

12 株植物根际促生菌促生功能稳定性评价及鉴定

柴晓虹^{1,2}, 姚拓¹, 李录山², 韦雷飞²

(1. 甘肃农业大学 草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/甘肃省草业工程实验室/中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070; 2. 攀枝花市农林科学研究院, 四川 攀枝花 617061)

摘要:对 12 株植物根际促生菌(PGPR)进行促生功能(固氮、溶磷、分泌 IAA)稳定性评价,选取促生功能稳定性良好的 PGPR 菌株,结合菌株形态学特征、主要生理生化特性以及分子特性进行鉴定。结果表明:Jm92、W5、PCRP-5、G、pwxp8、Lx191 与 Jx59 共 7 株菌促生功能稳定性较好,可应用于后续微生物菌剂的开发;7 株菌有 1 株属于短波单胞菌属(*Brevundimonas*),2 株属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),4 株属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

关键词:PGPR;固氮酶活性;溶磷量;IAA;16S rDNA

中图分类号:S144 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2020)05-0068-08

DOI: 10.13817/j.cnki.cyyep.2020.05.010

氮、磷对植物的生长至关重要^[1],几十年来,施用化肥一直被认为是解决土壤中氮、磷元素缺乏的有效方式^[2]。最新统计数据显示,我国化肥总施用量达到 5 900 万 t 左右,占全球化肥年施用量的 30% 以上,位居世界第一^[3]。但我国化肥的利用率低,土壤长期处于“超负荷”“过劳”,被化肥“喂瘦”的状态,土壤质量不断下降,出现了一系列的生态环境污染问题,因此寻找能替代化肥或部分替代化肥、减少化肥施用量的新型肥料具有重要意义。

植物根际促生菌(PGPR),是植物根际的多种有益微生物^[4-5]。一方面,PGPR 可通过产生植物类激素,如 IAA,以促进植物生长发育。另一方面,PGPR 可提高植物的养分吸收,如部分 PGPR 能够促进豆科植物的固氮作用,为植物提供养分;部分 PGPR 可分泌次生代谢产物,将难溶性盐类转化为可溶性盐类物质,进而被植物吸收^[6]。此外,PGPR 可抑制有害微生物的生长,达到降低植物病害的目的,进而提高作物产

量和品质,增加作物生产的经济效益和生态效益^[7-10]。利用 PGPR,特别是以固氮和解磷微生物为主体,研制成复合微生物菌肥,其成本低、无污染、增产稳定、可有效改良土壤,被称为土壤的“清洁剂”“营养师”,可作为新型肥料,解决土壤因过量施用化肥所引起的生态环境污染问题。近年来,植物促生菌的研究主要集中于两个方面:一是促生菌资源的筛选,如研究者已从红三叶(*Trifolium pratense*)、白三叶(*T. repens*)、百脉根(*Lotus corniculatus*)、燕麦(*Avena sativa*)等牧草或作物根际筛选出一大批促生菌资源^[11-18];二是制作复合微生物菌肥,研究其对牧草如苜蓿(*Medicago Sativa*),饲料作物如玉米(*Zea mays*),粮食作物如小麦(*Triticum aestivum*),经济作物如棉花(*Gossypium spp*),薯类作物如马铃薯(*Solanum tuberosum*),蔬菜作物如番茄(*Lycopersicon esculentum*),瓜类作物如甜瓜(*Cucumis melo*)的促生效果^[8,19-24]。但促生菌在保存的过程中,其促生功能稳定性会下降,盲目选取促生菌制作微生物肥料,可能达不到预期的促生效果,造成资源浪费,因此有必要开展 PGPR 菌株促生功能稳定性评价研究。本研究在前期试验基础上,对实验室保存的 12 株优良 PGPR 进行固氮能力、溶磷能力以及分泌 IAA 能力稳定性评价,筛选促生功能稳定性较好的菌株,为后续制作高效的复合微

收稿日期:2019-12-11; 修回日期:2020-04-02

基金项目:兰州市科技计划项目(2019-1-76)

