

一株羽毛针禾内生细菌的鉴定、功能及促生特性

焦诗雨, 李旭东, 张婷婷*, 马磊*

石河子大学生命科学学院, 新疆 石河子 832003

焦诗雨, 李旭东, 张婷婷, 马磊. 一株羽毛针禾内生细菌的鉴定、功能及促生特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3179-3191
Jiao Shiyu, Li Xudong, Zhang Tingting, Ma Lei. Identification, functions, and growth-promoting characteristics of an endophytic bacterium from *Stipagrostis pennata*[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3179-3191

摘要: 【背景】羽毛针禾是沙漠群落演替中的“先锋”草本植物, 可在荒漠贫瘠地带繁殖, 其生命力顽强、繁殖速度快、种子量大、扩散广。【目的】探究羽毛针禾具有促生效应的内生细菌资源。

【方法】从种子中分离出内源性细菌 Z1, 并对其进行了生物化学、发酵和促生等方面的研究。【结果】Z1 菌落呈黄色球形, 不透明, 中央有小突起, 边缘褶皱而湿润, 镜检成直杆状, 表面有细鞭毛, 大小范围为(0.5–1.0) μm × (1.0–3.0) μm 。经革兰氏染色试验、靛基质、甲基红、氧化酶、淀粉生产水解试验、V-P 试验、明胶液化学试验测定后均呈阳性, 甲基红试验、尿素分解实验测定均呈现阴性, 是泛生菌属(*Pantoea*)的细菌。Z1 具有产吲哚乙酸的能力, 单位产量为 3.14 mg/L; 而且具有溶磷、解钾、分泌铁载体的能力。Z1 菌株最佳发酵培养基条件是: 氮源为蛋白胨, 碳源是溶性淀粉, 无机盐为碳酸钙, pH 9.0。Z1 接种小麦 10 d 后促生效果明显, 叶宽、株高、根长等指标分别增长了 60.0%、13.5% 和 8.0%; 小麦幼苗的叶片含水量、总叶绿素含量、氮含量、可溶性蛋白等指标均有显著提升($P < 0.05$)。

【结论】Z1 是一株具有促生潜力的功能菌, 可为利用微生物-植物互作和治理荒漠提供新资源。

关键词: 羽毛针禾; 植物内生菌; 泛生菌属; 细菌鉴定; 促生特性

基金项目: 国家自然科学基金(32060145, 32060300, 31760302, 31560310)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32060145, 32060300, 31760302, 31560310)

***Corresponding authors:** E-mail: ZHANG Tingting: zting@shzu.edu.cn; MA Lei: mlei@shzu.edu.cn

Received: 2021-11-30; **Accepted:** 2022-01-19; **Published online:** 2022-03-31

Identification, functions, and growth-promoting characteristics of an endophytic bacterium from *Stipagrostis pennata*

JIAO Shiyu, LI Xudong, ZHANG Tingting*, MA Lei*

College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China

Abstract: [Background] With tenacious vitality, *Stipagrostis pennata* is a pioneer plant species in the desert, which features fast reproduction, high seed yield, and wide spread of seeds. [Objective] To test the growth-promoting endophytic bacteria of *S. pennata*. [Methods] The endophytic strain Z1 was isolated from the seeds of *S. pennata* and the biochemical characteristics, fermentation conditions, and growth-promoting performance were explored. [Results] The colonies of Z1 were spherical, yellow, and opaque, with small protrusions in the center and wrinkled and wet margins. Microscopy showed that it was straight rod-shaped with fine flagella on the surface and the size of (0.5–1.0) μm × (1.0–3.0) μm . The Gram staining test, indole test, oxidase test, starch hydrolysis test, V-P test, and gelatin liquefaction test all demonstrated positive results, while the methyl red test and urea hydrolysis test showed negative result. Moreover, it was identified as a *Pantoea* strain. Z1 produced Indole-3-acid, with the yield of 3.14 mg/L. Moreover, it can solubilize phosphorus and potassium and secrete iron carrier. The optimum fermentation conditions of Z1 are as follows: peptone as nitrogen source, soluble starch as carbon source, calcium carbonate as inorganic salt, and pH 9.0. The wheat growth-promoting effect of Z1 was obvious 10 days after the inoculation, as the leaf width, plant height, and root length were 60.0%, 13.5%, and 8.0% larger, respectively, and the leaf water content, total chlorophyll content, nitrogen content, and soluble protein of wheat seedlings were significantly increased ($P < 0.05$). [Conclusion] Z1 is a functional bacterium with growth-promoting potential, which can be used for microbe-plant interaction and desertification control.

Keywords: *Stipagrostis pennata*; plant endophytic bacteria; *Pantoea*; bacterial identification; growth-promoting characteristics

羽毛针禾(*Stipagrostis pennata*)为禾本科芦竹亚科针禾属植物(*Stipagrostis* *Nees*), 是多年生草本, 常形成草丛, 呈辐射状排列^[1], 集中繁殖分布于荒漠地带。由于其生长环境常年干燥、降水量少, 风蚀严重且土地沙质化程度高^[2], 所以羽毛针禾有耐干燥、耐暴风侵蚀、耐沙土掩埋等沙漠适应性特点, 可促进流沙的固定和改善沙漠土壤成分^[3]。羽毛针禾被广泛誉为古尔班通古特沙漠流动、半流动沙地中重要的“先锋”植物,

对荒漠等极端环境中优势群落的生物演替进程具有很重要的促进意义^[4]。近年来, 羽毛针禾因具有耐盐碱、耐干旱、抗逆性强等独特的适应性, 在荒漠化治理和生态恢复等方面发挥重要作用而受到广泛的关注^[5]。

植株内生细菌一般是指长期与健康植株或植物组织共存或寄生, 不致病却可以和植株建立某种互利共存关系的细菌^[6]。内生细菌在与宿主植物共同生长的协同进化过程中, 逐渐地进化出

一些与宿主相似度极高的物质特征,可提高植物在极端环境下的生存率并促进植株生长^[7-8]。例如,从极端生境植物披碱草中分离出一株内生真菌 LQ1230,制成菌剂施加后小麦发芽率剧增,改善了小麦幼苗的生长状况,显著增加了小麦幼苗的植株高度、根部长度、叶片宽度等指标,缓解了干旱对小麦幼苗根系的不良影响^[9]。但是,关于羽毛针禾种子内生菌促生特性的研究却鲜有报道。

