

燕麦根际固氮菌分泌IAA 的动态变化研究

吴瑛, 席林^{1,3} (1. 塔里木大学文理学院, 新疆阿拉尔 843300; 2. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆阿拉尔 843300; 3. 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室新疆, 新疆阿拉尔 843300)

摘要 对从草坪草和牧草根际分离出的4株联合固氮菌分泌IAA的能力和分泌动态进行了研究, 结果表明: 在培养3d后, 菌株分泌IAA的能力基本稳定。因此, 为了进一步的验证上述结果, 又进行了连续14d分泌IAA的动态测定。2次测定的IAA浓度不同, 但2次测定的IAA分泌动态规律基本一致。其中I012、I033、I034、I041分泌IAA能力分别为29.1 μg/ml、25.2 μg/ml、25.5 μg/ml、36.1 μg/ml。

关键词 联合固氮菌; 分泌IAA; 动态

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)15-04424-02

Dynamic of IAA Produced by Nitrogen Fixation Bacteria around Oat Root System

WU Ying et al (College of Arts and Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract Four associative nitrogen-fixing bacteria were isolated from turfgrass. The ability and dynamic of producing auxin were determined in a week. The results showed that the amount was stable after three days culture. In order to validate the results, the dynamic auxin during 14 days were determined as well. The concentrations of IAA in the two experiments were different, but the law of variety did not change. With LTP, IAA concentration of I012, I033, I034 and I041 reached 29.1 μg/ml, 25.2 μg/ml, 25.5 μg/ml and 36.1 μg/ml.

Key words associative nitrogen fixation bacteria; producing IAA; dynamic

目前, 从植物根际分离出许多种固氮微生物, 这类微生物大多可产生植物激素并具有与植物联合共生固氮的作用, 因此, 对植物的生长和氮素提供起着重要作用^[1]。IAA(3-吲哚乙酸)以很低浓度影响植物并在细胞延伸过程中提升细胞壁的疏松度; 外源生长素能刺激植物细胞壁释放大量的单糖和低聚糖, 从植物细胞壁释放的养分对植物细菌产生的IAA的反应有助于细菌附生植物的适合度^[2-6]。

大多数植物细菌都能产生3-吲哚乙酸或相关的吲哚类化合物, 在这些细菌中一些为植物致病菌, 近年来, 研究人员发现它可以有效地抑制不同的细菌、真菌引起的植物病害, 从而作为生防菌引起人们的研究兴趣, 其中激素的产生构成了病理学基因的一个因素, 测定细菌分泌IAA的能力已成为病理学专家的研究焦点^[7]。国内外在微生物激素方面的研究取得了一定的进展, 如利用赤霉素涂抹、浸种、拌种、蘸根、喷雾, 有明显增产效果。研究草坪草和牧草根际固氮菌分泌IAA的动态变化, 其目的是为微生物肥料开发筛选和提供优良的菌株。

1 材料与试验方法

1.1 材料 菌种由甘肃农业大学草业学院微生物实验室提供(表1)。

表1 试验所用的菌种名录

菌种编号	名称	来源
I012	<i>Pseudomonas</i> sp	早熟禾
I033	<i>Acetobacter</i> sp	高羊茅
I034	<i>Zooglyea</i> sp	黑麦草
I041	<i>Azospirillum lipoferum</i>	燕麦

1.2 方法

1.2.1 分泌IAA能力的定性测定。将待测菌株接种于含有1g/L NH₄NO₃和100ng/L色氨酸的CCM液体培养基的三角瓶中, 3个重复, 置于28℃摇床培养12d, 转速为125

r/min, 再用比色法定性测定菌株产生IAA的能力。比色液的组成及配方为0.5ml/L FeCl₃, 浓H₂SO₄30ml, 蒸馏水50ml。取上述的菌悬液50μl滴置于白色陶瓷板上, 同时加50μl比色液。对照只在比色液中加入1滴50μg/ml的生长素(IAA)。将白色陶瓷板置于室温下15min后观察颜色变化, 颜色变粉红或与对照颜色相似为阳性, 否则为阴性, 以确定该菌株有无产生生长素的能力^[8]。

