

研究报告



三叶鬼针草内生细菌群体多样性及重金属耐受和吲哚乙酸产生潜力

胡泽瑞 刘媛 彭长连 李淑彬*

华南师范大学生命科学学院 广东 广州 510631

摘要:【背景】定植于植物的多样内生细菌与宿主生长和抗逆能力密切相关。三叶鬼针草(*Bidens pilosa* L.)极具入侵性且抗逆性强,但目前该植物内生细菌相关研究报道极少。【目的】探究三叶鬼针草内生细菌群体多样性,筛选获得兼具重金属耐受性及吲哚乙酸(Indoleacetic acid, IAA)产生潜力的内生细菌菌株。【方法】采用 MiSeq 高通量方法分析三叶鬼针草内生细菌群体多样性,可培养方法测定内生细菌菌株对重金属 Pb、Cd、Ni、Hg 的耐受能力及产生 IAA 的潜力。【结果】从三叶鬼针草内生细菌群体中共测得 4 031 个操作分类单元(OTU),可归属于 25 个门 51 个纲 76 个目 182 个科及 536 个属。属级水平上,三叶鬼针草根、茎、叶和种子中分别以肠杆菌属(*Enterobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)及假单胞菌属(*Pseudomonas*)丰度最高,伯克氏菌属(*Burkholderia*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、假单胞菌属、泛菌属(*Pantoea*)次之;从三叶鬼针草分离得到 34 株内生细菌,所有菌株均至少对 1 种测试的重金属具有耐受性。其中,GF-1、GF-8、YF-1、YF-2、JF-1、GF-2 和 JF-8 这 7 个菌株能够产生 IAA,其产率为 57.48–312.22 $\mu\text{g/mL}$;基于 16S rRNA 基因序列分析,初步鉴定菌株 GF-1、GF-8、YF-1、YF-2、JF-1 为芽孢杆菌(*Bacillus* spp.),菌株 GF-2 为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),菌株 JF-8 为伯克氏菌(*Burkholderia* sp.)。【结论】三叶鬼针草内生细菌群体具有丰富的种群多样性。三叶鬼针草内生细菌菌株 GF-1、GF-8、YF-1、YF-2、JF-1、GF-2 和 JF-8 兼具多重金属耐受性及高产 IAA 潜力,是重金属复合污染土壤生物修复的优良候选菌株。

关键词: 三叶鬼针草, 内生细菌, 种群多样性, 重金属耐受, IAA 产生

Diversity, heavy-metal tolerance and indoleacetic acid production of bacterial endophytes in *Bidens pilosa*

HU Ze-Rui LIU Yuan PENG Chang-Lian LI Shu-Bin*

College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China

Abstract: [Background] Plants are inhabited by diverse bacterial endophytes that are closely related to the growth and stress tolerance of their hosts. *Bidens pilosa* L. is a highly invasive plant species with strong stress tolerance. However, up to date, there is limited literature reporting the research involving the bacterial endophytes of the plant species. [Objective] To investigate and characterize the diversity of

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1200105)

*Corresponding author: Tel: 86-20-61022290; E-mail: shuli_1990@126.com

Received: 20-04-2018; Accepted: 05-07-2018; Published online: 17-09-2018

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1200105)

*通信作者: Tel: 020-61022290; E-mail: shuli_1990@126.com

收稿日期: 2018-04-20; 接受日期: 2018-07-05; 网络首发日期: 2018-09-17

bacterial endophytes community of *B. pilosa*, and to obtain the bacterial isolates from the plant species with both potential of heavy metal-tolerance and indoleacetic acid (IAA) production. **[Methods]** The diversity of bacterial endophytes community was analyzed by using MiSeq high-throughput sequencing method. The tolerance ability to heavy metals Pb, Cd, Ni, and Hg, as well as the IAA-producing ability of bacterial endophytes were evaluated by using culture-dependent method. **[Results]** We recovered a total of 4 031 distinct operational taxonomic units from the total bacterial endophytes community of *B. pilosa*, which could be affiliated with 25 distinct bacterial phyla, 51 distinct bacterial classes, 76 distinct bacterial orders, 182 distinct bacterial families, and 536 distinct bacterial genera. At the genus level, the most dominant bacterial genera detected from the root, stem, leaf, and seed of *B. pilosam* were *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, and *Pseudomonas*, respectively, followed by *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, and *Pantoea*. Using culture-dependent method, we obtained 34 bacterial isolates from the internal tissues of *B. pilosa* and all obtained strains showed the tolerance at least to one tested heavy metal. Seven strains (numbered GF-1, GF-8, YF-1, YF-2, JF-1, GF-2, JF-8, respectively) could produce IAA with IAA yields varying in the ranging from 57.48–312.22 µg/mL. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, the 7 IAA-producing strains were identified, and strains GF-1, GF-8, YF-1, YF-2, JF-1 as *Bacillus* spp., strain GF-2 as *Pseudomonas* sp., strain JF-8 as *Burkholderia* sp. **[Conclusion]** The bacterial endophytes community of *B. pilosa* has high population diversity. Bacterial endophytes strains GF-1, GF-8, YF-1, YF-2, JF-1, GF-2, and JF-8 obtained from *B. pilosa* show not only multi-heavy metals tolerance also high IAA production, being good candidates used as bio-inoculation agent for bioremediation of heavy metal-contaminated soil.

