



内生真菌 KLBMP0506 对拟南芥的促生作用

陈雨杰, 蒋侄丽, 柳巧, 徐欢, 吕梦娇, 蒋继宏, 李露丹*

江苏师范大学生命科学学院 江苏省药食植物生物技术国家重点实验室(培育), 江苏 徐州 221116

陈雨杰, 蒋侄丽, 柳巧, 徐欢, 吕梦娇, 蒋继宏, 李露丹. 内生真菌 KLBMP0506 对拟南芥的促生作用[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 4051-4063.

CHEN Yujie, JIANG Zhili, LIU Qiao, XU Huan, LÜ Mengjiao, JIANG Jihong, LI Ludan. Growth-promoting mechanism of the endophytic fungus KLBMP0506 on *Arabidopsis thaliana*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 4051-4063.

摘要:【目的】研究植物内生菌 *Wickerhamomyces* sp. KLBMP0506 对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的促生作用及潜在的促生机制。【方法】本研究以野生型拟南芥为试验材料, 将其与菌株 KLBMP0506 进行平板共培养及盆栽接种试验, 并测定拟南芥鲜重、干重、主根长、侧根数、叶绿素含量和可溶性糖含量等生长、生理指标, 同时对筛选的与拟南芥侧根、主根形成及生长素合成和运输相关的 11 个基因进行实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析。【结果】接种目的菌株 KLBMP0506 后, 平板试验的拟南芥鲜重及侧根、盆栽试验的拟南芥鲜重、干重、茎长、叶绿素含量和可溶性糖含量均有一定程度的增加; 分隔平板试验及菌株 KLBMP0506 发酵液中促生活性物质分析显示, 该菌株产生的挥发性有机物及其发酵液中的正丁醇和乙酸乙酯提取物均对拟南芥有明显的促生作用; 此外, qRT-PCR 分析显示 KLBMP0506 处理后, 拟南芥中与侧根形成相关基因 *ABI4*、*FLA1* 的表达出现不同程度的下调, 与生长素合成、运输相关基因 *AUX1*、*EIR1*、*YUC4* 的表达整体呈上调趋势, 表明菌株 KLBMP0506 可能通过调控拟南芥中与侧根形成以及与生长素合成和运输相关基因的表达, 而实现对拟南芥的促生作用。【结论】本研究明确了菌株 KLBMP0506 对模式植物拟南芥的促生作用, 为其开发成为微生物菌肥提供理论依据。

关键词: 拟南芥; 内生真菌; 促生作用; qRT-PCR

资助项目: 国家自然科学基金(32101519); 江苏省自然科学基金(BK20210919); 江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX22_2793)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32101519), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20210919), and the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX22_2793).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-516-83656598, E-mail: lild@jsnu.edu.cn

Received: 2023-03-14; Accepted: 2023-05-18; Published online: 2023-06-07

Growth-promoting mechanism of the endophytic fungus KLBMP0506 on *Arabidopsis thaliana*

CHEN Yujie, JIANG Zhili, LIU Qiao, XU Huan, LÜ Mengjiao, JIANG Jihong, LI Ludan*

Key Laboratory of Biotechnology for Medi-edible Plant of Jiangsu Province, School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To investigate the effect and mechanism of *Wickerhamomyces* sp. KLBMP0506 in promoting the growth of *Arabidopsis thaliana*. [Methods] The strain KLBMP0506 was co-cultured with the wild-type *A. thaliana* in plates and inoculated in the *A. thaliana* plants cultivated in pots. The growth and physiological indexes of *A. thaliana* were determined, including fresh weight, dry weight, taproot length, number of lateral roots, chlorophyll content, and soluble sugar content. Further, qRT-PCR was performed on 11 selected genes involved in lateral root and taproot formation and auxin synthesis and transportation in *A. thaliana*. [Results] The inoculation with the target strain KLBMP0506 increased the fresh weight and lateral root number of *A. thaliana* in plates and the fresh weight, dry weight, stem length, chlorophyll content, and soluble sugar content of *A. thaliana* cultivated in pots. The partition plate test and analysis of the promotive substances in the fermentation broth of the strain KLBMP0506 showed that the volatile organic substances produced by the strain and the n-butanol and ethyl acetate extracts of the fermentation broth had significant growth-promoting effects on *A. thaliana*. In addition, after treatment with KLBMP0506, the expression levels of *ABI4* and *FLA1* involved in the lateral root formation were down-regulated, and those of *AUX1*, *EIR1*, and *YUC4* involved in auxin synthesis and transportation were up-regulated. The results indicated that the strain KLBMP0506 may promote the growth of *A. thaliana* by regulating the expression of genes associated with lateral root formation and auxin synthesis and transport. [Conclusion] This study confirmed the growth-promoting effect of strain KLBMP0506 on the model plant *A. thaliana*, providing a theoretical basis for developing microbial fertilizers with the strain.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; endophytic fungi; growth-promoting effect; qRT-PCR

植物内生菌是指一类在生长过程中一定阶段或全部阶段生活在生长状态良好的植物体内,并对宿主植物无明显致病性的微生物群^[1],主要包括内生真菌、内生细菌、内生放线菌。近年来,大量研究表明植物内生菌在促进植物生长发育方面发挥重要作用。一方面植物内生菌可以通过提高植物磷和钾的利用率、固氮等改善植物养分吸收和调节与生长和胁迫相关的植物激素等途径直接

促进植物生长发育^[2-3];另一方面,植物内生菌可以通过产生抗生素和水解酶、改善营养条件等引发对害虫和病原体的防御反应,还可以作为非生物胁迫的修复剂,从而间接地达到促进植物生长的作用^[3-5]。李福艳等^[6]从植物根际土壤中分离获得3株高产吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)菌株,对玉米、生菜进行促生长试验发现3株菌株均表现出良好的促生效果;Orozco-Mosqueda等^[7]

验证了具有产 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶活性的植物促生长细菌可以通过抵抗盐胁迫来促进植物生长; Shah 等^[8]以 3 种巴基斯坦小麦为原料, 分离出 5 株具有固氮、解磷、产铁载体、过氧化氢酶活性、磷酸盐溶解的菌株, 并且表现出了一定的抗菌活性及对干旱、盐胁迫的抵抗能力; 白洁等^[9]从欧李中分离出的 7 株内生菌具有多种优良促生特性, 可为后续研制微生物菌肥提供优良菌种, 在绿色农业发展中具有广泛的应用前景。

拟南芥是一种常见的模式植物, 具有生命周期短、个体较小和易于种植等优点, 同时其全基因组测序工作已于 2000 年完成^[10], 经常作为遗传学与分子生物学的理想研究材料^[11]。借助其探究植物内生菌的促生作用以及促生的潜在机制具有一定的可行性。目前, 农药和化肥的过度使用对环境及人类安全均造成了威胁, 因此开发可减少或部分取代化肥使用的绿色、安全、高效的微生物菌肥至关重要^[5,12]。

