

链霉菌 702 对水稻种子萌发、幼苗生长及土壤微生物的影响

魏赛金^{1,2}, 王世强², 李昆太², 涂国全², 潘晓华^{1*}

(1. 江西农业大学作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室/江西省作物生理生态与遗传育种重点实验室, 南昌 330045; 2. 江西农业大学生物科学与工程学院, 南昌 330045)

摘要:土壤微生物及其代谢产物往往会对作物生长产生影响。以春光 1 号水稻为供试种子, 链霉菌 702 及其代谢产物为供试菌和抗生素, 通过盆栽试验研究链霉菌 702 及其代谢产物农抗 702 对水稻种子萌发、秧苗素质和土壤微生物区系影响。结果表明, 低浓度农抗 702 促进水稻种子萌发、胚根和芽的生长, 根系活力提高, 但含糖量下降; 种子中的淀粉酶活性、蛋白质含量随农抗 702 浓度的升高先升后降。施加链霉菌 702 菌剂后土壤细菌和霉菌数量均有所减少, 放线菌数量增加, 硝化细菌和亚硝化细菌减少, 好气性纤维素分解菌增加, 土壤微生物不同生理类群的变化, 加速了土壤养分循环, 增强了水稻的养分吸收, 从而促进水稻生长。

关键词:链霉菌 702; 种子萌发; 秧苗生长; 微生物群落

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)05-0853-09 doi:10.11654/jaes.2014.05.005

Effects of *Streptomyces* 702 on Seed Germination and Seedling Growth of Rice and Soil Microbes

WEI Sai-jin^{1,2}, WANG Shi-qiang², LI Kun-tai², TU Guo-quan², PAN Xiao-hua^{1*}

(1. Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education/Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding of Jiangxi Province, JAU, Nanchang 330045; 2. Department of Bioengineering, JAU, Nanchang 330045)

Abstract: Soil microbes and their metabolites may influence crop growth. A pot experiment was conducted to investigate the effects of *Streptomyces* 702 and its metabolites (Ag-antibiotic 702) on seed germination and seedling growth of rice (Spring No.1) and soil microbial flora. Seed germination and radicle and bud growth were improved under low concentrations of Ag-antibiotic 702. With increasing Ag-antibiotic 702 concentrations, amylase activity and protein contents increased at first and then decreased. In addition, root vigor was enhanced, while sugar contents were reduced by the Ag-antibiotic 702. Additions of *Streptomyces* 702 agent tended to decrease soil bacteria, mold, nitrobacteria and nitrifying bacteria, but significantly increased actinomycetes and aerobic cellulose decomposing bacteria.

Keywords: *Streptomyces* 702; seed germination; seedling growth; microbial community

涂国全等在农用抗生素产生菌的分离筛选研究中, 从棉花地土壤中分离筛选到一株链霉菌 702, 菌种鉴定为稠李链霉菌 JAU4234 (*Streptomyces padanus* JAU4234), 从链霉菌 702 发酵产物中分离提取到了

一种新型多烯大环内酯抗生素, 命名为“农抗 702” (Ag-antibiotic 702)^[1], 该组分对水稻纹枯病菌、稻瘟病菌、稻曲病菌等 14 种植物病原真菌有明显的抑制作用^[2]。研究表明, 适宜浓度青霉素能明显提高小麦老化种子发芽率、发芽指数、幼苗根系活力、叶绿素含量及幼苗长度^[3]。青霉素可促进小麦、玉米、水稻和黄瓜等植物种子的发芽及幼苗的生长^[4]。Mukherji 等发现, 青霉素能提高水稻幼苗根、茎中的核酸、蛋白质和内源赤霉素的含量从而促进幼苗的生长^[5]。024 放线菌菌株发酵液对小麦种子的发芽率、出苗历时和根系生长

收稿日期: 2014-01-03

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2011BAD16B04, 2012BAD14B14); 国家自然科学基金项目 (30960011)

作者简介: 魏赛金 (1969—), 女, 博士, 教授, 主要从事微生物应用及水稻根际生态研究。E-mail: weisaijin@126.com

* 通信作者: 潘晓华 E-mail: xhuapan@163.com

有刺激作用^[6]。王飞等^[7]发现链霉菌 702 发酵液对水稻种传真菌具有抑制效果并对种子发芽率有影响。涂艳丽等^[8]发现链霉菌 702 发酵液能够提高水稻种子的耐贮藏性。

植物与微生物相互作用包括致病、共生和互生。对农业生产而言,利用植物与微生物的互生作用,可以促进作物生长,有效提高抗病、耐逆等性能^[9]。在分离到的互生微生物中,35%左右具有抑制植物病原微生物生长,促进植物生长的作用^[10]。

目前已发现可与高等植物发生互生作用的微生物主要集中在几个微生物类群中,如在根瘤菌属(*Rhizobium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌(*Streptomyces*)、白粉寄生菌属(*Ampelomyces*)、木霉属(*Trichoderma*)等属中发现了可提高植物抗病性的种类^[11]。野生植物内生放线菌对番茄、黄瓜幼苗具有防病促生作用^[12]。“5406”抗生素用于小麦拌种,具有防病、保苗和增产的效应,生防放线菌对小麦、大麦、番茄、黄瓜等作物种子的萌发及幼苗生长有促进作用^[13]。

本试验以不同浓度链霉菌 702 的代谢产物农抗 702 处理水稻种子,综合分析其对种子萌发率、淀粉酶活性、可溶性糖、蛋白质及根系活力的影响;以含高活性链霉菌 702 固体菌剂为材料,从对水稻生长的影响、功能微生物生态适应性和土壤可培养微生物群落组成等方面入手,明确链霉菌调控植物生长、生态功能及链霉菌和植物互作的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

