

两株生菜根际芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)的分离与特性研究程园园[△] 王晓丹[△] 刘莎莎 刘佳莉 郭长虹*

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院 分子细胞遗传与遗传育种

黑龙江省重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:【目的】从生菜根际土中筛选出 2 株具有多种生物学特性、促生和生防效果的芽孢杆菌。【方法】土样经过 80 °C 高温处理, 得到 2 株细菌。通过形态学、生理生化、16S rRNA 和 *gyrB* 基因鉴定菌株。对其溶磷、合成 IAA 和嗜铁素能力及对植物病原真菌的拮抗作用进行测定。用 2 株细菌处理生菜种子, 评价其促生效果。用菌株 WXD 3-2 处理小麦, 评价其生防效果。【结果】经过鉴定, 确定菌株 WXD 3-1 为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), WXD 3-2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。2 株菌均有溶磷、合成嗜铁素、IAA 能力和促生能力, 菌株 WXD 3-2 能够对多种病原菌产生拮抗作用, 抑制其生长。经过 WXD 3-1 和 WXD 3-2 处理, 生菜植株高、叶片宽、植株鲜重及植株干重与对照相比分别增加 21.51% 和 8.88%、31.93% 和 14.51%、41.30% 和 13.58%、42.76% 和 26.35%。菌株 WXD 3-2 能够减轻小麦根腐病病症, 小麦根部病斑减少。【结论】分离出的 2 株芽孢杆菌均具有溶磷、合成 IAA 和嗜铁素能力, 能够促进生菜的生长, 且菌株 WXD 3-2 还具有生防效果。

关键词: 芽孢杆菌, 嗜铁素, 溶磷, 吲哚乙酸, 拮抗作用, 生防

Isolation and characteristics of two *Bacillus* spp. from the rhizosphere of *Lactuca sativa*

CHENG Yuan-Yuan[△] WANG Xiao-Dan[△] LIU Sha-Sha LIU Jia-Li GUO Chang-Hong*

(Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025, China)

Abstract: [Objective] To isolating the *Bacillus* strains from the rhizosphere of *Lactuca sativa*, which have a variety of biological characteristics, the growth-promoting ability and effects of biocontrol. [Methods] In the study, high-temperature method was used to separate *Bacillus* spp.. The strains were identified according to morphological characteristics, physiological and biochemical responses, 16S rRNA and *gyrB* gene analysis. The phosphate solubilization, IAA syntheses, siderophore syntheses, the inhibition against the plant pathogenic fungus of two strains were studied. Planted the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170479); 国家科技支撑计划项目(No. 2011BAD17B04-2-1); 黑龙江省科技攻关项目(No. GC12B304); 黑龙江省自然科学基金项目(No. C201142)

*通讯作者: Tel: 86-451-88060691; 信箱: kaku2008@hotmail.com

并列第一作者

收稿日期: 2014-03-03; 接受日期: 2014-07-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-08-19

lettuce seeds soaked with the suspension liquid of two strains, and evaluated the effects of the growth-promoting after 30 days. Using the strain WXD 3-2 treated with wheat, evaluated the effects of inoculum concentrations of WXD 3-2. **[Results]** The strain WXD 3-1 was identified as *Bacillus megaterium* and WXD 3-2 was confirmed as *Bacillus subtilis*. Two strains had phosphate solubilization, IAA syntheses, siderophore syntheses, and the growth-promoting ability. The strain WXD 3-2 could inhibit varieties of plant pathogenic fungus. The height of the lettuce, the width of leaves, the fresh weights, and the dry weights were increased 21.51% and 8.88%, 31.93% and 14.51%, 41.30% and 13.58%, 42.76% and 26.35% compared with control. The results showed that the strain WXD 3-2 could reduce wheat root rot disease and wheat root lesion. **[Conclusion]** Two strains had phosphate solubilization, IAA syntheses, siderophore syntheses, and growth promotion ability. The strain WXD 3-2 had effects of biocontrol.

