寄主植物的生长^[6-7]。铝毒害影响根系细胞的分裂与分化,阻碍豆科植物结瘤

收稿日期:2017-08-17
基金项目:国家自然科学基金(31371642);广东省高等职业教育教学改革项目(GDJG2015100);广东农工商职业技术学院重点课题(xyzd1205)。
第一作者简介:李秀平(1971-),女,博士,副教授,主要从事植物营养及作物栽培研究。E-mail:xpli@gdaib.edu.cn。
通讯作者:年海(1962-),男,博士,教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:Hnian@scau.edu.cn。

固氮,致使共生活性下降^[8-10]。低 pH 和铝胁迫抑制根瘤菌与其宿主植物之间相互作用产生结瘤因子从而影响共生固氮系统的形成^[11-12]。Nod A 基因的表达在酸性条件下受到铝离子的抑制,铝影响结瘤基因的表达,对根瘤菌与其宿主植物相互作用过程的结瘤信号物质产生有抑制作用^[13]。酸和铝毒胁迫下植株 Kudesnik 接种菌株 348a,结瘤数增加,植株重提高 20% ~ 25%;植株 Kudesnik 接种菌株 9-4A,共生系统的形成受抑制,植株重、株高、根长和根瘤总数明显减少^[14-15]。可见,酸铝胁迫下豆科植物接种适宜的根瘤菌有利于共生系统形成,可以促进大豆的生长,提高大豆的产量。本研究通过对栽培大豆根瘤菌进行耐酸铝筛选,并对耐性菌株的生长特性和接种后的效果进行分析,研究铝毒对大豆-根瘤菌共生固氮体系的影响,为华南地区大豆耐酸铝根瘤菌的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

耐铝毒品种:华夏 1 号(华南农业大学育成),PI416937(美国引进);铝敏感性品种:Young(日本引进),桂夏 1 号(广西玉米研究所育成)。菌株分别从广东的增城宁西试验田和惠州农科所试验田生长的 20 个大豆品种中分离(表 1)。菌株活化培养采用 YMA 培养基,植株水培采用 Fahraeu 无氮植物营养液。

1.2 耐酸铝根瘤菌株的筛选

1.2.1 菌株的耐酸铝筛选 大豆根瘤菌的分离参照 Peter 等^[16]的方法进行。各菌株经活化后,接种于 YMA 液体培养基中,置恒温振荡器中 28 ± 1℃ 下培养,待 OD₆₀₀ 约为 1 时(用 UV-MINI-1240 220VE 型岛津紫外分光光度计测定),分别吸取 100 μL 菌悬液到铝浓度为 0, 25, 50, 100, 200 μmol · L⁻¹ YMA 液体培养基中(pH4.5、体积为 10 mL),置恒温振荡器中 28 ± 1℃、180 r · min⁻¹ 振荡培养,以培养液浑浊度的变化来检测菌的生长情况,培养 3 d 后分光光度计测量 OD₆₀₀。每个处理 3 个重复。

1.2.2 分离菌株固氮酶活性测定 固氮酶活性的测定采用乙炔还原法 ARA^[17]。

1.2.3 耐酸铝根瘤菌株的生长曲线 参照 Li 等^[18]的方法,根瘤菌活化 2 d,待 OD₆₀₀ 约为 1 时,分别吸取 100 μL 菌悬液接种到铝浓度为 0, 25, 50, 100, 200 μmol · L⁻¹ YMA 液体培养基中(pH4.5、体积为 10 mL),置恒温振荡器中 28 ± 1℃、180 r · min⁻¹

振荡培养,每隔 3 或 12 h 后,测其 OD₆₀₀ 值,每个处理 3 个重复。

1.3 酸铝对大豆结瘤及其生长的影响

1.3.1 试验设计 将 4 个不同铝毒耐性大豆品种,用 5 个铝水平(0,25,50,100,200 μmol · L⁻¹ AlCl₃ · 6H₂O),两个 pH 水平(pH4.5,pH6.0)处理,随机组合共 40 个处理。以 pH4.5 和 pH6.0 不接种作对照。每个处理 2 个重复。