供试菌株:链霉菌 702(*Streptomyces* 702),分离自江西农业大学科技园棉花试验田的土壤中。

试验土壤基本理化性状:含有机质 $33.54\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全氮 $17.88\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、碱解氮 $112.9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、有效磷 $21.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、速效钾 $87.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,pH 值 6.5。

固体培养基:大米 500 g,葡萄糖 5 g,麸皮 20 g,水 1500 mL。先将大米(不用淘洗)按常规方法蒸煮成饭,用少许水溶解葡萄糖均匀拌在米饭中,加入麸皮,加水混匀轻搓,装入 500 mL 蘑菇瓶中,每瓶 250 g,121 °C 高压灭菌 1 h,备用。

PDA 培养基^[14]、MS 培养基、高氏一号培养基、孟加拉红培养基、氯化细菌培养基、亚硝化细菌培养基、硝化细菌培养基、反硝化细菌培养基、好气性自生固氮菌培养基、厌气性自生固氮菌培养基、好气性纤维

素分解菌培养基按照参考文献[15]配制。以上培养基需经 121 °C,保压 30 min 灭菌,备用。

供试水稻种子:春光 1 号(感病品种)购自江西省农科院。

供试药剂:赤霉素 A、奈氏试剂、锌碘淀粉试剂、二苯胺试剂按照参考文献[15]配制。农抗 702 (99.47%),按照参考文献[16]制备。将农抗 702 溶于少许甲醇配制成 $800\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的农抗 702 母液备用。

1.2 农抗 702 对水稻种子萌发的影响

用 3% 的次氯酸钠对水稻种子表面消毒 90 s,无菌水冲洗,30 °C 下浸种催芽 48 h,将种子置于铺有一层滤纸,含 10 mL 不同浓度的农抗 702 或赤霉素的培养皿中,农抗 702 浓度分别为 2、4、6、8、10、20、30、50、70、100、150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,以无菌水为空白对照。每皿 15 粒种子,设三个重复。30 °C 黑暗培养,分别在培养 24、42、66 h 时观察记录各组处理的发芽情况(以幼芽达到种子长度一半,幼根与种子等长为发芽标准)。

1.3 农抗 702 对种子淀粉酶活性、可溶性糖含量、蛋白质含量及根系活力的影响

称取 0.7 g 左右萌发的水稻种子,去根去芽后置于研钵中,加入 pH 5.6 的柠檬酸缓冲液,磨成匀浆倒入 10 mL 具塞刻度试管中,用缓冲液定容至刻度,混匀后在 20 °C 下放置 15~20 min (每隔 3 min 振荡一次),经 4 °C、4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液备用。3,5-二硝基水杨酸比色法测定淀粉酶活性^[17],蒽酮法测定可溶性糖含量^[18],考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白含量^[19], α -萘胺法测定根系活力^[20]。

1.4 固体菌剂制备

将链霉菌 702 菌种移接在 PDA 培养基上,28 °C 培养 7 d,即得灰黄色的菌苔。当固体培养基温度降到 40 °C 以下,接入斜面孢子悬液 25 mL,28 °C 静置培养 24 h 后摇匀,继续培养 7 d 即长成黄褐色链霉菌 702 固体菌剂,50 °C 烘干粉碎待用。采用活菌计数法计算该固体菌剂中活菌含量为 $1.0\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

1.5 拌菌土壤制备

把过 20 目土壤筛的细土装入长 17 cm、宽 11.5 cm、高 6.5 cm 的耐高温塑料培养盆中,每盆中装细土 400 g,分别将 0.4、2.0、4.0 g 链霉菌 702 固体菌剂拌入细土中,以不含菌剂的土壤为对照,3 次重复,加水 300 mL 室温下孵育 6 d,待用。

1.6 水稻播种与管理

取春光 1 号水稻种子置于培养皿,加清水浸种 24 h,0.1% HgCl_2 溶液消毒 5 min 后用蒸馏水冲洗

三遍,播种于各组土壤中,每盆 100 粒。每日定时定量浇灌并记录生长状况,培养 33 d 后测定各项生理指标。

1.7 各项指标的测定

从培养盆中小心取出水稻苗,用流水冲洗根系上的土壤。随机选取 15 株秧苗进行秧苗素质调查,项目包括:株高(cm)、叶龄(片数)、假茎宽(mm)、叶宽(mm)、根数(条)、白根数(条)、根长(cm)、鲜重(g)和干重(g)。假茎宽为距离根部 2 cm 处的宽度;叶宽为第三片叶的宽度;株高为茎基部至第二长叶的叶尖;鲜重、干重分别是 100 棵苗的质量。同时,各处理取少许土壤,用于土壤微生物量测定。

1.8 不同处理土壤中的可培养微生物类群数量分析

1.8.1 土壤悬浮液制备

在灭菌的研钵中研磨新鲜土壤样品,称取两份 10.0 g 土样,一份于 105 °C 烘箱中烘干至恒重,计算土壤含水率。土壤含水率(%)=[(湿土重-干土重)/干土重]×100。取新鲜土壤 10.0 g 加到无菌 90 mL PBS 中,制成 1:10 的土壤悬液,静置 5 min,吸取 1.0 mL 移入 9.0 mL 磷酸缓冲液试管中,按 10 倍梯度稀释法稀释,用于土壤微生物分析。

