

盐碱胁迫下一株促进苜蓿生长的细菌筛选与鉴定

向君亮¹,唐呈瑞²,王佳琦¹,刘 权¹,张兴梅³,殷奎德¹

(1.黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院,黑龙江 大庆 163319;2.中国科学院沈阳应用生态研究所,辽宁 沈阳 110016;
3.黑龙江八一农垦大学农学院,黑龙江 大庆 163319)

摘 要:为改良和利用盐碱地,本研究以大庆草原盐碱土为材料,在 Na₂CO₃ 和 NaHCO₃ 终浓度分别为 50、100 mmol · L⁻¹,pH 8.5 的条件下对其中耐盐碱细菌进行分离,并在 CAS 铁载体检测培养基、ADF 培养基、PKO 无机磷培养基等功能性培养基上对菌株的促生功能进行检测;利用 16S rDNA 序列分析法进行菌株的菌种鉴定,在 pH 8.5,25 mmol · L⁻¹ Na₂CO₃胁迫下测试菌株对苜蓿种子发芽率、发芽势及幼苗生长的影响。结果表明:筛选得到的菌株 S11 具有产植物激素 IAA 和产 ACC 脱氨酶功能;通过对菌株 16S rDNA 序列进行分析,初步鉴定菌株 S11 为堀越氏芽孢杆菌(*Bacillus horikoshii*)。盐碱胁迫条件下,浸种接菌处理苜蓿种子后,种子发芽率和发芽势分别提高了 15%和 10%,幼苗根长、株高、鲜重以及叶绿素含量分别增加了 34.78%、12.5%、27.3%和 43.30%,这证明菌株 S11 具有缓解盐碱胁迫促进苜蓿生长的功能。

关键词:耐盐碱促生菌;菌株筛选鉴定;盐碱土;苜蓿
中图分类号:S182;S432.4⁺2 **文献标志码:**A

Screening and identification of *Medicago Sativa* Linn growth promoting rhizobacteria under saline-alkali stress

XIANG Jun-liang¹, TANG Cheng-rui², WANG Jia-qi¹, LIU Quan¹, ZHANG Xing-mei³, YIN Kui-de¹

(1.College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;
2. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, Liaoning 110016, China;
3. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: In order to ameliorate and utilize saline-alkali soil, the saline-alkali soil was used to separate the saline-alkali-tolerant bacteria under pH 8.5, 50 mmol · L⁻¹ Na₂CO₃ and 100 mmol · L⁻¹ NaHCO₃. The growth-promoting function of the strain was tested by CAS, ADF, PKO and other functional medium. The 16S rDNA sequence analysis was used to identify the strains. The effect of the bacteria on the alfalfa seed germination rate, germination potential and seedling growth were investigated under pH 8.5 and 25 mmol · L⁻¹ Na₂CO₃. The results showed that strain S11 could produce IAA and ACC deaminase, and it was identified as *Bacillus horikoshii*. Under the saline-alkali condition and after inoculation of strain S11, alfalfa seed germination rate and germination potential were increased by 15% and 10%, respectively. The root length, plant height, fresh biomass, and chlorophyll content were increased by 34.78%、12.5%、27.3% and 43.30%, respectively. This proved that strain S11 could relieve saline-alkali stress and promote the growth of alfalfa.

Keywords: saline-alkali tolerance PGPR; screening and identification of strains; saline-alkali soil; *Medicago Sativa* Linn

土壤盐碱化严重制约着全球农牧业的发展,是当前亟待解决的问题之一。大庆地处松嫩平原西部,黑龙江省西南部,其盐碱化土壤主要为苏打盐碱化草甸土和沼泽化草甸土。据统计,大庆市共有

盐碱化土地 28.7 万 hm^2 , 约占全市总土地面积的 59.4%, 其中耕地 2.1 万 hm^2 , 约占耕地总面积的 20.9%, 其余为牧业和其它用地。近年来, 由于油田开发和其它人为因素的影响, 土壤盐碱化现象呈明显加重趋势^[1]。苜蓿被称为“牧草之王”, 其不仅蛋白质含量高, 产量大, 耐旱、耐寒、耐盐碱胁迫能力强, 还能够改善土壤环境, 增加土壤含氮量, 保持水土, 在生态治理与恢复、高效优质畜牧业打造以及优化农业生产结构方面具有重要作用。有研究表明, 苜蓿能在轻度盐碱地上种植, 但随着草原以及耕地土壤盐碱化程度的加剧, 可种植苜蓿的土地面积也逐渐减少^[2]。

