DOI: 10.5846/stxb201907311619
姚丹,牛舒琪,赵祺,曹靖,韩庆庆,李慧萍,缑晶毅,张金林.梭梭根际枯草芽孢杆菌 WM13-24 对多年生黑麦草耐盐性的影响.生态学报,2020,40(20):7419-7429.
Yao D, Niu S Q, Zhao Q, Cao J, Han Q Q, Li H P, Gou J Y, Zhang J L.Induced salt tolerance of ryegrass by *Bacillus subtilis* strain WM13-24 from the rhizosphere of *Haloxylon ammodendron*.*Acta Ecologica Sinica*,2020,40(20):7419-7429.

梭梭根际枯草芽孢杆菌 WM13-24 对多年生黑麦草耐盐性的影响

姚 丹[1,2],牛舒琪[1,2],赵 祺[1,2],曹 靖[1],韩庆庆[1,2],李慧萍[1,2],缑晶毅[1,2],张金林[1,2,*]

1 兰州大学草地农业生态系统国家重点实验室草地微生物研究中心, 兰州 730020
2 农业农村部草牧业创新重点实验室,草地农业教育部工程研究中心,兰州大学草地农业科技学院, 兰州 730020

摘要:以从梭梭根际分离得到的促生细菌枯草芽孢杆菌 WM13-24 为供试菌株,大肠杆菌 DH5α 和枯草芽孢杆菌 GB03 分别为阴性对照和阳性对照,研究 WM13-24 对多年生黑麦草耐盐性的影响。结果表明:1) 在不同浓度 NaCl 处理 (0, 150 和 300 mmol/L)下,接种 WM13-24 提高了黑麦草的生物量、叶绿素含量、根长和根系活力。尤其是在 150 mmol/L NaCl 胁迫下,与空白对照相比,接种 WM13-24 处理的黑麦草植株叶绿素 a 和叶绿素 b 含量分别显著提高 44.05%和 53.79%,根长和根系活力分别显著提高 69.21%和 49.47% ($P<0.05$);300 mmol/L NaCl 胁迫下,根长和根系活力分别显著提高 24.07%和 58.48% ($P<0.05$)。2) 不同浓度 NaCl 胁迫下,接种 WM13-24 提高了黑麦草的过氧化氢酶活性,降低了相对质膜透性和丙二醛含量。尤其是在 300 mmol/L NaCl 胁迫下,与空白对照相比,接种 WM13-24 显著提高黑麦草叶片过氧化氢酶活性 64.21%,相对质膜透性和丙二醛含量分别显著降低了 24.56%和 54.24% ($P<0.05$)。3) 不同浓度 NaCl 胁迫下,接种根际有益细菌提高了黑麦草的可溶性糖和脯氨酸含量,降低了叶片渗透势,尤其在 300 mmol/L NaCl 胁迫下,与空白对照相比,接种 WM13-24 分别显著提高黑麦草叶片可溶性糖和脯氨酸含量 84.41%和 82.71% ($P<0.05$)。4) 接种根际有益细菌提高了在不同浓度 NaCl 胁迫下黑麦草地上部和根中的 K^+ 含量,降低了 Na^+ 含量,从而提高了 K^+/Na^+ 比,尤其是在 300 mmol/L NaCl 胁迫下,与空白对照相比,接种 WM13-24 显著提高根中的 K^+/Na^+ 比 87.93% ($P<0.05$)。本研究结果为利用荒漠植物根际促生细菌提高草类植物耐盐性和在盐碱地区建植牧草和草坪草奠定了一定的理论和实践基础。

关键词:梭梭;根际促生细菌;多年生黑麦草;盐胁迫;耐盐性

Induced salt tolerance of ryegrass by *Bacillus subtilis* strain WM13-24 from the rhizosphere of *Haloxylon ammodendron*

YAO Dan[1,2], NIU Shuqi[1,2], ZHAO Qi[1,2], CAO Jing[1], HAN Qingqing[1,2], LI Huiping[1,2], GOU Jingyi[1,2], ZHANG Jinlin[1,2,*]

1 *State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, Lenter for Grassland Nicrobime, Lanzhou University, Lanzhou* 730020, *China*
2 *Key Laboratory of Grassland Livestock Industry Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Engineering Research Center of Grassland Industry, Ministry of Education; College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou* 730020, *China*

Abstract: In this paper, the effects of a PGPR strain, *Bacillus subtilis* WM13-24 isolated from the rhizosphere of *Haloxylon ammodendron*, on salt tolerance of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) were investigated. At the same time, *Escherichia*

基金项目:国家重点研发计划(2019YFC0507703);国家自然科学基金项目(31222053,31801944)
收稿日期:2019-07-31; **网络出版日期**:2020-08-27

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: jlzhang@lzu.edu.cn

coli DH5α and *B. subtilis* GB03 were used as the negative control and the positive control, respectively. The results were as follows: 1) under various salt treatments (0, 150 and 300 mmol/L NaCl), inoculation of WM13-24 increased the biomass, chlorophyll content, root length and root vigour of ryegrass. Especially, under 150 mmol/L NaCl, inoculation of WM13-24 increased the contents of leaf chlorophyll a and chlorophyll b significantly by 44.05% and 53.79%, respectively, and the root length and root vigour significantly by 69.21% and 49.47%, respectively, compared with the blank control ($P<0.05$). Under 300 mmol/L NaCl, root length and root vigour were increased significantly by 24.07% and 58.48% by inoculation of WM13-24, respectively ($P<0.05$). 2) Under various NaCl treatments, inoculation of WM13-24 increased catalase (CAT) activity and reduced relative membrane permeability (RMP) and malondialdehyde (MDA) content of ryegrass. Especially, under 300 mmol/L NaCl, CAT activity of ryegrass was increased significantly by 64.21%, and relative membrane permeability and MDA content were reduced significantly by 24.56% and 54.24% by inoculation of WM13-24, respectively ($P<0.05$). 3) Under various NaCl treatments, inoculation of the PGPR strains increased soluble sugar and proline contents and reduced osmotic potential of ryegrass. Especially, under 300 mmol/L NaCl, the contents of soluble sugar and proline in ryegrass plants inoculated with WM13-24 were significantly increased by 84.41% and 82.71%, respectively ($P<0.05$). 4) Inoculation of the PGPR strains increased K^+ content in both shoots and roots of ryegrass under various NaCl treatments, and decreased Na^+ content, resulted in increased K^+/Na^+ ratio. Especially, under 300 mmol/L NaCl, root K^+/Na^+ ratio of ryegrass plants inoculated with WM13-24 was increased significantly by 87.93% ($P<0.05$). In summary, this study laid a theoretical and practical basis for the application of PGPR from the rhizosphere of desert plants in improving the salt tolerance of grass and forage plants and cultivating forage crops and turf grasses in saline-alkali areas.

