

研究报告



野大豆内生假单胞菌 YDX26 的鉴定及促生抗逆特性

朱梦卓¹ 孙洋洋¹ 赵晓妍¹ 董芮萌¹ 朱森¹ 汪雅楠¹ 王兰兰¹ 于翠梅² 马莲菊^{*1}¹ 沈阳师范大学生命科学学院 辽宁 沈阳 110034² 沈阳农业大学农学院 辽宁 沈阳 110161

摘要:【背景】野大豆具有栽培大豆所不具有的一些优良特性,这与其特有内生菌有关,已成为当下研究热点。【目的】对野大豆内生细菌进行分离鉴定,并从中筛选出具有促生和抗逆潜能菌株。

【方法】以组织分离法和涂布划线法进行细菌分离培养;根据形态特征、生理生化特性及基于 16S rRNA 基因序列系统发育分析对菌株进行菌种鉴定;通过选择性培养基或比色法等对菌株进行促生特性分析,采用水培试验分析菌株对水稻幼苗生长的影响;利用盐胁迫及聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)-6000 模拟干旱胁迫探究菌株抗逆性。【结果】分离得到一株编号为 YDX26 的细菌,基于菌株形态、理化特性和 16S rRNA 基因序列系统发育分析,将菌株 YDX26 初步鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)。该菌株溶磷量为 46.12 mg/L,吲哚-3-乙酸(Indole-3-Acetic Acid, IAA)活性为 19.97 μg/mL,1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylic Acid, ACC)脱氨酶活性为 3.95 μmol/(mg·h)。菌株 YDX26 对水稻幼苗株高、根长、地上部干重与地下部干重均有明显促进作用,分别提高了 17.34%、12.19%、5.32%和 10.70%。相较于对照菌株 DX22,在盐胁迫和干旱胁迫下,菌株 YDX26 表现出较好的耐盐和抗旱能力。【结论】野大豆内生细菌菌株 YDX26 具有较好的促生、耐盐和抗旱能力,可以作为农业生产上新的菌种资源。

关键词: 野大豆, 内生细菌, 鉴定, 促生能力, 抗逆性

Identification of endophytic *Pseudomonas* sp. YDX26 in *Glycine soja* and its growth-promoting and stress-resistant characteristicsZHU Mengzhuo¹ SUN Yangyang¹ ZHAO Xiaoyan¹ DONG Ruimeng¹ ZHU Miao¹
WANG Yanan¹ WANG Lanlan¹ YU Cuimei² MA Lianju^{*1}¹ College of Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang, Liaoning 110034, China² Agronomy College, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China

Abstract: [Background] *Glycine soja* has some excellent characteristics over the cultivated soybean, which is related to its unique endophytic bacteria and has become a research hotspot. [Objective] The

Foundation items: Fundamental Project of Education Department of Liaoning Province (LJC201912, LZD201901, LZD202004); Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Shenyang Normal University (202106037)

***Corresponding author:** E-mail: malianju@163.com

Received: 31-01-2021; **Accepted:** 05-06-2021; **Published online:** 18-06-2021

基金项目: 辽宁省教育厅项目(LJC201912, LZD201901, LZD202004); 沈阳师范大学大学生创新创业训练计划(202106037)

***通信作者:** E-mail: malianju@163.com

收稿日期: 2021-01-31; **接受日期:** 2021-06-05; **网络首发日期:** 2021-06-18

endophytic bacteria of *G. soja* were isolated and identified. The strains with growth-promoting activity and stress-resistant potential were screened out. **[Methods]** The endophytic bacteria were isolated by tissue culture and streaking method. The strains were identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics and the 16S rRNA gene sequence-based phylogenetic analysis. The growth-promoting characteristics of the strains were analyzed by selective media or colorimetric method. Hydroponic experiment was carried out to analyze the effect of strain on the growth of rice seedlings. Salt stress and PEG-6000 simulated drought stress were used to explore the stress resistance of the strain. **[Results]** A strain YDX26 was isolated. According to the morphological, physiological and biochemical characteristics, and the results of phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence, the strain YDX26 was primarily identified as *Pseudomonas* sp. This strain had the phosphorus solubilization of 46.12 mg/L, the IAA activity of 19.97 $\mu\text{g/mL}$, and the ACC deaminase activity of 3.95 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$. Moreover, it significantly increased the height, root length, aboveground dry weight, and underground dry weight of rice seedlings by 17.34%, 12.19%, 5.32%, and 10.70%, respectively. Compared with the control strain DX22, strain YDX26 showed improved salt and drought tolerance. **[Conclusion]** The endophytic bacterial strain YDX26 has better growth-promoting ability and salt and drought tolerance, and thus can be used as a new strain resource for agricultural production.

Keywords: *Glycine soja*, endophytic bacteria, identification, growth-promoting capability, stress resistance

植物内生细菌(Endophytic Bacteria)是指生活于植物组织内部但不引起明显病害的细菌^[1], 具有生存空间稳定以及不受外界环境影响等特点^[2]。截至目前, 人们已经从多种植物中分离得到超过 219 种(隶属于 71 个属)内生细菌, 其中以假单胞菌、芽孢杆菌、肠杆菌及土壤杆菌为优势种群^[3-4]。内生细菌可以通过固氮、溶磷、解钾、分泌植物激素等功能直接促进植物生长发育; 也可通过分泌铁载体、1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylic Acid, ACC)脱氨酶、水解酶以及抗生素等物质来帮助宿主植物提高对重金属、盐碱、病害等的抗性, 改善植物健康状况^[5]。Daungfu 等^[6]从柑桔中分离出的内生芽孢杆菌对柑桔溃疡病有较好的拮抗作用; 李亮亮等^[7]从松树体内分离出 3 株细菌, 发现其对松材线虫有较高杀线活性。姚玉玲等^[8]从高寒草地矮生嵩草中分离到一株内生细菌 263AG5, 发现该菌株除了对马铃薯炭疽病病原菌有较好的抑制作用, 还具有固氮和产吲哚-3-乙酸(Indole-3-Acetic Acid, IAA)功能; Rojas-Solis 等^[9]筛选出内生细菌 *Pseudomonas stutzeri* E25 和 *Stenotrophomonas maltophilia* CR71, 温室试验结果表明这 2 株细菌

