

# 高寒草地产胞外多糖植物根际促生菌筛选及促生特性研究

王振龙<sup>1</sup>, 姚拓<sup>1\*</sup>, 李智燕<sup>2</sup>, 柴加丽<sup>1</sup>, 何礼<sup>1</sup>, 陈鑫<sup>1</sup>

(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. 甘肃省草原技术推广总站, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:**【目的】筛选若尔盖高寒草地高产胞外多糖PGPR, 为研制适宜若尔盖高寒草地的多糖菌剂及相关产品提供优良菌种资源。【方法】在16℃条件下, 利用选择性培养基从高寒草地的波伐早熟禾(*Poa poophagorum*)和老芒麦(*Elymus sibiricus*)根际筛选高产胞外多糖PGPR, 利用16S rDNA测序与系统发育分析明确分类地位, 通过接种试验研究菌株和胞外多糖的促生特性。【结果】从两种植物根际筛选到3株产胞外多糖PGPR, 其中, 菌株NAHP4、PBR51高产胞外多糖, 产糖量分别为1462.50、1337.50 mg/L, 并兼具固氮、溶无机磷的促生特性; 胞外多糖对老芒麦的种子萌发和胚芽生长具有促进作用, 高浓度的胞外多糖对胚根生长具有显著抑制作用( $P < 0.05$ ); 接种菌株NAHP4、NBHP13、PBR51对老芒麦地下部分具有显著促进作用( $P < 0.05$ ), 其中, 菌株NAHP4的促进作用最大。【结论】菌株NAHP4作为高产胞外多糖PGPR资源, 具有研发适宜若尔盖高寒草地的多糖菌剂及相关产品的潜力。

**关键词:**植物根际促生菌; 胞外多糖; 高寒草地; 多糖菌剂

**中图分类号:**S812; S154.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)04-0094-09

**DOI:**10.13817/j.cnki.cycp.2024.04.011



若尔盖高寒草地地处青藏高原东缘, 是长江、黄河流域重要的水源涵养地及生物多样性集中区, 具有重要的生态地位<sup>[1]</sup>。近年来, 受自然因素和人类活动的影响, 若尔盖高寒草地出现退化现象<sup>[2]</sup>。因此, 恢复若尔盖的退化草地对涵养水源和保护生物多样性具有重要意义。目前, 科研工作者采用土壤微生物改良技术, 恢复了部分退化草地<sup>[3]</sup>。研究表明, 合理使用微生物菌肥能显著促进植被生长, 改善土壤结构、土壤肥力和土壤微生物群落, 从而促进草地生态系统的恢

复, 其中, 以植物根际促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)为菌种资源的微生物菌肥, 在草地恢复中取得良好的经济和生态效益<sup>[4-7]</sup>。PGPR是指生存于植物根际土壤或附生于植物根系的一类有益微生物, 能通过溶磷、固氮和解钾等方式显著促进植物生长发育和对土壤矿物质营养的吸收利用, 缓解外界环境对植物的胁迫, 提高植物抗病虫害的能力, 从而提高产量<sup>[8-9]</sup>。许多科研工作者主要针对具有固氮、溶磷、分泌植物激素的PGPR开展研究, 对产胞外多糖的PGPR及胞外多糖研究较少<sup>[9-13]</sup>。

胞外多糖是指一些特殊微生物在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的水溶性多糖<sup>[14]</sup>。在环境中, 产胞外多糖微生物及胞外多糖有利于土壤水稳定性团聚体的形成, 改善土壤的通气性和持水性, 减少土壤速效养分的固定和淋失, 起到保肥和缓释肥效的双重作用, 同时有利于微生物在不同生境的定殖, 提高植物的抗逆性<sup>[15-17]</sup>。产胞外多糖微生物及胞外多糖主要

**收稿日期:**2022-07-26; **修回日期:**2023-04-03

**基金资助:**甘肃省优秀研究生“创新之星”项目(2021CXZX-386); 禾本科牧草复合菌肥应用与推广技术(KJ CX2021010)

**作者简介:**王振龙(1995-), 男, 甘肃渭源人, 硕士研究生。

E-mail: wangzl@st.gsau.edu.cn

\*通信作者。E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

应用于食品、化工、医药等行业,在农业与环境保护领域的应用尚处于起步阶段<sup>[14]</sup>,尤其在寒旱草地生态系统中关于二者的研究较少。从若尔盖高寒草地的植物根际筛选高产胞外多糖 PGPR 资源并研发相关产品,对若尔盖高寒草地的恢复具有重要意义。

本研究从分布于若尔盖高寒草地的波伐早熟禾 (*Poa annua*)、老芒麦 (*Elymus sibiricus*) 根际分离筛选高产胞外多糖 PGPR, 以期为研制适宜若尔盖高寒草地的多糖菌剂及相关产品提供菌种资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究区概况与样品采集

选择位于四川省阿坝藏族羌族自治州若尔盖县的高寒草地为样地,平均海拔 3 500 m,高寒温带湿润气候,年均降水量 750 mm,年均气温 1.5 °C,常年处于低温状态,属于高寒地区,其植被分布最广泛的是禾本科 (Poaceae) 牧草中的早熟禾属和披碱草属,其中,波伐早熟禾、老芒麦分别属于早熟禾属、披碱草属中的优势种<sup>[18-19]</sup>。选择长势良好、无病害的波伐早熟禾和老芒麦进行编号:波伐早熟禾记为 A、老芒麦记为 B。采用五点法取样,每点采集 5 株完整的植物根系,分别装入自封袋中,带回实验室,并及时进行产胞外多糖 PGPR 分离与筛选。

