



王晶,李波,黎柳萍,等. 广西亚热带植物根际促生菌的筛选、鉴定及促生作用研究[J]. 南京农业大学学报,2024,47(3):468-476.

WANG Jing,LI Bo,LI Liuping,et al. Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria and its growth promoting effects in subtropical region in Guangxi [J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(3):468-476.

广西亚热带植物根际促生菌的筛选、鉴定及促生作用研究

王晶,李波,黎柳萍,韦靖,姜明国,周燕*

(广西民族大学海洋与生物技术学院/广西多糖材料与改性重点实验室/
海洋生物资源开发与利用国际合作重点实验室,广西 南宁 530008)

摘要:[目的]本文旨在从植物根际土壤中分离具有多种促生性能的菌株,并明确其促生特性和抗病效果。[方法]采用选择培养方法从植物根际土壤中筛选具有固氮、产氨、溶磷、解钾、分泌吲哚乙酸(indole acetic acid,IAA)、产铁载体和产蛋白酶等特性的菌株,通过 16S rRNA 对菌株分类学鉴定。测定其对小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、小麦冠腐病菌(*Fusarium graminearum*)、黄瓜织球壳菌(*Plectosphaerella cucumerina*)、香蕉炭疽病菌(*Colletotrichum musae*)、交链格孢菌(*Alternaria alternata*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抑制作用,并通过盆栽试验探究植物根际促生菌对植物的促生效果。[结果]从植物根际土壤中分离细菌 191 株,固氮及产氨菌 171 株,解有机磷菌 66 株,解无机磷菌 62 株,解钾菌 28 株,产铁载体菌 98 株,产 IAA 菌 41 株,产蛋白酶菌 45 株。抑菌试验表明贝莱斯芽胞杆菌 C32 对 6 种致病菌均表现出较强的抑菌活性,抑菌率均在 50%以上。盆栽试验结果表明,1 株 IAA 高产菌株川大肠杆菌 0208 对番茄和玉米植株促生效果最为显著。与对照组相比,玉米盆栽株高、茎粗、根长、地上部鲜重和地下部鲜重分别增加 21.49%、19.35%、42.98%、19.58% 和 56.67%,番茄盆栽分别增加 53.51%、14.90%、12.28%、43.12% 和 48.62%。[结论]从广西亚热带植物根际土壤中筛选到多株具有高效促生和防病功能的菌株,为微生物肥料的开发提供优质菌种资源。

关键词:植物根际促生菌;促生作用;吲哚乙酸;拮抗细菌

中图分类号:S144

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)03-0468-09

Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria and its growth promoting effects in subtropical region in Guangxi

WANG Jing,LI Bo,LI Liuping,WEI Jing,JIANG Mingguo,ZHOU Yan*

(College of Marine and Biotechnology/Guangxi Key Laboratory Cultivation Base for Polysaccharide Materials and Modification/Key Laboratory for International Cooperation in the Development and Utilization of Marine Biological Resources,Guangxi Minzu University,Nanning 530008,China)

Abstract:[Objectives]The paper was aimed to isolate a variety of plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR)from plant rhizosphere soil and clarify their growth-promoting characteristics and disease-resistant effects. [Methods] PGPR strains with characteristics of nitrogen fixation, ammonia production, phosphorus solubilization, potassium solubilization, indole acetic acid (IAA) secretion, siderophore production and protease production were screened from plant rhizosphere soil. Then the strains were identified by 16S rRNA. In addition, antibacterial activities against *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Colletotrichum musae*, *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* were determined, and the growth promoting effect of strains on plants were also tested by pot experiment. [Results] A total of 191 strains of bacteria were isolated from plant rhizosphere soil, including 171 strains of nitrogen-fixing and ammonia-producing bacteria, 66 strains of organophosphorous solubilizing bacteria, 62 strains of inorganic phosphorolytic solubilizing bacteria, 28 strains of potassium solubilizing bacteria, 98 strains of siderophore producing bacteria, 41 strains of IAA producing bacteria and 45 strains of protease producing bacteria. Antimicrobial experiments showed that *Bacillus velezensis* C32 exhibited strong antibacterial activity against six kinds of pathogenic bacteria, and the inhibition rate was generally more than 50%. The results of pot experiment showed that a high-yielding IAA strain, *Enterobacter chuandaensis* 0208, had the most significant growth promotion effect on tomato and maize. Compared with the control group, plant height, stem diameter, root length, fresh weight of overground and underground part of potted maize increased by 21.49%, 19.35%, 42.98%, 19.58% and 56.67%, and the increase of potted tomato was 53.51%, 14.90%, 12.28%, 43.12% and 48.62%, respectively. [Conclusions] Several strains with efficient growth promotion and disease prevention functions were screened from the plant rhizosphere soil of subtropical region in Guangxi, which could

收稿日期:2023-04-23

基金项目:广西民族大学 2020 年度校级引进人才科研启动项目(2020KJQD23)

*通信作者:周燕,博士,讲师,研究方向为微生物资源开发与利用,E-mail:zy209@126.com。

provide high-quality bacteria resources for the development of microbial fertilizers.

