

黄连种子内生细菌的分离鉴定及功能验证

向益青^{1,2}, 廖海浪³, 李娜^{1,2}, 钟芙蓉^{1,2}, 彭茂瑶^{1,2}, 马云桐^{1,2*}

¹西南特色中药资源国家重点实验室; ²成都中医药大学药学院, 成都 611137;

³四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所, 成都 611300

摘要:植物种子具有丰富的微生物资源,为深入挖掘黄连种子促生内生菌,本研究通过平板分离获得种子可培养内生菌,对获得的菌株进行溶磷、固氮、产铁载体和产 IAA 功能研究,筛选具有促生特性的菌株,结合种子萌发实验进行菌株促生功能验证,并对其进行分子生物学鉴定。结果表明,黄连种子可培养内生菌丰富,共分离得到内生菌 57 株,经 16S rRNA 鉴定出内生细菌 29 株,主要分布于芽孢杆菌属 *Bacillus*、寡养假单胞杆菌属 *Stenotrophomonas*、微杆菌属 *Microbacterium*、无色杆菌属 *Achromobacter* 等 13 个属。优势菌为芽孢杆菌属(7 株)和寡养假单胞杆菌属(7 株),分别占总鉴定菌株的 24.14%。促生特性研究表明,具有溶磷功能菌株 2 株,固氮功能菌株 9 株产铁载体菌株 2 株,产 IAA 菌株 6 株,其 IAA 分泌量为 64.52~203.57 mg/L。其中既具有溶磷功能又产 IAA 菌株 1 株,既溶磷又产铁载体菌株 1 株,既产铁载体又产 IAA 菌株 1 株。*Priestia megaterium* 和 *A. spanius* 可显著提高黄连种子的发芽率。本研究将为揭示种子内生菌的促生机制和顽拗性种子后熟与萌发机制提供理论依据,同时也为微生物菌肥的开发奠定基础。

关键词:黄连种子;内生细菌;物种鉴定;功能验证

中图分类号:R284.1;R93

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)2-0191-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.2.002

Isolation, identification and functional verification of bacteria from seeds of *Coptis chinensis*

XIANG Yi-qing^{1,2}, LIAO Hai-lang³, LI Na^{1,2}, ZHONG Fu-rong^{1,2}, PENG Mao-yao^{1,2}, MA Yun-tong^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources with Southwest Characteristics;

²School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

³Institute of Economic Crop Breeding and Cultivation, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 611300, China

Abstract: Plant seeds are rich in microbial resources. For digging into the endophytic bacteria of seeds of *Coptis chinensis*, endophytic bacterial strains were isolated from seeds with plate isolation, and the obtained strains were studied on phosphate-dissolving, nitrogen fixation, siderophores and IAA production. The strains with growth-promoting properties were screened, and were tested for growth-promoting effects in combination with the seed germination experiment, as well as molecularly identified. The results showed that seeds of *C. chinensis* were rich in culturable endophytic bacteria. A total of 57 endophytic bacteria strains were isolated, and 29 strains were identified by 16S rRNA, mainly distributed in 13 genera such as *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Microbacterium* and *Achromobacter*. The dominant bacteria were *Bacillus* (seven strains) and *Stenotrophomonas* (seven strains), accounting for 24.14% of the total identified strains respectively. The study of growth-promoting characteristics showed that there were two strains with phosphorus-dissolving function, nine strains with nitrogen-fixing function, two siderophores-producing strains, and six strains with IAA-producing function, and their IAA secretion amount ranged from 64.52-203.57 mg/L. Among them, one strain was capable of both phosphate-dissolving and IAA production, and one strain as capable of phosphate-dissolving and siderophore production, and one strain was capable of siderophore production and IAA production. *Priestia megaterium* and *A. spanius* could significantly increase the germination percentage of seeds of *C.*

chinensis. This study will provide a theoretical basis for revealing the growth promotion mechanism of seed endophytes and understanding the mechanism of after-ripening and germination of recalcitrant seeds, and also lay a foundation for the development of microbial fertilizer.

Key words: *Coptis chinensis* seeds; endophytic bacteria; species identification; functional verification

种子是植物的重要繁殖器官,在种质资源保存和农业生产中具有重要意义。种子内生菌与种子关系紧密,存在于种子的不同部位(种皮、胚、胚乳)以及种子的整个生长发育阶段^[1]。不同来源种子中微生物分类群之间高度重叠,种子内发现的内生菌分属 4 门 131 属^[2],其中变形菌门和 γ -变形菌门是不同种子内的优势类群,而芽孢杆菌属、假单胞菌属、类芽孢杆菌属、微球菌属、葡萄球菌属、泛菌属等在不同植物种子内最为常见。丹参^[3]、水稻^[4]、紫花苜蓿^[5]等种子内生菌种类丰富,携带大量功能基因,并通过直接或间接作用促进种子发育。种子内生菌具有多种与种子发育和萌发相关的生理功能,通过固氮、溶磷、产生植物激素、ACC 脱氨酶、产生铁载体、促进营养物质吸收等促进种子发育和植物生长^[6],以及产生抗生素、产生水解酶(果胶酶、淀粉酶、纤维素酶等)、诱导防御机制等促进种子内部物质转化^[7]、降低生物或非生物胁迫对植物的危害^[8]。

