



## 缓解花生连作障碍的根际促生菌分离及功能鉴定

王丹丹, 殷志秋, 孙丽, 刘鑫蓓, 刘佳凝, 庞诗琪, 解志红\*

山东农业大学资源与环境学院, 山东 泰安 271000

**摘要:**【目的】长期连作障碍严重降低花生生产的产量及品质, 根际促生菌可有效降解土壤中自毒化感物质、抑制植物病原菌生长及促进植物生长, 从而有效缓解连作障碍问题。筛选优化具有缓解花生连作障碍能力的多功能根际益生微生物, 验证其益生作用能力, 为根际促生菌株在连作障碍中的应用提供理论依据及技术支持。【方法】采集连作 12 年地块花生根际土壤, 利用以酚酸为唯一碳源的筛选培养基获得具有酚酸自毒化感物质降解及利用能力的根际促生菌, 通过 16S rRNA 基因测序进行系统发育分析, 确定根际促生菌株的分类地位, 并验证其对植物病原菌生长抑制能力及解磷、解钾、产植物激素吲哚乙酸能力。【结果】从连作 12 年的花生发病土壤中获得 7 株可高效降解酚酸类自毒物质且降解底物多样的根际微生物菌株, 经 16S rRNA 测序比对分别为克雷伯氏菌 B02 (*Klebsiella* sp. B02)、克雷伯氏菌 B07 (*Klebsiella* sp. B07)、克雷伯氏菌 B15 (*Klebsiella* sp. B15)、芽孢杆菌 B28 (*Bacillus* sp. B28)、不动杆菌 P09 (*Acinetobacter* sp. P09)、布鲁氏杆菌 VA05 (*Brucella* sp. VA05)、芽孢杆菌 CA04 (*Bacillus* sp. CA04)。促生实验表明, 7 株高效降解菌株均可以合成吲哚乙酸, 3 株具有固氮能力, 4 株菌具有解有机磷及无机磷的能力, 2 株菌具有解钾的能力。拮抗实验表明, 2 株菌可以抑制多种植物病原菌的生长, 均为芽孢杆菌属。选取 *Bacillus* sp. B28 初步验证对花生种子萌发及幼苗生长的影响, 结果表明根际促生菌可显著缓解酚酸对花生种子发芽的抑制, 并明显促进花生幼苗的生长。【结论】获得多株具有降解酚酸类自毒化感物质、抑制植物病原菌生长及促进植物生长的多功能花生根际促生菌, 更好地为根际促生菌在连作障碍治理中的有效应用提供菌株及技术支持。

**关键词:** 花生, 连作障碍, 根际促生菌, 功能鉴定

花生是我国主要油料经济作物, 伴随现代农业规模化及集约化发展, 花生产业的种植面积及单  
业技术发展与革新, 经济作物的种植模式开始向 位产量也在持续增长, 但同时也带来了连作障

基金项目: 国家自然科学基金(31570063, 31870020); NSFC-山东省联合基金重点支持项目(U1806206); 山东农业大学引进人才科研启动基金(010/72091)

\*通信作者。E-mail: zhihongxie211@163.com

收稿日期: 2021-03-20; 修回日期: 2021-05-11; 网络出版日期: 2021-10-12

碍, 花生连作障碍已成为制约花生产业可持续发展的重要影响因子<sup>[1-2]</sup>。

连作障碍导致当季作物损失巨大, 严重的几乎绝产, 同时还降低了农产品的质量与安全性, 如何实现安全有效地缓解连作障碍是目前亟需解决的问题。传统治理措施包括选用改善栽培制度、土壤熏蒸或者增施消石灰, 这些措施使连作障碍暂时得以缓解, 但是对于高度规模化和集约化的生产模式并不能彻底解决连作问题, 甚至会带来环境污染和食品安全问题<sup>[3]</sup>。根际区域微生物数量种类丰富且功能多样<sup>[4-5]</sup>, 而根际促生菌 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 是指附着于植物根际土壤颗粒中, 与植物根系相互影响、相互作用、相互促进, 对植物健康生长发挥着重要作用的一类根际微生物, 有望成为一种健康有效治理连作障碍的措施<sup>[6-8]</sup>。

连作障碍是植物与土壤两个系统中多个因素相互作用的结果, 其主要是由于土壤自毒化感物质积累、土壤微生物区系失衡及土壤理化性质恶化引起的<sup>[9-10]</sup>。酚酸类化感物质是广泛存在于植物中的一类重要的次生代谢产物, 常被认为是根系分泌物中主要的自毒化感物质, 对植物种子发芽、生长都有抑制作用, 还能造成作物幼苗根系细胞膜受到损伤, 影响作物健康生长。近年来, 科研人员利用以酚酸类物质作为唯一碳源的培养基, 已从自然环境中获得多种具有酚酸降解功能的细菌, 在缓解连作障碍中具有较好的实际应用价值<sup>[11-12]</sup>。植物土传病害也是导致连作障碍出现影响农业生产的主要因素之一, 传统对其防治主要以化学防治为主, 施用化学农药虽有一定效果, 但价格昂贵且长期使用会增加病原菌的抗性并造成环境的污染。根际促生菌在生长代谢过程中可产生多种具有抑菌活性的活性物质, 这些物

