

研究报告

假单胞菌 BP16 的分离鉴定及其植物促生性状和效应

杨杉杉¹ 李国光¹ 张胜男² 路晓培¹ 丁悦¹ 国情文¹ 田再民³ 冯福应^{1*}

(1. 内蒙古农业大学生命科学学院环境微生物研究室 内蒙古 呼和浩特 010018)

(2. 内蒙古自治区林业科学研究院 内蒙古 呼和浩特 010010)

(3. 河北北方学院 河北 张家口 075000)

摘要:【背景】*Pseudomonas* 最突出的植物促生性状是可抑制植物病原微生物,但其它植物促生性状报道相对较少。【目的】明确 *Pseudomonas* sp. BP16 的植物促生性状,揭示其对小麦幼苗和马铃薯的促生效应,以期为该菌株的田间应用提供理论依据。【方法】基于无机磷培养基,以涂布划线技术进行分离纯化;通过多相分类对 BP16 进行分类鉴定;以选择性培养基或比色法等方法对促生性状进行定性或定量分析;设置 3 种处理 pBP16、VK、CK,分别代表施加含 BP16 的颗粒微生物肥料、施加不含菌的空载体颗粒、颗粒微生物肥料和空载体颗粒都不施加的空白处理,采用盆栽试验分析不同处理下的小麦和马铃薯生长性状及其根围土壤理化性质的变化。【结果】共分离得到 41 株菌;1 株编号为 BP16 菌株的 16S rRNA 基因序列与 *P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* 的相似性最高(99.38%),但一些生理生化特征如明胶液化存在一定的差异;BP16 菌株的解磷酸钙-磷能力最强,其发酵液中水溶性磷含量可达 67.15 μg/mL 菌液,而且该菌具有固氮能力、产 IAA (Indole-3-acetic acid)能力(8.93 mg/L)、产铁载体能力(*D/d* 为 2.46)、ACC 脱氨酶活性,同时能够抑制植物病原菌马铃薯晚疫病病原菌、亚麻枯萎病病原菌和向日葵菌核病病原菌,其抑菌率分别为 76.19%、32.00%和 22.22%;pBP16 相比 VK 和 CK 处理,显著提高了小麦的株高、根长、叶绿素含量以及干重(提高约 5.29%–90.90%),根围土速效磷和速效氮含量也显著提高,提高约 8.63%–83.81%;同时,pBP16 较 VK 和 CK 处理的单株产量以及根围土速效磷都有极显著的提高,而速效氮水平高于 CK。【结论】菌株 BP16 为 *P. brassicacearum* 的一个新亚种,具有多种植物促生性状,对植物促生效应良好,可作为植物促生菌剂用菌种、具有良好的应用前景。

关键词: 植物根围促生菌, 颗粒微生物肥料, *Pseudomonas*, 小麦, 马铃薯

Foundation items: Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2015MS0355); Science and Technology Innovation-oriented Project of Inner Mongolia Autonomous Region (2017); Special Fund for Nation-oriented Science and Technology Development of Region (2017); Program for Young Talents of Science and Technology in Universities of Inner Mongolia Autonomous Region (NJYT-14-A05)

*Corresponding author: Tel: 86-471-4309240; E-mail: foyefeng@hotmail.com

Received: February 05, 2018; Accepted: April 18, 2018; Published online (www.cnki.net): June 28, 2018

基金项目: 内蒙古自然科学基金(2015MS0355); 内蒙古自治区科技创新引导项目(2017); 中央引导地方科技发展专项基金(2017); 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持计划”(NJYT-14-A05)

*通信作者: Tel: 86-471-4309240; E-mail: foyefeng@hotmail.com

收稿日期: 2018-02-05; 接受日期: 2018-04-18; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-28

Isolation and identification of *Pseudomonas* sp. BP16 and its plant growth-promoting traits and effects

YANG Shan-Shan¹ LI Guo-Guang¹ ZHANG Sheng-Nan² LU Xiao-Pei¹ DING Yue¹
GUO Qing-Wen¹ TIAN Zai-Min³ FENG Fu-Ying^{1*}

(1. Laboratory for Environmental Microbiology, College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

(2. Inner Mongolia Academy of Forestry Science, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China)

(3. Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: [Background] *Pseudomonas* is well known to inhibit plant pathogenic microorganisms. However, other plant growth-promoting traits are less reported. [Objective] To characterize the plant growth-promoting traits of *Pseudomonas* sp. BP16, and reveal its growth promoting effect on wheat seedling and potato. [Methods] The strain was isolated through spread and streak plating on medium of inorganic-phosphorus. We identified the taxonomic position based on polyphasic taxonomy and characterized plant growth-promoting traits on selective media or colorimetry. Wheat and potato were plot planted with 3 treatments, the first adding fertilizer containing BP16, second adding null carrier without inoculant, and third not adding any of them. [Results] 16S rRNA gene sequence of BP16 showed the highest similarity to that of *P. brassicacearum* subsp. *neoaureantiaca* (99.38%), and yet there were some major differences in physiochemical characters between them. Beside nitrogen-fixation, BP16 also possessed strong capabilities of Ca-phosphate-solubilizing (water-soluble phosphorus in fermentation solution reached 67.15 $\mu\text{g/mL}$), and production of indole-3-acetic acid (8.93 mg/L), siderophore (2.46 of *D/d*) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Additionally, BP16 remarkably inhibited the potato late blight, flax fusarium wilt and sunflower sclerotinia pathogens with inhibitory rates of 76.19%, 32.00% and 22.22%, respectively. Compared with the controls, wheat inoculated by BP16 increased plant height, root length, chlorophyll content and biomass. The content of rhizospheric available phosphorus and nitrogen also increased by the range from 8.63% to 83.81%. BP16 significantly enhanced the potato yield. [Conclusion] BP16 represents a new subspecies of *P. brassicacearum* and has multiple plant growth promoting traits. It can be used as a plant growth promoting agent.