黄连 *Coptis chinensis* Franch. 为毛茛科黄连属多年生草本植物,以干燥根茎入药,是许多中成药的原料之一,人工栽培面积大。然而,黄连种子具有形态和生理后熟特性,自植株上脱落后需经历 9 个月的变温层积才能成熟萌发,且发芽率低;在贮藏中不耐脱水^[9],给种子保存和质量控制以及黄连引种栽培等带来困难,进而影响药材产量和品质。课题组前期宏基因组研究发现,黄连种子具有丰富的内生菌,其可能参与氧化磷酸化、三羧酸循环、磷酸戊糖、糖酵解-糖异生等途径,这些途径与种子发育及植物生长联系密切,推测微生物在黄连种子后熟和萌发过程中可能发挥作用。

为深入挖掘黄连种子促生内生菌,本研究从黄连种子中通过平板分离获得可培养内生菌,16S rRNA 对黄连种子内生菌进行鉴定,对获得的菌株进行溶磷、固氮和产 IAA 等促生特性测定,结合种子萌发实验进行内生菌促生功能验证。以期筛选有益于种子后熟和萌发的内生菌,旨在为揭示植物内生菌的促生机制和顽拗性种子后熟与萌发机制提供一定的理论依据,同时也为新型、高效的微生物菌肥

的研究与开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

黄连种子于 2020 年 5 月采自四川省峨眉山市龙池镇富有村黄连种植基地(E103.286, N29.454),经成都中医药大学马云桐教授鉴定为毛茛科植物黄连(*Coptis chinensis* Franch.)的健康种子。采回种子保存于经灭菌处理后的湿润细沙中后熟,于 2020 年 12 月取后熟完成后的种子为本次实验材料。

1.1.2 供试培养基

内生细菌分离培养基:LB 培养基, R₂A 培养基;溶磷实验培养基:以 Ca₃(PO₄)₂ 为磷源的无机磷培养基;PVK 培养基^[10](Pikovskaya medium),NBRI 培养基^[11](National Botanical Research Institute's phosphate growth medium),以植酸钙为磷源的有机磷培养基:植酸钙培养基^[12];固氮实验培养基:Ashby 无氮培养基^[13];产铁载体实验培养基:CAS 培养基^[14](chrome azurol S assay medium)。

1.2 方法

1.2.1 黄连种子可培养内生细菌的分离纯化

取 2 g 黄连种子用清水洗净用 75% 乙醇浸泡 30 s,然后用无菌水清洗 2~3 次,用 2% NaClO 溶液处理 10 min,再用无菌水清洗 5~8 次,取最后一次清洗种子的无菌水 20 μ L 涂布于培养基上,用于检测消毒是否彻底。接种内生细菌采用稀释涂布平板法,将表面消毒的种子取 1 g 放入已灭菌的研钵中再加入 2 mL 无菌水研磨,在将研磨后的液体稀释为 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-7}$,涂布于 LB 和 R₂A 培养基上,每种培养基 3 个重复,37 $^{\circ}$ C 倒置培养 48 h。待分离培养基上单菌落长出后,在相应的新鲜平板上进行划线纯化,在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中黑暗倒置培养 48 h 后,选择单菌落接种到相应的斜面培养基中(依次编号为 ZZ-1~ZZ-X),待菌落长出后,放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.2.2 种子内生细菌的 16S rRNA 鉴定

采用 16S rRNA 方法对黄连种子内生菌进行分子生物学鉴定。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒

说明书提取分离菌株 DNA,采用通用引物 27F(5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGT-TACCTTGTTACGACT-3')(引物由北京擎科生物有限成都分公司合成)对提取的内生细菌 DNA 进行 PCR 扩增。50 μ L PCR 扩增体系:1 \times TSE101 mix 45 μ L,上下游引物各 2 μ L,DNA 模板 1 μ L。PCR 扩增程序:98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,98 $^{\circ}$ C 变性 3 min,55 $^{\circ}$ C 退火 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,循环数为 39 次,72 $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 停止反应。1% 的琼脂凝胶糖电泳检测 PCR 扩增产物。将合格的产物送至北京擎科生物有限成都分公司测序。获得的序列拼接后再用 BLAST 软件在线(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源性比对,确定各分离菌株分类地位。菌株间的进化树和聚类分析使用建树软件 MAGE 7 完成,比对方法 clustal W,建树方法 Maximum Likelihood,设定 bootstrap 为 1 000。

1.2.3 黄连种子内生细菌功能研究

溶磷功能研究:待测菌株在 LB 培养基上活化,取直径约 0.5 cm 的菌盘接种于 PVK 培养基、NBRI 培养基和植酸钙培养基上,每株重复 3 次,37 $^{\circ}$ C 培养 7 d。观察有无溶磷圈产生,以接种直径约 0.5 cm 的空白 LB 培养基为对照组。

