

3 种旱生禾草内生固氮菌的分离及促生性能测定

刘小龙¹, 芦 云², 罗 明^{1*}, 吴 昊¹, 王聪聪¹

(1. 新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆教育学院理学院, 新疆 乌鲁木齐 830043)

摘要:以 3 种多年生典型旱生禾草新农一号狗牙根(*Cynodon dactylon* ‘Xinnong No. 1’)、沙生冰草(*Agropyron desertorum*)、偃麦草(*Elytrigia repens*)为材料,从根、叶组织中分离内生固氮菌株,测定其固氮酶活性、溶磷性及分泌生长素的能力,为禾草多功能促生菌剂的菌种筛选奠定基础。结果表明:通过无氮培养基分离结合乙炔还原法,获得了 58 个内生固氮菌株,其固氮酶活性在 464~2338 nmol C₂H₄ · d⁻¹ · mL⁻¹之间;分离自不同种类禾草的菌株固氮酶活性差异明显,沙生冰草分离菌株固氮酶活性普遍高于从偃麦草和狗牙根中分离的菌株。采用溶磷圈法结合等离子体原子发射光谱法,筛选出 17 个具有溶解无机磷的能力菌株,溶磷量为 49.93~225.48 mg · L⁻¹。24 个菌株具有分泌植物生长素 IAA 的特性,IAA 产生量在 0.61~18.54 μg · mL⁻¹。3 种旱生禾草内生固氮菌中有 32 株兼具 2 种或 3 种促生性能,占测定菌株的 55.2%,其中菌株 XGEB4, XGEB26, XGEB30, XGEB64 和 XGEB65 促生性能较强,具有开发应用的潜力。

关键词:禾草;内生固氮菌;促生潜能;固氮酶活性

中图分类号:S154.381

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2012)04-0759-09

Isolating Endophytic Diazotrophic Bacteria from Three Xerophil Gramineae Grasses to Determine Their Nitrogen Fixation and Plant Growth-Promoting

LIU Xiao-long¹, LU Yun², LUO Ming^{1*}, WU Hao¹, WANG Cong-cong¹

(1. Agronomy College, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China;

2. Science School, Xinjiang Education Institute, Urumqi, Xinjiang 830043, China)

Abstract: Endophytic diazotrophic bacteria may contribute to the nitrogen nutrition and stress tolerance of host plants. In this paper, endophytic diazotrophs were isolated from the leaf and root tissues of three typical xerophil gramineae grasses, *Cynodon dactylon* ‘Xinnong No. 1’, *Agropyron desertorum* (Fisch.) Schult., *Elytrigia repens* (L.) Nevski, and the characteristics of nitrogenase activity, phosphate-solubilizing power and auxin (IAA) producing were investigated to screen strains for developing plant growth-promoting inocula. Results indicated that fifty eight isolates had been obtained using N-free medium and acetylene reduction assays (ARA). Nitrogenase activities differed significantly from different strains, ranging from 464 to 2338 nmol C₂H₄ · d⁻¹ · mL⁻¹. Nitrogenase from the strains of *A. desertorum* had higher activity than that from *C. dactylon* and *E. repens*. Seventeen strains out of all isolated strains showed inorganic phosphate solubilizing capacity varying from 49.93 mg · L⁻¹ to 225.48 mg · L⁻¹ based on the measurement of phosphate-solubilizing circle and plasma atomic emission spectrometry. Twenty-four strains had an ability to produce auxin IAA with levels of 0.61~18.54 μg · mL⁻¹ detected. Thirty-two strains (55.2% of total tested strains), have beneficial effects on plant growth including nitrogen fixation, solubilizing phosphate and indole acetic acid production. XGEB4, XGEB26, XGEB30, XGEB64 and XGEB65 have greater potential as bio-fertilizer inocula.