Keywords: plant growth-promoting rhizobacteria; growth-promoting effect; indole acetic acid (IAA); antagonistic bacteria

目前,人口增长对耕地地力产生的压力以及植物病原真菌对作物生长的威胁,使可持续农业生态系统迅速退化,全球农业生态系统正面临严峻挑战。为维持农业生产,加强施肥已成为一项基本措施^[1]。由于长期大量使用、滥用化肥,其通过食物链的生物积累和生物放大对人体健康产生危害,同时对有益的自然昆虫、土壤肥力和微生态系统也产生了不利影响^[2-3]。微生物因其具有安全、绿色、高效等特点,近年来受到广泛关注,因此,利用植物有益微生物,实现对农作物的施肥增产,是应对粮食安全和环境可持续性发展的有效方法^[4]。

植物根际土壤中含有大量促进植物生长的根际细菌,它们不仅能促进植物的生长发育,还能抵御病原微生物入侵,保护植物免受病害侵袭。通过不同的作用机制对植物的生长产生积极影响的根际细菌被称为植物根际促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)^[5]。PGPR影响植物的生长,对促进植物的健康起着至关重要的作用^[6]。PGPR可通过直接作用,如固氮、产氨、溶磷、解钾、分泌吲哚乙酸(IAA)等生长调节剂,促进植物生长发育^[7-8];也可以产生铁载体和激活不同的植物防御酶,如几丁质酶、蛋白酶、过氧化物酶、多酚氧化酶和 β -1,3-葡聚糖酶^[9],还能诱导植物的系统抗性(induced system resistance, ISR),从而触发植物防御及增强植物胁迫耐受性^[10-11],达到对植物害虫和病原体进行生物防治^[12-13]的效果。PGPR还可以促进植物根系发育和养分吸收,从而降低生产成本,减少化肥使用,减轻环境影响^[2]。

本研究以广西亚热带植物根际土壤样品为筛选材料,分离筛选具有固氮、产氨、溶磷、解钾、分泌 IAA、产铁载体和产蛋白酶的菌株,分析其促生性能和抑菌能力,旨在筛选出具有多种促生性能或拮抗效果的优质 PGPR 菌株,为微生物菌剂的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 分别采集广西大明山自然保护区(23°37' N, 108°49' E, 海拔 546.8 m)植物及广西亚热带作物研究所基地(22°34' N, 106°78' E, 海拔 101.9 m)坚果与番荔枝根际土壤,置于无菌采样袋中,于实验室 4 °C 保存备用。

1.1.2 番茄与玉米品种 番茄品种为‘红禧 F1’,购自河北中科茂华种业有限公司;玉米品种‘粤甜 29 号’,购自合肥合丰种业有限公司。

1.1.3 供试病原真菌 小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、小麦冠腐病菌(*Fusarium graminearum*)、黄瓜织球壳菌(*Plectosphaerella cucumerina*)、香蕉炭疽病菌(*Colletotrichum musae*)、交链格孢菌(*Alternaria alternata*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)由广西多糖材料与改性重点实验室提供。

1.1.4 主要培养基及试剂 LB 培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):胰蛋白胨 10.0 g, 酵母浸粉 5.0 g, NaCl 10.0 g, pH7.0。NA 培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 5 g, 琼脂 15.0 g, pH7.0。金氏 B 培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): K_2HPO_4 1.5 g, MnSO_4 1.5 g, 蛋白胨 20.0 g, 甘油 10 mL, 琼脂 15.0 g, pH7.2。蛋白胨水液体培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, pH7.2。有机磷培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):葡萄糖 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, 酵母浸粉 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, MgSO_4 0.3 g, FeSO_4 0.03 g, MnSO_4 0.03 g, 卵磷脂 0.2 g, CaCO_3 1.0 g, pH7.0~7.5;无机磷培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):葡萄糖 10.0 g, 酵母浸粉 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3g, MgSO_4 0.3 g, FeSO_4 0.03 g, MnSO_4 0.03 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, pH7.0~7.5;阿须贝固氮培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):甘露醇 10 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 0.2 g, CaSO_4 0.1 g, CaCO_3 5 g, pH7.2。亚历山鲍罗夫培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):蔗糖 5 g, FeCl_3 0.005 g, CaCO_3 0.1 g, Na_2HPO_4 2 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, 钾长石粉 1 g。牛奶琼脂培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):脱脂奶粉 15 g, LB 培养基 25 g, 琼脂 18 g;CAS 检测培养基($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$):CAS 60.5 mg, HDTMA 72.9 mg, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.645 mg, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 295.25 mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1 213.5 mg, $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ 125 mg, KH_2PO_4 37.5 mg, NaCl 62.5 mg, pH6.8。

1.2 菌株筛选及促生能力测定

1.2.1 PGPR 菌株的分离纯化 取土壤样品 10 g, 放入 90 mL 无菌水中, 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡 3 h, 梯度稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 倍的土壤悬液后, 分别涂布于 LB、NA 和金氏 B 筛选培养基上, 30 °C 恒温培养 1~3 d 后选择

不同形态菌株进行纯化并甘油保藏。

1.2.2 菌株固氮和产 NH_3 能力测定 将菌株纯化后接种于 LB 液体培养基中, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 24 h, 取菌液 $5\text{ }\mu\text{L}$ 接种于阿须贝固氮培养基中央, 每株菌重复 3 次, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 倒置培养 3 d, 观察菌株生长情况。若菌株正常生长, 则判断其具有固氮能力。

将菌株纯化后接种于装有 10 mL 蛋白胨水液体培养基的试管中, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 48 h 后加入 0.5 mL Nessler 试剂, 有黄褐色沉淀出现, 则表明其具有产 NH_3 能力^[14]。

1.2.3 菌株解磷能力测定 将纯化后菌株接种于有机磷培养基和无机磷培养基中央, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 倒置培养 5 d, 若菌落周围有透明圈产生, 则判断其具有解磷能力。测量溶磷透明圈直径 (D) 和菌落直径 (d), 并计算溶磷透明圈直径与菌落直径比值, 判断菌株解磷能力强弱。

将菌株接种至 LB 液体培养基中, 摇床培养至 D_{600} 值为 1.0, 按 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 接种量分别接种于装有 50 mL 有机磷培养基和无机磷培养基的发酵瓶中, 以不接菌的有机磷和无机磷培养液作为空白对照。 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 7 d 后, 发酵液 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 采用钼锑抗比色法^[15]测定上清液中有效磷含量。

