中国生态农业学报(中英文)
Chinese Journal of Eco-Agriculture

一株克锡勒氏菌对小麦苗期的促生耐盐效应研究

苑　霖，王新珍，孙宏勇，刘小京，刘彬彬

Growth promotion and mitigation of salt stress in wheat seedlings by a *Kushneria* bacterium

YUAN Lin, WANG Xinzhen, SUN Hongyong, LIU Xiaojing, and LIU Binbin

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12357/cjea.20210144

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

施氮和干湿灌溉对水稻抽穗期根系分泌有机酸的影响

Coupling effect of alternate wetting and drying irrigation and nitrogen rate on organic acid in rice root secretion at heading stage

中国生态农业学报(中英文). 2018, 26(4): 516–525

不同连作年限马铃薯根系分泌物的成分鉴定及其生物效应

Identification of chemicals in potato root exudates under different years of continuous cropping and their biologic effects

中国生态农业学报(中英文). 2018, 26(12): 1811–1818

氮肥减施对玉米幼苗根系分泌物影响的根际代谢组学分析

Effects of nitrogen fertilizer reduction on root exudates of maize seedling ana–lyzed by rhizosphere metabonomics

中国生态农业学报(中英文). 2018, 26(6): 807–814

高盐胁迫下小麦幼苗离子吸收动态及耐盐性筛选

Dynamic of ionic absorption and salt tolerance screening in wheat seedling under salt stress

中国生态农业学报(中英文). 2021, 29(4): 762–770

根系分泌物介导植物抗逆性研究进展与展望

Progress and perspective in research on plant resistance mediated by root exudates

中国生态农业学报(中英文). 2021, 29(10): 1649–1657

续断菊与玉米间作的铅累积及根系低分子量有机酸分泌特征研究

Lead accumulation and low–molecular–weight organic acids secreted by roots in *Sonchus asper* L.–*Zea mays* L. intercropping system

中国生态农业学报(中英文). 2020, 28(6): 867–875

关注微信公众号，获得更多资讯信息

中国生态农业学报(中英文) 2021 年 11 月 第 29 卷 第 11 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Nov. 2021, 29(11): 1913−1920

DOI: 10.12357/cjea.20210144

苑霖, 王新珍, 孙宏勇, 刘小京, 刘彬彬. 一株克锡勒氏菌对小麦苗期的促生耐盐效应研究[J]. 中国生态农业学报 (中英文), 2021, 29(11): 1913−1920

YUAN L, WANG X Z, SUN H Y, LIU X J, LIU B B. Growth promotion and mitigation of salt stress in wheat seedlings by a *Kushneria* bacterium[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2021, 29(11): 1913−1920

一株克锡勒氏菌对小麦苗期的促生耐盐效应研究*

苑 霖[1,2], 王新珍[1], 孙宏勇[1], 刘小京[1], 刘彬彬[1**]

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心 石家庄 050022; 2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘 要: 土壤盐渍化已经成为全球重要的生态环境问题之一, 农业生态系统中土壤盐分增加会影响作物生长发育、导致减产。近年来, 随着微生物组学研究的深入, 微生物提升植物抗逆性功能认识的加深, 生物肥料开始应用于盐碱地植物修复中。为探究根际促生菌在高盐环境中对小麦生长及代谢的影响, 本文选取一株分离自盐地碱蓬根际土中、具有耐盐和分泌植物生长素功能的克锡勒氏细菌 (*Kushneria indalinina* JP-JH), 选取耐盐小麦品种‘小偃 60’, 在无盐 (0 mmol·L^{-1})、低盐 (200 mmol·L^{-1}) 和高盐 (400 mmol·L^{-1}) 的水培条件下接种耐盐促生菌 JP-JH, 分析其对小麦苗期生长及根系分泌有机酸的影响。培养 40 d 后, 在无盐、低盐、高盐条件下, 接种 JP-JH 组小麦幼苗鲜重显著高于未接种对照组 (P<0.05); 在无盐、低盐时, 接菌组的小麦幼苗干重显著高于对照组 (P<0.05); 且在高盐胁迫时, 接菌组株高显著高于对照处理 (P<0.05)。在无盐条件下, 接菌未对小麦幼苗根系分泌的 6 种有机酸产生显著影响; 在盐胁迫 (低盐以及高盐) 条件下, 接菌显著提高了根系分泌草酸和酒石酸含量 (P<0.05)。上述结果表明耐盐促生菌能够在苗期促进小麦的生长发育, 且对根系分泌的部分有机酸产生了显著影响, 草酸和酒石酸可能在微生物-植物互作中具有重要作用。本研究揭示了细菌 *K. indalinina* JP-JH 对小麦的耐盐促生效应以及对根系分泌有机酸的影响, 为开发具有提升小麦耐盐促生功能的生物肥料提供理论依据和菌种资源。

关键词: 耐盐促生菌; 克锡勒氏菌; 小麦; 根系分泌物; 有机酸

中图分类号: S154.36 **开放科学码(资源服务)标识码(OSID):**

Growth promotion and mitigation of salt stress in wheat seedlings by a *Kushneria* bacterium*

YUAN Lin[1,2], WANG Xinzhen[1], SUN Hongyong[1], LIU Xiaojing[1], LIU Binbin[1**]

(1. Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050022, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Globally, soil salinization is a major land degradation process, taking more than 1 million hectares of farmland out of production per year, threatening food security. In salt-affected soils, crop growth, development, and yield dramatically decrease due to salt toxicity in plants, reduced soil fertility and water availability to plants, and altered hydraulic properties of the soil. The rhizospheric microbiome is closely related to crop stress tolerance. Plants recruit specific groups of microbes in the rhizosphere, which provide nutrients and plant hormones that promote plant growth and stress tolerance. *Kushneria indalinina* JP-JH is a salt-tolerant and auxin-secreting bacteria strain isolated from the rhizosphere of *Suaeda salsa*. In this study, the effects of *K. indalinina* JP-JH on the growth

