



李萍,滕长才,丁宝军,等.青海干旱地区蚕豆根瘤菌耐旱性研究[J].江西农业大学学报,2021,43(6):1241-1249.  
LI P,TENG C C,DING B J,et al.A study on drought tolerance of rhizobia strains of faba bean (*Vicia faba* L.) isolated from drought regions in Qinghai plateau[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2021,43(6):1241-1249.

# 青海干旱地区蚕豆根瘤菌耐旱性研究

李萍<sup>1,2</sup>,滕长才<sup>1</sup>,丁宝军<sup>1</sup>,刘玉皎<sup>1,2</sup>,侯万伟<sup>1,2</sup>,何涛<sup>2\*</sup>

(1.青海大学 农林科学院(青海省农林科学院),青海 西宁 810016;2.青海大学 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室,青海 西宁 810016)

**摘要:**【目的】蚕豆是重要的粮饲草肥兼用豆科作物,根瘤菌的共生不仅能进行生物固氮而且可以提高作物的抗逆性。干旱环境能孕育出在逆境中生长繁殖并结瘤、固氮的耐旱根瘤菌,为探究和发掘青海干旱地区耐旱蚕豆根瘤菌资源。【方法】在人工模拟干旱胁迫的PEG6000高渗透环境下对青海省干旱地区采集分离获得的49份蚕豆根瘤菌进行耐旱性鉴定分析。【结果】干旱胁迫对蚕豆根瘤菌生长存活的影响差异极显著( $P<0.001$ ),采用平均连锁法(UPGMA)法把49份菌株的耐旱能力分为3类群,并且不同胁迫条件下供试菌株表现为3种生长模式:第一种生长模式,在低浓度PEG条件下3种菌株的生长不但没有被抑制,其浊度值反而高于CK;第二种生长模式,在中等浓度PEG条件下6个菌株一方面存在一个中间致死渗透势,而在更高浓度PEG条件下存活数量又增高;第三种生长模式,在高浓度PEG条件下32个菌株随着渗透势的下降,培养液的浊度值也随之下降。【结论】干旱地区蚕豆根瘤菌对干旱的耐受能力表现出多样性,除了同一地区不同土壤环境中分离的不同菌株的耐旱性表现差异性外,同一土壤不同耕作方式、不同施肥方式下的菌株的耐旱能力也存在较大差异。最终筛选获得5株比较耐干旱的菌株为下一步共生结瘤实验提供菌株材料。

**关键词:**根瘤菌;耐旱性;蚕豆;干旱胁迫

中图分类号:S551<sup>+</sup>.4 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2021)06-1241-09

## A Study on Drought Tolerance of Rhizobia Strains of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Isolated from Drought Regions in Qinghai Plateau

LI Ping<sup>1,2</sup>, TENG Changcai<sup>1</sup>, DING Baojun<sup>1</sup>,  
LIU Yujiao<sup>1,2</sup>, HOU Wanwei<sup>1,2</sup>, HE Tao<sup>2\*</sup>

(1. Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University (Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Xining 810016, China; 2. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China)

**Abstract:** [Objective] Faba bean is an important legume crop which is used as grain, forage and fertilizer.

收稿日期:2021-06-05 修回日期:2021-08-10

基金项目:国家现代农业产业技术体系专项(CARS-08)、青海省科学技术厅项目(2020-ZJ-709)和青海省农林科学院创新基金项目(2019-NKY-04)

Project supported by the National Technical System Construction of Modern Agriculture Industry (CARS-08), Qinghai Provincial Department of Science and Technology Project (2020-ZJ-709) and the Innovation Fund Program of Qinghai Academy Agriculture and Forestry Science (2019-NKY-04)

作者简介:李萍, orcid.org/0000-0003-3860-0143, lping2008@sohu.com; \*通信作者:何涛,教授,博士生导师,主要从事植物生物技术研究, orcid.org/0000-0001-5375-6993, hetaoxn@aliyun.com。

Symbiotic rhizobia not only allow biological nitrogen fixation but also increase stress resistance of plants. The dry environment can breed the drought-tolerant rhizobia which can grow and reproduce, at the same time, they can form nodules and fix nitrogen in the adverse conditions. This study was to explore and discover faba bean *Rhizobium* resources of drought-tolerance in arid region in Qinghai. [Method] The drought resistance of 49 strains of faba bean rhizobia were evaluated under the condition of artificially simulated drought stress. [Result] There was a significant difference in growth and survival of faba rhizobia under drought stress ( $P < 0.001$ ). The average linkage method (UPGMA) was used to divide the drought-tolerant ability of the 49 strains from arid areas in Qinghai into three groups. At the same time, the strains showed three growth patterns under different stress conditions. In the first growth mode, the growth of the three strains under the low concentration PEG condition was not inhibited, but the turbidity value was higher than that of CK. In the second growth mode, six strains had an intermediate lethal osmotic potential under medium PEG concentration, but the number of viable strains increased under higher PEG concentration. In the third growth mode, the turbidity value of the culture medium decreased with the decrease of osmotic potential of 32 strains under high PEG concentration. [Conclusion] Those used strains showed a diversity of drought tolerance in the arid regions. Those different strains isolated from the same region but different soil environments showed a diversity of drought tolerance. The different strains from the same soil under different tillage and fertilization patterns had different drought resistance capability. In the end, five drought-tolerant strains were screened to provide strain materials for the next stage of symbiotic nodulation experiments.