### 1.2 高寒草地产胞外多糖 PGPR 的分离与筛选

在 16 °C 条件下,参照姚拓<sup>[20]</sup>的方法,将波伐早熟禾和老芒麦根际分为 3 个区域,即根表土 (soil adhering to roots, RS)、根系表面 (rhizoplan or surface of roots, RP) 和根内 (histoplan or interior of roots, HP)。将上述 3 个区域,采用稀释梯度法分离 PGPR,具体步骤参照马文文<sup>[21]</sup>的方法。在超净工作台中,将根系表面的虚土抖落后,混匀。准确称取 1.0 g 根系,放入装有 9 mL 0.85% 灭菌生理盐水的试管中,200 r/min 振荡 10 min 后静置,上清液即为 10<sup>-1</sup> 根表土壤稀释液;把振荡后的根系取出,用无菌水冲洗 5 次后,重新放入装有 9 mL 0.85% 灭菌生理盐水的试管中,并加入 3 粒无菌玻璃珠,200 r/min 振荡 10 min 后静置,上清液即为 10<sup>-1</sup> 根系表面稀释液;取出上述根系,并用石蜡将两端密封,先用 2% 的次氯酸钠溶液表面消毒 30 s 后,用无菌水冲洗干净,再用 75% 的酒精灭菌 1 min 后,用无菌水冲洗 5 次,剪去两端的石蜡,用无菌滤纸吸干根

系表面水分,放入已灭菌的研钵中,加入 9 mL 0.85% 灭菌生理盐水并研磨成匀浆,1 000 r/min 离心 10 min 后,上清液即为 10<sup>-1</sup> 根内组织稀释液。分别取 1 mL 10<sup>-1</sup> 稀释液于装有 9 mL 0.85% 灭菌生理盐水的新试管中,得到 10<sup>-2</sup> 稀释液,依次类推,制备 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 梯度的 RS、RP 和 HP 稀释液,备用。

分别取 3 个区域的 10<sup>-5</sup> 和 10<sup>-6</sup> 稀释液各 200 μL,涂布无氮培养基 (nitrogen free medium, NFM) 分离固氮菌<sup>[20]</sup>、NBRIIP (national botanical research institute's phosphate) 培养基分离溶磷菌<sup>[22]</sup>;采用 King 氏培养基<sup>[23]</sup> 从筛选的固氮菌和溶磷菌中筛选产胞外多糖 PGPR,分离菌株经 3 次平板划线获得纯菌落。将纯化好的菌株于 4 °C 冰箱保存,同时,在 -80 °C 冰箱中用 50% 的甘油保存 3 份,备用。

### 1.3 高寒草地产胞外多糖 PGPR 的特性测定

1.3.1 胞外多糖产量测定 将菌液按照 2% 的接种量,接种于 50 mL 已灭菌的 King 氏培养基中。在 16 °C、180 r/min 的条件下培养 48 h 后,取 10 mL 发酵液,在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min 后,取上清液于三角瓶中,加入 3 倍体积无水乙醇,震荡 1 min 后,在 4 °C 下静止沉淀 24 h,之后在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min,得到胞外多糖沉淀。在沉淀中加入 20 mL 蒸馏水,使其充分溶解后,取 1 mL 稀释至 20 mL 备用。胞外多糖的产量采用苯酚-硫酸法<sup>[24]</sup>测定,标曲为  $y=5.6x-0.0129$  ( $R^2=0.9985$ ),菌株胞外多糖的产量计算公式如下:

$$\text{胞外多糖产量 [mg/L]} = \frac{P \times T_s \times V \cdot 1000}{V_0}$$

式中:  $P$  显色液的胞外多糖量含量 (mg/L);  $T_s$  分取倍数;  $V_0$  提取胞外多糖的发酵液体积 (mL);  $V$  溶解多糖沉淀的蒸馏水体积 (mL)。

1.3.2 固氮酶活性测定 采用乙炔还原法对筛选的菌株进行固氮酶活性测定<sup>[25]</sup>。将固氮菌在 LB 液体培养基中培养 48 h 后,取 2 mL 菌液于无菌离心管进行离心,收集菌体,并将菌体接种于装有 5 mL 半固体 NFM 培养基的血清瓶中,每株菌 3 次重复,以不接菌为对照,用棉花塞封口,在 16 °C 培养 48 h 后,将棉花塞换成橡胶塞,用无菌注射器抽出 1 mL 气体,然后注入 1 mL C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 气体。在 16 °C 培养箱中培养 48 h 后,用 50 μL 微量进样器从血清瓶中分别抽取混合气体

50  $\mu\text{L}$ ,快速注入到气相色谱仪中,记录并观察 $\text{C}_2\text{H}_4$ 出峰时间及峰面积,测定 $\text{C}_2\text{H}_4$ 和 $\text{C}_2\text{H}_2$ 的含量。固氮酶活性的计算公式如下:

$$\text{固氮酶活性} [nmol/(h \cdot mL)] = \frac{T_s \cdot V \cdot 1000}{T_h \cdot V_m \cdot V_0 \cdot t \cdot M}$$

