

# 细茎石斛内生和根围细菌多样性及促生能力分析

张 礼, 童文君, 薛庆云, 丁小余<sup>①</sup>

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

**摘要:** 对采自湖北省英山县的细茎石斛 [*Dendrobium moniliforme* (Linn.) Sw.] 根、茎和叶中的内生细菌及其根围苔藓内生细菌和根围土壤细菌进行分离, 并采用扩增核糖体 DNA 限制性酶切分析 (ARDRA) 与 UPGMA 聚类分析相结合的方法对这些细菌菌株进行鉴定和多样性分析; 在此基础上, 采用平板检测技术测定了这些细菌菌株的解磷、解钾、产生素和嗜铁素的能力。结果显示: 从细茎石斛根和茎以及根围苔藓和根围土壤中共分离获得 75 株细菌菌株, 从叶中未分离出内生细菌。其中, 源自根和茎的内生细菌菌株分别为 14 和 7 株; 源自根围苔藓的内生细菌菌株偏少, 仅 14 株; 源自根围土壤的细菌菌株最多, 达到 40 株。75 株菌株可被分成 33 个 ARDRA 簇, 通过 16S rDNA 序列测定及比对, 它们分别隶属于链霉菌属 (*Streptomyces*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、拉恩氏菌属 (*Rahnella*)、潘多拉菌属 (*Pandora*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus*) 和泛菌属 (*Pantoea*), 其中芽孢杆菌属和假单胞菌属为优势属。在 75 株内生和根围细菌中, 有 22 株菌株兼具解无机磷和有机磷的能力, 25 株菌株具有解钾能力, 64 株菌株具有产生素能力, 39 株菌株具有产嗜铁素能力, 其中有 9 株菌株兼具解磷、解钾、产生素和嗜铁素的能力。总体上看, 细茎石斛的内生和根围细菌数量多且多样性较高, 其中 9 株兼具 4 种促生潜力的菌株可作为促进细茎石斛生长的候选菌株。

**关键词:** 细茎石斛; 内生细菌; 根围细菌; ARDRA 分析; 多样性; 促生能力

中图分类号: Q948.12<sup>+</sup>2.3; Q949.71<sup>+</sup>8.43 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2015)03-0032-09  
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.03.05

**Analyses on diversity and plant-growth-promoting ability of endophytic and rhizosphere bacteria of *Dendrobium moniliforme*** ZHANG Li, TONG Wenjun, XUE Qingyun, DING Xiaoyu<sup>①</sup> (College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2015, 24(3): 32-40

**Abstract:** Endophytic bacteria from root, stem and leaf of *Dendrobium moniliforme* (Linn.) Sw. collected from Yingshan County of Hubei Province, endophytic bacteria from rhizosphere moss and rhizosphere bacteria from rhizosphere soil of this species were separated, and these bacterium strains were identified and their diversity were analyzed by means of a combination method of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and UPGMA cluster analysis. On these bases, abilities of solubilizing phosphorus, solubilizing potassium, producing auxin and siderophore of these bacterium strains were detected by plate detection technology. The results show that 75 bacterium strains are obtained from root and stem of *D. moniliforme* and its rhizosphere moss and soil, endophytic bacterium is not isolated from leaf of *D. moniliforme*. In which, endophytic bacteria from root and stem are 14 and 7 strains, respectively, those from rhizosphere moss are less only with 14 strains, bacterium strains from rhizosphere soil are the most with 40 strains. 75 strains are divided into 33 ARDRA clusters, by 16S rDNA sequencing and alignment, they are belonging to genera of *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Pandora*, *Microbacterium*, *Lysinibacillus* and *Pantoea*, in which, *Bacillus* and *Pseudomonas* are the dominant genera. In 75 strains of endophytic and rhizosphere bacteria, 22 strains possess double abilities of solubilizing inorganic and organic phosphorus, 25 strains do solubilizing potassium ability, 64

收稿日期: 2015-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(311703000)

作者简介: 张 礼(1988—), 女, 江苏连云港人, 硕士研究生, 主要从事植物内生菌方面的研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: dingxynj@263.net

strains do producing auxin ability and 39 strains do producing siderophore ability, in which, 9 strains possess all abilities of solubilizing phosphorus and potassium, producing auxin and siderophore. On the whole, endophytic and rhizosphere bacteria of *D. moniliforme* are quantity with high diversity, in which, 9 strains with all of four plant-growth-promoting abilities can be used as candidate strains for promoting growth of *D. moniliforme*.

**Key words:** *Dendrobium moniliforme* (Linn.) Sw.; endophytic bacterium; rhizosphere bacterium; ARDRA analysis; diversity; plant-growth-promoting ability

细茎石斛 [*Dendrobium moniliforme* (Linn.) Sw.] 属石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 多年生附生草本植物,为传统名贵中药材,具有滋阴清热、生津益胃、止咳润肺等功效<sup>[1]</sup>。由于细茎石斛种子自然萌发困难,加之人们长期、无节制的采挖,其野生资源日渐枯竭<sup>[2]</sup>。

石斛属植物与其内生菌间存在复杂的微生态关系<sup>[3]</sup>,内生真菌可为石斛属植物提供营养源,因此,相关研究者除对石斛属植物可培养内生真菌进行分离鉴定外<sup>[4-5]</sup>,还对其内生细菌与寄主植物的相关性进行了较多研究。已有研究表明:从杓唇石斛 [*D. moschatum* (Buch. -Ham.) Sw.] 根部分离出的鞘氨醇菌属 (*Sphingomonas*) 和分枝菌属 (*Mycobacterium*) 细菌均能够明显提高杓唇石斛的种子萌发率<sup>[6]</sup>;俞婕等<sup>[7]</sup>将铁皮石斛 (*D. officinale* Kimura et Migo) 组培苗接种其内生细菌 ZJSH1 后,组培苗的株高、根粗和叶片大小等均优于对照;分离自双色石斛 (*D. chrysopterum* Schuit. et de Vogel) 叶片的 2 株芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 菌株可以有效防治由镰刀菌属 (*Fusarium*) 细菌引起的双色石斛叶斑病<sup>[8]</sup>;童文君等<sup>[9]</sup>从美花石斛 (*D. loddigesii* Rolfe) 体内分离出具有解磷、解钾及产生生长素能力的内生细菌,且部分菌株对美花石斛试管苗生长有促进作用。由此可见,细菌在石斛属植物的生长过程中具有重要作用,因此,开展对石斛属植物内生和根围细菌的研究具有十分重要的意义。

