



高寒地区牧草根际促生菌的筛选与特性

柴加丽 姚拓 王振龙 韩江茹 张蔚 刘晓婷 李茜

Screening and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from rhizosphere of forage species in an alpine region

CHAI Jiali, YAO Tuo, WANG Zhenlong, HAN Jiangru, ZHANG Wei, LIU Xiaoting, LI Qian

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0553>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

沧州盐碱地紫花苜蓿根际促生细菌的筛选

Screening of plant growth-promoting bacteria in alfalfa grown in saline in Cangzhou, Hebei Province

草业科学. 2017, 11(11): 2211 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0005>

两株根际高效溶磷菌的筛选、鉴定和溶磷特性

Screening, identification, and characteristics of two phosphate-solubilizing bacteria in the rhizosphere

草业科学. 2020, 37(10): 1979 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0158>

塔里木盆地光果甘草内生放线菌的分离鉴定及抗逆、促生特性

The isolation and identification of endophytic actinobacteria from *Glycyrrhiza glabra* in the Tarim basin and their stress resistance and ability to promote plant growth

草业科学. 2018, 12(7): 1624 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0374>

3株分离自高寒草甸根际芽孢杆菌的分子鉴定及其生物活性

Molecular identification and biological activity of three *Bacillus* strains isolated from an alpine meadow rhizosphere in Qinghai Province

草业科学. 2017, 11(12): 2454 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0055>

一株燕麦根腐病生防菌的鉴定及其防治效果

Identification of a biocontrol strain of oat root rot and its control effect

草业科学. 2021, 38(11): 2266 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0713>

青藏高原高寒草甸有毒植物对土壤理化性质和土壤微生物丰度的影响

Effects of toxic plants on soil physicochemical properties and soil microbial abundance in an alpine meadow on the Qinghai-Tibetan Plateau

草业科学. 2019, 36(12): 3033 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2019-0405>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0553

柴加丽, 姚拓, 王振龙, 韩江茹, 张蔚, 刘晓婷, 李茜. 高寒地区牧草根际促生菌的筛选与特性. 草业科学, 2022, 39(9): 1752-1762.

CHAI J L, YAO T, WANG Z L, HAN J R, ZHANG W, LIU X T, LI Q. Screening and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from rhizosphere of forage species in an alpine region. Pratacultural Science, 2022, 39(9): 1752-1762.

高寒地区牧草根际促生菌的筛选与特性

柴加丽¹, 姚拓¹, 王振龙¹, 韩江茹¹, 张蔚¹, 刘晓婷¹, 李茜²

(1. 甘肃农业大学草业学院 / 草业生态系统教育部重点实验室 / 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070;

2. 中国科学院西北高原生物研究所 / 青海省寒区恢复生态学重点实验室, 青海 西宁 810008)

摘要: 为获得高寒地区优良牧草根际促生菌资源, 本研究从高寒地区优良牧草中华羊茅 (*Festuca sinensis*)、草地早熟禾 (*Poa pratensis*)、紫穗鹅观草 (*Roegneria purpurascens*) 根际筛选促生菌, 研究菌株溶解有机磷、溶解无机磷、固氮、分泌激素特性, 并对优良菌株进行分子生物学鉴定。结果表明, 从3种牧草根际共筛选出14株溶解有机磷菌株, 其溶磷量为 6.51~141.49 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 菌株培养液 pH 为 2.97~3.79; 16株溶解无机磷菌株, 溶磷量为 371.29~538.59 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 菌株培养液均呈酸性; 22株固氮菌株, 固氮酶活性 91.71~160.20 $\text{nmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mL})^{-1}(\text{C}_2\text{H}_4)$; 14株分泌植物生长激素 IAA 菌株, 分泌量 0.10~0.92 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 同时分泌赤霉素、玉米素, 分泌量分别为 0.52~139.22 和 0.12~0.99 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。通过测定菌株综合特性, 共筛选出12株促生特性较全面的菌株, 经分子生物学鉴定, 菌株 SPCB4 为华西肠杆菌 (*Enterobacter huaxiensis*), 其余11株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的5个不同种。本研究鉴定的12株植物根际促生菌具有多种促生特性, 为后续草地植被恢复和微生物菌剂研制提供菌种资源和理论基础。

关键词: 高寒草甸; 植物根际促生菌; 溶磷; 固氮; 植物激素; 菌株鉴定; 微生物菌剂

文献标志码: A 文章编号: 1001-0629(2022)09-1752-11

Screening and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from rhizosphere of forage species in an alpine region

CHAI Jiali¹, YAO Tuo¹, WANG Zhenlong¹, HAN Jiangru¹, ZHANG Wei¹, LIU Xiaoting¹, LI Qian²

(1. College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University / The Key Laboratory for Grassland Ecosystem of Education Ministry / China–America Grassland and Animal Husbandry Sustainable Development Research Center, Lanzhou 730070, Gansu, China;

2. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences / Qinghai Provincial Key Laboratory of Restoration Ecology for Cold Regions, Xining 810008, Qinghai, China)

Abstract: This study aimed to obtain growth-promoting bacteria resources of excellent herbage in alpine regions, and then identify strain resources and provide a theoretical basis for grassland vegetation restoration and the development of microbial agents. Growth-promoting bacteria were screened from the rhizosphere of *Festuca sinensis*, *Poa pratensis*, and *Roegneria purpurascens* in the alpine regions. The characteristics of organic and inorganic phosphorus solubilization, nitrogen fixation, and hormone secretion of the strains were evaluated, and the superior strains were identified using molecular biology. The results showed that a total of 14 strains that could dissolve organic phosphorus were screened from the rhizosphere of the three herbage species, with the phosphorus solubilizing capacity ranging from 6.51 to 141.49 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the pH of strain culture media ranged from 2.97 to 3.79. A total of 16 inorganic phosphorus solubilizing strains were identified with

收稿日期: 2021-09-10 接受日期: 2022-01-06

基金项目: 科技部国家重点研发项目 (2019YFC0507703); 甘肃省林业与草原局草原生态修复治理科技支撑项目 (GSAU-TSYF-2021-011)

第一作者: 柴加丽 (1997-), 女, 甘肃民勤人, 在读硕士生, 研究方向为微生物菌剂研制。E-mail:1790744295@qq.com

通信作者: 姚拓 (1968-), 男, 甘肃庆阳人, 教授, 博士, 研究方向为草地生物多样性。E-mail:yaotuo@gsau.edu.cn

phosphorus solubilization capacity of $371.29\sim 538.59\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A total of 22 nitrogen-fixing strains were screened with nitrogen-fixing activity $91.71\sim 160.20\ \text{nmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mL})^{-1}$ (C_2H_4) and 14 strains were found secreting plant growth hormones with secretion levels of IAA at $0.10\sim 0.92\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and those of gibberellin and zeatin at $0.52\sim 139.22$ and $0.12\sim 0.99\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. After molecular biology identification, a total of 12 strains with comprehensive growth-promoting characteristics were screened out. The strain SPCB4 was *Enterobacter huaxiensis*, and the remaining 11 strains were identified as five different species of *Pseudomonas*. The 12 strains of plant growth-promoting rhizobacteria identified in this study exhibited multiple growth-promoting characteristics and provide strain resources and a theoretic basis for subsequent grassland vegetation restoration and development of microbial agents.

