

以茎尖组培苗检测甘蔗体内内生固氮菌的固氮活性

王伦旺¹, 李杨瑞^{2*}, 何为中¹, 贤武¹, 梁俊¹, 谭裕模¹

¹广西壮族自治区甘蔗研究所, 南宁 530007; ²广西壮族自治区农业科学院作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007

摘要: 以巴西引进的甘蔗品种‘B1’、‘B3’、‘B5’、‘B8’以及广西地区栽培品种‘新台糖16号’和‘桂糖11号’的茎尖进行组织培养, 对其继代4次的茎尖组培苗进行有氮与无氮培养比较以及于温室中无氮盆栽品种比较试验的结果表明, 经茎尖培养的甘蔗品种其原有的固氮能力不丧失, 4个巴西甘蔗品种的固氮能力和在无氮下的生长能力强于广西主栽品种‘新台糖16号’和‘桂糖11号’, 无氮培养的巴西甘蔗品种氮含量较高, 固氮活性较强, 缺氮症状出现时间较迟; 无氮盆栽的巴西甘蔗品种株高、分蘖、叶片的固氮活性等均优于‘新台糖16号’和‘桂糖11号’。

关键词: 茎尖培养; 生物固氮; 无氮实验; 甘蔗

The Detection of Activity for Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by Stem Apical Culture Seedlings

WANG Lun-Wang¹, LI Yang-Rui^{2*}, HE Wei-Zhong¹, XIAN Wu¹, LIANG Jun¹, TAN Yu-Mo¹

¹Guangxi Sugarcane Research Institute, Nanning 530007, China; ²Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

Abstract: Sugarcane stem apical culture was conducted with introduced varieties ‘B1’, ‘B3’, ‘B5’, and ‘B8’ from Brazil and domestic varieties ‘GT11’ and ‘ROC16’ to investigate the effect of tissue culture on the endophytic nitrogen fixation ability of the plants. The plants derived from stem apical culture that had been cloned for 4 generations were treated with and without nitrogen. The other experiment was conducted by pot culture without nitrogen fertilizer in the greenhouse. The results indicated that the regenerated plants of the tested sugarcane varieties did not lose the biological nitrogen fixation ability after stem apical culture. Under non-nitrogen condition, the nitrogen fixation capacity and growing vitality of the Brazilian varieties ‘B1’, ‘B3’, ‘B5’, and ‘B8’ were stronger than those of ‘GT11’ and ‘ROC16’, and the Brazilian varieties had stronger growing capacity, higher nitrogen content and higher nitrogenase activity, and their symptom of nitrogen deficiency appeared later. In the pot cultivation experiment, the Brazilian varieties showed more stalks, stronger tillering and nitrogenase activity in leaves than ‘GT11’ and ‘ROC16’.

Key words: stem apical culture; biological nitrogen fixation; non-nitrogen experiment; sugarcane

一般来说, 甘蔗生产中氮肥投入比例较大。就广西而言, 每年甘蔗种植面积达70万公顷左右, 施用氮肥折合尿素约42万吨, 投入的氮肥成本高达人民币8亿元以上。如能减少氮肥施用量, 就能显著降低甘蔗生产成本。减少氮肥施用量的较为经济有效办法是利用固氮生物的固氮特性。巴西在这方面曾做过大量应用性研究(Döbereiner 1988, 1992; Boddey等1991; Döbereiner等1993; Reis等1994), 并取得有意义的结果。Döbereiner (1988, 1992)、Döbereiner等(1993)和Reis等(1994)的工作证实, 与甘蔗有关的固氮菌有3种: 即固氮醋酸杆菌(*Gluconacetobacter*

diazotrophicus)、草螺菌(*Herbaspirillum seropedicae*)和固氮螺菌(*Azospirillum halopraeferrans*)。这些固氮细菌与豆科植物的根瘤菌不同, 属于植物内生固氮菌, 在甘蔗的根、茎、叶等器官组织中都能检测到, 在离体茎段中也能增殖传播。巴西已育成一大批有强固氮能力的甘蔗品种, 其中‘CB45-3’和‘SP70-1143’尤为突出, 这2个品种连续3年种在贫瘠的旱地

