

研究报告

耐低温荧光假单胞菌筛选体系建立及其植物促生作用评价

王超^{1,2} 李宏伟¹ 谢越盛¹ 郭坚华^{1*}

- (1. 南京农业大学植物保护学院植物病理学系江苏省生物源农药工程中心 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室(南京农业大学) 江苏 南京 210095)
(2. 环境保护部南京环境科学研究所 江苏 南京 210042)

摘要:【目的】以前期研究小麦生境分离细菌为菌株库,从中筛选耐低温菌株,评价其植物促生效果。【方法】通过4℃低温培养筛选耐低温菌株。以产吡啶乙酸、1-氨基环丙烷羧酸(ACC)脱氨酶、嗜铁素以及无机、有机磷溶解能力为评价指标,测定15℃和28℃环境中耐低温菌株的植物促生作用潜力,利用赋分评估系统选定潜力菌株进行温室和田间试验验证其植物促生作用。【结果】筛选到34株耐低温菌株,从中选定的8株植物促生潜力细菌温室试验促生效果和评估分值之间的相关性在0.62以上,菌株1bYB22和3bJN2在28℃环境中对黄瓜的促生效果均在28%以上,二者在15℃环境中对青菜种子根长的促生效果分别为116.76%和46.82%,菌株1bYB22在15℃环境中对青菜的促生效果为25.11%。菌株1bYB22在田间应用对小麦生长同样具有促生作用,增产效果达0.58%。【结论】研究建立的筛选体系从小麦生境分离菌株中获得了耐低温荧光假单胞菌株1bYB22和3bJN2,两株细菌在15℃和28℃均具有植物促生作用,同时可以在田间促进小麦生长。

关键词: 耐低温, 荧光假单胞菌, 赋分评估系统, 植物促生作用

Construction of screening system for cold tolerant *Pseudomonas fluorescens* for plant growth-promotion

WANG Chao^{1,2} LI Hong-Wei¹ XIE Yue-Sheng¹ GUO Jian-Hua^{1*}

- (1. Department of Plant Pathology, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Engineering Center of Bioresource Pesticide in Jiangsu Province, Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests (Nanjing Agricultural University), Ministry of Education, Nanjing, Jiangsu 210095, China)
(2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection of PR China, Nanjing, Jiangsu 210042, China)

Abstract: [Objective] We previously isolated bacterial strains from winter wheat habitats, now, we

Foundation item: Jiangsu Agricultural Science and Technology Independent Innovation Guiding Fund Project (No. CX(15)1044); Major Project of National Science and Technology (No. 2014ZX07206001); Cooperative Prospective Projects of Jiangsu Province Science and Technology Office (No. BY2014128-05)

***Corresponding author:** Tel: 86-25-84395312; Fax: 86-25-84395425; E-mail: jhguo@njau.edu.cn

Received: January 07, 2016; **Accepted:** June 02, 2016; **Published online** (www.cnki.net): June 08, 2016

基金项目: 江苏省农业科技自主创新引导资金项目(No. CX(15)1044); 国家重大科技专项项目(No. 2014ZX07206001); 江苏省科技厅产学研合作前瞻性项目(No. BY2014128-05)

***通讯作者:** Tel: 86-25-84395312; Fax: 86-25-84395425; E-mail: jhguo@njau.edu.cn

收稿日期: 2016-01-07; **接受日期:** 2016-06-02; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-06-08

will screen cold tolerant strains from those isolates and assess their plant growth-promoting potential. **[Methods]** We screened cold tolerant strains on nutrient agar plates incubated at 4 °C, determined these cold tolerant strains' plant growth-promoting attributes such as indole-3-acetic acid (IAA) production, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase production, inorganic and organic phosphate solubilization and siderophores production, selected strains with good potential according to the assessment system established here, and then tested their plant biomass increase effects at different temperatures based on bioassay experiments. **[Results]** We screened 34 cold tolerant strains from those isolates. For the selected 8 strains with good potential, the correlation coefficient indicating coincident relationship between the assessed growth promoting potential and the increase effect on plants in greenhouse condition was more than 0.62. Among them, 1bYB22 and 3bJN2 exhibited more than 28% increase effect on shoot weights of cucumber incubated at 28 °C, and seed bacterization with 1bYB22 and 3bJN2 also increased non-heading Chinese cabbage's root lengths with 116.76% and 46.82% at 15 °C, respectively. And 1bYB22 exhibited 25.11% increase effect on shoot weights of non-heading Chinese cabbage incubated at 15 °C. Field testing of the 1bYB22 inoculum in wheat also showed significant increase in growth and yield. **[Conclusion]** Through the screening system established in this study, we obtained cold tolerant *P. fluorescens* strains 1bYB22 and 3bJN2 from wheat habitat isolates, and these two bacterial strains both exhibited plant growth-promoting effect at 15 °C and 28 °C and promoted the growth of wheat in the field.

Keywords: Cold tolerant, *Pseudomonas fluorescens*, Assessment system, Plant growth promotion

温带地区的农业生态系统常处于亚适温环境, 植物和微生物会遭受低温胁迫, 因此该类地区农作物生长季节短^[1], 耐低温微生物由此体现出重要的农业应用意义。尽管这类微生物的最适增殖温度在常温范围, 它们在零上低温仍然能够增殖^[2]。因此, 有必要发掘和鉴定亚适温环境中能保持正常活力的微生物, 这些微生物作为接种菌用于全球温带地区的农业生产将发挥重要作用。

地球上高山土壤环境的特点是物理、生化因子存在明显的季节变化^[3], 低温居多, 耐低温微生物在高山及亚高山地区非常常见, 以耐低温细菌为主^[1]。Pandey 等^[4]在印度中部喜马拉雅亚高山山脉分离到了耐低温的具有溶磷、拮抗病原菌作用的恶臭假单胞菌。Negi 等^[5]在印度喜马拉雅山脉 Garhwal 地区鉴定到的假单胞菌能够分泌嗜铁素, 具有植物促生作用。多数关于分离自高山及亚高山地区耐低温细菌的研究都有假单胞菌的报道^[1], 并且假单胞菌通常具有植物促生作用, 同时能够增强植物对于病原物和非生物胁迫的抗性^[6], 称作植物促生细菌(Plant growth-promoting bacteria,

