

植物叶际固氮菌研究进展

沙小玲^{1,2} 梁胜贤¹ 庄绪亮^{1,2,3*} 韩庆莉⁴ 白志辉^{1,2,3*}

(1. 中国科学院生态环境研究中心 北京 100085)

(2. 中国科学院大学中丹学院 北京 100049)

(3. 中国科学院大学资源与环境学院 北京 100049)

(4. 西南林业大学林学院 云南 昆明 650224)

摘要: 固氮菌广泛存在于植物叶际,能固定空气中的氮气,满足自身或植物的部分氮素需求。基于纯种分离和培养的传统生物学方法已经研究了部分叶际固氮菌的特性,但对叶际固氮菌的物种组成、群落结构及生态功能等方面的认识还非常有限。随着分子生物学技术的发展、微生物分子生态学研究方法的逐步成熟,人们对叶际微生物的多样性和生态功能的研究越来越深入。叶际固氮菌具有丰富的多样性,温度、湿度、光照等环境因素及植物种类和微生物互作均会影响叶际固氮菌的组成。不同于根际固氮菌,叶际固氮菌具有非专一性,且不易受化肥的影响,其在农业生产上已经表现出潜在的应用价值。为此,本文综述了农作物、森林、海域生态系统中叶际固氮菌的群落结构组成及生态功能,以及外界因素对叶际固氮系统的影响。

关键词: 叶际, 固氮菌, 16S rRNA 基因, 微生物多样性, 微生物肥料

Nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere

SHA Xiao-Ling^{1,2} LIANG Sheng-Xian¹ ZHUANG Xu-Liang^{1,2,3*}
HAN Qing-Li⁴ BAI Zhi-Hui^{1,2,3*}

(1. Research Center for Eco-Environment Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

(2. Sino-Danish College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(4. Forestry College, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: Phyllosphere contains a wide distribution of nitrogen-fixing bacteria that fix nitrogen for bacterial and plant growth. The properties of nitrogen-fixing bacteria have been partially studied through traditional culture-dependent methods. However, knowledge on nitrogen-fixing bacteria diversity, community structure and function in phyllosphere remains limited. Recently, developments

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31570494); Science & Technology Program of Yunnan Province (No. 2013FB051); National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFC0501404)

*Corresponding authors: E-mail: ZHUANG Xu-Liang: xlzhuang@rcees.ac.cn; BAI Zhi-Hui: zhbai@rcees.ac.cn

Received: January 31, 2017; Accepted: July 04, 2017; Published online (www.cnki.net): August 11, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31570494); 云南省科技计划项目(No. 2013FB051); 国家重点研发计划课题项目(No. 2016YFC0501404)

*通讯作者: E-mail: 庄绪亮: xlzhuang@rcees.ac.cn; 白志辉: zhbai@rcees.ac.cn

收稿日期: 2017-01-31; 接受日期: 2017-07-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-08-11

in molecular ecology techniques have led to the widespread use of culture-independent methods, enable researchers to understand phyllosphere microbial diversity and ecological function. Phyllosphere nitrogen-fixing bacteria exhibit abundant diversity that is mainly affected by environmental conditions (temperature, humidity and light), the host plant species and microorganism interactions. Unlike rhizosphere diazotrophs, phyllosphere nitrogen-fixing bacteria may not be affected by chemical fertilizers and could thus be potentially beneficial in agricultural applications. This review discusses the latest research on phyllosphere nitrogen-fixing bacteria diversity and ecological functions in agricultural, forest, and marine ecosystems, and on the factors influencing the nitrogen-fixing system, thus providing new insight into phyllosphere nitrogen-fixing bacteria.

Keywords: Phyllosphere, Nitrogen-fixing bacteria, 16S rRNA gene, Microbial diversity, Biofertilizer

叶际微生物与其生存环境组成了一种独特而复杂的生态系统^[1]。一般认为叶际(Phyllosphere)是邻接植物地上部分(茎、叶、花、果)表面和内部的生境,而植物的叶是叶际的主导区域,其中的微生物称为叶际微生物(Phyllosphere microorganisms)^[2]。叶际存在许多有益的微生物种群,在一定程度上促进植物生长,拮抗植物病原菌。固氮菌可定殖于植物叶际,进行固氮作用,促进植物生长繁殖。固氮菌在自然生态系统氮循环中发挥着重要的作用,生物固氮的成本低、无污染、利用率高,是规模最大生态环保的氮肥制造基地^[3]。关于叶际固氮的微生物纯培养研究在 20 世纪报道较多。近年来,随着分子生态学技术的进步,越来越多的学者重视叶际固氮体系的发展。近期的研究逐步揭示了叶际固氮微生物多样性及其群落结构,依据植物种类和环境因子等因素综合评价种群特征。本文从叶际固氮微生物的多样性及生态功能、研究方法及其外部影响因素等方面综述了最新的研究进展,并对叶际固氮菌的生产应用进行了展望。