能明显地提高番茄叶绿素含量和生物量。

野大豆(*Glycine soja*)是栽培大豆的近缘种^[10], 我国保存有世界上最丰富的野大豆资源^[11]。野大豆因其生境复杂, 形成了具有强适应性和强抗逆性等特点, 这些进化特点使野大豆成为具有很高研究价值的理想材料^[12]。因此, 分离筛选出具有优良特性的野大豆内生菌, 对其进行深入探究, 发掘野大豆在农业领域的应用具有重大意义。目前, 张丹雨等^[13]从野大豆根际土中分离出 2 株根际促生菌(DB17、DB58), 发现它们不仅对水稻幼苗具有明显的促生作用, 而且对甜瓜枯萎病有着极强的抑菌性; 周振宇等^[14]研究表明, 野大豆内生真菌除了对瓜果腐霉等病原菌具有抑菌作用外, 还在抗盐和重金属等非生物胁迫中表现出极强的能力。然而, 关于野大豆内生细菌的相关研究很少, 尤其是在促生抗逆等方面的研究鲜有报道。

本研究从野大豆根中分离筛选得到一株内生细菌 YDX26, 分别从溶磷、合成生长素能力、产 ACC 脱氨酶活性、抗逆性和盆栽促生效果作用等方面进行研究, 以期对野大豆内生细菌种质资源的基础研究和开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

野大豆：2017年9月于辽宁省沈阳市蒲河地区采集健康植株；采样时整株植物拔出，低温保存，带回实验室后立即进行处理。

假单胞菌菌株 DX22：由沈阳师范大学菌种资源库提供。

1.1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨固体培养基、牛肉膏蛋白胨液体培养基和 LB 液体培养基，用于供试菌株培养；DF 培养基和 ADF 培养基，用于菌株产 IAA 和 ACC 脱氨酶活性测定；有机磷卵黄培养基和 PKO 无机磷培养基，用于溶磷能力测定。培养基的配制见参考文献[15]。

1.1.3 主要试剂和仪器

16S rRNA 基因扩增引物、*Taq* 聚合酶，生工生物工程(上海)股份有限公司；常规化学试剂，北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。恒温振荡培养箱，哈尔滨东联电子技术开发有限公司；PCR 仪，上海领成生物科技有限公司；紫外可见分光光度计，上海精密科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 野大豆内生细菌的分离纯化

将野大豆的根、茎和叶在无菌水下冲洗 30 min，然后切成长约 3 mm 小块，依次放在 75%酒精浸泡灭菌 30 s、0.1%升汞溶液消毒 30–40 s，再用无菌水冲洗 3 次，取最后一次洗涤液作对照，即取 20 μ L 的洗涤液涂抹于 NA 平板上，将其置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 2 d，若发现培养皿中无菌落出现，证明该组织表面消毒彻底。取彻底灭菌的组织块放在 NA 平板上进行分离培养，每个处理 3 次重复，置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 2 d，根据菌落形态、颜色等挑取不同单菌落，利用平板划线法进行菌种纯化，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.2 菌株 YDX26 的鉴定

(1) 分子生物学鉴定：采用菌落 PCR 法扩增菌株 16S rRNA 基因片段。以菌株 YDX26 基因组 DNA 为模板，采用细菌 16S rRNA 基因正向引物 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和反向引物 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L)：DNA 样品 2 μ L，引物 27F 和 1492R (10 μ mol/L)各 1 μ L，*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 25 μ L，ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 10 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 60 s，72 $^{\circ}$ C 1 min，30 次循环；72 $^{\circ}$ C 10 min；4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序，将测序结果剔除两边的杂峰后在 NCBI 数据库中进行 BLAST 序列比对，用 MEGA 7.0 软件中的邻接法构建系统发育树，确定菌株的分类学地位^[16]。

(2) 形态学观察及生理生化特征鉴定：将保存的菌株在牛肉膏蛋白胨固体培养基上活化，28 $^{\circ}$ C 培养 2 d，观察菌落特征及革兰氏染色特性；参照《伯杰细菌鉴定手册》^[17]和《常见细菌系统鉴定手册》^[18]分析生理生化特征。

1.2.3 菌株 YDX26 生长曲线

采用 LB 液体培养基将菌株 YDX26 活化，30 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养 24 h 制成种子液。取 1 mL 种子液接种于 50 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基(浓度 2%)，30 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养 48 h 制成母液。然后接种母液于 50 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中(每瓶 1 mL)，30 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养，每 4 h 取样测定其生物量(*OD*₆₀₀)，直测到 52 h，每组 3 次重复，绘制生长曲线图。

1.2.4 菌株 YDX26 促生能力测定

溶磷能力参考王玉琴等^[19]的方法进行溶有机磷和溶无机磷能力测定。

菌株产 IAA 活性的测定采用比色法^[20]，对菌株产 IAA 能力进行分析。

ACC 脱氨酶活性的测定参考 Glick^[21]的方法。

1.2.5 菌株 YDX26 对水稻幼苗生长的影响

挑选饱满的水稻种子, 依次经过 1% 的次氯酸钠溶液表面灭菌 40 s、75% 乙醇消毒 30 s 和无菌水漂洗 4–5 次; 接着在无菌水中浸种 1 d, 然后置于 28 °C 恒温培养箱内催芽 24 h; 待种子发芽后, 播种在装有 100 mL 霍格兰营养液的烧杯中, 置于 28 °C 光照培养箱内培养。水稻幼苗长至二叶一心时, 向培养液中加入 1 mL 菌株发酵液(OD_{600} 约为 1.0, 约 1×10^9 CFU/mL), 以加入无菌培养基溶液作为对照, 每组 3 次重复; 培养 8 d 后, 从每组随机抽取 10 株水稻幼苗测定地上部和地下部干重等指标。

