

# 蒙古黄芪内生细菌产IAA菌株筛选与培养条件优化

刘奎<sup>1,2</sup>, 郭凤霞<sup>1\*</sup>, 陈垣<sup>1</sup>, 周洋<sup>1</sup>, 李红玲<sup>1</sup>, 李琴<sup>1,2</sup>, 李国藩<sup>1,2</sup>, 王辉<sup>1,2</sup>

(1. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 农学院/甘肃省中药材规范化生产技术创新重点实验室, 甘肃省药用植物栽培育种工程研究中心, 甘肃省干旱生境作物学重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 2. 天津市现代中药资源研究企业重点实验室, 天津天士力现代中药资源有限公司, 天津 300410)

**摘要:**【目的】探寻蒙古黄芪内生菌的促生功能, 挖掘优异微生物资源。【方法】采用前期从蒙古黄芪品系甘芪1号根中分离纯化的20株内生细菌菌株(B1~B20, GenBank序列收录号OM938262~OM938281)为研究对象, 以纯培养液为对照(CK), 利用Salkowski显色法对产吲哚乙酸(IAA)功能菌株鉴定, 然后对优异菌株的培养条件进一步进行优化研究。【结果】甘芪1号根可培养内生细菌菌株, 有12株菌株较CK有明显Salkowski显色反应, 测量各菌株产IAA浓度依次为B16>B18>B10>B20>B8>B13>B11>B3>B4>B6>B1>B17, 产IAA浓度范围为2.74~26.48 mg/L, 平均10.10 mg/L, 其中B16高稳产IAA(GenBank OM938262), 平均产IAA浓度高达26.48 mg/L, 极显著高于其他菌株产IAA的水平。培养条件优化显示, B16菌株培养最适温度为15~25℃, 在浓度为0.1%~7%的NaCl培养基均能正常生长, 最适NaCl浓度为1%, 最适pH为7.0, 最适碳、氮源分别为酵母提取物和蛋白胨。培养条件优化后B16增殖及IAA产能较优化前分别极显著提高28.6%和53.5%。【结论】蒙古黄芪根内生细菌中产IAA菌株比例较高, 是优异豆科药用植物微生物资源宝库, 且筛选到一株高稳产IAA菌株B16, 经过培养条件优化可达到40.658 mg/L, 是有较大的生态调控利用潜力的菌株。

**关键词:** 蒙古黄芪; 内生细菌; 吲哚乙酸; 菌株筛选; 培养条件优化

**中图分类号:** S567 **文献标志码:** A **文章编号:** 1009-5500(2024)02-0145-10

**DOI:** 10.13817/j.cnki.cyyep.2024.02.015



植物内生菌(Endophyte)是存活于健康植物组织

和器官内部, 而被感染的寄主表现不明显感染症状的微生物类群<sup>[1-2]</sup>, 是微生物资源的活体库。环境中的微生物通过植物根部、幼嫩茎叶及花器接触性感染, 或通过伤口侵染等途径参与植物内生菌群落组成和结构的调控<sup>[3]</sup>。植物内生菌在保护植物资源<sup>[2]</sup>、防治病虫害<sup>[4-5]</sup>、促进植物生长发育<sup>[6-8]</sup>, 天然药品的研发<sup>[9-10]</sup>以及环境修复保护<sup>[11-14]</sup>中均具有不可替代的作用。吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)是一种常见的植物激素, 具有促进细胞伸长生长和细胞分裂的作用<sup>[15]</sup>, 同时还参与维管组织分化等许多生理生化过程, 如调节植物的顶端优势、向性运动等<sup>[1, 15-19]</sup>。吲哚乙酸通过膜定位蛋白在细胞间定向运输, 能够对植物的生理质量、叶片的叶绿素以及蛋白质含量等产生积

收稿日期: 2022-05-12; 修回日期: 2022-06-12

**基金项目:** 2021年省级现代丝路寒旱中药材产业发展项目(2130122); 甘肃省特色优势农产品评价-陇西黄芪(TYNPZ2020-18); 甘肃省科技支撑计划(1204FKCA123); 甘肃省现代农业中药材产业体系首席专家(GARS-ZYC-1); 企业委托项目(XDZY-(2017-2018)115, 2019620005000036-2022620005001507); 甘肃农业大学SRTP(202111018)和SIETP(202211026)

**作者简介:** 刘奎(1996-), 女, 山东济阳人, 硕士研究生。

E-mail: 15954909071@163.com

\*通信作者。E-mail: guofx@gsau.edu.cn

极作用<sup>[20]</sup>。许多内生细菌尤其是药用植物中发现的内生菌能够产生吡啶乙酸,是农业中用于改善植物生长发育的生物制剂的潜在良好活性成分来源<sup>[21]</sup>。姜云等<sup>[22]</sup>在人参中分离到一株高产吡啶乙酸菌株,能够对人参的种子根生长具有显著的促进作用;张琳等<sup>[23]</sup>从三七中分离到3株内生菌均能够产吡啶乙酸;高红等<sup>[24]</sup>将浑源黄芪进行内生菌分离,发现所分离的菌株中具有解磷固氮、产吡啶乙酸及ACC脱氨酶的菌株。药用植物的内生菌的潜在促生潜力不可忽视,是药用植物生态种植的重要微生物资源,但相比于非药用植物内生菌开发,药用植物促生菌及生防菌的开发还存在一定欠缺。

蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*)是豆科(Leguminosae)黄芪属(*Astragalus*)多年生草本药饲兼用植物,为中药黄芪的主要基原植物之一,以干燥根入药,生物活性成分含量高,食药同源<sup>[25-27]</sup>,茬口特性优良<sup>[28]</sup>,甘肃省定西市陇西县是蒙古黄芪的道地产区,黄芪产量高,质量优异,但连作重茬引发根病发生,严重影响栽培成效,挫伤了药农的积极性,农田撂荒有扩大之势<sup>[27]</sup>。甘芪1号是蒙古黄芪优异单株系选而成的高稳产优质品系,该品系可能存在特异性内生菌,前期研究已从其根中分离培养鉴定获得20个内生细菌菌株(GenBank accessions: OM938262~OM938281),但这些菌株的促生功能尚不明确,因此,探究这些内生菌资源的促生功能及其优化培养条件,可为合理开发蒙古黄芪优异内生菌资源提供科学依据,并进一步揭示其茬口特性优良的生态证据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料及来源

