

PGPB 对红树植物木榄幼苗的接种效应

李 玫, 廖宝文, 康丽华, 郑松发, 陈玉军

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要:通过盆栽试验研究了植物促生菌(PGPB)对红树植物木榄幼苗的接种效应,供试菌为6种解磷菌(即 *B. amy*, *Vib*, *B. atr*, *Xan*, *B. Lic*, *P. M.*)和5种固氮菌(即 *Au4*, *Phy*, *24S*, *JA4*, *cd*),结果表明:(1)分别接种6种解磷菌株6个月后木榄幼苗的生长均得到了不同程度的促进,与对照相比,木榄苗高增加21.57%~9.54%,生物量增加27.49%~20.32%,叶片的氮含量增加33.33%~1.35%,叶片的磷含量增加24.42%~2.04%;经差异显著性检验,*B. amy*和*Vib*2个菌种对木榄幼苗的促生效应比其它解磷菌株更明显;(2)分别接种5种固氮菌株6个月后木榄幼苗的生长均得到了促进,与对照相比,木榄幼苗的均高增加24.07%~10.22%,生物量增加32.36%~19.71%,叶片的氮含量增加23.39%~4.05%,叶片的磷含量增加32.79%~4.99%;差异显著性检验表明:*Au4*和*Phy*2个菌种对木榄幼苗的促生效果比其它固氮菌更显著。

关键词:解磷菌;固氮菌;木榄幼苗;接种;促生

中图分类号:S722.3 **文献标识码:**A

Effects of Inoculation with Plant Growth-promoting Bacteria on *Bruguiera gymnorhiza* Seedlings

LI Mei, LIAO Bao-wen, KANG Li-hua, ZHENG Song-fa, CHEN Yu-jun

(Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: A pot experiment was conducted to investigate the growth-promoting effects of inoculation with plant growth-promoting bacteria on *Bruguiera gymnorhiza* seedlings, including six phosphate solubilizing bacterial strains (i. e. *B. amy*, *Vib*, *B. atr*, *Xan*, *B. Lic*, *P. M.*) and five nitrogen-fixing bacterial strains (i. e. *Au4*, *Phy*, *24S*, *JA4*, *cd*). Results showed that: (1) After inoculated with the PSB for six months, the growth of the *B. gymnorhiza* seedlings was accelerated significantly. The average height of *B. gymnorhiza* seedlings was increased by 21.57%~9.54% compared to those of controls, and the biomass was accordingly increased by 27.49%~20.32%. The total N and P contents of inoculated seedling leaves were 33.33%~1.35% and 24.42%~2.04% respectively higher than those of controls; (2) The test of significance of difference also indicated that the growth-promoting effects of *B. amy* and *Vib* were significantly higher than those of other PSBs; (3) Six months after the inoculation of nitrogen-fixing bacterial strains, the average height of *B. gymnorhiza* seedlings were increased by 24.07%~10.22%, and the biomass was accordingly increased by 32.36%~19.71%. The total N and P contents of inoculated seedling leaves were 23.39%~4.05% and 32.79%~4.99% respectively higher than those of controls; (4) The test of significance of difference also indicated that the growth-promoting effects of *Au4* and *Phy* were significantly higher than those of other nitrogen-fixing bacterial strains.

Key words: phosphate solubilizing bacteria (PSB); N_2 -fixing bacteria; *Bruguiera gymnorhiza*; inoculation; growth-promoting

收稿日期: 2005-04-15

基金项目: 国家林业局 948 项目(2004-04-14); 广东省科技厅国际合作项目(2KB0682W)

作者简介: 李玫(1971—), 女, 重庆人, 硕士, 助理研究员, 现主要从事湿地生态学研究, 已在国内发表论文 18 篇。E-mail address: limei71@21cn.com

用 PGPB (Plant growth-promoting bacteria) 接种植物被认为是一种有效提高农作物产量的方法, PGPB 可通过各种代谢途径来促进植物生长, 如固氮, 磷酸增溶, 产生植物激素, 合成含铁细胞或对植物病原菌的生物控制等^[1,2]。目前, 国外在红树林领域研究的 PGPB 主要有固氮菌和解磷菌, 接种 PGPB 能有效促进红树林幼苗和胚轴的生长^[3], 而我国该方面的研究及技术应用尚属空白。

