



固氮菌株 XD20 对不同甘蔗品种的促生效应

毛莲英¹, 黄 婵¹, 祝 开¹, 杨丽涛^{1,2}, 李杨瑞^{1,2}, 邢永秀^{1*}

(1 广西大学 农学院/亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004; 2 广西农业科学院/中国农业科学院甘蔗研究中心/农业部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室, 南宁 530007)

摘 要: 菌株 XD20 是从甘蔗根内分离获得的一株具有固氮活性的内生菌株。该试验对其进行 16S rDNA 鉴定和 *nifH* 基因扩增, 并对其固氮、溶磷、产嗜铁素、产吲哚乙酸 (IAA) 等促生特性进行分析, 然后接种于甘蔗, 研究其对甘蔗的促生效应。结果表明: (1) 16S rDNA 序列的分析鉴定显示, 该菌株属于成团泛菌。 (2) *nifH* 基因通用引物 polyF/polyR 扩增得到一条大小为 360 bp 左右的基因序列, 该菌的固氮酶活性约为 $3\,187.8\text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。 (3) 菌株 XD20 具有产生 IAA 的能力, IAA 浓度可达 $36.71\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 同时具有溶解有机磷和产生嗜铁素的能力。 (4) 接种 XD20 到不同甘蔗品种 B8、ROC22 和 GT40 的组培苗, 接菌处理不同程度地提高 3 个品种甘蔗的株高、生物量以及叶片的叶绿素含量、硝酸还原酶活性、谷氨酰胺合成酶活性以及硝态氮的含量, 并对品种 B8 的促生作用效果最为显著。

关键词: 甘蔗; 内生固氮菌; 促生特性; 促生作用

中图分类号: Q933-331; Q939.11⁺3 **文献标志码:** A

Effect of Nitrogen-Fixing Strain XD20 on the Growth of Different Sugarcane Varieties

MAO Lianying¹, HUANG Chan¹, ZHU Kai¹, YANG Litao^{1,2}, LI Yangrui^{1,2}, XING Yongxiu^{1*}

(1 College of Agriculture, Guangxi University/State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-biore-sources, Nanning 530004, China; 2 Sugarcane Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Ministry of Agriculture Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement (Guangxi), Nanning 530007, China)

Abstract: Strain XD20 was an endophytic strain with nitrogen fixation activity isolated from sugarcane roots. In this experiment, 16S rDNA identification and *nifH* gene amplification were carried out, and its growth promoting characteristics, such as nitrogen fixation, phosphorus dissolving, ferritin production and indole-acetic acid (IAA) were analyzed. Meanwhile, the growth promoting effects on sugarcane after inoculating were also studied. The results showed that: (1) strain XD20 was identified as *Pantoea agglomerans* by 16S rDNA gene sequence. (2) About 360 bp was amplified by universal primer polyF/polyR of *nifH* gene, and the nitrogenase activity of the strain XD20 was $3\,187.8\text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ by using acetylene reductase method. (3) Strain XD20 had an ability to produce IAA, which the concentration of IAA reached $36.71\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and also can dissolve organophosphorus and produce ferritin. (4) Inoculating the strain XD20 to different varieties of sugarcane (B8, ROC22 and GT40), increased the plant height,

收稿日期: 2018-09-14; 修改稿收到日期: 2018-12-16

基金项目: 国家自然科学基金 (31560352, 31471449); 广西八桂学者和特聘专家专项基金 ([2013]3 号); 国家现代农业产业技术体系广西甘蔗创新团队建设项目 (gjnytxgxcxt-d-03-01); 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD17195100)

作者简介: 毛莲英 (1993—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事甘蔗生理与分子生物学研究。E-mail: 593917997@qq.com

* 通信作者: 邢永秀, 副教授, 主要从事甘蔗生理及分子生物学研究。E-mail: document126@126.com

plant biomass, chlorophyll content in leaves, nitrate reductase activity, glutamine synthase activity and nitrate nitrogen content of three sugarcane cultivars at varying degrees, and the promoting effect of B8 was the most significant.

Key words: sugarcane; endogenous nitrogen-fixing bacteria; promoting growth characterization; growth promoting effect

甘蔗是世界主要的糖料和能源作物,在世界范围内种植国家超过了 120 个^[1]。中国作为甘蔗种植大国,种植面积和产糖量高居世界第 3 位。以蔗糖业为主要支柱产业的广西,甘蔗种植面积和产糖量占全国的 60% 以上^[2]。然而,由于中国甘蔗种植面积大,每年甘蔗的种植需要施用大量的氮肥,这不仅提高了甘蔗的种植成本,而且过量的肥料容易对地下水造成污染,严重影响生态系统的平衡^[3]。巴西是生物固氮技术应用最为成功的一个国家,氮肥用量仅仅是中国的 1/8~1/10,部分品种的甘蔗通过生物固氮就能提供生长周期所需氮量的 30%~70%^[4]。因此,为了降低中国甘蔗种植的成本和解决大量施用氮肥污染环境的问题,生物固氮的应用显得尤为重要。

