

## 具溶磷能力的植物内生促生细菌的分离筛选及其生物多样性

黄静, 盛下放\*, 何琳燕

(南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:**【目的】具溶磷能力的植物内生促生细菌的分离筛选及生物多样性的研究将有助于扩大溶磷微生物来源、丰富功能内生细菌资源库及开发新的改善土壤磷素营养途径。【方法】结合内生细菌分离方法从油菜和玉米体内分离筛选具溶磷能力的内生细菌, 测定菌株摇瓶条件下的溶磷能力, 并研究其产生吲哚乙酸 (IAA)、铁载体、1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 脱氨酶等的特性, 采用 16S rDNA 限制性酶切片长度多态性分析 (RFLP) 研究了具溶磷能力的植物内生促生细菌的遗传多样性, 并挑选典型菌株进行了鉴定。【结果】分离筛选到 32 株具稳定溶磷能力的植物内生细菌, 所有菌株都能从磷酸钙中释放出有效磷并使培养液 pH 值降低, 释放的有效磷浓度最高达到 537.6 mg/L。分离自油菜的供试细菌都能产生吲哚乙酸和铁载体, 分离自玉米的供试细菌中有 68.4% 的菌株产生吲哚乙酸, 63.2% 的菌株产生铁载体, 63.2% 的菌株具 ACC 脱氨酶活性。分离菌株在 76% 相似性水平上可聚类分为 8 个群。11 株典型菌株归属于泛菌属 (*Pantoea*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 及罗尔斯顿菌属 (*Ralstonia*) 等 5 个属。【结论】油菜和玉米体内溶磷细菌具有丰富多样的生物学特性和遗传多样性。

**关键词:** 溶磷作用; 内生促生细菌; 生物多样性; ACC 脱氨酶; 玉米; 油菜

**中图分类号:** Q939      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0710-07

磷是植物生长发育所必需的三大营养元素之一。植物缺磷将直接影响植物的生长和作物的产量。虽然施加化学磷肥能改善植物磷素营养, 但是土壤中磷的固定现象导致磷肥当季利用率低, 土壤植物有效性磷素营养已成为影响我国农业高产的主要限制因素之一。

在磷的地球生物化学循环中, 微生物起着极其重要的作用。溶磷微生物能将土壤中的难溶态磷转化为植物可以利用的有效态磷<sup>[1]</sup>。研究表明接种溶磷微生物能提高植物磷素营养<sup>[2-5]</sup>。人们对分离自各种土壤、水体、植物根际、磷矿区以及其他特殊生境中的溶磷微生物进行了有关溶磷效应、溶磷机制及其应用效果等方面的研究<sup>[6-10]</sup>, 但有关分离自植物体内的溶磷细菌的研究至今未见报道。已有研

究报道表明植物内生菌具有丰富的生物多样性<sup>[13-14]</sup>。植物体本身可以看作一个复杂的微生态系统, 在这个系统中, 多种微生物能与植物形成营养和竞争的小生境<sup>[15]</sup>。在长期的协同进化过程中, 内生细菌与内生细菌之间、内生细菌与植物之间形成了和谐联合、互惠互利的关系。主要表现在, 一方面, 宿主植物为内生细菌提供生长必需的能量与营养, 更重要的是, 宿主植物为内生细菌提供了一个安全的生存环境, 避免内生细菌经受土壤中的一些竞争和胁迫因素的危害<sup>[12]</sup>。另一方面内生细菌对宿主植物产生多种有益生物学作用, 如固氮作用、分泌 IAA 等促进植物生长、抗植物病原菌等<sup>[11]</sup>。目前植物内生菌的应用主要在其生防和促生作用。另外, 研究表明, 大多数内生细菌是兼性内生, 即它们不仅

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (30400006)

\* 通信作者。Tel: + 86-25-84396484; Fax: + 86-25-84396326; E-mail: xfsheng604@sohu.com

**作者简介:** 黄静 (1985 - ), 女, 湖北武汉人, 博士研究生, 主要从事微生物生态与资源利用研究。E-mail: mirror840329@163.com

**收稿日期:** 2009-12-15; **修回日期:** 2010-02-24

存在于植物体内,也常见于根际土壤等环境<sup>[12]</sup>。针对目前溶磷细菌在实际应用中存在的诸如易受土著微生物的影响,难以在土壤中成功定殖,应用效果不稳定等现状,提出利用植物内生细菌这一资源,分离筛选植物内生溶磷细菌,利用其兼性内生特性,即可发挥定殖于植物体内的细菌的促生和防病效应,又可发挥定殖于植物根际土壤中的细菌的高效溶磷能力为植物提供有效磷素营养,促进植物生长,提高作物产量。

