DOI：10.11766/trxb202012040672
方丹，朱明珠，魏梦玉，杨玉婷，薛超，沈其荣. 含山梨醇的新型生物有机肥促生效应与机理研究[J]. 土壤学报，2022，59（6）：1606–1615.
FANG Dan，ZHU Mingzhu，WEI Mengyu，YANG Yuting，XUE Chao，SHEN Qirong. Mechanisms in Plant Growth Promotion by Novel Bio-organic Fertilizer Containing Sorbitol[J]. Acta Pedologica Sinica，2022，59（6）：1606–1615.

含山梨醇的新型生物有机肥促生效应与机理研究*

方 丹[1]，朱明珠[1]，魏梦玉[1]，杨玉婷[1]，薛 超[1, 2†]，沈其荣[1]
（1. 江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室，作物免疫学重点实验室，江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心，教育部资源节约型肥料工程技术研究中心，南京农业大学资源与环境科学学院，南京 210095；2. 绿色智能肥料创新农业农村部重点实验室，南京思农生物有机肥研究院，南京 210031）

摘 要：向含解淀粉芽孢杆菌 SQR9 的生物有机肥中添加山梨醇研制了新型生物有机肥，并通过黄瓜盆栽和拟南芥培养试验研究了该新型生物有机肥的促生效应与机理。结果表明，含解淀粉芽孢杆菌 SQR9 的生物有机肥对黄瓜具有显著促生效果，添加山梨醇有利于促进解淀粉芽孢杆菌 SQR9 在土壤中定殖，能进一步提高生物有机肥的促生效应。施用该新型生物有机肥能显著提高土壤中速效养分的含量以及黄瓜对养分的吸收。山梨醇能有效促进菌株 SQR9 分泌生长素（吲哚乙酸，IAA），进而促进野生型拟南芥根系的生长，而在使用 IAA 不敏感突变体时促生效果消失，说明山梨醇促进有益菌 SQR9 分泌 IAA 是该新型生物有机肥显著促进作物生长的机理之一。本研究提出了新型生物有机肥研发的新思路，为植物促生菌新应用模式的开发提供了理论依据。

关键词：解淀粉芽孢杆菌 SQR9；山梨醇；生物有机肥；促生；生长素
中图分类号：S144.1 **文献标志码：**A

Mechanisms in Plant Growth Promotion by Novel Bio-organic Fertilizer Containing Sorbitol

FANG Dan[1], ZHU Mingzhu[1], WEI Mengyu[1], YANG Yuting[1], XUE Chao[1, 2†], SHEN Qirong[1]
(1. *Jiangsu Provincial Key Lab for Organic Solid Waste Utilization*, *The Key Laboratory of Plant Immunity*, *Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Wastes*, *Educational Ministry Engineering Center of Resource-saving Fertilizers*, *College of Resources and Environmental Sciences*, *Nanjing Agricultural University*, *Nanjing* 210095, *China*; 2. *Key Laboratory of Green and Smart Fertilizer Innovation*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Nanjing Sinong Bio-organic Fertilizer Institute*, *Nanjing* 210031, *China*)

Abstract: 【Objective】In this study, a novel bio-organic fertilizer was designed by adding sorbitol, which is one of the preferred carbon sources for the functional strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, to the normal bio-organic fertilizer rich in strain SQR9 (2×10^8 CFU·g^{-1}). The plant growth promotion effect was evaluated. The mechanism for elevation of plant growth promotion effect of the normal bio-organic fertilizer by sorbitol addition was studied. 【Method】The effect of this novel

* 国家重点研发专项项目（2017YFD0200805）、国家自然科学基金项目（31902113）和中央高校基本科研业务费（KYXK202010）共同资助 Supported by the National Key Research and Development Program of China（No. 2017YFD0200805），the National Natural Science Foundation of China（No. 31902113）and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China（No. KYXK202010）
† 通讯作者 Corresponding author，E-mail：xuechao@njau.edu.cn
作者简介：方 丹（1996—），女，安徽宣城人，硕士研究生，主要从事植物营养学研究。E-mail：fd809156385@163.com
收稿日期：2020–12–04；收到修改稿日期：2021–06–22；网络首发日期（www.cnki.net）：2021–09–27

bio-organic fertilizer on cucumber growth, soil biological and chemical properties was evaluated by pot experiments. The effect of sorbitol on plant growth promotion and stimulating IAA (indole-3-acetic acid) production by strain SQR9-*gfp* was investigated by culturing experiment using Arabidopsis. 【Result】The pot experiment showed that the application of this novel bio-organic fertilizer could promote cucumber growth by increasing the soil nutrient availability and the colonization of strain SQR9-*gfp*. The addition of sorbitol could promote IAA production by strain SQR9-*gfp*. Comparing to the wild type Arabidopsis, the plant growth promotion effect of sorbitol addition vanished on the IAA insensitive mutant Arabidopsis *pin2*. 【Conclusion】These results suggest that the application of this novel bio-organic fertilizer can promote plant growth. The addition of sorbitol can promote IAA production by SQR9-*gfp* and this is one of the mechanisms through which the novel bio-organic fertilizer boosted plant growth.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9; Sorbitol; Bio-organic fertilizer; Growth promotion; Indole-3-acetic acid

长期过量施用化肥引发了一系列问题，如土壤板结与酸化、有机质含量下降、生物活性降低、果蔬品质变差等，为了促进农业的可持续发展，减少化肥施用量并配合有机替代成为扭转上述不利局面的重要措施[1]。生物有机肥是指畜禽粪便、农作物秸秆等废弃物经过腐熟堆肥处理后，与功能微生物复合而成的一类有机肥料[2]。生物有机肥能增加土壤肥力、净化和修复土壤，同时在促进植物生长、降低植物发病率、增加产量和提高作物品质等方面发挥重要作用[3]。

