

# 小麦苗期根系分泌物对根际反硝化细菌的影响\*

李振高 李良谟 潘映华 吴胜春

(中国科学院南京土壤研究所, 210008)

## 摘 要

本文通过无菌水培试验,研究了两种不同基因型小麦苗期根系分泌物对反硝化细菌优势种生长量和反硝化活性的影响。结果表明:两种不同基因型的小麦根系对反硝化细菌均有明显的根际效应,其菌数和反硝化活性又以郑引 1 号大于宝丰 7228;根分泌物中氨基酸组分两者相似,但其总量也以郑引 1 号大于宝丰 7228,对根际反硝化细菌产生直接影响。而反硝化活性不受菌株耐药标记的影响。

**关键词** 根际反硝化细菌,根分泌物,反硝化活性

根际微生物与高等植物间存在着非常密切的关系。植物在整个生长期进行着活跃的新陈代谢作用,根系不仅从环境中摄取养分和水分,同时也不断地向生长介质中分泌出一些可溶性有机物或根组织脱落细胞,为根际微生物提供了重要的营养和能量物质,从而产生明显的根际效应。根际微生物的活动对根际养分也有显著的活化作用<sup>[1]</sup>,促进植物的生长发育。不同植物根分泌物的质和量是不同的,同一植物在不同的发育阶段根分泌的有机物也不完全一样<sup>[1,7,8]</sup>。因此,研究微生物与植物间的相互关系,在理论和农业生产实践中均有重要意义。

生物反硝化作用是氮循环的重要环节。本文主要用无菌水培试验,研究了不同基因型小麦在同一发育时期的根系分泌物对反硝化细菌生长量和活性的影响,结果如下。

## 一、材料与方 法

(一) 菌种的常规分离与鉴定<sup>[2]</sup>。

(二) 供试抗性菌株 *Bacillus* sp. (12 号), *Pseudomonas* sp. (20 号)<sup>[4]</sup>。

(三) 无菌水培试验 1. 培养装置: 采用四角培养瓶<sup>[4]</sup>; 2. 培养液:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{KNO}_3$  0.125g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.125g, 蒸馏水 1000ml, pH7.0。将此液稀释 10 倍,装入四角培养瓶至近管内突起部位为限,塞好棉塞,常规高压灭菌。使用前,在无菌条件下,加入 50r 链霉素; 3. 种子消毒、接菌和培养: 将小麦种子于 95% 乙醇中浸湿,再用无菌水冲洗后,浸在 5% 次氯酸钠中消毒 30 分钟或更长时间,然后用无菌水洗涤 3—5 次。在无菌室分别将消毒的 3 粒小麦种子均匀地

\* 国家自然科学基金资助项目。

播种于四角培养瓶侧管中的纱布小圆盘上,于 28℃ 培育 24 小时后,移置自然光照下培育,并将根部用黑纸遮光。播种 2 天后,在无菌条件下,接入等量的反硝化菌纯培养液,继续培养。根据试验需要,定期取其培养液在含一定浓度链霉素的营养琼脂培养基上进行反硝化细菌平板分离计数。

(四) 菌株的反硝化活性测定 小麦植株在四角培养瓶中培养一定时期后,收集培养液,即未经纯化提取的根分泌物。按试验处理要求,并接种反硝化菌和注入乙炔,经培育后,用具有电子捕获器的 SP-501 型气相色谱仪测定  $N_2O$  的产生量<sup>[3]</sup>。

(五) 氨基酸分析 将小麦培育一定时间后的培养液浓缩为原体积的 1/100,经酸水解,取 50 $\mu$ l 浓缩液,用 835 型日立氨基酸分析仪分析。

## 二、结果与讨论

### (一) 根分泌物对反硝化菌生长量的影响

研究表明,小麦随着生育期的延长,其根际土壤中反硝化细菌的数量逐渐递增,到成熟期菌数明显下降<sup>[2]</sup>,说明随着小麦生长,根系发育越来越旺盛,根分泌物也逐渐增多,为根际土壤中反硝化细菌的发育创造了良好的生态环境。而且,种麦土壤中的菌数明显高于不种麦者。不同基因型小麦根际土壤相比较,以郑引 1 号根际反硝化细菌的数量高于宝丰 7228。用纯培养菌株进行的水培试验获得类似结果,即反硝化细菌在郑引 1 号根分泌物中的生长量大于宝丰 7228 号。随着培育时间的延长,仍以郑引 1 号的菌数大于宝丰 7228 号,又大于不种小麦者(图 1)。

