

欧李多功能 PGPR 菌株筛选、鉴定及促生防病特性研究

白洁¹, 姚拓^{1*}, 雷杨¹, 王辛有¹, 王占军², 马亚春¹

(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. 宁夏农林科学院荒漠化治理研究所, 宁夏回族自治区 银川 750000)

摘要:【目的】从荒漠草原灌木欧李(*Cerasus humilis*)根际筛选具有优良促生防病特性的植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)。【方法】采用选择性培养基, 筛选欧李根表面及根际土中细菌。通过乙炔还原法、Salkowski 法、钼锑抗比色法和平板对峙法分别测定菌株固氮酶活性、分泌 IAA、溶磷和拮抗病原菌的能力。并利用形态学、革兰氏染色及分子生物学方法对筛选出的 10 株优良根际促生菌进行初步鉴定。【结果】分离出的 31 株细菌, 固氮酶活性在 16.22~328.35 nmol C₂H₄/(h·mL); 分泌 IAA 量在 3.85~60.19 μg/mL; 解有机磷量在 10.66~118.76 μg/mL; 溶无机磷量在 1.42~289.93 μg/mL; 菌株 WGB2 对茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、麦根腐平脐蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)、尖突赤霉菌(*Gibberella acuminata*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和串珠赤霉菌(*Gibberella moniliformi*)均具拮抗作用, 抑菌率分别为 11.85%、39.91%、27.64%、59.84% 和 26.22%。初步鉴定 10 株优良根际促生菌菌株分属于 *Chryseomicrobium*、动性球菌属(*Planomicrobium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)。【结论】欧李 PGPR 菌株数量表现出根表面显著高于根际土, 且菌株具有丰富的促生防病特性, 可为后期微生物肥料的开发提供优质的菌种资源。

关键词: 欧李; PGPR; 促生; 防病

中图分类号: S662.5

文献标志码: A

文章编号: 1009-5500(2023)01-0020-09

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2023.01.003



近年来,为追求高产优质农产品,化肥被广泛运用于农作物生产中^[1]。然而化肥带来经济效益的同时,也会造成水体污染、土壤肥力下降和生态环境破坏等问题^[2]。因此研究开发对环境友好的新型肥料代替传统化肥,对于农业的可持续发展和生态环境保护

具有重要意义。而植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)是一类定殖于植物根际,具有促进植物生长和抑制病原菌的有益微生物^[3]。生长于特殊生境下的 PGPR,因其生境独特、物种稀有及研究较少,已逐渐成为研究 PGPR 的一大热点^[4]。目前,已有学者从极端环境下生长的植物根际分离获得具有固氮、分泌 IAA 和溶磷等功能的 PGPR,其对不良条件有一定耐受性,并具有开发成为适用性强的微生物肥料的潜力^[5-7]。因此,优良 PGPR 的筛选与鉴定对于开发微生物肥料、减施化肥和促进绿色农业的可持续发展能够发挥积极作用。

欧李(*Cerasus humilis*)作为我国特有的矮灌木,主要分布于北方荒漠草原等地区,具有较高的生态价值

收稿日期: 2021-08-23; **修回日期:** 2021-11-29

基金项目: 基于畜禽废弃物的肥料化生产及示范(2020C-16); 宁夏自治区重点研发项目(2020BBF02027)

作者简介: 白洁(1995-),女,内蒙古包头人,硕士研究生。

E-mail: 949310773@qq.com

*通讯作者, E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

和饲用价值^[8]。其表现出的耐盐碱、耐瘠薄和抗病虫害等优点,与定殖于根际的PGPR所发挥的促生防病功能密不可分。刘国强等^[9]从盐碱地生长的黑果枸杞根际土壤中分离的菌株可促进盐胁迫下黑果枸杞幼苗的生长。郭雨晴等^[10]从3种荒漠珍稀植物(四合木、霸王和长叶红砂)根际土中分离的5株优良菌株可显著增加高粱幼苗的根长、芽长和株高。吴晓晖等^[11]从青海极端生境植物根际分离的3株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对油菜菌核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*)和小麦长孢蠕菌(*Helminthosporium tritici-vulgaris*)均具有拮抗作用。因此荒漠等特殊生境中的植物根际很有可能成为优良菌种资源栖息地。然而,目前对于欧李的研究主要集中于品种选育、资源开发利用以及生态恢复等方面^[12-14],对其多功能PGPR菌株的筛选、鉴定及促生防病特性等方面的研究鲜见报道。