Key words: Gramineae grass; Endophytic diazotrophic bacteria; Potential for plant growth-promoting; Nitrogenase activity

收稿日期:2012-02-12;修回日期:2012-04-11

基金项目:国家自然科学基金(31060089);新疆草地资源与生态自治区重点实验室开放项目(XJDX0209-2008-05)资助

作者简介:刘小龙(1986-),男,山西临汾人,硕士研究生,研究方向为植物内生菌多样性,E-mail: longxingtianxia20050@126.com; * 通信作者 Author for correspondence, E-mail: luomingxjau@yahoo.com.cn

禾本科草作为牧草和草坪草的主要种类,大多具有耐干旱、耐盐碱、抗寒冷、耐践踏,适口性好,适于放牧和多次刈割等优良特性,而且根系强大,保蓄水土效果好,在人工草地建设、天然草地修复、城市绿化和生态环境保护中具有重要的作用^[1]。氮素是禾草生长最重要的营养元素,对维持禾草正常生长起着重要的作用。氮素营养严重失衡亏缺,直接影响草地的颜色、密度、绿期、抗病能力等,造成草地的生产力下降。生物固氮是草地生态系统输入氮素的重要部分,在维持草地氮素平衡和在解决氮素来源问题上有巨大的潜力,是发展草地生产力的长久之计^[2-3]。1987 年, Döbereiner 实验室证实了甘蔗 (*Saccharum*) 所需氮素营养的 60% 以上是来自生物固氮作用,并从甘蔗的根、茎和叶中分离得到固氮醋酸杆菌 (*Acetobacter diazotrophicus*)^[4]。1986 年 Barbara 从巴基斯坦的卡拉草 (*Leptochloa fusca*) 内分离到了固氮弧菌 (*Azoarcus* sp.)^[5]。这些研究揭示了在禾本科植物中存在着一类由定殖于宿主组织和器官内的内生固氮菌进行的、不同于经典固氮形式的高效固氮体系—内生固氮体系。植物内生固氮菌的发现为禾本科植物实现生物固氮开辟了一条新的途径。之后,国外的研究者先后对不同地域的水稻 (*Oryza sativa*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、燕麦 (*Avena sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、高粱 (*Sorghum bicolor*) 及芒草 (*Miscanthus* spp.)、象草 (*Pennisetum purpureum*)、欧洲海滨草 (*Ammophila arenaria*)、糖蜜草 (*Melinism inutiflora*) 等禾本科植物中的内生固氮菌展开了研究^[6-8]。研究证明,内生固氮菌避免了化合态氮的抑制及土著微生物的竞争,其固氮产物直接供给植物吸收,更有利于固氮效能充分发挥,表现出更高的固氮效率^[9]。内生固氮菌还具有分泌生长激素、促进宿主对难溶性磷酸盐的分解等多种有益作用,在促进宿主的营养吸收及竞争力、增强抗病抗逆性和提高对环境适应能力等方面显示出良好的应用前景,是潜能巨大、尚待开发的微生物资源^[10-11]。

本研究以 3 种典型旱生禾草新农一号狗牙根 (*Cynodon dactylon* ‘Xinnong No. 1’)、沙生冰草 (*Agropyron desertorum*)、偃麦草 (*Elytrigia repens*) 为材料,分离组织中的内生固氮菌,测定其固氮酶活性、溶磷性及分泌植物生长激素性能,从中筛选出固氮性能稳定、具有促生作用的功能菌株,为创制和应用禾草固氮促生菌剂,促进禾草生长,加速退化草地的治理修复,提高草地生产力提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 分离材料

狗牙根为新疆农业大学草业工程学院选育的草坪牧草兼用型新农一号狗牙根;偃麦草引种于阿勒泰地区;沙生冰草种子由内蒙古农业大学生态环境学院惠赠,均种植于新疆农业大学试验场。