质可以有效地抑制甚至可以杀死植物病原菌, 且对环境无害, 因此利用微生物及其所产生的抗菌物质进行植物病害生物防治具有很大的应用价值和潜力<sup>[13-14]</sup>。连作障碍还会导致土壤理化性质恶化, 不利于作物对养分的利用, 而根际促生菌通过多种促生机制促进植物生长。根际促生菌首先可以通过固氮、解磷及解钾等作用提高土壤中养分的含量及利用率, 为植物提供更多可利用的营养元素; 其次可以通过产生植物类激素促进植物生长<sup>[14]</sup>。

施用根际促生菌是治理连作障碍的重要方向, 而寻找有效的可以使用的多功能根际促生菌为最重要的部分, 本研究从 12 年花生连作障碍根际土壤中运用选择培养基筛选有酚酸自毒化感物质降解功能的菌株, 并测定了菌株对植物病原菌生长抑制、解磷、解钾及产 IAA (吲哚乙酸, indole-3-acetic acid) 的能力。本研究结果将为开发缓解连作障碍菌剂提供菌种资源, 并为根际促生菌治理连作障碍机理研究奠定前期基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试土壤:** 样品于 2020 年 5 月取自青岛市 12 年连续花生种植地块, 将花生整株采集, 去除根周围的大块附着土, 收集根系 1 cm 内的根际土 4 °C 保存。

**1.1.2 培养基、主要试剂和仪器:** LB 培养基 (g/L): Tryptone 10, Yeast extract 5, NaCl 10, pH 7.0。PDA 培养基 (g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, pH 7.0。NA 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 3, 氯化钠 5, pH 7.0。无机盐培养基 (g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.3, 葡萄糖 1,

NaCl 5, pH 7.0。Ashby 无氮固体培养基(g/L): 甘露醇 10.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub> 0.2, NaCl 0.2, CaSO<sub>4</sub> 0.1, CaCO<sub>3</sub> 5.0, pH 7.0。卵黄固体培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, NaCl 0.3, KCl 0.3, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.03, 蛋黄卵磷脂 0.2, CaCO<sub>3</sub> 5, Yeast extract 0.4, pH 7.0。无机磷固体培养基(g/L): Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, NaCl 0.3, KCl 0.3, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.003, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3, 葡萄糖 10, pH 7.0。缺钾固体培养基(g/L): 蔗糖 5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005, FeCl<sub>3</sub> 0.005, CaCO<sub>3</sub> 0.1, 钾长石粉 1, pH 7.0。

Salkowski 比色液(0.5 mol/L FeCl<sub>3</sub> 与 35% 高氯酸 1:5 混匀)、16S 扩增引物购自 TaKaRa 生物技术有限公司(大连)、高保真聚合酶 Primers STAR HS DNA polymerase 购自 TaKaRa 生物技术有限公司(大连)、基因组提取试剂盒购自 Axygen 生物技术有限公司(杭州)。

PCR 仪购于赛默飞世尔科技(ThermoFisher), 凝胶成像系统购于北京君意东方电泳设备有限公司, 酶标仪购于美国伯腾仪器有限公司(BioTek); 超净工作台购于苏州安泰空气技术有限公司; 微生物培养箱购于上海龙跃仪器设备有限公司; 摇床购于上海一恒科学仪器有限公司。

## 1.2 酚酸自毒物质降解菌的筛选

降解花生自毒物质微生物的分离主要包括富集、选择培养、纯化和驯化 4 个部分。

**1.2.1 富集:** 从连作 12 年的花生耕地中选取长势较好的花生植株, 采集根际土壤, 按 1% 将土壤接种于 1000 mg/L 苯甲酸的无机盐培养基中, 35 °C 摇床 180 r/min, 使能够降解苯甲酸的菌株得到富集。同理富集可降解对羟基苯甲酸、水杨

酸、肉桂酸、香草酸和香豆酸的微生物。

**1.2.2 选择培养:** 土壤悬液在摇床中培养 10 d 后稀释涂布, 共设置 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 六个浓度梯度, 涂布于 LB 培养基上, 35 °C 培养。

**1.2.3 纯化:** 采用平板划线法, 用接种环挑取单菌落并在 LB 固体培养基上画线培养, 待菌落长好后观察其特征包括菌落的大小、颜色、透明度、粘度、形状、菌落边缘(光滑、锯齿状、波浪状、纤维状等)、表面光滑程度(光滑、粗糙、皱纹、同心环、辐射状)、隆起(凸、凹、平)、基质是否产生水溶性色素、荧光的有无等, 若培养特征完全一致则为同一种菌, 如否则需多次划线反复纯化。

**1.2.4 驯化:** 为获得高效降解菌株, 在分离纯化之后对其进行驯化, 按相同方法配无机盐培养基, 将筛选得到的菌株再接回至无机盐培养基上, 将酚酸自毒物质的浓度提高至 5 g/L, 部分能适应或者产生变异的微生物留下来, 成为优势菌群。

## 1.3 降解菌的鉴定

采取提基因组 DNA 的方式扩增 16S rRNA 序列片段, 扩增引物为: 27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG; 1429R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT。

扩增结束后电泳检测 PCR 产物片段的长度和亮度, 验证合格的送至测序公司测序, 测序获得的 16S rRNA 序列片段在 EZBioCloud 网站上进行序列同源性比对分析。