Keywords: Plant growth-promoting rhizobacteria, Granule microbial fertilizer, *Pseudomonas*, Wheat (*Triticum aestivum*), Potato (*Solanum tuberosum*)

可利用耕地面积的不足、自然资源的不断消耗和土壤生产力下降等因素严重限制了现代农业生产力的提高,气候异常变化又常常使得粮食产量难以保证,而伴随全球人口数量增加使得粮食供需矛盾日益突出。以致于现代农业生产中不得不长期和持续地大量使用化肥与化学农药来满足世界人口的粮食需求,但这些物质的长期和大量使用导致严重的环境污染等问题,而接种植物根围促生细菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)可能是减少化肥和农药的使用、保障粮食安全供给的重要途径^[1],促进我国“减化肥、减农

药、增效益”农业战略的落实。

Pseudomonas 是土壤微生物组中关键的成员^[2],在不同土壤细菌群落中所占比例可达 1%–34%^[3],是一类主要的植物根围促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR),常用于接种农作物来提高产量^[1,4]。其中,能发荧光的 *Pseudomonas* 备受关注,因为它们常可用于生物防治植物病害并促进植物生长^[5]。例如, *Pseudomonas* 可抑制小麦纹枯病^[6]和鹰嘴豆的枯萎病^[7]等细菌或真菌引起的病害,并且可降低由病毒引起的番茄斑点枯萎病的发病率^[8];甚至在植物叶片上定殖而抑制

沙门氏菌, 减少其对人类健康的危害^[9]。此外, *Pseudomonas* 的成员还可通过固氮、解磷、产 IAA (Indole-3-acetic acid, IAA)、产铁载体等多种特性来促进植物生长^[1], 以及结合促进植物生长进行含油污泥污染土壤的生物修复^[10]。但是, 同时具有固氮和其它多种植物促生性状的 *Pseudomonas* 菌株有关报道还相对较少。

本研究从荒漠植物霸王根围分离获得一株细菌 *Pseudomonas* sp. BP16, 其具有固氮以及其它多种植物促生性状, 而且能力较强, 对小麦和马铃薯有较显著的促生作用, 这为该菌用于可持续有机农业提供了理论依据和实践基础。

1 材料与方法

1.1 根围土采集

参考杨鸿儒^[11]所述方法, 分别采集西鄂尔多斯高原荒漠灌木霸王(*Zygophyllum xanthonylon*)和室内盆栽植物的根围土。

1.2 主要试剂和仪器

DL2000 DNA marker、SYBR Green I 荧光染料, 北京全式金生物技术有限公司; 常规化学试剂均为国产分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

PCR 仪, Biometra 公司; 全自动高温高压灭菌锅, Tomy Kogyo 有限公司; 生物安全柜, 苏州安泰空气技术有限公司; 恒温光照培养箱, 上海精宏实验设备有限公司。

1.3 培养基

无机磷培养基(g/L): 葡萄糖 10.00, 硫酸铵 0.50, 氯化钠 10.00, 氯化钾 0.30, 硫酸镁 0.30, 磷酸钙 10.00, 硫酸亚铁 0.03, 硫酸锰 0.03, 琼脂粉 20.00, 加蒸馏水至 1 L, pH 7.50。

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 5.0, 加蒸馏水至 1 L, pH 自然。

Ashby 培养基(g/L): 磷酸二氢钾 0.2, 碳酸钙 5.0, 硫酸镁 0.2, 葡萄糖 10.0, 氯化钠 0.2, 硫酸钙 0.1, 琼脂粉 20.0, 加蒸馏水至 1 L, pH 自然。

R2A 培养基(g/L): 酵母提取物 0.50, 细菌学

蛋白胨 0.50, 酸水解酪素 0.50, 葡萄糖 0.50, 可溶性淀粉 0.50, 磷酸氢二钾 0.30, 丙酮酸钠 0.30, 七水合硫酸镁 0.05, TES 1.00, 加蒸馏水至 1 L, pH 自然。

DF 培养基(g/L): 磷酸二氢钾 4.0, 磷酸氢二钠 6.0, 硫酸镁 0.2, 葡萄糖 2.0, 葡萄糖酸 2.0, 柠檬酸 2.0, 硫酸氨 2.0, 加蒸馏水至 1 L, pH 7.2。

ADF 培养基(g/L): ACC 溶于灭菌的超纯水后, 用 0.22 μm 过滤器过滤灭菌, 加入到不含有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 DF 培养基中, ACC 添加的终浓度为 3.00 mmol/L。

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, 蒸馏水 1 L, pH 自然。马铃薯去皮, 切成块煮沸 30 min, 然后用纱布过滤, 再加糖及琼脂, 溶化后补足水至 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