蒙古黄芪内生菌活化及产IAA鉴定培养基的配置及组成见表1, Salkowski培养基参照刘璐等<sup>[18]</sup>和周铭典等<sup>[19]</sup>方法配制。含L-色氨酸培养基的制备:将需要添加L-色氨酸的培养基121℃高温高压灭菌25 min,加入无菌过滤的L-色氨酸,配置成L-色氨酸浓度为0.1 g/L的培养基<sup>[21-22]</sup>。采用浓度为1 mmol/L的NaOH和HCl调节pH至培养基酸碱度要求。

供试菌株均分离自2年生蒙古黄芪甘芪1号品系

表1 培养基的组成

Table 1 Composition of culture medium

培养基种类	培养基组成	
LB液体培养基	胰蛋白胨(g)	10.0
	氯化钠(g)	10.0
	酵母提取物(g)	5.0
	蒸馏水定容体积(mL)	1000
LB固体培养基	胰蛋白胨(g)	10.0
	氯化钠(g)	10.0
	酵母提取物(g)	5.0
	琼脂(g)	20.0
初始液体培养基	蒸馏水定容体积(mL)	1000
	蛋白胨(g)	10.0
	氯化钠(g)	10.0
	酵母提取物(g)	5.0
Salkowski	蒸馏水定容体积(mL)	100
	FeCl <sub>3</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	4.5
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mol·L <sup>-1</sup> )	10.8

成药期生长根部,共20株(B1~B15, GenBank accession: OM938267~OM938281; B16~B20, GenBank accession: OM938262~OM938266),均由甘肃农业大学中药材生态育种栽培陈垣课题组提供,涉及11属。

### 1.2 菌株活化与菌悬液制备

蒙古黄芪内生菌液制备:将上述超低温-80℃甘油保藏的蒙古黄芪内生菌株菌液(物种名和收录号见表2)取200 μL于5 mL中,置于30℃、180 r/min的摇床(TS-211B,上海天呈实验仪器制造有限公司,中国)振荡活化24 h,将活化菌株按接种量4%转接后继续摇床振荡扩大培养48 h后得到菌株母液,然后在离心机(CK3200,无锡百泰克生物技术有限公司,中国)转速为1×10<sup>4</sup> r/min离心2 min后去上清,加入无菌水稀释悬浮,测定D<sub>600 nm</sub>,当D<sub>600 nm</sub>=1时,则得到菌悬液,供后续功能鉴定分析。并将此时菌悬液进行稀释涂布计数计算菌浓度。

### 1.3 产IAA菌株鉴定

以IAA为溶质,灭菌后的LB培养基为溶剂,配置浓度为100 mg/L的IAA标准液,然后稀释成10个不同梯度浓度。按照1:2(单位mL)比例加入Salkowski显色液,暗反应1 h,测定D<sub>540 nm</sub>,拟合标准曲线方程。以不同浓度IAA溶液为横坐标,以D<sub>540 nm</sub>值为纵坐标,绘制标准曲线,经方差拟合建立标准曲线方程为Y=0.023 7X+0.147 4(R<sup>2</sup>=0.992, P<0.01),说明方程拟合度极显著,方程估测的可靠性强(图1)。

蒙古黄芪内生菌株产IAA含量的测定采用

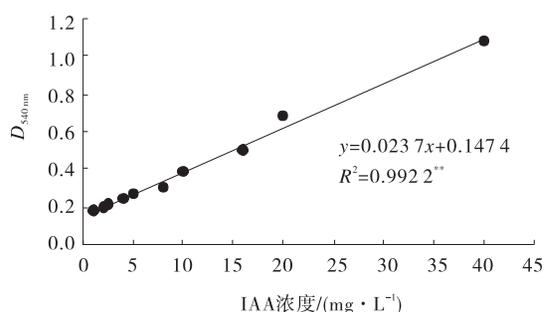


图1 IAA浓度与 $D_{540\text{nm}}$ 标准曲线图

Fig. 1 Standard curve of IAA concentrations with  $D_{540\text{nm}}$

Salkowski显色反应,将上述内生菌悬浮液按照4%的接种量、40%的装液量接种在含L-色氨酸LB培养基的三角瓶中发酵48 h,得到菌液,将菌液于离心机中( $1 \times 10^4$  r/min)离心5 min,得到发酵液。按照Salkowski显色法,取1 mL发酵液与2 mL比色液加入试管中震荡,暗反应1 h,室温静置培养,所得反应液测定 $D_{540\text{nm}}$ ,建立标准曲线方程计算各菌株反应液IAA产出浓度。

#### 1.4 菌株生长曲线

将菌悬液按4%的接种量接种在200 mL液体培养基,按照常规培养条件<sup>[17-18]</sup>,在30 °C、180 r/min摇床条件下培养,培养过程中每4 h取1次菌液样本,28 h后,测定 $D_{600\text{nm}}$ ,重复测定3组,分别绘制菌株的生长曲线,以确定最佳活化时间点。

#### 1.5 优异菌株的培养条件优化

对蒙古黄芪优异内生菌培养条件进行逐步递进优化,最后获得最佳优化条件。

1.5.1 优异菌株培养温度筛选试验 将优异菌菌悬液接种至含L-色氨酸的初始培养基中,分别在温度15、25、35和45 °C条件下180 r/min摇床振荡培养,在培养20、32、44、56和68 h取样,测定菌株的 $D_{600\text{nm}}$ 及产IAA量浓度。

