

# 一氧化氮供体 SNP 对不同苜蓿根瘤菌菌株生长的影响

蔡卓山,尹国丽,师尚礼,周向睿,苏军虎

(甘肃农业大学 草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/甘肃省草业工程实验室/中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃 兰州 730070)

**摘要:**为探寻提高苜蓿-根瘤菌共生固氮能力的途径,以苜蓿中华根瘤菌为材料,用 SNP 为外源 NO 供体,研究不同浓度外源 NO 对根瘤菌生长的影响及不同根瘤菌菌株对外源 NO 的敏感性差异,以期筛选出适宜根瘤菌生长的外源 NO 浓度和可与 NO 配施的根瘤菌菌株。结果表明:SNP 浓度为 0.08 mmol/L 时根瘤菌数量显著高于其他处理,其  $D_{600\text{ nm}}$  值为 0.9680;外源 NO 对于根瘤菌 TA34 的生长有明显的促进作用, $D_{600\text{ nm}}$  值较 CK 提高了 46.01%,而对 WL68 则具有较为显著的抑制性, $D_{600\text{ nm}}$  值较 CK 降低了 71.63%;不同菌种对于 NO 的敏感度不同,根瘤菌 WL68 对外源 NO 最敏感,而根瘤菌 GL28 对外源 NO 不敏感。

**关键词:**根瘤菌;外源 NO;浓度筛选

**中图分类号:** 文献标志码:A 文章编号:1009-5500(2020)01-0063-05

**DOI:** 10.13817/j.cnki.cyycp.2020.01.009

苜蓿 (*Medicago sativa*) 以其适应性强、产草量高、富含蛋白质等特点被称作“牧草之王”,同时还具有改土肥田、保持水土、改善生态环境的作用,是西部地区草地建设和荒漠化改造中首选的豆科牧草<sup>[1]</sup>。提高苜蓿产量最重要的方法之一是给其接种高效根瘤菌,根瘤菌-苜蓿形成的高效共生体系能固定 90~386 kg/hm<sup>2</sup> 的氮,可提供其生长所需 46%~92% 的氮素营养<sup>[2-4]</sup>。研究表明,根瘤菌的固氮效率受根瘤菌基因组和环境因子等多方面因素的影响,其中环境因子是严重影响根瘤菌固氮效率的因素<sup>[5-6]</sup>。师尚礼等<sup>[7]</sup>报道,在干旱半干旱地区,水分因子对根瘤菌结瘤数量造成较大影响,进而影响固氮量。因此,如何改善苜蓿在

干旱半干旱地区水分吸收和提高水分利用效率,以及提高苜蓿抗旱性成为增加根瘤菌-苜蓿共生体系固氮效率的关键问题之一。

一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 是广泛分布于生物体的一种气体类生物活性分子,是植物体重要的生物活性分子之一,植物体内通过酶促和非酶促途径产生 NO<sup>[8-9]</sup>。研究发现,在植物生长组织内会有纤维二糖(植物细胞壁的一种成分)的生成,而 NO 等活性氮类物质能够抑制植物纤维二糖的合成,从而破坏了细胞壁的完整性,促进细菌感染植物组织;同时,适宜的 NO 浓度对于苜蓿不定根、根毛的伸长和生长具有调控作用<sup>[10-13]</sup>。一些研究观察到苜蓿的幼年根瘤中存在 NO<sup>[14-15]</sup>;NO 可能在共生固氮的早期步骤中起关键作用,且 NO 浓度能调控根系上的结瘤数,进而影响固氮量和苜蓿的产量<sup>[16-17]</sup>。因此,在苜蓿生产中如何筛选出适于根瘤菌生长的外源 NO 浓度及对 NO 有较高敏感性的根瘤菌菌株,充分发挥根瘤菌的共生固氮作用,避免氮肥施用的盲目性,是一个亟待解决的科学问题。通过测定不同浓度外源 NO 对根瘤菌生长的影响,筛选出最适于根瘤菌生长的外源 NO 浓度,并分析不同菌株对于外源 NO 敏感