收稿 2006-10-23 修定 2006-12-29

资助 国家自然科学基金(30260054和30660085)和国家农业部“948”项目(2003-Q06)。

*通讯作者(E-mail: liyr@gxaas.net; Tel: 0771-3247689)。

上不施氮只施磷钾和微肥, 每年甘蔗产量即可分别达到 244 和 182 $t \cdot hm^{-1}$, 每年固氮量分别达 154 和 134 $kg (氮) \cdot hm^{-1}$, 固氮甘蔗品种通过固氮获得其所需氮量的 60% 以上(Döbereiner 1992; Döbereiner 等 1993)。近年来, 谭裕模等(2002)从巴西引进一批能固氮的甘蔗品种。他们用茎尖组培苗和原种茎段检测方法证实其中的甘蔗品种‘B1’、‘B3’、‘B5’和‘B8’具有很强的固氮能力, 在无氮盆栽的条件下, 具有较高的净光合速率, 叶片叶绿素含量较高, ATP 酶活性较高(梁俊等 2005)。只需在苗期施少量的氮肥和磷钾肥, 甚至不施氮肥, 能固氮的甘蔗品种‘RB72-454’(‘B1’)产量可达到 123.7 $t \cdot hm^{-1}$ 以上, 且无缺氮症状(谭裕模等 2002)。区域品种比较试验的结果表明, ‘RB72-454’比对照品种‘桂糖 11 号’增产 11.5%~51.4%, 最高产量达 174 $t \cdot hm^{-1}$, 增产显著(王伦旺等 2002)。Xing 等(2006)从‘B8’(‘RB86-7515’)的甘蔗茎段中分离到一种新的内生固氮菌, 并通过形态学、生理生化及分子生物学鉴定其分类地位, 命名为固氮土壤杆菌(*Agrobacterium diazotrophicus*)。

本文采用组织培养方法, 检测甘蔗茎尖组培苗及由其长成的植株固氮活性变化, 以期能为今后采用茎尖组培苗方式检测从境内外引进的甘蔗品种是否有固氮能力时提供参考。

材料与方 法

材料有从巴西引进的具有内生固氮能力的甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)品种‘B1’(‘RB72-454’)、‘B3’(‘RB83-5089’)、‘B5’(‘NA5679’)和‘B8’(‘RB86-7515’)(Xing 等 2006; 梁俊等 2005; 谭裕模等 2002)以及广西地区栽培的品种‘新台糖 16 号’(‘ROC16’)和‘桂糖 11 号’(‘GT11’)。

采用茎尖分生组织培养, 建立初代培养无性系。试验于 2003 年 11 月~2004 年 1 月参照贤武等(2000)文中方法在广西甘蔗研究所组织培养实验室进行。从甘蔗试验地分别取回各品种的中上部健康成熟茎段, 将其砍成单芽于 52 $^{\circ}C$ 恒温水槽中浸泡 30 min 后, 再于 38~40 $^{\circ}C$ 恒温条件下培植 10~15 d, 蔗芽萌发长至有 1~2 片叶时, 切下蔗芽, 去

掉老叶鞘和叶片, 以 75% 酒精消毒后, 在温室无菌条件下, 用接种针和解剖刀小心剥离茎尖生长点以外的幼叶(在解剖显微镜下进行), 切下长约 2 mm 的茎尖分生组织, 在无菌水中浸泡 20~30 min 后接种到茎尖诱导培养基(MS+2.0 $mg \cdot L^{-1}$ BA+0.1 $mg \cdot L^{-1}$ NAA)上进行液体振荡培养。诱导成丛苗后, 进行液体静置增殖培养。培养时光强为 30~40 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 照光时间 10 $h \cdot d^{-1}$ 左右, 温度为 27~30 $^{\circ}C$ 。

茎尖组培苗无氮培养试验于温室无菌条件下, 将不同品种的液体培养(MS+0.3 $mg \cdot L^{-1}$ 6-BA)继代 4 次的组培苗分别接种入改良的 MS 培养基(去掉 MS 中所有含氮化合物, 不附加任何生长调节物质)中进行液体静置培养, 以正常增殖的有氮培养基(改良的 MS+0.3 $mg \cdot L^{-1}$ 6-BA)作对照并同时培养。所有培养基均用双蒸馏水配制。每个品种的有氮或无氮处理各 12 瓶, 每瓶 8 苗。培养 15 d 后更换新的上述改良的 MS 培养基中, 连续培养 30 d 后, 从每个处理中取 6 瓶分别用双蒸馏水反复洗 4 次, 再用滤纸吸干组培苗表面的水分后称鲜重, 由广西农业科学院土壤肥料研究所完成氮素分析和干重测定。另外 6 瓶用岛津气相色谱仪测乙炔还原(固氮)活性(因‘ROC16’增殖慢, 材料少, 未作固氮活性测定)。