Keywords: alpine meadow; plant growth-promoting rhizobacteria; phosphorus dissolution; nitrogen fixation; plant hormones; bacterial identification; microbial bacteria

Corresponding author: YAO Tuo E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

高寒地区是我国重要的生态保护区,该地区海拔高、常年低温、气候条件恶劣,加上不合理放牧等一系列人类活动,使高寒地区草地生态系统受到破坏。研究发现,目前约有90%的可利用天然草地都存在不同程度退化^[1],这不仅改变了植物群落结构,还影响土壤固碳、水土保持等生态服务功能^[2-3]。草地作为发展畜牧业的基础和重要的生态屏障,受多重影响退化严重,因此,加强高寒地区草地生态的保护,探寻促进草地生物生长和恢复的有效措施势在必行^[4]。目前,我国研究学者和相关部门已经采取了一些措施,使用较多的就是围栏封育和施肥,这些方法的实施有力地缓解了高寒地区草地退化问题^[5],但均有一定的弊端,围栏封禁一般年限较长,造成草地资源浪费^[6];另外天然草地施用化肥,虽然可以显著提高地上生物量,但调查显示,我国化肥利用率只有40%左右,大部分化肥施入后以渗透方式进入土壤^[7],间接造成土壤微生物活性下降、养分比例失调、性状恶化,导致草地稳定性和可持续性差^[8]。因此,研制新型肥料对实现高寒草地可持续发展和保护生态环境十分必要^[9]。

植物根际促生菌 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 是一类有益菌,能在植物根际定殖,并通过固氮、溶磷、分泌激素等功能来促进植物生长,利用 PGPR 研制微生物菌肥或菌剂,能够修复土壤结构,改善土壤养分供应状况,持续效果好且对环境无污染^[10-11]。崔晓双等^[12]研究发现 PGPR 对番茄 (*Solanum lycopersium*)、黄瓜 (*Cucumis sativus*) 株高都有显著促进作用;任卓然等^[13]以两株促生菌为基础材料,发现微生物菌肥在退化草地修复中具

有改善土壤理化性质的潜力;Piromyou 等^[14]筛选饲用玉米 (*Zea mays*) 中 PGPR,发现其有利于田间植物生长发育。因此,筛选优良 PGPR 制作微生物菌肥或菌剂的技术为高寒地区植被恢复提供了新思路。鉴于此,本研究从高寒地区优良牧草中华羊茅 (*Festuca sinensis*)、草地早熟禾 (*Poa pretensis*)、紫穗鹅观草 (*Roegneria purpurascens*) 根际筛选低温适应型 PGPR,并将其运用于后续高寒地区微生物菌剂研制,对农业可持续发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

样品于2020年8月采自青海省门源县皇城乡,该采样地位于海北藏族自治州东部,海拔3200-3250 m,地理位置 $37^{\circ}39'51''\ \text{N}$, $101^{\circ}10'44''\ \text{E}$,气候类型属于高原大陆性气候,年平均气温 $0.8\ ^{\circ}\text{C}$,年平均降水量 $500\sim 600\ \text{mm}$ 。植被类型为高寒草甸,优势种包括嵩草 (*Kobresia myosuroides*)、草地早熟禾 (*Poa pretensis*),伴生种主要以禾本科异针茅 (*Stipa aliena*)、中华羊茅 (*Festuca sinensis*) 为主^[15-16]。采集中华羊茅、草地早熟禾、紫穗鹅观草完整植株,标注植物名称和采集日期,贮存于无菌自封袋后放入冰盒中,带回实验室立即进行 PGPR 菌株的分离。

1.2 培养基

固体溶磷培养基^[17]:葡萄糖 10 g,硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 0.1 g,氯化钾 (KCl) 0.3 g,七水合硫酸镁 $(\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 0.25 g,六水合氯化镁 $(\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O})$ 5.0 g,有机磷植酸钙 5.0 g/无机磷 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)]$ 5.0 g,

蒸馏水 1 000 mL, 琼脂 20 g, pH 7.0。

无氮培养基^[9](nitrogen free medium, NFM): 二水合氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.02 g, 七水合硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2 g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 0.5 g, 二水合钼酸钠 ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.002 g, 氯化钠 (NaCl) 0.1 g, 苹果酸 5.0 g, 0.5% 溴百里酚蓝 5 mL, 琼脂 20 g (固体培养基) 或 2 g (半固体培养基), 总体积 1 000 mL, pH 7.0。

King'B 培养基 (KB): 蛋白胨 20 g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 1.15 g, 七水合硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1.5 g, 丙三醇 15 mL。

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.5。

1.3 方法

1.3.1 牧草根际菌株分离纯化

为获得牧草根际所有菌株及分布状况, 参考蒋永梅^[9]的方法, 通常将根际分为 3 个区域, 即根表土壤 (soil adhering to roots, RS)、根系表面 (rhizoplan or surface of roots, RP) 和根内组织 (histoplan or interior of roots, HP)。分离方法: 在超净工作台中抖落牧草根系的土壤后称取 1 g 植物根系, 放入含有 9 mL 生理盐水 (0.85%, 已灭菌) 的试管中, 充分混匀, 得到 RS 区域 10^{-1} 稀释液; 将根系取出并放入另一个含有无菌玻璃珠的 9 mL 生理盐水 (0.85%, 已灭菌) 的试管中, 充分混匀得到 RP 区域的 10^{-1} 稀释液; 再将根系取出用石蜡将根系两端密封, 先用 75% 酒精灭菌 3 min, 然后用无菌水冲洗 2~3 次, 剪去石蜡两端并研磨后全部转入含有 9 mL 生理盐水 (0.85%, 已灭菌) 的试管中, 充分混匀, 得到 HP 区域的 10^{-1} 稀释液; 吸取各区域的 10^{-1} 稀释液 1 mL, 加入含有 9 mL 生理盐水 (0.85%, 已灭菌) 的试管中充分混匀, 得到 10^{-2} 稀释液, 按照梯度稀释法再依次制备浓度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液备用。利用平板涂布法分别将 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液均匀涂布到 NFM 培养基和固体溶磷培养基上, 每个区域的每个梯度稀释液在培养基上各重复 3 次, 15 °C 培养箱中培养 7~10 d, 用接种环挑取能在 NFM 培养基上生长的不同菌落进行纯化, 即为固氮菌株; 挑取固体溶磷培养基上有溶磷圈的不同菌落进行纯化, 即为溶磷菌株, 将纯化后的菌株保存于 4 °C 备用^[18]。

1.3.2 菌株促生特性测定

菌株固氮特性测定^[19]: 乙炔还原法。用接种环将菌株接种于 LB 液体培养基中, 在 15 °C、180 r·min⁻¹ 条件下培养 2~3 d, 并用无菌 LB 液体调节 OD₆₀₀ 一致^[11], 吸取 100 μL 菌液接种于盛有 3 mL 半固体 NFM 培养基的 12 mL 血清瓶中, 每株菌 3 次重复, 以不接菌培养基为对照, 15 °C 培养 48 h 后将棉花塞换成橡胶塞, 用无菌注射器抽出 1 mL 气体并注入 1 mL 乙炔, 15 °C 培养 48 h。用微量进样器抽取混合气体 50 μL 注入气象色谱仪 (Agilent 7890A, 美国) 气体进样柱内, 记录并观察 C₂H₄ 出峰时间及峰面积百分比, 计算固氮酶活性。

