

## 樱桃根际促生细菌的筛选与鉴定

陈波<sup>1</sup> 丁延芹<sup>1</sup> 马海林<sup>2</sup> 刘方春<sup>2</sup> 时健<sup>1</sup> 姚良同<sup>1</sup> 杜秉海<sup>1\*</sup>

(1. 山东农业大学 生命科学学院 山东省农业微生物重点实验室 山东 泰安 271018)

(2. 山东省林业科学研究院 山东 济南 250014)

**摘 要:** 【目的】筛选樱桃[*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don]生物肥料中应用的优良菌株资源。【方法】通过保绿法和萝卜子叶增重法,结合定量检测细菌分离物产植物激素的能力,从樱桃根际土壤中筛选具有良好应用潜力的细菌分离物。利用盆栽试验,验证其促生效果。对促生效果较好的细菌分离物,进行形态学观察、生理生化测定、16S rRNA 基因序列及系统发育树分析以确定其分类地位。【结果】筛选出 4 株具有良好应用潜力的细菌分离物,盆栽试验结果表明: AI5、AI21、PII17、PI7,尤其是 PII17,显著提高樱桃根系及地上部生物量,对樱桃生长有明显的促进作用。分类鉴定结果显示: AI5、AI21 为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*), PII17 为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.), PI7 为肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)。【结论】AI5、AI21、PII17、PI7,尤其是 PII17,对樱桃生长有明显的促进作用,在生物肥料的生产中具有广阔的应用前景。

**关键词:** 樱桃, 根际促生细菌, 筛选, 鉴定

## Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria from *Cerasus pseudocerasus* rhizosphere

CHEN Bo<sup>1</sup> DING Yan-Qin<sup>1</sup> MA Hai-Lin<sup>2</sup> LIU Fang-Chun<sup>2</sup>

SHI Jian<sup>1</sup> YAO Liang-Tong<sup>1</sup> DU Bing-Hai<sup>1\*</sup>

(1. Shandong Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

(2. Shandong Academy of Forestry, Jinan, Shandong 250014, China)

基金项目: 山东省科学技术发展计划攻关项目(No. 2007GG2009007, 2010GSF10621)

\*通讯作者: Tel: 86-538-8247781-8564; 信箱: bhdu@sdau.edu.cn

收稿日期: 2012-03-10; 接受日期: 2012-07-16

**Abstract: [Objective]** The aim of the present study was to provide the excellent strain resources for the production of *Cerasus pseudocerasus* bio-fertilizer. **[Methods]** Bacterial isolates were isolated and screened from the rhizosphere soil of *Cerasus pseudocerasus* using the methods of remaining green and radish cotyledon bioassay. And then, plant hormones produced by the bacterial isolates were quantitatively detected. Additionally, a pot experiment was conducted to determine whether the use of the bacterial isolates benefits the growth of *Cerasus pseudocerasus*. At last, the bacterial isolates that exert beneficial effects were identified based on the results of morphologic characteristics, physiological biochemical properties and phylogenetic analysis of 16S rRNA genes. **[Results]** Four plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with potential beneficial effects on *Cerasus pseudocerasus* growth were screened. According to the pot experiment results, AI5, AI21, PII17, and PI7, especially PII17 can significantly improve the root and aerial part biomass of *Cerasus pseudocerasus*, showing the beneficial effects on *Cerasus pseudocerasus* growth. AI5 and AI21 were identified as *Bacillus pumilus*. PII17 and PI7 were identified as *Pseudomonas* sp. and *Enterobacter* sp., respectively. **[Conclusion]** AI5, AI21, PII17, and PI7, especially PII17 that exert beneficial effects on *Cerasus pseudocerasus* growth exhibited broad application prospects in the bio-fertilizer production.

