

研究报告

广西葛根内生细菌的分离鉴定及其促生特性

黄小茜^{#1}, 陈翰^{#1}, 李发活¹, 梁任繁², 肖冬¹, 何龙飞^{*1}, 王爱勤^{*1}

1 广西大学农学院 植物科学国家级实验教学示范中心 广西农业环境与农产品安全重点实验室 广西高校作物栽培学与耕作学重点实验室, 广西 南宁 530004

2 广西农业科学院, 广西 南宁 530000

黄小茜, 陈翰, 李发活, 梁任繁, 肖冬, 何龙飞, 王爱勤. 广西葛根内生细菌的分离鉴定及其促生特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2017-2028.

HUANG Xiaoxi, CHEN Han, LI Fahuo, LIANG Renfan, XIAO Dong, HE Longfei, WANG Aiqin. Endophytic bacteria from *Pueraria montana* var. *lobata* in Guangxi: isolation, identification, and characterization of plant growth-promoting effect[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2017-2028.

摘要: 【背景】植物内生菌长期与宿主共生, 对宿主生长发育产生影响。葛根作为重要的药食两用作物, 葛根内生菌的研究具有重要实践意义。【目的】对广西葛根根部内生细菌进行分离、鉴定及促植物生长特性分析, 旨在了解该药食同源植物内生细菌种群结构及其促生特性, 为分析内生菌群体在药食同源植物产量和品质形成的作用及其内生细菌资源的开发利用提供参考。【方法】采用 6 种不同的培养基从广西葛根的根瘤、根系和根愈伤组织分离内生细菌, 16S rRNA 基因测序和系统发育分析内生细菌的分布特征和遗传多样性, 采用生理生化方法测定分离菌株的固氮活性、溶磷特性、产生嗜铁素、分泌吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)等促生特性。【结果】从葛根根瘤、根系和根部愈伤组织中共分离得到 223 个菌株, 16S rRNA 基因测序鉴定这些菌株隶属于 2 门 4 纲 10 科 19 属, 其中芽孢杆菌属、假单胞菌属、土壤杆菌属、肠杆菌属为葛根优势菌群; 内生细菌数量和群落组成存在明显的组织特异性, 其数量表现为根瘤>根系>根愈伤组织, 但其种群多样性表现为根愈伤组织>根系>根瘤。不同培养基分离出的细菌种群丰富度有差异。从供试菌株中筛选出 6 株具有 *nifH* 基因的内生菌, 15 株兼具固氮、溶磷、产生嗜铁素、分泌 IAA 4 种促生特性的内生菌, 17 株兼具 3 种促生特性的内生菌。【结论】广西葛根内生细菌资源非常丰富, 内生菌在葛根体内分布具有明显的组织特异性, 兼具多种促生特性。

关键词: 葛根; 内生菌; 固氮; 促生长作用; 组织特异性

资助项目: 国家自然科学基金(32260680); 广西壮族自治区重点研发计划(桂科 AB22080090); 国家现代农业产业技术体系(nycytxgxcxt-11-01)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260680), the Key Research and Development Program of Guangxi Zhuang Autonomous Region (AB22080090), and China Agriculture Research system (nycytxgxcxt-11-01).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. E-mail: HE Longfei, lfhe@gxu.edu.cn; WANG Aiqin, waiqing1966@126.com

Received: 2022-08-08; Accepted: 2022-09-06; Published online: 2022-12-14

Endophytic bacteria from *Pueraria montana* var. *lobata* in Guangxi: isolation, identification, and characterization of plant growth-promoting effect

HUANG Xiaoxi^{#1}, CHEN Han^{#1}, LI Fahuo¹, LIANG Renfan², XIAO Dong¹, HE Longfei^{*1}, WANG Aiqin^{*1}

1 Key Laboratory of Crop Cultivation and Tillage, Key Laboratory for Agro-environment and Agro-product Safety, National Demonstration Center for Experimental Plant Science Education, College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530000, Guangxi, China

Abstract: [Background] Endophytic bacteria coexist with the host for a long time, posing an impact on the growth and development of the host. *Pueraria montana* is an important plant with both medicinal and edible values. The research on the endophytic bacteria of this plant is of practical significance. [Objective] To isolate and identify the endophytic bacteria from the roots of *Pueraria montana* var. *lobata* growing in Guangxi and analyze their growth-promoting effect, so as to learn the community structure and growth-promoting effects of endophytic bacteria from the medicinal and edible plants, and provide references for revealing the role of endophytic bacteria in the production and quality formation of medicinal and edible plants and the development and utilization of endophytic bacterial resources. [Methods] Six different media were used to isolate the endophytic bacterial strains from the root nodules, root system, and root callus of *Pueraria montana* var. *lobata*. The 16S rRNA gene sequencing was employed to explore the distribution characteristics and genetic diversity of the endophytic bacteria. The physiological and biochemical tests were carried out to determine the nitrogen-fixing activity, phosphorous-solubilizing properties, siderophore production, and indole acetic acid (IAA) secretion of the isolated strains. [Results] A total of 223 strains were isolated from the root nodules, root system, and root callus of *Pueraria montana* var. *lobata*. These isolates were phylogenetically classified into 19 genera, 10 families, 4 classes of 2 phyla based on their 16S rRNA gene sequences. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Enterobacter* were the predominant taxa. The number and community structure of the endophytic bacteria varied between tissues. Specifically, the number of the endophytic bacteria was in the order of root nodules>root system>root callus and the diversity in the order of root callus>root system>root nodules. Furthermore, the bacterial communities were also distinct from various culture media showed different richness. There were 6 strains with *nifH* gene, 15 strains with four growth-promoting properties including nitrogen fixation, phosphorous solubilizing, siderophore production, and IAA secretion, and 17 strains with three growth-promoting properties were selected from the tested strains. [Conclusion] The endophytic bacteria in the roots of *Pueraria montana* var. *lobata* from Guangxi are genetically diverse, with the distribution varying between tissues and multiple growth-promoting properties.

