

海洋生境芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) T28菌株对番茄生长的多功能促进作用

崔荣强^{1,2}, 张久明¹, 马湘君¹, 李闯¹, 田黎^{1,2,*}

¹青岛科技大学生物系, 山东青岛266042; ²国家海洋局第一海洋研究所, 山东青岛266061

摘要: 以来自海洋生境具有强抑菌作用的芽孢杆菌T28为试验菌株, 采用生物学与分子生物学方法研究其对番茄生长的多种促进作用。结果表明, T28菌株具有固氮酶基因*nifH*和固氮作用, 可以分解磷和钾, 产生铁载体和促生长植物激素IAA。标记的T28菌株可在番茄植株上定殖, 从而提高番茄苗的叶绿素含量, 定殖15 d后比对照的叶绿素含量高33.3%, 且差异显著。从T28菌株中扩增到 γ -谷氨酰胺激酶(GK)基因*proB*, 推测T28菌株可能通过对脯氨酸的调节来诱导植物抗盐。病害防治试验证明, T28菌株对番茄灰霉病防效为68.8%, 防治效果明显。

关键词: 海洋生境芽孢杆菌T28菌株; 番茄; 多种功能

Multifunction of Marine *Bacillus* sp. Strain T28 on Tomato Growth-Promoting

CUI Rong-Qiang^{1,2}, ZHANG Jiu-Ming¹, MA Xiang-Jun¹, LI Chuang¹, TIAN Li^{1,2,*}

¹Biology Department, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao, Shandong 266042, China; ²First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, Shandong 266061, China

Abstract: In this study, the multifunction on tomato such as *nifH* gene and nitrogen fixation, phosphate- and potassium-dissolving, siderophore and indole-3-acetic acid (IAA) production abilities, was investigated using marine *Bacillus* sp. strain T28 *in vitro* and *in vivo*. With gene *nifH*, *proB*, siderophore and IAA production inferred that the strain promoted tomato growth by nitrogen fixation, phosphate- and potassium-dissolving and proline gathering to resist salt stress. The chlorophyll content in tomato seedlings was increased 33.3% after marked strain colonization 15 d and control effects on *Botrytis cinerea* was 68.8%.

Key words: marine *Bacillus* sp. strain T28; tomato; multifunction

微生物对植物生长、营养吸收、抗病和抗逆起着重要作用, 选择和促进微生物对植物的有益功能, 可降低农药和化肥的使用, 更有利于环境和农产品的安全, 也可满足人们注重生活质量崇尚有机农产品的需求。耕地盐渍化一直是我国可持续农业发展面临的突出问题, 随着温室大棚等设施生产的发展, 土壤次生盐渍化程度也不断加重(石伟等2011), 在众多的提高植物抗盐和降低土壤盐碱量的研究中, 有益微生物的作用得到重视。有益微生物对植物起作用首先要在植株体内定殖, 其定殖能力决定对植物作用的大小(Kloepper和Beauchamp 1992)。陆地微生物因生长条件限制, 较难在盐渍土壤中定殖, 而海洋微生物的原生境使其具备在高盐、低温环境下生长的优势。有报道认为, 表面活性素(surfactin)会加速生物膜的形成(索雅丽等2010), 从而通过快速增加表面动力促进有益菌在根部定殖, 其合成基因*srfAA*和*srfAB*受到关注。在高渗环境中, 一些生物通过调节脯氨酸含量, 应对外界渗透压变化, 这种调节受基因控

制, 通过基因测试能更准确获得具有此功能的菌株, 已证明*proB*基因控制的 γ -谷氨酰胺激酶(γ -glutamyl kinase, GK)参与了脯氨酸调节, 成为人们选择有益菌株的参考(刘瑞杰等2005)。

氮、磷、钾是植物生长必需的大量元素, 微生物的固氮作用可增加土壤氮素含量, 通过较保守的固氮酶(nitrogenase)基因*nifH*可以快速、准确地选择固氮菌株(章秋艳等2013)。土壤存在有大量无机磷和硅酸盐矿物形式的钾, 由于其溶解性差, 难于被植物吸收, 一些细菌可借助生命活动过程产生物质将难溶的磷、钾元素转变为可溶态以供植物利用(蔡磊等2002)。铁载体(siderophores)是一类具有很强特异螯合 Fe^{3+} 的小分子化合物, 许多植物根际微生物可通过合成这类物质来摄取环境中的铁, 并将多余的铁提供给植物利用(Henkels和

