

案例二 解磷菌对番茄的促生作用

贺字典 高玉峰

【案例说明】

磷作为植物生长必需的一种元素，对花芽分化、根系生长非常重要，但 P 元素过量后容易被土壤颗粒吸附固定，造成大部分磷元素浪费。在国家实施“稳氮减磷增钾”减肥减药增效政策的支持下，如何将土壤中被固定住的、难溶性的磷释放出来，被番茄吸收利用，PGPR 将发挥重要作用。本案例学生了解磷元素的特性与番茄对磷肥的需求，掌握 PGPR（植物根际生长促进菌）的分离、解磷菌的筛选、解磷效果的测定等教学重点。本案例适用于资源利用与植物保护领域硕士学位研究生。

【教学重点】

PGPR（植物根际生长促进菌）的分离、解磷菌的筛选、解磷效果的测定

【教学难点】

P 元素被土壤颗粒吸附固定的过程。

【教学准备】

（1）授课案例于开课一周发给学生，提示学生课前阅读相关材料；分成 4 组，以解磷菌的分离与鉴定、解磷菌肥的研制、解磷菌肥的效果、解磷菌肥对植物根际养分的作用为主题查资料，作出 PPT，上课汇报。

（2）课时分配（时间安排）：按照 2 节课 100 分钟的时间安排课程进程。课堂内容讲解 40~50 分钟；各小组案例讨论及答疑共 30~40 分钟，总结 10~20 分钟。

【教学过程】

背景介绍——案例引入——问题设置——分组讨论——课堂讨论总结——课后作业布置——考核——教学效果评价

【案例背景】

植物根际促生菌（plant growth promoting rhizobacteria，PGPR）是植物根际周围土壤中的一群自生细菌，通过产生抗生素和分泌铁载体等方式抑制或减轻植物病害、重金属、盐胁迫等对植物产生的不良影响，还能通过解磷、固氮、产生植物激素、酶解降低乙烯水平等方式直接刺激和调节植物生长。土壤中存在大量的 PGPR，主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)，它们能将难溶性磷转化为农作物可吸收利用的可溶性磷，促进农作物生长，改善土壤环境，显著提高土壤中的有效磷含量。磷肥能够增强番茄根系活力，使根系吸收养分能力加强，番茄根系中氮、磷、钾营养元素含量增加，提高番茄叶片中可溶性蛋白质和叶绿素含量。而且能够增加果实中可溶性糖含量、维生素 C 和可溶性固形物含量。随着番茄栽培面积的不断扩大，为追求番茄高产，不断增加磷肥施入量。施入土壤中的磷素大部分被土壤固定，只有 10%~25%被当季作物吸收利用，造成大部分磷元素浪费。在国家实施减肥减药增效政策的支持下，如何将土壤中被固定住的、难溶性的磷释放出来，被番茄吸收利用，PGPR 将发挥重要作用。

1、解磷菌的筛选

在 15 株 PGPR 菌株中，以 FQG-5 的解磷透明圈直径最大，为 2.33 cm，其次是 LZT-5、FQG-6 和 FQG-3 的解磷透明圈分别为 2.27，2.17 cm，四者差异不显著，但显著高于其他菌株的解磷透明圈（表 1）。

表 1 PGPR 解磷透明圈直径

菌株编号	透明圈直径(cm)	菌株编号	透明圈直径(cm)
Strains numbers	Transparent circle diameter	Strains numbers	Transparent circle diameter
AHG-1	1.93±0.2bc	FQG-1	2.10±0.2bc

AHG-2	2.03±0.2bc	FQG-3	2.17±0.1ab
AHG-4	1.73±0.3d	FQG-5	2.33±0.1a
AHG-5	2.03±0.1bc	FQG-6	2.17±0.1ab
LZT-1	1.47±0.2e	CRG-1	1.97±0.6bc
LZT-5	2.27±0.3a	CRG-3	1.50±0.2e
LZT-7	1.73±0.3d	CRG-8	2.10±0.2bc
LZT-8	1.77±0.2d		