**Keywords:** *Cerasus pseudocerasus*, Growth-promoting rhizobacteria, Screening, Identification

大樱桃成熟期早, 果实色泽艳丽、晶莹美观, 果肉柔软多汁、营养丰富, 鲜食风味极佳, 具有较高的经济价值, 已经成为一种大力推广的果树树种<sup>[1]</sup>。现阶段樱桃肥料施用主要以化学肥料为主, 长期施用不但对环境造成严重的影响<sup>[2]</sup>, 还导致樱桃果实品质的急剧下降。因此, 新型肥料, 尤其是新型生物肥料在樱桃中的应用显得尤为重要。植物根际土壤中含有大量的微生物, 其中根际细菌的含量较高。根际细菌可以划分为两类: 一类对植物生长有负面作用, 称为有害根际细菌 (Deleterious rhizobacteria, DRB); 一类对植物生长具有促进作用, 被称为植物根际促生细菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)。研究表明, PGPR 能定殖于植物根际且作用稳定, 在农业、园艺、林业中具有较强的应用潜力。开发 PGPR 生物肥, 可以有效降低化学肥料用量<sup>[3-5]</sup>。

因此, 新型 PGPR 生物肥在樱桃施肥中的应用值得研究。

关于 PGPR 筛选鉴定的研究报道很多, 但针对樱桃根际土壤筛选的研究很少。有文献报道, 从微生物生态学角度出发, 从植物根际筛选的 PGPR 具有较好的施用效果<sup>[4-7]</sup>。因此, 针对樱桃开展 PGPR 的筛选工作是有必要的。近年来, 随着科技手段的进步, 对微生物产植物激素促进植物生长的研究逐渐深入<sup>[8-10]</sup>。植物激素不但在植物生长发育过程中起着重要的作用, 而且能够抵抗外界生物及非生物各种应激反应对其造成的伤害<sup>[11]</sup>。因此, 本研究通过保绿法和萝卜子叶增重法, 从樱桃根际土壤中筛选出 4 株具有应用潜力的 PGPR, 并对其进行了鉴定, 通过盆栽实验初步验证了其促生效果, 以期为樱桃生物肥料的研究和开发提供优良的菌株资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及根际促生细菌的分离、纯化

从泰安市樱桃园采集根际土壤样品 1 个, 沂源县樱桃示范园采集根际土壤样品 3 个。通过梯度稀释法, 从樱桃根际土样中分离细菌。通过三区划线法对分离到的细菌进行纯化, 纯化后的细菌进行编号, 于 LB 斜面上保存备用。细菌分离用牛肉膏蛋白胨固体培养基(NA), 细菌培养用 LB 培养基, 细菌发酵用牛肉膏蛋白胨液体培养基(NA)。分子生物学试剂购自于 TaKaRa 公司, 试剂配制方法参照文献[12]。

### 1.2 保绿法筛选

**1.2.1 小麦种子的播种与培养:** 挑选颗粒饱满、大小一致的小麦种子, 用 0.1% 的升汞溶液浸泡 15 min 消毒, 然后用无菌水冲洗 5 次, 再用吸水纸吸干表面水分。将培养皿倒置, 内置 2 张灭菌滤纸。把小麦种子沿培养皿周围整齐地播种到培养皿中, 播种时使种子胚一律朝向培养皿中心, 每皿 25 粒, 加无菌水 6 mL。加盖后, 将培养皿放入 23 °C 的培养箱中避光培养。24–36 h 后观察种子萌发情况, 弃去未萌发和发芽不整齐的种子, 留下发芽整齐的种子, 继续培养。当麦芽顶到皿盖时, 摘去皿盖, 光照, 继续培养, 培养过程中注意适当补充蒸发的水分。

**1.2.2 细菌发酵液的制备:** 将 NA 培养基分装试管, 每管 5 mL,  $1 \times 10^5$  Pa 高压蒸汽灭菌 20 min。向液体培养基中接菌, 37 °C、180 r/min 摇床培养 24 h。

**1.2.3 细胞分裂素产生情况的测定:** 当小麦苗长至 10 cm 高时, 取小麦第一片真叶放到无菌水中, 待用。在每管细菌发酵液中加入 5 mL 无菌水, 稀释, 摇动混匀, 待用。另取一支装有不接菌的培养基试管, 加入 5 mL 无菌水, 稀释, 摇动混匀, 作为对照, 待用。将麦叶取出切成 1 cm 左右的小