**Keywords:** *Rhizobium*; drought tolerance; faba bean; drought stress

【研究意义】氮素是蚕豆生长必需的营养元素之一,蚕豆氮素的来源主要有根瘤固氮、土壤氮和肥料氮<sup>[1]</sup>,虽然肥料氮为作物获得高产提供了可能,但过度的施用和依赖造成土壤板结、肥力下降,给农业生产和生态环境带来巨大的负面影响而引起关注<sup>[2-3]</sup>。根瘤菌(*Rhizobium*)是一类能够固定大气中游离态的氮与豆科植物建立共生关系的 $\alpha$ -和 $\beta$ -变形菌<sup>[4]</sup>,蚕豆-根瘤菌构成的共生固氮体系可为蚕豆提供生长所需80%的氮源,一个生长季节能够固定并提供约200 kg/hm<sup>2</sup>,远远高于大豆(100 kg/hm<sup>2</sup>)<sup>[5]</sup>,因此,根瘤菌共生固氮的研究成为生命科学的研究热点。然而根瘤菌与豆科植物之间有很强的选择性,只有因地制宜的筛选与宿主相匹配的根瘤菌,才能形成有效共生固氮体系,生物固氮作用才得以充分发挥。【前人研究进展】根瘤菌-豆科作物的相互作用不仅取决于宿主植物自身的结瘤亲和性,更与限制结瘤环境因子有直接的关系<sup>[6-7]</sup>。干旱是影响作物生长的一个全球性问题,在干旱和半干旱地区,缺水使根瘤菌的繁殖受到抑制难以与豆科植物共生结瘤,是限制结瘤的重要因子之一。然而在这种干旱环境中却能孕育出在逆境中生长繁殖并结瘤、固氮的耐旱根瘤菌<sup>[8-9]</sup>,表现出与环境良好的适应性。研究者们发现,接种与之共生的高效根瘤菌不仅能减少干旱缺水所造成的细胞膜损伤、维持渗透压、减少氧化胁迫,显著提高作物的抗旱能力,而且能减少化学氮肥的施用,提高豆科作物的产量和品质。在农业实际生产中,大豆<sup>[10]</sup>、豌豆<sup>[11]</sup>、花生<sup>[12]</sup>、苜蓿<sup>[13]</sup>等豆科植物与高效根瘤菌接种提高其抗逆性、结瘤固氮能力和产量的研究报道屡见报端,已成为一项重要的农业措施。【本研究切入点】蚕豆(*Vicia faba* L.)属蝶形花科野豌豆属,是青海省重要的粮食、蔬菜、副食、饲料和轮作倒茬、间套种养地作物,在“化肥减量增效”和“全省打造全域绿色有机农畜产品示范省”行动中,蚕豆的生物固氮作用发挥着非常重要的作用<sup>[14]</sup>。有关蚕豆根瘤菌的研究报道主要涉及生物地理分布及形成机制<sup>[15]</sup>、系统发育及多样性<sup>[16]</sup>,生物和非生物胁迫少有研究<sup>[17]</sup>,而针对青海干旱地区耐旱根瘤菌筛选与评价尚未见报道。本研究以耐旱菌株接种提高蚕豆抗旱性的题科学问为出发点,广泛采集干旱地区蚕豆根瘤菌并对其耐旱性进行筛选和评价。【拟解决的关键问题】对干旱地区蚕豆根瘤菌的耐旱性进行研究,试图从中筛选出具有较强抗逆性的根瘤菌株,为下一步开展蚕豆耐旱根瘤菌的接种应用,充分发挥根瘤菌与蚕豆共生固氮效率提供前期技术基础。

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 试验材料

2020年6—7月,对青海省干旱农业蚕豆种植区的海东市1区(乐都区)、4县(化隆县、循化县、民和县、互助县)、西宁市3县(湟中县、大通县、湟源县)、海南藏族自治州1县(共和县)、1镇(塘格木镇)进行蚕豆根瘤采样(表1)。2020年8月—2021年1月,对72份根瘤样品进行分离,经灭菌处理YMA刚果红平板上划线纯化至获得单个典型菌落,革兰氏染色、镜检、初步鉴定后获得49份蚕豆根瘤菌,于10%甘油中-80℃保存。

表1 蚕豆根瘤菌菌株及其来源

Tab.1 *Rhizobium* strains isolated from faba bean and information of their source

菌株编号 Strains	采集地点 Site	海拔/m Elevation	经度 Longitude	纬度 Latitude	采样地情况 Sampling
HD-1	海东市化隆县昂思多镇	2 637	102°03'27.9"	36°09'54.5"	化肥
HD-2	海东市化隆县昂思多镇尕麻南村	2 752	102°04'56.1"	36°11'04.2"	化肥
HD-3	海东市化隆县阿什努乡阿乙村	2 981	102°11'23.6"	36°03'13.6"	化肥
HD-4	海东市循化县察汗都斯乡阿河滩村	1 887	102°22'6.5"	35°52'25.2"	豌豆茬
HD-5	海东市循化县察汗都斯乡阿河滩村	1 887	102°22'6.5"	35°52'25.2"	豌豆茬
HD-6	海东市循化县察汗都斯乡阿河滩村	1 887	102°22'6.5"	35°52'25.2"	蚕豆重茬
HD-9	海东市民和县官亭镇虎狼城中川公社	2 069	102°48'12.2"	36°56'47.4"	地膜种植
HD-10	海东市民和县甘沟村韩家嘴村三社	2 310	102°45'25.0"	36°58'58.4"	麦茬
HD-11	海东市民和县满坪镇傲沟村	2 403	102°45'20.9"	36°06'07.5"	不施肥
HD-13	海东市民和县西沟乡张家庄村	2 333	102°43'08.2"	36°08'12.1"	地膜种植
HD-15	海东市民和县峡门乡峡门镇	2 399	102°32'22.0"	36°14'59.8"	麦茬,地膜种植
HD-19	海东市乐都区蒲台乡侯白家村	2 043	102°29'51.6"	36°24'16.5"	马铃薯茬
HD-21	海东市乐都区瞿县镇磨台村	2 441	102°17'57.2"	36°21'05.0"	化肥
XN-22	西宁市湟中县李家山镇纳家村	2 619	101°32'54.8"	36°47'28.9"	地膜
XN-24	西宁市湟中县多巴镇丹麻寺村	2 421	101°30'40.2"	36°41'38.6"	马铃薯茬
XN-25	西宁市湟中县多巴镇燕尔沟村	2 369	101°32'54.4"	36°39'36.7"	化肥
XN-26	西宁市湟中县良种繁殖场	2 412	101°31'30.8"	36°42'59.9"	不施肥
XN-29	西宁市湟中县良种繁殖场	2 412	101°31'30.8"	36°42'59.9"	有机肥
XN-30	西宁市湟中县良种繁殖场	2 412	101°31'30.8"	36°42'59.9"	有机肥
XN-31	西宁市湟中县良种繁殖场	2 412	101°31'30.8"	36°42'59.9"	化肥
XN-32	西宁市湟中县良种繁殖场	2 412	101°31'30.8"	36°42'59.9"	化肥
XN-33	西宁市湟中县良种繁殖场	2 412	101°31'30.8"	36°42'59.9"	化肥
XN-34	西宁市湟中县良种繁殖场	2 412	101°31'30.8"	36°42'59.9"	化肥
XN-35	西宁市湟中县良种繁殖场	2 412	101°31'30.8"	36°42'59.9"	化肥
HD-38	海东市互助县五峰乡陈家台村	2 429	101°48'26.1"	36°50'40.7"	化肥
HD-39	海东市互助县威远镇下丰台沟	2 590	101°56'01.9"	36°52'01.9"	地膜
HD-40	海东市互助县西山乡杨徐村	2 691	101°51'53.3"	36°49'57.9"	有机肥
HD-41	海东市互助县塘川镇总寨村	2 347	101°54'04.5"	36°43'07.5"	有机肥
XN-42	西宁市大通县长宁镇王家庄	2 382	101°45'45.7"	36°49'18.9"	化肥
HN-43	海南州共和县铁盖村七台村	2 865	100°39'30.8"	36°12'07.2"	青稞茬,不施肥

