

曹媛媛, 陈 春, 郭婷婷, 等. 亲和性促生菌 DW12-L 的定殖及其对大豆生长的影响[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(4): 776-783.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.04.004

亲和性促生菌 DW12-L 的定殖及其对大豆生长的影响

曹媛媛¹, 陈 春¹, 郭婷婷¹, 钱 叶¹, 张程飞¹, 何相怡¹, 李 婷¹, Lay Khien Duc¹, 唐欣昀¹, 邵文韬², 王晓波², 邱丽娟³

(1.安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036; 2.安徽农业大学农学院, 安徽 合肥 230036; 3.中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程中心, 北京 100081)

摘要: 为了研究大豆亲和性根际促生菌(PGPR)菌株在大豆根际的定殖及其对大豆生长发育的影响, 采用电转化法将 *luxAB* 基因转入对大豆凝集素(SBA)具有亲和性的 PGPR 菌株 DW12 中。将标记菌株 DW12-L 接种于大豆品种中黄 606 根际, 以 SBA 非亲和的 PGPR 菌株 P34-L 作对照, 考察 DW12-L 在大豆根际定殖的时空特征, 检测菌株的定殖对大豆生长以及根系发育的影响。结果表明, DW12-L 可长期定居于大豆根际, 并随根系的生长在新的根段根际吸附定殖, 而 P34-L 在大豆根际不能稳定存活; DW12-L 显著促进大豆地上部和地下部生物量的积累以及根系的发育, P34-L 在大豆生长 30 d 时由于不能定殖于根际而无显著促生效果。与大豆凝集素具有亲和性的 PGPR 菌株 DW12-L 可定殖于大豆根际并促进大豆生长, 定殖能力的强弱是决定菌株能否发挥促生功能的关键。

关键词: 大豆; 植物根际促生菌; 凝集素; 定殖; 促生长; 根系发育

中图分类号: S565.101 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)04-0776-08

Colonization of soybean affinity rhizobacteria strain DW12-L and its effects on soybean growth

CAO Yuan-yuan¹, CHEN Chun¹, GUO Ting-ting¹, QIAN Ye¹, ZHANG Cheng-fei¹, HE Xiang-yi¹, LI Ting¹, LAY Khien-duc¹, TANG Xin-yun¹, SHAO Wen-tao², WANG Xiao-bo², QIU Li-juan³

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. School of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 3. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to study the colonization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in soybean rhizosphere and its effects on soybean growth and development, *luxAB* gene was transferred into a PGPR strain DW12 with specific affinity to soybean agglutinin (SBA) affinity by electrotransformation. The labeled strain DW12-L was inoculated in soybean (*Glycine max* Zhonghuang 606) rhizosphere. Using a PGPR strain P34-L without affinity to SBA as control, the spatial and temporal characteristics of colonization of DW12-L in soybean rhizosphere were studied, and the effects of colonization on

soybean (*Glycine max* Zhonghuang 606) growth and root development were detected. The results showed that DW12-L could survive in soybean rhizosphere for a long time and grow in the new space with extension of soybean root, while P34-L couldn't survive stably in soybean rhizosphere. The strain DW12-L significantly promoted the accumulation of aboveground and underground biomass and root development in soybean (*Glycine max* Zhonghuang 606), while strain P34-L had no significant effect on the growth of soybean because it could not colonize the rhizo-

收稿日期: 2019-03-28

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0100201); 国家自然科学基金项目(41401269, 31771819); 安徽省教育厅高校自然科学基金项目(KJ2019A0183); 安徽省大学生创新创业训练计划项目(201710364106)

作者简介: 曹媛媛(1980-), 女, 安徽合肥人, 博士, 副教授, 主要从事微生物与植物互作研究。(E-mail) yy721@hotmail.com; 陈春为共同第一作者

通讯作者: 王晓波, (E-mail) wxbphd@163.com; 邱丽娟, (E-mail) qiliujuan@caas.cn

sphere after soybean grew for 30 days. The PGPR strain DW12-L, which has affinity to SBA, can colonize soybean rhizosphere and promote soybean growth, and the colonization ability is an important basis for determining whether a strain can promote the soybean growth.