1.2 培养基及缓冲液

营养琼脂培养基 (NA)^[12]。

CCM 培养基^[13]: 溶液 I: KH_2PO_4 0.2 g, NaCl 0.1 g, K_2HPO_4 0.8 g, Na_2FeEDTA 28 mg, 钼酸钠 25 mg, 酵母浸膏 100 mg, 甘露醇 5.0 g, 蔗糖 5.0 g, 乳酸钠 0.5 mL, 蒸馏水 900 mL。溶液 II: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.06 g, 蒸馏水 100 mL。溶液 I 和 II 分别灭菌,冷却至 50℃ 左右混合后,再加入生物素 (VH) ($5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和维生素 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 mL。

Ashby 无氮培养基^[14]: 甘露醇 10.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 0.2 g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CaCO_3 5.0 g, 蒸馏水 1000 mL。

Nfb 无氮培养基^[15]: 苹果酸 5.0 g, KOH 4.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, NaCl 0.1 g, 溴百里酚蓝 2 mL, EDTA 4 mL, 维生素 1 mL (VB_6 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 生物素 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 微量元素 2 mL (CuSO_4 0.4 g, ZnSO_4 0.12 g, H_2BO_3 1.4 g, 钼酸钠 1 g, MnSO_4 1.5 g, 蒸馏水 1000 mL), 蒸馏水 1000 mL。

Pikovaskaia's (PKO) 无机磷培养基^[16]: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 4.0 g, 蔗糖 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, KCl 0.2 g, 酵母粉 0.5 g, MnSO_4 1 mL ($0.004 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), FeSO_4 (FeEDTA) 0.1 mL ($0.002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0。

蒙金娜有机磷培养基^[16]: 葡萄糖 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, FeSO_4 0.03 g, MnSO_4 0.03 g, 卵磷脂 0.2 g, CaCO_3 5.0 g, 酵母粉 0.4 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0。

磷酸缓冲液 (PBS): pH 7.0。

1.3 内生细菌的分离、纯化

将所采集新鲜禾草的根、叶各 1 g 用流水冲洗 1 h, 70% 酒精浸泡 30~60 s, 1%~2% NaClO 分别处理叶、根 1~10 min 进行表面灭菌, 无菌水冲洗

4次,取最后一次冲洗液涂抹 NA 平板以检测待分离材料表面灭菌是否彻底,确定适宜的表面灭菌时间。取经检验表面灭菌彻底的禾草根、叶材料放入于无菌研钵中,加灭菌的 PBS 缓冲液研磨。取稀释液涂布在 CCM 培养基平板。26~28℃培养,3~5 d后,挑取不同形态的菌落平板划线纯化,镜检,斜面保存。将分离得到的细菌反复接种于 Ashby 和 Nfb 无氮培养基上,确定能正常生长的菌株为备选菌株,待测其固氮酶活性。

1.4 固氮酶活性测定

采用乙炔还原法(acetylene reduction assay, ARA),主要参考李倍金等^[13]的方法,并对一些重要参数进行试验修正。将待测菌株接种于含 10 mL Nfb 半固体培养基的 25 mL 血清瓶中,30℃培养 2 d后,将棉塞换成胶塞密封,抽出 1.5 mL 气体后加入 1.5 mL C₂H₂(终浓度为 1%),培养 4 d。从瓶中抽取混合气体 0.2 mL 注入岛津 GC28A 气相色谱仪中测定 C₂H₂ 和 C₂H₄ 的产生情况,以不接种菌注有 C₂H₂ 的血清瓶为对照。色谱参数为:不锈钢层析柱 2 mm×1000 mm,柱温为 150℃,氢离子火焰检测器,温度为 20℃,载气为 N₂,气体体积流量为 30 mL·min⁻¹。利用气相色谱测定反应系统中生成的乙烯量换算成乙炔还原活性,以 ARA (nmol C₂H₄·d⁻¹·mL⁻¹)表示固氮酶活性。固氮酶活性大小用下列公式计算:

$$ARA(\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}) = (58.0 \times S_e \times T \times P_e) / (S_b \times T_e \times P \times t \times V)$$

式中, S_e :乙烯峰面积; T :开氏绝对温度($T=273.13 \text{ K}$); P_e :试验条件下的大气压强(Pa); S_b :乙炔峰面积; T_e :试验条件下的温度(K); P :绝对大气压强($P=101324.72 \text{ Pa}$); t :培养时间(d); V :体积(mL)。