固氮功能研究:待测菌株在 LB 培养基上活化,取直径约 0.5 cm 的菌盘接种于 Ashby 无氮培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 7 d,观察其生长情况和菌落周围是否出现透明圈,如出现透明圈则该菌株具有固氮能力,以接种直径约 0.5 cm 的空白 LB 培养基为对照组。

产铁载体功能研究:待测菌株在 LB 培养基上活化,取直径约 0.5 cm 的菌盘接种于 CAS 培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 7 d,观察其生长情况,观察菌落周围是否出现黄色圈,如出现黄色圈则该菌株具有产铁载体功能,以接种直径约 0.5 cm 的空白 LB 培养基为对照组。

产 IAA 功能定性测定:参考 Liu 等^[15]的方法将供试菌株接种于 100 mL LB 液体培养基(加入 0.5 g/L 色氨酸)。置于 30 $^{\circ}$ C 摇床,180 r/min 震荡培养 4 d。取菌悬液 10 000 r/min 离心 5 min,取离心后上清液 1 mL 于 10 mL EP 管中,同时加 4 mL 比色液(30 mL 浓 H_2SO_4 ,1.5 mL 0.5 mol/L $FeCl_3$,50 mL 蒸馏水),标准对照在比色液中加入 1 mL 50 mg/L 的吲哚乙酸标准品,空白对照加入 1 mL LB 液体培养基和 4 mL 比色液。所有 EP 管于室温避光放置 30 min 后观察,颜色变红者表示能够分泌 IAA,依据颜色变化分为深红、粉红和微红及无颜色变化 4 个

等级。

产 IAA 功能定量测定:供试菌株培养条件同上。然后将菌悬液 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液 1 mL 加入 4 mL 比色液,避光静置 30 min,于 530 nm 下比色,记录 OD 值。标准曲线的绘制采用分析纯的 IAA 梯度稀释制备,以 OD 值为纵坐标,IAA 浓度为横坐标,代入上述样品 OD 值,计算内生菌产生 IAA 的量。

1.2.4 黄连种子内生细菌促生功能的验证

选择 IAA 分泌量超过 100 mg/L 的细菌作为实验菌株,所选菌种接种于 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C,180 r/min 培养 24 h。调节菌悬液浓度为 1×10^8 CFU/mL,种子表面消毒后用菌悬液浸泡 1 h,对照组用无菌水浸泡 1 h,再接种于琼脂糖培养基上,每个平板 20 粒种子,每种细菌 3 个重复。每 3 d 观察一次,记录种子发芽(以种子裂口且长出 1 cm 的芽为标准)情况,连续观察 15 d。内生细菌对种子萌发的影响按以下公式计算。

发芽率 =

$$(15 \text{ d 种子发芽数} / \text{种子总数}) \times 100\% \quad (1)$$

发芽势 =

$$(\text{前 3 d 发芽种子数} / \text{种子总数}) \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5 数据处理

用 Excel 2018 软件计算平均值和标准差,用 SPSS 26 软件进行单因素方差分析比较组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 黄连种子内生细菌分离纯化及分子生物学鉴定

从黄连种子中共分离得到细菌 57 株(编号为 ZZ-1 ~ ZZ-57),其中 29 株可培养菌株(编号见表 1)通过 16S rRNA 基因序列比对成功,分别属于厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门中的芽孢杆菌属 *Bacillus*、变杆菌属 *Metabacillus*、赖氨酸芽孢杆菌属 *Lysinibacillus*、普里斯特氏菌属 *Priestia*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、微杆菌属 *Microbacterium*、无色杆菌属 *Achromobacter*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*、泛菌属 *Pantoea*、假芽孢杆菌属 *Fictibacillus*、欧文氏菌属 *Erwinia*、黄杆菌属 *Flavobacterium*、布鲁菌属 *Bruccella*。其中分离得到的芽孢杆菌属和寡养单胞菌属菌株最多,各占总鉴定菌株的 24.14%。

2.2 黄连种子内生细菌功能研究

2.2.1 溶磷特性

对 29 株黄连种子内生细菌进行溶磷特性测定

(见表1),所有菌株在 PVK 培养基上均无透明圈形成;在 NBRIP 培养基上菌株 ZZ-24 菌落周围形成透明圈,表明其可降解无机磷;菌株 ZZ-22 和 ZZ-24 在以植酸钙为底物的培养基上形成透明圈,表明 ZZ-