1 叶际是固氮菌生存的适宜场所

地球陆地表面覆盖着大量的植被(约 $4 \times 10^8 \text{ km}^2$),植物的上下层叶面积(约 $1.07 \times 10^{10} \text{ km}^2$)大约是地球面积的两倍^[4]。丰富的叶面积为微生物提供良好的栖息环境(10^6 – 10^7 cell/cm^2)^[5]。植物叶面存在多种有机物,包括碳水化合物、氨基酸、有机酸和糖醇,为微生物生存提供必要的碳源和氮源,如大豆叶分泌 0.2–10 $\mu\text{g/g}$ 糖分可供 10^7 – 10^8 微生物生存^[6]。此

外,植物产生可挥发的代谢物,如异戊二烯和 C_1 化合物(如甲醇),也可作为有效碳源。研究发现,叶面存在磷酸盐、硫酸盐和铁的传送系统,为叶际微生物生长提供必需的元素。与根际环境相比,叶际环境比较苛刻,营养物质相对贫乏。叶际表面微生物直接暴露于空气中,昼夜温差和湿度波动性大,紫外线照射和存在活性氧等不利因素均会影响微生物生存。微生物分泌的细胞外聚合物有助于维持湿润的叶际环境^[7]。叶面疏水性蜡状表皮降低了水分蒸发,减少了植物代谢物的溢出,造成贫营养的叶面环境^[8]。但研究表明,叶际微生物数量丰富,尤其在温带、亚热带和热带地区^[4]。分子生物学结果表明,叶际微生物群落结构复杂,存在不同的微生物群落,包括细菌、真菌、放线菌、线虫和病毒等^[9]。固氮菌在叶面上定殖,成为多种植物叶际微生物的主要类群。叶际固氮菌能还原空气中的氮气,满足自生或植物的氮素需求^[10]。

2 叶际固氮微生物

叶际是生物固氮的适宜场所,固氮菌广泛存在于植物叶际。目前,叶际固氮菌的研究多集中于农作物、森林、海域生态系统。Ruinen^[11]曾表明热带植物叶面固氮菌的数量平均为 $1.25 \times 10^7 \text{ CFU/cm}^2$ 。可见,叶际固氮菌的数量比较丰富。尤其是有效氮素缺乏的环境,植物的生长繁殖与叶际固氮菌密切相关,一般在湿地和贫营养环境下叶际固氮菌具有丰富的多样性。目前报道的叶际固氮菌主要为细菌和蓝细菌。Albino 等^[12]从红丁香叶际和根际筛出 34 株

具有固氮基因的细菌,其相似度只有 12%,可见红丁香叶际固氮菌具有多样性。Jadhav 等^[13]也表明西红柿、茄子和花生的叶面固氮菌相对较多。固氮的多样性随季节变化。冬季茄子叶面固氮菌最多,作物上叶际固氮菌种类在夏季较少。

一些研究表明农作物叶际固氮菌不但具有较高的固氮能力,还能促进作物生长,提高作物产量。Mwajita 等^[14]的研究表明,38.5%的水稻叶际细菌具有固氮酶活性,同时能产生溶磷作用和分泌吲哚乙酸(IAA),直接促进水稻生长。研究发现,叶际固氮菌可产生抗菌物质,降低玉米大、小斑病的发病率,间接促进作物生长发育。Venkatachalam 等^[15]发现从盆栽中分离的水稻叶围细菌的固氮作用明显高于田间试验。叶际固氮菌的固氮作用可能会受其他微生物的影响,如酵母和真菌^[16]。所以,研究农作物叶际固氮菌的活动规律是有必要的,它能为农作物增产提供指导作用。

叶际固氮菌在海域和森林的氮循环中发挥重要的作用。对于湿润的热带生态系统,叶面的固氮作用是重要的氮素来源^[17]。蓝细菌是森林和海域生态系统的优势固氮菌。Uku 等^[18]发现在低营养条件下,蓝细菌与海神草关系密切,可能进行联合固氮满足 N 的需求。通过乙炔还原法测定叶面固氮菌一昼夜的固氮量,可达 358 nmol C₂H₄/(g·h)。海草上的优势菌是深海底的蓝细菌,部分是蓝藻内共生体的海洋硅藻。研究还发现了在泛热带地区存在的独特固氮菌。海神草上的蓝细菌具有不同的异形胞,表明固氮菌种类的多样性,有利于海神草在 N 缺乏的海域生存^[19]。可见,叶际固氮菌可在一定程度上满足植物的氮素需求,有助于维持生态系统营养元素的平衡。

3 叶际固氮体系

固氮微生物体内含有特定的酶类——固氮酶,能将分子氮还原成氨。固氮酶一般由两种蛋白组成:一种含有 Fe,即铁蛋白;另一种含有 Fe 和 Mo,即钼铁蛋白。铁蛋白中含有 4 个 Fe,由 2 个亚基组

