

甘蔗不同组织联合固氮能力评价

胡浩南¹, 敖俊华², 黄晓财¹, 李欣欣^{3*}, 廖红³

¹华南农业大学农学院, 广州510642; ²广州甘蔗糖业研究所, 广州510642; ³福建农林大学根系生物学研究中心, 福州350002

摘要: 以甘蔗栽培品种ROC22和含有野生斑茅蔗血缘的BC2-32为材料, 通过乙炔还原法评价了甘蔗不同组织的固氮能力。结果显示, 在分蘖期, ROC22根系的固氮酶活性较高, 可能是联合固氮的主要器官; 在伸长期, 利用以蔗糖为碳源的LGI、SNX和SH培养基培养, 甘蔗叶片的固氮酶活性最高; 以苹果酸为碳源的JNFb和Mal处理, 积累一定糖分的+4和+5茎的固氮酶活性较高, 暗示了叶片主要定殖以蔗糖为碳源的内生固氮菌, 是伸长期固氮效率最高的部位, 其次为蔗茎。ROC22根系在SH培养条件下的固氮酶活性比BC2-32高25倍, 说明ROC22根系中含有某些优势内生固氮菌; 而两种甘蔗不同叶和蔗茎的固氮酶活性在伸长期表现较为相似的趋势, 说明ROC22和BC2-32中定殖的主要是以蔗糖为碳源, 较为保守且专性较强的内生固氮菌。

关键词: 甘蔗; 联合固氮; 固氮酶活性; 培养基; 组织

氮不仅是植物生长所必需的大量营养元素之一, 也是决定作物产量和品质的关键因子之一。为缓解人口增长对粮食需求的压力, 氮肥施用量迅速增加。然而, 氮肥的大量投入, 不仅提高了农业成本, 而且还引起了土壤酸化、大气污染及水体富营养化等问题(Guo等2010; Liu和Zhang 2011; Zhang等2013), 对生态环境构成了严重威胁。生物固氮是固氮微生物将大气中不能被植物直接利用的氮气还原成氨的过程, 是取之不尽、用之不竭的廉价氮源(Herridge等2008)。因此, 生物固氮的挖掘和利用, 对降低环境污染及农业的可持续发展意义重大。

根据固氮微生物与高等植物的关系, 生物固氮可分为自生固氮、共生固氮及联合固氮三个体系(Herridge等2008)。其中, 联合固氮是固氮菌在高等植物根、茎或叶中形成的一种无特殊共生结构的固氮系统。20世纪中, 巴西学者Döbereiner发现了甘蔗的联合固氮作用, 并提出根际联合固氮的概念, 暗示了禾本科作物具有生物固氮的潜能(Döbereiner 1961; Döbereiner等1972)。随后, 联合固氮作用在C3作物, 如水稻(Muthukumarasamy等2006)及高效的C4作物, 如玉米(Palus等1996; Roesch等2006)和高粱(James等1997)中被相继发现, 并利用不同培养基分离鉴定了多种联合固氮菌, 包括: 固氮菌(*Azotobacter* sp.)、固氮螺菌(*Azospirillum* sp.)、重氮醋酸杆菌(*Acetobacter diazotrophicus*)、固氮弧菌(*Azoarcus* sp.)、草螺菌(*Herbaspirillum* sp.)、伯克霍尔德菌(*Burkholderia*)及芽孢杆菌属(*Clostridium* sp.)等(Baldani等1997)。已有研究表明, 接

种联合固氮菌, 在氮肥施用量减少一半的同时, 亦能提高或维持作物产量(Boddey 1995; Döbereiner 1997)。由此可见, 充分利用联合固氮作用, 对农业减肥增效及保护生态环境具有重要作用。