式中: $T_s$  上机测定乙烯的峰面积( $\text{pA} \cdot \text{s}$ ); $T_h$  1  $\mu\text{L}$  标准乙烯形成的峰面积( $\text{pA} \cdot \text{s}$ ); $V$  反应体系的总体积( $\mu\text{L}$ ); $V_0$  上机测定的体积( $\mu\text{L}$ ); $V_m$  当地的气体摩尔体积( $\text{mol/L}$ ); $t$  换气后培养的时间; $M$  加入菌液的体积( $\text{mL}$ )。

**1.3.3 溶磷量测定** 将筛选的菌株接种于50 mL NBRIP液体培养基中,每株菌3次重复,在16  $^\circ\text{C}$ 、180 r/min条件下,培养10 d后,取培养液10 mL于离心管中。在4  $^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min条件下,离心10 min,取上清液1 mL于50 mL离心管中,同时加入0.5 mol/L  $\text{NaHCO}_3$ 溶液19 mL,置于摇床,180 r/min震荡30 min后,准确吸取浸提液5 mL于50 mL容量瓶中,采用钼蓝比色法测定溶磷量<sup>[26]</sup>。用紫外可见分光光度计测定 $D_{700\text{nm}}$ ,溶磷量的计算公式如下:

$$\text{溶磷量} (\mu\text{g/mL}) = \frac{P \times V \times T_s}{V_0}$$

式中: $P$  显色液的磷含量( $\mu\text{g/mL}$ ); $V$  显色液的体积( $\text{mL}$ ); $T_s$  分取倍数; $V_0$  发酵液的体积( $\text{mL}$ )。

#### 1.4 产胞外多糖PGPR的16S rDNA基因序列鉴定

对产胞外多糖PGPR进行16S rDNA基因序列鉴定,每株菌3次重复,使用DNA提取试剂(TaKaRa<sup>®</sup>),提取细菌基因组DNA,利用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行16S rDNA基因序列的PCR扩增<sup>[9]</sup>。PCR产物经1%凝胶琼脂糖电泳检测合格后,扩增的基因由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成测序。将完成测序的基因序列提交至NCBI的GenBank数据库中,利用BLAST程序进行同源序列比较分析后,分别下载相似度较高的标准菌株基因序列,采用Mega7.0软件以邻接法聚类分析,构建所测菌株的系统发育树,Bootstrap值设置为3000。

#### 1.5 接种胞外多糖溶液、菌剂的促生试验

**1.5.1 胞外多糖溶液对种子萌发过程的影响** 选取菌株NAHP4分泌的胞外多糖,并配置成不同浓度的

胞外多糖溶液。选取颗粒饱满、大小一致的老芒麦种子为材料。用1%的NaClO对种子消毒5 min,用无菌水冲洗10次,整齐摆放于垫有双层滤纸的培养皿,每个培养皿放30粒种子,依次加入浓度分别为0(CK)、20、40、60、80、100、120、140、160、200、300 mg/L的胞外多糖溶液,以浸没种子1/3为准,每个浓度3次重复。将培养皿置于恒温培养箱中,设置温度为25  $^\circ\text{C}$ ,以12 h光照,12 h黑暗为周期培养。以胚根突破种皮,且超过种长的1/2作为发芽标准,开始统计发芽数,每日1次,并补充相应水分,共培养16 d<sup>[27]</sup>。

测定指标:试验结束后,计算种子的发芽率<sup>[27]</sup>:

$$\text{发芽率} = (\text{发芽的种子数} / \text{培养的总种子数}) \times 100\%$$

每处理随机选取9株幼苗,并用卷尺测量胚芽长,使用自动扫描仪(LA2400 Scanner, Epsoneexpression 10000XL)扫描胚根,再使用WinRHIZO 2.0对根系扫描图像数据进行处理,得到总长、表面积、平均直径和根尖数的数据<sup>[12]</sup>。

**1.5.2 模拟土壤缺少速效磷促生试验** 供试菌剂:将菌株NAHP4、NBHP13、PBR51分别在LB液培养基中培养至活菌数为 $1 \times 10^8$  CFU/mL时,备用。供试植物为老芒麦。设置3个处理(1种菌剂为1个处理)、1个对照,每个处理3次重复。用1%的NaClO溶液对老芒麦种子消毒5 min,并用无菌水冲洗10次后,摆放于垫有双层滤纸的培养皿中,在25  $^\circ\text{C}$ 、12 h光照,12 h黑暗条件下培养,当胚芽长至2~3 cm时,选取长势一致的老芒麦幼苗,移栽至装有70 mL半固体Hoagland营养液(以难溶的磷酸三钙为唯一磷源,模拟缺少有效磷的土壤)的无菌长玻璃试管中<sup>[12]</sup>。待试管苗生长6 d后,各接种2 mL供试菌剂,CK接种2 mL无菌LB培养液。将试管苗置于光照培养室中,依据采样区牧草生长期的平均气温资料,设定25  $^\circ\text{C}$ 下光照14 h,15  $^\circ\text{C}$ 下10 h黑暗,光强度为6 000 lx<sup>[18]</sup>。统一管理30 d,定期补充无菌水,并更换试管位置。

试验结束后,用卷尺测量每支试管3株植株的株高,用游标卡尺测量茎粗。根系扫描同1.5.1小节,得到总根长、平均根直径的数据。扫描完成之后,分别将植株地上和地下部分装入纸袋,于烘箱105  $^\circ\text{C}$ 杀青30 min后调至70  $^\circ\text{C}$ 烘干至恒重,用分析天平测量地上