成(γ_2)。钼铁蛋白含有 2 个 Mo 和 28 个 Fe,由 2 个 α 亚基和 2 个 β 亚基组成四聚体($\alpha_2\beta_2$)。但一些细菌如固氮菌和少数光合固氮菌,其辅助因子含有钒,或仅含有铁^[20]。N₂ 的还原作用是由双组分固氮酶复合体催化的,蛋白单独存在没有固氮活性。生物固氮时,黄素氧还蛋白(Fld)或铁氧还蛋白(Fd)将 NAD(P)H₂ 提供的还原力[H]和 e⁻传递给铁蛋白,铁蛋白与 Mg-ATP 复合物结合后,将 H⁺和 e⁻传递给钼铁蛋白,同时 Mg-ATP 复合物水解。最后钼铁蛋白将 e⁻传递给 N₂ 和质子,产生 NH₃ 和 H₂^[21]。在固氮反应中,铁蛋白是固氮酶还原酶,而钼铁蛋白才是真正的固氮酶。固氮酶对氧极其敏感,一般催化反应需要在厌氧条件下进行。但对于非专性厌氧生物,微氧条件下更有利于高效固氮。固氮酶除了还原 N₂,还可以还原其他化合物,如乙炔等。目前较常用的固氮酶活性测定方法——乙炔还原法,正是运用了这个原理。

固氮微生物主要以 3 种体系进行固氮作用:自生固氮体系、联合固氮体系和共生固氮体系。目前,关于叶际固氮菌的固氮体系的研究还不透彻。一般认为叶际固氮菌可以联合固氮体系进行固氮作用。在联合固氮体系中,固氮细菌可分布在根际、叶面甚至组织内部,主要集中于根部。当进行固氮作用时,植物的分泌物和脱落物提供其生活和固氮所必需的能量和碳素。

联合固氮体系是自生固氮和共生固氮体系的过渡阶段。固氮菌与植物之间是一种松散的联合,没有形成特异的分化结构。目前,叶际联合固氮体系的探索还在初步阶段,但根际联合固氮体系的研究已趋于成熟。联合固氮体系的形成可以分为三个阶段:趋化、结合和入侵。植物根部分泌的有机酸、糖、氨基酸形成的梯度和低氧浓度能吸引联合固氮菌,大多数细菌受趋化蛋白 Mcps 甲基化作用控制,通过细菌鞭毛的旋转运动逐渐接近根部。联合固氮菌大多聚集在植物根表或根冠外的黏质或植物凝集素部分,细菌表面的胞外多糖与其进行相互识别

后, 吸附固定于植物根系。联合固氮菌可通过伤口、裂隙或根毛进入植物组织内, 定殖于表皮和皮层细胞的间隙, 有的固氮菌甚至进入中柱, 定殖于维管束细胞^[22]。进入植物内部的固氮菌, 具有较高的特异性, 是内部优势菌; 降低了其对营养物质的竞争, 促进植物与菌之间的物质交换。定殖于植物根际的固氮菌可能会释放自体诱导物的信号分子 (Autoinducer, AI), 使得自生密度不断增加, 形成群体感应 (Quorum sensing), 调节细胞胞外多糖的合成、吸附和生物膜的形成, 从而改变其生理活性^[23]。Elasri 等^[24]对假单胞杆菌存在的根际进行研究, 发现植物根际产生高丝氨酸内酯类信号分子明显高于对照, 所以, 联合固氮菌中存在群体感应。根际联合固氮体系的研究可为叶际固氮机制的探索提供指导思路, 促进叶际固氮菌与植物、其他叶际微生物关系的研究。

4 叶际固氮菌分子生态学研究方法

早期对叶际微生物的文献主要集中在植物病原菌的研究方面。近年来, 通过对叶际微生物 16S rRNA 基因的研究发现, 叶际微生物具有丰富的多样性, 其中未培养微生物占很大比例^[25]; 而未培养微生物与已培养的微生物种群在系统发育上差距很大。

微生物在基因水平上的多样性可通过 DNA 组成的复杂性体现出来。为提高 DNA 提取效率, 可从环境样品中直接提取 DNA, 全面反映微生物整体的群落结构。通过分子指纹技术, 快速检测和分析微生物群落结构。目前, 分子生物学方法已逐步运用于叶际固氮菌的研究。

4.1 实时荧光定量 PCR 技术 (Real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR)

RT-qPCR 是由核酸探针技术、荧光共振能量传递技术和 PCR 技术有机结合的实时定量检测的核酸技术^[26]。该方法不仅能定性, 还能定量研究微生物群落的结构特点和丰度变化, 为此 RT-qPCR 技术可作为初步筛选大量样品的检测技术。

Church 等^[27]运用 RT-qPCR 技术研究太平洋海

固氮基因 (*nifH*) 表达时发现, 单细胞蓝藻 *nifH* 表达情况与物种有关, 并且具有特定的时间规律。Zehr 等^[28]用 RT-qPCR 和定量 PCR 技术 (qPCR) 研究夏威夷附近海域的单细胞固氮蓝藻 *nifH* 时发现, 营养盐磷对固氮作用和 *nifH* 的表达影响不明显。而 RT-qPCR 结果表明, 某些单细胞蓝藻可能存在生理状态上的差异, 使其在细胞水平上, 固氮作用和光合作用不是空间隔离的。Short 等^[29]发现 912h4 *nifH* 序列丰度在港口附近最大, 而且其丰度值随盐度的增加而增加, 在 4 月份正午时达到最大。为此, RT-qPCR 技术多用于检测环境样品, 其对 *nifH* 的检测具有较强的特异性, 检测速度快。但 RT-qPCR 很少用于检测纯种培养微生物的 *nifH*。