把过滤灭菌的 Fahraeu 无氮植物营养液配好后分装到高压灭菌的大组培瓶子中(250 mL · 瓶⁻¹),大豆种子在灭菌的砂床发芽 2 ~ 3 d 后,将幼苗放到培养皿中用筛选得到耐酸铝根瘤菌液浸泡 15 min,用灭菌棉花固定在带孔泡沫板上。移苗后将纸培试管放在光照培养箱(光强 200 μmol · m⁻² · s⁻¹,光照时间 12 h)中培养。生长期间定期补充营养液。

1.3.2 测定项目与方法 在 30 d 后进行收获。收获时将根瘤小心摘下,记录有效根瘤数。然后用纸吸干水分,用万分之一天平称根瘤鲜重,迅速把根瘤放进小瓶中用于固氮酶活性的测定。固氮酶活性采用乙炔还原法 ARA 测定方法^[17]。

地上部放在信封中放入烘箱先 105℃ 杀青 20 min,75℃ 烘干称重。地上部杀青烘干后用于氮的测定。将样品粉碎,先用 H₂SO₄ - H₂O₂ 消煮,用自动定氮仪测定全氮(Kjedahl2300,FOSS,瑞士)。

1.4 数据分析

利用 Statview for Windows 5.0 (SAS Institute Inc.)统计软件对测量指标进行数据三因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌的分离和纯化

从生长在广东增城、惠州的 20 个品种的新鲜根瘤中分离获得了 45 株菌,经多次纯化后染色、镜检,发现菌株均为革兰氏阴性小杆菌;用这些菌株回接 Fahraeu 无氮植物营养液水培的大豆,均能使大豆结瘤,可以初步判定这些菌株为大豆根瘤菌,菌株序号和种质资源分布如表 1。

2.2 分离菌株的固氮酶活性

图 1 为分离出来的 45 株菌株回接大豆时的固氮酶活性的测定结果,所分离根瘤菌的固氮酶活性在 0.173 ~ 35.12 μmol C₂H₄ · g⁻¹ · h⁻¹ 之间,其中 30 号菌株最高为 35.12 μmol C₂H₄ · g⁻¹ · h⁻¹,6 号株最低为 0.173 μmol C₂H₄ · g⁻¹ · h⁻¹。

表 1 参试大豆种质资源
Table 1 Soybean germplasm of nodulation test

惠州种质 Germplasm in Huizhou	菌株号 Strain No.	增城种质 Germplasm in Zengcheng	菌株号 Strain No.
梗青 82 Gengqing 82	1	粤夏 05-3 Yuexia05-3	15、25、34
桂 0114-4 Gui0114-4	2、11	浙春 3 号 Zhechun 3	17、24
粤夏 03-3 Yuexia03-3	3、10	自贡冬豆 Zigongdongdou	18、20
南农 506 Nannong 506	4	巴西 15 Baxi 15	19、21
桂 0112-3Gui0112-3	5、6	巴西 2 Baxi 2	14、16、26、35
华夏 1 号 Huaxia 1	6	粤夏 03 Yuexia 03	23、29、30、32、33、36
桂 0104-1Gui0104	7	巴西 13 Baxi 13	22、28
粤夏 05-2Yuexia05-2	8、9、43、45	华夏 1 号 Huaxia 1	27、44
桂夏 2 号 Guixia 2	42	华夏 3 号 Huaxia 3	37
桂 0103-1 Gui0103-1	12	桂 0103-1 Gui0103-1	38、39
桂 0104-1 Gui0104-1	13	梗青 82 Gengqing 82	31、40、41