1.2.6 菌株 YDX26 的抗性测定

(1) 菌株 YDX26 的耐盐能力

分别配制含 NaCl 浓度为 0%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、5.0%、7.0%、9.0% 和 11.0% (质量体积分数) 的 LB 液体培养基, 将菌株 YDX26 和对照假单胞菌属菌株 DX22 接种在不同 NaCl 浓度的培养基中, 每组 3 次重复, 在 30 °C、120 r/min 下振荡培养至对数期(OD_{600} 约为 1.0), 测量样品生物量(OD_{600})。

(2) 菌株 YDX26 的抗旱能力

设置 PEG-6000 浓度分别为 0%、7.5%、9.0%、10.5%、12.0%、13.5% 和 15.0% 的牛肉膏蛋白胨液体培养基, 将菌株 YDX26 和对照菌株 DX22 接种在不同浓度的培养基中, 每组 3 次重复, 在 30 °C、120 r/min 振荡培养至对数期(OD_{600} 约为 1.0), 测量样品生物量(OD_{600})。

2 结果与分析

2.1 野大豆内生细菌的分离

通过采用组织分离法从野生大豆的根、茎和叶中分离出 32 株内生细菌, 分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、虚构芽孢杆菌属(*Fictibacillus*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、普罗威登斯菌属(*Providencia*)和类香菌属(*Myroides*)。其中编号为

YDX26 的菌株是从野生大豆根中分离获得。

2.2 菌株 YDX26 鉴定结果

2.2.1 菌株分子生物学鉴定结果

菌株 YDX26 在 GenBank 中的序列登录号为 MW757158。将该菌株测序所得序列与 GenBank 中已发表的 16S rRNA 基因序列进行同源性比对, 结果显示菌株 YDX26 同 *Pseudomonas mosselii* (NR024924.1)、*Pseudomonas soli* (NR134794.1) 和 *Pseudomonas entomophila* (NR102854.1) 等具有较高的序列相似性, 相似性均为 99%。系统发育树显示, 菌株 YDX26 与 *Pseudomonas mosselii* (NR024924.1) 聚在同一簇内, 说明菌株 YDX26 同 *Pseudomonas mosselii* (NR024924.1) 具有较近的同源关系, 属于 *Pseudomonas* sp. (图 1)。

2.2.2 菌株形态学观察及生理生化特征

经形态学观察, YDX26 菌落为白色圆形, 湿润粘稠, 表面平滑有光泽、边缘整齐; 细胞呈杆状, 革兰氏染色呈阴性, 大小为 $(1.8-2.0) \mu\text{m} \times (0.8-1.0) \mu\text{m}$, 多数单生, 有鞭毛和荚膜结构 (图 2)。菌株 YDX26 生理生化鉴定结果见表 1, 其接触酶试验、明胶液化测试、氧化酶、精氨酸双水解酶及葡萄糖、蔗糖和麦芽糖发酵均为阳性, 其余项目为阴性; 该菌株可在 4–41 °C 生长。查阅《常见细菌系统鉴定手册》^[18], 发现菌株 YDX26 符合假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) 特征。结合菌株分子鉴定结果, 初步将菌株 YDX26 鉴定为 *Pseudomonas* sp.。

2.3 菌株 YDX26 的生长曲线

测定细菌的生长曲线, 可以使人们更好地了解细菌的生长繁殖规律, 这对有效地利用和控制细菌的生长具有重要意义。由图 3 可知, 菌株 YDX26 在生长的前 4 h, OD_{600} 值基本保持不变, 0–4 h 为菌株的生长停滞期, 该期间活菌数量几乎不增加; 4 h 后, OD_{600} 值开始迅速增加, 活菌数量也呈对数增加, 细菌进入对数生长期, 28 h 时 OD_{600} 值达到最大, 为 1.731, 4–28 h 是菌株的对数生长

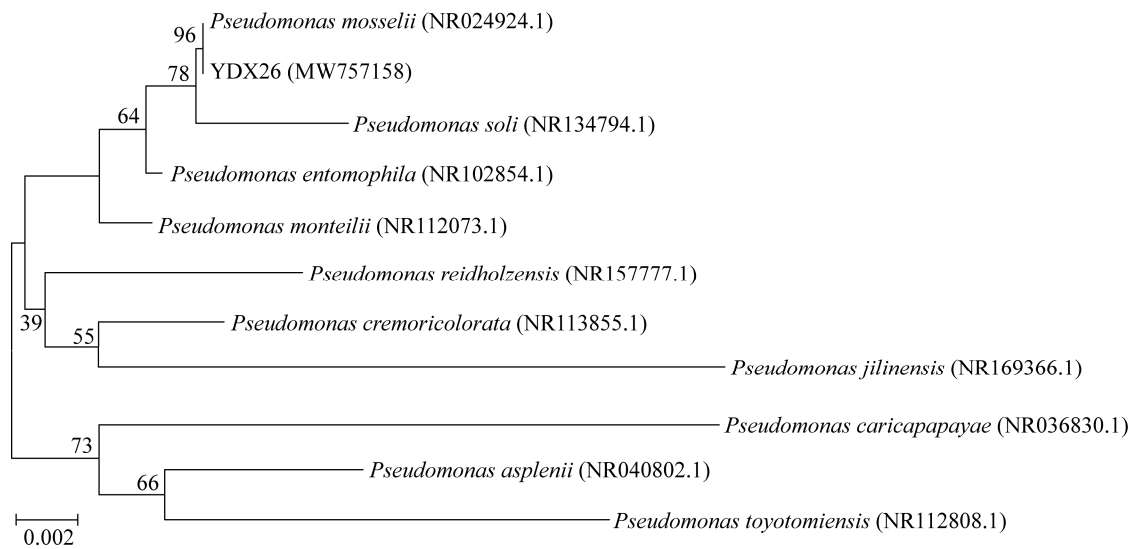


图 1 菌株 YDX26 及其近缘模式菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain YDX26 and its affinis model strain constructed based on the 16S rRNA gene sequence