甘蔗是世界范围内重要的糖料及能源作物。已有研究表明, 巴西在减少氮肥投入的情况下, 仍然能使甘蔗持续高产, 并且保持土壤含氮量基本稳定(Urquiaga等1992, 2012; Boddey 1995; Döbereiner 1997)。究其原因, 主要是甘蔗体内存在大量的内生固氮菌, 其联合固氮作用不容小觑(Döbereiner等1972; Lin等2012)。通过利用¹⁵N标记及氮平衡研究法表明, 一些甘蔗品种生长所需氮量的60%来源于生物固氮(Urquiaga等1992)。同时发现, 甘蔗根、茎和叶中均表现出不同程度的固氮能力, 且固氮菌的种类较多(桂意云等2007; Xing等2006; Magnani等2013)。目前, 测定固氮菌的固氮酶活性是衡量生物固氮能力简单、直观的方法之一。然而, 与豆科作物生物固氮的根瘤不同, 联合固氮是固氮微生物与宿主之间的一种松散结合, 未形成特化器官。因此, 对固氮酶活性测定需要利用适宜的培养基对固氮组织进行预培养。但是, 不同固氮菌种对外界培养基具有一定的选择性, 分离纯化或测定固氮酶活性的结果往往是某种培养基筛选的固氮菌或在该培养基条件下生长的固氮菌所产生的固氮酶活性。目前, 常用的培养基

收稿 2016-11-14 修定 2017-02-08

资助 福建省高效联合基础科研项目(2017J01603)。

* 通讯作者(E-mail: lixin0476@163.com)。

包括SNX (Xing等2006)、JNFb (Kirchhof等1997)、LGI (Kirchhof等1997)和SH (李杨瑞等2009)。已有研究报道,选择不同培养基筛选获得的甘蔗联合固氮菌不尽相同,即不同培养基培养出的固氮菌种不同(Xing等2006; Kirchhof等1997; Lin等2012),暗示了无论利用哪种培养基预培养甘蔗组织,并测定甘蔗体内固氮菌的固氮酶活性都有一定的局限性。可见,明确适合联合固氮菌生长的培养基,或者使用不同成分的培养基来综合评价甘蔗联合固氮能力是筛选高效生物固氮甘蔗品种的重要策略之一,同时也是研究甘蔗内生固氮机理的基础。所以,本研究以两种不同甘蔗品种为研究对象,利用不同培养基综合评价了不同组织部位的固氮酶活性,以期为甘蔗联合固氮的基础研究及生产实践提供参考。

材料与方 法

1 实验材料

1.1 植物材料

试验在广州甘蔗糖业研究所进行。以甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.)栽培品种ROC22 (‘新台糖22号’)和带有野生斑茅蔗血缘的新品系BC2-32为研究材料(劳方业等2006),3月初栽植,分两个时期采样。第一时期为分蘖期,只收获ROC22栽培品种,时间是6月下旬,甘蔗生长状况如图1-A所示。取样部位分别为根系、+4叶以及+4茎;第二时期为伸长期,9月下旬,甘蔗的生长状况见图1-B,同时收获ROC22和BC2-32的根、+2、+3、+4、+5叶以及上述叶位所对应的蔗茎,分别将上述采取样品进行固氮酶活性的测定。



图1 甘蔗生长表型

Fig.1 Growth performance of sugarcane

A: 分蘖期; B: 伸长期。

1.2 供试培养基

本试验共采用5种不同的培养基,具体如下。

LGI培养基,成分包括: K_2HPO_4 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.002 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和蔗糖 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

SNX培养基,成分包括: CaCO_3 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaCl $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.005 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和蔗糖 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

JNFb培养基,成分包括: DL-苹果酸 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 K_2HPO_4 $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $1.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaCl $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CaCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Fe-EDTA $0.066 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、2 mL微量元素和KOH $4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.8。其中微量元素包括: $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g 、 $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.235 g 、 H_3BO_3 0.28 g 、 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.008 g 、 $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.024 g , 分别溶于200 mL蒸馏水中。

SH培养基,成分包括: 蔗糖 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Mal培养基,成分包括: DL-苹果酸 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2 实验方法

参照Roesch等(2007)及桂意云等(2007)方法, 分别将不同品种甘蔗的根, +2、+3、+4和+5叶片及相应叶位的蔗茎用自来水及无菌水冲洗后, 再用剪刀切碎混均匀, 并称取1 g左右样品, 转入60 mL培养瓶中, 分别加入10 mL上述五种培养基, 培养48 h; 再用针筒抽出1 mL气体并同时注入等体积的乙炔继续培养24 h, 随后加入50% 三氯乙酸1 mL终止反应; 随后通过气相色谱仪测定形成的乙烯量。每个部位3个生物学重复。以 $\text{nmol}(\text{C}_2\text{H}_4)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 表示固氮酶活性大小, 计算公式如下:

$$\text{固氮酶活性}[\text{nmol}(\text{C}_2\text{H}_4)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}] = \frac{C \times (V_1 - V_2)}{M \times \text{FW} \times H} \times 10^9$$

