

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201506007

冯瑞章, 周浩均, 魏琴, 等. 油樟内生溶磷菌的筛选及其生物学特性 [J]. 广西植物, 2016, 36(11):1396–1402

FENG RZ, ZHOU GJ, WEI Q, et al. Screening and characterization of phosphate dissolving endophytic bacteria from *Cinnamomum longepaniculatum* [J]. Guihaia, 2016, 36(11):1396–1402

油樟内生溶磷菌的筛选及其生物学特性

冯瑞章¹, 周浩均², 魏 琴¹, 周万海^{1*}, 范轶玲¹, 秦 欢¹

(1. 宜宾学院生命科学与食品工程学院 香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室, 四川 宜宾 644000; 2. 四川省高县月江森林经营所, 四川 宜宾 645152)

摘 要: 筛选具有溶磷能力的植物内生细菌,并探索该类菌的促生和抗逆性能,有助于扩大溶磷微生物来源、研发微生物肥料、改善土壤磷素营养和提高农业产量。该研究以从油樟组织中分离得到的 50 株内生细菌为材料,通过溶磷圈法初筛得到 24 株具有溶磷潜能的菌株,利用钼蓝比色法测定它们的溶磷能力和培养液的 pH 值,并研究溶磷能力较强菌株产生吲哚乙酸(IAA)、铁载体、1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶、几丁质酶等促生和抗逆性能。结果表明:24 株油樟内生细菌都能从磷酸钙中释放出有效磷(溶磷量为 $51.26 \sim 237.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),其中, YG60、YG43、YG36、YG25、YG49、YG44 株菌的溶磷量较高,均大于 $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。接种油樟内生菌后,培养液的 pH 值均有一定程度的降低,但菌株溶磷量与培养液 pH 值间不存在显著相关性。6 株溶磷量大于 $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌株大部分具有分泌 IAA、产铁载体、ACC 脱氨酶活性和几丁质酶活性的能力;其中 YG43、YG60 和 YG25 分泌 IAA 的能力较强(IAA 分泌量分别为 22.55 、 18.75 和 $16.41 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), YG43 和 YG60 产铁载体的能力较强(As/Ar 小于 0.6), YG43、YG60 和 YG25 的 ACC 脱氨酶活性(分别为 0.194 、 0.224 、 $0.208 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$)较高, YG43 和 YG60 的几丁质酶活性(分别为 2.968 U 和 2.502 U)较高。综合菌株的溶磷、促生和抗逆性能,认为 YG43、YG60 和 YG25 菌株在促进植物生长、提高植物抗性、生物防治方面具有较好的应用前景。

关键词: 溶磷内生菌, 溶磷能力, IAA, 铁载体, ACC 脱氨酶, 几丁质酶

中图分类号: Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2016)11-1396-07

Screening and characterization of phosphate dissolving endophytic bacteria from *Cinnamomum longepaniculatum*

FENG Rui-Zhang¹, ZHOU Gao-Jun², WEI Qin¹,
ZHOU Wan-Hai^{1*}, FAN Yi-Ling¹, QIN Huan¹

(1. Key Lab of Aromatic Plant Resources Exploitation and Utilization in Sichuan Higher Education, College of Life Sciences & Food Engineering, Yibin University, Yibin 644000, Sichuan, China; 2. Gao County Yuejiang Forest Management Station, Yibin 645152, Sichuan, China)

Abstract: Screening endophytic strains with phosphate-dissolving and exploring the characterization of growth promoting and resistance were conducive to broad the phosphate dissolving microbial resources, to develop microbial fertiliz-

收稿日期: 2015-09-10 修回日期: 2015-12-09

基金项目: 宜宾市科技创新专项(2012ZNY006); 四川省大学生创新创业训练计划项目(20151064b17); 四川省高校科研创新团队项目(14TD0031); 四川省青年科技创新研究团队培育计划项目(2011JTD0035) [Supported by Program for Science and Technology Bureau of Yibin City (2012ZNY006); Training Programs of Innovation and Entrepreneurship Undergraduates in Sichuan Province (201510641017); Scientific Research Fund of Sichuan Provincial Education Department (14TD0031); Sichuan Youth Science and Technology Innovation Teams (2011JTD0035)]。

作者简介: 冯瑞章(1978-), 女, 甘肃武威人, 博士, 副教授, 研究方向为微生物资源开发利用, (E-mail) ruizhangfeng@126.com。

