微生物学通报
Microbiology China
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

Nov. 20, 2023, 50(11): 4852−4862
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.230218
Copyright ©2023 Microbiology China All Rights Reserved

研究报告

花生种子相关促生菌分离鉴定及功能评价

王丹丹[1]，孙丽[1]，于宏[1]，阎祥慧[1]，张成凯[1]，王孟亮[1]，陈大印[2]，解志红[*1]

1 山东农业大学资源与环境学院，山东 泰安 271018
2 山东蓬勃生物科技有限公司，山东 泰安 271000

王丹丹, 孙丽, 于宏, 阎祥慧, 张成凯, 王孟亮, 陈大印, 解志红. 花生种子相关促生菌分离鉴定及功能评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4852-4862.

WANG Dandan, SUN Li, YU Hong, YAN Xianghui, ZHANG Chengkai, WANG Mengliang, CHEN Dayin, XIE Zhihong. Isolation, identification, and functional characterization of plant growth-promoting bacteria from peanut seeds[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4852-4862.

摘　要：【背景】利用微生物促进植物健康生长是农业可持续发展的重要方向之一，而种子相关的促生菌可在植物生命周期早期与植物相互作用，对植物健康生长具有重要意义。【目的】发掘与利用种子相关促生菌的前提是筛选获得促生菌菌种资源，验证其益生能力，为其进一步应用与机理研究提供依据与支持。【方法】以花生种子为研究对象，从种子表面及种子内部分离纯化多株菌，测定菌株的固氮、解磷、解钾、吲哚乙酸合成和铁载体合成等促生能力，并验证菌株对常见植物病原菌的生长抑制特性；通过 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析，确定分类地位；通过生物膜形成能力及根际定殖能力测定菌株在植物根际的生存能力；最后通过催芽及盆栽试验测定菌株对花生种子发芽及幼苗生长的影响。【结果】从花生种子表面、种子内和胚根内分离筛选到 41 株菌，均有吲哚乙酸合成能力，其中 35 株有固氮能力，2 株有铁载体分泌能力，14 株有植物病原菌生长抑制能力。各选一株为代表的菌株，即 PS3、PE5 和 PR5，经 16S rRNA 基因序列比对分析鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。PS3、PE5 和 PR5 均可在 MSgg 液体培养基表面形成褶皱较强的生物膜，也可在花生根际形成有效定殖。催芽试验结果表明经过促生菌浸种后花生种子萌发率明显提高，在第 2 天时，PS5 将发芽率由 14.17%提高至 38.33%，PE5 发芽率提高至 30.83%，PR5 发芽率提高至 39.17%。三株菌能够明显促进花生幼苗生长，PS5 对花生幼苗苗高、根长、鲜重和干重分别提高 21.82%、22.20%、37.11%和 35.64%，PE5 分别提高 17.45%、18.93%、26.10%和 21.18%，PR5 分别提高 23.11%、23.92%、38.66%和 37.47%。【结论】筛选获得的花生种子相关促生菌，具有促进植物生长的潜力，明显促进种子萌发及幼苗生长，是良好的促生菌生物资源，具有较好的应用潜力。

关键词：花生；种子相关细菌；分离鉴定；促生；芽孢杆菌

资助项目：山东省重点研发计划(2021CXGC010804)；山东省自然科学基金(ZR2021QC175)
This work was supported by the Key Research and Development Program of Shandong Province (2021CXGC010804) and the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021QC175).
*Corresponding author. E-mail: zhihongxie211@163.com
Received: 2023-03-21; Accepted: 2023-06-13; Published online: 2023-07-07

Isolation, identification, and functional characterization of plant growth-promoting bacteria from peanut seeds

WANG Dandan[1], SUN Li[1], YU Hong[1], YAN Xianghui[1], ZHANG Chengkai[1], WANG Mengliang[1], CHEN Dayin[2], XIE Zhihong[*1]

1 College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China
2 Shandong Pengbo Bio-technology Limited Company, Tai'an 271000, Shandong, China

Abstract: [Background] The application of plant growth-promoting bacteria is an important measure for the sustainable development of agriculture. The seed-associated bacteria can interact with plants in the early lifecycle, being of great significance to plant growth. **[Objective]** To screen out the seed-associated bacterial strains with the function of promoting plant growth and inhibiting plant pathogens, to underpin the application of the strains in agricultural production. **[Methods]** The plant growth-promoting bacteria were isolated from the surface and the inside of peanut seeds. The roles of the isolates in promoting plant growth (nitrogen fixation, phosphorus solubilization, and IAA and siderophore production) and inhibiting the growth of plant pathogens were examined. The 16S rRNA gene sequencing was employed to determine the taxonomic status of the isolates. The biofilm formation and rhizosphere colonization tests were carried out to measure the viability of the strains in plant rhizosphere. Finally, pot experiments were conducted to examine the effects of the plant-growth promoting bacteria on the seed germination and seedling growth of peanut. **[Results]** A total of 41 plant-growth promoting bacterial strains were isolated from peanut seeds. All of the strains were capable of producing IAA, and 35, 2, and 14 strains showed the abilities of fixing nitrogen, secreting siderophores, and inhibiting plant pathogens, respectively. The representative strains (the surface/inside of peanut seed and the inside of peanut radicle), PS3, PE5, and PR5, were chosen according to the results of phylogenetic analysis and identified as *Bacillus* sp. The three strains formed folded biofilms on the surface of MSgg liquid medium and colonized the surface of peanut roots. They increased the seed germination rate and promoted the seedling growth of peanut. Specially, PS3, PE5, and PR5 increased the seed germination rate from 14.17% to 38.33%, 30.83%, and 39.17%, respectively, on day 2. Compared with the control, PS5 increased the seedling height, root length, fresh weight, and dry weight by 21.82%, 22.20%, 37.11%, and 35.64%, respectively; PE5 increased them by 17.45%, 18.93%, 26.10%, and 21.18%, respectively; PR5 increased them by 23.11%, 23.92%, 38.66%, and 37.47%, respectively. **[Conclusion]** The bacterial strains with high efficiency in promoting plant growth were isolated from peanut seeds, and significantly promoted seed germination and seedling growth. The strains provide potential resources for agricultural production, with excellent application potential.