红树林通常被认为是营养较缺乏(尤其是 N、P 元素)的生态系统^[4], 然而几乎所有红树林都生长茂盛, 并不表现出明显的营养缺乏现象。有研究指出, 根际微生物是保证红树林生态系统营养物质转化和生产力的主要生物群体^[5]。生物固氮作用是红树林生态系统中常见的现象, 该系统中有完善、高效的联合固氮生态系, 是氮素的重要来源^[6]。一个红树林生态系统中, 大约 40%~60% 的年氮需要量由腐烂叶片、根际、表层底泥中的固氮作用提供^[7]。迄今为止, 已从各种红树林植物的底泥、根际、根表面中分离出固氮细菌, 主要有: *Azospirillum* 属, *Azotobacter* 属, *Rhizobium* 属, *Clostridium* 属和 *Klebsiella* 属^[8], 同时, 由于红树林生长于海陆交界的潮间带, 海水中丰富的阳离子更磷酸根离子沉降到红树林底泥的间隙水中, 导致大部分磷酸根难以被植物体利用, 而解磷菌作为可溶性磷酸的潜在提供者, 将有益于红树植物的生长。在墨西哥的干旱红树林生态系统中, 已从黑红树植物的根际分离出 9 种解磷菌的菌株, 从白红树植物的根上分离出 3 种解磷菌的菌株^[9]。

红树林造林的成活率和保存率低一直是我国进行红树林恢复和发展中存在的难题, 在恢复被破坏的红树林区或人工营造红树林时, 可以尝试利用接种 PGPB 来促进红树植物幼苗的生长。本研究利用墨西哥合作方提供的 PGPB 菌株(包括 6 种解磷菌株和 5 种固氮菌株), 以红树植物木榄 (*Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam.) 幼苗为接种对象进行盆栽接种试验, 旨在筛选出促生效果佳的优良 PGPB 菌株服务于沿海防护林建设和红树林资源的保护。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物: 木榄, 采自海南省东寨港, 挑选成熟

的大小均匀、完好无损的胚轴作试验材料(平均鲜质量 21.6 g)。胚轴先用 0.1% 高锰酸钾溶液浸泡消毒 30 min, 取出后用无菌水冲洗数次。从墨西哥西北生物中心引进的供试解磷菌种 6 株, 分别编号为: B. amy, Vib, B. atr, Xan, B. Lic, P. M.; 供试固氮菌种 5 株, 分别编号为: Au4, Phy, 24S, JA4, cd, 菌种在液态氮中保存。试验前分别采用改良的 SRSM 无机磷液体培养基^[9]和改良的 OAB 液体培养基^[10]对解磷菌和固氮菌进行扩繁, 所有供试菌株均进行液体振荡培养(190 r·min⁻¹), 培养温度 28~30 ℃, 时间 3~5 d, 制成液体菌剂(菌数达 10⁶ cfu·mL⁻¹)使用。

1.2 试验方法

1.2.1 解磷菌的接种 试验共设 7 组, 即 6 个处理组和 1 个对照组(CK), 每组重复 30 次(即 30 盆); 培养基质(组成为 50% 红壤 + 40% 河砂 + 5% 火烧土 + 5% 土杂肥)经 2 次高压灭菌(121 ℃, 1 h)后装盆, 每盆装基质 0.5 kg, 栽种 1 株木榄胚轴。在胚轴发芽并长出第 1 对叶时, 各处理组同时接种供试的解磷菌液, 即每株在基质中分别用无菌注射器注射菌剂 5 mL, 对照组则每盆注射灭菌的改良 SRSM 无机磷培养基 5 mL。

1.2.2 固氮菌的接种 试验共设 6 组, 即 5 个处理组和 1 个对照组(CK), 每组重复 30 次(即 30 盆); 培养基质的处理, 木榄胚轴的栽种以及菌液的接种方法与 1.2.1 基本相同, 但对照组每盆注射灭菌的改良 OAB 培养基 5 mL。

1.2.3 试验管理 从注射液体菌剂起 6 个月内, 每天每盆补充适量的无菌水以保持等高的水位(均高出基质表面 1 cm), 每月定期施加 1 次盐度为 5‰ 的人工海水(由无菌水添加天然海盐制成) 50 mL·盆⁻¹。