注：分支上的数字为 Bootstrap 值，代表分类单位被聚在一起的概率；标尺代表碱基替换

Note: The numbers on the branches are bootstrap values, which indicate the probability that the taxa are clustered together; The scale represents base substitution

期；在 28 h 后菌株 YDX26 开始进入稳定期。菌株 YDX26 的对数生长期和稳定期都较长，通常认为细菌在这个时期代谢旺盛，对外界的不良环境有很强的抵抗力。由此可见，菌株 YDX26 对数生长期和稳定期较长的特点对于后期资源化应用是非常有利的。

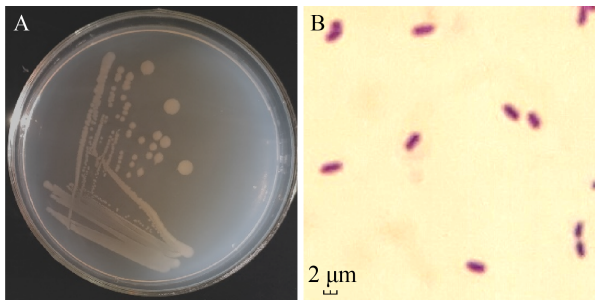


图 2 菌株 YDX26 的菌落和细胞形态特征

Figure 2 Colony and cell morphological characteristics of strain YDX26

注：A：菌株 YDX26 菌落形态；B：菌株 YDX26 细胞形态 (100×)，标尺=2 μm

Note: A: Colony morphology of strain YDX26; B: Cell morphology of strain YDX26 (100×), bar=2 μm

表 1 菌株 YDX26 的主要生理生化特征

Table 1 The main physiological and biochemical characteristics of strain YDX26

| 检测项目 Test items | 结果 Results |
|----------------------------------|------------|
| VP 试验 VP test | — |
| MR 试验 MR test | — |
| 石蕊牛乳试验 Litmus milk test | — |
| 接触酶试验 Catalase test | + |
| 硫化氢试验 Hydrogen sulfide test | — |
| 明胶液化测试 Gelatin liquefaction test | + |
| 氧化酶 Oxidase | + |
| 精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase | + |
| 淀粉水解试验 Starch hydrolysis test | — |
| 硝酸盐还原 Nitrate reduction | — |
| 葡萄糖 Glucose | + |
| 乳糖 Lactose | — |
| 蔗糖 Sucrose | + |
| 麦芽糖 Maltose | + |
| 4 °C 生长 Growth at 4 °C | + |
| 41 °C 生长 Growth at 41 °C | — |

注：+：阳性；—：阴性

Note: +: Positive; -: Negative

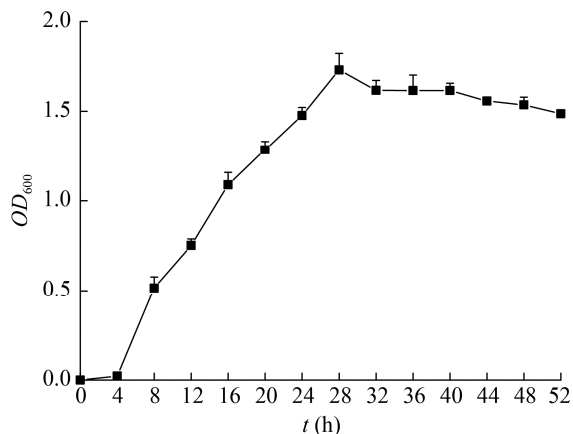


图3 菌株 YDX26 于 30 °C 培养的生长曲线
Figure 3 Growth curve of strain YDX26 at 30 °C

2.4 菌株 YDX26 的促生能力

试验结果表明菌株 YDX26 具有多种促生能力, 包括溶磷、产 IAA 以及 ACC 脱氨酶活性。其中溶解有机磷 D/d 值为 1.40 ± 0.10 , 溶解无机磷能力达到 46.12 ± 0.09 mg/L; 该菌株分泌 IAA 能力达到 19.97 ± 0.03 μ g/mL, ACC 脱氨酶活性达到 3.95 ± 0.02 μ mol/(mg·h)。

2.5 菌株 YDX26 对水稻幼苗生长的影响

水培试验结果表明, 菌株 YDX26 对水稻幼苗长势、生物量及主要农艺性状均明显优于对照 (图 4A)。图 4B 数据所示, 菌株 YDX26 对水稻幼苗株高表现出一定的促生作用, 比对照增加了 17.34%, 与对照相比呈显著差异 ($P < 0.05$); 除了能够使幼苗株高增加外, 菌株 YDX26 还能够促进根系发育, 与对照相比, 根长增加了 12.19%, 差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。菌株 YDX26 对水稻幼苗的干物质积累量也呈现出不同影响 (图 4C), 与对照组相比, 处理组地上部干重提高了 5.32%, 地下部干重提高了 10.70% ($P < 0.05$)。

2.6 菌株 YDX26 的抗性测定

2.6.1 菌株 YDX26 的耐盐能力

OD_{600} 值通常用来衡量菌液浓度, 相对菌浓度 (OD_{600} 值) 可以客观地反映菌株在盐胁迫下的相对耐盐性^[22]。图 5 数据显示, 菌株 YDX26 在 NaCl