22 和 ZZ-24 具有溶有机磷能力;ZZ-7 等 27 株细菌在 NBRIP 培养基和植酸钙培养基上均无溶磷圈形成,说明其无溶磷能力(见图1)。

表1 可培养菌株促生长特征

Table 1 Growth-promoting characteristics of cultivable strain

编号 Number	溶磷 Phosphate solubilization	固氮 Nitrogen fixation	产铁载体 Siderophore production	IAA 产量 IAA production (mg/L)
ZZ-4	-	-	+	66.91 ± 0.48
ZZ-6	-	-	-	103.25 ± 0.28
ZZ-7	-	-	-	-
ZZ-11	-	-	-	64.52 ± 0.51
ZZ-21	-	-	-	166.90 ± 1.00
ZZ-22	+	-	+	-
ZZ-23	-	+	-	-
ZZ-24	+	-	-	203.57 ± 1.23
ZZ-26	-	+	-	-
ZZ-29	-	-	-	177.86 ± 1.26
ZZ-30	-	+	-	-
ZZ-32	-	-	-	-
ZZ-33	-	-	-	-
ZZ-35	-	-	-	-
ZZ-36	-	+	-	-
ZZ-37	-	+	-	-
ZZ-38	-	+	-	-
ZZ-39	-	+	-	-
ZZ-44	-	+	-	-
ZZ-46	-	-	-	-
ZZ-47	-	-	-	-
ZZ-48	-	-	-	-
ZZ-49	-	-	-	-
ZZ-51	-	+	-	-
ZZ-52	-	-	-	-
ZZ-53	-	-	-	-
ZZ-54	-	-	-	-
ZZ-56	-	-	-	-
ZZ-57	-	-	-	-

注:表中数据为平均数 ± 标准差。+:有该功能特征;-:表示无该功能特征。

Note: Data in the table are mean ± standard deviation. +: The function is enabled; -: The function is not enabled.

2.2.2 固氮特性

对 29 株黄连种子内生细菌进行固氮功能研究(见表1),结果显示有 9 株内生细菌(ZZ-23、ZZ-26、ZZ-30、ZZ-36、ZZ-37、ZZ-38、ZZ-39、ZZ-44、ZZ-51)在

Ashby 无氮培养基上形成大小不一的透明圈(见图2),表明其具有固氮能力;ZZ-11 和 ZZ-21 等 20 株细菌在 Ashby 无氮培养基无透明圈形成,则其无固氮能力。

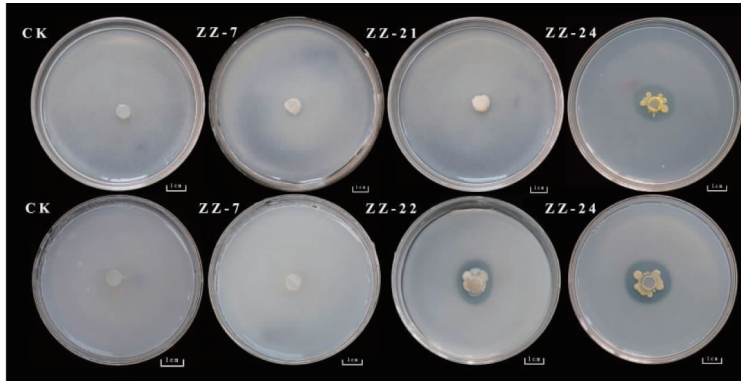


图1 黄连种子内生菌溶磷特性(比例尺:1 cm)

Fig. 1 Phosphorus-dissolving characteristics of endophytic bacteria strains from seeds of *C. chinensis* (scale:1 cm)

注:上排为 NBRIP 培养基,下排为植酸钙培养基。Note: The top row is NBRIP medium, the bottom row is calcium-phyticacids medium.

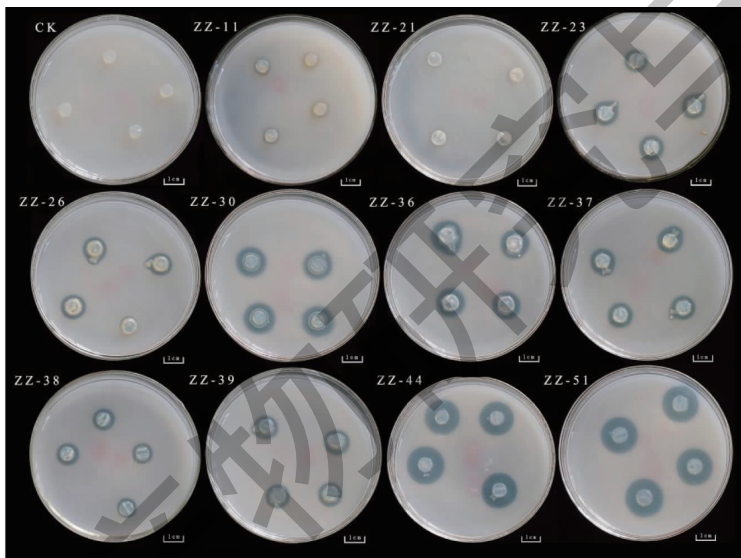


图2 黄连种子内生菌固氮特性(比例尺:1 cm)

Fig. 2 Nitrogen-fixing characteristics of endophytic bacteria strains from seeds of *C. chinensis* (scale:1 cm)