生物有机肥包括以下几种作用机理：（1）生物有机肥施入土壤后，肥料中的功能菌通过各种代谢活动提高土壤肥力。比如施用含固氮微生物的肥料，其中的固氮菌能通过特有的生物固氮作用将空气中不能被植株直接吸收利用的氮气还原为氨，再进一步转化为其他不同形态的氮后才能被植株吸收利用[4-7]；施用含解磷、解钾微生物的肥料，其中的微生物可将土壤中不能直接或者快速被植株吸收利用的不溶性或者有机类的养分，如磷酸三钙、磷酸铝、磷酸铁、有机磷等[8-9]分解转换为植株可直接吸收利用的养分。（2）生物有机肥中的功能菌能分泌生长素（吲哚乙酸，IAA）等生理活性物质促进植物生长[10]，同时当功能菌在植株根系繁殖形成优势种群时，也能抑制其他致病菌的生长繁殖，减少侵染作物根系的机会[11-12]。（3）生物有机肥中既含有 N、P、K 以及中量元素（Ca、Mg、S 等）和微量元素（Fe、Mn、Cu 等），供植物吸收利用，还含有氨基酸、蛋白质、糖、脂肪等有机成分[13]，这些成分能够帮助肥料中功能菌的定殖与功能发挥。定殖能力对功能微生物的应用潜力具有决定作用，功能菌如果不能定殖，其在应用中的可行性就会降低[14]。刘云鹏[15]研究发现山梨糖醇对解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp* 的定殖具有显著促进作用。碳源主要作用是供给菌种生命活动所需要的能量，构成菌体细胞成分，是菌体代谢中的主要碳素来源[16]，但是有机肥中微生物易利用的碳源是有限的。因此，笔者根据现有研究结果提出假说，向生物有机肥中加入功能菌 SQR9-*gfp* 偏好的碳源山梨醇，应能有效提高其定殖以及功能的发挥。鉴于此，本研究以含山梨醇和解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp* 的生物有机肥为研究对象，以试验作物生物性状、SQR9-*gfp* 定殖数量和产 IAA 能力为关键指标，研究了该生物有机肥的促生效应与机理。

1　材料与方法

1.1　供试材料

供试功能微生物为江苏省固体废弃物资源化高技术研究重点实验室分离保存的具有防控土传病害和促进植物生长的根际促生解淀粉芽孢杆菌 SQR9（*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9），该菌株为黄瓜根际促生拮抗功能菌株（PGPR）[17]，寄存于中国微生物菌种保存管理委员会普通微生物中心，菌种保藏号为 CGMCC NO.5808。该菌株已利用绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）进行标记，记为 SQR9-*gfp*。该菌株在荧光显微镜下能发出明亮的绿色荧光，其生长速度和代谢特性与野生型基本相同[18]。

本研究选用的黄瓜品种为江蔬-露丰黄瓜。

LB（Luria-Bertani）培养基（1 L）：蛋白胨 10 g，酵母粉 5 g，氯化钠 10 g，琼脂粉 2 g，pH 调至 7.0。培养 SQR9-*gfp* 时在接种前添加终质量浓度为 20 μg·mL^{-1} 的卡那霉素；马丁氏培养基：KH_2PO_4 1 g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g，葡萄糖 10 g，蛋白胨 5 g，0.1 g·L^{-1}

孟加拉红水溶液 3.3 mL，2.3 %琼脂，121 ℃高压灭菌 15 min[19]，使用前每 100 mL 培养基中加 1 g·mL^{-1} 链霉素溶液 0.3 mL；Landy 培养基（1 L）：葡萄糖 20 g，L-谷氨酸 5 g，磷酸二氢钾 1 g，酵母粉 1 g，七水合硫酸镁 0.5 g，氯化钾 0.5 g，四水合硫酸锰 5 mg，七水合硫酸铜 0.16 mg，七水合硫酸亚铁 0.15 mg，L-苯丙氨酸 2 mg，L-色氨酸 1 g，蒸馏水定容至 1 000 mL，调节 pH 至 6.5。

供试土壤采自江苏宜兴，土壤基本理化性质如下：pH 7.24，有机质 15.44 g·kg^{-1}，全氮 1.96 g·kg^{-1}，全磷 1.62 g·kg^{-1}，全钾 11.58 g·kg^{-1}，有效磷 21.26 mg·kg^{-1}，速效钾 86.53 mg·kg^{-1}。

供试有机肥由甘肃丝路盛丰生物科技集团有限公司提供。将解淀粉孢杆菌 SQR9-*gfp* 接种至有机肥中配制生物有机肥，使肥料中含菌量达到 2×10^8 CFU·g^{-1}。

试验所用拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）为哥伦比亚（Col-0）野生型和 IAA 不敏感突变型 *pin2*，由山西农业大学徐进教授团队提供。

1.2 试验设计

黄瓜盆栽试验设 4 个处理：普通有机肥（OF）、普通有机肥+SQR9-*gfp*（OF+SQR9-*gfp*）、普通有机肥+山梨醇（OF+S）和普通有机肥+ SQR9-*gfp* +山梨醇（OF+SQR9-*gfp*+S）。每个处理设置 10 个重复，每个盆钵装土 3 kg，添加 5%（肥料干物质量/土干物质量）制备好的生物有机肥与土拌匀作为基肥，选取长势一致的种苗移栽。山梨醇添加量为肥料干物质量的 4%，随生物有机肥施入土壤中。

SQR9-*gfp* 分泌 IAA 试验设 7 个处理：不添加山梨醇（CK）和添加山梨醇（1、5、10、15、20 和 25 mg·L^{-1}），设计参照刘云鹏[15]的方法进行。将解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp* 接种于不同山梨醇梯度的 Landy 培养基中，使其终浓度为 10 mL·L^{-1}，22 ℃，90 r·min^{-1} 避光摇菌 72 h。

拟南芥验证试验设 8 个处理：野生型、野生型+SQR9-*gfp*、野生型+山梨醇、野生型+SQR9-*gfp*+山梨醇、突变型、突变型+SQR9-*gfp*、突变型+山梨醇和突变型+SQR9-*gfp*+山梨醇。拟南芥种子表面消毒，具体过程如下：70%乙醇浸泡 2 min，10 g·L^{-1} NaClO 处理 3 min，再用无菌水洗涤 4 次，拟南芥种子于 1/2 MS（Murashige and Skoog，青岛海博）培养基 4 ℃避光春化 2 d 后，移至 22 ℃光照培养箱黑暗催芽 3 d。将发芽的拟南芥（5 株）移入不同处理的培养基中，山梨醇添加浓度为 1.5 g·mL^{-1}，SQR9-*gfp* 在 LB 培养基中发酵浓度要达到 1.0×10^8 CFU·mL^{-1}。培养皿外用封口膜（Parafilm）封住。22℃，16 h 光照/8 h 黑暗交替下 16 d 后观察拟南芥长势。

1.3 测定方法

土壤中可培养微生物数量的测定：本实验中涉及的可培养微生物包括 *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9-*gfp*、放线菌、细菌、真菌，全部采用梯度稀释平板计数法测定，操作如下：称取根际土（根际土提前过筛）5 g 溶于 45 mL 无菌水中，放入摇床以 175 r·min^{-1} 振荡 30 min，然后进行系列梯度稀释，吸取 0.1 mL 不同稀释度土壤悬液涂布于相应的选择性固体培养基上，细菌、芽孢杆菌（LB 培养基）放置于 29 ℃培养箱中培养 24 h 后计数；放线菌（放线菌培养基，青岛海博）于 30 ℃培养箱中培养 3 d 后计数；真菌（马丁氏培养基）于 28 ℃培养箱中 3～4 d 后计数。微生物数量以每克土壤的干物质量计算，以 CFU·g^{-1} 表示。