## 1.4 自毒物质降解率测定

降解率测定分别以 6 种自毒物质为唯一碳源, 将-80 °C 甘油管保存的根际促生菌菌种在 LB 固体培养基平板上划线活化, 置于 35 °C 培养箱培养 12 h。挑取 LB 固体培养基平板上的单菌落

接种于 3 mL 液体 LB 试管, 35 °C、170 r/min 振荡培养 12 h 作为种子液。将种子液以 1% 的接种量转接至 LB 液体培养基中, 35 °C、180 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.5, 取 1 mL  $OD_{600}$  为 0.5 的菌液加入到 49 mL 无机盐培养液中(对照加入 1 mL 无菌水), 培养液中以对应的自毒物质为唯一碳源, 浓度为 5 g/L, 35 °C 摇床培养 72 h, 8000 r/min 离心 10 min, 采用紫外可见分光光度法, 取上清液测定对应自毒物质的最大吸收峰波长的吸光度值计算降解率(公式 1)。

各物质的最大吸收波长分别为苯甲酸 230 nm、对羟基苯甲酸 246 nm、水杨酸 298 nm、肉桂酸 269 nm、香草酸 250 nm、香豆酸 268 nm。

降解率=(对照吸光度-处理后样品吸光度)/对照吸光度×100%。公式(1)

### 1.5 根际促生菌促生能力测定

固氮能力测定采用 Ashby 无氮固体培养基, 将目标根际促生菌接种于 Ashby 无氮固体培养基上, 35 °C 培养 7 d, 记录菌株的长势。

解磷能力测定包含有机磷解磷能力及无机磷解磷能力测定: 有机磷解磷能力测定采用卵黄固体培养基, 无机磷解磷能力测定采用无机磷固体培养基, 将目标根际促生菌接种于卵黄固体培养基/无机磷固体培养基上, 35 °C 培养 3 d, 观察是否有溶磷圈出现。

解钾能力测定采用缺钾固体培养基, 将目标根际促生菌接种于缺钾固体培养基上, 35 °C 培养 7 d, 观察是否有溶钾圈出现。

IAA 合生能力测定采用 Salkowski 法, 将目标根际促生菌接种于含 L-色氨酸(200 mg/L)的液体 LB 培养基中, 35 °C、170 r/min 摇床培养 4 d, 菌液于 4 °C、8000 r/min 条件下离心 10 min, 取

上清液于酶标板中, 加入等体积 Salkowski 比色液, 黑暗条件下静置反应 30 min 后, 迅速于 530 nm 下测定吸光度。

### 1.6 植物病原菌生长抑制实验

对真菌病原菌的生长抑制实验在 PDA 平板上进行, 首先将病原菌接种到 PDA 培养基上, 放置于 30 °C, 待菌丝长直径约 1 cm 后, 在距离菌丝边缘 3 cm 处接种目标根际促生菌, 再将平板置于 30 °C 培养箱中, 直至病原菌菌丝长满整个平板。

对细菌病原菌的生长抑制实验在 NA 平板上进行, 半固体培养基按 1% 的接种量加入细菌植物病原菌菌液( $OD_{600}=0.5$ ), 混合均匀后倒入无菌培养皿, 培养基凝固接种根际促生菌, 30 °C 培养 3 d。

观察拮抗圈的大小, 以此来检测目标根际促生菌对植物病原菌的生长抑制活性。

### 1.7 种子发芽实验

根际促生菌缓解酚酸抑制作物种子发芽实验, 选取花生为实验对象, 花生浸泡于 70% 酒精 10 min 后用无菌水清洗 3 遍完成消毒。设置 3 组实验: CK 为空白对照, 消毒后的花生种子置于含无菌水的培养皿中; 处理 T1 为消毒后的种子置于含 1 g/L 的酚酸溶液中; T2 处理在 T1 处理的基础上加入筛选到的酚酸降解细菌(细菌在  $OD_{600}$  为 0.5 时离心收集菌体, 菌体用无菌水清洗 3 次后重悬, 接种量为 1%)。每个处理 10 粒种子, 设置 3 次重复, 培养 4 d。

发芽指标测定: 以露白>1/2 种子长为标准, 发芽率(势)=(发芽种子数/供试种子数)×100%。

### 1.8 盆栽实验

用 70% 酒精消毒花生种子 10 min, 然后用无菌水冲洗种子 3 次。洗净的种子用无菌水浸泡 10 h

使之充分吸水。在灭菌完成的蛭石中拌入 MS 营养液达到湿润状态，然后分装至塑料杯中，每杯约 100 g，蛭石中间放入一颗花生种子，将活化好的菌株菌液统一调节  $OD_{600}$  值为 0.5，每杯加入 300  $\mu$ L 菌液，对照则加入同等灭活的菌液，每组重复 5 次。培养 30 d 后小心从蛭石中取出完整的花生植株，将花生植株上残留的蛭石冲洗干净，擦干后分别测量植株的根长、苗高和鲜重，用滤纸包好做好记号放入烘箱中一同烘干，24 h 后取出烘干后的花生植株测定干重。

