

温莪术根际促生菌株的促生效应及土壤定殖

周晓雷¹, 何文斐², 闯绍闯¹, 唐欣昀^{1*}, 姜程曦²

(1. 安徽农业大学生命科学院, 合肥 230036; 2. 温州医学院药学院, 温州 325035)

摘要: 测定了 38 株温莪术根际菌的产铁载体、解磷、产 IAA 的能力和抑制致病菌的能力。这些菌株中 25 株菌分泌 IAA 的量可达到 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上; 23 株菌铁载体产量达到 $10+$; 10 株菌解磷能力在 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上; 有 3 株菌对 4 种植物致病菌都有抑制效果。经综合评价筛选出 3 株菌进行盆栽试验。WP0702 产较高的铁载体, 抑菌能力较强; WK0101 铁载体、解磷、产 IAA 的能力均较高, 但无抑菌能力; 这 2 株菌株均明显促进温莪术的产量。试验数据证明具有抑制致病菌的能力、解磷和分泌适当浓度 IAA 的菌株都有作为生物有机肥的可能。用 *luxAB* 基因标记菌株 WP0702, 证明该菌株在不同土壤中可以持续存活。WP0702 和 WK0101 具有作为温莪术生物肥料、克服连作障碍的潜力。

关键词: 温莪术; 根际促生菌; 生理活性; 抑菌能力

中图分类号: S182

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)04-0591-04

The promotion effect of *Curcuma wenyujin* growth-promoting rhizobacteria strains and their survival ability in the soil

ZHOU Xiaolei¹, HE Wenfei², CHUANG Shaochuang¹, TANG Xinyun¹, JIANG Chengxi²

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Pharmacy, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035)

Abstract: In this experiment, the ability of 38 rhizosphere bacteria strains of *Curcuma wenyujin* to dissolve phosphorus, synthesize IAA, and inhibit pathogens were tested. Twenty five strains secreted $>1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA, 23 strains produced >10 siderophores, 10 strains dissolved $>2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphorus, and 3 strains showed inhibitory effect on four plant fungal pathogens. Finally, three strains were selected for a pot experiment. Strain WP0702 secreted a high siderophore concentration and inhibited the growth of pathogens. Strain WK0101 secreted high concentrations of both siderophore and IAA, dissolved a large amount of phosphorus, but showed no bacteriostatic ability. The two strains clearly promoted the yield of *Curcuma wenyujin*. It indicated that the strains that have the ability to dissolve phosphorus, secrete IAA, and inhibit fungal pathogens have potential to be used as biological fertilizers. Strain WP0702 labeled with the marker gene *LuxAB* could survive in different soils. Both WP0702 and WK0101 have potential to be a specific biological fertilizer for *Curcuma wenyujin*.

Key words: *Curcuma wenyujin*; rhizosphere bacteria; physiological activity; antipathogen activity

植物根际促生菌 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 是一类有益微生物, 可促进植物对矿物质的吸收, 抑制有害微生物的生长, 促进植物生长。随着有机农业的快速发展, PGPR 在农业的可持续发展中将扮演越来越重要的作用^[1-3]。一些 PGPR 菌株可分泌甲酸等有机酸, 促进部分难

溶盐类的溶解, 减少化学肥料使用量; 有些 PGPR 可合成铁载体增加植物对铁的吸收; 某些 PGPR 可以分泌适量的吲哚-3-乙酸 (IAA) 等类植物生长激素, 促进植物的生长^[4-5]。有些 PGPR 可以抑制植物病原微生物生长, 促进作物增产增收。我国农业生产中由于管理粗放, 种植种类单一, 种植技术缺乏

收稿日期: 2014-04-11

基金项目: 安徽省科技厅自然科学基金项目 (090413082), “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2011BAI04B04) 和浙江省教育厅科研项目 (Y201120031) 共同资助。