作者简介:柴晓虹(1990-),女,甘肃永昌人,硕士研究生。

E-mail:1106478496@qq.com

姚拓为通讯作者。E-mail:yaotuo@gsau.edu.cn

生物菌剂提供资源。

1 材料和方法

1.1 材料

供试菌株:Jx59,Jm92,G,MCMRS-5,NZRS-14,PCRP-5,PCRP-8,pw xp8,PZRP-2,W5,Lx191,4N4,

由甘肃农业大学草地生物多样性实验室提供(表 1),低温(−18℃)冷冻保存于 LB 斜面培养基,保存年限为 1~2 年,传代次数为 3 代。

培养基:LB 培养基^[36];NFM 培养基^[37];PKO 无机磷培养基^[38]、蒙金娜有机磷培养基^[11];CCM 培养基^[37]。

表 1 供试菌株
Table 1 Tested strains

菌株编号	宿主植物	来源
Jm92	苜蓿 <i>Medicago sativa</i> ^[25-27]	根表土壤(RS)
4N4	玉米 <i>Zea mays</i> ^[28]	根表土壤(RS)
W5	小麦 <i>Triticum aestivum</i> ^[29-30]	根表土壤(RS)
G	小麦 ^[31]	根表土壤(RS)
NZRS-14	醉马草 <i>Achnatherum inebrians</i> ^[32]	根表土壤(RS)
PCRP-8	垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i> ^[32]	根系表面(RP)
Lx191	小麦 ^[26,33]	根表土壤(RS)
Jx59	小麦 ^[34]	根表土壤(RS)
MCMRS-5	糙毛鹅观草 <i>Roegneria hirsuta</i> ^[32]	根表土壤(RS)
pw xp8	垂穗披碱草 ^[35]	根表土壤(RS)
PZRP-2	醉马草 ^[32]	根系表面(RP)
PCRP-5	垂穗披碱草 ^[32]	根系表面(RP)

1.2 方法

1.2.1 菌株促生功能稳定性评价 (1)固氮酶活性测定 利用 NFM 培养基^[37]和 LB 培养基^[36],参考张英^[35]的方法,供试菌株活化后,分别接种于 NFM 培养基血清瓶中(每菌株 3 个重复),采用乙炔还原法(ARA 法)结合气相色谱(GC)技术^[37]测定固氮酶活性浓度(μmol/h)。

(2)溶磷能力测定 定性测定:将菌株活化后,接种于 PKO 或蒙金娜平板上,于 28℃恒温培养 10 d,根据菌株形成的溶磷圈直径(HD)/菌落直径(CD)确定各菌株的溶磷能力^[39]。

定量测定:制备待试菌株悬浮液。将 0.5 mL 菌悬液(10⁸ cfu/mL)接种于 PKO 或蒙金娜液体培养基中。每株设 3 次重复,用不接种菌株培养基作为空白对照。将菌悬液置于 28℃、160 r/min 振荡培养 10 d,取适量培养液,于 4℃、10 000 r/min 离心 15 min,取上清液 5 mL,用钼锑抗显色-紫外分光光度计法^[39]测定有效磷质量分数(μg/mL)。

(3)菌株分泌 IAA 能力测定 定性测定:取 500 μL 待测菌悬液,接种至 50 mL CCM 培养基中。设 3 次重复,以不接种菌株的空白培养基作为对照。于

28℃、150 r/min 振荡培养 12 d,取 50 μL 菌悬液滴于白色陶瓷板,加 50 μL Spot 比色液^[16],15 min 后观察溶液的颜色变化,粉红色表示该菌株分泌 IAA,否则,表示该菌株不分泌 IAA。

定量测定:取上述培养液离心 10 min,取上清液 5 mL,加 5 mL S2 比色液,用紫外线分光光度计法^[13]测定 IAA 质量浓度(μg/mL)。

1.2.2 菌株鉴定 (1)菌株形态学特征观察:将菌株活化后,接种于 LB 平板上,置于 28~30℃培养箱中培养,观察并记录各菌株菌落的形态特征及颜色变化。菌株革兰氏染色:按照 Solarbio 的革兰氏染色试剂盒操作步骤^[40]。

(2)主要生理生化特征测定:菌株产酸、碱性能确定参考姚拓^[13]的方法,将各菌株分别接种于 NFM 固体培养基上,振荡培养 3 d,观察培养基的颜色。利用细菌微量生化反应管和 ATB Expression 半自动细菌鉴定仪,选取合适的细菌生化反应鉴定板条,加入菌悬液,通过自动阅读板条,获得数据并统计分析,得出初步鉴定结果,并获取生理生化特性信息,参照《伯杰细菌鉴定手册》、《常见细菌系统鉴定手册》^[41-42]进行补充分析。

(3)分子生物学鉴定:菌悬液制备是将菌株活化后,接种于LB液体培养基,置28~30℃,150 r/min振荡培养18~24 h。菌株总DNA提取按照TaKaRa的DNA提取试剂盒操作步骤。16S rDNA的PCR扩增:原料:正向引物341f:5'-CCTACGGGAGGCAG-CAG-3';反向引物518r:5'-ATTACCGCGGCTGCT-GG-3';模板,将所得DNA;预混酶(Takara公司*r Taq*和*Ex aq*,包括dNTP,Mg²⁺,PCR buffer,PCR酶);ddH₂O。