蒙古黄芪内生菌培养温度优化采用单因素试验方案,完全随机设计,3次重复。即将处于对数生长期的上述蒙古黄芪内生菌悬液按4%(体积分数)接种量接种至含L-色氨酸的初始培养基中,共接种12瓶,随机分为4组,每组3瓶,分别在温度15、25、35和45 °C条件下180 r/min摇床振荡培养。根据生长曲线,培养20、32、44、56和68 h,依次在无菌条件下取样1次,每次取样5 mL,其中3 mL用来测定 $D_{600\text{nm}}$ ,估测菌株生长动态。另将2 mL离心后收集菌液上清液,抽取

1 mL与2 mL比色液震荡混合后暗反应1 h,测定 $D_{540\text{nm}}$ ,估IAA产能,根据菌株生长和产IAA量为最后确定最佳的内生细菌培养温度。

1.5.2 优异菌株培养适宜盐浓度筛选试验 将菌悬液接种至含L-色氨酸的初始培养基中,分别在含不同浓度NaCl(0.1%、1%、4%、7%和10%)培养基条件下180 r/min摇床振荡培养,15 °C,培养21、27、39、51、63以及75 h,取样测量菌的 $D_{600\text{nm}}$ ,产IAA量浓度。

1.5.3 优异菌株最适初始pH筛选试验 将菌悬液接种至含L-色氨酸的初始培养基中,分别在初始pH不同(pH=3、5、7和10)的培养基条件下180 r/min摇床振荡培养,培养20、32、44、56和68 h,取样测量菌的 $D_{600\text{nm}}$ ,产IAA量浓度。

1.5.4 优异菌株适宜碳源筛选试验 将菌悬液进行接种至含L-色氨酸的初始培养基中,分别在碳源为牛肉膏(beef extract, BE)、蔗糖(sucrose, S)、酵母提取物(yeast extract, YE)和葡萄糖(glucose, G)培养基条件下按5%的量,180 r/min摇床振荡培养,培养温度和培养基初始pH为所筛选到的最适温度及最适pH,分别为15 °C和7.0,培养20、32、44、56和68 h,取样测量菌的 $D_{600\text{nm}}$ ,产IAA量浓度。

1.5.5 优异菌株适宜氮源筛选试验 将菌悬液进行接种至含L-色氨酸的初始培养基中,分别在,氮源分别为蛋白胨(peptone, P)、胰蛋白胨(tryptone, T)、氯化铵(ammonium chloride, AC)、硝酸钾(potassium nitrate, PN)培养基条件下按照10%的量,180 r/min摇床振荡培养,培养温度和培养基初始pH为所筛选到的最适温度及最适pH,分别为15 °C和7.0,碳源为酵母提取物,培养20、32、44、56和68 h取样,测量菌的 $D_{600\text{nm}}$ ,产IAA量浓度。

#### 1.6 统计分析

采用Excel 2003和SPSS 11.5统计软件作图并统计分析。多重比较选用Duncan法和T检验法。利用Excel散点图添加趋势线作图法和函数插入相结合的方法对菌液浓度(y)随培养时间(x)分别拟合Logistic曲线方程 $\hat{y} = \frac{k}{1 + e^{A+Bx}}$ ,根据曲线方程可直线化法求出方程参数, $\hat{y}$ 为方程估测的培养第x天的菌液浓度,k为潜在最大预测值,A是x=0时的估计值,B是培养进程每延长1 d,平均将要增加的菌液浓度,再利用方

程参数估算培养最大增殖速率等次级参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同蒙古黄芪内生菌株产 IAA 量

各菌株 IAA 浓度大小依次为 B16 > B18 > B10 > B20 > B8 > B13 > B11 > B3 > B4 > B6 > B1 > B17 > CK > B14 > B9 > B19 > B7 > B5 > B15 > B12 > B2(表 2)。D<sub>540 nm</sub> 和 IAA 估测量均大于 CK 的菌

株有 12 株,计算得各菌株平均产 IAA 浓度为 10.10 mg/L。其中,11 株较 CK 显著增大( $P < 0.05$ ),平均产 IAA 浓度为 10.77 mg/L。9 株较 CK 组极显著增大( $P < 0.01$ ),平均产 IAA 浓度为 11.30 mg/L,其中 B16 菌株产 IAA 浓度最大,高达(26.48) mg/L,极显著高于其他产 IAA 内生菌株的水平( $P < 0.01$ ),变异系数 CV=15.18。说明 B16 是高稳产 IAA 的优异菌株。

表 2 蒙古黄芪内生细菌菌株信息及菌株 Salkowski 显色反应和产 IAA 估测

Table 2 Strains Information of endogenous bacteria from *A. membranaceus* var. *mongholicus* root and comparison of their Salkowski reaction and estimated IAA concentrations

代码	GenBank accessions	菌株	D <sub>540 nm</sub>	产 IAA 量/(mg·L <sup>-1</sup> )	Rank of IAA productivity
B1	OM938267	<i>Microbacterium</i>	0.277±0.053*	5.47±2.26*	11
B2	OM938268	<i>Bacillaceae</i>	0.127±0.007 <sup>ns</sup>	-0.83±0.28 <sup>ns</sup>	20
B3	OM938269	<i>Rhodococcus</i>	0.326±0.015**	7.55±0.62**	8
B4	OM938270	<i>Bacillus</i>	0.316±0.015**	7.13±0.65**	9
B5	OM938271	<i>Bacillus</i>	0.145±0.021 <sup>ns</sup>	-0.09±0.86 <sup>ns</sup>	17
B6	OM938272	<i>Bacillus</i>	0.278±0.014*	5.50±0.57*	10
B7	OM938273	<i>Stenotrophomonas</i>	0.155±0.024 <sup>ns</sup>	0.32±0.99 <sup>ns</sup>	16
B8	OM938274	<i>Paenibacillaceae</i>	0.373±0.030**	9.53±1.25**	5
B9	OM938275	<i>Agrobacterium</i>	0.159±0.042 <sup>ns</sup>	0.49±1.75 <sup>ns</sup>	14
B10	OM938276	<i>Bacillus</i>	0.447±0.059**	12.64±2.48**	3
B11	OM938277	<i>Lysinibacillus</i>	0.332±0.009**	7.80±0.36**	7
B12	OM938278	<i>Bacillus</i>	0.134±0.009 <sup>ns</sup>	-0.55±0.36 <sup>ns</sup>	19
B13	OM938279	<i>Rhodococcus</i>	0.349±0.004**	8.51±0.15**	6
B14	OM938280	<i>Staphylococcus</i>	0.165±0.028 <sup>ns</sup>	0.74±1.18 <sup>ns</sup>	13
B15	OM938281	<i>Paenibacillus</i>	0.138±0.024 <sup>ns</sup>	-0.38±1.01 <sup>ns</sup>	18
B16	OM938262	<i>Pantoea</i>	0.775±0.095**	26.48±4.02**	1
B17	OM938263	<i>Ensifer</i>	0.212±0.004 <sup>ns</sup>	2.74±0.17 <sup>ns</sup>	12
B18	OM938264	<i>Bacillus</i>	0.531±0.0139**	16.19±5.847**	2
B19	OM938265	<i>Peribacillus</i>	0.155±0.054 <sup>ns</sup>	0.34±2.27 <sup>ns</sup>	15
B20	OM938266	<i>Paenibacillus</i>	0.423±0.008**	11.64±0.32**	4
CK	/	<i>Culture medium</i>	0.182±0.053	1.46±2.25	CK