1.2.4 菌株解钾能力测定 将纯化后菌株接种于亚历山鲍罗夫培养基中央, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 倒置培养 5 d, 若菌落周围有透明圈产生, 则判断其具有解钾能力。测量透明圈直径 (D) 和菌落直径 (d), 并计算透明圈直径与菌落直径比值, 判断菌株解钾能力强弱。

1.2.5 菌株产铁载体能力测定 将纯化后菌株接种于 CAS 检测培养基中央, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 倒置培养 3~5 d, 若菌落周围有橙黄色晕圈产生, 则判断其具有产铁载体能力。测量橙色铁载体晕圈 (D) 和菌落直径 (d) 并计算其比值。

1.2.6 菌株分泌吲哚乙酸 (IAA) 能力测定 取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 菌液 ($D_{600} = 1.0$) 接种于装有 20 mL 含 L -色氨酸 ($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 LB 液体培养基中, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 3 d, 取菌悬液 $8\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取 0.5 mL 上清液加入等体积 Salkowski 比色液混合, 分别以等量 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准品和空白培养基为阳性对照和阴性对照。室温避光显色 30 min, 观察颜色变化, 若溶液颜色变红则表示产生 IAA。测定 D_{530} 值, 根据标准曲线计算各菌株分泌 IAA 浓度^[16]。

1.2.7 菌株产蛋白酶能力测定 将纯化后的菌株接种于牛奶琼脂培养基中央, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 倒置培养 2 d, 重复 3 次, 若菌落周围有水解圈产生, 则判断其具有产蛋白酶活性。测量蛋白酶水解圈直径 (D) 和菌落直径 (d), 并计算 D/d 比值, 比值越大表示蛋白酶活性越强。

1.3 菌株鉴定

采用 16S rRNA 基因的通用引物 27F 和 1541R 进行 PCR 扩增, 将得到的扩增产物交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 将测序结果与 EzBioCloud 数据库 (www.ezbiocloud.net) 中的已知序列进行比对分析。

1.4 菌株抑菌能力测定

采用平板对峙法^[17]筛选对小麦根腐病菌 (*B. sorokiniana*)、小麦冠腐病菌 (*F. graminearum*)、黄瓜织球壳菌 (*P. cucumerina*)、香蕉炭疽病菌 (*C. musae*)、交链格孢菌 (*A. alternata*)、尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*) 具有拮抗作用的优良 PGPR 菌株。将病原菌接种于 PDA 与 LB 的混合培养基中央, 将待测细菌点接于距中央位置 25 mm 处, 每个处理重复 3 次, 以只接种病原菌的平板为对照。 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养 5~7 d, 待对照组病原菌即将铺满平板时, 测量对照组和处理组的病原菌直径, 并计算其抑菌率。抑菌率 = (对照组病原菌直径 - 处理组病原菌直径) / 处理组病原菌直径 $\times 100\%$ 。

1.5 菌株促生效果盆栽验证

发酵液制备: 将菌株接种至装有 50 mL LB 液体培养基的发酵瓶, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 24 h, 得到发酵液, 将发酵液与水按体积比 1:50 稀释, 以未接菌的 LB 液体培养基与水按体积比 1:50 稀释作为对照组。

盆栽试验: 番茄与玉米种子表面消毒后, 放置在内有湿润滤纸的 $13\text{ cm}\times 13\text{ cm}$ 的方形培养皿中, 室温条件下置于暗处催芽 24 h。已发芽的植物种子移栽入花盆中, 深度约 1.5 cm, 生长 7 d 后, 选取长势相对一致的植物幼苗开展试验。番茄和玉米试验组分别浇灌 50 mL 或 100 mL 上述发酵稀释液, 对照组浇灌等量 LB 稀释液, 每个处理 3 次重复, 每 7 d 浇灌 1 次, 28 d 后对番茄与玉米植株取样, 测定并记录各处理组植株的株高、茎粗、根长、地上部鲜重、地下部鲜重等指标。

1.6 数据处理与分析

运用 Excel 2016 和 SPSS 21.0 软件对数据进行处理和单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 PGPR 菌株特性筛选

通过固氮、产氨、解磷、解钾、产铁载体、分泌 IAA、产蛋白酶等 PGPR 特性,对植物根际土壤样品进行筛选,获得菌株 191 株,其中具有 3 种及以上促生特性的 PGPR 菌株共 84 株,部分植物根际促生菌特性如表 1 所示。

表 1 植物根际促生菌特性

Table 1 Characteristics of plant rhizosphere growth-promoting bacteria

菌株 Strain	固氮及产 NH ₃ Nitrogen fixation and NH ₃ production	解有机磷(D/d) Organophosphorus solubilization(D/d)	解无机磷(D/d) Inorganic phosphorus solubilization(D/d)	产蛋白酶(D/d) Proteinase production (D/d)	IAA 含量/(mg·L ⁻¹) IAA content	解钾 Potassium solubilization	产铁载体 Siderophore production
0208	+	2.04±0.01	1.61±0.00	-	60.72±0.06	-	+
0608	+	3.38±0.01	1.66±0.00	-	-	+	+
1040	+	-	-	2.64±0.11	-	-	-
A2	+	2.62±0.09	2.38±0.02	-	16.75±0.04	-	+
B6-2	+	3.39±0.01	1.43±0.02	-	20.84±0.06	-	+
BD4	+	5.33±0.01	2.86±0.00	-	11.46±0.03	-	+
C3	+	1.96±0.05	-	-	39.02±0.04	-	+
D2	+	3.82±0.04	1.63±0.01	-	-	-	+
F6	+	5.98±0.10	3.75±0.06	1.74±0.02	0.83±0.01	-	+

注:“+”表示具有该特性,“-”表示无该特性。

Note:“+” means with the characteristics,“-” means without the characteristics.