段, 装入含有不同细菌发酵液稀释液的试管及对照试管中, 每管 5 段。25 °C 暗室放置 4 d 后, 目测叶片保绿情况。将保绿效果好的菌种挑选出来, 重复上述步骤, 再进行两次复筛。

### 1.3 萝卜子叶增重法筛选

**1.3.1 萝卜种子的播种与培养:** 方法同上述小麦种子的播种与培养。

**1.3.2 接种与培养:** 细菌发酵液的制备方法同上。将培养好的细菌发酵液装入大离心管, 3 000 r/min 离心 20 min。取上清液 30 mL, 装入灭菌的三角瓶中, 并在三角瓶中加入 30 mL 无菌水稀释, 摇动混匀, 待用。另取一不接菌的装有 30 mL 液体培养基的三角瓶, 加 30 mL 无菌水稀释, 摇动混匀, 作为对照。

**1.3.3 细胞分裂素产生情况测定:** 参照文献[13]。

### 1.4 高效液相色谱(HPLC)测定菌液中细胞分裂素含量

**1.4.1 标准品制备:** 将反式玉米素(Trans-Zeatin, ZT)及激动素(Kinetin, KT)用甲醇溶解后, 配制浓度为 50 mg/L 的标准贮备液, 转移到棕色试剂瓶中, 置于 4 °C 的冰箱中备用。

**1.4.2 供试菌液样品制备:** 向 NA 培养基中接菌, 37 °C、180 r/min 摇床培养 2 d。将培养好的细菌发酵液装入大离心管, 4 000 r/min 离心 10 min, 去掉固相沉淀菌体部分。取上清液再过 0.22  $\mu$ m 的滤膜即为待上 HPLC 分析的样品。

**1.4.3 色谱条件:** 色谱柱: SupelcosiLC-18-DB (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 甲醇:1%冰醋酸=42:58 (V/V); 梯度流速: 0.01–12.00 min, 1 mL/min; 12.01–25.00 min, 1.2 mL/min; 25.01 min, 1 mL/min。检测波长: 254 nm, 柱温: 40 °C。

### 1.5 菌液吲哚乙酸(IAA)含量测定

测定方法参照文献[14]。

### 1.6 细菌分离物促生效果盆栽试验

试验地点设在山东省林业科学研究院试验苗

圃。供试土壤为潮土，土壤碱解氮、速效磷和速效钾的含量分别为 27.96、26.52 和 79 mg/kg，有机质含量为 6.83 g/kg。樱桃苗选用生长一致的一年生大樱桃实生苗。试验用盆高 20 cm，直径 30 cm。试验共设 5 个处理，分别为：处理 1，不接种任何菌剂(CK)；处理 2，接种 AI5 (AI5)；处理 3，接种 AI21 (AI21)；处理 4，接种 PII17 (PII17)；处理 5，接种 PI7 (PI7)。2011 年 4 月 13 日安排盆栽试验，每盆装土 9 kg，每处理重复 3 次。菌悬液制备方法为 AI5、AI21、PII17、PI7 分别接种 NA 液体培养基，37 °C、180 r/min 摇床培养 2 d。菌液接种方法：用无菌水将菌悬液调至  $2\times 10^8$  CFU/mL，樱桃苗沾根后定植，将 54 mL 稀释液浇灌于樱桃苗根部周围( $1.2\times 10^6$  CFU/g 土)。正常管理，樱桃停长后(2011 年 10 月 16 日)，采集樱桃根系和地上部样品，根系按照 0–1 mm，1 mm–5 mm 和 >5 mm 进行分级，于 105 °C 烘箱中杀青 15 min，转至 80 °C 烘箱中烘至恒重，测定其根系和地上部干重。数据采用 SPSS 17.0 软件 Duncan 法进行方差分析。

