文章编号:1000-7601(2025)05-0244-08 doi:10.7606/j.issn.1000-7601.2025.05.24

大豆根内耐盐碱促生细菌的分离鉴定及其促生功能研究

夏玉侨[1],荆瑞勇[1],姜 雪[1],王丽艳[1],郭永霞[1],于镇华[2],刘俊杰[2]

(1. 黑龙江八一农垦大学/农业农村部东北平原农业绿色低碳重点实验室,黑龙江 大庆 163319;
2. 中国科学院东北地理与农业生态研究所/黑土区农业生态重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150081)

摘 要:为挖掘苏打盐碱地大豆根内生细菌资源,以大庆苏打盐碱地大豆根系为材料,以组织研磨、平板划线和 PCR 测序法对大豆根内生细菌进行分离纯化鉴定,并测定其解磷、固氮、产铁载体、ACC 脱氨酶、IAA 能力、耐苏打盐碱能力;同时在浸种条件下进行大豆发芽试验。结果表明:筛选出的具有解磷、固氮、产铁载体、产 IAA、产 ACC 脱氨酶、耐受苏打盐碱(100~150 mmoL·L^{-1} $NaHCO_3$和 Na_2CO_3,摩尔比为 9∶1;pH 值 8.8)能力的 3 株内生细菌鉴定为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis* DC.24)、维氏芽孢杆菌(*Bacillus wiedmannii* DM57)、栖木假单胞菌(*Pseudomonas hibiscicola* DC-2)。发芽试验使用 3 株根内生细菌浸种处理大豆,均可显著提高大豆根尖数、根长、根表面积、根体积。在‘合丰 50’大豆品种中接种上述 3 株菌,大豆幼苗根尖数分别增加 169.7%、221.2%、172.7%,根长分别增加 52.8%、63.0%、29.8%,根体积分别增加 139.9%、125.6%、96.9%,根表面积分别增加 89.2%、83.6%、58.7%;接种于‘龙垦 310’品种,使其幼苗根尖数分别增加 758.8%、329.4%、341.1%,根长分别增加 101.1%、52.2%、50.0%,根体积分别增加 129.4%、82.3%、70.5%,根表面积分别增加 92.6%、51.2%、41.4%,表明 3 株根内生细菌具有促生功能,可作为开发苏打盐碱地微生物肥的菌种。

关键词:大豆;根内生细菌;耐盐碱;分离鉴定;促生功能

中图分类号:S565.1; S182; S482.2+92 **文献标志码**:A

Isolation and identification of endophytic salt-alkali tolerant growth-promoting bacteria from soybean roots and their growth-promoting functions

XIA Yuqiao[1], JING Ruiyong[1], JIANG Xue[1], WANG Liyan[1], GUO Yongxia[1], YU Zhenhua[2], LIU Junjie[2]

(1. *Heilongjiang Bayi Agricultural University*, *Key Laboratory of Low-carbon Green Agriculture in Northeastern Plain*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs P.R. China*, *Daqing*, *Heilongjiang* 163319, *China*;
2. *Institute of Northeast Geography and Agricultural Ecology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Key Laboratory of Agricultural Ecology in the Black Soil Region*, *Harbin*, *Heilongjiang* 150081, *China*)

Abstract: In order to explore the endophytic bacteria resources of soybean roots in soda saline-alkali land, the soybean roots in Daqing soda saline-alkali land were used as materials. The endophytic bacteria in soybean roots were isolated, purified, and identified by tissue grinding, plate streaking, and PCR sequencing, and their phosphate solubilization, nitrogen fixation, siderophore production, ACC deaminase, IAA ability, and soda saline-alkali tolerance were determined. The soybean germination test was carried out under soaking conditions. The results showed that the three screened endophytic bacteria that had the functions of phosphate solubilization, nitrogen fixation, siderophore production, plant hormone IAA production, ACC deaminase production, and tolerance to soda saline-alkali (100~150 mmoL·L^{-1} $NaHCO_3$ and Na_2CO_3, molar ratio of 9∶1; pH 8.8) were identified as *Bacil-*

收稿日期:2024-10-09 **修回日期**:2024-12-19

基金项目:中国科学院战略性先导科技专项:黑土地保护与利用科技创新工程专项(XDA28100200);黑龙江八一农垦大学三纵(基础培育)项目(ZRCPY202218)

作者简介:夏玉侨(1999-),男,辽宁岫岩人,硕士研究生,研究方向为农业生物技术。E-mail: 3111968958@qq.com

通信作者:郭永霞(1970-),女,山东青岛人,教授,博士生导师,主要从事农业生物技术研究。E-mail:guoyx@163.com

于镇华(1984-),女,黑龙江北安人,副研究员,硕士生导师,主要从事农业微生物资源开发与利用研究。E-mail:yuzhenhua@iga.ac.cn

lus siamensis DC.24, *Bacillus wiedmannii* DM57, and *Pseudomonas hibiscicola* DC-2. In the germination test, the number of root tips, root length, root surface area, and root volume of soybean were significantly increased by soaking seeds with three strains of endophytic bacteria. Inoculation of the three endophytic bacteria into the 'Hefeng 50' soybean variety resulted in an increase of 169.7%, 221.2%, and 172.7% in root tip number, 52.8%, 63.0%, and 29.8% in root length, 139.9%, 125.6%, and 96.9% in root volume, and 89.2%, 83.6%, and 58.7% in root surface area, respectively. In the 'Longken 310' variety, the number of root tips increased by 758.8%, 329.4%, and 341.1%, root length increased by 101.1%, 52.2%, and 50.0%, root volume increased by 129.4%, 82.3%, and 70.5%, and root surface area increased by 92.6%, 51.2%, and 41.4%, respectively. This indicated that the three root endophytic bacteria have growth-promoting functions and need to be developed for soda saline-alkali soil microbial fertilizer.

