

李婷, 邓顺升, 刘艳明, 等. 不同生长条件下铁皮石斛内生细菌多样性及活性菌株的筛选 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(5): 80-86.
LI Ting, DENG Shunsheng, LIU Yanming, et al. Diversity of endophytic bacteria of *Dendrobium officinale* under different growth conditions and screening of active strains[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(5): 80-86.

不同生长条件下铁皮石斛内生细菌 多样性及活性菌株的筛选

李 婷¹, 邓顺升¹, 刘艳明², 黄雅丽¹

(1 广州中医药大学 基础医学院, 广东 广州 510006; 2 广东药科大学 生命科学与生物制药学院/
广东省生物活性药物研究重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要:【目的】比较和分析野生与人工栽培铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 内生细菌分布特点, 筛选有较强定殖能力的活性菌株, 为促进野生铁皮石斛驯化、提高药材品质奠定基础。【方法】采用组织块分离法分离铁皮石斛根、茎、叶各部位的内生细菌, 利用 16S rDNA 序列和系统发育树对分离菌株进行分析鉴定, 体外筛选具有解磷、解钾、固氮、产铁载体、产 IAA、拮抗病原菌的促生活性菌株, 回接后再分离, 观察内生细菌在组培苗中的定殖动态。【结果】从铁皮石斛中分离到 285 株内生细菌, 其中, 217 株分离自野生铁皮石斛, 归类于 3 门 9 属, 以芽孢杆菌属 *Bacillus* 和不动杆菌属 *Acinetobacter* 为优势菌群存在于根、茎、叶中, 其菌株数分别占总分离菌株数的 79.26% 和 8.76%; 68 株内生细菌分离自人工栽培铁皮石斛, 归类于 1 门 3 属, 以伯克霍尔德菌属 *Burkholderia* 和埃希菌属 *Escherichia* 为优势菌群存在于根、茎中, 其菌株数分别占总分离菌株数的 54.41% 和 30.88%。泛菌属 *Pantoea* 在野生和人工栽培铁皮石斛中均有分布。野生铁皮石斛内生细菌的物种数 (9) 和多样性指数 (0.85) 明显高于人工栽培铁皮石斛 (物种数为 3, 多样性指数为 0.61)。活性筛选共获得 38 株菌株, 占筛选菌株的 45%, 4 株野生铁皮石斛的活性内生细菌中有 3 株在人工组培苗具有较好的定殖性。【结论】野生与人工栽培铁皮石斛内生细菌的类群结构和生物多样性具有明显差异, 铁皮石斛内生细菌蕴含丰富的促生潜力。

关键词: 铁皮石斛; 内生细菌; 多样性; 促生性; 定殖

中图分类号: S436

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2021)05-0080-07

Diversity of endophytic bacteria of *Dendrobium officinale* under different growth conditions and screening of active strains

LI Ting¹, DENG Shunsheng¹, LIU Yanming², HUANG Yali¹

(1 School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2 College of Life Science and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University/Guangdong
Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou 510006, China)

Abstract: 【Objective】To compare and analyze the distribution characteristics of endophytic bacteria in wild and cultivated *Dendrobium officinale*, and screen active strains with strong colonization ability. To lay the foundation for improving the domestication of wild *D. officinale* and the quality of medicinal materials. 【Method】The endophytic bacteria were isolated from the root, stem, leaf of *D. officinale* by tissue block

收稿日期: 2021-01-05 网络首发时间: 2021-04-30 14:08:50

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210430.1112.004.html>

作者简介: 李 婷 (1996—), 女, 硕士研究生, E-mail: 892809601@qq.com; 通信作者: 黄雅丽 (1981—), 女, 副教授, 博士, E-mail: huangyali@gzucm.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31700288); 广州中医药大学优秀青年学者科研基金 (KAB108133K11)