作者简介: 周晓雷, 硕士研究生。E-mail: zhouxiaolei6019@163.com

* 通信作者: 唐欣昀, 教授, 博士生导师。E-mail: tangxinyun@21cn.com

改进,产生较为严重的连作障碍。中药材栽培是我国主要的产业,但很多重要品种和资源稀缺的品种都是通过人工栽培,在种植过程中出现不同程度的连作障碍,影响了中药材的产量和质量,制约我国中药种植产业的发展。作物连作障碍主要原因之一是植物根际微生物区系失调,病原微生物富集,植物生长失调,发生病害,最终减产。因此可以从目标植物根际分离 PGPR 菌株,筛选优良有益菌株,研发生态接种剂使用,调控温莪术的根际生态系统,克服连作障碍^[6]。温莪术是一种重要的中药材,在实际的栽培过程中也被严重的连作障碍所困扰,因此可以尝试应用 PGPR 克服温莪术的连作障碍^[7-10]。PGPR 对致病菌的抑制作用包括释放抗生素、水解酶等物质直接抑制致病菌的生长;还有就是通过诱导作物增强自身抗性的办法来减少病原菌的入侵。本实验选取几项重要生理活性作为指标研究温莪术根际菌的促生效果,并用基因标记法证明筛选菌株可以长期在土壤中存活,筛选温莪术特异性 PGPR 菌株,研发该药材专用生态制剂,克服温莪术栽培的连作障碍问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 实验菌株分别属于伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和勒克氏菌属 (*Leclercia*) 等的 38 株细菌,分离自温莪术的根际土壤,部分菌株可以和温莪术凝集素发生特异性反应^[6];水稻纹枯霉菌、玉米小斑霉菌、小麦赤霉菌和棉花枯萎霉菌。以上这些菌株均来自安徽农业大学微生物实验室。*E.coli* WA803 *pTRI02::luxAB*, *tet^r*, *km^r* 均由南京农业大学馈赠。

1.1.2 温莪术块茎 由温州医学院提供,选取大小

均匀的块茎,称重,进行盆栽试验。

1.1.3 培养基和仪器 MKB 培养基^[11]、NBRIP 培养基^[12]、Hoagland 培养基^[13]、TSB 培养基^[14]和 PDA 培养基等^[15]; 202-3 型 TU-1800SPC 分光光度计、SB-JC-IA 型超净工作台、BIO-RAD 电转化仪等。

1.2 方法

1.2.1 铁载体测定 将各菌株在 MKB 液体培养基中培养,这里用的是 CAS 检测法来测定其合成铁载体的量的大小^[11]。将菌株的纯培养物离心取上清,按 1:1 (v/v) 的比例和 CAS 检测液混合,待反应 1 h 后,在 630 nm 波长处测定其吸光值 (A)。

1.2.2 解磷能力测定^[12] 在 NBRIP 培养基中接种上已经活化过的各菌株,然后在 28℃, 160 r·min⁻¹ 的条件下培养 7 d。离心以除去菌体,将上清液、水、1 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 和 1 mL 钼蓝比色液按照 1:2:1:1 (v/v) 的比例混匀,待反应 15 min 后再测量其在 660 nm 波长处的吸光度 A。

1.2.3 吲哚乙酸 (IAA) 测定 吲哚乙酸浓度的测定我们使用的是 Salkowski 比色法^[16]。将培养 7 d 的菌悬液在 5000 r·min⁻¹ 的条件下离心 10 min,将上清液和检测液按照 1:2 (v/v) 的比例混匀,在暗处放置 30 min 后测其在 530 nm 处的吸光值 (A),空白对照为离过心的空培养基。吲哚乙酸的实际浓度可以对照标准曲线得到。

1.2.4 真菌抑制能力的测验^[15] 因缺乏温莪术的病原真菌材料,本实验分别测定各菌株对水稻纹枯霉菌、玉米小斑霉菌、小麦赤霉菌和棉花枯萎霉菌的抑制能力。将 4 种霉菌接种到 PDA 培养基上,28℃ 条件下培养 1~2 d,在其生长最旺盛的边缘用灭过菌的小孔打孔器打孔,将这些打下的带菌丝的培养基块反接到新的 PDA 培养基的中央。在距离霉菌中心 3 cm 的位置接种各菌株,28℃ 培养,每天观察生长及抑制情况。

表 1 盆栽试验设计

Table 1 Pot experimental design

样品号 Sample number	尿素*/g Urea	磷酸二氢铵* /g Ammonium dihydrogen phosphate	氯化钾* /g Potassium chloride
CK	1.54	1.56	1.16
WP0702	1.54	0.78	1.16
WK0101	1.54	1.56	0.58
WN02	0.77	1.56	1.16

注:“*”为化学纯。Note: “*”means chemically pure.

