

攀枝花市相思树根瘤菌抗逆性的研究

徐开未, 张小平, 陈远学, 肖建蓉, 李显策

(四川农业大学 资源环境学院 四川 雅安 625014)

摘 要: 对12株分离自四川攀枝花的相思树根瘤菌进行了耐酸碱、耐盐、耐高温或低温、抗菌素抗性等抗逆性研究。结果表明: 该区的相思树根瘤菌具有很强的耐酸碱性能, 所有菌株都能耐受pH 4~12的环境。耐盐性普遍较差, 有83.3%的菌株不能在1%的NaCl平板上生长, 16.7%的菌株能耐受2%的NaCl。对温度的适应范围较宽, 分别有100%、33.3%的菌株经37℃、60℃处理30 min后仍能生长, 所有菌株均不能耐受4℃的低温, 在10℃的环境中有16.7%的菌株表现活力。对抗菌素的抗性差异很大, 其抗性普遍表现为: 林可霉素> 头孢菌素> 氨基青霉素> 链霉素> 卡拉霉素和庆大霉素。筛选到抗逆性强的优良菌株2个: Sac1、Sac2。

关键词: 攀枝花市; 相思树; 根瘤菌; 抗逆性

中图分类号: S 792.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)06-0165-04

四川攀枝花市属亚热带为基带的岛状式立体气候, 降雨高度集中, 干、雨季分明, 雨量集中在6~9月, 占年降水量的86.0%, 且降雨强度大, 水力侵蚀和重力侵蚀强烈。同时, 热量充沛, 昼夜温差大, 岩石风化作用强烈^[1]。地形切割强烈, 岩坡陡峭, 坡耕地面积约占耕地总面积的40%, 且多为顺坡种植。该市人口增长快、人口密度大、土地垦殖率高, 乱砍滥伐现象突出, 生态环境总体在恶化^[2], 土壤瘠薄、水土流失严重, 其复杂的生态环境条件成为造林极端困难的地区之一^[3]。

相思(*Acacia*)是常绿的乔木豆科树种, 主要生长在干旱半干旱地区, 它不仅速生、丰产而且适应性广, 耐干旱瘠薄, 根系发达且生有根瘤, 有固氮作用, 具有良好的改良土壤性能, 常被作为南方地区荒山造林的首选树种^[4], 也是攀西“天保”工程首选树种之一。在相同的立地条件下相思树比其他树种生长好, 抗干旱瘠薄和抗病虫害能力强, 保存率高^[5]。目前, 国内外对相思树根瘤菌进行了大量的研究, 其接种效果显著^[6-8]。但对攀枝花相思树根瘤菌的研究鲜见报道。该研究对攀枝花相思树根瘤菌的耐盐、耐高温和低温、耐酸碱、对抗生素的抗性等抗逆性进行初步分析, 旨在筛选适宜当地条件的优

良菌株用于人工接种, 促进豆科树的生长, 从而改善该地区的生态环境, 同时也为今后进行攀西豆科树根瘤菌多样性和系统发育研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 选用从攀枝花金沙江干热河谷区相思树根瘤中分离得到的12个菌株(见表1), 由四川农大微生物系提供。培养基: 以YMA为基础培养基。

表1 供试菌株

菌株	采样地点	海拔高度/m	土壤类型	土壤pH
Sac1	东区兰山矿区	1 440	红壤	5.5
Sac2	东区兰山矿区	1 440	红壤	5.5
Sac3	仁和区大龙潭乡	1 360	褐红土	5.5
Sac4	仁和区大龙潭乡	1 360	褐红土	5.5
Sac5	仁和区大龙潭乡	1 360	褐红土	5.5
Sac6	仁和区大龙潭乡	1 360	褐红土	5.5
Sac7	西区民政乡	1 200	褐红土	5.5
Sac8	西区民政乡	1 200	褐红土	5.5
Sac9	西区民政乡	1 200	褐红土	5.5
Sac10	西区民政乡	1 200	褐红土	5.5
Sac11	西区民政乡	1 200	褐红土	5.5
Sac12	西区民政乡	1 200	褐红土	5.5

