

普凤雅, 谷书杰, 何永宏, 等. 溶磷内生菌的筛选鉴定及其对薏苡生长发育的影响 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (7): 946–953.
PU F Y, GU S J, HE Y H, et al. Identification and Characterization of Phosphate-solubilizing Endophytes in *Coix lacryma-jobi* L. [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (7): 946–953.

溶磷内生菌的筛选鉴定及其对薏苡生长发育的影响

普凤雅¹, 谷书杰¹, 何永宏², 陈崧林¹, 杨志清^{1,3,4*}

(1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201; 3. 云南农业大学云南省药用植物生物学重点实验室, 云南 昆明 650201; 4. 云南农业大学西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】筛选具有溶磷能力的薏苡内生细菌并明确其类型, 为后续研制生物菌肥提供优良菌株资源。【方法】以播种 25 d 的薏苡幼苗为试验材料, 采用研磨稀释涂板法从薏苡的根、茎、叶中分离筛选具有溶磷能力的薏苡内生菌, 探索该类菌溶解有机磷、无机磷、分泌磷酸酶的能力; 通过盆栽试验探究溶磷内生菌对薏苡幼苗的促生长作用。【结果】筛选到溶解有机磷细菌 8 株, 溶解无机磷细菌 5 株。其中, 编号为 R24 的菌株溶解有机磷能力最强, 摇瓶 5 d 后, 上清液可溶性磷含量为 $37.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 编号为 L21 的菌株溶解无机磷能力最强, 摇瓶 5 d 后, 上清液可溶性磷含量为 $62.93 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。2 株溶磷菌及等比例混合菌液能够促进盆栽薏苡的株高、茎粗、分蘖数, 促生长能力从大到小为: $\text{L21} > \text{R24} > \text{混合菌液}$ [$V(\text{R24}) : V(\text{L21}) = 1:1$]。通过 16S rDNA 序列鉴定, R24 为短小芽孢杆菌, L21 为贝莱斯芽孢杆菌。【结论】溶磷菌 L21 和 R24 对薏苡生长有显著促进作用。

关键词: 薏苡; 内生菌; 溶磷细菌; 溶磷能力; 鉴定

中图分类号: S 182

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 07-0946-08

Identification and Characterization of Phosphate-solubilizing Endophytes in *Coix lacryma-jobi* L.

PU Fengya¹, GU Shujie¹, HE Yonghong², CHEN Songlin¹, YANG Zhiqing^{1,3,4*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 3. Key Laboratory of Medicinal Plant Biology of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 4. National & Local Joint Engineering Research Center on Germplasm Innovation & Utilization of Chinese Medicinal Materials in Southwestern China, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: 【Objective】Screening bacteria with phosphate-solubilizing ability in *Coix* were identified and provide excellent strain resource for bio-fertilization agent. 【Methods】Endophytic bacteria were isolated and purified from specimens the roots, stems, and leaves of 25-d-old seedlings of *Coix lacryma-jobi* L. Abilities of the isolates in dissolving organophosphate and inorganic phosphate as well as in secreting phosphatase were determined. In a pot experiment, effects of two selected isolates on the growth of *Coix* seedlings were examined. 【Results】Eight strains of bacteria capable of dissolving organophosphate and 5 of degrading inorganic phosphate were isolated. In the 5-d culture supernatants, the highest concentration of phosphorous converted from organophosphate at $37.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was reached by R24, and that from inorganic phosphate at $62.93 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ by L21. The enhancing effects on plant height, stem girth, and tillering number of the potted *Coix* seedlings by each and mixture in equal proportion of the two supernatants ranked in the order of $\text{L21} > \text{R24} > \text{mixed bacterial liquid}$ [$V(\text{R24}) : V(\text{L21}) = 1:1$]. The 16S rDNA sequence phylogenetic analysis identified R24 as *Bacillus pumilus* and L21 as *B. velezensis*. 【Conclusion】The phosphobacteria L21 and R24 displayed a significant effect in promoting the growth of *Coix* seedlings.

收稿日期: 2022-03-01 初稿; 2022-05-09 修改稿

作者简介: 普凤雅 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药用植物栽培与生理状态 (E-mail: pfy996@163.com)

* 通信作者: 杨志清 (1968-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 药食同源作物栽培与资源评价研究 (E-mail: yzq1468@126.com)

基金项目: 云南省科技计划项目 (2014RE002)

Key words: *Coix*; endophytes; phosphobacteria; phosphate-solubilizing ability; identification