部分干重和根干重<sup>[12]</sup>。

### 1.6 数据分析

利用 Microsoft Excel 2010 整理数据;采用 SPSS 25.0 和 Origin 2021 软件对实验数据进行统计分析和绘图;通过 One Way ANOVA 和 Duncan 法进行方差分析。图表数据均为平均值±标准误,不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 高寒草地产胞外多糖 PGPR 的特性

本研究从两种植物根际分离出 52 株 PGPR,具溶磷或固氮的促生特性,其中,只有菌株 NAHP4、

NBHP13、PBR1 分泌胞外多糖,产糖量分别为 1 462.50、617.26、1 337.50 mg/L。这 3 株菌兼具固氮、溶无机磷的促生特性,其中,菌株 NAHP4、NBHP13 具有较高的固氮酶活性,菌株 PBR1 具有较高的溶无机磷量(表 1)。

### 2.2 产胞外多糖 PGPR 的 16S rDNA 基因序列鉴定

基于各菌株的 16S rDNA 基因序列,通过同源序列比对分析和系统发育树分析可知,3 株产胞外多糖 PGPR 均属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),其中,菌株 NAHP4 初步鉴定为 *P. arsenicoxydans*、菌株 NBHP13 初步鉴定为 *P. veronii*、菌株 PBR1 初步鉴定为 *P. frederiksbergensis*(图 1)。

表 1 产胞外多糖 PGPR 的特性

Table 1 The characteristics of exopolysaccharide-producing PGPR

菌株 Strain	胞外多糖产量/ (mg·L <sup>-1</sup> )	固氮酶活性/ (nmol·h <sup>-1</sup> ·mL <sup>-1</sup> )	溶无机磷量/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
NAHP4	1462.50±61.86 <sup>a</sup>	166.98±6.90 <sup>a</sup>	355.39±6.16 <sup>a</sup>
NBHP13	617.26±36.21 <sup>b</sup>	181.22±11.68 <sup>a</sup>	329.01±8.82 <sup>a</sup>
PBR1	1337.50±10.31 <sup>a</sup>	105.31±0.95 <sup>b</sup>	361.55±14.31 <sup>a</sup>

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

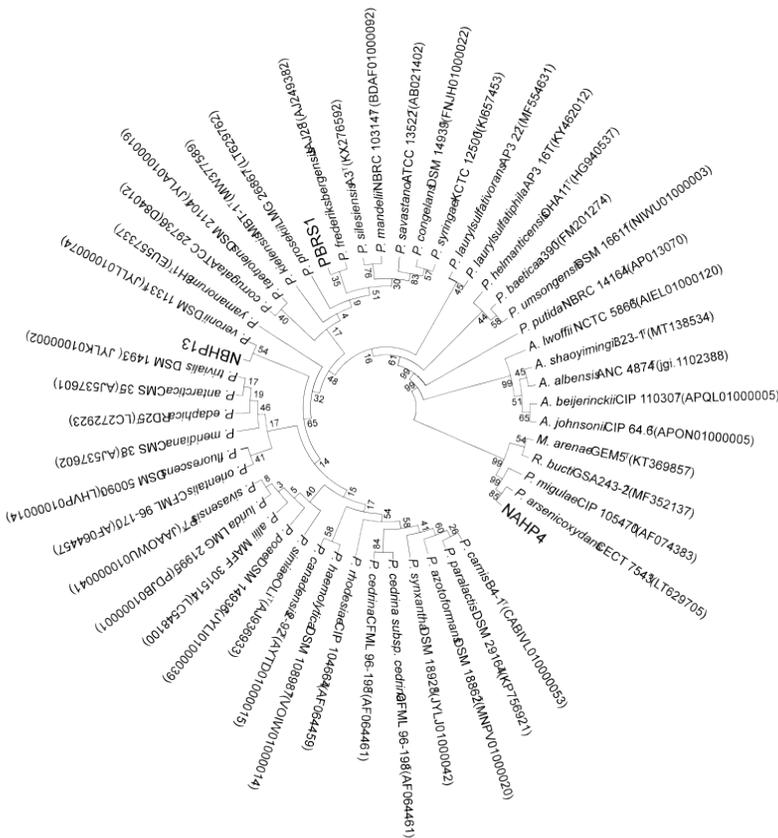


图 1 产胞外多糖 PGPR 的 16S rDNA 基因系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rDNA gene for exopolysaccharide-producing PGPR

### 2.3 胞外多糖溶液对老芒麦种子萌发过程的影响

本研究发现,胞外多糖溶液对老芒麦种子的萌发、胚芽、胚根具有不同的影响。在种子萌发期,除200 mg/L胞外多糖溶液对种子萌发具有抑制作用外,其余各浓度均具有促进作用,但差异不显著(图2-A)。在胚芽发育期,胞外多糖溶液对胚芽生长具有促进作用,其中,20、40、60、120、140 mg/L的促进作用显著( $P<0.05$ ),较0 mg/L分别增加胚芽长的

6.39%、9.33%、8.63%、8.03%、11.25%(图2-B)。在胚根发育期,高浓度的胞外多糖溶液对胚根生长具有显著抑制作用( $P<0.05$ ),如140、160、200、300 mg/L,较0 mg/L分别减少38.60%、40%、61.14%、36.96%,其中,对胚根的抑制作用显著( $P<0.05$ ),如300 mg/L较0 mg/L,总胚根长减少90.22%、胚根表面积减少43.06%、胚根尖数减少42.31%(图2-C、D、E、F)。

