

小麦根圈细菌中 PGPR 的筛选及其初步鉴定^{*}

王 平 冯新梅 王国新 董 彪 李阜棣

(华中农业大学 农业部农业微生物重点实验室,武汉 430070)

摘要 通过不灭菌砂培,比较了 31 株荧光色素产生菌和 22 株耐寒细菌接种处理麦种后对麦苗株高、地上部干重及总干重的影响,获得具有小麦生长刺激作用的荧光色素产生菌和耐寒细菌各 3 株,其中的 2 株耐寒细菌也是荧光色素产生菌。通过离体拮抗试验,得到了 7 株对小麦根腐病原菌及 5 株对小麦全蚀病原菌有抑制作用的根圈细菌。选取分别对小麦土传根腐病原菌和全蚀病原菌具有较强拮抗作用的 2 个菌株 Xl-6 和 Xyg-9(该菌株对麦苗生长也有较强刺激作用)进行了初步鉴定,分别属于 *Pseudomonas fluorescens* biovar I 和 III。

关键词 荧光假单胞菌群; PGPR(plant growth promoting rhizobacteria) 筛选; 拮抗作用; 鉴定
中图法分类号 S 154. 381

产荧光色素的假单胞菌在土壤中的分布十分丰富,而且是多种作物根圈的优势微生物种群^[1]。国内外的大量研究报道表明,许多分离自植物根圈的这类菌株对一些土传植物病原真菌具有拮抗作用,并能抑制由这些病原菌引起的植物病害,保护和促进多种一年生作物的生长^[2,3]。迄今为止,人们已从范围广泛的宿主植物根圈分离筛选到了这类植物促长根圈细菌(plant growth promoting rhizobacteria,简称 PGPR),有些菌株甚至已应用到农业生产实践中,获得了良好效果^[4]。可以说荧光假单胞菌群(Fluorescent pseudomonads)已成为筛选 PGPR 的重要资源库。

本研究对分离自湖北省 2 种土壤中冬小麦根圈的优势细菌中可能存在的 PGPR 菌株进行了初步筛选,并对其进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

1) 待测菌株。产水溶性黄绿荧光色素的菌株 31 个(代号 yg),产其它水溶性色素的菌株 7 个;耐寒细菌(代号 l) 22 株,其中在 KB 培养基上产水溶性黄绿色荧光色素的菌株 8 个。以上菌株均分离纯化自湖北省襄阳(代号 X)、潜江(代号 J)两地的冬小麦根圈^[5]。

2) 指示菌株。小麦根腐长蠕孢菌(*Helminthosporium sativum*),系中国农科院植保所何

礼远研究员提供,小麦全蚀病菌禾顶囊壳菌 [*Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx et Olivier var. *tritici*, 简称 G. g. t] 为华中农业大学植保系李国庆老师提供,小麦赤霉病菌禾谷镰孢菌 (*Fusarium graminearum* Schw.) 为华中农业大学微生物分子生态研究室胡正嘉教授提供,棉花枯萎病菌(京山小种)蚀脉镰孢菌 (*Fusarium vasinfectum* Atk.) 为华中农业大学植保系刘西钊副教授提供;棉花立枯病菌立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 为华中农业大学植保系但汉鸿老师提供。

1.2 小麦品种

鄂恩 1 号,购自华中农业大学种子室。

1.3 培养基与抗生素

KB 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、马铃薯培养基(PDA)及 1/5 马铃薯培养基^[6];测定果聚糖的产生及碳、氮化合物的利用之基础培养基^[7];Hoagland 氏营养液^[8];实验中所用 9 种抗生素分别为卡那霉素(Km),链霉素(Str),新霉素(Neo),红霉素(Ery),氨苄青霉素(Ap),四环素(Tc),氯霉素(Cm),利福平(Rif),萘啶酮酸(Nal),均购自 Sigma 公司,贮存液的配制参见有关说明。

1.4 促长试验

采用塑料杯装不灭菌河砂栽培试验,每杯播入 5 颗经表面消毒催芽的麦种并接入菌液 10 ml。水溶性色素产生菌和耐寒细菌培养液中的菌数分别为 9.6×10^9 和 2.2×10^9 cfu/ml(稀释平板测数),每个

收稿日期:1999-03-24

^{*}国家自然科学基金和国际科学基金资助项目

王 平,男,1964 年生,博士,副教授。工作单位:华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070

菌株设5个重复。另设不接菌对照(只接入灭活菌液)5个重复。小麦出苗后,每杯定苗3株。定期补充水分。每隔10 d按10 ml/杯添加 Hoagland 氏营养液。麦苗长至1个月时,量株高,测地上部干重和总干重。