* 国家自然科学基金项目 (31861133018, 41807058) 资助
** 通信作者: 刘彬彬, 主要研究方向为微生物生态与技术。E-mail: binbinliu@sjziam.ac.cn
苑霖, 主要研究方向为微生物生态与技术。E-mail: 574101722@qq.com
收稿日期: 2021-03-11 接受日期: 2021-04-22

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31861133018, 41807058).
** Corresponding author, E-mail: binbinliu@sjziam.ac.cn
Received Mar. 11, 2021; accepted Apr. 22, 2021

and salt tolerance of wheat seedlings were investigated. The experiment was conducted using the wheat variety 'Xiaoyan 60' in a hydroponic system with Hoagland nutrient solution. The seedlings were inoculated with *K. indalinina* JP-JH under no salt (0 mmol·L^{-1}), low salt (200 mmol·L^{-1}), and high salt (400 mmol·L^{-1}) conditions. Seeds without bacterial inoculation were prepared under the same conditions and used as control treatments. Plant growth parameters and organic acids contents in the root exudates were analyzed after 40 days of incubation. The results showed that the fresh weight of wheat seedlings in the treatments with *K. indalinina* JP-JH inoculation was significantly higher than that of the uninoculated group at all three salt concentrations. *K. indalinina* JP-JH inoculation significantly increased the plant dry weight of the whole plant under both salt-free and low salt-stressed conditions but had no significant effect on dry weight under high salt-stressed conditions. Meanwhile, *K. indalinina* JP-JH inoculation significantly increased plant height under high salt-stressed conditions but had no significant effect under salt-free and low salt-stressed conditions. Dry weight and plant height were negatively related to the salt concentration in the inoculated and uninoculated treatments. The concentrations of six organic acids (oxalic acid, tartaric acid, malic acid, citric acid, fumaric acid, and succinic acid) secreted from roots were determined for treatments with different salt concentrations, with or without bacterial inoculation. *K. indalinina* JP-JH inoculation significantly increased the contents of oxalic acid and tartaric acid in the root exudates under salt-stressed conditions (both low and high salt concentrations) but had no significant effect on organic acids secretion under salt-free conditions. This suggests that oxalic acid and tartaric acid may play important roles in regulating plant-microbe interactions and improving the salt tolerance of wheat variety 'Xiaoyan 60'. Taken together, our results indicate that *K. indalinina* JP-JH promotes plant growth and development and improves the salt tolerance of wheat at seedling stage, which may be related to alterations in the root exudation potential and plant-microbe interactions. This study produced new experimental data on the mechanisms of microorganisms that promote plant growth and salt tolerance and provided biological resources for developing biofertilizers to enhance wheat growth under salt stress conditions.

Keywords: Salt-tolerant and growth-promoting bacteria; *Kushneria indalinina*; Wheat; Root exudates; Organic acid

土壤盐渍化是土地退化的主要原因之一, 盐渍化影响作物生长, 降低粮食产量, 严重威胁农业生产和粮食安全[1]。据估计, 全世界约有 8000 万 hm^2 耕地受到土壤盐渍化的影响[2]。我国盐渍化土壤具有面积大、分布广的特点, 严重威胁区域农业的发展[3]。近年来, 盐碱地改良与治理技术逐渐发展起来, 种植耐盐作物被认为是开发和利用盐渍化土壤的有效途径, 且作物育种领域培育出了一系列的耐盐作物新品种, 为盐碱地的利用提供了种质资源[4-5]。

小麦 (*Triticum aestivum*) 是我国主要粮食作物之一, 2020 年统计结果显示, 我国小麦种植面积 2338 万 hm^2, 占全国粮食种植面积的 20%[6]。近年来, 我国耐盐小麦育种也取得了一系列进展: 为适应渤海经济区的发展, 李振声课题组选育了适合在河北省中南部冬麦区种植的耐盐小麦品种'小偃 81', 2007 年的检测结果显示其耐盐性显著优于普通小麦品种[7]; 赵松山等[8] 通过有性杂交, 在逆境与非逆境交替的条件下选育出小麦品种'沧 6001', 该品种具有抗旱、耐盐、抗寒、优质、丰产稳产等特点; 于亮等[9] 通过水、旱条件交替, 将'临汾 6154'与'冀麦 32'杂交, 选育出 4 个具有耐盐抗旱特性的小麦品种。然而随着世界人口的增长, 对粮食的需求也逐渐增加, 以粮食增产为目的的各种技术发展起来, 传统作物育种是基于对作物基因组控制的性状改良, 而目前一些科学家正试图通过调节植物微生物组来提高作物产量, 以满足日益增长的粮食需求[10]。实现这一目标的前提是明确植物-微生物互作机理, 而这一领域的研究目前仍处于起始阶段。

植物生长发育的过程中, 通过根系从培养介质中摄取营养和水分, 同时也向生长基质中分泌出大量有机物, 即根系分泌物[11]。根系分泌物是根际土壤微生物低分子养分的主要来源, 其组成与变化影响着根际微生物的群落构成[12]。同时, 植物也通过调控根系分泌物来适应和抵御不良环境。根系分泌物中的有机酸具有至少一个羧基、能够携带负电荷、可以络合土壤溶液的阳离子或者置换土壤母质中的阴离子, 从而影响植物和微生物对养分的吸收及固定、植物对逆境的抗性、微生物在根际的定殖等一系列过程[13]。研究表明, 低分子量有机酸能通过不同方式 (还原、螯合、酸化、离子交换) 溶解和转化部分难溶性的矿物, 还可以通过调节根表细胞的通透性, 来释放和提高根际养分的生物有效性, 进而促进植物对养分的吸收、促进植物生长发育[14-15]。