黑麦蔗糖培养基: 称取黑麦 50.0 g, 洗净后于 1 L 去离子水中浸泡过夜, 1×10^5 Pa 灭菌 40 min, 用 4 层纱布过滤, 收集滤液, 加入蔗糖 20.00 g, 补水至 1 L, pH 自然。

1.4 荒漠灌木霸王根围促生细菌分离纯化及筛选

以选择性培养基分离解无机磷的 PGPR: 称取 0.5 g 根围土壤放入 49.5 mL 无菌水的三角瓶, 振荡 30 min 后静置 10 min; 然后吸取 1 mL 上清液, 用无菌水稀释成 10^{-1} – 10^{-6} 6 个梯度的菌悬液, 分别涂布于无机磷固体培养基, 每种培养基各个梯度设置 3 个平行, 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 d, 挑取形态不同的单菌落划线纯化至获得纯培养物, 选取解磷能力最强的菌株 BP16 进行后续研究。

1.5 菌株 BP16 的分类鉴定

1.5.1 形态学观察

将菌株在 R2A 平板上培养 48 h, 观察菌落生长特征, 并作记录; 参照文献[12]进行革兰氏染色; 生理生化实验按照《常见细菌系统鉴定手册》^[13]方法进行。

1.5.2 菌株 BP16 的 16S rRNA 基因扩增和序列分析

以菌株 BP16 基因组 DNA 为模板, 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGG

TTACCTTGTTACGACTT-3')为引物,参考文献[11]扩增 16S rRNA 基因。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司纯化及测序。将所得序列以 EzTaxon 在线进行分类分析并获取近缘模式种序列;基于 Neighbor-Joining 法,利用 MEGA 6.0 软件中相关模块构建系统发育树。BP16 的 16S rRNA 基因登录号为 MG881764。

1.6 菌株 BP16 促生性状分析

1.6.1 固氮特性

将菌株 BP16 接种到 Ashby 固体培养基,3 次重复,并置于 28 °C 培养箱中培养。5 d 后,目测其生长状况,能生长出大量菌落则初步视为具固氮能力。同时利用两对引物 FGPH19 (5'-CTCCGGGC CRCCNGAYTC-3')和 polR (5'-ATSGCCATCATYTC RCCGGA-3')与 polF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGAC TC-3')和 AQER (5'-GACGATGTAGATYTCCTG-3'),以巢式 PCR 扩增固氮基因 *nifH*^[14]验证其固氮潜能。BP16 的 *nifH* 基因登录号为 MG881763。

1.6.2 解磷特性

参考文献[11]对菌株的解无机磷(磷酸钙)和有有机磷(植酸磷)的能力进行测定。

1.6.3 分泌 IAA 能力的测定

参考文献[15]对菌株产 IAA 能力进行分析。

1.6.4 ACC 脱氨酶活性的定性分析

挑取单菌落接种到 8 mL LB 培养液中,于 28 °C、160 r/min 下培养 12 h;之后取 0.2 mL 培养液转入 8 mL DF 培养基,于相同条件下再培养 24 h;然后再取 0.2 mL 培养液转入 8 mL ADF 培养液,并以不含 ACC、调整后的 ADF 培养基作为阴性对照,培养 24-48 h,测定 OD_{600} 处吸光值。每个处理 3 个重复,比对照吸光值大的菌株为阳性菌株。

1.6.5 产铁载体能力的测定

参考文献[11]对菌株的产铁载体能力进行测定。

1.6.6 NH₃ 产生能力的测定

参照康贻军等^[16]的方法。

1.6.7 抑制病原真菌的测定

采用两点对峙法^[17]:在黑麦蔗糖培养基或

PDA 培养基平板上距离中心 2 cm 的两点上分别接种病原真菌和所分离促生菌[在黑麦培养基上接种致病疫霉(*Phytophthora infestans*);在 PDA 培养基上分别接种尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)]。每个处理 3 次重复,以只接病原真菌不接所分离促生菌的平板为对照。18 °C (致病疫霉)或 25 °C (尖孢镰刀菌、核盘菌)暗培养,7 d 后观察其抑菌效果并计算抑菌率。抑菌率(%)=(对照菌落半径-处理菌落半径)/对照菌落半径×100。

抑制病原菌物质确定:对 2,4-二乙酰基藤黄酚(2,4-Diacetylphloroglucinol, DAPG)利用扩增基因 *phlD* 来确定^[18];氢氰酸(Hydrogen cyanide, HCN)的产生与否利用康贻军等^[16]的方法来确定。

1.7 植物促生效应分析

将菌株 BP16 接种入基质并制作成颗粒微生物肥料(3.2×10⁸ CFU/g 颗粒微生物肥料)^[19],不加任何菌制作空载体(空颗粒)。

盆栽实验:设 3 种处理和 5 个重复,即不施加空载体和颗粒微生物肥料(CK)、施加空载体(VK)、施加含菌株 BP16 的颗粒微生物肥料(pBP16),空载体和颗粒微生物肥料施加量均为 3.43 g/盆(小麦)或者 19.44 g/盆(马铃薯);在黑色塑料盆(2 种规格:用于小麦的为直径 21 cm×高 21 cm,用于马铃薯的为直径 50 cm×高 50 cm)中装入土(采自学校农场)至距盆高 5 cm 处,在每盆的中央分别播种 15 粒饱满的小麦种子或 1 个马铃薯切块(带 1 个芽眼,大小约为 5 cm×5 cm×5 cm),施加空载体和颗粒微生物肥料的处理在盆中央加入相应重量空载体或颗粒微生物肥料,覆土 2 cm;每个处理播种 5 盆,置于温室培养(温度 25 °C,光/暗周期 14 h/10 h)。种植一定时间(小麦为 50 d,马铃薯为 135 d)后,测定株高、根长、干重、叶绿素含量以及根围土速效氮和速效磷含量。