PGPB)^[7] 或植物根围促生细菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)^[8]。因此, 分离和鉴定 PGPR 或 PGPB 类耐低温假单胞菌用于改善温带地区的农业生产力非常具有现实意义。

纵观假单胞菌 PGPR 或 PGPB 特性的报道, 其植物促生作用机制主要包括以下几点: (1) 产生大量的植物激素吲哚-3-乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)^[9]; (2) 增强土壤养分的矿化及溶解, 尤其是不溶性磷酸盐类^[10]; (3) 分泌大量嗜铁素增进植物铁吸收^[11]; (4) 分泌 1-氨基环丙烷羧酸(1-Aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶降低植物根系乙烯含量^[12]。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)作为一种重要的生防细菌, 可通过抑制病原菌的发生、诱导系统抗性、产生植物激素、提高植物生长量等促进植株的生长发育^[13], 是微生物肥料和生防制剂生产中最常见也是最重要的菌种之一^[14]。Saravanakumar 和 Samiyappan^[15]发现番茄(*Lycopersicon esculentum*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)植株接种 *P. fluorescens* 92rk、P190r 后其根系总长度、总表面积及总体积

显著上升。张鹏等^[13]同样发现 *P. fluorescens* 能显著促进樱桃幼苗生长。前期研究中我们针对小麦全蚀病、赤霉病及茎基腐病的生物防治从小麦生境中分离了一批荧光假单胞菌^[16-17], 本研究进一步从中筛选耐低温菌株, 评价其植物促生作用潜力, 并选定潜力菌株进行温室和田间试验测定其植物促生效果。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

2,4-二硝基苯肼、高氯酸、 α -丁酮酸、牛血清蛋白、乙醇、次氯酸钠, 购自南京寿德试验器材有限公司。

RDN-350-5C 型人工气候箱, 宁波东南仪器有限公司; ULT1786-4-V41 超低温冰箱, 北京隆盛科技科技发展有限公司; 普通天平, 艾德姆衡器(武汉)有限公司; ZHWY-2102C 恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 供试菌株及培养条件

853 株细菌菌株系前期研究从我国江苏省和河南省小麦生境(根围土、根内、茎表、茎内、叶表、叶内)中分离保存^[16-17], 取保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的荧光假单胞菌菌株划线培养于 LB 平板培养基, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 活化 24 h 后转接于全营养琼脂平板培养基^[18]于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养, 观察 48 h 内的生长情况。

耐低温荧光假单胞菌菌株划线培养于 LB 平板培养基, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 活化 24 h 后转接于 LB 培养液中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 24 h 成种子液。以 1:100 的比率在 LB 培养液中扩繁。 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 扩繁 24 h 后所得菌液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1\ 818\times g$ 离心 10 min。所得菌体用无菌 0.85% NaCl 溶液重悬成约 5×10^7 CFU/mL 供温室试验使用, 所得菌体用无菌 LB 培养液重悬成 5×10^8 CFU/mL 供田间试验使用。

蜡质芽胞杆菌(*Bacillus cereus*) AR156 (菌株保藏编号: CGMCC No. 1929)从江苏省南京市下马坊菜园土壤中分离获得, 枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*) SM21 (菌株保藏编号: CGMCC No. 2058)和沙雷

氏菌(*Serratia* sp.) XY21 (菌株保藏编号: CGMCC No. 2059)从江苏省镇江市森林土壤中分离获得, 并鉴定保存。取保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的生防菌菌株 AR156、SM21 和 XY21 划线培养于 LB 平板培养基。在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后转接于 LB 培养液中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 24 h 成种子液。以 1:100 的比率在 LB 培养液中扩繁。 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 扩繁 24 h, 所得菌液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1\ 818\times g$ 离心 10 min, 将浓度均调成 5×10^8 CFU/mL 后以 1:1:1 混合即得 BBS 菌剂。

1.3 耐低温菌株植物促生潜力评价

分别在 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养温度下测定耐低温菌株产 IAA、嗜铁素、ACC 脱氨酶以及无机、有机磷溶解能力。

对于产 IAA 的定性测定, 在菌株划线 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养的平板上滴加 5 mL Salkowski 试剂^[19], $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 黑暗保温 15 min, 平板表层溶液变红说明能够产生 IAA, 再参照 Patten 和 Glick 的方法^[20]进行定量测定。

对于产嗜铁素活性测定, 菌株活化后分别点接于 CAS 平板培养基^[21]上, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养, 分别观察菌落周围的透明圈。

对于产 ACC 脱氨酶活性的定性测定, 菌株活化后接种于 SMA 固体培养基^[22], $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养, 选取传代 5 次后能够在 ACC 为唯一氮源的培养基上生长的菌株为产 ACC 脱氨酶阳性菌株, 然后按下述方法进行定量测定。菌株在 LB 培养液中 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 24 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 菌体用 SM 培养液洗涤离心 2 次, 然后菌体悬浮于 SMA 培养液, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 24 h; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)洗涤离心 2 次, 重新悬浮于 600 μL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液中(pH 8.5); 加入 30 μL 甲苯并迅速振荡 30 s 以破碎细胞; 取 100 μL 粗酶液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存用于测定蛋白浓度, 其余粗酶液进行 ACC 脱氨酶活性测

