



研究报告

一株高效甘蔗内生固氮菌 NN08200 的鉴定及其对甘蔗的促生长作用

史国英¹ 曾泉¹ 农泽梅^{1,3} 叶雪莲¹ 岑贞陆¹ 李杨瑞^{*2} 胡春锦^{*1}

1 广西农业科学院微生物研究所 广西 南宁 530007

2 广西甘蔗遗传改良重点实验室 广西 南宁 530007

3 广西大学农学院 广西 南宁 530005

摘要:【背景】生产上过高的氮肥投入是我国农业可持续发展的重要限制因子之一。利用生物固氮是减少氮肥施用量最为有效的途径,植物内生固氮菌资源的挖掘和利用对我国农业可持续发展具有重要实践意义。【目的】筛选高效甘蔗内生固氮菌,并对其联合固氮效率及促生长功能进行评价。【方法】从广西甘蔗茎基部组织分离筛选到一株内生固氮菌株 NN08200,利用乙炔还原法测定固氮酶活性,通过菌落 PCR 扩增 *nifH* 基因确定菌株为固氮菌;通过菌株培养性状和菌体形态观察、Biolog 细菌鉴定系统和 16S rRNA 基因序列分析确定该菌株的分类;采用盆栽接种测定菌株对甘蔗的实际促生长作用,并利用 ¹⁵N 同位素稀释法测定其相对固氮效率。【结果】菌株 NN08200 的固氮酶活性达到 2 445 nmol C₂H₄/(h·mL),菌株的 *nifH* 基因长度为 339 bp,与甘蔗内生固氮醋酸杆菌 *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 菌株的 *nifH* 相似性达 99%;根据菌株培养性状和菌体形态观察、Biolog 细菌鉴定系统和 16S rRNA 基因序列分析结果,菌株 NN08200 属于泛菌属(*Pantoea* sp.) 细菌;盆栽接种菌株 NN08200 能显著提高甘蔗幼苗的株高和干重,¹⁵N 同位素分析结果表明接种该菌株甘蔗植株的根、茎和叶从空气中获得氮素的百分率分别为 7.49%、15.02%和 10.79%,其联合固氮效率显著优于甘蔗内生固氮模式菌株 *G. diazotrophicus* PAL5,利用后者接种的甘蔗根、茎和叶从空气中获得氮的百分率分别为 3.53%、9.44%和 4.87%。【结论】菌株 *Pantoea* sp. NN08200 是高效甘蔗内生固氮菌,其固氮促生长效果明显高于 *G. diazotrophicus* PAL5 菌株,可望研发成为优良固氮微生物肥料生产菌种,并可进一步用于甘蔗联合固氮菌作用机理的相关研究。

关键词: 甘蔗,内生固氮菌,促生长作用,菌种筛选

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31101122, 31660025); Natural Science Foundation of Guangxi Province (2016GXNSFBA380178, 2017GXNSFBA198118); Special Scientific Research Funds of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (2015YT76, 2017JM37, 2017JZ06)

***Corresponding authors:** Tel: 86-771-3242208

E-mail: LI Yang-Rui: liyr@gxaa.net; HU Chun-Jin: chunjin-hu@126.com

Received: 05-07-2018; **Accepted:** 26-09-2018; **Published online:** 13-11-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31101122, 31660025); 广西自然科学基金(2016GXNSFBA380178, 2017GXNSFBA198118); 广西农科院基本科研业务专项(2015YT76, 2017JM37, 2017JZ06)

***通信作者:** Tel: 0771-3242208

E-mail: 李杨瑞: liyr@gxaa.net; 胡春锦: chunjin-hu@126.com

收稿日期: 2018-07-05; **接受日期:** 2018-09-26; **网络首发日期:** 2018-11-13

Identification of an endophytic nitrogen-fixing bacterium NN08200 from sugarcane and its growth promotion of sugarcane

SHI Guo-Ying¹ ZENG Quan¹ NONG Ze-Mei^{1,3} YE Xue-Lian¹ CEN Zhen-Lu¹
LI Yang-Rui^{*2} HU Chun-Jin^{*1}

1 Microorganism Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

2 Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Nanning, Guangxi 530007, China

3 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China

Abstract: [Background] Nitrogen fertilizer input for production in China is very high, which is one of the most serious impediments of the sustainable development of agriculture. Research on biological nitrogen fixation (BNF) has increased significantly because of its potential importance to economy and the environment. [Objective] The aim of this work was to screen and identify efficient endophytic nitrogen-fixing bacteria of sugarcane, and to demonstrate their potential for associative nitrogen fixation with sugarcane as well as plant growth promotion. [Methods] An endophytic diazotroph strain NN08200 was isolated from the stem of sugarcane, and its nitrogen fixation was tested further by using the acetylene reduction assay and PCR amplification of the *nifH* gene encoding the iron protein of nitrogenase. Identification of the strain species according to its culture character and the microscopic observation, automatic bacteria identification system and by analyzing their 16S rRNA gene sequences. To demonstrate its potential for associative nitrogen fixation with sugarcane and growth promotion activities, strain NN08200 was inoculated into micropropagated sugarcane seedlings to investigate their plant growth-promoting and associative BNF activities using the ¹⁵N isotope dilution technique. [Results] The acetylene reduction activity of strain NN08200 was 2 445 nmol C₂H₄/(h·mL), and PCR amplification of *nifH* amplified approximately 339 bp fragments from the strain. Cloning and sequencing of the amplicon showed that strain NN08200 contained sequences that were the closest match to *nifH*. Based on phenotypic characteristics, Biolog system test, and 16S rRNA gene sequence analysis, strain NN08200 was identified as *Pantoea* sp. Compared with the uninoculated controls, strain NN08200 significantly promoted the growth of micropropagated sugarcane seedlings by increasing dry weight and plant height of sugarcane. ¹⁵N isotope dilution assays demonstrated that the associative nitrogen fixation rates of NN08200 in the sugarcane roots, stems and leaves were 7.49%, 15.02% and 10.79%, respectively, which were higher than that of *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain PAL5, whose associative nitrogen fixation rates in the sugarcane roots, stems and leaves were 3.53%, 9.44% and 4.87%, respectively. [Conclusion] Strain NN08200 has the potential to efficiently fix N₂ in sugarcane and promote sugarcane growth.

