

研究报告

毛白杨内生细菌的分离鉴定及其对水稻促生作用

黄敏清¹, 谭佩婷², 陈伊航¹, 赵春茜¹, 刘丽平¹, 彭桂香³, 谭志远^{*1}¹ 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642² 湖南农业大学 园艺学院, 湖南 长沙 410128³ 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642

黄敏清, 谭佩婷, 陈伊航, 赵春茜, 刘丽平, 彭桂香, 谭志远. 毛白杨内生细菌的分离鉴定及其对水稻促生作用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1572-1586.

HUANG Mingqing, TAN Peiting, CHEN Yihang, ZHAO Chunxi, LIU Liping, PENG Guixiang, TAN Zhiyuan. Endophytic bacteria from *Populus tomentosa*: isolation, identification, and screening of strains promoting rice growth[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1572-1586.

摘要:【背景】毛白杨(*Populus tomentosa*)属杨柳科杨属的落叶大乔木, 在我国的种植面积非常广, 具有生长速度快、繁殖率高、环境适应性强等优点。探索其内生细菌的特性和功能对农业生产具有重要的实际指导意义。【目的】探究毛白杨内生细菌功能的多样性, 为农业高效生产提供优良的菌种资源。【方法】以速生植物毛白杨为研究材料, 采用葡萄糖-硝酸盐(dextrose-nitrate, DN)、LB、生物工艺细胞培养基(Czapek's continuous medium, CCM)和营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基分离纯化各组织内生细菌。测定菌株 16S rRNA 基因序列并进行系统发育树分析; 挖掘菌株固氮、溶磷、解钾、产铁载体、产生生长素等潜在促生长特性; 测定菌株生理生化特性, 筛选促生功能较强的菌株进行水稻种子萌发及水稻盆栽促生长试验。【结果】共分离到 16 株代表菌株, 其中 6 株具有溶磷能力, 6 株具有解钾能力, 7 株具有固氮能力, 6 株具有分泌生长素能力, 11 株具有分泌铁载体能力, 表明毛白杨内生细菌具有丰富的功能多样性。水稻种子的萌发及促生长试验结果显示: 4 株菌及 2 个组合菌液对水稻萌发和生长均具有促进作用, 其中, 土壤肠杆菌(*Enterobacter soli*) BYG3205 与乌尔斯氏植物内生菌(*Phytobacter ursingii*) BYG3102 和土壤不动杆菌(*Acinetobacter soli*) BYJ201 的组合处理比单菌处理的效果好。【结论】从毛白杨材料分离得到 16 株内生细菌, 并通过 16S rRNA 基因测序分析、固氮酶活性确定、内生细菌溶磷、解钾、产生生长素等促生特性等环节, 筛选出促生长特性菌株且对水稻盆栽试验表现出促进作用, 丰富了微生物资源库, 为绿色、可持续农业提供了可行途径。

关键词: 毛白杨; 内生细菌; 固氮; 耐重金属; 生防功能; 促生效果

资助项目: 国家自然科学基金(31970001); 华南农业大学农业农村部华南作物资源高效利用重点实验室-拉多美集团产业学院联合开放课题(ICSCAUGLFC202301)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970001), and the Key Laboratory for Enhancing Resource Use Efficiency of Crops in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Agricultural University-Ladome Group Industry College Joint Open Project Grant (ICSCAUGLFC202301).

*Corresponding author. E-mail: zytan@scau.edu.cn

Received: 2024-06-14; Accepted: 2024-07-27; Published online: 2024-08-28

Endophytic bacteria from *Populus tomentosa*: isolation, identification, and screening of strains promoting rice growth

HUANG Minqing¹, TAN Peiting², CHEN Yihang¹, ZHAO Chunxi¹, LIU Liping¹, PENG Guixiang³, TAN Zhiyuan^{*1}

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

2 College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

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

Abstract: [Background] *Populus tomentosa*, belonging to the family *Salicaceae*, is a deciduous large tree. It has a wide planting area in China and is characterized by fast growth, high reproductive rate, and strong environmental adaptability. Exploring the characteristics and functions of endophytic bacteria from *P. tomentosa* holds significant guidance for agricultural production. [Objective] To explore the functional diversity of endophytic bacteria in *P. tomentosa* and provide excellent bacterial resources for efficient agricultural production. [Methods] We used DN, LB, CCM, and NA media to isolate endophytic bacteria from various tissues of the fast-growing plant *P. tomentosa*. The 16S rRNA gene sequences of the bacterial strains were determined and used to build a phylogenetic tree. Potential plant growth-promoting characteristics such as nitrogen fixation, phosphorus solubilization, potassium release, siderophore production, and indole-3-acetic acid (IAA) production of the strains were explored. The biochemical characteristics of the strains were determined. The strains with strong growth-promoting effects were selected for rice seed germination and rice pot experiments. [Results] A total of 16 representative bacterial strains were isolated, among which 6, 6, 7, 6, and 11 strain had the abilities of solubilizing phosphorus, releasing potassium, fixing nitrogen, producing IAA, producing siderophores, respectively. This result indicated the rich functional diversity of endophytic bacteria in *P. tomentosa*. The results from rice seed germination and growth promotion experiments showed that 4 single strains and 2 strain combinations promoted rice germination and growth. The combination of *Enterobacter soli* BYG3205 with *Phytobacter ursingii* BYG3102 or *Acinetobacter soli* BYJ201 showed better effect than single strain treatments. [Conclusion] A total of 16 strains of endophytic bacteria were isolated from *P. tomentosa*, and their characteristics were analyzed through 16S rRNA gene sequencing, nitrogenase activity determination, phosphate solubilization, potassium solubilization, and auxin production. Selected bacterial strains with growth-promoting effects exhibited positive effects in rice pot experiments. These endophytic bacteria enriched the microbial resources and provided a feasible approach for green and sustainable agriculture.

Keywords: *Populus tomentosa*; endophytic bacteria; nitrogen fixation; heavy metal tolerance; biocontrol function; growth-promoting effect

毛白杨(*Populus tomentosa*)属杨柳科杨属的落叶大乔木, 在我国的种植面积非常广, 具有生长速度快、繁殖率高、环境适应性强等优

点^[1]。杨木的用途广泛, 不仅可用作于木材, 还在生态防护和农林防护林中得到广泛应用。杨树也是道路绿化和园林绿化的优良树种^[2],

由于其高大雄伟、成林迅速、防风防沙、吸收废气等特性而备受青睐^[3]。毛白杨叶主要含有酚苷类成分,其水提取物具有较强的抗菌和抗病毒作用。据报道,毛白杨的制剂已在进行抗肿瘤动物实验,在杀伤或者抑制癌细胞方面具有一定的作用。同时,毛白杨提取物还具有解热、镇痛、抗炎和祛痰的功效,具备药用价值^[4-5]。刘晓光等^[6]从杨树组织中分离筛选出一株广谱拮抗菌,该菌株能够对抗多种病原微生物,具有丰富的抗病菌应用价值。近年来农业领域对毛白杨的研究有限,多集中在林业方面,对毛白杨内生细菌的研究鲜有报道。毛白杨作为速生植物,相较于其他树种在无人照管的情况下短时间内迅速长成参天大树,其内部究竟有何种微生物在发挥着作用值得深思。探索其内生细菌的特性和功能对农业生产具有重要的实际指导意义^[7-8]。

自然界中植物内生细菌种类多、数量大,具有促进植物生长和提高植物抗逆性等特点,因而备受关注^[9]。植物内生细菌在各个方面都有着广泛的应用价值,如在植物活性物质生产中,利用内生细菌可生产得到高活性物质^[10]。在经济作物种植中内生细菌与寄主植物由于长期共生,二者达成互相对彼此有利的共生模式。主要体现在2个方面,一是宿主植物通过光合作用供给内生细菌所需的营养物质;二是内生细菌可以产生如植物生长素、赤霉素等代谢物^[11]。这些物质在一定范围内能够对植物生长发育起到促进作用,增加植物抗逆能力,进而增强植物对外界不良环境的抵御能力^[12]。另外,内生细菌具有提高植物的抗旱、抗盐碱等能力,进一步增加经济作物的产量^[13]。在环境保护方面,虽然土壤具有自净能力,但重金属却无法被降解^[14-15],长期积聚且超过正常范围后直接危害人体健康,并且会对环境造成极大的危害^[16],具有积累重金属能力的内生细菌的存在,以及植物与内生细菌共生体的存在都为修复重金属污染

