

# 植物根际促生菌 F13 的筛选、 鉴定及对豆角促生、抗病的效果\*

梁卫驱<sup>1,2</sup>, 胡珊<sup>1</sup>, 黄皓<sup>1</sup>, 郑伟才<sup>1</sup>, 喻孟君<sup>1</sup>,  
陈彦<sup>1</sup>, 陈淑慰<sup>1</sup>, 徐匆<sup>1</sup>, 罗华建<sup>1</sup>, 刘孝龙<sup>2,3</sup>

1. 东莞市农业科学研究中心, 广东 东莞 523000
2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275
3. 中国科学技术大学化学与材料科学学院, 安徽 合肥 230026

**摘要:** 为获得具有药肥双效的多功能植物根际促生菌, 从葡萄根际土壤中分离出同时具有溶磷解钾功能的菌株 F13。该菌通过形态学观察、生理生化检测和 16S rDNA 比对, 鉴定为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。经平板对峙法测定菌株 F13 对 8 种植物病原菌的抑制率为 63.26%~81.53%。田间应用中发现, 菌株 F13 发酵液灌根处理对豆角(*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.) 生长具有显著的促进作用, 其中实验组在株高、叶片数、茎粗方面分别高于对照组 26.7%、24.4%、11.9%, 产量高于对照组 39.68%; 在植株吸收磷、钾元素方面分别高于对照组 11.5%、46.8%; 在豆角果实中维生素 C、可溶性蛋白含量方面分别高于对照组 22.15%、55.55%。此外, 菌株 F13 对豆角白粉病的相对防效达 71.92%。因此, 菌株 F13 是一株具有巨大应用潜力的药肥双效植物根际促生菌。

**关键词:** 植物根际促生菌; 促生作用; 拮抗作用

中图分类号: S154.3 文献标志码: A 文章编号: 2097-0137(2024)02-0150-10

## Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria F13 and its effect on growth promotion and disease resistance of cowpea

LIANG Weiqu<sup>1,2</sup>, HU Shan<sup>1</sup>, HUANG Hao<sup>1</sup>, ZHENG Weicai<sup>1</sup>, YU Mengjun<sup>1</sup>,  
CHEN Yan<sup>1</sup>, CHEN Shuwei<sup>1</sup>, XU Cong<sup>1</sup>, LUO Huajian<sup>1</sup>, LIU Xiaolong<sup>2,3</sup>

1. Dongguan Agricultural Science Research Center, Dongguan 523000, China
2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China
3. College of Chemistry and Materials Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

**Abstract:** In order to obtain a plant growth-promoting rhizobacteria with dual effects of medicine and fertilizer, a bacteria strain, named as F13, which has the function of dissolving phosphorus and potassium, was isolated from the grape rhizosphere soil. The bacterium was identified as *Pseudomonas aeruginosa* by morphological observation, physiology and biochemistry and 16S rDNA identification. The plate

\* 收稿日期: 2023-06-21 录用日期: 2023-08-09 网络首发日期: 2023-10-23  
基金项目: 广东省科技计划项目(2017A020208002); 东莞市科技转化与推广服务项目(2019B0302)  
作者简介: 梁卫驱(1980年生), 男; 研究方向: 农业生物技术; E-mail: 75426838@qq.com  
通信作者: 胡珊(1981年生), 女; 研究方向: 农业生物技术; E-mail: 29657166@qq.com  
刘孝龙(1985年生), 男; 研究方向: 生物技术; E-mail: liuxl85@ustc.edu.cn  
(胡珊、刘孝龙为共同通信作者)

confrontation method determined that the fermentation broth of strain F13 had an antagonistic effect on 8 kinds of plant pathogens, and the antibacterial rate was between 63.26% and 81.53%. In the field application, it was found that the root irrigation of the strain F13 had a significant effect on the growth of cowpea. The experimental group was 26.7%, 24.4%, and 11.9%, respectively, higher than that of the control group in terms of plant height, number of leaves, and stem diameter, and the yield increased by 39.68%. Compared with the control group, the experimental group increased phosphorus and potassium by 11.5% and 46.8%, and increased vitamin C and soluble protein content by 22.15% and 55.55%, respectively. In addition, strain F13 had a good control effect on cowpea powdery mildew, and the control efficacy in field reached 71.92%. Therefore, strain F13 is a rhizosphere growth-promoting bacterium with great potential for application of medicine and fertilizer.

**Key words:** plant growth-promoting rhizobacteria; promoting effect; antagonistic action

近年来,为了更好地促进作物生长和防治作物病害,大量农业化学品被投入使用,导致农药、酰胺酯、激素、抗生素、抗性基因及病原微生物等非生物和生物的污染物在农田中不断积累,造成了一系列资源环境问题(何艳等,2018;李志明等,2019)。2016年以来,为促进农业可持续发展,国家陆续出台了相关政策,农业农村部也提出了我国农业要实现“农药化肥双减”的目标(王博等,2019)。由此,绿色高效的生物类肥料和农药替代化学类肥料和农药,是今后肥料产业的主要发展趋势(孙韵雅等,2020; Chopra et al., 2020)。

植物根际促生菌(PGPR)是生存在植物根际土壤微环境中,既可产生生长素、赤霉素等植物激素,促进植物的生长发育,还能通过相关代谢产物的拮抗作用抑制植物病原体,减缓植物病害,其应用潜力被广泛认可(Khan et al., 2010; Mousa et al., 2016; Gamez et al., 2019)。然而,目前在中国市场上,以PGPR为有效成分的生物制剂仍然较少,其质量良莠不齐(李建宏,2017)。由此,筛选出具有双重功效(既有肥效又抑菌)且稳定的PGPR菌株进行推广应用,有利于我国现代农业的可持续发展。