Keywords: Sugarcane, Endophytic nitrogen-fixing bacteria, Promoting effect, Strain screening

内生固氮菌是指那些定殖在植物内部与宿主植物联合固氮的微生物, 主要是细菌, 它们的部分或整个生活周期寄居在植物组织, 特别是营养繁殖的组织中生存、繁衍、传播而不会对植物引起明显的损害^[1-2]。对内生固氮菌最早的认识来自于禾本科作物和牧草。如 20 世纪 80 年代末以来, Boddey 等^[3]先后从甘蔗体内分离得到几种具有特殊生理生化特性的固氮菌, 包括 *Gluconacetobacter (Acetobacter) diazotrophicus*、*Herbaspirillum seropedicae*、

Herbaspirillum rubrisubalbicans 和 *Burkholderia* spp.^[3]; 这些属的固氮菌相继在巴西之后从美洲其他国家、澳洲^[4]和亚洲^[5-7]的甘蔗体内被分离。近年国内外的研究者先后对不同地域的甘蔗、水稻、小麦、燕麦、玉米、大麦、高粱、甘薯及卡拉草等植物的内生固氮菌进行了分离研究, 证明植物内生固氮菌资源非常丰富, 包括醋酸杆菌属 (*Acetobacter*)^[8]、草螺菌属 (*Herbaspirillum*)^[9]、肠杆菌属 (*Enterobacter*)^[10]、泛菌属 (*Pantoea*)、假单胞属

(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)^[11]、克雷伯氏菌属(*Klebesilla*)^[11-12]、*Methylobacterium*^[13]、*Raoultella terrigena*^[14]、*Mangrovibacter*^[15]、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、固氮弧菌属(*Azoarcus*)等^[16]。研究证明,内生固氮菌避免了化合态氮的抑制及土著微生物的竞争,更有利于充分发挥固氮效能,分泌固氮产物直接供给植物吸收,表现出更高的固氮效率^[17]。植物内生固氮菌除了能为宿主提供氮素以外,同时具有分泌生长素、溶磷、增强植株抗病性、抗逆境等多方面的促进植物生长作用,具有很大的应用潜力^[17-20]。近年来,大量施用化肥造成的肥料浪费及土壤、地下水体污染已引起了世界各国的广泛重视,减少化肥施用、提高氮肥利用率是当前农业生产的重要任务^[17,21]。随着生态农业和绿色食品的发展,植物内生菌逐渐应用于生物有机肥,因其具有消减化肥和农药过量使用引起的环境质量、食品安全和公众健康的弊端等优势,成为了国内外的研究热点。利用生物固氮是减少氮肥施用量最为有效的途径,生物固氮资源的研究、开发和利用在我国农业可持续发展中占有重要地位^[22]。本文对前期从甘蔗组织上分离筛选获得的一株内生固氮细菌 NN08200 菌株的固氮促生长特性进行研究,通过菌落和菌体形态特征分析、Biolog 细菌鉴定系统和 16S rRNA 基因序列分析确定菌株的分类地位,测定该菌株的固氮酶活性和溶磷能力,同时测定菌株对甘蔗幼苗的促生长作用,并利用 ¹⁵N 同位素稀释法测定其相对固氮效率,以为该菌株的进一步研究和应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株

供试菌株 NN08200 从广西南宁糖厂甘蔗种植基地的甘蔗品种新台糖 22 号植株茎基部组织分离筛选获得,是具有较高固氮酶活性的内生固氮菌,该菌株目前保藏于中国微生物菌种保藏管理委员

会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC 5438。

供试对照菌株为巴西甘蔗内生固氮菌 *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5,由浙江大学农业与生物技术学院提供。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

蔗糖、葡萄糖、NaCl、KH₂PO₄、MgSO₄、CaSO₄、CaCO₃、Ca₃(PO₄)₂,国药集团化学试剂有限公司;蛋白胨、酵母提取物,北京索莱宝科技有限公司;15%的(¹⁵NH₄)₂SO₄,上海化工研究院;BUGTM琼脂,Biolog Inc.公司。

PCR 仪,北京东胜创新生物科技有限公司;Biolog 微生物自动鉴定仪,广州市华粤行仪器有限公司。

培养基按有关参考文献配制:肉汁胨培养基(NA)^[20],Pikovaskaia培养基(PKO)^[23],LB 培养基和阿须贝无氮培养基(Ashby)^[24],C₂培养基^[10]。BUG 琼脂培养基:57 g BUGTM琼脂加入到 950 mL ddH₂O,调 pH 至 7.3。

