

接种根瘤菌的台湾相思对干旱胁迫的生化响应

曾小红^{1,2}, 伍建榕¹, 马焕成¹

(1. 西南林学院 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室, 云南 昆明 650224;
2. 中国热带农业科学院 科技信息研究所, 海南 儋州 571737)

摘要: 运用 PEG-6000 高渗溶液模拟干旱胁迫实验, 测定台湾相思 *Acacia richii* 接种不同根瘤菌后体内部分生化物质的变化趋势, 并探讨接种不同根瘤菌后对体内游离脯氨酸、可溶性糖和叶绿素积累的影响, 从而为筛选更有利于台湾相思在干旱环境下生存的根瘤菌提供支持。结果表明, 在一定时间内, 接种不同根瘤菌均能提高代谢物质的累积, 但从不同寄主分离得到的根瘤菌其作用有一定的差异。在分离自白灰毛豆 *Tephrosia candida* (菌株 SMD)、银合欢 *Leucaena leucocephala* (菌株 YHH)、台湾相思(菌株 TWXS)的根瘤菌中, 接种 SMD 更能促进台湾相思体内游离脯氨酸等代谢物质的累积。代谢物质的累积是台湾相思接种根瘤菌后对干旱胁迫的适应性表现, 来自白灰毛豆的根瘤菌对促进相思苗木在干旱环境中的抗逆性具有更大的潜力。表 3 参 16

关键词: 植物学; 干旱胁迫; 台湾相思; 根瘤菌; 脯氨酸; 可溶性糖; 叶绿素

中图分类号: S718.3; Q945.79 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)02-0181-05

Biochemical response of drought stressed *Acacia richii* seedlings inoculated with rhizobia

ZENG Xiao-hong^{1,2}, WU Jian-rong¹, MA Huan-cheng¹

(1. Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest of China State Forestry Administration, Southwest Forestry College, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Tech-Sci Information Research Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, Hainan, China)

Abstract: To determine if in a drought environment there was an adaptation for *Acacia richii* due to rhizobia, this experiment analyzed the accumulation of metabolites, such as proline, soluble sugar, and chlorophyll, after inoculation with SMD rhizobia separated from *Tephrosia candida*, YHH from *Leucaena leucocephala* and TWXS from *A. richii* under artificial drought conditions in a PEG-6000 solution. The contents of PEG-6000 were 0 (control), 0.010, 0.025 and 0.037 respectively. Results showed that different rhizobia increased metabolite accumulation in drought conditions, but there were different levels of accumulation depending on rhizobia strains. The rhizobia SMD had a stronger potential to promote seedling resistance in a drought environment than rhizobia YHH and TWXS. Thus, it is advantageous to choose rhizobia to promote growth of *A. richii* in drought conditions. [Ch, 3 tab. 16 ref.]

Key words: botany; drought stress; *Acacia richii*; rhizobia; proline; soluble sugar; chlorophyll

台湾相思 *Acacia richii* 是多年生的豆科 Leguminosae 木本植物, 生长快, 耐瘠薄, 有根瘤, 具有固氮作用, 可改良土壤, 且木材用途广等特性, 是荒山荒地造林的先锋树种, 已逐渐成为西部干热河谷地区的主要造林树种^[1,2]。干热河谷地带由于其干旱、高温、土壤等立地条件的限制, 决定了在该地

收稿日期: 2007-03-09; 修回日期: 2007-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30760199); 云南省自然科学基金资助项目(2003C0051M); 云南省重点学科建设项目(森林培育学); 云南省省院省校合作项目(森林培育学)

作者简介: 曾小红, 硕士研究生, 从事植物生理生态学等研究。E-mail: zxsummer0881@163.com。通信作者: 马焕成, 教授, 博士, 博士生导师, 从事困难地段的生态恢复与生物质能源林培育研究。E-mail: hcma@public.km.yn

区的造林工作的特殊性和艰巨性。除了在树种的引种栽培上尽量做到适种适树，而且对与之共生的根瘤菌的应用也需筛选适合该地区生态特点的抗逆性强的根瘤菌株。文章从根瘤菌和树种相结合的角度，探讨在干旱条件下，接种不同根瘤菌的台湾相思，在受到干旱胁迫时体内游离脯氨酸、可溶性糖和叶绿素等生化物质的变化及与抗旱性的关系，以期为干热河谷地带的植树造林筛选出适合的根瘤菌株。