Keywords: *Bidens pilosa* L., Bacterial endophytes, Population diversity, Heavy metal tolerance, IAA production

植物内生细菌(Bacterial endophytes)是指能够定植于植物体内,对宿主无明显不利影响的细菌。大量研究显示内生细菌可通过固氮作用、分泌生长素、产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶、铁载体、抗生素等多种方式促进植物生长,提高其对生物及非生物胁迫的抗性^[1-4]。外来植物入侵威胁入侵地生态系统物种多样性及服务功能,影响农林牧业生产^[5-6]。目前外来入侵植物内生细菌多样性及其功能也日渐被关注。White 等报道芦苇种子内生细菌能提高入侵植物幼苗生长和病原抗性,增加其与其他植物的竞争能力^[7]。李虎等对互花米草内生细菌群体的免培养分析显示其根内细菌极其丰富,其中许多具有促进植物对 C/N/S 的利用、减轻有机污染物对植物毒害等潜力^[8]。Aires 等报道南西贝利亚岛高度入侵植物 *Asparagopsis* spp.内生细菌定居多样化的具有活性氧清除、重金属抗性、有机物矿化等潜力的内生细菌^[9]。可见,内生细菌在外来植物迅速适应环境并成功入侵中也起着关键作用。

三叶鬼针草(*Bidens pilosa* L.)为菊科(*Compositae*)鬼针草属(*Bidens*)一年生草本植物,原产美洲热带,该植物极具入侵性,目前已入侵我国大部分地区,对农田、园艺生产,以及生物多样性和生态系统安全构成了严重危害^[10-11]。三叶鬼针草不仅繁殖迅速,而且生态适应性强,尤其能够耐受和富集镉(Cd)、铅(Pb)等多种重金属^[12-13]。目前,三叶鬼针草内生细菌群体多样性尚未系统研究,本论文通过高通量测序技术分析该入侵植物内生细菌群体多样性,同时通过传统分离培养技术分析了三叶鬼针草优势内生细菌的重金属耐受性和 IAA 产生潜力,以期揭示内生细菌群体在该入侵植物成功入侵中的潜在作用提供参考,并为该植物内生细菌资源的有效利用,特别是在微生物-植物联合修复重金属污染中的应用提供依据和候选菌株。

1 材料与方法

1.1 植物材料

三叶鬼针草根、茎、叶和成熟种子均收集于

广州市郊某三叶鬼针草单优入侵群落。随机选取 4–5 株三叶鬼针草健壮植株(株高 0.5 m 以上), 整株挖取后带回实验室。成熟种子收集于灭菌纸袋中。于 3 d 内完成总 DNA 抽提及优势内生细菌分离。

1.2 主要培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 细菌学蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 20.0, pH 7.2; 有氮培养基(g/L): 蔗糖 10.0, 硫酸铵 1.0, 磷酸氢二钾 2.0, 七水硫酸镁 0.5, 氯化钠 0.1, 酵母膏 0.5, 碳酸钙 0.5, pH 7.2; 色氨酸-有氮培养基: 向灭菌后的有氮液体培养中加入色氨酸, 使色氨酸终浓度为 0.5 mg/L。

1.3 主要试剂和仪器

Dzup (植物)基因组 DNA 提取试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 吲哚乙酸(IAA), Sigma 公司; Sackowski's 显色剂: 35%的高氯酸和 0.5 mol/L 的氯化铁按体积比 50:1 配置混匀, 现配现用。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 超微量分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司; MISEQ03, Illumina 公司。

1.4 三叶鬼针草内生细菌群体的免培养分析

1.4.1 总 DNA 抽提及高通量测序分析

用流水冲洗植株表面脏污, 吸干水分。用无菌剪刀剪取根、茎、叶分别置于培养皿中, 按照以下步骤对各组织样品及种子进行表面消毒: 75% 酒精浸泡 30 s→无菌水冲洗 3 次→0.3%次氯酸钠浸泡 4 min (种子和叶)或 6 min (根、茎)→无菌水冲洗 5 次。将表面消毒后的样品移入牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 28 °C 培养 24 h, 检查表面消毒效果^[8]。表面完全消毒的样品再次用灭菌超纯水冲洗 3 次以去除表面残留的微生物 DNA。将样品移入无菌研钵, 加入液氮充分研磨后严格按照植物 DNA 提取试剂盒中的说明提取总 DNA, 琼脂糖凝胶电泳验证后切胶回收纯化。紫外分光光度法检测其浓度和纯度后送生工生物工程(上海)股份有限公司利用

MISEQ03 平台进行高通量序列分析。测序靶标 DNA 为 16S rRNA 基因 V3–V4 可变区, 所用引物为 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')。

1.4.2 数据处理与操作分类单元(OTU)多样性分析

Illumina MiSeq 得到的原始图像数据文件经 Casava 碱基识别分析转化为原始读序。利用 Cutadapt 去除原始读序引物和接头序列, 利用 Pear 将成对的读序进行拼接, 并去除序列长度≤200 bp 的短序列及嵌合体序列, 得到可进一步分析的有效序列。利用 Usearch 对有效序列进行聚类, 相似性≥97%定义为同一操作分类单元(OTU)^[14]。使用软件 R 统计各组织 OTU 数及其相对丰度、共有的和独有的 OTU 数; 按照如下公式计算 OTU 覆盖率(Coverage): 覆盖率=1- n_1/N , n_1 为只含有 1 条序列的 OTU 数目, N 为序列总数。根据各组织中 OTU 数及各 OTU 相对丰度, 计算单样品 Shannon 多样性指数: Shannon 多样性指数 = $-\sum(P_i \times \ln P_i)$, 式中 P_i 为第 i 个 OTU 在该组织中的相对丰度。

1.4.3 种群组成分析

利用 BLASTn 将有效 OTU 序列与 NCBI 16S rRNA 基因数据库进行比对, 满足相似度>90%且覆盖率>90%的序列用于后续分类。进一步对满足上述条件的序列通过核糖体在线归类系统进行门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)各级系统分类水平的种群归类。使用 Bootstrapping 方法估计分类可信度。当某级水平的可信度≥80%时, 视为可确定为该级归类水平, 反之为该级水平不能归类(Unclassified)^[15]。根据种群归类结果, 分析各组织免培养内生细菌群体种群组成及其差异。使用软件 R 的 Vegan package 对所有组织内生细菌群体进行不同层级水平的非度量多维尺度分析(Non-metric multidimensional scaling, NMDS)。

1.5 三叶鬼针草优势内生细菌的分离及促生潜力测定

1.5.1 三叶鬼针草优势内生细菌的分离纯化

按照 1.4.1 方法对三叶鬼针草各组织严格表面

消毒后,取消毒研磨的样品用无菌水进行 10 倍稀释至 10^{-4} – 10^{-5} ,取各稀释度涂布于牛肉膏蛋白胨培养基平板,挑选在最高稀释度长出的菌苔进行纯化,并连续传代 5 次以上即得可稳定传代菌株。