2.2.3 产铁载体特性

对 29 株黄连种子内生细菌进行固氮功能研究(见表 1),结果显示菌株 ZZ-4、ZZ-22 在 CAS 培养基

上出现黄色晕圈,表明 ZZ-4 和 ZZ-22 有产铁载体的作用(见图 3);ZZ-6 等 27 株细菌在 CAS 培养基上未出现黄色晕圈,表明其无产铁载体能力。

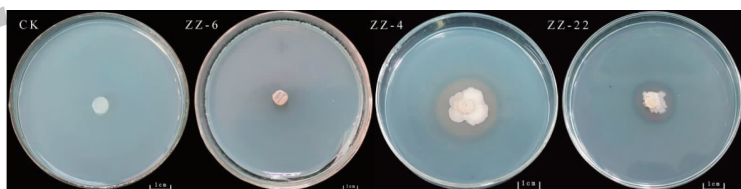


图3 黄连种子内生菌产铁载体特性(比例尺:1 cm)

Fig. 3 Siderophore production by endophytic bacteria strains from seeds of *C. chinensis* (scale:1 cm)

2.2.4 产 IAA 特性

对 29 株黄连种子内生细菌进行 IAA 测定(见

表 1),菌株 ZZ-4、ZZ-6、ZZ-11、ZZ-21、ZZ-24 和 ZZ-29 细菌菌液和比色液反应成不同程度的红色,说明其

具有产 IAA 能力(见图 4)。测定以上 6 株细菌所产 IAA 含量,其产量分别是 66.90、103.25、64.52、166.90、203.57、177.86 mg/L,产量最高的是菌株 ZZ-24,最

低是菌株 ZZ-11,其中菌株 ZZ-6、ZZ-21、ZZ-24 和 ZZ-29 的 IAA 产量超过 100 mg/L。

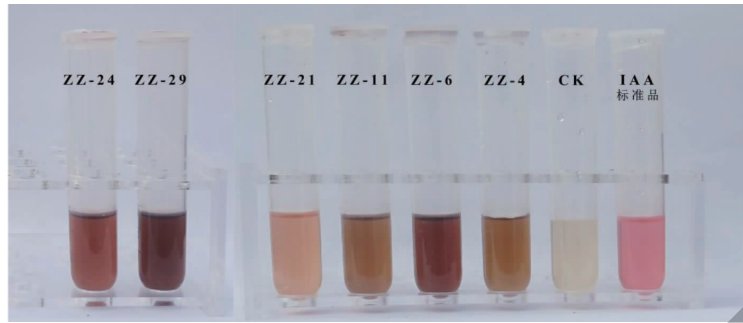


图 4 黄连内生菌产 IAA 特性

Fig. 4 Production of indoleacetic acid by endophytic bacteria strains from seeds of *C. chinensis*

2.3 功能菌株 16S rRNA 分析

通过 16S rRNA 序列比对获取 29 株黄连种子内生细菌及与其相似性高的同源菌株(见表 2),基于 16S rRNA 序列构建的发育系统树如图 5 所示。结果表明,ZZ-4 菌株与 *Ba. toyonensis* strain FORT 02 的序列聚于一支且序列相似性达 100%;ZZ-22 菌株与 *Ba. subtilis* strain GUCC 8 聚为一支,相似度为 100%;ZZ-24 菌株与 *Pr. megaterium* strain 5A1-13 相似度为 100%,一般认为 16S rRNA 基因序列相似性 $\geq 97\%$ 的原核生物为同一个种^[16],因此,将既能产铁载体又产 IAA 的 ZZ-4 菌株鉴定为 *Ba. toyonensis*;将既具有溶磷功能又产铁载体的 ZZ-22 菌株鉴定为 *Ba. subtilis*;将既能溶磷又可分泌 IAA 的 ZZ-24 菌株鉴定为 *Pr. Megaterium*。ZZ-21 和 ZZ-29 菌株与 *A. spanius* strain F20Cu-1 聚于一支且序列相似性都超

过 99%,故将具有产 IAA 能力的 ZZ-21 和 ZZ-29 菌株鉴定为 *A. spanius*。ZZ-6 菌株与 *L. fusiformis* strain ZLynn800-25 聚为一支,ZZ-11 与 *Me. niabensis* strain LewisBac8 聚为一支,相似性分别为 99.93%、99.78%,因此将 ZZ-6 和 ZZ-11 菌株鉴定为 *L. fusiformis*、*Me. niabensis*。ZZ-36、ZZ-37、ZZ-38、ZZ-39 均被鉴定为 *S. rhizophila*,且都具有固氮能力。菌株 ZZ-23、ZZ-26、ZZ-30、ZZ-44、ZZ-51 都具有固氮能力分别与 *Ba. amyloliquefaciens* strain JX-6、*Ba. toyonensis* strain WS2-2、*Ba. amyloliquefaciens* strain LE7、*Br. Thiophenivorans* strain DSM 7216、*Er. Billinghamiae* strain LMG 2613 相似度为 100%、99.93%、100%、99.92%、99.86%,其被鉴定为:*Ba. amyloliquefaciens*、*Ba. toyonensis*、*Ba. amyloliquefaciens*、*Br. thiophenivoran*、*Er. Billinghamiae*。