* **通讯作者:** 周万海, 博士, 副教授, 主要从事农业资源环境研究, (E-mail) wanhaizhou@126.com。

ers, to improve soil phosphorus nutritious and to increase agricultural yield. We isolated 50 endophytic bacteria from interior tissues of *Cinnamomum longepaniculatum*, and 24 phosphate dissolving endophytic bacteria strains were screened using phosphate solubilizing zone (PKO) inorganic culture medium, subsequently, the capacity of dissolving phosphorus of 24 strains were determined by phosphor-molybdate blue color methods, and the characteristics benefited to plant-microbe interaction-indoleacetic acid (IAA), siderophore, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase (ACC) and chitinase activities were also evaluated. The results showed that 24 strains could release phosphate from tricalcium phosphate with the range of dissolving phosphate from $51.26 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $237.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the maximum phosphate content in the solution was obtained with strain YG60. Among 24 strains, 6 strains (YG60, YG43, YG36, YG25, YG49, YG44) showed the higher phosphate solubilization capacity (237.08 , 211.53 , 180.68 , 166.85 , 151.28 , $150.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively). Furthermore, 24 strains could decrease the pH of the medium with the pH value range from 4.5 to 5.5, and the relationship between pH and phosphorus solubilization was also discussed; however, there were no close relationship between them. The further experimental results showed that most of the 6 strains with higher phosphate dissolving capacity had the ability to produce IAA and siderophores, and had ACC deaminase and chitinase activity. Among them, YG43, YG60 and YG25 possessed higher IAA producing capacity (22.55 , 18.75 and $16.41 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively); YG43 and YG60 possessed higher siderophores of $\text{As}/\text{Ar} < 0.6$ (0.459 , 0.579 respectively); YG43, YG60 and YG25 had strong ACC deaminase activity (0.194 , 0.224 , $0.208 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), YG43 and YG60 had strong chitinase activity (2.968 U , 2.502 U). In terms of all the properties of dissolving phosphate, secreting IAA, siderophores, ACC deaminase and chitinase, strains YG43, YG60 and YG25 isolated from interior tissues of *C. longepaniculatum* have abundant biological characteristics related to plant growth promotion, stress homeostasis regulation and biocontrol activity. They are possible to be further developed as excellent strains for application.

Key words: phosphate-dissolving endophytic bacteria, capacity of dissolving phosphorus, IAA, siderophores, ACC deaminase, chitinase

磷是植物生长发育所必需营养元素之一,植物缺磷直接影响植物的生长和作物的产量。目前,我国有 74% 的耕地土壤缺磷。化学磷肥的施加虽然能够改善植物磷素营养,但由于磷在土壤中的固定导致磷肥当季利用率较低(黄静等,2010)。在我国南方的红、黄壤中缺磷现象更为严重(王同等,2014)。研究表明接种溶磷微生物能提高植物磷素营养(Illmer & Schinner, 1992)。但是,由于受到土著微生物、土壤环境等因素的影响,土壤中溶磷微生物难以成功定殖,导致其应用效果不稳定(Reyes et al, 2006; 黄静等, 2010)。

内生菌作为植物植株整个微生态系统的重要组成部分,具有固氮、增强植物抗逆性、抗病虫害及促进植物生长等多种作用(黄静等, 2010); 同时大多数植物内生菌属兼性内生,它们不仅存在于植物体内,而且也常见于根际土壤等环境中(Lodewyckx et al, 2002)。油樟(*Cinnamomum longepaniculatum*)为樟科(Lauraceae)樟属(*Cinnamomum*)的常绿乔木,也是重要的经济作物,其根、茎、叶、种子均可作为提取芳香油的原料。调查显示,油樟本身几乎不发生

植物病害,亦有研究表明油樟油对水稻稻瘟病菌等 6 种植物病原真菌的菌丝生长、孢子萌发有强烈的抑制作用(魏琴等, 2006), 这些特性可能与内生菌参与构成油樟植株内部微生态环境有关(游玲等, 2009)。因此,以油樟为材料,对其组织内的溶磷细菌进行分离筛选,利用内生细菌的兼性特性,既可使这些微生物定殖于植物体内发挥促生和防病效应,也可使其定殖于植物根际土壤中发挥溶磷功能,为植物生长提供磷素营养,从而促进植物生长。

本研究以 50 株油樟内生细菌为材料,筛选具溶磷能力的菌株,研究其溶磷能力和生物学特性,为植物内生菌在提高植物磷素营养、促进植物生长等方面的利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株为分离自油樟(*Cinnamomum longepaniculatum*)组织中的 50 株内生细菌,于宜宾学院香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 油樟内生溶磷菌株筛选

1.2.1.1 内生溶磷菌株初选 将供试菌株活化后点接种至固体 PKO 培养基上,每株菌重复 4 次,28 ℃ 培养 7 d,观察能否有溶磷圈生成,测定各菌株的溶磷圈直径和菌落直径,分别以 D、d 表示,根据菌株是否产生溶磷圈初步判定该菌株有无溶磷潜能。

