

两株 PGPR 对豇豆苗期生长及土著细菌群落的影响

康贻军, 沈 敏, 王欢莉, 赵庆新

(盐城师范学院生命科学与技术学院, 江苏 盐城 224002)

摘 要:以扬豇 40 为材料,研究了植物根际促生菌 *Pseudomonas chlororaphis* RA6 和 *Bacillus pumilus* WP8 对豇豆种子出苗及幼苗生长的作用,评价浸种及拌土处理的差异,揭示一段时间内,两株植物根际促生菌(PGPR)在土壤中的行为特征及其对土著细菌群落结构的影响。结果表明:PGPR 对豇豆的促生作用因接种方式、接种量的不同而不同。WP8、RA6 浸种处理的出苗率分别比对照提高 14.29%和 9.52%($P<0.05$);15 d 时的株高分别比对照提高 14.39%和 10.40%($P<0.05$);茎叶干物重分别比对照增加 19.69%和 17.71%($P<0.05$)。WP8、RA6 低剂量拌土处理(10^4 cfu $\cdot$ g $^{-1}$ soil, 以下简作“低拌处理”)各指标与对照相比,均无显著差异($P>0.05$)。WP8、RA6 中剂量拌土处理(10^6 cfu $\cdot$ g $^{-1}$ soil, 以下简作“中拌处理”)出苗率和株高均比对照提高,但未达显著差异($P>0.05$);茎叶干物重分别比对照增加 12.71%和 18.59%($P<0.05$)。WP8、RA6 高剂量拌土处理(10^8 cfu $\cdot$ g $^{-1}$ soil, 以下简作“高拌处理”)出苗率分别比对照提高 9.52%和 14.29%($P<0.05$);15 d 时的株高分别比对照提高 6.37%和 7.64%($P<0.05$);茎叶干物重分别比对照增加 27.37%和 20.43%($P<0.05$)。DGGE 指纹图谱分析结果显示:各处理在 15 d 和 45 d 时,除 WP8 浸种处理外,其余土壤微生物群落多样性和对照均已发生明显变化,随时间推延,RA6 菌株在土壤中优势地位更趋明显,表现在 45 d 时仍可明显检测到;WP8 在土壤中存活时间不长,但拌土处理改变了土著细菌的群落结构。推测 WP8 的促生作用很可能与土著微生物群落的变化有关。

关键词:植物根际促生菌;豇豆;土著细菌群落

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)08-1537-07

Effects of Two Plant Growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) on Yardlong Bean Early Seedlings Growth and Indigenous Soil Bacterial Community

KANG Yi-jun, SHEN Min, WANG Huan-li, ZHAO Qing-xin

(School of Life Science and Technology, Yancheng Teachers University, Yancheng 224002, China)

Abstract: The object of the present paper is to explore the effect of two PGPRs, *Pseudomonas chlororaphis* RA6 and *Bacillus pumilus* WP8, on yardlong bean growth, and the difference of two methods of application, seeds soaking and soil drenching, as well as PGPR survival and its impact on the indigenous bacterial community. The results showed that PGPR effects of isolated strains on yardlong bean growth depended on inoculation methods and inoculation size. By seed soaking with WP8 and RA6, germination rate of yardlong bean seeds was increased by 14.29% and 9.52% respectively ($P<0.05$) from the control (CK); plant height at 15 days after germination was increased by 14.39% and 10.40% ($P<0.05$) respectively; above-ground dry weight was increased by 19.69% and 17.71% ($P<0.05$) respectively. By soil drenching with WP8 and RA6, plant height and above-ground dry weight were not significantly different from those of control when inoculation rate was low (10^4 cfu $\cdot$ g $^{-1}$ soil). However when inoculation rate was increased to 10^8 cfu $\cdot$ g $^{-1}$ soil, seed germination rate was increased by 9.52% and 14.29% respectively ($P<0.05$); plant height at 15 days after germination was increased by 6.37% and 7.64% ($P<0.05$); above-ground dry weight was increased by 27.37% and 20.43% ($P<0.05$). These data suggested that the PGPR strains were potential bio-agents promoting yardlong bean growth. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis based on 16S rRNA sequences indicated that microbial communities in PGPR treated soils were obviously different from those in control soil. Strain RA6 specific band became intensified as the time passed. However, strain WP8 specific band became weak as time passed.