1.1.3 供试土壤

盆栽接种试验用土壤为甘蔗试验地栽培土,土壤基本情况:全氮 0.147%,全磷 0.104%,全钾 1.229%,速效氮 78.6 mg/kg,速效磷 98 mg/kg,有机质 28.8 g/kg, pH 6.1。

1.1.4 甘蔗组培苗

供试甘蔗品种为巴西引进品种 RB 92-8064 (简称 B9),其组培苗由广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室提供。

1.2 方 法

1.2.1 菌株活化培养及固氮酶活性测定

菌株的活化培养采用 Ashby 无氮培养基,固氮酶活性的测定采用乙炔还原法,具体测定方法参照胡春锦等^[11]、孙建光等^[25]的方法进行,以甘蔗内生固氮模式菌株 *G. diazotrophicus* PAL5 为阳性对照。

1.2.2 菌株培养性状及菌体形态观察

以平板划线法将 NN08200 菌株培养于 NA 和 Ashby 无氮培养基上,置 30 °C 培养箱中培养 2 d。观察并记录菌落的颜色、大小、形状。

菌株 NN08200 活化后接种至 5 mL LB 培养液, 在摇床中 30 °C、200×g 培养过夜至对数中后期。取 1 mL 菌液 10 000×g 离心 5 min, 除去上清, 然后用无菌水重悬后 10 000×g 离心 5 min 洗菌 2 次, 用无菌水悬浮, 取 10 μL 菌液滴在铜网上, 用滤纸吸干水分; 取一滴 1% 醋酸双氧铀滴在铜网上染色 20–30 s, 用滤纸吸干水分后, 用电子显微镜观察细菌形态。

1.2.3 菌株的 *nifH* 扩增与序列分析

采用菌落 PCR 方法进行菌株 *nifH* 基因的扩增, 参照 Lin 等^[10]的方法进行。培养供试菌株 18–20 h, 挑取少许菌落作为 PCR 模板。利用已报道 *nifH* 基因扩增通用引物 PolyF (5'-TGCGAYCCSAARGCB GACTC-3') 和 PolyR (5'-ATSGCCATCATYTCR CCGGA-3') 扩增 NN08200 的 *nifH* 部分序列, 以 *G. diazotrophicus* PAL5 菌株为阳性对照, 以大肠杆菌 *E. coli* DH5α 菌株为阴性对照。将 *nifH* 扩增产物回收后克隆到 pMDTM18-T 载体上, 通过 PCR 验证的阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果提交 GenBank 获得登录号并在 NCBI 进行 BLAST 比对分析。

1.2.4 菌株的 16S rRNA 基因序列分析

16S rRNA 基因的扩增同样采用菌落 PCR 方法, 扩增产物测序及菌株系统发育分析参照胡春锦等^[11]的方法进行。扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 进行 BLAST 同源性比对, 并用软件 MEGA 4.0 构建菌株的系统发育树。

1.2.5 菌株的 Biolog 检测

挑取菌株 NN08200 的单菌落至 BUG 琼脂培养基, 28 °C 培养 16–24 h。用无菌棉签将 BUG 琼脂培养基上的菌体悬浮于 0.85% NaCl 溶液, 调节菌悬液 OD_{600} 为 0.2, 取 150 μL 菌液加入 Biolog-GN2 板, 28 °C 培养。分别在 4–6 h 和 16–24 h 用 Biolog 微生物自动鉴定仪及 Biolog Microstation 4.20.05 系统检测和分析代谢指数。

1.2.6 菌株对无机磷的降解能力测定

参考史国英等^[20]的方法, 将供试菌株 NN08200

以及对照菌株 *G. diazotrophicus* PAL5 分别接种到无机磷液体培养基, 接种量为 1% 活化菌液, 对照接种等量灭活菌液, 于 28 °C、120×g 培养 5 d 后, 参照文献[26]采用磷钼蓝比色法测定菌株发酵液中的有效磷含量。

1.2.7 接种效果及联合固氮效率测定

甘蔗栽培前土壤的处理: 栽培土经晒干、细化过筛后, 向栽培土样中加入丰度为 15% 的 (¹⁵NH₄)₂SO₄ 并混合均匀, 使土样中纯氮含量终浓度达到 120 mg/kg。

甘蔗品种 B9 组培苗的移栽及接种方法参考胡春锦等^[11]。将炼苗后生长基本一致的甘蔗组培苗移栽至上述栽培土中, 每桶种 3 个单株。将菌株 NN08200、PAL5 活化后分别在 LB 和 C₂ 液体培养基中培养 48 h, 6 000×g 离心 15 min 收集菌体, 用无菌水悬浮后 6 000×g 离心 15 min, 清洗 2 次后稀释到每毫升 1×10⁸–2×10⁸ 个细胞作为接种菌剂。甘蔗移栽当天以上述菌剂进行灌根接种 1 次, 移栽 7、14、21 d 后分别用同样的菌剂再灌根接种 3 次, 对照接等量无菌水。90 d 时整株收获甘蔗植株, 将植株解析成根、茎、叶并烘干至恒重, 分别测定菌株对甘蔗的接种效应和联合固氮效率。