4.2 变性梯度凝胶电泳技术 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)

DGGE 技术是微生物生态学中常用的分子指纹图谱技术之一。通常以复杂的环境样品为研究对象, 分析微生物基因组 DNA^[30], 推测复杂环境下微生物的群落特征、分类学地位, 观察微生物对环境的响应和适应机理。

Pedraza 等^[31]发现早稻叶际接种巴西固氮螺菌后, 其内生固氮细菌的微生物群落发生变化。DGGE 结果表明, 早稻叶际内生细菌的数量受接种的固氮螺菌基因型影响, 但其叶际内生优势菌群没有改变。Uku 等^[18]运用 DGGE 分析东非海草上的原核附生菌, 发现单细胞蓝藻在海神草和海尾草中占主导地位。然而在相同的地方, 全楔草没有出现蓝细菌, 说明蓝细菌与海草的共生关系具有一定的专一性。

可见, DGGE 技术能直观、定性地分析和比较微生物群落结构的差异。然而 DGGE 技术仅能分析有限的优势微生物类群, 存在低估微生物群落多样性的可能^[32]。所以, 在分析大规模环境样品时, DGGE 技术不是优先考虑的手段。

4.3 末端限制性片段长度多态性技术 (Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)

T-RFLP 技术引入了荧光物质, 用于评价复杂

的微生物群落多样性,能快速有效地分辨不同环境条件下微生物结构组成和多样性。T-RFLP 技术的分辨率优于 DGGE 技术。

Hunter 等^[33]从 3 种莴苣叶际提取总的 DNA,运用 T-RFLP 技术,建立 16S rRNA 基因克隆文库分析叶际细菌群落结构,结果表明不同植物形态叶际微生物的末端限制性片段长度存在显著差异。Rico 等^[34]运用 T-RFLP 技术研究森林叶际微生物动态时发现干旱会增加微生物群落的丰度,夏季群落增加较明显。在半干旱地区,干旱条件下叶际的碳氮比可能会随之升高。叶际微生物可能通过固氮作用提高植物适应环境的能力。可见,植物叶片特性对叶际微生物和固氮菌群落可能有一定影响。

4.4 高通量测序技术(Next-generation sequencing technology, NGS)

NGS 技术同样分析微生物基因组 DNA,并用芯片进行大规模平行测序。NGS 技术能全面反映整体微生物的物种遗传多样性和群落结构,并能客观反映低丰度的重要的功能微生物,弥补 DGGE 技术的缺点。

Knief 等^[35]对水稻叶际和根际的微生物进行宏基因组测序,发现叶际和根际存在一个碳转化过程。该方法确定根际固氮菌还原酶,而且 *nifH* 基因也存在于不同的叶际细菌。NGS 技术可较为全面地反应微生物的基因组和转录组水平的差异,为深入了解叶际固氮菌提供技术支持。

Balint-Kurti 等^[36]表明重组自交系玉米的叶际细菌群落存在多样性。研究植物对微生物群落作用机制时发现,玉米六号染色体区域(QTL)决定叶际微生物多样性,这些基因座与控制玉米真菌病害抗病性的基因部分重合。这种联系表明一些植物可促进有益微生物的生长。可利用分子生物学技术,研究固氮菌与植物叶际的作用机制,了解植物特性对固氮菌的影响机制,加深对叶际固氮菌的认识。其作用机制可能有助于进一步认识叶际固氮菌对植物生长繁殖的重要作用,尤其在氮素缺乏的地区,如海域和森林。

4.5 生物芯片技术(Biochip)

基因芯片,又称 DNA 芯片(DNA chip),是生物芯片中发展最成熟的技术。该技术是将大量已知的序列探针集成在同一个基片上,经过标记的靶核苷酸序列和基因芯片上特定位点的探针杂交,根据检测到的杂交信号对生物体的基因进行分析^[37]。基因芯片技术具有高度的并行性、多样性和微型化,可快速并行检测多个样品,避免误差,降低实验费用。张于光等^[38]构建了用于微生物群落鉴定的基因组芯片,该芯片含有固氮、硝化和去硝化等 2 704 个基因。谢建平^[39]运用基因功能芯片分析环境微生物群落时发现,铜矿厂的酸性矿坑水(AMD)的微生物群落结构较简单,但不同 AMD 样品的微生物群落结构有较大差异。气候变暖显著影响土壤微生物群落结构,并导致地表微生物群落功能基因的丰度增加。生物芯片技术操作便捷,自动化程度高,是未来检测技术的发展趋势,会广泛用于环境微生物领域,为叶际固氮基因信息的分析提供技术支持。