然而,目前鲜见关于细茎石斛内生及根围细菌的研究报道。欲明确细茎石斛内生和根围细菌对其生长的影响,首先要明确其内生和根围细菌的多样性。鉴于此,作者对细茎石斛的内生和根围细菌(包括根围苔藓内生细菌和根围土壤细菌)分别进行分离和纯化,采用扩增核糖体 DNA 限制性酶切分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)法对分离的菌株进行多样性分析,并对所有分离菌株的解磷、解钾、产生生长素和嗜铁素能力进行检测,以期初步揭示细茎石斛内生和根围细菌的相互关系及促生潜力,为筛选对细茎石斛有益的促生细菌、提高细茎石斛的

药材产量和药用活性成分含量提供研究依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

于 2012 年 6 月,在湖北省英山县细茎石斛种植园内随机采集 3 份样品,分别置于密封袋中保存、备用。每份样品包括 5 株细茎石斛(分成根、茎、叶 3 部分)及附生的根围苔藓和紧附于根系表面的根围土壤。

### 1.2 方法

1.2.1 细菌的分离和保存 取细茎石斛的根、茎和叶及其根围苔藓样品,每份 2 g,先后用体积分数 70% 乙醇和质量体积分数 0.1% HgCl<sub>2</sub> 对样品进行表面消毒<sup>[10]</sup>;将消毒后的样品分别放入灭菌研钵中,加入 9 倍样品质量的灭菌生理盐水(质量体积分数 0.85% NaCl 溶液),充分研碎;取 0.1 mL 研磨液涂于 NA 培养基平板<sup>[11]</sup>上,置于 28 °C 恒温箱中暗培养 1~3 d,挑选形态特征不同的菌落分别进行纯化。

用软毛刷轻轻刷下附着于细茎石斛根系表面的根围土壤,每份土样取 3 g,分别置于灭菌离心管中,加入 27 mL 灭菌生理盐水(质量体积分数 0.85% NaCl 溶液),涡旋混匀 3~5 min 后置于 200 r·min<sup>-1</sup> 摇床上室温振荡 30 min;对振荡后的菌液进行梯度稀释,取 0.1 mL 10<sup>-4</sup> 稀释菌液涂于 NA 培养基平板上,置于 28 °C 恒温箱中暗培养 1~3 d,挑选形态特征不同的菌落分别进行纯化。

纯化的细菌均分为 2 份,一份在常温下用无菌水保存,另一份在 -80 °C 条件下用体积分数 40% 甘油保存。

1.2.2 ARDRA 分析 细菌基因组 DNA 提取、细菌 16S rRNA 片段扩增以及 ARDRA 分析方法与童文君等<sup>[9]</sup>的方法一致,扩增片段经质量体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后用于 ARDRA 分析。

利用 GelCompar II 软件对 ARDRA 分析的酶切产

物图谱进行聚类分析。基于 Pearson 相关指数的相似性系数 (Pearson correlation indices of similarity)、采用非加权配对算数平均法 (unweighted pair-group method using arithmetic average, UPGMA) 绘制聚类图, 具体参数如下: optimization (0.45%), position tolerance (1.5%), chance towards end of fingerprint (0%), minimum height (0%), minimum surface (0%), uncertain bands (ignore)。以 80.0% 相似度为基准进行聚类分析; 从菌株活化到酶切, 对 5 个菌株进行重复, 菌株间的相似性均大于 80.0% 则聚为一簇。

选取各 ARDRA 簇的代表菌株进行 16S rDNA 测序, 将所得序列与 NCBI 数据库中的核苷酸序列进行 BLAST 比对; 选取同源性高的菌株, 运用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

1.2.3 细菌的促生潜力分析 将所有分离出的细菌菌株分别用 NA 培养基进行活化<sup>[9]</sup>。挑取单菌落到含 1 mL NA 液体培养基的 Eppendorf 管中, 28 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养至对数生长期 (18~24 h), 备用。

1.2.3.1 解磷能力分析 取 10 μL 待测菌液, 分别滴到含有机磷和无机磷的培养基<sup>[12]</sup> 平板上, 28 °C 恒温暗培养 72 h。观察 2 种培养基平板上有无透明菌圈并测量透明菌圈的半径, 能够形成透明菌圈的菌株具有解磷能力, 无透明菌圈的菌株则无解磷能力。每个菌株重复检测 3 次。

1.2.3.2 解钾能力分析 用以钾长石粉为惟一钾源的硅酸盐培养基进行细菌解钾能力检测<sup>[13]</sup>。取 10 μL 待测菌液, 滴到含钾长石粉的培养基平板上, 28 °C 恒温暗培养 10 d。观察平板上有无透明光滑油滴, 有透明油滴状菌落记为“+”, 无透明油滴状菌落记为“-”; 能够形成透明油滴状菌落的菌株具有解钾能力, 反之则无解钾能力。每个菌株重复检测 3 次。