1.5 离体拮抗试验

主要参考文献[9]。

1.6 小麦根圈细菌天然抗药性的测定

除测定四环素抗性时改用 LB 固体培养基以排除镁离子的干扰外,其它抗生素抗性的测定均采用 KB 固体培养基。

1.7 荧光假单胞菌群中 PGPR 的鉴定

主要参照[6,10]所规定的程序和要求进行。

2 结果与分析

2.1 小麦根圈细菌对麦苗的促长作用

通过不灭菌砂培,比较各供试菌株对麦苗株高、地上部干重及总干重的影响,试验结果如表1。在60个供试菌株中,只有6个菌株对麦苗生长有显著刺激作用,约占10%。其中荧光色素产生菌和耐寒细菌各3株,而耐寒菌株中的 X1-2、X1-5 也能在 KB 平板上产黄绿荧光色素。因此,实际上有5株荧光色素产生菌对麦苗有促长作用。

表1 小麦根圈细菌在不灭菌砂培中对麦苗生长的刺激作用¹⁾

Table 1 Stimulation of strains in wheat rhizosphere on wheat growth

菌株种类 Species of strain	菌株编号 No. of strains	株高/cm Height of plant	地上部干重/g plant ⁻¹ Dry weight of shoot	植株总干重 g plant ⁻¹ Dry weight of plant
耐寒菌株 Strains tolerating cold	CK	16.6a	0.19a	0.35a
	X1-2	23.0b	0.41b	0.70b
	X1-5	22.6b	0.47b	0.78b
	X1-11	22.2b	0.43b	0.81b
荧光色素产生菌 Strains producing fluorescein	CK	24.3a	0.37a	0.68a
	Xyg-3	28.2b	0.60b	1.28b
	Xyg-9	27.1b	0.57b	1.16b
	Xyg-13	27.3b	0.55b	1.43b

1) 表中不同字母表示采用 LSD 法多重比较,差异极显著($P < 0.01$) Different letters shows singnificant difference by LSD test ($P < 0.01$)

2.2 离体条件下小麦根圈细菌对病原真菌的拮抗作用

经过初筛和复筛,发现一些根圈细菌对5种病原真菌分别具有不同强度的拮抗作用(表2)。从表

表2 小麦根圈细菌对5种病原真菌的拮抗作用¹⁾

Table 2 Strains in wheat rhizosphere antagonism against 5 fungal diseases

供试菌株 Strains	棉花立枯 <i>R. solani</i>	棉花枯萎 <i>F. vasinfectum</i>	小麦根腐 <i>H. sativum</i>	小麦全蚀 <i>F. graminearum</i>	<i>G. g. t</i>
Xor-1	+	+++	++	++	+
Jor-1	+	+++	++	++	+
X1-3	+	++	+	++	++
X1-6	+	+	+++	+	+
Xyg-9	+	+	+	+	++
Xyg-15	++	+	+	+	-
Xyg-2	+++	-	++	+	-
Xyg-11	++	-	-	-	-

1) 抑菌距离: +++ : > 10mm; ++ : 6~10mm; + : < 6mm

Inhibition zone: +++ : > 10mm; ++ : 6~10mm; + : < 6mm

2中可知对病原真菌产生拮抗作用的所有菌株均为水溶性色素产生菌。从表2还可看出:菌株 Xor-1、Jor-1、X1-3、X1-6、Xyg-9 对上述5种指示菌都有较强的拮抗作用,说明它们为广谱性抗生素。而 Xor-1、Jor-1 对棉枯萎、小麦赤霉2种病菌的拮抗作用很强。X1-6 对小麦根腐病菌有很强的拮抗作用。

Xyg-2、Xyg-15、Xyg-11 对棉花立枯病菌的抑制作用很强,Xyg-9、X1-3 则对小麦全蚀病菌有较强的抑制作用。

2.3 小麦根圈细菌天然抗药性的测定

选取对小麦生长具有刺激作用以及对病原真菌有拮抗作用的小麦根圈细菌菌株13个,检查了它们对9种抗生素的天然抗性(表3)。所有菌株除了对氨基青霉素有一致的抗性外,对其它抗生素的抗性和敏感性各不相同。

表 3 小麦根圈细菌对 9 种抗生素的天然抗性¹⁾

Table 3 Natural antagonism of strains in wheat rhizosphere against 9 antibiotics

μg/ ml

菌号 No. of strains	Ap	Tc			Cm		Km		Str		Nal		Rif		Neo		Ery	
	50	12.5	15	18	20	30	25	50	25	50	25	50	10	20	10	25	25	50
X1-2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+								
X1-3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-			-	-		
X1-5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+								
X1-6	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
X1-11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-								
Xyg-2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-								
Xyg-3	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-								
Xyg-9	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Xyg-11	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+								
Xyg-13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-								
Xyg-15	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-						
Xor-1	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+								
Jor-1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+								