续表 Continued tab.

菌株编号 Strains	采集地点 Site	海拔/m Elevation	经度 Longitude	纬度 Latitude	采样地情况 Sampling
HN-45	海南州共和县铁盖村七台村	2 865	100°39'30.8"	36°12'07.2"	有机肥
HN-46	海南州共和县铁盖村七台村	2 865	100°39'30.8"	36°12'07.2"	有机肥
HN-47	海南州共和县铁盖村七台村	2 865	100°39'30.8"	36°12'07.2"	化肥
HN-48	海南州共和县铁盖村七台村	2 865	100°39'30.8"	36°12'07.2"	不施肥
HN-49	海南州共和县铁盖村七台二村	2 865	100°39'30.8"	36°12'07.2"	麦茬,化肥
HN-50	海南州共和县铁盖村七台二村	2 865	100°39'30.8"	36°12'07.2"	化肥
HN-51	海南州共和县铁盖村七台二村	2 865	100°39'30.8"	36°12'07.2"	麦茬
HN-53	海南州共和县沙珠玉乡珠玉村	2 873	100°16'12.2"	36°15'53.5"	重茬
HN-54	海南州共和县沙珠玉乡珠玉村	2 873	100°16'10.5"	36°15'69.3"	麦茬
HN-55	海南州共和县沙珠玉乡珠玉村	2 874	100°16'28.4"	36°15'29.1"	化肥
HN-57	海南州共和县沙珠玉乡扎布达村	2 884	100°11'44.9"	36°15'33.2"	麦茬
HN-58	海南州共和县沙珠玉乡扎布达村	2 877	100°11'44.9"	36°15'33.2"	麦茬
HN-59	海南州塘格尔镇东格村	2 981	100°11'44.9"	36°15'33.2"	青稞茬
XN-88	西宁市湟源县申中乡卡路村	2 765	101°11'31.5"	36°44'16.5"	蔬菜茬
XN-89	西宁市湟源县申中乡卡路村	2 762	101°11'40.0"	36°44'04.3"	不施肥
XN-90	西宁市湟源县申中乡卡路村	2 762	101°11'40.0"	36°44'04.3"	化肥
XN-92	西宁市湟源县申中乡卡路村	2 762	101°11'40.0"	36°44'04.3"	化肥
XN-95	西宁市湟源县申中乡卡路村	2 762	101°11'40.0"	36°44'04.3"	有机肥
XN-98	西宁市湟源县巴汉村	3 099	101°05'26.3"	36°38'57.6"	麦豆混播田,有机肥

## 1.2 试验设计

对采集分离纯化后的蚕豆根瘤菌进行耐旱性评价,在 YMA 培养液中加入不同浓度的聚乙二醇 (PEG-6000) 人工模拟干旱条件,设置 4 个不同的 PEG-6000 渗透势水平:(1)仅使用 YMA 液体培养液,渗透势为 0 mPa;(2)10% PEG-6000 的 YMA 液体培养液,渗透势为 -0.2 mPa;(3)15% PEG-6000 的 YMA 液体培养液,渗透势为 -0.4 mPa;(4)20% PEG-6000 的 YMA 液体培养液,渗透势为 -0.6 mPa,以 0 mPa PEG-6000 为对照(CK),每水平设 3 次重复。

## 1.3 研究方法

1.3.1 标准菌悬液制备 将保存于 10% 甘油中的菌株接入 YMA 固体平板培养基活化培养,分别挑取 1 环接种到已灭菌的 YMA 液体培养液中,置于 28 ℃、160 r/min 振荡培养 72 h,测定根瘤菌悬浮液的光密度值( $OD_{600}$  值约 0.8~0.9)。以较低  $OD_{600}$  值菌液为基准,将各菌液加无菌水稀释制成光密度值一致的菌悬液,即为试验用的标准菌悬液。

1.3.2 耐旱性测定 以菌株在渗透势下能否增殖为划分根瘤菌耐旱标准。吸取 0.1 mL 标准菌悬液接入不同 PEG-6000 浓度的 YMA 液体培养基中震荡培养,7 d 后混匀取样,在 600 nm 下测定其  $OD$  值,以  $OD$  值的大小评价其生长繁殖状况,测定前用相应浓度 PEG-6000 的 YMA 培养液对仪器进行调零处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 蚕豆根瘤菌耐旱性的多样性分析