Key Words: *Haloxylon ammodendron*; PGPR; perennial ryegrass; salt stress; salt tolerance

土壤盐渍化是降低植物生产力、制约农业发展的主要非生物胁迫因素之一[1]。全球大约 10 亿 hm^2 的土壤受到盐渍化的威胁,中国盐渍化土地约占全球盐渍土面积的 1/10[2]。盐胁迫对植物的影响主要有:盐离子毒害、减弱植物吸水能力、产生氧化胁迫、使叶片膨胀受损并诱导气孔关闭和降低光合能力等,从而降低其生物量和繁殖成功率,阻碍农业生产的发展[2-5]。土壤盐渍化导致可用土地面积大量减少,土地可利用率降低,生产成本增加,成为可持续农业生态系统发展的一个重大问题。

由于土壤盐渍化进程的加快和草地灌溉中污水使用量的增加,在许多地区草坪草受到土壤盐碱化影响的程度日益加深[6]。多年生黑麦草(*Lolium perenne*)是我国广为应用的一种冷季型草坪草,分蘖能力强,生长迅速,覆盖力强,品质优良,适应范围广,因此常作为建植草坪草地的先锋草种[7-8]。同时,多年生黑麦草也是一种品质优良的经济牧草,茎叶繁茂,幼嫩多汁,产草量高,再生性强,为各种家畜所喜食,在我国南方地区广为栽培[9-10]。多年生黑麦草对高温、寒冷和干旱环境都有一定的适应性,但当其生长环境盐分过高时,生长明显受到抑制,在商业栽培品种中其耐盐性仅为中等水平[11-12]。因此,研究如何提高多年生黑麦草的耐盐性,对草坪建植和农牧业生产的发展具有重要意义。

研究发现,一些定殖于植物根际的土壤细菌具有促进植物生长、减少植物病害发生率以及提高植物抗胁迫能力的特点,Kloepper 和 Schroth 于 1978 年将此类细菌命名为根际细菌,1981 年又将这类具有促生作用的根际细菌正式命名为根际促生细菌(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)[13-15]。研究表明,PGPR 可以通过直接作用和间接作用两大机制提高植物生产力,直接作用包括提高植物对营养元素的生物可得性和影响植物激素的浓度,如溶磷,生物固氮,产生吲哚乙酸、赤霉素、细胞分裂素和乙烯等小分子,生成铁载体和 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶等;间接作用包括干扰群体感应信号和抑制生物膜的形成,发挥抗真菌活性,诱导系统抗性,促进微生物和植物共生,产生干扰病原体毒素的等,从而调控植物的生长发育[16-18]。

分布于我国新疆、甘肃西部、宁夏西北部、青海北部、内蒙古的梭梭(*Haloxylon ammodendron*),是藜科(*Chenopodiaceae*)梭梭属多年生灌木或小乔木,由于其具有较强的抗旱耐盐性,已成为我国多个沙漠地区植被

恢复的重要树种。梭梭具有强大的根系,垂直根系一般深为 5 m,水平根系伸展可达 10 m,且其具有较强的根际正效应,据此推测其根系可以为 PGPR 提供一个独特的栖息地,从而帮助其适应极端环境[19-21]。因此,把目光聚焦在梭梭根际促生细菌上,研究其对多年生黑麦草的接种效应,以期为新型草坪草微生物菌肥的开发提供理论依据。

课题组前期分别从内蒙古阿拉善右旗(巴丹吉林沙漠)和甘肃民勤(腾格里沙漠)不同生长时期的梭梭根际土壤中分离纯化获得 293 株细菌,发现多株具有 PGPR 特性。前期预实验结果表明,一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株 WM13-24 对模式植物拟南芥具有明显的促生作用,本研究将菌株 WM13-24 接种于多年生黑麦草,研究其对黑麦草幼苗生长及耐盐性调控的生理机制。

1　材料与方法

1.1　实验材料

枯草芽孢杆菌菌株 WM13-24 (16S rRNA 基因序列在 GenBank 的注册号为 MN582985)分离于冬季甘肃民勤腾格里沙漠的 13 年树龄梭梭根际土壤,阳性参考菌株枯草芽孢杆菌 GB03 由美国德州理工大学 Paul W. Paré 教授提供,阴性对照大肠杆菌菌株(*Escherichia coli*) DH5α 购自中国大连 Takara 生物技术有限公司,多年生黑麦草种子“绅士”(*Lolium perenne* ‘Esquire’)由北京绿冠种业发展有限公司提供。

1.2　实验方法

1.2.1　菌液的制备及处理

LB 液体培养基以 10 g/L NaCl、10 g/L 胰蛋白胨和 5 g/L 酵母粉的比例配制,使用标准型 pH 计(PB-10,北京赛多利斯)调节 pH 至 7.2;将立式压力蒸汽灭菌锅(LDZX-50KBS,上海申安)温度调至 121℃对培养基进行高温灭菌 20 min;待其冷却后,在超净工作台上加入菌液,每 100 mL 的 LB 液体培养基分别添加 100 μL 的 WM13-24、GB03 和 DH5α 菌液;接着在 28℃、转速 180 r/min 条件下的恒温培养摇床(THZ-300,上海一恒科技)中培养过夜;使用紫外可见分光光度计(V-5800 型)测定菌液浓度,调节浓度至 $OD_{600}=0.90$ 时取出备用。

1.2.2　幼苗培养

实验采用盆栽,每盆装有高温灭菌(烘箱 80℃灭菌 8 h)的细沙和蛭石(体积比 1∶1)共 1500 g。每盆混合土中加入上述浓度调节至 $OD_{600}=0.90$ 的菌液 10 mL,空白对照加入 LB 液体培养基 10 mL,搅拌混匀后每盆均匀播种 1.5 g 黑麦草种子。待幼苗生长 7 d 后,对其进行间苗处理,每盆保留 10 株生长一致的幼苗。幼苗继续生长 20 d 后,往各对照组和处理组每株幼苗补接种上述菌液 1 mL,并添加不同盐浓度(0, 150, 300 mmol/L NaCl)的 1/2 Hoagland 营养液,在盐处理 2 周后测定相关生理数据。

1.3　生长生理指标测定

分别取各处理的幼苗,冲洗干净植物表面的灰尘,使用称重法称取地上部鲜重,用直尺直接测量根长,再将称过重量的样品烘至恒重后称取干重。用乙醇丙酮混合液浸提法测定叶绿素含量;用 TTC(氯化三苯基四氮唑)法测定幼苗根系活力;用 DDS-11C 型电导仪测定电导率,以相对电导率表示细胞膜相对透性;使用冰点渗透仪(OSMOMAT-030, Germany)测定渗透势;采用蒽酮比色法对可溶性糖含量进行测定;使用脯氨酸(Pro)含量测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)测定脯氨酸含量;使用过氧化氢酶(CAT)活性测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)测定过氧化氢酶(CAT)活性;采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)的含量(表 1)。

将待测幼苗地上部烘干捣碎后放入试管,添加 100 mmol/L 浓度的冰乙酸 10 mL,密封置于 90℃水浴锅中反应 2 h,待其冷却至室温,然后过滤,用火焰分光光度计(Sher wood 410)测定吸光值,最后结合标准曲线分别计算 Na^+、K^+离子含量 (mmol/g DW) (表 1)。

