

蔬菜作物根际促生菌分离筛选、鉴定及促生特性测定

李海云¹ 蒋永梅¹ 姚拓^{1*} 侯栋² 马亚春¹ 张惠荣¹

(1. 甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 兰州 730070;

2. 甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 兰州 730070)

摘要: 为从4种蔬菜作物根际分离和筛选植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)并研究其促生特性,采用固氮、无机和有机磷培养基筛选根际促生菌株,对其促生特性进行定性和定量分析,并通过形态特征及16S rDNA序列分析对优良促生菌株进行鉴定。结果表明:从4种蔬菜根际中共获得57株PGPR菌株,其中固氮菌24株,溶磷菌33株。筛选出的19株优良PGPR菌株的固氮酶活性在 $0.14\sim 3\,664.97\text{ nmol C}_2\text{H}_4\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间,以NCRS1菌株固氮酶活性最高;溶解无机磷菌株的溶磷量在 $36.99\sim 362.60\text{ }\mu\text{g/mL}$ 之间,培养液pH为4.57~5.75,以NCRP2菌株溶磷量最大;溶解有机磷菌株的溶磷量在 $9.24\sim 55.21\text{ }\mu\text{g/mL}$ 之间,培养液pH为6.24~7.75,以PPRS3菌株溶磷量最大;菌株分泌IAA量均小于 $3.36\text{ }\mu\text{g/mL}$;NCRP2菌株对小麦长蠕孢病菌 *Helminthosporium tritici-vulgaris*、番茄早疫病病菌 *Alternaria solani*、黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、马铃薯立枯丝核病菌 *Rhizoctonia solani*、油菜菌核病菌 *Sclerotinia clerotiorum* 和玉米小斑病菌 *Bipolaria maydis* 均有抑制作用。对19株优良PGPR菌株进行初步鉴定,分属于假单胞菌属 *Pseudomonas*、不动细菌属 *Acinetobacter*、*Advenella*、叶杆菌属 *Phyllobacterium*、细杆菌属 *Microbacterium*、芽胞杆菌属 *Bacillus*。本研究筛选出的优良PGPR菌株,可为今后生物菌肥推广应用提供菌种资源。

关键词: 植物根际促生菌; 固氮菌; 溶磷菌; 促生机制

Isolation, screening, identification and growth promoting characteristics of plant growth promoting rhizobacteria of vegetable crops

Li Haiyun¹ Jiang Yongmei¹ Yao Tuo^{1*} Hou Dong² Ma Yachun¹ Zhang Huirong¹

(1. Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China; 2. Vegetable Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu Province, China)

Abstract: In order to isolate and screen the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from the root of four vegetables and study their growth promoting properties, the PGPR were screened by nitrogen fixation medium, inorganic and organic phosphorus media, the growth-promoting characteristics (nitrogen fixation, phosphorus solubilization, IAA production and the biocontrol effect) were carried out with qualitative and quantitative analysis, meanwhile, the excellent strains were identified by using the morphological characteristics and the 16S rDNA sequence. The results showed that 57 strains of PGPR were obtained from four vegetables' rhizosphere, of which 24 were nitrogen fixing bacteria and 33 were phosphate solubilizing bacteria. The nitrogen fixation activity of 19 nitrogen fixation strains was within the range between $0.14\sim 3\,664.97\text{ nmol C}_2\text{H}_4\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the NCRS1 strain had the highest nitrogen fixation activity. The dissolution of inorganic or organic phosphorus strains were within the range between

基金项目: 国家自然科学基金(31660688), 国家现代农业(大宗蔬菜)产业技术体系(CARS-23-G-19)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

收稿日期: 2017-06-16

36.99–362.60 $\mu\text{g/mL}$ or 9.24–55.21 $\mu\text{g/mL}$, and the pH of each strain medium was within the range between 4.57–5.75 or 6.24–7.75, and the NCRP2 strain or PPRS3 strain had the highest capacity of dissolving inorganic or organic phosphorus, respectively. All strains secreted IAA less than 3.36 $\mu\text{g/mL}$. NCRP2 strain had inhibitory effects on *Helminthosporium tritici-vulgaris*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia clerotiorum*, and *Bipolaria maydis*. Preliminary identification of 19 strains of excellent PGPR strains, belong to *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Advenella*, *Phyllobacterium*, *Microbacterium* and *Bacillus*, respectively. The excellent PGPR strains selected in this study could provide bacterial strain resources for the promotion and application of bio-fertilizers in the future.

Key words: plant growth promoting rhizobacteria (PGPR); nitrogen-fixing bacteria; phosphate-solubilizing bacteria; promoting mechanism

在农业生产中,植物生长所必需的各种营养元素,除来自于大气、水、土壤供应之外,主要通过施肥来提供,农作物的增产有50%依赖于化肥(Erisman et al., 2008)。然而,近些年为了追求高产及高效益,我国农业生产普遍存在化肥使用超量情况。化肥的不合理施用,导致土壤性状恶化、养分比例失衡,农产品品质下降,同时生态环境被破坏(Mal et al., 2015)。因此,从农业可持续发展及保护生态环境等方面综合考虑,生物菌肥与化学肥料配施是提高土壤质量、改善生物多样性(主要为土壤微生物)和农产品品质的重要途径。植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)是能够在植物根际定殖,并能够进行固氮(自生、共生、联合固氮等)作用,溶解有机磷和无机磷,分泌植物激素和抗生素,产生铁载体,从而促进植物生长、拮抗病原菌的一类微生物(周建娇, 2013; 刘丹丹等, 2016)。利用从不同植物根际分离筛选的优良PGPR资源可以研制成具有促生、防病能力的微生物菌肥,与使用化肥、农药相比,微生物菌肥具有成本低、增产稳定、非再生能源消耗少、对生态环境及农产品安全、经济效益高等优点(姚拓, 2004)。生物菌肥通过利用微生物的生命代谢活动,改善养分供应状况,为植物提供营养元素,增强抗逆性,达到提高产量、改善品质、减少化肥使用、培肥地力的目的(El-Sayed et al., 2015)。故可以缓解我国资源短缺、环境污染、生物多样性破坏等问题(Embrandiri et al., 2013)。因此,植物根际促生菌种资源的筛选成为人们关注的热点。