0 引言

【研究意义】薏苡 (*Coix lacryma-jobi* L.) 属于禾本科 (*Gramineae*), 玉蜀黍族 (*Maydeae*) 薏苡属 (*Coix* L.) 植物, 是中国传统的药食兼用作物^[1]。薏苡长期以传统的种植方式栽培, 管理较为粗放, 化肥农药投入量大, 土壤环境遭到破坏, 导致磷素利用率严重下降, 不符合绿色生产^[2]。微生物对土壤磷的转化和有效性影响很大^[3], 解磷微生物能够将植物难以吸收利用的磷转化为可吸收利用的形态, 提高磷元素利用率, 从而促进植物生长发育^[4-5]。【前人研究进展】20 世纪 50 年代我国逐渐对解磷菌的应用开始进行研究, 先后从东北黑土和灰化土中筛选出解磷能力较强的芽孢杆菌、极毛杆菌等^[6]。近年来, 通过筛选具有解磷功能的菌株来提高作物栽培过程中磷元素的利用率, 促进作物生长已成为目前研究的热点。陆蓝翔等^[7]从樟树组织中分离筛选到 4 株菌具有解无机磷能力, 2 株菌具有解有机磷能力; 卢志红等^[8]研究表明内生细菌 SRW 具有较强的增磷能力, 能够促进鸭跖草生长发育; 蔡红丹等^[9]研究表明解磷菌 P2 的使用能够提高水稻种子的萌发, 促进根系生长。【本研究切入点】目前对薏苡内生菌的研究鲜见报道, 尤其是薏苡溶磷内生细菌。因此, 有必要筛选薏苡溶磷内生菌并探究内生菌对薏苡生长的影响, 以便深入了解薏苡生长发育过程中内生菌的作用。【拟解决的关键问题】通过分离文薏 2 号根、茎、叶内生细菌, 筛选薏苡溶磷内生菌, 并分别以植酸钙和 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 作为唯一有机磷源和无机磷源, 初步探究其溶解有机磷和无机磷能力, 通过盆栽试验探究溶磷内生菌对薏苡的促生长作用, 为薏苡溶磷内生菌的开发应用提供理论依据和优良菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

文薏 2 号 (2015 年通过国家小宗粮豆作物品种鉴定委员会鉴定^[10]) 由云南省文山州农业科学院提供。2020 年 7 月, 盆栽试验在云南农业大学后山标本园大棚内进行, 播种 25 d 后, 进行内生菌分离。

1.2 培养基

LB 培养基: $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白胨, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母提取物, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0; 固体培养基在液体 LB 培养基的基础上加入 20

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉。

无机磷培养基: $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值为 7.0~7.5, 固体培养基在液体培养基的基础上加入 $15.0 \sim 18.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉。

有机磷培养基: $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖, $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$, $0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeSO}_4$, $0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$, $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 植酸钙, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值为 7.0~7.5, 固体培养基在液体培养基的基础上加入 $15 \sim 18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉。

1.3 薏苡内生细菌分离和纯化

内生菌的分离纯化参考 Cardoso 等^[11]的方法略有修改。播种 25 d 后, 从薏苡植株上剪取健康的根、茎及叶组织各 1 g, 随后使用自来水冲洗 3 min 去除表面多余的杂质, 滤纸吸干表面水分。然后用 75 % 乙醇浸泡 2 min; 再用 1 % 次氯酸钠消毒根组织 5 min, 茎、叶组织 3 min; 最后用无菌水漂洗 6 次, 除去残留消毒剂并用无菌滤纸将其吸干。将消毒好的植物组织样品放入无菌研钵中并向其内加入 9 mL 无菌水, 研磨至呈匀浆状, 静置 5 min, 取上清液稀释 10^{-2} 倍, 涂布在 LB 平板上, 置于 35 °C 下培养 2 d。挑取长出的菌株进行纯化, 直至板上菌落颜色和形态基本一致, 纯化的菌株用 40 % 甘油保存至 -20 °C 冰箱备用。同时吸取最后一次漂洗的无菌水 100 μL 涂布于 LB 平板, 同等条件下培养, 检验表面消毒是否彻底。

1.4 溶磷内生细菌的筛选

定性测定: 从冰箱中取出保存的内生细菌, 室温下让其呈熔融状态。在超净台上用接种环蘸取少许菌液, 参照郭艺鹏等^[12]的方法分别点接于有机磷和无机磷固体平板上, 每个菌株重复 3 次。30 °C 培养 5 d, 观察有无溶磷圈生成, 测定溶磷圈直径 (D)、菌落直径 (d)。根据可溶性指数 (D/d) 大小初步确定菌株的溶磷能力。定量测定: 采用钼锑抗比色法^[13]测定其磷含量。

1.5 溶磷菌分泌磷酸酶活性测定

磷酸酶活性测定参照赵为容等^[14]的方法。分别将菌株 R24、L21 接种于 100 mL 有机磷和无机磷培养基中, 于 30 °C, $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡培养, 以相应的不接菌的培养基为空白对照, 试验重复 3 次, 每隔 24 h 取 1 mL 进行磷酸酶活性测定。

1.6 溶磷细菌对薏苡生长发育的影响

菌悬液制备：将菌体于 35 ℃ 下培养 28 h，然后 8 000 r·min⁻¹ 离心收集菌体，无菌水重悬，调节菌悬液浓度为 10⁷ cfu·mL⁻¹ 用于后续试验。

试验采用随机区组设计，设置 4 个处理，分别为 T1、T2、T3、T4 (CK)，每个处理 5 次重复，共 20 盆。T1：浇 L21 重悬菌液；T2：浇 R24 重悬菌液；T3：浇 R24 和 L21 等比例混合重悬菌液；T4：浇无菌水 (CK)。

挑选籽粒外观饱满无病虫危害的健康薏苡种子，表面消毒处理后播种于育苗盘内，10 d 后选择长势一致的苗移栽至高 17 cm、外口径 25 cm 的花盆里。采用灌根法，每盆灌入 400 mL 上述菌悬液，置于温室大棚中培养，对照用无菌水。在薏苡的生长过程中，于灌根菌液后，每隔 15 d 测量薏苡株高、茎粗、叶面积、分蘖数、叶片数，并用叶绿素测定仪测定叶绿素含量。