1.2 抗逆性测定

1.2.1 耐盐性测定 将供试菌株在YMA培养基进行活化培养。将培养的供试菌株接种在含有NaCl的平板上, NaCl的终浓度依次为1%、2%、3%、4%、5%, 以含0.01% NaCl的YMA平板作为阳性对照。采用点接种方法, 重复3次, 28℃培养观察7 d, 生长记为“+”, 不生长记为“-”。

1.2.2 生长温度范围测定 将培养的供试菌株接种于YMA培养基上, 分别在4℃、10℃下进行培养30 d、10 d; 在37℃或60℃下热激处理30 min后, 转到28℃下培养

第一作者简介: 徐开未(1971-), 女, 四川泸县人, 博士, 讲师, 现主要从事生物固氮方面的研究工作。E-mail: xkwei@126.com。
通讯作者: 张小平(1962-), 男, 四川南充人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事生物固氮与有益微生物资源等方面的研究工作。E-mail: aumdwshb@sicau.edu.cn。
基金项目: 国家“973”资助项目(2001CB108905); 国家自然科学基金资助项目(30570062)。
收稿日期: 2009-01-27

10 d。以 28℃的 YMA 平板为阳性对照,接种、观察和结果记录同上。

1.2.3 耐酸碱性测定 以 YMA 培养基为耐酸碱性测定的基础培养基,用 HCl 和 NaOH 调节 pH 值,依次为 4.0、5.0、6.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 以 pH 7.0 的平板作为阳性对照,接种、培养、观察和结果记录同 1.2.1。

1.2.4 抗菌素抗性的测定 选取头孢菌素(Cap)、氨苄青霉素(Amp)、链霉素(Sm)、林可霉素(Lin)、庆大霉素(Gm)、卡拉霉素(Km)6 种抗菌素,每种抗菌素 4 个浓度:5、50、100、300 μg/mL。将各种浓度的抗菌素溶液过滤灭菌后,分别加入到高温灭菌后冷却到 50℃左右的 YMA 培养基中,制成平板。以不含抗菌素 YMA 平板作为阳性对照,接种、培养、观察和结果记录同上。以上试验均设 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 耐盐性

供试相思树根瘤菌耐盐性普遍较差,有 83.3%的菌株不能在 1%的 NaCl 平板上生长,仅有 2 株(16.7%)能在 2%的 NaCl 平板上生长,这 2 株采自攀枝花东区兰山矿区,该土壤受矿区矿物的影响大。黄宝灵^[9]等研究从广西红壤丘陵区分离的相思根瘤菌有 53.3%能在 2%的 NaCl 平板上生长。李兴芳等^[10]分离自广西的相思根瘤菌有 70.8%能耐受 2%的 NaCl。可见,供试菌的耐盐性与地域环境密切相关。

表 2 盐和温度对根瘤菌生长的影响

菌株	NaCl/ %					温度/ °C			
	1	2	3	4	5	4(30 d)	10(10 d)	37(30 min)	60(30 min)
Sacr1	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Sacr2	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Sacr3	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Sacr4	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Sacr5	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Sacr6	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Sacr7	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sacr8	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sacr9	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sacr10	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sacr11	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sacr12	-	-	-	-	-	-	-	+	-

2.2 温度变化对相思根瘤菌生长的影响

温度是影响根瘤菌生长的重要生态因子之一。供试根瘤菌对温度的耐受性表现出较大的多样性(表 2),所有菌株在 4℃下(30 d)未表现出活力,分离自东区兰山矿区的 2 菌株能在 10℃下生长;37℃或 60℃热激处理 30 min 后,在 28℃下培养,分别有 100%、33.3%(均分离自仁和区大龙潭乡)的菌株仍有活力,表现出较强的抗热性,同时可看出,一般供试菌株耐高温能力强于低温。结果表明,温度变化对供试根瘤菌生长的影响主要受采

