

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.

耐铝根瘤菌的筛选及耐性菌株特性的研究

李秀平<sup>1,2</sup>, 王瑞鹏<sup>1</sup>, 年海<sup>1</sup>, 牟英辉<sup>1</sup>

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

**摘要:**【目的】对我国南方地区的野生大豆根瘤菌进行耐铝的筛选,以期建立一套耐铝根瘤菌筛选和鉴定体系,为南方大豆区接种高效耐铝菌株奠定基础.【方法】利用菌株活化培养法分离来自湖南各县和广州地区酸性土壤中的野生大豆根瘤菌株,通过分光光度计进行耐铝检测,研究耐性菌株的生长特性以及接种后对栽培大豆的生长和结瘤的影响.【结果和结论】菌株 W20 能在铝浓度为 200 μmol · L<sup>-1</sup> 的培养基上正常生长,而其他菌株的生长则受到较大抑制. 菌株 W20 的最适生长酸度为 pH 6.0,致死酸度为 pH 4.0. 通过质子通量试验发现, W20 的细胞膜能阻止过量的 H<sup>+</sup> 进入细胞. 在 Al<sup>3+</sup> 浓度为 200 μmol · L<sup>-1</sup> 时,华夏 3 号接种 W20 菌株后地上和地下部分生物量分别比对照增加了 60.9% 和 14.8%; 瘤数和瘤质量分别提高了 66% 和 209%; 地上和地下部分铵态氮含量分别比对照高 25.7% 和 9.4%.

**关键词:**根瘤菌; 酸铝胁迫; 质子通量; 铵态氮含量  
**中图分类号:**S565.1                      **文献标志码:**A                      **文章编号:**1001-411X(2014)04-0050-06

Screening for Al-tolerant rhizobium and a study on its characters

LI Xiuping<sup>1,2</sup>, WANG Ruipeng<sup>1</sup>, NIAN Hai<sup>1</sup>, MU Yinghui<sup>1</sup>

(1 Guangdong Sub-center of National Soybean Improvement Center /College of Agriculture, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou 510507, China)

**Abstract:**【Objective】The resistant aluminium strains of wild soybean rhizobia in Southern China were screened to set up a system of isolating and identifying aluminum-tolerant rhizobium, and to establish the foundation of effective inoculant for soybean planting areas in South China. 【Method】The nodules of wild soybean which grew in Hunan Province and Guangzhou area 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 using the method of inoculation. The effects on growth and nodulation of the cultivated-soybean were explored by inoculating with aluminum-tolerant strains. 【Result and conclusion】The results showed that the isolated rhizobium could grow with 200 μmol · L<sup>-1</sup> Al<sup>3+</sup> distinct from the other strains, showing some special features of tolerance to aluminum. The boundary pH that W20 could not survive was 4.0, while the favorite pH was 6.0. In the Proton flux assay, W20 had the ability to prevent more H<sup>+</sup> from penetrating the cytomembrane than W14, which could make W20 avoid some damage caused by H<sup>+</sup>. Inoculating with the effective rhizobium could significantly increase soybean biomass, nodulation, N content and reduce the content of Al<sup>3+</sup> with aluminum addition. The shoot and root biomass of soybean increased by 60.9% and 14.8% respectively, while the nodule num-

收稿日期:2014-01-06      优先出版时间:2014-06-03  
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7671/j.issn.1001-411X.2014.04.010.html>  
作者简介:李秀平(1971—),女,讲师,博士, E-mail: lpxy2008@163.com;通信作者:牟英辉(1975—),男,副教授,博士, E-mail: youhymoon@scau.edu.cn  
基金项目:国家自然科学基金(31371642,31171508);亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题(SKL-CU-SA-2013-08)

ber and nodule weight increased by 66% and 209% with the rhizobium of W20 strain inoculants at  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Al}^{3+}$ , respectively. Meanwhile  $\text{NH}_4\text{-N}$  content of shoot and root was stimulated by 25.7% and 9.4% respectively.