Keywords: plant growth promoting rhizobacteria (PGPR); yardlong bean; indigenous soil bacterial community

收稿日期:2012-01-30

基金项目:国家自然科学基金(41101235);江苏省高校自然科学基金(10KJB210005)

作者简介:康贻军(1980—),男,江苏如东人,博士,讲师,主要从事环境及农业微生物学研究。E-mail: yijunkang@yahoo.com

豇豆(*Vigna sesquipedalis*)是我国重要的常规蔬菜品种之一,长年栽培面积超过蔬菜种植面积的10%。豇豆是喜肥植物且全生育期易遭受病虫害,在栽培过程中投入化肥、农药和激素的量相对较高。设施大棚栽培豇豆过程中长期大量施肥,极易造成土壤质量下降和土传病害增多。因此,寻求新的、环境友好的生物制剂,逐步替代豇豆栽培的传统施肥方式,已成为当前蔬菜栽培、植物保护及环境科学领域的一项重要课题。

植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)指生存于植物根际、根表,并能直接或间接地促进或调节植物生长的微生物^[1]。PGPR既可帮助植物从环境中摄入某种养分,进行直接促生;也可通过减轻或预防不良环境因素(如病原菌、重金属等)给植物造成的伤害,从而间接促生^[2]。近些年零星可见国外几篇关于 PGPR 对豇豆促生作用的报道:Shankar 等^[3]研究发现 *Bacillus Pumilus* T4 和 *B. subtilis* GBO3 可以诱导豇豆对菜豆普通花叶病毒的抗性;Babalola 等^[4]报道了 *Enterobacter sakazakii* 8MR5, *Pseudomonas* 44MS8 以及 *Pseudomonas* 10M3 可以通过减少寄生杂草等途径提高豇豆产量。但迄今未见 PGPR 在贫瘠土壤中对豇豆促生作用的报道,而这对于了解豇豆生产中,能否因施用 PGPR 及其制剂以达到减少肥料、农药的施用量这一核心问题非常关键。

基于此,本文用相对贫瘠的校园荒土为生长介质,通过盆栽法研究两株 PGPR 及不同的使用方法对豇豆苗期生长的影响,明确其在土壤中的行为特征,并探究其对土壤土著细菌群落结构的影响,为研发豇豆专用生物菌剂提供素材和依据。

1 材料与方法

1.1 供试种子、菌株及其处理方法

试验所用豇豆品种为“扬豇 12”(江苏省扬州市扬子种业有限公司),供试 PGPR 为前期研究所筛选的 *Pseudomonas chlororaphis* RA6 和 *Bacillus pumilus* WP8^[5]。

取豇豆种子若干,用 70%酒精和 1%次氯酸钠溶液分别处理 5 min 和 1 min,再用无菌 dH₂O 冲洗 3 遍,风干备用。接种 WP8 及 RA6 于液体培养基 NB(蛋白胨 1%,牛肉粉 0.3%,NaCl 0.5%,pH 7.2±0.2), (28±2)℃、180 r·min⁻¹ 摇床培养 48 h 后,转至 50 mL 无菌离心管,5000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃去上清液,

细胞重悬于无菌自来水,混匀,调至 10¹⁰ cfu·mL⁻¹ 浓度,置于 4℃冰箱 3 d 内备用。使用前用无菌水调节至所需细胞浓度。

1.2 豇豆种子 PGPR 浸种方法

将消毒过的豇豆种子在 10⁸ cfu·mL⁻¹ PGPR 细胞液内浸泡 20 min,于无菌操作台上风干,备播种用。

1.3 供试土壤预处理及理化性质测定

土壤取自扬州大学扬子津校区校园内,土质为旱地黄棕壤,其基本理化性状:pH7.31(1:1 水浸),含水率 15.45%,有机质 1.97%,总氮 0.11 g·kg⁻¹,碱解氮 25.16 mg·kg⁻¹,速效磷 9.42 mg·kg⁻¹,速效钾 114.28 mg·kg⁻¹。