1.8 统计分析

数据的统计分析采用 Excel,方法为单因素方

差分析(One-way, ANOVA)和显著极差法(SD), 极显著差异水平 0.01 用大写字母表示, 显著差异水平 0.05 用小写字母表示。

2 结果与分析

2.1 荒漠灌木霸王根围促生细菌分离纯化及筛选

以无机磷培养基, 从霸王的根围土分离纯化到 41 株纯培养物。其中, 编号为 BP16 的菌株具有最强的解无机磷能力, 将其用于后续的研究。

2.2 菌株 BP16 的分类鉴定

2.2.1 初步的形态学鉴定

对菌株 BP16 的细胞形态和菌落特征进行观察, 菌株为革兰氏阴性(G⁻), 好氧, 菌体呈杆状。于 25 °C 下, 在 R2A 培养基上培养 48 h 后, 菌落形态特征为圆形、边缘光滑、表面湿润、颜色为浅黄色, 细胞大小为(0.8–1.6) μm×(0.3–0.6) μm。

2.2.2 生理生化特征

菌株 BP16 的常见生理生化特征见表 1, 具有较宽的温度(4–37 °C)、pH (4.0–10.0)和盐度(NaCl 0–5%)生长适应范围, 不能水解明胶而具有典型好氧细菌的氧化酶和过氧化氢酶活性、弱硝酸还原酶活性。

2.2.3 16S rRNA 基因序列分析及其系统发育树的构建

测序所得菌株 BP16 的 16S rRNA 基因片段长度为 1 349 bp。Ez-Taxon 分析表明, 此序列与现有

模式菌株 *P. brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca* ATCC 49054^T 和 *P. brassicacearum* subsp. *brassicacearum* DBK11^T 的相似性分别为 99.85% 和 99.55%。系统发育分析结果(图 1)表明, *P. brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca* ATCC 49054^T 和 *P. brassicacearum* subsp. *brassicacearum* strain DBK11^T 同处最小分支; 菌株 BP16 与 *P. brassicacearum* 已知的 2 个亚种亲缘关系最近, 但处于独立的分支、且进化距离相对已知的较远, 表明菌株 BP16 应为另外的一个亚种。

2.3 菌株 BP16 促生性状分析

菌株 BP16 在 NBRIP 液体培养基培养 7 d, 菌液中水溶性磷含量为 67.15 μg/mL 菌液, 菌液 pH 由 7.51 降为 4.49; 该菌还能在 Ashby 固体培养基上迅速生长, 其 *nifH* 基因扩增产物与氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga*) 的相似度最高(72%), 与固氮螺菌(*Aspirillum*)的次高(66%)(图 2); 不能在以植酸磷为唯一磷源的培养基上生长, 不具备解植酸磷能力; 但它具有产 IAA 的能力, 菌液中 IAA 浓度可达 8.93 mg/L; 具有产 NH₃、ACC 脱氨酶和铁载体能力(橙色晕圈直径与菌落直径比值 *D/d* 为 2.46); 菌株 BP16 存在 DAPG 合成关键基因以及可以产 HCN; 对峙实验结果(图 3A–C)显示, 菌株 BP16 能够同时拮抗植物病原菌马铃薯晚疫病病原菌(*Phytophthora infestans*)、亚麻枯萎病原菌(*Fusarium oxysporum*)和向日葵菌核病原菌(*Sclerotinia sclerotiorum*), 其抑菌率分别为

表 1 菌株 BP16 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain BP16

生理生化特征 Physiological and biochemical characteristics	实验结果 Results	生理生化特征 Physiological and biochemical characteristics	实验结果 Results
硝酸盐还原 Nitrate reduction	W	脲酶 Urease	+
氧化酶 Oxidase	+	麦芽糖 Maltose	-
过氧化氢酶 Catalase	+	柠檬酸盐 Citrate	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	七叶灵水解 Aesculin hydrolysis	-
明胶水解 Gelatin hydrolysis	-	pH range (optimum)	4.0–10.0 (7.0)
吡啶实验 Idol test	+	NaCl range (optimum) (% W/V)	0.0–5.0 (0.0)
V-P test	-	Temperature range (optimum) (°C)	4.0–37.0 (29.0)

注: +: 阳性或能够利用; -: 阴性或不能利用; W: 弱阳性。

Note: +: Positive (growth or reaction); -: Negative (no growth or no reaction); W: Weakly positive.