收稿 2015-05-08 修定 2015-10-30

资助 国家高技术“863”研究发展计划(2011AA10A202-2)、“十二五”国家科技支撑计划(2011BAE06B04)。

* 通讯作者(E-mail: tianli@fio.org.cn; Tel: 0532-88967423)。

Loper 1999)。吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)是一种植物体内的内源生长素,参与细胞生长、形成层分裂、维管组织分化等多种生理生化过程的调节与控制,具有分泌IAA活性的细菌能够促进植物种子萌发和生长(潘丽晶等2014)。

芽孢杆菌具有以营养与空间竞争、分泌抗菌物质、诱导植物抗性、对高等动物无毒害、不污染环境等优点,成为重要的植物生防菌,如果在防治病害的同时,兼能促进植物生长和抗逆能力,则为生防菌株的首选。相比陆地生境芽孢杆菌,海洋生境的芽孢杆菌在农业应用的研究相对较少,本文对来自潮间带红树植物芽孢杆菌T28菌株进行了相关研究,旨在为该菌株的进一步应用提供科学基础。

材料与方 法

1 供试菌株和植物材料

芽孢杆菌T28菌株由本课题组分离自广西山口潮间带红树植物,根据生理生化特性及16S rDNA基因序列分析及同源性比较,鉴定为*Bacillus* sp.,经抑菌谱测试,其对本课题组保存的番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、番茄叶霉病菌(*Cladosporium fulvum*)、马铃薯早疫病菌(*Alternaria solani*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotium*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)等7种农药筛选靶标菌具有较强的抑菌作用,抑菌率为75.3%~88.9%。

番茄(*Lycopersicon esculentum* M.)品种‘T2-69’的种子与土壤经消毒处理,育种钵内番茄培养至3~4片和6~7片叶备用。

2 培养基及菌悬液的制备

LB培养基和PDA培养基用于T28菌株培养和发酵及对峙抑菌试验;PKO无机磷培养基和解钾培养基(李显刚等2012;闫华晓等2012)用于测试菌株对磷、钾的降解作用;CAS培养基(赵翔等2006)用于观察菌株铁载体的产生;L-色氨酸的R₂A培养基(刘琳等2010)用于测试菌株IAA产生;ACCC55培养基(孙建光等2009)用于判断T28菌株固氮特性;NA培养基(蔡学清等2003)用于抗Rif突变株的筛选和定殖测试。

制备海洋芽孢杆菌悬液时,将T28菌株置于LB培养液中,于30℃下150 r·min⁻¹振荡培养4~5 d,调节浓度至10⁶ cfu·mL⁻¹。

制备病原真菌孢子悬液时,将番茄灰霉病菌发酵7 d,用4层纱布滤去菌丝,调节孢子浓度至200 cfu·mL⁻¹。

3 T28菌株耐盐定殖力的测试

T28菌株的利福平(300 μg·mL⁻¹)标记及筛选参考范晓静等(2013)的方法。

参照崔金香等(2010)的方法进行番茄苗定殖。取三至四叶期的番茄苗,浸入T28菌株悬浮液30 min(以浸水为对照),分别栽到灭菌的普通土与盐渍土盆钵内,于处理后2、4、7、10、15 d随机各抽取3棵苗的根、茎、叶0.5 g,无菌水冲洗并研碎,稀释后涂布在含有300 μg·mL⁻¹ Rif的NA平板上,3次重复,28℃下培养2~3 d后计数。

4 *srfAA*和*srfAB*基因的检测

参照文献(Joshi和McSpadden Gardener 2006)设计*srfAA*和*srfAB*引物序列。50 μL反应体系中包括双蒸水37.5 μL、10×Buffer 5 μL、200 μmol·L⁻¹ dNTP 4 μL、引物2 μL、*Taq*酶0.5 μL、基因组DNA 1 μL。*srfAA*的PCR扩增条件为:94℃预变性5 min;94℃ 1 min,62℃ 1 min,72℃ 1 min,30个循环;72℃延伸10 min。*srfAB*退火温度为58℃。扩增产物送北京华大基因公司测序。

