

土壤栽培和无土栽培菜心中内生细菌比较及分离鉴定*

顾李成¹ 黄彩怡¹ 黄淑芬¹ 江宝茹¹ 谭淑雅¹ 陈俊毅¹ 彭桂香² 谭志远^{1**}

¹华南农业大学农学院 广州 510642

²华南农业大学资源环境学院 广州 510642

摘要 菜心 (*Brassica parachinensis*) 是华南地区的一种特色蔬菜。为探究无土栽培和土壤栽培菜心中内生细菌的差异, 以这两种栽培方式的菜心为材料, 分离内生细菌。根据插入序列指纹图谱 (IS-PCR) 结果进行聚类, 对代表性菌株的16S rRNA基因序列进行系统发育分析, 并将菌株加入无土栽培营养液中, 收获后测定菜心的相对叶绿素含量 (SPAD) 和可溶性糖含量。结果显示, 从两种菜心中共分离到31株内生细菌, IS-PCR结果将其聚为9个类群, 16S rRNA基因鉴定其分别属于 *Bacillus* sp. (芽孢杆菌属)、*Rhizobium* sp. (根瘤菌属)、*Microbacterium* sp. (微杆菌属)、*Leifsonia* sp. (雷夫松氏菌属)、*Sphingomonas* sp. (鞘氨醇单胞菌属)、*Alcaligenes* sp. (产碱菌属) 和 *Agrobacterium* sp. (农杆菌属)。土壤栽培菜心中可培养细菌数目多于无土栽培菜心, 且土壤栽培菜心中内生细菌的碳代谢更多样化。生理生化实验显示, 部分菌株能分泌生长素和铁载体。加入土壤栽培菜心中分离得到的菌株SCG14和SCG0802后, 无土栽培菜心的相对叶绿素含量和可溶性糖含量比对照显著提高。本研究表明无土栽培和土壤栽培的菜心中的内生细菌在种类、数目、分布部位和碳源利用能力上有差异; 此外, 分离得到的菌株能提高无土栽培菜心的相对叶绿素以及可溶性糖含量, 有开发为微生物制剂的潜力。(图4表6参35)

关键词 无土栽培; 土壤栽培; 菜心; 内生细菌; 相对叶绿素含量; 可溶性糖含量

CLC Q939.11 : S634.5

Comparison, identification, and characterization of endophytic bacteria from Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis*) using soil and soilless culture*

GU Licheng¹, HUANG Caiyi¹, HUANG Shufen¹, JIANG Baoru¹, TAN Shuya¹, CHEN Junyi¹, PENG Guixiang² & TAN Zhiyuan^{1**}

¹ College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

² College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis*) is a type of special vegetable in southern China. In the present study, several endophytic bacterial strains were respectively isolated from soil and soilless cultivated Chinese flowering cabbage to identify the difference between the two materials. The isolated strains were divided into several groups according to their IS-PCR DNA fingerprinting patterns. Thereafter, 16S rRNA gene sequences of representative strains were aligned for phylogenetic analysis. The bacterial fluid of the representative strains was added into the soilless culture nutrient solution during planting. The relative chlorophyll content (SPAD) and soluble sugar content of each group were measured after harvest. As a result, 31 isolates were respectively acquired from the two materials and were divided into 9 groups by the IS-PCR fingerprinting method. Through a subsequent analysis of the 16S rRNA gene sequences of the representative strains, they were implied to belong to *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Microbacterium* sp., *Leifsonia* sp., *Sphingomonas* sp., *Alcaligenes* sp., and *Agrobacterium* sp. By using the plate counting method, we confirmed the presence of more culturable endophytic bacteria inside the soil cultured than the soilless cultured Chinese flowering cabbage. Furthermore, the Bio-BIQA board test result indicated that carbon metabolism of microbes from the soil cultured Chinese flowering cabbage had more diversity than those from the soilless cultured cabbage. The physiological and biochemical tests revealed that some strains could secrete indole acetic acid and produce siderophore. After adding the bacterial fluid of the strains, SCG14 and SCG0802, into the soilless

收稿日期 Received: 2019-03-26 接受日期 Accepted: 2019-05-13

*国家自然科学基金项目 (31370052)、广东省科技项目 (2018A050506075, 2018B020205003, 2018B020206001) 和广东省植物分子育种重点实验室资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370052), the Science and Technology Program of Guangdong Province (2018A050506075, 2018B020205003, 2018B020206001) and the Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zytan@scau.edu.cn)

culture nutrient solution, the relative chlorophyll content and soluble sugar content of Chinese flowering cabbage caused a significant promotion relative to that recognized in the control group. These findings demonstrate that the endophytic bacteria in soilless cultured Chinese flowering cabbage and those in soil cultured Chinese flowering cabbage differ in type, number, distribution, and carbon metabolism. In addition, the isolated strains could enhance the relative chlorophyll content (SPAD) and soluble sugar content of soilless cultured Chinese flowering cabbage, which have a prospect in the development of new microbial preparations.

Keywords soilless culture; soil culture; *Brassica parachinensis*; endophytic bacteria; relative chlorophyll content (SPAD); soluble sugar content

菜心 (Chinese flowering cabbage, CFC) 是广东省的特产蔬菜, 柔嫩可口。而且华南地区热量条件优越, 菜心可以在一年中多季种植^[1]。

无土栽培以人工的基质和营养液代替传统土壤栽培, 优化了植物根系环境, 充分发挥生长潜力, 提高品质, 这种作用在蔬菜上尤为明显^[2]。通过无土栽培技术, 农产品的供需矛盾可以被大大缓解。这一点, 对人口占世界五分之一的中国来说尤其有吸引力。

植物内生细菌是生活在植物组织内部的细菌, 它们不会对植物产生有害的影响^[3]。大多数植物体内均有植物内生细菌存在。一些具有生防作用的有益内生细菌不仅能够起到与化学农药相似的作用, 还能避免使用农药对环境 and 人类健康的危害, 在植物保护方面有很大的应用价值^[4]。植物内生细菌不只是定殖在植物体内, 并且在植物生长发育、抵抗生物与非生物胁迫等方面起重要作用^[5-7], 同时也能作为联合固氮菌制剂等, 因此, 植物内生细菌的研究现已成为国内外研究的一大热点。