1.2.2 分泌IAA能力的定量测定。采用Salkowski比色法测定分离物产生植物生长激素类物质IAA的能力。比色液的组成S₂:FeCl₃4.5g;10.8ml/L H₂SO₄1L, 测定范围5~200μg/ml, 一般超过100μg/ml就应该稀释;PC:FeCl₃12g;7.9ml/L H₂SO₄1L, 测定范围0.3~20μg/ml。显色反应红色表示有IAA或IPyA(丙酮酸), 标准曲线采用纯的IAA制作^[6]。

培养基组成: 蛋白胨20g;K₂HPO₄1.15g;MgSO₄·7H₂O1.5g;丙三醇15ml;总体积为1L。可以加0.1g/L L-色氨酸, 也可以不加L-色氨酸^[6]。

菌悬液的制备, 在盛有10ml LB液体培养基的试管中, 接种供试菌株, 28℃下, 置于轨道摇床上培养2~3d。用分光光度计测定菌株悬浮液的OD值, 并用无菌水调节OD值为0.6(波长600nm)。

在液体发酵的第2、4、6、8、10、12、14d分别取发酵液, 在10000r/min离心10min, 取上清液1ml再加比色液1ml进行显色, 在黑暗中静止30min, 取出立即用721型分光光度计测定, 波长是530nm^[6]。

2 结果与分析

2.1 不同培养时间对菌株分泌IAA能力的影响 联合固氮菌分泌能力测定颜色反应和测定结果见表2。

表2 联合固氮菌分泌IAA性能的颜色反应

菌株编号	颜色反应	菌株编号	颜色反应
I012	+++	I033	+++
I041	+++	I034	+++

注: “+++”表示红色; “++”表示粉红色; “+”表示浅红色; “-”表示不变色。

这种方法比较简单、方便、快捷, 适合于大量的筛选工

基金项目 教育部重点项目(207139); 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放课题(BR0506); 新疆生产建设兵团科技攻关项目(2006GC26)。

作者简介 吴瑛(1968-), 女, 甘肃天水人, 副教授, 从事化学教学和研究工作。

收稿日期 2007-03-05

作,而且对培养基的要求不是很高,可以在任何细菌培养基上都可以测定。在联合固氮菌的研究中,联合固氮菌对植物有生长促进作用的不仅是固氮作用,而起主要作用的是分泌激素^[3]。因此,人们对固氮菌的分泌植物生长激素类物质的研究非常重视。

对细菌分泌生长激素的动态变化、分泌的稳定性研究尤为重要,以确定微生物菌肥使用的时间和用量提供理论依据。另外,也可以确定测定分泌激素的最佳时间。因此对从禾本科草中分离出的4个分离物进行了6 d的初步测定,不同培养天数菌株分泌IAA的结果见表3。

表3 不同培养时间对菌株分泌IAA能力的影响 $\mu\text{g}/\text{ml}$

菌株	培养时间 h					
	24	48	72	96	120	144
I033 -	4.50	6.71	7.63	10.03	10.50	10.90
I033 +	8.50	15.80	18.10	21.57	21.50	22.33
I034 -	2.17	4.58	4.66	5.04	5.00	5.30
I034 +	5.48	7.30	8.97	8.96	9.13	9.74
I041 -	6.20	9.98	10.27	10.38	10.60	11.40
I041 +	9.40	13.05	16.00	17.20	17.00	16.80
I012 -	6.20	8.58	8.97	10.00	10.08	10.90
I012 +	14.50	18.29	19.20	21.81	22.00	21.70

注:“-”表示培养基中不加色氨酸;“+”表示培养基中加色氨酸。

对4种分离物的研究表明,培养后第3天是测定激素的最好时间,因为此时分泌激素的数量已达到了最高,这可能与细菌的活性有关,因为细菌在培养的24~48 h活性和繁殖能力最强,在72 h培养液中细菌的数量基本达到稳定,因此,此时培养液中的激素含量也达到最大,基本稳定。随着培养时间的继续,培养液中的营养不足,细菌死亡,分泌激素的数量不变,但是细菌自身代谢利用IAA的数量没有考虑在内。

