

不同产地美花石斛内生细菌分离及促生潜力比较

童文君, 张 礼, 薛庆云, 侯北伟, 丁小余^①

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 对采自广西、云南和广东的美花石斛 (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) 野生植株根、茎和叶内的内生细菌进行分离并测定其促生特性, 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内生细菌菌株进行分类并确定优势属; 在此基础上, 对具有解磷、解钾和产生生长素能力的菌株进行促生潜力评价。结果显示: 从不同产地美花石斛植株不同部位共分离得到 67 株内生细菌菌株, 其分布呈现出组织与地区的特异性; 其中, 来源于广西的植株中菌株数量最多 (42 株), 分离自茎的菌株数量最多 (34 株)。67 株内生细菌菌株可分为 31 个 ARDRA 簇, 经 16S rDNA 序列比对鉴定为 12 个属, 包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*)、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、涅斯捷连科氏菌属 (*Nesterenkonia*)、副球菌属 (*Paracoccus*)、泛菌属 (*Pantoea*) 和沙雷氏菌属 (*Serratia*), 其中芽孢杆菌属、微杆菌属和肠杆菌属为优势属; 来源于广西的植株中内生细菌的丰度与多样性均高于其他两地。在 67 株内生细菌菌株中, 有 30 株菌株具有解无机磷和解有机磷的双重能力、22 株具有解钾能力、24 株具有产生生长素能力, 其中仅 8 株菌株兼具 3 种促生能力。组培实验结果显示: 在培养基中接种 1×10^6 CFU $\cdot$ mL⁻¹ 芽孢杆菌 DLB20 菌株, 对株高 2 ~ 3 cm 和 3 ~ 4 cm 的美花石斛试管苗生长有促进作用, 且更有利于株高 3 ~ 4 cm 试管苗的生根, 表明具有解磷、解钾和产生生长素能力的菌株对美花石斛试管苗有一定的促生潜力。

关键词: 美花石斛; 内生细菌; 优势属; ARDRA; 聚类分析; 促生潜力

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(2014)01-0016-08
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2014.01.03

Isolation of endophytic bacteria in *Dendrobium loddigesii* collected from different locations and comparison on their plant-growth-promoting potential TONG Wenjun, ZHANG Li, XUE Qingyun, HOU Beiwei, DING Xiaoyu^① (College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2014, 23(1): 16-23

Abstract: The endophytic bacteria in root, stem and leaf of *Dendrobium loddigesii* Rolfe collected from Guangxi, Yunnan and Guangdong were isolated and their plant-growth-promoting activity was determined, and these endophytic bacterium strains were classified and their dominant genera were defined by means of a combination method of ARDRA and UPGMA. On these bases, plant-growth-promoting potential of bacterium strains with activities of solubilizing phosphorus, solubilizing potassium and producing IAA was also evaluated. Results show that 67 endophytic bacterium strains are obtained from different parts of *D. loddigesii* collected from different locations, and their distribution characteristics show a specificity of region and tissue. In which, number of endophytic bacterium strains in plants collected from Guangxi is the most (42 strains) and that isolated from stem is the most (34 strains). 67 endophytic bacterium strains are divided into 31 ARDRA clusters, which are identified into 12 genera including *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Psychrobacter*, *Brevundimonas*, *Nesterenkonia*, *Paracoccus*, *Pantoea* and *Serratia* by ways of 16S rDNA sequence alignment and the dominant genera are *Bacillus*, *Microbacterium* and *Enterobacter*. And

收稿日期: 2013-10-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31170300)

作者简介: 童文君 (1990—), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要从事美花石斛内生菌研究。

^①通信作者 E-mail: dingxynj@263.net

abundance and diversity of endophytic bacteria in plants collected from Guangxi are higher than those from other two locations. In 67 endophytic bacterium strains, 30 strains possess double activities of solubilizing inorganic and organic phosphorus, 22 strains do the solubilizing potassium activity and 24 strains do the producing IAA activity, in which, only 8 strains possess all of three plant-growth-promoting activities. Result of tissue culture experiment shows that 1×10^6 CFU $\cdot$ mL⁻¹ DLB20 strain of *Bacillus* is inoculated on the medium, which can promote growth of *D. loddigesii* plantlets with height of 2–3 cm and 3–4 cm, and is beneficial to rooting of plantlets with height of 3–4 cm, meaning that the strains with activities of solubilizing phosphorus, solubilizing potassium and producing IAA possess the plant-growth-promoting potential to *D. loddigesii* plantlets.