的土壤提供了可能性^[17]。因此,植物内生细菌具有广阔的发展前景。

目前,国内外关于毛白杨内生细菌的研究较为有限,而毛白杨作为一种速生树种,生长迅猛且耐旱性强。因此,探寻其中的内生细菌对农业生产具有重要意义^[18]。本文采用多种不同功能的培养基对毛白杨根、茎和叶组织进行内生细菌的分离纯化。通过16S rRNA基因序列测定确定菌株的分类地位,同时测定菌株的固氮酶活性并扩增 *nifH* 固氮酶基因,挖掘内生细菌溶磷、解钾、产生生长素等促生特性,最终筛选出具有良好促生特性的内生细菌对水稻进行促生长试验,以验证内生细菌能否发挥促进作物生长的作用。本研究旨在挖掘优良菌株,丰富微生物资源库,为绿色、可持续农业发展提供可行的途径。

1 材料与方法

1.1 样品

毛白杨采于河南省信阳市潢川县(114.01°E, 31.46°N)健康植株的根、茎、叶。供试水稻,健康饱满的粤优丝苗水稻品种。土壤取自华南农业大学农场。

1.2 培养基

LB培养基^[19](g/L):酵母提取物 6.0,蛋白胨 9.0, NaCl 10.0, pH 7.0。LB培养基是一种富含营养成分的培养基,主要用于培养大肠杆菌(*Escherichia coli*)和其他革兰氏阴性菌。

葡萄糖-硝酸盐(dextrose-nitrate, DN)培养基^[19](g/L):蔗糖 10.000, MgSO₄ 0.200, NaCl 0.100, K₂HPO₄ 0.200, KH₂PO₄ 0.400, CaCl₂ 0.020, FeCl₃ 0.010, Na₂MoO₄ 0.002, 苹果酸 5.000, pH 7.0。DN培养基由于自身低氮含量,所以主要用于培养固氮菌。

生物工艺细胞培养基(Czapek's continuous medium, CCM)^[19](g/L):蔗糖 5.000, NaCl 0.100, 酵母提取物 0.100, malic acid Na₂MoO₄ 0.025,

CaCl₂ 0.060, MgSO₄ 0.200, 甘露醇 5.000, KH₂PO₄ 0.200, K₂HPO₄ 0.800, 0.66% Fe₍₃₎-EDTA 4.0 mL, pH 7.0。CCM 培养基富含营养物质, 主要用于培养革兰氏阳性菌。

营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基^[19](g/L): 甘露醇 10.0, CaCO₃ 5.0, KH₂PO₄ 0.2, NaCl 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaSO₄·2H₂O 0.2, pH 7.0。NA 培养基因其营养丰富和无氮含量, 主要用于培养对营养要求较高的固氮菌。

蒙金娜无机磷(Pikovskaya, PKO)培养基^[20](g/L): 葡萄糖 10.000, (NH₄)₂SO₄ 0.500, 酵母提取物 0.500, NaCl 0.200, KCl 0.300, MgSO₄·7H₂O 0.100, FeSO₄ 0.003, MnSO₄ 0.03, Ca₃(PO₄)₂ 5.000, pH 6.8–7.0, 琼脂 20.000。

钾长石培养基^[21](g/L): MgSO₄·7H₂O 0.3, Na₂HPO₄ 0.5, NaCl 0.3, CaCO₃ 4.0, NaSO₄ 0.2, 葡萄糖 13.0, 钾长石 3.0, 琼脂 20.0, pH 7.0。

King 液体培养基(g/L): 酵母提取物 0.5, 蛋白胨 20, NaCl 10, pH 7.0。

甘露醇盐琼脂(mannitol salt agar, MSA)培养基^[22](g/L): 蛋白胨 5.0, 葡萄糖 4.0, KCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, pH 7.0。铬天蓝 S 染料(chromeazuroil S dye, CAS)染液(100 mL): 十六烷基三甲基溴化铵 0.15 g, FeCl₃ 0.003 g, 铬天青 0.065 g, 加 ddH₂O 定容至 100 mL。磷酸缓冲溶液(0.1 mol/L): NaH₂PO₃ 0.5 g, Na₂HPO₃ 2.0 g, NH₄Cl 0.25 g, KH₂PO₄ 0.075 g, NaCl 0.2 g, 无菌水 100 mL。3 个组分分开灭菌, 先加入 50 mL CAS 染液到 1.0 L MSA 培养基中, 再加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液 50 mL 后混合均匀, 即成 MSA-CAS 培养基。

所需固体培养基加入 20.0 g 琼脂粉, 半固体培养基加入 2.0 g 琼脂粉, 121 °C 灭菌 20 min。LB、DN、CCM、NA 等培养基所含碳、氮源不同, 适合不同种类的内生细菌生长^[23], 以期筛选出更多内生细菌资源。

1.3 主要试剂和仪器

2×Taq PCR Mix 和 DNA Marker, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 吡啶-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA), 合肥博美生物公司。凝胶成像系统和 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 气相色谱仪, 北京北分天普仪器技术有限公司; 可见分光光度计, 上海美普达仪器有限公司。

1.4 毛白杨内生细菌的分离和鉴定

在河南省信阳市潢川县的毛白杨种植园地中, 选取正常生长的毛白杨植株, 根、茎及叶部用无菌水冲洗干净表面污泥, 用剪刀剪成大约 3 cm 小段; 然后, 在超净工作台进行材料的消毒, 75%乙醇试剂浸泡 30 s, 10%次氯酸钠浸泡茎 2 min、根和叶 1 min, 无菌水冲洗 7–8 次; 将最后 1 次的洗涤液涂布于 LB 固体培养基上, 观察无细菌生长判定材料消毒完全。已消毒的材料无菌研钵研磨至匀浆, 加入无菌水梯度稀释至 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶, 吸取各梯度 100.0 μL 涂布于 LB 等平板, 37 °C 恒温培养箱倒置培养 3 d。待平板上出现菌落后, 挑选大小和形状有差异的单菌落, 参照 Redburn 等^[24]的方法, 选用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3') 扩增 16S rRNA 基因片段, PCR 反应体系: 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA (20 ng/μL) 1.5 μL, 27F (25 μmol/L) 1.0 μL, 1492R (25 μmol/L) 1.0 μL, 2×Taq PCR Mix 20.0 μL, ddH₂O 16.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物委托天一辉远生物有限公司进行测序, 将所得序列通过 NCBI 数据库进行 BLAST 同源性分析, 并采用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

1.5 各类群代表菌株的生理生化指标测定

对代表菌株进行生理生化检测, 包括革兰

氏染色、过氧化氢酶测定、甲基红染色试验、V.P 试验、硝酸还原试验、明胶液化试验、产氨试验、脲酶试验和内生细菌耐盐性测定,所用方法均参照《微生物学实验教程》^[25]进行。

1.6 毛白杨内生细菌固氮特性的测定

菌株固氮酶活性用乙炔还原法测定。使用无菌水制备菌悬液($OD_{600}=1$),吸取 10.0 μL 菌悬液放到含 3.0 mL DN 半固体培养基的 8.0 mL 试管中,用无菌水作为对照,用灭菌乳塞密封后 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,用电石制备乙炔气体,加到试管中使其终浓度为 1%。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d,抽取试管内 0.5 mL 液体注入气相色谱仪,测定是否有乙烯的产生进而判定菌株是否具有体外固氮能力,并按照公式计算出菌株的固氮酶活性,每个菌株重复 3 次,取平均值。计算公式如下:

$$EA=(58.0\times 103\times S_e\times T\times P_e)/(S_b\times T_e\times P\times t\times V)$$