separation method, and 16S rDNA sequence and phylogenetic tree were used to identify the isolated strains. The probiotic active bacterial strains with the abilities of phosphate-solubilizing, potassium-dissolving, nitrogen-fixing, siderophore-synthesizing, IAA-producing and antagonistic activity of pathogen were screened *in vitro*. The colonization dynamics of endophytic bacteria in tissue culture seedlings were observed after backgrafting and separation. 【Result】 A total of 285 endophytic bacteria strains were isolated from *D. officinale*, among which 217 were isolated from wild *D. officinale*, which were classified into three phylums and nine genera. *Bacillus* and *Acinetobacter* strains accounted for 79.26% and 8.76% of the total isolated strains respectively, and were the dominant bacteria. Only 68 endophytic bacteria strains were isolated from the cultivated *D. officinale*, which were classified into one phylum three genera, *Burkholderia* and *Escherichia* accounted for 54.41% and 30.88% of the total isolated strains respectively, and were the dominant bacteria. Only *Pantoea* was distributed in both wild and cultivated *D. officinale*. The number of endophytic species (9) and diversity index (0.85) of wild *D. officinale* were obviously higher than those of cultivated *D. officinale* (3 and 0.61 respectively). A total of 38 strains were obtained by active screening, accounting for 45% of the screened strains and three of four strains of endophytic bacteria from wild *D. officinale* showed good colonization in artificial tissue culture seedlings. 【Conclusion】 The biodiversity and community structure of endophytic bacteria of wild and artificially cultivated *D. officinale* are obviously different and the endophytic bacteria contains abundant potential of growth promotion.

Key words: *Dendrobium officinale*; endophytic bacteria; diversity; growth promotion potential; colonization

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 是兰科 Orchidaceae 石斛属 *Dendrobium* 多年附生草本, 以新鲜或干燥的茎入药。现代研究发现铁皮石斛含有多糖、生物碱及酚类等多种有效活性成分, 其提取物具有抗氧化、降血糖及防治糖尿病并发症、抗肿瘤、提高免疫力等多种药理作用^[1-2]。铁皮石斛作为药食同源药材, 已被大量应用于疾病及日常生活保健中, 其需求量急剧上升^[3-4]。目前铁皮石斛种子、苗茎段、原球茎等是市场规模化培养常用材料来源, 在一定程度上解决了铁皮石斛资源严重短缺的问题^[5]。但是人工种植铁皮石斛仍存在以下问题: 试管苗移栽成活率偏低、生长周期长, 致使铁皮石斛种植成本高而产量低^[6]; 人工种植铁皮石斛质量参差不齐, 且种植铁皮石斛有效成分含量相对低于野生铁皮石斛植株^[7-8]; 人工密集种植导致铁皮石斛较易遭受微生物病害的侵染, 造成炭疽病、白绢病、黑斑病、黑腐病等石斛病害的发生^[9], 这些现象被认为与组织培养苗生产与传代过程中缺乏植物内生菌有密切关系^[10]。

植物内生菌是指那些在生活史的一定阶段或全部阶段生活于植物的各种组织和器官内部并与宿主植物在长期共同进化过程中形成共生关系的一类微生物^[11]。作为兰科植物, 铁皮石斛的种子虽然数量众多但没有胚乳, 在自然条件下必须与微生物建立共生关系才能完成生活史^[12]。目前普遍认

为, 石斛内生菌可以通过增强水分和矿质营养吸收, 产生生长调节剂和维生素等物质以促进植株根、茎、叶的生长及提高活性成分^[13]。

石斛内生菌是影响石斛生长与药效的重要生态因素之一。目前石斛内生菌的研究主要集中在真菌方面, 细菌作为内生菌重要组成部分和活性类群研究较少。比较野生和人工铁皮石斛内生细菌结构差异, 研究野生铁皮石斛内生细菌活性和在组培苗中的定殖情况, 对于揭示植物内生菌结构形成的驱动因素、增强铁皮石斛驯化苗对自然环境的栽培适应性、提高铁皮石斛产量具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 药用植株和菌株

野生铁皮石斛采自广东省清远市 (23°20'49"N, 113°12' 11"E), 株高 10~15 cm; 人工栽培铁皮石斛采自广东省潮州市饶平铁皮石斛人工种植基地 (23°10'49"N, 113°21'9"E), 株高 20~35 cm。石斛样品生长状态均良好。采样时将整株植物完整挖出, 无菌采样袋密封好放入冰盒, 运送至实验室后置于 4 ℃ 冰箱中保存, 在 2 h 内进行内生细菌的分离。使用的铁皮石斛炭疽病致病菌为胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*, 由广州中医药大学中药学院张桂芳老师馈赠。

