

研究报告

一株高产吲哚乙酸促生菌的筛选鉴定、条件优化、应用效果及其代谢途径

相凯文^{1,2}, 李丹丹^{1,2}, 郭自春^{*2}, 任宗玲¹, 田慎重³, 高磊², 彭新华^{2,4}, 蔡燕飞^{*1}

1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642

2 中国科学院南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 211135

3 山东省农业科学院农业资源与环境研究所 养分资源高效利用全国重点实验室, 山东 济南 250100

4 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 耕地高效利用国家重点实验室, 北京 100081

相凯文, 李丹丹, 郭自春, 任宗玲, 田慎重, 高磊, 彭新华, 蔡燕飞. 一株高产吲哚乙酸促生菌的筛选鉴定、条件优化、应用效果及其代谢途径[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2599-2612.

XIANG Kaiwen, LI Dandan, GUO Zichun, REN Zongling, TIAN Shenzhong, GAO Lei, PENG Xinhua, CAI Yanfei. A high indole-3-acetic acid-producing bacterial strain with plant growth-promoting effect: screening, identification, culture condition optimization, application, and genome-wide analysis[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2599-2612.

摘要:【背景】华北平原潮土和砂姜黑土对国家粮食安全至关重要,但由于土壤结构障碍和长期不合理利用,影响冬小麦的萌发和生长。【目的】筛选出具有高产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)能力的菌株,并优化其培养条件,开展室内和田间试验,结合基因组测序分析 IAA 代谢途径。【方法】采集华北平原潮土和砂姜黑土的小麦根际土壤,通过稀释涂布平板法筛选菌株,并进行 IAA 定性和定量分析;探讨不同 pH 和 NaCl 浓度下的最适生长条件;结合形态学、生理生化及 16S rRNA 基因序列分析对其种属进行鉴定;通过小麦种子发芽试验及盆栽试验验证其促生效果,并制备菌剂应用于大田试验,评估增产效果;基于全基因组测序分析其 IAA 合成代谢通路。【结果】筛选出一株 IAA 产量达到 58.9 mg/L 的栗褐芽孢杆菌(*Bacillus badius*) 363,其最适生长条件为 pH 6.0、NaCl 浓度为 1%;种子萌发和盆栽试验表明,菌株 363 能促进小麦种子的发芽和根系生长,芽长和根长分别提高 72.9%和 161.8%,并且显著促进了小麦植株的生长,株高、地上生物量和根系干重在潮土和砂姜黑土上分别提高 35.7%和 22.6%、17.4%和 33.3%、33.3%和 36.4%。田间试验中,菌

资助项目:中国科学院南京土壤研究所自主部署项目(ISSASIP2214);国家重点研发计划(2023YFD1900204);井冈山农高区省级科技专项“揭榜挂帅”项目(20222-051261)

This work was supported by the Self-deployed Research Project of Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences (ISSASIP2214), the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1900204), and the “Unveiling the List of Hanging” Science and Technology Project of Jinggangshan Agricultural High-tech Industrial Demonstration Zone (20222-051261).

*Corresponding authors. E-mail: GUO Zichun, zcguo@issas.ac.cn; CAI Yanfei, yanfeicai@scau.edu.cn

Received: 2024-09-14; Accepted: 2024-10-14; Published online: 2024-11-21

株 363 在潮土和砂姜黑土上使小麦产量分别提高 10.8% 和 8.25%。全基因组分析表明菌株 363 有 2 条产 IAA 代谢通路。【结论】栗褐芽孢杆菌 363 在冬小麦促生方面具有很好的潜力, 未来在高效根际促生菌剂、生物肥料的开发中具有广泛的应用前景。

关键词: 栗褐芽孢杆菌; 冬小麦; 吲哚乙酸; 条件优化; 全基因组分析

A high indole-3-acetic acid-producing bacterial strain with plant growth-promoting effect: screening, identification, culture condition optimization, application, and genome-wide analysis

XIANG Kaiwen^{1,2}, LI Dandan^{1,2}, GUO Zichun^{*2}, REN Zongling¹, TIAN Shenzhong³, GAO Lei², PENG Xinhua^{2,4}, CAI Yanfei^{*1}

1 College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 211135, Jiangsu, China

3 State Key Laboratory of Nutrient Use and Management, Institute of Agricultural Resources and Environment, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong, China

4 State Key Laboratory of Efficient Utilization of Arable Land, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Background] The fluvo-aquic soil and Shajiang black soil in the north China Plain are critical to national food security. However, structural barriers in the soil and long-term improper utilization have negatively impacted the germination and growth of winter wheat. **[Objective]** To screen out the bacterial strains with high indole-3-acetic acid (IAA) production, optimize their growth conditions, examine their application performance by laboratory and field experiments, and analyze the IAA biosynthetic pathways by genome-wide analysis. **[Methods]** fluvo-aquic and Shajiang black soil samples were collected from wheat rhizosphere. The strains were screened by the dilution plate method, and their IAA production was analyzed qualitatively and quantitatively. The optimal growth conditions were determined under varying pH and NaCl concentrations. The strain was identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequencing results. Seed germination and pot experiments were conducted to assess the growth-promoting effects of the strain screened out on the plants. A bacterial inoculant was prepared and applied in field trials to evaluate its effect on wheat yield. Genome-wide analysis was performed to analyze the IAA biosynthetic pathways. **[Results]** A strain 363 which produced IAA at a concentration of 58.9 mg/L was identified as *Bacillus badius*. The optimal growth conditions were pH 6.0 and 1% NaCl. Seed germination and pot experiments showed that strain 363 significantly promoted wheat seed germination and increased the bud length and root length by 72.9% and 161.8%, respectively. Moreover, strain 363 promoted wheat plant growth, increasing the plant height, shoot biomass, and root dry weight by 35.7% and 22.6%, 17.4% and 33.3%, and 33.3% and 36.4% in fluvo-aquic soil and Shajiang black soil, respectively. In field trials, strain 363 increased wheat yields by 10.8% and

8.25% in fluvo-aquic soil and Shajiang black soil, respectively. Genome-wide analysis revealed that strain 363 had two IAA biosynthetic pathways. **[Conclusion]** *B. badius* 363 has great potential to promote the growth of winter wheat and demonstrates broad application prospects in the development of efficient plant growth-promoting rhizobacterial inoculants and biofertilizers. **Keywords:** *Bacillus badius*; winter wheat; indole-3-acetic acid (IAA); condition optimization; genome-wide analysis

华北平原是我国重要的粮食生产区域,其农作物种植模式为冬小麦与夏玉米轮作。潮土和砂姜黑土是主要的土壤类型,但因土壤质地不适中及长期不合理利用,这两类土壤普遍存在有机质含量低、结构性障碍严重等问题,可能会影响种子发芽及幼苗生长^[1-2]。此外,过量施用化肥会破坏土壤中微生物与其他生物之间的生态平衡,导致养分循环和病害抑制功能受损,进而影响种子的发芽和幼苗生长^[3]。

植物根际(rhizosphere)是土壤中受根系影响最为显著的微环境,富含养分,为微生物提供能量和营养来源^[4]。植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)通过加快物质循环、缓解非生物胁迫、合成植物激素和改善土壤环境等特性^[5-6],能够有效地促进植物的生长,已被广泛用于作物增产和植株抗逆性增强^[7-9]。研究表明,植物根际微生物的生理活动对土壤性状、植物养分吸收及生长有重要影响,其中通过产生植物激素与植物相互作用是PGPR发挥促生作用的关键机制之一^[10-11],吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)作为一种广泛存在于植物体内的生长素,不仅促进植物根系生长,增强作物对水分和养分的吸收,还能调节植物内部激素的平衡,增加细胞膜的稳定性,提高植物对生物与非生物胁迫的抗性^[12-13]。自1979年科学家发现巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)能合成IAA后,越来越多的研究发现,土壤中超过一半的细菌具有产IAA的能力^[11,14]。然而,PGPR作为一类复杂多样的微生物群体,其应用效果因环境和作物种类的不同而异。