Keywords: *Pueraria lobata*; endophytic bacteria; nitrogen fixation; growth-promoting effect; tissue specificity

植物内生菌与宿主共生,参与宿主体内各种代谢反应,对宿主生长发育,尤其是植物次生代谢产物形成产生影响^[1-2]。部分内生细菌具有较高的利用价值,内生细菌不仅可以促进宿主的种子发芽、开花和生物量积累等生长过程^[3],还可自发或间接产生抗肿瘤、抑菌和杀虫等生物活性物质^[4]。药用植物内生菌可产生与宿主植物相同或相似的药用活性成分,是抗癌、抗菌、抗肿瘤、抗炎、降糖、抗氧化等新型活性物质来源^[5]。异黄酮是豆科植物体内形成的一类次生代谢产物,主要参与植物组织和病原微生物的互作及防御反应^[6]。药用植物内生菌中芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、棒形杆菌属(*Clavibacter*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)和微小杆菌属(*Microbacterium*)都是常见的有定殖潜力的内生细菌^[7]。研究表明,这些内生菌与药用植物的生长^[8-9]、次生代谢产物积累^[10-11]密切相关。

葛(*Pueraria lobata*)是目前发现的含异黄酮最高的植物,也是我国重要的药食同源植物。葛根异黄酮是葛根主要的药用有效成分,对冠心病、心绞痛、心律失常、高血压、糖尿病及其并发症等具有良好的治疗效果,市场潜力巨大^[12]。葛根具有能在贫瘠的土壤快速生长的特性,且含有丰富淀粉和异黄酮,但葛根生长发育、异黄酮积累与其内生菌资源的关系仍不清楚,制约了葛根内生菌资源的开发应用。

本研究以广西栽培的药食兼用型葛的根瘤、根系和根愈伤组织为材料,分离、鉴定葛根内生细菌,探究其种群结构和遗传多样性,筛选具有高效固氮能力和促生特性强的菌株,以期为后续研究内生菌与葛根互作调控产量和品质形成关

系及葛根内生菌资源开发应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

LB 固体培养基、LB 肉汤培养基,广东环凯微生物科技有限公司;固氮根瘤菌固体培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;YMA 固体培养基、TY 固体培养基、DF 固体培养基、DF-ACC 固体培养基、NFB 固体培养基配方、L-色氨酸生长培养基、磷酸钙培养基和 CAS 培养基等参考文献[13]配制。采用本课题组选育的桂葛 8 号葛根(*Pueraria montana* var. *lobata*)品种,4 月初种植于广西大学网室,6 月下旬取葛根 20 株,分别取根瘤、根系和根愈伤组织作为试验材料。Taq DNA 聚合酶、10×PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTPs 和 DNA 凝胶回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,康为世纪生物科技有限公司;pMD™ 18-T Vector Cloning Kit,宝生物工程(大连)有限公司。

电子天平,华杰电子仪器有限公司;生化培养箱、恒温摇床,上海智城分析仪器制造有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅、洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;台式低速离心机、上海卢湘仪离心机仪器有限公司;PCR 仪,南宁市百谷生物科技有限公司;气相色谱仪,Perkin 公司;酶标仪、Tecan 公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

1.2 内生细菌的分离与纯化

将样品参考文献[14]进行表面消毒,在无菌条件下将材料与无菌磷酸缓冲液于无菌研钵中研磨成匀浆状。分别接种于 6 种不同培养基

(YMA、TY、DF、DF-ACC、NFB、固氮根瘤菌固体培养基)上。在 28 °C 光照培养箱培养 1–7 d。观察记录细菌的外观形态及大小,挑选单个菌落接种于 LB 固体培养基,进行纯化培养,将纯化后的菌落接种于 LB 液体培养基上至对数期,部分穿刺于固体培养基中常温保存,部分用 30% 甘油保存于–80 °C 冰箱,剩余菌液暂时 4 °C 保存,备提 DNA 用。

1.3 内生细菌的种属鉴定

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取各菌株 DNA。根据原核生物 16S rRNA 基因的保守序列设计通用引物 F8 (5'-AGAGTTTGTCTCTG GCTCAG-3')和 R1541 (5'-AAGGAGGTGATCCA GCCGCA-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L, F8 和 R1541 引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L、模板 DNA 2 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 循环 20 次; 72 °C 10 min。通过 1% 的琼脂糖凝胶,电泳检测各基因 PCR 产物片段长度和纯度,片段大小正确、条带明亮且清晰的样品送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测得菌株的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank 数据库进行 BLAST 比对,与数据库中的已知序列进行同源性分析,运用 MEGA 7 软件构建系统发育树。

1.4 细菌固氮酶铁蛋白基因(*nifH*)的检测

以各菌株 DNA 为模板,参照文献[13]设计简并引物 PolyF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGAC TC-3')和 PolyR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGG A-3')进行 *nifH* 基因的 PCR 扩增(简并碱基: R=A/G, S=G/C, Y=C/T, B=C/G/T),并以固氮菌 *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 为阳性对照, *E. coli* DH5 α 为阴性对照^[15]。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L,

PolyF 和 PolyR 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 DNA 2 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min。*nifH* 基因片段大小预计在 360 bp 左右。所有 PCR 产物经试剂盒回收与纯化后,采用 pMD™ 18-T Vector Cloning Kit 将 PCR 回收产物与 T 载体进行连接,转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经过 Amp 和蓝白斑的筛选,各挑选 8 个白色菌落分别接种至 LB 液体培养基于 28 °C、220 r/min 培养过夜。用菌悬液作为模板,用 PolyF/PolyR 引物进行 *nifH* 基因的 PCR 扩增,并对其进行质粒提取和 PCR 检验。选取含有重组质粒的阳性菌株送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测得序列提交 GenBank 数据库进行 BLAST 比对,与数据库中的已知序列进行同源性分析。

