

植物根际促生菌的筛选及鉴定

康贻军^{1,2,3}, 程洁², 梅丽娟², 殷士学^{2*}

(¹ 扬州大学农学院, 扬州 225009)

(² 扬州大学环境科学与工程学院, 扬州 225127)

(³ 盐城师范学院生命科学与技术学院, 盐城 224002)

摘要:【目的】植物根际促生菌(PGPR)和植物的互作关系往往不稳定,PGPR 菌群有可能提高菌株对野外环境的适应性。为此,本文根据 PGPR 促生机制的多样性,从不同植物根际土壤进行了 PGPR 的筛选及鉴定。【方法】首先,按照固氮、解磷、解钾、拮抗 6 种常见病原真菌,同时能在植物根际定殖为基本初筛标准,然后在实验室条件下测定初筛菌株的多项促生能力(PGP),最后通过生理生化试验和 16S rRNA 基因序列分析对所筛菌株进行鉴定。【结果】从江苏扬州、盐城等地土壤样品筛选出 14 株 PGPR,具有体外抑菌、产 NH₃、产 IAA、产 HCN、产嗜铁素、解磷、溶钾、固氮以及产抗生素等促生能力。分类鉴定结果显示:7 株属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、3 株属于类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、2 株为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、1 株为布克霍尔德里氏菌属(*Burkholderia*)、1 株为欧文氏菌属(*Erwinia*)。【结论】所筛细菌具有多种促生能力,且能在根际定殖,为进一步构建多功能 PGPR 广适菌群提供菌株资源。

关键词: 植物根际促生菌; 筛选; 鉴定

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0853-09

植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)指生存于植物根际、根表,并能直接或间接地促进或调节植物生长的微生物^[1]。过去几十年间,报道了大量该类细菌,包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、节杆菌属(*Arthobacter*)、布克霍尔德里氏菌属(*Burkholderia*)、杆菌属(*Bacillus*)以及沙雷氏菌属(*Serratia*)^[1-4]等。PGPR 既可帮助植物从环境中摄入某种养分,进行直接促生;也可通过减轻或预防不良环境因素(如病原菌、重金属等)给植物造成的伤害,从而间接促生。

尽管 PGPR 的促生机制尚未完全阐明,但其作用机制的多样性被普遍认同。主要包括:(1)产生调节植物生长的信号物质,如吡啶乙酸、赤霉素、细胞分裂素和乙烯^[4-5];(2)非共生固氮^[6];(3)产嗜铁素^[7]、抗生素^[8]和氰化物^[9]抵抗病原菌;(4)溶解磷矿物及其它养分^[10-12]。一些 PGPR 也能通过影响共生固氮结瘤、结节,从而间接促进植物生长^[13]。现今已开发成生物防治剂和热门的研究的 PGPR 菌株基本都是荧光假单胞菌和芽孢杆菌。

除上述特征,PGPR 在植物根际还应具有竞争性,并能定殖于根际^[3]。然而,PGPR 和植物的互作关系往往并不稳定,成功的实验室试验并不一定在田间原位能成功^[14]。PGPR 的这种不稳定性源于不

基金项目:国家自然科学基金(40871117)

* 通信作者。Tel: +86-514-87979575; Fax: +86-514-87978626; E-mail: sxyin@yzu.edu.cn

作者简介:康贻军(1980-),男,江苏如东人,讲师,博士研究生,从事环境微生物学研究工作。E-mail: yijunkang@yahoo.com

收稿日期:2010-03-09;修回日期:2010-04-27

同的环境条件对细菌生长造成影响,从而制约其促生效果。这些环境因子包括气象、土壤性质或土著微生物活力等^[1]。

因此,有必要将研究转向筛选适应于田间条件的菌株^[15]。其中一个可能的途径就是根据 PGPR 促生机制的多样性,构建适应不同环境要求的多功能 PGPR 菌群。本文基于这一理念,从不同土壤样品筛选具有多种促生机制的 PGPR 菌株,以期构建高效促生广适菌群提供素材。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物根、根际土壤样品来源及前期处理:细菌初筛工作于 2009 年 3 月至 5 月进行。分别采集扬州大学农学院试验田油菜、小麦根以及盐城国家麋鹿自然保护区芦苇根及其附着土壤(≤ 2 mm 区域),置于冰盒(温度约 4℃),立即带回实验室。取植物根部,用无菌 dH₂O 轻柔冲洗,以去除外围土壤,切成长约 3 cm 小段,各称取约 1 g 根段加入 200 mL 无菌 dH₂O,150 r/min 混合 30 min,梯度稀释后,分别吸取 20 μ L 菌液涂布于 3 种筛选培养基:Jensen's 培养基^[16]、King's B 培养基^[17]和 NA (nutrient agar)培养基,28℃ \pm 2℃ 培养 72 h,挑取共计 98 株形态各异的细菌,分别编号,供下一步工作。