本研究以课题组前期从茶树果实中分离出来的内生真菌异常威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*) KLBMP0506 为研究对象。前期试验证明其具有较强的解磷、固氮能力, 同时能够分泌色氨酸、天冬酰胺、丙氨酸等氨基酸, 具有良好的促生潜力。异常威克汉姆酵母属菌株曾被报道对离果采后青霉病有良好的防治效果^[13], Lanhuang 等发现该属菌株可以在番茄中快速定殖并稳定繁殖, 占据控制病原体感染的空间, 还能够通过刺激防御相关酶以及提高总酚和类黄酮化合物的含量来激发番茄的防御机制, 具有非凡的控制番茄灰霉病的能力^[14]。但目前对于该属菌株在促进植物生长方面的研究鲜有报道。本研究将 KLBMP0506 菌株作用于模式植物拟南芥, 目的是探究目标菌株对拟南芥的促生效果, 判断其能否开发成为微生物菌肥; 另外也进一步探究目的

菌株对拟南芥促生的潜在机制。本研究为理解植物内生菌的促生机理提供一定的理论依据, 同时也为研究和开发绿色、高效的微生物菌肥奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌种与菌株

菌种来源于本课题组前期从茶树果实中分离到的植物促生内生真菌 KLBMP0506。前期的研究表明其促生性能为具有较强的解磷、固氮能力, 同时分泌色氨酸、天冬酰胺和丙氨酸等氨基酸, 供试植株为模式植物哥伦比亚(*Columbia*, *Col*)野生型拟南芥。

1.2 平板共培养

拟南芥的种子用 75%酒精消毒 1 min 后用 20%次氯酸钠(有效氯含量约为 19%)消毒 15 min, 无菌水漂洗 3–4 次后平铺在配制好的 MS 培养基上, 4 d 后挑选 5 株长势相同的拟南芥幼苗转移至新的 MS 培养基中, 吸取活化后用无菌水稀释至 OD_{600} 为 0.5 的菌株 10 μ L, 在无菌苗下方 3 cm 处划线, 然后将平板竖立放于平板架, 置于 $(23\pm 2)^\circ\text{C}$ 光照培养箱中培养。

1.3 拟南芥的盆栽试验

1.3.1 拟南芥的移栽及灌菌

挑选于 MS 培养基上生长 6 日龄且生长状态一致的拟南芥无菌苗移栽至灭菌后的营养土中, 待测菌株在 30°C 、200 r/min 条件下于酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast peptone dextrose, YPD)培养基中培养 16 h, 无菌水稀释至 OD_{600} 为 1。每 7 d 向每株苗灌菌 1 mL, 对照组加无菌水 1 mL。每 7 d 取材 1 次, 检测其叶绿素、可溶性糖以及可溶性蛋白的含量, 并统计其鲜重、干重及主茎长。

1.3.2 叶绿素含量的测定

参考贾敏等^[15]的方法改良后进行叶绿素含

量测定(公式 1)。将拟南芥所有叶片剪碎混匀后称取 0.1 g 放入研钵中,加 1 mL 的蒸馏水避光研磨,研磨充分后转移至 15 mL 玻璃管中,避光反应至玻璃管底部的组织样本完全变白。加入提取液冲洗后转移至玻璃管中,定容至 10 mL,备用。取 200 μ L 反应液加入酶标板中,以提取液为对照,测定 663 nm 及 645 nm 处吸光值,记为 A_{663} 和 A_{645} 。

$$\text{计算方法为叶绿素含量(mg/g)} = \frac{(20.21 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}) \times V \times D}{(m \times 1000)} \quad \text{公式(1)}$$

式中: V 为提取液总体积; D 为稀释倍数; m 为样本质量。

1.3.3 可溶性糖含量的测定

参考沈诗钰等^[16]的方法改良后进行可溶性糖含量的测定。将拟南芥植株剪碎混匀后称取 0.1 g 加 1 mL 的蒸馏水研磨,沸水浴 10 min,掌上离心机速离冷却后,8 000 r/min 离心 10 min,取上清并用蒸馏水定容至 10 mL,混匀备用。取样本溶液 40 μ L,加入 40 μ L 蒸馏水,对照组加入 80 μ L 蒸馏水,然后各加入 20 μ L 蒽酮乙酸乙酯和 200 μ L 浓硫酸后混匀。98 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,冷却后取 200 μ L,测定 620 nm 处吸光值,记为 A_{620} 。绘制标准曲线(公式 2)。

$$\text{可溶性糖含量(mg/g)} = \frac{\text{样品浓度} \times V}{m} \quad \text{公式(2)}$$

式中: V 为提取液总体积; m 为样本质量。

1.3.4 可溶性蛋白含量的测定

参考高天瑜等^[17]的方法改良后进行可溶性蛋白的测定(公式 3),使用生工 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒,称取 0.1 g 剪碎混匀后的拟南芥植株,加入 1 mL 磷酸缓冲液,4 $^{\circ}$ C 下研磨。研磨后 10 000 r/min,低温离心 10 min,吸取上层液体备用。取样本溶液 4 μ L,对照组取蒸馏水 4 μ L,各加入 200 μ L 反应液混匀。60 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,冷却至室温后取 200 μ L 反应液加入酶标板,在波长 562 nm 处测定吸光度,分别记为 $A_{\text{空白管}}$ 、 $A_{\text{样品管}}$ 。

绘制标准曲线,记为 $A_{\text{标准管}}$ 。

可溶性蛋白含量(mg/g)=

$$\frac{\text{样品浓度} \times (A_{\text{样品管}} - A_{\text{空白管}})}{A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}} \quad \text{公式(3)}$$

1.4 分隔平板培养

在分隔平板的两侧分别倒 YPD 和 MS 培养基,挑选 4 株生长状态相同的无菌苗至分隔平板中,吸取 10 μ L OD_{600} 为 0.5 的菌液,接种于分隔平板的 YPD 培养基中央位置,然后将平板竖直立放于平板架,置于(23 \pm 2) $^{\circ}$ C 光照培养箱中培养。

1.5 菌株发酵液中活性部位的挑选

将目标菌株接种至 YPD 培养基,于 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 16 h 后收集菌液,7 000 r/min 离心 10 min 取上清。菌体发酵液和有机溶剂二氯甲烷按照 1:3 的比例混合萃取,并重复 3 次。同样方式分别加入乙酸乙酯和正丁醇萃取,收集萃取液并蒸馏。蒸馏后产物吹干并称重。参考文献[18]的方法取 20 mg 萃取物浸膏加水溶解其中水溶性物质后,过滤除菌,加入 100 mL MS 培养基中,对照组加入 20 mg YPD 培养基粉末。在无菌操作台内挑选 6 株生长状态相同的 4 日龄幼苗并转移至上述不同培养基中,然后将平板竖直立放于平板架,置于(23 \pm 2) $^{\circ}$ C 光照培养箱中培养。