**收稿日期:**2019-05-31; **修回日期:**2019-09-29

**基金项目:**国家现代牧草产业技术体系建设专项(CARA-35);甘肃农业大学盛彤笙科技创新基金(GSAU-STS-1516);甘肃省高等学校科学研究项目(2015B-053)资助

**作者简介:**蔡卓山(1979-),男,甘肃武威市人,博士,从事牧草种质资源和微生物制剂方面的研究。

E-mail:Caizs@gsau.edu.cn

度的差异性,可为苜蓿生产中根瘤菌的应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试材料为 10 个苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*),由甘肃农业大学草业学院提供,其来源地(表 1)。NO 供体亚硝基铁氰化钠(SNP)购自 Sig-

ma 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基配制及根瘤菌活化 配制 YMA 培养基(0.5 g 磷酸二氢钾,1.0 g 酵母粉,20.0 g 甘露醇,0.2 g 硫酸镁,0.1 g 氯化钠)和 YMB 培养基(YMA 培养基再加琼脂 15 g/L),利用划线法将供试菌株分别活化至 YMB 培养基中,放入光照培养箱中,28℃下培养 48 h。

表 1 菌株名称及来源

Table 1 Source of tested rhizobia

编号	菌株名称	菌株来源	编号	菌株名称	菌株来源
1	GA32	甘南(阿尔冈金)	6	DA53	定西(阿尔冈金)
2	GL28	甘南(陇东苜蓿)	7	DL58	定西(陇东苜蓿)
3	GA66	甘南(阿尔冈金)	8	DA99	定西(阿尔冈金)
4	QL31B	庆阳(陇东苜蓿)	9	WA32	武威(阿尔冈金)
5	TA34	天水(阿尔冈金)	10	WL68	武威(陇东苜蓿)

称取一定量的 SNP 用去离子水在无菌条件下配制 100 倍母液(现用现配),吸取一定量 SNP 母液稀释过滤后,加入已高温灭菌冷却后的 YMA 培养基中。

1.2.2 试验设计 挑选在 YMB 培养基上已生长良好的单个菌落接入 YMA 培养液培养后,调整至规定浓度,吸取 1 mL 分别加入添加了 SNP 的 YMA 液体培养基中,放入恒温摇床中,以 180 r/min,28℃下培养 48 h。

试验共设置 5 个处理,SNP 浓度分别为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mmol/L,以不加 SNP 的 YMA 培养基接入根瘤菌作为 CK。

1.2.3 测量菌液 OD 值 将处理好的菌液装入比色皿中,放入分光光度计测量其  $D_{600\text{ nm}}$  值。

### 1.3 数据处理

相对  $D_{600\text{ nm}}$  值 = 初始  $D_{600\text{ nm}}$  值 / CK  $D_{600\text{ nm}}$  值

采用 Microsoft Excel 2013 软件进行数据处理,采用 SPSS 19.0 软件中一般线性模型进行单因素方差分析,进行 Duncan 多重比较分析差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 同浓度外源 NO 对不同根瘤菌生长的影响

在供试 SNP 浓度范围内各菌株生长均不相同。添加外源 NO 能显著促进 TA34 的生长,其相对 OD 值随 SNP 浓度的增加表现出先增加后减小的趋势,在

浓度为 0.08 mmol/L 时达到最大,较 CK 增加了 46.01%;在各浓度下,外源 NO 显著抑制 QL31B,WA32 和 WL68,在 SNP 浓度为 0.02 mmol/L 和 0.04 mmol/L 时  $D_{600\text{ nm}}$  值分别达到最小,较各自 CK 减少了 89.99%,75.62% 和 78.36%。在供试 SNP 浓度范围内,根瘤菌 DL58 的相对  $D_{600\text{ nm}}$  值随 SNP 浓度的升高表现出先升高,后降低,再升高,在 0.01 mmol/L 时达到最大值;WL68,WA32 和 DA99 表现先降低,后升高,再降低,在 0.08 mmol/L 时达到最大值;其余根瘤菌的相对  $D_{600\text{ nm}}$  值均随 SNP 浓度的升高表现出先升高后降低的趋势,除 GL28 在 0.06 mmol/L 时达到最大值,其余均在 0.08 mmol/L 时达到最大值(表 2)。