但目前对菜心中内生细菌的研究还较少, 李静等从菜心中分离出一株能防治菜心炭疽病和霜霉病的多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)^[1]; 黄献培对积累了环丙沙星的菜心的根际和体内微生物群落结构进行过研究^[8]。此外, 在无土栽培和土壤栽培的比较方面, 近年来有学者对土壤栽培和无土栽培蔬菜的采后品质^[9]、经济效益^[10]、硫代葡萄糖苷含量^[11]进行了研究。但至今没有在内生细菌的层面上对无土栽培和土壤栽培的菜心比较研究的报道。

因此, 探究有土和无土栽培的菜心中内生细菌的差异, 以及它们对无土栽培菜心品质的影响, 一方面填补了这个研究方向的空白; 另一方面, 为进一步探究菜心中内生细菌的特性并加以利用, 开发微生物制剂, 从而改进菜心无土栽培使用的营养液配方做了基础性研究, 为提高无土栽培菜心的品质做贡献。

1 材料与方法

1.1 菜心的种植

2017年9月30日, 用椰棕和珍珠岩混合成的育苗基质育苗, 地点为华南农业大学试验基地23号棚。菜心幼苗有四片真叶展开时进行定植。在刚定植时, 每箱加入11 L营养液, 以根尖刚接触到营养液液面为宜。同时, 将菜心幼苗定植在装有菜园土的花盆中, 和无土栽培菜心的设备放置在一起, 控制光照和温度一致。无土栽培和土壤栽培的菜心数量相同,

各24株。

每天用与无土栽培相同的营养液浇灌土壤栽培的菜心, 至浇透为止。2017年11月3日, 收获无土栽培和土壤栽培的菜心, 进行下一步的试验。

营养液配方参考刘士哲方法^[12]:

A液 (500 mL): 硝酸钙47.2 g, 硝酸钾26.7 g, 硝酸铵5.3 g。

B液 (500 mL): 磷酸二氢钾10 g, 硫酸钾11.6 g, 硫酸镁26.4 g。

C液 (500 mL): 硫酸铁13.90 g, EDTA二钠18.6 g, 硼酸1.43 g, 硫酸锰0.77 g, 硫酸锌0.11 g, 硫酸铜0.04 g, 钼酸铵0.01 g。

其中A液、B液为200倍液, C液为1 000倍液, 稀释前不可混合。

1.2 内生细菌的分离

用自来水洗去菜心表面的灰尘, 分别取适量叶片、茎、根和花。将这些组织先用75%的酒精洗涤2 min, 去除蜡质层, 随即浸入0.1%氯化汞溶液2 min, 随后用无菌超纯水洗7遍, 每次30 min, 800 r/min摇动。取最后一次清洗液100 μ L用平板涂布法检验表面消毒是否彻底。

在超净工作台上, 将消毒好的根、茎、叶、花4种组织分别在研钵中磨碎, 将组织匀浆分别于LB与PCA平板上进行涂布, 37 $^{\circ}$ C培养数日, 每天观察平板上的菌落的颜色、形态和直径, 挑取代表性菌落在对应培养基平板上划线纯化, 待出现的单菌落颜色、形态一致时再用显微镜检测纯度。将确认纯化的菌株保存于灭过菌的15%丙三醇中, 混合均匀, 于-20 $^{\circ}$ C冷藏。

1.3 可培养内生细菌数量的计算

取无土栽培和土壤栽培菜心的根、茎、叶、花4种组织, 分别与0.01的天平上称重, 消毒方法同内生细菌的分离。加10 mL灭菌的超纯水研磨, 摇匀后用移液枪各取100 μ L组织匀浆在LB平板上涂布, 每种样品3个重复, 对菌落进行计数, 然后计算整棵菜心中总的可培养内生细菌数量。用SPSS对数据进行差异分析。

试验方法及培养基参考赵斌和何绍江的方法^[13]。

1.4 唯一碳源利用能力分析

将土壤栽培和对照组的无土栽培菜心的组织匀浆接种于Bio-BIQA碳源利用板^[14], 28 $^{\circ}$ C培养过夜。24 h后拍照并判断Bio-BIQA碳源利用板孔中菌株的生长状况。观察各孔的颜色变化, 变成蓝紫色或紫黑色为能利用该碳源, 否则不能利用该碳源, 以无碳源加超纯水的孔为对照, 两组菜心各3个

重复. 用SPSS对数据进行差异分析.

1.5 内生细菌总DNA的提取

提取方法为文献[15]中的小量提取法.

1.6 IS-PCR指纹图谱扩增及分析

以单引物J₃ (5'-GCT CAG GTC AGG TGG CCT GG-3') 扩增指纹图谱^[16]. 反应总体积为25 μL.

PCR程序为: (1) 95 °C预变性 3 min; (2) 95 °C变性 60 s; (3) 56 °C退火 50 s; (4) 72 °C延伸 60 s (第2、3、4步35个循环); (5) 72 °C再延伸 5 min.

PCR反应体系 (25 μL): ddH₂O 10.5 μL, 2*TSINGKE Master Mix 12.5 μL, J₃引物1 μL, DNA模板 (20 ng/μL) 1 μL.

PCR产物用6%非变性丙烯酰胺凝胶电泳分离, 染色后用Tanon凝胶成像系统将IS-PCR指纹图谱的结果转换为矩阵, 再使用TREECONW对各菌株进行聚类, 算法为非加权算术平均数配对法 (Unweighted pair-group method with arithmetic averages, UPGMA).

1.7 16S rRNA基因序列鉴定

根据IS-PCR指纹图谱结果, 从每个类群中选一株细菌作为代表性菌株进行16S rRNA基因序列分析. PCR扩增引物分别为: 上游引物25f (5'-AAC TKA AGA GTT TGA TCC TGG CTC-3'); 下游引物1 492r (5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT-3'); 反应程序同IS-PCR. PCR反应体系 (25.0 μL): ddH₂O 10.5 μL, 2*TSINGKE Master Mix 12.5 μL, 25f 0.5 μL, 1 492r 0.5 μL, DNA模板 (20 ng/μL) 1 μL. 16S rRNA基因扩增产物送交天一辉远测序. 借助NCBI数据库对所得序列BLAST, 然后用MEGA 7.0对代表菌株序列和模式菌株序列构建系统发育树, 方法为Neighbor-joining method, 计算次数为1 000次.