2.1.1 蚕豆根瘤菌耐旱性分析 以菌株在 PEG-6000 渗透势下能否增殖为划分根瘤菌耐旱标准,供试菌株在模拟干旱胁迫 0 ~ -0.6 mPa 下各渗透势水平下的浊度及相对值(即各菌株在各水平下的  $OD_{600}$  值与相应 0 mPa 的  $OD_{600}$  值的比值)进行数据分析(表 2)。

表2 供试菌株在干旱模拟条件下的吸光值(OD<sub>600</sub>)  
 Tab.2 Turbidity of the tested strain under simulated drought conditions

菌株编号 Strains	不同渗透势(MPa)的OD <sub>600</sub> 值 OD <sub>600</sub> of different osmotic potential							浊度相对值/% Turbidity relative		
	0	-0.2	降幅/% Decrement	-0.4	降幅/% Decrement	-0.6	降幅/% Decrement	-0.2	-0.4	-0.6
HD-1	1.37	0.15	89.38	0.52	62.33	0.56	59.01	10.62	37.67	40.99
HD-2	1.26	0.57	54.75	0.50	60.06	0.23	81.49	45.25	39.94	18.51
HD-3	1.28	0.62	51.63	0.48	62.48	0.38	70.52	48.37	37.52	29.48
HD-4	1.46	0.53	64.01	0.49	66.35	0.56	61.91	35.99	33.65	38.09
HD-5	1.06	0.15	85.94	0.29	72.45	0.29	72.73	14.06	27.55	27.27
HD-6	0.99	0.02	98.38	0.45	54.18	0.35	64.54	1.62	45.82	35.46
HD-9	1.15	0.02	98.32	0.33	71.30	0.30	73.97	1.68	28.70	26.03
HD-10	1.17	0.16	86.50	0.65	44.39	0.29	74.96	13.50	55.61	25.04
HD-11	1.56	1.07	31.65	0.99	36.47	1.07	31.37	68.35	63.53	68.63
HD-13	1.29	1.31	-1.52	1.25	3.74	1.06	17.94	101.52	96.26	82.06
HD-15	1.65	1.27	22.56	1.03	37.47	0.77	53.33	77.44	62.53	46.67
HD-19	1.92	1.75	8.55	1.19	38.05	0.99	48.56	91.45	61.95	51.44
HD-21	1.62	1.46	9.62	1.02	37.18	1.16	28.63	90.38	62.82	71.37
XN-22	1.44	1.35	6.81	0.89	38.52	1.00	30.58	93.19	61.48	69.42
XN-24	1.80	1.49	16.93	1.10	38.47	0.83	53.69	83.07	61.53	46.31
XN-25	1.48	1.87	-26.05	1.18	20.42	0.68	53.91	126.05	79.58	46.09
XN-26	1.55	1.35	12.99	0.76	51.25	0.51	66.93	87.01	48.75	33.07
XN-29	2.18	1.76	19.57	1.48	32.07	0.94	57.03	80.43	67.93	42.97
XN-30	2.11	1.62	23.31	1.16	45.32	0.90	57.39	76.69	54.68	42.61
XN-31	1.42	1.31	7.83	1.01	28.82	0.78	45.02	92.17	71.18	54.98
XN-32	1.70	1.50	11.71	1.17	31.07	0.85	49.94	88.29	68.93	50.06
XN-33	1.35	1.31	3.40	1.18	12.68	0.83	38.55	96.60	87.32	61.45
XN-34	1.96	1.67	14.60	1.22	37.79	0.81	58.73	85.40	62.21	41.27
XN-35	1.56	1.13	27.77	1.20	22.85	0.90	42.47	72.23	77.15	57.53
HD-38	1.76	1.42	19.29	1.36	22.34	0.90	48.86	80.71	77.66	51.14
HD-39	1.57	0.88	43.89	1.05	33.04	1.01	35.45	56.11	66.96	64.55
HD-40	1.64	1.44	12.26	0.93	42.94	0.71	56.37	87.74	57.06	43.63
HD-41	1.47	1.12	23.90	0.79	45.99	0.53	63.97	76.10	54.01	36.03
XN-42	1.61	1.34	16.80	0.91	43.40	0.70	56.62	83.20	56.60	43.38
HN-43	1.73	1.74	-0.56	1.27	26.61	0.90	48.04	100.56	73.39	51.96
HN-45	1.67	1.44	13.74	1.10	34.14	0.79	52.66	86.26	65.86	47.34
HN-46	1.71	1.44	15.90	1.00	41.54	0.93	45.37	84.10	58.46	54.63
HN-47	1.98	1.51	23.97	1.22	38.53	0.87	56.30	76.03	61.47	43.70
HN-48	1.63	0.99	39.36	1.25	23.30	0.80	50.51	60.64	76.70	49.49
HN-49	1.58	1.15	27.47	0.99	37.24	0.98	38.08	72.53	62.76	61.92
HN-50	1.57	1.38	12.28	0.97	38.19	1.08	31.41	87.72	61.81	68.59
HN-51	1.67	1.00	40.31	0.99	41.08	0.91	45.84	59.69	58.92	54.16
HN-53	1.85	1.52	17.97	1.10	40.42	0.92	50.62	82.03	59.58	49.38
HN-54	2.14	1.29	39.74	1.10	48.57	0.77	64.12	60.26	51.43	35.88
HN-55	2.20	1.96	11.19	1.51	31.59	0.80	63.70	88.81	68.41	36.30
HN-57	1.55	1.14	26.90	1.06	31.86	0.83	46.67	73.10	68.14	53.33
HN-58	1.35	1.22	9.89	1.04	22.94	0.82	39.40	90.11	77.06	60.60
HN-59	1.96	1.72	12.19	1.12	43.06	1.33	32.30	87.81	56.94	67.70
XN-88	1.68	1.33	20.79	0.92	45.12	0.84	50.13	79.21	54.88	49.87
XN-89	1.84	1.28	30.37	0.99	46.16	0.60	67.29	69.63	53.84	32.71
XN-90	1.58	1.40	11.28	1.13	28.33	0.88	44.02	88.72	71.67	55.98
XN-92	1.58	1.34	15.30	0.92	41.73	0.79	49.83	84.70	58.27	50.17
XN-95	1.40	1.00	28.59	0.93	33.88	0.86	38.74	71.41	66.12	61.26
XN-98	1.54	1.29	15.81	1.14	26.11	0.84	45.25	84.19	73.89	54.75

表中数值为3个重复的平均值。

Date are means of three replications.