本研究采集大田农作物油菜和玉米,结合内生细菌分离方法和溶磷细菌筛选方法从植物体内分离筛选具溶磷能力的内生促生细菌,研究其溶磷能力、促生生物学特性和遗传多样性,以期利用溶磷内生促生细菌提高植物磷素营养、促进植物生长提供实验依据和技术途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:** 采自南京郊区农田生长良好、无病症的油菜(汇油-50)和玉米(登海-11号)植株带回实验室后用消毒的剪刀分别截取根、茎、叶组织,立即分离。

**1.1.2 培养基:** ① 无机磷培养基(NBRIP): 葡萄糖 10.0 g, 磷酸三钙  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  5.0 g,  $\text{MgCl}_2$  5.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g,  $\text{KCl}$  0.2 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 g, 去离子水 1000 mL, 琼脂 15 g, pH 7.0(液体培养基不加琼脂)。② 有氮培养基(YN)参照文献<sup>[16]</sup>配制。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 16S rDNA 引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成; *Taq* 酶和限制性内切酶 *Hae* III 和 *Hha* I 购自 TaKaRa 公司; 磷酸三钙(分析纯, 购自天津科密欧试剂有限公司, 用去离子水浸泡洗涤数次后烘干, 过 80 目筛保存备用); ACC 购自 Sigma 公司; PTC-200 型 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司。

### 1.2 内生溶磷细菌的分离筛选

将所采集植株的根、茎、叶在自来水下冲洗干净, 吸干表面的水分, 称重后, 用消毒的剪刀剪成 2-3 cm 的小段, 转到无菌台上, 进行表面消毒, 程序如下: 75% 酒精(3 min) → 无菌水漂洗 → 0.1% 升汞中浸泡 1-3 min(具体视植物组织情况而定) → 无菌水漂洗 5-6 次, 转移至灭菌研钵中, 加入 10 mL 无菌水和少许灭菌的石英砂研磨, 研磨至匀浆状态后静置 3-5 min, 将上层汁液适度稀释, 然后取 0.1 mL 涂布 NBRIP 平板培养基, 重复 3 次, 平板置

于 28℃ 培养箱中培养 3-7 d 后, 挑取有透明圈的菌落, 进一步纯化后在 NBRIP 培养基上连续点接 3 次, 筛选稳定产生透明圈的菌株转至斜面, 4℃ 保存作为供试菌株。

检验表面消毒效果: 吸取 0.1 mL 最后一次漂洗消毒材料的无菌水, 涂平板, 培养后无微生物菌落生长表明样品表面消毒彻底。

### 1.3 菌株溶磷能力

收集 YN 液体培养基中培养(不超过 24 h)的细菌菌体, 以无菌水洗涤后, 重悬于无菌水中, 制备成含菌数约为  $10^8$  cfu/mL 的种子液。150 mL 三角瓶中装入 50 mL 液体 NBRIP, 115℃ 灭菌 30 min。按 2% 接种量向 50 mL 液体 NBRIP 培养基中接入各供试菌株种子液, 每株菌 3 个重复。以向同样的 NBRIP 液体培养基中接入等量无菌水作为对照。28℃, 160 r/min 振荡培养 5 d 后, 取培养液 8000 r/min 离心 10 min, 上清液经适当稀释后, 用钼锑抗比色法测定培养液中的有效磷; 同时取 3 mL 离心后的上清液用 pH 计测定培养液 pH 值。

### 1.4 菌株生物学特性

菌株发酵液中吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)的测定参考文献<sup>[17]</sup>的 Salkowski 方法; 铁载体(siderophore)测定参照文献的相对定量检测法<sup>[18]</sup>; 菌株 ACC 脱氨酶活性测定参照文献<sup>[16]</sup>。