**Key words:** rhizobium; acid and aluminum-tolerant; proton flux assay;  $\text{NH}_4\text{-N}$  content

我国南方酸性土壤的总面积为  $2.03 \times 10^7 \text{ hm}^2$ , 约占全国土地面积的 21%<sup>[1]</sup>. 化肥的大量施用以及酸雨的侵蚀, 加剧了土壤酸化的过程<sup>[2]</sup>. 酸性土壤中,  $\text{Al}^{3+}$  的毒害作用最为明显. 研究发现我国南方酸铝土壤中大豆土著菌的数量都处于一个较低的水平, 铝通过作用于细胞影响微生物的物质和能量代谢, 抑制微生物的生长和发育<sup>[3-4]</sup>. 细胞膜是  $\text{Al}^{3+}$  的作用位点, 但其结合与毒害的作用方式目前还没有定论<sup>[5-6]</sup>.  $\text{Al}^{3+}$  可以通过影响细胞膜的流动性而发挥其毒害作用<sup>[7]</sup>.  $\text{Al}^{3+}$  能引起敏感菌细胞膜中低有序质膜区含量降低; 在  $\text{Al}^{3+}$  诱导条件下, 抗性细菌细胞膜中低有序质膜区含量增加, 增强了细胞膜流动性<sup>[8-9]</sup>. Zheng 等<sup>[10]</sup> 研究发现将真菌酿酒酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 暴露于高浓度铝的条件下, 可通过活性氧类物质 (ROS) 激活细胞程序性死亡 (PCD) 诱导细胞死亡<sup>[11]</sup>. 酸铝对慢生根瘤菌在培养基中生长的限制作用更为明显.

Wood 和 Cooper<sup>[12]</sup> 研究表明, 当 pH 为 5.5 时, 三叶草根瘤菌的 2 株菌 HP3 和 BEL1192 增殖速率相同; pH 4.5 时 BEL1192 增殖缓慢; pH 小于 4.5 时, 菌株 HP3 基本不长. 在 pH 为 4.5 的液体培养基中,  $\text{Al}^{3+}$  浓度达到  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, BEL1192 菌体数量急剧下降, 而 pH 5.5 时  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Al}^{3+}$  就使 HP3 的菌体数量急剧下降.  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Al}^{3+}$  对菌株 HP3 对数生长期的毒害作用比延滞期大<sup>[12]</sup>. Johnson 等<sup>[13]</sup> 的研究结果表明, 适当浓度的  $\text{Al}^{3+}$  能刺激敏感菌株 DNA 的合成, 抗性菌株 DNA 的合成几乎不受  $\text{Al}^{3+}$  的影响. 野生大豆作为栽培大豆的祖先, 其基因型的多样性与抗逆能力均好于栽培大豆, 接种根瘤菌后对作物的生物量和固氮能力都有明显的提高<sup>[14]</sup>. 本研究通过对野生大豆根瘤菌进行耐酸铝筛选, 筛选出耐性菌株, 并对酸铝胁迫下菌株的生长特性和接种后的效果进行分析, 为南方大豆生产提供有利条件奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

大豆 *Glycine max* 品种为华夏 3 号. 菌株 W3、W11、W20、W23 来自湖南各县酸性土壤中的野生大

豆根瘤, C1 分离自广州地区酸性土壤中的栽培大豆根瘤, C2 分离自广州地区含镉土壤中的栽培大豆根瘤, C5 为模式菌株 USDA110, W14 为铝敏感菌株, 分离自湖南龙秀. 菌株活化培养采用 YMA (Yeast mannitol agar) 培养基.

### 1.2 菌株的耐酸铝筛选

菌株活化培养后, 分别接种于铝浓度为 0 (对照)、25、50、100、200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 YMA 液体培养基中 (pH 4.5、V 为 10 mL), 置恒温振荡器中 ( $28 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ 、180  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养, 3 d 后分光光度计测量  $D_{600 \text{ nm}}$  (用 UV-MINI-1240 220VE 型岛津紫外分光光度计测定). 每个处理 3 个重复, 并记录 pH.

### 1.3 致死 pH 和质子通量测定

致死 pH: 将耐性菌株 W20 分别转接到 pH 为 3.0、4.0、4.5、5.0、6.0 和 7.0 的 YMA 液体培养基中, 培养和测定方法同 1.2, 记录 pH.

质子通量: 将待测菌种在中性培养液中振荡培养至指数期中期, 经离心、洗涤收集活细胞 1~3 g (湿质量), 转入 50 mL 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 KCl 溶液中制成菌悬液, 水浴中保温 [ $28 \pm 1$ ]  $^{\circ}\text{C}$  并搅拌. 用 pH 仪测定其酸度, 待 pH 稳定 2 min 以上, 迅速加入 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HCl, 将 pH 调至  $4.0 \pm 0.1$ , 并在 15 min 之内每 30 s 记录 1 次 pH, 重复 3 次. 同样, 将中性培养液培养至指数期中期的 2 种菌悬液经离心、洗涤收集活细胞 1~3 g, 转入 pH 5.2 的培养液中振荡培养 1 h, 然后重复上述冲击方法并测定 pH 变化, 计算质子通量.