1.1.2 主要试剂和仪器:吲哚-3-乙酸 (IAA) 购自 Sigma 公司;Whatman 1 号滤纸购自英国 Whatman 公司;铬天青 S 购自四川西亚试剂公司;其余常规试剂(分析纯)购自上海生工生物工程技术服务有限公司。PCR 所用 Buffer、dNTP、Taq 酶等购自大连宝生物公司;吸光度用棱光 UV757CRT 紫外可见分光光度计测定;钾离子浓度用火焰光度计 6400A(南京艾赛特公司)测定;PCR 仪为 MJ Mini(Bio-Rad 公司)。

1.2 PGPR 菌株初筛

以具有广谱抑制 6 种常见植物病原菌能力,或具有解磷、解钾能力,并能在根际定殖作为 PGPR 初筛指标。

1.2.1 具抑菌能力菌株初筛:分别将 6 种病原指示菌株:番茄灰霉菌(*Botrytis cinerea* HY2-1,引发番茄灰霉病),麦根腐平脐蠕孢(*Bipolaris sorokiniana* YN3-5,引发小麦根腐病),小麦禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum* YN3-4,引发小麦赤霉病),小麦禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis* YN3-9,引发小麦纹枯病),水稻立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*

YN8-2,引发水稻纹枯病)以及水稻串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme* YN8-5,引发水稻恶苗病)孢子接种于 PDA 培养基中央,28℃ \pm 2℃ 培养 48 h 后,于该平板的一侧划线接种上述所挑出的菌株,继续培养 7 d,观察,保留具备抑制病原菌能力的细菌。

1.2.2 解磷、解钾菌株初筛:通过透明圈试验,筛选具备解磷^[18]、解钾^[19]能力的菌株。

1.2.3 细菌体外定殖根际能力试验:取番茄(*Lycopersicon Esculentum*)和豇豆(*Vigna sesquipedalis* W. F. Wight)种子若干,用 70% 酒精和 1% 次氯酸钠溶液分别处理 5 min 和 1 min,无菌 dH₂O 冲洗 3 遍。

接种各菌株于 NB 液体培养基,28℃ \pm 2℃,180 r/min 摇床培养 24 h 后,转至无菌 50 mL 离心管,4400 \times g 离心 10 min,弃去上清液,细胞重悬于 0.9% 无菌生理盐水(NSS),混匀,吸取 1 mL 至 90 mm 直径的培养皿(内垫有无菌 dH₂O 润湿的滤纸),每皿放置 15 粒消毒种子,室温放置 1 h 后转至暗处,28℃ \pm 2℃ 生长 4-5 d,待根长 1 cm 时,各处理取 1 株幼苗,切取根部,加至无菌 0.1 mol/L MgSO₄,梯度稀释,涂布菌液于 King's B 和 NA 培养基,28℃ \pm 2℃ 培养 72 h,计数,保留能在根际定殖 $> 10^5$ CFU/cm 的细菌^[20]。

将初筛所得共 14 株 PGPR 在各自培养基培养 24 h-48 h 后,以 20% 甘油作冷冻保护剂,-80℃ 保存。

1.3 PGPR 促生能力测定

1.3.1 体外抑菌能力测定:用改进的平板双培养法测定 PGPR 体外抑菌率^[21-22]。在 PDA 平板边缘均匀接种 3 滴 10^8 CFU/mL 菌液,28℃ \pm 2℃ 培养 24 h。从长有病原菌的 PDA 平板上用打孔器挖取 4 mm 直径病原菌块,转置于长有细菌的平板中央,继续培养 7 d。抑菌率(%) = (平板面积 - 病原菌覆盖面积) / 平板面积 \times 100%。

1.3.2 生长素 (IAA) 测定:产 IAA 能力测定参照 Glickmann 等人^[23]的方法进行。细菌在特定液体培养基中(添加 0.5 g/L L-色氨酸,约 2.5 mmol/L)生长 72 h(固氮菌)或 48 h(假单胞菌和芽孢杆菌),取培养液 2 mL,12000 \times g 离心 15 min,每 1 mL 上清液加 2 mL Salkowski 试剂(每升 10.8 mol/L H₂SO₄ 含 4.5 g FeCl₃),室温暗处显色 30 min 后,于 530 nm 处测光密度值。以空白培养基作对照,并以纯 IAA (Sigma 公司)对应的光密度作标准曲线,计算 IAA 产出量(mg/L)。

1.3.3 产 NH₃ 鉴定: 将菌株转接到含 10 mL 蛋白胨水 (10 g/L) 试管中, 28°C ± 2°C 培养 48 - 72 h, 每管加入 0.5 mL Nessler's 试剂, 颜色由褐色转为黄色的表明有 NH₃ 产生。

1.3.4 产 HCN 鉴定^[24]: 在 NB 培养基中添加 4.4 g/L 甘氨酸, 将细菌划线接种于该平板上, 另将浸过 2% 碳酸钠、0.5% 苦味酸溶液 (2,4,6-三硝基苯酚) whatman 1 号滤纸置于培养基上, 密封, 28°C ± 2°C 培养 4 d, 滤纸颜色由橘黄色转为红色的说明有 HCN 产生。