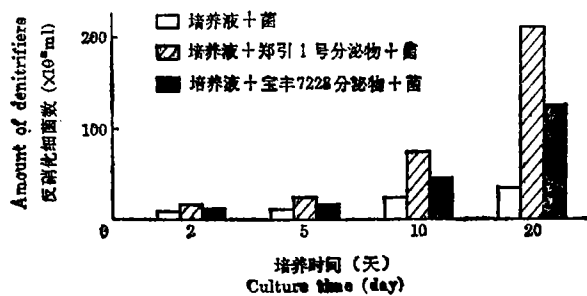


图 1 小麦根分泌物对反硝化细菌 12 号生长量的影响

Fig. 1 Effect of the wheat root exudates on the growing amount of the denitrifiers (No. 12 strain)

### (二) 根分泌物对反硝化菌活性的影响

反硝化细菌是土壤中反硝化作用的动力,它在厌氧、有充足的能源(根分泌物、脱落物)和电子受体( $NO_3^-$ -N)条件下,能进行反硝化作用,造成氮素的气态损失。表 1 表明,由于供栽培小麦的培养液中  $NO_3^-$  的起始浓度很低,当小麦生长吸收后几乎不存在  $NO_3^-$ 。因此,未补充加入  $NO_3^-$  的 1—8 处理未测出  $N_2O$ ,即使提供 C 源葡萄糖者(处理 5、6、7)也无反硝化活性。凡是加入电子受体  $KNO_3$  的(处理 9、10)均形成  $N_2O$ 。培育三天时,9 号、10 号两处理形成  $N_2O$  的量分别为 248 $N_2O\mu$ g/瓶和 723 $N_2O\mu$ g/瓶。说明郑引 1 号的根分泌物更能促进菌株的反硝化活性。为了证实根分泌物对反硝化活性是否起了刺激作

用或提供C源的作用,进行了不同基质的培养试验。表2的结果表明,在有 $\text{NO}_3^-$ 和C源的基础上,加入根分泌物(处理2、3),培育二天时,根分泌物刺激反硝化活性,较对照(处理1)形成的 $\text{N}_2\text{O}$ 量高37%和33%;以根分泌物代替C源的各处理(处理4—7)仍能进行反硝化作用,但活性较低,比有C源的处理2、3更低;还可以看出加入郑引1号分泌物的活性大于加入宝丰7228号分泌物者。

表1 小麦根分泌物对12号菌反硝化活性的影响

Table 1 Effect of wheat root exudates on the denitrifying activity of denitrifiers (No. 12 strain)

处 理 Treatment	$\text{N}_2\text{O}$ $\mu\text{g}$ /瓶(培育3天) $\text{N}_2\text{O}$ $\mu\text{g}$ /bottle
1. 宝丰7228号分泌物	0
2. 郑引1号分泌物	0
3. 宝丰7228号分泌物+菌	0
4. 郑引1号分泌物+菌	0
5. 宝丰7228号分泌物+糖*+菌	0
6. 郑引1号分泌物+糖*+菌	0
7. 原培养液+糖*+菌	0
8. 原培养液+菌	0
9. 宝丰7228号分泌物+ $\text{KNO}_3$ +菌	248
10. 郑引1号分泌物+ $\text{KNO}_3$ +菌	723

\* 1%葡萄糖。

表2 不同培养基加根分泌物对12号菌株反硝化活性的影响

Table 2 Effect of different culture mediums with root exudates added on the denitrifying activity of denitrifiers (No. 12 strain)

处 理 <sup>1)</sup> Treatment	培 育 天 数 Culture time (day)	
	2 $\text{N}_2\text{O}$ $\mu\text{g}$ /瓶 (bottle)	4
1. 培养基 <sup>1)</sup> +菌	281	1313
2. 培养基 <sup>1)</sup> +宝丰7228号分泌物+菌	384	1034
3. 培养基 <sup>1)</sup> +郑引1号分泌物+菌	373	1580
4. 无C培养基+宝丰7228号分泌物+菌	180	—
5. 无C培养基+郑引1号分泌物+菌	244	328
6. $\text{KNO}_3$ 溶液 <sup>2)</sup> +宝丰7228号分泌物+菌	168	230
7. $\text{KNO}_3$ 溶液 <sup>2)</sup> +郑引1号分泌物+菌	222	307

