

研究报告

异养氨氧化细菌通过双重作用机制促进多花黑麦草的再生

于浩^{1,2}, 王晓凌^{*1}, 段义忠², 司振强^{1,2}, 熊翔英^{1,2}, 吴迪^{1,2}, 李亚楠^{1,2}

1 河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471000

2 榆林学院 生命科学学院, 陕西 榆林 719000

于浩, 王晓凌, 段义忠, 司振强, 熊翔英, 吴迪, 李亚楠. 异养氨氧化细菌通过双重作用机制促进多花黑麦草的再生[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2962-2973.

YU Hao, WANG Xiaoling, DUAN Yizhong, SI Zhenqiang, XIONG Xiangying, WU Di, LI Ya'nan. Heterotrophic ammonia-oxidizing bacteria promote regeneration of Italian ryegrass via a dual-action mechanism[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2962-2973.

摘要:【背景】异养氨氧化细菌(heterotrophic ammonia-oxidizing bacteria, HAOB)通过增加叶片细胞分裂素含量促进多花黑麦草的再生,但其促进植物再生的具体机制尚未探明。【目的】揭示 HAOB 调控细胞分裂素的合成促进多花黑麦草再生的机制。【方法】以一株 HAOB 菌株(S2_8_1)为试验菌株,盆栽多花黑麦草作为植物材料。试验处理设计包括:常规供水(TA);添加空白富集培养基(TB);添加硝化抑制剂 3,4-二甲基吡唑磷酸盐(3,4-dimethylpyrazole phosphate, DMPP) (TN1);添加 DMPP 和 20 mmol/L 的 NO_3^- -N (TN2);添加 DMPP 和 30 mmol/L 的 NO_3^- -N (TN3);添加 DMPP 和 40 mmol/L 的 NO_3^- -N (TN4);接种菌株 S2_8_1 (TI)。【结果】30–40 mmol/L NO_3^- -N 对提高叶片细胞分裂素含量和根向叶片传递效果最好,从而促进叶片再生。在根际土壤硝化作用诱导的细胞分裂素增加达到最大限度时,接种菌株 S2_8_1 进一步增加了根中细胞分裂素的合成,提高了叶片中细胞分裂素的浓度。所测试的 HAOB 菌株 S2_8_1 通过双重作用显著提高了叶片细胞分裂素的浓度,促进了多花黑麦草再生。【结论】本研究揭示了 HAOB 菌株在根际发挥双重作用促进植物生长的机制,为提高牧草产量和农业可持续发展提供直接应用价值。

关键词: 异养氨氧化细菌; 细胞分裂素; 多花黑麦草; 再生; 土壤硝化作用

资助项目: 国家自然科学基金(U1304326); 河南省科学委员会优秀青年基金(174100510004); 河南省自然科学基金(162300410070)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U1304326), the Excellent Youth Foundation of Henan Scientific Committee (174100510004), and the Natural Science Foundation of Henan Province (162300410070).

*Corresponding author. E-mail: wangxl@haust.edu.cn

Received: 2023-10-29; Accepted: 2023-11-25; Published online: 2024-01-03

Heterotrophic ammonia-oxidizing bacteria promote regeneration of Italian ryegrass via a dual-action mechanism

YU Hao^{1,2}, WANG Xiaoling^{*1}, DUAN Yizhong², SI Zhenqiang^{1,2}, XIONG Xiangying^{1,2}, WU Di^{1,2}, LI Ya'nan^{1,2}

1 College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan, China
2 College of Life Sciences, Yulin University, Yulin 719000, Shaanxi, China

Abstract: [Background] Heterotrophic ammonia-oxidizing bacteria (HAOB) promote the regeneration of Italian ryegrass by increasing the content of leaf cytokinins, although the specific mechanism remains to be elucidated. [Objective] To elucidate how HAOB promote the regeneration of Italian ryegrass by regulating the synthesis of cytokinins via a dual-action mechanism (in the rhizosphere soil and outside the rhizosphere environment, respectively). [Methods] A strain (S2_8_1) of HAOB and potted Italian ryegrass were used in this study. The treatments were designed as follows: Regular watering (TA); Addition of blank medium for enrichment culture (TB); Addition of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) (TN1); Addition of DMPP and 20 mmol/L NO₃⁻-N (TN2); Addition of DMPP and 30 mmol/L NO₃⁻-N (TN3); Addition of DMPP and 40 mmol/L NO₃⁻-N (TN4); Inoculation with the strain S2_8_1 (TI). [Results] NO₃⁻-N of 30–40 mmol/L was most effective in increasing the content of leaf cytokinins and enhancing the transfer of these hormones from the roots to the leaves, thereby promoting leaf regeneration. When the nitration-induced increase in cytokinins in the rhizosphere soil reached the maximum, inoculation with strain S2_8_1 further boosted the synthesis of these hormones in the roots, leading to an increased concentration of cytokinins in the leaves. The HAOB strain S2_8_1 significantly elevated the level of cytokinins in leaves via a dual-action mechanism, thereby promoting the regeneration of Italian ryegrass. [Conclusion] This study unveils the dual-action mechanism by which HAOB strains in the rhizosphere enhance plant growth, offering a direct application value for improving forage yields and sustainable agriculture development.

