

研究报告

入侵植物欧洲千里光内生固氮菌和溶磷菌多样性

陆雪天, 赵菁, 程丹丹*

中国地质大学(武汉)环境学院, 湖北 武汉 430078

陆雪天, 赵菁, 程丹丹. 入侵植物欧洲千里光内生固氮菌和溶磷菌多样性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 454-470.

LU Xuetian, ZHAO Jing, CHENG Dandan. Diversity of endophytic nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria in the invasive *Senecio vulgaris*[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 454-470.

摘要:【背景】菊科(*Asteraceae*)外来入侵植物欧洲千里光(*Senecio vulgaris* L.)来源于欧洲, 广泛分布于我国西南和东北地区, 在湖北高海拔山区也有分布。在入侵过程中, 内生细菌可能在其获取氮磷营养方面起到了一些关键性作用。【目的】探究欧洲千里光内生固氮菌和溶磷菌的多样性和功能, 为理解其入侵机制及防治提供参考。【方法】选择来自 6 个不同种群的种子, 萌发后转移到花盆生长 6-8 周, 并从每个种群中各挑选 9 株生长情况良好的植株, 对其叶片和根组织表面进行消毒处理。使用基于 *nifH* 基因(固氮功能基因)的高通量测序方法对植物的固氮微生物群落结构和多样性进行研究。通过涂布平板法和平板划线法, 在固体无氮培养基(Ashby)和无机磷培养基(inorganic phosphate, NBRIP)上对植物内生菌进行分离、纯化, 对纯化的固氮菌株和溶磷菌株进行 16S rRNA 基因测序。采用钼锑抗比色法分析纯化溶磷菌株的溶磷能力。【结果】基于 *nifH* 基因的内生菌高通量测序结果表明, 欧洲千里光叶样本中固氮菌多样性显著高于根样本; 固氮菌群落中丰度最高的属是慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*, 30.9%-34.0%), 其次是伯克氏菌属(*Burkholderia*, 27.2%-27.4%)、*Methyloversatilis* (2.1%-7.1%)和固氮螺菌属(*Azospirillum*, 2.9%-3.9%); 共 6 个门, 其中变形菌门(*Proteobacteria*)在所有样本内相对丰度均达 90%以上。用 Ashby 培养基筛选得到 238 株纯菌, 分布在 4 门 7 纲 10 目 16 科 19 属, 其中丰度前 5 的优势菌属包括微杆菌属(*Microbacterium*, 31.0%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 24.8%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 22.1%)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*, 6.2%)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*, 2.8%)。用 NBRIP 培养基筛选共得到 318 株菌株, 鉴定这些内生菌覆盖到 3 门 5 纲 7 目 15 科 16 属, 其中丰度前 5 的优势菌属包括芽孢杆菌属(48.4%)、假单胞菌属(19.2%)、微杆菌属(15.2%)、类芽孢杆菌属(3.6%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 3.6%)。挑选了 24 株代表性菌株对溶磷能力进行了定性及定量检测, 结果表明有 17 株具备显著的溶磷能力, 而且细菌培养过程中培养基 pH 值下降。【结论】欧洲千里光内生固氮菌和内生溶磷菌具有丰富的多样性, 并且溶磷菌具有一定的溶磷能力, 在欧洲千里光的入侵过程中可能起着促进作用。

资助项目: 国家自然科学基金(31570537)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31570537).

*Corresponding author. E-mail: dandan.cheng@cug.edu.cn

Received: 2022-05-02; Accepted: 2022-06-20; Published online: 2022-07-26

关键词: *nifH* 基因; 高通量测序; 纯培养; 16S rRNA 基因序列; 溶磷活性

Diversity of endophytic nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria in the invasive *Senecio vulgaris*

LU Xuetian, ZHAO Jing, CHENG Dandan*

School of Environmental Studies, China University of Geosciences (Wuhan), Wuhan 430078, Hubei, China

Abstract: [Background] Native to Europe, *Senecio vulgaris* L. (*Asteraceae*) is widely distributed in southwest and northeast China as well as the high-altitude mountain areas of Hubei Province. In the invasion process, the endophytic bacteria may play a key role in nitrogen and phosphorus. [Objective] To investigate the diversity and functions of endophytic nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria in *S. vulgaris* and thus to serve as a reference for elucidating the invasion mechanism of this species and controlling its invasion. [Methods] Seeds from six different populations were selected and after germination, seedlings were transferred to pots for growth for 6–8 weeks. Nine healthy plants from each population were picked and the leaf surface and root surface were disinfected. High-throughput sequencing of *nifH* gene (nitrogen fixation-related gene) was performed to investigate the structure and diversity of nitrogen-fixing bacteria in *S. vulgaris*. Endophytes were isolated and cultured on Ashby (nitrogen-free) medium and NBRIP (inorganic phosphate) medium, and 16S rRNA gene of the purified nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing strains was sequenced. The phosphate-solubilizing ability of the isolated phosphorus-solubilizing strains was determined with the molybdenum-antimony anti-colorimetry method. [Results] The diversity of nitrogen-fixing bacteria in *S. vulgaris* leaf sample was significantly higher than that in root sample. Among the nitrogen-fixing bacteria, *Bradyrhizobium* (30.9%–34.0%) was most abundant, followed by *Burkholderia* (27.2%–27.4%), *Methyloversatilis* (2.1%–7.1%), and *Azospirillum* (2.9%–3.9%). A total of 6 nitrogen-fixing phyla were identified and the relative abundance of Proteobacteria was >90% in all samples. A total of 238 isolates (19 genera, 16 families, 10 orders, 7 classes, 4 phyla) were screened out via the Ashby medium. The top genera were *Microbacterium* (31.0%), *Bacillus* (24.8%), *Pseudomonas* (22.1%), *Stenotrophomonas* (6.2%), and *Paenibacillus* (2.8%). A total of 318 isolates (16 genera, 15 families, 7 orders, 5 classes, 3 phyla) were cultured on the NBRIP medium, and the top genera were *Bacillus* (48.4%), *Pseudomonas* (19.2%), *Microbacterium* (15.2%), *Paenibacillus* (3.6%), and *Acinetobacter* (3.6%). We performed quantitative and qualitative analysis of the phosphate-solubilizing ability of 24 representative strains. The result showed that 17 strains had remarkable phosphate-solubilizing ability and the phosphate-solubilizing process of these bacteria decreased the pH value of the culture medium. [Conclusion] *S. vulgaris* boasts abundant and diverse endophytic nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria, and the phosphate-solubilizing bacteria may facilitate the invasion of this species.

Keywords: *nifH* gene; high-throughput sequencing; pure culture; 16S rRNA gene sequence; phosphate-solubilizing activity

生物入侵指某生物由原栖息生境侵入到全新的环境中, 并对该地生物多样性及人类生产生活造成损失和危害的过程, 是当今世界面临的一个重要生态问题^[1]。生物入侵机制, 特别是植物的入侵机制是当前入侵生态学的研究热点之一。Dai 等^[2]将有关植物入侵机制的理论分为两大类: 一类与栖息地可入侵性有关, 另一类强调入侵植物的入侵能力, 并将这些互相关联的理论按照入侵过程的时间进度进行归纳整理。Latombe 等^[3]综述了 33 个具有代表性的植物入侵假说, 并将这些假说归纳成 6 类, 对应植物入侵的 6 个过程: 扩散、漂移、非生物的互作、营养级内互作、跨营养级的互作和遗传变化。一些针对入侵植物与土著种及环境相互作用机制的重要理论, 包括“天敌逃逸假说”^[4]“新武器假说”^[5]和“干扰假说”^[6-7]等, 聚焦于入侵植物与入侵地动物及植物的相互作用。目前已有研究表明与入侵植物相关的微生物可能在植物入侵机制中起到了某些重要作用^[8-9], 但尚未形成系统的理论, 因此, 加强这方面的研究将有助于推进对入侵植物的预防与治理工作。

植物生长环境中附着在植物表面或存在植物内部、受植物影响的微生物群及其基因组和遗传信息统称为植物微生物组^[10]。其中, 生活史中的全部或部分时间在植物的组织、器官中存在的微生物称作内生微生物^[11]。植物内生菌种类多、数量广, 影响植物的生理代谢, 对植物的生长起重要作用。氮和磷元素作为植物生长发育的重要物质基础, 在很多自然生态系统中是植物生长的主要限制因子^[12]。为满足植物对氮的需求, 内生固氮菌在增加土壤氮输入方面发挥作用^[13], 促进宿主吸收与利用氮素, 从而作用于宿主生长。例如, 水稻^[14-15]和蚕豆^[16]

中的内生固氮菌具有促进植物生长的功能。植物内生溶磷菌能够将无机磷转化为可溶性磷, 以促进宿主植物对磷的吸收和利用, 满足植物生长对磷元素的需要^[17]。在已有的植物内生固氮菌和溶磷菌研究中, 主要关注农作物和模式植物, 仅有少数对入侵植物开展植物内生菌的研究。李慧颖等研究发现禾本科外来入侵植物互花米草(*Spartina alterniflora*)根和叶内可培养内生菌具有丰富的多样性且多具有生防活性和促生功能, 包括溶磷和固氮等促生活性^[18]。保朱寿能研究发现菊科外来入侵植物紫茎泽兰(*Ageratina adenophora*)根部内生固氮菌具有较好的促生能力, 对宿主的促生作用明显^[19], 因此, 深入研究植物内生菌对入侵植物的作用具有着重要意义。