1.2.5 盆栽试验 将经生理生化试验筛选出的 3 株优良菌株进行盆栽试验,试验设计见表 1。采用温州当地土壤和黄褐土 2 种土壤,共设 10 组处理。每盆装 2 kg 干土;选取温莪术均匀块茎,称重浅埋;每

盆分别接种 10 mL 菌液和适量氮、磷和钾肥,加入适量水;用 10 mL 空白培养基作空白对照。将花盆放在均匀光照下培养,定期补水并观察生长情况^[2]。

1.2.6 WP0702 的标记及土壤定殖 将在 2 种土壤中

效果都较好的菌株 WP0702 用电转化方法标记 *luxAB* 基因^[17], 得到标记菌株 WP0702-*luxAB*。取盆栽试验中的 2 种土, 过 80 目筛, 每盆装 1 kg 干土, 每种土分设灭菌和不灭菌处理。向每一盆加入 400 mL 浓度相同 WP0702-*luxAB* 的菌悬液, 搅拌均匀, 在 28°C 条件下放置。定时取样测定各样品中标记菌株数量。

2 结果与分析

2.1 菌株生理活性

通过表 2 看出, 这些菌株中一共有 25 株对 IAA 的分泌量达到 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上; 铁载体产量达到 10+ 的有 23 株; 具有解磷能力的菌有 19 株, 其中在 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上的共有 10 株。对小麦赤霉菌有抑制效果的有 5 株, 对玉米小斑菌有抑制效果的共 4 株, 对水稻纹

枯菌有抑制效果的 3 株, 对棉花枯萎菌有抑制效果的最多共有 13 株, 其中对 4 种霉菌都有抑制效果的有 3 株, 分别是 WP0702、WK0801 和 WK0802。

2.2 盆栽试验结果

盆栽试验选取了比较有代表性的 3 株菌, 分别是 WP0702、WN02 和 WK0101。其中 WN 2 铁载体含量较高; WP0702 铁载体含量较高、抑菌能力较好; WK0101 各项生理活性均较好, 但抑菌性能较低。因为温莪术栽培采用块茎为种, 各块茎差异较大, 直接以块茎作为指标不能真实反应处理间的差异, 本实验采用新块茎和老块茎的重量比值作为指标。结果如图 1 所示, WP0702 和 WK0101 在黄褐土中都可以有效地提高其新老块茎的比值; 在温州土样中 WP0702 有促进作用。