Keywords: heterotrophic ammonia-oxidizing bacteria; cytokinins; Italian ryegrass; regeneration; soil nitrification

植物根际促生菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) 是一类生活在植物根际的益生菌, 它们通过与植物根部建立共生关系, 能够对植物的生长和发育产生积极影响^[1-3]。在农业生产上应用 PGPR 可以促进氮循环, 减少农药和化肥的使用^[4], 提高作物的产量和抗逆性^[5-7], 促进农业生态的可持续发展^[8]。因此,

深入研究 PGPR 的作用机理至关重要。

PGPR 在根际微环境中主要存在根际土壤和根(根表面和根内部)两种定殖位点^[9-11], 定殖于不同位点的 PGPR 发挥的作用也各不相同^[12]。定殖于根际土壤中的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) OSU-142 和 M3 可以增加土壤全氮、有效磷和有效钾等营养成分含量从而增加树莓的产量^[13];

巴西偶氮螺旋菌(*Azospirillum brasilense*)可以通过增加根际土壤中氮素的含量来促进水稻的生长^[14]。定殖在植物根内的芽孢杆菌和链霉菌(*Streptomyces* sp.)等通过产生吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)、细胞分裂素等植物激素促进作物生长^[15-17]。目前对于可以在根际微环境中同时发挥上述2种作用的PGPR鲜有报道,若找到这种双功能细菌将揭示PGPR对植物生长新的作用机制,进而有利于深入理解PGPR对植物生长的作用机理,同时为农业应用提供更加有效的思路。因此,为便于研究这一机制,本研究将根际微环境中PGPR在不同的定殖位点(即根际土壤内外)对植物产生的影响分为“土内作用”和“土外作用”。

土壤氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)是参与土壤硝化作用的主要细菌,在促进植物生长方面起着关键作用^[18-19]。有研究表明AOB能够促进根际土壤的硝化作用,导致土壤硝酸盐(NO_3^-)的释放增加。进而 NO_3^- 刺激植物根系中细胞分裂素的合成,最终促进植物的生长^[20]。另外一项研究表明,一株异养氨氧化细菌(heterotrophic ammonia-oxidizing bacteria, HAOB)显示出与细胞分裂素从根到叶的运输有很强的相关性,这种相关性导致了叶片细胞分裂素含量升高,有助于黑麦草在去叶后的再生^[21]。此外,研究报道许多PGPR具有直接参与调控细胞分裂素合成的功能。例如,某些根瘤菌和芽孢杆菌已被证明通过进入植物根调节细胞分裂素的合成^[22]。然而,关于HAOB能否直接调控植物体内细胞分裂素的合成尚未见报道。假设HAOB通过两种途径影响植物内细胞分裂素的水平,若证实这一假说则能确定土壤中存在发挥双重作用的细菌,进而将有助于揭示HAOB在根际微环境中的双重作用机制,即所

谓的“土内作用”和“土外作用”。

为了验证这一假设,本研究使用一株保藏于中国典型培养物保藏中心的HAOB菌株S2_8_1作为测试菌株,选取多花黑麦草作为植物材料。多花黑麦草在世界多地广泛种植,是优良的牧草作物,具有生长迅速,去叶后再生能力强等优点^[23]。通过向种植黑麦草的土壤中加入硝化抑制剂3,4-二甲基吡唑磷酸盐(3,4-dimethylpyrazole phosphate, DMPP)、添加 NO_3^- -N和接种HAOB菌株,研究了HAOB菌株对细胞分裂素合成和向叶片传递的影响。

1 材料与方法

1.1 样品

HAOB菌株S2_8_1属于根瘤菌科、剑菌属,购于中国典型培养物保藏中心(武汉大学),其保藏编号为CCTCC M2021374。

本试验在河南省洛阳市河南科技大学农场进行,该地区农田年平均降雨量为601 mm,年平均气温14.2 °C。2022年8月,将多花黑麦草置于温度为25 °C的培养箱中进行育苗。两周后,挑选长势较好且均匀的幼苗移至200个直径25 cm、高20 cm的塑料盆中,每盆装5.80 kg土壤,土壤有机碳含量为24.1 g/kg,全氮含量为2.3 g/kg。将移栽后的幼苗置于阳光下继续生长6周后挑选出63盆长势良好且均匀的盆栽用于试验。

1.2 试验设计

试验设置7个处理:(1)常规供水(TA);(2)添加空白富集培养基(TB);(3)添加DMPP(TN1);(4)添加DMPP和20 mmol/L的 NO_3^- -N(TN2);(5)添加DMPP和30 mmol/L的 NO_3^- -N(TN3);(6)添加DMPP和40 mmol/L的 NO_3^- -N(TN4);(7)接种菌株S2_8_1(TI)。根据试验处

理将挑选出的 63 盆多花黑麦草分为 7 组, 每组 9 盆。每组又分为 3 个亚组, 每个亚组 3 盆。考虑到 DMPP 作用的滞后性, 在进行修剪前 3 天, 每天向 TN1-TN4 组添加 30 mL DMPP (1.5 g/L)^[21]。在第 3 天 DMPP 添加完成后, 向 TN2、TN3 和 TN4 各盆中添加 200 mL 不同浓度的 NO₃⁻-N 溶液, 在再生期的第 0 天向 TB 中添加 100 mL 空白培养基, 向 TI 中加入 100 mL S2_8_1 (216 090 CFU/mL) 菌液, 各组差别部分用水和空白培养基补足。对各组进行处理后, 设置 14 d 的再生期(图 1)。

1.3 测量流程

(1) 将每个处理的亚组 1 的植物带到实验室并剪至 5 cm 的高度。立即对修剪下的植物进行称重, 以确定它们的鲜重。此外, 从新鲜修剪的植物中取 0.5 g 样品, 用于测量叶片中玉米素核苷(zeatin riboside, ZR)的浓度。然后, 将剩余的叶片样品在 65 °C 下干燥 72 h, 以测定其干物质含量。根据 Wang 等^[24]的方法收集木质部汁液。在修剪黑麦草叶片后, 立即用 0.2 g 吸水棉覆盖伤口 12 h, 以吸收木质部汁液。收集的木质部汁液用于测量 ZR 浓度。

(2) 从盆中取出完整的根和土壤, 使用干净的刷子刷去所有根部的土壤颗粒并收集。这个过程重复 5-10 次, 直到微小的土壤颗粒全部从根部剥离。在这些根际土壤中进行了土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量及土壤净硝化速率的测量。