干旱缺水对根瘤菌与豆科植物建立结瘤固氮共生体系具有重要影响。本研究结果显示,随着 PEG6000 浓度的增加,各菌株 OD 值总体上呈下降趋势,PEG6000 浓度在 10%、15%、20% 时,与对照菌株的 OD 值比较下降幅度分别为 3.40%~98.38%、3.74%~72.45%、17.94%~81.49%,平均下降 27.50%、39.06%、51.32%。随着干旱程度的增加,菌株生长受到的抑制作用逐渐增大。同时,笔者也发现在 PEG6000 浓度为 10% 时,有 3 个菌株(HD-13、XN-25、HN-43)的 OD 值并没有下降,反而与对照相比 OD 值上升,为 26.05%、1.52%、0.56%。比较不同菌株 OD 值下降结果发现,在同一个渗透水平 PEG6000 浓度条件下,菌株间 OD 值下降率存在较大差异,其中来自于典型干旱农业区的海东市乐都区瞿昙镇菌株号为 HD-21 和来自于西宁市湟中县李家山镇菌株号为 XN-22 的 OD 值下降率明显低于其它菌株,说明这 2 株根瘤菌能够耐受一定程度的干旱,可以作为下一步耐旱菌株接种蚕豆提高耐旱性的实验的材料。

2.1.2 干旱胁迫下蚕豆根瘤菌生长分析 对不同 PEG6000 渗透势水平下测定的菌悬液浊度值进行方差分析,考察干旱模拟胁迫下供试的 49 份蚕豆根瘤菌菌株耐旱性的显著性差异(表 3)。方差分析表明,以 PEG6000 模拟干旱胁迫条件,以不胁迫 0% 为对照,设定 10%、15%、20% 的胁迫梯度间在 1% 水平上差异极显著,说明本研究设定的胁迫梯度能较好区分菌株的耐旱能力,结果可靠。同时方差分析还显示干旱对蚕豆根瘤菌生长存活的影响差异极显著( $P < 0.0001$ )。

表 3 干旱模拟条件下供试菌株生长的方差分析  
Tab.3 Variance analysis of rhizobia growth under drought conditions

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F-value	显著性水平 Prob.
菌株 Strains	113 206.893 4	48	2 370.175 7	213.326 2	0
渗透势 Potential	42 164.359 1	2	20 281.337 8	1 828.874 1	0
菌株×渗透势 Strains×Potential	49 655.791 3	103	517.247 8	44.700 9	0
误差 Error	3 575.457 0	296	12.184 5		
总变异 Total	213 562.242 0	463			

同时,用平均连锁法(UPGMA)对参试的 49 份蚕豆根瘤菌菌株耐旱能力相似性进行聚类分析,聚类结果表明:来自青海干旱地区的 49 份菌株的耐旱能力可分为 3 类群(图 1)。第一类群由 8 个菌株组成,均来自海东市干旱地区,其中 6 株来自海东市化隆县和循化县,2 株来自海东市民和县;第二类群由 38 个

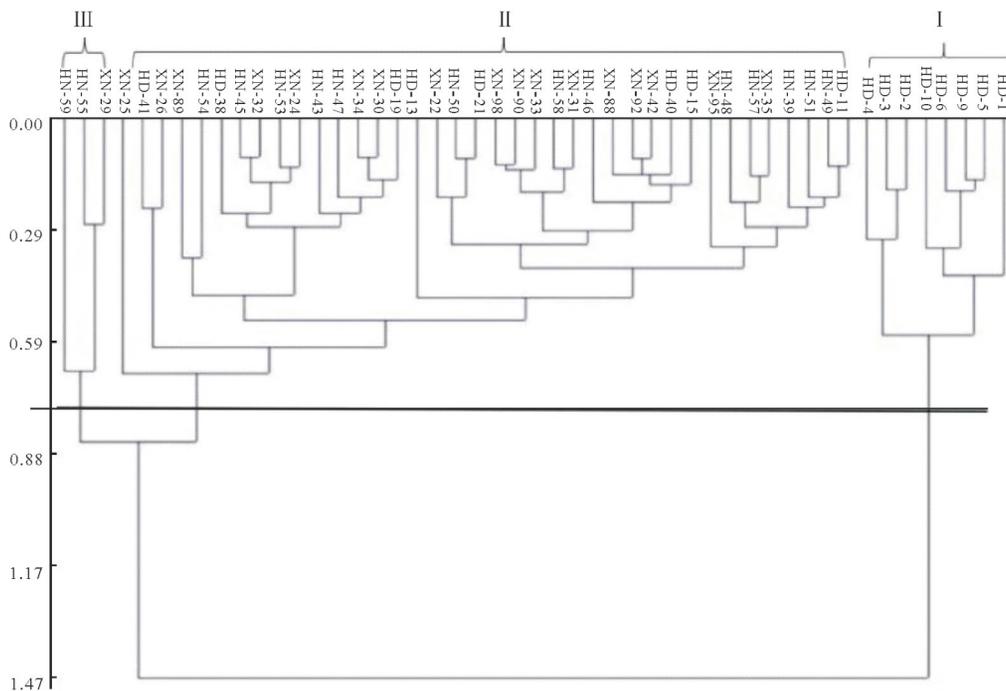


图 1 供试菌株耐旱能力聚类分析结果

Fig.1 Dendrogram showing relationship among rhizobia strain of dry-tolerant

菌株组成,其中3株来自海东市民和县,2株来自海东市乐都县,10株来自西宁市湟中县,4株来自海东市互助县,1株来自西宁市大通县,12株来自海南州共和县,6株来自西宁市湟源县;第三类群由3个菌株组成,1株来自西宁市湟中县,2株来自海南州共和县和海南州塘格尔镇。