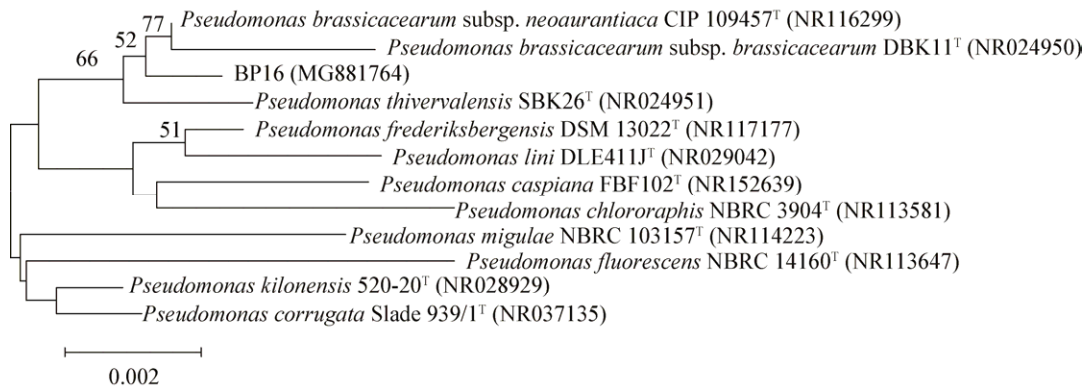


图 1 菌株 BP16 基于 16S rRNA 基因的系统发育进化树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene for the strain BP16

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 登录号; 分支点处仅显示大于 50% 的节点值(1 000 次重复抽样的百分比); 0.002 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank; Bootstrap values higher than 50% are shown at branching points (expressed as percentages of 1 000 replications); Bar 0.002 represents sequence divergence.

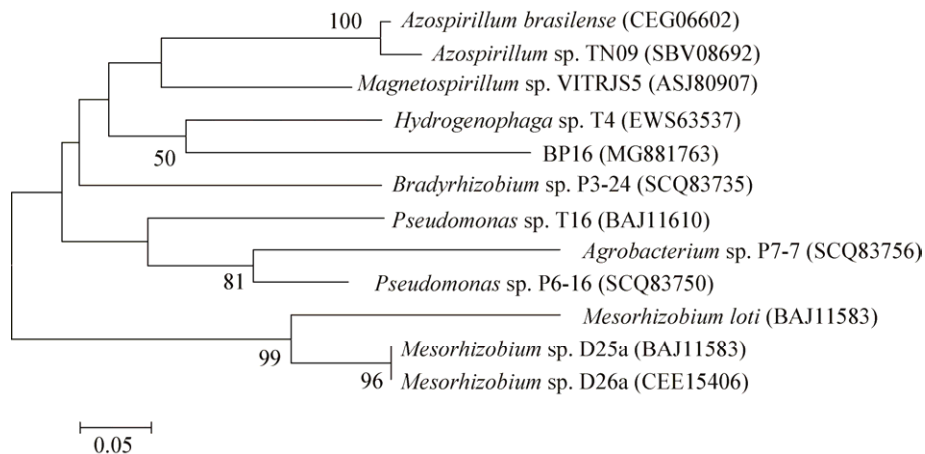


图 2 菌株 BP16 基于 *nifH* 蛋白氨基酸序列的系统发育进化树

Figure 2 Phylogenetic tree based on *nifH* protein amino acid sequence for the strain BP16

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 登录号; 分支点处仅显示大于 50% 的节点值(1 000 次重复抽样的百分比); 0.05 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank; Bootstrap values higher than 50% are shown at branching points (expressed as percentages of 1 000 replications); Bar 0.05 represents sequence divergence.

76.19%、32.00%和 22.22%。可见, BP16 是具有固氮以及其它多种促生性状的菌株。

2.4 菌株 BP16 的植物促生效应

接种菌株 BP16 能显著促进小麦的生长, 各处理的株高、根长、叶绿素含量以及干重均高于 CK (不施加空载体和颗粒微生物肥料的处理)与 VK (施加空载体的处理); 这些指标较 CK 分别增加 6.97%、18.17%、55.32%、90.90%, 较 VK 分别增加

5.29%、12.95%、10.61%、58.53%。此外, 接菌处理小麦植株的根围土的速度氮含量较 CK、VK 分别增加 18.23%、8.63%, 速效磷含量较 CK、VK 分别增加 69.41%、83.81%, 均达极显著差异水平(表2)。

类似地, 菌株 BP16 也对马铃薯具有良好的促生效应, 表现在其相比 VK 和 CK 的单株产量以及根围土速效磷都有极显著的提高, 速效氮水平高于 CK 但低于 VK (表 3)。