1.3.5 产嗜铁素鉴定^[25]: 将 CAS 培养基划分成若干等分, 接种供试菌株 (10 μL 10⁶ CFU/mL), 28°C ± 2°C 培养 48 h - 72 h, 如菌株周边有黄绿色晕圈产生, 即表明该菌株具产嗜铁素能力。

1.3.6 溶磷及解钾能力测定: 在培养基中添加 Ca₃(PO₄)₂ 或硅酸盐, 28°C ± 2°C, 170 r/min 培养 5 d, 12000 × g 离心 30 min, 钼锑抗比色法定量测定溶解磷含量^[26], 火焰光度法测定上清液钾的含量^[19]。同时测定各处理上清液 pH 值。

1.4 PGPR 分子鉴定及生理生化测定

1.4.1 PGPR 分子鉴定: 细菌在 NB 液体培养基中培养至对数期, 按冻融法提取细菌基因组 DNA^[27]。以总 DNA 为模板, 利用特异引物 27F/1492R (上游引物 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; 下游引物 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3')^[28] 扩增 16S rRNA 基因近乎全长片段。50 μL 的反应体系中含有 1 × PCR Buffer (含 MgCl₂), 200 μmol/L 的 dNTPs, 0.2 μmol/L 的引物, 1 × Taq DNA 聚合酶 (大连宝生物) 和 1 μL 的模板。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 64°C 退火 1 min, 72°C 延伸 90 s, 20 个循环, 每次循环退火温度降低 0.5°C; 72°C 延伸 20 min。PCR 产物送上海生工测序。根据获得 16S rDNA 序列在 GenBank 中 Blast 搜索同源序列, 并以 ClusterX 软件进行多重序列比对。通过 MEGA 4.0 软件, 以邻接法 (Neighbour-Joining) 建立系统进化树, 采用 1000 次重复取样进行 Bootstrap 检验^[29]。

1.4.2 生理生化指标测定: 参照文献 [30] 进行。

1.5 *nifH*, PCA 和 Phl 基因扩增

为探究所筛细菌是否具有固氮、产吩嗪-1-羧酸 (phenazine-1-carboxylic acid, PCA) 和 2,4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, DAPG) 的相关基因, 扩增产物合成的关键基因。理论上, 如能扩增回收到目的片段, 则说明该菌有固氮或产相应抗生

素能力的关键基因。

nifH 基因扩增参照 Widmer 等人^[31] 方法进行。引物对: *nifH*: GCIWTITAYGGNAARGGNGG; *nifH* (rev): GCRTAIABNGCCATCATYTC。25 μL 的 PCR 反应体系含有: 1 (PCR Buffer, 200 nmol/L dNTPs, 1 mmol/L 引物, 5 mg/mL BSA, 2 μL 模板, 1 × Taq DNA 聚合酶 (大连宝生物)。PCR 反应程序: 95°C 预变性 5 min; 94°C 和 92°C 变性各 11 s 和 15 s, 48°C 和 50°C 退火各 8 s 和 30 s, 74°C 和 72°C 延伸各 10 s, 40 个循环; 72°C 延伸 10 min。

PCA 和 Phl 基因扩增参照 Raaijmakers 等人^[32] 方法进行。引物对 (PCA): PCA2a: TTGCCAAGCC TCGCTCCAAC; PCA3b: CCGCGTTGTTCTCGTTCA T。引物对 (Phl): Phl2a: GAGGACGTCGAAGACCA CCA; Phl2b: ACCGCAGCATCGTGTATGAG。25 μL 的 PCR 反应体系含有: 1 (PCR Buffer, 200 nmol/L dNTPs, 1 mmol/L 引物, 1 μL 模板, 1 × Taq DNA 聚合酶 (大连宝生物)。PCR 反应程序: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 1 min, 67°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环。

PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶 (EB 染色) 电泳检测。

2 结果

2.1 PGPR 对 6 种常见病原真菌的体外拮抗作用

通过初筛获得 7 株具有广谱抑制病原真菌能力的细菌, 分别是 RA2、RA4、RA8、RBA1、RBP7、WP7 和 WP8, 通过平板双培养法计算各细菌体外抑菌率如表 1 所示。由表可知, RBA1 对 6 种常见病原真菌的抑制率最为显著, 最高达 80.96% (拮抗小麦纹枯病菌); RA2 相对其它 6 株细菌, 其体外抗病广谱性能力稍弱, 对其中 3 种病原真菌无拮抗能力。6 种病原真菌中, 对水稻纹枯病菌基本抑制率最低, 暗示该病菌在农业生产防控中相对难控制, 这也从另一角度解释了水稻纹枯病成为水稻的第二大病害 (仅次于稻瘟病) 的原因^[33], 即土壤中能拮抗该病菌的细菌数量相对较少、能力也相对较弱。

2.2 PGPR 促生指标测定结果

试验分别测定了 14 株细菌的多项促生指标。理论上, 所筛细菌在田间试验可能发挥作用的前提是必须具备 6 项 PGP 特性中的 1 项或同时具备多项。表 2 显示, 供试菌株中除 3 株 (RBP7、WP7、WP8) 只具备 1 项 PGP 特性, 其余 11 株细菌都同时具备 2 项以上的 PGP 特性, 其中 RA4 同时具备了 5

