

玉米根际细菌中 PGPR 的筛选及初步鉴定

丁延芹¹, 杜秉海²

(1. 山东农业大学资源与环境学院, 泰安 271018; 2. 山东农业大学生命科学学院)

摘要: 通过离体拮抗试验和检测菌株产生铁载体的情况从玉米根际细菌中筛选出 8 株拮抗菌和 26 株铁载体产生菌, 其中 DC01、DC09、DC22、PY313 既具有真菌抗性又能产生铁载体, 并对部分菌株进行了初步鉴定。

关键词: 玉米; PGPR 筛选; 拮抗作用; 铁载体

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-0616(2001)03-0041-03

植物根际存在着一些有益的细菌, 它们可以通过直接或间接的方式促进植物生长并防治病原菌引起的植物病害, 这一类能促进植物生长的根际细菌, 称为 PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)。有些 PGPR 菌株已应用到农业生产中, 并获得了良好效果。最早的应用是 1972 年 Kerr 等在澳大利亚试验用放射土壤杆菌 (*A. radio bacteria* K84) 防治土壤杆菌 (*A. tumefaciens*) 引起的果树冠瘿病获得成功^[1]。PGPR 生防机制之一是能产生铁载体 (siderophores), 它对 Fe³⁺ 具有超强络合力, 能产生较大量铁载体的根际细菌在与不能产生铁载体或产量很小的有害微生物竞争铁素营养时将占优势, 从而抑制有害微生物的生长繁殖, 表现出生物防治作用^[2]。

本研究以离体拮抗试验和铁载体产生情况为指标筛选出一批玉米根际促生细菌 (PGPR)。

1 材料与方法

1.1 供试菌株 由泰安典型棕壤玉米根际分离得到的细菌

1.2 植物病原真菌 本实验室收藏 (见表 1)

1.3 玉米品种 掖单 13 (购自山东农业大学优良品种推广处)

表 1 供试植物病原真菌

菌株编号	菌种名称
135	小麦根腐病菌 (<i>Bipolaris sorokiniana</i>)
b	棉花枯萎病菌 (<i>Fusarium oxysporium f. vasinfectum</i>)
104	玉米圆斑病菌 (<i>Helminthosporium carbonum</i> Ullstr)
f	小麦全蚀病菌 (<i>Ophiobolus graminis saccardo</i>)
a	棉花立枯病菌 (<i>Rhizoctonia solani kuhn</i>)
d	棉花黄萎病菌 (<i>Verticillium dahliae</i>)
3	苹果斑点病菌 (<i>Aternaria mali roberts</i>)
H	黄瓜枯萎病菌 (<i>Fusarium oxysporium f. cucumerinum</i>)
L	棉轮纹病菌 (<i>A. schoenya gossypii Sydow</i>)
F	腐烂病菌 (<i>Cytophora cincta</i>)

1.4 培养基

1.4.1 细菌培养用 LB 培养基

1.4.2 病原真菌培养及拮抗试验用改良 PDA 培养基

土豆 200g; 葡萄糖 20g; K₂HPO₄ 0.6g; MgSO₄ 1g; (NH₄)₂SO₄ 1g; CaCO₃ 3g; 琼脂 18g; 去离子水 1000ml; pH 自然

1.5 离体拮抗试验方法

(1) 无菌操作将约 10ml 无菌水倒入活化 2~3 代后的病原真菌试管中, 用接种环轻轻刮动菌丝和孢子, 使之进入无菌水中, 然后一并倒入装有玻璃珠的 150ml 三角瓶中, 充分振荡, 使菌丝和孢子分散均匀。

(2) 无菌微量取样器吸 0.1ml 上述悬液加入平板中, 用涂沫玻璃棒涂布均匀, 然后向其中加入无菌小圆滤纸片, 28℃ 培养 1~2d, 在滤纸上点接测

试细菌, 28℃ 培养 2~ 3d, 观察有无抑菌圈及抑菌圈大小

1.6 产生铁载体的细菌的检测方法

采取铬奥醇(CAS)法, 详细方法参见[3]。为防止 Fe^{3+} 的干扰, 试验中所用玻璃仪器用 $6mol/L$ HCl 浸泡, 并用灭菌牙签点接测试菌于平板上。

1.7 PGPR 的初步鉴定

按照[4~ 6]进行分类鉴定。

2 结果与分析

2.1 离体条件下玉米根际细菌对病原真菌的拮抗作用

表1 玉米根际细菌对病原真菌的拮抗作用

测试菌	病原真菌
DC22	135, 104, H, d
PY313	f, b, H, F
DC06	H, L, a
DC01	L
DC02	a
DC09	d
BY211	d

经过初筛、复筛, 发现一些根际细菌对 12 种病原真菌中某些种具有拮抗作用(表 1)。试验还发现菌株 DC22 对小麦根腐、玉米圆斑、棉花黄萎病菌具有拮抗作用, 三种病害均是大田植物病害。菌株 PY313 对小麦全蚀、棉花枯萎、黄瓜枯萎病菌具有拮抗作用。DC22、PY313 两株菌具有较广抗菌谱。另外, 试验表明 DC22 对棉花黄萎、小麦根腐病菌具有较强的拮抗作用。

