

桉树与联合固氮菌相互作用的研究*

康丽华

(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)

摘要: 联合固氮菌-催婉克氏菌 (*Klebsiella oxytoca* NG13/pMC73A) 接种木本植物桃金娘科 (Myrtaceae) 桉树属 (*Eucalyptus*) 的苗木, 研究它们之间相互作用关系。扫描电镜观察结果表明: 联合固氮菌不但可以在桉树根表定殖, 而且还可进入根内定殖, 并在接种桉树的根际、根表和根内均分离到该菌。接种联合固氮菌能刺激桉树根系的分泌作用, 并对根系分泌物的氨基酸、糖及激素的含量有所影响。联合固氮菌对桉树生长有明显的促进作用。

关键词: 桉树, 联合固氮菌, 相互作用

中图分类号: S718.83 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0014-05

INTERACTION OF ASSOCIATIVE NITROGEN-FIXATION BACTERIA WITH EVCAIYPTUS

KANG Li-Hua

(Research Institute of Tropical Forestry, Chese Academy of Forestry, Guangzhou 510520)

Abstract: The interaction of *Klebsiella oxytoca* NG13/pMC73A with *Eucalyptus* were studied. The results showed that the root surface and even the inner cortex of *Eucalyptus* were colonized by *K. oxytoca*. The *K. oxytoca* was reisolated from rhizosphere, root surface and inner root of inoculated *Eucalyptus*. The inoculation with *K. oxytoca* stimulated the excretion of *Eucalyptus* root and affected the contents of amino acids, carbohydrates, phytohormones of root exudates. The seedlings of *Eucalyptus* to inoculation with *K. oxytoca* increased growth, total dry matter and N content by 29.81% ~ 100.40% after 3 months in comparinon to the uninoculated seedlings.

Key words: Interaction, *Eucalyptus*, *Klebsiella oxytoca*

生物固氮在农、林业生产中起着重要作用, 据报道, 全球每年生物固氮的总量大约为 1 亿吨, 是工业氮肥的 3 倍多^[1]。作为生物固氮的一个重要方面——联合固氮作用日益引起重视。近 20 年来, 水稻、甘蔗、牧草等禾本科作物的联合固氮作用研究已有大量报道, 在根表糖基分布、植物凝集素、细菌胞外多糖及有关基因的克隆、鉴定与调控机制等方面的研究取得较大进展^[2,3], 并逐步成为研究的前沿。但迄今为止对于联合固氮体系的作用机理还有许多问题尚未阐明, 为了使联合固氮作用获得更高的效益, 对植物和细菌的相互作用进行深入研究具有重要意义。近年来, 联合固氮菌与水稻、牧草等禾本科植物的相互作用研究较多, 然而与木本植物相互作用的研究几乎没有。

桉树 (*Eucalyptus*) 是木本植物桃金娘科 (Myrtaceae) 树种, 是世界上 3 大速生树种之一, 也是我国华南地区的主要造林树种之一。目前, 我国桉树人工林面积已超过 100 万公顷, 且每年新增 5 ~ 10 万公顷。桉树是很好的纸浆原材料, 在广东、广西和海南, 桉树造林已成为外商投资热点。桉树木片的出口为我国林业部门赚取了大量外汇, 成为林业行业支柱产业。目前, 为提高桉树人工林产量, 通常采用施用化学肥料的措施,

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39670605)

Project Granted by Chinese National natural Science Fund (No. 39670605)

国家“九五”攻关项目 (No. 96-011-01-07-01)

收稿日期: 2001-04-15, 修回日期: 2001-06-11

这不仅需要巨额投资,增加营林成本,且造成环境污染;长期经营桉树的林地土壤板结,地力衰退,产量下降,这是实现桉树可持续发展的最大障碍。然而通过人工接种联合固氮菌,将空气中约占78.6%的分子态氮转化为可供桉树吸收利用的氨态氮,促进桉树生长。这对于日趋贫瘠的桉树林地土壤改良、地力保持具有重要意义。本文研究了联合固氮菌与桉树之间的相互作用关系,以便提高联合固氮作用效益。

