

文章编号: 1674 - 7054(2015) 03 - 0285 - 08

五唇兰根部内生细菌的筛选及其促生活性

张芳芳, 宋希强, 丁琼, 朱国鹏

(海南大学 园艺园林学院 / 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南 海口 570228)

摘要: 以野生五唇兰植株根部中分离出的 15 株内生细菌为研究对象, 将其接入五唇兰组培苗中进行共培养, 研究其对组培苗的促生影响并分析其固氮、溶磷和产 IAA 能力等促生活性。结果表明, 15 株内生细菌中有 11 株对五唇兰组培苗有促生作用, 其中 *Paenibacillus graminis* (TW2-4) 对五唇兰组培苗有显著的促生影响, 促生效果最佳。15 株内生细菌中, 9 株具潜在固氮能力; 10 株具产 IAA 的能力, 其中 *Bacillus cereus* (TW1-4) 产 IAA 能力最强; 7 株具溶解无机磷能力, *Bacillus megaterium* (TW1-1) 溶磷量最高, 内生细菌的溶磷能力与其产酸能力呈正相关。

关键词: 五唇兰; 内生细菌; 植物促生活性

中图分类号: S 182

文献标志码: A

DOI: 10. 15886/j. cnki. rdsxb. 2015. 03. 011

五唇兰 [*Phalaenopsis pulcherrima* (Lindl.) J. J. Sm.] 为兰科 (Orchidaceae) 蝴蝶兰属 (*Phalaenopsis*) 多年生常绿草本植物, 为东亚特有种, 主要分布在热带雨林的低海拔地区。主产于印度东北部、老挝、泰国、缅甸等东南亚国家, 中国仅海南有分布^[1]。五唇兰花型美丽, 色彩娇艳, 具有较高的观赏价值, 是蝴蝶兰杂交的重要亲本, 以其作为亲本的蝴蝶兰杂交种曾被列为朵丽蝶兰属 (*Doritaenopsis*)。这些杂交种的切花和盆花在国际兰花市场上颇受追捧^[2]。植物内生细菌 (Endophytic bacteria) 是指能够在植物的组织和细胞内部或间隙栖息, 并能建立和谐的共生关系的细菌^[3]。1933 年, Rogers 首次在澳大利亚兰科植物 *Gastrodia sesamoides* 的植株中观察到了细菌的存在^[4]。20 世纪 80 年代以来, 兰科植物内生细菌受到了国内外研究学者的重视, Wilkinson 等^[5] 从 13 种西澳大利亚地生兰的 12 个菌根组织中分离到一批内生细菌; Tsavkelova^[6-9] 在附生兰和地生兰中分离到了种类不同且丰富的内生细菌; 目前, 已从 90 多种兰科植物中分离到大量内生细菌 (orchid-associated bacteria, OAB)^[9-10]。在自然界长期的进化过程中, 兰科植物形成了依赖微生物成活和生长的特性^[11]。近年来, 兰科植物内生细菌成为国内外研究的热点, 究其原因, 要归功于其有很多有益的生物学特性^[12]。这些有益的生物学特性主要表现为, 内生细菌具有能促进其宿主植物生长发育的能力。兰科植物内生细菌可以通过合成植物激素如 IAA, CTK 以及合成某些酶等直接促进植物生长, 又可以通过固氮、溶磷、产生铁螯合等方面间接促进植物生长^[13-15]。巴西学者利用在独占春 (*Cymbidium eburneum*) 分离的内生细菌接种到卡特兰 (*Cattleya loddigesii*) 组培苗中, 显著促进了植株生长, 并提高了组培苗的移栽成活率^[16]。分离自成年西澳大利亚地生兰菌根的 3 株内生细菌不仅促进了种子萌发, 对幼苗的生长也具有促进作用^[17]。四季豆 (*Phaseolus vulgaris*) 的根段用兰科植物内生细菌培养滤液处理后能快速长出须根^[18]。铁皮石斛 (*Dendrobium catenatum*) 组培苗在接种内生细菌 ZJSH1 后, 其株高、根粗、叶片大小均优于对照组, 其中平均株高比对照高 17.8%, 植株净质量比对照高 16.3%^[19]。目前, 无论是在兰科植物实验室小规模研究中, 还是在大规模生产中, 都越来越多地运用了组织培养技术, 在这种形式的种苗繁育过程中, 种苗一直在无菌条件下生长, 到了驯化移栽培育阶段, 兰花苗抵抗力较