鉴于此,本研究以欧李为植物材料,从其根表面和根际土中分离细菌菌株,并对这些菌株促生特性(固氮、分泌IAA和溶磷)和生防特性进行研究,筛选出兼具多种特性的优良菌株,利用形态学、革兰氏染色及分子生物学方法进行初步分类鉴定。以期为开发微生物肥料提供优质的菌种资源,同时对揭示荒漠植物的抗逆机理提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 供试植物样品和病原菌:欧李植物样品采自宁夏回族自治区银川市永宁县,采集其根系及根际土,装入无菌自封袋中,标注植物名称及采集日期,置于冰盒中带回实验室,存于4℃冰箱,进行PGPR菌株分离。供试病原菌:茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、麦根腐平脐蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)、串珠赤霉菌(*Gibberella moniliformi*)、尖突赤霉菌(*Gibberella acuminata*)和禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)由甘肃农业大学草地微生物实验室提供。

1.1.2 供试培养基 无氮培养基(nitrogen free medium, NFM)^[15]用于固氮菌的分离;无机磷培养基(national botanical research institute's phosphate, NBRIP)^[16]用于溶无机磷细菌的分离;蒙金娜有机磷培养基^[17]

用于解有机磷细菌的分离;LB培养基^[18]用于固氮菌和溶磷菌的保存和培养;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)^[19]用于研究菌株拮抗病原菌特性研究。King氏液体培养基^[20]用于菌株分泌IAA特性测定。

1.2 试验方法

1.2.1 固氮菌和溶磷菌的分离和筛选 为获得欧李根际促生菌:(1)欧李根际土细菌分离:去除欧李根周围大块附着土,抖落并收集根系表面虚土(即根际土)。称取根际土5g于装有45mL无菌0.85%生理盐水的三角瓶中,28℃、180r/min下震荡30min,吸取悬浮液1mL加入到9mL无菌生理盐水中混匀,做一系列10倍梯度的稀释,依次制备成浓度为 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 的根际土稀释液;(2)欧李根表面细菌分离:称取(1)中抖落虚土的根系1g,利用无菌水清洗干净后,放入另1支盛有9mL灭菌0.85%生理盐水的离心管中,其中加入灭菌玻璃珠,500r/min离心30min后取上清液,稀释方法同上。吸取上述两种样品制备的稀释液100μL,分别涂布于NFM、NBRIP和蒙金娜固体培养基上进行固氮菌、溶无机磷和解有机磷细菌的分离,2种样品的每个浓度梯度均做3个平行涂布。无菌涂布器均匀涂布后,平板倒置于温度为28℃的培养箱中培养。待菌落长出后,挑取NFM培养基上菌落较大的单个菌落于新的NFM上进行平板划线,纯化后即即为固氮菌。分别挑取NBRIP和蒙金娜培养基上菌落周围形成明显透明圈的单个菌落进行平板划线,纯化后即即为溶磷菌。分离出的固氮菌和溶磷菌接种于LB固体平板上备用。

1.2.2 欧李PGPR菌株促生特性测定 固氮酶活性测定:采用乙炔还原法^[21];合成植物激素IAA特性测定:采用Salkowski法^[22];菌株溶磷特性测定:采用钼锑抗比色法^[23]。

1.2.3 欧李优良PGPR拮抗病原菌特性测定 本研究筛选出固氮酶活性较高的菌株(WGB6和WT16);分泌IAA量最高的菌株(NGB15-2、WGB26-2和WGB12);解有机磷量最高菌株(YGB13、WGB36和WGB2);溶无机磷最高菌株(WGB12、NGB15-1和WGB34),分别对麦根长蠕孢、茄病镰刀菌、尖突赤霉菌、禾谷镰刀菌和串珠赤霉菌利用平板对峙法^[24]进行拮抗病原菌特性研究。在PDA平板中心分别接种5

种病原菌,在十字两端距中心位置2.8 cm处分别接种PGPR菌株,每处理3次重复,以只接种病原菌的平板为对照,28℃培养5~7 d,采用十字交叉法测量病原菌菌落直径,计算抑制率。

抑制率=(对照病原菌菌落直径-处理病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径×100%

1.2.4 优良PGPR菌株初步鉴定 (1) 菌体形态观察 将优良PGPR菌株接种于LB平板上培养24 h后革兰氏染色(依据革兰氏染色试剂盒步骤对菌株进行革兰氏染色),显微镜下观察菌体形态和颜色。

(2) 16S rDNA 基因序列比对 筛选出的10株促生特性较强的菌株利用试剂盒提取细菌总DNA之后,进行16S rDNA基因序列扩增。利用引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R:5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3',PCR反应体系(25 μL):2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL、DNA模板1 μL、引物(10 μmol/L)各0.5 μL、ddH₂O 10.5 μL。PCR扩增参数设置:94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,重复循环32次;72℃ 5 min,将PCR产物在1%凝胶琼脂糖中进行电泳。测序由兰州天启基因生物科技有限公司完成。测序结果在Ezbiocloud数据库中进行比对。