目前,已有多种芽孢杆菌被证实具备促生功能,并在玉米、生菜、龙葵等作物上的应用

效果有显著差异^[15-16]。然而,外源促生菌对水分、温度、土壤等环境条件的依赖性较强,非潮土和砂姜黑土来源的功能菌在这些土壤中的应用效果往往不理想,限制了小麦生长与产能发挥。本研究从华北平原砂姜黑土和潮土的小麦根际采集土壤,筛选适用于小麦生长的促生菌,并对其进行鉴定和条件优化,通过室内和田间进一步验证其促生效果,以期开发适用于华北平原的高效根际促生菌剂和生物肥料提供优质菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品

土壤样品采集于山东省德州市富民家庭农场和安徽省怀远县龙亢农场,土壤类型分别为潮土和砂姜黑土。多年秸秆还田下小麦生长情况良好的根际土壤。在采集根际土壤样品的过程中,先去除土壤表层的凋落物及石块等杂质,接着使用采样铲挖掘10–20 cm深处的土壤,将土壤样品装入采样袋后带回实验室,存4 °C备用。供试小麦种子为‘济麦22’,购于河间市萌芽种子销售有限公司。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基(g/L):牛肉膏 3.0,蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0, pH 7.0–7.2。LB 液体培养基(g/L):蛋白胨 10.0, 酵母提取粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0–7.2。LB 固体培养基:在LB 液体培养基的基础上添加20.0 g/L 琼脂。柠檬酸盐培养基(g/L): $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 5.0, X_5HPO_4 1.0, $NH_4H_2PO_4$ 1.0, NaCl 5.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 琼脂 15.0, 1%溴麝香草酚蓝(酒精溶液) 10.0, pH 7.0–7.2。淀粉琼脂培养基

(g/L): 牛肉膏 5.0, 可溶性淀粉 5.0, 琼脂 15.0–18.0, pH 7.0–7.2。

Salkowski 比色液, 50 mL 35% HClO_4 和 1 mL 0.5 mol/L 的 FeCl_3 混合; 甲基红试剂, 10 mg 甲基红溶于 30 mL 95% 无水乙醇中, 再加入 20 mL 蒸馏水; IAA 标准品, 北京索莱宝科技有限公司; L-色氨酸标准品, 上海源叶生物科技有限公司。

紫外分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 电子显微镜, Nikon 公司; 酶标仪, BioTek 公司; 高压蒸汽灭菌锅, 上海精科实业有限公司; 人工气候培养箱, 上海新苗医疗器械有限公司。

1.3 产 IAA 芽孢杆菌的分离筛选

1.3.1 菌株的分离

称取 10.0 g 土壤样品加入含 90 mL 无菌水和玻璃珠的 250 mL 锥形瓶中, 30 °C、180 r/min 振荡 30 min 后静置 30 s, 取 2 mL 上清液于 90 °C 水浴处理 10 min 后用无菌水进行梯度稀释 (10^{-3} – 10^{-5}), 取 100 μL 稀释液均匀涂布于 NA 培养基, 37 °C 培养 10–12 h 分离单菌落。

1.3.2 定性初筛

挑取单菌落接种于 4 mL 含 100 mg/L 色氨酸的 LB 培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h。取 200 μL 菌液与等量 Salkowski 比色液混合, 置于黑暗环境下显色 30 min 后观察颜色变化。以含 100 mg/L 色氨酸的 LB 培养基为阴性对照, 以 IAA 标准溶液为阳性对照。溶液变红即表明菌株具有产 IAA 的能力, 颜色越深表明分泌的量越大。

1.3.3 定量复筛

配制 0、0.5、1、5、10、15、20、25 mg/L 的 IAA 标准溶液, 分别取 2 mL 各浓度 IAA 溶液和等量 Salkowski 比色液混合, 黑暗环境显色 30 min 后用分光光度计测定混合液 OD_{530} 值, 以 OD_{530} 值和溶液浓度为横纵坐标绘制标准曲线。

活化待测菌株接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 24 h。取 2 mL 菌液用分

光光度计测定其 OD_{600} 值后 4 °C、180 r/min 离心 5 min, 吸取上清液与等量比色液混合, 黑暗环境下显色 30 min 后测定其 OD_{530} 值, 对比标准曲线, 计算出菌株在 $OD_{600}=1.0$ 时产生的 IAA 含量^[17]。

1.4 菌株的形态特征、生理生化特性和分子生物学鉴定

形态特征和生理生化特性参考文献 [18–19]。将筛选出的菌株活化后在 LB 固体培养基上培养 24 h, 观察生成单菌落的形态、颜色、光滑程度和边缘特征, 进行革兰氏染色^[20]和芽孢染色^[21], 在油镜下观察菌株革兰氏染色及芽孢染色后的结果。

从新鲜纯化后的 LB 固体培养基中挑取适量菌体, 选择细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行序列扩增。PCR 反应体系: 5×*FastPfu* Buffer 10 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , 正、反向引物 (5 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , *FastPfu* Polymerase (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 模板 DNA 2 μL , ddH₂O 补足 50 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 45 °C 72 s, 27 个循环; 72 °C 10 min; 10 °C 终止反应。将产物送至上海凌恩生物科技有限公司完成测序, 所得 16S rRNA 基因序列进行人工校正和拼接后, 将序列上传至 NCBI-BLAST 库中比对分析。使用 MEGA 11 软件中的邻接 (neighbor-joining, NJ) 法构建 16S rRNA 基因系统发育树^[22]。

1.5 菌株的最佳生长条件

1.5.1 菌株生长的最适 pH

设置初始 pH 4.0、6.0、7.0、8.0、10.0、12.0 的 LB 液体培养基, 以 1% 的接种量转接 OD_{600} 为 0.4 的菌液于不同 pH 的 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 24 h, 测定菌株的生长情况, 试验设置 3 次重复, 测定 OD_{600} 值。

1.5.2 菌株生长的最适盐度

配制含 1%、3%、5%、7%、9%、11% NaCl 的 LB 液体培养基, 其余操作同 1.5.1^[23]。

1.6 菌株的促生效果测定

1.6.1 小麦种子生根发芽试验

将‘济麦 22’小麦种子用 75%乙醇清洗 2 min, 清水洗涤 2 次, 再以 3%次氯酸钠处理 1 min, 清水洗涤 2 次, 吹干。在培养皿上铺一层无菌滤纸, 将吹干后的小麦种子放入培养皿中, 每个培养皿 30 颗小麦种子。均匀浇施 5 mL 10^6 CFU/mL 的菌重悬液于小麦种子表面, 对照处理浇施等量无菌水, 每个处理 3 个重复, 置于 22 °C 人工气候培养箱中, 相对湿度 65%–80%, 每天定时定量施加无菌水, 7 d 后测定小麦种子发芽率、主根长及芽长。

1.6.2 小麦盆栽试验

产 IAA 芽孢杆菌对小麦生长的影响盆栽试验在中国科学院南京土壤研究所温室中进行。供试小麦品种为‘济麦 22’, 盆栽所使用土壤为潮土和砂姜黑土。

选取内径 12.5 cm、高 16.5 cm 的圆形花盆, 每盆装土量约为 1.8 kg。将小麦种子表面用 2% 的次氯酸钠消毒 30 min, 用自来水冲洗干净后再用蒸馏水清洗 3 次。准备培养皿, 培养皿中放置浸湿的滤纸, 将小麦种子按照处理数均匀地分开, 并分别放在浸过水的滤纸上, 在 25 °C 的黑暗中发芽 48 h。将菌株 363 接种到 20 mL 的 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜 (10–12 h) 后制成种子液, 吸取 500 μ L 接种到 50 mL 的 LB 培养基中, 同等条件下培养至 OD_{600} 为 1.0–1.2, 8 000 r/min 离心 7 min 去除上清液, 用无菌水重悬菌体。设置对照组和试验组, 每个处理 4 盆, 每盆 10 粒出芽均一的小麦种子, 对照组浇施清水, 试验组浇施菌重悬液, 使土壤中菌落数含量达 10^9 CFU/kg, 调节含水量为田间持水量的 60%。