近年来, 随着科技的发展, 盐碱地的生物改良手段得到进一步应用。微生物改良盐碱地的实践, 主要是利用对植物有促生作用的细菌在其根际定殖, 改善植物根际环境, 从而减轻盐碱胁迫对植物的生长抑制作用。植物根际促生菌 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) 可以通过固氮、溶磷、解钾、产植物激素 (IAA, GA 等)、产 ACC 脱氨酶、产铁载体以及诱导植物对生物及非生物胁迫的系统抗性来促进植物生长^[3-4]。大量研究表明, 在应对非生物胁迫方面, 根际有益微生物有增强植物耐受干旱胁迫、盐碱胁迫、重金属胁迫、养分亏缺等非生物胁迫能力。赵琦等^[5]研究发现, 混合盐碱胁迫下, 接种丛枝菌根真菌可以提高紫花苜蓿的存活率、株高、总生物量、可溶性蛋白质含量以及脯氨酸含量; 张福海等^[6]发现, 施用耐盐碱促生菌剂后, 能够显著提高盐碱环境下枸杞的产量及品质, 枸杞枝条的生长、叶片叶绿素含量、产量、百粒重及果实多糖含量均显著增加; 庞学兵等^[7]研究表明, 具有 ACC 脱氨酶活性的菌株能有效缓解盐碱胁迫对棉苗生长的抑制作用, 提高棉苗对盐碱胁迫的抵抗能力。由于盐碱地土壤含盐量和 pH 值都较高, 中性土壤中筛选得到的 PGPR 在盐碱环境中很难存活定殖, 所以一些在中性土壤中有很好促生效果的菌肥在盐碱土中施用很难发挥促生作用。在大庆市大面积的盐碱地中, 蕴藏着巨大的耐盐碱微生物资源, 必将具有重要的应用价值。本研究从盐碱土壤中分离筛选鉴定耐盐碱菌株, 并对其植物促生功能进行检测, 为研制和开发能够治理盐碱土壤的生物制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 盐碱土样品 本试验中的盐碱土样品于

2017 年 9 月采集于黑龙江省大庆市龙凤区未经人为破坏的盐碱地草原, 轻度盐碱土采集于地表无白色碱斑, 且植被覆盖度良好的地块, 其 pH 值为 8.34, 含盐量为 0.30%, 速效钾、有效磷、碱解氮分别为 398.00、19.20、315.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 有机质为 33.70 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 中度盐碱土样采集于地表有少量白色碱斑, 且有稀疏植被覆盖的地块, 其 pH 值为 9.77, 总含盐量为 0.85%, 速效钾、有效磷、碱解氮分别为 334.00、17.75、59.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 有机质为 7.50 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 重度盐碱土采集于地表具有大量白色碱斑且无植被覆盖地块, 其 pH 值为 10.46, 总含盐量为 1.43%, 速效钾、有效磷、碱解氮分别为 257.00、56.80、56.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 有机质为 1.72 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 非盐碱土样于 2017 年 9 月采集于黑龙江省八五零农场水稻田, 其 pH 值为 5.58, 含盐量为 0.06%, 速效钾、有效磷、碱解氮分别为 114.10、113.20、223.60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 有机质为 31.40 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 采样深度为地面 0~20 cm, 挑出枯草、草根及石块, 混匀。

1.1.2 培养基 基础培养基参照 Poli A 等^[8]的方法配制; 筛选培养基^[9]: 在基础培养基中加入 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 使其终浓度分别为 50、100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 调节 pH 值至 8.5; PKO 无机磷培养基按照 Gupta R 等^[10]的方法进行配制; 阿须贝无氮培养基参照李艳星等^[11]的方法进行配制; King 氏培养基参照 Glickmann E 等^[12]的方法进行配制; ADF 培养基参照刘莎莎^[13]的方法进行配制; CAS 铁载体检测培养基参照荣良燕等^[14]的方法进行配制。

1.1.3 植物种子 本试验使用的苜蓿品种为“敖汉”, 种子由黑龙江八一农垦大学草业科学实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化 称取 5 g 土壤样品置于装有 25 ml 无菌水的三角瓶中, 170 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 10 min, 静置片刻, 以此为原液, 吸取上清液稀释 10^{-4} 倍后涂于筛选培养基上。28℃ 培养 1 周后, 挑取单菌落划线培养, 传代至少 3 次, 直至获得纯种, 用 50% 甘油保存菌种, 于 -40℃ 冰柜中备用。

1.2.2 菌株的促生功能检测 分别参照 Rani Gupta 等^[10]、李艳星等^[11]、Eric Glickmann 等^[12]、刘莎莎^[13]以及荣良燕等^[14]的方法进行菌株解磷、固氮、产 IAA、产 ACC 脱氨酶、产铁载体能力的定性检测; 参照郑鹏^[15]、詹寿发等^[16]的方法对 ACC 酶活性以及 IAA 产量进行定量检测。

