

研究报告



基于可培养法分析亚热带植物内生与根际芽胞杆菌种类分布异质性

刘国红¹ 姚运法² 车建美¹ 陈倩倩¹ 刘波^{*1}¹ 福建省农业科学院农业生物资源研究所 福建 福州 350003² 福建省农业科学院亚热带农业研究所 福建 漳州 363005

摘要:【背景】芽胞杆菌是农业上重要的微生物菌剂,对植物具有促生、防病、防虫等作用。【目的】了解亚热带植物内生和根际芽胞杆菌的种群分布,为其功能挖掘提供科学依据。【方法】采用可培养手段对甘蔗(*Saccharum officinarum*)、红麻(*Hibiscus cannabinus* L.)、黄麻(*Corchorus capsularis* L.)、黄秋葵(*Abelmoschus esculentus*)和玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa*)根际土壤和根内生芽胞杆菌进行分离,利用 16S rRNA 基因测序对分离菌株进行分类鉴定,并分析系统发育地位。【结果】共获得了可培养芽胞杆菌菌株 144 株,其中根内生芽胞杆菌 82 株,根际土壤 62 株。经 16S rRNA 基因测序鉴定为芽胞杆菌 4 个属 37 个种,分别为芽胞杆菌属、短芽胞杆菌属、类芽胞杆菌属和赖氨酸芽胞杆菌属。芽胞杆菌菌落数量和种类在根部及其根际土壤中差异较大,根际土壤中芽胞杆菌菌落数量远远大于根部,根际土壤中芽胞杆菌菌落含量范围为 $(0.2-370.0) \times 10^5$ CFU/g,而根部为 $(0.1-81.0) \times 10^3$ CFU/g。根部分离获得的芽胞杆菌种类远大于根际土壤中,从作物根际土壤中共获得了芽胞杆菌 19 个种,从根部获得内生芽胞杆菌共 32 个种。阿氏芽胞杆菌(*Bacillus aryabhatai*)、仙草芽胞杆菌(*Bacillus mesonae*)和假蕈状芽胞杆菌(*Bacillus pseudomycoides*)同时存在于 4 种作物的根际土壤和根部,其他芽胞杆菌种类仅存在于 1 种作物的根际或者根部。【结论】亚热带作物根际土壤和根部芽胞杆菌种类和数量极为丰富,而且还存在可分离培养的芽胞杆菌潜在新物种,这为了解植物与根际微生物相互作用、根际环境生态平衡提供了理论基础和科学依据。

关键词: 芽胞杆菌, 根部和根际土壤, 种群分布, 亚热带经济作物

Distribution heterogeneity of *Bacillus*-like species in endophyte and rhizosphere of subtropical crops based on culturable methodLIU Guo-Hong¹ YAO Yun-Fa² CHE Jian-Mei¹ CHEN Qian-Qian¹ LIU Bo^{*1}¹ Agricultural Bio-resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China² Subtropical Agriculture Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005, China

Abstract: [Background] *Bacillus*-like species are important microbial inoculants in agriculture to

Foundation item: External Cooperative Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (DEC201821209)

***Corresponding author:** Tel: 86-591-87882571; E-mail: fzliubo@163.com

Received: 29-03-2020; **Accepted:** 06-08-2020; **Published online:** 11-08-2020

基金项目: 福建省农业科学院对外合作项目(DEC201821209)

***通信作者:** Tel: 0591-87882571; E-mail: fzliubo@163.com

收稿日期: 2020-03-29; **接受日期:** 2020-08-06; **网络首发日期:** 2020-08-11

promote plant growth, prevent disease and insect. **[Objective]** To study *Bacillus*-like species community of several subtropical plant endophyte and rhizosphere soil, providing scientific foundation for mining *Bacillus*-like species. **[Methods]** On the basis of the culturable method, *Bacillus*-like species were isolated from roots and rhizosphere soil samples of *Saccharum officinarum*, *Hibiscus cannabinus* L., *Corchorus capsularis* L., *Abelmoschus esculentus*, and *Hibiscus sabdariffa*. Then, the isolates were identified by 16S rRNA gene and phylogenetic tree was constructed to explore the relationship between isolates and their related type species. **[Results]** There were 144 isolates obtained, including 82 isolates of endophytic bacteria and 62 isolates of rhizosphere bacteria, which were identified as 37 species of 4 genera, including *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus*, and *Paenibacillus* through 16S rRNA gene sequencing. The dominant genus was *Bacillus*, and the second one was *Paenibacillus*. There was great difference of the species number and colonies content in the root and rhizosphere soil. The colonies content in the rhizosphere was greater than roots. The colonies content range of *Bacillus*-like species in rhizosphere was $(0.2-370.0) \times 10^5$ CFU/g, but $(0.1-81.0) \times 10^3$ CFU/g in the root. Species number in roots was much larger than rhizosphere, which 19 species were obtained from rhizosphere and 32 were from roots. *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus mesonae* and *Bacillus pseudomycoides* were both distributed in the 4 crop's roots and rhizosphere, other species only occurred in the one crop's roots or rhizosphere. **[Conclusion]** There were rich *Bacillus*-like species number and abundant content in the crop's rhizosphere and roots, and several culturable potential novel *Bacillus* species, providing the theoretical base and scientific foundation for interaction of plant-microbe and ecological balance of rhizosphere environment.

Keywords: *Bacillus*-like species, Root and rhizosphere soil, Species distribution, Subtropical economic crops

随着植物与微生物相互作用研究已逐步成为国内外研究热点,大量研究结果表明内生和根际细菌结构对植物生长起着重要作用,如产生生长素吲哚-3-乙酸(indol-3-acetic acid, IAA)^[1]、防治病害^[2-3]、提高耐盐性^[4]、促进生长代谢^[5]及改善根际环境微生物生态平衡^[6]等。此外,细菌群落结构多样性因作物种类^[7]、耕作方式^[8]、土壤 pH^[9]不同而异。不同作物根际土壤细菌结构有着显著差异,不同科作物套种有利于提高根际细菌多样性,改良根际土壤微环境^[7]。因此,研究植物根际和内生细菌多样性对阐明这些细菌功能及挖掘利用具有非常重要的意义。

植物内生菌(endophytic bacteria)指生活史中某一阶段生活在植物组织内,对植物未引起明显病害症状的一类微生物,包含细菌、真菌与放线菌等^[10]。由于植物内生菌与其“协同进化”关系,决定了某些内生菌具有产生与宿主植物相同或相似生物活性物质的能力。植物内生菌能调节土壤微生物区系,影响土壤微生物种类及数量、生物量、酶活性等。土壤微生物是自然环境中最主要

的分解者,土壤中物种和能量转化主要依赖微生物,根际土壤微生物种群结构多样性越来越受到广泛的关注。

已报道的植物内生菌及根际土壤细菌种类以芽胞杆菌属、类芽胞杆菌属、假单胞菌属、固氮菌属等为主^[11-14]。近年来,大多数研究集中在作物根际或者内生菌,而关于纤维作物根际和根内生芽胞杆菌种群分布特征的报道甚少。甘蔗、红麻、黄麻、黄秋葵和玫瑰茄都是重要的经济作物,从组成成分来看,它们都属于纤维类作物。因此,本文通过对5种纤维作物根际土壤和根内生芽胞杆菌的分离鉴定,研究根际土壤和根内生芽胞杆菌的系统发育,探讨芽胞杆菌种群分布特征与宿主的相关性,为植物和细菌的相互作用研究提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样采集

