黑龙江农业科学 2022(8):31-35
Heilongjiang Agricultural Sciences
http://hljnykx.haasep.cn
DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2022.08.0031

李立新,徐嘉莉,王茂淋,等.盐碱胁迫下水稻促生菌的筛选[J].黑龙江农业科学,2022(8):31-35.

盐碱胁迫下水稻促生菌的筛选

李立新,徐嘉莉,王茂淋,薛逢伯,李忠悦,陈 晓,黄咏雪,卜媛媛
(东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室/东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:水稻在生长过程中常受到各类非生物胁迫的影响,例如土壤盐碱化、干旱等,进而导致水稻大量减产。为促进盐碱胁迫下植物的生长,从黑龙江省安达盐碱地植物根际土壤中分离得到了 6 株植物根际促生菌(PGPR),并对其促生作用进行初步研究。结果表明,分离到的 6 株植物根际促生菌能够显著促进拟南芥、水稻和玉米在盐碱条件下的生长,使生物量大幅提高。这些 PGPR 均属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),有良好的抗逆性,其分泌的促生物质不尽相同,说明这些根际促生菌具有不同的促生机制。

关键词:盐碱胁迫;植物根际促生菌;芽孢杆菌;促生机制

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

水稻是重要的粮食作物,其品质、产量和栽培面积均受到高度重视[1]。水稻在生长发育过程中要面对各种生物胁迫和非生物胁迫,如干旱、高盐、温度、重金属和病虫害等[2]。土壤盐碱化严重影响水稻的产量。全世界有超过 8.31 亿 hm^2 的农业土地受到盐碱化的威胁,而且持续恶化[3]。盐碱胁迫造成离子毒害、渗透胁迫、氧化损伤和营养缺乏的同时[4],高 pH 胁迫破坏离子稳态、加速 ROS 的积累,从而导致细胞结构受损[3],严重阻碍植物发育。因此,盐碱地改良和恢复措施成为研究热点。植物根际促生菌(PGPR)能够有效促进植物生长,因其成本低且绿色环保受到广泛关注,对 PGPR 促生机制的研究也越来越多。现有研究表明 PGPR 主要是通过分泌 ACC 脱氨酶[5]、吲哚乙酸(IAA)[6]和铁载体[7]等物质,以及具有溶磷和固氮能力等发挥促生作用。

本研究从黑龙江省安达碱性盐碱地植物根际土壤中分离得到了 6 株促生菌,通过盆栽试验研究其在盐碱条件下对水稻生长的影响,以期为促进植物生长、改善土壤盐碱化提供了新的菌种资源和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以从黑龙江省安达碱性盐碱地植物根际土壤中分离得到的 6 株促生菌(AD1-9、AD2-7、AD2-9、AD2-17、AD2-24 和 AD2-26)为供试菌株。以无促生作用的细菌菌株作为负对照,以拟南芥(Col-0 生态型,本实验室扩繁)、水稻(日本晴,本实验室扩繁)和玉米(市售品种)为供试植物。

1.2 PGPR 的耐逆性检测

1.2.1 不同 pH 条件下的生长曲线 种子液制备:取菌株于装有 20 mL LB 液体培养基的50 mL 三角瓶中,30 ℃,180 $r\cdot min^{-1}$ 振荡培养 12 h,调节液体的 $OD_{600}=1.0$,即为种子液。取 10 mL 的 LB 液体培养基于试管中,设置试管中 pH 梯度为 3~10,向调节好 pH 的试管中接种 1%的种子液,于 37 ℃130 $r\cdot min^{-1}$ 的摇床中培养,每 2 h 测量 1 次 OD_{600}。

1.2.2 不同 NaCl 浓度下的生长曲线 取10 mL 的 LB 液体于试管中,设置 NaCl 的浓度为0.4,0.8,1.2,1.6 和 2.0 $mol\cdot L^{-1}$,接种 1%的种子液,于 37 ℃130 $r\cdot min^{-1}$ 的摇床中培养,每 2 h 测量1 次OD_{600}。

1.2.3 不同碳酸氢钠浓度下的生长曲线 取 10 mL的 LB 液体于试管中,设置 $NaHCO_3$ 的浓度为 10,20,30,40 和 50 $mmol\cdot L^{-1}$,并接种 1%的种子液,于 37 ℃130 $r\cdot min^{-1}$ 的摇床中培养,每 2 h测量 1 次 OD_{600}。