1.6 qRT-PCR

本文挑选调控拟南芥侧根数目的基因 *ABI4*、*FLA1* 和 *ASA1*,调控拟南芥主根生长的基因 *PLT3*、*PLT5*、*PLT7*、*HB52* 以及调控生长素合成和运输的基因 *AUX1*、*BIG*、*EIR1* 和 *YUC4*,共计 11 个基因,探究菌株 KLBMP0506 处理的盆栽拟南芥在第 7、14、21、28 和 35 天这些与生长相关基因表达量的变化,目标菌株对拟南芥的处理方法同材料与方法中的 1.3.1,以无菌水处理的拟南芥植株作为对照组。

1.6.1 qRT-PCR 引物的设计及 RNA 的提取

以 *UBQ5* 为内参基因,设计引物并由上海生工公司合成(表 1)。

表 1 qRT-PCR 引物的设计

Table 1 Design of qRT-PCR primers

Type of gene	Name of gene	Sequence (5'→3')
Control the number of lateral roots	<i>ABI4-F</i>	GACTTCGTTTCATCATGAGGTG
	<i>ABI4-R</i>	AGTTCAAATCCTCCATCGAACT
	<i>FLA1-F</i>	ATCTGAGAGGTGGTAAAGTTGG
	<i>FLA1-R</i>	GTTTTTGAAGCTCCAGGGTTAG
	<i>ASA1-F</i>	CTGGTCCAACCTGAAGTTCAATG
	<i>ASA1-R</i>	CAGGATCACGACCTACAATGTA
Regulate taproot growth	<i>PLT3-F</i>	CACAGTAGCATTAACCTTCGCTC
	<i>PLT3-R</i>	CTTCAAAAGGGATTCCACAAGG
	<i>PLT5-F</i>	GTTGTCTTCTCTCCGACCTAC
	<i>PLT5-R</i>	TATTGACTTGAGCTCAGAGTCG
	<i>PLT7-F</i>	GAGAGAGGTGGAACAGTAACA
	<i>PLT7-R</i>	TTCTTTGTCCCAATGTTTCGAC
	<i>HB52-F</i>	CTATGAACAAGAAGCTTGAGCC
	<i>HB52-R</i>	AAGAGACTGAGTCTTGAACCTG
Regulate auxin synthesis and transport	<i>AUX1-F</i>	CCTAAGCAATTTCTATGGCAC
	<i>AUX1-R</i>	GCTCTGTATTCGACGTAGAGAA
	<i>BIG-F</i>	ATTTATCTGCGAGTTTGTGTCTG
	<i>BIG-R</i>	CAATGCACAGTTAATACGAGCA
	<i>EIR1-F</i>	ACGGTTACACTAATAGCTACGG
	<i>EIR1-R</i>	CTTTCTTCGCCGTCTTCATAAC
	<i>YUC4-F</i>	CATCTCCTACGTTGAGTCCTAC
	<i>YUC4-R</i>	CTTGCGTCTTCACATTCCATAG

使用北京艾德莱生物科技有限公司的 EASYspin Universal Plant RNA Kit 试剂盒提取处理组和对照组不同取样时间点的拟南芥植株的 RNA。

1.6.2 RNA 的反转录

反转录使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司的 HiScript IIQ RT SuperMix for qPCR 试剂盒。反转录反应体系(20 μ L): 模板 RNA 0.5 μ g, 4 \times gDNA wiper Mix 4 μ L, 用 ddH₂O 补充至 16 μ L, 用移液枪轻轻吹打混匀后 42 $^{\circ}$ C 反应 2 min 后, 加入 4 μ L 5 \times HiScript II Select qRT SuperMix II。

1.6.3 qRT-PCR 反应

使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司的 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒, 以各组不同取样时间点拟南芥植株的 cDNA 为模板, 每个样品技术性重复 3 次, 以取自同一时间点的

无菌水处理拟南芥植株中目标基因的表达量作对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[19]计算处理组拟南芥植株中相应基因的相对表达量。qRT-PCR 反应体系(10 μ L): 2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix 5 μ L, Primer-F (10 μ mol/L) 0.3 μ L, Primer-R (10 μ mol/L) 0.3 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, ddH₂O 3.4 μ L。

2 结果与分析

2.1 KLBMP0506 与拟南芥的平板共培养

拟南芥与菌株 KLBMP0506 在同一培养基上共生长 14 d 后, 与对照组相比, 接种菌株后的拟南芥幼苗鲜重比对照组增加了 150%, 侧根的数目显著增加了 276.9%, 主根长无明显差异(图 1, 图 2)。结果表明菌株 KLBMP0506 对拟南芥无菌苗有一定的促生作用。

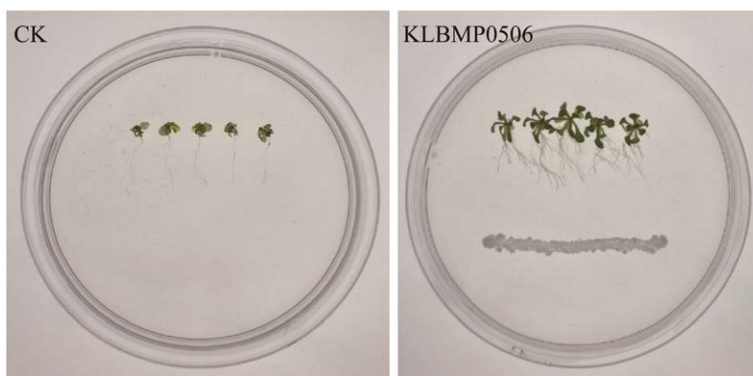


图 1 KLBMP0506 与拟南芥平板共培养 14 d 形态图

Figure 1 Morphology of KLBMP0506 and *Arabidopsis thaliana* plate co-cultured for 14 d.