1961 年,Dobereiner 在甘蔗根际分离发现固氮菌 *Beijerinckia* sp.^[5],随后在甘蔗的根、茎、叶片都分离出了相应的固氮菌,并首次提出了内生固氮菌这个概念,内生固氮菌的相关研究受到了广泛的关注。目前,在甘蔗体内分离到的内生固氮菌主要有醋酸固氮菌(*Aceotbaceter diazotrophicus*)、固氮螺菌(*Azospirillum lipoferum*)、伯克氏菌属(*Burkholderia* spp)、草螺菌属(*Herbaspirillum* spp.)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella* spp.)^[6-7]等。大量研究表明,内生固氮菌除了有固氮作用之外,还能分泌包括吲哚乙酸(IAA)、赤霉素和脱落酸等植物生长调节物质,促进植物生长,同时也能防治一些植物细菌病^[8]。Fuentes-Ramirez 等^[9]发现 18 株分离自墨西哥不同地块的 *A. diazotrophicus* 和巴西的模式菌株,在色氨酸的液体培养条件下均能产生 IAA。Bastian 等^[10]发现 *A. diazotrophicus* 和 *H. seropedicae* 能在给定的培养条件下产生 IAA 和赤霉素 GA₁、GA₃ 组分。杨海莲等^[11]发现阴沟肠杆菌对水稻稻瘟病、纹枯病和白叶枯病均有一定的防治效果。Braun 等^[12]发现成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)可以作为一种生防菌株,能抑制由丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)引起的大麦基核枯萎病,但效果受施用时间的影响。可见,内生固氮菌在农业生产中具有巨大的应用价值。

甘蔗是广西最重要的经济作物,菌株 XD20 是从甘蔗根内分离获得的成团泛菌固氮菌株。*Pantoea agglomerans* 菌株在农业生产中的应用已有较多报道,该菌株对番茄、黄瓜、玉米、大豆和水稻都有不同程度的促生作用^[13-16]。定殖研究表明,*Pantoea agglomerans* 菌株的定殖因作物种类的不同而异,如与大麦相比,该菌株更易进入小麦根部。同时发现该菌株促进小麦产量提高的幅度也与品种有关^[17]。成团泛菌作为一种在农业生产上具有应用潜力的菌株,在水果采后的生物防治、土壤溶磷和水稻玉米上的应用报道较多,但在甘蔗上的应用研究报道却较少。

因此,本研究对分离自甘蔗根部的内生固氮菌菌株 XD20 进行鉴定,并通过对其主要的促生特性及回接 3 个甘蔗品种组培苗的促生作用的观察,评价内生固氮菌菌株 XD20 对甘蔗的促生效果,为该菌在甘蔗上的应用和实现甘蔗生态系统的可持续发展提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试菌株 XD20 为本实验室分离。供试土壤为灭菌处理的赤红壤(pH 7.31,全氮 0.25 g·kg⁻¹,全磷 0.33 g·kg⁻¹,全钾 7.81 g·kg⁻¹)。供试植株为甘蔗品种 B8、ROC22 和 GT40 的组培苗。

1.2 内生固氮菌菌株培养及相关指标测定

1.2.1 菌株的培养 从-80℃超低温冰箱中取出保存的菌株 XD20,置于冰上 5 min,在超净工作台用接种环在 LB 固体培养基上进行活化,挑取单菌落于 LB 液体培养基培养 12 h。

1.2.2 固氮酶活性测定 采用乙炔还原法测定固氮酶活性^[18],以巴西甘蔗内生固氮菌模式菌株 *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 为对照,将得到的 XD20 单菌落接种于装有 7 mL 半固体 Dobereiner 培养基容积为 15 mL 小瓶中,在无氧条件下用橡胶塞和蜡密封,在 28℃、120 r·min⁻¹摇床上培养 24 h 后,抽出 10%的气体再注入同体积的高纯乙炔,使乙炔的终浓度达到 1%,继续培养 24 h

后,用气相色谱仪测定乙烯的生成量,并以 $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 表示固氮酶活性大小,计算公式如下:

$$\text{固氮酶活性} = \frac{\text{样品峰高} \times \text{标准乙烯浓度} \times \text{乙烯进样量} \times \text{培养瓶气相体积} \times 273}{\text{标准气峰高} \times \text{样品进样量} \times \text{培养时间} \times 300 \times 22.4}$$

1.2.3 内生固氮菌促生特性测定 (1)产吲哚乙酸 (IAA) 能力。采用 Salkowski 比色法测定细菌分泌 IAA 的能力^[19]。菌株在 LB 液体培养基中过夜培养,取 100 μL 转移至含 0.1% L-色氨酸的 LB 液体培养基。菌株在 28 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 2 d 后,8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取 150 μL 上清液作为待测液,加样孔中加入 100 μL Salkowski's 试剂 (0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 , 35% HClO_4), 30 $^{\circ}\text{C}$ 放置 45 min,观察显色结果。530 nm 处绘制 IAA 标准品吸光度值 (OD) 标准曲线,查得测量样品 IAA 浓度。

(2)产嗜铁素能力。采用 CAS 平板法检测细菌产嗜铁素能力^[20]。将菌株接于铬奥醇 CAS 培养基上,以大肠杆菌 *E. Coil* 为阴性对照,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d 后,用蒸馏水洗净培养基表面细菌,观察菌落周围颜色的变化。并在紫外灯下观察有无黄绿色荧光产生。

(3)解磷能力。将菌株接种于 Pikovaskaia's 培养基^[21]平板,30 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 3 d 后,将培养基表面细菌用蒸馏水冲洗除去,根据透明圈直径 (D) 与菌落直径 (d) 的大小判断细菌解磷能力强弱。

1.2.4 *nifH* 基因的扩增 固氮酶基因 *nifH* 的扩增采用通用引物 polyF/polyR,PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 共 35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。扩增产物胶回收后与 pMD 18-T Vector 连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,采用蓝白斑筛选,菌液 PCR 鉴定阳性重组子,并送上海生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.5 16S rDNA 序列及系统发育分析 16S rDNA 的扩增采用引物 27F/1492R,扩增产物进行序列测定,测序结果在 NCBI 网页上进行 BLAST 程序比较分析,用软件 Clustal X 和 MEGA 6.0 分别进行序列分析和系统发育树的构建。