1 材料与方法

1.1 方法

1.1.1 苗木培育 挑选子粒饱满的台湾相思种子，在体积分数为 75% 乙醇中消毒 1 min，然后均匀播种在盛有土壤(红土:腐殖土 = 3:1，并用体积分数为 36% 的甲醛灭菌)的塑料花盆内。每盆保留 5 株生长良好，长势一致幼苗。整个育苗期不施肥。

1.1.2 根瘤菌的培养及苗木接种 接种的各根瘤菌菌液为前期野外采集根瘤，在实验室经分离、培养并回接验证的根瘤菌纯菌株，经活化培养后使用。3 种菌 SMD，YHH 和 TWXS 分别分离自白灰毛豆 *Tephrosia candida*，银合欢 *Leucaena leucocephala* 和台湾相思。根瘤菌接入 YMA (酵母汁甘露醇琼脂) 平板培养基，在 28 °C 培养 5 d，刮下菌体，在摇床上震荡制成菌液，将菌液浇在长出真叶的种子周围，每个菌株接种 3 盆(3 个重复)。每天定时浇水，每隔 15 d 浇 1 次无氮营养液，隔 30 d 追加 1 次根瘤菌菌液，直到苗木根部长出根瘤。同时培养不接种根瘤菌的苗木，作为接种有根瘤菌苗木的对照组(对照)。对照组在干旱胁迫过程中不浇水。

1.1.3 对苗木进行干旱胁迫 实验用苗木 2005 年于昆明的旱季 3~7 月在西南林学院校内塑料大棚内进行，不受外界降水的影响，棚内日平均温度 30 °C。至 7 月底，当嫩枝条长到 20~50 cm，接种根瘤菌的小苗长出根瘤时，选取长势一致苗木用于实验。本实验采用 PEG-6000 人工模拟干旱胁迫。将 PEG (聚乙二醇) 配置成 0, 10, 25, 37 g·L⁻¹ 4 种质量浓度，渗透势分别为 0, -15.90, -77.38, -159.00 Pa^[3]，每个质量浓度设 3 个重复。用上述质量浓度 PEG 溶液将盆栽的各苗木浇至过饱和，参考马焕成对胡杨 *Populus euphratica* 渗透势试验方法^[4] 进行。

1.1.4 生化指标的测定 在处理后的第 1, 3, 5, 7 天早晨取叶龄相似叶片，测定叶片脯氨酸、可溶性糖及叶绿素，各生化指标测定试验均设 3 个重复。脯氨酸参照张殿忠等^[5]的方法，用 722 分光光度计在 550 nm 比色测定。可溶性糖用蒽酮比色法测定^[6]，用 722 分光光度计在 630 nm 比色测定。叶绿素参照文献[4]的方法测定。

2 结果与分析

2.1 PEG 胁迫后台湾相思苗木的观察

在不同质量浓度 PEG 溶液中，台湾相思幼苗在 2 d 内，其叶片多数保持新鲜状态，部分出现萎蔫。第 3 天开始，随时间的增加，叶片萎蔫逐渐增加。但没有因 PEG 质量浓度的增加而萎蔫度也增加。对照组幼苗叶片，随时间增加萎蔫也逐渐增加。

2.2 干旱胁迫对接种根瘤菌的台湾相思叶片脯氨酸质量分数的影响

从表 1 可以看出，台湾相思幼苗接种不同豆科树种根瘤菌后，在日平均温度 30 °C，PEG 质量浓度为 0, 10, 25, 37 g·L⁻¹ 不同渗透胁迫条件下，不同时间内，脯氨酸出现不同程度的积累。在同等渗透胁迫条件下，随时间增加，脯氨酸累积增多；而在相同时间内，脯氨酸的累积和渗透胁迫的强度并不成正相关。在 PEG 质量浓度为 25 g·L⁻¹，第 3 天时，游离脯氨酸累积最多，其中以接种 SMD 菌株的脯氨酸累积最多，为 1.965 mg·g⁻¹。但随时间延长，植物体内脯氨酸下降，叶片萎蔫，说明逐步脱水使苗木已不能承受干旱胁迫造成的威胁。

接种 YHH 菌株的台湾相思在不同渗透胁迫下，脯氨酸均随胁迫时间的延长而增加，在第 3 天时，分别比第 1 天增长 58.02%，390.20%，165.76% 和 110.80%；5 d 后脯氨酸下降；第 7 天时大部分叶片萎蔫。而接种 SMD 和 TWXS 的苗木叶片，PEG 处理后第 1, 3 天，25 g·L⁻¹ 浓度下，游离脯氨酸