参考文献[27]完成植株株高、干物质分析。样品含氮量及 ¹⁵N 同位素含量由河海大学环境学院用碳氮稳定同位素质谱(Sercon Integra-CN)测定。固氮效率根据公式: $Ndfa = (1 - ^{15}N_{fx} - ^{15}N_{nfx}) \times 100\%$ 计算^[28]。式中 *Ndfa* 为固氮百分率, ¹⁵*N_{fx}* 为处理样品中 ¹⁵N 原子百分超, ¹⁵*N_{nfx}* 为对照样品中 ¹⁵N 原子百分超。

1.3 数据分析

利用 Excel 2003 和 DPS 9.50 分析软件进行数据统计分析, 采用 Duncan's 新复极差法进行比较。

2 结果与分析

2.1 菌株的联合固氮能力

菌株 NN08200 在无氮培养基上生长良好, 固氮酶活性测定结果显示该菌株固氮酶的乙炔还原乙烯活性约为 2 445 nmol C₂H₄/(h·mL), 高于阳性对

照巴西甘蔗内生固氮菌模式菌株 *G. diazotrophicus* PAL5 的固氮酶活性 $1.68 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{h}\cdot\text{mL})$ 。

利用引物 PolyF/PolyR 对 NN08200 菌株进行了 PCR 扩增, 获得了一条大小约 400 bp 的片段, 测序分析结果表明该扩增片段为 339 bp 的 *nifH* 基因序列, 证明 NN08200 菌株含有钼铁固氮酶铁蛋白基因, 该菌株为内生固氮菌。该序列已在 NCBI 登录, 登录号为 KX539264。利用软件 MEGA 4.0 构建基于该菌株 *nifH* 基因序列的系统发育树(图 1), 结果表明 NN08200 菌株与甘蔗内生固氮醋酸杆菌 *G. diazotrophicus* PAL5 菌株的遗传距离较近, 相似性

达到 99%。

2.2 菌株的分类鉴定结果

2.2.1 菌株的形态和菌落培养性状

电子显微镜下菌株 NN08200 菌体为直杆状, 以周生鞭毛运动, 平均大小为 $(0.5-1.0) \mu\text{m} \times (1.0-3.0) \mu\text{m}$ (图 2A)。菌株在 NA 培养基上呈淡黄色, 菌落圆形, 边缘整齐, 低凸, 光滑。NN08200 菌株的形态特征符合泛菌属细菌的基本特征^[29]。菌株在 Ashby 平板上的菌落较大, 透明至半透明菌落, 菌落形状不规则, 边缘光滑, 菌落低凸, 质地均匀。

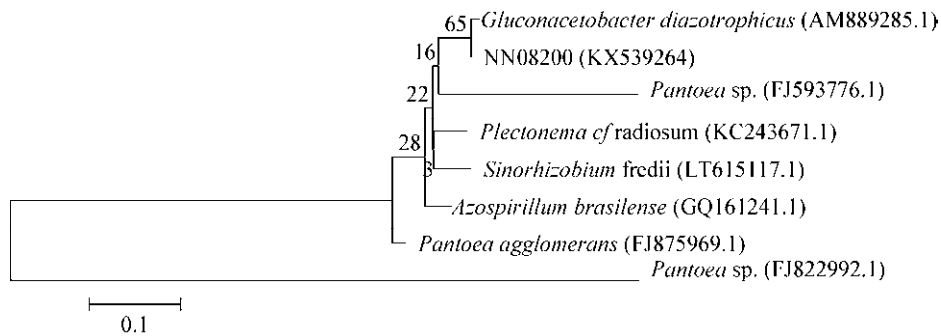


图 1 邻接法构建菌株 NN08200 的 *nifH* 基因系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain NN08200 based on *nifH* gene sequences by Neighbor-Joining method

注: 括号中为相关细菌的 GenBank 的登录号; 分支位置中的数字表示 Bootstrap 支持率; 标尺表示每个位点的碱基置换率。下同。

Note: The numbers in parentheses represent the sequence accession numbers in GenBank. The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap. The scale bar represents substitutions of per nucleotide position. The same below.

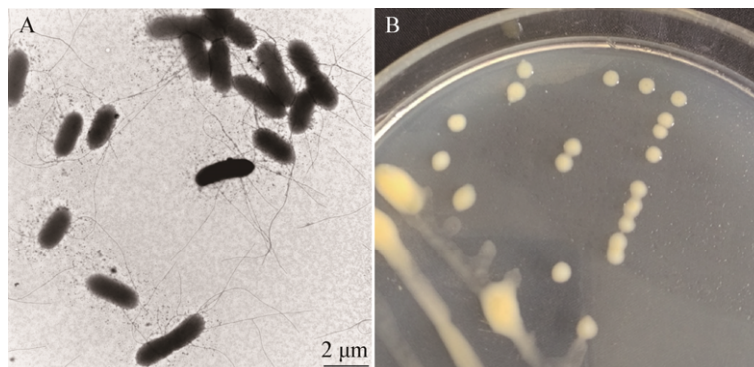


图 2 菌株 NN08200 的形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of strain NN08200

注: A: 菌体; B: 菌落。

Note: A: Bacterial cells. Scale bar=2 μm ; B: Colonies.