式中: S_b 为乙炔峰面积, T_e 为实验条件下的温度($^{\circ}\text{C}$), P 为绝对大气压强(Pa), t 为培养时间(h), V 为容器体积(mL), S_e 为乙烯峰面积, T 为凯氏绝对温度($T=273.13\text{ K}$), P_e 为实验条件下的大气压强(Pa)。

1.7 固氮酶功能基因 *nifH* 的序列扩增与分析

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取检测到固氮酶活的菌株基因组 DNA,以菌株 DNA 为模板扩增固氮酶 *nifH* 基因,设计引物 Zehr-F (5'-TGYGAYCCNAARGCNGA-3')和 Zehr-R (5'-NDGCCATCATYTCNCC-3')进行 PCR 反应扩增基因片段(PCR 反应体系和条件同 1.4)。PCR 结束后用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,检测 PCR 产物。

1.8 毛白杨内生细菌促生特性探究

溶磷试验:将菌株活化后用灭过菌的牙签点种到 PKO 培养基上,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 2–5 d,通过观察菌落周围是否形成透明圈来判断菌株是否具有溶磷能力,有透明圈则说明菌株具有溶磷能力。采用钼锑抗比色法对各菌株溶磷能力进行测定^[26]。

解钾试验:将菌株活化后用灭过菌的牙签

点种到钾长石培养基上,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 2–5 d,通过观察菌落周围是否有透明圈,判断菌株是否具有解钾能力,有透明圈则说明菌株具有解钾能力。参考文献[27]的方法对各菌株解钾能力进行测定。

分泌生长素试验:定性分析:将菌株活化后接种至 King 液体培养试管中,每个菌株设 3 个重复,28 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 培养 2 d。吸取 50 μL 菌悬液于陶瓷比色板上,加入等量比色液,设阴性对照和阳性对照,阴性对照加入 50 μL 未接菌的 King 液体培养基,阳性对照中加入 50 μL 浓度为 10 mg/L 的植物生长激素,之后在黑暗条件下静置 0.5 h,观察颜色变化,能产生生长素的菌株其混合液在静置后会变为粉红色或红色。定量分析:使用纯的 IAA 制作标准曲线,采用 Salkowski 比色法^[23]对代表菌株分泌生长素的能力进行测定。

产铁载体试验:将菌株接种于 MSA-CAS 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 培养 3–5 d,观察培养基变色情况,未变色则菌株不具有产铁载体能力,如果培养基颜色变为粉红色则菌株具有分泌铁载体的能力^[22]。

1.9 毛白杨内生细菌促进水稻种子萌发

菌株处理:用灭菌接种环将菌株接种至 LB 液体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min 培养 24 h,制成 $OD_{600}=1$ 的菌悬液待用。

水稻种子处理:(1) 水中浸泡 24 h 打破种子休眠,有利于种子萌发;(2) 种子表面消毒:用 0.1% HgCl_2 消毒 3 min,无菌水重复清洗种子 6 遍,每次 3 min。

使用制备好的菌悬液浸种 24 h,将 30 粒种子转至铺有灭菌滤纸的无菌培养皿中,以无菌水作为对照。放置在 28 $^{\circ}\text{C}$ 的暗培养箱中培养,5 d 后转至组培瓶中培养,向每个组培瓶中加入 25.0 mL 无菌水和 1.0 mL 的菌悬液,对照组只加入无菌水,10 d 后观察生长情况,随机选取 3 株实验样品测量其根长、苗长数据。

数据分析和作图:使用 GraphPad Prism8.01

软件进行数据分析和作图。

1.10 毛白杨内生细菌促进水稻种子生长试验

根据菌株性能互补特性, 设置 2 个组合进行水稻促生长试验, 分别为组合 1 (BYG3205+BYG3102)和组合 2 (BYG3205+BYJ201)。将无菌土加到塑料盆 3/4 处, 加入 500.0 mL 的无菌水使土壤湿润, 随后加入 200.0 mL 的各个菌株及组合菌悬液, 以等体积 LB 培养液为对照。待土壤干燥后再加入 200.0 mL 的各个单菌菌悬液及组合菌悬液, 重复 3 次, 充分确保菌株定殖到土壤中。10 d 后取生长状态一致的水稻苗和其土壤转移至另一新的塑料盆中, 每盆 3 株秧苗, 每个处理 3 次重复。每天进行观察并做好实验记录, 依据盆栽土情况施加无菌水, 每隔 5 d 加 200.0 mL 的菌悬液, 对照组加经稀释过的 LB 培养液。在水稻生长到 28 d 的时候, 测量其根长、株高。

2 结果与分析

2.1 毛白杨内生细菌的分离及鉴定结果

采用 LB、DN、CCM、NA 培养基对毛白

杨组织进行内生细菌的分离与纯化, 通过平板划线法和稀释涂布平板法, 共分离得到 51 株内生细菌, 对菌株进行 16S rRNA 基因测序并进行相似性分析, 构建菌株亲缘关系发育树, 聚类得到 16 种菌株, 分别属于肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、小浴氏菌属(*Kosakonia*)、多源杆菌属(*Pluralibacter*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、新鞘氨醇菌属(*Novosphingobium*)、植物内生菌属(*Phytobacter*) (表 1 和图 1)。

2.2 毛白杨内生细菌生理生化指标测定结果

如表 2 所示, 菌株 BYG302、BYG3205、BYG3001、BYJ403、BYG2901、BYG3102 革兰氏染色为阳性反应, 表明这些菌株为革兰氏阳性菌, 其余菌株皆为革兰氏阴性菌; 过氧化氢酶试验表明, 只有菌株 BYG1504、BYG2001、BYG2004、BYG3102 为阴性反应, 其余菌株均为阳性反应, 这说明, 分离到的内生细菌大部分都含有过氧化氢酶, 能将过氧化氢分解为水和氧

表 1 菌株 16S rRNA 基因序列相似性

Table 1 Similarity of 16S rRNA gene sequences of strain

菌株编号 No. of strain	登录号 Accession number	相似性最高模式菌株 The model strain with the highest similarity	相似性 Similarity (%)
BYG302	MZ410575	<i>Enterobacter kobei</i> DSM13645 ^T	100.00
BYG3205	MZ410565	<i>Enterobacter soli</i> ATCC BAA-2102 ^T	99.68
BYG1802	MZ410566	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> LMG2683 ^T	100.00
BYJ101	OM757970	<i>Klebsiella granulomatis</i> KH22 ^T	99.49
BYG502	OM757971	<i>Klebsiella spallanzanii</i> SPARK-775-C1 ^T	98.25
BYG3001	MZ410567	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> 01A030 ^T	99.65
BYG1504	OM757975	<i>Klebsiella varicola</i> subsp. <i>tropica</i> SB5531 ^T	99.23
BYJ201	MZ410568	<i>Acinetobacter soli</i> CIP110264 ^T	100.00
BYG2001	OM757966	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC19606 ^T	100.00
BYG3801	OM757974	<i>Kosakonia pseudosacchari</i> JM-387 ^T	99.74
BYG7	MZ410569	<i>Kosakonia oryzae</i> Ola51 ^T	99.89
BYG1801	MZ410570	<i>Pluralibacter gergoviae</i> JCM1234 ^T	99.54
BYJ403	MZ410571	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> DSM 25135 ^T	99.48
BYG2901	MZ510575	<i>Pseudomonas alloputida</i> Kh7 ^T	100.00
BYG2004	MZ410573	<i>Novosphingobium pokkalii</i> L3E4 ^T	99.90
BYG3102	MZ410574	<i>Phytobacter ursingii</i> ATCC 27989 ^T	99.78