5 叶际固氮菌的影响因素

为深入了解叶际固氮微生物,有效控制叶际固氮菌的氮代谢,发掘叶际固氮体系的潜力,研究影响叶际固氮菌的环境因素和寄主植物是有必要的。

5.1 湿度和光照

湿度和光照对叶际固氮产生很大影响。在含水量和光照适宜的条件下,有利于固氮微生物生存并发挥固氮作用。以前有学者提出增加湿度和光照,可提高植物光合作用,促进植物分泌代谢产物,可刺激固氮作用。

光照可能影响叶际固氮菌的种类。Hamisi 等^[19]研究海神草的叶际固氮菌的昼夜变化,发现白天的优势固氮菌存在异形胞,而晚上的主要固氮菌没有异形胞。适宜的湿度条件有利于微生物进行固氮作用。固氮微生物对干旱高度敏感,在水分胁迫的条件下,固氮作用迅速受到抑制。研究表明干旱条件会严重影响豆科作物共生固氮作用。然而叶际固氮菌也易受湿度环境的影响^[15]。在哥斯达黎加雨林,

如果缺乏降水, 伪枝藻属的固氮速率会在 2–3 d 内下降至零。在水分充足的条件下, 其他小气候条件如温度、光照强度等因素也会影响叶际固氮微生物的固氮速率, 但程度较小^[18]。Rico 等^[34]发现气候干旱会增加麻栎叶际微生物的丰度, 显著提高夏季叶际微生物数量, 但碳氮比也会随之升高。干旱的环境条件可能影响了麻栎叶际固氮菌生存状况。叶际固氮菌主要分布在热带雨林, 温带森林系统也存在叶际固氮菌, 其物种丰度及多样性主要取决于水分^[40]。

5.2 植物种类

叶际固氮的研究中, 未发现固氮菌与寄主形成专一性联合。但固氮微生物的某些种类适应于特定的植物种类和生态环境, 这是自然选择的结果。Fürnkranz 等发现哥斯达黎加雨林的 *Carludovica drudei* 和 *Costus laevis* 的主要固氮菌都是念珠藻属^[41]。Rigonato 等^[42]发现 *Rhizophora mangle* 和 *Laguncularia racemosa* 的叶际具有相似的蓝细菌。同一研究区域, 大量潜在的固氮蓝细菌与海神草关系密切, 而全楔草属上没有发现蓝细菌^[33]。

Rigonato 等^[43]研究了森林叶际蓝细菌群落特征, 发现叶际蓝细菌主要受植物种类影响, 树的地理位置对蓝细菌群落分布影响较小。在光照条件下, 叶际固氮速率与植物种类的密切相关, 而伪枝藻属的固氮速率与覆盖的叶面积有关。植物种类不同导致叶面营养条件不一致, 这可能是固氮菌种类存在差异的原因之一。

同一种植物生长在不同的生境, 叶际固氮微生物的种类也存在多样性。研究表明肯尼亚海岸线地带海神草的优势固氮菌为单细胞蓝藻^[41]; 而印度洋水域海神草的优势蓝细菌是深海底的蓝细菌^[34]。

叶际固氮优势种的差异和适应性是微生物对具有光化学特性和分泌物性质的特殊植物的选择。植物叶片分泌的碳水化合物量是影响叶际固氮菌生长繁殖的限制因素之一。

5.3 微生物之间的相互作用

植物叶际富集了数量庞大且种类繁多的微生物,

这些微生物的集合及其全部遗传信息可称为叶际微生物组^[44-45]。微生物之间通过协作和竞争等相互作用控制群落发展。Lv 等^[46]通过磷酸脂肪酸 (PLFA) 和 DGGE 技术分析发现变形菌门革兰氏阴性菌(G⁻)的高丝氨酸内酯(AHLs)作为群体感应(QS)分子, 调节了烟叶叶际细菌群落的密度, 同时还改变了群落的结构。Müller 等^[47]也发现产生 AHL 的变形菌门的细菌和假单胞菌可通过 QS 机制与其他菌种在营养缺乏的叶际环境中竞争。

叶际固氮菌不仅受环境条件和宿主植物的影响, 固氮菌与其他微生物之间也存在复杂的相互作用。将多粘类芽孢杆菌喷于油菜叶际, 发现油菜叶际的细菌总量和真菌总量, 以及革兰氏阳性菌(G⁺)和 G⁻的数量均有一定影响^[48]。将固氮螺菌属接种于水稻, 分析表明水稻叶际微生物的优势群落没有受到影响, 而氮元素含量及水稻产量得到提高^[31]。固氮菌的加入打破了微生物原有的生态平衡, 但微生物群落自身能够修复再次达到新的平衡。随着微生物组技术的发展, 更多的细菌和真菌被发现参与了植物固氮^[49]。所以, 系统研究叶际微生物组在宿主植物氮元素营养吸收方面的功能, 可以更好的了解营养吸收过程, 提高营养吸收效率, 减少化学肥料的使用。