积累程度比质量浓度 10 和 37 g·L⁻¹, 高出近 3 倍的量(第 1 天分别为 260.78%, 318.18% 及 325.92%, 275.19%; 第 3 天分别为 280.81%, 427.22% 及 56.80%, 85.49%)。而后, 随时间延长脯氨酸累积减少或叶片萎蔫。这说明台湾相思因逐渐失水而对干热高温的胁迫不能再进行自我调节。

在 10 g·L⁻¹PEG 质量浓度下, 接种 SMD 的台湾相思与接种 YHH 和 TWXS 的相比, 其叶片脯氨酸的累积在第 1 天(0.204 mg·g⁻¹)、第 3 天(0.516 mg·g⁻¹)较低(YHH 分别为 0.298 mg·g⁻¹, 1.411 mg·g⁻¹, TWXS 分别为 0.355 mg·g⁻¹, 1.125 mg·g⁻¹), 但当胁迫时间到第 5 天时, 游离脯氨酸回升达到 1.425 mg·g⁻¹。在 25 g·L⁻¹PEG 质量浓度时, 接种 TWXS 的叶片从一开始就含有较多脯氨酸(1.512 mg·g⁻¹), 但在第 5 天叶片萎蔫; 而接种其他菌种的叶片在胁迫到第 7 天才出现萎蔫。质量浓度为 37 g·L⁻¹时, 接种 SMD 的脯氨酸为 1.348 mg·g⁻¹, 而接种 TWXS 和 YHH 的苗木已出现萎蔫。这说明, 接种 SMD 菌种后, 台湾相思幼苗更容易积累游离脯氨酸, 更能调节自身代谢物质, 从而适应高温干旱的环境条件。

2.3 干旱胁迫对接种根瘤菌的台湾相思叶片可溶性糖质量分数的影响

从表 2 可看出, 随 PEG 处理时间的延长, 干旱胁迫的加剧, 无论接种何种根瘤菌, 幼苗叶片的可溶性糖均出现明显累积现象。接种不同根瘤菌的幼苗在 10 g·L⁻¹PEG 质量浓度下, 可溶性糖累积均是先下降后上升, 在第 5 天或第 7 天达到至高, 随后叶片萎蔫。在 25 g·L⁻¹PEG 质量浓度下, 接种 SMD 和 TWXS 的叶片, 可溶性糖的累积从一开始就上升至叶片萎蔫, 而接种 YHH 的叶片, 稍有下降后再上升至叶片萎蔫。在 37 g·L⁻¹质量浓度下, 各叶片可溶性糖的累积程度和 25 g·L⁻¹质量浓度时相差不大, 只有接种 TWXS 的叶片出现先下降再上升至叶片萎蔫, 而接种 YHH 的叶片反而一直升高

表 1 台湾相思接种不同的根瘤菌后叶片
脯氨酸质量分数的变化

Table 1 The change of proline content of *Acacia richii* leaves inoculated with different rhizobia

苗木	PEG 质量浓度/ (g·mL ⁻¹)	不同胁迫时间脯氨酸质量分数/(mg·g ⁻¹)			
		1 d	3 d	5 d	7 d
对照(不接菌)		0.255	0.470	1.691	W
接种 SMD	0	0.262	0.414	0.290 **	0.358
	10	0.204	0.516	1.425	1.055
	25	0.736 **	1.965 **	1.069 *	W
	37	0.176	0.371	0.748 **	1.348
接种 YHH	0	0.170	0.194	0.582 **	W
	10	0.298	1.411 **	1.069 *	0.916
	25	0.221	1.621 **	1.384	W
	37	0.356	1.509 **	1.850	W
接种 TWXS	0	0.318	0.490	0.489 **	W
	10	0.355	1.125 *	0.309 **	0.963
	25	1.512 **	1.764 **	W	—
	37	0.403	0.951 *	1.668	W

说明: * 示各处理与对照差异显著($P < 0.5$); ** 示处

理与对照差异极显著($P < 0.01$); W 示叶片萎蔫。

表中数据为 3 次重复的平均值。

表 2 台湾相思接种不同根瘤菌后叶片
可溶性糖质量分数的变化

Table 2 The change of soluble sugar content of *Acacia richii* leaves inoculated with different rhizobia

