

刘拴成,张翠英,何月秋.潜在促生菌株的筛选及其在小麦上的应用效果[J].江苏农业科学,2018,46(1):43-48.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.012

# 潜在促生菌株的筛选及其在小麦上的应用效果

刘拴成<sup>1,2</sup>,张翠英<sup>1,3</sup>,何月秋<sup>1</sup>

(1. 云南农业大学植物保护学院,云南昆明 650201; 2. 集宁师范学院生物系,内蒙古乌兰察布 012000;

3. 北京师范大学乌兰察布集宁附属中学,内蒙古乌兰察布 012000)

**摘要:**为了筛选潜在促生菌株并研究该菌株在小麦上的应用效果,采用土壤平板稀释法,从玉米植株的根围土壤中筛选出 1 株解磷作用较强的芽孢杆菌 CY18,并成功扩增出植酸酶基因的部分编码区。通过革兰氏染色、芽孢染色初步鉴定该菌株为芽孢杆菌,并将其应用于促进小麦生长的研究。结果表明:CY18 在温室和田间试验中均能促进小麦生长;在室内试验中,CY18 菌剂促生效果最好的  $B_{500}$  处理( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL)与对照相比,分别可使小麦鲜质量、株高、根长增长 6.94%、22.87%、52.25%,除鲜质量外差异达到极显著水平。

**关键词:**根际促生菌株;筛选;小麦生长;促生效应;微生物肥料

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)01-0043-06

植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, 简称 PGPR)的研究和应用已成为当前微生物研究的新热点之一。目前,一般将微生物肥料分为两大类,即狭义的(根瘤菌肥)和广义的(通过产生植物激素、抗生素等促进植物营养吸收的肥料)。内生细菌是指能够定殖在植物细胞间隙或细胞内,并与寄主植物建立和谐联合关系的一类微生物<sup>[1]</sup>,目前已在大量的非豆科农作物根际发现固氮菌,如丁延芹等从小麦、玉米和黑麦草的根际土壤中分离出固氮芽孢杆菌<sup>[2]</sup>。因此,农民们更愿意花更低廉的价格去购买那些对人类健康和环境有益的新型微生物肥料<sup>[3]</sup>。现在有些人倾向于育种工作,如经过遗传工程改造,将来会提高种子的抗病性,但即使是应用遗传工程改造得到了优良的品种,所需的时间却是相当长的,而且所耗费的人力、物力、财力是相当大的,此外育出的新品种向市场推广还需要一定的时间<sup>[4]</sup>。而 PGPR 肥料的使用既对环境无污染,又对人的身体无害,同时价格低廉,很快适应了当代消费者的需求。在可持续的、生态的农业系统中,有机农业是避免或拒绝大量合成的化学肥料、杀虫剂、生长调节剂、动物饲料添加剂的一类产业化系统<sup>[5]</sup>。为了推动有机农业系统的可行性实施,我们主要依靠生物肥料、作物轮作、秸秆还田、厩肥、绿肥,以及远离农场的有机废气物、机械化耕作、生物病虫害防治等确保土壤生产力,特别是适量的微生物肥料与常规化肥混合使用不仅表现为增产,还可养地。PGPR 不仅通过供给植物营养来促进植物生长,也可以帮助保护清洁的环境和土壤生产力,是化学合成肥料很好的替代品。生物肥料通过共生或非共生固氮作用增加土壤中的氮元

素含量。据统计,全球约有 1 750 万 t 氮元素是通过生物固氮来增加土壤中的氮元素含量的。高档磷肥昂贵而且紧缺,但是生物肥料能够弥补这个缺口,有多种微生物能够溶解来源比较廉价的磷元素,如磷酸盐。还有某些 PGPR 能促进植物与有益根际真菌之间的共生<sup>[6-8]</sup>,这正是当前农资市场上所必需的肥料,并且从经济、环境效益来看也符合农民的要求,比如增加农民收入、减少肥料的费用、减少温室气体的排放和减少硝态氮向地下水的排放<sup>[9]</sup>,这正是 PGPR 所具有的特点。微生物肥料正成为新兴“绿色产业”,在农业生产中发挥其应有的经济价值、社会价值和生态价值。例如,对玉米施用“肥力高”复合菌肥,可以使抽雄期、吐丝期、开花期和成熟期均比对照提早 2 d,且能促进玉米生长,改善穗粒结构,提早成熟,提高产量,增加效益,同时对土壤也有一定的改良作用<sup>[10]</sup>。施用生物肥能增强玉米根系活力,提高叶片内的硝酸还原酶活力及叶绿素的含量,促进玉米生长,提高其产量,使其籽粒品质也得到改善<sup>[11-13]</sup>。同时,生物肥料还可以改善土壤的理化性状,提高土壤肥力。目前,全世界的农药和化学肥料使用量在增长,造成了有机肥使用不足,土壤养分比例失调,土地板结,土壤质量下降,河流、地下水污染等一系列问题<sup>[14]</sup>。适当降低化肥用量并配合施用生物肥料(拌种或追施),可以在不增加(甚至减少)肥料投入的情况下提高小麦、玉米等粮食作物的产量,从而提高经济效益<sup>[15]</sup>。因此,从植物根际筛选这类内生细菌意义重大,将筛选出的菌株初步应用在小麦试验上,可为将来开发这种微生物肥料提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验所用小麦材料为川麦 107,种子购自当地市场;大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,笔者所在实验室保存;主要试剂有胰蛋白胨、蛋白胨、氯化钠、琼脂、葡萄糖、氯化钙、硝酸铵、氯化钾、硫酸镁、硫酸亚铁、硫酸锰、植酸钙、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基硫酸钠(SDS)、三氯乙酸(TCA)、氨苄青霉素(Amp)