1.2.4 分泌氢离子能力的检测 取 150 mL 的 LB 液体于 500 mL 锥形瓶中,接种 5%的种子液,置于 37 ℃130 $r\cdot min^{-1}$ 的摇床中培养,每 2 h 取2 mL 的液体 10 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心后,测量上清液的 pH。

收稿日期:2022-05-21
基金项目:国家自然科学基金(32170279)。
第一作者:李立新(1969—),女,博士,教授,从事植物与微生物互作、逆境生物学研究。E-mail:lixinli0515@163.com。

1.3 PGPR 菌种鉴定

16S rDNA 的 PCR 扩增产物委托生工生物工程股份有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 网站进行序列比对。

1.4 PGPR 促生效果鉴定

取拟南芥(Col-0 生态型)种子,用 2.6%(v/v)次氯酸钠灭菌 5 min、蒸馏水清洗 3 次后春化3 d,播种于 1/2MS 固体培养基(pH5.8)和加碱培养基(pH8.0,并加入 1.5 mmol·L^{-1} $NaHCO_3$)。在培养基下方接种促生菌。于 22 ℃、12 h 光/12 h 暗(光强 5 000 lx)条件下竖直培养 7 d,观察幼苗生长状态。以不接种促生菌作为空白对照(CK),以无促生作用的细菌为负对照(NC)。

1.5 PGPR 促生物质的检测

根据宋扬等[8]方法检测促生菌分泌铁载体、ACC 脱氨酶、IAA、溶磷和固氮能力。

1.6 盆栽试验

水稻种子经表面消毒后,在 30 ℃恒温培养 5 d,将预先萌发的的种子播种于灭菌后的土壤中,每盆栽 5 粒水稻。试验土壤共设置 4 个处理,分别为水处理、盐碱处理(50 mmol·L^{-1},Na_2CO_3∶$NaHCO_3$ = 1∶9)、水+促生菌液处理、盐碱(50 mmol·L^{-1}∶Na_2CO_3∶$NaHCO_3$=1∶9)+促生菌液处理,3 次重复。28 ℃培养 45 d 后测量植株生物量,包括株高、鲜重、干重、叶片数量和叶绿素含量。

