

磷高效转基因水稻OsPT4根际高效解有机磷细菌的分离鉴定

张乐, 张思宇, 王亚露, 李刚, 杨殿林, 赵建宁

引用本文:

张乐, 张思宇, 王亚露, 李刚, 杨殿林, 赵建宁. 磷高效转基因水稻OsPT4根际高效解有机磷细菌的分离鉴定[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(4): 834-840.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0936>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

磷高效转基因水稻对潮土无机磷形态的影响

倪土, 李刚, 修伟明, 魏琳琳, 侯萌瑶, 杨殿林, 赵建宁

农业环境科学学报. 2017, 36(8): 1551-1556 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0126>

设施农业土壤中聚磷菌的筛选及其生物学特性分析

吴晓青, 吕玉平, 周方园, 赵晓燕, 张广志, 任何, 周红姿, 王加宁, 张新建

农业环境科学学报. 2019, 38(8): 1704-1711 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0535>

碱活化载镁橘皮生物炭除磷后对土壤的改良作用

王波, 罗婷, 勾曦, 唐勇, 姜飞, 吴桐, 谢燕华

农业环境科学学报. 2021, 40(1): 155-162 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0627>

不同有机酸对土壤杆菌在菜心根际定殖的影响

吕耀, 王立立, 徐智敏, 李取生, 林欣, 周婷, 叶汉杰, 高琼

农业环境科学学报. 2018, 37(9): 1918-1924 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0198>

降解水稻秸秆细菌-真菌复合菌系的构建与评价

梅新兰, 郑海平, 李水仙, 杨天杰, 江高飞, 韦中, 徐阳春, 沈其荣

农业环境科学学报. 2021, 40(10): 2217-2225 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0051>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张乐, 张思宇, 王亚露, 等. 磷高效转基因水稻 OsPT4 根际高效解有机磷细菌的分离鉴定[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(4): 834–840.

ZHANG L, ZHANG S Y, WANG Y L, et al. Isolation and identification of efficient organophosphate-dissolving bacteria from rhizosphere soil of P-efficient transgenic rice OsPT4[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(4): 834–840.



开放科学 OSID

磷高效转基因水稻 OsPT4 根际高效解有机磷细菌的分离鉴定

张乐^{1,2}, 张思宇^{1,2}, 王亚露^{1,2}, 李刚^{1,2}, 杨殿林^{1,2}, 赵建宁^{1,2*}

(1. 农业农村部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2. 农业农村部产地环境污染防治重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点实验室, 天津 300191)

摘要:为提升磷高效转基因水稻根际土壤的磷素利用率, 采用传统微生物分离培养技术分离筛选高效解有机磷菌株, 并对分离菌株进行鉴定和解磷能力的测定。以改良的蒙金娜固体有机磷培养基分离磷高效转基因水稻 OsPT4 根际土壤中的解有机磷菌株, 检测其溶磷特性, 并通过比对 16S rDNA 基因序列进行分类鉴定。结果表明: 从磷高效转基因水稻根际土壤中分离获得 15 株解磷菌株, 纯化复筛后获得 6 株可以产生明显溶磷圈且生长稳定的解有机磷菌株。6 株解磷菌的可溶性指数在 1.50~6.33 之间, 其中菌株 Y7 的可溶性指数最高; 培养 24 h 后菌株的解磷量在 10.60~87.43 mg·L⁻¹ 之间, 其中菌株 Y7 最大。培养 24 h 后菌株 Y7 的菌液 pH 降低最多, 碱性磷酸酶分泌量仅低于菌株 Y11。除 Y7 外的 5 株菌株均为大田土壤中分离筛选的常见类群, 在解磷能力、溶磷特性上与传统大田作物中筛选获得的解磷菌株无明显差异。菌株 Y7 的解磷能力最强, 经鉴定其属于泛菌属 (*Pantoea* sp.), 是常见的水稻种子内生菌核心类群, 酸化作用和碱性磷酸酶作用是其主要的解磷机制, Y7 可作为高效解磷菌资源进行进一步研究。

关键词:磷高效转基因水稻; 解有机磷细菌; 16S rDNA

中图分类号: S511 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2022)04-0834-07 doi:10.11654/jaes.2021-0936

Isolation and identification of efficient organophosphate-dissolving bacteria from rhizosphere soil of P-efficient transgenic rice OsPT4

ZHANG Le^{1,2}, ZHANG Siyu^{1,2}, WANG Yalu^{1,2}, LI Gang^{1,2}, YANG Dianlin^{1,2}, ZHAO Jianning^{1,2*}

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China; 2. Key Laboratory of Environmental Pollution Prevention and Control in Production Area, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Tianjin Key Laboratory of Agricultural Environment and Agricultural Product Safety, Tianjin 300191, China)