1.8 代表菌株生理生化鉴定

具体试验方法及培养基配方参见文献[13], 包括柠檬酸盐试验、明胶液化试验、硝酸盐还原试验、乙酰甲基甲醇试验 (V.P.)、甲基红试验 (M.R.)、精氨酸双水解试验、生长素定性试验、铁载体检测试验.

1.9 内生细菌对无土栽培菜心品质的影响

种植时间为2018年12月4日至2019年1月5日, 地点为华南农业大学试验基地23号棚. 菜心品种和营养液配方与前期一

致. 共6个处理, 每个处理种3箱, 每箱6株, 在种植初期加入11 L营养液, 保证菜心苗根尖刚好接触到营养液液面.

在定植菜心苗的同时, 将前期试验中从菜心中分离出的菌株在LB液体培养基中进行扩大培养, 条件为37 °C摇床培养72 h, 之后把菌液按照不同处理加入各组无土栽培营养液中.

1.10 菜心品质的定量测定

测定指标为6种不同处理的菜心样品的相对叶绿素含量 (SPAD) 和可溶性糖含量. 用Konka Minolta SPAD-502叶绿素仪测定相对叶绿素含量; 将各组菜心于恒温鼓风干燥箱中75 °C烘干24 h后, 用蒽酮比色法^[17]测定1.0 g干样中可溶性糖含量.

利用SPSS比较6种不同处理间菜心的指标是否有显著差异, 统计方法为Duncan's新复极差法 (DMRT), 柱状图用Excel 绘制.

2 结果与分析

2.1 菜心内生细菌分离结果

如表1所示, 本试验总共从无土栽培和土壤栽培的菜心中分离出31株内生细菌, 其中从无土栽培菜心中分离出17株内生细菌, 土壤栽培的菜心中分离出14株内生细菌. 两种栽培方式的菜心中, 从根部分离出的细菌共有22株, 其中无土栽培的菜心根部9株, 土壤栽培的菜心根部13株; 叶部4株, 其中无土栽培的菜心叶中3株, 土壤栽培的菜心叶中1株; 花中4株, 均来源于无土栽培的菜心; 茎部1株, 来源于无土栽培菜心. 细菌数量为根>叶和花>茎.

2.2 不同栽培基质菜心中可培养内生细菌数量

如表2所示, 通过平板涂布计数法得知, 土壤栽培菜心的各组织中菌落数都多于无土栽培菜心菌落数量. 说明土壤栽培菜心中可培养内生细菌数量高于无土栽培菜心.

2.3 菜心内生菌唯一碳源利用多样性分析

如表3所示, 土壤栽培的菜心中内生菌 (包括内生细菌) 的碳源利用率较高, 达到88.1% ± 1.3%; 无土栽培的菜心中的内生菌 (包括内生细菌) 的碳源利用率较低, 为75.8% ± 3.4%.

2.4 IS-PCR指纹图谱分析

根据IS-PCR指纹图谱的结果, 使用TREECONW将31株

表1 不同栽培基质菜心中内生细菌
Table 1 The endophytic bacteria from Chinese flowering cabbage of different culture mediums

菌株 Strain	分离部位 Origin	来源 Source	培养基 Medium	菌株 Strain	分离部位 Origin	来源 Source	培养基 Medium
WCG01	根 Root	无土栽培 Soilless culture	LB	WCH05	花 Flower	无土栽培 Soilless culture	LB
WCG05	根 Root	无土栽培 Soilless culture	LB	SCG06	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCG0701	根 Root	无土栽培 Soilless culture	LB	SCG0801	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCG0702	根 Root	无土栽培 Soilless culture	LB	SCG0802	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCG0703	根 Root	无土栽培 Soilless culture	LB	SCG09	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCG08	根 Root	无土栽培 Soilless culture	LB	SCG1001	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCG0901	根 Root	无土栽培 Soilless culture	PCA	SCG1002	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCG10	根 Root	无土栽培 Soilless culture	PCA	SCG11	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCG11	根 Root	无土栽培 Soilless culture	PCA	SCG1201	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCJ0202	茎 Stem	无土栽培 Soilless culture	LB	SCG1204	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCY0203	叶 Leaf	无土栽培 Soilless culture	PCA	SCG14	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCY0301	叶 Leaf	无土栽培 Soilless culture	PCA	SCG15	根 Root	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCY0302	叶 Leaf	无土栽培 Soilless culture	PCA	SCG17	根 Root	土壤栽培 Soil culture	LB
WCH02	花 Flower	无土栽培 Soilless culture	LB	SCG18	根 Root	土壤栽培 Soil culture	LB
WCH03	花 Flower	无土栽培 Soilless culture	LB	SCY0302	叶 Leaf	土壤栽培 Soil culture	PCA
WCH04	花 Flower	无土栽培 Soilless culture	LB				

表2 不同栽培基质菜心 (CFU) 中可培养内生细菌数量 (n_{CFU}/g^{-1} , FM)
Table 2 The number of culturable endophytic bacteria from CFC (Chinese flowering cabbage) of different culture medium (n_{CFU}/g^{-1} , FM)

样品 Sample	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	花 Flower
土壤栽培菜心 Soil cultured CFC	264.3 ± 8.8**	67.3 ± 5.3**	82.5 ± 15.6*	153.8 ± 3.6*
无土栽培菜心 Soilless cultured CFC	11.2 ± 0.3	0.8 ± 0.2	5.4 ± 0.7	126.7 ± 7.3

表中数据为3次重复的平均值 ± 标准误。
The data in the table are the average ± standard errors of 3 repetitions.
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表3 菜心 (CFU) 内生菌碳源利用情况
Table 3 The utility of carbon source of endophytic microbes in CFC (Chinese flowering cabbage)

样品 Sample	可利用碳源数量 Number of useable carbon source	碳源利用率 The carbon utility rate (r/%)
土壤栽培菜心 Soil cultured CFC	83.7 ± 1.2*	88.1 ± 1.3*
无土栽培菜心 Soilless cultured CFC	72 ± 3.2	75.8 ± 3.4

表中数据为3次重复的平均值 ± 标准误。
The data in the table are the average ± standard errors of 3 repetitions.
* $P < 0.05$.