5 *proB*基因的扩增

参照文献(张小青等2002)设计的引物序列为:5'-CACAAGCGCGTTCAATCAATCAAGGTGG-3';5'-CAGTTCTTTGCGGAGTCCGTTTGC-3'。反应体系同第4节。扩增条件为:94℃预变性5 min;94℃ 1 min,54℃ 70 s,72℃ 2 min,30个循环;72℃延伸10 min。

6 叶绿素含量测定

参照崔金香等(2010)的方法测定叶绿素含量。取种植在普通土和盐渍土的番茄苗新鲜叶片各0.1 g,加入少量碳酸镁和石英砂及4 mL丙酮,研成匀浆,过滤后转入10 mL容量瓶,用80%丙酮定容至10 mL。调分光光度计波长为663、645 nm,分别测定样品液的A₆₆₃、A₆₄₅。

7 *nifH*基因的检测

参考Mehta等(2003)的方法检测*nifH*基因。设

计的PCR引物序列为: 5'-GGCTGCGATCCAAGG-CCGATCACCCG-3'; 5'-CTGGCCTTGTTCGCG-GATGGCATGGC-3'。反应体系同第4节。PCR条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 延伸10 min。扩增产物送北京华大基因测序。

8 菌株固氮、降解磷和钾及产铁载体的检测

将在LB平板上培养48 h的T28菌株分别接在ACCC55培养基、PKO无机磷培养基、解钾培养基、CAS培养基上, 3个重复, 29 °C培养72 h, 观察菌株生长及产生透明圈直径。参照Machuca和Milagres (2003)的方法, 将发酵液在离心力560×g下离心15 min, 取上清与CAS染液以1:1 (V/V)混匀, 静置1 h, 用分光光度计测定波长为630 nm的吸光值(A_s), 未接种的培养基在波长630 nm的吸光值为参比值(A_r), 根据公式: $[(A_r - A_s)/A_r] \times 100$ 计算铁载体活性。

9 IAA的检测

将T28菌株接种于含有100 mg·L⁻¹ L-色氨酸的R₂A培养基(Glickmann和Dessaux 1995)中, 30 °C、150 r·min⁻¹培养5 d, 取50 μL菌悬液滴于白色陶瓷板上, 加50 μL Salkowski比色液, 以50 μL IAA (50 mg·L⁻¹)的比色液作为阳性对照。颜色变红表示能产生IAA。

10 番茄灰霉病防治试验

将番茄灰霉病菌孢子悬液喷施番茄苗, 叶片开始表现症状后喷施T28菌悬液, 每个处理15株共60片叶, 以无菌水为对照, 重复3次。喷施T28菌悬液6 d后调查发病情况, 计算病情指数和防治效果(Wallwork等1996)。

11 数据分析方法

采用SPSS 19.0进行数据统计分析。

实验结果

1 T28菌株的固氮及降解磷和钾的能力

以T28菌株DNA为模板, 扩增到710 bp的特征性条带, 将测序结果在NCBI中与已知序列进行BLAST, T28菌株的*nifH*基因与*Bacillus amyloliquefaciens* BA-1 (AWQY01000002)的*nifH*基因同源性为91%。

培养观察显示, T28菌株在ACCC55培养基长势良好, 培养4 d后菌落直径为15 mm, 菌落为乳白

色, 光滑湿润。在PKO无机磷培养基和解钾培养基上均产生晕圈(表1)。证明T28菌株具有固氮及分解磷和钾的能力。

表1 T28菌株分解磷和钾并产铁载体

Table 1 The strain T28 dissolves phosphate and potassium, and produces siderophore

| 培养基 | 晕圈平均直径/mm | 菌落平均直径/mm |
|-----------|------------------------|-----------------------|
| PKO无机磷培养基 | 14.0±0.75 ^a | 6.2±0.25 ^b |
| 解钾培养基 | 17.1±0.85 ^a | 9.2±0.35 ^b |
| CAS培养基 | 17.6±1.23 ^a | 8.3±0.49 ^b |

同行不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 图2、表2同此。

2 T28菌株能产生铁载体及合成IAA

T28菌株在CAS培养基产生较明显橙黄色晕圈(表1), 随培养时间的延长, 橙黄色晕圈会逐渐变大, 培养4 d时, 分光光度计测得的 A_s 和 A_r 值分别为0.202和0.552, 计算出铁载体活性为63.4%, 证明菌株具有产生铁载体的能力且活性较强(孙磊等2011)。菌悬液与Salkowski比色液混合后呈现阳性的红色, 同时在进行其他试验中也观察到, 喷T28菌株的盆栽番茄苗生长较快, 说明T28菌株能产生IAA, 对番茄生长具有促进作用。