Key words: *Dendrobium loddigesii* Rolfe; endophytic bacterium; dominant genus; ARDRA; cluster analysis; plant-growth-promoting potential

在植物的健康组织或器官内存在大量微生物,在不引起植物病变的同时这些微生物能与植物建立良好的相互合作关系, Petirini 将这种在其生活史中某个阶段或全部阶段不会引起植物组织或器官明显变化的细菌称为植物内生细菌(endophyte bacteria)^[1]。兰科(Orchidaceae)植物与内生细菌存在着复杂的微生态关系,细菌可通过气孔、皮孔及伤口等开放性结构进入植物组织,然后在植物组织间隙或细胞间质形成具有生态功能的群落,同时植物组织也可保护内生细菌免受紫外线或干燥等其他有害环境的伤害,从而保障内生细菌生存^[2]。至今,已从 90 多种兰科植物中分离出大量内生细菌,这些内生细菌对兰科植物具有重要的生物学功能,如解磷、解钾、分泌 IAA、促进植物生长及抗植物病原菌等^[3]。

石斛属(*Dendrobium* Sw.)为兰科第2大属,包括 1 400 多个种,主要分布于亚洲热带和亚热带地区、太平洋岛屿以及大洋洲^[4]。目前中国已记载石斛属植物 81 种 2 变种,其中 18 种为中国特有种^[5]。近年来有关石斛属内生细菌的研究已有报道,表明有些内生细菌菌株能直接促进石斛属植物的生长。俞婕等^[6]从铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)中分离到 1 株内生细菌 SH1,将其发酵原液接种于铁皮石斛组培苗的基部,其组培苗的生长速率明显提高; Tsavkelova 等^[7]从杓唇石斛[*Dendrobium moschatum* (Buch. -Ham.) Sw.]气生根内分离出大量可进行光合作用且为宿主提供氮素营养的内生细菌。因而,研究石斛内生细菌可为石斛生长和产量的提高等提供理论依据和技术支持。

美花石斛(*Dendrobium loddigesii* Rolfe)又名环草石斛、小环草和小黄草等,主要分布在广西、广东、贵州和云南等地,具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等

功效^[8]。近年来,随着市场需求的增加价格上涨,美花石斛被大量采挖,其野生资源遭到极大破坏。由于美花石斛在自然状态下生长周期长、繁殖系数低,所以近年来主要采用组织培养技术实现其大量繁殖,但其组培苗移栽成活率低以及生长缓慢仍是阻碍美花石斛产业化的主要问题。朱国胜等^[9]的研究结果表明:美花石斛生长缓慢主要是因为缺乏共生菌根真菌。但有关美花石斛内生细菌与其生长的关系鲜见研究。

作者以采自广西、云南和广东的美花石斛为研究对象,对其根、茎和叶中的可培养内生细菌进行分离,剔除重复菌株并通过 16S rDNA 序列测定和比对鉴定分离出的菌株,同时利用扩增核糖体 DNA 限制性酶切分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)方法对内生细菌菌株的多样性进行分析^[10-11],并测定所有分离菌株的促生相关特性(包括解磷、解钾和产生生长素 IAA 能力);在此基础上,以既能解磷、解钾又能产生生长素的菌株作为促生实验菌株,研究这些菌株对美花石斛试管苗的促生效应。以期寻找与美花石斛生长相关的内生细菌、改善其人工生长环境提供平台,并为美花石斛人工培育产业研发奠定理论和应用基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物采集及组培 供试的野生美花石斛植株于 2011 年至 2012 年采自广西、云南和广东,样株编号分别为 GX20120601—GX20120603、YN20111201—YN20111203 和 GD20111101—GD20111105,合计 11 株,均由南京师范大学生命科学学院丁小余教授鉴

定,活体植株保存于南京师范大学生命科学学院植物资源与环境研究所。美花石斛试管苗由本课题组培养,培养条件为温度 $21\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照度 $1\ 500\text{ lx}$ 、光照时间 $12\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、空气相对湿度 $60\% \sim 80\%$ 。

1.1.2 美花石斛内生细菌的分离、保存和活化 从11株美花石斛的根、茎和叶上分别取质量相等的样品,共33份;称取质量后用体积分数 2.5% NaClO 溶液浸泡 10 min ,并用无菌水淋洗3次(取最后1次淋洗液 0.1 mL 均匀涂于 NA 培养基^[12]上,若 48 h 后无菌落出现则可确认表面消毒干净);将表面消毒后的植物样品置于灭菌研钵中,加入相当于样品质量9倍的灭菌水并研磨,分别取 0.1 mL 研磨液涂于 NA 培养基上,置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养 $1 \sim 3\text{ d}$,待菌落长出后根据菌落的形态进行纯化;常温下用水保存,同时用体积分数 40% 甘油保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下。每份样品设置3个重复。

所有菌株均用 NA 培养基活化。挑取常温下用水保存或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用体积分数 40% 甘油保存的菌株,划线分离培养,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h ;挑取单菌落至 NA 培养液中,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $250\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 24 h ,备用。

1.2 方法

1.2.1 解磷能力测试 吸取待测菌液 $10\text{ }\mu\text{L}$,分别滴到有机磷培养基(OPA)和无机磷培养基(NPA)^[13]平板上,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h ;观察 NPA 及 OPA 平板上透明菌圈的有无并测量菌圈半径(cm),每一菌株重复检测3次。