1.5.2 三叶鬼针草优势内生细菌对重金属的耐受性测定

按照文献[16-17]分别配制 100–1 000 mg/L 的 Cd^{2+} 、 Ni^{+} 、 Pb^{2+} 溶液和 10–40 mg/L 的 Hg^{2+} 溶液。将灭菌的圆滤纸片(直径为 6 mm)轻贴于预先均匀涂布各菌株菌液的牛肉膏蛋白胨培养基平板表面,再于各滤纸片上分别滴加 8 μL 不同浓度的重金属溶液,30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 2 d 后观察结果。纸片周围无透明圈出现即为耐受。每一菌株每一测定 3 个重复。

1.5.3 三叶鬼针草优势内生细菌产 IAA 潜力测定

定性测定:于 24 孔板培养孔中加入 0.5 mL 色氨酸-有氮液体培养基,接入 50 μL 过夜培养的各菌株菌液,30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 48 h 后,加入 0.5 mL 现配的 Sackowcki's 显色剂,避光放置 30 min 后观察其颜色变化,颜色变红则为阳性,表示能够分泌 IAA^[18]。

定量测定:选取初筛阳性菌株,按 1% (体积比)将其过夜培养的菌液接种于色氨酸-有氮液体培养基中,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养,待其 OD_{600} 接近 1.0 时,将培养液于室温(25 $^{\circ}\text{C}$ 左右)、8 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清加入等体积现配的 Sackowcki's 显色剂,避光放置 30 min,测定 OD_{530} 值^[18]。通过 IAA 标准曲线定量计算单位体积上清中 IAA 含量。每个菌株重复测定 3 次。

1.5.4 三叶鬼针草产 IAA 内生细菌菌株的初步鉴定

选取具产 IAA 能力的内生细菌菌株接入 LB 培

养液中振荡培养 24 h,4 000 $\times g$ 离心 10 min 收集菌体,用细菌基因组提取试剂盒提取基因组 DNA,方法参见试剂盒说明书。以提取的各 DNA 为模板,用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTG GCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTA CGACTT-3')扩增菌株 16S rRNA 基因序列。PCR 反应体系(25 μL): Premix Taq 12.5 μL , 正、反向引物(10 mmol/L)各 1 μL , 模板 DNA (约 200 ng) 2 μL , ddH₂O 8.5 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。切胶回收目标产物(约 1 500 bp)后委托深圳华大基因公司测序。所得序列在 NCBI 进行 BLAST 同源性搜索,下载相近序列,运用 MEGA 5.05 构建 Neighbor-Joining 系统树,自展数(Bootstrap)为 1 000。

2 结果与分析

2.1 三叶鬼针草内生细菌群体操作分类单元的多样性分析

三叶鬼针草 4 个组织 16S rRNA 基因 V3–V4 可变区高通量测序后共得到 36 617 条长度为 407 \pm 2 bp 的有效序列。在 97% 相似度下将其聚类,共产生 4 031 个 OTU,以根最多,种子次之,然后是茎,叶最少(表 1)。4 个组织 OTU 覆盖率均接近或超过 90% (表 1),说明研究结果能反映所测样品真实情况。根据各样品 OTU 数量及各 OTU 相对丰度计算不同组织内生细菌群体 Shannon 指数在 1.25–5.12 之间,以根最大,叶最少(表 1),可见,鬼针草根中内生细菌群体无论多样性还是丰富度都最高。每个组织均有多个独有的 OTU,4 个组织全部共有的 OTU 仅 12 个,表明该植物不同组织内生细菌群体组成可能不同。

表 1 三叶鬼针草内生细菌群体操作分类单元多样性分析

Table 1 OTU-based diversity analysis of bacterial endophytes community of *B. pilosa*

组织 Tissues	有效序列数目 Numbers of valid sequences	OTU 数目 Numbers of OTU	Shannon 指数 Shannon index	覆盖率 Coverage (%)
根 Root	18 814	2 934	5.12	86.66
茎 Stem	1 948	264	4.27	92.27
叶 Leaf	1 183	113	1.25	92.65
种子 Seed	14 672	882	2.11	95.98

2.2 三叶鬼针草内生细菌群体门和纲水平的种群组成分析

基于核糖体在线归类分析，三叶鬼针草根、茎、叶和种子 4 个组织 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区 OTU 序列 95% 以上能在纲或以上水平进行归类，分属 25 个原核生物门，51 个不同的细菌纲。以变形菌门(*Proteobacteria*)为绝对优势细菌门，其总丰度接近 80%，其次为厚壁菌门(*Firmicutes*)，再

次为放线菌门(*Actinobacteria*) (图 1A)。在纲水平上，三叶鬼针草根、茎、叶、种子内生细菌群体分别分属于 42、24、14、21 个纲。 α -变形菌纲(*α -proteobacteria*)是该植物根、叶、种子的优势纲，其丰度分别为 46.3%、82.9%、50.9%，而茎最优势纲则为 γ -变形菌纲(*γ -proteobacteria*)，其相对丰度接近 30% (图 1B)。4 个组织次优势纲也不同：根为放线菌纲(*Actinobacteria*，13%)，茎为