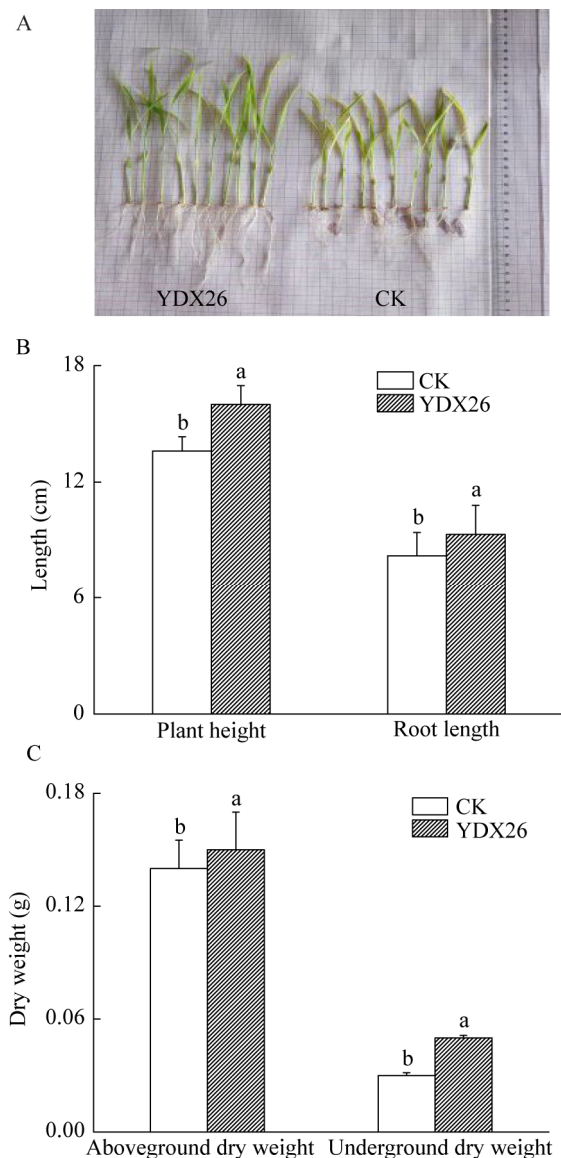


图4 菌株 YDX26 对水稻幼苗生长的影响

Figure 4 Effects of strain YDX26 on the growth of rice seedlings

注: A: 菌株 YDX26 对水稻幼苗表型的影响, CK 和菌株 YDX26 分别代表未接种和接种菌株 YDX26 的处理; B: 菌株 YDX26 对水稻幼苗株高和根长的影响, 柱形图上不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); C: 菌株 YDX26 对水稻幼苗地上部和地下部干重的影响, 柱形图上不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: A: Effects of strain YDX26 on the phenotype of rice seedlings, CK and YDX26 represent the nothing-inoculated and strain YDX26-inoculated, respectively; B: Effects of strain YDX26 on plant height and root length of rice seedlings, the different letter means significant difference ($P < 0.05$); C: Effects of strain YDX26 on aboveground and underground dry weight of rice seedlings, the different letter means significant difference ($P < 0.05$)

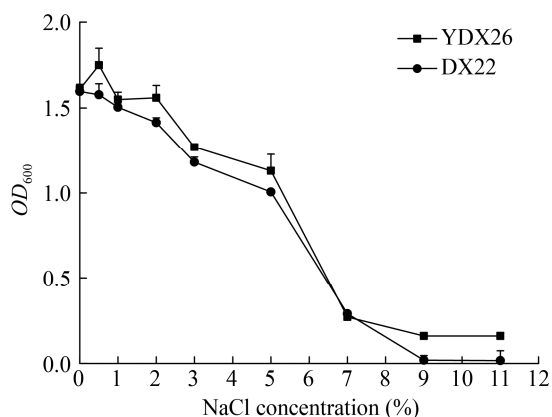


图 5 不同浓度 NaCl 胁迫对菌株 YDX26 的影响
Figure 5 Effects of different NaCl concentrations on strain YDX26

浓度为 0.5% 时, OD_{600} 值高于未加 NaCl, 说明适宜的盐浓度有利于菌株 YDX26 的生长; 随 NaCl 浓度的提高, 菌株 YDX26 与对照菌株 DX22 的 OD_{600} 值均表现为降低, 菌浓度下降, 说明两菌株的生长受到抑制。当 NaCl 浓度低于 5% 时, 菌株 YDX26 的 OD_{600} 值高于对照菌株 DX22; 当 NaCl 浓度在 5%–7% 时, 2 株内生细菌的 OD_{600} 值均明显下降, 菌株生长受到明显抑制, 但菌株 YDX26 的 OD_{600} 值仍高于对照菌株 DX22; 当 NaCl 浓度达到 11% 时, 菌株 YDX26 仍能生长, 而菌株 DX22 则不能生长。结果表明菌株 YDX26 与对照菌株 DX22 相比具有较强的耐盐性。

2.6.2 菌株 YDX26 的抗旱能力

通过设置不同浓度 PEG-6000 模拟干旱来研究菌株 YDX26 的抗旱能力。由图 6 可知, 随着干旱胁迫程度的增加 (PEG-6000 浓度 > 7.5%), 菌株 YDX26 与对照菌株 DX22 的 OD_{600} 值与未加 PEG-6000 相比均呈下降趋势, 菌液浓度降低, 表明菌株的生长受到了一定的影响。当 PEG-6000 浓度为 0%–15% 时, 菌株 YDX26 的 OD_{600} 值均高于对照菌株 DX22, 尤其在 PEG-6000 浓度为 15% 时, 菌株 DX22 生长缓慢, 菌株 YDX26 的生物量比对照菌株 DX22 增加了 26.9%。结果表明菌株 YDX26 与对照菌株 DX22 相比具有较强的耐旱性。

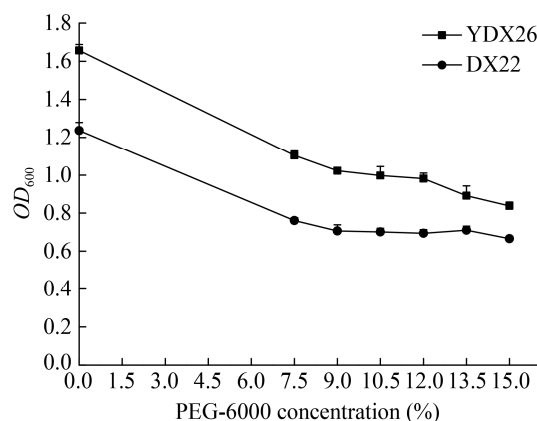


图 6 不同浓度 PEG-6000 胁迫对菌株 YDX26 的影响
Figure 6 Effects of different PEG-6000 concentrations on strain YDX26