1.2.2 解钾能力测试 参照文献[14]的方法配制含有钾长石的培养基,吸取待测菌液 $10\text{ }\mu\text{L}$,滴至钾长石培养基平板上,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h ;观察平板上有无形成透明光滑油滴,并统计能形成透明光滑油滴的菌株数量,每一菌株重复检测3次。

1.2.3 产生生长素能力测试 用含 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-色氨酸的 NA 液体培养基,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养菌液 48 h ;取 1 mL 菌悬液滴于白色瓷板上,并加 1 mL Salkowski 比色液^[15],对照组仅滴加 1 mL 比色液;将白色瓷板置于室温条件下避光放置 30 min 后观察其颜色变化,并记录颜色变化强度,每一菌株重复检测3次。

1.2.4 ARDRA 分析 采用 CTAB 法^[16]提取内生细菌 DNA,利用细菌通用引物 8f 和 1492r 对内生细菌的 16S rRNA 片段进行扩增^[17];用 AluI 和 MspI (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) 2 种限制性内切酶对 16S

rRNA 扩增产物进行联合酶切;取酶切后的样品进行电泳,并在 UVP 凝胶成像系统上进行观察^[18]。

利用 GelCompar II 软件分析酶切产物图谱。基于 Pearson 相关指数的相似性系数、采用 UPGMA 法(unweighted pair-group method using arithmetic averages)绘制聚类树状图,具体参数如下:optimization (0.66%); position tolerance (1.3%); chance towards end of fingerprint (0%); minimum height (0%); minimum surface (0%); uncertain bands (ignore)。以 70.0% 相似度为基准对菌株进行聚类分析;从菌株活化到酶切,对5个菌株进行重复,5个菌株相似度均大于 70.0% 则聚在一簇。

选取各 ARDRA 簇的代表菌株进行 16S rDNA 测序,并在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,获得各菌株的分类鉴定结果。

1.2.5 试管苗促生潜力观察 将既能解磷、解钾又能产生生长素的菌株接种到 200 mL NA 液体培养基中,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $250\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养至对数期,至菌液的 OD_{600} 值约为 $1 \times 10^8\text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,用无菌 NA 培养液稀释 100 倍备用。

取 300 株试管苗,按照 $3 \sim 4\text{ cm}$ 、 $2 \sim 3\text{ cm}$ 和 $1 \sim 2\text{ cm}$ 株高分为3组,其中,株高 3 cm 试管苗分至第2组,株高 2 cm 试管苗分至第3组,每组 100 株。分别吸取 1 mL 稀释菌液($1 \times 10^6\text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)添加至试管苗根部,对照组仅添加 1 mL NA 培养液;每组 5 个重复。将试管苗置于温度 $(25 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照度 $1\ 500\text{ lx}$ 、光照时间 $12\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、空气相对湿度 $60\% \sim 80\%$ 的条件下培养,每隔 10 d 观察 1 次,连续观察 2 个月,分别记录培养瓶中试管苗的株高和根长变化。

2 结果和分析

2.1 不同产地美花石斛内生细菌分布特征

分离结果显示:从来源于广西、云南及广东 3 个产地的美花石斛根、茎和叶中分别分离获得内生细菌菌株 42、11 及 14 株,共计 67 株内生细菌菌株。从分离部位看,分离自茎的菌株占总菌株数的 51% (34 株),数量最多;分离自根的菌株占 31% (21 株);分离自叶的菌株仅占 18% (12 株),数量最少。

2.2 美花石斛内生细菌促生特性分析

2.2.1 解磷能力分析 测定结果显示:在分离获得的 67 株美花石斛内生细菌菌株中,有 54 株菌株能够

在 OPA 培养基(有机磷培养基)上产生明显的透明菌圈,且菌圈半径为 0.3~1.6 cm。按产地划分,其中有 40 株菌株分离自来源于广西的植株,占 74%;有 9 株菌株分离自来源于云南的植株,占 16%;有 5 株菌株分离自来源于广东的植株,占 10%。按分离部位划分,其中有 50% (27 株)的菌株分离自茎,30% (16 株)的菌株分离自根,20% (11 株)的菌株分离自叶。

可在 NPA 培养基(无机磷培养基)上产生明显透明菌圈的有 30 株菌株。按产地划分,其中 90% (27 株)分离自来源于广西的植株,3% (1 株)分离自来源于云南的植株,7% (2 株)分离自来源于广东的植株;按照分离部位划分,其中 47% (14 株)分离自茎,30% (9 株)分离自根,23% (7 株)分离自叶。此外,所有能解无机磷的菌株均表现出解有机磷的特性。