Key words: soybean; plant growth promoting rhizobacteria; lectin; colonization; growth promotion; root development

植物-根际微生物-土壤-环境协同作用形成稳定的根际生态系统^[1-4],其中植物与其根际微生物在生长、营养、代谢等诸方面相互作用、相互影响。植物的根系分泌物影响根际微生物的生态分布与菌群组成,同时根际微生物又刺激并调控宿主植物的生长和发育^[2,5-11]。化肥的施用使作物稳定增产,然而过量施用化肥会导致肥料利用率低、资源浪费,并造成环境污染^[12],研发并应用微生物肥料成为改变传统施肥模式的重要措施之一。

植物根际促生菌(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)是生存于植物根际,能促进植物生长和营养吸收,防治植物病害的一类有益微生物^[13],可制成微生物肥料,降低化肥使用量,减轻环境污染^[14]。PGPR 具有良好的促生能力,但其发挥功效的前提是能稳定吸附并长期定殖于植物根际。具备根际定殖能力是 PGPR 菌株可被应用的前提和基础^[15]。微生物在植物根部的定殖涉及二者间相互识别过程,相互识别的先导物质是植物分泌的凝集素^[16-18]和细菌的胞外多糖等成分^[19-22]。凝集素可作为媒介将细菌定位于植物根部,再启动后续系列反应,介导细菌成功定殖^[16-18,22]。研究 PGPR 在根际的存活和定殖需要有能在含有大量土著性微生物的土壤环境中易于追踪目标菌株的方法。*luxAB* 基因标记技术已被应用于复杂土壤环境中目标微生物的研究。Flemming 等^[23]用 *luxAB* 标记铜绿假单胞菌 UG2L,研究其在有油污染和无油污染两种土壤中的存活情况。Zhu 等^[24]采用 *luxAB* 基因标记台湾嗜铜菌 X1 菌株,追踪菌株在不同类型土壤中的存活情况,测定菌株降解土壤中残留农药毒死蜱的能力。Tang 等^[25]将 *luxAB* 基因导入荧光假单胞菌 X16 细胞中,检测 X1 菌株在土壤中的存活情况。

关于 PGPR 促生作用的研究大多集中于其对植物干物质的积累,尚需详细研究 PGPR 在植物根部的定殖与根系发育的关系。大豆是世界上最主要的油料作物,在中国广泛种植^[26]。已有关于大豆与其促生菌的研究多集中于其和根瘤菌的共生关系中,而对

大豆根际内广泛存在的大量非共生关系的有益微生物研究十分有限。本研究选用本实验室(安徽农业大学生命科学学院微生物学实验室)前期从大豆根际筛选的与大豆凝集素(Soybean agglutinin, SBA)具有亲和性的 PGPR 菌株为材料,用发光酶 *luxAB* 基因标记菌株,并以 SBA 非亲和的 PGPR 菌株为对照,研究亲和性菌株在大豆根际的定殖能力及其对大豆生长和根系发育的影响,探索大豆凝集素在 PGPR 与大豆的识别及介导菌株在大豆根际成功定殖过程中的作用,为 PGPR 与植物的互作关系研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) WA803 (pTR102: *luxAB*, *kan*, *tet*) 菌株,由南京农业大学生命科学学院提供。肠杆菌(*Enterobacter* sp.) DW12 菌株,为本实验室采用解磷培养基从大豆品种中黄 606 根际分离获得的 PGPR 菌株,该菌株可与大豆凝集素结合,与大豆凝集素具有亲和性。对照菌株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) P34-L 菌株,为在本实验室前期分离筛选获得的 PGPR 菌株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) P34 中导入质粒 pTR102: *luxAB*-*kan*-*tet* 构建获得的标记菌株,该菌株可与小麦凝集素结合,与小麦凝集素具有亲和性,可定殖于小麦根际,促进其生长^[27],但与大豆凝集素无亲和性。大豆(*Glycine max*)品种中黄 606 是由中国农科院作物科学研究所选育的高蛋白大豆品种。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌和感受态细胞的培养 采用 LB 培养基^[28]培养细菌,采用 SOC^[29]液体培养基培养复苏的感受态细胞。

1.2.2 DW12 菌株的 *luxAB* 基因标记 采用质粒提取试剂盒提取大肠杆菌 WA803 质粒。将 DW12 菌株于 28 ℃、160 r/min 培养 13~16 h 至 OD_{600} 为 0.6,4 ℃、6 000 r/min 离心 10 min,去上清液,加入冰浴的超纯水,离心洗涤 2 次,再用冰浴的 10%甘油洗涤 1 次,离

心收集菌体,加入 2 ml 10%甘油制备 DW12 感受态细胞。采用电转化方法^[28,30]将质粒 pTR102:*luxAB-kan-tet* 转入 DW12 菌株中,将含有转化子的菌液涂布于含有卡那霉素(kan)和四环素(tet)的 LB 固体培养基平板上,待培养长出菌落后在培养皿盖内部滴加 10% 癸醛,筛选发光菌落即为转化子。将转化子进行 16SrRNA 测序比对,并采用提取质粒和多次转接^[27]的方法,测定转化子遗传稳定性。

1.2.3 标记菌株与出发菌株的促生特性比较 分别测定出发菌株 DW12 与标记菌株 DW12-L 的溶磷能力和产 IAA 能力 2 项促生长特性指标,判断外源质粒 pTR102 的导入对菌株促生长能力是否产生影响。其中菌株溶磷能力采用钼蓝比色法^[31]测定,产 IAA 能力采用 Salkowski 比色法^[32]测定。