50 μL PCR反应体系组成:25 μL 预混酶,引物(10 μmol/L)各2 μL,模板2 μL(50 ng/μL),ddH₂O 19 μL。

反应条件:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸60 s,循环30次,72℃再延伸10 min。

(4)PCR扩增产物的检测及16S rDNA扩增胶回收:参照张英^[35]的试验方法和步骤。

(5)序列的测定:委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

(6)序列分析与系统进化树构建:测序结果在Gen-Bank数据库([http:// www. ncbi. nlm. nih. Gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))中比对,并与已报道细菌菌株进行同源性比较,用Mega 5.0软件Neighbor-Joining法,构建菌株系统发育树。

1.2.3 数据处理 利用Excel 2010 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 菌株促生功能稳定性评价

2.1.1 固氮菌及固氮酶活性 12株促生菌中,具有固氮能力的共6株(表2),低温保存1~2a后,菌株

Jm92、4N4、W5、G、NZRS-14 及 PCRP-8 的固氮酶活性分别下降 21. 08%、68. 22%、8. 03%、23. 68%、94. 31%及 94. 38%,菌株 4N4、NZRS-14 与 PCRP-8 固氮酶活性浓度均下降 50%以上,说明其固氮酶活性退化速度较快,促生功能稳定性较差,不宜作为制作微生物菌剂的功能菌,菌株 Jm92、W5 与 G 可作为后续制作微生物菌剂的功能菌。

表 2 固氮酶活性

Table 2 Nitrogenase activity

菌株编号	固氮酶活性/(μmol·h ⁻¹)	
	保存前	保存后
Jm92	75. 34 ^[27]	59. 46
4N4	178. 94 ^[28]	56. 87
W5	510. 20 ^[29-30]	469. 24
G	783. 45 ^[31]	597. 92
NZRS-14	609. 18 ^[32]	34. 65
PCRP-8	701. 48 ^[32]	39. 44

2.1.2 溶磷菌及溶磷能力 定性测定发现,具有溶磷(有机或无机)特性的9株菌中,Jm92与G菌株的溶磷能力已退化,pw xp8能溶解无机和有机磷,尚具溶磷特性的7株溶磷菌HD/CD值大小顺序依次为:pw xp8>PCRP-5>PZRP-2>Jx59>Lx191>4N4>MCMRS-5(表3)。定量测定发现,7株溶磷菌的溶磷(无机)量大小顺序依次为:PCRP-5>Lx191>Jx59>4N4>pw xp8 > PZRP-2>MCMRS-5,且低温保存1~2 a后,其溶无机磷能力分别下降77. 70%、21. 67%、12. 10%、23. 67%、14. 71%、97. 91%和48. 09%,菌株Lx191、Jx59、4N4、pw xp8的促生功能稳定性相对较好。此外,虽然菌株PCRP-5的溶无机

表 3 溶磷圈大小及有效磷质量分数

Table 3 Soluble phosphorus ring size and p-solubilization capacity

菌株编号	PKO 培养基(无机磷)			蒙金娜培养基(有机磷)		
	HD/CD 值	有效磷质量分数/(μg·mL ⁻¹)		HD/CD 值	有效磷质量分数/(μg·mL ⁻¹)	
		保存前	保存后		保存前	保存后
Jx59	2. 77	109. 39 ^[34]	96. 15	—	—	—
Jm92	—	132. 60 ^[27]	—	—	—	—
G	—	32. 15 ^[31]	—	—	—	—
MCMRS-5	1. 60	11. 23 ^[32]	5. 83	—	—	—
PCRP-5	3. 30	970. 77 ^[32]	216. 49	—	—	—
pw xp8	3. 82	20. 33 ^[35]	17. 34	1. 49	11. 90 ^[35]	10. 63
PZRP-2	2. 79	740. 62 ^[32]	15. 51	—	—	—
Lx191	2. 48	200. 20 ^[26,33]	156. 82	—	—	—
4N4	2. 15	78. 25 ^[28]	59. 73	—	—	—

注:HD:溶磷圈直径(cm);CD:菌落直径(cm)

磷能力下降程度较 4N4 快,但其溶无机磷量远大于 4N4,而菌株 pwxp8 既可溶解无机磷又可溶解有机磷,因此,可将菌株 PCRP-5、Lx191、Jx59、及 pwxp8 作为制作微生物菌剂的功能菌。