1.7 菌株的田间试验

试验地点分别位于山东省德州市临邑富民家庭农场(潮土)和安徽省蚌埠市龙亢农场(砂姜黑土), 试验小区为长 12 m、宽 6 m, 设置施

加菌剂和不施加菌剂 2 个处理, 不同处理之间设置 2 m 的保护行。玉米收获后在秸秆表面喷施菌剂, 菌剂用量为 10 kg/hm², 接着以常规耕作方式还田。按照当地的小麦种植习惯播种小麦。在小麦成熟期, 每个小区选 6 个 1 m² 样方收获, 脱粒后测产。小麦产量(kg/hm²)=样方小麦籽粒重(kg/m²) $\times$ 666.7 m² $\div$ 15 hm²。

1.8 菌株的全基因组测序及 IAA 代谢途径

将菌株送上海凌恩生物科技有限公司完成测序, 通过二代测序技术完成菌株 363 的全基因组测序工作。将氨基酸序列与 KEGG 和 CAZy 数据库进行比对, 获取基因组在这些数据库中的注释信息, 从已知功能基因中挖掘目标功能基因。

1.9 数据处理

试验数据采用 Excel 和 IBM SPSS Statistics 26 进行统计学分析, 采用 Duncan 检验($P<0.05$)进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 产 IAA 芽孢杆菌的分离与筛选结果

本研究通过分离纯化从小麦根际土壤样本中获得了约 120 株芽孢杆菌。经过初步筛选, 挑选出 15 株具有产 IAA 能力的芽孢杆菌。在定性初筛和定量复筛的基础上, 最终筛选出一株产 IAA 能力较为显著的菌株(图 1)。该菌株在发酵培养 24 h 后的 IAA 产量达到 58.9 mg/L, 将其编号为 363。

2.2 菌株的形态、生理生化及分子生物学鉴定结果

形态学结果表明, 菌株 363 的菌落表面湿润且光滑, 呈现凸起状, 其边缘清晰整齐, 且具有淡黄色的外观(图 2A)。革兰氏染色(图 2B)和芽孢染色(图 2C)后, 该菌株在油镜下呈紫色, 表明其为革兰氏阳性菌, 并具有产芽孢的能力, 菌体呈杆状结构(图 2)。生理生化试验结果显示, 菌株 363 在淀粉水解及甲基红反应中呈阴性,

而在柠檬酸盐利用、产生物膜及明胶液化等试验中呈现阳性反应(表 1)。通过 16S rRNA 基因序列测定,并在 NCBI 数据库中进行同源性比对,发现菌株 363 与芽孢杆菌属中栗褐芽孢杆菌(*Bacillus badius*)相似度为 99.2%,表明菌株 363 与栗褐芽孢杆菌(*Bacillus badius*)亲缘关系较近,利用 MEGA 11.0 软件中的 NJ 法构建了基于 16S rRNA 基因的系统发育树(图 3)。结合菌株 363 在系统发育树上的位置、菌落特征及生理生化特性,最终确定菌株 363 为栗褐芽孢杆菌。

2.3 菌株 363 的最佳生长条件

如图 4A 所示,菌株 363 在初始 pH 4.0 时

无法生长,而在 pH 6.0 时,其生长量达到最大值。尽管 pH 值介于 7.0–12.0 时菌株仍能维持生长,但生长速率明显减缓。如图 4B 所示,NaCl 浓度为 1%时,菌株 363 生长量较大;当 NaCl 浓度为 3%和 5%时,菌株依然能够生长,但其生长速度显著下降;当 NaCl 浓度升至 7%–11%时,菌株完全停止生长。综上所述,菌株 363 的最适生长 pH 值为 6.0,NaCl 浓度为 1%。

2.4 菌株 363 的促生效果

2.4.1 菌株 363 对小麦种子生根发芽的影响

如表 2 所示,接种菌株 363 处理显著提升了小麦种子的芽长和根长,分别较对照组提高了 72.9%和 161.8%。小麦发芽率则无显著差异。

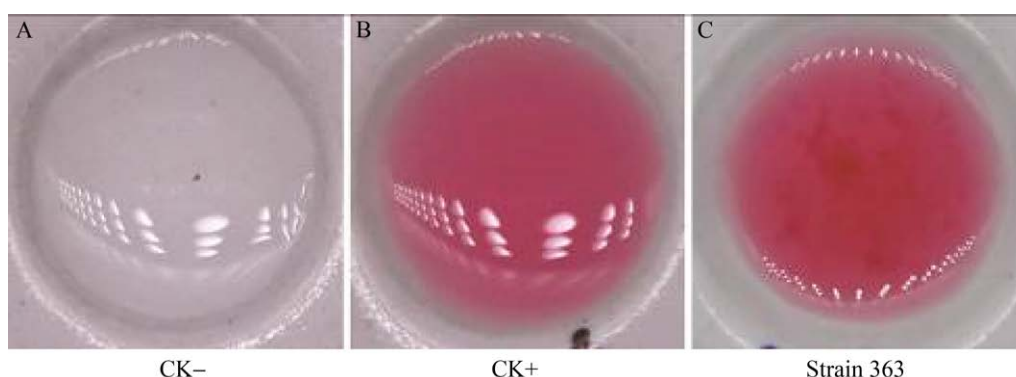


图 1 菌株产吲哚乙酸能力的定性测定 CK-: 阴性对照, LB 培养基; CK+: 阳性对照, IAA 标准溶液。

Figure 1 Qualitative determination of the ability of bacterial strains to produce indole-3-acetic acid. CK-: Negative control, LB medium; CK+: Positive control, IAA standard solution.

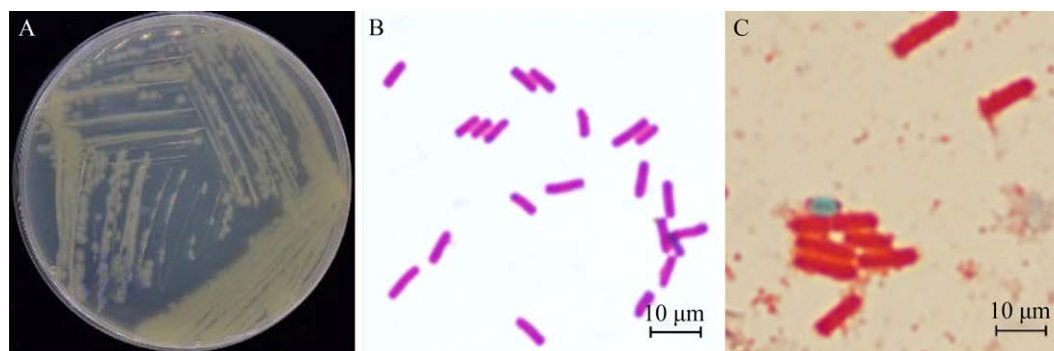


图 2 菌株 363 的菌落形态图及镜检图 A: 平板上的菌落形态; B: 革兰氏染色; C: 芽孢染色。

Figure 2 Colony morphology and microscopic examination image of strain 363. A: Colony morphology on plate; B: Gram staining; C: Spore staining.

表 1 菌株 363 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain 363

项目 Item	结果 Result
淀粉水解 Starch hydrolysis	—
甲基红反应 Methyl red reaction	—
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+
产生物膜 Produce biofilm	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
革兰氏染色 Gram staining	+
运动性(游动蠕动) Motility (Swimming and peristalsis)	+

+: 阳性; -: 阴性。

+: Positive; -: Negative.