根际微生物研究的主要目的之一是充分挖掘根际微生物资源, 开发生物肥料, 减少农药化肥的使用, 促进农业可持续发展[16]。植物根际促生菌 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 是指存在于植物根际, 对植物生长有促进作用的有益细菌的统称, 国内外已发现多个种属的根际微生物具有促生潜能[17]。PGPR 具有解磷、解钾、固氮等多种生理功能, 能够分泌植物生长调节物质, 促进植物根系生长, 从而促进植物对土壤中养分的吸收[18]。同时, PG-

PR 可产生多种外源植物激素, 研究最广泛的是植物生长素 (IAA), IAA 能够在一定浓度范围内使植物细胞生长, 根系进一步发育, 从而促进植物生长[19]。研究发现, 某些植物根系能够分泌大量的有机酸, 进而激活难溶性磷从而满足植物自身生长发育的需要[20-21]。

王新珍等[22] 分离纯化的克锡勒氏菌 *Kushneria indalinina* JP-JH 菌株, 具有较强的耐盐、耐碱特性, 能在 1%~15% 质量浓度的盐胁迫下生长, 并能分泌植物生长素吲哚乙酸 (IAA), 在一定盐胁迫下促进作物生长。因此本试验选择耐盐小麦品种‘小偃 60’, 在其幼苗根部接种根际促生菌 JP-JH, 从根系分泌有机酸的角度探讨克锡勒氏菌 JP-JH 对小麦幼苗生长及抗盐性的影响, 为充分挖掘根际微生物资源, 开发生物肥料提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　供试小麦及菌株

供试小麦品种为耐盐抗旱小麦品种‘小偃 60’。‘小偃 60’是以‘小偃 54’和‘鲁麦 13’为亲本, 经过有性杂交、系统选择, 是适合在环渤海低平原盐碱麦区种植的耐盐抗旱小麦新品种[23]。所用菌种 JP-JH 是王新珍等[22] 前期从盐地碱蓬 (*Suaeda salsa*) 根际土壤筛选分离得到, 具有较强的耐盐、耐碱性, 能分泌植物生长素吲哚乙酸。

1.1.2　培养基

液体培养使用液体 LB 培养基, 固体培养采用加入 2% 琼脂的 LB 固体培养基; 植物溶液培养采用霍格兰 (Hoagland HB8870-1) 培养液, 购自青岛海博生物公司。

1.1.3　液相色谱试验材料

高效液相色谱试验采用色谱纯级的有机酸标准物, 草酸 (oxalic acid)、酒石酸 (tartaric acid)、琥珀酸 (succinic acid) 购自 Sigma 公司。苹果酸 (DL-malic acid)、柠檬酸 (citric acid)、富马酸 (fumaric acid) 购自中国食品药品检定研究院。有机相: 乙腈 (色谱纯), 格里斯 (天津) 医药化学技术有限公司。流动相: 磷酸二氢钾 (色谱纯), 上海源叶生物科技有限公司。微孔滤膜 (水系, 0.45 μm), 天津市津腾实验设备有限公司。液相色谱试验用水为超纯水。

1.1.4　主要仪器和设备

采用的高效液相色谱仪 (Waters e2695) 配备 2998 型光电二极管阵列检测器 (Waters), Atlantis T3 C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Waters)。根系分泌物浓缩采用北京博医康实验仪器有限公司生产的冷冻干燥机。植物培养使用智能人工气候箱 PRX-1000D, 产自宁波赛福实验仪器有限公司。

1.2　小麦培养与取样

1.2.1　浸种与育苗

选取大小一致、颗粒饱满、健康无病害的小麦种子, 用去离子水洗涤 3 遍, 在水中浸泡 6~8 h 后, 用次氯酸钠溶液 (有效氯 2%) 浸泡 20 min, 再用灭菌去离子水清洗 3 次。在直径 9 cm 的培养皿上放置 2 层灭菌滤纸, 将表面消毒后的小麦种子置于其上, 每皿 50 粒种子, 每个培养皿加入 10~15 mL 去离子水。2~3 d 后选取出苗整齐的种子移栽到定植绵中, 在营养液中培养。

1.2.2　菌悬液制备

取−80 ℃ 甘油管保藏的 *K. indalinina* JP-JH 菌液, 接种于 LB 液体培养基中, 振荡培养进行活化。待 *K. Indalinina* JP-JH 菌株活化后, 在 LB 固体培养基上划线培养 48 h, 取单菌落接种到装有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 28 ℃、150 $r\cdot min^{-1}$ 条件下震荡培养 24 h。然后将培养物 8000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体。按上述离心条件用无菌水洗涤 3 次, 并用无菌水调节菌液, 使其在波长 600 nm 下的 OD 值为 0.6 左右。

1.2.3　溶液培养

设置无盐、低盐和高盐 3 个盐浓度梯度, 即配制 NaCl 浓度为 0 $mmol\cdot L^{-1}$ (无盐)、200 $mmol\cdot L^{-1}$ (低盐)、400 $mmol\cdot L^{-1}$ (高盐) 的霍格兰营养液。待小麦种子萌发 (发芽标准以根长等于种子的长或者芽长等于种子长的一半为标准) 后, 以定植棉固定, 放入 400 mL 上述不同盐浓度的营养液中, 处理组加入菌悬液 20 mL, 对照组加入清水 20 mL。每个处理 3 次重复, 每个重复 10 株苗, 每 7 d 更换一次营养液+菌悬液/清水。昼夜周期为: 光照 16 h, 黑暗 8 h; 培养温度为: 昼 25 ℃ 左右, 夜 20 ℃ 左右。

1.3　根系分泌物收集与处理

在小麦移苗 40 d 后, 于光照充足的上午, 用灭菌去离子水淋洗根部 3~5 次, 在 5 $mg\cdot L^{-1}$ 百里酚溶液中浸泡 3 min, 减少来自营养液中物质的污染, 然后用滤纸吸干根表面水分, 将小麦幼苗移至 500 mL 0.5 $mmol\cdot L^{-1}$ 的 $CaCl_2$ 溶液中, 使根部处于黑暗状态收集 4 h, 将获得的溶液定容至 500 mL。在本研究中我们将该方法得到的收集物定义为根系分泌物。值得注意的是该收集物与水培过程中的分泌物并不完全相同, 但能够反映出不同处理植物因生理状态不