2.2.2 解钾能力分析 测定结果显示:在分离获得的 67 株美花石斛内生细菌菌株中,有 22 株菌株能形成透明的光滑油滴状菌落,说明这些菌株具有解钾能力。按产地划分,其中 68% (15 株)分离自来源于广西的植株,22% (5 株)分离自来源于云南的植株,10% (2 株)分离自来源于广东的植株;按照分离部位划分,其中 64% (14 株)分离自茎,36% (8 株)分离自根,而分离自叶的菌株均无解钾能力。

2.2.3 产生长素能力分析 测定结果显示:在分离获得的 67 株内生细菌菌株中,有 24 株菌株可使 Salkowski 比色液变红,说明这些菌株具有产生长素能力。按照产地划分,其中 75% (18 株)分离自来源于广西的植株,17% (4 株)分离自来源于云南的植株,8% (2 株)分离自来源于广东的植株;按照分离部位划分,其中 67% (16 株)分离自茎,21% (5 株)分离自根,12% (3 株)分离自叶。

此外,在所有 67 株菌株中,有 8 株菌株同时兼具解无机磷、解有机磷、解钾以及产生长素的特性,并且这些菌株均分离自来源于广西的植株茎部。

2.3 美花石斛内生细菌多样性分析

根据 ARDRA 分析结果,采用 UPGMA 法对 67 株内生细菌进行聚类分析,结果见图 1。聚类分析结果显示:67 株内生细菌共表现出 50 种不同的 ARDRA 谱型,根据 70.0% 的相似度划分,67 株菌株被分为 31 个 ARDRA 簇(图 1)。其中,仅包含 1 株菌株的 ARDRA 簇有 18 个,而其他 13 个 ARDRA 簇则包含 2 株及 2 株以上的菌株。按照产地划分,其中分离自广西植株的 42 株菌株分属于 22 个 ARDRA 簇,分离

自云南植株的 11 株菌株分属于 5 个 ARDRA 簇,分离自广东植株的 14 株菌株分属于 7 个 ARDRA 簇。最大的 ARDRA 簇(第 12 簇)包含 3 个产地的 13 株菌株,其中 6 株分离自茎;第二大簇(第 3 簇)包含分离自广西植株根、茎和叶的 9 株菌株,其中 5 株菌株分离自根。

从 31 个 ARDRA 簇中分别选出 1 个代表性菌株,对其 16S rDNA 片段序列进行测序,并与 NCBI 核酸数据库中的序列进行比对,31 个 ARDRA 簇代表性菌株的比对结果及促生特性见表 1。结果显示:分离获得的 67 株内生菌株属于 12 个属,分别是假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、副球菌属(*Paracoccus*)、泛菌属(*Pantoea*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)。其中,芽孢杆菌属、微杆菌属和肠杆菌属为美花石斛内生细菌的优势属。芽孢杆菌属在 3 个产地植株的根、茎和叶中均有分布,肠杆菌属仅在广西植株的根、茎和叶中有分布,鞘氨醇单胞菌属仅分布于广西植株的根中,葡萄球菌属仅分布于广西植株的叶中,嗜冷杆菌属仅分布于广东植株的茎中,副球菌属仅分布于广东植株的根中,涅斯捷连科氏菌属仅分布于云南植株的根和茎中。

2.4 美花石斛内生细菌促生潜力分析

由表 1 可见:8 株兼具 3 种促生特性的菌株分别隶属于芽孢杆菌属、肠杆菌属和假单胞菌属。因 3 个产地的植株中均分布有芽孢杆菌属菌株,故将芽孢杆菌菌株 DLB20 作为促生实验菌株。观察结果显示:当加入 1×10^6 CFU · mL⁻¹ DLB20 后,菌落在培养基上生长缓慢,并逐渐与美花石斛试管苗形成稳定的生长环境。接种 10 d 后,株高不同的 3 个实验组的试管苗长势均正常,培养基表面有少许菌落产生。接种 30 d 后,第 3 实验组的试管苗根部细菌开始繁殖,植株开始萎蔫发黄;第 1 与第 2 实验组的试管苗生长良好,长势没有明显差异。接种 60 d 后,第 3 实验组的植株死亡,第 1 与第 2 实验组的试管苗长势良好且株高无明显区别,但第 1 实验组试管苗的生根状况优于第 2 实验组;3 个对照组的试管苗均正常生长,但第 1 和第 2 对照组的试管苗长势弱于实验组。3 个实验组和 3 个对照组试管苗的生长状况对比见图 2。