2015年1月,从福建省漳州市采集了5种亚热带经济作物甘蔗、红麻、黄麻、黄秋葵和玫瑰茄

的根际土壤和根部样本。轻轻除去作物表层覆盖物后,挖取根部,抖落根周围的土壤作为根际土壤样本。样本采集完后装入无菌袋带回实验室,放于4℃冰箱保藏备用。

1.1.2 主要试剂和仪器

2×PCR Master Mix、引物,铂尚生物技术(上海)有限公司。LB培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,氯化钠 5.0,琼脂 15.0, pH 7.2。PCR仪和凝胶成像分析仪, Bio-Rad 公司;恒温培养箱,施都凯仪器设备(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 芽胞杆菌的分离、纯化与保存

根部芽胞杆菌的分离:称取根1g放入75%酒精里浸泡30s,接着用10%次氯酸钠浸泡5min,用无菌水漂洗样品3次后转入灭过菌的干净研钵中研磨,并配成 10^{-1} 浓度的悬浊液。将稀释成 10^{-1} 浓度的样品放置到80℃的水浴中加热10min,杀死其他细菌。吸取1mL土壤原液至装有9mL无菌水的试管,即配成 10^{-2} 浓度,依次稀释配置成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 浓度。最后一次的无菌水清洗液作为对照涂布于LB平板,置于30℃恒温培养箱培养2d,确定根的表面是否消毒彻底。

根际土壤芽胞杆菌的分离:土壤中芽胞杆菌的分离参考刘国红等^[15]描述的方法,将10g土壤与90mL无菌水振荡20min混匀,80℃水浴15min,依次稀释涂布LB培养基,30℃培养2d后进行观察并拍照记录菌株的菌落大小、形状、颜色、光泽、透明度、湿润度、边缘等特征。根据菌落特征挑取单菌落,采用连续划线法进行纯化,获得的单菌落采用20%甘油冷冻法保藏于-80℃超低温冰箱。

1.2.2 DNA提取及16S rRNA基因的PCR扩增

芽胞杆菌基因组DNA的提取主要是采用苯酚-氯仿法进行提取,具体参考文献^[16]描述的方法。采用细菌16S rRNA基因通用引物27F(5'-AGAGTTTGA TCMTGGCTCAG-3')和1492R'(5'-TACGGYTACCT TGTTACGACTT-3')对分离菌株DNA进行16S

rRNA基因的PCR扩增。PCR反应体系参考刘国红等^[15]描述的方法。PCR反应条件:95℃5min;95℃30s,55℃45s,72℃1.5min,35个循环;72℃10min。PCR产物以1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,检测有条带的菌株PCR产物送至铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序。测定的序列提交至NCBI的GenBank数据库并获得序列号(表1)。

1.2.3 基于16S rRNA基因序列的系统发育树构建

将芽胞杆菌菌株的16S rRNA基因序列上传至EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)^[17]和NCBI数据库,与已知模式菌株的16S rRNA基因序列进行比对,初步判断分离菌株的分类地位。利用MEGA 7.0软件构建系统发育进化树^[18],采用Neighbor-Joining方法推断进化史^[19],进行1000次重复验证^[20],进化距离借助p-distance法进行计算^[21]。

1.2.4 芽胞杆菌菌落结构多样性分析

将两种菌之间的16S rRNA基因序列相似性98.65%作为种的界定阈值。通过Primer 5.0软件,采用Shannon多样性指数和均匀度指数进行芽胞杆菌多样性分析比较。

2 结果与分析

2.1 芽胞杆菌的分离及菌落含量

从5种作物根部和根际土壤共分离获得芽胞杆菌144株,其中根际土壤62株,内生芽胞杆菌82株。根际土壤中芽胞杆菌菌落含量范围(0.2–370.0)× 10^5 CFU/g,根部内生菌落含量为(0.1–81.0)× 10^3 CFU/g。其中,根际土壤菌落含量与其根内生菌含量差异较大的为黄秋葵,两者相差2000多倍,主要由于火山灰类芽胞杆菌(*Paenibacillus cineris*)的含量(3.7×10^7 CFU/g)导致。甘蔗的根际与其根内生菌含量相近,两者相差约4倍,其余3种作物相差约100–200倍。

2.2 芽胞杆菌的鉴定与系统发育分析

对菌落形态特征进行合并,选取95株菌进行16S rRNA基因序列测定。由表1可知,10株分离芽胞杆菌与已知模式菌株的相似性低于原核生物

表 1 基于 16S rRNA 基因序列的芽胞杆菌鉴定

 Table 1 Identification of *Bacillus*-like species based on 16S rRNA gene sequence analysis