1.3 数据分析

采用SPSS 20.0软件对试验数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),显著性水平为 $P<0.05$,表中数据均为平均值±标准误。

2 结果与分析

2.1 欧李PGPR固氮酶活性及分泌IAA特性研究

从欧李根表面及根际土中分离出31株根际促生菌,分别对其固氮和分泌IAA能力进行定量分析。在菌株固氮酶活性测定中,固氮酶活性在16.22~328.35 nmol C₂H₄/(h·mL),以菌株WT16最高。其中从欧李根表分离的菌株固氮酶活性在16.22~304.86 nmol C₂H₄/(h·mL)之间,大于220 nmol C₂H₄/(h·mL)的菌株有2株;欧李根际土中分离的菌株固氮酶活性在156.24~328.53 nmol C₂H₄/(h·mL),其中大于220 nmol C₂H₄/(h·mL)的菌株有6株。综合固氮酶活性测定结果表明,欧李根际土中分离的菌株的固氮酶活性普遍高于从欧李根表分离的菌株(表1)。对

菌株IAA分泌能力测定中,分泌IAA量在3.85~60.19 μg/mL,以菌株NGB15-2最高。其中在欧李根表分离的菌株中,分泌IAA量在20~35 μg/mL的菌株有7株,分别为NGB6、NGB3、WGB26-2、WGB34、WGB12、WGB14和WGB6。此外,从欧李根际土中分离的菌株分泌IAA的量均小于12 μg/mL,普遍小于从欧李根表分离菌株的IAA分泌量(表1)。

2.2 欧李PGPR溶磷特性研究

在菌株溶磷能力测定中,菌株解有机磷量在10.66~118.76 μg/mL,以菌株WGB36最高,其中菌株解有机磷量大于100 μg/mL的菌株有WGB2、YGB13、WGB12和WGB36,从欧李根际土分离的菌株解有机磷量均小于70 μg/mL。分离菌株溶无机磷量在1.42~289.93 μg/mL,其中溶无机磷量大于240 μg/mL的菌株有WGB34、NGB3、NGB15-1、WGB26-2、WGB12和WGB14,均分离自欧李根表面,而从欧李根际土中分离的菌株溶无机磷量均小于12 μg/mL(表2)。

2.3 欧李PGPR生防特性研究

从欧李根际筛选出的10株优良PGPR进行平板对峙试验中,对于5株病原菌的抑制率在8%~59.84%之间,菌株WGB26-2、WGB12、WGB34、NGB15-1、WGB36和WGB2表现出生防作用(表3)。其中菌株WGB2表现出较强的生防能力,对5株病原菌:茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、麦根腐平脐蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)、尖突赤霉菌(*Gibberella acuminata*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和串珠赤霉菌(*Gibberellamoniliformi*)的抑制率分别为11.85%、39.91%、27.64%、59.84%和26.22%、(图1)。

2.4 欧李优良PGPR初步鉴定

10株优良PGPR菌体形态均呈杆状,其中菌株WT16、YGB13和WGB2在革兰氏染色中呈阳性,其他菌株均呈阴性(表4)。通过扩增10株菌株16S rDNA基因序列,并在数据库中与模式菌株进行比对。结果显示:菌株N1GB15-2与*Chryseomicrobium imtechense*相似度为99.37%;菌株WGB26-2、WGB12、WGB34、NGB15-1和WGB36与*Pseudomonas pisci*相似度分别为99.51%、99.43%、99.51%、99.84%和99.84%;菌株YGB13与*Planomicrobium soli*相似度为98.76%;菌株WT16与*Arthrobacter rhombi*相似度

表 1 欧李根际促生菌固氮酶活性和分泌 IAA 能力

Table 1 Nitrogenase activity and IAA secretion ability of growth-promoting bacteria in rhizosphere of *Cerasus humilis*

