

研究报告



类芽孢杆菌 QHZ11-gfp 在马铃薯植株上的定殖特征及促生效果

董爱菊^{1,2} 邱慧珍^{*1,2} 董莉^{1,2} 周洋子^{1,2} 陈兰兰^{1,2} 王友玲^{1,2} 王川³

1 甘肃农业大学资源与环境学院 甘肃省干旱生境作物学重点实验室 甘肃 兰州 730070

2 甘肃省畜禽废弃物资源化利用工程研究中心 甘肃 兰州 730070

3 甘肃农业大学动物医学院 甘肃 兰州 730070

摘要:【背景】生防菌在作物根系的有效定殖是其功能发挥的前提,而直观的跟踪技术和有效的定量方法是研究生防菌根系分布规律的重要工具。【目的】研究马铃薯黑痣病病原菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) JT18 的拮抗菌 QHZ11 在马铃薯植株上的定殖特征及对马铃薯的促生效果。

【方法】采用绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)对 QHZ11 进行标记,将标记菌株菌悬液、生物有机肥和无菌水分别接种至灭菌土壤,通过激光共聚焦显微技术和实时荧光定量 PCR 等方法观察和测定标记菌株在马铃薯植株不同部位的定殖特征、数量变化及对马铃薯的促生效果。【结果】pHAPII 质粒成功导入 QHZ11 并可稳定遗传 40 代,记为 QHZ11-gfp;菌株标记前后的菌落形态、生长曲线和对 *R. solani* JT18 的拮抗能力等基本一致。从第 7 天开始,相继在马铃薯芽上和根上发现了绿色荧光,说明 QHZ11-gfp 成功定殖到了马铃薯的芽、根等部位。QHZ11-gfp 在根系和匍匐茎的定殖数量均呈现先升高至块茎形成期达到峰值后下降的趋势,并且在整个生育期根系的定殖数量始终大于匍匐茎。菌悬液和生物有机肥处理均显著促进了马铃薯根系的生长,并通过增加株高等农艺性状提高了块茎产量。其中,生物有机肥处理在各部位的荧光强度、定殖数量和对马铃薯的促生效果均显著优于菌悬液。【结论】QHZ11-gfp 可在马铃薯植株上成功定殖并对马铃薯有良好的促生效果,将其制成生物有机肥促进了其定殖,使促生效果也更好。

关键词: 类芽孢杆菌, 绿色荧光标记, 定殖特征, 实时荧光定量 PCR, 促生作用

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31760614); National Key Research and Development Program of China (2017YFD0800200)

***Corresponding author:** Tel: 86-931-7631731; E-mail: hzqiu@gsau.edu.cn

Received: 10-03-2021; **Accepted:** 29-03-2021; **Published online:** 01-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31760614); 国家重点研发计划(2017YFD0800200)

***通信作者:** Tel: 0931-7631731; E-mail: hzqiu@gsau.edu.cn

收稿日期: 2021-03-10; **接受日期:** 2021-03-29; **网络首发日期:** 2021-04-01

The colonization characteristics of *Paenibacillus jamilae* QHZ11-gfp in potato plants and its growth-promoting effect

DONG Aiju^{1,2} QIU Huizhen^{*1,2} DONG Li^{1,2} ZHOU Yangzi^{1,2} CHEN Lanlan^{1,2}
WANG Youling^{1,2} WANG Chuan³

1 Gansu Provincial Key Laboratory of Arid-Land Crop Science, College of Resources and Environmental Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

2 Engineering Research Center of Livestock and Poultry Waste Resource Utilization in Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730070, China

3 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

Abstract: [Background] The effective colonization of biocontrol bacteria in crop roots is the prerequisite for their functions, and intuitive tracking technology and effective quantitative methods are important tools for studying the roots' distribution of biocontrol bacteria. [Objective] To study the colonization characteristics of QHZ11 (antagonistic bacteria of *Rhizoctonia solani* JT18) in potato plants and its growth-promoting effect on potato. [Methods] Using green fluorescent protein (GFP) to label QHZ11, and separately inoculating the labeled bacterial suspension, bio-organic fertilizer and sterile water into the sterilized soil. Using laser confocal microscopy technology and real-time fluorescent quantitative PCR to study the colonization characteristics and quantitative changes of labeled strain in different parts of potato plants and its growth-promoting effect on potato. [Results] The pHAPII plasmid was successfully transformed into QHZ11 and could be inherited stably for 40 generations in QHZ11-gfp, recorded as QHZ11-gfp; the colony morphology, growth curve and antagonistic ability against *R. solani* JT18 of strain before and after the labeling were basically same. Starting from the 7th day, green fluorescence successively were found on the potato buds and roots, indicating that QHZ11-gfp successfully colonized on the potato buds, roots, etc. The quantity of colonization of QHZ11-gfp in the roots and stolons both showed a trend of first increasing to the peak in tuber formation period and then decreasing and in the whole growth period, the quantity of colonization of QHZ11-gfp in the roots was always > stolons. Both bacterial suspension and bio-organic fertilizer treatments significantly promoted the growth of potato roots, increased the tuber yield by increasing plant height, etc. The fluorescence intensity, the quantity of colonization and the growth-promoting effect on potato of bio-organic fertilizer treatment were significantly better than those of bacterial suspension. [Conclusion] QHZ11-gfp can be successfully colonized on potato plants and has a good growth-promoting effect on potatoes. Making it into bio-organic fertilizer promotes its colonization and makes the growth-promoting effect better.

Keywords: *Paenibacillus jamilae*, green fluorescent labeling, colonization characteristics, real-time fluorescent quantitative PCR, growth promotion

植物根际促生菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR)是一类能在植物根际或根系存活定殖,并具有促进植物生长或防控病害能力的有益微生物^[1]。近年来,辅以 PGPR 的生物有机肥因其显著的生防能力、环境友好及安全无毒等特点在农业生产上得到广泛应用^[2-3]。将 PGPR 与有机肥料进行二次固体发酵制成微生物有机肥后施入土壤,

外源 PGPR 可借助于有机肥和根系分泌物在作物根系定殖并聚集成膜,发挥其促生和拮抗土传病害的作用^[4-5]。有效施用辅以 PGPR 菌株的生物有机肥已在小麦^[6]、番茄、草莓、黄瓜、香蕉等作物^[7-10]上获得巨大成功,成为促进作物生长和防控土传病害最有效的方法^[10]。

PGPR 在作物根系的有效定殖是发挥促生和

生防作用的基础,而直观有效的跟踪技术和定量方法是研究其在作物根系原位分布规律的重要工具^[11]。随着现代标记基因技术的建立与发展,报告基因的兴起为细菌的定殖研究提供了有效手段^[12],其中分离自维多利亚发光水母中的绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)^[13]因其标记基因小、无毒无害、结构稳定及能在多种生物细胞中表达应用等优点成为当前基因工程中最理想的报告基因,用来研究目标菌株在各种生境中的原位分布和定殖规律^[14-15]。利用 GFP 标记生防菌株已在多种芽孢杆菌上取得成功,如枯草芽孢杆菌^[16]、蜡样芽孢杆菌^[17]和解淀粉芽孢杆菌^[18]等。