6 农业生产应用及展望

叶际固氮体系的研究还不成熟, 在应用价值方面研究较少。但叶际固氮菌已显示出促进作物增产的潜在效果。Giri 等^[50]从森林叶际分离出 *Corynebacterium* sp. AN1 和 *Flavobacterium* sp. TK2 均可进行固氮, 其中 TK2 固氮效果更好。将它们接种于玉米叶际, 可显著提高作物产量, 达 30%–37%, 增产效果接近化肥的作用。我们的前期研究发现, 将多粘类芽孢杆菌微生物肥料喷施于茶树叶面, 结果表明茶的水可溶出物, 茶多酚含量及其产量得到显著提高^[51]。Madhaiyan 等^[52]从 *Jatropha* 叶际内部分离出 *Methylobacterium* L2-4 菌株, 具有固氮作用。将其接种于 *Jatropha* 叶际表面, 可显著增加叶片数

量、叶绿素含量和株重,同时种子产量也得到提高。研究表明,叶际固氮菌也可分泌激素刺激植物生长发育,提高增产效果。现在,越来越多学者发现叶际固氮菌可分泌生长素,促进植物生长。

在生产上,化肥肥料是提高作物高产的有效途径。但农肥和化肥的施用会一定程度上影响固氮微生物的多样性。刘朴方等^[53]研究表明农肥和化肥的施用均会降低大豆根瘤菌和土壤固氮菌的多样性,并对固氮菌的群落结构造成影响,其中化肥处理的影响效果更明显。张腊梅^[54]发现施用氮肥不利于稻田土壤厌氧固氮菌的生长,长期未施氮肥处理的土壤中厌氧固氮菌数量较施氮肥处理的高 75.7%。罗兰芳等^[55]的研究也表明稻田土壤施用氮肥后,好氧和厌氧自生固氮菌的数量低于不施氮肥处理。Berthrong 等^[56]发现在松林中,氮肥对 *nifH* 群落结构有较大影响,抑制了固氮菌的丰度和多样性。

肥料的施用对叶际固氮菌的影响没有明确定论。以前有学者研究发现在有底肥的基础上喷施叶际固氮菌的盆栽和田间增产效果均优于无底肥处理。但在无底肥大豆上喷施叶际固氮菌,其增产效果明显高于有底肥处理。可见,叶际固氮菌与肥料的作用关系与作物种类密切相关。但是叶际固氮菌在生产实践的应用效果及栽培措施对其的影响还需要进一步探讨。

念珠藻属为常见的森林叶际固氮菌,Nilsson 等^[57]选取能与水稻自然共生的念珠藻属,将其定殖于水稻根际,创造共生关系体系。但体系所形成的类根瘤对水稻根的生长造成不利影响。但相比较单独存活的蓝细菌,与水稻形成共生固氮的蓝细菌固氮活性较高。所以,在研究叶际固氮菌应用价值时,要考虑寄主与固氮菌的特异性和相互作用,探索相适应的固氮体系,建立共生关系,确保最佳的固氮条件,促进植物生长。

虽然叶际固氮体系的固氮能力低于根际共生固氮,但因其寄主范围的非专一性,在农业生产上具有应用潜力。我们的前期研究发现,叶际固氮菌具有丰富的多样性,但是有些叶际固氮菌用固氮酶

基因的常用引物进行 PCR 扩增,得不到扩增片段,推测可能含有新型固氮基因。叶际微生物具有哪些新型固氮基因及其作用机制有待深入研究。有文献报道,根瘤菌可在植物内部进行迁移,定殖于植物内部,并通过气孔进入叶际表面,成为叶际附生微生物^[58]。但是,目前的研究还不能解释固氮菌与植物叶面的互作关系,有待深入研究叶际固氮体系的作用机制。叶际固氮菌所处环境的氧分压较高,影响固氮酶的活性,固氮效率较低。因此,调控叶际微环境提高叶际微生物固氮效率,是增加其应用价值的一个研究方向。叶际固氮与固氮微生物、植物及生态环境密切相关,要综合考虑三者之间的相互关系,充分发挥固氮微生物在生产实践中的经济价值和生态效益。

参 考 文 献

- [1] Pan JG, Hu Q, Qi HY, et al. Advance in the research of phyllospheric microorganism[J]. Acta Ecology Sinica, 2011, 31(2): 583-592 (in Chinese)
潘建刚, 呼庆, 齐鸿雁, 等. 叶际微生物研究进展[J]. 生态学报, 2011, 31(2): 583-592
- [2] Remus-Emsermann MNP, Tecon R, Kowalchuk GA, et al. Variation in local carrying capacity and the individual fate of bacterial colonizers in the phyllosphere[J]. The ISME Journal, 2012, 6(4): 756-765
- [3] Mohammadi K, Sohrabi Y, Heidari G, et al. Effective factors on biological nitrogen fixation[J]. African Journal of Agricultural Research, 2012, 7(12): 1782-1788
- [4] Kim M, Singh D, Lai-Hoe A, et al. Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees[J]. Microbial Ecology, 2012, 63(3): 674-681
- [5] Yadav R, Papatheodorou E, Karamanoli K, et al. Abundance and diversity of the phyllosphere bacterial communities of Mediterranean perennial plants that differ in leaf chemistry[J]. Chemoecology, 2008, 18(4): 217-226
- [6] Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 1875-1883
- [7] Baldotto LEB, Olivares FL. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2008, 54(11): 918-931
- [8] Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(12): 828-840
- [9] Newton AC, Gravouil C, Fountaine JM. Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops[J]. Annals of Applied Biology, 2010, 157(3): 343-359
- [10] Rejili M, Mahdhi M, Fterich A, et al. Symbiotic nitrogen fixation