来源	菌株	固氮酶活性/(nmol C ₂ H ₄ ·(h·mL) ⁻¹)	IAA/(μg·mL ⁻¹)
欧李根表	SGB105	120.52±12.63 ^{ijklm}	3.95±1.77 ⁿ
	SGB9-2	207.89±9.29 ^{efgh}	8.30±0.08 ^l
	SGB101	180.29±12.94 ^{fg hij}	14.47±1.11 ^h
	SGB84	180.91±24.83 ^{fg hij}	14.16±1.14 ^h
	SGB104	179.28±20.88 ^{fg hij}	12.00±0.18 ⁱ
	NGB6	86.77±7.96 ^{mn}	30.34±1.16 ^d
	NGB8	130.48±2.96 ^{ijklm}	15.21±0.01 ^h
	NGB15-2	148.66±8.84 ^{hijkl}	60.19±0.28 ^a
	NGB15-3	105.96±5.60 ^{klmn}	15.65±0.52 ^h
	NGB3	131.10±30.60 ^{ijklm}	26.87±1.10 ^e
	NGB15-1	97.26±38.41 ^{lmn}	10.65±0.14 ⁱ
	YGB28	188.00±13.74 ^{fg hij}	10.39±0.21 ^{ij}
	YGB15	176.44±19.18 ^{ghij}	7.57±0.10 ^l
	YGB25-2	200.87±15.59 ^{efgh}	4.66±0.04 ⁿ
	YGB13	77.09±.60 ^{mno}	15.67±0.05 ^h
	YGB25-1	156.05±11.60 ^{hijk}	14.76±0.04 ^b
	WGB36	59.60±8.56 ^{nop}	8.33±0.09 ^l
	WGB26-2	16.22±2.12 ^p	30.39±0.35 ^c
	WGB34	27.61±3.62 ^{op}	22.38±0.34 ^g
	WGB12	173.16±18.74 ^{ghij}	33.67±0.26 ^b
WGB14	248.32±17.49 ^{cd e}	23.89±0.53 ^{fg}	
WGB6	304.86±52.72 ^{ab}	24.14±0.11 ^f	
WGB8	162.79±9.95 ^{higk}	3.85±0.04 ^{mn}	
WGB2	171.83±9.41 ^{ghij}	8.80±0.07 ⁿ	
欧李根际土	WT14	269.94±18.31 ^{bcd}	3.85±0.15 ⁿ
	WT16	328.53±5.44 ^a	8.80±0.14 ^{jl}
	YT1	223.98±13.88 ^{defg}	3.89±0.12 ⁿ
	YT2	273.02±9.93 ^{bcd}	8.17±0.08 ^l
	YT3	295.87±8.75 ^{abc}	4.71±0.58 ⁿ
	YT4	156.24±18.58 ^{hijk}	11.31±0.60 ^j
	YT8	235.89±14.25 ^{def}	7.11±0.25 ^{im}

注:表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。下同

为 98.86%; 菌株 WGB6 与放射农杆菌 (*Agrobacterium radiobacter*) 相似度为 98.91%; 菌株 WGB2 与皮尔瑞俄类芽孢杆菌 (*Paenibacillus peoriae*) 相似度为 99.44% (表 4)。

3 讨论

本试验从欧李根表面及根际土中分离出 31 株 PGPR 菌株, 数量表现出根表面 > 根际土, 根表面作为根系活动直接影响部位, 与根际土相比, 较易积累更多的根系分泌物和土壤中的一营养物质, 为微生物生长提供丰富的营养和良好的环境条件^[25]。另外,

Williams 等^[26]研究发现, 植物根系分泌的甘露聚糖可促进土壤中大量微生物附着于植物根表面。

荒漠植物根际微生物与植物根系关系密切, 主要表现为在瘠薄的土壤中, 部分微生物可为植物生长提供必需元素 (氮和磷等) 和生理活性物质 (植物激素 IAA), 从而建立一个更适宜植物生长的微环境^[27]。本试验分离的 PGPR 菌株固氮酶活性在 16.22~328.35 nmol C₂H₄/(h·mL)。根据菌株来源的不同, 固氮酶活性表现出菌株分离于根际土的普遍高于根表面的, 与高亚敏等^[28]研究 PGPR 固氮酶活性的结果相反, 这可能是由于外界自然生境不同导致固氮酶活性出现变

表2 欧李根际促生菌溶磷特性

Table 2 Phosphorus soluble characteristics of growth-promoting bacteria in rhizosphere of *Cerasus humilis*