1.4 育苗盘装土及 PGPR 拌土方法

育苗盘规格为 25 孔穴,每孔装土重量为 80 g。

PGPR 拌土方法:每孔穴加入 8 mL 10⁹ cfu·mL⁻¹ 的 PGPR,制成 10⁸ cfu·g⁻¹ soil 的高拌处理试样;每孔穴加入 8 mL 10⁷ cfu·mL⁻¹ 的 PGPR,制成 10⁶ cfu·g⁻¹ soil 的中拌处理试样;每孔穴加入 8 mL 10⁵ cfu·mL⁻¹ 的 PGPR,制成 10⁴ cfu·g⁻¹ soil 的低拌处理试样。对照孔穴用 8 mL 自来水代替。

1.5 播种及豇豆生育期管理

于 2010 年 5 月 16 日进行豇豆播种,每孔穴播入 3 粒种子,深度为 2~3 cm,覆土后每孔穴补充 5 mL 自来水,置于室温环境,每日 14 h 光照期(阴天补以日光灯照),10 h 黑暗期。昼、夜平均温度分别为 25、18℃。整个试验期不施任何肥料,只在土表干燥时,每孔穴补以等量自来水。

7 d 后,统计种子出苗率,之后间苗至每穴 1 棵;分别于播种后 7、9、11 d 和 15 d,各处理随机取 5 株幼苗,测量茎长;自来水冲洗后,将茎叶和根部分离,置于烘箱 75~80℃烘 8 h 左右至恒重并称重。

1.6 土壤、纯菌株基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增

选取 RA6 高拌处理播种 45 d 后土壤(图 3 中标作 1)、RA6 高拌处理播种 15 d 后土壤(图 3 中标作 2)、RA6 浸种处理播种 15 d 后土壤(图 3 中标作 3)、RA6 纯菌株(图 3 中标作 4)、对照(原始土样,图 3 中标作 5)、WP8 高拌处理播种 45 d 后土壤(图 3 中标作 6)、WP8 高拌处理播种 15 d 后土壤(图 3 中标作 7)、WP8 浸种处理播种 15 d 后土壤(图 3 中标作 8)、WP8 纯菌株(图 3 中标作 9),按 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil 试剂盒操作规程和冻融法分别提取土壤和纯菌株基因组 DNA。

PCR 扩增引物对包括:P2:ATT ACC GCG GCT

GCT GG;P3-GC:CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G CCT ACG GGA GGC AGC AG (下划线部分为“GC夹”)^[6]。50 μL 的 PCR 反应体系含有:1 $\times$ PCR Buffer,200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs,5 μL BSA (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),1 μL 引物,1 μL 模板,1 $\times$ Taq DNA 聚合酶(Takara,大连宝生物)。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。扩增产物经 2%琼脂糖凝胶(EB 染色)电泳检测后,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存或 4 $^{\circ}\text{C}$ 短期保存备 DGGE 用。

1.7 DGGE 及其分析方法

使用 8%丙烯酰胺凝胶,电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE,变性梯度 30%~70%(100%变性剂含有 7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素和 40%去离子甲酰胺),PCR 产物上样量为 30 μL +5 μL 10 $\times$ loading buffer。80 V、60 $^{\circ}\text{C}$ 、电泳 13 h,EB 染色 30 min,于 SensiCapture 凝胶图像分析系统下成像。用 Quantity one 软件对 DGGE 图谱进行定量分析。

1.8 DDGE 特征条带割胶、克隆及测序

将 DGGE 图谱中优势性条带(或感兴趣的特征条带)标记后割胶回收、轻微捣碎,加入灭菌去离子水、离心、50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后离心取上清作为 PCR 的模板进行 PCR 扩增。所用引物是:P2、P3(不含 GC 夹),PCR 程序同 1.6 节所述。所得产物经琼脂糖凝胶(3S Spin DNA Agarose Gel Purification Kit,申能博彩公司)纯化后,用 pMD 18-T Vector 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,热激转化至 *E. coli* DH5 α 菌株细胞中。在含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 培养基上随机挑取 15 个白色转化子。菌落 PCR 确认阳性克隆后,交由上海生物工程技术有限公司测序。

将测序获得的 16S rDNA 序列在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中进行比对,并提交

Genbank 登记获取基因登录号(Accession number)。

1.9 数据分析及作图方法

数据在 SPSS 15.0 for Windows 里用 Duncan's multiple range test 进行多组样本间差异显著性分析,当 $P<0.05$ 时,认为处理间存在显著差异。