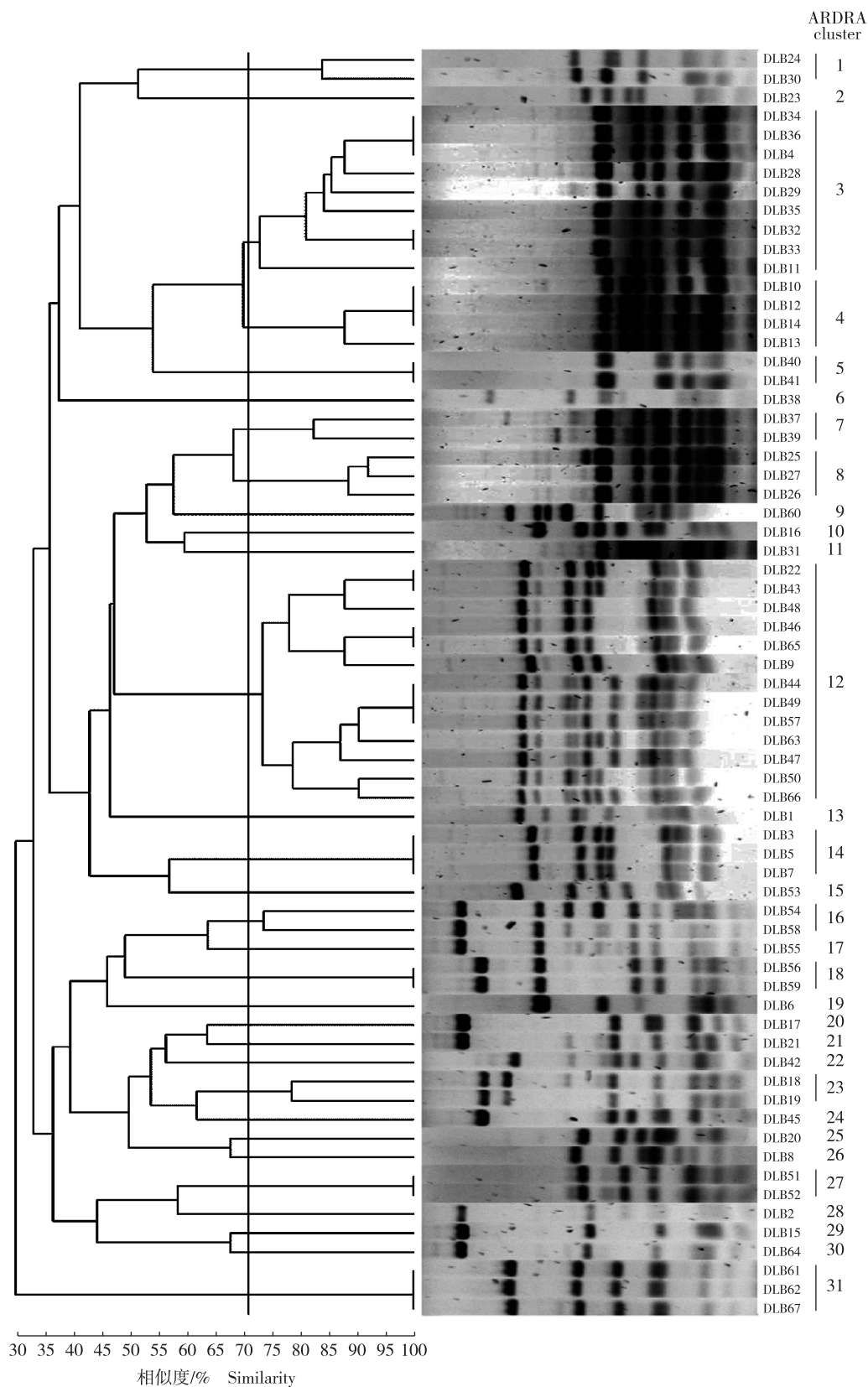


图 1 美花石斛 67 株内生细菌的 ARDRA 指纹图谱及其聚类图

Fig. 1 ARDRA fingerprint and cluster dendrogram of 67 strains of endophytic bacteria isolated from *Dendrobium loddigesii* Rolfe

表 1 美花石斛内生细菌 31 个 ARDRA 簇代表菌株的特征信息
Table 1 Characteristic information of representative strains of 31 ARDRA clusters of endophytic bacteria from *Dendrobium loddigesii* Rolfe