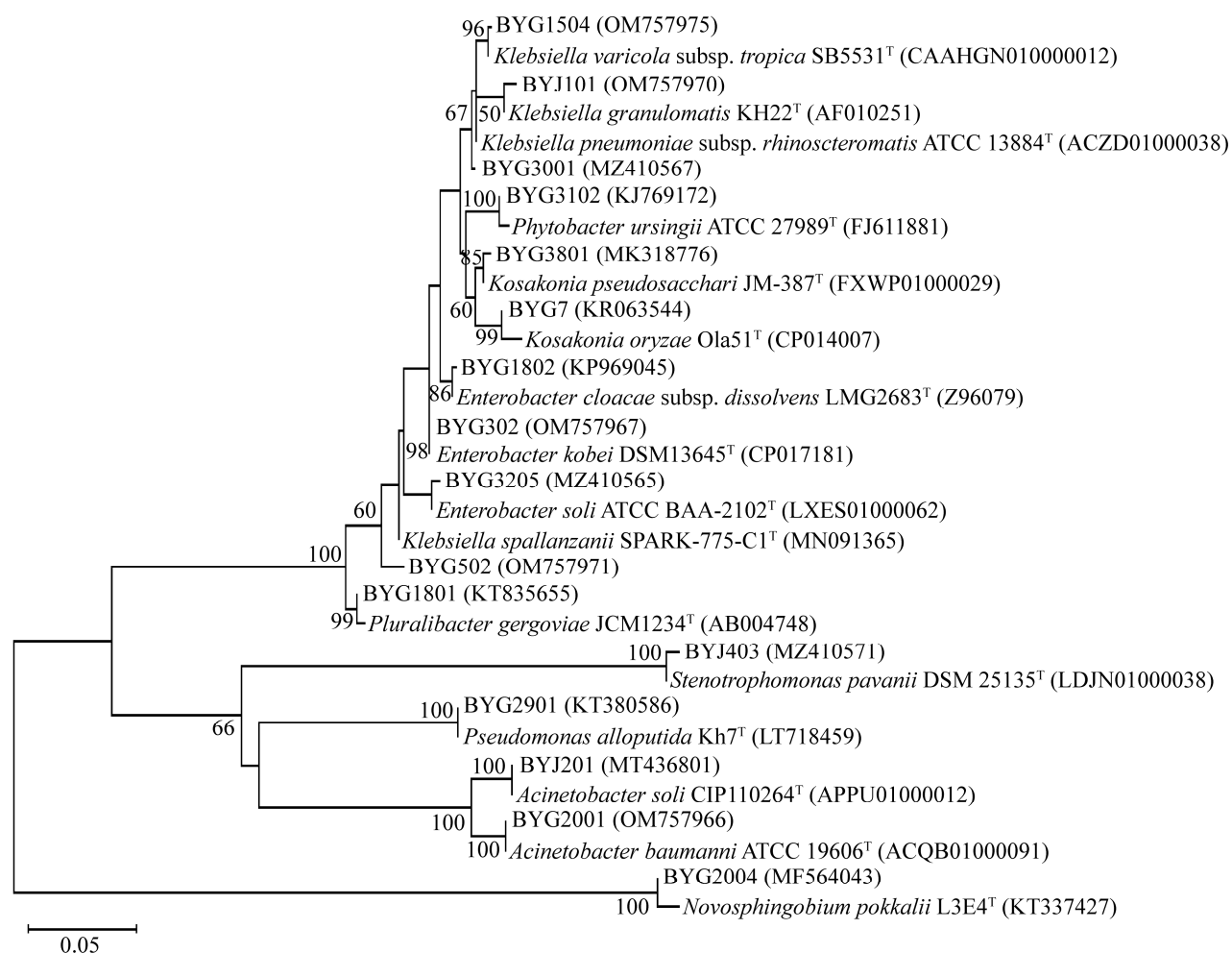


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株系统发育树 分支处数值表示 bootstrap 值；括号内数值为 GenBank 登录号；标尺 0.05 代表序列的进化差异。

Figure 1 Phylogenetic tree of strains based on 16S rRNA gene sequence. Numbers at branch nodes present bootstrap value; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar 0.05 represents sequence variance.

气；菌株 BYG1802、BYJ101、BYG3001、BYG2001、BYJ403、BYG3102 甲基红试验为阴性反应，其余为阳性反应，表明这些菌株具有将葡萄糖分解成丙酮酸、醋酸等有机酸的能力，具有较强的糖代谢能力；除菌株 BYG502 产氨试验为阴性外，其余菌株均为阳性反应，表明这些菌株可以分解含氮有机化合物；脲酶试验可以用来检测菌株是否具有脲酶，试验表明菌株 BYG302、BYG3205、BYG3801、BYG7、

BYG2004 为阴性反应不能产脲酶，其余菌株均为阳性反应，具备产生脲酶的能力；在硝酸还原试验中，菌株 BYG502、BYJ201、BYG2901、BYG3102 为阴性反应，其余为阳性反应，阳性反应的菌株具有硝酸盐还原能力，在实际应用生产上，可以将一些硝酸盐还原成植物可以吸收利用的含氮化合物；明胶液化试验只有一株菌 BYJ403 是阳性反应，表明菌株 BYJ403 具有产明胶酶的能力。V.P 试验可以看到菌株

表 2 毛白杨内生细菌生理生化指标

Table 2 Physiological and biochemical indices of endophytic bacteria of *Populus tomentosa*

菌株编号 Strain number	菌株名称 Strain name	Gram's stain	过氧化 氢酶 Catalase	甲基红 试验 Methyl red test	硝酸还原 Nitrate reductase	明胶液化 Gelatin liquefaction	V.P 试验 V.P test	产氨 Ammonia production	脲酶 Urease
BYG302	<i>Enterobacter kobei</i>	+	+	+	+	-	+	+	-
BYG3205	<i>Enterobacter soli</i>	+	+	+	+	-	-	+	-
BYG1802	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	-	+	-	+	-	+	+	+
BYJ101	<i>Klebsiella granulomatis</i>	-	+	-	+	-	-	+	+
BYG502	<i>Klebsiella spallanzanii</i>	-	+	+	-	-	+	-	+
BYG3001	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i>	+	+	-	+	-	+	+	+
BYG1504	<i>Klebsiella varicola</i> subsp. <i>tropica</i>	-	-	+	+	-	+	+	+
BYJ201	<i>Acinetobacter soli</i>	-	+	+	-	-	+	+	+
BYG2001	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	+	-	-	+	+
BYG3801	<i>Kosakonia pseudosacchari</i>	-	+	+	+	-	+	+	-
BYG7	<i>Kosakonia oryzae</i>	-	+	+	+	-	+	+	-
BYG1801	<i>Pluralibacter gergoviae</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
BYJ403	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+
BYG2901	<i>Pseudomonas alloputida</i>	+	+	+	-	-	-	+	+
BYG2004	<i>Novosphingobium pokkalii</i>	-	-	+	+	-	-	+	-
BYG3102	<i>Phytobacter ursingii</i>	+	-	-	-	-	+	+	+

+: 阳性反应; -: 阴性反应。

+: Positive reaction; -: Negative reaction.