菌株编号 Strain No.	作物 Crop	来源 Source	最近匹配 Closest match	菌落含量 Colonies content ($\times 10^5$ CFU/g)	序列号 Accession No.	相似度 Similarity (%)
FJAT-29801	甘蔗	根	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	0.110	MF948299	100
FJAT-29789	<i>Saccharum</i>	Root	<i>Bacillus bataviensis</i> LMG 21833 ^T	0.010	MF948291	99.1
FJAT-29786	<i>officinarum</i>		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	0.020	MF948290	100
FJAT-29799			<i>Bacillus drentensis</i> LMG 21831 ^T	0.100	MF948297	99.1
FJAT-29796			<i>Bacillus mesonae</i> FJAT-13985 ^T	0.010	MF948296	99.9
FJAT-29790			<i>Bacillus mesophilum</i> IITR-54 ^T	0.130	MF948292	98.2
FJAT-29791			<i>Bacillus mesophilum</i> IITR-54 ^T	0.060	MF948293	97.9
FJAT-29792			<i>Bacillus panacisoli</i> CJ32 ^T	0.090	MF948294	97.7
FJAT-29794			<i>Bacillus safensis</i> FO-36b ^T	0.080	MF948295	99.9
FJAT-29800			<i>Paenibacillus woosongensis</i> YB-45 ^T	0.810	MF948298	95.9
FJAT-29886	甘蔗	根际土壤	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	0.500	MF948346	100
FJAT-29883	<i>Saccharum</i>	Rhizosphere	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	0.200	MF948343	100
FJAT-29890	<i>officinarum</i>	soil	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	0.500	MF948349	100
FJAT-29897			<i>Bacillus drentensis</i> LMG 21831 ^T	1.200	MF948353	99.1
FJAT-29884			<i>Bacillus mesonae</i> FJAT-13985 ^T	0.500	MF948344	100
FJAT-29885			<i>Bacillus pseudomycolides</i> DSM 12442 ^T	0.200	MF948345	99.9
FJAT-29894			<i>Bacillus safensis</i> FO-36b ^T	2.000	MF948351	99.6
FJAT-29887			<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 ^T	0.200	MF948347	99.9
FJAT-29896			<i>Brevibacillus brevis</i> NBRC 15304 ^T	1.000	MF948352	99.7
FJAT-29889			<i>Bacillus frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T	0.300	MF948348	99.7
FJAT-29893			<i>Paenibacillus pocheonensis</i> Gsoil 1138 ^T	1.000	MF948350	98.8
FJAT-29812	红麻	根	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	0.130	MF948306	100
FJAT-29808	<i>Hibiscus</i>	Root	<i>Bacillus bataviensis</i> LMG 21833 ^T	0.001	MF948304	99.3
FJAT-29802	<i>cannabinus</i> L.		<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11 ^T	0.001	MF948300	99.7
FJAT-29805			<i>Bacillus mesonae</i> FJAT-13985 ^T	0.005	MF948302	100
FJAT-29814			<i>Bacillus mesonae</i> FJAT-13985 ^T	0.010	MF948308	98.5
FJAT-29804			<i>Bacillus pseudomycolides</i> DSM 12442 ^T	0.005	MF948301	100
FJAT-29809			<i>Bacillus bataviensis</i> NBRC 15720 ^T	0.001	MF948305	95.8
FJAT-29816			<i>Bacillus timonensis</i> MM10403188 ^T	0.030	MF948309	98.8
FJAT-29813			<i>Brevibacillus brevis</i> NBRC 15304 ^T	0.110	MF948307	99.7
FJAT-29806			<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i> M-GX18 ^T	0.004	MF948303	99.6
FJAT-29911	红麻	根际土壤	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	21.000	MF948360	100
FJAT-29907	<i>Hibiscus</i>	Rhizosphere	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	2.000	MF948358	100
FJAT-29906	<i>cannabinus</i> L.	soil	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	1.100	MF948357	99.9
FJAT-29905			<i>Bacillus panacisoli</i> CJ32 ^T	8.000	MF948356	97.8
FJAT-29898			<i>Bacillus pseudomycolides</i> DSM 12442 ^T	2.000	MF948354	100
FJAT-29901			<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9 ^T	16.000	MF948355	99.9
FJAT-29910			<i>Paenibacillus pabuli</i> JCM 9074 ^T	13.000	MF948359	99.4
FJAT-29833	黄麻	根	<i>Bacillus acidicer</i> CBD 119 ^T	0.020	MF948315	99.9
FJAT-29835	<i>Corchorus</i>	Root	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	0.020	MF948317	99.9
FJAT-29838	<i>capsularis</i> L.		<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	0.110	MF948319	99.9
FJAT-29845			<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	0.100	MF948321	99.9
FJAT-29832			<i>Bacillus drentensis</i> LMG 21831 ^T	0.010	MF948314	99.3
FJAT-29842			<i>Bacillus kochii</i> WCC 4582 ^T	0.010	MF948320	100
FJAT-29836			<i>Bacillus mesonae</i> FJAT-13985 ^T	0.010	MF948318	99.9

(待续)

(续表 1)

FJAT-29830			<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205 ^T	0.001	MF948312	99.4
FJAT-29822			<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442 ^T	0.004	MF948310	100
FJAT-29831			<i>Bacillus bataviensis</i> NBRC 15720 ^T	0.010	MF948313	99.6
FJAT-29834			<i>Bacillus timonensis</i> MM10403188 ^T	0.010	MF948316	99.1
FJAT-29829			<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9 ^T	0.003	MF948311	100
FJAT-29927	黄麻	根际土壤	<i>Bacillus acidicer</i> CBD 119 ^T	3.000	MF948367	99.0
FJAT-29918	<i>Corchorus</i>	Rhizosphere	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	8.000	MF948364	99.9
FJAT-29914	<i>capsularis</i> L.	soil	<i>Bacillus drentensis</i> LMG 21831 ^T	2.000	MF948362	99.6
FJAT-29917			<i>Bacillus mesonae</i> FJAT-13985 ^T	1.000	MF948363	99.9
FJAT-29921			<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442 ^T	2.000	MF948365	99.7
FJAT-29913			<i>Bacillus frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T	2.000	MF948361	99.7
FJAT-29924			<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9 ^T	4.000	MF948366	100
FJAT-29850	黄秋葵	根 Root	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	0.002	MF948325	99.6
FJAT-29846	<i>Abelmoschus</i>		<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	0.002	MF948322	100
FJAT-29855	<i>esculentus</i>		<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	0.011	MF948329	99.9
FJAT-29847			<i>Bacillus mesonae</i> FJAT-13985 ^T	0.001	MF948323	99.9
FJAT-29848			<i>Bacillus muralis</i> LMG 20238 ^T	0.001	MF948324	95.3
FJAT-29854			<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442 ^T	0.010	MF948328	98.9
FJAT-29852			<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 ^T	0.001	MF948326	99.93
FJAT-29853			<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9 ^T	0.010	MF948327	100
FJAT-29859			<i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439 ^T	0.100	MF948331	99.9
FJAT-29857			<i>Paenibacillus taichungensis</i> BCRC 17757 ^T	0.010	MF948330	98.3
FJAT-29930	黄秋葵	根际土壤	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	19.000	MF948369	100
FJAT-29933	<i>Abelmoschus</i>	Rhizosphere	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	2.000	MF948372	100
FJAT-29932	<i>esculentus</i>	soil	<i>Bacillus bataviensis</i> LMG 21833 ^T	2.000	MF948371	99.5
FJAT-29929			<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	2.000	MF948368	100
FJAT-29934			<i>Bacillus mesonae</i> FJAT-13985 ^T	2.000	MF948373	99.9
FJAT-29937			<i>Bacillus mesophilum</i> IITR-54 ^T	2.000	MF948375	98.2
FJAT-29938			<i>Bacillus velezensis</i> CR-502 ^T	10.000	MF948376	99.1
FJAT-29936			<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442 ^T	1.000	MF948374	98.9
FJAT-29939			<i>Brevibacillus brevis</i> NBRC 15304 ^T	370.000	MF948377	99.7
FJAT-29931			<i>Bacillus frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T	1.000	MF948370	99.57
FJAT-29867	玫瑰茄	根 Root	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	0.003	MF948337	100
FJAT-29866	<i>Hibiscus</i>		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	0.003	MF948336	99.9
FJAT-29881	<i>sabdariffa</i>		<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	0.120	MF948341	100
FJAT-29868			<i>Bacillus drentensis</i> LMG 21831 ^T	0.003	MF948338	99.1
FJAT-29880			<i>Bacillus mesonae</i> FJAT-13985 ^T	0.010	MF948340	100
FJAT-29872			<i>Bacillus oleronius</i> DSM 9356 ^T	0.001	MF948339	99.5
FJAT-29860			<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442 ^T	0.002	MF948332	100
FJAT-29865			<i>Bacillus sporothermodurans</i> M215 ^T	0.001	MF948335	98.7
FJAT-29861			<i>Bacillus frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T	0.001	MF948333	100
FJAT-29863			<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9 ^T	0.008	MF948334	99.9
FJAT-29882			<i>Paenibacillus pabuli</i> JCM 9074 ^T	0.120	MF948342	98.6
FJAT-29941	玫瑰茄	根际土壤	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 ^T	0.400	MF948378	98.9
FJAT-29950	<i>Hibiscus</i>	Rhizosphere	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	5.000	MF948382	100
FJAT-29949	<i>sabdariffa</i>	soil	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	1.000	MF948381	99.9
FJAT-29947			<i>Bacillus mesonae</i> FJAT-13985 ^T	4.000	MF948380	100
FJAT-29944			<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442 ^T	2.000	MF948379	100
FJAT-29953			<i>Bacillus vireti</i> LMG 21834 ^T	12.000	MF948383	98.3
FJAT-29955			<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9 ^T	1.000	MF948384	100