1.2.1.2 油樟内生溶磷菌株摇瓶复选 将 50 mL PKO 液体培养基置于 150 mL 三角瓶,121 ℃,1.01 P 条件高压灭菌 25 min,备用。将 LB 斜面培养基上生长 24 h 的供试菌株制成菌数约为 10^8 cell · mL⁻¹ 菌悬液,按菌悬液与培养基 1 : 50 比例接种,不接菌作为对照,每株菌重复 3 次,28 ℃、160 r · min⁻¹ 摇床培养 8 d,4 ℃、10 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,取一定量的上清液,测其有效磷含量和 pH 值,有效磷含量即为菌株的溶磷量。有效磷含量用钼锑抗比色法测定,菌株溶磷量为扣除不接种对照的值 ($\mu\text{g P} \cdot \text{mL}^{-1}$);pH 值用酸度计测定。

1.2.2 油樟内生溶磷菌株分泌 IAA 能力

1.2.2.1 定性测定 将筛选出的溶磷效果较好的菌株接种于盛有 15 mL King 液体培养基的试管中,28 ℃、160 r · min⁻¹ 摇床培养 8 d,每株菌重复 3 次。药品选择和配置方法参考李振东等(2010)。分别取各菌株培养液 50 μL 滴置于白色的陶瓷板上,加入 50 μL PC 比色液。以在比色液上加等量 50 mg · L⁻¹ 生长素(IAA),不加菌株培养液作为对照。室温条件下 15 min 内观察颜色变化,颜色变为粉红色表示可以分泌 IAA,颜色越深表示分泌 IAA 浓度越大,不变色则表示不能分泌 IAA。

1.2.2.2 定量测定 采用 Glickmann et al (1995) 的 Salkowski 比色法:配置 2.5 mg · mL⁻¹ 的色氨酸溶液过滤除菌,取 1 mL 加入 4 mL 已高压灭菌的 LB 液体培养基中,使色氨酸浓度达到 0.5 mg · mL⁻¹,分别接种各供试菌株,28 ℃、160 r · min⁻¹ 摇床培养 3 d,4 ℃、10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液 1 mL,加入 50 μL 的 10 mmol · L⁻¹ 正磷酸,加入 2 mL Salkowski's 显色剂,黑暗条件(25 ℃)显色 30 min,测定 530 nm 下的吸光值。以蒸馏水为对照调零,配制不同浓度的 IAA 作标准曲线,计算培养液的 IAA 浓度,以 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 表示。

1.2.3 油樟内生溶磷菌株产铁载体能力的测定

1.2.3.1 定性筛选 将筛选出的溶磷效果较好的菌株分别接种于铬天青(chromea zural S, CAS) 平板

培养基上,28 ℃ 培养 2 d 后观察是否有橙红色显色圈出现,并测量显色圈大小。

1.2.3.2 定量测定 将产生橙红色显色圈的菌株分别接种于 MKB 培养液和富铁培养液中,28 ℃、160 r · min⁻¹ 摇床培养 24 h,接种 1 mL 发酵液于 MKB 和富铁培养液中,28 ℃、160 r · min⁻¹ 摇床培养 36 h,4 ℃、10 000 r · min⁻¹ 下离心 10 min,即可得到铁载体上清液和其无铁载体对照的上清液,备用。取铁载体上清液于洁净的试管中,加入相同体积 CAS 检测液,充分混匀,于 630 nm 波长下测定吸光值,以 A_s 表示,取双蒸水作为对照调零;另取相同体积的富铁培养液(对照液)与 CAS 检测液反应,于 630 nm 波长下测定吸光值,以 A_r 表示,计算 A_s 与 A_r 的比值(A_s/A_r),参照 Machuca & Milagres(2003)的标准和方法检测各菌株产铁载体的能力。

1.2.4 油樟内生溶磷菌株 ACC 脱氨酶能力的测定

1.2.4.1 定性测定 参考 Penrose & Glick(2003)的方法,分别接种各供试菌株于 5 mL 的无氮液体培养基中,28 ℃、160 r · min⁻¹ 摇床培养 24 h;接种上述培养液 0.1 mL 于 5 mL DF 液体培养基中,28 ℃、160 r · min⁻¹ 摇床培养 24 h;接种 0.1 mL 培养液于 5 mL ADF 液体培养基中,28 ℃、160 r · min⁻¹ 摇床培养 24~48 h,以不接种菌株的 ADF 培养基为对照;将 ADF 培养基中的生长菌株重复转接和培养 3 次,能够生长的菌株为 ACC 脱氨酶阳性菌株。

1.2.4.2 定量测定 参照 Seleh et al(2001)的方法,每分钟形成 1 mol 丁酮酸的量为 1 个酶活力单位。采用 Bradford 法测定蛋白质,标准蛋白为牛血清白蛋白。酶活力的计算参照黄盖等(2013)的方法,酶活力用 U · mg⁻¹ 表示。