定。取粗酶液 200 μL 加入 0.5 mol/L ACC 20 μL 混匀, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 15 min, 加入 1 mL 0.56 mol/L HCl 终止反应, 12 000 r/min 离心 5 min; 取上清 1 mL 加入 800 μL 0.56 mol/L HCl 和 300 μL 0.2% 2,4-二硝基苯肼溶液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min; 加入 2 mL 2 mol/L NaOH 溶液混匀, 540 nm 测吸光度值。对照 α -丁酮酸标准曲线和蛋白测定标准曲线计算菌株的酶活性。ACC 脱氢酶活性表示方法为: 反应条件下, 每毫克菌体蛋白每小时催化 ACC 脱氢形成 α -丁酮酸的微摩尔数, 单位为 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$ 。通过 Bradford 比色法测定蛋白质含量, 以牛血清蛋白为标准物绘制标准曲线, 计算获得线性方程。

对于不溶性磷溶解能力测定, 菌株活化后分别点接于 Pikovskaya 平板培养基(无机磷测定)^[23]和 PSM 平板培养基(有机磷测定)^[24], 15 $^{\circ}\text{C}$ 和 28 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 3–7 d 后分别观察菌落周围的透明圈。

建立赋值系统, 便于直观反映耐低温菌株的植物促生潜力, 具体如下: 以 CAS 平板、Pikovskaya 平板和 PSM 平板上透明圈的大小判定菌株产嗜铁素以及无机磷、有机磷溶解能力的大小, 没有透明圈或不能合成 IAA 及 ACC 脱氢酶, 赋 0 分; 透明圈直径 1–5 mm 或合成 IAA 浓度 1–6 mg/L 或合成 ACC 脱氢酶活性 0–0.5 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$, 赋 1 分; 透明圈直径 5.1–10 mm 或合成 IAA 浓度 6–15 mg/L 或合成 ACC 脱氢酶活性 0.5–1 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$, 赋 2 分; 透明圈直径 10 mm 以上或合成 IAA 浓度 16 mg/L 以上或合成 ACC 脱氢酶活性 1 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$ 以上, 赋 3 分; 各项评估赋分加和即得菌株植物促生潜力总分。

1.4 耐低温菌株植物促生温室试验

青菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee cv. Aijiaohuang] 种子经表面消毒(70%乙醇浸泡 3 min, 然后用 2% 次氯酸钠溶液浸泡 5 min, 最后无菌水浸洗 3 次,

每次 1 min)后浸泡在菌悬液中, 以 0.85% NaCl 溶液为对照, 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5 min, 然后用无菌水浸洗 2 次, 每次 1 min, 备用。试验 1: 将种子平铺在 2.25% 水琼脂平板上, 每板 10 粒种子, 每个处理 3 个平板, 独立重复 3 次; 平板竖直放置于 15 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养, 6 d 后测量根长。试验 2: 将种子播种于塑料穴盘中(装有高温灭菌处理的营养土, 组分为东北黑土和蛭石, 二者以 3:1 (体积比)均匀混合; 东北黑土的理化性质: 有机质含量 34.87 ± 1.56 g/kg, 总氮含量 84.33 ± 10.19 mg/kg, 总磷含量 4.13 ± 0.47 mg/kg, 总钾含量 529.67 ± 39.11 mg/kg, pH 6.64 ± 0.08 , 每个处理 1 盘(45 株苗), 独立重复 3 次; 置于培养箱 15 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 光照时间 16 h, 光照强度为 6 000 lx; 培养 20 d 后每株青菜幼苗浇灌 5 mL 菌悬液, 以 0.85% NaCl 溶液为对照; 继续培养 30 d 后测定地上部生物量。

黄瓜(*Cucumis sativus* L. cv. Jinyou No. 1)种子经表面消毒后浸泡在菌悬液中, 以 0.85% NaCl 溶液为对照, 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5 min, 然后用无菌水浸洗 2 次, 每次 1 min, 然后将种子播种于容积 355.46 cm^3 的一次性塑料杯子中(装有无菌营养土), 每个处理 24 株苗, 独立重复 3 次; 置于温室 28 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 光照时间 16 h, 光照强度为 6 000 lx; 培养 15 d 后每株青菜幼苗浇灌 10 mL 菌悬液, 以 0.85% NaCl 溶液为对照; 继续培养 15 d 后测定地上部生物量。

1.5 耐低温菌株 1bYB22 和 3bJN2 植物促生作用田间试验

田间试验选取小麦(鲁麦 23 号)为供试植物, 试验田位于山东省临沂市费县石井镇大安村 (35.07°E , 117.67°N), 田块前茬种植作物为玉米, 土壤养分含量: 氮 8.40 mg/kg, 磷 38.00 mg/kg, 钾 80.00 mg/kg, pH 7.11。

1bYB22 和 3bJN2 菌悬液分别以清水稀释 10 倍作为浸种液, 多菌合剂 BBS 稀释 50 倍作为浸种液, 清水作对照, 将小麦种子置于上述浸种液和

清水中室温(约 18 °C)浸种 5 min, 滤出小麦种子后到田间播种。撒播播种, 行间距 25 cm, 每处理(1bYB22、3bJN2、BBS 和清水对照)播种 4 行, 每处理播种 10 m² (播种行长 10 m), 每处理 3 个重复, 随机区组排列。小区间间隔 40 cm, 并起垄作为隔离带。撒播前播种沟底浇适量水, 覆土, 踩实。返青后和扬花期分别进行菌剂浇灌处理(同浸种液), 每株小麦平均 10 mL, 对照组以清水代替。除菌剂处理外, 各处理组田间管理措施相同。分别于出苗期和拔节期以五点取样法进行促生效果调查(地上部、地下部生物量及叶片数), 收获前 5 点调查每 m² 有效穗数, 并取样进行室内考种(穗长、穗粒数和千粒重)。

1.6 数据分析

耐低温菌株植物促生性质以及青菜、黄瓜、小麦生物量等数据由 Microsoft Excel 2007 统计分析, 显著水平由 DPS v 7.05 获得; 菌株植物促生潜力总分与实际促生效果的相关性系数由 Microsoft Excel 2007 获得。

2 结果与分析

2.1 耐低温细菌的筛选

以上述 853 株小麦生境分离细菌为菌株库, 通过观察它们在 4 °C 环境中全营养琼脂平板培养基上的生长情况, 选取能够在 48 h 内正常形成菌落的菌株, 共获得 34 株耐低温菌株(表 1)。