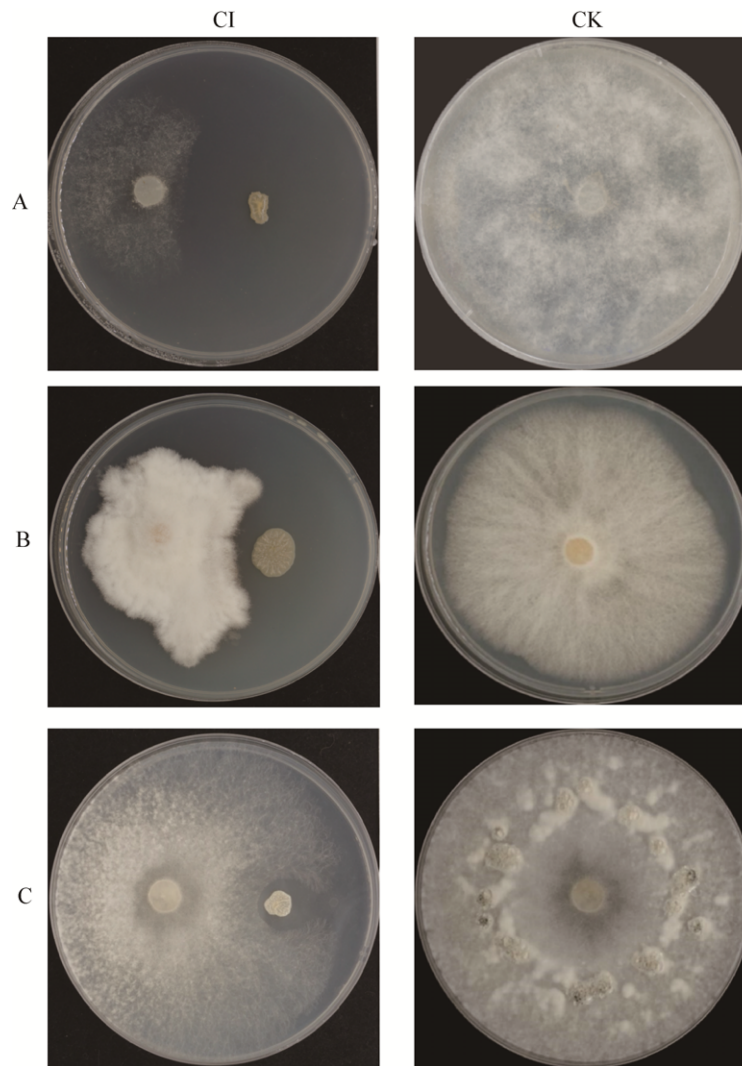


图 3 菌株 BP16 对马铃薯晚疫病、亚麻枯萎病病原菌和向日葵菌核病病原菌的抑菌作用

Figure 3 Inhibition of strain BP16 against *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum*

注: CI: 同时接种病原菌和 BP16 的对照; CK: 只接病原菌的对照. A、B 和 C 分别接有马铃薯晚疫病、亚麻枯萎病和向日葵菌核病病原菌.

Note: CI: Co-inoculating with pathogen and BP16; CK: Inoculating with pathogen only. A, B and C showed pathogens *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum* inoculated, respectively.

表 2 菌株 BP16 接种对小麦苗期生长的影响

Table 2 Inoculation effects of the strain BP16 on the growth of wheat seedling

处理 Treatments	株高 Plant height (cm)	干重 Dry weight (g/pot)	叶绿素含量 Chlorophyll content (mg/g)	根长 Root length (cm)	速效磷 Available phosphorus (mg/kg dry soil)	速效氮 Available nitrogen (mg/kg dry soil)
pBP16	35±0.61 ^A	0.62±0.05 ^A	5.62±0.08 ^A	38.37±1.10 ^A	5.71±0.49 ^A	81.97±0.67 ^A
VK	33.24±0.87 ^B	0.39±0.01 ^B	5.08±0.03 ^C	33.97±0.68 ^B	3.11±0.03 ^B	75.46±2.04 ^C
CK	32.72±0.50 ^B	0.33±0.05 ^B	3.62±0.13 ^B	32.47±1.21 ^B	3.37±0.37 ^B	69.34±1.08 ^B

注: CK: 不施加空载体或颗粒微生物肥料的空白处理; VK: 施加空载体; pBP16: 施加含菌株 BP16 的颗粒微生物肥料的处理. 上标大写字母代表 0.01 差异显著性水平.

Note: CK, VK and pBP16 represent the treatments adding neither null-carrier nor microbial fertilizer particle, null-carrier and particle fertilizer contained the strain BP16, respectively. The superscript in upper letters indicate significant difference level of 0.01.

表 3 菌株 BP16 接种对马铃薯生长的影响

Table 3 Inoculation effects of the strain BP16 on the growth of potato

处理	单株产量	速效磷	速效氮
Treatments	Per plant tuber weight (g/plant)	Available phosphorus (mg/kg dry soil)	Available nitrogen (mg/kg dry soil)
pBP16	36.17±0.76 ^A	9.81±0.58 ^A	54.33±1.76 ^B
VK	25.03±0.45 ^B	6.27±0.18 ^B	62.67±3.55 ^A
CK	26.63±0.78 ^B	6.12±0.12 ^B	43.83±1.76 ^C

注: CK、VK 和 pBP16 分别代表不施加空载体或颗粒微生物肥料的空白处理、施加空载体和施加含菌株 BP16 的颗粒微生物肥料的处理; 上标大写字母代表 0.01 差异显著性水平。

Note: CK, VK and pBP16 represent the treatments adding neither null-carrier nor microbial fertilizer particle, null-carrier and particle fertilizer contained the strain BP16, respectively. The superscript in upper letters indicate significant difference level of 0.01.