Keywords: peanut; seed-associated bacteria; isolation and identification; plant growth-promoting; *Bacillus*

花生是我国重要的油料经济作物，也是一种营养价值很高的食物，提高花生产量以及保证花生种子品质是花生产业发展的重要方向。随着化学农药的过度使用，利用有益微生物提高作物产量及防治植物病害已成为花生产业的研究热点[1-3]。植物相关促生菌可通过多种途径促进植物健康生长，如合成吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、固氮、解磷、解钾和抑制植物病原菌生长等，并且植物相关促生菌对环境友好，因此施用植物促生菌有望成为一种健康而有效的措施[4-7]。

种子是植物繁育的最主要器官，具有丰富的微生物资源，这些微生物是植物-微生物系统的重要组成成分[8-9]。种子相关微生物种群在种子表面及植物发育过程中具有高度竞争性，可迅速占据栖息位置及利用营养物质，研究种子相关菌群是制定微生物接种剂的关键之一，可以调节植物相关微生物的功能，从而提高植物的适应性，对植物健康生长具有重要意义[10-12]。Solanki 等[13]对小麦籽粒相关菌群分析发现，小麦种子相关微生物可以抑制产毒真菌的生物活性，通过拮抗作用保护植物免受植物病原体的侵害，同时还能有效减少种子黄曲霉毒素的污染。Figueiredo 等[14]研究发现，种子相关菌可促进玉米种子发芽及植物健康生长。此外，种子相关菌还可以促进植物在逆境下的健康生长及对重金属等污染的修复能力[15-16]。种子相关细菌作为种子贮藏及植物早期发育的共生菌，对植物健康生长具有重要意义，因此，分离筛选多功能种子相关促生菌可为生物方法提高作物产量提供支持。目前，种子相关细菌研究基本以种子内生菌为重点，而对种子表面相关细菌研究较少。本研究从花生种子表面、种子内部分离筛选具有促生特性的菌株进行鉴定，选取优势菌株验证对花生种子萌发及幼苗的促生能力，以期为微生物菌肥研制提供多功能促生菌株，也为其应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 花生种子

花生种子为花育 25，由山东省农业科学院提供。

1.1.2 培养基

LB 培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、chrome azurol S assay (CAS)培养基、Ashby 无氮固体培养基、无机磷固体培养基、缺钾固体培养基、murashige and skoog (MS)培养基成分均购于青岛海博生物技术有限公司并按说明书配制。Minimal salts glycerol glautamate (MSgg)培养基参考 Hamon 等[17]方法配制。

磷酸缓冲液(g/L)：NaCl 8.00，Na_2HPO_4 1.44，KH_2PO_4 0.24，KCl 0.20，pH 7.4。

Salkowski 比色液：0.5 mol/L $FeCl_3$ 与 35% 高氯酸 1:50 (体积比)混匀。

1.1.3 主要试剂和仪器

基因组提取试剂盒，爱思进生物技术(杭州)有限公司；高保真聚合酶 Primes STAR HS DNA Polymerase，宝生物工程(大连)有限公司。

超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；多功能涡旋混合器，Scientific Industries 公司；恒温培养箱，上海龙跃仪器设备有限公司；恒温摇床，上海一恒科学仪器有限公司；PCR 仪，赛默飞世尔科技公司。

1.2 菌株分离

1.2.1 花生种子表面相关细菌分离

选取饱满的花生，在超净台去壳，用无菌水清洗 3 次后将花生种子浸泡在无菌水中 3 h

后涡旋 30 min，涂布于 LB 固体培养基，35 ℃培养 1 d，根据菌落形态特征的差异，选择性挑取单菌落划线纯化，直至培养特征完全一致。

1.2.2 花生内生细菌分离

花生种子 75%酒精处理 30 min 后无菌水冲洗 5 次，再使用 10%次氯酸钠浸泡处理 10 min 后无菌水冲洗 5 次，取最后漂洗无菌水涂布于 LB 固体培养基上，35 ℃培养 1 d，检测灭菌是否彻底。将消毒后的种子与适量无菌磷酸缓冲液在无菌研钵内研磨，取匀浆上清液涂布于 LB 固体培养基，35 ℃培养 1 d，根据菌落形态特征的差异，选择性挑取单菌落划线纯化，直至培养特征完全一致。

1.2.3 花生胚根内生细菌分离

将消毒后的花生种子置于含无菌水的培养皿中培养 4 d，将根与适量无菌磷酸缓冲液在无菌研钵内研磨，取匀浆上清液涂布于 LB 固体培养基，35 ℃培养 1 d，根据菌落形态特征的差异，选择性挑取单菌落划线纯化，直至培养特征完全一致。