2.2 耐低温菌株植物促生作用潜力评价

以产 IAA、ACC 脱氨酶、嗜铁素, 溶解无机、有机磷能力为评价指标, 分别在 15 °C 和 28 °C 环境中测定了 34 株耐低温菌株的产 IAA、ACC 脱氨酶、嗜铁素活性以及溶解无机、有机磷能力。结果发现, 除不能分泌嗜铁素外, 菌株 1bYB22 在两种温度环境中具有上述所有特性, 其在 15 °C 和 28 °C 环境中合成的 IAA 分别为 16.18、36.30 mg/L; 菌株 3bJN2 在 28 °C 环境中合成的 IAA 达 29.64 mg/L, 此外, 10 个菌株在两种温度环境中都能合成 IAA, 4 个菌株不能合成 IAA; 菌株

4aYN9 在 28 °C 环境中合成 ACC 脱氨酶的活性高达 1.89 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$, 1bYB22 等 5 个菌株在两种温度环境中都能合成 ACC 脱氨酶; 1bYB22 等 8 个菌株在两种温度环境中同时具有溶解无机、有机磷能力, 5 个菌株没有溶磷能力; 4aYB2 等 10 个菌株在两种温度环境中都能合成嗜铁素。根据耐低温菌株在培养平板上形成的透明圈大小以及合成 ACC 脱氨酶活性、IAA 的浓度, 对菌株植物促生潜力评估赋分, 结果如表 2 所示。

2.3 耐低温菌株植物促生作用温室试验

根据耐低温菌株植物促生潜力评估得分情况, 选取了总分 9 分(含)以上的菌株(1bYB22、3bJN2、2aGN9、2aJB15、1bYB11、3bT16、3aYB8 和 4aT6)进行温室试验。青菜种子播种 50 d 后进行结果统计, 发现菌株 1bYB22 对青菜生长具有显著促生作用, 促生效果达 25.11%, 菌株 3bT16、3aYB8 和 4aT6 没有促生作用(图 1A II, 表 3, 图 2A); 青菜种子在水琼脂平板上黑暗生长了 6 d, 统计发现菌株 1bYB22 和 3bJN2 处理组的根长显著高于对照组, 前者促生效果达 116.76%, 菌株 1bYB11、3aYB8 和 4aT6 没有促生作用(图 1B, 表 3, 图 2B); 黄瓜种子播种 25 d 后进行结果统计, 发现菌株 1bYB22、3bJN2、1bYB11 和 3bT16 对黄瓜生长具有显著促生作用, 其中菌株 3bJN2 促生效果达 28.87%, 仅菌株 4aT6 没有促生作用(图 1A I, 表 3, 图 2C)。

基于耐低温菌株的产 IAA、ACC 脱氨酶、嗜铁素以及无机、有机磷溶解能力, 构建了评估系统用于温室试验前评价菌株的植物促生潜力, 为了验证该系统的有效性, 我们分析了 8 个菌株在温室试验中的实际促生作用与植物促生潜力之间的相关性。结果发现, 对于 15 °C 温室土壤培养的青菜, 该相关性系数为 0.85 (图 2A); 对于 15 °C 水琼脂平板培养的青菜, 该相关性系数为 0.83 (图 2B); 对于 28 °C 温室土壤培养的黄瓜, 该相关性系数为 0.62 (图 2C)。

表 1 耐低温荧光假单胞菌菌株信息
Table 1 Cold-tolerant fluorescent *Pseudomonads* screened and obtained in this study

菌株 Strains	来源 Source
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 3bGN4	河南小麦根 Root of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 3aYB7	江苏小麦叶表 Surface of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2bJN5	河南小麦茎内 Interior of stems of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4aYN9	江苏小麦叶内 Interior of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 3bJN4	河南小麦茎内 Interior of stems of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2aYN7	江苏小麦叶内 Interior of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4aYN8	江苏小麦叶内 Interior of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1bYB14	河南小麦叶表 Surface of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4aYN6	江苏小麦叶内 Interior of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2bJN3	河南小麦茎内 Interior of stems of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1bYB22	河南小麦叶表 Surface of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4aYB2	江苏小麦叶表 Surface of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2aGN9	江苏小麦根 Root of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 3aGN1	江苏小麦根 Root of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2bGN6	河南小麦根 Root of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4aGN7	江苏小麦根 Root of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 3aYB8	江苏小麦叶表 Surface of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2aT19	江苏小麦根围土 Rhizosphere soil of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4aYN12	江苏小麦叶内 Interior of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2bJN7	河南小麦茎内 Interior of stems of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2bJN6	河南小麦茎内 Interior of stems of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 3bT14	河南小麦根围土 Rhizosphere soil of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 3bJN2	河南小麦茎内 Interior of stems of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1bYB44	河南小麦叶表 Surface of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 3bT16	河南小麦根围土 Rhizosphere soil of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1bYB20	河南小麦叶表 Surface of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2aJN6	江苏小麦茎内 Interior of stems of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1bYB57	河南小麦叶表 Surface of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2bGN8	河南小麦根 Root of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2bJN1	河南小麦茎内 Interior of stems of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2aJB15	江苏小麦茎表 Surface of stem of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4aT6	江苏小麦根围土 Rhizosphere soil of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2aYB8	江苏小麦叶表 Surface of leaves of wheat
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1bYB11	河南小麦叶表 Surface of leaves of wheat

表 2 耐低温假单胞菌菌株植物促生潜力评估
Table 2 Plant growth promotion attributes of cold tolerant *Pseudomonads* at different temperatures