1.2.5 油樟内生溶磷菌株产几丁质酶的测定

1.2.5.1 定性测定 分别接种各供试菌株于几丁质平板培养基上,37 ℃ 培养 3~5 d,观察菌落周围是否有透明圈产生,有则表明该株菌有产几丁质的能力,反之则没有。

1.2.5.2 定量测定 酶活性测定采用 DNS 法,分别接种各供试菌株于几丁质液体培养基中,28 ℃、160 r · min⁻¹ 摇床培养 8 d,4 ℃、10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,将 0.5 mL 发酵液和 0.5 mL 胶体几丁质混合,37 ℃ 水浴 30 min,煮沸 10 min,4 000 r · min⁻¹ 离心 5 min。取 0.5 mL 上清液加入 0.5 mL DNS,煮沸 5 min 迅速冷却后加入蒸馏水 4 mL,测定 540 nm 下的吸光值。根据 N-乙酰氨基葡萄糖标准曲线计算还原

糖含量。一个几丁质酶活力单位定义为每分钟(37℃)产生1 μmol N-乙酰氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量,以 U 表示。

2 结果与分析

2.1 内生溶磷菌株筛选及溶磷能力

通过溶磷圈法对前期分离纯化得到的 50 株油樟内生细菌进行初筛,发现菌株在 PKO 固体培养基上产生的透明圈差距较大。如表 1 所示,培养 7 d 后,D/d>3 的细菌有 6 株(菌株 YG43 的 D/d 值最大,为 3.84),占供试菌株数量的 12%, 2.5<D/d<3、2<D/d<2.5 和 1.5<D/d<2 的细菌有分别有 11 株、7 株和 15 株,其余 9 株细菌的 D/d 均小于 1.5 或者溶磷圈不明显。D/d 值是表征菌株相对溶磷能力的一个指标,因此,初步筛选 D/d>2 的 24 株细菌通过液体培养研究它们的溶磷能力,另外 26 个菌株,则侧重研究其它方面的性能。

表 1 不同 D/d 值菌株分布

Table 1 Distribution of strains with different D/d values		
D/d 值 D/d Value	菌株数 Strain number	菌株编号 Code of strains
D/d>3	6	YY1、YG32、YG36、YG43、YG44、YG60
2.5<D/d<3	11	XY8、YG2、YG10、YG21、YG25、YG30、YG35、YG41、YG49、YG55、YG58
2<D/d<2.5	7	YG6、YG7、YG9、YG23、YG46、YG51、YG61
1.5<D/d<2	15	XY6、YY7、YG1、YG3、YG4、YG18、YG20、YG31、YG33、YG34、YG39、YG40、YG48、YG56、YG65
D/d<1.5	9	YY5、YG8、YY11、YG12、YG15、YG24、YG31、YG50、YG66

将初选得到的 24 株菌分别液体培养 8 d 后,测定其上清液可溶性磷含量,由表 2 可知,菌株对磷酸钙的溶解能力存在较大差异,供试菌株的溶磷量在 51.26~237.08 μg · mL⁻¹之间,其中大于 200.00 μg · mL⁻¹的有 2 株菌,150~200 μg · mL⁻¹的有 4 株菌,100~150 μg · mL⁻¹的有 10 株菌,分别占供试菌株的 8.33%、16.67%和 41.67%。菌株 YG60 的溶磷量最大,为 237.08 μg · mL⁻¹,是溶磷量最小菌株 YG33 (51.26 μg · mL⁻¹) 的 4.62 倍。此外,从各菌株的溶磷能力定性与定量结果可知,对油樟内生菌株而言,

并非定性测定的 D/d 值越大,定量测定的溶磷量就越大,如 YY1 和 YG60 的 D/d 值均大于 3,溶磷量却分别为 237.08 μg · mL⁻¹和 61.75 μg · mL⁻¹,前者是后者的 3.84 倍。因此,固体平板培养只可对供试菌株是否具有溶磷能力作初步定性判断,而液体培养测定的菌株溶磷能力在理论上更准确。此外,各菌株在 PKO 培养基上生长 8 d 后,其培养液的 pH 值均较接种前明显下降,各菌株培养液的 pH 值介于 4.5~5.5,下降最大的为 YG9,pH 值下降为 4.4。

表 2 菌株的溶磷量和培养液的 pH 值

Table 2 Available phosphorus and pH value of phosphate-solubilizing endophytic bacteria