菌株溶磷特性测定^[20]: 钼蓝比色法。将固体溶磷培养基上有溶磷圈的菌株接种于装有 20 mL 液体培养基 (已灭菌) 中于 15 °C、180 r·min⁻¹ 条件下培养 10~14 d。取培养液 8 mL 于 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 条件下离心 15 min, 取上清液 1 mL 于 100 mL 三角瓶中, 同时加入 NaHCO₃ 溶液 19 mL, 置于摇床 (180 r·min⁻¹) 摇动 30 min 后, 准确吸取滤液 5 mL, 再加入 5 mL 钼锑抗显色液于 50 mL 容量瓶中, 定容后显色 30 min。用紫外可见光分光光度计测定 OD₇₀₀, 并计算溶磷量。

菌株分泌激素特性测定^[21], 定性判断: 将 PGPR 菌株接种于盛有已灭菌的三角瓶中, 在 15 °C、180 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 10~12 d。吸取各菌液 50 μL 于白瓷板上, 加 50 μL Spot 比色液, 其中对照加 50 μL 浓度为 0.01% 的 3-IAA, 将白瓷板放置于室温黑暗条件下, 20 min 内观察并记录颜色变化。如变深粉色即菌株分泌生长素 (Indole-3-acetic acid, IAA) 能力较强, 用 ++ 表示; 变浅粉色即菌株能分泌 IAA 但能力较弱, 用 + 表示。定量测定: 采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[22] 测定植物激素 (IAA、GA₃、t-Z) 含量。HPLC 色谱条件为: 固定相为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5-Micron), 流动相为甲醇: 水: 冰乙酸溶液 = 45: 54: 1, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 °C, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 进样量为 10 μL。将筛选出的菌株接种于 150 mL KB 液体培养基中, 15 °C、180 r·min⁻¹ 摇床中培养 5 d。发酵液在 4 °C 离心 10 min (5 000 r·min⁻¹) 收集上清液, 用乙酸乙酯萃取后用浓缩仪浓缩至近干, 甲醇定容至 2 mL, HPLC 进行分析。

1.3.3 优良菌株鉴定

将上述分离筛选到的优良 PGPR 菌株在 LB 平板上进行活化, 采用热裂解法提取细菌 DNA, 利用通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rDNA 序列的 PCR 扩增^[23], 反应体系为 2 × Taq PCR MasterMix 25 μL、DNA 模板 3 μL、正反向引物各 1 μL、ddH₂O 20 μL、16S rDNA 序列测定由兰州天启生物科技有限公司完成。将测序结果在 EzbioCloud 的 16S-based ID 数据库中进行同源序列比较, 采用 Mega5.0 软件以邻接法构建所测菌株的系统发育树再次确认^[24]。

1.4 数据分析

采用 SPSS 25.0 软件分析数据, 采用 Duncan 法对不同菌株促生特性 (溶磷、固氮、分泌激素) 进行

差异分析, 采用 Excel 2010 软件作图。

2 结果与分析

2.1 高寒地区牧草根际促生菌数量分布

通过 3 种培养基筛选, 共获得 181 株菌株 (图 1), 分离自中华羊茅根际 59 株, 其中根表土 (RS)、根表面 (RP) 和根内 (HP) 菌株分别占总数的 33.90%、38.98% 和 27.12%; 草地早熟禾根际 64 株, 其中 32.81% 分离自 RS, 39.06% 分离自 RP, 28.13% 分离自 HP; 紫穗鹅观草根际 58 株, 不同区域 (RS、RP、HP) PGPR 占总数的 32.76%、39.66% 和 27.58%。总体来看, 3 种牧草根际促生菌分布均表现出 RP > RS > HP 的分布趋势。通过选择培养基共分离到溶解有机磷 52 株, 溶解无机磷 55 株, 固氮 74 株。

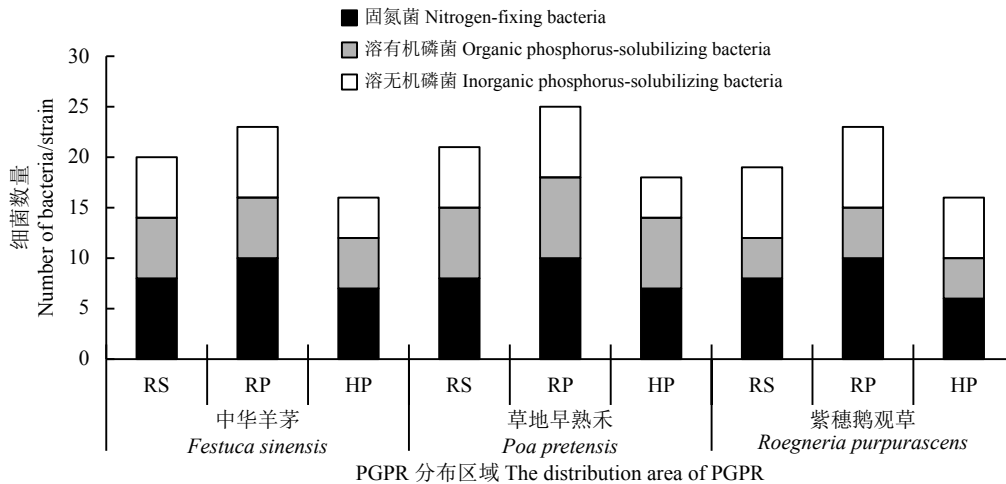


图 1 细菌菌株牧草根际的数量及分布情况

Figure 1 Number and distribution of bacterial strains in the rhizosphere of forage species

RS: 根表土壤; RP: 根系表面; HP: 根内组织; PGPR: 植物根际促生菌。

RS: soil adhering to roots; RP: rhizoplane or surface of roots; HP: histoplane or interior of roots; PGPR: plant growth-promoting rhizobacteria.

2.2 菌株促生特性测定

2.2.1 菌株溶磷特性测定

对溶磷菌株溶磷量测定, 结果表明, 供试的 52 株溶有机磷菌株中有 14 株具有良好的溶解以植酸钙为有机磷磷源的能力, 占供试菌株的 26.92%; 供试的 55 株溶无机磷菌株中有 16 株具有良好的溶解以磷酸三钙为无机磷磷源的能力, 占供试菌株的 29.09%。14 株溶有机磷菌株溶磷量为 6.51~141.49 μg·mL⁻¹ (表 1), 其中 ZMBJ2 溶磷量显著 ($P < 0.05$) 高于其他菌株, 达 141.49 μg·mL⁻¹, GMDB1 溶磷量最低, 为 6.51 μg·mL⁻¹, 溶磷量在 100 μg·mL⁻¹ 以上的菌株有

两株, 分别是 ZMBJ2 和 ZMBN4, 均分离自中华羊茅根际。菌株溶有机磷培养液均呈酸性, pH 2.97~3.79。16 株溶无机磷菌株溶磷量为 371.29~538.59 μg·mL⁻¹ (表 2), 其中菌株 GPDB3 溶磷量最大, 达 538.59 μg·mL⁻¹, 其次是 ZPBN1, 为 533.93 μg·mL⁻¹; 菌株 GPDJ1 溶磷量最小, 为 371.29 μg·mL⁻¹, 菌株溶无机磷培养液 pH 为 3.98~4.79, 呈酸性。

2.2.2 固氮菌株特性测定

对固氮菌株固氮酶活性测定 (表 3) 发现, 不同菌株固氮能力不同, 根据固氮能力共筛选出 22 株优良固氮菌, 固氮酶活性在 91.71~160.20 nmol·(h·mL)⁻¹