1.7 菌株生理生化测定和 16S rDNA 序列分析

将筛选获得的菌株划线接种在 LB 固体培养基上，35 ℃ 培养 24 h 后，根据《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》对菌株进行形态学和生理生化测定。用生工生物工程 (上海) 有限公司研制的试剂盒提取细菌 DNA，采用通用引物 27 F (5'-3': AGTTTGATCMTGGCTCAG) 和 1492R (5'-3': GGTTACCTTGTTACGACTT) 进行 PCR 扩增。送至生工生物工程 (上海) 有限公司测序，获得菌株的 16S rDNA 序列。将所测序列在 GenBank 中进行 blast 同源性搜索，然后将菌相似性较高的序列用 MAGE-X 软件中的邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育树。

1.8 数据分析与处理

采用 Excel 2010 和 SPSS 25.0 对数据进行记录、整理、统计和分析。

2 结果与分析

2.1 不同菌株降解有机磷能力测定

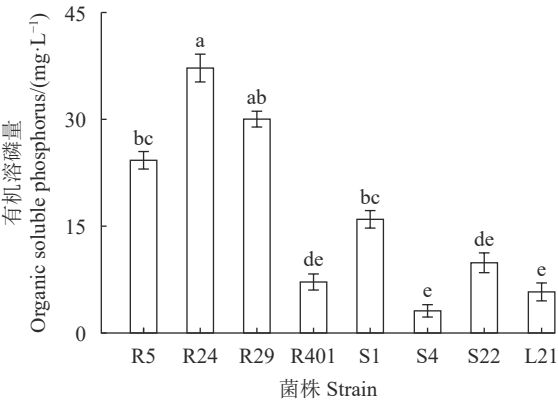
2.1.1 定性测定 将菌株点接于有机磷固体培养基中，培养 5 d 后，观察有无透明圈，结果如表 1 所示，在固体平板上，菌株 R24 的溶磷圈直径 (D) 与菌落直径 (d) 之比最大，为 (2.15 ± 0.13)，显著大于其余菌株 (P<0.05)。

2.1.2 定量测定 菌株在液体培养基中培养 5 d 后，测定上清液可溶性磷的含量，结果 (图 1) 发现不同菌株间存在显著差异 (P<0.05)。其中，R24 菌株可溶性磷含量最大，为 37.20 mg·L⁻¹，显著大于除

表 1 菌株降解有机磷能力的比较
Table 1 Organic phosphate degrading ability of strains

菌株 Strains	菌株直径 Strain diameter/ cm	透明圈直径 Diameter of transparent ring/cm	D/d
R5	0.35±0.05 b	0.55±0.05 cd	1.58±0.09 b
R24	0.29±0.06 b	0.63±0.09 bc	2.15±0.13 a
R29	0.33±0.05 b	0.53±0.05 d	1.62±0.11 b
R401	0.50±0.01 a	0.77±0.05 a	1.53±0.12 b
S1	0.29±0.05 b	0.49±0.05 d	1.71±0.16 b
S4	0.37±0.03 b	0.54±0.03 cd	1.46±0.19 b
S22	0.39±0.03 b	0.66±0.06 b	1.69±0.09 b
L21	0.49±0.11 a	0.79±0.02 a	1.66±0.32 b

不同小写字母表示不同材料间差异显著 (P<0.05)；下同。
Different small letters indicate significant 0.05 among different materials. The same as below.



不同小写字母表示不同材料间差异显著 (P<0.05)；下同。
Data with different lowercase letters indicate significant differences at P<0.05. The same as below.

图 1 有机磷培养基摇瓶培养 5 d 后可溶性磷含量

Fig. 1 Solubilized phosphorus in organophosphate-containing liquid medium after 5 d culture in shaking-flask

R29 以外的其他供试菌株 (P<0.05)，分离自根部的 R29 菌株可溶性磷含量次之，为 30.03 mg·L⁻¹。

2.2 不同菌株降解无机磷能力的测定

2.2.1 定性测定 将菌株点接至无机磷固体培养基中，培养 5 d 后观察有无透明圈。各供试菌株的溶无机磷能力存在一定差异，分离自叶片的 L21 菌株的溶磷圈最大，溶磷圈直径 (D) 与菌落直径 (d) 之比为 (2.01 ± 0.25)，显著大于其余菌株 (P<0.05) (表 2)。

2.2.2 定量测定 菌株在液体培养基中培养 5 d 后，测定上清液可溶性磷含量。测定结果如图 2 所示。L21 菌株可溶性磷含量最大，为 62.93 mg·L⁻¹，显著

表 2 菌株降解无机磷的能力比较
Table 2 Inorganic phosphate degrading ability of strains

菌株编号 Strains	菌株直径 Strain diameter/cm	透明圈直径 Diameter transparent ring/cm	D/d
R5	0.70±0.10 a	1.32±0.18 a	1.89±0.15 bc
R24	0.35±0.06 b	0.65±0.12 b	1.88±0.39 bc
R29	0.29±0.04 b	0.52±0.09 b	1.82±0.16 bc
R401	0.79±0.07 a	1.19±0.06 a	1.52±0.06 c
L21	0.33±0.02 b	0.67±0.04 b	2.01±0.25 a