(3) 分离每个处理的亚组 1 中植物的根和茎, 用水洗净根部。这些根和茎样本在 65 °C 下干燥 72 h, 以测定其干物质含量。

添加期的第 3 天, 完成每个处理亚组 1 的测量后, 将亚组 2 和亚组 3 中的植物剪至 5 cm 高, 并让它们再生 7 d, 随后将剪下的植物在 65 °C 下干燥 72 h 以获得它们的生物量。同时, 在土

壤中添加约 100 mL AOB 溶液, 对第 2、3 亚组进行接种菌株 S2_8_1 处理(TI)。

再生期的第 7 天, 与添加期的亚组 1 相同, 对亚组 2 进行相同的 3 个步骤。将亚组 3 中的植物剪至 5 cm 高, 再生 7 d。再生期的第 14 天, 对亚组 3 进行相同的 3 个步骤。因此, 在 14 d 内的第 0、7 天, 每个处理中的植物被修剪 2 次。第 0 天是指再生期的开始, 之所以选择 7 d 的再生期, 是因为在此期间可辨别出再生差异^[25]。

1.4 相关指标测量和数据分析

在再生期的第 7、14 天, 亚组 2 和 3 中的修剪生物量分别作为第 1、2 次修剪后第 7、14 天各处理的再生叶生物量。在再生期的第 0 天, 亚组 1 的修剪和茎生物量以及修剪、茎和根部生物量的总和分别为修剪前各处理的地上总生物量和总生物量。

第 7 天亚组 2 的修剪和茎生物量与第 0 天的修剪生物量之和为第 1 次修剪后第 7 天各处理的累积地上生物量; 亚组 2 的总地上生物量和其第 7 天的根生物量之和为第 1 次修剪后第 7 天各处理的累积总生物量。第 14 天亚组 3 的修剪和地上生物量与第 0、7 天的修剪生物量的总和为第 2 次修剪后第 7 天各处理的累积地上生物量, 第 14 天的亚组 3 和其根生物量之总和为第 2 次修剪后第 7 天各处理的累积总生物量。

土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 分别使用吡啶酚蓝法和苯酚二磺酸比色法测定含量^[26]。将水分保持在 60% 田间持水量的根际土壤样品在 25 °C 培养 7 d 以测定根际土壤净硝化速率。土壤净硝化速率采用公式(1)进行计算。