2.4.2 菌株 363 对小麦生长的影响

在潮土和砂姜黑土 2 种土壤条件下的小麦盆栽试验表明, 施用菌株 363 制剂后, 小麦的生长指标在 30 d 后均有所提升(表 3)。在潮土中, 菌株 363 处理组的小麦株高、地上生物量、根系干重分别较对照组提高了 35.7%、17.4%和 33.3%; 在砂姜黑土中, 这些指标分别提高了 22.6%、33.3%和 36.4%。

2.5 菌株 363 的田间试验结果

田间试验结果显示, 施加菌株 363 制剂可以提高小麦的产量(图 5)。相较于对照组, 施加菌株 363 制剂后, 潮土和砂姜黑土试验区的

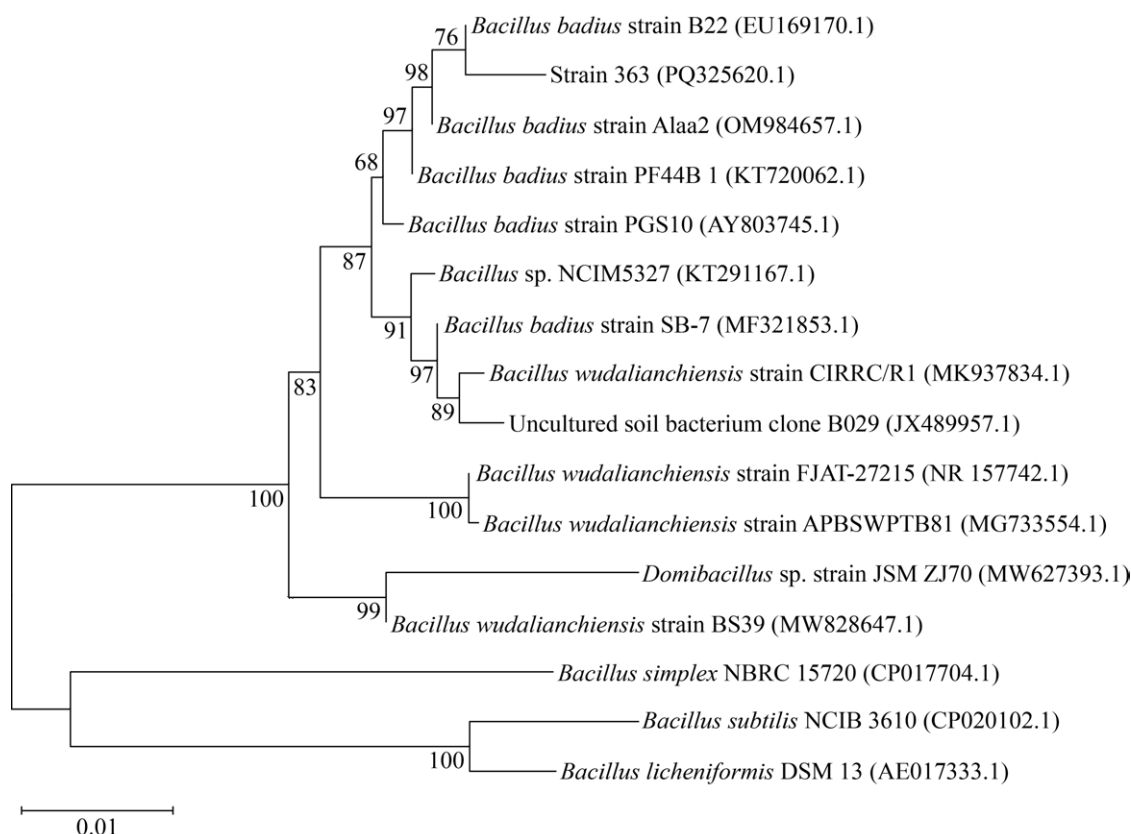


图 3 菌株 363 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内的编号指的是各菌株相关基因的 GenBank 登录号; 分支点上的数值为 bootstrap 值(百分值); 标尺表示序列之间差异的数字尺度。

Figure 3 Phylogenetic tree of strain 363 constructed based on the 16S rRNA gene sequence. The serial number in parentheses indicates the GenBank accession number of the strain's related genes; The values on the branching points are the bootstrap values (percentile), and the scales indicate the numerical scales of the differences between the sequences.

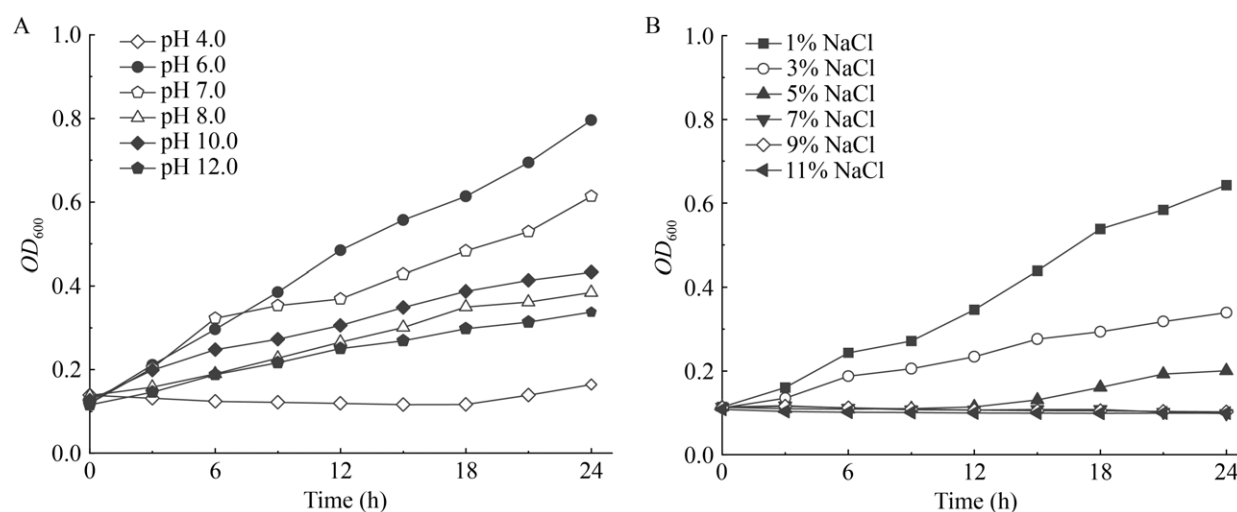


图 4 菌株 363 在不同 pH (A) 和不同 NaCl 浓度(B) 下的生长曲线

Figure 4 Growth curves of strain 363 at different pH (A) and different NaCl concentrations (B).

表 2 菌株 363 对小麦种子生根发芽的影响

Table 2 Effect of strain 363 on root development and germination of wheat seeds

处理 Treatment	CK	Strain 363
发芽率	70.0±3.00a	74.3±8.08a
Germination rate (%)		
芽长 Buds grow (cm)	4.99±1.50b	8.63±2.53a
根长 Root length (cm)	1.44±0.59b	3.77±1.60a

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same below.

小麦产量分别提高了约 10.8% 和 8.25%，增产效果显著。

2.6 菌株 363 全基因组测序及 IAA 代谢途径分析

2.6.1 全基因组测序分析

菌株 363 全基因组全长 4 687 059 bp, G+C 含量 41.1%。全基因组预测到编码基因 4 940 个, 编码基因总长度为 3 999 801 bp, 编码基因平均长度为 809 bp; 有 98 个 tRNA, 10 个 5S rRNA, 1 个 16S rRNA, 1 个 23S rRNA (图 6)。

2.6.2 基因功能注释

将预测基因的蛋白序列分别与 KEGG 和 CAZy 等数据库进行比对(图 7), 结果显示, 共有 2 488 个基因注释到 KEGG 数据库中, 116 个

基因注释到与 CAZy 数据库相关。在 4 940 个功能基因中, KEGG 数据库的功能注释基因占比为 50.4% (图 7A), 主要涉及新陈代谢、环境信息处理、遗传信息处理、细胞转化和有机系统。其中, 在新陈代谢中被注释最多的为氨基酸代谢(361 个基因)、碳水化合物代谢(289 个基因)、辅因子和维生素的代谢(198 个基因)。此外, CAZy 数据库的注释结果表明(图 7B), 共有 91 个基因分布于 6 类碳水化合物活性酶, 其中糖苷水解酶 15 个, 糖基转移酶 19 个, 糖类酯解酶 34 个, 多糖裂解酶 1 个, 氧化还原酶 7 个, 碳水化合物结合模块 15 个。