1.2 培养基和试剂

马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基购于广东环凯微生物科技有限公司。活性菌筛选培养基配制参考文献 [14]。2×T5 Direct PCR kit(Tsingke) 购于北京擎科新业生物技术有限公司。共生培养基配制: 1/2 MS(购自海博生物技术有限公司)+2 g/L 活性炭+8 g/L 琼脂。引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3') 和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3') 由深圳华大基因股份有限公司合成。

1.3 内生细菌的分离和纯化

用自来水冲洗掉铁皮石斛植株上的泥土后, 将其根、茎、叶分开, 剪成约 2 cm 的小段, 依次用 ϕ 为 75% 的乙醇溶液浸泡 2 min, 10.91~65.45 g/L 的 NaClO 溶液浸泡 5 min, 无菌水冲洗至少 3 遍, 用无菌镊子和剪刀将植株根、茎、叶剪碎, 取 0.1 g 剪碎组织置于无菌研钵中, 加无菌水 1 mL 研磨成匀浆, 取 0.1 mL 组织匀浆均匀涂布于 PDA 平板上, 37 °C 条件下培养 14 d 左右, 每天观察菌株生长状况, 将新长出菌落转接新的 PDA 平板, 根据肉眼可辨的菌落形态特征, 将从同一器官内分离到的相同菌株去除, 转接纯化至单菌落后保存。同时收集表面消毒时最后 1 次冲洗样品的水样, 以同样的方法涂布于 PDA 平板检测消毒效果。

1.4 内生细菌的鉴定

使用 Direct PCR kit 扩增细菌 16S rDNA。挑取单菌落菌体加入 50 μ L Lysis buffer A 中, 95 °C 水浴 10 min, 加入等量 Lysis buffer B 作为缓冲液; 涡旋振荡后短暂离心, 取上清液作为 DNA 模板, 以 27F 和 1492R 为引物扩增细菌 16S rDNA, PCR 反应条件:98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 2 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定无误后送上海美吉生物有限公司测序, 测序序列于 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 中比对。选代表性菌株的 16S rDNA 序列信息, 使用 MEGA7.0 软件, 采用邻接法构建其系统发育树, 并用 iTOL 进一步美化。

1.5 内生细菌活性筛选

参照文献 [14] 的方法筛选解磷、解钾、产 IAA 和固氮的活性菌株。参照文献 [15] 的方法筛选产铁载体的活性菌株。将筛选菌株和致病炭疽菌接种在 PDA 平板上, 两菌相距 5 cm, 置于培养箱内 28 °C 条件下培养 3~5 d, 观察并记录菌株生长情况和菌株间的拮抗现象。每种拮抗菌设 3 次重复。

1.6 内生细菌定殖动态

将内生菌于 37 °C、250 r/min 条件下培养至对数期, 稀释成 1×10^6 CFU/mL 菌液备用。随机挑选健康且长势一致 (2~4 叶期) 铁皮石斛组培苗, 移至含有共生培养基的旋口瓶中, 每瓶 3 棵苗。吸取 0.5 mL 稀释菌液添加至试管苗根部, 对照组仅添加 0.5 mL 培养基。将试管苗置于温度 (25 $\pm$ 2) °C、光照度 1 500 lx、每天光照时间 12 h、空气相对湿度 60%~80% 的条件下培养。分别取接种后 3、10、20 和 30 d 的铁皮石斛苗, 用无菌剪刀将其根、茎、叶分开, 按 “1.3” 方法表面消毒以及检测消毒效果。将根、茎和叶分别置于无菌的研钵中研磨至匀浆, 再用无菌蒸馏水梯度稀释, 涂布平板, 于 37 °C 条件下培养 48 h 后, 统计回接菌定殖情况。

1.7 数据处理

参考文献 [16] 的方法对野生和人工栽培铁皮石斛内生细菌的 Shannon-Wiener 多样性指数 (Shannon-Wiener diversity index, H')、均匀度指数 (Evenness index, E)、相似性系数 (Similarity coefficient, C) 进行计算及分析。采用 Excel、SPSS 软件进行数据整理统计, 利用 Duncan's 法分析铁皮石斛不同部位的多样性指数差异, 采用 t 检验分析不同生境下的数据是否存在差异。