本研究以溶磷作为最初的筛选标准筛选出菌株F13,并对其进行菌株鉴定,实验室条件下研究其抗病、促进生长的应用潜力。实际应用条件下研究其抗病、促进生长的效果,为PGPR替代部分化学肥料和农药的实际应用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 培养基 解磷细菌固体培养基、CAS检测培养基、解钾菌固体培养基购自海博生物技术有

限公司;PDA琼脂培养基、营养琼脂培养基购自环凯微生物科技有限公司;蒙金娜有机磷固体培养基:称取葡萄糖10.0 g、碳酸钙5.0 g、七水硫酸镁0.3 g、氯化钠0.3 g、硫酸铵0.5 g、七水硫酸亚铁0.03 g、七水硫酸锰0.03 g,将预先溶解于 $\varphi=75\%$ 乙醇的卵磷脂1.0 g,溶解于超纯水中并定容至1 L,调pH至7.2~7.4;金氏B培养基:将10 g蛋白胍、1.5 g磷酸氢二钾、1.5 g七水硫酸镁及10 mL甘油溶解在超纯水中,并定容至1 L,调pH至7.0。

1.1.2 供试植物病原菌 玉米小斑病菌(*Cochliobolus heterostrophus*)、水稻纹枯病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*)、辣椒炭疽病菌(*Rhizoctonia solani*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*)、甘蔗赤腐病菌(*Colletotrichum falcatum*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、花生褐斑病菌(*Cercospora arachidicola*)和冬瓜根腐病菌(*Fusarium solani*),由华南农业大学植物病理系提供。

1.1.3 供试豆角品种 靛翡12号豆角(*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.),购自河北慕兰多种子有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 溶磷菌株的筛选

1) 溶磷菌株的初筛。采用5点采样法对广东东莞葡萄种植园(东经113°45'26",北纬22°57'8")的葡萄根际土壤进行采样,混匀后的样品置于无菌自封袋,4℃保存。样品10 g加入90 mL无菌水中,37℃、120 r/min振荡1 h,梯度稀释至土壤悬浮液的 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 倍,各稀释液取100  $\mu$ L均匀涂布溶磷平板上,37℃培养箱培养3~5 d,观察是否有溶磷圈,选择溶磷圈较大的菌落划线纯化,

纯化后的菌株转入 30%( $\varphi$ )甘油管中,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

2) 溶磷圈法复筛。对初筛菌株进行复筛, 将菌株点接于解磷固体培养基, 每个菌株 3 个重复,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 3 d, 测量溶磷圈直径( $D$ )与菌落直径( $d$ )的大小, 计算菌株溶磷指数

$$T = D/d.$$

### 1.2.2 菌株鉴定

1) 形态学观察。通过观察菌体形态、有无芽孢、芽孢形态及着生位置、革兰氏染色结果进行菌株鉴定。

2) 生理生化鉴定。采用 API 细菌鉴定系统(API 20NE 和 API 20E)进行鉴定。

3) 16S rDNA 鉴定。使用细菌 16S rDNA 通用引物

27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'),

1492R (5'-TACGGCTACCTGTTACGACTT-3')

对菌株基因组进行扩增。将 PCR 产物测序结果在 NCBI 中进行 Blastn 比对, 获得菌株的分子鉴定结果。取与菌株同源性较高的 16S rDNA 序列, 利用 MEGA 11.0 构建其系统进化树。

### 1.2.3 菌株拮抗作用的研究

1) 制备菌株发酵液。在 LB 培养基中接入菌株单菌落, 于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min 培养 18 h 后调整菌液  $A_{600}$  至 1.0。取 1.5 mL 菌液接至 100 mL LB 培养基中, 于  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 6 d, 即得发酵液。

2) 平板对峙法测定抑菌谱。在 PDA 平板中心接种直径为 6 mm 的病原菌菌饼, 菌丝面朝下。实验组在距病原菌菌饼 2 cm 处的培养基上垂直滴 20  $\mu\text{L}$  发酵菌液, 对照组不接种发酵菌液。 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养至对照组菌丝满板时, 测量实验菌株与病原真菌的距离。病原真菌菌丝生长抑制率  $A$  计算方式为

$$A = [(\bar{d}_c - \bar{d}_i) / \bar{d}_c] \times 100\%,$$

其中  $\bar{d}_c$  为对照组菌落直径平均值,  $\bar{d}_i$  为实验组菌落直径平均值。

1.2.4 KB 药敏试验 在 LB 培养基中接入菌株,  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min 培养 24 h。将菌液均匀涂于固体培养基表面, 并以一定间隔粘帖 K-B 药敏纸片, 在  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 24 h。采用游标卡尺测量抑菌圈直径, 以 NCCLS 药敏试验标准判定菌株的耐药性。

### 1.2.5 促生拮抗因子检测

1) 解钾能力。将菌株 F13 在解钾培养基上划线,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 72 h 后, 依据平板上是否有光滑、透明、油滴状的菌落来检测菌株的解钾能力。

2) 产嗜铁素能力。将菌株 F13 接种于 CAS 检测平板上。在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  的培养箱中培养 5 d, 通过菌落

周围是否出现橙色或者深黄色晕圈来检测菌株是否有产嗜铁素的能力。

3) 产蛋白酶能力。将菌株 F13 接种于酪蛋白检测平板上,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 3 d, 根据菌落周围是否产生蓝色透明圈来表明菌株是否有产蛋白酶的能力。

1.2.6 对豆角白粉病的田间防治试验 将划线培养的单克隆菌株接种至 LB 液体培养基中,  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min 培养 18 h 后调整菌液  $A_{600}$  至 1.0。取 1.5 mL 菌液接至 100 mL LB 培养基中,  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 6 d, 即得菌株发酵液。