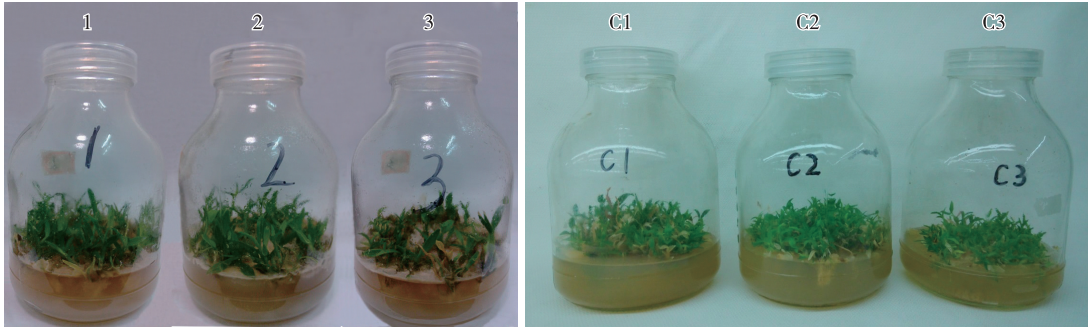
簇号 Cluster No.	菌株 Strain	采集地 Location	分离部位 Isolation part	相近属 ¹⁾ Similar genus ¹⁾	相似度/% Similarity	ASP ²⁾	菌圈半径/cm ³⁾ Radius of bacterium ring ³⁾		API ⁴⁾
							NPA ($\bar{X}\pm SE$)	OPA ($\bar{X}\pm SE$)	
1	DLB24	Guangxi	Stem	<i>Pseudomonas</i> sp. WPCB008 (KF791511)	99	+	1.15±0.00	1.30±0.00	+
2	DLB23	Guangxi	Stem	<i>Microbacterium</i> sp. dv6 (KF791512)	99	-	0.00±0.00	0.30±0.00	-
3	DLB29	Guangxi	Stem	<i>Enterobacter</i> sp. TSB7 (KF791537)	100	+	0.95±0.00	1.00±0.00	++
4	DLB14	Guangxi	Stem	<i>Enterobacter</i> sp. 5112 (KF791513)	99	-	0.90±0.00	1.50±0.00	-
5	DLB40	Guangxi	Root	<i>Pantoea</i> sp. At-9b (KF791538)	99	-	1.20±0.00	1.60±0.00	+
6	DLB38	Guangxi	Root	<i>Serratia</i> sp. B1-2 (KF791514)	99	+	0.00±0.00	0.40±0.00	-
7	DLB39	Guangxi	Root	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355 (KF791539)	99	-	0.80±0.00	1.40±0.00	+
8	DLB27	Guangxi	Stem	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355 (KF791515)	99	+	1.10±0.00	1.30±0.00	++
9	DLB60	Guangdong	Stem	<i>Bacillus</i> sp. 38AAV (KF791516)	99	-	0.00±0.00	0.00±0.00	+
10	DLB16	Guangxi	Stem	<i>Exiguobacterium</i> sp. Y11 (KF791517)	99	-	0.60±0.00	1.40±0.00	-
11	DLB31	Guangxi	Root	<i>Sphingomonas</i> sp. MN35 (KF791518)	99	+	0.71±0.00	1.30±0.00	-
12	DLB9	Guangxi	Leaf	<i>Microbacterium</i> sp. LKS07 (KF791519)	99	-	0.40±0.00	1.00±0.00	-
13	DLB1	Guangxi	Leaf	<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 26824 (KF791520)	99	-	0.60±0.00	1.20±0.00	-
14	DLB3	Guangxi	Leaf	<i>Microbacterium</i> sp. MDT1-31-1 (KF791521)	99	-	0.70±0.00	1.30±0.00	-
15	DLB53	Guangdong	Leaf	<i>Bacillus</i> sp. NBRC 100445 (KF791522)	99	-	0.00±0.00	1.20±0.00	+
16	DLB54	Guangdong	Stem	<i>Psychrobacter</i> sp. es9 (KF791540)	99	+	0.00±0.00	0.30±0.00	-
17	DLB55	Guangdong	Stem	<i>Bacillus</i> sp. IAFILS6 (KF791523)	100	-	0.00±0.00	0.50±0.00	-
18	DLB56	Guangdong	Stem	<i>Bacillus</i> sp. MHS009 (KF791524)	99	-	0.00±0.00	0.00±0.00	-
19	DLB6	Guangxi	Leaf	<i>Staphylococcus</i> sp. Y6 (KF791525)	100	-	0.65±0.00	1.28±0.00	+
20	DLB17	Guangxi	Stem	<i>Paenibacillus</i> sp. Ma-2 (KF791526)	99	-	0.60±0.00	1.60±0.00	-
21	DLB21	Guangxi	Stem	<i>Paenibacillus</i> sp. P5E (KF791541)	99	+	0.00±0.00	0.80±0.00	+
22	DLB42	Guangxi	Root	<i>Bacillus</i> sp. IHB B 3463 (KF791527)	99	-	w	1.10±0.00	-
23	DLB19	Guangxi	Stem	<i>Paenibacillus</i> sp. PSSUR1 (KF791528)	99	+	0.40±0.00	1.30±0.00	+
24	DLB45	Yunnan	Stem	<i>Bacillus</i> sp. A-09 (KF791529)	99	-	0.00±0.00	0.65±0.00	+
25	DLB20	Guangxi	Stem	<i>Bacillus</i> sp. JL-31 (KF791530)	99	+	0.70±0.00	0.90±0.00	++
26	DLB8	Guangxi	Leaf	<i>Brevundimonas</i> sp. YIM KMY42-2 (KF791531)	100	-	0.00±0.00	0.00±0.00	+
27	DLB52	Guangdong	Leaf	<i>Nesterenkonia</i> sp. NP1 (KF791532)	99	-	0.00±0.00	0.90±0.00	-
28	DLB2	Guangxi	Leaf	<i>Bacillus</i> sp. cp-h44 (KF791533)	99	-	0.70±0.00	1.30±0.00	-
29	DLB15	Guangxi	Stem	<i>Bacillus</i> sp. HH07 (KF791534)	100	-	0.50±0.00	1.20±0.00	+
30	DLB64	Guangdong	Root	<i>Bacillus</i> sp. L34 (KF791535)	100	-	0.00±0.00	0.15±0.00	-
31	DLB67	Guangdong	Root	<i>Paracoccus</i> sp. 8-11 (KF791536)	100	-	0.00±0.00	0.60±0.00	+