1.4　数据处理

每个处理设置 12 个重复,所有图中的数值为平均值± SE;数据使用 Excel 2010 作图,中文版 SPSS 17.0(美国伊利诺斯州芝加哥 SPSS 公司)进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

表 1 生长生理指标测定方法

Table 1 Methods for measurements of growth and physiological indicators

生长生理指标 Growth and physiological indicators	测定方法 Methods for measurement
地上部干鲜重 Fresh and dry weight of shoot	称重法
根长 Root length	直尺测量法
叶绿素含量 Chlorophyll content	乙醇丙酮浸提法
根系活力 Root vigour	TTC(氯化三苯基四氮唑)法
细胞膜相对透性 RMP	测定相对电导率
脯氨酸含量 Proline content	使用脯氨酸(Pro)含量测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)
过氧化氢酶活性 CAT	使用过氧化氢酶(CAT)活性测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)
丙二醛含量 MDA content	硫代巴比妥酸法
Na^+、K^+离子含量 $Na^+$and K^+ content	火焰分光光度计法

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下 WM13-24 对黑麦草生长的影响

正常条件下,接种根际促生细菌的黑麦草幼苗根系长势优于 LB 空白对照和 DH5α 阴性对照,尤其是菌株 WM13-24 处理的幼苗侧根发育显著优于其他处理;150 mmol/L NaCl 处理 2 周时,接种根际促生细菌的幼苗地上部和根系生长均显著优于空白与阴性对照;300 mmol/L NaCl 处理 2 周时,根际促生细菌处理的幼苗与空白和阴性对照比较,根系更为发达,分蘖数更多(图 1)。150 mmol/L NaCl 处理 2 周时,菌株 GB03 和

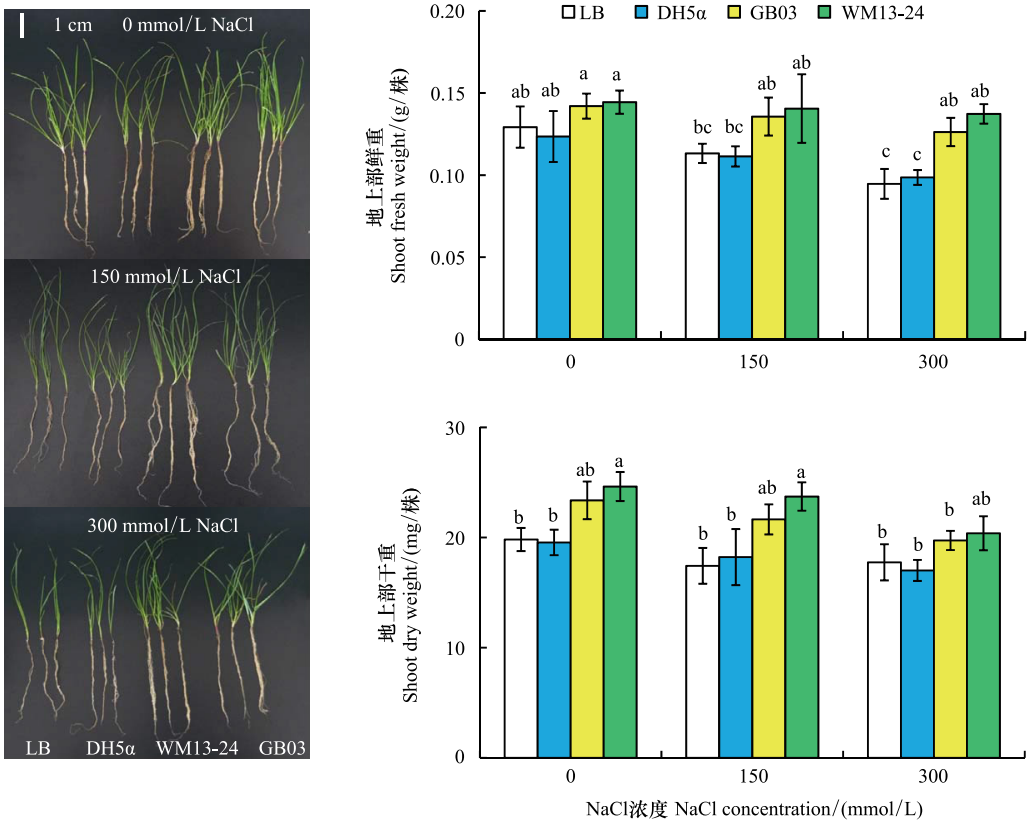


图 1 盐胁迫下根际促生细菌对多年生黑麦草幼苗生长和地上部生物量的影响

Fig.1 Effects of the PGPR strains on growth and shoot biomass of perennial ryegrass under salt treatments

FW:鲜重,Fresh weight;DW:干重,Dry weight

WM13-24 处理的幼苗地上部鲜重与空白对照相比提高了 19.79%和 24.09%,干重分别增加了 24.18%和显著提高了 36.11%（$P < 0.05$）;300 mmol/L NaCl 处理 2 周时,鲜重分别显著提高 33.42%和 45.05%（$P<0.05$）,干重提高 11.17%和 14.85%（图 1）。

150 mmol/L NaCl 处理 2 周时,接种根际促生细菌提高了幼苗的叶绿素含量,尤其是 WM13-24 处理的幼苗,与空白对照相比,其叶绿素 a 和叶绿素 b 分别显著增加了 44.05%和 53.79%（$P<0.05$）,GB03 处理的幼苗分别增加了 18.56%和 16.71%;300 mmol/L NaCl 处理下,GB03 和 WM13-24 处理的幼苗,其叶绿素 a 含量分别提高 17.81%和 17.46%,叶绿素 b 含量分别提高了 33.92%和 27.72%（图 2）。

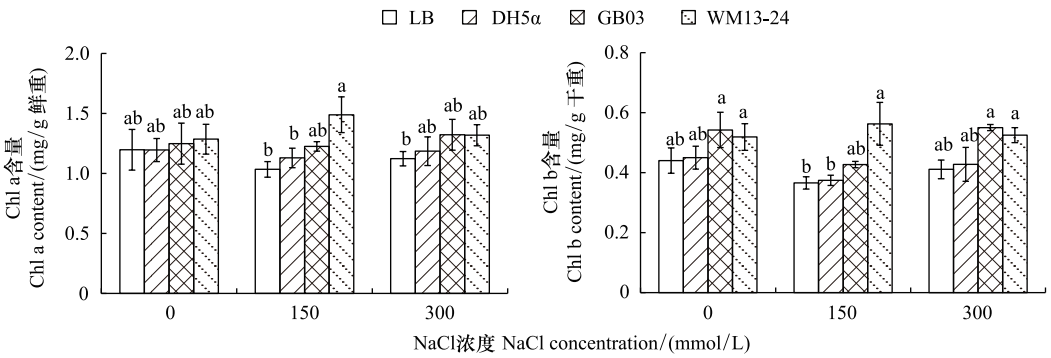


图 2　盐胁迫下根际促生细菌对多年生黑麦草幼苗叶绿素含量的影响

Fig.2　Effects of the PGPR strains on chlorophyll content of perennial ryegrass under salt treatment