$$\text{SNR} = \frac{C_a - C_f}{7} \quad (1)$$

式中 C_a 和 C_f 分别为培养后的土壤 NO₃⁻ 含量和培养前的土壤 NO₃⁻ 含量。

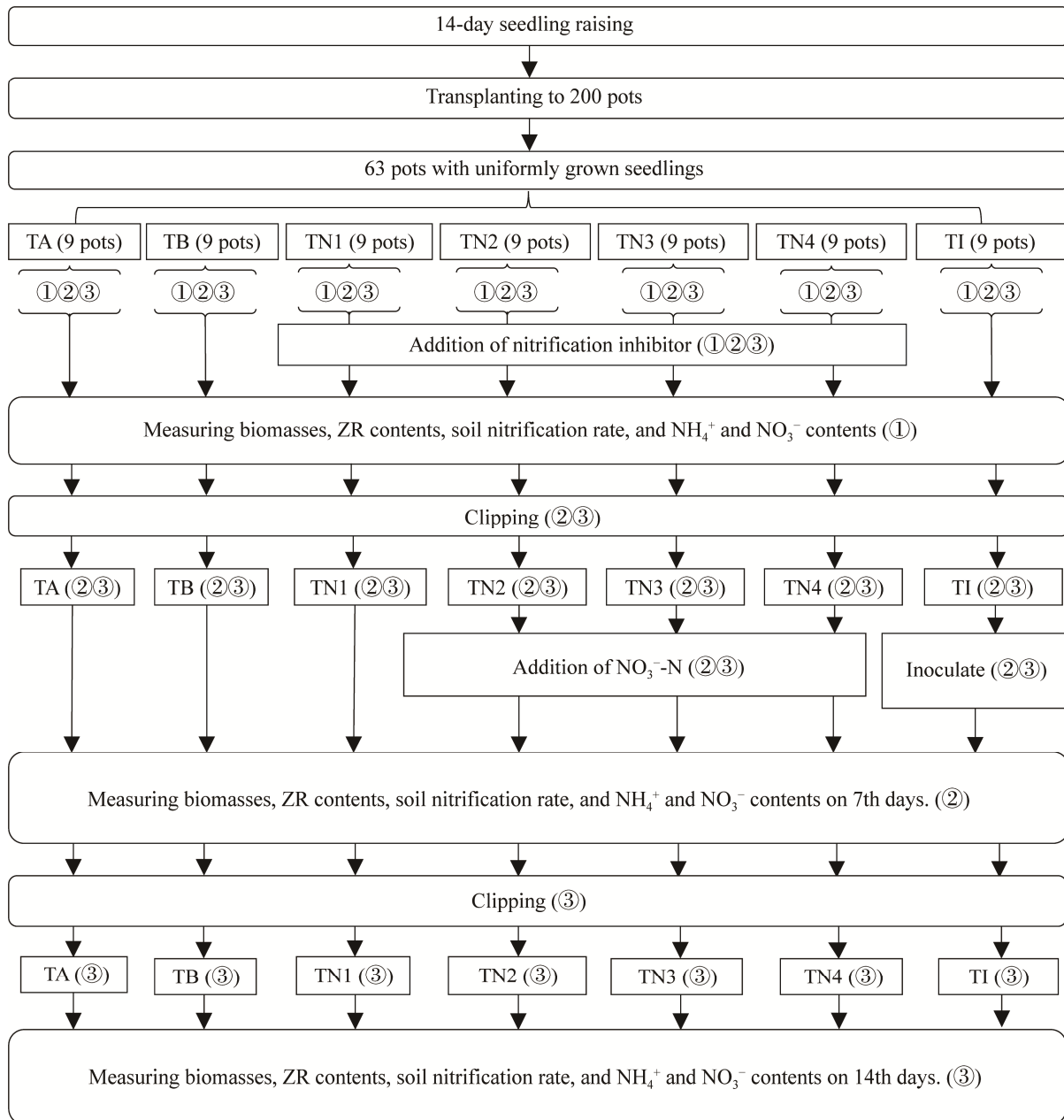


图 1 试验流程图 TA、TB、TN1、TN2、TN3、TN4 和 TI 分别表示常规供水处理、添加空白培养基、添加 DMPP、添加 DMPP 和 20 mmol/L 的 NO_3^- -N、添加 DMPP 和 30 mmol/L 的 NO_3^- -N、添加 DMPP 和 40 mmol/L 的 NO_3^- -N、接种菌株 S2_8_1；①、②和③分别代表每种处理的第 1、2 和 3 亚组；ZR：玉米素核苷

Figure 1 Experiment flowchart. TA, TB, TN1, TN2, TN3, TN4, and TI represent treatments as follows: Regular watering, addition of blank medium for enrichment culture, addition of DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate), addition of DMPP and 20 mmol/L NO_3^- -N, addition of DMPP and 30 mmol/L NO_3^- -N, addition of DMPP and 40 mmol/L NO_3^- -N, and inoculation with the strain S2_8_1; ①, ② and ③ show the first, second and third subgroups of each treatment; ZR: Zeatin riboside.

通过切割茎收集木质部汁液提取物, 随后立即用 0.2 g 脱脂棉覆盖茎伤口。12 h 后测定棉花重量。木质部汁液量等于脱脂棉重量的增加量。汁液的体积通过将增加的重量除以 1 g/cm^3 来确定。将叶和木质部汁液提取物样品的残留物溶解在 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH } 7.4$) 中, 并进行酶联免疫吸附测定以测定玉米素核苷含量^[27]。玉米素核苷从根到叶的运输速率(R_{ZR})表示为每小时木质部汁液中玉米素核苷的含量。 R_{ZR} 采用公式(2)进行计算:

$$R_{\text{ZR}} = \frac{C_{\text{ZR}}}{12} \quad (2)$$

式中 C_{ZR} 为木质部汁液玉米素核苷的含量。

使用 SPSS 27 进行统计分析。构建的图表中的值对应于平均值。采用单因素方差分析和邓肯多元范围检验分析试验中的土壤硝化速

率、生物量、激素和氮素指数。

2 结果与分析

2.1 黑麦草再生叶生物量、累积地上生物量和累积总生物量

如表 1 所示, 再生第 7 天时, 相较于 TA 处理, TN2、TN3 和 TN4 处理再生叶生物量均显著增高; 相较于 TN1 处理, TA 处理再生生物量增加 216.9%, 表明 DMPP 抑制多花黑麦草的再生, 而添加 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 可以减轻这种抑制, 促进多花黑麦草再生。在 TN2、TN3 和 TN4 处理之间, TN3 和 TN4 处理再生叶生物量显著增加, 但二者间无明显差异, 这表明 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 对多花黑麦草的再生促进是有限度的, 达到最大促进效果后, 进一步添加 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 对多花黑麦草的再生促进作用有限, 在 $30\text{--}40 \text{ mmol/L}$ 达到最大促进效果。

表 1 不同处理各部分生物量

Table 1 Biomasses of each part in different treatments

指标 Index	再生时间 Regrowth days (d)	TA	TB	TN1	TN2	TN3	TN4	TI
再生叶生物量 Regenerate leaf biomass (g/plant)	7	1.87±0.03d	1.79±0.23d	0.59±0.05e	3.03±0.09c	3.78±0.12b	3.73±0.26b	4.28±0.37a
	14	0.57±0.02c	0.73±0.11bc	0.06±0.03d	0.75±0.04bc	0.91±0.02b	0.87±0.04b	2.32±0.31a
累积地上生物量 Accumulation of aboveground biomass (g/plant)	0	4.70±0.08a	4.79±0.54a	4.76±0.19a	4.58±0.15a	4.60±0.14a	4.55±0.04a	4.92±0.33a
	7	6.57±0.10d	6.61±0.23d	5.35±0.23e	7.60±0.08c	8.38±0.20b	8.28±0.23b	9.29±0.75a
	14	7.14±0.09d	7.36±0.52d	5.41±0.22e	8.35±0.07c	9.29±0.18b	9.15±0.22b	12.03±0.94a
累积总生物量 Cumulative total biomass (g/plant)	0	6.17±0.10b	6.83±0.25a	6.11±0.21b	6.10±0.05b	6.12±0.12b	6.15±0.07b	6.98±0.67a
	7	8.03±0.13d	8.64±0.63cd	6.70±0.21e	9.12±0.11bc	9.90±0.15b	9.88±0.33b	11.29±1.31a
	14	8.16±0.12e	9.38±0.14d	6.77±0.23f	9.87±0.09c	10.81±0.14b	10.75±0.32b	13.82±0.38a

TA、TB、TN1、TN2、TN3、TN4 和 TI 分别表示常规供水处理、添加空白培养基、添加 DMPP、添加 DMPP 和 20 mmol/L 的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、添加 DMPP 和 30 mmol/L 的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、添加 DMPP 和 40 mmol/L 的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 和接种菌株 S2_8_1。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

TA, TB, TN1, TN2, TN3, TN4, and TI represent treatments as follows: regular watering, addition of blank medium for enrichment culture, addition of DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate), addition of DMPP and 20 mmol/L $\text{NO}_3^- \text{-N}$, addition of DMPP and 30 mmol/L $\text{NO}_3^- \text{-N}$, addition of DMPP and 40 mmol/L $\text{NO}_3^- \text{-N}$, and inoculation with the strain S2_8_1. Different lowercase letters represent significant differences ($P < 0.05$). The same below.