生物防治的关键是要有高效的 PGPR 菌株,本实验室前期筛选出 1 株对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) JT18 有强拮抗作用的类芽孢杆菌(*Paenibacillus jamilae*) G1。该菌株抑菌率为 66.7%,可使 *R. solani* JT18 菌丝发生畸形;同时具有解磷能力,还能产生 Fe 载体、生长素和酶等,具备一株优良生防菌的必要条件,我们在对实验室菌株进行保藏时,将 G1 命名为 QHZ11^[19-20]。PGPR 发挥作用的前提是在作物根系的有效定殖,然而 QHZ11 能否在马铃薯根系定殖及具体的定殖特征和动态变化规律尚不明确,因此本试验以 QHZ11 为研究对象,通过盆栽试验研究标记菌株 QHZ11-gfp 在马铃薯植株不同部位的定殖特征、数量变化及对马铃薯的促生效果,以期为研究 QHZ11 与马铃薯根系的相互作用提供依据,并为其生物有机肥的应用和推广提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

立枯丝核菌(*R. solani*) JT18 和类芽孢杆菌(*Paenibacillus jamilae*) QHZ11 均由本实验室分离、鉴定和保存;携带在 HpaII 启动子控制下表达 GFP

蛋白的大肠杆菌-芽孢杆菌多拷贝穿梭载体 pHAPII (GenBank 登录号: HM151400),该质粒带有卡那霉素(Kan)抗性基因,由南京农业大学沈其荣教授惠赠。

1.1.2 品种

马铃薯“大西洋”原原种,由定西市农科院提供。

1.1.3 土壤与肥料

土壤采自定西市马铃薯长期试验点,全氮 1.73 g/kg,碱解氮 161 mg/kg,速效磷 140.23 mg/kg,速效钾 122 mg/kg, pH 8.1。使用前用干净的布袋装满土置于铁筐中,扎紧布袋,在 1×10^5 Pa 的高压锅里灭菌 30 min,每筐装土 20 kg,每次 2 筐,每筐灭 2 遍。

有机肥料:由江阴联业生物科技有限公司提供。

化肥:尿素、过磷酸钙和硫酸钾镁均购于当地的农资市场。

1.1.4 主要试剂和仪器

FastPure Plant DNA Isolation Mini Kit、ChamQ™ Universal SYBR® qPCR Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司;DL2000 DNA Marker,兰州天启基因生物科技有限公司。荧光定量 PCR 仪,Roche 公司;根系扫描仪爱普生有限公司;倒置荧光显微镜和激光共聚焦显微镜,ZEISS 公司。

1.2 方法

1.2.1 QHZ11 的 GFP 标记

在 1.8 kV、200 Ω 、25 μ F 和 5–6 ms 的条件下用电击法将质粒 pHAPII 转入 QHZ11 感受态细胞(制备方法参考文献[21]);比较标记前后菌落的形态特征,将标记菌株单菌落与其菌液制片分别置于倒置荧光显微镜下观察并挑取阳性转化子,以 pHAPII 载体上的 *gfp* 基因设计特异性引物(*gfp*-F: 5'-ATGA GTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACT-3'; *gfp*-R: 5'-T TATTTGTATAGTTTCATCCATGCCA-3'; Size: 750 bp)分别对转化子与野生菌株进行菌落 PCR 扩增和电泳检测,将扩出目的基因的阳性转化子记为

QHZ11-gfp。

1.2.2 质粒稳定性测定

比较 QHZ11 与 QHZ11-gfp 的生长曲线及对 *R. solani* JT18 的拮抗能力(平板对峙法)^[19]; 以 8 h 为 1 代检测 QHZ11-gfp 的质粒稳定性。

1.2.3 盆栽试验设计

菌悬液的制备: 将活化过夜的 QHZ11-gfp 种子液接种于含 30 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 培养 48 h, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min 去除上清液, 用磷酸缓冲液洗涤菌体 3 次并等体积重悬, 使功能菌总数达 10^8 CFU/mL。

氨基酸有机肥的制备^[22]: 取普通有机肥料 7 kg 于周转箱(内径 56 cm \times 36 cm \times 28 cm), 按 15% (体积质量分数)加入氨基酸水解液后混匀, 每天定时搅拌至 pH 接近 6.8 时备用。

生物有机肥的制备^[22]: 将 QHZ11-gfp 菌悬液按 5% (体积质量分数)接种至氨基酸有机肥中, 每天定时搅拌, 控制含水率在 60% \pm 1%, 好氧发酵 8 d, 制成生物有机肥(BOF11-gfp)。其中有机质含量 46.10%, 全氮 1.96%, P_2O_5 3.09%, K_2O 1.52%, QHZ11-gfp 总量达 8.19×10^8 CFU/g。

盆栽试验在甘肃农业大学网室进行, 设 3 个处理: T1: CK (无菌水灌土); T2: QHZ11-gfp [菌悬液灌土, 土壤质量: 菌悬液体积=100:1 (质量体积比)均匀拌入灭菌土壤]; T3: BOF11-gfp [生物有机肥质量: 土壤质量=1.5:100 (质量比)均匀拌入灭菌土壤], 处理后于当天播种。

各处理等养分设计(CK 和 QHZ11-gfp 处理各添加尿素、过磷酸钙和硫酸钾镁 3.83 g, 17.38 g 和 5.7 g, 使养分与 BOF11-gfp 处理补齐), 每盆装土 6 kg, 每处理 20 盆。对原原种消毒、打破休眠、催芽待种子露白后播种, 每盆 8 株, 于苗期定殖 4 株, 生育期 120 d。

1.2.4 QHZ11-gfp 在马铃薯植株不同部位的定殖特征

进行破坏性取样, 分别在播种后第 7 天采集芽, 第 7、14、21 和 28 天采集根系样品, 第 47 天采集

匍匐茎样品。

取样时将马铃薯植株从土壤中完整挖出, 无菌水冲去芽、根系和匍匐茎表面的土壤并切成 1 cm 小段, 部分样品进行横切和纵切后置于激光共聚焦显微镜下观察不同部位的荧光强度[波长 488 nm, 信号范围 560–680 nm, Leica Confocal Software (V2.61)分析图像]。

1.2.5 QHZ11-gfp 在马铃薯根系和匍匐茎的定量 PCR

同 1.2.4 破坏性取样方法, 分别在播种后的第 7 天和第 27 天采集根系样品, 在第 47、67、87 和 107 天采集根系和匍匐茎样品。连同 1.2.4 一起共采样 8 次(第 27 天和第 28 天为同一次), 每次每处理随机采 2 盆, 每盆 3 株。

将根系和匍匐茎用无菌水冲洗干净后剪碎, 置于研钵中加液氮研磨, 用 FastPure Plant DNA Isolation Mini Kit 提取 DNA, 实时荧光定量 PCR 方法^[20]进行定量。