2.2 不同固氮菌对分泌IAA能力的影响 经测定发现,联合固氮菌都能分泌生长素IAA,菌株I041和I012效果最好,而I034菌株和I033的效果较差。与大多联合固氮菌一样,粪产碱菌可产生植物激素,在LW培养基中培养的A1501及A1513均产生植物激素IAA,其IAA产量随着培养时间的增加而增加。培养24 h,产生的IAA分别达 $3.94 \mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $6.84 \mu\text{g}/\text{ml}$ ^[3]。4个菌株分泌IAA,加前体的浓度大于不加前体的浓度。姚拓从燕麦根际分离获得的8株联合固氮菌株均具有分泌植物生长素的特性,但分泌IAA的能力差异较大,分泌IAA的浓度 $2.16 \sim 17.31 \mu\text{g}/\text{ml}$ ^[8]。这与目前报道具有分泌植物生长素能力的细菌主要有 *Azospirillum*、*Azotobacter*、*Bradyrhizobium*、*Acetobacter*、*Flavobacterium*、*Acaligenes*、*Enterobacter*、*Pseudomonas*、*Xanthomonas*、*Azoarcus*和*Zoogloea*等属的结果相似^[11]。Rasul等用高效液相色谱仪测定分离自水稻、Kallar草和小麦根际的13株菌株(分别属于 *Azospirillum*、*Enterobacter*、*Pseudomonas*、*Azoarcus*、*Zoogloea*和*Flavobacterium*)发现,除3株属于 *Enterobacter* 属的菌株外,其余10株均产生IAA,其浓度在 $1 \sim 22 \mu\text{g}/\text{ml}$ ^[11]。但是对于不同属的细菌分泌IAA有差异,对于同一属也有很大差异。

对I012、I033、I034、I041 4种菌株分泌IAA的动态变化进行了14 d的测定,结果见图1~4。4种菌株在发酵的第3天分泌IAA的能力最强,以后随着发酵的时间增加,分泌IAA

的数量基本没有发生。说明在发酵的第3天测定IAA比较好。I012、I033、I034、I041 4种菌株分泌IAA能力分别为 29.1 、 25.2 、 25.5 和 $36.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