注:表中数据为平均值±SD。\*表示与对照培养液差异显著( $P < 0.05$ ),\*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ ),ns表示差异不显著。

### 2.2 蒙古黄芪优异内生菌株 B16 生长曲线

选取高稳产 IAA 的 B16 菌株转接至 LB 液体培养基。蒙古黄芪内生泛菌属 B16 菌株增殖动态符合 Logistic 曲线方程( $y = \frac{1.743}{1 + e^{1.455 - 0.215x}}$ ,  $R^2 = 0.692^{**}$ ),经直线化方程( $y = 2.158 - 0.273x$ ,  $R^2 = 0.839^{**}$ )拟合估算,在接种后培养 4~12 h 是快速生长增殖期,培养

14~28 h 处于缓慢增殖期,培养 26 h 后达到最大(图 2)。因此,后续培养条件优化试验中,选取培养 12 h 接种进行重新发酵,发酵 20 h 测定菌体浓度。将菌株稀释悬浮至 D<sub>540 nm</sub> 为 1 时涂布计数,初始菌落浓度为  $4.98 \times 10^7$  cfu/mL。

### 2.3 优异菌株 B16 培养条件的优化

2.3.1 培养温度对 B16 增殖和 IAA 产量的动态影

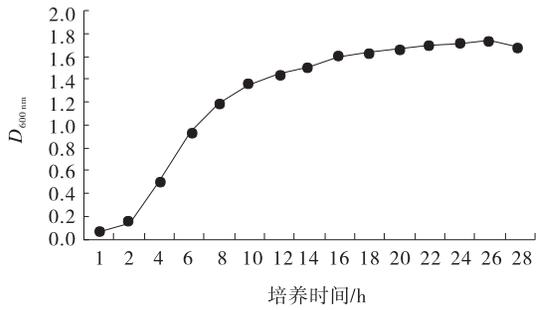


图2 B16的生长曲线和直线拟合

Fig. 2 Growth curve and straight line fitting of B16

响 不同培养温度和培养时间对菌株生长动态和产 IAA 量均具有极显著影响( $P < 0.01$ )。在基础培养基 15 °C 培养条件下,菌株 B16 在培养 32 h 时,  $D_{600\text{nm}}$  达最大值,此后生长稳定。在 25 °C 培养,该菌株生长速度相对较快,培养 20 h 已达到最大值( $D_{600\text{nm}} = 1.778$ ),此

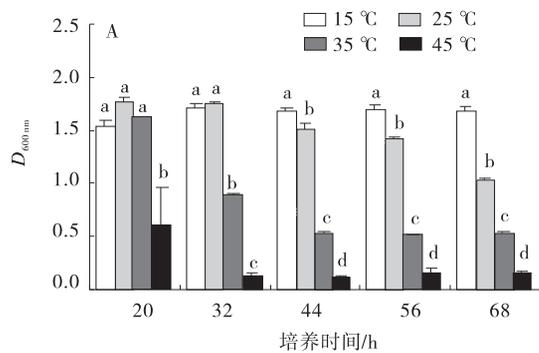


图3 培养温度对菌株 B16 的增殖及产 IAA 量影响的时间动态

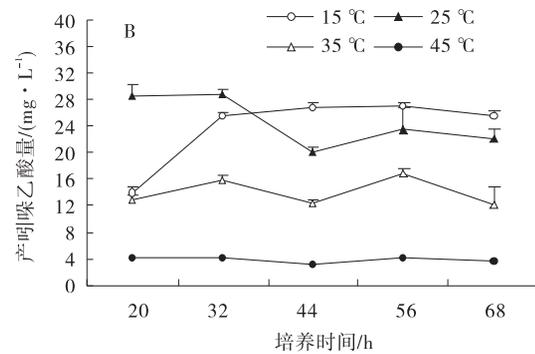
Fig. 3 Time dynamics of the effect of culture temperature on the proliferation and IAA production of strain B16

2.3.2 培养基盐浓度对 B16 增殖和 IAA 产量动态影响 不同盐浓度下培养不同时间对菌株 B16 的生长和产 IAA 具有极显著影响( $P < 0.01$ )。盐浓度 0.1% 条件下培养,在 39 h 开始处于对数生长期,达到较高的菌浓度,在 75 h 仍然能够使菌株浓度维持在较高的水平。在盐浓度为 1% 条件下 B16 菌株的生长速度较快,在培养 21 h 已达较高的菌浓度,随培养时间延长其菌浓度仍具有上升趋势,降解速度较慢,在 75 h 仍可以保持较高浓度水平。盐度为 4% 的培养条件下,培养初期菌株增长速度慢,但随培养时间的延长,菌液浓度在 39 h 后达到相对稳定的水平。盐浓度为 7% 的培养条件下,随培养时间的延长有持续增长趋势,培养 63 h 和 75 h 达到稳定高增长的水平。盐浓度为 10% 的培养条件下,在培养 20~75 h 菌株未见明显增长趋势(图 4-A)。

