

甘蔗联合固氮菌对甘蔗叶片养分含量的影响*

Influence of Azotobacter upon Contents of Nutrients of Sugarcane Leaves

樊妙姬 陈丽梅 蒋艳明 韦莉莉 高宁芝** 苏群忠**
 Fan Miaoji Chen Limei Jiang Yanming Wei Lili Gao Ningzhi Su Qunzhong

(广西大学生物技术与糖业工程学院 南宁市秀灵路 13号 530005)

(Guangxi Univ., College of Biotechnology & Sugar-Industry Engineering, 13 Xiulinglu, Nanning, Guangxi, 530005)

摘要 分析从广西不同地方、不同品种的甘蔗分离到的甘蔗联合固氮菌若干株的固氮酶活性,并将这些菌株接种甘蔗,分析接种了甘蔗联合固氮菌的甘蔗根组织的固氮酶活性,研究它们对甘蔗叶中氮、磷、钾及微量元素含量的影响。

关键词 联合固氮作用 固氮菌 甘蔗 固氮酶 养分含量

中图法分类号 S 154.381; S 566.101

Abstract Research bio-nitrogen-fixing character and the affected plant growth by azotobacter associated with sugarcane and other cereals is a very important subject. In this paper, it would be analysed nitrogenase of some azotobacter strains in association with sugarcane, which are come from different sites of Guangxi and different variety of sugarcane as well. And inoculated sugarcane by these strains, analysed the nitrogenase of the root of bacterium-inoculated sugarcane analysed the contents of Nitrogen, Phosphorus, Potassium and micronutrient of sugarcane leaves which affected by azotobacter strains.

Key words associative nitrogen-fixing, azotobacter, sugarcane, nitrogenase, contents of nutrients

大量的研究表明,在甘蔗、玉米等禾本科植物的根际存在多种固氮微生物。由于这些存在于根际的固氮菌与植物存在着相对的寄主专一性,因此 70 年代巴西学者 Dobereiner 提出了联合固氮作用 (Associative Nitrogen Fixation) 的概念^[1]。联合固氮是介于自生固氮与共生固氮之间的类型。在联合固氮体系中,固氮菌聚居于植物根际、根表,甚至有一部分菌进入根内、根细胞中^[2],将固定的氮提供给植物,与相应联合的植物具有较密切的相互关系。联合固氮的研究引起了日益广泛的关注,特别是联合固氮菌对作物的增产效应更是成为人们关注的热点^[3]。

甘蔗是我国南方的重要经济作物之一,糖业生产已成为广西的经济支柱产业。广西年种植甘蔗 40 万

hm² 以上,甘蔗生产在广西农业生产中具有重要的地位。但是广西土地贫瘠,含氮量不足,致使单产较低。施用高效甘蔗联合固氮菌将成为促进甘蔗增产的措施之一^[4,5],因此筛选固氮酶活性高的甘蔗联合固氮菌,研究甘蔗联合固氮菌对甘蔗根组织的固氮酶活性和叶中氮、磷、钾及微量元素的影响,对今后的联合固氮理论研究和甘蔗联合固氮菌的应用具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

实验所用的菌株: P4 (美国菌种保藏中心)、P5 (美国菌种保藏中心)、M J9701 (广西宾阳台糖 10 号)、M J9702 (广西宾阳台糖 10 号)、M J9703 (广西宾阳台糖 10 号)、M J9704 (广西宾阳台糖 10 号)、M J9705 (广西宾阳台糖 10 号)、M J9706 (广西柳城 CP)、M J9707 (广西柳城,台糖 16 号)、M J9708 (广西南

1998-04-18 收稿

* 广西教委资助项目。

** 广西糖业公司原料处,南宁,530022 (Guangxi Sugar-Industry Company, Dept. of Raw Material, Nanning, 530022)

宁, 桂糖 16号) MJ9709 (广西钦州, 桂糖 16号), 固氮菌基础培养基I (固体): 2% 葡萄糖, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄, 0.05% CaCO₃, 0.02% NaCl, 0.0005% NaMoO₄, 1.5% 琼脂, H₂O 1L, pH值 7.2 或 pH值 5.0; 固氮菌基础培养基II (液体): 0.05% 酵母膏, 其它成分同培养基I。培养温度为 30°C。

1.2 固氮酶活性分析

将菌株接种于 10 mL 液体的固氮基础培养基II, 于 30°C 摇床振荡培养至 3 d 和 7 d, 分别取 1 mL 于灭菌的 5 mL 小瓶中, 盖上橡皮塞, 瓶盖边缘以 Parafilm 封口。用注射器将 1 mL 的乙炔注入其中, 于 30°C 反应 1 h, 然后取 40 μL 反应气体, 以岛津 GC-9A 气谱检测乙烯含量后, 以下列公式计算固氮酶活性

$$\text{固氮酶活性 (nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mL 菌液} \cdot \text{min)} = \frac{K \cdot \text{样品乙烯峰高 (mm)} \cdot \text{反应瓶体积 } (\mu\text{L})}{\% \text{ 乙烯峰高 (mm)} \cdot \% \text{ 乙炔进样量 } (\mu\text{L}) \cdot \text{反应时间 (min)}}$$