1) “+”表示在抗性平板上生长;“-”表示不能在抗性平板上生长;“空白”表示未检测
“+” shows growth in antagonized plate,“-” shows no growth in antagonized plate,“blank” shows no checking

表 4 菌株 X1 - 6 和 Xyg - 9 的生理生化特征

Table 4 Physical and chemical characteristics of X1 - 6 and Xyg - 9

项目 Subjects	菌株 Strains		项目 Subjects	菌株 Strains	
	X1-6	Xyg-9		X1-6	Xyg-9
接触酶 Catalase activity	+	+	丁酸盐 Butyrate	-	-
氧化酶 Oxidase test	+	+	乙酸苯酯 Phenylacetate	-	-
卵磷脂酶 Egg-yolk test	+	+	乙醇 Ethanol	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	丙二醇 Propyleneglycol	-	-
葡萄糖的氧化发酵 OF test	+	+	肌醇 Inositol	+	+
多聚β-羟基丁酸的利用 Extracellular PHB hydrolysis	-	-	山梨醇 Sorbitol	+	-
果聚糖的产生 Levan production test	+	-	核糖醇 Adonitol	+	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	含氮化合物的利用		
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	-	Utilization of compound including nitrogen		
V. P 反应 V. P reaction	-	-	缬氨酸 L-Valine	+	+
M. R 反应 M. R reaction	-	-	甘氨酸 Glycine	-	+
硝酸盐还原 Denitrification	-	+	β-丙氨酸 β-Alanine	+	+
含碳化合物的利用 Utilization of carbohydrate			肌酸 Creatine	-	-
L-阿拉伯糖 L-Aarbinose	+	+	马尿酸 Hippurate	-	-
D-半乳糖 D-Galactose	+	+	甜菜碱 Betain	+	+
海藻糖 Trehalose	+	+	4℃生长情况 Growth at 4℃	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	39℃生长情况 Growth at 39℃	+	+
葡萄糖酸钠 Saccharate	+	+	41℃生长情况 Growth at 41℃	-	-

2.4 荧光色素产生菌中 PGPR 的分类鉴定

选取分别对土传小麦根腐病菌和全蚀病菌具有较强拮抗作用、铁载体产量也很大^[11]的2个菌株 X1-6 和 Xyg-9 (该菌株对麦苗生长也有一定的刺激作用)进行了分类鉴定,鉴定结果如下。菌株 X1-6 和 Xyg-9 平板菌落均为圆形,低凸面,边缘整齐,菌落粘稠、半透明,产水溶性黄绿荧光色素。琼脂斜面培养扩展,琼脂穿刺培养呈绒毛状。检不出脓青素。菌体形态均为杆状,两端钝圆,大小为 0.6~1.0 μm × 2.0~2.8 μm ,极生多鞭毛,长约 5.0~6.2 μm 。革兰氏染色阴性。经 10 个重复/菌株、共 3 次试验,这 2 个菌株的生理生化特征如表 4。根据 Palleroni 关于 Pseudomonadaceae 一科的介绍^[10],确定这 2 个菌株均属于荧光假单胞菌。

根据荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 的不同菌株对多种含碳、氮化合物的利用情况,又可将其分为 5 个生物变种 (biovar)。X1-6 不具硝酸盐还原酶、不能利用甘氨酸,但可利用山梨醇和核糖醇,故认为它属于生物变种 I。Xyg-9 具有硝酸盐还原酶,故认为它可能是生物变种 II、III、IV 中的 1 种。但它能利用甘氨酸、不能利用山梨醇和核糖醇,故可判断该菌株属于生物变种 III。

综合以上分析,可以认为 X1-6 和 Xyg-9 这 2 个菌株分别属于荧光假单胞菌生物变种 I 和 III。

3 讨 论

据报道,在小麦根圈分布有丰富的荧光假单胞菌群,它们的存在对小麦的生长具有重要影响^[12,13]。许多研究结果表明:分离自小麦根圈的一些产荧光色素的假单胞菌对引起小麦根部病害的多种土传病原真菌具有显著的抑制作用,有一些还能刺激小麦的生长^[14~17]。小麦在连作多年以后,根部病害全蚀病和根腐病的发病率会自然下降,其原因是麦地土壤中富集了大量荧光假单胞菌群,这类细菌所产铁载体和抗生素也大量累积,可对病原真菌产生显著的拮抗作用,导致病害减轻^[18],这也就是所谓的“抑病土”现象。现在,人们正不断从小麦根圈分离和筛选具有生防潜力的产荧光色素的假单胞菌。