1.5 促生特性分析

根据分离出的菌株菌落形态及其 16S rRNA 与 *nifH* 基因测序结果对菌株进行分类,并选取具有代表性的菌株进行后续促生特性分析。参照文献[16]采用乙炔还原法(acetylene reduction assay, ARA)方法测定内生菌的固氮酶活性。参照文献[15]采用 Salkowski 方法测定分泌 IAA 含量。参照文献[13]采用(chrome azurol S, CAS)平板法定性判断细菌是否能够分泌嗜铁素。参照文献[13]采用平板法根据透明度和透明圈直径判断细菌解磷能力强弱。

1.6 数据处理

利用 Excel2007、SPSS11.5 和 GraphPad Prism 8 软件对数据进行分析 and 处理。

2 结果与分析

2.1 葛根内生细菌的分离鉴定

从桂葛 8 号根瘤、根系、根愈伤组织共分离

得到 223 株葛根内生细菌, 在分类学上属于 2 门 4 纲 10 科 19 属。其中, 芽孢杆菌属(*Bacillus*) 占 32.29%, 假单胞菌属(*Pseudomonas*) 占 28.25%, 土壤杆菌属(*Agrobacterium*) 占 19.28%, 肠杆菌属(*Enterobacter*) 占 4.48%, 这些为优势菌属; 此外, 不动杆菌属(*Acinetobacter*) 8 株, 根瘤菌属(*Rhizobium*) 4 株, 泛菌属(*Pantoea*) 3 株, 寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*) 3 株, 无色杆菌属(*Achromobacter*) 2 株, 克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*) 2 株, 类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*) 2 株, 普罗维登斯菌属(*Providencia*) 2 株, 假黄单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*) 2 株, 沙雷氏菌属(*Serratia*) 2 株, 剑菌属(*Ensifer*) 1 株, 贪食菌属(*Variovorax*) 1 株, 葡萄球菌属(*Staphylococcus*) 1 株, 勒克氏菌属(*Leclercia*) 1 株, 碱性卤芽孢杆菌属(*Alkalihalobacillus*) 1 株, 这些为少数菌群。

2.2 内生细菌数量和群落组成结构分析

从不同部位分析, 来源于根瘤的内生细菌 102 株, 隶属于 7 属, 其中芽孢杆菌属(占 48.0%)、假单胞菌属(29.4%)、土壤杆菌属(占 10.7%)为优势菌属; 来源于根系的内生细菌 80 株, 隶属于 10 属, 其中假单胞菌属(占 35.0%)、土壤杆菌属(占 27.5%)、芽孢杆菌属(占 16.2%)为优势菌属; 来源于愈伤组织的内生细菌 41 株, 隶属于 14 属, 其中土壤杆菌属(占 24.3%)、芽孢杆菌属(占 24.3%)、假单胞菌属(占 12.1%)为优势菌属。如图 1A 和图 1B 所示, 不同部位分离到的菌株数量存在组织特异性, 表现为根瘤>根系>愈伤组织(图 1A); 此外, 内生细菌种群结构也存在明显差异, 属的数量表现为愈伤组织>根系>根瘤(图 1B)。

2.3 不同培养基分离葛根内生细菌效果

从固氮根瘤菌培养基中分离到 45 株内生细菌,

隶属于 8 属, 其中土壤杆菌属(占 42.2%)、芽孢杆菌属(占 20.0%)、假单胞菌属(占 20.0%)为优势菌属; 从 YMA 固体培养基中分离到 53 株内生细菌, 隶属于 7 属, 其中芽孢杆菌属(占 43.3%)、假单胞菌属(占 35.8%)为优势菌属; 从 NFB 培养基中分离到 38 株内生细菌, 隶属于 7 属, 其中芽孢杆菌属(占 39.4%)、假单胞菌属(占 36.8%)为优势菌属; 从 DF 培养基中分离到 30 株内生细菌, 隶属于 10 属, 其中土壤杆菌属(占 23.3%)、假单胞菌属(占 23.3%)、芽孢杆菌属(占 16.6%)为优势菌属; 从 TY 固体培养基中分离到 36 株内生细菌, 隶属于 10 属, 其中芽孢杆菌属(占 41.6%)、假单胞菌属(占 27.7%)为优势菌属; 从 DF-ACC 固体培养基中分离到 21 株内生细菌, 隶属于 5 属, 其中土壤杆菌属(占 38.0%)、芽孢杆菌属(占 23.8%)、假单胞菌属(占 19.0%)、肠杆菌属(占 14.2%)为优势菌属。

如图 2A、2B 所示, 6 种培养基中分离获得的菌株数量表现为: YMA 培养基>固氮根瘤菌培养基>NFB 培养基>TY 培养基>DF 培养基>DF-ACC 培养基(图 2A); 但其内生细菌属的数量表现为: TY 培养基=DF 培养基>固氮根瘤菌培养基>NFB 培养基=YMA 培养基>DF-ACC 培养基(图 2B)。

2.4 葛根内生细菌系统发育树分析

分离得到的 223 株葛根内生菌 16S rRNA 基因测序结果与 GenBank 数据库中已有序列进行 BLAST 对比, 综合系统发育树结果, 确定菌株归属。已将 16S rRNA 基因的测序结果提交到 NCBI 的核苷酸数据库(nucleotide database)。如图 3 所示, 运用 MEGA 7 软件对所得菌株及其同源菌株进行系统发育树分析。总体上, 根据 16S rRNA 基因序列能够将菌株在属的水平上分出 3 大分支, 芽孢杆菌属的菌株聚为一大支, 菌