1.3 促生菌促生能力的测定

采用 Salkowski 法测定促生菌 IAA 合生能力，将菌株接种于 LB 液体培养基中，其中 L-色氨酸浓度为 200 mg/L，35 ℃、200 r/min 振荡培养 4 d，4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液，取 100 μL 上清液于酶标板中，加入 100 μL Salkowski 比色液，黑暗条件下静置 30 min 测定 530 nm 吸光度。

定性测定促生菌铁载体合成、固氮、解磷及解钾能力。菌株接种于 CAS 固体培养基上，35 ℃培养 7 d，观察是否有橙黄色晕圈出现。菌株接种于 Ashby 无氮固体培养基上，35 ℃培养 3 d，记录是否有菌落形成。菌株接种于无机磷固体培养基上，35 ℃培养 3 d，观察是否有透明圈出现。菌株接种于缺钾固体培养基上，35 ℃培养 7 d，观察是否有透明圈出现。

1.4 植物病原菌生长抑制试验

从实验室前期保存的菌株库里选取 4 株植物病原菌曲霉菌(*Aspergillus* sp.)、疫霉菌(*Phytophthora* sp.)、尖孢镰刀菌(*Fusariu oxysporum*)和劳尔氏菌(*Ralstonia* sp.)进行生长抑制试验。首先将直径 0.5 cm 的植物病原菌菌饼置于 PDA 培养基平板中心，30 ℃培养至菌落直径约 1 cm，将目标菌株接种在距离菌丝边缘 2 cm 处，30 ℃继续培养观察是否形成抑菌圈。

1.5 菌株鉴定

利用基因组提取试剂盒提取目的菌株基因组 DNA，利用高保真聚合酶及引物 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′)和 1492R (5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′)扩增 16S rRNA 基因序列，PCR 反应体系及反应条件按高保真聚合酶说明书操作。获得的序列在 EzBioCloud 数据库进行 BLAST 比对分析，选取相似度高的模式菌株，利用 MEGA-X 软件构建系统发育树(neighbor-joining)。

1.6 生物膜试验

目标促生菌接种于 LB 液体培养基中 35 ℃、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 值约为 1.0，菌液 4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min 后去除上清液，菌体用 MSgg 培养基洗涤 3 次并等体积重悬。48 孔细胞培养板外围培养孔中加入 1 mL 无菌水以防止边缘效应，中间孔中每孔加入 1 mL MSgg 培养基及 10 μL 菌悬液，静置培养 48 h 后观察成膜情况。

1.7 根际定殖试验

目标促生菌接种于 LB 液体培养基中 35 ℃、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 值约为 1.0，

菌液 4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min 后去除上清液，菌体用 MS 培养基洗涤 3 次并等体积重悬。消毒后的花生种子置于含无菌水的培养皿中催芽 3 d，移至无菌蛭石中继续培养 4 d，小心取出用无菌水清洗干净，移栽到含有 50 mL 1/2 MS 液体培养基的 100 mL 无菌三角瓶中，22 ℃光照培养箱中静置培养至花生幼苗三复叶一心状态，将准备好的菌悬液按 1%接种至 MS 液体培养基中。22 ℃光照培养箱中继续静置培养 3 d，每天补充营养液，保持三角瓶中液体为 50 mL。将花生幼苗在超净台取出，无菌水清洗根表 3 次，将根置于无菌水中涡旋 20 min 后超声 5 min，菌悬液稀释涂布于 LB 平板上，35 °C 培养过夜计数。

1.8 种子发芽试验

目标促生菌接种于 LB 液体培养基中 35 ℃、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 值约为 1.0，菌液 4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min 后去除上清液，菌体用无菌水洗涤 3 次并等体积重悬，消毒后的花生种子在菌悬液中浸泡 3 h 后在无菌超净台风干，置于含无菌水的培养皿中培养；CK 则直接将消毒后的花生种子置于含无菌水的培养皿中培养。每个处理 20 粒种子，设置 5 次重复，置于 25 ℃避光培养 4 d 计算发芽率。发芽率(%)=正常发芽的种子数/总供试种子数×100。

1.9 盆栽试验

在无菌蛭石中加入无菌 MS 营养液后分装至花盆中，每盆约 300 g 基质，蛭石中间放入一颗消毒后的花生种子。CK 为空白对照，每 2 天补充 20 mL MS 营养液；处理组除每 2 天补充 20 mL MS 营养液外，每 8 天补充加入 1 mL 促生菌菌悬液(参考 1.7 根际定殖试验中菌悬液制备方法)，30 d 后将花生植株从基质中取出，测量植株的苗高、根长、鲜重及干重，每组重复 5 次。

2 结果与分析

2.1 花生种子相关菌株分离及促生能力鉴定

从花生种子表面、种子内部及胚根共分离纯化到 41 株细菌，分别编号为 PS1–PS18、PE1–PE17 和 PR1–PR6。定性检测菌株固氮、解磷、解钾及铁载体合成能力，结果表明，41 株菌中仅有 6 株菌(PS3、PS7、PS8、PR2、PR3 和 PR6)无法在 Ashby 无氮固体培养基上形成单菌落，其余 35 株菌均有固氮能力。41 株菌均未在缺钾固体培养基上出现透明圈，而在无机磷固体培养基上仅菌株 PS3 及 PS5 出现较弱透明圈。在 CAS 固体培养基培养后，仅胚根内生菌 PR4 及 PR5 产生了橙黄色晕圈(图 1)。定量检测花生种子相关菌株的 IAA 合成能力，41 株菌均可产 IAA，其中合成能力最强的 10 株菌如图 2 所示，而菌株 PE16 产 IAA 能力最强，为 27.35 mg/L。