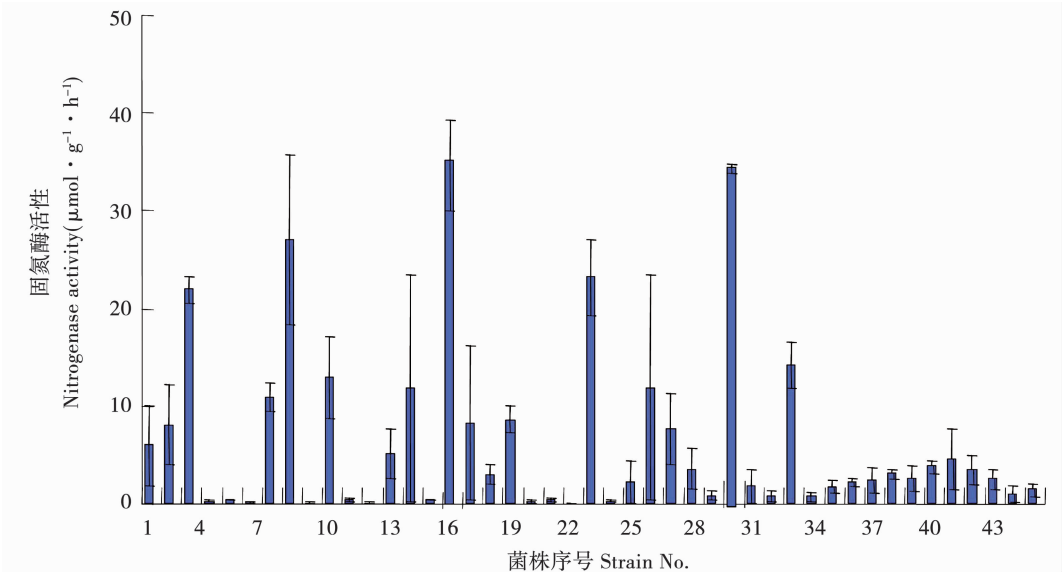


图 1 分离菌株固氮酶活性的测定
Fig. 1 Determination of nitrogenase activity of isolated strains

2.3 耐酸铝根瘤菌的筛选

根据固氮酶活性测定结果,选择活性较高的 3、8、16、23 和 30 号菌株进行进一步筛选。如图 2 所示,随着铝浓度的升高,菌的生长明显被抑制。有些菌株在含有低浓度铝的(25 μmol·L⁻¹)培养基中生长速度加快,例如 23 和 30 号菌株在铝浓度为 25 μmol·L⁻¹时生长量均高于对照。本试验分离出来的菌株对酸铝的耐受远远高于慢生根瘤菌的模式菌株 *B. japonicum* USDA6^T。当铝浓度达到 100 μmol·L⁻¹时,菌株的生长量几乎减少到对照(铝浓度 0 μmol·L⁻¹)的 50%,铝浓度达到 200 μmol·L⁻¹时,菌株的生长量几乎减少到对照(铝浓度 0 μmol·L⁻¹)的 20%,根据整体生长量表现筛选 30 号菌株为耐酸铝菌株,代号为 YX30。

2.4 酸铝对 YX30 根瘤菌株生长的影响

从图 3 曲线可以看出,偏中性条件(pH6.0)下菌悬液的 OD₆₀₀值均高于酸性条件(pH4.5)下的。从曲线在菌株各生长时期(延滞期、对数生长期和稳定期)的趋势来看,偏中性条件下,根瘤菌的延滞期较短约为 18 h;酸性条件下,根瘤菌延滞期增长约为 36 h。pH6.0 时,不同浓度的铝对根瘤菌延滞期几乎没有影响;pH4.5 时,低浓度的铝(25 和 50 μmol·L⁻¹)对根瘤菌延滞期也几乎没有影响。当铝浓度增加到 100 μmol·L⁻¹时,根瘤菌延滞期延长至 48 h。酸性条件下根瘤菌的生长与偏中性条件下的相比,均表现出对数生长期出现滞后,稳定期到达延迟。与 pH6.0 时相比,pH4.5 时 YX30 菌株的对数生长期晚出现 18 h,稳定期晚到达约 20 h。