本研究从羽毛针禾种子中分离筛选得到一株内生细菌 Z1,首先对其进行了初步鉴定,而后分别对其产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、解磷、解钾、产铁载体功能进行了分析;对菌株生长培养基发酵条件进行选择优化,最后通过盆栽小麦幼苗试验验证菌株的促生效果。本研究旨在以植物-微生物互作关系为切入点,探究特殊生境下植物内生菌的特性,以期发掘能够增强宿主抗逆性和促进植物生长的植物内生菌,为荒漠生态环境的改善及土地沙化的治理提供研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

在新疆地区古尔班通古特沙漠收集健康无病害的羽毛针禾种子,装入无菌塑料袋,然后冷藏带回实验室并于12-24 h内完成种子内生菌的分离。

供试小麦为津农6号小麦,由石河子大学农学院李诚教授惠赠。

1.1.2 培养基

含有机磷和无机磷的选择培养基^[10]用于解磷功能菌的筛选,钾长石作为钾源的培养基用于筛选解钾功能菌^[11],铬天青(chrome-azurol S, CAS)检测培养基用于产铁载体菌的筛选^[12]。

1.1.3 主要试剂和仪器

革兰氏染色试剂,北京索莱宝科技有限公司;双氧水,山东利尔康医疗科技股份有限公司;明胶粉,上海祥瑞生物科技有限公司;氯化钠,天津市致远化学试剂有限公司;甲基红指示剂,国药集团化学试剂有限公司;肌酸,尿素,国药集团化学试剂有限公司。

超净工作台,上海尚道仪器制造有限公司;高压灭菌锅,浙江新丰医疗器械有限公司;高速离心机,广州吉迪仪器有限公司;电子秤,上海浦春计量仪器有限公司、低速离心机,广州吉迪仪器有限公司、分光光度计,上海菁华科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 内生细菌的分离纯化

将同样地的羽毛针禾种子混合,称取4 g,装入干净的烧杯中,用无菌水搅拌清洗5遍,立即用75%酒精对小麦种子进行消毒,时长6 min。无菌烧杯中倒入无菌水用无菌玻璃棒搅拌清洗种子3遍,沥干水分放进无菌台,用紫外灭菌灯照射30 min以上。将无菌清水注入无菌烧杯中搅拌冲洗至1 min后,将清水倒净并反复3遍,将洗涤后的种子放入75%乙醇溶液中,在超净操作台中静置约5 min,倒掉无水乙醇;再向烧杯内倒入2%次氯酸钠溶液淹没种子,静置3 min;倒掉消毒液后,用无菌水将种子搅拌清洗6-8次保留最后一次清洗液,用于后续消毒检验。将彻底灭菌过的种子加无菌水研磨。

取研磨后液体和无菌水按1:10的比例混合成10%溶液,用稀释涂布平板法在37 °C恒温培养箱对细菌进行培养,待菌落长出再用无菌接种环划线培养纯化细菌,分出单个菌并进行编号。

1.2.2 Z1 菌株的形态学及生理生化指标鉴定

(1) 菌落形态鉴定

用无菌接种环挑取单菌落至细菌液体培养基, 37 °C、180 r/min 摇瓶培养到对数期(OD_{600} 约为 1.0), 使用无菌水将发酵液稀释 1×10^{17} 倍, 涂布到牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 待平板有菌落长成便可观察细菌菌落的形态。

(2) 革兰氏染色

以金黄色葡萄球菌为阳性对照, 以大肠杆菌感染为阴性对照, 取载玻片一张, 滴 3 滴菌液, 于酒精灯明火上固化后, 首先用草酸铵结晶紫将细菌侵染 60 s, 用蒸馏水洗涤, 碘液复染 60 s, 再洗涤, 95% 的乙醇重新洗涤 20 s, 再用番红复染 1 min, 用光学显微镜油镜观察 结果。

(3) 菌体形态

用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)进一步观察细菌菌体形态结构。

(4) 生理生化指标鉴定

以金黄色葡萄球菌为阳性对照、大肠杆菌为阴性对照, 将通过细菌纯化试验的 Z1 细菌菌株进行活化培养, 37 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 至对数期(OD_{600} 约为 1.0), 无菌接种环挑取单菌落, 对照《常见细菌鉴定手册》^[13]中鉴定细菌的试验方法对种子中内生细菌进行生理生化特性方面的详细鉴定。

1) 靛基质试验: 挑取单菌落接入含蛋白胨的培养基, 37 °C、180 r/min 培养 48 h, 细菌可将蛋白胨分解成吲哚, 与显色剂混合反应阳性成红色, 阴性为黄色。

2) 甲基红试验方法: 用无菌接种环挑取单菌落, 再转接于细菌营养液体培养基中, 在 37 °C 条件下 180 r/min 培养 48 h 后, 用胶头滴管加指示剂数滴(甲基红), 结果阳性显鲜红, 阴性显淡黄或深黄色。

3) 氧化酶试验: 选择洁净的滤纸片, 蘸取少许菌苔, 然后滴加反应试剂, 细菌在与化学试剂接触后 10 s 内变为暗紫色溶液为阳性, 无色

为阴性。

4) 淀粉水解试验: 用接种环, 挑取待测菌的菌落后转接于淀粉肉汤液态培养基, 经 37 °C、180 r/min 摇瓶培养 2 d, 取 2 mL 的培养菌液于玻璃试管中, 用胶头滴管滴加一滴碘液于试管中, 观察试验现象, 反应液无颜色变化为阳性, 液体颜色为蓝色则为阴性。

5) V-P 实验: 用接种环挑取待测菌的菌落后转接于淀粉肉汤液态培养基, 经 37 °C、180 r/min 培养细菌 48 h, 随后将菌悬液和 40% NaOH 水溶液按 1:1 的配比均匀, 并加入少许肌酸溶液, 等反应大约 10 min 后, 若反应液为红色则为阳性结果。

6) 明胶液化试验: 将试验细菌接入 37 °C 液化后的明胶培养基中, 在 37 °C 培养箱培养 2 d, 培养后将反应液放入 4 °C 冰箱静置 30 min 后取出。明胶凝固为阴性, 明胶不凝固则为阳性。

7) 尿素分解试验: 将细菌接入液体尿素培养基中, 37 °C、180 r/min 摇瓶培养 18-24 h, 取反应液 2 mL 于试管中, 滴加一滴酚红指示剂, 观察结果变红为阳性, 不变红为阴性。

8) 触酶试验: 取一张洁净载玻片, 将试验所用细菌点接入 H_2O_2 水珠, 立刻观察反应。形成的大量气泡的为阳性, 完全没有气泡产生为阴性。

1.2.3 Z1 菌株的分子鉴定

采用菌落 PCR 的方法扩增菌株的 16S rRNA 基因片段(引物 fD1: 5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3'; 引物 rP2: 5'-ACGGCTACCTGT TACGACTT-3')。将扩增后的 PCR 产物送华大基因技术公司检测。将序列检测结果通过检索 NCBI 数据库查找相似序列, 使用 MEGA 7.0 软件建立系统发育树。