项体外促生能力,说明所筛菌株均具备田间试验的先决条件。

表 1 7 株 PGPR 对病原真菌的抑菌率

Table 1 Antifungal activity of the 7 PGPR strains

PGPR	<i>Botrytis cinerea</i> HY2-1	<i>Bipolaris sorokiniana</i> YN3-5	<i>Fusarium graminearum</i> YN3-4	<i>Rhizoctonia cerealis</i> YN3-9	<i>Rhizoctonia solani</i> YN8-2	<i>Fusarium moniliforme</i> YN8-5
RA2	30.02 ± 0.52	0	32.06 ± 1.33	0	0	54.91 ± 1.64
RA4	54.76 ± 0.29	58.23 ± 2.14	58.98 ± 0.33	64.75 ± 0.79	14.61 ± 0.85	32.88 ± 0.41
RA8	53.06 ± 0.95	55.07 ± 1.50	54.46 ± 0.59	64.04 ± 1.19	10.52 ± 0.33	30.12 ± 0.67
RBA1	61.29 ± 1.85	60.99 ± 1.59	60.65 ± 0.79	80.96 ± 1.12	25.28 ± 0.97	48.93 ± 0.98
RBP7	52.53 ± 0.93	39.91 ± 1.29	61.50 ± 0.72	40.54 ± 0.46	27.84 ± 0.19	41.93 ± 0.89
WP7	30.15 ± 1.31	28.83 ± 0.46	63.94 ± 0.63	38.35 ± 0.65	29.22 ± 1.06	40.66 ± 0.81
WP8	53.99 ± 1.33	64.67 ± 0.79	14.52 ± 0.50	30.91 ± 0.55	13.27 ± 0.74	64.94 ± 1.23

Table values represents mean rate of fungistasis (%) ± standard error (SE).

试验定量测定了菌株产 IAA 能力、溶磷及解钾特性。由数值看,菌株间产 IAA 和溶磷特性数值差异较大,如产 IAA,WP6 测定值最高达 20.92 mg/L,而 WP9 仅为 3.11 mg/L;相对而言,菌株间的解钾特性差异不大,仅 RA6 与其它测定值间有显著差异 ($P < 0.05$)。

从分子水平检测了所筛菌株是否具有固氮、产 2,4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, DAPG) 和吩嗪-1-羧酸 (phenazine-1-carboxylic acid, PCA) 的潜在能力。如图 1, RA2、RA8、RBA1、RA6 和 RP7 等 5 株细菌能检测到片段大小为 464 bp 的目标条带; RA4、RBP7、WP7 及 WP6 等 4 株细菌可以检测到片段大小 745 bp 的目标条带; RA8、RA6 和 RP7 能检测到片段大小 1150 bp 的目标条带。PCA 基因扩增结果中 (图 1-C), WP6 也能检测到相对微弱的目标条带。

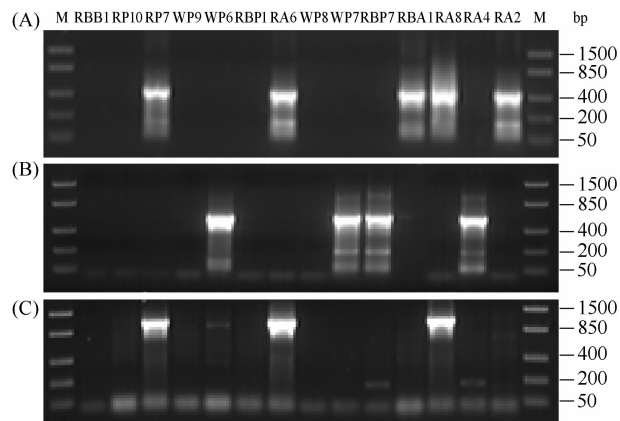


图 1 菌株 *nifH* 基因 (A)、*phlD* 基因 (B) 及产 PCA 基因 (C) 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *nifH* gene (A), *phlD* gene (B) and PCA gene (C).

2.3 菌株分子鉴定及理化指标

对所筛菌株进行革兰氏染色、过氧化氢酶、硝酸盐还原等表型特性检测 (表 3) 及 16S rRNA 基因序

列分析,结果显示:14 株菌株中,RA4、WP7 和 RBP7 属于类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) (图 2-A); WP8 和 RBB1 为芽孢杆菌属 (*Bacillus*) (图 2-A); WP6、WP9、RP10、RBP1、RP7、RP8 和 RA6 属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (图 2-B); RBA1 属于布克霍尔德里菌属 (*Burkholderia*) (图 2-B); RA2 属于欧文氏菌属 (*Erwinia*) (图 2-B)。菌株 RA2、RA4、RA6、RA8、RBA1、RBB1、RBP1、RBP7、RP7、RP10、WP6、WP7、WP8 以及 WP9 的 16S rRNA 基因序列测序结果在 GenBank 中登录号分别为:GU979220-GU979233。