1.2.6 QHZ11-gfp 对马铃薯的促生效果

根系形态参数用根系扫描仪测定; 根系活力采用 TTC 法^[23]测定; 分别在马铃薯不同生育期测定植株的农艺性状^[24], 收获时每处理 3 盆用以统计产量。

1.2.7 数据分析

Excel 2010 和 SPSS 23 分析试验数据, Duncan 氏新复极差法检验差异显著性($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 QHZ11 的 GFP 标记

利用电击法成功将质粒 pHAPII 导入了 QHZ11 感受态细胞, 标记前后菌株单菌落均呈椭圆不规则状、乳白色、不透明(图 1A 和 1B); 在倒置荧光显微镜下, 标记菌株单菌落和菌液制片均可发出明亮的绿色荧光(图 1C 和 1D); 菌落 PCR 结果显示阳性转化子可以扩增出 750 bp 左右的目的条带, 而野生菌株无条带(图 2), 说明 pHAPII 质粒成功导入了 QHZ11, 记为 QHZ11-gfp。

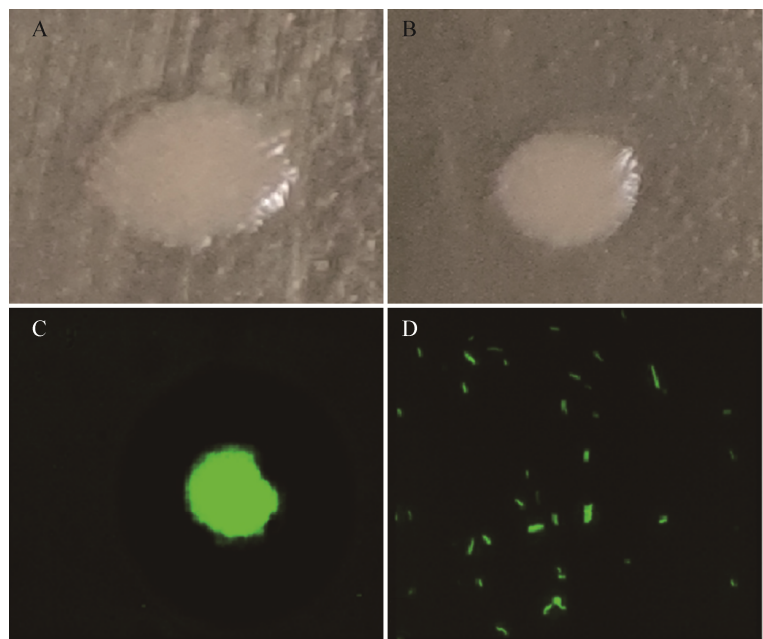


图 1 菌株标记前后菌落的比较和荧光显微镜下的荧光观察
Figure 1 Comparison of colony before and after strain labeling and fluorescence observation under fluorescence microscope
Note: A: QHZ11; B: QHZ11-gfp; C: QHZ11-gfp single colony; D: QHZ11-gfp single cell (1 000×)

2.2 质粒稳定性测定

生长曲线对比(图 3A)发现前 15 h 时 QHZ11-gfp 比 QHZ11 生长略慢, 之后生长趋势基本相同, 整体看质粒的导入未影响 QHZ11 的生长速度; QHZ11 与 QHZ11-gfp 对 *R. solani* JT18 的抑菌率(图 3B–3D)分别为 67.0%和 65.5%, 说明标记前后菌株对 JT-18 的拮抗能力基本相同。

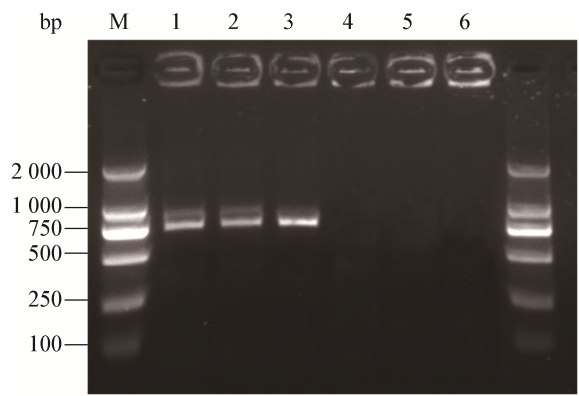


图 2 阳性转化子菌落 PCR 验证
Figure 2 PCR verification of colonies of positive transformants
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1–3: Positive transformants; 4–6: Negative control QHZ11

质粒稳定性检测(图 4)表明, QHZ11-gfp 连续培养 40 代, 仍有很多菌体发出绿色荧光且亮度均一, 说明质粒可在 QHZ11 中遗传表达且稳定性强, 可用于后续定殖试验。

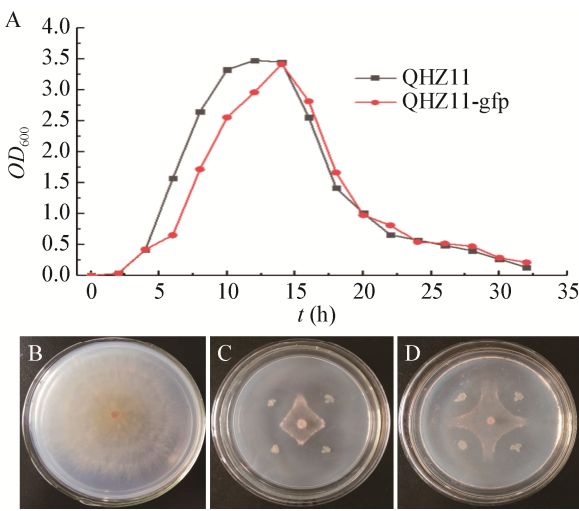


图 3 菌株标记前后生长曲线和拮抗能力的比较
Figure 3 Comparison of growth curve and antagonistic ability of strains before and after labeling
Note: A: QHZ11 and QHZ11-gfp growth curve; B: Control, JT-18 (5 d); C: QHZ11 inhibition rate 67.0% (5 d); D: QHZ11-gfp inhibition rate 65.5% (5 d)

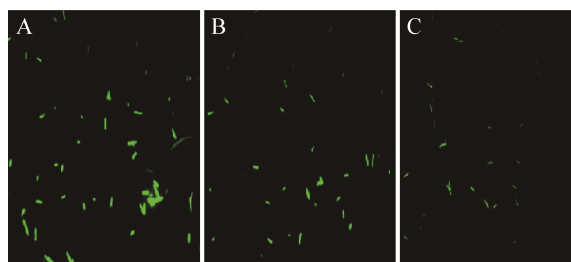


图4 QHZ11-gfp 质粒稳定性检测

Figure 4 QHZ11-gfp plasmid stability test

Note: A: QHZ11-gfp 1 generation; B: QHZ11-gfp 20 generation; C: QHZ11-gfp 40 generation (1 000×)