1.2.3.3 产生长素能力分析 将待测细菌接种到含有 200 mg·L<sup>-1</sup> L-色氨酸的 LB 液体培养基中, 28 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 24 h, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min; 取 1 mL 上清液, 加入 2 mL Salkowski 比色液<sup>[14]</sup>, 混匀后室温下避光静置 30 min, 观察溶液颜色变化, 溶液呈粉红色表明该菌株能够产生生长素。每个菌株重复检测 3 次。

对具有产生长素能力的菌株进行定量检测。首先测定菌悬液的 OD<sub>600</sub> 值, 用含有 200 mg·L<sup>-1</sup> L-色氨酸的 LB 液体培养基将所有菌悬液浓度调节一致; 28 °C、10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min; 取上清液, 分别加

入上清液 2 倍体积的 Salkowski 比色液, 混匀后室温下避光静置 30 min, 测定溶液的 OD<sub>530</sub> 值<sup>[15-16]</sup>, 各菌株均重复检测 3 次。根据 Mishra 等<sup>[17]</sup> 的方法绘制各菌株生长素产量的标准曲线, 并采用 EXCEL 2007 软件计算各菌株的生长素产量。

1.2.3.4 产嗜铁素能力分析 参照文献<sup>[18]</sup> 配制能够检测嗜铁素的 WA 培养基; 取 10 μL 待测菌液, 滴加到培养基平板上, 28 °C 恒温暗培养 3 d。观察菌落颜色变化, 具橘黄色晕圈说明该菌株具有产嗜铁素的能力, 并测量晕圈半径。每个菌株重复检测 3 次。

## 2 结果和分析

### 2.1 细茎石斛内生和根围细菌的分布特征

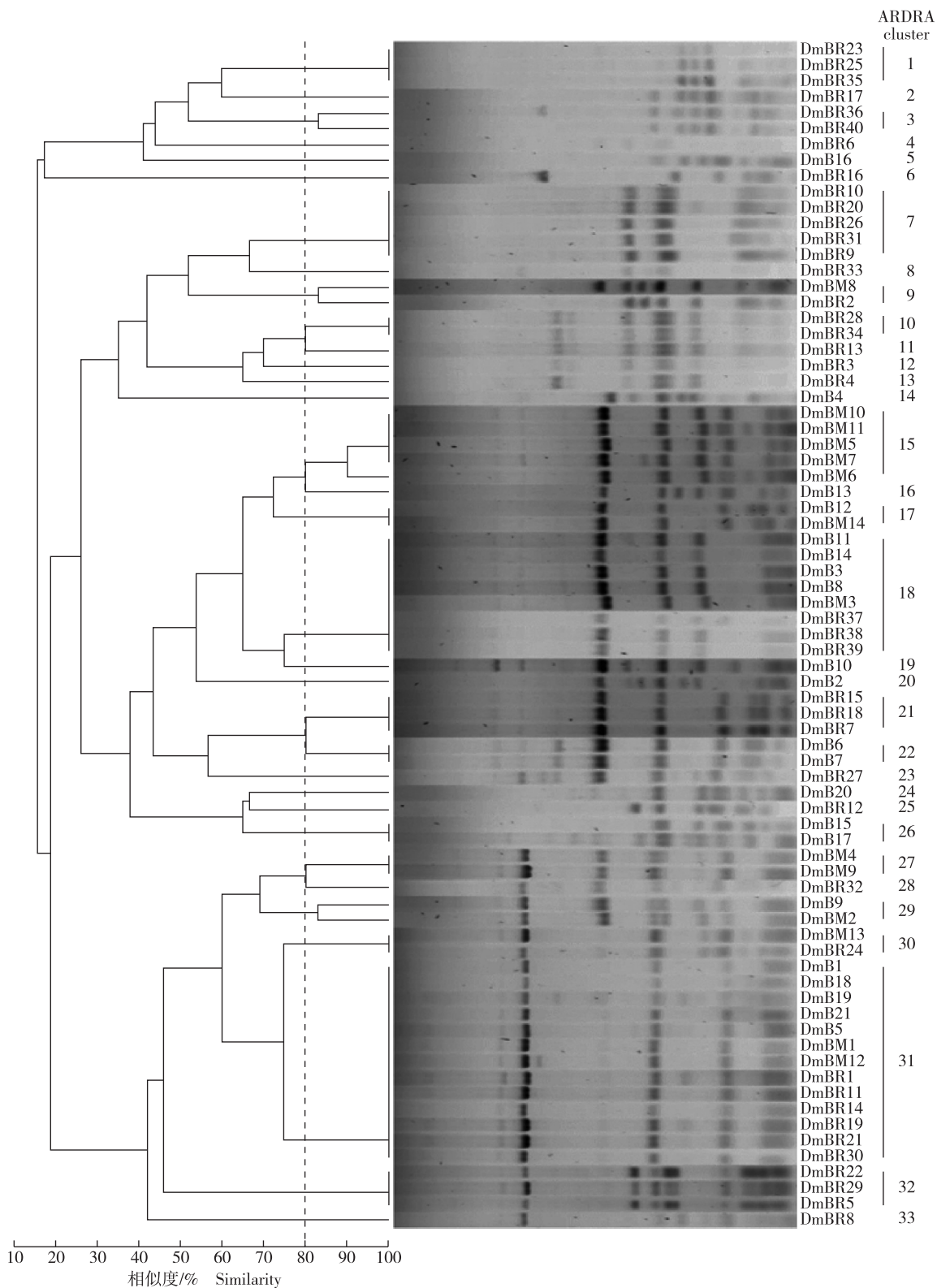
依据菌落形态的差异, 共分离获得细茎石斛内生细菌和根围细菌 75 株。其中, 源自细茎石斛植株的内生细菌 21 株, 编号为 DmB1 至 DmB21, 包括源自根中的菌株 14 株和源自茎中的菌株 7 株, 从叶中没有获得内生细菌; 源自根围苔藓的内生细菌 14 株, 编号为 DmBM1 至 DmBM14, 数量偏少; 源自根围土壤的菌株数量最多, 共 40 株, 编号为 DmBR1 至 DmBR40。

