

接种固氮菌对甘蔗组培苗氮营养生理特性的影响

梁俊^{1,2,3,4}, 李杨瑞^{2,5,6*}, 吴凯朝^{1,2,3,5}, 莫磊兴^{2,3,4}, 罗霆¹, 游建华^{2,3,5} (1. 广西大学, 广西南宁 530004; 2. 中国农业科学院甘蔗研究中心, 广西南宁 530007; 3. 广西甘蔗研究所, 广西南宁 530007; 4. 农业部甘蔗品质监督检验测试中心(南宁), 广西南宁 530007; 5. 国家糖料改良中心广西甘蔗品种改良分中心, 广西南宁 530007; 6. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西南宁 530007)

摘要 [目的] 研究接种固氮菌对甘蔗组培苗氮营养生理特性的影响。[方法] 将 2 种内生固氮菌 B16L 与 B8R 接种到甘蔗栽培品种 G16、R16 与 R22 的组培苗中, 研究这些组培苗的氮营养生理特性的变化。[结果] 于分蘖期和拔节期的测定结果表明, R16 与 R22 + 1 叶的叶绿素含量、 Ca^{2+} -ATP 酶活性处理均大于对照, G16 + 1 叶的 Ca^{2+} -ATP 酶活性处理低于对照。相对于分蘖期, 拔节期不同品种的处理与对照的 + 1 叶的叶绿素含量、 Ca^{2+} -ATP 酶活性都有所升高。不同品种的处理与对照 + 1 叶的硝态氮含量没有规律变化。[结论] 接种内生固氮菌改善了 R16 与 R22 健康组培苗的一些氮营养生理特性, 但对 G16 的影响不大。

关键词 甘蔗; 固氮; 叶绿素; 硝态氮; Ca^{2+} -ATP 酶活性

中图分类号 S566.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)10-03964-02

Effects of Inoculating Azotobacter on the Physiological Characteristics of Nitrogen Nutrition in the Tissue Cultured Seedlings of Sugarcane

LIANG Jun et al (Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004)

Abstract [Objective] The aim was to study the effects of azotobacter inoculation on the physiological characteristics of nitrogen nutrition in the tissue cultured seedlings of sugarcane. [Method] Two species of endophytic azotobacters B16L and B8R were inoculated into the tissue cultured seedlings of sugarcane cultivars G16, R16 and R22 so as to study the changes of physiological characteristics of nitrogen nutrition in these tissue cultured seedlings. [Result] Determinations in tillering and jointing stages showed that the chlorophyll content and Ca^{2+} -ATPase activity in the + 1 leaves of R16 and R22 in treatments were bigger than that in CK and the Ca^{2+} -ATPase activity in the + 1 leaf of G16 in treatment was lower than that in CK. Compared with tillering stage, the chlorophyll content and Ca^{2+} -ATPase activity in the + 1 leaves of different cultivars in treatments and CK in jointing stage had some increase. The nitrate nitrogen contents in the + 1 leaves of different cultivars in treatments and CK changed irregularly. [Conclusion] The inoculation of endophytic azotobacter improved some physiological characteristics of nitrogen nutrition in the healthy tissue cultured seedlings of R16 and R22, but had little effect on G16.

Key words Sugarcane; Nitrogen-fixation; Chlorophyll; Nitrate nitrogen; Ca^{2+} -ATPase activity