2.3 QHZ11-gfp 在马铃薯植株不同部位的定殖特征

2.3.1 在马铃薯芽上的定殖特征

在播种后的第7天即可在马铃薯芽表面观察到绿色荧光(图5A–5C),而且BOF11-gfp的荧光强度显著强于QHZ11-gfp处理(图5B和5C),说明将QHZ11-gfp制成生物有机肥有利于其定殖;芽的横切图(图5D–5F)进一步说明了这一问题,2个处理的QHZ11-gfp均进入了芽分生组织,但只有生物有机肥处理中QHZ11-gfp进入了维管束。

2.3.2 QHZ11-gfp 在马铃薯根系和匍匐茎的定殖特征

播种后的第7、14和21天,与对照相比,在QHZ11-gfp和BOF11-gfp处理的马铃薯根表及根尖分区均可观察到绿色荧光(图6D–6U);7d时根表荧

光最强,14d时伸长区荧光最强,至28d时荧光消失(图6V–6Y),说明pHAPII质粒导入QHZ11后在土壤中的稳定时间约为25d;BOF11-gfp处理中各部位的荧光强度均强于QHZ11-gfp,进一步表明QHZ11制成生物有机肥有利于其定殖。

马铃薯匍匐茎的形成约在播种后的第47天,由于质粒的稳定性受土壤和气候等因素的影响,在激光共聚焦显微镜下未观察到拮抗菌在匍匐茎的定殖(图7),但后期对匍匐茎进行荧光定量PCR,仍能检测到拮抗菌的数量。

2.4 QHZ11-gfp 在马铃薯根系和匍匐茎的定量PCR

从图8可以看到,随着马铃薯生育进程的推进,根系上QHZ11-gfp的定殖数量随之升高,至第47天(块茎形成期)与匍匐茎上的定殖数量均达到峰值后同时下降,至第107天(成熟期)降到最低;在整个生育期,标记菌株的定殖数量始终呈现BOF11-gfp>QHZ11-gfp处理、根系>匍匐茎的规律,这种差异在播种后的第47天最为显著,BOF11-gfp处理QHZ11-gfp在根系的数量(1.07×10^5 copies/g)高于匍匐茎(6.63×10^4 copies/g),并且在根系上生物有机肥处理(1.07×10^5 copies/g)的定殖数量高于菌悬液处理(1.65×10^4 copies/g)。

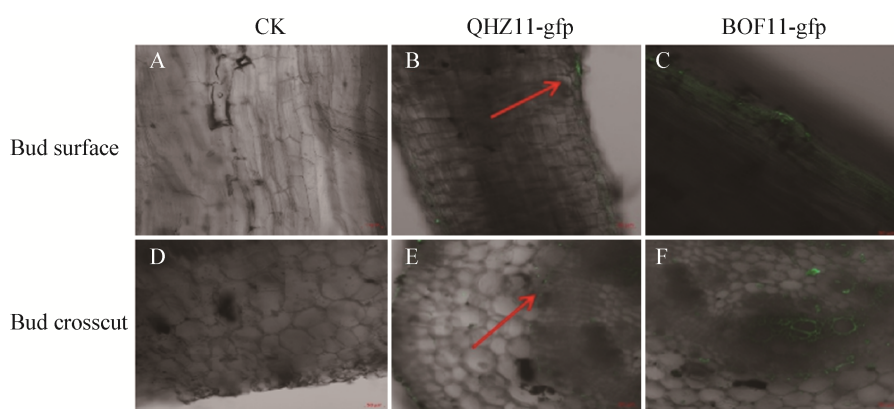


图5 QHZ11-gfp 在马铃薯芽上的定殖

Figure 5 Colonization of QHZ11-gfp on potato bud

Note: A–C: Bud surface; D: Bud meristem; E–F: Bud meristem and vascular bundle. Red arrow: Fluorescence

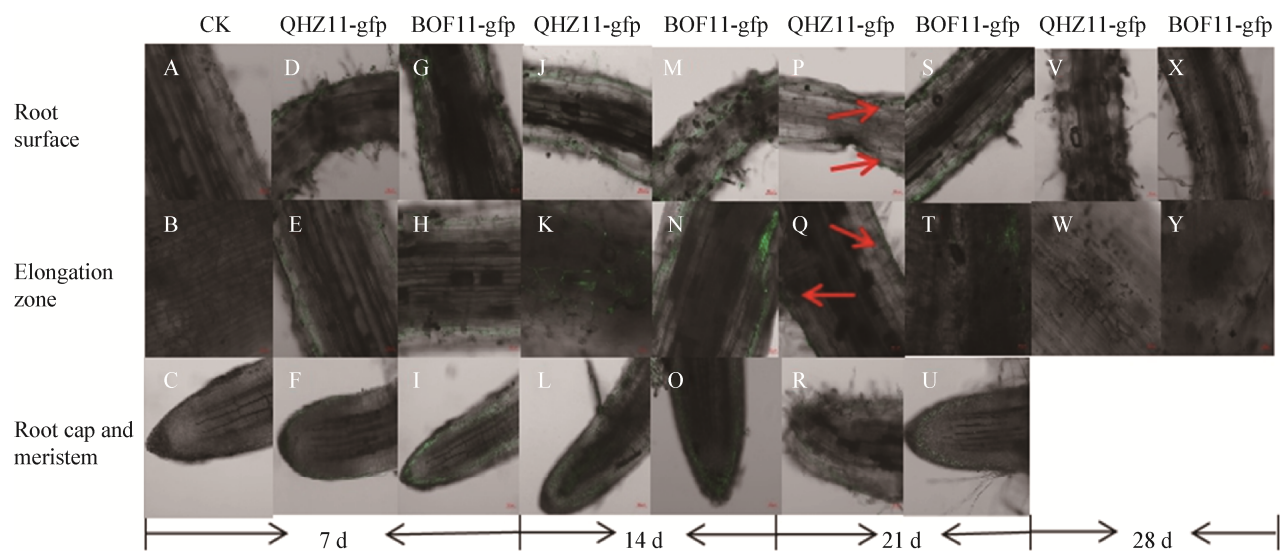


图 6 不同天数 QHZ11-gfp 在马铃薯根系的定殖

Figure 6 Colonization of QHZ11-gfp in potato roots with different days

Note: A–I: The 7th day of sowing; J–O: The 14th day of sowing; P–U: The 21st day of sowing; V–Y: The 28th day of sowing. Red arrow: Fluorescence

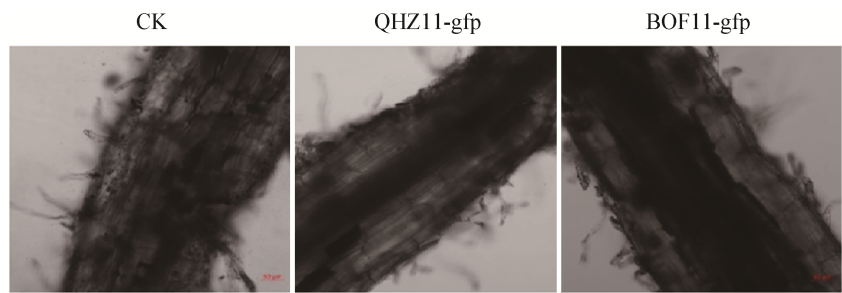


图 7 QHZ11-gfp 在马铃薯匍匐茎的定殖(47 d)