3 讨论

本研究的目标是从不同土壤筛选多功能 PGPR,从而为构建高效广适促生菌群提供菌株素材。从实验室筛选的初步结果看,所筛 14 株细菌均有促生能力或潜力,同时可在植物根际定殖,因此具备野外试验的必备条件。但由于体外试验存在局限性,野外试验中往往难以再现体外试验的结果^[34],因此尚需盆栽试验进一步证实。但体外试验对于筛选菌株工作仍是一个必要步骤。

关于体外抑菌率的计算,本研究采取的是双培养平板面积差法。之前的报道曾出现过一些不同的方法,例如:Idris 等人^[20]用真菌在平板上生长的长度差计算抑菌率;Recep 等人^[35]将 PGPR 划线接种于平板边缘,测量平板中心真菌菌丝覆盖的区域从而计算出抑菌率,该方法由于划线接种 PGPR,不能定量控制接种量,导致结果偏差;Wang 等人^[36]用抽滤后的细菌培养液涂抹平板,观察真菌在该平板上的生长状况计算抑菌率,该法可能会忽略挥发性化合物对病原真菌的抑制作用。所用方法不同会造成对不同菌株抑菌率大小的判断。以本研究中 WP7 和 WP8 菌株拮抗麦根腐 (参见表 1) 为例,如用 Idris 等人的方法计算,则抑菌率 WP8 (19.76%) <

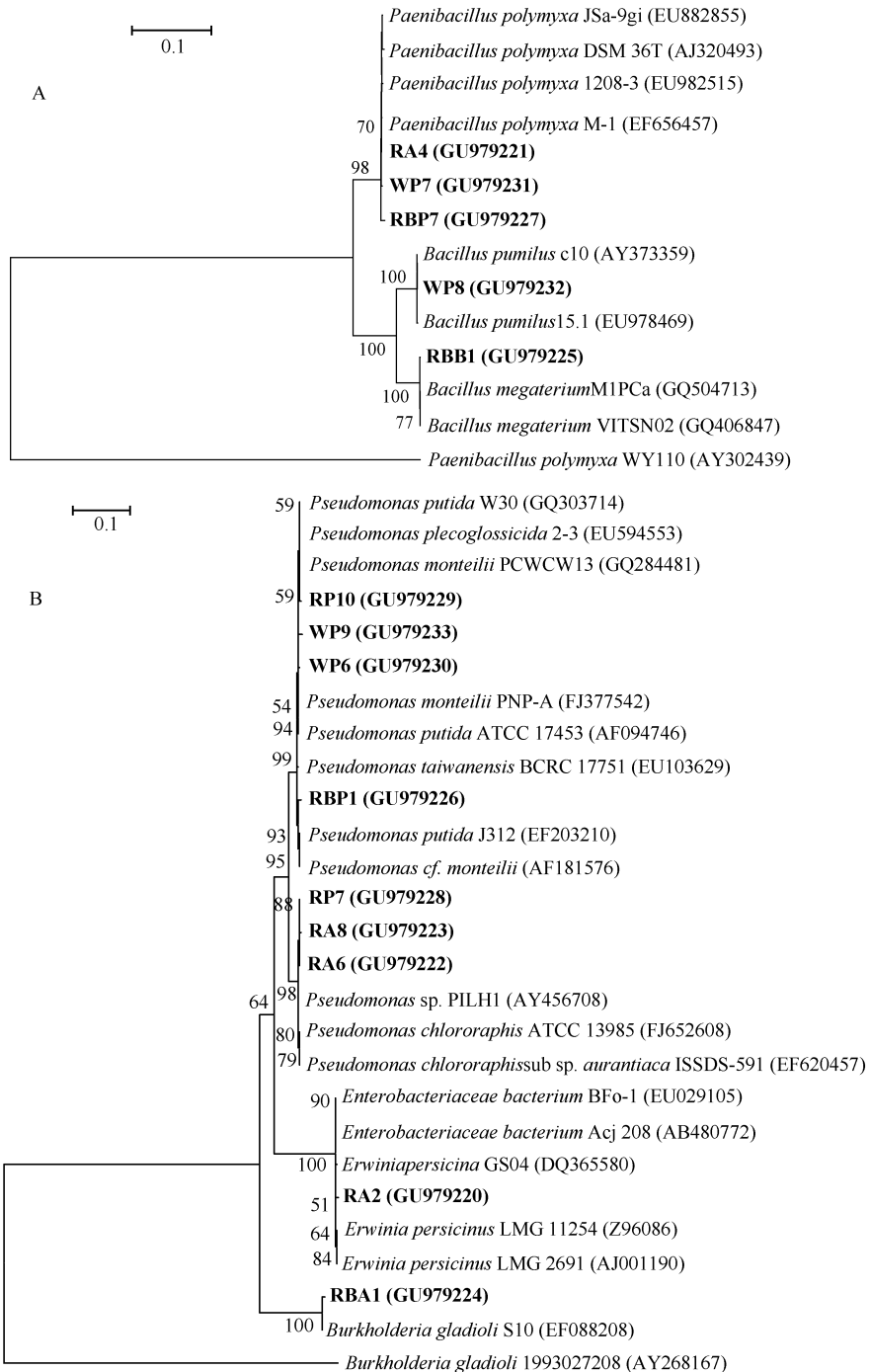


图2 14株PGPR 16S rRNA基因序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic trees of 5 PGPRs within the Enterobacteriaceae family (A) and another 9 PGPRs (B) by using 16S rRNA gene sequences.