2 结果与分析

2.1 两株 PGPR 对豇豆株高的影响

如图 1,豇豆在育苗盘里生长约 10 d 就已达到株高峰值。15 d 时,WP8 和 RA6 浸种处理的株高分别比 CK 高 14.39%和 10.40%,均达到显著差异;低拌处理时,两株 PGPR 与 CK 之间的差异不显著;RA6 中拌处理比 CK 显著增高,但 WP8 仍差异不显著;高拌时,WP8 和 RA6 分别比 CK 增高 7.56%和 6.61%,差异达显著水平。

比较浸种处理和高拌处理的株高可知:WP8 浸种处理株高比高拌处理显著增高 7.51%,而 RA6 浸种处理比高拌处理增高 2.78%,但差异未达显著水平。

2.2 两株 PGPR 对豇豆出苗率及幼苗茎叶干物重的影响

如图 2-A,WP8、RA6 浸种处理出苗率分别达到 96.0%和 92.0%,比 CK (84.0%) 提高 14.29%和 9.52%,均达到显著差异;WP8 低拌处理出苗率只有 76.0%,比 CK 下降 9.52%,而中拌处理和高拌处理分别比 CK 提高 4.76%和 9.52%。RA6 低拌处理出苗率比 CK 略低,仅有 80.0%,而中拌和高拌的出苗率分别达到 88.0%和 96.0%。

豇豆茎叶组织干物质重结果显示,两株 PGPR 浸种处理的干物质重分别达到 65.16 mg 和 64.08 mg,均比 CK 显著提高,但 WP8 和 RA6 处理差异不显著。WP8 随拌土浓度增加,其茎叶干物重也显著增加。

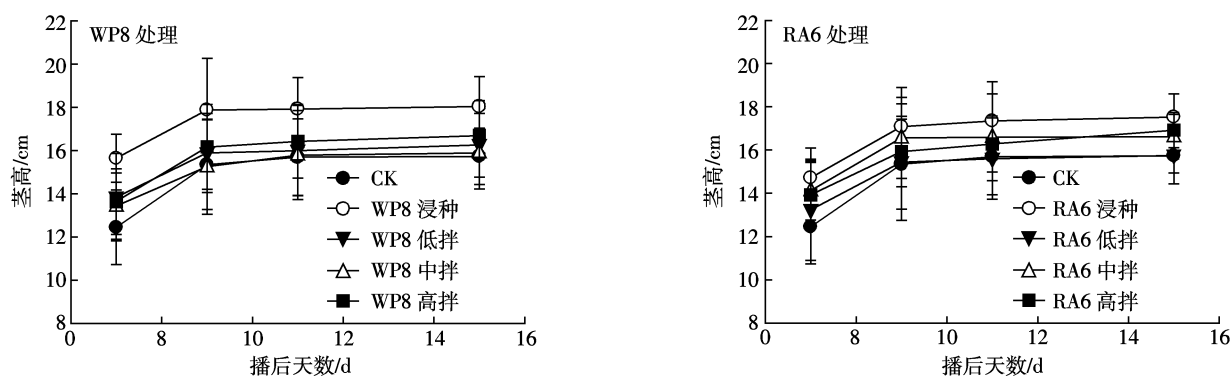


图1 两株 PGPR 及其不同施用方法和浓度对豇豆株高的影响

Figure 1 Effect of two PGPRs with different application methods and inoculum density on shoot height of cowpea seedlings

RA6 中拌和高拌处理之间无显著差异,但都比 CK 显著增加。

如图 2-B,将豇豆茎叶干物重和种子出苗率作相关分析显示,两者之间存在极显著的相关性(Pearson correlation, 2-tailed, $P < 0.01$),说明适合种子出苗的土壤及生长环境,同样也适合豇豆干物质的积累;而豇豆种子出苗率和株高之间则没有显著相关性。说明在衡量 PGPR 对植物促生作用的时候,单测定株高远不足以说明问题。

2.3 两株 PGPR 对土壤土著细菌群落结构的影响

按 1.6 节步骤,提取 9 个处理基因组 DNA,以 P2 和 P3-GC 为引物,扩增 16S rDNA 片段后进行 DGGE 分析。DGGE 图片显示(图 3-A),WP8 和 RA6 在土壤