表 2 内生细菌 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库比对结果

Table 2 Comparison of 16S rRNA gene sequence of endophytic bacteria with NCBI

菌株 Strain	登录号 Accession number	相似菌株名称 Similar strain name	相似度 Similarity (%)	相似菌株登录号 Accession number of similar strain
ZZ-4	ON620292	<i>Ba. toyonensis</i> strain FORT 02	100	MG561338
ZZ-6	ON620293	<i>L. fusiformis</i> strain ZLynn800-25	99.93	KY316399
ZZ-7	ON620294	<i>Pa. polymyxa</i> strain DYJL38	99.93	HQ317179
ZZ-11	ON620295	<i>Me. niabensis</i> strain LewisBac8	99.78	MH329936
ZZ-21	ON620296	<i>A. spanius</i> strain F20Cu-1	99.78	MW672499
ZZ-22	ON620297	<i>Ba. subtilis</i> strain GUCC 8	100	ON882057
ZZ-23	ON620298	<i>Ba. amyloliquefaciens</i> strain JX-6	100	KX980396
ZZ-24	ON620299	<i>Pr. megaterium</i> strain 5A1-13	100	MK598810
ZZ-26	ON620300	<i>Ba. toyonensis</i> strain WS2-2	99.93	MT605503

续表 2(Continued Tab. 2)

菌株 Strain	登录号 Accession number	相似菌株名称 Similar strain name	相似度 Similarity(%)	相似菌株登录号 Accession number of similar strain
ZZ-29	ON620301	<i>A. spanius</i> strain F20Cu-1	99.93	MW672499
ZZ-30	ON620302	<i>Ba. amyloliquefaciens</i> strain LE7	100	OP143931
ZZ-32	ON620303	<i>Ba. amyloliquefaciens</i> strain LE7	100	OP143931
ZZ-33	ON620304	<i>Ba. aryabhatai</i> strain ZJJH-2	100	MT605509
ZZ-35	ON620305	<i>S. rhizophila</i> strain BF1-3	99.93	MT078676
ZZ-36	ON620306	<i>S. rhizophila</i> strain BF1-3	99.86	MT078676
ZZ-37	ON620307	<i>Fi. nanhaiensis</i> strain PDSPXHF61	100	KY980739
ZZ-38	ON620308	<i>S. rhizophila</i> strain D81_CV1R	99.93	MK883184
ZZ-39	ON620309	<i>S. rhizophila</i> strain LMR781	100	MW559702
ZZ-44	ON620310	<i>Br. thiophenivorans</i> strain DSM 7216	99.92	NR042599
ZZ-46	ON620311	<i>S. rhizophila</i> strain D81_CV1R	100	MK883184
ZZ-47	ON620312	<i>S. rhizophila</i> strain LMR781	100	MW559702
ZZ-48	ON620313	<i>Pa. agglomerans</i> strain KABNA3	100	MT605812
ZZ-49	ON620314	<i>S. rhizophila</i> strain JLS11	100	MT501809
ZZ-51	ON620315	<i>E. billingiae</i> strain LMG 2613	99.86	NR118431
ZZ-52	ON620316	<i>M. phyllosphaerae</i> strain P-RA6	100	MT533897
ZZ-53	ON620317	<i>Fl. chilense</i> strain TB1-14	100	MF565385
ZZ-54	ON620318	<i>Fi. nanhaiensis</i> strain FJAT-46938	99.93	MG651549
ZZ-56	ON620319	<i>M. phyllosphaerae</i> strain P-RA6	100	MT533897
ZZ-57	ON620320	<i>M. oxydans</i> strain I-S-R2-2	100	MK398050

2.4 产 IAA 内生细菌促生长功能验证

为验证产 IAA 内生菌的促生长功能,用 IAA 产量超过 100 mg/L 的内生细菌(ZZ-6、ZZ-21、ZZ-24、ZZ-29)菌液处理黄连种子,结果见表 3,其中 ZZ-24 和 ZZ-29 菌株对发芽率有显著促进作用,与对照组相比分别提高 13.34% 和 10%。ZZ-24 和 ZZ-29 对种子的发芽势有较显著的影响,菌株 ZZ-6 和 ZZ-21 与对照组相比无显著影响。

3 讨论与结论

Truyens 等^[2]发现在不同植物的种子中芽孢杆菌属和假单孢杆菌属为优势类群,同时类芽孢杆菌属、微球菌属、葡萄球菌属、泛菌属和不动杆菌属在种子内生菌中也十分常见。本研究以黄连种子为对象,共分离鉴定出 29 株分布于 13 个属的内生细菌,其中优势菌为芽孢杆菌属和寡养假单孢杆菌属。促生特性研究表明黄连种子内生菌具有产 IAA、溶磷、固氮和产铁载体的功能,其中部分内生细菌同时具有多种促生功能,如 *Ba. toyonensis* ZZ-4 能产 IAA 和铁载体,*Pr. megaterium* ZZ-24 能产 IAA 并具有溶磷