田间防效试验设置 2 个处理。处理 1: 将发酵液稀释 50 倍后喷施于豆角叶面; 处理 2: 清水对照。选取 3 个豆角白粉病发病小区作 3 个重复的处理试验区。每隔 5 d 喷施 1 次发酵液, 共喷施 2 次。喷施均匀, 喷头朝上, 药液均匀喷湿叶片正反面, 液滴以欲滴未滴为宜, 各处理均实施常规田间管理。对不同组别进行病情调查, 调查时间分别为施药前、第 1 次喷药 4 d 后、第 1 次喷药 9 d 后。每小区随机抽取 10 棵豆角调查病害情况, 每棵调查 5~8 片叶, 每片叶按白粉病病斑面积( $S$ )的百分比分级, 防治效果根据以下公式计算

$$E = \frac{\sum(n \times s)}{N \times s_{\max}} \times 100\%,$$

$$F = [(E_c - E_i) / E_c] \times 100\%,$$

其中  $E$  为病情指数,  $n$  为各级叶片总数,  $N$  为调查总叶片数,  $s$  为各级代表值,  $s_{\max}$  为最高值代表值,  $F$  为防治效果,  $E_c$  为对照组病情指数,  $E_i$  为处理组病情指数。

病害分级标准, 将叶片白粉病病斑面积( $S$ )的百分比分为 6 级。0 级: 叶片健康、无病斑; 1 级:  $S \leq 10\%$ ; 3 级:  $11\% \leq S \leq 20\%$ ; 5 级:  $21\% \leq S \leq 30\%$ ; 7 级:  $31\% \leq S \leq 50\%$ ; 9 级:  $S > 50\%$ 。

1.2.7 对豆角的促生增产能力 菌株发酵液制备同 1.2.6。

选取 7~8 叶期的豆角苗用发酵液进行灌根处理, 处理组: 将发酵菌液稀释 50 倍, 取 300 mL 均匀浇灌在根周围的土壤。对照组: 浇灌 300 mL 稀释 50 倍的无菌 LB 培养基。每个试验组 50 株豆角, 7 d 后重复灌根 1 次。处理后 15 d, 每个试验组随机取 8 棵豆角, 测定其叶片数、株高、茎粗等生长指标, 计算促生增幅; 豆角收获完成后, 计算每个处理的产量。

1.2.8 对豆角植株磷元素、钾元素吸收的影响 采用火焰光度计测定植株钾含量, 钒钼黄比色法测定植株磷含量(何艳慧, 2020)。

### 1.2.9 对豆角果实中VC、蛋白质含量的影响

1) 对豆角果实中VC含量的影响。称取20 g豆角的可食用部分, 在20 mL  $\varphi=1\%$ 的草酸溶液中研磨成匀浆, 浆液在9 000 r/min的条件下离心10 min, 收集上清液, 用蒸馏水定容至100 mL。取1 mL稀释浆液转移至10 mL容量瓶, 继续用蒸馏水稀释并定容。以蒸馏水为对照, 在265 nm波长下检测吸光度, 建立标准曲线并计算VC含量。

2) 对豆角果实中蛋白质含量的影响。称取30 g豆角的可食用部分, 在30 mL磷酸缓冲溶液中研磨为匀浆, 将浆液在9 000 r/min下离心10 min。在250  $\mu\text{L}$ 考马斯亮蓝G-250中加入5  $\mu\text{L}$ 上清液, 混合均匀, 并在595 nm处下检测吸光度。依据建立的标准曲线计算蛋白质含量。

1.2.10 数据处理 采用统计软件SPSS 25.0统计分析数据, 图表中数据为平均值 $\pm$ 标准差。采用单因素方差分析中的LSD对不同组别差异显著性进行分析( $\alpha=0.05$ )。

## 2 实验结果

### 2.1 溶磷菌株的筛选结果

利用解磷细菌培养基对葡萄根际土壤进行溶磷细菌筛选, 挑取其中6株菌落形态不同、生长速度快, 具有较大溶磷圈的菌株, 并采用溶磷圈法考察各菌株的解磷能力。表1为各菌株直径及溶磷透明圈直径。各菌株溶磷指数( $D/d$ )值范围为2.98~4.25,  $D/d$ 值最大的菌株是菌F13, 达到了 $4.25\pm 0.20$ , 图1表明菌F13具有较强的溶磷活性。

表1 菌株的溶磷能力

Table 1 Phosphate solubilization capacity of different strains

菌株	$D/\text{mm}$	$d/\text{mm}$	$D/d$
F2	$12.87\pm 0.60$	$4.81\pm 0.23$	$2.68\pm 0.19$
F4	$18.20\pm 0.36$	$5.25\pm 0.11$	$3.47\pm 0.10$
F7	$26.67\pm 0.71$	$8.98\pm 0.39$	$2.98\pm 0.15$
F11	$19.60\pm 0.82$	$7.16\pm 0.19$	$2.74\pm 0.04$
F13	$22.57\pm 0.37$	$5.31\pm 0.40$	$4.25\pm 0.20$
F20	$19.40\pm 0.82$	$5.96\pm 0.35$	$3.27\pm 0.26$

### 2.2 菌株鉴定结果

2.2.1 菌落培养特征 菌株F13在培养基上划线, 36  $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h, 如图2所示, 菌落表面光滑、湿润、扁平、有光泽、边缘不规则, 呈淡黄色。如图3所示, F13为革兰氏阴性菌, 菌体呈单个、成双或短链状排列。