1.2.3 菌株 16S rDNA 序列分析 用“细菌基因组 DNA 提取试剂盒”提取菌株的总 DNA 后, 利用引物

27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)、1492R(5′-GGTTACCTTGTACGACTT-3′)扩增其 16S rDNA。PCR 扩增体系为:2× Taq mix 25 μL,引物各 1 μL,模板 1 μL,ddH₂O 补至 50 μL;反应条件:95℃ 5 min;94℃ 1 min-55℃ 1 min-72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,然后利用 PCR 产物纯化试剂盒纯化,纯化后 PCR 产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果在 NCBI Blast 进行序列比对,用 MEGA 7 做系统发育树。

1.2.4 种子的处理及幼苗生长 将菌株接种于基础培养基中,37℃,175 r·min⁻¹振荡培养 24 h 后,10 000 g 离心 15 min,弃上清,沉淀用无菌生理盐水洗涤 3 次后重悬,菌悬液稀释至 10⁸ CFU·mL⁻¹,将苜蓿种子经表面消毒后,按表 1 的处理方法对种子进行处理,CK 和 B 处理组分别为在非盐碱胁迫下生理盐水和菌悬液浸种,S 和 BS 处理组为盐碱胁迫下生理盐水和菌悬液浸种,培养皿经封口膜封口后置于光照培养箱中 25℃,12 h/12 h 光/暗培养,培养 3 d 统计种子发芽势,培养 5 d 统计种子发芽率,培养 25 d 统计苗株高、根长和鲜重,用叶绿素仪测定幼苗叶片的 SPAD 值,SPSS 18.0 进行统计分析,Origin 8.5 作图。

2 结果分析

2.1 细菌分离结果

对非盐碱土、轻度、中度、重度盐碱土按 1:5 制备土壤浸提液后,将土壤浸提液稀释,涂布于 Na₂CO₃ 和 NaHCO₃ 终浓度分别为 50、100 mmol·L⁻¹,pH 8.5 的筛选培养基上培养 7 d 后,各处理中耐盐碱细菌的种类和数量有所不同,如图 1 所示。在非盐碱土中,经过多次反复培养,筛选培养基上未生长细菌菌落,说明在本试验设定的盐碱条件下,

表 1 苜蓿种子的处理方法

Table 1 The treatment of seeds			
处理组名 Treatement	浸种方式 Soaking method	培养皿中 Na ₂ CO ₃ 溶液加入量/ml Na ₂ CO ₃ solution volume	培养皿中无菌水加入量/ml Sterile water volume
CK	生理盐水 Physiological saline	0	10
	菌悬液 Bacterial suspensions	0	10
S	生理盐水 Physiological saline	10	0
	菌悬液 Bacterial suspensions	10	0

非盐碱土中几乎没有可培养的耐盐碱细菌。轻度盐碱土中,培养基上生长出少量不同形态的菌落,随着盐碱土盐碱程度的加重,培养基上生长的菌落数与种类均有所增加,证明本筛选方法适用于耐盐碱细菌的筛选。通过筛选,共得到 43 株不同菌落形态的耐盐碱细菌,编号为 S01-S43。

2.2 菌株促生功能鉴定

将分离得到的耐盐碱细菌分别接种于阿须贝无氮培养基、PKO 无机磷培养基、CAS 铁载体检测培养基、ADF 培养基以及 King 氏培养基中,37℃ 培养,对菌株的促生功能进行检测,结果如表 2 所示(无促生功能的菌株已剔除):共有 8 株细菌能在阿须贝无氮培养基上生长,具有固氮能力;没有菌株能在 PKO 无机磷培养基上产生透明的溶磷圈,故所有菌株均无解磷能力;有 6 株菌能在 CAS 铁载体检测培养基上产生橘黄色的晕圈,具有产铁载体的能力;有 3 株菌能在 ADF 培养基上生长,具有产 ACC 脱氨酶的能力;有 4 株菌的发酵液上清能与 S2 比色液反应显粉红色,故仅有 5 株菌能产 IAA。菌株 S11 虽然无固氮、解磷、产铁载体的能力,但其同时具有产 ACC 脱氨酶和产 IAA 的能力,且两种能力均强于其他菌株,而 ACC 脱氨酶可以降低植株体内乙烯含量,提高植物对盐碱胁迫的抗性,故选择菌株 S11 对其 ACC 脱氨酶活力以及产 IAA 量进行定量分析及后续试验;通过对菌株 ACC 脱氨酶的定量检测,结