细菌聚为9类 (图1)。不同类群的指纹图谱的条带数量和大小之间存在明显区别, 显示了各类群之间分子水平上的差异。

结合内生细菌分离结果 (表2) 可得, 同时存在于土壤栽培和无土栽培的类群有4个, 为类群 I、类群 III、类群 VI 和类群 VIII。只存在于无土栽培菜心中的类群有3个, 为类群 IV、类群 VII 和类群 IX。只存在于土壤栽培菜心中的类群有2个, 为类群 II 和类群 V。

2.5 16S rRNA基因序列分析

从每个类群中选出一个代表性菌株, 使用25f和1 492r 这对引物其进行扩增, 测序后, 登录NCBI进行BLAST, 获得模式菌株序列比对结果 (表4), 进而采用邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统发育树 (图2), 计算次数为1 000次。

2.6 代表性菌株生理生化及功能试验

如表5所示, 类群 III、类群 V、类群 VII 和类群 IX 的代表菌株均能将葡萄糖分解为丙酮酸, 再进一步产生其他有机酸, 使培养液 pH 值小于 4.2, 从而使甲基红显红色; 类群 II、III、IV、VI、VIII、IX 的代表菌株代谢葡萄糖的过程中, 产生的乙酰甲基甲醇经过一系列反应后, 其产物同精氨酸反应显示红色; 类群 I、III、IV、V、VII、VIII 的代表菌株可以还原培养基中的 NO_3^- , 使之成为 NO_2^- , 并进一步还原为 NH_3 和 N_2 , 使格利丝亚硝酸试剂变为红色, 粉红色或是棕色; 类群 III、V、VII、VIII 的代表菌株可以分泌蛋白酶, 将明胶降解为小分子物质, 使

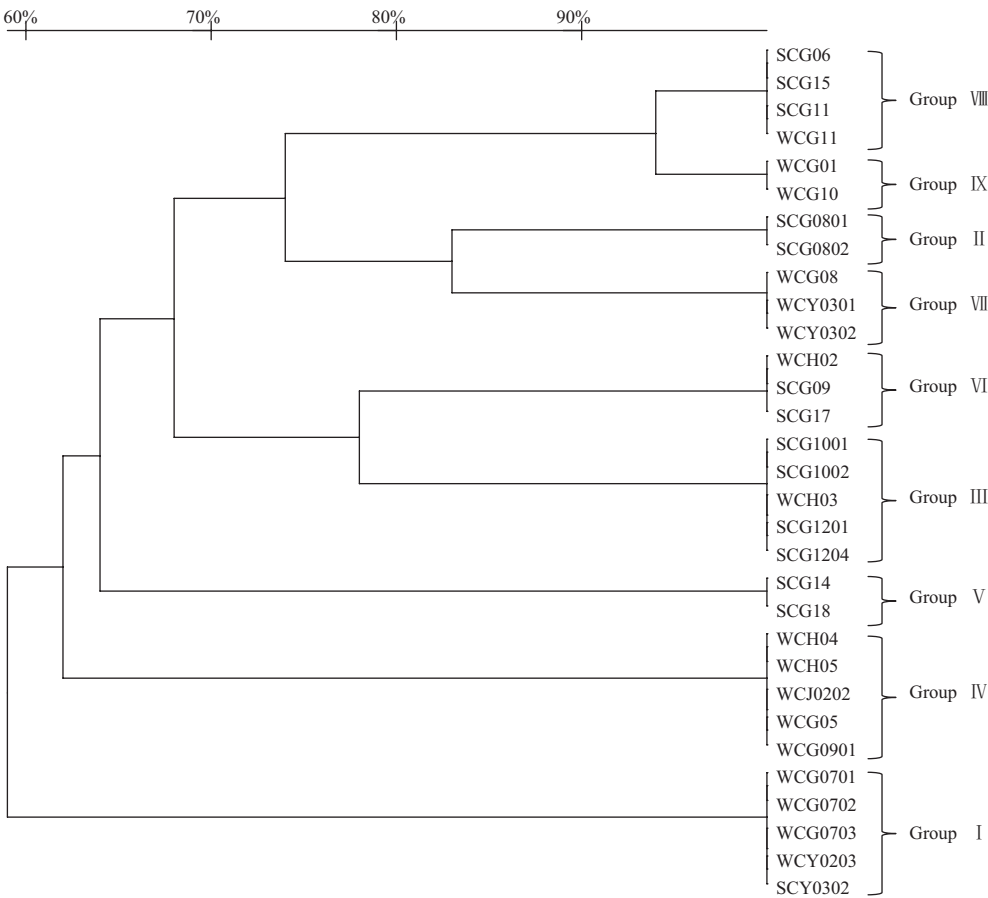


图1 两种栽培基质菜心内生细菌IS-PCR指纹图谱相似性聚类图 (UMPGA)。
Fig. 1 The similarity clustering diagram of IS-PCR fingerprint of endophytic bacteria from Chinese flowering cabbage of two different culture medium (UMPGA).