Keywords: soybean; root endophytic bacteria; salt-alkai tolerance; isolation and identification; growth-promoting function

植物内生细菌指在健康植株茎、叶和根等器官或组织内能长期稳定生存且对寄主无害的一类微生物[1],根内生细菌数量远远超过其他植物器官,不同寄主植物的内生细菌多样性不同[2]。植物内生细菌可以通过固氮[3]、溶磷[4]、产植物激素(IAA等)[5-6]、产 ACC 脱氨酶[7]、产铁载体[8]以及诱导植物对生物及非生物胁迫的抗性[9]来促进植物生长,可为寄主植物提供氮素、可利用的磷素和生长激素 IAA,调节乙烯水平,减少植物病原菌的致病。已研究内生细菌的作物有小麦[10]、玉米[7]、水稻[11]及大豆[12]等粮食作物,分离获得内生细菌具备开发微生物肥的潜力。

黑龙江省是我国大豆的主要种植区,而黑龙江省主要种植区是九三区域,种植区域面积是制约大豆产量的重要因素。黑龙江省松嫩平原苏打盐碱地亟待开发利用[13],而苏打盐碱地会抑制大豆的生长发育,耐盐碱细菌可缓解盐碱对大豆的胁迫效应[14]。因此挖掘耐盐碱内生细菌资源对盐碱地种植大豆提高其产量、苏打盐碱地改良具有重大意义。

本研究从苏打盐碱地种植的大豆根系中分离根内生细菌,检测根内生细菌促生和耐受苏打盐碱胁迫的功能,采用分子鉴定方法明确耐盐碱促生细菌的分类归属并探究内生细菌对大豆种子萌发的影响,为开发微生物肥提供材料与数据支撑。

1　材料与方法

1.1　供试材料

1.1.1　大豆根系组织　采样点位于黑龙江省大庆市龙凤区开荒盐碱地大豆田(125° 11′41″E, 46°34′47″N)。分别采集大豆苗期、开花结荚期、鼓粒期、成熟期的根系,每次取样时随机取 5 株完整植株,根系和植株均带回实验室,自来水冲洗根表,4°C 冰箱保存备用,2 d 内分离根系内生细菌。

1.1.2　大豆种子　供试材料为'龙垦 310'和'合丰 50'大豆品种,分别由国家杂粮中心杂粮绿色防控左豫虎团队和黑龙江八一农垦大学农学院种质资源创新团队提供。

1.2　试验方法

1.2.1　菌株的分离纯化　菌株分离纯化参照荆瑞勇等[12]方法进行,新鲜大豆根系经过 0.1%升汞浸泡灭菌 10 min 后,使用 75%乙醇浸泡 5 min,再使用无菌水清洗 4~5 次,取 200 μL 最后 1 次冲洗后的无菌水涂布于 NA 平板倒置于 30℃恒温培养箱中黑暗培养,作为空白对照。称取 1 g 已表面灭菌的大豆根部鲜组织置于灭菌的研钵中,加入灭菌的石英砂充分研磨后加入 9 mL 无菌水,吸取研磨液分别稀释 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}倍后涂于 20% NA 培养基平板上。30℃培养 7 d 后挑取单菌落,划线分离 3 次获得纯菌株,用 50%甘油于-20℃冰柜保存菌株。

1.2.2　菌株功能鉴定　菌株固氮能力鉴定:参照李艳星等[15]的方法,在阿须贝氏培养基平板上接种 2 μL 浓度 1×10^8 CFU · mL^{-1}菌悬液,30℃倒置避光培养 7 d 后观察是否长出菌落,定性观察其固氮性能,并采用乙炔还原法[16]定量检测细菌的固氮能力。

菌株解磷能力鉴定:按照 Gupta 等[17]、陈定安等[18]的方法检测无机磷和有机磷的解磷效果。即在以葡萄糖为碳源、$Ca_3(PO_4)_2$为主要成分的无机磷培养基和 $CaCO_3$、卵磷脂为主要成分的有机磷培养基平板上,分别接种 2 μL 浓度为 10^8 CFU · mL^{-1}的菌悬液,于 30℃倒置避光培养 7 d 后观察菌落周围是否有透明解磷圈,并记录透明圈和菌落直径,通过菌株溶磷圈半径:菌株半径(D/d)判断其解磷能力。其次在无机磷、有机磷液体培养基中接种 2 μL 浓度 10^8 CFU · mL^{-1}菌悬液,对照组接入等体积

灭菌后的无菌水,30℃、150 r·min^{-1}振荡培养3 d,然后将培养液于8 000 r·min^{-1}离心10 min,取上清液通过钼锑抗比色法[19]测定有效磷含量,定量检测其解磷能力。

菌株产ACC脱氨酶能力鉴定:参照Dubey等[20]的方法进行配置,以葡萄糖为碳源,加入ACC使终浓度为3 mmoL·L^{-1},配置成产ACC脱氨酶检测固体培养基,在平板上接种2 μL浓度1×10^8 CFU·mL^{-1}菌悬液,30℃倒置避光培养7 d后观察是否长出菌落。

菌株产铁载体能力鉴定:参照何翔等[8]、Manjanatha等[21]的方法,在以铬天青为主要成分的CAS铁载体检测培养基上分别接种浓度为1×10^8 CFU·mL^{-1}筛选出的菌株菌悬液2 μL,于30℃倒置避光培养7 d后观察菌落周围是否有透明或黄色晕圈,判断其是否具有产铁载体能力。取供试菌株(菌浓度为1×10^8 CFU·mL^{-1})10 μL接种于100 mL MSA液体培养基中,于30℃、180 r·min^{-1}摇床培养48 h,10 000 r·min^{-1}离心10 min,取1.5 mL上清液加1.5 mL CAS检测液,充分混匀,静置1 h后测定630 nm处的吸光值(A_s),以不接菌的空白培养基为对照,于630 nm处测得吸光值(A_r),分别计算铁载体活性单位(S_u),计算公式为:$S_u=[(A_r-A_s)/A_r]\times100\%$,定量计算菌株产铁载体能力。