菌株 B16 在盐浓度为 0.1% 的培养条件下,其产

后随培养时间的延长呈下降趋势。在 35 °C 和 45 °C 温度下培养与 25 °C 培养具有相似的增长趋势,均在培养 20 h 后开始下降(图 3-A)。

菌株 B16 在 15 °C 培养条件下,培养 32 h 达到较高浓度,并在培养 56 h 仍处于相对稳定的趋势,当培养时间超过 56 h 后开始下降。在 25 °C 培养条件下, B16 菌株 IAA 量在培养 20 h 时便达到较高水平,极显著高于其他温度同期培养的水平( $P < 0.01$ ),培养 32 h 达到最高(28.80 mg/L)(图 3-B)。菌株 B16 在 35 °C 培养条件下,所产 IAA 的量维持在 12.90~16.70 mg/L 波动,较高水平的产量未出现。在 45 °C 条件下培养 20~68 h,该菌株产 IAA 量整体水平持续很低,极显著低于其他温度组的水平( $P < 0.01$ )。



IAA 量并不能达到较高水平,且稳定性较差。菌株 B16 在盐浓度为 1% 的培养条件下,其产 IAA 量较高且稳定性好,在培养 21 h 已达到较高浓度水平,随后持续增加并在测定时间结束维持在稳定高的水平,极显著高于其他盐浓度培养不同时间的水平,在培养 21~75 h,平均产 IAA 浓度范围为 19.07~27.51 mg/L,平均为 24.52 mg/L,最高达 28.74 mg/L。在培养盐浓度 4% 条件下, B16 菌株产 IAA 浓度较低,但显著高于盐浓度大于 7% 及 10% 培养的各水平(图 4-B)。

2.3.3 培养基 pH 对 B16 增殖和 IAA 产量动态影响 不同初始 pH 条件下培养时间对菌株 B16 的增殖具有极显著影响( $P < 0.01$ )。在 pH 3.0 的培养条件下,该菌株基本不增殖。在 pH 5.0 的培养条件下增殖速度极显著加快( $P < 0.01$ ),在 20 h 时已达到稳定水平,并呈现稳定升高趋势。在 pH 7.0 的培养条件下,增殖速

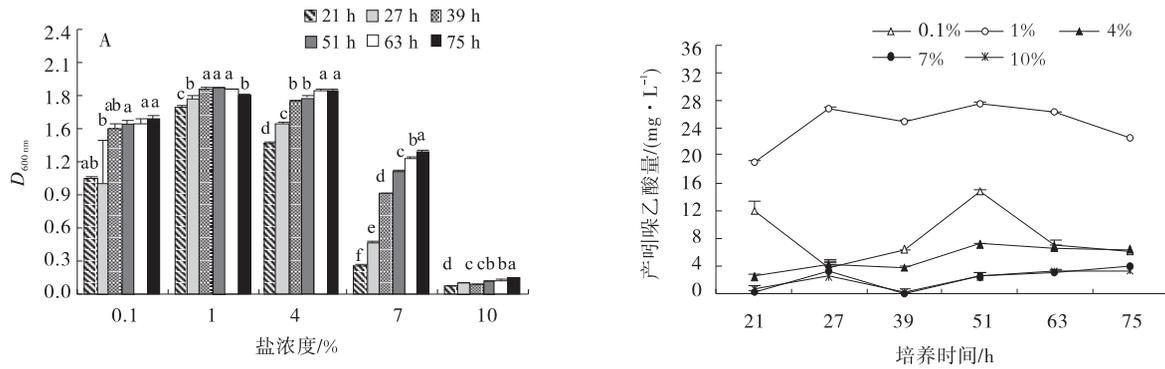


图4 培养盐浓度对B16的增殖及产IAA量影响的时间动态

Fig. 4 Time dynamics of the effects of culture salt concentration on the proliferation and IAA production of B16

度加快最为显著( $P < 0.01$ ),在培养20 h其 $D_{600\text{ nm}}$ 为4个组中最大,极显著高于同时期其他组的水平( $P < 0.01$ ),并维持在高稳水平。在pH 9.0培养条件下,菌株的生长速度相对较慢,且在56 h达到最高以后有降解趋势(图5-A)。

初始pH和培养时间对菌株B16的IAA产能出现极显著( $P < 0.01$ )差异。菌株B16在pH 3.0培养环境

下,其产IAA的量呈稳定低的波动趋势。该菌株在pH 5.0~9.0培养条件下,在培养20 h时产IAA浓度超过15.00 mg/L,但与pH 3.0培养条件的差异不显著,在培养44 h后产IAA浓度接近30.00 mg/L,并均维持在相对稳定高的水平。在pH=7培养条件下,产IAA浓度在各时段始终最大(图5-B)。

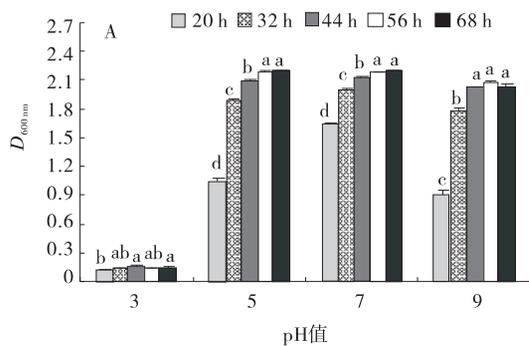
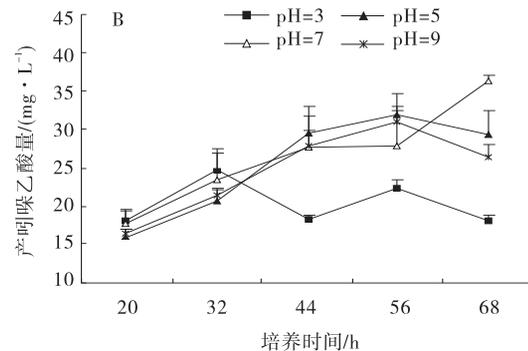


