

郑会明, 翟娜娜, 毛怡玲, 钟增涛. 紫云英根瘤菌不同菌株间结瘤竞争能力的比较[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 403–406.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.143

# 紫云英根瘤菌不同菌株间结瘤竞争能力的比较

郑会明, 翟娜娜, 毛怡玲, 钟增涛

(南京农业大学生命科学院, 江苏南京 210095)

**摘要:**通过竞争结瘤试验研究紫云英根瘤菌不同菌株间的竞争结瘤能力,以紫云英宁波大桥品系为宿主植物,7株分离自不同生境紫云英根部瘤体内的菌株与中慢生华癸根瘤菌 7653R 为研究对象,采用单独接种、与 7653R 菌株 1:1 混合接种方式,在 30 d 时采样,统计根瘤数量、根瘤质量、不同菌株的占瘤率、定殖能力等。结果发现,紫云英根瘤菌 2 号菌株的竞争能力与 7653R 相当,其他菌株的竞争性都不同程度地弱于 7653R,尤其是 1 号菌株的定殖能力最弱,仅是 7653R 占瘤率的 9%。在同时含有 2 种根瘤菌的瘤体内,7653R 和竞争菌株的数量比例相近。不同生境根瘤菌的竞争结瘤能力存在差异,试验同时获得了 1 株与经典菌株 7653R 竞争能力相当的紫云英根瘤菌菌株。

**关键词:**紫云英根瘤菌;7653R;竞争性;占瘤率

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0403-03

豆科植物的固氮作用是在根瘤菌的参与下完成的,其过程包括根瘤菌吸附侵染豆科植物根毛,引起根毛卷曲形成侵入线,最终引起植物形成根瘤,根瘤菌在根瘤内部进行生物固氮并将其产物输送给植物。该共生固氮体系在促进农业可持续发展、减少化学氮肥施用、保护生态环境等方面都具有极其重要的意义,因而研究、开发、利用这一共生固氮体系具有重大的生态、经济和社会价值<sup>[1]</sup>。大豆、豌豆、苜蓿、三叶草、菜豆等豆科植物可以作为动物以及人类的食物氮源;紫云英可作为田间作物的氮肥提高作物产量,也可作为绿肥在贫瘠的土壤里生长,从而提升土壤质量。我国已在浙江、福建、江苏等地广泛种植紫云英、苜蓿、三叶草等豆科固氮植物,作为绿肥或者牲畜食料。

实践证明,接种与不接种根瘤菌关系到绿肥植物收获量的多少,但由于人工接种的根瘤菌剂与土著根瘤菌之间存在竞争性,往往不能达到预期的接种效果<sup>[2]</sup>,也阻碍了固氮菌株有效用发挥。近年来在竞争结瘤机制和根瘤菌寄主特异性方面的研究取得了许多进展,对根瘤菌竞争结瘤相关基因及豆科植物的寄主专一性结瘤相关基因均有了一定的认识。其中根瘤菌本身的基因型对竞争结瘤能力具有重要影响,目前已经报道了根瘤菌的运动性、趋化性、细菌素的产生<sup>[3]</sup>、生长繁殖速度、细胞表面特征、结瘤相关基因<sup>[4]</sup>,如大豆慢生根瘤菌中的 *nfeC* 基因<sup>[5]</sup>、中华苜蓿根瘤菌中的 *nifA* 基因等<sup>[6]</sup>,它们在结瘤竞争力方面发挥了重要的作用。

影响竞争结瘤的因素复杂多样,解决方案也很多,但筛选使用竞争结瘤能力高的根瘤菌和选育抑制土著根瘤菌结瘤的

植物品种是最佳的途径。陈华癸等最先在我国分离获得紫云英根部有效结瘤的菌株中慢生华癸根瘤菌<sup>[7]</sup>,目前在田间试验中被广泛接种应用的是具有良好结瘤固氮能力的 7653R,该菌株同时还作为中慢生紫云英根瘤菌的典型菌株,其基因组已由华中农业大学初步完成测定。本研究从不同生境环境紫云英的根部瘤体中分离了 9 株紫云英根瘤菌,比较了其在不同品种紫云英根部结瘤的能力,同时还研究了其与典型菌株 7653R 共同接种时的竞争结瘤能力,初步获得了 1 株与 7653R 结瘤能力相当的菌株,为后续大田的接种使用提供了材料,同时也为后续研究竞争结瘤能力相关的遗传学分析提供了新的试验对象。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株与材料