1.5 溶磷性能测定

1.5.1 溶磷的定性测定 采用溶磷圈法测定。将供试菌株活化后分别接种于 Pikovaskaia's 无机磷培养基和蒙金娜有机磷培养基平板上,28℃下培养 7 d,观察接种菌株周围有无透明溶磷圈形成。测定溶磷圈直径,计算 D/d 值(其中 D 为溶磷圈直径,d 为菌落直径),初步确定菌株的溶磷能力。每一菌株 4 次重复。

1.5.2 溶磷强度测定 采用等离子体原子发射光谱法测定溶磷强度,光谱仪为美国 PE OPTIMA

4300DV 等离子体发射光谱仪。以初筛出的溶磷菌株制备菌悬液(浓度为 $1 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)。取 5 mL 菌悬液接种于 50 mL 液体培养基中,每一菌株 5 个重复,28℃下 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 10 d,4℃下 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液测定有效磷含量。对照除不接种菌株外均与处理相同。

1.6 分泌生长素 IAA 的测定

1.6.1 分泌生长素吲哚乙酸(IAA)的定性测定 取在含有 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 色氨酸的 CCM 液体培养基上培养的菌株悬浮液 1 滴,同时滴加 1 滴比色液。对照仅在比色液中加 1 滴 $50 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IAA,置于室温下 15 min 后观察颜色的变化,颜色变为粉红色者为阳性,不变色为阴性,以确定菌株是否产生 IAA。

1.6.2 分泌生长素 IAA 的定量测定 采用 Salkowski 比色法。将初筛产 IAA 阳性菌株培养液 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 1 mL 加比色液于 40℃温箱黑暗显色 0.5 h,取出后立即测定 $OD_{530 \text{ nm}}$ 。

$$\text{IAA 含量}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = (A \times V_1) / (V \times V_2)$$

式中: A :标准曲线上查得的 IAA 量(μg); V_1 :样品提取液体积(mL); V :样品体积(mL); V_2 :样品反应液体积(mL)。

1.7 数据统计分析

采用 Excel 2007 和 DPS 7.05 软件对试验数据进行处理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 3种禾草内生细菌的分离

采用 CCM 培养基从狗牙根、沙生冰草和偃麦草的根、叶组织中分离得到 70 株内生细菌菌株,确定能同时在 Ashby 和 Nfb 培养基上生长的菌株有 58 株,选择其中生长良好的菌株作为内生固氮菌的备选菌,测定其固氮酶活性。

2.2 禾草内生固氮菌的固氮酶活性

分离菌株固氮酶活性的测定结果如表 1 所示。各菌株的固氮酶活性在 $464 \sim 2338 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间。根据 ARA 的大小,将禾草内生固氮菌的固氮活性划分为 3 类:固氮活性弱($ARA \leq 600 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)的菌株有 20 个,占

总数的 34.5%。其中 14 个菌株分离自狗牙根,6 个分离自偃麦草;固氮活性中等($AR = 600 \sim 1500 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)的菌株有 30 个,占总数的 51.7%。其中 12 个分离自沙生冰草,13 个分离自狗牙根,5 个分离自偃麦草;固氮活性强($ARA \geq 1500 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)的菌株有 8 个,占总数的 13.8%,此类菌株均分离自沙生冰草,其中 XGEB83 菌株的固氮酶活性最高,达到了 $2338 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果说明分离自不同种类禾草的内生固氮菌固氮酶活性存在明显差异,分离自沙生冰草菌株的固氮酶活性普遍高于从偃麦草和狗牙根中分离的菌株。

测定结果还显示,狗牙根、沙生冰草和偃麦草的根及叶片内均有内生固氮菌的分布,分离自同一植株不同组织中的菌株数量相差不大,但其固氮酶活性的大小有一定差异。从狗牙根和偃麦草根中分离的固氮酶活性为中等的菌株数多于叶片分离菌株,而沙生冰草根和叶中分离菌株在固氮酶活性上则无明显差别。