2、PGPR 对番茄幼苗生长性状及土壤养分的影响

将 5%和 10%的 FQG-5 和 LZT-5 2 种 PGPR 分别加入到番茄育苗基质后,番茄幼苗地上部鲜重和地下部鲜重分别为 1.23, 1.29, 1.12, 1.19 g 和 0.19, 0.20, 0.18, 0.18 g, 四者间差异不显著,但均显著高于清水对照。番茄幼苗地上部干重以 10% FQG-5 处理的最重为 0.04 g,显著高于其他处理。用 FQG-5 和 LZT-5 处理的番茄幼苗地下部干重均显著高于清水对照。同样用 10% FQG-5 和 LZT-5 处理的育苗基质栽培的番茄幼苗株高、茎粗和叶面积最高,分别为 13.66 cm、0.35 cm、28.95 cm² 和 13.70 cm、0.36 cm、29.75 cm², 显著高于其他处理(表 2)。

表 2 PGPR 对番茄幼苗生长性状的影响

PGPR 处理	地上部鲜重 (g)	根系鲜重(g)	地上部干重 (g)	根系干重(g)	株高 (cm)	茎粗 (cm)	叶面积 (cm ²)
PGPR treatment	Fresh weight of overground	Root fresh weight	dry weight of overground	Root dry weight	Plant height	Stem diameter	Leaf areas
清水对照	1.10±0.01b	0.15±0.01b	0.03±0.00b	0.02±0.00c	11.04±0.76c	0.29±0.02c	19.85±2.01d
5%FQG-5	1.23±0.09ab	0.19±0.01a	0.03±0.00ab	0.03±0.00bc	12.61±0.83b	0.33±0.00b	23.99±0.88c
10%FQG-5	1.29±0.16a	0.20±0.02a	0.04±0.00a	0.03±0.00a	13.66±0.22ab	0.35±0.02a	28.95±0.89a
5%LZT-5	1.12±0.08b	0.18±0.01a	0.03±0.00b	0.03±0.00ab	13.13±0.15ab	0.34±0.00a	26.51±1.45b
10%LZT-5	1.19±0.02ab	0.18±0.01a	0.03±0.01b	0.03±0.00ab	13.70±0.44a	0.36±0.01a	29.75±0.48a

将 10% FQG-5 加入到番茄育苗基质中测定番茄根围土壤养分,全氮、全磷、全钾、铵态氮、速效磷、速效钾和有机质含量分别为 245.2, 73.0, 268.7, 70.59, 43.45, 160.42 mg·kg⁻¹ 和 40.22 g·kg⁻¹。10% FQG-5 与其他 PGPR 菌株处理后的番茄根围土壤养分含量相比,除了铵态氮含量差异不显著外,其他 6 种养分含量均显著增高(表 3)。

表 3 PGPR 对番茄幼苗根围土壤养分的影响

PGPR 处理	全氮	全磷	全钾/	铵态氮	速效磷/ (mg·kg ⁻¹)	速效钾	有机质
PGPR	(mg·kg ⁻¹)	(mg·kg ⁻¹)	(mg·kg ⁻¹)	(mg·kg ⁻¹)	速效磷/ (mg·kg ⁻¹)	(mg·kg ⁻¹)	(g·kg ⁻¹)
treatment	Total nitrogen	Total phosphorus	Total potassium	Ammonium nitrogen	Available phosphorus	Available potassium	Organic matter
清水对照	86.3±0.04e	62.1±0.03d	123.6±0.02d	28.70±3.64b	23.15±1.71e	75.73±2.98d	15.84±1.15d
5% FQG-5	204.2±0.05b	63.2±0.03b	62.5±0.05b	67.55±0.97a	38.05±0.52b	131.70±6.10b	33.88±1.31b
10% FQG-5	245.2±0.09a	73.0±0.02a	268.7±0.03a	70.59±0.95a	43.45±0.81a	160.42±3.18a	40.22±2.04a
5% LZT-5	157.6±0.12d	53.3±0.02c	136.2±0.02c	57.05±1.47ab	28.47±0.60d	106.99±3.42c	25.39±1.52c
10% LZT-5	182.6±1.91c	65.8±0.02b	163±0.03b	63.54±0.66a	31.30±0.94c	124.72±3.52b	31.63±0.93b

