

相思根瘤菌耐酸性研究及 耐酸菌株的筛选*

康丽华 李素翠

摘要 对22株相思根瘤菌耐酸性的比较结果得出:大多数的相思根瘤菌不耐酸。在pH 5.0条件下大多数根瘤菌生长不好,只有IS004、IS002、CR002和LR007菌株生长较好,在培养基pH 3.86条件下和在pH4.9土壤悬液中,IS004和IS002菌株的生长及存活率较其它菌株高,通过在酸性条件下生长与结瘤的试验,初步筛选出耐酸菌株IS002。

关键词 相思根瘤菌 耐酸性 金合欢属

黑木相思(*Acacia melanoxylon* R. Br.)、灰木相思(*A. implexa* Benth.)、银荆(*A. dealbata* Link, Enum.)和黑荆(*A. meamsii* De Wild.)是我国近年来从澳大利亚新引进的豆科树种,具有速生、耐瘠薄且较马占相思(*A. mangium* Wild)、大叶相思(*A. auriculiformis* A. Cunn. ex. Benth)等热带相思耐寒的特性,在我国热带、南亚热带地区越来越受到重视,已逐渐成为我国亚热带荒山造林的主要树种之一^[1]。相思是含羞草科金合欢属(*Acacia*)树种,其根系与土壤中根瘤菌共生形成根瘤,将大气中约占76%的分子态氮转化为相思能利用的氨态氮,促进其生长。很多研究表明大多数豆科作物的根瘤菌最适合在中性和微碱性环境中生长繁殖^[2,3],相思树木根瘤菌是否也和豆科作物根瘤菌的生长特性一样,这方面研究较少。本文对相思根瘤菌的耐酸性进行了研究并初步筛选出耐酸菌株,这对于热带、南亚热带红壤地区相思的栽培具有重要意义和应用价值。

1 材料与方 法

1.1 根瘤菌来源与分离方法

分别从广州龙洞林场(23°06'N, 113°18'E)、广州筲基窝(23°15'N, 113°23'E)和广东省韶关河口林场(25°08'N, 114°20'E)的黑木相思、银荆、灰木相思和卷荚相思(*A. cincinnata* F. Muell., Fragm)等树木根瘤中分离根瘤菌。挑取新鲜、饱满、个大的根瘤,自来水洗净表面泥沙,于95%酒精浸泡15~30s后,放入0.1%酸性升汞溶液中表面消毒3~5min,无菌水冲洗干净。将经表面消毒后的根瘤放在两片无菌载玻片之间,用力挤压使根瘤破碎,用接种针沾取根瘤液在YMA^[4]平板上划线,28~30℃恒温培养至菌落出现,挑取典型菌落进行鉴定并回接到原宿主植物。

1997—03—15 收稿。

康丽华副研究员,李素翠(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)。

* 本文为中澳合作项目9227(1994~1997年)“相思根瘤菌有效性及持久性研究”课题部分内容。本所张方秋和孙冰同志协助采集根瘤,郑翠梅同志参加全部工作,在此一并致谢。

1.2 根瘤菌在 pH 5.0 培养基耐酸性的测定

供试菌株经活化后用接种针点种在 pH 5.0 的 YMA 培养基平板, 每个平板接 3 个菌株, 每个菌株接种 3 个平板, 在 28~30 ℃ 恒温培养 5~7 d 后测量菌落直径。以 pH 7.0 的 YMA 培养基平板为对照。

1.3 根瘤菌在 pH 3.86 液体培养基中耐酸性的测定

供试菌株接种在 pH 3.86 的 YMA 培养液, 每个菌株接种 3 瓶, 在 25~28 ℃ 振荡培养 (100 r/min) 3~5 d。每隔一定时间取菌悬液在分光光度计 $\lambda=600\text{ nm}$ 处测光密度。以 pH 7.0 的 YMA 培养液为对照。