菌株产IAA能力鉴定:采用改良Salkowski比色法[22]测定,即:每株细菌制备成浓度为1×10^8 CFU·mL^{-1}菌悬液,将10 μL菌悬液接入装有1 mL含色氨酸(500 mg·mL^{-1})NA液体培养基的1.5 mL离心管中,无菌水作对照,每株菌3次重复,置于30°C摇床,180 r·min^{-1}振荡培养7 d。培养结束后菌悬液8 000 r·min^{-1}离心10 min,取100 μL上清液,加入200 μL Salkows ki比色液,避光静置反应35 min。酶标仪测定各菌株的OD_{530}值,重复3次。根据IAA标准曲线计算各菌株产生的IAA浓度。

菌株耐苏打盐碱能力鉴定:参照石伟[23]的筛选耐盐碱菌株培养基Ⅱ进行改良后配制,在NA固体培养基中加入$NaHCO_3$和Na_2CO_3(摩尔比为9∶1)水溶液使其终浓度分别为0、50、100、150、200 mmol·L^{-1},将稀释至10^8 CFU·mL^{-1}的2 μL菌悬液接种在不同浓度苏打盐培养基平板上,30℃倒置避光培养5 d后观察是否长出菌落。

1.2.3 菌株分子生物学鉴定 使用"细菌基因组DNA提取试剂盒"(离心柱型)(天根生化科技有限公司,DP302)提取菌株的总DNA后,利用引物27F(5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′)、1492R(5′-GCT TAC CTT CTT ACG ACT T-3′)[15]扩增其16S rRNA基因,PCR扩增体系为:2x Taq mix 25 μL,引物各1 μL,模板1 μL,ddH_2O补至50 μL,反应条件:95℃ 5min;94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2 min,30个循环;72℃ 10 min。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,纯化后PCR产物送往华大科技(北京)股份有限公司进行测序。内生细菌测得序列在EzBioCloud.net进行比对,与同源性最高序列共同采用MEGA11软件构建系统发育树。

1.2.4 菌株对大豆种子萌发及幼苗生长的影响 将筛选出的根内生细菌接种于NA液体培养基中,30℃、180 r·min^{-1}振荡培养16 h后,8 000 r·min^{-1}离心10 min,弃上清,沉淀用无菌水洗涤3次后重悬,菌悬液稀释至1×10^8 CFU·mL^{-1}。将大豆种子用0.1%升汞浸泡2 min,75%乙醇60 s,无菌水冲洗3次后[12],用筛选出的根内生细菌菌悬液浓度为1×10^8 CFU·mL^{-1}分别浸种1 h,以无菌水做对照(CK),在直径9 mm的无菌培养皿底垫上1层无菌滤纸,每个平皿放20粒无菌大豆种子,再覆盖上1层无菌滤纸,每个平板加入5 mL无菌水,避光培养,每个处理组重复5次,每天记录发芽数,培养7 d后统计数据,计算种子发芽率、发芽势、发芽指数;培养7 d后使用万深LA-S系列植物图像分析仪(杭州万深检测科技有限公司)测定并分析根尖数、根长、根表面积、根体积等指标。

发芽率(GR)=(发芽的种子数/试验种子数)×100%;

发芽势(GP)=(发芽高峰时间内发芽数/试验种子数)×100%;

发芽指数(GI)=$\sum(G_t/D_t)$

式中,G_t为在第t天的发芽数;D_t为相应发芽日。

1.2.5 数据处理与分析 用SPSS 18.0进行数据统计分析,利用R语言作图。

2 结果与分析

2.1 根内生细菌的分离

采用组织研磨法对大豆根内生细菌进行分离,共分离出182株菌落形态、大小、颜色、生长速度不同的大豆根内生细菌,分别编号为苗期菌株DM1-DM59、开花结荚期菌株DC.1-DC.72、鼓粒期菌株DC1-DC42、成熟期菌株DC-1-DC-9。筛选出具有固氮、解磷、产ACC脱氨酶、产铁载体、耐苏打盐碱能力强或功能全的3株菌株DC.24、DM57、DC-2进行详细研究。

2.2　筛选出的根内生细菌功能鉴定

2.2.1　固氮、解磷、产 ACC 脱氨酶、产铁载体能力和耐苏打盐碱能力　对筛选出的 3 株根内生细菌 DC.24、DM57、DC-2 的固氮、解磷、产 ACC 脱氨酶、产铁载体能力进行了定性和定量分析。结果如图 1 所示。由图 1 可知,DC.24、DM57、DC-2 均可在无氮培养基上生长,乙炔还原法测定 3 株菌固氮酶活性分别为 18.57±6.15、21.89±0.45、26.36±4.32 pmoL·mL^{-1}·h^{-1}。

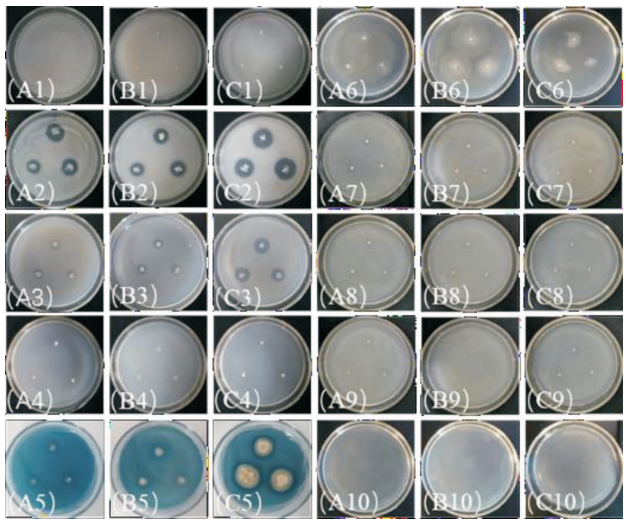
3 株根内生细菌均可在无机磷、有机磷培养基上生长良好且产生透明解磷圈,DC.24、DM57、DC-2 解无机磷圈半径:菌株半径(D/d)分别为 1.62±0.09、2.07±0.10、2.25±0.12,定量检测 3 株菌在无机磷液体培养基 3 d 内的有效磷含量分别为 36.27±1.44、50.97±1.19、67.39±2.50 mg·L^{-1};解有机磷圈 D/d 分别为 1.76±0.22、1.89±0.17、2.75±0.35,定量检测在有机磷液体培养基 3 d 内的有效磷含量分别为 49.45±0.87 、58.62±2.31、61.48±1.19 mg·L^{-1}。在解无机磷和有机磷的定量检测中 DC-2 处理组的有效磷含量均显著高于 DC.24、DM57 处理组,可知 DC-2 的解无机磷、有机磷能力均最强。