黄瓜生物学性状的测定：黄瓜于移栽后 25 d 时测定各处理的株高、茎粗、叶绿素相对含量测量值（SPAD）、地上部分鲜物质量和干物质量。SPAD、株高和茎粗分别选用叶绿素测定仪（SPAD-502 Plus，KONICA MINOLTA，日本）、钢卷尺和得威斯游标卡尺进行测定；地上部鲜物质量和干物质量用百分之一天平进行测定。

土壤中速效养分的测定：土壤有效磷采用 0.5 mol·L^{-1} 碳酸氢钠浸提—钼锑抗比色法测定，利用乙酸铵浸提—火焰光度计法测定土壤速效钾。土壤铵态氮和硝态氮含量的测定：称取过 20 目筛的土样 3 g 于 50 mL 离心管中，然后加入 25 mL 0.01 mol·L^{-1} 氯化钙浸提溶液，旋紧离心管的瓶塞，放置于摇床上，室温下 170 r·min^{-1}，震荡 30 min 后过滤于 10 mL 离心管中，最后用流动分析仪（Seal Auto Analyzer AA3，德国）测定铵态氮、硝态氮含量。

作物养分的测定：植物全氮测定采用凯氏法，即用浓硫酸和混合加速剂消煮黄瓜样品，将有机氮转化为铵态氮后用蒸馏滴定法测定。植物全磷测定采用 H_2SO_4-H_2O_2 消煮，钼锑抗比色法测定。植物全钾测定采用火焰光度计法[20]。测定方法参考鲍士旦[21]方法进行。

IAA 的检测采用 Salkowski 比色法。标准曲线

采用 IAA 标准品（Sigma）制作。配制的 IAA 溶液浓度依次为 10、20、30、40、50 mg·L^{-1}，分别取上述 IAA 溶液 0.5 mL，等体积加入 S2 比色液，在黑暗中静置 30 min 后使用酶标仪（Molecular Devices，M5，美国）测定 OD_{535} 值，以加入了比色液的 Landy 培养基调零，重复三次，获得数据制作标准曲线。

将解淀粉芽孢杆菌的菌悬浮液按 8 000 r·min^{-1}、4 ℃离心 10 min 后取上层发酵液 0.5 mL，以 1∶1 的比例加入 S2 比色液，避光反应 30 min，其中以 Landy 培养基为空白对照。若反应液变为红色，则说明发酵液中含 IAA 类似物，且颜色越深表示 IAA 含量越高。用分光光度计测定 OD_{535} 值，用相应的标准曲线计算出该菌株产 IAA 的量。S2 比色液：4.5 g 三氯化铁溶于 300 mL 蒸馏水中，缓慢加入 597.4 mL 98%浓硫酸，冷却后于容量瓶中定容至 1 000 mL，比色液 IAA 测定范围为 5～200 mg·L^{-1}。

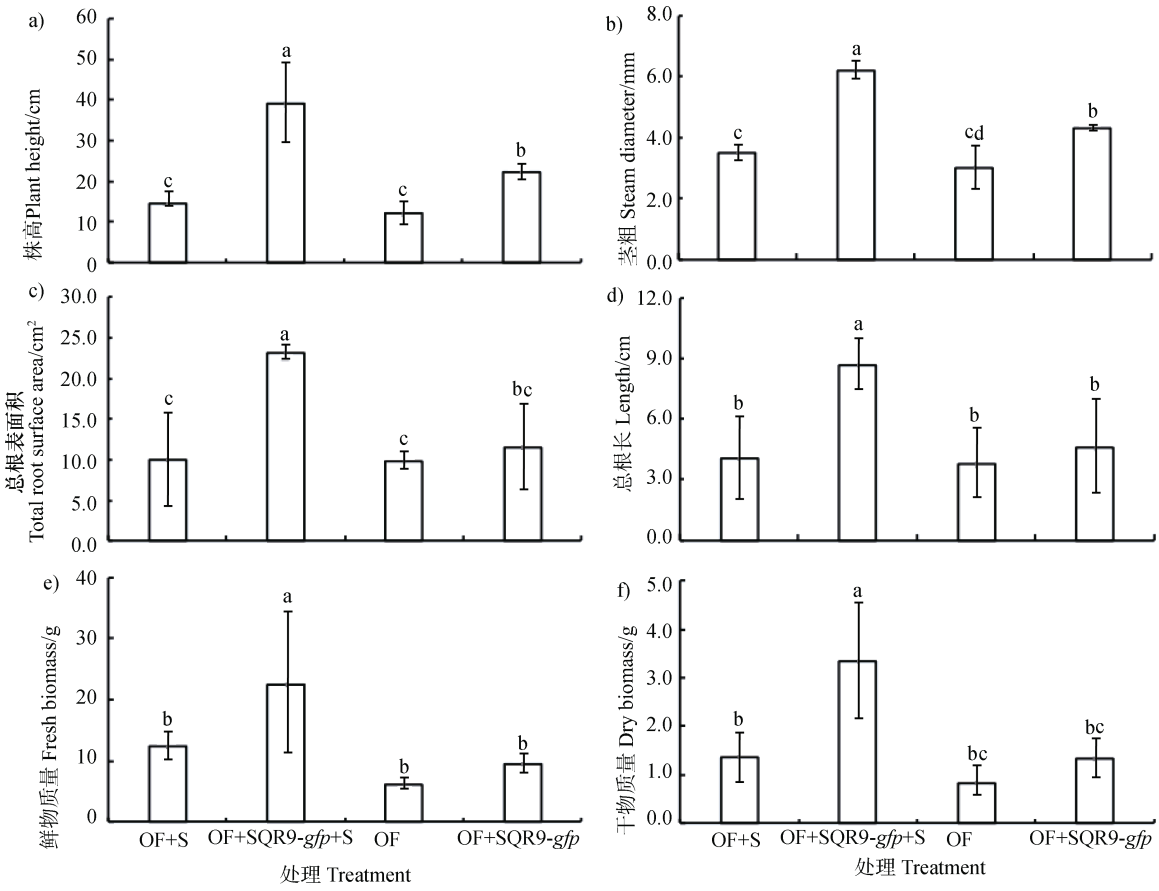
1.4　数据处理

采用 Excel 2016 和 SPSS13.0 软件进行数据统计分析，使用最小显著差异法（least significant difference，LSD）检验进行多重比较（P<0.05）。

2　结果与讨论

2.1　不同肥料处理对黄瓜生物学性状的影响

不同施肥处理对黄瓜生物学性状具有显著影响（图 1）。OF+SQR9-*gfp*+S 处理的株高相比 OF+S 增加了 2.67 倍，较 OF+SQR9-*gfp* 增加了 1.76 倍，较 OF 增加了 3.24 倍；OF+SQR9-*gfp*+S 的茎粗相比 OF+S 增加了 1.77 倍，较 OF+SQR9-*gfp* 增加了 1.43 倍，较 OF 增加了 2.06 倍；OF+SQR9-*gfp*+S 的总根



注：OF+S：普通有机肥+山梨醇；OF+SQR9-*gfp*+S：普通有机肥+解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp* +山梨醇；OF：普通有机肥；OF+SQR9 *gfp*：普通有机肥+解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp*。下同。Note：OF+S：organic fertilizer+sorbitol；OF+SQR9-*gfp*+S：organic fertilizer+*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9-*gfp*+sorbitol；OF：organic fertilizer；OF+SQR9-*gfp*：organic fertilizer+*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9-*gfp*. The same below.