1.4 菌株在酸性土壤中存活率的测定

酸性砖红壤性土壤取自广东省徐闻县南华农场橡胶林下 10~15 cm 土壤, 自然风干, 每个三角瓶装 5 g 土壤加蒸馏水 25 mL, 经 121 ℃ 灭菌后测得自然 pH 为 4.9, 接菌后在 25~28 ℃ 振荡培养, 每个菌株接种 3 瓶, 每隔 7 d 取样用稀释平板法进行活菌计数^[5], 另外取相同的土壤悬液用经灭菌的 1 mol(NaOH)/L 调 pH 7.0 作为对照。

1.5 酸性条件下结瘤生长的比较

沙和蛭石按 1:1 (体积比) 混合, 经 121 ℃ 高压灭菌后装入塑料育苗容器, 每个塑料育苗容器移植 1 株苗, 每株苗接根瘤菌悬液 3 mL, 每个菌株接 10 株苗, 每星期每个育苗容器加入 pH 5.0 的醋酸缓冲液 10 mL 调节基质酸度^[6], 6 个月后观察。另外设不加醋酸缓冲液作对照。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

从 3 个地点 4 个相思树种根瘤中分离得到 24 株菌株(表 1)。这些菌株具有根瘤菌的典型形态特征^[7,8], 回接到原宿主植物均能结瘤, 证明所分离的菌株是根瘤菌。

表 1 根瘤菌株与分离地点和宿主植物

| 菌株 | 宿主植物 | 分离地点 | 菌株 | 宿主植物 | 分离地点 |
|-------|------|------|-------|------|------|
| LR006 | 黑木相思 | 龙洞林场 | LL007 | 黑木相思 | 笋基窝 |
| LR005 | 黑木相思 | 龙洞林场 | LL001 | 黑木相思 | 笋基窝 |
| LR007 | 黑木相思 | 龙洞林场 | LL019 | 黑木相思 | 笋基窝 |
| LR003 | 黑木相思 | 龙洞林场 | LL004 | 黑木相思 | 笋基窝 |
| LR012 | 黑木相思 | 龙洞林场 | LL002 | 黑木相思 | 笋基窝 |
| LL010 | 黑木相思 | 笋基窝 | LL016 | 黑木相思 | 笋基窝 |
| LL012 | 黑木相思 | 笋基窝 | CR002 | 卷荚相思 | 龙洞林场 |
| LL015 | 黑木相思 | 笋基窝 | IS004 | 灰木相思 | 河口林场 |
| LL013 | 黑木相思 | 笋基窝 | IS002 | 灰木相思 | 河口林场 |
| LL017 | 黑木相思 | 笋基窝 | DS001 | 银荆 | 河口林场 |
| LL009 | 黑木相思 | 笋基窝 | DS002 | 银荆 | 河口林场 |

2.2 根瘤菌在 pH 5.0 培养基的生长情况

根瘤菌在 pH 5.0 培养基的生长情况见表 2, 从结果看出大多数菌株在 pH 5.0 培养基上生长不好, 菌落直径比值小于 0.5 的有 LR012、LL012、LL013、LL017 和 LL019 共 5 株菌, 占供试菌株总数的 22.73%; 在 0.5~0.9 之间的有 LR006 等 13 株菌, 占供试菌株总数的 59.09%; 大于 0.