另外,0.02~0.04 mmol/L SNP 浓度对于除 TA34 外其余 9 个菌株均有抑制性,0.06 mmol/L 浓度下对于 GA32、TA34、DA99 的生长有促进作用,占供试菌株的 30%,0.08 mmol/L 浓度下对于 GA32、GL28、GA66、TA34、DA53、DA99 均有促进作用,占总数的 60%,0.1 mmol/L SNP 浓度下具有促进作用的菌株为 TA34、DL58,占总数的 20%;同时任意浓度 SNP 对菌种 WL68,QL31B,WA32 的扩繁都有抑制作用。

### 2.2 不同外源 NO 浓度下根瘤菌生长的差异性比较

根瘤菌的  $D_{600\text{ nm}}$  均值随着 SNP 浓度的增加表现出先增加后降低的趋势,并在浓度为 0.08 mmol/L 时,根瘤菌的平均相对  $D_{600\text{ nm}}$  达到最大,为 0.968 0,但

表 2 不同 SNP 浓度下根瘤菌的相对 OD 值

Table 2 Relative OD values of rhizobia at different SNP concentrations

菌种	SNP 浓度/(mmol · L <sup>-1</sup> )				
	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
GA32	0.763 9±0.031 6 <sup>bB</sup>	0.705 8±0.036 0 <sup>bB</sup>	0.815 3±0.079 5 <sup>bB</sup>	1.086 8±0.089 8 <sup>aA</sup>	0.865 7±0.053 9 <sup>bB</sup>
QL31B	0.100 1±0.004 0 <sup>gC</sup>	0.137 7±0.014 0 <sup>cC</sup>	0.356 0±0.249 3 <sup>bC</sup>	0.830 1±0.005 1 <sup>dA</sup>	0.619 4±0.020 4 <sup>cAB</sup>
GL28	0.600 2±0.006 3 <sup>cC</sup>	0.912 6±0.068 7 <sup>bB</sup>	1.217 3±0.071 6 <sup>aA</sup>	1.216 1±0.022 4 <sup>bcA</sup>	0.918 4±0.061 2 <sup>bB</sup>
GA66	0.466 3±0.062 4 <sup>dC</sup>	0.5862 ±0.055 3 <sup>cC</sup>	0.857 5±0.036 2 <sup>cdB</sup>	1.285 4±0.012 8 <sup>bA</sup>	0.926 1±0.064 2 <sup>bB</sup>
TA34	1.112 8±0.014 5 <sup>aC</sup>	1.166 1±0.131 0 <sup>aBC</sup>	1.414 7±0.101 3 <sup>aAB</sup>	1.460 1±0.020 4 <sup>aA</sup>	1.083 7±0.078 7 <sup>aC</sup>
DA53	0.678 5±0.008 3 <sup>cC</sup>	0.696 1±0.012 4 <sup>cC</sup>	0.992 8±0.081 6 <sup>bedAB</sup>	1.109 0±0.068 3 <sup>aA</sup>	0.903 4±0.038 2 <sup>bB</sup>
DL58	0.293 2±0.034 2 <sup>efCD</sup>	0.543 0±0.031 9 <sup>bB</sup>	0.242 0±0.055 3 <sup>dD</sup>	0.373 2±0.006 0 <sup>cC</sup>	1.207 6±0.027 5 <sup>aA</sup>
WA32	0.319 0±0.036 7 <sup>efC</sup>	0.243 8±0.041 8 <sup>deC</sup>	0.462 0±0.014 4 <sup>eB</sup>	0.748 3±0.024 2 <sup>dA</sup>	0.666 5±0.022 4 <sup>aA</sup>
DA99	0.360 4±0.014 5 <sup>ed</sup>	0.348 2±0.068 6 <sup>dD</sup>	1.142 7±0.056 7 <sup>abcB</sup>	1.282 9±0.006 3 <sup>bA</sup>	0.885 3±0.027 6 <sup>bC</sup>
WL68	0.259 6±0.012 6 <sup>fA</sup>	0.216 3±0.042 7 <sup>deA</sup>	0.224 9±0.035 5 <sup>eA</sup>	0.398 5±0.105 5 <sup>eA</sup>	0.319 2±0.029 2 <sup>dA</sup>