1.2.4 Z1 菌株的功能鉴定

IAA 测定: 使用比色法^[14]定性检测细菌产

IAA 的能力。将细菌菌悬液用移液枪按 2% 接种量接入含有 L-色氨酸底物的液体细菌培养基, 在 37 °C、180 r/min 摇床培养条件下培养 4 d, 将培养液 10 000 r/min 离心 10 min, 取高速离心后的 Z1 细菌的上清液与试验所用的比色液试剂按照 1:1 比例混合(1 mL 0.5 mol/L FeCl₃ 与 49 mL 35% HClO₄ 混匀), 摇晃试管使液体充分混匀, 放入暗箱反应 30 min, 对照则用无菌水与比色液混合, 观察试验结果, 红色、微红均为阳性, 不变色则为阴性。

解有机磷测定: 采用透明圈法^[15], 在解磷功能选择培养基上接种 Z1 细菌的菌株, 并放置在 28 °C 恒温培养箱培养 4 d, 当解磷选择培养基上的细菌菌落边缘有透明圈出现, 则该细菌菌株存在解有机磷的能力, 每组试验做 3 次重复。

解无机磷的试验方法: 在无机磷培养基上用接种环点接细菌菌株, 放于 28 °C 的恒温培养箱中培养 4 d 后观察, 如果在无机磷培养基上有细菌菌落形成, 则该菌株存在解无机磷的能力, 每组试验设置 3 次重复。

解钾试验方法: 将已纯化的细菌用平板划线法接种在含有钾长石的选择培养固体培养基上, 然后放入 37 °C 的恒温培养箱中培养 4 d, 每天定时观察。若培养基表面有菌落生长, 则试验菌具有解钾能力。

分泌铁载体: 首先应用 CAS 检测平板法, 在每块 CAS 检测平板上点接菌株, 经 28 °C 培养 5 d, 再观察菌体周围有无形成橙色晕圈, 如形成了橙色晕圈则该菌株已具备了分泌铁载体的能力。

1.2.5 Z1 菌株发酵条件优化

Z1 菌株生长曲线的测定: 将细菌用无菌接种环挑取一环接到液体细胞培养基中, 放入摇床中以 37 °C、180 r/min 培育至对数期(OD_{600} 约为 1.0), 再取 2% 的发酵液接种上述细胞培养基, 按上述方法传代培养细菌 3 代以上, 在第 4 代细

菌摇瓶培育期时每隔 2 h 采样 4 mL, 并测发酵液在 600 nm 波长的吸光度。将横坐标设定为时间, 将纵坐标设定为吸收光度, 制作 Z1 菌株的生长曲线。

初始 pH 对 Z1 细菌生长与发育的处理试验: 将细菌液体培养基的 pH 值依次调至 6.0、7.0、8.0 和 9.0 这 4 个分散变化梯度, 按 2% 的接种量接入细菌种子液, 37 °C、180 r/min 振荡培养细菌至对数期(OD_{600} 约为 1.0), 再取 4 mL 的 Z1 菌发酵液, 用紫外分光光度计测其 OD_{600} 值, 每组试验至少 3 次重复。

几种碳源的培养基均以加入 10 g/L 蛋白胨和 2 g/L 氯化钠为基础培养基, 再分别以 5 g/L 可溶性淀粉、麦芽糖、乳糖作为碳源进行试验, 试验对照组设置为不加碳源的培养基, 调 pH 值为 7.2–7.4。以 2 g/L 的接种剂量及 37 °C、180 r/min 振荡培养细菌至对数期(OD_{600} 约为 1.0), 再取出 4 mL 发酵液用紫外分光光度计测其 OD_{600} 值, 每组试验至少 3 次重复。

不同的氮源培养基一般以先添加 5 g/L 蔗糖和 2 g/L 氯化钠溶液作为基础培养基, 然后分别以 10 g/L 蛋白胨、硫酸铵和尿素作为氮源, 无氮源作为对照, 调 pH 值为 7.2–7.4。按 2% 的接种量接入细菌种子液, 37 °C、180 r/min 振荡培养至对数期(OD_{600} 约为 1.0), 取 4 mL 发酵液测其 OD_{600} 值, 每组试验至少 3 次重复。

不同的无机盐培养基均以加入 10 g/L 蛋白胨和 5 g/L 蔗糖作为基础培养基, 分别加 2 g/L 氯化钠、碳酸钙、硫酸镁为无机盐, 试验对照组设置为不加无机盐的培养基, 调 pH 值为 7.2–7.4。按 2% 的接种剂量接入细胞种子液, 37 °C、180 r/min 振荡培养细菌至对数期(OD_{600} 约为 1.0), 再取出 4 mL 发酵液用紫外分光光度计测其 OD_{600} 值, 每组试验至少 3 次重复。

1.2.6 接种 Z1 菌株对小麦幼苗的影响

盆栽试验：按 2% 的接种量将细菌种子液接入牛肉膏蛋白胨液体培养基中，37 °C、180 r/min 振荡培养至对数期(OD_{600} 约为 1.0)，将细菌发酵液装入 30 mL 离心管中，6 000 r/min 离心 5 min。将沉淀用无菌盐水制成菌细胞悬液(OD_{600} 约为 1.0，约 1.0×10^8 CFU/mL)，用灭菌蒸馏水浸渍约 10 h，将浸渍后的小麦种子加少许灭菌蒸馏水，放入恒压栽培箱中避光处理约 16 h，种子萌动后将其栽入装含沙量 60% 的无菌土料的花盆中，以 30 粒每盆，每天浇灭菌蒸馏水 100 mL，隔天再浇灌细菌悬液 100 mL，以灭菌蒸馏水为对照组，如此反复 3 次；10 d 后测其株高、根长度、叶长度^[16]、叶片叶绿素(采用乙醇提取比色法)^[17]、叶片氮含量(采用凯氏定氮法)^[18]和可溶性蛋白质浓度(使用考马斯 G-250 法)^[19]。