综合方差分析和聚类结果表明:青海干旱地区蚕豆根瘤菌耐旱能力呈现多样性,来自青海不同干旱地区的蚕豆根瘤菌的干旱耐受能力不尽相同,并且来自同一地区的蚕豆根瘤菌之间的耐旱能力也呈多样性特征。

## 2.2 干旱条件下菌株生长模式分析

PEG-6000模拟干旱条件下供试菌株的生长模式也不尽相同,以0%PEG-6000培养液为对照,不同胁迫条件下供试菌株主要表现为3种生长模式。

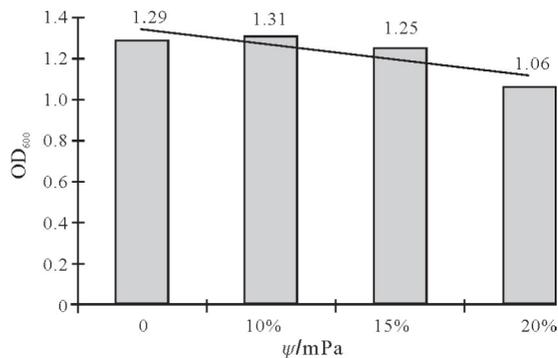


图2 第一类生长模式(菌株:HD-13)

Fig.2 The first kind of growth model(strain:HD-13)

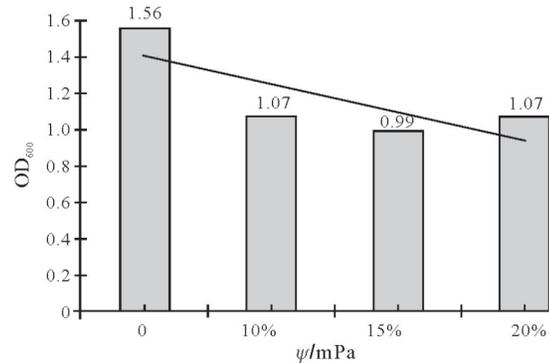


图3 第二类生长模式(菌株:HD-11)

Fig.3 The second kind of growth model(strain:HD-11)

第一种模式,在 $\psi=-0.2$  mPa(10% PEG6000)时,菌株的生长不但没有被抑制,其浊度值反而高于CK( $\psi=0$  mPa)(图2),这些菌株是HD-13、XN-25、HN-43,占供试菌株的6.1%。在干旱条件下,这3种菌株在10% PEG处理下的生长状况优于对照,说明培养液10%的渗透势对根瘤菌菌株生长的影响不大,而且适当的胁迫反而对根瘤菌菌株的生长有促进作用,这可能是这些菌株与宿主蚕豆植株长期生长在干旱环境中对其生存环境适应的结果。同时发现,菌株号为HD-13的菌株分离自海东市民和县西沟乡,宿主蚕豆为地膜栽培种植。蚕豆地膜覆盖栽培技术是青海省干旱农业区蚕豆生产的一项高产栽培技术,地膜栽培下干旱地区土壤湿润,适合类生菌的生长及繁殖;菌株号为HN-43的菌株分离自海南州共和县铁盖村,宿主蚕豆种植在不施肥的青稞茬农田,不同的土壤环境催生了具有抗性的菌株,使菌株具有较好的耐旱性。第二种模式,菌株HD-1,HD-11,HD-21,XN-22,HN-50,HN-59,这6个菌株一方面存在一个中间致死渗透势,即菌株在 $-0.4$  mPa渗透势时存活数量减少或增殖能力减弱,而在 $-0.6$  mPa这一更低渗透势时存活数量又增高(图3)。第三种模式,随着渗透势的下降,蚕豆根瘤菌培养液的吸光度值也随之下降(图4)。这些菌株HD-2,HD-3,HD-13,HD-15,HD-19,XN-24,XN-26,XN-29,XN-30,XN-31,XN-32,XN-33,XN-34,HD-38,HD-40,HD-41,XN-42,HN-45,HN-46,HN-47,HN-49,HN-51,HN-54,HN-55,HN-57,HN-58,XN-88,XN-89,XN-90,XN-92,XN-95,XN-98,共32个菌株,占供试菌株的65.3%。

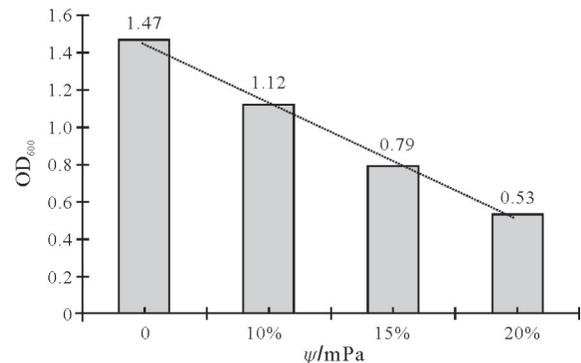


图4 第三类生长模式(菌株:HD-41)

Fig.4 The third kind of growth model(strain:HD-41)

## 3 讨论与结论

水分是土壤微生物能否正常生长的最重要的限制因素之一,豆科植物-根瘤菌共生关系的形成及其活性对于干旱十分敏感,土壤干旱缺水使根瘤菌的存活受到影响。本论文结果表明青海干旱地区蚕豆根瘤菌资源中存在耐旱性较强的菌株,耐旱能力呈现多样性,同时从侧面反映出利用PEG6000人工模拟干