表4 代表菌株16S rRNA基因序列同源性比对结果
Table 4 The similarity of 16S rRNA gene sequence of the representative strains compared with known species

类群 Type	菌株 Strain	GenBank登录号 GenBank accession number	相似性最高的模式菌株 The most similar model strain	相似性 Similarity (r/%)
I	WCG0701	MK838446	<i>Bacillus badius</i> 110 ^T	98.3
II	SCG0802	MK843271	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T	99.4
III	SCG1002	MK843272	<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118 ^T	99.9
IV	WCG05	MK843302	<i>Microbacterium paraoxydans</i> CF36 ^T	99.5
V	SCG14	MK843250	<i>Leifsonia soli</i> TG-S248 ^T	98.9
VI	WCH02	MK843306	<i>Sphingomonas panaciterrae</i> DCY91 ^T	99.6
VII	WCG08	MK843304	<i>Bacillus oleronius</i> DSM 9356 ^T	99.4
VIII	SCG06	MK843234	<i>Alcaligenes faecalis</i> sub sp. <i>parafaecalis</i> G ^T	99.6
IX	WCG01	MK843300	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NCPPB 2437 ^T	98.9

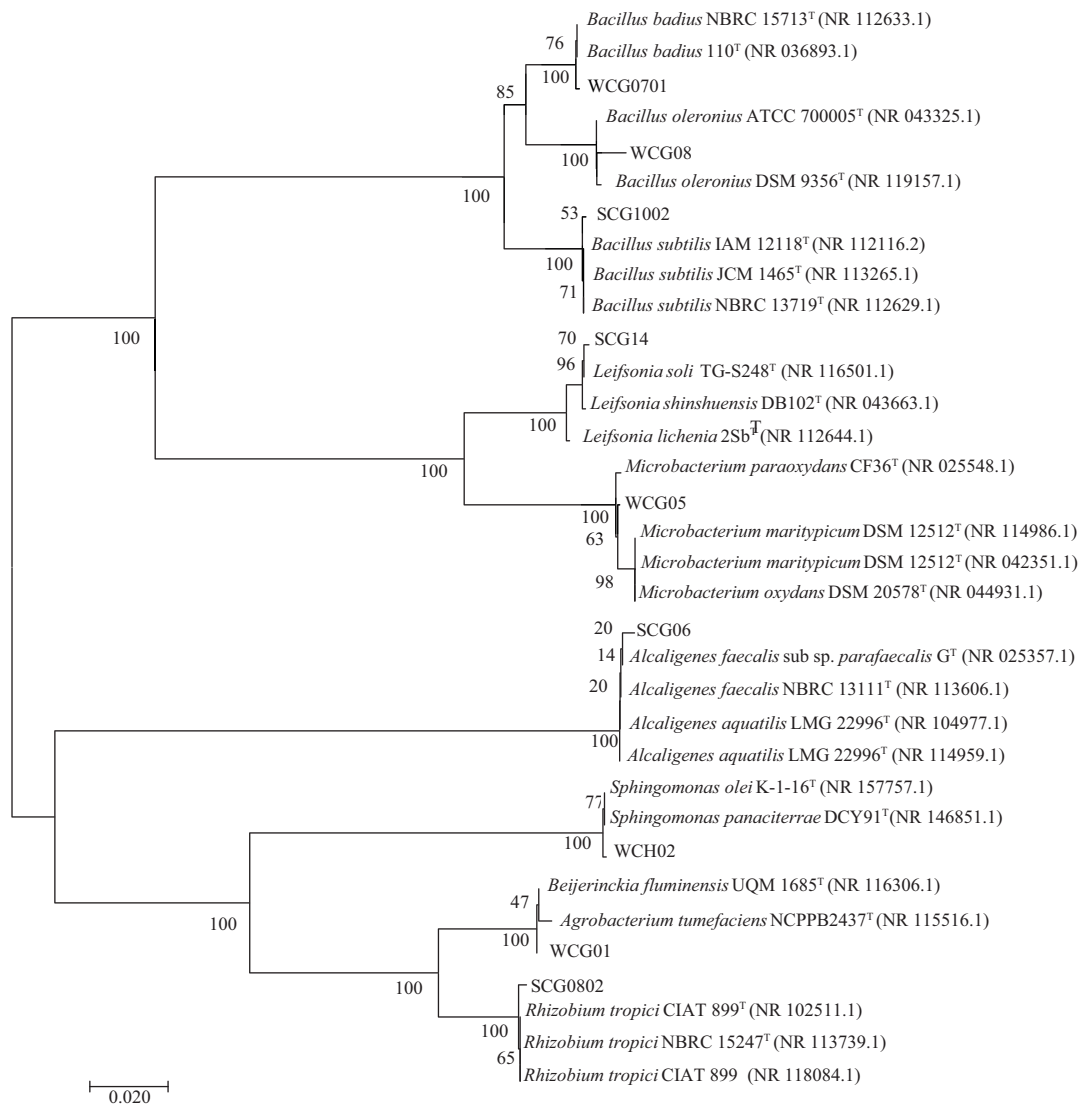


图2 代表菌株系统发育树。标尺为核苷酸碱基差异，分支处的数字为1 000次的自展支持率(%)，上标T为模式菌株标号，括号内为模式菌株的NCBI登记号。
Fig. 2 Phylogenetic tree of representative strains based on 16S rRNA gene sequence. The scale shows the nucleotide base difference, the number at the branch is the self-expanding support rate (%) of 1 000 times, the superscript T is the model strain label, and the NCBI registration numbers of the representative strain are in parentheses.

其失去凝胶特性，在4 ℃低温下无法凝固；类群Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅷ的代表菌株可通过两步水解，将精氨酸分解，使培养基pH下降，酚红显黄色；类群Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ的代表菌株可以分解柠檬酸盐作为碳源，产生的二氧化碳与培养基中的钠离子结合成

Na₂CO₃，使培养基中的溴麝香草酚蓝显蓝色。
在功能方面，属于类群Ⅰ的WCG0701、属于类群ⅣWCG05、属于类群Ⅶ的WCG08有一定的分泌生长素能力。属于类群Ⅷ的SCG06能产生铁载体。

表5 代表菌株的生理生化及功能试验结果

Table 5 The physiological and biochemical properties of the representative strains

菌株 Strain	WCG01	WCG05	SCG06	WCG0701	WCG08	SCG0802	SCG1002	SCG14	WCH02
柠檬酸钠 Citrate utilization	-	+	-	-	-	+	+	-	-
明胶 Gelatin	-	-	+	-	+	-	+	+	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	+	+	+	+	-	+	+	-
乙酰甲基甲醇 Voges prokauer	+	+	+	-	-	+	+	-	+
甲基红 Methyl red	+	-	-	-	+	-	+	+	-
精氨酸双水解 Arginine dihydrolase	-	+	+	-	-	-	+	+	-
生长素 Indoleacetic acid	-	+	-	+	+	-	-	-	-
铁载体 Siderophore	-	-	+	-	-	-	-	-	-

“+”为阳性反应，“-”为阴性反应。
“+” is positive reaction,“-” is negative reaction.