菌株 Strains	产 ACC 脱氨酶		产吲哚乙酸		无机磷溶解		有机磷溶解		产嗜铁素		植物促生潜力
	ACC deaminase production		IAA production		Inorganic phosphate solubilisation		Organic phosphate solubilisation		Siderophores production		Assessed growth promoting potential
	28 °C	15 °C	28 °C	15 °C	28 °C	15 °C	28 °C	15 °C	28 °C	15 °C	
1bYB22	1	1	3	3	1	1	2	2	0	0	14
4aYB2	1	1	0	1	0	0	0	0	3	1	7
2aGN9	0	0	1	0	2	1	2	3	1	0	10
3aGN1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	4
2bGN6	0	0	0	1	1	1	0	0	2	0	5
2bJN7	0	0	1	0	1	1	0	0	3	1	7
2bJN6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
3bT14	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	4
3bJN2	0	0	3	0	1	3	1	3	0	0	11
1bYB44	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	7
3bT16	1	0	1	1	1	1	2	3	2	0	12
1bYB20	1	0	1	0	1	1	0	2	0	0	6
2aJN6	0	0	0	1	0	0	0	1	3	0	5
1bYB57	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	4
2bGN8	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	5
2aJB15	1	0	1	1	1	2	1	2	2	0	11
4aT6	0	0	1	0	2	2	2	2	0	0	9
2aYB8	1	0	1	1	0	0	1	1	3	0	8
1bYB11	1	0	1	0	1	2	1	3	2	0	11
4aGN7	2	0	1	0	2	2	1	0	0	0	8
3aYB8	2	0	1	0	2	2	1	1	0	0	9
2aT19	0	0	1	0	1	1	1	0	3	1	8
3bGN4	0	0	0	1	1	1	0	0	2	0	5
3aYB7	1	0	1	1	1	0	1	2	0	0	7
2bJN5	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	4
4aYN9	3	1	1	1	0	1	0	1	0	0	8
3bJN4	1	0	1	1	1	1	0	0	2	1	8
2aYN7	0	0	0	1	0	1	0	1	2	1	6
4aYN8	0	0	0	1	0	0	0	1	2	2	6
1bYB14	1	0	1	1	0	0	0	0	3	0	6
4aYN6	2	0	0	0	2	2	0	0	1	0	7
2bJN3	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	4
2bJN1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	4
4aYN12	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	7

注：没有透明圈或不能合成 IAA 及 ACC 脱氨酶，赋 0 分；透明圈直径 1–5 mm 或合成 IAA 浓度 1–6 mg/L 或合成 ACC 脱氨酶活性 0–0.5 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$ ，赋 1 分；透明圈直径 5.1–10.0 mm 或合成 IAA 浓度 6–15 mg/L 或合成 ACC 脱氨酶活性 0.5–1.0 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$ ，赋 2 分；透明圈直径 10 mm 以上或合成 IAA 浓度 16 mg/L 以上或合成 ACC 脱氨酶活性 1 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$ 以上，赋 3 分。

Note: The *in vitro* biochemistry activity was graded with 0, 1, 2, or 3 based on the diameter (in mm) of the semicircular hyaline zones: Grade 0, no antagonism; Grade 1, 1–5 mm; Grade 2, 5.1–10 mm; Grade 3, >10 mm. The ability of synthesizing IAA was graded with 0, 1, 2, or 3 based on the concentration of IAA: Grade 0, no IAA; Grade 1, 1–6 mg/L; Grade 2, 6–15 mg/L; Grade 3, >16 mg/L. The ACC deaminase activity was expressed as $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$ and graded with 0, 1, 2, or 3: Grade 0, 0 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$; Grade 1, 0–0.5 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$; Grade 2, 0.5–1.0 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$; Grade 3, >1 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}/(\text{h}\cdot\text{mg protein})$.



图 1 耐低温菌株 *P. fluorescens* 1bYB22 对青菜和黄瓜的促生作用

Figure 1 Growth promoting effect of cold tolerant *P. fluorescens* 1bYB22 on no-heading Chinese cabbage and cucumber under greenhouse condition

注: A: 温室培养的幼苗; I: 黄瓜幼苗; II: 青菜幼苗. B: 发芽的青菜种子. 1bYB22: 菌株 1bYB22 处理组; Control: 对照组.
Note: A: Seedlings in greenhouse condition; I: Seedlings of cucumber; II: Seedlings of cabbage. B: Germinating seeds. Seedlings of 1bYB22-treated (1bYB22) and control (Control).

表 3 耐低温假单胞菌菌株温室条件下对青菜和黄瓜的促生作用			
Table 3 Growth promoting effect of cold tolerant Pseudomonads on no-heading Chinese cabbage and cucumber under greenhouse condition			
处理 Treatments	青菜地上部鲜重 Shoot weight of non-heading Chinese cabbage (g)	青菜种子根长 Root length of non-heading Chinese cabbage (cm)	黄瓜地上部鲜重 Shoot weight of cucumber (g)
1bYB22	6.17±0.99a	3.75±0.24a	4.31±0.76a
3bJN2	5.22±0.93b	2.54±0.30b	4.33±1.16a
2aGN9	5.14±0.64b	2.08±0.28bcd	3.64±0.62bcde
2aJB15	5.13±0.52b	2.42±0.28bc	3.60±0.42cde
1bYB11	5.08±0.58b	1.55±0.27def	4.22±1.06ab
3bT16	4.88±1.41bc	1.84±0.21bcde	3.99±0.51abc
4aT6	4.84±0.87bc	1.33±0.22ef	3.28±0.66e
3aYB8	4.41±0.62c	1.42±0.28def	3.96±0.63abcd
Control	4.93±0.85bc	1.73±0.24cdef	3.36±0.74de

注: 数值为平均值±标准差, 不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 的显著水平差异性显著(LSD test).
Note: The data are the averages±SD of three replicates. Values with the same English letter within the same column don't differ from each other significantly according to Duncan's test at $P<0.05$.