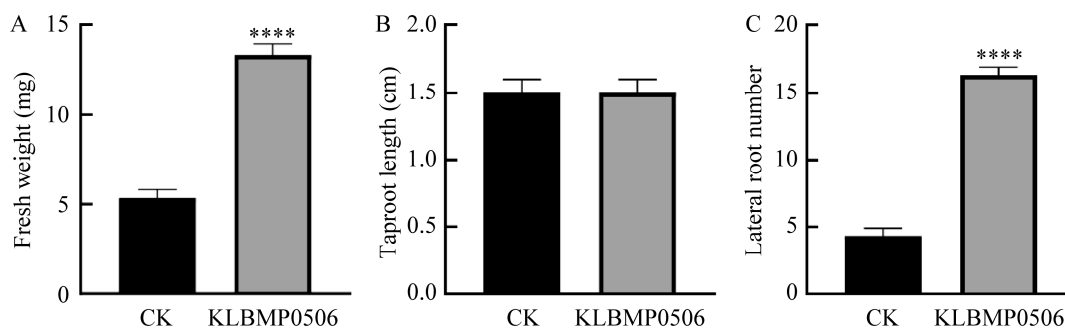


图 2 KLBMP0506 与拟南芥平板共培养 14 d 对拟南芥生长的影响

Figure 2 Effect of KLBMP0506 co-cultured with *Arabidopsis thaliana* plate for 14 d on growth of *Arabidopsis thaliana*. A: Fresh weight. B: Taproot length. C: Lateral root number. ****: $P < 0.0001$.

2.2 KLBMP0506 对盆栽拟南芥的影响

将 KLBMP0506 接种于移栽后的拟南芥植株, 发现其对拟南芥有明显的促生作用, 接种目标菌株使不同时间段的拟南芥的鲜重分别增加 97.75%、355.62%、146.37%、58.97%和 54.48%;

干重分别增加 144.44%、242.86%、226.67%、117.37%和 128.33%。因在 7 d 和 14 d 时拟南芥并未抽薹, 计算第 21、28、35 天的茎长, 分别比对照组增加 97.22%、93.48%和 85.71% (图 3, 表 2)。

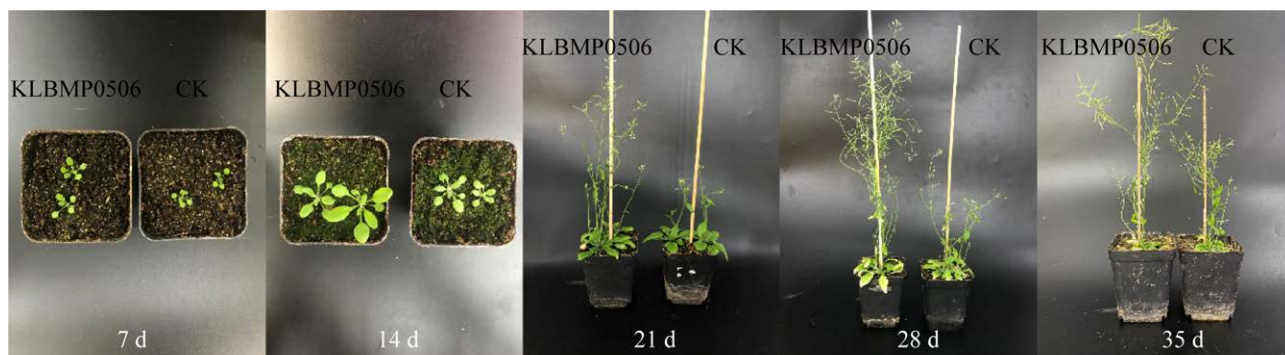


图 3 KLBMP0506 对盆栽拟南芥生长的影响

Figure 3 The effect of KLBMP0506 on the growth of potted *Arabidopsis thaliana*.

表 2 盆栽试验中 KLBMP0506 对拟南芥的促生效果

Table 2 Growth promoting effect of KLBMP0506 on *Arabidopsis thaliana* in pot experiment

Treatment	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	Stem length (cm)
CK (7 d)	7.40±0.70	0.60±0.02	0.00±0.00
KLBMP0506 (7 d)	14.63±0.92**	1.47±0.15**	0.00±0.00
CK (14 d)	18.10±1.40	2.33±0.20	0.00±0.00
KLBMP0506 (14 d)	82.47±3.10****	8.00±0.62***	0.00±0.00
CK (21 d)	159.70±2.40	18.50±2.48	12.00±0.58
KLBMP0506 (21 d)	393.50±9.34****	60.43±1.58***	23.67±0.33****
CK (28 d)	350.90±21.78	41.83±2.15	15.33±0.33
KLBMP0506 (28 d)	557.80±16.47**	90.93±5.96**	29.67±0.88***
CK (35 d)	666.50±18.02	62.13±4.50	16.33±0.33
KLBMP0506 (35 d)	1 030.00±41.90**	141.90±3.10***	30.33±0.33****

** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$.

此外,本研究通过测定目标菌株处理后拟南芥盆栽苗的叶绿素、可溶性糖及可溶性蛋白的含量来探究菌株 KLBMP0506 对拟南芥生长发育的影响。可溶性糖标准曲线为 $y=0.0042x+0.0959$, $R^2=0.9917$; 可溶性蛋白标准曲线为 $y=0.0012x-0.0068$, $R^2=0.9924$ 。结果显示施菌后的拟南芥植株的叶绿素含量和可溶性糖含量均都有所提高,其中叶绿素含量在移栽后第 28 天上升最多,比对照组增加 22.73%; 可溶性糖含量在移栽后第 7 天比对照组增加 39.01%。然而,可溶性蛋白的含量并未比对照

组有明显的增加,在移栽后第 14、21 天比对照组含量低(表 3)。

2.3 KLBMP0506 与拟南芥分隔平板培养

将拟南芥无菌苗与 KLBMP0506 于分隔平板中共生长 14 d 后,发现隔离共生长的 KLBMP0506 仍然能够促进拟南芥的生长。与对照组相比,和菌株分隔共生长的拟南芥幼苗的鲜重增加 165.5%,虽然主根的长度缩短 6.12%,但是侧根数增加 312.5%(图 4,图 5)。推测可能是 KLBMP0506 在生长时产生了某种挥发性物质促进了拟南芥的生长发育。

表 3 KLBMP0506 处理后拟南芥叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白含量变化

Table 3 Changes of chlorophyll, soluble sugar and soluble protein contents in *Arabidopsis thaliana* after KLBMP0506 treatment

Treatment	Chlorophyll content (mg/g)	Soluble sugar content (mg/g)	Soluble protein content (mg/g)
CK (7 d)	5.12±0.07	2.21±0.06	14.72±0.35
KLBMP0506 (7 d)	5.61±0.10*	3.08±0.11**	14.74±0.06
CK (14 d)	5.04±0.09	2.90±0.05	16.73±0.41
KLBMP0506 (14 d)	5.83±0.23*	3.15±0.07*	14.47±0.19**
CK (21 d)	5.74±0.17	2.75±0.04	16.35±0.08
KLBMP0506 (21 d)	6.69±0.26*	2.93±0.09	15.45±0.17**
CK (28 d)	6.05±0.08	2.73±0.08	15.92±0.05
KLBMP0506 (28 d)	7.43±0.07***	2.90±0.06	16.19±0.11
CK (35 d)	5.54±0.09	2.57±0.05	15.71±0.10
KLBMP0506 (35 d)	6.47±0.12**	2.78±0.02*	15.75±0.12

* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

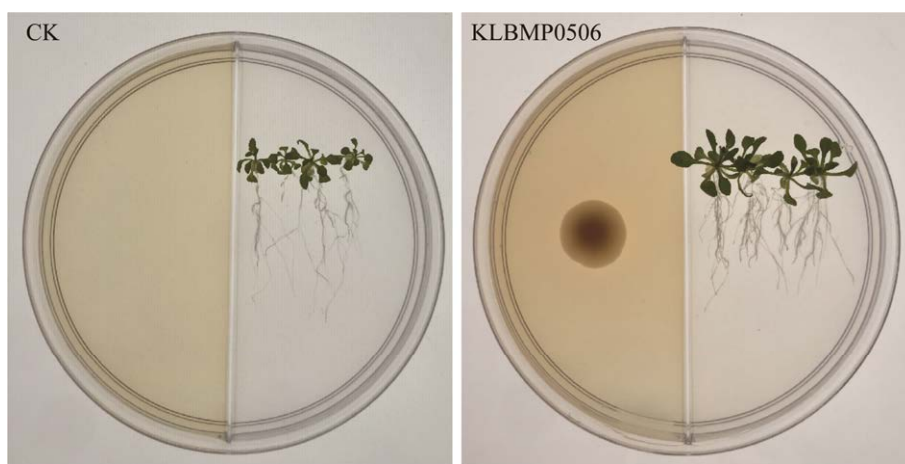


图 4 KLBMP0506 与拟南芥分隔平板共培养 14 d 形态图

Figure 4 Morphology of KLBMP0506 co-cultured with *Arabidopsis thaliana* separator plates for 14 d.

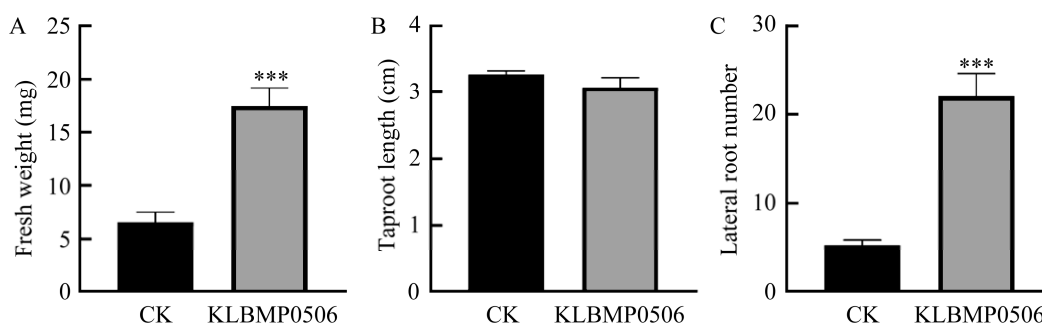


图 5 KLBMP0506 与拟南芥分隔平板共培养 14 d 对拟南芥生长的影响

Figure 5 Effect of KLBMP0506 co-cultured with *Arabidopsis thaliana* separator plate for 14 d on growth of *Arabidopsis thaliana*. A: Fresh weight. B: Taproot length. C: Lateral root number. ***: $P < 0.001$.

2.4 KLBMP0506 发酵液中活性部位的挑选

通过不同有机溶剂对菌株发酵产物进行萃取,从二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇中分别萃取得到 0.259 3 g、0.311 9 g 和 6.325 g 的产物。通过观察转接至含有不同萃取产物的培养基中拟南芥的生长状况(表 4),发现二氯甲烷提取物降低拟南芥鲜重,正丁醇提取物和乙酸乙酯提取物

分别提高拟南芥鲜重 32.1%和 42.2%,此外,在正丁醇提取物中拟南芥的主根长增长 128.2%,对照组与二氯甲烷萃取产物组的拟南芥幼苗没有长出侧根,而正丁醇萃取产物组与乙酸乙酯萃取产物组的拟南芥均长出了 3–5 条侧根。因此推测 KLBMP0506 具有促生作用的成分主要存在于正丁醇提取物和乙酸乙酯的提取物中。

表 4 KLBMP0506 发酵液不同提取物对拟南芥的促生效果

Table 4 Growth promoting effect of different extracts from KLBMP0506 fermentation broth on *Arabidopsis thaliana*

Treatment	Fresh weight (mg)	Taproot length (cm)	Lateral root number
CK	3.63±0.07	1.30±0.00	0.00±0.00
Methylene chloride extract	3.17±0.12*	1.13±0.03**	0.00±0.00
N-butanol extract	4.80±0.15**	2.97±0.15***	3.33±0.33***
Ethyl acetate extract	5.17±0.18**	1.10±0.06*	3.67±0.33***

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

2.5 qRT-PCR 检测结果

将提取的 RNA 反转录得到 cDNA 后进行 qRT-PCR 检测,测定菌株 KLBMP0506 处理后拟南芥中各供试基因的表达情况。

菌株 KLBMP0506 对调控拟南芥侧根数目相关基因的转录影响如图 6 所示, 基因 *ABI4*、*FLA1* 的表达量总体呈下降趋势。*ABI4* 的表达量在拟南芥移栽后第 7、21、28 和 35 天分别为对照组的 0.01、0.40、0.33 和 0.26 倍; *FLA1* 的表达量在 5 个时间段分别为对照组的 0.04、0.51、0.69、0.11 和 0.19 倍, 表明目标菌株可能通过下调与侧根形成相关基因的表达促进拟南芥的生长发育。

菌株 KLBMP0506 对调控拟南芥主根生长相关基因的转录影响如图 7 所示。本研究选取的调控拟南芥主根生长的相关基因除 *HB52* 在第 14 天、*PLT3* 在第 35 天的表达量有较为明显的升高外, 其他基因的表达并未有显著变化, 尤其在前面的时间段, 表明菌株 KLBMP0506 对拟南芥对拟南芥中与主根生长相关基因并没有明显的调控作用。

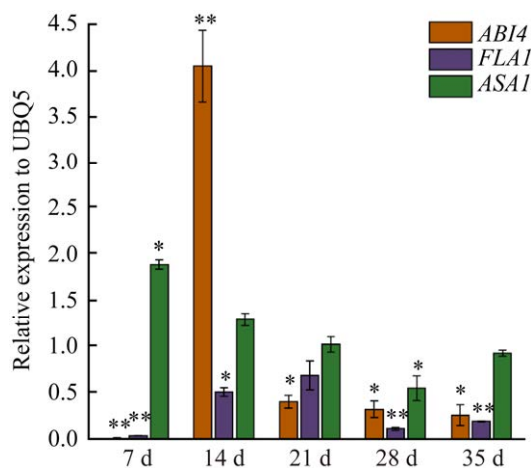


图 6 KLBMP0506 对调控拟南芥侧根数目相关基因的转录影响

Figure 6 Effects of KLBMP0506 on transcription of genes related to lateral root number in *Arabidopsis thaliana*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