株类群相似度为 94%；假单胞菌属菌株聚为一大支，菌株类群相似度为 96%；根瘤菌属与土

壤杆菌属亲缘关系较近，聚为一大支，菌株类群相似度为 94%。

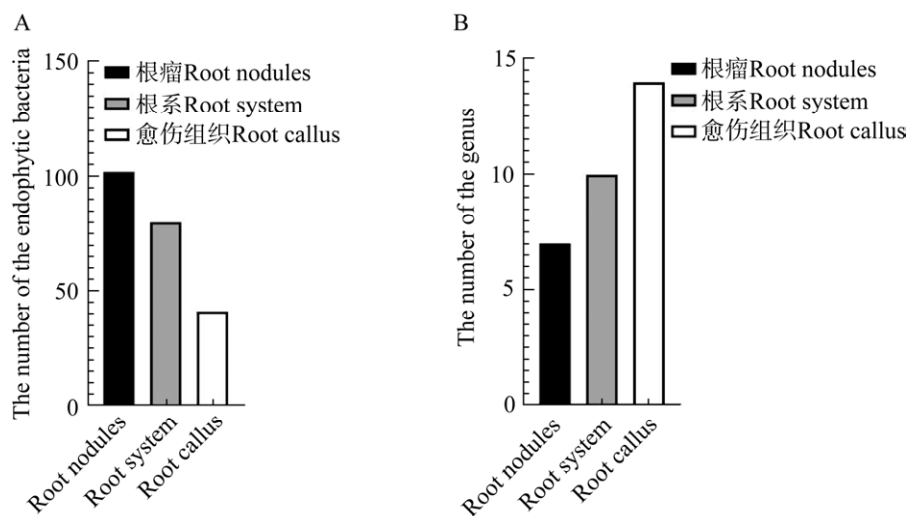


图 1 不同部位分离出内生细菌菌株数量(A)及归属种类情况(B)

Figure 1 The number (A) and genus (B) of the endophytic bacteria from different tissues.

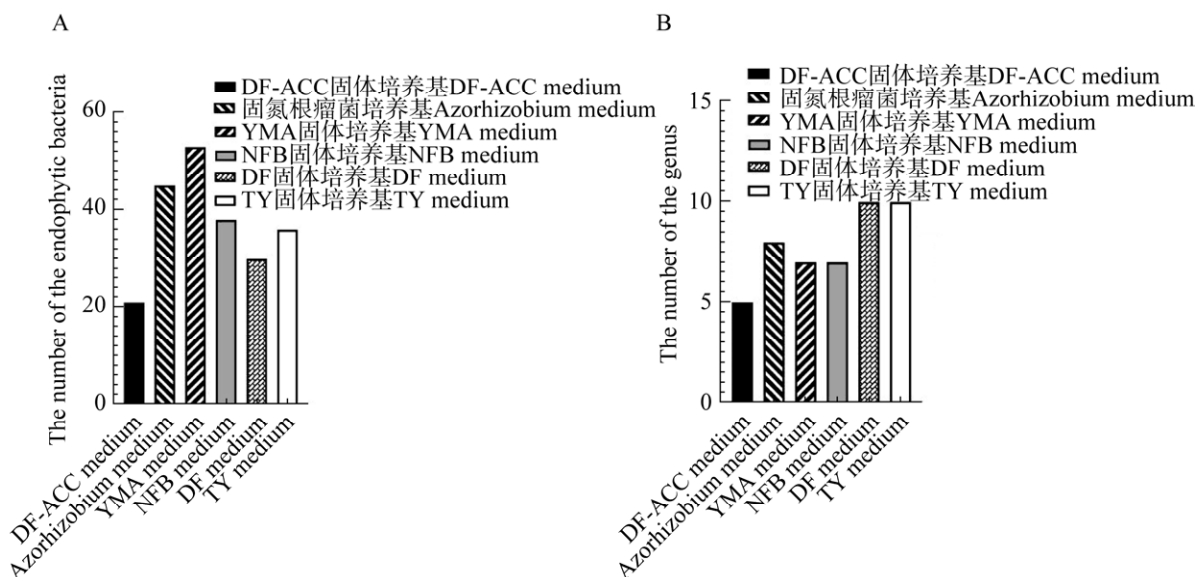


图 2 不同培养基分离出内生细菌菌株数量(A)和归属种类情况(B)

Figure 2 The number (A) and genus (B) of the genus from different isolation media.