WP7 (34.81%), 而以本研究采取的方法计算, 则抑菌率 WP8 (64.67%) > WP7 (28.83%), 显然该法比 Idris 等人的方法更为可靠、准确。

以往报道表明, 细菌抑菌原理包括产氨、氰化物、嗜铁素以及抗生素等^[7-9]。本研究显示, 7 株具有广谱抑菌作用的细菌的作用机制具有多样性, 比如 RA4 就拥有上述所有的抑菌原理。然而, 细菌产

生的一些代谢产物诸如氰化物、抗生素、生长素等等在抑制病原菌或直接促进植物生长的同时, 也会对其它一些非病原菌微生物甚至对植物产生影响。例如, PGPR 产生适量的 IAA 可以促进植物生长^[37], 而有些细菌产生过量的 IAA 反而会抑制植物生长, 成为植物根际有害菌 (Deleterious rhizobacteria, DRB)^[38], 这一现象已在甜菜 (*Beta vulgaris*)^[39]、玉

米^[40]、茛苳^[41]等植物上得到证实。再比如一些 PGPR 通过产 HCN 拮抗病原菌从而间接促生,但许多 DRB 却通过产生 HCN 抑制细胞色素氧化呼吸系统,影响植物根际代谢^[42]。因此 PGPR 与 DRB 的划分并无十分清晰的界限^[43]。PGPR 集中的一些菌属如假单胞菌属(*Pseudomonas*)、布克霍尔德氏菌属

(*Burkholderia*)、杆菌属(*Bacillus*)等,同时也是植物常见病原菌较为集中的几类菌属。这些代谢产物对植物而言,其功能到底是促生或是抑制,取决于产物的浓度以及不同物种或品种植物的忍受力。因此,可以预见本研究所筛细菌,在野外试验中可能有部分会对植物生长产生负面效应。

表 2 细菌体外促生能力

Table 2 *In vitro* plant growth promoting (PGP) activities of bacterial isolates

Strains	NH ₃ production ^a	HCN production ^a	Siderophore production	IAA production (mg/L) ^{bde}	Soluble phosphate (mg P/L) ^{bde}	Soluble potassium (mg/L) ^{bef}
RA2	+	+	-	19.88 ± 1.16 a	ND	ND
RA4	+++	+	+	ND	7.17 ± 2.02 (6.99 ± 0.10) d	1.21 ± 0.13 (2.25 ± 0.06) b
RA8	-	+	+	ND	22.33 ± 8.33 (6.44 ± 0.14) d	1.14 ± 0.18 (2.29 ± 0.05) b
RBA1	+	-	+	ND	ND	ND
RBP7	-	++	-	ND	ND	ND
WP7	-	+	-	ND	ND	ND
WP8	-	-	+	ND	ND	ND
RBB1	++	-	-	10.51 ± 0.50 b	ND	ND
RBP1	+++	+	-	4.85 ± 1.95 c	106.75 ± 9.39 (5.38 ± 0.29) a	ND
WP6	+++	-	-	20.92 ± 1.54 a	68.33 ± 16.07 (5.10 ± 0.49) c	ND
WP9	+	-	-	3.11 ± 0.62 c	97.67 ± 10.60 (5.70 ± 0.56) ab	ND
RP10	+++	+	-	14.19 ± 5.71 b	84.67 ± 12.42 (5.00 ± 0.33) bc	ND
RP7	+++	+	+	ND	ND	0.92 ± 0.16 (3.01 ± 0.17) b
RA6	-	+++	+	ND	ND	1.37 ± 0.38 (3.55 ± 0.25) ab

^a “+++” to “-” represent the different amount of production according to the color differences; ^b Values are means ± standard error (SE); ^c Values in parenthesis represent pH ± SE of culture solution, pH of control is 8.27 ± 0.03; ^d Not detected (ND); ^e Different letters represent significant differences (Duncan-test, $P < 0.05$); ^f Values in parenthesis represent pH ± SE of culture solution, pH of control is 5.04 ± 0.08, soluble potassium of control is 0.67 ± 0.04.

表 3 PGPRs 表型特征

Table 3 Phenotypic characterization of PGPRs

Item	RA2	RA6	RA8	RBA1	RP7	RP10	WP6	WP8	WP7	RBP1	RA4	RBP7	RBB1	WP9
Shape	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Gram reaction	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Catalase activity	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
M - R reaction	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
V - P reaction	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reductase	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Fermentation - Oxidation test ^a	F	F	F	F	F	O	F	ND	F	O	F	F	ND	F
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
Urease	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Proteolysis of gelatin	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
H ₂ S formation	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+

^a “+” means positive reaction; “-” means negative reaction. ^a ND = Not determined.