1.8.2 土壤主要微生物类群纯培养——平板计数

测定土壤中细菌、放线菌、真菌的数量,并计算每克干土中的数量^[15]。

$$\text{土壤微生物数量(CFU/g)} = M \times D / W$$

式中:M 为菌落平均数;D 为稀释倍数;W 为土壤烘干质量。

1.8.3 土壤功能微生物纯培养——MPN 计数

测定土壤中链霉菌 702、氨化细菌、亚硝化细菌、硝化细菌、反硝化细菌、好气性自生固氮菌、厌氧自生固氮菌、好气性纤维素分解菌的数量,并计算每克干土中的数量^[15]。将有菌液生长的最后 3 个稀释度中出现细菌生长的管数作为数量指标,从 MPN 数值表^[21]中求得数量指标后,再乘以数量指标第一位数的稀释倍数,即是初始液中的菌液浓度。

$$\text{土壤微生物的数量(CFU/g)} = M \times D / W$$

式中:M 为最大或然数近似值;D 为全部出现菌的最高稀释倍数;W 为土壤烘干质量。

1.8.4 土壤微生物 T-RFLP 分析

采用土壤基因组 DNA 提取试剂盒,对培养水稻 30 d 的 CK 和链霉菌 0.5:100 的土样微生物 DNA 提取。纯化后用于 PCR 扩增。用细菌通用引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(5'端用 FAM 标记)

和 1492R:5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'进行 16S rDNA 片段扩增。反应体系及组成参考文献[22]。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)回收纯化 DNA。分别用 HaeIII(Takara)和 MspI(Takara)进行酶切 6 h,具体酶切体系参照说明书进行配制。将酶切产物经过脱盐处理后,与上样缓冲液和 Standard Marker(GeneScan-500.1, Applied Biosystems)混合,96 °C 变性 4 min,迅速冰浴,然后在 ABI 自动测序分析仪(Model 3130 Applied Biosystems)上进行毛细管电泳。电泳结果用 Genemarker V 1.2 软件分析。将细菌序列的长度与 MiCA:Microbial Community Analysis III 数据库(<http://mica.ibest.uidaho.edu/pat.php>)进行对比,找出 T-RFs 所对应的细菌类群。采用 Shannon-wiener index(*H*)、Berger-Parker index(*D*)和 Sorensen similarity index 评价不同处理土壤细菌的多样性、优势度和相似程度,并通过生态学软件(biodap)进行统计分析。以水稻鲜重为指标,采用相关分析的方法,找出显著相关的菌种,在 NCBI 数据库进行 Blast 同源性比对,用 DNAMAN 作出系统发育图。

1.9 数据统计分析

采用 Excel 2007 和 DPS 7.05 进行数据处理和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 农抗 702 对水稻种子萌发率的影响

培养 66 h 农抗 702 浓度为 2、4、6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理组的发芽率与对照相比分别提高了 8.94%、6.67%、11.14%,低浓度农抗 702 对种子萌发的效果几乎与生长刺激素赤霉素 A 等同,农抗 702 浓度高于 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的处理种子发芽率则低于对照(表 1)。

2.2 农抗 702 对萌发种子根长、芽长的影响

农抗 702 对根长有促进作用,但随着农抗 702 浓度的增加,根长受到抑制。农抗 702 浓度为 2、4、6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 根长比对照分别提高了 3.27%、3.33%、10.28%,差异不显著。而农抗 702 浓度为 8、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,比对照根长要短 22.77%、90.03%、90.79%,且差异显著。农抗 702 对芽长的影响没有明显的规律性(表 2)。

2.3 农抗 702 对萌发种子根系活力的影响

农抗 702 对萌发种子根活力的影响如图 1 所示,浓度为 2、4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 农抗 702 处理的种子较对照水稻种子根活力分别提高 24.4%、97.73%,增加显著。

表 1 不同处理对水稻种子发芽率的影响
Table 1 Effects of Ag-antibiotic 702 and GA on germination rates of rice seeds

名称 Name	浓度 Concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	发芽率 Germination rate/%		
		24 h	42 h	66 h
农抗 702 Ag-antibiotic 702	0	75.53 $\pm$ 2.22aA	75.53 $\pm$ 2.22aA	75.53 $\pm$ 2.22aAB
	2	80.00 $\pm$ 3.85aA	80.00 $\pm$ 3.85aA	84.47 $\pm$ 2.22aA
	4	82.20 $\pm$ 4.44aA	82.20 $\pm$ 4.44aA	82.20 $\pm$ 4.44aA
	6	82.20 $\pm$ 2.22aA	82.20 $\pm$ 2.22aA	86.67 $\pm$ 3.85aA
	8	71.13 $\pm$ 2.22aA	71.13 $\pm$ 2.22aAB	71.13 $\pm$ 2.22aAB
	10	66.67 $\pm$ 5.88aA	66.67 $\pm$ 5.88aAB	70.00 $\pm$ 5.88aAB
	20	66.67 $\pm$ 7.70aA	70.00 $\pm$ 8.01aA	76.67 $\pm$ 8.01aA
	30	70.00 $\pm$ 8.01aA	70.00 $\pm$ 8.01aA	73.33 $\pm$ 9.69aAB
	50	70.00 $\pm$ 3.85aA	70.00 $\pm$ 8.01aA	70.00 $\pm$ 8.01aAB
	70	71.13 $\pm$ 5.88aA	71.13 $\pm$ 5.88aAB	71.13 $\pm$ 5.88aAB
	100	36.67 $\pm$ 8.01bA	43.33 $\pm$ 10.18bC	50.00 $\pm$ 12.37bBC
	150	26.67 $\pm$ 4.44bB	43.33 $\pm$ 11.55bC	43.33 $\pm$ 11.55bC
赤霉素 A(GA)	10	80.00 $\pm$ 3.85aA	80.00 $\pm$ 2.22aA	84.45 $\pm$ 2.22a

表 2 不同梯度 702 对水稻根长和芽长的影响
Table 2 Impacts of different concentrations of Ag-antibiotic 702 on root and shoot lengths of rice

农抗 702 的浓度 Ag-antibiotic 702 concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	根长 Root length/cm	芽长 Germinal length/cm
0	3.40 $\pm$ 0.18a	1.83 $\pm$ 0.08ab
2	3.51 $\pm$ 0.18a	1.83 $\pm$ 0.08ab
4	3.52 $\pm$ 0.16a	1.74 $\pm$ 0.06ab
6	3.75 $\pm$ 0.14a	1.90 $\pm$ 0.07a
8	2.63 $\pm$ 0.25b	1.99 $\pm$ 0.10a
10	0.34 $\pm$ 0.10c	1.62 $\pm$ 0.09b
20	0.31 $\pm$ 0.06c	1.78 $\pm$ 0.09ab

注:表中数据为 3 次重复的平均值 $\pm$ 标准误;同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。
Note: Data in table are mean $\pm$ SE from three replicates. Data within a column followed by different lowercase letters indicate significant difference according to Duncan's new multiple range test($P<0.05$).