Figure 7 Colonization of QHZ11-gfp on stolons of potato (47 d)

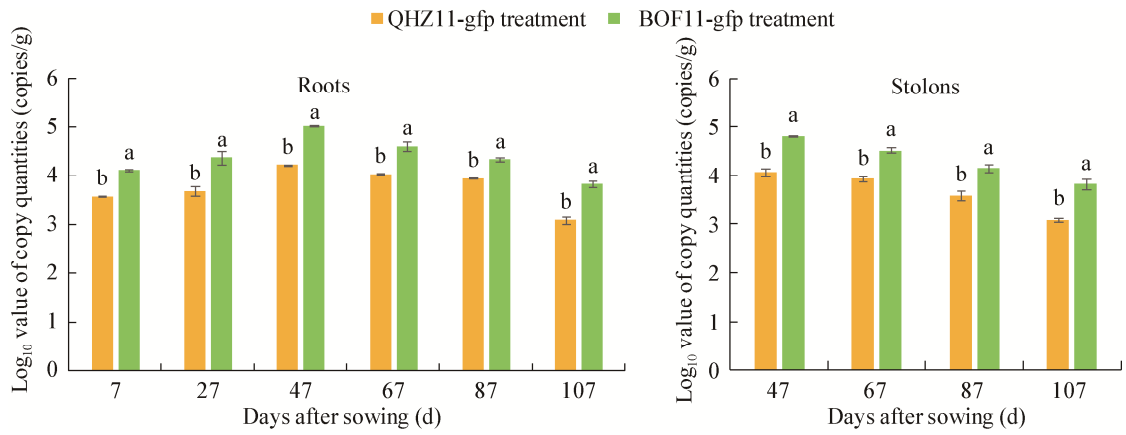


图 8 QHZ11-gfp 在马铃薯根系及匍匐茎的定殖数量

Figure 8 Colonization quantities of QHZ11-gfp in potato roots and stolons

Note: The different lowercase letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$ level

2.5 QHZ11-gfp 对马铃薯的促生效果

2.5.1 QHZ11-gfp 对马铃薯根系形态和根系活力的影响

从图 9 可以看出,随着马铃薯生育进程的推进,根系形态和根系活力均呈现先升高至块茎膨大期(67 d)到达峰值,随后下降的趋势;在整个生育期,BOF11-gfp 和 QHZ11-gfp 处理各指标均显著高于对照组,并且 2 组处理之间也有显著差异,BOF11-gfp 始终高于 QHZ11-gfp 处理,尤其在总根长和根尖数上,BOF11-gfp 比 QHZ11-gfp 处理分别高出 0.63 倍和 0.5 倍。

2.5.2 QHZ11-gfp 对马铃薯生物量和地上部生长的影响

在马铃薯不同生育期测定其农艺性状(图 10),结果均呈现先升高后下降的趋势,并且整个生育期,QHZ11-gfp 和 BOF11-gfp 在株高、茎粗、叶厚以及干重上均显著高于对照组,BOF11-gfp 也显著高于 QHZ11-gfp 处理,其中干重差异最明显,

BOF11-gfp 处理平均地上、地下干重分别比 QHZ11-gfp 高出 0.93 倍和 0.77 倍。

2.5.3 QHZ11-gfp 对马铃薯产量的影响

于收获期统计块茎产量(表 1),结果表明 QHZ11-gfp 和 BOF11-gfp 处理均显著增加了马铃薯的块茎产量,其中 BOF11-gfp 处理的产量比 CK 和 QHZ11-gfp 处理分别增加了 0.45 倍和 0.34 倍。

3 讨论

PGPR 在作物根系的定殖是其充分发挥生防作用的关键,研究 PGPR 在根系的定殖及分布规律,是阐明其作用机制的基础^[25-26]。研究发现利用多拷贝质粒进行菌株标记时,其携带的报告基因和抗性等因素会消耗宿主菌株的能量,甚至影响宿主的生长和代谢,使菌株无法发挥正常的生理功能^[27]。本研究中,QHZ11 在标记前后的菌落形态、生长曲线和对立枯丝核菌的拮抗能力基本相同,说明外源质粒的导入并未影响菌株的生长和代谢功能,这为进

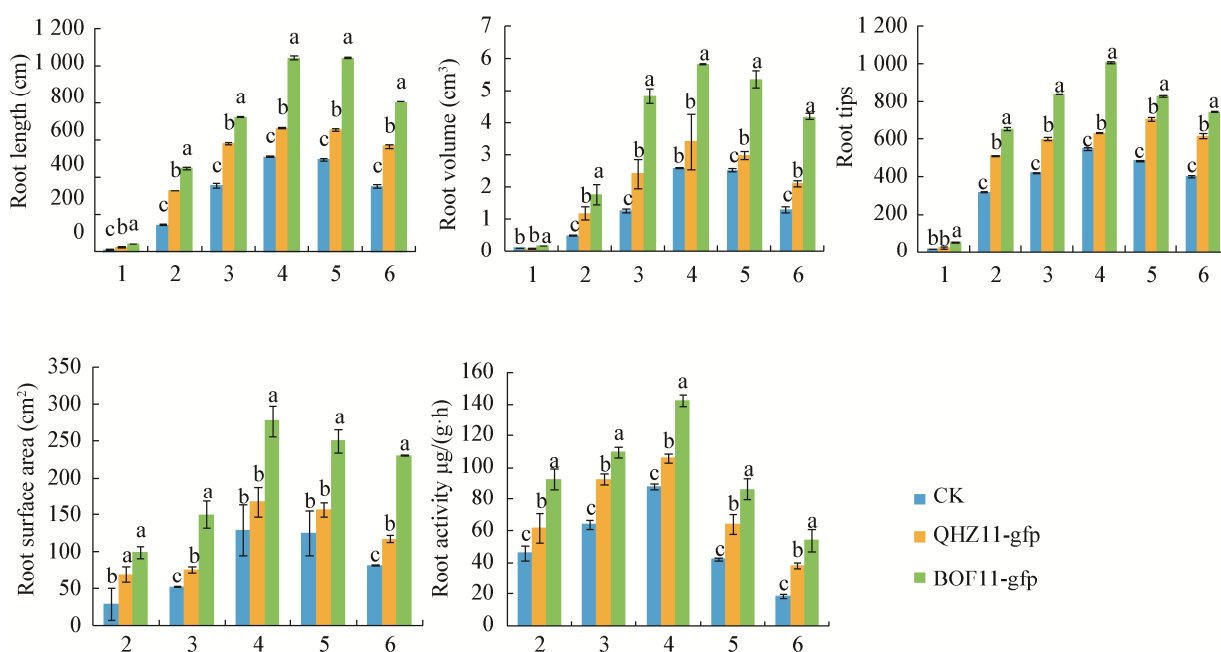


图 9 不同生育期 QHZ11-gfp 对马铃薯根系形态及活力的影响

Figure 9 Effects of QHZ11-gfp in different growth stages on root morphology and activity of potato