- of wild legumes in Tunisia: Soil fertility dynamics, field nodulation and nodules effectiveness[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2012, 157: 60-69
- [11] Ruinen J. Occurrence of *Beijerinckia* species in the phyllosphere[J]. Nature, 1956, 178(4526): 220-221
- [12] Albino U, Saridakis DP, Ferreira MC, et al. High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil[J]. Plant and Soil, 2006, 287(1/2): 199-207
- [13] Jadhav P. Azotobacter isolates in the phyllosphere of crops grown in sewage irrigated fields[A]//Global Sustainable Biotech Congress[C]. Jalgaon: At North University, 2014
- [14] Mwajita MR, Murage H, Tani A, et al. Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters[J]. SpringerPlus, 2013, 2: 606
- [15] Venkatachalam S, Ranjan K, Prasanna R, et al. Diversity and functional traits of culturable microbiome members, including cyanobacteria in the rice phyllosphere[J]. Plant Biology, 2016, 18(4): 627-637
- [16] Delmotte N, Kniff C, Chaffron S, et al. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(38): 16428-16433
- [17] Abril AB, Patricia AT, Enrique HB. The importance of phyllosphere microbial populations in nitrogen cycling in the Chaco semi-arid woodland[J]. Journal of Tropical Ecology, 2005, 21(1): 103-107
- [18] Uku J, Björk M, Bergman B, et al. Characterization and comparison of prokaryotic epiphytes associated with three east African seagrasses[J]. Journal of Phycology, 2007, 43(4): 768-779
- [19] Hamisi M, Diez B, Lyimo T, et al. Epiphytic cyanobacteria of the seagrass *Cymodocea rotundata*: diversity, diel *nifH* expression and nitrogenase activity[J]. Environmental Microbiology Reports, 2013, 5: 367-376
- [20] Hoffman BM, Lukoyanov D, Dean DR, et al. Nitrogenase: a draft mechanism[J]. Accounts of Chemical Research, 2013, 46 (2): 587-595
- [21] Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR. Electron transfer in nitrogenase catalysis[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2012, 16(1/2): 19-25
- [22] Wei CY, Lin L, Luo LJ, et al. Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth[J]. Biology and Fertility of Soils, 2014, 50(4): 657-666
- [23] Sessitsch A, Haridoim P, Döring J, et al. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis[J]. The American Phytopathological Society, 2012, 25(1): 28-36
- [24] Elasmri M, Delormes S, Lemanceau P, et al. Acyl-homoserine lactone production in plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soil borne *Pseudomonas* spp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(3): 1198-1209
- [25] Zhang BG, Bai ZH, Hoefel D, et al. Impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community within the pepper plant phyllosphere[J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(6): 1915-1922
- [26] Wang S, Gonzalez PP, Ye J, et al. Abundance and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere and bulk paddy soil under different duration of organic management[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(2): 493-503
- [27] Church MJ, Short CM, Jenkins BD, et al. Temporal patterns of nitro-genase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic North Pacific Ocean[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5362-5370
- [28] Zehr JP, Montoya JP, Jenkins BD, et al. Experiments linking nitrogenase gene expression to nitrogen fixation in the North Pacific subtropical gyre[J]. Limnology and Oceanography, 2007, 52(1): 169-183
- [29] Short SM, Jenkins BD, Zehr JP. Spatial and temporal distribution of two diazotrophic bacteria in the Chesapeake Bay[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4): 2186-2192
- [30] Li XL, Penttinen P, Gu YF, et al. Diversity of *nifH* gene in rhizosphere and non-rhizosphere soil of tobacco in Panzhihua, China[J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(3): 995-1001
- [31] Pedraza RO, Bellone CH, de Bellone SC, et al. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop[J]. European Journal of Soil Biology, 2009, 45(1): 36-43
- [32] Xia WW, Jia ZJ. Comparative analysis of soil microbial communities by Pyrosequencing and DGGE[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(12): 1489-1499 (in Chinese)
夏围围, 贾仲君. 高通量测序和DGGE分析土壤微生物群落的技术评价[J]. 微生物学报, 2014, 54(12): 1489-1499
- [33] Hunter PJ, Hand P, Pink D, et al. Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca* species) phyllosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 8117-8125
- [34] Rico L, Ogaya R, Terradas J, et al. Community structures of N₂-fixing bacteria associated with the phyllosphere of a Holm oak forest and their response to drought[J]. Plant Biology, 2014, 16(3): 586-593
- [35] Knief C, Delmotte N, Chaffron S, et al. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice[J]. The ISME Journal, 2012, 6(7): 1378-1390
- [36] Balint-Kurti P, Simmons SJ, Blum JE, et al. Maize leaf epiphytic bacteria diversity patterns are genetically correlated with resistance to fungal pathogen infection [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2010, 23(4): 473-484
- [37] Ben-Yoav H, Dykstra PH, Bentley WE, et al. A microfluidic-based electrochemical biochip for label-free diffusion-restricted DNA hybridization analysis[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 38(1): 114-120
- [38] Zhang YG, Li DQ, Xiao QM, et al. Microarrays and their application to environmental microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(3): 406-410 (in Chinese)
张于光, 李迪强, 肖启明, 等. 基因芯片及其在环境微生物研究中的应用[J]. 微生物学报, 2004, 44(3): 406-410
- [39] Xie JP. Research on the application of functional gene chip (GeoChip) for two typical environmental microbial community analysis[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Zhongnan University, 2011 (in Chinese)