3 株根内生细菌在产 ACC 脱氨酶能力检测培养基上均可生长,产生菌落,证明其均具有产 ACC 脱氨酶的能力,DM57 菌落形成最快,推测 DM57 的产 ACC 脱氨酶能力最好。

在 CAS 产铁载体培养基上 3 株菌均可产生黄色透明晕圈,均具有产铁载体的能力,DC.24、DM57、DC-2 的透明晕圈与菌落比值分别为 1.14±1.03、1.13±1.04、1.41±4.04,DC-2 晕圈直径最大,定量检测铁载体活性单位 Su 分别为 74.26%、85.86%、93.91%,依据 Manjanatha 等[21]对细菌产铁载体能力划分,3 株内生细菌分泌铁载体的能力分别为++、+++、++++,DC-2 菌株产铁载体能力最强。

苏打盐碱耐受能力见图 1,3 株根内生细菌 DC.24、DM57、DC-2 在苏打盐浓度为 0 mmoL·L^{-1}的培养基上生长良好,DC.24、DC-2 在 pH 值 8.8 的 150 mmoL·L^{-1}苏打盐培养基上仍能生长,DM57 在 pH 值 8.5 的 100 mmoL·L^{-1}苏打盐培养基上可以生长,但在 150 mmoL·L^{-1}苏打盐培养基上菌落形成极其缓慢,3 株根内生细菌在 pH 值 9.0 的 200 mmoL·L^{-1}苏打盐碱培养基上均无法生长,说明 DC.24、DC-2 具有较强的耐苏打盐碱能力,DM57 次之。综合以上结果可知,DC.24、DM57、DC-2 均具有固氮、解磷、产 ACC 脱氨酶、产铁载体和耐苏打盐碱能力。

2.2.2　产 IAA 能力　3 株根内生细菌产 IAA 能力见图 2,发酵上清液均能与 Salkowski 比色液反应显粉红色。定量分析发现 DC.24、DM57 和 DC-2 在发酵 7 d 时分泌 IAA 的量分别为 14.5±0.6、7.5±5.3、19.2±0.7 μg·mL^{-1},DC-2 显著高于 DC.24、DM57。



注:(A)、(B)、(C)分别代表 DC.24、DM57、DC-2 根内生细菌;(1)、(2)、(3)、(4)、(5)分别对应固氮、解无机磷、解有机磷、产 ACC 脱氨酶、产铁载体能力;(6)、(7)、(8)、(9)、(10)分别对应苏打盐浓度 0、50、100、150、200 mmoL·L^{-1}。

Note: (A), (B), and (C) are three root endophytic bacteria DC.24, DM57, and DC-2, respectively. (1), (2), (3), (4), and (5) corresponded to nitrogen fixation, inorganic phosphorus, organic phosphorus, ACC deaminase, and siderophore production, respectively. (6), (7), (8), (9), and (10) correspond to 0, 50, 100, 150, 200 mmoL·L^{-1} of soda-salt concentration, respectively.

图 1　菌株 DC.24、DM57、DC-2 促生功能、耐苏打盐碱功能鉴定结果

Fig.1　Identification results of the growth-promoting function and soda-salt and alkali tolerance of strains DC.24, DM57, and DC-2

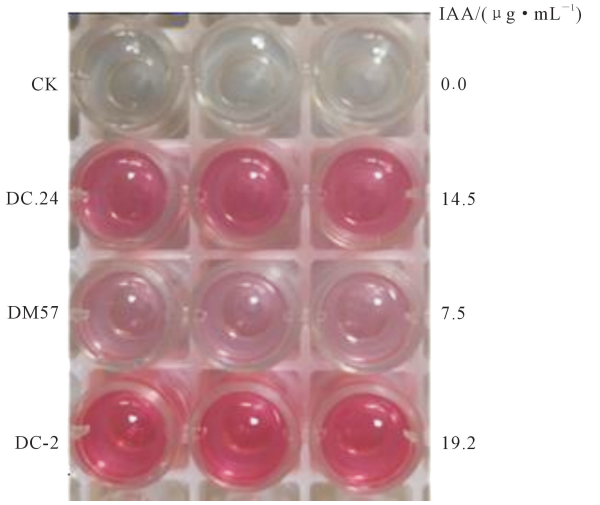


图 2　菌株 DC.24、DM57、DC-2 产 IAA 能力鉴定结果

Fig.2　Identification results of IAA production by strains DC.24, DM57, and DC-2

2.3 根内生细菌菌株分子生物学鉴定

对 DC.24、DM57、DC-2 的基因组 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增,测序获得的序列片段在 EzBioCloud 数据库中进行比对分析发现,菌株 DC.24、DM57、DC-2 分别与菌株 *Bacillus siamensis*(AJVF01000043)(99.86%)、*Bacillus wiedmannii*(LOBC01000053)(99.93%)、*Pseudomonas hibiscicola*(AB021405)(99.56%)同源关系最近,利用邻接法在 MEGA 11 软件上构建系统发育树见图 3,初步判定 DC.24 为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)、DM57 为维氏芽孢杆菌(*Bacillus wiedmannii*)、DC-2 为栖木假单胞菌(*Pseudomonas hibiscicola*)。