### 2.2 细茎石斛内生和根围细菌的多样性分析

对 75 株细茎石斛内生和根围细菌的 ARDRA 分析结果以及基于 ARDRA 分析结果的 UPGMA 聚类分析结果见图 1。由图 1 可见: 75 株细菌菌株共形成 37 种 ARDRA 谱型, 根据 80% 的相似性划分, 75 株细菌菌株被分为 33 个 ARDRA 簇, 多样性较高。有 17 个 ARDRA 簇只包含 1 株细菌菌株, 其他 16 个 ARDRA 簇则包含 2 株及 2 株以上的细菌菌株。其中, 最大的 ARDRA 簇 (第 31 簇) 包含 13 株细菌菌株, 其中 2 株分离自细茎石斛的根, 3 株分离自细茎石斛的茎, 6 株分离自根围土壤, 2 株分离自根围苔藓。

由图 1 还可见: 细茎石斛根部内生细菌分属于 9 个 ARDRA 簇, 茎部内生细菌分属于 4 个 ARDRA 簇, 根围土壤细菌分属于 21 个 ARDRA 簇, 根围苔藓内生细菌则分属于 8 个 ARDRA 簇。

从 33 个 ARDRA 簇中分别随机选出 1 株细菌, 对其 16S rRNA 基因片段 (长度约 1 500 bp) 进行测序, 将测序结果登录到 GenBank 数据库中, 登录号分别为 KF720904 至 KF720936。应用 MEGA 5.0 软件对这些序列及 GenBank 数据库中与其相似性在 99% 以上的序列进行序列比对并构建系统发育树, 结果见图 2。

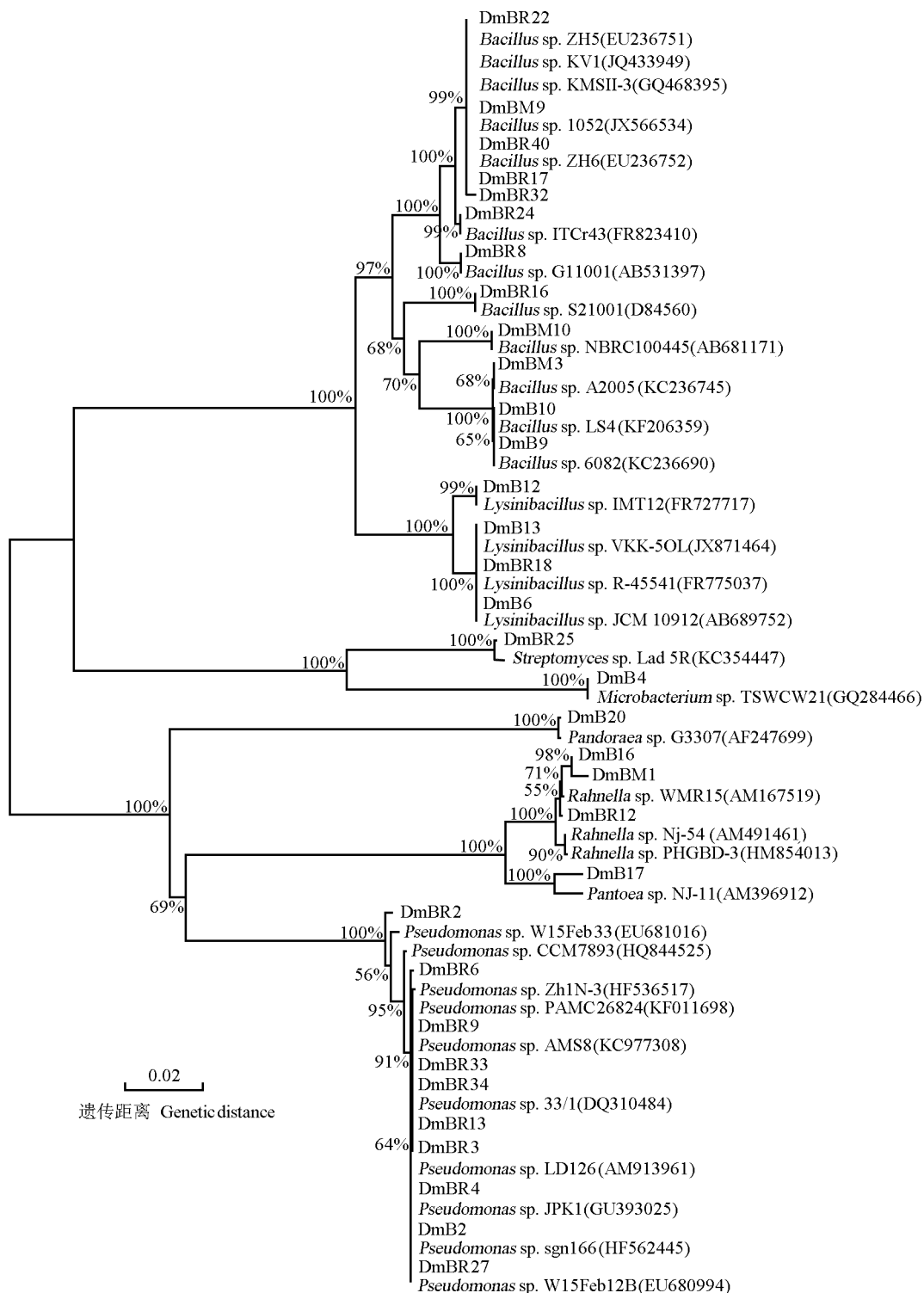


DmB: 分离自细茎石斛的内生菌株 Endophytic bacterium strains isolated from *Dendrobium moniliforme*; DmBR: 分离自根围土壤的菌株 Strains isolated from rhizosphere soil; DmBM: 分离自根围苔藓的内生菌株 Endophytic bacterium strains isolated from rhizosphere moss.