2.2 花生种子相关菌株抑制植物病原菌生长特性

利用平板对峙试验测定花生种子相关菌株对植物病原菌的生长抑制能力，结果如表 1 所示，有 14 株菌对曲霉菌、疫霉菌、劳尔氏菌有生长抑制能力(PS1、PS2、PS3、PS4、PS7、PS8、PS9、PS10、PS11、PE5、PE10、PE15、PR4

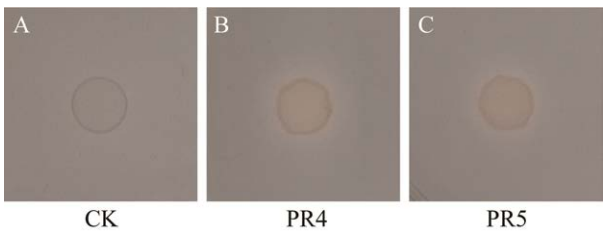

图 1 培养基检测铁载体合成

Figure 1 Siderophore production activity was tested on CAS medium.

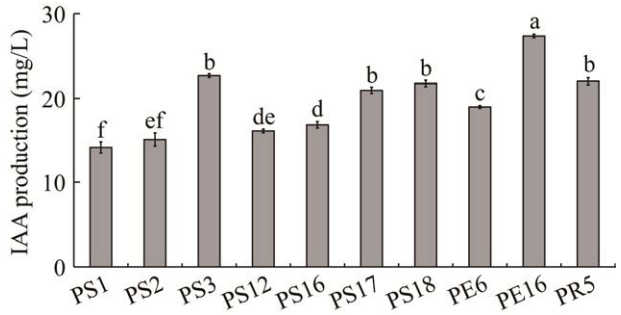

图 2 部分花生种子相关细菌 IAA 产量 不同小写字母表示具有显著差异(P<0.05)

Figure 2 IAA production of some peanut seed-associated bacteria. Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).

和 PR5)，其中 PS2、PS4、PS7、PS8、PS9、PS11 和 PR5 这 7 株菌对尖孢镰刀菌有明显抑制能力，而菌株 PS3、PE5 对尖孢镰刀菌拮抗能力较弱。

2.3 菌株 16S rRNA 基因分析

提取 41 株菌的基因组 DNA 并进行 16S rRNA 基因序列扩增测序，将获得的序列在 EzBioCloud 数据库进行比对分析，结果表明，36 株为 *Bacillus* sp.，4 株为 *Priestia* sp.，1 株为 *Paenibacillus* sp.。

从种子表面、种子内部及胚根内获得的菌株中依据 IAA 及植物病原菌生长能力各选取一株菌作为进一步研究对象，分别为菌株 PS3、PE5 和 PR5。通过 16S rRNA 基因序列比对获得与目的菌株相似性高的 16S rRNA 基因序列，构建系统发育树如图 3 所示。菌株 PS3、PR5 与 *Bacillus siamensis* KCTC 13613 (AJVF01000043) 的 16S rRNA 基因序列相似度最高，菌株 PE5 与 *Priestia qingshengii* G19 (JX293295)的 16S rRNA 基因序列相似度最高，相似度均高于 99%。

表 1 促生菌对植物病原菌的生长抑制能力

Table 1 Antagonistic assay against plant pathogens of plant growth promoting bacteria

菌株编号 Strains No.	曲霉菌 *Aspergillus* sp.	尖孢镰刀菌 *Fusariu oxysporum*	疫霉菌 *Phytophthora* sp.	劳尔氏菌 *Ralstonia* sp.
PS1	++	–	++	++
PS2	++	++	+	++
PS3	++	W	++	++
PS4	++	++	++	++
PS7	++	++	++	++
PS8	++	++	++	++
PS9	++	++	++	++
PS10	++	–	++	++
PS11	++	+	+	++
PE5	++	W	+	++
PE10	++	–	++	++
PE15	++	–	++	++
PR4	++	–	+	++
PR5	++	+	++	++

++：较强拮抗(拮抗圈半径>2.0 mm)；+：拮抗(拮抗圈半径=0.5–2.0 mm)；W：微弱拮抗(拮抗圈半径<0.5 mm)；–：无拮抗

++: Strong inhibition (the radius>2.0 mm); +: Inhibition (the radius=0.5–2.0 mm); W: Week inhibition (the radius<0.5 mm); –: No inhibition.