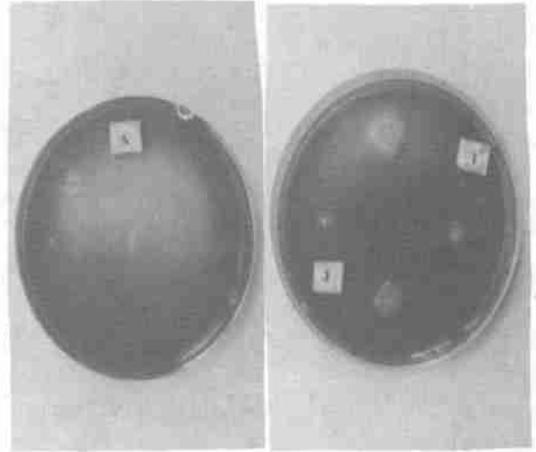
2.2 铁载体的检测结果

产生铁载体的菌株在铬奥醇检测平板上表现为在菌落周围形成橙红色晕圈, 检测结果十分直观。本研究共检测到 26 株产生铁载体的玉米根际细菌, 其中 DC01、DC09、DC22 菌落周围形成的橙红色晕圈较大(图 1)。

2.3 PGPR 的初步鉴定

选取具有明显拮抗作用和产生较多铁载体的菌株 DC01、DC09、DC22、PY313 进行分类鉴定, 初步鉴定结果如下: DC01、DC22、PY313 为假单

胞菌(*Pseudomonas* spp.), DC09 为射光杆菌(*Lucibacterium* sp.)。



A. DC01 I DC09 J. DC22

图1 PGPR 产生铁载体的情况

DC09 菌的特征描述: 无芽胞杆菌, 菌体平均大小为 $1.09 \times 3.23 \mu m$, 极生单鞭毛, 革兰氏阴性, 发酵葡萄糖, 能利用 D-半乳糖、甘露醇、蔗糖, 甲基红阳性, 不产甲基乙酰甲醇, 接触酶阳性, 能水解淀粉, 液化明胶, 不能利用阿拉伯糖。

DC01 菌的特征描述: 无芽胞杆菌, 两端略尖, 菌体平均大小为 $0.77 \times 1.70 \mu m$, 无鞭毛, 革兰氏阴性, 发酵葡萄糖, 能利用阿拉伯糖、乳糖、甘露醇、蔗糖、D-半乳糖, 能利用甘油产生二羟基丙酮, 可液化明胶, 不利用淀粉, 甲基红阴性, 不产甲基乙酰甲醇, 接触酶阴性, 适当条件下可产生非水溶性黄绿色色素。

DC22 菌的特征描述: 无芽胞杆菌, 菌体平均大小为 $0.83 \times 1.07 \mu m$, 极生单鞭毛, 革兰氏阴性, 发酵葡萄糖, 能利用 D-半乳糖、甘露醇、蔗糖、阿拉伯糖、乳糖, 甲基红阳性, 产生甲基乙酰甲醇, 能利用甘油产生二羟基丙酮, 接触酶阳性, 能水解淀粉, 液化明胶, 能产生水溶性橙红色色素。

PY313 菌的特征描述: 无芽胞短杆菌, 菌体平均大小为 $0.56 \times 0.96 \mu m$, 极生单鞭毛, 革兰氏阴性, 能利用葡萄糖、D-半乳糖、甘露醇、蔗糖、阿拉伯糖, 甲基红阳性, 不产生甲基乙酰甲醇, 不产

生二羟基丙酮, 接触酶阳性, 不能利用乳糖和淀粉, 可液化明胶, 能产生水溶性橙色色素

3 讨论

大量资料表明, 植物根际细菌是筛选 PGPR 的重要资源库。现报道较多的是假单胞菌属和芽胞杆菌属的根际细菌具有防病促生的能力^[7,8]。PGPR 的生防机制多种多样, 目前, 较统一的观点包括竞争作用、铁载体的产生、抗生素作用、诱导系统抗性和产生HCN 等^[9]。

本研究利用拮抗试验和铁载体的产生来筛选 PGPR, 在几次重复试验中, 结果是较稳定的, 微生物铁载体一方面供给自身生长所需的铁素养分, 另一方面铁载体在植物根际的大量沉积, 也有利于植物铁素营养的改善, 在石灰性土壤上效果尤为明显^[10], 因此, 铁载体的产生可作为筛选 PGPR 的重要内容之一。

本研究发现菌株DC22、PY313 既能产生铁载体又具有较广的抗菌谱, 可初步推测其抗生素作用可能与产生铁载体有关, 但其生防机理还需进一步证实。筛选的 PGPR 是在离体条件下测定

的, 在活体条件下是否对植物根部病害也有抑制作用, 以及铁载体在活体条件下的产生条件, 尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Kerr A. Biological control of crown gall: Seed inoculation [J]. J. Appl. Bacteriol. 1972, 35: 493-497.
- [2] Buyer J S, et al [J]. Plant and Soil 1990, 129: 101-107.
- [3] 王 平, 等 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326
- [4] 中科院南京土壤研究所微生物室 土壤微生物研究法[M]. 科学出版社, 1985
- [5] 张纪忠, 等 微生物分类学[M]. 复旦大学出版, 1990
- [6] 刘复今, 等 简明第八版伯杰细菌手册[M]. 山东大学出版社, 1988
- [7] 王 平, 等 小麦根圈细菌中 PGPR 的筛选及其初步鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(4): 352-356
- [8] 刘国奇, 等 韭菜根际荧光假单胞菌株的分离和初步研究 [J]. 微生物学通报, 1999, 26(3): 189-192
- [9] 陈晓斌, 等 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.
- [10] BarNess E, et al[J]. Plant and Soil 1991, 130: 231-241.

Screening of PGPR Strains Isolated From the Rhizosphere of Maize

D NG Yan-qin¹, DU Bing-hai²

(1. College of resources and environment Taian 271018; 2. College of life sciences Shandong Agricultural University)

Abstract: According to the results of in vitro antagonistic experiments and production of microbial siderophores 8 strains of antagonistic bacteria and 26 strains of siderophores-producing bacteria were screened. Strains DC22, PY313 both produce siderophores and have antagonism to several pathogens.

Key words: Maize; PGPR; Siderophores, Antagonism