收稿日期:2017-04-04

基金项目:云南省昆明市科技局项目(编号:09H130301)。

作者简介:刘拴成(1979—),男,内蒙古四子王旗人,硕士,讲师,主要从事微生物促进植物生长方面的研究及园艺专业课程教学工作。  
E-mail:lsc2009jntc@163.com。

通信作者:何月秋,博士,教授,主要从事水稻抗稻瘟病分子育种教学和研究工作。E-mail:ynfh2007@163.com。

等,均为分析纯,购自永华化学科技(江苏)有限公司。

1.2 潜在促生菌株的筛选

采用土壤平板稀释法,从不同植物根际土壤中筛选具有植酸酶活性的生防菌株,将稀释后的细菌菌液涂布于 LB 平板上(含 10 g 胰蛋白胨、5 g 蛋白胨、10 g 氯化钠、12 g 琼脂、1 L 蒸馏水,pH 值=7),28 ℃ 培养 2~3 d,挑取单菌落转接到含有植酸钙的筛选平板上(含 2% 葡萄糖、0.2% 氯化钙、0.5% 硝酸铵、0.05% 氯化钾、0.05% 硫酸镁、0.001% 硫酸亚铁、0.001% 硫酸锰、0.1% 植酸钙、1.5% 琼脂,pH 值=7),于 30 ℃ 培养 3 d,挑选产生透明消解圈的菌株,从中挑选出透明消解圈最大的菌株对指示植物进行促生长效果研究。

1.3 促生菌植酸酶基因的克隆

1.3.1 潜在促生菌株总 DNA 的提取 采用 CTAB 法提取微量基因组 DNA,具体步骤如下:(1)活化保存的菌种,挑取单菌落至含 LB 液体培养基的 20 mL 小管中,37 ℃、200 r/min 振荡培养 12~16 h。(2)取 1.5 mL 培养液,12 000 r/min 离心 2 min,收集菌体,用蒸馏水洗涤 1~2 次。(3)在沉淀物管中加入 565 μL TE 缓冲液,用移液枪反复吹打使之悬浮。加入 2 μL 50 mg/mL 溶菌酶溶液(终浓度 100 μg/mL),37 ℃ 保温 20 min。(4)加入 10 μL RNase(10 mg/mL),至终浓度为 25 μg/mL,然后加入 30 μL 10% SDS 溶液,37 ℃ 保温 30 min。(5)加入 2.5 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K,至终浓度为 50 μg/mL,37 ℃ 保温 60~90 min。(6)加入 100 μL 5mol/L NaCl,充分混匀,再加入 80 μL CTAB-NaCl 溶液(含 50 g/L CTAB、0.5 mol/L NaCl),混匀,于 65 ℃ 保温 10 min。(7)加入等体积 24:1 的三氯甲烷-异戊醇,混匀,离心 5 min,将上清液转入 1 支新的离心管中,如果难以移出上清液,先用牙签除去界面物质。(8)加入 0.6 倍体积的异丙醇,轻轻混匀直至 DNA 沉淀下来,再分别用 70%、95% 的乙醇洗涤 1 次。(9)12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,在超净工作台上风干,重溶于 100 μL TE 溶液中,4 ℃ 保存。

1.3.2 植酸酶基因部分片段的克隆

1.3.2.1 植酸酶基因引物的设计及反应体系 利用已合成的植酸酶引物,以从不同农作物根系周围分离到的 CY12、CY18、CY20、CY48 菌株基因组 DNA 为模板进行扩增。PCR 反应体系如表 1 所示,反应程序:94 ℃ 3 min;94 ℃ 50 s,57 ℃ 1 min,72 ℃ 3 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。扩增反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient 型 PCR 仪上进行。

表 1 PCR 反应体系

| 反应成分               | 初始浓度       | 所需体积(μL) |
|--------------------|------------|----------|
| ddH <sub>2</sub> O |            | 16.7     |
| 10 × buffer        | 10 ×       | 2.5      |
| MgCl <sub>2</sub>  | 25 mmol/L  | 1.5      |
| dNTPs              | 2.5 mmol/L | 1.0      |
| PhyF               | 10 μmol/L  | 1.0      |
| PhyR               | 10 μmol/L  | 1.0      |
| DNA                | 20 ng/μL   | 1.0      |
| TaqDNA 聚合酶         | 5 U/μL     | 0.3      |
| 总和                 |            | 25.0     |