功能。种子萌发实验进一步验证具有促生功能的黄连种子内生细菌多分布于芽孢杆菌属。Gagne-Bourgue 等^[17]的研究结果表明芽孢杆菌具有产 IAA、细胞分裂素和溶磷特性,Lu 等^[18]测定出亳菊中的巨大芽孢杆菌 BN7 能够解磷、解钾和产 IAA。因此,芽孢杆菌属可能在黄连种子后熟和萌发过程中发挥重要作用,在农业生产中具有较大的开发利用价值。

磷在土壤中大致以不溶性的无机磷和有机磷形式存在,仅小部分磷溶于土壤中可以被植物吸收利用^[19],植物中具有溶磷能力的内生菌可将难以被植物吸收的磷转为易吸收的形式,从而促进植物生长发育^[20]。Xie 等^[21]从植物根际土中分离得到的 *Pseudomonas brassicacearum* H9 具有较高解磷活性的细菌,其菌悬液对小麦种子和黄瓜种子的萌发具有显著促进作用。此外,种子萌发和幼苗生长受 IAA 的调控,适量的外源 IAA 可以促进种子萌发和植物根部发育^[22];Xu 等^[23]从番茄种子和水稻种子中分离出 3 株能产 IAA 的内生细菌,其在番茄、水

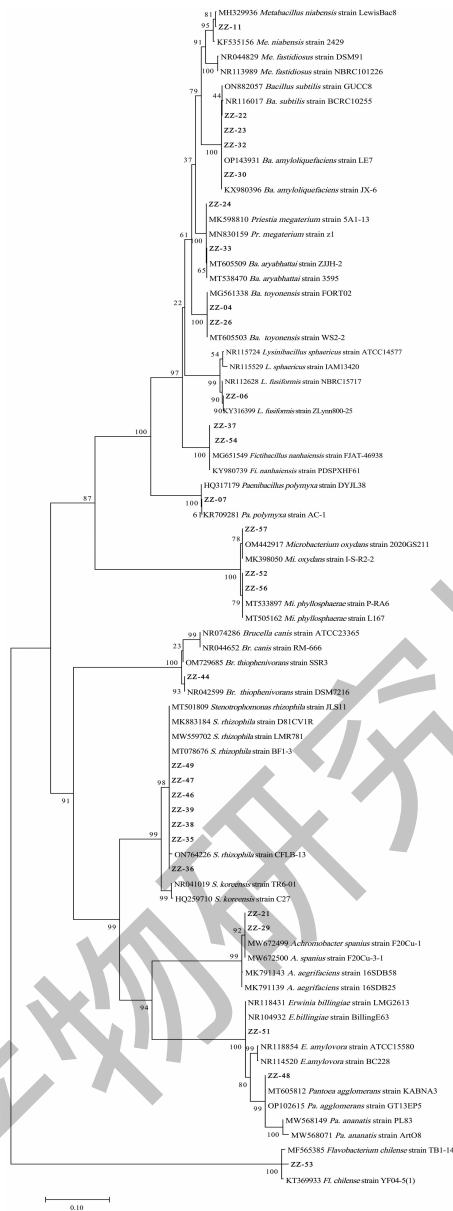


图5 16S rRNA 系统发育进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA

表3 不同内生细菌对种子萌发的影响

Table 3 Effects of different endophytic bacteria on seed germination

不同处理方式 Different processing method	平均发芽率 Average germination rate(%)	平均发芽势 Average germination potential(%)
CK	43.33 ± 2.89 ^{de}	23.33 ± 2.89 ^{de}
ZZ-6	45.00 ± 5.00 ^{de}	25.00 ± 5.00 ^d
ZZ-21	48.33 ± 5.77 ^d	28.33 ± 2.89 ^d
ZZ-24	56.67 ± 2.89 ^{abc}	38.33 ± 2.89 ^{abc}
ZZ-29	53.33 ± 2.89 ^{ab}	33.33 ± 2.89 ^a

注:表中数据为平均数 ± 标准差 (n=3)。不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。

Note: Data in the table are mean ± standard deviation (n=3). Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).