BYG302、BYG1802、BYG502、BYG3001、BYG1504、BYJ201、BYG3801、BYG7、BYG1801、BYJ403、BYG3102 均为阳性反应。从上述生理生化结果可以看出毛白杨内生细菌具有功能多样性,丰富了农业领域的植物内生细菌资源库。

2.3 毛白杨内生细菌耐盐性测定结果

如表 3 所示,毛白杨 16 株内生细菌均能够在 2%、3%、4% NaCl 浓度下生长,在 NaCl 浓度为 5% 的情况下,菌株 BYG1802 不能生长,其余 15 株菌均可以正常生长,在 NaCl 浓度为 6% 的情况下,菌株 BYG1802、BYG502、BYJ201 不能生长,其余菌株均可以生长,当 NaCl 浓度达到 7% 的时候,除了 BYG3205、BYG7、BYG2901、BYG2004、BYG3102 可以正常生长外,其余菌株在此浓度下不生长。从上述结果可

以看到毛白杨内生细菌大部分的耐盐性很好。

2.4 毛白杨内生细菌固氮酶活性测定及 *nifH* 基因扩增

乙炔还原法具有简便、快速和灵敏等优点,因而被广泛使用作为测定细菌固氮酶活力的方法,通过此方法对毛白杨 16 株内生细菌固氮酶活性进行测定,菌株 BYG3801、BYG502、BYG1802、BYG3102、BYG3001、BYG7、BYG1801 具有固氮酶活性,固氮酶活性分布在 62.92–528.62 nmol/(mL·h) 之间,其中菌株 BYG3102 具有最高的固氮酶活性(表 4)。

微生物固氮主要是固氮酶在发挥作用,而 *nifH* 基因是编码固氮酶铁蛋白的基因,是固氮微生物具有的最保守的功能基因,因而扩增 *nifH* 可以在分子水平上证明微生物具有固氮能力^[14]。对具有固氮酶活性的菌株进行 *nifH* 基因

表 3 毛白杨内生细菌耐盐性测定

Table 3 Determination of salt tolerance of endophytic bacteria in *Populus tomentosa*

菌株编号 Strain number	2% NaCl	3% NaCl	4% NaCl	5% NaCl	6% NaCl	7% NaCl
BYG302	+	+	+	+	+	-
BYG3205	+	+	+	+	+	+
BYG1802	-	+	+	-	-	-
BYJ101	+	+	+	+	+	-
BYG502	+	+	+	+	-	-
BYG3001	+	+	+	+	+	-
BYG1504	+	+	+	+	+	-
BYJ201	+	+	+	+	-	-
BYG2001	+	+	+	+	+	-
BYG3801	+	+	+	+	+	-
BYG7	+	+	+	+	+	+
BYG1801	+	+	+	+	+	-
BYJ403	+	+	+	+	+	-
BYG2901	+	+	+	+	+	+
BYG2004	+	+	+	+	+	+
BYG3102	+	+	+	+	+	+

+: 可以生长; -: 不生长。

+: Growing; -: Not growing.

表 4 菌株固氮酶活性测定

Table 4 Nitrogenase activity assay of bacterial strains

菌株编号 Strain number	固氮酶活性 Nitrogenase activity (nmol/(mL·h))	分离培养基 Isolated medium
CK	0.00	-
BYG3801	279.10±3.50	NA
BYG502	317.20±6.90	CCM
BYG1802	262.80±4.30	DN
BYG3102	528.62±13.40	DN
BYG3001	62.92±1.70	DN
BYG7	168.16±3.20	DN
BYG1801	189.40±3.70	DN

表中的数据为 3 次重复的平均值±标准差。

The data in the table are the mean of the triplicate replicates and their standard deviations.

扩增, PCR 结果进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果显示这 7 株菌均可扩增得到一条 360 bp 的条带, 证明它们具有固氮酶 *nifH* 基因, 这与乙炔还原法测得的结果一致(图 2)。

2.5 毛白杨内生细菌产促生活性物质

通过 PKO 培养基对毛白杨内生细菌进行溶

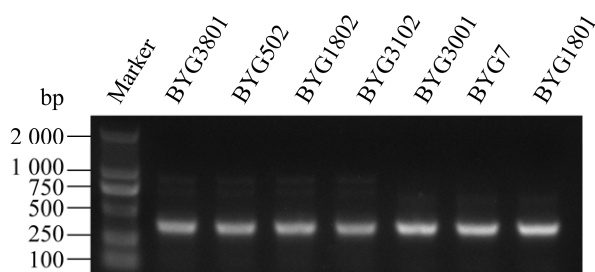
图 2 菌株固氮酶 *nifH* 基因 PCR 扩增产物电泳图

Figure 2 Electropherogram of PCR amplification product of nitrogenase *nifH* gene of the strain. Marker: 100 bp DNA Ladder.

磷初筛, 16 株菌中有 6 株菌具有溶磷能力, 分别为菌株 BYJ101、BYJ201、BYG1801、BYG3001、BYG3205、BYG2001, 它们可以在 PKO 培养基上形成透明圈, 大小不同的圈表明细菌溶解磷的能力有差异(图 3)。采用钼锑抗比色法进行可溶性磷含量测定, 6 株菌株发酵液中可溶性磷质量分数为 10.65–75.94 mg/L; 其中, 菌株 BYG1801 表现出最强的溶磷能力, 其发酵液中可溶性磷高达 75.94 mg/L; 其余 5 株菌株发酵液中

可溶性磷含量从大到小依次为菌株 BYG3205、BYJ101、BYG2001、BYJ201、BYG3001。

使用钾长石培养基对毛白杨内生细菌解钾能力进行定性测定, 16 株菌中有 6 株菌具有解钾能力, 菌株在钾长石培养基上会产生透明圈, 透明圈的大小不同表明菌株溶解钾的能力也有所不同(图 4)。进一步测定可溶性钾含量, 6 株菌株发酵液中可溶性钾的质量分数为 21.51–109.50 mg/L; 其中, 菌株 BYG2004 表现出最强的溶钾能力, 其发酵液中可溶性钾高达 109.50 mg/L; 其余 5 株菌株发酵液中可溶性钾含量从小到大依次为菌株 BYG3001、BYJ201、BYG1504、BYG2901、BYG3205。

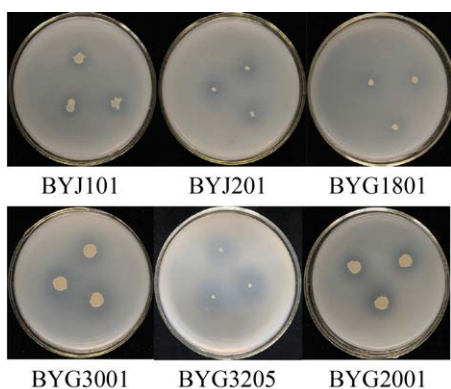


图 3 毛白杨内生细菌溶磷定性效果
Figure 3 Qualitative effect of phosphorus lysis by endophytic bacteria in *Populus tomentosa*.

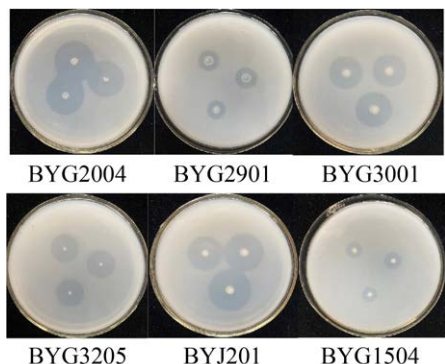


图 4 毛白杨内生细菌解钾定性效果
Figure 4 Qualitative effect of potassium delysis by endophytic bacteria of *Populus tomentosa*.

使用 Salkowski 比色法对各代表菌株进行生长素类化合物的定性和定量检测, 结果如表 5 所示。毛白杨 16 株内生细菌中共有 6 株菌具有产生生长素能力, 分别为菌株 BYG302、BYG3001、BYG3205、BYG1802、BYG2001、BYG3102。但产生生长素能力均较低, 产生的生长素质量分数为 1.16–18.24 mg/L; 其中, 菌株 BYG3102 产生生长素能力最高, 其次是菌株 BYG302 和 BYG2001, 能力最弱的是菌株 BYG3001。

采用 MSA-CAS 培养基对毛白杨 16 株内生细菌进行产铁载体功能检测(图 5), 试验结果表明 11 株菌具有分泌铁载体的能力, 分别为菌株 BYG1802、BYG2901、BYJ403、BYG3102、BYG3205、BYG3001、BYG1801、BYG302、BYJ101、BYG7、BYG2004, 其余 5 株菌不具备分泌铁载体的功能, 由图 5 可以看到培养基的颜色较对照发生了变化, 培养基颜色变为了深紫色、深蓝色、粉红色、浅紫色, 这表明这些菌株分泌的铁载体类型不同。

2.6 毛白杨内生细菌对水稻种子萌发及促生作用

2.6.1 菌株促进水稻种子萌发试验结果

通过对毛白杨内生细菌溶磷、解钾、固氮、产生生长素、生理生化促生等特性的综合分析, 选

表 5 毛白杨内生细菌产生生长素能力测定

Table 5 Determination of the ability of endophytic bacteria to produce IAA in *Populus tomentosa*

菌株编号	IAA content	分离培养基
Strain number	(mg/L)	Separation medium
BYG302	11.12±0.05b	DN
BYG3001	1.16±0.01f	DN
BYG3205	4.06±0.04e	DN
BYG1802	7.44±0.12d	CCM
BYG2001	9.14±0.02c	DN
BYG3102	18.24±0.65a	DN
CK	0.00±0.00	—

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$, Duncan's 法)。

The different lowercase letters indicated significant difference ($P<0.05$, Duncan's method).