Abstract: P-efficient transgenic rice OsPT4 shows a relatively high consumption rate of available phosphorus. To increase P-utilization, organophosphate-dissolving bacteria were isolated from the rhizosphere soil of P-efficient transgenic rice OsPT4 by Pikovskaya organophosphorus solid medium and classified by 16S rDNA gene sequencing. Fifteen organophosphate-dissolving strains were isolated, of which six produced clear transparent circles on the organophosphorus medium and were used for purification and rescreening. Their solubility index ranged from 1.50~6.33, and strain Y7 showed the highest solubility. Phosphate-dissolving capacity, after being cultured for 24 h, ranged from 10.60~87.43 mg·L⁻¹, and strain Y7 showed the highest capacity. After culturing for 24 h, strain Y7 showed the highest pH reduction, and the second highest alkaline phosphatase secretion (after strain Y11). Five of the strains (excluding Y7) were common groups that could be screened from traditional field crop soil and they showed no difference in P-solubilizing ability or mechanism. Strain

收稿日期: 2021-08-20 录用日期: 2021-11-01

作者简介: 张乐(1994—), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 主要研究方向为农业生态学。E-mail: zhangle1052@163.com

*通信作者: 赵建宁 E-mail: zhaojn2008@163.com

基金项目: 国家转基因重大专项(2016ZX08012005-005); 中国农业科学院科技创新工程协同创新任务(CAAS-XTCX2016015)

Project supported: The National Special Transgenic Project of China (2016ZX08012005-005); The Technology Innovation Program of the Chinese Academy of Agricultural Sciences(CAAS-XTCX2016015)

Y7 was identified as *Pantoea* sp., a common core group of endophytic bacteria in rice seeds. Its phosphorolytic mechanism was the interaction of pH reduction and alkaline phosphatase secretion, which could be used as a resource for efficient phosphorolytic bacteria in future research.

Keywords: P-efficient transgenic rice; organophosphate-solubilizing bacteria; 16S rDNA

磷是地球生命系统的主要营养元素之一,也是生态系统常见的营养限制因子^[1]。磷素是植物必需的大量无机营养元素,在植物体内的含量通常仅次于氮和钾,对于植物生长代谢有非常重要的作用^[2-3]。但是世界上绝大部分农田土壤严重缺乏作物可利用的有效态磷。据报道全世界 13.19 亿 hm^2 的耕地中约有 43% 缺磷,我国 1.07 亿 hm^2 农田中大约有 2/3 严重缺磷^[4]。然而土壤总磷资源丰富,但其主要以无法直接被作物吸收利用的不溶态和难溶态形式存在,可供植株吸收利用的可溶性无机态磷酸盐含量严重缺少,因此提高作物对农田土壤中磷素的高效利用有重要的研究意义和价值^[5-6]。

为了解决大面积农田土壤有效磷缺失的现状,基于土壤中磷素的分布情况,当前主要从 3 个方面提高作物对农田土壤磷素的利用效率:第一个方面是施加磷肥,补充农田土壤中的磷素^[7];第二方面是利用解磷微生物生产解磷菌剂,解磷微生物的发现为解磷肥料的生产奠定了基础^[8];第三方面是培育磷高效作物品种,通过一些传统杂交育种手段及现代生物技术手段培育出对土壤磷素有更高吸收利用效率的品种^[9]。虽然施加磷肥在一定程度上缓解了大面积农田土壤有效磷缺失的现状,但是研究表明磷肥在施用农田后大部分会转化成溶解度较低的钙化态磷和闭蓄态磷,同时由于磷在土壤中的扩散系数很低且受土壤对磷的吸附和固化作用等因素的影响^[10],土壤中的有效态磷含量依然很低,可供作物直接吸收利用的磷素十分有限,磷素水平依旧制约着农业生产^[6,11]。而且由于磷肥的消耗,可供生产的磷矿资源日益紧张。在未来的研究工作中,从提高土壤磷素的吸收效率出发,生产优质解磷菌剂和培育磷高效作物品种将更加具有现实意义。

土壤微生物是土壤中数量最大、种类最丰富的生物类群,在土壤养分转化和结构形成中发挥着重要的作用,其中有一类可以将植物无法吸收的有机磷转化为可吸收无机磷形态的功能微生物类群被称为解磷菌(Phosphate-solubilizing microorganisms, PSM)。解磷菌不仅种类繁多,而且在自然界中数量也十分庞大,是一项非常值得开发研究的资源^[12]。1903 年 STALSTROM 发现土壤中存在的某些微生物具有解

磷作用^[13],目前已发现在自然界中存在着大量具有解磷作用的微生物,包括细菌、真菌、放线菌及蓝藻^[14-15]。世界上应用最早且最广的具有解磷作用的微生物是巨大芽孢杆菌,在后续的研究中,各类芽孢杆菌、假单胞菌和一些杆菌及部分真菌也被开发利用为菌剂菌肥,这些微生物在生物肥料的生产中得到了广泛的应用^[16-17]。