基因种定义的阈值, 分别是 FJAT-29814、FJAT-29791、FJAT-29937、FJAT-29792、FJAT-29905、FJAT-29848、FJAT-29809、FJAT-29953、FJAT-29800 和 FJAT-29857。

基于 16S rRNA 基因构建系统发育树, 见图 1。95 株芽胞杆菌分为 4 个类群: 芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、短芽胞杆菌属 (*Brevibacillus*)、赖氨酸芽胞杆菌属 (*Lysinibacillus*) 和类芽胞杆菌属 (*Paenibacillus*)。芽胞杆菌属为优势属, 其次为类芽胞杆菌属, 其余依次为赖氨酸芽胞杆菌属、短芽胞杆菌属。潜在新种 FJAT-29814、FJAT-29953、FJAT-29937、FJAT-29791 和 FJAT-29809 与其相近的芽胞杆菌种类模式菌株聚为一大类, 潜在新种 FJAT-29792 和 FJAT-29905 聚为另一个分支, 以上皆归为芽胞杆菌属。潜在新种 FJAT-29800 和 FJAT-29857 与其相近的类芽胞杆菌菌株聚为一大分支。其中, 潜在新种 FJAT-29814 与其最相近模式菌株 *Bacillus mesonae* FJAT-13985^T 的 16S rRNA 基因相似性为 98.5%, FJAT-29791 与其最近模式菌株 *Bacillus mesophilum* IITR-54^T 为 97.9%, FJAT-29937 与其模式菌株 *B. mesophilum* IITR-54^T 为 98.2%, FJAT-29792 与其最相近模式菌株 *Bacillus panacisoli* CJ32^T 为 97.7%, FJAT-29905 与 *B. panacisoli* CJ32^T 为 97.8%, FJAT-29848 与相近模式菌株 *Bacillus muralis* LMG 20238^T 为 95.3%, FJAT-29809 与 *Bacillus bataviensis* NBRC 15720^T 为 95.8%、FJAT-29953 与 *Bacillus vireti* LMG 21834^T 为 98.3%, FJAT-29800 与相近模式菌株 *Paenibacillus woosongensis* YB-45^T 为 95.8%, FJAT-29857 与 *Paenibacillus taichungensis* BCRC 17757^T 为 98.3%。通过 DSMZ 的 Phylogeny Server 在线比对分析, 发现潜在新种 FJAT-29937 和 FJAT-29791 的 16S rRNA 基因相似性为 99.9%, 高于种的定义阈值, 应为同一种; FJAT-29792 和 FJAT-29905 的相似性为 97.6%, 应为两个不同的潜在新种。

因此, 95 株菌经 16S rRNA 基因测序鉴定为芽

胞杆菌 4 个属 37 个种, 分别为芽胞杆菌属、短芽胞杆菌属、类芽胞杆菌属和赖氨酸芽胞杆菌属。其中芽胞杆菌属含 29 个种、短芽胞杆菌属 1 个种、类芽胞杆菌属 5 个种、赖氨酸芽胞杆菌属 2 个种, 包含潜在新种 9 个(表 1)。

2.3 根际土壤芽胞杆菌种群分布特征

5 种作物根际土壤中芽胞杆菌菌落总含量范围 (7.6–409.0)×10⁵ CFU/g, 甘蔗根际土壤中的芽胞杆菌含量最少, 而黄秋葵根际土壤中的含量最高, 达 409×10⁵ CFU/g。

从作物根际土壤中共获得了芽胞杆菌的 20 个种, 分属于芽胞杆菌属(16 个种)、短芽胞杆菌属(1 个种)、类芽胞杆菌属(2 个种)和赖氨酸芽胞杆菌属(1 个种), 包含芽胞杆菌属潜在新种 2 个(FJAT-29905 和 FJAT-29953)。

芽胞杆菌在根际土壤中的分布见图 2。由图 2 可知, 阿氏芽胞杆菌(*Bacillus aryabhattai*)和假蕈状芽胞杆菌(*Bacillus pseudomycolides*)同时分布在 5 种作物根际土壤中, 为广分布型种类。仙草芽胞杆菌(*Bacillus mesonae*)和蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)分布在 4 种作物根际土壤, 高地芽胞杆菌(*Bacillus altitudinis*)、耐寒芽胞杆菌(*Bacillus frigoritolerans*)和解木糖赖氨酸芽胞杆菌(*Lysinibacillus xylanilyticus*)分布在 3 种作物根际土壤, 为中分布型种类。其余芽胞杆菌基本仅在一种作物根际土壤分离获得, 为窄分布型种类。

2.4 根内生芽胞杆菌的种群结构

芽胞杆菌种类菌落含量范围为 (0.27–1.42)×10⁵ CFU/g, 其中甘蔗根内生芽胞杆菌菌落总量为 1.42×10⁵ CFU/g, 含量最高, 远大于其他 4 种作物根部的芽胞杆菌含量, 其余 4 种作物根内的含量为 (0.15–0.31)×10⁵ CFU/g。

从根部获得内生芽胞杆菌共 30 个种, 其中芽胞杆菌属 23 个种、短芽胞杆菌属 1 个种、类芽胞杆菌属 4 个种、赖氨酸芽胞杆菌属 2 个种, 包含潜在新种 6 个。