### 1.4 回接试验

大豆种子处理: 挑选籽粒饱满的大豆种子数粒, 先在  $\varphi$  为 95% 的乙醇溶液中处理 3 min, 取出后用无菌水冲洗 5~6 次, 放入  $\varphi$  为 10% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液浸泡 1 min, 取出后用无菌水冲洗 5~6 次, 然后埋于经 120  $^{\circ}\text{C}$  高温灭菌 30 min 的沙子中, 保持一定的湿度, 在 28  $^{\circ}\text{C}$  的培养箱中培养 48 h.

菌液培养: 用接种环在试管中挑 1 环根瘤菌到 TY 液体培养基中, 用胶塞塞好后, 放在摇床上培养至对数生长期 (约 3~4 d), 培养温度为 28  $^{\circ}\text{C}$ .

水培箱的制备: 将试验用的塑料桶洗净, 并用  $\varphi$  为 0.1% 的 HCl 溶液浸泡 24 h, 用自来水冲洗 2 次,

再用去离子水冲洗 1 次,晾干,每桶装入约 5 mL 营养液,并用过滤灭菌的  $\text{AlCl}_3$  母液调配成试验所需的含铝营养液.

接种处理:将已催芽的种子放到培养皿中用菌液浸泡 15 min,用灭菌棉花固定在带孔的泡沫板上.移苗后,将水培苗放在光照培养箱(光照度  $200\text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间 12 h)中培养,生长期间定期补充营养液.

2 结果与分析

2.1 耐铝菌株的筛选

酸铝筛选的结果表明,  $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Al}^{3+}$  的胁迫对多数菌株的生长有较为明显的抑制作用,抑制程度最大的菌株为 W11 与 W23,其相对生长量分别为 15.6% 与 12.8%,其余菌株的生长在该浓度下也受到不同程度的抑制,仅有菌株 W20 的生长情况较好,在  $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  高铝浓度胁迫下其生长量仍能达到对照(无  $\text{Al}^{3+}$  处理)的 90%,说明菌株 W20 耐铝

毒的能力要强于其他菌株(表 1). 菌株 W20 的 pH 随铝浓度的增加变化幅度小于其他菌株,除  $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Al}^{3+}$  处理外,在其他浓度的铝处理下,菌株 W20 培养基的 pH 都显著高于其他培养基,接近中性值(表 2).

表 1 不同浓度铝处理下各菌株的相对生长量<sup>1)</sup>  
Tab. 1 Relative growth quantity of strains under different  $\text{Al}^{3+}$  concentrations %

| 菌株  | $c(\text{Al}^{3+})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ |       |       |      |
|-----|-------------------------------------------------------|-------|-------|------|
|     | 25                                                    | 50    | 100   | 200  |
| W20 | 98.8                                                  | 120.0 | 91.6  | 90.5 |
| C1  | 94.9                                                  | 91.8  | 83.1  | 63.3 |
| W3  | 98.0                                                  | 85.8  | 77.1  | 60.8 |
| C2  | 124.2                                                 | 116.8 | 64.4  | 57.0 |
| C5  | 110.9                                                 | 103.1 | 110.8 | 52.9 |
| W11 | 72.0                                                  | 70.3  | 54.2  | 15.6 |
| W23 | 54.2                                                  | 47.5  | 12.1  | 12.8 |

1) 相对生长量 = 铝胁迫处理后菌株生长个数/无  $\text{Al}^{3+}$  处理菌株生长个数  $\times 100\%$ .