菌株 Strain	溶磷量 Available phosphorus (μg · mL ⁻¹)	pH 值 pH value	菌株 Strain	溶磷量 Available phosphorus (μg · mL ⁻¹)	pH 值 pH value
YG60	237.08 ± 7.45	4.9	YG38	125.63 ± 6.93	5.0
YG43	211.53 ± 12.39	4.6	YG30	113.80 ± 9.25	5.3
YG36	180.68 ± 13.17	5.2	YG23	108.63 ± 8.15	5.1
YG25	166.85 ± 11.21	5.5	YG6	104.28 ± 6.12	5.4
YG49	151.28 ± 7.41	4.6	YG9	96.23 ± 4.31	4.4
YG44	150.20 ± 5.23	4.6	YG61	91.60 ± 10.75	5.3
YG2	145.90 ± 8.49	4.8	YG18	83.50 ± 5.82	4.7
YG32	143.30 ± 10.27	5.1	YY7	69.36 ± 8.58	5.2
XY8	139.30 ± 8.40	5.4	YG4	67.11 ± 6.40	7.0
YG46	137.00 ± 9.29	5.2	YY1	61.75 ± 3.23	5.8
YG35	135.45 ± 10.57	5.1	YG57	55.15 ± 5.11	6.0
YG7	126.74 ± 7.82	4.9	YG33	51.26 ± 4.34	5.3

为进一步发掘油樟溶磷内生菌的功能,选择溶磷量大于 150 μg · mL⁻¹的 6 株菌(分别为 YG60、YG43、YG36、YG25、YG49、YG44)研究其生物学特性。

2.2 内生菌分泌 IAA 性能分析

油樟内生细菌分泌 IAA 能力的定性显色反应结果表明(表 3)。6 株供试菌株不但具有较高的溶解难溶性磷的能力,同时均具有分泌生长素的功能, YG43 的显色反应为深红色, YG60、YG25 和 YG44 菌株呈粉红色, YG49 和 YG36 呈浅粉红色。定量测定结果表明各菌株分泌 IAA 量在 4.92~22.55 μg · mL⁻¹之间,其中分泌 IAA 量超过 20 μg · mL⁻¹的有 1 株(YG43,22.55 μg · mL⁻¹),超过 10 μg · mL⁻¹

表 3 菌株分泌 IAA 和产铁载体的性能
Table 3 IAA and siderophore producing ability of
phosphate solubilizing endophytic bacteria

菌株 Strain	IAA 含量 Content of IAA		铁载体 Siderophore	
	显色反应 ¹ Spot test	IAA 值 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) IAA value	定性检测 ² Qualitative analysis	定量检测 (As/Ar) Quantitative analysis
YG43	+++	22.55 ± 2.21	+++	0.579 ± 0.0334
YG60	++	18.75 ± 1.97	+++	0.459 ± 0.0479
YG25	++	16.41 ± 2.01	++	0.699 ± 0.0298
YG44	+	9.68 ± 1.17	+	0.847 ± 0.0641
YG49	+	7.67 ± 1.39	-	-
YG36	+	4.92 ± 0.84	+	0.821 ± 0.3957

注: 1. +++, ++, + 分别表示深粉红色、粉红色和浅粉色; 2. +++, ++, +, - 分别表示橙黄色晕圈较大、中等、较小和没有。
Note: 1. +++, ++, +, - means deep pink, pink and light pink respectively; 2. +++, ++, +, - means larger, moderate, small and without orange-red hole respectively.

的有 2 株 (YG60、YG25, IAA 分泌量分别为 $18.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $16.41 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 其余 3 株的 IAA 分泌量均低于 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量测定与定性测定结果相对一致。

2.3 内生菌产铁载体能力分析

将 6 株油樟内生细菌接种于 CAS 平板上培养 2 d 后, 检测到除 YG49 之外的其它 5 菌株 (YG43、YG60、YG25、YG44、YG36) 的菌落周围均出现橙黄色晕圈, 说明这些菌株在 CAS 培养基上产生了铁载体, 其中 YG43、YG60 和 YG25 菌落周围形成的橙红色晕圈较大, 表明这 3 株菌能够产生较多的铁载体。定量检测铁载体的方法以 As 与 Ar 的比值 (As/Ar, Ar 为对照吸光值) 大小比较不同菌株产生铁载体的能力, As/Ar 值越小, 说明菌株产铁载体的能力越强。由表 3 可知, YG43 和 YG60 的 As/Ar 值小于 0.6, 分别为 0.579 和 0.458, 说明这 2 株菌产生铁载体的能力较强; YG25 的 As/Ar 值为 0.694, 说明产铁载体的能力中等; YG44 和 YG36 的 As/Ar 值均大于 0.8, 说明这 2 株菌能产生铁载体, 但产铁载体能力较弱。

2.4 内生菌产脱氨酶 (ACC) 能力分析

将溶磷能力较高的 6 株油樟内生细菌接种于 SMA 固体培养基后的 ACC 脱氨酶活性定性筛选实验结果表明 (表 4), 经 5 次传代后 YG49 不能正常

生长, 其它 5 株菌 (YG60、YG43、YG36、YG25、YG44) 均能够在 SMA 固体培养基上正常生长, 说明除 YG49 外, 其它菌株都具有 ACC 脱氨酶活性。定量检测结果显示 (表 4), 各菌株的 ACC 脱氨酶活性大小顺序为 $\text{YG60} > \text{YG25} > \text{YG43} > \text{YG36} > \text{YG44}$, 酶活大小介于 $0.052 \sim 0.224 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; YG49 无产 ACC 脱氨酶能力。