1.2.4 标记菌株定殖与根系发育指标测定 采用韦兵等的根袋设计^[33]测定标记菌株的定殖与根系发育情况。收纳盒规格:长×宽×高=52 cm×40 cm×31 cm。大豆催芽:将大豆种子置于无菌水中浸泡 1 h 后转移至铺有 4 层湿润纱布的平皿中,在大豆种子上再铺上湿润的 4 层纱布,置于 28 ℃ 培养箱中,每天适当补水保湿,48 h 后挑选根长 2~3 mm 的发芽大豆种子备用。接种:分别将 P34-L 和 DW12-L 菌株接种于装有 LB 液态培养基的三角瓶中,于 28 ℃、160 r/min 振荡培养约 24 h 至 $OD_{680}=0.8$,将发芽的大豆种子浸泡于菌液中,浸种 30 min 后播种于装有 250 g 黄褐土的根袋内。每个根袋内种 1 颗大豆种子,并于播种时在大豆种子附近土壤施加 1 ml 相应菌液。另取催芽后浸泡于无菌 LB 液体培养基中 30 min 的大豆种子,于播种时在大豆种子附近土壤施加 1 ml LB 液体培养基,作为对照。每个处理 3 个重复。大豆栽培及取样:将根袋插入装满黄褐土的收纳盒中,每个收纳盒装 6 个根袋。白天 28 ℃ (16 h)、夜晚 22 ℃ (8 h) 阳光温室中培养,光照度 1 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,分别于培养 10 d、15 d、20 d、25 d、30 d、35 d 时取样分析。取样时,轻轻抖落根系上附着的大块土粒,将根系自上而下每隔 2 cm 切成等距离的根段,各根段分别置于装有无菌水的三角瓶中^[27],28 ℃、160 r/min 摇床振荡 1 h 后再旋转振荡 2 min。将样品适当稀释并涂于含有 kan 和 tet 的 LB 固体培养基平板上,28 ℃ 培养 2~3 d,待长出菌落后在平皿盖内部滴加 10% 癸醛,于黑暗处计数发光菌落数,计算各根段根际存活的标记菌株数量。

同时,采用根系扫描仪扫描各处理大豆根系,检测根系总长度、根系总表面积、根系总投影面积、根尖数、分叉数和交叉数 6 项根系发育指标,并测定大豆根系鲜、干质量和茎叶鲜、干质量 4 项大豆生长指标。

1.3 数据处理

采用 SPSS17.0 软件统计分析数据,采用 Excel 2007 软件制作图表。

2 结果与分析

2.1 PGPR 标记菌株 DW12-L 的遗传稳定性

在培养皿盖内部滴加 10% 癸醛后, DW12-L 菌落在黑暗处发荧光,说明外源质粒 pTR102 已成功导入。将 DW12-L 分别涂布于加有 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kan 和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tet 的 LB 固体培养基平板和不加抗生素的 LB 固体培养基平板上连续传代培养,发现 10 代后平板上菌落发光率仍达 100%,说明质粒 pTR102 在 DW12-L 中能稳定遗传(图 1)。

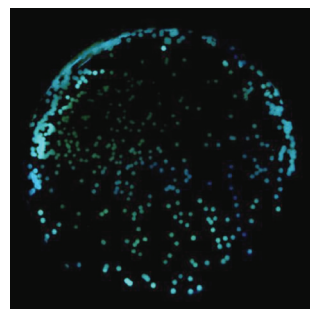


图 1 PGPR 标记菌株 DW12-L 荧光菌落

Fig.1 Fluorescence emitted by the labeled plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strain DW12-L colonies

2.2 PGPR 标记菌株与出发菌株促生长特性比较

溶磷能力和产 IAA 能力是检测 PGPR 促生长特性的重要指标。由表 1 可见,标记菌株 DW12-L 在这 2 项促生长特性上和出发菌株 DW12 无显著差异,表明外源质粒的导入对菌株的促生长特性未产生影响,标记菌株 DW12-L 可用于追踪菌株的定殖动态及研究其对大豆生长的影响。

表 1 PGPR 出发菌株与标记菌株的促生长特性

Table 1 Growth characteristics of original strains and labeled strains of PGPR

菌株	溶磷能力($\mu\text{g}/\text{ml}$)	产 IAA 能力($\mu\text{g}/\text{ml}$)
DW12	158.81±6.54	42.75±3.63
DW12-L	159.03±7.09	42.81±2.85