1.2.4 测定方法 试验结束时测量每株幼苗苗高。整株采收所有幼苗, 用蒸馏水冲洗干净, 自然晾干后在 70~80 ℃烘箱中烘干至恒质量, 计算每株总生物量。每组随机选取 3 株, 分别测定叶片的全 N 和全 P 含量。全 N 含量用扩散法测定, 全 P 含量用钼锑抗比色法测定^[11]。

2 试验结果

2.1 接种不同解磷菌、固氮菌对木榄苗高、生物量的促生效果

2.1.1 解磷菌 木榄幼苗接种解磷菌 6 个月后的

苗高及生物量见表1。表1表明:6种解磷菌对木榄幼苗苗高、生物量的增长均有一定的促进效果,苗高比对照增加21.57%~9.54%,生物量比对照增加27.49%~20.32%,其中B. amy和Vib 2个菌种对木榄苗高的促生效果最佳。经差异显著性分析(表1),接种6种解磷菌的木榄苗高、生物量与对照相比均达极显著差异($P < 0.01$),但各处理间差异不显著。

表1 接种不同解磷菌对木榄幼苗生长的影响

菌种	苗高/cm			生物量/(g·株 ⁻¹)		
B. amy	16.06 ± 1.664	a	A	10.48 ± 1.331	a	A
Vib	15.71 ± 1.930	ab	AB	10.16 ± 1.246	a	A
B. atr	15.49 ± 1.753	ab	AB	10.39 ± 1.312	a	A
Xan	15.51 ± 1.788	ab	AB	9.89 ± 1.286	a	A
B. Lic	14.72 ± 1.907	b	B	9.97 ± 1.104	a	A
P. M.	14.47 ± 1.906	b	B	9.95 ± 1.279	a	A
CK	13.21 ± 1.813	c	C	8.22 ± 1.014	b	B

注:同列不同小写字母表示0.05水平差异显著,不同大写字母表示0.01水平差异显著,下同。

2.1.2 固氮菌 木榄幼苗接种固氮菌6个月后的苗高、生物量见表2。表2表明:5种固氮菌对木榄幼苗苗高、生物量的增长均有明显促进效果,尤以Au4和Phy菌株效果更佳。苗高比对照增加10.22%~24.07%,生物量比对照增加19.71%~32.36%。运用SPSS软件进行差异显著性分析(表2),接种5种固氮菌的木榄苗高与对照相比均达极显著差异($P < 0.01$),生物量除cd外与对照相比均达极显著差异($P < 0.01$)。

表2 接种不同固氮菌对木榄幼苗生长的影响

菌种	苗高/cm			生物量/(g·株 ⁻¹)		
Au4	16.39 ± 1.639	a	A	10.88 ± 1.100	a	A
Phy	15.84 ± 1.812	a	AB	10.24 ± 1.136	ab	AB
24S	15.27 ± 1.968	ab	AB	10.46 ± 1.115	ab	AB
JA4	15.25 ± 1.913	ab	AB	10.16 ± 1.225	b	B
cd	14.56 ± 1.868	b	B	9.84 ± 1.136	bc	BC
CK	13.21 ± 1.813	c	C	8.22 ± 1.014	c	C

2.2 接种不同解磷菌、固氮菌对木榄幼苗叶片N、P含量的影响

2.2.1 解磷菌 接种6种解磷菌株后木榄幼苗叶片的全N、全P含量见表3。从表3看出,6种解磷菌株均使木榄幼苗叶片的全N、全P含量增高,其中,全N的含量比对照增加33.33%~1.35%,全P的含量比对照增加24.42%~2.04%。经差异显著性分析,接种B. amy、Vib后,木榄幼苗叶片的全N、

全P含量极显著高于对照($P < 0.01$);接种B. atr、Xan后,叶片的全N、全P含量显著高于对照($P < 0.05$);而接种B. Lic、P. M.后,叶片的全N、全P含量稍高于对照,但无显著差异。

表3 接种不同解磷菌后木榄幼苗叶片的全N、全P含量

菌种	全N/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	全P/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
B. amy	0.988 **	10.591 **
Vib	0.929 **	10.164 **
B. atr	0.858 *	9.723 *
Xan	0.831 *	9.572 *
B. Lic	0.797	8.709
P. M.	0.751	8.686
CK	0.741	8.512