Note: 1: Bud period; 2: Seeding period; 3: Tuber formation period; 4: Tuber expansion period; 5: Starch accumulation period; 6: Maturing period. The different lowercase letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$ level

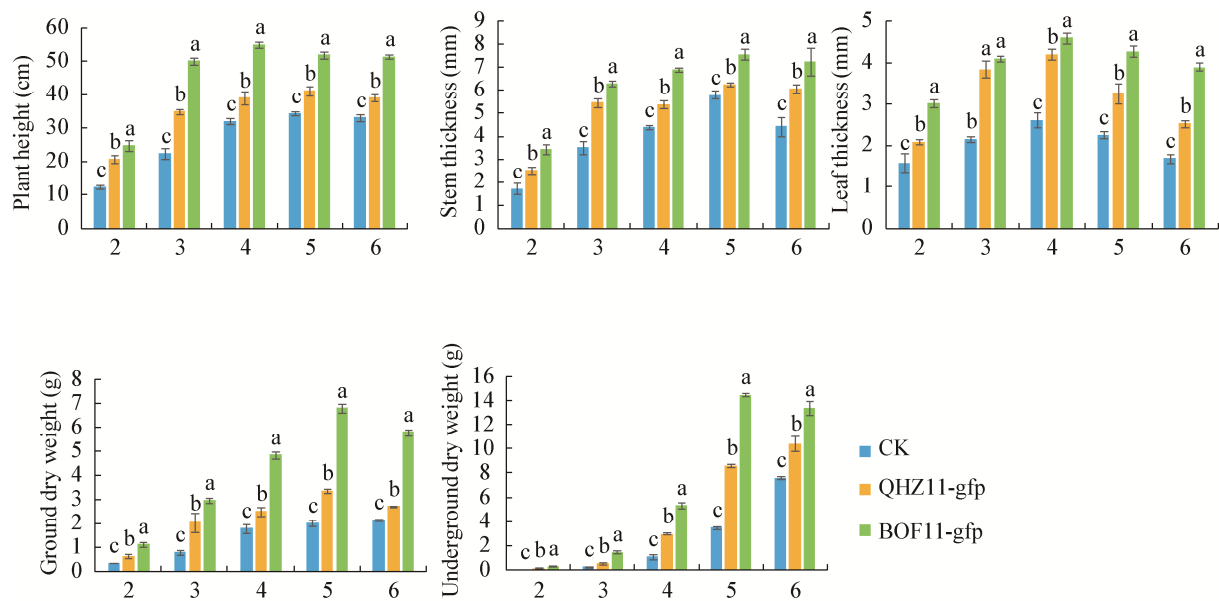


图 10 不同生育期 QHZ11-gfp 对马铃薯生物量和地上部生长的影响
Figure 10 Effects of QHZ11-gfp in different growth stages on biomass and aboveground growth of potato

Note: 1: Seeding period; 2: Tuber formation period; 3: Tuber expansion period; 4: Starch accumulation period; 5: Maturing period; The different small letters indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ level

一步研究 QHZ11-gfp 在马铃薯植株的定殖特征奠定了基础。

植物通过释放特定的信号分子向根系吸引 PGPR，然而向根系分泌物的趋化是植物与 PGPR 相互作用的第一步。PGPR 对根系分泌物高度亲和，因为根系分泌物可作为碳源和能源吸引 PGPR 到达根表占据不同生态位定殖并聚集成膜^[15,28-29]。本研究通过对马铃薯芽和根系每隔 7 d 的观察发现，QHZ11-gfp 可在马铃薯芽表和根表定殖，说明芽和根系分泌的不同物质为拮抗菌的生存和繁殖提供了营养物质和能源。Yi 等^[30]从基因水平上分析了马

铃薯根系分泌物中对芽孢杆菌起趋化作用的物质发现，这些基因主要编码膜蛋白、转录调节因子或参与氨基酸代谢和生物合成。关于马铃薯根系趋化 QHZ11-gfp 的具体物质，还需进一步从化学鉴定水平和转录组水平上分析。

有些 PGPR 能够存在于植物内部组织中，被称为“内生细菌”^[31]，如巨大芽孢杆菌可以进入水稻内部定殖^[32]，枯草芽孢杆菌可以成为黄瓜内生菌^[33]等。内生菌比生存在根际或根系上的细菌更具优势，因为生活在植物组织内代表着与植物细胞有不断“接触”的机会，而且内生菌比根际和根系上的微生物更能整合到植物代谢中，从而起到杀灭真菌^[34]、诱导植物对病原体的系统抗性等作用^[35]。本研究 QHZ11-gfp 可以进入芽的分生组织、维管束及根尖分区，尤其是伸长区进行定殖，说明 QHZ11-gfp 可以作为马铃薯内生菌，这决定了其在马铃薯的病害防治中拥有巨大的应用潜力，但内生菌 QHZ11-gfp 与马铃薯植株的互动机制尚不清楚，还需要后期深

表 1 不同处理马铃薯产量

Table 1 Potato yield of different treatments

处理 Treatments	产量 Yield (g/pot)
CK	949.51±4.35c
QHZ11-gfp	1 026.92±4.14b
BOF11-gfp	1 375.62±5.93a

Note: The different lowercase letters indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ level

人的探究。本研究还发现无论在芽上还是根系上, BOF11-gfp 的荧光强度均显著强于 QHZ11-gfp 处理, 说明拮抗菌以生物有机肥为载体可促进其在马铃薯植株的定殖, 因为生物有机肥可以提高土壤养分, 并将土壤的 pH 调节至适宜拮抗菌生存的范围^[36], 在施入土壤初期, 拮抗菌便可借助有机肥提供的营养物质迅速生长繁殖, 进而大量运动到马铃薯根系定殖。

本研究采用实时荧光定量 PCR 方法对马铃薯根系和匍匐茎的拮抗菌进行了定量检测, 结果发现拮抗菌在根系和匍匐茎的定殖数量均在块茎形成期到达峰值, 在成熟期降至最低, 而且整个生育期, 拮抗菌的定殖数量始终是根系>匍匐茎, BOF11-gfp>QHZ11-gfp 处理。由于块茎形成期是马铃薯生长高峰期, 此时期根系生长和代谢最为活跃, 产生了大量根系分泌物, 吸引着成批拮抗菌到达根系并使其定殖数量达到峰值; 然而将拮抗菌制成生物有机肥后, 其定殖数量在根系上显著高于菌悬液处理, 进一步说明拮抗菌以有机肥为载体十分有利于其生存和定殖。生育后期马铃薯植株的根系营养供给重点转为块茎, 根系萎蔫干枯, 分泌物大大减少, 这应该是拮抗菌数量降至最低的主要因素。