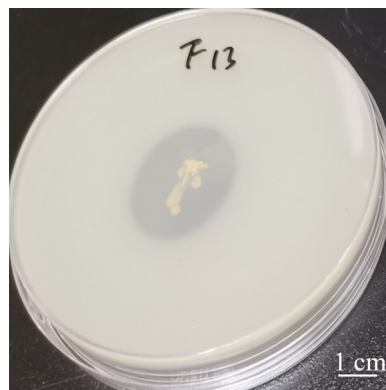


图1 菌株F13的溶磷圈

Fig. 1 Phosphate-solubilizing transparent circle of strain F13

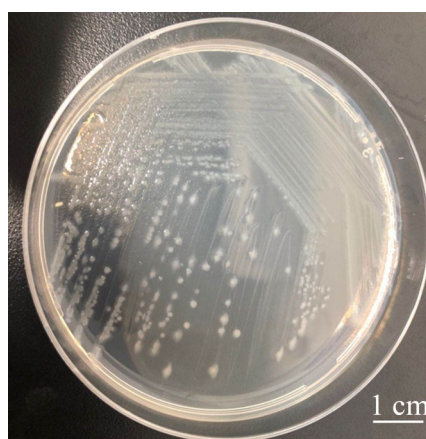


图2 菌株F13培养基上的菌落图片

Fig. 2 Colony morphology of strain F13

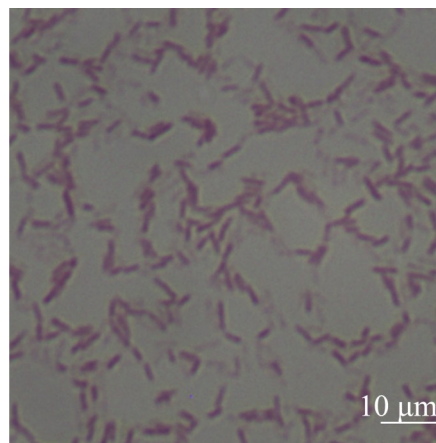


图3 菌株F13革兰氏染色

Fig. 3 Gram stain of strain F13

2.2.2 生理生化特性 如表2所示, 菌株能利用的碳源有蔗糖、果糖、甘露醇、肌醇、乳糖、半乳糖、甘油、阿拉伯糖、鼠李糖等; 不能利用的有蜜三糖、麦芽糖、水杨甙。能水解淀粉、液化明胶, 接触酶阳性, 不能产生吲哚。

2.2.3 16S rDNA 鉴定结果 菌株F13 16S rDNA

表 2 菌株 F13 的生理生化鉴定结果<sup>1)</sup>

Table 2 Physiological and biochemical identification results of strain F13

生理生化 试验	检测 结果	生理生化 试验	检测 结果	生理生化 试验	检测 结果
柠檬酸盐	+	吡啶试验	-	甲基红	+
接触酶	+	淀粉水解	+	明胶液化	+
乳糖	+	果糖	+	木糖	+
甘露醇	+	甘油	+	阿拉伯糖	+
蔗糖	+	肌醇	+	鼠李糖	+
半乳糖	+	阿拉伯 半乳糖	+	麦芽糖	-
水杨甙	-	蜜三糖	-		

1) “+”表示可生长、利用;“-”表示不可生长、利用。

的 PCR 产物见图 4。将 PCR 产物测序结果在 NCBI 中进行 Blastn 比对。序列比对结果表明菌株 F13 与 *Pseudomonas aeruginosa* strain YW1 同源性达 100%。

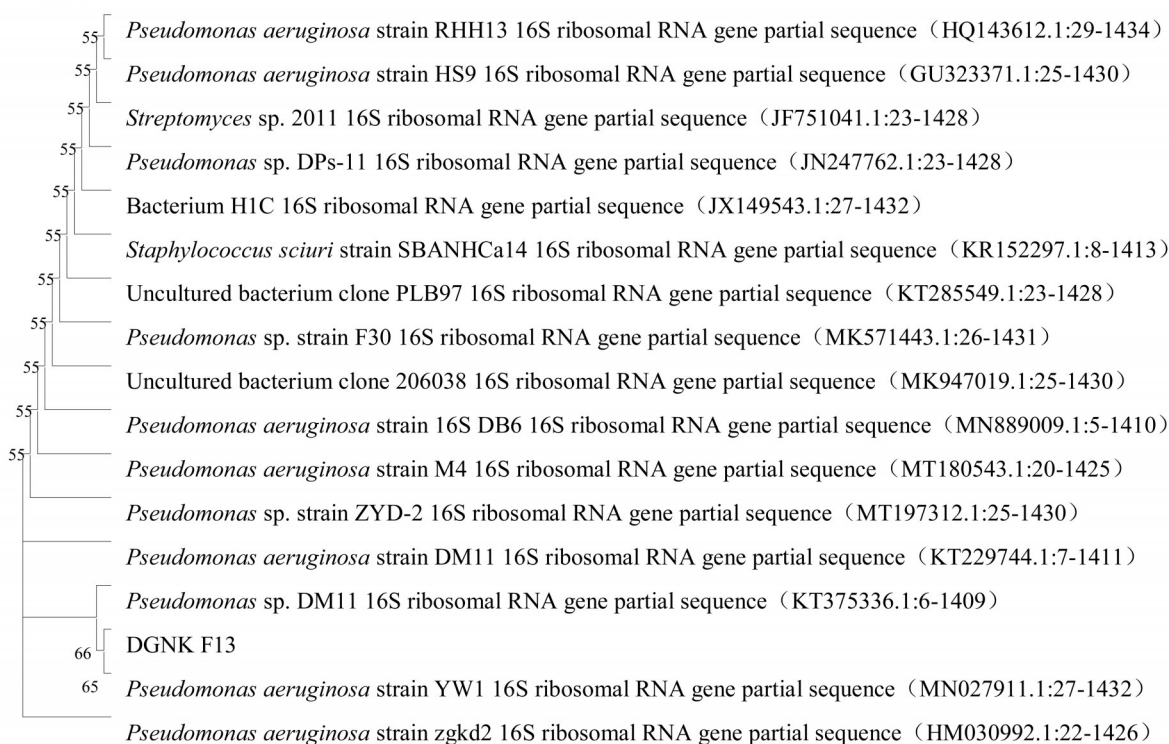
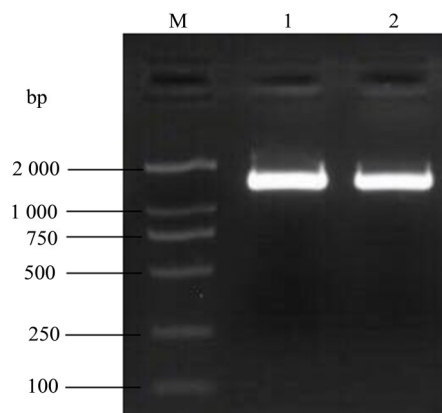