2.3 P34-L 菌株和 DW12-L 菌株在大豆根际的定殖动态和分布规律

从表 2 可见,对照假单胞菌 P34-L 菌株和 DW12-L 菌株在大豆根际定殖水平存在差异。刚接种时,大豆的根长仅 2~3 mm,此时标记菌株只存在于 2~3 mm 根段根际;生长 10 d 时,大豆根长已超过 8 cm,P34-L 与 DW12-L 随着大豆根系的生长和延伸繁殖至新根段根际,并在各根段根际均具有较高密度;大豆生长 15 d 时,两菌株在不同根段根际也均有分布,但与大豆凝集素亲和的菌株 DW12-L 具有较高的菌群密度,其在大豆各根段根际分布数量约为大豆凝集素非亲和性菌株 P34-L 的 10 倍;大豆生长 20 d 时,两菌株在各根段根际分布数量差异更显著,DW12-L 数量为 P34-L 的 11~290 倍;大豆生长 25 d 时,P34-L 在 0~2 cm 根段根际已无分布;大豆生长 30 d 以后,P34-L 在各根段根际均无分布,而 DW12-L 在大豆生长 35 d 后在各根段根际依然

保持较高的定殖水平,0~2.0 cm、2.1~4.0 cm、4.1~6.0 cm、6.1~8.0 cm 和 >8.0 cm 5 个根段根际处的定殖密度分别达 2.4×10^5 CFU/g、 9.3×10^4 CFU/g、 1.3×10^5 CFU/g、 1.9×10^5 CFU/g 和 1.5×10^5 CFU/g。比较 DW12-L 在大豆生长不同时期各根段根际的存活情况,发现大豆生长 15 d 时 DW12-L 在 >4.0 cm 根段根际处的分布数量上升,大豆生长 20 d 时在各根段根际分布数量均有所上升,说明该菌株可利用大豆根际提供的养分和环境进行生长繁殖;大豆生长 25 d 后,DW12-L 在各根段根际处的定殖密度均有所降低,这可能是由于土壤中其他土著微生物与标记菌株竞争营养与有利位点,消耗了土壤中的养分。同时,土壤温度、土壤含水量等因素也是影响菌株定殖密度减少的原因。上述研究结果说明与大豆凝集素具有亲和性的 PGPR 菌株 DW12-L 在大豆根际可以长期稳定的存活,且随大豆根的生长在新的根段根际附着、繁殖。

表 2 P34-L 和 DW12-L 菌株在大豆品种中黄 606 不同根段根际的定殖数量

Table 2 Colonization number of strains P34-L and DW12-L on different root segments of soybean (*Glycine max* Zhonghuang 606)

时间 (d)	菌株	定殖数量(CFU/g)				
		0~2.0 cm	2.1~4.0 cm	4.1~6.0 cm	6.1~8.0 cm	>8.0 cm
10	P34-L	$2.1 \times 10^4 \pm 3.2 \times 10^3$	$2.7 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^3$	$2.4 \times 10^4 \pm 2.6 \times 10^3$	$2.9 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^3$	$3.1 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^3$
	DW12-L	$7.3 \times 10^5 \pm 5.5 \times 10^4$	$3.9 \times 10^5 \pm 3.1 \times 10^4$	$3.8 \times 10^4 \pm 2.3 \times 10^3$	$4.1 \times 10^4 \pm 4.7 \times 10^2$	$5.2 \times 10^4 \pm 3.4 \times 10^3$
15	P34-L	$2.2 \times 10^4 \pm 1.9 \times 10^3$	$3.1 \times 10^4 \pm 2.8 \times 10^3$	$3.6 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^3$	$2.8 \times 10^4 \pm 2.3 \times 10^3$	$3.6 \times 10^4 \pm 2.5 \times 10^3$
	DW12-L	$4.8 \times 10^5 \pm 3.7 \times 10^4$	$2.4 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^4$	$2.8 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4$	$3.9 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^4$	$4.2 \times 10^5 \pm 3.0 \times 10^4$
20	P34-L	$1.0 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^3$	$1.2 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^3$	$3.5 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^3$	$1.6 \times 10^4 \pm 9.3 \times 10^2$	$3.3 \times 10^4 \pm 2.1 \times 10^3$
	DW12-L	$2.9 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^5$	$6.1 \times 10^6 \pm 3.6 \times 10^5$	$3.9 \times 10^5 \pm 1.8 \times 10^4$	$4.2 \times 10^6 \pm 3.3 \times 10^5$	$5.8 \times 10^6 \pm 2.4 \times 10^5$
25	P34-L	0	$3.0 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5 \pm 8.3 \times 10^3$	$3.0 \times 10^4 \pm 2.6 \times 10^3$	$1.2 \times 10^5 \pm 7.5 \times 10^3$
	DW12-L	$3.0 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^4$	$3.1 \times 10^5 \pm 2.1 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^4$	$2.9 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^5$	$1.9 \times 10^6 \pm 5.7 \times 10^4$
30	P34-L	0	0	0	0	0
	DW12-L	$3.0 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^4$	$3.1 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5 \pm 3.7 \times 10^3$	$1.9 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^3$
35	P34-L	0	0	0	0	0
	DW12-L	$2.4 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^4$	$9.3 \times 10^4 \pm 4.9 \times 10^3$	$1.3 \times 10^5 \pm 7.2 \times 10^3$	$1.9 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^4$