1.7 菌株鉴定

1.7.1 形态特征及生理生化特征测定：参考文献 [15–17] 方法，对其菌落形态，菌体细胞形态及部

分生理生化性状进行测定。

1.7.2 16S rRNA 基因序列同源性比较：基因组 DNA 的提取方法参照文献[18]。PCR 反应体系为 (25  $\mu$ L)：Taq 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L，10 $\times$ Buffer (Mg<sup>2+</sup>) 2.5  $\mu$ L，dNTPs (2.5 mmol/L each) 2  $\mu$ L，引物 (20  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L，模板 1  $\mu$ L，DEPC H<sub>2</sub>O 18  $\mu$ L。采用通用引物 27F/1492R (正向引物：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'；反向引物：5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应条件为：95 °C 5 min；94 °C 1 min，56 °C 1 min，72 °C 1.5 min，共 30 个循环；72 °C 10 min。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测，溴化乙锭染色后，在 UVP 紫外凝胶成像系统上观察照相。测序工作由生工生物工程(上海)有限公司完成。测序结果提交 GenBank，并进行 BLAST 分析。

2 结果与分析

2.1 樱桃根际促生细菌的筛选

从泰安樱桃根际土样中分离出 73 株细菌分离物，从沂源根际土样中分离出 373 株细菌分离物。通过保绿法、萝卜子叶增重法(表 1)，筛选出 4 株具有良好应用潜力的细菌分离物，分别记为 AI5、AI21、PII17、PI7。

表 1 保绿法和萝卜子叶增重法筛选结果					
Table 1 The results of the methods of remaining green and radish cotyledon weight increase					
土样 Soil samples	细菌分离物 Bacterial isolates	保绿效果 Remaining green result	萝卜子叶原重 Original weight of radish cotyledon (g)	萝卜子叶现重 Current weight of radish cotyledon (g)	增重百分比 The percentage of weight increase (%)
泰安土样 Taian soil sample	对照	++	0.118	0.193	63.5
	AI5	++++	0.129	0.226	75.2
	AI21	++++	0.135	0.233	72.6
沂源土样 Yiyuan soil sample	对照	++	0.094	0.137	45.7
	PII17	++++	0.091	0.192	111.1
	PI7	++++	0.093	0.156	67.7

注: +++++: 深绿; +++; 浅绿; ++: 浅黄; +: 黄.  
Note: +++++: Dark green; +++; Light green; ++: Light yellow; +: Yellow.

大量研究表明,植物根际促生细菌产一定浓度的细胞分裂素和 IAA,对植物生长具有明显的促进作用<sup>[4,8-11]</sup>。因此,本研究定量检测了 4 株细菌分离物产细胞分裂素和 IAA 的能力,结果如表 2 所示,可以看出,AI5、PII17 产反式玉米素(ZT)、激动素(KT)和 IAA;AI21、PI7 产 ZT 和 KT,但不产 IAA。

2.2 细菌分离物促生效果

由表 3 可以看出,同 CK 处理相比,AI5、AI21、PII17、PI7 处理的 0–1 mm、1 mm–5 mm 根系生物量、根系总干重及地上部生物量明显增加,且差异达显著水平;各处理之间>5 mm 根系生物量差异不明显。5 个处理中,PII17 处理根系生物量及地上部生物量最高,且差异显著。其中,0–1 mm、1 mm–5 mm 根系总干重和地上部生物量,同 CK

处理相比分别增加了 39.55%、32.93%、22.72%和 26.49%。由此可见,AI5、AI21、PII17、PI7 可以显著提高樱桃根系,尤其<5 mm 根系的生长发育水平和地上部生物量,对樱桃的生长有明显的促进作用;筛选出的 4 株 PGPR 中,除>5 mm 根系干重外,PII17 同其他菌株相比差异显著,促生效果最好。

2.3 樱桃根际促生细菌菌落特征及菌体形态

AI5 在 LB 平板上培养 24 h 后呈圆形不透明,中心褶皱。菌体细胞大小为(0.5–0.9) μm×(1.2–2.0) μm。产芽孢, G<sup>+</sup>, 细胞短杆状。AI21 在 LB 平板上培养 24 h 后呈圆形不透明,表面光滑。菌体细胞大小为(0.5–0.8) μm×(1.2–2.0) μm。产芽孢, G<sup>+</sup>, 细胞短杆状。PII17 在 LB 平板上培养 24 h 后呈圆形不透明,表面光滑。菌体细胞大小为(0.5–1.0) μm×