9的只有 LR005、LR007、IS002和 IS004共4株菌, 占供试菌株总数的18. 18%。

表 2 根瘤菌在 pH 5. 0 培养基的生长情况

| 菌 株 | 菌落直径(mm) | | 菌落直径比值 pH 5. 0/ pH 7. 0 | 菌 株 | 菌落直径(mm) | | 菌落直径比值 pH 5. 0/ pH 7. 0 |
|-------|----------|---------|----------------------------|-------|----------|---------|----------------------------|
| | pH 7. 0 | pH 5. 0 | | | pH 7. 0 | pH 5. 0 | |
| LR006 | 8. 3 | 5. 0 | 0. 60 | LL007 | 7. 1 | 3. 5 | 0. 49 |
| LR005 | 8. 0 | 5. 8 | 0. 93 | LL001 | 4. 3 | 3. 2 | 0. 74 |
| LR007 | 5. 3 | 3. 5 | 1. 07 | LL019 | 6. 8 | 2. 5 | 0. 37 |
| LR003 | 8. 0 | 5. 8 | 0. 72 | LL004 | 6. 0 | 3. 2 | 0. 53 |
| LR012 | 7. 5 | 2. 8 | 0. 38 | LL002 | 8. 0 | 4. 0 | 0. 50 |
| LL010 | 5. 3 | 3. 5 | 0. 66 | LL016 | 6. 8 | 3. 5 | 0. 51 |
| LL012 | 6. 2 | 2. 8 | 0. 45 | CR002 | 3. 0 | 2. 5 | 0. 83 |
| LL015 | 4. 6 | 3. 0 | 0. 65 | IS004 | 6. 7 | 6. 5 | 0. 97 |
| LL013 | 6. 5 | 2. 5 | 0. 38 | IS002 | 5. 5 | 5. 8 | 1. 05 |
| LL017 | 6. 5 | 1. 5 | 0. 23 | DS001 | 10. 8 | 5. 3 | 0. 51 |
| LL009 | 4. 8 | 2. 5 | 0. 52 | DS002 | 8. 3 | 5. 3 | 0. 64 |

2. 3 根瘤菌在 pH 3. 86 液体培养基的生长情况

根瘤菌在 pH 3. 86 液体培养基的生长情况见表 3 和图 1。结果看出, 供试菌株在 pH 3. 86 液体培养基的生长情况差异很大, 大多数菌株在 pH 3. 86 液体培养基生长不好, 只有从灰木相思根瘤分离的 IS002 和 IS004 菌株在 pH 3. 86 液体培养基生长较好, 其 OD 值的比值分别为 1. 181 7 和 0. 738 0。

表 3 根瘤菌在 pH 3. 86 液体培养基的生长情况

| 菌 株 | OD 值 | | OD 比值 pH 3. 86/ pH 7. 0 | 菌 株 | OD 值 | | OD 比值 pH 3. 86/ pH 7. 0 |
|-------|----------|----------|----------------------------|-------|----------|----------|----------------------------|
| | pH 7. 0 | pH 3. 86 | | | pH 7. 0 | pH 3. 86 | |
| LL009 | 0. 236 7 | 0. 0250 | 0. 105 6 | LR003 | 0. 178 3 | 0. 018 3 | 0. 102 3 |
| IS002 | 0. 586 7 | 0. 693 3 | 1. 181 7 | LL001 | 0. 107 3 | 0. 047 0 | 0. 438 0 |
| LL017 | 0. 208 3 | 0. 016 7 | 0. 080 2 | LL007 | 0. 120 3 | 0. 008 3 | 0. 087 7 |
| LL016 | 0. 175 0 | 0. 023 5 | 0. 134 3 | IS004 | 0. 413 3 | 0. 305 0 | 0. 738 0 |
| LL010 | 0. 181 7 | 0. 017 5 | 0. 096 3 | | | | |

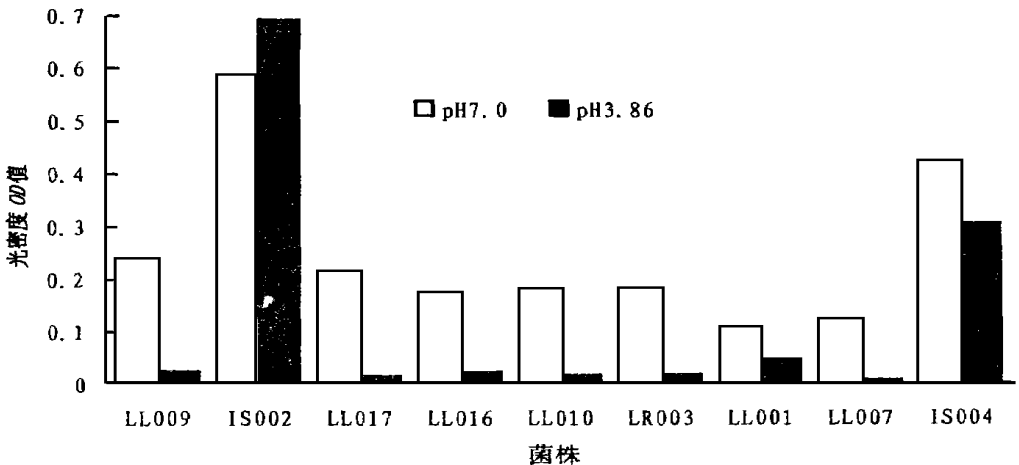
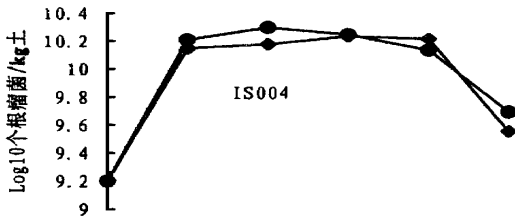