表 2 不同浓度铝处理下各菌株培养基的 pH<sup>1)</sup>  
Tab. 2 pH values of strain mediums under different  $\text{Al}^{3+}$  concentrations

| 菌株  | $c(\text{Al}^{3+})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ |                       |                        |                       |                       |
|-----|-------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
|     | 0                                                     | 25                    | 50                     | 100                   | 200                   |
| W20 | $6.96\pm0.03\text{a}$                                 | $6.95\pm0.01\text{a}$ | $6.88\pm0.02\text{a}$  | $6.86\pm0.01\text{a}$ | $6.93\pm0.04\text{a}$ |
| C5  | $6.74\pm0.02\text{b}$                                 | $6.73\pm0.03\text{b}$ | $6.75\pm0.01\text{b}$  | $6.64\pm0.00\text{a}$ | $6.50\pm0.05\text{b}$ |
| C1  | $6.70\pm0.03\text{b}$                                 | $6.81\pm0.05\text{b}$ | $6.80\pm0.09\text{ab}$ | $6.81\pm0.01\text{a}$ | $6.46\pm0.05\text{b}$ |
| W3  | $6.37\pm0.04\text{cd}$                                | $6.45\pm0.04\text{c}$ | $6.40\pm0.03\text{c}$  | $6.32\pm0.23\text{b}$ | $6.22\pm0.19\text{c}$ |
| C2  | $6.47\pm0.06\text{c}$                                 | $6.46\pm0.04\text{c}$ | $6.34\pm0.06\text{c}$  | $6.35\pm0.05\text{b}$ | $6.16\pm0.00\text{c}$ |
| W11 | $6.19\pm0.01\text{e}$                                 | $6.16\pm0.03\text{d}$ | $5.91\pm0.02\text{d}$  | $5.99\pm0.01\text{c}$ | $5.98\pm0.01\text{d}$ |
| W23 | $6.27\pm0.02\text{de}$                                | $6.02\pm0.01\text{e}$ | $5.87\pm0.01\text{d}$  | $5.26\pm0.01\text{c}$ | $4.84\pm0.01\text{e}$ |

1) 同列数据后凡是有一个相同小写字母者,表示差异不显著( $P>0.05$ ,LSD 法).

2.2 致死 pH 的测定

pH 为 4.0、4.5、5.0、6.0 和 7.0 时菌株 W20 的  $D_{600\text{ nm}}$  分别为 0.01、1.06、1.41、1.67 和 1.56. 在  $\text{pH}\leq 4.0$  时,菌株 W20 的  $D_{600\text{ nm}}$  几乎不变,说明在该酸度下菌株停止生长,其致死 pH 为 4.0;在  $\text{pH}\geq 4.5$  时,菌株 W20 均能正常生长,且  $D_{600\text{ nm}}>1.0$ ;当  $\text{pH}\geq 6.0$ ,菌悬液的  $D_{600\text{ nm}}>1.5$ ,同时,菌株 W20 在 pH 为 6.0 环境中的生长情况要好于在 7.0 的情况下.

2.3 铝毒对菌株生长的影响

图 1 所示,在 48 h 之内菌株 W20 生长缓慢,处理与对照之间没有明显差别,54 h 以后, $\text{Al}^{3+}$  的毒害作用开始显现,对照组的生长速度高于处理组. 在浓度为  $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{Al}^{3+}$  处理下,菌株的生长速度差异不大,受铝毒影响差别不明显. 当  $\text{Al}^{3+}$  达到 200

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,菌株的生长受到影响,66 h 后,毒害作用明显加强.

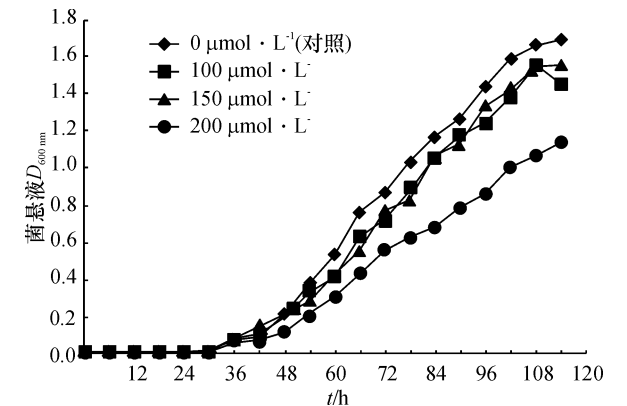


图 1 W20 在不同铝浓度下的生长曲线  
Fig. 1 Growth curves of W20 under different  $\text{Al}^{3+}$  concentrations

2.4 耐性菌株 W20 与敏感菌株 W14 质子通量的变化

未经酸处理的菌株 W14 质子通量在 6 min 达到最大值  $3.20 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 经过酸处理后其最大峰值为  $2.86 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 出现在 5 min, 并且在其后的时间段, 质子通量几乎均小于未经处理的菌株. 经诱导和不诱导处理的 W20 菌株细胞的质子通量在大部分时段内几乎为 0, W20 耐酸菌株对酸诱导并不敏感(图 2).