图5 培养基pH对B16增殖及产IAA量影响的时间动态

Fig. 5 Time dynamics of the effect of medium pH on B16 proliferation and IAA production

2.3.4 不同碳源对B16增殖和IAA产量动态影响  
4种不同碳源培养条件下,B16菌株均可以达到较高浓度,但生长速度不同。碳源为牛肉膏(BE)和葡萄糖(G)培养条件下菌株的生长速度相似,增殖较慢,在培养44 h达到较高菌浓度并保持稳定。在碳源为蔗糖(S)条件下B16增殖加快,在20 h便能够到达较高的菌浓度,且菌浓度仍有上升趋势。在碳源为酵母提取物(YE)的培养条件下,菌株增殖速度最快,在20 h便可达到较高浓度水平且稳定,并在32~68 h均较其他碳源组极显著升高( $P < 0.01$ )(图6-A)。

不同碳源对菌株B16产IAA量影响程度更为显著( $P < 0.01$ ),影响程度因培养时间的不同差异很大。在碳源为酵母提取物(YE)的培养条件下,其产IAA的速度最快,在培养20 h时已为4个组中最高,与其他



碳源组具有极显著差异( $P < 0.01$ ),并在培养44 h达到最高水平(46.60 mg/L),且其降解速度最慢。B16菌株在碳源为蔗糖(S)的培养条件下,其IAA的浓度上升较为缓慢,并呈现相对稳定且较低的水平;在与牛肉膏(BE)培养20 h,各时段其IAA产生量均极显著低于其他碳源组相应时段的水平。B16菌株在碳源为葡萄糖(G)的培养条件下,产IAA的量始终处于较低水平,在各时段均极显著低于其他碳源相应时段的水平(图6-B)。

2.3.5 不同氮源对B16增殖和IAA产量动态影响  
氯化铵(AC)作氮源B16初始增殖最慢,但在培养32 h后接近其他氮源同时段培养的水平。硝酸钾(PN)为氮源条件下B16初始增殖最快,培养32 h后处于相对稳定高的水平,但与其他氮源的差异不显著。4种氮

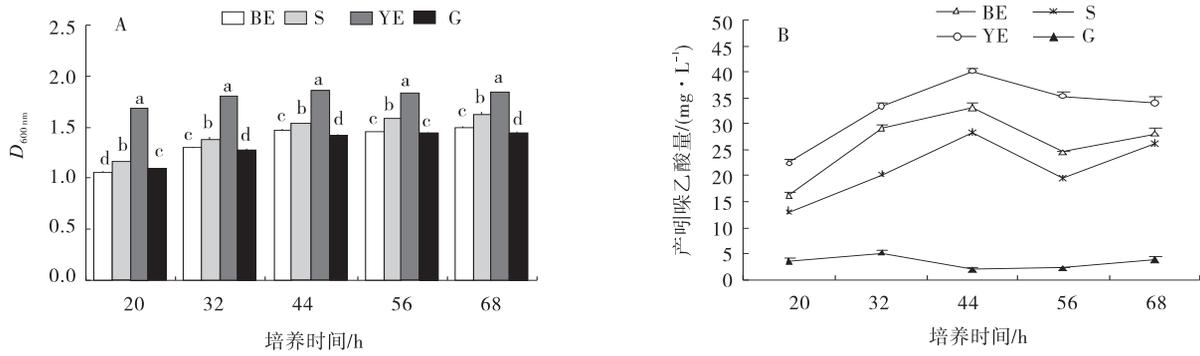


图6 不同碳源对B16的增殖及产IAA量影响的时间动态

Fig. 6 Time dynamics of the effects of different carbon sources on B16 proliferation and IAA production

注:BE:牛肉膏 Beef extract;S:蔗糖 Sucrose;YE:酵母提取物 Yeast extract;G:葡萄糖 Glucose

源中,培养56 h时B16菌株增殖均最快,但与培养32、44和68 h其他时段的差异性均未达到显著水平。蛋白胨(P)和胰蛋白胨(T)作氮源培养条件下,B16增殖均呈基本一致趋势,均在培养56 h达到最高增殖浓度,且稳定性好(图7-A)。

采用4种N源培养20~68 h,蛋白胨(P)和胰蛋白胨(T)培养条件下,B16产IAA量趋势基本一致,其初

始产量虽然较低,但在培养20 h后均快速上升,至培养56 d均达到最高产量,分别较初始量提高1219.5% ( $P < 0.01$ )和538.4% ( $P < 0.01$ ),此后,随培养时间延后有下降趋势,但P较T培养降解速度极显著减慢 ( $P < 0.01$ )。氯化铵(AC)培养条件下,极显著低于P和T作N源的水平。在硝酸钾(PN)作为氮源条件下基本不产IAA, $D_{540nm}$ 的IAA产量为负值(图7-B)。

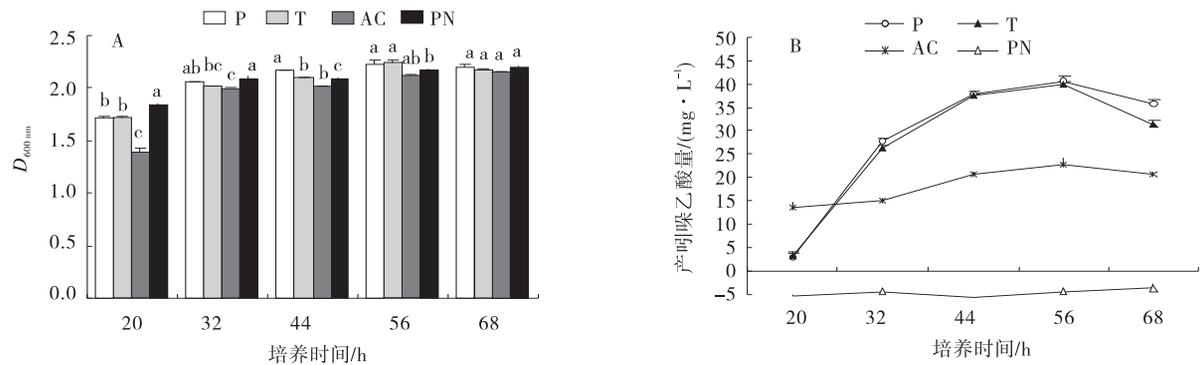


图7 不同氮源对B16增殖及产IAA量影响的时间动态

Fig. 7 Time dynamics of effects of different nitrogen sources on B16 proliferation and IAA production