1.3 甘蔗组培苗培养、接种及相关指标测定

1.3.1 甘蔗组培苗的获得 从田间选取长势健康的宿根甘蔗尾梢,参照魏春燕等^[22]的方法进行甘蔗组培苗的培养。

1.3.2 菌悬液的制备及接种处理 用 LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 过夜培养至培养基浑浊,600 nm 下的吸光度为 1.0 左右,离心 (8 000

$\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 收集菌体,用无菌水悬浮菌体,离心 2 次洗去培养基,再次用无菌水悬浮至 10^6 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的接种浓度,备用。选取长势基本一致的已生根的甘蔗组培苗转到装有 50 mL 1/10 MS 液体培养液的培养瓶中,培养基不含维生素也未添加任何激素。每个品种分别设处理组和对照组 (每个处理 4 瓶,每瓶 4 株苗),每个处理组接种 2 mL 菌悬液,每个对照组则用 2 mL 无菌水代替。接种处理 2 d 后将各品种组培苗开盖炼苗,选取长势健康一致的甘蔗组培苗进行移栽,每桶移栽 2 株。

1.3.3 株高和叶片叶绿素含量的测定 随机选取每个处理的 3 株苗,分别于接菌后 60、90 和 120 d 测定株高和叶绿素含量,株高测定为根基部到 +1 叶 (即最高可见肥厚带) 叶环的位置,叶绿素含量用便携式叶绿素测定仪 SPAD-502 测定。

1.3.4 叶片硝酸还原酶、谷胱甘肽合成酶活性和硝态氮含量的测定 每个处理随机取 3 株,分别于接菌后 60、90 和 120 d 取 +1 叶测定各项生理指标,硝酸还原酶 (NR) 活性根据郑炳松^[23]的方法测定,酶活力以每小时每克鲜重产生的 NO_2^- 微克数表示;谷氨酰胺合成酶 (GS) 活性根据韦莉萍^[24]的方法测定,以 37 $^{\circ}\text{C}$ 下每小时每克鲜重催化产生的谷氨酰基羟氨酸的量表示 1 个酶活性单位;硝态氮 (NO_3^-) 含量采用水杨酸-硫酸法^[25]测定。

1.3.5 植株生物量的测定 在接菌后 200 d 收获所有植株,分单株将植株的地上部分和地下部分分开,用去离子水冲洗干净,擦干水分,105 $^{\circ}\text{C}$ 杀青 30 min,65 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒量,测定生物量。

1.4 数据处理

采用 Excel 2010 软件进行数据处理及作图,采用 SPSS 15.0 软件进行统计分析,所有数据用平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 内生固氮菌株 XD20 的鉴定

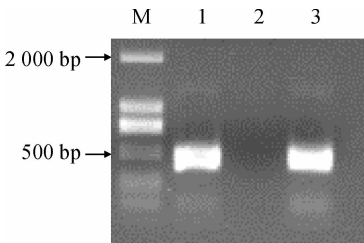
以菌株 XD20 的 DNA 为模板,经 polyF/PolyR 扩增得到一条大小为 360 bp 左右的 *nifH* 基因序列 (图 1)。经 *nifH* 基因序列发育进化树分析,菌株 XD20 与 *Pantoea agglomerans* 位于同一分支 (图 2),表明菌株与 *P. agglomerans* 亲缘关系最近,为成团泛菌。

采用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,得到一条大小为 1 500 bp 左右的条带,扩增产物经胶回收送上海生工测序,经过 NCBI 上的 Blast 程序比

对,用邻接法(Neighbor-joining,NJ 法)进行系统发育树的构建(图 3)。菌株 XD20 与 *P. agglomerans* strain-Y115 最相似,结合 *nifH* 基因的结果分析,将 XD20 鉴定为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)。

2.2 内生固氮菌株 XD20 固氮酶活性和促生特性

阳性对照巴西甘蔗内生固氮菌模式菌株 *Glucanacetobacter diazotrophicus* PAL5 的固氮酶活性为 3 285.6 nmol · mL⁻¹ · h⁻¹,而 XD20 的固氮酶活性则为 3 187.8 nmol · mL⁻¹ · h⁻¹,即菌株 XD20 具有较高的固氮酶活性。



M 为 DNA 分子量标准;1 为阳性对照菌株 *G. diazotrophicus* PAL5;2 为阴性对照菌株 *E. coli* DH5 α ;3 为菌株 XD20

图 1 *nifH* 基因的 PCR 扩增结果

M is DNA marker 2000; 1 is a positive control strain of *G. diazotrophicus* PAL5; 2 is a negative control strain of *E. coli* DH5 α ; 3 is strain XD20

Fig. 1 PCR amplification results of XD20 *nifH* gene

同时,菌株 XD20 在含有 100 mg · L⁻¹ 色氨酸的 King 培养液中变红(图 4,A),说明该菌株 XD20 可以分泌 IAA。比色法测定菌株 XD20 分泌 IAA 的数值为 36.71 μ g · mL⁻¹。经过溶磷圈法测定,菌株 XD20 的溶磷圈直径 D(菌落+透明圈)与菌落直径(d)的比值(D/d)大于 1.5,菌株的溶磷效果较强(图 4,B)。XD20 在 CAS 培养基培养 5 d 后,生长良好,在菌株周围有明显的橘黄色透明晕圈生成,加长培养时间,晕圈变化不大。对照菌株大肠杆菌菌落周围无明显的晕圈生成,因此可断定产生橘黄色晕圈的细菌在生长过程中分泌了对铁有较高亲和力的嗜铁类物质,即嗜铁素(图 5)。

2.3 接种内生固氮菌对甘蔗株高和叶绿素含量的影响

图 6 显示,接菌处理能显著促进甘蔗的生长,各品种处理与对照差异都可达到显著水平。其中,品种 B8 的株高在接菌后 60、90 和 120 d 时分别比对照显著增加了 47.2%、60.9% 和 21.5%,品种 ROC22 则分别比对照显著增加了 64.2%、22.8% 和 20.1%,品种 GT40 分别比对照显著增加了 36.3%、30% 和 9.7%。同时,接种处理对各品种甘蔗叶片的叶绿素含量同样有不同程度促进作用,但品种反应不一,其中对品种 ROC22 的促进效果更加