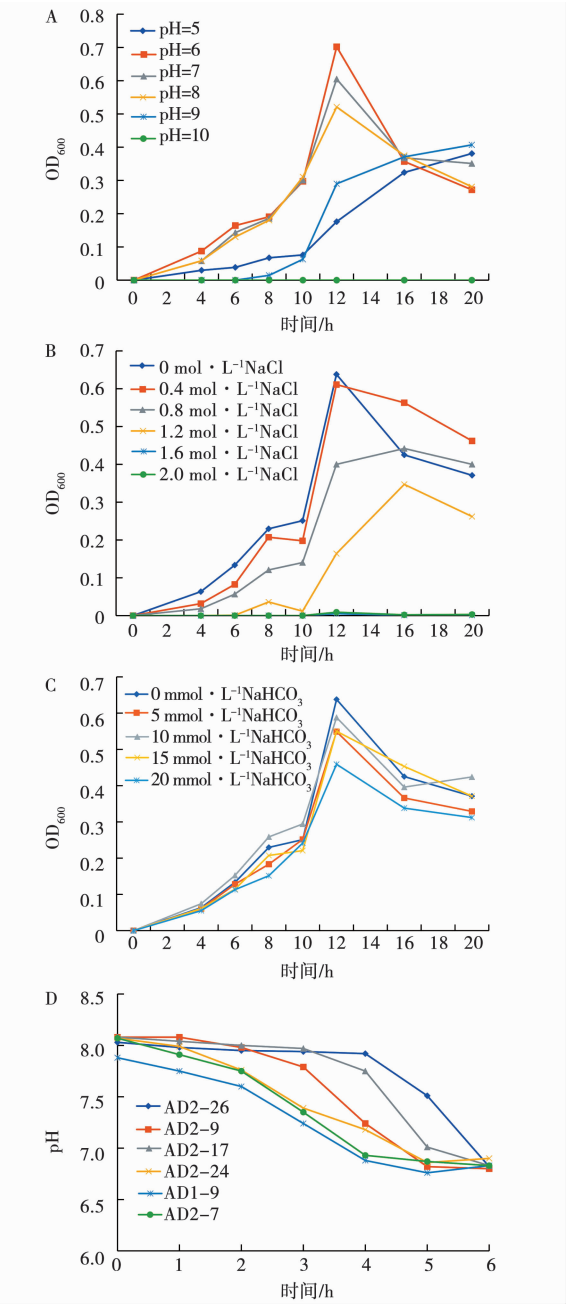
1.7 数据分析

试验数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行 t 检验。

2 结果与分析

2.1 PGPR 耐逆性检测

由于 6 株促生菌均是从盐碱地植物根际土壤分离的,本试验仅以其中一个 AD2-9 促生菌为代表检测其耐逆性。结果显示,AD2-9 在 pH 9(图 1A)、1.2 mol·L^{-1} NaCl(图 1B)、20 mmol·L^{-1} $NaHCO_3$(图 1C)条件下能较好地生长,说明促生菌 AD2-9 抗逆性较强。对这些促生菌进行分泌氢离子能力的测定,结果显示能产生大量氢离子使培养液的 pH 下降(图 1D)。



A. PGPR 在 pH5～10 条件下的生长情况;B. PGPR 在不同浓度 NaCl 培养液中的生长情况;C. PGPR 在不同浓度 $NaHCO_3$ 培养液中的生长情况;D. PGPR 分泌氢离子能力检测。

图 1 不同条件下 PGPR 的生长情况和分泌氢离子能力比较

2.2 促生菌的菌属鉴定

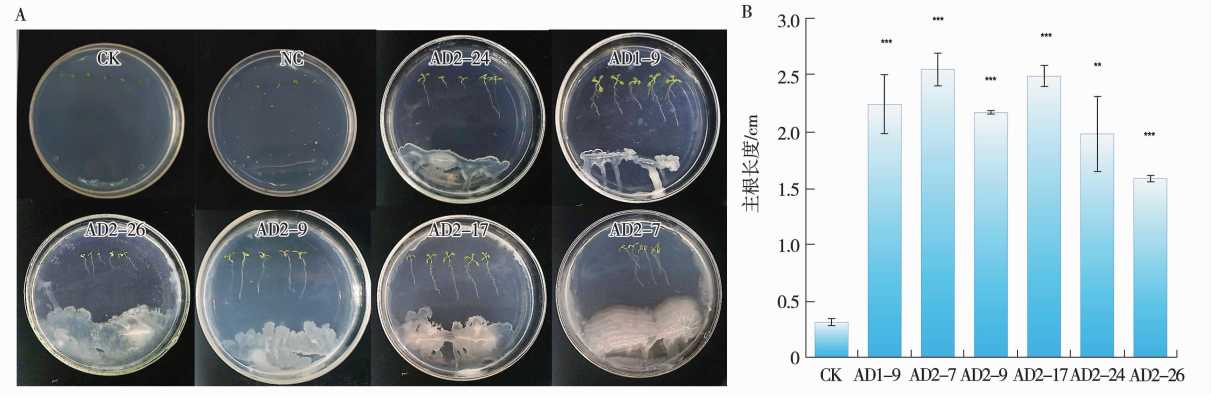
通过测定 16S rDNA 序列鉴定各促生菌的菌属。结果表明,6 株促生菌全部属于芽孢杆菌属(表 1),其中,*Bacillus* sp. 近缘菌 2 株,*Bacillus amylolique faciens* 近缘菌 2 株,*Bacillus tequilensis* 菌 1 株,*Bacillus subtilis* 菌 1 株。

2.3　促生菌的促生效果

在模拟盐碱胁迫条件下(pH 8.0+1.5 mmol·L^{-1} $NaHCO_3$)，检测了根际促生菌对拟南芥的促生能力。由图 2 可知，对照中的拟南芥幼苗在盐碱条件下发芽率较低，根基本上不伸长，子叶生长缓慢。与对照相比，有 6 株 PGPR 显著促进拟南芥生长，幼苗的根长显著增长、侧根增多，地上部分生长旺盛，显著好于对照。