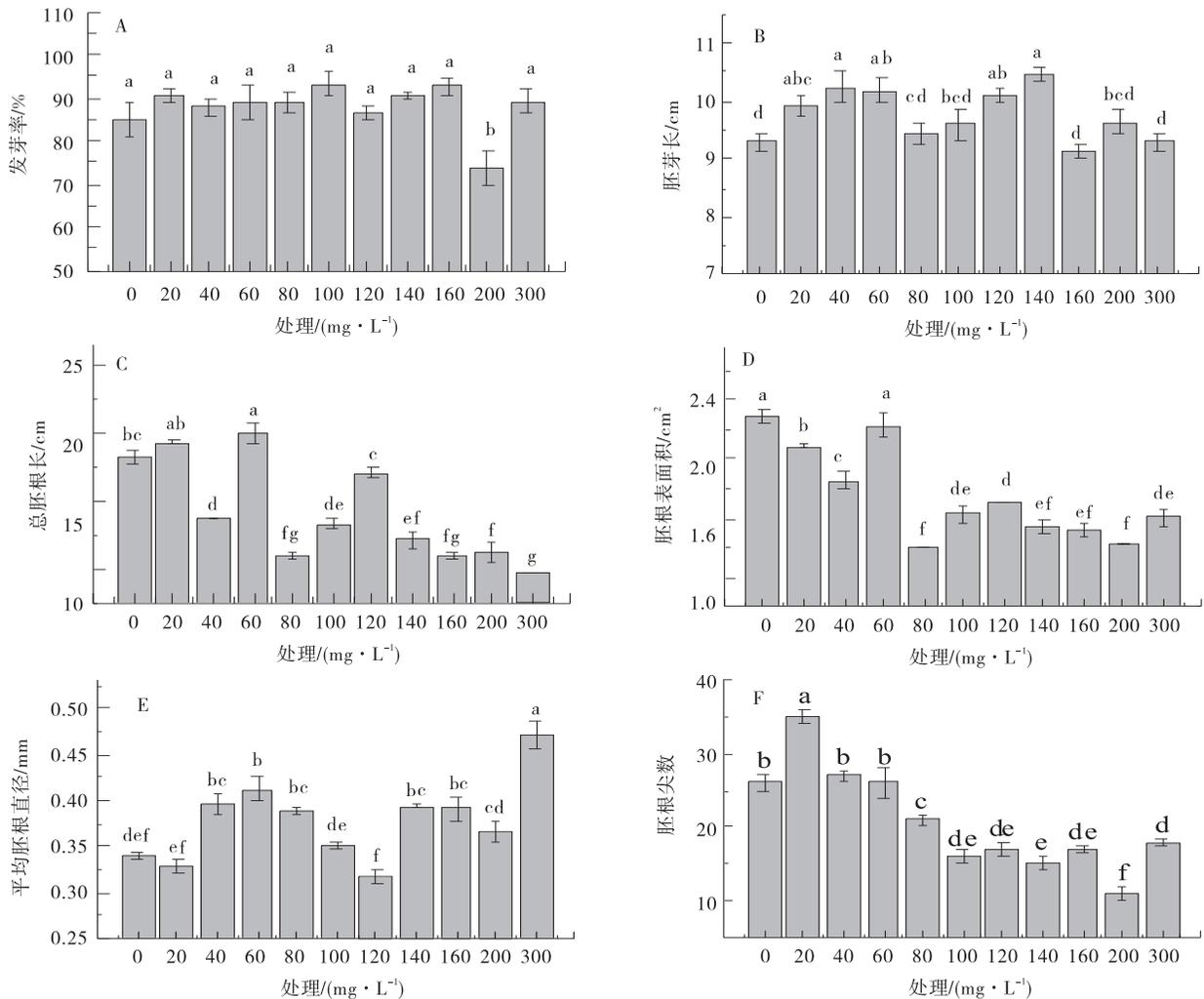


图2 胞外多糖溶液对老芒麦种子萌发过程的影响

Fig. 2 Effects of the exopolysaccharide solution on seed germination of *Elymus sibiricus*

注:不同小写字母表示不同处理在0.05水平差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.4 高寒草地产胞外多糖 PGPR 对老芒麦生长的影响

在以磷酸三钙为唯一磷源的培养条件下,菌株 NAHP4、NBHP13、PBRS1对老芒麦的株高(图3-A)、茎粗(图3-B)、地上干重(图3-C)、根干重(图3-D)、总根长(图3-E)和平均根系直径(图3-F)整体生长的促进作用较CK分别增加14.76%、11.34%和8.45%,

其中,对老芒麦地下部分具有显著的促进作用( $P<0.05$ ),而对地上部分具有抑制作用,但差异不显著。菌株 NAHP4对地下部分的促进作用最大,较CK增加31.06%,而菌株 NBHP13、PBRS1对老芒麦地上干重具有显著的抑制作用( $P<0.05$ ),地上干重较CK分别减少7.89%、13.14%。