2.1.3 菌株分泌 IAA 能力 定性测定发现,菌株 4N4 分泌 IAA 能力已退化(表 4)。定量测定显示,低温保存 1~2 a 后,Jm92、4N4、G 及 Lx191 分泌 IAA 量分别下降 23.94%、100%、20.30% 及 8.79%。因此,菌株 Jm92、G、Lx191 促生功能稳定性较好,可作

为后续制作微生物菌剂的功能菌。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 菌株形态学特征 各菌株在 LB 固体培养基上均能生长,且 24 h 后出现菌落。供试的 7 株菌菌落大多数呈乳白色、较小、圆形、有光泽、无色素,与保存前相比变化不大,仅 pwxp8 在 LB 固体培养基上产生黑色素并扩散(表 5)。

除 W5 和 PCRP-5 为革兰氏阳性菌外,其他所有供试菌株均为革兰氏阴性菌(表 5)。

表 4 菌株分泌生长素类物质的能力

Table 4 The auxin producing ability of tested strains

菌株编号	颜色反应		分泌生长素/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	保存前	保存后	保存前	保存后
Jm92	+ ^[27]	+	47.25 ^[27]	35.94
4N4	+ ^[28]	—	17.80 ^[28]	—
G	+ ^[31]	+	37.34 ^[31]	29.76
Lx191	+ ^[33]	+	54.36 ^[33]	49.58

注:+:粉红色;—:不变色.

表 5 菌落特征及革兰氏染色结果

Table 5 The results o colony characteristics and gram staining

菌株编号	颜色	大小	形状	质地	革兰氏染色
Jx59	乳白色	较小	圆形	干燥,有光泽	阴性
W5	乳白色	较大	圆形	干燥,有光泽	阳性
G	乳白色	较小	圆形	湿润,有光泽	阴性
PCRP-5	乳白色	较小	圆形	湿润,有光泽	阳性
Lx191	乳白色	较大	圆形	干燥,有光泽	阴性
pwxp8	乳白色	较小	圆形	干燥,有光泽,产黑色素	阴性
Jm92	浅棕色	较大	圆形	湿润,有光泽	阴性

2.2.2 主要生理生化特征 Jx59、Jm92 为不产酸、碱菌株;G、pwxp8、Lx191 为产碱菌株;PCRP-5 与 W5 为产酸菌株。

菌株生理生化特性参照《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》^[41-42],Jm92 疑为短波单胞菌属

(*Brevundimonas*)的缺陷短波单胞菌(*B. diminuta*)。W5 疑为芽孢杆菌属(*Bacillus*)的蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)。PCRP-5 疑为芽孢杆菌属的短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)。Lx191、G、pwxp8 及 Jx59 疑为假单胞菌属(*Pseudo-**monas*)的荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)。

表 6 菌株生理生化特性

Table 6 The physiological and biochemical characteristics of tested strains

生化指标	测定株						
	Jm92	W5	PCRP-5	G	pwxp8	Lx191	Jx59
厌氧生长	+	—	—	—	—	—	—
接触酶	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇产酸	—	—	+	—	—	—	—
明胶水解	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产酸	—	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖产酸	—	—	+	+	+	+	+
木糖产酸	—	—	+	+	+	+	+
淀粉水解	—	+	—	—	—	—	—

续表 6

生化指标	测定株						
	Jm92	W5	PCRP-5	G	pwxp8	Lx191	Jx59
酪氨酸水解	nd	+	—	nd	nd	nd	nd
吡啉形成	nd	+	—	—	—	—	—
硝酸盐还原亚硝酸盐	—	+	—	+	+	+	+
V-P 反应	—	+	+	—	—	—	—
5℃	—	—	—	+	+	— *	+
50℃	—	—	— *	—	—	—	—
1 g/100mL NaCl	+	+	+	+	+	+	+
5 g/100mL NaCl	d	d *	— *	d *	d *	+	+
7 g/100mL NaCl	—	d *	— *	— *	— *	— *	— *

注: +: 90%~100%菌株反应阳性; —: 90%~100%菌株反应阴性; d: 40%~60%菌株阳性; nd: 没有测定; *: 主要生化反应结果与参考株不同