来源	菌株	解有机磷/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	溶无机磷/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
欧李根表	SGB105	50.99±0.64 ^{ghijklm}	52.99±1.63 ^d
	SGB9-2	84.25±8.50 ^{bcd}	2.97±0.57 ^e
	SGB101	36.39±3.13 ^{lm}	4.45±0.64 ^e
	SGB84	77.62±2.83 ^{bcd}	4.78±0.78 ^e
	SGB104	33.25±0.63 ^m	14.38±0.57 ^e
	NGB6	65.44±5.07 ^{cdefghij}	8.19±0.55 ^e
	NGB8	71.34±0.80 ^{cdefgh}	7.16±1.07 ^e
	NGB15-2	59.11±6.29 ^{efghijkl}	3.49±0.61 ^e
	NGB15-3	50.56±1.05 ^{ghijklm}	38.36±0.96 ^d
	NGB3	64.91±1.94 ^{cdefghijk}	279.06±1.67 ^a
	NGB15-1	61.38±13.24 ^{defghijkl}	283.70±1.35 ^a
	YGB28	82.41±0.75 ^{bcd}	41.07±31.34 ^d
	YGB15	71.82±3.59 ^{cdefg}	2.39±0.46 ^e
	YGB25-2	62.98±4.11 ^d	2.00±0.36 ^e
	YGB13	114.94±1.21 ^a	7.48±1.10 ^e
	YGB25-1	60.37±0.91 ^{defghijkl}	1.68±0.11 ^e
	WGB36	118.76±3.91 ^a	193.40±6.86 ^c
	WGB26-2	45.38±1.01 ^{ijklm}	248.84±3.11 ^b
	WGB34	85.65±20.07 ^{bcd}	283.97±1.98 ^a
	WGB12	100.49±3.77 ^{ab}	289.93±7.44 ^a
WGB14	89.85±7.00 ^{bc}	274.30±5.72 ^a	
WGB6	40.74±0.54 ^{iklm}	9.42±1.53 ^e	
WGB8	75.86±0.73 ^{cdefg}	2.07±0.30 ^e	
WGB2	100.87±2.6 ^{ab}	3.32±0.70 ^e	
欧李根际土	WT14	46.01±0.35 ^{hijklm}	2.07±0.30 ^e
	WT16	39.26±30.22 ^{klm}	2.00±0.39 ^e
	YT1	61.67±0.59 ^{defghijk}	1.42±0.45 ^e
	YT2	54.49±1.29 ^{fghijklm}	10.90±1.13 ^e
	YT3	40.259±0.65 ^{ijklm}	4.33±0.74 ^e
	YT4	10.66±0.47 ⁿ	1.62±0.45 ^e
	YT8	67.64±0.45 ^{cdeghi}	12.90±0.45 ^e

表3 欧李根际促生菌对5种供试病原真菌的拮抗效果

Table 3 Inhibition effect of growth-promoting bacteria in rhizosphere of *Cerasus humilis* on 5 pathogenic fungi

菌株	茄病镰刀菌	麦根腐平脐蠕孢	串珠赤霉菌	尖突赤霉菌	禾谷镰刀菌
NGB15-2	—	—	—	—	—
WGB26-2	—	26.26±1.01 ^c	7.55±1.09 ^c	—	12.94±0.68 ^b
WGB12	—	15.38±1.43 ^d	8±2.31 ^c	—	9.80±1.96 ^c
WGB34	—	31.43±3.60 ^b	13.73±5.19 ^b	—	—
NGB15-1	—	31.05±1.21 ^b	—	—	—
WGB36	—	31.92±1.24 ^b	—	—	—
YGB13	—	—	—	—	—
WT16	—	—	—	—	—
WGB6	—	—	—	—	—
WGB2	11.85±0.74 ^a	39.91±0.47 ^a	26.22±0.37 ^a	27.64±2.66 ^a	59.84±1.84 ^a

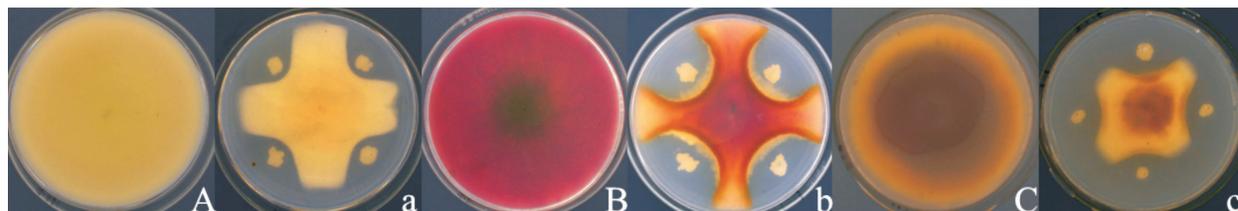


图 1 菌株 WGB2 对部分病原菌平板对峙图

Fig. 1 Diagram of plate confrontation between strain WGB2 and part of pathogens

注:大写字母为对应小写字母的对照;a:麦根腐平脐蠕孢;b:禾谷镰刀菌;c:尖突赤霉菌

表 4 欧李根际促生菌 16S rRNA 基因相似性比对、菌体形态及革兰氏染色

Table 4 Comparison of 16S rRNA gene similarity, bacterial morphology and Gram staining of PGPR strains of *Cerasus humilis*

