

金钗石斛内生细菌的组成及多样性分析

吴庆珊, 雷 珣, 雷友梅, 蒲 星, 刘 颖, 翁庆北^①

(贵州师范大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 采用 9 种培养基对贵州省的赤水市旺隆镇(P1)、贵阳市贵州师范大学生命科学学院大棚(P2)和金沙县台金生态农业观光园(P3)内栽培的金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)根、茎和叶中的内生细菌进行了分离,并采用扩增核糖体 DNA 限制性分析(ARDRA)法对分离的内生细菌进行了多样性分析。结果表明:从 3 个样地金钗石斛的根、茎和叶中共分离出 1 081 株内生细菌,隶属 2 门 5 科 12 属 40 种 1 亚种,可分成 41 个 OTUs;其中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)和短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)为优势属,*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 和 *Brevibacillus invocatus* 为优势种(亚种)。金钗石斛的内生细菌在不同器官中的分布存在差异,根中内生细菌的菌株数量最多(695),且根中内生细菌的 Shannon-Wiener 多样性指数(2.20)和 Margalef 丰富度指数(5.81)均高于茎和叶中内生细菌,而叶中内生细菌的 Pielou 均匀度指数却最高(0.69);并且,茎和叶间内生细菌的 Sørensen 相似性系数最高(0.82),显著高于根和茎间以及根和叶间内生细菌的 Sørensen 相似性系数。3 个样地金钗石斛内生细菌的共有 OTUs 有 14 个,分离菌株数占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 96.5%;并且,3 个样地金钗石斛内生细菌的 Shannon-Wiener 多样性指数和 Pielou 均匀度指数差异较小,仅 P1 样地金钗石斛内生细菌的 Margalef 丰富度指数明显高于 P2 和 P3 样地。NA、TSA、LB、KB、R2A 和 TB 培养基从金钗石斛中分离出的内生细菌菌落数和 OTU 数量均高于 YPD、YT 和 YG 培养基。研究结果显示:金钗石斛体内含有丰富的内生细菌资源,并且,其内生细菌的组成和多样性与分离器官、种植地和培养基密切相关。

关键词: 金钗石斛; 内生细菌; 扩增核糖体 DNA 限制性分析(ARDRA); 组成分析; 多样性分析

中图分类号: Q948.12⁺2.3; Q949.71⁺8.43 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2018)01-0079-12
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2018.01.10

Analyses on composition and diversity of endophytic bacteria in *Dendrobium nobile* WU Qingshan, LEI Xun, LEI Youmei, PU Xing, LIU Ying, WENG Qingbei^① (School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2018, 27(1): 79-90

Abstract: Endophytic bacteria in root, stem, and leaf of *Dendrobium nobile* Lindl. cultivated in Wanglong Town of Chishui City (P1), greenhouse of School of Life Sciences of Guizhou Normal University of Guiyang City (P2), and Taijin Ecological Agricultural Sightseeing Garden of Jinsha County (P3) in Guizhou Province were isolated by using nine kinds of media, and diversity analysis of isolated endophytic bacteria was conducted by using amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). The results show that 1 081 endophytic bacteria are isolated from root, stem, and leaf of *D. nobile* in three plots, which are belonging to 40 species and 1 subspecies in 12 genera of 5 families in 2 phyla, and can be divided into 41 OTUs; in which, *Bacillus* and *Brevibacillus* are dominant genera, and *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *Brevibacillus invocatus* are dominant species (subspecies). There is difference in distribution of endophytic bacteria in different organs of *D. nobile*. Strain number of endophytic bacteria in root is the largest (695), and Shannon-Wiener diversity index (2.20) and Margalef richness index

收稿日期: 2017-07-07

基金项目: 贵州师范大学研究生创新基金(研创[2016]22); 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金([2011]47); 国家大学生创新创业训练计划项目(20131001); 贵州省大学生创新创业训练计划项目(201410663004)

作者简介: 吴庆珊(1991—),男,贵州仁怀人,硕士研究生,主要从事微生物资源开发利用方面的研究工作。

^①通信作者 E-mail: wengqb@126.com

(5.81) of endophytic bacteria in root are both higher than those of endophytic bacteria in stem and leaf, while Pielou evenness index of endophytic bacteria in leaf is the highest (0.69). In addition, Sørensen similarity index of endophytic bacteria between stem and leaf is the highest (0.82), and is significantly higher than that between root and stem and between root and leaf. There are 14 common OTUs in endophytic bacteria of *D. nobile* in three plots, its isolated strain number accounts for 96.5% of total isolated strain number of endophytic bacterium resources from *D. nobile*. In addition, there are relatively small differences in Shannon-Wiener diversity index and Pielou evenness index of endophytic bacteria of *D. nobile* in three plots, and only Margalef richness index of endophytic bacteria of *D. nobile* in P1 plot is obviously higher than that in P2 and P3 plots. Colony number and OTU number of endophytic bacteria isolated from *D. nobile* in NA, TSA, LB, KB, R2A, and TB media are higher than those in YPD, YT, and YG media. It is suggested that there are abundant endophytic bacterium resources in *D. nobile*, and the composition and diversity of its endophytic bacteria are closely related with isolated organs, cultivated fields, and media.

Key words: *Dendrobium nobile* Lindl.; endophytic bacteria; amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA); composition analysis; diversity analysis

金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 隶属兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium* Sw.), 为多年生草本植物^[1], 多附生在阴凉通风的悬崖石壁上或树上, 主要分布在中国西南、华南和台湾等地。金钗石斛在贵州省有 50 余年的栽培历史, 贵州省赤水市的金钗石斛在 2006 年由国家质量监督检验检疫总局批准实施国家地理标志产品保护。金钗石斛为中国传统名贵中药材和保健品原料, 主要化学成分包括生物碱、多糖、倍半萜类、菲类、联苜类等, 具有抗肿瘤、抗衰老、改善记忆、提高免疫力、提高胃肠道功能及抗白内障等功效^[2], 经济价值很高。然而, 金钗石斛种子自然萌发困难, 随着人们对金钗石斛的不断开发利用, 导致其野生资源日渐枯竭, 因此, 应建立完善的金钗石斛人工组培繁殖和保育体系, 以加快金钗石斛的规范化和规模化种植。

植物内生细菌栖居于健康的植物组织和器官的细胞间隙或细胞内, 不会对寄主植物造成实质性危害, 并可与寄主植物建立和谐共生关系^[3]。相关研究表明: 兰科植物具有依赖菌根成活和生长的特性^[4-5], 其内生细菌的数量和种类因生境而异, 并与兰科植物的种类、根龄、生长季节及菌根真菌的定植程度等密切相关^[6-8]。迄今为止, 研究者们已经从 90 多种兰科植物中分离出大量的内生细菌, 并以根部内生细菌为主^[9], 其中, 已经分离出内生细菌的石斛属植物有美花石斛 (*D. loddigesii* Rolfe)^[10]、细茎石斛 [*D. moniliforme* (Linn.) Sw.]^[11]、铁皮石斛 (*D. officinale* Kimura et Migo)^[12] 和 杓唇石斛 [*D. moschatum* (Buch.-Ham.) Sw.]^[13] 等。