2.2.3 菌株分子特性及鉴定 将7株菌进行Blast比对,结果表明,菌株Jm92与*Brevundimonas diminuta* ATCC 11568^T同源性达99.26%;菌株W5与*Bacillus mycoides* DSM 2048^T、*Bacillus cereus* ATCC 14579^T及*Bacillus pseudomycoides* DSM 12442^T同源性均达97.53%;菌株PCRP-5与*Bacillus pumilus* ATCC 7061^T同源性达100%;菌株Lx191与*Pseudomonas fluorescens* DSM 50090^T、*Pseudomonas putida* NBRC 14164^T及*Pseudomonas asplenii* ATCC 23835^T同源性均达100%。从系统发育树来看,菌株Jm92与*Brevundimonas diminuta* ATCC 11568^T亲缘关系最近(图1A);菌株W5与*Bacillus cereus* ATCC 14579^T亲缘关系最近,菌株PCRP-5与*Bacillus pumilus* ATCC 7061^T亲缘关系最近(图1B);菌株Lx191与*Pseudomonas fluorescens* DSM 50090^T亲缘关系最近(图1C)。

综上,分子生物学16S rDNA序列相似性及系统进化分析完全支持ATB Expression半自动细菌鉴定仪对菌株Jm92、W5、PCRP-5和Lx191的鉴定结果,确定菌株Jm92为缺陷短波单胞菌(*B. diminuta*),菌株W5为蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*),菌株PCRP-5为短小芽孢杆菌(*B. pumilus*),菌株Lx191为荧光假单胞菌(*P. fluorescens*);菌株W、pwxp8和Jx59并没有与荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)在同一个分支,似乎表明与其他假单胞菌属的种类分类地位更近,出现这一现象的原因在于本研究扩增的是16S rDNA的V3区,其片段只有200bp左右,遗传信息量十分有限,因此我们只能用这个指标确定待测菌株属的分类地位,即菌株W、pwxp8和Jx59属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。综合这3株菌的形态学、生理生化指标和

ATB Expression半自动细菌鉴定仪的结果,将这3株菌鉴定为荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)。

3 讨论

3.1 菌株促生功能稳定性评价

植物根际存在大量的促生菌,包括固氮菌、溶磷菌、生长素产生菌和生防菌等有益微生物,其功能各不相同。以往对促生菌的研究主要集中在促生菌的筛选、鉴定以及菌肥的研制,如朱颖等^[11]、田宏等^[16]、王琦琦等^[17]、邓振山等^[18]分别从红三叶草(*Trifolium pratense*)、多年生试验地草坪、木碱蓬和巨菌草根际分离和筛选出不同的促生菌,并将其运用在微生物肥料开发中。但促生菌在保存过程中,其促生功能稳定性会下降,应预先对促生菌进行稳定性评价,选择促生稳定性较好的PGPR制作微生物肥料,否则可能达不到预期的促生效果。本研究针对实验室保存的12株促生菌,进行了促生功能稳定性评价。复选了3株固氮菌、4株溶磷菌及3株生长素产生菌(共7株),在低温保存1~2a后,发现其促生功能仍然较强且稳定性较好,因此,可作为后续制作微生物菌剂的功能微生物。本研究中的个别菌株(如PGPR-5),虽然低温保存后,其溶磷能力下降明显,但其溶磷量依然远高于其他溶磷的菌株,其原因有待进一步研究。另外,本研究发现,通过溶磷圈法与钼锑抗显色法测定菌株的溶磷能力,所得结果差异较大,这与前人的研究结果一致^[11-12,15];有些菌株定性测定时溶磷圈很大,但定量测定时溶解无机磷能力却不强,反之亦然。如菌株pwxp8的HD/CD值大于菌株Lx191,但其溶磷量却远低于菌株Lx191,可能是由于两种培养过程和方式