### 1.9 数据处理及分析

利用 Microsoft Excel 和 Origin 9.1 软件进行数据分析及图表制作。

## 2 结果和分析

### 2.1 酚酸高效降解菌的筛选

通过高浓度酚酸自毒物质驯化后，共计分离得到 131 株菌株，通过对酚酸降解菌自毒物质降解率测定，有 51 株根际促生菌对各自酚酸自毒物

质降解率高于 50%。利用底物广谱实验探究所筛降解率高的 51 株根际促生菌对于其他自毒物质的降解效果，实验结果如图 1 所示，表明有 14 株菌对 6 种酚酸都有降解能力(B01、B02、B03、B07、B15、B28、P04、P09、P15、SA06、VA05、VA12、CA01、CA04)，其中 7 株 B02、B07、B15、B28、P09、VA05、CA04 对苯甲酸、对羟基苯甲酸、水杨酸、肉桂酸、香草酸、香豆酸降解效率均超过 50%。

### 2.2 酚酸高效降解菌的鉴定

对分离筛选得到的 7 株高效降解菌株的 16S rRNA 基因序列通过 NCBI 数据库完成分子生物学鉴定，其结果如表 1 所示。从表 1 中的结果可以看到，7 株高效降解菌株与其相似菌的相似度均超过 99%，分别为：克雷伯氏菌 B02 (*Klebsiella* sp. B02)、克雷伯氏菌 B07 (*Klebsiella* sp. B07)、克雷伯氏菌 B15 (*Klebsiella* sp. B15)、芽孢杆菌 B28 (*Bacillus* sp. B28)、不动杆菌 P09 (*Acinetobacter* sp. P09)、布鲁氏杆菌 VA05 (*Brucella* sp. VA05)、芽孢杆菌 CA04 (*Bacillus* sp. CA04)。

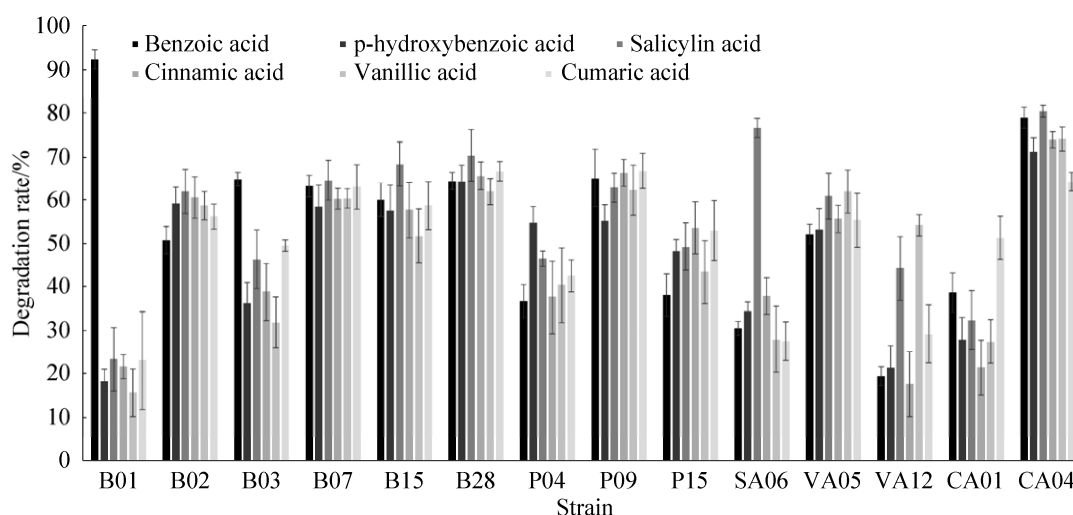


图 1. 14 株根际促生菌对 6 种酚酸降解率

Figure 1. The degradation rates of six phenolic acids by 14 plant growth-promoting rhizobacteria.

表 1. 菌株的分类  
Table 1. Classification of strains

Strains	Top-hit taxon	Top-hit strain	Accession No. of similar strains	Similarity/%	Completeness/%
B02	<i>Klebsiella variicola</i>	SB5531 (T)	CAAHGN010000012	99.93	96.5
B07	<i>Klebsiella variicola</i>	SB5531 (T)	CAAHGN010000012	99.93	96.6
B15	<i>Klebsiella variicola</i>	SB5531 (T)	CAAHGN010000012	99.86	95.8
B28	<i>Bacillus halotolerans</i>	ATCC 25096 (T)	LPVF01000003	99.93	94.6
P09	<i>Acinetobacter pittii</i>	CIP 70.29 (T)	APQP01000001	99.79	95.9
VA05	<i>Brucella intermedia</i>	LMG 3301 (T)	ACQA01000003	100.00	97.5
CA04	<i>Bacillus halotolerans</i>	ATCC 25096 (T)	LPVF01000003	99.44	97.1

### 2.3 根际促生菌促生特性

定殖在根际的微生物通常会发挥其促进植物生长的特性, 如调节植物激素水平、固氮、解磷、解钾等, 为了进一步探究所筛选菌株的促生特性, 对 7 株高效降解菌株各项促生能力进行检测, 结果如表 2 所示。

定量检测植物根际促生菌的产 IAA 能力, 7 株高效降解菌株均可以合成植物激素 IAA, 其中菌株 *Bacillus* sp. B28 在相同条件下分泌的 IAA 最多, 达到 9.58 mg/L; 其次为 *Klebsiella* sp. B02, 分泌量为 9.56 mg/L; 7 株高效降解菌中 IAA 分泌最少的为 *Acinetobacter* sp. P09, 但也达到了 6.66 mg/L。