2.6.3 IAA 合成代谢通路分析

菌株 363 的 IAA 产量达到 58.9 mg/L, 表明其具备完整的 IAA 合成代谢通路。IAA 的产生和色氨酸代谢息息相关。根据代谢图和 IAA 生物合成的 KEGG 分析, 鉴定出 2 种与 IAA 合成相关的酶(图 8)。首先是醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, EC: 1.2.1.3), 该酶在吲哚乙醛途径和色胺途径的最后一步中起作用, 将吲哚乙醛转化为 IAA; 其次是单胺氧化酶(monoamine oxidase, EC: 1.4.3.4), 该酶能将色胺氧化为吲哚乙醛, 进一步参与 IAA 的合成。

表 3 菌株 363 对小麦生长的影响

Table 3 Effect of strain 363 on wheat growth

生长指标 Growth index	潮土 Fluvo-aquic soil		砂姜黑土 Shajiang black soil	
	CK	Strain 363	CK	Strain 363
株高 Plant height (mm)	11.2±0.26b	15.2±0.24a	32.3±0.54b	39.6±0.76a
地上生物量 Aboveground biomass (g)	0.23±0.01b	0.27±0.01a	0.63±0.03b	0.84±0.02a
根系干重 Root dry weight (g)	0.12±0.01b	0.16±0.01a	0.11±0.01b	0.15±0.01a

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

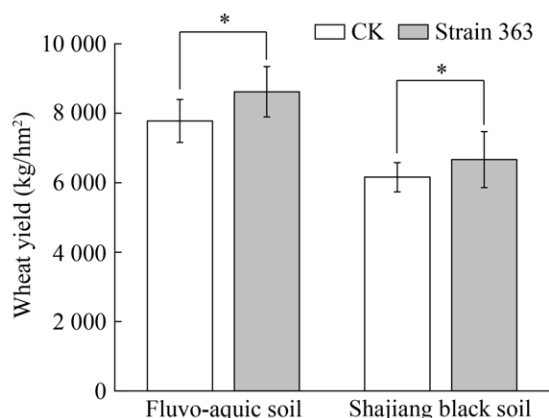


图 5 田间条件下菌株 363 对小麦产量的影响

Figure 5 Effect of strain 363 on wheat yield under filed conditions. *: $P<0.05$.

3 讨论

3.1 菌株 363 的分离、鉴定及其生长条件优化

本研究从华北平原典型的潮土和砂姜黑土小麦根际土壤中筛选出具有较高 IAA 产量的菌株 363, 其 IAA 分泌量高达 58.9 mg/L, 远高于吴翔等^[24]优化培养条件后获得的弯曲芽孢杆菌 (*Bacillus flexus*) MY07 的 IAA 产量。通过理化分析及 16S rRNA 基因测序, 菌株 363 被鉴定为栗褐芽孢杆菌 (*Bacillus badius*), Saghafi 等于 1951 年在美国加利福尼亚对该菌株进行分离培养并描述其表征^[25]。Gopinath 等^[26]的研究进一步揭示了该菌株的应用潜力, 尤其是其胞外提取物在促进芽和根的萌发方面的积极作用, 显示出其在根际促生领域的重要研究前景。

发酵培养基的优化对菌株的生长至关重

要, 因为其为菌株的生长繁殖提供了所需的营养^[27]。本研究表明, 菌株 363 的最适生长 pH 值为 6.0, 这与吴婧等^[28]从砂姜黑土中筛选到的固氮螺菌的最适生长条件相似, 但与 Anandham 等^[29]从牛粪中分离的菌株在 pH 7.0 条件下表现最佳的结果有所不同, 这种差异可能与菌株的原始分离环境有关。菌株 363 在 pH 6.0 和 7.0 条件下均表现出良好的生长能力, 表明其具有较强的耐酸性; 而在 pH 8.0–12.0 时, 尽管生长速率有所下降, 但菌株仍能生长, 显示出一定的耐碱性。因此, 菌株 363 在不同酸碱性土壤中均具有广泛的应用潜力。在耐盐性方面, 菌株 363 在 1% 的 NaCl 浓度下生长情况较好, 并且在 3%–5% NaCl 浓度下仍能维持生长, 但超过 7% NaCl 时则停止生长, 表明该菌株具有较好的耐盐能力。

3.2 菌株 363 对小麦的促生及增长效果

尽管栗褐芽孢杆菌的某些功能特性已得到一定程度的解析, 其在植物根际促生方面的研究, 尤其是盆栽试验或田间试验的应用仍较为少见。李福艳等^[15]将分离的栗褐芽孢杆菌 YC5064 应用于玉米和生菜, 表现出良好的促生效果。蒋森^[16]分离的栗褐芽孢杆菌 QT3 在龙葵上同样展示了对根、茎、叶的显著促进作用。然而, 栗褐芽孢杆菌在小麦促生方面的研究相对有限。本研究小麦种子发芽和盆栽试验表明, 菌株 363 显著促进了芽和根的生长, 同时也显著提升了小麦株高及地上、地下生物量的积累。菌株 363 通过分泌 IAA 等植物激素显著促进了根系生长^[30], 而增强的根系可以通过改善土壤