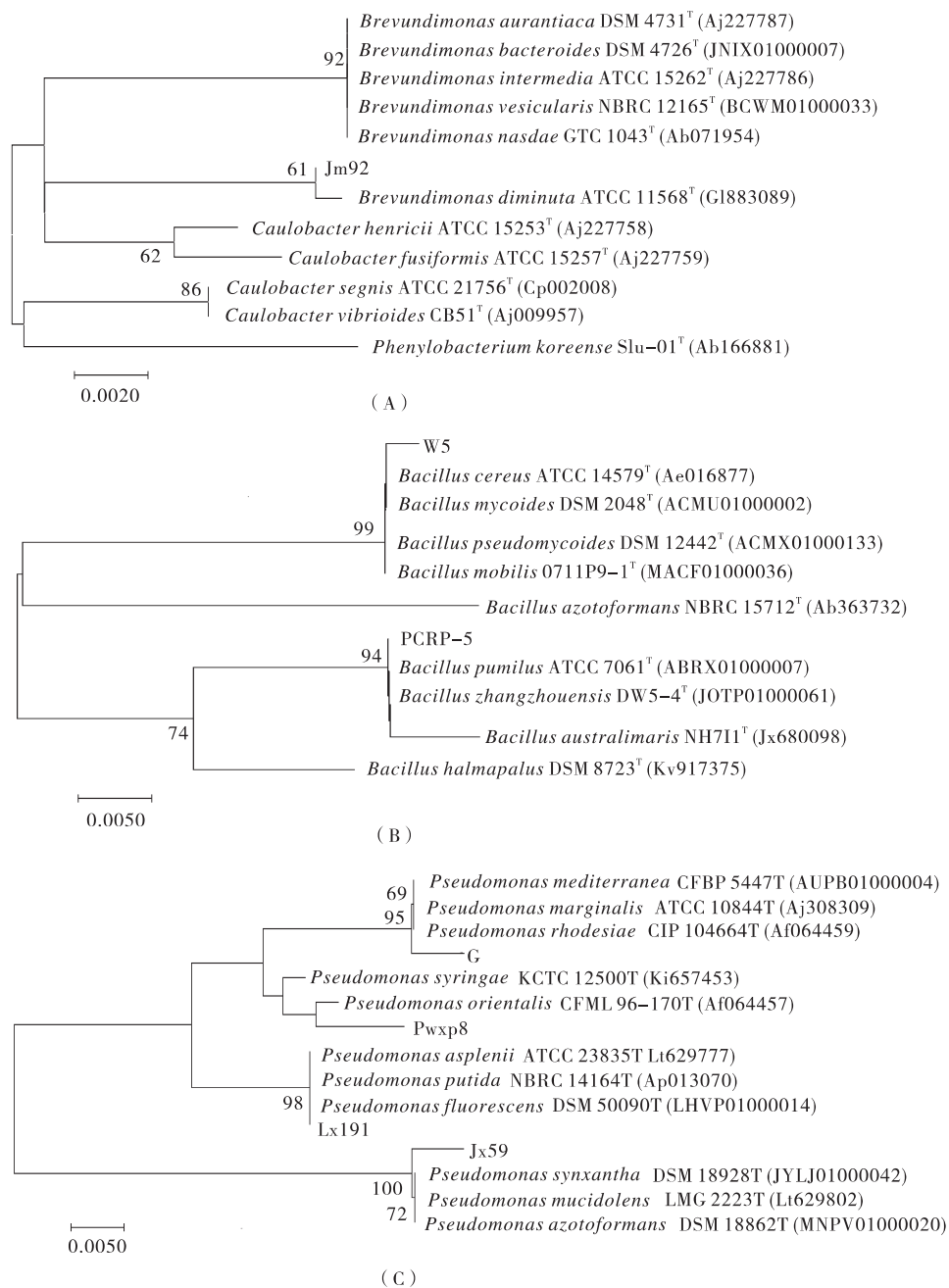


图 1 菌株的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of strains

注:A:菌株 Jm92 系统发育树;B:菌株 W5、PCRP-5 系统发育树;C:菌株 G、pwxp8、Lx191、Jx59 系统发育树的不同引起的^[44-45]。溶磷圈法测定溶磷菌溶磷能力,主要是通过菌株自身产生有机酸,经渗透扩散于其周围形成一个明显的环,来确定该菌株是否具有溶磷能力^[43],其可靠性值得怀疑,因为有些菌株不能产生溶磷圈,但液体培养时可溶解多种形态的磷,所以,用钼锑抗显色法定量判断菌株的溶磷能力更为准确。

3.2 菌株鉴定

本研究采用 ATB Expression 半自动细菌鉴定仪对 7 株促生功能稳定性较好的菌株进行初步鉴定,除

配置菌悬液和加样为手工外,其他操作都为自动化的,其方法标准、简单、准确性高。初步确定菌株 Jm92 为缺陷短波单胞菌(*B. diminuta*),W5 为蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*),PCRP-5 为短小芽孢杆菌(*B. pumilus*),菌株 G、pwxp8、Lx191 及 Jx59 为荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)。同时结合形态学、生理生化和分子生物学的研究指标进行补充鉴定,其中形态学与生理生化指标支持 ATB Expression 半自动细菌鉴定仪对 7 株 PGPR 的鉴定结果;这 7 株菌中有 5 株,分别为 Jm92、