表 2 各菌株所具有的促生功能情况统计表

Table 2 Statistics of the plant growth promoting function of each strain					
菌株编号 Strain number	固氮 Nitrogen fixation	解磷 Phosphate solubilizing	产铁载体 Production of siderophores	产 ACC 脱氨酶 Production of ACC deaminase	产 IAA Production of IAA
S01	++	-	-	-	-
S11	-	-	-	+++	++
S16	+	-	-	+	-
S18	+	-	-	-	+
S23	-	-	+	-	+
S24	-	-	+	-	-
S29	+	-	-	-	+
S30	-	-	+	+	-
S31	++	-	-	-	-
S34	-	-	++	-	-
S36	+	-	-	-	-
S38	+	-	-	-	-
S40	-	-	+	-	-
S41	+	-	-	-	+
S42	-	-	+	-	-

注:“+”表示该菌具有此项功能,“+”的数量多少表示该功能的强弱;“-”表示该菌无此项功能。
Note: “+” indicates that the strain has this function, and the number of “+” indicates the strength of this function; “-” indicates that the strain has no such function.

果显示:菌株 S11 的 ACC 脱氨酶活性为 $25.38 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;如图 2C 所示,菌株 S11 在 King 培养基中培养,每隔 12 h 取培养液上清液测定其 IAA 产量,结果发现,0~36 h IAA 产量增速最快,当培养到 60 h 时,IAA 产量几乎稳定在 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右,不再增长,故可以认为,菌株 S11 产 IAA 最佳培养时间为 48~60 h,其 IAA 产量最大为 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右。

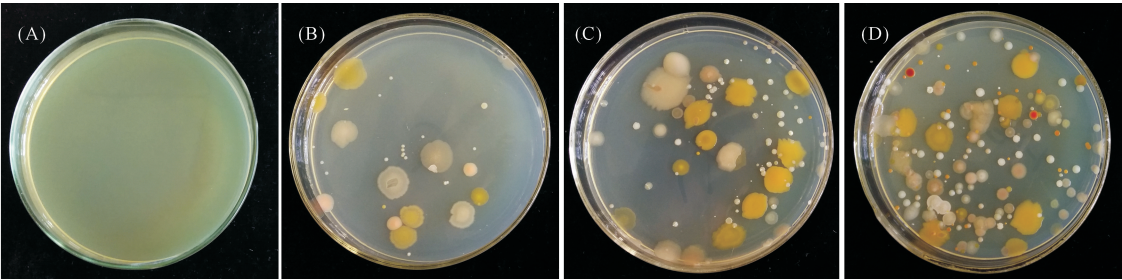
2.3 细菌菌种鉴定

对具有较好促生功能的菌株 S11 的基因组 DNA 进行提取后,利用引物 27F 与 1492R 对其 16S rDNA 进行 PCR 扩增,纯化后对序列进行测序,所得序列长度为 1 460 bp。将获得的序列片段在 NCBI 数据库中进行 Blast 序列比对分析,并挑选与该菌株 16S rDNA 序列最相似的模式菌株及其它不同种属的模式菌株,利用临近法在 Mega 7.0 软件上做系统发育树。如图 3 所示,菌株 S11 与模式菌株 *Bacillus horikoshii* DSMZ8719^T 在同一支上,遗传关系最为接近,其序列相似度为 97.94%,其它序列相似度较

高的菌株也均为芽孢杆菌属,所以初步判定 S11 为 *Bacillus horikoshii*。

2.4 菌株 S11 对盐碱胁迫下苜蓿种子发芽及幼苗生长的影响

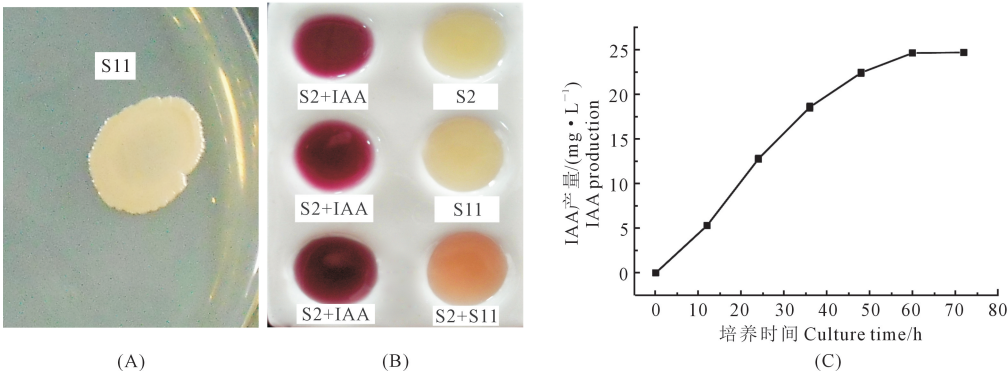
2.4.1 菌株 S11 对发芽率及发芽势的影响 将苜蓿种子在不同条件下进行处理后进行萌发试验,对不同处理条件下的苜蓿种子发芽势及发芽率进行统计,结果如图 4 所示,pH 8.5, 25 mM Na₂CO₃ 盐碱胁迫可以明显降低苜蓿种子发芽势和发芽率(*P* 值分别为 0.002 和 0.019),抑制苜蓿种子发芽,其发芽率仅为 55.00%;菌悬液浸种接菌后,苜蓿种子的发芽率明显上升(*P* = 0.043),达到 70.00%,而 CK 组的发芽率为 73.33%,菌株 S11 几乎消除了盐碱胁迫对种子萌发的抑制作用;与对照相比,在无盐碱胁迫下菌液处理后种子的发芽率无显著差异,表明菌液处理对种子的发芽率没有影响,但在盐碱胁迫下,苜蓿种子发芽受到抑制,接种菌株 S11 后能显著增强苜蓿种子对盐胁迫环境的耐受力,提高发芽率。