表 2 分离物发酵产生的植物激素的种类和含量  
Table 2 The varieties and contents of plant hormones by isolates fermentation

细菌分离物 Bacterial isolates	反式玉米素 Trans-Zeatin (μg/L)	激动素 Kinetin (μg/L)	吲哚乙酸 Indoleacetic acid [μg/(mL·OD <sub>600</sub> )]
AI5	709	223	49.2
AI21	6 126	247	—
PII17	5 702	368	72.5
PI7	274	896	—

注:—: 不产 IAA。  
Note: —: No IAA.

表 3 不同处理对樱桃生物量的影响  
Table 3 Effects of different treatments on *Cerasus pseudocerasus* biomass

处理 Treatments	根系干重 Root dry weight (g)				地上部生物量 Aerial part dry weight (g)
	0–1 mm	1 mm–5 mm	>5 mm	总干重	
CK	6.17 (0.19) c	5.01 (0.22) d	7.04 (0.25) a	18.22 (0.59) c	39.41 (0.45) c
AI5	7.41 (0.21) b	6.01 (0.19) b	6.91 (0.27) a	20.33 (0.13) b	43.99 (2.13) b
AI21	7.46 (0.33) b	5.99 (0.26) b	6.92 (0.22) a	20.37 (0.33) b	43.07 (1.14) b
PII17	8.61 (0.31) a	6.66 (0.29) a	7.09 (0.32) a	22.36 (0.21) a	49.85 (3.09) a
PI7	7.17 (0.43) b	5.56 (0.26) c	7.08 (0.41) a	19.81 (0.26) b	44.75 (2.25) b

注: 小写字母为 Duncan 多重比较结果, 同列相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著(P<0.05); 括号中数值为标准差。  
Note: Different small letters in the same row are significantly different at the 0.05 level according to Duncan's test. The figures in parentheses are standard deviations.

(1.5–2.5)  $\mu\text{m}$ 。不产芽孢,  $\text{G}^-$ , 细胞直或微弯杆状。PI7 在 LB 平板上培养 24 h 后呈圆形不透明, 表面光滑。菌体细胞大小为  $(0.6\text{--}1.0) \mu\text{m} \times (1.2\text{--}1.8) \mu\text{m}$ 。不产芽孢,  $\text{G}^-$ , 细胞直杆状。

2.4 樱桃根际促生细菌的生理生化特征

AI5、AI21、PII17 和 PI7 的主要生理生化特征见表 4。PII17 与 *Pseudomonas aeruginosa* 的模

式种生理生化指标上具有相同的特征。PI7 与 *Enterobacter cloacea* 的模式种生理生化指标上具有相同的特征。AI5、AI21 与 *Bacillus pumilus* 的模式种生理生化指标上具有相同的特征, 但这两株菌在硫化氢试验上存在差异, 原因可能是不同菌株间确实存在差异, 也可能是生长环境影响了菌的生理特征。

表 4 生理生化特征							
Table 4 Characteristic of physiology and biochemistry							
特征 Characteristics	<i>Bacillus pumilus</i>	AI5	AI21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PII17	<i>Enterobacter cloacea</i>	PI7
明胶液化 Glutin hydrolysis	+	+	+	+	+	(+)	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	—	—	—	—	—	ND	—
吲哚试验 Indol test	—	—	—	—	—	—	—
甲基红试验 Methyl red test	ND	+	+	—	—	ND	—
伏-普试验 V-P test	+	+	+	—	—	ND	+
硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	—	—	—	+	+	ND	ND
柠檬酸盐利用试验 Citrate utilization test	+	+	+	ND	+	+	+
硫化氢试验 $\text{H}_2\text{S}$ test	ND	+	—	—	—	ND	+
果糖 Fructose	ND	+	+	+	+	ND	+
蔗糖 Sucrose	ND	+	+	ND	—	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+	ND	—	ND	+
接触酶试验 Peroxidase test	+	+	+	+	+	ND	+
卵磷脂酶试验 Lecithinase test	—	—	—	ND	—	ND	—
脲酶试验 Urease test	ND	+	+	ND	—	—	—
鸟氨酸脱羧酶试验 Ornithine decarboxylase test	ND	—	—	—	—	+	+
赖氨酸脱羧酶试验 Lysine decarboxylase test	ND	—	—	—	—	—	—

注: +: 阳性; —: 阴性; (+): 迟缓阳性(3–7 d); ND: 未测定。  
Note: +: Positive; —: Negative; (+): Slow positive (3–7 d); ND: Not detected.