### 1.5 16S rDNA 片段的限制性酶切多态性(16S rDNA -RFLP)及系统发育学分析

分离菌株的基因组 DNA 提取参照参考文献<sup>[19]</sup>的方法; 采用细菌通用引物 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492r: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' 扩增细菌 16S rDNA。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用经 EB 染色的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物用 *Hae* III 和 *Hha* I 2 种限制性内切酶进行酶切。酶切体系为 10 μL: 0.5 μL 限制性内切酶, 1 μL 10 × buffer, 2-4 μL PCR 产物, 无菌超纯水补足至 10 μL。酶切反应混合物于 37℃ 水浴 3 h 后, 加 1 μL 10 × Loading buffer 终止反应。酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳(80 V, 2 h)分离, EB 染色, 再用凝胶成像系统记录酶切指纹图谱。所得凝胶图像上的酶切谱带进行统计记录, 对应于每一个菌株, 在相同位置有条带处记为“1”, 无条带处记为“0”。采用 MVSP3.1 聚类分析软件的平均连锁法(Unweighted Pair Group Mathematical Average,

UPGMA) 进行聚类分析并构建树状图谱。

根据 16S rDNA 限制性酶切片段聚类分析结果, 结合分离菌株的溶磷能力及生物学特性等指标选取不同操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU) 代表菌株, 将成功扩增的 PCR 产物直接由上海英骏生物技术有限公司完成 16S rDNA 的序列测定。将测定的序列用 BLAST 与 GenBank 数据库中的序列进行比对分析, 选取若干相似性较高的典型菌株 16S rDNA 序列, 经 Clustal X1.83 进行自动排序比对后, 用 MEGA3.1 软件包中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

## 2 结果和分析

### 2.1 内生溶磷细菌的分离

采用无机磷选择培养基, 根据在无机磷平板上

菌落周围产生的透明圈, 从油菜和玉米体内分离筛选到 32 株具有稳定溶解磷酸三钙的植物内生细菌。其中 13 株分离自油菜 (根 10 株, 茎 3 株), 19 株分离自玉米 (根 6 株, 茎 5 株, 叶 8 株)。试验表明, 供试油菜和玉米体内存在具有溶磷能力的内生细菌。

### 2.2 菌株溶磷能力

由图 1 可以看出, 分离的 32 株细菌均有溶磷能力。分离菌株接菌处理的发酵液中可溶性磷含量比对照增加 2.5 - 12.7 倍。分离自玉米叶的 M1L5 菌株发酵液中可溶性磷含量最高 (537.6 mg/L)。另外, 分离自玉米的内生细菌溶磷能力比分离自油菜的内生细菌溶磷能力强。与对照相比, 接菌处理发酵液 pH 均有不同程度的降低, 最大降幅达到 2.79 个 pH 单位。

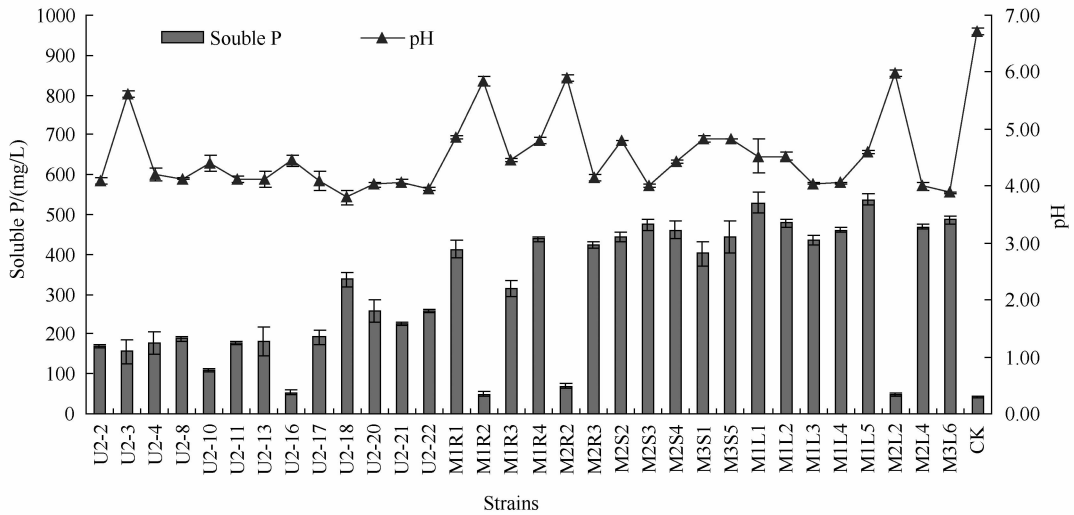


图 1 液体摇瓶条件下分离菌株对磷酸三钙的溶解能力

Fig. 1  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Solubilization by the tested strains in the liquid media.