图 5 基于 16S rDNA 序列的菌株 F13 系统发育进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain F13 based on 16S rDNA sequence

### 2.3 菌株 F13 对病原真菌的拮抗作用

菌株 F13 对病原真菌的拮抗效果如表 3 所示。菌株 F13 发酵液对 8 种植物病原真菌的生长抑制率在 63.26% ~ 81.53% 之间, 其中对玉米小斑病菌、花生褐斑病菌的抑制率超 80%。



M: DNA Maker; 1, 2: PCR 产物。

图 4 菌株 F13 16S rDNA 的 PCR 产物电泳结果

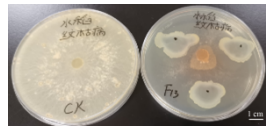
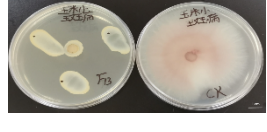

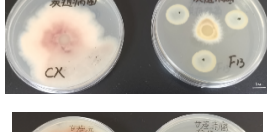
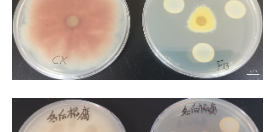
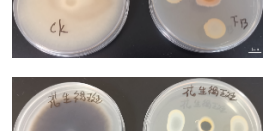
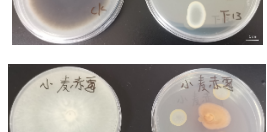

Fig. 4 Electrophoresis result of PCR products of 16S rDNA of strain F13

在序列比对的基础上, 利用 MEGA 11.0 软件构建了该菌株系统进化树(图 5)。经形态学分析、生理生化分析及分子鉴定, 菌株 F13 为铜绿假单胞菌。

### 2.4 菌株 F13 药敏实验结果

表 4 所示为菌株 F13 对 15 种抗生素的药敏结果, 其中, F13 对氨苄西林、氯霉素和万古霉素等 7 种抗生素耐药, 对四环素、链霉素等 4 种抗生素中度敏感, 对诺氟沙星、庆大霉素等 4 种抗生素高度敏感。

表3 菌株F13对植物病原真菌的拮抗作用  
Table 3 Antagonistic effect of strain F13 on plant fungal diseases

植物病原真菌	对照菌落直径/cm	处理菌落直径/cm	抑菌率/%	培养基菌落图
水稻纹枯病菌	8.57±0.04	1.93±0.12	77.48	
玉米小斑病菌	8.07±0.25	1.50±0.10	81.41	
香蕉枯萎病菌	7.60±0.30	1.83±0.15	75.92	
辣椒炭疽病菌	6.07±0.25	2.23±0.06	63.26	
甘蔗赤腐病菌菌	8.23±0.25	1.97±0.15	76.06	
冬瓜根腐病菌	8.57±0.15	2.03±0.15	76.31	
花生褐斑病菌	7.20±0.20	1.33±0.15	81.53	
小麦赤霉病菌	8.68±0.02	2.40±0.10	72.35	

## 2.5 菌株F13促生拮抗因子检测结果

菌株F13促生拮抗因子检测结果如图6a~b所示, 菌株F13既能产铁载体又可分泌胞外蛋白酶; 在解钾培养基上能生长成透明的光滑的油滴状的菌落(图6c), 说明该菌株具有解钾能力。

## 2.6 菌株F13防治大田豆角白粉病的初步效果

白粉病是一种由真菌感染引起的植物常见病害, 会危害植物的叶片、叶梢及果实与茎秆。从表5、图7中可知, 豆角叶片经喷施发酵液9d后, 其白粉病病斑已基本消失, 表明菌株F13发酵液对豆角白粉病有优良的防治效果。

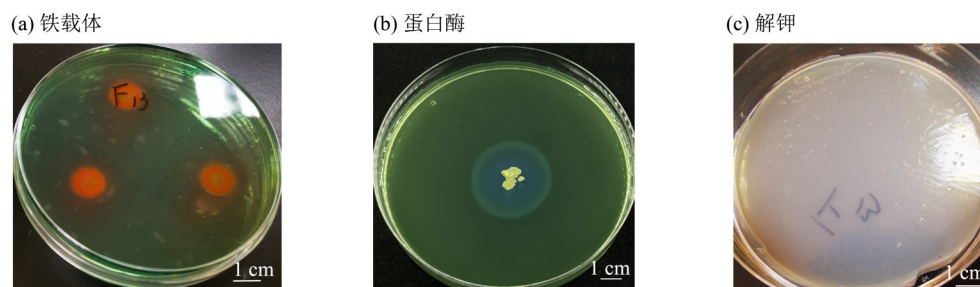


图6 菌株F13促生拮抗因子的测定结果

Fig. 6 Results of growth promoting and antagonistic factors by strain F13

表4 药敏实验结果<sup>1)</sup>  
Table 4 Antimicrobial susceptibility test results of strain F13

抗菌素	含药量/( $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	抑菌圈直径 $d/\text{mm}$	敏感性
氨苄西林	0.5	0	R
万古霉素	1.5	2.07±0.12	R
丁胺卡那霉素	1.5	2.43±0.09	R
利福平	0.25	0	R
亚胺培南	0.5	8.67±0.94	R
氯霉素	1.5	0	R
阿莫西林	1.0	0	R
多西环素	1.5	12.67±1.25	I
四环素	1.5	10.33±0.47	I
萘啶酸	1.5	13.67±1.25	I
链霉素	0.5	13.00±1.63	I
恩诺沙星	0.5	27.33±1.25	S
诺氟沙星	0.5	30.67±1.25	S
卡那霉素	1.5	24.67±0.47	S
庆大霉素	0.5	27.67±1.70	S