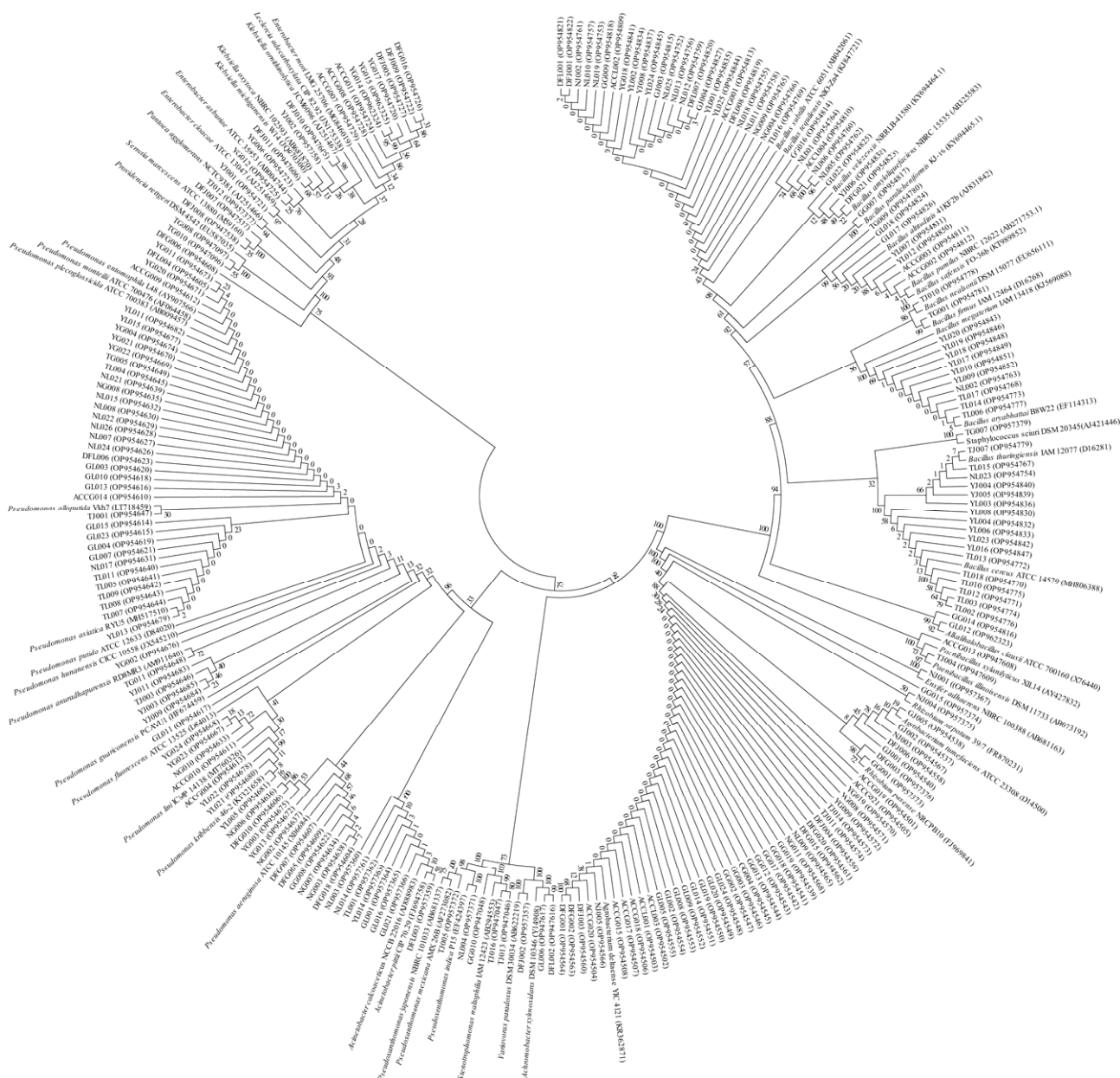


图3 葛根内生菌基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内序号为序列的 GenBank 登录号; 利用 MEGA 7 邻接法构建系统发育树; 分支点上的数字表示 1 000 次重复后得到的置信值

Figure 3 The phylogenetic tree of endophytic bacteria from *Pueraria lobata* based on the 16S rRNA gene sequence. Numbers in parentheses are GenBank accession number; The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method; Numbers at the branch points indicates bootstrap values obtained after 1 000 replicates.

2.5 促生特性分析

表 1 为所选的具有代表性的 40 株菌及其固氮能力与促生特性分析结果。从表 1 可看出, 40 株菌在固氮酶活性方面的差异性极显著, 其中

有 38 株检测到有固氮酶活性, 占总检测菌株的 95%, 活性范围为 0.13–0.70 nmol/(mL·h), 其中 DFJ008 固氮酶活性最强, NL017、YG017 则未检测到固氮酶活性。仅有 6 个菌株检测到具

表 1 内生细菌的促生特性

Table 1 The growth-promoting characteristic of isolated strains

菌株 Strains	固氮酶活性 Nitrogenase activity (nmol/(h·mL))	IAA 含量 Content of IAA (mg/L)	嗜铁素 Siderophore production	解磷酸钙 Phosphorous- solubilizing properties	<i>nifH</i> 基因 <i>nifH</i> gene	来源植物 部位 Source	分离培养基 Media	分类归属 Genus affiliation
DFJ008	0.70±0.12a	18.36±1.90f	+	—	—	Root callus	DF	<i>Serratia</i>
GG018	0.55±0.11b	15.66±0.22h	—	+	—	Root system	Azorhizobium	<i>Agrobacterium</i>
YL010	0.54±0.05bc	2.09±0.18no	—	—	—	Root nodules	YMA	<i>Bacillus</i>
YL024	0.54±0.07bc	1.30±0.10o	—	—	—	Root nodules	YMA	<i>Bacillus</i>
GG001	0.53±0.10bc	14.61±0.26i	—	+	—	Root system	Azorhizobium	<i>Rhizobium</i>
YJ003	0.48±0.050bc	1.68±0.13no	+	+	—	Root callus	YMA	<i>Pseudomonas</i>
YL022	0.46±0.07bc	2.05±0.15no	—	—	—	Root nodules	YMA	<i>Pseudomonas</i>
DFG015	0.46±0.06bc	7.22±0.13lm	+	+	—	Root system	DF	<i>Agrobacterium</i>
ACCG003	0.43±0.06c	1.75±0.05no	+	+	—	Root system	DF-ACC	<i>Bacillus</i>
DFJ011	0.40±0.06d	8.25±0.70l	+	+	+	Root callus	DF	<i>Klebsiella</i>
DFJ007	0.39±0.14de	18.00±0.34fg	—	+	—	Root callus	DF	<i>Serratia</i>
GJ004	0.38±0.06de	1.50±0.16no	+	—	—	Root callus	Azorhizobium	<i>Bacillus</i>
DFG001	0.37±0.01de	17.25±1.40g	+	+	+	Root system	DF	<i>Agrobacterium</i>
GL004	0.37±0.06de	2.88±0.62mn	+	+	—	Root nodules	Azorhizobium	<i>Pseudomonas</i>
GL023	0.34±0.05e	43.53±0.74a	+	+	+	Root nodules	Azorhizobium	<i>Pseudomonas</i>
ACCG002	0.32±0.02ef	10.55±2.53k	+	+	—	Root system	DF-ACC	<i>Bacillus</i>
DFL002	0.31±0.04f	1.64±0.17no	+	+	—	Root nodules	DF	<i>Achromobacter</i>
DFL006	0.31±0.04f	1.77±0.31no	+	+	—	Root nodules	DF	<i>Pseudomonas</i>
ACCG018	0.30±0.05fg	12.50±2.40j	+	—	—	Root system	DF-ACC	<i>Agrobacterium</i>
ACCG020	0.30±0.07fg	12.40±3.92jk	+	—	+	Root system	DF-ACC	<i>Agrobacterium</i>
YJ006	0.29±0.04fg	2.31±0.30no	+	—	—	Root callus	YMA	<i>Bacillus</i>
NG011	0.28±0.04g	2.32±0.22n	+	—	—	Root system	NFB	<i>Agrobacterium</i>
GG013	0.28±0.03gh	16.65±0.74gh	—	—	—	Root system	Azorhizobium	<i>Agrobacterium</i>
GG019	0.27±0.06gh	27.65±2.29d	+	+	—	Root system	Azorhizobium	<i>Agrobacterium</i>
YJ005	0.27±0.02gh	1.30±0.15o	+	—	—	Root callus	YMA	<i>Bacillus</i>
NL022	0.26±0.06h	2.17±0.14no	+	—	—	Root nodules	NFB	<i>Pseudomonas</i>
DFG003	0.26±0.05hi	3.69±0.01mn	+	+	—	Root system	DF	<i>Rhizobium</i>
YJ004	0.26±0.05hi	7.86±0.87lm	+	+	—	Root callus	YMA	<i>Bacillus</i>
GG012	0.25±0.09i	13.72±0.52ij	—	+	—	Root system	Azorhizobium	<i>Agrobacterium</i>
DFJ006	0.25±0.02ij	34.10±1.5c	+	—	+	Root callus	DF	<i>Agrobacterium</i>
DFJ003	0.25±0.04ij	25.59±1.01e	+	+	+	Root callus	DF	<i>Agrobacterium</i>
YG014	0.19±0.04j	41.22±2.78b	+	+	—	Root system	YMA	<i>Pantoea</i>
YL005	0.19±0.04j	1.39±0.03o	—	—	—	Root nodules	YMA	<i>Pseudomonas</i>
ACCG021	0.19±0.01jk	11.88±0.70jk	+	—	—	Root system	DF-ACC	<i>Agrobacterium</i>
YL009	0.18±0.09k	1.73±0.09no	—	—	—	Root nodules	YMA	<i>Bacillus</i>
GL005	0.16±0.03l	16.67±0.04gh	—	—	—	Root nodules	Azorhizobium	<i>Agrobacterium</i>
YL021	0.13±0.06m	1.69±0.14no	—	+	—	Root nodules	YMA	<i>Pseudomonas</i>
YL017	0.13±0.06m	3.35±0.09mn	—	+	—	Root nodules	YMA	<i>Bacillus</i>
NL017	0n	4.70±0.31m	+	—	—	Root nodules	NFB	<i>Pseudomonas</i>
YG017	0n	19.56±0.10ef	+	+	—	Root system	YMA	<i>Enterobacter</i>