里的存活情况及其对土著细菌群落的影响差异很大。对 WP8 而言,在 15 d 时可检测到,但在施入土壤 45 d 时未能检出,说明该菌在土壤中的存活时间小于 45 d。WP8 浸种处理的土壤条带多样性和 CK 相似,聚类分析可归为一类(图 3-B),但 WP8 高拌处理以及高拌 45 d 处理土壤和对照差异明显。虽然 WP8 在土壤中存活时间不长,但其高拌处理仍可改变土壤细菌群落。这种改变主要反映在土壤中优势群落的变化,在图谱上表现为某些条带和 CK 相比亮度明显增加,如图中 b、c、d 箭头所指处。对 RA6 而言,1、2、3、4 条带均和 CK 发生变化,但 1 和 2 条带聚类分析归为一类,也就是说 RA6 高拌 45 d 和高拌 15 d 的土壤细菌群落结构未发生重大变化。RA6 无论是通过浸种还是

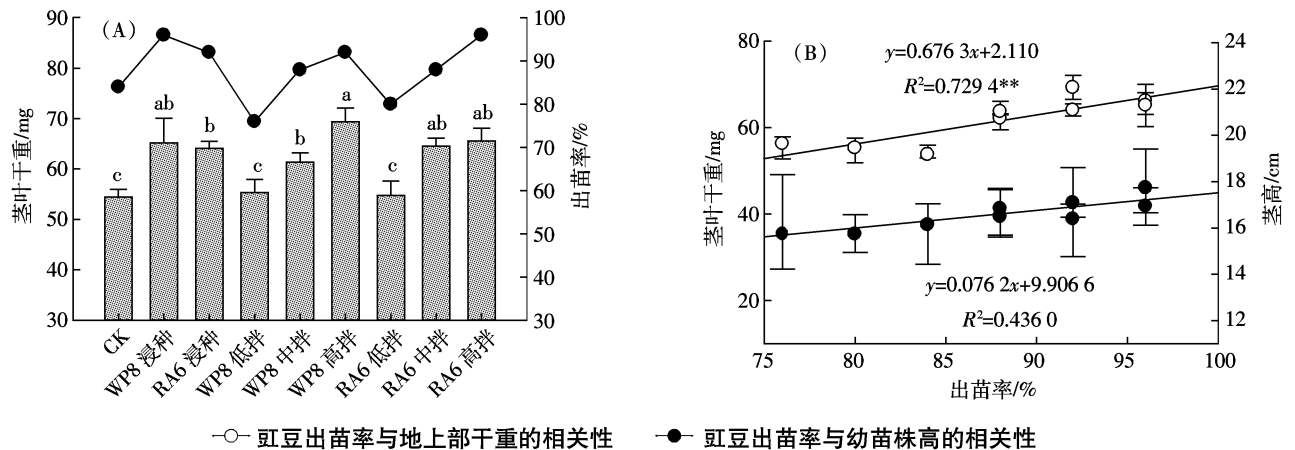


图 2 两株 PGPR 不同处理方法对豇豆出苗率和幼苗干物重的影响(A)及其相关性分析(B)

Figure 2 Effect of two PGPRs with different application methods and inoculum density on seeds emergency rate and shoot dry weight of cowpea seedlings(A) and the relationships between emergency rate and shoot biomass(hollow circles) and shoot height(solid circles)(B)