欧洲千里光(*Senecio vulgaris* L.)是一年生或二年生的菊科千里光属草本植物, 原产于欧洲, 在北美、澳大利亚、新西兰等地分布广泛^[20]。19 世纪末传入我国东北和西南地区, 并扩散到西北地区, 在湖北主要分布于神农架^[21]。欧洲千里光生长发育迅速, 传播能力和繁殖能力极强^[22], 其部分基因型对除草剂具有抗性, 因此在北美某些地区较难防治。此外, 欧洲千里光还能产生对家畜和人类都存在一定危害的生物碱^[23]。从目前的研究情况来看, 欧洲千里光是一种弱入侵性物种, 通过入侵调查发现该物种常分布于公路沿线等营养条件较差的环境^[24-25], 意味着欧洲千里光可能有着其他渠道, 例如微生物转化的氮磷养分来获取生长所必需的养分以完成入侵过程, 存在成为强入侵种的风险。研究欧洲千里光微生物组, 对了解欧洲千里光的入侵机制和进行防治都具有重大意义。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

欧洲千里光种子分别来源于湖北神农架的6个不同种群, 种子于2017年10月萌发, 之后转移至花盆中, 植株生长时间为6–8周, 至开花前收获用作实验材料。6个种群各挑选9株健康长势良好的植株, 收集叶子和根作为实验样品。每个种群按照每3株随机混合记作3个平行重复样。

1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(NA)参考文献[26]配制, 无氮培养基(Ashby)参考文献[27]配制, 无机磷培养基(inorganic phosphate, NBRIP)参考文献[28]配制。

1.3 主要试剂和仪器

研究所用的钼酸铵显色液配制步骤: 将10 g 钼酸铵溶解于60 °C 150 mL 水中标记为溶液1, 配制5 g/L 酒石酸锑钾溶液标记为溶液2, 取90.3 mL 的浓硫酸稀释至200 mL 水中标记为溶液3; 将溶液3缓慢地不断搅拌后加入溶液1, 取50 mL 溶液2加入混合液并定容至500 mL, 摇匀后在棕色瓶中储藏; 钼酸铵显色液即每200 mL 的贮存液内溶解3 g 左旋抗坏血酸(现配现用); 100 mg/L 磷酸标准液配制: KH_2PO_4 0.439 4 g, 浓 H_2SO_4 5.0 mL, 定容至1 L。

Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 裂解液, TaKaRa 公司。pH 仪, Denver 公司。

1.4 植物材料的消毒

参考文献[29]报道的方法对欧洲千里光叶和根样品进行表面消毒。将样本用超纯水冲洗干净杂质, 剔除腐败组织后, 使用70%酒精浸泡振荡1 min, 再使用有效氯含量为1%的次氯酸钠浸泡振荡2 min, 并使用大量无菌水冲洗4次。取冲洗最后一次的无菌水涂于NA平板^[27], 28 °C 培养2–3 d, 若无菌生长则表面消毒完全。

1.5 内生固氮菌的 *nifH* 基因序列扩增及鉴定

固氮基因(*nif*)的高通量测序技术是目前对植物内生固氮菌进行研究的常用方法^[30]。将取自同一个种群植物的DNA样本混合, 进行后续固氮微生物测序及分析。用 *nifH* 基因特异引物 poly-F (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3')和 poly-R (5'-ATSGCCATCATYTTCRCCGGA-3')^[31–32] 进行PCR扩增。PCR反应体系(25 μL): 5×Reaction Buffer 5 μL, 5×GC Buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mol/L) 2 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各1 μL, DNA模板2 μL, Q5[®]高保真DNA聚合酶(0.02 U/μL) 0.25 μL, 双蒸水8.75 μL。PCR反应条件: 98 °C 5 min; 98 °C 30 s, 59.5 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30个循环; 72 °C 5 min。

对原始序列进行拼接和质控, 运用QIIME V1.7.0^[33]得到可用高质量数据(clean tags)。通过比对数据库(gold database), 用UCHIME算法进行检测、嵌合体序列的去除^[34], 最终得到有效数据(effective tags)。

使用UPARSE V7.0.1001^[35]序列比对工具对高质量的数据序列按97%的相似度进行聚类、划分可操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)。选择每个OTU中出现频数最高的序列作为代表序列, 使用软件QIIME调用BLAST的命令对各OTU代表序列在Zehr数据库(<https://www.jzehrlab.com/nifh>)^[36]中进行比对, 随后进行物种注释分析, 获得分类学信息, 统计各样本各分类水平的群落组成, 获得每个代表序列的分类学信息, 绘制OTU表, 计算各样本的各分类水平上的物种组成比例。

1.6 可培养内生细菌的筛选和纯化

用无菌剪刀将消毒后的叶、根剪碎, 在无菌条件下研磨成匀浆, 吸取100 μL 研磨液涂布Ashby无氮培养基^[27]和NBRIP无机磷培养基^[28]平板, 每个处理做3个重复样, 于28 °C 培养

2–3 d, 观察菌落情况。若能在 Ashby 培养基上生长, 则初步说明菌株具有好氧自生固氮能力^[37]。若能在 NBRIP 筛选培养基上生长, 则初步说明在该菌株的作用下, 难溶性 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 可以转化为可溶性的有效磷^[38]。

观察、拍照、记录菌落的各类性状如颜色、形状、是否透明等。一个培养皿中各类性状一致的菌落, 只选一个菌落为代表进行划线分离培养, 每隔 2 d 分离培养一次, 直至分离出生长、形态稳定不变的单个菌落, 移入试管斜面保存于 4 °C, 为后续实验提供菌株材料。

1.7 可培养内生细菌的 16S rRNA 基因序列扩增及鉴定

将保存在试管斜面的纯菌接种于 NA 平板上^[27], 20 °C 活化 2–3 d, 使用 Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 裂解液提取纯化的细菌基因组 DNA 作为 PCR 模板。PCR 反应体系(50 μL): Premix *Taq* 25 μL , 引物 27F (5'-CTACGGGAGGCACGAG-3')和 1492R (5'-GTA TTACCGCGGCTGCTGG-3')^[39] (10 ng/ μL)各 1 μL , 模板 DNA 3 μL , 双蒸水 20 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s, 36 个循环; 72 °C 8 min。PCR 产物经凝胶电泳检测后进行测序。使用 BioEdit^[40]软件拼接正、反向序列。使用 Mothur^[41]软件对拼接成功的菌株序列按照 97%相似性进行 OTU 聚类, 每个 OTU 选取一株代表菌株进行后续分析。序列比对通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) 和 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 进行鉴定。

1.8 可培养内生溶磷菌的溶磷定性及定量检测

将筛选出的可培养溶磷菌株重新接种于加入溴酚蓝的 NBRIP 培养基平板中^[42], 同时以不接种菌株的空白平板为对照。于 30 °C 培养 7 d,

观察菌株的生长情况。将菌株接种至 150 mL NBRIP 液体培养基中, 同时准备不接种菌株的空白对照, 30 °C、150 r/min 培养 7 d。先测定其 pH 值, 随后 5 000 r/min 离心 3 min, 取上清液 2.0–2.5 mL, 采用钼锑抗比色法^[43]测定其中水溶性磷含量。

1.9 统计分析

利用 *nifH* 基因扩增子分析得到的 OTU 丰度矩阵, 计算每个样本的群落 α 多样性, 如使用 QIIME 软件绘制稀释曲线(rarefaction curve)观测样本的测序结果。 α 多样性是对单个样品中物种多样性的分析, 其中 Shannon 多样性指数可以反映群落的丰富度。应用 Mothur 计算样本 Shannon 多样性指数, 用方差分析欧洲千里光固氮微生物的 α 多样性。

2 结果与分析

2.1 欧洲千里光内生固氮菌群落组成和多样性

细菌 *nifH* 基因高通量测序结果表明, 从 12 个样本内得到 570 772 条高质量序列, 剔除鉴定为非细菌和稀有的序列后剩余 479 440 条可用序列, 平均序列长度约为 320 nt, 共聚类至 4 655 个 OTU。欧洲千里光固氮菌群落的 α 多样性分析表明, 叶样本中 Shannon 多样性指数较高(均值为 7.13), 根较低(均值为 5.45), 并且差异显著(ANOVA test: $df=1, 10; F=7.39; P=0.022$)。

叶、根固氮菌群落共准确鉴定到 6 个门, 包括变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinomycetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)和螺旋体门(*Spirochaetes*)。其中, 变形菌门在所有样本内均达 90%以上, 平均相对丰度高达 91.5%。各样本中共有 4.9%的 OTU 未准确鉴定至门水平(图 1A)。