菌株	模式菌株	同源序列	相似度/%	菌体形态	革兰氏染色
NGB15-2	MW 10	<i>Chryseomicrobium imtechense</i>	99.37	杆状	G ⁻
WGB26-2	P50	<i>Pseudomonas piscium</i>	99.51	杆状	G ⁻
WGB12	P50	<i>Pseudomonas piscium</i>	99.43	杆状	G ⁻
WGB34	P50	<i>Pseudomonas piscium</i>	99.51	杆状	G ⁻
NGB15-1	P50	<i>Pseudomonas piscium</i>	99.84	杆状	G ⁻
WGB36	P50	<i>Pseudomonas piscium</i>	99.84	杆状	G ⁻
YGB13	XN13	<i>Planomicrobium soli</i>	98.76	杆状	G ⁺
WT16	F. 98.3HR. 69	<i>Arthrobacter rhombi</i>	98.86	杆状	G ⁺
WGB6	ATCC 19358	<i>Agrobacterium radiobacter</i> 放射农杆菌	98.91	杆状	G ⁻
WGB2	DSM 8320	<i>Paenibacillus peoriae</i> 皮尔瑞俄类芽孢杆菌	99.44	杆状	G ⁺

注:G⁺:革兰氏阳性;G⁻:革兰氏阴性

化。土壤中可被植物吸收利用的有效磷含量较低,溶磷菌可通过酸解、酶解作用,将土壤中无效磷转化为有效磷^[29]。本研究中,分离的 PGPR 菌株解有机磷量在 10.66~118.76 μg/mL(菌株 WGB36 最高),溶无机磷量在 1.42~289.93 μg/mL(菌株 WGB12 最高),不同菌株间溶磷能力差别较大,外界环境中碳源、氮源及微量元素的种类对菌株溶磷作用会产生影响^[30]。此外,在对分离的 PGPR 分泌 IAA 能力测定中,菌株分泌 IAA 量在 3.85~60.19 μg/mL(菌株 NGB15-2 最高)。分泌 IAA 的 PGPR 菌株可通过改变植物细胞内环境、增加细胞体积和质量以起到促进植物根部发育的作用^[31],这可能促使欧李根系发达,利于吸收营养和水分,并能固着土壤,发挥出保持水土,固定流沙的生态功能。

目前,对于优良 PGPR 菌株的筛选过程中,除了要具有促生作用,还应筛选具有抑制病原菌的菌

株,这对生产实践具有重要意义^[32]。本研究对筛选出促生作用较强的 10 株 PGPR 菌株分别进行平板对峙试验,菌株 WGB26-2、WGB12、WGB34、NGB15-1 和 WGB36 对病原菌麦根腐平脐蠕孢、禾谷镰刀菌和串珠赤霉菌表现出一定的拮抗作用。同时,该 5 株细菌均被初步鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas piscium*)。Yun 等^[33]从麦穗中分离的菌株 *Pseudomonas piscium* 可抑制禾谷镰刀菌的生长和其霉菌毒素的生物合成。但本试验中只有菌株 WGB12 和 WGB26-2 对禾谷镰刀菌具有抑制作用,可能由于不同植株、地域、气候条件等存在差异所致。除此之外,被初步鉴定为皮尔瑞俄类芽孢杆菌(*Paenibacillus peoriae*)的菌株 WGB2 表现出较强的生防能力,对供试的 5 株病原菌均有不同程度的拮抗作用,其中对禾谷镰刀菌的抑制率达到 59.84%。禾谷镰刀菌是一种常见的植物病原菌,能够引起多种植物(小麦、玉米和燕麦等)病害的发

生^[34-36]。因此筛选出高效抑制其生长的生防菌对于农业生产中病害的防治是十分的关键的。被筛选出的其他三株优良 PGPR (NGB15-2、WT16 和 WGB6) 均未表现出生防作用,分别被初步鉴定为:*Chryseomicrobium*、节杆菌属(*Arthrobacter*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)。其中节杆菌属菌株曾多次从荒漠化地区、盐碱地中分离获得,具有较强的耐盐碱性,是此类生境的优势菌属^[37-38]。如今,从欧李根际土中分离获得,预示该菌株对欧李表现出的耐盐碱性可能起到促进作用。

4 结论

(1) 本研究从欧李根际分离出 31 株细菌,均具有固氮酶活性(16.22~328.35 $\mu\text{mol/mL}$)、解有机磷(10.66~118.76 $\mu\text{g/mL}$)、溶无机磷(1.42~289.93 $\mu\text{g/mL}$)、分泌 IAA(3.85~60.19 $\mu\text{g/mL}$)的能力。