注:P:蛋白胨 Peptone;T:胰蛋白胨 Tryptone;AC:氯化铵 Ammonium chloride;PN:硝酸钾 Potassium nitrate

### 3 讨论

植物内生菌资源丰富<sup>[1]</sup>,是宝贵的植物微生物资源。姜云等<sup>[22]</sup>从人参中筛选到的较高产IAA菌株JJ5-2,产IAA为10.2 mg/L;王辰月等<sup>[29]</sup>从洽草中筛选到的菌株分泌IAA能力均小于20 mg/L;贾西贝等<sup>[9]</sup>从碱蓬根际土壤中分离筛选到一株能产IAA促生菌株,经过条件优化产量可以达到87.86 mg/L;周铭典等<sup>[19]</sup>从堆肥中筛选到一株停滞棒杆菌,产IAA量可以达到138.87 mg/L。本研究发现,蒙古黄芪甘芪1号品系成药生长旺盛期根培养分离的内生细菌中,产IAA的菌株占60%,高产IAA菌株涉及5个属,其中

泛菌属(*Pantoea*)B16高稳产IAA,最高产IAA量可以达到40.658 mg/L,可以作为未来生态农业的优良资源,也揭示出蒙古黄芪优良品系甘芪1号高稳产性能的微生态基础。

农业环境中的微生物数量大,物种丰富多样,土壤中80%的有机质来源于微生物。作为在植物内部生长存活的菌株,这些产IAA菌株对其分离源环境均具有较强的适应性和定殖潜能,与植物相互作用,在利用植物自身生长的同时,其产生的IAA又促进植物的生长<sup>[1,16]</sup>。本研究鉴定筛选出高稳产IAA菌株B16,在25℃时生长增殖速度快,在15℃条件下产IAA量相对较多且具有一定的稳定性,这可能是蒙古

黄芪成药栽培期对冷凉环境长期适应选择的结果,也可能与 IAA 的降解温度相关,30 ℃以上高温不利于 IAA 产出,更不利于其宿主蒙古黄芪的生长发育。此外菌株 B16 能够在盐浓度为 7% 的环境中生存,然而只有在 1% 盐浓度培养条件下产 IAA 量较好,说明虽然菌株能够在较高盐浓度环境中生存,但产 IAA 量受盐浓度影响较大。菌株在 pH 值为 5.0~9.0 可以正常生存,pH 对菌株产 IAA 能力影响不大。

蒙古黄芪产区农业可耕地面积有限,随连作重茬和大量化肥投入造成根病加重<sup>[28]</sup>,但一般田块根部发病率在 50% 以下,说明个体抗逆差异性很大,可能与其内源微生物菌群差异性有关。本研究发现,从多年有机栽培条件下优选蒙古黄芪品系甘芪 1 号在旺盛生长根内生菌中筛选出产 IAA 优异菌株 B16,在增殖培养时对培养基添加的 C、N 源的选择性并不强,适应性广,但 IAA 产能选择性很强,最佳 C、N 源分别为酵母和蛋白胨,该培养基条件下 B16 产 IAA 量最高。另外,菌株 B16 在含硝酸钾的培养基可以增殖但不产 IAA,揭示含钾化学肥料对蒙古黄芪产 IAA 功能的抑制作用较大,也说明其寄主适应范围广,但生产性能受气候环境和栽培中投入化学肥料的影响较大。这进一步诠释了蒙古黄芪的道地性不能轻易扩张的理论,也反映出“甘芪 1 号”品系对生态有机栽培的适应性较强。

## 4 结论

蒙古黄芪根内生菌资源较为丰富,是微生物资源的一大宝库。本研究培养分离筛选出功能菌株 B16,蒙古黄芪根可培养内生细菌产生 IAA 的菌株占比较高,开发前景良好。

### 参考文献:

- [1] 郝晓娟. 植物内生菌[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2010:1-2.
- [2] 范丽霞,郑继平,白新鹏. 药用植物内生菌及其对道地药材影响的研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(22):11221-11223.
- [3] 陈柯璇,李海燕. 植物种子内生菌及其应用前景的研究进展[J]. 中国野生植物资源,2021,40(11):40-44.
- [4] 畅涛,杨成德,薛莉,杨小利,等. 珠芽蓼内生菌 ZA1 对马铃薯的防病促生研究[J]. 草业学报,2015,24(12):83-91.
- [5] Nandhini S, Sendhilvel V, Babu S. Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici*, the wilt pathogen [J]. Journal of Biopesticides,2012,5(2):178-185.
- [6] Hamid H, Nelly N, Syahrawati M, et al. Potential of endophytic bacteria from corn as biopesticide: a biological control of insect pests [J]. Journal of Biopesticides, 2019, 12(1):40-45.
- [7] 陈晓燕,王小琳,谢先进. 不同微生物菌剂对玉米产量及土壤肥力的影响[J]. 热带农业科学,2021,41(9):11-16.
- [8] 王伟楠,兰智勇,喻文丽,等. 盐穗木根际产 ACC 脱氨酶耐盐菌株的筛选及鉴定[J]. 中国土壤与肥料,2021(2):270-275.
- [9] 贾西贝,王琦琦,李杨,等. 一株产吡啶乙酸耐盐促生菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国酿造,2019,38(11):37-42.
- [10] 夏广清. 东北红豆杉内生菌对返魂草黑斑病的抗性研究[J]. 林业实用技术,2013(10):36-37.
- [11] 杨志军,邓毅,曼琼,等. 内生菌在天然药物研究中的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2018,34(5):593-596.
- [12] Mastretta C, Barac T, Vangronsveld J, et al. Endophytic bacteria and their potential application to improve the phytoremediation of contaminated environments[J]. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 2006, 23(1):175-188.
- [13] 曹阳,宋立超,钮旭光,等. 焦化厂地肤根内解苈细菌的筛选及促生潜力[J]. 应用生态学报,2019,30(6):2056-2062.
- [14] Kabra A, Khandare R V, Govindwar S P. Development of a bioreactor for remediation of textile effluent and dye mixture: A plant-bacterial synergistic strategy [J]. Water Res,2013,47(3):1035-1048
- [15] 廖春雨. 固氮内生菌 HMLR8 和 HMLR13 对水稻的促生效应的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2010.
- [16] 苑博华,廖祥儒,郑晓洁,等. 吡啶乙酸在植物细胞中的代谢及其作用[J]. 生物学通报,2005(4):21-23.
- [17] 姜云,田磊,陈长卿,等. 一株人参内生产吡啶乙酸细菌的筛选及鉴定[J]. 中国中药杂志,2015,40(2):213-217.
- [18] 刘璐,唐文竹,李宪臻. 一株产吡啶乙酸菌的筛选、鉴定