2 结果与分析

2.1 野生与人工栽培铁皮石斛内生细菌的类群结构

从野生铁皮石斛植株中分离到 217 株内生细菌, 根据测序比对和系统发育分析结果, 内生细菌可以归类为芽孢杆菌属 *Bacillus*、微杆菌属 *Microbacterium*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、短食单胞菌属 *Stenotrophomonas*、硫胺素芽孢杆菌属 *Aneurinibacillus*、棒状杆菌属 *Leifsonia*、短小杆菌属 *Curtobacterium*、无色菌属 *Achromobacter*、泛菌属 *Pantoea* 等 9 个属 (隶属于 3 个门)(图 1)。其中芽孢杆菌属和不动杆菌属菌株数分别占总分离菌株数的 79.26% 和 8.76%, 为优势菌群。野生铁皮石斛不同组织内生细菌类群结构存在差异 (图 2)。分离自根的内生细菌有 70 株, 优势菌群是芽孢杆菌属 (占根部分离菌株的 81.16%)、微杆菌属 (7.25%) 和不动杆菌属 (5.8%)。来自茎的内生细菌有 128 株, 优势菌群是芽孢杆菌属 (占茎部分离菌株的 79.84%)、不动杆菌属 (9.3%) 和短食单胞菌属 (6.2%)。叶中分离到 19 株细菌, 以芽孢杆菌属 (占叶部分离菌株的 68.42%)、不动杆菌属 (15.79%) 为优势菌群。芽孢

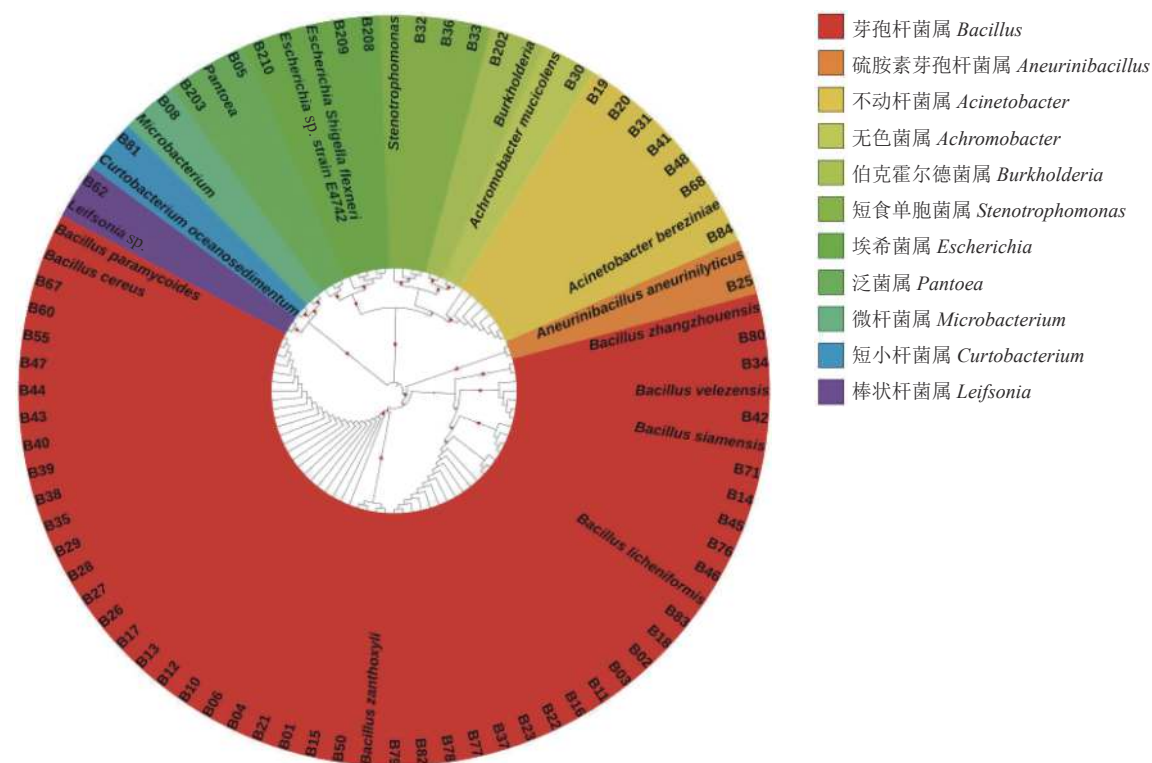


图 1 基于 16S rDNA 建立的部分铁皮石斛内生细菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence of partial endophytic bacteria isolated from the *Dendrobium officinale*