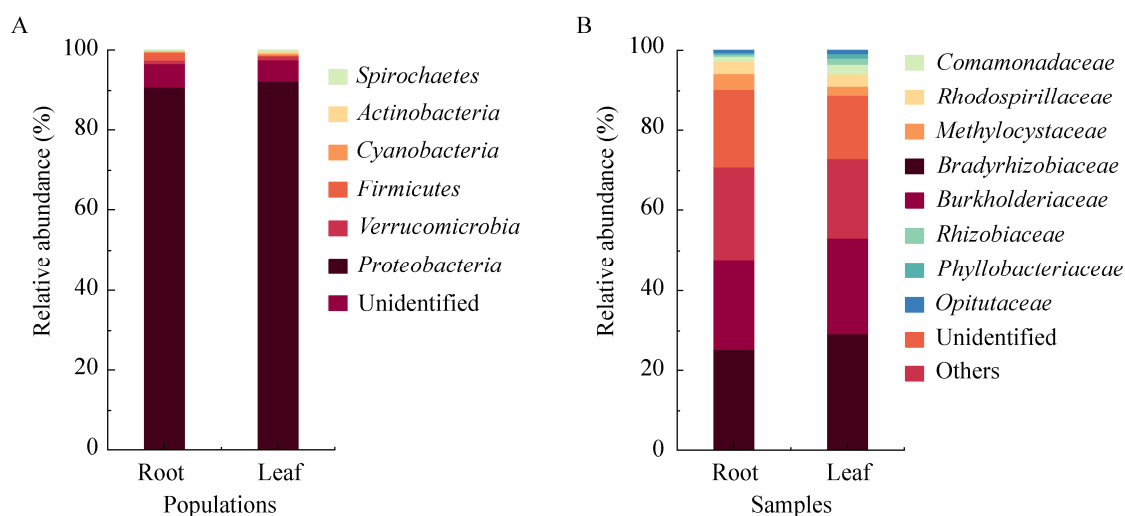


图 1 欧洲千里光内生固氮菌的前 10 门(A)和前 10 科(B)的相对丰度

Figure 1 Relative abundance of top ten phyla (A) and top ten families (B) of nitrogen-fixing bacteria in *Senecio vulgaris* plants.

根和叶样本中固氮菌群落组成前 10 科基本一致, 而且除瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)和丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)外, 其余各科均属于变形菌门。慢生根瘤菌科(*Bradyrhizobiaceae*)在根样本(30.9%)和叶样本(34.1%)中的丰度均最高; 其次是伯克氏菌科(*Burkholderiaceae*), 在根样本和叶样本中的丰度都高达 27.8%; 甲基孢囊菌科(*Methylocystaceae*)在根样本(4.8%)中丰度略高于叶样本(2.7%)。在叶样本中丰度第 3 高(3.4%)的红螺菌科(*Rhodospirillaceae*), 在根样本中也有较高的丰度(3.9%)。瘤胃菌科在根样本中丰度较高(1.7%), 叶样本中却相对较低(0.3%); 丛毛单胞菌科则呈现相反趋势, 在叶样本中丰度(2.8%)高于根样本中丰度(1.4%) (图 1B)。

根和叶样本中丰度最高的属均为慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*, 30.9%–34.0%), 还鉴定出丰度较高的伯克氏菌属(*Burkholderia*, 27.2%–27.4%)、*Methyloversatilis* (2.1%–7.1%)和固氮螺菌属(*Azospirillum*, 2.9%–3.9%)。根中丰度较高的有红长命菌属(*Rubrivivax*, 3.9%)、*Pleomorphomonas* (3.1%); 叶中 *Pseudacidovorax* (2.4%)和艾德昂

菌属(*Ideonella*, 2.3%)丰度也较高。

2.2 可培养内生固氮菌的分离和鉴定结果

使用 Ashby 无氮培养基, 从欧洲千里光的根和叶样本中共分离得到 238 株纯菌, 覆盖到 4 门 7 纲 10 目 16 科 19 属。其中变形菌门(33.79%)丰度最高, 其次是放线菌门(33.10%)和厚壁菌门(30.34%), 丰度最低的是拟杆菌门(*Bacteroides*, 2.76%)。丰度前 5 的优势菌属包括微杆菌属(*Microbacterium*, 31.0%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 24.8%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 22.1%)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*, 6.2%)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*, 2.8%), 这 5 个属的细菌丰度之和占全部鉴定菌株的 86.9%。芽孢杆菌属、微杆菌属、假单胞菌属在根、叶两部分样本都有分布, 其中, 假单胞菌属在根样本中鉴定出来的菌株数高于叶中, 芽孢杆菌属情况则与之相反, 微杆菌属在根、叶中分离出的菌株数量差别不明显(表 1, 图 2)。

2.3 可培养内生溶磷菌的分离与鉴定结果

使用 NBRIP 培养基, 从欧洲千里光的根和叶样本中共分离得到 318 株纯菌, 覆盖到 3 门

5 纲 7 目 15 科 16 属。其中厚壁菌门(54.40%)丰度最高, 其次为变形菌门(29.60%), 丰度最低的是拟杆菌门(1.60%)。丰度前 5 的优势菌属包括芽孢杆菌属(48.4%)、假单胞菌属(19.2%)、微杆菌属(15.2%)、类芽孢杆菌属(3.6%)和不动杆菌属(*Acinetobacter*, 3.6%), 该 5 个属的菌株数

目总和占全部鉴定菌株的 88.4%。芽孢杆菌属、微杆菌属、假单胞菌属在根、叶样本中都有分布, 其中, 假单胞菌属在根样本中鉴定出来的菌株数量高于叶样本, 微杆菌属情况则与之相反, 芽孢杆菌属在根、叶样本中分离出的菌株数量差别不大(图 3, 表 2)。

表 1 欧洲千里光可培养内生固氮菌鉴定结果

Table 1 Identification results of culturable endophytic nitrogen fixing bacteria in *Senecio vulgaris* plants

属 Genus	种 Species	OTU	归并至该 OTU 菌株数目 Number of isolations identified as this OTU	相似性* Similarity* (%)
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	/	OTU01	45	99.64
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	OTU03	25	100.00
<i>Bacillus</i>	<i>aryabhatai</i>	OTU05	4	99.27
<i>Bacillus</i>	<i>safensis</i>	OTU07	9	99.85
<i>Bacillus</i>	<i>acidiceler</i>	OTU10	1	99.25
<i>Bacillus</i>	<i>brevibacterium</i>	OTU12	1	99.93
<i>Bacillus</i>	/	OTU18	3	99.78
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	/	OTU02	6	100.00
<i>Pseudomonas</i>	/	OTU04	15	99.93
<i>Pseudomonas</i>	/	OTU21	2	98.60
寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i>	<i>rhizophila</i>	OTU06	4	99.04
不动杆菌 <i>Acinetobacter</i>	/	OTU08	4	99.93
嗜冷杆菌 <i>Psychrobacter</i>	/	OTU09	1	100.00
甲基杆菌 <i>Methylobacterium</i>	<i>aminovorans</i>	OTU11	1	99.93
微杆菌 <i>Microbacterium</i>	/	OTU13	3	99.85
类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus</i>	/	OTU14	3	99.64
<i>Paenibacillus</i>	<i>lautus</i>	OTU26	1	99.93
节杆菌 <i>Arthrobacter</i>	<i>humicola</i>	OTU15	1	100.00
鞘氨醇杆菌 <i>Sphingobacterium</i>	/	OTU16	3	97.67
葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i>	/	OTU17	3	99.93
普罗维登斯菌 <i>Providencia</i>	<i>burhodogranariae</i>	OTU19	1	98.45
根瘤菌 <i>Rhizobium</i>	/	OTU20	1	99.62
红球菌 <i>Rhodococcus</i>	<i>corynebacterioides</i>	OTU22	1	99.55
<i>Rhodococcus</i>	<i>erythropolis</i>	OTU28	1	100.00
香味菌 <i>Myroides</i>	<i>odoratus</i>	OTU23	1	98.21
摩根氏菌 <i>Morganella</i>	<i>psychrotolerans</i>	OTU24	1	99.49
闪板硫菌 <i>Lampropedia</i>	/	OTU25	1	100.00
申氏菌 <i>Shinella</i>	<i>kummerowiae</i>	OTU27	1	99.92
动性球菌 <i>Planococcus</i>	/	OTU29	1	100.00

/: 不能确定具体菌种或鉴定到多个种; *: 指使用 EzBioCloud 鉴定结果相似性

/: A specific strain could not be identified or that multiple species were identified; *: Similarity of identification results from EzBioCloud.