2.4 P34-L 和 DW12-L 菌株对大豆地上部和地下部生长的影响

分别于大豆生长 10 d、20 d 和 30 d 时采样测定大豆植株地上部鲜质量、地上部干质量、根系鲜质量和根系干质量 4 项生长指标,分析 P34-L 和 DW12-L 对大豆生长的影响(表 3)。由表 3 可以看出,大豆

生长 10 d 时,两菌株对大豆地上部鲜质量、根系鲜质量和根系干质量均有显著的促进作用($P < 0.05$),其中对根系干质量的促进作用达极显著水平($P < 0.01$),DW12-L 对地上部干质量的促进作用达显著水平,两菌株间对大豆生长指标的影响无显著差异;大豆生长 20 d 时,两菌株处理的大豆植株在地下部

鲜质量、地上部干质量和根系干质量上比未施菌的对照植株均有显著增加,其中两菌株对地上部鲜质量的促进作用均达极显著水平($P<0.01$),DW12-L 对根系鲜质量的促进作用达显著水平($P<0.05$)。两菌株间对大豆地上部鲜质量、地上部干质量的影响无显著差异,但 DW12-L 对大豆根系鲜质量和根系干质量的促进作用较 P34-L 显著($P<0.05$)。大

豆生长 30 d 时,DW12-L 处理的植株地上部鲜质量、根系鲜质量和根系干质量较未施菌的对照分别增加 21.6%、77.8%和 75.0%,达显著水平($P<0.05$),其中对根系鲜质量和根系干质量的促进作用达极显著水平($P<0.01$),而 P34-L 处理对 4 项指标均无显著促进作用。上述结果表明菌株 DW12-L 对大豆的生长具有优良的促生效果。

表 3 P34-L 和 DW12-L 菌株对大豆品种中黄 606 生长的影响

Table 3 Effects of strains P34-L and DW12-L on soybean (*Glycine max* Zhonghuang 606) growth

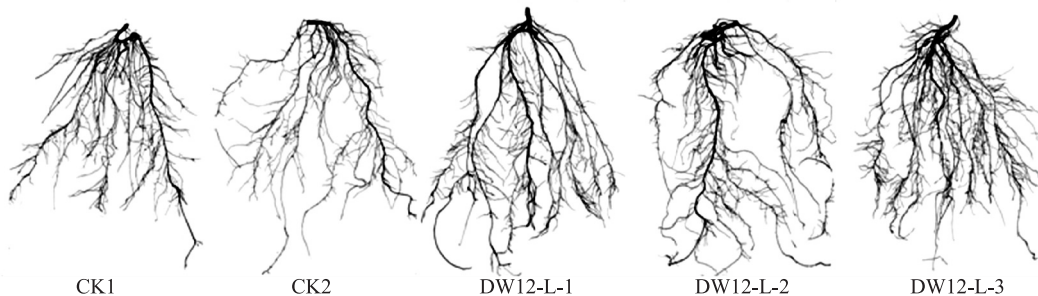
时间(d)	样品	地上部鲜质量(g)	地上部干质量(g)	根系鲜质量(g)	根系干质量(g)
10	CK	0.837±0.121b	0.133±0.006b	0.257±0.052b	0.009±0.001B
	P34-L	1.157±0.146a	0.177±0.025 ab	0.403±0.038a	0.020±0.001A
	DW12-L	1.227±0.156a	0.197±0.031a	0.397±0.078a	0.017±0.004A
20	CK	1.367±0.140B	0.170±0.010b	0.683±0.085b	0.041±0.003c
	P34-L	2.043±0.368A	0.247±0.042a	0.790±0.029b	0.048±0.002b
	DW12-L	2.210±0.392A	0.277±0.017a	0.937±0.040a	0.057±0.004a
30	CK	2.070±0.214b	0.273±0.032a	0.847±0.002B	0.052±0.002B
	P34-L	2.127±0.110b	0.283±0.021a	0.953±0.041B	0.057±0.004B
	DW12-L	2.517±0.210a	0.333±0.045a	1.506±0.122A	0.091±0.001A

CK:未施菌的大豆植株;P34-L:接种 P34-L 的大豆植株;DW12-L:接种 DW12-L 的大豆植株。同列数值后不同小写字母表示处理间差异达显著水平($P<0.05$),不同大写字母表示处理间差异达极显著水平($P<0.01$)。

2.5 P34-L 和 DW12-L 菌株对大豆根系发育的影响

接种 DW12-L 的大豆植株与未施菌的对照相比侧根增多,具有更发达的根系(图 2),表明菌株 DW12-L 可显著促进大豆根系的发育。大豆根系发育关键指标的测定结果表明:P34-L 在大豆生长 10 d 时显著提高根系发育的各项指标,其中对根系总投影面积、根系总表面积、根尖数、分叉数的促进达极显著水平,在大豆生长 20 d 时极显著促进总投影