1.3.2.2 感受态细胞的制备、连接及转化 将笔者所在实验室保存的大肠杆菌 DH5α 活化后,挑取单菌落于 LB 液体培

养基中,于 37 ℃、200 r/min 反应 10~12 h,再从此瓶中取 1 mL 培养液,接种于另一个装有 9 mL LB 液体培养基的 25 mL 细胞培养瓶中,继续培养约 2 h 后,进行感受态细胞制作。具体步骤如下:(1)取上述培养好的 DH5α 于 50 mL LB 液体培养基中,冰浴 30 min。(2)将(1)中的培养物于 6 000 r/min 离心 2 min,沉淀用 1 mL 0.1 mol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 洗涤 2 次。(3)6 000 r/min 离心 2 min,将沉淀再用适量 0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub> 悬浮,4 ℃ 放置,待用。制备好感受态细胞后,紧接着进行连接、转化,步骤如下:(1)连接。将 PCR 产物再经过胶回收植酸酶基因片断,根据以下体系进行连接:3 μL 纯化后的 PCR 产物,0.5 μL pUCm-T[含有氨苄抗性(Amp<sup>r</sup>)],1 μL 10 × Ligation Buffer,1 μL PEG 4000,4 μL 灭菌 ddH<sub>2</sub>O,0.5 μL T<sub>4</sub> DNA 连接酶,混匀后于 22 ℃ 连接过夜。(2)转化。①取 100 μL 已制备好的感受态细胞置于冰上,待完全溶解后,轻轻混匀。②将已扩增出的目标片段与载体连接过夜。③加入 5 μL 连接液,轻轻混匀,冰上放置 30 min。④42 ℃ 水浴热激约 90 s,冰上放置 2 min。⑤加入 500 μL LB 液体培养基,37 ℃、200 r/min 振荡培养 1~2 h 后,用麦康凯琼脂培养基(含 100 mg/L Amp)进行红白反应斑反应筛选转化子。麦康凯培养基配方:取 10 g 麦康凯琼脂,加入 200 mL 蒸馏水,101 ℃ 灭菌 30 min。⑥选取白斑,接种于 500 μL LB 液体培养基(含 100 mg/L Amp)。

1.3.2.3 植酸酶基因测序 将扩增出的 963 bp 特异性片段用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离并回收,回收过程按照生工生物工程(上海)股份有限公司的 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒的步骤进行,并克隆至载体 pUCm-T 上,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

1.4 植酸酶基因的序列分析

将得到的序列通过美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上的 BLAST 比对找出与已公布的植酸酶基因序列同源性较高的一系列序列,通过生物学软件 DNAMAN 5.2.10.1、TreeView X 0.5.0 进行核酸序列分析。

1.5 植酸酶活性测定步骤

1.5.1 磷标准曲线的绘制 将 4.0 mmol/L 磷酸二氢钾标准溶液用 Tris-HCl(0.1 mol/L,pH 值=7)分别稀释成 0.0、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0 mmol/L 的溶液,按照植酸酶活性测定步骤同时反应。以无机磷含量为纵坐标(取 0.2 mL 以上稀释液,无机磷含量分别为 0.00、0.16、0.32、0.48、0.64、0.80 μmol),以 D<sub>600 nm</sub> 为横坐标,绘制标准曲线,列出直线回归方程( $y=kx+b$ )。

植酸酶活性定义:样品在植酸钠浓度为 5 mmol/L、温度为 37 ℃、pH 值=7 的条件下,1 min 内从植酸钠(Sigma,P-8810)中释放 1 μmol 无机磷,即为 1 个植酸酶活性单位,以 A 表示。植酸酶活性 A 计算公式如下:

$$A=K[D_{600\text{ nm}}(\text{样品})-D_{600\text{ nm}}(\text{空白})]/30。$$

式中:A 为样品植酸酶活性;K 为标准曲线斜率;30 为反应时间(min)。

1.5.2 植酸酶活性测定 挑取单菌落于装有 50 mL LB 液体培养基的 100 mL 三角瓶中,培养过夜,按接种量 10% 接种于装有 200 mL ASW(含 5 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、

500 mg KCl、500 mg CaCl<sub>2</sub>、20 g NaCl、3 g 胰蛋白胨、1.5 g 大豆蛋白胨、5 g 葡萄糖)液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 37 ℃、170 r/min,连续 5 d,每隔 12 h 取样 1 次。

该产酶培养基参照 Idriss 等的方法<sup>[16]</sup>并稍作修改,植酸酶活性测定参照 Choi 等方法<sup>[17]</sup>并稍作修改,具体步骤见表 2。

表 2 植酸酶活性测定步骤

| 反应步骤 | 样品               | 标准                   | 样品空白             | 标准空白             |
|------|------------------|----------------------|------------------|------------------|
| 1    | 0.8 mL 底物(植酸钠溶液) | 0.8 mL 底物(植酸钠溶液)     | 1.0 mL TCA(终止液)  | 1.0 mL TCA(终止液)  |
| 2    | 37 ℃ 预热 5 min    | 37 ℃ 预热 5 min        | 0.8 mL 底物(植酸钠溶液) | 0.8 mL 底物(植酸钠溶液) |
| 3    | 0.2 mL 样品稀释液(混合) | 0.2 mL 磷酸二氢钾标准溶液(混合) | 37 ℃ 预热 5 min    | 37 ℃ 预热 5 min    |
| 4    | 37 ℃ 保温 30 min   | 37 ℃ 保温 30 min       | 0.2 mL 样品稀释液(混合) | 0.2 mL 缓冲液(混合)   |
| 5    | 1.0 mL TCA       | 1.0 mL TCA           |                  |                  |
| 6    | 1.0 mL 显色剂       | 1.0 mL 显色剂           | 1.0 mL 显色剂       | 1.0 mL 显色剂       |
| 7    | 混合               | 混合                   | 混合               | 混合               |