在兰科植物的整个微生态系统中, 植物与其内生微生物相互作用, 并且, 内生细菌间、内生细菌与植物菌根真菌间的相互作用可直接或间接促进植物生长发育。植物内生细菌不仅可以生物固氮和分泌 IAA 等植物激素直接促进植物生长^[5-8], 还可以通过诱导植物体产生植物激素、增强植物体抗逆性及防御病原体入侵等途径间接促进植物生长发育^[14-15], 因此, 内生细菌对植物的生长和繁殖具有重要作用。相关研究表明: 接种内生细菌可提高兰科植物种子的萌发率^[5-7] 和组培苗炼苗移栽的成活率^[13, 16], 促进组培苗生长, 并提高组培苗的生物产量及多糖等活性成分的含量。不同生长阶段的兰科植物对促生微生物的种类需求不同^[9], 并且, 内生细菌与菌根真菌混合接种的促生效果明显优于单独接种菌根真菌^[17]。综上所述, 兰科植物内生细菌对维持兰科植物的物种多样性及其规模化园艺栽培和药用生产等具有重要意义。

传统分离培养是微生物研究的重要基础, 对丰富兰科植物内生细菌资源, 研究内生细菌的生物学特性及其与植物种子萌发和幼苗生长等的相互作用具有不可替代的作用。为此, 作者从贵州省 3 个地区人工种植的金钗石斛根、茎和叶等器官中分离出内生细菌, 并采用扩增核糖体 DNA 限制性分析 (amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) 法对分离的内生细菌进行多样性分析, 以期丰富兰科植物内生细菌的种质资源, 为进一步利用内生细菌共生技术开发药用植物栽培和活性天然产物分离等研究提供基础数据和参考依据。

1 研究地概况和研究方法

1.1 研究地概况

供试金钗石斛分别来自贵州省赤水市旺隆镇(P1)、贵州省贵阳市贵州师范大学生命科学学院大棚(P2)和贵州省金沙县台金生态农业观光园大棚(P3)3个样地,均于2015年9月采集。其中,P1样地位于北纬28°32'01"、东经105°51'52",海拔377 m,属中亚热带湿润季风气候,年均温18.1℃,年均空气相对湿度82%,供试植株以压石法仿野生种植^[18],栽培基质以苔藓、腐熟牛肥和锯木屑为主;P2样地位于北纬26°35'31"、东经106°43'10",海拔1 096 m,供试植株种植在大棚内,棚内温度25℃~30℃,年均空气相对湿度75%~85%,栽培基质以营养土和锯木屑为主,基质含水量为50%~60%;P3样地位于北纬27°29'53"、东经106°10'09",海拔948 m,供试植株种植在大棚内,棚内温度25℃~30℃,年均空气相对湿度70%~80%,栽培基质以泥炭和珍珠岩为主,基质含水量为40%~60%。

1.2 研究方法

1.2.1 样株的采集方法 采用五点取样法在样地内选择正常生长且无病虫害的2年生金钗石斛植株,每个采样点采集1株样株,同一样地的5株样株放入1个无菌袋中,置于冰盒中带回实验室,尽快用于内生细菌分离。经鉴定,样株种植于贵州师范大学生命科学学院微生物实验室进行活体保存。

1.2.2 内生细菌的分离和纯化 用蒸馏水冲洗样株表面,用滤纸吸干表面水分,每个样地分别称取根、茎和叶各2.0 g;先用体积分数75%乙醇进行消毒,根、茎和叶的消毒时间分别为3 min、2 min和30 s;接着用质量体积分数0.1% HgCl₂溶液进行消毒,根、茎和叶的消毒时间分别为1 min、1 min和40 s;再用质量体积分数4% NaClO溶液进行消毒,根、茎和叶的消毒时间均为3 min;最后用无菌水漂洗3次。用无菌滤纸吸干根、茎和叶的表面水分,置于盛有18 mL 无菌水的无菌研钵中研磨至匀浆,采用10倍梯度稀释法用无菌水稀释匀浆液,量取稀释10、100和1 000倍的匀浆液各100 μL,分别均匀涂布在LB、NA、TB、YT、YPD、TSA、YG、R2A和KB培养基平板上,置于37℃条件下倒置培养1~2 d,以菌落形成单位(colony forming unit, CFU)为准统计菌落总数。每个

样地金钗石斛根、茎和叶不同稀释倍数的匀浆液均设置3个平行实验。挑取单菌落进行纯化培养,使用相应的斜面培养基置于4℃条件下保存,或使用体积分数30%甘油置于-80℃条件下保存。

1.2.3 细菌基因组DNA的提取 使用相应的培养基将各菌株进行活化,并接种至5 mL相应的液体培养基中,于37℃条件下160 r·min⁻¹振荡培养过夜;菌液在12 000 r·min⁻¹条件下离心2 min,收集沉淀,参照董乙义等^[19]的方法提取细菌基因组DNA。

1.2.4 ARDRA分析 使用通用引物27F(引物序列为5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(引物序列为5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')扩增细菌基因组DNA中16S rDNA的近全长片段;使用限制性内切酶Hha I和Hae III对扩增产物进行酶切分析,根据ARDRA的酶切产物带型划分不同的操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)。

选取每个OTU的代表性菌株,将扩增出的16S rDNA片段送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序;使用BLASTn程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)将测序获得的序列与GenBank数据库中已知的序列进行在线比对;下载与分离菌株16S rDNA序列最相似的菌株序列,使用Clustal W软件进行多重比对;使用MEGA 7.0软件,采用邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,重复抽样检测1 000次;将每个OTU代表性菌株的16S rDNA序列提交至GenBank数据库,获得GenBank登录号。

1.3 数据分析

使用Shannon-Wiener多样性指数(H')、Pielou均匀度指数(E)和Margalef丰富度指数(R)分析金钗石斛内生细菌的多样性,使用Sørensen相似性系数比较金钗石斛不同部位内生细菌组成的相似程度^[20]。采用SPSS 20.0统计分析软件对相关数据进行处理,采用LSD法进行差异显著性分析。