(2) 筛选出 10 株优良 PGPR 菌株进行病原菌拮抗试验,菌株 WGB2 对 5 株病原菌均表现出生防作用,抑制率达到 11.85~59.84%。

(3) 10 株优良 PGPR 被初步鉴定为:NGB15-2 为 *Chryseomicrobium imtechense*; WGB26-2、WGB12、WGB34、WGB15-1 和 WGB36 为 *Pseudomonas piscium*; YGB13 为 *Planomicrobium soli*; WT16 为 *Arthrobacter rhombi*; WGB6 为放射农杆菌(*Agrobacterium radiobacter*); WGB2 为皮尔瑞俄类芽孢杆菌(*Paenibacillus peoriae*)。

参考文献:

- [1] 唐汉,王金武,徐常塑,等. 化肥减施增效关键技术研究进展分析[J]. 农业机械学报,2019,50(4):1-19.
- [2] 马骥毓,张英,马文彬,等. 黄芪根际促生菌(PGPR)筛选与特性研究[J]. 草业学报,2017,26(1):149-159.
- [3] 孙韵雅,陈佳,王悦,等. 根际促生菌促生机理及其增强植物抗逆性研究进展[J]. 草地学报,2020,28(5):1203-1215.
- [4] 刘少芳,王若愚. 植物根际促生细菌提高植物耐盐性研究进展[J]. 中国沙漠,2019,39(2):1-12.
- [5] 杨贵森,吕星宇,虎瑞,等. 腾格里沙漠固沙植被区微生物土壤微生物功能群时空格局[J]. 土壤学报,2022,59(2):580-590.
- [6] 杨鸿儒,袁博,赵霞,等. 三种荒漠灌木根际可培养固氮细菌类群及其固氮和产铁载体能力[J]. 微生物学通报,2016,43(11):2366-2373.
- [7] 张盼,王伟楠,樊永红. 盐穗木根际土壤产 ACC 脱氨酶细菌的筛选与鉴定[J]. 新疆农业科学,2018,55(11):2112-2121.
- [8] 张琴,宋经元,邵飞,等. 防风固沙优良树种欧李的潜在适生区及生态特征[J]. 北京林业大学学报,2018,40(3):66-74.
- [9] 刘国强,旭格拉·哈布丁,艾山江,等. 黑果枸杞根际促生菌的筛选鉴定及促生能力分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2019,58(1):56-62.
- [10] 郭雨晴,赵世超,徐道龙,等. 3 种荒漠珍稀植物根际促生菌的筛选、鉴定及对高粱幼苗生长的影响[J]. 草地学报,2020,28(4):112.
- [11] 吴晓晖,谢永丽,梁欣,等. 青海极端生境植物根围促生菌分离鉴定及生物活性分析[J]. 湖北农业科学,2018,57(8):61-65.
- [12] 温静,周兰英,蒲光兰. 成都地区欧李品种果实品质分析与综合评价[J]. 四川农业大学学报,2020,38(1):71-78.
- [13] 张士凯,郝良卿,张启月,等. 欧李开发及利用的研究进展[J]. 食品工业科技,2020,41(4):361-367.
- [14] 李金峰,刘林,杜俊杰. 晋西黄土丘陵沟壑区欧李人工林水土保持效益研究[J]. 山西水土保持科技,2016(4):10-12.
- [15] 韩文星,姚拓,席琳乔,等. PGPR 菌肥制作及其对燕麦生长和品质影响的研究[J]. 草业学报,2008,17(2):75-84.
- [16] Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170 (1) : 265-270.
- [17] 陈俊,陆俊锬,康丽华,等. 红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养[J]. 微生物学通报,2009,36(8):1183-1188.
- [18] 曹晶晶,熊桐梓,钞亚鹏,等. 极耐盐碱固氮菌的分离鉴定及固氮特性研究[J]. 微生物学报,2021,61(11):3483-3495.
- [19] 杨荣,高婷,李滢璟,等. 辣椒根际促生菌的分离筛选及抗病促生特性研究[J]. 生物技术通报,2020,36(5):104-109.
- [20] 李海云,蒋永梅,姚拓,等. 蔬菜作物根际促生菌分离筛选、鉴定及促生特性测定[J]. 植物保护学报,2018,45