150 mmol/L NaCl 处理 2 周时, 与空白对照相比,GB03 和 WM13-24 处理的幼苗根长分别显著提高了 48.50%和 69.21%（$P<0.05$）;300 mmol/L NaCl 处理 2 周时,与空白对照相比,GB03 处理的幼苗根长提高了 9.58%,WM13-24 处理组显著提高了 24.07%（$P<0.05$）。其中 WM13-24 处理对根长的促进效果更佳,150 和 300 mmol/L NaCl 处理下,WM13-24 处理下幼苗根长与 GB03 处理相比分别显著提高了 13.94%和 13.22%（$P<0.05$）（图 3）。

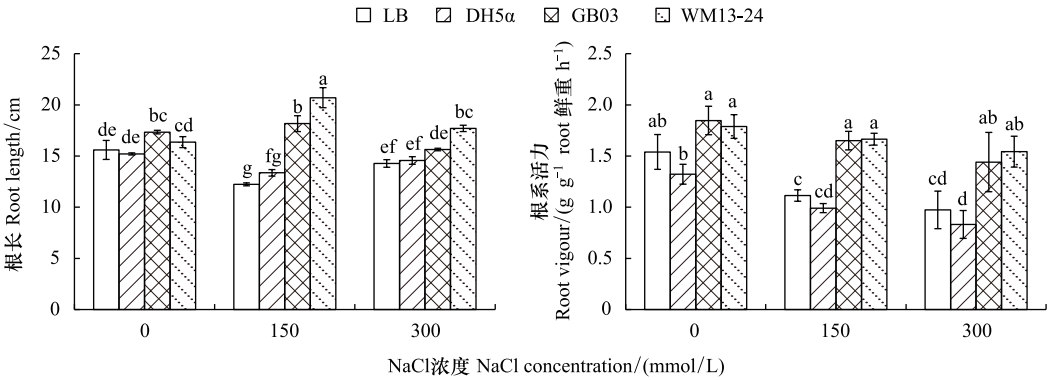


图 3　盐胁迫下根际促生细菌对多年生黑麦草幼苗根长和根系活力的影响

Fig.3　Effects of the PGPR strains on root length and root vigour of perennial ryegrass under salt treatments

盐处理 2 周时,正常生长条件下,GB03 和 WM13-24 处理的黑麦草幼苗的根系活力与空白对照相比提高了 19.99%和 16.16%。150 mmol/L NaCl 处理 2 周时,GB03 和 WM13-24 处理的幼苗根系活力与空白对照相比分别显著提高了 48.28%和 49.47%（$P<0.05$）;300 mmol/L NaCl 处理 2 周时,分别显著提高了 47.92%和 58.48%（$P<0.05$）（图 3）。

2.2 盐胁迫下 WM13-24 对黑麦草质膜完整性的影响

150 mmol/L NaCl 处理黑麦草幼苗 2 周时,与空白对照组相比,菌株 GB03 处理的幼苗过氧化氢酶活性提高了 45.71%,WM13-24 处理的显著提高了 87.90%(P<0.05);300 mmol/L NaCl 处理幼苗 2 周时,与空白对照相比,GB03 和 WM13-24 处理组分别显著提高氧化氢酶活性 47.51%和 64.21%(P<0.05)(图 4)。

150 mmol/L NaCl 处理黑麦草幼苗 2 周时,GB03 处理的幼苗相对质膜透性与空白对照组相比降低了 31.65%,WM13-24 显著降低了 43.54%(P<0.05);300 mmol/L NaCl 处理 2 周时,GB03 和 WM13-24 处理与空白对照相比分别显著降低了 23.01%和 24.56%(P<0.05)(图 5)。300 mmol/L NaCl 处理 2 周时,GB03 和 WM13-24 处理的幼苗丙二醛含量与空白对照相比显著降低了 1.22 倍和 54.24%(P<0.05)(图 5)。

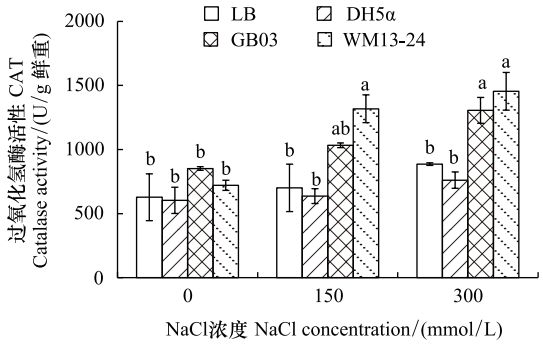


图 4 盐胁迫下根际促生细菌对多年生黑麦草幼苗过氧化氢酶活性的影响

Fig.4 Effects of the PGPR strains on CAT activity of perennial ryegrass under salt treatments

CAT:过氧化氢酶,Catalase

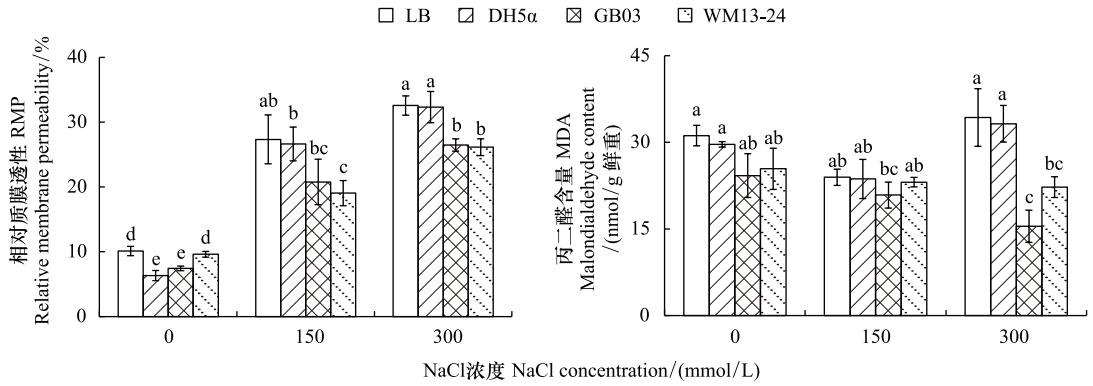


图 5 盐胁迫下梭梭根际促生细菌对多年生黑麦草幼苗丙二醛含量和相对质膜透性的影响

Fig.5 Effects of the PGPR strains on MDA content and relative plasma permeability of perennial ryegrass under salt treatments

RMP:相对质膜透性透性,Relative membrane permeability;MDA:丙二醛,Malondialdehyde

2.3 盐胁迫下 WM13-24 对黑麦草渗透调节能力的影响

150 mmol/L NaCl 处理黑麦草幼苗 2 周时,菌株 GB03 和 WM13-24 处理的幼苗可溶性糖含量与空白对照组相比分别提高了 42.68%和 47.88%;300 mmol/L NaCl 处理幼苗 2 周时,分别显著提高了 1.04 倍和 84.41%(P<0.05)(图 6)。