收稿日期: 2015 - 03 - 22

基金项目: 海南省自然科学基金 [海南濒危兰科植物五唇兰种群动态监测的保育研究 (312063)] 资助; 海南省科技成果示范推广专项 [朵丽蝴蝶兰高效增产栽培技术示范与推广 (CGSF20120001 - 02)]

作者简介: 张芳芳 (1990 年 -), 女, 海南大学园艺园林学院 2012 级硕士研究生, E-mail: zhangfang_712@163.com

通信作者: 朱国鹏 (1971 年 -), 男, 研究员, 研究方向: 热带园艺作物营养研究, E-mail: guopengzhu@163.com

弱,生长状况差。将促生细菌接种于组培苗中对于提高组织培养苗的移栽成活率、改善其生长状况将可能起到重要作用。本研究在适宜的共生培养体系条件下,以五唇兰组培苗为材料,15株内生细菌为供试菌株,接种与五唇兰无菌幼苗中,并分析产 IAA 能力、溶磷性、固氮性等促生活性,探讨内生细菌对植物生长的影响及其促生机理,以期获得使五唇兰生物量显著增加的内生细菌,促进组织培养技术的发展,为进一步制作兰科植物生物菌剂,增加五唇兰杂交种的切花和盆花产量提供依据和资源菌。

1 材料与方法

1.1 供试菌株 于2013年12月—2014年09月,自海南省霸王岭自然保护区采集野生五唇兰植株,在其根部分离内生细菌,经分子鉴定后挑选15株代表内生细菌,对其纯化后利用甘油超低温保存法进行保存,于2014年11月进行细菌接种实验,其分类学地位及编号见表1。

表1 五唇兰组培苗接种菌株

Tab. 1 Inoculated strains for tube plant of *Phalaenopsis pulcherrima*

供试菌株 Strains	分类地位 Classification	供试菌株 Strains	分类地位 Classification
TW2-2	<i>Paenibacillus macerans</i>	SW1-6	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
TW3-2, TW3-6	<i>Pantoea agglomerans</i>	TW3-1, TW3-4	<i>Burkholderia sp.</i>
TW1-1, TW1-2	<i>Bacillus megaterium</i>	TW1-3, SW2-3	<i>Bacillus mycoides</i>
TW1-4, TW3-5	<i>Bacillus cereus</i>	TW3-3	<i>Erwinia tasmaniensis</i>
SW1-7	<i>Pandoraea pnomenusia</i>	TW2-1	<i>Paenibacillus graminis</i>

1.2 供试植株及培养基 选取根数为2~3条、叶数为3~4片、长势一致的健康五唇兰无菌组培苗为实验材料,供试组培苗由本重点实验室提供。培养基为1/2 MS培养基、NA培养基、NBRIP无机磷培养基和Ashby培养基。

1.3 五唇兰促生细菌筛选 将健康五唇兰无菌组培苗,去除琼脂,测量鲜质量(精确到0.001g),统计根数和分蘖数,再接种到1/2 MS培养基上,每袋各接2株,利用移液枪分别吸取50 μL 菌剂,施于每株组培苗根部进行单一接种,以不接菌为对照,每处理重复30袋,密封。所有处理均放在培养室中进行共培养,每天光照12 h,光强40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,温度(25 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度70%~75%。每隔10 d观察菌苗的生长状况,90 d后取苗再次测定其鲜质量,统计新根数、分蘖数,并根据接菌苗与不接菌苗的生长势判断菌株的作用效果。

1.4 内生细菌促生活性分析

1.4.1 分泌 IAA 细菌的筛选 参考文献[20]的方法:将内生细菌接种于加有200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ L-色氨酸的NA液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下,180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床避光培养4 d。分别取50 μL 菌悬液滴于白色陶瓷板上,同时加50 μL 已配制好的Salkowski比色液(50 mL 35% HClO_4 + 1 mL 0.5 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ FeCl_3),以加入50 μL 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA标准品的比色液作为阳性对照。最后避光静置30 min后观察,颜色变红者表示能够分泌 IAA。采用分光光度法测定各组具有分泌 IAA 能力的细菌悬液的 OD_{600} 值,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取50 μL 上清液并加入等体积的Salkowski比色液,避光静置30 min,于530 nm处检测其吸光度,每样品重复3次。以浓度0,10,20,30,40,50,60,70,80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分析纯 IAA 标准液制作标准曲线。计算菌浓度 OD_{600} 值为1时,单位体积发酵液中 IAA 的含量。