1) R表示低敏或耐药( $0\text{ mm}\leq d<10\text{ mm}$ ); I表示中敏( $10\text{ mm}\leq d\leq 15\text{ mm}$ ); S表示高敏( $d>15\text{ mm}$ )。

表5 菌株F13对豆角白粉病的防治效果<sup>1)</sup>  
Table 5 Effect of strain F13 on cowpea powdery mildew

处理	药前病情指数	用药后 4 d		用药后 9 d	
		病情指数	防治效果/%	病情指数	防治效果/%
菌株F13发酵液	7.62±0.71	9.41±0.56	60.96	12.81±0.56	71.92
清水对照	7.41±0.34	23.85±0.13	—	45.62±0.26	—

1) “—”代表没有防治效果。

## 2.7 菌株F13对豆角的促生增产作用

从表6的结果可以看出,施用菌株F13发酵液后,豆角的生长指标均有增加,其中,植株高度、叶片数、茎粗分别比对照组增加了26.7%、24.4%、11.9%,产量比对照组增加了39.68%,表明菌株F13对豆角有良好的增产促生作用。

## 2.8 菌株F13对豆角吸收磷、钾元素的影响

从图8a中可以看出,施用菌株F13发酵液后,豆角植株中磷、钾元素的含量分别比对照

组增加了11.5%、46.8%。实验结果表明,菌株F13的发酵液能够促进豆角植株对磷、钾元素的吸收。

## 2.9 菌株F13对豆角果实中VC含量和可溶性蛋白含量的影响

从图8b~c中可以看出,施用菌株F13发酵液后,豆角果实中VC、可溶性蛋白的含量分别比对照组增加了22.15%和55.55%。表明菌株F13的发酵液能促进豆角果实中营养成分(VC、可溶性蛋白)的积累。

表6 菌株F13对豆角增产促生的作用  
Table 6 Effect of strain F13 on cowpea growth promotion

项目	株高/cm	叶片数/片	茎粗/mm	果实产量/kg
菌株F13组	128.75±21.81	24.88±2.47	7.73±0.88	44.0
对照组	101.61±17.40	20±2.27	7.17±0.68	31.5



图7 菌株F13对豆角白粉病防治效果

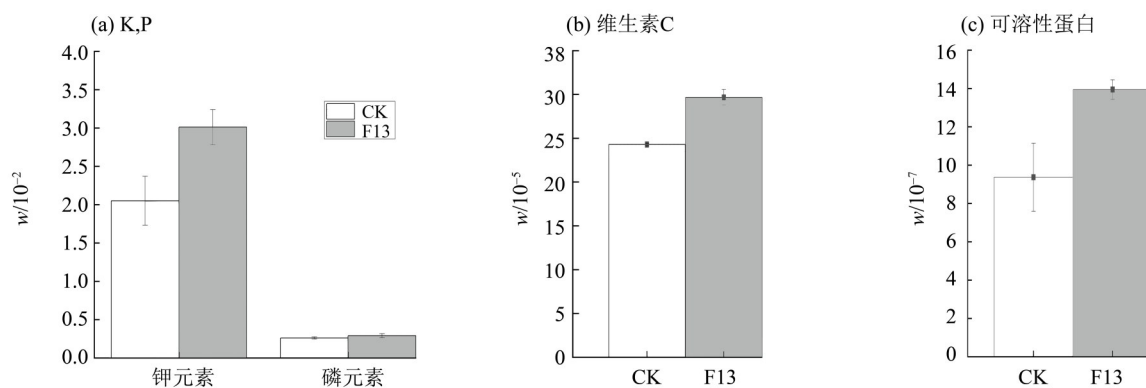
Fig. 7 Effect of strain F13 on cowpea powdery mildew

### 3 讨论

植物对氮、磷、钾的吸收利用直接影响其生长发育, 而土壤中的大部分磷和钾以固态的形式存在, 土壤中能被植物自身直接利用的磷和钾非常有限(张典利等, 2018)。目前我国传统农业主要通过大量使用化肥来实现增产, 我国的化肥存在使用量大、利用效率低、造成严重环境污染的问题(崔元培等, 2021; Guo et al., 2021)。利用PGPR菌制作成微生物肥料, 有利于提高土壤的使用效率, 减少化肥造成土壤板结等问题(Reis et al., 2020)。本研究首先以溶磷解钾作为筛选条件, 从

农田中分离得到具有较强的溶磷解钾活性菌株F13, 经鉴定F13为铜绿假单胞菌。此外, 该菌株还可以分泌铁载体, 促进植物吸收铁元素。在间接促生方面, 该菌可以拮抗香蕉枯萎病菌、冬瓜根腐病菌、甘蔗赤腐病菌、水稻纹枯病菌等8种植物病原菌, 具有较强的防病功能。由于该菌同时具有促生肥效以及抗病的作用, 具有较强的应用价值。

豆角属豆科一年生蔬菜, 在我国北方地区广泛栽培, 其生长发育过程离不开氮、磷、钾、钙、硼、镁等多种营养元素, 生长过程中易患真菌感染导致的白粉病(杨增梅, 2021)。目前主要采用施加有机肥或无机肥的方式对豆角进行培育增产, 采用施加抗菌剂的方式对豆角进行病害防治(张祥会等, 2021)。然而, 大量化肥及杀菌剂的使用容易导致土壤板结、理化性质恶化、养分不平衡及利用率低, 造成环境恶化及资源的浪费(Majeed et al., 2018)。为了推进农业的可持续发展, 多种PGPR菌被研发并应用于蔬菜及粮食种植中, 但目前仍未有PGPR菌对豆角增产及病害防治的报道。菌株F13可通过溶磷解钾作用显著增加豆角的株高、茎粗、叶片数, 以及果实产量, 并且该促生方案相比以往的有机肥和无机肥的促生方案仍然具有显著优势。张祥会等(2021)发现, 采用有机肥+无机肥配施处理可使豆角增产29.44%, 而PGPR菌株F13则可使豆角增产达到约40%。此外, 施加菌株F13可明显提高豆角可溶性蛋白、维生素C的含量, 证明在菌株F13干预后, 豆角果实品质也有明显提升。除增产效果外, 本研究发现菌株F13的施用可以防治豆角白粉病。白粉病作为一种常见的植物病害, 浸染的寄主超过1500个属的植物(Seddigh et al., 2014), 而菌株F13可通过与病菌