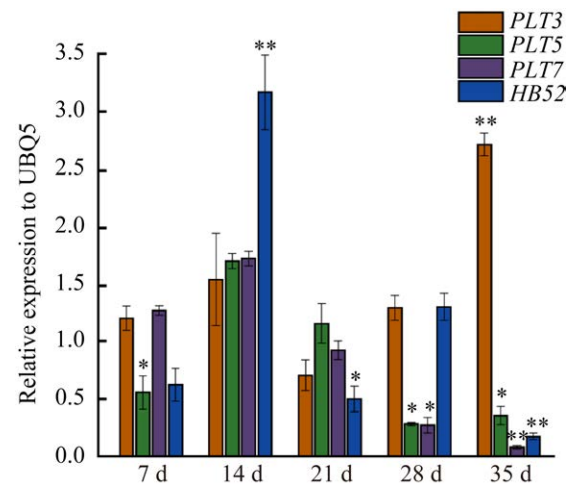


图 7 KLBMP0506 对调控拟南芥主根生长相关基因的转录影响

Figure 7 Effects of KLBMP0506 on transcription of genes related to taproot growth in *Arabidopsis thaliana*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

菌株 KLBMP0506 对调控拟南芥生长素合成、运输相关基因转录影响如图 8 所示。从整体来看, 调控拟南芥生长素合成和运输的相关基因 *AUX1*、*EIR1* 和 *YUC4* 的表达量总体上呈不同程度的上调, 其中基因 *YUC4* 的表达变化最为显著,

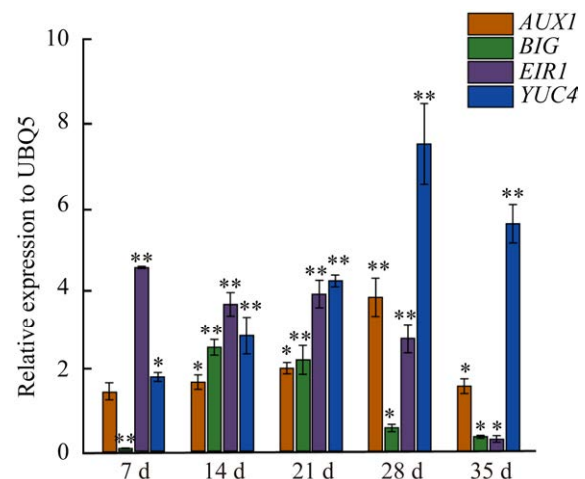


图 8 KLBMP0506 对调控拟南芥生长素合成和运输相关基因的转录影响

Figure 8 Effects of KLBMP0506 on transcription of genes involved in regulating auxin synthesis and transport in *Arabidopsis thaliana*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

较对照组的表达量上升 1.79–7.43 倍, 表明菌株 KLBMP0506 能够通过调控拟南芥生长素合成和运输的相关基因的表达而促进拟南芥的生长。

3 讨论与结论

近年来关于植物内生菌促生作用的研究已成为研究热点, 本研究从茶树中分离得到一株有潜在促生功能的内生真菌, 并利用模式植物拟南芥验证其促生效果, 为后期研究开发微生物菌肥提供理论依据。

本研究中菌株 KLBMP0506 隶属于异常威克汉姆酵母属, 目前已有一些研究证实该属菌株具有潜在的促生能力。Kumla 等^[20]从土壤中分离得到的 *W. anomalus* strains SDBR-CMU-S1-06 展现出了较强的产 IAA、铁载体、ACC 脱氨酶及解磷能力; Fernandez-San Millan 等^[21]的研究发现从西班牙葡萄园分离的 *W. anomalus*-32 具有产 IAA、几丁质酶等促生潜能; Srinivasan 等^[22]从海藻中提取的 *W. anomalus* MSD1 具有固氮潜力, 可溶解不溶性磷酸盐和锌, 产生铁载体, 并具有 ACC 脱氨酶活性。课题组前期也同样证明该属菌株 KLBMP0506 具有较强的解磷、固氮能力, 同时能够分泌色氨酸、天冬酰胺、丙氨酸等氨基酸, 进一步表明异常威克汉姆酵母属菌株具有一定的促生特性, 但目前利用该属菌株促进植物生长, 探究其对植物的促生作用及潜在促生机制的研究还鲜有报道。

本研究通过平板共培养及盆栽试验, 检测拟南芥植株的相关生长指标, 结果均表明菌株 KLBMP0506 可显著促进拟南芥植株的生长。植物体内叶绿素、可溶性糖及可溶性蛋白含量在植物的生长发育中发挥重要的作用, 作为检测植物生长状况的重要指标。在本研究中经菌液处理后拟南芥植株的叶绿素及可溶性糖含量提高, 进一

步说明该菌株对拟南芥具有一定的促生长作用, 这与张现勇等^[23]从油菜中分离获得的菌株 yc8 可明显提高油菜幼苗植株的鲜重、株高、叶绿素、可溶性蛋白及可溶性糖含量的结果相一致。郭彩苹等^[24]发现长枝木霉 T6 菌株发酵滤液可通过显著提高小油菜幼苗叶绿素和可溶性蛋白含量从而促进小油菜生长。

微生物挥发性有机化合物(MVCs)是调节植物生长发育过程的简单、高效的化合物群^[25]。Phoka 等^[26]发现木霉菌 PSU-P1 产生的挥发性有机化合物增加了拟南芥鲜重、根长和叶绿素含量, 促进了拟南芥的生长; Ryu 等^[27]的研究表明植物促进生长的根际细菌(PGPR)释放的 VOC 混合物可促进拟南芥幼苗的生长, 如 2,3-丁二醇和乙酰丙酮显著促进了拟南芥幼苗的生长; 另外还有研究发现二氧化碳也是作为挥发性有机化合物中重要成分, 能够促进拟南芥的生长^[28]; 在本研究中菌株 KLBMP0506 与拟南芥无菌苗在分隔平板共培养时, 拟南芥植株的鲜重及侧根数均表现出明显的增加, 结合同一平板共培养及盆栽试验结果, 我们推测菌株 KLBMP0506 能够分泌某些植物激素或者一些活性成分可直接接触并作用于植物以及产生的一些挥发性物质均可促进拟南芥的生长。另外本研究进一步进行目标菌株发酵液中活性部位的挑选试验, 结果显示正丁醇提取物和乙酸乙酯提取物可显著提高拟南芥植株的鲜重并促进侧根的形成, 表明目标菌株的胞外发酵产物中正丁醇及乙酸乙酯提取物促生效果显著, 分别与一株蓬碱内生真菌 JP4-1^[29]及开唇兰小菇和兰小菇的乙酸乙酯提取物具有的促生作用相一致^[30]。