氮素是植物需求量最大的矿质营养元素。100 多年前, 科学家证明某些微生物可以固定大气中的氮供植物生长利用^[1]。固氮微生物可分为两类, 一类是能独立生存的非共生微生物, 另一类是与其他植物共生的共生微生物。20 世纪 80 年代初, 在巴西最先有人提出观点: 甘蔗可以通过固氮菌把大量氮转化成自身需要的氮营养物质, 这些固氮菌寄生于甘蔗内部, 并且从许多巴西甘蔗品种中分离到甘蔗内生固氮菌, 这种甘蔗固氮菌属于共生微生物^[2]。许多科研工作者利用微生物分离、N 平衡法、¹⁵N 技术、生理生化技术等, 在甘蔗固氮菌领域进行了大量的研究, 证明了甘蔗具有高效的生物固氮能力^[3-6]。在国内, 关于甘蔗固氮的研究很少。近年来, 邢永秀等从广西的几个甘蔗主栽品种和巴西的固氮甘蔗品种中分离到数种固氮微生物, 如 *Achromobacter xylosoxidans*、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Agrobacterium diazotrophicus*, 这些固氮菌都具有较高的固氮酶活性^[7]。笔者将这些固氮菌株接种到甘蔗组培苗中, 研究接种这些甘蔗固氮菌后甘蔗氮营养生理特性的变化。

1 材料与方法

1.1 试验材料 参试甘蔗品种: 广西甘蔗栽培品种桂糖 16 号(G16)、新台糖 16 号(R16)、新台糖 22 号(R22)。挑选生长势较好的健康组培苗各 10 瓶, 每瓶含有已生根的甘蔗健康组培苗 5 丛。参试固氮菌: 从广西甘蔗品种新台糖 16 号分离

到的 B16L 固氮菌, 从巴西引进的甘蔗品种 B8 分离到的固氮菌 B8R; 两者已用乙炔还原法证明具有较高的固氮酶活性。

1.2 试验方法

1.2.1 接种固氮菌。试验的处理(A)与对照(B)只设一个水平, 所有处理和对照分别为: G16A、G16B, R16A、R16B, R22A、R22B。2005 年 3 月 3 日参试固氮菌均用液体 JNFB 培养基^[7]培养, 当它们的浓度均大于 0.1 (用分光光度计在波长为 600 nm 时测定的数值)时, 将 2 种固氮菌各取 500 ml 混匀, 备用。每个甘蔗品种的组培苗有 10 瓶, 处理与对照各 5 瓶, 所有组培苗均用消毒过的剪刀剪去根部一小部分。将处理的甘蔗组培苗放在固氮菌混合液中浸泡 30 min, 让固氮菌侵入甘蔗组培苗中, 再将甘蔗组培苗放入培养瓶中, 并更换培养基。对照的甘蔗组培苗分不做接种处理。

1.2.2 塑料盆移栽。细沙用灭菌锅消毒, 装于 80 cm × 50 cm 大小的长方形塑料盆中, 每个塑料盆均装 8 cm, 塑料盆底部四周打有小洞, 便于排水。2000 年 4 月 24 日将所有甘蔗组培苗移栽到装有细沙的塑料盆中。挑选生长势较好的甘蔗组培苗, 每个品种的处理与对照各 2 盆。

1.2.3 塑料桶移栽。2005 年 5 月 20 日选取生长势较好的甘蔗苗移栽到塑料桶中, 塑料桶中装有从山坡上挖来的黄泥土, 肥力较为贫瘠。每个品种的处理与对照各种 6 桶, 每桶种 6 株。在甘蔗苗移栽到塑料桶中 14 d 后, 每个品种每桶挑选生长势较好的 4 株, 拔去其余 2 株。

1.2.4 取样。分别在分蘖期(6 月 20 日)、拔节期(7 月 25 日)采样。每个品种的处理与对照随机选取 + 1 叶 6 片, 用蒸馏水洗净, 擦干后装入保鲜袋, 置于 - 20 ℃ 冰箱保存, 测定 Ca^{2+} -ATP 酶活性大小。再选取有代表性的 + 1 叶 6 片, 作为新鲜样品, 测定甘蔗的硝态氮与叶绿素含量。

基金项目 国家自然科学基金(30260054, 3066085); 广西农业科学院科技发展基金(2004013); 广西科学研究与开发项目(桂科能 0330015-1E); 广西自然科学基金(桂科基 0778006-5, 桂科基 0448092)。