PGPR的促生作用主要体现在改善植物根际营养环境,分泌促生物质以及提高寄主对非生物胁迫的忍耐力等(Aslantaş et al., 2007; 刘佳莉等, 2013),也在土壤发育、土壤肥力形成、营养循环、植物生长等方面发挥着重要作用(徐万里等, 2015)。目前,已有研究学者对玉米 *Zea mays*、水稻 *Oryza sativa*、小

麦 *Triticum aestivum*、番茄 *Lycopersicon esculentum*、樱桃 *Prunus avium* 等开展了PGPR资源的筛选研究(Chithrashree et al., 2011; Turan et al., 2011; 荣良燕等, 2015)。余贤美等(2014)研究表明, Bs-15菌株可提高土壤中细菌和放线菌数量,能够成功定殖并可改善土壤性状;一些耐盐促生细菌可以增加叶面吸收的养分,增强植物的抗氧化能力,使盐毒性下降(Bharti et al., 2014); PGPR能分泌激素类物质,产生铁载体,使微生物在根际通过养分争夺与利用、抑制病原物,有利于植物生长,促进矿质养分(如铁元素等)的吸收利用,降低重金属在植物体内的累积和吸收(Guo & Chi, 2014); PGPR还可以使根瘤菌和菌根共生来共同发挥作用促进菌根周围细菌的繁殖,有利于溶磷细菌的定殖(刘丹丹等, 2016)。

本研究从油菜、辣椒和大葱等4种植物根际分离筛选出PGPR菌株,通过进一步筛选获得兼有固氮、溶磷、分泌生长激素、生防作用的优良PGPR菌株,并利用形态学和分子生物学对其进行分类鉴定,以期今后生物菌肥的推广应用提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和病原菌:植物根际样品采自甘肃省兰州市榆中县定远镇蒋家营村,选择长期施用农家肥和化肥施用量较多的区域,采用五点取样法在该区域内分别选择花椰菜 *Brassica oleracea*、油菜 *Brassica campestris*、辣椒 *Capsicum annuum* 和大葱 *Allium fistulosum* 共4种植物,将根际尽量完整采集,分别装入无菌自封袋中,标注植物名称及采集日期,放置于冰盒中迅速带回实验室进行菌株分离,获得PGPR菌株。供试病原菌有小麦长蠕孢病菌 *Helminthosporium tritici-vulgaris*、番茄早疫病菌 *Alternaria solani*、黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、马铃薯立枯丝核

病菌 *Rhizoctonia solani*、油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、玉米小斑病菌 *Bipolaria maydis*, 均由甘肃农业大学植物保护学院薛丽老师提供。

培养基: 固氮培养基 (nitrogen free medium, NFM) (韩文星等, 2008): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g、 NaCl 0.1 g、苹果酸 5.0 g、生物素 10 μg 、0.5% 溴百里酚蓝 5 mL、琼脂 20 g (固体培养基) 或 2 g (半固体培养基), 总体积 1 000 mL, pH 7.0; 无机磷 (national botanical research institute's phosphate, NBRIP) 培养基 (Nautiyal, 1999): 葡萄糖 10 g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g、 KCl 0.2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 6.8~7.0; 蒙金娜有机磷培养基 (陈俊等, 2009): $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 CaCO_3 5.0 g、葡萄糖 10.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g、卵磷脂 0.2 g、 NaCl 0.3 g、 KCl 0.3 g、酵母膏 0.4 g、琼脂 20 g, 总体积 1 000 mL, pH 7.0~7.5; King 氏液体培养基: 蛋白胨 20 g、 K_2HPO_4 1.15 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g、丙三醇 15 mL、L-色氨酸 0.1 g (或不加色氨酸); 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g, 自然 pH, 加水至 1 000 mL; LB (Luria-Bertani) 固体培养基: 胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、 NaCl 10 g、琼脂 15~20 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0; LB 液体培养基: LB 培养基中不添加琼脂。

试剂及仪器: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、2 $\times$ Taq PCR MasterMix, 天根生化科技 (北京) 有限公司; 3-吡啶乙酸 (3-IAA), 北京索莱宝科技有限公司; GC 7890F 气相色谱仪, 山东金普分析仪器有限公司; KV-T1 可见光分光光度计, 南京肯凡电子科技有限公司; SPX-GB 型光照培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 固氮菌和溶磷菌的分离筛选

为了解 PGPR 在植物根际的分布, 一般将根际分为 3 个部分, 即根表土 (soil adhering to roots, RS)、根系表面 (rhizoplane or surface of roots, RP) 和根内 (histoplane or interior of roots, HP) 3 个区域。用稀释梯度法将上述 3 种采集样品分别依次制备成浓度为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的稀释液备用。将制备好的各浓度稀释液分别接种到 NFM、NBRIP、蒙金娜有机磷培养基中, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 5~7 d, 选取 NFM 培养基中生长较快、菌落形态较大的不同单菌落, 进行重复划线、分离、纯化, 即为固氮菌株。用接种环

挑取 NBRIP 和蒙金娜有机磷培养基中菌落周围出现透明圈 (溶磷圈) 的不同大小单菌落, 并采用平板划线法重复操作, 直至菌株纯化, 即为溶磷菌株。将纯化好的菌株于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 备用。

1.2.2 菌株促生特性测定

从 1.2.1 中分离到的 PGPR 菌株中筛选出 19 株优良 PGPR 菌株进行促生特性的测定, 其中包括 6 株固氮菌株和 13 株溶磷菌株。

固氮特性测定: 菌株的固氮酶活性采用乙炔还原法进行测定 (Piromy et al., 2011)。用接种环分别将 19 株 PGPR 菌株接种于 5 mL 半固体 NFM 培养基中 (血清瓶, 规格 15 mL), 每株菌 3 次重复, 以不接菌培养基为对照, 用棉花塞封口, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 将棉花塞换成橡胶塞, 用无菌注射器抽出 1 mL 气体, 然后注入 1 mL C_2H_2 气体, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 48 h, 之后用 100 μL 微量进样器从血清瓶中分别抽取混合气体 50 μL 快速注入到气相色谱仪气体进样柱内, 记录并观察 C_2H_4 出峰时间及峰面积, 测定 C_2H_4 和 C_2H_2 的含量。