正常条件下,GB03 和 WM13-24 处理的幼苗脯氨酸含量较空白对照组分别显著提高了 58.52%和 80.25%(P < 0.05);150 mmol/L NaCl 处理 2 周时,GB03 和 WM13-24 处理的幼苗脯氨酸含量较空白对照分别显著提高了 68.81%和 1.08 倍(P < 0.05);300 mmol/L NaCl 处理幼苗 2 周时,GB03 和 WM13-24 处理的幼苗脯氨酸含量较空白对照分别显著提高了 48.68%和 82.71%(P < 0.05),WM13-24 与 GB03 处理的幼苗相比,脯氨酸含量显著提高了 22.88%(P < 0.05)(图 6)。

150 mmol/L NaCl 处理幼苗 2 周时,根际促生细菌处理的幼苗渗透势均低于空白对照和阴性对照,GB03 和 WM13-24 处理的幼苗渗透势与空白对照相比分别降低了 26.13%和 23.96%;300 mmol/L NaCl 处理 2 周时,分别降低了 14.73%和 29.08%(图 6)。

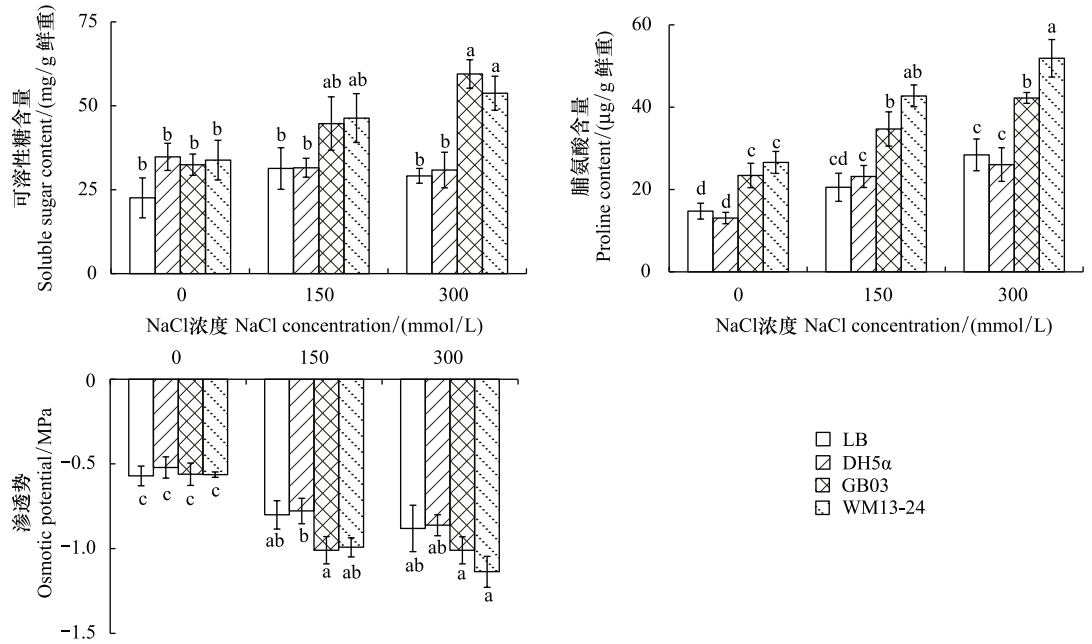


图 6　盐胁迫下梭梭根际促生细菌对多年生黑麦草可溶性糖含量,脯氨酸含量和渗透势的影响

Fig.6　Effects of the PGPR strains on soluble sugar and proline contents and osmotic potential of perennial ryegrass under salt treatments

2.4　盐胁迫下 WM13-24 对黑麦草 Na^+和 K^+含量的影响

150 mmol/L NaCl 处理黑麦草幼苗 2 周时,用菌株 GB03 和 WM13-24 处理的幼苗,其地上部的 K^+含量与空白对照组相比分别提高了 13.61%和 14.58%,Na^+含量降低了 34.65%和 22.52%,K^+/Na^+分别提高了 52.97%和 40.38%;300 mmol/L NaCl 处理幼苗 2 周时,地上部的 K^+含量分别提高了 21.08%和 10.80%,Na^+含量显著降低了 26.22%和 20.17%（$P < 0.05$),K^+/Na^+分别提高了 59.08%和 38.59%（图 7)。

150 mmol/L NaCl 处理黑麦草幼苗 2 周时,菌株 GB03 和 WM13-24 处理的幼苗根中的 K^+含量与空白对照组相比分别提高了 15.62%和 23.18%,Na^+含量降低了 36.08%和 36.67%,K^+/Na^+分别显著提高了 57.34%和 68.35%（$P < 0.05$);300 mmol/L NaCl 处理 2 周时,与空白对照相比根中的 K^+含量分别提高了 25.67%和 30.53%,Na^+含量显著降低了 27.84%和 43.97%,K^+/Na^+分别显著提高了 65.25%和 87.93%（$P < 0.05$)(图 7)。

3　讨论与结论

盐胁迫下植物生长速率变慢,根、茎和叶片生物量显著下降,生物量一定程度上可反应植株的生长状况和抵御盐胁迫的能力[22]。已有的研究表明,接种根际促生菌可促进植物在盐胁迫下的生长。Chen 等[23]发现解淀粉芽孢杆菌菌株(*Bacillus amyloliquefaciens*)SQR9 可通过分泌生长素和赤霉素,促进玉米在盐胁迫下的生长,也可通过上调参与植物光合作用关键基因 *RBCS* 和 *RBCL*,维持玉米在盐胁迫下的光合速率,显著提高了玉米在盐胁迫下的生物量。Siddikee 等[24-25]还发现接种根际促生细菌可通过减少盐胁迫诱导的乙烯从而缓解盐胁迫对红辣椒植株生长的抑制作用,盐胁迫下红辣椒幼苗的生物量与正常条件下持平。本实验发现,在 150 和 300 mmol/L NaCl 胁迫条件下,接种根际促生细菌均能提高盐胁迫下黑麦草幼苗地上部生物量,尤其是梭梭根际促生细菌 WM13-24。另外,在 150 和 300 mmol/L NaCl 条件下,接种根际促生细菌的幼苗叶绿素 a 及叶绿素 b 含量均高于空白对照和阴性对照,并且在 150 mmol/L NaCl 处理时,与已商业化生产的阳性对照菌株 GB03 相比,接种 WM13-24 能够更有效的维持黑麦草幼苗叶绿素含量,而叶绿素作为光合作用中的重要参与者,是表征光合利用率最重要的指标之一,叶绿素含量的高低直接影响植物的光合能力[2]。植物叶片作