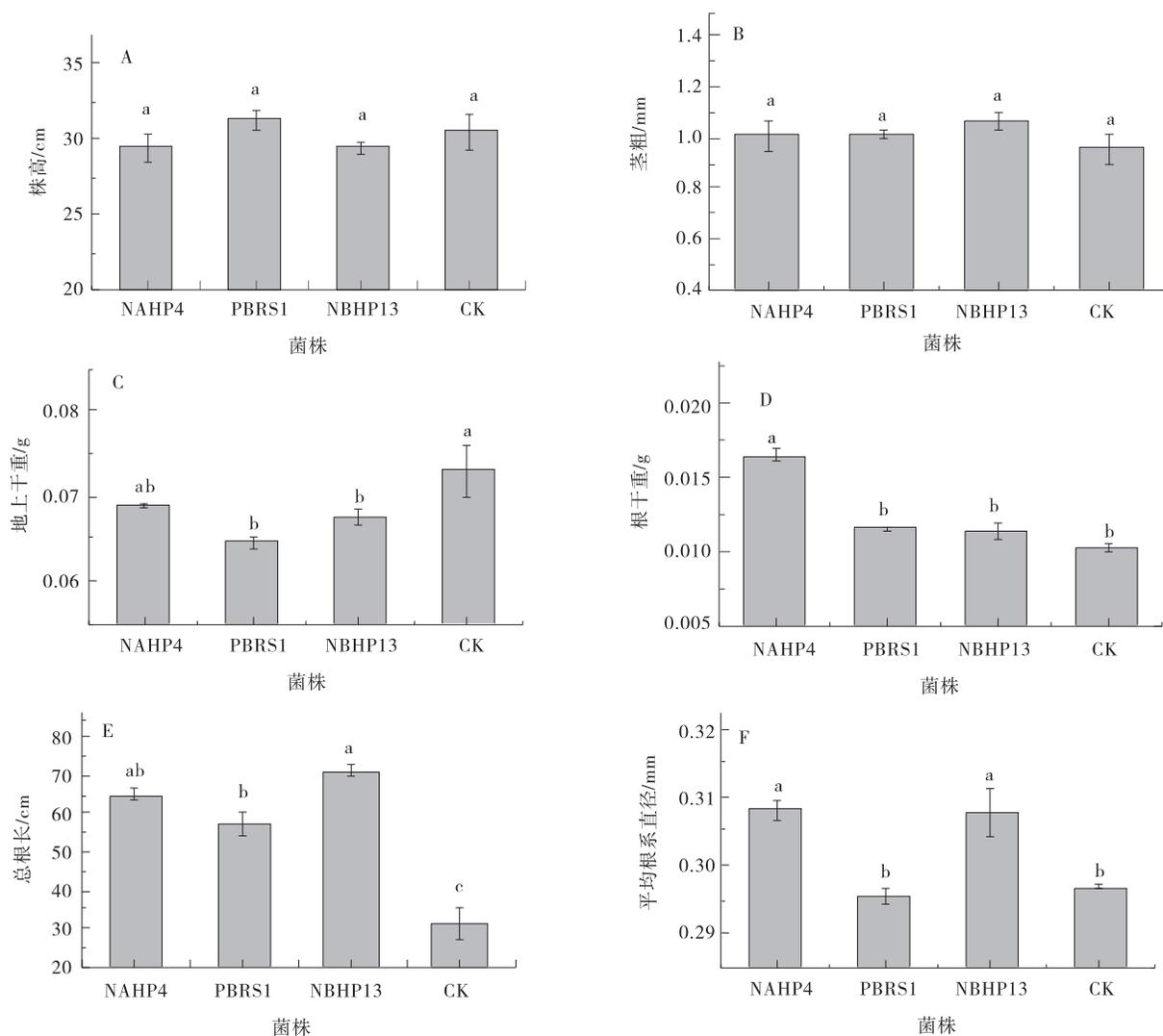


图3 高寒草地产胞外多糖 PGPR 对老芒麦生长的影响

Fig. 3 Effects of exopolysaccharide-producing PGPR in alpine grassland on growing of *Elymus sibiricus*

注:不同小写字母表示不同处理在0.05水平差异显著( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

近年来,气候变化和人类活动加剧了部分高寒草地的退化,其中,若尔盖地区以“沙化”为主<sup>[19,28-29]</sup>。沙化草地的植物群落、生物多样性和土壤养分等均受到不同程度影响,而土壤结构遭到的破坏最为严重<sup>[1,30]</sup>。贺金生等<sup>[31]</sup>提出基于乡土草种、微生物、养分调控为主的“近自然恢复”理论,其中,适宜高寒草地的功能性微生物资源将发挥重要作用。研究表明,在土壤中特殊微生物分泌的胞外多糖能通过官能团的亲水作用和粘合作用增加土壤颗粒的粘结性,提高水稳性团聚体,改善土壤团粒结构;作为储备碳源,有利于土壤微生物生存,而PGPR的溶磷、固氮和解钾等促生性能显著促进植物对土壤矿物质营养的吸收利用,缓

解外界环境对植物的胁迫,提高植物抗病虫害的能力,从而促进植物生长。对比发现,胞外多糖主要对土壤及土壤微生物起调解作用,而溶磷、固氮和解钾等促生特性主要促进植物对养分的吸收,两者协同才能有效的恢复退化草地<sup>[6,8-9,15-16,32-33]</sup>。闫亚南<sup>[16]</sup>研究表明,高产胞外多糖 PGPR 对植物根部生长的促进作用显著,能显著增加土壤有机质含量和土壤多糖含量。张文平等<sup>[34]</sup>研究表明,乳酸菌多糖能显著改善土壤结构,提高土壤团聚体稳定性,缓解土壤酸化,提高土壤酶活性,对土壤养分有明显的改善效果。因此,从若尔盖地区的高寒草地筛选高产胞外多糖 PGPR 资源,并研发相关产品,对于若尔盖退化草地的恢复具有重要意义。