溶磷特性测定: 定性测定: 将 19 株 PGPR 菌株分别接种在 NBRIP 和蒙金娜有机磷培养基上, 每菌株 3 次重复, 每个培养皿中接种 4 个区域, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 7 d, 观察并测量每株菌溶磷圈的大小, 通过溶磷圈大小进行初步筛选, 去除 $D/d < 1.5$ 的菌株, 其中 D 代表溶磷圈直径, d 代表菌落直径。定量测定: 采用钼蓝比色法对菌株溶磷量进行测定 (姚拓等, 2004a)。选取初筛后 $D/d > 1.5$ 的菌株, 在无菌条件下, 分别将其接种至盛有 50 mL NBRIP 和蒙金娜液体培养基 (有机磷培养基中不添加琼脂) 的 150 mL 三角瓶中, 每株菌 3 次重复, 以不接菌培养基为对照, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 条件下振荡培养 12 d 后, 测定培养液 pH 和溶磷量。

分泌 IAA 特性测定: 定性测定: 将 19 株 PGPR 菌株分别接种于 50 mL King 氏液体培养基中, 每菌株 3 次重复, 以不接菌培养基为对照, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 条件下振荡培养 12 d。吸取各菌液 100 μL 于白瓷板上, 加等体积 Spot 比色液, 其中对照加 100 μL 3-吡啶乙酸, 每处理 3 次重复, 将白瓷板放置于室温黑暗条件下, 20 min 内观察并记录颜色变化。如变为粉红色即能分泌 IAA, 浅粉色即分泌 IAA 能力弱, 没有颜色变化即为不能分泌 IAA。定量测定: 利用 Salkowski 比色法对分离获得的 19 株 PGPR 菌株分泌 IAA 特性进行测定 (姚拓等, 2004b)。吸取以上各菌株培养液 10 mL, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 条件下离

心 15 min, 吸取上清液 5 mL, 并加等体积的 S2 比色液, 在黑暗条件下放置 30 min, 测定波长 530 nm 处各培养液的吸光度值, 通过制作的标准曲线计算测定样品的 IAA 浓度。

1.2.3 菌株生防能力测定

利用平板对峙法(荣良燕等, 2011)初步筛选 19 株优良 PGPR 菌株对小麦长蠕孢病菌、番茄早疫病菌、黄瓜枯萎病菌、马铃薯立枯丝核病菌、油菜菌核病菌、玉米小斑病菌的拮抗作用。将保存的 6 种病原菌分别转接在 PDA 平板上, 25℃ 培养 5~7 d。同时将供试的 PGPR 菌株接种到 LB 液体培养基中, 于 28℃、160 r/min 条件下振荡培养 24 h。采用交叉法在 PDA 平板中心位置分别接种 6 种病原菌菌饼, 在十字两端距中心位置 23 mm 处分别接种供试菌株, 每处理 3 次重复, 以只接种病原菌的培养基为对照。28℃ 培养 5~7 d, 待对照铺满整个平板时, 采用交叉法测量菌落直径, 计算抑制率。抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100%。通过初筛结果选择抑制率 > 40% 的菌株按照上述方法进行复筛, 每菌株 3 次重复。观察离拮抗菌最近的抑菌圈边缘菌丝生长状况, 以只接病原菌边缘菌丝为对照, 在显微镜下观察病原菌菌丝生长状况, 以确定 PGPR 菌株对 6 种病原菌的生防能力。

1.2.4 优良 PGPR 菌株鉴定

将上述分离筛选到的 19 株优良 PGPR 菌株在 LB 平板上进行活化, 接种于 LB 液体培养基中, 于 28℃、160 r/min 条件下振荡培养 24 h, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌总 DNA, 利用通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rDNA 序列的扩增, 即正向引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-AG-3') 和反向引物 1492R (5'-GGTTACCTTGTTA-CGACTT-3')。50 μL 反应体系: 2×Taq PCR Master-Mix 25 μL、DNA 模板 2 μL、正反向引物各 2 μL、ddH₂O 19 μL。PCR 扩增参数设置: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 30 s, 重复循环 30 次; 72℃ 总延伸 10 min; 将 PCR 产物进行 1% 凝胶琼脂糖电泳检测, 并于 -20℃ 保存待用。16S rDNA 序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。将测序结果在 NCBI 的 GenBank 数据库中利用 BLAST 程序进行同源序列比较分析, 采用 Mega 5.0 软件以邻接法构建所测菌株的系统发育树, 自展值为 1 000 次。

1.3 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行 One-Way

ANOVA 分析并作图, 应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 PGPR 菌株的初步筛选

通过 NFM、NBRIP、蒙金娜有机磷培养基分离筛选出具有固氮和溶磷能力的 PGPR 菌株 57 株, 其中固氮菌株 24 株, 溶磷菌株 33 株。从花椰菜根际分离筛选出 4 株固氮菌株 NBRP1、NBHP1、NBRS2、NBRP2 和 6 株溶磷菌株 MBHP1、PBRP1、PBRP2、PBHP1、PBRP1、PBRP2; 从油菜根际分离筛选出 7 株固氮菌株 NYHP1、NYRP1、NYRP2、NYRP3、NYRS1、NYRS2、NYRS3 和 5 株溶磷菌株 MYRS1、MYRS2、MYHP1、PYRS1、PYRS2; 从大葱根际分离筛选出 7 株固氮菌株 NCRP1、NCRP2、NCRP3、NCRS1、NCRS2、NCHP1、NCHP2 和 13 株溶磷菌株 MCRS1、MCRS2、MCRS3、MCRS4、MCHP1、MCHP2、MCRP1、MCRP2、MCRP3、PCHP1、PCR1、PCRS1、PCRS2; 从辣椒根际分离筛选出 6 株固氮菌株 NPHP1、NPHP2、NPRP1、NPRP2、NPRS1、NPRS2 和 9 株溶磷菌株 MPRS1、MPRS2、MPHP1、MPHP2、PPRS1、PPRS2、PPRS3、PPHP1、PPHP2。

2.2 优良 PGPR 菌株的促生特性

供试 19 株优良 PGPR 菌株的固氮酶活性在 0.14~3 664.97 nmol C₂H₄·h⁻¹·mL⁻¹ 之间, 其中菌株 NCRS1 的固氮酶活性最高, 达 3 664.97 nmol C₂H₄·h⁻¹·mL⁻¹, 其次是 PYRS1 菌株, 达 1 557.63 nmol C₂H₄·h⁻¹·mL⁻¹, NYRS2 和 PCHP1 菌株的固氮酶活性分别为 160.03、108.90 nmol C₂H₄·h⁻¹·mL⁻¹, 其余菌株固氮酶活性均小于 33.11 nmol C₂H₄·h⁻¹·mL⁻¹ (表 1)。