磷高效转基因水稻品种 OsPT4,是利用生物技术手段将水稻高亲和磷酸盐转运蛋白 *OsPT4* 基因导入受体而获得的磷高效吸收型水稻,由南京农业大学资源与环境学院培育^[18]。OsPT4 通过编码磷高效转运蛋白编码基因合成磷高效转运蛋白,从而提高了其对土壤中有效磷的吸收消耗速率^[19]。在此基础上开发解磷菌剂增加土壤有机磷水解是否可以进一步提升其磷素利用效率?为此本研究以磷高效转基因水稻 OsPT4 为试验材料,利用改良的蒙金娜有机磷选择培养基分离 OsPT4 根际土壤中的高效解有机磷菌株,初步探究其解磷能力和溶磷特性,并通过与传统大田作物中分离获得的解磷菌资源进行比较判断,以其应用可行性和价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品采集

从 2014 年开始在农业农村部环境保护科研监测所内的网室中进行磷高效转基因水稻 OsPT4 连续种植实验,目前已连续种植 7 年。土壤样品为 2020 年 9 月采集的磷高效转基因水稻 OsPT4 根际土壤,使用直径 3.5 cm 的土钻在距水稻主茎 2 cm 处采集 0~20 cm 深的土壤。

1.1.2 培养基

改良的蒙金娜有机磷固体培养基:葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, 卵磷脂 0.2 g, CaCO_3 5.0 g, 酵母膏 0.4 g, 琼脂 20 g, ddH₂O 1 000 mL, pH 为 7.0~7.5^[20-21](液体培养基不加琼脂)。

LB 培养基:胰蛋白胨 1 g, 酵母 0.5 g, NaCl 1 g, ddH₂O 100 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 解有机磷菌株的分离纯化

称取 1.0 g 根际土壤样品,加入 9 mL 无菌水,涡旋混匀 30 s,静置 10 min。吸取 1 mL 土壤悬液,加入 49 mL 配制好的蒙金娜有机磷液体培养基,30 ℃、160 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h。吸取 1 mL 培养好的菌液按照 10⁻¹~10⁻⁶ 进行连续 10 倍梯度稀释,分别涂布在蒙金娜有机磷固体培养基上,每个梯度设置 3 个平行。在 30 ℃ 恒温培养箱中培养 5 d,确定 10⁻⁵ 为最佳稀释倍数。按照上述方法和最佳稀释倍数将土壤样品进行解有机磷菌株的分离,挑取产生溶磷圈的单菌落进行划线纯化 3~5 代获得纯菌株,将纯菌株在 LB 培养基中扩增培养后使用甘油法保存。

1.2.2 解有机磷菌株的菌落特征观察和可溶性指数的测定

将分离得到的纯菌株点接到蒙金娜固体有机磷培养基上,30 ℃ 恒温培养 3 d,观察菌落形态特征,参照《常见细菌系统鉴定手册》^[22] 对菌株进行初步鉴定。分别测定菌落直径和溶磷圈直径以计算可溶性指数,初步判断解有机磷菌株的解磷能力。计算公式为:

$$\text{可溶性指数} = \text{溶磷圈直径} / \text{菌落直径}$$

1.2.3 解有机磷菌株 24 h 解磷量和溶磷特性的测定

挑选产生明显溶磷圈的解磷菌株进行解磷量、pH 和碱性磷酸酶的测定。将各菌株分别接种于 LB 液体培养基,37 ℃、180 r·min⁻¹ 培养 7 h,然后用分光光度计调整菌液浓度至 OD₆₀₀=0.6。分别吸取 750 μL 菌悬液加入到 15 mL 蒙金娜液体培养基中,37 ℃、180 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h (每个菌株 3 组重复),取 10 mL 培养液用酸度计测定 pH,剩余培养液 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 获得上清液^[23]。取 2 mL 上清液用钼锑抗显色法测定有效磷含量。另取 0.5 mL 上清液用碱性磷酸酶活性检测试剂盒 (BOXBIO) 测定碱性磷酸酶活性^[21]。

1.2.4 解有机磷菌株生长曲线的测定

将解有机磷菌株分别接种到 LB 液体培养基,37 ℃、180 r·min⁻¹ 培养 7 h,然后使用分光光度计调整菌液浓度至 OD₆₀₀=0.1 用于接种。在 100 mL LB 液体培养基中接种 5 mL OD₆₀₀=0.1 的菌液,30 ℃、180 r·min⁻¹ 恒温振荡培养 30 h,每隔 2 h 监测一次 OD₆₀₀ 值并记录,观测菌株的生长状况并绘制生长曲线。

1.2.5 菌株的鉴定及其同源性分析

将纯化的单菌落挑入 10 mL LB 液体培养基中,摇床培养至菌液浑浊后,吸取菌液 2 mL 进行 DNA 的提取。采用 16S rDNA 通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rDNA 基因序列的扩增,PCR 产物使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行质量检测后,送上海生工进行测序。