标准乙烯为 1%, 当进样 10 μL 时 K= 4.2, 当进样 20 μL 时 K= 8.4, 依此类推, 当进样 40 μL 时 K= 33.6

1.3 接种甘蔗并测定根的固氮酶活性

将菌种接种入固氮基础培养基II (液体) 100 mL, 30°C, 振荡培养 5 d, 将甘蔗组织培养小苗 (二级苗) 的根浸入菌液, 20 min 取出小苗种于灭菌的沙瓶中, 45 d 后取出, 取 1 g 根于灭菌小瓶中, 盖上橡皮塞 盖边缘以 Parafilm 封口。测定固氮酶活性, 方法同 1.2 甘蔗品种为台糖 20号, 二级组织培养小苗。

1.4 甘蔗叶中氮、磷、钾及微量元素的测定

将整株甘蔗苗的叶片剪下, 烘干剪碎。用凯氏定氮法测定氮的含量; 用比色法测定磷的含量; 用原子吸收法测定钾、钙及微量元素

1.5 数据处理

所测数据进行显著性方差分析^[6]。

2 结果与分析

2.1 固氮酶活性测定

分别以固氮基础培养基II 振荡培养 3 d 和 7 d 后, 测得固氮酶活性 (表 1)。在培养 3 d 时, 菌株 MJ9701 MJ9705 MJ9706 和 MJ9708 的固氮酶活性比 P4 的高, $P < 0.01$; MJ9702 MJ9709 为无差异; MJ9703 MJ9704 则比 P4 的低, 分别是 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 。在培养第 7 天时, 除了 MJ9701 比对照低 ($P < 0.01$) 以外; 其余菌株均比对照高 ($P < 0.01$)。从固氮酶活性和菌的生长量看, 菌株 MJ9701 生长快, 第 3 天显示出高生长量和高固氮酶活性, 之

后生长继续而固氮酶活性降低, 认为该菌液受污染或该菌仅生长前期有固氮酶活性, 还需继续研究。其它菌株在第 7 天均表现出高固氮酶活性, 且生长量适中, 其中菌株 MJ9705 和 MJ9708 固氮酶活性最高

表 1 菌株的固氮酶活性测定结果

菌株 Strain	72 h		168 h	
	OD600	固氮酶活性 Nitrogenase activity	OD600	固氮酶活性 Nitrogenase activity
P4	0.297	47.127	1.046	79.751
P5				
MJ9701	1.387	113.037*	2.523	27.593*
MJ9702	0.757	40.980	1.409	136.619*
MJ9703	0.658	19.185*	1.301	133.927*
MJ9704	0.750	28.003	1.222	131.908*
MJ9705	0.548	167.335*	1.232	190.123*
MJ9706	0.298	119.525*	1.444	117.775*
MJ9707	0.256	37.907		
MJ9708	0.532	105.182*	1.347	166.568*
MJ9709				

固氮酶活性单位: nmol C₂H₄ · mL 菌株 · min; 与 P4 相比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Nitrogenase activity unit nmol C₂H₄ · mL cultural · minute; Compared with strain P4, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 固氮菌对甘蔗根的固氮酶活性的影响

接种菌株后, 甘蔗根的固氮酶活性测定结果见表 2 相对于对照, 只有接种 P4 MJ9703 和 MJ9708 菌株的甘蔗根固氮酶活性比对照的高 ($P < 0.01$); 接种 MJ9702、MJ9704 的甘蔗根的固氮酶活性与对照无差异 ($P > 0.05$); 接种 P4 MJ9705 MJ9706 及 MJ9709 菌株的甘蔗根固氮酶活性比对照的活性低, 差异显著 ($0.01 < P < 0.05$)。

表 2 固氮菌对甘蔗根的固氮酶活性的影响

Table 2 Effect of azotobacter on nitrogenase activity of sugarcane root

菌株 Strain	固氮酶活性 Nitrogenase activity	菌株 Strain	固氮酶活性 Nitrogenase activity
p4	169.359*	p5	75.119*
MJ9701		MJ9702	101.069
MJ9703	150.238*	MJ9704	92.192
MJ9705	79.216	MJ9706	80.582
MJ9707		MJ9708	152.287*
MJ9709	61.461	CK	101.069

固氮酶活性单位: nmol C₂H₄ · 克根组织 · 分钟; 与对照 (CK) 相比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Nitrogenase activity unit nmol C₂H₄ · gram root · minute; Compared with CK, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 固氮菌对甘蔗叶中氮、磷、钾、钙和镁含量的影响

接种固氮菌菌株后测定甘蔗叶片中的氮、磷、钾

钙和镁的含量, 结果见表 3 在氮的含量方面, M J9702 M J9703 M J9704 M J9705 M J9708 和 M J9709 的含氮量高于对照, 但无显著差异, 以 M J9708 的含量最高; P4 P5 和 M J9706 的含氮量与对照相当 接种固氮菌的甘蔗叶中磷、钾、钙和镁的含量与对照差异也不显著。