注:(A) 为非盐碱土,(B) 为轻度盐碱土,(C) 为中度盐碱土,(D) 为重度盐碱土。
Note:(A) Non saline-alkali soil; (B) Mild saline-alkali soil; (C) Moderate saline-alkali soil; (D) Heavy saline-alkali soil.

图 1 不同程度盐碱胁迫下细菌生长情况

Fig.1 Bacteria growth status in different degrees of saline-alkali stress



注:(A)产 ACC 脱氨酶定性检测结果;(B)产 IAA 定性检测结果,其中 S2+IAA 为阳性对照,S2 为比色液,S11 为菌株培养液上清液;(C)不同培养时间 IAA 产量。
Note: (A) Production of ACC deaminase; (B) IAA production, S2+IAA is a positive control, S2 is a colorimetric solution, S11 is a culture supernatant of the strain; (C) IAA production at different culture times.

图 2 菌株 S11 促生功能鉴定结果

Fig.2 Growth promoting function identification results of strain S11

2.4.2 菌株 S11 对幼苗生长的影响 幼苗在光照培养箱中培养 25 d 后,测定幼苗的根长、株高、鲜重以及叶绿素含量,结果如图 5 所示,非盐碱处理下接种接菌后,幼苗的根长、株高以及叶绿素含量与对照相比无显著变化,但鲜重显著增加($P=0.000$);与对照相比,在碱胁迫条件下,苜蓿幼苗的根长、株

高、鲜重和叶绿素含量均显著降低,幼苗的生长受到了抑制;盐碱胁迫后接种 S11,幼苗的根长、鲜重和叶绿素含量较盐碱胁迫下显著增加(P 值分别为 0.002,0.000 和 0.000);可见,芽孢杆菌 S11 可以缓解轻度盐碱条件对苜蓿幼苗生长的胁迫作用,促进幼苗生长。

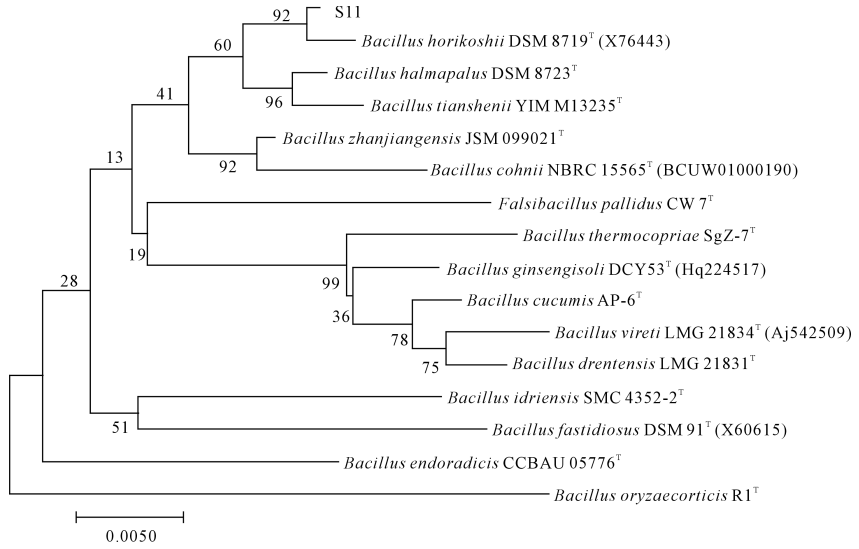
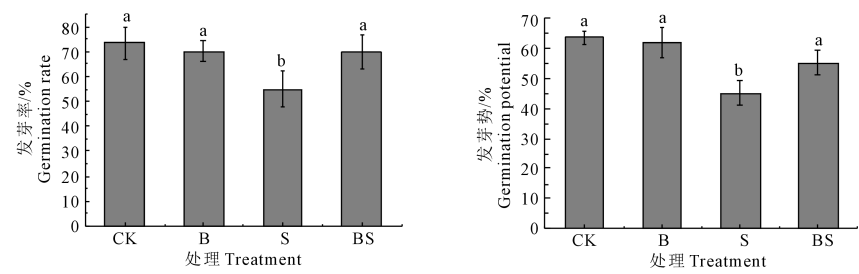


图 3 菌株 S11 系统发育树
Fig.3 The phylogenetic tree of strain S11



注:同一指标不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同。
Note: The different letters in the same index mean significant difference at $P<0.05$, the same below.