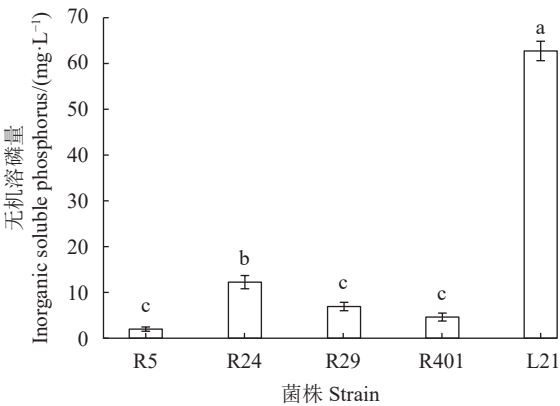


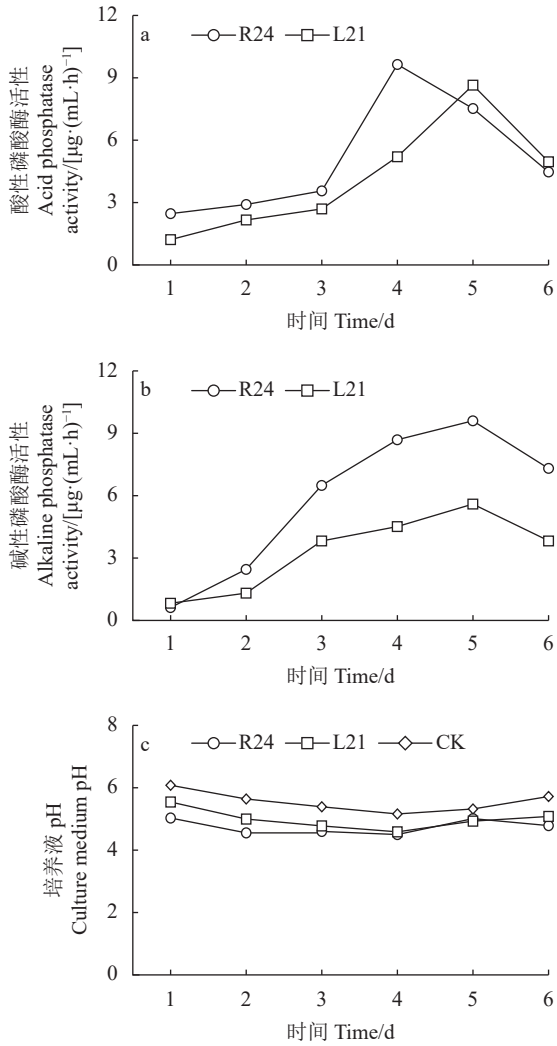
图 2 无机磷培养基摇瓶培养 5 d 后可溶性磷含量

Fig. 2 Solubilized phosphorus in inorganic phosphate-containing liquid medium after 5 d culture in shaking-flask

大于其余供试菌株 ($P<0.05$), 分离自根部的 R5 菌株可溶性磷含量最小, 为 $1.99\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 在有机磷培养基中溶磷菌株分泌磷酸酶的动态变化

在有机磷培养基中, 2 株解磷细菌培养 6 d 后, 发酵液酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的活性分别如图 3-a、b 所示, 随着培养时间的增加, 菌株分泌磷酸酶活性呈现先上升后降低的趋势。培养 4 d 后, 菌株 R24 的酸性磷酸酶活性达到最大值; 培养 5 d 后, 菌株 L21 的酸性磷酸酶活性达到最大值。两菌株相比, R24 分泌酸性磷酸酶活性的峰值比 L21 高出 10.37%。R24 和 L21 分泌碱性磷酸酶的能力均在培养第 5 天时达到最大值, 其中 R24 比 L21 高出 72.58%。测定发酵液每天的 pH 值发现, 两菌株培养后, 其发酵液的 pH 值均低于空白处理, R24 的 pH 低于 L21 (图 3-c)。说明在有机磷培养基中, 菌株 R24 分泌酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性均高于 L21, 有利于其分解难溶性有机磷, 此结果与 2.1 中该菌株溶解有机磷能力最高一致。



a: 酸性磷酸酶活性; b: 碱性磷酸酶活性; c: 有机磷培养基 pH 动态变化。

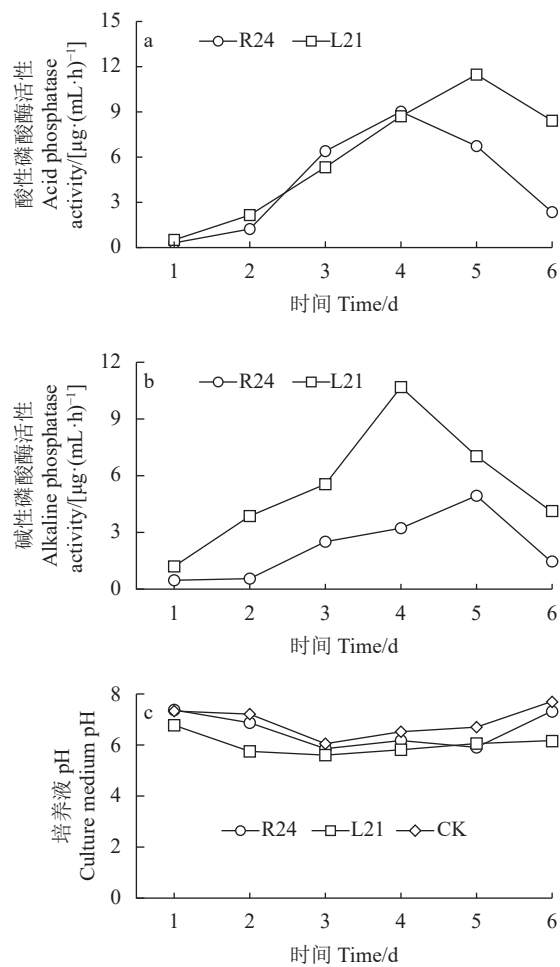
a: Acid phosphatase activity; b: Alkaline phosphatase activity; c: Dynamic pH changes in organophosphate culture medium.

