

研究报告

耐氨固氮菌分泌物对水稻秧苗生长的影响*

丘明祺 卢秋雁 朱红惠 邱晓颖 丘元盛

(广东省微生物研究所 广州 510070)

摘要: 研究了催婉克氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 的不同菌株 (耐氨固氮型、野生型、不固氮型) 对杯栽水稻秧苗生长的影响, 发现耐氨固氮菌可分泌某种植物生长促进物质。此类物质可被阳离子树脂吸附, 在 80℃ 下活性不受影响。在适宜浓度下, 可使水稻秧苗的根重和苗重增加 30%。

关键词: 耐氨固氮菌, 植物生长促进物质

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0001-04

INFLUENCE OF EXUDATES OF AMMONIUM-RESISTANT N_2 -FIXING BACTERIA ON THE GROWTH OF RICE SEEDLING

QIU Ming-Qi LU Qiu-Yan ZHU Hong-Hui QIU Xiao-Ying QIU Yuan-Sheng

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

Abstract: By using cup culture, influence of different strains (ammonium-resistant N_2 -fixing type, wild type, none N_2 -fixing type) of *Klebsiella oxytoca* on the growth of rice seedling was compared. It was discovered that ammonium-resistant N_2 -fixing bacteria could excrete some plant growth promoting substance, which could be adsorbed by cation resin. It's activity wouldn't be affected at 80℃. At optimal concentration, the weight of rice root and seedling were increased by 30%.

Key words: Ammonium-resistant N_2 -fixing Bacteria, Plant growth promoting substance

采用基因工程技术选育的抗氨阻遏型固氮菌 (简称耐氨固氮菌), 经过多年的田间试验已证实其在水稻上的应用具有显著效果, 平均增产率达到 10%, 在甘蔗和蔬菜上的应用也有良好的反映, 说明它对不同作物均有促进生长的作用。^[1] 多年来的研究结果表明, 施用耐氨固氮菌除了可增加田间固氮量, 更可令水稻根系发达, 加强水稻对营养的吸收, 从而促进水稻生长。这也就意味着耐氨固氮菌能分泌出植物生长促进物质, 它对植物具有极强的促生作用。但其促生机理至今尚不清楚。本项研究的目的是探讨在水培或沙培条件下固氮菌液的不同部分对水稻秧苗生长的影响, 为今后深入研究耐氨固氮菌的增产机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

催婉克氏菌 (*Klebsiella oxytoca*): 野生型菌株 NG13 和不固氮的突变株 NG1389, 由日本国立遗传学研究所提供; 耐氨固氮型菌株 XX₂/pMC73A, 由本所选育而得。

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863 项目”) (No. 101-03-04-01)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 101-03-04-01)

收稿日期: 2001-04-20, 修回日期: 2001-05-06

1.2 细菌培养基

LB 培养液: 蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, NaCl 5g, 加水定容至 1L, pH 7.0~7.2。

Davis 培养液: 葡萄糖 20g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.32g, KH_2PO_4 3.4g, K_2HPO_4 12.06g, MgSO_4 0.1g, Na_2MoO_4 0.025g, FeSO_4 0.025g, 加水定容至 1L, pH 7.0。

1.3 水稻营养液

采用道格拉斯水稻营养液^[2]。

1.4 供试菌液样品处理

将选用菌株接种于 LB 培养基摇瓶培养 8h, 再转接于 Davis 培养基摇瓶培养 15h, 所得菌液经 10000r/min 高速离心 20min, 取上清液。将上清液过 732 阳离子树脂柱, 当流出液与上清液的 pH 相等时停止过柱, 对树脂柱进行洗脱, 分部收集洗脱液。以菌液、上清液、各收集液为样品进行杯栽试验。

1.5 水稻杯栽方法

水稻品种: 博优 3550, 由广东省农科院水稻研究所提供。

沙培和水培试验: 称 200g 细沙盛于塑料杯中, 加入水稻营养液 50mL, 每杯点播 15 颗水稻种子, 或量取 200mL 水稻营养液加入塑料杯中, 液面蒙一层纱网, 网面上点播 15 颗水稻种子。分别加入适量样品, 对照 (CK) 为与供试样品等量的未接种培养基。每个处理设 3 个重复, 随机放置于玻璃温室中, 适时补加营养液, 观察水稻秧苗生长状况, 于一定生长周期后收集水稻苗。