通过测定 19 株优良 PGPR 菌株的溶磷圈大小发现, 溶无机磷菌株 *D/d* 值在 1.53~2.73 之间, 溶磷量在 36.99~362.60 μg/mL 之间, 各菌株培养液 pH 在 4.57~5.75 之间, 其中以 NCRP2 菌株的溶磷量最大, MCRS1 菌株的 *D/d* 值最大, 达 2.73。溶有机磷菌株 *D/d* 值在 1.50~2.28 之间, 溶磷量在 9.24~55.21 μg/mL 之间, 各菌株培养液 pH 在 6.24~7.75 之间, 其中以 PPRS3 菌株的溶磷量最大; 能同时溶解无机磷和有机磷的菌株包括 NYRS3、NCRS1、NPRS1、MBHP1、MPHP1、MCRP1、MYRS2、MCRP2、MCRS1、MCRS4、PCHP1、PYRS2、PYRS1、PCR1、PCRS2、PBRP1、PCRS1、PPHP1。经过溶磷圈定性分析发现, 不同 PGPR 菌株的溶磷能力存在差异, 菌株溶解无机磷的能力高于溶解有机磷的能力。另外, 供试 19 株优

良 PGPR 菌株分泌 IAA 量均小于 3.36 $\mu\text{g/mL}$ (表 1)。

表 1 优良 PGPR 菌株促生特性测定结果

Table 1 Determination result of the growth-promoting characteristics of excellent PGPR strains

来源 Source	菌株 Strain	固氮酶活性 Nitrogenase activity ($\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)	无机磷 Inorganic P			有机磷 Organic P			IAA ($\mu\text{g/mL}$)
			<i>D/d</i>	pH	溶磷能力 Phosphate solubilization capacity ($\mu\text{g/mL}$)	<i>D/d</i>	pH	溶磷能力 Phosphate solubilization capacity ($\mu\text{g/mL}$)	
油菜 <i>Brassica campestris</i>	NYRS2	160.03± 10.68 a	—	—	—	—	—	—	3.36± 0.04 a
	NYRS3	12.10± 1.53 b	1.96± 0.09 b	5.75± 0.01 a	36.99± 0.43 e	1.51± 0.07 c	6.86± 0.07 d	9.24± 0.14 b	1.59± 0.05 fgh
	MYRS2	1.50± 0.02 c	1.54± 0.12 e	4.69± 0.00 d	329.68± 0.62 b	1.50± 0.02 c	6.24± 0.04 d	32.23± 1.15 b	1.76± 0.11 a
	PYRS1	1 557.63± 85.96 a	1.66± 0.12 cd	4.65± 0.01 b	273.03± 0.89 e	—	—	—	0.89± 0.03 d
	PYRS2	25.38± 2.71 c	1.77± 0.09 c	4.63± 0.00 b	338.96± 0.5 c	1.56± 0.08 c	7.02± 0.01 d	33.95± 2.07 b	1.82± 0.02 a
花椰菜 <i>Brassica oleracea</i>	PBR2	—	1.61± 0.11 d	4.67± 0.01 a	356.61± 1.99 a	—	—	—	0.82± 0.06 d
	NBRP2	7.05± 0.30 b	—	—	—	—	—	—	2.24± 0.18 c
	MBHP1	33.11± 0.37 c	1.53± 0.03 e	4.74± 0.01 b	351.60± 0.38 a	—	—	—	—
大葱 <i>Allium fistulosum</i>	MCRS1	2.08± 0.21 c	2.73± 0.1 a	4.73± 0.01 bc	323.11± 0.22 c	1.88± 0.07 b	7.05± 0.009 c	21.31± 1.71 c	1.75± 0.16 a
	MCRP1	3.56± 0.56 c	1.54± 0.12 e	4.83± 0.01 a	276.48± 3.85 f	1.50± 0.02 c	7.27± 0.02 a	45.44± 1.99 a	1.28± 0.09 b
	NCRP2	28.86± 2.29 b	1.75± 0.1 c	4.65± 0.02 f	362.60± 2.01 a	—	—	—	1.71± 0.02 efg
	NCRS1	3 664.97± 140.08 a	2.01± 0.09 b	4.84± 0.02 d	350.78± 0.95 b	1.56± 0.04 c	7.75± 0.01 b	17.61± 0.14 a	1.66± 0.07 efg
	NCRS2	1.57± 0.08 b	1.62± 0.24 d	4.92± 0.01 c	342.98± 5.43 b	—	—	—	1.04± 0.07 lm
	MCRS4	1.63± 0.13 c	2.31± 0.14 b	4.69± 0.01 d	263.18± 0.28 h	2.01± 0.22 a	7.14± 0.00 b	27.63± 2.51 bc	1.72± 0.06 a
	PCHP1	108.90± 11.77 b	1.68± 0.11 cd	4.58± 0.01 c	345.77± 1.44 b	1.75± 0.16 bc	7.27± 0.01 b	29.35± 1.52 b	0.61± 0.04 e
	PCRP1	2.27± 0.25 c	1.55± 0.06 e	4.57± 0.01 c	358.91± 2.29 a	—	—	—	1.25± 0.04 c
	PCRS2	1.68± 0.23 c	1.82± 0.13 c	4.64± 0.00 b	300.53± 0.70 d	1.78± 0.06 bc	7.23± 0.00 c	12.11± 1.52 c	1.5± 0.06 b
	PPRS3	0.14± 0.03 c	—	—	—	2.28± 0.30 a	7.24± 0.01 c	55.21± 3.04 a	—
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	MHP1	1.22± 0.32 c	1.53± 0.03 e	4.82± 0.01 a	291.17± 0.36 e	1.55± 0.08 c	7.19± 0.01 b	27.63± 2.87 bc	1.61± 0.01 a

D: 溶磷圈直径; d: 菌落直径。表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。D: Diameter of phosphate solubilizing circle; d: diameter of colony。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3 菌株的生防能力