2.5 铝毒对大豆生物量的影响

在  $\text{Al}^{3+}$  浓度为  $200 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 华夏 3 号接种

根瘤菌的地上部分生物量比未接种菌株的均降低; 接种根瘤菌后, 生物量的积累要高于对照. 接种 W20 的植株在无  $\text{Al}^{3+}$  条件下以及  $200 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Al}^{3+}$  胁迫下, 其生物量均高于接种其他菌株的植株, 在  $\text{Al}^{3+}$  浓度为  $200 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 接种 W20 的植株生物量比 CK 增加了 60.9% (图 3A). 在无  $\text{Al}^{3+}$  条件下, 华夏 3 号地下部分的生物量接菌处理的均要高于对照. 接种 W20 的植株地下部分的生物量在  $200 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Al}^{3+}$  胁迫下比未接种植株的高 14.8%; 接种 W14 的植株地下部分的生物量在  $\text{Al}^{3+}$  浓度为  $200 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 比对照低 8.7% (图 3B).

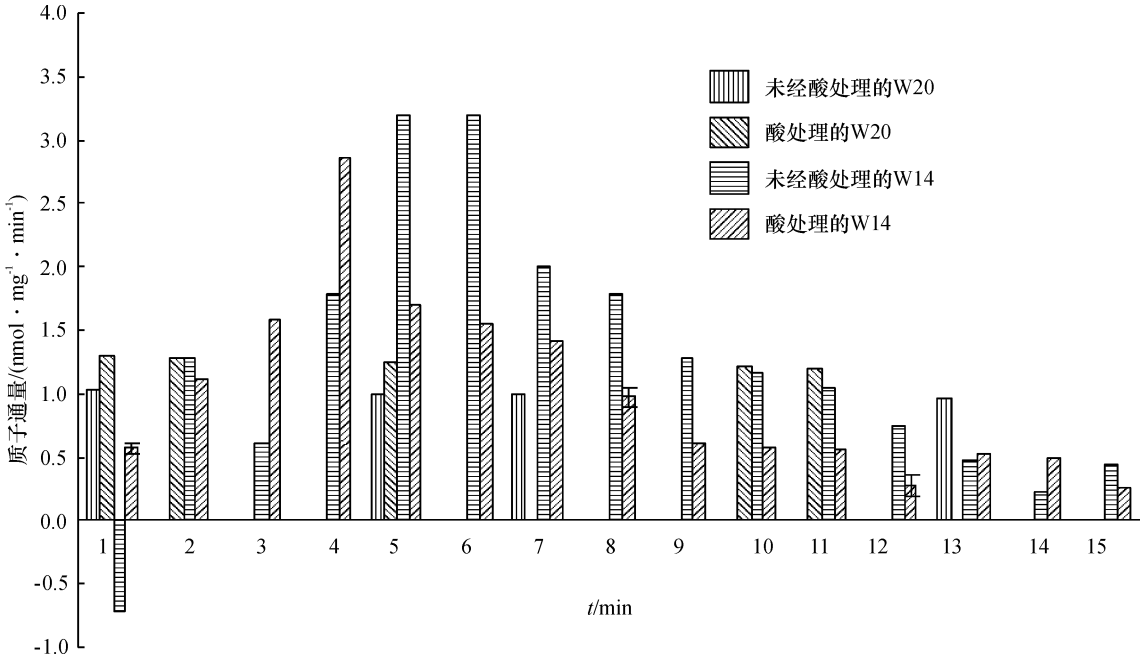
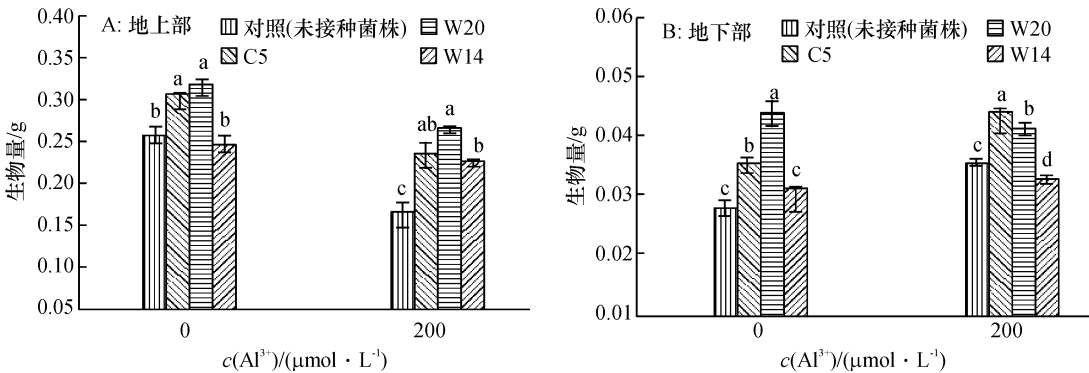