旱环境筛选耐旱根瘤菌的方法是可行的。以0% PEG6000的YMA液体培养液为对照,考察根瘤菌在不同梯度渗透浓度下的生长情况发现,分离自青海不同干旱地区的蚕豆根瘤菌在没有渗透干旱胁迫下其生长繁殖能力存在差异,不同根瘤菌在相同渗透胁迫环境下和同一根瘤菌在不同胁迫环境下其生长繁殖能力均存在差异,并且随着干旱胁迫强度的加深,所有菌株生长繁殖能力均出现不同程度的下降。分析原因笔者认为青海特殊的地理环境造就了与之长期共生蚕豆根瘤菌的生长多样性,加之土壤是一个不连续的高度异质体,这种高度异质环境使根瘤菌在土壤中所处的微环境存在差异,这些差异使蚕豆根瘤菌向不同方向进化,从而表现出耐旱能力多样性特点。同时笔者也认为这种多样性分布的产生是由于当地种植制度、土地利用状况、土壤类型等方面差异使蚕豆根瘤菌表现出耐旱能力多样性特点。与此同时,分离自同一地区不同蚕豆品种的根瘤菌耐旱能力也呈现多样性,这可能与根瘤菌结瘤的宿主专一性及品种差异有关。迟玉成<sup>[18]</sup>研究山东省花生土著根瘤菌耐旱性中指出,山东省花生种植区存在具有较强耐干旱的菌株,来自同一地区的花生根瘤菌耐旱能力呈现多样性,来自同一地区、不同花生品种的根瘤菌耐旱能力也呈现多样性。这一结论与本研究得到的结果一致。裴晓峰<sup>[19]</sup>对耐旱大豆根瘤菌研究中同样也得到相似结论。

逆境条件下分布的根瘤菌表现出与环境良好的适应性,根瘤菌株的耐旱性与其分离地点相关,是菌株长期适应生态环境的结果,这一观点在本研究中也得到了证实。本论文中大多数菌株生长的最适PEG浓度在10%以下,说明10%的渗透势对根瘤菌菌株生长的影响不大,而且适当的胁迫反而对根瘤菌菌株的生长有促进作用,这可能是这些菌株与宿主蚕豆植株长期生长在干旱环境中对其生存环境适应的结果。相似的结论在黄明勇等<sup>[20]</sup>对花生根瘤菌耐旱性研究和韩梅<sup>[21]</sup>对蚕豆耐旱性研究中也报道。本论文发现随着渗透势浓度的增加,6个菌株(HD-1, HD-11, HD-21, XN-22, HN-50, HN-59)在-0.4 mPa渗透势时存活数量减少或增殖能力减弱,而在-0.6 mPa这一更低渗透势时存活数量又增高。本研究中存在这种现象与曾小红<sup>[22]</sup>在用PEG6000人工模拟干旱条件研究金沙江河谷地区豆科树种根瘤菌耐干热中得到的结论一致。Van Rensburg<sup>[23]</sup>在研究中认为这是由于中间渗透势使细胞部分失水使其功能酶造成损伤,而在-0.6 mPa更低的渗透势情况下存活率提高是由于酶的正常功能受到保护所致。本研究最终筛选获得5个比较耐干旱的菌株,分别分离自海东市民和县的菌株HD-11,海东市乐都区的菌株HD-21,西宁市湟中县的菌株XN-22,海南州共和县的菌株HN-50,海南州塘格尔镇的菌株HN-59,它们在-0.6 mPa(即20% PEG)的渗透势水平仍能生长发育,菌液浊度在68%以上。可以间接推断上述菌株在干旱胁迫时对寄主植物具有较强的浸染能力,有利于寄主植物在干旱环境中获取更多的养分,从而提高了蚕豆植株的抗旱性。

同时,蚕豆根瘤菌共生体系的固氮过程从根本上是由根瘤菌、蚕豆和所在环境共同决定的,土壤复杂的理化性和各种生物因素,势必对根瘤菌耐旱性造成影响,在下一步的研究工作中需要考虑土壤理化性对耐旱菌株的影响。

## 参考文献 References:

- [1] 叶茵.中国蚕豆学[M].北京:中国农业出版社,2003:174-179.  
YE Y.Chinese faba bean science[M].Beijing:China Agriculture Press,2003:174-179.
- [2] 陈文新,汪恩涛.中国根瘤菌[M].北京:科学出版社,2011:225-231.  
CHEN W X,WANG E T.*Rhizobium* in China[M].Beijing:Science Press,2011:225-231.
- [3] SINDHU S S,SHARMA R,SINDHU S, et al.Soil fertility improvement by symbiotic rhizobia for sustainable agriculture[J].Soil fertility management for sustainable development,2019:101-166.
- [4] STEFAN A,VAN CAUWENBERGHE J,ROSU C M, et al.Genetic diversity and structure of *Rhizobium* leguminosarum populations associated with clover plants are influenced by local environmental variables[J].Systematic and applied microbiology,2018,41(3):251-259.
- [5] HARDARSON G,ATKINS C.Optimising biological N<sub>2</sub> fixation by legumes in farming systems[J].Plant and soil,2003,252(1):41-54.
- [6] 程波,王健,石红标,等.草甘膦和根瘤菌对紫花苜蓿品质及固氮能力的影响[J].中国草地学报,2021,43(2):47-53.  
CHEN B,WANG J,SHI H B, et al.Effects of glyphosate and *Rhizobium* on the quality traits and nitrogen fixation of *Medicago sativa*[J].Chinese journal of grassland,2021,43(2):47-53.

