



## 一株高效甘蔗内生固氮细菌 GXS16 的鉴定及其对甘蔗的促生长作用

农倩<sup>1</sup> 林丽<sup>2</sup> 谢金兰<sup>2</sup> 莫璋红<sup>2</sup> 黄杏<sup>2</sup> 李长宁<sup>\*2</sup>

1 广西农业科学院植物保护研究所 广西 南宁 530007

2 农业农村部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室 广西甘蔗遗传改良重点实验室  
广西 南宁 530007

**摘要:**【背景】我国甘蔗生产中氮肥过量施用严重,导致生产成本居高不下,充分发挥甘蔗与内生固氮菌的联合固氮作用,减少氮肥施用量,对促进我国甘蔗产业可持续发展具有重要意义。

【目的】筛选优势甘蔗内生固氮菌,对其基本特性、联合固氮效率及促生长功能进行评价。【方法】从甘蔗根系分离到一株内生固氮菌 GXS16,利用乙炔还原法测定固氮酶活性,通过 PCR 扩增 *nifH* 基因确定菌株为固氮菌;通过形态观察、Biolog 检测和 16S rRNA 基因序列分析等对菌株进行分类;通过接种盆栽甘蔗检测菌株的促生长作用,采用 <sup>15</sup>N 同位素稀释法检测菌株相对固氮效率。

【结果】菌株 GXS16 固氮酶活性为 2.42 μmol-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(h·mL),根据菌株培养性状和菌体形态观察、Biolog 检测、16S rRNA、*nifH*、*acdS* 基因序列分析结果,菌株 GXS16 属于伯克氏菌属(*Burkholderia*);菌株 GXS16 还具有 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶(1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase, ACC)活性及合成生长素吲哚乙酸(Indole-3-Acetic Acid, IAA)、降解无机磷的功能;接种 GXS16 处理甘蔗植株的株高比对照增长 15%以上,干重增长 20%以上,<sup>15</sup>N 同位素测定显示甘蔗根、茎、叶从空气中获得氮的百分比分别为 7.69%、15.64%和 8.72%,效率显著优于模式菌株 *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5。【结论】*Burkholderia* sp. GXS16 是一株高效甘蔗内生固氮菌,具有良好应用前景。

**关键词:** 甘蔗, 内生固氮菌, 特性鉴定, 促生长作用

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31701489, 31801288); Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2019GXNSFDA185004); Fundamental Research Fund of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (2021YT09, 2021JM01, 2021JM68)

\*Corresponding author: Tel: 86-771-3899305; E-mail: lcn560@163.com

Received: 24-03-2021; Accepted: 08-05-2021; Published online: 24-06-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31701489, 31801288); 广西自然科学基金(2019GXNSFDA185004); 广西农业科学院基本科研业务专项(2021YT09, 2021JM01, 2021JM68)

\*通信作者: Tel: 0771-3899305; E-mail: lcn560@163.com

收稿日期: 2021-03-24; 接受日期: 2021-05-08; 网络首发日期: 2021-06-24

## Characters identification and sugarcane growth promotion analysis of an endophytic nitrogen fixing bacteria GXS16

NONG Qian<sup>1</sup> LIN Li<sup>2</sup> XIE Jinlan<sup>2</sup> MO Zhanghong<sup>2</sup> HUANG Xing<sup>2</sup> LI Changning<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup> Plant Protection Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

<sup>2</sup> Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement; Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanning, Guangxi 530007, China

**Abstract: [Background]** The nitrogen fertilizer input for sugarcane crop production is very high in China, which result in the high planting costs and cause the field pollution. Sugarcane can obtain high levels of nitrogen via N<sub>2</sub>-fixation by associated N<sub>2</sub>-fixing bacteria. It is imperative to substantially reduce the nitrogen fertilizer inputs and to substitute nitrogen fertilizers with biological nitrogen fixation to develop a high benefit-cost ratio and environmentally benign sugarcane production in China. **[Objective]** The aim of this study was to systematically identify efficient endophytic nitrogen fixing bacteria of sugarcane, as well as demonstrate their potential for associative nitrogen fixation and plant growth promotion ability. **[Methods]** An endophytic diazotroph strain GXS16 was isolated from the roots of sugarcane, and its nitrogen fixation ability was tested by acetylene reduction assay and *nifH* gene sequence amplification. Strain GXS16 species classification was identified by its culture and the microscopic observation characters, Biolog detection and 16S rRNA gene sequence analysis together. Strain GXS16 was inoculated with micro propagated sugarcane seedlings to detect its growth promotion ability and associative nitrogen fixation activity with <sup>15</sup>N isotope dilution method. **[Results]** Strain GXS16 showed a high acetylene reduction activity of 2.42 μmol-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(h·mL). Based on phenotypic characteristics, Biolog system test, 16S rRNA gene, *nifH* and *acdS* gene sequence analysis, GXS16 was classified into *Burkholderia* sp. Furthermore, GXS16 containing ACC deaminase activity, and other plant growth promoting traits as IAA production and phosphate solubilization ability. GXS16 significantly promoted the growth of sugarcane seedlings. Compared with the uninoculated controls, GXS16 increased plant height and dry weights more than 15% and 20%, respectively. <sup>15</sup>N isotope dilution assays demonstrated that the associative nitrogen fixation rates of GXS16 in the sugarcane roots, stems and leaves were 7.69%, 15.64% and 8.72%, respectively, which were higher than that of model strain *G. diazotrophicus* PAL5. **[Conclusion]** Strain GXS16 has a great potential to efficiently fix N<sub>2</sub> in sugarcane and promote sugarcane growth.