1.4.2 内生细菌溶磷能力的测定 参照文献[21]的方法:分别将培养24 h的内生细菌点接于NBRIP平固体培养基上,每处理重复3次,28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养3 d后检查菌落周围是否出现透明圈。若出现透明圈,则说明该菌株能使难溶性 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 转化为可溶性的有效磷,进一步通过钼锑比色法定量测定内生细菌的解磷能力,同时测定发酵液的pH值。

钼锑比色法步骤:将 OD_{600} 调节一致的五唇兰内生细菌菌悬液,按1%的接种量接入装有50 mL NBRIP液体培养基的150 mL三角瓶中,以接入等量无菌水作为对照,每处理重复3次。28 $^{\circ}\text{C}$,180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养6 d后,取各处理培养液转入离心管中,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,取1 mL上清液于50

mL 容量瓶中,加入钼锑抗混合显色剂 5 mL 后加水定容至刻度,静置 30 min 后,于 660 nm 测定吸光值,同时测定菌液的 pH 值。以 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷(K_2HPO_4) 标准溶液 0, 2, 4, 6, 8, 10 mL 制作磷标准曲线。计算 OD_{660} 时的磷含量。

1.4.3 固氮活性的定性测定 参照文献 [22-23] 的方法进行定性检测:为明确结果的准确性,将培养 24 h 的五唇兰内生细菌分别接种到液体和固体 Ashby 培养基上同时培养:将培养 24 h 的菌液以 $20 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种在 Ashby 液体培养基内,以接种无菌水为对照,每处理重复 3 次,共 14 个处理。28 °C 恒温培养 3, 7 d 后目测其与对照对比情况,明显浑浊为阳性,即有固氮活性,否则无固氮活性;同时将培养 24 h 的菌株划线培养于 Ashby 固体培养基上 28 °C 恒温,第 3, 7 d 后观察其生长状况,连续 3 次继代培养明显生长的菌株,每次 7 d,仍明显生长的记为具有固氮活性。

1.5 数据处理 鲜质量增长率(%) = (处理后鲜质量 - 处理前鲜质量) / 处理前鲜质量 × 100,采用 SPSS19.0 软件对相关处理数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 内生细菌对五唇兰组培苗的影响 15 株内生细菌接种后,组培苗均能与其良好共生,无致死植株出现(表 2)。由表 2 可见,所有植株与内生细菌接种后,株高和根长都显著性增长,除 TW3-5, TW3-6 和 SW1-7 外,其余接菌组对植株根数都有显著性的增加。TW2-1 和 TW1-3 极显著促进了植株的分蘖。TW2-1, SW1-7, SW1-6, TW3-1, TW3-4, TW3-3, TW1-1, TW1-3 和 SW2-3 极显著提高了五唇兰组培苗的鲜质量,接菌苗的鲜质量增长率高出对照的 199%, 137.508%, 103.683%, 89.036%, 118.624%, 142.745%, 95.027%, 129.21% 和 154.852%; TW3-2, TW3-6 也显著地高出对照组的 66.988% 和 68.566%。TW2-1, TW3-3, TW1-4 和 SW2-3 对植株的干质量有显著的影响,分别高出对照的 13.37, 3.88, 4.27 和 4.39 mg。

表 2 内生细菌对五唇兰无菌组培苗形态特征和生长的影响

Tab. 2 Effects of different endophytic bacteria on the physical characteristics and growth of the tube plants of *Phalaenopsis pulcherrima*