注:表中各个处理的总体积均为 3.0 mL。

1.6 小麦促生长试验

1.6.1 室内拌种促生长试验 用灭菌水将 CY18 分别稀释为 B<sub>200</sub>、B<sub>500</sub>、B<sub>1 000</sub> 处理,浓度分别为 2.5 × 10<sup>8</sup>、1.0 × 10<sup>8</sup>、5.0 × 10<sup>7</sup> CFU/mL,另设清水对照(CK),取上述不同浓度菌液各 10 mL,分别放入已标记好的培养皿中,再将表面消过毒的小麦品种川麦 107 分别放入培养皿中拌种 10 min,晾干后,将种子放入装有土的培养皿中,每个培养皿 20 粒种子,各个处理 3 次重复,共 8 个处理。以后根据土壤干湿状况浇清水,以保持土壤湿润,室内培养。5 d 后调查小麦植株生长状况,分别测定其鲜质量、株高、根长,记录试验结果。

1.6.2 小区浸种促生长试验 参照“1.6.1”节,用灭菌水将 CY18 分别稀释为 B<sub>200</sub>、B<sub>500</sub>、B<sub>1 000</sub> 处理,另设清水对照(CK),将已消毒的小麦品种川麦 107 种子于上述不同浓度菌液中浸种 1 h 后晾干,立即播种于事先划分好的田间小区内。每个重复播 50 粒种子。各个处理 3 次重复,共 8 个处理。18 d 后调查小麦植株生长状况,分别测定其鲜质量、株高、根长。

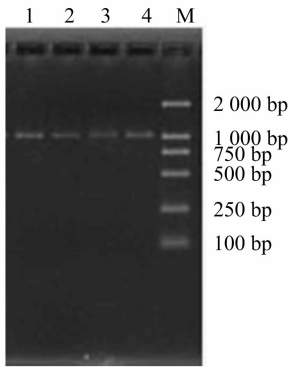
2 结果与分析

2.1 潜在促生菌株的筛选及植酸酶基因编码区的扩增

经过解磷菌筛选培养基筛选,从晋宁、屏边、玉溪、元江等地的作物根围共筛选出 4 株具有解磷作用的菌株,即 CY12、CY18、CY20、CY48。通过设计特异引物,对其进行特异性 PCR 电泳检测结果表明,这 4 个菌株均扩增出 1 个 963 bp 的特异性条带(图 1),与预期条带大小一致。然后选出解磷效果最好的(即透明消解圈最大的)菌株 CY18(图 2),经革兰氏染色、芽孢染色,初步确定该菌株为芽孢杆菌,并对其进行促生长试验。

2.2 CY18 菌株植酸酶基因序列分析

将得到的序列通过 NCBI 网站中的 BLAST 比对,找出与已公布的植酸酶基因序列同源性较高的一系列序列,通过生物学软件 DNAMAN5.2.10.1、TreeView X 0.5.0 进行核酸序列分析。通过 BLAST 比对,CY18 菌株与已经在 GenBank 中登录的 13 条植酸酶基因核苷酸序列的平均同源性高达 97%,同源性范围为 91.5% ~ 99.7%(表 3)。遗传距离范围为 0.003 ~ 0.085(表 4),遗传距离最近的为 EU624118。从系统进化树和同源树来看,按进化中亲缘关系的远近明显分为两大进化源,其中 AF453255 与 AY836773、AF029053、AJ277890 为第一大进化源,其余的为第二大进化源,CY18 属



1~4 分别对应的菌株为 CY12、CY18、CY20、CY48  
图 1 植酸酶基因部分编码区的扩增

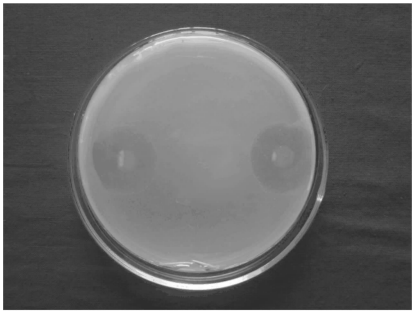


图 2 CY18 的溶磷试验

于第 2 大进化源(图 3、图 4)。

2.3 不同培养时间植酸酶活性的变化

2.3.1 磷标准曲线的制作 根据“1.5.1”节的步骤,对 6 个梯度的磷酸二氢钾标准溶液,按植酸酶活性测定步骤,以无机磷含量为纵坐标(0.2 mL 稀释液中的无机磷含量分别为 0.00、0.16、0.32、0.48、0.64、0.80 μmol)、以 D<sub>600 nm</sub> 为横坐标绘制标准曲线(图 5)。