图 4 不同处理对苜蓿种子发芽率及发芽势的影响

Fig.4 Effects of different treatments on germination rate and germination potential of alfalfa seeds

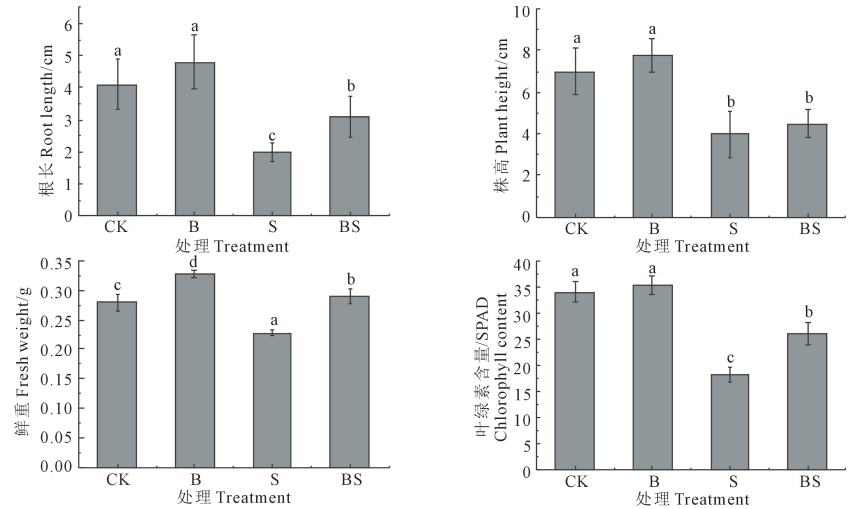


图 5 不同处理对幼苗生理指标的影响

Fig.5 Effects of different treatments on physiological indexes of seedlings

3 讨 论

植物根际促生菌(PGPR)是一类存在于植物根际周围,并且能够通过其自身特有的功能,如固氮、溶磷、解钾、产植物激素或 ACC 脱氢酶等直接或间接促进植物生长的微生物。从 1922 年 Lipman 等报道了小麦上的 PGPR 到现在,研究人员已分离出许多具有促生功能的细菌并制成了微生物菌剂应用于生产实践中^[3]。大多数 PGPR 很难适应盐碱环境,难以存活,所以普通生物菌肥在盐碱地应用起来具有很大难度。本试验从大庆地区盐碱草原土壤中分离得到了一株耐盐碱菌,经过促生功能检测,其具有产植物激素 IAA 及 ACC 脱氢酶功能,我们在前期研究中发现,菌株 S11 能在 $0.3\sim 3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Na}^{+}$ 浓度, pH 8.0~11.5 的环境下生长,而大庆地区轻度盐碱土的 pH 值在 8.5 左右^[14],故判断菌株 S11 对大庆地区的盐碱土具有良好的适应能力,具有一定的应用价值。

自然环境中,非生物逆境胁迫并不是单一存在的,它们往往多个同时作用于植物,如本试验中的盐、碱同时胁迫。松嫩平原是我国最大的苏打型盐渍区,其土壤中的盐碱类型以 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 为主。盐胁迫下,过多的 Na^{+} 可抑制植物对 NO_3^{-} 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等必需元素的吸收,还可以造成细胞结构的损坏。过量的 CO_3^{2-} 和 HCO_3^{-} 造成土壤的 pH 值升高,使植物根系对必需元素吸收能力下降,破坏胞内离子平衡,这样更加剧了 Na^{+} 对细胞的毒害作用,直接或间接抑制根细胞的分裂、生长和细胞膜的电渗透性,使根对离子的选择性吸收能力下降或丧失^[17-19]。颜宏等^[20]研究表明, pH 胁迫对植物生长的破坏程度最大,其次是离子毒害和渗透胁迫。

乙烯是植物体内合成的一种重要激素,可以帮助植物种子打破休眠,促进植物的成熟与衰老^[21]。当植物遇到逆境胁迫时,其乙烯的合成量会显著增加,这就直接导致了植物的衰老。细菌产生的 ACC 脱氢酶可以帮助植物分解掉乙烯的合成前体 ACC,将其代谢成 α -丁酮酸和氨,并将其作为碳氮源利用,供应细菌生长需求,这样,一方面使其不断向体外分泌 ACC,降低了植物体内的 ACC 含量从而减少乙烯的合成量,减轻了盐碱胁迫下乙烯对植物的毒害^[22],提高了植物对环境胁迫的耐受力;另一方面细菌从 ACC 的分解产物中获得生长所必需的碳氮源,使得这个共生关系良好地被维持着。