通过比较累积地上生物量与累积总生物量可知,在再生第 0 天时各处理之间累积地上生物量与总生物量的差异并不显著。然而,在再生 7 d 和 14 d 时,相较于添加 NO_3^- -N 的处理, TI 处理的再生叶生物量显著增加;再生第 14 天时 TI、TN2、TN3 和 TN4 处理累积地上生物量分别较 TA 处理提高 68.5%、16.9%、30.1%和 28.2%,累积总生物量较 TA 处理分别提高 69.4%、20.1%、32.5%和 31.7%,说明接种 S2_8_1 菌剂对黑麦草的促生效果要高于添加过量的 NO_3^- -N。

2.2 根际土壤硝化速率及 NO_3^- -N 与 NH_4^+ -N 含量

由表 2 可知,添加 DMPP 显著抑制根际土壤硝化作用,使根际土壤硝化速率降低。TN1、TN2、TN3 和 TN4 处理添加 DMPP,再生期间它们硝化速率较低且无显著差异。TA 处理未添加 DMPP,因此其分解土壤硝化速率显著高于 TN1、TN2、TN3 和 TN4 处理。TB 处理和 TI 处理的根际土壤硝化速率显著高于其他处理,说明添加空白培养基和添加菌株 S2_8_1 均可促进根际土壤硝化作用。再生第 7、14 天时,

相较于 TB 处理, TI 处理的根际土壤硝化速率提高 92.5%和 95.7%,由此可见菌株 S2_8_1 对根际土壤硝化作用促进效果显著大于空白培养基。

相较于 TA 处理, TI 处理在其再生期内 NO_3^- -N 含量显著增加,表明接种菌株 S2_8_1 增加了根际土壤中 NO_3^- -N 的含量。在第 7、14 天, TN1 处理 NO_3^- -N 含量较 TA 处理显著降低, TN2、TN3 和 TN4 处理 NO_3^- -N 含量显著增加,结果说明, DMPP 的添加降低了根际土壤中 NO_3^- -N 含量的积累, NO_3^- -N 的添加导致根际土壤中 NO_3^- -N 含量升高。根际中 NH_4^+ -N 含量的变化则不规律。

2.3 叶片与伤流液中 ZR 含量与 ZR 由根至叶的传输速率

由表 3 可知,再生第 0 天时, TN 处理中 ZR 浓度显著低于 TA 处理,这表明 DMPP 降低了多花黑麦草叶片细胞分裂素的浓度。再生第 7、14 天时, TN2、TN3 和 TN4 处理 ZR 含量均高于 TA 处理; TN3 处理叶片中 ZR 浓度较 TN2 处理显著增加 14.3%和 14.6%、较 TN1 处理显著增加 83.5%和 111.1%; TN3 和 TN4 处理

表 2 不同处理 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N 含量和土壤硝化速率

Table 2 NO_3^- -N, NH_4^+ -N contents and nitrification rates in soil under different treatments

指标 Index	再生时间 Regrowth days (d)	TA	TB	TN1	TN2	TN3	TN4	TI
土壤 NH_4^+ -N 含量	0	11.81±0.87a	9.93±1.00b	10.26±0.98b	10.55±0.82ab	11.23±1.07ab	11.67±0.76a	11.83±0.38a
Soil NH_4^+ -N content (mg/kg)	7	11.43±1.09ab	8.98±0.34c	10.21±0.76bc	9.56±0.90c	12.22±0.88a	11.67±0.81a	11.14±0.20ab
土壤 NO_3^- -N 含量	14	9.59±0.42a	8.21±0.37ab	11.10±0.23b	11.91±0.19ab	11.04±0.34b	12.08±0.26b	8.74±0.56ab
Soil NO_3^- -N content (mg/kg)	0	17.44±2.32a	17.66±0.10a	16.77±1.16a	17.88±1.39a	16.26±1.64a	17.13±1.19a	18.33±1.74a
土壤硝化速率	7	11.70±1.36c	19.84±1.43d	8.11±0.93e	31.95±2.08b	36.43±1.93a	37.52±3.91a	26.64±1.97c
Soil nitrification rate (mg/(kg·d))	14	10.48±0.75d	13.20±0.98c	5.11±0.48e	34.73±2.17b	37.52±3.43b	38.65±3.73b	27.44±2.62a
土壤硝化速率	0	1.88±0.14b	5.99±1.14a	0.55±0.03c	0.54±0.06c	0.49±0.03c	0.50±0.15c	6.54±0.54a
Soil nitrification rate (mg/(kg·d))	7	1.56±0.27c	4.13±0.26b	0.47±0.09d	0.48±0.10d	0.57±0.11d	0.53±0.09d	7.95±1.35a
	14	1.80±0.15c	4.41±0.87b	0.50±0.14d	0.55±0.13d	0.49±0.01d	0.57±0.13d	8.63±0.57a

表 3 不同处理叶片中玉米素核苷的含量和玉米素核苷由根至叶的运输速率

Table 3 The content of zeatin riboside in leaves and bleeding sap and the transfer rate of zeatin riboside from root to leaf under different treatments

指标 Index	再生时间 Regrowth days (d)	TA	TB	TN1	TN2	TN3	TN4	TI
叶片 ZR 含量 Leaf ZR content (ng/g)	0	57.53±1.06b	67.35±3.23a	46.45±2.58c	42.92±1.39c	45.54±2.10c	44.09±1.76c	67.99±2.85a
	7	67.53±2.26d	77.91±1.93c	48.09±1.14e	77.14±1.52c	88.24±2.02b	89.56±1.83b	95.44±5.36a
	14	69.28±2.97d	82.49±3.25c	44.38±1.04e	81.74±1.67c	93.71±1.62b	93.50±0.96b	107.52±1.29a
R_{ZR} (ng/h)	0	1.23±0.21b	2.85±0.69a	1.04±0.08b	1.04±0.05b	1.07±0.09b	1.07±0.05b	2.90±0.24a
	7	0.76±0.20c	2.55±0.12f	0.63±0.12f	1.06±0.11de	1.39±0.44cd	1.58±0.47c	3.20±0.05a
	14	0.90±0.40d	2.06±0.15bc	0.60±0.11d	1.65±0.47bc	2.22±0.08b	2.09±0.16bc	2.89±0.33a

ZR: 玉米素核苷. R_{ZR} : 玉米素核苷从根到叶的运输速率ZR: Zeatin riboside. R_{ZR} : the transport rate of zeatin riboside from root to leaf.