1.3 数据分析

数据整理与分析采用 SPSS 和 MEGA，绘图采用 Origin、R 等软件。

2 结果与分析

2.1 Z1 菌株鉴定和特性分析结果

2.1.1 形态学和生理生化鉴定结果

通过细菌培养、纯化，从羽毛针禾种子中分离得到一株内生细菌 Z1。该菌菌落为黄色偏乳白色，呈圆形，中间部分微微隆起，边缘稍微褶皱，灯下光滑且湿润。光学显微镜检呈直杆状，大小为 $(0.5-1.0) \mu\text{m} \times (1.0-3.0) \mu\text{m}$ ，属革兰氏阳性杆菌且带鞭毛(图 1)。Z1 在甲基红(methylred)测试中表现为阴性，在靛基质(indole)试验、氧化酶(oxidase)试验、淀粉水解试验、V-P 试验和明胶液化试验中都表现为阳性(表 1)。

2.1.2 分子生物学鉴定结果

通过比对 NCBI 数据库，Z1 菌株属于泛菌

属(*Pantoea*)。系统发育树显示，菌株 Z1 与成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)亲缘关系较近。结合细菌形态学特征与其他生理生化结果，以及对 16S rRNA 基因的分子生物学分析，最终确认菌株 Z1 属于泛菌属(*Pantoea*)(图 2)。

2.1.3 Z1 菌株的功能鉴定结果

在解有机磷选择培养基平板和解无机磷选择培养基平板上，Z1 菌株菌落附近都能形成透明圈，表明 Z1 菌株同时存在解有机磷和无机磷的能力(图 3A 和 3B)。用 CAS 检测平板法检查发现菌体周围有橙色晕圈的存在，表明细菌 Z1 具有产生铁载体物质的能力(图 3C)。菌株 Z1 能在解钾活性的试验培养基——硅酸盐培养基上生长，因而菌株 Z1 具有解钾能力(图 3D)。

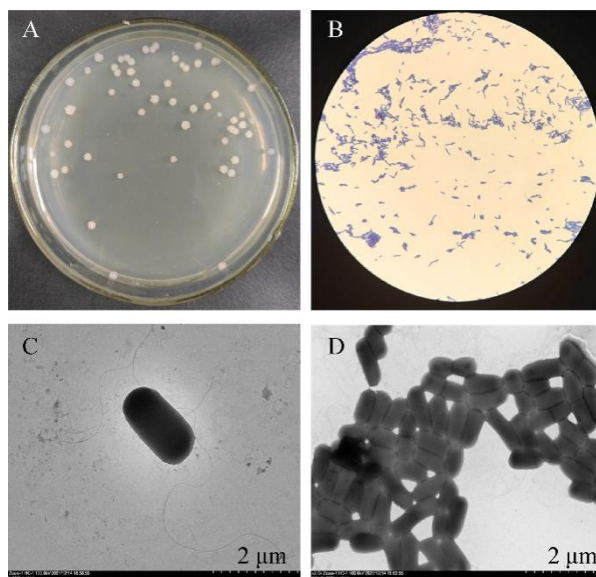


图 1 Z1 细菌的形态学鉴定 A: Z1 菌落形态特征; B: Z1 革兰氏染色光学照片(1 000×); C: 单个菌体形态的电镜照片; D: 多个菌体形态的电镜照片

Figure 1 Morphological identification of Z1 bacteria. A: Colony morphological characteristics; B: Z1 Gram stain optical photo (1 000×); C: Electron micrograph of single cell morphology; D: Electron micrographs of multiple cells morphology.

表 1 菌株 Z1 生理生化试验结果

Table 1 Physiological and biochemical test results of strain Z1

试验名称 Test names	试验现象 Experimental phenomenon	试验结果 Results
革兰氏染色 Gram staining test	菌体呈紫色 The cell is purple	+
靛基质试验 Indole test	反应液呈红色 The reaction solution is red	+
甲基红试验 Methylred test	反应液呈红色 The reaction solution is red	-
氧化酶试验 Oxidase test	反应液呈紫色 The reaction solution is purple	+
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	无颜色变化 No color change	+
V-P 试验 V-P test	培养液呈红色 The culture medium is red	+
明胶液化试验 Gelatin test	培养基 4 度呈液态 The medium is liquid at 4 degrees	+
尿素分解实验 Urea decomposition test	酚红指示剂未变红 Phenol red indicator does not turn red	-
触酶试验 Contact enzyme test	有气泡 Bubble	+

Note: +: Positive, -: Negative

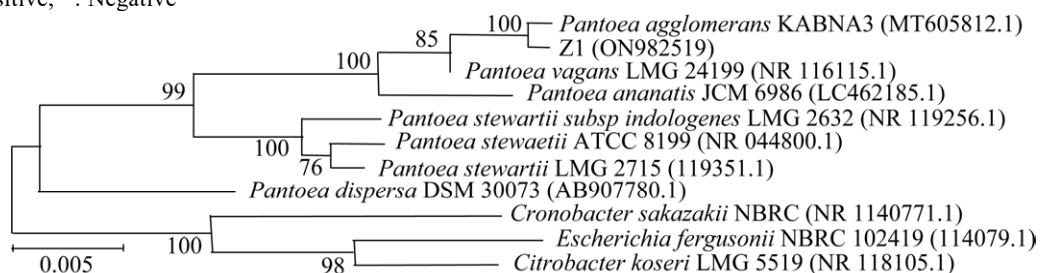


图 2 待测菌株和参比菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 括号中序号为 GenBank 的登录号; 基于 1 000 次重复的 50%的 bootstrap 值标记于分支点处; 标尺 0.005 表示 0.5%的核苷酸差异

Figure 2 The neighbor-joining phylogenetic tree based on 16 rRNA gene sequences of the tested strains and their closely related reference strains. The serial number in brackets is the login number of GenBank; The bootstrap value $\geq 50\%$ based on 1 000 repetitions is marked at the branch point; Scale 0.005 represents a nucleotide difference of 0.5%.

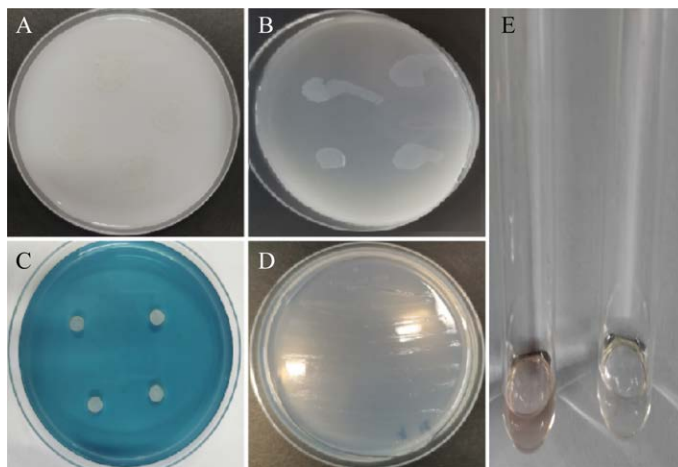


图 3 Z1 菌株在解有机磷、解无机磷、产铁载体、解钾培养基的生长表现和产 IAA 的试验现象 A: 解有机磷培养基; B: 解无机磷培养基; C: 产铁载体培养基; D: 解钾培养基; E: 产 IAA 情况

Figure 3 Growth performance and IAA production of strain Z1 in organic phosphorus, inorganic phosphorus, iron carrier and potassium medium. A: Hydrolyzed organic phosphorus medium; B: Hydrolyzed inorganic phosphorus medium; C: Iron producing carrier medium; D: Potassium dissolving medium; E: IAA auxin production.