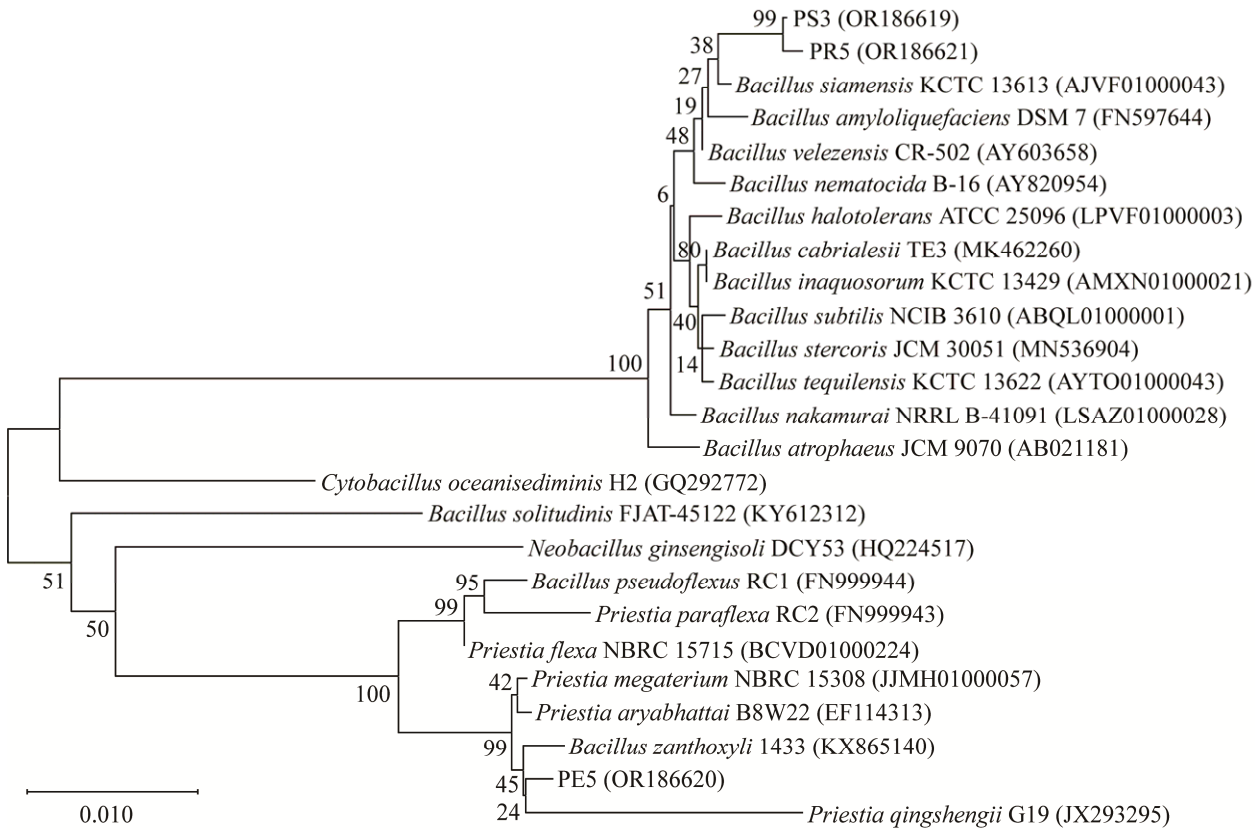

图 3 基于花生种子相关细菌的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号里序号为序列 GenBank 登录号；分支点数值代表进化树 bootstrap 值；分支长度代表进化距离，标尺为 0.010

Figure 3 Phylogenetic tree of peanut seed-associated bacteria based on 16S rRNA gene sequence. The GenBank accession number of aligned sequences are shown in parentheses. Values at branch nodes represent bootstrap value. The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.010.

2.4 促生菌生物膜形成能力及在花生根部定殖能力

促生菌的根际高效定殖是发挥作用的前提，与它们形成生物膜的能力呈正相关，将菌株 PS3、PE5 及 PR5 接种至 MSgg 液体培养基静置培养 48 h 后观察生物膜形成情况，结果如图 4 所示，3 株菌均可在 MSgg 液体表面形成生物膜且有褶皱出现，成膜能力较强。进一步对菌株 PS3、PE5 和 PR5 在花生根部的定殖能力进行了测试，结果如图 5 所示，表明 3 株菌均可在花生的根表面有效定殖，有利于发挥其促进植物生长的能力。

2.5 促生菌对花生种子发芽及幼苗生长的影响

不同促生菌菌液浸种对花生种子发芽的影响如图 6 所示，花生种子 2 d 开始萌发，4 d 趋

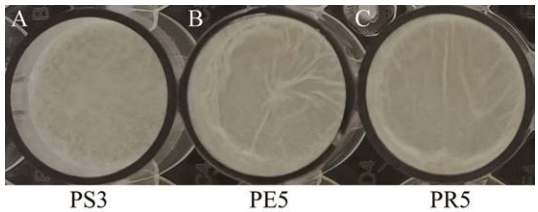

图 4 生物膜形成能力(48 h)

Figure 4 Biofilm formation was tested on MSgg medium (48 h).

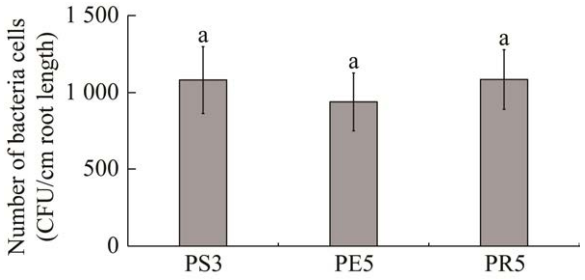

图 5　菌株 PS3、PE5 和 PR5 在花生根际的定殖能力　不同小写字母表示具有显著差异(P<0.05)

Figure 5　Colonization ability of strain PS3, PE5 and PR5 on peanut root. Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).

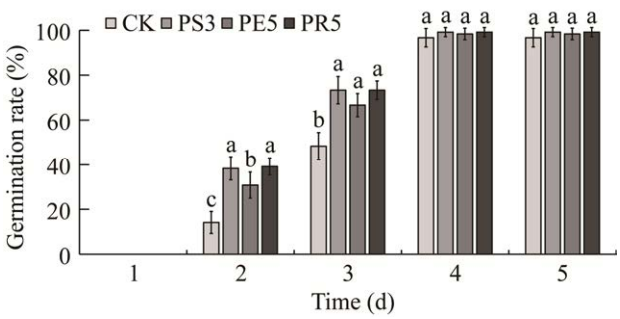

图 6　植物促生菌对花生种子萌发的影响　不同小写字母表示具有显著差异(P<0.05)

Figure 6　Effect of plant growth promoting bacteria on peanut seed germination. Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).