同而导致的产生根系分泌物能力的差别。‘浸根法’也在前人的研究中被广泛使用[24-25]。收集的根系分泌物在 4 ℃ 冰箱保存, 为便于测量, 对分泌物进行浓缩, 根系分泌物首先过 0.45 μm 滤膜过滤, 取 40 mL 滤液放入 50 mL 离心管中, 于−20 ℃ 冷冻为固态, 通过真空冷冻干燥机干燥浓缩至干粉状态, 于−20 ℃ 保存[26-27]。

1.4 根系分泌物中有机酸的高效液相色谱测定

1.4.1 色谱条件

色谱柱: Atlantis T3 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 0.08 mol·L^{-1} KH_2PO_4 (pH=2.5); 流速 1.0 mL·min^{-1}; 进样体积 20 μL; 进样时间 20 min, 柱温 35 ℃, 检测波长 210 nm。

1.4.2 流动相和有机酸标准品的制备

精确称取 10.8872 g 色谱纯级别的 KH_2PO_4 固体粉末, 放入 1 L 容量瓶中定容, 配制成 0.08 mol·L^{-1} KH_2PO_4 溶液, 用磷酸调节 pH 至 2.5, 过 0.45 μm 滤膜, 以去除杂质作为流动相。试验前进行 10 min 超声脱气, 去除溶液中的气泡, 使测量基线稳定。

准确称取草酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸、柠檬酸、富马酸 100 mg, 于 10 mL 容量瓶中, 加水溶解并定容至 10 mL, 得到 10 mg·mL^{-1} 的标准酸母液, −4 ℃ 保存作为储备液。以流动相对母液进行稀释, 配制不同浓度的草酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、富马酸、琥珀酸, 过 0.45 μm 微孔滤膜后作为标准样品, 同时制备不同浓度的标准混合酸。

1.4.3 有机酸测定

取 40 mL 冻干浓缩的干粉状收集物, 用流动相溶解定容至 5 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取 1.5 mL 滤液置于 2 mL 豁口进样瓶中。将标准有机酸样品按照浓度由低到高的顺序进样测定, 确定各标准酸出峰时间。再将标准样品混合酸按照浓度由低到高的顺序进样测定, 由单标准酸保留时间定性。通过 Empower 3 软件, 以色谱工作站中增强型积分法测量峰面积, 以对应组分的峰面积对其浓度绘制外标曲线。待测样品进样后, 以各组分在色谱图中的保留时间定性, 通过外标法定量计算各样品溶液中不同有机酸浓度[28-29]。

1.5 植物生理指标测定

待采集根系分泌物后, 用滤纸吸干植株表面水分, 去除残留的小麦种子, 剪去根部, 用电子天平称量其地上部分重量, 记为鲜重。用尺子测量从根基部到叶顶端的距离, 标记为株高。将剪去根部的小麦幼苗, 整株装入提前烘至恒重的牛皮纸质信封中, 置于 80 ℃ 烘箱中, 烘干至恒重, 用电子天平称量其重量, 记为干重。

1.6 数据统计分析

采用 Empower 3 通过标准样品绘制外标曲线, 对待测样品进行定性、定量分析。采用 Microsoft Excel 2019 对数据进行整理, 通过 SPSS 26.0 软件进行显著性分析, 使用 Origin 2018 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱条件与标准品的测量

经过预试验的优化, 确定高效液相色谱的试验条件为: 流速 1.0 mL·min^{-1}; 进样体积 20 μL; 进样时间 20 min, 柱温 35 ℃, 检测波长为 210 nm。

流动相为 0.08 mol·L^{-1} KH_2PO_4 (pH=2.5) 溶液, 利用上述试验条件得到标准样品混合酸的高效液相色谱图 (图 1)。

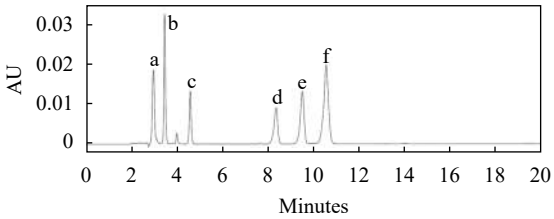

图 1 6 种标准样品混合有机酸液相色谱图

Fig. 1 Liquid chromatogram of mixed standard solutions of six organic acids

a: 草酸; b: 酒石酸; c: 苹果酸; d: 柠檬酸; e: 富马酸; f: 琥珀酸。a: oxalic acid; b: tartaric acid; c: malic acid; d: citric acid; e: fumaric acid; f: succinic acid.

由图 1 可见, 在选定色谱条件下, 标准有机酸按照保留时间的出峰顺序分别为草酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、富马酸、琥珀酸, 标准酸的保留时间及线性关系见表 1。

2.2 不同 NaCl 浓度下 *K. indalinina* JP-JH 菌对小麦生长的影响

加入耐盐促生菌 *K. indalinina* JP-JH 组与无菌组在无盐、低盐、高盐条件下小麦的鲜重、干重、株高结果见图 2。以 *T* 检验下 $P<0.05$ 为效果显著, 对不同盐浓度下加菌组与未加菌组的 3 种生长指标进行比较。在无盐、低盐与高盐胁迫下, 添加 *K. indalinina* JP-JH 菌的小麦幼苗在鲜重上均显著高于未施菌组 ($P<0.05$), 无盐、低盐和高盐处理下加菌组的小麦幼苗鲜重分别增加 27.36%、37.96% 和 24.63%。无盐与低盐时, 加入 *K. indalinina* JP-JH 组小麦幼苗干重显著高于对照组 ($P<0.05$), 分别增加 27.61% 和 49.82%; 高盐处理时小麦干重增加了 7.72%, 但加菌组与对照组无显著差异。而株高方面, 只有在高盐