表 3 甘蔗叶片中氮、磷、钾、钙和镁的含量

Table 3 The contents of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium of sugarcane leaves

菌株 Strain	元素含量 The contents of elements (mg/gFW)				
	N	P	K	Ca	Mg
P4	15.1	1.7	12.5	4.4	1.2
P5	15.5	1.9	17.1	4.5	1.0
M J9701					
M J9702	17.6	1.8	14.5	5.5	1.3
M J9703	16.5	1.6	15.5	4.9	1.5
M J9704	17.4	1.5	15.9	4.3	1.3
M J9705	17.6	1.4	16.0	4.1	0.9
M J9706	15.3	1.5	12.9	4.7	0.8
M J9707					
M J9708	18.0	1.8	14.8	4.2	1.2
M J9709	16.1	2.0	14.5	4.7	1.3
CK	15.3	1.6	14.0	5.3	1.0

2.4 固氮菌对甘蔗叶中微量元素含量的影响

接种固氮菌菌株后测定甘蔗叶片中的铜、铁、锰和锌的含量, 结果见表 4 接种固氮菌的甘蔗叶中铜、铁和锌的含量与对照无显著差异, 但锰的含量则均比对照的高 ($P < 0.01$)

表 4 甘蔗叶片中微量元素的含量

Table 4 The contents of micronutrients of sugarcane leaves

菌株 Strain	元素含量 The contents of elements ($\mu\text{g/gFW}$)			
	Cu	Fe	Mn	Zn
P4	2.63	79.79	139.41*	25.43
P5	4.93	93.16	109.28*	24.63
M J9701				
M J9702	3.46	77.07	50.23*	19.92
M J9703	3.89	99.49	98.19*	19.90
M J9704	3.47	62.05	93.73*	17.36
M J9705	2.60	110.99	65.47*	18.64
M J9706	3.49	85.64	66.08*	23.04
M J9707				
M J9708	3.93	86.42	72.90*	21.83
M J9709	3.90	88.46	102.77*	24.71
CK	3.90	107.14	31.97	24.19

* * 与对照 (CK) 相比, * $P < 0.01$. Compared with CK, * $P < 0.01$.

3 讨论

从表 2 看, 对照即未接种固氮菌的甘蔗根的乙炔还原活性较高, 甚至高于固氮菌 P5 M J9705

M J9706 M J9709 接种的甘蔗根的乙炔还原活性, 且差异显著。原因可能是甘蔗根部存在其它还原酶类产生的乙炔还原活性; 或是由于上述菌株与实验用的甘蔗品种间存在菌-寄主品种的不相匹配; 或者其它因素的影响等, 还需进一步的研究。

E. M. Avolta^[7]介绍了几个国家或地区提出的甘蔗叶片主要养分的适宜含量, 但每个国家提出的叶片养分适宜含量的幅度较大, 国家与国家间提出的叶片适宜养分含量的数据间差别也较大, 因此, 所得结果难于比较。无论如何, 有效的固氮菌其自身应具有较高的固氮酶活性, 同时能提高寄主植物根的固氮酶活性, 增加寄主植物的氮的积累^[3]。综合上述测定结果, 认为菌株 M J9708 是甘蔗的有效的联合固氮菌。

从微量元素的测定结果看, 接种固氮菌的甘蔗叶片中锰的含量有极显著的提高, 与巴西提出的甘蔗叶片主要养分的适宜含量中^[7], 锰的含量为 $100\mu\text{g/gFW} \sim 250\mu\text{g/gFW}$ 相当或接近, 而对照的甘蔗叶片锰含量仅为 $31.97\mu\text{g/gFW}$ 。接种固氮菌会显著地提高甘蔗叶片中锰的含量, 其原因和意义还有待于进一步的研究。

致谢

承蒙广西大学生物技术实验中心发酵研究室为本研究无偿提供实验条件, 以及该中心的黄日波 (博士) 教授、周竞文、蒙健宗、王邕、罗兰、李俊芳、卢杰等老师的热忱帮助, 在此谨表示衷心感谢!

参考文献

- 1 Doberëiner J. Biological nitrogen fixation in tropical grasses: possibilities for partial replacement of mineral N fertilizers. *AMBIO*, 1977, 6 (2/3): 174~177.
- 2 James EK, Reis VM, Olivares FL. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*, *J. of Experimental Botany*, 1994, 45 (275): 757~766.
- 3 尤崇杓, 姜涌明, 宋鸿遇. 生物固氮. 北京: 科学出版社, 1987.
- 4 Boddey RM. The nitrogen-fixing of sugar cane. *Plant and Soil*, 137 (1): 111~117.
- 5 Tikhonovich A (eds), *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands, 1995, 641~646.
- 6 陈芳远. 田间试验方法及统计分析. 南宁: 广西科协普及部, 1985.
- 7 Avolta E M. High yield of sugarcane apply fertilizer. *International Potash Institute Bulletin*, 1994, 14: 57~60.

(责任编辑: 邓大玉 蒋汉明)