2.3.1 优良生防菌株筛选

筛选出的19株优良促生菌株对不同病原菌防治效果不同,其中对部分病原菌抑制率大于50%的菌株有NCRP2、NYRS2、MPHP1、MBHP1,其余菌株对病原菌的抑制率均小于50%,甚至对病原菌没有

防治效果。其中,NCRP2菌株对小麦长蠕孢病菌、番茄早疫病菌、黄瓜枯萎病菌、马铃薯立枯丝核病菌、油菜菌核病菌和玉米小斑病菌的抑制效果较好(图1),抑制率分别是61.23%、53.41%、51.52%、53.16%、77.44%和59.87%(表2)。后续将测定NCRP2菌株对供试病原菌菌丝生长的影响。

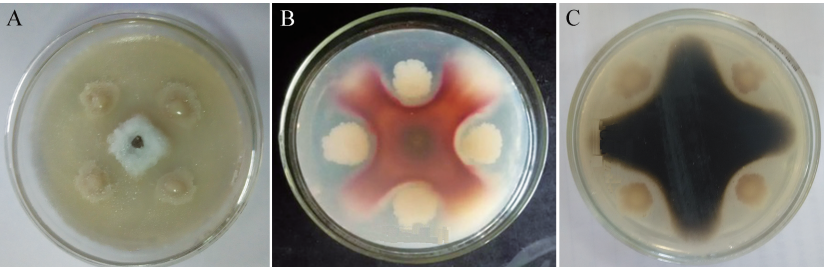


图1 NCRP2菌株与部分植物病原菌的平板对峙试验

Fig. 1 Panel confrontation of strain NCRP2 for part pathogen fungi

A: 油菜菌核病菌; B: 黄瓜枯萎病菌; C: 番茄早疫病菌。A: *Sclerotinia sclerotiorum*; B: *Fusarium oxysporum*; C: *Alternaria solani*.

表2 PGPR菌株对6种供试植物病原菌的拮抗效果

Table 2 Inhibition Effect of PGPR for six pathogen fungus

来源	菌株	小麦长蠕孢病菌	番茄早疫病菌	黄瓜枯萎病菌	马铃薯立枯丝核病菌	油菜菌核病菌	玉米小斑病菌
Source	Strain	<i>Helminthosporium tritici-vulgaris</i>	<i>Alternaria solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Bipolaria maydis</i>
油菜	NYRS2	51.44±1.25 a	—	—	—	—	—
Brassica	NYRS3	—	39.89±1.27 a	—	47.87±1.43 a	—	—
campestris	MYRS2	—	—	—	—	—	46.04±0.74 b
	PYRS1	—	—	—	—	—	—
	PYRS2	—	—	—	—	—	—
花椰菜	PBRS2	44.04±1.72 a	—	—	—	—	—
Brassica	NBRP2	37.90±2.01 c	—	20.72±1.21 a	—	—	—
oleracea	MBHP1	—	—	—	52.54±0.56 a	—	—
大葱	MCRS1	29.55±2.33 b	—	—	—	—	39.29±1.55 a
Allium	MCRP1	—	—	—	—	—	35.36±0.74 b
fistulosum	NCRP2	61.23±1.54 a	53.41±0.67 b	51.52±1.67 a	53.16±1.61 b	77.44±0.89 a	59.87±0.83 b
	NCRS1	—	—	—	—	—	—
	NCRS2	—	37.99±1.33 a	—	49.16±0.68 a	—	—
	MCRS4	—	—	—	—	—	38.94±1.76 a
	PCHP1	—	—	—	—	—	—
	PCRP1	—	—	—	—	—	—
	PCRS2	41.22±2.12 a	—	—	—	—	27.44±0.69 a
辣椒	PPRS3	48.44±0.74 b	—	—	—	—	32.41±1.47 b
Capsicum	MPHP1	56.78±0.86 b	—	—	—	—	30.50±0.33 c
annuum							

表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3.2 NCRP2 菌株对病原菌菌丝生长的影响

在光学显微镜下观察优良生防菌株 NCRP2 对病原菌菌丝生长的影响情况(图 2)。与对照(只接

病原菌)相比, NCRP2 菌株能使小麦长蠕孢病菌的菌丝膨大、变形;能使油菜菌核病菌的细胞壁破裂, 菌丝膨大且变形。

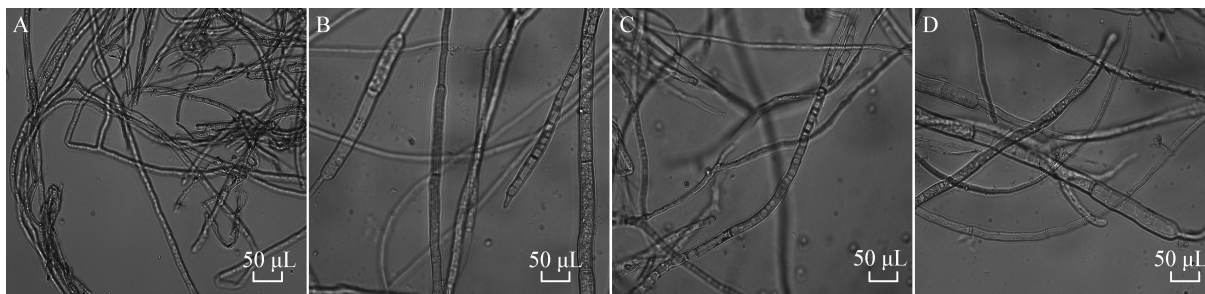


图 2 菌株 NCRP2 对部分植物病原菌菌丝生长的影响

Fig. 2 Effect of strain NCRP2 on mycelial growth of part pathogen fungi

A: 小麦长蠕孢病菌(CK); B: 菌株 NCRP2 拮抗小麦长蠕孢病菌效果; C: 油菜菌核病菌(CK); D: 菌株 NCRP2 拮抗油菜菌核病菌效果。A: *Helminthosporium tritici-vulgaris* (CK); B: effect of strain NCRP2 for mycelial growth of *H. tritici-vulgaris*; C: *Sclerotinia clerotiorum* (CK); D: effect of strain NCRP2 for mycelial growth of *S. clerotiorum*.