试验所用菌株为中慢生华癸根瘤菌 7653R,由华中农业大学馈赠。其他 9 株紫云英根瘤菌分离自不同生境紫云英根部瘤体内。根瘤菌培养所用培养基均为 TY 培养基<sup>[8]</sup>,所用抗生素浓度为利福平(Rif)20 μg/mL、链霉素(Str)100 μg/mL。

紫云英种子闽紫 5 号由福建省土壤肥料所提供,粤肥 1 号、信阳种、弋江种、宁波大桥和闽紫 6 号由浙江省农业科学院提供;蛭石购自南京农业大学芳华园艺中心。

### 1.2 种子表面消毒与催芽

将紫云英种子放入无菌三角瓶中,无菌水清洗数次以洗去种子表面的尘土;75% 乙醇处理 5 min,无菌水洗 3 次;5% NaClO 处理 3 min,无菌水洗 10 次以洗净种子表面残留试剂;加入适量的无菌水浸泡 3 h 使其充分吸水膨胀,随后分装至平板中,使种子单层均匀地铺开;将种子于 22 ℃ 黑暗中倒置催芽(在平板盖底部洒些无菌水以保持湿润的催芽环境),约 24 h 后种子露白,即可种植。

### 1.3 确定紫云英植株品系及菌株

分别以粤肥 1 号、信阳种、弋江种、宁波大桥、闽紫 6 号和闽紫 5 号共 6 个品系紫云英种子作为宿主植物,活化中慢生紫云英根瘤菌菌株至  $D_{600\text{ nm}}$  约为 2.0,浸泡已发芽紫云英种子

收稿日期:2014-06-13

基金项目:国家重大基础研究“973”项目(编号:2010CB126500-G);国家自然科学基金面上项目(编号:31170077)。

作者简介:郑会明(1982—),女,江苏射阳人,博士,讲师,主要从事分子微生物学与生物固氮研究。E-mail:hmzheng@njau.edu.cn。

通信作者:钟增涛,博士,副教授,主要从事分子微生物学与生物固氮研究。E-mail:ztzhong@njau.edu.cn。

20 min, 种植入一次性杯子盛装的无菌蛭石中, 设置温室温度为白天 16 ℃、12 h, 黑夜 22 ℃、12 h, 适时适量浇灌无菌水和无氮营养液。每组种植 6 盆, 每盆 5 株苗, 待第 1 张真叶长出后, 间苗, 留下生长状态趋于一致的 20 株苗; 同时接种无菌水处理作为空白对照。分别在 15、30 d 时观察结瘤情况, 以结瘤情况确定竞争结瘤试验的供试菌株和紫云英种子品系。

1.4 竞争结瘤试验

TY 培养基中活化根瘤菌细胞密度至  $D_{600\text{ nm}}$  约 2.0, 将 7653R Str 抗性突变株菌液与其他根瘤菌 Rif 抗性突变株培养菌液等体积(4 mL : 4 mL) 混合, 振荡混匀, 浸泡紫云英种子 20 min, 种植, 以单独接种处理组作为对照; 以接种无菌水处理作为空白对照。每组处理设置 20 株紫云英重复。

1.5 根瘤数量、根瘤重量统计及菌体分离

小心拆盆, 轻轻抖落根部蛭石, 剪取每颗根瘤, 记录瘤数、瘤质量。将单个根瘤瘤体置于 1.6% NaClO 下处理 1 min 进行表面消毒杀菌, 水洗 4 次, 去除残留药物。将表面消毒后的单个根瘤置于 1.5 mL 离心管中, 捣碎后用 500  $\mu\text{L}$  无菌水悬浮, 振荡混匀后, 取 100  $\mu\text{L}$  该菌液到 900  $\mu\text{L}$  无菌水中, 依次进行梯度稀释至  $10^{-4}$ 。对于单独接种根瘤菌的紫云英植株, 每个梯度各取 10  $\mu\text{L}$  点样于 TY 空白板, 待长出单菌落后, 计数; 对于混合接种根瘤菌的紫云英植株根瘤, 每个梯度各取 10  $\mu\text{L}$  点样于分别含有 Str 100  $\mu\text{g/mL}$ 、Rif 20  $\mu\text{g/mL}$  的 TY 平板上, 待长出单菌落后, 计数。