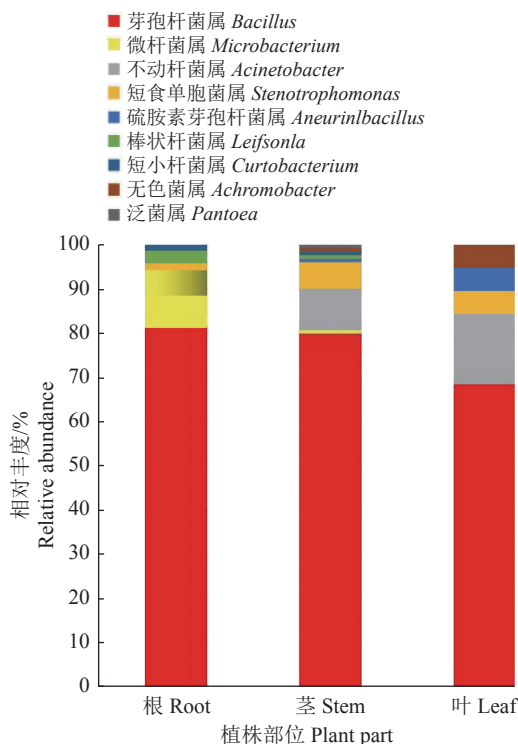


图2 野生铁皮石斛可培养内生细菌在属水平的相对丰度

Fig. 2 The relative abundance of cultivatable endophytic bacteria isolated from wild *Dendrobium officinale* at the genus level

杆菌属、不动杆菌属、短食单胞菌属存在于野生铁
皮石斛根、茎、叶各组织部位。

从人工栽培铁皮石斛植株中分离到 68 株内生细菌, 归类为伯克霍尔德菌属 *Burkholderia*、埃希菌属 *Escherichia*、泛菌属 *Pantoea* 3 个属 (隶属于 1 个门)(图 1)。其中伯克霍尔德菌属和埃希菌属分别占总分离菌株数的 54.41% 和 30.88%, 为优势菌群。人工栽培铁皮石斛不同组织内生细菌类群结构存在差异(图 3)。根中分离到细菌 34 株, 茎中分离到

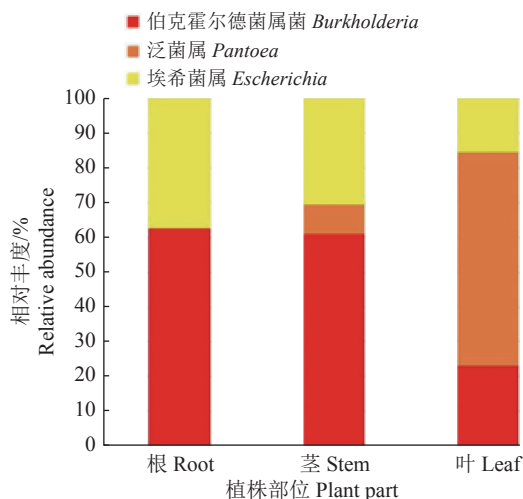


图3 人工栽培铁皮石斛可培养内生细菌在属水平的相对丰度

Fig. 3 The relative abundance of cultivatable endophytic bacteria isolated from artificial cultivation *Dendrobium officinale* at the genus level

细菌 22 株,均以伯克霍尔德菌属 (占根部分离菌株的 62.5%,占茎部分离菌株的 60.87%) 和埃希菌属 (占根部分离菌株的 37.5%,占茎部分离菌株的 30.43%) 为优势菌群,并且这 2 个菌群也存在于叶中。叶中分离到细菌 12 株,以泛菌属 (61.54%) 为优势菌群。

以上结果表明,野生与人工栽培铁皮石斛内生菌类群和比例存在较大差异,只有泛菌属在野生和人工栽培铁皮石斛中都可以分离到。

2.2 野生与人工栽培铁皮石斛内生细菌的多样性和相似性

从多样性指数 (H') 来看 (表 1),野生铁皮石斛

内生细菌的 H' 为 0.85,根、茎、叶的内生细菌 H' 分别为 0.75、0.80 和 1.02,根、茎、叶内生细菌的均匀度指数 (E) 分别为 0.42、0.36、0.63,叶中内生细菌的 H' 和 E 显著高于根和茎中的相关指数。野生植株中茎与根的相似性系数 (C) 最高 ($C_{\text{茎-根}}=0.72$),其次是茎与叶 ($C_{\text{叶-茎}}=0.65$),根与叶的相似性最低 ($C_{\text{根-叶}}=0.60$);根据 Jaccard 相似性系数原理,当 C 介于 0.00~0.25 时为极不相似, C 介于 0.25~0.50 时为中等不相似, C 介于 0.50~0.75 时为中等程度相似, C 介于 0.75~1.00 时为极度相似^[16]。由此可见,野生铁皮石斛根、茎、叶 3 个部位两两之间的内生细菌类群组成均为中等相似。