**Keywords:** sugarcane, endophytic nitrogen fixing bacteria, characters identification, growth promotion

甘蔗是我国重要的糖料作物,但生产过程中氮肥过量施用严重,一般施氮素 450–750 kg/hm<sup>2</sup>,比世界平均水平多 1 倍。氮肥用量高、利用率低,导致种植成本高、蔗田环境污染,严重限制甘蔗产业可持续发展。巴西甘蔗种植成本低,施很少氮肥就能高产,并且保持土壤含氮量基本稳定,主要原因是经长时间不施或少施氮肥的驯化,甘蔗生长得益于生物固氮而大幅减少对氮肥的需求<sup>[1]</sup>。甘蔗能通过与固氮菌联合固氮获得氮素。联合固氮是指固氮菌定殖在植物体表面或内部,利用植物提供的碳源在氧分压合适的微环境中固氮<sup>[2]</sup>。联合固氮与共生固氮不同,固氮微生物与宿主之间

只是一种松散结合,未形成根瘤类的特化器官,但具有很高的固氮效率,研究表明甘蔗中 30%–60% 氮素来源于生物固氮<sup>[3]</sup>。20 世纪 60 年代,巴西研究者从甘蔗根际分离得到多种固氮细菌,开创非豆科植物联合固氮研究<sup>[4]</sup>。随后又从甘蔗内分离得到几种固氮菌,把内生固氮菌概念引入非豆科植物联合固氮领域<sup>[5]</sup>。研究发现固氮葡萄糖醋酸杆菌 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)、织片草螺菌、红苍白草螺菌和伯克氏菌属(*Burkholderia*)是巴西甘蔗生物固氮系统中重要的贡献者<sup>[6]</sup>。随后这些属的固氮菌相继从南美洲其他国家、澳大利亚和亚洲种植的甘蔗内分离<sup>[7-8]</sup>。多年来,我国甘蔗联合固

氮研究团队相继从不同条件下分离筛选出大量固氮菌, 研究结果显示我国甘蔗内生固氮菌具有多样性和特异性<sup>[9-12]</sup>。研究证明, 内生固氮菌可以避免土壤中化合态氮的抑制及根际微生物的竞争, 固定的氮代谢产物可以被植物直接吸收, 拥有更高的固氮效率<sup>[13]</sup>。除上述固氮功能外, 不少菌株还具有分泌吲哚乙酸(Indole-3-Acetic Acid, IAA)和嗜铁素、溶解无机磷、解钾、拮抗病原微生物、降解农药等促进植物生长功能<sup>[14-15]</sup>, 应用潜力巨大。伯克氏菌属(*Burkholderia*)作为潜在的固氮菌属, 其多样性、固氮能力、对作物生长和增产的促进作用已得到研究证实<sup>[16-17]</sup>。本研究对分离获得的一株伯克氏内生固氮菌 GXS16 的生理生化特性进行鉴定, 通过接种盆栽甘蔗检测菌株的促生长作用, 采用<sup>15</sup>N 同位素稀释法检测菌株相对固氮效率, 为菌株进一步研究和应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

固氮菌 GXS16 分离自甘蔗品种桂糖 31 号根系, 供试对照菌株巴西 *G. diazotrophicus* PAL5 由研究团队制备保存; 甘蔗品种 RB86-7515 (B8) 组培苗由广西农业科学院甘蔗研究所生物室提供。

### 1.2 菌株固氮酶活性测定

采用乙炔还原法测定固氮酶活性。活化菌株在 Ashby 液体培养基<sup>[18]</sup>中 30 °C、160 r/min 生长 48 h, 取 1 mL 接种于 50 mL 锥形瓶中(含 10 mL Ashby 液体培养基), 30 °C、160 r/min 培养 24 h 后从瓶内抽出 5 mL 气体, 再注入 5 mL 气体乙炔, 继续培养 36 h。通过气相色谱法检测瓶内乙烯含量, 以 nmol-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(h·mL) 表示固氮酶活性<sup>[14]</sup>。

### 1.3 菌株培养性状及菌体形态观察

将菌株 GXS16 划线于 LB 固体培养基上, 30 °C 培养箱中培养 48 h, 观察并记录菌落大小、形状、颜色等。将 GXS16 单菌落接种至 5 mL LB 培养液, 30 °C、150 r/min 培养至对数中后期(*OD*<sub>600</sub> 约为 1.0)。吸取 1.5 mL 菌液, 8 000 r/min 离心 5 min,

丢弃上清, 无菌水清洗菌体 2-3 次后悬浮菌体, 取 10 μL 菌液滴在铜网上, 1%醋酸双氧铀进行菌体染色 15-30 s, 电子显微镜下观察菌株形态。

### 1.4 菌株 Biolog 检测

挑取 GXS16 单菌落至 BUG 琼脂平板培养基<sup>[12]</sup>上, 30 °C 培养 24 h。用无菌棉签取少量菌体悬浮于 0.85% NaCl 溶液, 调节菌悬液 *OD*<sub>600</sub> 为 0.1。吸取 150 μL 菌液加入 Biolog-GN2 板微孔中, 30 °C 培养。24 h 和 48 h 后用 Biolog 微生物自动鉴定仪和 Biolog Microstation 系统检测并分析代谢指数。