图 3 溶磷菌株在有机磷培养基中分泌磷酸酶活性动态变化

Fig. 3 Dynamic changes on phosphatase secretion of two strains in organophosphate medium

2.4 在无机磷培养基中溶磷菌株分泌磷酸酶的动态变化

在无机磷培养基中, 2 株解磷菌培养 6 d 后, 发酵液酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的活性如图 4-a、b 所示, 随着培养时间的增加, 菌株分泌磷酸酶活性呈现的趋势为先上升后下降。R24 分泌酸性磷酸酶活性在培养第 4 天时达到最大值, 而 L21 在培养 5 d 时达到最大值, L21 的酸性磷酸酶活性最大值比 R24 高出 27.30%; R24 分泌碱性磷酸酶活性在培养第 5 天达到最大值, 而 L21 在培养 4 d 达到最大值, L21 碱性磷酸酶活性最大值比 R24 高出 116.84%。测定发酵液每天的 pH 可知, 两菌株培养后, 发酵液的 pH 均低于空白处理, L21 发酵液的 pH 低于 R24



a: 酸性磷酸酶活性; b: 碱性磷酸酶活性 c: 无机磷培养基 pH 动态变化。
a: Acid phosphatase activity; b: Alkaline phosphatase activity; c: Dynamic pH changes in inorganic phosphate culture medium.

图 4 溶磷菌株在无机磷培养基中分泌磷酸酶活性动态变化
Fig. 4 Dynamic changes on phosphatase secretion of two strains in inorganic phosphate medium

(图 4-c)。说明在无机磷培养基中, L21 分泌的酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性高于 R24, 有利于该菌株

分解难溶性无机磷, 此结果与 2.2 中的该菌株溶解无机磷能力相同。

2.5 不同溶磷菌株处理对薏苡农艺性状的影响

由表 3 可知, 在培养 60 d 后, T1、T2 和 T3 处理下的薏苡株高、茎粗、分蘖数和叶面积均大于对照 CK。其中, 株高和分蘖数与 CK 达到显著水平 ($P < 0.05$)。T1、T2 和 T3 处理对薏苡的叶片生长影响较小, 与 CK 相比未达到显著水平 ($P > 0.05$)。在培养 30 d 后, 薏苡叶片叶绿素相对含量达到最大值, T1、T2 和 T3 处理分别比 CK 增加 19.74%、12.85%、7.98%。总之在培养 60 d 后, T1、T2 和 T3 处理对薏苡的生长发育均有一定的促进作用 (图 5)。

2.6 溶磷菌株生理生化与 16S rDNA 鉴定

2.6.1 细菌的生理生化鉴定 如图 6 所示, R24 菌落圆形, 凸起明显, 白色, 表面粗糙湿润; L21 菌落圆形, 凸起不明显, 白色, 表面粗糙干燥, R24 和 L21 革兰氏染色均为阳性。菌株 R24、L21 的生理生化测定结果见表 4, 在所测定的生理生化指标中, 菌株 R24 的甲基红试验、淀粉水解、硝酸盐试验为阴性, 其余为阳性; 菌株 L21 的柠檬酸试验为阴性, 其余为阳性。

2.6.2 细菌分子鉴定 对菌株进行 16S rDNA 基因片段扩增, 将 PCR 产物测序结果提交 GenBank 与序列相似性较高的菌株进行比对, 构建系统发育树 (图 7)。结果显示: 2 株细菌均为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。其中, 菌株 R24 与 *Bacillus pumilus* (登录号: NBRC 12092) 处于系统发育树的同一分支, 同源性 99%, 鉴定为短小芽孢杆菌; 菌株 L21 与 *Bacillus velezensis* (登录号: MK092676.1) 处于系统发育树的同一分支, 同源性 100%, 鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。

表 3 不同处理下盆栽薏苡农艺性状
Table 3 Agronomic traits of potted plants after treatments

时间 Time/d	处理 Treatment	株高 Plant height/cm	茎粗 Stem diameter/mm	分蘖 Tillers number/个	叶片 Blades number/片	叶面积 Leaf area/m ²	叶绿素相对含量 SPAD
15	T1	38.80±3.49 a	5.34±0.09 a	0.00±0.00	4.40±0.55 a	0.29±0.03 a	19.45±0.85 ab
	T2	37.00±2.12 a	4.72±0.23 bc	0.00±0.00	4.00±0.00 a	0.28±0.05 a	21.14±1.37 a
	T3	39.40±2.07 a	5.05±0.20 ab	0.00±0.00	4.40±0.55 a	0.25±0.04 a	20.17±1.64 ab
	CK	36.80±3.96 a	4.66±0.45 c	0.00±0.00	4.20±0.45 a	0.25±0.06 a	18.12±1.83 b
30	T1	52.00±7.18 a	6.94±0.27 a	1.60±0.89 a	5.20±0.45 a	0.56±0.06 a	23.11±1.72 a
	T2	42.00±3.54 b	7.07±0.36 a	1.40±0.89 a	5.40±0.55 a	0.47±0.09 ab	21.78±1.69 ab
	T3	46.60±6.31 ab	6.82±0.54 a	1.40±0.55 a	5.40±0.55 a	0.54±0.09 a	20.84±1.62 bc
	CK	40.80±7.05 b	5.87±0.19 b	0.60±0.55 a	5.20±0.45 a	0.40±0.06 b	19.30±0.49 c