之间则无明显差异; R_{ZR} 趋势与叶片 ZR 含量相同,说明添加 NO_3^- -N 可以促进根系合成细胞分裂素并向叶片传递,但在添加量达到 30–40 mmol/L 时趋于稳定。TI 处理在再生期内其 ZR 含量和 R_{ZR} 显著高于添加 NO_3^- -N 的处理,结果表明,当因 NO_3^- -N 而产生的 ZR 达到最大量时,菌株 S2_8_1 仍能独立增加细胞分裂素的合成和向叶片的转运。

3 讨论

植物根系通过木质部汁液将细胞分裂素运输到地上茎叶部,根尖顶端的分生组织是营养吸收和细胞分裂素合成的关键部位,研究表明各种植物在 NO_3^- 刺激下,细胞分裂素的合成增加^[28-29]。这种效应主要来自根系感知 NO_3^- 的能力,并随后通过细胞分裂素将这种信号传递到叶片中。在本研究中比较了在添加 DMPP 的条件下,添加不同浓度的 NO_3^- -N 与玉米素核苷和黑麦草再生的关系。DMPP 的添加排除了土壤微环境产生 NO_3^- 的影响,随着添加的 NO_3^- 浓度从 0 上升到 30 mmol/L,黑麦草再生生物量显著增高,而添加的 NO_3^- 浓度从 30 mmol/L 上

升到 40 mmol/L 时黑麦草再生生物量差异不显著,说明 NO_3^- 促进多花黑麦草再生有最大限度,达到最大限度后再添加 NO_3^- 对多花黑麦草再生促进有限。

ZR 是一种主要的细胞分裂素,土壤 NO_3^- 通过刺激根系合成细胞分裂素并将其运送至叶片中发挥作用^[30-31]。我们在研究中观察到的细胞分裂素传递到叶片的峰值现象是因为根系感知 NO_3^- 信号的能力是有限度的。随着土壤中 NO_3^- 浓度从 0 上升到 30 mmol/L,增加了黑麦草根与 NO_3^- 相互作用的可能性,进而增强了根源性细胞分裂素的信号,导致细胞分裂素向叶片传递的速度增加,这一趋势可以从 ZR 和 R_{ZR} 值逐渐上升中明显看出。然而,当 NO_3^- 浓度超过特定阈值时,多余的 NO_3^- 在土壤中可能导致堵塞,由于根具有一定的表面积,这降低了 NO_3^- 与根的接触增强的可能性。这导致了在 NO_3^- 浓度从 30 mmol/L 上升到 40 mmol/L 时 ZR 和 R_{ZR} 值达到峰值的现象。当根际土壤中的 NO_3^- 浓度达到一定阈值时,对黑麦草的促进效果,也就是“土内作用”已经发挥到了保持不变。

硝化作用是土壤中氮素转化的重要过程^[32-33]。硝化作用包括两个过程,即铵态氮氧化成亚硝酸氮和亚硝酸氮氧化成 NO_3^- ,氨氧化细菌(AOB)是参与第1步反应的关键细菌,反应较为缓慢是土壤硝化速率的限制步骤,在氮循环中起着关键作用^[34-35]。在本试验中,相较于未接种的TA处理,接种菌株S2_8_1的TI处理的 NO_3^- 含量、根际土壤硝化速率、叶片细胞分裂素含量和各部分生物量均显著增加。相较于TN3和TN4处理,接种菌株S2_8_1的TI处理在再生期内叶片ZR平均含量分别显著提高19.1%和19.3%, R_{ZR} 平均速率分别显著提高92.1%和89.7%。结果表明,菌株S2_8_1具有促进根际土壤硝化作用和增加根际土壤中细胞分裂素合成的“土内作用”。

根据上述最适 NO_3^- 浓度的分析,说明TI处理细胞分裂素含量的升高不仅仅是由于菌株S2_8_1介导的硝化作用对土壤释放的 NO_3^- 的作用,还可能存在着另一种机制独立地增加根中细胞分裂素的合成,并传递至叶片,从而促进黑麦草的再生。很可能是菌株S2_8_1通过其“土外作用”在再生期间导致TI处理中更高的ZR和 R_{ZR} 水平。这一作用是指菌株S2_8_1通过直接途径促进细胞分裂素在根内组织中从根部到叶片的传输。因此,本研究表明,菌株S2_8_1在根际土壤内外发挥了增加细胞分裂素合成的双重作用。

现代农业生产中常通过施用氮素肥料或菌肥增加牧草的生产力^[36-37]。相较于常规处理,添加30 mmol/L NO_3^- 和接种菌株S2_8_1的处理叶片ZR浓度分别显著提高了35.26%和55.20%,该结果初步表明菌株S2_8_1通过“土内作用”对叶片细胞分裂素浓度的促进大于其“土外作用”。相较于施加过量 NO_3^- 的处理,菌株S2_8_1通过