14 株 PGPR 中,多数具有产 NH₃、HCN 能力。近 60% 芽孢杆菌具有产 IAA 能力,只有 20% 芽孢杆菌能够产 IAA,这与 Ahmad 等人^[1]的研究结果相似。溶磷菌集中在假单胞菌属细菌,且以恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)为主,由于许多该类细菌能够产酸^[44-45],因而具备溶磷能力,从图 3-A 也可

看出溶磷量与溶液 pH 呈显著负相关($P < 0.05$),说明溶磷与细菌产酸密切相关;硅酸盐细菌以绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)为主,其解钾机理迄今尚无定论,从图 3-B 可见,溶钾量与 pH 无显著相关性,说明其机理与产酸无关,有可能是酶解或与胞外多糖类物质有关。

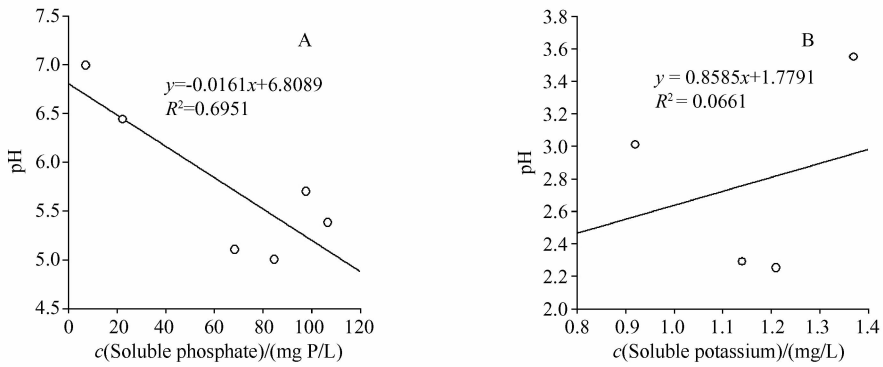


图3 细菌溶磷量和解钾量与培养液 pH 的相关性

Fig. 3 Relationships between soluble phosphate (A), potassium (B) and culture pH.

从菌株鉴定结果看,14株细菌中有8株属于假单胞菌属,5株属于杆菌属,说明菌株来源地(江苏扬州和盐城)土壤中可培养的PGPR多数集中在上述两个菌属。试验并未筛选到相关报道中常见的固氮菌属,但在无氮培养基上却筛选出了5株可以固氮的非固氮菌属细菌,并且RA2、RA8、RBA1、RA6和RP7均可扩增出*nifH*基因,但RA4却未能扩增出该基因,其原因可能是试验中不可控因素导致无氮培养基中尚存微量氮素。从鉴定结果看,RA4属于多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*),很多该类细菌虽具有固氮能力^[46],但并不绝对。

由于本研究所筛细菌具有多种促生机制,因此具有野外应用的巨大潜力,而且这些细菌拥有固氮、解磷、解钾、产IAA等能力,将这些细菌进行组合后,有望在较为贫瘠的土壤上受到明显效果并得到应用。当然,之前需要进行菌株组合及温室盆栽试验,具体结果尚需进一步研究证实。

致谢 本研究中6株植物病原真菌承扬州大学园艺与植物保护学院童蕴慧教授惠赠,特致谢忱!

参考文献

- [1] Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 2008, 163(2): 173-181.
- [2] Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 1980, 286: 885-886.
- [3] Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*, 1999, 63: 1670-1680.
- [4] Glick BR. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1995, 41(2): 109-117.
- [5] Arshad M, Frankenberger Jr WT. Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil*, 1991, 133(1): 1-8.
- [6] Boddey RM, Dobereiner J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1995, 42(1-3): 241-250.
- [7] Scher FM, Baker R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, 1982, 72: 1567-1573.
- [8] Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD, O' Gara F. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(1): 353-358.
- [9] Flaishman MA, Eyal Z, Zilberstein A, Voisard C, Haas D. Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9(7): 642-645.
- [10] de Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 1997, 24(4): 358-364.
- [11] Mantelin S, Touraine B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(394): 27-34.
- [12] Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian*