表 1　标准有机酸保留时间与线性回归方程

Table 1　Retention times and regression equations of the organic acid standards

有机酸 Organic acid	保留时间 Retention time (min)	回归方程 Regression equation	相关系数 R^2 Correlation coefficient	标准偏差 Standard error	线性范围 Concentration range (mg·mL^{-1})	检出限 Detection limit (μg·mL^{-1})
草酸 Oxalic acid	2.904	Y=(1.55e+7)X+(2.11e+4)	0.9998	1.3269e+4	0.0001~1.000	0.01
酒石酸 Tartaric acid	3.361	Y=(1.95e+6)X+(3.01e+3)	0.9998	2.0975e+3	0.0008~1.000	0.15
苹果酸 Malic acid	4.443	Y=(9.95e+5)X+(4.19e+2)	0.9997	1.0730e+3	0.0008~1.000	0.20
柠檬酸 Citric acid	8.438	Y=(1.38e+6)X+(3.60e+2)	0.9999	1.1506e+3	0.0008~1.000	0.30
富马酸 Fumaric acid	9.577	Y=(1.12e+8)X−(1.66e+4)	0.9999	6.5999e+4	0.00002~1.000	0.01
琥珀酸 Succinic acid	10.826	Y=(1.10e+6)X−(7.49e+2)	0.9999	1.0485e+3	0.0008~1.000	2.00

胁迫下, *K. indalinina* JP-JH 使株高显著增加 24.82% (P<0.05), 无盐和低盐处理时差异不显著。

不同盐胁迫条件下, *K. indalinina* JP-JH 对小麦幼苗生长的促进效果也不尽相同。低盐胁迫下 *K. indalinina* JP-JH 使小麦幼苗鲜重和干重增加量 (百分比) 大于无盐和高盐, 这说明低盐胁迫下 *K. indalinina* JP-JH 对小麦幼苗重量的促进作用最为显著。高盐胁迫下 *K. indalinina* JP-JH 使鲜重显著增加, 但对干重的影响不显著。由此推测, 添加 *K. indalinina* JP-JH 可能会促进小麦幼苗对水分的吸收, 从而使作物水分含量增加。同时, 由图可以看出, 即使添加 JP-JH, 小麦鲜重和干重仍随盐胁迫的加重而降低, 说明 *K. indalinina* JP-JH 对小麦鲜重、干重有一定的促进作用, 但仍无法补偿盐胁迫对小麦的危害。只有高盐胁迫下加菌组小麦株高较无菌组增加显著, 但高盐胁迫对小麦生长影响十分显著, 小麦整体长势差, 所以, *K. indalinina* JP-JH 对小麦株高的促进作用并不明显。

2.3　不同 NaCl 浓度下 *K. indalinina* JP-JH 菌对小麦根系分泌有机酸的影响

加菌与无菌处理在无盐、低盐、高盐时小麦根系分泌有机酸液相色谱测定结果见图 3。由图 3 可以看出, 加菌与不加菌有机酸分泌的种类差别不大, 均能检测到草酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、富马酸和琥珀酸, 且均以草酸、酒石酸、苹果酸分泌量较多, 琥珀酸次之, 柠檬酸、富马酸分泌量较少。

由图 3 可知, 加入 *K. indalinina* JP-JH 使部分根系分泌有机酸增加, 主要体现在草酸、酒石酸。无盐胁迫下加菌组除苹果酸外, 有机酸分泌量较高, 但与对照组无显著差异。低盐胁迫下, 加菌组草酸、酒石酸、柠檬酸、富马酸、琥珀酸分泌量高于未加菌组, 且草酸和酒石酸差异显著 (P<0.05), 分别增加 58.95% 和 101.76%。高盐胁迫下, 加菌组除富马酸外其余 5 种有机酸分泌量均高于未加菌组, 草酸和酒石酸差异显著 (P<0.05), 分别增加 41.72% 和 95.63%。

由此可见, 加入耐盐促生菌 JP-JH 改变了小麦根系有机酸的分泌, 其中低盐与高盐胁迫对草酸和酒石酸分泌的促进作用最为显著。同时, 在低盐胁迫下 *K. indalinina* JP-JH 使草酸、酒石酸分泌量增幅较大, 大于高盐胁迫时的增幅。

3　讨论与结论

随着植物微生物组学的发展, 根际微生物功能的研究也日渐深入。根际促生菌是指存在于植物根际, 对植物生长具有促进作用的有益菌类, 其与作物抗逆性密切相关, 是生产生物菌肥的基本原料。一些根际微生物能够分泌外源生长激素影响植物代谢, 植物也可通过根系代谢产生的分泌物活化土壤矿质养分, 促进植物对难溶营养物质的吸收, 影响植物在逆境下的生长发育[30-31]。为探究耐盐促生菌 *K. indalinina* JP-JH 对禾本科粮食作物小麦苗期的作用效果, 在营养液水培条件下, 对小麦幼苗根际接种 *K. indalinina* JP-JH, 待生长 40 d 后, 对小麦幼苗的生理指标与根系分泌有机酸进行测定分析。结果表明, 在无盐处理与低盐胁迫时, 加入耐盐促生菌 *K. indalinina* JP-JH 组的小麦鲜重、干重显著增加; 在高盐胁迫下, 加菌处理的鲜重与株高显著高于对照组。从作物的生理指标分析, 根际耐盐促生菌 *K. indalinina* JP-JH 对无盐处理与盐胁迫 (低盐与高盐) 下苗期小麦的生长具有促进作用。根际促生菌对小麦苗期的促生效果在以前的研究中也被报道过, 杨杉杉[32] 对内蒙古荒漠植物根际土中分离的根际促生菌进行了研究, 发现单菌和复合菌剂均对小麦苗期有明显的促生效果。