图 1　不同施肥处理对黄瓜生物学性状的影响

Fig. 1　Effect of different fertilizer treatments on biological characteristics of cucumber

长相比 OF+S 增加了 2.15 倍，较 OF+SQR9-*gfp* 增加了 1.88 倍，较 OF 增加了 2.29 倍；OF+SQR9-*gfp*+S 的总根表面积相比 OF+S 增加了 2.32 倍，较 OF+SQR9-*gfp* 增加了 2.02 倍，较 OF 增加了 2.33 倍；OF+SQR9-*gfp*+S、OF+SQR9-*gfp* 和 OF+S 与 OF 相比，地上部分鲜物质量和干物质量均有所增加，OF+SQR9-*gfp*+S 显著高于 OF+SQR9-*gfp* 和 OF+S（$P<0.05$），OF+S 与 OF 相比差异不显著。说明 OF+SQR9-*gfp*+S 能够提高黄瓜地上部分鲜物质量和干物质量。综上所述，OF+SQR9-*gfp*+S 对黄瓜有明显的促生效果，这与前期大量的研究结果一致，说明 SQR9-*gfp* 是一株优秀的植物促生菌，施用该菌株研制的生物有机肥能够显著促进作物生长[22-24]。

2.2 不同肥料处理对土壤中速效养分含量的影响

不同施肥处理对土壤中速效钾的影响如图 2 左所示：OF+SQR9-*gfp*+S 处理的速效钾含量最高，为 249.8 mg·kg^{-1}。OF+SQR9-gfp+S 处理与 OF+S 处理、OF 处理、OF+SQR9-*gfp* 处理之间有显著性差异。不同施肥处理对土壤中有效磷的影响如图 2 右所示：OF+SQR9-*gfp*+S 处理的有效磷含量最高，为 128.2 mg·kg^{-1}。OF+SQR9-*gfp*+S 处理与 OF+S 处理、OF 处理、OF+SQR9-*gfp* 处理之间有显著性差异。表明添加山梨醇和 SQR9-*gfp* 能明显改善土壤的理化性质，提高土壤中速效钾和有效磷的含量，同时添加山梨醇和 SQR9-*gfp* 的处理效果最优，其次是单独添加山梨醇或者 SQR9-*gfp* 的处理。

不同施肥处理对土壤中铵态氮和硝态氮含量具有显著影响（图 3）。OF+SQR9-*gfp* 处理的铵态氮含量最高，达到 31.43 mg·kg^{-1}，其次是 OF、OF+S、OF+SQR9-*gfp*+S 处理。各处理之间均存在显著差异。OF+S 处理的硝态氮含量最高，达到 246.5 mg·kg^{-1}，其次是 OF+SQR9-*gfp*+S、OF、OF+SQR9-*gfp* 处理。OF+S 与 OF、OF+SQR9-*gfp* 处理之间均有显著差异；OF+SQR9-*gfp*+S 与 OF、OF+SQR9-*gfp* 处理之间也均有明显差异。施用含山梨醇的生物有机肥能有效提高土壤速效养分的含量，进而促进植物的生长。王华等[25]研究表明，施用生物有机肥能显著提高油茶园土壤中的铵态氮和硝态氮含量。张迎春等[26]研究表明，在莴笋种植过程中，生物有机肥部分代替化肥，土壤中各养分含量均有明显提高，硝化细菌

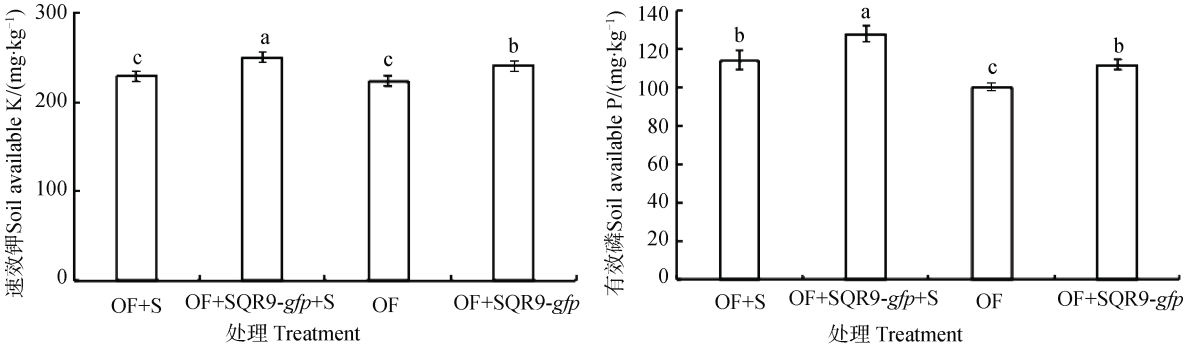


图 2 不同施肥处理对土壤速效钾和有效磷的影响

Fig. 2 Effect of different fertilizer treatments on available K and P in the soil

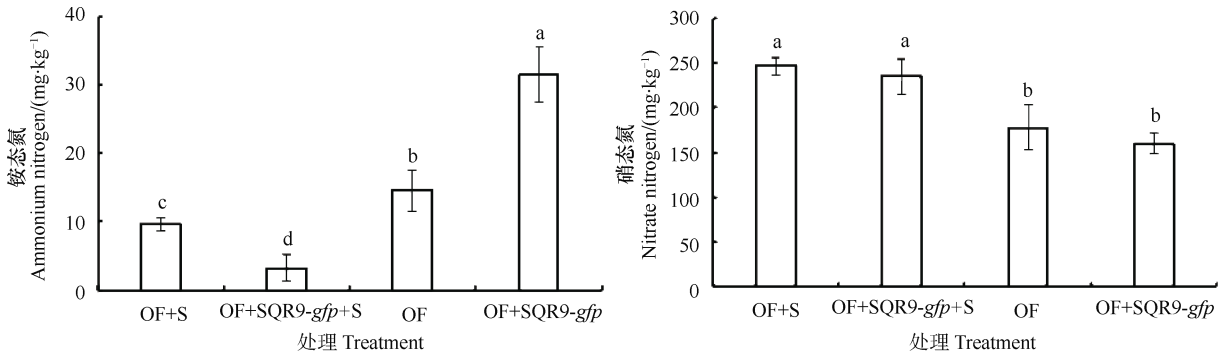


图 3 不同施肥处理对土壤中铵态氮（左）和硝态氮（右）含量的影响

Fig. 3 Effect of different fertilizer treatments on the contents of ammonium（left）and nitrate（right）nitrogen in the soil