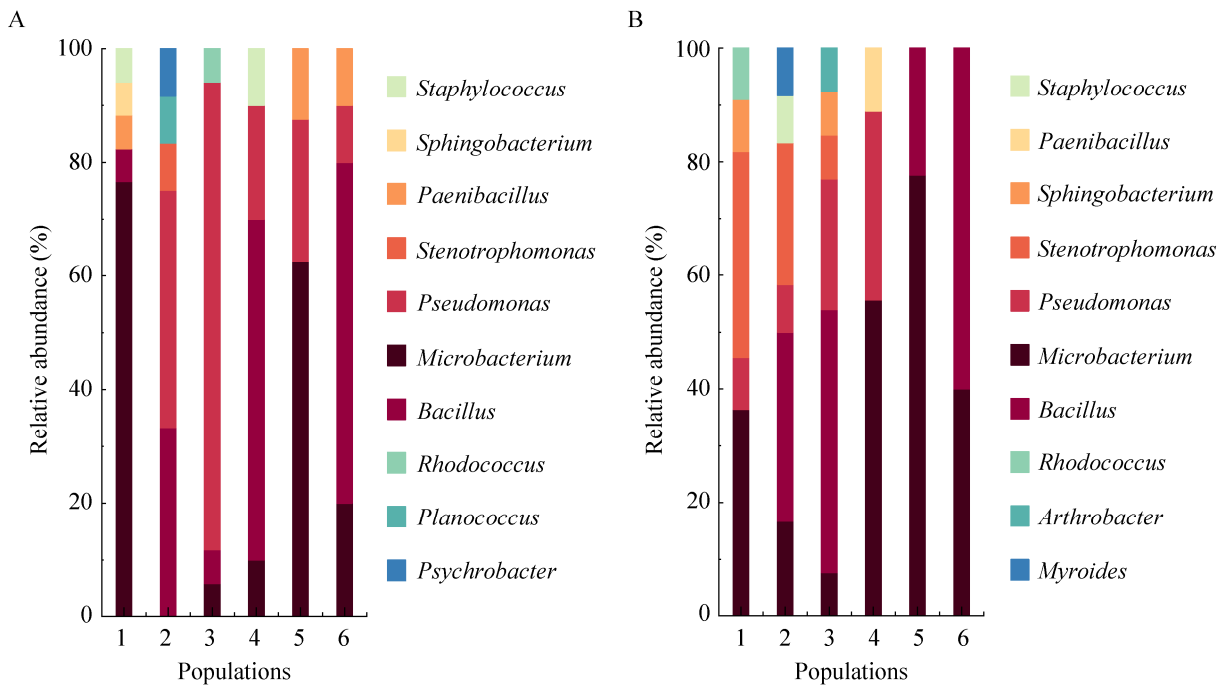


图 2 欧洲千里光叶(A)和根(B)可培养内生固氮菌前 10 属相对丰度

Figure 2 Relative abundance of the top ten genera of culturable endophytic nitrogen-fixing bacteria in leaf (A) and root (B) in *Senecio vulgaris* plants.

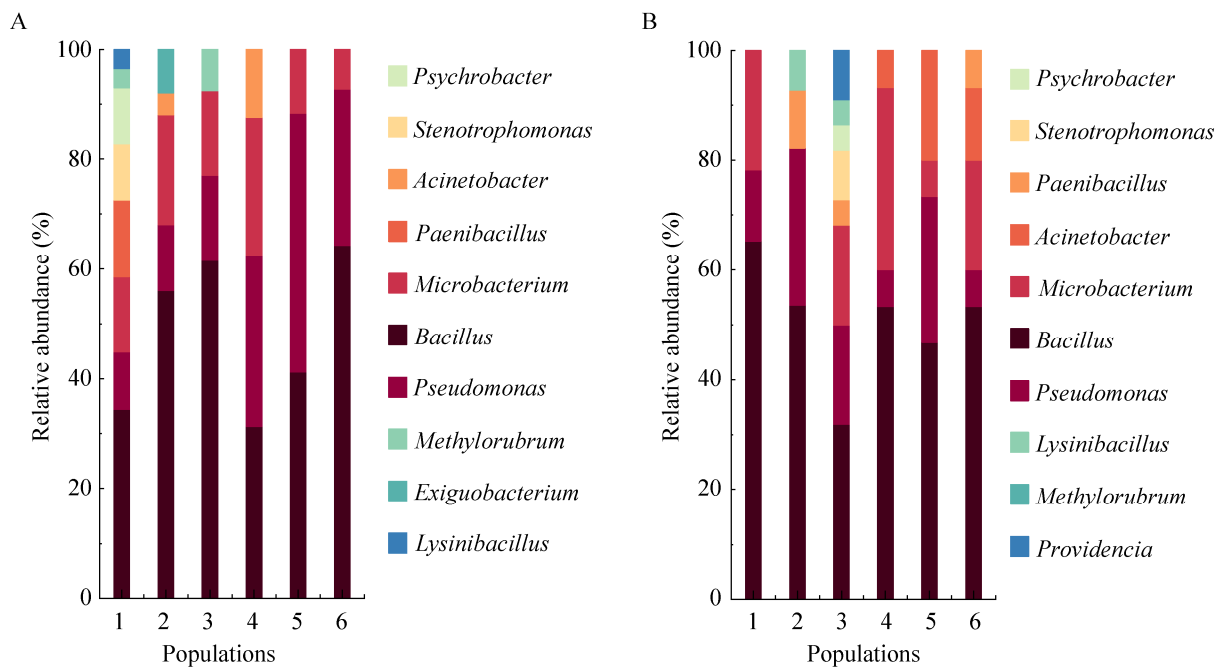


图 3 欧洲千里光叶(A)和根(B)可培养内生溶磷菌前 10 属相对丰度

Figure 3 Relative abundance of the top ten genera of culturable endophytic phosphorus-solubilizing bacteria in leaf (A) and root (B) in *Senecio vulgaris* plants.

表 2 欧洲千里光可培养内生溶磷菌鉴定结果

Table 2 Identification results of culturable endophytic phosphorus-solubilizing bacteria in *Senecio vulgaris* plants

属	种	OTU	归并至该 OTU 菌株数目	相似性*
Genus	Species		Number of isolations identified as this OTU	Similarity* (%)
微杆菌 <i>Microbacterium</i>	/	OTU01	38	99.64
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	/	OTU02	60	100.00
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	OTU04	27	99.93
<i>Bacillus</i>	<i>aryabhattai</i>	OTU06	17	99.04
<i>Bacillus</i>	<i>safensis</i>	OTU08	10	99.93
<i>Bacillus</i>	<i>acidiceler</i>	OTU11	4	99.93
<i>Bacillus</i>	<i>brevibacterium</i>	OTU13	1	99.85
<i>Bacillus</i>	<i>circulans</i>	OTU24	2	99.63
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	/	OTU03	23	100.00
<i>Pseudomonas</i>	/	OTU05	25	99.27
寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i>	<i>rhizophila</i>	OTU07	5	99.85
不动杆菌 <i>Acinetobacter</i>	/	OTU09	9	100.00
嗜冷杆菌 <i>Psychrobacter</i>	/	OTU10	4	99.25
甲基杆菌 <i>Methylobacterium</i>	<i>aminovorans</i>	OTU12	3	99.93
赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus</i>	/	OTU14	4	99.86
类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus</i>	/	OTU15	1	99.64
<i>Paenibacillus</i>	<i>chibensis</i>	OTU17	3	99.93
<i>Paenibacillus</i>	<i>tundrae</i>	OTU19	3	100.00
<i>Paenibacillus</i>	/	OTU22	2	100.00
节杆菌 <i>Arthrobacter</i>	<i>humicola</i>	OTU16	2	100.00
普罗维登斯菌 <i>Providencia</i>	<i>burhodogranariae</i>	OTU18	2	98.45
根瘤菌 <i>Rhizobium</i>	/	OTU20	1	99.62
苍白杆菌 <i>Ochrobactrum</i>	/	OTU21	2	99.46
微小杆菌 <i>Exiguobacterium</i>	<i>acetylicum</i>	OTU23	2	99.85

/: 不能确定具体菌种或鉴定到多个种; *: 指使用 EzBioCloud 鉴定结果相似性

/: A specific strain could not be identified or that multiple species were identified; *: Similarity of identification results from EzBioCloud. The same below.