2 结果与分析

2.1 确定紫云英植物品系及根瘤菌菌株种类

从不同生境紫云英根部瘤体分离到了 9 株根瘤菌, 分别单独接种至 6 个品系的紫云英种子, 在 15、30 d 时观察结瘤情况, 以 7653R 菌株作为阳性对照菌。如表 1 所示, 从根瘤菌结瘤专一性看, 8、9 号菌株与紫云英共生结瘤的专一性很强, 在 15 d 时只与信阳种共生结瘤; 而 1~7 号菌株对宿主的专一性较低。从紫云英植物宿主的专一性看, 信阳种、弋江种和宁波大桥种对菌种的专一性较其他品系要低; 15 d 时, 信阳种可以与所有测试菌株共生结瘤; 30 d 时, 弋江种、宁波大桥种均能和所有菌株共生结瘤。

表 1 分离根瘤菌在不同品系紫云英宿主上的结瘤情况

所接菌种编号	闽紫 1 号	闽紫 6 号	粤肥 2 号	弋江种	信阳种	闽紫 5 号	宁波大桥
7653R	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
2	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
3	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+
4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
5	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+
6	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+
7	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+
8	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+
9	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+
空白	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

注: “+”表示能够结瘤; “-”表示不能够结瘤; “/”前为接种 15 d 后的结瘤情况, “/”后为接种 30 d 后的结瘤情况。

2.2 紫云英根瘤菌分离菌株与其 Rif 抗性菌株结瘤能力的鉴定

在以上结瘤试验基础上, 选用可以与所有测试菌株有效结瘤的宁波大桥种作为后续紫云英根瘤菌竞争结瘤试验的宿主植物, 1~7 号菌株作为根瘤菌侵染对象。为了区分瘤体内紫云英根瘤菌的种类, 需要选择合适的筛选标签, 抗生素是被广泛应用的标签之一<sup>[9]</sup>。本研究筛选获得了 1~7 号 7 株紫云英根瘤菌的 Rif 自发突变抗性株 Z1~Z7, 检测了 Rif 抗性的产生是否会影响原有根瘤菌的结瘤能力。

分别将野生型菌株与 Rif 抗性株单独接种到紫云英植株, 结果如图 1 所示, 野生型和 Rif 抗性突变株根瘤数量、根瘤质量均无显著差异, 因此后续可以用 Rif 抗性突变株代表野生型菌株进行与 7653R 间的竞争结瘤试验。

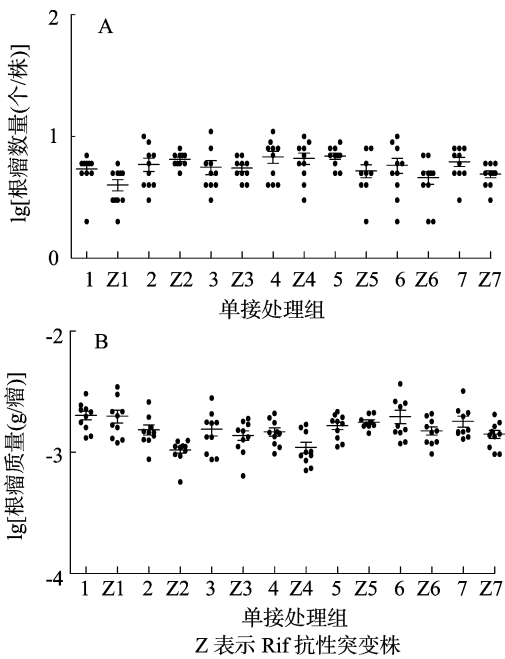


图 1 紫云英根瘤菌野生型和 Rif 抗性株的结瘤数量(A)和质量(B)

2.3 紫云英分离菌株与 7653R 间的竞争结瘤

在实践中接种根瘤菌剂到土壤中时, 根瘤菌剂与土著菌的浓度未知、二者之间的数量比值也不确定。在本竞争结瘤试验中, 设置了 2 种接种液浓度, 为了更接近于实际菌剂接种中的细胞密度, 分别设置了  $1.0 \times 10^6$  CFU /mL 和  $1.0 \times 10^7$  CFU /mL 2 种接种液浓度, 浸泡已经微发芽的紫云英种子, 各 20 个重复。

在接种后 30 d 时, 统计各处理的根瘤菌总数和结瘤数量。结果发现, 在结瘤数量上, 1、2、5、7 号菌株与 7653R 混合接种处理后, 根瘤数量比单独接种处理组时稍少(图 2), 3 号菌株与 7653R 混合接种后结瘤数量比单独接种时稍多。在瘤体质量上, 仅 4 号菌株混合接种的瘤体质量低于单独接种菌株。这说明菌种之间的竞争可能会影响植株的结瘤情况, 但影响都不显著。