2.4 耐低温菌株 1bYB22 和 3bJN2 对小麦的田间促生作用

分别于小麦出苗期、拔节期及收获时统计了耐低温菌株的田间促生效果, 出苗期菌株 1bYB22 和 3bJN2 对小麦表现出了显著的促生作用, 菌株处理

组小麦植株地上部、地下部鲜重和叶片数均显著高于对照组, 且显著高于多菌合剂 BBS (图 3A, 表 4); 拔节期两个菌株都有促生作用, 但效果不显著, 然而 BBS 却表现出了显著的促生效果(图 3B, 表 4); 测定产量因子发现, 耐低温菌株及 BBS 处

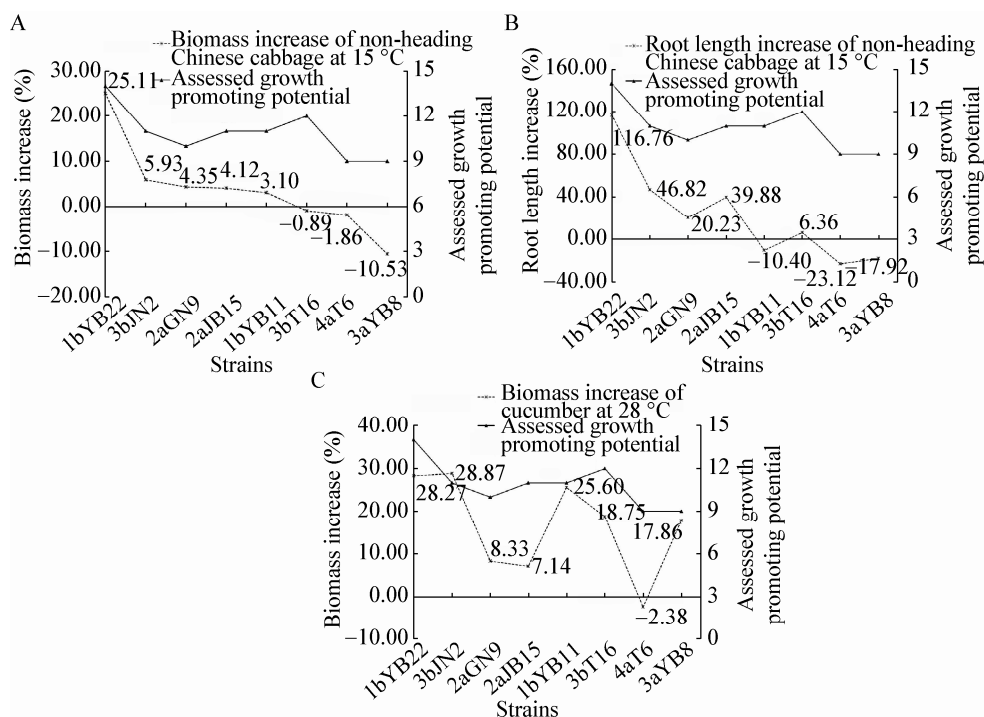


图 2 耐低温假单胞菌菌株植物促生作用与促生潜力之间的相关性

Figure 2 The coincident relationship between the assessed growth promoting potential and the plant growth promoting effect on non-heading Chinese cabbage and cucumber

注: A: 土壤中 15 °C 温室培养的青菜, 相关系数为 0.85; B: 平板上 15 °C 萌发的青菜种子, 相关系数为 0.83; C: 土壤中 28 °C 温室培养的黄瓜, 相关系数为 0.62; 数据标签标示促生效果(%).

Note: A: The biomass increase of non-heading Chinese cabbage in greenhouse condition at 15 °C, and the correlation coefficient was 0.85; B: The root length increase of non-heading Chinese cabbage on Agar plates at 15 °C, and the correlation coefficient was 0.83; C: The biomass increase of cucumber under greenhouse condition at 28 °C, and the correlation coefficient was 0.62; Data labels indicate the plant growth promoting effect (%).

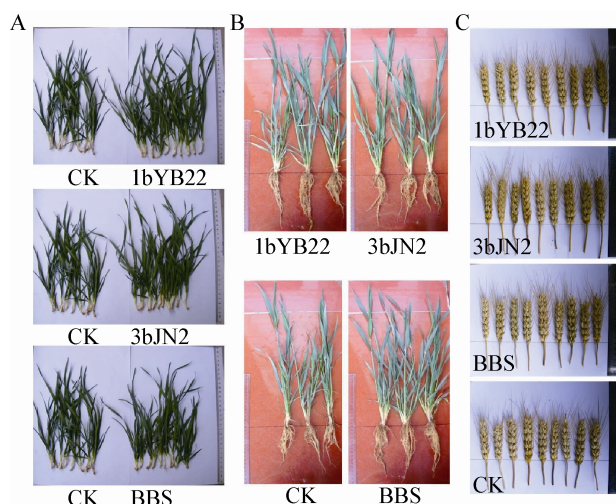


图 3 耐低温菌株对小麦的田间促生作用

Figure 3 Growth promoting effect of cold tolerant Pseudomonads on wheat in field

注: A、B: 不同生长时期的小麦幼苗; C: 小麦穗。1bYB22: 菌株 1bYB22 处理组; 3bJN2: 菌株 3bJN2 处理组; BBS: BBS 菌剂处理组; CK: 清水对照组。

Note: A, B: Wheat seedlings at different stages; C: Wheat ears. Seedlings of 1bYB22-treated (1bYB22), 3bJN2-treated (3bJN2), BBS-treated (BBS) and water-treated (CK).