续上表

时间 Time/d	处理 Treatment	株高 Plant height/cm	茎粗 Stem diameter/mm	分蘖 Tillers number/个	叶片 Blades number/片	叶面积 Leaf area/m ²	叶绿素相对含量 SPAD
45	T1	55.80±4.21 a	8.91±0.42 a	2.20±0.45 a	6.00±0.00 a	0.79±0.06 a	22.79±0.78 a
	T2	51.00±4.30 a	8.56±0.3 a	2.20±0.45 a	5.60±0.55 a	0.70±0.09 b	20.38±0.91 b
	T3	52.80±9.73 a	7.21±0.36 b	1.80±1.10 ab	5.60±0.55 a	0.74±0.04 ab	18.90±0.48 c
	CK	54.40±2.88 a	6.76±0.35 b	1.00±0.71 b	5.40±0.55 a	0.61±0.02 c	16.90±1.16 d
60	T1	70.80±4.32 a	9.04±0.34 a	2.20±0.45 ab	6.20±0.45 a	0.92±0.04 a	18.42±0.92 a
	T2	67.20±4.44 a	8.68±0.19 a	2.40±0.55 a	6.00±0.00 a	0.77±0.06 b	18.70±1.01 a
	T3	66.00±4.30 a	7.70±0.12 b	1.80±1.10 ab	5.80±0.45 a	0.89±0.07 a	15.67±1.21 b
	CK	58.00±2.55 b	7.24±0.62 b	1.20±0.84 b	6.00±0.00 a	0.60±0.08 c	16.28±2.45 b

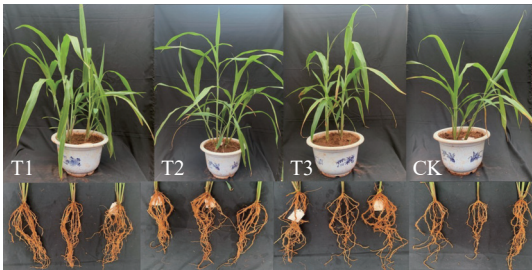


图 5 不同处理下薏苡的生长情况

Fig. 5 Growth phenotype of coix seedlings after treatments

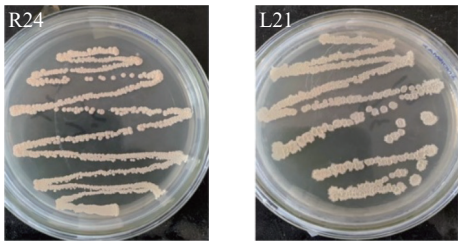


图 6 菌株 R24、L21 的菌落形态

Fig. 6 Colony morphology of R24 and L21

表 4 菌株的生理生化特性

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of strains

试验指标 Test index	菌株 Strains	
	R24	L21
革兰氏染色 Gram stain	+	+
V-P试验 V-P test	+	+
甲基红试验 Methyl red test	-	+
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	-	+
吲哚试验 Indole test	+	+
柠檬酸试验 Citrate test	+	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+
硝酸盐试验 Nitrate reduction test	-	+

+: 阳性; -: 阴性。
+: Positive; -: Negative.

3 讨论与结论

解磷菌是一类能够将土壤中的难溶性磷转化为可以被植物吸收利用的可溶性磷的有益微生物，在玉米^[15]、小麦^[16]等作物上已进行广泛研究。目前国内很少有对薏苡进行内生菌的分离鉴定及功能的探究。本研究通过平板接菌试验筛选得到溶解有机磷细菌 8 株，分别为分离自薏苡根系的 R5、R24、R29、R401，分离自薏苡茎秆的 S1、S4、S22，分离自薏苡叶片的 L21，而 R5、R24、R29、R401 和 L21 同时具有溶解无机磷的能力。这与马骢毓等^[17]从黄芪根际中分离得到溶解无机磷菌株 42 株和溶解有机磷菌株 33 株在数量上有所差距，究其原因可能是不同的植物、分离的材料数所导致。

本研究中，分离自薏苡根系的 R24 对有机磷的溶解能力最强，为 37.20 mg·L⁻¹，分离自薏苡叶片的 L21 对无机磷的溶解能力最强，为 62.93 mg·L⁻¹；狄义宁等^[18]在甘蔗中分离得到的溶磷菌 D5 的溶磷量。此外，R24 在有机磷培养基中分泌磷酸酶的能力最强，酸性磷酸酶活性和碱性磷酸酶活性分别达 9.64 μg·(mL·h)⁻¹ 和 9.63 μg·(mL·h)⁻¹；L21 在无机磷培养基中分泌磷酸酶的能力最强，酸性磷酸酶活性和碱性磷酸酶活性分别达到 11.47 μg·(mL·h)⁻¹、10.69 μg·(mL·h)⁻¹。溶磷内生细菌的溶无机磷和有机磷的能力各不相同，这可能是由于菌株分泌的磷酸酶、植酸酶等能力不同^[19]，同时菌株溶磷能力的高低也与菌株自身的遗传因素有关^[20-21]，有待进一步深入研究。