2.3.2 CY18 菌株不同时间植酸酶活性变化 由图 6 可知,CY18 菌株植酸酶活性在前 36 h 变化缓慢,后来较快上升,72 h 时的酶活性为 0.012 5 U,再以后缓慢上升直到 108 h 时活性达到最高值,为 0.013 6 U,此后活性又极速下降。

2.4 拌种、浸种处理对小麦促生长效果

就拌种而言,不同处理对小麦发育前期各生物学指标有不同程度的影响(表 5)。B<sub>200</sub>、B<sub>500</sub>、B<sub>1 000</sub> 处理与对照相比在鲜质量、株高、根长上作用效果整体趋势一致,都表现出高浓度

表 3 14 条芽孢杆菌植酸酶基因核苷酸序列同源性比较结果 %

| 核苷酸序列    | CY18   | AY220075 | AY518208 | AY055220 | U85968 | AJ584664 | AF298179 | AF292103 | EF092835 | AY836773 | AF029053 | AJ277890 | AF453255 | EU624118 |
|----------|--------|----------|----------|----------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| CY18     | 100.00 |          |          |          |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AY220075 | 99.60  | 100.00   |          |          |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AY518208 | 99.50  | 99.90    | 100.00   |          |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AY055220 | 99.10  | 99.50    | 99.40    | 100.00   |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| U85968   | 98.30  | 98.30    | 98.20    | 97.80    | 100.00 |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AJ584664 | 98.30  | 98.30    | 98.20    | 97.80    | 98.90  | 100.00   |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AF298179 | 98.90  | 99.40    | 99.20    | 98.90    | 98.50  | 98.20    | 100.00   |          |          |          |          |          |          |          |
| AF292103 | 97.80  | 98.00    | 97.90    | 97.70    | 97.20  | 97.20    | 97.50    | 100.00   |          |          |          |          |          |          |
| EF092835 | 97.80  | 98.00    | 97.90    | 97.70    | 97.20  | 97.20    | 97.50    | 100.00   | 100.00   |          |          |          |          |          |
| AY836773 | 92.50  | 92.70    | 92.60    | 92.20    | 92.40  | 91.90    | 92.50    | 91.90    | 91.90    | 100.00   |          |          |          |          |
| AF029053 | 92.50  | 92.70    | 92.60    | 92.20    | 92.40  | 91.90    | 92.50    | 91.90    | 91.90    | 100.00   | 100.00   |          |          |          |
| AJ277890 | 92.50  | 92.70    | 92.60    | 92.20    | 92.40  | 91.90    | 92.50    | 91.90    | 91.90    | 100.00   | 100.00   | 100.00   |          |          |
| AF453255 | 91.50  | 91.70    | 91.60    | 91.20    | 91.80  | 91.30    | 91.60    | 90.70    | 90.70    | 96.60    | 96.60    | 96.60    | 100.00   |          |
| EU624118 | 99.70  | 99.70    | 99.60    | 99.20    | 98.40  | 98.40    | 99.00    | 97.90    | 97.90    | 92.60    | 92.60    | 92.60    | 91.60    | 100.00   |

表 4 14 条芽孢杆菌植酸酶基因核苷酸序列距离

| 核苷酸序列    | CY18  | AY220075 | AY518208 | AY055220 | U85968 | AJ584664 | AF298179 | AF292103 | EF092835 | AY836773 | AF029053 | AJ277890 | AF453255 | EU624118 |
|----------|-------|----------|----------|----------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| CY18     | 0     |          |          |          |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AY220075 | 0.004 | 0        |          |          |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AY518208 | 0.005 | 0.001    | 0        |          |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AY055220 | 0.009 | 0.005    | 0.006    | 0        |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| U85968   | 0.017 | 0.017    | 0.018    | 0.022    | 0      |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AJ584664 | 0.017 | 0.017    | 0.018    | 0.022    | 0.011  | 0        |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AF298179 | 0.011 | 0.006    | 0.008    | 0.011    | 0.015  | 0.018    | 0        |          |          |          |          |          |          |          |
| AF292103 | 0.022 | 0.020    | 0.021    | 0.023    | 0.028  | 0.028    | 0.025    | 0        |          |          |          |          |          |          |
| EF092835 | 0.022 | 0.020    | 0.021    | 0.023    | 0.028  | 0.028    | 0.025    | 0        | 0        |          |          |          |          |          |
| AY836773 | 0.075 | 0.073    | 0.074    | 0.078    | 0.076  | 0.081    | 0.075    | 0.081    | 0.081    | 0        |          |          |          |          |
| AF029053 | 0.075 | 0.073    | 0.074    | 0.078    | 0.076  | 0.081    | 0.075    | 0.081    | 0.081    | 0        | 0        |          |          |          |
| AJ277890 | 0.075 | 0.073    | 0.074    | 0.078    | 0.076  | 0.081    | 0.075    | 0.081    | 0.081    | 0        | 0        | 0        |          |          |
| AF453255 | 0.085 | 0.083    | 0.084    | 0.088    | 0.082  | 0.087    | 0.084    | 0.093    | 0.093    | 0.034    | 0.034    | 0.034    | 0        |          |
| EU624118 | 0.003 | 0.003    | 0.004    | 0.008    | 0.016  | 0.016    | 0.010    | 0.021    | 0.021    | 0.074    | 0.074    | 0.074    | 0.084    | 0        |