表1 PGPR菌株溶解有机磷能力

Table 1 Ability of PGPR to dissolve organic phosphorus

| 菌株编号 Strain code | 溶有机磷量 Dissolved organic phosphorus/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | pH |
|---------------------|--|-----------------|
| ZMBJ1 | 15.83 ± 1.04i | 3.13 ± 0.06efg |
| ZMBJ2 | 141.49 ± 0.48a | 2.97 ± 0.22g |
| ZMBJ3 | 93.68 ± 8.17c | 3.69 ± 0.09abc |
| ZMBB1 | 63.45 ± 0.29e | 3.01 ± 0.05fg |
| ZMBB2 | 11.36 ± 0.57j | 3.31 ± 0.04def |
| ZMBN2 | 69.87 ± 0.29d | 3.79 ± 0.27a |
| ZMBN4 | 120.96 ± 1.00b | 3.72 ± 0.39ab |
| SMCB3 | 73.33 ± 2.13d | 3.38 ± 0.05cde |
| GMDJ1 | 26.35 ± 0.29h | 3.46 ± 0.06bcd |
| GMDJ3 | 44.49 ± 2.19f | 3.53 ± 0.12abcd |
| GMDJ4 | 33.97 ± 1.50g | 3.41 ± 0.20bcde |
| GMDJ5 | 17.78 ± 0.82i | 3.51 ± 0.06abcd |
| GMDB1 | 6.51 ± 0.29k | 3.32 ± 0.02def |
| GMDB3 | 9.91 ± 0.29jk | 3.21 ± 0.25defg |

不同小写字母表示不同菌株之间差异显著($P < 0.05$); 下表同。

Different lowercase letters within the same column indicate significant difference between the different strains at the 0.05 level; this is applicable for the following tables as well.

表2 PGPR菌株溶解无机磷能力

Table 2 Ability of PGPR to dissolve inorganic phosphorus

| 菌株编号 Strain code | 溶无机磷量 Dissolved inorganic phosphorus/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | pH |
|---------------------|--|----------------|
| ZPBJ2 | 417.52 ± 12.36de | 4.34 ± 0.16cde |
| ZPBJ3 | 417.15 ± 15.79de | 3.98 ± 0.06f |
| ZPBB1 | 381.24 ± 11.78f | 4.52 ± 0.20bc |
| ZPBB3 | 485.05 ± 20.03b | 4.09 ± 0.11ef |
| ZPBN1 | 533.93 ± 24.56a | 4.04 ± 0.07f |
| SPCJ2 | 498.65 ± 14.15b | 4.03 ± 0.06cd |
| SPCJ4 | 443.85 ± 5.54cd | 4.19 ± 0.10def |
| SPCB1 | 401.40 ± 27.90ef | 4.79 ± 0.04a |
| SPCB2 | 445.36 ± 24.00cd | 4.56 ± 0.40abc |
| SPCB4 | 470.31 ± 24.46bc | 4.69 ± 0.06ab |
| SPCN2 | 468.29 ± 21.88bc | 4.16 ± 0.10def |
| GPDJ1 | 371.29 ± 2.15f | 4.36 ± 0.03cd |
| GPDJ2 | 465.39 ± 3.17bc | 4.04 ± 0.02f |
| GPDB2 | 374.31 ± 21.21f | 4.40 ± 0.19f |
| GPDB3 | 538.59 ± 28.75a | 3.98 ± 0.04f |
| GPDB4 | 385.20 ± 16.42ef | 3.99 ± 0.05f |

表3 PGPR菌株固氮能力

Table 3 Nitrogen fixing capacity of PGPR strains

| 菌株编号 Strain code | 固氮酶活性(C_2H_4) Nitrogen capacity/[$\text{nmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mL})^{-1}$] |
|---------------------|--|
| ZNBJ1 | 152.53 ± 12.58ab |
| ZNBJ2 | 135.74 ± 17.84abcd |
| ZNBJ3 | 143.63 ± 13.86abc |
| ZNBJ4 | 138.96 ± 21.72abcd |
| ZNBJ5 | 134.74 ± 21.39abcd |
| ZNBJ6 | 143.77 ± 19.73abc |
| ZNBB1 | 121.34 ± 8.43abcd |
| ZNBB2 | 110.60 ± 29.44bcd |
| ZNBB3 | 106.88 ± 10.80bcd |
| ZNBN1 | 131.27 ± 26.22abcd |
| SNCJ1 | 138.46 ± 13.78abcd |
| SNCJ2 | 125.55 ± 25.42abcd |
| SNCJ3 | 135.63 ± 4.70abcd |
| SNCB2 | 129.15 ± 31.61abcd |
| GNDJ1 | 160.20 ± 37.14a |
| GNDJ3 | 101.35 ± 5.66cd |
| GNDJ4 | 139.38 ± 16.02abcd |
| GNDJ5 | 106.62 ± 16.08bcd |
| GNDJ6 | 132.27 ± 4.95abcd |
| GNDB2 | 107.42 ± 46.28bcd |
| GNDN1 | 136.84 ± 17.94abcd |
| GNDN2 | 91.71 ± 60.49d |

(C_2H_4), 其中固氮酶活性在 $150 \text{ nmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mL})^{-1}(\text{C}_2\text{H}_4)$ 以上的菌株有两株, 分别是 GNDJ1 和 ZNBJ1, GNDN2 固氮酶活性最小, 为 $91.71 \text{ nmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mL})^{-1}(\text{C}_2\text{H}_4)$ 。从中华羊茅和紫穗鹅观草根际分离的优良固氮菌数量较多, 而草地早熟禾根际最少。

2.2.3 分泌激素菌株特性测定

对上述溶磷、固氮 PGPR 分泌 IAA 能力定性判断(表4), 发现 14 株菌株具有分泌 IAA 能力, 其中 ZNBJ1、ZMBN4、ZPBN1、SNCJ3、SPCJ2、SPCB4 在显色反应中呈现深粉色, 其余菌株为浅粉色。利用高效液相色谱法对 14 株 PGPR 分泌激素含量测定发现, 菌株分泌赤霉素、IAA、玉米素的含量分别为 $0.52\sim 139.22$ 、 $0.10\sim 0.92$ 和 $0.12\sim 0.99 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 其中, 菌株 ZMBN4 分泌赤霉素能力最强, 显著高于其