其中, C: 标准曲线上对应的乙烯浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); V_1 : 瓶子的体积(L); V_2 : 装样品所占用的体积(L); M: 乙烯分子量; FW: 样品鲜重(g); H: 加入乙炔后培养的时间(h)。

3 数据处理

应用Microsoft Excel 2007进行数据的统计与计算, 采用SigmaPlot进行作图。

实验结果

1 甘蔗分蘖期根、+4叶及+4茎固氮酶活性变化

利用JNFb、LGI、SNX和SH分别培养ROC22分蘖期的根、+4叶及+4茎, 并测定其固氮酶活性。结果如图2所示, 除SH培养基, ROC22 +4叶的固氮酶活性比根系高外, 其他三种培养基培养根系固氮酶活性均明显高于+4叶的固氮酶活性。其中, 由不同培养基培养测定的根系固氮酶活性由高到低的顺序为: $\text{LGI} > \text{JNFb} > \text{SNX} > \text{SH}$ 。虽然, +4茎只有以JNFb为培养基条件时, 才能测定出固氮酶活性, 但是根系的固氮酶活性依然最高, 是蔗茎的2.01倍, 而叶几乎没有固氮酶活性; 在LGI培养条件下, 根和叶测得的固氮酶活性最高, 分别为 354.42 和 $180.62 \text{ nmol}(\text{C}_2\text{H}_4)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$; 以SNX为培养基时, 只有根系中能测定出较高的固氮酶活性。上述结果暗示, 在甘蔗分蘖期, 根系可能是最主要的联合固氮器官; 同时, 存在一些偏嗜LGI培养基的内生固氮菌, 其更适合用于甘蔗分蘖期内生固氮菌的培养及固氮酶活性测定, 而JNFb在某些茎的优势菌种培养和研究中, 具有一定的应用潜力。

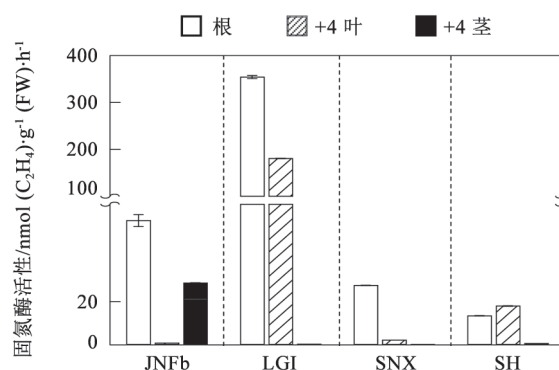


图2 不同培养基对甘蔗不同组织固氮酶活性的影响
Fig.2 Effects of different culture medium on nitrogenase activities in different tissues of sugarcane

2 不同培养基对甘蔗根部固氮酶活性的影响

为了进一步明确不同发育时期甘蔗固氮酶活性变化以及品种间是否存在差异, 本研究利用不同培养基分别培养ROC22和BC2-32根系, 测定其固氮酶活性。利用SH培养基培养的ROC22根系, 其固氮酶活性高于其他培养基75倍以上(图3-A), 也高出SH培养BC2-32的根系固氮酶活性25倍(图3-B); 其他四种培养基对两个甘蔗品种根系固氮酶活性的影响不大。值得一提的是, LGI、SNX、JNFb 和Mal等四种培养基培养的BC2-32根系固氮酶活性在 $4.80\sim 10.09 \text{ nmol}(\text{C}_2\text{H}_4)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 之间变化, 均普遍高于在 $0.74\sim 1.17 \text{ nmol}(\text{C}_2\text{H}_4)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 范围的ROC22根系固氮酶活性(图3)。上述结果表明, ROC22甘蔗根部存在固氮酶活性较高、且嗜好SH培养基的优势固氮菌株系。