Keywords: *Bacillus* spp., Siderophore, Phosphate solubilizing, IAA, Antagonism, Biocontrol

生菜(*Lactuca sativa* L.)是菊科草本植物,因其含有丰富的维生素和矿物质,叶片脆嫩,口感好,具有较高的营养价值和经济价值,是深受人们喜爱的蔬菜之一^[1]。随着蔬菜产业的发展,生菜生产中农药和化肥的使用也日益普遍,带来了严重的环境污染、食品安全、抗药性等问题^[2]。所以开发生物肥料与生物农药,对于提高生菜的产量和品质,减少农药化肥造成的土壤板结、水体污染、农药残留等问题,具有十分重要的意义。

植物根际促生细菌(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)是生长在植物根周围能够直接或间接地促进植物生长的细菌^[3]。根际菌通过生物固氮^[4]、解磷作用^[5]、产生植物生长激素^[6]等机制促进植物生长、防治植物疾病和促进营养物质吸收。芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是一类很重要的植物根际促生细菌,在逆境条件下产生芽孢以抵抗周围不良环境的革兰氏阳性杆菌。它广泛分布在土壤中,不仅可以促进植物生长,还可以产生抑菌物质(例如:杆菌肽、大环脂、环脂等)防治植物病害^[7]。因其耐高温、抗逆性强、适应性强等特点,所以常用于生物肥料生防菌剂的研究,已经在一些粮食作物及经济作物上被广泛应用^[8]。但是,目前关于生菜根际芽孢杆菌的研究还比较少。

本研究从哈尔滨师范大学试验田生菜根际土中分离纯化2株芽孢杆菌,对其产生嗜铁素能力、溶磷能力、吲哚乙酸(IAA)合成能力和对植物病原菌的拮抗能力进行评估,评价了2株菌对生菜的促

生效果,并对小麦根腐病的生防能力进行初步评价。研究结果表明,2株菌具有一定溶磷、合成嗜铁素和IAA能力,为微生态制剂的研制提供菌种资源。菌株WXD 3-2能够抑制植物病原真菌,且能够减轻小麦根腐病的危害。为进一步利用芽孢杆菌提高生菜产量和防治生菜病害提供依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌(Pathogens)

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、稻梨孢菌(*Pyricularia oryzae*)、金黄壳囊孢菌(*Cytospora chrysosperma*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)、茄链格孢菌(*Alternaria solani*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、禾旋孢腔菌(*Cochliobolus sativus*)由本实验室提供。

1.2 培养基

PDA培养基(g/L):土豆200,葡萄糖20,蒸馏水1L,琼脂15;LB培养基(g/L):蛋白胨10,酵母粉5,氯化钠10,蒸馏水1L,pH7.0;MKB培养基(g/L):酪蛋白水解物5.0,甘油15mL,磷酸氢二钾2.5,MgSO₄·7H₂O2.5,去离子水1L,pH7.2;NBRIP培养基(g/L):葡萄糖10.00,Ca₃(PO₄)₂5.00,MgCl₂5.00,MgSO₄·7H₂O0.25,KCl0.20,(NH₄)₂SO₄0.10,去离子水1L,pH7.0;DF培养基(g/L):KH₂PO₄4.0,Na₂HPO₄6.0,

MgSO₄·7H₂O 0.2, FeSO₄·7H₂O 1 mg, 葡萄糖 2.0, 葡萄糖酸 2.0, 柠檬酸 2.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, 微量元素 0.1 mL, pH 7.5。

1.3 方法

1.3.1 芽孢杆菌的分离纯化:取哈尔滨师范大学试验田生菜根际土 5 g, 放入盛有 45 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中, 在摇床上 37 °C、180 r/min 振荡 30 min 后于 80 °C 的水浴锅中保持 15 min。然后用无菌水进行梯度稀释后涂布 PDA 平板, 37 °C 培养 24 h 左右, 挑取菌落形态差异比较明显的单菌落进行筛选。将分离的菌株划线进行纯化, 纯化到第六代, 做成甘油菌保存在 -80 °C。

1.3.2 分离菌株的鉴定:(1) 分离菌株的生理生化鉴定: 对菌株进行革兰氏染色、芽孢染色、明胶液化、接触酶、M.R 测定、V-P 测定、淀粉水解、柠檬酸盐利用实验, 参照《伯杰细菌手册》^[8]进行对比。(2) 分离菌株 16S rRNA 鉴定: 采用 CTAB/NaCl 方法提取细菌 DNA。根据原核生物 16S rRNA 保守序列通用引物 F8: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; F1541: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' 进行扩增。扩增条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将所得产物送至上海生工生物工程基因测序公司进行 DNA 序列测定, 得到 16S rRNA 序列。(3) 分离菌株 *gyrB* 基因的鉴定: 以 *gyrB*1F (5'-GAAGTCA TCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTY GA-3') 和 *gyrB* 2R (5'-AGCAGGATACGGATGTGC GAGCCRTCACRTCNCRCTCNGTCAT-3') 为引物, 扩增条件为: 95 °C 4 min; 96 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。将所得产物送至上海生工生物工程基因测序公司进行 DNA 序列测定, 再 BLAST 进行序列分析。