2.2 菌株固氮和产氨能力分析

利用阿须贝固氮培养基和蛋白胨水液体培养基,在分离到的 191 株细菌中筛选出 171 株具有固氮及产氨能力的细菌,如 BD4、F6 和 A2 等(图 1)。

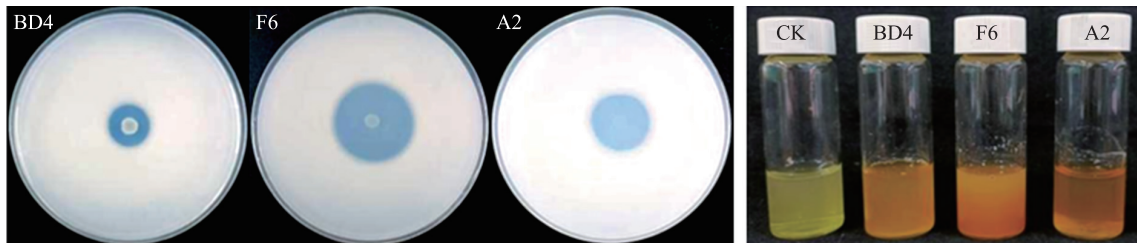


图 1 植物根际细菌生物固氮及产氨能力分析

Fig. 1 Nitrogen fixation and ammonia production analysis of plant rhizosphere bacteria

BD4: 亚洲假单胞菌 *Pseudomonas asiatica*; F6: 铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*; A2: 硝基还原假单胞菌 *Pseudomonas nitroreducens*. 下同 The same as follows.

2.3 菌株解磷能力及解钾能力分析

对分离到的 191 株细菌进行溶磷能力测定,其中 66 株具有溶解有机磷能力,62 株具有溶解无机磷能力,多数菌株同时具有溶有机磷和无机磷能力(图 2)。钼锑抗比色法定量测定磷含量,溶无机磷含量为

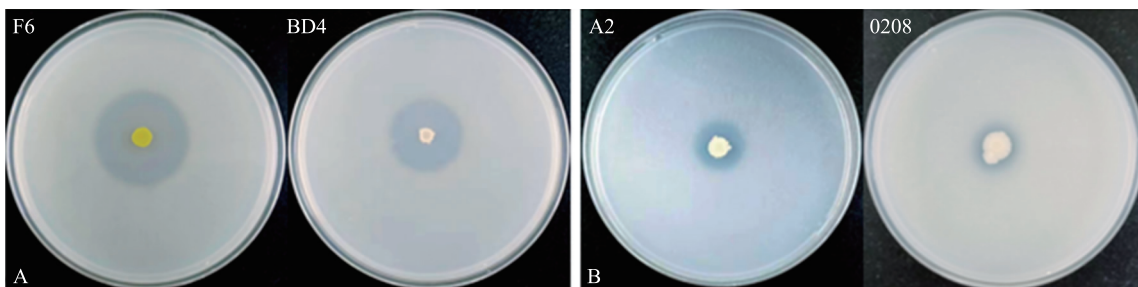


图 2 植物根际细菌溶磷能力分析

Fig. 2 Phosphorus-solubilizing analysis of plant rhizosphere bacteria

A. 有机磷 Organic phosphorus; B. 无机磷 Inorganic phosphorus. 0208: 川大肠杆菌 *Enterobacter chuandaensis*. 下同 The same as follows.

8.23~206.39 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶有机磷含量为 2.16~19.30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对分离到的 191 株细菌进行解钾能力测定, 其中 28 株具有解钾能力(图 3)。

2.4 菌株产铁载体能力分析

在 CAS 检测培养基上共有 98 株细菌产生橙黄色晕圈, 证明其具有产铁载体能力, 其中菌株 F6 周围产生的橙黄色晕圈最大, 可溶性指数 (D/d) 为 5.58, 具有高效的产铁载体能力(图 4)。

2.5 菌株分泌 IAA 能力分析

对具有溶磷能力的菌株进行分泌 IAA 能力测定, 其中 41 株具有分泌 IAA 能力。菌株 0208 分泌 IAA 能力显著高于其他菌株, 达 60.72 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 5)。

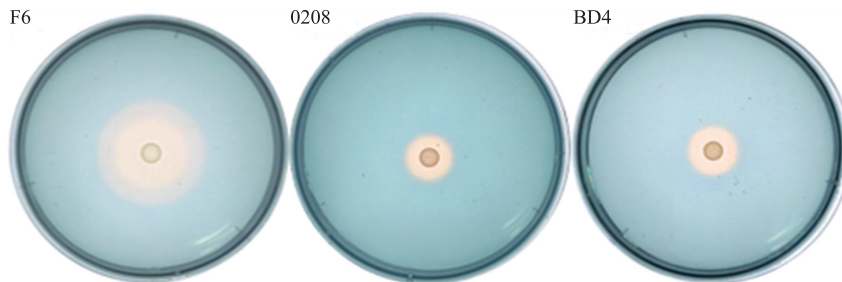


图 4 植物根际细菌产铁载体能力分析

Fig. 4 Siderophore production analysis of plant rhizosphere bacteria

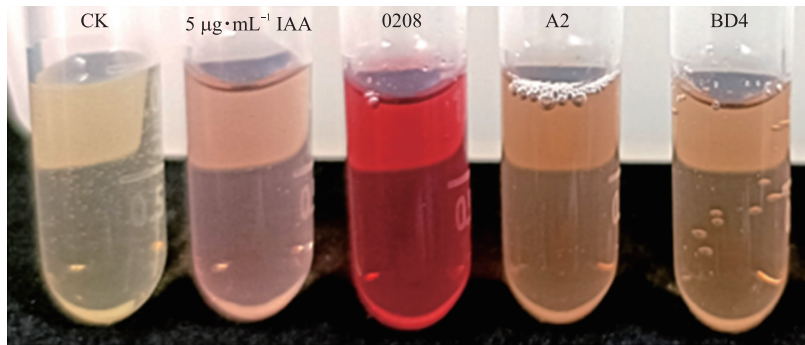


图 5 部分植物根际细菌分泌 IAA 能力分析

Fig. 5 Analysis of secreting IAA by plant rhizosphere bacteria

2.6 菌株产蛋白酶能力分析

对具有溶磷能力的菌株进行产蛋白酶能力测定, 共有 45 株细菌在牛奶琼脂培养基上产生水解圈, 其中 C32 可溶性指数 (D/d) 为 3.20, 具有最大的蛋白酶活性(图 6)。