### 1.5 菌株分泌 IAA 和降解无机磷能力测定

采用 Salkowsky 比色法<sup>[19]</sup>测定菌株分泌 IAA 的能力。取 100 μL 菌悬液接种于 5 mL L-色氨酸生长培养基, 30 °C 暗培养 48 h。取 1 mL 上述菌液 8 000 r/min 离心 5 min, 上清液为待测样。先加 200 μL 待测样至 96 孔板, 后加入 100 μL Salkowsky 试剂, 置暗处 30 °C 显色 30 min 后于酶标仪中测定 *OD*<sub>530</sub>。将 1 g/L 的 IAA 母液稀释成不同浓度梯度, 按上述方法测定并制作标准曲线, 计算菌株分泌 IAA 的能力。将 1% 活化菌液(对照为等量灭活菌液)接种到无机磷液体培养基中, 30 °C、160 r/min 振荡培养 5 d 后采用磷钼蓝比色法<sup>[20]</sup>测定菌株发酵液中有磷含量。

### 1.6 菌株 ACC 脱氨酶活性检测和 *acdS* 基因扩增

根据生成的 α-酮丁酸的含量和菌体蛋白含量, 采用二硝基苯肼比色法检测并计算菌株 ACC 脱氨酶活性<sup>[21]</sup>。ACC 脱氨酶结构基因 *acdS* 扩增引物为 F (5'-ATCGGCGGCATCCAGWSNAAYCANAC-3') 和 R (5'-GTGCATCGACTTGCCCTCRTANACNGG RT-3')。PCR 反应体系(终浓度): 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol/L dNTPs, 0.05 U/μL *Taq* DNA 聚合酶, 1 μL DNA 模板。PCR 反应条件: 94 °C 40 s, 53 °C 45 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。产物经回收克隆验证后送去测序, 后进行 BLAST 同源性比对。

### 1.7 菌株 *nifH* 与 16S rRNA 基因序列扩增测序

*nifH* 基因扩增引物为 F (5'-TGYGAYCCNAAR

GCNGA-3')和 R (5'-ADNGCCATCATYTCNCC-3'); 16S rRNA 基因引物为 F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')和 R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCG CA-3')。两者扩增体系(终浓度): 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol/L dNTPs, 0.05 U/μL *Taq* DNA 聚合酶, 1 μL DNA 模板。 *nifH* PCR 反应条件: 94 °C 30 s, 67 °C 降落到 57 °C 45 s, 72 °C 45 s, 20 个循环; 94 °C 30 s, 57 °C 45 s, 72 °C 45 s, 15 个循环; 72 °C 5 min。 16S rRNA 基因 PCR 反应条件: 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。 产物经回收克隆验证后送去测序, 进行 BLAST 同源性比对, 通过 MEGA 7.0 软件构建菌株系统发育树。

### 1.8 促生效应和联合固氮效率检测

盆栽种植甘蔗, 每盆装土 3 kg。土壤养分情况: 全氮 0.125%, 全磷 0.102%, 全钾 2.214%, 速效氮 69.2 mg/kg, 速效磷 83.6 mg/kg, 有机质 27.5 g/kg, pH 6.2。土壤经晒干细化过筛后, 加入丰度为 15% 的(<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 并混合均匀, 使土壤中纯氮含量为 120 mg/kg。B8 组培苗移栽及菌株接种参考 Lin 等<sup>[14]</sup>的方法。将炼苗后长势基本一致的植株移入盆中, 每盆种 2 单株, 每处理 10 盆。将菌株 GXS16 和 PAL5 活化, 分别移入 LB 和 C<sub>2</sub> 液体培养基中 30 °C、150 r/min 培养 48 h, 8 000×g 离心 10 min 收集菌体, 无菌水 8 000×g 离心 5 min 清洗 2 次, 最后稀释到含(1-2)×10<sup>8</sup> 个/mL 细胞的菌液作为接种菌剂。移栽时以上述菌剂 300 mL 浇灌根部接种 1 次, 移栽 15、30 d 后再浇灌 1 次, 对照浇等量无菌水。移栽 90 d 后收获全株, 分部位烘干称重, 磨碎并进行数据测定。各部位氮含量及<sup>15</sup>N 含量由自然资源部第二海洋研究所测定。固氮效率计算公式为:  $Ndfa=100 \times [1 - (\text{atom}\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ 接种植株} / \text{atom}\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ 对照植株})]^{[22]}$ 。

### 1.9 数据分析

采用 DPS 软件以 Duncan's 新复极差法 ( $P \leq 0.05/0.01$ ) 进行各处理平均数差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株生理生化特性

菌株 GXS16 在 LB 平板上呈圆形, 湿润, 隆起, 边缘光滑, 淡黄色, 不透明(图 1A), 生长较快, 革兰氏阴性; 电镜下观察菌株为长杆状, 平均大小为(1.5-2.0) μm×(0.4-0.8) μm (图 1B)。

菌株 GXS16 具有较强固氮能力, 以 Ashby 液体培养基培养( $OD_{600}=1.0$ ), 固氮酶的乙炔还原乙烯活性为 2.42 μmol-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(h·mL), 显著高于对照菌株 *G. diazotrophicus* PAL5 的固氮酶活性 1.73 μmol-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(h·mL) (图 2A)。把菌株 GXS16 接种在无机磷液体培养基<sup>[23]</sup>中, 培养 5 d 后发酵液中水溶性磷含量为 165.2 mg/L, 高于菌株 PAL5 的 128.6 mg/L, 二者差异极显著(图 2B)。