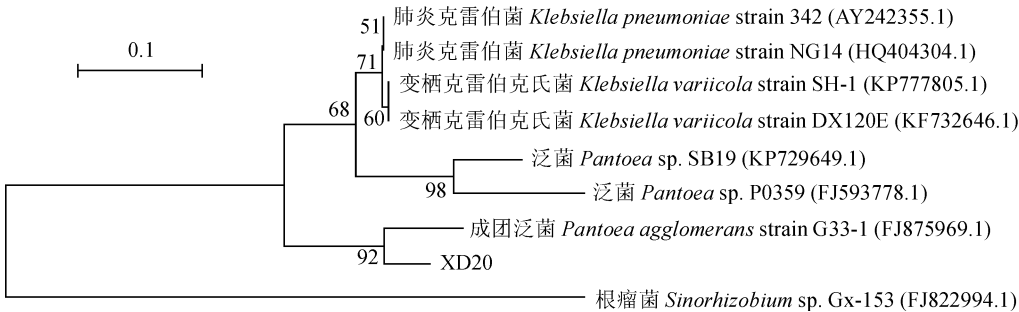


图 2 XD20 *nifH* 基因序列的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the strain XD20 with the *nifH* gene sequence

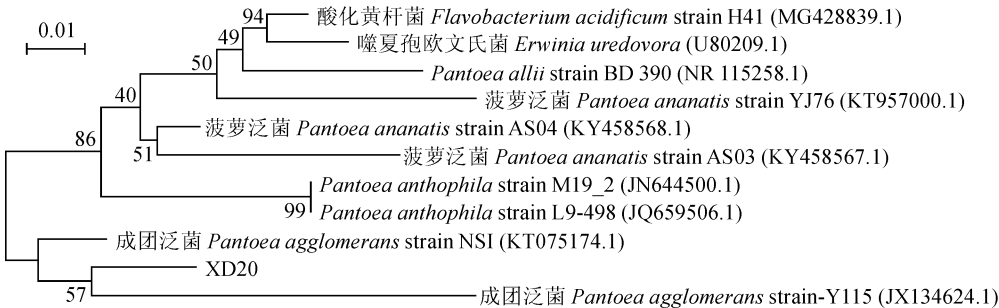


图 3 XD20 16S rDNA 基因序列的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the strain XD20 with the 16S rDNA gene sequence

明显,其在接菌后 60 和 90 d 的叶绿素含量分别显著高于对照 9.5%和 10.3%。

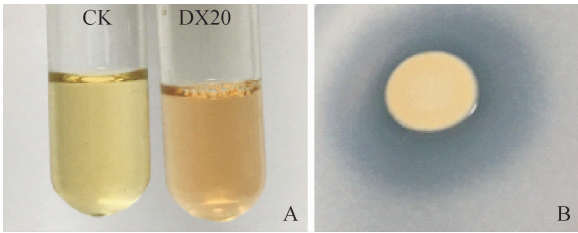


图 4 菌株 XD20 分泌 IAA 和溶磷能力
Fig. 4 The ability of strain XD20 for IAA producing and phosphorus solubilization

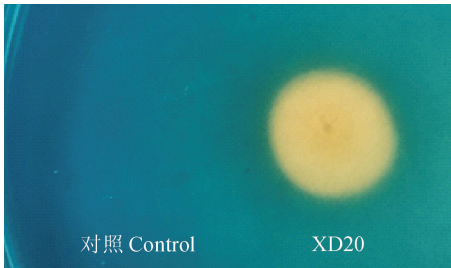


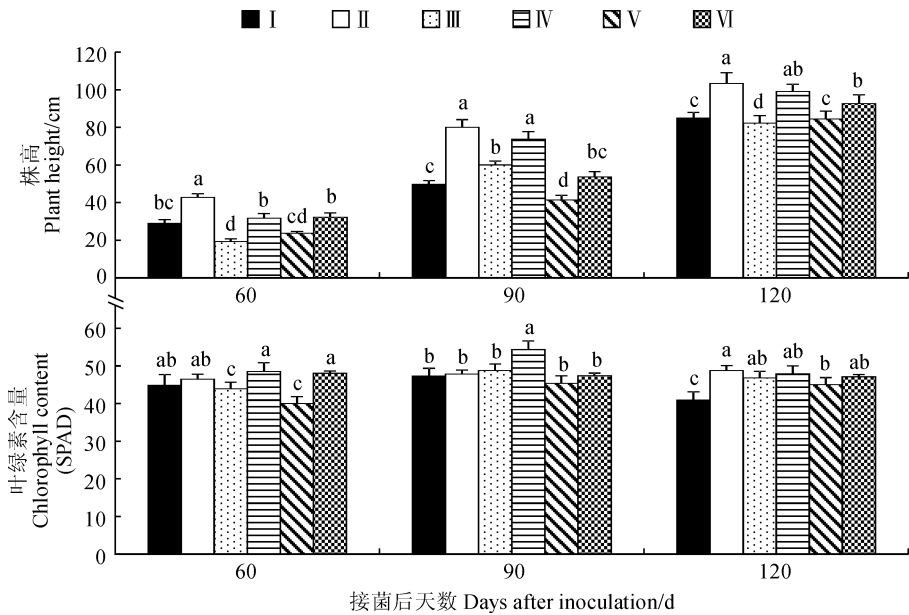
图 5 XD20 在 CAS 平板上产生的嗜铁圈
Fig. 5 XD20 iron ring produced on CAS plate