苗木	PEG 质量浓度/ (g·mL ⁻¹)	不同胁迫时间可溶性糖质量分数/(mg·g ⁻¹)			
		1 d	3 d	5 d	7 d
对照(不接菌)		14.215	30.685	54.679	14.215
接种 SMD	0	13.887	15.496 **	14.120 *	28.756
	10	23.635 **	19.855 **	66.545	W
	25	16.741	21.270	40.591	W
接种 YHH	37	17.168	28.892	53.801	64.235
	0	15.601	12.993 *	31.350 *	W
	10	20.756 *	13.787 *	45.928 *	43.578
接种 TWXS	25	25.369 **	23.256 *	36.359 *	W
	37	23.394 *	25.563 *	W	—
	0	14.385 **	25.256 *	32.890 *	W
	10	25.516 **	16.921 *	30.856 *	55.545
	25	27.767 **	28.003	W	—
	37	19.503 *	17.736 *	59.417 *	W

说明: * 示各处理与对照差异显著($P < 0.5$); ** 示处

理与对照差异极显著($P < 0.01$); W 示叶片萎蔫。

表中数据为 3 次重复的平均值。

至萎蔫。

总体看来，接种SMD的台湾相思其可溶性糖累积得最多；在第5天时可溶性糖的积累在不同渗透条件下分别比第1天增长1.68%，181.55%，142.46%，213.38%，接种TWXS的次之，分别增长128.64%，20.93%，萎蔫和204.66%。累积得最少的是接种YHH的相思叶片，增长分别为100.95%，121.28%，43.32%和萎蔫。在同样渗透胁迫下，接种SMD的台湾相思，其叶片积累的可溶性糖比接种其他根瘤菌的要快要高。即SMD相较于YHH和TWXS两种根瘤菌，在一定程度上更能提高台湾相思体内可溶性糖的累积。

2.4 干旱胁迫对接种根瘤菌的台湾相思叶片叶绿素质量分数的影响

从表3可以看出，台湾相思在接种不同根瘤菌后，其叶片中叶绿素质量分数的变化均是先达到一个高峰值(第3天)再逐渐下降。接种TWXS的叶片，在 $25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG质量浓度下，叶绿素质量分数仅下降2.7%就出现萎蔫。而接种SMD和YHH 2种菌的叶片，叶绿素(分别为 4.436 ， $4.333\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)均比对照高(分别为 3.680 ， $2.834\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。在干旱条件下，干旱使植物叶片叶绿素质量分数有明显的降低^[7]，但在本次试验中，叶片叶绿素含量并没有开始就出现降低现象，而是先上升到一个高峰点后再缓慢下降。

在试验过程中，干旱胁迫开始时叶绿素质量分数的提高并不比没有接种的叶片叶绿素明显；当进行到第3天时，未接种根瘤菌的苗木叶绿素开始下降(第1天为 $3.192\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，第3天为 $2.454\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)，而接种根瘤菌其叶绿素反而提高(除接种TWXS的苗木在 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG质量浓度有所下降)，提高17.36%~78.16%。到第7天时，未接种的叶片出现萎蔫，而接种根瘤菌的部分叶片未萎蔫。

3 讨论

在水分胁迫下植物体干物质的增加，糖分的积累是植物适应干旱环境的部分特征^[8]。

这不仅能提高树木忍耐脱水的能力，而且，在干旱条件下细胞内溶质的主动积累，可导致细胞渗透势的下降，维持膨压，加强渗透调节，提高在干旱条件下植物吸水的能力^[9,10]。可溶性糖的积累可能源于水分胁迫促使呼吸速度显著上升，促成多糖的分解速率加快^[11]。Hakimi等^[12]研究指出叶片中可溶性糖的质量分数与胁迫程度呈正相关。

从本次实验结果可以看出，接种不同根瘤菌的苗木，在干旱胁迫过程中，游离脯氨酸等的质量分数没有一直呈上升趋势，而是出现了一个高峰后开始降低。这一结果与前人在小麦 *Triticum sestivum*^[13]，大麦 *Hordeum vulgare*^[7]，苜蓿 *Medicago sp.*^[14]等植物上所得到的结果一致。因此，可以认为游离脯氨酸等是台湾相思接种不同根瘤菌后，受到不同渗透胁迫下对干旱的一种调节方式。将分离自金沙江干热河谷的根瘤菌接种在同一树种苗木上，结果表明，接种根瘤菌后能显著影响苗木体内游离脯氨酸和可溶性糖的质量分数。在分离白灰毛豆、银合欢和台湾相思等3种豆科树种的根瘤菌