表 1 铁皮石斛内生细菌的多样性¹⁾
Table 1 The diversity of endophytic bacteria in *Dendrobium officinale*

生境 Habitat	植株部位 Plant part	物种数 No. of bacteria species	多样性指数 Shannon-Wiener diversity index (H')	均匀度指数 Evenness index (E)	相似性系数 Similarity coefficient (C)		
					根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
野生 Wild	根 Root	6	0.75b	0.42b		0.72	0.60
	茎 Stem	9	0.80b	0.36b	0.72		0.65
	叶 Leaf	5	1.02a	0.63a	0.60	0.65	
	整株 Whole plant	9	0.85	0.39			
人工栽培 Artificial cultivation	根 Root	2	0.47b	0.68b		0.44	0.70
	茎 Stem	3	0.87a	0.80a	0.44		0.64
	叶 Leaf	3	0.93a	0.84a	0.70	0.64	
	整株 Whole plant	3	0.61	0.56			

1)相同生境同列数据后的不同小写字母表示植株不同部位间差异显著($P<0.05$, Duncan's法)
1)Different lowercase letters in the same column of the same habitat indicate significant differences among different plant parts ($P<0.05$, Duncan's test)

人工栽培铁皮石斛内生细菌的 H' 为 0.61,根、茎、叶的内生细菌 H' 分别为 0.47、0.87、0.93,根、茎、叶内生细菌的 E 分别为 0.68、0.80、0.84,说明叶中的内生细菌多样性最高,且类群最均匀,根的内生细菌 H' 和 E 显著低于茎和叶的相关指数;人工栽培植株中根与叶相似性最高 ($C_{\text{根-叶}}=0.70$),其次是茎与叶 ($C_{\text{叶-茎}}=0.64$),根与茎中最低 ($C_{\text{根-茎}}=0.44$);根据 Jaccard 相似性系数原理判断标准,人工栽培铁皮石斛植株内生细菌类群在根-叶和茎-叶中均为中度相似,根-茎中为中度不相似。

2.3 野生铁皮石斛活性内生菌的筛选

以野生铁皮石斛代表性内生细菌为供试菌株,进行解磷、解钾、固氮、产铁载体、产 IAA、拮抗菌的活性筛选,共获得 38 株菌株,占筛选菌株的 45%,其中 10 株具有解钾活性,30 株具有固氮活性,2 株具有产 IAA 活性,4 株具有拮抗病原菌活性。这些

活性菌株中,10 株分离自根,25 株分离自茎,3 株分离自叶,分子生物学鉴定归类为芽孢杆菌属 (28 株)、无色菌属 (3 株)、不动杆菌属 (1 株)、短小杆菌属 (1 株)、硫酸素芽孢杆菌属 (2 株)、泛菌属 (1 株)、短食单胞菌属 (1 株)、寡养单胞菌属 (1 株)。菌株 *Bacillus* sp.B70、*Curtobacterim* sp.B81 同时具有固氮和产 IAA 活性。菌株 *Bacillus* sp.B03、*Bacillus* sp.B23、*Stenotrophomons* sp.B32、*Bacillus* sp.B41、*Achromobacter* sp.B68、*Bacillus* sp.B83 同时具有解钾和固氮的特性。说明野生铁皮石斛内生细菌具备较好的促生潜力,是发展菌剂的良好备选。

2.4 野生铁皮石斛内生细菌在铁皮石斛组培苗中的定殖

菌株 *Bacillus* sp.B70、*Curtobacterim* sp.B81 是促生活性较高的菌株,不动杆菌属 *Acinetobacter* 是野生铁皮石斛优势菌群,泛菌属 *Pantoea* 细菌在野