图 1 根瘤菌在不同 pH 培养基的生长情况

2.4 根瘤菌在酸性土壤中的存活率

图2是根瘤菌 IS004、DS001、IS002、LL007 和 LR012 菌株在 pH 4.9 和 pH 7.0 土壤悬液



的生长曲线。供试菌株的数量变化大致相同,在前期(0~7 d)除了 DS001 菌株外其余菌株的根瘤菌数量上升,中期(7~14 d)根瘤菌数量呈稳定状态,后期(14 d 后)根瘤菌数量呈下降趋势,但 DS001 和 IS002 菌株在 21 d 后根瘤菌数量才开始下降。供试菌株在不同 pH 条件下的

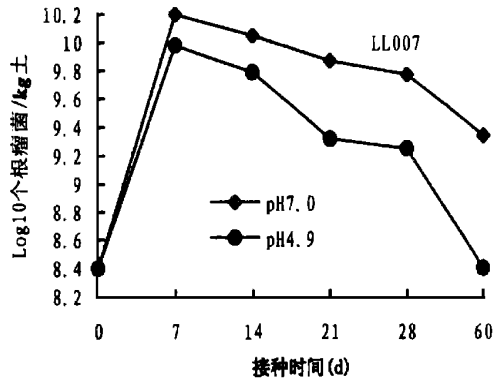
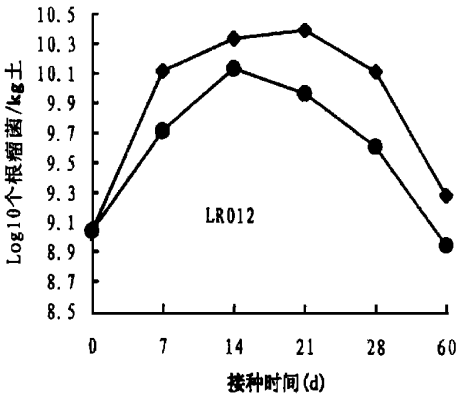
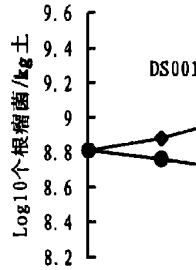
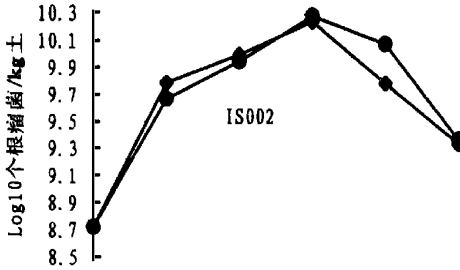


图2 不同pH土壤悬液的根瘤菌数量

生长情况存在差异, IS004 和 IS002 菌株在 pH 4.9 条件下的根瘤菌数量大于或等于 pH 7.0; 其余菌株的根瘤菌数量则小于 pH 7.0; 说明 IS004 和 IS002 菌株的耐酸能力高于其它 3 个菌株。

2.5 根瘤菌在酸性条件下的结瘤情况

根瘤菌在酸性条件下的生长结瘤情况见表4, 可以看出 IS002 菌株在酸处理条件下的苗高、瘤数、瘤重, 地上、地下及总生物量均高于对照(pH 7.0), 其余菌株均低于 pH 7.0。