1) 培养基: 柠檬酸钠 5.0g,  $\text{KNO}_3$  2.0g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g, 蒸馏水 1000ml, pH7.2—7.5。

2)  $\text{NO}_3^-$ -N 0.25mg/ml。

3) 培养物的总体积 15ml。

用菌株 *Pseudomonas* sp. 20号进行另一组试验也获得类似的结果,根分泌物对其反硝化活性的刺激效应更强(表3),培育二天时,所形成的 $\text{N}_2\text{O}$ 量较对照(处理1)多61%和73%;以根分泌物代替C源(处理5—8)时,较无C源的处理4明显提高反硝化活性;两个基因型小麦根分泌物相比较,仍以郑引1号分泌物的效应高于宝丰7228号,只是无C源培养基加入郑引1号分泌物的处理6却是例外,原因不明。

表 3 不同培养基加根分泌物对20号菌株反硝化活性的影响

Table 3 Effect of different culture mediums with root exudates added on denitrifying activity of denitrifiers (No. 20 strain)

处 理* Treatment	培育天数 Culture time (day)	
	2	4
	N <sub>2</sub> O μg/瓶 (bottle)	
1. 培养基+菌	432	1105
2. 培养基+宝丰 7228 号分泌物+菌	696	1254
3. 培养基+郑引 1 号分泌物+菌	746	2849
4. 无 C 培养基+菌	48.5	528
5. 无 C 培养基+宝丰 7228 号分泌物+菌	705	2781
6. 无 C 培养基+郑引 1 号分泌物+菌	210	—
7. KNO <sub>3</sub> 溶液+宝丰 7228 号分泌物+菌	250	1281
8. KNO <sub>3</sub> 溶液+郑引 1 号分泌物+菌	431	2541

\* 培养基和培养物总体积同表 2。

### (三) 原始菌株与抗性菌株反硝化活性的比较

在无菌水培过程中,由于需在不同时间进行取样分析,尽管在无菌条件下操作,但培育时间长,取样次数多,难免遭受杂菌污染。因此,采用抗性菌株进行培育试验。图 3 所示,原始菌株与抗性菌株的反硝化活性相同,说明应用具有特殊标记的菌株进行纯培养试验是可行的,从而避免了纯菌在长期培育过程中,因操作不慎引起的杂菌污染问题。

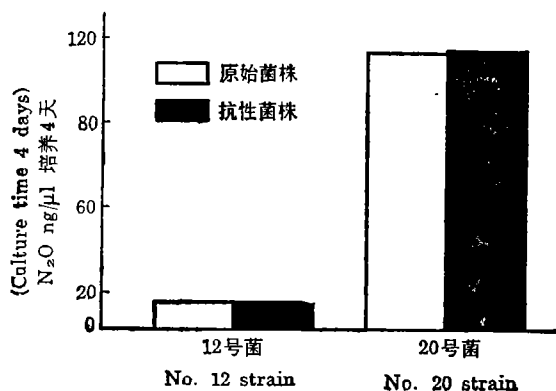


图 2 原始菌株与抗性菌株反硝化活性的比较

Fig. 2 Comparison of denitrifying activity of original strain and streptomycin resistance strain

### (四) 根分泌物中氨基酸组分及其含量的分析

已有资料说明完整根分泌的化合物的种类繁多,但有必要了解其分泌物中可溶性有机物的种类和数量,这对根际微生物的发育是十分重要的。据范晓晖报道<sup>1)</sup>,检测到小麦根系分泌物的有机酸主要为草酸和柠檬酸,而且宝丰 7228 号分泌有机酸的量大于郑引 1

1) 范晓晖,1989: 稻麦根际的 pH 环境及其对磷胁迫的反应。33—34 页。硕士论文。

表 4 不同基因型小麦根分泌物中的氨基酸

Table 4 Components of amino acid in root exudates of the wheats of different genotypes