2.3 禾草内生固氮菌的溶磷能力

对分离禾草内生固氮菌株的无机磷溶解和有机磷溶解性能分别进行了定性和定量测定。在 PKO 无机磷培养基上有 17 株产生溶磷圈,D/d 值为 $1.25 \sim 2.40$,占测定总菌数的 29.3%;溶磷量在 $49.93 \sim 225.48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,其中溶磷量大于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菌株有 14 株,菌株间溶磷量差异极显著($P < 0.01$)(表 2)。在蒙金娜培养基上有 14 株菌产生溶磷圈,D/d 值为 $1.67 \sim 3.25$,表明菌株能产生降解卵磷脂的酶类,占测定总菌数的 24.1%;对其溶磷强度进行定量测定,除 XGEB81 和 XGEB82 溶磷量在 0.12 和 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 外,其余菌株均为负值(表 3)。这可能是菌体将有机磷分解释放的磷吸收同化或储藏于自身细胞内,因而使培养液中的有效磷增量为负值。

2.4 禾草内生固氮菌分泌生长素特性

对分离内生固氮菌株进行分泌植物生长素(IAA)的测定结果表明(表 4),有 24 株菌株具有分泌 IAA 的特性,占测定菌株数的 41.4%。不同菌株分泌生长素能力存在较大差异,IAA 产生量在 $0.61 \sim 18.54 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,最高为 XGEB26 号菌株,可达 $18.54 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 禾草内生固氮菌的多种促生性能

如表 5 所示,从固氮酶活性菌株溶磷性、分泌植物生长素特性的测定结果看,分离获得的旱生禾草内生固氮菌株中有 32 个兼具 2 种或 3 种促生性能,占测定菌株的 55.2%;在 18 个兼具 3 种促生性能菌株中,XGEB4,XGEB26,XGEB30,XGEB64 和 XGEB65 菌株促生性能较强,具有作为禾草多功能促生菌剂的开发应用潜力。

不同禾草种类中分离的具有促生性能的内生固氮菌株在数量上也存在一定差异(图 1)。如筛选获得的同时具备固氮、溶磷、产生生长素 3 种促生性能的内生固氮菌株中,分离自沙生冰草的有 10 株,占全部菌株数的 50%,狗牙根和偃麦草中分别有 5 株和 3 株,占全部菌株的 11.9%和 13.6%。

3 讨论与结论

3.1 禾草内生固氮菌的固氮活性

本试验从狗牙根、偃麦草、沙生冰草的根和叶片组织中分离获得 58 个内生固氮菌株,其固氮酶活性在 $464 \sim 2338 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间。其中从沙生冰草根、叶中分别获得了固氮活性 2338 和 $2035 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌株,说明沙生冰草根、叶组织均存在高固氮酶活性菌株,普遍高于从偃麦草和狗牙根中分离的菌株。傅晓方等^[17]从玉米(郑单 958)叶片中分离到 2 株固氮酶活性分别为 591.9 和 $344.6 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内生固氮菌株。Dalton 等^[18]从沙丘草(*Ammophila arenaria*)中分离的内生固氮菌株的最高酶活为 $20.6 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。李倍金等^[13]从不同品种的高羊茅(*Festuca arundinacea*)中分离的内生固氮菌酶活范围在 $8 \sim 2865 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间。研究结果表明,植物种类、品种(基因型)会对内生固氮菌固氮酶活性产生影响。此外,植物组织、生育期、生长年限及其生长地域环境等多种因素都可能是影响固氮酶活性变化的因素。固氮酶活性只表明了固氮菌潜在的固氮能力,内生固氮菌的侵入、定殖与固氮效能的稳定发挥均受到多种环境条件的影响^[19]。接种具有固氮活性的菌株在田间的实际效果与固氮酶活性并不直接相关,还和菌株的竞争及适应能力有很大的关系^[20]。因此,进一步的回接试验对筛选出与本地环境相适应的高效固氮优良菌株具有重要意义。