在 2 种不同根瘤菌共同接种过程中, 竞争性结瘤主要是通过比较瘤体内根瘤菌的数量比率, 即占瘤率来衡量的<sup>[10]</sup>。将 7653R 和 1~7 号菌株分别 1 : 1 混合接种至紫云英根部, 30 d 后, 统计每处理中根瘤菌的占瘤率情况。如图 3 所示, 在

所有类型的混合接种处理中,86.96%~94.29%的瘤体都是单个根瘤菌侵染形成,而2种不同根瘤菌共同侵占同一瘤体的比率只有5.71%~13.04%,该结果与Gage等的研究结果

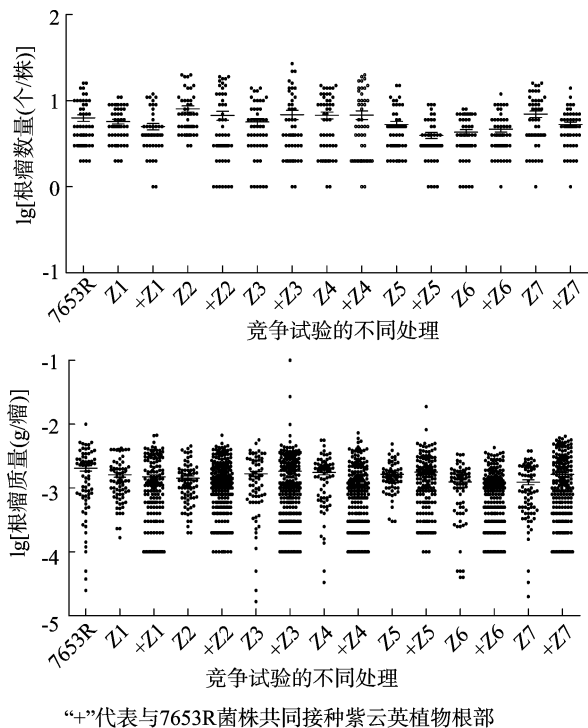


图2 竞争性接种结瘤数量(A)和质量(B)

一致<sup>[11]</sup>。在所有的共同接种试验中,多数菌株(1、3、4、5、6、7号菌株)的竞争性都不同程度地弱于7653R,占瘤率仅是7653R的43%~62%,尤其是1号菌株的定殖能力最弱,约是7653R占瘤率的9%。该结果显示出了传统大田应用菌株7653R良好的竞争能力,但同时也表明,2号菌株在瘤体中的占瘤率为48.77%,与7653R的竞争能力相当(42.44%),这显示了不同紫云英根瘤菌竞争能力的差异。

根瘤菌竞争能力的比例还可以通过考察2种根瘤菌共同占据的瘤体内根瘤菌的数量比例。将图3中2种根瘤菌共同占据的瘤体捣碎后,进行梯度稀释计数,据抗性计算其中2种不同根瘤菌确切的细菌数量,计算数量比值。如图4所示,在7653R与紫云英分离菌株共同占据的瘤体内,7653R与不同根瘤菌的数量比均接近1,其数量相当。