面积、根系总表面积、分叉数、交叉数的增加,但在 30 d 时未见显著促进效果。而 DW12-L 在大豆生长 10~30 d 时均可显著促进根系 6 项指标的增加,大豆生长 30 d 时 DW12-L 处理的大豆根系各指标分别较未施菌的对照增加 41.21%、10.39%、48.09%、52.37%、74.99%和 98.64%,其中在根尖数、分叉数和交叉数指标上差异达极显著水平($P<0.01$)(表 4)。



CK1、CK2:对照;DW12-L-1、DW12-L-2、DW12-L-3:接种 DW12-L 的大豆植株。

图 2 接种菌株 DW12-L 30 d 后大豆品种中黄 606 的根系形态

Fig.2 Root morphology of soybean (*Glycine max* Zhonghuang 606) seedlings after inoculation of strain DW12-L for 30 d

表 4 P34-L 和 DW12-L 菌株对大豆品种中黄 606 根系发育的影响

Table 4 Effects of strains P34-L and DW12-L on soybean (*Glycine max* Zhonghuang 606) root development

时间 (d)	接种菌株	总根长 (cm)	总投影面积 (cm ²)	根系总表面积 (cm ²)	根尖数	分叉数	交叉数
10	CK	44.95±3.50b	2.79±0.06B	8.23±0.88B	32.62±0.33B	48.00±2.00C	4.67±0.58c
	P34-L	93.81±6.09a	5.82±0.64A	18.60±0.04A	90.48±16.18A	133.00±3.00B	8.67±1.53b
	DW12-L	87.73±0.76a	6.44±0.68A	20.50±2.69A	86.62±2.78A	156.53±1.36A	12.00±1.00a
20	CK	410.10±68.67b	17.78±1.45C	55.86±4.37C	564.77±18.66B	985.00±147.65C	164.00±7.81C
	P34-L	551.48±87.01ab	24.46±6.37AB	70.18±4.90B	581.81±20.21B	1559.00±130.50B	237.33±3.22B
	DW12-L	662.01±8.67a	30.18±1.68A	94.80±3.76A	913.00±41.80A	2106.00±125.86A	300.33±19.50A
30	CK	580.86±28.65b	20.95±2.07b	66.48±6.28b	618.67±55.41B	1290.33±94.16B	294.33±30.09B
	P34-L	615.37±65.78b	24.18±0.26b	75.97±3.25b	693.00±65.51B	1480.33±162.62B	277.67±8.96B
	DW12-L	820.24±132.21a	31.34±3.87a	98.45±12.15a	942.67±64.36A	2258.00±73.63A	584.67±16.65A

CK:未施菌的大豆植株; P34-L:接种 P34-L 的大豆植株; DW12-L:接种 DW12-L 的大豆植株。同列数值后不同小写字母表示处理间差异达显著水平($P<0.05$),不同大写字母表示处理间差异达极显著水平($P<0.01$)。

3 讨 论

具有根际定殖能力是 PGPR 菌株可被应用的基础^[15]。菌株具备定殖能力不仅是指菌株可存活于植物根际,还需要能随着宿主植物根系的生长而迁移繁殖。Mirzaei 等^[34]研究了固氮菌对茴香的促生效果及其在茴香根际的定殖能力,结果表明,施用固氮菌可显著提高茴香的产量,氮素的施加对固氮菌的定殖能力产生影响。Bal 等^[35]将分离获得的产 ACC 脱氨酶的 PGPR 菌株施用于水稻,发现这些菌株可显著增加水稻根长、茎长、茎质量、发芽率和叶绿素含量。赵青云等^[36]将 PGPG 菌株 Y-IVI 及利用该菌株生产的有机肥施加于香草兰,发现 Y-IVI 可促进香草兰的生长,且有机肥的施加提高了菌株定殖能力。这些研究侧重于 PGPR 的促生效果和在作物根际的定殖方面,均没有将菌株的定殖能力和促进根系发育联系在一起。本研究结果表明,发光酶 *luxAB* 基因标记的 DW12-L 菌株与大豆具有亲和性,可在大豆根际定殖存活,并随着大豆根系的生长和延伸在新的根段根际定殖,可促进大豆根系的发育和干物质的积累。DW12-L 能在大豆根际长期定殖存活,说明该菌株可适应大豆根际环境,具有大豆根际定殖能力,在长期定殖的基础上发挥其解磷促生能力,将土壤中难溶态磷溶解为可溶态磷供大豆吸收利用,同时产生大豆生长所需的生长激素,促进大豆根系的生长发育,增加根尖数和根面积等。根尖数是影响植物吸收水分和矿质元素的重要因