1.3.3 分离菌株嗜铁素合成含量的测定:(1) 定性: 采用 Schwyn 和 Neilands^[9]的方法, 将分离的菌株点接种到铬奥醇 CAS (Chrome azurol S) 固体板上, 28 °C 培养 3-5 d, 观察菌落周围的颜色变化, 有橘黄色圈产生即可产生嗜铁素。(2) 定量:

将可产生橘黄色圈的菌株接种到 MKB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 摇床培养 48 h; 菌液离心, 取上清液 3 mL, 等比例加入 3 mL CAS 检测液, 充分混合。静置 1 h 后, 630 nm 处测吸光值记为 A 。对照为去离子水与 CAS 检测液等体积混合反应, 测得的值记为 A_r , A/A_r 为样品中嗜铁素的相对含量^[10]。

1.3.4 分离菌株溶磷能力的测定:(1) 定性: 采用 Nguyen^[11]的方法, 将分离的菌株点接种到 NBRIP 固体板上, 28 °C 培养 2 d, 观察菌落周围是否有透明圈出现, 出现透明圈则有溶解磷的能力。(2) 定量: 采用钼锑抗法^[12], 将有溶解磷能力的菌株接种到 NBRIP 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 摇床培养 5 d, 菌液离心, 取上清 50 μ L, 加入 2.5 mL 钼锑抗混合显色剂, 定容到 50 mL, 反应 30 min, 660 nm 测吸光值。对照为去离子水与钼锑抗混合显色剂反应。

1.3.5 分离菌株吲哚乙酸(IAA)合成能力的测定:将分离的菌株在 DF 培养基中培养(180 r/min) 2 d, 然后再取 1 mL 转入到添加不同浓度色氨酸(L-Trp)的 DF 培养基(0、200 和 500 μ g L-Trp/mL)中继续培养 2 d, 每个浓度重复 3 次。测 OD_{600} 吸光值。剩下的菌液 10 000 r/min 离心 10 min, 取 500 μ L 上清液, 添加 2 mL Salkowski 试剂, 室温下暗反应 20 min, 测 OD_{535} 测吸光值^[13]。

1.3.6 分离菌株对植物病原菌广谱拮抗作用的初步测定:采用平板对峙生长法接种植物病原菌和分离的菌株, 在 PDA 平板中心接种直径为 7 mm 的植物病原菌(尖孢镰刀菌、稻梨孢菌、金黄壳囊孢菌、核盘菌、串珠镰刀菌、禾谷镰刀菌、灰葡萄孢菌、茄链格孢菌、立枯丝核菌、禾旋孢腔菌), 在距菌块 2.5 cm 处接种分离的菌株。对照为只接种病原菌的平板。28 °C 培养 3-5 d, 观察结果^[14]。

1.3.7 分离菌株促生效果的测定:采用浸种接种法, 将菌株在 LB 培养液中培养 12 h 的纯培养物 4 °C 离心收集菌体, 再用无菌水悬起得到菌悬液, 室温下将种子浸于菌悬液中, 对照为无菌水浸种,

2 d 后将发芽的种子移到花盆(2 kg 农田土)中, 每盆 10 粒种子, 每个处理 3 个重复, 每周浇一次菌液, 30 d 后测生菜植株高、叶片宽、植株鲜重及植株干重等指标^[15]。

1.3.8 分离菌株对小麦根腐病生防效果的初步评价: 将种植在蛭石一周龄的小麦苗从蛭石中取出, 洗净, 用石英砂揉搓小麦根部, 然后分别浸泡在无菌水和病原菌悬浮液中 2 h, 重新种植回去, 最后再分别浇分离菌株的菌液, 每天浇一次水和菌液。一周后观察实验结果^[16]。

1.3.9 数据处理与统计分析: 合成嗜铁素含量、溶解磷和合成 IAA 能力为平均值 \pm SE。运用 SPSS 软件对促生实验结果进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌的分离及鉴定

用 PDA 培养基筛选, 土样经过 80 °C 水浴 15 min 处理得到菌株 WXD 3-1 和 WXD 3-2。纯化后观察菌落形态, 菌株 WXD 3-1 菌落略呈黄色, 表面光滑; 菌株 WXD 3-2 菌落表面粗糙不透明, 呈白色。分离的 2 株菌均为革兰氏阳性杆状菌, 有鞭毛; 接触酶反应、明胶液化反应、淀粉水解、柠

