

## 大豆根瘤菌与促生菌复合系筛选及机理研究

薛晓昀,冯瑞华,关大伟,李俊,曹凤明

(中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所,北京 100081)

**摘要:**通过溶磷和生长素分泌的定性测定,从大豆根际土壤及实验室保藏菌株中分离筛选植物根际促生细菌(PG-PR),采用大豆根瘤菌和促生菌双接种的蛭石盆栽试验,初筛获得能够促进大豆植株生长、提高大豆根瘤菌结瘤固氮作用的促生菌5株。进一步的土壤盆栽复筛实验表明,筛选得到的5株促生菌与大豆根瘤菌进行双接种,能够在阜阳、济宁和延安的3种土壤中明显提高大豆的根瘤数量、根瘤干重、植株干重和全氮含量,并且能够促进植株对磷素的吸收。溶磷能力定量测定表明,5株促生菌均具有溶解无机磷的能力,有的菌株具有较高的溶磷能力;高效液相色谱法测定促生菌发酵液的成分,结果显示5株促生菌具有产生植物激素和有机酸的能力。经过16S rRNA基因序列分析,所分离的根际促生菌1-3、P7和P13分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、叶杆菌属(*Phyllobacterium* sp.)和中华根瘤菌属(*Sinorhizobium* sp.)。

**关键词:**大豆根瘤菌;植物根际促生菌(PGPR);双接种;筛选

**中图分类号:**S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2011)04-0613-08

## Screening and Analysis for Efficient Co-inoculation System of Soybean Rhizobia and Plant Growth-promoting Rhizobacteria

XUE Xiao-yun, FENG Rui-hua, GUAN Da-wei, LI Jun, CAO Feng-ming

(Institute of Agricultural Resources and Agricultural Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10081, China)

**Abstract:** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) were screened from soybean rhizosphere soil and collected strains through qualitative analysis of phosphate solubilization and IAA. Five PGPR strains were acquired, which improved nodulation on soybean when co-inoculated with soybean rhizobia in vermiculite pot experiment. Furthermore in the soil pot experiment with Fuyang, Jining and Yanan's soils, the co-inoculation of soybean rhizobia with five PGPR strains significantly increased the number of nodules, nodule dry weight, plant dry weight, total N and P contents. The result of qualitative determination of phosphate displayed that five PGPR strains dissolved inorganic phosphorus efficiently. Analysis of fermentation with HPLC showed that 5 isolated strains secreted plant hormones and organic acids. Through 16S rRNA gene sequence analysis, three PGPR 1-3, P7 and P13 strains isolated from soybean rhizosphere soil were belonged to *Bacillus* sp., *Phyllobacterium* sp. and *Sinorhizobium* sp., respectively.

**Key words:** Soybean Rhizobia; Plant Growth-promoting Rhizobacteria; Co-inoculation; Screening

利用大豆根瘤菌接种豆科植物以提高其固氮效率已有100多年历史,作为一项有效的农业技术措施,接种根瘤菌剂在许多国家得到了广泛的应用。如何提高大豆根瘤菌的共生结瘤和固氮效果,一直成为大豆根瘤菌应用研究的主要方向。为得到更高效的大豆根瘤菌,一种方法是有针对性地选育出适合某地区某土壤类型主栽品种的高固氮力、高竞争结瘤能力的优良菌株;另一种则是通过大豆根瘤菌和促生微生物相互作用关系研究,选出具有提高大豆根瘤菌结瘤能力和效果的促生微生物,开发出新型复合的大豆根瘤菌剂。

能够对大豆根瘤菌固氮作用产生影响的微生物很多,主要包括VA菌根真菌、光合细菌以及植物根际促生细菌(PGPR)<sup>[1-4]</sup>。植物根际促生细菌是一类生存在植物根圈范围内,能通过分泌植物激素等方法促进植物生长或对病原菌有拮抗作用的有益细菌,包括芽孢杆菌、假单胞菌、固氮螺菌、固氮菌和链霉菌等,本身在农业上具有应用价值<sup>[5]</sup>。许多研究表明,根际促生细菌能够在共接种豆科植物中促进结瘤,包括增加瘤数、促进根系发育等<sup>[6-7]</sup>。将大豆根瘤菌与其它有益微生物复合,会更有利于大豆根瘤菌的结瘤固氮作用,并已成为大豆根瘤菌

收稿日期:2011-03-29

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资助项目(nycytx-004);中央级公益性科研院所科研业务费专项资助项目(2010-34)。

第一作者简介:薛晓昀(1986-),女,硕士,研究方向为生物固氮。E-mail:x0x4y@126.com。

通讯作者:冯瑞华(1962-),女,副研究员,硕士生导师,主要从事农业微生物学研究。E-mail:rhfeng@caas.ac.cn。

剂和其它微生物制剂的发展方向。该文主要通过蛭石及土壤盆栽试验,筛选出对大豆根瘤菌株结瘤能力具有促进作用的根际促生细菌,得到大豆根瘤菌-促生菌的优良组合,进一步优化大豆根瘤菌复合菌剂;并对促生菌的溶磷能力、植物激素分泌及有机酸分泌进行了测定,初步分析了促生菌提高大豆结瘤固氮能力的机理,为大豆根瘤菌高效固氮复合

菌剂的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 采用的菌株包括由大豆种植实验田地土中分离得到的促生菌株,以及实验室保藏收集的芽孢杆菌、假单胞菌和大豆根瘤菌,见表1。

