

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.03.022

杂交构树根际固氮菌的分离与特性研究

张 军, 彭轶楠, 郭 琪*, 王沛雅, 李 鑫, 杨 晖*

(甘肃省科学院生物研究所, 甘肃省微生物资源开发利用重点实验室, “特色微生物与植物资源创新”
甘肃省国际科技合作基地, 甘肃 兰州 730000)

摘要: [目的] 获得杂交构树根际固氮菌菌株并明确其功能特性。 [方法] 以 Ashby 培养基为选择分离条件, 从甘肃天水、兰州、张掖种植试验区的杂交构树根系及根际土壤中分离固氮菌, 对固氮菌进行鉴定及系统发育分析, 同时测定固氮酶活性、溶磷、分泌吡啶乙酸和抑制植物病原菌的能力, 并采用熵权法对菌株特性进行综合评价。 [结果] 从远根土和根表土中共分离出 10 株固氮菌, 分属 8 个属, 以假黄单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 居多。各菌株均具有固氮酶活性, TS4 和 HP10 的固氮酶活性均大于 $180 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$; 仅 TS4 和 HTZ2 具有溶磷能力; 有 8 株菌能够分泌吡啶乙酸, HTZ4 的分泌能力最强, 分泌量为 $44.62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。所有菌株对灰霉菌 (*Botrytis cinerea* Persoon) 无拮抗作用; 有 7 株菌分别对至少 2 种以上植物病原菌有抑制作用。HTZ4、HTZ3、HP5 分别对茄链格孢 (*Alternaria solani* (Ellis et G. Martin) Sorauer)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* Schlecht)、腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani* (Martius) Sacco) 有最强抑制, 抑制率分别为 50.00%、48.78%、47.37%。综合性能较强的菌株为 TS4、HP5、ZY9、HTZ4 和 HTZ5。 [结论] 研究结果可为进一步开发综合性能优良的固氮菌株, 研制杂交构树多功能固氮菌肥, 提高西北半干旱地区杂交构树产量提供依据和指导。

关键词: 杂交构树; 固氮; 溶磷; 分泌 IAA; 抑制病原菌

中图分类号: S714.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)03-0187-07

构树 (*Broussonetia papyrifera* (Linnaeus) L' Héritier ex Ventenat) 是一种具有重要经济价值的多年生乔木, 属于桑科 (Moraceae) 构属 (*Broussonetia*)。根据 Angiosperm Phylogeny Group III 分类系统, 又属固氮分支^[1]。近年来, 新品种杂交构树华构 1 号因抗逆性强、生长速度快、产量高、粗蛋白质含量高的优点, 被用作优质的木本饲料来源在全国 20 多个省 (市) 推广种植; 但在甘肃等西北干旱与半干旱地区, 杂交构树的生长存在产量低、翌年返青率低等问题^[2]。针对以上问题, 研究人员一方面开展了选育适宜甘肃冷凉地区的高产抗寒性品系的工作; 另一方面, 鉴于研究表明杂交构树高含量的粗蛋白来源和速生可能与其内生和根际共生的共生固氮或联合固氮菌有密切关系^[3], 可通过从杂交

构树根际土壤中筛选本土固氮菌微生物再回接的方式, 提高菌肥效果, 达到增产的目的。因此, 根据土壤环境情况分离筛选杂交构树优良固氮菌株, 是研制菌肥最基础的前期工作。本研究旨在从甘肃地区种植的杂交构树根际分离筛选获得固氮菌株, 并对其固氮、促生、溶磷、生物防治等功能进行研究, 可为进一步开发甘肃地区杂交构树微生物氮肥提供菌种资源。

1 试验材料

1.1 样品

为便于研究, 将根际分为远根土 (距离根部 1~10 cm 的土壤)、根表土 (距离根部 0~1 cm 的土壤) 与根 3 个部位, 于 2019 年 8 月在甘肃的天

收稿日期: 2021-01-11 修回日期: 2021-03-08

基金项目: 兰州市城关区科技计划项目“新型固氮菌资源筛选及其特性研究”(2019-6-3); 甘肃省科学院科技产业化项目 (2019CY-06)

* 通讯作者: 郭琪, 女, 硕士, 副研究员. 主要研究方向: 植物资源与菌植互作. E-mail: guoqi9207@163.com; 杨晖, 女, 博士, 研究员. 主要研究方向: 生物技术. E-mail: yanghui43@163.com

水 (34°5'N, 105°82'E)、兰州 (36°0'N, 103°57'E) 和张掖 (38°43'N, 100°40'E) 杂交构树种植试验区, 按照蛇型采样法, 各取 5 个点分别采样, 现场混合后将根系样品和采用四分法保留的土壤样品装入无菌自封袋中运回实验室进行分离。天水、兰州、张掖采样区 0~20 cm 土层土壤的全氮含量分别为 0.616、0.356、0.284 g·kg⁻¹, 硝态氮含量分别为 247.00、28.80、26.05 mg·kg⁻¹。