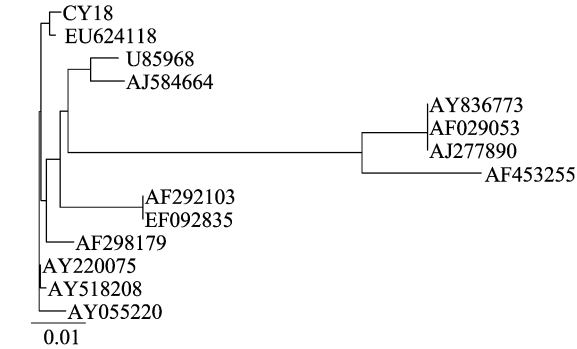


图3 14 条芽孢杆菌植酸酶基因系统进化树

抑制、低浓度促生的效应,中浓度促生效果最好。B<sub>500</sub> 处理与对照相比,鲜质量、株高、根长分别增加 5.56%、22.87%、52.25%,差异达到极显著水平(除鲜质量外)。

就浸种而言,不同浓度梯度浸种小麦对生育前期各个指标影响各异,由图 7 可以看出,效果比较好的是 B<sub>1000</sub> 处理,与对照相比在株高、鲜质量上分别增加 16.43%、34.18%,但以

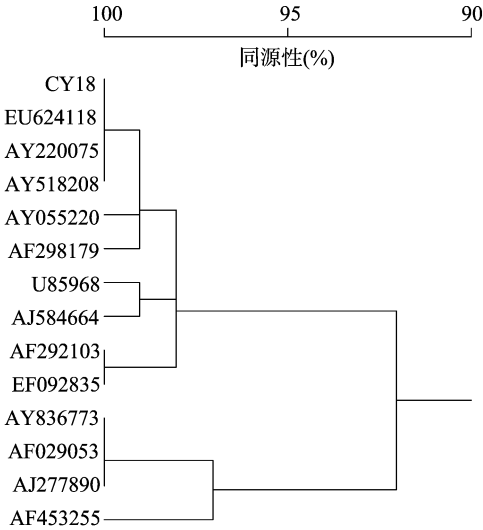


图4 14 条芽孢杆菌植酸酶核苷酸序列同源树上处理对根长均无明显影响。

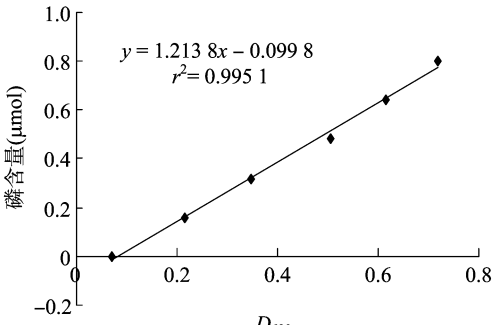


图5 磷标准曲线

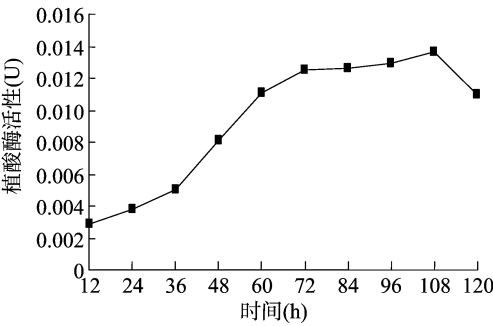


图6 CY18 菌株不同时间植酸酶活性变化趋势

表 5 CY18 菌液拌种在室内对小麦鲜质量、株高和根长的影响

| 处理                 | 鲜质量<br>(g)     | 株高<br>(cm)       | 根长<br>(cm)       |
|--------------------|----------------|------------------|------------------|
| CK                 | 0.18 ± 0.003aA | 6.21 ± 0.339bB   | 6.01 ± 0.262bCB  |
| B <sub>200</sub>   | 0.17 ± 0.001aA | 6.20 ± 0.194bB   | 5.68 ± 0.772cB   |
| B <sub>1 000</sub> | 0.18 ± 0.019aA | 6.82 ± 0.401abAB | 7.60 ± 0.734abAB |
| B <sub>500</sub>   | 0.19 ± 0.005aA | 7.63 ± 0.151aA   | 9.15 ± 0.383aA   |

注:表中数据均为“均值 ± 标准误”。同列数据后标有不同小写、大写字母分别表示差异显著 ( $P < 0.05$ )、极显著 ( $P < 0.01$ )。

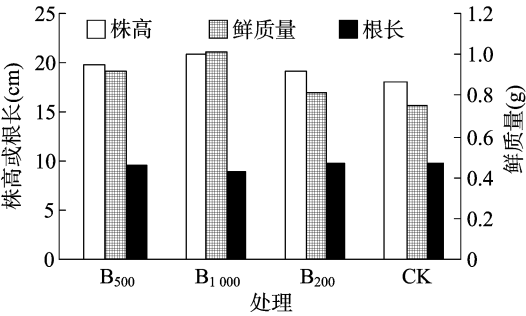


图7 CY18 菌剂浸种在田间促进小麦鲜质量、株高和根长的效果

3 讨论

3.1 PGPR 对植物的促生效应

植物根围、根际细菌促进植物生长的重要性众所周知<sup>[18-19]</sup>。de Freitas 等报道,假单胞菌能够刺激小麦的生长<sup>[20]</sup>。当豌豆、大豆的种子用根围细菌浸泡后,其根茎的生长和营养物质的吸收量都会增加<sup>[21-22]</sup>。Höflich 等报道,通过根围密切相关的细菌促进植物生长的机制更可能是由于营养物质的流动、植物激素的产生、对土传植物病原物的拮抗形成的<sup>[19,23]</sup>。根围细菌栖居在有机质相对丰富的根表,并合成