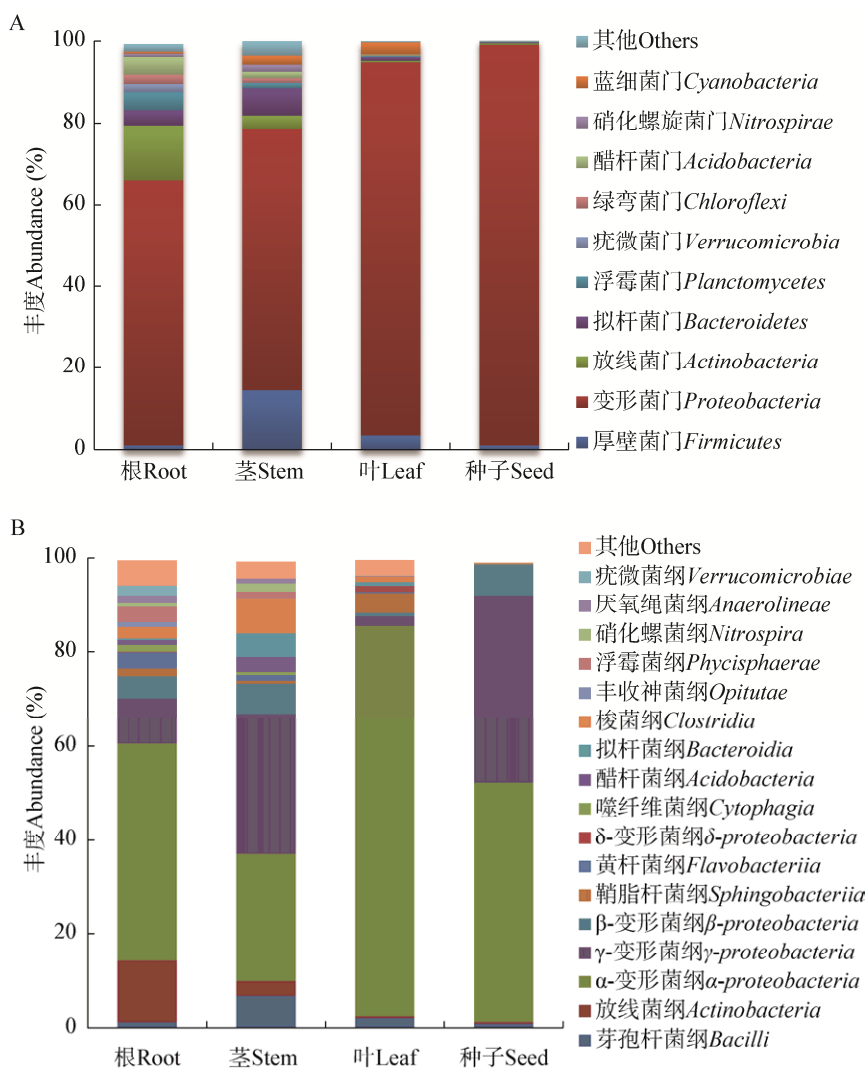


图 1 三叶鬼针草内生细菌门(A)和纲(B)水平的种群组成
Figure 1 Populations composition of bacterial endophytes community of *B. pilosa* at the phylum (A) and class (B) levels

α -变形菌纲 (27.2%)，叶为鞘脂杆菌纲 (*Sphingobacteriia*, 4.3%)，种子为 γ -变形菌纲 (39.8%) (图 1B)。其他在 1 个或多个组织中丰度达到 1% 以上且其丰度在不同组织差异较大的细菌纲包括拟杆菌纲 (*Bacteroidia*)、浮霉菌纲 (*Planctomycetacia*)、黄杆菌纲 (*Flavobacteriia*)、醋杆菌纲 (*Acidobacteria*)、芽孢杆菌纲 (*Bacilli*)、梭菌纲 (*Clostridia*)、 β -变形菌纲 (β -*proteobacteria*)、疣微菌纲 (*Verrucomicrobiae*)、醋杆菌纲 (*Acidobacteria*)、厌氧绳菌纲 (*Anaerolineae*)、硝化螺菌纲 (*Nitrospira*)、噬纤维菌纲 (*Cytophagia*) 等 15 个细菌纲 (图 1B)。

2.3 三叶鬼针草内生细菌群体目和科水平上的种群组成分析

三叶鬼针草各组织得到的 OTU 均有许多不能在目、科和属水平上进行归类。在已归类的 76 个细菌目中，根、茎、叶、种子内生细菌群体分别分属于 72、25、14、22 个目。根组织中放线菌目 (*Actinomycetales*) 丰度最高，肠杆菌目 (*Enterobacteriales*) 次之；叶组织中鞘脂单胞菌目 (*Sphingomonadales*) 丰度最高，芽孢杆菌目 (*Bacillales*) 次之；种子和茎组织均以假单胞菌目 (*Pseudomonadales*) 丰度最高，肠杆菌目 (*Enterobacteriales*) 次之 (图 2A)。在已归类的科中，