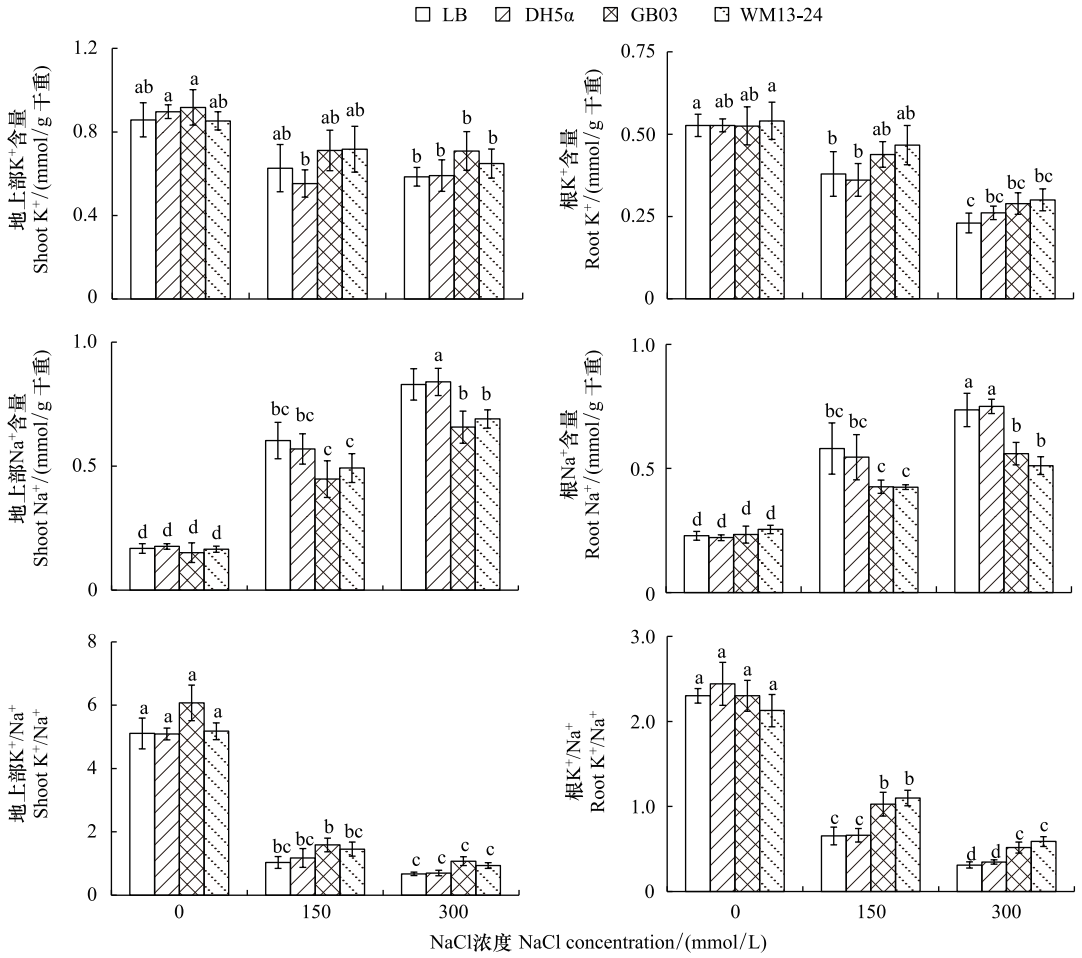


图 7 盐胁迫下梭梭根际促生细菌对多年生黑麦草幼苗 Na^+和 K^+含量的影响

Fig.7 Effects of the PGPR strains on Na^+ and K^+ content of perennial ryegrass under various salt treatments

为光合作用的重要部位,在植物生长和抵抗外界胁迫方面起着至关重要的作用,除此之外,根系作为植物吸收水分和营养元素的重要器官,也是反映植物生长和抗逆能力的关键器官,白玉娥等[26]提出强壮植物根系是提高植物抗性的一种有效途径,有研究发现根际促生细菌能够促进植株根系伸长生长,提高根系活力,从而增强植株摄取营养的能力,最终改善植物在胁迫条件下的生长发育[27]。类似的结果也在本实验中发现,在盐胁迫下,WM13-24 促进了黑麦草根的生长,显著提高了幼苗的根系活力。因此,WM13-24 可能通过提高盐胁迫下叶绿素含量以维持盐胁迫下植物的光合作用,也可能通过促进根系的生长,增强植株在胁迫条件下吸收水分和营养物质的能力,从而维持幼苗在盐胁迫条件下的生长,帮助其更好的适应盐逆境。

当植物遭受环境胁迫时,膜的结构和功能发生改变,膜渗透性增加,细胞内含物外泄,这种膜变化构成了植物细胞在环境胁迫下的初始响应,所以细胞膜渗透性的变化为评估植物对环境胁迫的耐受力提供了有力证据[28-29]。在盐胁迫条件下,接种根际促生细菌的黑麦草幼苗叶片相对质膜透性均低于对照组幼苗,且随着盐浓度增加,接种 WM13-24 的植株叶片相对质膜透性的上升幅度显著小于空白和阴性对照组,与阳性对照 GB03 相比,其在降低植物叶片相对质膜透性方面效果也更具优势。WM13-24 通过抑制盐胁迫下黑麦草幼苗膜透性的增加,减少电解质的外渗,从而维持幼苗细胞膜的稳定性,有效缓解盐胁迫对植株的伤害。

在正常情况下,细胞内活性氧的产生与清除处于一种动态平衡的状态。但植物在遭受逆境胁迫时,这种平衡遭到破坏,活性氧的积累导致膜脂过氧化,严重影响生物膜的功能,造成植株氧化损伤[30-31]。盐胁迫下植物体内活性氧的积累是导致盐害的主要原因之一[32]。Chen 等[23]发现,盐胁迫下,接种解淀粉芽孢杆菌

SQR9 可通过保护玉米免受因活性氧积累而造成的损伤及渗透胁迫而赋予其耐盐性。因此,通过改善植物内源性抗氧化系统,及时清除植物体内积累的活性氧,以及降低其渗透势,可增强其对环境胁迫的耐受性[33]。对活性氧的清除有两类防御系统,分为酶促和非酶促两大类,其中酶促类清除剂包括过氧化氢酶(CAT)等[31]。CAT 是植物体内重要的保护酶之一,它能清除细胞内过多的活性氧自由基,减少膜质的过氧化,进而保护膜的结构,从而使植物能在一定程度上抵御逆境胁迫,一般认为 CAT 活性越大,植物的抗逆能力越强,故其活性的高低可以反映植物抗逆性[34]。150 mmol/L NaCl 和 300 mmol/L NaCl 处理幼苗 2 周时,与空白对照相比,接种 WM13-24 显著提高了幼苗的 CAT 活性,进而提高了黑麦草在盐胁迫条件下对活性氧的清除能力;同样作为膜质过氧化的指示化合物的丙二醛(MDA),是由盐胁迫引起的氧化胁迫造成膜损伤的结果,因此,MDA 含量可用于反映植物遭受逆境损害的程度[35-38]。在 300 mmol/L NaCl 处理 2 周时,接种根际促生细菌显著降低了黑麦草幼苗丙二醛含量,说明接种根际细菌可通过提高 CAT 等清除剂的活性,及时清除植物体内活性氧,从而减少由盐逆境引起的氧化胁迫对植株的伤害。