于稳定，2 d 时，空白对照发芽率为 14.17%，PS5 发芽率为 38.33%，PE5 发芽率为 30.83%，PR5 发芽率为 39.17%，3 d 时 PS5、PE5 和 PR5 浸种后发芽率也明显高于空白对照，结果表明经过促生菌浸种后花生种子萌发率明显提高。

利用盆栽试验测定促生菌对花生幼苗生长的影响，结果如图 7 所示，相较于空白处理，PS5 对花生幼苗苗高、根长、鲜重和干重分别提高 21.82%、22.20%、37.11%和 35.64%，PE5 分别提高 17.45%、18.93%、26.10%和 21.18%，PR5 分别提高 23.11%、23.92%、38.66%和 37.47%。本试验结果表明基质中添加促生菌菌液对花生幼苗有明显促进作用。

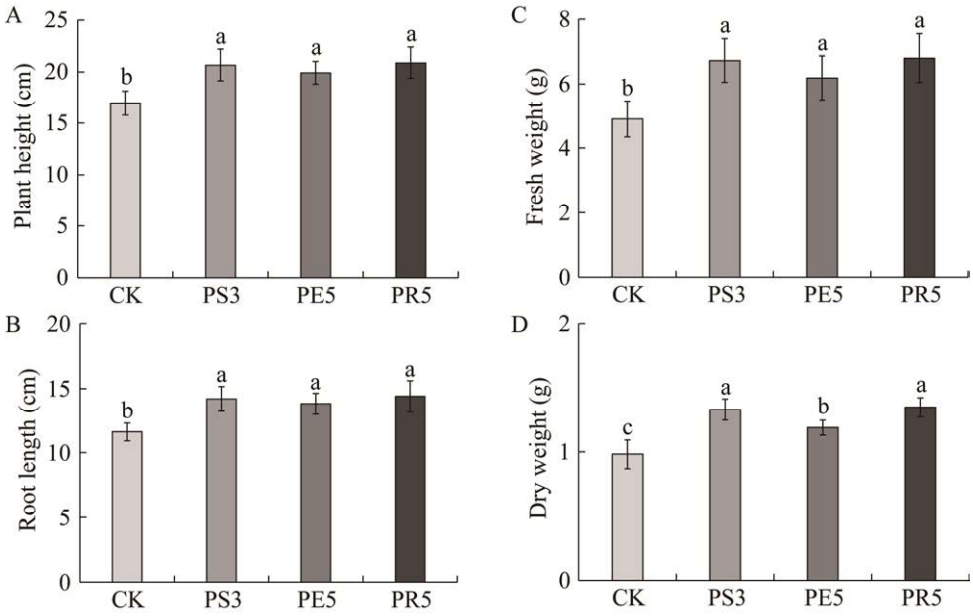

图 7　植物促生菌对花生幼苗生长的影响　A：株高. B：根长. C：鲜重. D：干重. 不同小写字母表示具有显著差异(P<0.05)

Figure 7　Effect of plant growth promoting bacteria on peanut seeding growth. A: Plant height. B: Root length. C: Fresh weight. D: Dry weight. Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).

3 讨论

种子是植物生命周期的开始，也是农业生产中最基本、最重要的资料，携带着丰富的微生物资源[6-9]，直接或间接影响着植物的健康生长，利用种子相关促生菌制备微生物菌剂或微生物有机肥，不仅可以提高作物产量，同时也利于农业的可持续发展[18-19]。

芽孢杆菌在逆境下形成芽孢，增强了菌株在不良环境中的生存能力，因此逐渐成为人们广泛研究的一类植物促生微生物。芽孢杆菌可通过多种途径促进植物健康成长，一方面可以通过固氮、铁螯合等作用提高土壤中有效养分的含量[20-21]；另一方面可以分泌植物类激素，促进植物根系生长、增加侧根及根毛数量，从而促进植物对养分和水分的吸收[22]；再一方面可以在生长代谢过程中产生多种具有抑菌活性的次级代谢产物，这些次级代谢产物不仅增强菌株在复杂环境中的竞争能力，同时也能抑制植物病原菌的生长，保护植物健康生长[23-24]。本研究从花生种子表面、种子内部及胚根内部分离得到多株促生菌，结合促生及拮抗能力分别各选一株为代表，经鉴定 3 株均为芽孢杆菌属，在生产、运输及田间施用时可以形成抗逆性极强的芽孢形态，具有较高的适应性[24-27]。

根际定殖一般指目标微生物在植物根部增值并持续维持一定种群数量的能力，接种到土壤的植物促生菌在植物根际定殖、存活是其充分发挥益生能力的前提，很多研究指出植物促生菌株在其宿主根际的成功定殖与其促生效果密切相关[28-30]。植物促生菌在农业生产中发挥重要促生功能的关键步骤是芽孢杆菌在植物根际的成功定殖，而生物膜的形成是影响根际定殖的重要因素[31]。生物膜是细菌在多聚糖、蛋白质或胞外 DNA 等基质黏附下结合于固体、液体介质表面的多细胞聚集体，具有比单细胞状态下更强的环境适应能力及逆境耐受力[32-33]。本研究通过试验研究了 3 株益生菌在细胞培养板中的生物膜形成情况，发现 PS3、PE5 和 PR5 都能在 MSgg 液体培养基中形成较厚的生物膜，且具有一定的立体结构，定殖试验发现 3 株菌均可在花生根部有效定殖。菌株接种到土壤，在植物根际有效定殖是充分发挥促生的基础，本研究涉及的目的菌株生物膜形成能力强且能有效地定殖根际，表明具有较好的实际生产应用潜力。