作者简介 梁俊(1976-), 男, 广西玉林人, 博士, 助理研究员, 从事甘蔗育种研究。* 通讯作者, 博士, 教授, 博士生导师。

收稿日期 2008-02-21

1.3 测定项目及方法

1.3.1 叶绿素含量的测定。采用彭运生等^[8]的方法。取分析纯丙酮和无水乙醇按 2:1 配成混合液,摇匀,置有色玻璃瓶内,盖紧。将甘蔗叶片剪成宽度小于 1 mm 的细丝,混匀,准确称取 2.00 g 样品装入试管,置于用黑布包好的试管架上,加入上述混合液 10.00 ml,塞上塞子,转入黑暗柜子中放至叶片完全发白,用黑布包好取出,于 663、645 nm 测 OD 值,再由丙酮法公式计算叶绿素含量。

1.3.2 Ca^{2+} - ATP 酶液提取和活性测定。采用李杨瑞^[9](1987)的方法。
①酶液提取:准确称取 1.00 g 样品,加入 10 ml pH 值 7.5 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(含有 2 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L DTT)和 1.0 g 石英砂,冰浴,研磨成匀浆,10 000 r/min(0~4℃)离心 10 min,取上清液即为粗酶提取液。
②酶活性测定:取 4 支试管,分别加入 0.5 ml 反应液(pH 值 7.5 0.05 mol/L Tris-HCl + 50 mmol/L NaCl + 2 mmol/L CaCl_2 + 5 mmol/L DTT)、0.2 ml ATP 溶液,混合。其中 2 支加入 0.1 ml 酶液 36℃ 水浴保温 20 min 后,加入 0.2 ml 20% 三氯乙酸终止反应;另 2 支则先加入 0.2 ml 三氯乙酸,再加入酶提取液作为对照。最后在处理和对照中均加入 2 ml H_2O 和 3 ml 定磷试剂,45℃ 水浴加热 20 min 后,测 OD_{660} 值。由于该方法用 Ca^{2+} - ATP 酶水解 ATP 后所释放无机磷的量表示 Ca^{2+} - ATP 酶活性,故以 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准磷溶液制作标准曲线。

1.3.3 叶片硝态氮含量的测定。采用酚二磺酸比色法^[10-12]。称取剪碎的新鲜样品 5.00 g,加入 10.00 ml 去离子水 1.00 g 石英砂,磨碎,混匀之后量取提取液 10.00 ml,加入去离子剂后,转入 100 ml 容量瓶中定容,并过滤。吸取适量的滤液放于蒸发皿中,在 80℃ 的水浴锅中蒸干。冷却后加入 5 ml 的酚二磺酸,于干燥器中反应 10 min,转入 50 ml 的容量瓶,加入 6 ml 1:1 的氨水显色,冷却后定容,在 420 nm 下比色。

2 结果与分析

2.1 不同甘蔗品种 +1 叶的叶绿素含量 从图 1 可知,R16 与 R22 +1 叶的叶绿素含量在 2 个测定时期处理均大于对照,而 G16 +1 叶的叶绿素含量在 2 个测定时期处理与对照的对比表现不一致。不同甘蔗品种的处理与对照的 +1 叶的叶绿素含量到了拔节期,相对于分蘖期都有所升高。

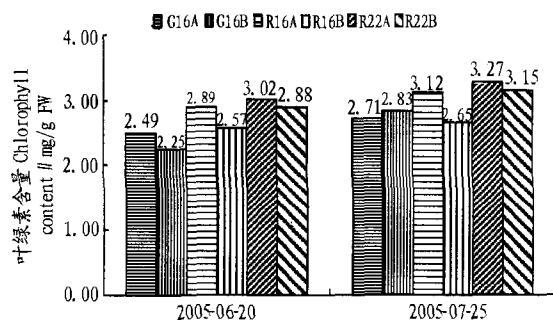


图 1 不同甘蔗品种 +1 叶的叶绿素含量

Fig.1 Chlorophyll content in +1 leaf of different sugarcane varieties

2.2 不同甘蔗品种 +1 叶的硝态氮含量 从图 2 可以看出,参试材料处理与对照 +1 叶的硝态氮含量在分蘖期与拔节期的表现不一致,同一测定时期各品种处理与对照的对比表现