檬酸盐实验均呈阳性; M.R 测定和吡啶实验均呈阴性。糖发酵和 V-P 测定中, 菌株 WXD 3-1 呈阴性, 菌株 WXD 3-2 呈阳性。

以 F₈ 和 R₁₅₄₁ 为引物对分离的 2 菌株进行 PCR 扩增, 得到大约 1.5 kb 的 16S rRNA 片段。以 UP-1F 和 UP-2R 为引物对分离的 2 株菌的 *gyrB* 基因进行 PCR 扩增, 得到大约 1.2 kb 的片段。送公司测序后, 进行 BLAST, 与已知原核序列进行比较。16S rRNA 序列分析结果显示菌株 WXD 3-1 序列与 *Bacillus megaterium* (HQ840732.1) 一致性达到 99%; 菌株 WXD 3-2 序列与 *Bacillus subtilis* (532532175) 一致性达到 99%。*gyrB* 基因序列分析结果显示菌株 WXD 3-1 序列与 *Bacillus megaterium* (365822233) 一致性达到 99%; 菌株 WXD 3-2 序列与 *Bacillus subtilis* (387165390) 一致性达到 99%。用 MEGA 4 做进化树见图 1 和图 2。结果显示, 菌株 WXD 3-1 与巨大芽孢杆菌在同一个分支, 菌株 WXD 3-2 与枯草芽孢杆菌在同一分支。再结合生理生化特征, 最后确定菌株 WXD 3-1 为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), WXD 3-2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

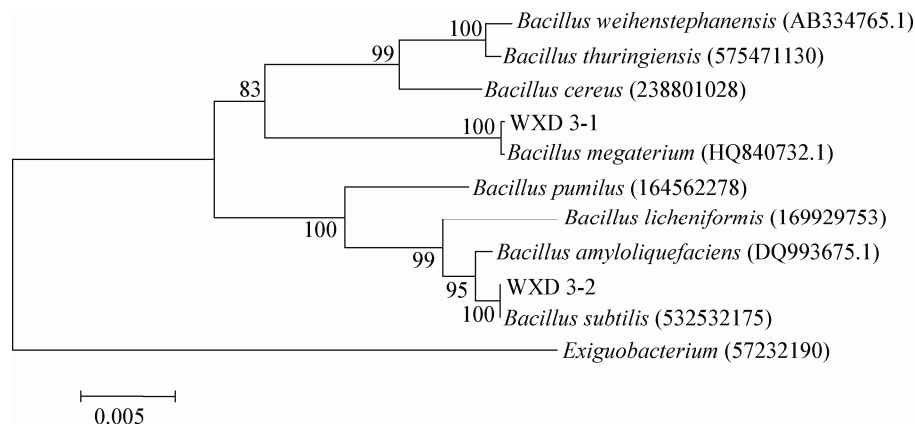


图 1 基于 16S rRNA 基因构建的分离菌株的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of isolates derived from 16S rRNA gene sequences

注: 分支点的数字为分支自展支持率(%); 括号中的序号为 GenBank 数据库中的登录号; 比例尺 0.005 代表序列分歧度。

Note: Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap (%); those in parentheses are the GenBank accession number. Bar 0.005 represents sequence divergence.

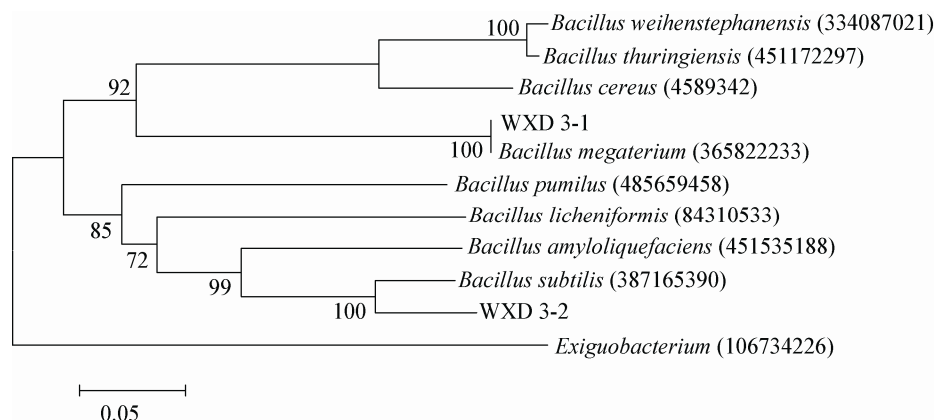


图2 基于 *gyrB* 基因构建的分离菌株的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of isolates derived from *gyrB* gene sequences

注：分支点的数字为分支自展支持率(%)；括号中的序号为 GenBank 数据库中的登录号；比例尺 0.05 代表序列分歧度。

Note: Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap (%); those in parentheses are the GenBank accession number. Bar 0.05 represents sequence divergence.