表1 供试菌株

Table 1 Strains used in study

菌株 Strains	分离地或来源 Origins or sources
胶冻样芽孢杆菌( <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> ) DB	本实验室
多粘类芽孢杆菌( <i>Paenibacillus polymyxa</i> ) CGMCC1.0224	本实验室
多粘类芽孢杆菌( <i>Paenibacillus polymyxa</i> ) SC2	山东农业大学山东省农业微生物重点实验室
枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> ) CGMCC1.15,1.108	本实验室
荧光假单胞菌( <i>Pseudomonas fluorescens</i> ) ACCC10645,10040	本实验室
巨大芽孢杆菌( <i>Bacillus megaterium</i> ) CCTCCA 92075 <sup>T</sup>	本实验室
日本慢生大豆根瘤菌( <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ) 4219	本实验室
弗氏中华大豆根瘤菌( <i>Sinorhizobium fredii</i> ) 4644	本实验室
促生菌 P4, 促生菌 P7, 促生菌 P13, 促生菌 P14	山西汾阳
促生菌 1-3, 促生菌 2-13	山东济宁

ACCC 为中国农业微生物菌种保藏管理中心;CCTCC 为中国典型培养物保藏中心;CGMCC 为中国普通微生物菌种保藏中心。

ACCC: Agricultural Culture Collection of China;CCTCC: China Center for Type Culture Collection;CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Center.

1.1.2 供试大豆品种 大豆品种中黄13由中国农业科学院作物科学研究所提供。

1.1.3 供试土壤 安徽省农科院阜阳农科所、陕西省延安农科所和山东省济宁农科院提供的大豆种植试验田地表土。

1.1.4 培养基 溶磷培养基:葡萄糖 10 g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5.0 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g, NaCl 0.2 g, KCl 0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03 g,  $\text{MnSO}_4$  0.03 g,  $\text{FeSO}_4$  0.003 g, 酵母膏 0.5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH = 6.8 ~ 7.0, 其中  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  单独灭菌后与培养基混合。

刚果红液体培养基:  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, NaCl 0.1 g, 酵母膏 1 g, 甘露醇 10 g, 0.25% 刚果红 10 mL,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 g, L-色氨酸 100 mg, 蒸馏水 1 000 mL, pH = 7.0。比色液配方:  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{FeCl}_3$  1 mL、 $\text{H}_2\text{SO}_4$  30 mL、蒸馏水 50 mL。

### 1.2 试验方法

1.2.1 溶磷菌筛选 称取 10 g 土样溶于 100 mL 无菌水中,用 10 倍系列稀释法配制土壤悬液,涂布到溶磷培养基中,28℃ 培养 4 d,根据溶磷圈大小,挑取单菌落利用平板划线法分离纯化后,4℃ 下保存。

芽孢杆菌筛选:称取 10 g 土样溶于 100 mL 无菌水中,水浴煮沸,用 10 倍系列稀释法配制土壤悬液,涂布到牛肉膏蛋白胨培养基,28℃ 培养 4 d,挑取单菌落,镜检观察芽孢菌,利用平板划线法分离纯

化后,4℃ 下保存。

1.2.2 产生长素 (IAA) 能力定性测定 将分离得到菌株与试验室提供菌株接种于盛有 50 mL 刚果红培养基的三角瓶中,置于转速  $125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 温度 28℃ 的摇床培养<sup>[8]</sup>,每菌株 3 次重复,培养 12 d 后,取菌悬浮液 100  $\mu\text{L}$  此置于白色塑料比色板上,加 100  $\mu\text{L}$  的比色液,15 min 后观察颜色变化。粉红色为阳性,表示菌株能够分泌 IAA,粉红色颜色越深表示分泌 IAA 能力越大;无色为阴性,表示菌株不能分泌 IAA。在比色液中分别加入 10、30 和 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 作对照进行粉红色颜色深度的比较<sup>[9]</sup>。

1.2.3 溶磷能力定性测定 将分离得到菌株与试验室提供菌株接种于到溶磷培养基上,28℃ 培养 4 d,观察出现溶磷圈的菌落,测定溶磷圈直径 (D)、菌落直径 (d),根据能否产生溶磷圈与 D/d 值大小来初步确定菌株的溶磷能力<sup>[10]</sup>。

1.2.4 蛭石盆栽初筛试验 将供试根瘤菌接种在固体 YMA 斜面上活化,然后转接在 YMA 液体培养基中,28℃,  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 摇床培养,菌株培养 3 ~ 4 d,用液体 YMA 培养基调 OD 值 ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ),使菌体浓度达  $10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。促生菌接种在牛肉膏蛋白胨斜面上活化,然后转接在牛肉膏蛋白胨液体培养基中,28℃,  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 摇床培养,菌株培养 48 h,用培养基调 OD 值 ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ),使菌体浓度达到  $10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。选择大小相近的大豆种子,在 95% 的酒精中浸泡 30 s,用 0.1% 次氯酸钠灭菌 5 min,然后

用无菌水清洗 5~6 次,播种在盛有灭菌蛭石的塑料盆(17 cm × 15 cm)中,每盆 6 颗种子,分别接种供试根瘤菌悬液 1 mL,促生菌悬液 1 mL。以单接种根瘤菌悬液 1 mL 为单接种对照,不接种为全空白对照,每处理设 4 次重复,随机区组排列。将植株置于白天 25~30℃、夜间 15~20℃、每天光照 8 h 的温室中培养。出苗后每盆留 3 株,培养 40 d 后收获。