氨基酸 Amino acid	毫 微 克 ng		占总量% make up total amount%	
	郑引 1 号	宝丰 7228 号	郑引 1 号	宝丰 7228 号
半胱氨酸	242.37	102.18	1.37	1.61
天冬氨酸	1929.07	473.94	10.89	7.49
苏氨酸	379.36	125.38	2.14	1.98
丝氨酸	502.12	158.26	2.83	2.50
谷氨酸	2459.25	795.06	13.89	12.57
脯氨酸	1229.25	584.51	6.94	9.24
甘氨酸	1462.53	564.18	8.26	8.92
丙氨酸	2028.81	786.97	11.46	12.44
胱氨酸	162.42	43.09	0.92	0.68
缬氨酸	1263.98	497.11	7.14	7.86
甲硫氨酸	43.91	9.13	0.25	0.14
异亮氨酸	1005.66	388.24	5.68	6.14
亮氨酸	1905.30	709.12	10.76	11.21
酪氨酸	33.81	22.78	0.19	0.36
苯丙氨酸	734.67	245.20	4.15	3.88
赖氨酸	991.09	393.41	5.60	6.21
组氨酸	105.34	23.62	0.59	0.37
精氨酸	1073.37	361.77	6.06	5.72
鸟氨酸	24.00	16.91	0.14	0.27
$\gamma$ -氨基酸	130.37	25.96	0.74	0.41
总 量	17 706.68	6 326.82		

注: 样品量 50 $\mu$ l, 小麦培育 30 天。

号。经分析,供试两个基因型小麦根分泌物中氨基酸的组分相似,但氨基酸总量两者有明显差异,郑引 1 号和宝丰 7228 号根分泌物中氨基酸总量分别为 17.706mg 和 6.327mg (培育 30 天,样品用量 50 $\mu$ l,见表 4)。因此,上述培养基中加入郑引 1 号根分泌物时,菌株 *Bacillus* sp. 12 号和 *Pseudomonas* sp. 20 号的反硝化活性高于加入宝丰 7228 号根分泌物者,显然与此有关。

综上所述,不同基因型小麦根际反硝化细菌随着小麦生长时间的延长而增加,其菌数以郑引 1 号 > 宝丰 7228 号;菌株反硝化活性也是郑引 1 号 > 宝丰 7228 号;根分泌物中氨基酸组分相似,但其总量又以郑引 1 号 > 宝丰 7228 号。综合说明根际反硝化细菌的生长量和反硝化活性是受根分泌物的质和量的直接影响,这是由于根分泌物的刺激作用和提供碳源及能源的作用。

## 参 考 文 献

1. 陈华舜、李卓棣、陈文新、曹燕珍编著,1981: 土壤微生物学。252—270 页,上海科学技术出版社。
2. 李振高、潘映华、李良谟,1993: 不同基因型小麦根际细菌及酶活性的动态研究。土壤学报,第 30 卷 1 期,1—3 页。
3. 李良谟、伍期途、周秀如、李振高、潘映华,1988: 气相色谱测定  $N_2O$  的方法及其应用。分析微生物学专辑,172—176 页,科学出版社。

4. 吴胜春、李良谟、李振高、潘映华, 1994: 根际优势菌耐药菌株的获得及其<sup>15</sup>N标记。微生物学通报, 第21卷4期, 195—198页。
5. 张福锁、曹一平, 1992: 根际动态过程与植物营养。土壤学报, 第29卷3期, 239—250页。
6. 彭珍荣, 1986: 细菌与植物相互作用的培养技术及其应用研究。生态学杂志, 5(2): 53—56页。
7. M. Mench et al., 1991: Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L., Plant and Soil. 132, p187—196.
8. M. V. Martinez-toledo et al., 1988: Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*, Plant and Soil. 110, p149—152.

## INFLUENCE OF THE ROOT EXUDATES OF WHEAT SHOOTS ON THE DENITRIFIERS IN RHIZOSPHERE

Li Zhengao, Li Liangmo, Pan Yinghua and Wu Shengchun

(Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing 210008)

### Summary

Studies of the root exudates of wheat shoots on the growing amount and denitrification activity of the dominant denitrifiers species were conducted by the sterile aquicultural experiments. The results indicated that the rhizosphere effects of the two different genotype wheats in the denitrifiers are significant. The total amount of the bacteria are larger and the activity of denitrification are more intensive in the rhizosphere of Zhenyin No.1 than those in the rhizosphere of Baofen No. 7228. The components of amino acid of the root exudates of Zhenyin No.1 are similar to those of Baofen No. 7228, but the quantity of amino acid, the former is larger. The lable of resistance to streptomycin on the denitrifiers has no effect on the activity of denitrification.

**Key words** Rhizosphere denitrifiers, Root exudates, Denitrifying activity