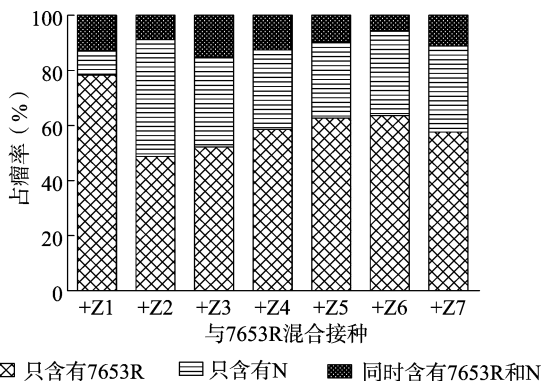


图3 根瘤中不同菌株的占瘤率

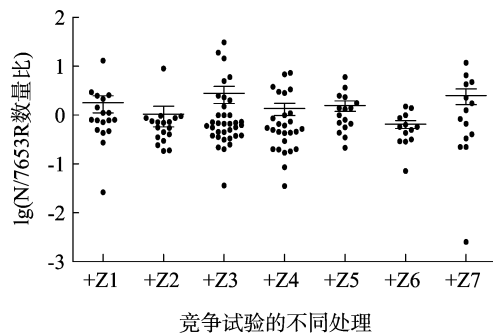


图4 2种菌株共同占据瘤体内根瘤菌数量的比例

### 3 讨论

将紫云英根瘤菌经典菌株7653R与分离自不同生境的9株紫云英根瘤菌菌株,分别单独接种于闽紫1号、闽紫6号、粤肥2号、弋江种、信阳种、闽紫5号、宁波大桥共6个品系的紫云英植株,确定结瘤专一性较低的7株紫云英根瘤菌和宁波大桥种子作为后续竞争试验的研究菌株。

在7653R和1~7号菌株间进行竞争结瘤,结果发现单接处理组之间、混接处理组之间在根瘤数量、根瘤质量、结瘤时间方面均无显著差异。在统计了不同根瘤菌的占瘤率后,确定了2号菌株竞争性较强,与7653R占瘤率相当,其他检测菌株则都低于7653R,尤其是1号菌株,其占瘤率仅是同时接种的7653R占瘤率的9%。在同时含有2种根瘤菌的根瘤内,7653R和混合接种的紫云英根瘤菌菌数比值多在0.1~10,且多集中在1附近,说明二者在同一根瘤内部的定殖能力相近。

根瘤菌与植物的共生固氮是二者之间不断发生信号交流互作的过程,该过程还包括不同根瘤菌之间的竞争,人工接种的根瘤菌菌剂要取得良好的施肥效果,首先需要具有一定的与土壤中原有根瘤菌竞争的能力。已有的研究结果表明,影响根瘤菌竞争结瘤的因素主要是根瘤菌与宿主植物的遗传因素,也和土壤的生态环境相关。将同一种根瘤菌接种到不同基因型的植株结瘤,其结瘤能力表现不同,即根瘤菌对宿主植物基因型有一定的依赖性,如有研究表明大豆的隐性基因*rlj*能抑制许多大豆慢生根瘤菌的结瘤<sup>[12]</sup>。根瘤菌本身基因型对竞争结瘤能力也有重要影响,一些根瘤菌产生的细菌素可抑制其他对该细菌素敏感的根瘤菌,如可以产生三叶草素的豌豆根瘤菌三叶草型T24菌株,可抑制对三叶草素敏感的菌株的结瘤,但三叶草素抗性菌株的结瘤则不受其抑制。田间试验也证实,产生三叶草素的工程菌株比不产三叶草素菌株在占瘤率方面至少高20%,且在产量方面,也不逊于接种不产三叶草素的作物<sup>[3]</sup>。

本试验结果对菌剂接种有一定的理论指导意义。将竞争能力与7653R相当的2号菌株制成菌剂可以接种到紫云英根部,最大限度地排斥土著根瘤菌,增强接种效果,以充分发挥生物固氮的作用,减少化肥的施用。在后续研究中,还可以将根瘤菌接种于不同品系的紫云英,考察不同的根瘤菌与何种品系紫云英植株共生结瘤能力最强,从而有针对性地进行根瘤菌菌剂的定向接种,提高接种效率,用最低的成本改善土壤环境或得到更多的鲜草量。

李伊光,郭建忠,刘 力. 改性山核桃外果皮对孔雀石绿的吸附性能研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):406-409.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.144

# 改性山核桃外果皮对孔雀石绿的吸附性能研究

李伊光<sup>1</sup>, 郭建忠<sup>2</sup>, 刘 力<sup>2</sup>

(1. 浙江农林大学工程学院, 浙江临安 311300; 2. 浙江农林大学理学院/浙江省林业生物质化学利用重点实验室, 浙江临安 311300)

**摘要:**以改性山核桃外果皮为吸附剂,考察 pH 值、吸附剂用量、温度等对孔雀石绿(MG)吸附性能的影响及吸附动力学、热力学性质。结果表明,在改性山核桃外果皮用量为 1.0 g/L、初始孔雀石绿浓度 50 mg/L、吸附温度 298 K、吸附时间 360 min 及保持溶液原始 pH 值条件下, MG 去除率可达 99.09%;改性山核桃外果皮对 MG 的吸附符合准二级动力学模型和 Langmuir 等温模型,是一个自发进行的放热过程。