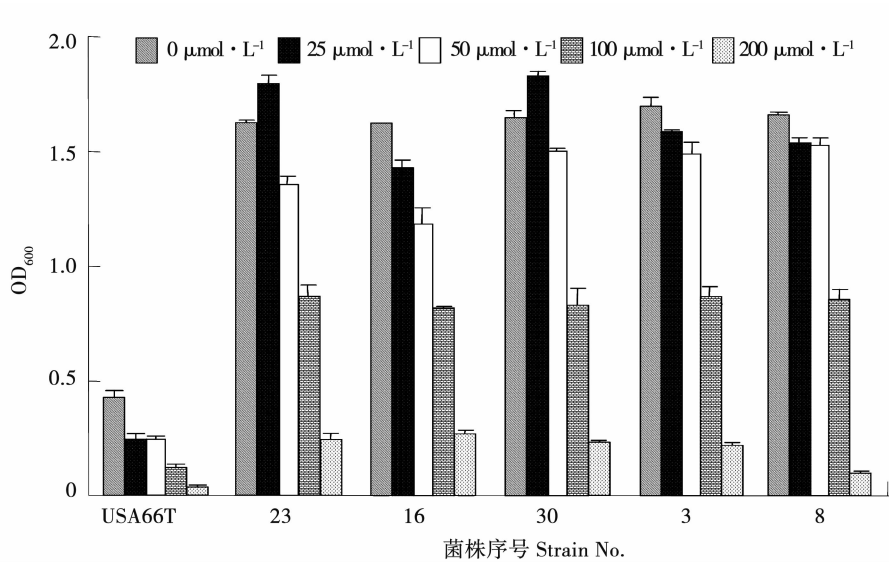


图2 不同浓度铝处理下各菌株的相对生长量

Fig. 2 Relative growth quantity of strains under different Al³⁺ concentrations

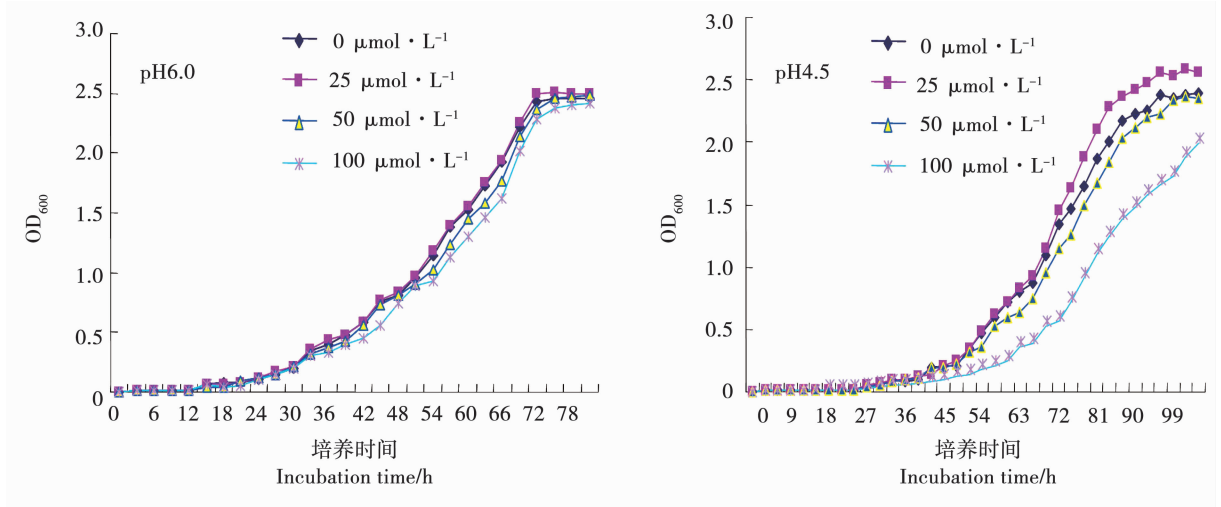


图3 YX 30 根瘤菌株在不同铝浓度下生长曲线

Fig. 3 Growth curves of YX30 strain under Al³⁺ treatments

2.5 酸铝对大豆结瘤及其生长的影响

2.5.1 酸铝对大豆结瘤的影响 三因素方差分析的结果显示,接种根瘤菌 YX30 后有效瘤数存在极显著的基因型差异($F = 7.14^{**}$)。且 pH 和铝处理

之间,基因型和铝处理之间,pH、Al 浓度、基因型三因素之间对结瘤数影响存在着显著的交互作用, F 值分别为 13.59^{***} 、 5.33^{***} 、 5.65^{**} (表 2)。

表 2 三因素方差分析的结果

Table 2 Effect of three-factor variance analysis							
处理 Treatment	pH	铝浓度 Al ³⁺ concentration	基因型 Genotype	pH × Al ³⁺ concentration	pH × 基因型 pH × Genotype	铝浓度 × 基因型 Al ³⁺ concentration × Genotype	pH × 铝浓度 × 基因型 pH × Al ³⁺ concentration × Genotype
瘤数 Nodule number	3.39 ns	0.29 ns	7.14 **	0.68 ns	13.59 ***	5.33 ***	5.65 **

*: 0.01 < P < 0.05; **: 0.01 < P < 0.01; ***: P < 0.0001; ns: 差异不显著。下同。

*: 0.01 < P < 0.05; **: 0.01 < P < 0.01; ***: P < 0.0001; ns: No significant difference. The same below.