2.2 分离菌株嗜铁素合成含量的测定

将菌株点接种在 CAS 固体板上，在菌落周围可以产生橘黄色圈，说明该菌株可以合成嗜铁素。定量测定菌株合成嗜铁素能力， A/A_r 值代表嗜铁素的相对含量，该值越低，说明嗜铁素的含量越高。菌株 WXD 3-1 的 A/A_r 值为 0.61；WXD 3-2 的 A/A_r 值为 0.45 (图 3)。

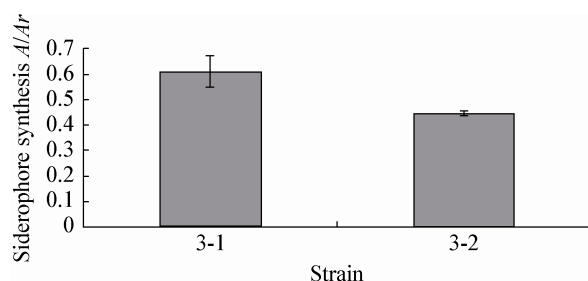


图3 分离菌株嗜铁素合成含量

Figure 3 Siderophore equivalent synthesis of bacterial isolates

2.3 分离菌株溶磷能力的测定

将菌株点接种在 NBRIP 固体板上，在菌落的周围产生透明圈，说明菌株有溶磷的能力。菌株接种在 NBRIP 液体培养基中培养 5 d，然后定量测定溶磷能力。菌株 WXD 3-1 溶磷能力为 93.20 mg/L；WXD 3-2 溶磷能力为 72.95 mg/L (图 4)。

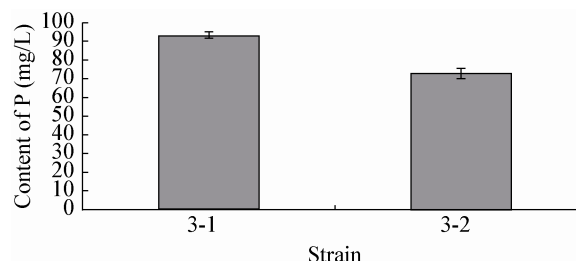


图4 分离菌株的溶磷测定

Figure 4 Phosphate solubilization capacity of bacterial isolates

2.4 分离菌株吲哚乙酸(IAA)合成含量的测定

两株菌均可以产生吲哚乙酸，随着色氨酸(L-Trp)浓度的增大，IAA 合成含量也相应增加。无论 L-Trp 浓度如何变化，菌株 WXD 3-1 合成吲哚乙酸的能力高于菌株 WXD 3-2 (图 5)。

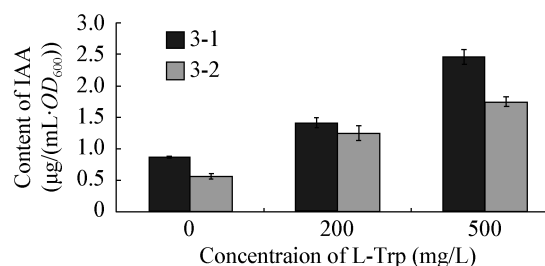


图5 分离菌株 IAA 的合成含量

Figure 5 The production of IAA by bacterial isolates of various concentration

2.5 分离菌株对植物病原菌广谱拮抗作用的初步测定

采用平板对峙生长法测定菌株对植物病原真菌的拮抗作用，结果表明菌株 WXD 3-2 能够抑制 10 种植物病原真菌的生长(图 6)，对植物病原真菌的拮抗作用具有广谱性，但 WXD 3-1 对植物病原真菌没有拮抗作用。

2.6 分离菌株促生效果评价

用菌株 WXD 3-1 及 WXD 3-2 处理生菜种子，30 d 后测量生菜植株高、叶片宽、植株鲜重及植株干重等指标(表 1)。植株高由 21.90 cm 增加到 26.61 cm 和 23.84 cm；叶片宽由 4.21 cm 增加到 5.32 cm 和 4.82 cm；植株鲜重由 1.87 g 增加到 2.64 g 和 2.12 g；植株干重由 0.05 g 增加到 0.07 g 和 0.06 g。植株株高、叶片宽、植株鲜重及植株干重均显著高于对照