表 2 PGPR 菌株促生生理活性
Table 2 Physiological activities of PGPR strains

菌株编号 Strain code	IAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	铁载体 Ironophore	解磷能力/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Phosphate-dissolving ability	菌株编号 Strain code	IAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	铁载体 Ironophore	解磷能力/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Phosphate-dissolving ability
WK0102	0.86±0.06	10+	-	WP0602	0.15±0.01	10+	1.59±0.01
WK0101	1.81±0.12	10+	2.42±0.01	WP0703	0.04±0.01	3+	0.87±0.00
WK0801	1.51±0.19	10+	-	N11	2.24±0.00	7+	-
WK0802	1.46±0.21	10+	-	WP0805	1.18±0.00	-	1.54±0.00
WP0903	2.35±0.03	10+	2.27±0.01	WN10	1.34±0.02	10+	-
WN01	0.03±0.01	10+	-	N0701	0.58±0.01	10+	-
WP0702	0.15±0.04	10+	-	WP0807	1.16±0.01	-	1.79±0.00
WP1001	2.48±0.00	7+	2.65±0.01	WP0805	2.14±0.01	10+	1.88±0.01
WP05	1.24±0.01	10+	2.00±0.01	WK0501	0.05±0.02	5+	-
WN0101	1.07±0.05	10+	1.66±0.03	WN04	0.02±0.00	10+	-
WN0102	1.24±0.02	10+	1.68±0.03	W8	1.08±0.00	9+	2.21±0.01
WP02	1.70±0.01	10+	2.28±0.03	WN03	1.02±0.00	9+	-
N9	1.17±0.00	9+	-	WN06	1.04±0.00	7+	-
WN2	0.70±0.02	10+	-	WN0201	1.01±0.01	10+	-
WP0102	1.18±0.01	9+	2.32±0.02	W2	2.34±0.01	10+	2.33±0.02
WP0101	1.3±0.01	7+	2.19±0.03	WK0201	1.14±0.00	6+	-
WK07	1.15±0.01	10+	2.27±0.01	WK0502	0.09±0.00	-	-
WP0601	0.21±0.01	10+	1.90±0.01	WK0503	0.38±0.00	10+	-
WP0304	0.14±0.01	10+	1.81±0.01	WK0202	1.15±0.00	7+	-

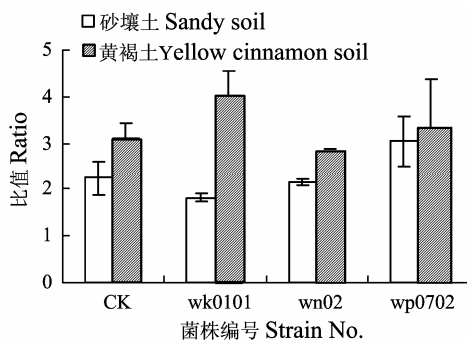


图 1 盆栽试验新/老块茎比值

Figure 1 The ratio of new tuber to old tuber in pot experiment

2.3 WP0702 的标记及土壤定殖结果

用电转化法得到标记菌株 WP0702-*luxAB*, 该菌株在 4 个盆中的定殖情况如图 2 所示。几个盆中标记菌株的数量逐渐降低, 因为实验中没有向土壤添加营养物质, 营养物质的消耗可能是导致这种现象的原因。在黄褐土中, 2 个处理间的差异不大; 而在未灭菌沙壤土中标记菌株数量下降比较明显, 因为在未灭菌土壤中存在大量其他微生物, 沙壤土的营养有限, 其他菌株会竞争营养, 导致标记菌株数量下降明显。与沙壤土相比, 黄褐土比较肥沃,

营养消耗有限,因此标记菌株在黄褐土中的数量变化较为缓慢。定殖1个月 after 标记菌株在黄褐土中仍保持 $10^5 \cdot g^{-1}$ 左右水平,实验数据反映 WP0702-luxAB 可在不同土壤中长期存活。