表 1　促生菌种属鉴定结果

菌种 ID	种属(近缘种)	最大相似度/%
AD1-9	*Bacillus* sp.	99.22
AD2-7	*Bacillus tequilensis*	100.00
AD2-9	*Bacillus* sp.	99.93
AD2-17	*Bacillus subtilis*	100.00
AD2-24	*Bacillus amyloliquefaciens*	99.79
AD2-26	*Bacillus amyloliquefaciens*	99.86



A. 盐碱条件下促生菌的促生效果；B. 拟南芥培养 7 d 幼苗根长统计。

图 2　促生菌对拟南芥生长的促进作用

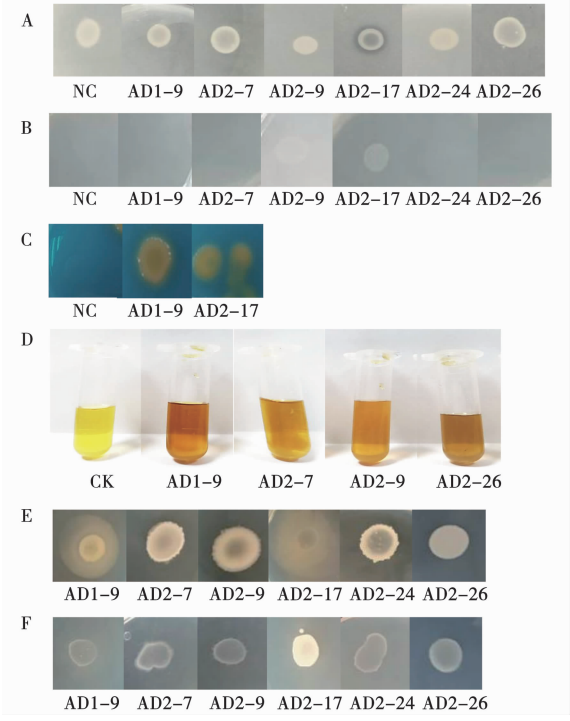
注：** 表示处理间在 $P<0.01$ 水平差异显著，*** 表示处理间在 $P<0.001$ 水平差异显著。

2.4　促生菌促生物质检测

为了探究促生菌的促生机理，对 6 株根际促生菌的分泌物质进行了鉴定，其中，AD2-17 有溶磷能力(图 3A)，AD2-9 和 AD2-17 具有固氮能力(图 3B)，AD1-9 和 AD2-17 能够分泌铁载体(图 3C)，AD1-9、AD2-7、AD2-9 和 AD2-26 能够产生 IAA(图 3D)，而所有的菌株都能分泌 ACC 脱氨酶(图 3E、F)。这些结果表明，不同的促生菌可以通过不同的机制来促进植物生长发育。