($P<0.05$)，且菌株 WXD 3-1 比 WXD 3-2 的促生效果更加明显。

2.7 分离菌株对小麦根腐病生防效果的初步评价

通过菌株拮抗平板实验发现，菌株 WXD 3-2 对小麦根腐病病原菌有拮抗作用。初步评价菌株 WXD 3-2 对小麦根腐病的影响。实验分组：(1) CK 用石英砂破坏根部。(2) 用石英砂破坏根部，之后浸泡在病原菌菌悬液中 2 h。(3) 用石英砂破坏根部，之后浸泡在病原菌菌悬液中 2 h，再浇灌菌株 WXD 3-2 菌悬液。研究结果发现，只用致病菌禾旋孢腔菌处理的小麦苗根部发黑，叶子枯死，茎基出现黑斑。加入拮抗菌株 WXD 3-2 的小麦苗根部病斑减少，叶片水分含量较高，没有完全枯萎，茎基无病斑(图 7)。

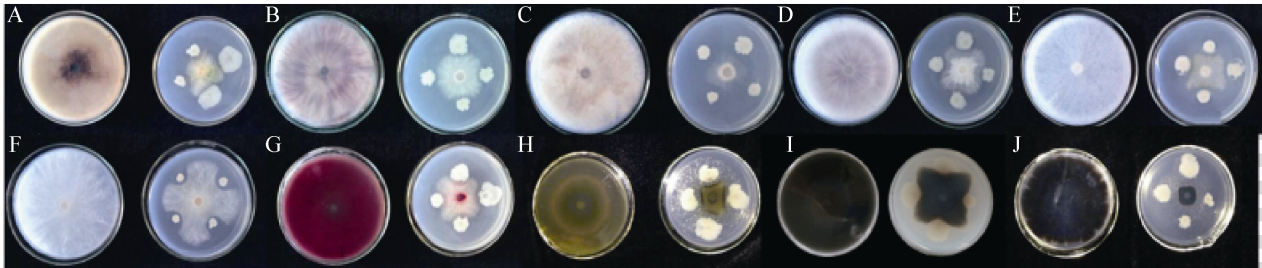


图 6 分离菌株 WXD 3-2 对病原菌的拮抗作用

Figure 6 Antagonism of strain WXD 3-2 against pathogenic fungi

注：A：立枯丝核菌；B：尖孢镰刀菌；C：灰葡萄孢菌；D：串珠镰刀菌；E：核盘菌；F：金黄壳囊孢菌；G：禾谷镰刀；H：茄链格孢菌；I：稻梨孢菌；J：禾旋孢腔菌。
Note：A: *Rhizoctonia solani*; B: *Fusarium oxysporum*; C: *Botrytis cinerea*; D: *Fusarium moniliforme*; E: *Sclerotinia sclerotiorum*; F: *Cytospora chrysosperma*; G: *Fusarium graminearum*; H: *Alternaria solani*; I: *Pyricularia oryzae*; J: *Cochliobolus sativus*.

表 1 不同菌株处理对生菜生长的影响								
Table 1 Growth promotion of lettuce by inoculation different strains								
处理 Treatment	植株高 Plant height (cm)	较 CK 增加	叶片宽 Width of leaf (cm)	较 CK 增加	植株鲜重 Fresh weight (g)	较 CK 增加	植株干重 Dry weight (g)	较 CK 增加
		百分比 Increase rate compared with CK (%)		百分比 Increase rate compared with CK (%)		百分比 Increase rate compared with CK (%)		百分比 Increase rate compared with CK (%)
CK	21.90±1.79c	0	4.21±0.52b	0	1.87±0.20c	0	0.05±0.01b	0
+WXD 3-1	26.61±1.12a	21.51	5.32±0.36a	31.93	2.64±0.23a	41.30	0.07±0.01a	42.76
+WXD 3-2	23.84±1.36b	8.88	4.82±0.61a	14.51	2.12±0.22b	13.58	0.06±0.01a	26.35

注：同列字母相同者表示差异不显著，不同字母表示显著水平 $P<0.05$ 。
Note: Same denomitor in each transaction indicates difference prominence, different denomitors indicate prominence level $P<0.05$.



图7 分离菌株 WXD 3-2 对小麦根腐病的生防效果
Figure 7 Effects of inoculum concentrations of WXD 3-2 on control of *Cochliobolus sativus*

注: A: 禾旋孢腔菌+菌株 WXD 3-2; B: 禾旋孢腔菌; C: CK.
Note: A: *Cochliobolus sativus* + Strain WXD 3-2; B: *Cochliobolus sativus*; C: CK.