2.4 接种内生固氮菌对甘蔗氮代谢的影响

接种内生固氮菌处理能显著促进 3 个甘蔗品种叶片的硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)活性以及硝态氮(NO₃⁻-N)含量(图 7)。其中,品种 B8 叶片 NR 活性在接菌后 60、90 和 120 d 分别提高 65.0%、9.8% 和 77.2%,ROC22 则分别提高 6.9%、14.6%和 36.9%,GT40 分别提高 44.2%、36.5%和 59.1%。叶片 GS 活性在 B8 接菌后的 60、90 d,ROC22 接菌后的 120 d,GT40 接菌后 120 d 显著高于相应对照。B8 叶片硝态氮含量在接菌后 60、90 和 120 d 分别提高 7.8%、37.1%和 35.4%,ROC22 分别提高 3.3%、56.7%和 23.8%,GT40 分别提高 4.8%、21.4%和 12.7%。

2.5 接种内生固氮菌对甘蔗生物量的影响

接种内生固氮菌 XD20 对甘蔗地上部、地下部生物量积累的促进作用均达到显著水平(表 1)。其中,品种 B8、ROC22、GT40 单株总生物量在接菌后 200 d 分别比对照显著增加 46.2%、38.1%和 23.4%。由此可以看出,接种内生固氮菌 XD20 对甘蔗品种 B8 的促生效果要明显优于品种 ROCC 和 GT40。



I. B8 对照; II. B8 接种; III. ROC22 对照; IV. ROC22 接种; V. GT40 对照; VI. GT40 处理。

同期内不同小写字母表示甘蔗品种及处理间在 0.05 水平存在显著性差异;下同

图 6 固氮菌 XD20 对 3 个甘蔗品种组培苗株高和叶片叶绿素含量的影响

I. B8 control; II. B8 inoculation; III. ROC22 control; IV. ROC22 inoculation; V. GT40 control; VI. GT40 inoculation. Different small letters in the same sampling date for the different sugarcane cultivars meant significant difference between treatments at 0.05 level. The same as below

Fig. 6 Effect of nitrogen fixing bacteria DX20 on chlorophyll content in leaves and plant height of three sugarcane cultivars

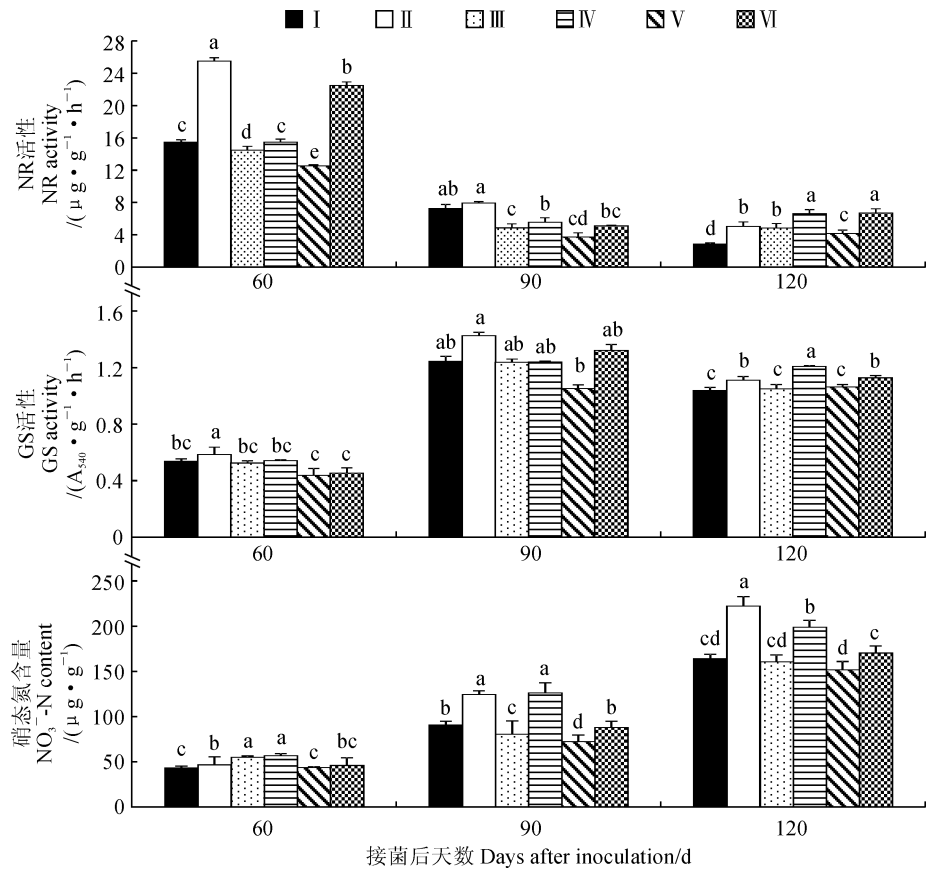


图 7 固氮菌 XD20 对 3 个甘蔗品种组培苗叶片 NR、GS 和硝态氮含量的影响
Fig. 7 Effect of nitrogen fixing bacteria DX20 on nitrate reductase, glutamine synthetase activity and $\text{NO}_3^- \text{-N}$ content in leaves of three sugarcane cultivars

表 1 固氮菌 XD20 对 3 个甘蔗品种组培苗单株生物量的影响

Table 1 Effect of nitrogen fixing bacteria DX20 on the biomass of single plant of three sugarcane cultivars