1.2 供试病原菌

灰霉菌 (*Botrytis cinerea* Persoon) (*Bc*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kuhn) (*Rs*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* Schlecht) (*Fo*)、腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani* (Martius) Sacco) (*Fs*)、茄链格孢 (*Alternaria solani* (Elliset G. Martin) Sorauer) (*As*) 由甘肃省农业科学研究院植保所提供。

2 研究方法

2.1 固氮菌的分离与培养

远根土与根表土固氮菌的分离采用常规稀释平板涂布法在 Ashby 培养基上进行。根系固氮菌的分离: 取根径约 1~10 mm 的根, 剪成 3~5 cm 的段, 用自来水冲洗 1~2 h, 在无菌操作台中用 75% 酒精浸泡 1 min 后, 无菌水洗涤 3~5 次, 再用 0.1% 的升汞浸泡 3 min 后, 无菌水洗涤 3~5 次, 吸干表面水分, 切成 5~8 mm 的小段, 接种于 Ashby 培养基。28℃, 恒温培养 5~7 d, 待分离的菌落长出后用平板划线法继续在 Ashby 培养基上进行纯化。将纯化好的菌株接入 LB 斜面上, 培养 3 d 后置入冰箱 4℃ 保藏。

2.2 固氮菌的鉴定及系统发育分析

观察菌落形态学特征。根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 说明提取单菌落基因组 DNA, 送生物工程 (上海) 股份有限公司 16S rDNA 测序, 结果与 NCBI GenBank 中的已知序列进行同源性比对后, 判定细菌种类并划分到属或种。应用 MEGA7.0 软件, 采用邻接法聚类分析, 构建系统发育树, Bootstrap 值为 1 000。

2.3 指标测定

固氮酶活性按照微生物固氮酶 (NITS) ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司) 说明书操作测定; 溶磷能力采用定性溶磷圈法^[4]和钼锑抗定量比色法^[5]测定; 分泌 IAA 能力采用定性显色法和 Salkowski 定量比色法^[5-6]测定。

2.4 固氮菌对植物病原真菌的拮抗能力

采用滤纸条法^[7]研究分离到的固氮菌对植物病原真菌的拮抗能力。用 LB 液体培养基培养分离得到的固氮菌, 待菌体浓度达到 $OD_{600} = 1$ 时, 取菌液备用。在 PDA 培养基平板中央接种直径为 7 mm 的植物病原菌菌丝块, 分别进行如下 3 种处理: a 对照 (无处理); b 无菌水滤纸条对照 (距菌丝块两侧 1.5 cm 位置放置用无菌水浸湿的滤纸条); c 拮抗试验 (距菌丝块两侧 1.5 cm 位置放置浸湿固氮菌菌液的滤纸条)。3 种处理 28℃ 培养 7~10 d, 观察抑菌效果。待处理 b 病原菌铺满整个平板时, 垂直滤纸条方向测量处理 b 与处理 c 病原菌的菌落直径, 计算抑制率。抑制率 = (处理 b 菌落直径 - 处理 c 菌落直径) / 处理 b 菌落直径 × 100%。

2.5 菌株特性综合评价

采用熵权法^[8]对分离到菌株性能进行综合评价。

2.6 数据处理

对获得的数据应用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析, 并用 Duncan 氏法进行多重比较。

3 结果与分析

3.1 固氮菌菌株的分离及鉴定

经 16S rDNA 测序比对发现, 从 3 个试验区杂交构树根际共分离到 10 株固氮菌, 有 5 株菌为 3 地共有, 分属同 1 菌株 (表 1)。与该属模式菌株及最高相似性菌株的 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树 (图 1) 表明: 10 株菌分属 8 个属 9 个种, 其中, 3 地共有菌 HTZ1、HTZ2、HTZ3、HTZ4、HTZ5 分别被认定为根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn) (同源相似性 98.16%, 下同)、费氏中华根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii* (Scholla et Elkan) Chen) (99.82%)、阿拉伯分枝杆菌 (*Mycolicibacterium arabiense* Zhang) (98.88%)、墨西哥假黄单胞菌 (*Pseudoxanthomonas mexicana* Thierry) (97.87%) 和日本假黄单胞菌 (*Pseudoxanthomonas japonensis* Thierry) (98.13%)。从天水试验区远根土中另外分离得到的 2 株菌 TS2、TS4, 分属纤维弧菌属 (*Cellvibrio*) 和固氮菌属 (*Azotobacter*), 被认定为 *Cellvibrio fibrivorans* Mergaert (98.17%) 和圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum* Beijerinck) (99.73%)。从兰州远根土和根表土中另外分离得到的 2 株菌 HP5、HP10 分属肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和鞘氨醇杆菌属