定性检测 7 株高效降解菌固氮、解磷及解钾的能力, 其中 *Klebsiella* sp. B02、*Klebsiella* sp. B07、*Klebsiella* sp. B15 可在 Ashby 无氮固体培养基正常生产, 证明这 3 株根际促生菌具有固氮能力; 有 4 株菌表现出解有机磷及无机磷的能力,

分别为 *Klebsiella* sp. B02、*Klebsiella* sp. B07、*Klebsiella* sp. B15 及 *Acinetobacter* sp. P09; 有 2 株菌表现出解钾的能力, 为 *Klebsiella* sp. B07、*Klebsiella* sp. B15。

### 2.4 根际促生菌抑制植物病原菌生长特性

选取 4 株植物病原真菌及 1 株植物病原细菌进行拮抗实验, 结果如表 3 所示。*Bacillus* sp. B28 及 *Bacillus* sp. CA04 对 5 种常见的植物病原菌生长都有抑制能力, 包括黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*)、疫霉菌 (*Phytophthora capsici*)、灰霉菌 (*Botrytis cinerea*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 及劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*), *Klebsiella* sp. B07 仅对黄曲霉菌表现出了较弱的抑制效果, 其余 4 株根际促生菌 *Klebsiella* sp. B02、*Klebsiella* sp. B15、*Acinetobacter* sp. P09 及 *Brucella* sp. VA05 没有拮抗植物病原菌能力。

表 2. 促生活性检测  
Table 2. Promoting growth feature test

Strains	IAA production/(mg/L)	Nitrogen fixation	Phosphorus solution	Potassium solution
<i>Klebsiella</i> sp. B02	9.56±0.08	+	+	-
<i>Klebsiella</i> sp. B07	8.33±0.15	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp. B15	9.21±0.08	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. B28	9.58±0.08	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp. P09	6.66±0.07	-	+	-
<i>Brucella</i> sp. VA05	7.82±0.15	-	+	-
<i>Bacillus</i> sp. CA04	8.64±0.21	-	-	-

+: strain has the related capacity; -: strain does not have the related capacity.

表 3. 植物病原菌生长抑制实验

Table 3. Antagonistic assay against plant pathogens

Strains	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
<i>Klebsiella</i> sp. B02	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp. B07	W	-	-	W	-
<i>Klebsiella</i> sp. B15	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. B28	++	+	++	++	+
<i>Acinetobacter</i> sp. P09	-	-	-	-	-
<i>Brucella</i> sp. VA05	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. CA04	++	+	++	++	++

++: strong inhibition (the radius >2 mm); +: inhibition (the radius between 0.5 mm and 2 mm); W: weak inhibition (the radius <0.5 mm); -: no inhibition.

## 2.5 *Bacillus* sp. B28 对花生种子萌发及幼苗生长的影响

高效降解菌 *Bacillus* sp. B28 对 6 种常见酚酸类自毒化感物质降解率均超过 50%，另外 *Bacillus* sp. B28 的 IAA 合成能力最强，且对多种植物病原菌都有很强的拮抗能力，因此选取 B28 验证其缓解酚酸(苯甲酸)抑制花生种子萌发及促进花生幼苗生长的能力。

**2.5.1 *Bacillus* sp. B28 缓解酚酸对花生种子萌发的抑制：**经过不同处理后花生种子萌发的能力如图 2 所示，各处理在第 2 天开始种子发芽，空白对照发芽率达 80%，苯甲酸处理实验组 T1 的种子发芽率仅为 10%，而添加 B28 可显著缓解酚酸对花生种子萌发的副作用，实验组 T2 的发芽率恢复至 56.7%，随着种植时间延长，T2 的发芽率逐渐升高，在处理第 4 天与空白对照恢复一致。本实验结果表明苯甲酸显著抑制花生种子的萌发，而根际促生菌 *Bacillus* sp. B28 可有效缓解苯甲酸对种子萌发的影响。

**2.5.2 *Bacillus* sp. B28 促进花生幼苗生长：**幼苗盆栽实验结果如表 4 所示，花生植株生长的对比如图 3 所示，盆栽基质中添加根际促生菌 B28 对

花生的鲜重、干重、株高、根长影响显著，花生鲜重增加 30.85%，干重增加 57.60%，地上部分苗高增加 12.55%，地下部分根长增加 37.48%。室内盆栽试验测定菌株对植物生长作用影响表明，*Bacillus* sp. B28 对花生有明显的促进生长作用。

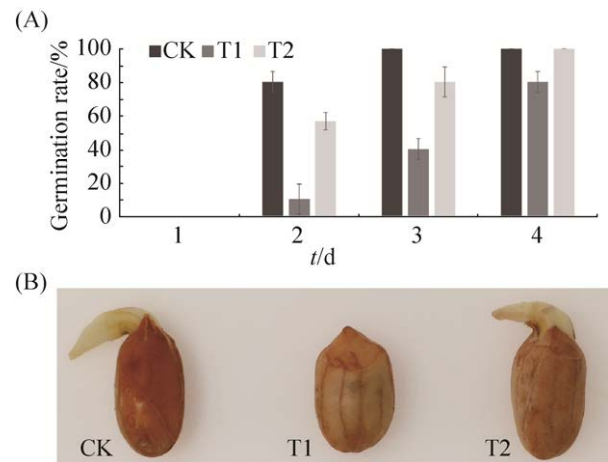


图 2. *Bacillus* sp. B28 缓解苯甲酸对花生种子萌发的抑制

Figure 2. *Bacillus* sp. B28 relieves the inhibition of benzoic acid on peanut seed germination. A: the indexes of peanut seed germination under different treatment; B: the difference of peanut seed germination (seeds of the second day).