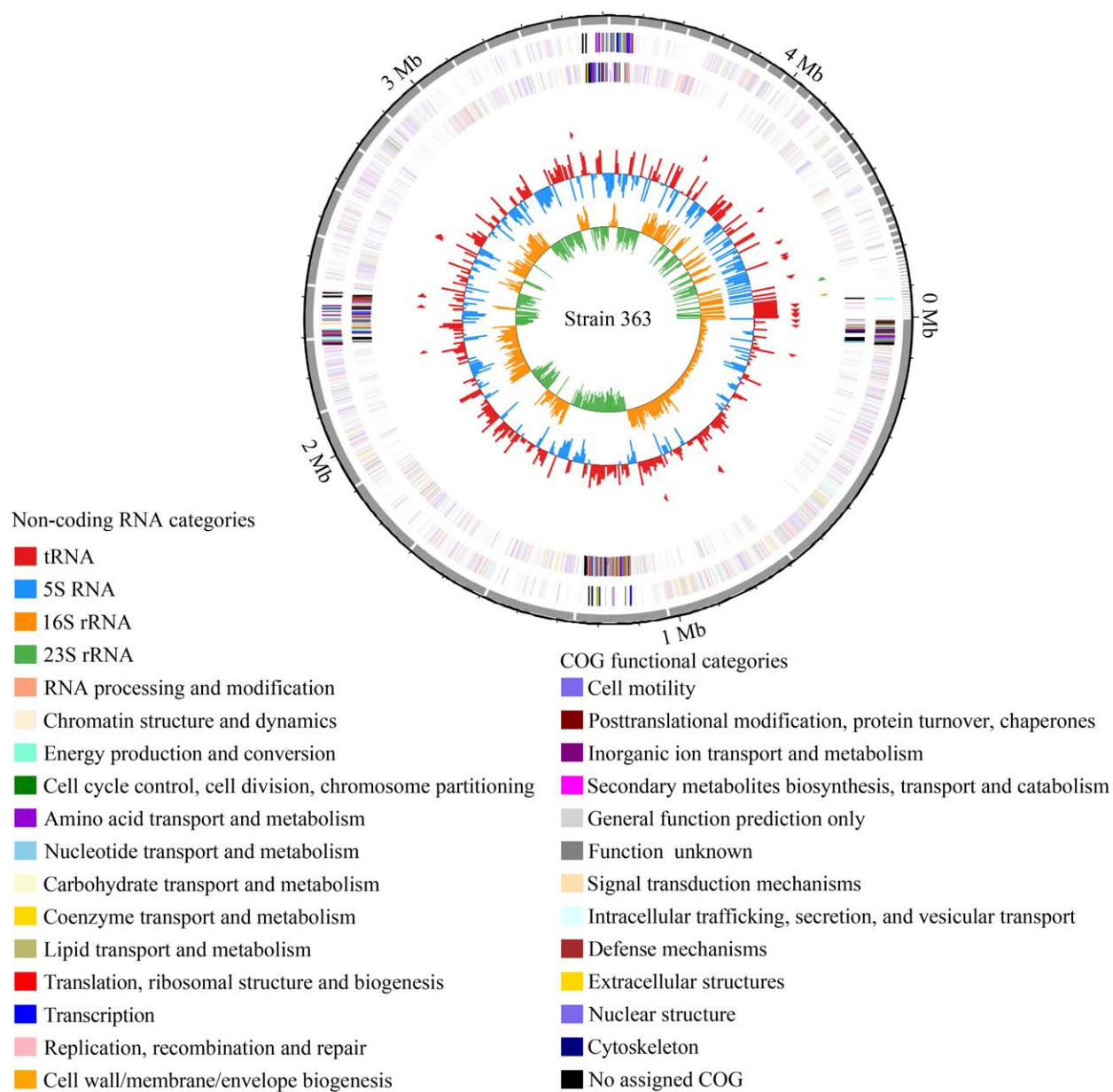


图 6 菌株 363 全基因组圈图 圈图的最外面一圈为基因组大小的标识；第 2 圈和第 3 圈为正链、负链上的编码序列(coding sequence, CDS)，不同的颜色表示 CDS 不同的蛋白质直系同源簇(clusters of orthologous groups of proteins, COG)的功能分类；第 4 圈为 rRNA 和 tRNA；第 5 圈为 G+C 含量，向外的红色部分表示该区域 G+C 含量高于全基因组平均 G+C 含量，向内的蓝色部分表示该区域 G+C 含量低于全基因组平均 G+C 含量；最内一圈为 G+C skew 值，具体算法为 $G-C/G+C$ 。

Figure 6 Circular genome map of strain 363. The outermost ring of the genome map indicates genome size; The second and third rings represent the CDS on positive and negative strands, with different colors indicating different COG functional classification of CDS; The fourth ring shows rRNA and tRNA; The fifth ring displays the G+C content, where the outward red sections indicate regions with a G+C content higher than the average genome G+C content, and the inward blue sections indicate regions with a G+C content lower than the average G+C content; The innermost ring represents the G+C skew value, calculated as $G-C/G+C$.

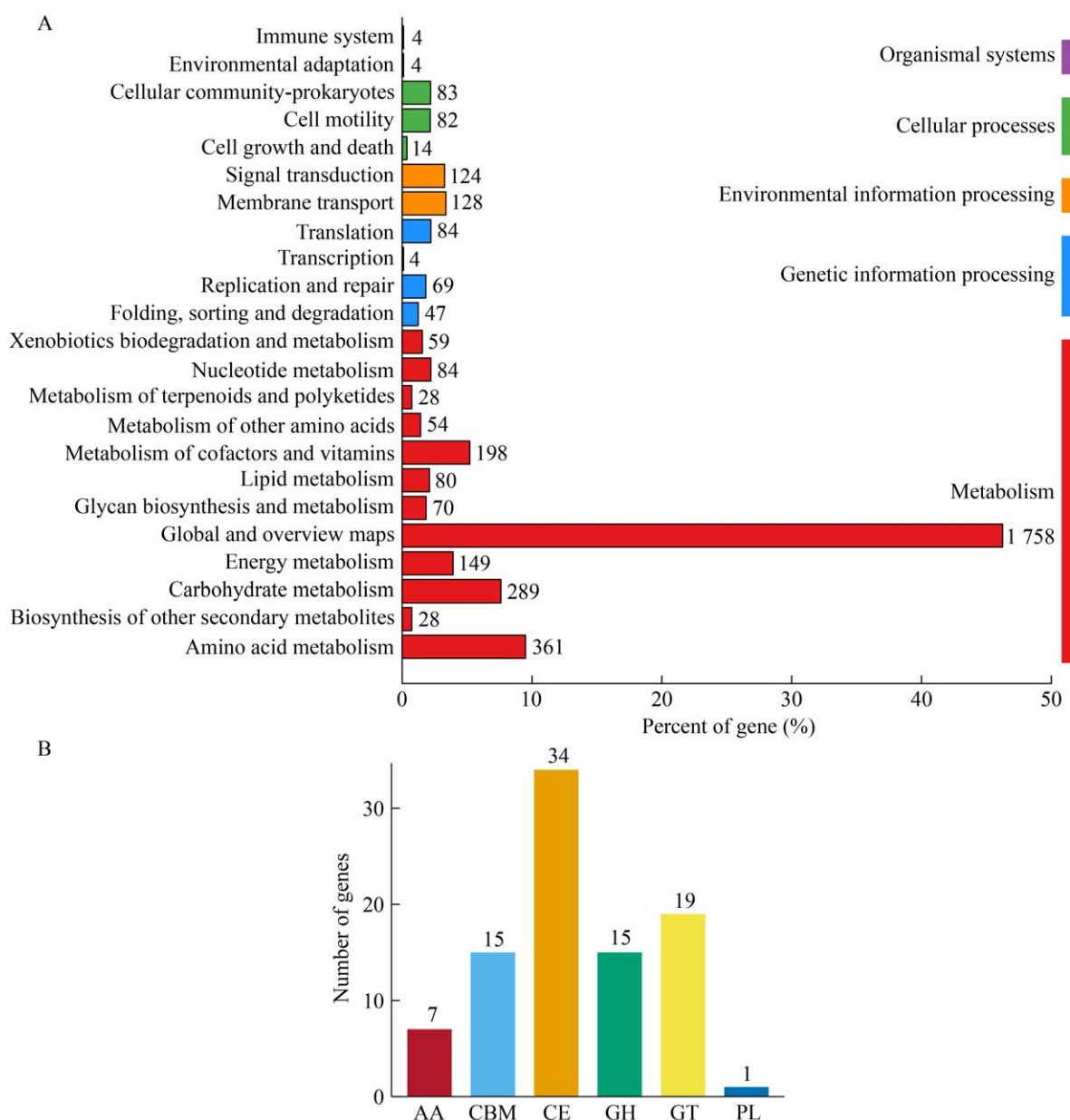


图 7 基因组 KEGG 数据库(A)和 CAZy 数据库(B)注释结果 AA: 氧化还原酶; CBM: 碳水化合物结合模块; CE: 糖类酯解酶; GH: 糖苷水解酶; GT: 糖基转移酶; PL: 多糖裂解酶。

Figure 7 Annotation result of genome using KEGG database (A) and CAZy database (B). AA: Auxiliary activities; CBM: Carbohydrate-binding modules; CE: Carbohydrate esterases; GH: Glycoside hydrolases; GT: Glycosyl transterases; PL: Polysaccharide lyases.