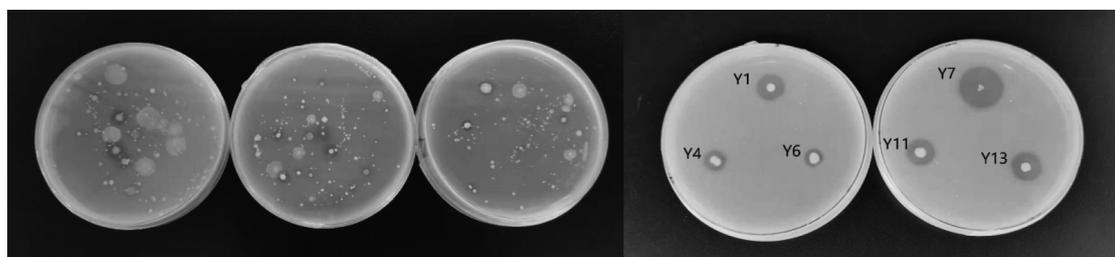
1.3 数据处理

试验数据使用 Excel 进行初步整理后,用 SPSS 软件 (21.0 版本) 进行数据分析。对可溶性指数、24 h 菌株的解磷量、pH、碱性磷酸酶活性进行单因素方差分析和 LSD 多重比较 ($P < 0.05$ 表示差异显著)。使用 Origin 软件 (2018 版本) 绘制菌株 24 h 解磷量、pH 和碱性磷酸酶图,并拟合 6 株菌株的生长曲线。菌株鉴定测序结果通过 Blast 程序与 NCBI 数据库进行比对,下载同源性高的序列使用 MEGA 软件 (7.0 版本) 构建系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 解有机磷菌株的筛选纯化

采用传统微生物分离培养方法,使用蒙金娜固体有机磷培养基对磷高效转基因水稻 OsPT4 根际土壤中的解有机磷菌株进行分离,共获得 15 株解有机磷菌株 (图 1a),分别命名为 Y1~Y15。经过纯化培养 3 代后获得 6 株解磷能力较强且生长稳定的菌株 (图 1b),分别是 Y1、Y4、Y6、Y7、Y11、Y13,对其进行进一步解磷能力和溶磷特性的研究。



(a) 初筛时 3 个重复平板
Three repeat plates for initial screening

(b) 纯化后 6 株菌株产生的透明圈
The transparent rings produced by 6 purified strains

图 1 解有机磷菌株的筛选

Figure 1 Screening picture of solution organophosphorus hydrolyzing strains

2.2 菌株的菌落特征观察

从菌落的形状、大小、颜色等方面观察6株解有机磷菌株单菌落的形态特征并记录,初步判断6株菌株均为革兰氏阴性细菌(表1)。

2.3 解有机磷菌株的解磷能力

可溶性指数和24 h解磷量常作为表征菌株解磷能力的指标。可溶性指数结果显示:6株解有机磷菌株的解磷能力之间存在一定差异,可溶性指数由大到小排序为Y7>Y11>Y1>Y13>Y4>Y6, Y7菌株的可溶性指数最高为6.33,其次的Y11为3.81(表2)。另外,对6株解有机磷菌株的解磷能力进行定量分析,结果表明Y7培养24 h后的菌液中的无机磷浓度达到87.43 mg·L⁻¹(图2),显著高于其他5个菌株。

2.4 解有机磷菌株的溶磷特性

酸化作用和碱性磷酸酶作用是解磷菌溶磷的主要机制。各菌液在培养24 h后pH均有所降低,表现为酸性, Y7菌株的pH下降最显著,为3.42,各菌株培养24 h后菌液pH由大到小的排序为Y11>Y6>Y1>Y13>Y4>Y7(图3a)。培养24 h菌液中的碱性磷酸酶

活性结果显示(图3b):6株解有机磷菌株之间分泌碱性磷酸酶的能力存在一定的差异, Y11菌株分泌碱性磷酸酶的能力最强,为38.69 μg·mL⁻¹·h⁻¹,其次是Y7菌株,为36.20 μg·mL⁻¹·h⁻¹,碱性磷酸酶活性由大到小排序为Y11>Y7>Y4>Y13>Y6>Y1。

2.5 解有机磷菌株的生长曲线

各菌株生长曲线均可分为3个时期,即指数生长期、平稳增长期和缓慢衰落期。在培养的前8 h中,菌落环境和营养条件适宜,菌株以指数倍数快速增长,在8~26 h内以平稳速度缓慢增长,在第26 h达到顶峰,随后受营养条件的限制速度开始缓慢下降。其中Y1和Y4增长稍缓慢, Y6、Y7、Y11和Y13增长速度基本一致(图4)。

2.6 解有机磷菌株的鉴定

经16S rDNA扩增子基因序列测序分析(图5),结果发现:6株菌株属于不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和泛菌属(*Pantoea*)4个菌属。Y6与Y13的亲缘关系较近,同属肠杆菌属; Y4和Y11的亲缘关系较近,同属

表1 6株解有机磷菌株菌落形态特征

Table 1 Colony morphological characteristics of 6 strains of organophosphorus hydrolyzing bacteria

菌株 Strain	菌落形态 Colony morphology	革兰氏染色 Gram test	分类 Classify
Y1	形态为圆形,边缘整齐,表面光滑湿润,淡黄色,小而隆起,易被挑起	G-	细菌
Y4	形态为圆形,边缘整齐,表面光滑,淡黄色,小而隆起,易被挑起	G-	细菌
Y6	形态为圆形,边缘整齐,表面光滑,中间凸起白色,有同心圆	G-	细菌
Y7	形态不规则,黄色	G-	细菌
Y11	形态为圆形,边缘整齐,表面光滑,淡黄色,小而隆起,易被挑起	G-	细菌
Y13	形态为圆形,边缘啮噬状,湿润黏稠,易挑起	G-	细菌

注:G-表示革兰氏染色反应显示阴性。

Note:G- means negative for Gram.