2 结果和分析

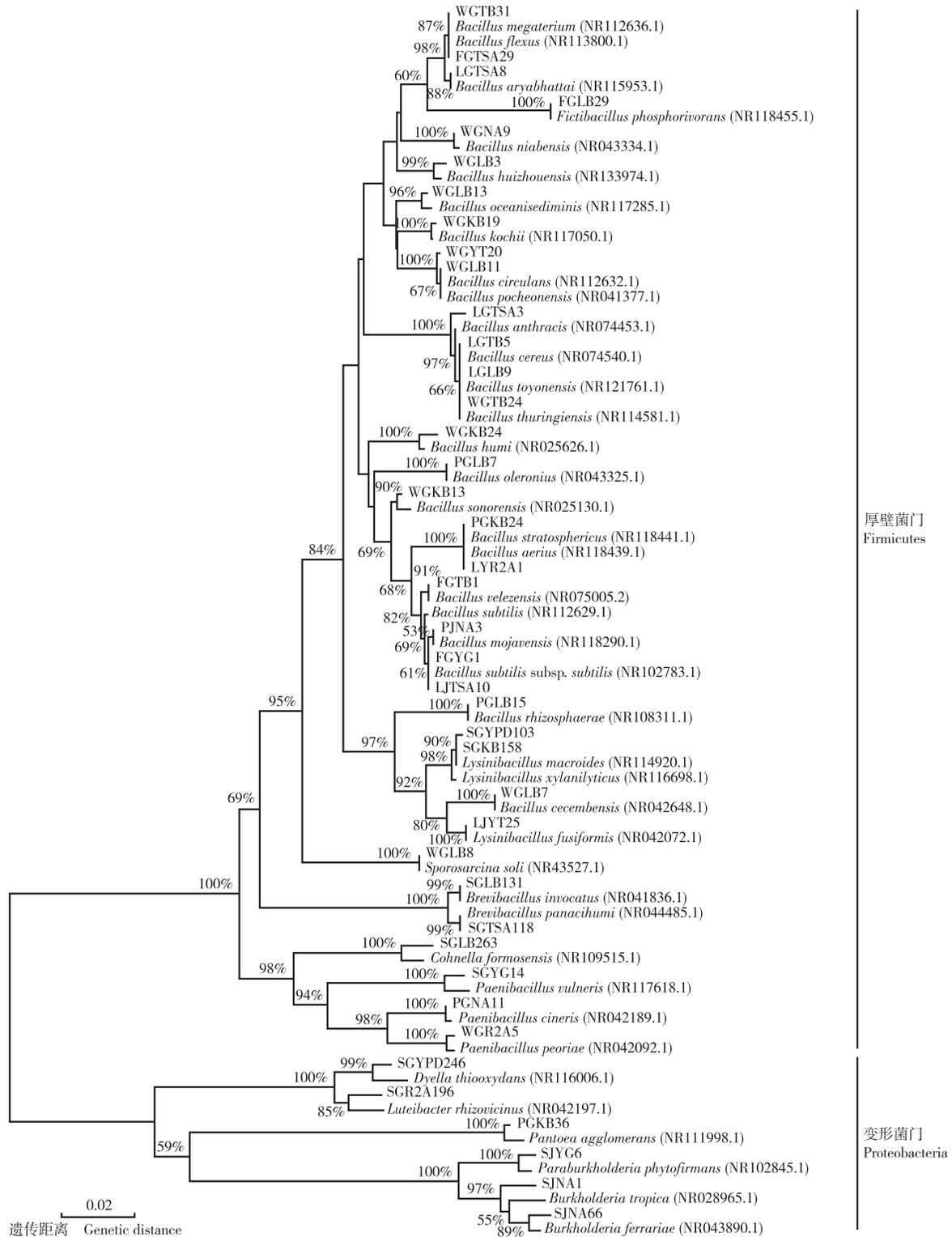
2.1 金钗石斛内生细菌的总体组成分析

统计结果表明:在贵州省的赤水市旺隆镇、贵阳市贵州师范大学生命科学学院大棚和金沙县台金生态农业观光园3个样地金钗石斛的根、茎和叶中共分离出1 081株内生细菌菌株;根据ARDRA分析结果,这些菌株可分成41个OTUs。每个OTU代表菌株与

GenBank 数据库中近缘菌株 16S rDNA 序列的相似度及各 OTU 的分离菌株情况见表 1; 基于 16S rDNA 序列构建的各 OTU 代表菌株与 GenBank 数据库中近缘菌株的系统发育树见图 1。

表 1 金钗石斛内生细菌 41 个 OTUs 代表菌株与 GenBank 数据库中近缘菌株 16S rDNA 序列的相似度及各 OTU 的分离菌株情况分析
Table 1 Similarity of 16S rDNA sequences between representative strains of 41 OTUs of endophytic bacteria in *Dendrobium nobile* Lindl. and relative strains in GenBank database, and analysis on status of isolated strains of each OTU

OTU 编号 No. of OTU	代表菌株 Representative strain 编号 No.	登录号 Accession number	近缘菌株 Relative strain 种类 Species	登录号 Accession number	相似度/% Similarity	分离菌株 数量 Number	Isolated strain 比例/% Percentage
变形菌门 Proteobacteria							
OTU33	SJNA66	KX131116	<i>Burkholderia ferrariae</i>	NR043890.1	98	3	0.3
OTU10	SJNA1	KX131107	<i>Burkholderia tropica</i>	NR028965.1	98	36	3.3
OTU4	SJYG6	KX131106	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>	NR102845.1	99	32	3.0
OTU23	PGKB36	KX131131	<i>Pantoea agglomerans</i>	NR111998.1	98	1	0.1
OTU29	SGYPD246	KX131110	<i>Dyella thiooxydans</i>	NR116006.1	99	28	2.6
OTU20	SGR2A196	KX131117	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	NR042197.1	99	1	0.1
厚壁菌门 Firmicutes							
OTU14	PGNA11	KX131100	<i>Paenibacillus cineris</i>	NR042189.1	99	60	5.6
OTU39	WGR2A5	KX131124	<i>Paenibacillus peoriae</i>	NR042092.1	99	1	0.1
OTU18	SGYG14	KX131109	<i>Paenibacillus vulneris</i>	NR117618.1	99	6	0.6
OTU2	SGLB131	KX131108	<i>Brevibacillus invocatus</i>	NR041836.1	99	219	20.3
OTU34	SGTSA118	KX131114	<i>Brevibacillus panacihumi</i>	NR044485.1	100	1	0.1
OTU13	SGLB263	KX131111	<i>Cohnella formosensis</i>	NR109515.1	98	23	2.1
OTU27	WGLB8	KX131127	<i>Sporosarcina soli</i>	NR043527.1	100	2	0.2
OTU15	LYR2A1	KX131094	<i>Bacillus aerius</i>	NR118439.1	99	44	4.1
OTU1	LG TSA3	KX131092	<i>Bacillus anthracis</i>	NR074453.1	99	5	0.5
OTU21	LG TSA8	KX131095	<i>Bacillus aryabhatai</i>	NR115953.1	100	55	5.1
OTU30	WGLB3	KX131126	<i>Bacillus huizhouensis</i>	NR133974.1	99	1	0.1
OTU16	WGLB7	KX131120	<i>Bacillus cecembensis</i>	NR042648.1	99	1	0.1
OTU7	LG TB5	KX131096	<i>Bacillus cereus</i>	NR074540.1	100	60	5.6
OTU26	WGLB11	KX131125	<i>Bacillus circulans</i>	NR112632.1	100	2	0.2
OTU8	WGYT20	KX131129	<i>Bacillus pocheonensis</i>	NR041377.1	100	2	0.2
OTU40	PGLB15	KX131102	<i>Bacillus rhizosphaerae</i>	NR108311.1	99	1	0.1
OTU17	FG TSA29	KX131089	<i>Bacillus flexus</i>	NR113800.1	100	2	0.2
OTU28	WGKB24	KX131122	<i>Bacillus humi</i>	NR025626.1	99	2	0.2
OTU38	WGKB19	KX131123	<i>Bacillus kochii</i>	NR117050.1	99	1	0.1
OTU11	WGKB13	KX131119	<i>Bacillus sonorensis</i>	NR025130.1	99	4	0.4
OTU9	WGTB31	KX131121	<i>Bacillus megaterium</i>	NR112636.1	100	2	0.2
OTU24	FGTB1	KX131088	<i>Bacillus velezensis</i>	NR075005.2	99	1	0.1
OTU31	PJNA3	KX131101	<i>Bacillus mojavensis</i>	NR118290.1	99	1	0.1
OTU25	WGNA9	KX131128	<i>Bacillus niabensis</i>	NR043334.1	99	1	0.1
OTU22	WGLB13	KX131118	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	NR117285.1	99	1	0.1
OTU32	PGLB7	KX131099	<i>Bacillus oleronius</i>	NR043325.1	99	2	0.2
OTU19	PGKB24	KX131104	<i>Bacillus stratosphericus</i>	NR118441.1	100	1	0.1
OTU12	FGYG1	KX131090	<i>Bacillus subtilis</i>	NR112629.1	100	2	0.2
OTU3	LJ TSA10	KX131093	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NR102783.1	99	459	42.5
OTU36	WGTB24	KX131132	<i>Bacillus thuringiensis</i>	NR114581.1	99	1	0.1
OTU5	LGLB9	KX131097	<i>Bacillus toyonensis</i>	NR121761.1	100	12	1.1
OTU35	FGLB29	KX131091	<i>Ficitibacillus phosphorivorans</i>	NR118455.1	99	2	0.2
OTU41	LJYT25	KX131133	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	NR042072.1	99	1	0.1
OTU37	SGYPD103	KX131112	<i>Lysinibacillus macroides</i>	NR114920.1	99	1	0.1
OTU6	SGKB158	KX131115	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	NR116698.1	99	1	0.1
总计 Total						1 081	100.0