甘蔗品种 Sugarcane cultivar	处理 Treatment	地上部分干重 Shoot dry weight /g	地下部分干重 Root dry weight /g	合计 Total /g
B8	对照 Control	29.35±0.94c	2.60±0.08bc	31.95±0.69cd
	接种 Inoculation	43.25±1.53a	3.45±0.16a	46.70±1.53a
ROC22	对照 Control	27.65±2.30cd	2.85±0.09b	30.50±1.44cd
	接种 Inoculation	39.90±1.12b	3.25±0.12a	43.15±1.24b
GT40	对照 Control	25.70±1.01d	2.37±0.18c	28.07±1.18d
	接种 Inoculation	31.68±2.65c	2.96±0.04b	34.64±1.35c

注:同列不同小写字母表示处理(品种)间差异达到 0.05 显著水平($P < 0.05$)
Note: Different normal letters in the same column meant significant difference among treatments or cultivars at 0.05 level

3 讨论

农业可持续发展的目标是生态环境友好型,减少化学药品的使用和增加作物的产量。固氮菌能够通过生物固氮等不同机制提高宿主的产量和改善宿主的品质^[26]。目前,成团泛菌属细菌固氮、溶磷、分泌铁载体和分泌生长素的原位促生作用和对寄主的

促生效应的研究已有较多报道。例如,成团泛菌属菌株 *Pantoea agglomerans* NII-186 具有分泌铁载体、分泌生长素和溶磷的能力^[27],*Pantoea agglomerans* YS19 具有较高的固氮活性和较强的生物固氮能力^[28]。本研究中菌株 XD20 是从种植在广西的甘蔗根内分离获得的内生固氮菌株,结合 16S rDNA 和 *nifH* 的基因序列的系统发育进化树分析

结果,把菌株 XD20 归属为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)。本研究对其的促生特性分析表明,该菌具有溶磷、分泌铁载体、分泌生长素和固氮能力。XD20 具有较高的固氮酶活性,同时具有分泌 IAA 的能力,分泌量为 $36.71\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。生长激素 IAA 的分泌可以促进植物根系生长,增强根系吸收矿物营养和水分的能力,对于植物的生长有很好的促进作用^[29]。磷是植物生长必需的三大营养元素之一,溶磷微生物可以把土壤中不能被植物所利用的磷转化为可利用形态,从而起到促生作用^[30-31]。XD20 也具备了很好的溶磷能力。嗜铁素,是增加植物对土壤中铁元素吸收利用的一种螯合机制,对植物有着促进生长,防治病害的作用^[32-33]。因此,兼具了固氮、产 IAA、分泌嗜铁素和解磷能力的菌株 XD20,在微生物肥料的研究领域具有很好的开发和应用潜力。同时需要指出的是,在应用生物肥料的同时,需对该菌株的环境安全性进行评价。

Pantoea sp. 在不同作物上的应用研究表明,该属菌株对接种作物的生长发育有促进作用。Mohlite 等^[34]利用电子显微镜发现 *P. agglomerans* 具有耐金属的能力,通过形态和结构变化保护细胞。Chen 等^[35]用紫花苜蓿叶片分离的 *Pantoea alhagi* LTyr-11ZT 处理小麦,促进了小麦的生长和增强了小麦的耐旱性。柯红娇等^[36]用 *Pantoea agglomerans* Ljb-2 处理番茄植株后,提高产量并改善果实品质。Mirza 等^[37]从甘蔗植株体内分离出 4 株肠杆菌,回接甘蔗发现,接种处理增加了甘蔗植株的生物量。本研究结果表明,接种 XD20 后的 3 个甘蔗品

种的株高、生物量和叶绿素含量相比对照都有显著的提高,同时提高了其 NR 和 GS 的活性,促进了甘蔗植株对硝态氮的吸收积累,这与欧阳雪庆等^[38]和魏春燕等^[39]用固氮菌接种甘蔗后的研究结果相似。Santos 等^[40]研究发现,幼嫩的甘蔗植株 NR 活性最高,而在甘蔗植株成熟期 NR 活性最低,活性减少量达到 80%。在本研究中,接种 XD20 甘蔗在达到成熟期时 NR 活性的减少量相对减小。

影响接种菌株与寄主的互作因素很多,品种是一个重要的影响因子。Verma 等^[17]报道,*Pantoea* sp. 在寄主根部的定殖能力因作物种类的不同而不同,与大麦相比,该菌株更易进入小麦根部,并且对小麦产量的提高也与品种有关。吴凯朝等^[41-42]应用不同甘蔗品种 GT24、GT9、YC84/153、GT18、CP65/357 和 F172 接种成团泛菌 A01,结果也表明菌株对甘蔗的促生效果因甘蔗品种不同而异。在本研究中接种菌株 XD20 对 3 个甘蔗品种的促生效应也不同,其中对甘蔗品种 B8 的效果最好。B8 的株高、生物量以及叶片的硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)活性明显高于 ROC22 和 GT40,可能与 XD20 菌株更容易与甘蔗品种 B8 建立联合固氮体系有关,这需要进一步试验验证。

综上所述,甘蔗内生固氮菌株 XD20 属于成团泛菌(*Pantoea agglomerans*),具有溶磷、分泌铁载体、分泌生长素和较高的固氮酶活性等多个促生特性,并且对本试验中的 3 个甘蔗品种表现出了不同程度的促生效应,但该菌株的促生效果还需要在大田试验中进一步验证。

参考文献:

[1] GERMAINE K J, CHHABRA S, SONG B, *et al.* Microbes and sustainable production of biofuel crops: A nitrogen perspective[J]. *Biofuel*, 2010, 1: 877-888.

[2] 李杨瑞, 杨丽涛, 谭宏伟, 等. 广西甘蔗栽培技术的发展进步[J]. 南方农业学报, 2014, 45(10): 1 770-1 775.

LI Y R, YANG L T, TAN H W, *et al.* Development and progress of sugarcane farming technologies in Guangxi, China[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45(10): 1 770-1 775.