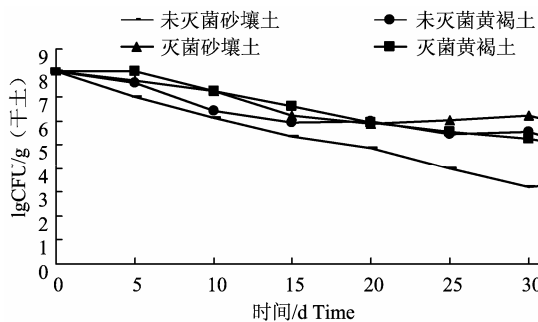


图 2 WP0702-luxAB 在土壤中的定殖

Figure 2 The colonization of WP0702-luxAB in the soil

3 讨论

试验测定出菌株中有 25 株菌对 IAA 的分泌量可以达到 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上;有 23 株菌铁载体产量达到 10+;有 10 株菌解磷能力在 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上;有 3 株菌对 4 种植物致病菌都有抑制效果的。最后筛选出 3 株菌来进行盆栽试验。通过盆栽试验结果与所选菌株的各项测试指标的比较分析可以看出,WP0702 铁载体产量和抑制致病菌能力 2 项指标较好;WK0101 虽然缺乏抑制致病菌能力,但解磷活性和分泌 IAA 活性较高;这 2 株菌株都有效提高了新老块茎的比值。WN02 产铁载体较高,但缺乏其他活性,没有表现促生效果。这说明菌株抑制致病菌、解磷或分泌 IAA 的能力都可能促进温莪术产量的增加。因为温莪术长期在传统种植地的种植及种植工艺的单一不变等,导致了其有严重的连作障碍。产生连作障碍的原因主要包括致病菌的积累和营养元素的缺失等。本实验中的 WP0702 具有较好的抑菌能力,它的促生效果可能主要是因为抑制了存在于土壤中过多的致病菌;WK0101 则主要是解磷或者 IAA 的分泌起到的作用。

标记及定殖试验说明 WP0702 菌株可以在土壤中长期存活,并对促生效果产生重要影响。PGPR 和作物根际相互作用,根际分泌物等可以促进菌株的繁殖,因此在盆栽或田间试验中菌体数量将比土壤实验中的数量更高,可以使土壤中 PGPR 的数量长期维持在较高水平,发挥促生效应,进而增加作物产量。

本实验初步检测了 38 株温莪术根际细菌的几种促生生理活性,初步揭示这些菌株的促生机理,

经过盆栽栽培实验选出具有作为温莪术生物肥料潜力的菌株 WP0702 和 WK0101。盆栽试验与田间试验还存在诸多差异,因此这些菌株的促生效果和定殖情况还需要通过大田试验来进一步的验证。

参考文献:

- [1] 马威龙,李深,张宏敏.根际有益微生物对植物的促生抗逆作用[J].吉林农业,2011(4):254.
- [2] 饶毅萍.黄瓜根际促生菌的促生效应与防病作用[J].长江蔬菜,2009(14):11-14.
- [3] 苏晓东,卢林纲.植物促生菌及其促生机理[J].现代化农业,2002(6):7-7.
- [4] 张淑香,高子勤.连作障碍与根际微生态研究Ⅱ根系分泌物与酚酸物质[J].应用生态学报,2000,11(1):152-156.
- [5] 康贻军,胡健,单君,等.两株解磷真菌的解磷能力及其解磷机理的初步研究[J].微生物学通报,2006,33(5):22-27.
- [6] 刘祥亮,周晓雷,何文斐,等.温莪术根际亲和性高效促生菌的筛选和初步鉴定[J].中国农业科技导报,2012,14(4):121-127.
- [7] 潘莹.微生物肥料的优势及发展前景[J].中国商界,2010(8):354-355.
- [8] 张子龙,王文全.药用植物连作障碍的形成机理及其防治[J].中国农业科技导报,2009,11(6):19-23.
- [9] 耿士均,王波,刘刊,等.专用微生物肥对不同连作障碍土壤根际微生物区系的影响[J].江苏农业学报,2012,28(4):758-764.
- [10] 荣良燕,姚拓,赵桂琴,等.产铁载体 PGPR 菌筛选及其对病原菌的拮抗作用[J].植物保护,2011,37(1):59-64.
- [11] 王平,董飏.小麦根圈细菌铁载体的检测[J].微生物学通报,1994,21(6):323-326.
- [12] Nautiyal C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 170(1): 265-270.
- [13] Rodrigues E P, Rodrigues L S, De Oliveira A L M, et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N_2 fixation of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant and Soil, 2008, 302 (1): 249-261.
- [14] 周仲强.植物根际促生细菌功能菌株的筛选 [D].长春:吉林大学,2007.
- [15] Zhang J, Liu J, Meng L, et al. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat roots by wheat germ agglutinin labeled with fluorescein isothiocyanate[J]. The Journal of Microbiology, 2012, 50(2): 191-198.
- [16] 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.
- [17] 韦兵,唐欣昀.假单胞菌 JK45 菌株 lux 基因标记及在土壤中的存活[J].农业环境科学学报,2006,25(6):1524-1528.