2.7 PGPR 菌株鉴定

根据 PGPR 菌株特性筛选结果, 选择具有 3 种及以上促生特性的 PGPR 菌株进行鉴定。通过 16S rDNA 鉴定及 BLAST 比对, 对具有多种特性的 84 株 PGPR 菌株的分类地位进行分析。图 7 结果显示: 38 株菌株属于芽胞杆菌属 (*Bacillus*), 31 株菌株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 7 株菌株属于克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*), 3 株菌株属于沙雷氏菌属 (*Serratia*), 2 株菌株属于肠杆菌属 (*Enterobacter*), 1 株菌株属于普罗威登斯菌属 (*Providencia*), 1 株菌株属于微枝形杆菌属 (*Microvirga*), 1 株菌株属于伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)。

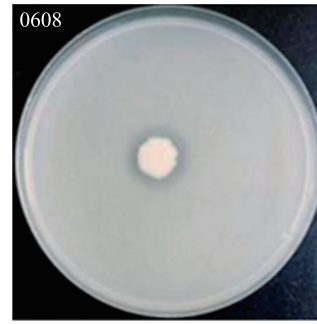


图 3 植物根际细菌解钾能力分析

Fig. 3 Potassium-solubilizing analysis of plant rhizosphere bacteria

0608: 产气克雷伯氏菌 *Klebsiella aerogenes*.

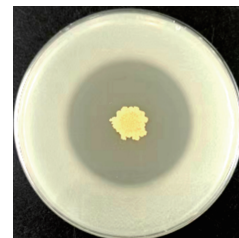


图 6 贝莱斯芽胞杆菌 C32 产蛋白酶能力分析

Fig. 6 Proteinase production analysis by *Bacillus velezensis* C32

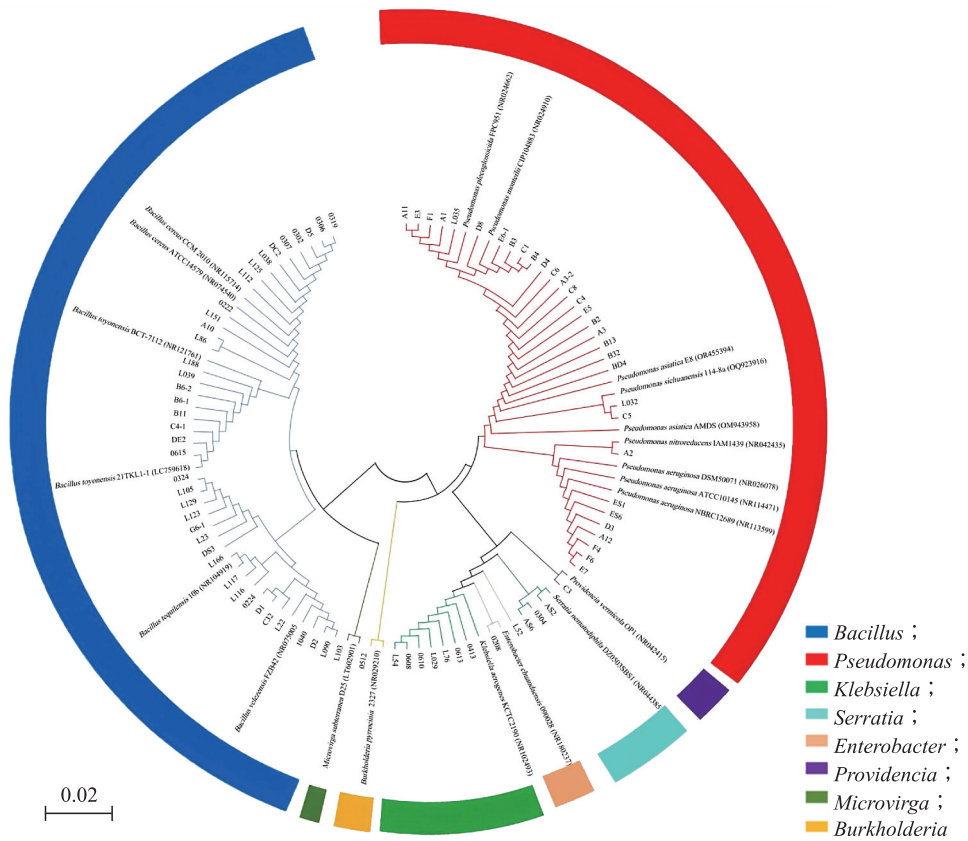


图 7 基于 16S rRNA 基因序列的 84 株 PGPR 菌株系统发育分析

Fig. 7 Phylogenetic analysis of 84 PGPR strains based on 16S rRNA gene sequences

2.8 菌株抑菌能力分析

在 84 株细菌中,对植物病原真菌小麦根腐病菌、小麦冠腐病菌、黄瓜织球壳菌、香蕉炭疽病菌、交链格孢菌、尖孢镰刀菌有拮抗效果的菌株数量分别为 20、12、18、24、12 和 31 株。其中贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*) C32 对 6 种病原菌抑制率为 58.25%~87.29%,拮抗作用显著,具有广谱的抑菌活性(图 8 和表 2)。