生和人工栽培铁皮石斛中都存在, 菌株 *Acinetobacter* sp.B48 和 *Pantoea* sp.B28 具有拮抗病原菌活性。以菌株 *Bacillus* sp.B70、*Curtobacterim* sp.B81、*Acinetobacter* sp.B48 和 *Pantoea* sp.B28 为供试菌, 观察它们在铁皮石斛组培苗的定殖动态。结果表明, 除了 *Curtobacterim* sp.B81 以外, 其他 3 株菌株能定殖在组培苗的不同部位 (表 2)。菌株 *Pantoea* sp.B28、*Acinetobacter* sp.B48、*Bacillus* sp.B70 在回接 3 d 后能在植物宿主中分离到, 说明内生菌具有一定的定殖效率。在回

接后 10 d, 内生菌定殖部位和数量有所增多, 是内生菌定殖的发展时期。回接后 20 d, 定殖部位有所减少, 说明内生菌定殖因组织部位环境不同出现偏好性。定殖菌回接后 30 与 20 d 相比, 除 *Acinetobacter* sp.B48 在叶中的定殖消失, 其余菌株定殖部位相对稳定, 是定殖相对稳定期。在 30 d 的定殖观察中, 菌株 *Acinetobacter* sp.B48 和 *Bacillus* sp.B70 最终定殖在茎部, 菌株 *Pantoea* sp.B28 能定殖在根、茎、叶各部位。

表 2 内生菌在铁皮石斛组培苗中的定殖动态¹⁾

Table 2 Colonization trends of endophytic bacteria in potted seedling of *Dendrobium officinale*

回接菌株 Backgrafted strain	回接后3 d			回接后10 d			回接后20 d			回接后30 d		
	Three days after backgrafting			10 days after backgrafting			20 days after backgrafting			30 days after backgrafting		
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
<i>Pantoea</i> sp.B28	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter</i> sp.B48	—	—	+	+	+	+	—	+	+	—	+	—
<i>Bacillus</i> sp.B70	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	—
<i>Curtobacterim</i> sp.B81	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

1) “—” 表示没有分离到回接菌, “+” 表示分离到回接菌
1) “—” denotes no isolation of inoculated bacteria; “+” denotes isolation of inoculated bacteria

3 讨论与结论

兰科植物有着丰富的内生细菌资源, 已有研究报道其在根、茎和叶中均有分布, 对宿主植物的生长、抗病和抗逆性等具有重要作用^[17]。本研究从铁皮石斛根、茎、叶中分离到 285 株内生细菌, 隶属 3 门 11 属。从野生铁皮石斛共分离到 217 株内生细菌, 归类为芽孢杆菌属、微杆菌属等 9 个属, 以芽孢杆菌属、不动杆菌属为优势菌群存在于根、茎、叶各部位。从人工栽培铁皮石斛植株中只分离到 68 株内生细菌, 归类为伯克霍尔德菌属、埃希菌属、泛菌属 3 个属, 以伯克霍尔德菌属、埃希菌属为优势菌群存在于植株根、茎部。只有泛菌属在野生和人工栽培铁皮石斛中都有分布, 野生铁皮石斛内生细菌物种多样性指数均明显高于人工栽培铁皮石斛内生细菌, 表明两者内生细菌组成结构存在较大差异。这可能是因为野生铁皮石斛多生长在物种多样的山林环境, 该环境蕴含了丰富的微生物资源, 而人工种植大棚环境单一, 物种有限, 栽培基质频繁消毒处理, 长期的人工栽培模式大大降低了植物内生菌的多样性。植物缺乏内生菌也是其生长缓慢、成活率低、抗逆性差的主要因素^[10]。把野生铁皮石斛中具有促生和生防活性的内生菌接入人工栽培铁皮石斛, 一方面可提高人工栽培铁皮石斛内生