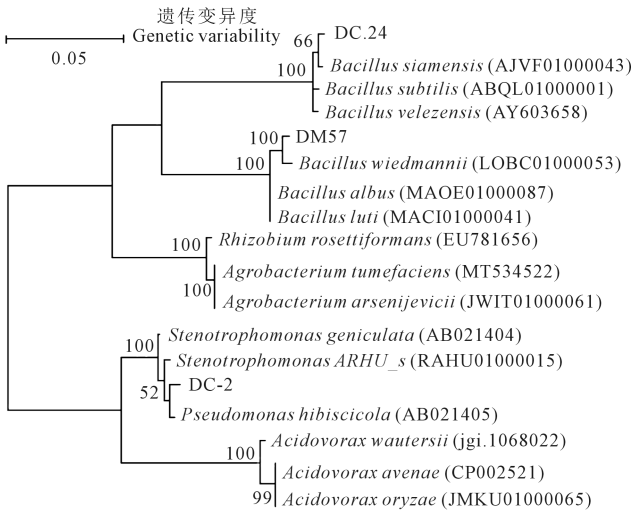


图 3 基于 16S rRNA 基因序列分离菌株与同源菌株构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence isolation strains and homologous strains

2.4 根内生细菌对大豆种子及根生长的影响

2.4.1 根内生细菌对大豆种子萌发的影响 将筛选出的 3 株细菌菌悬液浸种大豆培养 7 d 后的种子发芽率见图 4,大豆发芽率差异显著性分析可知,在对照处理中‘合丰 50’的发芽率显著高于‘龙垦 310’,经菌株 DC-2、DC.24、DM57 处理后‘合丰 50’、‘龙垦 310’的发芽率均较对照组有提高。在两个大豆品种中 DM57 的发芽率均为最高。综上可知,DC.24、DM57、DC-2 处理均能显著提高大豆种子的发芽率。发芽势与发芽指数表现出相同趋势,在 2 个大豆品种中,DC.24、DM57、DC-2 处理均能显著提高大豆发芽势和发芽指数。3 个处理组间无显著差异。但在‘龙垦 310’品种中,DC-2 处理组的发芽势和发芽指数均为最高。因此,DC.24、DM57、DC-2 处理均能显著提高大豆种子的发芽势和发芽指数。

发芽率与发芽势和发芽指数分析可知,DC.24、DM57、DC-2 处理相对于对照组,均表现出上升趋势,但在发芽率中 DM57 效果最好,在发芽势与发芽指数中,DC-2 效果最好。

2.4.2 根内生细菌对大豆根生长的影响 将筛选出的 3 株根内生细菌 DC.24、DM57、DC-2 分别制备成 1×10^8 CFU · mL^{-1}菌悬液,使用菌悬液浸种大豆 1 h,培养 7 d 后进行根部扫描,数据指标见图 5。

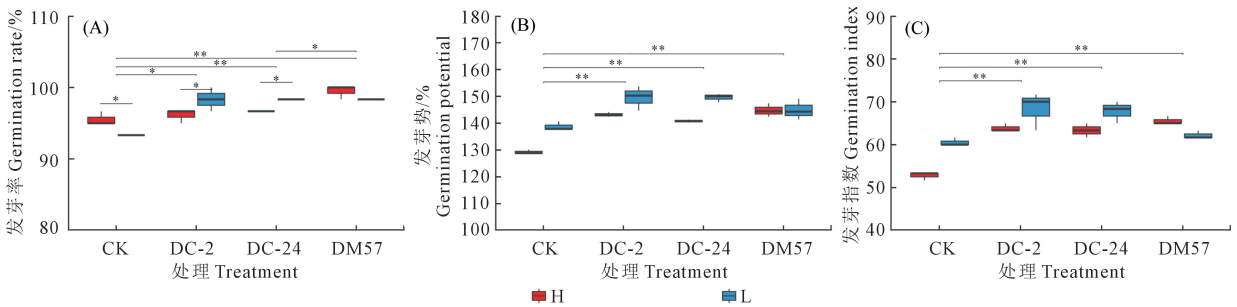
从图 5 中可见,3 株菌均可提高 2 个大豆品种的根尖数。组内差异显著性分析可知,3 个菌株对不同的大豆品种影响不同,在对照中不同品种大豆的根尖数无显著性差异,但 DC.24 处理的‘龙垦 310’的根尖数极显著($P<0.001$)高于‘合丰 50’,‘合丰 50’DM57 处理的根尖数显著($P<0.01$)高于‘龙垦 310’。从组间差异显著性分析可知,对于两个品种,3 株菌处理的根尖数均极显著($P<0.001$)高于对照组,DC.24 处理的根尖数显著($P<0.05$)高于 DC-2 处理,DC-2、DM57 处理组间无显著性差异。DC.24、DM57、DC-2 菌悬液浸种后对‘合丰 50’品种的根尖数分别显著增加了 169.7%、221.2%、172.7%,‘龙垦 310’的根尖数分别显著增加了 758.8%、329.4%、341.1%。综上所知,DC.24、DM57、DC-2 处理均能显著提高大豆的根尖数,不同大豆品种在不同促生细菌浸种情况下对根尖数的促生效果表现不同。

大豆根长组内差异显著性分析可知,两品种的对照组根长无显著差异,但‘龙垦 310’DC.24 处理的根长显著($P<0.05$)高于‘合丰 50’,DC-2、DM57 处理的根长无显著差异。表明施用不同促生菌对不同大豆品种的根长促生效果不同。从组间差异显著性分析可知,对于不同品种,DC.24、DM57 处理的根长均极显著($P<0.001$)高于对照,DC-2 处理的根长与对照无显著性差异。DC.24 处理的根长显著($P<0.05$)高于 DM57 处理,极显著($P<0.001$)高于 DC-2 处理。DC.24、DM57、DC-2 菌悬液浸种后‘合丰 50’的根长分别增加了 52.8%、63.0%、29.8%,‘龙垦 310’的根长分别增加了 101.1%、52.2%、50.0%。综上所知,DC.24 和 DM57 菌株均可显著增加大豆的根长,但 DC-2 菌株效果不明显,说明不同菌对大豆根长的促生效果不同,而且不同品种的大豆对促生细菌的敏感程度不同。

大豆根体积组内差异显著性分析可知,在对照中‘龙垦 310’的根体积极显著($P<0.001$)高于‘合丰 50’,而 DC.24、DM57、DC-2 处理后的根体积在品种间无显著性差异。从组间差异显著性分析可