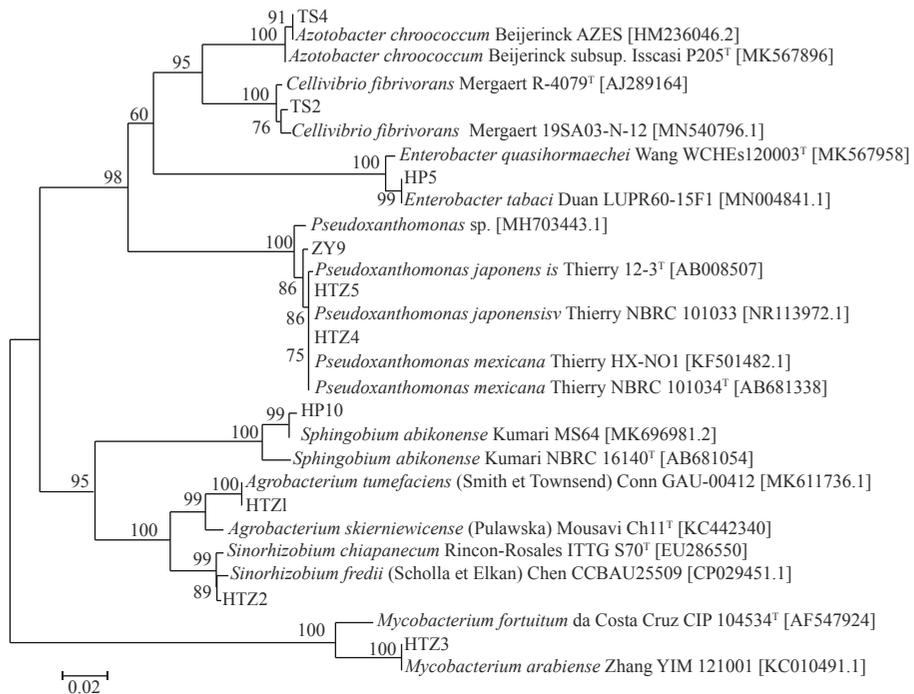
表1 杂交构树根际固氮菌分离结果与菌落形态

Table 1 Results and colony morphology of root-bound nitrogen-fixing bacteria from hybrid *Broussonetia papyrifera*

分离地 Collection sites	菌株 Strain	分离部位 Separated position	菌落直径 Colony dia-meter/mm	生长速度 Growth rate	菌落形态 Colonial morphology
①②③	HTZ1	TS	2.0~3.0	++	无色透明, 表面凸起, 边缘整齐, 后期有流动性 Colorless and transparent, convex surface, neat edge, fluidity in later period
①	TS2	FRS	2.0~3.0	++	无色半透明, 表面凸起, 边缘不规则, 后期有流动性 Colorless translucent, convex surface, irregular edge, fluidity in later period
①②③	HTZ2	TS	0.5~1.0	++	乳白半透明, 表面凸起, 边缘整齐 Milky white translucent, convex surface, neat edges
①	TS4	FRS	0.5~1.0	++	乳白不透明, 表面凹陷, 边缘不规则 Opalescent opacity, concave surface, irregular edge
②	HP5	FRS	1.0~2.0	+	橘黄不透明, 表面凸起, 边缘整齐, 后期生长非常缓慢 Orange and opaque, raised surface, neat edges, very slow growth later
①②③	HTZ3	TS	1.0~2.0	+++	淡黄半透明, 表面凸起, 有粘性, 边缘不规则, 后期流动性强 Pale yellow and translucent, convex surface, viscous, irregular edge, strong fluidity in later period
①②③	HTZ4	TS	0.5~1.0	+++	淡黄半透明, 表面凸起, 有粘性, 边缘整齐, 后期流动性强 Pale yellow and translucent, convex surface, viscous, neat edge, strong fluidity in later period
①②③	HTZ5	TS	0.5~1.0	+++	淡黄不透明, 表面凹陷, 有粘性, 边缘不规则, 后期流动性强 Pale yellow and opaque, sunken surface, viscous, irregular edge, strong fluidity in later period
③	ZY9	FRS	0.5~1.0	++	乳白不透明, 表面凹陷, 边缘不规则, 后期棕褐 Opalescent opaque, surface sunken, margin irregular, brown in later period
②	HP10	TS	0.5~1.0	++	乳白不透明, 表面褶皱, 边缘不规则, 后期棕褐 Opalescent opacity, surface pleated, margin irregular, brown in later period

注: ①、②、③分别代表天水、兰州、张掖试验区; 分离部位中TS、FRS分别代表根表土、远根土; 生长速度中“+、++、+++”分别代表菌株前期生长较慢、中等、较快, 48 h内的为生长速度较快, 72 h内为中等, 96 h内较慢。

Notes: ①, ② and ③ respectively represent Tianshui, Lanzhou and Zhangye experimental areas respectively. TS and FRS represent root topsoil and far rhizosphere soil, respectively. "+, ++, +++" respectively represent the slow, medium and fast growth in the early stage of the strain, the fast growth within 48 h, the medium growth within 72 h, and the slow growth within 96 h.