表 4. *Bacillus* sp. B28 对花生生物量的影响Table 4. The effects of *Bacillus* sp. B28 on peanut growth

Strains	Fresh weight/g	Dry weight/g	Shoot length/cm	Root length/cm
CK	5.646±0.349 b	0.566±0.059 b	18.80±0.689 b	10.78±0.626 b
<i>Bacillus</i> sp. B28	7.388±0.521 a	0.892±0.039 a	21.16±0.321 a	14.82±0.455 a

a, b: significant difference at  $P < 0.05$  level.

图 3. *Bacillus* sp. B28 花生盆栽促生实验

Figure 3. The peanut pot experiment of *Bacillus* sp. B28.

### 3 讨论和结论

根际微生物被看作植物的第二基因组, 对植物的生长和健康发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。根际促生菌可通过以下几个方面缓解连作障碍, 保护作物健康生长: (1) 降解自毒化感物质。在连作障碍土壤中酚酸类自毒化感物质往往是几种甚至是十几种共同存在的<sup>[15]</sup>, 花生连作障碍土壤中常见的有对羟基苯甲酸、香草酸、香豆酸、苯甲酸、肉桂酸、邻苯二甲酸、阿魏酸等<sup>[11,16-17]</sup>, 其降解是多种微生物及多种降解途径共同发挥作用, 因此筛选高效且降解底物多样的根际促生菌, 是利用

生物方法治理作物连作障碍的关键<sup>[18-19]</sup>。(2) 拮抗植物病原菌。根际环境微生物数量众多, 微生物之间竞争异常激烈, 根际促生菌基因组中相对大比例的基因用来编码合成脂肽和聚酮等活性物质以拮抗各种真菌和细菌, 增强其竞争优势<sup>[20-21]</sup>, 这些物质可以抑制甚至杀死植物病原菌, 从而有效抑制连作障碍中土传病害的发生<sup>[22]</sup>。(3) 促进作物生长。根际促生菌一方面可以提高土壤中可利用养分的含量, 另一方面可以通过产生植物类激素促进植物生长, 如合成植物激素 IAA<sup>[23]</sup>。

根际促生菌可通过多种途径缓解花生连作障碍, 对作物健康生长息息相关<sup>[24-26]</sup>, 因此, 筛选获得高效的多功能根际促生菌具有重要意义, 但是根际促生菌在实际应用过程中仍存在着有效菌株在土壤中存活期短、效果不稳定、作用效果单一等问题, 制约着根际促生菌在连作障碍治理中的应用, 因此筛选效果稳定的微生物菌群是生物方法治理成功的关键。目前, 利用以酚酸类自毒化感物质为唯一碳源的筛选培养基从自然环境中已获得多种具有酚酸降解功能的根际促生菌, 包括芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、固氮菌属(*Azotobacter* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、微小杆菌属(*Exiguobacterium* sp.)等<sup>[12,27-28]</sup>, 颜艳伟等也对连作花生根际土壤中优势微生物菌群进行了系统的分离鉴定, 为根际促生菌分离提供了参考依据<sup>[29]</sup>。这些根际微生物



不仅可降解酚酸类自毒化感物质且降解底物多样, 在缓解连作障碍中具有较好的实际应用价值, 但是对于其他益生功能如对植物病原菌拮抗能力及促生能力报道较少, 没有挖掘根际促生菌的多功能性。

本研究从连作 12 年花生根际土壤中筛选根际促生菌, 可适应连作障碍土壤极端环境, 提高外源菌剂的存活率从而发挥作用。通过降解率及底物多样性实验, 获得 7 株高效降解菌株, 其中 2 株为革兰氏阳性菌, 芽孢杆菌 B28 及芽孢杆菌 CA04; 5 株为革兰氏阴性菌, 克雷伯氏菌 B02、克雷伯氏菌 B07、克雷伯氏菌 B15、不动杆菌 P09 及布鲁氏杆菌 VA05。促生实验表明, 7 株菌株均有合成 IAA 的能力, 但对于解磷、解钾及固氮, 5 株革兰氏阴性菌表现出了一定的能力, 而 2 株革兰氏阳性菌均没有解磷、解钾及固氮能力。拮抗实验表明, 2 株革兰氏阳性菌对常见的植物病原菌均表现出了较强的生长抑制活性, 而 5 株革兰氏阴性菌对植物病原菌基本没有拮抗能力。

本研究对根际促生菌自毒化感物质降解、植物病原菌生长抑制及促进花生生长特性只进行了基础实验及分析, 作用机理仍需进一步研究。通过高效降解菌拮抗及促生实验发现, 不同种属功能差异较明显, 没有任何单一根际促生菌能包含所有期望的益生功能, 因此, 在筛选根际促生菌时, 应包含多个种属, 防止获得的菌株功能单一, 限制其应用范围。也可将多个具有自毒化感物质降解、抑制植物病原菌生长及促生能力的根际促生菌配制高效多功能复合菌剂, 从而提高根际促生菌对连作障碍的综合治理效果。

## 参考文献

[1] Wan SB, Zhang JL. Discussion on new ways to reduce cost

and increase efficiency of peanut industry in China. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2019, 41(5): 657–662. (in Chinese)

万书波, 张佳蕾. 中国花生产业降本增效新途径探讨. *中国油料作物学报*, 2019, 41(5): 657–662.