分支上的数值为 1 000 次重复抽样检测的自展支持率 Datums on the branches are the bootstrap values of 1 000 replications. 括号内的编号为近缘菌株在 GenBank 数据库中的登录号 Nos. in brackets are accession numbers of relative strains in GenBank database. 大写字母和数字组合为各 OTU 代表菌株的编号 Combinations of capitals and numbers are Nos. of representative strains of each OTU.

图 1 基于 16S rDNA 序列构建的金钗石斛内生细菌各 OTU 代表菌株与 GenBank 数据库中近缘菌株的系统发育树
 Fig. 1 Phylogenetic tree of representative strains of each OTU of endophytic bacteria in *Dendrobium nobile* Lindl. and relative strains in GenBank database based on 16S rDNA sequences

结果表明:分离的菌株属于厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)2门,包括5科12属40种1亚种,且各OTU代表菌株与GenBank数据库中近缘菌株16S rDNA序列的相似度为98%~100%。

属于厚壁菌门的OTUs有35个,分离菌株数占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的90.7%,包括芽孢杆菌科(Bacillaceae)和类芽孢杆菌科(Paenibacillaceae)2科共7属,其中,芽孢杆菌科包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)和虚构芽孢杆菌属(*Fictibacillus*)3属,类芽孢杆菌科包括短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)和柯恩氏菌属(*Cohnella*)4属。进一步分析结果表明:属于芽孢杆菌属的OTUs有24个,分离菌株数占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的61.3%;属于类芽孢杆菌属和赖氨酸芽孢杆菌属的OTUs各有3个,分离菌株数分别占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的6.2%和0.3%;属于短芽孢杆菌属的OTUs有2个,分离菌株数占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的20.4%;属于柯恩氏菌属、芽孢八叠球菌属和虚构芽孢杆菌属的OTUs各只有1个,分离菌株数分别占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的2.1%、0.2%和0.2%。

属于变形菌门的OTUs有6个,分离菌株数占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的9.3%,包括伯克氏菌科(Burkholderiaceae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)和黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)3科共5属,其中,伯克氏菌科包括伯克氏菌属(*Burkholderia*)和副伯克氏菌属(*Paraburkholderia*)2属,黄单胞菌科包括藤黄杆菌属(*Luteibacter*)和戴氏菌属(*Dyella*)2属,肠杆菌科仅泛菌属(*Pantoea*)1属。进一步分析结果表明:属于

伯克氏菌属的OTUs有2个,属于副伯克氏菌属、戴氏菌属、泛菌属和藤黄杆菌属的OTUs各只有1个,分离菌株数分别占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的3.6%、3.0%、2.6%、0.1%和0.1%。

从分离菌株数的比例来看,芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属为金钗石斛内生细菌的优势属;*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 和 *Brevibacillus invocatus* 为优势种(亚种),分离菌株数分别占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的42.5%和20.3%。

2.2 金钗石斛不同器官内生细菌的组成及多样性分析

2.2.1 组成分析

研究结果(表2)表明:从金钗石斛根中分离出695株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的64.3%,包括12属38种1亚种;从茎和叶中各分离出232和154株内生细菌菌株,分别占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的21.5%和14.2%,分别包括7属13种1亚种和6属11种1亚种。进一步分析结果表明:OTU31和OTU41仅在金钗石斛茎中分离获得,其余39个OTUs均可在金钗石斛根中分离获得,其中的24个OTUs仅能在根中分离获得,但分离菌株数较少;金钗石斛根、茎和叶中内生细菌的共有OTUs有9个。

结合表1,从分离菌株数的比例来看,芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属为金钗石斛根、茎和叶内生细菌的优势属,*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 和 *Brevibacillus invocatus* 为优势种(亚种);并且,*Burkholderia tropica*、*Paenibacillus cineris*、*Paraburkholderia phytofirmans*、*Brevibacillus invocatus*、*Bacillus aerius*、*Bacillus aryabhattai*、*Bacillus cereus*、*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 和 *Bacillus toyonensis* 8种1亚种细菌在金钗石斛的根、茎和叶中均有分布。

表2 不同器官、样地和培养基中金钗石斛内生细菌41个OTUs的分离菌株数量分析¹⁾

Table 2 Analysis on isolated strain number of 41 OTUs of endophytic bacteria from *Dendrobium nobile* Lindl. in different organs, plots, and media¹⁾

OTU 编号 No. of OTU	器官 ²⁾ Organ ²⁾			样地 ³⁾ Plot ³⁾			培养基 Medium								
	R	S	L	P1	P2	P3	TSA	NA	LB	R2A	KB	YG	TB	YPD	YT
变形菌门 Proteobacteria															
OTU33	1	2	—	—	3	—	—	1	1	1	—	—	—	—	—
OTU10	22	10	4	11	11	14	6	2	5	3	6	5	4	2	2
OTU4	29	1	2	17	9	6	1	1	4	6	—	1	2	8	9
OTU23	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
OTU29	25	—	3	11	9	8	5	2	1	4	2	1	4	8	1
OTU20	1	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—

续表2 Table 2 (Continued)