种子萌发是作物生命周期的开始，发芽率高有利于促进种子在种植后快速且集中萌发，统一且快速的出苗利于农业生产，也利于作物快速适应环境尤其是在逆境胁迫下[34]。种子发芽试验表明，利用筛选到的种子相关促生菌浸种后可明显提高花生种子发芽率；幼苗促生试验也表明，培养基质中添加目标促生菌可显著促进花生幼苗的生长，说明接种目标植物促生菌后促进植物的早期生长，利于现代农业的规模化及机械化生产。

种子相关促生菌可通过多种途径促进植物健康成长，而功能多样且高效的促生菌更有实际应用价值。目前植物促生菌在实际应用中仍存在问题，尤其在盆栽试验中发现促生菌在基质中存活时间短，需要在培养过程中再次添加菌体才能发挥促生能力，因此我们下一步会针对菌体存活时间短等问题制备复合菌剂或者与生物炭、纳米材料等配合施用，提高促生菌在土壤中的存活率。

4 结论

本研究共获得 41 株花生种子相关促生细菌，其中 PS3、PE5 及 PR5 经 16S rRNA 基因序列比对分析鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)，具有较强的 IAA 合成能力及拮抗植物病原菌生

长能力，且能在花生根部有效定殖，并明显促进花生种子萌发及花生幼苗生长，具有较大的应用潜力，可为生物方法提高作物产量提供优质菌种资源。

REFERENCES

[1] CHEN L, SHI H, HENG J, WANG D, BIAN K. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2[J]. Microbiological Research, 2019, 218: 41-48.

[2] 王丹丹, 殷志秋, 孙丽, 刘鑫蓓, 刘佳凝, 庞诗琪, 解志红. 缓解花生连作障碍的根际促生菌分离及功能鉴定[J]. 微生物学报, 2021, 61(12): 4086-4096.
WANG DD, YIN ZQ, SUN L, LIU XB, LIU JN, PANG SQ, XIE ZH. Isolation and identification of peanut plant-growth promoting rhizobacteria with the potential to alleviate continuous cropping obstacle[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(12): 4086-4096 (in Chinese).

[3] CHEN L, WU YD, CHONG XY, XIN QH, WANG DX, BIAN K. Seed-borne endophytic *Bacillus velezensis* LHSB1 mediate the biocontrol of peanut stem rot caused by *Sclerotium* rolfsii[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(3): 803-813.

[4] OLEŃSKA E, MAŁEK W, WÓJCIK M, SWIECICKA I, THIJS S, VANGRONSVELD J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: a methodical review[J]. Science of the Total Environment, 2020, 743: 140682.

[5] OLANREWAJU OS, GLICK BR, BABALOLA OO. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(11): 197.

[6] PANG FH, TAO AL, AYRA-PARDO C, WANG T, YU ZW, HUANG SL. Plant organ- and growth stage-diversity of endophytic bacteria with potential as biofertilisers isolated from wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1): 1-16.

[7] GUO JJ, LING N, LI Y, LI KS, NING HL, SHEN QR, GUO SW, VANDENKOORNHUYSE P. Seed-borne, endospheric and rhizospheric core microbiota as predictors of plant functional traits across rice cultivars are dominated by deterministic processes[J]. New Phytologist, 2021, 230(5): 2047-2060.

[8] ABDULLAEVA Y, AMBIKA MANIRAJAN B, HONERMEIER B, SCHNELL S, CARDINALE M. Domestication affects the composition, diversity, and co-occurrence of the cereal seed microbiota[J]. Journal of Advanced Research, 2021, 31: 75-86.

[9] 曹艳花, 徐凤花, 陈小忠, 张晓霞, 韦善君, 马晓彤. 水稻种子相关细菌的系统发育分析与促生能力评价[J]. 中国土壤与肥料, 2011(5): 83-87.
CAO YH, XU FH, CHEN XZ, ZHANG XX, WEI SJ, MA XT. Analysis on growth-promoting ability and phylogeny with rice seed associated bacteria[J]. Soils and Fertilizers Sciences in China, 2011(5): 83-87 (in Chinese).

[10] CARRIL P, CRUZ J, Di SERIO C, PIERACCINI G, AIT BESSAI S, TENREIRO R, CRUZ C. Modulation of the wheat seed-borne bacterial community by *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and its potential effects for tryptophan metabolism in the root endosphere[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 792921.

[11] DUMIGAN CR, DEYHOLOS MK. *Cannabis* seedlings inherit seed-borne bioactive and anti-fungal endophytic bacilli[J]. Plants, 2022, 11(16): 2127.

[12] COMPANT S, CAMBON MC, VACHER C, MITTER B, SAMAD A, SESSITSCH A. The plant endosphere world-bacterial life within plants[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(4): 1812-1829.