表 3 显示品种和根瘤菌之间的匹配关系,YX30 菌株与华夏 1、Young 的匹配性较好,结瘤能力强。华夏 1 号瘤数最多,pH4.5 铝浓度为 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有效结瘤数为 21 个,其次为 Young。但不同 pH 和不同 Al 浓度对结瘤数影响不显著。对于耐酸铝品种华夏 1 号、PI416937 来说,pH4.5 下铝浓度为 200

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时还能的结瘤,而敏感品种 Young 和桂夏 1 号在铝浓度为 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时已经不能结瘤。pH4.5 条件下,铝浓度为 $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有效结瘤数比不加铝处理要多,这一结果在华夏 1 号上表现尤为明显。对于不耐酸铝品种桂夏 1 号来说,同一铝浓度下,pH6.0 的结瘤数高于 pH4.5。

表 3 酸铝处理后接种根瘤菌对 YX30 的结瘤的影响

Table 3 Effect of rhizobium of YX30 on nodulation under Al^{3+} treatments

铝浓度 Al^{3+} concentration/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	华夏 1 号 Huaxia 1		桂夏 1 号 Guixia 1		Young		PI416937	
	pH4.5	pH6.0	pH4.5	pH6.0	pH4.5	pH6.0	pH4.5	pH6.0
对照 CK	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0	17±0.9	19.3±1.9	2.3±0.3	6±1.5	14±0.6	7.3±1.8	6.7±0.3	5.3±1.2
25	21±0.58	18.7±2.3	2.7±0.3	4±1	16.7±1.4	9±1	8.7±1.2	10±3.2
50	15±2.3	12.7±2.2	3.3±0.3	4±0	12.7±2.0	9.7±1.9	7.3±0.9	4.5±2.5
100	7±0.6	10.3±1.9	2.3±0.3	5±1	9±2.6	9.3±1.4	4.3±0.9	5.7±0.9
200	2±0.6	—	—	—	—	—	2.3±0.9	—

2.5.2 酸铝对大豆固氮酶活性的影响 统计分析表明 pH、Al 浓度及品种对固氮酶活的影响都达到差异显著的水平(表 4)。表 5 显示 pH6.0 时菌株的固氮能力强于 pH4.5。华夏 1 号在 pH4.5 铝浓度为 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时固氮能力最强为 $15.9\ \mu\text{mol}\ \text{C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,在 pH6.0 铝浓度为 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时固氮酶活性最高为 $26.6\ \mu\text{mol}\ \text{C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。PI416937 在 pH4.5 和 pH6.0 铝浓度为 $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时固氮活性最强分别

为 $18.0\ \mu\text{mol}\ \text{C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $32.0\ \mu\text{mol}\ \text{C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; Young 在 pH4.5 和 pH6.0 铝浓度为 $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 是固氮活性最强分别为 26.7 和 $47.9\ \mu\text{mol}\ \text{C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。酸铝敏感品种桂夏 1 号不加铝的时候活性最高,固氮能力随着铝浓度的增加而减弱,从固氮酶活性来看,YX30 菌株与桂夏 1, Young 的匹配性较好结瘤固氮能力强。

表 4 三因素方差分析的结果

Table 4 Effect of three-factor variance analysis

处理 Treatment	pH	铝浓度 Al^{3+} concentration	基因型 Genotype	pH×铝浓度 $\text{pH}\times\text{Al}^{3+}$ concentration	pH×基因型 $\text{pH}\times\text{Genotype}$	铝浓度 Al^{3+} concentration× Genotype	pH×铝浓度×基因型 $\text{pH}\times\text{Al}^{3+}\times$ concentration×Genotype
固氮酶活 Nitrogenase activity	4.47**	27.66***	22.54***	7.70**	9.03***	4.02**	7.31**

表 5 酸铝处理下接种 YX30 菌株对大豆固氮酶活性的影响

Table 5 Effect of Rhizobium YX30 on Nitrogenase activity of soybean under Al^{3+} treatments($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)