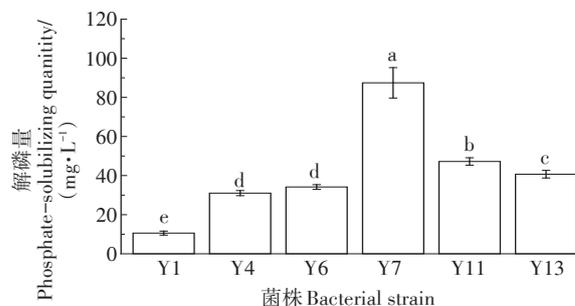
表2 6株解有机磷菌株的可溶性指数

Table 2 Dissolving phosphate zone diameter to culture community zone diameter of organophosphorus hydrolyzing bacteria

菌株 Strain	溶磷圈直径 Dissolving phosphate diameter/mm	菌落直径 Colony diameter/ mm	可溶性指数 Solubility index
Y1	9.67±4.04cd	4.00±<0.01bc	2.42±1.00c
Y4	9.67±0.58cd	4.67±0.58ab	2.08±0.14c
Y6	7.00±1.00d	4.67±0.58ab	1.50±0.10c
Y7	19.00±<0.01a	3.00±<0.01d	6.33±<0.01a
Y11	13.67±0.58b	3.67±0.58cd	3.81±0.76b
Y13	12.00±1.00bc	5.00±<0.01a	2.40±0.20c

注:每列数字后不同字母表示在0.05水平上差异显著(P<0.05)。

Note: Different letters after each column of numbers indicate significant differences at 0.05 level(P<0.05).



不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)。下同
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments (P<0.05). The same below

图2 6株解有机磷菌株培养24 h的解磷量

Figure 2 Phosphorus solubility of the 6 organophosphorus hydrolyzing strains

假单胞菌属。

3 讨论

解磷微生物在土壤磷素循环中具有重要作用,解磷微生物的分布具有明显的根际效应,且受到土壤类型、环境因子和种植作物类型等多因素的影响^[24-25]。本研究从OsPT4根际土壤中共分离获得15株解有机磷菌株,在后续分离纯化过程中仅6株能在有机磷培养基上稳定生长且形成明显的透明圈。有研究发现,约60%初筛得到的有解磷能力的菌株在后续纯化培养过程中失去解磷能力^[26],其原因可能是不同菌株对环境的适应性和对磷素的要求有一定差异^[27]。此外,6株菌株的生长特性和活性基本保持一致,生长曲线均符合微生物

培养特点,即在有限资源的条件下培养阶段分为指数生长期、平稳增长期和缓慢衰落期3个阶段。

解磷能力是筛选解磷菌资源的基本标准。聂振等^[28]从我国南方水稻根际土中分离的24株解磷菌株的发酵液的可溶性总磷含量为23.7~79.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,张广志等^[29]从设施菜地土壤中分离获得的14株解磷菌株的平均解磷量为48.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,庄馥璐等^[21]从苹果根际分离获得的10株解磷菌株的可溶性指数在1.5~5.3之间,解磷量最高为104.125 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本研究OsPT4根际土中分离获得的6株解磷菌的可溶性指数为1.50~6.33,培养24 h后培养液中的有效磷含量为10.60~87.43 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,解磷能力与上述研究中筛选得到的菌株相当,其中Y7菌株在可溶性指数和解磷量

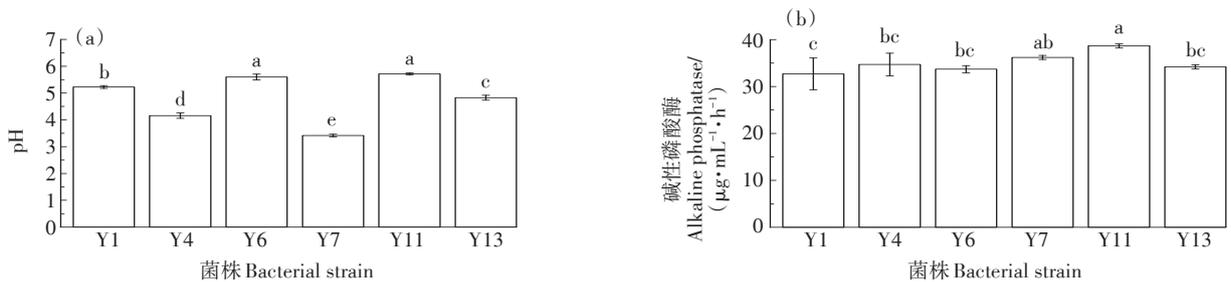


图3 6株解有机磷菌株培养24 h后菌液的pH和碱性磷酸酶活性
Figure 3 The pH and alkaline phosphatase activity of the 6 organophosphorus hydrolyzing strains