也不一致,没有规律的变化。

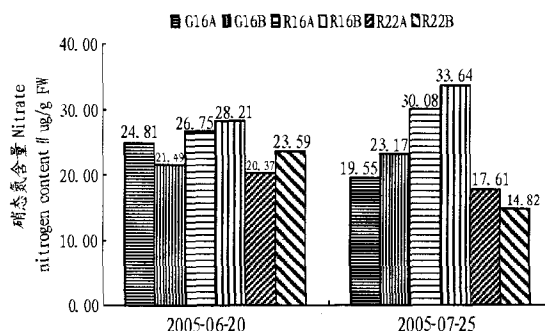


图 2 不同甘蔗品种 +1 叶的硝态氮含量

Fig.2 Nitrate nitrogen content in +1 leaf of different sugarcane varieties

2.3 不同甘蔗品种 +1 叶的 Ca^{2+} - ATP 酶活性 由图 3 可知,拔节期的甘蔗 +1 叶片的 Ca^{2+} - ATP 酶活性强于分蘖期,但是同一品种的处理与对照表现不一致,R16 与 R22 +1 叶的 Ca^{2+} - ATP 酶活性在 2 个测定时期中处理均高于对照,而 G16 +1 叶的 Ca^{2+} - ATP 酶活性在 2 个测定时期处理均低于对照。

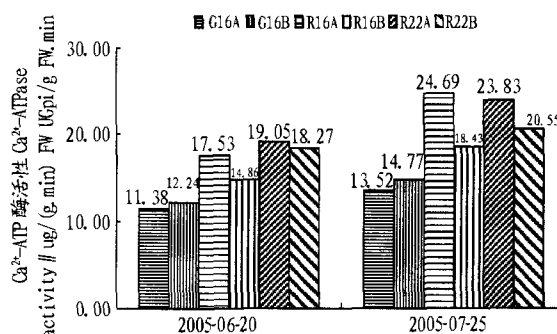


图 3 不同甘蔗品种 +1 叶的 Ca^{2+} - ATP 酶活性

Fig.3 Ca^{2+} - ATPase activity in +1 leaf of different sugarcane varieties

3 结论与讨论

(1)甘蔗生物固氮属于联合共生固氮,与豆科植物的根瘤固氮有区别,很多基础问题还没有达成共识。在国内,首先是李星洪等从 GT11 中分离到成团泛菌,并利用乙炔还原法证明其具有固氮酶活性^[13]。樊妙姬等将甘蔗内生固氮菌接种到甘蔗组培苗中,结果发现接种组培苗的固氮酶活性并没有改变^[14]。刑永秀已经从巴西引进的甘蔗品种与广西甘蔗栽培品种中分离到一些固氮菌,并用乙炔还原法证明这些菌具有固氮酶活性^[7]。该试验是在刑永秀研究的基础上,对甘蔗组培苗接种固氮菌后氮营养生理特性的变化情况进行了研究。

(2)叶绿素是绿色植物区别于其他生物的显著标志,是光合作用的根本。而植物固氮能力的大小受光合作用的影响,光合作用越强才可以为生物固氮提供更多的能量^[15]。该试验结果表明,R16 与 R22 的叶绿素含量在接种内生固氮菌后均有所提高。宋亚娜等将甘蔗内生固氮菌接种于甘薯组培苗中,发现接种后的甘薯组培苗叶绿素含量也有所增加^[6]。无论是自生固氮还是共生固氮,固氮酶催化 N_2 还原都需要 ATP 参加,ATP 是固氮的能量来源。在该试验中,R16

表 3 不同玉米杂交组合不同水分处理下生物产量的水分利用率 g/kg
Table 3 Water use efficiency for biomass of different maize hybrid combinations under different water treatments