OTU 编号 No. of OTU	器官 ²⁾ Organ ²⁾			样地 ³⁾ Plot ³⁾			培养基 Medium								
	R	S	L	P1	P2	P3	TSA	NA	LB	R2A	KB	YG	TB	YPD	YT
厚壁菌门 Firmicutes															
OTU14	38	14	8	29	17	14	10	8	17	6	5	4	3	5	2
OTU39	1	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
OTU18	5	—	1	3	1	2	1	1	1	1	—	1	1	—	—
OTU2	108	64	47	88	61	70	30	41	32	41	15	13	11	18	18
OTU34	1	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
OTU13	21	2	—	11	8	4	2	2	2	7	2	4	1	2	1
OTU27	2	—	—	1	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	1
OTU15	31	7	6	25	9	10	5	8	7	8	4	6	2	4	1
OTU1	5	—	—	3	1	1	1	1	1	1	—	—	—	1	—
OTU21	47	4	4	28	12	15	12	7	11	12	4	7	—	—	2
OTU30	1	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
OTU16	1	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
OTU7	40	13	7	34	13	13	10	12	13	9	3	5	—	3	5
OTU26	2	—	—	2	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
OTU8	2	—	—	2	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
OTU40	1	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—
OTU17	1	1	—	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—
OTU28	2	—	—	2	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—
OTU38	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—
OTU11	4	—	—	2	1	1	1	—	—	1	1	—	—	1	—
OTU9	2	—	—	1	—	1	1	—	—	—	—	—	1	—	—
OTU24	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
OTU31	—	1	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—
OTU25	1	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
OTU22	1	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
OTU32	2	—	—	1	—	1	—	—	1	—	—	1	—	—	—
OTU19	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—
OTU12	1	—	1	—	1	1	—	1	—	—	—	1	—	—	—
OTU3	279	110	70	207	127	125	68	88	102	98	16	11	35	22	19
OTU36	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
OTU5	9	2	1	6	4	2	1	1	2	1	—	3	1	2	1
OTU35	2	—	—	1	—	1	—	—	1	—	1	—	—	—	—
OTU41	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
OTU37	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
OTU6	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
总计 Total	695	232	154	493	293	295	156	180	208	201	64	63	67	77	65

¹⁾ —: 未分离出内生细菌 No endophytic bacterium isolated.

²⁾ R: 根 Root; S: 茎 Stem; L: 叶 Leaf.

³⁾ P1: 贵州省赤水市旺隆镇 Wanglong Town in Chishui City of Guizhou Province; P2: 贵州省贵阳市贵州师范大学生命科学院大棚 Greenhouse of School of Life Sciences of Guizhou Normal University in Guiyang City of Guizhou Province; P3: 贵州省金沙县台金生态农业观光园 Taijin Ecological Agricultural Sightseeing Garden in Jinsha County of Guizhou Province.

2.2.2 多样性分析 从分离自金钗石斛根、茎和叶的内生细菌多样性分析结果(表3)来看,根中内生细菌的 Shannon-Wiener 多样性指数(H')和 Margalef 丰富度指数(R)最高,分别为 2.20 和 5.81;茎中内生细菌的 H' 和 R 值分别为 1.57 和 2.39,叶中内生细菌的 H' 和 R 值分别为 1.71 和 2.18。从 Pielou 均匀度指数(E)来看,叶中内生细菌的 E 值最高,为 0.69;根

和茎中内生细菌的 E 值相近,分别为 0.60 和 0.59。

Sørensen 相似性系数分析结果表明:金钗石斛叶和茎间、根和叶间以及根和茎间内生细菌的 Sørensen 相似性系数分别为 0.82、0.55 和 0.57,并且,叶和茎间内生细菌的 Sørensen 相似性系数显著高于根和叶间以及根和茎间内生细菌的 Sørensen 相似性系数 ($P<0.05$)。

表 3 金钗石斛不同器官内生细菌的多样性分析

Table 3 Diversity analysis on endophytic bacteria in different organs of *Dendrobium nobile* Lindl.

器官 Organ	分离菌株数 Isolated strain number	OTU 数量 OTU number	Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener diversity index	Margalef 丰富度指数 Margalef richness index	Pielou 均匀度指数 Pielou evenness index
根 Root	695	39	2.20	5.81	0.60
茎 Stem	232	14	1.57	2.39	0.59
叶 Leaf	154	12	1.71	2.18	0.69

2.3 不同样地金钗石斛内生细菌的组成及多样性分析

2.3.1 组成分析 研究结果(表 2)表明:从贵州省赤水市旺隆镇(P1)的金钗石斛中分离出 493 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 45.6%,包括 10 属 28 种 1 亚种;从贵州省贵阳市贵州师范大学生命科学学院大棚(P2)的金钗石斛中分离出 293 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 27.1%,包括 9 属 21 种 1 亚种;从贵州省金沙县台金生态农业观光园(P3)的金钗石斛中分离出 295 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 27.3%,包括 10 属 23 种 1 亚种。进一步分析结果表明:P1、P2 和 P3 样地金钗石斛内生细菌的特有 OTUs 分别有 10、6 和 5 个;3 个样地金钗石斛内生细菌的共有 OTUs 有 14 个,分离菌株数占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 96.5%。

结合表 1,从分离菌株数的比例来看,芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属为 3 个样地金钗石斛内生细菌的优势属,*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 和 *Brevibacillus invocatus* 为优势种(亚种);并且,不同样地金钗石斛的内生细菌存在一定差异,例如:泛菌属仅分离自 P1 样地的金钗石斛,藤黄杆菌属仅分离自 P2 样地的金钗石斛,而芽孢八叠球菌属未分离自 P2 样地的金钗石斛,赖氨酸芽孢杆菌属未分离自 P1 样地的金钗石斛。

2.3.2 多样性分析 从分离自 3 个样地金钗石斛的内生细菌多样性分析结果(表 4)来看:P1 样地金钗石斛内生细菌的 Margalef 丰富度指数(R)明显高于 P2 和 P3 样地;而 3 个样地金钗石斛内生细菌的 Shannon-Wiener 多样性指数(H')和 Pielou 均匀度指数(E)差异较小,其中,P1 样地金钗石斛内生细菌的 H' 值略高于 P2 和 P3 样地,而 P2 样地金钗石斛内生细菌的 E 值则略高于 P1 和 P3 样地。

表 4 不同样地金钗石斛内生细菌的多样性分析

Table 4 Diversity analysis on endophytic bacteria of *Dendrobium nobile* Lindl. in different plots

样地 ¹⁾ Plot ¹⁾	分离菌株数 Isolated strain number	OTU 数量 OTU number	Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener diversity index	Margalef 丰富度指数 Margalef richness index	Pielou 均匀度指数 Pielou evenness index
P1	493	29	2.06	4.52	0.61
P2	293	22	1.97	3.52	0.65
P3	295	24	1.93	3.87	0.62

¹⁾ P1: 贵州省赤水市旺隆镇 Wanglong Town in Chishui City of Guizhou Province; P2: 贵州省贵阳市贵州师范大学生命科学学院大棚 Greenhouse of School of Life Sciences of Guizhou Normal University in Guiyang City of Guizhou Province; P3: 贵州省金沙县台金生态农业观光园 Taijin Ecological Agricultural Sightseeing Garden in Jinsha County of Guizhou Province.