3 T28菌株在番茄定殖及促进耐盐作用

从T28菌株扩增到*srfAA*与*srfAB*基因簇片段大小为737和197 bp的特征性条带, 将测序结果在NCBI中与已知序列BLAST的结果表明, *srfAA*基因与*Bacillus subtilis* BEST195 (AP011541)和*B. subtilis* XF-1 (CP004019)的*srfAA*基因同源性为95%; *srfAB*基因与*B. amyloliquefaciens* LFB112 (CP006952)和*B. subtilis* F229u (AF520861)的*srfAB*基因同源性为90%以上, 表明T28菌株可能产生表面活性素, 促进T28菌株在植物体内定殖。

标记的T28菌株在2种土壤上生长的番茄苗中均可正常定殖, 普通土和盐渍土中番茄根部的定殖菌量在测定的第4天达到最高, 分别是 1.39×10^5 、 1.56×10^5 cfu·g⁻¹ (FW), 随着时间延长有所下降, 15 d后分别为 2.4×10^4 、 3.9×10^4 cfu·g⁻¹ (FW), 后者比前者定殖量高40%。T28菌株定殖普通土的茎、叶的最高值分别出现在第7天和第4天, 含量为 2.13×10^4 和 9.3×10^3 cfu·g⁻¹ (FW), T28菌株定殖盐

渍土茎、叶的最高点均出现在第4天, 含量为 2.7×10^4 和 1.2×10^4 cfu·g⁻¹ (FW), 即T28菌株在盐渍土茎、叶定殖量分别比普通土定殖量高27%和29%, 15 d后, 后者茎叶仍可检测到T28菌株, 前者则检测不到(图1)。

4 GK基因及番茄苗中叶绿素含量的变化

从T28菌株扩增到1 325 bp的特征性条带, 将测序结果在NCBI中与已知序列进行BLAST比对的结果表明, 其*proB*基因与*B. subtilis* GK-2 (AY601668)和*B. amyloliquefaciens* AC-1

(NC020410)的*proB*基因同源性在91%以上。推测T28菌株可能通过GK对脯氨酸含量进行调节, 从而达到抗高渗和抗盐作用(蒋雪梅等2013)。

图2显示, 经T28菌株处理15 d的普通土中番茄苗的叶绿素含量为 $2.31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW), 比对照增加10%, 达到显著效果($P < 0.05$); 而盐渍土中番茄苗的叶绿素含量为 $2.07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW), 比对照增加33.3%, 有显著提高($P < 0.01$)。盐胁迫下T28菌株能显著提高番茄苗的叶绿素含量, 经T28菌株处理的番茄苗明显比对照叶色浓绿, 表明T28菌株能够促