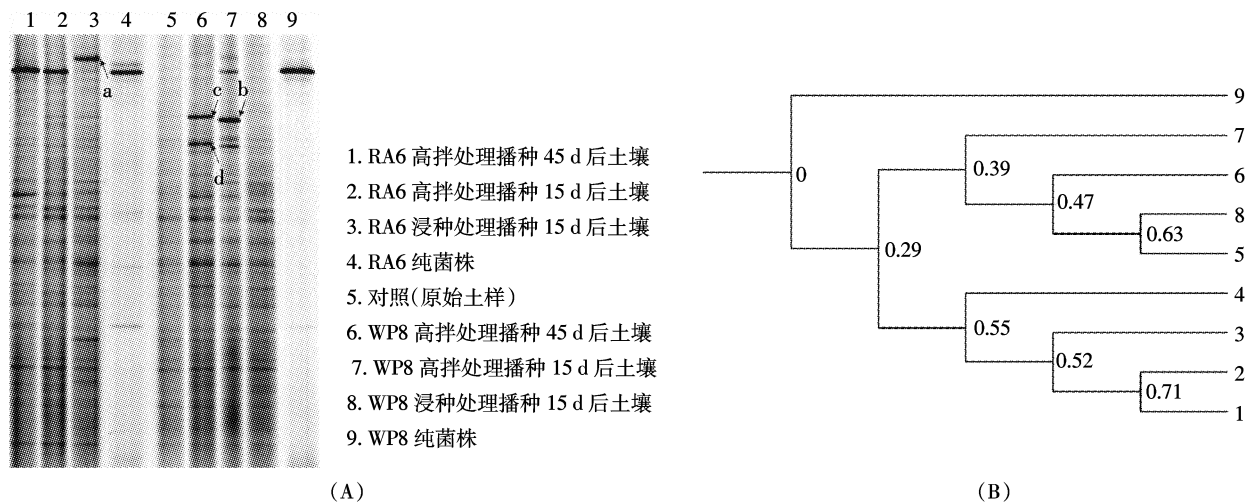


图 3 不同土壤 PCR-DGGE 指纹图谱(A)及各泳道聚类分析图(B)

Figure 3 PCR-DGGE fingerprint of different soils(A) and cluster analysis of DGGE banding patterns(B)

拌土处理,均能很好地在土壤中生存竞争,而且随时间推延,其优势群落地位更趋明显,如图中 1、2、3 条带显示。RA6 浸种处理与拌土处理的差异在图中用 a 箭头标出,而且浸种处理细菌条带数比拌土及 CK 处理少。

表 1 列举了 DGGE 图谱中几条特征条带克隆序列与基因库最相似序列的比对结果。除 d 条带中有一个典型克隆与 *Bdellovibrio bacteriovorus* 具有 99% 的相似度外,其余各条带所对应的序列均是 NCBI 收录的未培养细菌。其中,RA6 浸种处理在一段时间内使得土壤中未培养 δ -变形菌形成优势种群;WP8 拌土处理 45 d 后,其土壤中未培养的 *Acidobacteria* 和 *Bdellovibrio bacteriovorus* 成为优势种群,而后者是一种寄生细菌,其本身具有一定的生防潜力。

3 讨论

豇豆是广受人们喜爱的蔬菜植物,其规模化种植面积逐年提升,但很多地区由于过于追求产量、降低病虫害,以致农药化肥等农资产品大量甚至超量施用,由此造成的食品安全、环境污染、生态破坏等问题也日益显现。很多学者致力于研制适用于如番茄等蔬菜植物的生物肥料和生物农药,但目前很多人尚未关注豇豆栽培这一领域所面临的问题。因此,筛选并研究适合于豇豆生长的 PGPR,可为研制微生物肥料提供菌株素材。

有报道指出接种外源细菌至土壤,其存活和竞争受到接种浓度和接种技术^[7]的影响,由此也会影响到促生效果。本研究中,不同的菌株、不同接种方法和浓度对促生效果存在影响。从结果看,浸种处理无论是出苗率还是株高,以及干物重积累方面均优于拌土处理。Ciccillo 等^[8]发现,*Burkholderia ambifaria* MCI 7 浸种处理能促进植物生长,而拌土处理却产生有害影

响。本文未发现拌土处理对豇豆生长的负面影响,只是其促生效果不如浸种处理而已。另外,从经济学角度,浸种处理的成本远比拌土处理低,这有利于日后的生产应用。

试验中,豇豆出苗率和株高及茎叶干物重的相关性说明适合豇豆出苗的环境条件,同样适合其地上部分干物质的积累,而这与株高却无相关性。因此,在类似试验中,不能单纯以株高等指标来说明问题。对于不是以获得整株植物作为最终收获物的情况下,株高对 PGPR 的促生效果并非是一个必要指标。本实验并未测定比较植物根部指标,如根长、根鲜重、干重等,这并不意味着这些指标不重要,只是较短的生长时间(15 d)对豇豆根部的影响较小,加之实验采用的育苗盘育苗,而非盆栽,这可能也限制了豇豆根的发育伸长,导致根部数据之间缺乏可比性而弃用。

试验发现两株 PGPR (*P. chlororaphis* RA6 和 *B. pumilus* WP8)能显著促进豇豆种子出苗和幼苗生长,但 PCR-DGGE 指纹图谱显示两株 PGPR 在同一土壤中的行为特点及其对土著微生物群落的影响各不相同。RA6 在试验土壤中的特点是:(1)有较强的存活、竞争能力,且随时间推延,优势地位越明显;(2)形成 RA6 单优势种群。WP8 在试验土壤中的特点是:(1)存活时间小于 45 d,但该菌可引起其他多于一种优势种群的产生;(2)形成共优势种群。