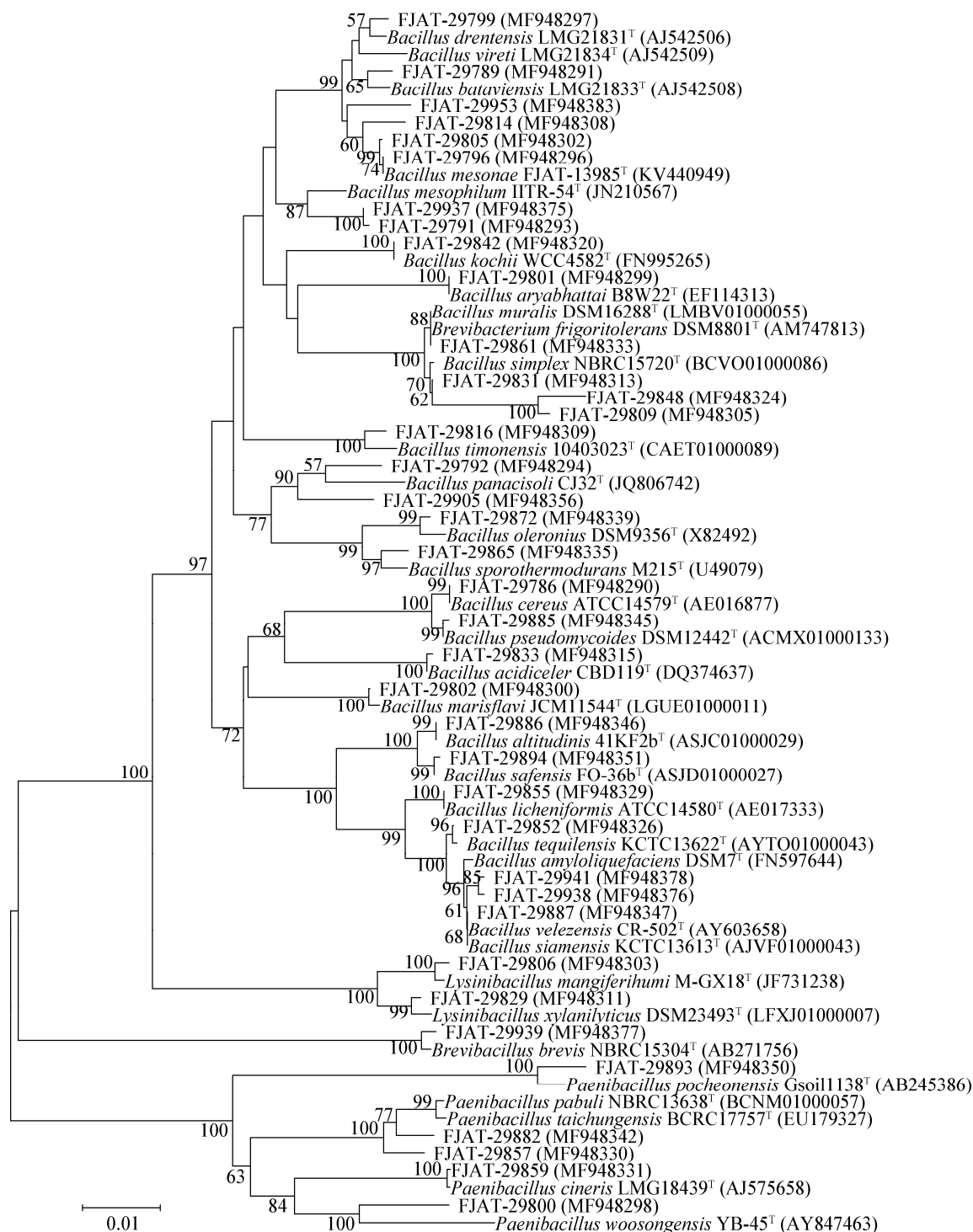


图 1 基于 16S rRNA 基因序列的作物根际及根部芽胞杆菌系统发育分析

Figure 1 The phylogenetic analysis of *Bacillus*-like species isolated from crops endophytes and rhizosphere soil based on 16S rRNA gene sequence

注：分支上的数字为 Bootstrap 值，表示构建系统进化树时计算 1 000 次时形成该节点的百分比，只显示大于 50% 的值；括号内数字为 GenBank 登录号；标尺 0.01 代表 1% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异。

Note: The bootstrap values (%) presented at the branches were calculated from 1 000 replications, only showing bootstrap value higher than 50%; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar 0.01 represents 10 nucleotide substitutions per 1 000 nucleotides.

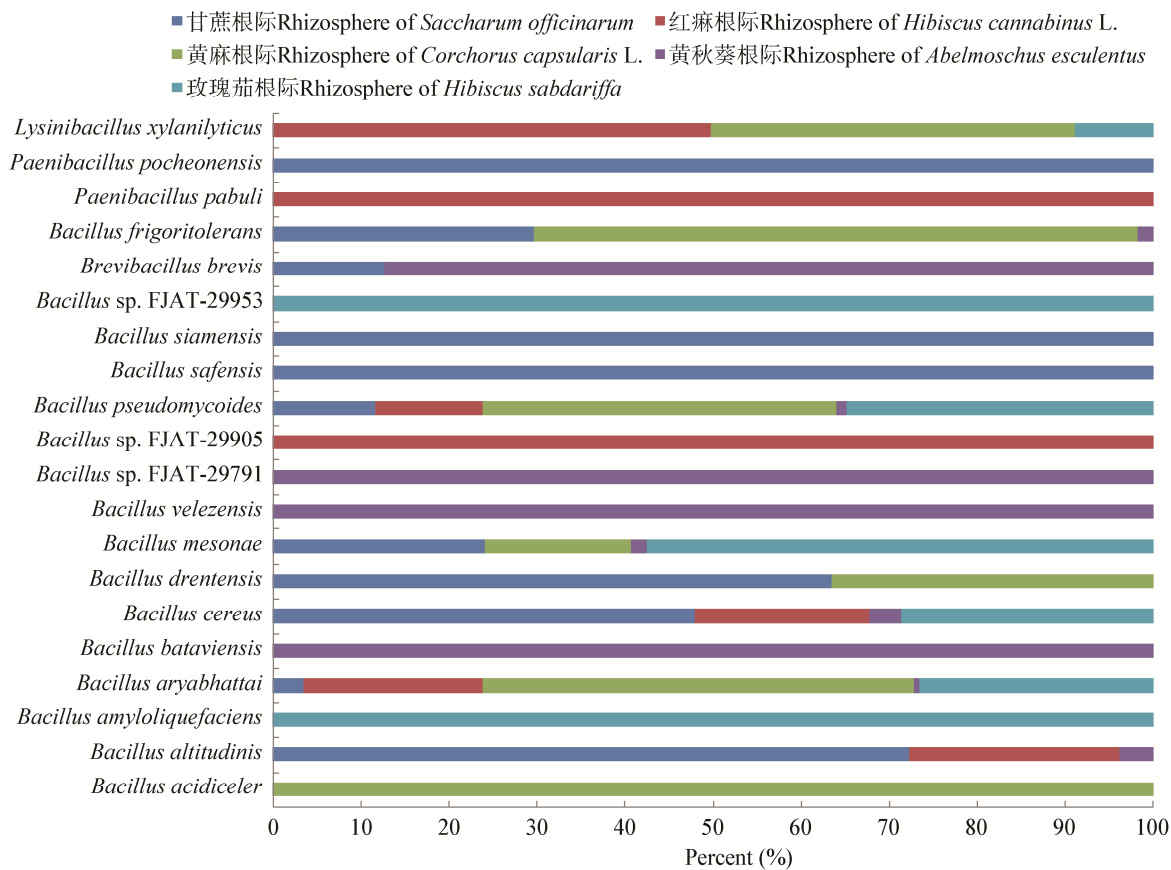


图 2 5 种作物根际土壤芽胞杆菌分布特征
Figure 2 The distribution characteristics of *Bacillus*-like species in the rhizosphere soils of five crops

由图 3 可知, 仙草芽胞杆菌同时分布在 5 种作物根内部, 为广分布型内生种类。高地芽胞杆菌、阿氏芽胞杆菌、蜡状芽胞杆菌、蕈状芽胞杆菌和假蕈状芽胞杆菌分布在 4 种作物根内, 解木糖赖氨酸芽胞杆菌和钻特省芽胞杆菌(*Bacillus drementensis*)分布在 3 种作物根内, 为中分布广型种类。其余种类分布在 1-2 种作物根内, 为窄分布型芽胞杆菌。