菌株 GXS16 在以 ACC 为唯一氮源的 DF 培养基中生长良好, 诱导 16 h 后检测到的 ACC 脱氨酶活性为 15.37 μmol-α-ketobutyrate/(mg-protein·h)。菌株 GXS16 具有合成并分泌 IAA 的能力, 在添加 L-色氨酸的培养基中( $OD_{600}=1.0$ )能分泌 32 μg IAA/mL。

### 2.2 菌株 Biolog 鉴定

用 Biolog 鉴定系统检测显示 GXS16 能够利用麦芽糖、木糖醇、甲酸等 48 种碳源, 不能利用糊精、淀粉、蔗糖等。GXS16 的碳源代谢谱与 *Burkholderia contaminans* 最相似, SIM 值为 0.79, DIST 值为 2.84。

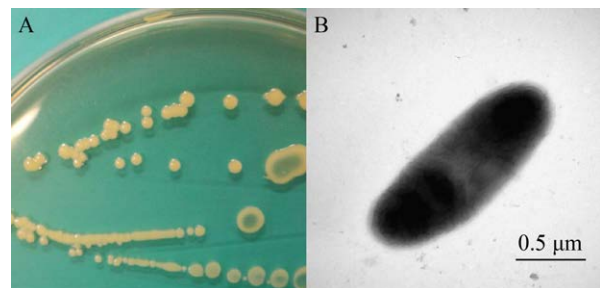


图 1 菌株 GXS16 的菌落和菌体形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of strain GXS16

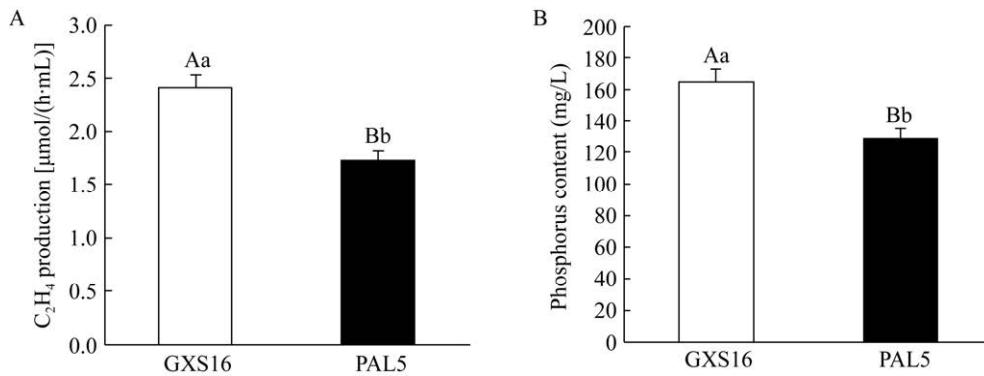


图2 菌株 GXS16 的乙炔还原乙烯活性和降解无机磷能力

Figure 2 The acetylene reduction activity and soluble phosphorus content of strain GXS16

注: 标有不同字母的处理间在 0.01 和 0.05 水平差异显著

Note: Bars superscripted by a different letter are significantly different at the 0.01 and 0.05 probability level

### 2.3 菌株 *nifH* 和 *acdS* 基因片段扩增

扩增菌株 GXS16 *nifH* 基因, 获得长度为 353 bp 的片段(图 3A), BLAST 结果显示其与 *Burkholderia tropica* 菌株 R2-127 的 *nifH* 基因序列一致性为 99%, 将该基因序列提交 NCBI, 获得登录号 KU527071。使用简并引物扩增得到长度为 689 bp 的 ACC 脱氢酶结构基因 *acdS* 片段(图 3B), BLAST 结果显示其与 *Burkholderia tropica* BM273 的 *acdS* 序列一致性为 99%, 将该基因序列提交 NCBI, 获得登录号 KU517660。

### 2.4 菌株 16S rRNA 基因序列的系统进化分析

测序结果显示, 菌株 GXS16 16S rRNA 基因片段为 1 521 bp, BLAST 结果表明其与多株伯克氏菌属(*Burkholderia*)细菌的相似性最高, 在 96%–100% 之间, 将该基因序列提交 NCBI, 获得登录号

KT183545。系统发育树显示, 菌株 GXS16 与伯克氏菌各属的亲缘关系较近(图 4)。综合菌株培养性状、菌体形态鉴定、16S rRNA 基因序列分析、Biolog 鉴定分析, 将菌株 GXS16 鉴定为伯克氏菌属(*Burkholderia*)。

### 2.5 菌株对甘蔗的促生效应和联合固氮效率

甘蔗组培苗移栽在含有 <sup>15</sup>N 的基质中生长 90 d, 相比对照, 接种菌株 PAL5 后甘蔗株高以及根、茎、叶的干重分别增加 10.5%、15.9%、21.7%和 14.1%, 在 5%置信水平有显著性差异(图 5A、5B)。接种菌株 GXS16 对甘蔗的促生长作用高于接种菌株 PAL5, 甘蔗株高以及根、茎、叶的干重分别比接种 PAL5 提高 4.9%、7.3%、9.8%和 6.8% (图 5A、5B)。与对照相比, 接种菌株 PAL5 后甘蔗根、茎、叶的总氮含量分别增加 20.4%、39.1%和 24.4%, 而接种菌株 GXS16 后各组织的总氮含量比接种 PAL5 分别提高 4.4%、12.1%和 11.4% (图 5C), 差异显著。接种菌株 GXS16 的甘蔗苗中 <sup>15</sup>N 浓度低于未接种的对照甘蔗苗, 差异在 5%置信水平显著, 根、茎和叶从空气中获得氮的百分比分别为 7.69%、15.64%和 8.72%。菌株 GXS16 联合固氮效率显著优于模式菌株 PAL5, 利用后者接种的甘蔗根、茎和叶从空气中获得氮的百分比分别为 5.68%、10.31%和 6.95% (图 5D)。