W5、G、Lx191、Jx59, 前人已鉴定^[26,29,31,34], 但与本研究鉴定结果不一致, 可能是因为早期研究上述 5 株菌的分类地位时只限于扩增 16S rDNA 的序列分析, 方法较单一, 结果存在一定的局限性; 本研究主要依靠 ATB Expression 半自动细菌鉴定仪, 同时结合形态学、生理生化和分子生物学的多角度进行分析, 鉴定结果更接近菌株分类的真实情况。目前, 国内外报道的 PGPR 菌主要有芽孢杆菌属、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和假单胞菌属等, 如 Smith 等^[46] 发现蜡状芽孢杆菌能够定殖于植物根际, 且能促进植物根系生长, 因此可应用这些优良 PGPR 菌株制作微生物菌剂, 将其广泛应用在牧草、作物、蔬菜及瓜果等的栽培技术中。

4 结论

供试 12 株 PGPR 中, 菌株 Jm92、W5、PCRP-5、G、pwxp8、Lx191 与 Jx59, 低温冷冻保存后, 其促生功能稳定性良好; 经鉴定, Jm92 为缺陷短波单胞菌、W5 为蜡状芽孢杆菌、PCRP-5 为短小芽孢杆菌、G 为荧光假单胞菌、pwxp8、Jx59 及 Jm92 则均为为荧光假单胞菌。

参考文献:

- [1] 于兵, 吴克宁. 施氮对高寒草原植物生长和土壤无机氮含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(15): 214—218.
- [2] Liu X J. Nutrient research on the activity of enzyme and soil nutrient in the different types of farmland[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2004, 35(4): 523—525.
- [3] 李琦, 姚拓, 杨晓玫, 等. 半干旱地区不同剂型微生物菌肥替代部分化肥对燕麦生长和品质的影响[J]. 干旱区资源与环境, 2020, 34(3): 159—165.
- [4] 黄晓东, 季尚宁, Bernard Glick, 等. 滑铁卢大学植物促生菌技术的研究与开发[J]. 现代化农业, 2002(10): 19—21.
- [5] 李琬, 刘森, 张必弦, 等. 植物根际促生菌的研究进展及其应用现状[J]. 中国农学通报, 2014, 30(24): 1—5.
- [6] 曾美娟, 钟永嘉, 刁勇. 药用植物根际促生菌促生机理研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(11): 13—18.
- [7] 冯祖卿. 德根贝微生物肥对云香巴斯玛 1 号产质量的影响[J]. 作物研究, 2013, 27(6): 630—633.
- [8] 邢卫峰, 于侦云, 陈刘军, 等. 生物肥料“宁盾”对甜瓜枯萎病的防治效果[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 78—81.
- [9] 祝青凤, 李红梅, 李智强, 等. 复合微生物肥料在油菜上的肥效试验[J]. 土壤肥料, 2014, (4): 25.
- [10] 田丹丹, 韦绍龙, 张进忠, 等. 一种生物肥料对香蕉促生及防控枯萎病的效果研究[J]. 植物保护, 2016, (1): 38—40.
- [11] 朱颖, 姚拓, 李玉娥, 等. 红三叶根际溶磷菌分离及其溶磷机制初探[J]. 草地学报, 2009, 17(2): 259—263.
- [12] 李显刚. 百脉根和白三叶根际溶磷菌筛选、溶磷特性与促生效应研究及其 16SrDNA 序列分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [13] 姚拓. 饲用燕麦和小麦根际促生菌特性研究及其生物菌肥初步研制[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2002.
- [14] 李凤霞, 张德罡, 姚拓. 燕麦根际促生菌特性研究[J]. 草业学报, 2005, 14(1): 58—62.
- [15] 张英, 朱颖, 姚拓. 三叶草根际溶磷菌溶磷及分泌 IAA 能力测定[J]. 草原与草坪, 2012, 32(5): 36—40.
- [16] 田宏, 张德罡, 姚拓, 等. 禾本科草坪草固氮菌株筛选及部分特性初步研究[J]. 中国草地, 2005, 27(5): 47—52.
- [17] 王琦琦, 冯丽, 李杨, 等. 新疆木碱蓬 (*Suaeda dendroides*) 根际耐盐促生细菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2569—2578.
- [18] 邓振山, 李静, 刘玉珍, 等. 巨菌草促生菌的筛选及其促生效应[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2019, 45(1): 50—54.
- [19] 李玉娥, 姚拓, 荣良燕. 溶磷菌溶磷和分泌 IAA 特性及对苜蓿生长的影响[J]. 草地学报, 2010, 18(1): 84—88.
- [20] 刘润进, 李敏. AM 菌剂生物肥料田间应用试验[J]. 莱阳农学院学报, 2001, 18(2): 81—84.
- [21] 王继雯, 赵俊杰, 刘莉, 等. M 14 复合生物肥料抗小麦孢囊线虫及增产效果[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(5): 676—680.
- [22] 翟俊松, 王小玲. 有机生物肥料在棉花作物上的应用试验[J]. 安徽农学通报, 2015, 21(10): 89—90.
- [23] 李萍, 张忠福, 王海. 马铃薯配施不同生物肥料试验初报[J]. 农艺农技, 2019(4): 35—39.
- [24] 安静. 浅析腐植酸生物肥料在番茄上的应用效果[J]. 植保土肥, 2016(3): 60—61.
- [25] 冯瑞章, 姚拓, 周万海, 等. 不同生存环境和磷酸盐对 4 株溶磷菌溶磷能力的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(6): 856—860.
- [26] 冯瑞章, 姚拓, 周万海, 等. 溶磷菌对燕麦生物量及植株氮、磷含量的影响[J]. 水土保持学报, 2009, 23(2): 188—192.
- [27] 韩华雯, 孙丽娜, 姚拓, 等. 苜蓿根际有益菌接种剂对苜蓿生长特性影响的研究[J]. 草地学报, 2013, 21(2): 353—359.