茎尖组培苗无氮栽培试验于 2004 年 4 月 10 日在温室条件下进行, 各品种的茎尖组培苗经生根培养(MS+10 $mg \cdot L^{-1}$ NAA)后移植到无菌、低氮、新红壤基质(经 121 $^{\circ}C$ 高压灭菌 60 min, 土壤全氮含量为 0.033%, 水解氮为 22 $mg \cdot kg^{-1}$)中进行盆栽, 每盆装干土 20 kg, 种植 1 株健壮组培苗, 每品种种 3 盆, 在整个培养过程中每盆只施用 25 g KH_2PO_4 (分 2 次淋施, 浓度 2%), 不施氮素肥料, 2004 年 11 月 20~26 日观察蔗株生长情况和按上述方法测定各品种叶片的固氮活性。

实验结果

1 无氮培养条件下不同品种甘蔗组培苗的生长

在不附加任何生长调节物质和氮素条件下培养 15 d 的各品种组培苗长势弱, 叶色淡, 出现黄叶, 生根, 增殖减缓, 与正常有氮培养相比品种之间有明显差异, ‘ROC16’和‘GT11’

的组培苗黄化速度最快, 长势最弱, 增殖缓慢, 不生根; ‘B1’ 和 ‘B3’ 的组培苗黄化速度最慢, 缺氮症状出现时间最迟, 生根少; ‘B5’ 和 ‘B8’ 黄化速度和缺氮症状出现时间居中, 但

生根多。组培苗黄叶数从多到少依次为 ‘R0C16’ > ‘GT11’ > ‘B8’ > ‘B5’ > ‘B3’ > ‘B1’ (表1)。说明各品种之间耐氮缺失的能力差异较大, 可能与品种间的固氮活性大小有关。

表1 无氮培养条件下不同品种甘蔗组培苗的生长

Table 1 The growth of regenerated plants of different varieties under non-nitrogen condition

品种	增值芽数/个·瓶 ⁻¹	生根数/条·瓶 ⁻¹	枯黄叶数/片·瓶 ⁻¹	生长情况
‘B1’	12.7 ^{Aa}	1.7 ^{Bbc}	1.0 ^{Fc}	叶色绿色, 长势较好, 无明显缺氮症状。
‘B3’	10.0 ^{ABab}	3.6 ^{Bb}	2.2 ^{DEc}	叶色绿色, 长势好, 无明显缺氮症状。
‘B5’	8.0 ^{ABCab}	9.4 ^{Aa}	5.2 ^{Db}	叶色淡, 长势弱, 显现缺氮症状。
‘B8’	9.7 ^{ABCab}	8.7 ^{Aa}	6.8 ^{BCb}	叶色淡, 长势较好, 显现缺氮症状。
‘GT11’	5.2 ^{BCbc}	0 ^{Bc}	9.3 ^{BAa}	部分苗枯死; 叶色淡, 长势弱, 缺氮症状较明显。
‘R0C16’	3.0 ^{Fc}	0 ^{Bc}	10.0 ^{Aa}	部分苗枯死; 叶色淡, 长势弱, 缺氮症状极明显。

培养 15 d 后测定。表中各列中不同大写字母表示差异极显著, 不同小写字母表示差异显著, 下表同此。

2 无氮和有氮培养条件下不同品种甘蔗组培苗的含氮量、干重和固氮活性

从表2可以看出, 茎尖组培苗无氮培养 30 d 后, 4 个巴西甘蔗品种的氮含量都比 ‘GT11’ 和 ‘R0C16’ 的高, 从高到低依次是 ‘B8’ > ‘B5’ > ‘B3’ > ‘B1’ > ‘GT11’ > ‘R0C16’, 各甘蔗品种的氮含量都比有氮培养的低; 干物质重量变化因品种而异, 无氮培养 30 d 后的干重高于有氮培养的品种只有 ‘B8’, 其他品种则相反。但从固氮活性来看, 无氮培养的各甘蔗品种的固氮活性明显高于有氮培养的, 巴西品种明显高于广西地区栽培品种 ‘GT11’; 其中 ‘B8’ 经无氮培养 30 d 后的固氮活性最高,