2.5 作物根际和根内生芽胞杆菌种类分布比较

芽胞杆菌菌落数量和种类在根部及其根际土壤中的差异较大, 根际土壤中的芽胞杆菌菌落数量远远大于根部, 但根部分离获得种类远大于根际土壤。

芽胞杆菌种类在根部及其根际土壤分布不均匀。阿氏芽胞杆菌和仙草芽胞杆菌皆存在于甘

蔗、黄麻、黄秋葵和玫瑰茄的根际土壤及其根内, 假蕈状芽胞杆菌在除甘蔗之外的 4 种作物的根际土壤和根内均有分布。在甘蔗根未获得内生的假蕈状芽胞杆菌, 在红麻根部未发现阿氏芽胞杆菌, 在红麻根际土壤未获得仙草芽胞杆菌。高地芽胞杆菌同时存在于红麻根际土壤和根部, 解木糖赖氨酸芽胞杆菌同时存在于黄麻和玫瑰茄的根际土壤及其根部, 钻特省芽胞杆菌同时存在于甘蔗和黄麻的根部及其根际土壤中。其他 30 种芽胞杆菌仅存在于 1 种作物的根际土壤或者根部。

从表 2 的多样性指数统计分析可以发现, 甘蔗根际土壤中的 Shannon 指数最高, 达 2.128 3, 甘蔗、红麻和玫瑰茄根际土壤的多样性指数 H' 大于其根部, 而黄麻和黄秋葵则与之相反。均匀度指数的大小与 Shannon 指数相反。

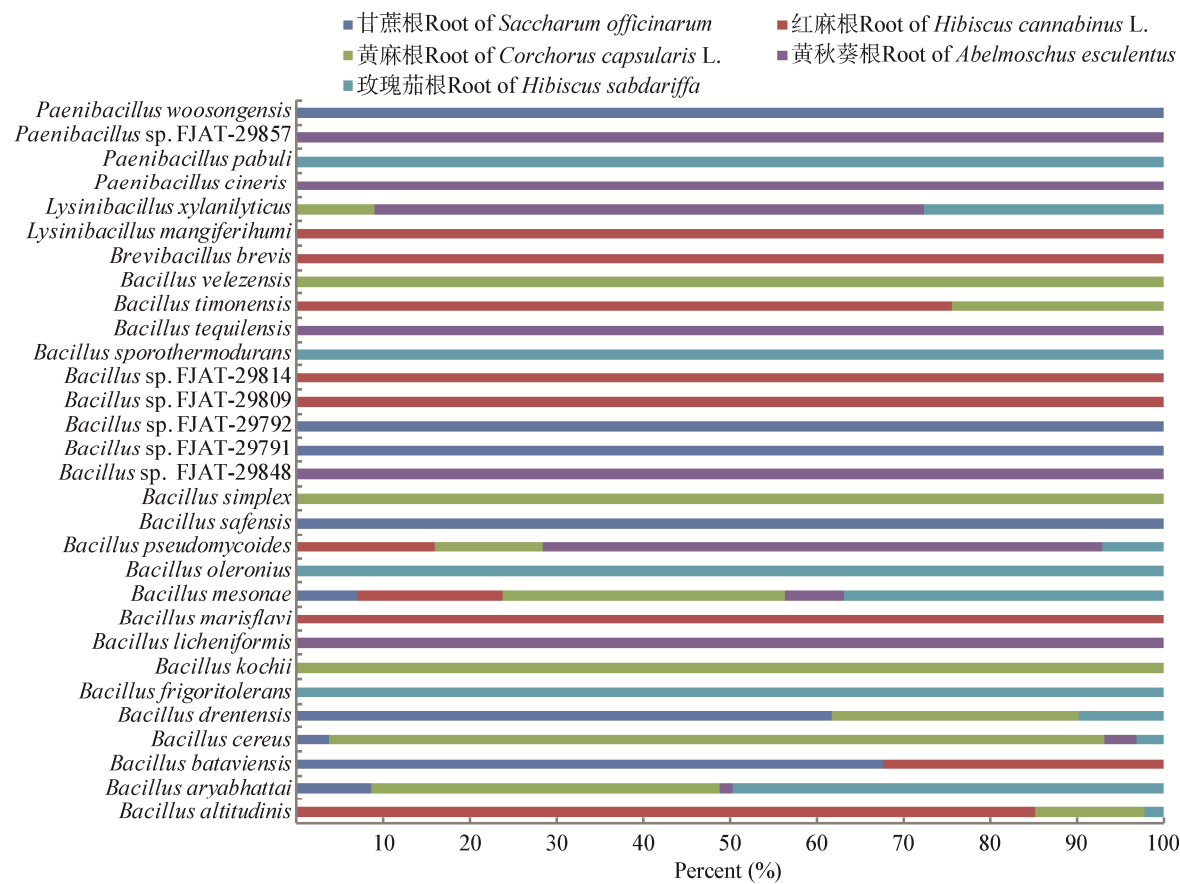


图 3 5 种作物根内生芽胞杆菌分布特征
Figure 3 The distribution characteristics of endophytic *Bacillus*-like species in the root of five crops

表 2 作物根际土壤和根部芽胞杆菌多样性指数
Table 2 Diversity index of *Bacillus*-like species in the crops roots and endophytes

作物 Crop	来源 Source	J'	H'
甘蔗	根际土壤 Rhizosphere soil	0.887 6	2.128 3
<i>Saccharum officinarum</i>	根 Root	0.662 1	1.524 5
红麻	根际土壤 Rhizosphere soil	0.885 4	1.722 9
<i>Hibiscus cannabinus</i> L.	根 Root	0.576 9	1.328 3
黄麻	根际土壤 Rhizosphere soil	0.896 2	1.743 9
<i>Corchorus capsularis</i> L.	根 Root	0.710 1	1.764 6
黄秋葵	根际土壤 Rhizosphere soil	0.211 1	0.485 9
<i>Abelmoschus esculentus</i>	根 Root	0.530 7	1.221 9
玫瑰茄	根际土壤 Rhizosphere soil	0.763 4	1.485 5
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	根 Root	0.498 1	1.194 3

注: J' : 均匀度指数; H' : 香农-威纳指数.
Note: J' : Pielou's evenness index; H' : Shannon-Wiener index.

3 讨论

细菌多样性对揭示细菌种群结构功能及其与生存环境的相关性至关重要, 植物根际细菌多样性与其受外界环境变化的压力相关。目前, 已对小麦^[22]、仙草^[15]、马铃薯^[23]等多种经济作物根际或内生菌多样性进行了报道, 尽管甘蔗、红麻、黄麻、黄秋葵和玫瑰茄根是农业上重要的经济作物, 但尚未见以上 5 种作物根际土壤或者根内生菌多样性的研究报道。仅王丽等^[24]进行了甘蔗茎部内生细菌的分离, 但从中未获得芽胞杆菌。不同培养基获得的细菌种类不同。基于可培养方法, 利用 LB 培养基, 本文从甘蔗、红麻、黄麻、黄秋葵和玫瑰茄根际土壤和根部获得了可培养芽胞杆菌 144 株, 根际土壤的芽胞杆菌菌落含量远远大于根部, 这与前人研究结果^[13]一致。这可能是由于大多数植物内生菌来源于土壤^[25-26], 土壤中含有植物根分泌的丰富碳源, 这些碳源可被细菌生长利用^[27]。前人研究已证明根际细菌群落丰富度高于其内生菌^[28]。本研究表明, 甘蔗、红麻和玫瑰茄根际土壤的多样性指数 H' 大于其根部, 与已报道研究结果^[13,28]一致, 但是黄麻和黄秋葵则与之相反, 具体原因需要进一步实验验证, 这也说明植物与根际微生物相互作用关系错综复杂。