2.4 农抗 702 对种子萌发时籽粒中淀粉酶活性的影响

图 2 显示了不同浓度的农抗 702 对淀粉酶活性的影响,结果表明,低浓度农抗 702 处理的种子淀粉酶的活性随着农抗 702 浓度的增加而提高,在 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时达到最大,淀粉酶活性增加 6.56%,之后开始降低。总体而言,农抗 702 对淀粉酶活性有一定的促进作用。

2.5 农抗 702 对种子萌发时籽粒中蛋白质和可溶性糖含量的影响

图 3 为不同浓度的农抗 702 对可溶性蛋白含量的影响。结果表明,随着农抗 702 浓度的增加,可溶性蛋白含量增加。农抗 702 浓度为 2、4、6、8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 较对照分别增加了 2.74%、16.59%、33.91%、22.10%,但

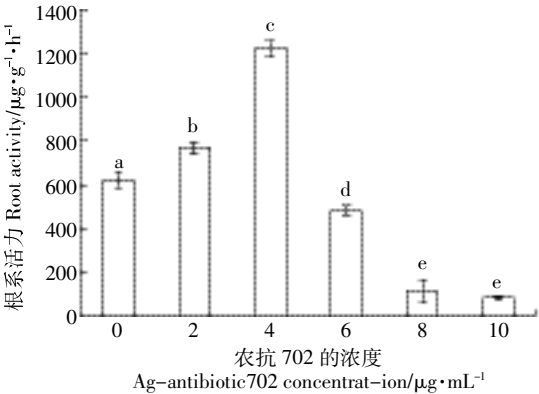
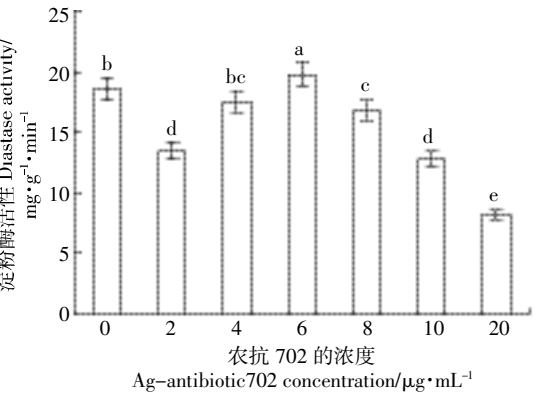


图 1 农抗 702 对发芽种子根活力的影响
Figure 1 Effects of Ag-antibiotic 702 on rice root activities



图中数据为 3 次重复的平均值 $\pm$ 标准误。不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。下同
Bars are mean $\pm$ SE from three replicates. Bars with different lowercase letters indicate significant difference according to Duncan's new multiple range test($P<0.05$). The same below

图 2 农抗 702 对种子淀粉酶活性的影响
Figure 2 Effects of Ag-antibiotic 702 on diastase activity of rice seeds

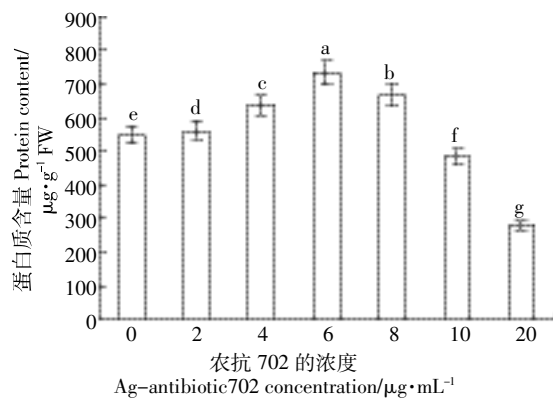


图 3 农抗 702 对种子蛋白质含量的影响

Figure 3 Effects of Ag-antibiotic 702 on seed proteins of rice seeds at germination

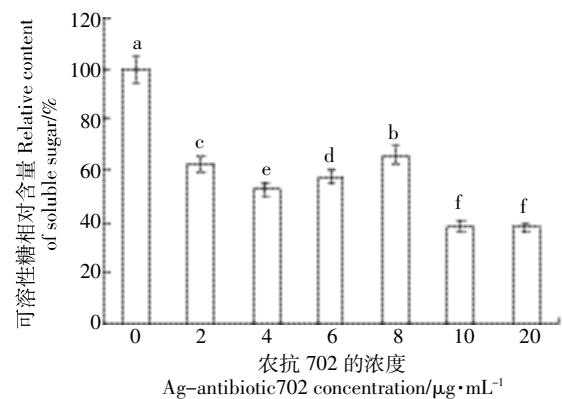


图 4 农抗 702 对种子可溶性糖含量的影响

Figure 4 Effects of Ag-antibiotic 702 on soluble sugar contents of rice seeds

是高浓度农抗 702 降低了可溶性蛋白的含量。如图 4 所示,以对照含糖量为 100%,不同浓度农抗 702 处理的水稻种子的含糖量分别为 62.66%、52.68%、57.78%、66.24%、38.37%、37.98%,与对照相比,含糖量依次降低了 37.34%、47.32%、42.22%、33.76%、61.63%、62.02%,农抗 702 促进了糖的消耗。