3 讨论

植物根围含有多种多样的有机物, 可为细菌提供丰富的碳源和能源。因而吸引了大量细菌的定殖。其中, 对植物有益的细菌被称为 PGPR; PGPR 通过固氮、解磷、产植物激素、产铁载体、产 ACC 脱氨酶和抑制病原微生物等来促进植物的生长^[20]。而一些逆境, 如荒漠可能是 PGPR 重要的新来源^[2,6,11,21]。*Pseudomonas* 是生长于 Negev 荒漠中的丛枝霸王(*Zygophyllum dumosum*)和四翅滨藜(*Atriplex halimus*)根围细菌中的优势类属; 所分离到的纯培养物与 *P. stutzeri* 和 *P. brassicacearum* 近缘, 它们都具有产铁载体能力, 但缺乏解无机磷能力^[21]。本研究发现 *Pseudomonas* 也是生长于西鄂尔多斯高原的灌木霸王根围细菌的主要类群之一; 基于 16S rRNA 基因和基础生理生化的分析表明, 其中一株编号为 BP16 的菌株属于种 *P. brassicacearum*, 与亚种 *P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* 亲缘关系最近。种 *P. brassicacearum* 分为 2 个亚种, 即 *P. brassicacearum* subsp. *brassicacearum* 和 *P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca*, 这 2 个亚种具有明显的液化明胶的能力^[22]。菌株 BP16 生长温度和 pH 范围或最适点与亲缘关系最近的 2 个模式亚种也不同, 而且基于 API ZYM、API 20NE 和 Biolog GeneIII 的酶活和碳源利用能力结果(数据未列)也存在其它一些重要的差异(如缺乏液化明胶的能力以及弱的硝酸盐还原能力)。目前, *Pseudomonas* 中报道了具有固氮能力的只有 *P. sensu stricto*、*P. stutzeri* 和 *P. azotifigens*

菌株^[23]。但是, 菌株 BP16 分别在无机磷和 Asebey 培养基上生长迅速, 说明该菌株同时具有较强的解无机磷(磷酸钙)和固氮能力, 并且该菌株还同时具有较强的产 IAA、铁载体和 ACC 脱氨酶等促生能力, 这在已报道的 *Pseudomonas* 菌株中是很少见的。因此, 菌株 BP16 可能代表了 *P. brassicacearum* 中另外的一个亚种(建议可命名为 *P. brassicacearum* subsp. *azotifigens*)。*P. brassicacearum* 可通过产 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) 和 Hydrogen cyanide (HCN) 来抑制病原微生物^[24], 而且 DAPG 还与信号转导以及生物膜的形成调控有关^[24-25]。*Pseudomonas* 作为常见的生防菌剂菌种之一, 对许多植物病虫害有良好的防治效果, 如根结线虫、小麦全蚀病、辣椒疫病和谷类白霉病等^[2]。菌株 BP16 对马铃薯晚疫病、胡麻枯萎病和向日葵菌核病的病原微生物也表现出了良好的抑制能力, 这可能与其可产生 DAPG 和 HCN 有密切关系。另外, 菌株 BP16 同时具有的固氮、解磷、产 IAA 和产 ACC 脱氨酶的植物促生性状, 使其显著地促进了小麦和马铃薯干物质的积累(生物量提高), 并且显著提高了这 2 种主要粮食作物根围速效磷的含量, 甚至显著提高了马铃薯单株的产量。相比其它 PGPR, *Pseudomonas* 的固氮能力很少受到关注, 但具备该能力的 *Pseudomonas* sp. K1 的确可很明显促进水稻的生长^[26]。磷是植物生长所必需的大量元素之一^[27], 接入可产生生长素 IAA 和解无机磷的 *P. extremaustralis* 也明显提高了小麦的生物量^[28]。但具有多种植物促生性状的 PGPR 对