注: 中括号中为相关细菌的 GenBank 登录号, 分支位置中的数字表示 Boostrap 支持率。

Notes: the GenBank login number of the related bacteria is shown in brackets. The number of the branch position indicates the support rate of Bootstrap.

图1 基于16S rDNA基因序列构建的10株杂交构树根际固氮菌株系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of nitrogen fixing strains from rhizosphere constructed based on 16S rDNA gene sequence

(*Sphingobium*), 被认定为烟草肠杆菌 (*Enterobacter tabaci* Duan) (99.53%) 和 *Sphingobium abikonense* Kumari (98.70%)。从张掖远根土中分离得的 ZY9 也属于假黄单胞菌属 (*Pseudoxanthomonas* sp.) (99.38%)。以上菌株在杂交构树根际的分布数量表现为根表土 > 远根土, 菌株种类数量最多的为假黄单胞菌属, 共 3 株, 优势率为 37.5%。3 个试验区杂交构树的根内均未分离得到固氮菌。

3.2 固氮、溶磷、促生、生防特性及综合评价

表 2 表明: 分离得到的 10 株固氮菌固氮酶活性存在差异, 其中, HTZ4 的固氮酶活性最低

(130.41 IU·L⁻¹), TS4 的活性最高 (184.51 IU·L⁻¹)。所有固氮菌均无溶解无机磷的能力, 仅 HTZ2 和 TS4 在蒙金娜有机磷培养上出现溶磷圈, 说明这 2 株菌具有一定溶解有机磷 (卵磷脂) 的能力 (图 2、表 2), 但二者差异不显著, 而在发酵液中有机磷的增量表现为 TS4 显著大于 HTZ2。能够分泌 IAA 的固氮菌有 8 株, 占分离获得菌株数量的 80%。HTZ4 和 HTZ1 产 IAA 显色反应最明显, 说明具有较强的分泌 IAA 的能力, 分泌量分别达 44.62、36.52 μg·mL⁻¹, 与其他菌株差异极显著; HTZ4 菌液 IAA 的分泌量比 HP10 的高出约 20 倍 (表 2)。

表 2 固氮菌固氮酶活性、溶磷和产 IAA 能力的检测结果

Table 2 Results of activity, dissolved phosphorus and IAA production capacity of nitrogen-fixing bacteria

固氮菌 Nitrogen fixing bacteria	固氮酶活性 Nitrogenase activity/ (IU·L ⁻¹)	溶解有机磷 Soluble phosphorus reaction/ (mm·mm ⁻¹)	有机磷增量 Organophosphorus increment/ (μg·mL ⁻¹)	产 IAA 显色反应 IAA chromogenic reaction	IAA 增量 IAA Increment/ (μg·mL ⁻¹)
HTZ1	139.53 ± 1.09 E	0.00 ± 0.02 B	0.00 ± 0.12 C	+++	36.52 ± 0.69 B
TS2	137.40 ± 2.05 E	0.00 ± 0.05 B	0.00 ± 0.02 C	-	0.00 ± 0.00 E
HTZ2	163.08 ± 1.06 C	1.18 ± 0.02 A	1.60 ± 0.91 B	++	8.47 ± 0.29 C
TS4	184.51 ± 0.66 A	1.37 ± 0.06 A	3.15 ± 0.31 A	+	3.84 ± 0.24 DE
HP5	153.05 ± 0.60 D	0.00 ± 0.01 B	0.00 ± 0.22 C	+	1.73 ± 0.08 E
HTZ3	177.52 ± 0.91 B	0.00 ± 0.02 B	0.00 ± 0.17 C	-	0.00 ± 0.09 E
HTZ4	130.41 ± 1.61 F	0.00 ± 0.05 B	0.00 ± 0.04 C	+++	44.62 ± 0.70 A
HTZ5	166.58 ± 1.32 C	0.00 ± 0.11 B	0.00 ± 0.02 C	++	7.74 ± 0.31 C
ZY9	155.64 ± 0.52 D	0.00 ± 0.08 B	0.00 ± 0.00 C	+	5.26 ± 0.17 D
HP10	182.84 ± 0.55 AB	0.00 ± 0.10 B	0.00 ± 0.00 C	+	2.26 ± 0.25 E

注: 表中数据为平均值 ± 标准误。同列不同大写字母表示差异极显著 ($p < 0.01$); 产 IAA 显色反应中“-、+、++、+++”分别代表不变色、浅红色、粉红色、红色。

Notes: Data in the table are mean ± standard error. Different capital letters in the same column indicated significant difference ($p < 0.01$); In IAA reaction, “-, +, ++, +++” respectively represent non-discoloration, light red, pink, and red.