3 讨论

植物根际促生菌(PGPR)一般通过溶磷、固氮、产生生长激素等机制促进植物生长^[1]。其中芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是目前已报道的根际促生菌的重要类群^[17]。本研究分离纯化出 2 株菌,经过形态学、生理生化、16S rRNA 及 *gyrB* 基因鉴定,确定菌株 WXD 3-1 为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), WXD 3-2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。2 株菌均有合成吲哚乙酸(IAA)和嗜铁素能力及溶解磷的能力,用分离的 2 株菌处理生菜,植株高、叶片宽和植株鲜重及植株干重均显著增加($P<0.05$)。用对小麦根腐病病原菌具有拮抗作用的菌株 WXD 3-2 处理染病小麦,小麦根腐病病症减轻。

铁元素是生命物质的基础,但土壤中能够被生物直接利用的铁元素很少,PGPR 可以合成嗜铁素与铁结合,从而被植物利用^[18]。Ben 等^[19]研究发现,荧光假单胞菌产生的嗜铁素能够有效地抑制康乃馨镰刀菌枯萎病的发生,说明嗜铁素在植物生长

及病害防治起到重要作用。Husen 等^[20]研究发现 UW85 芽孢杆菌能够产生嗜铁素,作为高效的 PGPR,可以提高农作物产量。本研究分离出的 WXD 3-2 合成嗜铁素的相对含量为 0.45,而菌株 WXD 3-1 合成嗜铁素相对含量为 0.61, A/A_r 值代表嗜铁素的相对含量,一般产嗜铁素能力高的细菌 A/A_r 值低于 0.5^[9]。因此推断,菌株 WXD 3-2 能够抑制多种植物病原菌的生长,且菌株 WXD 3-2 对植物病原真菌有光谱拮抗能力,其机制可能源于菌株较高的合成嗜铁素能力。研究人员已从棉花、玉米、小麦、番茄、黄瓜、马铃薯等农作物根际土中分离出具有拮抗作用的芽孢杆菌。黎起秦等曾报道过枯草芽孢杆菌 B47 对番茄青枯病有较好的防治作用^[21]。由于菌株 WXD 3-2 对小麦根腐病病原菌有抑制作用,用其处理致病的小麦。研究结果显示,与对照组只加病原菌的小麦相比,根部病斑减少,叶片水分含量较高,没有完全枯萎,茎基无病斑。

土壤中磷含量高低也是影响植物生长的关键因素,其中只有无机磷可以被植物利用,且 95% 以上的磷为无效磷,植物很难利用^[22]。能够溶解磷的细菌可以促进植物更好地吸收无机磷,从而促进植物生长。Seshadri 等^[23]发现 3 株芽孢杆菌有溶解磷的能力,能够促进植物生长。本研究分离的 2 株菌均有溶磷能力,而且都促进了植物生长。吲哚乙酸(IAA)是一种重要的植物激素,大部分 PGPR 均能够产生 IAA,它可以促进植物根系生长发育^[24]。Swain 等^[25]报道接种能够产生 IAA 的枯草芽孢杆菌,促进了薯蓣科植物(*Dioscorea rotundata* L.)的生长。从茶树根际土中分离出的巨大芽孢杆菌是能够溶解磷酸盐,产生 IAA,嗜铁素和抗真菌的代谢产物,该菌能够促进植物生长,有效减少疾病的发病率^[26]。用本研究分离出的 2 株芽孢杆菌处理生菜,与未接菌处理的对照相比植株高增加 21.51%和 8.88%;叶片宽增加 31.93%和 14.51%;植株鲜重增加 41.30%和 13.85% 植株干重增加 42.76%和 26.35%。筛选出的 2 株芽孢杆菌是 PGPR 的重要组成部分,PGPR 溶解磷和合成 IAA 均可以促进

植物生长。分离出 2 株芽孢杆菌 IAA 合成能力和溶解磷能力 WXD 3-1 均高于菌株 WXD 3-2, 且菌株 WXD 3-1 的促生效果与对照相比较菌株 WXD 3-2 显著。因此推断, 本研究分离的 2 株芽孢杆菌的促生原因可能是通过产生溶解磷和合成 IAA 进而促进植物生长。