表 4 禾草内生固氮菌分泌生长素 IAA 性能测定

Table 4 IAA-producing activity of isolated endophytic diazotrophic bacteria

菌株	IAA 产生量	菌株	IAA 产生量	菌株	IAA 产生量
Strains	IAA-producing/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Strain	IAA-producing/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Strains	IAA-producing/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
XGEB26	18.54 ^{Aa}	XGEB63	5.69 ^{Gg}	XGEB90	1.80 ^{Kl}
XGEB78	9.38 ^{Bb}	XGEB77	5.22 ^{Hh}	XGEB76	1.72 ^{Kl}
XGEB30	8.36 ^{Cc}	XGEB32	3.66 ^{Ii}	XGEB79	1.28 ^{Lm}
XGEB64	6.98 ^{Dd}	XGEB83	3.66 ^{Ii}	XGEB84	1.26 ^{Lm}
XGEB65	6.81 ^{Dde}	XGEB74	3.04 ^{Jj}	XGEB75	1.15 ^{Lmn}
XGEB4	6.60 ^{DEe}	XGEB82	2.60 ^{Jk}	XGEB85	1.15 ^{Lmn}
XGEB92	6.20 ^{EFf}	XGEB7	1.84 ^{Kl}	XGEB81	0.87 ^{LMno}
XGEB11	6.17 ^{Ff}	XGEB89	1.82 ^{Kl}	XGEB73	0.61 ^{Mo}

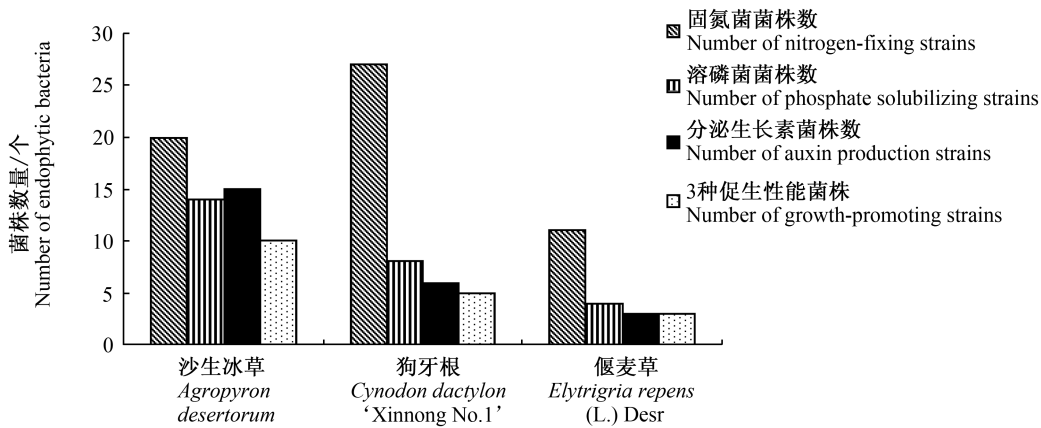


图 1 3 种禾草中分离的促生菌株数量

Fig. 1 Numbers of endophytic diazotrophic bacteria with plant-growth-promoting

3.2 禾草内生固氮菌的溶磷及产生生长素的性能

内生菌能产生植物生长激素类物质,对宿主植物的生长起促进作用。Ramesh 等^[21]研究发现兰科药用植物内生菌能产生赤霉素、吲哚乙酸、脱落酸、玉米素和玉米素核苷 5 种生长激素。沈德龙等^[22]证明水稻内生成团泛菌 YS1 能分泌生长素(IAA)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA4)和细胞分裂素(CTK),它们共同调节水稻生理代谢,能影响水稻乳熟期光合产物的分布。本试验结果显示,从狗牙根、偃麦草、沙生冰草中分离的内生固氮菌中不少菌株可分泌产生 IAA,菌株比例达到了 32.97%。但除生长素(IAA)外,菌株是否也能产生其他生长激素,还有待进一步检测。