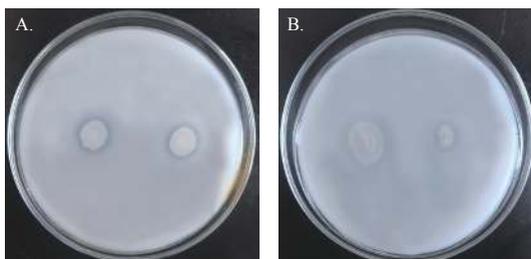


图 2 菌株 HTZ2 (A) 和 TS4 (B) 在蒙金娜有机磷培养基上的解磷能力

Fig. 2 Phosphorolysis ability of strains HTZ2 (A) and TS4 (B) on Montana organophosphate medium

10 株固氮菌对不同植物病原菌的拮抗作用不同 (表 3、图 3、4)。所有菌株对 *Bc* 均无拮抗作用, 除 HTZ2、TS4 和 TS2 对另外 4 种供试病原菌

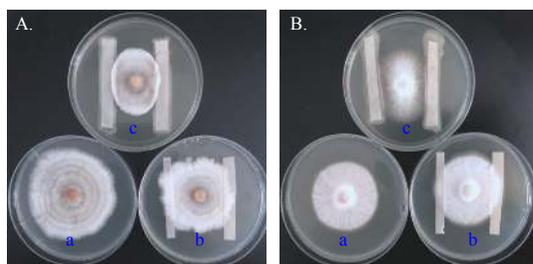
也无抑制效果或效果微弱外, 其余 7 株菌分别对至少 2 种以上病原菌有一定的抑制作用, 其中, HP5、HP10、HTZ4、ZY9 对 *As*、*Fs*、*Fo* 均有拮抗作用, HTZ4、HP5 分别对 *As*、*Fs* 的抑菌率最大, 分别为 50.00%、47.37%, 其次为 HP10, 对 *As*、*Fs* 抑制率分别为 45.83%、44.44%; HP5、ZY9 对 *Rs* 也有拮抗作用。

通过对分离得到的 10 株固氮菌进行固氮、溶磷、分泌生长素、抑菌特性测试结果表明: 各菌株对不同测试指标表现各异, 其中, TS4、HTZ2 具有固氮、溶磷、分泌 IAA 的能力, 但不具备抑制供试病原菌的能力; HP5、HTZ4、HTZ5、ZY9、HP10 除无溶磷能力外, 具有不同程度的固氮、分泌 IAA、抑制病原菌 *Fs*、*As*、*Fo*、*Rs* 的作用, 而

表 3 固氮菌与植物病原菌的拮抗作用

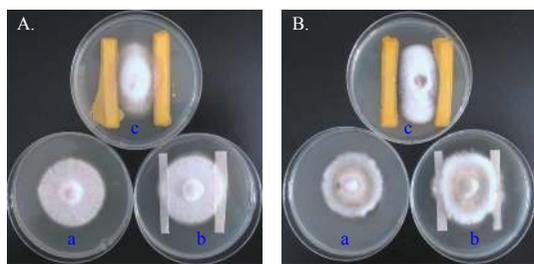
Table 3 Results of antagonism between nitrogen-fixing bacteria and plant pathogenic fungi

固氮菌 Nitrogen-fixing bacteria	抑菌率 Antibacterial rate/%				
	<i>Fs</i>	<i>As</i>	<i>Fo</i>	<i>Bc</i>	<i>Rs</i>
HTZ1	0.00 ± 0.12 F	18.37 ± 0.02 F	28.57 ± 0.02 C	0.00	0.00 ± 0.11 D
TS2	0.00 ± 0.02 F	6.25 ± 0.02 G	0.00 ± 0.11 E	0.00	0.00 ± 0.19 D
HTZ2	0.00 ± 0.11 F	0.00 ± 0.10 H	0.00 ± 0.05 E	0.00	0.00 ± 0.10 D
TS4	0.00 ± 0.08 F	0.00 ± 0.02 H	0.00 ± 0.13 E	0.00	0.00 ± 0.01 D
HP5	47.37 ± 0.76 A	40.00 ± 0.44 C	11.73 ± 0.25 D	0.00	37.58 ± 0.29 B
HTZ3	0.00 ± 0.05 F	21.55 ± 0.32 E	48.78 ± 1.01 A	0.00	0.00 ± 0.02 D
HTZ4	42.85 ± 0.31 C	50.00 ± 0.54 A	11.76 ± 0.12 D	0.00	0.00 ± 0.04 D
HTZ5	25.19 ± 0.45 E	0.00 ± 0.05 H	0.00 ± 0.08 E	0.00	40.74 ± 0.13 A
ZY9	27.27 ± 0.18 D	37.50 ± 1.65 D	30.30 ± 0.09 B	0.00	34.61 ± 0.96 C
HP10	44.44 ± 0.77 B	45.83 ± 0.76 B	26.82 ± 1.33 C	0.00	0.00 ± 0.05 D