3 不同培养基对甘蔗叶部固氮酶活性的影响

利用不同培养基分别培养不同甘蔗品种伸长期的+2、+3、+4和+5叶片, 进行固氮酶活性测定。结果如图4所示, ROC22和BC2-32不同叶位的固氮酶活性在LGI、SNX和SH条件下均明显高于JNFb和Mal处理。在ROC22中(图4-A), 同一培养基类型不同叶位的固氮酶活性差异不明显。同时, 在BC2-32中(图4-B), 除+4及+5叶的固氮酶活性在LGI条件下明显低于+2及+3叶外, 其他培养条件下不同叶位固氮菌的固氮酶活性与ROC22的变化趋势相类似。然而, ROC22不同叶位的固氮酶活性普遍高于BC2-32, 尤其是在LGI、SNX和SH条件下: ROC22固氮酶活性最低是 $103.66 \text{ nmol}(\text{C}_2\text{H}_4)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$, 最高为 $362.65 \text{ nmol}(\text{C}_2\text{H}_4)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 。

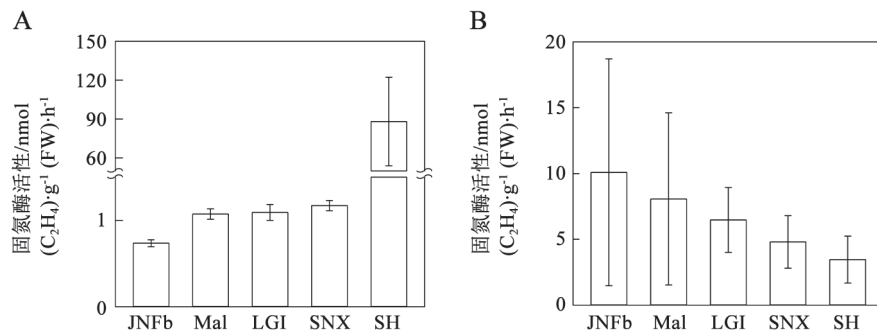


图3 不同培养基对甘蔗根部固氮酶活性的影响

Fig.3 Effects of different culture medium on nitrogenase activities in roots of sugarcane

A: ROC22; B: BC2-32。

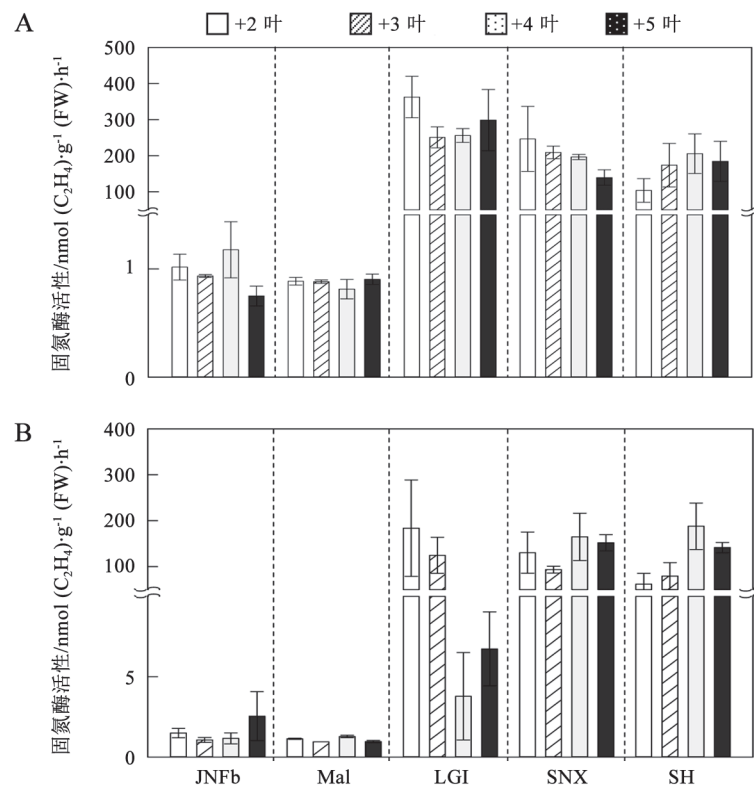


图4 不同培养基对甘蔗不同叶位固氮酶活性的影响

Fig.4 Effects of different culture medium on nitrogenase activities in different leaves of sugarcane