注:**, $P < 0.01$;*, $P < 0.05$;下同。

2.2.2 固氮菌 接种5种固氮菌株后木榄幼苗叶片的全N、全P含量见表4。从表4看出,5种固氮菌株均使木榄幼苗叶片的全N、全P含量增高,全N的含量比对照增加4.05%~23.39%;全P的含量比对照增加4.99%~32.79%。经差异显著性分析(t-检验)表明:接种Au4、Phy后,叶片的全N、全P含量极显著高于对照($P < 0.01$);接种24S后,叶片的全N、全P含量显著高于对照($P < 0.05$)。

表4 接种不同固氮菌后木榄幼苗叶片的全N、全P含量

菌种	全N/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	全P/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
Au4	10.503 **	0.984 **
Phy	10.162 **	0.932 **
24S	9.226 *	0.825 *
JA4	8.857	0.801
cd	8.845	0.778
CK	8.512	0.741

3 讨论

PGPB研究已成为国际上的热门课题,在促进植物生长,增加作物产量,植物病害的生物防治方面进行了大量研究。PGPB是指自由生活在土壤或附生于植物根际、茎叶的一类可促进植物生长的有益菌类,一般指具有固氮、解磷、产生植物激素和分泌抗生素等能力或至少具有其中之一能力的细菌、蓝细菌等。我国在PGPB的研究中多以禾本科作物(如水稻、小麦、玉米等)为接种对象,而在木本植物上(包括红树林植物)应用甚少^[12]。

本文以红树植物木榄的幼苗为接种对象研究了PGPB的促生效应,试验表明:6种解磷菌株不

同程度地促进了木榄幼苗对 N、P 的吸收,并促进了幼苗生长,其中促生效果最佳的菌种是 *B. amy* 和 *Vib.*。有研究认为,解磷菌增加植物吸收磷量是由于解磷菌分泌的生长调节物质促进了根系的生长;也有人认为,解磷菌具有解磷和促进生长的双重作用^[13];还有研究指出,添加磷元素(不加任何氮元素)可使自然生态系统中的固氮速率增加 5~10 倍^[14],这与本研究中木榄幼苗在接种解磷菌后不仅增加了对磷的吸收而且增加了对氮的吸收相一致。至于微生物的解磷机制,一般认为有机磷微生物在土壤缺磷的情况下,向外分泌植酸酶、核酸酶和磷酸酶等,水解有机磷转化为无机磷酸盐。无机磷微生物的解磷机制一般认为与微生物产生有机酸有关,这些有机酸能够降低 pH 值,又可与 Fe、Al、Ca、Mg 等离子结合,从而使难溶性磷酸盐溶解^[15]。目前,我国在红树林领域内关于解磷菌的研究刚开始^[16],今后还有许多工作要做,包括专一红树植物解磷菌的筛选、解磷机制的探讨、高效解磷菌菌剂的应用乃至产业化等。

试验还表明:供试的 5 种固氮菌株在接种后均不同程度地促进了木榄幼苗的生长,具体表现为各处理的苗高、生物量、叶片全 N 和全 P 含量均显著高于未接种的对照,其中 Au4 和 Phy 2 个固氮菌种对木榄幼苗的促生效果最明显。对红树林固氮微生物的研究目前仅见于国外的一些报道,Sengupta 等^[17]在印度 Ganges 河口湾的热带红树群落中进行了离体根乙炔还原实验,7 种常见的处于较早演替阶段的红树种离体根的固氮酶活性高达 $64 \sim 130 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \text{C}_2\text{H}_4\text{dw}$ 。Mann^[18]在研究了南非的 Beachwood 红树林后指出,有大量根际固氮菌和红树林根系进行联合固氮,固氮菌在根系周围获得根系分泌的有机物,作为固氮的能源和碳源,固氮活性与水温、光照强度和季节性变化有重要关系,生物固氮的 24.3% 化合态氮供红树林吸收。Toledo 等^[19]在墨西哥的 Balandra 泻湖也对红树林根际、气生根系与蓝藻的联合固氮关系进行了详细研究,证明红树林根系不同的位置可能联合共生不同的海洋蓝细菌。从气生根上分离出并得到鉴定的两种蓝细菌(分属微鞘蓝细菌属和隐杆蓝细菌属)都是固氮菌,萌芽白骨壤(*Avicennia germinans* L.)的幼苗在接种原型微鞘蓝细菌 6 d 后,其固氮作用^[20]和氮积累增加(叶中的氮含量比未接种红树提高了 5%~