图 1 细茎石斛 75 株内生和根围细菌的 ARDRA 及聚类分析结果

Fig. 1 Results of ARDRA and cluster analyses on 75 strains of endophytic and rhizosphere bacteria of *Dendrobium moniliforme* (Linn.) Sw.





分支上的数值代表 1 000 次重复抽样检测的自展支持率 Datums on the branches indicate the bootstrap value of 1 000 replications. 所有具有登录号的序列均引自 GenBank, 括号内为登录号 All of sequences with accession Nos. are induced from GenBank, and the accession Nos. are in brackets. DmB: 分离自细茎石斛的内生菌株 Endophytic bacterium strains isolated from *Dendrobium moniliforme*; DmBR: 分离自根围土壤的菌株 Strains isolated from rhizosphere soil; DmBM: 分离自根围苔藓的内生菌株 Endophytic bacterium strains being isolated from rhizosphere moss.

图 2 基于 16S rDNA 序列构建的细茎石斛内生和根围细菌与相似细菌的 NJ 系统发育树  
 Fig. 2 NJ phylogenetic tree of endophytic and rhizosphere bacteria of *Dendrobium moniliforme* (Linn.) Sw. and similar bacteria based on 16S rDNA sequence

从系统发育树可见:分离出的细茎石斛内生和根围细菌隶属于8个属,分别为链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、拉恩氏菌属(*Rahnella*)、潘多拉菌属(*Pandoraea*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)和泛菌属(*Pantoea*)。其中,芽孢杆菌属(29株)和假单胞菌属(16株)为细茎石斛内生和根围细菌的优势属,并且前者均存在于细茎石斛根和茎内以及根围苔藓体内和根围土壤中,后者仅存在于细茎石斛根内和根围土壤中。此外,微杆菌属(1株)仅分布于细茎石

斛根中;泛菌属(2株)仅分布于细茎石斛茎内;拉恩氏菌属(15株)在细茎石斛的茎和根内以及根围苔藓体内和根围土壤中均有分布;链霉菌属(3株)仅分布于细茎石斛的根围土壤中;潘多拉菌属(1株)分布于细茎石斛茎内;赖氨酸芽孢杆菌属(8株)分布于细茎石斛根内以及根围苔藓体内和根围土壤中。

### 2.3 细茎石斛内生和根围细菌的促生能力分析

对分离自细茎石斛根和茎的内生细菌以及分离自根围土壤和根围苔藓的细菌进行促生能力测定,结果见表1。

表1 细茎石斛内生和根围细菌33个ARDRA簇各菌株促生能力分析( $\bar{X} \pm SE$ )

Table 1 Analyses on plant-growth-promoting ability of all strains of 33 ARDRA clusters of endophytic and rhizosphere bacteria of *Dendrobium moniliforme* (Linn.) Sw. ( $\bar{X} \pm SE$ )

菌株 <sup>1)</sup> Strain <sup>1)</sup>	来源 Source	簇号 Cluster No.	菌圈半径/cm <sup>2)</sup> Radius of bacterium ring <sup>2)</sup>		解钾能力 <sup>3)</sup> Ability of solubilizing potassium <sup>3)</sup>	生长素 产量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Production of auxin	晕圈半径/cm <sup>4)</sup> Radius of aureola <sup>4)</sup>
			NPA	OPA			
DmBM1	苔藓 Moss	31	0.00±0.00	2.67±0.58	-	63.02±0.58	0.00±0.00
DmBM2	苔藓 Moss	29	0.00±0.00	3.00±1.00	+	70.80±3.00	0.00±0.00
DmBM3	苔藓 Moss	18	2.33±0.58	0.00±0.00	+	84.09±2.78	5.00±0.00
DmBM4	苔藓 Moss	27	2.12±0.58	8.30±1.15	+	91.78±3.12	6.33±1.00
DmBM5	苔藓 Moss	15	0.00±0.00	0.00±0.00	-	0.00±0.00	4.33±0.58
DmBM6	苔藓 Moss	15	0.00±0.00	1.67±0.58	-	70.58±2.35	7.00±0.00
DmBM7	苔藓 Moss	15	0.00±0.00	2.00±1.00	-	0.00±0.00	0.00±0.00
DmBM8	苔藓 Moss	9	0.00±0.00	1.00±0.00	+	70.30±3.38	0.00±0.00
DmBM9	苔藓 Moss	27	0.00±0.00	8.67±2.08	-	0.00±0.00	0.00±0.00
DmBM10	苔藓 Moss	15	1.67±0.58	1.00±0.00	+	81.38±2.76	4.33±0.58
DmBM11	苔藓 Moss	15	0.00±0.00	0.00±0.00	-	84.09±4.58	0.00±0.00
DmBM12	苔藓 Moss	31	0.00±0.00	9.00±2.00	-	0.00±0.00	0.00±0.00
DmBM13	苔藓 Moss	30	2.00±0.00	10.67±0.58	-	70.22±1.15	6.00±0.00
DmBM14	苔藓 Moss	17	2.00±0.00	6.00±0.00	-	49.87±2.36	4.00±0.00
DmBR1	土壤 Soil	31	0.00±0.00	0.00±0.00	+	77.56±4.13	5.00±0.00
DmBR2	土壤 Soil	9	0.00±0.00	0.00±0.00	-	0.00±0.00	3.00±0.00
DmBR3	土壤 Soil	12	2.00±0.00	4.67±1.15	+	49.64±4.01	6.00±0.00
DmBR4	土壤 Soil	13	2.33±0.58	7.00±0.00	-	42.22±3.06	6.00±0.00
DmBR5	土壤 Soil	32	1.00±0.00	0.00±0.00	-	77.91±1.59	0.00±0.00
DmBR6	土壤 Soil	4	2.00±0.00	7.00±0.00	-	105.51±2.64	2.00±0.00
DmBR7	土壤 Soil	21	0.00±0.00	0.00±0.00	-	84.76±3.36	0.00±0.00
DmBR8	土壤 Soil	33	2.67±1.53	5.00±0.00	+	42.53±4.09	0.00±0.00
DmBR9	土壤 Soil	7	2.00±0.00	6.00±0.00	+	77.16±1.95	4.00±0.00
DmBR10	土壤 Soil	7	3.33±1.53	6.33±0.58	+	42.89±3.37	3.00±0.00
DmBR11	土壤 Soil	31	0.00±0.00	0.00±0.00	-	0.00±0.00	0.00±0.00
DmBR12	土壤 Soil	25	0.00±0.00	0.00±0.00	-	112.27±2.01	2.00±0.00
DmBR13	土壤 Soil	11	2.67±1.15	4.33±3.79	-	105.11±3.77	3.00±0.00
DmBR14	土壤 Soil	31	3.00±1.00	2.00±3.46	+	77.56±4.08	0.00±0.00
DmBR15	土壤 Soil	21	4.00±1.73	0.33±0.58	+	105.33±3.46	4.00±0.00
DmBR16	土壤 Soil	6	6.33±0.58	2.00±3.46	+	84.00±3.79	3.00±0.00
DmBR17	土壤 Soil	2	5.33±0.58	0.00±0.00	-	105.33±2.17	4.00±0.00
DmBR18	土壤 Soil	21	0.00±0.00	0.00±0.00	+	119.20±4.19	2.00±0.00
DmBR19	土壤 Soil	31	3.67±1.53	0.00±0.00	-	70.09±2.88	0.00±0.00
DmBR20	土壤 Soil	7	4.33±3.06	0.00±0.00	+	91.38±1.99	5.00±0.00