达到 46.236 nmol (C₂H₄)·g⁻¹ (FW)·h⁻¹, 是 ‘GT11’ 的 57 倍, 但 ‘B8’ 也显现出缺氮症状。上述结果说明, 即使是具有内生固氮菌并有固氮能力的巴西甘蔗品种在组培的条件下, 培养基中也不能缺少氮素, 否则生长不良, 或黄化枯死。这说明甘蔗幼苗生长初期的形态建成和体内固氮酶合成时均还需要供应一定的无机氮素。同时这也可能是为什么在生产中甘蔗苗期必须施用一定量氮肥的原因。

3 不同品种甘蔗茎尖组培苗耐无氮栽培能力比较

不同品种甘蔗茎尖组培苗生根后移入温室中盆栽, 土壤经过高压灭菌。栽培时如不施氮肥, 植株叶色即变淡, 生长明显减缓, 茎变细, 分

表2 无氮和有氮培养条件下甘蔗组培苗的含氮量、干重和固氮活性

Table 2 The content of nitrogen and the weight of dry matter and the nitrogenase activity of the regenerated plants under non-nitrogen or nitrogen condition

品种	无氮培养			有氮培养		
	含氮量/%	干重/g·瓶 ⁻¹	固氮活性/ nmol (C ₂ H ₄)·g ⁻¹ (FW)·h ⁻¹	含氮量/%	干重/g·瓶 ⁻¹	固氮活性/ nmol (C ₂ H ₄)·g ⁻¹ (FW)·h ⁻¹
‘B1’	1.327 ^{ABab}	2.26 ^{ABab}	4.459 ^{Bbc}	3.952 ^{Aa}	2.73 ^{BCb}	4.214 ^{Aa}
‘B3’	1.387 ^{ABab}	2.60 ^{Aa}	9.873 ^{Bb}	3.429 ^{Aa}	3.49 ^{Aa}	0.286 ^{Bbc}
‘B5’	1.662 ^{ABa}	2.16 ^{ABabc}	12.383 ^{Bb}	3.654 ^{Aa}	3.22 ^{ABa}	0.721 ^{Bbc}
‘B8’	1.781 ^{Aa}	1.91 ^{ABCbc}	46.236 ^{Aa}	4.404 ^{Aa}	1.74 ^{Dd}	1.547 ^{Bb}
‘GT11’	1.123 ^{Bb}	1.69 ^{BCcd}	0.810 ^{Bc}	4.515 ^{Aa}	2.66 ^{BCbc}	0.06 ^{Bc}
‘R0C16’	1.066 ^{Bb}	1.26 ^{Cd}	—	3.376 ^{Aa}	2.26 ^{CDc}	—

培养 30 d 后测定。

藨少, 呈现出明显的缺氮症状。各品种缺氮症状出现的时间顺序与无氮培养的组培苗相似, 其中有4个巴西品种甘蔗明显晚些。种植7个月后各品种的株高仅30~83 cm, 茎径仅1.68~2.02 cm, 每株分藨0.7~2.3个, 叶片固氮活性 $2.146\sim 8.006 \text{ nmol (C}_2\text{H}_4\text{)} \cdot \text{g}^{-1} \text{ (FW)} \cdot \text{h}^{-1}$ 。其中4个巴西甘蔗品种的株高和分藨数均超过广西地区品种‘ROC16’和‘GT11’。不同品种之间的叶片固氮活性变化与株高变化相似, 固氮活性从高到低依次为‘B8’>‘B5’>‘B3’>‘B1’>‘GT11’>‘ROC16’(表3), 显示固氮活性越高的品种, 栽培时耐无氮的能力越强。

表3 各品种组培苗无氮栽培条件下主要农艺性状及其叶片的固氮酶活性

Table 3 The tested varieties' agronomic performance and nitrogenase activity under free nitrogen fertilizer-used cultivation condition