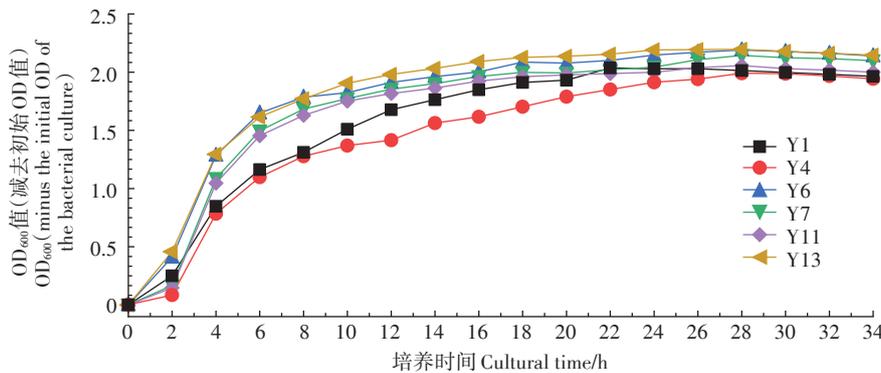


图4 6株解有机磷菌株的生长曲线
Figure 4 Growth curve of 6 organophosphorus hydrolyzing strains

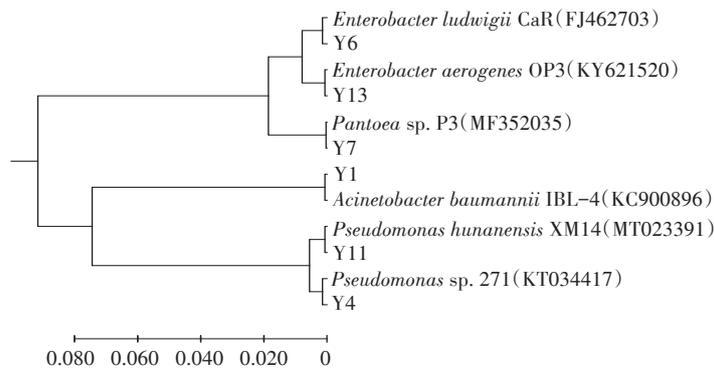


图5 6株解有机磷菌株的系统发育进化树
Figure 5 Phylogenetic tree of established based on 16S rDNA sequences of 6 organophosphorus hydrolyzing strains

上均表现最好,解磷能力在上述解磷菌株中也属于较高水平,为高效解磷菌资源。

不同菌株在不同培养条件下的解磷能力有差异,菌株之间的溶磷特性也不完全相同。目前,相关研究发现解磷菌解磷主要有两大机制:一是部分微生物可以分泌出有机酸、硫化物、 H^+ 等酸性物质降低生长环境的pH,从而使难溶性磷酸盐溶解;二是在受到磷限制时,一些微生物可以分泌释放胞外磷酸酶水解有机磷^[30-31]。通过测定培养24 h后菌液的pH和碱性磷酸酶活性分析菌株的解磷特性发现,Y7菌株的解磷机制主要为酸化作用和碱性磷酸酶作用,而Y11菌株解磷的主要机制是碱性磷酸酶作用,其他菌株在分泌碱性磷酸酶活性方面差异不显著,pH降低量与解磷能力有一定的相关性。

从大田作物中筛选获得的常见解磷微生物种类主要有芽孢杆菌、不动杆菌、假单胞菌、埃希氏菌、欧文氏菌、沙雷氏菌和肠杆菌等菌属^[31]。从OsPT4根际土中筛选获得的6株高效解有机磷菌株在分类上,Y1属于不动杆菌属,Y6和Y13属于肠杆菌属,Y4和Y11为假单胞菌属,5株菌株均为常见的解磷菌类别。特殊的是解有机磷能力最强的Y7菌株属于泛菌属,虽然目前从水稻土壤中分离获得高效解磷泛菌菌株的研究较少,但相关研究表明泛菌在自然界中分布广泛,可以从水中和土壤中分离获得^[32],且在研究中其常作为水稻、大麦、萝卜等大田作物的种子内生菌核心类群^[33-34],多个类型的泛菌都具有解磷能力和分泌IAA的能力,对植物具有促生作用和抵抗真菌性病害的功能^[35]。