- Journal of Microbiology*, 2008, 54(10): 876-886.
- [13] Fuhrmann J, Wollum II? AG. Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. *Biology and Fertility of Soils*, 1989, 7(2): 108-112.
- [14] Chanway CP, Holl FB. First year field performance of spruce seedlings inoculated with plant growth promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1993, 39(11): 1084-1088.
- [15] 康贻军, 程洁, 梅丽娟, 胡健, 朴哲, 殷士学. 植物根际促生菌作用机制研究进展. *应用生态学报 (Chinese Journal of Applied Ecology)*, 2010, 21(1): 232-238.
- [16] Gruft H. Nalidixic acid as a decontaminant in L? wenstein-Jensen medium. *Journal of Bacteriology*, 1965, 90(3): 829.
- [17] King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1954, 44(2): 301-307.
- [18] 杨慧, 范丙全, 龚明波, 李全霞. 一株新的溶磷草生欧文氏菌的分离、鉴定及其溶磷效果的初步研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(1): 51-56.
- [19] 李凤汀, 郝正然, 杨则瑗, 张春莉. 硅酸盐细菌 HM8841 菌株解钾作用的研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1997, 37(1): 79-81.
- [20] Idris HA, Labuschaghe N, Korsten L. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control*, 2007, 40(26): 97-106.
- [21] Paulitz T, Zhou T, Rankin L. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically grown cucumber. *Biological Control*, 1992, 2: 226-237.
- [22] Landa BB, Hervas A, Bettiol W, Jimenez DRM. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*, 1997, 25(4): 305-318.
- [23] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 793-796.
- [24] Lorek H. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiologia Plantarum*, 1948, 1: 142-146.
- [25] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1): 47-56.
- [26] 康贻军, 胡健, 单君, 何芳, 朴哲, 殷士学. 两株高效解磷真菌的分离、筛选及其解磷特性的研究. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2006, 33(10): 22-27.
- [27] Miller J, Jenny A, Rhyan J, Saari D, Suarez D. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1997, 9: 244-249.
- [28] Monis PT, Gliglio S, Saint CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry*, 2005, 340(1): 24-34.
- [29] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.
- [30] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [31] Widmer F, Shaffer BT, Porteous LA, Seidler RJ. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 374-380.
- [32] Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(3): 881-887.
- [33] Lee FN, Rush MC. Rice sheath blight: a major rice disease. *Plant Disease*, 1983, 67: 829-832.
- [34] Inam-ul-Haq M, Javed M, Ahmad R, Rehman A. Evaluation of different strains of *Pseudomonas fluorescense* for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Pakistan Journal of Plant Pathology*, 2003, 2: 65-74.
- [35] Recep K, Fikretin S, Erkol D, Cafer E. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. *Biological Control*, 2009, 50(2): 194-198.
- [36] Wang H, Wen K, Zhao X, Wang X, Li A, Hong H. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. *Crop Protection*, 2009, 28(8): 634-639.
- [37] Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 1875-1883.
- [38] Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment*, 2003, 26: 186-199.

- [39] Loper JE, Schroth MN. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 1986, 76: 386-389.
- [40] Sarwar M, Frankenberger Jr WT. Influence of L-tryptophan and auxins applied to the rhizosphere on the vegetative growth of *Zea mays* L. *Plant and Soil*, 1994, 160: 97-104.
- [41] Barazani O, Friedman J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. *Journal of Chemical Ecology*, 1999, 25: 2397-2406.
- [42] Schippers B, Bakker AW, Bakker PAHM, Peer R. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant and Soil*, 1990, 129: 75-83.
- [43] Nehl DB, Allen SJ, Brown JF. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, 1997, 5: 1-20.
- [44] Nijkamp K, van Luijk N, de Bont JAM, Wery J. The solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of cinnamic acid from glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 69 (2): 170-177.
- [45] Mars AE, Gorissen JP, van den Beld I, Eggink G. Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillic acid by *Pseudomonas putida* GS1 in a fed-batch reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(1-2): 101-107.
- [46] Guemouri AS, Berge O, Bourrain M, Mavingui P, Thiery JM. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *European Journal of Soil Biology*, 2000, 36(3): 149-159.

Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria

Yijun Kang^{1,2,3}, Jie Cheng², Lijuan Mei², Shixue Yin^{2*}

(¹ College of Agronomy, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(² College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

(³ School of Life Science and Technology, Yancheng Teachers University, Yancheng 224002, China)

Abstract: [**Objective**] The interaction between plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and plants can be unstable, PGPR with PGP activities may be well adapted to particular soil environment. Based on this, we isolated and identified PGPRs from different rhizosphere soils according to their multiple mechanisms. [**Methods**] Preliminary screening of PGPRs under the premises of PGPR may having the abilities of N₂-fixing, phosphate and potassium solubilization, and resistance against six common pathogenic fungi as well as rhizosphere colonization. After that, multiple PGP activities were detected *in vitro*. Finally, PGPRs were classified and identified by combining physiological and biochemical tests and 16S rRNA gene sequence analysis. [**Results**] Fourteen strains having various mechanisms of PGP activities such as NH₃, IAA, HCN, siderophore, antibiotics production, phosphate and potassium solubilization, and N₂-fixing were isolated from different rhizosphere soils in Yangzhou and Yancheng, Jiangsu province. These 14 isolates could be identified as *Pseudomonas* (7 isolates), *Paenibacillus* (3 isolates), *Bacillus* (2 isolates), *Burkholderia* (1 isolate) and *Erwinia* (1 isolate). [**Conclusion**] Isolates with multiple PGP activities can also be rhizospheric competent, able to survive and colonize in the rhizosphere, providing promising isolates for PGPRs combination to resolve the challenges in field application of PGPR.

Keywords: plant growth promoting rhizobacteria (PGPR); screening; identification

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Foundation of Natural Science of China (40871117)

* Corresponding author. Tel : +86-514-87979575; Fax: +86-514-87978626; E-mail: sxysin@yzu.edu.cn

Received: 9 March 2010/Revised: 27 April 2010