菌株 Strains	根数 Root number	根长/mm Root length	根粗/mm Root diameter	分蘖数 No. of tillers	株高/mm Plant height	鲜质量增长率/% Fresh weight growth rate	干质量/mg Dry weight
TW2-2	7.90 abcde	16.790 ab	1.603 bc	1.10 bc	40.205 abc	108.345 cdef	5.35 abc
TW3-3	8.80 ab	13.642 bc	1.832 ab	1.30 bc	31.585 cde	156.958 bcdef	5.91 ab
TW3-5	4.10 de	12.0285 c	1.925 ab	0.30 c	27.193 de	69.767 ef	2.11c
TW1-4	9.20 a	13.790 bc	1.710 bc	1.00 bc	41.461 abc	103.730 cdef	6.30 ab
TW3-2	7.40 abcde	12.966 bc	2.110 ab	1.00 bc	36.591 abcde	128.919 bcdefcdef	4.84 abc
TW3-6	5.00 efg	13.669 bc	1.889 ab	0.80 c	27.568 de	130.497 bcdef	2.79 c
SW1-7	5.20 defg	12.443 c	1.975 ab	1.10 bc	34.001 abcde	199.439 abc	4.14 bc
SW1-6	5.50 cdefg	15.078 abc	1.701 bc	0.00 c	37.944 abcd	165.614 abcde	3.86 bc
TW3-1	10.20 a	13.709 bc	2.112 ab	0.10 bc	32.978 bcde	150.967 bcdef	5.28 abc
TW3-4	5.50 cdefg	18.089 a	1.966 ab	1.20 bc	44.627 a	180.555 abcd	3.76 bc
TW2-1	8.30 abcd	13.254 bc	1.760 ab	8.30 a	31.109 cde	204.676 abc	15.40 a
TW1-1	5.90 bcdef	18.634 a	1.883 ab	0.40 c	43.247 ab	260.931 a	4.73 abc
TW1-2	7.90 abcde	12.672 bc	1.714 bc	1.00 bc	27.738 de	96.670 def	4.99 abc
TW1-3	8.70 ab	13.468 bc	1.975 ab	2.70 b	30.372 cde	191.14 abcd	4.02 bc
SW2-3	8.40 abc	14.184 bc	2.253 a	0.60 c	40.686 abc	216.783 ab	6.42 ab
CK	2.80 g	7.409 d	1.248 c	0.00 c	14.108 f	61.931 f	2.03 c

注:相同字母之间表示差异性不显著,不同字母之间表示呈 $P < 0.01$ 的差异性

Note: Values within the same column with the same letter(s) indicate no significant difference; values within the same column with the different letter(s) indicate significant difference by Duncan's multiple range test at $P < 0.01$

综合考虑,共有 11 株内生细菌对五唇兰组培苗有促进作用,分别为 *P. graminis*(TW2-1) *P. agglomerans*(TW3-2、TW3-6) *B. megaterium*(TW1-1) *Bacillus mycoides*(TW1-3、SW2-3) *P. pnomenus*(SW1-7) , *A. radiobacter*(SW1-6) *Burkholderia* sp. (TW3-1、TW3-4) 和 *E. tasmaniensis*(TW3-3) 8 个种。部分内生细菌对五唇兰组培苗的影响见图 1。*P. graminis*(TW2-1) 在各个方面均对五唇兰组培苗有显著影响,促生效果最佳。

2.2 内生细菌促生活性分析

2.2.1 内生细菌促生活性筛选 15 株内生细菌中有 9 株连续 3 次继代能够在 Ashby 培养基上正常生长,表明其具有潜在固氮能力。分别有 7 株内生细菌具有溶解无机磷的能力。有 10 株加入 Salkowski 比色液后变红,表明其具有产 IAA 的能力。15 株内生细菌中,其中 TW1-1、TW2-1、TW3-1 和 SW2-3 同时具有固氮、溶磷、产 IAA 能力; TW3-6、TW3-2、TW1-1 和 TW1-2 同时具有溶磷和产 IAA 能力; TW3-4 同时具有固氮和溶磷能力。

五唇兰内生细菌产 IAA 能力见表 3,由表 3 可见, TW1-4 产 IAA 能力最强,达 $(29.256 \pm 5.26) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$, TW1-4、SW2-3 和 TW2-1 3 株细菌产量高于 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Duncan 检验也呈显著性差异。

表 3 五唇兰内生细菌的促生功能特性

Tab. 3 Evaluation of growth-promoting properties of endophytic bacteria isolated from *Phalaenopsis pulcherrima*

菌株 Strains	固氮能力 Nitrogen Fixing	解磷能力 phosphate Solubilizing	生长素产生量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1})$ Production of IAA
TW3-3	+	-	-
TW3-2	-	+	6.475 ± 0.754 de
TW3-6	-	+	6.412 ± 2.06 de
TW3-1	+	+	10.445 ± 4.158 de
TW3-4	+	+	-
TW2-1	+	+	21.882 ± 1.175 ab
TW1-3	+	-	-
SW2-3	+	+	24.82 ± 5.286 ab
TW1-1	+	+	19.198 ± 4.868 bc
SW1-6	+	-	-
SW1-7	+	-	-
TW1-4	-	-	29.256 ± 5.26 a
TW3-5	-	-	12.985 ± 7.589 cd
TW2-2	-	-	5.673 ± 0.604 de
TW1-2	-	+	5.674 ± 2.128 de

注: 相同字母之间表示差异性不显著,不同字母之间表示呈 $P < 0.05$ 的差异性

Note: Values within the same column with the same letter(s) indicate no significant difference; values within the same column with the different letter(s) indicate significant difference by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$