数量也有明显的增加。上述研究均说明施用生物有机肥能有效提高土壤中有效养分的含量。土壤氮素的矿化和硝化作用受微生物的影响，微生物参与并调控其过程[27]。含山梨醇的生物有机肥的施用给土壤微生物提供了碳源，有利于提高土壤微生物多样性，其中易利用的碳源能迅速改善微生物的营养条件，促进微生物快速大量繁殖及新陈代谢，提升了土壤生物肥力水平，有利于土壤营养元素的矿化与活化[28-29]。碳源的添加能够显著提高固氮菌的固氮酶活性[30]，山梨醇的添加也能显著提高土壤固氮酶活性，进而提高了土壤氮素营养水平。菌剂的添加本身引入了一部分营养元素，也有利于提高土壤化学肥力水平。

2.3　不同肥料处理对黄瓜养分吸收的影响

不同施肥处理黄瓜植株的养分含量如表 1 所示，在不同施肥处理中，OF+SQR9-*gfp*+S 处理的黄瓜全氮、全磷、全钾的含量最高，分别达到了 19.85 mg·kg^{-1}、5.01 mg·kg^{-1}、23.87 mg·kg^{-1}。OF+SQR9-*gfp*+S 处理植株全氮含量较 OF 处理高 43.6%；OF+SQR9-*gfp*+S 处理吸收的全磷较 OF 处理高 2.29 倍；OF+SQR9-*gfp*+S 处理的钾肥利用率较 OF 处理高 23.7%。综上所述，相比单独添加山梨醇、单独添加解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp* 和 OF 的处理，在同时添加山梨醇和解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp* 的生物有机肥处理中，作物能更大限度地汲取土壤和肥料中的养分。

2.4　不同肥料处理对土壤中微生物数量的影响

不同施肥处理对土壤中微生物数量的影响如图 4 所示。就不同处理的真菌数量而言，OF+SQR9-*gfp*+S 与 OF+SQR9-*gfp* 处理之间有明显差异；OF+SQR9-*gfp*+S 与 OF、OF+SQR9-*gfp*+S 与 OF+S

表 1　不同施肥处理下黄瓜植株养分含量

Table 1　Effects of different fertilizer treatments on nutrient absorption of cucumber/（mg·kg^{-1}）

处理 Treatment	全氮 Total N	全磷 Total P	全钾 Total K
OF	13.82±0.03d	2.18±0.01c	18.21±0.52b
OF+S	16.58±0.04c	2.44±0.12c	19.73±0.06b
OF+SQR9-*gfp*	18.64±0.11b	4.16±0.10b	23.78±0.22a
OF+SOR9-*gfp*+S	19.85±0.11a	5.01±0.16a	23.87±1.79a

注：同列不同小写字母表示不同处理之间差异显著（P<0.05）。Note：Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between different treatments（P<0.05）.

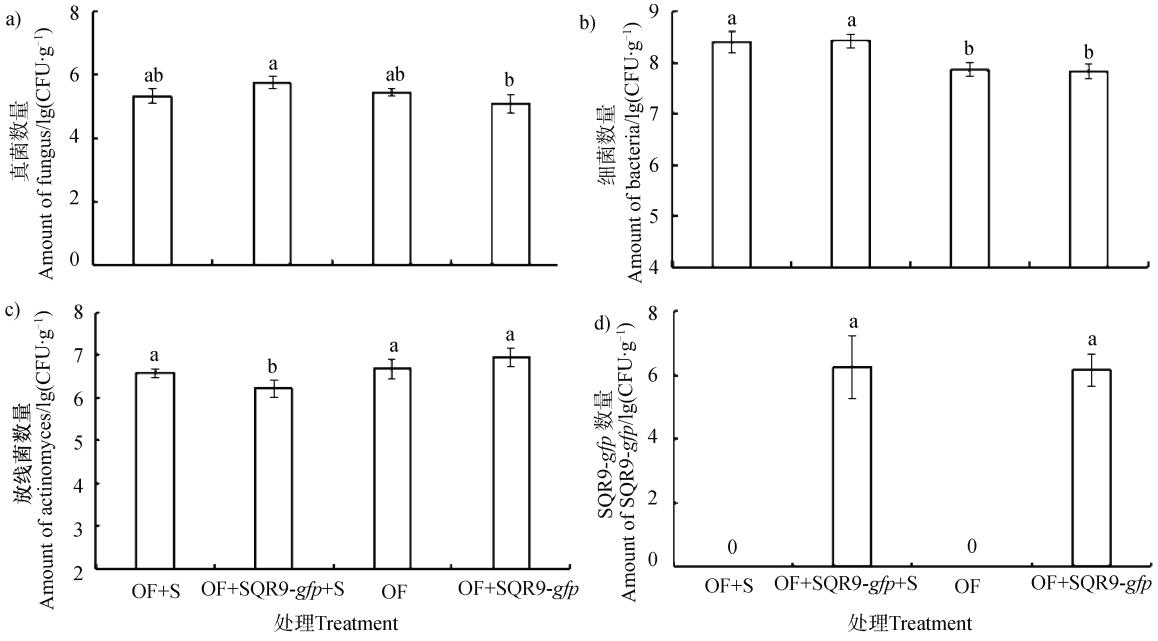


图 4　不同施肥处理对土壤中可培养真菌、细菌、放线菌和 SQR9-*gfp* 数量的影响

Fig. 4　Effect of different fertilizer treatments on the amount of microorganism in the soil