2.4 优良 PGPR 菌株的鉴定

通过对 19 株优良 PGPR 菌株进行革兰氏染色, 发现 NYRS2、NBRP2、NYRS3、PCHP1、MYRS2 和 MBHP1 菌株为革兰氏阳性菌(G^+), 其余菌株为革兰氏阴性菌(G^-)。将菌株测序结果与同源序列进行比对分析, 并构建系统发育树(图略), 初步鉴定为: NCRS1、PBR2 菌株为 *Pseudomonas migulae*, MHP1 菌株为 *Pseudomonas thivervalensis*, MCRS1、PCRS2、PYRS2、MCRP1 和 PPRS3 菌株为乙酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus*, MCRS4 菌株为 *Advenella kashmirensis*, NCRP2、NCRS2 菌株为叶杆菌 *Phyllobacterium ifriqiense*, NYRS3 菌株为 *Microbacterium binotii*, NBRP2 菌株为 *Microbacterium profundum*, MBHP1、MYRS2、NYRS2 及 PCHP1 菌株为短小芽胞杆菌 *Bacillus pumilus*, PYRS1 菌株为 *Pseudomonas syringae*, PCR1 菌株为 *Pseudomonas brassicacearum*(表 3)。

3 讨论

目前, 在 PGPR 菌株筛选过程中, 不仅要选择具有促生作用, 还应筛选具有抑制病原菌的菌株, 这对生产实践具有重要的作用(刘力伟等, 2016)。陈思宇等(2013)从南京、徐州和常州等市土样中分离获得 11 株对 5 种水稻病害的病原菌均具有显著抑制作用的拮抗细菌, 能促进株高和鲜重; 孙广正等(2014)发现 PGPR 菌株对油菜菌核病菌、尖刀镰孢菌、立枯丝核菌具有良好的抑制效果, 并且能够促进植物生

长; 刘邰洲等(2012)研究发现, 枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 菌株 PTS-394 对番茄枯萎病和青枯病的防效最好, 分别达 77.4% 和 80.0%, 菌株 H-70、L-1 和 SJ-280 的防效均高于 60.0%; 王静等(2015)研究结果发现, 短小芽胞杆菌 AR03 菌株显著抑制烟草炭疽病菌 *Colletotrichum destructivum* 菌丝生长、孢子萌发和病害发生, 1×10^8 CFU/mL 菌悬液对炭疽病的盆栽防治效果为 83.03%。本研究从 4 种蔬菜根际共分离筛选到 57 株 PGPR 菌株, 其中固氮菌株 24 株, 溶磷菌株 33 株, 通过定性和定量方法分别测定了其中 19 株优良 PGPR 菌株的固氮特性、溶磷特性、分泌 IAA 量、生防能力, 发现不同类型的 PGPR 菌株固氮能力存在差异, 大多数菌株的固氮能力较弱, 可能由于不同植株、土壤、地域条件等存在差异, 同时温度(席琳乔等, 2008)、光照(田宏等, 2005)也对固氮酶活性有显著影响。本试验中, 该地区分离的 PGPR 菌株溶磷能力较强, 溶磷量在 9.24~362.60 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 菌液 pH 在 4.57~7.75 之间, 不同 PGPR 菌株间溶磷能力差别较大。

PGPR 菌株的溶磷圈大小可能与其生长时间有关, 也与其分泌代谢物的种类、释放速度以及代谢物在平板上的蔓延速度等有关。另外, 外界环境中碳源、氮源及微量元素的种类都可以影响菌株的溶磷量(马文彬等, 2014)。从植物根际分离筛选出的菌株可以分泌激素类物质, 能促进植物生长, 这种能力与菌株自身的特性有关, 土壤中约有 50% 以上的细菌能分泌 IAA(Rasul et al., 1998)。本试验中采用平

板对峙法研究 PGPR 菌株对 6 种植物病原菌的抑制效果,发现部分 PGPR 菌株对植物病原菌有抑制作用,抑制率大于 50% 的菌株有 NCRP2、NYRS2、MPHP1、MBHP1,其中 NCRP2 菌株对小麦长蠕孢病菌、番茄早疫病菌、黄瓜枯萎病菌、马铃薯立枯丝核病菌、油菜菌核病菌和玉米小斑病菌均有较好的拮抗效果。此外,对 PGPR 菌株在土壤中的定殖能力

研究也是 PGPR 在生产应用前较为重要的环节,一般采用荧光蛋白标记法标记优良菌株,用荧光显微镜定期观测菌株在土壤中定殖的能力及动态。对于本试验中筛选到的优良 PGPR 菌株在土壤中的定殖能力仍有待于进一步深入研究,以期 PGPR 菌株的推广应用提供可行性。

表3 优良 PGPR 菌株的 16S rDNA 序列分析鉴定结果
Table 3 Sequence analysis and identification of 16S rDNA sequences of choiceness PGPR strains

菌株 Strain	宿主植物 Host plant	分离部位 Separation site	同源序列 Homologous sequence	相似度 (%) Similarity
PCHP1	大葱 <i>Allium fistulosum</i>	根内 HP	短小芽胞杆菌	99
MBHP1	花椰菜 <i>Brassica oleracea</i>	根内 HP	<i>Bacillus pumilus</i>	100
MYRS2	油菜 <i>Brassica campestris</i>	根表土 RS		99
NYRS2	油菜 <i>Brassica campestris</i>	根表土 RS		99
NCRP2	大葱 <i>Allium fistulosum</i>	根表面 RP	叶杆菌	99
NCRS2	大葱 <i>Allium fistulosum</i>	根表土 RS	<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i>	99
PCRS2	大葱 <i>Allium fistulosum</i>	根表土 RS	乙酸钙不动杆菌	99
MCRS1	大葱 <i>Allium fistulosum</i>	根表土 RS	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100
PPRS3	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	根表土 RS		99
MCRP1	大葱 <i>Allium fistulosum</i>	根表面 RP		99
PYRS2	油菜 <i>Brassica campestris</i>	根表土 RS		99
MCRS4	大葱 <i>Allium fistulosum</i>	根表土 RS	<i>Advenella kashmirensis</i>	100
NBRP2	花椰菜 <i>Brassica oleracea</i>	根表面 RP	<i>Microbacterium profundum</i>	99
NYRS3	油菜 <i>Brassica campestris</i>	根表土 RS	<i>Microbacterium binotii</i>	99
PYRS1	油菜 <i>Brassica campestris</i>	根表土 RS	<i>Pseudomonas syringae</i>	99
NCRS1	大葱 <i>Allium fistulosum</i>	根表土 RS	<i>Pseudomonas migulae</i>	99
PBRP2	花椰菜 <i>Brassica oleracea</i>	根表土 RS		99
PCRP1	大葱 <i>Allium fistulosum</i>	根表面 RP	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	99
MPHP1	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	根内 HP	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	99

RS: Soil adhering to roots; RP: rhizoplan or surface of roots; HP: histoplan or interior of roots.