的孔隙度和结构, 间接缓解土壤结构障碍的问题^[31], 特别是在砂姜黑土这种易板结的土壤中, 增强的根系有助于打破土壤紧实层, 增加透气性和透水性, 从而改善小麦的生长环境。

为进一步探究菌株 363 在田间的应用效

果, 本研究在华北平原山东潮土和安徽砂姜黑土进行了大田试验。结果显示: 施加菌株 363 的制剂显著提高了小麦的产量, 潮土和砂姜黑土上的小麦增产分别为 10.8% 和 8.25%。相比之下, 熊伟东等^[32]在砂质潮土上应用短小芽孢杆

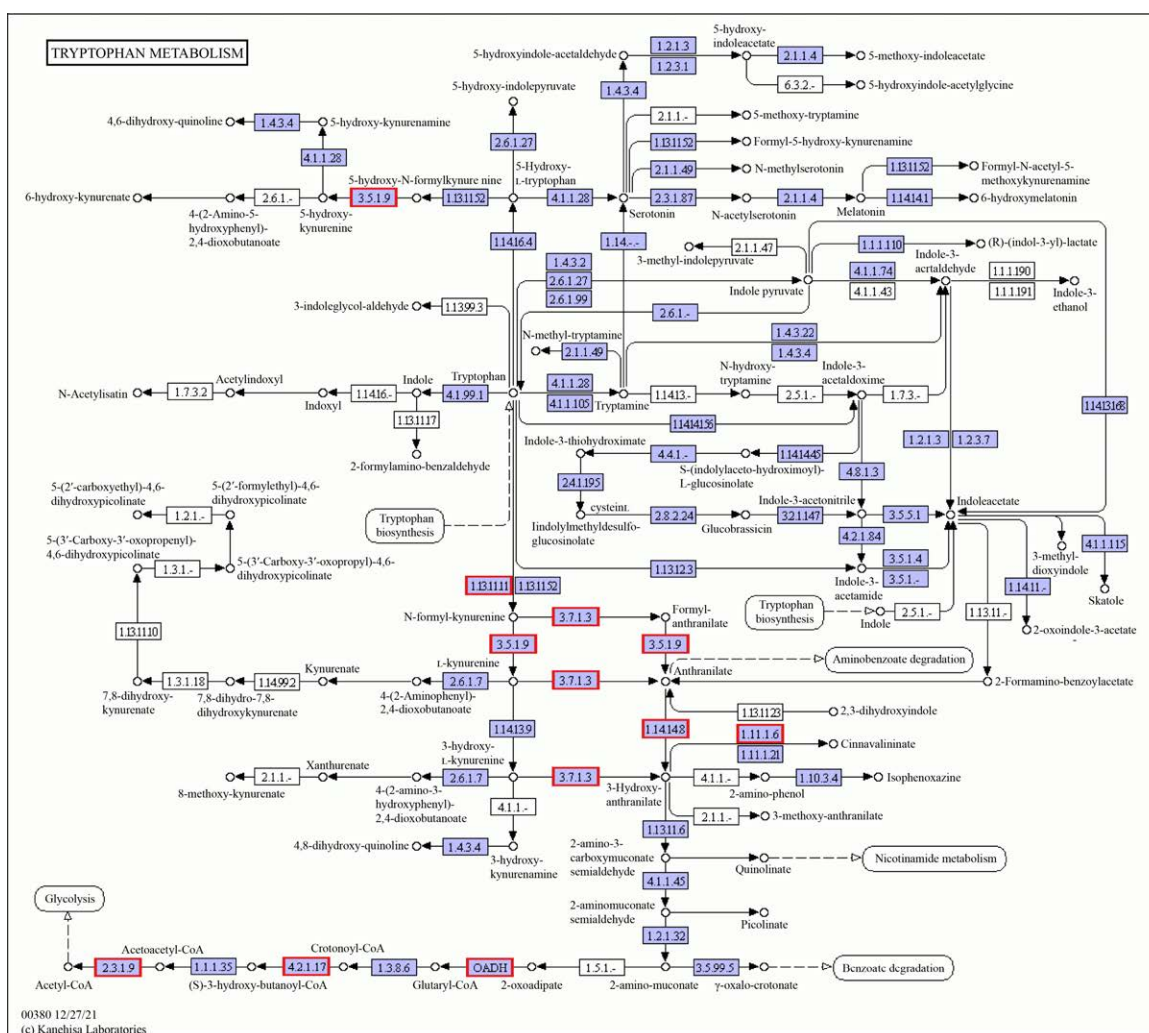


图 8 菌株 363 的 IAA 合成代谢通路
Figure 8 IAA anabolic pathway in strain 363.

菌剂的研究表明, 小麦产量增产率达 12.8%; 房运喜等^[33]在砂姜黑土麦田施用微生物复合菌剂的增产率为 11.6%。值得注意的是, 上述两项研究所使用的菌剂为商用产品, 且仅在单一土壤类型上进行了验证。相比之下, 本研究所用的促腐菌株 363 源自华北平原的砂姜黑土和潮土, 且在两种不同土壤类型上均实现了与上述研究相近的增产效果。表明该菌株在不同土壤条件下均具有比较强适应性和广泛的应用潜力, 具有推广应用价值。

3.3 菌株 363 的 IAA 合成代谢途径分析

为深入解析菌株 363 的基因组特征及促生

相关的基因, 本研究采用二代测序技术对栗褐芽孢杆菌 363 进行了全基因组测序分析。菌株 363 功能主要注释为与生物代谢、环境信息处理和细胞过程相关的基因, 表明该菌株生长代谢旺盛, 与促生性能相符。基因注释在 KEGG 数据库中主要关联到氨基酸代谢和碳水化合物代谢。进一步证实了其代谢潜能。CAZy 数据库的注释结果表明, 大部分基因被注释为糖类酯解酶, 这一类酶系在碳水化合物的降解、修饰及生物合成过程中具有重要作用^[34]。通过全基因组分析, 鉴定出 IAA 合成途径中的 2 种关键酶, 分别是色胺途径的单胺氧化酶(EC:

1.4.3.4)和同时参与色胺途径与 IPyA 途径的醛脱氢酶(EC: 1.2.1.3), 进一步增强其促生作用。

4 结论

本研究从华北平原典型的潮土和砂姜黑土的小麦根际土壤中筛选出一株高产 IAA 的栗褐芽孢杆菌(*Bacillus badius*) 363。该菌株在 pH 6.0 的条件下生长最佳, 具备较强的耐酸碱能力, 在 1% NaCl 浓度下生长较优, 在 3%–5% NaCl 浓度下仍能继续生长。通过小麦种子发芽试验和盆栽试验表明, 菌株 363 能显著促进小麦的生长与发育, 在潮土和砂姜黑土中均表现出良好的定殖能力和显著的增产效果。全基因组分析表明, 菌株 363 的 IAA 合成途径中涉及单胺氧化酶和醛脱氢酶这 2 种关键酶。