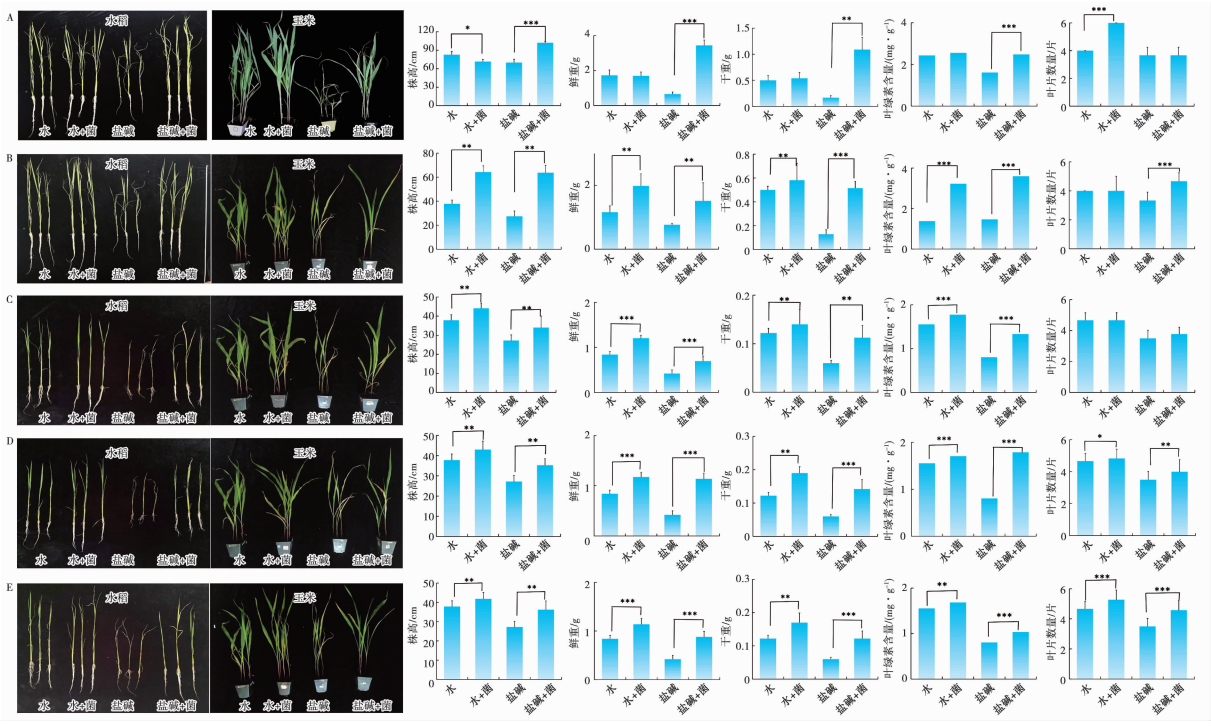
2.5　促生菌对水稻和玉米生长发育的促进作用

由图 4 可知，有 5 株促生菌能够显著促进盐碱条件下水稻和玉米的生长发育，明显提高了生物量，包括株高、鲜重、干重、叶片数量和叶绿素含量。其中，有促生菌处理的水稻株高在 0.05，0.01或 0.001 水平高于无促生菌处理，水稻鲜重、干重和叶绿素含量，除 AD1-9 水与水+菌处理间无显著差异外，其他促生菌处理均与无促生菌处理在0.05，0.01 或 0.001 水平差异显著，水稻叶片数量仅 AD2-7 和 AD2-24 的处理与无促生菌处理间在 0.05，0.01 或 0.001 水平差异显著。



A. 溶磷能力检测；B. 固氮能力检测；C. 铁载体检测；D. IAA 检测；E. ACC 脱氨酶检测(DF 培养基)；F. ACC 脱氨酶检测(ADF 培养基)。

图 3　促生菌分泌物质检测



A. AD1-9；B. AD2-9；C. AD2-17；D. AD2-7；E. AD2-24。

图 4　盐碱条件下促生菌处理下水稻和玉米的生长情况及水稻的生理指标

注：* 表示处理间在 $P<0.05$ 水平差异显著，** 表示处理间在 $P<0.01$ 水平差异显著，*** 表示处理间在 $P<0.001$ 水平差异显著。

3　讨论

植物由于本身的特性无法主动躲避环境胁迫。为了能够生存并延续种族，植物在长期进化中获得了一定的环境胁迫的适应性。土壤盐碱化威胁生态安全和粮食安全，给农业的可持续性发展带来了巨大挑战。中重度盐碱地经过改良可以成为后备耕地，为农业可持续性发展提供保障。利用传统的物理和化学方法进行盐碱地改良见效快，但是存在成本高、不稳定等弊端。如果在传统治理后跟进生物治理方法能够巩固盐碱地改良效果。生物治理方法不仅成本低，而且稳定、效果好。利用抗逆性好的微生物菌肥促进多种植物在盐碱地中生长，可以提高改良盐碱地的效率，不仅能够改良盐碱土壤的理化性质，同时，形成先锋植被，为盐碱地区域生态环境的恢复提供前提。因此，盐碱地生物改良方法逐步受到重视，促生菌的菌种资源和耐盐碱植物种质资源的筛选和机制研究成为热点。