图 2 酸处理和未经酸处理的菌株 W20 与 W14 的质子通量  
Fig. 2 Proton flux accumulation variation of W20 and W14 under acid and no acid treatments



各图中相同浓度不同柱子上凡是有一个相同小写字母者, 表示差异不显著 ( $P > 0.05$ , LSD 法).

图 3 铝处理后接种根瘤菌对华夏 3 号生物量的影响

Fig. 3 Effects of rhizobium on biomass of Huaxia3 under  $\text{Al}^{3+}$  treatment

2.6 铝毒对大豆结瘤的影响

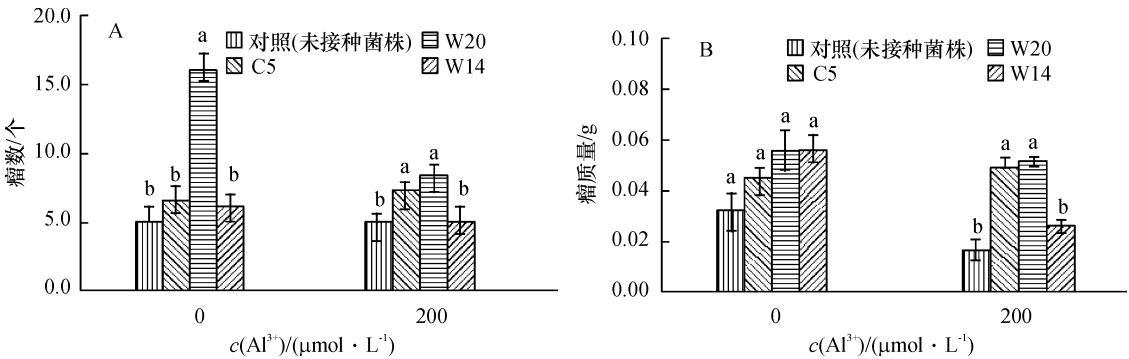
在无  $\text{Al}^{3+}$  和铝胁迫下, W20 菌株处理的华夏 3 号的结瘤个数均高于其他菌株处理, 在  $\text{Al}^{3+}$  浓度为  $200 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 接种 W20 的结瘤数比对照增加了

66%, 瘤质量增加了 209%. 敏感菌株 W14 在  $\text{Al}^{3+}$  浓度为  $200 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时接种后结瘤数接近于对照, 瘤质量比对照增加 58% (图 4).

2.7 铝毒对大豆中铵态氮含量的影响

接种 C5、W20、W14 菌后,华夏 3 号地上部分铵态氮的质量分数均高于对照,其中耐性菌株 W20 在  $\text{Al}^{3+}$  浓度为  $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时接种后的铵态氮质量

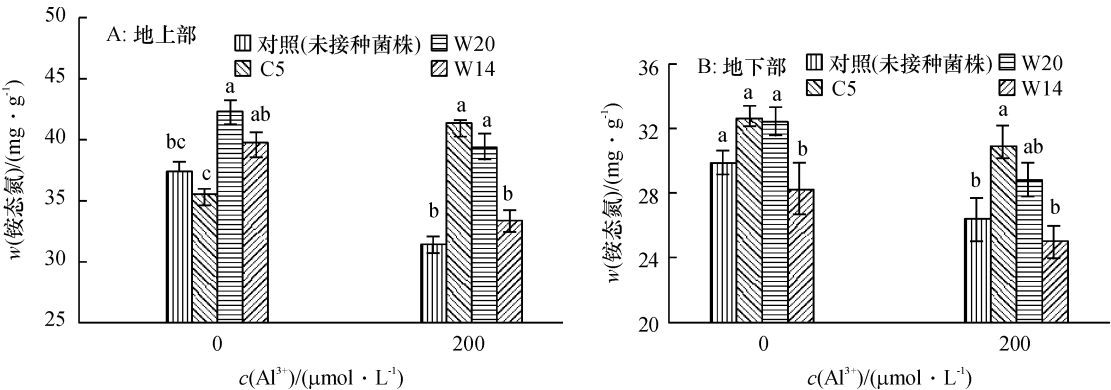
分数比对照高 25.7%. 铝胁迫下地下部分铵态氮的质量分数普遍低于无  $\text{Al}^{3+}$  条件,在  $\text{Al}^{3+}$  浓度为  $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,接种 W20 菌株后地下部的铵态氮质量分数比对照增加了 9.4% (图 5).