1.6 秧苗的烘干与称量

洗净秧苗, 置于恒温烘箱 105℃~110℃烘 30min 杀青, 再于 60℃~80℃烘干。用电子天平分别称出秧苗的根重和株重, 再计算出平均根重和平均株重。

2 结果

2.1 不同菌株的比较试验

经乙炔还原法验证, 供试的各菌株的相对固氮活性分别为: 0 (不固氮型), 100 (野生型), 110 (耐氮固氮型)。采用沙培杯栽方法以比较不同菌株对水稻秧苗生长的影响。试验结果见表 1。

表 1 不同菌株对水稻秧苗生长的影响

处理	平均根重 (mg/株)	增加率 (%)	平均苗重 (mg/株)	增加率 (%)
CK	25.27		81.42	
XX ₁ /pMC73A	32.61	29.0	89.05	9.4
NG13	28.44	12.5	85.96	5.6
NG1389	27.07	7.1	84.27	3.5

实验结果表明: ①如同多年来田间应用试验的结果, 接种耐氮型固氮菌株对杯栽水稻秧苗的生长有明显的促进作用, 而且对根部生长的促进作用更是显著。②接种野生菌株也有良好的效果, 但比不上工程菌株。③接种不固氮菌株对水稻秧苗的生长也有一定的促进效果。这是因为催婉克氏菌也有可能分泌出某些如吲哚乙酸 (IAA)、赤霉素 (GA) 和脱落酸 (ABA) 之类的植物生长促进物质。④耐氮型固氮菌株仅比野生菌株多出一个 *nifA* 质粒, 这个质粒仅含有抗卡那霉素基因、抗氨基青霉素基因和 *nifA*

基因，而不固氮菌株只是切断了野生菌株上的某一个固氮基因。除此之外，3 个菌株再没有其他区别，按理它们应能分泌出相同的植物生长促进物质。但是，他们对水稻秧苗生长促进作用却有明显差别。因此，耐氨固氮型菌株有较好的促生作用应与 *nifA* 质粒的表达有关。

2.2 不同组分间比较试验

选取耐氨固氮型菌株摇瓶培养，经处理得到菌液、上清液和阳离子树脂过柱洗脱液 1、2，以此为样品进行水培试验，所得试验结果见表 2。

表 2 不同组分对水稻秧苗生长的影响

处理	平均根重 (mg/株)	增加率 (%)	平均苗重 (mg/株)	增加率 (%)
CK	20.7		57.7	
菌液	24.1	16.4	65.0	12.7
上清液	24.8	19.8	65.6	13.7
阳柱洗脱液 1	27.1	30.9	76.3	32.2
阳柱洗脱液 2	23.7	14.5	67.1	16.3

表 2 表明：①阳离子树脂过柱洗脱液经检测没有活菌，但又具有很强的促生作用，表明在本项试验中耐氨固氮菌的促生作用是由于它们所分泌的某些促生物质引起的。②这些未知的促生物质可被阳离子树脂吸附。③应是洗脱液的促生作用优于菌液和上清液，是因为样品经过吸附洗脱后，提高了有效成分浓度。④样品中含有的物质可能较多，现时收集采用的分段方法并不一定确切，因此，洗脱液 1、2 都表现出很强的促生作用。这可能是同一物质处于两个不同的收集段，也可能是不同物质分别处于不同的收集段。相对而言，洗脱液 1 的促生效应优于洗脱液 2。