[2] Tang CH, Guo F, Zhang JL, Yang S, Meng JJ, Geng Y, Wang JG, Li XG, Wan SB. Research progress on mechanism of peanut continuous cropping obstacle and its mitigation countermeasures. *Journal of Peanut Science*, 2019, 48(1): 66–70. (in Chinese)

唐朝辉, 郭峰, 张佳蕾, 杨莎, 孟静静, 耿耘, 王建国, 李新国, 万书波. 花生连作障碍发生机理及其缓解对策研究进展. *花生学报*, 2019, 48(1): 66–70.

[3] Chen T, Lin S, Wu LK, Lin WX, Sampietro DA. Soil sickness: current status and future perspectives. *Allelopathy*, 2015, 36(2): 167–195.

[4] Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8): 478–486.

[5] Sasse J, Martinoia E, Northen T. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science*, 2018, 23(1): 25–41.

[6] Zhou WJ, Lv DG, Qin SJ. Research progress in interaction between plant and rhizosphere microorganism. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2016, 38(3): 253–260. (in Chinese)

周周杰, 吕德国, 秦嗣军. 植物与根际微生物相互作用关系研究进展. *吉林农业大学学报*, 2016, 38(3): 253–260.

[7] Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci E, Subramanian S, Smith DL. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1473.

[8] Tao CY, Li R, Xiong W, Shen ZZ, Liu SS, Wang BB, Ruan YZ, Geisen S, Shen QR, Kowalchuk GA. Bio-organic fertilizers stimulate indigenous soil *Pseudomonas* populations to enhance plant disease suppression. *Microbiome*, 2020, 8(1): 1–14.

[9] Li TL, Yang LJ. Overcoming continuous cropping obstacles—the difficult problem. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(5): 916–918. (in Chinese)

李天来, 杨丽娟. 作物连作障碍的克服——难解的问题. *中国农业科学*, 2016, 49(5): 916–918.

[10] Schandry N, de Becker C. Allelopathic plants: models for studying plant-interkingdom interactions. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(2): 176–185.

[11] Zhang CY, Yu CY, Gao JS. Isolation and identification of a phenolic acids-degrading bacterium from peanut soil.

- Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48(5): 93–95, 99. (in Chinese)  
张春杨, 于春雨, 高金山. 花生土壤酚酸降解菌的分离和鉴定. *安徽农业科学*, 2020, 48(5): 93–95, 99.
- [12] Wang Y, Zhang W, Zhang Z, Wang W, Xu S, He X. Isolation, identification and characterization of phenolic acid-degrading bacteria from soil. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(1): 208–220.
- [13] Niu B, Wang WX, Yuan ZB, Sederoff RR, Sederoff H, Chiang VL, Borriss R. Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 585404.
- [14] Oleńska E, Małek W, Wójcik M, Swiecicka I, Thijs S, Vangronsveld J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: a methodical review. *Science of the Total Environment*, 2020, 743: 140682.
- [15] Li ZH, Wang Q, Ruan X, Pan CD, Jiang DA. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2010, 15(12): 8933–8952.
- [16] Li PD, Wang XX, Li YL, Wang HW, Liang FY, Dai CC. The contents of phenolic acids in continuous cropping peanut and their allelopathy. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(8): 2128–2134. (in Chinese)  
李培栋, 王兴祥, 李奕林, 王宏伟, 梁飞燕, 戴传超. 连作花生土壤中酚酸类物质的检测及其对花生的化感作用. *生态学报*, 2010, 30(8): 2128–2134.
- [17] Liu P, Zhao HJ, Tang ZH, Zhang YF, Lin HT, Shen YW, Wang JT, Wan SB. Effects of continuous cropping on root exudates of different resistance peanut (*Arachis hypogaea* L.) varieties and allelochemicals content in soil. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2015, 37(4): 467–474. (in Chinese)  
刘苹, 赵海军, 唐朝辉, 张玉凤, 林海涛, 沈玉文, 王江涛, 万书波. 连作对不同抗性花生品种根系分泌物和土壤中化感物质含量的影响. *中国油料作物学报*, 2015, 37(4): 467–474.
- [18] Monisha TR, Ismailsab M, Masarbo R, Nayak AS, Karegoudar TB. Degradation of cinnamic acid by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas* sp. TRMK2. *3 Biotech*, 2018, 8(8): 1–8.
- [19] Xiang W, Wei XL, Tang H, Li LB, Huang RS. Complete genome sequence and biodegradation characteristics of benzoic acid-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. SCB32. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 1–12.
- [20] Shi SJ, Nuccio EE, Shi ZJ, He ZL, Zhou JZ, Firestone MK. The interconnected rhizosphere: High network complexity dominates rhizosphere assemblages. *Ecology Letters*, 2016, 19(8): 926–936.
- [21] Wang DD, Xu ZH, Zhang GS, Xia LM, Dong XY, Li Q, Liles MR, Shao JH, Shen QR, Zhang RF. A genomic island in a plant beneficial rhizobacterium encodes novel antimicrobial fatty acids and a self-protection shield to enhance its competition. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(9): 3455–3471.
- [22] Dror B, Wang ZQ, Brady SF, Jurkevitch E, Cytryn E. Elucidating the diversity and potential function of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic gene clusters in the root microbiome. *bioRxiv*, 2020, DOI:10.1101/2020.06.07.138487.
- [23] Ryu MH, Zhang J, Toth T, Khokhani D, Geddes BA, Mus F, Garcia-Costas A, Peters JW, Poole PS, Ané JM, Voigt CA. Control of nitrogen fixation in bacteria that associate with cereals. *Nature Microbiology*, 2020, 5(2): 314–330.
- [24] Liu Y, Liu LD, Zhang LL, Wu Y, Wang GW, Wang Q, Jiang Y. Screening, identification of multifunctional peanut root-promoting rhizobacteria and its promoting effects on peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(10): 125–134. (in Chinese)  
刘晔, 刘晓丹, 张林利, 吴越, 王国文, 汪强, 姜瑛. 花生根际多功能高效促生菌的筛选鉴定及其效应研究. *生物技术通报*, 2017, 33(10): 125–134.
- [25] Yu RQ, Kurt Z, He F, Spain JC. Biodegradation of the allelopathic chemical pterostilbene by a *Sphingobium* sp. strain from the peanut rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(5): e02154–18.
- [26] Syed S, Tollamadugu NVKVP, Lian B. *Aspergillus* and *Fusarium* control in the early stages of *Arachis hypogaea* (groundnut crop) by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) consortium. *Microbiological Research*, 2020, 240: 126562.
- [27] Khalid M, Hassani D, Bilal M, Asad F, Huang DF. Influence of bio-fertilizer containing beneficial fungi and rhizospheric bacteria on health promoting compounds and antioxidant activity of *Spinacia oleracea* L. *Botanical Studies*, 2017, 58(1): 35.
- [28] Wu FH, An YQ, An YR, Wang XJ, Cheng ZY, Zhang Y, Hou XW, Chen CX, Wang L, Bai JG. *Acinetobacter calcoaceticus* CSY-P13 mitigates stress of ferulic and p-hydroxybenzoic acids in cucumber by affecting antioxidant enzyme activity and soil bacterial community. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1262. DOI:10.3389/fmicb.2018.01262.
- [29] Yan YW, Zhang H, Liu L, Xian HQ, Cui DJ. Isolation and identification of dominant microorganisms in rhizosphere of continuous cropping with peanut. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(6): 835–842. (in Chinese)  
颜艳伟, 张红, 刘露, 咸洪泉, 崔德杰. 连作花生田根际土壤优势微生物的分离和鉴定. *微生物学报*, 2011, 51(6): 835–842.