**1.2.5 土壤盆栽复筛试验** 选取在蛭石盆栽初筛中表现良好的大豆根瘤菌与促生菌组合 5 组,进行土壤盆栽复筛试验。将大豆种子播种在盛有 1.5 kg 土的花盆(17 cm × 15 cm)中,每盆种 6 颗种子,接种根瘤菌液 2 mL,以不接种为对照,每个处理设 4 个重复。盆栽条件与管理同“1.2.4”,培养 40 d 后收获。

**1.2.6 接种效果测定** 分别在蛭石盆栽和土壤盆栽收获时测定根瘤数。获取根瘤 65℃ 烘干至恒重,称取瘤重。同时取植株地上部分(以第一片叶叶痕处为划分标准),105℃ 杀青 1 h,75℃ 烘干至恒重,称地上植株干重。植株全磷、全氮含量采用紫外可见分光光度法检测,由黑龙江省农业科学院土壤肥料检测中心完成检测。

**1.2.7 溶磷定量测定** 将筛选得到的 5 株促生菌接种于 LB 液体培养基中,摇培过夜,菌体离心,用无菌水洗 2 次,制备成菌悬液,菌数约为  $1 \times 10^7$  个 · mL<sup>-1</sup>。三角瓶中装入 100 mL 已灭菌的筛选溶磷培养基,难溶磷酸盐浓度为  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,分别接种 1 mL 菌悬液,28℃,160 r · min<sup>-1</sup>,摇床分别培养 3、5、7 d。培养液  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,4℃ 离心 5 min,取上清液测定有效磷含量和 pH 值。设不接菌为对照,每个处理重复 3 次。将发酵液在  $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 10 min,取上清液稀释适当倍数,利用 UV3010 紫外可见分光光度计在 700 nm 处通过钼锑抗比色法测定光密度并计算有效磷含量,溶磷量为扣除不接种对照的值<sup>[11-12]</sup>。

**1.2.8 发酵液成分测定** 采用高效液相色谱法测定 5 株促生菌发酵液的有关激素和有机酸成分。激素检测,液相色谱仪型号为 Agilent1100,四元泵,二极管阵列检测。固定相为 X13-C18,5 μm,4.6 \* 250 mm,流动相为甲醇加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc,30℃ 梯度洗脱。有机酸检测,液相色谱仪型号为 Lumtech,210 nm 紫外检测。固定相为 Eurospher100-C18,5 μm,4.6 \* 250 mm,流动相为  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸氢二钾缓冲溶液,和体积分数 3% 的甲醇,流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ <sup>[13]</sup>。由北京林业大学公共分析测试中心完成检测。

**1.2.9 16S rRNA 基因序列分析** 筛选所得 3 株根

际促生菌,提取总 DNA,以通用引物 P1、P6 进行 PCR 扩增。PCR 产物直接测序<sup>[14]</sup>,由上海生工生物工程技术有限公司完成测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 根际促生菌筛选及促生能力定性分析

在汾阳土壤样品中得到解磷菌 9 株,芽孢杆菌 8 株;在济宁土壤样品中得到解磷菌 1 株,芽孢杆菌 20 株。对分离得到的 38 株菌株进行产生生长素能力的测定,共有 6 株解磷菌、1 株芽孢菌产生生长素。

对实验室提供的 30 株菌株进行溶磷能力定性测定,12 株菌株溶磷效果较好,并对其分泌生长素能力定性检测,共 12 株菌株具有明显的分泌生长素的能力。根据溶磷及分泌生长素效果,共选择 14 株促生菌株(表 1)进行蛭石盆栽试验。

### 2.2 蛭石盆栽初筛

通过对促生菌溶磷和分泌生长素能力的定性分析,选取 14 株促生菌株,分别与快生大豆根瘤菌 4644、慢生大豆根瘤菌 4219 进行共接种蛭石盆栽初筛试验。接种菌株在中黄 13 根部结瘤的数量、瘤干重、大豆植株地上干重结果见表 2。

由表 2 可知,部分双接种与 CK 相比,总瘤数、主瘤数、瘤干重、植株干重均有大幅度提高,其中,快生大豆根瘤菌 4644 与枯草芽孢杆菌 1.15、促生菌 P13、P7;慢生大豆根瘤菌 4219 与促生菌 1-3、巨大芽孢杆菌 92075 在 3 次蛭石盆栽重复验证之后,证明其对于瘤数、瘤重、植株干重等指标具有稳定的增幅。快生大豆根瘤菌 4644 与枯草芽孢杆菌 1.15、促生菌 P13 和 P7 的组合,与单接种相比,瘤干重分别增加 132.3%、79.2% 和 129.0%;总瘤数分别增加 39.0%、34.7% 和 42.0%;主根瘤数分别增加 71.3%、34.0% 和 25.0%;植株地上干重分别增加 46.0%、45.5% 和 25.5%。慢生大豆根瘤菌 4219 与巨大芽孢杆菌 92075 和促生菌 1-3 的组合,与单接种相比,瘤干重分别增加 32% 和 44.6%;植株地上干重分别增加 23.6% 和 10.8%。此 5 个组合为下一步土壤盆栽复筛的试验组合。

### 2.3 土壤盆栽复筛

土壤盆栽试验分别采用陕西延安、山东济宁和安徽阜阳的土壤。3 种土壤盆栽中,陕西延安的为砂质土,保水能力最差,其盆栽的单接种 CK 所结有效根瘤较少,在主根、侧根处多形成白色细小的无效根瘤。安徽阜阳土壤为黏质土,保水能力较好,盆栽的单接种 CK 结瘤也较多。但在 3 种土壤中,双接种结瘤都有明显提高,结果见表 3。

表 2 双接种蛭石盆栽实验数量性状统计结果

Table 2 Basic analysis of quantitative characters of co-inoculation pot plant test on Vermiculite

根瘤菌株 Rhizobium	促生菌株 PGPR strains	总瘤数 Total nodule number	主瘤数 Nodule number on taproot	瘤干重 Nodule dry weight per plant/g	植株干重 Dry weight per plant/g	
快生大豆根瘤菌 4644	CK	9.9bcd	2.2a	0.076abcd	0.398ab	
	促生菌 P4	10.2bcde	2.1a	0.073abcd	0.414ab	
	促生菌 P7	12.4bcde	3.9a	0.149f	0.467abc	
	促生菌 P13	14.5e	4.9a	0.139ef	0.650cd	
	促生菌 P14	9.7abcd	3.9a	0.081abc	0.363ab	
	促生菌 1-3	12.2bcde	2.8a	0.141bcdef	0.631cd	
	促生菌 2-13	13.5cde	4.0a	0.098abcd	0.511abcd	
	枯草芽孢杆菌 1.15	13.7de	3.9a	0.177def	0.513abcd	
	枯草芽孢杆菌 1.108	11.8bcde	3.0a	0.117abcde	0.316a	
	多粘类芽孢杆菌 1.0224	5.0a	1.0a	0.032ab	0.68d	
	荧光假单胞菌 10645	8.4ab	3.0a	0.076abcde	0.312a	
	荧光假单胞菌 10040	9.0abc	3.3a	0.118abcde	0.521bcd	
	巨大芽孢杆菌 92075	15.0e	6.9b	0.121cdef	0.352ab	
	多粘类芽孢杆菌 SC2	10.8bcde	4.4a	0.071abc	0.471abc	
	胶冻样类芽孢杆菌 DB	13.8de	1.6a	0.077ab	0.473abc	
	慢生大豆根瘤菌 4219	CK	21.6bc	3.8ab	0.105bcd	0.463ab
		促生菌 P4	13.8ab	3.7ab	0.064abc	0.430ab
		促生菌 P7	13.7ab	2.2ab	0.092abcd	0.424ab
促生菌 P13		13.4ab	1.6ab	0.074abcd	0.434ab	
促生菌 P14		11.9ab	2.3ab	0.071abcd	0.391ab	
促生菌 1-3		21.7bc	2.3ab	0.141d	0.613b	
促生菌 2-13		12.6ab	1.0a	0.083abcd	0.533ab	
枯草芽孢杆菌 1.15		13.5ab	3.0ab	0.089bed	0.516ab	
枯草芽孢杆菌 1.108		9.2a	2.6ab	0.038ab	0.466ab	
多粘类芽孢杆菌 1.0224		32.1c	1.9ab	0.129cd	0.508ab	
荧光假单胞菌 10645		6.3a	0.5a	0.022a	0.427ab	
荧光假单胞菌 10040		18.8ab	1.6ab	0.061abc	0.303a	
巨大芽孢杆菌 92075		18.2ab	3.0ab	0.125cd	0.539ab	
多粘类芽孢杆菌 SC2		19.5ab	2.3ab	0.166abcd	0.416ab	
胶冻样类芽孢杆菌 DB		19.6ab	4.9b	0.119cd	0.520ab	

表中数据为 4 次试验的平均值, 同列数值后不同字母代表在 0.05 水平差异显著。

Values presented were means of four repeated experiments. Values within a column followed by different letters are different at 0.05 probability level.

在阜阳土与济宁土盆栽试验中, 单接种对照与双接种都能够形成有效根瘤, 但双接种试验组的结瘤状况明显优于单接种。在 2 种土壤中, 根际土著解磷细菌 P13、根际土著解磷细菌 P7、巨大芽孢杆菌 92075 都使根瘤干重提高了 80% 以上, 巨大芽孢杆菌 92075 使根瘤干重提高 100% 以上。与 CK 相比, 5 个双接种组合使植株干重提高 12.4%~39.2%, 植株含氮量提高 6.0%~37.9%。

延安土壤盆栽试验中, 空白对照不产生根瘤。单接种对照不产生有效根瘤, 只在主根与侧根末端形成白色细小的无效根瘤, 可能由于该地区气候干旱, 土著根瘤菌偏少且结瘤能力弱所致。双接种试验组能够正常产生有效根瘤, 植株干重增长皆在

15% 以上。结瘤能力的提升使得双接种植株的含氮量明显增大。与 CK 相比, 根际土著解磷细菌 P13、根际土著解磷细菌 P7、枯草芽孢杆菌 1.15、促生菌 1-3 都使植株含氮量提高 20% 以上, 巨大芽孢杆菌 92075 使植株含氮量提高 52.6%。

#### 2.4 促生菌解磷能力定量分析

筛选出的促生菌与大豆根瘤菌的双接种组合中, 有 5 株促生菌株, 分别为枯草芽孢杆菌 1.15、促生菌 P7、P13、巨大芽孢杆菌 92075 和促生菌 1-3。除枯草芽孢杆菌 1.15 和巨大芽孢杆菌 92075 外, 其余 3 株菌株由大豆根际土壤中分离得到, 5 株促生菌均有溶解磷的能力。促生菌株在 3、5、7d 时的溶解磷能力见表 4。

表 3 双接种土壤盆栽实验数量形状统计结果

Table 3 Basic analysis of quantitative characters of co-inoculation pot plant test on soil

土壤 Soil source	根瘤菌株 Rhizobium	促生菌株 PGPR strains	总瘤 Nodule number per plant	地上植株干重 Plant dry weight/g	干重提高 Percentage of dry weight increase/%	根瘤干重 Nodule dry weight/g	干重提高 Percentage of dry weight increase/%	地上植株全氮 Total N content per plant/mg	
阜阳	快生根瘤菌 M-5	枯草芽孢杆菌 1.15	14.2	0.874	28.7	0.055	41.0	25.477	
		促生菌 P13	21.0	0.887	30.6	0.073	87.2	29.315	
		促生菌 P7	12.9	0.897	32.1	0.075 *	92.3	31.969	
		CK	8.8 *	0.679	—	0.039 *	—	24.043	
	慢生根瘤菌 B-b-9	促生菌 1-3	16.0	1.213	20.9	0.070	75.0	41.630	
		巨大芽孢杆菌 92075	27.0	1.127	12.4	0.086 *	115.0	40.628	
		CK	9.6	1.003	—	0.040	—	31.665	
	济宁	快生根瘤菌 M-5	枯草芽孢杆菌 1.15	15.0	0.990 *	39.2	0.062	121.4	37.511
			促生菌 P13	15.0	0.815	14.7	0.051	82.1	33.073
促生菌 P7			25.0 *	0.801	12.7	0.080 *	185.7	31.976	
CK			6.0	0.711	—	0.028 **	—	28.753	
慢生根瘤菌 B-b-9		促生菌 1-3	10.0	0.832	30.4	0.053	35.9	29.254	
		巨大芽孢杆菌 92075	14.0 *	0.807	26.5	0.122 *	212.8	33.754	
延安	快生根瘤菌 M-5	枯草芽孢杆菌 1.15	11.0	0.680	19.1	0.017	142.9	28.594	
		促生菌 P13	10.5	0.735	28.7	0.023	228.6	26.298	
		促生菌 P7	12.0	0.712 *	24.7	0.025	257.1	25.578	
		CK	5.0	0.571	—	0.007	—	21.275	
	慢生根瘤菌 B-b-9	促生菌 1-3	7.0 *	0.803	21.4	0.043 *	—	29.896	
		巨大芽孢杆菌 92075	3.7 *	0.767	16.1	0.023	—	34.016	
		CK	2.1 *	0.661	—	0	—	22.309	

表中数据均为 4 个重复的平均值,均值比较采用 Duncan 法,\*表示在  $P < 0.05$  水平差异显著,\*\*表示在  $P < 0.01$  水平差异极显著。

Values presented were means of four repeated experiments. \* indicated significant difference ( $P < 0.05$ ) between strains by Duncan test, \*\* indicated very significant difference ( $P < 0.01$ ).

表 4 不同时间段促生菌发酵液中磷含量

Table 4 Phosphate concentration of PGPR broth in different time ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

促生菌株 PGPR strains	接种后天数 Days after inoculation		
	3	5	7
枯草芽孢杆菌 1.15	32.96	124.96	255.58
促生菌 P7	146.03	193.08	216.25
促生菌 P13	120.04	266.11	266.81
巨大芽孢杆菌 92075	44.90	42.09	48.41
促生菌 1-3	82.82	153.05	153.75

除枯草芽孢杆菌 1.15 外,其余促生菌在 5 d 时溶磷值达到最高。以枯草芽孢杆菌 1.15 和促生菌 P13 溶磷能力最强,促生菌 P7、促生菌 1-3 次之,巨大芽孢杆菌 92075 最差。

测定土壤盆栽的植株全磷,可以发现双接种使得植株含磷量都有所提升(表 5)。与 CK 相比,双接种植株的含磷量明显增加,在 3 种土壤中,植株全磷含量皆提高了 10% 以上,其中促生菌 P13 使含磷

量提高 20% 以上。但在不同的土壤中,促生菌对植株全磷的提升效果有所不同,如枯草芽孢杆菌 1.15,在济宁土中全磷提高 62.5%,但在阜阳土中仅提高 19.5%;促生菌 P13 表现较为稳定,植株全磷提高 25.6% ~ 48.1%。在延安土壤中,5 个双接种实验组的植株全磷皆提高 30% 以上,阜阳土和济宁土中差异较大,提升幅度为 12.0% ~ 62.5%。

表5 植株全磷含量

Table 5 Total P content of pot plant

根瘤菌株 Rhizobium	促生菌株 PGPR strains	阜阳 Fuyang		济宁 Jining		延安 Yan'an	
		地上植株全磷 Total P content per plant/g	全磷提高 Percentage of total P increase/%	地上植株全磷 Total P content per plant/g	全磷提高 Percentage of total P increase/%	地上植株全磷 Total P content per plant/g	全磷提高 Percentage of total P increase/%
快生根瘤菌 4644	枯草芽孢杆菌 1.15	0.288	19.5	0.566	62.6	0.315	36.4
	促生菌 P13	0.328	36.1	0.437	25.6	0.342	48.1
	促生菌 P7	0.341	41.5	0.414	18.9	0.306	32.5
	CK	0.242	—	0.348	—	0.231	—
慢生根瘤菌 4219	促生菌 1-3	0.438	12.0	0.401	29.4	0.373	35.1
	巨大芽孢杆菌 92075	0.446	14.1	0.438	41.3	0.370	34.1
	CK	0.391	—	0.310	—	0.276	—

### 2.5 促生菌发酵液成分分析

通过定性测定,5个促生菌都具有生产 IAA 的能力。用高效液相色谱法检测 5 株促生菌发酵液中含有的激素及有机酸,其成分与含量见表 6。

从表 6 可以看出,5 株促生菌都有一定的分泌生长素的能力。巨大芽孢杆菌 92075 产生生长素能力最强,48 d 时发酵液中 IAA 浓度为  $2.094 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。促生菌 1-3 产 IAA 能力较弱,48 d 时发酵液中浓度为  $0.156 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,用定性检测法已经无法检测到。赤霉素含量差异较大,巨大芽孢杆菌 92075 发酵液中高达  $18.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,枯草芽孢杆菌 1.15 仅为  $0.824 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。脱落酸浓度均在  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以

下,符合 IAA 浓度高时则脱落酸浓度低的规律,也表明 5 株促生菌几乎没有产生脱落酸的能力。除促生菌 1-3 外,其余菌株发酵液中,玉米素的浓度均为 0,表明其不产生玉米素。

在促生菌 P7、P13 的发酵液中,可以检测到苹果酸、柠檬酸、乙酸和丙酸;巨大芽孢杆菌 92075 和枯草芽孢杆菌 1.15 发酵液中有苹果酸、柠檬酸和乙酸;促生菌 1-3 发酵液中只有乙酸。4 种有机酸总含量最高的为菌株 1.15 的发酵液( $0.353 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),最低为菌株 P7 的发酵液( $0.190 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。在 48 h 时检测 5 个菌株发酵液的 pH 均大于 7。

表6 促生菌株发酵产生的激素、有机酸成分及含量

Table 6 Composition and content of hormones and organic acid in growth-promoting stains' fermentation( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

促生菌株 PGPR strains	赤霉素 GA3	生长素 IAA	脱落酸 ABA	玉米素 Z	苹果酸 Malic acid	乙酸 Acetic acid	柠檬酸 Citric acid	丙酸 Propionic acid	有机酸总计 Total organic acid
枯草芽孢杆菌 1.15	0.824	0.554	0.058	0	0.001	0.324	0.028	0	0.353
促生菌 P7	8.496	0.622	0.062	0	0.005	0.089	0.018	0.078	0.190
促生菌 P13	17.69	0.525	0.042	0	0.015	0.108	0.007	0.062	0.192
巨大芽孢杆菌 92075	18.56	2.094	0.029	0	0.005	0.157	0.030	0	0.192
促生菌 1-3	15.92	0.156	0	0.086	0	0.277	0	0	0.277

### 2.6 促生菌 16SrRNA 基因序列分析

促生菌 P7、P13 和促生菌 1-3 是从大豆根际土壤中分离得到的促生细菌。测定其 16S rRNA 基因序列,在 NCBI 中进行比对。促生菌 P7 与 *Phyllobacterium ifriqiyense* 具有 99% 的同源性,促生菌 P13 与 *Sinorhizobium meliloti* 具有 99% 的同源性,促生菌 1-3 与 *Bacillus firmus* 具有 99% 的同源性,它们分别归属于叶杆菌属、中华根瘤菌属和芽孢杆菌属。

## 3 讨论

从采自山西汾阳、陕西延安和山东济宁 3 个地区的大豆根际土壤中,筛选得到 38 株根际促生细菌,连同实验室已有的 30 株保藏菌株,进行溶磷能力和产生生长素的定性测定。

根据溶磷及产生生长素能力,选择 14 个菌株与广

谱性的快生大豆根瘤菌 4644 和慢生大豆根瘤菌 4219 进行共接种试验。经蛭石基质盆栽试验筛选,有 5 个共接种组合,在根瘤数目、根瘤干重、植株地上干重和植株含氮量方面均有大幅度的提高,能够较好地促进大豆的结瘤和生长。此 5 个共接种组合,分别为快生大豆根瘤菌 4644 与枯草芽孢杆菌 1.15、促生菌 P13 和 P7,以及慢生大豆根瘤菌 4219 与促生菌 1-3 和巨大芽孢杆菌 92075。在汾阳、延安和济宁 3 种土壤基质盆栽中,5 个促生菌与大豆根瘤菌共接种组合均能够促进大豆结瘤和植株生长,与蛭石盆栽结果基本一致。但每个促生菌只能和单一的大豆根瘤菌种进行配合,以枯草芽孢杆菌 1.15 为例,在与快生大豆根瘤菌 4644 进行共接种时,对植株结瘤和生长具有促进作用,与慢生大豆根瘤菌 4219 共接种时则没有这种促进作用。

5 株促生菌皆有一定的溶磷能力。芽孢杆菌属、慢生根瘤菌属等是已报道的溶磷细菌,能够将土壤中非溶态的磷素转化为植物可以利用的形式。枯草芽孢杆菌 1.15、促生菌 P13 溶磷能力最强,促生菌 P7、促生菌 1-3 次之,巨大芽孢杆菌 92075 溶磷能力较为不明显。通过对土壤盆栽大豆植株的全磷含量测定,双接种使得植株含磷量提高至少 10% 以上,最高达到 62.5%。磷是植物生长发育所必需的大量营养元素之一,参与植物体内许多重要化合物的组成及多种营养代谢。研究显示磷对大豆根瘤的发育有利,可促进氮的固定和氨的转化,有利于大豆籽粒氮素含量提高<sup>[15-16]</sup>。该研究采用的 3 种土壤中,速效磷含量低,属于缺磷土壤,而缺磷是土壤限制大豆生产的重要因素<sup>[17]</sup>。有研究表明,土壤所含的全部磷元素中,80%~90% 处于难溶状态,只有在微生物的作用下转化成可利用的无机磷酸根的形式才可被利用<sup>[18]</sup>。当土壤含磷量低时,根瘤菌虽然进入根内,但不形成根瘤,而土壤中磷素丰富能够促进植株的株高、生物量和产量的增加,有效改善根系生长状况,促进根系的伸长生长和根系表面积以及根体积的增加<sup>[19]</sup>。通常通过施用磷肥来提高大豆产量,而该研究中,溶磷菌起到了替代磷肥的作用。试验结果表明,双接种植株的全磷含量全部提高,同时根瘤数量和干重明显高于对照。溶磷菌促进植株对磷素的吸收,是双接种提高大豆结瘤固氮的原因之一。

5 个促生菌都有一定的产生生长素的能力,几乎没有产生脱落酸的能力。除促生菌 1-3 外,其余菌株不产生玉米素。一般认为促生菌的代谢产物如植物激素等对固氮菌结瘤起促进作用,包括增加瘤数、促进根系发育等。有报道证实根际促生细菌产生的吲哚-3-乙酸导致根系增大,供结瘤的侵染位点增多。此外,通过刺激幼苗生长,能够促进幼苗的光合作用能力,从而为根系提供更多可释放的有机物<sup>[20]</sup>。5 个促生菌都产生一种或几种有机酸,但产量并不高。有研究表明溶磷量与分泌的有机酸量之间缺乏相关性<sup>[21]</sup>,但也有报道二者之间存在显著的相关性<sup>[22]</sup>。该研究中,促生菌的溶磷量与有机酸产生之间并未表现出明显的相关性,其机理有待进一步研究。

5 个促生菌中,枯草芽孢杆菌 1.15、巨大芽孢杆菌 92075 为实验室保藏菌株,促生菌 P7、P13,促生菌 1-3 为大豆根际土壤中筛选得到。经 16SrDNA 序列测定和比对,促生菌 P7、P13 和促生菌 1-3 分别与 *Phyllobacterium ifriqiyense*、*Sinorhizobium meliloti* 和 *Bacillus firmus* 亲缘关系最近,同源性均达 99%。该

研究筛选到的 5 株促生菌中,有 3 株是芽孢杆菌。芽孢杆菌是根际促生细菌中的一类,诸多研究表明,在与大豆或豌豆的共生体系中,芽孢杆菌和根瘤菌之间的合作能够促进植物的生长发育,刺激根瘤菌的种群数量及结瘤<sup>[23-24]</sup>。叶杆菌与中华苜蓿根瘤菌本身都具有共生固氮的能力。叶杆菌属是根瘤菌科中的一个属,有报道证实,*P. ifriqiyense* 在山黎豆的根部能够固氮<sup>[25]</sup>。中华苜蓿根瘤菌是牧草使用的重要微生物肥料,可以与苜蓿属的植株形成共生。作为具有溶磷、产生长素能力的促生菌株,该研究所筛选的叶杆菌与中华苜蓿根瘤菌能够对根瘤菌与大豆植株的共生体系产生有利的影响。

## 参考文献

- [1] Quatrini P, Scaglione G, Incannella G, et al. Microbial inoculants on woody legumes to recover a municipal landfill site[J]. Water, Air & Soil Pollution, 2003, 3: 189-199.
- [2] 赵丹丹, 李涛, 赵之伟. 丛枝菌根真菌-豆科植物-根瘤菌共生体系的研究进展[J]. 生态学杂志, 2006, 25(3): 327-333. (Zhao D D, Li T, Zhao Z W. Research advances in arbuscular mycorrhizal fungi-legumes-rhizobia symbiosis[J]. Chinese Journal of Ecology, 2006, 25(3): 327-333.)
- [3] 邹铎, 韩静淑, 玉书锦. 紫色非硫光合细菌与大豆根瘤菌固氮作用的协同效应[J]. 微生物学杂志, 1988, 8(3): 18-23. (Zou H, Han J S, Yu S J. The synergistic action between phototropic bacteria and rhizobium in nitrogen fixation[J]. Journal of Microbiology, 1988, 8(3): 18-23.)
- [4] Chanway C P, Radley R A, Holl F B, et al. Effect of *Bacillus* strains on growth of pine (*Pinus contorta* Dougl.), spruce (*Picea glauca* Voss.) and douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* MIRB. Franco) [M]. The Rhizosphere and Plant Growth, 1991: 366.
- [5] Kloepper J W, Schroth M N, Miller T D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting bacteria on potato plant development and yield[J]. Phytopathology, 1980, 71: 642-644.
- [6] Petersen D J, Srinivasan M, Chanway C P. *Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium elii* populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* [J]. FEMS microbiology, 1996, 142: 271-276.
- [7] Lifshitz R, Guilmette H, Kozlowski M. Tn5-mediated cloning of a genetic region from *Pseudomonas putida* involved in the stimulation of plant root elongation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 54: 3169-3172.
- [8] Oken Y, Vanderleyden J. Root associative *Azospirillum* species can stimulate plants[J]. ASM news, 1997, 63(7): 366-372.
- [9] 姚拓. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究 II 固氮菌的溶磷性和分泌植物生长素特性测定[J]. 草业学报, 2004, 13(3): 85-90. (Yao T. Associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Avena sativa* in an alpine region II Phosphate-solubilizing power and auxin production[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2004, 13(3): 85-90.)
- [10] 冯月红, 姚拓, 龙瑞军. 土壤解磷菌研究进展[J]. 草原与草坪, 2003(1): 3-7. (Feng Y H, Yao T, Long R J. Research progress of

- phosphate-dissolving microorganisms in plant rhizosphere [J]. Grassland and Turf, 2003(1):3-7.)
- [11] 赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料, 2001(3):7-11. (Zhao X R, Lin Q M. A review of phosphate dissolving microorganisms[J]. Soils and Fertilizers, 2001(3):7-11.)
- [12] 吕学斌,孙亚凯,张毅民. 几株高效溶磷菌株对不同磷源溶磷活力的比较[J]. 农业工程学报, 2007, 23(5):195-197. (Lv X B, Sun Y K, Zhang Y M. Comparative research on the influences of several high efficient phosphate-solubilizing strains on phosphate solubilizing activity[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2007, 23(5):195-197.)
- [13] 高海燕,王善广,胡小松. 利用反相高效液相色谱法测定梨汁中有机酸的种类和含量[J]. 食品与发酵工业, 2004(8):96-100. (Gao H Y, Wang S G, Hu X S. Study on determination of kinds and contents of organic acids in pear juice by high performance liquid chromatography [J]. Food and Fermentation Industries, 2004(8):96-100.)
- [14] Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] 蔡柏岩,葛菁萍,祖伟. 不同磷肥水平对大豆磷营养状况和产量品质性状的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2007, 13(3):404-410. (Cai B Y, Ge Q P, Zu W. Effect of phosphorus levels on soybean phosphorus nutrition, yield and quality[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2007, 13(3):404-410.)
- [16] 吴明才,肖昌珍,郑普英. 大豆磷素营养研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32(3):59-65. (Wu M C, Xiao C Z, Zheng P Y. Study on the physiological function of phosphorus to soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1999, 32(3):59-65.)
- [17] 徐青萍,罗超云,廖红,等. 大豆不同品种对磷胁迫反应的研究[J]. 大豆科学, 2003, 22(2):108-114. (Xu Q P, Luo C Y, Liao H, et al. Study on the response of soybean varieties to P deficiency[J]. Soybean Science, 2003, 22(2):108-114.)
- [18] 张玉兰,王俊宇,马星竹,等. 提高磷肥有效性的活化技术研究进展[J]. 土壤通报, 2009, 40(1):194-199. (Zhang Y L, Wang J Y, Ma X Z, et al. Advances on activating technique research in improving the validity of phosphorus fertilizer[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2009, 40(1):194-199.)
- [19] 刘君,蔡昆争,骆世明,等. 磷处理对不同磷效率基因型大豆根系性状和干物质积累及产量的影响[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2008, 25(3):211-214. (Liu J, Cai K Z, Luo S M, et al. Effects of phosphorous treatment on root traits and dry matter accumulation and yield of soybean genotypes with different P efficiency[J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2008, 25(3):211-214.)
- [20] Holl F B, Chanway C P, Turkington R et al. Response of crested wheatgrass (*Agrop. vron cristafum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa* [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1988, 20:19-24.
- [21] Lin Q M, Wang H, Zhao X R, et al. Capacity of some bacteria and fungi in dissolving rock [J]. Microbiologica Sinica Bulletin, 2001, 28(2):26-30.
- [22] 王光华,周克琴,金剑,等. 不同碳源对三种溶磷真菌溶解磷矿粉能力的影响[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2):32-36. (Wang G H, Zhou K Q, Jin J, et al. Effect of different C sources on the solubilization of rock phosphate by three phosphate solubilizing fungi (PSF) [J]. Chinese Journal of Ecology, 2004, 23(2):32-36.)
- [23] Chanwa C P, Radley R A, Holl F B, et al. Effect of *Bacillus* strains on growth of pine (*Pinus contorta Dougl.*), spruce (*Picea glauca Voss.*) and douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) Franco) [J]. The Rhizosphere and Plant Growth, 1991:366.
- [24] Camacho M, Santamaría C, Temprano F, et al. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47:1058-1062.
- [25] Mantelin S, Saux M F L, Zakhia F, et al. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56:827-839.

(上接第 612 页)

- [4] 王琳,董钻,张宪政. 土壤水分状况对大豆生长和产量的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 1991, 22(4):49-53. (Wang L, Dong Z, Zhang X Z. The effect of soil moisture state on the growth and yield of soybean [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1991, 22(4):49-53.)
- [5] 郑淑娟. 水分光照与硼对大豆生长发育及根系性状的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2006. (Zheng S J. The effect of soil moisture and illumination and boron on growth and root character of soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2006.)
- [6] Albrecht S L, Boote K J, Bennett J M. Relationship of nitrogenase activity to plant water stress in field grown soybeans *Glycine max* [J]. Field Crops Research, 1984, 8:61-72.
- [7] Hsiao T C, Xu I K. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress; biophysical analysis and relation to water transport [J]. Journal of Experimental Botany, 2000, 51:1595-1616.
- [8] 王芳,朱洪德,李伟. 干旱胁迫对不同大豆品系干物质积累的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2006, 18(2):23-26. (Wang F, Zhu H D, Li W. The influence of drought stress on the soybean dry substance [J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2006, 18(2):23-26.)