植物的侧根数目、主根长度和生长素的合成及运输均会影响植物的生长发育, 植物的生物量也会受相关基因的调控。侧根作为植物根系的重

要部分, 在固定和吸收水分和养分方面起着至关重要的作用, 是影响植物生长的关键因素之一^[31], 张方亮等^[32]不完全统计了调控侧根数量的基因有 69 个, 其中基因 *ABI4* 和 *FLA1* 突变体均会导致侧根数目增多。本研究中基因 *ABI4*、*FLA1* 的表达量总体呈下调趋势, 表明菌株 KLBMP0506 可通过下调 *ABI4*、*FLA1* 基因的表达促进拟南芥侧根的形成, 这与我们平板共培养试验中菌株 KLBMP0506 的处理增加了拟南芥侧根数目的结果相吻合。侧根数目的增多有利于增加植物根系的表面积, 可以从更多的方向获得植物生长发育所需的营养物质。有研究表明 *ABI4* 基因可介导脱落酸和细胞分裂素通过减少拟南芥中的极性生长素转运来抑制侧根形成^[33]。本研究中挑选的调控拟南芥主根生长的相关基因的表达受目标菌株处理的影响不明显, 尤其是前面的时间段, 说明菌株 KLBMP0506 对拟南芥主根的生长并未有明显的促进作用, 这也与我们的平板共培养试验结果相一致。另外, 我们选择的调控拟南芥生长素合成和运输的相关基因 *AUX1*、*EIR1* 和 *YUC4* 的表达量总体上呈不同程度的上调, 其中基因 *YUC4* 的表达变化最为显著, 较对照组的表达量上升 1.79–7.43 倍。*YUC4* 作为生长素合成关键酶基因, 其表达量的上调可促进生长素的生物合成和运输, 并可通过与拟南芥中脱落酸的串扰影响植物的生长和发育^[34]。综合以上分析我们推测, 菌株 KLBMP0506 可能通过调控拟南芥中与侧根形成以及与生长素合成和运输相关基因的表达, 而实现对拟南芥的促生作用。本研究初步探讨了菌株 KLBMP0506 对拟南芥的促生效果及潜在的促生机制, 然而更深层次的分子调控机理仍有待进一步的研究。本研究可为开发高效环保的微生物菌肥提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] KUSARI S, HERTWECK C, SPITELLER M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(7): 792-798.
- [2] 丁绍武, 张鹏, 刘梦铭. 植物内生菌对植物生长的影响研究进展[J]. *现代农业科技*, 2020, 769(11): 132-134.
DING SW, ZHANG P, LIU MM. Research progress on the effects of endophytes on plant growth[J]. *XIANDAI NONGYE KEJI*, 2020(11): 132-134 (in Chinese).
- [3] AFZAL I, SHINWARI ZK, SIKANDAR S, SHAHZAD S. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants[J]. *Microbiological Research*, 2019, 221: 36-49.
- [4] KHARE E, MISHRA J, ARORA NK. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2732.
- [5] 林国钦, 张婷, 左杰, 何锦欣, 蓝灿华, 田宝玉. 产 IAA 根内生菌的分离鉴定及对小麦促生效果[J]. *福建农业科技*, 2022, 53(4): 10-17.
LIN GQ, ZHANG T, ZUO J, HE JX, LAN CH, TIAN BY. Isolation and identification of IAA-producing endophytic bacteria and its growth-promoting effect on the growth of wheat[J]. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2022, 53(4): 10-17 (in Chinese).
- [6] 李福艳, 刘晓玉, 颜静婷, 蔡燕飞. 三株产吲哚乙酸根际促生芽孢杆菌的筛选鉴定及其促生作用[J]. *浙江农业学报*, 2021, 33(5): 873-884.
LI FY, LIU XY, YAN JT, CAI YF. Isolation and identification of three indole-3-acetic acid producing plant-growth-promoting rhizosphere *Bacillus* sp. and their growth-promoting effects[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2021, 33(5): 873-884 (in Chinese).
- [7] OROZCO-MOSQUEDA MDC, GLICK BR, SANTOYO G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): an efficient mechanism to counter salt stress in crops[J]. *Microbiological Research*, 2020, 235: 126439.
- [8] SHAH D, KHAN MS, AZIZ S, ALI H, PECORARO L. Molecular and biochemical characterization, antimicrobial activity, stress tolerance, and plant growth-promoting effect of endophytic bacteria isolated from wheat varieties[J]. *Microorganisms*, 2021, 10(1): 21.