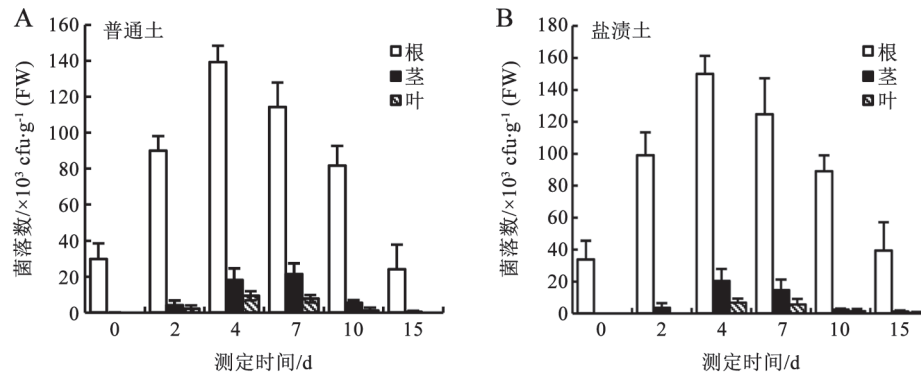


图1 标记的T28菌株在番茄苗的定殖情况

Fig.1 Colonization of tomato by marked strain T28

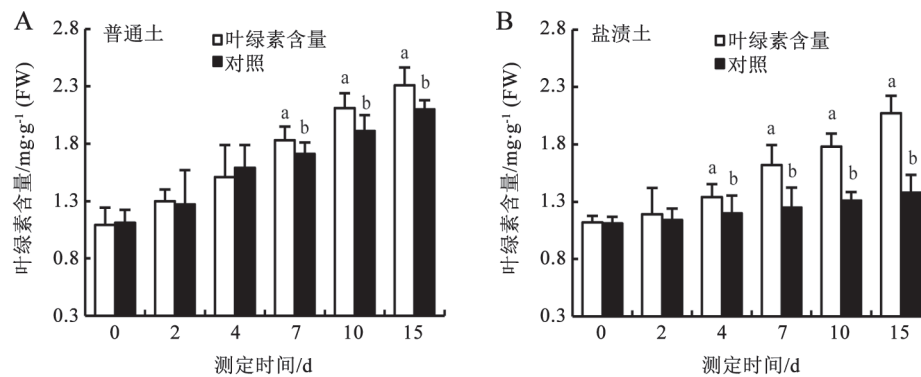


图2 番茄苗在普通土和盐渍土中叶绿素含量的变化

Fig.2 The changes of tomato chlorophyll content in both soil and saline soil

进盐胁迫下植物的生长。

5 番茄灰霉病的防治效果

从表2看出, 喷施T28菌悬液后第6天, 对照的发病指数为68.8%, T28菌株处理的发病指数为29.6%, 防效达到57.0%, 防治效果显著($P < 0.05$), 表明T28对番茄灰霉病具有良好的防治效果。

表2 T28菌株对番茄灰霉病的防治效果

Table 2 The control efficiency of strain T28 to gray mold of tomato

| 喷施菌悬液时间/d | 病情指数/% | | 防治效果/% |
|-----------|------------------------|------------------------|--------|
| | 对照 | T28菌株处理 | |
| 6 | 68.8±0.59 ^a | 29.6±1.24 ^b | 57.0 |

讨 论

提高栽培植物产量是农业生产永恒的目标,我国人多地少的特点对此要求更加迫切,化学农药和化肥在快速控制病虫害和提高产量的同时,对农产品和环境的污染不容忽视,生物农药与肥料以其与环境良好的兼容性日益受到重视,芽孢杆菌是目前生物农药中应用最多的活菌制剂,但实际应用时往往因为生物产品作用缓慢而受到限制,如果生防菌对植物有利的促进作用较多,无疑会增加其利用价值。

我国是土壤盐渍化较严重的国家之一,盐渍化土壤总面积达3 460万ha,相当于耕地的1/3,同时土壤次生盐渍化程度也不断加重,为了利用这些土地,多采用培育耐盐植物品种和使用物理和化学方法降低盐害。土传病害一般使用微生物农药效果较好,但由于目前农药产品的生防菌都来源于陆地,耐盐性能较差,在含盐量较高的土壤中难以存活、定殖和繁殖,影响了其在盐渍地对土传病害的防治。日益受到重视的海洋微生物因原生境的高盐恰好解决了此问题,本课题组曾首次报道了海洋微生物具有良好的诱导植物抗盐的作用(崔金香等2010),如果在此基础上对植物还有其它它有利的作用,开发的潜力将更大,本文初步证明T28菌株还具有固氮、分解磷和钾、产生铁载体和分泌植物生长激素的优良特性。

叶绿素是绿色植物进行光合作用的必需物质,是研究植物生长和生理变化的重要指标,不仅植物病原菌侵染植株会造成叶片光合能力下降(杜国栋等2013),在高盐胁迫下,盐生植物藜苗期叶绿素含量显著下降(吕秀云等2012)。本文结果显示,T28显著提高了盐胁迫番茄叶片中叶绿素的含量(图2),可能与T28菌株诱导番茄抗盐有关。随着对固氮菌研究的深入,固氮菌发现的种类日益增多,但能够产生芽孢的相对较少(Ding等2005),而海洋生境芽孢杆菌作为益生菌对植物氮、磷、钾的促进作用更少有报道,本文初步探讨了海洋生境芽孢杆菌T28菌株对固氮及分解磷和钾的作用,显示海洋生境微生物具有潜在的农用价值。

参考文献

蔡磊,李文鹏,张克勤(2002). 高效解磷菌株的分离、筛选及其对小

麦苗期生长的促进作用研究. 土壤通报, 33 (1): 44-46

蔡学清,何红,胡方平(2003). 双抗标记法测定枯草芽孢杆菌BS-2和BS-1在辣椒体内的定殖动态. 福建农林大学学报(自然科学版), 32 (1): 41-45