1 材料与方法

1.1 菌种

联合固氮菌选用含有抗氨苄青霉素(Ap^r)和卡那霉素(Km^r)质粒的催婉克氏菌(*Klebsiella oxytoca* NG13/pMC73A),来自广东省微生物研究所。

1.2 菌的培养

在LB培养基中添加0.1g氨苄青霉素(Ap)/L和0.05g卡那霉素(Km)/L,28℃~30℃液体振荡(100r/min)培养2~3d。

1.3 桉树苗木的培育及接种方法

桉树树种采用尾叶桉(*Eucalyptus urophylla*),种子经0.1%HgCl₂表面消毒5min,用无菌水冲洗干净,播种于放有滤纸的无菌培养皿内,置于28℃~30℃培养箱,发芽后移植到经1×10⁵Pa灭菌1h的蛭石,沙为1:1的容器中,待苗木长至2cm~3cm时,用无菌注射器吸取5mL菌液注射到苗木根系周围。培养3~4个月后取出苗木,进行显微观察和测定桉树的高生长、生物量和N含量。

1.4 扫描电镜观察

将接菌的桉树根在含0.88%NaCl的磷酸盐缓冲液中洗涤数次,除去根表的杂质,用JFC-1100离子溅射度膜,JSM-T300扫描电镜观察。

1.5 计数根际、根表及根内的催婉克氏菌

将接菌的桉树根分别经以下处理:(a)保留与根紧密结合的根际土,(b)用含有0.88%NaCl的磷酸盐缓冲液反复冲洗,除去根际土,(c)将经过b处理的根加2%Na-CLO消毒3min,再用无菌水冲洗。将经过上述不同处理的桉树根剪成0.3cm~0.5cm的小段,于研钵中研磨成浆状,梯度稀释后涂在含有氨苄青霉素和卡那霉素的LB培养基上,28℃~30℃培养2~3d后计数,测定联合固氮菌在根际、根表及根内的定殖数量。

1.6 桉树根系分泌物的收集

将经过3%盐酸浸泡12h、蒸馏水冲洗干净后烘干的河沙装入直径为3.5cm、高为19.5cm的玻璃大试管,加满Jensen营养液,在1×10⁵Pa灭菌1h。然后播种经过0.1%HgCl₂表面消毒5min并用无菌水冲洗干净的桉树种子。出苗后每支试管保留1株苗,接种处理每株苗加1mL的菌悬液,对照处理每株苗加1mL的无菌培养液。每个处理4株苗,3次重复。每周浇1~2次无菌水。培养3~4个月后取出桉树苗,称根系鲜重,每个处理随机各取30g根系,用1L的无菌蒸馏水淋洗,收集液在60℃减压浓缩至0.2L。

1.7 桉树根系分泌物的测定

用氨基酸自动分析仪测定分泌物中氨基酸成分及含量。用分光光度计测定分泌物中糖类的成分及含量。用酶联免疫法测定分泌物中激素的成分及含量^[4]。

1.8 桉树根系分泌物的添加及活菌数量测定

桉树根系分泌物经Sartorius Minisart N 0.2μm过滤灭菌后加入已灭菌的含有氨苄青霉

素和卡那霉素的 LB 液体培养基, 使其浓度为 5%、10% 和 20%, 接种联合固氮菌后振荡培养 3d, 用活菌计数法测定菌数。

2 结果与讨论

2.1 联合固氮菌在桉树根际的定殖部位

经扫描电镜观察, 接种催婉克氏菌的桉树在根表皮、根毛区均可观察到大量的菌体, 并且在皮层薄壁细胞区也可观察到催婉克氏菌的存在(图 1)。在未接种的对照桉树根表或薄壁细胞中则看不到菌体存在(图 2)。结果表明: 催婉克氏菌不但可以在桉树根表定殖, 而且还可进入根内定殖。这与联合固氮菌在水稻等禾本科植物上的定殖部位相同^[6-7]。