无明显差异，但 OF+SQR9-*gfp*+S 真菌数量均高于 OF 和 OF+S 处理。就不同处理的细菌数量而言，OF+SQR9-*gfp*+S 与 OF 相比，具有显著差异；OF+SQR9-*gfp*+S 与 OF+S 无显著差异，但 OF+SQR9-*gfp*+S 的细菌数量高于 OF+S。就不同处理的放线菌数量而言，OF+SQR9-*gfp* 优于其他处理，具有显著差异；OF 与 OF+S 处理相比具有显著差异，且施加 SQR9-*gfp* 的处理最优。就不同处理的 SQR9-*gfp* 数量而言，OF+SQR9-*gfp*+S 与 OF+SQR9-*gfp* 处理相比无明显差异，但 OF+SQR9-*gfp*+S 处理中 SQR9-*gfp* 的数量高于 OF+SQR9-*gfp* 处理，这可能是因为山梨醇促进 SQR9-*gfp* 定殖的作用主要体现在施用初期，在初期 OF+SQR9-*gfp*+S 处理中 SQR9-*gfp* 的数量较高，随着黄瓜盆栽周期延长，山梨醇很快被消耗完，而菌株 SQR9-*gfp* 的数量也随之下降，因此，添加山梨醇对解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp* 的定殖具有积极的作用。有研究[31-32]表明，生物有机肥施用后能促进根际土壤中细菌、放线菌的增殖，从而抑制病原真菌的繁殖，降低真菌数量，进而改善微生物群落结构。而本研究发现，OF+SQR9-*gfp*+S 处理的细菌、真菌数量要高于 OF+SQR9-*gfp* 处理，其放线菌数量低于 OF+SQR9-*gfp* 处理。因此，施用含山梨醇和 SQR9-*gfp* 的生物有机肥对改善土壤的微生物群落结构，激活土壤生物活性，提高土壤生物肥力具有积极的意义。

2.5 山梨醇对 SQR9-*gfp* 菌株分泌 IAA 的影响

山梨醇对 SQR9-*gfp* 分泌 IAA 的影响如图 5 所示。以解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp* 为供试菌株，采用 Salkowski 比色液显色法定量测定菌株在山梨醇不同浓度梯度下产 IAA 能力。结果显示：随着山梨醇浓度的增加，SQR9-*gfp* 分泌 IAA 的能力不断增加，山梨醇 15 mg·L^{-1} 时达到最大值，且与其他处理有显著差异。生长素的作用是促进细胞分裂和器官的生长，引起植物向地性反应，促进植物雌花分化等[33]。自然界中不仅植物可以合成 IAA，许多微生物同样具有分泌 IAA 的能力，可促进植物生长[34]。

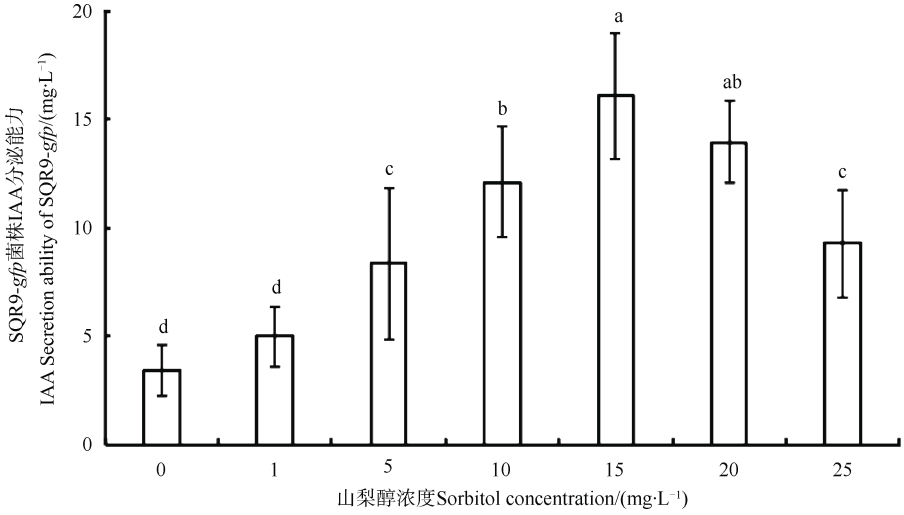
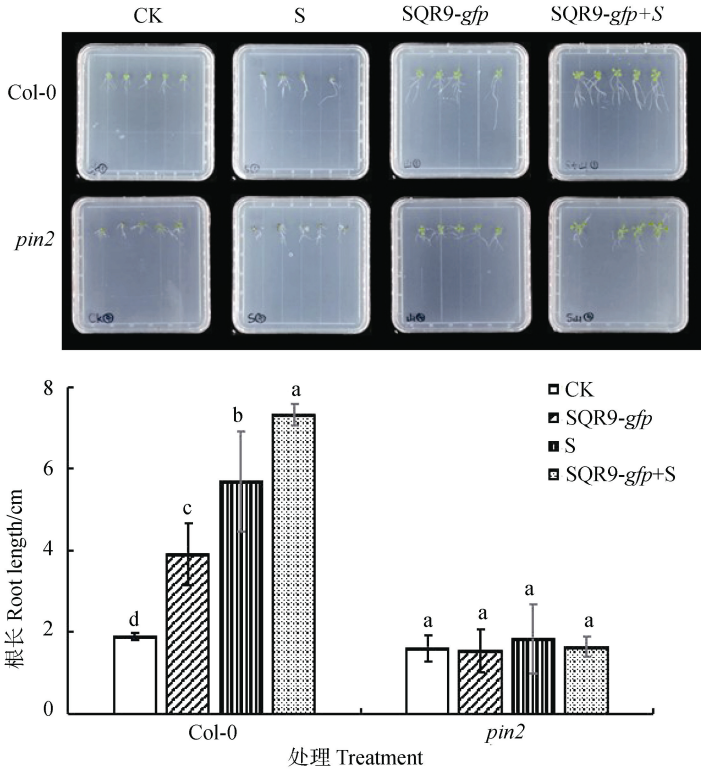


图 5 不同山梨醇浓度对 SQR9-*gfp* 产 IAA 的影响

Fig. 5 Effects of different sorbitol concentrations on IAA production by SQR9-*gfp*

2.6 不同处理对野生型和突变型拟南芥的影响

不同处理下拟南芥根系会发生构型变化如图 6 所示。在 Col-0 野生型中，山梨醇+SQR9-*gfp* 处理的根长显著高于其他处理；在 IAA 不敏感突变体 *pin2* 中，山梨醇+SQR9-*gfp* 处理的根长未显著高于其他处理，且各处理间无显著差异。当山梨醇浓度达到 10 mg·L^{-1} 时，会显著提高 SQR9 的定殖水平[16]。本研究发现，添加山梨醇能够促进菌株 SQR9-*gfp* 合成生长素，并且在纯培养条件下当山梨醇添加量为 15 mg·L^{-1} 时达到最大值。此外，pin 蛋白与生长素的极性运输有关，pin 突变体常表现出生长素运输异常[35]。本研究通过野生型和 IAA 不敏感突变型 *pin2* 拟南芥对比试验，证实了添加山梨醇促进菌株 SQR9-*gfp* 分泌 IAA 是该新型生物有机肥促进植物生长的机理之一。IAA、细菌和植物三者为相互作用、协调的有机整体，构成一幅动态的复杂调控网络。



注：S：山梨醇；SQR9-*gfp*：解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp*；SQR9-*gfp*+S：解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp* +山梨醇；Col-0：哥伦比亚野生型拟南芥；*pin2*：IAA 不敏感型拟南芥突变体。Note：S：sorbitol；SQR9-*gfp*：*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9-*gfp*；SQR9-*gfp*+S：*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9-*gfp*+sorbitol；Col-0：colombian wild type arabidopsis；*pin2*：IAA-insensitive arabidopsis mutant.