2.6 链霉菌 702 固体菌剂对水稻幼苗生长的促进作用

将链霉菌 702 的固体菌剂与土壤分别按质量比 0:100、0.1:100、0.5:100、1:100 进行混合,研究链霉菌 702 对水稻苗期生长的影响。结果表明,与对照相比,在供试的浓度范围内,链霉菌 702 对叶龄没有显著的影响,当菌剂与土壤的质量比为 0.1:100 时,对幼苗的生长没有明显的促进作用,当菌剂与土壤的质量比为 0.5:100 时,幼苗株高、假茎宽、叶宽、总根数、白根数、根长、主根长、鲜重、干重与对照相比分别提高了 15.75%、16.53%、1.98%、21.19%、12.50%、35.30%、37.03%、50.14%、54.91%,差异显著(表 3)。

在供试的浓度范围内,随着菌剂浓度的加大,秧苗株高增加。链霉菌 702 浓度为 1:100 对水稻苗高的促进率高达 34.17%,与对照相比差异显著。水稻秧苗健壮与否的标志之一是秧苗根系发育状况,而秧苗地下生长部分的重要参数是根数与白根数。在同等条件下水稻育秧,秧苗的白根数与根数呈正相关,根数多,白根数也多,白根的多少直接影响插秧后的秧苗返青及分蘖。增加白根数可以提高秧苗的整体素质。由表 3 可知,与对照相比,链霉菌 702 浓度为 0.5:100 对白根数的影响有明显差异。

2.7 不同处理土壤中可培养微生物类群数量分析

从表 4 可以看出,土壤三大微生物类群中,可培养细菌在数量上比可培养放线菌和真菌多,占绝对优势,是优势菌群。施加链霉菌 702 菌剂后的土壤可培养细菌和霉菌数量均有所减少,而放线菌数量则高于对照土壤,菌剂和土壤比为 0.1:100、0.5:100、1:100 的处理与对照相比,可培养细菌数分别降低了 35.64%、

表 3 链霉菌 702 对水稻幼苗生长的影响

Table 3 Effects of *Streptomyces* 702 on growth of rice seedling

秧苗素质指标 Index of seedling quality	菌剂:土壤 Microbial inoculum:soil/ $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$			
	0:100	0.1:100	0.5:100	1:100
株高 Plant height/cm	24.87±0.83c	23.21±1.06c	28.29±1.03b	33.37±0.78a
叶龄 Leaf age	4.09±0.09a	4.27±0.18a	4.13±0.17a	4.07±0.18a
假茎宽 Stem width/mm	2.48±0.09b	2.29±0.13bc	2.89±0.12a	3.15±0.13a
叶宽 Leaf width/mm	3.03±0.07b	2.97±0.08bc	3.09±0.09ab	3.37±0.07a
总根数 Total root number	14.96±0.55b	13.93±0.73b	18.13±0.90a	13.80±0.58b
白根数 White root number	9.84±0.52ab	7.73±0.54c	11.07±0.84a	8.80±0.45bc
根长 Root length/cm	7.62±0.43b	7.77±0.53b	10.31±0.60a	8.35±0.46b
主根长 Main root length/cm	5.67±0.25b	6.86±0.57a	7.77±0.41a	7.82±0.41a
鲜重 Fresh weight/g	31.99±0.49c	30.73±0.36c	48.30±0.54b	60.53±1.18a
干重 Dry weight/g	4.79±0.02e	4.98±0.01d	7.42±0.07b	10.88±0.04a

表4 链霉菌 702 对水稻土壤可培养微生物的影响(CFU·g⁻¹)
Table 4 Effects of *Streptomyces* 702 on culturable microorganisms in paddy soil

可培养微生物名称 Name of culturable microorganisms	菌剂:土壤 Microbial inoculums:soil/g·g ⁻¹			
	0:100	0.1:100	0.5:100	1:100
细菌 Bacteria	5.33×10 ⁹	3.43×10 ⁹	1.70×10 ⁹	5.17×10 ⁸
放线菌 Actinomycetes	2.0×10 ⁵	6.17×10 ⁷	7.75×10 ⁸	9.45×10 ⁸
霉菌 Moulds	3.5×10 ⁴	2.17×10 ⁴	4.9×10 ³	3.12×10 ⁴
链霉菌 702 <i>Streptomyces</i> 702	0	5.24×10 ⁵	6.38×10 ⁶	1.24×10 ⁷
氨化细菌 Ammonifying bacteria	4.22×10 ⁸	3.63×10 ⁸	3.58×10 ⁸	2.98×10 ⁸
亚硝化细菌 Nitritebacteria	9.04×10 ²	1.56×10 ²	36.00	96.00
硝化细菌 Nitrobacteria	5.43×10 ⁴	4.67×10 ⁴	4.6×10 ⁴	3.83×10 ⁴
反硝化细菌 Denitrifyingbacteria	4.22×10 ⁶	3.63×10 ⁶	3.58×10 ⁶	2.98×10 ⁶
好气性自生固氮菌 Aerobic nitrogen-fixing bacteria	6.03×10 ³	1.82×10 ⁴	3.58×10 ⁴	2.98×10 ⁴
厌氧自生固氮菌 Anaerobic nitrogen-fixing bacteria	3.47×10 ³	7.78×10 ⁴	3.93×10 ⁵	3.62×10 ⁵
好气性纤维素分解菌 Aerobic cellulose decomposing bacteria	49.7	2.07×10 ²	3.32×10 ²	4.26×10 ²

49.52%、90.30%，可培养霉菌数分别降低了 38.00%、86.00%、10.86%，可培养放线菌数分别提高了约 200 倍、5000 倍和 7000 倍。链霉菌 702 的菌数分别占可培养放线菌菌数的 0.85%、0.82%、1.31%；氨化细菌分别降低了 13.98%、15.17%、29.38%，亚硝化细菌分别降低了 83.43%、96.02%、89.38%，硝化细菌分别降低了 14.00%、15.29%、29.47%，反硝化细菌分别降低了 13.98%、15.17%、29.38%；而好气性自生固氮菌分别提高了约 2 倍、5 倍和 4 倍，厌氧自生固氮菌分别提高了约 21 倍、112 倍和 103 倍，好气性纤维素分解菌分别提高了约 3 倍、5 倍和 7 倍。