样点即生态环境的影响。综上所述,相思树种的根瘤菌对温度有较广范围的适应性,而且多数耐高温,这可能与所处的攀枝花干热河谷环境有关,也可能与相思树种原产热带,植株耐高温有关。

2.3 耐酸碱性

供试根瘤菌耐酸碱范围很广泛,耐酸碱能力很强。试验结果表明(表 3),12 株供试菌株均可在 pH 4~12 的范围内生长。结合表 1,这些根瘤菌原来生活的土壤环境为酸环境。可见,从酸性环境中分离的供试根瘤菌有极强的耐酸碱性,这与环境的酸碱性关系不大,与土壤类型和海拔高度关系也不大,可能主要与该地区的特殊干热生态环境有关。何恒斌等研究也认为西北荒漠地区沙冬青根瘤菌的耐酸碱能力也很强,耐酸碱范围也很广泛,94.1%的沙冬青根瘤菌可以在 pH 5~11 的范围内生长^[11]。而黄宝灵等^[9]研究的从广西红壤丘陵区分离的相思根瘤菌多数不耐酸,pH 5 时仅有 13.3%的菌株能生长,pH 8.5 时仅有 46.7%的菌株能耐受,在微酸至中性条件下生长较好。综上所述,根瘤菌的耐酸碱性

表 3 不同 pH 值条件下根瘤菌的生长情况

菌株	pH 4	pH 5	pH 6	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12
Sacr1	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr2	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr3	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr4	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr5	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr6	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr7	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr8	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr9	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr10	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr11	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacr12	+	+	+	+	+	+	+	+

注:“+”表示生长,“-”表示不生长。

2.4 抗菌素抗性

供试根瘤菌对不同抗菌素抗性的差异较大,不同菌株对同一抗生素的抗性差异也较大,多样性明显。从表 4 可知,全部供试菌株对林可霉素所用各浓度(5~300 μg/mL)不敏感,均有抗性;对头孢菌素、氨苄青霉素的抗性也较强,仅 Sacr5 不能忍耐 5 μg/mL 头孢菌素和 50 μg/mL 氨苄青霉素,其余菌株均能耐受 100 μg/mL 头孢菌素和氨苄青霉素,且分别有 75.0%、41.7%的菌株能耐受 300 μg/mL 的头孢菌素和氨苄青霉素;88.7%的菌株能在 5 μg/mL 链霉素的 YMA 平板上生长,仅有 Sacr1 菌株能耐受 300 μg/mL 链霉素;供试菌对卡拉霉素和庆大霉素均较敏感,分别有 50.0%、41.7%的菌株能耐受 5 μg/mL 的环境,其余 3 个浓度均无抗性。综上所述,供试菌对 6 种抗菌性的抗性普遍表现为:林可霉

素> 头孢菌素> 氨苄青霉素> 链霉素> 卡拉霉素和庆大霉素。不同菌株具有不同的抗药性特征, 对抗菌素的敏感性差异很大, 对多种抗菌素最敏感的菌株是 Sacr5。结合表 1.4 可知, 供试菌株对抗菌素抗性与采样地点关系密切, 来自同一采样点的菌株对同一抗菌素的抗性差异一般小于来自不同采样点的菌株。Sacr1、Sacr7、Sacr8、Sacr9、Sacr10、Sacr12 对多种抗菌素表现出较强的抗性。根瘤菌对天然抗菌素敏感性是一项重要的生理生化特性, 而且可作为分群的一项指标。一般认为根瘤

表 4

不同抗菌素对根瘤菌的生长情况

菌株	C _{ap} /μg · mL ⁻¹				Amp/μg · mL ⁻¹				Sm/μg · mL ⁻¹				Km/μg · mL ⁻¹				Gm/μg · mL ⁻¹			
	5	50	100	300	5	50	100	300	5	50	100	300	5	50	100	300	5	50	100	300
Sacr1	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sacr2	+	+	+	+	++	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Sacr3	+	+	+	+	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacr4	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacr5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacr6	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacr7	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Sacr8	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Sacr9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Sacr10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Sacr11	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacr12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