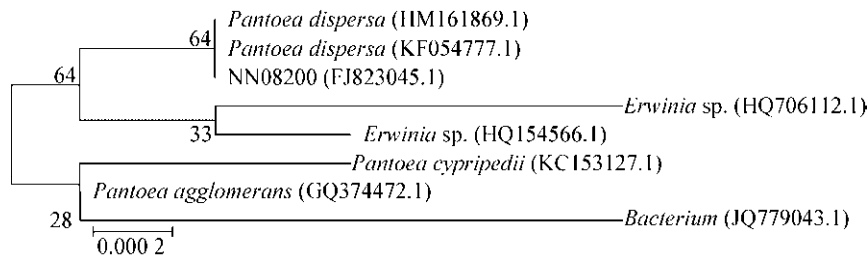


图 3 基于 16S rRNA 基因序列用邻接法构建菌株 NN08200 的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain NN08200 by Neighbor-Joining method

2.2.2 菌株的 16S rRNA 基因序列分析及系统发育关系

将菌株 NN08200 的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库进行在线同源比对, 结果显示该菌株与多株泛菌属(*Pantoea*)细菌的相似性最高, 在 97%–99% 之间。系统发育树(图 3)显示, 菌株 NN08200 与已报道的成团泛菌 *Pantoea dispersa* (MH542330.1) 自成一个分支, 表明这两个菌株的亲缘关系最近。

2.2.3 菌株的 Biolog 鉴定系统分析结果

Biolog 微生物鉴定系统检测显示 12 h 时菌株 NN08200 的碳源代谢谱与数据库中 *Pantoea agglomerans* 的匹配度(SIM 值)为 0.54, 说明该菌株与 *Pantoea agglomerans* 的相似性较高。

综合菌株的培养性状和菌体形态、16S rRNA 基因的序列分析和 Biolog 鉴定系统分析结果, 将菌株 NN08200 鉴定为肠菌科泛菌属(*Pantoea*)细菌。

2.3 菌株的溶磷能力分析

研究表明, 接种菌株 NN08200 在常用无机磷液体培养基上培养 5 d, 发酵液中水溶性磷含量最高可达到 152.30 mg/L, 而接种 *G. diazotrophicus* PAL5 菌株发酵液中水溶性磷含量为 131.35 mg/L, NN08200 在液体培养条件下降解无机磷的效果明显优于 PAL5 菌株, 差异达极显著水平(图 4)。

2.4 菌株接种对甘蔗的促生效应和联合固氮效率

菌株接种效应及 ^{15}N 同位素稀释法测定菌株相对固氮效率分析结果见表 1。甘蔗组培苗移栽在含

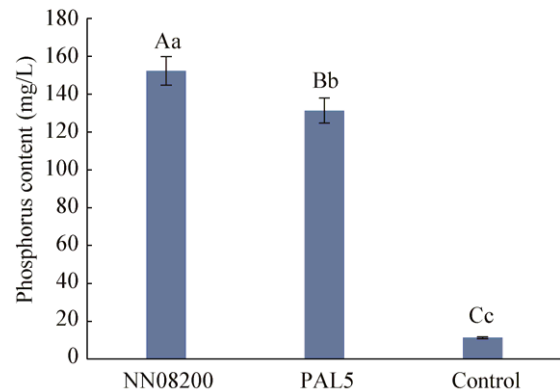


图 4 菌株 NN08200 不同处理发酵液中可溶性磷含量测定结果

Figure 4 The concentration of soluble phosphorus in fermentative liquid of strain NN08200

注: 不同字母表示处理间差异在 0.05、0.01 水平上差异显著。下同。

Note: Different letters mean significant different at 0.05 and 0.01 level. The same below.

有 ^{15}N 的基质中生长 90 d, 相比不接种的对照, 接种 NN08200 提高了甘蔗组培苗 B9 的株高以及根、茎、叶的干重, 分别比对照增加 23.43%、9.47%、22.04% 和 27.03%; 接种 PAL5 对 B9 的促生长作用略低于接种菌株 NN08200。两个菌株对甘蔗 B9 的促生长效果表现在提高植株株高以及根、茎的干重。

接种 NN08200 菌株的供试 B9 甘蔗组培苗中 ^{15}N 浓度低于没有接种的对照甘蔗苗, 差异在 5% 的置信水平显著。接种 NN08200 菌株甘蔗组培苗的根、茎和叶从空气中获得氮的百分率分别为 7.49%、

表 1 接种 NN08200、PAL5 菌株对甘蔗(B9 组)生长及氮素利用的影响

Table 1 Inoculation effects of NN08200 and PAL5 on growth and nitrogen use of sugarcane

| Treatment | 平均株高 Average height (cm) | 平均干重 Average dry weight (g) | | | 平均固氮效率 Average fixation efficiency (%) | | |
|-----------|-----------------------------|--------------------------------|-------------|--------------|---|---------|--------|
| | | 根 Root | 茎 Stalk | 叶 Leaf | 根 Root | 茎 Stalk | 叶 Leaf |
| NN08200 | 58.56±4.98Aa | 2.16±0.19Aa | 3.42±0.27Aa | 10.01±0.56Aa | 7.49 | 15.02 | 10.79 |
| PAL5 | 57.73±7.00Aa | 1.94±0.15Aab | 4.19±0.27Bb | 9.41±0.63Aa | 3.53 | 9.44 | 4.87 |
| CK | 47.44±5.61Bb | 1.97±0.10Ab | 2.81±0.21Cc | 7.87±0.52Bb | 0 | 0 | 0 |