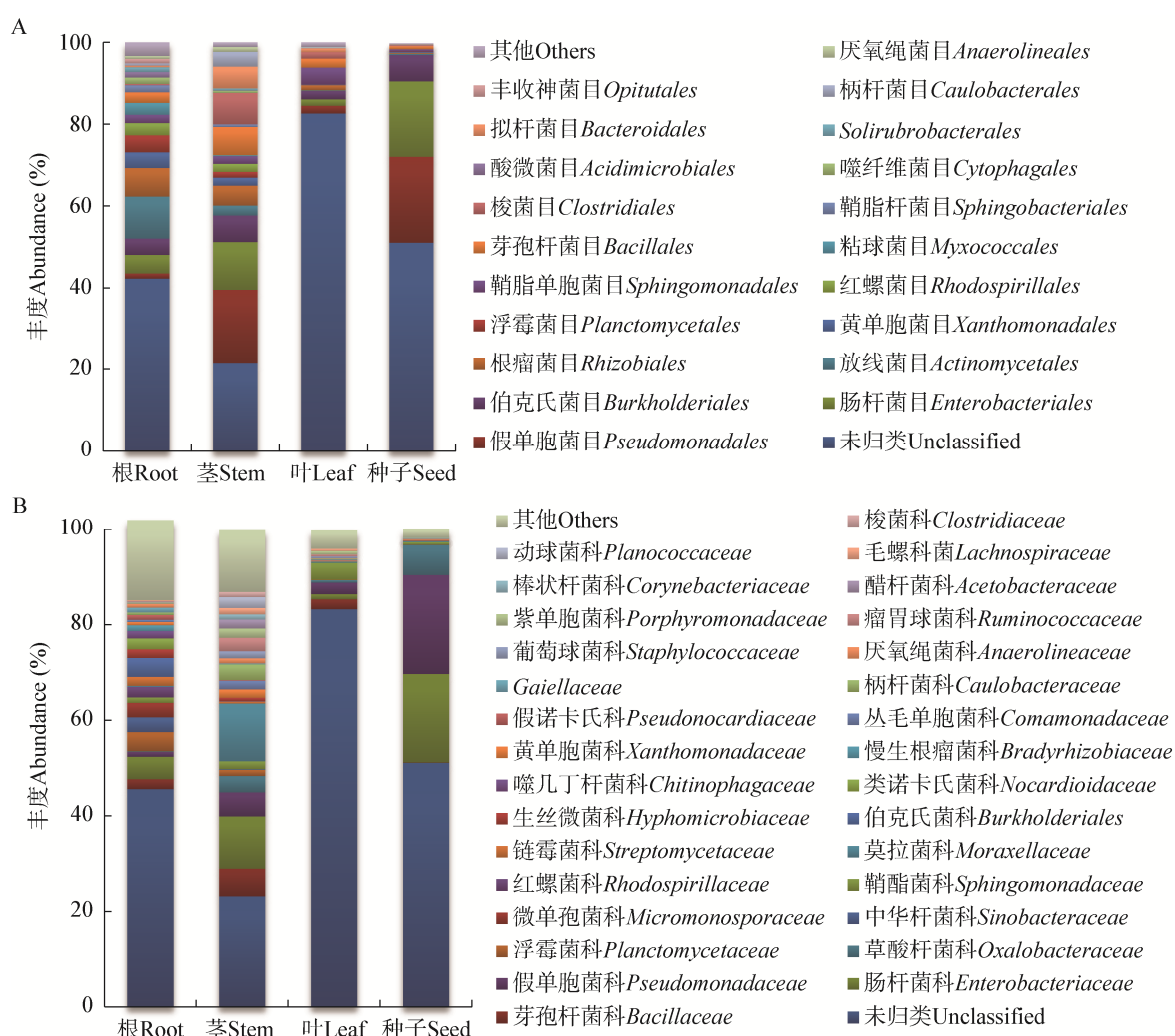


图 2 三叶鬼针草内生细菌目(A)和科(B)水平的种群组成

Figure 2 Populations composition of bacterial endophytes community of *B. pilisa* at the order (A) and family (B) levels

根、茎、叶、种子内生细菌群体分别分属于 151、79、32、57 个科, 分别以肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、莫拉氏菌科(*Moraxellaceae*)、鞘酯单胞菌科(*Sphingomonadaceae*)、假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)为最优势科(图 2B)。

2.4 三叶鬼针草内生细菌群体属水平上的种群组成分析

三叶鬼针草根、茎、叶、种子所得 OTU 序列分别有约 56%、75%、17%、49% 可在属水平归类, 分属 536 个不同的属, 各组织所含属数目不同, 依次为: 根(421)>茎(137)>种子(119)>叶(49)。已归类的属中, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)总丰度最高, 该属在 4 个组织均有分布, 尤其在种子中丰度高达 20%。其次为不动杆菌属(*Acinetobacter*), 该属主要分布于根、茎两个组织, 在茎中丰度高达 12%。叶组织中鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)丰度最高, 茎、叶组织中甲基杆菌属(*Methylobacterium*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)丰度也较高。根组织中各属分布较为均匀, 肠杆菌属(*Enterobacter*)丰度最高, 伯克氏菌属(*Burkholderia*)次之, 此外小单孢子菌属

(*Micromonospora*)、类诺卡氏属(*Nocardioideis*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、出芽菌属(*Gemmata*)、芽孢杆菌属、不动杆菌属等在根中丰度也 $\geq 1\%$, 为根优势细菌属(图 3)。泛菌属(*Pantoea*)、马赛菌属(*Massilia*)等其他 15 属也在 1 个或多个组织中丰度 $\geq 1\%$ 。一些属仅在 1 个或几个组织中被检出, 如小单孢子菌属、类诺卡氏属、伯克氏菌属仅在根中被检出, *Rosenbergiella* 属仅在种子中被检出, 棒状杆菌属(*Corynebacterium*)仅在茎中被检出, 说明一些细菌种群在三叶鬼针草内具有一定的组织偏好性。

2.5 三叶鬼针草内生细菌群体种群组成的 NMDS 分析

图 4 显示门、纲、属 3 个分类学水平上三叶鬼针草所有组织内生细菌群体种群组成的 NMDS 分析斑点图, 3 个不同的分类学水平结果一致, 代表该植物不同组织的斑点明显分开, 说明该植物不同组织内生细菌群体种群组成存在明显差异; 代表根组织的斑点与代表其他 3 个组织的斑点距离最远, 说明根中内生细菌群落组成与其他组织差异最大。