素^[37]。DW12-L 极显著增加根尖数、分叉数和交叉数,说明该菌株可更好地促进大豆吸收水分和营养,进而促进大豆根系发育,提高大豆干物质的积累。

细菌和植物之间具有亲和性,能相互识别是细菌成功定殖植物根际的前提。已有大量研究结果证实豆科植物的凝集素在豆科植物及根瘤菌的识别和共生关系的建立中起关键性作用^[16-18,20,38]。大豆凝集素处理后的根瘤菌在大豆根部的吸附量显著提高,进而促进侵染结瘤过程^[39]。豌豆根瘤菌可感染成功转入豌豆凝集素基因的三叶草植株,并使之结瘤^[20]。近年来也有研究者报道凝集素在 PGPR 与植物的亲和识别和介导 PGPR 定殖过程中的作用。Yegorenkova 等^[40]报道小麦凝集素与 PGPR 表面多糖的识别和结合可介导巴西固氮螺菌在小麦根际的定殖。Antonyuk 等^[41]发现小麦凝集素在固氮螺菌与小麦的信号交流中起作用。本研究结果也表明与大豆凝集素具有亲和性的 PGPR 菌株 DW12-L 能够定殖于大豆根际,进而发挥其促生功能,而与大豆凝集素不具亲和性的 PGPR 菌株 P34-L 不能在大豆根际定居存活,促生效果小。P34-L 是与小麦凝集素具有亲和性的促生菌株,在前期的研究中已证明该菌株可定殖于小麦根际,促进小麦生长和根系发育^[27]。该菌株在小麦根际表现出强定殖能力,而本试验结果表明该菌株在大豆根际无法长期定居存活。本研究结果表明凝集素可能在 PGPR 与植物的识别及介导菌株的定殖过程中起重要作用。

具备根际定殖能力是 PGPR 发挥促生功效的前

提,然而目前很多生产应用领域使用的微生物肥料菌株只是实验室保藏的普通 PGPR 菌株,虽然菌株本身具有促生性能,但没有被证明与作物具有特异亲和性,是否可以在目标作物根部定殖存活。这种理论的缺乏制约了 PGPR 类菌剂的研发和应用,表现在应用领域就是生物肥料使用效果难以稳定、应用徘徊不前、市场忽冷忽热。本研究为研发应用于大豆的生物肥料生产提供了理论指导,并为大豆专用微生物肥料生产提供了一株潜在的优良菌株。

综上所述,具有根际定殖能力的大豆亲和性 PGPR 菌株能在大豆根际长期存活,并产生有益于大豆生长的代谢产物,刺激大豆根系发育,进而促进植株的营养吸收,促进大豆生长。本试验评价分析了大豆亲和性菌株 DW12-L 在大豆根际定殖与植株生长和根系发育之间的关系,初步揭示了大豆 PGPR 菌株的促生机理。PGPR 对植物的促生机理复杂,涉及微生物与植物的识别、互作以及根际微环境等各种因素,本研究结果为进一步探讨亲和性菌株与大豆之间的互作关系和菌株的促生机理,以及开发可应用于生产的大豆特异性高效 PGPR 菌剂(生物肥料)奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王梦姣. 陕南水稻根际细菌多样性变化趋势[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(3): 552-558.
- [2] 张福锁, 申建波, 冯 固, 等. 根际生态学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2009: 14-15.
- [3] 黄 文, 陈颖卓, 庄远红. 油茶根际与非根际土壤养分含量和微生物数量的季节变化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(19): 265-270.
- [4] 陆雅海, 张福锁. 根际微生物研究进展[M]. 土壤, 2006, 38(2): 113-121.
- [5] 江 彬, 毕银丽, 申慧慧, 等. 氮营养与 AM 真菌协同对玉米生长及土壤肥力的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 327-332.
- [6] 毕江涛, 贺达汉. 植物对土壤微生物多样性的影响研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(9): 244-250.
- [7] 王继雯, 赵俊杰, 李冠杰, 等. 新型复合微生物肥料对冬小麦生物学性状的影响[J]. 南方农业学报, 2018, 49(10): 1953-1958.
- [8] 吴林坤, 林向民, 林文雄. 根系分泌物介导下植物-土壤-微生物互作关系研究进展与展望[J]. 植物生态学报, 2014, 38(3): 298-310.
- [9] 耿丽平, 李小磊, 赵全利, 等. 添加微生物菌剂对小麦产量及土壤生物学性状的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 50-54.
- [10] ARTURSSON V, FINLAY R D, JANSSON J K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(1): 1-10.
- [11] 吴小杰, 田 稼, 孙 超, 等. 微生物肥料对洛川老龄果园苹果产量及品质的影响[J]. 山东农业科学, 2018, 50(7): 121-125.
- [12] 常 凤, 王海标, 陶静静, 等. 减氮配施控释尿素对冬小麦产量及氮肥效率的影响[J]. 中国农学通报, 2018, 34(25): 1-6.
- [13] LUGTENBERG B, KAMILOVA F. Plant growth promoting rhizobacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63(1): 541-556.
- [14] 白文娟, 胡蓉蓉, 章家恩, 等. 溶磷菌对玉米苗期生长和磷素吸收的影响[J]. 生态科学, 2014, 33(3): 401-407.
- [15] NELSON L M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants[J]. Crop Management, 2004, 3(1): 105-112.
- [16] HIRSCH A. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2(4): 320-326.
- [17] RÜDIGER H, GABIUS H. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications[J]. Glycoconjugate Journal, 2001, 18(8): 589-613.
- [18] DE HOFF P L, BRILL L M, HIRSCH A M. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2009, 282(1): 1-15.
- [19] RODRÍGUEZ-NAVARRO D, DARDANELLI M, RUÍZ-SAINZ J. Attachment of bacteria to the roots of higher plants[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 272(2): 127-136.
- [20] CRUZ L F, COBINE P A, DE LA FUENTE L. Calcium increases *Xylella fastidiosa* surface attachment, biofilm formation, and twitching motility[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(5): 1321-1331.
- [21] NIELSEN L, LI X, HALVERSON L J. Cell-cell and cell-surface interactions mediated by cellulose and a novel exopolysaccharide contribute to *Pseudomonas putida* biofilm formation and fitness under water-limiting conditions[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(5): 1342-1356.
- [22] D'IAZ C, MELCHER L, HOOYJAAS P, et al. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the rhizobium-legume symbiosis[J]. Nature, 1989, 338: 579-581.
- [23] FLEMMING C A, LEUNG K T, LEE H, et al. Survival of lux-lac-marked biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* UG2L in soil monitored by nonselective plating and PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(5): 1606-1613.
- [24] ZHU B, CAO Y, WANG D, et al. Survival and chlorpyrifos-degradation of strain *Cupriavidus taiwanensis* Lux-X1 in different type soils[J]. Journal of Food Agriculture & Environment, 2013, 11(2): 873-876.
- [25] TANG X, SUN Y, WEN C, et al. Survival of *Pseudomonas fluores-*