溶磷菌对植物的生长发育具有显著的促进作用，在本研究中，浇灌 L21 菌液后，与对照相比，薏苡的株高较 CK 增加 22.07%，茎粗增加 24.86%，叶面积增加 53.33%，分蘖数增加 83.33%。经 L21 和 R24 处理后，薏苡根系活力与 CK 达到显著水平 ($P<0.05$)，分别较 CK 增加 89.52%、63.76%。L21 和 R24

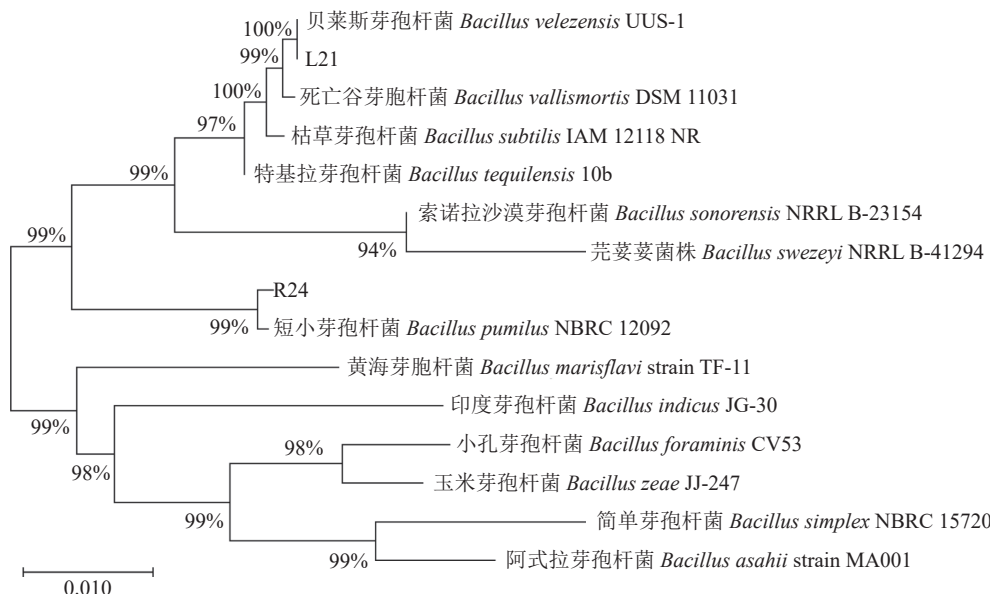


图 7 溶磷菌株 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic trees generated by neighbor-joining method based on 16S rDNA sequences of selected strains

的等比例混合菌液与 CK 相比, 在株高、叶面积方面促进效果显著, 但是低于 L21 和 R24 单独处理的效果, 可能的原因是两株菌在营养物质和生态位等方面有所竞争, 这与 Li 等^[22]研究的溶磷菌增加了玉米芽长、生物量的结果一致。总的来说 L21、R24 和混合菌剂处理对薏苡的生长发育均有一定的促进作用, 促生长能力从大到小为: L21>R24>(L21+R24), 可作为开发薏苡微生物肥料的优质菌种资源。

参考文献:

- [1] 李晓凯, 顾坤, 梁慕文, 等. 薏苡仁化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51 (21): 5645-5657.
- LI X K, GU K, LIANG M W, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Coicis Semen [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51 (21): 5645-5657. (in Chinese)
- [2] 王艳玲, 何园球, 吴洪生, 等. 长期施肥下红壤磷素积累的环境风险分析 [J]. *土壤学报*, 2010, 47 (5): 880-887.
- WANG Y L, HE Y Q, WU H S, et al. Environmental risk analysis of accumulated phosphorus in red soil under long-term fertilization [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47 (5): 880-887. (in Chinese)
- [3] SANTOYO G, MORENO H G, OROZCO M M, et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes [J]. *Microbiological Research*, 2016, 183: 92-99.
- [4] 潘复静, 陈英倩, 梁月明, 等. 种植密度对马尾松人工林土壤磷转化功能微生物与细菌群落结构的影响 [J]. *生态学杂志*, 2021, 40 (5): 1233-1243.
- PAN F J, CHEN Y Q, LIANG Y M, et al. Effects of stand density on community structure of soil *phoD*-harboring microorganisms and bacteria in *Pinus massoniana* plantations [J]. *Chinese Journal of*

Ecology, 2021, 40 (5): 1233-1243. (in Chinese)