有研究证明,植物内生菌具有溶磷作用,能促进宿主对有机磷的降解和难溶性磷酸盐的分解吸收,对改善植物磷素营养起一定作用^[6]。黄静等^[23]从玉米、油菜(*Brassica chinensis*)中分离筛选到具稳定溶磷能力的内生细菌菌株,释放有效磷浓度最高达到 537.6 mg · L⁻¹。张国霞等^[24]测定了陵水普通野生稻(*Oryza rufipogon*)内生菌对无机磷酸盐

的溶磷特性,溶磷量最高的菌株为(12.7 ± 0.04) μg · mL⁻¹,接种水稻后能促进其根、茎生长。本研究从狗牙根、偃麦草、沙生冰草内生固氮菌中筛选出的无机磷溶解菌 17 株,溶磷量在 49.93 ~ 225.48 mg · L⁻¹之间,具有较高的溶磷能力。试验中还检测出 14 株菌在有机磷培养基平板上出现明显的溶磷圈,但定量测定时除 2 株菌能产生微量有效磷外,其余菌株的有效磷增量均为负值。这可能是由于菌株在分解有机磷过程中,其矿化产生的有效磷被菌体细胞自身吸收同化或者以磷酸盐状态贮藏在细胞内,因而使得培养基质中的有效磷增量出现负值,赵小蓉等^[25]研究结果也证实了此现象。目前关于土壤溶磷菌、菌根真菌的溶磷机制有不少研究,其解磷机制因菌株不同而不同,而关于植物内生菌解磷机制的研究还很少,有待进一步去研究探讨。

3.3 禾草内生固氮菌的抗逆促生功能

研究发现,内生菌可以提高宿主应对外界环境的应激耐受性,包括抗旱、耐盐碱、耐重金属和有机物污染、抗病虫害等,能明显增加宿主在逆境中的生

存能力^[26]。Bin Ye等^[27]在芒草(*M. sinensis*)上同时接种内生固氮菌 *Clostridium* sp. kas201-1 和 *Enterobacter* sp. b901 菌株,明显增强了该草的抗盐能力。殷水宁等^[28]的试验发现,在水分胁迫条件下,利用从骆驼刺(*Alhagi camelorum*)组织中分离获得的内生细菌 YSN27 处理异缘植物小麦,能够显著提高其茎叶和根的干鲜重。关于内生菌增强宿主抗逆性的机制一些学者从不同角度进行了研究和报道,但目前尚不明确。

狗牙根、偃麦草、沙生冰草是抗旱、抗寒、耐盐碱能力较强的多年生禾草,本研究从其根、叶组织内分离出内生固氮菌,其中不仅具有高固氮活性、还具有溶磷、分泌生长素性能的菌株,有的菌株具备1或2种性能,有的为3种兼备,具有丰富的功能多样性。这些功能是否与内生菌与宿主在长期共同进化中形成了互利共生关系,促进了宿主生长和增强了抗逆性直接相关还有待深入探讨。此外,内生固氮菌与寄主植物之间建立起“和谐联合关系”是发挥其有益的生物学和生态学功能的关键。本试验获得的具备固氮、溶磷、产生生长素性能的内生固氮菌株,在回接禾草后其定殖传导性如何?能否充分发挥固氮促生效能等还有待通过生物测定试验证实。