¹⁾ 括号内为 GenBank 登录号 There are GenBank accession numbers in brackets.
²⁾ ASP: 解钾能力 Activity of solubilizing potassium; +: 具有解钾能力 With activity of solubilizing potassium; -: 无解钾能力 Without activity of solubilizing potassium.
³⁾ 用不同培养基上的菌圈半径表示解磷能力 Activity of solubilizing phosphous are 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; w: 表示菌圈微弱无法测量 Representing that weak bacterium ring could not be measured.
⁴⁾ API: 产生生长素的能力 Activity of producing IAA; +: 具有产生生长素能力 With activity of producing IAA; ++: 具有较强的产生生长素能力 With stronger activity of producing IAA; -: 无产生生长素的能力 Without activity of producing IAA.

3 讨论和结论

自 20 世纪 80 年代末以来,兰科植物的内生细菌日益成为研究热点。兰科植物内生细菌种类非常丰富,在根、茎和叶中均有分布^[19],其中根和茎是常见的分离部位。例如,章华伟等^[20]从铁皮石斛中分离

出 23 株内生细菌,其中茎中分布较多;Tsavkelova 等^[21]的研究结果显示:从杓唇石斛分离内生细菌,根部是常见的分离部位。本实验结果显示:美花石斛茎中所含的内生细菌最多,其次是根,也说明兰科植物的根和茎是常见的分离部位。Chen 等^[22]的研究结果表明:美花石斛内生真菌随产地差异表现出一定的特异性,本实验结果也显示美花石斛内生细菌与其内生真菌同样具有地区特异性。



1-3. 实验组 Experimental group; 1. 株高 3~4 cm 试管苗 Plantlets with height of 3~4 cm; 2. 株高 2~3 cm 试管苗 Plantlets with height of 2~3 cm; 3. 株高 1~2 cm 试管苗 Plantlets with height of 1~2 cm. C1-C3. 对照组 Control group; C1. 株高 3~4 cm 试管苗 Plantlets with height of 3~4 cm; C2. 株高 2~3 cm 试管苗 Plantlets with height of 2~3 cm; C3. 株高 1~2 cm 试管苗 Plantlets with height of 1~2 cm.

图 2 接种内生细菌菌株 60 d 后美花石斛试管苗生长状况比较

Fig. 2 Comparison of growth status of *Dendrobium loddigesii* Rolfe plantlets after inoculated endophytic bacterium strains for 60 d

兰科植物内生细菌优势属是指宿主组织内出现频率较高的属。Wilkinson 等^[23-25]认为:假单胞菌属是地生兰的优势属,其次是芽孢杆菌属、库特氏菌属(*Kurthia*)和节杆菌属(*Arthrobacter*)。在有关的研究中芽孢杆菌也被证实为杓唇石斛^[26]和流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum* Hook.)^[27]内生细菌的优势属。本实验结果显示:美花石斛内生细菌优势属包括芽孢杆菌属、微杆菌属和肠杆菌属,其中芽孢杆菌属在来源于 3 个产地的植株内均为优势属,肠杆菌属仅存在于来源于广西的美花石斛植株中,且来源于广西的植株中优势属的种类和数量都比来源于云南和广东的植株丰富,与来源于广西的美花石斛样品新鲜程度较佳有关。这一研究结果也证实了 Wilkinson 等^[24]关于“兰科植物内生细菌优势属会随地区、季节,尤其是基于菌根真菌侵染的组织形态学的不同而发生变化,且不同地区表现出差异性”的结论。

磷和钾都是植物生长必不可少的营养元素,利用解磷和解钾的内生细菌转化环境中的磷和钾是改善植物生长的首选方法之一^[28]。生长素 IAA 可以通过增加根的生长促进植物生长和分化,还可促进根毛增殖和延长,有利于根从土壤中吸收更多的营养物质^[29]。通常,促生实验依据内生细菌菌株解磷、解钾、产生长素的能力来衡量其促生潜力,而本实验结果证实具有促生潜力的美花石斛内生细菌菌株可以促进其试管苗的生长。