表 4 PGPR 菌株分泌植物激素能力
Table 4 Ability of PGPR strains to secrete plant hormones

| 菌株编号 Strain code | 显色反应 Chromogenic reaction | 赤霉素(GA ₃) Gibberellic acid/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 生长素(IAA) Indole-3-acetic acid/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 玉米素(t-Z) Trans-zeatin/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) |
|---------------------|------------------------------|--|---|---|
| ZNBJ1 | ++ | — | 0.27 ± 0.03d | 0.12 ± 0.00e |
| ZNBJ6 | + | — | 0.10 ± 0.01d | 0.14 ± 0.01de |
| ZMBJ3 | + | 2.37 ± 0.03bc | 0.15 ± 0.01d | 0.24 ± 0.00cd |
| ZNBB1 | + | — | 0.12 ± 0.02d | 0.49 ± 0.12b |
| ZMBN2 | + | 5.16 ± 0.63bc | 0.17 ± 0.04d | 0.13 ± 0.01e |
| ZMBN4 | ++ | 139.22 ± 17.62a | 0.34 ± 0.05bc | 0.18 ± 0.01cde |
| ZPBN1 | ++ | 0.52 ± 0.02d | 0.14 ± 0.02d | 0.25 ± 0.05c |
| SNCJ3 | ++ | 12.30 ± 1.49b | 0.41 ± 0.06b | 0.13 ± 0.01e |
| SPCJ2 | ++ | 1.80 ± 0.09bc | 0.13 ± 0.02d | 0.12 ± 0.02e |
| SPCB4 | ++ | 2.99 ± 1.30bc | 0.92 ± 0.13a | 0.99 ± 0.04a |
| GMDJ3 | + | — | 0.12 ± 0.02d | 0.16 ± 0.06cde |
| GNDJ4 | + | 1.00 ± 0.18bc | 0.10 ± 0.002d | 0.15 ± 0.02cde |
| GMDB3 | + | 3.70 ± 0.19bc | 0.11 ± 0.01d | 0.16 ± 0.08cde |
| GPDB3 | + | — | 0.14 ± 0.01d | 0.14 ± 0.01de |

IAA显色反应中：“++”表示深粉色；“+”表示浅粉色。

In the color reaction of IAA; “++” indicates dark pink; “+” indicates light pink.

他菌株 ($P < 0.05$), 菌株 SPCB4 分泌 IAA 和玉米素能力均最强, 相比其他菌株差异显著 ($P < 0.05$).

2.3 菌株综合促生特性评价

对前期筛选的 53 株菌株综合特性测定, 共筛选出 12 株优良 PGPR(表 5), 其中菌株 ZMBJ3、ZMBN4、SPCJ2、SPCB4 同时具有固氮、溶有机磷、溶无机磷、分泌 3 种激素的能力, ZMBJ2 溶有机磷能力较强; ZPBN1、GPDB3 溶无机磷能力较强; ZNBJ1、ZNBJ3、GNDJ1、GNDJ4、GNDN1 固氮能力较强, 综合测定发现上述 12 株 PGPR 促生特性较全面, 可为后期微生物复合菌剂研制提供菌种资源。

2.4 优良 PGPR 菌株的鉴定

通过对 12 株优良 PGPR 测序, 使用 Ezbiocloud 进行同源序列比对, MEGA 7.0 构建系统发育树后, 发现本研究测定的 12 株菌株 16S r DNA 基因序列与所选参比序列的相似度均高于 98% (表 6)。鉴定结果表明, 菌株 SPCB4 为华西肠杆菌 (*Enterobacter huaxiensis*), 其余 11 株菌株均为假单胞菌属, 其中 ZNBJ3、ZNBJ1、SPCJ2、GPDB3、GNDN1、GNDJ1 为

Pseudomonas piscium; ZPBN1、ZMBJ3 为 *Pseudomonas neuropathica*; ZMBJ2 为 *Pseudomonas pisciculturae*; ZMBN4 为 *Pseudomonas bubulae*; GNDJ4 为 *Pseudomonas mucoides*。

3 讨论

本研究发现菌株溶磷量与菌液 pH 没有相关关系, 这与赵小蓉等^[25]、Narsian 和 Patel^[26] 研究结果一致, 而张亮等^[27] 对 5 株自生固氮菌溶磷机制的研究发现, 培养基 pH 与磷含量呈显著负相关关系; 康贻军等^[28] 也发现溶磷菌的溶磷量与培养介质 pH 之间存在良好的相关性。对于溶磷菌的溶磷量与菌液 pH 相关性的研究, 出现不同的研究结果, 究其原因可能与菌株在不同时期的代谢活动有关, 溶磷过程较复杂, 菌株在溶磷时会产生有机酸, 如草酸、乳酸、苹果酸、柠檬酸等, 在有机酸的作用下, 导致菌液呈酸性。不同菌株在不同生长时期产生有机酸种类及含量不同, 导致研究结果不同^[29-30]。因此, 研究菌株培养过程中产生的有机酸及含量, 了解溶磷量与培养液 pH 的动态变化, 才能明确分

表5 优良 PGPR 菌株综合特性
Table 5 Comprehensive characteristics of excellent PGPR strains

| 菌株编号 Strain code | 溶有机磷量 Dissolved organic phosphorus/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 溶无机磷量 Dissolved inorganic phosphorus/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 固氮酶活性 Nitrogen capacity/ $[\text{nmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mL})^{-1}(\text{C}_2\text{H}_4)]$ | 赤霉素(GA_3) Gibberellic acid/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 生长素(IAA)含量 Indole-3-acetic acid/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 玉米素(t-Z) Trans-zeatin/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) |
|---------------------|--|--|--|---|---|---|
| ZMBJ2 | 141.40 ± 0.48a | 307.60 ± 0.19ef | 51.11 ± 7.52b | — | — | — |
| ZMBJ3 | 93.68 ± 8.17c | 373.03 ± 0.50d | 28.06 ± 15.47bc | 2.37 ± 0.03bc | 0.15 ± 0.01d | 0.24 ± 0.00cd |
| ZMBN4 | 120.90 ± 1.00b | 288.50 ± 0.29f | 37.68 ± 16.97bc | 139.20 ± 17.62a | 0.34 ± 0.05bc | 0.10 ± 0.01cde |
| ZPBN1 | 30.44 ± 0.50g | 533.90 ± 24.57a | — | 0.52 ± 0.02d | 0.14 ± 0.02d | 0.25 ± 0.05c |
| ZNBJ1 | 28.68 ± 0.58g | 260.10 ± 0.66g | 152.53 ± 12.58a | — | 0.27 ± 0.03d | 0.12 ± 0.00e |
| ZNBJ3 | 46.00 ± 0.48f | 326.17 ± 0.57e | 143.63 ± 13.86a | — | — | — |
| SPCJ2 | 47.45 ± 0.50f | 498.60 ± 14.15b | 18.50 ± 6.79bc | 1.80 ± 0.09bc | 0.13 ± 0.02d | 0.12 ± 0.02e |
| SPCB4 | 71.70 ± 0.29d | 470.30 ± 24.46c | 14.96 ± 0.47c | 2.99 ± 1.30bc | 0.92 ± 0.13a | 0.99 ± 0.04a |
| GPDB3 | 32.46 ± 0.22g | 538.50 ± 28.75a | 15.34 ± 1.49c | — | 0.14 ± 0.01d | 0.14 ± 0.01de |
| GNDJ1 | 70.94 ± 0.39d | 292.09 ± 4.58f | 160.20 ± 37.14a | — | — | — |
| GNDJ4 | — | 363.90 ± 0.85d | 139.38 ± 16.02a | 1.00 ± 0.18bc | 0.10 ± 0.00 | 0.15 ± 0.02cde |
| GNDN1 | 64.90 ± 0.48e | 319.49 ± 8.95e | 136.84 ± 17.94a | — | — | — |