2.5 内生菌产几丁质酶能力

将 6 株油樟内生溶磷细菌接种于产几丁质酶的固体平板上培养 7 d, 发现均有明显的透明圈产生, 说明供试菌株皆有一定的产几丁质酶的能力, 但各菌株的透明圈差异较大, 透明圈直径 (D) 与菌落直径 (d) 的比值 (D/d) 介于 $1.59 \sim 3.12$ 。通过液体培养定量测定供试菌株的几丁质酶活性的结果表明 (表 4), 各菌株的几丁质酶活性大小顺序为 $\text{YG60} > \text{YG25} > \text{YG43} > \text{YG36} > \text{YG44} > \text{YG49}$, 酶活大小介于 $0.618 \sim 2.968 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

表 4 菌株 ACC 脱氨酶活性和几丁质酶活性
Table 4 ACC deaminase activity and chitosanase
activity of phosphate solubilizing endophytic bacteria

菌株 Strain	ACC 脱氨酶 ACC deaminase		几丁质酶 Chitosanase	
	定性检测 Qualitative analysis	ACC 脱氨酶活性 ACC deaminase activity ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	D/d 值 D/d value	几丁质酶 活性 Chitosanase activity (U)
YG43	+	0.194 ± 0.017	3.12	2.968 ± 0.314
YG60	+	0.224 ± 0.023	2.43	2.502 ± 0.23
YG25	+	0.208 ± 0.009	1.59	0.618 ± 0.179
YG44	+	0.052 ± 0.011	1.87	1.972 ± 0.157
YG49	-	-	2.01	1.428 ± 0.169
YG36	+	0.081 ± 0.014	2.35	1.624 ± 0.201

注: +, 阳性; -, 阴性。
Note: +, positive; -, negative.

3 讨论与结论

植物内生细菌因其对宿主的多种有益的生物学作用, 逐渐成为国内外学者研究的热点。作为我国特有的天然产芳香油植物, 可经高温蒸馏从油樟 (*Cinnamomum longepaniculatum*) 叶片中提取几十种不同沸点的化学物质, 这些物质精加工后的产物均是国防、医药、轻工等方面重要的稀有原料。具有溶

磷能力的油樟内生促生细菌的筛选及促生、抗逆等生物学特性的研究,对溶磷微生物资源收集,植物内生细菌与宿主相互作用机制的理解及土壤磷素营养改善途径的开发都具有重要意义(黄静等,2010)。

本研究从油樟内生细菌中初筛到 24 株具有溶磷潜能的菌株,液体培养结果显示,溶磷量大于 $200.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌株有 2 株, $150 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌株有 4 株,黄静等(2010)从玉米叶中分离的内生细菌溶磷量高达 $537.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,姚玉玲等(2014)从矮生嵩草中分离的内生细菌溶磷量为 $60.52 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,说明油樟内生细菌对无机磷的溶解能力较强。微生物在溶磷过程中会分泌如甲酸、草酸、苹果酸等在内的各类有机酸,这些酸类物质既可降低培养基质的 pH 又能与钙、铁、铝等离子形成螯合物从而使难溶性磷酸盐溶解(Rashid et al,2004)。本研究中 24 株菌在 PKO 培养基上生长 8 d 后,其培养液的 pH 值较接种前均有明显下降,但菌株溶磷量与培养液 pH 值之间无显著线性关系($P > 0.05$)。表明内生溶磷细菌在培养期间,介质的酸度有一定降低,但培养液中的有机酸含量及种类、磷酸酶活性及产生多糖等的动态变化,均会对菌株的溶磷能力产生影响(李显刚等,2012)。

植物内生菌可通过自身合成或者促进植物合成如生长素(IAA)、赤霉素(GA)、细胞分裂素(CTKs)、脱落酸(ABA)和乙烯等植物生长激素促进植物体的生长发育,其中生长素(IAA)是最活跃的成分(杨波等,2013)。一定浓度的 IAA 既可直接促进植物生长,又能通过增加细胞的体积和质量、改变细胞的内环境达到促生的目的(李显刚等,2012)。本研究发现,6 株溶磷能力较强的油樟内生细菌均具有分泌生长素的功能,且 3 株分泌 IAA 的能力较强(YG43、YG60 和 YG25),这一结果对油樟内生细菌作为促生菌促进植物生长开辟了新的途径。