CK为未施用菌剂对照组;(a)为植株中的质量分数;(b)和(c)为果实中的质量分数

图8 菌株F13对豆角植株吸收磷、钾元素及果实中维生素C、可溶性蛋白质量分数的影响

Fig. 8 The effects of strain F13 on phosphorus and potassium uptake, as well as vitamin C and soluble protein levels in cowpeas

之间的相互作用达到较好的生物防治效果。此外,本研究表明菌株 F13 能拮抗多种植物病原菌,对防治其他类型的真菌性病害也有一定的应用潜力。

PGPR 的相互作用对于植物的生长和生产力至关重要,许多 PGPR 通过调节植物养分利用率达到直接促生效果(周益帆等, 2023; Anand et al., 2022)。目前已发现,无色菌、假单胞菌、杆状菌、产气杆菌、根瘤菌、产黄菌属等菌可以溶解无机磷,其中杆状菌、假单胞菌和根瘤菌是最有效的解磷菌株(张爱民等, 2015; 闫洪雪等, 2016; Zeng et al., 2022)。对于解钾菌,研究报道较多的有环状芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌和土壤芽孢杆菌(党雯等, 2014)。此外,芽孢杆菌、假单胞菌、肠杆菌以及产碱杆菌为常见产铁载体的微生物(陈姗姗, 2018; Upadhyay et al., 2022)。本研究分离筛选的铜绿假单胞菌 F13 被证明具有溶磷解钾及产生铁载体的作用,在实际应用中可明显提高豆角的产量。对于抗病作用,PGPR 主要通过竞争、拮抗、诱导系统抗性、溶菌作用等途径抑制病原菌(赵晨阳等, 2019; 于文清等, 2020)。具有促生拮抗病原菌能力的微生物种类很多,以假单胞菌和芽孢杆菌两属最为常见(Dutta et al., 2022; Olanrewaju et al., 2022)。由于铜绿假单胞菌能分泌多种拮抗植物病原菌的代谢产物,如有嗜铁素类、吩嗪类、藤黄绿脓菌素类、胞外多糖类、鼠李糖脂以及新型抗生素,使其具有良好的生物防治潜力(Huang et al., 2016; Khan et al., 2022),其中来源于铜绿

假单胞菌 M18 的申嗪霉素原药及其 1% 悬浮剂已获得中国农业部农药登记证(编号:PD20110314、PD20110315)(Ge et al., 2004; 方运玲等, 2014)。目前研究发现了大量具有促生或者抗病作用的 PGPR 菌株,但同时具有促生和抗病的双重功效的菌株还很少见。其中,刘海霞(2022)通过大田试验研究发现铜绿假单胞菌 B-6 可以在番茄植株的根茎基部定殖,对番茄青枯病较好的防治效果,最高防效达 60.27%; 施用其 50 倍发酵稀释液后可以促进细菌的增长,抑制真菌的生长,且土壤微生物群落的多样性和丰富度高于对照;可以促进土壤速效磷、钾元素的增加。张莹等(2017)发现解淀粉芽孢杆菌 L-H15 同时具有固氮溶磷解钾、分泌铁载体和植物激素以及抑制尖孢镰刀菌和立枯丝核菌的能力,但没有进行实际应用的研究。此外,为了同时达到促生以及抗病的效果,谢雨歆等(2017)的研究还提出了使用多功能 PGPR 混合菌剂,从而达到增产以及抗病的作用。本研究发现的菌株 F13 同时具有促生和抗病的双重功效,并检测了该菌株在农田中的实际应用效果,虽然根际分离的铜绿假单胞菌生防菌株相比临床分离的铜绿假单胞菌毒性较低,但仍然对人体和动物具有一定的毒性(蒋海霞等, 2015),后续研究我们将利用分子生物学的技术手段研究其促生、拮抗机理,并进行定向遗传改造,降低其致病性和细胞毒性,为该菌进行开发应用提供安全保障。

## 参考文献:

- 陈姗姗, 2018. 植物根际促生菌(PGPR)的鉴定及其对植物生长的影响[D]. 重庆:重庆师范大学.
- 崔元培, 魏子颀, 王建忠, 等, 2021. “双减”背景下化肥、农药施用现状与发展路径[J]. 北方园艺, (9): 164-173.
- 党雯, 郜春花, 张强, 等, 2014. 解钾菌的研究进展及其在农业生产中的应用[J]. 山西农业科学, 42(8): 921-924.
- 方运玲, 孙爽, 申阅, 等, 2014. 微生物源农药申嗪霉素的研制与应用[J]. 农药学报, 16(4): 387-393.
- 何艳, 冯佳胤, 徐建明, 2018. 我国农田有机和生物污染研究工作展望: 基于“农田有毒有害化学/生物污染与防控机制研究”国家重点研发计划项目工作的思考[J]. 农业环境科学学报, 37(11): 2371-2374.
- 何艳慧, 2020. 解盐促生菌 *Pseudomonas* sp. Rs-198 全基因组学分析及其与植物根际互作机制研究[D]. 石河子: 石河子大学.
- 蒋海霞, 周莲, 何亚文, 2015. 铜绿假单胞菌生防菌株抑菌代谢产物及其生防应用研究进展[J]. 微生物学通报, 42(7): 1338-1349.
- 李建宏, 2017. 优良植物根际促生菌 *Bacillus mycoides* Gnytl 特性研究及全基因组测序分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学.
- 李志明, 吉庆勋, 杨曼利, 等, 2019. 我国农田土壤污染现状及防治对策[J]. 河南农业, 23: 46-49.
- 刘海霞, 2022. 铜绿假单胞菌 B-6 对土壤微生物生态的影响及对番茄青枯病的防效[D]. 太谷: 山西农业大学.
- 孙韵雅, 陈佳, 王悦, 等, 2020. 根际促生菌促生机理及其增强植物抗逆性研究进展[J]. 草地学报, 28(5): 1203-1215.
- 王博, 徐志宇, 王楷, 等, 2019. 1961—2015 年各国化肥消费量与人均 GDP 相关性分析[J]. 农业资源与环境学报, (6): 718-727.
- 谢雨歆, 曾庆宾, 杨军伟, 等, 2017. 植物根际促生细菌在烤