注:同行不同大写字母表示同一菌种不同 SNP 浓度下 OD 值的差异显著( $P<0.05$ ),同列不同小写字母表示同一 SNP 浓度下不同菌种 OD 值差异显著( $P<0.05$ )

与 CK 无显著差异( $P<0.05$ )。根瘤菌  $D_{600\text{nm}}$  值由高到低顺序为:0.08 mmol/L 处理 $\geq$ 0.1 mmol/L 处理 $\geq$ 0.06 mmol/L 处理 $>$ 0.04 mmol/L 处理 $>$ 0.02 mmol/L 处理。

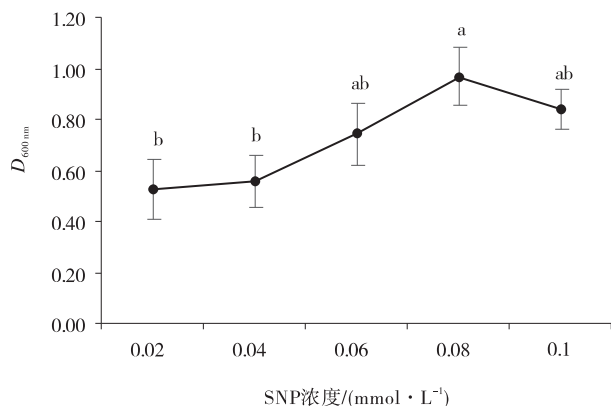


图 1 不同 SNP 浓度下根瘤菌的生长

Fig. 1 Effects of different SNP concentrations on the growth of rhizobia

注:不同小写字母表示浓度间根瘤菌 OD 值差异显著( $P<0.05$ )

### 2.3 外源 NO 对不同根瘤菌菌株生长的影响

添加外源 NO 对不同根瘤菌菌株生长的影响差异较大,其中对菌株 TA34 生长具有显著的促进作用,其  $D_{600\text{nm}}$  值较 CK 增加了 24.76%,同时对 WL68 的生长具有强烈的抑制作用, $D_{600\text{nm}}$  值较 CK 降低了 71.63%,但对于菌种 GL28 的生长基本无影响,除上述 3 种菌种外,外源 NO 对于其余 7 种根瘤菌的扩繁都有不同

程度的抑制作用(图 2)。

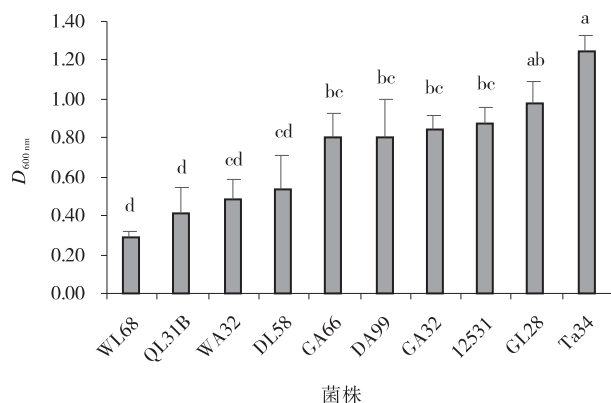


图 2 外源 NO 对不同根瘤菌菌株生长的影响

Fig. 2 Effects of NO treatments on the growth of different rhizobia

注:不同小写字母表示 SNP 处理后根瘤菌菌株的 OD 值差异显著( $P<0.05$ )

## 3 讨论

NO 是一种多功能活性分子,广泛存在于生物体中并且在植物的生长发育和胁迫应答过程中起重要作用<sup>[18-19]</sup>。研究表明,一氧化氮是建立植物-根瘤菌共生体系的必要因素;苜蓿根瘤菌通过 NO 介导几种蛋白质的翻译和修饰来调节植物酶的活性,从而影响植物——根瘤菌共生固氮;适宜的外源 NO 可以提高苜蓿抗旱和抗盐能力,有效缓解紫花苜蓿的胁迫损伤,促进生长发育,并提高其产量。根瘤菌共生紫花苜蓿不

仅可以共生固氮,还能使苜蓿具有更强的渗透调节能力和活性氧防御能力<sup>[20-26]</sup>。在紫花苜蓿接种根瘤菌的同时添加外源 NO,对苜蓿抗旱能力是否具有叠加效应还未可知,而一定浓度 NO 会抑制细菌的生长,这为 NO 和根瘤菌联合提高苜蓿抗旱性研究带来不确定性。因此,明确根瘤菌生长的外源 NO 适宜浓度及不同根瘤菌对 NO 敏感性差异成为开展研究和应用的前提。