取菌株 BYG3102、BYJ201、BYG3001、BYG3205 这 4 株菌进行对水稻种子萌发的探究试验, 其菌悬液对水稻种子的萌发效果如图 6 所示。培养 10 d 左右测量其根长度、茎叶长度并进行记录, 用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行作图, 由图 7 可知, 经过 4 株菌的处理, 茎长明显优于对照组, 其中菌株 BYJ201 是 4 组处理中对水稻种子萌发作用最明显的, 其地下部分的根长与对照组相比提高了约 39.50%, 茎长提高了约 57.40%, 结果表明, 毛白杨 4 株内生细菌 BYG3102、BYJ201、BYG3001、BYG3205 均在一定程度上对水稻种子萌发起促进作用。可以作为潜在的促生工程菌株在农业上开发加以利用。

2.6.2 菌株促进水稻生长试验结果

对水稻促生长试验在 4 株单菌处理基础之上,

根据菌株之间性能的不同增加 2 个组合处理, 组合 1 (BYG3205+BYG3102)、组合 2 (BYG3205+BYJ201), 以菌悬液处理水稻种苗, 以无菌的 LB 培养液作为空白对照组, 在自然条件下生长 10–15 d 后, 对水稻苗的根长、茎叶长进行测量并记录。用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行作图, 结果如图 8、图 9 所示。

试验结果表明, 不论是单菌液处理还是组合菌液处理, 在根长和株高方面指标都明显增加, 这与水稻种子萌发试验的结果一致, 而菌株 BYG3205 与菌株 BYG3102 和 BYJ201 的组合对水稻的处理效果都比单独使用 BYG3205 的处理效果好, 在以后的生产实践中可以考虑将 BYG3205 与其他 2 种菌进行混合使用, 但菌株 BYJ201、BYG3102 与 BYG3205 混合使用效

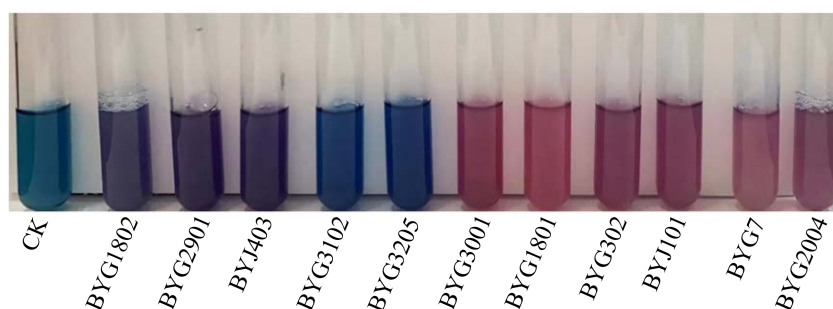


图 5 毛白杨内生细菌产铁载体效果 不同颜色表明菌株分泌的铁载体类型不同。

Figure 5 Effect of siderophore-producing effect of endophytic bacteria in *Populus tomentosa*. Different colors indicate that the bacterial strains secrete different type of iron carriers.



图 6 毛白杨不同内生细菌处理下水稻种子萌发试验效果

Figure 6 Effect of rice seed germination test under different endophytic bacteria treatments of *Populus tomentosa*.

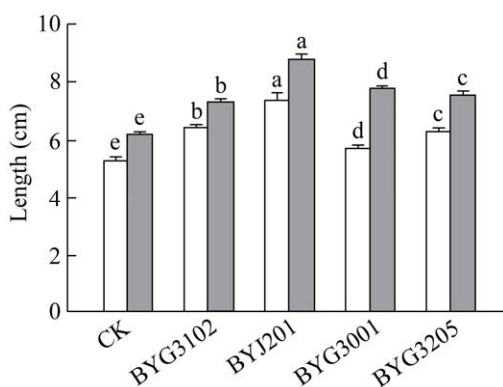


图 7 毛白杨不同内生细菌处理下水稻种子萌发试验数据分析柱状图 不同小写字母表示各处理间差异显著性($P<0.05$)。

Figure 7 Histogram of data analysis of rice seed germination experiment under different endophytic bacteria treatment with different endophytic bacteria in *Populus tomentosa*. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).

果差于单菌处理效果, 该现象可能是由于菌株混合使用过程中相互作用, 降低了相关促生物质的生成量。

3 讨论

植物内生细菌是植物微生态系统中重要的组成部分, 内生细菌与宿主植物相互作用, 互惠互利, 其资源丰富多样, 是一类非常重要的

资源宝库^[28]。各种植物中均有内生细菌的分布, 近年来, 研究者已经从番茄、辣椒、杜仲、石斛、红豆杉^[29-33]等植物组织内分离出了大量的内生细菌。几乎植物的所有组织内都含有内生细菌, 例如根、茎、叶、花、果实、种子、根瘤等^[34], 不同生长情况的宿主植物含有内生细菌的种类也不尽相同。内生细菌在快速生长的植物个体和组织中非常丰富, 生长时间较长的植株比生长时间较短的植物含有更多的内生细菌^[35]。不同植物器官内植物内生细菌的分布差异很大, 一项研究表明, 根组织内生细菌的数量远远多于其他植物器官的内生细菌^[36], 其特点是寄主植物多样性和种属多样性, 是生物因素和非生物因素共同作用下的结果^[37]。本文从毛白杨各组织内共分离得到 51 株内生细菌, 其中根部 39 株, 约占总菌株数的 76%, 茎部 7 株菌, 叶部 5 株菌。对分离得到的内生细菌进行 16S rRNA 基因分子鉴定及生理生化指标鉴定, 51 株内生细菌分属 9 个不同的属, 16 个不同的种。

内生细菌在植物体内生存空间稳定, 受外界环境的干扰较小, 可以产生多种次级代谢产物(生物活性物质)^[38], 对寄主植物具有防病、促进寄主生长、固氮等生物学作用, 在农业生产中具有广泛的应用价值^[39-40]。有些细菌可以



图 8 毛白杨不同内生细菌处理下水稻生长试验效果

Figure 8 Effect of rice growth experiment under different endophytic bacteria treatments of *Populus tomentosa*.

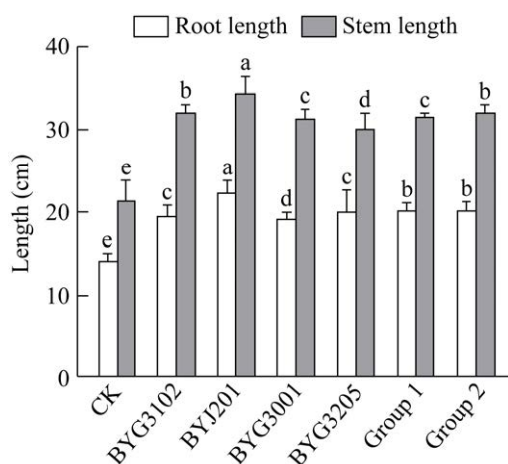


图 9 毛白杨不同内生细菌处理下水稻株高及根长数据分析柱状图 不同小写字母表示各处理间差异显著性($P < 0.05$)。

Figure 9 Histogram of rice plant height and root length data analysis under different endophytic bacteria treatments in *Populus tomentosa*. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$). Group 1: BYG3205+BYG3102; Group 2: BYG3205+BYJ201.