表3 台湾相思接种不同根瘤菌后叶片叶绿素质量分数的变化

Table 3 The change of chlorophyll content of *Acacia richii* leaves inoculated with different rhizobia

苗木	PEG 质量浓度/ ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	不同胁迫时间叶绿素质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
		1 d	3 d	5 d	7 d
对照(不接菌)		3.192	2.454	2.415	W
接种 SMD	0	2.861	4.172 **	4.072 **	2.833
	10	2.618 **	3.795 **	2.888	2.920
	25	3.680 **	4.436 **	4.125 **	W
	37	2.517 *	2.954	2.966	2.199
接种 YHH	0	3.021	4.332 **	3.921 **	4.144
	10	2.632 **	4.826 **	3.542 *	3.403
	25	2.834 **	4.333 **	3.542 *	W
	37	2.848 **	5.004 **	3.922 **	W
接种 TWXS	0	2.936	4.650 *	4.560	W
	10	2.578 **	4.593 **	3.536 *	3.468
	25	4.034 *	3.925 **	W	W
	37	3.058 *	5.108 **	4.043 **	W

说明：*示各处理与对照差异显著($P<0.5$)；**示处理与对照差异极显著($P<0.01$)；W示叶片萎蔫。
表中数据为3次重复的平均值。

中，接种SMD的台湾相思苗木，比接种YHH和TWXS的，其游离脯氨酸、可溶性糖等更容易累积。由于在高温、干旱等不利植物生长的环境条件下分离到的根瘤菌菌株本身就具有较强的抗逆性^[15,16]，这就有可能表明将分离自该环境下的根瘤菌接种到苗木上，由于根瘤菌—豆科树种的共生作用，从而促进苗木对不利环境的抗逆性。

在选择促进有利于台湾相思苗木抗性育种的根瘤菌菌株中，研究分析认为，分离自白灰毛豆的根瘤菌(SMD)对促进相思苗木在干旱环境中的抗逆性更具有潜力。

参考文献：

- [1] 马焕成. 干热河谷造林新技术[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2001.
- [2] 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.
- [3] BURLYN E M, MERRILL R K. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000 [J]. *Plant Physiol*, 1973, 51: 914–916.
- [4] 马焕成. 胡杨对渗透胁迫和盐分胁迫的不同响应[J]. 西南林学院学报, 1998, 18(1): 1–7.
- [5] 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法[J]. 植物生理学通讯, 1990(4): 62–65.
- [6] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [7] HANSON A D, NELSEN C F, EVERSON E H. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought using to contracting barley cultivars [J]. *Crop Sci*, 1977, 17: 720–726.
- [8] 沈国舫, 李吉跃, 武康生. 京西山区主要造林树种抗旱特性的研究[M]//沈国舫. 造林论文集. 北京: 中国林业出版社, 1990: 3–12.
- [9] 李全德, 邹琦, 程炳蒿. 土壤干旱下不同抗旱性小麦品种的渗透调节和渗透调节物质[J]. 植物生理学报, 1992, 18(1): 37–44.
- [10] JONES M M, OSMOND C B, TURNER N C. Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficit [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1980, 7: 193–205.
- [11] 孙国荣, 张睿, 姜丽芬, 等. 干旱胁迫下白桦实生苗叶片的水分代谢与部分渗透调节物质的变化[J]. 植物研究, 2001, 21(3): 413–415.
- [12] HAKIMI A, MONNEVEUX P, GALIBA G. Soluble sugars, proline, and relative water content (RWC) as traits for improving drought tolerance and divergent selection for RWC from *Triticum polonicum* to *T. durum* [J]. *J Genet Breed*, 1995, 49: 237–244.
- [13] KARAMANOS A I, DROSSOPOULOS I B, NIABIS K A. Free proline accumulation during development in the organ of two wheat cultivars subjected to different degree of water stress [J]. *Crop Physiol Abst*, 1985, 11: 428.
- [14] 李波, 贾秀峰, 白庆武, 等. 干旱胁迫对苜蓿脯氨酸累计的影响[J]. 植物研究, 2003, 23(2): 189–191.
- [15] 陈文新. 新疆地区豆科根瘤菌特性的分析(一)[J]. 土壤肥料, 1984(3): 4–7.
- [16] 关桂兰, 郭沛新, 王卫卫, 等. 新疆干旱地区根瘤菌资源研究: 根瘤菌抗逆性及生理生化反应特性[J]. 微生物学报, 1992, 32(5): 346–352.