注: a病原菌对照; b无菌水对照; c固氮菌菌液处理(下同)。
A: *Rhizoctonia solani*; B: *Fusarium solani*
Notes: a: Pathogenic bacteria control; b Sterile water control; c: Nitrogen-fixing bacteria liquid treatment(The same below). A: *Rhizoctonia solani*; B: *Fusarium solani*

图 3 HP5 菌株与部分病原菌的拮抗试验结果
Fig. 3 Antagonistic test results of the HP5 strain against some pathogenic fungi



注 Note: A: *Fusarium solani*; B: *Alternaria solani*

图 4 HP10 菌株与部分病原菌的拮抗试验结果
Fig. 4 Antagonistic test results of the HP10 strain against some pathogenic fungi

TS2 具有较强的固氮能力。为此, 对 10 株固氮菌的上述 4 个特性进行了综合评价(表 4), 排名前 5 位的菌株为 TS4、HP5、ZY9、HTZ4 和 HTZ5。

表 4 固氮菌特性综合评价结果

Table 4 Comprehensive evaluation results of nitrogen-fixing bacteria characteristics

菌株 Bacterial strain	各指标比重值 Specific gravity value of each index							得分 Score	排名 Ranking
	固氮 Nitrogen fixation	有机磷增量 Organophosphorus increment	IAA增量 IAA increment	抑菌 Bacteriostatic activity					
				<i>Fs</i>	<i>As</i>	<i>Fo</i>	<i>Rs</i>		
HTZ1	0.031 8	0.000 0	0.330 7	0.000 0	0.083 7	0.180 9	0.000 0	0.078 8	8
TS2	0.024 4	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.028 5	0.000 0	0.000 0	0.004 1	10
HTZ2	0.114 0	0.336 8	0.076 7	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.104 2	6
TS4	0.188 9	0.663 2	0.034 8	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.186 2	1
HP5	0.079 0	0.000 0	0.015 7	0.253 2	0.182 2	0.074 3	0.332 8	0.131 7	2
HTZ3	0.164 5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.098 2	0.308 8	0.000 0	0.055 5	9
HTZ4	0.000 0	0.000 0	0.404 0	0.229 0	0.227 8	0.074 4	0.000 0	0.118 3	4
HTZ5	0.126 3	0.000 0	0.070 1	0.134 6	0.000 0	0.000 0	0.360 8	0.106 3	5
ZY9	0.088 1	0.000 0	0.047 6	0.145 7	0.170 8	0.191 8	0.306 5	0.130 5	3
HP10	0.183 0	0.000 0	0.020 5	0.237 5	0.208 8	0.169 8	0.000 0	0.084 4	7
熵值 Entropy	0.868 8	0.425 2	0.677 7	0.709 0	0.787 3	0.735 3	0.557 0		
权重 Weight	0.058 6	0.256 6	0.143 9	0.129 9	0.095 0	0.118 2	0.197 8		

4 讨论

联合固氮菌不同于具有专一宿主植物（如豆科）的共生固氮菌（如根瘤菌），大多聚集在植物根表而在自然生态系统中广泛存在^[9]，除具有固氮能力外，还可通过分泌生长激素、溶磷、增强抗病性和抗逆性等间接作用促进植物生长^[10]。目前，利用联合固氮菌调控植物微生态环境已应用在玉米^[11]、甘蔗^[12]等作物上，其生态和经济效益潜力前景广阔。本研究对杂交构树根际联合固氮菌的分离属首次。从甘肃 3 个杂交构树种植试验区共分离到分属 8 个属的固氮菌，以假单胞菌属居多，与通过高通量测序得出构树根际微生物以假单胞菌属数量最多的结果不一致^[3]，这可能与杂交构树生长年限和取材地域的差异有关。分离得到的固氮菌菌株在根际的分布数量表现为根表土 > 远根土 > 根，这一规律与从玉米和禾草根际分离促生菌^[13-14]得到的结果一致；但 3 地根中没有分离到固氮菌，又与二者能够在根中获得菌株不一致，这可能与各自的繁殖方式不同有关，前二者主要进行种子繁殖，存在一定内源微生物，杂交构树为无性繁殖组培苗，受微生物侵染的几率较小，炼苗后移植大田的种植年限也较短（3 地种植期均为 2 a）。另外，黄酮类化合物是杂交构树的主要药用成分，也是微生物向杂交构树根际定殖的重要信号物质^[3]，幼龄期杂交构树根中黄酮类物质的积累明显不足，有可能造成微生物向根表移动而尚未侵入内根际；但也不能排除分离方法的局限性是根内未分离出菌株的原因之一。上述推测需后续开展试验进一步证实。