2.4 不同培养基分离出的金钗石斛内生细菌的组成及数量分析

2.4.1 组成分析 研究结果(表 2)表明:TSA 培养基从金钗石斛中分离出 156 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 14.4%,包括 7 属 16 种 1 亚种;NA 培养基从金钗石斛中分离出 180 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 16.7%,包括 8 属 18 种 1 亚种;LB 培养基从金钗石斛中分离出 208 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 19.2%,包括 8 属 22 种 1 亚种;

R2A 培养基从金钗石斛中分离出 201 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 18.6%,包括 8 属 16 种 1 亚种;KB 培养基从金钗石斛中分离出 64 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 5.9%,包括 9 属 15 种 1 亚种;YG 培养基从金钗石斛中分离出 63 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 5.8%,包括 7 属 13 种 1 亚种;TB 培养基从金钗石斛中分离出 67 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 6.2%,包括 7 属 12 种 1 亚种;YPD 培养基从金钗石斛中分离

出 77 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 7.1%,包括 8 属 12 种 1 亚种;YT 培养基从金钗石斛中分离出 65 株内生细菌菌株,占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 6.0%,包括 9 属 14 种 1 亚种。进一步分析结果表明:TSA、YPD 和 YT 培养基分离出的金钗石斛内生细菌均有 1 个特有 OTU,NA、R2A 和 TB 培养基分离出的金钗石斛内生细菌均有 2 个特有 OTUs,LB 和 KB 培养基分离出的金钗石斛内生细菌分别有 3 和 4 个特有 OTUs,而 YG 培养基分离出的金钗石斛内生细菌无特有 OTU;9 种培养基分离出的金钗石斛内生细菌共有 OTUs 有 7 个。

结合表 1,从分离菌株数的比例来看,芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属为 9 种培养基分离出的金钗石斛内生细菌的优势属,*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 和 *Brevibacillus invocatus* 为优势种(亚种)。

2.4.2 数量分析 统计结果(表 5)表明:NA 培养基从金钗石斛根中分离出的内生细菌菌落数最多,为 10.67×10^5 CFU · g⁻¹;R2A 培养基从金钗石斛根中分离出的内生细菌菌落数次之,为 10.20×10^5

CFU · g⁻¹;KB 培养基从金钗石斛根中分离出的内生细菌菌落数最少,仅为 1.76×10^5 CFU · g⁻¹。供试 9 种培养基从金钗石斛根中分离出的内生细菌菌落数存在极显著差异($P < 0.01$),并且,TSA、NA、LB 和 R2A 培养基从金钗石斛根中分离出的内生细菌菌落数显著高于 KB、YG、TB、YPD 和 YT 培养基。另外,TSA、NA、LB、R2A 和 KB 培养基从金钗石斛根中分离出的内生细菌 OTU 数量均较多(15~20 个 OTUs),而 YG、TB、YPD 和 YT 培养基从金钗石斛根中分离出的内生细菌 OTU 数量却较少(9~10 个 OTUs)。

由表 5 可见:LB 培养基从金钗石斛茎中分离出的内生细菌菌落数最多,为 10.47×10^4 CFU · g⁻¹;KB 培养基从金钗石斛茎中分离出的内生细菌菌落数次之,为 9.23×10^4 CFU · g⁻¹;NA 培养基从金钗石斛茎中分离出的内生细菌菌落数最少,仅为 3.70×10^4 CFU · g⁻¹。供试 9 种培养基从金钗石斛茎中分离出的内生细菌菌落数无显著差异。另外,9 种培养基从金钗石斛茎中分离出的内生细菌 OTU 数量差异较小(7~11 个 OTUs)。

表 5 不同培养基分离的金钗石斛各器官内生细菌菌落数和 OTU 数量的比较($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 5 Comparison on colony number and OTU number of endophytic bacteria isolated from each organ of *Dendrobium nobile* Lindl. in different media ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

培养基 Medium	根 Root		茎 Stem		叶 Leaf	
	菌落数/CFU · g ⁻¹ Colony number	OTU 数量 OTU number	菌落数/CFU · g ⁻¹ Colony number	OTU 数量 OTU number	菌落数/CFU · g ⁻¹ Colony number	OTU 数量 OTU number
TSA	(9.96±1.02)×10 ⁵ a	15	(5.43±1.88)×10 ⁴ a	8	(9.53±1.56)×10 ³ ab	8
NA	(10.67±1.16)×10 ⁵ a	16	(3.70±0.38)×10 ⁴ a	9	(4.30±1.68)×10 ³ ab	5
LB	(9.40±2.03)×10 ⁵ a	20	(10.47±1.27)×10 ⁴ a	11	(10.13±1.51)×10 ³ a	9
R2A	(10.20±0.96)×10 ⁵ a	15	(8.50±1.36)×10 ⁴ a	10	(7.10±0.96)×10 ³ ab	7
KB	(1.76±0.32)×10 ⁵ b	16	(9.23±0.99)×10 ⁴ a	10	(5.25±1.78)×10 ³ ab	5
YG	(5.52±2.09)×10 ⁵ b	10	(6.47±0.98)×10 ⁴ a	9	(2.93±1.54)×10 ³ b	4
TB	(2.80±1.41)×10 ⁵ b	10	(7.17±0.95)×10 ⁴ a	8	(9.03±0.41)×10 ³ ab	8
YPD	(3.68±1.17)×10 ⁵ b	9	(4.70±2.21)×10 ⁴ a	7	(5.90±1.66)×10 ³ ab	6
YT	(4.27±0.85)×10 ⁵ b	10	(5.50±2.10)×10 ⁴ a	7	(5.40±1.33)×10 ³ ab	6

¹⁾ 同列中的不同小写字母表示不同培养基从同一器官中分离的内生细菌菌落数差异显著($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant difference in colony number of endophytic bacteria isolated from the same organ among different media ($P < 0.05$).

由表 5 还可见:LB 培养基从金钗石斛叶中分离出的内生细菌菌落数最多,为 10.13×10^3 CFU · g⁻¹;TSA 培养基从金钗石斛叶中分离出的内生细菌菌落数次之,为 9.53×10^3 CFU · g⁻¹;YG 培养基从金钗石斛叶中分离出的内生细菌菌落数最少,仅为 2.93×10^3 CFU · g⁻¹。供试 9 种培养基从金钗石斛叶中分离出的内生细菌菌落数存在显著差异($P < 0.05$),并

且,LB 培养基从金钗石斛叶中分离出的内生细菌菌落数显著高于 YG 培养基,而二者与其余 7 种培养基从金钗石斛叶中分离出的内生细菌菌落数差异不显著。另外,供试 9 种培养基从金钗石斛叶中分离出的内生细菌 OTU 数量较少(4~9 个 OTUs)。

比较分析结果表明:供试 9 种培养基从金钗石斛根中分离出的内生细菌菌落数和 OTU 数量均最多,

从金钗石斛茎中分离出的内生细菌菌落数和 OTU 数量居中,而从金钗石斛叶中分离出的内生细菌菌落数和 OTU 数量均最少。

3 讨论和结论

兰科植物的内生细菌对宿主植物的生长、抗病和抗逆性等具有重要作用,因此,分离纯化金钗石斛的内生细菌并研究其组成有助于阐明内生细菌在与金钗石斛共生过程中的功能和作用。本研究从金钗石斛中共分离出 1 081 株内生细菌菌株,隶属 2 门 5 科 12 属,可划分为 41 个 OTUs,并且,金钗石斛的内生细菌具有较高的遗传多样性。据不完全统计,从兰科植物中分离出的内生细菌不少于 60 种,并且,兰科植物内生细菌的组成差异与其生境不同有关^[8-9]; Tsavkelova 等^[8]和 Wilkinson 等^[21]的研究结果表明:芽孢杆菌属和假单胞菌属(*Pseudomonas*)为兰科植物内生细菌的优势属,常见内生细菌还包括类芽孢杆菌属、伯克氏菌属、肠杆菌属(*Enterobacter*)和赖氨酸芽孢杆菌属等^[10-13];本研究中,芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属为金钗石斛内生细菌的优势属,并且从未从金钗石斛体内分离出假单胞菌属内生细菌。作者还采用相同培养基对金钗石斛根际土壤进行了细菌分离实验,同样得出芽孢杆菌属和假单胞菌属为优势属的结论(另文发表)。另外,芽孢八叠球菌属、柯恩氏菌属和虚构芽孢杆菌属在兰科植物内生细菌研究中鲜见报道。推测兰科植物内生细菌组成差异除了与生境有关外,还可能与寄主植物种类密切相关。