[3] 杨丽涛, 胡春锦, 林 丽, 等. 广西甘蔗内生固氮菌资源及其应用的相关基础研究[C]. 2014 年中国作物学会学术年会论文摘要集, 北京: 中国作物学会, 2014.

[4] BODDEY R M, URQUIAGA S, ALVES B J R, *et al.* Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: Present knowledge and future applications [J]. *Plant and Soil*, 2003, 25(2): 139-149.

[5] DBEREINER J. Nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijer-*

inck Derx in the rhizosphere of sugarcane[J]. *Plant and soil*, 1961, 15: 211-216.

[6] REIS V M, BALDANI J I, BALDANI V L D, *et al.* Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19: 227-247.

[7] KENNEDY I R, ISLAM N. The current and potential contribution of a symbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms[J]. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2001, 41: 447-457.

[8] 覃丽萍, 黄思良, 李杨瑞. 甘蔗内生固氮菌的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 150-152.

QIN L P, HUANG S L, LI Y R. Research Progress in *Endophytic diazotrop*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(5): 150-152.

[9] FUENTES RAMIREZ L E, JIMENEZ SALGADO T, ABARCA OCAMPO I R, *et al.* *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of

- Mexico[J]. *Plant and Soil*, 1993, 154: 145-150.
- [10] BASTIAN F, COHEN A, PICCOLI P, *et al.* Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropecae* in chemically-defined culture media [J]. *Plant Growth Regulation*, 1998, **24**(1): 7-11.
- [11] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未, 等. 水稻内生阴沟肠杆菌 MR12 的鉴定及其固氮和防病作用[J]. 植物病理学报, 2001, **31**(1): 92-93.
YANG H L, SUN X L, SONG M, *et al.* Studies on the rice endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MR12 S identification and its effects of nitrogen fixation and biological control to plant disease[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2001, **31**(1): 92-93.
- [12] BRAUN K A, JACOBSEN B J, SANDS D C. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley by antagonistic *Pantoea agglomerans*[J]. *Phytopathology*, 2000, **90**(4): 368-375.
- [13] DURSUN A, EKINCI, M, DONMEZ M F. Effects of foliar application of plant growth promoting bacterium on chemical contents, yield and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Pak. J. Bot.*, 2010, 42, 3 349-3 356.
- [14] GOND S K, TORRES M S, BERGEN M S, *et al.* Induction of salt tolerance and up-regulation of aquaporin genes in tropical corn by rhizobacterium *Pantoea agglomerans*[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2015, **60**(4): 392-399.
- [15] FEI L, YA W, QING G *Zet al.* Diversity and plant growth promoting activities of the cultivable rhizo-bacteria of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) [J]. *Biodiver Sci*, 2011, 19, 476-484.
- [16] RUPPEL S, HECHT-BUCHHOLZ C, REMUS *Ret al.* Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy [J]. *Plant Soil*, 1992, 145, 261-273.
- [17] VERMA S C, SINGH A, CHOWDHURY S P, *et al.* Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter[J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26, 425-429.
- [18] 韩 梅, 罗培宇, 肖亦农, 等. 玉米内生固氮菌的分离鉴定及其促生长作用研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2010, **41**(1): 94-97.
HAN M, LUO P Y, XIAO Y L, *et al.* Isolation of endophytic N₂-fixing bacteria of corn rice and their function for promoting growth[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2010, **41**(1): 94-97.
- [19] 胡春锦, 林 丽, 史国英, 等. 广西甘蔗根际高效联合固氮菌的筛选及鉴定[J]. 生态学报, 2012, **32**(15): 4 742-4 745.
HU C J, LIN L, SHI G Y, *et al.* Screening and identification of associative nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of sugarcane in Guangxi[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, **32**(15): 4 745-4 752.
- [20] 梁建根, 竺利红, 吴安吉, 等. 土壤中分泌嗜铁素细菌的筛选及影响其分泌因素的研究[J]. 园艺学报, 2007, **34**(4): 1 023-1 028.
- LIANG J G, ZHU L H, WU A J, *et al.* Studies on screening of siderophore producing bacteria in the soil and factors influencing its secretion[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, **34**(4): 1 023-1 028.
- [21] YAO T. Associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Avena sativa* in an alpine region II Phosphate-solubilizing power and auxin production[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2004, **13**(3): 85-90.
- [22] 魏春燕, 邢永秀, 莫 遥, 等. 绿色荧光蛋白基因标记的固氮菌 DX120E 在甘蔗植株内的定殖[J]. 作物学报, 2014, **40**(6): 1 132-1 139.
WEI C Y, XING Y X, MO Y, *et al.* Colonization of nitrogen fixing bacterial strain *Klebsiella* sp. DX120E labeled with Green Fluorescent Protein (GFP) gene within sugarcane plants [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, **40**(6): 1 132-1 139.
- [23] 郑炳松. 现代植物生理生化研究技术[M]. 北京: 气象出版社, 2006.
- [24] 韦莉萍. 不同钼水平对甘蔗固氮生理生化的影响[D]. 南宁: 广西大学, 2005.
- [25] 邹 琦. 植物生理学实验指南[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [26] CHEBOTAR V K, MALFANOVA N V, SHCHERBAKOV A V, *et al.* Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development (review) [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2015, **51**(3): 271-277.
- [27] DASTAGER S G, DEEPA C K, PUNEET S C, *et al.* Isolation and characterization of plant growth-promoting strain *Pantoea* NII-186 from Western Ghat Forest soil[J]. *Ind. Lett. Appl Microbiol*, 2009, 49, 20-25.
- [28] ZHANG X, LI E, XIONG X, *et al.* Colonization of endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 on host rice, with formation of multicellular symplasmata[J]. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 26, 1 667-1 673.
- [29] AMBREEN AHMED, SHAHIDA HASNAIN, *et al.* Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*[J]. 2010, 313-319.
- [30] PEIXA A, MATEOSB P F, RODRIGUEZ B C, *et al.* Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 1 927-1 935.
- [31] 范作伟, 孙甜田, 吴海燕. 溶磷微生物肥料配方筛选及其效果验证[J]. 吉林农业科学, 2015, **40**(4): 34-38.
FAN Z W, SUN T T, WU H Y. Screening of phosphate solubilizing microorganism fertilizer formula and verification of its effect[J]. *Journal of Jilin Agricultural Sciences*, 2015, **40**(4): 34-38.
- [32] 余贤美, 郑服丛. 嗜铁素在促进植物生长及病害防治等方面的应用[J]. 中国农学通报, 2007, **23**(8): 507-510.
YU X M, ZHENG F C. The Development and utilization of siderophore on plant growth promotion and plant disease control[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, **23**(8): 507-510.
- [33] FENG Y, SHEN D, SONG W. Rice endophyte *Pantoea* YS19 promotes host plant growth and affect allocations of host photosynthates[J]. *Appl. Microbiol*, 2010, 100: 938-945.