铁载体的产生是植物内生细菌促进宿主生长发育的另一条重要途径,植物内生微生物或者植物根际通过分泌产生多种对铁具有高亲和力的铁载体,铁载体可将 Fe^{3+} 还原为植物体可以高效吸收和利用的 Fe^{2+} ,溶解和结合土壤中的铁元素供植物细胞利用;同时微生物产生的铁载体通过与植物根际的病原微生物争夺有限的铁营养,抑制病原微生物的生长和繁殖,从而起到生物防治作用(Buyer et al,1993)。目前还无可作为各类微生物铁载体的标品用于其标准曲线的测定,因此,国际上通用 As/Ar

值作为微生物铁载体定量检测的指标(何苗等,2011)。本研究中,5 株油樟内生细菌能够产生铁载体,且 YG43 和 YG60 的 As/Ar 值小于 0.6,产铁载体的能力较强。因此,产铁载体可能是油樟内生细菌的促生机理之一。

ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate,1-氨基环丙烷-1-羧酸)脱氨酶是许多植物促生细菌(Plant growth promoting bacteria,PGPB)共有的一个特征性酶,具有该种酶活性的内生细菌和植物根际对促进植物生长发育、提高植物抗高低温、盐、旱、涝、及重金属等各种胁迫起到重要作用(Iniguez et al,2004)。黄盖等(2013)从苜蓿根际分离的 ACC 30 菌株的酶活力为 $0.217 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,该菌株能够促进苜蓿根的伸长。本研究中除 YG49 外,其它 5 株菌均具有 ACC 脱氨酶活性,且 YG49、YG60 和 YG25 的酶活力在 $0.2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 左右。因此,油樟内生细菌具有极大的促生、抗逆潜能。

几丁质酶水解真菌细胞壁几丁质产生的中间产物几丁寡糖可以作为植物功能调节剂,刺激植物生长,诱导植物产生防御反应,从而提高植物的抗病性(郭玉莲,2005)。此外,几丁质酶与 β -1,3-葡聚糖酶、其它 PRP 等防卫蛋白存在协同作用,可以增大作用范围,从而提高抑菌效果。本研究中的 6 株油樟内生细菌皆有较高的产几丁质酶的能力,酶活大小介于 $0.618 \sim 2.968 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,这些内生细菌产生的几丁质酶对植物病虫害的入侵和感染起到重要的防治作用(Barboza-Corona et al,2009),这也可能是油樟生长中几乎不发生植物病、虫害的原因之一。研究表明,真菌和细菌的几丁质酶活性最高,细菌对真菌的抑制作用上最强(陈三凤和李季伦,1994),因此,本研究可丰富几丁质酶产生菌及生防菌资源。

通过溶磷圈法和液体培养法从 50 株油樟内生细菌中筛选到 6 株(YG60、YG43、YG36、YG25、YG49、YG44)溶磷能力较强的菌株,综合各菌株的溶磷、促生和抗逆性能,认为 YG43、YG60 和 YG25 菌株在促进植物生长、提高植物抗性及生物防治方面具有较好的应用前景。

参考文献:

- BARBOZA-CORONA JE, ORTIZ-RODRIGUEZ T, FUENTE-SALCIDO N, et al, 2009. Hyperproduction of chitinase influences crystal toxin synthesis and sporulation of [J]. Anton Leeuwenhoek, 96(1):31-42.
- BUYER JS, KRATZKE MG, SIKORA LJ, 1993. A method for de-