- [5] WONIAK M, GAZKA A, TYKIEWICZ R, et al. Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the biologic GEN III MicroPlate™ Test [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (21): 5283.
- [6] 池景良, 郝敏, 王志学, 等. 解磷微生物研究及应用进展 [J]. *微生物学杂志*, 2021, 41 (1): 1-7.
- CHI J L, HAO M, WANG Z X, et al. Advances in research and application of phosphorus-solubilizing microorganism [J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 41 (1): 1-7. (in Chinese)
- [7] 陆蓝翔, 江明明, 王焱, 等. 两株樟树内生抗病细菌的分离、筛选及鉴定 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2018, 42 (6): 128-136.
- LU L X, JIANG M M, WANG Y, et al. Isolation, screening and identification of endophytic bacteria from *Cinnamomum camphora* that promote growth and antagonistic pathogen [J]. *Journal of Nanjing Forestry University(Natural Sciences Edition)*, 2018, 42 (6): 128-136. (in Chinese)
- [8] 卢志红, 倪国荣, 陈龙, 等. 鸭跖草抗铜内生菌株的筛选及其促生性质研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2019, 41 (6): 1167-1174.
- LU Z H, NI G R, CHEN L, et al. Isolation and growth-promoting properties of Anti-copper endophytes strains from *Commelina communis* [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2019, 41 (6): 1167-1174. (in Chinese)
- [9] 蔡红丹, 王碧盈, 肖翠红, 等. 解磷、溶磷菌对水稻种子萌发的影响 [J]. *黑龙江农业科学*, 2019 (7): 42-45.
- CAI H D, WANG B Y, XIAO C H, et al. Effects of phosphate-solubilizing bacteria on seed germination of rice [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2019 (7): 42-45. (in Chinese)
- [10] 农明英, 张世鲍, 高海涛, 等. 薏苡品种文薏2号及主要栽培技术 [J].

- 中国种业, 2018 (10): 94-97.
- NONG M Y, ZHANG S B, GAO H T, et al. Variety Wenyi No. 2 and its main cultivation techniques [J]. *China Seed Industry*, 2018 (10): 94-97. (in Chinese)
- [11] CARDOSO V M, CAMPOS F F, SANTOS A, et al. Biotechnological applications of the medicinal plant *Pseudobrickellia brasiliensis* and its isolated endophytic bacteria [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129 (4): 926-934.
- [12] 郭艺鹏, 王海儒, 孙林琦, 等. 枣根际解磷细菌的分离筛选及16S rDNA鉴定 [J]. 河南农业大学学报, 2015, 49 (6): 811-816, 837.
- GUO Y P, WANG H R, SUN L Q, et al. Screening and 16S rDNA identification of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere soils of jujube [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2015, 49 (6): 811-816, 837. (in Chinese)
- [13] 张黎丽, 张阁, 王欣艺, 等. 土壤中降解有机磷微生物的筛选 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2019, 50 (5): 774-777.
- ZHANG L M, ZHANG G, WANG X Y, et al. Screening of strains for Organophosphorus-degradation in soil [J]. *Journal of Shandong Agricultural University(Natural Science Edition)*, 2019, 50 (5): 774-777. (in Chinese)
- [14] 赵为容. 小麦亲和性根际解磷菌解磷机理及促生效果研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
- ZHAO W R. Study on phosphorus dissolving mechanisms and growth-promoting effects of affinity Phosphate-solubilizing rhizobacteria for wheat[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [15] ADNAN M, FAHAD S, ZAMIN M, et al. Coupling phosphate-solubilizing bacteria with phosphorus supplements improve maize phosphorus acquisition and growth under lime induced salinity stress [J]. *Plants*, 2020, 9 (7): 900.
- [16] 张云霞, 雷鹏, 许宗奇, 等. 一株高效解磷菌 *Bacillus subtilis* JT-1 的筛选及其对土壤微生态和小麦生长的影响 [J]. *江苏农业学报*, 2016, 32 (5): 1073-1080.
- ZHANG Y X, LEI P, XU Z Q, et al. Screening of a high-efficiency phosphate solubilizing bacterium *Bacillus subtilis* JT-1 and its effects on soil microecology and wheat growth [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 32 (5): 1073-1080. (in Chinese)
- [17] 马骥毓, 张英, 马文彬, 等. 黄芪根际促生菌(PGPR)筛选与特性研究 [J]. *草业学报*, 2017, 26 (1): 149-159.
- MA C Y, ZHANG Y, MA W B, et al. Identification of plant growth promoting rhizobacteria *Astragalus membranaceus* and their effectiveness [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26 (1): 149-159. (in Chinese)
- [18] 狄义宁, 刘鲁峰, 谢林艳, 等. 一株甘蔗内生菌鉴定及其溶磷能力的研究 [J]. *作物杂志*, 2018, 34 (6): 68-75.
- DI Y N, LIU L F, XIE L Y, et al. Identification and characterization of a phosphate-solubilizing endophyte from sugarcane [J]. *Crops*, 2018, 34 (6): 68-75. (in Chinese)
- [19] 庄馥璐, 柴小粉, 高蓓蓓, 等. 苹果根际解磷菌的分离筛选及解磷能力 [J]. *中国农业大学学报*, 2020, 25 (7): 69-79.
- ZHUANG F L, CHAI X F, GAO B, et al. Isolation and screening of phosphorus-solubilizing bacteria in apple rhizosphere [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25 (7): 69-79. (in Chinese)
- [20] XIE J, YAN Z, WANG G, et al. A bacterium isolated from soil in a Karst rocky desertification region has efficient Phosphate-solubilizing and plant growth-promoting ability [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021 (11): 625450.
- [21] 刘胜亮, 朱舒亮, 祁先慧, 等. 四株解磷菌分泌有机酸与溶解磷酸三钙能力的研究 [J]. *新疆农业科学*, 2017, 54 (6): 1114-1121.
- LIU S L, ZHU S L, QI X H, et al. Study on organic acid secreted from 4 strains Phosphorus-solubilizing bacteria and calcium phosphate dissolving ability [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2017, 54 (6): 1114-1121. (in Chinese)
- [22] LI Y, LIU X, HAO T, et al. Colonization and maize growth promotion induced by phosphate solubilizing bacterial isolates [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18 (7): 1253.

(责任编辑：林海清)