2.3 同一组分不同浓度比较试验

选取上述试验中促生效果比较明显的成分，即耐氨固氮型菌株分泌物阳离子树脂洗脱液第一部分和第二部分，采用不同的浓度进行水培杯栽试验。结果见表 3。

表 3 不同浓度样品对水稻秧苗生长的影响

处理	平均根重 (mg/株)	增加率 (%)	平均苗重 (mg/株)	增加率 (%)
CK	20.7		57.7	
洗脱液 1				
0.1mL	20.6	-0.5	57.6	-0.2
0.5mL	26.3	27.1	69.6	20.6
1.0mL	27.1	30.9	76.3	32.2
2.5mL	23.5	13.5	60.2	4.3
5.0mL	20.1	-2.8	55.6	-3.6
洗脱液 2				
0.1mL	21.0	1.4	57.1	-1.0
0.5mL	23.3	12.6	64.8	12.3
1.0mL	23.7	14.5	67.1	16.3
2.5mL	22.1	6.8	60.2	4.3
5.0mL	21.3	2.9	58.2	0.9

从试验结果可以看出，用量过小（0.1mL/杯）或过大（5.0mL/杯）对水稻秧苗生长不起作用，最佳的浓度应该为 1mL/杯。在适宜浓度下，促生作用表现得非常明显，根

重和苗重增加率可达到30%以上。

2.4 不同温度处理比较试验

选取上述试验中促生效果比较明显的成分,即XX₂/pMC73A阳离子树脂洗脱液第1部分和第2部分,分别经80℃水浴处理10min和100℃煮沸处理10min。所得样品进行沙培杯栽试验。结果见表4。

表4 不同温度处理的样品对水稻秧苗生长的影响

处理	平均根重 (mg/株)	增加率 (%)	平均苗重 (mg/株)	增加率 (%)
CK	9.87		21.8	
阳柱洗脱液1				
不加热	10.1	2.3	24.6	12.8
80℃	11.2	13.5	25.4	16.5
100℃	10.1	2.3	24.3	11.5
阳柱洗脱液2				
不加热	10.3	4.4	23.3	6.9
80℃	11.0	11.4	24.3	11.5
100℃	10.1	2.3	23.7	8.7

由于催婉克氏菌不含芽孢,在60℃以上很快就会死亡,由此也说明了本项试验结果不受活菌的干扰。试验结果也表明,样品中的有效促生物质经过80℃和100℃处理后,活性并没有受到影响。这对将来的制剂加工是非常有利的。

3 讨论

通过多年的研究,人们现已对植物根圈促生细菌(PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria)的促生机理有了较多的了解。产生植物生长调节物质(PGRS, plant growth regulation substances)是PGPR促生作用中一个很重要的部分^[3-6]。在本项研究中,我们发现耐氨固氮菌的分泌物中具有效力极强的促生物质。在适当浓度下施用,根重和苗重的增加可达30%。此类物质能被阳离子树脂吸附,并且经80℃处理后不会失去活性。由于我们采用了同一菌种的不同菌株(耐氨固氮型、野生型、不固氮型)进行比较,三者的主要区别在于有无nifA质粒,而耐氨型固氮菌的促生作用特别明显,也就是说促生物质的生成途径与nifA质粒的表达有关。此外,通过紫外线全波段扫描进行检测,不同菌株分泌物的光谱无明显的区别,说明这类促生物质没有特异的紫外吸收峰。它对水稻的主要作用是促进根系生长,增强根系吸收能力,进而促进植株地上部分生长,导致作物增产。因此,深入研究将会有重大的应用前景。

参考文献

- [1] 丘元盛. 耐氨固氮菌的应用. 广州:暨南大学出版社, 1997. 153~156.
- [2] 马太和. 无土栽培. 北京:北京出版社, 1980. 95~96.
- [3] 葛 诚, 崔 阵, 吴 薇. 世界农业, 1994, (9): 28~29, 1994 (10): 26~27.
- [4] 林 敏, 尤崇杓. 中国农业科学, 1989, 22 (6): 6~12.
- [5] 许煜泉, 林志新, 钟仲贤. 上海农业学报, 1997, 13 (4): 89~96.
- [6] 占新华, 蒋延惠, 徐阳春. 植物营养与肥科学报, 1999, 5 (2): 97~105.
- [7] 丁 静, 沈镇德, 方亦雄, 等. 植物学通讯, 1979, (2): 27~39.