相同浓度不同柱子上凡是有有一个相同小写字母者,表示差异不显著 ( $P>0.05$ , LSD 法).

图 4 铝处理后接种根瘤菌对华夏 3 号结瘤的影响

Fig. 4 Effects of rhizobium on nodulation of Huaxia3 under  $\text{Al}^{3+}$  treatment



各图中相同浓度不同柱子上凡是有有一个相同小写字母者,表示差异不显著 ( $P>0.05$ , LSD 法).

图 5 铝处理后接种根瘤菌对华夏 3 号氮含量的影响

Fig. 5 Effects of rhizobium on  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  content of Huaxia3 under  $\text{Al}^{3+}$  treatment

3 讨论与结论

本研究对实验室长期保存的 7 株根瘤菌的耐酸铝能力进行了研究,其中 4 株分离自野生大豆,3 株分离自栽培大豆. 研究表明,大部分的菌株都能在浓度  $0\sim200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的铝胁迫下生长,随着铝浓度的升高,菌株的生长受到抑制. 在  $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  铝处理时,多数根瘤菌的生长量受到明显抑制,仅有 W20 的生长受到影响的程度较低,因此,我们筛选出具有耐铝特性的菌株 W20. 在酸性条件下 ( $\text{pH}<5$ ),铝主要以  $\text{Al}^{3+}$  的形式存在,这种形态的铝对生物的危害最为明显. Illmer 和 Schinner<sup>[15]</sup> 认为  $\text{Al}^{3+}$  和 ATP 形成稳定的复合物,并且抑制了细胞内的能量流动,尤其对质膜上的 ATPase 的影响尤为明显. 本研究结果表明,  $\text{Al}^{3+}$  对菌株的生长影响始于 48 h,说明  $\text{Al}^{3+}$  影响菌株 W20 的代谢活动.

在酸性条件下,细胞内的 pH 下降程度越低,胞

<http://xuebao.scau.edu.cn>

内的可溶性铝含量也会降低,可溶性铝与核酸的磷酸基团相结合被抑制,进而影响细胞的分裂<sup>[16]</sup>. 有研究表明耐酸与耐铝特性可能存在一定的相关性,在耐酸的根瘤菌资源中,可能存在耐铝性强的菌株<sup>[17-20]</sup>. 本研究结果表明,菌株 W20 经过酸诱导后具有较强的抵御  $\text{H}^+$  的能力,而菌株 W14 在经过酸诱导后对  $\text{H}^+$  的抵御能力明显地降低,这可能是因为细胞膜在受到酸处理后抗拒  $\text{H}^+$  能力不同引起的. 在酸性  $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  铝胁迫条件下接种菌株 W20 明显地提高了华夏 3 号大豆地上部、地下部的生物量,增加了结瘤数量,促进了植株体内氮的含量. 本研究通过对野生大豆根瘤菌进行耐酸铝筛选,筛选出耐性菌株 W20,并对其在酸铝胁迫下的菌株生长特性和接种后的效果进行了分析,为华南酸铝性红壤地区种植大豆高产技术提供了理论基础和试验依据.