细菌的浓度是影响促生效果的关键因子,低浓度(1×10^5 CFU $\cdot$ mL⁻¹)具有促生效果,而高浓度则可能

对植物有不利影响^[30],这可能与“细菌浓度过高会破坏植物或部分组织,从而引起植物生长不良甚至死亡”有关。基于以上原因,作者从能解磷、解钾又能产 IAA 的 8 个美花石斛内生细菌菌株中选择用于促生实验的菌株,考虑到芽孢杆菌属是美花石斛内生细菌中分布最广泛的优势属,所以将芽孢杆菌 DLB20 菌株选为测试菌株。实验结果表明: 1×10^6 CFU $\cdot$ mL⁻¹ DLB20 可以促进株高 3~4 cm 的美花石斛试管苗生长及生根,但导致株高 1~2 cm 试管苗死亡,表明植物内生细菌的促生效果与细菌的接种浓度和植株长势有关。Aspray 等^[31]认为:细菌仅在一定浓度范围内具有促生作用,不同细菌的促生浓度范围存在差异。因此,确定内生细菌的适接种浓度对有效提高其促生效果有重要作用^[32]。此外,Frey-Klett 等^[30]认为:兰科植物在不同的生长阶段可能与不同的菌株共生。因此,从成年植株根内分离的菌株对兰科植物不同生长阶段植株的促生作用有差异。

由于内生细菌的数量及种类与植物的产地密切相关,因而,建议扩大采样数量和采样地点对美花石斛内生细菌进行更为广泛的分离和筛选。有关美花石斛内生细菌种类还需要采用分子生物学手段和生理生化实验进一步鉴定。

参考文献:

- [1] PETRINI O. Fungal endophytes of tree leaves [M] // ANDREWS J H, HIRANO S S. Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer-Verlag, 1991: 179-197.
- [2] LODIEWYCKX C, VANGRONVELD J, PORTEOUS F, et al. Endophytic bacteria and their potential applications [J]. Critical

- Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(6): 583–606.
- [3] 胡 萌. 植物内生细菌研究进展[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2008, 39(1): 148–151.
- [4] LAVARACK P S, HARRIS W, STOCKER G. *Dendrobium* and Its Relatives[M]. Portland: Timber Press, 2000.
- [5] ZHU G H, JI Z H, WOOD J J, et al. *Dendrobium* [M] // WU Z Y, RAVEN P H, HONG D Y. Flora of China: Vol. 25. Beijing: Science Press, 2009: 367–397.
- [6] 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.
- [7] TSAVKELOVA E A, LOBAKOVA E S, KOLOMEITSEVA G L, et al. Associative cyanobacteria isolated from the roots of epiphytic orchids[J]. Microbiology, 2003, 72(1): 92–97.
- [8] 张光浓, 毕志明, 王峥涛, 等. 石斛属植物化学成分研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(6): 附5–附8.
- [9] 朱国胜, 刘作易, 黄永会, 等. 美花石斛组培苗促生内生真菌分离及筛选[J]. 种子, 2007, 26(12): 17–20.
- [10] FULTHORPE R R, RHODES A N, TIEDJE J M. High levels of endemicity of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(5): 1620–1627.
- [11] CHO J C, TIEDJE J M. Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5448–5456.
- [12] 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.
- [13] 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(3): 209–216.
- [14] 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.
- [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(2): 793–796.
- [16] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11–15.
- [17] CHELIUS M K, TRIPLETT E W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L.[J]. Microbial Ecology, 2001, 41(3): 252–263.
- [18] 张晓霞, 马晓彤, 曹卫东, 等. 紫云英根瘤菌的系统发育多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(3): 380–384.
- [19] 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.
- [20] 章华伟, 钟超群. 铁皮石斛内生细菌的分离和初步鉴定[J]. 湖南农业科学, 2013, 52(8): 1811–1813.
- [21] 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.
- [22] 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(3): 328–337.
- [23] WILKINSON K G, DIXON K W, SIVASITHAMPARAM K. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids[J]. New Phytologist, 1989, 112(3): 429–435.
- [24] 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.
- [25] WILKINSON K G, DIXON K W, BRADLEY J K, et al. Identification and characterization of bacteria associated with western Australian orchids[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26(1): 137–142.
- [26] TSAVKELOVA E A, CHERDYNTSEVA T A, NETRUSOV A I. Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids [J]. Microbiology, 2004, 73(6): 710–715.
- [27] 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(6): 655–664.
- [28] ADESEMOYE A O, KLOEPPER J W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2009, 85(1): 1–12.
- [29] KUKLINSKY-SOBRA L, ARAÚJO W L, MENDES R, et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion [J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(12): 1244–1251.
- [30] FREY-KLETT P, CHURIN J L, PIERRAT J C, et al. Dose effect in the dual inoculation of an ectomycorrhizal fungus and a mycorrhiza helper bacterium in two forest nurseries[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31(11): 1555–1562.
- [31] ASPRAY T J, JONES E E, WHIPPS J M, et al. Importance of mycorrhization helper bacteria cell density and metabolite localization for the *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* symbiosis [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 56(1): 25–33.
- [32] LIU P, NESTER E W. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits *vir* gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(12): 4658–4662.