3 讨论

野大豆对外界的不良环境具有很强的耐受性和抗性, 这些优良特性是其长期在不同生存环境条件下演化出来的对逆境的生理生化和分子适应, 除了有遗传因素调控外, 还有一些微生物发挥了重要作用^[23]。因此, 野大豆与其特有的内生菌间的联系也成为当下一个重要的研究方向^[24]。

许多植物内生菌可以通过其产生的自身代谢产物 (如 IAA、ACC 脱氨酶等) 促进细胞生长、加速细胞分化、抑制植物产生过量乙烯, 从而促进宿主植物生长^[25]。磷作为植物生长的必需营养元素, 既参加许多重要的代谢活动, 又是很多器官的组成成分。土壤中虽然含有大量的磷元素, 但大部分磷都以难溶的化合物存在, 导致植物无法直接吸收利用^[26]。因此, 将矿物态磷转变为可以被吸收的有效磷, 为植物及其他微生物提供磷源的溶磷微生物就显得尤为重要^[27]。刘国强等^[28]从黑果枸杞分离得到一株具有溶磷和产铁载体能力、产 IAA 等多功能性菌株, 进行盆栽试验发现接种菌株后对植物的鲜重和干重等生长指标均有促进作用。赵龙飞等^[29]从大豆根瘤中筛选出 8 株具有 ACC 脱氨酶活性的内生细菌, 其中菌株 DD132 的 ACC 脱氨酶活性最高, 对小麦促生效果最为明

显。Yu 等^[30]从大豆根中分离出的微杆菌和赖氨酸杆菌能够分泌大量的 IAA, 研究发现这 2 株菌均能显著促进供试大豆植株的生长。杨杉杉等^[31]分离出一株 *Pseudomonas* sp. 属菌株 BP16, 其发酵液中产 IAA 量为 8.93 mg/L, 低于菌株 YDX26 产 IAA 含量, 盆栽试验表明菌株 BP16 对小麦生长具有显著促进作用, 与 CK 相比, 株高、根长和干重分别增加了 6.97%、18.17% 和 90.90%。Chen 等^[32]从杉树中分离到一株具有溶磷能力和 ACC 脱氨酶活性的假单胞属细菌 JRP22, 接种杉树幼苗后, 能够显著增加杉树幼苗的高度和茎粗等。与上述实验结果相比, 本实验研究的菌株 YDX26 同时具备溶磷、产 IAA 能力和 ACC 脱氨酶活性, 说明菌株 YDX26 也具有促生潜力; 为此, 本实验又通过水培试验研究菌株 YDX26 对水稻幼苗的促生作用, 发现接种菌株 YDX26 对水稻幼苗生长具有明显促生作用, 株高、根长、地上部干重和地下部干重分别比对照增加了 17.34%、12.19%、5.32% 和 10.70%, 进一步证明菌株 YDX26 对植物具有促生作用。

有研究报道一些内生菌株自身具有耐盐、抗旱等能力。吴萍等^[33]从大豆根瘤中分离出 32 株内生菌, 其中 93.8% 菌株能在含 3% NaCl 的培养基上生长, 78.1% 菌株能在含 7% NaCl 的培养基上生长。Li 等^[34]从健康植物 *Lepidium perfoliatum* L. 的根、茎、叶中分离出 62 株内生细菌, 其中 89% 的菌株能耐 12% 的 NaCl, 87% 的菌株能耐 30% 的 PEG。Chen 等^[35]从西北荒漠地区采集的骆驼刺植物组织中分离获得一株内生细菌 *Pantoea alhagi* LTJR-11Z, 能够耐受 9% NaCl 和 20% PEG。自身具有耐盐抗旱能力的内生菌株侵染作物后, 可以增强作物抗逆性, 促进作物生长^[36-39]。Sapre 等^[40]分离自小麦根际的耐盐促生菌株 IG3 在 100 mmol/L 盐浓度胁迫下能够显著提高燕麦耐盐性, 促进燕麦生长。Khan 等^[41]从 *Artemisia princeps* Pamp. 中分离出一株内生细菌 *Curtobacterium* sp. SAK1, 其

能够显著提高大豆的耐盐性。Eke 等^[42]从沙漠仙人掌中分离出 4 株可耐受 5%–40% PEG-6000 浓度的内生细菌, 在干旱胁迫下接种番茄能够显著提高其抗性, 从而增加幼苗的成活率。在本实验中, 内生细菌 YDX26 表现出一定的耐盐和抗旱能力, 最大可耐受 11% NaCl 浓度, 可在 15% PEG-6000 浓度的培养基上生长, 说明该菌株具有提高作物抗逆的潜力, 促进作物生长。

目前, 关于假单胞菌属菌株的应用, 除了用于促进植物生长外, 还用来进行污染土壤的生物修复。如从高羊茅根际土壤中分离得到的 *Pseudomonas* sp. SB 能够降低土壤中的石油烃和多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 的含量^[43]。假单胞菌属中也有一些属对动物、植物和人类具有致病性, 因此, 假单胞菌属菌株在被用于生产实际前, 应对其进行安全性评估。

4 结论

野大豆内生细菌 YDX26, 经形态学、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.), 该菌株具有溶磷、产 IAA 和产 ACC 脱氨酶等多种植物促生特性, 对水稻幼苗具有显著的促生作用。菌株 YDX26 具有一定的耐盐性, 最大可耐受 11% 的 NaCl 浓度, 在 7.5%–15.0% 的 PEG-6000 浓度培养基上该菌株也能较好地生长。因此, 菌株 YDX26 可作为植物促生菌剂用菌种, 是一株值得开发和应用的潜在菌株。

REFERENCES

- [1] Chaouachi M, Marzouk T, Jallouli S, Elkahoui S, Gentzbittel L, Ben C, Djéali N. Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 172: 111389
- [2] Chen L, Liang ZN, Zhu H. Research advances in the studies of plant endophytic[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(8): 30-34 (in Chinese)
陈龙, 梁子宁, 朱华. 植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(8): 30-34
- [3] Chen ZB, Xia ZY, Lei LP, Chen HR. Diversity of cultivable endophytic bacteria isolated from tobacco[J].