将 24 株欧洲千里光可培养内生溶磷菌 OTU 代表菌株活化, 一共活化成功 23 株, 接种至 NBRIP 固体培养基时可观察到部分样品点涂平板产生溶磷圈现象。其中有 4 个菌株的 3 个平行样中均可观察到产溶磷圈现象; 1 个菌株的 2 个平行样可以观察到产溶磷圈现象; 3 个菌株只有一个平行样中观察到产溶磷圈现象, 其余菌株均能在 NBRIP 固体平板上生长, 但无溶磷

圈产生(表 3)。

2.4 可培养内生溶磷菌的溶磷能力

在接种了溶磷菌的培养液中, 可溶性磷的含量在 0.094–6.249 mg/L 之间, 不同菌株之间差别较大。有 6 个菌株在培养 7 d 后, 其培养液中 Pi 含量低于空白对照, 其中 2 个菌株其培养液中计算出的 Pi 含量为负数, 这些菌株不具备溶磷能力。在 17 株具有溶磷能力的细菌中,

表 3 欧洲千里光内生溶磷菌代表菌株溶磷功能测试结果

Table 3 Results of phosphorus solubilizing function test of representative strains of endophytic phosphorus-solubilizing bacteria in *Senecio vulgaris* plants

菌株编号 Strain No.	鉴定结果 Identification results	产生溶磷圈直径 Diameter of phosphorus soluble circle (mm)	可溶磷(Pi)含量 Contents of Pi (mg/L)	培养基 pH 值 pH value of mediums
No.1	微杆菌 <i>Microbacterium</i>	—	1.570	6.240±0.02
No.2	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	5	0.966	7.781±0.06
No.4	<i>Bacillus</i>	—	4.759	5.646±0.04
No.6	<i>Bacillus</i>	18	1.225	6.157±0.04
No.8	<i>Bacillus</i>	7	3.195	7.596±0.03
No.11	<i>Bacillus</i>	—	4.409	5.840±0.02
No.13	<i>Bacillus</i>	—	0.159	7.508±0.03
No.24	<i>Bacillus</i>	—	5.575	5.746±0.01
No.3	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	—	1.928	6.190±0.03
No.5	<i>Pseudomonas</i>	17	5.834	5.514±0.03
No.7	寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i>	—	2.815	6.948±0.10
No.9	不动杆菌 <i>Acinetobacter</i>	—	5.481	5.569±0.04
No.10	嗜冷杆菌 <i>Psychrobacter</i>	—	5.281	5.794±0.03
No.14	赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus</i>	—	4.905	5.658±0.04
No.15	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus</i>	16	0.629	6.189±0.01
No.17	<i>Paenibacillus</i>	—	1.349	6.976±0.04
No.19	<i>Paenibacillus</i>	—	5.600	5.419±0.03
No.22	<i>Paenibacillus</i>	—	0.094	7.647±0.04
No.16	节杆菌 <i>Arthrobacter</i>	15	/	7.548±0.02
No.18	普罗维登斯菌 <i>Providencia</i>	—	/	7.944±0.01
No.20	根瘤菌 <i>Rhizobium</i>	—	0.193	7.267±0.02
No.21	苍白杆菌 <i>Ochrobactrum</i>	15	3.296	7.161±0.02
No.23	微小杆菌 <i>Exiguobacterium</i>	—	6.250	5.967±0.03
Blank			0.959	7.750

—: 不能产生溶磷圈; /: Pi 含量为负值

—: A phosphorus soluble circle cannot be produced; /: Negative value for the calculated Pi content.

芽孢杆菌属所占比例最大, 共有 6 个菌株, 溶磷能力为 0.966–5.574 mg/L。其次为假单胞菌属和类芽孢杆菌属, 均有 2 个菌株具有溶磷能力, 溶磷性能范围为 1.928–5.843 mg/L 和 1.349–5.600 mg/L。溶磷活性最高的菌株是微小杆菌(*Exiguobacterium*), 摇床培养 7 d 后可溶磷含量可达 6.250 mg/L(表 3)。测定培养基的 pH 值后可知, 与开始培养时的接近中性(pH 6.8–7.0)的条件相比, 培养过程中 pH 值显著下降, 而且通过相关性分析表明培养液中可溶磷的含量与 pH 值呈负相关(图 4)。

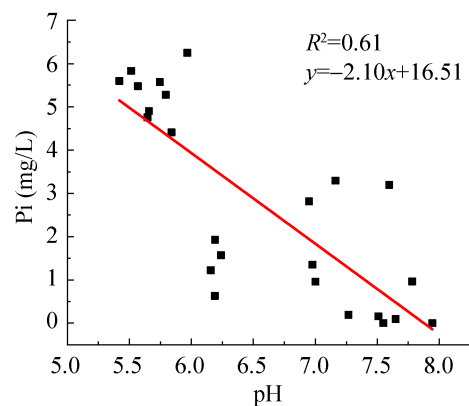


图 4 液体培养基中正磷酸根含量(Pi)与 pH 值相关性
Figure 4 Correlation between orthophosphate content (Pi) and pH value in liquid medium.

3 讨论与结论

3.1 欧洲千里光内生固氮菌的多样性

在内生菌的分离过程中, 灭菌的方法、时间以及筛选内生菌的培养基选择都会对实验结果产生一定的影响。在对植物组织进行表面消毒的时候, 我们发现经过一次消毒很难消除所有杂菌。在一项针对植物内生菌分离和组织消毒的研究中提出, 乙醇在杀死植物表面微生物的同时会使植物根茎吸入部分水分, 从而导致内生菌少量存活。然而 HgCl_2 浓度稳定、消毒效果好且所需时间少, 分离得到的内生菌数量较稳定^[44], 因此在之后的研究中可以从植物样本的消毒方法上进行改进。

我们发现欧洲千里光叶样本中内生固氮菌群落的 α 多样性高于根样本。在巨菌草(*Pennisetum* sp.)的内生固氮菌研究中, 同样采用了基于固氮基因 *nifH* 的高通量测序方法, 结果表明, 内生固氮菌多样性受植物生长时期不同影响, 根部菌群组成在成熟期最高, 而叶部则在拔节期较高^[45]。本文中作为实验材料的所有欧洲千里光植株都统一经过了 6–8 周的栽培, 处于同样的发育期, 因此在后续实验中可以对欧洲千里光的不同发育期设置梯度, 以探究在该植物的不同发育期固氮内生菌的多样性是否会发生变化, 探寻其中规律将有助于进一步了解固氮菌群在欧洲千里光内部起促生作用的方式和趋势。

欧洲千里光 *nifH* 基因高通量测序结果表明, 其内生固氮微生物组中共有 91.5% 的变形菌, 其余几个门总相对丰度不足 3%, 该结果与巨菌草的内生固氮菌群落研究^[46]一致, 在巨菌草的不同生长时期, 变形菌门在固氮菌中都占据了最大的比例^[45]。变形菌门在与植物相关的固氮菌群落中具有较高的丰度占比, 这可能是

由于具有固氮能力的细菌大部分属于蓝藻和变形菌^[34]; 而且能与植物共生并固氮的结瘤细菌都归属于变形菌门^[47]。

科水平上, 慢生根瘤菌科和伯克氏菌科丰度很高, 而且在根(30.9%和 27.8%)与叶(34.1%和 27.8%)样本中差距不大。甲基孢囊菌科在根样本(4.8%)中丰度略高于叶样本(2.7%), 该科细菌能从甲烷中获取碳和能量^[48], 并和其他根瘤菌目的细菌一样具有固氮功能。在叶样本中丰度第三高(3.4%), 而且在根样本中也有较高丰度(3.9%)的红螺菌科具有固氮能力, 在甘蔗根部^[49]和巨菌草根^[50]都作为固氮菌被鉴定到。

属水平与科水平对应有两个属丰度很高, 分别是慢生根瘤菌属(30.9%–34.0%)和伯克氏菌属(27.2%–27.4%)。此外, *Methyloversatilis* 在根和叶内也作为丰度较高(2.1%–7.1%)的固氮菌存在。慢生根瘤菌属具有较强的固氮能力, 是良好的固氮资源, 能帮助宿主抗盐碱, 将其回接至植物台湾相思(*Acacia confuse*)中, 能明显提升宿主植株的抗旱能力^[51]。慢生根瘤菌属能够提升植物对盐的耐受^[52], 还具有产吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)的能力, 对水稻有良好的促生作用^[53]。伯克氏菌属作用非常广泛, 不仅具有高效的固氮能力, 还能促进难溶性磷酸盐和钾盐的溶解, 分泌植物 IAA 生长素, 被认为是植物常用的促生菌种之一^[54]。*Methyloversatilis* 属于亚硝化单胞菌目, 目前未明确划分至科水平, 该属在小麦和水稻中也是优势内生固氮菌之一^[55]。

根据可培养内生固氮菌的鉴定结果, 丰度前 5 的优势菌属包括微杆菌属(31.0%, 放线菌门)、芽孢杆菌属(24.8%, 厚壁菌门)、假单胞菌属(22.1%, 变形菌门)、寡养单胞菌属(6.2%, 变形菌门)和类芽孢杆菌属(2.8%, 厚壁菌门)。高通量测序结果表明, 内生固氮菌群落中丰度很

高的慢生根瘤菌和伯克氏菌并不包括在内, 丰度较高的 *Methyloversatilis* 在纯培养实验中丰度仅为 1.3%; 有一定丰度的疣微菌门、蓝细菌门、螺旋体门, 在可培养内生固氮菌中并未鉴定到。考虑到培养条件的影响, 可以参考已有研究对培养基进行改进, 以便分离、培养出更多的固氮菌。例如改良优化 Ashby 培养基^[56], 或者使用酵母提取物-甘露醇-琼脂培养基。后者常用于根瘤菌的纯化实验^[57], 因此对根瘤菌的培养具有更强的特性, 更符合根瘤菌生长的营养条件。