- [7] 潘亭亭,王乐,姚红丽,等.豌豆根瘤菌高效菌株的筛选[J].江苏农业科学,2018,46(11):119-121.  
PAN T T, WANG L, YAO H L, et al. Screening of high efficient strains of *Rhizobium* on Pea[J]. Jiangsu agriculture sciences, 2018, 46(11): 119-121.
- [8] 刘旭艳,石凤翎,刘昊,等.接种根瘤菌对苜蓿生长及土壤养分的影响[J].中国草地学报,2016,38(6):45-52.  
LIU X Y, SHI F L, LIU H, et al. Effects of *Rhizobium* of the growth of Alfalfa and the soil nutrient content[J]. Chinese journal of grassland, 2016, 38(6): 45-52.
- [9] FURLAN A L, BIANUCCI E, CASTRO S, et al. Metabolic features involved in drought stress tolerance mechanisms in peanut nodules and their contribution to biological nitrogen fixation [J]. Plant science, 2017, 263: 12-22.
- [10] 马家斌,于晓波,吴海英,等.接种根瘤菌对西南地区大豆光合性能和固氮能力的影响[J].中国油料作物学报,2020,42(1):102-108.  
MA J B, YU X B, WU H Y, et al. Effects of inoculation of different *Rhizobium* on photosynthetic characteristics and nitrogen fixation of soybean[J]. Chinese journal of oil crop sciences, 2020, 42(1): 102-108.
- [11] 马蕾,李胜,马绍英,等.豌豆根瘤共生植株生长和光合荧光特性对水分胁迫的响应[J].西北农业学报,2020,29(4):537-551.  
MA L, LI S, MA S Y, et al. Response of growth and photosynthetic fluorescence characteristics of *Rhizobium* symbiotic plants to water stress[J]. Acta agriculture boreali-occidentalis Sinica, 2020, 29(4): 537-551.
- [12] 刘鹏,田颖哲,钟永嘉,等.酸性土壤上花生高效根瘤菌的分离及应用[J].中国农业科学,2019,52(19):3393-3403.  
LIU P, TIAN Y Z, ZHONG Y J, et al. Isolation and application of effective *Rhizobium* strains in peanut on acid soils[J]. Scientia agriculture Sinica, 2019, 52(19): 3393-3403.
- [13] 李莎莎,李红,杨伟光,等.苜蓿抗旱生理与分子机制[J].草业科学,2018,35(2):331-340.  
LI S S, LI H, YANG W G, et al. Physiological and molecular mechanisms of response to drought stress in alfalfa[J]. Pratacultural science, 2018, 35(2): 331-340.
- [14] 李萍,侯万伟,刘玉皎.青海高原耐旱蚕豆品种青海13号响应干旱胁迫蛋白质组学分析[J].作物学报,2019,45(2):267-275.  
LI P, HOU W W, LIU Y Y. Proteomic analysis of drought stress response on drought resistance for *Vicia faba* L. variety 'Qinghai 13' in Qinghai Plateau of China[J]. Acta agronomica Sinica, 2019, 45(2): 267-275.
- [15] 熊惠洋.蚕豆土著根瘤菌的生物地理分布及其形成机制[D].北京:中国农业大学,2017.  
XIONG H Y. The biogeography of indigenous rhizobia associated with faba bean and its underlying formation mechanism [D]. Beijing: China Agriculture University, 2017.
- [16] 贾腾飞,张小娟.蚕豆根瘤菌生物地理学及 AFLP 多样性分析[J].分子生物育种,2019,17(20):6860-6866.  
JIA T F, ZHANG X J. Analysis of biogeography and AFLP diversity of *Vicia faba* rhizobium[J]. Molecular plant breeding, 2019, 17(20): 6860-6866.
- [17] 王静静,董艳,肖靖秀,等.不同黄酮类物质对蚕豆根瘤菌生长的影响[J].西南林业大学学报,2018,38(5):110-115.  
WANG J J, DONG Y, XIAO J X, et al. Effects of different flavonoids on the growth of faba bean rhizobia[J]. Journal of southwest forestry university, 2018, 38(5): 110-115.
- [18] 迟玉成,王烽辉,樊堂群,等.山东省花生土著根瘤菌耐盐、耐旱性初步研究[J].花生学报,2008,37(1):21-25.  
CHI Y C, WANG J H, FAN T Q, et al. Preliminary study on NaCl-tolerance and drought-tolerance of bradyrhizobial strains (*Arachis*) isolated from Shandong[J]. Journal of peanut science, 2008, 37(1): 21-25.
- [19] 裴晓峰,关大伟,李俊,等.耐旱大豆根瘤菌的筛选及其接种效应[J].大豆科学,2012,31(3):420-424.  
PEI X F, GUAN D W, LI J, et al. Screening of drought-tolerance rhizobium and its influence on soybean[J]. Soybean science, 2012, 31(3): 420-424.
- [20] 黄明勇,张小平,李登煜,等.金沙江干热河谷区土著花生根瘤菌耐旱性初步研究[J].应用与环境生物学报,2000,6(3):263-266.  
HANG M Y, ZHANG X P, LI D Y, et al. Studies on drought tolerance bradyrhizobial strains (*Arachis*) isolated from Jinshajiang River dry-hot valley[J]. Chinese journal of applied and environmental biology, 2000, 6(3): 263-266.
- [21] 韩梅.蚕豆根瘤菌耐旱耐盐碱性研究[J].青海大学学报,2019,37(4):35-41.  
HAN M. Drought and saline tolerance of *Vicia faba* *Rhizobium*[J]. Journal of Qinghai university, 2019, 37(4): 35-41.
- [22] 曾小红,伍建榕,马焕成,等.金沙江河谷地区豆科树种根瘤菌耐干热研究[J].水土保持研究,2006,13(4):75-77.  
ZENG X H, WU J R, MA H C, et al. Study on drought hot tolerance of *Rhizobium* strains of legume isolated from Jinshajiang River dry-hot valley[J]. Research of soil and water conservation, 2006, 13(4): 75-77.
- [23] VAN RENSBURG H J, STRIJDOM B W. Survival of fast- and slow-growing rhizobium ssp. under conditions of relatively mild desiccation[J]. Soil biol biochem, 1980, 12: 353-356.