本研究中,在非盐碱胁迫条件下接种菌株 S11

后,苜蓿种子的发芽率、发芽势、株高、根长和叶绿素含量与对照相比并没有显著差异,这说明菌株 S11 在正常情况下对苜蓿的促生长作用并不明显,可能是因为正常处理时的环境不适宜菌株的生长,没有在幼苗的根部定植,从而未发挥促生长作用。在盐碱胁迫条件下,苜蓿种子的发芽率比正常条件下下降 18.33%,发芽势也明显低于对照组 ($P=0.002$),在接种 S11 后,苜蓿种子的发芽率提高到 70%,几乎完全消除了盐碱胁迫对苜蓿种子发芽的抑制作用,拓宽了苜蓿在盐碱胁迫下生长的生态幅,增加了盐碱地种植苜蓿的可行性。在盐碱胁迫条件下,苜蓿幼苗的株高、根长、鲜重和叶绿素含量分别下降了 42.86%、43.90% 和 46.36%,这与前人的研究结果相一致^[23]。虽然处理使用的 Na_2CO_3 浓度仅 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,盐浓度并不高,但其存在大量的 CO_3^{2-} ,这就使得非生物胁迫不仅有盐胁迫,还存在碱胁迫,研究表明,碱胁迫对植物的危害远远大于盐胁迫对植物的危害^[2],这可能是抑制苜蓿生长的最主要原因。盐碱胁迫可以抑制植株叶片中的叶绿素合成,从而导致植株的光合速率降低,生长受到抑制。在接种芽孢杆菌 S11 后,幼苗鲜重和叶绿素含量分别提高了 27.31% 和 43.30%,这可能是细菌产 ACC 脱氢酶降低了幼苗体内乙烯含量,从而减轻盐碱胁迫对叶绿素合成的抑制作用,缓解了盐碱胁迫对幼苗叶片光合速率的影响,提高光合效率,增强了苜蓿幼苗对盐碱胁迫的耐受能力,这与庞学兵等^[7]研究结果相一致。刘冠一等^[21]研究发现,接种促生菌后可以明显增加盐碱胁迫下紫花苜蓿的株高、根长、地上部干重和根干重;Ramadoss 等^[24]发现用耐盐细菌菌株 (*Halobacillus sp* 和 *Bhalodenitrificans*) 接种后,可以提高小麦对盐胁迫的耐受力并促进小麦的生长,增加其产量;Bharti N 等^[25]也发现,当接种了 3 种耐盐促生细菌(短小芽孢杆菌 STR2,盐单胞菌 (*Halomonas desiderata*) 和微小杆菌 (*Exiguobacterium oxidotolerans* STR36) 后,薄荷的耐盐性增加。随着盐胁迫程度的提高,薄荷的鲜重、叶茎比和产油量逐渐下降,在接种 PGPR 后,植株渐渐修复了这种伤害,在中低盐度胁迫下,达到了较高的产量。

吲哚乙酸(IAA)是植物体内普遍存在的天然生长素,低浓度的 IAA 可以促进主根伸长,高浓度的 IAA 能促进侧根的形成和根毛的增加,菌株分泌一定量的 IAA 可以有效地促进植物根系新陈代谢,有助于植物吸收土壤中的营养。IAA 有多种合成途径,其最主要的是色氨酸途径^[26]。本试验在含有色

氨酸的 King 培养基中培养菌株,经检测,其能产生 IAA,最大产量在 24 mg · L⁻¹左右。盐碱胁迫下,苜蓿幼苗根的生长受到明显抑制,其根长较正常条件下下降 43.90%,而在接种菌株 S11 后,幼苗根长所受到的抑制作用明显得到缓解,根长较盐碱胁迫下增加了 34.78%,这可能是因为菌株产生了少量的 IAA,低浓度的 IAA 可以促进植物根的伸长,从而缓解了盐碱胁迫对根的抑制作用;在接种菌株后,幼苗株高相对于盐碱胁迫下变化不显著,这和人报道的 IAA 对根的影响大于茎的结果相符合,也侧面验证了菌株产生的 IAA 缓解了盐碱胁迫对幼苗生长的抑制作用,增强了苜蓿的耐盐碱能力。菌株 S11 对苜蓿的具体促生机理以及菌株的耐盐碱机理还有待于进一步研究。

4 结 论

本研究从大庆草原盐碱土壤中分离得到一株具有产植物激素 IAA 及产 ACC 脱氨酶功能的菌株,初步鉴定为堀越氏芽孢杆菌(*Bacillus horikoshii*);在盐碱胁迫条件下,接种菌株 S11 后能显著增加苜蓿种子的发芽率、发芽势、根长、株高、鲜重以及叶绿素含量,缓解盐碱胁迫对苜蓿的抑制作用,促进苜蓿生长。

参 考 文 献:

[1] 王爽.大庆盐碱土可培养嗜盐细菌与古菌多样性及多相分类研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2011.