本研究筛选出 2 株芽孢杆菌 WXD 3-1 和 WXD 3-2, 对生菜的生长均有促进作用。另外菌株 WXD 3-2 对植物病原真菌有广谱的拮抗作用。菌株 WXD 3-2 可以一定程度上缓解小麦根腐病病症。其促生机理及对植物病害的防治能力还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Monteiro FP, Ferreira LC, Pacheco LP, et al. Antagonism of *Bacillus subtilis* against *Sclerotinia Sclerotiorum* on *Lactuca sativa*[J]. Journal of Agricultural Science, 2013, 5(4): 214-223.
- [2] 程洪斌, 刘晓桥, 陈红漫. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展[J]. 上海农业学报, 2006, 22(1): 109-112.
- [3] Kloepper JW, Leong T, Teintze M, et al. Enhanced plant growth by siderophones produced by plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. Nature, 1980, 286: 885-886.
- [4] 陈阳, 朱天辉, 朴春根, 等. 解磷芽孢杆菌的筛选及其解磷能力的测定[J]. 贵州林业科技, 2008, 36(2): 17-24.
- [5] 孟宪法, 隆小华, 康健, 等. 菊芋内生固氮菌分离、鉴定及特性研究[J]. 草业学报, 2011, 20(6): 157-163.
- [6] 薛恒平. 微生态制剂浅析[J]. 饲料工业, 1996, 17(1): 30-35.
- [7] Saidi N, Kouki S, M'Hiri F, et al. Characterization and selection of *Bacillus* sp. strains, effective biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, the causal agent of *Fusarium* crown and root rot in tomato[J]. Annals of Microbiology, 2009, 59(2): 191-198.
- [8] George MG, Julia AB, Timothy GL. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition[M]. New York Berlin Heidelberg: Springer, 2004.
- [9] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160: 47-56.
- [10] 王平, 董飏, 李阜棣, 等. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326.
- [11] Nguyen C, Yan W, Tacon F, et al. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P. D. Orton[J]. Plant and Soil, 1992, 43: 193-199.
- [12] 张祥胜. 钼锑抗比色法测定磷细菌发酵液中有磷含量测定值的影响因素分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 4822-4823.
- [13] 李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 等. 珠芽蓼内生菌 Z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定[J]. 草业学报, 2010, 19(2): 61-68.
- [14] Gajbhiye A, Alok R, Meshram SU, et al. Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*[J]. World Journal Microbiology Biotechnology, 2010, 26(7): 1187-1194.
- [15] 赵骥民, 辛树权, 何正飏, 等. 碱胁迫下 PGPR 菌株对水稻萌发及水稻幼苗生长的促生作用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(34): 11060-11062.
- [16] Liu B, Huang L, Kang ZS. Evaluation of endophytic bacterial strains as antagonists of take-all in wheat caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in greenhouse and field[J]. Journal of Pest Science, 2011, 84(3): 257-264.
- [17] Hafeez FY, Yasmin S, Ariani D. Plant growth promoting bacteria as biofertilizer[J]. Agronomy Sustainable Development, 2006, 26: 143-150.
- [18] 余贤美, 郑服丛. 嗜铁素在促进植物生长及病害防治等方面的应用[J]. 中国农学通报, 2007, 23(8): 507-509.
- [19] Ben JD, Jan WM, Peter AH, et al. Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp.[J]. Netherlands Journal of Medicine, 1993, 99(5/6): 277-289.
- [20] Husen E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*[J]. Indonesian Journal of Agricultural Sciences, 2003, 4(Suppl 1): 27-31.
- [21] 黎起秦, 罗宽, 林纬, 等. 内生菌 B47 的定殖能力及其对番茄青枯病的防治作用[J]. 植物保护学, 2006, 3(4): 363-368.
- [22] Hong W, Adhityan A, John SG. Modeling of phosphorus dynamics in aquatic sediments: II-examination of model performance[J]. Water Research, 2003, 37(16): 3939-3953.
- [23] Seshadri S, Ignacimuthu S, Vadivelu M, et al. Inorganic phosphate solubilization by two insect pathogenic *Bacillus* sp.[J]. Developments in Plant and Soil Sciences, 2007, 102: 351-355.
- [24] Brturk Y, Ercisli S, Haznedar A, et al. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings[J]. Biological Research, 2010, 43(1): 91-98.
- [25] Swain MR, Naskar SK, Ray RC. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisets by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora[J]. Polish Journal of Microbiology, 2007, 56(2): 103-110.
- [26] Chakraborty U, Chakraborty B, Basnet M. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2006, 46(Suppl 3): 186-195.