含 Salkowski 试剂的试管中, 添加 Z1 菌株发酵液上清液的试管呈浑浊微粉红, 未加 Z1 菌株发酵液上清液的试管清澈呈黄色, 此现象说明 Z1 具有分泌 IAA 的能力, 使用分光光度计通过对 IAA 定量检测发现, Z1 菌株产 IAA 能力高达 3.14 mg/L (图 3E)。

2.1.4 Z1 菌株生长曲线

由菌株 Z1 生长曲线图(图 4)得知, 0 点为细菌菌株生长起始点, 摇瓶培养 2 h 后细菌进入对数期, 随后生物量开始迅速增长, 培养 8 h 后细菌生长缓慢, 进入平台期。

2.2 Z1 菌株发酵条件优化结果

Z1 菌株在试验所设置的 4 组酸碱条件下都

能生长, 生物量在 pH 6.0 时最低, 并随 pH 值的增加而增加, 在 pH 9.0 时, 生物量达到峰值, 为 2.016, 说明菌株 Z1 喜弱碱环境(图 5A)。

添加 4 种无机盐培养基对菌株生长的影响

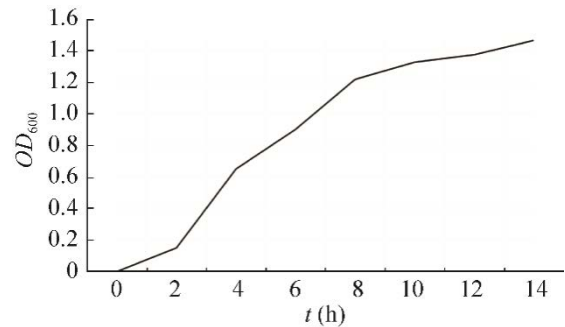


图 4 Z1 菌株生长曲线

Figure 4 Growth curve of strain Z1.

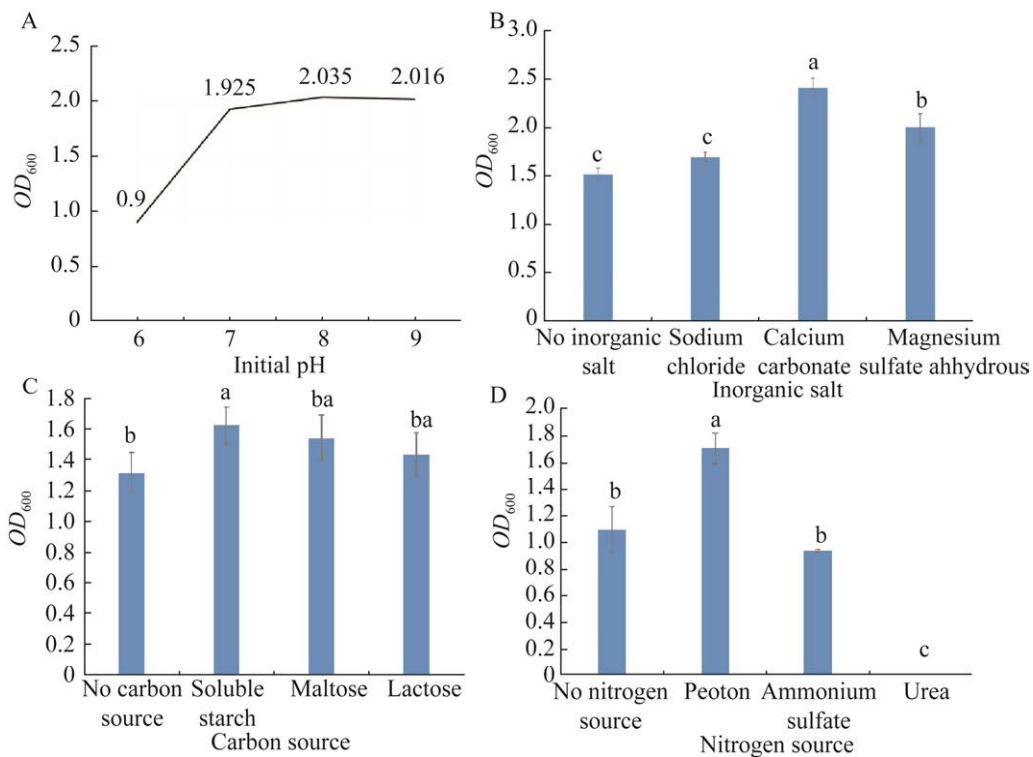


图 5 Z1 菌株发酵条件的优化 A: 初始 pH 值对 Z1 生长发育的影响; B: 各种水溶无机盐对 Z1 生长发育的影响; C: 不同碳源对 Z1 生长发育的影响; D: 不同氮源对 Z1 生长的影响。图中组间的差异显著用不同小写字母来表示($P<0.05$), 误差棒代表偏离平均值 \pm 标准误, 下同

Figure 5 Optimization of fermentation conditions of strain Z1. A: The effect of initial pH value on the growth and development of Z1; B: The effect of various water-soluble inorganic salts on the growth and development of Z1; C: The effect of different carbon sources on the growth and development of Z1; D: The effect of different nitrogen sources on the growth level of Z1. The difference between the groups in the figure is significantly represented by different lowercase letters ($P<0.05$), and the error bar represents a standard error deviating from the mean value, the same below.