### 2.3 菌株的生物学特性

由表 1 可以看出, 分离自油菜的菌株均能产生 IAA (或其衍生物), 分离自玉米的菌株中有 13 株菌 (68.4%) 能产生 IAA (或其衍生物)。分离自油菜的菌株均能分泌铁载体 (即  $A/Ar < 1$ , A 和 Ar 分别为接菌和未接菌上清反应液在 630 nm 波长处的吸光值,  $A/Ar$  比值越小表明产铁载体的量越多), 分离自玉米的菌株中有 12 株菌 (63.2%) 分泌铁载体, 其中 17 株菌株能够分泌较高量的铁载体 (即  $A/Ar < 0.4$ ), 占总分离菌株的 53.1%。分离菌株中有 14 株细菌 (其中 13 株分离自玉米, 1 株分离自油菜) 能在 SMA 培养基中良好生长, 且  $OD_{600/SMA}$  显著高于  $OD_{600/SM}$  (对照), 说明这 14 株细菌能以 ACC 为唯一氮源进行良好生长, 具有 ACC 脱氨酶活性。

### 2.4 溶磷内生细菌的 16S rDNA 限制性酶切多态性分析和系统发育分析

本研究采用 *Hha* I 和 *Hae* III 两种限制性内切酶对扩增的片段 (约 1.5 kb) 进行了 RFLP 分析。供试菌株 16S rDNA 经 *Hha* I 酶切后在 -620 bp 之间产生 2 - 4 条带, 多数菌株在 210、340、392bp 处有共同条带, 分别占总分离细菌的 75.0%、65.6% 和 65.6%, 因此可以认为这 3 条带是油菜和玉米溶磷内生细菌 *Hha* I 酶切的特征带; 经 *Hae* III 酶切后, 分离菌株在 160 - 1100 bp 之间产生 2 - 4 条带, 多数分离菌株产生 160 bp 和 390 bp 两条带, 分别占分离菌株的 75% 和 68.8%, 是 *Hae* III 酶切的特征带。对这两种限制性内切酶条带综合分析构建 UPGMA 树状聚类图, 所有分离菌株在 76% 相似性水平上聚成

表 1 分离自油菜和玉米的溶磷内生细菌的生物学特性

Table 1 Characteristics of phosphate-solubilizing endophytic bacterial strains isolated from the tissues of rape and maize

Strain	IAA <sup>a</sup>	Siderophore <sup>b</sup>	ACC deaminase activity
<b>Rape</b>			
<b>Root</b>			
U2-2	+	++++	-
U2-3	++	+++++	-
U2-4	++	++++	-
U2-8	+	+++	-
U2-10	+	++++	-
U2-11	+	++++	-
U2-13	+	+++++	+
U2-16	++	+++++	-
U2-17	+	++++	-
U2-18	++	++++	-
<b>Stem</b>			
U2-20	++	++++	-
U2-21	++	+++++	-
U2-22	+++	+++++	-
<b>Maize</b>			
<b>Root</b>			
M1R1	+	++++	-
M1R2	++	-	++
M1R3	++	+++++	+
M1R4	+	-	+
M2R2	-	+	+++
M2R3	-	+	+++
<b>Stem</b>			
M2S2	+	+++++	++
M2S3	-	+	+++
M2S4	+	+	++
M3S1	+	++	+++
M3S5	-	+	-
<b>Leaf</b>			
M1L1	+	+++	-
M1L2	+	++++	-
M1L3	-	-	-
M1L4	++	-	++
M1L5	+	++++	+
M2L2	-	-	-
M2L4	+++	-	++
M3L6	+++	-	++

a: IAA production: + + +, > 40 mg/L; + +, 20 - 40 mg/L; +, < 20 mg/L; -, no production. b: + + + + +, 0 - 0.2; + + + +, 0.2 - 0.4; + + +, 0.4 - 0.6; + +, 0.6 - 0.8; +, 0.8 - 1; -, Negative.