表 4 耐低温假单胞菌菌株对小麦的田间促生作用 Table 4 Growth promoting effect of cold tolerant Pseudomonads on wheat in field										
处理 Treatments	出苗期 Seedling			拔节期 Stem elongation			产量因子 Yield components			
	地上鲜重 Shoot FW (g)	叶片数 Number of leaves	地上干重 Shoot DW (g)	地上鲜重 Shoot FW (g)	根鲜重 Root FW (g)	穗长 Spike length (cm)	穗粒数 Number of grains per ear	千粒重 Weight of thousand seeds (g)	每 m ² 穗数 Number of ear per m ²	理论产量 Grain yields (kg/hm ²)
1bYB22	1.08±0.11a	10±2a	0.21±0.03a	13.34±1.40ab	2.51±0.44a	8.51±0.77a	41±3a	47.78±1.31a	272±9a	4 397.14
3bJN2	1.02±0.10b	9±1b	0.19±0.03b	13.70±2.36ab	2.30±0.39ab	8.59±0.71a	41±3a	48.36±1.23a	272±8a	4 383.85
BBS	0.81±0.12c	8±1c	0.16±0.02c	14.11±2.67a	2.51±0.44a	8.60±0.72a	41±3a	48.90±2.55a	274±6a	4 509.20
CK	0.63±0.15d	6±1d	0.12±0.03d	12.18±3.02b	2.16±0.60b	8.54±0.85a	42±3a	48.03±1.69a	269±10a	4 377.44

注: 数值为平均值±标准差, 不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 的显著水平差异性显著(LSD test).
Note: The data are the averages ± SD of three replicates. Values with the same English letter within the same column don't differ from each other significantly according to Duncan's test at $P<0.05$.

理组植株穗长、穗粒数、千粒重,每 m^2 有效穗数及理论产量均高于对照组,但效果都不显著,菌株 1bYB22 和 3bJN2 分别增产 0.58%、0.19%,低于 BBS 的 3.90% (图 3C, 表 4)。

3 结论与讨论

本研究从小麦生境分离细菌中成功筛选到 34 株耐低温菌株,通过菌株植物促生性质生物测定、温室及田间促生试验,最终获得了具有农业生产实际应用价值的耐低温 PGPB *P. fluorescens* 1bYB22;首次报道了从小麦生境筛选和评价耐低温 PGPR/PGPB,其他关于耐低温 PGPR/PGPB 的报道大多来源于印度喜马拉雅山区^[5,22,25-26]。

近年来,有益微生物大量用于农业生产,可有效减少化学肥料的使用。对于温带地区而言,筛选具有植物促生作用的耐低温微生物是必不可少的。为了实现此目标,首先是获得耐低温微生物。小麦是我国重要的粮食作物,其生长周期跨冬季、春季,甚至是初夏,因此,小麦生境中的微生物能适应很广的温度范围,小麦生境中的假单胞菌是获得耐低温菌株的良好来源。另外,在获得耐低温微生物的基础上,建立恰当的微生物植物促生作用潜力评价系统对于高效率得到耐低温 PGPR/PGPB 也是至关重要的。本研究建立的评价系统从 34 株耐低温菌株中筛选出 8 株植物促生潜力菌株(表 2),其中部分菌株在温室试验中表现出了较好的促生效果(图 1, 表 3),并且 8 株耐低温菌株的温室促生效果与植物促生潜力得分之间存在较好的相关性,相关性系数均在 0.62 以上(图 2),表明该评价系统在筛选耐低温 PGPR/PGPB 中是有效的,对筛选用于温带地区农业生产的微生物类投入品具有指导意义。当然,PGPR/PGPB 能否成功定殖同样决定其促生作用的发挥,后期研究中将把耐低温菌株定殖能力考虑到评价系统中。

作为植物体内活跃的生长激素之一,IAA 能激发植株快速(比如细胞伸长)而长久(比如细胞分裂、分化)的生长反应^[27]。据统计,80%左右的植

物根围分离菌能够产生 IAA,特别是当培养基中加入了色氨酸^[28]。我们测定了耐低温菌株的产 IAA 能力,发现 30 株细菌能够在 15 °C 和(或) 28 °C 环境中产生 IAA (表 2),这些菌株产生的 IAA 在一定程度上会促进植物生长,比如菌株 1bYB22,它在 15 °C 培养温度下能产生 16.18 mg/L 的 IAA,该浓度的 IAA 相比空白处理可能足以显著促进 15 °C 环境中青菜种子根的伸长(图 1B)。在植物和微生物生长发育不可或缺的营养元素中,磷是仅次于氮的矿质营养元素,参与细胞代谢所需能量的积累和释放^[29]。通过接种溶磷微生物增加土壤中植物可利用磷元素含量在温室试验^[30]和田间应用中^[31]都有报道。本研究中 29 株耐低温菌株在 15 °C 和(或) 28 °C 环境中具有溶解无机和(或)有机磷的能力(表 2),这些菌株在土壤定殖后能增加可溶性磷元素含量,一定程度上解释了菌株接种的青菜和黄瓜植株相比对照组有更高的地上部生物量(图 1A, 表 3)。Çakmakçı 等^[32]同样发现 9 株产 IAA 且具有溶磷能力的假单胞菌和芽胞杆菌菌株能够增加小麦及菠菜的生物量,促进氮磷钾吸收,增强酶的活力。PGPR/PGPB 的植物促生作用同样体现在根的形态上,比如延长主根、增生侧根和不定根^[33],进而促进植物对营养元素的吸收^[34]。研究同样发现耐低温菌株在水琼脂平板上增长了青菜主根(6.36%–116.76%, 图 2 B),也增加了土壤培养青菜的地上部生物量(3.10%–25.11%, 图 2A)。Mishra 等^[35]在耐低温 *P. putida* PGRs4 定殖的小麦幼苗上发现了相似结果,并且 PGRs4 促进了小麦幼苗对氮磷的吸收。

耐低温 *P. fluorescens* 1bYB22 在温室中表现出了广谱、显著的促生作用(图 1, 图 2, 表 3),对其促生性质测定发现,1bYB22 在 15、28 °C 下均能产 ACC 脱氨酶、IAA,并能溶解不溶性磷,但不会产生嗜铁素(表 2),说明 1bYB22 可能通过降低植物根围乙烯含量、增加吲哚乙酸含量促进植物生长,同时增加土壤中植物可以利用的磷元素含量。已有很多关于耐低温假单胞菌类 PGPR/PGPB