通过高效液相色谱测定根系分泌的 6 种有机酸, 结果表明, 在无盐处理与有盐胁迫时, 均检测到了草酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、富马酸和琥珀酸 6

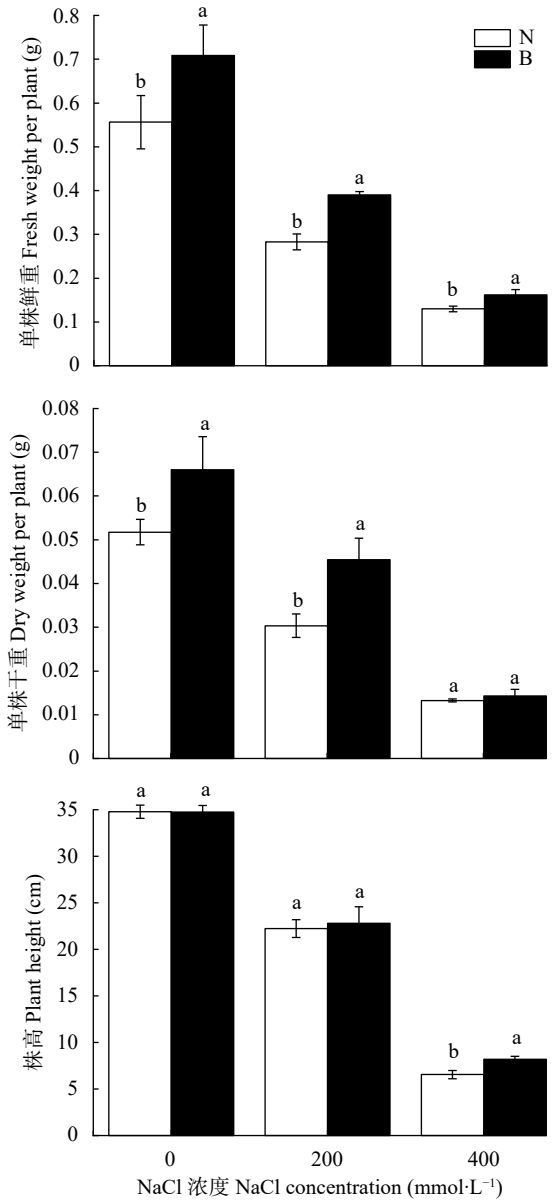

图 2 不同 NaCl 浓度下 *Kushneria indalinina* JP-JH 菌对小麦幼苗鲜重、干重、株高的影响

Fig. 2 Effects of *Kushneria indalinina* JP-JH on fresh weight, dry weight and plant height of wheat seedlings grown hydroponically under different NaCl concentrations

N: 不加菌对照组; B: 施加 *K. indalinina* JP-JH 菌。不同小写字母表示接种菌处理和对照间差异显著 (P<0.05)。N: control (without *K. indalinina* JP-JH); B: *K. indalinina* JP-JH inoculation. Different lowercase letters mean significant differences between treatments N and B at P<0.05 level (n=3).

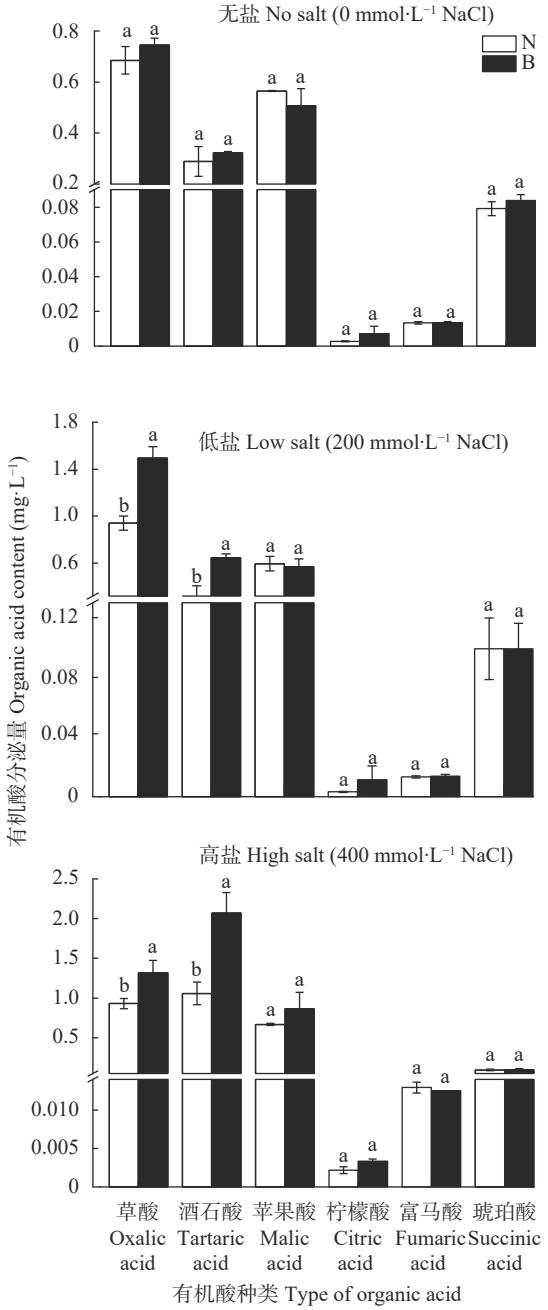

图 3 不同 NaCl 浓度下 *Kushneria indalinina* JP-JH 菌对小麦根系分泌有机酸的影响

Fig. 3 Effects of *Kushneria indalinina* JP-JH on organic acids secreted by wheat roots under different NaCl concentrations

N: 不加菌对照组; B: 施加 *K. indalinina* JP-JH 菌。不同小写字母表示接种菌处理和对照间差异显著 (P<0.05)。N: control (without *K. indalinina* JP-JH); B: *K. indalinina* JP-JH inoculation. Different lowercase letters mean significant differences between treatments N and B at P<0.05 level (n=3).