8 个群。68.8% 的菌株聚集在 Group I、Group VI、Group VIII 中, 其中 Group VIII 包含的菌株最多, 占 34.3%; Group I 次之, 占 18.8%。Group II 仅包含一株菌。从酶切树状聚类图来看, 分离的溶磷内生细菌存在丰富的遗传多样性, 不同宿主植物的溶磷内生细菌之间存在一定的差异, 玉米溶磷内生细菌较油菜的更丰富一些, 且不同组织之间差异也较大。

根据 UPGMA 树状图聚成的类群, 结合菌株生长状况、溶磷效果、生物学特性等指标, 挑取代表菌株 11 株测定其 16S rDNA 序列并获得 GenBank 登录号, 从 NCBI 数据库下载相似性较高的典型菌株序列, 构建系统发育树(图 2)。11 株菌分属于  $\gamma$ -变形菌门(Gammaproteobacteria)和  $\beta$ -变形菌门(Betaproteobacteria), 包括 5 个属: 泛菌属(*Pantoea*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)及罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*)。其中 4 株属于假单胞菌属(分离自油菜根及玉米根), 4 株属于泛菌属(分离自油菜茎及玉米根、茎、叶), 各占测序菌株的 36.4%, 是优势种属。另 3 株分别分离自玉米茎(M3S1、M2S3)和叶(M2L2)的菌株在系统发育关系上分别与伯克霍尔德氏菌、罗尔斯顿菌属、不动杆菌属很近, 所占比例相对较小。

### 3 讨论

植物内生细菌因其具有多种有益生物学作用, 已成为国内外研究的热点<sup>[11]</sup>。植物内生细菌的来源之一可能是土壤<sup>[24]</sup>, 即植物根际细菌通过植物根部的自然孔口或伤口以主动或被动方式侵入植物体内成为内生细菌, 而后在长期的进化过程中成为植物体微生态系统的一员。油菜和玉米是我国重要的经济和粮食作物, 土壤有效磷的缺乏已成为制约我国农业高产的主要因素之一。利用植物内生细菌的溶磷及促生特性, 对于扩大溶磷细菌种质资源, 理解内生细菌与植物相互作用机制和开拓改善植物磷素营养的新途径有重要的意义。

本研究从油菜和玉米植株体内分离筛选到 32 株具有稳定溶磷能力的植物内生细菌, RFLP 分析在 76% 的相似性水平上分为 8 种遗传型, 它们能够产生 IAA、铁载体和 ACC 脱氨酶, 具有较丰富的生物多样性。菌株的这些促生生物学功能及溶磷特性可能对油菜和玉米的生长及磷素营养的改善起到一定的促进作用。研究表明, 不同类型土壤和植物根际土壤广泛分布溶磷细菌, 其种群、功能和遗传特性等丰富多样<sup>[6, 20-21]</sup>。

在 RFLP 分析中, 分离菌株中 68.8% 的菌株聚属于 Group I、Group VI、Group VIII 中, 其中 Group VIII 包含的菌株全部分离自油菜植株, 占 34.3%; 分离自玉米的溶磷内生细菌的遗传多样性比油菜溶磷内生细菌更加丰富(图 2)。已有的研究表明, 假单胞菌

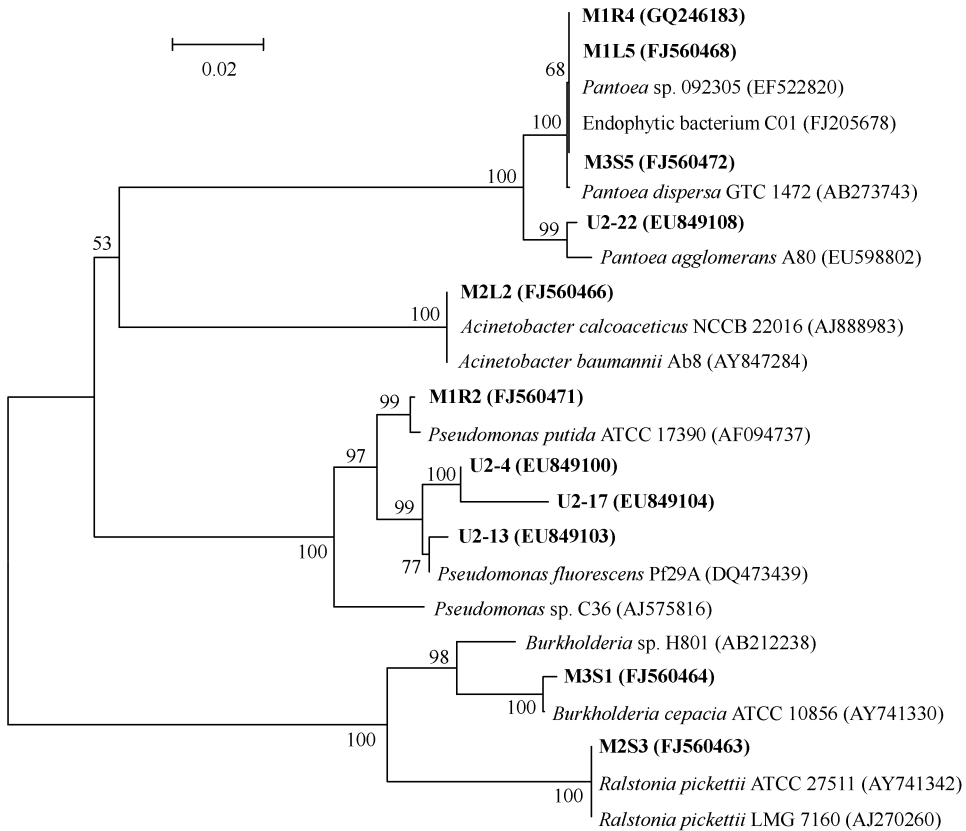


图 2 具溶磷能力的内生细菌典型菌株的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 2 Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among 16S rDNA sequences of phosphate-dissolving endophytic bacteria and their closely related sequences from GenBank. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000 resample data sets. Scale bar indicates evolutionary distance.

属 (*Pseudomonas*)、泛菌属 (*Pantoea*)、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*) 等是植物中的优势内生细菌<sup>[12]</sup>, 而且也是较常见的解磷细菌<sup>[1]</sup>。本研究也发现, 假单胞菌属和泛菌属是分离筛选出的具稳定溶磷效应的优势种属。此外, 本研究分离到的罗尔斯顿菌属和不动杆菌属作为溶磷细菌还少见报道, 说明从植物体内分离溶磷细菌扩大了溶磷微生物的来源。

分离自玉米的溶磷内生细菌中具有 ACC 脱氨酶活性的菌株比分离自油菜的溶磷内生细菌中具有 ACC 脱氨酶活性的菌株多。研究表明, 具 ACC 脱氨酶活性的细菌可以促进植物生长和防治植物病害<sup>[22-23]</sup>。本研究分离植物内生溶磷细菌, 既可以利用菌株在植物体内定殖后对植物的促生、防病效应, 又可以利用分离菌株在植物根际土壤的定殖作用来溶解土壤中的磷, 改善植物的磷素营养。因此, 具溶磷促生效应的植物内生细菌在植物体内和根际土壤中的定殖规律、影响因素以及内生细菌-植物相互作用机制等值得进一步研究。

## 参考文献

- [1] Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 1999, 17: 319-339.
- [2] Reyes I, Valery A, Valdúz Z. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant and Soil*, 2006, 287: 69-75.
- [3] 陈哲, 吴敏娜, 秦红灵, 魏文学. 土壤微生物溶磷分子机理研究进展. *土壤学报 (Acta Pedologica Sinica)*, 2009, 46 (5): 925-931.
- [4] El-Tarabily KA, Nassar AH, Sivasithamparam K. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied Soil Ecology*, 2008, 39: 161-171.
- [5] Peix A, Rivas-Boyer AA, Mateos PF, Rodríguez-Barrueco C, Martínez-Molina E, Velázquez E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate

- solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 103-110.
- [6] Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Chen FT, Lai WA, Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34: 33-41.
- [7] Cakmakci R, Dönmez F, Aydın A, Sahin F. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38: 1482-1487.
- [8] Wu GF, Zhou XP. Characterization of phosphorus-releasing bacteria in a small eutrophic shallow lake, Eastern China. *Water Research*, 2005, 39: 4623-4632.
- [9] Delvasto P, Ballester A, Muñoz JA, González ML, Igual JM, Valverde A, García-Balboa C. Mobilization of phosphorus from iron ore by the bacterium *Burkholderia caribensis* FeGL03. *Minerals Engineering*, 2009, 22: 1-9.
- [10] Gulati A, Rahi P, Vyas P. Characterization of phosphate-solubilizing *Fluorescent pseudomonads* from the rhizosphere of seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas. *Current Microbiology*, 2008, 56: 73-79.
- [11] 胡萌. 植物内生细菌研究进展. 山东农业大学学报(自然科学版) (*Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*), 2008, 39 (1): 148-151.
- [12] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M, van der Lelie D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2002, 21: 583-606.
- [13] Wang ET, Tan ZY, Guo XW, Rodríguez-Duran R, Boll G, Martínez-Romero E. Diverse endophytic bacteria isolated from a leguminous tree *Conzattia multiflora* grown in Mexico. *Archives of Microbiology*, 2006, 186: 251-259.
- [14] Sun L, Qiu FB, Zhang XX, Dai X, Dong XZ, Song W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 2008, 55: 415-424.
- [15] 冯永君, 宋未. 植物内生细菌. 自然杂志 (*Ziran Zazhi*), 2007, 23 (5): 249-252.
- [16] 孙乐妮, 何林燕, 张艳峰, 张文辉, 王琪, 盛下放. 海州香薷 (*Elsholtzia splendens*) 根际铜抗性细菌的筛选及生物多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49 (10): 1360-1366.
- [17] Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 1951, 26: 192-195.
- [18] 赵翔, 陈绍兴, 谢志雄, 沈萍. 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* sp-f 的筛选鉴定及其铁载体特性研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46 (5): 691-695.
- [19] 赵飞, 盛下放, 黄智, 何琳燕. 山东地区钾矿物分解细菌的分离及生物学特性. 生物多样性 (*Biodiversity Science*), 2008, 16 (6): 593-600.
- [20] 林启美, 赵小蓉, 孙炎鑫, 姚军. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布. 土壤与环境 (*Soil and Environmental Sciences*), 2000, 9 (1): 34-37.
- [21] Oliveira CA, Alves VMC, Marriel IE, Gomes EA, Scotti MR, Carneiro NP, Schaffert RE, Sá NMH. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41: 1782-1787.
- [22] Dey R, Pal KK, Bhatt DM, Chauhan SM. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 2004, 159: 371-394.
- [23] 沈萍, 闫淑珍, 陈双林, 崔晓灿, 李莉. 具 ACC 脱氨酶活性的植物内生细菌对辣椒的促生作用和对疫霉病的防治作用. 植物保护学报 (*Acta Phytophylacica Sinica*), 2008, 35 (1): 28-32.
- [24] Hallmann J, Rodríguez-Kábana R, Kloepper JW. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 551-560.

# Biodiversity of phosphate-dissolving and plant growth-promoting endophytic bacteria of two crops

Jing Huang, Xiafang Sheng\*, Linyan He

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] We isolated and characterized phosphate-dissolving endophytic bacteria from two commonly cultivated crops. [ **Methods** ] Phosphate-dissolving endophytic bacteria were isolated by plating and screening from interior tissues of rape and maize plants on NBRIP medium with tricalcium phosphate as sole phosphate source. Bacteria were characterized regarding characteristics that may be relevant for a beneficial plant-microbe interaction—indoleacetic acid, siderophore and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase production, and further classified by restriction analysis of 16S rDNA. Eleven typical strains were identified by 16S rDNA sequence analysis. [ **Results** ] Thirty-two phosphate-dissolving endophytic bacteria were isolated from maize and rape plants and classified by restriction analysis of 16S rDNA in 8 different taxonomic groups at the similarity level of 76%. All the isolates could release phosphate from tricalcium phosphate and decrease the pH of the medium. The maximum phosphate content (537.6 mg/L) in the solution was obtained with strain MIL5. Thirteen isolates isolated from rape produced indoleacetic acid and siderophore, 68.4% and 63.2% of the strains isolated from maize produced indoleacetic acid and siderophore, respectively. 63.2% of the strains isolated from maize were able to grow on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as the sole nitrogen source. The eleven strains belonged to five different genera including *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* and *Ralstonia*. [ **Conclusions** ] Phosphate-dissolving endophytic bacteria isolated from rape and maize plants have abundant characteristics relative to promoting plant growth and genetic diversity.

**Keywords:** Phosphate-dissolution; plant growth-promoting endophytic bacteria; biodiversity; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase; maize; rape

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400006)

\* Corresponding author. Tel: +86-25- 84396484; Fax: +86-25- 84396326; E-mail: xfsheng604@sohu.com

Received: 28 December 2009/Revised: 24 February 2010

## 《微生物学报》投稿方式

从 2006 年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发“收稿回执”,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有 2 个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 邮寄纸样:为了保护知识产权,务必请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板);为了核实文中的图、表等内容,还需要提供一份纸质稿件。
- (5) 受理费:100 元审稿费。按照“稿件受理通知”中提供的详细地址办理,务必通过邮局汇款,切忌夹在纸样材料中随信邮寄!【为了便于查找,请在汇款单上注明“稿件编号”。】