[13] SOLANKI MK, ABDELFATTAH A, SADHASIVAM S, ZAKIN V, WISNIEWSKI M, DROBY S, SIONOV E. Analysis of stored wheat grain-associated microbiota reveals biocontrol activity among microorganisms against mycotoxigenic fungi[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(9): 781.

[14] FIGUEIREDO dos SANTOS L, FERNANDES SOUTA J, de PAULA SOARES C, OLIVEIRA da ROCHA L, LUIZA CARVALHO SANTOS M, GRATIVOL C, FERNANDO WURDIG ROESCH L, LOPES OLIVARES F. Insights into the structure and role of seed-borne bacteriome during maize germination[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2021, 97(4): fiab024.

[15] KOLBAS A, KIDD P, GUINBERTEAU J, JAUNATRE R, HERZIG R, MENCH M. Endophytic bacteria take the challenge to improve Cu phytoextraction by sunflower[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(7): 5370-5382.

[16] PARMAR S, SHARMA VK, LI T, TANG WT, LI HY. Fungal seed endophyte FZT214 improves *Dysphania ambrosioides* Cd tolerance throughout different developmental stages[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 783475.

[17] HAMON MA, LAZAZZERA BA. The sporulation

transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2001, 42(5): 1199-1209.

[18] COTTYN B, DEBODE J, REGALADO E, MEW TW, SWINGS J. Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(3): 885-897.

[19] 徐萌, 王金缘, 胡金丽, 崔曼, 李梦雪, 陈熙, 郭晴雪, 马莲菊. 植物内生菌对大豆促生长和抗胁迫作用的研究进展[J]. 大豆科学, 2017, 36(6): 965-969, 977.
XU M, WANG JY, HU JL, CUI M, LI MX, CHEN X, GUO QX, MA LJ. Action of plant endophytes on soybean growth and stress tolerance[J]. Soybean Science, 2017, 36(6): 965-969, 977 (in Chinese).

[20] DARAZ U, LI Y, SUN Q, ZHANG M, AHMAD I. Inoculation of *Bacillus* spp. modulate the soil bacterial communities and available nutrients in the rhizosphere of vetiver plant irrigated with acid mine drainage[J]. Chemosphere, 2021, 263: 128345.

[21] 宋凤鸣, 刘建华, 史正军, 江亚雄, 叶宇轩, 许建新. 解磷解钾根际促生菌的分离鉴定和筛选应用[J]. 广东农业科学, 2017, 44(3): 94-100.
SONG FM, LIU JH, SHI ZJ, JIANG YX, YE YX, XU JX. Identification and screening of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with ability of phosphate-solubilizing or potassium-solubilizing[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2017, 44(3): 94-100 (in Chinese).

[22] CARDOSO AF, ALVES EC, da COSTA SDA, de MORAES AJG, DIAS da SILVA D Jr, LINS PMP, da SILVA GB. *Bacillus cereus* improves performance of Brazilian green dwarf coconut palms seedlings with reduced chemical fertilization[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 649487.

[23] FAN B, WANG C, SONG XF, DING XL, WU LM, WU HJ, GAO XW, BORRISS R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2491.

[24] ZAID DS, CAI SY, HU C, LI ZQ, LI YG. Comparative genome analysis reveals phylogenetic identity of *Bacillus velezensis* HNA3 and genomic insights into its plant growth promotion and biocontrol effects[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(1): e0216921.

[25] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.
CHEN ZY, ZHANG J, HUANG DF. Research progress on antimicrobial mechanism and genetic engineering of *Bacillus* for plant diseases biocontrol[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(2): 97-103 (in Chinese).

[26] CHECINSKA A, PASZCZYNSKI A, BURBANK M. *Bacillus* and other spore-forming Genera: variations in responses and mechanisms for survival[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2015, 6: 351-369.

[27] RABBEE MF, ALI MS, CHOI J, HWANG BS, JEONG SC, BAEK KH. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(6): 1046.

[28] LUGTENBERG B, KAMILOVA F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 541-556.

[29] SANTOYO G, URTIS-FLORES CA, LOEZA-LARA PD, OROZCO-MOSQUEDA MDC, GLICK BR. Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)[J]. Biology, 2021, 10(6): 475.

[30] 孙真, 郑亮, 邱浩斌. 植物根际促生细菌定殖研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 8-15.
SUN Z, ZHENG L, QIU HB. Research advances on colonization of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(2): 8-15 (in Chinese).

[31] ARNAOUTELI S, BAMFORD NC, STANLEY-WALL NR, KOVÁCS ÁT. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(9): 600-614.

[32] BUZZO JR, DEVARAJ A, GLOAG ES, JURCISEK JA, ROBLEDO-AVILA F, KESLER T, WILBANKS K, MASHBURN-WARREN L, BALU S, WICKHAM J, NOVOTNY LA, STOODLEY P, BAKALETZ LO, GOODMAN SD. Z-form extracellular DNA is a structural component of the bacterial biofilm matrix[J]. Cell, 2021, 184(23): 5740-5758.e17.

[33] KARYGIANNI L, REN Z, KOO H, THURNHEER T. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities[J]. Trends in Microbiology, 2020, 28(8): 668-681.

[34] 张凯晔, 刘晓琳, 董小燕, 刘润进, 贺立恒, 解志红. 田菁种子内生菌的分离及其对萌发的影响[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(6): 40-48.
ZHANG KY, LIU XL, DONG XY, LIU RJ, HE LH, XIE ZH. Isolation of endophytic cultures from *Sesbania cannabina* seeds and their effects on germination[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(6): 40-48 (in Chinese).