16S rRNA 基因是原核生物分类地位判断的黄金指标之一, 当两株菌之间 16S rRNA 基因序列相似性低于 98.65% 时, 可认为是两种不同的种^[29]。通过 16S rRNA 基因序列鉴定, 本研究从 5 种作物甘蔗、红麻、黄麻、黄秋葵和玫瑰茄根际土壤和根部分离获得了可培养芽胞杆菌资源的 4 个属 37 个种, 芽胞杆菌属为优势属, 其次为类芽胞杆菌属; 此外还发现了 9 个潜在新种。众所周知, 芽胞杆菌属和类芽胞杆菌属是农业生态系统中普遍存在的优势种群和功能菌, 能进行固氮、分泌植物激素、抑制病原菌等^[30-32], 从而促进植物生长, 提高作物产量。阿氏芽胞杆菌、仙草芽胞杆菌和假草状芽胞杆菌分布于 5 种作物根际或根部, 为广分布型种类。阿氏芽胞杆菌是土壤中常见种群,

几乎在所有土壤中均有分布^[33-34]。仙草芽胞杆菌是 5 种作物的优势种, 该种由本实验室发现鉴定并发表^[35], 其来源于仙草根部的内生菌。本研究从 5 种作物均获得了仙草芽胞杆菌, 说明该种芽胞杆菌可能是一种植物内生或根际常见种。5 种作物根际和根部含有丰富的芽胞杆菌资源, 本研究发现部分作物根部内生菌种类数量大于根际, 这可能与选择的分离方法和培养基等有关。张瑞杰等^[36]采用 3 种培养基分析香蒲根内生细菌多样性, 发现获得的细菌种群和功能菌株具有一定的差异。符运会等^[37]采用琼脂和明胶两种不同凝固剂, 分析发现获得的细菌种类具有明显差异。本文利用 LB 琼脂培养基基于可培养方法进行分析, 由于稀有种类含量较低, 而且根际优势种类也可能对某些稀有种的生长具有抑制作用, 从而导致根际获得的种类偏少, 具体原因需要进一步研究验证。

植物内生菌是高效功能生防菌资源的重要来源, 其内生菌生防菌能有效地抑制植物病原菌, 促进植物生长。九里香内生菌枯草芽胞杆菌对芒果采后病害具有一定的防治作用^[38], 油菜根内生芽胞杆菌可防治十字花科作物根肿病^[39], 块根块茎类作物根茎中含有大量内生固氮的芽胞杆菌 (*Bacillus*、*Domibacillus* 和 *Fictibacillus*)^[12]。何斐等^[11]确定健康魔芋根表土壤优势菌为放射性根瘤菌 (*Rhizobium radiobacter*) 和苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*), 并具有一定的促生、抗魔芋软腐病能力。何姣等^[40]从苹果枝条获得有效抑制苹果树腐烂病菌的内生菌解淀粉芽胞杆菌 longA。本研究获得的分离菌株 FJAT-29941 具有高效降解纤维素的能力^[41], 其他菌株的功能特性有待进一步研究。

作物根际与其组织根茎叶作为一类特殊环境, 蕴藏着丰富的芽胞杆菌新资源, 如 *Bacillus oryzicola* sp. nov. 分离自水稻根部^[42], *Bacillus capparidis* sp. nov. 分离于刺山柑根部^[43]。本文获得了 9 个芽胞杆菌潜在新种, 这些分离菌株与其最相

近模式菌株的 16S rRNA 基因相似性低于细菌基因种的定义阈值, 具体分类地位需要进一步的多相分类手段进行验证^[44-45]。其中, 7 个新种为根内生芽胞杆菌潜在新种, 内生菌具有与其宿主相似的生物学特性, 本文的 5 种作物均富含纤维成分, 玫瑰茄和黄秋葵属于中药材, 从这些作物分离的潜在芽胞杆菌新种可能具有与其宿主相似的功能特性, 即可能具有生物活性或者降解纤维素的能力。

4 结论

基于可培养方法, 本文研究了 5 种热带经济作物根际和根部可培养芽胞杆菌资源多样性, 结果表明根际土壤芽胞杆菌含量远远高于根内生菌。经 16S rRNA 基因序列鉴定, 分离菌株隶属于芽胞杆菌 4 个属。其中, 阿氏芽胞杆菌、仙草芽胞杆菌和假草芽胞杆菌几乎存在于 5 种经济作物的根际和根部, 这为了解植物与根际细菌作用和功能菌剂研发提供了一定支撑。

REFERENCES

- [1] Etesami H, Alikhani HA, Hosseini HM. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents[J]. *MethodsX*, 2015, 2: 72-78
- [2] Liu YP, Zhang N, Qiu MH, et al. Enhanced rhizosphere colonization of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by pathogen infection[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 353(1): 49-56
- [3] Chen SF, Zhang MS, Wang JY, et al. Biocontrol effects of *Brevibacillus laterosporus* AMCC100017 on potato common scab and its impact on rhizosphere bacterial communities[J]. *Biological Control*, 2017, 106: 89-98
- [4] Shahzad R, Khan AL, Bilal S, et al. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2017, 136: 68-77
- [5] da Silveira APD, Sala VMR, Cardoso EJB, et al. Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 107: 313-319
- [6] Hong YW, Liao D, Hu AY, et al. Diversity of endophytic and rhizoplane bacterial communities associated with exotic *Spartina alterniflora* and native mangrove using *Illumina* amplicon sequencing[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2015, 61(10): 723-733
- [7] Yao HK, Liu YF, Zhang CJ, et al. Analysis of soil biological properties and bacterial diversity in rhizospheres of different crops[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 31(2): 372-378 (in Chinese)
姚华开, 刘岳飞, 张传进, 等. 不同作物根际土壤生物学性状及细菌多样性特征比较[J]. *西南农业学报*, 2018, 31(2): 372-378
- [8] Huo QD, Zhao QF, Ma Y, et al. Effects of different cultivation methods on bacterial community diversity in rhizosphere soil of *Angelica sinensis*[J]. *Guihaia*, 2018, 38(2): 241-249 (in Chinese)
霍庆迪, 赵庆芳, 马艳, 等. 不同耕作方式对当归根际土壤细菌群落多样性的影响[J]. *广西植物*, 2018, 38(2): 241-249
- [9] Jiao S, Lu YH. Soil pH and temperature regulate assembly processes of abundant and rare bacterial communities in agricultural ecosystems[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(3): 1052-1065
- [10] Stone JK, Bacon CW, White JF. An overview of endophytic microbes: endophytism defined[A]//*Microbial Endophytes*[M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 29-33
- [11] He F, Zhang ZL, Cui M, et al. Identification, disease resistance and growth-promoting effect of dominant bacteria in the rhizosphere soil of healthy *Amorphophallus konjac*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2015, 24(8): 75-83 (in Chinese)
何斐, 张忠良, 崔鸣, 等. 健康魔芋根表土壤优势细菌鉴定及其抗病促生作用[J]. *西北农业学报*, 2015, 24(8): 75-83
- [12] Li YX, Guo PY, Sun JG. Isolation, identification, phylogeny and growth promoting characteristics of endophytic diazotrophs from tuber and root crops[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(1): 104-122 (in Chinese)
李艳星, 郭平毅, 孙建光. 块根块茎类作物内生固氮菌分离鉴定、系统发育与促生特性[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(1): 104-122
- [13] Tian XY, Zhang CS. Illumina-Based analysis of endophytic and rhizosphere bacterial diversity of the coastal halophyte *Messerschmidia sibirica*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2288
- [14] Xu YJ, Zhao LF, Chen P, et al. Isolation, screening and characterization of phytopathogen antagonistic endophytes from wild *Artemisia argyi*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(12): 3697-3705 (in Chinese)
徐亚军, 赵龙飞, 陈普, 等. 植物病原菌拮抗性野生艾蒿内生菌的分离、筛选和鉴定[J]. *生态学报*, 2013, 33(12): 3697-3705
- [15] Liu GH, Liu B, Che JM, T et al. Phylogenetic diversity of endophytic *Bacillus* species isolated from *Mesona chinensis*[J]. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2015,