本项研究首批促长试验表明:分离自小麦根圈的少数产荧光色素的假单胞菌在不灭菌砂培条件下对小麦苗期生长具有明显的刺激作用。但随后所作的几次复证实验则发现促长效果很不一致,即使同

一菌株,在不同试验中的促长效果也不稳定。因此,要筛选出一个高效、稳定且生态适应性强的 PGPR 菌株是不容易的。单凭一次或少数几次试验结果就断定某菌株可以直接应用于农业生产,甚至在未开展任何应用基础研究的情况下就大面积推广应用,是不科学的,也是不负责任的。这次鉴定的 2 个菌株 X1-6 和 Xyg-9 在离体条件下对小麦根腐病菌和全蚀病菌具有较强的拮抗作用,但在活体条件下对小麦根部病害是否也有抑制作用,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Weller D M. Biological control of soil-borne pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 1988, 26: 379~407
- 2 O'Sullivan M, Gara F O. Traits of fluorescent pseudomonas spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev*, 1992, 56 (4): 662~676
- 3 王 平,胡正嘉,李阜棣. 荧光假单胞菌群中 PGPR 的作用机制. 见:葛诚主编. 微生物肥料的生产应用及其发展. 北京:中国农业出版社,1996. 210~218
- 4 Cook R J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 1993, 31: 53~80
- 5 王 平,胡正嘉,李阜棣. 小麦内根圈中几类微生物群体数量比较的研究. *华中农业大学学报*, 1994a, 13 (4): 318~324
- 6 中国科学院微生物研究所. 一般细菌常用鉴定方法. 北京:科学出版社,1979.
- 7 Yasuda M, Katoh K. Properties of fluorescent pigment-producing *Pseudomonas* strains isolated from soil and roots of fruit trees. *Soil Sci Plant Nutr*, 1987, 33 (4): 577~583
- 8 西北农学院,华南农学院主编. 农业化学研究法. 北京:农业出版社,1979.
- 9 李阜棣,喻子牛,何绍江等. 农业微生物实验技术. 北京:中国农业出版社,1996.
- 10 Palleroni N J. Pseudomonadaceae. In: Krieg, ed. *Bergeys manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Willams and Wilkins, 1984. 1. 141~199
- 11 王 平,董 飏,李阜棣等. 小麦根圈细菌铁载体的检测. *微生物学通报*, 1994b, 21 (6): 323~326
- 12 Elliott L F, Lynch J M. Pseudomonads as a factor in the growth of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Soil Biol Biochem*, 1984, 16 (1): 69~71
- 13 葛 诚,崔 阵,吴 薇. 植物根圈促生细菌及其研究. *世界农业*, 1994, 9: 28 - 29, 10: 26~27
- 14 De Freitas J R, Germida J J. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under growth chamber conditions. *Soil Biol Biochem*, 1992a, 24 (11): 1127~1136
- 15 De Freitas J R, Germida J J. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under field conditions. *Soil Biol Biochem*, 1992b,

- 24(11):1137~1146
- 16 彭于发,陈善铭,黄大日方等. 荧光假单胞菌 Tn5 诱变菌株防治小麦全蚀病的初步研究. 植物病理学报,1991,20(3):229~233
- 17 Ryder M H, Rovira A D. Biological control of take-off of glasshouse-grown wheat using strains of *Pseudomonas corrugata* isolated from wheat field soil. Soil Biol Biochem, 1993,25(3):311~320
- 18 衣海青,崔云龙. 小麦根腐病研究进展及防治对策. 世界农业,1995,2:28~30

SCREENING AND IDENTIFICATION OF PGPR STRAINS ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE OF WINTER WHEAT(*Triticum aestivum* L.)

Wang Ping Feng Xinmei Wang Guoxin Dong Biao Li Fudi
(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

ABSTRACT The effects of 31 strains of fluorescent pseudomonads and 22 strains of psychrotrophic bacteria which were isolated from wheat rhizosphere in the field conditions inoculated to wheat seeds on plant height, dry weight of shoot and total dry weight have been compared. Three strains of each group of the above bacteria with plant growth-promoting role were screened; two strains of psychrotrophic bacteria also could produce fluorescent pigment on Kings B medium. Seven strains antagonistic to wheat root rot pathogen (*Helminthosporium sativum*) and five strains resistant to take-all pathogen (*Gaeummanomyces graminis* var *tritici*) were obtained by *in vitro* antagonistic experiments. The natural resistance of 13 strains to 9 kinds of antibiotics was detected. Strains XI-6 and Xyg-9 antagonistic to *H. sativum* and *G. g. t.* were identified as *Pseudomonas fluorescens* biovar **I** and **III**, respectively.

KEY WORDS fluorescent pseudomonads, screening of PGPR, antagonism, identification