参考文献

- [1] 焦树英,韩国栋.若干禾本科牧草在荒漠草原区的适应性及其生产性能和营养价值评价[J]. 草地学报,2007,15(4):327-334
- [2] 郑红丽,乌兰巴特尔,张巧莲,等.内蒙古锡林郭勒天然草地非共生固氮细菌的分布和数量动态[J]. 草地学报,2009,19(4):540-542
- [3] Reis V M, Dos F B, Quesada D M, *et al.* Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses[J]. Australian Journal of Plant Physiology,2001,28(9):837-844
- [4] Robert M B, Segundo U, Bruno J R A, *et al.* Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: Present knowledge and future applications[J]. Plant and Soil,2003,252(1):139-149
- [5] Triplett E W, Elkan G H, Upchurch R G. Diazotrophic endophytes: Progress and prospects for nitrogen fixation in monocots[J]. Plant and Soil,1996,186(1/2):29-38
- [6] Claudine F, Kristina L, Claudine E. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plant [J]. Plant and Soil,2009,321(1/2):35-59
- [7] Robert P R, Kieran G, Ashley F, *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. FEMS Microbiol Letters,2008,278(1):1-9
- [8] 王华荣,彭桂香,谭志远,等. 糖蜜草 (*Melinis minutiflora* Beauv.) 内生固氮菌分离鉴定[J]. 生态学报,2006,26(8):2566-2571
- [9] Nisarar T, Yusuke H, Shotaro A, *et al.* Two seasons' study on nifH gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): Expression of nifH genes similar to those of rhizobia[J]. Plant and Soil, 2011,338(1/2):435-449
- [10] Prabhat J, Ashok K. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant[J]. Microbial Ecology,2009,58(1):179-188
- [11] Ma Y, Mani R, Luo Y M, *et al.* Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants-effects on plant growth and Ni uptake[J]. Journal of Hazardous Materials,2011,195(15):230-237
- [12] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京:农业出版社,1999:54
- [13] 李倍金,罗明,周俊,等. 几种禾草内生固氮菌的分离及固氮活性测定[J]. 草业学报,2008,17(5):37-42
- [14] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京:高等教育出版社,2009:365-374
- [15] 彭桂香,王华荣,张国霞. 糖蜜草内生固氮菌 IS-PCR 和 16S rRNA 基因全序列分析[J]. 华南农业大学学报,2005,26(4):73-76
- [16] 韩玉竹,赵建军,曾兵,等. 多花黑麦草根际解磷菌的分离及解磷能力测定[J]. 草地学报,2011,19(5):766-770
- [17] 傅晓方,韩红江,郝勇锋,等. 玉米内生固氮菌的分离鉴定及对小麦幼苗的促生效应[J]. 西北农业学报,2012,21(1):66-71
- [18] Dalton D A, Kramer S, Azios N, *et al.* Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49 (3):469-479
- [19] 季华,潘存德,周俊,等. 荒漠灌木内生固氮菌对环境因子的适应性研究[J]. 中国沙漠,2011,31(4):942-947
- [20] 孙建光,张燕春,徐晶,等. 高效固氮芽孢杆菌筛选及其生物学特性[J]. 中国农业科学,2009,42(6):2043-2051
- [21] Ramesh R, Joshi A A, Ghanekar M P. Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2009,25(1):47-55
- [22] 沈德龙,冯永君,宁未. 内生成泛菌 YS19 对水稻乳熟期光合产物在旗叶、穗分配中的影响[J]. 自然科学进展,2002,12(18):863-865
- [23] 黄静,盛下放,何琳燕. 具溶磷能力的植物内生促生细菌的分离筛选及其生物多样性[J]. 微生物学报,2010,50(6):710-716
- [24] 张国霞,茅庆,何忠义,等. 陵水普通野生稻 (*Oryza rufipogon*) 内生菌的固氮及溶磷特性[J]. 应用与环境生物学报,2006,12(4):457-460
- [25] 赵小蓉,林启美. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物通报,2001,28(1):1-4
- [26] Rodriguez R J, Henson J, Van V E, *et al.* Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis[J]. International Society of Microbial Ecology,2008,2(4):404-416
- [27] Bin Y, Asami S, Kiwamu M. Effect of inoculation with anaerobic nitrogen-fixing consortium on salt tolerance of *Miscanthus sinensis* [J]. Soil Science and Plant Nutrition,2005,51(2):243-249
- [28] 殷水宁,孙广宇. 内生细菌 YSN-7 提高小麦耐旱性研究[J]. 西北农业学报,2007,16(5):282-284