2.7 接种不同内生菌对无土栽培菜心品质的影响

根据IS-PCR和16S rRNA基因序列的测定结果，I、Ⅲ、Ⅵ、Ⅷ4个类群同时存在于无土栽培和土壤栽培菜心中，Ⅳ、Ⅶ、Ⅸ3个类群只存在于无土栽培菜心中，Ⅳ、Ⅶ、Ⅸ3个类群只存在于土壤栽培菜心中（图3），选择每个类群中的一株菌作为代表性菌株进行栽培试验。如表6所示，每个处理中，分别加入20 mL每种细菌的菌液，并设置不加细菌的对照。每组3个重复，求各组数据的平均值和标准误，统计方法为Duncan’s新复极差法（ $\alpha = 0.05$ ），统计结果见图4。

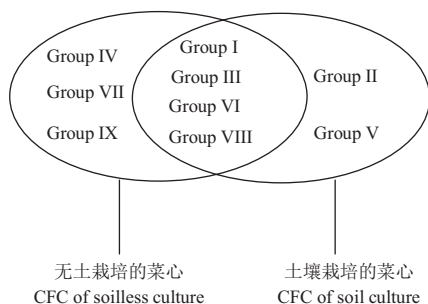


图3 两种栽培方式菜心（CFC）中内生细菌分布情况。
Fig. 3 Distribution of endophytic bacteria from two different culture types of CFC (Chinese flowering cabbage).

表6 不同处理无土栽培菜心中回接菌株列表

Table 6 The representative strains added to the soilless culture solution of CFC (Chinese flowering cabbage)

处理 Treatment	加入菌株 The representative strains added to the soilless culture solution
1	WCG05 (Ⅳ), WCG08 (Ⅶ), WCG01 (Ⅸ), WCG0701 (Ⅰ), SCG1002 (Ⅲ), WCH02 (Ⅵ), SCG06 (Ⅷ)
2	SCG0802 (Ⅱ), SCG14 (Ⅴ), WCG0701 (Ⅰ), SCG1002 (Ⅲ), WCH02 (Ⅵ), SCG06 (Ⅷ)
3	SCG0802 (Ⅱ), SCG14 (Ⅴ)
4	WCG05 (Ⅳ), WCG08 (Ⅶ), WCG01 (Ⅸ)
5	WCG0701 (Ⅰ), SCG1002 (Ⅲ), WCH02 (Ⅵ), SCG06 (Ⅷ)
CK	无 Without

每个处理中，分别加入20 mL每种细菌的菌液。CK为对照组。括号中为类群编号。

Add 20 mL of liquid medium of each strain to each dispose. CK means control group. The group numbers are in the brakcts.

在95%的置信度下，处理3的相对叶绿素含量值显著高于对照，与其他组无显著差异；处理3的可溶糖含量显著高于对照以及其他处理（图4）。

3 讨论与结论

不同类群内生菌的插入序列（IS）位置 and 数量存在差异，因此许多学者^[15-16, 18-19]运用IS-PCR技术对内生菌进行聚类分析，本研究通过此技术将31株内生菌分为9个类群，与各类群菌株的16S rRNA基因序列比对结果相互印证，进一步体现了该结果的可靠性；聚类结果显示，在土壤和无土两种不同栽培方式下种植的菜心，其内生菌的种类和数量存在差异；平板计数结果表明，土壤栽培的菜心体内内生菌的数量高于无土栽培菜心；Bio-BIQA碳源利用板的结果显示，土壤栽培的菜心中内生菌的碳源利用率要高于无土栽培菜心；进一步的功能测定试验中分离得到3株具有产生长素能力的菌株；1株具有产铁载体功能的菌株；无土栽培菜心的回接实验表明，菌株SCG0802和SCG14能显著提高菜心的相对叶绿素和可溶性糖含量。

土壤栽培的菜心体内内生菌的数量高于无土栽培菜心，可能是由于土壤有机质丰富，而营养液中的有机物数量有限，所以在生长期会有更多的内生菌从根部等位置侵入菜心体内，与菜心共生，因此体内可培养内生菌的数量远多于无土栽培菜心中的数量。其中，两种栽培方式的菜心根和花中内生菌数目较多，可能是根是内生细菌进入植物的首要通道，同时根作为植物吸收无机养料的器官，有多种无机离子；而相比于茎和叶，花中有较丰富的次生代谢物，因此这两个器官中有更多的细菌生长繁殖。

土壤栽培的菜心中内生菌的碳源利用率高于无土栽培菜心，可能的原因是土壤可利用的碳源种类更多，土壤栽培菜心中可培养微生物的碳代谢比无土栽培菜心中的更为多样化，能产生更多的生化反应，使菜心组织中的微生物的碳源利用情况更为多样化，这也可以解释从土壤栽培的菜心中分离出的菌株SCG0802和SCG14能提升无土栽培菜心的品质的现象。得到的3株具有产生长素能力的菌株，其中WCG05被鉴定为*Microbacterium* sp.，WCG0701和WCG08均被鉴定为*Bacillus* sp.，相关研究报道也表明这两个属的菌株具有产生长素功能^[20-22]；铁载体功能的定性试验中，得到属于*Alcaligenes* sp.的SCG06菌株，Sayyed和Patel以及Khanolkar等的研究结果^[23-24]也表明此属菌株具有产铁载体功能。

菜心的回接实验结果表明处理3的菜心的相对叶绿素和可溶性糖含量均高于对照，说明土壤栽培的菜心中分离得到的菌株SCG0802和SCG14能提高无土栽培菜心的品质，这与