- tection of pseudobactin, the siderophore produced by a plant-growthpromoting *Pseudomonas* strain, in the barley rhizosphere [J]. *Appl Environ Microbiol*, 59(3): 677-681.
- CHEN SF, LI JL, 1994. Purification and properties of Chitinase from *Flavobacterium* sp. [J]. *Acta Microbiol Sin*, 34(1): 14-19. [陈三凤, 李季伦, 1994. 黄杆菌(*Flavobacterium* sp)几丁质酶的纯化和性质 [J]. *微生物学报*, 34(1): 14-19.]
- GLICKMANN E, DESSAUX Y, 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 61(2): 793-796.
- GUO YL, 2005. Chitinase and its effects on plant disease prevention [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 21(1): 283-285. [郭玉莲, 2005. 微生物几丁质酶及其在植物病害防治中的作用 [J]. *中国农学通报*, 21(1): 283-285.]
- HE M, HUANG Y, WANG J, et al, 2011. Isolation, characterization and mutation breeding of siderophore-producing bacterium MX-26 of peach rhizosphere [J]. *Acta Phytophyl Sin*, 38(5): 432-436. [何苗, 黄云, 王靖, 等, 2011. 桃树根际铁载体产生菌 MX-26 的分离鉴定及诱变选育 [J]. *植物保护学报*, 38(5): 432-436.]
- HUANG G, GAO H, WANG C, et al, 2013. ACC 30 strain with ACC deaminase activity: its isolation, identification and growth-promoting effect [J]. *Microbiol Chin*, 40(5): 812-821. [黄盖, 高焱, 王琛, 等, 2013. ACC 脱氨酶活性菌株 ACC 30 的分离、鉴定及其促生作用 [J]. *微生物学通报*, 40(5): 812-821.]
- HUANG J, SHENG XF, HE LY, 2010. Biodiversity of phosphate-dissolving and plant growthpromoting endophytic bacteria of two crops [J]. *Acta Microbiol Sin*, 50(6): 710-716. [黄静, 盛下放, 何琳燕, 2010. 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 [J]. *微生物学报*, 50(6): 710-716.]
- ILLMER P, SCHINNER F, 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil [J]. *Soil Biol Biochem*, 24(4): 389-395.
- INIGUEZ AL, DONG Y, TRIPLETT EW, 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342 [J]. *Mol Plant Microb Inter*, 17(10): 1078-1085.
- LI XG, WANG XL, YAO T, et al, 2012. Characters of solubilizing phosphate, secreting IAA and organic acids of phosphorus-solubilizing bacteria from rhizosphere of *Lotus corniculatus* [J]. *Chin J Soil Sci*, 43(6): 1385-1390. [李显刚, 王小利, 姚拓, 等, 2012. 溶磷菌的溶磷、分泌 IAA 及有机酸特性研究 [J]. *土壤通报*, 43(6): 1385-1390.]
- LI ZD, CHEN XR, LI P, et al, 2010. Identification of *Polygonum viviparum* endophytic bacteria Z5 and determination of the capacity to secrete IAA and antagonistic capacity towards pathogenic fungi [J]. *Acta Pratac Sin*, 19(2): 61-68. [李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 等, 2010. 珠芽蓼内生菌 Z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定 [J]. *草业学报*, 19(2): 61-68.]
- LODEWYCKX C, VANGRONVELD J, PORTEOUS F, et al, 2002. Endophytic bacteria and their potential applications [J]. *Crc Crit Rev Plant Sci*, 21: 583-606.
- MACHUCA A, MILAGRES AMF, 2003. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus* [J]. *Lett Appl Microbiol*, (36): 177-181.
- PENROSE DM, GLICK BR, 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *Physiol Plant*, 118: 10-15.
- RASHID M, KHALIL S, AYUB N, 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions [J]. *Pakistan J Biol Sci*, 7(2): 187-196.
- REYES I, VALERY A, VALDUZ Z, 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine [J]. *Plant Soil*, 287: 69-75.
- SELEH SS, GLICK BR, 2001. Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4 [J]. *Can J Microbiol*, 47(8): 698-705.
- WANG T, KONG LY, JIAO JG, et al, 2014. Screening of phosphate-solubilizing bacteria in Red soil and their acting mechanisms [J]. *Aata Pedol Sin*, 51(2): 373-380. [王同, 孔令雅, 焦加国, 等, 2014. 红壤溶磷菌的筛选及溶磷机制 [J]. *土壤学报*, 51(2): 373-380.]
- WEI Q, LI Q, LUO Y, et al, 2006. Antifungal activity of leaf essential oil from *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 28(1): 63-66. [魏琴, 李群, 罗扬, 等, 2006. 油樟油对植物病原真菌活性的抑制作用 [J]. *中国油料作物学报*, 28(1): 63-66.]
- YANG B, CHEN Y, LI X, et al, 2013. Research progress on endophyte-promoted plant nitrogen assimilation and metabolism [J]. *Acta Ecol Sin*, 33(9): 2656-2664. [杨波, 陈晏, 李霞, 等, 2013. 植物内生菌促进宿主氮吸收与代谢研究进展 [J]. *生态学报*, 33(9): 2656-2664.]
- YAO YL, WANG Y, WANG YQ, et al, 2014. Identification of endophytic bacteria from *kobresia humilis* and determination of phosphate-solubilizing, IAA secretion and antagonistic abilities [J]. *Acta Agrest Sin*, 22(6): 1252-1257. [姚玉玲, 王颖, 王玉琴, 等, 2014. 矮生嵩草内生细菌溶磷抑菌和产 IAA 能力的测定及鉴定 [J]. *草地学报*, 22(6): 1252-1257.]
- YI T, LIAO YX, FENG YJ, 2008. Plant-endophyte interaction: growth-promoting effect of endophytes and their biofilm formation [J]. *Microbiol China*, 35(11): 1774-1780. [易婷, 缪煜轩, 冯永君, 2008. 内生菌与植物的相互作用: 促生与生物薄膜的形成 [J]. *微生物学通报*, 35(11): 1774-1780.]
- YOU L, WANG T, LI L, et al, 2009. Analyses on volatile organic compound of 78 endophytic fungi isolated from *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao ex H. W. Li [J]. *J NW A & F Univ*, 37(9): 193-198. [游玲, 王涛, 李兰, 等, 2009. 78 株油樟内生真菌发酵产物的挥发性组分分析 [J]. *西北农林科技大学学报*, 37(9): 193-198.]