## 2.5 16S rRNA 基因序列分析

将 AI5、AI21、PII17、PI7 的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank, 所得收录号分别为 HQ143570、HQ143571、HQ143572 和 HQ143573。构建系统进化树见图 1。可以看出, AI5、AI21 与 *Bacillus pumilus* 同处于一个最小的分支, 进化距离最近。AI5 的 16S rRNA 基因序列与 *Bacillus pumilus* (AY876289) 的相似性达 99%。AI21 与 *Bacillus pumilus* (AY876289) 的相似性达 100%。将 AI5、AI21 鉴定为短小芽孢杆

菌(*Bacillus pumilus*)。PII17 与 *Pseudomonas putida* 同处于一个最小分支上, 其 16S rRNA 基因序列与 *Pseudomonas putida* (D84020) 的相似性达 97.16%, 综合前面生理生化指标考虑, 将其初步鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。PI7 与 *Enterobacter ludwigii* 同处于一个最小分支上, 其 16S rRNA 基因序列与 *Enterobacter ludwigii* (AJ853891) 的相似性达 98.34%, 综合前面生理生化指标考虑, 将其初步鉴定为肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)。

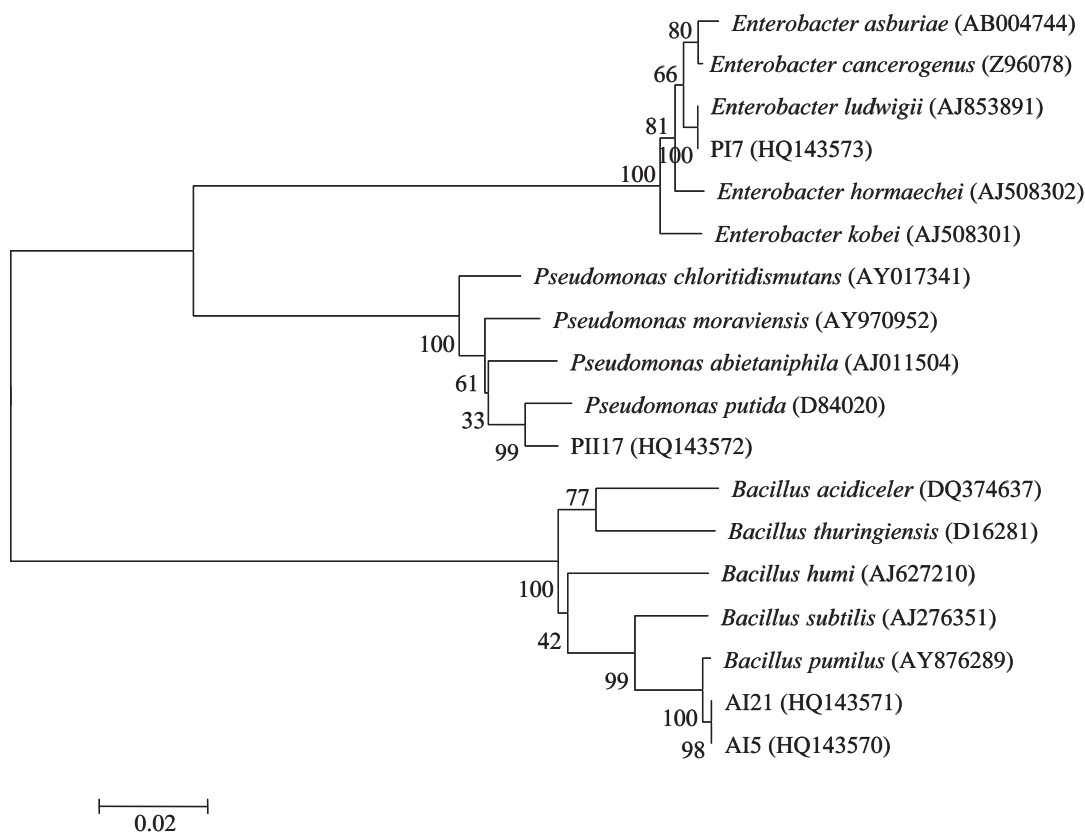


图 1 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树  
Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA genes