其在根际土壤内外发挥了增加细胞分裂素合成的双重作用表现出了更大优势,显著增加了黑麦草再生生物量和细胞分裂素含量,对于牧草营养成分和产量的提高具有很大潜力。

本研究的结果仅证明HAOB通过“土内作用”和“土外作用”的双重作用机制调控细胞分裂素的合成从而促进黑麦草的再生。然而,尚未明确揭示其“土外作用”的具体机制。我们推测可能是由于HAOB自身分泌的细胞分裂素进入根系,或是HAOB稳定地定殖在植物根系内,通过基因调控等机制增加了根中细胞分裂素的合成,从而增加了细胞分裂素向叶片的转移和积累。未来的研究可以继续探索HAOB的“土外作用”,明确其“土内作用”和“土外作用”在促进细胞分裂素合成中的占比,以进一步揭示HAOB对植物促生长的双重作用机制,在农业生产中发挥最大促进效果,实现最大经济效益。

4 结论

本研究发现HAOB通过双重作用机制促进黑麦草再生。在种植多花黑麦草的土壤中添加 NO_3^- -N可缓解DMPP对土壤硝化作用的限制,促进黑麦草的再生,结果表明 NO_3^- 浓度为30-40 mmol/L时,对再生叶生物量和叶片细胞分裂素的正向影响最大。我们的研究还表明,接种菌株S2_8_1在促进细胞分裂素从根传递到叶片方面起着至关重要的作用。这种效应归因于两种机制:“土内作用”和“土外作用”。“土内作用”表现在接种菌株S2_8_1可提高根际土壤硝化速率,导致土壤释放更多的 NO_3^- ,增加细胞分裂素合成。接种菌株S2_8_1还表现出了“土外作用”,独立地促进了细胞分裂素从根向叶片的传递,而不是“土内作用”对 NO_3^- 的影响。

本研究的发现有助于提高牧草产量和 HAOB 对植物促生机制的研究, 也为进一步探索 HAOB 的作用机制提供了理论指导。

REFERENCES

- [1] 吴建峰, 林先贵. 土壤微生物在促进植物生长方面的作用[J]. 土壤, 2003, 35(1): 18-21.
WU JF, LIN XG. Effects of soil microbes on plant growth[J]. Soils, 2003, 35(1): 18-21 (in Chinese).
- [2] NASEBY DC, PASCUAL JA, LYNCH JM. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(1): 161-169.
- [3] 张典利, 孟臻, 亓文哲, 乔康. 植物根际促生菌的研究与应用现状[J]. 世界农药, 2018, 40(6): 37-43, 50.
ZHANG DL, MENG Z, QI WZ, QIAO K. The research and application status of plant growth promoting rhizobacteria[J]. World Pesticides, 2018, 40(6): 37-43, 50 (in Chinese).
- [4] 马莹, 曹梦圆, 石孝均, 李振轮, 骆永明. 植物促生菌的功能及在可持续农业中的应用[J]. 土壤学报, 2023, 60(6): 1555-1568.
MA Y, CAO MY, SHI XJ, LI ZL, LUO YM. Functions of plant growth-promoting bacteria and their application in sustainable agriculture[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(6): 1555-1568 (in Chinese).
- [5] HASHEM A, TABASSUM B, ABD_ALLAH EF. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(6): 1291-1297.
- [6] HA-TRAN DM, NGUYEN TTM, HUNG SH, HUANG E, HUANG CC. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: a review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(6): 3154.
- [7] SATI D, PANDE V, PANDEY SC, SAMANT M. Recent advances in PGPR and molecular mechanisms involved in drought stress tolerance[J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2023, 23: 106-124.
- [8] RINCÓN-MOLINA CI, RUÍZ-VALDIVIEZO VM, RINCÓN-ROSALES R, DAVID FLORES FÉLIX J. Editorial: plant growth-promoting bacteria as a key tool for future agriculture: agronomic, molecular and omics approaches[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1168891.
- [9] 沈仁芳, 赵学强. 土壤微生物在植物获得养分中的作用[J]. 生态学报, 2015, 35(20): 6584-6591.
SHEN RF, ZHAO XQ. Role of soil microbes in the acquisition of nutrients by plants[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(20): 6584-6591 (in Chinese).
- [10] 贺纪正, 陆雅海, 傅伯杰. 土壤生物学前沿[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
HE JZ, LU YH, FU BJ. Frontier of Soil Biology[M]. Beijing: Science Press, 2015 (in Chinese).
- [11] LAMBERS H, MOUGEL C, JAILLARD B, HINSINGER P. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective[J]. Plant and Soil, 2009, 321(1): 83-115.
- [12] ZHANG RF, VIVANCO JM, SHEN QR. The unseen rhizosphere root-soil-microbe interactions for crop production[J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 37: 8-14.
- [13] 付晓峰, 张桂萍, 张小伟, 任嘉红. 溶磷细菌和丛枝菌根真菌接种对南方红豆杉生长及根际微生物和土壤酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2016, 36(2): 353-360.
FU XF, ZHANG GP, ZHANG XW, REN JH. The Effects of phosphate-solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on the growth of southern yew, rhizospheric microorganisms, and soil enzyme activities[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 36(2): 353-360 (in Chinese).
- [14] ZHANG JH, HUANG J, HUSSAIN S, ZHU LF, CAO XC, ZHU CQ, JIN QY, ZHANG H. Increased ammonification, nitrogenase, soil respiration and microbial biomass N in the rhizosphere of rice plants inoculated with rhizobacteria[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(10): 2781-2796.
- [15] 王世强. 链霉菌 JD211 对水稻的防病促生效应及机制[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2014.
WANG SQ. Antifungal and growth-promoting effects of *Streptomyces* JD211 on rice: mechanisms and implications[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [16] COCHARD B, GIROUD B, CROVADORE J,