植物的促生效应更佳, 可更加广泛使用^[29-30]。因此具有多种植物促生性状可作为筛选 PGPR 的重要依据, 而菌株 BP16 符合这样的标准。

4 结论

菌株 BP16 可能为 *P. brassicacearum* 的一个新亚种, 具有固氮、解磷酸钙-磷、产 IAA、产铁载体、产 ACC 脱氨酶、产 HCN 和 DAPG 等多种植物促生性状, 相关促生能力较强, 对植物促生效应良好, 可作为植物促生菌剂用菌种, 具有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] Meena VS, Mishra PK, Bisht JL, et al. Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture: Volume II: Applications in Crop Production and Protection[M]. Singapore: Springer, 2017
- [2] Keswani C, Singh HB, Sarma BK. Advances in PGPR Research[M]. Wallingford UK: CABI Publishing, 2017
- [3] Aislabie J, Deslippe JR. Soil microbes and their contribution to soil services[A]//Dymond JR ed. Ecosystem Services in New Zealand — Conditions and Trends[M]. Lincoln, New Zealand: Manaaki Whenua Press, 2013: 112-161
- [4] Tewari S, Arora NK. Fluorescent *Pseudomonas* sp. PF17 as an efficient plant growth regulator and biocontrol agent for sunflower crop under saline conditions[J]. Symbiosis, 2016, 68(1/3): 99-108
- [5] Jain R, Pandey A. A phenazine-1-carboxylic acid producing polyextremophilic *Pseudomonas chlororaphis* (MCC2693) strain, isolated from mountain ecosystem, possesses biocontrol and plant growth promotion abilities[J]. Microbiological Research, 2016, 190: 63-71
- [6] Wang XF. Rhizosphere of wheat growing in adverse soils as a source of highly active anti-fungi, plant growth-stimulating and resistant rhizobacteria[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese)
王雪飞. 从逆境土壤发现高效抗病促生抗逆的小麦根际细菌 [D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2013
- [7] Kandoliya UK, Marviya GV, Rathod PJ, et al. Pathogenesis related hydrolytic enzymes induction in response to PGPR seed priming against wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*) in Chickpea[J]. Indian Journal of Agricultural Biochemistry, 2017, 30(2): 182-188
- [8] Vasanthi VJ, Samiyappan R, Vetrivel T. Management of tomato spotted wilt virus (TSWV) and its thrips vector in tomato using a new commercial formulation of *Pseudomonas fluorescens* strain and neem oil[J]. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2017, 5(6): 1441-1445
- [9] Hsu CK, Micallef SA. Plant-mediated restriction of *Salmonella enterica* on tomato and spinach leaves colonized with *Pseudomonas* plant growth-promoting rhizobacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 259: 1-6
- [10] Liu WX, Sun JY, Ding LL, et al. Rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. SB) assist phytoremediation of oily-sludge-contaminated soil by tall fescue (*Festuca arundinacea* L.)[J]. Plant and Soil, 2013, 371(1/2): 533-542
- [11] Yang HR. Diversity and community structure of rhizospheric bacteria associated with desert shrubs in the western ordos[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agriculture University, 2016 (in Chinese)
杨鸿儒. 西鄂尔多斯荒漠灌木根际细菌多样性和群落结构的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2016
- [12] Ren XZ. Classification and Identification of Plant Pathogenic Bacteria[M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 1994: 5 (in Chinese)
任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 5
- [13] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 169 (in Chinese)
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: 169
- [14] Langlois RJ, LaRoche J, Raab PA. Diazotrophic diversity and distribution in the tropical and subtropical Atlantic ocean[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 7910-7919
- [15] Glickmann E, Dessaux Y. A Critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(2): 793-796
- [16] Kang YJ, Cheng J, Mei LJ, et al. Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(7): 853-861 (in Chinese)
康贻军, 程洁, 梅丽娟, 等. 植物根际促生菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 853-861
- [17] Liu XG, Gao KX, Gu JC, et al. Testing on the antagonism of the dominant of endophytic fungi from *Populus tomentosa*, *Chaetomium* ND35 in the laboratory[J]. Scientia Silvae Sinicae, 1999, 35(5): 57-61 (in Chinese)
刘晓光, 高克祥, 谷建才, 等. 毛白杨内生菌优势种毛壳 ND35 室内拮抗作用的研究[J]. 林业科学, 1999, 35(5): 57-61
- [18] Almario J, Bruto M, Vacheron J, et al. Distribution of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes among the *Pseudomonas* spp. reveals unexpected polyphyletism[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1218
- [19] Zhang SN, Gong RH, Meng JY, et al. A microbial fertilizer particle, particle carrier and its preparation method: China, CN201410451655.0[P]. 2014-12-17 (in Chinese)
张胜男, 巩瑞红, 孟建宇, 等. 一种微生物肥料颗粒、颗粒载体及其制备方法: 中国, CN201410451655.0[P]. 2014-12-17
- [20] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 541-556
- [21] Kaplan D, Maymon M, Agapakis CM, et al. A survey of the microbial community in the rhizosphere of two dominant shrubs of the Negev Desert highlands, *Zygophyllum dumosum* (Zygophyllaceae) and *Atriplex halimus* (Amaranthaceae), using cultivation-dependent and cultivation-independent methods[J]. American Journal of Botany, 2013, 100(9): 1713-1725

- [22] Ivanova EP, Christen R, Bizet C, et al. *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* subsp. nov., orange-pigmented bacteria isolated from soil and the rhizosphere of agricultural plants[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(10): 2476-2481
- [23] Venieraki A, Dimou M, Vezyri E, et al. The nitrogen-fixation island insertion site is conserved in diazotrophic *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas* sp. isolated from distal and close geographical regions[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e105837
- [24] Paulin MM, Novinscak A, Lanteigne C, et al. Interaction between 2,4-diacetylphloroglucinol- and hydrogen cyanide-producing *Pseudomonas brassicacearum* LBUM300 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the tomato rhizosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(13): e00073-17
- [25] Mavrodi DV, Mavrodi OV, Parejko JA, et al. The role of 2,4-diacetylphloroglucinol- and phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. in natural protection of wheat from soilborne pathogens[A]//Maheshwari D, ed. Bacteria in Agrobiological: Plant Nutrient Management[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2011: 267-283
- [26] Mirza MS, Mehnaz S, Normand P, et al. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth[J]. Biology and Fertility of Soils, 2006, 43(2): 163-170
- [27] Bei ZL, Zhang X. Isolation and identification of phosphate-solubilizing bacteria from Lingwu long jujube rhizosphere soil[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(4): 311-313 (in Chinese)
贝鑫临, 张欣. 灵武长枣根际溶磷菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 311-313
- [28] Kudoyarova GR, Vysotskaya LB, Arkhipova TN, et al. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2017, 39: 253
- [29] Liu K, Newman M, McInroy JA, et al. Selection and assessment of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of multiple plant diseases[J]. Phytopathology, 2017, 107(8): 928-936
- [30] Xu FF. Isolation of saline-alkaline tolerant PGPR of desert plant and their effect of growth promotion and mechanism on three plants under salt stress[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agriculture University, 2017 (in Chinese)
许芳芳. 荒漠植物耐盐碱 PGPR 的分离筛选及其对盐胁迫下三种植物的促生效应和机理[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2017

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,月刊,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计,本刊2012年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连年获得“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2018年每册定价80元,全年960元,我们免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路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

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413