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 中登录号; 分支点数字代表步长值; 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.02 represents sequence divergence.

### 3 结论与讨论

樱桃施肥是樱桃管理过程中的关键环节, 目前樱桃肥料施用主要以速效肥料为主, 不但对环境造成了严重的影响, 还导致了樱桃果实品质的急剧下降<sup>[2]</sup>。因此, 提高肥料利用率是提高樱桃果实品质、降低环境污染风险的关键。因此, 亟需开发环保、高效的新型肥料。通过筛选产植物激素的 PGPR 来促进植物生长的方法, 是一个能持续提高作物产量和改善作物品质的途径, 具有广阔的应用前景<sup>[19]</sup>。

PGPR 对土壤性质的适应性是其使用效果的决定因素<sup>[20-21]</sup>, 只有 PGPR 在植物根际具有竞争性、能定殖于根际, 才能发挥其促生作用<sup>[22]</sup>。因此, 具有促生作用的 PGPR 并不一定有着良好的使用效果。另有研究发现, 将特定的植物根际促生细菌应用于特定的植物中, 有着良好的应用效果, 而普通微生物并不适于在所有植物中应用<sup>[6]</sup>。因此, 稀少的 PGPR 菌株资源是限制樱桃生物肥料高效利用的限制因素之一, 针对樱桃筛选出樱桃中专用的 PGPR, 是樱桃施肥中的关键环节。过去几十年间, 国内外有关筛选产植物激素的 PGPR 促进植物生长的报道很多, 包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、节杆菌属(*Arthobacter*)、布克霍尔德里氏菌属(*Burkholderia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)以及沙雷氏菌属(*Serratia*)等<sup>[23]</sup>, 但是尚未有用此方法促进大樱桃生长的相关报道。本文从微生物生态学角度出发, 从樱桃根际样品中分离得到 446 株分离物, 通过保绿法、萝卜子叶增重法筛选结合定量检测分离物产植物激素的结果, 最终筛选出 4 株具有较好应用潜力的细菌 AI5、AI21、PII17 和 PI7。其中, AI5 和 PII17 产 ZT、KT 及 IAA。AI21 和

PI7 产 ZT 和 KT, 不产 IAA。Hussain 等利用高效液相色谱-电喷雾-串联质谱仪的方法筛选了 12 株产细胞分裂素的细菌, 其中产细胞分裂素最强的菌株 Am3, 所产细胞分裂素总量为 416.73  $\mu\text{g/L}$ <sup>[10]</sup>。本文 4 株菌产细胞分裂素能力最强的为 AI21, 其产细胞分裂素总量为 6 373  $\mu\text{g/L}$ ; 最弱的为 PI7, 产细胞分裂素总量为 1 170  $\mu\text{g/L}$ 。可见, 本文所筛选菌株产细胞分裂素能力优于 Anwar Hussain 所筛选菌株。刘琳等从春兰根组织中共分离到内生细菌 256 株, 其中 57 株具有分泌 IAA 的能力<sup>[14]</sup>。内生细菌的 IAA 产量介于 0.5–114.8  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{OD}_{600})$  之间。产量高于 50  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{OD}_{600})$  的内生细菌为 9 株(15.8%), 产量介于 20–50  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{OD}_{600})$  的内生细菌为 14 株(24.6%), 其余 34 株(59.7%)产量低于 20  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{OD}_{600})$ 。本文所筛菌株 AI5 的 IAA 产量为 49.2  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{OD}_{600})$ , PII17 的 IAA 产量为 72.5  $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{OD}_{600})$ , 与刘琳所筛选菌株相比, 产 IAA 能力一般。通过对所筛菌株进行形态学观察、生理生化测定, 16S rRNA 基因序列及系统发育学分析, 初步鉴定 AI5、AI21 为短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*, PII17 为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), PI7 为肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)。菌种筛选鉴定结果与前人报道的 PGPR 筛选结果具有相同之处。