组合 Combinations	正常供水 Normal situation	中度干旱胁迫 Drought stress
411 × 449	8.77 abABC	9.29 abAB
交 51 × 411	9.19 aA	9.05 abcABC
449 × 18599	8.10 bcABC	8.38 bcdABC
S11 × 411	7.80 cBC	8.24 cdBC
449 × S11	8.28 abcABC	8.14 cdC
411 × 18599	7.63 cC	8.03 dC
449 × 交 51	8.58 abcABC	8.62 abcdABC
S11 × 交 51	8.11 bcABC	8.40 bcdABC
18599 × S11	8.84 abAB	8.61 bcdABC
交 51 × 18599	9.04 abA	9.47 aA
平均 Mean	8.43 bA	8.62 aA

水分利用率顺序为:交 51 × 18599 > 411 × 449 > 交 51 × 411 > 449 × 交 51 > 18599 × S11 > S11 × 交 51 > 449 × 18599 > S11 × 411 > 449 × S11 > 411 × 18599。与正常供水处理相比,除交 51 × 411、449 × S11 和 18599 × S11 外的玉米杂交组合的生物产量水分利用率均有所提高。交 51 × 18599、411 × 449、交 51 × 411 生物产量的水分利用率相对较高,其余杂交组合生物产量水分利用率相对较低。其中,交 51 × 18599 的生物产量水分利用率在 0.01 水平显著高于 S11 × 411、449 × S11 和 411 × 18599,在 0.05 水平显著高于 S11 × 交 51 和 449 × 18599,比其他 9 个杂交组合分别高 1.94%、4.64%、9.86%、9.99%、12.74%、13.00%、14.93%、16.34%、17.93%;411 × 449 的生物产量水分利用率在 0.01 水平显著高于 449 × S11 和 411 × 18599,在 0.05 水平显著高于 S11 × 411,比其他 8 个杂交组合分别高 2.65%、7.77%、7.90%、10.60%、10.86%、12.74%、14.13%、15.69%;交 51 × 411 的生物产量水分利用率在 0.05 水平显著高于 411 × 18599,比其他 7 个杂交组合分别高 4.99%、

5.11%、7.74%、7.80%、9.83%、11.17%、12.70%。

3 结论与讨论

(1)研究表明,在中度干旱胁迫下玉米的耗水量在 0.01 水平显著低于正常供水,水分利用率在 0.05 水平显著高于正常供水。这和前人的研究结果一致^[4,7-9]。植株生长对干旱反应最为敏感。干旱对禾谷作物不同生理功能影响的先后顺序为:细胞扩张(生长)→气孔运动→蒸腾作用(水分散失)→光合作用→物质运输。在中度的水分亏缺下,虽然植株生长受到抑制,但光合作用基本不受影响,物质运输不受阻,根冠比将增大,渗透调节得以加强,水分利用率随蒸腾大幅度下降而升高^[4]。

(2)在不同土壤水分处理下 10 个玉米杂交组合在生物产量、耗水量、水分利用率上存在着显著或极显著差异。综合各个杂交组合的表现来看,交 51 × 18599 表现最好,在 2 种土壤水分处理下均表现为产量高、耗水量中等、水分利用率高的特性。交 51 × 18599 抗旱性、产量形成及水分利用特性值得进一步从其形态发育、生理生化特性、遗传特点等方面进行深入研究,从而为以高产、抗旱、高效用水为目标的品种选育及推广提供理论依据。