参考文献:

[1] 赵其国. 中国东部红壤地区土壤退化的时空变化、机

- 理及调控[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 70-280.
- [2] 曾希柏. 红壤酸化及其防治[J]. 土壤通报, 2000(3): 111-113.
- [3] 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(23): 2903-2910.
- [4] 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(4): 414-419.
- [5] ILLMER P, ERLEBACH C. Influence of Al on growth, cell size and content of intracellular water of *Arthrobacter* sp. PL/1-95 [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2003, 84(3): 239-246.
- [6] YAGANZA E S, RIOUX D, SIMARD M, et al. Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(11): 6800-6808.
- [7] VIERSTRA R, HAUG A. The effect of  $Al^{3+}$  on the physical properties of membrane lipids in *Thermoplasma acidophilum* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1978, 84(1): 138-143.
- [8] VAN DERZEL J M. Ceramic-fused-to-metal restorations with a new CAD/CAM system [J]. Quintessence Int, 1993, 24(11): 769-778.
- [9] 李朝苏, 刘鹏, 蔡妙珍, 等. 荞麦对酸铝胁迫生理响应的研究[J]. 水土保持学报, 2005, 19(3): 105-106.
- [10] ZHENG K, PAN J W, Ye L, et al. Programmed cell death-involved aluminum toxicity in yeast alleviated by antiapoptotic members with decreased calcium signals [J]. Plant Physiol, 2007, 143(1): 38-49.
- [11] KEYSER H H, MUNNS D N. Effects of calcium, manganese and aluminum on growth of rhizobia in acid media [J]. Soil Sci Soc Am J, 1979, 43: 500-503.
- [12] WOOD M, COOPER J E. Acidity, aluminum and multiplication of rhizobium trifolii: Effects of initial inoculum density and growth phase [J]. Soil Biol Biochem, 1988, 20: 83-87.
- [13] JOHNSON A C, WOOD M. DNA, a possible site of action of aluminum in *Rhizobiums* spp. [J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(12): 3629-3633.
- [14] 史晓霞, 师尚礼, 杨晶. 豆科植物根瘤菌分类研究进展 [J]. 草原与草坪, 2006(1): 12-17.
- [15] ILLMER P I, SCHINNER F S. Influence of aluminum on motility and swarming of *Pseudomonas* sp. and *Arthrobacter* sp. [J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 155(1): 121-124.
- [16] WOOD M. A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications [J]. Plant and Soil, 1995, 171(1): 63-69.
- [17] 辜建平, 张磊, 魏世清, 等. 一株耐酸野生葛藤 (*Pueraria lobata*) 根瘤菌的筛选与耐酸机理初步研究 [J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 653-656.
- [18] 陈淑珍. 酸铝对大豆-根瘤菌共生固氮体系影响研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2008.
- [19] 徐开未, 张小平, 陈远学, 等. 钼与花生根瘤菌的复配及在酸性紫色土上的接种效果 [J]. 植物营养与肥料学报, 2005, 11(6): 816-821.
- [20] 陈远学, 徐开未, 张小平, 等. 花生根瘤菌对微量元素耐性的筛选 [J]. 中国土壤与肥料, 2007(4): 76-79.

【责任编辑 周志红】

(上接第49页)

- [28] DONG Y S, ZHUANG B C, ZHAO L M, et al. The genetic diversity of annual wild soybeans grown in China [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 98-103.
- [29] 庄炳昌, 王玉民, 徐豹, 等. 中国不同纬度不同进化类型大豆的 RAPD 分析 [J]. 科学通报, 1994, 39(23): 2178-2180.
- [30] 周晓馥, 庄炳昌, 王玉民, 等. 利用 RAPD 与 SSR 技术进行野生大豆种群内分化的研究 [J]. 中国生态农业学报, 2002, 10(4): 10-13.
- [31] 赵青松, 年海, 杨存义. 湖南新田野生大豆自然居群遗传多样性分析 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(11): 2221-2227.
- [32] CREGAN P B, JARVIK T, BUSH A L, et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome [J]. Crop Sci, 1999, 39(5): 1464-1490.
- [33] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel: Population genetic software for teaching and research-an update [J]. Bioinformatics, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [34] WANG K J, LI X H. Genetic characterization and gene flow in different geographical-distance neighbouring natural populations of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) and implications for protection from GM soybeans [J]. Euphytica, 2012, 186(3): 817-830.
- [35] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. Genetics, 2000, 155(2): 945-959.
- [36] FALUSH D, STEPHENS M, PRITCHARD J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles [J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7(4): 574-578.
- [37] 曲若竹, 侯林, 吕红丽, 等. 群体遗传结构中的基因流 [J]. 遗传, 2004, 31(3): 377-382.
- [38] YOSHIMURA Y, MIZUGUTI A, MATSUO K. Analysis of the seed dispersal patterns of wild soybean as a reference for vegetation management around genetically modified soybean fields [J]. Weed Biol Manag, 2011, 11(4): 210-216.

【责任编辑 周志红】