4 结论

从磷高效转基因水稻根际土壤中分离获得15株解有机磷菌株,纯化复筛后获得6株可以在有机磷培养基上产生明显透明圈的解有机磷菌株。6株菌株在解磷能力上与大田作物中分离获得的解磷菌解磷能力相当,其中Y7菌株表现最好,可溶性指数高达6.33,在24 h内的解磷量达到 $87.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,为高效解磷菌资源。除菌株Y7外的5株菌株均为大田土壤中可分离获得的常见解磷菌类别,Y7属于水稻种子内生菌核心类群泛菌属(*Pantoea*),酸化作用和碱性磷酸酶作用是其主要的解磷机制。另外,磷高效转基因水稻的种植对有效磷消耗效率的影响是否改变了根系土壤中的解磷菌群落结构,使泛菌等类群菌株的相对丰度增加则需要基于现代分子生物学方法对解磷微生物整体群落进行进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘芷宇. 植物的磷素营养和土壤磷的生物有效性[J]. 土壤, 1992(2): 97-101. LIU Z Y. Phosphorus nutrition in plants and bioavailability of phosphorus in soil[J]. *Soils*, 1992(2): 97-101.
- [2] 李诗奇, 李政, 王仙宁, 等. 植物对氮磷元素吸收利用的生理生态学过程研究进展[J]. 山东农业科学, 2019, 51(3): 151-157. LI S Q, LI Z, WANG X N, et al. Advances in research of physiological and ecological process of nitrogen and phosphorus absorption and utilization in plant[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2019, 51(3): 151-157.
- [3] 王庆仁, 李继云, 李振声. 高效利用土壤磷素的植物营养学研究[J]. 生态学报, 1999, 19(3): 417-421. WANG Q R, LI J Y, LI Z S. Studies on plant nutrition of efficient utility for soil phosphorus[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, 19(3): 417-421.
- [4] 汪涛, 杨元合, 马文红. 中国土壤磷库的大小、分布及其影响因素[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2008, 44(6): 945-952. WANG T, YANG Y H, MA W H. Storage, patterns and environmental controls of soil phosphorus in China[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2008, 44(6): 945-952.
- [5] 赵吴琼. 长期施肥土壤有机磷形态变化及有效性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007: 10-12. ZHAO W Q. Research on the form changes and availability of organic phosphorus long-term fertilizer[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2007: 10-12.
- [6] 马进川. 我国农田磷素平衡的时空变化与高效利用途径[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018: 79-88. MA J C. Temporal and spatial variation of phosphorus balance and solutions to improve phosphorus use efficiency in Chinese arable land[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018: 79-88.
- [7] 吴曦. 植物高效利用土壤磷素的机理研究[J]. 产业与科技论坛, 2017, 16(9): 47-48. WU X. Study on the mechanism of efficient utilization of soil phosphorus by plants[J]. *Industrial and Science Tribune*, 2017, 16(9): 47-48.
- [8] 凌宏清, 袁力行. 我国作物养分高效研究的现状与未来发展趋势[J]. 中国基础科学, 2016, 18(2): 54-60. LING H Q, YUAN L X. Research status of crop nutrient efficiency and its future development in China[J]. *China Basic Science*, 2016, 18(2): 54-60.
- [9] 周志高, 汪金舫, 周健民. 植物磷营养高效的分子生物学研究进展[J]. 植物学通报, 2005, 22(1): 82-91. ZHOU Z G, WANG J F, ZHOU J M. Current advances in the molecular biology of high efficient phosphorus nutrition in plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, 22(1): 82-91.
- [10] SONIA M, EMMANUEL F, JÖRG L. Phosphorus allocation to leaves of beech saplings reacts to soil phosphorus availability[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10(6): 891-897.
- [11] 王永壮, 陈欣, 史奕. 农田土壤中磷素有效性及影响因素[J]. 应用生态学报, 2013, 24(1): 260-268. WANG Y Z, CHEN X, SHI Y. Phosphorus availability in cropland soils of China and related affecting factors[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(1): 260-268.
- [12] CHEN Y, SUN R B, SUN T T, et al. Evidence for involvement of key-stone fungal taxa in organic phosphorus mineralization in subtropical soil and the impact of labile carbon[J]. *Soil Biology and Biochemistry*,