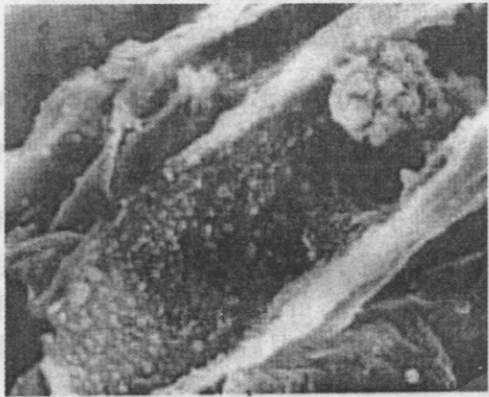


图 1 接种的桉树根表皮细胞 (2,000 ×)

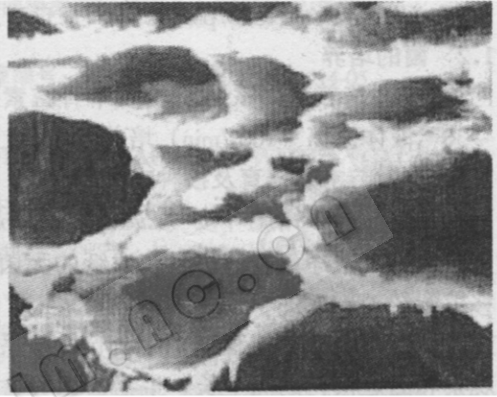


图 2 未接种的桉树根表皮细胞 (2,000 ×)

2.2 联合固氮菌在桉树根际各部位的定殖情况

表 1 桉树根际的催婉克氏菌数量

处理	根际 (个/g 土)	根表 (个/g 根)	根内 (个/g 根)
接种	4.9×10^6	3.8×10^6	1.3×10^4
对照	0.0	0.0	0.0

多; 其次为根表; 根内数量最少 (表 1)。这与联合固氮菌在水稻、小麦等禾本科植物根系的分布情况相一致^[5]。

用含有卡拉霉素和氨卞青霉素的选择性培养基对桉树根际各部位定殖的催婉克氏菌数量进行分析, 菌数统计结果表明: 在根际土壤中催婉克氏菌数量最

表 2 桉树根系分泌物氨基酸成分及含量

游离氨基酸	名称氨基酸含量 (mg/g 鲜重根)	
	接种	对照 (不接种)
天冬氨酸 Asp	0.033	0.014
谷氨酸 Glu	0.047	0.034
丝氨酸 Ser	0.026	0.020
甘氨酸 Gly	0.014	0.013
苏氨酸 Thr	0.013	0.009
组氨酸 His	0.086	0.052
丙氨酸 Ala	0.020	0.021
精氨酸 Arg	0.041	0.025
酪氨酸 Tyr	0.045	0.031
缬氨酸 Val	0.037	0.021
蛋氨酸 Met	0.027	0.017
苯丙氨酸 Phe	0.034	0.020
异亮氨酸 Ile	0.027	0.020
亮氨酸 Leu	0.041	0.027
赖氨酸 Lys	<0.024	<0.024
氨基酸总量	0.466	0.299

2.3 联合固氮菌对桉树根系分泌物的影响

在水稻等禾本科植物与联合固氮菌的相互作用研究中, 发现了植物根所分泌的碳化物可作为微生物的能源, 而且有些分泌物还因为微生物的存在而增加^[8-10], 分泌物中的有机酸和糖对于根际微生物的生长、在根际的聚集、并与根的联合固氮等是不可缺少的物质^[7]。在未接种固氮菌条件下, 桉树根能分泌多种氨基酸、糖类物质和激素, 其中有些物质可能成为固氮菌良好的碳源和氮源物质而被吸收利用, 以支持其在根际的生长。为此我们测定了在接种固氮菌条件下桉树根系分泌物的组成和含量, 结果

发现氨基酸、糖类和激素含量均发生变化(表 2、3),其中除丙氨酸外的 14 种氨基酸和激素含量高于对照,糖类除了葡萄糖以外其余的蔗糖、果糖和多糖均低于对照,这可能是定殖在桉树根际的催婉克氏菌选择性吸收利用蔗糖、果糖、多糖和丙氨酸以维持其生长及代谢,同时释放出氨基酸和激素。