- Microbiology China, 2011, 38(9): 1347-1354 (in Chinese)
陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 陈海如. 烟草可培养内生细菌的分离及多样性分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1347-1354
- [4] Sun K, Liu J, Li X, Ling WT. Isolation, identification, and performance of two pyrene-degrading endophytic bacteria[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(4): 853-861 (in Chinese)
孙凯, 刘娟, 李欣, 凌婉婷. 两株具有芘降解功能的植物内生细菌的分离筛选及其特性[J]. 生态学报, 2014, 34(4): 853-861
- [5] Pérez-Montaño F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, Del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, Cubo T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production[J]. Microbiological Research, 2014, 169(5/6): 325-336
- [6] Daungfu O, Youpensuk S, Lumyong S. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants[J]. Tropical Life Sciences Research, 2019, 30(1): 73-88
- [7] Li LL, Tan JJ, Chen FM. The screening and identification of two bacterial strains with nematicidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2017, 41(4): 37-41 (in Chinese)
李亮亮, 谈家金, 陈凤毛. 两株松材线虫拮抗细菌的筛选和鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2017, 41(4): 37-41
- [8] Yao YL, Wang Y, Wang YQ, Yang CD. Identification of endophytic bacteria from *Kobresia humilis* and determination of phosphate-solubilizing, IAA secretion and antagonistic abilities[J]. Acta Agrestia Sinica, 2014, 22(6): 1252-1257 (in Chinese)
姚玉玲, 王颖, 王玉琴, 杨成德. 矮生嵩草内生细菌溶磷、抑菌和产 IAA 能力的测定及鉴定[J]. 草地学报, 2014, 22(6): 1252-1257
- [9] Rojas-Solis D, Zetter-Salmón E, Contreras-Pérez M, Rocha-Granados MDC, Macías-Rodríguez L, Santoyo G. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 13: 46-52
- [10] Xu M, Wang YN, Li YJ, Li MX, Wang LL, Yu CM, Ma LJ. Screening and identification of a wild soybean endophytic fungus YD-25 and its anti-heavy metal activity[J]. Soybean Science, 2019, 38(2): 258-266 (in Chinese)
徐萌, 王宇楠, 李滢璟, 李梦雪, 王兰兰, 于翠梅, 马莲菊. 一株野生大豆内生真菌 YD-25 的筛选鉴定及其抗重金属活性研究[J]. 大豆科学, 2019, 38(2): 258-266
- [11] Fu YL, Wei ZY, Wang Y, Liu XY, Wang BB, Qiao YK, Li GL, Zhang K. Identification of saline-alkali stress and determination of physiological index of wild soybean (*Glycine soja*) in eastern Hebei province[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(10): 2316-2325 (in Chinese)
符杨磊, 魏志园, 王宇, 刘潇阳, 王冰冰, 乔亚科, 李桂兰, 张锴. 冀东野生大豆(*Glycine soja*)耐盐碱性鉴定及耐性生理指标测定[J]. 核农学报, 2020, 34(10): 2316-2325
- [12] Guo Y, Yang P, Zhang DY, Liu YY, Ma LJ, Bu N. Screening, identification and growth-promoting effect of multifunction rhizosphere growth-promoting strain of wild soybean[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(10): 108-115 (in Chinese)
郭英, 杨萍, 张丹雨, 刘莹莹, 马莲菊, 卜宁. 野大豆多功能根际促生菌的筛选鉴定和促生效果研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(10): 108-115
- [13] Zhang DY, Qu TT, Liu YY, Guo Y, Bu N. Antibacterial function and promoting effect of two plant growth promoting rhizobium from *Glycine soja*[J]. Soybean Science, 2019, 38(4): 563-569 (in Chinese)
张丹雨, 曲甜甜, 刘莹莹, 郭英, 卜宁. 2 株野生大豆根际促生菌抑菌促生作用研究[J]. 大豆科学, 2019, 38(4): 563-569
- [14] Zhou ZY, Hu JL, Su X, Liu DX, Bu N, Ma LJ. Identification and resistance of an endophytic fungus YD02 strain in wild *Glycine soja*[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(11): 106-111 (in Chinese)
周振宇, 胡金丽, 苏昕, 刘冬雪, 卜宁, 马莲菊. 一株野大豆内生真菌 YD02 菌株的鉴定及抗逆性研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(11): 106-111
- [15] Zhou DQ. Microbiology Experiment Manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1986 (in Chinese)
周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986
- [16] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [17] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
- [18] Dong XZ, Cai MY. Systematic Identification Manual of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)

- Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [19] Wang YQ, Yang CD, Wang Y, Yao YL, Chen XR. Identification and determination of biological functions of endophytic bacteria 265ZY4 from *Stipa capillata*[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 101-109 (in Chinese)
王玉琴, 杨成德, 王颖, 姚玉玲, 陈秀蓉. 针茅内生细菌菌株 265ZY4 的鉴定及其生物学功能[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 101-109
- [20] Amprayn KO, Rose MT, Kecskés M, Pereg L, Nguyen HT, Kennedy IR. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 61: 295-299
- [21] Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 251(1): 1-7
- [22] Wang XC, Ma XT, Han M, Cao WD, Zhang HL, Bai JS, Zeng NH, Gao SJ, Zhou GP, Wang YQ. Screening of rhizobia of common vetch (*Vicia sativa*) in Qinghai, and assessment of symbiont salt tolerance[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(8): 145-153 (in Chinese)
王雪翠, 马晓彤, 韩梅, 曹卫东, 张宏亮, 白金顺, 曾闹华, 高嵩涓, 周国朋, 王艳秋. 青海箭筈豌豆根瘤菌的筛选及其共生体耐盐性研究[J]. 草业学报, 2016, 25(8): 145-153
- [23] Kong YF, Zhu XC, Zhang JF, Tian CJ. Responses of drought resistance from wild and cultivated soybeans to arbuscular mycorrhizal fungi inoculation[J]. Soils and Crops, 2017, 6(1): 25-31 (in Chinese)
孔钰凤, 朱先灿, 张建峰, 田春杰. 野生大豆与栽培大豆抗旱性对接丛枝菌根真菌的响应[J]. 土壤与作物, 2017, 6(1): 25-31
- [24] Ratnaweera PB, De Silva ED, Williams DE, Andersen RJ. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp.[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015, 15: 220
- [25] Sheng XF, Xia JJ, Jiang CY, He LY, Qian M. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape[J]. Environmental Pollution, 2008, 156(3): 1164-1170
- [26] Yang H, Fan BQ, Gong MB, Li QX. Isolation and identification of a novel phosphate-dissolving strain P21[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(1): 51-56 (in Chinese)
杨慧, 范丙全, 龚明波, 李全霞. 一株新的溶磷草生欧文氏菌的分离、鉴定及其溶磷效果的初步研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(1): 51-56
- [27] Gu Y. Comparison of phosphate-solubilizing bacteria from oxidized tailings and rhizosphere tailings of *Imperata cylindrica*[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2018, 49(1): 119-125 (in Chinese)
谷艳. 氧化尾矿与白茅根际尾矿中可培养溶磷菌比较研究[J]. 土壤通报, 2018, 49(1): 119-125
- [28] Liu GQ, Habden Xugela, Ai SJ, Wang HB, Zheng Y. Isolation and identification of growth-promoting rhizobacteria from *Lycium ruthenicum* soil and their promoting effects[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2019, 58(1): 56-62 (in Chinese)
刘国强, 旭格拉·哈布丁, 艾山江, 王洪斌, 郑勇. 黑果枸杞根际促生菌的筛选鉴定及促生能力分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2019, 58(1): 56-62
- [29] Zhao LF, Xu YJ, Chang JL, Li M, Zhang YL, Dang YJ, Wang MS, Cheng YW, Zhang BY. Screening, resistance and growth-promoting effect of endophytic bacteria with ACC deaminase activity isolated from soybean nodules[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(6): 1009-1021 (in Chinese)
赵龙飞, 徐亚军, 常佳丽, 李敏, 张艳玲, 党永杰, 王梦思, 程亚稳, 张斌月. 具 ACC 脱氢酶活性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其促生作用[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 1009-1021
- [30] Yu J, Yu ZH, Fan GQ, Wang GH, Liu XB. Isolation and characterization of indole acetic acid producing root endophytic bacteria and their potential for promoting crop growth[J]. Journal of Agricultural Science & Technology, 2016, 18(5): 1381-1391
- [31] Yang SS, Li GG, Zhang SN, Lu XP, Ding Y, Guo QW, Tian ZM, Feng FY. Isolation and identification of *Pseudomonas* sp. BP16 and its plant growth-promoting traits and effects[J]. Microbiology China, 2018, 45(10): 2121-2130 (in Chinese)
杨杉杉, 李国光, 张胜男, 路晓培, 丁悦, 国情文, 田再民, 冯福应. 假单胞菌 BP16 的分离鉴定及其植物促生性状和效应[J]. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2121-2130
- [32] Chen JQ, Zhao GY, Wei YH, Dong YH, Hou LY, Jiao RZ. Isolation and screening of multifunctional phosphate solubilizing bacteria and its growth-promoting effect on Chinese fir seedlings[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 9081
- [33] Wu P, He QY, Li ZP, Shi J, Zhu CW, Sheng W. Phenotypic diversity of soybean rhizobia in Anhui province[J]. Soybean Science, 2011, 30(2): 219-223 (in Chinese)
吴萍, 何庆元, 李正鹏, 史均, 祝嫦巍, 盛伟. 安徽省大

- 豆根瘤菌表型多样性研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(2): 219-223
- [34] Li YT, Cheng C, An DD. Characterisation of endophytic bacteria from a desert plant *Lepidium perfoliatum* L.[J]. Plant Protection Science, 2017, 54: 32-43
- [35] Chen CQ, Xin KY, Liu H, Cheng JL, Shen XH, Wang Y, Zhang L. *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 41564
- [36] Xu YJ, Zhao LF, Xing HF, Luo YX, Wei ZX. Effects of endophytic bacteria on proline and malondialdehyde of wheat seedlings under salt stress[J]. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(11): 3726-3737 (in Chinese)
徐亚军, 赵龙飞, 邢鸿福, 罗云霄, 魏正欣. 内生细菌对盐胁迫下小麦幼苗脯氨酸和丙二醛的影响[J]. 生态学报, 2020, 40(11): 3726-3737
- [37] Lee SW, Lee SH, Balaraju K, Park KS, Nam KW, Park JW, Park K. Growth promotion and induced disease suppression of four vegetable crops by a selected plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus subtilis* 21-1 under two different soil conditions[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(6): 1353-1362
- [38] Piromyou P, Buranabanyat B, Tantasawat P, Tittabutr P, Boonkerd N, Teaumroong N. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand[J]. European Journal of Soil Biology, 2011, 47(1): 44-54
- [39] Mehta P, Walia A, Kulshrestha S, Chauhan A, Shirkot CK. Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(1): 33-44
- [40] Sapre S, Gontia-Mishra I, Tiwari S. *Klebsiella* sp. confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*)[J]. Microbiological Research, 2018, 206: 25-32
- [41] Khan MA, Asaf S, Khan AL, Ullah I, Ali S, Kang SM, Lee IJ. Alleviation of salt stress response in soybean plants with the endophytic bacterial isolate *Curtobacterium* sp. SAK1[J]. Annals of Microbiology, 2019, 69(8): 797-808
- [42] Eke P, Kumar A, Sahu KP, Wakam LN, Sheoran N, Ashajyothi M, Patel A, Fekam FB. Endophytic bacteria of desert *Cactus* (*Euphorbia trigonas* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. Microbiological Research, 2019, 228: 126302
- [43] Liu WX, Sun JY, Ding LL, Luo YM, Chen MF, Tang CX. Rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. SB) assist phytoremediation of oily-sludge-contaminated soil by tall fescue (*Festuca arundinacea* L.)[J]. Plant and Soil, 2013, 371(1/2): 533-542