以上结果表明, 在入侵植物欧洲千里光的根部和叶部, 通过高通量和纯培养两种方法都可以鉴定出一定数量的固氮菌。对于固氮菌固氮能力的研究, 主要是使用乙炔还原法^[58], 本文未进行固氮能力检测, 但分离得到的内生固氮菌已从其他入侵植物中被鉴定到, 或已被证明有促生能力, 在一定程度上可以证明欧洲千里光内生固氮菌对其入侵起到了促进作用。从外来入侵植物紫茎泽兰根部分离出比较丰富的慢生根瘤菌属、伯克氏菌属、假单胞菌属和根瘤菌属(*Rhizobium*)菌株, 接种这些内生优势固氮菌对紫茎泽兰生长有明显的促进效应^[19]。对比紫茎泽兰的研究成果, 我们发现欧洲千里光内生固氮菌的组成与其具有相似性。在后续研究中, 我们将会改进筛选和培养的方法, 将纯培养得到的内生固氮菌回接植株以观察其对欧洲千里光是否具有促生作用, 进一步验证该结论。

3.2 欧洲千里光内生溶磷菌的多样性及溶磷能力

我们从欧洲千里光根和叶内共筛选出 17 株具溶磷能力的细菌, 优势属为芽孢杆菌属, 其次是假单胞菌属和类芽孢杆菌属, 经过定量检测溶磷能力最高的菌株为微杆菌属。芽孢杆菌

属繁殖力强、培养难度低, 在培养基空间竞争上优势较大^[59]; 而假单胞菌是土壤中的常见微生物群体, 能产生大量的次生代谢产物以适应环境的变化^[60], 这可能是此两类细菌在可培养内生菌株中比例较高的原因。芽孢杆菌和假单胞菌作为常见溶磷菌属^[61]在很多植物的内生菌分离和鉴定实验中都占有较高的丰度且往往具有促生功能。例如, 在甘蔗及其亲缘本地的分离实验中, 芽孢杆菌和假单胞菌都作为溶磷菌被分离纯化^[62]; 同样的结果在甘薯^[63]的内生菌分离实验中也得到了验证, 该实验中芽孢杆菌和假单胞菌都表现出了溶磷能力, 而且作为内生溶磷菌被鉴定。

从欧洲千里光样本中分离出的芽孢杆菌属和假单胞菌属的溶磷能力都不突出, 接种了芽孢杆菌的培养基中可溶磷含量为 0.966–5.574 mg/L, 假单胞菌的溶磷性能范围为 1.928–5.843 mg/L, 远低于其他研究。例如, 从樟树中分离得到的内生芽孢杆菌溶磷量为 39.85 mg/L^[64], 而从野大豆中分离纯化出的内生假单胞菌溶磷量达到了 46.12 mg/L^[65], 推测原因可能与培养条件有关, 有研究指出培养基的初始 pH 值会影响菌株的溶磷能力^[66]。此外, 由于溶磷机制和溶磷过程的复杂性, 如果想要进一步探究如何提高菌种的溶磷能力, 或是找出菌种溶磷能力低下的原因, 还需要借助高通量的方法, 在后续的实验我们也会进行更多的尝试和探究。

我们发现溶磷能力最强的菌株属于微杆菌属, 微杆菌属在水稻种子内生菌的分离培养实验中是优势菌属, 被认为可以直接或间接促进种子生长, 并且具有垂直传播的能力^[67]。关于入侵植物种子内生菌和垂直传播的研究, 目前还非常少, 但已有实验证明入侵植物种子内生菌可以保护植物不受病害影响并促进植株生长^[68], 这在未来也可以成为我们的一个研究方向。我

他们还筛选出了不动杆菌属,但在溶磷能力的检测中该属菌株未表现出很好的溶磷水平。不动杆菌属在红叶石楠的内生菌分离培养中被鉴定为优势菌种,也被认为具有产 IAA 的能力,而且有助于植物生长和对重金属的吸收^[69];它能够通过溶解碳酸钙而获得一定的溶磷能力,还能够固化部分磷^[70],对植物的生长有着重要意义。以上结果表明,在欧洲千里光的根部和叶部存在丰富的溶磷菌资源,而且有半数以上的菌种经验证具有溶磷能力;同时,部分溶磷菌在前人研究中被证明有促生功能。但目前我们纯培养出的欧洲千里光内生溶磷菌表现出的溶磷能力远远低于其他同类研究,在排除培养条件后应当考虑是否有其他因素影响其内生溶磷菌的溶磷能力,例如植物生长环境和生长状态。在培养过程中我们观察到,培养液中可溶磷的含量与 pH 值呈负相关。这可能是因为溶磷菌在生长过程中产生多种有机酸,导致环境中的 pH 值下降,也表明这些溶磷菌的溶磷机制可能是酸解。溶磷菌在生长繁殖的过程中可以产生乙酸、乳酸、苹果酸、草酸、琥珀酸、柠檬酸和葡萄糖酸等有机酸,将固定态磷酸盐中的磷释放到环境中^[61]。

基于 *nifH* 基因高通量测序结果,我们发现欧洲千里光根和叶固氮内生菌群落以变形菌门为主,其多样性在叶中高、根中较低。固氮菌群落中的优势属包括慢生根瘤菌属、伯克氏菌属、*Methyloversatilis* 和固氮螺菌属。基于菌株纯培养结果,从欧洲千里光根和叶样本中分离纯化出内生固氮菌 238 株和内生溶磷菌 318 株,其中固氮菌优势菌属包括微杆菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属等。溶磷菌数目最多的是芽孢杆菌属,其次是假单胞菌属、微杆菌属等,而溶磷能力最强的菌株来自微小杆菌属。综上所述,欧洲千里光根部和叶部内生菌中固氮菌和

溶磷菌都十分丰富,丰度较高的菌属都有研究证明为植物促生菌,而且可培养溶磷菌具有一定的溶磷能力,推测可以帮助欧洲千里光更好地适应环境,以完成入侵过程。在接下来的后续研究中,我们会将筛选出的固氮菌和溶磷菌回接植株,以进一步研究内生菌在植物入侵机制中的作用。

REFERENCES

- [1] COURCHAMP F, FOURNIER A, BELLARD C, BERTELSMEIER C, BONNAUD E, JESCHKE JM, RUSSELL JC. Invasion biology: specific problems and possible solutions[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2017, 32(1): 13-22.
- [2] DAI ZC, WAN LY, QI SS, RUTHERFORD S, REN GQ, WAN JSH, DU DL. Synergy among hypotheses in the invasion process of alien plants: a road map within a timeline[J]. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 2020, 47: 125575.
- [3] LATOMBE G, RICHARDSON DM, McGEOCH MA, ALTWEGG R, CATFORD JA, CHASE JM, COURCHAMP F, ESLER KJ, JESCHKE JM, LANDI P, MEASEY J, MIDGLEY GF, MINOARIVELLO HO, RODGER JG, HUI C. Mechanistic reconciliation of community and invasion ecology[J]. Ecosphere (Washington, D C), 2021, 12(2): e03359.
- [4] TORCHIN ME, MITCHELL CE. Parasites, pathogens, and invasions by plants and animals[J]. Frontiers in Ecology and the Environment, 2004, 2(4): 183-190.
- [5] CALLAWAY RM, THELEN GC, RODRIGUEZ A, HOLBEN WE. Soil biota and exotic plant invasion[J]. Nature, 2004, 427(6976): 731-733.
- [6] HIERRO JL, MARON JL, CALLAWAY RM. A biogeographical approach to plant invasions: the importance of studying exotics in their introduced and native range[J]. Journal of Ecology, 2005, 93(1): 5-15.
- [7] SAX DF, GAINES SD, BROWN JH. Species invasions exceed extinctions on Islands worldwide: a comparative study of plants and birds[J]. The American Naturalist, 2002, 160(6): 766-783.
- [8] 管铭, 潘小翠, 张崇邦, 王江. 外来植物入侵的微生物生态学进展[J]. 浙江大学学报(理学版), 2015, 42(4): 445-452.
GUAN M, PAN XC, ZHANG CB, WANG J. Advances in the study on microbial ecology associated with exotic plant invasion[J]. Journal of Zhejiang University