研究发现,不同浓度 NO 对不同苜蓿根瘤菌菌株的生长影响不同,表现为随 NO 浓度升高先增加后降低的趋势,在 SNP 浓度为 0.08 mmol/L 时达到最高,可能是由于高浓度 NO 能够调节鞭毛生长和鞭毛装配蛋白表达;随着浓度进一步提高,NO 对根瘤菌产生细胞毒害作用导致根瘤菌生长量下降。

10 个苜蓿根瘤菌菌株对外源 NO 敏感性有差异,其原因可能由于不同菌株利用反硝化和解毒反应的生理过程来消除外源 NO 对其毒害作用的能力不同,以及利用不同浓度的 NO 来调节自身的生理反应存在差异,在实际生产中可根据目标根瘤菌和土著根瘤菌对外源 NO 敏感性差异,提高目标根瘤菌在苜蓿根系的定植率;根据根瘤菌对 NO 敏感性高低可将其大致分为 3 类,即外源 NO 促进生长型、无影响型和抑制生长型。本实验只是初步验证外源 NO 对于根瘤菌生长的影响,其可靠性和可行性有待生产实践的检验。另外,由于试验材料菌种数量的局限性,研究所得出的结论是否适用于所有根瘤菌,也有待进一步验证。

## 4 结论

(1)外源 NO 对根瘤菌可能具有选择性抑制或促进作用,在实际生产应用前应进行预实验进行判别。

(2)不同苜蓿根瘤菌菌株对 NO 敏感性不同,参试菌株多在 SNP 浓度为 0.08mmol/L 时生长量达到最高,因此在实际应用时外源 NO 浓度不宜超过此量。

### 参考文献:

[1] 曹宏,章会玲,盖琼辉. 22 个紫花苜蓿品种的引种试验和生产性能综合评价[J]. 草业学报, 2011, 20(6): 219-229.

[2] 曾昭海,胡跃高. 共生固氮在农牧业上的作用及影响因素研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2006, 14(4): 21-24.

[3] 曾昭海,隋新华,胡跃高. 紫花苜蓿—根瘤菌高效共生体筛选及田间作用效果[J]. 草业学报, 2004, 13(5): 95-

100.

[4] Provorov N A, Saimnazarov U B, Tanriverdiev T A. The contributions of plant and bacteria genotypes in the growth and nitrogen accumulation of inoculated alfalfa [J]. *Plant and Soil*, 1994, 164: 213-219.

[5] 李友国,周俊初,刘墨清. 影响根瘤菌共生固氮效率的主要因素及遗传改造[J]. 微生物学通报. 2002, 29(6): 86-89.

[6] 张庆昕,朱爱民,张玉霞,等. 接种不同根瘤菌对沙地苜蓿结瘤及生长状况的影响[J]. 草原与草坪, 2019, 39(1): 7-15.

[7] 师尚礼. 甘肃寒旱区苜蓿根瘤菌促生能力影响因子分析及高效促生菌株筛选研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.

[8] Chandokm R, Ytterberg A J, Van Wijk K J. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is variant of the protein of the glycine decarboxylase compels [J]. *Cell*, 2003, 113(4): 1380-1384.

[9] Wojtaszek O. Nitric oxide in plants to NO or not to NO [J]. *Photochemistry*, 2000, 54(1): 1-4.

[10] Johnson E G, Sparks J P, Dzikovski B, Crane B R, Gibson D M, Loria R. Plant-pathogenic *Streptomyces* species produce nitric oxide synthase-derived nitric oxide in response to host signals[J]. *Chem Biol*, 2008, 15(1): 43-50.

[11] 鱼小军,徐长林,景媛媛,等. 外源 NO 对 NaCl 胁迫下扁蓿豆种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 草原与草坪, 2014, 34(02): 68-72.