3、PGPR 对露地番茄成株期生长性状和土壤养分的影响

PGPR 灌根后的番茄茎粗为 0.90 cm、株高为 88.70 cm、叶面积为 18.08 cm²、光照强度为 5905 lx、产量为 42 371.18 kg·hm⁻², 分别为生物炭+复合肥的 1.1、1.11、1.13、1.19 和 1.19 倍, 显著于其他对照(表 4)。

表 4 PGPR 对露地番茄成株期生长性状的影响

处理	茎粗(cm)	株高(cm)	叶面积(cm ²)	光照强度(lx)	产量(kg·hm ⁻²)
Treatment	Stem diameter	Plant height	Leaf areas	Light intensity	Yield
三本农好有机肥 CK	0.83±0.04b	90.30±6.17ab	16.26±1.02b	5583±240a	23638.48±7020.18b
羊粪+尿素 CK	0.89±0.02ab	83.50±1.39bc	16.76±0.17ab	4763±197b	41904.28±1484.08a
生物炭+复合肥 CK	0.88±0.01ab	81.00±2.53c	15.90±0.40b	4965±117b	38819.4±1077.53ab
10%FQG-5	0.90±0.01a	88.70±2.23a	18.08±0.07a	5905±151a	42371.18±2434.55a
空白 CK	0.730±0.01c	85.23±2.53b	13.25±0.07c	3965±197c	20145.34±2023.51c

用 10%FQG-5 灌根处理的露地番茄根围的速效磷为 40.05 mg·kg⁻¹、速效钾 193.00 mg·kg⁻¹、铵态氮 78.30 mg·kg⁻¹、硝态氮 50.53 mg·kg⁻¹、有机质 37.79 g·kg⁻¹、全氮 0.80 g·kg⁻¹、全磷 0.79 g·kg⁻¹、全钾 2.03 g·kg⁻¹，分别为生物炭+复合肥的 1.11、1.46、1.26、1.1、1.66、1.33、1.22 和 1.43 倍，均显著高于其它处理（表 5）。

表 5 PGPR 对露地番茄根围土壤养分的影响

处理	速效磷 (mg·kg ⁻¹)	速效钾 (mg·kg ⁻¹)	铵态氮 (mg·kg ⁻¹)	硝态氮 (mg·kg ⁻¹)	有机质 (g·kg ⁻¹)	全氮 (g·kg ⁻¹)	全磷 (g·kg ⁻¹)	全钾 (g·kg ⁻¹)
Treatment	Available phosphorus	Available potassium	Ammonium nitrogen	Nitrate nitrogen	Organic matter	Total nitrogen	Total phosphorus	Total potassium
三本农好 有机肥	30.05±4.43b	102.03±3.59d	60.79±7.36a	40.57±2.17b	22.92±1.45b	0.71±0.14a	0.78±0.03a	1.20±0.28b
羊粪+尿素	30.05±2.78b	161.09±5.22b	69.97±1.02a	43.05±0.11b	14.60±1.85b	0.79±0.04a	0.69±0.03b	1.74±0.24b
生物炭 +复合肥	36.24±2.27ab	132.47±6.41c	61.95±6.70a	47.36±1.98ab	22.75±1.70b	0.60±0.04a	0.65±0.01b	1.42±0.18ab
10%FQG-5	40.05±3.76a	193.00±14.21a	78.30±6.05a	50.53±6.39a	37.79±8.29a	0.80±0.05a	0.79±0.06a	2.03±0.12a
空白 CK	18.14±0.02c	96.70±2.60e	20.54±1.10b	21.54±0.99c	9.31±0.03c	0.55±0.05b	0.33±0.01c	0.87±0.12c