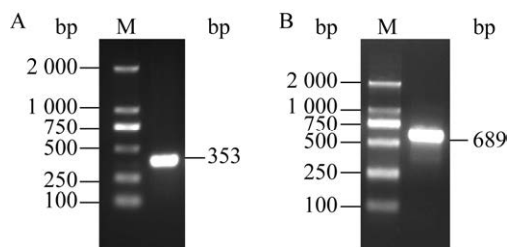


图3 GXS16 菌株 *nifH* (A)和 *acdS* (B)基因片段扩增结果  
Figure 3 Amplified products of *nifH* (A) and *acdS* (B) genes of strain GXS16

Note: M: DL2000 DNA marker

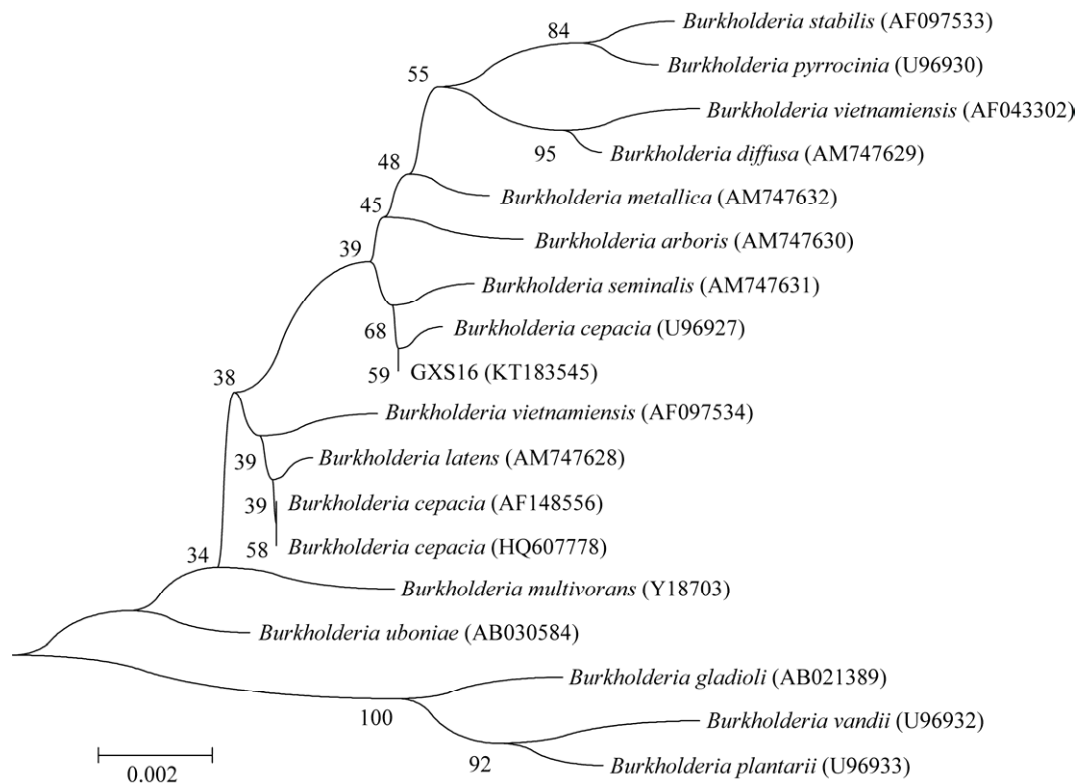


图4 菌株 GXS16 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

Figure 4 Phylogenetic analysis of strain GXS16 based on 16S rRNA gene sequence

### 3 讨论与结论

传统观点认为,甘蔗生长周期长,需肥量大(其中对氮肥需求量最大),因此我国甘蔗生产上氮肥过量施用严重,导致甘蔗生产成本居高不下,严重缺乏国际竞争力。同时,我国甘蔗氮肥利用率比较低(约14.5%~24.7%),大部分氮被挥发、淋溶及土壤吸附,造成所施氮素大量损失,不仅浪费严重,而且进入环境中成为面源污染因素,恶化环境,亟待探寻减肥增效的有效途径<sup>[24]</sup>。充分利用甘蔗的生物固氮特性,减少氮肥施用量,提高肥料利用率,对促进我国甘蔗产业的可持续发展具有重要意义<sup>[25]</sup>。

固氮微生物有效应用的前提是优良菌株的挖掘与鉴定。研究发现,甘蔗内生固氮菌在不同产区、不同品种、不同组织、不同栽培方式等条件下具有多样性和特异性<sup>[26-27]</sup>,分离和研究适合我国甘蔗生

产的内生固氮菌是其进一步应用的基础。本研究对分离到的固氮菌株 GXS16 的基本特性进行鉴定,结果显示该菌株具有较高的固氮酶活性, *nifH* 基因分析结果从遗传型上证实该菌株的固氮功能,菌株的分类鉴定结果显示 GXS16 属于伯克氏菌属 (*Burkholderia*)。伯克氏菌属作为潜在的一大类固氮菌,其多样性、固氮能力、促进作物生长、环境修复等作用都得到充分研究证实<sup>[28]</sup>。如 Bernabeu 等<sup>[16]</sup>使用 *Burkholderia tropica* MTo-293 接种西红柿,发现结果数量和产量都比对照显著增加。Shahid 等<sup>[17]</sup>从蚕豆中分离到 *Burkholderia cepacia* PSBB1,发现接种后能缓解土壤中过量草甘膦对鹰嘴豆的危害并提高产量和品质。Malviya 等<sup>[29]</sup>从甘蔗中根系分离到 *Burkholderia anthina* MYSP113,并用其回接到甘蔗中,显著提高了甘蔗植株的生物量。Yang 等<sup>[30]</sup>从玉米土壤中分离到 *Burkholderia* sp. XHY-12,