图 6　不同处理下拟南芥根系发生的构型变化

Fig. 6　The response of Arabidopsis root architecture to different treatments

3　结　论

本研究以广泛应用的具有促生以及生防效果的菌株解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）SQR9-*gfp* 为目标菌株，加入该菌株偏好的碳源山梨醇研制出一种新型的生物有机肥，施用该生物有机肥显著促进植物的生长，添加山梨醇能进一步提升生物有机肥的促生作用，提升土壤有效养分含量。添加山梨醇能有效提高菌株 SQR9-*gfp* 分泌 IAA，进而促进植物根系生长，这也是添加山梨醇能够进一步提升含解淀粉芽孢杆菌 SQR9-*gfp* 的生物有机肥促生效应的机理之一。本研究提出了新型生物有机肥研发的新思路，为植物促生菌新应用模式的开发提供了理论依据。

参考文献（References）

[1] Wu X，Hu H，Wang R，et al，Effects of reduction of chemical fertilizer and substitution coupled with organic manure on the molecular ecological network of microbial communities in fluvo-aquic soil[J]. Acta Pedologica Sinica，2022，59（2）：545—556. [吴宪，胡菏，王蕊，等. 化肥减量和有机替代对潮土微生物群落分子生态网络的影响[J]. 土壤学报，2022，59（2）：545—556.]

[2] Bo G D，Yang B，Huang G H，et al. Research progress on effects of bio-organic fertilizer on soil and growth of flue-cured tobacco[J]. Anhui Agricultural Sciences，2020，48（18）：23—25. [薄国栋，杨斌，黄广华，等. 生物有机肥对植烟土壤及烤烟生长发育影响研究进展[J]. 安徽农业科学，2020，48（18）：23—25.]

[3] Tong X J，Li W J，Li J，et al. Effect of effective microorganisms compost on winter wheat growth[J]. Research of Agricultural Modernization，2003，24（6）：456—458，463. [同小娟，李维炯，李俊，等. 有效微生物堆肥对冬小麦生长发育的影响[J]. 农业现代化研究，2003，24（6）：456—458，463.]

[4] Kizilkaya R. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils[J]. Journal of Environmental Biology，2009，30（1）：73—82.

[5] Wang S，Pablo G P，Ye J，et al. Abundance and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere and bulk paddy soil under different duration of organic management[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology，2012，28（2）：493—503.

[6] Zhang Q L，Lin M，Ping S Z，et al. Biological nitrogen fixation and its application in sustainable agriculture[J]. Biotechnology Bulletin，2008（2）：1—4. [张秋磊，林敏，平淑珍，等. 生物固氮及在可持续农业中的应用[J]. 生物技术通报，2008（2）：1—4.]

[7] Yao T. Research progress of plant growth promoting rhizobacteria[J]. Grassland and Turf，2002（4）：3—5. [姚拓. 促进植物生长菌的研究进展[J]. 草原与草坪，2002（4）：3—5.]

[8] Xie L H，Lv J L，Zhang Y P，et al. Influence of long-term fertilization on phosphorus fertility of calcareous soil Ⅱ. inorganic and organic phosphorus[J]. Chinese Journal of Applied Ecology，2004，15（5）：790—794. [谢林花，吕家珑，张一平，等. 长期施肥对石灰性土壤磷素肥力的影响Ⅱ.无机磷和有机磷[J]. 应用生态学报，2004，15（5）：790—794.]

[9] Alla M H. Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae[J]. Letters in Applied Microbiology，1994，18（5）：294—296.

[10] Zhang D Y，Liu Y，Wu Y，et al. Isolation and identification of IAA-producing strains from peanut rhizosphere and its promoting effects on peanut growth[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences，2016，38（1）：104—110. [张东艳，刘晔，吴越，等. 花生根际产 IAA 菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. 中国油料作物学报，2016，38（1）：104—110.]

[11] Zhao L Y，Li W Q，Tang L X，et al. Effect of organic manure on cucumber Fuasarium wilt control and its mechanism[J]. Acta Pedologica Sinica，2015，52（6）：1383—1391 [赵丽娅，李文庆，唐龙翔，等. 有机肥对黄瓜枯萎病的防治效果及防病机理研究[J]. 土壤学报，2015，52（6）：1383—1391.]

[12] Nian H J，Chen L M. Factors affecting the competitive colonization of beneficial bacteria in plant rhizosphere[J]. Chinese Journal of Ecology，2010，29（6）：1235—1239. [年洪娟，陈丽梅. 土壤有益细菌在植物根际竞争定殖的影响因素[J]. 生态学杂志，2010，29（6）：1235—1239.]

[13] Fu X M，Mao J M，Shen Z S，et al. Development status and trend of bio-organic fertilizer in China[J]. Hubei Agricultural Sciences，2017，56（3）：401—404. [付小猛，毛加梅，沈正松，等. 中国生物有机肥的发展现状与趋势[J]. 湖北农业科学，2017，56（3）：401—404.]

[14] Wu X，Tang Y，Gan B C，et al. A preliminary method to determine the colonization ability of bacterial microorganisms in soil[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China，2020（3）：204—209. [吴翔，唐亚，甘炳成，等. 一种初步判断细菌类微生物在土壤中定殖能力的方法[J] 中国土壤与肥料，2020（3）：204—209.]

[15] Liu Y P. Enhanced plant growth promotion and root colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 through rhizosphere interaction[D]. Nanjing：Nanjing Agricultural University，2015. [刘云鹏. 增强解淀粉芽孢杆菌 SQR9 根际定殖和促生的根际互作机制研究[D]. 南京：南京农业大学，2015.]

[16] Liu F. Optimization of conditions for liquid and solid-state fermentation of antagonistic strain *Bacillus subtilis* SQR9[D]. Nanjing：Nanjing Agricultural University，2012. [柳芳. 生防菌 *Bacillus subtilis* SQR9 液体及固体发酵条件优化[D]. 南京：南京农业大学，2012.]

[17] Liang X L，Sun L，Zhang J，et al. Utilization of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 for developing compound microbial fertilizer[J]. Soils，2015，47（3）：558—563. [梁晓琳，孙莉，张娟，等. 利用 *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 研制复合微生物肥料[J]. 土壤，2015，47（3）：558—563.]