RA6 在土壤中的行为特征,代表了人们关于 PGPR 促生条件的普遍看法。即外源 PGPR 在土壤中必须能存活,并在根际定殖形成一定的种群密度^[9-10]。由于同一种植物,根际微生物群落结构通常是稳定的^[11],这意味着只要 PGPR 在土壤中能存活,那么根际定殖应该没有问题(因为筛选 PGPR 就有根际定殖指标,但缺乏其土壤中存活的指标),因此 PGPR 在土壤中存活和竞争成了促生表现的首要条件^[12]。一些研

表 1 测序克隆序列与其 Genbank 最相似序列的比对结果

Table 1 Comparison between determined clone sequence and its most similar sequence in Genbank

条带 Band	长度 Length	亲缘性最近 Closest relative	相似度 Similarity
a	193 bp	Uncultured delta proteobacterium clone AUVE_06G02(EF651304)	100%
b	189 bp	Uncultured bacterium clone WIF18(HQ166681)	100%
c	191 bp	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone KBS_T1_R4_149264_c8(HM062409)	100%
	172 bp	Uncultured bacterium clone;PSAE039(AB533429)	100%
d	172 bp	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> (GQ427200)	99%
	191 bp	Uncultured bacterium clone sbrh_5(FJ174974)	100%

注:以上 6 段序列在 Genbank 中的登录号依次为:JF700232、JF700233、JF700234、JF700235、JF700236 和 JF700237。

Note: Genbank accession numbers of 6 sequences above are JF700232, JF700233, JF700234, JF700235, JF700236 and JF700237.

究也证实在土壤中能长期存活的 PGPR 与促生能力的关系。Jeon 等^[13]通过吡啶橙直接计数监测了土壤中接种的 *Pseudomonas* sp., 数量在 2 个月内远比未接种土壤高; Raaijmakers 等^[14]发现 *P. fluorescens* Q8rl-96 能从接种初期的低细胞密度群体 ($10\sim100\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}\text{ soil}$) 迅速建立起高密度群体 ($10^7\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}\text{ soil}$), 其抗病性在连续种植 8 轮后依然保持; 而 *P. fluorescens* Q2-87 和 1M1-96 在连续种植 8 轮后消失, 并伴随着抗病性的丧失。Landa 等^[15]的研究也有类似结论。因此, 像 RA6 这样的一类 PGPR, 其首要促生条件是能在土壤中存活和竞争。

再来看 WP8, 它在土壤中不能长期存活和竞争, 因此不满足人们通常认可的促生条件。那么, WP8 的促生机制到底是什么呢? 从前期研究结果^[9]看, WP8 只存在产嗜铁素 (Siderophore) 这一项体外促生指标, 而嗜铁素往往与提高植物抗病性相关^[16]。相较而言, RA6 却存在产 HCN、嗜铁素及溶钾等促生指标。因此, WP8 的促生途径 (或机制) 并非常见。从 PCR-DGGE 指纹图谱看, WP8 虽不能长期存活, 却能一定程度上影响土壤微生物优势种群, 根据微生物学原理, 土壤微生物优势种群对整个微生物群落起决定作用, 因而 WP8 对土壤土著微生物群落产生了影响。在排除其他可能之后, 我们推测 WP8 的促生表现很可能与土壤土著微生物群落的改变有关。

已有研究表明外源 PGPR 能在一定程度上改变土壤 (或根际土壤) 微生物群落^[17-18], 遗憾的是, 这些研究都没有 PGPR 存活时间的同期数据, 因此我们无法从前人的工作结果中找到答案。事实上, 曾经有学者提出“PGPR 对土著微生物群落的影响是其另一个促生机制”的假说^[19], 只是至今未能证明。Ramos 等^[20]研究发现, *Bacillus licheniformis* 对欧洲桉木促生效果越好, 则土壤微生物群落响应幅度越明显。最近一项研究显示, 接种 *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 能在某一阶段改变大麦根际土壤中的优势菌群, 但其本身并不能形成优势种群^[21]。由此可以肯定的是, 自然界确实存在类似 WP8 的 PGPR, 它们在土壤中存活时间不长, 但能通过调控土壤微生物群落进行促生。