3 结 语

供试菌株在 pH 5.0 和 pH 3.86 的培养条件下初步筛选及在 pH 4.9 的酸性红壤中测定其存活率, 最后根据在酸性条件下的生长结瘤情况, 初步筛选出耐酸菌株 IS002。这对于今后在南亚热带地区推广应用根瘤菌接种技术提供有利条件。筛选结果也说明了大多数相思根瘤

菌和农作物豆科植物根瘤菌一样不耐酸,所以在酸性红壤地区人工接种根瘤菌一定要用经过

表 4 根瘤菌在酸性条件下的生长结瘤

| 菌 株 | 处 理 | 苗高 (cm) | 瘤数 (个/株) | 瘤重 (g 干重/株) | 地上 (g 干重/株) | 地下 (g 干重/株) | 总生物量 (g 干重/株) |
|-------|---------|------------|-------------|----------------|----------------|----------------|------------------|
| LR012 | 酸处理 | 7.6 | 25.6 | 0.121 6 | 0.340 6 | 0.455 6 | 0.917 8 |
| | 对照(不加酸) | 11.7 | 38.4 | 0.163 4 | 0.690 4 | 0.448 8 | 1.302 6 |
| IS004 | 酸处理 | 10.4 | 30.0 | 0.140 8 | 0.568 2 | 0.622 7 | 1.331 7 |
| | 对照(不加酸) | 10.3 | 13.0 | 0.164 0 | 0.784 8 | 0.661 7 | 1.610 4 |
| IS002 | 酸处理 | 8.8 | 12.5 | 0.115 0 | 0.353 8 | 0.556 5 | 1.025 3 |
| | 对照(不加酸) | 6.8 | 11.3 | 0.074 4 | 0.194 5 | 0.247 8 | 0.516 7 |
| DS001 | 酸处理 | 6.9 | 15.0 | 0.078 2 | 0.249 3 | 0.439 0 | 0.766 5 |
| | 对照(不加酸) | 7.2 | 7.0 | 0.051 0 | 0.254 3 | 0.414 3 | 0.719 6 |
| LL007 | 酸处理 | 6.1 | 8.0 | 0.034 8 | 0.184 5 | 0.340 0 | 0.559 3 |
| | 对照(不加酸) | 6.6 | 7.5 | 0.057 7 | 0.173 3 | 0.293 0 | 0.524 0 |

选育的耐酸菌株,以提高接种菌在土壤中的存活率和结瘤数量,提高共生固氮效果。

参 考 文 献

- 1 洪菊生. 澳大利亚阔叶树研究. 北京: 中国林业出版社, 1993. 207 ~ 224.
- 2 陈文新. 土壤中影响根瘤菌存活的主要因素. 微生物通报, 1986, (4): 180 ~ 183.
- 3 中国科学院红壤生态实验站编辑. 红壤生态系统研究. 北京: 科学出版社, 1992. 204 ~ 210.
- 4 Vincent J M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook No 15. Blackwell, Oxford, 1970, 164.
- 5 Somasegaran P, Hoben H J. The handbook for rhizobia: methods in legume-rhizobia technology. Springer Verlag, New York, 1994. 450.
- 6 张隆芬, 张启明, 陈明锋. 木豆的含氮量及根瘤的固氮改土效益. 热带亚热带森林生态系统研究, 1985, (2): 157 ~ 161.
- 7 陈华癸, 李阜棣, 陈文新, 等. 土壤微生物学. 上海: 上海科学技术出版社, 1981. 132 ~ 158.
- 8 孙建光, 章凡, 王昌平, 等. 海南省根瘤菌资源考察及分类. 微生物学报, 1993, 33(2): 135 ~ 143.

A Study on Acid-tolerance of *Acacia* Rhizobia

Kang Lihua Li Sucui

Abstract The 22 isolates obtained from *Acacia* nodules were compared for their acid-tolerance in this study. The results indicate that most of them could not grow at pH 5.0, but isolates IS002, IS004, CR002 and LR007 could grow at pH 5.0, IS002 and IS004 not only could grow at pH 3.86 but also in acid soil suspension (pH 4.9), which had high survival rate than the other strains. IS002 was selected in this study as acid-resistant strain.

Key words *Acacia* rhizobia acid-tolerance *Acacia*