微生物多糖在促进种子萌发、幼苗生长等方面的

作用受到人们的广泛关注<sup>[16,35-37]</sup>。张文平等<sup>[35]</sup>研究表明,胞外多糖浸种能够提高水稻种子的发芽率,促进水稻根系的生长。本研究发现,胞外多糖溶液对种子萌发和胚芽生长具有促进作用,但高浓度的胞外多糖溶液对胚根生长具有显著抑制作用( $P<0.05$ ),其原因可能是胞外多糖所含的葡萄糖等为种子萌发、胚芽、胚根的生长提供一些养分,但因含量有限,发挥微弱的促进作用,而高浓度的胞外多糖溶液含有较多营养物质,可以促进胚芽生长,但由于其粘性增高,在胚根周围形成一层粘膜,阻碍胚根获取水分、养分、氧气等,显著抑制胚根生长,从而影响胚芽生长,其具体原因还有待进一步研究。

磷作为植物生长所需的重要养分之一,对促进植物生长及提高产量具有重要作用<sup>[38-39]</sup>。本研究发现,在以磷酸三钙为唯一磷源的培养条件下,接种菌株 NAHP4、NBHP13 和 PBR1 对老芒麦地下部分具有显著的促进作用( $P<0.05$ ),其原因可能是菌株 NAHP4、NBHP13 和 PBR1 通过分泌有机酸、质子和多糖等,从含磷的难溶性化合物中释放植物可利用的磷,供植物吸收利用,从而促进老芒麦地下部分的生长。李明源等<sup>[12]</sup>研究同样表明,接种固氮菌和溶磷菌对垂穗披碱草(*E. nutans*)的根系发育具有促进作用。郑淇元等<sup>[40]</sup>研究表明,在缺少速效磷的土壤中,施用溶磷菌肥能够将土壤中难溶性磷酸盐转化为可利用形态,提高土壤肥力,促进植物的生长。因此,在缺少速效磷养分的条件下,能将难溶性磷酸盐转化为可利用形态,并促进植物生长的菌株具有研发菌剂的潜力。

## 4 结论

筛选出 3 株产胞外多糖 PGPR,其中,菌株 NAHP4 的胞外多糖产量最高,为 1 462.50 mg/L。菌株 NAHP4 对老芒麦根干重、总根长和平均根系直径整体生长的促进作用最大,较 CK 增加 31.06%,且分泌的胞外多糖对老芒麦种子萌发和胚芽生长具有促进作用。因此,菌株 NAHP4 具有研发适宜若尔盖高寒草地的多糖菌剂及相关产品的潜力。

### 参考文献:

[1] 税伟,白剑平,简小枚,等. 若尔盖沙化草地恢复过程中土

壤特性及水源涵养功能[J]. 生态学报,2017,37(1): 277-285.

[2] 董高生. 玛曲县草原退化现状调查研究[J]. 甘肃畜牧兽医,2017,47(2):117-118.

[3] 贺金生,卜海燕,胡小文,等. 退化高寒草地的近自然恢复:理论基础与技术途径[J]. 科学通报,2020,65(34): 3898-3908.

[4] 吴振华,钱泽樱,王彬,等. 切根和微生物接种剂对退化羊草典型草原的影响[J]. 中国高科技,2020(6):15-16.

[5] 任卓然,邵新庆,李金升,等. 微生物菌肥对退化高寒草甸地上生物量和土壤理化性质的影响[J]. 草地学报,2021, 29(10):2265-2273.

[6] 张万通,李超群,于露,等. 植物根际促生菌菌肥在高寒草甸替代化肥效应研究[J]. 草地学报,2021,29(7):1423-1429.

[7] 李琦,冯影,张建贵,等. 不同剂型促生菌肥与化肥配施对紫花苜蓿生产性能及营养品质的影响[J]. 草原与草坪, 2020,40(1):74-79.

[8] Nico M, Ribaud C M, Gori J I, et al. Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants (*Oryza sativa*) inoculated with plant growth-promoting bacteria[J]. Applied soil ecology, 2012, 61(1): 190-195.

[9] 杨婉秋,敬洁,朱灵,等. 川西北高寒草甸植物根际促生菌筛选及其特性研究[J]. 草地学报,2021,29(6):1174-1182.

[10] 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.

[11] 赵树栋,李建宏. 高原早熟禾根际促生菌分离筛选及特性研究[J]. 草地学报,2021,29(9):1885-1891.

[12] 李明源,王继莲,姚拓,等. 祁连山高寒草地扁蓿豆和黄花棘豆耐冷 PGPB 的筛选及促生特性研究[J]. 农业生物技术学报,2021,29(11):2074-2086.

[13] 柴晓虹,姚拓,李录山,等. 12 株植物根际促生菌促生功能稳定性评价及鉴定[J]. 草原与草坪,2020,40(5): 68-75.

[14] 魏宏宇,李怡,彭帅英,等. 胞外多糖促进胁迫条件下农作物生长的研究与展望[J]. 江苏农业学报,2022,38(4):1123-1134.

[15] 李明源,王继莲,魏云林,等. 细菌胞外多糖的特性及应用研究[J]. 生物技术通报,2014(6):51-56.