A: ROC22; B: BC2-32。

(FW)·h⁻¹; BC2-32的固氮酶活性最低为3.78 nmol (C₂H₄)·g⁻¹ (FW)·h⁻¹, 最高为187.96 nmol (C₂H₄)·g⁻¹ (FW)·h⁻¹。说明在伸长期, 不同甘蔗品种+2、+3、+4和+5叶片中均存在大量的, 以蔗糖为碳源的内生固氮菌, LGI、SNX和SH培养基更适合用于甘蔗叶片固氮酶活性测定时的前培养; ROC22栽培品种叶片的固氮效率更高。

4 不同培养基对甘蔗茎部固氮酶活性的影响

利用5种不同培养基分别培养不同甘蔗品种伸长期的蔗茎, 进行固氮酶活性测定。结果如图5所示, 在不同培养基条件下, 甘蔗+2、+3、+4和+5茎的固氮酶活性不同。在ROC22中, LGI、SNX和SH培养条件下+2和+3茎的固氮酶活性明显高于+4和+5茎, 而JNFb处理结果相反, 即+4和+5茎的固

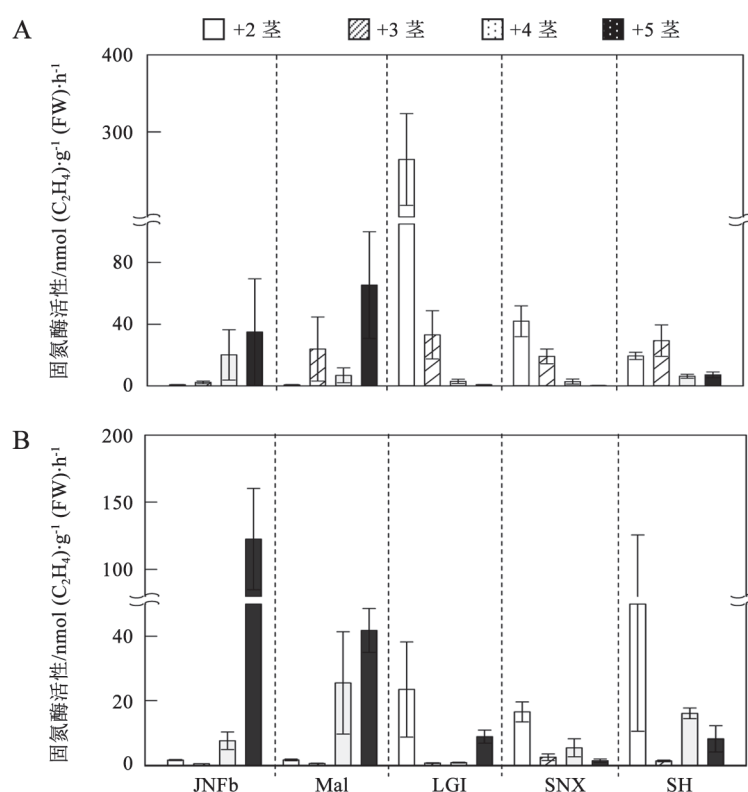


图5 不同培养基对甘蔗不同茎固氮酶活性的影响

Fig.5 Effects of different culture medium on nitrogenase activities in different stems of sugarcane

A: ROC22; B: BC2-32。

氮酶活性明显高于+2和+3茎; 在Mal培养基条件下, 不同茎的固氮酶活顺序为: +5>+3>+4>+2 (图5-A)。在BC2-32中, 利用JNFb和Mal培养基处理的+4和+5茎的固氮酶活性明显高于+2和+3茎; 利用LGI处理的+2和+5茎的固氮酶活性高于+3和+4茎, 而SNX处理的+2和+4茎与+3和+5茎相比, 固氮酶活性较高; 在SH培养基条件下, 不同茎的固氮酶活性顺序为: +2>+4>+5>+3 (图5-B)。说明, 甘蔗不同茎中的固氮菌对培养基存在较强选择性, 在同一培养基条件下不同茎的固氮酶活性存在较大差异。所以, 对于测定甘蔗不同茎的固氮酶活性而言, 较难筛选和使用一种适宜的培养基对蔗茎进行前培养。