—: 检测阴性; +: 检测阳性. 不同小写字母表示组间数据差异显著($P<0.05$)—: Negative; +: Positive. Data with different lowercase letters are significantly different ($P<0.05$) among different groups.

有 *nifH* 基因,其中 1 株(GL023)属于假单胞菌属, 4 株(DFG001、ACCG020、DFJ003、DFJ006)属于土壤杆菌属, 1 株(DFJ011)属于克雷伯氏杆菌属, 它们均具有固氮酶活性, 其中 DFJ011、DFG001、GL023 的固氮酶活性较高。

40 株菌在分泌 IAA 方面的差异性极显著。所有检测菌株都可分泌 IAA, 含量范围为 1.30–43.53 mg/L, 其中 GL023 菌株分泌 IAA 含量最高, 其次是 YG014、DFJ006、GG019 和 DFJ003 较高, YJ005 和 YL024 菌株最低。

40 株菌中, 有 27 株具有产嗜铁素特性, 占总检测菌株的 67.5%; 22 株具有解磷酸钙特性, 占总检测菌株的 55%; 有 15 株兼具 4 种促生特性, 占总检测菌株 37.5%; 17 株兼具 3 种促生特性, 占总检测菌株 42.5%; 1 株兼具 2 种促生特性。

3 讨论与结论

3.1 关于葛根内生菌资源多样性研究

植物内生菌资源多样性表现在内生菌自身的多样性、宿主植物本身的多样性和植物分离器官组织的多样性^[5]。内生细菌的分离种类和数量受分离所采用的培养基、培养条件、宿主生长阶段及生存环境等因素的影响^[17]。研究表明, 药用植物内生真菌的优势菌群会随季节变化而产生差异, 非优势菌群或生长缓慢的内生真菌有时会因其生长空间受到限制而无法分离获得^[18]。不同地域葛根内生菌已有报道, 陈强从四川省葛藤根瘤中分离到 23 株根瘤菌, 分布于 *Bradyrhizobium* 和 *Mesorhizobium* 2 个属, 均为慢生型根瘤菌^[19]。谢徽等从四川省攀枝花葛藤根瘤中分离到 43 株菌, 分属于 *Bradyrhizobium*、*Rhizobium*、*Agrobacterium* 这 3 个属, 大部分为快生型, 少数为慢生型^[20]。熊党生从葛根中筛选出的产黄酮内生菌具有较强的抗氧化活性^[21]。本

研究以广西药食兼用型桂葛 8 号根部的 3 个不同部位为材料, 采用 6 种不同培养基分离到 2 门 4 纲 10 科 19 属内生菌群, 种群结构和遗传多样性在不同培养基和不同部位中分离存在差异, 该结果与黄丽丽等^[17]研究结果相吻合。此外, 本实验获得根瘤菌与土壤杆菌多为快生型, 与谢徽等^[20]研究结果基本吻合, 推测葛根根瘤菌科菌株主要以快生型为主。这些根瘤菌虽未检测出固氮酶 *nifH* 基因特异带, 却检测到具有促植物生长特性, 如菌株 GL005 在固氮酶活性和分泌 IAA 方面有良好的促植物生长特性, 是否是根瘤菌的固氮特性受翻译水平调控还是不同发育时期表达差异有待进一步证实。

本实验中分离到的芽孢杆菌属、假单胞菌属、土壤杆菌属、肠杆菌属是葛根优势菌群, 与前人报道的甘草、春兰根、石斛、重楼等中草药内生菌优势菌群结果相近^[8,22–23]。说明葛根促生内生菌资源非常丰富, 这些中草药内生细菌可能具有共同的优势种群定殖^[7]。这些内生菌是否与葛根互作调控葛根生长发育、葛根异黄酮积累有待进一步研究。