芽孢杆菌是 PGPR 中最常见的种类[9]。芽孢杆菌作为生物肥料和生物防治剂商业化程度较高。由于芽孢杆菌能够产生耐热和耐干燥的内孢子，因其效果好、稳定性好、易储存和运输而受到青睐[10]，在食物保鲜、益生菌、防治植物病原真菌等领域均有应用[11]。本研究筛选到 6 株抗逆性较强的根际促生菌均属于芽孢杆菌。这些根际促生菌能够在盐碱条件下有效促进多种植物的生长发育，具有高效和广谱性。这些根际促生菌的分泌物质不尽相同，说明它们的促生机制各不相同，但这些促生菌都能够产生 ACC 脱氨酶。盐碱胁迫使植物体产生高浓度的乙烯从而抑制植物生长。促生菌分泌的 ACC 脱氨酶通过抑制植物中乙烯前体物质 ACC 的产生来降低乙烯含量，从而减少了其对植物生长的抑制作用。如果将几种功能有互补的菌种进行配合研制复合菌剂，有望能更有效地在盐碱胁迫条件下促进作物生长、提高产量。复合促生菌剂的研发为改良盐碱地提供了物质基础。同时，耐盐碱植物的生长为盐碱地植被恢复提供了前提条件。改良的盐碱地可以成为后备耕地，利于粮食生产的可持续性发展。

4 结论

本研究筛选到 6 株能够有效促进植物生长的根际促生菌，能够改善盐碱协迫下水稻和玉米的生长状况，显著提高了植物的生物量，是比较理想的、高效、广谱的促生菌。如果将几种功能互补的菌株进行配合可以研制高效复合菌剂，有望更有效地提高作物产量。

参考文献：

[1] MUTHAYYA S,SUGIMOTO J D,MONTGOMERY S,et al. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption[J]. Annals of the New York Academy of Sciences,2014,1324:7-14.

[2] 李雪梅，李玥莹，马莲菊，等. 逆境胁迫下水稻蛋白质组学研究进展[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版)，2009，27(3)：257-263.

[3] 陈忠男，王志刚，徐伟慧. 生防菌在农业中的应用及其机制研究进展[J]. 高师理科学刊，2022，42(6)：89-94，110.

[4] 刘鹏，毕江涛，罗成科，等. 耐盐菌对盐胁迫下水稻种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 农业环境科学学报，2022，41(2)：246-256.

[5] 左鹏飞，徐俊，张天瑶，等. 含 ACC 脱氨酶的 PGPR 对东方百合'Souvenir'生长的影响[J]. 现代园艺，2022，45(9)：39-41，46.

[6] 赵柏霞，闫建芳，夏国芳，等. 马哈利樱桃根际产吲哚乙酸细菌多样性及产素能力研究[J]. 江苏农业科学，2017，45(20)：169-172.

[7] 马莹，骆永明，滕应，等. 根际促生菌及其在污染土壤植物修复中的应用[J]. 土壤学报，2013，50(5)：1021-1031.

[8] 宋扬. 盐碱胁迫下植物根际促生菌筛选与促生机制初探[D]. 哈尔滨：东北林业大学，2021.

[9] 周智博，王卿惠，郭欣欣，等. 解淀粉芽孢杆菌抑菌蛋白研究进展[J]. 高师理科学刊，2022，42(4)：64-69.

[10] 王宏浩，赵素娟，石虎，等. 枯草芽孢杆菌的益生特性及其在动物生产中的应用[J]. 北方牧业，2021(16)：24-25.

[11] 田照辉，徐绍刚，董颖，等. 6 株芽孢杆菌的分离鉴定和生物学特性[J]. 江苏农业科学，2021，49(13)：157-161.

Screening of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Rice Growth Under Saline-alkali Stress

LI Li-xin, XU Jia-li, WANG Mao-lin, XUE Feng-bo, LI Zhong-yue, CHEN Xiao, HUANG Yong-xue, BU Yuan-yuan

(Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration, Ministry of Education/College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Rice is affected by various biotic and abiotic stresses during development, such as soil salinization and drought as well, which result in massive reduction in rice production. In order to promote the plant growth under saline-alkali stress, 6 plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) were isolated from the rhizosphere soil of plants grown in saline-alkali land in Anda area in Heilongjiang Province, and their growth-promoting effects were preliminarily studied. The results showed that the six isolated PGPRs could significantly promote the growth of *Arabidopsis*, rice and maize under saline-alkali conditions, and the biomass was improved remarkably. All of the PGPRs belong to *Bacillus*, with good stress tolerance. They have different secretions indicating that their growth-promoting mechanisms are different.

Keywords: saline-alkali stress; plant growth-promoting rhizobacteria; *Bacillus*; growth promoting mechanisms

欢迎关注本刊微信公众号