参考文献

[1] 李运朝.玉米抗旱性鉴定研究进展[J].玉米科学,2004,12(1):63-68.
[2] 山仑.植物水分利用效率和干旱地区农业用水[J].植物生理学通讯,1994,34(1):61-66.
[3] 山仑.宁南山区主要粮食作物生产力和水分利用的研究[J].中国农业科学,1998,21(2):9.
[4] 山仑.节水农业及其生理生态基础[J].应用生态学报,1991,2(1):70.
[5] 肖厚军,蒋大明,夏锦慧,等.贵州岩溶旱区不同耕作覆盖方式玉米产量及水分利用率的研究[J].干旱地区农业研究,2004,22(1):73-75.
[6] 慕自新,张岁岐,郝文芳,等.玉米根系形态性状和空间分布对水分利用效率的调控[J].生态学报,2005,25(11):2895-2900.
[7] 李刚,王金艳.玉米生物产量水分利用效率的差异比较[J].杂粮作物,2005,25(5):316-318.
[8] 杨涛.干旱胁迫下不同玉米品种的耗水特性及其水分利用效率的差异[J].干旱地区农业研究,2005,23(5):103-107.
[9] 崔振海,马兴林.苗期干旱对玉米产量和水分利用效率的影响[J].玉米科学,2005,13(2):79-81.

(上接第 3965 页)

与 R22 + 1 叶的 Ca²⁺ - ATP 酶活性在 2 个测定时期处理均大于对照,均可以为甘蔗固氮提供更多的 ATP。硝态氮会抑制豆科植物根瘤固氮酶活性,但该研究的不同甘蔗品种处理与对照的硝态氮含量没有规律的变化。

(3)该试验发现,接种内生固氮菌可以改善甘蔗品种 R16 与 R22 健康组培苗的一些氮营养生理特性,但对甘蔗品种 G16 的影响不大。分析其原因可能是用于接种的内生固氮菌是从新台糖 16 号与巴西甘蔗品种 B8 中分离得到的,导致接种到 G16 健康组培苗中之后,G16 的氮营养生理特性变化不大。若需要了解这些内生固氮菌对甘蔗健康组培苗氮营养吸收的影响,还需要进行固氮菌分离、荧光标记等多方面的研究。

参考文献

[1] RUSCHEL A. Biological nitrogen fixation in sugarcane[M]//SUBBA R N, eds. Current developments in biological nitrogen fixation. Queensland: Queensland Branch Press, 1984:221-235.
[2] PATRIQUIN D G, GRACIOLLA R. Nitrogenase activity of sugarcane propagated from stem cuttings in sterile vermiculite[J]. Soil Biol & Biochem, 1980, 12: 413-417.

[3] LIMA E, BODDEY R M. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance[J]. Soil Biol Biochem 1987, 19:165-170.
[4] URQUIAGA CRUZ K. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates[J]. Soil Sci So, 1992, 56:105-114.
[5] BODDEY R M, URQUIGA S, REIS V. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane[J]. Plant and Soil, 1991, 137:111-117.
[6] LIR P, MACRAE I C. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1991, 23,999-1002.
[7] 邢永秀.甘蔗内生固氮细菌的分离 鉴定和生长特性[D].桂林:广西大学,2006.
[8] 彭运生,刘恩.关于提取叶绿素方法的比较研究[J].北京农业大学学报,1992,18(3):247-250.
[9] 李杨瑞.甘蔗叶片细胞器的 Ca²⁺ - ATP 酶和 Mg²⁺ - ATP 酶活性[J].植物生理学通讯,1987(6):20-21.
[10] 牛森.作物品质分析[M].北京:农业出版社,1992:183-185.
[11] 南京农业大学.土壤农化分析[M].北京:农业出版社,1981:49-51.
[12] 刘士哲.现代实用无土栽培技术[M].北京:中国农业出版社,2001:562-563.
[13] 李星洪,李大捷,李薇.对从甘蔗根部分离的固氮成团泛菌的研究[J].北京大学学报:自然科学版,1998,34(6):741-745.
[14] 樊妙姬,陈丽梅,蒋艳明.甘蔗联合固氮菌对甘蔗叶片养分含量的影响[J].广西科学,1998,5(4):311-313.
[15] BUTTERY B R, BUZZELL R I.大豆光合作用速率和叶绿素含量之间的关系[M].北京:科学出版社,1979:72-75.
[16] 宋亚娜,郑伟文.接种重氮营养醋杆菌对植物生长的影响[J].江西农业大学学报,2003,25(4):587-590.