表6 优良 PGPR 菌株鉴定
Table 6 Identification of superior PGPR strains

| 菌株编号 Strain code | 宿主植物 Host plant | 分离部位 Separation site | 同源性菌株 Homologous strain | 相似度 Similarity/% |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|---------------------|
| SPCB4 | 草地早熟禾 <i>Poa pratensis</i> | RP | <i>Enterobacter huaxiensis</i> | 98.54 |
| ZNBJ3 | 中华羊茅 <i>Festuca sinensis</i> | RS | <i>Pseudomonas piscium</i> | 99.59 |
| ZNBJ1 | 中华羊茅 <i>Festuca sinensis</i> | RS | <i>Pseudomonas piscium</i> | 99.35 |
| SPCJ2 | 草地早熟禾 <i>Poa pratensis</i> | RS | <i>Pseudomonas piscium</i> | 99.19 |
| GPDB3 | 紫穗鹅观草 <i>Roegneria purpurascens</i> | RP | <i>Pseudomonas piscium</i> | 99.59 |
| GNDN1 | 紫穗鹅观草 <i>Roegneria purpurascens</i> | HP | <i>Pseudomonas piscium</i> | 99.59 |
| GNDJ1 | 紫穗鹅观草 <i>Roegneria purpurascens</i> | RS | <i>Pseudomonas piscium</i> | 99.51 |
| ZPBN1 | 中华羊茅 <i>Festuca sinensis</i> | HP | <i>Pseudomonas neuropathica</i> | 98.78 |
| ZMBJ3 | 中华羊茅 <i>Festuca sinensis</i> | RS | <i>Pseudomonas neuropathica</i> | 99.19 |
| ZMBJ2 | 中华羊茅 <i>Festuca sinensis</i> | RS | <i>Pseudomonas pisciculturae</i> | 99.30 |
| ZMBN4 | 中华羊茅 <i>Festuca sinensis</i> | HP | <i>Pseudomonas bubulae</i> | 98.88 |
| GNDJ4 | 紫穗鹅观草 <i>Roegneria purpurascens</i> | RS | <i>Pseudomonas mucoides</i> | 99.19 |

RP: 根表面; RS: 根表土; HP: 根内。

RP: rhizoplane or surface of roots; RS: soil adhering to roots; HP: histoplane or interior of roots.

析其相关关系。

根际固氮菌是定殖于植物根际的固氮细菌,这类细菌不仅为植物生长提供氮素营养,还能活化土壤微生物,从而促进植物生长^[31]。杨婉秋等^[20]从天祝高寒草甸5种牧草根际分离20株固氮菌,固氮酶

活性为5.23~64.87 $\text{nmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mL})^{-1}(\text{C}_2\text{H}_4)$;而本研究从海北高寒草甸3种牧草根际分离到22株固氮能力优良的菌株,固氮酶活性为91.71~160.20 $\text{nmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mL})^{-1}(\text{C}_2\text{H}_4)$ 。固氮酶活性不同主要指微生物体内钼铁固氮酶活性不同,钼铁固氮酶由铁蛋白和钼

铁蛋白组成^[32],主要受样地生境条件和寄主植物种类影响,本研究采集样地海拔低于天祝高寒草甸,且采集牧草均为多年生禾本科牧草,生长季较长,使本研究固氮酶活性相对较高。

植物激素 (plant hormones, PHs) 是植物体内可自身合成的微量有机物,在低浓度下参与并调控植物生长发育^[33]。除植物外,微生物也能分泌生长素 (indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素 (gibberellic acid, GA₃)、玉米素 (trans zeatin, t-Z) 等植物激素,这些微生物分泌的植物激素释放到土壤中,共同参与调控植物生长发育^[34]。高亚敏等^[22]从天祝高山草原优良牧草嵩草 (*Kobresia myosuroides*)、珠芽蓼 (*Polygonum viviparum*) 根际分离的菌株在 28 °C 培养后发现,菌株分泌 IAA、GA₃ 和 t-Z 含量分别为 0.24~69.98、0.34~68.87 和 0.11~47.59 μg·mL⁻¹,刘婷等^[35]在同一样地采用相同方法分离无脉苔草 (*Carex enervis*) 根际 PGPR,发现 IAA 分泌量为 8.20~86.36 μg·mL⁻¹,GA₃ 分泌量为 26.36~135.90 μg·mL⁻¹,t-Z 分泌量为 9.55~141.68 μg·mL⁻¹;本研究测定了 3 种牧草根际促生菌分泌激素的能力,发现不同菌株分泌激素种类和含量存在差异,其中从中华羊茅根际分离的菌株分泌 GA₃ 能力最强,而早熟禾与紫穗鹅观草分泌 3 种激素的能力差异不明显。从 3 种牧草根际分离的菌株分泌激素 (IAA、GA₃ 和 t-Z) 含量分别为 0.10~0.92、0.52~139.22、0.10~0.99 μg·mL⁻¹,其中 GA₃ 分泌量与前人研究基本相同,而 IAA 与 t-Z 分泌量较低。造成这种结果的原因是采样地、植物种类与培养温度的不同^[36]。本研究培养温度为 15 °C,说明低温不利于菌株分泌 IAA 与 t-Z,而对 GA₃ 分泌没有影响。

鉴定的 12 株优良 PGPR 中,有 11 株假单胞菌属和 1 株肠杆菌属。假单胞菌属细菌生态适应性

广,主要分布于土壤、水和其他基质上,是世界上最为复杂的细菌属之一,也是种类最多的,并且物种数目在逐年增加^[37]。据报道,大多数假单胞菌属不仅可以促进植物生长,还能防治植物病害,生防机理包括竞争营养物质、诱导植物抗性、产生抑菌物质等^[38-39],生防作用有待进一步研究。目前发现华西肠杆菌对部分临床常用抗菌药物耐药,其研制微生物菌剂的安全性尚不明确,若作为微生物接种剂,需要对其致病性和安全性检测^[40]。本研究鉴定的优良 PGPR 主要是假单胞菌属,并未发现芽孢杆菌属,可能与牧草本身及生存的生境条件有关,此外芽孢杆菌耐受温度范围较广,大多为 20~50 °C,本研究筛选温度会使一些低温适应性菌株优先生长,不适宜大多数芽孢杆菌生长繁殖。目前,国内对 PGPR 的研究及相关菌剂产品研发较多,但存在不同菌剂对环境的适应性不同的问题。因此,可以借鉴国外的经验,从特定气候、生境中筛选 PGPR 菌株,以生产出适合特定气候、生境的微生物菌剂^[41],另外,国内外对于 PGPR 的研究主要集中在对作物生长促进方面^[42],而针对草地与牧草的微生物菌剂研制较少。本研究筛选的菌株对低温有良好适应性,利用其研制微生物菌剂对后期高寒地区天然草地植被恢复具有重要意义。

4 结论

共分离到 181 株菌株,分离自中华羊茅根际 59 株、草地早熟禾根际 64 株、紫穗鹅观草根际 58 株,菌株在 3 种牧草根际均表现出 RP > RS > HP 的分布规律。通过促生特性综合测定,共筛选 12 株综合促生特性较强,有进一步研究利用价值的菌株,其中有 1 株肠杆菌属 (*Enterobacter*),11 株假单胞菌属 (*Pseudomonas*),可用于微生物菌剂的研制。

参考文献 References:

- [1] ZOU J R, LUO C Y, XU X L, ZHAO N, ZHAO L, ZHAO X Q. Relationship of plant diversity with litter and soil available nitrogen in an alpine meadow under a 9-year grazing exclusion. *Ecological Research*, 2016, 31(6): 841-851.
- [2] 雷声剑. 祁连县高寒草地生态系统服务价值评估与生态补偿研究. 西安: 陕西师范大学硕士学位论文, 2016.
LEI S J. Research on ecosystem service value evaluation and ecological compensation of alpine grassland in Qilian County. Master Thesis. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2016.
- [3] 齐洋. 放牧制度对玛曲高寒草地植被和土壤的影响. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2019.
QI Y. Effects of grazing system on vegetation and soil of on an alpine meadow in Maqu Country, Gansu. Master Thesis. Beijing:

- Beijing Forestry University, 2019.
- [4] 郑雨馨. 肃南裕固族自治县高寒草地水资源潜力及水草畜平衡配置研究. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2019.
ZHENG Y X. Study on water resources potential and balanced configuration of water-grass-livestock in alpine grassland of Sunan Yugu Autonomous County. Master Thesis. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.
- [5] BAI X J, YANG X, ZHANG S M, AN S S. Newly assimilated carbon allocation in grassland communities under different grazing enclosure times. *Biology and Fertility of Soils*, 2021, 57(4): 563-574.
- [6] QIANG L I. Effects of fencing on vegetation and soil restoration in a degraded alkaline grassland in northeast China. *Journal of Arid Land*, 2014, 6(4): 478-487.
- [7] 赵叶舟, 王浩铭, 汪自强. 豆科植物和根瘤菌在生态环境中的地位和作用. 农业环境与发展, 2013, 30(4): 7-12.
ZHAO Y Z, WANG H M, WANG Z Q. The role of leguminous plants and rhizobium in ecological environment. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2013, 30(4): 7-12.
- [8] LIU C J, GONG X W, DANG K, LI J, YANG P, GAO X L, DENG X P, FENG B L. Linkages between nutrient ratio and the microbial community in rhizosphere soil following fertilizer management. *Environmental Research*, 2020, 184: 109261.
- [9] 蒋永梅. 四种植物根际促生菌筛选及生物菌肥效果研究. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2017.
JIANG Y M. Screening plant growth promoting rhizobacteria from four plants and study on the application of biofertilizer. Master Thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.
- [10] LI H Y, QIU Y Z, YAO T. Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago Sativa*, and *Cucumis Sativus* seedlings. *Soil and Tillage Research*, 2020, 199(1): 792-801.
- [11] 王伟, 岳政府, 刘孝文, 张瑞福. 低温适应型植物根际促生细菌的筛选及促生效应研究. *南京农业大学学报*, 2017, 40(1): 93-100.
WANG W, YUE Z F, LIU X W, ZHANG R F. Screening of low temperature adapted plant growth-promoting rhizosphere and investigating of their promoting effects. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, 40(1): 93-100.
- [12] 崔晓双, 王伟, 张如, 张瑞福. 基于根际营养竞争的植物根际促生菌的筛选及促生效应研究. *南京农业大学学报*, 2015, 38(6): 958-966.
CUI X S, WANG W, ZHANG R, ZHANG R F. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria based on rhizosphere nutrition competitiveness and investigation of their promoting effects. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, 38(6): 958-966.
- [13] 任卓然, 邵新庆, 李金升, 李慧, 何宜璇, 古维娜, 王茹颖, 杨灵婧, 刘克思. 微生物菌肥对退化高寒草甸地上生物量和土壤理化性质的影响. *草地学报*, 2021, 29(10): 2265-2273.
REN Z R, SHAO X Q, LI J S, LI H, HE Y X, GU W N, WANG R Y, YANG L J, LIU K S. Effects of microbial fertilizer on aboveground biomass and soil physical and properties of degraded alpine meadows. *Acta Agrestia Sinica*, 2021, 29(10): 2265-2273.
- [14] PIROMYOU P, BURANABANYAT B, TANTASAWAT P, TITTABUTR P, BOONKERD N, TEAUMROONG N. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(1): 44-54.
- [15] 杨林, 石莎, 冯金朝, 赵敏杰, 陶季, 蓝智钢. 青海海北高寒草甸植被多样性研究. *中央民族大学学报*, 2008, 17(S1): 126-132.
YANG L, SHI S, FENG J C, ZHAO M J, TAO J, LAN Z G. Plant diversity in alpine meadow in Haibei Region of Qinghai Province. *Journal of Central University for Nationalities*, 2008, 17(S1): 126-132.
- [16] 井向前, 王瑞红, 任德智, 白玛玉珍, 潘刚, 周尧治. 青海海北3种典型高寒草甸植物群落特征研究. *草地学报*, 2017, 25(1): 190-194.
JING X Q, WANG R H, REN D Z, Baimayuzhen, PAN G, ZHOU Y Z. Characteristics of three kinds of typical plant communities of the alpine meadow in Haibei region, Qinghai. *Acta Agrestia Sinica*, 2017, 25(1): 190-194.
- [17] 陈丹阳, 李汉全, 张炳火. 两株解磷细菌的解磷活性及作用机制研究. *中国生态农业学报*, 2017, 25(3): 410-418.
CHEN D Y, LI H Q, ZHANG B H. Phosphate solubilization activities and action mechanisms of two phosphate-solubilizing bacteria. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2017, 25(3): 410-418.
- [18] 刘婷. 高寒草甸优势植物根际促生菌资源评价及菌种鉴定. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2016.
LIU T. Evaluating and identifying of plant growth promoting rhizobacteria of dominant alpine meadows. Master Thesis. Lanzhou:

- Gansu Agricultural University, 2016.
- [19] 李明源, 王继莲, 姚拓, 王振龙, 张惠荣, 柴加丽, 刘晓婷, 李青璞. 祁连山高寒草地扁蓿豆和黄花棘豆耐冷 PGPB 的筛选及促生特性研究. 农业生物技术学报, 2021, 29(11): 2074-2086.
LI M Y, WANG J L, YAO T, WANG Z L, ZHANG H R, CHAI J L, LIU X T, LI Q P. Screening and promoting effects of cold-adapted PGPB from *Melissitus ruthenica* and *Oxytropis ochrocephala* grown in the alpine grassland of Qilian Mountains. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(11): 2074-2086.
- [20] 杨婉秋, 敬洁, 朱灵, 高永恒. 川西北高寒草甸植物根际促生菌筛选及其特性研究. 草地学报, 2021, 29(6): 1174-1182.
YANG W Q, JING J, ZHU L, GAO Y H. Screening and characteristics of plant growth-promoting rhizosphere from alpine meadow plants in Northwest Sichuan. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(6): 1174-1182.
- [21] 刘婷, 姚拓, 陈建纲, 刘欢. 固相萃取-高效液相色谱法测定植物根际促生菌发酵产物中 3 种植物激素的含量. 分析科学学报, 2017, 33(2): 201-206.
LIU T, YAO T, CHEN J G, LIU H. Determination of plant hormones in bacterial fermentation products of plant growth promoting rhizobacteria by solid phase extraction-high performance liquid chromatography. Journal of Analytical Science, 2017, 33(2): 201-206.
- [22] 高亚敏, 姚拓, 李海云, 罗慧琴, 张建贵, 杨琰珊, 刘婷. 高寒草甸嵩草、珠芽蓼根际优良植物根际促生菌的分离筛选及促生特性研究. 草业学报, 2019, 28(11): 114-123.
GAO Y M, YAO T, LI H Y, LUO H Q, ZHANG J G, YANG Y S, LIU T. Isolation, screening and growth-promoting characteristics of plant growth promoting rhizobacteria in the rhizosphere of *Kobresia myosuroides* and *Polygonum viviparum* alpine meadow pasture. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(11): 114-123.
- [23] 李建宏, 李雪萍, 李昌宁, 韩冰, 徐万里, 姚拓. 一株植物根际促生菌 Gnyt1 的特性研究及分类地位的确定. 草业学报, 2019, 28(5): 55-67.
LI J H, LI X P, LI C N, HAN B, XU W L, YAO T. Characterization of a plant-growth-promoting rhizosphere bacterium, Gnyt1 and determination of its taxonomic status. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(5): 55-67.
- [24] 李显刚, 姚拓, 舒键虹, 高巍. 三株优良促生菌的 16S rDNA 序列初探. 湖北畜牧兽医, 2020, 41(6): 5-7, 9.
LI X G, YAO T, SHU J H, GAO W. Preliminary study on the 16S rDNA sequences of three excellent growth-promoting bacteria. Hubei Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2020, 41(6): 5-7, 9.
- [25] 赵小蓉, 林启美, 李保国. 溶磷菌对 4 种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究. 微生物学报, 2002, 42(2): 236-241.
ZHAO X R, LIN Q M, LI B G. The solubilization of four insoluble phosphates by some microorganisms. Acta Microbiology, 2002, 42(2): 236-241.
- [26] NARSIAN V, PATEL H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(4): 559-565.
- [27] 张亮, 杨宇虹, 李倩, 吴叶宽, 黄建国. 自生固氮菌活化土壤无机磷研究. 生态学报, 2013, 33(7): 2157-2164.
ZHANG L, YANG Y H, LI Q, WU Y K, HUANG J G. Mobilization of inorganic phosphorus from soils by five azotobacters. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(7): 2157-2164.
- [28] 康贻军, 胡健, 单君, 何芳, 朴哲, 殷士学. 两株解磷真菌的解磷能力及其解磷机理的初步研究. 微生物学通报, 2006, 33(5): 22-27.
KANG Y J, HU J, SHAN J, HE F, PU Z, YIN S X. Solubilization on capacity of insoluble phosphates and its mechanism by two phosphate solubilizing fungi. Microbiology China, 2006, 33(5): 22-27.
- [29] SCERVINO J M, MESA M P, MONICA D L, RECCHI M, MORENO N S, GODEAS A. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46(7): 755-763.
- [30] KIM M S, PARK S J, LEE C H, YUN S G, KO B Y G, YANG J E. Effects of organic acids on availability of phosphate and growth of corn in phosphate and salts accumulated soil. Korean Journal of Soil Science & Fertilizer, 2016, 49(3): 265-270.
- [31] 胡梦媛, 李雅颖, 葛超荣, 张迎迎, 姚槐应. 禾本科植物联合固氮的研究现状及应用前景. 中国生态农业学报, 2021, 29(11): 1815-1826.
HU M Y, LI Y Y, GE C R, ZHANG Y Y, YAO H Y. Research status and application prospects of combined nitrogen fixation in

- gramineous plants. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2021, 29(11): 1815-1826.
- [32] 卓丽霞. 陕西不同生态区土壤细菌及固氮微生物多样性分析. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2017.
ZHUO L X. The analysis of soil bacteria and nitrogen fixation microbial diversity in different ecological region soils of Shaanxi Province. Master Thesis. Xi'an: Northwest University, 2017.
- [33] 罗晓峰, 戚颖, 孟永杰, 帅海威, 陈锋, 杨文钰, 舒凯. Karrikins 信号传导通路及功能研究进展. *遗传*, 2016, 38(1): 52-61.
LUO X F, QI Y, MENG Y J, SHUAI H W, CHEN F, YANG W Y, SHU K. Current understanding of signaling transduction pathway and biological functions of Karrikins. *Hereditas*, 2016, 38(1): 52-61.
- [34] XIANG Y, SONG X N, QIAO J, ZANG Y M, LI Y P, LIU Y, LIU C S. An ultrahigh-performance liquid chromatography method with electrospray ionization tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of five phytohormones in medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* under abscisic acid stress. *Journal of Natural Medicines*, 2015, 69(3): 278-286.
- [35] 刘婷, 姚拓, 陈建纲, 马文彬, 刘欢, 马骢毓, 蒋永梅. 无脉苔草根际优良促生菌鉴定及其作用研究. *草业学报*, 2016, 25(12): 130-139.
LIU T, YAO T, CHEN J G, MA W B, LIU H, MA C Y, JIANG Y M. Identification and study on the effects of plant growth promoting rhizobacteria of *Carex enervis*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(12): 130-139.
- [36] 唐佩佳. 一株大豆促生菌 *Bacillus safensis* J2 的分离、筛选及其促生功能研究. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2021.
TANG P J. Isolation and screening of J2 from pigeon pea [*Bacillus safensis* (L.) millsp] and its plant growth promoting function. Master Thesis. Harbin: Northeast Forestry University, 2021.
- [37] 俞华富. 丁香假单胞菌 MB03 杀线虫毒性基因的克隆表达与杀虫活性研究. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2016.
YU H F. Expression of pathogenic gene from *Pseudomonas syringae* MB03 and nematocidal activity against *Caenorhabditis elegans*. Master Thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [38] 石玉莹, 宋海慧, 苗爽, 宫超, 王慧, 黄海锋, 陈秀玲, 张淑梅, 王傲雪. 番茄灰霉病和叶霉病拮抗细菌 WXCDD51 的筛选鉴定及其生防促生作用. *园艺学报*, 2017, 44(10): 1925-1936.
SHI Y Y, SONG H H, MIAO S, GONG C, WANG H, HUANG H F, CHEN X L, ZHANG S M, WANG A X. Screening, identification, biocontrol and growth promoting effects of antagonistic bacteria WXCDD51 of tomato gray mold disease and tomato leaf mold disease. *Acta Horticulture*, 2017, 44(10): 1925-1936.
- [39] 戴美松, 王月志, 蔡丹英, 施泽彬, 孙钧. 我国微生物菌肥登记现状及其在果树减肥增效中的应用. *浙江农业科学*, 2021, 62(2): 241-246.
DAI M S, WANG Y Z, CAI D Y, SHI Z B, SUN J. Status of registration of microbial fertilizers in my country and its application in weight loss enhancement of fruit trees. *Zhejiang Agricultural Sciences*, 2021, 62(2): 241-246.
- [40] 撤冬荣, 侯栋, 姚拓, 兰晓君, 朱瑞婷. 莴笋根部促生菌筛选与促生特性测定. *干旱地区农业研究*, 2020, 38(3): 127-133.
HAN D R, HOU D, YAO T, LAN X J, ZHU R T. Lettuce root growth promoting bacteria screening and determination of growth promoting properties. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2020, 38(3): 127-133.
- [41] 李智燕, 冯今, 张洁, 温洪, 荣良燕, 陆飒, 谭立伟. 豆科牧草微生物肥料研究初探. *甘肃畜牧兽医*, 2015, 45(11): 69-71.
LI Z Y, FENG J, ZHANG J, WEN H, RONG L Y, LU S, TAN L W. Preliminary study on microbial fertilizers for legume pastures. *Gansu Animal Husbandry and Veterinary*, 2015, 45(11): 69-71.
- [42] 孙少志. 根际细菌对番茄生长与抗虫性的影响. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2019.
SUN S Z. Effects of rhizosphere bacteria on growth and anti-herbivore resistance of tomato. Master Thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2019.

(责任编辑 王芳)