兰科植物的许多内生细菌对植物的种子萌发和植株生长具有促进作用,被称为植物促生细菌(plant growth promoting bacteria, PGPB)。在金钗石斛分离的内生细菌中,OTU40 的代表菌株 PGLB15 与 GenBank 数据库中近缘菌株 *Bacillus rhizosphaerae*(登录号 NR108311.1) 16S rDNA 序列的相似度为 99%, OTU10 的代表菌株 SJNA1 与 GenBank 数据库中近缘菌株 *Burkholderia tropica*(登录号 NR028965.1) 16S rDNA 序列的相似度为 98%, OTU9 的代表菌株 WGTB31 与 GenBank 数据库中近缘菌株 *Bacillus megaterium*(登录号 NR112636.1) 16S rDNA 序列的相似度为 100%,并且,这些近缘菌株均具有固氮作用^[22-23],据此推测这些代表菌株可能为金钗石斛生长提供氮素营养。另外,在金钗石斛分离的内生细菌

中,OTU24 的代表菌株 FGTB1 与 GenBank 数据库中近缘菌株 *Bacillus velezensis*(登录号 NR075005.2) 16S rDNA 序列的相似度为 99%, OTU4 的代表菌株 SJYG6 与 GenBank 数据库中近缘菌株 *Paraburkholderia phytofirmans*(登录号 NR102845) 16S rDNA 序列的相似度为 99%,并且,这 2 种近缘菌株对植物均具有一定的促生作用^[24-25],据此推测这 2 种代表菌株对金钗石斛也有促生作用。研究表明:细茎石斛的许多内生菌具有解磷、解钾、产生生长素及产嗜铁素的能力^[11];杓唇石斛的鞘氨醇菌属(*Sphingomonas*)和分枝菌属(*Mycobacterium*)内生细菌^[8]及铁皮石斛根中 *Sphingomos paucimmobilis* 和 *Paenibacillus mucilaginosus* 等内生细菌^[16]对宿主植物均具有促生作用。已有研究表明:金钗石斛的多株内生细菌具有产 IAA 和解钾等活性,并对玉米(*Zea mays* Linn.) 种子萌发和幼苗生长具有促生作用^[26]。然而,关于内生细菌促进兰科植物生长的机制尚未明确,关于金钗石斛内生细菌的促生作用也未可知,均有待深入研究。

由于植株各营养器官所处的微环境不同,导致植物内生细菌在器官中的分布存在差异,部分内生细菌具有明显的组织偏向性。本研究结果表明:金钗石斛根中内生细菌的菌落数和多样性均高于茎和叶;在分离出的 12 属 41 个 OTUs 中,有 2 个 OTUs 仅能在茎中分离获得,其余 39 个 OTUs 均可在根中分离获得,且其中的 24 个 OTUs 仅能在根中分离获得。推测造成上述结果的原因可能是由于金钗石斛根际土壤中的细菌含量丰富且多样性较高(另文发表),并且,金钗石斛海绵状结构组织的气根为内生细菌提供了适宜的栖居生境,更易被根际土壤中的细菌成功定植^[5,8]。另外,金钗石斛叶和茎间内生细菌的 Sørensen 相似性系数(0.82)显著高于叶和根间(0.55)以及茎和根间(0.57)内生细菌的 Sørensen 相似性系数,这可能与金钗石斛叶和茎中含有较高含量的石斛碱有关^[2],推测石斛碱的积累可能对金钗石斛的内生细菌具有选择作用,因此,关于金钗石斛内生细菌组成与石斛碱的关系有待进一步深入研究。

微生物可借助空气和雨水等,通过植物表面伤口或气孔从叶表面进入体内,但根部裂纹仍是目前细菌在植物体内定植的最主要“热点”^[25]。本研究中,金钗石斛内生细菌菌株 PGLB15、FGTB1、SGLB263、SGKB158、SGYPD246、SGR2A196、WGLB3、WGKB13、

WGKB24、WGLB8 和 WGYT20 等与已报道的土壤细菌 16S rDNA 序列具有较高的相似性^[22,24,27-35];并且,金钗石斛内生细菌中 16 个 OTUs 的代表菌株与金钗石斛根际土壤中分离的细菌 16S rDNA 序列具有较高的相似性(97%~100%)(另文发表),但内生细菌的多样性低于根际土壤细菌,而内生细菌中 *Cohnella*、*Sporosarcina*、*Dyella*、*Luteibacter* 和 *Pantoea* 的种类并未在金钗石斛根际土壤中分离获得,说明金钗石斛特别是根部的内生细菌与其根际土壤细菌间既存在一定的相似性,也存在一定的特异性。值得注意的是,金钗石斛代表菌株 SGLB263 和 SGKB158 的近缘菌株均具有降解木聚糖的作用^[27-28],说明这 2 种内生细菌可能通过分解表皮和细胞壁进入金钗石斛体内,并以组织中的纤维素为碳源,顺利定植于体内。

研究表明:植物内生细菌间以及内生细菌与宿主植物间存在和谐与竞争的关系^[36]。贵州省赤水市旺隆镇(P1)、贵州省贵阳市贵州师范大学生命科学学院大棚(P2)和贵州省金沙县台金生态农业观光园(P3)的金钗石斛内生细菌的 Shannon-Wiener 多样性指数和 Pielou 均匀度指数差异较小,3 个样地金钗石斛内生细菌的共有 OTUs 有 14 个,分离菌株数占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 96.5%,且优势属均为芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属,优势种(亚种)均为 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 和 *Brevibacillus invocatus*,据此推测这 3 个样地金钗石斛的来源相同,且内生细菌的优势属和优势种(亚种)与金钗石斛的生长发育有关。Wilkinson 等^[37]认为,兰科植物内生细菌的优势属随地区和季节,尤其是基于菌根菌感染的组织形态不同而发生变化,且不同地区间存在差异;童文君等^[10]也认为,不同产地美花石斛的内生细菌存在地区特异性。本研究中,供试 3 个样地金钗石斛内生细菌的特有 OTUs 共 21 个,但分离菌株数较少,仅占金钗石斛内生细菌分离菌株总数的 2.4%,推测这可能与不同样地的环境和栽培条件有关。