[18] Zhang N，Wu K，Shen Y F，et al. Investigation of the colonization patterns of plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 on banana roots[J]. Journal of Nanjing Agricultural University，2014，37（6）：59—65. [张楠，吴凯，沈怡斐，等. 根际益生菌解淀粉芽孢杆菌 SQR9 在香蕉根表的定殖行为研究[J]. 南京农业大学学报，2014，37（6）：59—65.]

[19] Li X H，Jia K Z，He J，et al. Isolation and identification of chlorpyrifos degrading strain Sphingomonas sp. Dsp-2 and its chlorpy[J]. Acta Pedologica Sinica，2007，44（4）：734—739. [李晓慧，贾开志，何健，等. 一株毒死蜱降解菌株 Sphingomonas sp. Dsp-2 的分离鉴定及降解特性[J]. 土壤学报，2007，44（4）：734—739.]

[20] Xue H，Duan Z Q，Dong J L，et al. Effects of root zone temperature on cucumber growth，yield and nitrogen use efficiency[J]. Soils，2015，47（5）：842—846. [薛鹤，段增强，董金龙，等. 根区温度对黄瓜生长、产量及氮肥利用率的影响[J]. 土壤，2015，47（5）：842—846.]

[21] Bao S D. Analytical methods for soil and agro-chemistry[M]. Beijing：China Agriculture Press，2000. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京：中国农业出版社，2000.]

[22] Zhang M，Li R，Cao L，et al. Algal sludge from Taihu Lake can be utilized to create novel PGPR-containing bio-organic fertilizers[J]. Journal of Environment Management，2014，132：232—236.

[23] Liu H J. Uilization of acidolysis amino acffis from deae pigs to produce bio-organic fertilizers and their effects on soil microbial community[D]. Nanjing：Nanjing Agricultural University，2016. [刘红军. 基于病死猪酸解的氨基酸生物有机肥研制及其对土壤微生物区系的

影响[D]. 南京：南京农业大学，2016.]

[24] Shao J H. Indole-3-acetic acid synthesis pathways and plant-growth-promotion effects of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9[D]. Nanjing：Nanjing Agricultural University，2014. [邵佳慧. 解淀粉芽孢杆菌 SQR9 吲哚乙酸合成途径及促生效应的研究[D]. 南京：南京农业大学，2014.]

[25] Wang H，Niu D K，Hu D N，et al. Effects of different fertilization on soil nitrogen and microbial community and function in *Camellia oleifera* forest [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers，2014，20（6）：1468—1476. [王华，牛德奎，胡冬南，等. 不同肥料对油茶林土壤氮素含量、微生物群落及其功能的影响[J]. 植物营养与肥料学报，2014，20（6）：1468—1476.]

[26] Zhang Y C，Jie J M，Li J，et al. Effects of partial substitution of chemical fertilizer by bio-organic fertilizer on *Asparagus lettuce* and soil physical-chemical properties and microorganisms[J]. Journal of Soil and Water Conservation，2019，33（4）：196—205. [张迎春，颉建明，李静，等. 生物有机肥部分替代化肥对莴笋及土壤理化性质和微生物的影响[J]. 水土保持学报，2019，33（4）：196—205.]

[27] Liao S X，Ren Y T，Yuan X B，et al. Effect of fencing on contents of soil ammonium nitrogen and nitrate nitrogen in the Loess Plateau[J]. Acta Prataculturae Sinica，2016，33（6）：1044—1053. [廖圣祥，任运涛，袁晓波，等. 围封对黄土高原草地土壤铵态氮和硝态氮的影响[J]. 草业学报，2016，33（6）：1044—1053.]

[28] Liu T Z. Response of soil nitrifying bacteria population size and nitrification to sheep grazing intensity in Steppe of Eastern Gansu Province[D]. Lanzhou：Lanzhou University，2012. [刘天增. 陇东典型草原土壤硝化微生物及硝化作用对绵羊放牧强度的响应[D]. 兰州：兰州大学，2012.]

[29] Hu K，Li H X，Lu W S，et al. Effect of microbial organic fertilizer application on soil microbial activity[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture，2010，18（2）：303—306. [胡可，李华兴，卢维盛，等. 生物有机肥对土壤微生物活性的影响[J]. 中国生态农业学报，2010，18（2）：303—306.]

[30] Wang Z. Preliminary development and application of microbial fertilizer[D]. Qufu，Shandong：Qufu Normal University，2019. [王臻.微生物肥料的初步研制与应用[D]. 山东曲阜：曲阜师范大学，2019.]

[31] He X，Huang Q W，Yang X M，et al. Screening and identification of pathogen causing banana fusarium wilt and the relationship between spore suspension concentration and the incidence rate[J]. Scientia Agricultura Sinica，2010，43（18）：3809—3816. [何欣，黄启为，杨兴明，等. 香蕉枯萎病致病菌筛选及致病菌浓度对香蕉枯萎病的影响[J]. 中国农业科学，2010，43（18）：3809—3816.]

[32] Wei Q J，Zheng X Y，Deng K Y，et al. Screening and identification of antagonistic *Bacillus vallismortis* B against cucumber Fusarium wilt and its biological effect[J]. Journal of Nanjing Agricultural University，2013，36（1）：40—46. [韦巧婕，郑新艳，邓开英，等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的筛选鉴定及其生物防效[J]. 南京农业大学学报，2013，36（1）：40—46.]

[33] Shu J H，Wang Z Y，Liu X X，et al. Study on content of hormones and organic acids secreted by fermentation broth of different growth-promoting bacteria[J]. Guizhou Agricultural Sciences，2020，48（2）：61—64. [舒健虹，王子苑，刘晓霞，等. 不同促生菌培养发酵分泌的激素和有机酸含量[J]. 贵州农业科学，2020，48（2）：61—64.]

[34] Yao Y L，Wang Y，Wang Y Q，et al. Identification of endophytic bacteria from *Kobresia humilis* and determination of phosphate- solubilizing，IAA secretion and antagonistic abilities[J]. Acta Agrestia Sinica，2014，22（6）：1252—1257. [姚玉玲，王颖，王玉琴，等. 矮生嵩草内生细菌溶磷、抑菌和产 IAA 能力的测定及鉴定[J]. 草地学报，2014，22（6）：1252—1257.]

[35] Liu S P，Wang L，Wang J R，et al. PIN gene family in higher plants[J]. Plant Physiology Journal，2009，45（8）：833—841. [刘士平，王璐，王继荣，等. 高等植物的 PIN 基因家族[J]. 植物生理学报，2009，45（8）：833—841.]

（**责任编辑：**陈荣府）