崔金香,田黎,高伟,史振平,张久明(2010). 几株具有农药活性的海洋微生物菌株诱导番茄抗盐作用与机理研究. 农业环境科学学报, 29 (11): 2100-2106

杜国栋,李爽,刘志琨,吕三三,王冰莹(2013). 苹果褐斑病菌侵染对苹果叶片光合机构功能的影响. 植物生理学报, 49 (9): 902-908

范晓静,杨春泉,邱思鑫,胡方平(2013). 番茄细菌性斑点病生防菌的鉴定、防病及定殖力. 福建农林大学学报(自然科学版), 42 (4): 337-341

蒋雪梅,戚文华,肖娟,胥晓,陈坚(2013). 盐胁迫下外源脯氨酸对银杏雌雄幼苗生理生化特性的影响. 植物生理学报, 49 (6): 579-585

李显刚,姚拓,王小利,陆瑞霞(2012). 一株分离自葛藤根际高效溶磷细菌特性研究及菌株鉴定. 中国土壤与肥料, 5 (2): 87-91

刘琳,孙磊,张瑞英,姚娜,李潞滨(2010). 春兰根中可分泌吡啶乙酸的内生细菌多样性. 生物多样性, 18 (2): 195-200

刘瑞杰,陈婷,曹军卫(2005). 渗透压调节基因*proBA*的融合表达对大肠杆菌耐高渗透胁迫能力的影响. 微生物学报, 45 (1): 23-26

吕秀云,油天钰,赵娟,陈莎莎,兰海燕(2012). 盐胁迫下藜的形态结构与生理响应. 植物生理学报, 48 (5): 477-484

潘丽晶,陈继敏,张妙彬,何润,蔡晓平(2014). 蝴蝶兰根内生细菌的分离及可分泌IAA细菌的筛选. 中国农学通报, 30 (16): 148-152

石伟,高野哲夫,柳参奎(2011). 一株耐碳酸盐*Bacillus*属细菌的鉴定和特性分析. 基因组学与应用生物学, 30 (5): 603-607

孙建光,张春燕,徐晶,胡海燕(2009). 高效固氮芽孢杆菌筛选及其生物学特性. 中国农业科学, 42 (6): 2043-2051

孙磊,邵红,刘琳,张瑞英,赵立华,李潞滨,姚娜(2010). 可产生铁载体的春兰根内生细菌多样性. 微生物学报, 51 (2): 189-195

索雅丽,李术娜,李红亚,王全,王树香,朱宝成(2010). 番茄灰霉病菌拮抗菌株的筛选及功能基因的分析. 中国植保导刊, 30 (8): 7-10

闫华晓,赵辉,朱硕斐,薛彦辉,许秀坤,王德虎(2009). 6株硅酸盐细菌解磷解钾活性的研究. 安徽农业科学, 37 (28): 13728-13729

章秋艳,赵建宁,李刚,王丽娟,王慧,常泓,杨殿林(2013). 不同耐草甘膦转基因大豆对根际土壤固氮细菌多样性的影响. 农业环境科学学报, 32 (9): 1827-1833

张小青,曹军卫,翟超,陈建军(2002). 枯草芽孢杆菌渗透压调节基因*proB*的克隆和表达. 微生物学报, 42 (2): 163-168

赵翔,谢志雄,陈绍兴,沈萍(2006). 适合高产铁载体细菌筛选、检测体系的改进与探析. 微生物学通报, 33 (6): 13-18

Ding Y, Wang J, Liu Y, Chen S (2009). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region.

- J Appl Microbiol, 99: 1271~1281
- Glickmann E, Dessaux Y (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl Environ Microbiol, 619 (2): 793~796
- Henkels MD, Loper JE (1999). Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. Appl Environ Microbiol, 65 (12): 5357~5363
- Joshi R, McSpadden Gardener BB (2006). Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. Phytopathology, 96 (2): 145~154
- Kloepper JW, Beachamp CJ (1992). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Can J Microbiol, 38 (6): 667~672
- Machuca A, Milagres AMF (2003). Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. Lett Appl Microbiol, 36: 177~181
- Mehta MP, Butterfield DA, Baross JA (2003). Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. Appl Environ Microbiol, 69 (2): 960~970
- Wallwork H (1996). Cereal root and crown diseases. Adelaide: SARDI-GRDC Press, 26~31