- (4):836—845.
- [21] 姚拓,龙瑞军,王刚,等. 兰州地区盐碱地小麦根际联合固氮菌分离及部分特性研究[J]. 土壤学报,2004,41(3):444—448.
- [22] 张银翠,姚拓. 溶磷细菌的溶磷及分泌吡啶乙酸能力研究[J]. 草原与草坪,2020,40(2):17—22.
- [23] Piromyong P, Buranabanyat B, Tantasawat P, *et al.* Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(1):44—54.
- [24] 荣良燕,柴强,姚拓,等. 复合微生物接种剂替代部分化肥对豌豆间作玉米的促生效应[J]. 草业学报,2015,24(2):22—30.
- [25] 吴林坤,林向民,林文雄. 根系分泌物介导下植物—土壤—微生物相互作用关系研究进展与展望[J]. 植物生态学报,2014,38(3):298—310.
- [26] Williams Alan, Wilkinson A, Krehenbrink M, *et al.* Glucomannan—mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection [J]. *Journal of bacteriology*, 2008, 190(13):4706—4715.
- [27] 李婷,张威,刘光琇,等. 荒漠土壤微生物群落结构特征研究进展[J]. 中国沙漠,2018,38(2):329—338.
- [28] 高亚敏,姚拓,李海云,等. 高寒草甸嵩草、珠芽蓼根际优良植物根际促生菌的分离筛选及促生特性研究[J]. 草业学报,2019,28(11):114—123.
- [29] 秦利均,杨永柱,杨星勇. 土壤溶磷微生物溶磷、解磷机制研究进展[J]. 生命科学研究,2019,23(1):59—64+86.
- [30] 马文彬,姚拓,王国基,等. 根际促生菌筛选及其接种剂对箭筈豌豆生长影响的研究[J]. 草业学报,2014,23(5):241—248.
- [31] 孙韵雅,陈佳,王悦,等. 根际促生菌促生机理及其增强植物抗逆性研究进展[J]. 草地学报,2020,28(5):1203—1215.
- [32] 刘力伟,刘丽媛,胡同乐,等. 荧光假单胞菌 SS101 对苹果再植病害的生防效果[J]. 植物保护学报,2016,43(5):812—818.
- [33] Chen Yun, Wang Jing, Yang Nan, *et al.* Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1):3429.
- [34] 于思勤,马忠华,张猛,等. 河南省小麦赤霉病发生规律与综合防治关键技术[J]. 中国植保导刊,2019,39(2):53—60.
- [35] 闫珊珊,刘光芒,王建萍,等. 有氧条件下污染禾谷镰刀菌的玉米品质变化规律和呕吐毒素的积累动态变化规律[J]. 微生物学报,2020,60(8):1661—1671.
- [36] 杨琰珊,姚拓,张建贵,等. 燕麦根腐病原真菌分离鉴定及致病性研究[J]. 草原与草坪,2021,41(2):60—69.
- [37] 代金霞,周波,田平雅. 荒漠植物柠条产 ACC 脱氨酶根际促生菌的筛选及其促生特性研究[J]. 生态环境学报,2017,26(3):386—391.
- [38] 王静,程昱润,肖国举,等. 宁夏银北不同草田轮作模式对细菌群落组成特征的影响[J]. 农业机械学报,2021,52(7):283—292.

Isolation and identification of multifunctional PGPR and characterization of growth-promoting and disease-prevention of *Cerasus humilis*

BAI Jie¹, YAO Tuo^{1*}, LEI Yang¹, WANG Xin-you¹, WANG Zhan-jun²,
MA Ya-chun¹

- (1. College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Key laboratory of Grassland Ecology System, Ministry of Education, Sino-U. S. Centers for Grazing land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China;
2. Desertification Control Institute of Ningxia Academy of Agriculture and Forestry

Science, Yinchuan, 750000, China)

Abstract: [Objective] The aim of this research was to screen plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from the rhizosphere of the desert steppe shrub *Cerasus humilis* with excellent growth-promoting and disease-preventing properties. In this study, selective media were used to screen the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of the *Cerasus humilis*. Acetylene reduction method, Salkowski method, molybdenum antimony colorimetric method and plate confrontation method were used to determine the nitrogenase activity, secretion of IAA, phosphorus and antagonism. Using Morphology, gram staining and molecular biology methods, 10 strains with excellent rhizosphere growth-promoting were preliminarily identified. The results from 31 strains of bacteria which were screened showed that: the nitrogenase activity was 16.22~328.35 nmol C₂H₄/(h·mL); the amount of IAA secreted was 3.85~60.19 μg/mL; the amount of dissolved organic phosphorus was 10.66~118.76 μg/mL; the amount of dissolved inorganic phosphorus was 1.42~289.93 μg/mL; strain WGB2 was effective against *Fusarium solani*, *Bipolaris sorokiniana*, *Gibberella acuminata*, *Fusarium graminearum* and *Gibberella moniliformi*, and the inhibition rates were 11.85%, 39.91%, 27.64%, 59.84%, and 26.22%, respectively. PGPR of *Cerasus humilis* showed that the number of bacteria on the root surface was significantly higher than that of the rhizosphere soil. Ten strains were preliminarily identified as belonging to *Chryseomicrobium*, *Planomicrobium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium* and *Paenibacillus*.

Key words: *Cerasus humilis*; PGPR; growth promotion; disease prevention