- (Science Edition), 2015, 42(4): 445-452 (in Chinese).
- [9] 王莉莉, 戴志聪, 祁珊珊, 司春灿, 林英, 刘雪艳, 杜道林. 植物内生细菌及其对入侵生态学的启示[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(3): 9-12.
WANG LL, DAI ZC, QI SS, SI CC, LIN Y, LIU XY, DU DL. Endophytic bacteria and its enlightenment to invasion ecology[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(3): 9-12 (in Chinese).
- [10] 吴晓青, 周方园, 张新建. 微生物组学对植物病害微生物防治研究的启示[J]. 微生物学报, 2017, 57(6): 867-875.
WU XQ, ZHOU FY, ZHANG XJ. Enlightenment from microbiome research towards biocontrol of plant disease[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(6): 867-875 (in Chinese).
- [11] RODRIGUEZ RJ, WHITE JF Jr, ARNOLD AE, REDMAN RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles[J]. The New Phytologist, 2009, 182(2): 314-330.
- [12] COMPTON J, MALLINSON D, GLENN CR, FILIPPELLI G, FÖLLMI K, SHIELDS G, ZANIN Y. Variations in the global phosphorus cycle[A]//Marine Authigenesis: from Global to Microbial[M]. Tulsa: SEPM (Society for Sedimentary Geology), 2000: 21-33.
- [13] GALLEGO-GIRALDO L, BHATTARAI K, PISLARIU CI, NAKASHIMA J, JIKUMARU Y, KAMIYA Y, UDVARDI MK, MONTEROS MJ, DIXON RA. Lignin modification leads to increased nodule numbers in alfalfa[J]. Plant Physiology, 2014, 164(3): 1139-1150.
- [14] 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.
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).
- [15] 阳洁, 江院, 王晓甜, 尹坤, 秦莹溪, 谭志远. 几株高效溶磷解钾药用稻内生固氮菌的筛选与鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(2): 186-195.
YANG J, JIANG Y, WANG XT, YIN K, QIN YX, TAN ZY. Screening and identification of several endophytic diazotrophs with high capability of phosphate solubilizing and potassium decomposing from *Oryza officinalis*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2016, 24(2): 186-195 (in Chinese).
- [16] 王新南, 罗家豪, 郝俊杰, 张晓艳, 刘璐, 付丽平, 王家林, 韩燕红, 刘全兰. 蚕豆幼苗内生固氮菌促生长特性的研究[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(6): 33-39.
WANG XN, LUO JH, HAO JJ, ZHANG XY, LIU L, FU LP, WANG JL, HAN YH, LIU QL. Plant growth-promoting activities of endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from seedlings of faba bean (*Vicia faba* L.)[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(6): 33-39 (in Chinese).
- [17] 方珍娟, 张晓霞, 马立安. 植物内生菌研究进展[J]. 长江大学学报(自科版), 2018, 15(10): 41-45.
FANG ZJ, ZHANG XX, MA L. Research progress of endophytic bacteria in plants[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2018, 15(10): 41-45 (in Chinese).
- [18] 李慧颖, 申乃坤, 吴家法, 杨立芳, 吴宛容, 邓礼霞, 姜明国. 广西北部湾入侵植物互花米草内生可培养细菌多样性及促生防病活性分析[J]. 南方农业学报, 2021, 52(4): 1012-1021.
LI HY, SHEN NK, WU JF, YANG LF, WU WR, DENG LX, JIANG MG. Diversity of culturable endophytic bacteria in invasive plant *Spartina alterniflora* of Guangxi Beibu Gulf and their biocontrol effect and plant-growth-promoting activity[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(4): 1012-1021 (in Chinese).
- [19] 保朱寿能. 紫茎泽兰(*Ageratina adenophora*)根内生固氮菌的分离及促生效应研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2017.
Bao ZSN. Isolation and growth-promoting effects of *Ageratina adenophora* root endophytic nitrogen-fixing bacteria[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2017 (in Chinese).
- [20] MOORE R. The biology of Canadian weeds[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1991, 71(3): 885-886.
- [21] 田忠赛, 程丹丹, 徐琳, 赵菁, 杨晓菁, 冯亮. 欧洲千里光在中国入侵状况的初步调查[J]. 安全与环境工程, 2018, 25(2): 7-14.
TIAN ZS, CHENG DD, XU L, ZHAO J, YANG XJ, FENG L. Preliminary investigation on invasion situation of *senecio vulgaris* L.(Asteraceae)in China[J]. Safety and Environmental Engineering, 2018, 25(2): 7-14 (in Chinese).
- [22] FIGUEROA R, DOOHAN D, CARDINA J, HARRISON K. Common groundsel (*Senecio vulgaris*) seed longevity and seedling emergence[J]. Weed Science, 2007, 55(3): 187-192.
- [23] 刘永衡, 张自萍, 王永利. 欧洲千里光化学成分的研究[J]. 中草药, 2010, 41(10): 1608-1612.
LIU YH, ZHANG ZP, WANG YL. Chemical constituents in *Senecio vulgaris*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2010, 41(10): 1608-1612 (in Chinese).

- [24] de SILVA S, BALL AS, HUYNH T, REICHMAN SM. Metal accumulation in roadside soil in Melbourne, Australia: effect of road age, traffic density and vehicular speed[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 208: 102-109.
- [25] LI ZG, ZHANG GS, LIU Y, WAN KY, ZHANG RH, CHEN F. Soil nutrient assessment for urban ecosystems in Hubei, China[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75856.
- [26] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 陈海如. 烟草可培养内生细菌的分离及多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(9): 1347-1354.
- CHEN ZB, XIA ZY, LEI LP, CHEN HR. Diversity of cultivable endophytic bacteria isolated from tobacco[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(9): 1347-1354 (in Chinese).
- [27] 王春红. 大豆根际土壤溶无机磷细菌的溶磷特性研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2015.
- WANG CH. Solubilizing properties of the inorganic phosphate- solubilizing bacteria isolated from soybean rhizosphere soil[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [28] 薛智权, 唐中伟, 李浩, 周然, 梁建萍. 山西黄芪根际固氮菌的分离与应用[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(7): 483-488.
- XUE ZQ, TANG ZW, LI H, ZHOU R, LIANG JP. Isolation and application of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere of *Astragalus membranaceus* Bunge in Shanxi[J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2016, 36(7): 483-488 (in Chinese).
- [29] 苏坤, 黄英, 李良波, 利达朝, 唐辉, 黄荣韶. 牛大力内生细菌的多样性及其促生特性研究[J]. *广西科学院学报*, 2020, 36(2): 171-176.
- SU K, HUANG Y, LI LB, LI DC, TANG H, HUANG RS. Study on the diversity and growth promoting characteristics of the endophytic bacteria isolated from *Callerya speciose*[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2020, 36(2): 171-176 (in Chinese).
- [30] 慈恩, 高明. 生物固氮的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2004, 20(1): 25-28.
- CI E, GAO M. Research progress on biological nitrogen fixation[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2004, 20(1): 25-28 (in Chinese).
- [31] GABY JC, BUCKLEY DH. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the nifH gene of nitrogenase[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e42149.
- [32] LEPPÄNEN SM, RISSANEN AJ, TIROLA M. Nitrogen fixation in *Sphagnum* mosses is affected by moss species and water table level[J]. *Plant and Soil*, 2015, 389(1): 185-196.
- [33] CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK, FIERER N, PEÑA AG, GOODRICH JK, GORDON JI, HUTTLEY GA, KELLEY ST, KNIGHTS D, KOENIG JE, LEY RE, LOZUPONE CA, MCDONALD D, MUEGGE BD, PIRRUNG M, REEDER J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [34] EDGAR RC, HAAS BJ, CLEMENTE JC, QUINCE C, KNIGHT R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [35] EDGAR RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [36] 张博雅, 余珂. 微生物基因数据库在氮循环功能基因注释中的应用[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(9): 3021-3038.
- ZHANG BY, YU K. Application of microbial gene databases in the annotation of nitrogen cycle functional genes[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(9): 3021-3038 (in Chinese).
- [37] 栾敏. 土壤自生固氮菌的分离鉴定及生物固氮与促进植物生长效应研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2007.
- LUAN M. Isolation and identification of soil free living nitrogen fixation bacteria and their nitrogen-fixation and plant rowth-promotion effect[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese).
- [38] 齐文娟, 龙瑞军, 周万海, 冯瑞章, 姚拓, 徐松鹤. 溶磷菌在 5 种不同培养基中溶解磷矿粉的性能比较[J]. *草原与草坪*, 2007, 27(5): 37-41.
- QI WJ, LONG RJ, ZHOU WH, FENG RZ, YAO T, XU SH. Study on the phosphate solubilization ability of phosphate solubilizing bacteria in five different mediums[J]. *Grassland and Turf*, 2007, 27(5): 37-41 (in Chinese).
- [39] 霍颖异, 许学伟, 王春生, 杨俊毅, 吴敏. 浙江苍南近海沉积物细菌物种多样性[J]. *生态学报*, 2008, 28(10): 5166-5172.
- HUO YY, XU XW, WANG CS, YANG JY, WU M. Bacterial diversity of the sediment from Cangnan Large Fishing Bay[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(10): 5166-5172 (in Chinese).
- [40] SUGIMOTO N, YAMAMOTO K, SATOH N. Positional effect of single bulge nucleotide on PNA(peptide nucleic acid)/DNA hybrid stability[J]. *Nucleic Acids*