降解重金属, 这为利用生物技术修复污染土壤提供了优良的材料基础^[41]。而内生细菌所具有的这些作用与它们的功能密切相关, 因此, 植物内生细菌功能多样性的研究越来越受到人们的重视^[42]。本实验从毛白杨各组织中分离得到的内生细菌具有多种生物学功能, 其中有 7 株菌具有体外固氮特性, 表明这些菌株可以将空气中的氮固定为氨气, 为植物提供所利用的氨气, 同时促进植物对氮素等营养元素的吸收; 6 株菌具有溶磷能力, 6 株菌具有解钾能力, 溶磷解钾微生物可以提高植物对磷、钾等元素的吸收利用, 极大提高植物对肥料的吸收利用, 提高绿色可持续农业绿色发展; 6 株菌具有分泌生长素的能力, 表明这些内生细菌可以分泌植物激素来调节内部激素水平, 促进植物生长发育, 生长素对植物细胞生长与伸长具有促进作用。11 株菌具有分泌铁载体的能力, 5 株菌能够在 7% NaCl 浓度下生长。上述结果表明毛

白杨内生细菌具有丰富的功能多样性。其中菌株 BYG3001 具有上述所有生物学功能, 菌株 BYG1802、BYG3102、BYG1801 也具有 3 项生物学功能, 这些菌株可在之后的研究中作为重点研究对象。

此外, 为了更加全面地阐述内生细菌在促进作物生长方面的能力, 丰富内生细菌的相关资源库, 并为我国农业生产和发展做出更大的贡献, 用毛白杨内生细菌对水稻种子进行萌发试验, 结果显示 4 株菌对水稻种子萌发均有一定程度的促进作用。土壤不动杆菌(*Acinetobacter soli*)最初是从韩国白云山的森林土壤中分离出来的^[43], 在盐田中也被分离到, 研究表明土壤不动杆菌可以有效溶解土壤中 66%–68% 的钾^[44–45]。本研究中施用 BYJ201 菌液的水稻种子与对照相比根长增加了 39.5%, 茎叶长增加了 57.4%; 在水稻促生长试验中, 菌液处理过的水稻, 株高与对照相比显著增加了 42.8%–60.9%, 水稻根长显著提高了 35.7%–59.5%。这可能是因为菌株降解或螯合了金属离子, 以提高植物对矿物质的吸收利用来促进植物生长。水稻种子的萌发及促生长试验结果显示, 4 株菌及 2 个组合菌液对水稻萌发和生长均具有促进作用, 其中菌株 BYG3205 与 BYG3102 和 BYJ201 的组合处理比其单菌处理的效果好, 在之后的农业生产中可以考虑将它与其他 2 株菌混合使用, 增加促进植物生长的效果。

4 结论

从毛白杨根、茎、叶中分离的可培养内生固氮细菌具有丰富的多样性及促生长特性。菌株 BYG3001 具有全部生物学功能且适应环境的能力强, 之后可重点研究; 菌株 BYG1802、BYG3102、BYG1801 也具有溶磷、解钾、产铁载体等多种生物学功能; 菌株 BYG3801、BYG502、BYG3102 等 7 株菌具有固氮酶 *nifH* 基因, 可进行体外固氮。各类群菌株具备固氮、产铁载体、

产生生长素、溶磷、解钾等潜在促生长特性，可以作为潜在的工程菌株进一步研究和利用，这为生物肥料制备提供了菌种资源与理论基础。

REFERENCES

- [1] ZHANG BY, ZHU WX, DIAO S, WU XJ, LU JQ, DING CJ, SU XH. The poplar pangenome provides insights into the evolutionary history of the genus[J]. *Communications Biology*, 2019, 2: 215.
- [2] 魏星. 杨树病害种类及防治技术[J]. *山西林业*, 2023(S1): 76-77.
- [3] 李善文, 张志毅, 何承忠, 安新民. 中国杨树杂交育种研究进展[J]. *世界林业研究*, 2004, 17(2): 37-41.
- [4] 房春林. 杨树花及其复方制剂药学与临床应用研究[D]. 雅安: 四川农业大学博士学位论文, 2010.
- [5] 张辉, 徐济萍, 梁大连. 毛白杨的药用研究[J]. *山东医药工业*, 2002, 21(4): 31-32.
- [6] 刘晓光, 高克祥, 谷建才, 杜建玲, 唐秀光. 毛白杨内生菌优势种毛壳ND35室内拮抗作用的研究[J]. *林业科学*, 1999, 35(5): 57-61, 130.
- [7] AN XM, GAO K, CHEN Z, LI J, YANG X, YANG XY, ZHOU J, GUO T, ZHAO TY, HUANG S, MIAO DY, KHAN WU, RAO P, YE MX, LEI BQ, LIAO WH, WANG J, JI LX, LI Y, GUO B, et al. High quality haplotype-resolved genome assemblies of *Populus tomentosa* Carr., a stabilized interspecific hybrid species widespread in Asia[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(2): 786-802.
- [8] YANG XY, ZHAO TY, RAO P, GAO K, YANG X, CHEN Z, AN XM. Transcriptome profiling of *Populus tomentosa* under cold stress[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 135: 283-293.
- [9] FAGORZI C, MENGONI A. Endophytes: improving plant performance[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1777.
- [10] 黄敬瑜, 张楚军, 姚瑜龙, 高旭, 侯梓淇, 张露, 李欧. 植物内生菌生物抗菌活性物质研究进展[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(2): 178-186.
- [11] HAN L, ZUO YL, HE XL, HOU YT, LI M, LI BK. Plant identity and soil variables shift the colonisation and species composition of dark septate endophytes associated with medicinal plants in a northern farmland in China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 167: 104042.
- [12] GOTOR-VILA A, TEIXIDÓ N, CASALS C, TORRES R, de CAL A, GUIJARRO B, USALL J. Biological control of brown rot in stone fruit using *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 under field conditions[J]. *Crop Protection*, 2017, 102: 72-80.
- [13] COSTACURTA A, VANDERLEYDEN J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 1995, 21(1): 1-18.
- [14] VERMA K, PANDEY J, SIDDIQUI E. Heavy metal pollution in the Ganga river enhances carbon storage relative to flux[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2020, 104(1): 41-48.
- [15] REZAEI A, HASSANI H, HASSANI S, JABBARI N, FARD MOUSAVI SB, REZAEI S. Evaluation of groundwater quality and heavy metal pollution indices in Bazman basin, southeastern Iran[J]. *Groundwater for Sustainable Development*, 2019, 9: 100245.
- [16] SUN QB, LIANG B, ZHANG C, GAO F, CHEN ZL. Sources and ecological assessment of heavy metal contamination in the surface sediment in Honghai Bay[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, 349(1): 012022.
- [17] 张轩. 矿区复合重金属污染杨树生态区细菌多样性及重金属耐受内生菌筛选[D]. 长沙: 湖南大学硕士学位论文, 2019.
- [18] 杨敬敬, 韩烁, 王霞, 赵国柱, 何湘伟. 三倍体毛白杨不同组织内生细菌多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(8): 3021-3036.
- [19] YANG JJ, HAN S, WANG X, ZHAO GZ, HE XW. Diversity of endophytic bacteria in different tissues of triploid *Populus tomentosa*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(8): 3021-3036 (in Chinese).
- [20] 李锦, 谭德东, 邱济平, 杨昌胜, 许刚, 谭志远. 香蕉抗枯萎病株系内生菌的分离鉴定及抑菌促生效果[J]. *华南农业大学学报*, 2024, 45(2): 256-265.
- [21] LI J, TAN DD, QIU JP, YANG CS, XU G, TAN ZY. Isolation and identification of endophytic bacteria from banana *Fusarium* wilt resistant strains and their inhibitory and growth-promoting effects[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2024, 45(2): 256-265 (in Chinese).
- [22] 胡晓峰, 郭晋云, 张楠, 沈标, 徐阳春, 沈其荣. 一株溶磷抑菌细菌的筛选及其溶磷特性[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(11): 2253-2260.
- [23] HU XF, GUO JY, ZHANG N, SHEN B, XU YC, SHEN QR. Screening of a phosphate solubilizing and disease inhibiting bacteria strain and studies on its P-solubilizing characteristics[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(11): 2253-2260 (in Chinese).
- [24] 胡文哲. 藤县药用野生稻内生固氮菌分离与鉴定[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2016.
- [25] HU WZ. Identification of endophytic diazotrophs isolated from Tengxian *Oryza officinalis*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [26] 陈绍兴, 赵翔, 沈萍, 谢志雄. 高灵敏假单胞菌铁载体的平板检测方法[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(3): 122-127.
- [27] CHEN SX, ZHAO X, SHEN P, XIE ZX. High-sensitive detection method for siderophores from *Pseudomonas*[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(3): 122-127 (in Chinese).
- [28] 刘丽辉, 蒋慧敏, 区宇程, 谭志远, 彭桂香. 南方野生稻内生细菌的分离鉴定及促生作用[J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(5): 1051-1058.
- [29] LIU LH, JIANG HM, OU YC, TAN ZY, PENG GX. Identification and growth promotion of endophytic bacteria isolated from *Oryza meridionalis*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2020,