也各不相同。添加碳酸钙所培养产生的细菌生物量最高, 而且与无无机盐对照组存在显著性差异, 即在试验所用 4 种水溶性无机盐中碳酸钙为最适无机盐, 其次是硫酸镁; 添加 NaCl 的细菌生物量水平则稍高于对照组, 而且与对照组比较无显著性差异(图 5B)。

当在缺少碳源培养基中加入可溶性淀粉时, 菌株 Z1 的生物量较对照组有显著差异且达到了最大值, 说明可溶性淀粉是几组试验中培养基碳源的最佳选择。不仅如此, 加入麦芽糖时生物量位列第二, 加入乳糖时位列第三, 它们之间无显著性差异(图 5C)。

以蛋白胨为氮源的作用效果最好且与对照组有显著差异, 所以蛋白胨为最适氮源。其中硫酸铵、尿素则显著低于对照(图 5D)。

2.3 Z1 菌株对小麦的促生效果分析

2.3.1 Z1 菌株对小麦的促生效果分析

接种菌株 Z1 至小麦幼苗生长后 10 d 以内, 与对照组比较, 株高和根长分别提高了 13.5% (图 6A)和 8.0% (图 6B), 说明菌株 Z1 对小麦幼苗具有较显著的促进生长效果, 而且对小麦株高的促生作用更明显。

接种菌株 Z1 10 d 后, 小麦幼苗的叶宽与对

照组相比增加了 60% (图 7), 是未接菌对照组的近 2 倍, 而且盆栽小麦整体长势较好, 叶片分布较为均匀, 小麦苗叶片的颜色也更深, 说明菌株 Z1 对小麦幼苗有非常明显的促进生长的作用, 具体体现在可显著增加其幼苗叶片的宽度。

2.3.2 菌株菌悬液对小麦幼苗生理指标的影响

从盆栽小麦叶片中的叶绿素含量、氮含量、可溶性蛋白含量来看, 浇灌菌组均较浇灌灭菌蒸馏水组(CK)大量增加, 其中, 加菌组叶绿素含量较未加菌对照组提高了 34%, 叶片氮含量提高了 21%, 叶片可溶性蛋白含量提高了 15.7%, 而且与对照组有显著性差异(图 8)。

3 讨论

气候干燥、水资源稀缺等的恶劣生存环境, 导致沙漠地区植被极其稀少, 沙漠周围土地沙化愈演愈烈, 沙漠土地面积也在不断扩张。如何开发沙漠的植物和微生物资源, 是治理荒漠的重要研究方向之一。促生菌可以通过溶解有机磷、无机磷、解钾、分泌 IAA、产铁载体等功能, 帮助植物充分吸收利用所需营养物质, 促进植物生长^[20-23]。

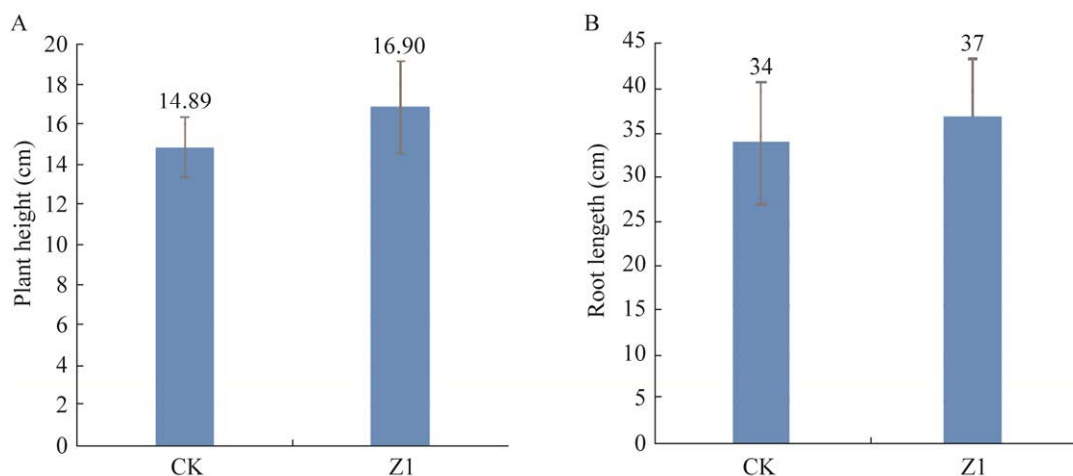


图 6 接种菌株 Z1 处理对小麦幼苗株高(A)和对根长(B)的影响

Figure 6 Effect of strain Z1 on plant height (A) and root length (B) of wheat seedlings.

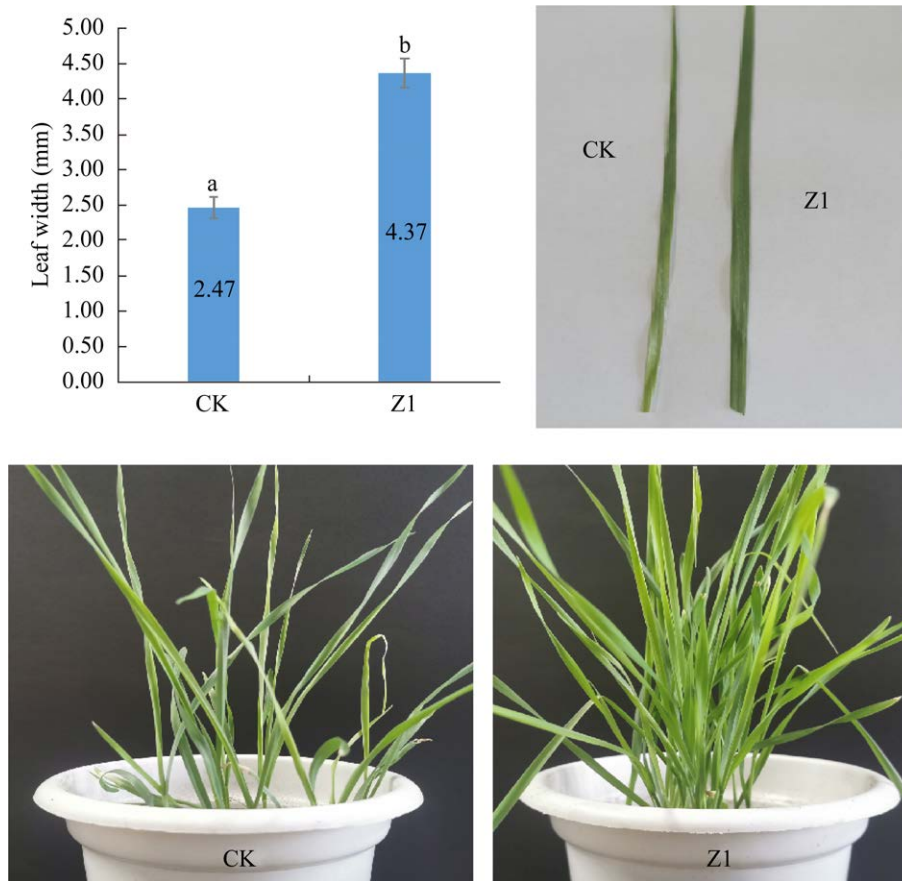


图7 接种菌株 Z1 处理对盆栽小麦幼苗叶宽的影响

Figure 7 Effect of inoculation strain Z1 on leaf width of potted wheat seedlings.