15.02%和 10.79%,其联合固氮效率显著优于甘蔗固氮模式菌株 *G. diazotrophicus* PAL5, 利用后者接种的甘蔗根、茎和叶从空气中获得氮的百分率分别为 3.53%、9.44%和 4.87%。

3 讨论与结论

甘蔗是我国最重要的糖料作物,而我国甘蔗主产区蔗地 90%以上为旱坡地,土壤保水、保肥能力差,化肥利用率很低,其中生产上氮肥的施用量比世界平均水平高出一倍以上,因此国内甘蔗生产成本明显偏高,缺乏国际竞争力。近年来,受国际糖业的冲击,我国甘蔗和蔗糖产业已呈现下滑趋势^[30]。造成甘蔗产业萎缩的主要原因是甘蔗种植收益近年来已大幅下降,蔗农的积极性受到影响,而造成收益下降的原因除了市场的冲击因素以外,甘蔗种植成本总体过高也是一个重要的原因。我国甘蔗生产上氮肥施用量为 500–700 kg/hm²,是巴西平均施氮量的 8–10 倍,是印度推荐施氮量 280 kg/hm²的 2 倍多^[31]。减少氮肥施用量最为有效的途径是利用生物固氮。生物固氮是地球上固氮作用的重要途径之一,每年的总固氮量中约有 60%来自生物固氮,在解决氮素来源问题上有巨大的潜力,生物固氮资源的研究、开发和利用在我国农业可持续发展中占有重要地位^[22]。充分发挥蔗地生态系统中联合固氮菌的固氮促生潜力,对提高我国甘蔗的生产能力和保护并改善甘蔗的生态环境,以及促进我国甘蔗产业的可持续发展具有重要的经济和社会意义^[11]。

本研究筛选到的甘蔗内生固氮菌株 NN08200 具有较高的固氮酶活性, *nifH* 基因分析结果从遗传型上证明了该菌株的固氮功能, ¹⁵N 同位素稀释法

分析结果显示该菌株与甘蔗的联合固氮效率显著优于甘蔗固氮模式菌株 *G. diazotrophicus* PAL5; 同时,菌株 NN08200 具有良好的溶磷效果,对于缓解我国甘蔗主产区红壤土中的磷素缺乏问题具有潜在的应用价值;盆栽接种试验结果表明该菌株对甘蔗具有显著的促生长作用,接菌处理甘蔗植株的株高以及干重均比对照增长 20%以上,这些研究结果均预示了菌株 NN08200 具有成为固氮生物肥料优良菌种的光明前景。菌株的分类鉴定结果显示菌株 NN08200 属于泛菌属(*Pantoea*)细菌。近年来我国研究工作者从不同生态条件、不同植物上均分离筛选获得了内生固氮泛菌属细菌,并且证明该菌属细菌对植物具有良好的固氮促生长作用。如张磊等^[32]从马铃薯上分离获得的内生固氮菌株 *Pantoea* spp. GWR2、GWR3 具有极高的产 IAA 能力,分别为 186.07、162.21 μg/mL, GWR2 兼具产 ACC 脱氨酶活性和溶解无机磷的能力;陈静等^[33]研究证明泛菌属细菌为烤烟内生固氮菌的优势菌群;李艳星等^[34]从胡萝卜、白萝卜、紫甘蓝、山药、莲藕、芋头、红薯、生姜、甜菜等多种块根块茎类作物的根、茎部也分离获得了泛菌属内生固氮菌;傅蕾^[35]研究证明从象草中分离筛选获得的内生菌 *Pantoea* sp. PP04 也能够显著促进杂交狼尾草生长;覃姚红^[36]研究证明玉米种子内生固氮泛菌属细菌能显著促进小麦生长并提高植株的抗旱能力;此外,泛菌属细菌作为内生固氮菌还从野生稻^[37]、辣椒^[38]、荒漠灌木^[39]、兰科植物等多种植株组织中分离筛选得到^[40]。泛菌属细菌同时也是土壤固氮细菌种群中的重要成员,同时具有固氮、溶磷、解钾和拮抗植物病

原菌的功能^[41]。本研究获得的甘蔗内生固氮菌 *Pantoea* sp. NN08200 相对于甘蔗固氮模式菌株 *G. diazotrophicus* PAL5 还具有容易培养、菌体生长量较大、促生长效果更加明显的特性, 具有作为揭示甘蔗联合固氮菌机理研究模式菌株的潜力, 该菌株的进一步研究和应用可为建立适应我国生态条件下稳定有效的甘蔗联合固氮体系提供基础。