2.2.2 内生细菌溶磷定量检测及细菌发酵液 pH 的测定 所得发酵液可溶磷元素含量与发酵液 pH 见图 2, TW1-1 发酵液溶磷量最高,为 $(77.023 \pm 5.015) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其 pH 与不接菌的发酵液(pH8.9)相比明显下降。SW2-3、TW3-4、TW2-1、TW3-6、TW3-2 和 TW1-1 发酵液溶磷量与对照相比,均呈显著性差异,其 pH 值也都低于 5.0。TW1-2 发酵液溶磷量最低,仅为 $(11.416 \pm 6.7) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 与对照相比无显著性差异; 而 pH 最高的菌株为 TW3-1(pH7.4), 其溶磷量也没有显著性差异。



图 1 内生细菌对五唇兰无菌组培苗生长的影响

Fig. 1 Effects of different endophytic bacteria on the tube plants of *Phalaenopsis pulcherrima*

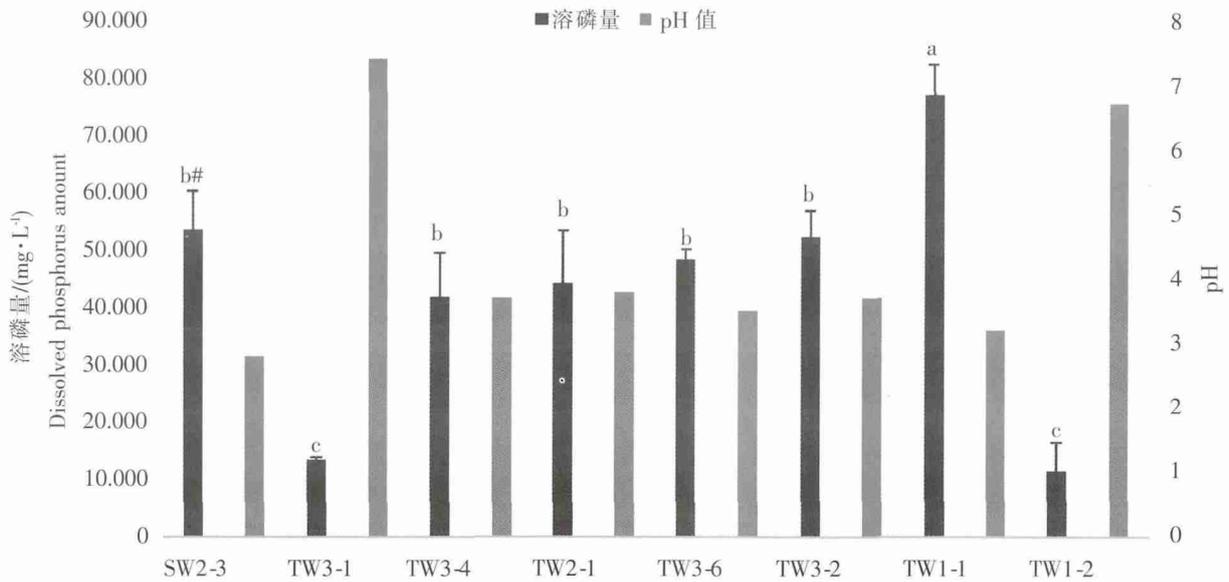


图 2 五唇兰内生细菌磷溶解量与发酵液 pH

竖线表示标准差, 相同字母之间表示差异性不显著, 不同字母之间表示呈 $P < 0.01$ 的差异性

Fig. 2 The amount of dissolved phosphorus released by phosphate solubilizing bacteria and the pH of their fermentation solutions
Vertical bars indicate standard errors; bars with the same letter indicate no significant differences; bars with different letters indicate significant difference by Duncan's multiple range test at $P < 0.01$

3 讨论

结果表明, 15 株内生细菌对五唇兰组培苗具有不同程度的作用, 11 株内生细菌接入的组培苗表现出生长迅速、苗色翠绿、叶宽、茎粗壮、根系发达等, 说明内生细菌起到了促生作用。其中, 对组培苗根系的影响主要体现在两方面, 一是增加了新根数量, 二是诱导根部出现分叉现象, 形成了多个根尖, 增加了根