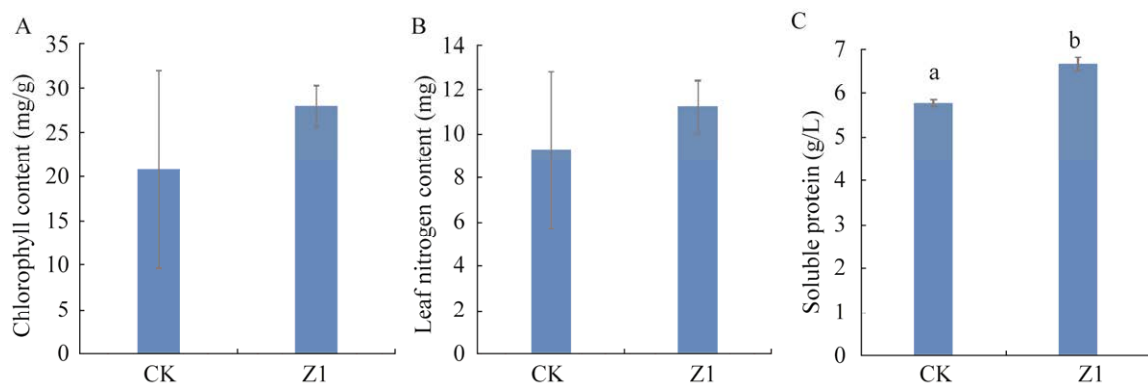


图8 接种菌株 Z1 对盆栽小麦幼苗生理指标的影响 A: 盆栽小麦叶片叶绿素的含量(mg/g); B: 盆栽小麦叶片含氮量; C: 盆栽小麦叶片可溶性蛋白的含量

Figure 8 Effects of strain Z1 on physiological indexes of potted wheat seedlings. A: Chlorophyll content of wheat seedling leaves; B: Nitrogen content in leaves of wheat seedlings; C: Content of soluble protein in leaves of wheat seedlings.

本研究从荒漠植物羽毛针禾种子中分离出的内生菌 Z1 具有溶磷、解钾、产铁载体和分泌 IAA 等功能。与其他细菌相比^[24], Z1 的 IAA 产量偏低, 这可能是因为菌株 Z1 源于荒漠, 其生长特性仍待深究。然而, 与其他促生小麦的细菌相比, 菌株 Z1 对小麦幼苗株高的促生效果比较明显。例如, 接种 LQ1230 的小麦株高增加了 2%^[25], 但接种菌株 Z1 后小麦株高增加了 13.5%。另外, 在叶绿素方面, 与其他沙地分离菌相比, Z1 的促增效果也比较好。例如, 沙地柏根中分离的根部内生细菌 SDB9 处理的绿豆其叶绿素增长了 7.81%^[26]; 而菌株 Z1 处理小麦幼苗后, 叶绿素提高了 34%。菌株 Z1 提升小麦幼苗的可溶性蛋白含量的水平接近其他内生菌的水平。例如, 野生大豆内生细菌 YDX14 能提升小麦幼苗的可溶性蛋白含量至 2.47 倍^[27], 而 Z1 为 1.16 倍。

改善土壤营养物质代谢和促进植物生长的功能, 是有益微生物改良土壤环境的前提条件。功能菌 Z1 菌株可通过溶磷、解钾、产铁载体而改善土壤环境, 并且可以分泌生长素促进植物的生长。该菌株可作为潜在的促进植物生长和改良荒漠土壤的菌源。

4 结论

Z1 菌株是一株植物内生细菌, 为泛生菌属 (*Pantoea*), 有溶解有机磷、无机磷及固氮功能, 可以分泌 IAA 和产生铁离子。可溶性糖为碳源, 蛋白胨为氮源, 碳酸钙为无机盐, pH 值为 9.0 时其发酵效果较优。施加 Z1 菌株菌悬液能提高小麦幼苗的生长速率。本研究可为改善荒漠环境、提高植物在极端环境中抗逆性的相关研究提供一定参考。

REFERENCES

- [1] 张玲, 王绍明, 张霞, 徐海霞, 陆嘉惠. 羽毛针禾种群遗传多样性分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(21): 12643-12645
Zhang L, Wang SM, Zhang X, Xu HX, Lu JH. RAPD analysis of the genetic structure of *Stipagrostis pennata* populations[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(21): 12643-12645 (in Chinese)
- [2] 钱亦兵, 吴兆宁, 杨海峰, 蒋超. 古尔班通古特沙漠纵向沙垄植被空间异质性[J]. 中国沙漠, 2011, 31(2): 420-427
Qian YB, Wu ZN, Yang HF, Jiang C. Vegetation spatial heterogeneity across longitudinal dunes in the southern Gurbantunggut desert[J]. Journal of Desert Research, 2011, 31(2): 420-427 (in Chinese)
- [3] 王建明, 张霞, 王绍明. 羽毛针禾萌发特性研究[J]. 种子, 2009, 28(5): 8-10, 14
Wang JM, Zhang X, Wang SM. Germination characteristics of *Stipagrostis pennata*[J]. Seed, 2009, 28(5): 8-10, 14 (in Chinese)
- [4] 钱亦兵, 张立运, 吴兆宁. 工程行为对古尔班通古特沙漠植被的破损及恢复[J]. 干旱区研究, 2001, 18(4): 47-51
Qian YB, Zhang LY, Wu ZN. Destruction and regeneration of the desert vegetation in the engineering activities in the Gurbantunggut desert[J]. Arid Zone Research, 2001, 18(4): 47-51 (in Chinese)
- [5] Ding XX, Zhang TT, Ma L. Rapidly evolving genetic features for desert adaptations in *Stipagrostis pennata*[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 846
- [6] Zhang C, Ma X, Zhu RQ, Liu ZZ, Gu MM, Zhang JY, Li Y, Xu YY, Zhu DH. Analysis of the endophytic bacteria community structure and function of *Panax notoginseng* based on high-throughput sequencing[J]. Current Microbiology, 2020, 77(10): 2745-2750
- [7] Parvandi M, Rezadoost H, Farzaneh M. Introducing *Alternaria tenuissima* SBUpl, as an endophytic fungus of *Ferula assa-foetida* from Iran, which is a rich source of rosmarinic acid[J]. Letters in Applied Microbiology, 2021, 73(5): 569-578
- [8] 李旭东, 马磊, 张婷婷. 羽毛针禾内生细菌分离鉴定及系统发育树分析[J]. 北方园艺, 2020(3): 77-84
Li XD, Ma L, Zhang TT. Isolation, identification and phylogenetic tree analysis of endophytic bacteria from *Stipagrostis pennata*[J]. Northern Horticulture, 2020(3): 77-84 (in Chinese)