- 谢建平. 功能基因芯片(GeoChip)在两种典型环境微生物群落分析中应用的研究[D]. 长沙: 中南大学博士学位论文, 2011
- [40] Peñuelas J, Rico L, Ogaya R, et al. Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest[J]. *Plant Biology*, 2012, 14(4): 565-575
- [41] Fürnkranz M, Wanek W, Richter A, et al. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica[J]. *The ISME Journal*, 2008, 2(5): 561-570
- [42] Rigonato J, Alvarenga DO, Andreote FD, et al. Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80(2): 312-322
- [43] Rigonato J, Gonçalves N, Andreote APD, et al. Estimating genetic structure and diversity of cyanobacterial communities in Atlantic forest phyllosphere[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2016, 62(11): 953-960
- [44] Müller DB, Vogel C, Bai Y, et al. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives[J]. *Annual Review of Genetics*, 2016, 50(1): 211-234
- [45] Liu SJ, Shi WY, Zhao GP. China microbiome initiative: opportunity and challenges[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017, 32(3): 241-250 (in Chinese)
刘双江, 施文元, 赵国屏. 中国微生物组计划: 机遇与挑战[J]. *中国科学院院刊*, 2017, 32(3): 241-250
- [46] Lv D, Ma AZ, Bai ZH, et al. Response of leaf-associated bacterial communities to primary acyl-homoserine lactone in the tobacco phyllosphere[J]. *Research Microbiology*, 2012, 163(2): 119-124
- [47] Müller T, Ruppel S. Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87(1): 2-17
- [48] Su YM. Effect of *Paenibacillus polymyxa* on quality of rape and the microbial community in rape phyllosphere and rhizosphere[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2011 (in Chinese)
宿燕明. 多粘类芽孢杆菌对油菜品质及其叶际, 根际微生物群落的影响[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2011
- [49] Bai Y, Qian JM, Zhou JM, et al. Crop Microbiome: breakthrough technology for agriculture[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017, 32(3): 260-265 (in Chinese)
白洋, 钱景美, 周俭民, 等. 农作物微生物组: 跨越转化临界点的现代生物技术[J]. *中国科学院院刊*, 2017, 32(3): 260-265
- [50] Giri S, Pati BR. A comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated *Corynebacterium* sp. & *Flavobacterium* sp. and their potentialities as biofertilizer[J]. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*, 2004, 51(1/2): 47-56
- [51] Xu SJ, Bai ZH, Jin B, et al. Bioconversion of wastewater from sweet potato starch production to *Paenibacillus polymyxa* biofertilizer for tea plants[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4131
- [52] Madhaiyan M, Alex THH, Ngoh ST, et al. Leaf-residing *Methylobacterium* species fix nitrogen and promote biomass and seed production in *Jatropha curcas*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 222
- [53] Liu PF, Wang HY. Effects of organic and chemical fertilizer applications on the diversity of soybean rhizobia and soil nitrogen-fixing bacteria[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(6): 1468-1472 (in Chinese)
刘朴方, 王宏燕. 农肥和化肥施用对大豆根瘤菌多样性的影响[J]. *生态学杂志*, 2012, 31(6): 1468-1472
- [54] Zhang LM. Effects of fertilize, pesticide and heavy metal on characteristic of microbes in purple paddy soil[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Xinan University, 2007 (in Chinese)
张腊梅. 肥料农药和重金属对紫色水稻土微生物特性的影响[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2007
- [55] Luo LF, Nie J, Zheng SX, et al. Effect of controlled release nitrogen fertilizer on soil microbial biomass carbon and nitrogen contents[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(11): 2925-2932 (in Chinese)
罗兰芳, 聂军, 郑圣先, 等. 施用控释氮肥对稻田土壤微生物生物量碳、氮的影响[J]. *生态学报*, 2010, 30(11): 2925-2932
- [56] Berthrong ST, Yeager CM, Gallegos-Graves L, et al. Nitrogen fertilization has a stronger effect on soil nitrogen-fixing bacterial communities than elevated atmospheric CO₂[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(10): 3103-3112
- [57] Nilsson M, Bhattacharya J, Rai AN, et al. Colonization of roots of rice (*Oryza sativa*) by symbiotic *Nostoc* strains[J]. *New Phytologist*, 2002, 156(3): 517-525
- [58] Ji KX, Chi F, Yang MF, et al. Movement of rhizobia inside tobacco and lifestyle alternation from endophytes to free-living rhizobia on leaves[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(2): 238-244