就宿主本身而言, 葛根种质资源资源丰富, 全世界葛属种类约 20 种, 我国约有 9 种和 2 个变种。不同种类、不同地域药用植物品质、产量差异较大, 其内生菌资源可能存在差异^[24], 因此葛根内生菌资源还需要从不同地域、不同品种、不同发育时期进行分离鉴定, 才能全面掌握葛根内生菌资源分布及其与葛根互作促生效应。本研究结果进一步丰富了葛根内生菌资源, 为葛根内生菌资源研究和开发利用提供理论指导。

3.2 内生菌功能多样性与葛根生长的相关性

研究表明, 内生细菌促进植物生长发育的机制主要有两种途径, 一是内生细菌通过生物固氮、产生铁载体、溶磷、合成特异酶或分泌产生植物生长素、细胞分裂素以及赤霉素等物质, 直

接促进植物的生长发育;二是通过促进宿主植物自身合成多种植物生长激素、改善植物对 N、P 等营养元素以及其他矿物质的利用率、诱导宿主植物合成一些小分子物质或者酶,提高植物对生物何非生物胁迫的敏感性,间接促进植物的生长发育^[5]。

内生菌分布于植物各组织,通过占据有利生态位,丰富的内生菌群落在利用植物的同时对植物的生长提供帮助,与根际、叶际等外部环境相比,作为内环境的微生物更容易发挥生物学功能和提高竞争力^[25]。大多数陆地植物通过根系与微生物建立共生关系。张敏等研究表明,在甘草中其根部内生细菌种类都比茎部丰富,且芽孢杆菌属(*Bacillus*)在根部为绝对优势菌^[8]。大量研究表明,芽孢杆菌属(*Bacillus*)在促生内生菌中占据重要位置,具有分泌促生物质,改善植物生长状况的能力^[26-27]。此外,芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)作为溶磷微生物也在促生内生菌上得到广泛认可。本研究得到的结果与前人研究结果相符。发现受检的 40 株内生菌有 80%兼具有 3-4 种促生特性,95%具有固氮活性,100%具有分泌 IAA 特性。推测葛根内生细菌可能通过多重促生效应直接促进葛根快速生长,但是否联合互作调控葛根产量和品质有待进一步研究。本研究所筛选出的高效促生内生菌为后续葛根-内生菌互作研究和开发利用提供了菌种和理论指导。

REFERENCES

- [1] 李淑彬,黄娟,周仁超,李泽恩,徐诗如,阮婷,庞启华. 南药植物高良姜内生细菌多样性及其促生潜力[J]. 生态学报, 2015, 35(10): 3204-3213.
LI SB, HUANG J, ZHOU RC, LI ZE, XU SR, RUAN T, PANG QH. Diversity and plant growth-promoting potential of bacterial endophytes of *Alpinia officinarum* Hance, a famous south-China medicinal plant[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(10): 3204-3213 (in Chinese).
- [2] 杜晓宁,徐惠娟,黄盼盼,代金霞. 宁夏枸杞内生细菌的多样性及其抑菌活性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(9): 1779-1787.
DU XN, XU HJ, HUANG PP, DAI JX. Diversity and antimicrobial activity of endophytic bacteria isolated from *Lycium barbarum* of Ningxia[J]. Microbiology China, 2015, 42(9): 1779-1787 (in Chinese).
- [3] 谢凤颖. 几种药用植物内生真菌的分离鉴定及菌丝培养特性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2012.
XIE FY. Isolation, identification and mycelium culture characteristics of endophytic fungi from several medicinal plants[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2012 (in Chinese).
- [4] 谭广秀. 具有抑菌活性的桑树内生菌的分离鉴定及其抑菌物质研究[D]. 镇江: 江苏科技大学硕士学位论文, 2012.
TAN GX. Isolation and identification of endophytes from mulberry with antibacterial activity and study on antibacterial substances[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University of Science and Technology, 2012 (in Chinese).
- [5] 吕艳娜,孙小萌,赵芮,李文静,刘晓晶,蒲高忠. 药用植物内生细菌多样性及其生物学作用[J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(6): 45-49.
LÜ YN, SUN XM, ZHAO R, LI WJ, LIU XJ, PU GZ. Diversity and biological effects of endophytic bacteria in medicinal plants[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2017, 36(6): 45-49 (in Chinese).
- [6] 孙君明,韩粉霞. 植物次生代谢产物异黄酮的调控机理[J]. 西南农业学报, 2005, 18(5): 663-667.
SUN JM, HAN FX. Manipulating mechanism of secondary metabolites-isoflavone in plants[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2005, 18(5): 663-667 (in Chinese).
- [7] GOLINSKA P, WYPIJ M, AGARKAR G, RATHOD D, DAHM H, RAI M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 108(2): 267-289.
- [8] 张敏,沈德龙,饶小莉,曹凤明,姜昕,李俊. 甘草内生细菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(4): 524-528.
ZHANG M, SHEN DL, RAO XL, CAO FM, JIANG X, LI J. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Glycyrrhiza*[J]. Microbiology China, 2008, 35(4): 524-528 (in Chinese).