- cence X16 (*luxAB*) strain in soils accumulated with mixed rare elements[J]. *Journal of Rare Earth*, 2004, 22(1): 904-908.
- [26] 曾学明.我国大豆产业发展战略规划研究[J]. *中国农业资源与区划*, 2017, 38(9): 89-97.
- [27] 姜孝珣.小麦亲和性根际解磷菌的筛选及其促进小麦生长的研究[D].合肥:安徽农业大学, 2016.
- [28] 陈晓斌,张炳欣.植物根围促生细菌(PGPR)作用机制的研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2000, 20(1): 38-41.
- [29] 王昀璐,花日茂,唐欣昀,等.电转化法将 *luxAB* 基因导入毒死蜱降解菌 β 菌株的研究[J]. *环境科学学报*, 2011, 31(1): 40-45.
- [30] TAGAWA J, INOUE T, NAITO M, et al. Development of a novel plasmid vector pTIO-1 adapted for electrotransformation of *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 105: 174-179.
- [31] GULL M, HAFEEZ F Y, SALEEM M, et al. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture[J]. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2004, 44: 623-628.
- [32] SENTHILKUMAR M, MADHAIYAN M, SUNDARAM S P, et al. Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methyl-obacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. cv. CO-43)[J]. *Microbiological Research*, 2009, 164(1): 92-104.
- [33] 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.
- [34] MIRZAEI A, NASERI R, SOLEYMANIFARD A, et al. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on agronomic characteristic and root colonization in fennel[J]. *Planta Medica*, 2011, 77(1): 1277.
- [35] BAL H B, NAYAK L, DAS S, et al. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress[J]. *Plant and Soil*, 2013, 366(1/2): 93-105.
- [36] 赵青云,赵秋芳,王 辉,等.根际促生菌 *Bacillus subtilis* Y-IVI 在香草兰上的应用效果研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(2): 535-540.
- [37] 陈 红,冯 云,周建梅,等.植物根系生物学研究进展[J]. *世界林业研究*, 2013, 26(5): 25-29.
- [38] 李 建.大黑花云豆凝集素的分离纯化性质研究及玉竹凝集素的基因克隆研究[D].成都:四川大学, 2007.
- [39] LODEIRO A R, GARCIA S L L, VAZQUEZ T E E, et al. Stimulation of adhesiveness infectivity, and competitiveness for nodulation *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 188: 177-184.
- [40] YEGORENKOVA I V, KONNOVA S A, SACHUK V N, et al. *Azospirillum brasilense* colonisation of wheat roots and the role of lectin-carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation[J]. *Plant and Soil*, 2001, 231(2): 275-282.
- [41] ANTONYUK L P, EVSEEVA N V. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein[J]. *Microbiology*, 2006, 75(4): 470-475.

(责任编辑:张震林)