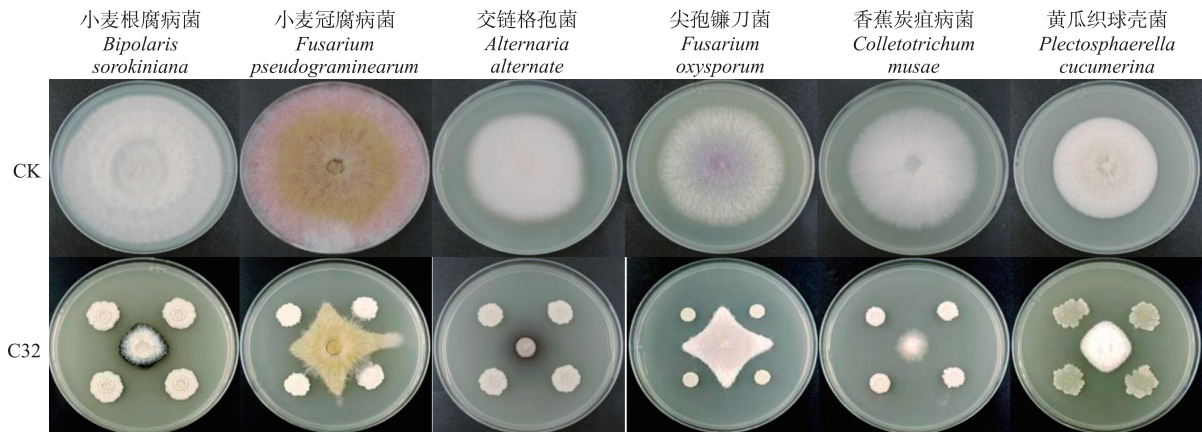


图 8 贝莱斯芽胞杆菌 C32 对植物病原菌生长抑制效果

Fig. 8 The inhibitory effect of *B. velezensis* C32 on the growth of plant pathogens

表 2 菌株 C32 对 6 种植物病原菌生长抑制率

Table 2 The growth inhibition rate of strains C32 against 6 plant pathogens

病原真菌 Pathogenic fungi	抑菌率 Inhibition rate	病原真菌 Pathogenic fungi	抑菌率 Inhibition rate
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	79.40	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	57.52
小麦冠腐病菌 <i>Fusarium pseudograminearum</i>	65.56	香蕉炭疽病菌 <i>Colletotrichum musae</i>	84.53
交链格孢菌 <i>Alternaria alternate</i>	87.29	黄瓜织球壳菌 <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	58.25

2.9 盆栽试验结果

综合菌株促生特性结果,对具有优良性能的菌株进行番茄与玉米盆栽试验,观察菌株对番茄和玉米促生长能力。从图9和表3结果可见,高产 IAA 菌株川大肠杆菌 (*Enterobacter chuandaensis*) 0208 能显著促进番茄与玉米的生长。经 0208 发酵液处理后,番茄与玉米植株在株高、茎粗、根长、地上部鲜重、地下部鲜重方面均显著高于 CK。

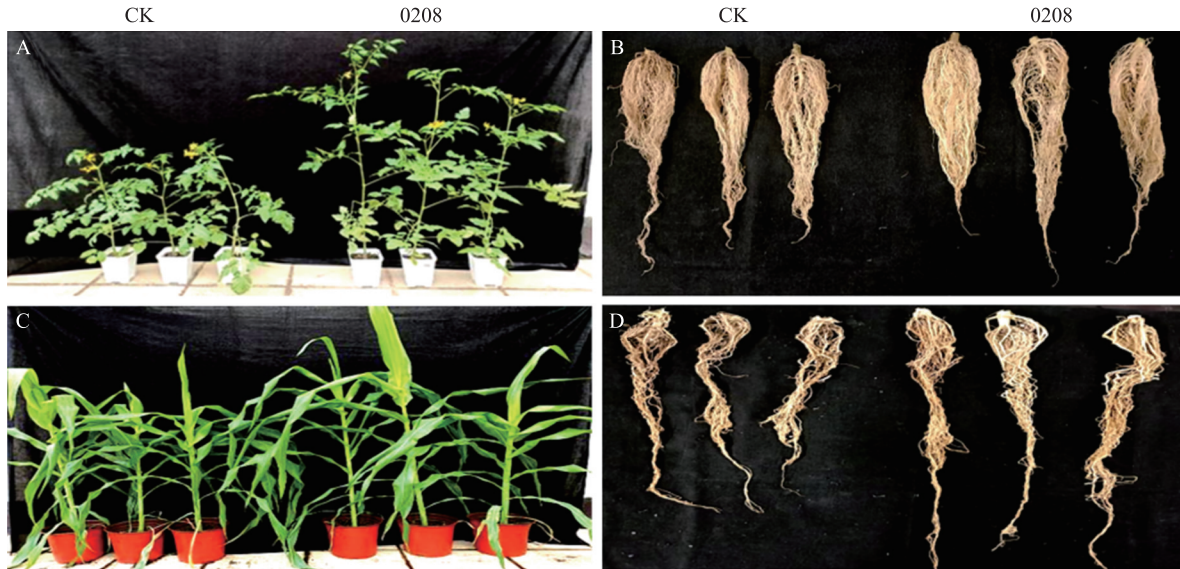


图9 川大肠杆菌 0208 对番茄与玉米植株表型的影响

Fig. 9 Effects of *Enterobacter chuandaensis* 0208 on plant phenotypes of tomato and maize

A、B. 不同处理下番茄生长情况 Tomato growth under different treatments; C、D. 不同处理下玉米生长情况 Maize growth under different treatments.