作者贡献声明

相凯文: 试验执行、数据处理和分析、论文撰写和修改; 李丹丹: 技术支持、数据收集、论文修改; 郭自春: 研究构思和设计、项目资助、论文讨论和修改; 任宗玲: 参与试验设计、参与论文修改; 田慎重: 提供资源支持; 高磊: 参与论文讨论与修改; 彭新华: 参与试验设计、提供研究平台、论文指导; 蔡燕飞: 试验指导、论文讨论与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 郭伟, 李丹丹, 徐基胜, 周云鹏, 王青霞, 周谈坛, 赵炳梓. 秸秆与有机无机肥配施对不同质地潮土土壤质量和小麦产量的影响[J]. 土壤学报, 2024, 61(5): 1360-1373. GUO W, LI DD, XU JS, ZHOU YP, WANG QX, ZHOU TT, ZHAO BZ. Effects of application of straw and organic-inorganic fertilizers on soil quality and wheat yield in different texture fluvo-aquic soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024, 61(5): 1360-1373 (in Chinese).
- [2] 王梦宇, 全昊天, 韩燕来, 李培培, 陈文举, 毕庆生. 深耕及培肥对砂姜黑土理化性质和小麦产量的影响[J]. 土壤通报, 2022, 53(6): 1431-1439. WANG MY, TONG HT, HAN YL, LI PP, CHEN WJ, BI QS. Effects of deep tillage and fertilization on wheat yield and physicochemical properties of lime concretion black soil[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2022, 53(6): 1431-1439 (in Chinese).
- [3] 常沛尹, 王中华, 李凤敏, 高梓源, 张辉红, 王祎, 李芳, 韩燕来, 姜瑛. 玉米根际多功能促生菌的筛选及其对冬小麦-夏玉米轮作体系产量提升效果[J]. 生物技术通报, 2024, 40(1): 231-242. CHANG LY, WANG ZH, LI FM, GAO ZY, ZHANG HH, WANG Y, LI F, HAN YL, JIANG Y. Screening multi-functional rhizobacteria from maize rhizosphere and their chancing effects on winter wheat-summer maize rotation system[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(1): 231-242 (in Chinese).
- [4] 刘璐, 唐文竹, 李宪臻. 一株产吲哚乙酸菌的筛选、鉴定与优化[J]. 大连工业大学学报, 2019, 38(4): 239-243. LIU L, TANG WZ, LI XZ. Screening, identification and optimization of IAA producing bacteria[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2019, 38(4): 239-243 (in Chinese).
- [5] AHMAD F, AHMAD I, KHAN MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities[J]. Microbiological Research, 2008, 163(2): 173-181.
- [6] SCHLÜTER U, MASCHER M, COLMSEE C, SCHOLZ U, BRÄUTIGAM A, FAHNENSTICH H, SONNEWALD U. Maize source leaf adaptation to nitrogen deficiency affects not only nitrogen and carbon metabolism but also control of phosphate homeostasis[J]. Plant Physiology, 2012, 160(3): 1384-1406.
- [7] PANTOJA-GUERRA M, VALERO-VALERO N, RAMÍREZ CA. Total auxin level in the soil-plant system as a modulating factor for the effectiveness of PGPR inocula: a review[J]. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2023, 10(1): 6.
- [8] HA-TRAN DM, NGUYEN TTM, HUNG SH, HUANG E, HUANG CC. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: a review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(6): 3154.
- [9] ALI S, KHAN N. Delineation of mechanistic approaches employed by plant growth promoting microorganisms for improving drought stress tolerance in plants[J]. Microbiological Research, 2021, 249: 126771.
- [10] 邓振山, 党军龙, 张海州, 李军, 韦革宏. 植物根际促生菌的筛选及其对玉米的促生效应[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7): 980-988. DENG ZS, DANG JL, ZHANG HZ, LI J, WEI GH. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria and their promoting effects on maize[J]. Microbiology China, 2012, 39(7): 980-988 (in Chinese).
- [11] SPAEPEN S, VERSÉES W, GÖCKE D, POHL M, STEYAERT J, VANDERLEYDEN J. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(21): 7626-7633.
- [12] TARIQ M. Antagonistic features displayed by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review[J]. Journal of Plant Science and Phytopathology, 2017, 1(1): 38-43.
- [13] 周益帆, 白寅霜, 岳童, 李庆伟, 黄艳娜, 蒋玮, 何川, 王金斌. 植物根际促生菌促生特性研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 644-666. ZHOU YF, BAI YS, YUE T, LI QW, HUANG YN,

- JIANG W, HE C, WANG JB. Research progress on the growth-promoting characteristics of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 644-666 (in Chinese).
- [14] TIEN TM, GASKINS MH, HUBBELL DH. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 37(5): 1016-1024.
- [15] 李福艳, 刘晓玉, 颜静婷, 蔡燕飞. 三株产吡啶乙酸根际促生芽孢杆菌的筛选鉴定及其促生作用[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(5): 873-884.
- LI FY, LIU XY, YAN JT, CAI YF. Isolation and identification of three indole-3-acetic acid producing plant-growth-promoting rhizosphere *Bacillus* sp. and their growth-promoting effects[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2021, 33(5): 873-884 (in Chinese).
- [16] 蒋森. 耐镉根际促生菌的筛选及其产芽孢条件优化[D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- JIANG M. Screening of cadmium-tolerant rhizosphere growth-promoting bacteria and optimization of sporulation conditions[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2019 (in Chinese).
- [17] 刘晔, 刘晓丹, 张林利, 吴越, 王国文, 汪强, 姜瑛. 花生根际多功能高效促生菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 125-134.
- LIU Y, LIU XD, ZHANG LL, WU Y, WANG GW, WANG Q, JIANG Y. Screening, identification of multifunctional peanut root-promoting rhizobacteria and its promoting effects on peanuts (*Arachis hypogaea* L.)[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(10): 125-134 (in Chinese).
- [18] 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.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial System[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [19] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- UCHANAN RE, GIBBONS NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [20] TRIPATHI N, SAPRA A. Gram Staining[M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- [21] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2018.
- SHEN P, CHEN XD. Experiments in Microbiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2018 (in Chinese).
- [22] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [23] POIRIER Y, JASKOŁOWSKI A, CLÚA J. Phosphate acquisition and metabolism in plants[J]. Current Biology, 2022, 32(12): R623-R629.
- [24] 吴翔, 甘炳成, 黄忠乾, 彭卫红. 一株产 IAA 菌株的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. 四川农业大学学报, 2014, 32(4): 432-435, 461.
- WU X, GAN BC, HUANG ZQ, PENG WH. Screening and identification of a IAA biosynthesis strain and optimization of its culture conditions[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2014, 32(4): 432-435, 461 (in Chinese).
- [25] SAGHAFI M, APPLEMAN MD. Rediscovery of *Bacillus badius* batchelor[J]. Journal of Bacteriology, 1953, 65(2): 220.
- [26] GOPINATH S, KUMARAN KS, SUNDARARAMAN M. A new initiative in micropropagation: airborne bacterial volatiles modulate organogenesis and antioxidant activity in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) callus[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2015, 51(5): 514-523.
- [27] 王辰, 张谷月, 张园园, 沈婷, 王世梅. 白刺链霉菌 (*Streptomyces albospinus*) CT205 菌株发酵条件优化及其次生代谢产物性质研究[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(2): 304-310.
- WANG C, ZHANG GY, ZHANG YY, SHEN T, WANG SM. The optimization of fermentation conditions of *Streptomyces albospinus* CT205 and study of secondary metabolite[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2015, 38(2): 304-310 (in Chinese).
- [28] 吴婧, 裴彩娥, 朱媛媛, 黄薇, 马超, 姜瑛, 朱林, 邵建. 一株兼具产 IAA 能力纤维素降解菌的筛选、鉴定及条件优化[J]. 生物技术通报, 2020, 36(12): 54-63.
- WU J, NIE CE, ZHU YY, HUANG W, MA C, JIANG Y, ZHU L, GAO HJ. Isolation, identification of a cellulose-degrading bacterium with IAA-producing ability and optimization of its culture conditions[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(12): 54-63 (in Chinese).
- [29] ANANDHAM R, HEO J, KRISHNAMOORTHY R, SenthilKUMAR M, GOPAL NO, KIM SJ, KWON SW. *Azospirillum ramasamyi* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from fermented bovine products[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(5): 1369-1375.
- [30] 苑博华, 廖祥儒, 郑晓洁, 吴立峰, 赵慧. 吡啶乙酸在植物细胞中的代谢及其作用[J]. 生物学通报, 2005, 40(4): 21-23.
- YUAN BH, LIAO XR, ZHENG XJ, WU LF, ZHAO H. Metabolism and function of IAA in plant cell[J]. Bulletin of Biology, 2005, 40(4): 21-23 (in Chinese).
- [31] PHILIPPOT L, CHENU C, KAPPLER A, RILLIG MC, FIERER N. The interplay between microbial communities and soil properties[J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 22(4): 226-239.
- [32] 熊伟东, 刘晔, 王国文, 汪强, 韩燕来, 姜瑛. 促生菌剂在砂质潮土麦田的应用效果[J]. 麦类作物学报, 2016, 36(7): 945-950.
- XIONG WD, LIU Y, WANG GW, WANG Q, HAN YL, JIANG Y. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria agents application on wheat in sandy soil[J]. Journal of Triticeae Crops, 2016, 36(7): 945-950 (in Chinese).
- [33] 房运喜, 赵玉荣, 钱国平, 詹其厚. 微生物菌剂在砂姜黑土区小麦上的施用效果初步研究[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(4): 190.
- FANG YX, ZHAO YR, QIAN GP, ZHAN QH. Preliminary study on the application effect of microbial agents on wheat in Shajiang black soil area[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2007, 13(4): 190 (in Chinese).
- [34] CANTAREL BL, COUTINHO PM, RANCUREL C, BERNARD T, LOMBARD V, HENRISSAT B. The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(suppl_1): D233-D238.