品种	固氮活性/ $\text{nmol (C}_2\text{H}_4\text{)} \cdot \text{g}^{-1} \text{ (FW)} \cdot \text{h}^{-1}$	株高/cm	分藨数/ 条·株 ⁻¹	茎径/ cm
‘B1’	3.493 ^{BCbc}	60 ^{ABbc}	2.0 ^{ABa}	2.01 ^{Aa}
‘B3’	6.064 ^{ABab}	75 ^{ABab}	1.3 ^{ABab}	1.89 ^{Aa}
‘B5’	7.604 ^{Aa}	78 ^{ABab}	2.3 ^{Aa}	1.78 ^{Aa}
‘B8’	8.006 ^{Aa}	83 ^{Aa}	1.7 ^{ABab}	1.96 ^{Aa}
‘GT11’	2.725 ^{BCc}	53 ^{BCc}	0.7 ^{Bb}	2.02 ^{Aa}
‘ROC16’	2.146 ^{Cc}	30 ^{Cd}	0.7 ^{Bb}	1.68 ^{Aa}

讨 论

根据本试验结果可以得出2个印象。

(1) 茎尖培养长成的甘蔗再生植株, 其体内的内生固氮菌的固氮能力不会丧失。说明根据茎尖组培苗的表现, 判别和决定能否引种具有固氮能力的甘蔗品种是可行的。我们曾对甘蔗品种‘B1’和‘GT11’的茎尖培养物(包括组培苗和培养液)进行显微检测, 未见到有宿根矮化病(RSD)的病原菌, PCR检测其反应为阴性, 因此可以认为茎尖培养的RSD等病原菌已消失, 可以除病脱毒(邓展云等2004)。但甘蔗品种‘B1’茎尖组培苗的假茎段在含有溴百里香草酚蓝的LGI

固氮醋酸杆菌专用培养基(1.5%的琼脂)上呈现橙色反应(谭裕模等2002), 甘蔗品种‘GT11’的则保持蓝色, 据此推测甘蔗品种‘B1’茎尖培养长成植株后, 其体内仍然有具固氮活性的内生固氮菌存在, 但对此尚需进一步研究。

(2) 引进的巴西甘蔗品种‘B8’、‘B5’、‘B3’和‘B1’的固氮能力强于广西地区栽培的品种‘新台糖16号’(‘ROC16’)和‘桂糖11号’(‘GT11’)。这与已有报道(谭裕模等2002; 梁俊等2005)是一致的。但如不补充外源氮素, 有固氮能力的甘蔗品种幼苗生长也不正常, 并出现缺氮症状。因此生产中根据甘蔗品种的特性适时合理施用氮肥是必要的。

参考文献

- 邓展云, 刘海斌, 李鸣, 王伯辉, 朱秋珍, 王维赞, 谭裕模, 王伦旺(2004). 广西甘蔗宿根矮化病菌的PCR检测. 西南农业学报, 17(3): 324~327
- 梁俊, 李杨瑞, 梁朝旭(2005). 不同甘蔗品种在无氮肥条件下的光合生理特性. 中国农学通报, (8): 188~207
- 谭裕模, 王伦旺, 王天算, 贤武, 庞天(2002). 固氮甘蔗品种RB72454田间肥料敏感试验. 广西蔗糖, 26(1): 12~15
- 王伦旺, 谭裕模, 王天算, 庞天, 贤武(2002). 甘蔗品种RB72454和新台糖25号区域品比试验初报. 甘蔗糖业, (4): 15~19
- 贤武, 王伦旺, 王天算, 庞天, 黄成丰(2000). 甘蔗茎尖脱毒培养研究初报. 广西甘蔗, 21(4): 1~13
- Boddey RM, Urquiaga S, Reis VM, Döbereiner J (1991). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant Soil, 137(4): 111~117
- Döbereiner J (1988). Isolation and identification of root associated diazotrophs. Plant Soil, 110: 207~212
- Döbereiner J (1992). Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. Cienc Cult, 44(5): 310~313
- Döbereiner J, Reis VM, Paula MA, Olivares F (1993). Endophytic diazotrophs in sugarcane, cereals and tuber plants. In: Palacios R (ed). New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Netherlands: Academic Pub, 671~676
- Reis VM, Olivares FL, Döbereiner J (1994). Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. World J Microbiol Biotech, 10: 401~405
- Xing YX, Yang LT, Huang SL, Li YR (2006). Identification of a new nitrogen fixing endo-bacterium strain isolated from sugarcane stalk. Sugar Tech 8(1): 49~53