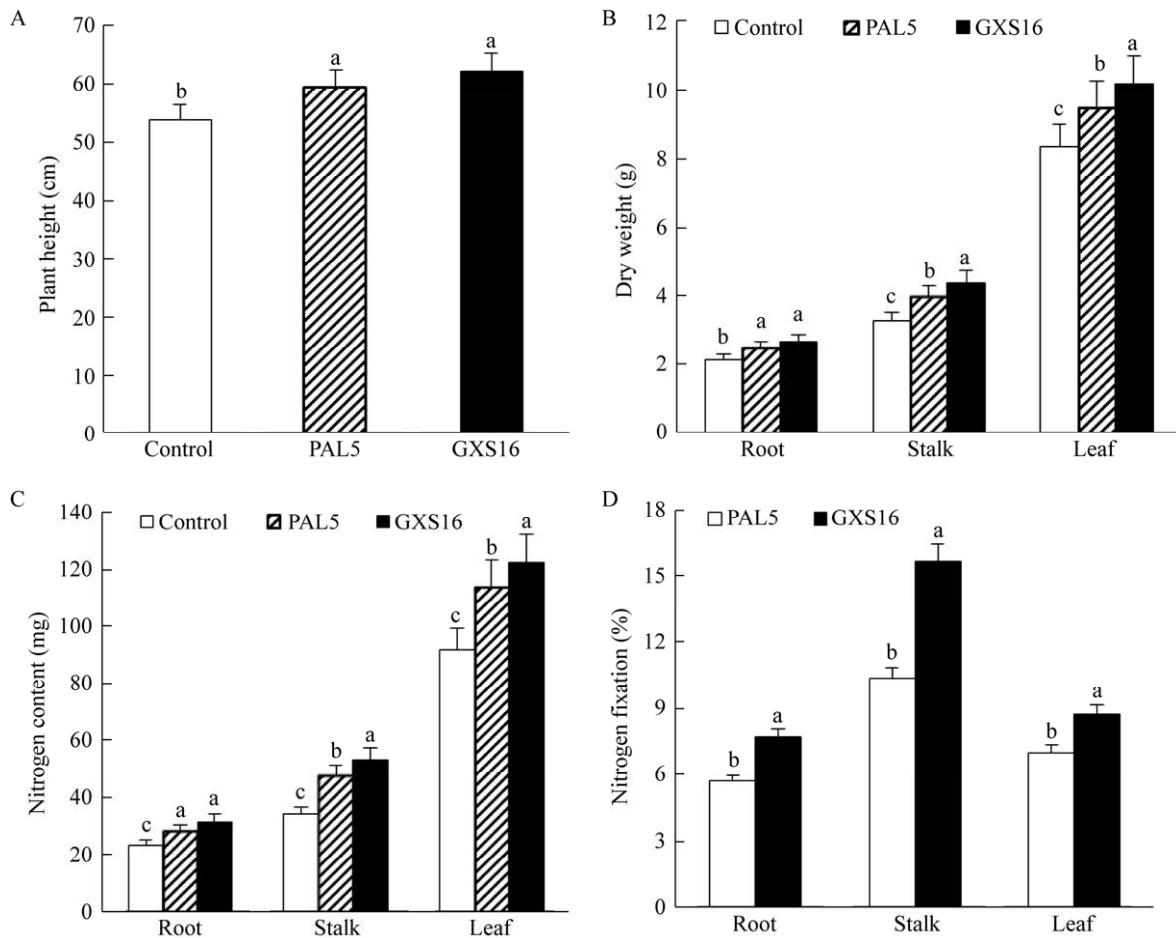


图 5 接种 GXS16 和 PAL5 菌株对甘蔗组培苗的促生效应及氮素利用的影响

Figure 5 Inoculation effects of strain GXS16 and PAL5 on growth promotion and nitrogen use efficiency of sugarcane

注: 不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$

Note: Different lowercase letters indicate significant differences,  $P < 0.05$

用其接种葡萄苗后, 显著提高了植株的株高、根长和鲜重。本研究结果显示, 菌株 GXS16 能显著促进 B8 甘蔗组培苗的生长, 盆栽甘蔗接菌处理的株高比对照增长 15% 以上, 干重比对照增长 20% 以上;  $^{15}\text{N}$  同位素稀释法测定结果表明菌株 GXS16 的联合固氮效率显著优于模式菌株 *G. diazotrophicus* PAL5, 表明菌株 GXS16 具有良好的应用价值。此外, 菌株 GXS16 还具有溶解无机磷特性, 应用该特性对缓解我国甘蔗主产区土壤中磷素缺乏问题提供了一条有效途径。