- 26(5): 1051-1058 (in Chinese).
- [24] REDBURN AC, PATEL BKC. Phylogenetic analysis of *Desulfotomaculum thermobenzoicum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA[J]. FEMS Microbiology Letters, 1993, 113(1): 81-86.
- [25] 周德庆, 祖若夫, 徐德强, 范长胜, 宋大新. 微生物学实验教程[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2013.
- ZHOU DQ, ZU RF, XU DQ, FAN CS, SONG DX. Experimental Microbiology[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2013 (in Chinese).
- [26] 赵龙飞, 徐亚军, 曹冬建, 李源, 厉静杰, 吕佳萌, 朱自亿, 秦珊珊, 贺学礼. 溶磷性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其系统发育和促生[J]. 生态学报, 2015, 35(13): 4425-4435.
- ZHAO LF, XU YJ, CAO DJ, LI Y, LI JJ, LÜ JM, ZHU ZY, QIN SS, HE XL. Screening, resistance, phylogeny and growth promoting of phosphorus solubilizing bacteria isolated from soybean root nodules[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(13): 4425-4435 (in Chinese).
- [27] 冉广芬, 马海州, 孟瑞英, 陈育刚. 四苯硼钠: 季铵盐容量法快速测钾[J]. 盐湖研究, 2009, 17(2): 39-42.
- RAN GF, MA HZ, MENG RY, CHEN YG. Rapid determination of potassium content by sodium tetraphenylboron: quaternary ammonium salt volumetric method[J]. Journal of Salt Lake Research, 2009, 17(2): 39-42 (in Chinese).
- [28] HOFFMAN BM, LUKOYANOV D, YANG ZY, DEAN DR, SEEFELDT LC. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage[J]. Chemical Reviews, 2014, 114(8): 4041-4062.
- [29] CHANDRANGSU P, RENSING C, HELMANN JD. Metal homeostasis and resistance in bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(6): 338-350.
- [30] KUMAR A, SONG HW, MISHRA S, ZHANG W, ZHANG YL, ZHANG QR, YU ZG. Application of microbial-induced carbonate precipitation (MICP) techniques to remove heavy metal in the natural environment: a critical review[J]. Chemosphere, 2023, 318: 137894.
- [31] 黄雪珍, 赵龙飞. 药用植物内生菌对宿主植物促生作用机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1653-1665.
- HUANG XZ, ZHAO LF. Mechanism of endophytes of medicinal plants in promoting the growth of host plants[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1653-1665 (in Chinese).
- [32] 黎起秦, 罗宽, 林伟, 彭好文, 罗雪梅. 番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 364-367.
- LI QQ, LUO K, LIN W, PENG HW, LUO XM. Isolation of tomato endophytic antagonists against *Ralstonia solanacearum*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(4): 364-367 (in Chinese).
- [33] DOWARAH B, AGARWAL H, KRISHNATREYA DB, SHARMA PL, KALITA N, AGARWALA N. Evaluation of seed associated endophytic bacteria from tolerant chilli cv. Firingi Jolokia for their biocontrol potential against bacterial wilt disease[J]. Microbiological Research, 2021, 248: 126751.
- [34] 谢辉, 李莉, 吴鸣谦, 陈双林. 1株杜仲内生真菌的抗氧化活性分析和菌种鉴定[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(1): 230-232.
- XIE H, LI L, WU MQ, CHEN SL. Antioxidant activity analysis and identification of an endophytic fungal strain from *Eucommia ulmoides* oliv[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(1): 230-232 (in Chinese).
- [35] 高阳, 朱双丽, 吴庆珊, 雷珣, 安忠琦, 王玉倩, 牛晓娟, 翁庆北. 金钗石斛 IAA 内生细菌筛选及对干旱胁迫下玉米种子萌发的影响[J]. 种子, 2017, 36(4): 36-41.
- GAO Y, ZHU SL, WU QS, LEI X, AN ZQ, WANG YQ, NIU XJ, WENG QB. Screening of IAA producing endophytic bacteria in *Dendrobium nobile* lindl and effect on *Zea mays* seed germination under drought stress[J]. Seed, 2017, 36(4): 36-41 (in Chinese).
- [36] STROBEL G, DAISY B, CASTILLO U, HARPER J. Natural products from endophytic microorganisms[J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(2): 257-268.
- [37] 王坚, 刁治民, 徐广, 肖前青, 曾智科. 植物内生菌的研究概况及其应用[J]. 青海草业, 2008, 17(1): 24-28.
- WANG J, DIAO ZM, XU G, XIAO QQ, ZENG ZK. Study and application on endophyte[J]. Qinghai Prataculture, 2008, 17(1): 24-28 (in Chinese).
- [38] 马同锁, 田苗珍, 袁红楼, 赵士豪, 薛胜平. 不同生长环境对 2 种蔬菜内生菌分布的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17): 7812-7813, 7815.
- MA TS, TIAN MZ, YUAN HL, ZHAO SH, XUE SP. Effect of the different growth environmental conditions on the distribution of endophytes in two species of vegetables[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(17): 7812-7813, 7815 (in Chinese).
- [39] LIU YR, PONPANDIAN LN, KIM H, JEON J, HWANG BS, LEE SK, PARK SC, BAE HH. Distribution and diversity of bacterial endophytes from four *Pinus* species and their efficacy as biocontrol agents for devastating pine wood nematodes[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 12461.
- [40] 赵旭, 常思静, 景春娥, 薛林贵. 我国植物内生菌研究进展[J]. 中国沙漠, 2010, 30(1): 87-91.
- ZHAO X, CHANG SJ, JING CE, XUE LG. Review of research on endophytic bacteria in China[J]. Journal of Desert Research, 2010, 30(1): 87-91 (in Chinese).
- [41] ANYASI RO, ATAGANA HI. Endophyte: understanding the microbes and its applications[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2019, 22(4): 154-167.
- [42] DUDEJA SS, SUNEJA-MADAN P, PAUL M, MAHESWARI R, KOTHE E. Bacterial endophytes: molecular interactions with their hosts[J]. Journal of Basic Microbiology, 2021, 61(6): 475-505.
- [43] KESHAVARZ-TOHID V, VACHERON J, DUBOST A, PRIGENT-COMBARET C, TAHERI P, TARIGHI S, TAGHAVI SM, MOËNNE-LOCCOZ Y, MULLER D. Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas allopuntida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov.[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2019, 42(4): 468-480.
- [44] KIM D, BAIK KS, KIM MS, PARK SC, KIM SS, RHEE MS, KWAK YS, SEONG CN. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil[J]. Journal of Microbiology, 2008, 46(4): 396-401.
- [45] BHATTACHARYA S, BACHANI P, JAIN D, PATIDAR SK, MISHRA S. Extraction of potassium from K-feldspar through potassium solubilization in the halophilic *Acinetobacter soli* (MTCC 5918) isolated from the experimental salt farm[J]. International Journal of Mineral Processing, 2016, 152: 53-57.