[34]

MOHITE B V, KOIL S H, PATIL S V. Heavy metal stress and its consequences on Exopolysaccharide (EPS)-producing *Pantoea agglomerans*[J]. *Appl Biochem Biotechnol.*, 2018, 186: 199-216.

[35]

CHEN C Q, XIN K Y, LIU H, *et al.* *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat[J], *Scientific report*, 2017,7: 41 564.

[36]

柯红娇, 王 勇, 卫 甜, 等. 成团泛菌 Ljb-2 对番茄黄化曲叶病毒病的田间防效初步研究[J]. 园艺学报, 2014, **41**(5): 985-993.
KE H J, WANG Y, WEI T, *et al.* Suppression of tomato yellow leaf curl virus disease by the *Pantoea agglomerans* strain Ljb-2 in the field [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, **41**(5): 985-993.

[37]

MIRZA M S, AHMAD W, LATIF F, *et al.* Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*[J]. *Plant and Soil*, 2001, 237: 47-54.

[38]

欧阳雪庆, 罗 霆, 杨丽涛, 等. 甘蔗内生固氮菌液浸种对甘蔗生长前期氮代谢相关酶活性的影响[J]. 广西农业科学, 2010, **41**(5): 416-418.
OUYANG X Q, LUO T, YANG L T, *et al.* Effects of sett-soaking with sugarcane endophytic diazotroph solution on N metabolism related enzymes activities at the early growth stage of sugarcane [J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2010, **41**(5): 416-418.

[39]

魏春燕, 邢永秀, 林 丽, 等. 接种变栖克雷伯氏菌 DX120E 对不同甘蔗品种的促生效应[J]. 应用生态学报, 2014, **25**(7): 2 085-2 092.
WEI C Y, XING Y X, LIN L, *et al.* Growth-promoting effect of inoculating *Klebsiella variicola* DX120E on different sugarcane cultivars[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, **25**(7): 2 085-2 092.

[40]

SANTOS C L R, CAZETTA J O, SARAN L M, *et al.* Otimização da análise da atividade da redutase do nitrato e sua caracterizaçãoem folhas de cana-de-açúcar[J]. *Pesqui Agr-opecu Bras*, 2014, 49: 384-394.

[41]

吴凯朝, 梁 俊, 韦莉萍, 等. 内生固氮菌对甘蔗伸长期光合生理特性的影响[J]. 广西植物, 2011, **31**(5): 668-673.
WU K C, LIANG J, WEI L P, *et al.* Effects of nitrogen fixing bacteria on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sugarcane at elongating stage[J]. *Guihaia*, 2011, **31**(5): 668-673.

[42]

韦莉萍, 吴凯朝, 邢永秀, 等. 接种内生固氮菌 A01(*Pantoea agglomerans*)对甘蔗伸长期固氮生理特性的影响[J]. 南方农业学报, 2016, **47**(1): 18-23.
WEI L P, WU K C, XING Y X, *et al.* Effects of nitrogen-fixing bacteria A01 on physiological characteristics of nitrogen fixation in sugarcane at elongating stage [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2016, **47**(1): 18-23.

(编辑:裴阿卫)

《西北植物学报》2018 年审稿专家名单

(以姓氏笔画为序)

于 卓	于澄宇	尤庆敏	王 虹	王卫卫	王冬冬	王军辉	王全喜	王亚琴	王孝安	王振林
王崇英	王得祥	王喆之	尤庆敏	甘立军	田惠桥	叶绍明	巩振辉	阳成伟	吕德国	刘文哲
刘占林	刘巧泉	刘西平	刘全儒	刘家熙	刘德兵	孙广玉	孙玉合	朱仁斌	朱志红	朱相云
朱瑞良	庄 静	李 敏	李世清	李忠虎	李周岐	李秧秧	李得孝	李登科	李鹏民	初庆刚
杜 诚	杜雄明	杨洪强	邱全胜	陈 鹏	陈 勤	陈兴福	陈贵林	陈昆松	张文辉	张宏利
张宪春	张硕新	张镔铨	房经贵	於丙军	罗 建	周明芹	胡银岗	胡胜武	洪棋斌	贺军民
赵 桦	赵世伟	赵建成	赵继新	饶广远	饶景萍	郭守玉	郭晓思	唐 明	徐 炎	徐子勤
高志奎	贾海锋	梁文裕	梁国华	曹建国	常朝阳	龚月桦	韩文炎	赖钟雄	廖文波	黎 斌
魏安智	上官周平									

以上为《西北植物学报》2018 年的审稿专家,感谢一年来在百忙之中为本刊把好学术质量关,在此特向专家们致以最诚挚的谢意,还望在今后的岁月中继续支持学报的工作。