4、PGPR 解磷菌的鉴定

将 PGPR 菌株的 16SrRNA 序列测序后，经过与 Genbank 中的 16SrRNA 序列比对后 15 株 PGPR 分属于 8 个种的细菌，分别为嗜麦芽寡养单胞菌（*Stenotrophomonas maltophilia*）、土生拉乌尔菌（*Raoultella terrigena*）、土壤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）、产酸克雷伯菌（*Klebsiella oxytoca*）、克吕沃尔氏菌（*Kluyvera cryocrescens*）、不动杆菌（*Acinetobacter*）、粘质沙雷氏菌（*Serratia marcescens*）、成团泛菌（*Pantoea agglomerans*）。其中解磷效果较好的菌株 LZT-5 为不动杆菌（*Acinetobacter*）。FQG-5 为嗜麦芽寡养单胞菌（*Stenotrophomonas maltophilia*）。FQG-6 和 FQG-3 分别为成团泛菌（*Pantoea agglomerans*）和土壤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）（表 6、图 1）。

表 6 PGPR 解磷菌种类

PGPR 编号	PGPR 种类	PGPR 编号	PGPR 种类
AHG-1	嗜麦芽寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FQG-1	产酸克雷伯菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>
AHG-2	土生拉乌尔菌 <i>Raoultella terrigena</i>	FQG-3	土壤农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AHG-4	土壤农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	FQG-5	嗜麦芽寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
AHG-5	产酸克雷伯菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>	FQG-6	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>

LZT-1	克吕沃尔氏菌 <i>Kluyvera cryocrescens</i>	CRG-1	产酸克雷伯菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>
LZT-5	不动杆菌 <i>Acinetobacter</i>	CRG-3	产酸克雷伯菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>
LZT-7	粘质沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	CRG-8	嗜麦芽寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
LZT-8	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>		

