

玉米根际无机磷溶解菌的筛选与促生特性*

李 静¹ 张金羽¹ 张 琪² 张潇月¹ 李 玥¹ 李成成¹ 程雪芬¹ 赵 珂^{1**}

¹四川农业大学资源学院 成都 611130

²四川农业大学生命科学学院 雅安 625000

摘 要 从玉米根际土中筛选对无机磷具有高效溶解作用和促生功能的菌株,以向微生物肥料的开发提供菌株资源。采用溶磷圈法从玉米根际土中筛选溶磷菌株,采用钼锑抗比色法进一步测定菌株的溶磷能力。通过对菌株产吲哚-3-乙酸 (IAA)、产铁载体、固氮、产几丁质酶能力及抗菌活性进行检测,综合评价溶磷菌的促生能力,并通过盆栽实验探索单一菌株及复合菌系对玉米促生的潜能。共筛选获得34株溶磷菌,其溶磷量为33.74-273.44 mg/L; 34株菌中有10株菌 (29.41%) 同时具有3种及以上的促生功能,菌株PSM16、PSM27、PSM30同时具有4种促生功能; 18株菌 (52.94%) 对不同供试病原菌表现出不同程度的抗性,菌株PSM12、PSM22、PSM25、PSM27、PSM34对5种目标病原菌同时具有抑菌作用; 盆栽结果显示在土壤有效磷缺乏的条件下,经菌株PSM01、PSM12、PSM16及复合菌系处理后的玉米植株的株高、物质质量、根系发达程度均显著提高 ($P < 0.05$), 促生效果显著,且能提高土壤有效磷含量,复合菌系的效果更优。16S rRNA基因测序结果显示,PSM01、PSM12、PSM16分别属于*Bacillus aryabhattai*、*Paenibacillus silvae*、*Pseudomonas moorei*。本研究为溶磷菌剂的开发提供了菌种资源,所构建的复合菌系具有较好的应用前景。(图4 表4 参43)

关键词 玉米; 根际; 无机磷溶解菌; 筛选; 促生

CLC S154.39

Screening and analysis of plant growth-promoting properties in inorganic phosphate-solubilizing bacteria from maize rhizosphere*

LI Jing¹, ZHANG Jinyu¹, ZHANG Qi², ZHANG Xiaoyue¹, LI Yue¹, LI Chengcheng¹, CHENG Xuefen¹ & ZHAO Ke^{1**}

¹ College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

² College of Life sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625000, China

Abstract This study was designed to screen the inorganic phosphate-solubilizing bacteria (PSB) plant growth promoting capacity from maize rhizosphere to provide strain resources for the development and production of microbial fertilizer. This was based on the halo formation of screening medium to identify the phosphate solubilizing capacities of isolates. The Mo-Sb method was used to further analyze the phosphate solubilizing activity of the strains. The plant growth promoting properties of strains were evaluated by the production of indole-3-acetic acid (IAA), siderophore, N₂-fixation, production chitinase, and antimicrobial activity. Pot experiments were employed to evaluate the potential plant growth promoting ability of pure culture and microbial consortia of PSB. The results showed the isolation of 34 strains from the maize rhizosphere that showed phosphate solubilizing activity. The amount of phosphate solubilization by isolates ranged from 33.74 mg/L to 273.44 mg/L. Ten strains (29.41%) possessed at least three of the plant growth promoting properties. Strains PSM16, PSM27, and PSM30 harbored plant growth promoting properties including the production of IAA, siderophore, chitinase, and nitrogen fixing ability. A total of 18 strains (52.94%) showed antimicrobial activity, and strains PSM12, PSM22, PSM25, PSM27, and PSM34 possessed antimicrobial activity against 5 pathogens. Pot experiments showed that the PSM01, PSM12, PSM16, and PSB consortia all increased the maize biomass, promoted the height and root growth significantly ($P < 0.05$) under available phosphorus deficiency, and improved soil available phosphorus. The best results were observed in the PSB consortia. The 16S rRNA gene sequences analysis demonstrated that the strains PSM01, PSM12, and PSM16 belonged to *Bacillus aryabhattai*, *Paenibacillus silvae*, and *Pseudomonas moorei*, respectively. This study provides strain resources for the development of biofertilizer and indicates that the PSB consortia is a good candidate to be applied as a biofertilizer to enhance soil fertility and promote plant growth.

Keywords maize; rhizosphere; inorganic phosphate-solubilizing bacteria; screening; plant growth promoting

收稿日期 Received: 2018-06-04 接受日期 Accepted: 2018-10-12

*国家高技术研究发展计划 (863计划) (2013AA102802-05) 资助 Supported by the National High-tech R&D Program of China (863 Program) (2013AA102802-05)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhaoke82@126.com)

磷(P)是作物生长发育所必需的三大营养元素之一,对植物的生长调节起重要作用^[1].全国土壤普查表明,我国土壤中约95%的磷都以难溶性无机态和有机态存在,难以被植物吸收利用^[2],为满足实际农业生产所使用的高水溶性磷肥施入土壤后易形成难溶性的磷酸盐,并迅速被土壤矿物吸附固定或为微生物固持,其当季利用率仅为10%-25%^[3].因此,如何提高土壤中磷素的利用率已成为目前科学研究的热点问题之一.

土壤中存在着一类能够溶解土壤难溶磷酸盐和有机磷、减少磷肥固定及提高磷肥利用率的微生物类群,被称为溶磷或解磷微生物(Phosphate-solubilizing microorganisms, PSM),它们能够依靠自身的代谢产物或与其他生物协同使土壤中易于被植物吸收利用的磷含量提高,从而增加作物吸磷量,提高作物产量^[4].其中土壤中的根际微生物可通过各种途径对植物的生长发育产生有益影响^[5].研究表明,根系微生物能定殖于植物根际,通过重寄生、产生抗生素、植物生长调节素等机制促进植物生长,且作用稳定^[6-7],在农业、林业等具有较强的应用潜力.因此,从植物根际土中筛选溶磷能力强、功能稳定、促生效果好的菌株对实际农业生产具有重要的理论和实践意义.

目前,关于解磷微生物的研究在国内外已有相关报道,部分菌株也得到了推广应用,但大多数菌株存在溶磷、促生效果不稳定的问题.土壤微生物受到土壤环境和生物多样性的影响,对于环境的变化十分敏感,其结构和功能会迅速地对环境变化做出响应^[8],因此,从特定的土壤环境中分离筛选具有无机磷溶解及促生作用的菌株,该菌株在其特定的环境中具有较强的适应性和竞争力^[9],能更好地发挥其解磷及促生能力,提高土壤中的有效磷含量,促进作物更好生长.此外,单一菌株在土壤中的定殖能力差,具有不稳定性,而复合菌系具有较强的适应能力,在土壤中的定殖能力强,对土壤磷素养分、作物增产和品质改善的影响优于单一菌株^[10-11],具有更好的实际应用价值.基于此,我们以四川盆地玉米根际土为对象,筛选具有无机磷溶解作用的菌株,并构建复合菌系,对单菌株及复合菌系的促生能力进行分析,探究溶磷、促生综合能力较好的菌株及复合菌系对玉米生长的影响,旨在为四川地区开发和研制具有促生作用的溶磷菌剂提供理论依据和菌株资源.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 供试玉米植株采自四川省成都市郫都区(30°43'-30°52'N, 103°42'-104°2'E),随机选取3个种植区,每个种植区随机选取5株玉米进行根际土的采集,根际土的采集方法参照Clegg等人的方法^[12]进行.

1.1.2 培养基 分离筛选培养基:无机磷培养基^[2];纯化保种培养基:LB培养基^[13];抗病促生能力检测培养基:PDA培养基、IAA显色液^[14]、CAS^[15]、NFM(Nitrogen free medium)^[16]、MM-Chitin^[17].

1.1.3 抗病活性指示菌株 赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)、西瓜枯

萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、蕃茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)均由四川农业大学植物病理实验室提供.

1.1.4 玉米品种 晶彩加甜糯 3: 1.

1.2 方法

1.2.1 无机磷溶解菌的分离及初筛 将采集到的新鲜根际土用无菌水制成 10^{-4} - 10^{-6} 菌悬液,涂布在固体无机磷培养基上,28℃培养3 d,设置3个重复.挑选能在无机磷培养基上形成透明圈的单菌落进行分离纯化后,再接种于无机磷培养基上,于28℃培养4 d,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^[18]的大小初步判断菌株的溶磷能力.

1.2.2 无机磷溶解菌的复筛 将初筛获得的具有无机磷溶解作用的菌株接种于LB液体培养基,28℃摇床培养24 h,菌株制成种子悬浮液.离心后弃上清液后,加蒸馏水,调节其OD值一致,按10%的接种量接种于装有45 mL无机磷液体培养基的三角瓶内,以接等量的蒸馏水为对照,置于28℃、160 r/min摇床上振荡培养4 d.用钼锑抗比色法^[19]测定上清液中有效磷含量,根据标准曲线计算出溶磷量,并测定培养液的pH值,设置3个重复.

1.2.3 菌株促生及抗病能力测定 菌株产IAA能力参考Gordon等方法^[14]测定,产铁载体能力参照Shin等方法^[15]测定,固氮能力参考Ribeiro等方法^[16]检测,产几丁质酶能力参考肖湘等方法^[17]测定.

采用对峙生长法测试抗病活性:取真菌菌饼($d = 5$ mm)置于固体PDA培养基中心,距离真菌菌饼3 cm的上下左右各点接一株无机磷溶解菌,设3次重复,28℃培养4 d,观察并记录抑菌圈的大小.

1.2.4 菌株对玉米的促生效果试验 选择综合效果较好的PSM01、PSM12、PSM16菌株,采用盆栽实验确定其对玉米的促生效果.盆栽实验土壤采自成都附近农村(惠禾村)的一个有效磷缺乏土壤耕作层(每kg土中含有效磷8.98 mg),分装到口径为21 cm的花盆中,每盆约3.0 kg.所选择菌株间的拮抗作用参照杨林丽等人的方法^[20]进行检测.并将无拮抗的菌株按体积比1:1进行复合菌系构建.参照邓振山等人的方法^[21]对玉米进行催芽、浸种、移栽,每个装置1株,每组3个重复,将装置放在光照室里,每盆每天浇水10 mL.分别在第3片和第5片真叶长出时浇灌50 mL用无菌水制成的无机磷溶解菌的菌悬液(1×10^8 CFU/mL).玉米生长40 d后,测定其株高和生物量,采用EPSON1680根系扫描仪(Epson, Long Beach, USA)扫描各组样品根系,WinRhizo2005a根系分析软件获得根系总根长、总根表面积、总根体积、根尖数、分支数等形态指标^[22-23].并测定根际土壤^[12]有效磷含量.

1.2.5 菌株的分子生物学鉴定 提取盆栽实验所用的菌株DNA^[24].选用细菌通用引物8-27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行16S rRNA扩增并测序.测序获得的基因序列与美国生物技术研究中心(National center for biotechnology, NCBI)数据库中的已知序列进行BLAST比对,确定菌株的分类地位;采用Neighbor-joining法构建系统发育树^[25].

1.2.6 数据处理 数据采用Excel 2016和SPSS统计软件进行作图、方差分析和多重比较分析.

2 结果与分析

2.1 无机磷溶解菌的分离与初筛

共分离得到51株菌，其中34株具有无机磷溶解能力且可稳定遗传，34株菌的*D/d*值范围在1.20-3.75，有18株菌的*D/d*值超过1.50，表现出较好的溶磷效果；其中菌株PSM01的*D/d*值最大为3.75，初步判定所分离菌株中PSM01具有最强的无机磷溶解能力（表1）。

2.2 菌株的溶磷能力及其与pH的关系

不同菌株对同种磷物质来源的溶解能力差异很大。在以磷酸三钙为唯一磷源的无机磷液体培养基中接种初筛菌株种子悬浮液培养4 d后，培养液中有效磷浓度介于33.74-273.44 mg/L之间（表2）。菌株PSM02的溶磷能力最高，发酵上清液中有效磷浓度为273.44 mg/L，初筛中效果最好的PSM01溶解释放的有效磷浓度为267.17 mg/L，溶磷能力较高。菌株PSM32的溶磷能力最低，发酵上清液中有效磷浓度仅为33.74 mg/L。34株溶磷菌发酵液的pH介于4.70-6.77之间，各菌株之间pH差异较大。菌株PSM02的pH最低，为4.70；菌株

PSM32的pH最高，为6.77。溶磷能力高的菌株发酵液pH较低，溶磷能力低的菌株发酵液pH较高，有较少菌株表现出特殊性，表明这些菌株在培养过程中，能够分泌一些酸性物质，导致pH下降，使难溶性磷得以溶解。由34株无机磷降解菌发酵液的有效磷含量与pH之间的关系可知，溶磷菌的溶磷能力与溶液pH呈极显著的负相关性（ $R = -0.775$, $N = 34$, $P < 0.01$ ），普遍表现为发酵上清液的pH值越低，有效磷浓度越高（图1）。

2.3 菌株的促生及抗病能力

34株无机磷溶解菌中有28株菌（82.35%）具有产IAA能力，其分泌的IAA浓度范围为0.17-39.89 mg/L，其中2株的IAA浓度达34.92 mg/L（PSM14）和39.89 mg/L（PSM17），表现出较高的产IAA能力；28株菌（82.35%）能够在CAS培养基上产生橘红色透明圈，表现出产铁载体能力；9株菌（26.47%）在装有NFM培养基的试管内产生一层透明薄膜，表明其具有固氮能力；9株菌（26.47%）具有产几丁质酶能力。10株菌（29.41%）同时具有3种及其以上的促生功能，菌株PSM16、PSM27、PSM30同时具有4种促生功能（表3）。

表1 无机磷溶解菌的初筛结果
Table 1 Preliminary results of inorganic phosphate-solubilizing strains screened

菌株 Strain	菌落直径 Colony diameter (d/cm)	水解圈直径 Hydrolytic circle diameter (D/cm)	<i>D/d</i>	菌株 Strain	菌落直径 Colony diameter (d/cm)	水解圈直径 Hydrolytic circle diameter (D/cm)	<i>D/d</i>
PSM01	0.80 ± 0.02	3.02 ± 0.02	3.76 ± 0.07	PSM18	0.81 ± 0.02	1.22 ± 0.02	1.50 ± 0.03
PSM02	1.01 ± 0.01	2.51 ± 0.01	2.49 ± 0.02	PSM19	0.79 ± 0.01	1.19 ± 0.01	1.49 ± 0.01
PSM03	0.91 ± 0.01	2.20 ± 0.02	2.41 ± 0.04	PSM20	1.50 ± 0.02	2.22 ± 0.02	1.48 ± 0.02
PSM04	0.90 ± 0.02	2.11 ± 0.01	2.36 ± 0.05	PSM21	0.81 ± 0.01	1.17 ± 0.01	1.44 ± 0.01
PSM05	1.24 ± 0.01	2.71 ± 0.02	2.19 ± 0.03	PSM22	0.90 ± 0.01	1.30 ± 0.02	1.44 ± 0.02
PSM06	1.02 ± 0.02	2.13 ± 0.00	2.09 ± 0.04	PSM23	1.01 ± 0.01	1.41 ± 0.01	1.40 ± 0.02
PSM07	0.81 ± 0.01	1.72 ± 0.02	2.13 ± 0.01	PSM24	0.91 ± 0.01	1.26 ± 0.01	1.40 ± 0.01
PSM08	1.05 ± 0.02	2.04 ± 0.01	1.94 ± 0.03	PSM25	0.81 ± 0.01	1.08 ± 0.02	1.34 ± 0.01
PSM09	1.09 ± 0.01	2.09 ± 0.02	1.92 ± 0.03	PSM26	1.31 ± 0.02	1.71 ± 0.03	1.31 ± 0.01
PSM10	0.72 ± 0.02	1.31 ± 0.02	1.83 ± 0.06	PSM27	1.11 ± 0.01	1.41 ± 0.01	1.27 ± 0.00
PSM11	1.06 ± 0.02	1.82 ± 0.02	1.73 ± 0.04	PSM28	1.12 ± 0.02	1.40 ± 0.02	1.25 ± 0.03
PSM12	1.23 ± 0.03	2.03 ± 0.03	1.65 ± 0.02	PSM29	1.03 ± 0.02	1.31 ± 0.02	1.27 ± 0.03
PSM13	1.50 ± 0.02	2.50 ± 0.01	1.67 ± 0.02	PSM30	1.02 ± 0.03	1.26 ± 0.01	1.23 ± 0.03
PSM14	0.75 ± 0.02	1.20 ± 0.01	1.61 ± 0.04	PSM31	1.79 ± 1.01	2.19 ± 0.01	1.22 ± 0.01
PSM15	1.01 ± 0.01	1.53 ± 0.03	1.52 ± 0.02	PSM32	1.02 ± 0.02	1.23 ± 0.01	1.21 ± 0.02
PSM16	1.02 ± 0.01	1.54 ± 0.02	1.51 ± 0.01	PSM33	1.40 ± 0.02	1.71 ± 0.01	1.21 ± 0.02
PSM17	1.45 ± 0.02	2.21 ± 0.02	1.53 ± 0.02	PSM34	1.01 ± 0.01	1.21 ± 0.02	1.20 ± 0.01

表2 无机磷溶解菌的溶磷能力检测
Table 2 Phosphate-solubilizing capacity of inorganic phosphate-solubilizing strains

菌株 Strain	有效磷含量 Available phosphorus (μg mg ⁻¹)	pH	菌株 Strain	有效磷含量 Available phosphorus (μg mg ⁻¹)	pH
PSM01	273.44 ± 1.15	4.70 ± 0.01	PSM18	103.64 ± 0.53	5.59 ± 0.02
PSM02	267.17 ± 0.61	4.71 ± 0.01	PSM19	89.68 ± 0.39	5.87 ± 0.02
PSM03	197.62 ± 0.82	4.87 ± 0.02	PSM20	61.55 ± 0.54	5.70 ± 0.02
PSM04	165.92 ± 0.92	4.95 ± 0.02	PSM21	130.86 ± 0.43	5.87 ± 0.02
PSM05	183.63 ± 0.57	5.08 ± 0.03	PSM22	48.85 ± 0.30	6.20 ± 0.01
PSM06	169.29 ± 0.58	5.24 ± 0.03	PSM23	56.60 ± 0.47	5.92 ± 0.01
PSM07	152.87 ± 0.53	5.53 ± 0.01	PSM24	101.55 ± 0.31	6.19 ± 0.01
PSM08	137.08 ± 0.89	5.17 ± 0.01	PSM25	41.59 ± 0.29	6.22 ± 0.01
PSM09	123.51 ± 0.48	5.49 ± 0.01	PSM26	128.90 ± 0.43	5.77 ± 0.01
PSM10	136.28 ± 0.39	5.54 ± 0.02	PSM27	44.94 ± 0.38	5.99 ± 0.02
PSM11	140.67 ± 0.39	5.20 ± 0.02	PSM28	83.45 ± 0.60	4.86 ± 0.04
PSM12	103.68 ± 0.58	5.33 ± 0.03	PSM29	65.46 ± 0.53	6.24 ± 0.56
PSM13	82.52 ± 0.34	5.79 ± 0.02	PSM30	89.35 ± 0.57	5.94 ± 0.01
PSM14	148.33 ± 0.47	5.70 ± 0.02	PSM31	66.78 ± 0.38	6.16 ± 0.01
PSM15	150.70 ± 0.46	5.87 ± 0.02	PSM32	33.74 ± 0.20	6.77 ± 0.03
PSM16	113.21 ± 0.41	5.22 ± 0.01	PSM33	66.43 ± 0.13	5.55 ± 0.02
PSM17	74.42 ± 0.37	5.85 ± 0.01	PSM34	37.77 ± 0.70	6.23 ± 0.01

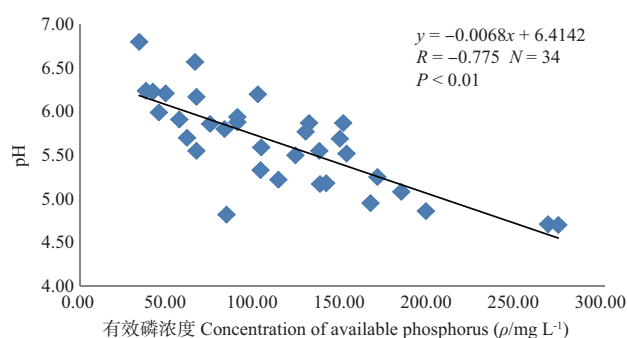


图1 培养液中有有效磷含量与pH的关系。

Fig. 1 Relationship between pH value and available phosphorus in culture medium.

34株无机磷溶解菌中有18株菌(52.94%)对不同供试病原菌表现出不同程度的抗性,其中有14株菌(41.18%)对赤霉菌具有抗菌活性,6株菌(17.65%)对晚疫病菌具有抗菌活性,8株菌(23.53%)对西瓜枯萎病菌具有抗菌活性,10株菌(29.41%)对蕃茄早疫病菌具有抗菌活性,7株菌(20.59%)

对稻瘟病菌具有抗菌活性. 菌株PSM12、PSM22、PSM25、PSM27、PSM34同时对5种目标病原菌具有抗菌活性,表现出广谱的抗菌活性(表3)。

2.4 菌株对玉米促生能力试验

盆栽试验结果表明,菌株PSM01、PSM12、PSM16及复合菌系(PSM01 + PSM12 + PSM16, 3株菌之间互不拮抗)对玉米的生长具有显著的促进作用($P < 0.05$) (表4, 图2),株高分别高出对照组(CK) 18.79%、29.13%、26.78%、36.93%,地上平均生物量分别高出对照组64.61%、120.87%、93.36%、121.54%,地下平均生物量分别高出对照组146.02%、173.38%、151.99%、190.55%;与对照组相比,菌株PSM01、PSM12、PSM16及复合菌系处理过的玉米植株的总根长、总根面积、平均根系直径、根尖数、分指数等各项指标均显著大于对照组($P < 0.05$),表明溶磷菌不仅可以促进玉米植株的生长,提高植株生物量,还能促进玉米根系的生长,其中复合菌系对玉米植株生长的促进效果最佳. 土壤中有效磷含量测定结果显示(图3),与对照组相比,经菌株处理的盆栽

表3 无机磷溶磷菌的促生和抗病能力

Table 3 The capacity of growth promoting and antibiosis of inorganic phosphate-solubilizing strains screened

菌株 Strain	IAA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	铁载体 Siderophore	固氮 Nitrogen fixing	几丁质 Chitinase	赤霉菌 <i>Fusarium graminearum</i>	晚疫病菌 <i>Phytophthora infestans</i>	西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	稻瘟病菌 <i>Pyricularia oryzae</i>
PSM01	14.26 ± 0.74	+	-	+	-	-	+	+	+
PSM02	9.97 ± 1.02	++	+	-	-	-	-	-	-
PSM03	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PSM04	1.23 ± 0.12	-	-	-	-	-	-	-	-
PSM05	2.54 ± 0.21	+++	-	-	-	-	-	-	-
PSM06	16.51 ± 0.94	++	-	-	-	-	-	-	-
PSM07	3.57 ± 0.21	+	+	-	-	-	-	-	-
PSM08	5.03 ± 0.63	+	-	-	-	-	-	-	-
PSM09	3.24 ± 0.18	++	-	-	-	-	-	-	-
PSM10	8.15 ± 0.42	++	-	-	+	-	-	-	-
PSM11	3.61 ± 0.31	-	-	-	+	-	-	-	-
PSM12	10.92 ± 1.32	+++	-	++	++	++	++	++	++
PSM13	7.85 ± 1.08	+	-	-	-	-	-	-	-
PSM14	34.92 ± 1.44	-	-	-	-	-	-	-	-
PSM15	3.57 ± 0.27	+	-	-	-	-	-	-	-
PSM16	23.22 ± 0.55	+++	+	+	+	-	-	-	-
PSM17	39.89 ± 1.19	++	-	-	-	-	-	-	-
PSM18	7.77 ± 0.16	+	+	-	-	-	-	-	-
PSM19	3.96 ± 0.23	-	-	-	+	-	-	-	-
PSM20	-	+	-	-	+	-	-	-	-
PSM21	6.08 ± 0.13	+++	-	-	-	-	-	-	-
PSM22	0.81 ± 0.21	+++	-	++	+	+	+	+	+
PSM23	2.93 ± 0.49	-	-	-	+	-	-	+	-
PSM24	0.17 ± 0.06	+	-	-	-	-	-	+	-
PSM25	-	+	-	+++	++	+	+	+	+
PSM26	-	+	+	-	+	-	-	-	-
PSM27	0.81 ± 0.02	+	+	++	++	+	+	+	+
PSM28	1.49 ± 0.41	++	-	-	-	-	-	-	-
PSM29	0.53 ± 0.27	+++	-	-	-	-	+	+	-
PSM30	11.49 ± 0.46	+++	+	++	-	-	-	-	-
PSM31	2.08 ± 0.18	+++	-	-	+	-	-	+	-
PSM32	-	++	+	+++	-	+	+	-	+
PSM33	3.95 ± 0.15	+	-	-	+	-	-	-	-
PSM34	-	++	-	+++	++	+	+	+	+
阳性菌株数 Number of positive strains	28	28	9	9	14	6	8	10	7

+: 水解圈大小或抗菌强度. +: 0-5 mm; ++: 5-10 mm; +++; > 10 mm; -: 无效果。

+: Hydrolysis ring size or antibacterial intensity; +: 0-5 mm; ++: 5-10 mm; +++; > 10 mm; -: negative.

表4 玉米植株的生物量及常规根系指标
Table 4 The biomass and conventional root indexes of maize

菌名 Strain	株高 Plant height (h/cm)	植株生物量 Weight of plant (m/g)		常规根系指标 Conventional root index				
		地上 Aboveground	地下 Underground	总根长 Length (l/cm)	总根表面积 Suf. area (A/cm ²)	平均根系直径 Avg. diameter (d/mm)	根尖数 Tips	分支数 Forks
CK	31.03 ± 1.55d	10.54 ± 0.15d	4.02 ± 0.23d	1669.37 ± 13.41e	278.72 ± 1.25e	0.517 ± 0.022e	2778 ± 43e	8227 ± 133e
PSM01	36.86 ± 1.03c	17.35 ± 0.48c	9.89 ± 0.05c	1995.41 ± 0.62d	431.10 ± 5.89d	0.683 ± 0.003c	3548 ± 28c	9485 ± 109d
PSM12	40.07 ± 0.98b	23.28 ± 0.28a	10.99 ± 0.21b	2560.62 ± 4.54b	537.72 ± 0.80b	0.734 ± 0.010b	4374 ± 28b	14371 ± 71c
PSM16	39.94 ± 1.19b	20.38 ± 0.29b	10.13 ± 0.42c	2267.71 ± 36.97c	522.19 ± 2.01c	0.816 ± 0.007a	3027 ± 74d	13218 ± 238b
复合 Consortia	42.49 ± 0.99a	23.35 ± 0.22a	11.68 ± 0.32a	3219.69 ± 27.33a	609.04 ± 0.04a	0.600 ± 0.014d	5872 ± 132a	16436 ± 557a

P < 0.05 (LSD).

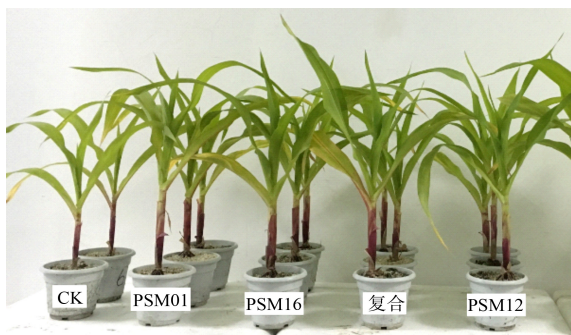


图2 菌株对玉米的促生效果。
Fig. 2 The growth promoting effect of strains on maize growth.

土壤的有效磷含量明显增多,说明所添加的单一菌株及复合菌系均可溶解土壤中的难溶性磷,促进植株对有效磷的吸收利用,且复合菌系表现出更好的溶磷能力。

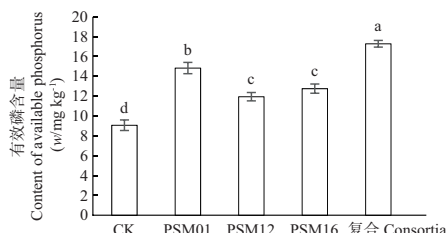


图3 根际土壤有效磷含量。
Fig. 3 The content of available phosphorus in rhizosphere soil.

2.5 菌株系统发育分析

用于盆栽试验的3株菌经16S rRNA基因测序分析后基于16S rRNA基因序列构建N-J系统发育树(图4)。菌株PSM01、PSM12、PSM16与对应相似性最高的菌株同源率为99%-100%,分别属于*Bacillus aryabhattai*、*Paenibacillus silvae*、*Pseudomonas moorei*。

3 讨论与结论

磷是植物生长发育必需的营养元素之一,无论在酸性还是碱性土壤中都有一部分难溶性磷不能被植物吸收利用,而溶磷微生物能增加磷的利用率。本研究从玉米根际土中筛选获得的菌株对无机磷的溶磷量最高可达273.44 mg/L,高于吕睿等(66.47 mg/L)^[26]、白文娟等(108.31 mg/L)^[27]分离的无机磷溶解菌的最高溶磷量,但低于马文文等(582.46 mg/L)^[28]分离的无机磷溶解菌的最高溶磷量,这可能与菌株

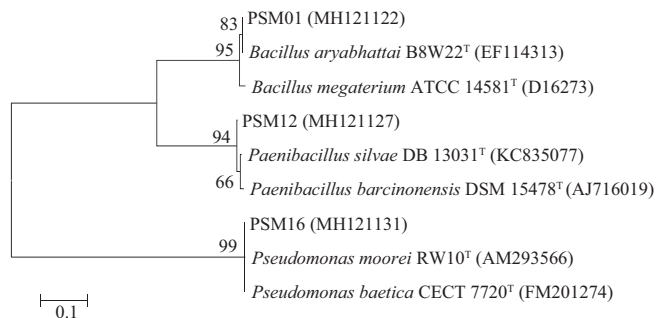


图4 无机磷溶解菌16S rRNA基因序列的系统发育N-J树。
Fig. 4 Phylogenetic N-J tree based on 16S rRNA gene sequences of inorganic phosphate-solubilizing bacteria.

的分离来源有关。土壤微生物在生命过程中会受到其所处的生存条件,如温度、湿度、酸碱度等的影响,而根际微生物除了受土壤本身类型的影响外,还会受到植物根系的形态、根系分泌物的种类和产量的影响^[29-30]。因此,不同生境下的微生物的类群及功能是与其所生存的环境相适应的,本研究所分离得到的无机磷溶解菌仍表现出较高的溶磷能力,这为四川地区溶磷菌剂的开发提供了良好的菌株资源。许多研究表明,溶磷菌的溶磷机理之一是菌体生长过程中分泌有机酸,这些酸既能降低pH值,又能与铁、铝、钙等离子螯合,使难溶性磷转化为有效磷^[31-32],提高土壤中的有效磷含量。本研究筛选出的具有无机磷溶解作用的菌株在培养4天后pH值明显下降,溶磷菌的溶磷能力与溶液pH呈极显著的负相关($R = -0.775$, $P < 0.01$),表明本研究所获得的溶磷菌主要通过产酸降低培养液的pH以促进无机磷的溶解,提高有效磷含量,在溶磷过程中发挥着重要的作用,但供试菌株所分泌的酸的种类有待进一步研究。

有研究表明,溶磷微生物不仅可将植物不能吸收利用的固定态磷转化为可吸收的游离态磷,供植物吸收利用,还可通过分泌生长素(IAA)、赤霉素(GA)等植物激素、产铁载体、固氮作用等直接促进植物生长发育,或产生相关细胞壁降解酶提高植物自身对致病菌的防卫能力^[33-34]间接促进植物生长。梅新兰等将具有溶磷和促生作用的菌株单独及复合接种后,能显著促进玉米的生长^[35];Karlidag等采用*Bacillus* M3、*Bacillus* OSU-142和*Microbacterium* FS01菌株单独及复合接种苹果,5年后苹果的产量、水果重量、枝条长度及直径均有显著增加,且复合菌系的效果都显著高于单一菌株^[36];Pereira所研究的3株溶磷菌在不施加磷肥的时候可显著提高土壤有效磷含量,促进玉米的生长,增加玉米的根长、株高及生物产量^[37]。本研究也得出相同的结果,试验中所筛选

的溶磷、促生及抗病综合能力较好的菌株的盆栽结果表明,供试菌株在土壤有效磷含量缺乏的情况下能促进玉米的生长,并提高土壤中有效磷的含量,其中复合菌系效果最好。分析其原因,一方面可能是不同菌株的溶磷机制不同,在土壤中的定殖能力及溶磷能力不同,将多种菌株复合后,既增加有效菌在土壤中生存的几率,又能通过菌株间的协同作用增加对土壤难溶磷的溶解作用,促进植物对有效磷的吸收利用;另一方面可能是促生菌对植物的促生效应仅仅靠单一的促生途径是无法实现的,通常是通过多种途径协同作用促进植物生长^[38],将具有不同促生功能的菌株复合接种后,能协同作用,提高其对植物生长的促进能力。因此,利用复合菌系在提高土壤有效磷含量、促进植物生长方面具有更广阔的应用前景。

本研究最终筛选用于盆栽实验的优良菌株分别归属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)。其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)是目前报道的土壤中溶磷效果较强的菌种之一^[39],不仅能改善土壤中磷、钾等元素的形态,使之成为有效态而被植物利用,还能产生多种抗生素、植物激素或植酸酶等物质,直接促进植物生长或抑制根区病原微生物的生长间接促进植物生长,对植物生长区域的微生态调节和农作物的生长及病害防治具有重要意义^[40, 41],类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)是目前报道的具有良好固氮、抗病和促进植物生长能力的菌种之一^[42, 43],本研究所获得的类芽孢杆菌也表现出较好的抗病、促生能力,同时具有无机磷溶解能力,这为开发多功能的微生物制剂提供了良好的菌种资源。

本研究从玉米根际土中共获得34株具有无机磷溶解能力的菌株,菌株的溶磷能力与溶液pH呈极显著的负相关性($R^2 = 0.6004$, $N = 34$, $P < 0.01$),初步判定菌株主要通过产酸来溶解土壤中的难溶性无机磷,具体机制有待进一步研究;溶磷、促生及抗病综合能力较好的菌株PSM01、PSM12、PSM16及复合菌系(PSM01 + PSM12 + PSM16)在提高土壤有效磷含量和促进玉米植株生长方面效果显著,可为通过微生物途径改善磷素供应,促进作物生长提供理论依据和优良的菌株资源。

参考文献 [References]

- 胡山,牛世全,龙洋,李渭娟,赵丹,豆建涛.河西走廊盐碱土壤中一株高效溶磷菌的鉴定及条件优化[J].微生物学通报,2017,44(2):358-365 [Hu S, Niu SQ, Long Y, Li WJ, Zhao D, Dou JT. Identification of an efficient phosphorus solubilizing bacteria from saline-alkali soil in the Hexi Corridor and optimization of its condition [J]. *Microbiology*, 2017, 44(2): 358-365]
- 银婷婷,王敬敬,柳影,梁亚杰,王兴彪,韩一凡,王夏,程美娟,黄志勇.高效解磷菌的筛选及其促生机制的初步研究[J].生物技术通报,2015,31(12):234-242 [Yin TT, Wang JJ, Liu Y, Liang YJ, Wang XB, Han YF, Wang X, Cheng MJ, Huang ZY. The screening of efficient phosphorus-solubilizing bacteria and the primary study on its mechanism of plant-growth-promoting [J]. *Biot Bull*, 2015, 31(12): 234-242]
- 朱斌.玉米根际高效溶磷菌株的分离鉴定、室内溶磷条件和溶磷效果研究[D].重庆:西南大学,2012 [Zhu B. The study of high dissolved phosphorus isolation identification, conditions of indoor dissolved phosphorus and dissolved [D]. Chongqing: Southwest University, 2012]
- Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum* [J]. *Soil Biol Biochem*, 1999, 31(5): 655-665
- Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization [J]. *Soil Biol Biochem*, 2010, 42(5): 669-678
- Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere [J]. *J Expl Bot*, 2001, 52 (Spec Issue): 487-511
- 马海林,邢尚军,刘方春,陈波,丁延芹,姚良同,杜秉海.冬枣(*Ziziphus jujube* Mill.)根际3株促生细菌的筛选与鉴定[J].应用与环境生物学报,2013,19(4):100-104 [Ma HL, Xing SJ, L, Chen B, Ding YQ, Yao LT, Du BH. Screening and identification of three plant growth-promoting rhizobacteria from winter jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) rhizosphere [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2013, 19(4): 100-104]
- 余悦.黄河三角洲原生演替中土壤微生物多样性及其与土壤理化性质关系[D].济南:山东大学,2012 [Yu R. Relationship between soil microbial diversity and soil physicochemical properties along the primary succession of Yellow River Delta [D]. Ji'nan: Shandong University, 2012]
- 王荣民,杨艳,管业坤,张国生,刘继明,林春斌.土著菌种的采集培养及菌种分析[J].江西畜牧兽医杂志,2013,(6):11-14 [Wang RM, Yang Y, Guan YK, Zhang GS, Liu JM, Lin CB. Collection, culture and strain analysis of indigenous bacteria [J]. *Jiangxi J Anim Husb Vet Med*, 2013, (6): 11-14]
- Belimov AA, Kojemiakov AP, Chuvarliyeva CV. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria [J]. *Plant Soil*, 1995, 173(1): 29-37
- 乔志伟,洪坚平,刘超.最佳组合溶磷细菌的筛选及培养条件的优化[J].中国土壤与肥料,2017,(5):141-146 [Qiao ZW, Hong JP, Liu C. Screening the best combination of phosphobacteria and optimization of its culture conditions[J]. *Soils Fert Sci China*, 2017(5): 141-146]
- Clegg S, Gobran G.R. Rhizospheric P and K in forest soil manipulated with ammonium sulfate and water [J]. *Can J Soil Sci*, 1997, 77(4): 525-533
- 李静,张瀚能,赵翀,张金羽,张琪,张靖莹,刘茂柯,陈强,赵珂.高效纤维素降解菌分离筛选、复合菌系构建及秸秆降解效果分析[J].应用与环境生物学报,2016,22(4):689-696 [Li J, Zhang HN, Zhao C, Zhang JY, Zhang Q, Zhang JY, Liu MK, Chen Q, Zhao K. Isolation and screening of cellulose decomposing microbe and the straw decomposing effect of complex microbial system [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2016, 22(4): 689-696]
- Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of Indoleacetic acid [J]. *Plant Physiol*, 1951, 26(1): 192
- Shin SH, Lim Y, Lee SE, Yang NW, Rhee JH. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids [J]. *J Microbiol Meth*, 2001, 44(1): 89
- Ribeiro CM, Cardoso EJ. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*) [J]. *Microbiol Res*, 2012, 167(2): 69-78
- 肖湘,周樱,王凤平.高效几丁质降解菌CB101的分离、鉴定及其几丁质酶的研究[J].海洋学报,2003,25(1):138-142 [Xiao X, Zhou Y, Wang FP. Isolation and identification of a high-efficient chitin-degrading marine bacterium CB101 and studies on its chitinases system [J]. *Acta Ocean Sin*, 2003, 25(1): 138-142]
- 王浩,姜妍,刘伟,李远明,于佳,王绍东.大豆根际高效溶磷菌株的

- 分离及溶磷能力分析[J]. 大豆科学, 2014, **33** (3): 404-407 [Wang H, Jiang Y, Liu W, Li YM, Yu J, Wang SD. Isolation and analysis on ability of phosphate dissolving bacteria in rhizosphere of soybean [J]. *Soyb Sci*, 2014, **33** (3): 404-407]
- 19 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000 [Bao SD. Soil and agricultural chemistry analysis [J]. Beijing: China Agriculture Publishing House, 2000]
 - 20 杨林丽. 纤维素降解菌筛选及混合菌种纤维素降解能力测定[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2013 [Yang LL. Screening of cellulose-decomposing bacteria and measuring activity of cmcase of the mixed bacteria [D]. Xi'an: Northwest A&F University, 2013]
 - 21 邓振山, 党军龙, 张海州, 李军, 韦革宏. 植物根际促生菌的筛选及其对玉米的促生效应[J]. 微生物学通报, 2012, **39** (7): 980-988 [Deng ZS, Dang JL, Zhang HZ, Li J, Wei GH. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria and their promoting effects on maize [J]. *Microbiology*, 2012, **39** (7): 980-988]
 - 22 孙三杰, 李建明, 宗建伟, 姚勇哲, 陈凯利. 亚低温与干旱胁迫对番茄幼苗根系形态及叶片结构的影响[J]. 应用生态学报, 2012, **23** (11): 3027-3032 [Sun SJ, Li JM, Zong JW, Yao YZ, Chen KL. Effects of sub-low temperature and drought stress on root morphology and leaf structure of tomato seedlings [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2012, **23** (11): 3027-3032]
 - 23 刘世全, 曹红霞, 张建青, 胡笑涛. 不同水氮供应对小南瓜根系生长、产量和水氮利用效率的影响[J]. 中国农业科学, 2014, **47** (7): 1362-1371 [Liu SQ, Cao HX, Zhang JQ, Hu XT. Effects of different water and nitrogen supplies on root growth, yield and water and nitrogen use efficiency of small pumpkin [J]. *Sci Agric Sin*, 2014, **47** (7): 1362-1371]
 - 24 陈强, 陈文新, 张小平, 李登煜, Lindstrom K. 四川省部分豆科植物根瘤菌的遗传多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2008, **14** (1): 83-89 [Chen Q, Chen WX, Zhang XP, Li DY, Lindstrom K. Genetic diversity of rhizobia isolated from some legumes in Sichuan, China [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, **14** (1): 83-89]
 - 25 Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, **33** (7): 1870
 - 26 吕睿, 贾凤安, 刘晨, 胡婷, 甄丽莎. 无机磷降解菌株的分离、鉴定及解磷能力[J]. 江苏农业科学, 2017, **45** (20): 295-298 [Lü R, Jia FA, Liu C, Hu T, Zhen LS. Isolation, identification and phosphorus-solubilizing abilities of inorganic phosphorus-solubilizing strains [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2017, **45** (20): 295-298]
 - 27 白文娟, 胡蓉蓉, 章家恩, 冯丽芳, 徐华勤. 玉米根际溶磷细菌的分离、筛选及溶磷能力研究[J]. 华南农业大学学报, 2013, **34** (2): 167-176 [Bai WJ, Hu RR, Zhang JE, Feng LF, Xu HQ. A Study on the isolation, screening and phosphate solubilizing capacity of phosphate solubilizing bacteria in the rhizosphere of corn [J]. *J S Chin Agric Univ*, 2013, **34** (2): 167-176]
 - 28 马文文, 姚拓, 蒲小鹏, 卢虎, 张玉霞, 王国基. 东祁连山7种禾草根际溶磷菌筛选及其溶磷特性[J]. 草业科学, 2015, **32** (4): 515-523 [Ma WW, Yao T, Pu XP, Lu H, Zhang YX, Wang GJ. Screening and characteristics of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of 7 grasses on eastern Qilian Mountains [J]. *Prat Sci*, 2015, **32** (4): 515-523]
 - 29 Martinez-Toledo MV, Rubia TDL, Moreno J, Gonzalez-Lopez J. Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*[J]. *Plant Soil*, 1988, **110** (1): 149-152
 - 30 张蕾, 徐慧敏, 朱宝利. 根际微生物与植物再植病的发生发展关系[J]. 微生物学报, 2016, **56** (8): 1234-1241 [Zhang L, Xu HM, Zhu BL. Association of rhizosphere soil microbiome with the occurrence and development of replant disease-a review [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2016, **56** (8): 1234-1241]
 - 31 Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol Biochem*[J]. *Soil Biol Biochem*, 2013, **31**(5): 655-665
 - 32 舒健虹, 王普昶, 李显刚, 王小利, 李小冬. 无机磷溶解菌的分离筛选及其对扁穗雀麦生长的影响[J]. 草业学报, 2017, **26** (5): 173-180 [Shu JH, Wang PC, Li XG, Wang XL, Li XD. Isolation and screening of inorganic phosphate-solubilizing bacteria and their effect on the growth of *Bromus cartharticus* [J]. *Acta Pratacut Sin*, 2017, **26** (5): 173-180]
 - 33 Panhwar QA, Radziah O, Rahman AZ, Sariah M, Razi IM, and Naher UA. Contribution of phosphate-solubilizing bacteria in phosphorus bioavailability and growth enhancement of aerobic rice [J]. *Span J Agr Res*, 2011, **9** (3): 810-820
 - 34 田婧, 李邵, 马宁, 连青龙, 鲁少尉, 鲍顺淑. 植物根际促生菌作用机理研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, **44** (10): 1-2 [Tian J, Li S, Ma N, Lian QL, Lu SW, Bao SS. Research progress of the action mechanism of plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2016, **44** (10): 1-2]
 - 35 梅新兰, 闪安琪, 蒋益, 韦中, 王誉瑶, 王世梅, 沈其荣, 徐阳春, 刘建. 适应玉米的溶磷细菌筛选及其对玉米生长的影响[J]. 土壤学报, 2016, **53** (2): 502-509 [Mei XL, Shan AQ, Jiang Y, Wei Z, Wang YY, Wang SM, Shen QR, Xu YC, Liu J. Screening of Phosphate-solubilizing bacteria adaptable to corn and effects of the bacteria on the growth of corn [J]. *Acta Pedol Sin*, 2016, **53** (2): 502-509]
 - 36 Karlidag H, Esitken A, Turan M, Sahin F. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple [J]. *Sci Horticult*, 2007, **114** (1): 16-20
 - 37 Pereira SIA, Castro PML. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils [J]. *Ecol Eng*, 2014, **73**: 526-535
 - 38 荣良燕, 柴强, 姚拓, 张榕, 冯今, 杨浩, 曹蕾, 朱倩. 复合微生物接种剂替代部分化肥对豌豆间作玉米的促生效应[J]. 草业学报, 2015, **24** (2): 22-30 [Rong LY, Chai Q, Yao T, Zhang R, Ma J, Yang H, Cao L, Zhu Q. Partial replacement of chemical fertilizer by compound microbial inoculant and potential for promoting growth of intercropped *Zea mays* and *Pisum sativum* [J]. *Acta Pratacut Sin*, 2015, **24** (2): 22-30]
 - 39 Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization [J]. *Biol Fertil Soils*, 2011, **47** (4): 437-446
 - 40 陈志谊, 刘永峰, 刘卮洲, 张荣胜. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J]. 江苏农业学报, 2012, **28** (5): 999-1006 [Chen ZY, Liu YF, Liu YZ, Zhang RS. Research progress in biocontrol of *Bacillus* spp. against plant diseases [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2012, **28** (5): 999-1006]
 - 41 Sreevidya M, Gopalakrishnan S, Kudapa H, Varshney RK. Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea [J]. *Braz J Microbiol*, 2016, **47** (1): 85-95
 - 42 石皓文, 李永斌, 李朋飞, 王志敏, 陈三凤. 田间接种固氮类芽孢杆菌对小麦的增产效应[J]. 中国农业大学学报, 2016, **21** (6): 52-55 [Shi HW, Li YB, Li PF, Wang ZM, Chen SF. Effect of nitrogen-fixing *Paenibacillus* spp. on wheat yield[J]. *J China Agric Univ*, 2016, **21** (6): 52-55]
 - 43 陈倩. 根际细菌的固氮、抗病与促生潜能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011 [Chen Q. Study on nitrogen fixation, disease, resistance and plant growth promotion of bacteria from rhizosphere [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011]