REFERENCES

- [1] Guan XQ, Du QY, Yu JZ. Isolation and characteristics of N₂-fixers from rhizosphere of plant *Leymus chinensis* in the rangeland of inner Mongolia[J]. Acta Agrestia Sinica, 1997, 5(2): 101-107 (in Chinese)
关秀清, 杜千有, 于井朝. 内蒙古草原羊草根际联合固氮菌的分离鉴定及其生理生化特性研究[J]. 草地学报, 1997, 5(2): 101-107
- [2] Zhang HF, Hu JC, Huang JF. Application and prospect of biological nitrogen fixation on agriculture[J]. Nature Magazine, 2002, 24(3): 135-138 (in Chinese)
张华峰, 胡建成, 黄巨富. 生物固氮在农业中的应用现状与展望[J]. 自然杂志, 2002, 24(3): 135-138
- [3] Boddey RM, Döbereiner J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future[J]. Fertilizer Research, 1995, 42(1/3): 241-250
- [4] Baldani JI, Baldani VLD. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience[J]. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2005, 77(3): 549-579
- [5] Muthukumarasamy R, Revathi G, Lakshminarasimhan C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties[J]. Biology and Fertility of Soils, 1999, 29: 157-164
- [6] Xing YX, Yang LT, Huang SL, et al. The 16S rRNA gene sequences and growth characteristics of two nitrogen fixing Endo-bacteria strains from sugarcane stalk[J]. Microbiology China, 2008, 35(11): 1732-1737 (in Chinese)
邢永秀, 杨丽涛, 黄思良, 等. 甘蔗茎内两个内生菌株 16S rRNA 序列分析及其生长特性[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1732-1737
- [7] Asis Jr CA, Kubota M, Ohta H, et al. Isolation and partial characterization of endophytic diazotrophs associated with Japanese sugarcane cultivar[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2000, 46(3): 759-765
- [8] Reis VM, Olivares FL, Döbereiner J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1994, 10(4): 401-405
- [9] Wang HR, Peng GX, Zhang GX, et al. Characterization of endophytic diazotrophs isolated from molasses grass[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(8): 2566-2571 (in Chinese)
王华荣, 彭桂香, 张国霞, 等. 糖蜜草(*Melinis minutiflora* Beauv.)内生固氮菌分离鉴定[J]. 生态学报, 2006, 26(8): 2566-2571
- [10] Lin L, Li ZY, Hu CJ, et al. Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China[J]. Microbes and Environments, 2012, 27(4): 391-398
- [11] Hu CJ, Lin L, Shi GY, et al. Screening and identification of associative nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of sugarcane in Guangxi[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(15): 4745-4752 (in Chinese)
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): 4745-4752
- [12] 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
- [13] Madhaiyan M, Chan KL, Ji LH. Draft genome sequence of *Methylobacterium* sp. strain L2-4, a leaf-associated endophytic N-fixing bacterium isolated from *Jatropha curcas* L.[J]. Genome Announcements, 2014, 2(6): e01306-14
- [14] Schicklberger M, Shapiro N, Loqué D, et al. Draft genome sequence of *Raoultella terrigena* R1Gly, a diazotrophic endophyte[J]. Genome Announcements, 2015, 3(3): e00607-15
- [15] Behera P, Vaishampayan P, Singh NK, et al. The draft genome sequence of *Mangrovibacter* sp. strain MP23, an endophyte isolated from the roots of *Phragmites karka*[J]. Genomics Data, 2016, 9: 128-129
- [16] Hu CJ, Shi GY, Zeng Q, et al. The diversity of culturable endogenous nitrogen-fixing bacteria of sugarcane in two different soil conditions[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2017(2): 141-148 (in Chinese)
胡春锦, 史国英, 曾泉, 等. 两种不同土壤条件下可培养甘蔗内生固氮菌的多样性[J]. 中国土壤与肥料, 2017(2): 141-148
- [17] Gao C, Huang SF, Hu L, et al. Diversity and plant growth promotion of endophytic bacteria isolated from *Oryza nivara*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2018, 24(1): 33-38 (in Chinese)
郜晨, 黄淑芬, 胡莉, 等. 尼瓦拉野生稻内生菌多样性和促生作用[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(1): 33-38
- [18] Zhang GX, Mao Q, He ZY, et al. Detection of nitrogenase activity and phosphorus dissolving ability of endophytic isolates from *Oryza rufipogon* in Lingshui[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2006, 12(4): 457-460 (in Chinese)
张国霞, 茅庆, 何忠义, 等. 陵水普通野生稻(*Oryza*