樱桃 PGPR 的筛选, 并不意味着樱桃生物肥料开发成功。不同的环境条件, 诸如气象、土壤性质或其他土著微生物活力等均会对细菌生长造成影响, 成功的实验室试验并不一定在田间原位能成功<sup>[20-21]</sup>。通过初步的盆栽试验证实, 本研究筛选出的 4 株 PGPR, 对樱桃根系的生长, 尤其是 <5 mm 根系的生长和地上部干物质的积累有积极的作用。因此, 本研究为樱桃生物肥的开发利用提供了良好的菌株资源, 为我们围绕 4 株 PGPR, 尤其是 PII17, 开展进一步的樱桃生物肥料研究工作奠定了基础。



## 参 考 文 献

- [1] 邢尚军, 刘方春, 马丙尧, 等. 钙对甜樱桃贮藏品质、钙形态及细胞超微结构影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(9): 2091–2096.
- [2] Fang QX, Yu Q, Wang EL, et al. Soil nitrate accumulation, leaching and crop nitrogen use as influenced by fertilization and irrigation in an intensive wheat-maize double cropping system in the North China Plain[J]. Plant and Soil, 2006, 284(1/2): 335–350.
- [3] Abbasi MK, Sharif S, Kazmi M, et al. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants[J]. Plant Biosystems, 2011, 145(1): 159–168.
- [4] Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers[J]. Microbial Ecology, 2009, 58: 921–929.
- [5] Sandeep K, Piyush P, Maheshwari DK. Reduction in dose of chemical fertilizers and growth enhancement of sesame (*Sesamum indicum* L.) with application of rhizospheric competent *Pseudomonas aeruginosa* LES4[J]. European Journal of Soil Biology, 2009, 45(4): 334–340.
- [6] 刘方春, 邢尚军, 马海林, 等. 生物肥对冬枣生物学特性及产量和品质的影响[J]. 水土保持学报, 2010, 4(6): 223–226.
- [7] 张慧, 杨兴明, 冉炜, 等. 土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应[J]. 土壤学报, 2008, 45(6): 1095–1101.
- [8] Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, et al. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants[J]. Plant and Soil, 2005, 272(1/2): 201–209.
- [9] Arkhipova TN, Prinsen E, Veselov SU, et al. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil[J]. Plant and Soil, 2007, 292(1/2): 305–315.
- [10] Anwar H, Shahida H. Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(11): 2645–2654.
- [11] Bari R, Jones JDG. Role of plant hormones in plant defence responses[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(4): 473–488.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 1564–1594.
- [13] 赵世杰, 史国安, 董新纯, 等. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 107–110.
- [14] 刘琳, 孙磊, 张瑞英, 等. 春兰根中可分泌吲哚乙酸的内生细菌多样性[J]. 生物多样性, 2010, 18(2): 195–200.
- [15] Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. 2nd ed. New York: Heidelberg Springer-Verlag, 2004: 172–184.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370–399.
- [17] 郭俊涛. 微生物的鉴别与图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 18–36.
- [18] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金思特 RE, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 187–213.
- [19] Siddiqui ZA. PGPR: Biocontrol and Biofertilization[M]. The Netherlands: Springer, 2005: 173–195.
- [20] Chanway CP, Holl FB. First year field performance of spruce seedlings inoculated with plant growth promoting rhizobacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1993, 39(11): 1084–1088.
- [21] Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities[J]. Microbiological Research, 2008, 163(2): 173–181.
- [22] Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth[J]. Soil Science Society of America Journal, 1999, 63: 1670–1680.
- [23] Karakurt H, Kotan R, Dadaşoğlu F, et al. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. Kütahya)[J]. Turkish Journal of Biology, 2011, 35(3): 283–291.