- 37(1): 35-40 (in Chinese)
刘国红, 刘波, 车建美, 等. 仙草植物内生芽胞杆菌种群多样性研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2015, 37(1): 35-40
- [16] Cheng HR, Ning J. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(1): 55-59
- [17] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617
- [18] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [19] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [20] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791
- [21] Nei M, Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics[M]. Oxford: Oxford University Press, 2000
- [22] Zhao Q, Deng YY, Li W, et al. Analysis of endophytes diversity in wheat seedlings by metagenomic technology[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017, 47(3): 313-324 (in Chinese)
赵芹, 邓渊钰, 李伟, 等. 小麦幼苗内生菌多样性的宏基因组分析[J]. 植物病理学报, 2017, 47(3): 313-324
- [23] Liu GH, Liu B, Che JM, et al. Diversity of *Bacillus*-like species isolated from potato rhizosphere soils in Yili, Xinjiang[J]. Biodiversity Science, 2017, 25(8): 856-863 (in Chinese)
刘国红, 刘波, 车建美, 等. 新疆伊犁马铃薯根际芽胞杆菌纯培养多样性[J]. 生物多样性, 2017, 25(8): 856-863
- [24] Wang L, Zhang JL, Wang JH, et al. Isolation and molecular identification of endophytic bacteria in sugarcane stem[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, 34(11): 2227-2232 (in Chinese)
王丽, 张剑亮, 王继华, 等. 甘蔗茎部内生细菌的分离及分子鉴定[J]. 热带作物学报, 2013, 34(11): 2227-2232
- [25] Hallmann J, Rodríguez-Kábana R, Kloepper JW. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31(4): 551-560
- [26] Lamb TG, Tonkyn DW, Kluepfel DA. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1996, 42(11): 1112-1120
- [27] Wawrik B, Kerkhof L, Kukor J, et al. Effect of different carbon sources on community composition of bacterial enrichments from soil[J]. Applied Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6776-6783
- [28] Tan Y, Cui YS, Li HY, et al. Diversity and composition of rhizospheric soil and root endogenous bacteria in *Panax notoginseng* during continuous cropping practices[J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57(4): 337-344
- [29] Kim M, Oh HS, Park SC, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 346-351
- [30] Wu K, Fang ZY, Guo R, et al. Pectin enhances bio-control efficacy by inducing colonization and secretion of secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* SQY 162 in the rhizosphere of tobacco[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127418
- [31] Jung WJ, Mabood F, Souleimanov A, et al. Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 *in vitro*[J]. Microbial Pathogenesis, 2014, 77: 13-16
- [32] Mohkam M, Nezafat N, Berenjian A, et al. Identification of *Bacillus* probiotics isolated from soil rhizosphere using 16S rRNA, *recA*, *rpoB* gene sequencing and RAPD-PCR[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2016, 8(1): 8-18
- [33] Liu GH, Liu B, Zhu YJ, et al. Diversity of *Bacillus*-like species in Taiwan[J]. Biodiversity Science, 2016, 24(10): 1154-1163 (in Chinese)
刘国红, 刘波, 朱育菁, 等. 台湾地区芽胞杆菌物种多样性[J]. 生物多样性, 2016, 24(10): 1154-1163
- [34] Krishnamoorthy R, Kwon SW, Kumutha K, et al. Diversity of culturable methylotrophic bacteria in different genotypes of groundnut and their potential for plant growth promotion[J]. 3 Biotech, 2018, 8(6): 275
- [35] Liu B, Liu GH, Hu GH, et al. *Bacillus mesonae* sp. nov., isolated from the root of *Mesona chinensis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64: 3346-3352
- [36] Zhang RJ, Zhang QQ, Huang XR, et al. Diversity of endophytic bacteria in roots of *Typha orientalis* estimated by culture method[J]. Wetland Science, 2016, 14(2): 201-211 (in Chinese)
张瑞杰, 张琼琼, 黄兴如, 等. 基于分离培养方法的香蒲根内生细菌多样性[J]. 湿地科学, 2016, 14(2): 201-211
- [37] Fu YH, Qu JH, Zhang LJ, et al. Effects of different medium coagulants on diversity of culturable bacteria in water sediments[J]. Journal of Southern Agriculture, 2018, 49(9): 1787-1793 (in Chinese)
符运会, 屈建航, 张璐洁, 等. 不同培养基凝固剂对水体

- 沉积物中可培养细菌多样性的影响[J]. 南方农业学报, 2018, 49(9): 1787-1793
- [38] Wang LY, Liao FX, Luo YP. Identification of an endophytic bacterial strain HBS-1 isolated from *Mangifera indica* and its biological control efficacy against diseases of postharvest mango[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2012, 28(1): 41-45 (in Chinese)
- 王兰英, 廖凤仙, 骆焱平. 九里香内生细菌 HBS-1 的鉴定及其对芒果采后病害的防效[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(1): 41-45
- [39] Wang HJ, Chen ZJ, Wu YX, et al. Isolation and identification of endophytic bacteria from canola with control effect on clubroot disease of cruciferous crops[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2014, 36(1): 92-97 (in Chinese)
- 王会军, 陈卓君, 吴毅歆, 等. 防治十字花科作物根肿病的油菜内生细菌分离与鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(1): 92-97
- [40] He J, Zhang LL, Zhao LY, et al. Identification of the endophytic strain longA from apple twig and its antifungal mechanism against *Valsa mali*[J]. Microbiology China, 2016, 43(10): 2254-2260 (in Chinese)
- 何姣, 张亮亮, 赵玲云, 等. 苹果枝条内生菌 longA 的鉴定及其抑菌作用机理初探[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2254-2260
- [41] Liu GH, Liu B, Che JM, et al. Screening of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain and its probiotic characteristics[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(6): 1043-1055 (in Chinese)
- 刘国红, 刘波, 车建美, 等. 一株解淀粉芽胞杆菌的筛选及其益生特性研究[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(6): 1043-1055
- [42] Chung EJ, Hossain MT, Khan A, et al. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice[J]. The Plant Pathology Journal, 2015, 31(2): 152-164
- [43] Wang HF, Li QL, Zhang YG, et al. *Bacillus capparisidis* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from roots of *Capparis spinosa* L.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(2): 282-287
- [44] Logan NA, Berge O, Bishop AH, et al. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(8): 2114-2121
- [45] Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(1): 249-266