此外, WP8 的作用机制也许/一定不止一个。对于拌土处理而言, 我们认为这可能与微生物群落的改变有关, 这也许是 WP8 的另一条 (但不是唯一) 促生途径, 至于浸种处理从原理上讲, 应该不会对非根际土壤产生较大影响, 其作用机制可能是通过其他途径 (具体未知)。本研究只是说明 WP8 或类似 WP8

这类细菌可能的另一条促生途径, 具体尚需进一步实验证明。

4 结论

(1) 通过豇豆育苗试验, 证明 *Pseudomonas chlororaphis* RA6 和 *Bacillus pumilus* WP8 对豇豆种子出苗及幼苗生长具有显著的促进作用, 浸种处理的效果总体优于拌土处理。

(2) DGGE 指纹图谱揭示 RA6 和 WP8 的作用机制不同, RA6 可较长时间存活于土壤中并有促生效果, WP8 则可能通过影响土著微生物群落发挥促生作用。

参考文献:

- [1] Ahmad F, Ahmad I, Khan M. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities [J]. *Microbiological Research*, 2008, 163(2): 173-181.
- [2] 康貽军, 程 洁, 梅丽娟, 等. 植物根际促生菌作用机制研究进展[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(1): 232-238.
KANG Yi-jun, CHENG Jie, MEI Li-juan, et al. Action mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): A review [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(1): 232-238.
- [3] Shankar A C U, Nayaka S C, Niranjana-Raj S, et al. Rhizobacteria-mediated resistance against the blackeye cowpea mosaic strain of bean common mosaic virus in cowpea (*Vigna unguiculata*) [J]. *Pest Management Science*, 2009, 65(10): 1059-1064.
- [4] Babalola O O, Sanni A I, Odhiambo G D, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria do not pose any deleterious effect on cowpea and detectable amounts of ethylene are produced [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23(6): 747-752.
- [5] 康貽军, 程 洁, 梅丽娟, 等. 植物根际促生菌的筛选及鉴定[J]. *微生物学报*, 2010, 50(7): 853-861.
KANG Yi-jun, CHENG Jie, MEI Li-juan, et al. Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(7): 853-861.
- [6] Muyzer G, Waal E C D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [7] van Elsas J D, Heijnen C E. Methods for the introduction of bacteria into soil: A review [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1990, 10: 127-133.
- [8] Ciccillo F, Fiore A, Bevilacqua A, et al. Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity [J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(4): 238-245.
- [9] Holl F B, Chanway C P. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa* [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, 38(4): 303-308.

- [10] Hatzinger P B, Alexander M. Relationship between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa[J]. *Plant and Soil*, 1994, 158(2):211–222.
- [11] Tilak K V B R, Ranganayaki N, Pal K K, et al. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria[J]. *Current Science (India)*, 2005, 89(1):136–150.
- [12] Cattelan A J, Hartel P G, Fuhrmann J J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1999, 63(6):1670–1680.
- [13] Jeon J S, Lee S S, Kim H Y, et al. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2003, 41(4):271–276.
- [14] Raaijmakers J M, Weller D M. Exploiting genotypic diversity of 2, 4-Diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. :Characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1–96[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2001, 67(6):2545–2554.
- [15] Landa B B, Mavrodi D M, Thomashow L S, et al. Interactions between strains of 2, 4 – diacetylphloroglucinol – producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat[J]. *Phytopathology*, 2003, 93(8):982–994.
- [16] Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(4):307–319.
- [17] Baudoin E, Nazaret S, Mougel C, et al. Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(2):409–413.
- [18] Naiman A D, Latrónico A, de Salamone I E G. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* :Impact on the production and culturable rhizosphere microflora[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 45(1):44–51.
- [19] Probanza A, García J A L, Palomino M R, et al. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105)[J]. *Applied Soil Ecology*, 2002, 20(2):75–84.
- [20] Ramos B, García J A L, Probanza A, et al. Alterations in the rhizobacterial community associated with European alder growth when inoculated with PGPR strain *Bacillus licheniformis*[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2003, 49(1):61–68.
- [21] Buddrus-Schiemann K, Schmid M, Schreiner K, et al. Root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(2):381–393.