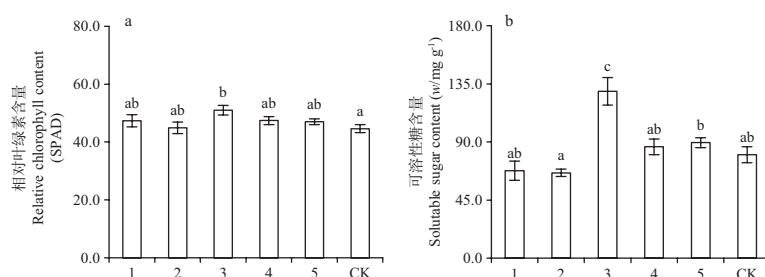


图4 菜心 (CFC) 的品质 ($N = 3$)。图中柱代表3次重复的平均值, 误差棒代表每组数据的标准误差, 不同字母代表0.05水平下的显著差异。横轴数字和字母代表不同处理。可溶性糖的含量是菜心地上部干样中的含量。

Fig. 4 The quality of Chinese flowering cabbage (CFC, $N = 3$). The column represents average of 3 repeats, the error bars represent the standard deviation of each group of data and different letters on the columns show the significance level of difference at 0.05 level. The number under the x-axis means different treatment. The soluble sugar content was the content in the dry sample of CFC's shoot.

前人对柳树^[25]、花生^[26]的研究结果一致, 可能原因是它们在菜心体内的定殖能力较强, 并具有对菜心的生理生化过程进行调控的能力^[27], 如提高菜心体内的酶活性^[28], 增加菜心体内N、Mg含量, 从而提高叶绿素含量, 增强光合作用, 促进菜心生物量增加^[29]。因此可推断菌株SCG0802和SCG14具有开发成微生物制剂的潜力。

本研究分离所得菌株均为可培养内生菌, 有些内生菌在培养基上可以存活, 但无法繁殖形成菌落, 即所谓VBNC状态 (Viable but nonculturable, 存活但不可培养)^[30], 因此传统方法获得的微生物只占环境中微生物总数的1/10左右, 仅靠传统方法不能充分显示菜心中内生细菌的分布状况^[31], 因而需要更先进的技术手段进行更深入的科学验证。另外, 内生菌的组成也与植物生长环境、季节、发育阶段等多方面因素相关^[32-35], 本研究由于条件和时间限制只使用了水培和菜园土盆栽进行对比, 因此还可以进一步设计不同季节、栽培基质及营养液配方的栽培试验, 以获得更加全面的试验结果。

参考文献 [References]

- 李静, 陈维信, 刘爱媛, 冯淑杰, 肖晶. 菜心内生细菌CX-PA的检测及生防作用[J]. 中国生物防治, 2007, **23** (4): 362-367 [Li J, Chen WX, Liu AY, Feng SJ, Xiao J. Identification and biocontrol effect of bacterial strain CX-PA selected from flowering Chinese flowering cabbage [J]. *Chin J Biol Ctrl*, 2007, **23** (4): 362-367]
- Savvas D, Gruda N. Application of soilless culture technologies in the modern greenhouse industry—a review [J]. *Eur J Hort Sci*, 2018, **83** (5): 280-293
- Hong CE, Park JM. Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2016, **10** (6): 353-357
- Singh M, Kumar A, Singh R, Pandey KD. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds [J]. *Biotechnology*, 2017, **7** (5): 315
- Liu HW, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CMJ, Schenk PM. Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria [J]. *Front Microbiol*, 2017, **8**: 2552
- Singh M, Awasthi A, Soni SK, Singh R, Verma RK, Kalra A. Complementarity among plant growth promoting traits in rhizospheric bacterial communities promotes plant growth [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 15500
- Shameer S, Prasad TNKV. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses [J]. *Plant Growth Regul*, 2018, **84** (3): 603-615
- 黄献培. 环丙沙星高/低累积菜心根际及体内微生物学特征差异研究[D]. 广州: 暨南大学, 2016 [Huang XP. Differences in rhizospheric and endophytic microbial characteristics of Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis*) with high/low ciprofloxacin accumulation [D]. Guangzhou: Jinan University, 2016]
- Pace B, Capotorto I, Gonnella M, Baruzzi F, Cefola M. Influence of soil and soilless agricultural growing system on postharvest quality of three ready-to-use multi-leaf lettuce cultivars [J]. *Adv Horticult Sci*, 2018, **32** (3): 353-362
- Maestre-Valero JF, Martin-Gorriz B, Soto-Garcia M, Martinez-Mate MA, Martinez-Alvarez V. Producing lettuce in soil-based or in soilless outdoor systems, which is more economically profitable? [J]. *Agric Water Manage*, 2018, **206**: 48-55
- Di Gioia F, Avato P, Serio F, Argentieri MP. Glucosinolate profile of *Eruca sativa*, *Diplotaxis tenuifolia* and *Diplotaxis erucoides* grown in soil and soilless systems [J]. *J Food Compos Anal*, 2018, **69**: 197-204
- 刘士哲. 现代实用无土栽培技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 144-145 [Liu SZ. Technique of modern practical soilless culture [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2001: 144-145]
- 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002 [Zhao B, He SJ. Microbiology experiment [M]. Beijing: Science Press, 2002]
- 彭桂香, 张武, 谭卫军, 谭志远. 细菌生理特性快速检测试剂盒研制[J]. 生态学杂志, 2011, **30** (11): 2509-2515 [Peng GX, Zhang W, Tan WJ, Tan ZY. A kit for rapid detection of bacterial physiological characters [J]. *Chin J Ecol*, 2011, **30** (11): 2509-2515]
- 谭志远, 傅琴梅, 彭桂香, 原红娟, 程艳波, 江院. 青香茅和五节芒内生固氮菌的分离与生理生化鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2013, **19** (4): 643-649 [Tan ZY, Fu QM, Peng GX, Yuan HJ, Cheng YB, Jiang Y. Identification and characterization of endophytic diazotrophs isolated from *Cymbopogon caesius* and *Miscanthus floridulus* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2013, **19** (4): 643-649]
- 王春连, 章琦, 周永力, 赵炳宇. 我国长江以南地区水稻白叶枯病原菌遗传多样性分析[J]. 中国水稻科学, 2001, **15** (2): 131-136 [Wang CL, Zhang Q, Zhou YL, Zhao BY. Genetic diversity of pathogen

- Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from southern regions of Yangtze river in China [J]. *Chin J Rice Sci*, 2001, **15** (2): 131-136]
- 17 肖英方, 张存政, 顾正远. 水稻品种对白背飞虱的抗性机理[J]. 植物保护学报, 2001, **28** (3): 198-202 [Xiao YF, Zhang CZ, Gu ZY. Studies on the relationship between resistance to whitebacked planthopper *Sogatelia furcifera* (horvath) and contents of some metabolites in rice varieties [J]. *Acta phytophyl Sin*, 2001, **28** (3): 198-202]
 - 18 林琳, 姬广海, 马改转, 王永吉, 张丽辉. 西南地区水稻细菌性条斑病菌的遗传多样性分析[J]. 江西农业大学学报, 2011, **33** (2): 264-269 [Lin L, Ji GH, Ma GZ, Wang YJ, Zhang LH. Genotypic diversity analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in southwest China by rep-PCR [J]. *Acta Agric Univ Jiangxiensis*, 2011, **33** (2): 264-269]
 - 19 曾列先, 陈深, 张慧, 潘汝谦, 杨健源, 伍圣远, 翟培茹, 朱小源. 广东水稻白叶枯病菌遗传多样性和小种分化研究[J]. 植物病理学报, 2009, **39** (3): 231-237 [Zeng LX, Chen S, Zhang H, Pan RQ, Yang JY, Wu SY, Zhai PR, Zhu XY. Genetic diversity and variability of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Guangdong [J]. *Acta Phytopath Sin*, 2009, **39** (3): 231-237]
 - 20 Mutai C, Njuguna J, Ghimire S. Brachiaria Grasses (*Brachiaria* spp.) harbor a diverse bacterial community with multiple attributes beneficial to plant growth and development [J]. *Microbiol Open*, 2017, **6**: e497
 - 21 Shen FT, Yen JH, Liao CS, Chen WC, Chao YT. Screening of rice endophytic biofertilizers with fungicide tolerance and plant growth-promoting characteristics [J]. *Sustainability*, 2019, **11** (4): 1104-1133
 - 22 Shao J, Xu Z, Zhang N, Shen QR, Zhang RF. Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 [J]. *Biol Fertil Soils*, 2015, **51** (3): 321-330
 - 23 Sayyed RZ, Patel PR. Biocontrol potential of siderophore producing heavy metal resistant *Alcaligenes* sp. and *Pseudomonas aeruginosa* RZS3 vis-a-vis organophosphorus fungicide [J]. *Indian J Microbiol*, 2011, **51** (3): 266-272
 - 24 Khanolkar D, Dubey SK, Naik MM. Tributyltin chloride (TBTCl)-enhanced exopolysaccharide and siderophore production in an estuarine *Alcaligenes faecalis* strain [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2015, **68** (4): 612-621
 - 25 刘桂青, 杨栋, 倪其军, 李廷强, 郝虎林, 陈宝, 杨卫东, 杨肖娥. 内生菌对柳树生长及氮磷吸收的强化作用[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2016, **42** (2): 256-264 [Liu GQ, Yang D, Ni QJ, Li YQ, Hao HL, Chen B, Yang WD, Yang XE. Bioaugmentation effects of endophytic bacteria on growth and nitrogen and phosphorus accumulation of willow [J]. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci)*, 2016, **42** (2): 256-264]
 - 26 杨鑫, 杜全能, 齐文武, 张旭, 谭玲玲, 廉欣, 兰时乐, 李林. 花生内生菌的分离及促生长作用初步研究[J]. 花生学报, 2018, **47** (3): 19-25 [Yang X, Du QN, Qi WW, Zhang X, Tan LL, Lian X, Lan SL, Li L. Studies on the isolation and growth-promotion of endophyte in Peanut [J]. *J Pean Sci*, 2018, **47** (3): 19-25]
 - 27 Berninger T, Lopez OG, Bejarano A, Preininger C, Sessitsch A. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants [J]. *Microbiol Biotechnol*, 2018, **11** (2): 277-301
 - 28 Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J. Changes in the population of seed bacteria of transgenerationally Cd-exposed *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Biol*, 2013, **15** (6): 971-981
 - 29 张新成. 东南景天内生菌分离鉴定及其强化重金属超积累效应与机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2012 [Zhang XC. Isolation and identification of endophytes from *Sedum alfredii* and the mechanisms of their enhancement on heavy metal hyperaccumulation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012]
 - 30 Ayrapetyan M, Williams T, Oliver JD. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells [J]. *J Bacteriol*, 2018, **200** (20): e00249-18
 - 31 郑芳芹. 环丙沙星高/低累积菜心内生细菌生物多样性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2012 [Zhen FQ. Biodiversity of endophytic bacteria in flowering Chinese flowering cabbage with high and low accumulation of ciprofloxacin [D]. Guangzhou: Jinan University, 2012]
 - 32 Zhang JY, Zhang N, Liu YX, Zhang XN, Hu, B, Qin, Y, Xu HR, Wang H, Guo XX, Qian JM, Wang W, Zhang PF, Jin T, Chu CC, Bai Y. Root microbiota shift in rice correlates with resident time in the field and developmental stage [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2018, **61** (6): 613-621
 - 33 Coleman-Derr D, Desgarennes D, Fonseca-Garcia C, Gross S, Clingenpeel S, Woyke T, North G, Visel A, Partida-Martinez LP, Tringe SG. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species [J]. *New Phytol*, 2016, **209** (2): 798-811
 - 34 Walters WA, Jin Z, Youngblut N, Wallace JG, Sutter J, Zhang W, Gonzalez-Pena A, Peiffer J, Koren O, Shi QJ, Knight R, del Rio TG, Tringe SG, Buckler ES, Dangi JL, Ley RE. Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes [J]. *PNAS*, 2018, **115** (28): 7368-7373
 - 35 Liu Y, Zuo S, Zou Y, Wang JH, Song W. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages [J]. *Ann Microbiol*, 2013, **63** (1): 71-79