[2] 武伟,田雨,张红香,等.盐、碱胁迫与温度对黄花苜蓿种子发芽的影响[J].草业科学,2015(11):1847-1853.

[3] Parray J A, Jan S, Kamili A N, et al. Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2016,35(3):877-902.

[4] 蔺吉祥,高战武,王颖,等.盐碱胁迫对紫花苜蓿种子发芽的协同影响[J].草地学报,2014,22(2):312-318.

[5] 赵琦,包玉英.混合盐碱胁迫下丛枝菌根真菌对紫花苜蓿生长及 2 种酚酸含量的影响[J].西北植物学报,2015,35(9):1829-1836.

[6] 张福海,罗会,崔松山,等.耐盐促生菌剂对盐碱环境下枸杞生长的影响[J].园艺与种苗,2017,(7):33-35.

[7] 庞学兵,王朝阳,王爱英,等.根际促生菌对棉苗盐碱胁迫的缓解效应[J].西北农业学报,2017,(1):101-109.

[8] Poli A, Esposito E, Orlando P, et al. Halomonas alkaliantarctica sp nov., isolated from saline lake Cape Russell in Antarctica, an alkalophilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium

[J]. Systematic and Applied Microbiology,2007,30(1):31-38.

[9] 石伟.极端盐碱土壤细菌的分离筛选及抗盐特性研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2011.

[10] Gupta R, Singal R, Shankar A, et al. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms [J]. Journal of General & Applied Microbiology,2006,40(3):255-260.

[11] 李艳星,郭平毅,孙建光.块根块茎类作物内生固氮菌分离鉴定、系统发育与促生特性[J].中国农业科学,2017,(1):104-122.

[12] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied & Environmental Microbiology,1995,61(2):793-796.

[13] 刘莎莎.植物根际促生菌互作提高苜蓿抗盐碱能力研究[D].哈尔滨:哈尔滨师范大学,2016.

[14] 荣良燕,姚拓,赵桂琴,等.产铁载体 PGPR 菌筛选及其对病原菌的拮抗作用[J].植物保护,2011,(1):59-64.

[15] 郑鹏.ACC 脱氨酶根际促生菌的分离鉴定及其对于干旱胁迫下玉米甜菜碱代谢的影响[D].咸阳:西北农林科技大学,2015.

[16] 詹寿发,卢丹妮,毛花英,等.2 株溶磷、解钾与产 IAA 的内生真菌菌株的筛选、鉴定及促生作用研究[J].中国土壤与肥料,2017,(3):142-151.

[17] 尉晶.浅析盐碱胁迫对燕麦种子萌发和幼苗的影响[J].黑龙江八一农垦大学学报,2017,(5):13-15,88.

[18] 李波,于海龙.苏打盐碱胁迫下不同来源苜蓿品种抗盐性综合评价[J].草地学报,2017,25(1):204-208.

[19] 张飞鹏,林志伟,张振南,等.大庆盐碱土中微生物的分离及芽孢杆菌的鉴定[J].黑龙江八一农垦大学学报,2011,23(5):6-8.

[20] 颜宏,赵伟,尹尚军,等.羊草对不同盐碱胁迫的生理响应[J].草业学报,2006,15(6):49-55.

[21] 刘冠一,刘艳玲,刘博文,等.含 ACC 脱氨酶活性的复合菌株提高苜蓿抗盐碱能力研究[J].核农学报,2017,(5):1022-1028.

[22] Ullah A, Heng S, Munis M F H, et al. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review [J]. Environmental and Experimental Botany,2015,117:28-40.

[23] 殷丽华,徐鹏,柯希望,等.混合盐碱胁迫对绿豆种子萌发与幼苗生长发育的影响[J].黑龙江八一农垦大学学报,2015,(5):40-43.

[24] Ramadoss D, Lakkineni V K, Bose P, et al. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats[J]. Springer plus,2013,2(1):1-7.

[25] Bharti N, Barnawal D, Awasthi A, et al. Plant growth promoting rhizobacteria alleviate salinity induced negative effects on growth, oil content and physiological status in Mentha arvensis[J]. Acta Physiologiae Plantarum,2014,36(1):45-60.

[26] Xie Y, Han S, Li X, et al. Ameliorates of salt stress on bermuda grass by the fungus aspergillus aculeatus[J]. Molecular plant-microbe interactions,2017,30(3):245-254.