知,3 株根内生细菌处理的根体积均极显著($P<0.001$)高于对照,DC.24 处理的根体积极显著($P<0.001$)高于 DM57、DC-2 处理,DM57、DC-2 处理的根体积间无显著性差异。DC.24、DM57、DC-2 菌悬液浸种后,‘合丰 50’的根体积分别增加了 139.9%、125.6%、96.9%,‘龙垦 310’的根体积分别增加了 129.4%、82.3%、70.5%。综上所知,DC.24、DM57、DC-2 处理均能显著提高大豆的根体积,不同大豆品种在不同促生细菌浸种情况下对根体积的促生效果表现不同。

大豆根表面积组内差异显著性分析可知,在对照中‘龙垦 310’的根表面积极显著($P<0.01$)高于‘合丰 50’,3 个菌株处理后,DC.24 处理中‘龙垦 310’的根表面积显著($P<0.05$)高于‘合丰 50’,但 DM57、DC-2 处理组中品种间无显著性差异。表明施用不同促生菌对不同大豆品种的根表面积促生效果不同。从组间差异显著性分析可知,3 株菌处理的根表面积均极显著($P<0.001$)高于对照,DC.24 处理极显著($P<0.001$)高于 DM57、DC-2 处理,DC-2、DM57 处理间无显著性差异。DC.24、DM57、DC-2 菌



注:H 代表‘合丰 50’品种、L 代表‘龙垦 310’品种,*、* *、* * * 分别表示存在显著($P<0.05$)、极显著($P<0.01$)、非常显著($P<0.001$)差异。下同。

Note: H represents ‘Hefeng 50’ variety, L represents ‘Longken 310’ variety; *, * *, * * * represent significant difference ($P<0.05$), extremely difference ($P<0.01$), extremely significant difference ($P<0.001$), respectively. The same below.

图 4　不同根内生细菌对大豆种子萌发的影响

Fig.4　Effects of different root endophytic bacteria on soybean seed germination

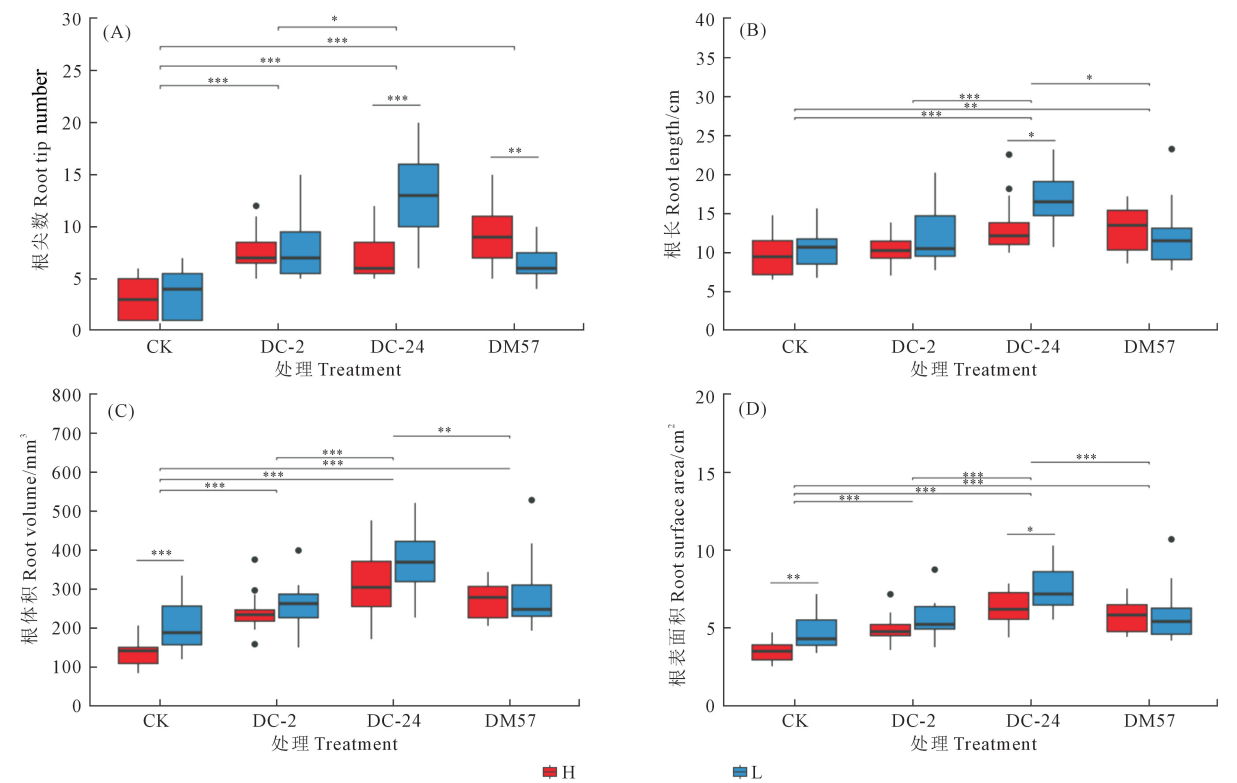


图 5　不同根内生细菌对大豆根生长指标的影响

Fig.5　Effects of different root endophytic bacteria on soybean root growth indicators

悬液浸种后,‘合丰50’的根表面积分别增加了89.2%、83.6%、58.7%,‘龙垦310’的根表面积分别增加92.6%、51.2%、41.4%。综上所知,DC.24、DM57、DC-2均能显著提高大豆根表面积,不同大豆品种在不同促生细菌浸种情况下根表面积的促生效果表现不同。

综上所述,暹罗芽孢杆菌DC.24、维氏芽孢杆菌DM57、栖木假单胞菌DC-2菌悬液浸种1 h后均可促进大豆根的伸长和生长,增加根尖数,3株根内生细菌均对大豆种子萌发、根的生长发育起促进作用。