- [28] 王国基. 根际促生专用菌肥研制及其对玉米促生作用的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [29] 韩文星. PGPR 菌肥研制及其对燕麦生长和品质影响的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
- [30] 席琳乔, 姚拓, 张德罡. 固氮菌对燕麦不同生育期促生作用的研究[J]. 草业学报, 2007, 16(3): 38—42.
- [31] 刘青海. 六株溶磷菌与四株固氮菌互作效应及其菌剂对苜蓿促生效果研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.
- [32] 马文文. 禾草根际促生菌资源筛选及其数据库管理系统构建[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [33] 刘青海, 姚拓, 马从, 等. 6 株溶磷菌和 4 株固氮菌混合培养条件的研究[J]. 草原与草坪, 2011, 31(6): 1—6.
- [34] 冯瑞章. 苜蓿和小麦根际溶磷菌之溶磷特性和促生效应研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
- [35] 张英. 西藏阿里高寒草原四种牧草根际促生菌资源筛选及促生机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [36] 李凤霞, 张德罡, 姚拓. 高寒地区燕麦根际高效 PGPR 菌培养条件研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 39(3): 316—320.
- [37] 窦新田. 生物固氮[M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [38] Hafeez F Y, Malik K A. Manual on Biofertilizer Technology[M]. Pakistan: National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering, 2000.
- [39] Smith K P, Goodman R M. Host variation for interactions with beneficial plant associated microbes[J]. Annual Review of Phytopathology, 1999, 96: 4786—4790.
- [40] 孙广正. 微生物接种剂对油菜和西葫芦病害防治及其促生作用研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
- [41] Buchanan R E, Bergey D H. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th Chinese edn[M]. Beijing: Chinese Science Press, 1984.
- [42] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 162—166.
- [43] 林启美, 王华, 赵小蓉, 等. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 26—30.
- [44] Jone D L, Darrah P R. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere[J]. Plant Soil, 1994, 166, 247—257.
- [45] Shekhar Nautiyal C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. Federation of European Microbiological Societies, 1999, 170, 265—270.
- [46] Smith C B, Anderson J E, Fischer R L, *et al.* Stability of green fluorescent protein using luminescencespectroscopy; is GFP applicable to field analysis of contaminants? [J]. Environmental Pollution, 2002, 120(3): 517—520.

Stability evaluation of growth promoting function and identification of 12 PGPR strains

CHAI Xiao-hong^{1,2}, YAO Tuo¹, LI Lu-shan², WEI Lei-fei²

(1. College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University/Key Laboratory for Grassland Ecosystem of Ministry of Education/Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province/Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China;

2. Academy of Agricultural and Forestry Sciences of Panzhihua City, Panzhihua 617061, China)

Abstract: The functional stability (nitrogen fixation ability, phosphorus dissolving ability, IAA secreting ability) of 12 PGPR strains were evaluated. The strains with better functional stability were selected to identify in terms of morphological characteristics, main physiological and biochemical characteristics and molecular characteristics. The results showed that Jm92, W5, PCR-5, G, pwxp8, Lx191 and Jx59 had better functional stability and could be applied to the further development of microbial agents. After identification, one strain was from *Brevundimonas*, two were from *Bacillus* and four were from *Pseudomonas*.

Key words: PGPR; nitrogenase activity; phosphorus solubility; IAA; 16S rDNA