续表1 Table 1 (Continued)

菌株 <sup>1)</sup> Strain <sup>1)</sup>	来源 Source	簇号 Cluster No.	菌圈半径/cm <sup>2)</sup> Radius of bacterium ring <sup>2)</sup>		解钾能力 <sup>3)</sup> Ability of solubilizing potassium <sup>3)</sup>	生长素 产量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Production of auxin	晕圈半径/cm <sup>4)</sup> Radius of aureola <sup>4)</sup>
			NPA	OPA			
DmBR21	土壤 Soil	31	3.00±1.00	0.00±0.00	+	0.00±0.00	5.00±0.00
DmBR22	土壤 Soil	32	4.67±2.08	0.00±0.00	-	56.13±3.92	2.00±0.00
DmBR23	土壤 Soil	1	3.67±2.08	0.00±0.00	-	0.00±0.00	4.00±0.00
DmBR24	土壤 Soil	30	0.00±0.00	0.00±0.00	+	105.73±4.86	3.00±0.00
DmBR25	土壤 Soil	1	3.67±2.08	7.67±2.08	+	105.16±3.55	5.00±0.00
DmBR26	土壤 Soil	7	4.00±1.73	10.00±1.00	-	98.76±2.11	4.00±0.00
DmBR27	土壤 Soil	23	4.00±1.73	7.67±1.15	-	98.13±3.15	4.00±0.00
DmBR28	土壤 Soil	10	3.67±2.89	10.33±0.58	+	105.47±2.33	4.00±0.00
DmBR29	土壤 Soil	32	0.00±0.00	0.00±0.00	+	112.58±3.47	3.00±0.00
DmBR30	土壤 Soil	31	0.00±0.00	0.00±0.00	-	98.71±2.55	0.00±0.00
DmBR31	土壤 Soil	7	2.33±0.58	0.00±0.00	+	84.71±1.13	5.66±1.53
DmBR32	土壤 Soil	28	2.00±1.00	0.00±0.00	+	126.00±4.39	0.00±0.00
DmBR33	土壤 Soil	8	2.67±0.58	0.00±0.00	-	119.07±3.38	4.00±0.00
DmBR34	土壤 Soil	10	2.33±0.58	0.00±0.00	-	105.64±2.90	4.00±0.00
DmBR35	土壤 Soil	1	2.00±1.00	0.00±0.00	-	77.60±2.98	4.00±0.00
DmBR36	土壤 Soil	3	2.00±1.00	0.00±0.00	+	126.27±1.98	0.00±0.00
DmBR37	土壤 Soil	18	2.00±0.00	5.00±2.00	-	84.58±3.78	3.00±0.00
DmBR38	土壤 Soil	18	1.33±0.58	3.33±1.53	-	63.42±1.55	0.00±0.00
DmBR39	土壤 Soil	18	0.00±0.00	7.33±1.15	-	161.69±2.56	0.00±0.00
DmBR40	土壤 Soil	3	2.33±0.58	5.00±2.00	-	112.40±1.53	5.00±0.00
DmB1	根 Root	31	0.00±0.00	2.33±0.58	-	91.33±2.33	1.00±0.00
DmB2	根 Root	20	0.00±0.00	0.00±0.00	-	0.00±0.00	0.00±0.00
DmB3	根 Root	18	0.00±0.00	0.00±0.00	-	119.24±4.98	0.00±0.00
DmB4	根 Root	14	0.00±0.00	0.00±0.00	-	175.47±3.28	0.00±0.00
DmB5	根 Root	31	0.00±0.00	0.00±0.00	-	77.42±2.03	0.00±0.00
DmB6	根 Root	22	0.00±0.00	0.00±0.00	-	136.00±1.63	0.00±0.00
DmB7	根 Root	22	0.00±0.00	0.00±0.00	-	147.33±2.39	0.00±0.00
DmB8	根 Root	18	0.00±0.00	0.00±0.00	+	77.73±1.83	0.00±0.00
DmB9	根 Root	29	0.00±0.00	0.00±0.00	-	70.22±2.76	1.33±0.16
DmB10	根 Root	19	0.00±0.00	0.00±0.00	-	184.04±1.97	0.00±0.00
DmB11	根 Root	18	0.00±0.00	0.00±0.00	-	175.64±3.81	0.00±0.00
DmB12	根 Root	17	0.00±0.00	0.00±0.00	-	168.58±3.02	0.00±0.00
DmB13	根 Root	16	0.00±0.00	0.00±0.00	-	287.47±2.67	0.00±0.00
DmB14	根 Root	18	0.00±0.00	10.00±0.00	-	273.02±3.99	0.00±0.00
DmB15	茎 Stem	26	0.00±0.00	7.33±0.58	-	210.24±1.93	5.00±0.00
DmB16	茎 Stem	5	0.00±0.00	1.00±1.00	+	231.51±3.88	0.00±0.00
DmB17	茎 Stem	26	3.00±1.00	8.67±1.15	-	136.42±2.22	0.00±0.00
DmB18	茎 Stem	31	3.00±1.00	0.00±0.00	-	112.71±3.35	0.00±0.00
DmB19	茎 Stem	31	0.00±0.00	0.00±0.00	-	0.00±0.00	0.00±0.00
DmB20	茎 Stem	24	3.67±1.53	0.00±0.00	-	280.04±3.44	0.00±0.00
DmB21	茎 Stem	31	1.00±1.73	0.00±0.00	-	0.00±0.00	0.00±0.00