菌多样性, 增强其对栽培环境的适应性, 另一方面也为铁皮石斛仿生态栽培奠定基础。

钾和磷是植物生长必需的营养元素。IAA 可以促进根的生长, 增强根毛增殖和延长。固氮菌为宿主提供一定氮源, 满足其生命需求, 有利于增加产量。产铁载体的内生细菌可以螯合 Fe^{3+} , 有效地竞争致病真菌对铁的需求^[14]。炭疽病是人工栽培铁皮石斛的重要病害, 严重影响石斛产量和品质^[15]。从野生铁皮石斛内生细菌中筛选解磷、解钾、固氮、产铁载体、产 IAA、拮抗炭疽菌活性菌株, 共获得 38 株活性菌株, 占筛选菌株的 45%, 这些内生细菌具有开发促生和生防菌剂的良好潜力。但是菌剂应用在生产栽培实践中面临的主要问题是有效期短和效果不稳定^[18], 其主要原因是活性菌在自然条件下在宿主植物的定殖能力有限。因此定殖能力强是内生菌开发为生产应用菌剂的前提条件。本研究将促生活性较高的菌株 *Bacillus* sp.B70、*Curtobacterim* sp.B81 及优势类群的菌株 *Acinetobacter* sp.B48、*Pantoea* sp.B28 回接组培苗, 除了 *Curtobacterim* sp.B81 以外, 其余菌株在组培苗都有定殖分布, 说明来源于野生铁皮石斛的内生菌在人工组培苗中仍有较好的定殖性。虽然是通过根部接种, 但是菌株 *Bacillus* sp.B70 在回接后 20 d 只存在于茎部, 菌

株 *Acinetobacter* sp.B48 存在于茎和叶部, 这可能是由于植物不同组织部位结构和成分不同, 内生细菌在宿主植物中分布具有组织偏嗜性。

综上所述, 铁皮石斛内生细菌资源丰富, 野生和人工铁皮石斛内生细菌多样性有较大差异, 内生细菌活性比较普遍, 在人工组培苗中有一定的定殖性, 这为铁皮石斛内生细菌功能性开发和利用奠定了基础。

参考文献:

[1] ZHANG J, GUO Y, SI J, et al. A Polysaccharide of *Dendrobium officinale* ameliorates H₂O₂-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes via PI3k/AKT and MAPK pathways[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 104: 1-10.

[2] CHEN H, NIE Q, HU J, et al. Metabolism amelioration of *Dendrobium officinale* polysaccharide on type II diabetic rats[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 102: 105582.

[3] 李朝锋. 广西铁皮石斛产业发展概况及对策研究[D]. 南宁: 广西大学, 2019.

[4] 张明, 刘宏源. 药用石斛产业的发展现状及前景[J]. *中国现代中药*, 2010, 12(10): 8-11.

[5] 李桂锋, 李进进, 许继勇, 等. 铁皮石斛研究综述[J]. *中药材*, 2010, 33(1): 150-153.

[6] 庞璐, 赵兴兵, 吴维佳, 等. 珍贵濒危药材: 铁皮石斛栽培技术[J]. *企业技术开发*, 2011, 30(17): 122-123.

[7] 陈燕兰, 钟淳菲, 徐雅因, 等. 不同地区铁皮石斛的品质差异研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(8): 123-130.

[8] 马旂旒. 不同区域铁皮石斛成分差异分析与指纹图谱建立研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2017.

[9] 邱道寿, 刘晓津, 郑锦荣, 等. 棚栽铁皮石斛的主要病害及其防治[J]. *广东农业科学*, 2011, 38(S1): 118-120.

[10] 陈晓梅, 闫浩利, 王春兰, 等. 菌根真菌 *Mycena* sp. 对铁皮石斛生长和多糖化学性质的影响[J]. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46(7): 872-879.

[11] HARDOIM P R, VAN OVERBEEK L S, BERG G, et al. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(3): 293-320.

[12] RASMUSSEN H. Terrestrial orchids: From seed to mycotrophic plant[M]. Oxford: Cambridge University Press, 1995: 25-30.

[13] 徐超, 刘国华, 张红岩, 等. 优良共生真菌对铁皮石斛的促生机制[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(23): 161-162.

[14] 李鹭. 华石斛根部可培养内生细菌分离鉴定及其促生研究[D]. 海口: 海南大学, 2015.

[15] 龙云川, 陈轩, 周少奇. 高产铁载体根际菌的筛选鉴定及硒活化特性评价[J]. *生物技术进展*, 2017, 7(5): 402-408.

[16] 谢华蓉. 广藿香内生真菌多样性及其在青枯病生物防治中的作用[D]. 广州: 广东药科大学, 2017.

[17] 张萍, 宋希强. 兰科植物内生细菌物种多样性及其促生机理研究进展[J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(1): 92-98.

[18] BENIZRI E, BAUDOUIN E, GUEKCRT A. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2001, 11(5): 557-574.

【责任编辑 李晓卉】