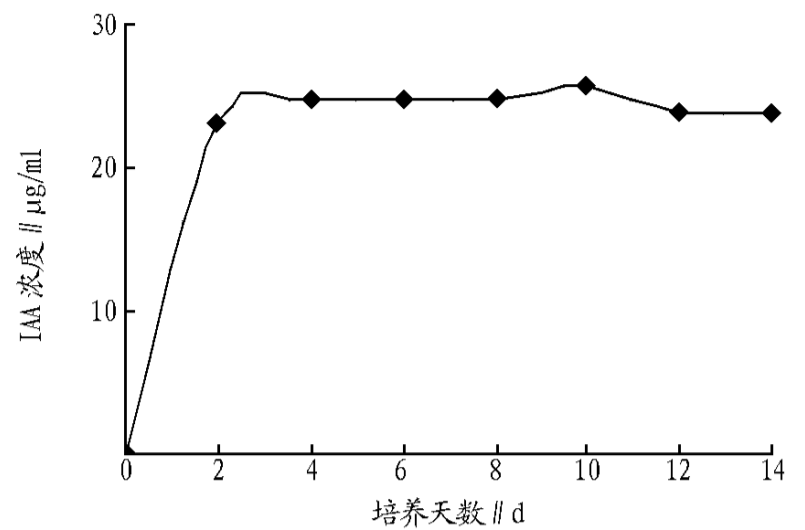


图1 I034 细菌分泌IAA 动态变化

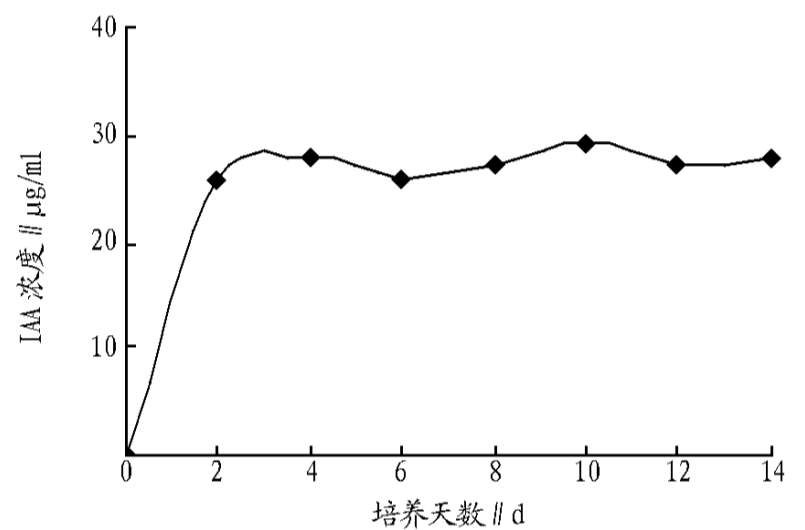


图2 I012 细菌分泌IAA 动态变化

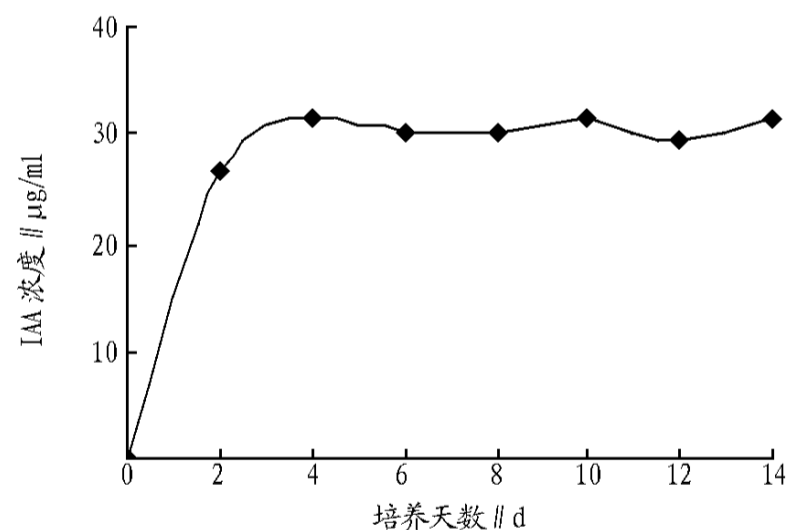


图3 I041 细菌分泌IAA 动态变化

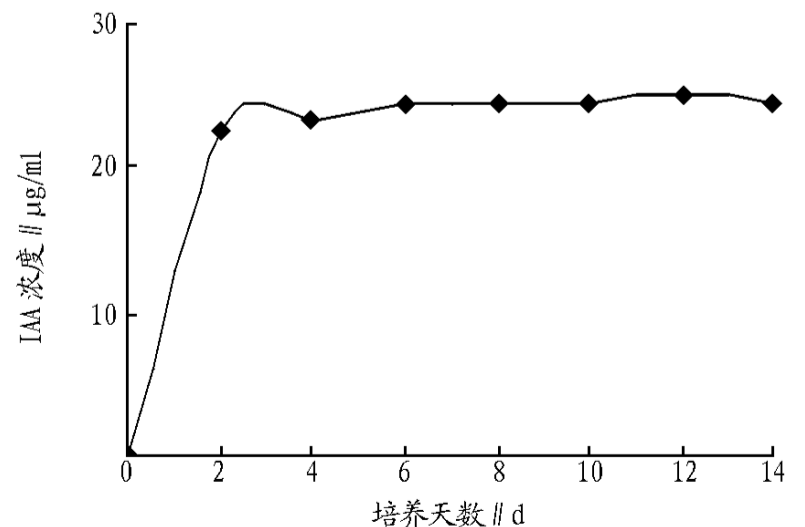


图4 I033 细菌分泌IAA 动态变化

2次测定IAA的含量不一样,这主要与接种的数量多少有关,但2次测定的变化规律相似。这种方法还是比较实用

(下转第4441页)

(上接第4425页)

的,至于要比较几个菌株的数量差异,需要保持接种量的一致,或选择定量测定的方法。

从整个曲线的稳定性来看,比色法测定的结果较稳定,需要准确测定和比较菌株的数量以及种类的多少,需要用高效液相色谱仪或液质联用色谱,另外也需要知道接种的数量,或者使用每克干细胞含量,而不用每毫升的含量作单位。