铝浓度 Al^{3+} concentration / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	华夏 1 号 Huaxia 1		桂夏 1 号 Guixia 1		Young		PI416937	
	pH4.5	pH6.0	pH4.5	pH6.0	pH4.5	pH6.0	pH4.5	pH6.0
0	4.74±1.83	15.4±3.07	29.0±7.15	24.1±4.40	5.03±0.577	19.6±5.60	11.7±3.51	14.8±2.75
25	13.4±0.457	14.3±2.50	26.5±2.78	23.0±2.61	26.7±3.91	47.9±5.31	18.0±1.81	32.0±2.26
50	15.9±1.93	7.01±1.35	26.1±8.10	47.8±7.36	3.77±1.00	13.2±2.38	10.2±1.32	22.6±4.27
100	13.4±2.04	26.6±5.86	6.05±2.60	40.3±1.70	11.5±2.04	36.6±7.30	4.13±0.61	12.0±2.05
200	5.4±0.418	—	0±0	—	0±0	—	8.63±0.589	—

2.5.3 酸铝对大豆地上部干重的影响 接种 YX30 号根瘤菌后,不同 pH、铝处理和品种对植株地上部干重影响显著。表 6 显示 pH4.5 同 pH6.0 相比,华夏 1 号在铝浓度为 25 和 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时地上部干重提高的幅度分别降低了 10.07% 和 19.25%,而在不加铝的时候提高的幅度减少 3.49%;桂夏 1 号在铝浓度为 25 和 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时地上部干重提高的幅度

分别降低了 11.84% 和 14.05%,而在不加铝的时候只提高幅度 2.4%;Young 在铝浓度为 25 和 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时地上部干重提高的幅度分别降低了 21.71% 和 13.57%,而在不加铝的时候提高了 0.43%;PI416937 在铝浓度为 25 和 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时地上部干重提高幅度分别增加了 2.23% 和 8.3%,而在不加铝的时候只提高了 0.63%。

表 6 酸铝处理下接种 YX30 菌株对大豆地上部干重的影响
Table 6 Effect of rhizobium of YX30 on shoot dry weight of soybean under Al³⁺ treatments(%)

铝浓度 Al ³⁺ concentration/(μmol·L ⁻¹)	华夏 1 号 Huaxia 1		桂夏 1 号 Guixia 1		Young		PI416937	
	pH4. 5	pH6. 0	pH4. 5	pH6. 0	pH4. 5	pH6. 0	pH4. 5	pH6. 0
0	3. 36	6. 85	9. 86	4. 45	2. 46	4. 02	1. 11	0. 48
25	14. 99	25. 06	29. 47	41. 31	11. 05	32. 76	26. 88	24. 57
50	13. 52	32. 77	21. 90	35. 95	14. 85	28. 42	25. 41	16. 84
100	-9. 11	10. 74	-17. 81	-8. 29	-22. 68	-8. 98	-12. 10	-38. 67

表中的数值为接种根瘤菌和 CK 相比提高的百分数,下同。
The value in the table was increased rate of inoculated YX30 compared with CK. The same below.

2. 5. 4 酸铝对大豆地上部含氮量的影响 表 7 显示接种 YX30 根瘤菌后,不同的铝处理,不同品种对植株地上部含氮量都有着显著的影响。pH4. 5 同 pH6. 0 相比,华夏 1 号在铝浓度为 25 和 50 μmol·L⁻¹ 时地上部含氮量提高幅度分别增加了 15. 58% 和 21. 58%,而是不加铝的时候只提高的幅度降低了 12. 39%; 桂夏 1 号在铝浓度为 25 和 50 μmol·L⁻¹ 时提高幅度分别增加了 29. 86% 和 39. 57%,而是不加铝的时候只提高的幅度增加了 58. 94%; YOUNG 在铝浓度为 25 和 50 μmol·L⁻¹ 时地上提高了 14. 33% 和 1. 64%,而是不加铝的时候只提高的幅度降低了 20. 89%; PI416937 在铝浓度为 25¹和 50 μmol·L⁻¹ 时提高的幅度增加了 58. 35% 和 75. 66%,而是不加铝的时提高幅度增加了 27. 72%。

表 7 酸铝铝处理后接种根瘤菌对 YX30 的氮含量的影响
Table 7 Effect of rhizobium on NH₄⁺ - N content of YX30 under Al³⁺ treatments (%)

铝浓度 Al ³⁺ concentration /(μmol·L ⁻¹)	华夏 1 号 Huaxia 1		桂夏 1 号 Guixia 1		Young		PI416937	
	pH4. 5	pH6. 0	pH4. 5	pH6. 0	pH4. 5	pH6. 0	pH4. 5	pH6. 0
0	8. 48	20. 87	92. 69	33. 75	17. 43	38. 32	43. 09	15. 37
25	54. 60	39. 02	97. 37	67. 51	14. 33	60. 89	97. 55	39. 2
50	56. 64	35. 06	109. 64	70. 07	21. 58	23. 22	87. 76	12. 1
100	20. 04	72. 24	26. 56	14. 96	-3. 72	2. 98	19. 70	-0. 48