外界盐浓度越高植物所遭受的渗透胁迫强度就越大,对盐胁迫抗性越强的植物,其渗透势下降越快[39]。本实验结果表明盐胁迫条件下 WM13-24 显著降低了黑麦草幼苗的渗透势,从而有利于维持植株幼苗在胁迫条件下对水分的吸收。与 GB03 相比,接种 WM13-24 在降低叶片渗透势方面效果更显著。渗透调节是植物适应盐渍等胁迫的主要生理机制之一,植物在遭受渗透胁迫时,植物能够合成脯氨酸、可溶性糖等有机渗透调节物质来避免细胞脱水以维持细胞膨压,稳定细胞中酶分子的活性构象,从而保护酶免受盐离子的伤害[40-42],同时脯氨酸还可作为自由基的清除剂而保持细胞膜的完整性[43-44]。本实验同样发现,在盐胁迫条件下接种 WM13-24 通过促进黑麦草幼苗体内对脯氨酸和可溶性糖的积累,提高了幼苗渗透调节能力和抵御盐胁迫的能力。

在盐胁迫条件下,植株通过控制其体内 K^+和 Na^+平衡以保持其正常生长[45]。植物遭受盐胁迫时,会通过主动吸收的方式从外界吸收并积累较多无机盐离子,如 Na^+、K^+、Mg^{2+}、Cl^-等,以调节渗透势。钾是植物生长的必需元素,能够维持细胞的基本功能,同时保持较低水平的蛋白酶和核酸内切酶活性并防止植物在盐胁迫下造成的细胞损伤和死亡[46]。细胞质内过多 Na^+的积累会造成 Na^+毒害和渗透胁迫,并阻碍植物对 K^+的吸收,造成 K^+匮缺,抑制植物体内依赖于 K^+的生理生化反应同时干扰其他正常生理生化过程,最终导致植物生长受到抑制[2, 47-50]。Wang 等[51]研究表明,小花碱茅(*Puccinellia tenuiflora*)能够在高浓度 Na^+环境下生存,且能够在体内维持较低的 Na^+浓度,这主要是依靠其对 K^+、Na^+强大的选择性吸收能力。随着 NaCl 浓度的升高,海滨碱蓬(*Suaeda maritima*)幼苗体内的 K^+含量会相应的提高,一方面可以维持植物体内的 K^+含量,另一方面还可保持相对稳定的 K^+/Na^+,有利于植物生长发育[52]。在盐胁迫条件下接种枯草芽孢杆菌菌株 GB03 后拟南芥体内 Na^+含量与未接种对照相比降低了 54%[53];接种菌株 GB03 还降低了小麦和小花碱茅体内 Na^+的积累并提高了 K^+/Na^+,从而增强二者的耐盐性[54-55]。本实验表明在不同浓度的盐胁迫处理下,接种 WM13-24 与 GB03 均显著降低了黑麦草幼苗地上部 Na^+的积累,同时一定程度增加了地上部 K^+的含量。并且与 GB03 相比,WM13-24 更大幅度地降低了根中的 Na^+水平,在保护黑麦草免受 Na^+的毒害作用方面效果更加显著,同时维持了根中更高的 K^+含量,提高了根中的 K^+/Na^+,从而提高了黑麦草的耐盐性。

综上所述,两株根际促生细菌(WM13-24 和 GB03)均维持了多年生黑麦草在盐胁迫条件下的生长,尤其是分离自梭梭根际的枯草芽孢杆菌 WM13-24 效果更佳。接种 WM13-24 显著提高了多年生黑麦草的生物量、叶绿素含量、根系活力、过氧化氢酶活性、可溶性糖、游离脯氨酸含量及地上部钾/钠比,降低了丙二醛含量、相对质膜透性、叶片渗透势,从而提高了多年生黑麦草的耐盐性。本研究结果为利用荒漠植物根际促生细菌提高草类植物耐盐性和在盐碱地区建植牧草和草坪草奠定了一定的理论和实践基础。

参考文献(References):

[1] Meloni D A, Oliva M A, Martinez C A, Cambraia J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. Environmental and Experimental Botany, 2003, 49(1): 69-76.

[2] 张金林, 李惠茹, 郭姝媛, 王锁民, 施华中, 韩庆庆, 包爱科, 马清. 高等植物适应盐逆境研究进展. 草业学报, 2015, 24(12): 220-236.
[3] James R A, Blake C, Byrt C S, Munns R. Major genes for Na^+ exclusion, *Nax*1 and *Nax*2 (wheat *HKT*1; 4 and *HKT*1; 5), decrease Na^+ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(8): 2939-2947.
[4] Zhang J L, Shi H Z. Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. Photosynthesis Research, 2013, 115: 1-22.
[5] Deinlein U, Stephan A B, Horie T, Luo W, Xu G H, Schroeder J I. Plant salt-tolerance mechanisms. Trends in Plant Science, 2014, 19(6): 371-379.
[6] Huang B R, DaCosta M, Jiang Y W. Research advances in mechanisms of Turfgrass tolerance to abiotic stresses: from physiology to molecular biology. Critical Reviews in Plant Sciences, 2014, 33(2-3): 141-189.
[7] Wu Y Y, Chen Q J, Chen M, Chen J, Wang X C. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene. Plant Science, 2005, 169(1): 65-73.
[8] Kane K H. Effects of endophyte infection on drought stress tolerance of *Lolium perenne* accessions from the Mediterranean region. Environmental and Experimental Botany, 2011, 71(3): 337-344.
[9] 宿梅飞, 魏小红, 辛夏青, 岳凯, 赵颖, 韩厅, 马文静, 骆巧娟. 外源 cGMP 调控盐胁迫下黑麦草种子萌发机制. 生态学报, 2018, 38(17): 6171-6179.
[10] Wang J P, Bughrara S S. Evaluation of drought tolerance for Atlas fescue, perennial ryegrass, and their progeny. Euphytica, 2008, 164(1): 113-122.
[11] Hu L X, Li H Y, Pang H C, Fu J M. Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(2): 146-156.
[12] Tang J C, Yu X Q, Luo N, Xiao F M, Camberato J J, Jiang Y W. Natural variation of salinity response, population structure and candidate genes associated with salinity tolerance in perennial ryegrass accessions. Plant, Cell & Environment, 2013, 36(11): 2021-2033.
[13] Kloepper J W, Schroth M N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes//Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. France: Gilbert-Clarey, Tours, 1978: 879-882.
[14] Kloepper J W, Leong J, Teintze M, Schroth M N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature, 1980, 286(5776): 885-886.
[15] Kloepper J W, Schroth M N. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. Phytopathology, 1981, 71(10): 1020-1024.
[16] Bhattacharyya P N, Jha D K. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(4): 1327-1350.
[17] Paré P W, Zhang H M, Aziz M, Xie X T, Kim M S, Shen X, Zhang J L. Beneficial rhizobacteria induce plant growth: mapping signaling networks in *Arabidopsis*//Witzany G, ed. Biocommunication in Soil Microorganisms. Berlin: Springer, 2011: 403-412.
[18] 赵晨阳, 戴峰, 刘述颖, 谢倩影, 李晨, 石佳. 植物根际促生菌的研究进展. 安徽农业科学, 2019, 47(16): 12-13, 24-24.
[19] Zou T, Li Y, Xu H, Xu G Q. Responses to precipitation treatment for *Haloxylon ammodendron* growing on contrasting textured soils. Ecological Research, 2010, 25(1): 185-194.
[20] Huang Z Y, Zhang X S, Zheng G H, Gutterman Y. Influence of light, temperature, salinity and storage on seed germination of *Haloxylon ammodendron*. Journal of Arid Environments, 2003, 55(3): 453-464.
[21] 沈亮, 徐荣, 刘赛, 徐常青, 贺宁, 刘同宁, 陈君. 肉苁蓉寄主梭梭根际土壤微生物种类及群落结构特征. 生态学报, 2016, 36(13): 3933-3942.
[22] Wang Y, Nil N. Changes in chlorophyll, ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2000, 75(6): 623-627.
[23] Chen L, Liu Y P, Wu G W, Njeri K V, Shen Q R, Zhang N, Zhang R F. Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. Physiologia Plantarum, 2016, 158(1): 34-44.
[24] Siddikee M A, Chauhan P S, Anandham R, Han G H, Sa T. Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(11): 1577-1584.
[25] Siddikee M A, Glick B R, Chauhan P S, Yim W J, Sa T M. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. Plant Physiology and Biochemistry, 2011, 49(4): 427-434.
[26] 白玉娥, 易津, 谷安琳, 阮征. 盐胁迫对 11 种禾本科牧草根系细胞膜透性的影响. 干旱区资源与环境, 2001, 15(5): 51-54.
[27] Egamberdieva D, Kucharova Z. Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. Biology and Fertility of Soils, 2009, 45(6): 563-571.
[28] 王宝山. 生物自由基与植物膜伤害. 植物生理学通讯, 1988(2): 12-16.
[29] Liu Y D, Cao T, Glime J M. The changes of membrane permeability of mosses under high temperature stress. The Bryologist, 2003, 106(1): 53-60.