植物生长素,可作为一种次生代谢产物促进植物的生长。植物激素对植物的生长调节发挥着非常重要的作用,它们可以促进种子萌发、根的延长、增加叶面积<sup>[24]</sup>。Patten 等研究表明,产植物激素是一个细菌促进植物生长的重要因素,它们在低浓度下,通过改变生理学和形态学过程来调控植物生长。前人已经在假单胞菌属中的多个种中发现它们可以合成 IAA,从而影响根的生长<sup>[25]</sup>。国内外利用微生物促进植物生长成功的例子很多,但大多数集中于假单胞菌、芽孢杆菌属中,微生物肥料虽然在近 10 年逐步受到重视,但仍处于摸索发展阶段,目前,增加农作物的产量主要依靠化学肥料,施用化学肥料虽然见效快,但是由于长期大量施用同类化学肥料,不仅对环境造成严重的污染,而且给人畜的健康也带来了威胁,造成大量有毒的化学成分累积,如重金属中毒等。因此,有必要大力提倡推广微生物的应用,筛选能有效促进植物生长的生物资源。

本研究表明,从根围分离出来的细菌也能够显著促进小麦的生长,应用于促生长的菌株 CY18 可能的促生机制是一种激素,也表现出高浓度抑制,低浓度效果不明显,只有在适合的浓度才能发挥更好的作用,另一个可能的机制就是菌株产生植酸酶,能更有效地吸收中等肥力土壤中的磷元素,从而促进植物的生长。据报道,土壤中仅有 0.1% 的总磷可被植物利用<sup>[26-27]</sup>,大部分以植酸或植酸盐的形式贮存起来。在本研究中,应用的菌株可以扩增出植酸酶基因的部分编码区,所以猜测这也是促生长的一个机制,但是该菌株只表现出表观的促生效应,没有对其主要病害进行调查。因此,对于病害的发生与前期生物学指标的关系就不是很清楚,是否由于控制了病害而间接地促进植物生长,还有待后人进一步研究。由于时间有限,笔者只是对该菌株应用于低磷条件下对农作物的促生效果进行初步研究,至于在什么样的磷肥水平下菌株的解磷效果最好且促生效果最佳,还需后人进一步研究。

3.2 对菌株发酵条件的优化及对菌株进行遗传改良的必要性

细菌的生长繁殖依赖于从周围环境中吸收营养物质<sup>[28-29]</sup>。因此,培养基中各种营养成分的比例是否适合细菌的生长,以及是否适合活性物质的产生,会在很大程度上影响目标产物的产量<sup>[30]</sup>。实践表明,培养基的配方不仅是决定活性物质产量的关键因素,其营养成分的比例也决定活性物质的种类,除培养基影响外,菌株的代谢活性与培养条件密切相关,尤其受温度、接种量影响较大<sup>[31]</sup>。因此,在确立促生作用的主要机制后,必须针对目标方向摸索不同培养基、培养时间、接种量、转速等影响因素的最优组合,力求使目标产物最大化。此外,选择适当的发酵时间,使目标产物达到最高且稳定,这样有利于分离、提纯活性物质。如果条件允许,针对具体菌株的具体情况,探索不同培养基、培养时间、接种量、转速等条件的最佳组合,将会大大提高目标活性物质的产量并降低生产成本。除优化培养基条件、发酵条件外,利用物理或化学方法对菌株进行诱变,或利用现代基因工程技术对菌株进行遗传改良,均是提高目标活性物质产量的有效途径。关于细菌菌株的诱变改良,前人已做过大量试验,并在不少菌株上取得了成功,卢文轩等采用低能氮离子束注入技术成功对硅酸盐细菌进行诱变,经过初筛、复筛选出解钾能力强的硅酸盐

细菌 S-05, 发酵液 50 倍稀释处理组速效钾含量最高, 分别比原菌株处理组 (CK1)、空白对照组 (CK2) 提高 55.79%、260.84%<sup>[32]</sup>。赵志浩等通过紫外线、硫酸二乙酯交替处理筛选出 1 株产菌量和芽孢生成量较高的突变株 PE-R, 其产量约是原菌株的 2 倍<sup>[33]</sup>。对荧光假单胞杆菌进行物理或化学诱变改良或进行基因改造, 以提高其抗病能力、增强适应性, 近些年来已有越来越多的研究报道。