微生物产生植物激素,研究最多的是生长素(IAA)。已经知道包括荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas* spp)在内的许多根际微生物可以产生生长素、赤霉素和细胞激动素等物质,色氨酸(生长素的前体)能由植物根分泌,也可由微生物的代谢产物或微生物自溶而得,它可以促进生长素的合成^[9]。

3 讨论

目前,有关微生物肥料促进植物生长的机理研究,微生物活动产生的植物激素、酸性物质以及维生素都能不同程度地刺激、调节植物的生长。

许多研究表明,植物生长发育过程中,共生微生物产生的植物激素对其生长起重要作用。对根际促生细菌产生IAA的作用及机制的研究较为深入,IAA的重要作用不仅在于其直接促生作用,即通过与质膜上质子泵结合使之活化,改变细胞内环境,导致细胞壁糖溶解、可塑性增加以及促进RNA、蛋白质的合成,最终增加细胞体积和质量以达到促生的作用。同时可使色氨酸(Trp)类似物解毒,减轻其毒害作用。另外,IAA还可以抑制植物防卫系统酶,如几丁质酶、1,3-葡聚糖酶等的活性,使有益细菌更易定殖于植物。

菌肥发酵液中植物激素的测定结果是将蜡状芽孢杆菌和胶质芽孢杆菌分别发酵24 h后,等体积混合发酵液,类吲哚乙酸浓度为5.82 μg/ml。徐幼平报道阴沟肠杆菌在发酵48 h,培养基中添加0.2%色氨酸时,发酵液中IAA含量可达904.38 mg/L,与不加色氨酸的对照相比,增加了近900倍^[12]。其中发酵液稀释32倍对植物的促进效果最好,但该

试验结果只能提高2倍。

硅酸盐细菌NBT菌株在有氮培养基中,能产生并分泌生长素(IAA),其浓度分别为0.54~3.77 nmol/ml。在培养的初期,发酵液中的含量较少,培养3 d,虽然细胞数量最多,但发酵液中IAA的量没有达最大,随着培养时间延长,细胞部分衰亡,自溶,产生的IAA,分泌到培养液中,使培养液中的IAA浓度增加,说明IAA是在稳定期的后期大量产生^[9]。

参考文献

- [1] OKENY. Root associative azospirillum species can stimulate plants [J]. *ASM News*, 1997, 63(7): 366 - 370.
- [2] FUENTES REMREZ. *Acetobacter diazotrophicus*, an IAA producing bacterium isolated from sugar cane cultivates of Mexico [J]. *Plant and soil*, 1993, 154: 145 - 150.
- [3] 陈明, 张维, 林敏. 粪产碱菌耐铵工程菌与水稻联合共生固氮作用 [J]. *核农学报*, 1999, 13(6): 373 - 376.
- [4] IIDJA HALDA ALJA. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. *Can J. Microbiol*, 2003, 49: 781 - 787.
- [5] THAKURIA D, TALUKDAR N C, GOSWAMI C, et al. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam [J]. *Current Science*, 2004, 86(7): 978 - 985.
- [6] ERIC GLICKMANN, YVES DESSAUX. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 2: 793 - 796.
- [7] 田国忠, 李怀方, 裴维蕃. 植物激素与植物病害的相互作用 [J]. *植物生理学通讯*, 1999, 35(3): 177 - 184.
- [8] 姚拓. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究 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(3): 85 - 90.
- [9] 盛下放, 黄为一. 硅酸盐细菌BNT菌株生理特性的研究 [J]. *土壤学报*, 2001, 38(4): 567 - 574.
- [10] 蒋先军, 黄昭贤, 谢德体, 等. 硅酸盐细菌代谢产物对植物生长的促进作用 [J]. *西南农业大学学报*, 2000, 22(2): 116 - 119.
- [11] RASUL G, MRZ MS, LAHIF F, et al. Identification of plant growth hormones produced by bacterial isolates from rice, wheat and kallar grass [M] // MAHUK A, MRZ MS, LADHA J K. *Proceedings of the 7th international symposium on nitrogen fixation with nonlegumes*. The Netherlands: Kluwer Publishers, 1998: 25 - 37.
- [12] 徐幼平, 臧荣春, 陈卫良, 等. 阴沟肠杆菌EB发酵液对植物的促生作用和IAA分析 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2001, 27(3): 282 - 284.