- Symposium Series, 1999, 42(1): 95-96.
- [41] YANG SZ, LIEBNER S, ALAWI M, EBENHÖH O, WAGNER D. Taxonomic database and cut-off value for processing *mcrA* gene 454 pyrosequencing data by MOTHUR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 103: 3-5.
- [42] NAUTIYAL CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170(1): 265-270.
- [43] 丁春荣, 石慧. 钼锑抗分光光度法测定总磷问题的讨论[J]. 污染防治技术, 2009, 22(4): 106-108.
DING CR, SHI H. Discussion on the problems of total phosphorus determination by Mo-Sb anti-spectrophotometry method[J]. Pollution Control Technology, 2009, 22(4): 106-108 (in Chinese).
- [44] 王志勇, 刘秀娟, 易曲. 植物内生菌分离时表面消毒条件的比较[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 366-367.
WANG ZY, LIU XJ, YI Q. Comparison of surface disinfection conditions in isolation of endophytes[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(8): 366-367 (in Chinese).
- [45] 林标声, 范锦琳, 宋昭昭, 张丽丽, 张煜隆, 林占熿. 巨菌草不同生长时期的内生固氮菌群组成分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(7): 1479-1490.
LIN BS, FAN JL, SONG ZZ, ZHANG LL, ZHANG YL, LIN ZX. Endophytic diazotrophs composition of *Pennisetum* sp. at different growth stages[J]. Microbiology China, 2018, 45(7): 1479-1490 (in Chinese).
- [46] 贾雨雷, 林标声, 廖真, 汪丽芳, 黄在兴, 宋昭昭, 梅兰, 林占熿. 典型生境巨菌草根内生固氮菌的群落多样性[J]. 微生物学报, 2020, 60(1): 148-160.
JIA YL, LIN BS, LIAO Z, WANG LF, HUANG ZX, SONG ZZ, MEI L, LIN ZX. Diversity of endophytic nitrogen-fixing bacteria community in the roots of *Pennisetum* sp. of typical habitats[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(1): 148-160 (in Chinese).
- [47] 蒲强, 谭志远, 彭桂香, 李永涛, 刘丽辉, 张海春, 曹禹. 根瘤菌分类的新进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 619-633.
PU Q, TAN ZY, PENG GX, LI YT, LIU LH, ZHANG HC, CAO Y. Advances in rhizobia taxonomy[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 619-633 (in Chinese).
- [48] Surhone LM, Tennoe MT, Henssonow SF. *Methylocystaceae*[M]. Methylocystaceae, 2011.
- [49] DONG M, YANG ZT, CHENG GY, PENG L, XU Q, XU JS. Diversity of the bacterial microbiome in the roots of four *Saccharum* species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 267.
- [50] LIN BS, LIU JM, ZHANG X, WENG CR, LIN ZX. The flora compositions of nitrogen-fixing bacteria and the differential expression of *nifH* gene in *Pennisetum giganteum* z.x.lin roots[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 5568845.
- [51] 沙桦欣, 伍建榕, 马焕成, 周利平, 王芳, 张东华. 接种根瘤菌对台湾相思生长和抗旱能力的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2013, 28(4): 517-522.
SHA HX, WU JR, MA HC, ZHOU LP, WANG F, ZHANG DH. Inoculation of rhizobia strains enhance the growth and drought tolerance of *Acacia confusa*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2013, 28(4): 517-522 (in Chinese).
- [52] 柳晓东. 骆驼刺中慢生根瘤菌 CCNWXJ12-2^T 盐胁迫转录组分析及与耐盐相关基因功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2016.
LIU XD. Transcriptome analysis of *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12-2^T under salt stress and functional study of genes related to salt tolerance[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2016 (in Chinese).
- [53] 蔡文杰. 慢生根瘤菌 ORS278 与水稻互作研究[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2018.
CAI WJ. The study of interaction between *Bradyrhizobium* sp. ORS278 and rice[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [54] GHOSH R, BARMAN S, MUKHERJEE R, MANDAL NC. Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India[J]. Microbiological Research, 2016, 183: 80-91.
- [55] 童帅. 水稻、小麦内生固氮菌固氮酶 *nifH* 基因多样性及其活性研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2020.
TONG S. Diversity and activity of nitrogenase *NifH* gene from endophytic diazotrophs in rice and wheat[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020 (in Chinese).
- [56] 孙科, 耿凤英, 于秋菊, 冯希勇. 牛蒡根内生固氮菌分离、鉴定及培养条件优化的研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(11): 133-137.
SUN K, GENG FY, YU QJ, FENG XY. Isolation, identification and culture condition optimization of endophytic nitrogen-fixing bacteria from burdock root[J].

- China Brewing, 2021, 40(11): 133-137 (in Chinese).
- [57] 吴红慧, 周俊初. 根瘤菌培养基的优化和剂型的比较研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 14-19.
WU HH, ZHOU JC. Medium optimization and inoculant type comparison of rhizobium[J]. Microbiology, 2004, 31(2): 14-19 (in Chinese).
- [58] 韩斌, 孔继君, 邹晓明, 巩合德. 生物固氮研究现状及展望[J]. 山西农业科学, 2009, 37(10): 86-89, 85.
HAN B, KONG JJ, ZOU XM, GONG HD. The evolvement and expectation of biological nitrogen fixation[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2009, 37(10): 86-89, 85 (in Chinese).
- [59] 曹树威, 余昌花, 罗鲜青, 魏莎, 蒋世强, 邓祝新, 王英群, 黄丽霞, 唐承明, 李美珍, 李芳芳, 王国利. 芽孢杆菌特性及其在畜牧生态养殖中应用研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(11): 77-85.
CAO SW, YU CH, LUO XQ, WEI S, JIANG SQ, DENG ZX, WANG YQ, HUANG LX, TANG CM, LI MZ, LI FF, WANG GL. Research progress on characteristics of *Bacillus* and its application in animal ecological breeding[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2021, 55(11): 77-85 (in Chinese).
- [60] GROSS H, LOPER JE. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp[J]. Natural Product Reports, 2009, 26(11): 1408-1446.
- [61] 池景良, 郝敏, 王志学, 李杨. 解磷微生物研究及应用进展[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 1-7.
CHI JL, HAO M, WANG ZX, LI Y. Advances in research and application of phosphorus-solubilizing microorganism[J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(1): 1-7 (in Chinese).
- [62] 狄义宁, 谢林艳, 谷书杰, 马豪, 刘鲁峰, 何丽莲, 李富生. 甘蔗及甘蔗近缘属内生菌的筛选、鉴定与功能研究[J]. 中国农业大学学报, 2021, 26(11): 70-83.
DI YN, XIE LY, GU SJ, MA H, LIU LF, HE LL, LI FS. Screening, identification and biological function study of endophytic bacteria isolated from sugarcane and its related Genera[J]. Journal of China Agricultural University, 2021, 26(11): 70-83 (in Chinese).
- [63] 黄哲鸿. 甘薯内生细菌的分离及鉴定[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2019.
HUANG ZH. Isolation and identification of endophytic bacteria from sweet potato[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2019 (in Chinese).
- [64] 陆蓝翔, 江明明, 王焱, 张岳峰, 张洪良, 叶建仁. 两株樟树促生抗病内生细菌的分离、筛选及鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2018, 42(6): 128-136.
LU LX, JIANG MM, WANG Y, ZHANG YF, ZHANG HL, YE JR. Isolation, screening and identification of endophytic bacteria from *Cinnamomum camphora* that promote growth and antagonistic pathogen[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2018, 42(6): 128-136 (in Chinese).
- [65] 朱梦卓, 孙洋洋, 赵晓妍, 董芮萌, 朱淼, 汪雅楠, 王兰兰, 于翠梅, 马莲菊. 野大豆内生假单胞菌 YDX26 的鉴定及促生抗逆特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4100-4110.
ZHU MZ, SUN YY, ZHAO XY, DONG RM, ZHU M, WANG YN, WANG LL, YU CM, MA LJ. Identification of endophytic *Pseudomonas* sp. YDX26 in *Glycine soja* and its growth-promoting and stress-resistant characteristics[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4100-4110 (in Chinese).
- [66] 韩蕾, 杨乐, 唐金铭, 张雅倩. 解磷菌发酵及溶磷条件的研究[J]. 生物技术通报, 2019, 35(1): 98-104.
HAN L, YANG L, TANG JM, ZHANG YQ. Fermentation condition and phosphate-dissolving capacity of phosphate-solubilizing bacterium[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(1): 98-104 (in Chinese).
- [67] 王志山, 黎妮, 王伟平, 刘洋. 水稻种子内生细菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(1): 236-246.
WANG ZS, LI N, WANG WP, LIU Y. Research progress in endophytic bacteria in rice seeds[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(1): 236-246 (in Chinese).
- [68] VERMA SK, KINGSLEY KL, BERGEN MS, KOWALSKI KP, WHITE JF. Fungal disease prevention in seedlings of rice (*Oryza sativa*) and other grasses by growth-promoting seed-associated endophytic bacteria from invasive *Phragmites australis*[J]. Microorganisms, 2018, 6(1): 21.
- [69] 黄雅丽, 赖安萍, 侯柚银, 张华峰, 刘希华. 红叶石楠耐铅内生细菌的分离及其 16S rDNA 鉴定[J]. 三明学院学报, 2020, 37(6): 24-29.
HUANG YL, LAI AP, HOU YY, ZHANG HF, LIU XH. Isolation and 16S rDNA identification of Pb-resistant endophytic bacteria isolated from *Photinia serrulata*[J]. Journal of Sanming University, 2020, 37(6): 24-29 (in Chinese).
- [70] 李文, 莫港澳, 孙欣, 王陶, 李同祥, 刘洵, 王祥庭. 不动杆菌 JL-1 降解磷的性能研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 311-315.
Li W, Mo GA, Sun X, Wang T, Li TX, Liu X, Wang YT. Study on characteristics of phosphate solubilization by *Acinetobacter indicus* JL-1[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(12): 311-315 (in Chinese).