- CHABLAIS R, ARMINJON L, LEFORT F. Endophytic PGPR from tomato roots: isolation, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation of treated tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(4): 765.
- [17] 薛磊. 棉花黄萎病生防链霉菌的抗病促生作用及其机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2013.
- XUE L. Research on the disease resistance and growth-promoting effects of biocontrol *Streptomyces* on cotton *Fusarium* wilt, along with its mechanisms[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2013 (in Chinese).
- [18] FANG Y, WANG F, JIA XB, CHEN JC. Distinct responses of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to green manure combined with reduced chemical fertilizer in a paddy soil[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2019, 19(4): 1613-1623.
- [19] HINSINGER P, VETTERLEIN D, YOUNG IM. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance[J]. *Plant and Soil*, 2009, 321(1): 117-152.
- [20] WANG XL, QIN RR, SUN RH, WANG JJ, HOU XG, QI L, SHI J, LI XL, ZHANG YF, DONG PH, ZHANG LX, QIN DH. No post-drought compensatory growth of corns with root cutting based on cytokinin induced by roots[J]. *Agricultural Water Management*, 2018, 205: 9-20.
- [21] WU D, MA K, WANG XL, QI L, LIU YH, SONG P, LIU W, ZHANG MM, ZHAO W, SONG CW. Increasing Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) regrowth via inoculation with an ammonia-oxidizing bacterial strain[J]. *Grassland Science*, 2023, 69(1): 51-64.
- [22] 韩学东, 杜春梅, 董锡文. 植物根际促生菌研究综述[J]. *乡村科技*, 2023, 14(5): 87-90.
- HAN XD, DU CM, DONG XW. A Summary of plant growth promoting rhizobacteria studies[J]. *Rural Science and Technology*, 2023, 14(5): 87-90 (in Chinese).
- [23] PAVINATO PS, RESTELATTO R, SARTOR LR, PARIS W. Production and nutritive value of ryegrass (cv. Barjumbo) under nitrogen fertilization[J]. *Revista Ciência Agronômica*, 2014, 45(2): 230-237.
- [24] WANG XL, LIU D, LI ZQ. Effects of the coordination mechanism between roots and leaves induced by root-breaking and exogenous cytokinin spraying on the grazing tolerance of ryegrass[J]. *Journal of Plant Research*, 2012, 125(3): 407-416.
- [25] WU D, WANG XL, ZHU XX, WANG HH, LIU W, QI L, SONG P, ZHANG MM, ZHAO W. Effect of ammonia-oxidizing bacterial strains that coexist in rhizosphere soil on Italian ryegrass regrowth[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(11): 2122.
- [26] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- LU RK. Methods of Soil Agrochemical Analysis[M]. Beijing: China Agriculture Sciencetech Press, 2000 (in Chinese).
- [27] QIN RR, WANG XL. Effects of crown height on the compensatory growth of Italian ryegrass based on combined effects of stored organic matter and cytokinin[J]. *Grassland Science*, 2020, 66(1): 29-39.
- [28] ZAICOVSKI CB, ZIMMERMAN T, NORA L, NORA FR, SILVA JA, ROMBALDI CV. Water stress increases cytokinin biosynthesis and delays postharvest yellowing of broccoli florets[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 49(3): 436-439.
- [29] OLDROYD GED, LEYSER O. A plant's diet, surviving in a variable nutrient environment[J]. *Science*, 2020, 368(6486): eaba0196.
- [30] KOWALCHUK GA, STEPHEN JR. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 485-529.
- [31] LANDREIN B, FORMOSA-JORDAN P, MALIVERT A, SCHUSTER C, MELNYK CW, YANG WB, TURNBULL C, MEYEROWITZ EM, LOCKE JCW, JÖNSSON H. Nitrate modulates stem cell dynamics in *Arabidopsis* shoot meristems through cytokinins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(6): 1382-1387.
- [32] POITOUT A, CRABOS A, PETŘÍK I, NOVÁK O, KROUK G, LACOMBE B, RUFFEL S. Responses to systemic nitrogen signaling in *Arabidopsis* roots involve trans-zeatin in shoots[J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(6): 1243-1257.
- [33] 秦子娟, 张宇亭, 周志峰, 石孝均, 郭涛. 长期施肥对中性紫色水稻土氮素矿化和硝化作用的影响[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(16): 3392-3400.

- QIN ZX, ZHANG YT, ZHOU ZF, SHI XJ, GUO T. Characteristics of mineralization and nitrification in neutral purple paddy soil from a long-term fertilization experiment[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(16): 3392-3400 (in Chinese).
- [34] 赵薇, 伊文博, 王顶, 吴开贤, 赵平, 龙光强, 汤利. 间作对马铃薯种植土壤硝化作用和硝态氮供应的影响[J]. *应用生态学报*, 2020, 31(12): 4171-4179.
- ZHAO W, YI WB, WANG D, WU KX, ZHAO P, LONG GQ, TANG L. Effects of intercropping on soil nitrification and nitrogen supply in potato field[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, 31(12): 4171-4179 (in Chinese).
- [35] 苏瑜, 王为东. 我国北方四类土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌的活性及对氨氧化的贡献[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(9): 3519-3527.
- SU Y, WANG WD. Activity of AOA and AOB and their contributions to ammonia oxidization in four soils in North China[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(9): 3519-3527 (in Chinese).
- [36] 杨曾平, 聂军, 廖育林, 周兴, 谢坚, 鲁艳红, 纪雄辉, 吴家梅, 谢运河. 不同施肥量对稻田一年生黑麦草产量及氮磷钾吸收的影响[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(30): 173-180.
- YANG ZP, NIE J, LIAO YL, ZHOU X, XIE J, LU YH, JI XH, WU JM, XIE YH. Effect of different fertilizations on biomass yield and N, P, K absorption of annual ryegrass in rice field[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(30): 173-180 (in Chinese).
- [37] 何国兴, 宋建超, 温雅洁, 刘彩婷, 祁娟. 不同根瘤菌肥对紫花苜蓿生产力及土壤肥力的综合影响[J]. *草业学报*, 2020, 29(5): 109-120.
- HE GX, SONG JC, WEN YJ, LIU CT, QI J. Effects of different rhizobium fertilizers on alfalfa productivity and soil fertility[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2020, 29(5): 109-120 (in Chinese).