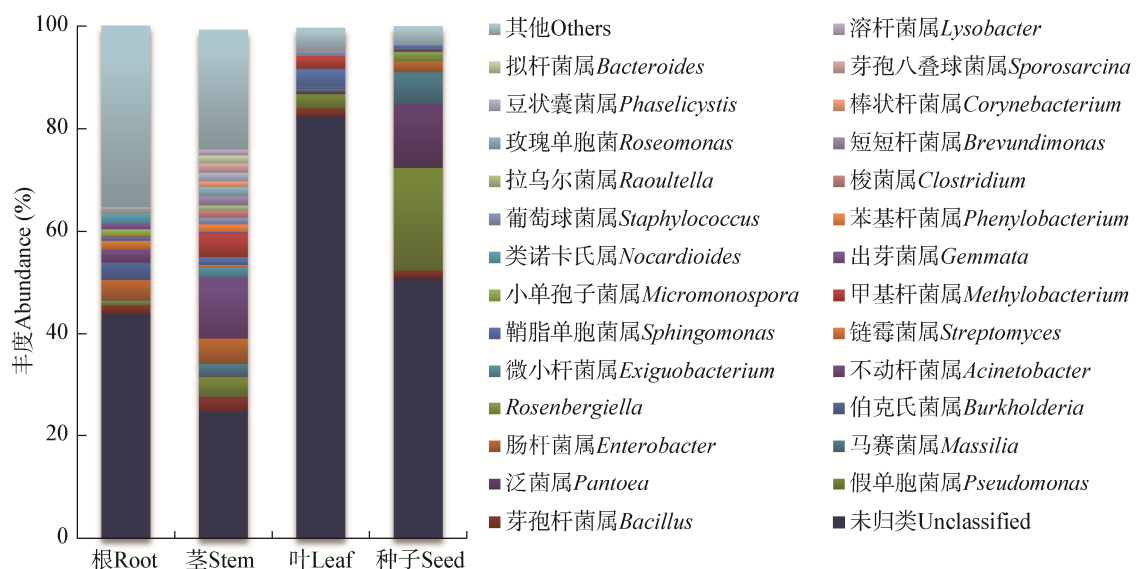


图 3 三叶鬼针草内生细菌群体属水平的种群组成

Figure 3 Populations composition of bacterial endophytes community of *B. pilosa* at the genus level

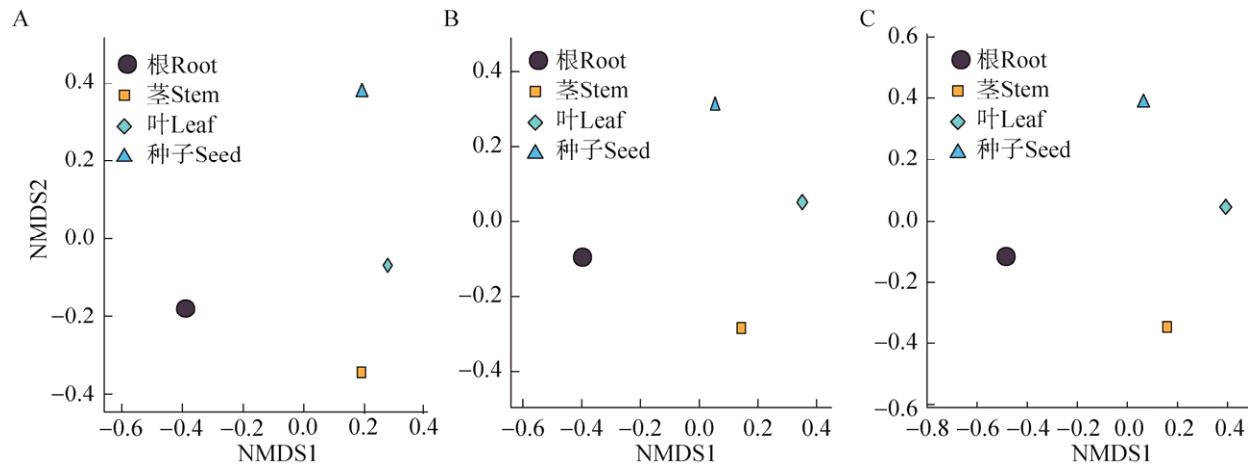


图 4 三叶鬼针草内生细菌群体种群组成门(A)、纲(B)、属(C)水平的 NMDS 分析斑点图
Figure 4 NMDS plots of bacterial endophytes community of *B. pilisa* at the levels of phylum (A), class (B), and genus (C)

2.6 三叶鬼针草根优势内生细菌的分离和重金属耐受能力

用常规的植物内生细菌分离培养方法，从三叶鬼针草根、茎内生细菌获得 34 株可稳定传代的细菌菌株。34 株内生细菌对 Pb、Cd、Ni、Hg 等 4 种重金属的耐受能力综合为表 2。从表 2 可知，所有菌株均至少对 1 种测试的重金属具有不同程度的耐受能力。30 个菌株能耐受≥200 mg/L Pb²⁺，其

中 5 个菌株最高 Pb²⁺耐受浓度可达 1 000 mg/L；16 个菌株能耐受≥100 mg/L Cd²⁺，其中 3 株最高耐受浓度达到 500 mg/L；30 个菌株能耐受≥100 mg/L Ni⁺，其中 2 株最高 Ni⁺耐受达到 1 000 mg/L；Hg²⁺对所测菌株毒害最高，仅 6 个菌株表现 Hg²⁺耐受，其最高耐受浓度也仅为 30 mg/L。12 个菌株可同时耐受 3 种以上的重金属。菌株 YF-1、YF-2、YF-3、JF-1-2 能同时耐受 4 种测试重金属。

表 2 三叶鬼针草内生细菌菌株重金属耐受测定
Table 2 Detection of heavy metals tolerance of bacterial endophytes isolated from *B. pilisa*

菌株 Strains	最高耐受浓度 The highest tolerance concentration (mg/L)				菌株 Strains	最高耐受浓度 The highest tolerance concentration (mg/L)			
	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Ni ⁺	Hg ⁺		Pb ²⁺	Cd ²⁺	Ni ⁺	Hg ⁺
GF-1	200	200	100	—	JF-6	100	200	—	—
GF-2	200	100	100	—	JF-8	1 000	100	200	—
GF-3	1 000	—	1 000	—	JF-9	100	—	100	—
GF-5	100	—	100	—	JF-10	100	—	200	—
GF-7	100	—	100	—	JF-11	100	—	100	—
GF-8	1 000	500	200	—	JF-12	200	—	200	—
GF-10	100	—	200	—	JF-13	500	—	200	—
GF-X	100	—	—	—	JF-14	—	—	200	—
GF-Y	500	100	100	—	JF-15	100	500	—	—
JF-1	1 000	200	200	—	YF-1	1 000	500	500	30
JF-1-2	1 000	100	200	10	YF-2	500	100	1 000	10
JF-2	200	100	200	—	YF-3	200	100	100	10
JF-3	500	—	500	—	YF-4	—	—	100	—
JF-4	1 000	200	—	30	YF-5	—	100	100	10
JF-5	100	—	200	—	YF-7	500	—	200	—
YF-7	500	—	200	—	YF-10	100	200	500	—
YF-8	500	—	100	—	YF-11	—	—	200	—

注：—：菌株不能耐受该重金属所测试的最低浓度(Pb²⁺、Cd²⁺、Ni⁺为 100 mg/L，Hg²⁺为 10 mg/L)。
Note: —: Strain cannot tolerant the lowest concertrations tested (100 mg/L for Pb²⁺, Cd²⁺, and Ni²⁺, 10 mg/L for Hg²⁺).