种有机酸。在无盐处理时, 加菌组与无菌组 6 种有机酸的分泌量无显著差异; 在盐胁迫 (低盐与高盐) 时, 加菌处理使得根系分泌的草酸和酒石酸显著增加, 其余 4 种有机酸的变化不显著。由此我们推测, 在盐胁迫条件下, 根际耐盐促生菌 *K. indalinina* JP-JH 的加入, 对根系部分有机酸的分泌产生影响, 使得草酸、酒石酸含量显著升高。接种外源微生物促进植物生长以及改变根系分泌有机酸的现象在低磷胁迫条件下的枳实 (*Poncirus trifoliata*) 生苗生长过程中也曾被发现[33]。

有研究表明, 根系分泌物中的低分子量有机酸

是金属活化剂, 能激活根际难溶性矿质养分, 促进植物对营养的吸收与利用[34]。王树起等[35] 发现缺磷胁迫会使大豆 (*Glycine max*) 分泌的草酸含量增加, 而根系分泌的草酸则可以改变磷在土壤中的溶解性[36]。而本试验中, 低盐与高盐条件下, 耐盐促生菌 *K. indalinina* JP-JH 使根系分泌的部分有机酸 (草酸、酒石酸) 含量增加, 这有可能会活化土壤中锌和磷等营养物质, 从而促进植物对这些养分的吸收利用。植物生理指标的改变也会反过来影响根系有机酸的分泌。Dinkelaker 等[20] 发现白羽扇豆 (*Lupinus albus*) 在逆境条件下, 植物会形成一种特殊的根部结构, 这种结构促进根部分泌大量有机酸, 从而活化土壤中的难溶性营养元素, 满足自身生长需要。同时, 研究表明苗期禾本科植物接种碱蓬 (*Suaeda glauca*) 内生菌能够提高叶片、根系中某些有机酸的含量, 提高植物抗逆能力[37]。综上所述, 本试验中加菌组小麦幼苗生理指标的改善, 也可能是影响根系有机酸变化的原因, 但是, 还需要对根系形态以及其他相关生理指标的变化进行进一步分析。

本研究通过对小麦幼苗接种 *K. indalinina* JP-JH 菌株, 揭示了 *K. indalinina* JP-JH 菌对小麦的促生效应, 以及对小麦根系分泌有机酸的影响。根际耐盐促生菌 *K. indalinina* JP-JH 能够在盐胁迫条件下促进小麦幼苗的生长发育, 证明该菌株具有一定的应用价值, 为微生物菌肥的研发提供依据与菌种资源。且 *K. indalinina* JP-JH 在盐胁迫下对根系分泌的草酸、酒石酸产生影响, 为逆境条件下研究微生物与植物互作提供了新的数据。

参考文献　References

[1] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167(2): 313−324

[2] KONG X Q, LUO Z, DONG H Z, et al. Non-uniform salinity in the root zone alleviates salt damage by increasing sodium, water and nutrient transport genes expression in cotton[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 2879

[3] 李建国, 濮励杰, 朱明, 等. 土壤盐渍化研究现状及未来研究热点[J]. 地理学报, 2012, 67(9): 1233−1245
LI J G, PU L J, ZHU M, et al. The present situation and hot issues in the salt-affected soil research[J]. Acta Geographica Sinica, 2012, 67(9): 1233−1245

[4] GENC Y, OLDACH K, TAYLOR J, et al. Uncoupling of sodium and chloride to assist breeding for salinity tolerance in crops[J]. The New Phytologist, 2016, 210(1): 145−156

[5] AKRAMI M, ARZANI A. Inheritance of fruit yield and quality in melon (*Cucumis melo* L.) grown under field salinity stress[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 7249

[6] 国家统计局. 国家统计局关于2020年粮食产量数据的公告[EB/OL]. 国家统计局. [2020-12-10]. http://www.stats.gov.cn/tjsj/zxfb/202012/t20201210_1808377.html
National Bureau of Statistics. Announcement of the National Bureau of Statistics on grain output data in 2020[EB/OL]. National Bureau of Statistics. [2020-12-10]. http://www.stats.gov.cn/tjsj/zxfb/202012/t20201210_1808377.html

[7] LI Z S, LI B, ZHENG Q, et al. Review and new progress in wheat wide hybridization for improving the resistance to biotic and abiotic stresses[C]//Advances in Wheat Genetics: from Genome to Field, 2015, DOI: 10.1007/978-4-431-55675-6_43

[8] 赵松山, 王奉芝, 陆丽, 等. 抗旱耐盐型小麦品种沧6001的选育[J]. 华北农学报, 2000, 15(S1): 113−117
ZHAO S S, WANG F Z, LU L, et al. Breeding and selection of drought resistant and salt tolerant wheat variety Cang 6001[J]. Acta Agriculturae Boreall-Sinica, 2000, 15(S1): 113−117

[9] 于亮, 钮力亚, 王奉芝, 等. 临汾6154/冀麦32小麦组合的育种利用[J]. 作物研究, 2017, 31(2): 115−118
YU L, NIU L Y, WANG F Z, et al. Study on the breeding and usage of wheat combination of Linfen 6154/Jimai 32[J]. Crop Research, 2017, 31(2): 115−118

[10] WAGNER M R, LUNDBERG D S, DEL RIO T G, et al. Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12151

[11] MARSCHNER H. Functions of mineral nutrients[M]//Mineral Nutrition of Higher Plants. Amsterdam: Elsevier, 1995: 229–312

[12] SASSE J, MARTINOIA E, NORTHEN T. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome?[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23(1): 25−41

[13] JONES D L. Organic acids in the rhizosphere — a critical review[J]. Plant and Soil, 1998, 205(1): 25−44