3 结论与讨论

本研究的菌株分别增城宁西和惠州农科所试验田生长的栽培大豆品种中分离,大部分的菌株都能在 0 ~ 200 μmol·L⁻¹ 的铝胁迫下生长,并且随着铝浓度的升高,菌的生长受到抑制,通过生长活性和固氮能力的比较,筛选出具有耐铝特性的优良菌株 YX30。酸铝胁迫下,高效固氮共生系统的形成依赖于豆科植物与根瘤菌的共同作用。我国南方不同类型土壤中大豆土著菌的数量都处于一个较低的水平,这表明接种根瘤菌成为未来南方大豆产业发展重要措施^[19]。酸性条件下,25 μmol·L⁻¹ 的铝能促进菌株的生长,比不加铝时生长速度要快。当铝浓度增加到 50 μmol·L⁻¹ 时,菌株的生长开始受到抑制。我们认为低浓度的铝能促进根瘤菌的生长可能是因为培养基中的铝离子作为一种微量元素被吸收和利用,促进了菌株的生长^[20-21]。

共生固氮体系对酸铝的耐受能力与品种耐酸铝能力密切相关,本研究将筛选的 YX30 菌株在酸性条件下回接大豆,结瘤数随着铝浓度的增加而减少。耐酸铝品种华夏 1 号和 PI416937 在铝浓度增

加到 200 μmol·L⁻¹ 时仍能结瘤,不耐酸铝品种桂夏 1 号和 Young 在铝浓度增加到 200 μmol·L⁻¹ 时已经不能结瘤,可能是高浓度的铝抑制结瘤基因和结瘤信号物质的表达从而减少了结瘤数。在 pH4. 5 和 pH6. 0 条件下,铝浓度达到 100 μmol·L⁻¹ 以上时,几个品种的固氮酶活性、地上部干重、含氮量均表现为负增长,这可能是因为高浓度铝抑制了宿主,对根瘤菌的存活和种群数量有影响,根际根瘤菌数量减少从而侵染率降低影响结瘤数致使供给植物的氮素养料减少,进而影响植株的固氮酶活性,生物量,含氮量等。

本研究对接种之前的大豆根瘤菌进行酸铝处理然后再接种,发现用低于 50 μmol·L⁻¹ 的铝预处理的细菌生长速度明显加快而且结瘤数也显著增加,这可能是酸性环境中接种酸铝预处理的根瘤菌能加快根瘤菌对酸性环境的适应过程,减少环境对菌株的应激从而使共生固氮体系更有效的形成。综合瘤数、植株地上部干重和含氮量这 3 个指标发现,用适量的铝预处理根瘤菌后接种到含有适量铝的大豆生长环境中,能促进共生固氮体系的形成和发育,提高大豆的生物量和含氮量。因此,本研究分

离出来的菌株 YX30 具有较强的固氮能力,可以强耐酸铝,可以作为华南地区酸性土壤的接菌剂,以促进大豆生长和固氮。

参考文献

[1] 曾希柏. 红壤酸化及其防治[J]. 土壤通报,2000(3): 111-113. (Zeng X B. Acidification of red soils and control methods [J]. Chinese Journal of Soil Science,2000(3): 111-113.)

[2] 程凤娟,曹桂芹,王秀荣,等. 华南酸性低磷土壤中大豆根瘤菌高效株系的发现及应用[J]. 科学通报, 2008,53(23): 2903-2910. (Cheng F X,Cao G Q, Wang X Y, et al. The discovery and application of the efficient strains of soybean rhizobia in the acid low phosphorus soil in south China [J]. Chinese Science Bulletin, 2008, 53(23): 2903-2910.)

[3] 罗义勇,刘卫红,严金平. 微生物铝毒害和耐铝毒机制研究进展[J]. 生命科学, 2011,23(4): 414-419. (Luo Y Y, Liu W H, Yan J P. Research advances on aluminum toxicity and tolerant mechanism of microorganisms[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011,23(4): 414-419.)

[4] Keyser H H, Munns D N. Effects of calcium, manganese and aluminum on growth of rhizobia in acid media[J]. Soil Science Society of America Journal,1979, 43: 500-503.