本研究中,不同培养基从金钗石斛中分离出的内生细菌的菌株数量和种类存在差异;与营养成分含量较高的 YPD、YT 和 YG 培养基相比,NA、TSA、LB、KB、R2A 和 TB 培养基分离出的金钗石斛内生细菌的菌落数和 OTU 数量更多。郭斌等^[38]认为,多数微生物更倾向于生长在与其自然环境相近的基质中。当在贫营养的植物体内生长的微生物突然被转移到富营养的培养基中时,将导致其新陈代谢反应失衡,不

利于其生长^[36]。R2A 是一种贫营养型培养基,含有的丙酮酸钠能够降解微生物培养过程中产生的毒性氧^[39],因而,该培养基从金钗石斛中分离出的内生细菌的菌株数量和种类较丰富。

综上所述,金钗石斛内生细菌资源丰富,且其内生细菌的组成和多样性与分离器官、种植地及培养基密切相关;其中,芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属为金钗石斛内生细菌的优势属,*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 和 *Brevibacillus invocatus* 为优势种(亚种)。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 85-86.
- [2] 乙引, 陈玲, 张习敏. 金钗石斛研究 [M]. 北京: 电子工业出版社, 2009: 6.
- [3] JAMES E K, OLIVARES F L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1997, 17(1): 77-119.
- [4] SHAO S C, BURGESS K S, CRUSE-SANDERS J M, et al. Using *in situ* symbiotic seed germination to restore over-collected medicinal orchids in southwest China [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 888.
- [5] PAVLOVA A S, LEONTIEVA M R, SMIRNOVA T A, et al. Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 123(1): 217-232.
- [6] FARIA D C, DIAS A C F, MELO I S, et al. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(2): 217-221.
- [7] TSAVKELOVA E A, EGOROVA M A, LEONTIEVA M R, et al. *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in co-cultures with diverse associated bacteria [J]. *Plant Growth Regulation*, 2016, 80(1): 1-13.
- [8] TSAVKELOVA E A, CHERDYNTSEVA T A, BOTINA S G, et al. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin [J]. *Microbiological Research*, 2007, 162(1): 69-76.
- [9] 张萍, 宋希强. 兰科植物内生细菌物种多样性及其促生机理研究进展 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(1): 92-98.
- [10] 童文君, 张礼, 薛庆云, 等. 不同产地美花石斛内生细菌分离及促生潜力比较 [J]. *植物资源与环境学报*, 2014, 23(1): 16-23.
- [11] 张礼, 童文君, 薛庆云, 等. 细茎石斛内生和根围细菌多样性及促生能力分析 [J]. *植物资源与环境学报*, 2015, 24(3): 32-40.
- [12] 王明月, 陶茜, 李克艳, 等. 铁皮石斛内生细菌群落结构分析 [J]. *西部林业科学*, 2014, 43(5): 106-111.

- [13] TSAVKELOVA E A, CHERDYNTSEVA T A, NETRUSOV A I. Bacteria associated with the roots of epiphyticorchids [J]. *Microbiology*, 2004, 73(6): 825-831.
- [14] AHMED M, KIBRET M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective[J]. *Journal of King Saud University-Science*, 2014, 26(1): 1-20.
- [15] SINGH S P, GAUR R. Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinomycetes associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfsii* in chickpea[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(2): 506-518.
- [16] 俞 婕, 赵凯鹏, 董 飞, 等. 野生铁皮石斛内生菌的分离及促生作用研究[J]. *现代农业科技*, 2010(9): 96-97.
- [17] DA SILVA J A T, TSAVKELOVA E A, ZENG S, et al. Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development[J]. *Planta*, 2015, 242(1): 1-22.
- [18] 付芳婧, 刘 政. 金钗石斛优良种源的适生条件及仿野生栽培的关键技术[J]. *种子*, 2012, 31(7): 137-139.
- [19] 董乙义, 艾义郎, 黄 煜, 等. 人类活动对织金洞洞穴水中可培养细菌多样性的影响[J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 35(4): 64-70, 76.
- [20] WHITTAKER R H. Evolution and measurement of species diversity [J]. *Taxon*, 1972, 21(2/3): 213-251.
- [21] WILKINSON K G, SIVASITHAMPARAM K, DIXON K W, et al. Identification and characterization of bacteria associated with western Australian orchids[J]. *Soil Biology Biochemistry*, 1994, 26(1): 137-142.
- [22] MADHAIYAN M, POONGUZHALI S, LEE J-S, et al. *Bacillus rhizosphaerae* sp. nov., an novel diazotrophic bacterium isolated from sugarcane rhizosphere soil [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011, 100(3): 437-444.
- [23] REIS V M, SANTOS P E-D I, TENORIO-SALGADO S, et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(6): 2155-2162.
- [24] CHEN X H, KOUMOUTSI A, SCHOLZ R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(9): 1007-1014.
- [25] HARDOIM P R, VAN OVERBEEK L S, VAN ELSAS J D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(10): 463-471.
- [26] 高 阳, 朱双丽, 吴庆珊, 等. 金钗石斛 IAA 内生细菌筛选及对干旱胁迫下玉米种子萌发的影响[J]. *种子*, 2017, 36(4): 36-41.
- [27] HAMEED A, HUNG M-H, LIN S-Y, et al. *Cohnella formosensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the rhizosphere of *Medicago sativa* L. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(8): 2806-2812.
- [28] LEE C S, JUNG Y-T, SOOYEON P, et al. *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from forest humus [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(2): 281-286.
- [29] WEON H-Y, ANANDHAM R, KIM B-Y, et al. *Dyella soli* sp. nov. and *Dyella terrae* sp. nov., isolated from soil [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(7): 1685-1690.
- [30] JOHANSEN J E, BINNERUP S J, KROER N, et al. *Luteibacter rhizovicinus* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(6): 2285-2291.
- [31] LI J, YANG G, WU M, et al. *Bacillus huizhouensis* sp. nov., isolated from a paddy field soil [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 106(2): 357-363.
- [32] PALMISANO M M, NAKAMURA L K, DUNCAN K E, et al. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(5): 1671-1679.
- [33] HEYRMAN J, RODRÍGUEZ-DÍAZ M, DEVOS J, et al. *Bacillus arenosi* sp. nov., *Bacillus arvi* sp. nov. and *Bacillus humi* sp. nov., isolated from soil [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 111-117.
- [34] KWON S-W, KIM B-Y, SONG J, et al. *Sporosarcina koreensis* sp. nov. and *Sporosarcina soli* sp. nov., isolated from soil in Korea [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(8): 1694-1698.
- [35] TEN L N, BAEK S-H, IM W-T, et al. *Bacillus pocheonensis* sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic bacterium isolated from soil of a ginseng field [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(11): 2532-2537.
- [36] 冉国华, 张志元. 植物内生细菌研究及其应用 [J]. *海南大学学报(自然科学版)*, 2004, 22(4): 365-373.
- [37] WILKINSON K G, DIXON K W, SIVASITHAMPARAM K, et al. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria [J]. *Plant and Soil*, 1994, 159(2): 291-295.
- [38] 郭 斌, 吴晓磊, 钱 易. 提高微生物可培养性的方法和措施 [J]. *微生物学报*, 2006, 46(3): 504-507.
- [39] BLOOMFIELD S F, STEWART G S, DODD C E, et al. The viable but non-culturable phenomenon explained? [J]. *Microbiology*, 1998, 144(1): 1-3.

(责任编辑: 佟金凤)