2.7 三叶鬼针草优势内生细菌群体的 IAA 产生潜力测定

24 孔板-Salkowski's 显色反应对 34 株测试菌株的 IAA 产生潜力进行初筛, 出现红色显色反应即为 IAA 产生阳性菌株, 分泌能力越强则红色越深。7 个菌株显示具有 IAA 产生潜力(图 5A)。进一步通过摇瓶培养定量测定各阳性菌株的 IAA 产率, 结果显示, IAA 产率范围为 57.48–312.22 $\mu\text{g/mL}$, 以菌株 JF-1 为最高, 接着依次为 YF-1 (225.69 $\mu\text{g/mL}$) 和 GF-8 (81.11 $\mu\text{g/mL}$) (图 5B)。

2.8 三叶鬼针草产 IAA 内生细菌菌株的初步鉴定

扩增测序 7 株具 IAA 产生菌株的 16S rRNA 基因, 相似性搜索显示其与 NCBI 已有序列最高相似性均 $\geq 99\%$ 。用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树, 菌株 GF-1、YF-2 与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)位于同一分支, 菌株 GF-2 与硝基还原假单胞菌(*Pseudomonas nitroreducens*)位于同一分支, 菌株 GF-8、YF-1 与解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)位于同一分支, 菌株 JF-1 与甲基

营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)位于同一分支, 菌株 JF-8 与唐菖蒲伯克霍尔德菌(*Burkholderia gladioli*)位于同一分支(图 6)。

3 讨论与结论

本研究利用 MiSeq 高通量方法 HiSeq 从三叶鬼针草根、茎、叶、种子 4 个不同组织共获得 36 617 条细菌 16S rRNA 基因 V3–V4 区有效序列, 4 193 个 OTU (表 1)。虽然得到的 OTU 中有平均近 50% 不能在目、科、属水平上归类, 但已归类的 OTU 分属 76 个不同的细菌目、182 个不同的细菌纲和 536 个不同的细菌属, 说明该植物内生细菌群体具有丰富的种群多样性和遗传多样性。三叶鬼针草 4 个组织中共有的 OTU 仅 12 个, 代表各组织内生细菌群体门、纲和属水平上群体组成的 NMDS 斑点也明显分开(图 4), 说明该植物不同组织内生细菌群落组成存在明显差异。三叶鬼针草可产生多种能抑制微生物或其他植物生长的化感物质, 而且这些化感物质的种类和含量随组织而异^[19-20], 这可能是该植物不同组织内生细菌群体种群组成存在差异的重要原因之一。

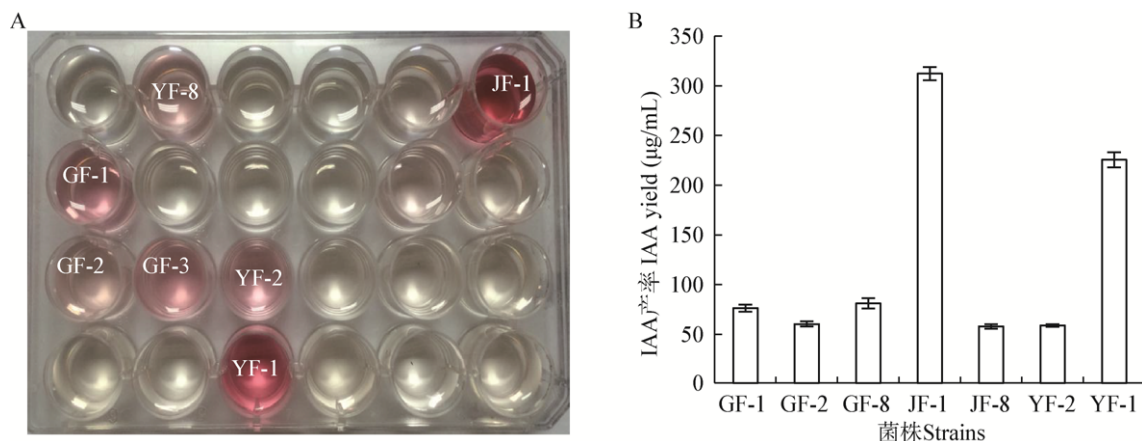


图 5 三叶鬼针草内生细菌菌株产 IAA 能力测定

Figure 5 Detection of IAA-producing potential of bacterial endophytes isolated from *B. pilosa*

注: A: 定性测定; B: 定量测定。

Note: A: Qualitative determination; B: Quantitative determination.