讨 论

甘蔗是光合高效的C₄作物, 生物量大, 对氮肥需求高。同时, 甘蔗还是典型的联合固氮作物。由于内生固氮菌的生物固氮作用, 能满足甘蔗生长所需氮量的60% (Urquiaga等1992)。然而, 内生固氮菌种类较多, 对生长底物具有不同嗜好性

(Cavalcante和Döbereiner 1988)。因此, 筛选适宜的培养基对宿主组织进行预培养, 是研究联合固氮菌、测定固氮酶活性, 进而评价甘蔗联合固氮能力的基础。本研究利用不同培养基包括: JNFb、Mal、LGI、SNX及SH, 对不同甘蔗品种不同组织部位固氮酶活性进行了评价。结果发现, 甘蔗不同组织部位固氮酶活性存在差异。在甘蔗生长伸长期(图1-B), 除ROC22根系在SH条件下, 具有较高的固氮酶活性外, 其他培养基处理下, 不同甘蔗根系中的固氮酶活性均较低(图3); 而LGI、SNX及SH培养条件下, 甘蔗不同叶位的固氮酶活性均较高, 适合选择此三种培养基测定甘蔗伸长期不同叶位的固氮酶活性, 进而评价其固氮效率(图4); 对于蔗茎而言, 对培养基成分具有较强的选择性, 不同培养基条件下, 不同甘蔗茎的固氮酶活性不同, 较难选择某一种较优的培养基来评价某一叶位所对应蔗茎的固氮能力(图5)。

此外, 已有研究指出, 甘蔗不同组织中固氮菌的固氮酶活性在各个生长季节存在差异, 随着植

株的生长,其固氮酶活性呈现“不断上升-达到最高-逐渐下降”的变化,这种变化可能与甘蔗的氮营养需求规律、土壤养分、水分等状况有关(桂意云等2007; dos Reis Junior等2000)。因此,在本研究中,通过评价ROC22分蘖期和伸长期不同组织部位的固氮酶活性,发现根系在分蘖期是主要的固氮器官;而在伸长期,叶片成为固氮能力最强的部位,这可能与甘蔗组织发育状态、养分需要和固氮效率等息息相关。

联合固氮是一种固氮微生物为宿主提供氮源,同时从宿主不同组织获取碳水化合物的互惠互利关系。因此,能否为固氮微生物提供理想的碳源,是分离甘蔗联合固氮菌及测定固氮酶活性的主要因子之一。研究发现,甘蔗体内定殖多种不同的固氮菌,且利用碳源的种类不同(Cavalcante和Döbereiner 1988; Kirchof等1997)。例如,目前认为草螺菌和醋酸杆菌是甘蔗体内的专性内生固氮菌。其中,草螺菌嗜有机酸,而醋酸杆菌主要以蔗糖为碳源(邢永秀2006; Boddey等1991)。苹果酸是某些固氮微生物(如,根瘤菌)的碳源(Oldroyd等2011),是否也适用于联合固氮菌呢? 本研究所使用的五种培养基中, JNFb和Mal的碳源为苹果酸,而LGI、SNX和SH培养基的碳源为蔗糖。在甘蔗伸长期,以苹果酸为碳源的JNFb和Mal培养条件下,不同甘蔗品种的不同叶中的固氮酶活性均较低(图4); 而其他三种以蔗糖为碳源的培养基,不同叶位的叶中均具有很高的固氮酶活性(图4); 此外,以苹果酸为碳源的JNFb和Mal培养+2、+3、+4和+5茎,测定其固氮酶活性的结果中也表明,具有一定糖分积累的+4和+5茎的固氮酶活性明显高于+2和+3嫩茎,或者+4和+5蔗茎中定殖嗜苹果酸的内生固氮菌(图5); 而其他三种以蔗糖为碳源的培养基,可能由于嫩茎中本身糖分较少,需要外源蔗糖的缘故,致使+2嫩茎的固氮酶活性相对较高(图5)。这与共生固氮,例如,根瘤菌不同,其主要以苹果酸为碳源(Oldroyd等2011); 而甘蔗的联合固氮中,尤其是在甘蔗伸长期,叶部及嫩茎中定殖的内生固氮菌主要以蔗糖为碳源,可能是由于甘蔗本身就是积累蔗糖的糖料作物,在长期进化中,蔗糖不需要转化,直接成为固氮微生物的碳源。