[12] 蔡卓山,师尚礼,曹文侠,等. 水分胁迫下外源 NO 对苜蓿幼苗生长的影响[J]. 草原与草坪, 2014, 34(4): 13-18

[13] 周万海,师尚礼,寇江涛. 盐胁迫下外源 NO 对苜蓿幼苗生长及氮代谢的影响[J]. 应用生态学报, 2012, 23(11): 3003-3008.

[14] Casella S, Leporini C, Nuti M P. Nitrous oxide production by nitrogen-fixing, fast-growing Rhizobia[J]. *Microbial ecology*, 1984, 10(2): 107-114.

[15] Hidalgo-García Alba, Torres María J, Salas Ana, et al. *Rhizobium etli* Produces Nitrous Oxide by Coupling the Assimilatory and Denitrification Pathways[J]. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10(3389): 980-991.

[16] Imène Hichri, Alexandre Boscardi, Claude Castella, et al. Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(10): 2877-2887.

- [17] I sabelle Damiani, Nicolase Pauly, Alaine PUPPO, *et al.* Reactive oxygen species and nitric oxide control early steps of the legume - Rhizobium symbiotic interaction [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(454): 1-8.
- [18] 向华, 南丽丽, 李春晓, 等. 一氧化氮对铅胁迫下杂花苜蓿种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. *草原与草坪*, 2014, 34(2): 77-80+85.
- [9] 陈明, 沈文飏, 阮海华, 等. 一氧化氮对盐胁迫下小麦幼苗根生长和氧化损伤的影响[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(5): 569-576.
- [20] Del Giudice J, Cam Y, Damiani I, *et al.* Nitric oxide is required for an optimal establishment of the medicago *truncatula-sinorhizobium meliloti* symbiosis [J]. *New Phytologist*, 2011, 191(2): 405-417
- [21] Blanquet P, Silva L, Catrice O, *et al.* *Sinorhizobium meliloti* Controls Nitric Oxide-Mediated Post-Translational Modification of a *Medicago truncatula* Nodule Protein [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(12): 1353-1363
- [22] 马其东, 刘自学, 洪绂曾, 等. 不同根系发育能力的苜蓿品种接种根瘤菌的效果[J]. *草业学报*, 1999, 8(4): 21-28.
- [23] 刘建新, 胡浩斌, 王鑫. 外源 NO 对盐胁迫下黑麦草幼苗根生长抑制和氧化损伤的缓解效应[J]. *植物研究*, 2008, 28(1): 7-13.
- [24] 陈润娟, 雷娅伟, 白小明, 等. NO 对低温胁迫下草地早熟禾抗氧化系统的调控[J]. *草原与草坪*, 2017, 37(06): 17-23.
- [25] 蔡卓山, 师尚礼, 谢森林, 等. 外源 NO 对水分胁迫下苜蓿种子萌发的影响[J]. *核农学报*, 2013, 27(11): 1777-1782.
- [26] 冯瑞章, 魏琴. 外源 NO 对 NaCl 胁迫下燕麦幼苗氧化损伤的缓解效应[J]. *草原与草坪*, 2012, 32(6): 7-10+16.

## Effect of nitric oxide donor SNP on the growth of different alfalfa rhizobium strains

CAI Zhuo-shan, YIN Guo-li, SHI Shang-li, ZHOU Xiang-rui, SU Jun-hu

(College of Grassland Science, Gansu Agricultural University/Key Laboratory for Grassland Ecosystem of Ministry of Education/Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province/Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** In order to explore approaches to improve the nitrogen fixation ability of alfalfa rhizobia, the effects of different concentrations of exogenous NO on the growth of rhizobia and the sensitivity of different rhizobia to exogenous NO were studied by using SNP as the donor of exogenous NO to screen out the suitable concentration of exogenous NO for the growth of rhizobia and the rhizobia strains that can be combined with NO. The results showed that when SNP concentration was 0.08 mmol/L, the number of rhizobia was significantly higher than that of other treatments, and its OD value was 0.968 0. Exogenous NO promoted the growth of TA34 significantly, and the OD value increased 46.01% compared with CK, but it inhibited WL68 significantly, and the OD value decreased 71.63% compared with CK. Different strains showed different sensitivities to NO, and WL68 was the most sensitive to exogenous NO, while GL28 was not sensitive.

**Key words:** rhizobia; exogenous NO; concentration screening