的相关报道^[5,22,25,36], 但均来自印度喜马拉雅山区, 1bYB22 是首个分离自小麦生境的耐低温 PGPB。

田间试验中, 耐低温菌株 1bYB22 和 3bJN2 在出苗期表现出了显著的促生作用, 且效果均优于多菌合剂 BBS (图 3A, 表 4); 拔节期, 两个耐低温菌株的促生作用均不显著, 且效果均差于 BBS (图 3B, 表 4); 表明耐低温菌株在温度较低的情况下仍能够正常生长和发挥促生作用, 而在常温下效果较好的 BBS 在出苗期时的低温环境中作用不佳, 可能是因为芽胞杆菌在低温下不能正常代谢。

参 考 文 献

- [1] Maheshwari DK. Plant Growth and Health Promoting Bacteria[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2011: 18
- [2] Morita RY. Psychrophilic bacteria[J]. Bacteriological Reviews, 1975, 39(2): 147-167
- [3] Bowman WD, Seastedt TR. Structure and Function of An Alpine Ecosystem: Niwot Ridge, Colorado[M]. New York: Oxford University Press, 2001: 15
- [4] Pandey A, Trivedi P, Kumar B, et al. Characterization of phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (Bo) Isolated from a sub-alpine location in the Indian Central Himalaya[J]. Current Microbiology, 2006, 53(2): 102-107
- [5] Negi YK, Garg SK, Kumar J. Cold-tolerant fluorescent *Pseudomonas* isolates from Garhwal Himalayas as potential plant growth promoting and biocontrol agents in pea[J]. Current Science, 2005, 89(12): 2151-2156
- [6] Wu X, Monchy S, Taghavi S, et al. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(2): 299-323
- [7] Bashan Y, Holguin G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(8/9): 1225-1228
- [8] Kloepper JW, Schroth MN. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes[A]//Angers J. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Station de Pathologie Végétale et Phytobactériologie[C]. Tours, France: INRA, 1978: 879-882
- [9] Viruel E, Lucca ME, Siñeriz F. Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina[J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(7): 489-496
- [10] Miller SH, Browne P, Prigent-Combaret C, et al. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species[J]. Environmental Microbiology Reports, 2010, 2(3): 403-411
- [11] Fernández-Piñar R, Cámara M, Dubern JF, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone quorum sensing signal alters the multicellular behaviour of *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Research in Microbiology, 2011, 162(8): 773-781
- [12] Penrose DM, Glick BR. Levels of ACC and related compounds in exudate and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(4): 368-372
- [13] Zhang P, Qin SJ, Zhou WJ, et al. Effects of *Pseudomonas fluorescens* inoculation on root respiration and seedling growth of Cherry[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(19): 3857-3865 (in Chinese)
- [14] Liu H, Wu XQ, Ren JH, et al. Phosphate-dissolving characteristics and growth promoting effect of *Pseudomonas fluorescens* JW-JSI on poplar seedlings[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2013, 49(9): 112-118 (in Chinese)
- [15] Saravanakumar D, Samiyappan R. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogaea*) plants[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(5): 1283-1292
- [16] Yang MM, Mavrodi DV, Mavrodi OV, et al. Biological control of take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields[J]. Phytopathology, 2011, 101(12): 1481-1491
- [17] Wang LY, Wang C, Shen CM, et al. Biocontrol of wheat *Fusarium* head blight and *Fusarium* crown rot caused by *Fusarium graminearum*[J]. Journal of Triticeae Crops, 2014, 34(5): 703-708 (in Chinese)
- [18] Atlas RM. The Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food[M]. Boca Raton: CRC Press, 1995: 197
- [19] Roca A, Pizarro-Tobías P, Udaondo Z, et al. Analysis of the plant growth-promoting properties encoded by the genome of the rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(3): 780-794
- [20] Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3795-3801
- [21] Alexander DB, Zuberer DA. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria[J]. Biology and Fertility of Soils, 1991, 12(1): 39-45
- [22] Glick BR, Karaturovic DM, Newell PC. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1995, 41(6): 533-536
- [23] Naik PR, Sahoo N, Goswami D, et al. Genetic and functional diversity among fluorescent *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of Banana[J]. Microbial Ecology, 2008, 56(3): 492-504
- [24] Jorquera MA, Hernández MT, Rengel Z, et al. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2008, 44(8): 1025-1034
- [25] Mishra PK, Mishra S, Selvakumar G, et al. Characterisation of a psychrotolerant plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain PGERs17 (MTCC 9000) isolated from North Western Indian Himalayas[J]. Annals of Microbiology, 2008, 58(4): 561-568
- [26] Selvakumar G, Joshi P, Nazim S, et al. Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere[J]. Biologia, 2009, 64(2): 239-245
- [27] Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(4): 425-448
- [28] Patten CL, Glick BR. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1996, 42(3): 207-220
- [29] Johri JK, Surange S, Nautiyal CS. Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline

- soils[J]. Current Microbiology, 1999, 39(2): 89-93
- [30] Kumar V, Behl RK, Narula N. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions[J]. Microbiological Research, 2001, 156(1): 87-93
- [31] Chabot R, Antoun H, Cescas MP. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*[J]. Plant and Soil, 1996, 184(2): 311-321
- [32] Çakmakçı R, Erat M, Erdoğan Ü, et al. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2007, 170(2): 288-295
- [33] Mantelin S, Desbrosses G, Larcher M, et al. Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp.[J]. Planta, 2006, 223(3): 591-603
- [34] Canbolat MY, Bilen S, Çakmakçı R, et al. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora[J]. Biology and Fertility of Soils, 2006, 42(4): 350-357
- [35] Mishra PK, Bisht SC, Ruwari P, et al. Alleviation of cold stress in inoculated wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings with psychrotolerant *Pseudomonads* from NW Himalayas[J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(7): 497-513
- [36] Selvakumar G, Kundu S, Joshi P, et al. Growth promotion of wheat seedlings by *Exiguobacterium acetylicum* 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas[J]. Indian Journal of Microbiology, 2009, 50(1): 50-56

~~~~~  
(上接 p.2634)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达.....

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbncn>