



# 乌头产吲哚乙酸内生细菌遗传多样性、抗逆性及其对水稻幼苗生长的影响

罗兴<sup>1</sup>, 邹兰<sup>1\*</sup>, 吴清山<sup>1</sup>, 张要朋<sup>1</sup>, 巫荣星<sup>1</sup>, 王茜<sup>1</sup>, 熊伟<sup>1</sup>, 戴维<sup>2</sup>, 叶坤浩<sup>2</sup>, 黄晶<sup>1\*</sup>

1 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621000

2 绵阳市农业科学研究院, 四川 绵阳 621000

罗兴, 邹兰, 吴清山, 张要朋, 巫荣星, 王茜, 熊伟, 戴维, 叶坤浩, 黄晶. 乌头产吲哚乙酸内生细菌遗传多样性、抗逆性及其对水稻幼苗生长的影响. 微生物学报, 2022, 62(4): 1485–1500.

Luo Xing, Zou Lan, Wu Qingshan, Zhang Yaopeng, Wu Rongxing, Wang Qian, Xiong Wei, Dai Wei, Ye Kunhao, Huang Jing. Genetic diversity, stress resistance, and effect on rice seedling growth of indoleacetic acid-producing endophytic bacteria isolated from *Aconitum carmichaelii* Debeaux. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1485–1500.

**摘要:**【目的】探究乌头产吲哚乙酸(IAA)内生细菌的遗传多样性、溶磷解钾能力、抗逆能力及其对水稻幼苗生长的影响, 为道地产区乌头产业可持续发展提供科技支撑。【方法】从健康乌头植株分离可培养内生细菌, 采用 Salkowski 比色法测定内生细菌产 IAA 能力, 16S rDNA 限制性片段长度多样性(16S rDNA-RFLP)及 16S rDNA 全长序列研究其遗传多样性及系统发育地位, 平板培养法测定产 IAA 内生细菌溶磷解钾及其对 pH、温度、盐、抗生素等的耐受能力, 平板法测定菌悬液浸泡后水稻种子萌发率和室内水培法探究产 IAA 内生细菌对水稻幼苗生长的影响。【结果】从健康乌头植株分离获得 24 株高产 IAA 的内生细菌, 其分泌 IAA 的值为 21.39–84.43 mg/L。16S rDNA-RFLP 分析表明, 24 株产 IAA 的内生细菌可分为 12 个类群, 代表菌株 16S rRNA 基因系统发育结果显示这些菌分属于肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*)、泛菌属(*Pantoea*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)和金黄杆菌属(*Chryseobacterium*), 表现出较丰富的遗传多样性。另外, 24 株菌中有 12 株菌具有较强的溶钾能力, 大部分供试菌株可耐受较广范围的 pH、温度和盐浓度,

**基金项目:** 四川省科技计划(2021NZZJ0025, 2021YFN0068); 2021 年四川省级大学生创新创业训练计划; 2020 年中医药发展四川省级补助资金

Supported by the Sichuan Provincial Science and Technology Department Fund (2021NZZJ0025, 2021YFN0068), by the Sichuan Provincial Innovation and Entrepreneurship Training Plan for College Students in 2021 and by the 2020 Sichuan Provincial Subsidies for TCM Development

\*Corresponding authors. E-mail: ZOU Lan, zoulan@swust.edu.cn; HUANG Jing, huang.jing@swust.edu.cn

Received: 17 August 2021; Revised: 20 October 2021; Published online: 10 November 2021

但对抗生素耐受性不强; 10 株内生细菌可显著提高水稻种子的萌发率, 16 株内生细菌可显著促进水稻幼苗的生长, 综合筛选出 3 株内生细菌(JY1-1S、JY3-6S 和 JY10-1L)既能提高水稻种子发芽率, 又能促进水稻幼苗生长。【结论】乌头植株含有较丰富的高产 IAA 的内生细菌资源, 且其遗传多样性丰富; 本研究筛选出 3 株对水稻种子萌发和幼苗生长具显著促进作用的内生细菌, 可为后续生物肥料的开发提供优质菌种。

**关键词:** 乌头; 内生细菌; IAA; 遗传多样性; 促生; 溶磷解钾; 抗逆性; 水稻

## Genetic diversity, stress resistance, and effect on rice seedling growth of indoleacetic acid-producing endophytic bacteria isolated from *Aconitum carmichaelii* Debeaux

LUO Xing<sup>1</sup>, ZOU Lan<sup>1\*</sup>, WU Qingshan<sup>1</sup>, ZHANG Yaopeng<sup>1</sup>, WU Rongxing<sup>1</sup>, WANG Qian<sup>1</sup>, XIONG Wei<sup>1</sup>, DAI Wei<sup>2</sup>, YE Kunhao<sup>2</sup>, HUANG Jing<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, Sichuan, China

<sup>2</sup> Mianyang Academy of Agricultural Sciences, Mianyang 621000, Sichuan, China

**Abstract:** [Objective] To explore the genetic diversity, phosphorus- and potassium-solubilizing ability, stress resistance, and effect on rice seedling growth of indoleacetic acid (IAA)-producing endophytic bacteria isolated from *Aconitum carmichaelii* Debeaux and to provide scientific support for the sustainable development of *A. carmichaelii* industry. [Methods] Culturable endophytic bacteria were isolated from surface sterilized healthy plants of *A. carmichaelii*, and their IAA-producing capacities were measured by Salkowski spectrophotometry. The genetic diversity and phylogenetic status of these bacteria were studied via 16S rDNA-restriction fragment length polymorphism (16S rDNA-RFLP) and 16S rDNA full-length sequence. The phosphorus- and potassium-solubilizing abilities and stress resistance of them were studied by plate culture method. The effects of IAA-producing endophytic bacteria on the seed germination rate of rice were tested by semi-solid culture method after the seeds were immersed in bacterial liquids for 30 min. The effects of the endophytic bacteria on rice seedling growth were investigated by hydroponic experiment in our laboratory. [Results] Twenty-four endophytic bacterial strains were isolated from healthy *A. carmichaelii*, with the IAA-producing capacities ranging from 21.39 mg/L to 84.43 mg/L. The 16S rDNA-RFLP analysis indicated that these 24 strains were classified into 12 groups. The phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequences showed that the representative strains belonged to *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Sphingobacterium*, and *Chryseobacterium*, which demonstrated high genetic diversity. Twelve strains showed strong potassium-solubilizing capacities. Most of the strains could grow normally within wide ranges of pH, temperature, and NaCl concentration, while they showed little resistance to different antibiotics. Ten strains significantly improved the germination rate of rice seeds, and 16 strains significantly promoted

the growth of rice seedlings. We screened out 3 strains JY1-1S, JY3-6S, and JY10-1L that could not only improve the seed germination rate but also promote the seedling growth of rice. **[Conclusion]** *A. carmichaelii* harbored rich and diverse IAA-producing endophytic bacteria. We screened out 3 endophytic bacterial strains that could promote the seed germination and seedling growth of rice. This study laid a foundation for the development of plant growth-promoting biological fertilizer in the future.

**Keywords:** *Aconitum carmichaelii* Debeaux; endophytic bacteria; indoleacetic acid; genetic diversity; plant growth-promoting capacity; phosphorus- and potassium-solubilizing abilities; stress resistance; rice

植物内生菌指其生活史的全部或部分栖息在植物体内而不引起明显病症的微生物, 可从严格表面消毒的植物组织中分离获得<sup>[1]</sup>。植物内生菌与植物长期协同进化, 相互选择, 形成了复杂多样的共生关系, 其活动及代谢产物可对植物产生有益影响, 如内生菌可释放酶类增加植物对环境胁迫的适应性<sup>[2-3]</sup>, 分泌各类有机酸、无机酸将难溶性磷、钾溶解为可溶态被植物吸收利用<sup>[4-5]</sup>, 以及分泌吲哚乙酸(IAA)等植物激素促进植物生长。植物常见的内生细菌如芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)被证实可促进作物生长<sup>[6]</sup>, 增强植物抗逆和抗病能力<sup>[7]</sup>。植物内生细菌因此成为生物肥料和生防材料的重要资源库。

乌头(*Aconitum carmichaelii* Debeaux)为毛茛科乌头属药用植物<sup>[8]</sup>, 其子根加工品为附子, 是我国 40 种大宗名贵中药之一<sup>[9]</sup>, 有近 3 000 年的药用历史。四川江油是附子的道地产区, 除满足国内需求, 江油附子还远销韩国、日本等国, 国内外市场对附子需求量持续增长。乌头是一种需肥量较高的植物, 如其基肥(有机肥和化学肥料)需求量高达 15 t/hm<sup>2</sup><sup>[10]</sup>。肥料用量过多或不合理使用, 造成土壤养分失衡、酸化、病害严重等一系列问题<sup>[11-12]</sup>, 引发乌头连作障碍, 因而亟需寻求高效绿色的途径如生物肥料来提高其产量。然而目前暂无生物肥料在乌头生长方面的应用。为提高种植效益, 基于乌头

生长特点, 江油道地产区采用乌头套作水稻的栽培模式, 有效降低了土壤酸化程度、减少病害发生, 实现乌头连年种植<sup>[13-14]</sup>。然而, 目前关于乌头/水稻模式下乌头对水稻生长发育影响的研究未见报道, 如乌头内生细菌是否影响水稻生长。因此本研究从乌头内生细菌促生能力(如产 IAA)及其应用潜力的角度(如对水稻生长的影响), 首次从江油道地产区的健康乌头植株分离出产 IAA 的内生细菌, 并解析其遗传多样性、溶磷溶钾能力、抗逆能力及对水稻生长的影响, 以期对相关微生物肥料研制提供优质菌种资源、为道地产区乌头/水稻种植模式的绿色可持续发展提供科技支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 健康乌头植株的采集

健康乌头植株采集自乌头道地产区四川省江油市(表 1), 于乌头收获期随机采集 5 株表面无明显病斑且无机械损伤的健康乌头植株, 整株装入无菌袋, 24 h 内分离内生细菌。

### 1.2 乌头内生细菌的分离纯化

清水反复冲洗乌头植株, 并以软毛刷轻轻刷去植株块根残留泥土, 尽量不造成物理损伤。将乌头植株的根、茎、叶剪成 3 cm 左右大小, 分别放入无菌烧杯中, 先用 75% 的酒精浸泡处理 1 min, 无菌水冲洗 1 次; 然后用 2% NaClO (有效氯含量)浸泡处理 8 min, 浸泡过程中持续

表 1 乌头内生细菌分离信息

Table 1 Isolation information of *A. carmichaelii* Debeaux endophytic bacteria

Strains	Sampling sites	Organs
JY-1-1L	Yanngting, Wudu, Jiangyou, Sichuan	Leaf
JY-1-1R	Yanngting, Wudu, Jiangyou, Sichuan	Root
JY-1-1S	Yanngting, Wudu, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-1-2R	Yanngting, Wudu, Jiangyou, Sichuan	Root
JY-1-2S	Yanngting, Wudu, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-1-3R	Yanngting, Wudu, Jiangyou, Sichuan	Root
JY-1-4R	Yanngting, Wudu, Jiangyou, Sichuan	Root
JY-2-2S	Laopingba, Sanhe, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-3-6S	Laopingba, Sanhe, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-5-1S	Changgeng, Zhangming, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-5-3S	Changgeng, Zhangming, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-6-1L	Changqing, Xiping, Jiangyou, Sichuan	Leaf
JY-6-2S	Changqing, Xiping, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-6-3S	Changqing, Xiping, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-6-4S	Changqing, Xiping, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-9-3S	Qiaolou, Taiping, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-9-4R	Qiaolou, Taiping, Jiangyou, Sichuan	Root
JY-10-1L	Qiaolou, Taiping, Jiangyou, Sichuan	Leaf
JY-10-3S	Qiaolou, Taiping, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-10-4L	Qiaolou, Taiping, Jiangyou, Sichuan	Leaf
JY-10-4S	Qiaolou, Taiping, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-10-5S	Qiaolou, Taiping, Jiangyou, Sichuan	Steam
JY-10-6L	Qiaolou, Taiping, Jiangyou, Sichuan	Leaf
JY-10-7L	Qiaolou, Taiping, Jiangyou, Sichuan	Leaf

振荡以保证样品与消毒液充分接触；最后用无菌水洗涤 5 次，每次持续 1 min。取最后一次冲洗液 100  $\mu$ L 均匀涂布于 LB 平板，放置于 28  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 5 d，以检测表面消毒的效果。选取表面消毒彻底的样品放入无菌破碎机中打碎，接种到 LB 平板，放置于 28  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 5 d，然后选取颜色、大小、光泽度等不同的菌落转接于新的 LB 平板进行纯化(至少 3 次)，直至获得纯菌株。将纯化的菌株用甘油(30%终浓度)保种并保存于-80  $^{\circ}$ C 冰箱。

### 1.3 乌头内生细菌分泌 IAA 能力测定

采用 Salkowski 比色法<sup>[15]</sup>测定乌头内生细菌 IAA 分泌能力：向含有 L-色氨酸(200 mg/L)的 LB 液体培养基中接种纯化的内生细菌

( $OD_{600}=0.2$ )，28  $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h (快生菌)或 7 d (慢生菌)，测定  $OD_{600}$  值，同时取 1 mL 菌悬液 10 000 r/min 离心 10 min 后，取 400  $\mu$ L 上清液加入同体积的 Salkowski 比色液，暗处理 30 min，测定混合液在 530 nm 波长处的吸光值。配置 20、40、60、80、100 mg/L 的 IAA 标准溶液，以相同方式处理并绘制标准曲线，计算各乌头内生细菌分泌 IAA 的含量。

### 1.4 内生细菌多样性及系统发育地位鉴定

采用 GUTC 法提取供试菌株总 DNA，并用 1%的琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的质量。采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增，PCR 扩增体系为：2 $\times$  Mix 12.5  $\mu$ L，10  $\mu$ mol/mL 的 27F 1  $\mu$ L，10  $\mu$ mol/mL 的 1492R 1  $\mu$ L，模板 1  $\mu$ L，ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L。PCR 扩增条件：94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min；94  $^{\circ}$ C 变性 30 s，50  $^{\circ}$ C 退火 30 s，72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min，30 个循环；72  $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶检测，电泳电压 80 V，80 min。选用 *Hinf* I (37  $^{\circ}$ C)、*Hae* III (37  $^{\circ}$ C)和 *Taq* I (65  $^{\circ}$ C)对纯化后的 16S rRNA 基因 PCR 产物进行酶切，酶切产物用 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测(电泳电压 80 V 150 min)并记录条带类型。

综合 3 种酶切结果利用 NTSYS 软件进行聚类分析，每个类群选取 1 株代表菌株。对代表菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增，产物送至北京擎科生物科技有限公司测序，将所得序列在 NCBI 数据库进行比对，根据比对结果选取参比菌株，利用 MEGA7.0 软件构建系统发育树，明确其分类地位。

### 1.5 乌头产 IAA 内生细菌溶磷解钾及抗逆能力测定

1.5.1 乌头产 IAA 内生细菌溶磷解钾能力测定  
分别接种 50  $\mu$ L  $OD_{600}=0.2$  的供试菌株菌悬

液于分别以  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、卵磷脂为唯一磷源的培养基和以钾长石粉为唯一钾源的培养基, 28 °C 倒置培养 3–7 d, 观察是否有溶磷圈、溶钾圈。无机磷培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 0.2 g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  10.0 g,  $\text{CaCO}_3$  0.5 g, 葡萄糖 0.5 g,  $\text{MnSO}_4$  0.02 g,  $\text{FeSO}_4$  0.02 g, 琼脂粉 20.0 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 为 7.2; 有机磷培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 0.2 g, 卵磷脂 0.2 g,  $\text{CaCO}_3$  0.5 g, 葡萄糖 0.5 g,  $\text{MnSO}_4$  0.02 g,  $\text{FeSO}_4$  0.02 g, 琼脂粉 20.0 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 为 7.2; 解钾培养基:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.0 g, 蔗糖 5.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{FeCl}_3$  0.05 g,  $\text{CaCO}_3$  0.1 g, 钾长石粉 1.0 g, 琼脂粉 20.0 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 为 7.2。

### 1.5.2 乌头产 IAA 内生细菌抗逆能力测定

(1) 温度: 将供试菌株点接种于 LB 平板, 分别于 4、28、37 和 65 °C 热激处理 30 min 后置于 28 °C 培养箱恒温培养 4 d, 观察记录菌落生长情况。

(2) pH: 将供试菌株分别接种于 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 的 LB 平板, 28 °C 恒温培养 4 d, 观察记录菌落生长情况。

(3) NaCl 浓度: 将供试菌株分别接种于 NaCl 浓度为 1%、2%、3%、4% 和 5% 的 LB 平板, 以 NaCl 浓度 0.5% 为对照, 28 °C 恒温培养 4 d, 观察记录菌落生长情况。

(4) 抗生素及浓度: 将供试菌株分别接种于硫酸链霉素(streptomycin sulphate)、硫酸新霉素(neomycin sulfate)、硫酸卡那霉素(kanamycin sulfate)浓度为 25、50、100、200、500 mg/L 的 LB 平板, 以接种无抗生素 LB 平板为对照, 28 °C 恒温培养 4 d, 观察记录菌落生长情况。

### 1.6 乌头产 IAA 内生细菌对水稻种子萌发的影响

将供试菌株接种于 LB 液体培养基, 28 °C 恒温摇床培养 48 h (快生菌) 或 7 d (慢生菌), 将 20 粒水稻种子(荃优 967)浸没于浓度为  $1 \times 10^8$  cell/mL 的菌悬液 30 min, 然后将水稻种子置于 0.2% 琼脂培养基, 以浸没无菌水的水稻种子为对照, 置于 28 °C 培养箱培养, 3 次生物学重复, 3 d 后统计发芽数、生根数、芽长、根长并计算发芽率。发芽率(%)=发芽种子数/供试种子总数 $\times$ 100。

### 1.7 乌头产 IAA 内生细菌对水稻幼苗生长的影响

选取大小一致的水稻种子, 经严格表面消毒(同乌头植株表面消毒), 放置于 0.2% 琼脂培养基中, 于 28 °C 培养箱培养至发芽作为供水稻幼苗。选取生长一致的水稻幼苗置于含有水稻生长低营养液<sup>[16]</sup>的试管(1 株/管), (母液 A:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.43 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.3 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.75 g,  $\text{HBO}_3$  2.8 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.026 g,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.007 g; 母液 B:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.0 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.0 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.44 g, EDTA 0.4 g; 母液 C:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  60.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40.0 g; 母液 D:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  66.03 g, 4 种母液均以无菌水定容至 1 000 mL, 并灭菌。加入 1 mL 母液 A, 50 mL 母液 B, 15 mL 母液 C, 1 mL 母液 D, 无菌水定容至 1 000 mL 作为水稻生长低营养液)。待水稻幼苗在试管中生长 3 d 后, 在每支试管中接种 1 mL ( $2 \times 10^8$  cell/mL) 供试菌株菌悬液, 每个处理设置 10 个重复, 置于 25 °C 光照培养室, 每天光处理 16 h, 暗处理 8 h, 每 3 d 补充 1 次营养液, 培养 30 d, 统计水稻植株地上鲜重、根鲜重、根长、株高、地上干重及根干重。

### 1.8 数据统计与分析

用 SPSS 25.0 软件对乌头内生细菌产 IAA 含量、水稻种子萌发率、水稻幼苗农艺性状进行统计分析。采用单因素分析和显著差异法分析, 显著性水平设为  $P \leq 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 乌头健康植株采集与内生细菌的分离纯化

本研究从四川省江油市 5 个行政村乌头植株的根、茎、叶中共分离获得 24 株内生细菌(表 1), 其中从茎分离的菌株最多(13 株), 占总分离菌株的 54.2%, 其次为叶(6 株), 从根中分离的菌株最少(5 株)。

### 2.2 乌头内生细菌产 IAA 能力

供试乌头内生细菌分泌 IAA 能力见表 2, 其 IAA 分泌量为 21.39–84.43 mg/L, 其中 JY-10-7L 含量最高 (84.43 mg/L), JY-1-3R (65.79 mg/L)次之, JY-6-3S (21.39 mg/L)最低。15 株供试菌株 IAA 分泌量介于 20–40 mg/L, 7 株介于 40–60 mg/L, 2 株介于 60–80 mg/L。

表 2 供试菌株 IAA 分泌量

Strains	IAA value/(mg/L)	Strains	IAA value/(mg/L)
JY-1-1L	21.880±0.543e	JY-6-2S	45.630±0.054d
JY-1-1R	41.554±0.109d	JY-6-3S	21.391±0.163e
JY-1-1S	29.815±2.391e	JY-6-4S	42.533±0.870d
JY-1-2R	26.663±0.543e	JY-9-3S	22.533±2.065e
JY-1-2S	41.337±2.500d	JY-9-4R	28.293±4.565e
JY-1-3R	65.793±0.761b	JY-10-1L	57.837±0.543c
JY-1-4R	28.946±0.543e	JY-10-3S	35.500±0.946e
JY-2-2S	24.054±0.543e	JY-10-4L	36.826±1.359e
JY-3-6S	22.207±0.870e	JY-10-4S	24.054±0.435e
JY-5-1S	34.652±1.467e	JY-10-5S	40.902±1.087d
JY-5-3S	32.533±0.326e	JY-10-6L	40.739±2.011d
JY-6-1L	24.728±0.957e	JY-10-7L	84.434±7.880a

Data was presented by means with standard error of three replicates. Different lowercase letters indicated significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 内生细菌多样性及系统发育地位

#### 2.3.1 内生细菌多样性

对供试菌株进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增, 均获得 1 条长约 1 500 bp 的单一条带。16S rRNA 基因 PCR 产物经 *Hinf*I 酶切后共获得 9 种条带类型, 以 G 型最多(6 株); *Hae* III 共 6 个类型, e 型最多(9 株); *Taq* I 共 7 个类型, 以 6 型最多 (6 株)(表 3)。综合 3 种酶切结果在 NTSYS 软件分析中, 以 91%相似度水平, 将供试菌株划分为从 A–L 的 12 个类群(图 1), 其中 H 组包含菌株最多(5 株), 其次为 K 组(4 株)、C 组(3 株)、I 组(3 株)、A 组(2 株), 其余分组各 1 株。

表 3 乌头内生细菌酶切类型

Table 3 16S rDNA-RFLP types of endophytic bacteria from *A. carmichaelii* Debeaux

Strains	16S rDNA-RFLP		
	<i>Hinf</i> I	<i>Hea</i> III	<i>Taq</i> I
JY-10-1L	H	b	3
JY-10-3S	H	c	3
JY-10-4L	I	d	5
JY-10-4S	E	e	6
JY-10-5S	G	a	5
JY-10-6L	H	e	7
JY-10-7L	D	b	2
JY-1-1L	F	c	6
JY-1-1R	H	e	3
JY-1-1S	G	e	6
JY-1-2R	D	b	5
JY-1-2S	G	e	6
JY-1-3R	H	e	5
JY-1-4R	E	e	3
JY-2-2S	B	c	3
JY-3-6S	G	e	6
JY-5-1S	G	e	6
JY-5-3S	C	a	5
JY-6-1L	A	a	3
JY-6-2S	I	b	3
JY-6-3S	E	a	4
JY-6-4S	I	f	3
JY-9-3S	G	a	2
JY-9-4R	D	b	1

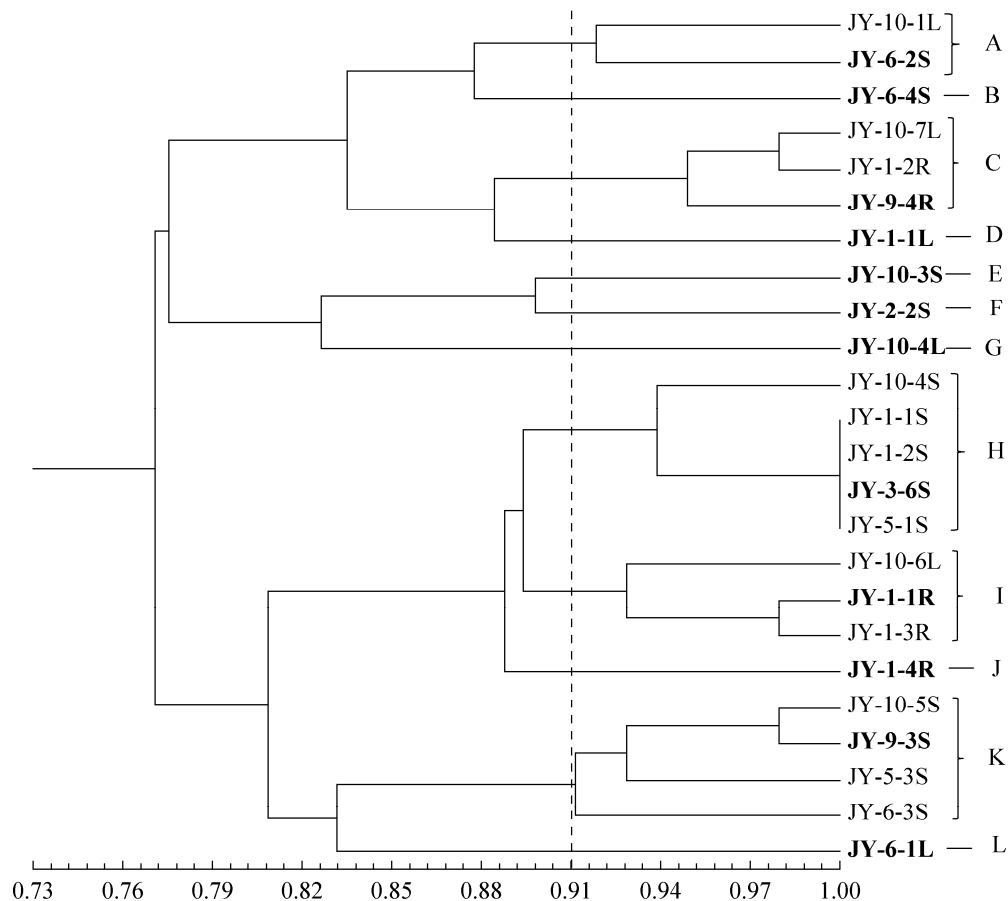


图 1 供试菌株 NTSYS 聚类图

Figure 1 Cluster diagram of NTSYS of strains. Strains in bold were selected as the representative strain for 16S rRNA gene sequencing.

### 2.3.2 内生细菌系统发育地位

根据 RFLP 聚类结果, 选取 12 株代表菌株进行 16S rRNA 基因序列测定, 并构建系统发育树以明确其分类地位(图 2)。代表菌株与参比菌株聚为 8 个不同的发育分支。分支 I 为肠杆菌属(*Enterobacter*), 由 JY-1-4R 和其参比菌株组成。JY-1-4R 的最相似菌株为 *Enterobacter huaxiensis*, 相似性为 95.29%; 分支 II 为克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*), 含 2 株菌, JY-6-4S 与 JY-6-2S 最相似菌株均为 *Klebsiella oxytoca*, 相似性分别为 98.62%和 98.48%; 分支 III 为泛菌属(*Pantoea*), 由 JY-1-1L 和参比菌株组成, 与 *Pantoea agglomerans* 相似性最高, 为 94.61%; 分支 IV 为假单胞菌属(*Pseudomonas*), 含 2 株菌, JY-10-3S 与 JY-2-2S

相似性为 100%, 即为同一种菌, 与 *Pseudomonas baetica* 相似性最高(94.59%); 分支 V 为微杆菌属(*Microbacterium*), 仅由 JY-10-4L 与其最相似菌株 *Microbacterium oxydans* 组成, 相似性为 97.61%; 分支 VI 为芽孢杆菌属(*Bacillus*), 有 3 株菌, JY-6-1L 与 JY-3-6S 的最相似菌株为 *Bacillus subtilis*, 相似性分别为 99.13%、99.21%, JY-9-3S 最相似菌株为 *Bacillus amyloliquefaciens*, 相似性为 98.21%; 分支 VII 为鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*), 由 JY-1-1R 及参比菌株组成, 与 *Sphingobacterium multivorum* 相似性最高, 为 95.14%; 分支 VIII 为金黄杆菌属(*Chryseobacterium*), 由 JY-9-4R 及其参比菌株组成, 与 *Chryseobacterium culicis* 相似性最高, 为 97.12%。

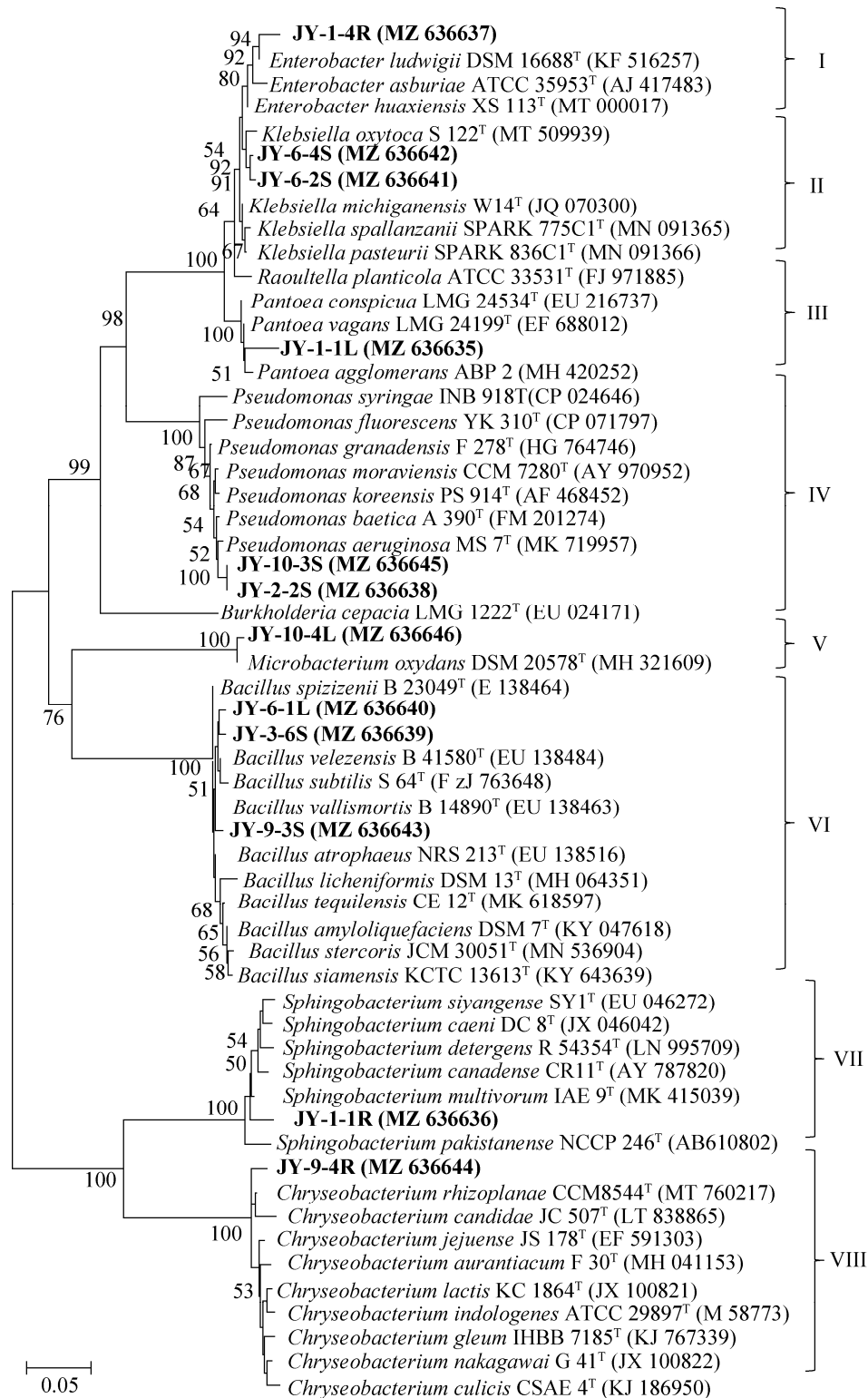


图 2 代表菌株 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 2 16S rRNA gene based phylogenetic tree of representative stains isolated from *A. carmichaelii* Debeaux and reference strains. Numbers in bracket represent the sequences accession number in the GenBank. Bootstrap value was 1 000. Bar, 0.05 sequence divergence.



## 2.4 乌头产 IAA 内生细菌溶磷解钾及抗逆能力

### 2.4.1 乌头产 IAA 内生细菌溶磷解钾能力

供试菌株在以  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  为磷源的无机磷和以卵磷脂为磷源的有机磷培养基中均能正

常生长, 培养 6 d 后均无溶磷圈出现, 表明其无溶磷能力(表 4); 在以钾长石粉为钾源的培养基中能正常生长, 其中 12 株供试菌株的菌落周围呈现透明状溶钾圈, 表明有解钾能力(图 3)。

表 4 供试菌株溶磷解钾能力

Table 4 Phosphorus and potassium solubilizing ability of tested strains

Strains	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		Lecithin		$\text{K}_2\text{O}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 6\text{SiO}_2$	
	Growth	Solubilizing capacity	Growth	Solubilizing capacity	Growth	Solubilizing capacity
JY-10-5S	1	N	1	N	1	Y
JY-10-4L	1	N	1	N	1	N
JY-10-4S	1	N	1	N	1	Y
JY-10-1L	1	N	1	N	1	Y
JY-9-4R	1	N	1	N	1	N
JY-10-3S	1	N	1	N	1	Y
JY-6-4S	1	N	1	N	1	Y
JY-9-3S	1	N	1	N	1	N
JY-6-1L	1	N	1	N	1	N
JY-6-3S	1	N	1	N	1	N
JY-5-3S	1	N	1	N	1	N
JY-6-2S	1	N	1	N	1	Y
JY-10-6L	1	N	1	N	1	Y
JY-10-7L	1	N	1	N	1	N
JY-1-1R	1	N	1	N	1	Y
JY-1-1S	1	N	1	N	1	N
JY-1-2R	1	N	1	N	1	Y
JY-1-2S	1	N	1	N	1	Y
JY-1-1L	1	N	1	N	1	N
JY-1-3R	1	N	1	N	1	Y
JY-1-4R	1	N	1	N	1	Y
JY-2-2S	1	N	1	N	1	N
JY-3-6S	1	N	1	N	1	N
JY-5-1S	1	N	1	N	1	N

“1” indicated that bacteria could grow normally on the corresponding plates; “0” indicated that bacteria could not grow on the corresponding plates. “Y” indicated the existence of solubilizing circles around the colonies. “N” meant no solubilizing circles by the strains.

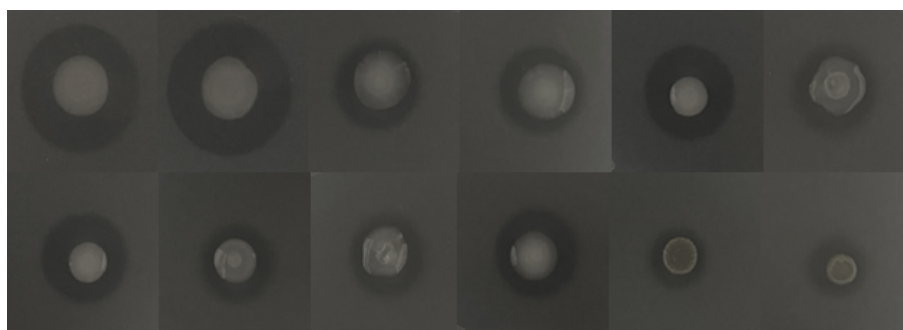


图 3 供试菌株解钾能力

Figure 3 Potassium solubilization ability of the tested strains. From top to bottom, from left to right, the strains were named JY-1-2R, JY-1-2S, JY-1-3R, JY-6-2S, JY-10-6L, JY-1-1R, JY-10-3S, JY-6-4S, JY-1-4R, JY-10-5S, JY-10-4S, JY-10-1L.

### 2.4.2 乌头产 IAA 内生细菌抗逆能力

供试菌株对温度、pH、NaCl 浓度的耐受性普遍较强(表 5), 大部分菌株均能在 4 °C、28 °C、37 °C、65 °C 热激 30min 处理后生长, 仅 3 株菌耐温性不强, 其中 JY-5-3S 最弱, 在 4 °C、37 °C 和 65 °C 热激 30min 处理后均无法生长, 其次为 JY-10-6L (4 °C、65 °C 热激 30 min 处理) 和 JY-9-4R (4 °C); 除 JY-5-3S 在 pH 8.0 以上、JY-9-4R 在 pH 10.0 以上、JY-1-3R 在 pH 11.0 条件下无法生长, 其余菌株在 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 时均可生长; 仅 JY-5-3S 与 JY-9-4R 在 NaCl 浓度 4% 以上无法生长, 其余供试菌株在 NaCl 浓度为 1%、2%、

3%、4%、5% 条件下都可正常生长。与 CK 相比, 14 株供试菌株在添加硫酸链霉素、硫酸新霉素、硫酸卡那霉素 3 种抗生素的 LB 平板中无法生长(表 6)。3 株供试菌株能在含硫酸链霉素的 LB 培养基上生长, 其中 JY-2-2S 耐受性最强, 可在含硫酸链霉素 300 mg/L 的 LB 培养基上生长, JY-6-3S (200 mg/L) 与 JY-10-7L (50 mg/L) 次之。9 株供试菌株能在含硫酸新霉素的 LB 培养基上生长, 其中 8 株菌仅能在 25 mg/L 浓度下生长, JY-6-4S 可在 50 mg/L 浓度下生长, 表现出一定耐受性。JY-5-3S、JY-6-4S 分别能在含硫酸卡那霉素 100 mg/L、25 mg/L 的 LB 培养基上生长, 表现出一定的耐受性。

表 5 供试菌株对不同温度、pH、NaCl 浓度的耐受性

Table 5 Tolerance abilities of tested strains to different temperature, pH and NaCl concentrations

Strains	CK	T/°C			pH						NaCl/%				
		4	37	65	5.0	6.0	8.0	9.0	10.0	11.0	1	2	3	4	5
JY-1-1L	+++	+	++	+	+	+++	++	+	+	+	+++	++	++	++	+
JY-1-1R	+++	+	+++	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	+	+
JY-1-1S	+++	++	++	++	+	+	+	++	+	+	+++	++	++	++	+
JY-1-2R	+++	+	++	+	++	+	+++	+	+	+	++	+	+	+	+
JY-1-2S	+++	++	+++	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+
JY-1-3R	+++	+	++	+	+	+	++	+	+	-	+++	++	++	+	+
JY-1-4R	+++	++	+++	+	+	++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+
JY-2-2S	+++	+	++	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+
JY-3-6S	+++	++	++	++	+	++	+	+	+	+	+++	++	+	+	+
JY-5-1S	+++	+	++	+	+	+	+++	+	+	+	++	++	++	+	+
JY-5-3S	+++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
JY-6-1L	+++	+	+++	+	+	++	+++	++	+	+	++	+	+	+	+
JY-6-1S	+++	++	++	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+
JY-6-3S	+++	+	+++	+	+	+	++	++	+	+	++	++	++	+	+
JY-6-4S	+++	++	++	++	+	++	++	+	+	+	+++	+	+	+	+
JY-9-3S	+++	+	+	+	+	+	++	+	+	+	++	++	++	+	+
JY-9-4R	+++	-	++	+	+	++	++	+	-	-	++	+	+	-	-
JY-10-1L	+++	++	+++	+	+	++	++	+	+	+	++	+	+	+	+
JY-10-3S	+++	+	+++	+	+	+	+	+	+	+	+++	++	++	+	+
JY-10-4L	+++	++	++	+	+	++	+++	++	+	+	++	+	+	+	+
JY-10-4S	+++	+	++	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+
JY-10-5S	+++	++	++	+	+	++	++	+	+	+	++	++	++	+	+
JY-10-6L	+++	-	+	-	+	++	++	+	+	+	++	++	++	+	+
JY-10-7L	+++	++	+++	++	+	++	++	++	+	+	+++	++	++	++	+

CK indicated the bacterial growth status on LB solid medium and different numbers of “+” indicated the growth status of tested bacteria on corresponding plates as compared to that of CK; “-” indicated that bacteria could not grow on the corresponding plates.

**表 6 供试菌株不同抗生素及浓度的耐受性**  
**Table 6 Antibiotics tolerance capacities of tested strains**

Strains	CK	Streptomycin sulphate/(mg/L)					Neomycin sulfate/(mg/L)					Kanamycin sulfate/(mg/L)				
		25	50	100	200	300	25	50	100	200	300	25	50	100	200	300
JY-1-1L	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-1-1R	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-1-1S	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-1-2R	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-1-2S	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-1-3R	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-1-4R	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-2-2S	+++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-3-6S	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-5-1S	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-5-3S	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
JY-6-1L	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-6-1S	+++	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-6-3S	+++	++	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-6-4S	+++	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
JY-9-3S	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-9-4R	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-10-1L	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-10-3S	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-10-4L	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-10-4S	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-10-5S	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-10-6L	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JY-10-7L	+++	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CK indicated the bacterial growth status on LB solid medium without any antibiotics and different numbers of “+” indicated the growth status of tested bacteria on corresponding plates as compared to that of CK; “-” indicated that bacteria could not grow on the corresponding plates.

**2.5 乌头产 IAA 内生细菌对水稻种子萌发的影响**

供试菌株发酵液浸泡处理水稻种子发芽情况见表 7。24 株供试菌株均可促进水稻种子萌发，其中 9 株供试菌株(JY-1-1R、JY-3-6S、

JY-5-3S 等)发酵液显著促进水稻种子萌发，JY-1-1R、JY-3-6S 和 JY-5-3S 处理促进发芽率最显著，发芽率为 98.3%。JY-5-3S、JY-6-3S、JY-1-1S 和 JY-9-3S 均能显著促进水稻根系的生长；JY-5-3S、JY-10-1L、JY-3-6S 均能促进水稻芽的生

长。JY-5-3S 能显著提高水稻发芽率、根长与芽长。

## 2.6 乌头产 IAA 内生细菌对水稻幼苗生长的影响

供试菌株对水稻幼苗生长有不同程度的促进作用(表 8)。JY-10-1L、JY-1-1S、JY-2-2S 显著促进水稻干物质的积累; 7 株供试菌株(JY-10-1L、JY-1-1S、JY-2-2S 等)处理后与 CK

相比显著促进水稻鲜重增加; JY-10-1L 显著促进根系伸长; 5 株(JY-10-1L、JY-1-1S、JY-6-4S 等)显著提高水稻株高; JY-2-2S 与 JY-10-1L 显著提高植株地上部分鲜重及干重; 7 株(JY-2-2S、JY-10-1L、JY-1-1S 等)显著提高根鲜重; 13 株(JY-10-1L、JY-1-1S、JY-2-2S 等)显著提高根干重。

表 7 供试菌株对水稻种子萌发的影响

Table 7 Effect of strains on seed germination of rice

Strains	Germination rate/%	Root length/cm	Bud length/cm
JY-1-1R	98.3±1.7↑*	1.834±0.191	1.181±0.106
JY-3-6S	98.3±1.7↑*	1.875±0.083	1.259±0.026↑*
JY-5-3S	98.3±1.7↑*	2.057±0.137↑*	1.281±0.019↑*
JY-10-1L	96.7±1.7↑*	1.793±0.081	1.284±0.094↑*
JY-10-3S	96.7±1.7↑*	1.694±0.124	1.231±0.043
JY-1-3R	95.3±2.9↑*	1.717±0.074	1.252±0.085
JY-2-2S	95.3±2.9↑*	1.595±0.103	1.247±0.056
JY-9-4R	95.1±2.9↑*	1.419±0.017	0.946±0.084
JY-6-4S	95.1±0.1↑*	1.619±0.111	1.184±0.055
JY-6-3S	93.3±4.4	2.089±0.241↑*	1.268±0.086
JY-1-1S	93.3±3.3	2.279±0.232↑*	1.249±0.065
JY-10-7L	93.3±1.7	1.759±0.051	1.222±0.058
JY-1-2S	91.7±4.4	1.748±0.111	1.252±0.056
JY-10-4L	91.7±4.4	1.863±0.182	1.222±0.088
JY-9-3S	91.7±3.3	2.071±0.179↑*	1.108±0.079
JY-1-4R	91.4±2.9	1.632±0.111	1.124±0.041
JY-5-1S	91.1±2.9	1.642±0.097	1.156±0.075
JY-1-2R	88.3±6.7	1.559±0.168	1.175±0.076
JY-6-2S	88.3±4.4	1.617±0.188	1.144±0.075
JY-10-4S	88.3±3.3	1.887±0.073	1.108±0.064
JY-1-1L	88.3±1.7	1.729±0.206	0.933±0.083
JY-10-6L	86.7±4.4	1.451±0.159	1.022±0.122
JY-10-5S	85.4±2.9	1.762±0.164	1.095±0.048
JY-6-1L	85.4±0.1	1.701±0.023	1.079±0.073
CK	85.3±0.3	1.676±0.005	1.068±0.027

Data was presented by means with standard error of three replicates. "↑\*" indicated a significant promotion ( $P<0.05$ ) compared to CK.

表 8 供试菌株对水稻苗期生长的影响

Table 8 Effects of tested strains on rice seedling growth

Strains	Plant dry weight/g	Plant fresh weight/g	Root length/cm	Hight/cm	Shoot fresh weight/g	Root fresh weight/g	Shoot dry weight/g	Root dry weight/g
JY-2-2S	0.061±0.004↑*	0.288±0.032↑*	18.780±0.889	20.030±1.591	0.223±0.024↑*	0.065±0.008↑*	0.053±0.003↑*	0.008±0.001↑*
JY-10-1L	0.054±0.004↑*	0.277±0.018↑*	21.690±0.996↑*	21.210±1.061↑*	0.220±0.014↑*	0.057±0.005↑*	0.057±0.003↑*	0.007±0.001↑*
JY-1-1S	0.053±0.003↑*	0.281±0.020↑*	20.760±1.041	22.880±0.687↑*	0.213±0.018	0.068±0.007↑*	0.046±0.003	0.007±0.001↑*
JY-6-1L	0.051±0.002	0.256±0.005↑*	18.630±0.426	20.650±0.925	0.211±0.004	0.045±0.002	0.045±0.002	0.006±0.001↑*
JY-10-6L	0.049±0.007	0.223±0.033	17.730±0.324	19.490±0.854	0.197±0.022	0.051±0.004	0.048±0.004	0.006±0.001↑*
JY-1-1L	0.047±0.005	0.295±0.009↑*	18.210±0.970	18.520±0.848	0.226±0.008↑*	0.048±0.001	0.041±0.004	0.006±0.001↑*
JY-10-3S	0.047±0.003	0.231±0.010	19.240±0.742	20.160±1.115	0.193±0.009	0.038±0.004	0.041±0.003	0.006±0.001↑*
JY-6-4S	0.045±0.003	0.234±0.020	17.400±0.251	21.570±1.511↑*	0.186±0.017	0.048±0.004↑*	0.042±0.003	0.006±0.001↑*
JY-10-4L	0.042±0.005	0.216±0.027	21.020±1.217	21.970±1.031↑*	0.208±0.015	0.032±0.004	0.037±0.005	0.005±0.001↑*
JY-1-1R	0.039±0.004	0.181±0.024	16.810±0.483	16.980±1.633	0.140±0.020	0.041±0.005	0.033±0.003	0.005±0.001↑*
JY-1-4R	0.038±0.005	0.242±0.012	17.440±0.601	19.670±1.092	0.199±0.012	0.043±0.006	0.033±0.005	0.004±0.001
JY-6-3S	0.038±0.002	0.211±0.007	19.550±0.683	19.250±0.677	0.169±0.005	0.042±0.002	0.033±0.002	0.005±0.001↑*
JY-10-4S	0.037±0.005	0.224±0.018	16.790±0.981	17.910±0.827	0.177±0.015	0.046±0.003	0.032±0.005	0.004±0.001
JY-10-5S	0.037±0.004	0.292±0.034↑*	18.460±0.468	20.910±0.862	0.213±0.009	0.079±0.034↑*	0.032±0.004	0.004±0.001
JY-1-2R	0.036±0.003	0.249±0.015	20.710±0.546	19.310±0.447	0.211±0.015	0.038±0.003	0.031±0.003	0.006±0.001↑*
JY-3-2R	0.034±0.005	0.188±0.024	19.370±0.615	20.110±0.854	0.173±0.011	0.036±0.002	0.032±0.003	0.006±0.001↑*
JY-5-3S	0.034±0.004	0.230±0.011	19.620±0.728	19.640±0.794	0.198±0.008	0.032±0.004	0.030±0.003	0.004±0.001
JY-1-3R	0.034±0.004	0.183±0.018	19.660±0.478	14.610±0.588	0.155±0.016	0.028±0.003	0.030±0.004	0.004±0.001
JY-10-7L	0.033±0.005	0.212±0.029	21.570±0.944	21.440±0.696↑*	0.189±0.014	0.046±0.004	0.032±0.004	0.004±0.001
JY-6-2S	0.033±0.003	0.236±0.010	18.870±1.320	18.830±1.268	0.188±0.007	0.048±0.005↑*	0.029±0.003	0.004±0.001
CK	0.033±0.001	0.193±0.006	17.870±0.396	17.890±0.476	0.174±0.005	0.019±0.001	0.030±0.001	0.003±0.001
JY-9-4R	0.032±0.004	0.221±0.017	19.520±0.631	19.390±1.007	0.180±0.013	0.041±0.005	0.028±0.004	0.004±0.001
JY-5-1S	0.032±0.004	0.191±0.011	15.750±0.658	16.890±1.025	0.165±0.010	0.026±0.001	0.028±0.004	0.004±0.001
JY-3-6S	0.030±0.004	0.270±0.034↑*	19.480±0.446	19.130±0.498	0.193±0.004	0.077±0.034↑*	0.026±0.003	0.004±0.001
JY-9-3S	0.030±0.004	0.178±0.011	18.210±0.359	18.720±0.498	0.141±0.011	0.037±0.001	0.025±0.004	0.004±0.001

Data was presented by means with standard error of three replicates. “↑\*” indicated a significant promotion compared to CK.

### 3 讨论

IAA 可促进种子萌发和植株生长，还能增强植株对逆境的适应性。常见的可分泌 IAA 的植物内生菌包括芽孢杆菌属、微杆菌属、假单胞菌属、肠杆菌属和泛菌属<sup>[17-18]</sup>。本研究从健康乌头植株分离筛选到 24 株分泌 IAA 的内生细菌，分别属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、泛菌属(*Pantoea*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏

杆菌属(*Klebsiella*)、微杆菌属(*Microbacterium*)。张鑫从陕西乌头植株中分离到 30 株内生细菌，分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)<sup>[19]</sup>，乌头内生细菌具有较丰富的遗传多样性。不同内生细菌分泌 IAA 的量存在差异，如从石斛分离的内生细菌产 IAA 量为 12.8–34.5 mg/L<sup>[20]</sup>，地黄、人参和高良姜内生细菌产 IAA 量分别可达 34.69、10.20 及 31.58 mg/L<sup>[21-23]</sup>，而本研究乌头内生细菌分泌 IAA 值介于 21.39–84.43 mg/L 之间，特别是 JY-10-7L (金黄杆菌

属), 其产 IAA 值高达 84.4 mg/L。以上结果表明, 中药材包含丰富的高产 IAA 内生菌资源, 具有较大开发潜力。Bhise 等<sup>[24]</sup>研究发现金黄杆菌 IAA 分泌量为 61.18 mg/L, 并且能显著促进小麦种子萌发和幼苗生长。本研究中 JY-10-7L 对水稻种子萌发无显著促进的作用, 但能显著促进水稻幼苗植株的生长(株高), 表现出一定的促生潜力。JY-10-7L 是否可以促进乌头自身的生长有待进一步测定。

当今世界环境问题日益严峻, 土壤酸化、盐碱化、干旱以及抗生素滥用等对农业生产和食品安全造成严重威胁, 亟需通过绿色环保的方法提高农业生产且保护生态环境, 如生物肥料的开发与利用, 而生物肥料研制的关键在于高效促生菌株的筛选。本研究分离到的 24 株乌头产 IAA 内生细菌均能在含难溶性磷和钾的培养基上生长, 其中 12 株菌具有较强的解钾能力, 24 株菌对于温度、pH 和 NaCl 的耐受性较强, JY-2-2-S 和 JY-6-3-S 能耐受 200 mg/L 的硫酸链霉素, 这些菌株或可提高植株对于极端环境的耐受性。

乌头/水稻套作模式是目前道地产区有效缓解连作障碍、实现乌头连年种植的新型栽培模式<sup>[13]</sup>。然而, 目前关于乌头对水稻生长的影响研究未见报道。本研究测定了乌头产 IAA 内生细菌对水稻种子萌发和幼苗生长的影响。分析发现, 9 株产 IAA 的乌头内生细菌可显著促进水稻种子的萌发, 分别属于芽孢杆菌属、克雷伯氏菌属、假单胞菌属、鞘氨醇杆菌属和金黄杆菌属。已有报道指出这些菌均可促进种子的萌发, 如棉花、燕麦、烟草、番茄和水稻等<sup>[25-28]</sup>。接种产 IAA 内生细菌可显著促进植物侧根和主根数量、长度和重量的增加<sup>[29]</sup>。Duangpaeng 等<sup>[30]</sup>研究表明, 产 IAA 内生细菌可显著提高水稻的株高及地上部质量, 本研究发现 13 株菌可显著

增加水稻根部鲜重, 3 株菌可显著提高水稻地上部鲜重或干重, 5 株菌可显著提高水稻株高。综合以上结果, 筛选到菌株 JY-2-2S, JY-1-1S 和 JY-10-1L 的促生效果最佳。这 3 株菌分别被鉴定为假单胞菌、芽孢杆菌和克雷伯氏菌, 是常见的具有促生抗病抗逆多功能的植物内生细菌, 拥有较大应用潜力和开发前景<sup>[31-33]</sup>。不同的菌株产 IAA 的值不同, 其对水稻幼苗的生长影响也存在差异, 可能是因为 IAA 对作物生长有一定的最适范围, 浓度过低其促生效果不明显, 浓度过高反而抑制作物生长。有研究指出, 外源添加 IAA 浓度低于 0.175 mg/L 时将促进水稻生长<sup>[34]</sup>。本研究水稻生长低营养液中 IAA 含量均未超过 0.175 mg/L, 与前人的报道一致<sup>[34]</sup>。道地产区乌头收获后, 其须根和地上部常翻埋还田, 因此我们推测乌头有益内生菌(如产 IAA 菌)也会释放到地里进一步促进轮作水稻的生长, 然而乌头产 IAA 内生细菌对乌头植株的促生潜力及田间应用效果还需进一步研究。

## 4 结论

从四川江油乌头健康植株分离得到 24 株产 IAA 的内生细菌, 经 16S rRNA 基因鉴定分属于肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、泛菌属(*Pantoea*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*), 从这些菌株中筛选到溶钾、耐温、耐酸碱、耐盐以及对水稻种子的萌发及幼苗的生长表现出较好促生效果的内生细菌, 如菌株 JY-2-2S、JY-1-1S、JY-10-7L 等至少 3 株内生细菌具有较大促生潜力, 可作为后续研制生物肥料的优质菌种资源。

## 参考文献

- [1] Kogel KH, Franken P, Hückelhoven R. Endophyte or parasite—what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(4): 358–363.
- [2] Shahzad R, Khan AL, Bilal S, Waqas M, Kang SM, Lee IJ. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Environmental and Experimental Botany*, 2017, 136: 68–77.
- [3] Karthikeyan B, Joe MM, Islam MR, Sa TM. ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis*, 2012, 56(2): 77–86.
- [4] Clark RB. Differential magnesium efficiency in corn inbreds: I. dry-matter yields and mineral element composition. *Soil Science Society of America Journal*, 1975, 39(3): 488–491.
- [5] Xie MJ, Cheng AH, Cao WW. Advanced and development tendency of microbial fertilizer in China. *Journal of Microbiology*, 2000, 20: 42–45.
- [6] Sharma S, Verma PP, Kaur M. Isolation, purification and estimation of IAA from *Pseudomonas* sp. using high-performance liquid chromatography. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2014, 8(4): 3203–3208.
- [7] 胡泽瑞, 刘媛, 彭长连, 李淑彬. 三叶鬼针草内生细菌群体多样性及重金属耐受和吲哚乙酸产生潜力. *微生物学通报*, 2019, 46(1): 29–41.  
Hu ZR, Liu Y, Peng CL, Li SB. Diversity, heavy-metal tolerance and indoleacetic acid production of bacterial endophytes in *Bidens pilosa*. *Microbiology China*, 2019, 46(1): 29–41. (in Chinese)
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部: 2020年版 分辑号: 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [9] 张世臣, 李可. 中国附子. 北京: 中国中医药出版社, 2013.
- [10] Yu M, Yang YX, Shu XY, Huang J, Hou DB. *Aconitum Carmichaelii* Debeaux, cultivated as a medicinal plant in Western China. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2016, 63(5): 919–924.
- [11] 周晓阳, 徐明岗, 周世伟, Colinet Gilles. 长期施肥下我国南方典型农田土壤的酸化特征. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(6): 1615–1621.  
Zhou XY, Xu MG, Zhou SW, Gilles C. Soil acidification characteristics in Southern China's croplands under long-term fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2015, 21(6): 1615–1621. (in Chinese)
- [12] Jian Z, Xia F, Liu X, He Y, Xu J, Brookes PC. Effects of nitrogen fertilizer on the acidification of two typical acid soils in South China. *Journal of Soils and Sediments*, 2014, 14(2): 415–422.
- [13] 黄晶, 任品安, 侯大斌, 陈杰, 戴维. 四川江油道地中药材附子套作水稻技术规程探析. *园艺与种苗*, 2016, 36(7): 19–20, 44.  
Huang J, Ren PA, Hou DB, Chen J, Dai W. Discussion relay inter-cropping techniques of geoherb *Aconitum Carmichaelii* dext. and rice in Jiangyou of Sichuan province. *Horticulture & Seed*, 2016, 36(7): 19–20, 44. (in Chinese)
- [14] 任品安, 黄晶, 陈鑫, 余马, 侯大斌. 中药材附子套作水稻对土壤性状及附子产量的影响. *四川农业大学学报*, 2018, 36(3): 286–291.  
Ren PA, Huang J, Chen X, Yu M, Hou DB. Effects of relay intercropping of Chinese herbal medicine *Aconitum Carmichaelii* Debeaux and rice on soil properties and aconite yield. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2018, 36(3): 286–291. (in Chinese)
- [15] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 793–796.
- [16] Feng Y, Shen D, Song W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(5): 938–945.
- [17] 姜晓宇, 高菊生, 徐凤花, 曹艳花, 唐雪, 张晓霞. 水稻种子内生细菌多样性及其分泌植物生长素能力的测定. *微生物学报*, 2013, 53(3): 269–275.  
Jiang XY, Gao JS, Xu FH, Cao YH, Tang X, Zhang XX. Diversity of endophytic bacteria in rice seeds and their secretion of indole acetic acid. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(3): 269–275. (in Chinese)
- [18] 殷幼平, 李佳, 林亚玉, 陈世伟, 王中康. 柑橘黄龙病隐症寄主九里香内生细菌分离及功能鉴定. *微生物学通报*, 2012, 39(10): 1418–1427.  
Yin YP, Li J, Lin YY, Chen SW, Wang ZK. Isolation and characterization of endophytic bacteria from huanglongbing's hidden host plant- *Murraya paniculate*. *Microbiology China*, 2012, 39(10): 1418–1427. (in Chinese)
- [19] 张鑫. 乌头内生菌 *Herbaspirillum* sp. Aconite 5-28 的分离鉴定及其基因组学研究. 陕西师范大学硕士学位论文, 2015.

- [20] 张礼, 童文君, 薛庆云, 丁小余. 细茎石斛内生和根围细菌多样性及促生能力分析. *植物资源与环境学报*, 2015, 24(3): 32–40.  
Zhang L, Tong WJ, Xue QY, Ding XY. Analyses on diversity and plant-growth-promoting ability of endophytic and rhizosphere bacteria of *Dendrobium moniliforme*. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2015, 24(3): 32–40. (in Chinese)
- [21] 赵龙飞, 徐亚军, 邓振山, 赖心河, 周金源, 马素珍, 符可, 周璞, 朱艳芳. 拮抗棉花枯萎病菌的地黄内生细菌筛选、鉴定和促生潜能. *微生物学报*, 2021, 61(8): 2338–2357.  
Zhao LF, Xu YJ, Deng ZS, Lai XH, Zhou JY, Ma SZ, Fu K, Zhou P, Zhu YF. Screening, identification and growth-promoting of antagonistic endophytic bacteria associated with *Rehmannia glutinosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(8): 2338–2357. (in Chinese)
- [22] 姜云, 田磊, 陈长卿, 张冠军, 李桐, 陈京秀, 王雪. 一株人参内生生产吲哚乙酸细菌的筛选及鉴定. *中国中药杂志*, 2015, 40(2): 213–217.  
Jiang Y, Tian L, Chen CQ, Zhang GJ, Li T, Chen JX, Wang X. Screening and identification of indoleacetic acid producing endophytic bacterium in *Panax ginseng*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40(2): 213–217. (in Chinese)
- [23] 李淑彬, 黄娟, 周仁超, 李泽恩, 徐诗如, 阮婷, 庞启华. 南药植物高良姜内生细菌多样性及其促生潜力. *生态学报*, 2015, 35(10): 3204–3213.  
Li SB, Huang J, Zhou RC, Li ZE, Xu SR, Ruan T, Pang QH. Diversity and plant growth-promoting potential of bacterial endophytes of *Alpinia Officinarum Hance*, a famous south-China medicinal plant. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(10): 3204–3213. (in Chinese)
- [24] Bhise KK, Bhagwat PK, Dandge PB. Synergistic effect of *Chryseobacterium gleum* sp. SUK with ACC deaminase activity in alleviation of salt stress and plant growth promotion in triticum aestivum L.. 3 *Biotech*, 2017, 7(2): 1–13.
- [25] 李剑峰, 杨鑫, 张淑卿, 杜建雄, 刘健. 2种植物内生固氮菌对燕麦种子萌发及幼苗生长的效果. *西南农业学报*, 2015, 28(6): 2465–2468.  
Li JF, Yang X, Zhang SQ, Du JX, Liu J. Effects of two endophytic diazotrophs (*Klebsiella oxytoca* Msp2c and *Pseudomonas fluorescence* LM531) on seed germination and seedling growth in *Avena sativa*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 28(6): 2465–2468. (in Chinese)
- [26] Das SN, Dutta S, Kondreddy A, Chilukoti N, Pullabhotla SVSRN, Vadlamudi S, Podile AR. Plant growth-promoting chitinolytic *Paenibacillus elgii* responds positively to tobacco root exudates. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2010, 29(4): 409–418.
- [27] Walia A, Mehta P, Chauhan A, Shirkot CK. Effect of *Bacillus subtilis* strain CKT1 as inoculum on growth of tomato seedlings under net house conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 2014, 84(1): 145–155.
- [28] Karnwal A. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology*, 2009, 91(1): 61–63.8.
- [29] Kim YC, Leveau J, McSpadden Gardener BB, Pierson EA, Pierson LS, Ryu CM. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1548–1555.
- [30] Duangpaeng A, Phetcharat P, Chanthapho S, Boonkantong N, Okuda N. The study and development of endophytic bacteria for enhancing organic rice growth. *Procedia Engineering*, 2012, 32: 172–176.
- [31] Schweizer P, Schlagenhauf E, Schaffrath U, Dudler R. Different patterns of host genes are induced in rice by *Pseudomonas syringae*, a biological inducer of resistance, and the chemical inducer benzothiadiazole (BTH). *European Journal of Plant Pathology*, 1999, 105(7): 659–665.
- [32] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(3): 115–125.
- [33] 李梦娇, 彭晟, 徐绍忠, 余代宏, 赵明富, 文国松. 克雷伯氏菌在农业与环境治理上的应用. *生物技术进展*, 2014, 4(6): 415–420.  
Li MJ, Peng S, Xu SZ, Yu DH, Zhao MF, Wen GS. Application of *Klebsiella* spp. in agriculture and environmental management. *Current Biotechnology*, 2014, 4(6): 415–420. (in Chinese)
- [34] 宁倩, 吴金水, 李宝珍, 吴蔓莉. 水稻苗期生长特性对不同浓度 IAA 的响应. *农业现代化研究*, 2013, 34(2): 235–238.  
Ning Q, Wu JS, Li BZ, Wu ML. Response of growth characteristics to different IAA concentrations in rice seedling. *Research of Agricultural Modernization*, 2013, 34(2): 235–238. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)