上述结果说明链霉菌 702 和各微生物之间存在相互作用，提高了土壤中对水稻生长有促进作用的有益微生物的数量，改变了水稻土的微生态环境。

2.8 土壤微生物 T-RFLP 分析

由表 5 可知，最适处理组的链霉菌 702 0.5:100 土壤的 Shannon-Wiener 多样性指数(H')为 3.17，与 CK 相比增加 34.89%，优势度(D')却比 CK 小，说明链霉菌 702 能促进一些稀有或生态势较弱的细菌的生长。从相似指数看，经过链霉菌 702 处理的土壤与 CK 差异很大，说明土壤细菌群落结构发生了显著变化。

图 5、图 6 为与水稻鲜重有显著正相关的细菌系

统发育树。通过对其功能分析，发现链霉菌 702 处理组中显著正相关的细菌包括有益菌、功能菌和病原菌，且以有益菌和功能菌为主，按细菌功能的不同分为 5 大类：

(1) 硫素循环，主要包括亚硫酸盐杆菌、脱硫弧菌和戈登氏菌属。

(2) 碳素循环，主要有红球菌属、海迪茨氏菌等，还存在一些具有降解作用的菌，包括降解纤维素的噬纤维菌属，降解酚酸类的微杆菌属。

(3) 氮素循环，包括固氮作用的慢生根瘤菌属，具有硝化作用的硝化杆菌属和硝化螺旋菌属。

(4) 营养代谢，主要包括一些链霉菌属参与土壤的营养代谢循环，同时在防治植物病害上也起到一定作用。

(5) 有益菌，有益菌多为芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属。

3 讨论

本试验表明，低浓度的农抗 702($\leq 6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对水稻种子的生长有促进作用，种子萌发率，根长、根系活力等指标均高于对照，但随农抗 702 浓度的升高，其又表现出抑制作用。这些变化趋势与种子中蛋白质

表5 链霉菌 702 对水稻土壤微生物多样性及相似性影响
Table 5 Effects of *Streptomyces* 702 on biodiversity and similarity of paddy soil microorganisms

土壤类型 Soil type	片段总数 Total number of fragments	显著片段数 Significant number of fragments	多样性指数 Shannon-Wiener index(H')	优势度 Berger-Parker index(D')	相似系数 Sorenson similarity index
CK	11	1	2.35	0.164	1
链霉菌 702 0.5:100	26	3	3.17	0.095	0.52

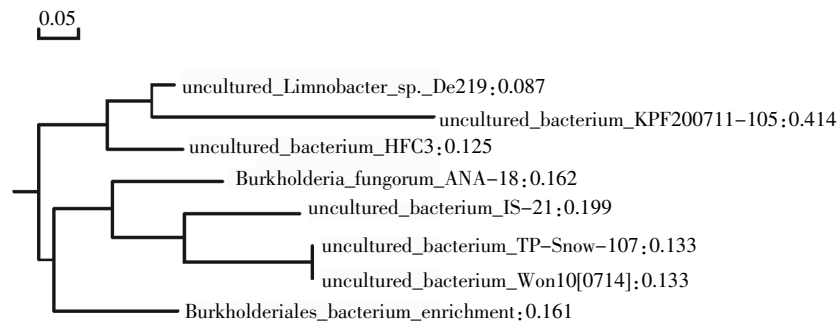


图 5 CK 土壤中显著相关细菌系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of bacteria in control soil

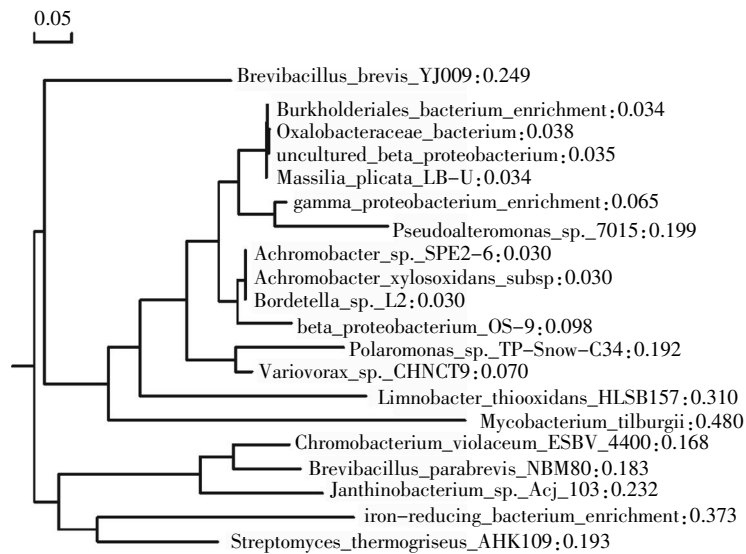


图 6 链霉菌 702 0.5:100 组土壤中显著相关细菌系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree of bacteria in soil treated with *Streptomyces* 702 at 0.5:100

含量的变化趋势一致,与 Mukherji 等发现^[23]一致。而出现这种低促高抑的原因可能是低浓度农抗 702 可提高水稻内源赤霉素、蛋白质含量而促进根的生长;高浓度农抗 702 则破坏了水稻抗氧化系统,从而抑制其生长。添加适当比例的链霉菌 702 提高了水稻秧苗素质,与峥嵘^[24]研究 5406 放线菌对小麦幼苗的影响结果相符,出现这种现象可能跟外源添加链霉菌 702 改变了根域微生物区系有关。研究发现接种链霉菌 702 提高了土壤中可培养放线菌的数量,降低了可培养真菌的数量,与周永强等的研究结果一致^[25]。