- rufipogon*)内生菌的固氮及溶磷特性[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(4): 457-460
- [19] Wang QS, Shi GY, Su LT, et al. Growth-promoting effect by inoculating 3 strains of associative nitrogen-fixing bacteria in sugarcane[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(3): 397-402
- [20] Shi GY, Mo YM, Cen ZL, et al. Identification of an inorganic phosphorus-dissolving bacterial strain BS06 and analysis on its phosphate solubilization ability[J]. Microbiology China, 2015, 42(7): 1271-1278 (in Chinese)
史国英, 莫燕梅, 岑贞陆, 等. 一株高效解无机磷细菌 BS06 的鉴定及其解磷能力分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1271-1278
- [21] Wang ZW, Ji YL, Chen YG. Studies and biological significances of plant endophytes[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 349-363 (in Chinese)
王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349-363
- [22] Chen WX, Chen WF. Exertion of biological nitrogen fixation in order to reducing the consumption of chemical nitrogenous fertilizer[J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2004, 6(6): 3-6 (in Chinese)
陈文新, 陈文峰. 发挥生物固氮作用减少化学氮肥用量[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(6): 3-6
- [23] 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 (in Chinese)
姚拓. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究 II 固氮菌的溶磷性和分泌植物生长素特性测定[J]. 草业学报, 2004, 13(3): 85-90
- [24] Wu X, Gan BC, Jia DH, et al. Isolation and identification of a free living nitrogen-fixing bacteria[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(1): 255-258 (in Chinese)
吴翔, 甘炳成, 贾定洪, 等. 一株自生固氮细菌的分离和鉴定[J]. 西南农业学报, 2013, 26(1): 255-258
- [25] Sun JG, Xu J, Hu HY, et al. Collection and investigation on asymbiotic nitrogen-fixing microbial resources from 13 provinces over China[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009, 15(6): 1450-1465 (in Chinese)
孙建光, 徐晶, 胡海燕, 等. 中国十三省市土壤中非共生固氮微生物菌种资源研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(6): 1450-1465
- [26] Yi Y. Screening of phosphorus-solubilizing strain and its phosphate dissolving mechanism[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2011 (in Chinese)
伊莹. 高效解磷细菌的筛选及解磷机理的研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2011
- [27] Lu RK. The Analysis Method of Soil Agricultural Chemistry[M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2000: 312-314 (in Chinese)
鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 312-314
- [28] Fried M, Broeshart H. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop[J]. Plant and Soil, 1975, 43(1/3): 707-711
- [29] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 365 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 365
- [30] Li YR, Yang LT, Tan HW, et al. Development and progress of sugarcane farming technologies in Guangxi, China[J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(10): 1770-1775 (in Chinese)
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): 1770-1775
- [31] Tan YM, Wang LW, Wang TS, et al. Study on the sensitivity to nitrogen of sugarcane nitrogen-fixed variety RB72-454 in the field[J]. Guangxi Sugarcane & Cane sugar, 2002(1): 12-15 (in Chinese)
谭裕模, 王伦旺, 王天算, 等. 固氮甘蔗品种 RB72-454 田间肥料敏感试验[J]. 广西蔗糖, 2002(1): 12-15
- [32] Zhang L, Yuan M, Sun JG, et al. Isolation and functional characterizations of potato endogenous nitrogen-fixing bacteria[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2016(6): 139-145 (in Chinese)
张磊, 袁梅, 孙建光, 等. 马铃薯内生固氮菌的分离及其促生特性研究[J]. 中国土壤与肥料, 2016(6): 139-145
- [33] Chen J, Li B, Zeng QB, et al. Diversity of culturable endophytic diazotrophic bacteria in flue-cured tobacco in Panzhihua[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 428-437 (in Chinese)
陈静, 李斌, 曾庆宾, 等. 攀枝花地区烤烟可培养内生固氮菌的多样性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 428-437
- [34] Li YX, Guo PY, Sun JG. Isolation, identification, phylogeny and growth promoting characteristics of endophytic diazotrophs from tuber and root crops[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(1): 104-122 (in Chinese)
李艳星, 郭平毅, 孙建光. 块根块茎类作物内生固氮菌分离鉴定、系统发育与促生特性[J]. 中国农业科学, 2017, 50(1): 104-122
- [35] Fu L. The mechanism of endophyte *Pantoea* sp. PP04 promoting growth and enhancing salinity tolerance of hybrid Pennisetum[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2017 (in Chinese)

- 傅蕾. 植物内生菌 *Pantoea* sp. PP04 促进杂交狼尾草生长及提高其耐盐能力的作用机制研究[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2017
- [36] Qin YH. Identification of endophytic diazotroph bacteria from maize seeds and research of its effects on wheat growth and drought resistance[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2014 (in Chinese)
覃姚红. 玉米种子内生固氮菌的鉴定及其对小麦生长及抗旱能力影响的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2014
- [37] Yuan HJ, Yan H, Yang F, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of endophytic nitrogen-fixing bacteria in *Oryza australiensis*[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2014, 20(4): 571-577 (in Chinese)
原红娟, 严慧, 杨芳, 等. 澳洲野生稻(*Oryza australiensis*) 内生固氮菌的分子鉴定及发育分析[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(4): 571-577
- [38] Luo N, Xiao HL, Lu S, et al. The isolation of pepper endogenous nitrogen-fixing bacteria identification and diversity analysis[J]. Crops, 2014(6): 52-56 (in Chinese)
罗娜, 肖海兰, 鲁颂, 等. 辣椒内生固氮菌的分离鉴定与多样性分析[J]. 作物杂志, 2014(6): 52-56
- [39] Xu ZJ, Luo M, Wang WX, et al. The molecular diversity of endophytic diazotrophic bacteria from three typical desert shrubs and PCR-RFLP analysis of their nitrogenase gene *nifH*[J]. Journal of Desert Research, 2014, 34(2): 472-480 (in Chinese)
徐正金, 罗明, 王卫霞, 等. 3 种典型荒漠灌木内生固氮菌及固氮酶基因 *nifH* 多样性分析[J]. 中国沙漠, 2014, 34(2): 472-480
- [40] Zhang FF. Screen and growth-promoting effect of endophytic bacteria from *Phalaenopsis pulcherrima* roots[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2015 (in Chinese)
张芳芳. 五唇兰根部内生细菌筛选及其促生效应研究[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2015
- [41] Liu CX, Jiao RZ, Zhao JJ. Screening and functional research of broad spectrum antagonistic strains against forest pathogenic fungi[J]. Current Biotechnology, 2018, 8(1): 63-70 (in Chinese)
刘彩霞, 焦如珍, 赵京京. 林木病原菌广谱拮抗菌株的筛选及功能研究[J]. 生物技术进展, 2018, 8(1): 63-70