本研究中，5 株 3 地共有菌均来自根表土，说明离杂交构树根系较近土壤中的微生物种类可能只与根中信号传导物质有关；而 3 地特有种，除 HP10 以外均来自远根土，说明较远土壤中的微生物种类可能受 3 地气候、土壤理化性质、类型及耕作措施等因素的影响较大。有研究表明，土壤含氮量是影响植物固氮菌种类和数量的重要因素^[15-16]，高水平的氮素不利于固氮菌菌群的生长。本研究中，从天水试验区根际土壤获得的固氮菌种类与数量并未因土壤中全氮和硝态氮水平与兰州、张掖试验区差异较大而呈明显差异，差异仅表现为特有种，可能原因是 3 地试验区土壤含氮量整体偏低而不足以产生“氮阻遏”效应。杂交构树根部虽不形成根瘤，但从根际分离到了根瘤菌，说明根瘤菌也可定殖于非豆科植物根际固氮^[17]。

从菌株特性看，本研究中固氮、溶磷、分泌 IAA 和抑制植物病原菌能力较强的菌株在属种的分布无较强规律性，具有一定的普遍性，且大多分离自根表土，离根系较近，表明这些菌株的活性与杂交构树根际分泌物的相互作用也有一定相关性^[18]。本研究应用熵权法筛选出了综合性能较强的 5 株固氮菌，但排名靠后的菌株在某些特性方面的表现也较优异，如鞘氨醇杆菌属菌株 HP10，在本研究中表现为较高的固氮酶活性和抑制腐皮镰孢菌、茄链格孢的能力，该属菌株在降解芳香族化合物、耐盐碱、青贮中蛋白水解^[19-21]等方面都有应用，具有多种生物学功能。因此，可进一步发掘其应用范围或研究与其他菌株的联合应用。另外，杂交构树抗逆性强，耐盐碱^[22]，后续可在盐碱地种植的杂交构树根际发掘耐盐、耐碱固氮菌株。

5 结论

从甘肃境内 3 个种植区的杂交构树根际分离获得 10 株固氮菌，并分析了其固氮、溶磷、分泌 IAA 和抑制植物病原菌的特性，为西北半干旱地区杂交构树根际微生物深入研发与利用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘冰, 叶建飞, 刘凤, 等. 中国被子植物科属概览: 依据 APG III 系统[J]. 生物多样性, 2015, 23(2): 225-231.
- [2] 郭琪, 张军, 李鑫, 等. 饲用型杂交构树在甘肃地区的种植适应性研究[J]. 饲料研究, 2020, 43(7): 106-110.
- [3] Peng X J, Liu H, Chen P L, et al. A Chromosome scale genome assembly of Paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) provides new insights into its forage and papermaking usage[J]. Molecular Plant, 2019, 12(5): 661-677.
- [4] 狄义宁, 刘鲁峰, 谢林艳, 等. 一株甘蔗内生菌鉴定及其溶磷能力的研究[J]. 作物杂志, 2018, 34(6): 68-75.
- [5] 张英, 朱颖, 姚拓, 等. 分离自牧草根际四株促生菌株(PG-PR)互作效应研究[J]. 草业学报, 2013, 22(1): 29-37.
- [6] 杨豆, 王清海, 万松泽, 等. 2 株毛竹枯梢病拮抗细菌筛选及其促生功能[J]. 林业科学研究, 2020, 33(6): 139-147.
- [7] 傅晓方. 玉米内生固氮菌的分离鉴定及其对小麦幼苗的促生效益研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2011: 11-15.
- [8] 马宁, 刘艳霞, 李想, 等. 基于熵权法综合评价植物根际促生菌对烟草的促生作用[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(5): 887-895.
- [9] 马海宾, 康丽华, 江业根, 等. 联合固氮菌对桉树青枯病菌的抑制作用研究[J]. 林业科学研究, 2007, 20(4): 473-476.
- [10] Madhurankhi G, Suresh D. Plant growth-promoting rhizobacteria-alleviators of abiotic stresses in soil: A review[J]. Pedosphere, 2020, 30(1): 40-61.
- [11] 葛安辉, 方萍, 熊超, 等. 联合固氮菌叶面接种剂的优化及其在玉米叶际的定殖[J]. 微生物学通报, 2018, 45(6): 1303-1313.