- 烟提质增产中的作用[J].烟草科技, 50(7):14-21+30.
- 闫洪雪,刘露,李丽,等,2016. PGPR的研究进展及其在农业上的应用[J].黑龙江农业科学, (6):148-151.
- 杨增梅,2021.豆角的生长习性和两种病害及其防治[J].农家参谋, 697(13):63-64.
- 于文清,丁洪胜,闫凤超,等,2020.植物根际促生菌促生及御病研究进展[J].现代化农业, (8):53-56.
- 张爱民,李乃康,赵钢勇,等,2015.土壤中解磷、解钾微生物研究进展[J].河北大学学报(自然科学版), 35(4):442-448.
- 张典利,孟臻,亓文哲,等,2018.植物根际促生菌的研究与应用现状[J].世界农药, 40(6):37-43+50.
- 张祥会,马晓晓,董斌,等,2021.不同施肥模式对珠江三角洲豆角产量的影响[J].湖北农业科学, 60(17):23-26.
- 张莹,秦宇轩,尚庆茂,等,2017.解淀粉芽孢杆菌L-H15的促生与抗病特性研究[J].农业机械学报, 48(12):284-291+298.
- 赵晨阳,戴峰,刘述颖,等,2019.植物根际促生菌的研究进展[J].安徽农业科学, 47(16):12-13+24.
- 周益帆,白寅霜,岳童,等,2023.植物根际促生菌促生特性研究进展[J].微生物学通报, 50(2):644-666.
- ANAND U, VAISHNAV A, SHARMA S K, et al, 2022. Current advances and research prospects for agricultural and industrial uses of microbial strains available in world collections[J]. Sci Total Environ, 842: 156641.
- CHOPRA A, BOBATE S, RAHI P, et al, 2020. *Pseudomonas aeruginosa* RTE4: A tea rhizobacterium with potential for plant growth promotion and biosurfactant production[J]. Front Bioeng Biotechnol, 8: 861.
- DUTTA P, MUTHUKRISHNAN G, KUTALINGAM GOPALASUBRAMAIAM S, et al, 2022. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and its mechanisms against plant diseases for sustainable agriculture and better productivity[J]. BIOCELL, 46(8):1843-1859.
- GAMEZ R, CARDINALE M, MONTES M, et al, 2019. Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla) [J]. Microbiol Res, 220:12-20.
- GE Y, HUANG X, WANG S, et al, 2004. Phenazine-1-carboxylic acid is negatively regulated and pyoluteorin positively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18 [J]. Fems Microbiol Lett, 237(1): 41-47.
- GUO Y, WANG J, 2021. Spatiotemporal changes of chemical fertilizer application and its environmental risks in China from 2000 to 2019[J]. Int J Env Res Pub Heal, 18(22): 11911.
- HUANG J, LIU Z, LI S, et al, 2016. Isolation and engineering of plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* for enhanced cadmium bioremediation [J]. J Gen Appl Microbiol, 62(5):258-265.
- KHAN M S, ZAIDI A, AHEMAD M, et al, 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective[J]. Arch Agron Soil Sci, 56 (1): 73-98.
- KHAN M S, GAO J, ZHANG M, et al, 2022. *Pseudomonas aeruginosa* Ld-08 isolated from *Lilium davidii* exhibits antifungal and growth-promoting properties [J]. PLoS One, 17(6): e0269640.
- MAJEED A, KALEEM ABBASI M, HAMEED S, et al, 2018. *Pseudomonas* sp. AF-54 containing multiple plant beneficial traits acts as growth enhancer of *Helianthus annuus* L. under reduced fertilizer input [J]. Microbiol Res, 216:56-69.
- MOUSA W K, SHEARER C, LIMAY-RIOS V, et al, 2016. Root-hair endophyte stacking in finger millet creates a physicochemical barrier to trap the fungal pathogen *Fusarium graminearum* [J]. Nat Microbiol, 1 (12) : 16167.
- OLANREWAJU O S, BABALOLA O O, 2022. Plant growth-promoting rhizobacteria for orphan legume production: Focus on yield and disease resistance in *Bambara* groundnut[J]. Front Sustain Food Syst, 6: 922156.
- REIS V M, ALVES B J R, HARTMANN A, et al, 2020. Beneficial microorganisms in agriculture: The future of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Plant Soil, 451 (1): 1-3.
- SEDDIGH S, KIANI L, TAFAGHODINIA B, et al, 2014. Using aerated compost tea in comparison with a chemical pesticide for controlling rose powdery mildew [J]. Arch Phytopathol Plant Prot, 47(6): 658-664.
- UPADHYAY S K, CHAUHAN P K, 2022. Optimization of eco-friendly amendments as sustainable asset for salt-tolerant plant growth-promoting bacteria mediated maize (*Zea mays* L.) plant growth, Na uptake reduction and saline soil restoration[J]. Environ Res, 211: 113081.
- ZENG Q, DING X, WANG J, et al, 2022. Insight into soil nitrogen and phosphorus availability and agricultural sustainability by plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Environ Sci Pollut Res, 29(30): 45089-45106.