- [9] 白洁, 姚拓, 王占军, 雷杨, 杨晓蕾, 张蔚. 欧李内生促生菌分离、鉴定及促生、耐盐碱特性[J]. 干旱地区农业研究, 2022, 40(1): 132-138.
- BAI J, YAO T, WANG ZJ, LEI Y, YANG XL, ZHANG W. Isolation and identification as well as growth enhancement and saline-alkali tolerance properties of *Cerasus humilis* plant growth-promoting endophytes[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2022, 40(1): 132-138 (in Chinese).
- [10] INITIATIVE TAG. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature*, 2000, 408(6814): 796-815.
- [11] 张振桢, 许煜泉, 黄海. 拟南芥: 一把打开植物生命奥秘大门的钥匙[J]. 生命科学, 2006, 18(5): 442-446.
- ZHANG ZZ, XU YQ, HUANG H. *Arabidopsis*, a powerful tool for exploring the mysteries of plant Kingdom[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2006, 18(5): 442-446 (in Chinese).
- [12] BARON NC, RIGOBELLO EC. Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture[J]. *Mycology*, 2022, 13(1): 39-55.
- [13] 张奇儒. 异常威克汉姆酵母控制梨果采后病害及其诱导梨果抗性相关机制研究[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2019.
- ZHANG QR. Study on the mechanism of controlling postharvest diseases and inducing pear resistance by *Wickham* abnormal yeast[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2019 (in Chinese).
- [14] LANHUANG BE, YANG QY, GODANA EA, ZHANG HY. Efficacy of the yeast *Wickerhamomyces anomalus* in biocontrol of gray mold decay of tomatoes and study of the mechanisms involved[J]. *Foods*, 2022, 11(5): 720.
- [15] 贾敏, 朱胜琪, 王雅慧, 谭杉杉, 刘洁霞, 熊爱生. 不同贮藏条件对芹菜叶绿素含量的影响及相关基因表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(6): 1078-1086.
- JIA M, ZHU SQ, WANG YH, TAN SS, LIU JX, XIONG AS. Effects of different storage conditions on the content of chlorophyll and expression analysis of related genes in celery (*Apium graveolens*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2022, 30(6): 1078-1086 (in Chinese).
- [16] 沈诗钰, 孙威江, 唐琴, 陈佳佳, 林馥茗, 黄艳, 周喆, 陈翠翠. 基于近红外光谱技术的白茶可溶性糖总量快速测定研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(1): 16-23.
- SHEN SY, SUN WJ, TANG Q, CHEN JJ, LIN FM, HUANG Y, ZHOU Z, CHEN CC. Rapid determination of total water-soluble sugars in white tea by near-infrared spectroscopy[J]. *Natural Product Research and Development*, 2019, 31(1): 16-23 (in Chinese).
- [17] 高天瑜, 郑斌, 许文天, 梁清志, 王松标, 李蕊, 曾教科, 武红霞. 芒果成花过程碳水化合物和可溶性蛋白含量的变化[J]. 中国南方果树, 2022, 51(3): 63-69.
- GAO TY, ZHENG B, XU WT, LIANG QZ, WANG SB, LI R, ZENG JK, WU HX. Changes of carbohydrate and soluble protein contents during flowering of mango[J]. *South China Fruits*, 2022, 51(3): 63-69 (in Chinese).
- [18] 文先. 内生真菌 *Epichloë bromicola* 菌种分离鉴定及其发酵物对拟南芥幼苗生长的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2015.
- WEN X. Isolation and identification of *Epichloë bromicola* strain and the effects of extracts of its fermentation broth on the growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia University, 2015 (in Chinese).
- [19] MAVRIDIS K, STRAVODIMOS K, SCORILAS A. Downregulation and prognostic performance of microRNA 224 expression in prostate cancer[J]. *Clinical Chemistry*, 2013, 59(1): 261-269.
- [20] KUMLA J, NUNDAENG S, SUWANNARACH N, LUMYONG S. Evaluation of multifarious plant growth promoting trials of yeast isolated from the soil of Assam tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) plantations in northern Thailand[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(8): 1168.
- [21] FERNANDEZ-SAN MILLAN A, FARRAN I, LARRAYA L, ANCIN M, ARREGUI LM, VERAMENDI J. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development[J]. *Microbiological Research*, 2020, 237: 126480.
- [22] SRINIVASAN R, KRISHNAN SR, RAGUNATH KS, PONNI KK, BALAJI G, PRABHAKARAN N, CHELLIAPPAN B, LAKSHMI NARAYANAN R, GRACY M, LATHA K. Prospects of utilizing a multifarious yeast (MSD1), isolated from South Indian coast as an agricultural input[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2022, 39: 1022-1032.
- [23] 张现勇, 韩巨才, 刘慧平, 邢鲲. 油菜内生细菌 *yc8* 发酵液对植物促生作用及其营养代谢的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(29): 9121-9122, 9124.

- ZHANG XY, HAN JC, LIU HP, XING K. Effect of the fermentation of endophytic bacteria strain yc8 from rapeseeds on the growth-promoting effect and nutrition metabolism[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(29): 9121-9122, 9124 (in Chinese).
- [24] 郭彩苹, 张禄, 孙晨曦, 马耀杰, 李昕冉, 景涛, 徐秉良, 张树武. 不同种子处理方法下长枝木霉 T6 菌株对小油菜促生作用及生理特性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2023, 41(1): 178-184.
- GUO CP, ZHANG L, SUN CX, MA YJ, LI XR, JING T, XU BL, ZHANG SW. Effects of *Trichoderma longibrachiatum* T6 on growth promotion and physiological characteristics of *Brassica chinensis* under different seed treatment methods[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2023, 41(1): 178-184 (in Chinese).
- [25] TYAGI S, MULLA SI, LEE KJ, CHAE JC, SHUKLA P. VOCs-mediated hormonal signaling and crosstalk with plant growth promoting microbes[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(8): 1277-1296.
- [26] PHOKA N, SUWANNARACH N, LUMYONG S, ITO SI, MATSUI K, ARIKIT S, SUNPAPAO A. Role of volatiles from the endophytic fungus *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 in biocontrol potential and in promoting the plant growth of *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Fungi, 2020, 6(4): 341.
- [27] RYU CM, FARAG MA, HU CH, REDDY MS, WEI HX, PARÉ PW, KLOPPER JW. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(8): 4927-4932.
- [28] ZHANG CL, ZHANG MY, YAN ZW, WANG FX, YUAN XZ, ZHAO S, ZHANG L, TIAN HY, DING ZJ. CO₂ is a key constituent of the plant growth-promoting volatiles generated by bacteria in a sealed system[J]. Plant Cell Reports, 2021, 40(1): 59-68.
- [29] 于飞, 谷玥, 张奇, 卜宁. 一株碱蓬内生真菌的鉴定及促生活性产物的初步研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32(5): 151-157.
- YU F, GU Y, ZHANG Q, BU N. The identification of a fungal endophyte of *Suaeda salsa* and preliminary research on active products of promoting growth[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(5): 151-157 (in Chinese).
- [30] 高微微, 郭顺星. 内生真菌菌丝及代谢物对铁皮石斛及金线莲生长的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(6): 556-559.
- GAO WW, GUO SX. Effects of endophytic fungal hyphae and their metabolites on the growth of *Dendrobium candidum* and *Anoectochilus roxburghii*[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2001, 23(6): 556-559 (in Chinese).
- [31] WU CY, WANG XQ, ZHEN WB, NIE YQ, LI Y, YUAN PL, LIU QQ, GUO SY, SHEN ZG, ZHENG BL, HU ZB. SICKLE modulates lateral root development by promoting degradation of lariat intronic RNA[J]. Plant Physiology, 2022, 190(1): 548-561.
- [32] 张方亮, 高亚梅, 王占斌, 韩毅强, 郑殿峰, 何俊华. 拟南芥侧根生长发育相关的基因[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2015, 27(4): 19-24.
- ZHANG FL, GAO YM, WANG ZB, HAN YQ, ZHENG DF, HE JH. Lateral root development of related genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2015, 27(4): 19-24 (in Chinese).
- [33] SHKOLNIK-INBAR D, BAR-ZVI D. ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2010, 22(11): 3560-3573.
- [34] MUNGUÍA-RODRÍGUEZ AG, LÓPEZ-BUCIO JS, RUIZ-HERRERA LF, ORTIZ-CASTRO R, GUEVARA-GARCÍA ÁA, MARSCH-MARTÍNEZ N, CARREÓN-ABUD Y, LÓPEZ-BUCIO J, MARTÍNEZ-TRUJILLO M. YUCCA4 overexpression modulates auxin biosynthesis and transport and influences plant growth and development via crosstalk with abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*[J]. Genetics and Molecular Biology, 2020, 43(1): e20190221.