[16] 闫亚南. 产胞外多糖植物促生菌对小麦高效利用钾肥的

- 影响及机制研究[D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [17] Goller C C, Seed P C. Revisiting the escherichia coli polysaccharide capsule as a virulence factor during urinary tract infection: contribution to intracellular biofilm development[J]. *Virulence*, 2010, 1(4): 333-337.
- [18] 朱粟锋, 刘煜杰, 张强, 等. 生态恢复模式对若尔盖高寒沙化草地土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. *环境工程技术学报*, 2022, 12(1): 199-206.
- [19] 杨雨薇, 吴迪. 若尔盖县土地沙漠化研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2019, 25(18): 98-101, 104.
- [20] 姚拓. 饲用燕麦和小麦根际促生菌特性研究及其生物菌肥的初步研制[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2002.
- [21] 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.
- [22] Nautiyala C S. An efficient microbial growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms [J], *FEMS microbiology Letters*, 1999, 170(1): 265-270.
- [23] 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.
- [24] 杜秀娟. 产胞外多糖细菌筛选及其对土壤团聚体的影响[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2016.
- [25] 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.
- [26] 微生物肥料生产菌株质量评价通用技术要求: NY/T1847-2010. [S], 2010.
- [27] 王立凤, 庞珊珊. 锌胁迫对蓝花鼠尾草种子萌发的影响[J]. *甘肃农业科技*, 2021, 52(8): 25-28.
- [28] 曹广民, 林丽, 张法伟, 等. 青藏高原高寒矮嵩草草甸稳定性的维持、丧失与恢复[J]. *草业科学*, 2010, 27(8): 34-38.
- [29] 尚占环, 董全民, 施建军, 等. 青藏高原“黑土滩”退化草地及其生态恢复近10年研究进展——兼论三江源生态恢复问题[J]. *草地学报*, 2018, 26(1): 1-21.
- [30] 吕世海, 卢欣石. 呼伦贝尔草地风蚀沙化植被生物多样性研究[J]. *中国草地学报*, 2006, 28(4): 6-10, 23.
- [31] 贺金生, 刘志鹏, 姚拓, 等. 青藏高原退化草地恢复的制约因子及修复技术[J]. *科技导报*, 2020, 38(17): 66-80.
- [32] 罗丽朦, 王丽学, 秦立刚, 等. 多糖和土壤团聚体对扁穗冰草根鞘形成的影响[J]. *生态学报*, 2014, 34(17): 4859-4865.
- [33] 张文平, 李昆太, 黄林, 等. 产胞外多糖菌株的筛选及其对土壤团聚体的影响[J]. *江西农业大学学报*, 2017, 39(4): 772-779.
- [34] 张文平, 王清, 黄诗宸, 等. 乳酸菌胞外多糖对水稻生长及土壤理化性质的影响[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(1): 130-138.
- [35] 张文平, 杨臻, 吴佩佳, 等. 乳酸菌胞外多糖对逆境胁迫下水稻种子萌发及幼苗生长的影响[J]. *核农学报*, 2019, 33(1): 138-147.
- [36] 马纯艳, 卜宁, 马连菊. 褐藻胶寡糖对高粱种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. *沈阳师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 28(1): 79-82.
- [37] 郭田, 王刘庆, 廖美德. PS04菌株对水稻纹枯病的防效及对水稻2种防御性酶活性的诱导[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2013, 41(6): 98-102.
- [38] 霍佳慧, 毕少杰, 于欣卉, 等. 植物根际促生菌作用机制研究进展[J]. *现代农业科技*, 2022(9): 90-96.
- [39] 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.
- [40] 郑淇元, 谢意太, 卞海洋, 等. 溶磷菌肥对红壤磷组分及土壤肥力的影响[J]. *江西农业大学学报*, 2022, 44(1): 233-244.

# Screening and studying the growth-promoting characteristics of exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria in alpine grassland

WANG Zhen-long<sup>1</sup>, YAO Tuo<sup>1\*</sup>, LI Zhi-lan<sup>2</sup>, CHAI Jia-li<sup>1</sup>, HE Li<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>1</sup>

(1. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Grassland Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China; 2. Grassland Technology Extension Station of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** **【Objective】** To screen high exopolysaccharide-producing PGPR resources from the Zoige alpine grassland in order to provide valuable strains for developing Polysaccharide bacterial reagents suitable for Zoige alpine grassland and related products. **【Method】** At 16 °C, high exopolysaccharide-producing PGPR was isolated from the rhizosphere of *Poa poophagorum* and *Elymus sibiricus* in alpine grassland using selective media. Their taxonomic status was determined by 16S rDNA sequencing and phylogenetic analysis. The growth-promoting characteristics of the strain and exopolysaccharide were evaluated through inoculation tests. **【Result】** Three strains of exopolysaccharide-producing PGPR were identified from the rhizosphere of the two plants. Among them, strains NAHP4 and PBRS1 were notable for their high exopolysaccharides production, with levels of 1 462.50 and 1 337.50 mg/L, respectively. This strains exhibited growth-promoting properties, including nitrogen fixation and inorganic phosphorus solubilisation. Exopolysaccharides promoted seed germination and seedling growth of *Elymus sibiricus*, through high concentration of exopolysaccharides significantly inhibited radicle growth ( $P < 0.05$ ). The inoculated strains NAHP4, NBHP13 and PBRS1 promoted root development in *Elymus sibiricus* ( $P < 0.05$ ), with NAHP4 showing the greatest effect. **【Conclusion】** Strain NAHP4, as a high exopolysaccharide-producing PGPR resource, has significant potential for developing polysaccharide bacterial reagents and related products suitable for the alpine grassland of Zoige.

**Key words:** plant; rhizosphere growth-promoting bacteria; exopolysaccharide; alpine grassland; polysaccharide bacterial reagent

(责任编辑 康宇坤)