研究表明, 植物遭受逆境胁迫时会应激产生乙烯, 高水平的乙烯可抑制植物根系伸长、促进植物

器官衰老和脱落<sup>[31-32]</sup>。1-氨基环丙烷-1-羧酸 (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid, ACC) 是乙烯生物合成的直接前体。研究显示, 逆境条件下某些定殖在植物体内且具有 ACC 脱氨酶活性的细菌能吸收植物细胞分泌出来的 ACC, 并通过 ACC 脱氨酶催化 ACC 脱氨基反应, 生成  $\alpha$ -酮丁酸和  $\text{NH}_3$  作为细菌生长所需的碳氮源<sup>[33]</sup>, 降低植物细胞内 ACC 浓度, 减少乙烯生成量, 缓解乙烯大量积累对植物生长的抑制。研究表明, 接种具有 ACC 脱氨酶活性的细菌能够增强番茄<sup>[34]</sup>、马铃薯<sup>[35]</sup>、小麦<sup>[36]</sup>的耐水分胁迫能力并提高水分利用率。此外, 还能提高作物对盐和重金属胁迫、涝害、病害

的抗性<sup>[37-39]</sup>。研究证实, 具 ACC 脱氨酶活性的细菌确实降低了水分胁迫下番茄幼苗产生乙烯的量<sup>[40]</sup>, 而且抗性的提高与抗氧化防护系统增强密切相关<sup>[41]</sup>。本研究中菌株 GXS16 在以 ACC 为唯一氮源的 DF 培养基中生长良好, 并可诱导出较高的 ACC 脱氨酶活性, 但接种菌株 GXS16 能否提高甘蔗对上述胁迫环境的抗性, 还需进一步研究证实。

## REFERENCES

- [1] Yang L, Ou HP, Liang YJ, Liu XH, Yang LT, Wang M, Huang DL, Li YR. The research progress of nitrogen physiology in sugarcane[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2014(6): 1-7 (in Chinese)  
杨柳, 区惠萍, 梁永检, 刘昔辉, 杨丽涛, 汪淼, 黄东亮, 李杨瑞. 甘蔗氮素吸收利用的生理机制研究进展[J]. *中国土壤与肥料*, 2014(6): 1-7
- [2] Carvalho TLG, Ferreira PCG, Hemery AS. Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria[J]. *Tropical Plant Biology*, 2011, 4(1): 31-41
- [3] Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(4): 435-443
- [4] Lima E, Boddey RM, Döbereiner J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a <sup>15</sup>N aided nitrogen balance[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, 19(2): 165-170
- [5] Döbereiner J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants[J]. *Symbiosis*, 1992, 13: 1-13
- [6] Reis VM, Baldani JJ, Baldani VLD, Döbereiner J. Biological dinitrogen fixation in Gramineae and palm trees[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19(3): 227-247
- [7] Boddey RM, Urquiaga S, Alves BJR, Reis V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications[J]. *Plant and Soil*, 2003, 252(1): 139-149
- [8] Baldani JJ, Baldani VLD. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience[J]. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, 2005, 77(3): 549-579
- [9] Hu CJ, Lin L, Shi GY, Wang Q, Wang QS, Li YR. Screening and identification of associative nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of sugarcane in Guangxi[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(15): 4745-4752 (in Chinese)  
胡春锦, 林丽, 史国英, 汪茜, 王钱崧, 李杨瑞. 广西甘蔗根际高效联合固氮菌的筛选及鉴定[J]. *生态学报*, 2012, 32(15): 4745-4752
- [10] Peng DH, Yang JB, Li J, Xing YX, Qin LD, Yang LT, Li YR. Effects of intercropping with soybean on bacterial and nitrogen-fixing bacterial diversity in the rhizosphere of sugarcane[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2014, 38(9): 959-969 (in Chinese)  
彭东海, 杨建波, 李健, 邢永秀, 覃刘东, 杨丽涛, 李杨瑞. 间作大豆对甘蔗根际土壤细菌及固氮菌多样性的影响[J]. *植物生态学报*, 2014, 38(9): 959-969
- [11] Hu CJ, Shi GY, Zeng Q, Cen ZL, Song J, Yang LT, Li YR. The diversity of culturable endogenous nitrogen-fixing bacteria of sugarcane in two different soil conditions[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2017(2): 141-148 (in Chinese)  
胡春锦, 史国英, 曾泉, 岑贞陆, 宋娟, 杨丽涛, 李杨瑞. 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
- [12] Shi GY, Zeng Q, Nong ZM, Ye XL, Cen ZL, Li YR, Hu CJ. Identification of an endophytic nitrogen-fixing bacterium NN08200 from sugarcane and its growth promotion of sugarcane[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(6): 1336-1345 (in Chinese)  
史国英, 曾泉, 农泽梅, 叶雪莲, 岑贞陆, 李杨瑞, 胡春锦. 一株高效甘蔗内生固氮菌 NN08200 的鉴定及其对甘蔗的促生长作用[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(6): 1336-1345
- [13] Gao C, Huang SF, Hu L, Wang Z, Cao YL, Tan ZY. Diversity and plant growth promotion of endophytic bacteria isolated from *Oryza nivara*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(1): 33-38 (in Chinese)  
郜晨, 黄淑芬, 胡莉, 王增, 曹玉琳, 谭志远. 尼瓦拉野生稻内生菌多样性和促生作用[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(1): 33-38
- [14] Lin L, Li ZY, Hu CJ, Zhang XC, Chang SP, Yang LT, Li YR, An QL. Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China[J]. *Microbes and Environments*, 2012, 27(4): 391-398
- [15] Wei CY, Lin L, Luo LJ, Xing YX, Hu CJ, Yang LT, Li YR, An QL. Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(4): 657-666
- [16] Bernabeu PR, Pistorio M, Torres-Tejerizo G, Estrada-De Los Santos P, Galar ML, Boiardi JL, Luna MF. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropicalis*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 191: 113-120
- [17] Shahid M, Khan MS. Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing *Burkholderia cepacia* PSBB<sub>1</sub> carrying multifarious plant growth promoting activities[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(2): 1-17
- [18] Wu X, Gan BC, Jia DH, Jiang YJ, Tang J, Zhou J. Isolation and identification of a free living nitrogen-fixing bacteria[J].



- Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(1): 255-258 (in Chinese)
- 吴翔, 甘炳成, 贾定洪, 蒋元继, 唐杰, 周洁. 一株自生固氮细菌的分离和鉴定[J]. 西南农业学报, 2013, 26(1): 255-258
- [19] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(2): 793-796
- [20] Sun M. Rapid determination of phosphorus content in soil based on colorimetry and spectroscopy[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2016, 7(11): 4478-4483 (in Chinese)
- 孙明. 基于比色法和光谱法的土壤中磷的快速检测方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(11): 4478-4483
- [21] Ali SZ, Sandhya V, Venkateswar Rao L. Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp.[J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(2): 493-502
- [22] Oliveira ALM, Canuto EL, Urquiaga S, Reis VM, Baldani JI. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria[J]. Plant and Soil, 2006, 284(1/2): 23-32
- [23] Shi GY, Mo YM, Cen ZL, Zeng Q, Yu GM, Yang LT, Hu CJ. Identification of an inorganic phosphorus-dissolving bacterial strain BS06 and analysis on its phosphate solubilization ability[J]. Microbiology China, 2015, 42(7): 1271-1278 (in Chinese)
- 史国英, 莫燕梅, 岑贞陆, 曾泉, 余功明, 杨丽涛, 胡春锦. 一株高效解无机磷细菌 BS06 的鉴定及其解磷能力分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1271-1278
- [24] Li YR, Yang LT. Sugarcane agriculture and sugar industry in China[J]. Sugar Tech, 2015, 17(1): 1-8
- [25] Li YR. Innovation and prospect of sugarcane in Guangxi[J]. Journal of Guangxi Agriculture, 2019, 34(4): 1-7 (in Chinese)
- 李杨瑞. 广西甘蔗创新与展望[J]. 广西农学报, 2019, 34(4): 1-7
- [26] Antunes JEL, Lyra MCCP, Ollero FJ, Freitas ADS, Oliveira LMS, Araújo ASF, Figueiredo MVB. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane[J]. Genetics and Molecular Research, 2017, 16(2): gmr16029662
- [27] Solanki MK, Wang Z, Wang FY, Li CN, Lan TJ, Singh RK, Singh P, Yang LT, Li YR. Intercropping in sugarcane cultivation influenced the soil properties and enhanced the diversity of vital diazotrophic bacteria[J]. Sugar Tech, 2017, 19(2): 136-147
- [28] Estrada-De Los Santos P, Rojas-Rojas FU, Tapia-García EY, Vásquez-Murrieta MS, Hirsch AM. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1303-1314
- [29] Malviya MK, Solanki MK, Li CN, Htun R, Singh RK, Singh P, Yang LT, Li YR. Beneficial linkages of endophytic *Burkholderia anthina* MYSP113 towards sugarcane growth promotion[J]. Sugar Tech, 2019, 21(5): 737-748
- [30] Yang XA, Chen XJ, Song ZQ, Zhang XW, Zhang JF, Mei SY. Antifungal, plant growth-promoting, and mycotoxin detoxication activities of *Burkholderia* sp. strain XHY-12[J]. 3 Biotech, 2020, 10(4): 1-9
- [31] Xu J, Zhang SQ. Regulation of ethylene biosynthesis and signaling by protein kinases and phosphatases[J]. Molecular Plant, 2014, 7(6): 939-942
- [32] Kazan K. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2015, 20(4): 219-229
- [33] Laslo É, György É, Mara G, Tamás É, Ábrahám B, Lányi S. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants[J]. Crop Protection, 2012, 40: 43-48
- [34] Porcel R, Zamarreño ÁM, García-Mina JM, Aroca R. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 36
- [35] Belimov AA, Dodd IC, Safronova VI, Davies WJ. ACC deaminase-containing rhizobacteria improve vegetative development and yield of potato plants grown under water-limited conditions[J]. Aspects of Applied Biology, 2009, 98: 163-169
- [36] Arzanesh MH, Alikhani HA, Khavazi K, Rahimian HA, Miransari M. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(2): 197-205
- [37] Nadeem SM, Zahir ZA, Naveed M, Ashraf M. Microbial ACC-deaminase: prospects and applications for inducing salt tolerance in plants[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2010, 29(6): 360-393
- [38] Glick BR, Stearns JC. Making phytoremediation work better: maximizing a plant's growth potential in the midst of adversity[J]. International Journal of Phytoremediation, 2011, 13(Supp1): 4-16
- [39] Etesami H, Mirseyed Hosseini H, Alikhani HA. Bacterial biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, a useful trait to elongation and endophytic colonization of the roots of rice under constant flooded conditions[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2014, 20(4): 425-434
- [40] Mayak S, Tirosh T, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers[J]. Plant Science, 2004, 166(2): 525-530
- [41] Aguiar NO, Medici LO, Olivares FL, Dobbss LB, Torres-Netto A, Silva SF, Novotny EH, Canellas LP. Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria[J]. Annals of Applied Biology, 2016, 168(2): 203-213