ROC22是台湾选育甘蔗栽培品种,具有早

熟、高糖、稳产等特点; 而BC2-32是含有斑茅血缘的新品系,具有较强的抗逆性、适应性和宿根性(劳方业等2006)。通过评价上述两种甘蔗伸长期不同组织的固氮酶活性,发现ROC22根系固氮酶活性在SH培养条件下是BC2-32的25倍(图3)。暗示了ROC22具有高效固氮的品种优势,可能与本身高糖特性有关; 而两个甘蔗品种的叶和茎的固氮酶活性存在较为相似的变化趋势,说明甘蔗中也可能存在某些较为保守、且专性的内生固氮菌。上述结果可为筛选高效固氮的甘蔗品种及内生固氮菌株提供一些可参考的依据。

参考文献

- Baldani J, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J (1997). Recent advances in BNF with non-legume plant. *Soil Biol Biochem*, 29: 911-922
- Boddey RM (1995). Biological nitrogen fixation in sugarcane: a key to energetically viable biofuel production. *Crit Rev Plant Sci*, 14: 263-279
- Boddey RM, Urquiaga S, Reis V, Döbereiner J (1991). Biological nitrogen fixation associated with sugarcane. *Plant Soil*, 137: 111-117
- Cavalcante VA, Döbereiner J (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*, 108: 23-31
- dos Reis Junior FB, Reis VM, Döbereiner J (2000). Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant Soil*, 219: 153-159
- Döbereiner J (1961). Nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugarcane. *Plant Soil*, 15: 211-216
- Döbereiner J (1997). Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol Biochem*, 29: 771-774
- Döbereiner J, Day JM, Dart PJ (1972). Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugarcane and some other grasses. *Plant Soil*, 37: 191-196
- Gui YY, Liu XH, Yang RZ, Li YR (2007). Detection of nitrogenase activities in different parts of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Plant Physiol Commu*, 43: 291-294 (in Chinese with English abstract) [桂意云, 刘昔辉, 杨荣仲, 李杨瑞(2007). 甘蔗不同部位的固氮酶活性检测. *植物生理学通讯*, 43: 291-294]
- Guo JH, Liu XJ, Zhang Y, Shen JL, Han WX, Zhang WF, Christie P, Goulding KWT, Vitousek PM, Zhang FS (2010). Significant acidification in major Chinese croplands. *Science*, 327: 1008-1010
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*, 311: 1-18
- James EK, Olivares FL, Baldani JI, Döbereiner J (1997). *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *J Exp Bot*, 98: 532-541
- Kirchof G, Reis VM, Baldani JI, Eckert B, Döbereiner J (1997).

- Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant Soil*, 194: 45–55
- Lao FY, Fu C, Chen ZH, Chen JW, Zhang CM, Yang YH, Deng HH (2006). Molecular identification of genuine hybrids from the cross of *Saccharum* and *E. arundinaceu*. *Sugarcane Canesugar*, 1: 6–11 (in Chinese with English abstract) [劳方业, 符成, 陈仲华, 陈健文, 张垂明, 杨业后, 邓海华(2006). 斑茅杂交后代的分子鉴定. *甘蔗糖业*, 1: 6–11]
- Li YR, Yang RZ, Fang FX, Gui YY, Zhou H, Liu XH (2009). A method to measure the azotobacter nitrogenase activity within sugarcane: CN101381763A. 2009-03-11 [李杨瑞, 杨荣仲, 方锋学, 桂意云, 周会, 刘惜辉(2009). 一种测定甘蔗体内固氮菌固氮酶活性的方法: CN101381763A. 2009-03-11]
- Lin L, Guo W, Xing Y, Zhang X, Li Z, Hu C, Li S, Li Y, An Q (2012). The actinobacterium *Microbacterium* sp. 16SH accepts pB-BR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N₂ associated with micropropagated sugarcane plants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 1185–1195
- Lin L, Li Z, Hu C, Zhang X, Chang S, Yang L, Li Y, An Q (2012). Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. *Microbes Environ*, 27: 391–398
- Liu XJ, Zhang FS (2011). Nitrogen fertilizer induced greenhouse gas emissions in China. *Curr Opin Env Sust*, 3: 407–413
- Magnani GS, Weber CH, Bessalho JC, Daros E, Baura V, Yates MG, Monteiro RA, Faoro H, Pedrosa FO, Souza EM (2013). Culture-independent analysis of endophytic bacterial communities associated with Brazilian sugarcane. *Genet Mol Res*, 12: 4549–4558
- Muthukumarasamy R, Kang UG, Park KD, Jeon WT, Cho YS, Kwon SW, Song J, Roh DH, Revathi G (2006). Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *J Appl Microbiol*, 102: 981–991
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet*, 45: 119–144
- Palus JA, Borneman J, Ludden PW, Triplett EW (1996). A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. *Plant Soil*, 186: 135–142
- Roesch LFW, de Quadros PD, Camargo FAO, Triplett EW (2007). Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World J Microbiol Biotechnol*, 23: 1377–1383
- Roesch LFW, Olivares FL, Pereira Passaglia LM, Selbach PA, Saccol de Sá EL, Oliveira de Camargo FA (2006). Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. *World J Microb Biot*, 22: 967–974
- Urquiaga S, Cruz KHS and Boddey RM (1992). Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci Soc Am J*, 56: 105–114
- Urquiaga S, Xavier RP, de Moraes RF, Batista RB, Schultz N, Leite JM, Maia e Sá J, Barbosa KP, de Resende AS, Alves BJR, et al (2012). Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant Soil*, 356: 5–21
- Xing YX (2006). Isolation and identification of endophytic nitrogen fixation in sugarcane and growth characteristics (PhD thesis). Nanning: Guangxi University [邢永秀(2006). 甘蔗内生固氮细菌的分离、鉴定和生长特性(博士论文). 南宁: 广西大学]
- 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: 49–53
- Zhang FS, Chen XP, Vitousek P (2013). An experiment for the world. *Nature*, 497: 33–35

Evaluation on associative nitrogen fixation capability in different tissues of sugarcane

HU Hao-Nan¹, AO Jun-Hua², HUANG Xiao-Cai¹, LI Xin-Xin^{3,*}, LIAO Hong³

¹College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ²Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou 510642, China; ³Root Biology Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Using two sugarcane varieties including ROC22 cultivar and BC2-32 which harboring blood lineage from *Erianthus arundinaceus* as plant materials, an acetylene reduction method was employed to evaluate the nitrogen (N₂) fixation capability in different tissues of sugarcane. Results showed that, ROC22 had the higher nitrogenase activities in roots than other tissues, and thus might be the primary N₂ fixation organ at tillering stage. While sugarcane leaves had the highest nitrogenase activities when separately cultured by LGI, SNX and SH which providing with sucrose as the carbon source, and +4 and +5 stem with certain sugar accumulation showed relatively high nitrogenase activity when using JNFb and Mal which malate as carbon, suggested that sugarcane leaves predominantly colonized by sucrose-preferred endophytic diazotroph and possessing the highest N₂ fixation efficiency, and followed by sugarcane stalks at elongation stage. The nitrogenase activities in roots of ROC22 are more than 25 times than BC2-32 by using SH culture medium, elucidated that there are some N₂ fixation efficient and dominant azotobacter in ROC22, while it is showed the similar tendency of nitrogenase activities in different leaves and stalks in both two sugarcane varieties at elongation stage, indicated that ROC22 and BC2-32 mainly colonized by some conserved and specific strains of endophytic diazotroph which prefer sucrose as carbon source.

Key words: sugarcane; associative nitrogen fixation; nitrogenase activity; culture medium; tissue

Received 2016-11-14 Accepted 2017-02-08

This work was supported by the Efficient Joint Basic Research Project in Fujian Province (Grant No. 2017J01603).

*Corresponding author (E-mail: lixinxin0476@163.com).