- 与优化[J]. 大连工业大学学报, 2019, 38(4): 239–243.
- [19] 周铭典, 蔡冠竟, 宁静, 等. 一株产吡啶乙酸菌的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. 生物学杂志, 2021, 38(2): 65–69.
- [20] Bishnu M, Dhurva P G, Sanjay N K, *et al.* Quantification of indole-3-acetic acid from bambusa tulda roxb. seedlings using high performance liquid chromatography [J]. African Journal of Biotechnology, 2020, 19 (10) : 781–788.
- [21] Moliszewska E B, Nabrdalik M. Application and biological impact of endophytic bacteria as IAA producers [J]. Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture, 2020(6): 77–87.
- [22] 姜云, 田磊, 陈长卿, 等. 一株人参内生吡啶乙酸细菌的筛选及鉴定[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 213–217.
- [23] 张琳, 陈彦宏, 王雪妍, 等. 三七植物内生细菌的促生作用[J]. 大连工业大学学报, 2018, 37(4): 244–248.
- [24] 高红, 盛剑, 白旭, 等. 浑源黄芪内生细菌的菌群组成及其功能[J]. 微生物学报, 2020, 60(8): 1638–1647.
- [25] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 315–316.
- [26] Samuel O A, Huang B T, Chen Y, *et al.* Antioxidant and antibacterial insights into the leaves, leaf tea and medicinal roots from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 19625.
- [27] 陈垣, 朱蕾, 郭凤霞, 等. 甘肃渭源蒙古黄芪根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(4): 428–431.
- [28] 白刚, 郭凤霞, 陈垣, 等. 岷县生荒地和熟地育成当归苗抗逆生理特性的差异[J]. 草业学报, 2019, 28(11): 86–95.
- [29] 王辰月, 陈秀蓉, 杨成德. 分泌吡啶乙酸苕草内生细菌的筛选及其对种子发芽的影响[J]. 草原与草坪, 2013, 33(1): 21–24.

## Identification and selection of IAA-producing strains from endophytic bacteria of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* root and optimization of culture conditions

LIU Lei<sup>1,2</sup>, GUO Feng-xia<sup>1\*</sup>, CHEN Yuan<sup>1</sup>, ZHOU Yang<sup>1</sup>, LI Hong-ling<sup>1</sup>, LI Qin<sup>1</sup>,  
LI Guo-fan<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences and Technology, College of Agronomy / Gansu Provincial Key Lab of Aridland Crop Science, Gansu Provincial Engineering Research Centre for Medical Plant Cultivation and Breeding, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Tianjin Key Lab of Modern Chinese Medicine Resource Research Enterprise, Tianjin Tianshli Modern Chinese Medicine Resources Co., Ltd, Tianjin 300410, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the growth promoting capabilities of its endophytic bacteria and harness excellent microbial resources. [Method] We isolated and purified 20 endophytic bacterial strains (B1 ~B20, GenBank serial numbers OM938262~OM938281) from the roots of "Ganqi No. 1". Using a pure culture medium as control (CK), we identified functional strains capable of producing indoleacetic acid (IAA) through salkowski chromogenic method. Subsequently, we optimised the culture conditions for the outstanding strains. [Result] The results showed that 12 strains of endophytic bacteria from the root of "Ganqi No. 1" exhibited significant Salkowski color reactions compared to CK. Among them, strain B16 demonstrated the highest IAA production concentration, followed by

B18 > B10 > B20 > B8 > B13 > B11 > B3 > B4 > B6 > B1 > B17, respectively. The IAA production concentrations ranged from 2.74 to 26.48 mg/L, average 10.10 mg/L. Notably, strain B16 (GenBank OM 938262) consistently produced IAA at a high concentration of 26.48 mg/L, significantly outperforming other strains. Optimization of culture conditions showed that strain B16 thrived in 0.1%~7% NaCl medium at temperatures ranging 15 °C to 25 °C, with the optimum NaCl concentration being 1% and the optimal pH level at 7.0. Yeast extract and peptone were identified as the optimal carbon and nitrogen sources respectively. Following optimization process, strain B16 exhibited a 28.6% increase in proliferation and a 53.5% enhancement in IAA production. **【Conclusion】** These findings highlight the prevalence of IAA-producing strain among the endophytic bacteria of *Astragalus mongholicus* root, underscoring their importance as a valuable resource for medicinal leguminous plants. Strain B16, in particular, emerged as a highly stable producer of IAA with its production reaching 40.658 mg/L post-culture condition optimization. This strain holds significant potential for ecological regulation and utilization.

**Key words:** *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*; endogenous bacteria; indole-3-acetic acid; strain screening; culture conditions optimization

(责任编辑 新奇峰)