植物根际存在大量的促生菌,包括固氮菌、溶磷菌、产生生长素菌、生防菌等有益微生物,其功能各不相同。目前,国内外研究人员已对 PGPR 的作用机制进行了许多研究,主要分为直接作用和间接作用(Yang et al., 2009)。其中,直接作用是指 PGPR 菌株将 N、P 等元素转化为植物可吸收利用的营养元素,同时,能合成和分泌 IAA、赤霉素、细胞分裂素等可直接促进植物生长。间接作用是指 PGPR 菌株通过产生抗菌物质、增强植物抗性、提高土壤肥力等途径改善植物生境,间接促进植物的生长,从而增加产量。综上,不同植物根际促生菌的促生机理存在多

样性,即使是同一种促生菌在不同植物上也会产生不同的作用效果。因此,需要针对不同的寄主和环境选择最适宜的促生菌,更好地促进植物生长和生防效果,也符合农牧业可持续发展的要求,并具有良好的研发应用前景。

参 考 文 献 (References)

Aslantaş R, Çakmakçı R, Şahin F. 2007. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. Scientia Horticulturae, 111(4): 371-377
Bharti N, Barnawal D, Awasthi A, Yadav A, Kalra A. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria alleviate salinity induced negative

- effects on growth, oil content and physiological status in *Mentha arvensis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(1): 45–60
- Chen J, Lu JK, Kang LH, Yang ZD. 2009. Primary identification, capability of phosphate-solubilization and optimization of medium of some microorganism from mangrove. *Microbiology China*, 36(8): 1183–1188 (in Chinese) [陈俊, 陆俊锐, 康丽华, 杨振德. 2009. 红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养. *微生物学通报*, 36(8): 1183–1188]
- Chen SY, Chen ZY, Zhang RS. 2013. Screening and evaluation of antagonistic bacteria against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Plant Protection*, 40(3): 211–218 (in Chinese) [陈思宇, 陈志谊, 张荣胜. 2013. 水稻纹枯病菌拮抗细菌的筛选及鉴定. *植物保护学报*, 40(3): 211–218]
- Chithrashree, Udayashankar AC, Nayaka SC, Reddy MS, Srinivas C. 2011. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, 59(2): 114–122
- El-Sayed SF, Hassan HA, El-Mogy MM. 2015. Impact of bio-and organic fertilizers on potato yield, quality and tuber weight loss after harvest. *Potato Research*, 58(1): 67–81
- Embrandiri A, Singh RP, Ibrahim MH. 2013. Biochemical, morphological, and yield responses of lady's finger plants to varying ratios of palm oil mill waste (decanter cake) application as a bio-fertilizer. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 27: 7[#]
- Erisman JW, Bleeker A, Hensen A, Vermeulen A. 2008. Agricultural air quality in Europe and the future perspectives. *Atmospheric Environment*, 42(14): 3209–3217
- Guo J, Chi J. 2014. Effect of Cd-tolerant plant growth promoting rhizobium on plant growth and Cd uptake by *Lolium multifloru* Lam. and *Glycine max* L. Merr. in Cd-contaminated soil. *Plant and Soil*, 375(1/2): 205–214
- Han WX, Yao T, Xi LQ, Sun HY, Liu WW, Sun LN. 2008. PGPR bio-fertilizers producing and its effect on *Avena sativa* growth and quality development. *Acta Prataculturae Sinica*, 17(2): 75–84 (in Chinese) [韩文星, 姚拓, 席琳乔, 孙红阳, 刘雯雯, 孙丽娜. 2008. PGPR 菌肥制作及其对燕麦生长和品质影响的研究. *草业学报*, 17(2): 75–84]
- Liu DD, Li M, Liu RJ. 2016. Recent advances in the study of plant growth-promoting rhizobacteria in China. *Chinese Journal of Ecology*, 35(3): 815–824 (in Chinese) [刘丹丹, 李敏, 刘润进. 2016. 我国植物根围促生细菌研究进展. *生态学杂志*, 35(3): 815–824]
- Liu JL, Fang F, Shi XH, Chen HY, Yao L, Guo CH. 2013. Isolation and characterization of PGPR from the rhizosphere of the *Avena sativa* in saline-alkali soil. *Acta Prataculturae Sinica*, 22(2): 132–139 (in Chinese) [刘佳莉, 方芳, 史煦涵, 陈红艳, 姚琳, 郭长虹. 2013. 2株盐碱地燕麦根际促生菌的筛选及其促生作用研究. *草业学报*, 22(2): 132–139]
- Liu LW, Liu LY, Hu TL, Wang YN, Wang ST, Cao KQ. 2016. Biocontrol effect of *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 against apple replant disease. *Journal of Plant Protection*, 43(5): 812–818 (in Chinese) [刘力伟, 刘丽媛, 胡同乐, 王亚南, 王树桐, 曹克强. 2016. 荧光假单胞菌 SS101 对苹果再植病害的生防效果. *植物保护学报*, 43(5): 812–818]
- Liu YZ, Chen ZY, Liang XJ, Zhu JH. 2012. Screening, evaluation and identification of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Ralstonia solanacearum*. *Chinese Journal of Biological Control*, 28(1): 101–108 (in Chinese) [刘邮洲, 陈志谊, 梁雪杰, 朱剑花. 2012. 番茄枯萎病和青枯病拮抗细菌的筛选、评价与鉴定. *中国生物防治学报*, 28(1): 101–108]
- Ma WB, Yao T, Wang GJ, Zhang YX, Rong LY. 2014. Assessment of rhizobacteria strains for *Vicia sativa*. *Acta Prataculturae Sinica*, 23(5): 241–248 (in Chinese) [马文彬, 姚拓, 王国基, 张玉霞, 荣良燕. 2014. 根际促生菌筛选及其接种剂对箭筈豌豆生长影响的研究. *草业学报*, 23(5): 241–248]
- Mal B, Mahapatra P, Mohanty S. 2015. Effect of diazotrophs and chemical fertilizers on production and economics of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) cultivars. *American Journal of Plant Sciences*, 5(1): 168–174
- Nautiyal CS. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1): 265–270
- Piromy P, Buranabanyat B, Tantasawat P, Tittabutr P, Boonkerd N, Teamroong N. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology*, 47(1): 44–54
- Rasul G, Mirz MS, Latif F, Malik KA. 1998. Identification of plant growth hormones produced by bacterial isolates from rice, wheat and Kallar grass. // Malik KA, Mirza MS, Ladha JK. Nitrogen fixation with non-legumes. *Developments in Plant and Soil Sciences Book Series*. Dordrecht: Springer, 79: 25–37
- Rong LY, Chai Q, Yao T, Zhang R, Feng J, Yang H, Cao L, Zhu Q. 2015. Partial replacement of chemical fertilizer by compound microbial inoculant and potential for promoting growth of intercropped *Zea mays* and *Pisum sativum*. *Acta Prataculturae Sinica*, 24(2): 22–30 (in Chinese) [荣良燕, 柴强, 姚拓, 张榕, 冯今, 杨浩, 曹蕾, 朱倩. 2015. 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. *草业学报*, 24(2): 22–30]
- Rong LY, Yao T, Zhao GQ, Chai Q, Xi LQ, Wang XL. 2011. Screening of siderophore-producing PGPR bacteria and their antagonism against the pathogens. *Plant Protection*, 37(1): 59–64 (in Chinese) [荣良燕, 姚拓, 赵桂琴, 柴强, 席琳乔, 王小利. 2011. 产铁载体 PGPR 菌筛选及其对病原菌的拮抗作用. *植物保护*, 37(1): 59–64]
- Sun GZ, Yao T, Liu T, Lu H. 2014. Antagonism of plant growth promoting rhizobacteria on three soil-borne fungous pathogen. *Microbiology China*, 41(11): 2293–2230 (in Chinese) [孙广正, 姚拓, 刘婷, 卢虎. 2014. 植物根际促生菌对 3 种土传真菌病害病原的抑