对土壤可培养功能微生物的研究表明,各种功能微生物的数量均发生变化。含氮有机物如蛋白质、尿素、尿酸、核酸等经氨化细菌的分解作用而产生氨的氨化作用对提供农作物氮素营养十分重要,施入不同浓度的链霉菌 702 菌剂氨化细菌分别降低了 13.98%、15.17%和 29.38%,降低比例不大,可能引起

的不利作用较小。亚硝化细菌和硝化细菌所引起的硝化作用是自然界氮素循环中不可缺少的一环,但是对农业生产意义不大,硝化作用产生的硝酸盐极易随雨水流入江河湖海,从而降低肥料的利用率,更为严重的是引起水体的富营养化而导致环境污染。而施入链霉菌 702 可以有效降低硝化细菌和亚硝化细菌的数量,尤其是亚硝化细菌分别降低了 83.43%、96.04%、89.40%,下降比例较大,从而有效减弱了土壤的硝化作用,防止氮素营养的损失,有利于农业生产。由固氮微生物引起的生物固氮作用是地球上仅次于光合作用的生物化学反应,是生物圈中一切生物生存和繁荣发展的还原态氮化物的源泉。施入链霉菌 702 极大地促进了好气性自生固氮菌和厌氧自生固氮菌数量的增加,其中好气性自生固氮菌分别提高了约 2 倍、5 倍和 4 倍,厌氧自生固氮菌分别提高了 21 倍、112 倍和 103 倍,由此可见链霉菌 702 在土壤中定殖可以有

效促进土壤中固氮微生物的生长,从而促进作物的生长。土壤中存在许多可以分解纤维素的微生物,包括真菌、细菌、放线菌等,这些微生物对纤维素的生物转化具有重要意义。施入固体菌剂促使好气性纤维素分解菌分别提高了3倍、5倍和7倍,有利于纤维素等大分子物质分解成小分子的糖供水稻吸收利用,从而促进水稻的生长。

土壤微生物 T-RFLP 分析发现,与对照相比,处理的根域土壤中有益微生物的含量明显增加,进一步说明链霉菌 702 和土壤可培养微生物之间存在着相互作用。链霉菌 702 能促进一些稀有或生态势较弱的菌群的生长,其作为一种有益菌,参与土壤的营养代谢循环,同时在防治植物病害上也起到一定作用。通过显著相关分析发现,链霉菌属对水稻生长的促进是显著的。链霉菌 702 添加一方面会广谱地抑制土壤中致病菌的增长,另一方面会调整土壤中群落结构,增加与水稻生长相关的 C、N、S 循环及有益菌的数量,从而促进水稻的营养代谢进而促进水稻生长。具体机制可能是:

(1)施加链霉菌 702 固体菌剂后,促进了土壤有益微生物数量的增加,土壤微生态系统发生了较大变化,从而加速土壤中作为碳源、氮源等有机质的分解转化,增加了土壤速效养料的含量,促进了矿质养料的有效性,提高了土壤的生物活性和物理缓冲能力,提供了有利根系生长的条件,从而有效促进了作物的生长发育。

(2)优先占领根际,改善土壤微生物区系,通过产生抗生素,诱导植物系统抗性或拮抗作用抑制根际的病原菌生长,或者是增强植株的形态抗病性^[26]。

(3)产生生长素吲哚-3-乙酸(IAA)、铁载体等物质促进植物营养吸收,促进植物生长、发育^[27]。当然,这种影响是相互的,正如 Ortiz-Castro R 等文章中所论述的^[28]。

4 结论

低浓度农抗 702 促进水稻种子萌发、胚根和芽的生长,提高根系活力。种子中的淀粉酶活性、蛋白质含量随农抗 702 浓度的升高先升后降。施加链霉菌 702 菌剂降低了土壤可培养细菌和霉菌数量,增加可培养放线菌数量;降低了硝化细菌和亚硝化细菌的菌数,提高了好气性纤维素分解菌菌数。土壤微生物不同生理类群的变化,加速了土壤养分循环,增强了水稻的养分吸收,从而促进水稻生长。农抗 702 对水稻种子

萌发具有低促高抑作用,其产生菌链霉菌 702 对水稻根域土壤微生态系统调整作用显著。

参考文献:

- [1] Xiong Z Q, Zhang Z P, Li J H, et al. Characterization of *Streptomyces padanus* JAU4234, a producer of actinomycin X2, fungichromin, and a new polyene macrolide antibiotic[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(2):589-592.
- [2] 周云,张智平,涂晓嵘,等.农抗 702 抗真菌活性的测定[J]. *江西农业大学学报*, 2009, 31(6):1127-1133.
ZHOU Yun, ZHANG Zhi-ping, TU Xiao-rong, et al. Determination of the antifungal activity of agricultural antibiotics 702[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2009, 31(6):1127-1133.
- [3] 汤菊香,冯艳芳. KH_2PO_4 和青霉素对小麦老化种子发芽及幼苗生长的影响[J]. *种子*, 2001, 4:19-20, 25.
TANG Ju-xiang, FENG Yan-fang. Effect of KH_2PO_4 and penicillin on the germination of wheat aged seed and the growing of seedling[J]. *Seed*, 2001, 4:19-20, 25.
- [4] 孙存华. 青霉素对小麦种子发芽和幼苗生长的影响[J]. *植物生理学通讯*, 1990(5):32-34.
SUN Cun-hua. Effects of penicillin on seed germination and growth of wheat[J]. *Plant Physiology Communications*, 1990(5):32-34.
- [5] Mukherji S, Wareing P F. The effect of penicillin on the levels of endogenous gibberellins and cytokinins in mungbean seedlings[J]. *Biol Plant*, 1983, 25(3):161-165.
- [6] 王远宏. 024 放线菌及其所产抗生素的初步研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2002:63-65.
WANG Yuan-hong. Preliminary studies on the 024-strain of actinomycetes and its antibiotic[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2002: 63-65.
- [7] 王飞,涂艳丽,李标,等.链霉菌 702 发酵液对水稻种传真菌的抑制效果、种子发芽率的影响[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(7):1969-1970.
WANG Fei, TU Yan-li, LI Biao, et al. Studies on *Streptomyces* 702 fermentation solution restraint of rice seed-born fungi and effect of seed germination[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(7):1969-1970.
- [8] 涂艳丽,王飞,赵伟,等.链霉菌 702 发酵液对提高水稻种子耐贮藏性的研究[J]. *种子*, 2007, 26(9):39-41.
TU Yan-li, WANG Fei, ZHAO Wei, et al. Study of *Streptomyces* 702 fermentation liquid on enhancing storage endurance of rice seeds[J]. *Seed*, 2007, 26(9):39-41.
- [9] Morrissey J P, Dow J M, Mark L, et al. Are microbes at the root of a solution to world food production[J]. *EMBO*, 2004, 5(10):922-926.
- [10] Furnkranz M, Muller H, Berg G. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia[J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2009, 116(4):149-155.
- [11] Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(1):11-18.
- [12] 梁亚萍,宗兆锋,马强. 6 株野生植物内生放线菌防病促生作用