[5] Cackmak I, Horst W J. Effect of Aluminum on lipid peroxidation, superoxideper, dismutase, catalase and preoxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) [J]. Physiologia Plantarum, 1991,83:463-468.

[6] 刘鹏,金婷婷,徐根娣,等. 大豆根系分泌物对根际土壤铝形态的影响[J]. 浙江师范大学学报, 2008,31(4): 445-451. (Liu P, Jin T T, Xu G D, et al. The effect of soybean's root exudates on the forms of aluminum of rhizosphere soil [J]. Journal of Zhejiang Normal University, 2008,31(4): 445-451.)

[7] Wulff C, Hesse H, Fisahn J. Sulphate fertilization a meliorates long-term aluminum toxicity symptom in perennial ryegrass [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014,83:88-99.

[8] 裴新梅,许中坚. 酸铝与铅复合污染对大豆幼苗生长的影响[J]. 湖南生态科学学报, 2015,2(4): 14-20. (Pei X M,Xu Z J. Effect of acid aluminum and lead compound pollution on growth of soybean seedling [J]. Journal of Hunan Ecological Science, 2015,2(4): 14-20.)

[9] Lazof D B, Rincon M, Rufty J W, et al. Aluminum accumulation and associated effects on NO₃-influx in roots of two soybean genotypes differing in Al tolerance [J]. Plant and Soil, 1994, 164(2):291-294.

[10] 孟福赐. 土壤铝毒与植物生长[J]. 土壤学进展, 1992, 20(2): 29-33. (Meng F C. Soil aluminum toxigity and plant growth [J]. Progress in Soil Science, 1992, 20(2): 29-33.)

[11] 衡楠楠,陈远学,徐开未,等. 大豆根瘤菌 SCAUs8 的接种效果、促生性及系统发育研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(8): 1708-1714. (Heng N N, Chen Y X, Xu K W, et al. Field assessment of symbiotic efficiency, growth-promoting ability and phylogeny of soybean rhizobial strain SCAUs8 [J]. Microbiology China, 2016, 43(8): 1708-1714.)

[12] 王宏光,孙殿君,马忠强,等. 大豆根瘤菌 HD001 的分离鉴定及结瘤能力检测[J]. 大豆科学, 2014,33(3): 379-384. (Wang H G, Sun D J, Ma Z Q, et al. Isolation and identification of rhizobium HD001 and its nodulation capacity test in soybean germplasm[J]. Soybean Science, 2014,33(3): 379-384.)

[13] Richardson A E. Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii* [J]. Plant Physiology, 1988, 109: 37.

[14] Shirokikh A A, Shirokikh I G, Ustyuzhanin I A. Reaction of legume-rhizobial symbiotic systems to stress caused by acidity and aluminum toxicity[J]. Russian Agricultural Sciences, 2005, 8: 9-12.

[15] 孔繁翔,桑伟莲,蒋新,等. 铝对植物毒害及植物抗铝作用机理[J]. 生态学报, 2000, 20(5): 855-862. (Kong F X, Sang W L, Jiang X, et al. Aluminum toxicity and tolerance in plants [J]. Acta Ecologica Sinica, 2000, 20(5): 855-862.)

[16] Peter M G, Barry G R. Viability of rhizobium bacteroids isolated from soybean nodule protoplasts [J]. Planta,1978,142:329-333.

[17] Sasakawa H, Trung B C, Yoshida S. Stem nodulation on *Aeschynomene indica* plants by isolated rhizobia[J]. Soil Science & Plant Nutrition, 1986, 32:145-149.

[18] 李秀平,王瑞鹏,年海,等. 耐铝根瘤菌的筛选及耐性菌株特性的研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(4): 50-55. (Li X P, Wang R P, Nian H, et al. Screening for Al-tolerant rhizobium and a study on its characters[J]. Journal of South China Agricultural University, 2014, 35(4): 50-55.)

[19] 应小芳. 大豆耐铝毒的营养和生理机理研究[D]. 金华:浙江师范大学, 2005. (Ying X F. Studies on nutritional and physiological mechanisms of soybean as affected with aluminum [D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2005.)

[20] Chaintreuil C, Arrighi J, Giraud E, et al. Evolution of symbiosis in the legume genus *Aeschynomene* [J]. New Phytologist, 2013, 200(4):1247-1259.