研究表明, PGPR 可通过增加养分获取、改变激素水平等促进植物生长^[37]。本试验通过探究 QHZ11-gfp 对马铃薯的促生效果发现, QHZ11-gfp 不仅能促进马铃薯根系形态的建成, 提高根系活力, 还能增加株高、叶厚、生物量和块茎产量等, 并且 BOF11-gfp 比 QHZ11-gfp 处理效果更显著, 这与许帅等^[38]的研究结果相似。QHZ11-gfp 具有产 IAA、Fe 载体和溶磷等特性^[19], 这决定了其对植株具有良好的促生作用, 然而将其制成生物有机肥后, 有机肥中含有大量的活性微生物可以活化土壤中难溶性养分, 同时生物有机肥中的活性有机质还可以参与根细胞的合成和根系呼吸作用, 从而增强根系活力^[39]。张舒涵等^[40]的研究指出, 根系形态学特征除了通过控制根长影响养分吸收, 也通过增加细根来提高根系整体的生长速率。本研

究中 QHZ11-gfp 对马铃薯根系的促进尤其表现在根长和根尖数上, 这与徐文兵等^[41-42]的研究结果相一致。

4 结论

QHZ11-gfp 可在马铃薯植株上成功定殖并对马铃薯有良好的促生效果, 将其制成生物有机肥促进了其定殖, 使促生效果也更好。这为研究 QHZ11 与马铃薯植株的互作提供了依据, 并为 QHZ11 生物有机肥的田间应用和推广奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Hussain T, Khan AA. *Bacillus subtilis* HussainT-AMU and its antifungal activity against potato black scurf caused by *Rhizoctonia solani* on seed tubers[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 23: 101443
- [2] Luo X, Feng HC, Xia LM, Zhang RF, Yu GH, Shen QR, Zhang N. Transcriptomic profiling of plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 in response to banana root exudates[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2019, 42(1): 102-110 (in Chinese)
罗兴, 冯海超, 夏丽明, 张瑞福, 余光辉, 沈其荣, 张楠. 根际促生解淀粉芽胞杆菌 SQR9 对香蕉根系分泌物响应的转录组分析[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(1): 102-110
- [3] Larkin RP. Biological control of soilborne diseases in organic potato production using hypovirulent strains of *Rhizoctonia solani*[J]. *Biological Agriculture & Horticulture*, 2020, 36(2): 119-129
- [4] Cui XS, Wang W, Zhang R, Zhang RF. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria based on rhizosphere nutrition competitiveness and investigation of their promoting effects[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, 38(6): 958-966 (in Chinese)
崔晓双, 王伟, 张如, 张瑞福. 基于根际营养竞争的植物根际促生菌的筛选及促生效应研究[J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38(6): 958-966
- [5] Ling N, Wang QJ, Yang XM, Xu YC, Huang QW, Shen QR. Control of *Fusarium* wilt of watermelon by nursery application of bio-organic fertilizer[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(5): 1136-1141 (in Chinese)
凌宁, 王秋君, 杨兴明, 徐阳春, 黄启为, 沈其荣. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(5): 1136-1141
- [6] Wang XF, Mavrodi DV, Ke LF, Mavrodi OV, Yang MM, Thomashow LS, Zheng N, Weller DM, Zhang JB. Biocontrol and plant growth-promoting activity of

- rhizobacteria from Chinese fields with contaminated soils[J]. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8(3): 404-418
- [7] Kamal A. M. A, Hadeel M. M. KB, Mohamed H, Saad A. M. A, Yasser S. M. Biological control of the tomato wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using formulated plant growth-promoting bacteria[J]. *Egyptian Journal of Pest Control*, 2019, 29(1): 1-8
- [8] Kim MJ, Shim CK, Ko BG, Kim J. Effect of the *Microalga Chlorella fusca* CHK0059 on strawberry PGPR and biological control of *Fusarium* wilt disease in non-pesticide hydroponic strawberry cultivation[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(5): 708-716
- [9] Ye XF, Li ZK, Luo X, Wang WH, Li YK, Li R, Zhang B, Qiao Y, Zhou J, Fan JQ, et al. A predatory myxobacterium controls cucumber *Fusarium* wilt by regulating the soil microbial community[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 49
- [10] Shen ZZ, Ruan YZ, Chao X, Zhang J, Li R, Shen QR. Rhizosphere microbial community manipulated by 2 years of consecutive biofertilizer application associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51(5): 553-562
- [11] Zhou YZ, Qiu HZ, Dong L, Wei RY, Dong AJ, Wang YL, Wang C. Screening of highly effective biocontrol *Bacillus* strains for potato scab and optimization of its fermentation conditions[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2020, 38(5): 259-266 (in Chinese)
- 周洋子, 邱慧珍, 董莉, 魏茹云, 董爱菊, 王友玲, 王川. 马铃薯疮痂病高效生防芽孢杆菌的筛选及发酵条件优化[J]. *干旱地区农业研究*, 2020, 38(5): 259-266
- [12] Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(5): 669-678
- [13] Ren JH, Liu H, Jiang N, Wei YH, Zhang B, Wang Y. *Sinorhizobium meliloti* CHW10B strain GFP-Labeling and its colonization associated with *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(1): 74-79 (in Chinese)
- 任嘉红, 刘辉, 姜楠, 魏玉宏, 张冰, 王莹. GFP 标记溶磷草木樨中华根瘤菌 CHW10B 及其定殖[J]. *林业科学*, 2015, 51(1): 74-79
- [14] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263(5148): 802-805
- [15] Zhang N, Wu K, Shen YF, Zhang RF, Shen QR, Huang QW. Investigation of the colonization patterns of plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 on banana roots[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(6): 59-65 (in Chinese)
- 张楠, 吴凯, 沈怡斐, 张瑞福, 沈其荣, 黄启为. 根际益生菌解淀粉芽孢杆菌 SQR9 在香蕉根表的定殖行为研究[J]. *南京农业大学学报*, 2014, 37(6): 59-65
- [16] Ramos C, Molbak L, Molin S, Denmark. Bacterial activity in the rhizosphere analyzed at the single-cell level by monitoring ribosome contents and synthesis rates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 66(2): 801-809
- [17] Hwang IK, Lee HY, Kim MH, Jo HS, Choi DH, Kang PW, Lee YH, Cho NS, Park KW, Chae HZ. Development of real-time PCR assay for genetic identification of the mottled skate, *Beringraja pulchra*[J]. *Forensic Science International*, 2015, 255: 80-84
- [18] Sirajuddin SA, Sundram S. Evaluation of two transformation protocols and screening of positive plasmid introduction into *Bacillus cereus* EB2, a Gram-positive bacterium using qualitative analyses[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, 51(3): 919-929
- [19] Guan XM. Isolation of antagonistic bacterium strains against pathogen causing black scurf of potato and its acting mechanism[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- 关小敏. 马铃薯黑痣病生防细菌的筛选及其生防作用机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2014
- [20] Dong L, Qiu HZ, Zhou YZ, Dong AJ, Chen LL, Wang YL, Wang C. Rapid detection and application of antagonistic bacterium QHZ11 against *Rhizoctonia solani* in potato by real-time fluorescence quantitative PCR[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(12): 4338-4348 (in Chinese)
- 董莉, 邱慧珍, 周洋子, 董爱菊, 陈兰兰, 王友玲, 王川. 马铃薯立枯丝核菌拮抗菌 QHZ11 的实时荧光定量 PCR 快速检测与应用[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(12): 4338-4348
- [21] Zhang N. Research of interaction between plant roots and rhizosphere beneficial *Bacillus* strains N11 and SQR9[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- 张楠. 根际有益芽孢杆菌 N11 及 SQR9 与植物根系的互作研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2012
- [22] Qiu XL. Effects of bio-organic fertilizers on soil biological activities and the root growth, morphology and activities of potato[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- 邱晓丽. 不同生物有机肥对土壤生物活性以及对马铃薯的生物效应的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2018
- [23] Zhu XY, Liang M, Ma Y. A review report on the experiments for the determination of root activity by TTC method[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2020, 47(6): 211-212 (in Chinese)
- 朱秀云, 梁梦, 马玉. 根系活力的测定(TTC 法)实验综述报告[J]. *广东化工*, 2020, 47(6): 211-212
- [24] Zhang SM, Wang TT, Yang HZ, Song ZY, Gao JH, Xie XS,