注 “+”表示能生长 有抗性; “-”表示不能生长, 无抗性; 全部供试菌株对 5~300 μg/mL 的林可霉素(Lin)均有抗性。

3 小结

该研究对相思树根瘤菌进行的抗逆性分析, 得出攀枝花市相思树根瘤菌耐盐能力普遍较差; 生长 pH 值范围宽, 耐酸碱能力强, 能在 pH 4~12 的 YMA 培养基上生长; 耐高温和耐热性较强, 均能忍耐 37℃ 的温度。在抗菌素抗性方面, 对抗菌素的敏感性差异很大, 对 6 种抗菌性的抗性普遍表现为: 林可霉素> 头孢菌素> 氨苄青霉素> 链霉素> 卡拉霉素和庆大霉素, 其中 Sacr5 对多种抗菌素的抗性普遍较差。攀枝花市相思树根瘤菌表现出抗逆的多样性和特异性。可见, 菌株对逆性环境的耐性与寄主植物的生态条件关系密切, 也与菌株本身有关。这可能是由于根瘤菌与相应的寄主植物长期对特殊环境适应的结果。

该试验筛选到对盐、酸碱性和、低温和高温、对多种抗菌素等抗逆性均强的 2 个优良菌株: Sacr1、Sacr2。

参考文献

[1] 何政伟, 黄润秋, 贺奋琴, 等. 攀枝花地区水土流失动态变化研究 [J]. 成都理工大学学报(自然科学版), 2005, 32(3): 302-307.

[2] 张建平, 刘淑珍. 金沙江干热河谷区攀枝花市土地退化初探 [J]. 中国

菌对抗菌素较敏感, 被抗菌素抑制, 而山西根瘤菌对不同抗菌素抗性不同, 分别有 60%、34%、6% 能耐受 50 mg/L 氨苄青霉素、链霉素、卡拉霉素^[12]。何恒斌^[11] 等对西北荒漠地区沙冬青根瘤菌对抗菌素的测定结果表明, 有近 50.0% 的菌株对 300 μg/mL 的氨苄青霉素和氯霉素有抗性。黄宝灵等^[9] 从广西红壤丘陵区分离的相思根瘤菌对氨苄青霉素均无抗性, 对 Sm 的抗性普遍较强。说明根瘤菌有着丰富的抗逆能力强的菌株, 在不同的生态环境中使根瘤菌演变出一些特异性和更强的抗逆性。

沙漠 1998, 18(2): 149-153.

[3] 张祖荣. 横断山区干旱河谷 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1992: 6-7.

[4] 潘志刚, 游应天. 中国主要外来树种引种栽培 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1994: 37-48.

[5] 胡荣春. 干热河谷台湾相思育苗造林技术研究 [J]. 四川林业科技, 1995, 16(3): 74-78.

[6] Vemma R K. Effect of inoculation of VAM fungi and Rhizobium on growth and biomass in Acacia nodulation in nuRLery [J]. Indian Forester, 1994, 20(12): 1089-1094.

[7] 尚军红, 康丽华, 罗玉萍, 等. 相思根瘤菌和解磷菌培养基优化及解磷能力研究 [J]. 林业科学研究, 2005, 18(2): 177-182.

[8] 王新荣, 康丽华, 马占相思优势外生菌根菌与根瘤菌双接种效应初报 [J]. 林业科学研究, 1998, 11(5): 542-546.

[9] 黄宝灵, 吕成群, 韦原莲, 等. 相思树种根瘤菌的若干抗逆特性 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2004, 28(1): 29-32.

[10] 李兴芳, 樊妙姬, 蒋艳明, 等. 相思根瘤菌的抗逆性初步研究 [J]. 广西科学, 2003, 10(4): 312-314, 324.

[11] 何恒斌, 贾昆峰, 贾桂霞, 等. 沙冬青根瘤菌的抗逆性 [J]. 植物生态学报, 2006, 30(1): 140-146.

[12] 王静, 马玉珍, 史清亮, 等. 山西根瘤菌资源多样性与特异性研究 [J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(1): 79-84.