- [12] 毛莲英, 黄 婵, 祝 开, 等. 固氮菌株XD20对不同甘蔗品种的促生效应[J]. 西北植物学报, 2019, 39 (1): 140-148.
- [13] 李建宏, 李雪萍, 张建贵, 等. 饲用玉米根际促生菌资源筛选及其特性研究[J]. 草原与草坪, 2017, 37 (1): 44-49.
- [14] 马文文, 姚 拓, 蒲小鹏, 等. 东祁连山7种禾草根际溶磷菌筛选及其溶磷特性[J]. 草业科学, 2015, 32 (4): 515-523.
- [15] 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.
- [16] 刘彩霞, 焦如珍, 董玉红, 等. 模拟氮沉降对杉木林土壤氮循环相关微生物的影响[J]. 林业科学, 2015, 51 (4): 96-102.
- [17] 李 婷, 何 来, 梁泉峰. 非豆科植物的根瘤菌促生机制的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15 (2): 97-102.
- [18] 袁仁文, 刘 琳, 张 蕊, 等. 植物根际分泌物与土壤微生物相互作用关系的机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2020, 36 (2): 26-35.
- [19] Hwaseo k H, Hogyun S, Kyung-Jin K. Structural insights into a maleylpyruvate hydrolase from *Sphingobium* sp. SYK-6, a bacterium degrading lignin-derived aryls[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 514(3): 765-771.
- [20] Hamdy A H, Somya E D, Mostafa M E S. Monitoring the degradation capability of novel haloalkaliphilic tributyltin chloride (TBTCl) resistant bacteria from butyltin-polluted site[J]. Revista Argentina de Microbiología, 2019, 51(1): 39-46.
- [21] Zhou Y M, Chen Y P, Guo J S, et al. The correlations and spatial characteristics of microbiome and silage quality by reusing of citrus waste in a family-scale bunker silo[J]. Journal of Cleaner Production, 2019, 226: 407-418.
- [22] 王金山, 刘金升, 彭献军, 等. 杂交构树在滨海盐碱地生态绿化中的应用[J]. 天津农业科学, 2014, 20 (2): 95-101.

Isolation and Investigation on Properties of Nitrogen-fixing Bacteria from Rhizosphere of *Broussonetia papyrifera* Hybrid

ZHANG Jun, PENG Yi-nan, GUO Qi, WANG Pei-ya, LI Xin, YANG Hui

(Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Application, Gansu International Science and Technology Cooperation Base of Microorganism and Plant Germplasm Resources & Genetic Improvement, Lanzhou 730000, Gansu, China)

Abstract: [Objective] To obtain strains of nitrogen-fixing bacteria from *Broussonetia papyrifera* (Linnaeus) L' Héritier ex Ventenat hybrid and determine their functional characteristics. [Method] The Ashby medium was selected as separation condition to isolated nitrogen-fixing bacteria from the roots and rhizosphere soil of *B. papyrifera* hybrid in Tianshui, Lanzhou and Zhangye experimental areas of Gansu Province. In addition, identification and phylogenetic analysis were carried out on the isolated nitrogen-fixing bacteria. The nitrogenase activity, phosphorus solubility, properties of IAA-producing and inhibition of plant pathogenic fungi of each strain were determined at the same time. Entropy weight method was used for comprehensive evaluation of the features of the strains. [Result] A total of 10 nitrogen-fixing bacteria was isolated from the soil far from the rhizosphere and topsoil, which belonged to 8 genera, mostly *Pseudoxanthomonas*. Each strain showed nitrogenase activity, among which the nitrogenase activity of the strains TS4 and HP10 was greater than $180 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$. Only the strains TS4 and HTZ2 had certain phosphorus solubility. 8 strains could secrete IAA, among which the strain HTZ4 demonstrated the strongest secretion ability, with an IAA increment of $44.62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. All strains showed no antagonistic effect on *Botrytis cinerea* Persoon, 7 strains showed inhibitory effects on at least two kinds of plant pathogens. The strains HTZ4, HTZ3, and HP5 showed the strongest inhibitory activities against *Alternaria solani* (Ellis et G. Martin) Sorauer, *Fusarium oxysporum* Schlecht and *Fusarium solani* (Martius) Sacco, respectively, with inhibition rates of 50.00%, 48.78% and 47.37%. To sum up, the strains with strong comprehensive properties were the strains TS4, HP5, ZY9, HTZ4 and HTZ5. [Conclusion] The results of this study can provide data and references for further developing nitrogen-fixing strains with excellent comprehensive performance, multifunctional nitrogen-fixing bacterial fertilizer for *Broussonetia papyrifera* hybrid, and promoting the yield of *Broussonetia papyrifera* hybrid in semi-arid area of Northwest China.

Keywords: *Broussonetia papyrifera* hybrid; nitrogenase activity; phosphorus solubility; IAA-producing; inhibiting plant pathogens