<sup>1)</sup> DmB: 分离自细茎石斛的内生菌株 Endophytic bacterium strains isolated from *Dendrobium moniliforme*; DmBR: 分离自根围土壤的菌株 Strains isolated from rhizosphere soil; DmBM: 分离自根围苔藓的内生菌株 Endophytic bacterium strains isolated from rhizosphere moss.

<sup>2)</sup> 用不同培养基上的菌圈半径表示解磷能力 Ability of solubilizing phosphorus is showed by radius of bacterium ring on different media; NPA: 无机磷培养基 Inorganic phosphorus medium; OPA: 有机磷培养基 Organic phosphorus medium.

<sup>3)</sup> +: 具有解钾能力 With ability of solubilizing potassium; -: 无解钾能力 Without ability of solubilizing potassium.

<sup>4)</sup> 用培养基上的晕圈半径表示产嗜铁素能力 Ability of producing siderophore are showed by radius of aureola on medium.

2.3.1 解磷能力分析 测定结果(表1)显示;在分离获得的75株细菌菌株中,有34株细菌(包括细茎

石斛内生细菌5株、根围苔藓内生细菌11株、根围土壤细菌18株)能够在有机磷(OPA)培养基平板上产

生透明菌圈,菌圈半径为0.33~10.67 cm,说明这些菌株具有分解有机磷的能力;有39株细菌(包括细茎石斛内生细菌4株、根围苔藓内生细菌5株、根围土壤细菌30株)能够在无机磷(NPA)培养基平板上产生透明菌圈,菌圈半径为1.00~6.33 cm,说明这些菌株具有分解无机磷的能力。统计结果显示,在OPA和NPA培养基平板上都能够产生透明菌圈的菌株共有22株,其中21株分离自根围土壤和根围苔藓,且这22株菌株以假单胞菌属和芽孢杆菌属为优势菌,分别为9和8株。

2.3.2 解钾能力分析 在分离获得的75株细菌菌株中,有25株菌株能够在以钾长石为惟一钾源的硅酸盐培养基上形成油滴状菌落,说明这些菌株具有解钾能力(见表1)。其中,23株菌株分离自根围苔藓和根围土壤,且这25株菌株以芽孢杆菌属和假单胞菌属为优势菌,分别有11和7株。

2.3.3 产生生长素能力分析 在分离获得的75株细菌菌株中,有64株菌株能够产生生长素,生长素产量为42.22~287.47  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (见表1)。其中,生长素产量高于100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌株有30株,包括细茎石斛内生细菌14株和根围土壤细菌16株。分离自细茎石斛根部的芽孢杆菌属菌株DmB13的产生生长素能力最强,生长素产量达到287.47  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.4 产嗜铁素能力分析 在分离获得的75株细菌菌株中,有39株菌株能够在WA培养基平板上产生橘黄色晕圈,晕圈半径为1.00~7.00 cm(见表1)。其中,36株菌株分离自根围苔藓和根围土壤,且这39株菌株以芽孢杆菌属和假单胞菌属为优势菌,各为14株;产嗜铁素能力最强的菌株为分离自根围苔藓内的芽孢杆菌属菌株DmBM13。

2.3.5 促生能力综合分析 综合分析结果表明:在分离获得的75株细菌菌株中,有9株菌株兼具解磷、解钾、产生生长素和嗜铁素的能力,包括假单胞菌属菌株4株、芽孢杆菌属菌株3株、赖氨酸芽孢杆菌属菌株1株和链霉菌属菌株1株,这些菌株主要分离自细茎石斛的根围土壤(7株)和根围苔藓(2株)。

### 3 讨论和结论

ARDRA法是通过采用合适的限制性内切酶对细菌的核糖体DNA片段进行酶切分析以研究细菌多样性并在属甚至种水平对菌株进行分类鉴定的研究方

法<sup>[19]</sup>,可单独与其他分子标记联合用于细菌系统发生学和分类学研究<sup>[20-21]</sup>。将ARDRA用于分析细茎石斛内生和根围细菌的多样性较16S rDNA序列测序更方便、快捷,并且成本较低。