狗牙根新品种(系)在川西南的适应性研究

初秀娟, 张新全, 刘伟, 易杨杰

(四川农业大学 草业科学系 四川 雅安 625014)

摘 要: 2007~2008 年, 在四川西南的雅安、洪雅、双流 3 个地区, 以国外引进品种 Tifway 和南京狗牙根为对照, 对川西南地区的 5 个狗牙根新品种(系)进行了适应性评价。结果表明: 与对照品种 Tifway 和南京相比, 大部分参试新品种(系)均表现良好, 其中川南狗牙根、Sau2011 和 Sau9936 表现出较好的观赏坪用价值和适应性。大部分材料在西南地区具有重大的推广价值。

关键词: 狗牙根; 川西南地区; 适应性

中图分类号: S 688.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)06-0168-04

狗牙根(*Cynodon dactylon* L. Pers.), 又叫铁线草、爬地草, 属禾本科狗牙根属。狗牙根原产于非洲, 分布在热带、亚热带和温带沿海地区。在美国的南部、非洲、欧洲、亚洲的南部各国都有分布^[1], 为世界广布种。在我国, 狗牙根主要分布于黄河流域及其以南地区, 此外

新疆、吉林、青海、甘肃、河北等地也有分布^[2]。在我国西南部, 气候类型多样, 生境各异, 蕴藏着丰富的狗牙根基因资源。野外调查结果显示, 野生狗牙根从海拔 70 m 的河滩至 3 080 m 以上的森林边缘都有分布。狗牙根植株低矮、繁殖力强、抗旱、耐践踏、质地较细、色泽好及养护管理费用低等优点而成为暖季型草坪草中最重要、应用范围广泛的草种之一^[3]。

草坪草坪用性状区域试验是对草坪草稳定性和适应性的一种测试, 有利于全面了解草坪草的各方面表现, 为草坪草新品种的示范推广和鉴定提供科学依据。同一品种(系)在不同地区对土壤、气候等的适应性存在一定的差异性^[4]。试验于 2007~2008 年, 在雅安、洪雅、双流开展了狗牙根坪用性状的区域试验, 对其在川西南地区的适应性展开了评价。为了筛选出最适应四川西南地区栽种的优良野生狗牙根, 为大面积推广提供依据。

第一作者简介: 初秀娟(1982-), 女, 内蒙古赤峰人, 在读硕士, 研究方向为牧草及草坪草种质资源开发与育种。E-mail: chuxiujuan82@163.com。

通讯作者: 张新全(1965-), 男, 教授, 博士生导师, 中国草原学会副理事长, 现主要从事草育种与种质资源研究工作。E-mail: zhangxq@sicau.edu.cn。

基金项目: 科技部“973”资助项目(2007CB108907); 四川省青年基金资助项目(907ZQ026-120)。

收稿日期: 2008-12-20

Preliminary Study on the Stress Resistance of Rhizobia Isolated from *Acacia* in Panzhihua

XU Kai-wei, ZHANG Xiao-ping, CHEN Yuan-xue, XIAO Jian-rong, LI Xian-ce

(College of Resource and Environmental Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: 12 rhizobia isolated from *Acacia* in Panzhihua of Sichuan Province were tested on their tolerance to pH, NaCl, temperature variation and intrinsic antibiotic. The results indicated that all strains could grow at a range of pH from 4~12, 83.3% of strains could not tolerate NaCl stress at 1% concentration, only 16.7% strains could tolerate 2% NaCl. 100.0% or 33.3% of strains could grow after being exposed to 37℃ or 60℃ for 30 min, and all strains couldn't grow at 4℃, 16.7% strains could grow at 10℃. The tested strains had high differences in resistance to different intrinsic antibiotics, such as generally lincomycin resistance > cephalosporin resistance > ampicillin resistance > streptomycin resistance > kalamycin and gentamicin resistance. Altogether, 2 strains i.e. Sacr1 and Sacr2 showed high ability of tolerance to salt, acid, alkali, low and high temperature, different intrinsic antibiotics.

Key words: Panzhihua; *Acacia*; Rhizobia; Resistance