- Zhao W. Effects of special fertilizer on agronomic traits and yields of potato[J]. Chinese Potato Journal, 2020, 34(4): 224-228 (in Chinese)
- 张淑敏, 王婷婷, 杨恒哲, 宋兆云, 高进华, 解学仕, 赵文. 专用肥对马铃薯农艺性状和产量的影响[J]. 中国马铃薯, 2020, 34(4): 224-228
- [25] Panchami PS, Geetha Thanuja K, Karthikeyan S. Isolation and characterization of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from cardamom rhizosphere[J]. Current Microbiology, 2020, 77(10): 2963-2981
- [26] Liu YP, Chen L, Wu GW, Feng HC, Zhang GS, Shen QR, Zhang RF. Identification of root-secreted compounds involved in the communication between cucumber, the beneficial *Bacillus amyloliquefaciens*, and the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2017, 30(1): 53-62
- [27] Tian T, Wang Q. The application of green fluorescent protein (GFP) as molecular marker in microbiology[J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(1): 68-73 (in Chinese)
- 田涛, 王琦. 绿色荧光蛋白作为分子标记物在微生物学中的应用[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(1): 68-73
- [28] Qi C, Cun HC, He PF, Li XY, Wu YX, He PB, He YQ. Colonization ability in cucumber plant and biocontrol mechanism of *Bacillus subtilis* YN201490[J]. Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition, 2019, 41(1): 172-180 (in Chinese)
- 祁超, 寸海春, 何鹏飞, 李兴玉, 吴毅歆, 何鹏搏, 何月秋. 生防菌 YN201490 在黄瓜植株体内的定殖能力及防病机制的初步研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2019, 41(1): 172-180
- [29] Liu YP, Zhang N, Qiu MH, Feng HC, Vivanco JM, Shen QR, Zhang RF. Enhanced rhizosphere colonization of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by pathogen infection[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 353(1): 49-56
- [30] Yi YL, De Jong A, Frenzel E, Kuipers OP. Comparative transcriptomics of *Bacillus mycoides* strains in response to potato-root exudates reveals different genetic adaptation of endophytic and soil isolates[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1487
- [31] Sorokan A, Cherepanova E, Burkhanova G, Veselova S, Rumyantsev S, Alekseev V, Mardanshin Ir, Sarvarova E, Khairullin R, Benkovskaya G. Endophytic *Bacillus* spp. as a prospective biological tool for control of viral diseases and non-vector *Leptinotarsa decemlineata* Say. in *Solanum tuberosum* L.[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 569457-569457
- [32] Liu XM, Zhao HX, Chen SF. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4[J]. Current Microbiology, 2006, 52(3): 186-190
- [33] Cao Y, Zhang ZH, Ling N, Yuan YJ, Zheng XY, Shen B, Shen QR. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(5): 495-506
- [34] Rania ABA, Hayfa JK, Ahlem N, Sonia MT, Mejda DR. Biocontrol of *Fusarium* wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Solanum elaeagnifolium* stems[J]. Journal of Phytopathology, 2016, 164(10): 811-824
- [35] Rashid MHO, Chung YR. Induction of systemic resistance against insect herbivores in plants by beneficial soil microbes[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1816
- [36] Zhang H, Hua ZW, Liang WZ, Niu QH, Wang X. The prevention of bio-organic fertilizer fermented from cow manure compost by *Bacillus* sp. XG-1 on watermelon continuous cropping barrier[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(16): 5714
- [37] Batista BD, Lacava PT, Ferrari A, Teixeira-Silva NS, Bonatelli ML, Tsui S, Mondin M, Kitajima EW, Pereira JO, Azevedo JL. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability[J]. Microbiological Research, 2018, 206: 33-42
- [38] Xu S, Xie XW, Zhang Y, Shi YX, Chai AL, Li L, Li BJ. Screening of biocontrol *Bacillus* isolate against potato *Fusarium* wilt and its biocontrol effect[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(5): 761-770 (in Chinese)
- 许帅, 谢学文, 张昀, 石延霞, 柴阿丽, 李磊, 李宝聚. 马铃薯枯萎病生防芽孢杆菌筛选及生防效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(5): 761-770
- [39] Feng HC, Zhang N, Fu RX, Liu YP, Krell T, Du WB, Shao JH, Shen QR, Zhang RF. Recognition of dominant attractants by key chemoreceptors mediates recruitment of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(1): 402-415
- [40] Zhang SH, Zhang JL, Wang W, Li CZ. Influence of potassium chloride on the root physiology and morphology of potato under drought stress[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2018(5): 77-84 (in Chinese)
- 张舒涵, 张俊莲, 王文, 李朝周. 氯化钾对于旱胁迫下马铃薯根系生理及形态的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2018(5): 77-84
- [41] Xu WB, Wu F, Deng XH, Qi YJ, Luo JQ, Li QL, Yang LL, Li HL, Luo W. Effects of root-zone application of different bio-organic fertilizers on flue-cured tobacco roots[J]. Chinese Tobacco Science, 2017, 38(5): 45-49 (in Chinese)
- 徐文兵, 吴峰, 邓小华, 齐永杰, 罗建钦, 李群岭, 杨丽丽, 李海林, 罗伟. 根区施用不同生物有机肥对烤烟根系生长发育的影响[J]. 中国烟草科学, 2017, 38(5): 45-49
- [42] Groover W, Held D, Lawrence K, Carson K. Plant growth-promoting rhizobacteria: a novel management strategy for *Meloidogyne incognita* on turfgrass[J]. Pest Management Science, 2020, 76(9): 3127-3138