- [9] 吴伟, 张鹏飞, 张桂萍, 李秀芳, 任嘉红. 连翘根际高效解有机磷细菌的筛选鉴定及促生长特性研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学版), 2018, 38(3): 93-100.
WU W, ZHANG PF, ZHANG GP, LI XF, REN JH. Screening, identification and growth promoting characteristics of high efficient organic phosphate-mineralizing bacterium from rhizosphere soils of *Forsythia suspensa*[J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences Edition), 2018, 38(3): 93-100 (in Chinese).
- [10] 陈小静, 冯定胜, 赵明, 张小洁, 王一丁. 四种华重楼内生细菌的初步研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2005, 42(4): 827-830.
CHEN XJ, FENG DS, ZHAO M, ZHANG XJ, WANG YD. Preliminary studies on 4 endophytic bacteria of *Paris polyphylla* var. *chineseis*[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2005, 42(4): 827-830 (in Chinese).
- [11] LIU KH, DING XW, DENG BW, CHEN WQ. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(9): 1171.
- [12] 杨旭东, 王爱勤, 何龙飞. 葛根种质资源及其开发利用研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(24): 11-16.
YANG XD, WANG AQ, HE LF. Research progress of *Radix puerariae* germplasms and its utilization[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(24): 11-16 (in Chinese).
- [13] 罗丽静. 广西甘蔗野生种质内生细菌及蔗豆间作内生根瘤菌的分离与鉴定[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文论文, 2014.
LUO LJ. Isolation and identification of endophytic bacteria from wild sugarcane germplasm and endophytic *Rhizobium* from intercropping sugarcane and bean in Guangxi[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2014 (in Chinese).
- [14] 魏娟, 何冬旭, 李国红, 张梁. 云南重楼内生细菌的分离鉴定及系统发育树分析[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(2): 165-169.
WEI J, HE DX, LI GH, ZHANG L. Isolation and identification of endophytic bacteria in *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch) and phylogenetic analysis[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(2): 165-169 (in Chinese).
- [15] 胡春锦, 林丽, 史国英, 汪茜, 王钱崧, 李杨瑞. 广西甘蔗根际高效联合固氮菌的筛选及鉴定[J]. 生态学报, 2012, 32(15): 4745-4752.
HU CJ, LIN L, SHI GY, WANG Q, WANG QS, LI YR. Screening and identification of associative nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of sugarcane in Guangxi[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(15): 4745-4752 (in Chinese).
- [16] 桂意云, 刘昔辉, 杨荣仲, 李杨瑞. 甘蔗不同部位的固氮酶活性检测[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 291-294.
GUI YY, LIU XH, YANG RZ, LI YR. Detection of nitrogenase activities in different parts of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)[J]. Plant Physiology Journal, 2007, 43(2): 291-294 (in Chinese).
- [17] 黄丽丽, 乔宏萍, 康振生. 植物内生细菌及其在农业方面的应用研究[J]. 临沂师范学院学报, 2006(6): 63-68.
HUANG LL, QIAO HP, KANG Z. Endophytic bacteria of plant and their application in agriculture[J]. Journal of Linyi Teachers' University, 2006(6): 63-68 (in Chinese).
- [18] 谭小明, 周雅琴, 陈娟, 郭顺星. 药用植物内生真菌多样性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(18): 1563-1580.
TAN XM, ZHOU YQ, CHEN J, GUO SX. Research progress on diversity of endophytic fungi in medicinal plants[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2015, 50(18): 1563-1580 (in Chinese).
- [19] 陈强, 陈文新, 张小平, 李登煜, LINDSTROM K. 四川省葛藤属根瘤菌的遗传多样性研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1641-1646.
CHEN Q, CHEN WX, ZHANG XP, LI DY, LINDSTROM K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Pueraria* spp. in Sichuan, China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(11): 1641-1646 (in Chinese).
- [20] 谢徽, 张小平, LINDSTROM K. 攀西地区葛藤根瘤菌的 RFLP 遗传多样性[J]. 四川农业大学学报, 2009, 27(3): 314-320.
XIE H, ZHANG XP, LINDSTROM K. RFLP genetic diversity of rhizobia isolated from *Pueraria lobata* in Panxi[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2009, 27(3): 314-320 (in Chinese).
- [21] 熊党生. 葛根内生菌的分离及其发酵产物抗氧化活性的初步研究[J]. 化工时刊, 2012, 26(1): 27-29.
XIONG DS. Kudzu isolation of endophytic bacteria and preliminary study of antioxidant activity of the fermentation product[J]. Chemical Industry Times, 2012, 26(1): 27-29 (in Chinese).
- [22] 孙磊, 邵红, 刘琳, 张瑞英, 赵立华, 李潞滨, 姚娜. 可产生铁载体的春兰根内生细菌多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 189-195.
SUN L, SHAO H, LIU L, ZHANG RY, ZHAO LH, LI

- LB, YAO N. Diversity of siderophore-producing endophytic bacteria of *Cymbidium goeringii* roots[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 189-195 (in Chinese).
- [23] 杨绍周, 吴毅歆, 邵德林, 朱隆华, 何月秋. 鼓槌石斛内生细菌分离、鉴定及功能分析[J]. 中国农学通报, 2014, 30(25): 171-176.
- YANG SZ, WU YX, SHAO DL, ZHU LH, HE YQ. Isolation, identification and functional analyses of endophytic bacteria from *Dendrobium chrysotoxum*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(25): 171-176 (in Chinese).
- [24] 童文君, 张礼, 薛庆云, 侯北伟, 丁小余. 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.
- TONG WJ, ZHANG L, XUE QY, HOU BW, DING XY. Isolation of endophytic bacteria in *Dendrobium loddigesii* collected from different locations and comparison on their plant-growth-promoting potential[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2014, 23(1): 16-23 (in Chinese).
- [25] 刘丽辉, 彭桂香, 黄淑芬, 王祖城, 庭友卫, 谭志远. 落地生根内生固氮菌多样性和促生特性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2538-2547.
- LIU LH, PENG GX, HUANG SF, WANG ZC, TING YW, TAN ZY. Diversity and growth promotion of endophytic diazotrophic bacteria isolated from *Bryophyllum pinnatum*[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2538-2547 (in Chinese).
- [26] BOKHARI A, ESSACK M, LAFI FF, ANDRES-BARRAO C, JALAL R, ALAMOUDI S, RAZALI R, ALZUBAIDY H, SHAH KH, SIDDIQUE S, BAJIC VB, HIRT H, SAAD MM. Bioprospecting Desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 18154.
- [27] 汪钱龙, 张德智, 王菊芬, 邓必强, 周丽洪, 魏兰芳. 不同植物促生细菌对玉米生长的影响及其生长素分泌能力研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2015, 30(4): 494-498.
- WANG QL, ZHANG DZ, WANG JF, DENG BQ, ZHOU LH, WEI LF. Effects of plant growth-promoting bacterial on the growth of maize and the IAA secrete ability detection[J]. Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Sciences, 2015, 30(4): 494-498 (in Chinese).