3 讨 论

本研究中,试验所分离出的3株根内生细菌经16S rRNA基因序列鉴定初步判定DC.24、DM57、DC-2分别为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis* DC.24)、维氏芽孢杆菌(*Bacillus wiedmannii* DM57)、栖木假单胞菌(*Pseudomonas hibiscicola* DC-2),经功能检测,均有解磷、固氮、产铁载体、产ACC脱氨酶、产IAA能力,与已报道的促生细菌功能相近[5-8]。上述分离的根内生细菌种类归属已有报道,如芽孢杆菌[24-25]、假单胞菌[26]表现出解磷、固氮、产IAA、ACC脱氨酶、铁离子载体等促生特性,但本文筛选获得的内生细菌的耐盐碱性更强,在苏打盐碱地开发微生物菌肥具有应用潜力。

解磷能力是促生细菌普遍具有的能力[18,27],本试验所分离出的3株根内生细菌均在无机磷、有机磷平板上形成了溶磷圈,具有解磷能力。定量检测结果表明,DC.24、DM57、DC-2解无机磷能力分别为36.27±1.44、50.97±1.19、67.39±2.50 mg·L^{-1},与薛应钰等[28]的解无机磷细菌(557 mg·L^{-1})相比并不突出,但DC.24、DM57、DC-2解有机磷能力分别为49.45±0.87、58.62±2.31、61.48±1.19 mg·L^{-1},高于李章雷等[29]所分离的解有机磷耐盐碱促生细菌(34.61 mg·L^{-1})、沈佳佳等[24]分离的解有机磷细菌(2.88~5.30 mg·L^{-1})。现解磷细菌的分离筛选研究主要集中在解无机磷上,而土壤中的有机磷占全磷的29%~-90%[30],分离同时具有解无机磷和有机磷的高效解磷菌,对缓解磷素缺乏和减少化肥使用具有重要意义。本试验所分离的3株根内生细菌在具有解无机磷能力的同时还具有较强的解有机磷能力,具有开发应用价值。

苏打盐碱耐受能力可作为盐碱地促生细菌的筛选指标,本试验所分离的3株根内生细菌虽然解磷、固氮等能力存在差异,但均具有良好的耐苏打盐碱能力。Shukla等[31]研究发现,部分耐盐细菌能帮助幼苗抵抗盐胁迫,促进生长。本试验所分离的DC.24、DM57、DC-2具有良好的耐盐碱胁迫能力,可耐受的Na_2CO_3和$NaHCO_3$苏打复合盐浓度依次为150、100、150 mmol·L^{-1},高于向君亮等[32]在Na_2CO_3和$NaHCO_3$终浓度分别为50 mmol·L^{-1}和100 mmol·L^{-1}、pH值8.5的条件下筛选出的具有缓解盐碱胁迫以及促生功能的细菌。同时耐受pH值8.8,普遍高于已报道的促生细菌(pH值8.2~8.5)[32]。3株内生细菌具备盐碱地改良微生物菌剂的潜力。由此可知本试验所筛选出的3株耐苏打盐碱促生细菌具有作为盐碱地改良微生物菌剂的潜力。

根部促生和菌种特性在3株内生菌间存在差异。DC.24、DM57、DC-2菌株7 d内分别能够分泌IAA 14.5±0.6、7.5±0.3、19.2±0.7 μg·mL^{-1},与现已报道的具有产IAA能力的促生菌[5]相比并不高,3株内生细菌处理的大豆根尖数、根长、根体积、根表面积均显著高于对照,但DC-2的解磷、固氮、产铁载体能力较强,对大豆根长、根体积、根表面积的促生效果不如DC.24和DM57处理组。陶泽等[33]研究发现,产IAA为53.10 mg·L^{-1}的肠杆菌D46处理樱桃的总根长、根体积、根表面积均低于对照;朱艳蕾等[34]所分离的产IAA为27.99 mg·L^{-1}的变形菌Rb-5处理下银砂槐的根长与对照无显著差异,而且促生效果最好的菌株芽孢杆菌Ba-8和酵母菌Ra-7产IAA浓度均在10~15 mg·L^{-1},与本试验情况一致,可能是不同浓度IAA对不同植物根系影响效果不同[35]的特性造成。不同浓度的IAA对植物根系的影响不同,而且不同植物对IAA的敏感程度不同[35]。李欣欣等[5]的研究结果与本试验结果一致,不同根内生细菌产IAA的能力强弱存在差异,促生效果上也存在差异。

4 结 论

从大庆盐碱地的大豆根内分离筛选出3株具有解磷、固氮、产IAA、ACC脱氨酶、铁载体能力的根内促生细菌暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis* DC.24)、维氏芽孢杆菌(*Bacillus wiedmannii* DM57)、栖木假单胞菌(*Pseudomonas hibiscicola* DC-2),且3株根内生细菌具有较强的耐苏打盐碱能力。菌悬液浸种处理可使大豆根尖数、根长、根表面积、根体积显著增加。筛选出的根内生细菌对植株有促生作用,具有作为生物菌肥的潜力,可为盐碱地种植大豆提供微生物种质资源。

参 考 文 献:

[1] 杨镇, 曹君. 植物内生菌及其次级代谢产物的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(4): 1-6.
YANG Z, CAO J. Research progress of endophytic fungi and their secondary metabolites[J]. Journal of Microbiology, 2016, 36(4): 1-6.

[2] 喻江, 于镇华, 刘晓冰, 等. 植物根组织内生细菌多样性及其促生作用[J]. 中国农学通报, 2015, 31(13): 169-175.
YU J, YU Z H, LIU X B, et al. Diversity and growth promoting effects of endophytic bacteria in plantroots[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(13): 169-175.

[3] RAMOS A C, MELO J, DE SOUZA S B, et al. Inoculation with the endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* promotes growth, nutrient uptake and photosynthetic efficiency in rice[J]. Planta, 2020, 252(5): 87.

[4] VAN DER HEIJDEN M G A, BARDGETT R D, VAN STRAALEN N M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems[J]. Ecology Letters, 2008, 11(3): 296-310.