- 2020, 148: 107900.
- [13] 池景良, 郝敏, 王志学, 等. 解磷微生物研究及应用进展[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 1-7. CHI J L, HAO M, WANG Z X, et al. Advances in research and application of phosphorus-solubilizing microorganism[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 41(1): 1-7.
- [14] 杜雷, 王素萍, 陈岗, 等. 一株高效解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2017(3): 136-141. DU L, WANG S P, CHEN G, et al. Isolation and identification of efficient phosphate-solubilizing bacterial strain and its phosphate-solubilizing capacity[J]. *Soils and Fertilizers Sciences in China*, 2017(3): 136-141.
- [15] 唐岷宸, 李文静, 宋天顺, 等. 一株高效解磷菌的筛选及其解磷效果验证[J]. 生物技术通报, 2020, 36(6): 102-109. TANG M C, LI W J, SONG T S, et al. Screening of a highly efficient phosphate-solubilizing bacterium and validation of its phosphate-solubilizing effect[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(6): 102-109.
- [16] KOUR D, RANA K L, KAUR T. Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and -mobilizing microbes: A review[J]. *Pedosphere*, 2021, 31(1): 43-75.
- [17] AURELIO O, ESTIBALIZ S. Recent advancements for microorganisms and their natural compounds useful in agriculture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105: 891-897.
- [18] 吴娜. 水稻磷转运蛋白OsPT4的生理功能鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 51-64. WU N. Physiological functional identification of rice phosphate transporter OsPT4[D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2011: 51-64.
- [19] 曹璇, 臧怀敏, 赵云丽, 等. 磷高效转基因水稻全生育期根际土壤磷组分特征差异[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(10): 1951-1957. CAO X, ZANG H M, ZHAO Y L, et al. Phosphorus fractions in rhizospheric soil of high-phosphorus efficiency transgenic rice during its growth period[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(10): 1951-1957.
- [20] 余贤美, 沈奇宾, 李炳龙, 等. 土壤解磷细菌分离和筛选方法的建立[J]. 热带作物学报, 2008, 29(3): 321-325. YU X M, SHEN Q B, LI B L, et al. Establishment of isolation and screening method of soil phosphorus digesting bacteria[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2008, 29(3): 321-325.
- [21] 庄馥璐, 柴小粉, 高蓓蓓, 等. 苹果根际解磷菌的分离筛选及解磷能力[J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(7): 69-79. ZHUANG F L, CHAI X F, GAO B B, et al. Isolation and screening of phosphorus-solubilizing bacteria in apple rhizosphere[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(7): 69-79.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 362-397. DONG X Z, CAI M Y. Manual for systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 362-397.
- [23] 赵小蓉, 林启美, 孙焱鑫, 等. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 1-4. ZHAO X R, LIN Q M, SUN Y X, et al. The methods for quantifying capacity of bacteria in dissolving P compounds[J]. *Microbiology China*, 2001, 28(1): 1-4.
- [24] 陈定安, 魏小武, 张敏, 等. 油茶树根际土壤解有机磷细菌的分离、鉴定及解磷能力分析[J]. 农业科学与技术, 2020, 21(1): 41-47. CHEN D A, WEI X W, ZHANG M, et al. Isolation, identification and phosphate solubilizing capacity of organophosphate-dissolving bacteria in tea-oil rhizosphere soil[J]. *Agricultural Sciences and Technology*, 2020, 21(1): 41-47.
- [25] 刘泽平, 王志刚, 徐伟慧, 等. 水稻根际促生菌的筛选鉴定及促生能力分析[J]. 农业资源与环境学报, 2018, 35(2): 119-125. LIU Z P, WANG Z G, XU W H, et al. Screen, identification and analysis on the growth-promoting ability for the rice growth-promoting rhizobacteria[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2018, 35(2): 119-125.
- [26] GUAN Z J, LU S B, HUO Y L, et al. Do genetically modified plants affect adversely on soil microbial communities?[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2016, 235: 289-305.
- [27] 叶震. 东祁连山高寒草地土壤优良解磷细菌的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010: 22-24. YE Z. Examining of the excellent phosphate-solubilizing bacteria in soil of east Qilian Mountain alpine meadow[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2010: 22-24.
- [28] 聂振, 林思芹, 林元山. 水稻根际解磷菌的分离鉴定与特性研究[J]. 湖南农业科学, 2021(5): 1-4. NIE Z, LIN S Q, LIN Y S. Isolation, identification and characteristics of phosphate-solubilizing bacteria from rice rhizosphere[J]. *Human Agricultural Sciences*, 2021(5): 1-4.
- [29] 张广志, 吴晓青, 赵晓燕, 等. 设施土壤中解磷-反硝化复合功能细菌筛选及其活性研究[J]. 土壤通报, 2020, 51(6): 1467-1472. ZHANG G Z, WU X Q, ZHAO X Y, et al. Screening and activity of phosphorous releasing and denitrifying bacteria in greenhouse soils[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2020, 51(6): 1467-1472.
- [30] 张艺灿, 刘凤之, 王海波. 根际溶磷微生物促生机制研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2020(2): 1-9. ZHANG Y C, LIU F Z, WANG H B. Research progress on plant-growth-promoting mechanisms of phosphate-solubilizing rhizosphere microbes[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2020(2): 1-9.
- [31] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料, 2001(3): 7-11. ZHAO X R, LIN Q M. Advances in the study of phosphorus degradation by microorganisms[J]. *Soils and Fertilizers*, 2001(3): 7-11.
- [32] 郭鹤宝, 何山文, 王星, 等. 水稻种子内生泛菌(*Pantoea* spp.)系统发育多样性及其促生功能[J]. 微生物学报, 2019, 59(12): 2285-2295. GUO H B, HE W S, WANG X, et al. Phylogenetic diversity and plant growth-promoting characteristics of endophytic *Pantoea* spp. in rice seeds[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(12): 2285-2295.
- [33] KAUR G, REDDY M S. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics[J]. *Pedosphere*, 2015, 25(3): 428-437.
- [34] FENG Y J, SHEN D L, DONG X Z, et al. *In vitro* symplasmata formation in the rice diazotrophic endophyte *Pantoea agglomerans* YS₁₉[J]. *Plant and Soil*, 2003, 255(2): 435-444.
- [35] VERMA S K, KINGSLEY K, IRIZARRY M, et al. Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 122(6): 1680-1691.

(责任编辑: 李丹)