- [9] 张辑. 中国兰属植物内生菌多样性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院硕士学位论文, 2012
Zhang J. Research on diversity of endosymbiotic fungi in roots of *Cymbidium*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Forestry, 2012 (in Chinese)
- [10] 庞发虎, 杜瑞卿, 王坦, 黄思良. 小麦内生细菌促生菌株的筛选及其影响小麦生长的因子的相关性分析[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(1): 8-21
Pang FH, Du RQ, Wang T, Huang SL. Screening of wheat growth-promoting entophytic bacterial strains and correlation analysis of factors influencing wheat growth[J]. Journal of China Agricultural University, 2016, 21(1): 8-21 (in Chinese)
- [11] 陈腊, 李可可, 米国华, 胡栋, 隋新华, 陈文新. 解钾促生菌的筛选鉴定及对东北黑土区玉米的促生效应[J]. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1560-1570
Chen L, Li KK, Mi GH, Hu D, Sui XH, Chen WX. Screening and identification of potassium-solubilizing bacteria and their promoting effects on maize in black soil of Northeast China[J]. Microbiology China, 2021, 48(5): 1560-1570 (in Chinese)
- [12] 贺春萍, 赵璐璐, 孙亮, 李锐, 梁艳琼, 郑肖兰, 吴伟怀. 一株产铁载体橡胶树拮抗细菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 热带作物学报, 2012, 33(12): 2240-2245
He CP, Zhao LL, Sun L, Li R, Liang YQ, Zheng XL, Wu WH. Identification and drug resistant analysis of a strain of siderophores producing antagonist bacteria from rubber tree[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33(12): 2240-2245 (in Chinese)
- [13] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
Cai MY, Dong XZ. Handbook for Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [14] 杨莱, 高婷, 李滢璟, 魏崇瑶, 高森, 马莲菊. 辣椒根际促生菌的分离筛选及抗病促生特性研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(5): 104-109
Yang M, Gao T, Li YJ, Wei CY, Gao M, Ma LJ. Isolation and screening of plant growth-promoting rhizobacteria in pepper and their disease-resistant growth-promoting characteristics[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(5): 104-109 (in Chinese)
- [15] 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
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)
- [16] 刘佳. 微核心种质小麦根系形态和耗能性差异及其与地上部性状相关性研究[D]. 新乡: 河南科技学院硕士学位论文, 2021
Liu J. Study on the difference of root morphology and energy dissipation and its correlation with shoot characters of wheat microcore germplasm[D]. Henan: Master's Thesis of Henan Institute of Science and Technology, 2021 (in Chinese)
- [17] 程贵文, 龚洪恩, 颜送宝, 陈传松, 罗嘉东, 袁小平, 吴建国. 油茶叶绿素提取方法的比较研究[J]. 湖北林业科技, 2017, 46(6): 11-13, 58
Cheng GW, Gong HE, Yan SB, Chen CS, Luo JD, Yuan XP, Wu JG. Comparison of chlorophyll extraction methods in *Camellia oleifera*[J]. Hubei Forestry Science and Technology, 2017, 46(6): 11-13, 58 (in Chinese)
- [18] 贾朋, 钱磊, 罗树凯, 郑丹青, 李浩, 陈婉颖, 陈勇. 洋紫荆叶绿素含量的分布特征及与叶片氮含量的关系[J]. 中国城市林业, 2019, 17(6): 13-17
Jia P, Qian L, Luo SK, Zheng DJ, Li H, Chen WY, Chen Y. Chlorophyll content distribution and its relationship with nitrogen content in leaves of *Bauhinia variegata*[J]. Journal of Chinese Urban Forestry, 2019, 17(6): 13-17 (in Chinese)
- [19] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000
Zou Q. Plant physiology experiment[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2000. (in Chinese)
- [20] 潘文文. 卷柏内生真菌多样性及其对小麦抗旱性的影响[D]. 郑州: 郑州大学硕士学位论文, 2016
Pan WW. Endophytic mycoflora of selaginella: diversity patterns and effect on drought tolerance in wheat[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University, 2016 (in Chinese)
- [21] 杨成刚. 防治白菜根肿病的功能细菌筛选与应用[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2018
Yang CG. Screening and application of functional bacteria for clubroot disease control[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2018 (in Chinese)
- [22] 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)

- [23] 王贵生. 亳菊内生菌的分离鉴定及抑菌促生功能研究[D]. 阜阳: 阜阳师范学院硕士学位论文, 2018
Wang GS. Study on isolation and identification of endophytes from *Chrysanthemum morifolium* cv. Boju and their antibacterial and growth promoting functions[D]. Fuyang: Master's Thesis of Fuyang Normal University, 2018 (in Chinese)
- [24] 许芳芳, 袁立敏, 邵玉芳, 范国花, 周心爱, 郑文玲, 李冬梅, 冯福应. 肠杆菌 FYP1101 对盐胁迫下小麦幼苗的促生效应[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 102-110
Xu FF, Yuan LM, Shao YF, Fan GH, Zhou XN, Zheng WL, Li DM, Feng FY. Effect of *Enterobacter* sp. FYP1101 on wheat seedling growth under salt stress[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 102-110 (in Chinese)
- [25] 强晓晶. 披碱草内生真菌对小麦抗旱性的影响机制[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2019
Qiang XJ. Mechanisms underlying the effects of endophytic fungi isolated from *Elymus dahuricus* on the drought resistance of wheat[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese)
- [26] 艾银婷. 沙地柏根际促生细菌的筛选和功能鉴定[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2019
Ai YT. Screening and identification of growth-promoting rhizobacteria from *Sabina vulgaris*[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2019 (in Chinese)
- [27] 赵晓妍, 曹越, 董芮萌, 朱梦卓, 汪雅楠, 朱淼, 于翠梅, 马莲菊. 一株野生大豆内生细菌 YDX14 菌株的分离、鉴定及促生效应研究[J]. 大豆科学, 2021, 40(2): 224-231
Zhao XY, Cao Y, Dong RM, Zhu MZ, Wang YN, Zhu M, Yu CM, Ma LJ. Isolation, identification and growth promoting effect of an endophytic bacteria YDX14 in wild soybean[J]. Soybean Science, 2021, 40(2): 224-231 (in Chinese)