# Isolation and identification of peanut plant-growth promoting rhizobacteria with the potential to alleviate continuous cropping obstacle

Dandan Wang, Zhiqiu Yin, Li Sun, Xinbei Liu, Jianing Liu, Shiqi Pang, Zhihong Xie\*

College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, Shandong Province, China

**Abstract:** [Objective] Continuous cropping obstacle reduced the production and quality of agricultural products, and application of rhizosphere beneficial microbes with the function of degrading autotoxic substances, inhibiting the growth of plant pathogen and promoting plant growth was an important strategy for suppression of continuous cropping obstacle. Screening and revealing the function of peanut plant-growth promoting rhizobacteria with the potential to alleviate soil degeneration caused by continuous cropping obstacle, would provide scientific evidence for the application in agricultural produce. [Methods] Screening high-efficiency plant growth-promoting rhizobacteria with function of degrading autotoxic substances, inhibiting the growth of plant pathogen and promoting plant growth from 12-year peanut field with continuous cropping obstacle, and the phylogenetic analysis was performed by 16S rRNA gene sequencing to determine the taxonomic status. [Results] 7 plant growth-promoting rhizobacteria with high-efficiency in degrading autotoxic substances were isolated from the rhizosphere from 12-year continuous cropping peanut soil, and according to phylogenetic analysis, identified as *Klebsiella* sp. B02, *Klebsiella* sp. B07, *Klebsiella* sp. B15, *Bacillus* sp. B28, *Acinetobacter* sp. P09, *Brucella* sp. VA05 and *Bacillus* sp. CA04. The result of growth-promoting experiments indicated that 7 strains showed the ability of IAA-producing, 3 strains showed the ability of nitrogen-fixing, 4 strains showed the ability of phosphate solubilization, 2 strains showed the activity of potassium solubilizing. The result of antagonistic activity showed that 2 strains could against to plant pathogen, and belong to the specie of *Bacillus* genus. *Bacillus* sp. B28 was selected for peanut pot experiment, the results showed that strain *Bacillus* sp. B28 can significantly alleviate the inhibition of phenolic acid on peanut seed germination and promote the growth of peanut seedling. [Conclusion] This research screened plant growth-promoting rhizobacteria with high-efficiency in alleviate continuous cropping obstacles, provided strains and scientific evidence for the application in agricultural produce.

**Keywords:** peanut, continuous cropping obstacle, plant growth-promoting rhizobacteria, function research

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570063, 31870020), by the NSFC-Shandong Joint Fund Key Projects (U1806206) and by the Scientific Research Foundation of Shandong Agricultural University (010/72091)

\*Corresponding author. E-mail: zhihongxie211@163.com

Received: 20 March 2021; Revised: 11 May 2021; Published online: 12 October 2021