表 3 桉树根系分泌物糖类和激素成分及含量

处理	糖类含量 (mg/g 鲜重根)				激素含量 (pmol/g 鲜重根)	
	蔗糖	果糖	葡萄糖	多糖	赤霉素	脱落酸
接种	0.025	0.007	0.007	0.071	2713.33	260.0
对照	0.032	0.008	0.002	0.129	1843.33	190.0

2.4 桉树根系分泌物对联合固氮菌的影响

培养基添加根系分泌物对固氮菌生长的影响结果表明:在根系分泌物浓度为 20% 时,固氮菌数量为 333.3×10^6 个/mL,比对照提高 177.752%,随着浓度的降低,固氮菌数量随之下降,当桉树根系分泌物浓度下降为 5% 时,其数量仅为 147.0×10^6 个/mL,比对照提高 22.50% (表 4)。说明桉树根际环境适合固氮菌的生长。

表 4 不同浓度的桉树根系分泌物对固氮菌生长的影响

根系分泌物浓度	固氮菌数量 ($\times 10^6$ 个/mL 菌液)	比对照增加 (%)
5%	147.0	22.50
10%	280.0	133.33
20%	333.3	177.75
对照	120.0	-

2.5 接种联合固氮菌促进桉树生长的作用

联合固氮菌对桉树生长有明显的促进作用(表 5),接种固氮菌的桉树在苗高、叶片干重、茎干重、根干重和总生物量均高于不接种的对照。表 6 结果可以看出:桉树接种固氮菌后,其叶片、茎、根和全植株的 N 含量明显高于不接种的对照。这可能是桉树根际的催婉克氏菌固定空气中分子态 N 的结果。联合固氮菌与桉树之间的相互作用研究结果,对桉树人工接种固氮菌提供指导,具有广阔的应用前景。

表 5 接种联合固氮菌对桉树苗木生长的效应

分析项目	接种	对照	接种比对照增加 (%)	F 值 *
苗高 (cm)	46.6	35.9	29.81	107.2 **
叶片数 (对/株)	26.5	19.3	37.31	6.191 **
叶片干重 (g/株)	0.7447	0.5516	35.01	5.249 **
茎干重 (g/株)	0.8979	0.5771	55.59	15.51 **
根干重 (g/株)	0.9011	0.5036	78.93	14.85 **
总生物量 (g/株)	2.5445	1.6322	55.89	13.78 **

* F 值为方差分析值, ** 为接种与对照差异极显著 ($P \leq 0.01$)

表 6 接种联合固氮菌对桉树苗木 N 含量的影响 (mg/株)

桉树苗木	接 种	对照	接种比对照增加 (%)
叶片	13.362	9.863	35.48
茎	6.196	3.852	60.85
根	6.984	3.485	100.40
全植株	26.542	17.190	54.40

参考文献

- [1] 尤崇标, 姜涌明, 宋鸿遇主编. 生物固氮. 北京: 科学出版社, 1987. 322 ~ 347.
- [2] 林 敏, 尤崇标. 核农学报, 1993, 7: 98 ~ 104.
- [3] Brockwell J. Applied Microbiology, 1963, 11: 3771 ~ 3383.
- [4] 吴颂如, 陈婉芬, 周 燮. 植物生理学通讯, 1988, 5: 53 ~ 57.
- [5] 尤崇标, 姜涌明, 宋鸿遇主编. 生物固氮. 北京: 科学出版社, 1987. 224 ~ 235.
- [6] Old K M, Nicolson T H. New Phytologist, 1975, 74: 51 ~ 58.
- [7] Martin J K. Soil Biology Biochemistry, 1977, 9: 1 ~ 7.
- [8] Barber D A, Lynch J M. Soil Biology Biochemistry, 1977, 9: 305 ~ 308.
- [9] 尤崇标主编. 水稻根际联合固氮. 北京: 农业出版社, 1990. 273 ~ 283.
- [10] 尤崇标主编. 水稻根际联合固氮. 北京: 农业出版社, 1990. 294 ~ 297.