- 的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(7): 131-136.
- LIANG Ya-ping, ZONG Zhao-feng, MA Qiang. Inhibiting and promoting effect on plants of six strains endophytic actinomycetes isolated from wild plants[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2007, 35(7): 131-136.
- [13] 郭小芳. 6株生防放线菌的生物学习性及防病抑菌作用研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学, 2005.
- GUO Xiao-fang. Studies on biological characteristic and control effect of six strains of actinomycetes against target pathogens[D]. Xianyang: Northwest Agriculture and Forestry University, 2005.
- [14] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社. 1998.
- FANG Zhong-da. Plant pathology research methods[M]. Beijing: China Agriculture Press. 1998.
- [15] 林贵兵. 丹参栽培土壤适宜性可培养微生物类群数量研究[D]. 成都中医药大学, 2010.
- LIN Gui-bing. Research on microbial population structure on soil suitability of salvia miltiorrhiza origin[D]. Chengdu University of TCM, 2010.
- [16] 魏赛金, 熊智强, 涂国全, 等. 链霉菌702菌株所产抗真菌单体组分DZP-8和DZP-9的分离纯化与制备[J]. 广东农业科学, 2011, 38(16): 4-7.
- WEI Sai-jin, XIONG Zhi-qiang, TU Guo-quan, et al. Isolation, purification and preparation of the antifungal monomer DZP-8 and DZP-9 from *Streptomyces* 702[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 38(16): 4-7.
- [17] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社, 2000: 151-153.
- ZOU Qi. Plant physiology experimental guidance[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 151-153.
- [18] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 二版. 广州:华南理工大学出版社, 2006: 55-56.
- CHEN Jian-xun, WANG Xiao-feng. Plant physiology experimental guidance[M]. Second edition. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2006: 55-56.
- [19] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. 天津化工, 2009, 23(3): 40-41.
- WANG Xiao-ping, XING Shu-li. Determination of protein quantitation using the method of coomassie brilliant blue[J]. *Tianjin Chemical Industry*, 2009, 23(3): 40-41.
- [20] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2009: 30-31.
- ZHANG Zhi-liang, QU Wei-jing, LI Xiao-fang. Plant physiology experimental guidance[M]. Beijing: Higher Education Press, 2009: 30-31.
- [21] 土壤微生物研究会[日]. 土壤微生物实验法[M]. 叶维青, 张维谦, 周鹏里, 等译. 北京:科学出版社, 1983: 215-220.
- Microbial Research [Japan]. Microbial experimental method [M]. YE Wei-qing, ZHANG Wei-qian, ZHOU Peng-li, et al translation. Beijing: Science Press, 1983: 215-220.
- [22] 倪国荣. 不同土壤肥力及施肥制度下的双季稻田土壤微生物特征[D]. 南昌:江西农业大学, 2013.
- NI Guo-rong. Characteristics of soil microbial under different fertility and fertilization systems of double cropping rice field[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013.
- [23] Mukherji S, Wareing P F. The effect of penicillin on the levels of endogenous gibberellins and cytokinins in mungbean seedlings[J]. *Biol Plant*, 1983, 25(3): 161-165.
- [24] 嵇嵘. 5406放线菌对小麦幼苗的影响[J]. 内蒙古农业大学学报, 2006, 27(2): 150-154.
- ZHENG Rong. The effect of 5406 actinomycetes on the wheat seedling[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2006, 27(2): 150-154.
- [25] 周永强, 薛泉宏, 杨斌, 等. 生防放线菌对西瓜根域微生态的调整效应[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(4): 143-149.
- ZHOU Yong-qiang, XUE Quan-hong, YANG Bin, et al. Adjusted effect of inoculating with biocontrol actinomycetes on microbial flora of watermelon rooting zone[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2008, 36(4): 143-149.
- [26] 董金皋, 黄梧芳. 植物的形态结构与抗病性[J]. 植物病理学报, 1995, 25(1): 1-3.
- DONG Jin-gao, HUANG Wu-fang. The morphological structures and is a series instance in plant[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1995, 25(1): 1-3.
- [27] Burdman S J E, Okon Y. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. Microbial Interactions in Agriculture and Forestry[M]. Calicut, India: Science Publishers Inc. 2000: 229-250.
- [28] Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo H A, Macias-Rodriguez L, et al. The role of microbial signals in plant growth and development[J]. *Plant Signal Behavior*, 2009, 4(8): 701-712.