[14] 龚松贵, 王兴祥, 张桃林, 等. 低分子量有机酸对红壤无机磷活化的作用[J]. 土壤学报, 2010, 47(4): 692−697
GONG S G, WANG X X, ZHANG T L, et al. Release of inorganic phosphorus from red soils induced by low molecular weight organic acids[J]. Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(4): 692−697

[15] STEVENS G G, PÉREZ-FERNÁNDEZ M A, MORCILLO R J L, et al. Roots and nodules response differently to P starvation in the Mediterranean-type legume *Virgilia divaricata*[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 73

[16] VESSEY J K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers[J]. Plant and Soil, 2003, 255(2): 571−586

[17] BHATTACHARYYA P N, JHA D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture[J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2012, 28: 1327−1350

[18] BABALOLA O O. Beneficial bacteria of agricultural importance[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(11): 1559−1570

[19] PAEPEN S, VANDERLEYDEN J, REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(4): 425−448

[20] DINKELAKER B, ROMHELD V, MARSCHNER H. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.)[J]. Plant, Cell and Environment, 1989, 12(3): 285−292

[21] GARDNER W K, BARBER D A, PARBERY D G. The

acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. Ⅲ. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced[J]. Plant and Soil, 1983, 70: 107−124

[22] 王新珍, 刘小京, 胡春胜, 等. 一株缓解植物盐害的耐盐促生细菌JP-JH及其应用: 中国, CN111100813A[P]. [2020-05-05]. https://www.iprdb.com/patent-528-CN111100813B.html
WANG X Z, LIU X J, HU C S, et al. A salt-tolerant and growth-promoting bacterium JP-JH for alleviating plant salt injury and its application: China, CN111100813A[P]. [2020-05-05]. https://www.iprdb.com/patent-528-CN111100813B.html

[23] OGIHARA Y, TAKUMI S, HANDA H. Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field[M]. Toyota: Springer, 2015

[24] MURATOVA A, POZDNYAKOVA N, GOLUBEV S, et al. Oxidoreductase activity of sorghum root exudates in a phenanthrene-contaminated environment[J]. Chemosphere, 2009, 74(8): 1031−1036

[25] 钟正燕, 陈炳发, 宋雁辉, 等. 根分泌物有机酸的研究方法[J]. 环境科学导刊, 2019, 38(S1): 12−18
ZHONG Z Y, CHEN B F, SONG Y H, et al. Research methods on organic acids in root exudates[J]. Environmental Science Survey, 2019, 38(S1): 12−18

[26] ZHAO L J, HUANG Y X, HU J, et al. ^{1}H NMR and GC-MS based metabolomics reveal defense and detoxification mechanism of cucumber plant under nano-Cu stress[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(4): 2000−2010

[27] TU S X, MA L N, LUONGO T. Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata*[J]. Plant and Soil, 2004, 258(1): 9−19

[28] 王平, 周荣. 高效液相色谱法测定植物根系分泌物中的有机酸[J]. 色谱, 2006, 24(3): 239−242
WANG P, ZHOU R. Determination of organic acids exuded from plant roots by high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2006, 24(3): 239−242

[29] 郭燕, 梁俊, 李敏敏, 等. 高效液相色谱法测定苹果果实中的有机酸[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 227−230
GUO Y, LIANG J, LI M M, et al. Determination of organic acids in apple fruits by HPLC[J]. Food Science, 2012, 33(2): 227−230

[30] 蒋晓玲. 解淀粉芽孢杆菌Y19微生物菌肥的研制及其生物效益研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2015
JIANG X L. Development of microbial fertilizer and biological effect of *Bacillus amyloliquefaciens* Y19[D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2015

[31] 史功赋, 赵小庆, 方静, 等. 土壤微生物在植物生长发育中的作用及应用前景[J]. 北方农业学报, 2019, 47: 108−114
SHI G F, ZHAO X Q, FANG J, et al. Research progress on the effects of soil microorganisms on plant growth and development[J]. Journal of Northern Agriculture, 2019, 47: 108−114

[32] 杨杉杉. 耐盐植物根际促生细菌筛选及其对盐胁迫小麦幼苗的促生效应研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018
YANG B B. Study on isolation of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria and their promotion effect on wheat seedling under salt stress[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018

[33] 刘进法, 王鹏, 罗园, 等. 低磷胁迫下AM真菌对枳实生苗吸磷效应及根系分泌有机酸的影响[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(1): 9–13
LIU J F, WANG P, LUO Y, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on absorbing phosphorus and excreting organic acids of *Poncirus trifoliata* seedlings under low-phosphorus stress[J]. Subtropical Plant Science, 2010, 39(1): 9–13

[34] 孙晨瑜, 曾燕红, 马俊卿, 等. 丛枝菌根真菌对黄花蒿生长和根系分泌物化学组成的影响[J]. 热带作物学报, 2020, 41(9): 1831−1837
SUN C Y, ZENG Y H, MA J Q, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on *Artemisia annua* L. growth and chemical composition of root exudates[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(9): 1831−1837

[35] 王树起, 韩晓增, 乔云发, 等. 缺磷胁迫条件下大豆根系有机酸的分泌特性[J]. 大豆科学, 2009, 28(3): 409−414
WANG S Q, HAN X Z, QIAO Y F, et al. Characteristics of organic acids exudated from soybean (*Glycine max* L.) roots under P deficiency stress[J]. Soybean Science, 2009, 28(3): 409−414

[36] JONES D L, DENNIS P G, OWEN A G, et al. Organic acid behavior in soils—misconceptions and knowledge gaps[J]. Plant and Soil, 2003, 248(1/2): 31−41

[37] 梅映学. 碱蓬内生菌高Y1-1对镉和/或铝胁迫下水稻幼苗内源激素及有机酸含量的影响[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2017
MEI Y X. Effect of endophyte Gao Y1-1 infection on endogenous hormones and organic acids of rice seedlings under Cd and/or Al stress[D]. Shenyang: Shenyang Normal University, 2017