表面积,这不仅利于植物吸收营养,亦可提高各种微生物在根部的侵染率^[3]。本研究筛选出的 11 株促生细菌,类芽孢杆菌属(TW2-1)在各个方面均对五唇兰组培苗有显著的影响,促生效果最佳。类芽孢杆菌属的细菌已经被证实可以促进植物的生长,提高根系发育^[4, 24-26]。在自然环境下,兰科植物主要依靠种子和分株两种形式进行繁殖。通过内生细菌的回接,发现 TW2-1 处理的五唇兰组培苗的分蘖数显著增加,表明其促进了五唇兰的分蘖生长。克隆分株可提高植物在其生长环境中的竞争力^[27],这在一定程度上表明接种内生细菌有利于五唇兰组培苗的出瓶移栽。对五唇兰促生细菌的活性分析表明,五唇兰促生细菌具有丰富而有益的生物学特性。本研究筛选出的 10 株具有分泌 IAA 能力的内生细菌,产吲哚范围为 5.673 ~ 29.256 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。兰科植物组培苗与内生细菌在共生培养过程中,可以有效吸收细菌分泌的 IAA 进而增加根及组培苗干质量^[28]。在巴西濒危卡特兰(*Cattleya walkeriana*)中分离出有分泌 IAA 能力的内生细菌 15 株,分别属于伯克氏菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属和肠杆菌属(*Enterobacter*)^[29]。本研究与其实验方法相同,10 株可产 IAA 的内生细菌分别属于芽孢杆菌属、泛菌属、伯克氏菌属和类芽孢杆菌属。

固氮能力是内生细菌能否促进植物生长的一个重要指标。本实验共筛选出的 9 株固氮菌株分属于伯克氏菌属、芽孢杆菌属、欧文氏菌属、土壤杆菌属和草酸菌属。不同无氮培养基间存在一定的差异,使用某一种无氮培养基进行固氮细菌的筛选不能够得到所有具固氮潜力的细菌^[32],五唇兰体内是否还存在有其他种属的固氮细菌尚待研究。IAA 促进植物生长时,刺激细胞进行分裂和合成 DNA 需要大量氮参与^[30]。同时具有固氮和产 IAA 能力的 TW2-1, TW1-1 和 SW2-3 能显著促进植物的生长。在植物生长过程中,为促进植物的生长,通常在其机制中施加固氮菌。研究发现,与联合固氮菌相比,内生固氮菌具有更高的固氮效率,它们定殖在宿主植物组织内,能避免土壤微生物的竞争和化合态氮的抑制,有利于充分发挥其固氮效能,产生的固氮产物直接供给植物吸收,从而提高植物的氮营养^[31]。

内生细菌具备溶磷性,对其宿主植物在野外的生活生长起到了关键的作用,15 株内生细菌中,有 8 株具有溶磷性,溶磷量范围为 11.416 ~ 77.023 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。8 株内生细菌的溶磷量与产酸能力均呈正相关,推测五唇兰内生细菌通过分泌酸性物质来溶解磷酸钙,释放难溶的磷元素。其中, TW1-1 与 TW1-2 为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),是已知的溶磷菌并广泛应用于微生物菌剂中。植物体外的促生细菌,通过释放土壤中不溶性的磷元素,促进植物生长和次级代谢物积累的能力已有报道^[33-34]。而植物内生细菌可能通过植物根部的自然孔洞或伤口侵入植物体内,成为植物体微生态体系的一部分。因此,可以利用内生细菌在植物根际土壤中的定殖来改善植物的磷素营养。

内生细菌是否可增强五唇兰组培苗的抗逆性,提高其出瓶成活率尚需进一步进行生理等方面的研究。Srinath 等学者尝试利用植物细菌来克服植物组培增殖阶段的困难,以提高组培苗的出瓶成活率^[35-36],并有研究证实了接种细菌的巴西濒危卡特兰组培苗,在移栽驯化时组培苗的成活率得到了显著提高^[37]。因此,本研究对提高兰科植物组培苗质量、实现优质栽培具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 吉占和, 陈心启, 罗毅波. 等. 中国植物志[M]. 北京: 自然科学出版社, 1999: 276 - 278.
- [2] 张哲, 宋希强, 朱国鹏. 等. 东亚特有种五唇兰的开花物候与繁殖特性[J]. 热带作物学报, 2013, 34(7): 1223 - 1227.
- [3] KLOPPER J W, BEAUCHAM P C J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38: 1219 - 1232.
- [4] TARKKA MT, FREY-KLETT P. Mycorrhiza helper bacteria [C]. Varma A(eds). Mycorrhiza. Berlin: Springer, 2008: 113 - 132.
- [5] WILKINSON KG, DIXON KW, SIVASITHAMPARAM K, et al. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria [J]. Plant Soil, 1994, 159(2): 291 - 295.
- [6] TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, LOBAKOVA ES, et al. Microbiota of the orchid rhizoplane [J]. Microbiology, 2001, 70(4): 567 - 573.
- [7] TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, NETRUSOV AI. Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids [J]. Microbiology, 2004, 73(6): 710 - 715.
- [8] TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, BOTINA SG, et al. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin [J]. Microbiology Research, 2007, 162(1): 69 - 76.
- [9] TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, KLIMOVA SY, et al. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid,