本研究中,最大的2个ARDRA簇(第31簇和第18簇)均包含细茎石斛的内生和根围细菌。据此推测细茎石斛的内生和根围细菌之间存在一定的联系,根围细菌可能通过细茎石斛根部的自然孔洞或伤口进入体内,成为其体内细菌的一部分。16S rDNA序列测定结果表明:分离的75株内生和根围细菌菌株隶属于8个属,且芽孢杆菌属菌株在细茎石斛体内及根围生境中均具有明显优势,这一结果与Tsavkelova等<sup>[6,22]</sup>的研究结果一致。此外,细茎石斛的根和茎中均存在特有的细菌种类,如根中的微杆菌属菌株、茎中的泛菌属菌株等,说明这些内生细菌菌株可能具有组织特异性。

在本研究分离出的75株细茎石斛内生和根围细菌菌株中,4株假单胞菌属菌株、3株芽孢杆菌属菌株、1株赖氨酸芽孢杆菌属菌株和1株链霉菌属菌株兼具解磷、解钾、产生生长素和嗜铁素的能力,这9株菌株均具有释放土壤中的磷和钾元素、螯合铁元素及产生生长素的能力,据此认为这些菌株具有促进植物生长的潜能。此外,芽孢杆菌属菌株DmB13虽然不具有解磷、解钾和产嗜铁素的能力,但是其产生生长素的能力最强,因此可将其作为进一步促生实验的候选菌株。通常情况下,植物的生长发育需要各种营养元素,而其内生和根围细菌可通过固氮、溶磷、分泌植物激素(生长素、赤霉素、细胞分裂素和乙烯等)等方式直接影响植物的新陈代谢<sup>[23-24]</sup>。另外,微生物产生的嗜铁素对植物的铁营养调控也具有一定的作用,许多微生物分泌的嗜铁素可作为缺铁植物的铁源<sup>[25]</sup>。因此,将具有良好促生潜力的细菌应用于农业生产,可以在一定程度上替代化肥和农药<sup>[26]</sup>。

综上所述,细茎石斛根和茎的内生细菌、根围苔藓细菌和根围土壤细菌种类均较多(75株)且多样性较丰富(8属),共分成33个ARDRA簇,以芽孢杆菌属和假单胞菌属细菌为主。其中,22株菌株兼具解无机磷和有机磷的能力、25株菌株具有解钾能力、64株菌株具有产生生长素能力、39株菌株具有产嗜铁素能力,共9株菌株兼具解磷、解钾、产生生长素和嗜铁素的能力,因此,可将这些菌株作为促进细茎石斛生长的候选菌株。



## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2005年版(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 62-63.
- [2] 郑伟, 张云伟, 陈龙清. 石斛属植物的菌根研究进展[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(9): 2279-2282.
- [3] 董丹丹, 汪志平. 石斛属植物内生菌的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(3): 550-553.
- [4] CHEN X M, DONG H L, HU K X, et al. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2010, 29: 328-337.
- [5] CHEN J, WANG H, GUO S X. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. Mycorrhiza, 2012, 22: 297-307.
- [6] TSAVKELOVA E A, CHERDYNTSEVA T A, KLIMOVA S Y, et al. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin [J]. Archives of Microbiology, 2007, 188: 655-664.
- [7] 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.
- [8] 程萍, 郑燕玲, 黎永坚, 等. 石斛兰镰刀菌叶斑病的生物防治研究[J]. 中国农学通报, 2008, 24(9): 357-361.
- [9] 童文君, 张礼, 薛庆云, 等. 不同产地美化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.
- [10] GUO L D, HYDE K D, LIEW E C Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences [J]. New Phytologist, 2000, 147: 617-630.
- [11] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 214-215.
- [12] ZHENG Y, XUE Q Y, XU L L, et al. A screening strategy of fungal biocontrol agents towards *Verticillium wilt* of cotton [J]. Biological Control, 2011, 56: 209-216.
- [13] 杨柳, 唐旺全, 蒋艳, 等. 解钾芽孢杆菌的分离、鉴定及其代谢产物分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(28): 17265-17267.
- [14] LIBBERT E, RISCH H. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism: V. Isolation and identification of the IAA-producing and destroying bacteria from pea plants [J]. Physiologia Plantarum, 1969, 22: 51-58.
- [15] GLICKMANN E, DESSAUX Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 793-796.
- [16] 刘琳, 孙磊, 张瑞英, 等. 春兰根中可分泌吲哚乙酸的内生细菌多样性[J]. 生物多样性, 2010, 18(2): 182-187.
- [17] MISHRA A, CHAUHAN P S, CHAUDHRY V, et al. Rhizosphere competent *Pantoea agglomerans* enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, without altering the rhizosphere functional diversity [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 100: 405-413.
- [18] SHIN S H, YONG L, LEE S E, et al. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44: 89-95.
- [19] LOUWS F J, RADEMAKER J L W, De BRUIJN F J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phylobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis [J]. Annual Review of Phytopathology, 1999, 37: 81-125.
- [20] PONNUSAMY K, JOSE S, SAVARIMUTHU I, et al. Genetic diversity study of *Chromobacterium violaceum* isolated from Kolli hills by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53: 341-349.
- [21] DUNBAR J, WHITE S, FORNEY L. Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 1326-1331.
- [22] TSAVKELOVA E A, CHERDYNTSEVA T A, NETRUSOV A I. Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids [J]. Microbiology, 2004, 73: 710-715.
- [23] GAIERO J R, MCCALL C A, THOMPSON K A, et al. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion [J]. American Journal of Botany, 2013, 100: 1738-1750.
- [24] WEYENS N, VAN DER LELIE D, TAGHAVI S, et al. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27: 591-598.
- [25] 金崇伟, 俞雪辉, 郑绍建. 微生物在植物铁营养中的潜在作用 [J]. 植物营养与肥料学报, 2005, 11(5): 688-695.
- [26] BHATTACHARYYA P N, JHA D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28: 1327-1350.

(责任编辑: 佟金凤)