[30] Apel K, Hirt H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55(1): 373-399.

[31] Hoque M A, Banu M N A, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. Journal of Plant Physiology, 2008, 165(8): 813-824.

[32] Moradi F, Ismail A M. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. Annals of Botany, 2007, 99(6): 1161-1173.

[33] Haque M E, Yoshida Y, Hasunuma K. ROS resistance in *Pisum sativum* cv. Alaska: the involvement of nucleoside diphosphate kinase in oxidative stress responses via the regulation of antioxidants. Planta, 2010, 232(2): 367-382.

[34] 朱杭申, 黄丕生. 土壤水分胁迫与水稻活性氧代谢. 南京农业大学学报, 1994, 17(2): 7-11.

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

[36] Bharti N, Pandey S S, Barnawal D, Patel V K, Kalra A. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. Scientific Reports, 2016, 6: 34768.

[37] Dionisio-Sese M L, Tobita S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. Plant Science, 1998, 135(1): 1-9.

[38] 刘晶, 才华, 刘莹, 朱延明, 纪巍, 柏锡. 两种紫花苜蓿苗期耐盐生理特性的初步研究及其耐盐性比较. 草业学报, 2013, 22(2): 250-256.

[39] Ponnuvel S, Vijayalakshmi C, Thiyagarajan K, Kannanbapu J R, Kota S, Padmavathi G, Geetha S, Sritharan N, Viraktamath B C. Changes in photosynthesis, chlorophyll fluorescence, gas exchange parameters and osmotic potential to salt stress during early seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). SABRAO Journal of Breeding and Genetics, 2014, 46(1): 120-135.

[40] Nolte K D, Hanson A D, Gage D A. Proline accumulation and methylation to proline betaine in *Citrus*: Implications for genetic engineering of stress resistance. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1997, 122(1): 8-13.

[41] Blum A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? Australian Journal of Agricultural Research, 2005, 56(11): 1159-1168.

[42] Dacosta M, Huang B R. Osmotic adjustment associated with variation in bentgrass tolerance to drought stress. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2006, 131(3): 338-344.

[43] Kishor P B K, Sangam S, Amrutha R N, Laxmi P S, Naidu K R, Rao K R S S, Rao S, Reddy K J, Theriappan P, Sreenivasulu N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Current Science, 2005, 88(3): 424-438.

[44] Ahmad M, Zahir Z A, Khalid M, Nazli F, Arshad M. Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer′s fields. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 63: 170-176.

[45] Qin Y, Druzhinina I S, Pan X Y, Yuan Z L. Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. Biotechnology Advances, 2016, 34(7): 1245-1259.

[46] Demidchik V, Cuin T A, Svistunenko D, Smith S J, Miller A J, Shabala S, Sokolik A, Yurin V. *Arabidopsis* root K^+-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. Journal of Cell Science, 2010, 123: 1468-1479.

[47] Zhu J K. Plant salt tolerance. Trends in Plant Science, 2001, 6(2): 66-71.

[48] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6(5): 441-445.

[49] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681.

[50] Zhang J L, Flowers T J, Wang S M. Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. Plant and Soil, 2010, 326(1/2): 45-60.

[51] Wang C M, Zhang J L, Liu X S, Li Z, Wu G Q, Cai J Y, Flowers T J, Wang S M. *Puccinellia tenuiflora* maintains a low Na^+ level under salinity by limiting unidirectional Na^+ influx resulting in a high selectivity for K^+ over Na^+. Plant, Cell & Environment, 2009, 32(5): 486-496.

[52] Zhang J L, Flowers T J, Wang S M. Differentiation of low-affinity Na^+ uptake pathways and kinetics of the effects of K^+ on Na^+ uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. Plant and Soil, 2013, 368(1/2): 629-640.

[53] Zhang H M, Kim M S, Sun Y, Dowd S E, Shi H Z, Paré P W. Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter *HKT*1. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(6): 737-744.

[54] Zhang J L, Aziz M, Qiao Y, Han Q Q, Li J, Wang Y Q, Shen X, Wang S M, Paré P W. Soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03) induces biomass accumulation and salt tolerance with lower sodium accumulation in wheat. Crop and Pasture Science, 2014, 65(5): 423-427.

[55] Niu S Q, Li H R, Paré P W, Aziz M, Wang S M, Shi H Z, Li J, Han Q Q, Guo S Q, Li J, Guo Q, Ma Q, Zhang J L. Induced growth promotion and higher salt tolerance in the halophyte grass *Puccinellia tenuiflora* by beneficial rhizobacteria. Plant and Soil, 2016, 407(1/2): 217-230.