- promote seed germination , and increase their microbial yield in response to exogenous auxin [J]. Archives of Microbiology , 2007 , 188(6) : 655 – 664.
- [10] 张萍. 铁皮石斛内生细菌研究[D]. 海口: 海南大学 2012.
- [11] 李洪立, 何云, 申志斌, 等. 菌根化五唇兰组培苗的光合生理特性[J]. 热带作物学报 2011, 32(6) : 1060 – 1063.
- [12] 胡萌. 植物内生细菌研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版) , 2008 , 39(1) : 148 – 151.
- [13] KUKLINSKY S J , ARAUJO WL , MENDES R , et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion [J]. Environmental Microbiology , 2004 , 6(12) : 1244 – 1251.
- [14] IVANOVA EG , DORONINA NV , TROTSSENKO YA. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins [J]. Microbiology , 2001 , 70(4) : 452 – 458.
- [15] 孙磊, 邵红, 刘琳, 等. 可产生铁载体的春兰根内生细菌多样性[J]. 微生物学报 2011, 51(2) : 189 – 195.
- [16] DEISE CF , ARMANDO FD , ITAMAR M , et al. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology 2013 , 29(2) : 217 – 221.
- [17] WILKONSON KG , DIXON KW , SIVASITHAMPARAM K. Interaction of soil bacteria , mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids [J]. New Phytologist , 1989 , 112(3) : 429 – 435.
- [18] TSAVKELOVA EA , CHERDYNTSEVA TA , NETRUSOV AI. Auxin production by bacteria associated with orchid roots [J]. Microbiology , 2005 , 74(1) : 46 – 53.
- [19] 俞婕, 赵凯鹏, 董飞, 等. 野生铁皮石斛内生菌的分离及促生作用研究[J]. 现代农业科技 2010(9) : 96 – 97.
- [20] 刘琳, 孙磊, 张瑞英, 等. 春兰根中可分泌吲哚乙酸的内生细菌多样性[J]. 生物多样性 2010 , 18(2) : 195 – 200.
- [21] 钟传青, 黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化[J]. 土壤学报, 2005 , 42(2) : 286 – 294.
- [22] 罗明, 卢云. 植物内生固氮菌研究进展[J]. 微生物学杂志, 2005 , 25(1) : 82 – 88.
- [23] 李鹏. 东祁连山珠芽蓼内生细菌功能多样性研究及其鉴定[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- [24] ERTURK Y , ERCISLI S , HAZNEDAR A , et al. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings [J]. Biological Research , 2010 , 43: 91 – 98.
- [25] ERTURK Y , ERCISLI S , CAKMAKCI R. Yield and growth response of strawberry to plant growth – promoting rhizobacteria inoculation [J]. J Plant Nutrion , 2012(35) : 817 – 826.
- [26] PHI QT , YU-MI P , KEYUNG-JO S , et al. Assessment of root-associated Paenibacillus polymyxa groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper [J]. Journal of Microbiology Biotechnology , 2010 , 20: 1605 – 1613.
- [27] 董鸣, 于飞海. 克隆植物生态学[M]. 北京: 科学出版社 2011: 35 – 51.
- [28] TEIXEIRA A eixeira DA , ALFENAS AC , MAFIA RG , et al. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth [J]. Brazilian Journal of Microbiology , 2007(38) : 118 – 123.
- [29] GALDIANO RF JR , PEDRINHO EAN , CASTELLANE TCL , et al. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of Cattleya walkeriana , an endangered brazilian orchid , and their role in acclimatization [J]. Re Bras Ci Solo , 2011 , 35: 729 – 737.
- [30] 潘瑞焯, 董愚得. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社 2004, 30 – 223.
- [31] 罗明, 卢云. 植物内生固氮菌研究进展[J]. 微生物学杂志 2005, 25(1) : 82 – 88.
- [32] 周佳宇, 贾永, 王宏伟, 戴传超. 茅苍术叶片可培养内生细菌多样性及其促生潜力[J]. 生态学报 2013, 33(4) : 1106 – 1117.
- [33] RANA A , SAHARAN B , JOSHI M , et al. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat [J]. Annals of Microbiology 2011, 61: 893 – 900.
- [34] ARUN P , SANJAY K , ANKIT P , et al. Microbial and chemical sources of phosphorus supply modulate the yield and chemical composition of essential oil of rose – scented geranium (*Pelargonium species*) in sodic soil [J]. Biology and Fertility of Soils 2012, 48: 117 – 122.
- [35] SRINATH J , BAGYARAJ DJ , SATYANARAYANA BN. Enhanced growth and nutrition of micropropagated *Ficus benjamina* to *Glomus mosseae* co-inoculated with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus coagulans* [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology , 2003 , 19: 69 – 72.
- [36] THOMAS P. Isolation of *Bacillus pumilus* from in vitro grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte [J]. Journal of Applied Microbiology , 2004 , 97: 114 – 123.
- [37] RENATO FGJ , ELIAMAR AP , TEREZA CLC , et al. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Calliandra walkeriana* , an endangered Brazilian orchid , and their role in acclimatization [J]. R Bras Ci Solo , 2011 , 35: 729 – 737.