表3 川大肠杆菌 0208 对番茄及玉米促生效果

Table 3 Growth promoting effect of *E. chuandaensis* 0208 on tomato and maize

作物 Crop	处理 Treatment	株高/cm Plant height	茎粗/mm Stem diameter	根长/cm Root length	地上部鲜重/g Fresh weight of overground	地下部鲜重/g Fresh weight of underground
番茄 Tomato	CK	20.52±1.04	2.55±0.20	17.1±1.22	35.30±0.40	1.09±0.04
	0208	31.50±3.53 **	2.93±0.23 **	19.20±1.25 *	50.52±0.53 **	1.62±0.05 **
玉米 Maize	CK	32.72±3.69	8.01±0.54	37.30±2.71	136.85±0.35	5.17±0.08
	0208	39.75±2.07 *	9.56±0.78 *	53.33±7.51 *	163.64±0.50 **	8.10±0.03 *

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

大多数根际微生物具有溶磷、解钾、固氮、分泌 IAA 等生理功能,对植物的生长发育起着至关重要的作用^[18-19]。江美彦等^[20]从白芷根际土壤中分离到 77 株根际细菌,23 株具有固氮能力,20 株溶解无机磷,4 株产铁载体,7 株具有分泌 IAA 能力,其中格氏克雷伯氏菌 XI-1 兼具多种优良 PGPR 特性,对白芷盆栽株高、根长、根粗、地上鲜重和根鲜重都具有明显促进作用。杨华等^[21]将水稻种子用 PGPR 菌液浸泡处理后,种子萌发率提高 25%~43%,水稻幼苗根长增加 18%~42%,促生效果显著。张昊鑫等^[22]从烟草根际土壤中分离出 1 株兼具溶磷、解钾及分泌 IAA 能力等多功能细菌,在番茄种子萌发和幼苗生长上具有显著促进作用。本研究以固氮、产 NH_3 、溶有机磷、溶无机磷、解钾、产铁载体和蛋白酶、分泌 IAA 这些指标作为综合考察菌株促生能力的评判标准,从 11 份植物根际土壤样品中共分离到 191 株细菌,其中 171 株同时具有固氮及产 NH_3 能力,66 株具有溶解有机磷能力,62 株具有溶解无机磷能力,28 株具有解钾能力,41 株具有分泌 IAA 能力,98 株具有产铁载体能力。

土壤中全磷含量很高,但大部分以难溶性或不溶性磷形式存在,不能供植物利用。PGPR 可将无效磷转化为有效磷增加根际土壤对磷的吸收,在磷循环和促进植物生长中发挥重要作用^[8]。本研究个别菌株平板定性测试时溶磷圈明显,但钼锑抗比色法定量测定溶磷能力时数值偏小,这与万水霞等^[23]报道的 PGPR 菌株溶磷圈的大小与溶磷能力并不完全正相关相符。

吲哚乙酸(IAA)是一种植物激素,不仅调控植物生长发育,而且在植物与微生物互作中发挥重要作用。本研究筛选出1株高产 IAA 菌株 0208, IAA 分泌量达 $60.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 发酵液接种于番茄与玉米后发现,番茄株高、茎粗、根长、地上部鲜重和地下部鲜重分别提高 53.51%、14.90%、12.28%、43.12% 和 48.62%, 玉米各项指标分别提高 21.49%、19.35%、42.98%、19.58% 和 56.67%, 表现出明显的促生作用。

PGPR 菌株不仅能有效提高作物产量,而且对植物病害也有较好的防治作用。Heo 等^[24]从杂草根际土壤中分离出1株伯克霍尔德菌,对多种植物病原真菌表现出明显的拮抗作用,同时兼具固氮、溶磷、溶锌、产蛋白酶和产 IAA 等多种 PGPR 性状,在促进番茄植株根定殖的同时,也对番茄镰刀菌枯萎病的防治有显著效果。袁玉娟等^[25]发现拮抗菌贝莱斯芽胞杆菌 SQR9 和哈茨木霉 T37 能在黄瓜根系有效定殖,二者混合制成的生物有机肥显著促进黄瓜地上部与地下部的生长,并对黄瓜土传枯萎病具有明显防治效果。本试验中菌株 C32 对6种植物常见病原菌均表现出较好的拮抗效果,对病原菌抑制率均高于 50%,具有广谱抑菌活性,对植物病害具有潜在的防治作用。后续也将对菌株 C32 与其他生防菌协同复合,以提高对植物病害的防治效果。

本研究对植物根际菌株的促生特性及抑菌活性进行分析,并通过盆栽试验进一步验证其促生能力。下一步将深入研究川大肠杆菌 0208 的非生物胁迫特性(重金属胁迫、盐胁迫和干旱胁迫),同时对具有广谱抑菌效果菌株的防病机制和盆栽防效进行探究,以期能为植物根际微生物肥料的研发提供优质菌种资源。

参考文献 References:

- [1] Kumar S, Diksha, Sindhu S S, et al. Biofertilizers: an ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability [J]. *Current Research in Microbial Sciences*, 2021, 3: 100094.
- [2] Khatoun Z, Huang S, Rafique M, et al. Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems [J]. *Journal of Environmental Management*, 2020, 273: 111118.
- [3] Singh B. Are nitrogen fertilizers deleterious to soil health? [J]. *Agronomy*, 2018, 8(4): 48.
- [4] Chouhan G K, Verma J P, Jaiswal D K, et al. Phytomicrobiome for promoting sustainable agriculture and food security: opportunities, challenges, and solutions [J]. *Microbiological Research*, 2021, 248: 126763.
- [5] Zarei T, Moradi A, Kazemini S A, et al. Improving sweet corn (*Zea mays* L. var. *saccharata*) growth and yield using *Pseudomonas fluorescens* inoculation under varied watering regimes [J]. *Agricultural Water Management*, 2019, 226: 105757.
- [6] Lelapalli S, Baskar S, Jacob S M, et al. Characterization of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacterium *Lysinibacillus pakistanensis* strain PCPSMR15 isolated from *Oryza sativa* [J]. *Current Research in Microbial Sciences*, 2021, 2: 100080.
- [7] Alipour K S, Arabhosseini S, Karimi E, et al. *Pseudomonas putida* P3-57 induces cucumber (*Cucumis sativus* L.) defense responses and improves fruit quality characteristics under commercial greenhouse conditions [J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 280: 109942.
- [8] Lebrazi S, Niehaus K, Bednarz H, et al. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization by rhizobacterial strains isolated from *Acacia cyanophylla* root nodules and their effects on its plant growth [J]. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 2020, 18(1): 71.
- [9] Nawaz S, Bano A. Effects of PGPR (*Pseudomonas* sp.) and Ag-nanoparticles on enzymatic activity and physiology of cucumber [J]. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2020, 11(2): 124-136.
- [10] Bharti N, Pandey S S, Barnawal D, et al. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34768.
- [11] 王宏燕, 韩凯鑫, 冯丽荣, 等. 耐盐解磷菌筛选鉴定及生理特性研究 [J]. *东北农业大学学报*, 2023, 54(5): 28-37.
Wang H Y, Han K X, Feng L R, et al. Screening and identification of salt-resistant phosphorus bacteria and its physiological characteristics [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2023, 54(5): 28-37 (in Chinese with English abstract).
- [12] Wang H, Liu R, You M P, et al. Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): role of bacterial diversity [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1988.
- [13] Kong Z, Liu H. Modification of rhizosphere microbial communities: a possible mechanism of plant growth promoting rhizobacteria enhancing plant growth and fitness [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 920813.
- [14] Kapadia C, Patel N, Rana A, et al. Evaluation of plant growth-promoting and salinity ameliorating potential of halophilic bacteria isolated from saline soil [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 946217.
- [15] 杨顺, 杨婷, 林斌, 等. 两株溶磷真菌的筛选、鉴定及溶磷效果的评价 [J]. *微生物学报*, 2018, 58(2): 264-273.
Yang S, Yang T, Lin B, et al. Isolate and evaluation of two phosphate-dissolving fungi [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(2): 264-273 (in Chinese with English abstract).
- [16] Cocharde B, Giroud B, Crovadore J, et al. Endophytic PGPR from tomato roots: isolation, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation of treated tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(4): 765.

- [17] 豆雅楠,牛世全,豆建涛,等. 芽孢杆菌拮抗苹果树腐烂病菌的筛选、鉴定及抑菌活性初探[J]. 微生物学通报,2018,45(12):2684-2694.
Dou Y N, Niu S Q, Dou J T, et al. Screening, identification and preliminary study on biocontrol effect of antagonistic *Bacillus* against the pathogen of *Valsa mali* for apple tree[J]. Microbiology China, 2018, 45(12): 2684-2694 (in Chinese with English abstract).
- [18] 周益帆,白寅霜,岳童,等. 植物根际促生菌促生特性研究进展[J]. 微生物学通报,2023,50(2):644-666.
Zhou Y F, Bai Y S, Yue T, et al. Research progress on the growth-promoting characteristics of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 644-666 (in Chinese with English abstract).
- [19] 陈佳,缙晶毅,赵祺,等. 梭梭根际根瘤菌对紫花苜蓿生长及耐盐性的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(6):99-110.
Chen J, Gou J Y, Zhao Q, et al. Induced growth and salt tolerance of alfalfa by rhizobium strains from the rhizosphere of *Haloxylon ammodendron* [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2021, 45(6): 99-110 (in Chinese with English abstract).
- [20] 江美彦,周杨,刘仁浪,等. 白芷根际促生菌的筛选及其促生效果研究[J]. 生物技术通报,2022,38(8):167-178.
Jiang M Y, Zhou Y, Liu R L, et al. Screening and plant growth promoting of grow-promoting bacteria in rhizosphere bacteria of *Angelica dahurica* var. *formosana* [J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(8): 167-178 (in Chinese with English abstract).
- [21] 杨华,胡展,郭照辉,等. 水稻促生菌的筛选、鉴定及其促生效果[J]. 微生物学通报,2022,49(6):2088-2099.
Yang H, Hu Z, Guo Z H, et al. Screening and identification of rice growth-promoting strains and their effects on rice growth[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2088-2099 (in Chinese with English abstract).
- [22] 张昊鑫,王中华,牛兵,等. 产 IAA 兼具溶磷解钾高效促生菌的筛选、鉴定及其广谱性应用[J]. 生物技术通报,2022,38(5):100-111.
Zhang H X, Wang Z H, Niu B, et al. Screening, identification and broad-spectrum application of efficient IAA-producing bacteria dissolving phosphorus and potassium[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(5): 100-111 (in Chinese with English abstract).
- [23] 万水霞,王静,李帆,等. 玉米根际高效溶磷菌的筛选、鉴定及促生效应研究[J]. 生物技术通报,2020,36(5):98-103.
Wan S X, Wang J, Li F, et al. Screening and Identification of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere soil and its growth promoting effect[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(5): 98-103 (in Chinese with English abstract).
- [24] Heo A Y, Koo Y M, Choi H W. Biological control activity of plant growth promoting rhizobacteria *Burkholderia contaminans* AY001 against tomato fusarium wilt and bacterial speck diseases[J]. Biology, 2022, 11(4): 619.
- [25] 袁玉娟,胡江,凌宁,等. 施用不同生物有机肥对连作黄瓜枯萎病防治效果及其机理初探[J]. 植物营养与肥料学报,2014,20(2):372-379.
Yuan Y J, Hu J, Ling N, et al. Effects and mechanisms of application with different bio-organic fertilizers in controlling *Fusarium* wilt of cucumber[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2014, 20(2): 372-379 (in Chinese with English abstract).

责任编辑:刘怡辰