- 制作用. 微生物学通报, 41(11): 2293–2230]
- Tian H, Zhang DG, Yao T, Xi LQ. 2005. Isolation and characteristics of nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of turfgrass. Grassland of China, 27(5): 47–52 (in Chinese) [田宏, 张德罡, 姚拓, 席琳乔. 2005. 禾本科草坪草固氮菌株筛选及部分特性初步研究. 中国草地学报, 27(5): 47–52]
- Turan M, Gulluce M, Karadayi M, Sahin F. 2011. Role of soil enzymes produced by PGPR strains in wheat growth and nutrient uptake parameters in the filed conditions. Current Opinion in Biotechnology, 22: 133–140
- Wang J, Kong FY, Chen XH, Tian H. 2015. The inhibitory effect of *Bacillus pumilus* AR03 against tobacco anthracnose. Plant Protection, 41(1): 104–107 (in Chinese) [王静, 孔凡玉, 陈晓红, 田华. 2015. 短小芽孢杆菌 AR03 对烟草炭疽病的抑制作用. 植物保护, 41(1): 104–107]
- Xi LQ, Li DF, Wang JF, Ma JP, Zhang LL. 2008. Measurement of nitrogen fixation capability and excreted IAA capability of PGPB isolated from cotton rhizosphere in salina. Arid Zone Research, 25(5): 690–694 (in Chinese) [席琳乔, 李德锋, 王静芳, 马金萍, 张利莉. 2008. 棉花根际促生菌固氮和分泌生长激素能力的测定. 干旱区研究, 25(5): 690–694]
- Xu WL, Tang GM, Ge CH, Wang XH, Liu H. 2015. Effects of long-term fertilization on diversities of soil microbial community structure and function in grey desert soil of Xinjiang. Acta Ecologica Sinica, 35(2): 468–477 (in Chinese) [徐万里, 唐光木, 葛春辉, 王西和, 刘骅. 2015. 长期施肥对新疆灰漠土壤微生物群落结构与功能多样性的影响. 生态学报, 35(2): 468–477]
- Yang J, Kloepper JW, Ryu CM. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends in Plant Science, 14(1): 1–4
- Yao T. 2004. Associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Avena sativa* in an alpine region II. Phosphate-solubilizing power and auxin production. Acta Prataculturae Sinica, 13(3): 85–90 (in Chinese) [姚拓. 2004. 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. 草业学报, 13(3): 85–90]
- Yao T, Long RJ, Wang G, Hu ZZ. 2004a. Isolation and characteristics of associative symbiotic nitrogen bacteria from rhizosphere of wheat in Lanzhou area. Acta Pedologica Sinica, 41(3): 444–448 (in Chinese) [姚拓, 龙瑞军, 王刚, 胡自治. 2004a. 兰州地区盐碱地小麦根际联合固氮菌分离及部分特性研究. 土壤学报, 41(3): 444–448]
- Yao T, Pu XP, Zhang DG, Li JH. 2004b. Associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Avena sativa* in an alpine region III. Effect on *Avena sativa* growth and quantification of nitrogen fixed. Acta Prataculturae Sinica, 13(5): 101–105 (in Chinese) [姚拓, 蒲小鹏, 张德罡, 李金花. 2004b. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究 III. 固氮菌对燕麦生长的影响及其固氮量测定. 草业学报, 13(5): 101–105]
- Yu XM, Hou CM, Wang HR, An M, Zhang Q, Wang ZT, Zhou GF. 2014. Colonization of *Bacillus subtilis* Bs-15 in Jujube plant and soil and its influence on the microbial diversity in the soil. Chinese Journal of Biological Control, 30(4): 497–502 (in Chinese) [余贤美, 侯长明, 王海荣, 安森, 张琼, 王中堂, 周广芳. 2014. 枯草芽孢杆菌 Bs-15 在枣树体内和土壤中的定殖及其对土壤微生物多样性的影响. 中国生物防治学报, 30(4): 497–502]
- Zhou JJ. 2013. Screen for plant growth promoting bacteria and investigations on endophytic nitrogen-fixers in vegetables. Master Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [周建娇. 2013. 促生菌筛选及蔬菜内生固氮菌研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]

(责任编辑: 李美娟)