114%)^[21]。

目前,国内红树林湿地的 PGPB 研究尚处在起步阶段,如何筛选优良高效的乡土促生菌种以及寻找适合田间应用的接种方法和介质将是亟待解决的问题。国外研究表明:用混合菌剂接种比用纯菌株的促生效果更好,把从红树林根际分离出来的固氮细菌 *Phyllobacterium* sp. 和某种解磷菌混合起来,其固氮能力比仅用纯菌株时增加 200%,而且这两种混合菌株接种红树林幼苗后,进入叶片的氮元素增加^[2]。因此,建议开展有关红树植物 PGPB 混合菌剂研制与接种的研究,以便将来研制出促生效果显著的菌剂,并推广应用于红树林资源的保护和恢复。

参考文献:

- [1] Glick B R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria [J]. *Can J Microbiol*, 1995, 41: 109~117
- [2] Bashan Y, Hognin G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990—1996) [J]. *Can J Microbiol*, 1997, 43: 103~121
- [3] Bashan Y, Moreno M, Troyo E. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp [J]. *Biol Fertil Soils*, 2000, 32: 265~272
- [4] Alongi D M, Christoffersen P, Tirendi F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1993, 171: 201~223
- [5] Holguin G, Bashan Y, Mendoza-Salgado R A, et al. La Microbiología de los manglares. Bosques en la frontera entre el mar y la tierra [J]. *Cienciay Desarrollo*, 1999, 144: 26~35
- [6] 董俊德,王汉奎,张煜,等. 海洋固氮生物多样性及其对海洋生产力的氮、碳贡献 [J]. *生态学报*, 2002, 22(10): 1741~1749
- [7] Van der Valk A G, Attiwill P M. Acetylene reduction in an *Avicennia marina* community in Southern Australia [J]. *Aust J Bot*, 1984, 32: 157~164
- [8] Sengupta A, Chaudhuri S. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India [J]. *Oecologia*, 1991, 87: 560~564
- [9] Vazquez P, Holguin G, Puente M E, et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon [J]. *Biol Fertil Soils*, 2000, 30: 460~468
- [10] Okon, Y, Albrecht S L, Burris R H. Methods for growing *Spirillum* *Lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1977, 33: 85~88
- [11] GB 7888-87. 森林植物与森林枯枝落叶层全氮、全磷、全钾、全钠、全钙、全镁的测定(硫酸-高氯酸消煮法) [S]
- [12] Han J G, Yan M H, Sun L, et al. Isolation, Selection, Characterization of Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with Rice and Capsicum Plants [R]. The 2nd International Workshop and Product Exhibition on White Agriculture (Microbial Agriculture). Beijing,

- 2004
- [13] 赵小荣,林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料,2001(3):7~11
- [14] Lean D R S, Liao C F H, Murphy T P, et al. The importance of nitrogen fixation in lakes; Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and a symbiotic bacteria[J]. Ecol Bull (Stockholm), 1978, 26: 41~51
- [15] 赵小蓉,林启美,李保国. 溶磷菌对4种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究[J]. 微生物学报,2002,42(2):236~241
- [16] 万璐,康丽华,廖宝文,等. 红树林根际解磷菌分离、培养及解磷能力的研究[J]. 林业科学研究,2004,17(1):89~94
- [17] Sengupta A, Chaudhuri S. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India[J]. Oecologia, 1991, 87:560~564
- [18] Mann F D. Biological nitrogen fixation associated with Blue green algal communities in the Beachwood Mangrove Nature Reserve 2. Seasonal variation in acetylene reduction activity[J]. SAFRJBOT/S-AFR Tydskrif Plantkd., 1993, 59(3):1~8
- [19] Toledo G, Bashan Y, Soeldner A. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots[J]. Can J Microbiol, 1995, 41:999~1011
- [20] Toledo G, Bashan Y, Soeldner A. In vitro colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria [J]. Can J Microbiol, 1995, 41:1012~1020
- [21] Bashan Y, Puente M E, Myrold D D, et al. In vitro transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings[J]. FEMS Microbiol Ecol, 1998, 26:165~170