[5] 李欣欣, 赵静, 廖红. 吲哚乙酸、吲哚丁酸和萘乙酸对大豆幼根生长的影响[J]. 植物生理学报, 2013, 49(6): 573-578.
LI X X, ZHAO J, LIAO H. Effects of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthylacetic acid on soybean [*Glycine max* (L.) Merr] root growth[J]. Plant Physiology Journal, 2013, 49(6): 573-578.

[6] 郑喜清, 胡静一, 邸娜. 3 株有机磷降解菌的促生特性及其对番茄种子萌发的影响[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(5): 170-177.
ZHENG X Q, HU J Y, DI N. Growth-promoting characteristics of three organophosphate-degrading bacteria and their effects on tomato seed germination[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2024, 52(5): 170-177.

[7] OJUEDERIE O B, BABALOLA O O. Growth enhancement and extenuation of drought stress in maize inoculated with multifaceted ACC deaminase producing rhizobacteria[J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2023, 6: 1076844.

[8] 何翔, 张庆, 李楚, 等. 具铁载体活性病原细菌的筛选及铁摄取干预对其生长影响[J]. 植物保护, 2020, 46(3): 85-93.
HE X, ZHANG Q, LI C, et al. Screening of the pathogenic bacteria with siderophore-producing activity and the effect of intervention in iron uptake on its growth[J]. Plant protection, 2020, 46(3): 85-93.

[9] ALI M A, AHMED T, IBRAHIM E, et al. A review on mechanisms and prospects of endophytic bacteria in biocontrol of plant pathogenic fungi and their plant growth-promoting activities[J]. Heliyon, 2024, 10(11): e31573.

[10] 张昊, 张荣涛, 吴魏位, 等. 不同抗旱性小麦品种内生细菌群落结构及功能预测[J]. 麦类作物学报, 2024, 44(3): 399-406.
ZHANG H, ZHANG R T, WU W W, et al. Analysis on community structure and function prediction in endophytic bacteria of different drought tolerant wheat varieties[J]. Journal of Triticeae Crops, 2024, 44(3): 399-406.

[11] 韩如月, 李睿瑞, 杨帆, 等. 一株水稻根内生拮抗细菌 SM13 的分离及鉴定[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1030-1040.
HAN R Y, LI R R, YANG F, et al. Isolation and identification of an endophytic and antagonistic bacterium from riceroots[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1030-1040.

[12] 荆瑞勇, 韩如月, 杨帆, 等. 盐碱地大豆根内促生拮抗细菌 DCX 的分离及鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(5): 788-795.
JING R Y, HAN R Y, YANG F, et al. Isolation and identification of an endophytic, antagonistic and growth promoting bacteria DCX from soy-bean roots in saline-alkali soil[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2019, 41(5): 788-795.

[13] 王爽. 大庆盐碱土可培养嗜盐细菌与古菌的多样性及多相分类研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2011.
WANG S. Biodiversity and polyphasic taxonomy of culturable halophilic bacteria and archaea from saline-alkaline soil in DAQING [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2011.

[14] 张美珍, 王丽娜, 赵微, 等. 耐盐碱溶磷菌对大豆幼苗叶片脂质代谢组的影响[J]. 中国油料作物学报, 2023, 45(6): 1284-1294.
ZHANG M Z, WANG L N, ZHAO W, et al. Effects of salt/alkali-tolerant phosphate-solubilizing bacteria on lipid metabolome of soybean seedlings[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2023, 45(6): 1284-1294.

[15] 李艳星, 郭平毅, 孙建光. 块根块茎类作物内生固氮菌分离鉴定、系统发育与促生特性[J]. 中国农业科学, 2017, 50(1): 104-122.
LI Y X, GUO P Y, SUN J G. Isolation, identification, phylogeny and growth promoting characteristics of endophytic diazotrophs from tuber and root crops [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(1): 104-122.

[16] 丁武. 乙炔还原法检测早稻固氮酶活性[J]. 福建稻麦科技, 1993, 11(1): 52-54.
DING W. Detection of nitrogenase activity in early rice by acetylene reduction method[J]. Fujian Science and Technology of Rice and Wheat, 1993, 11(1): 52-54.

[17] GUPTA R, SINGAL R, SHANKAR A, et al. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. Journal of General & Applied Microbiology, 2006, 40(3): 255-260.

[18] CHEN D A, WEI X W, ZHANG M, et al. Isolation, identification and phosphate solubilizing capacity of organophosphorus solubilizing bacteria in rhizosphere soil of *Camellia oleifera*[J]. Agricultural Science & Technology, 2020, 21(1): 41-47.

[19] 中华人民共和国农业部. 植株全磷含量测定 钼锑抗比色法: NY/T 2421-2013[S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
Ministry of Agriculture of the PRC. Determination of total phosphorus in plant—vanadiummolybdate blue colorimetric method: NY/T 2421—2013[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2014.

[20] DUBEY A, MALLA M A, KUMAR A, et al. Seed bio-priming with ACC deaminase-producing bacterial strains alleviates impact of drought stress in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. Rhizosphere, 2024, 30: 100873-100873.

[21] MANJANATHA M G, LOYNACHAN T E, ATHERLY A G. Tn5 mutagenesis of Chinese *Rhizobium fredii* for siderophore overproduction [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1992, 24(2): 151-155.

[22] TSAVKELOVA E A, CHERDYNTSEVA T A, BOTINA S G, et al. Bacteria associated with orchidroots and microbial production of auxin [J]. Microbiological Research, 2007, 162(1): 69-76.

[23] 石伟. 极端盐碱土壤细菌的分离筛选及抗盐特性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
SHI W. Screening and resistance-analysis of microorganisms in extreme saline soil environments[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2011.

[24] 沈佳佳, 侯小改, 王二强, 等. 油用牡丹根际解有机磷细菌的筛选及解磷功能研究[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 157-165.
SHEN J J, HOU X G, WANG E Q, et al. Organic phosphate-solubilizing bacteria screening in the rhizosphere of *Paeonia ostii* and study on their phosphate-solubilizing capabilities [J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(6): 157-165.

(下转第 262 页)