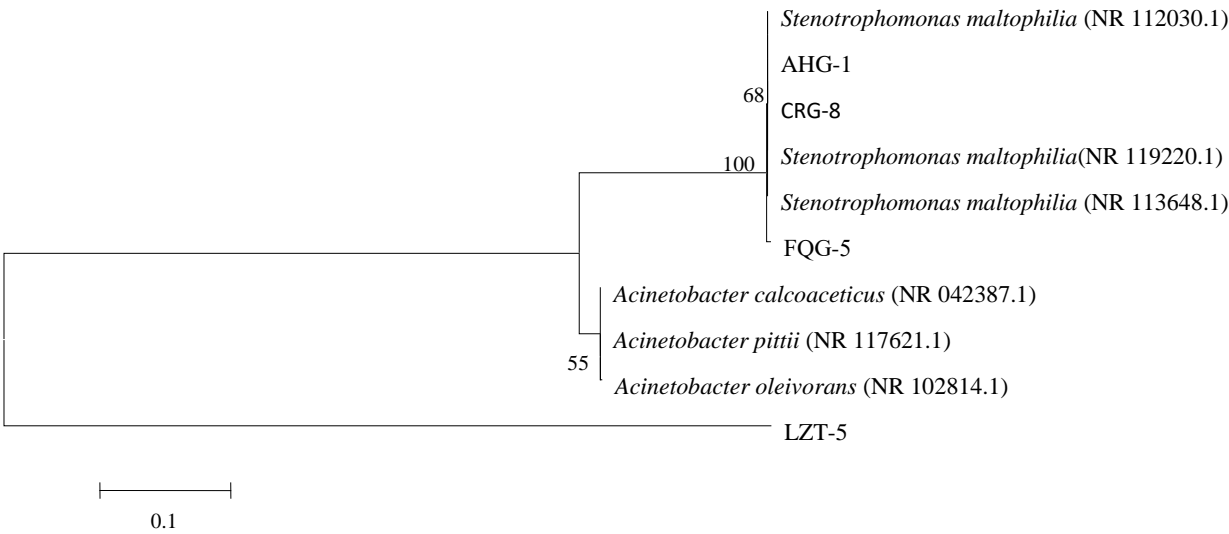


图 1 基于 16srRNA 的 FQG-5 和 LZT-5 与代表种系统发育树图谱

【分组汇报方案】

3~4 人一组进行汇报。一组汇报时，其他组找到其中的问题进行问询。

【课堂讨论总结】

教师要掌握每一组汇报时防控策略的关键点是否到位，鼓励引导所有学生参与质询，指出方案中未到位的地方。汇报质询结束后，教师针对每组的方案予以点评。

【课后作业】

课后形成解钾菌或固氮菌的分离与对其他作物的促生作用应用方案。

【考核方式】

以组为单位，由小组中的一位成员通过 PPT 方式阐述，小组全体成员参加方案的答疑，每小组时间控制在 10 分钟以内，讨论修改后以组为单位提交解钾菌或固氮菌的分离与对其他作物的促生作用应用方案。

【参考文献】

[1] 李文,莫港澳,孙欣.不动杆菌 JL-1 降解磷的性能研究[J].江苏农业科学,2019,47(12):311- 315.

[2] 席先梅,刘正坪.促进小麦生长的根围细菌的筛选及初步鉴定[J].北京农学院学报,2006,21 (2):48-50.

[3] 卯婷婷,莫维弟,赵玳琳,等.解磷拮抗真菌分离鉴定及其对猕猴桃软腐病的生防评价[J].南方农业学报,2019,50(8):1748-1755.

[4] Sravani Ankati,Appa Rao Podile. Metabolites in the root exudates of groundnut change during interaction with plant growth promoting rhizobacteria in a strain-specific manner[J].Journal of Plant Physiology,2019(243):34-48.

[5] 高美玲.磷对番茄产量和品质影响的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2003.

- [6] 鲍士旦.土壤农化分析[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [7] 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.
- [8] 上官亦卿,常帆,吕睿,等.解磷菌的分离、筛选、鉴定及解磷能力研究[J].湖北农业科学,2019, 58(1):30-34,38.
- [9] 杨海君,谭周进,肖启明,等.假单胞菌的生物防治作用研究[J].中国生态农业学报,2004 (3):158-161.
- [10] 贺字典,,闫立英,石延霞,等.产生 ACC 脱氢酶的 PGPR 种衣剂对黄瓜细菌性茎软腐病防治效果研究[J].中国生物防治学报,2017,33(6):817-825.
- [11] Toshy Agrawal, Anil S. Kotasthane,Renu Kushwah. Genotypic and phenotypic diversity of polyhydroxybutyrate (PHB) producing *Pseudomonas putida* isolates of Chhattisgarh region and assessment of its phosphate solubilizing ability[J]. Biotech,2015, 5(3): 45-60.
- [12] 贺立虎,李娟丽.解磷菌对油菜品质及土壤理化性质的影响[J].陕西农业科学,2018,64(8): 47-50.
- [13] Zaidi A, Khan M S, Amil M. Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea(*Cicer-arietinum* L.)[J].European Journal of Agronomy, 2003,19 (1): 15-21.
- [14] Laheurte F, Berthelin J. Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus[J]. Plant and Soil,1988(105): 11-17.
- [15] 韩杨.耐盐解磷菌的筛选、鉴定及其在盐胁迫下对甘草的促生作用[D].天津:天津科技大学,2013.
- [16] Qingwei Zeng, Xiaoqin Wu. Identification and characterization of the rhizosphere phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2 and its plant growth-promoting effects on poplar seedlings[J]. Ann Microbiol,2017(67): 219-230.