**关键词:**山核桃外果皮; 吸附; 孔雀石绿; 动力学模型

**中图分类号:**X703 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0406-04

孔雀石绿(MG),别称碱性绿、盐基块绿、孔雀绿,分子式为  $C_{23}H_{25}CN_2$ ,是一种带有金属光泽的绿色结晶体,易溶于水。MG 属三苯甲烷类染料,被广泛用于制陶业、纺织业、皮革业、水产养殖业等<sup>[1]</sup>。近年来,随着我国经济飞速发展,制陶业、纺织业、皮革业等在一定程度上得到发展和壮大,相应地产生大量含 MG 的废水。MG 已被确认具有潜在的致癌、致畸、致突变等毒副作用<sup>[2]</sup>,如果含 MG 废水大量排放到自然水体中,会使水体着色,破坏水生生态系统平衡,甚至危害人体健康。针对 MG 毒性<sup>[3-4]</sup>,研究人员已经研究多种从废水

中去除 MG 的方法,如凝聚、氧化或臭氧化、光催化降解和活性炭吸附等方法<sup>[5-14]</sup>。其中活性炭吸附是相对效果较好的方法,但由于其制备成本较高,应用受到限制。因此,来源丰富、价格低廉、适用范围广的新型生物质吸附剂材料越来越受到国内外研究者的关注,利用多孔性结构的农林废弃物处理成为研究热点。山核桃(*Carya cathayensis* Sarg.)是一种世界性干果,属胡桃科山核桃属,在我国浙、皖两省交界的天目山地区有较大种植面积,年产量巨大。国内外对山核桃的研究主要集中在遗传多样性、成花机理、栽培生理、生态分布方面,有关山核桃外果皮综合利用的研究相对较少。长期以来,由于对山核桃外果皮的研究和开发利用认识不足,一直被作为废弃物丢弃,这不仅污染环境,而且浪费资源,其价值没有得到有效利用。试验以山核桃外果皮为原料,利用甲醛改性制备成生物质吸附剂,并探讨其处理废水中有毒染料 MG 的可行性及影响因素,以期如山核桃外果皮在染料废水中的治理应用提供参考和依据,也为农林废弃物的开发利用探索新

收稿日期:2014-02-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31270619);浙江省科技厅重大项目(编号:2008C12055);浙江农林大学青年教师创新团队(编号:2010RC02);浙江省科技创新活动计划(编号:2012R412051)。  
作者简介:李伊光(1989—),男,河南洛阳人,硕士,从事废水吸附处理研究。E-mail:806551186@qq.com。

## 参考文献:

- [1] Long S R. Genes and signals in the *Rhizobium* - legume symbiosis [J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(1): 69-72.
- [2] Triplett E. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* [J]. *Molecular Plant - Microbe Interaction*, 1990, 3: 199-206.
- [3] Robleto E A, Kmiecik K, Oplinger E S, et al. Trifolixotoxin production increases nodulation competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under agricultural conditions [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2630-2633.
- [4] Triplett E W, Sadowsky M J. Genetics of competition for nodulation of legumes [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1992, 46(1): 399-428.
- [5] Chun J Y, Stacey G. A *Bradyrhizobium japonicum* gene essential for nodulation competitiveness is differentially regulated from two promoters [J]. *Molecular Plant - microbe Interactions*, 1994, 7(2): 248-255.
- [6] Sanjuan J, Olivares J. NifA - NtrA regulatory system activates transcription of *nfe*, a gene locus involved in nodulation competitiveness of *Rhizobium meliloti* [J]. *Archives of Microbiology*, 1991, 155(6): 543-548.
- [7] Chen H, Shu M. Note on the root - nodule bacteria of *Astragalus sinicus* L. [J]. *Soil Science*, 1944, 58(4): 291-294.
- [8] Beringer J E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1974, 84(1): 188-198.
- [9] Tas E, Leinonen P, Saano A, et al. Assessment of competitiveness of rhizobia infecting *Galega orientalis* on the basis of plant yield, nodulation, and strain identification by antibiotic resistance and PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 529-535.
- [10] George M L, Robert F M. Competition among *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains for nodulation of common bean [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, 38(2): 157-160.
- [11] Gage D J. Analysis of infection thread development using Gfp - and DsRed - expressing *Sinorhizobium meliloti* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(24): 7042-7046.
- [12] Josephson K L, Bourque D P, Bliss F A, et al. Competitiveness of KIM 5 and Viking 1 bean rhizobia: Strain by cultivar interactions [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1991, 23(3): 249-253.