Activity Analysis of Growth-promoting Endophytic Bacteria Isolated from the Roots of *Phalaenopsis pulcherrima*

ZHANG Fangfang , SONG Xiqiang , DING Qiong , ZHU Guopeng

(College of Horticulture and Gardening , Hainan University / Key Laboratory of Protection and Developmental Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources , Ministry of Education (Hainan University) , Haikou 570228 , China)

Abstract: Endophytic bacteria of orchid plants play an important role in orchid life cycle. An attempt was made to inoculate 15 endophytic bacteria isolated from the root of wild plants *Phalaenopsis pulcherrima* into *Phalaenopsis pulcherrima* plantlets *in vitro* for co-culture to analyze their abilities of nitrogen fixation , phosphate solubilization and IAA production. Of the 15 endophytic bacteria , 11 strains were found to have a growth-promoting effect on *P. pulcherrima* plantlets , of which the strain *Paenibacillus graminis* produced best growth-promoting effect; 9 strains had a potential ability of nitrogen fixation; 10 strains were able to produce IAA , of which the strain *Bacillus cereus* produced the highest amount of IAA; 7 strains was able to dissolve phosphorus , of which *Bacillus megaterium* dissolved the highest amount of phosphorus. In addition , endophytic bacteria had a positive correlation between the ability of phosphate-solubilization and the ability of IAA production.

Key words: *Phalaenopsis*; endophytic bacteria; plant growth-promoting activity

(上接第 278 页)

Effect of ^{60}Co - γ Ray Irradiation on the Antioxidant Activities and the Colors of the Liquid Samples of Extracted Mature Leaves in *Ilex Kudingcha* C. J. Tseng

GUO Yan² , ZHAO Feng¹ , LIU Guomin² , LUO Zhiping³ , LIU Xiande³ , LI Lihui⁴

(1. Hainan Radio and TV University , Haikou 570208 , China;

2. The Kudingcha Research Institute , Hainan University , Haikou 570228 , China;

3. Hunan Institute of Nuclear Agricultural Science and Space-induced Breeding , Changsha , Hunan 410125;

4. The College of Agronomy , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: The liquid samples of water-extract (15 °C) , hot water extract (90 °C) , methanol extract (70%) , alcohol extract (70%) and acetone extract (70%) from the mature leaves of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng were irradiated with ^{60}Co - γ ray at respective doses of 0 (CK) , 10 , 20 and 30 kGy. The antioxidant activities of the liquid samples were determined via ABTS and DPPH methods and the colors of the liquid samples before and after irradiation were observed and compared. The results showed that the antioxidant activity of the liquid sample of the water extract (room temperature) was slightly increased after irradiation of ^{60}Co - γ ray. There was , however , no significant difference in the liquid samples extracted with hot water (90 °C) , 70% methanol , 70% alcohol and 70% acetone. The colors of all the liquid samples extracted with 5 different solvents from the mature leaves in *I. kudingcha* faded in some degrees. of which the color of the liquid sample extracted with 70% alcohol was the palest , followed by that of the liquid sample extracted with 70% methanol. When the extracts are used for food fresh-keeping and for food or cosmetics preparation , it is recommended to use the extract with 70% methanol as solvent and treat with ^{60}Co - γ ray at the dose of 10 kGy to ensure the security of food and cosmetics.

Key words: *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; ^{60}Co - γ irradiation; antioxidant activity