稻、油菜和萝卜等植物的根、茎、叶中定殖,并对幼苗有不同程度的促生长作用。Khalaf 等^[24]从瓜类种子中得到 56 株可以分泌生长素的内生细菌,其中芽孢杆菌属和肠杆菌属为优势属。田菁种子中可产生生长素内生细菌的 IAA 分泌量范围是 1.29 ~ 25.47 mg/L, *Ba. velezensis* SC60 IAA 产量最高,且显著促进胚根发育和提高种子活力^[25]。本实验获得 6 株可分泌 IAA 的内生细菌,其中 ZZ-6、ZZ-21、ZZ-24、ZZ-29 分泌量超过 100 mg/L,且既能溶磷又高产 IAA 的 *Pr. megaterium* ZZ-24 对黄连种子的促生效果显著。进一步的种子内生菌多种促生特性的探索和多功能

内生菌的挖掘有助于解析内生菌在种子发育与萌发过程中的作用机制。

黄连种子中存在多种促生内生细菌,优势菌多分布于芽孢杆菌属,既能溶磷又高产 IAA 的 *Pr. megaterium* ZZ-24 对黄连种子有较好的促生能力,表明其具有潜在的研究和开发利用潜力。具有多种促生能力的内生菌可能在黄连种子长时间的后熟过程中发挥作用,可能是黄连种子能够完成后熟并成功萌发的重要因素。

参考文献

- Kaga H, Mano H, Tanaka F, et al. Rice seeds as sources of endophytic bacteria[J]. *Microbes Environ*, 2009, 24: 154.
- Truyens S, Weyens N, Cuypers A, et al. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants[J]. *Environ Microbiol Rep*, 2015, 7: 40-50.
- Haimin C, Hongxia W, Bin Y, et al. Core microbiome of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* seed: a rich reservoir of beneficial microbes for secondary metabolism? [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 672.
- Walitang DI, Kim K, Madhaiyan M, et al. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of rice [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17: 40-50.
- Jie Z, Elizabeth R, Padmini R, et al. Taxonomic and functional shifts in sprout spent irrigation water microbiome in response to *Salmonella* contamination of alfalfa seeds [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2021, 87: 1811-01820.
- Xu M, Sheng J, Chen L, et al. Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30: 835-845.
- Walitang DI, Kim K, Madhaiyan M, et al. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of rice [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17: 40-50.
- Dalling JW, Davis AS, Arnold AE, et al. Extending plant defense theory to seeds [J]. *Annu Revcol Evol S*, 2020, 51: 123-141.
- Shen C, Zhong FR, Huang L, et al. Effect of rapid dehydration on germination and physiological and biochemical characteristics of the ripened seeds of *Coptis chinensis* [J]. *J. Chin. Med. Mater.*, 2019, 42: 720-724.
- Ren JH, Liu H, Wu XH, et al. Screening, identification and growth promotion of inorganic phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2012, 52: 295-303.
- Shekhar NC. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms [J]. *Fems Microbiol Lett*, 1999, 170: 265-270.
- Chen DY, Li HQ, Zhang BH, et al. Phosphate solubilization activities and action mechanisms of two phosphate-solubilizing bacteria [J]. *Chin J Eco-Agric* (中国生态农业学报), 2017, 25: 410-418.
- Andriiuk KI. Nitrogen-fixing activity of soil actinomycetes and associative cultures [J]. *Mikrobiol Zh*, 1967, 29: 91-95.
- Jasim B, John Jimtha C, Jyothis M, et al. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum* [J]. *Plant growth regulation*, 2013, 71: 1-11.
- Liu L, Sun L, Zhang RY, et al. Diversity of endophytic bacteria that can secrete indoleacetic acid in spring Langen [J]. *Biodiversity Sci* (生物多样性), 2010, 18: 195-200.
- Liu C, Li JB, Bing RP, et al. The applications of the 16S rRNA gene in microbial ecology: current situation and problems [J]. *Acta Ecol Sin*, 2015, 35: 2769-2788.
- Gagne - Bourgue F, Aliferis K A, Seguin P, et al. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars [J]. *J Appl Microbiol*, 2013, 114: 836-853.
- Lu J, Tang J, Wang GS, et al. Study on the identification, bio-control and growth-promoting function of endophytic strain BN7 from *Chrysanthemum morifolium* Ramat 'Boju' [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33: 1301-1307.
- Buddhi C W, Min-Ho Y. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: a review [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2012, 6: 6600-6605.
- Di YN, Liu LF, Xie LY, et al. Identification of a sugarcane endophyte and its phosphorus solubilizing ability [J]. *Crops* (作物杂志), 2018, 34: 68-75.
- Xie CX. Screening and identification of phosphate-solubilizing bacteria and their effects on plant growth [D]. Tianjin: Hebei University of Technology (河北工业大学), 2016.
- Meng Y, Shuai H, Luo X, et al. Karrikins: regulators involved in phytohormone signaling networks during seed germination and seedling development [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 7: 2021.
- Xu MS. Diversity analysis of cultivable endophytic bacteria from tomato and rice seeds and function of growth-promoting bacteria [D]. Beijing: China Agricultural University (中国农业大学), 2014.
- Khalaf EM, Raizada MN. Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family [J]. *BMC Microbiol*, 2016, 16: 131.
- Zhang KY, Liu XL, Dong XL, et al. Isolation of endophytes cultures from *Sesbania cannabina* seeds and their effects on germination [J]. *J Agric Sci Technol* (中国农业科技导报), 2020, 22: 40-48.