#### 4 结论

通过土壤平板稀释法, 从玉米根围分离到 1 株解磷作用较强的芽孢杆菌 CY18。CY18 浸种、拌种对小麦等有明显的促生长效应, 在浓度不同时, 促生长效应明显不同: 中浓度效果最佳, 低浓度和高浓度效果不太理想。

#### 参考文献:

- [1] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未. 植物内生细菌的研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 224-227.
- [2] 丁延芹, 王建平, 刘 元, 等. 几株固氮芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(6): 690-697.
- [3] Anderson M D, Hollingsworth C S, Vanzee V, et al. Consumer response to integrated pest management and certification [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 1996, 60(2/3): 97-106.
- [4] Tahmatsidou V, O'Sullivan J, Cassells A C, et al. Comparison of AMF and PGPR inoculants for the suppression of *Verticillium* wilt of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Selva) [J]. Applied Soil Ecology, 2006, 32(3): 316-324.
- [5] Orhan E, Esitken A, Ercisli S, et al. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry [J]. Scientia Horticulturae, 2006, 111(1): 38-43.
- [6] Ness R L L, Vlek P L G. Mechanism of calcium and phosphate release from hydroxy-apatite by mycorrhizal hyphae [J]. Soil Science Society of America Journal, 2000, 64(3): 949-955.
- [7] Marschener H. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition [J]. Field Crops Research, 1998, 56(1/2): 203-207.
- [8] Bethlenfalvai G J. Mycorrhizae in the agricultural plant-soil system [J]. Symbiosis, 1993, 14: 413-425.
- [9] Aslantas R, Cakmakci R, Sahin F. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 111(4): 371-377.
- [10] 黄寿熙. 生物肥料对玉米生长及产量影响 [J]. 上海农业科技, 2004(5): 92-93.
- [11] 裴润梅, 梁 和, 范稚莲, 等. 桂乐牌复合微生物肥料对甜玉米产量品质及土壤特性的影响 [J]. 中国农学通报, 2003, 19(4): 131-133.
- [12] 孙国波. 新型微生物肥料对玉米生长及产量的影响 [J]. 上海农业科技, 2006(3): 129.
- [13] 王彦才, 李培富, 康 义. 玉米施用复合微生物肥料“农夫乐”的效果 [J]. 宁夏农学院学报, 2001, 22(2): 19-21.
- [14] 吴建峰, 林先贵. 我国微生物肥料研究现状及发展趋势 [J]. 土壤, 2002, 34(2): 68-72.
- [15] 王明友, 李光忠, 陈洪美. 小麦、玉米施用微生物接种剂增产效

应初报 [J]. 土壤肥料, 2001(3): 44-47.

- [16] Idriss E E, Makarewicz O, Farouk A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect [J]. Microbiology, 2002, 148(7): 2097-2109.
- [17] Choi Y M, Suh H J, Kim J M. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. [J]. Journal of Protein Chemistry, 2001, 20(4): 287-292.
- [18] Germida J J, Siciliano S D, de Freitas J R. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1998, 26(1): 43-50.
- [19] Höflich G, Wiehe W, Kühn G, et al. Plant growth stimulation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms [J]. Experientia, 1994, 50(10): 897-905.
- [20] de Freitas J R, Germida J J. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonas under field conditions [J]. Soil Biol Biochem, 1992, 24(11): 1137-1146.
- [21] Egamberdiyeva D, Höflich G. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan [J]. J Arid Environ, 2004, 56(2): 293-301.
- [22] Groppa M D, Zawoznik M S, Tomaro M L. Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants [J]. European J Soil Biol, 1998, 34(2): 75-80.
- [23] Lifshitz R, Klopper J W, Kozłowski M, et al. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions [J]. Canadian J Microbiol, 1987, 33(5): 390-395.
- [24] Zimmer W, Kloos K, Hundeshagen B, et al. Auxin biosynthesis and denitrification in plant growth promotion bacteria [J]. Ecological Science, 1995, 37: 121-128.
- [25] Patten C L, Glick B R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3795-3801.
- [26] Peix A, Rivas-Boyer A A, Mateos P F, et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33(1): 103-110.
- [27] Tilak K V B R, Ranganayaki N, Pal K K, et al. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria [J]. Current Science, 2005, 89(1): 136-150.
- [28] 钟正丹, 何义国, 赵兴秀, 等. 白酒酒糟中抗氧化乳酸菌的筛选及培养基优化 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 533-536.
- [29] 李文利, 傅以钢, 刘征宇, 等. 基于溶藻效果的溶藻细菌 A21 培养基成分优化 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 516-520.
- [30] 吴磊明, 余晓冬. 影响抗生素效价的研究 [J]. 实用医学杂志, 1996, 12(7): 486-487.
- [31] 罗 鹏, 许煜泉, 张 霞, 等. 荧光假单胞菌株 M18 产 PCA 发酵条件研究 [J]. 上海农业学报, 2002, 18(2): 66-71.
- [32] 卢文轩, 蒋立科, 罗 曼. 离子束注入硅酸盐细菌诱变选育研究 [J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(6): 636-639.
- [33] 赵志浩, 徐银荣, 徐银秀. 钾细菌诱变选育和发酵的研究 [J]. 生物技术, 2004, 14(6): 50-52.