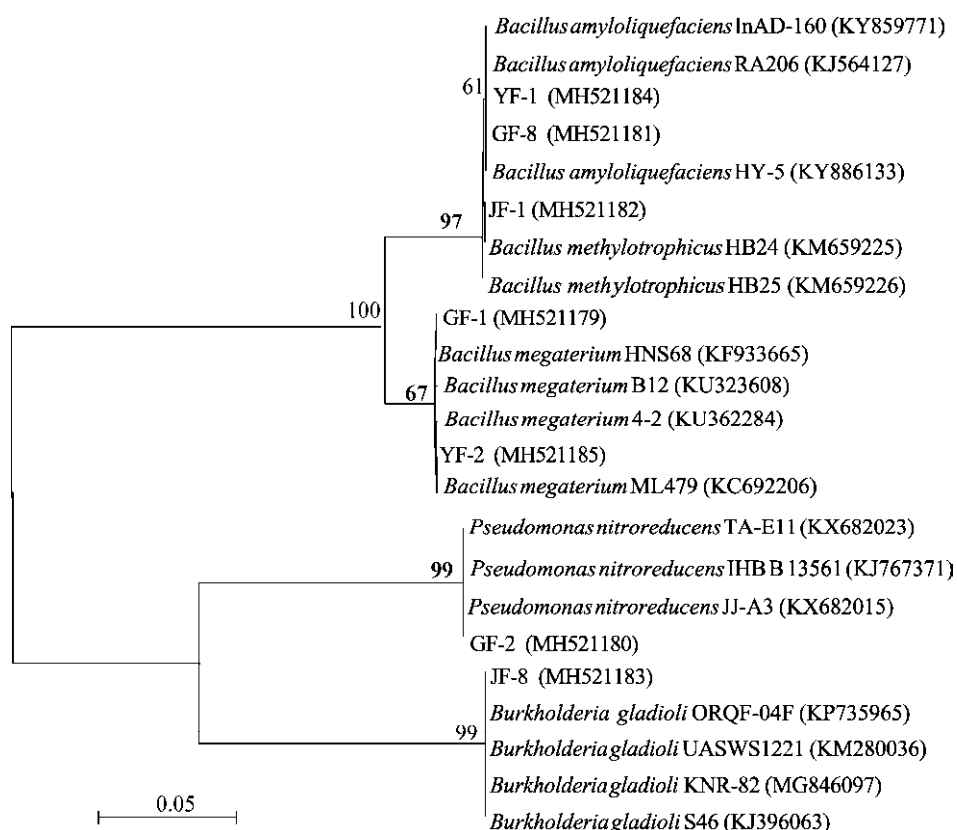


图 6 三叶鬼针草产 IAA 内生细菌菌株 16S rRNA 基因 Neighbor-Joining 进化树

Figure 6 Neighbor-Joining phylogenetic tree of IAA-producing bacterial endophytes isolated from *B. pilosa* based on the 16S rRNA genes sequences

注：分支上的数据表示自展 1 000 次的支持百分率；括号内为 GenBank 序列号；标尺参数表示进化距离。

Note: Numbers at each branch point indicate the percentage supported by bootstrap values based on 1 000 replications. GenBank accession numbers are shown in the parentheses. The scale bar indicates 0.05 substitutions per nucleotide position.

种群归类结果显示变形菌门是三叶鬼针草内生细菌群体最优势细菌门(图 2)。与本文相似, 互米花^[8]等入侵植物、水稻^[21]、拟南芥^[22]、盐生植物盐角草^[23]、超富集植物东南景天^[24]等内生细菌群体优势细菌门也均为变形菌门, 说明变形菌门细菌普遍存在于植物体内。放线菌不仅具有产生多样性活性物质的能力, 而且在环境有机质的降解矿化、营养固定、改善环境理化参数等方面也扮演着重要角色^[25-26]。本研究结果显示三叶鬼针草内生细菌群体中也含有丰富的放线菌, 其中包括了类诺卡氏菌属、小单孢子菌属、短短杆菌属、出芽菌属等许多稀有放线菌属(图 3), 这提示三叶鬼针草内生放线菌值得进一步研究。其他已

归类的优势细菌属包括假单胞菌属、泛菌属、马赛菌属、不动杆菌属、鞘脂单胞菌属、甲基杆菌属、伯克氏菌属和芽孢杆菌属等, 这些细菌属多为广泛报道的具促生抗逆或/和降解环境有毒有害物质的细菌属。如假单胞菌属、芽孢杆菌属、泛菌属、伯克氏菌属是典型的促生细菌, 可以通过多种方式直接或间接促进植物生长^[27]。马赛菌属的一些菌株具有降解甲苯、三氯乙烯等多种有毒有害物质和促进植物生长的潜力^[28-29]。不动杆菌属细菌不仅是典型的脱氮除磷细菌, 还能降解各种环境污染物^[30-31]。甲基杆菌能在寡营养环境中生长, 且大多具有较强的抗辐射和抗渗透压力^[32-33]。鞘脂单胞菌不仅可降解多种环境污染物, 还能激

活植物抗病、抗氧化相关途径^[33-34], 提示三叶鬼针草内生细菌群体也可能潜在贡献于其宿主的环境适应性和抗病抗逆能力。值得提出的是, 本研究结果显示三叶鬼针草含有丰富的不动杆菌, 不动杆菌有较强的耐药性, 是医院感染的重要致病菌之一^[35]。最近有学者指出不动杆菌等多抗药菌以植物作为载体进行传播可能是威胁人类健康的重要因素之一^[36]。在三叶鬼针草防控中应该考虑防止其中可能的内生性多抗药性菌株进入环境。

具有重金属抗性的内生细菌可通过对重金属的直接吸附、吸收和转化来降低重金属对宿主的毒害强度, 被认为在协同宿主植物耐受重金属胁迫方面发挥重要的作用^[4]。本研究中, 34 株从三叶鬼针草中得到的内生细菌菌株均对 Pb、Cd、Ni、Hg 4 种重金属显示出不同程度的耐受能力, 其中多个菌株对多种测试重金属具有耐受能力(表 2)。这提示三叶鬼针草对镉、铅等重金属的耐受和富集能力可能与其体内定居的大量重金属抗性细菌有关。IAA 不仅可直接促进植物生长, 也是介导植物与环境、植物与微生物互作的重要信号分子^[37]。IAA 在植物抗重金属胁迫中也发挥重要作用, 外源添加 IAA 可通过对生长、细胞结构和根系构建、活性氧状态等的调节, 及对重金属的络合作用等多种方式提高受体植物重金属耐受能力, 这已在多个研究中得到证实^[38-41]。本研究从三叶鬼针草中分离得到的 34 株内生细菌中有 7 个菌株显示出具有产生 IAA 的能力, 其产率为 57.48–312.22 $\mu\text{g/mL}$ (图 5)。在报道的产生 IAA 内生细菌中, 不同菌株的 IAA 分泌水平有很大差异。例如, 姜晓宇等报道水稻种子内生细菌 IAA 分泌量最高可达 269.83 $\mu\text{g/mL}$ ^[18]。刘琳等从春兰获得 57 株分泌 IAA 内生细菌, 其 IAA 产率为 0.5–129.68 $\mu\text{g/mL}$ ^[42]。本研究从三叶鬼针草中分离得到的一些菌株 IAA 产率远高于其他文献报道菌株。研究也已显示接种具重金属抗性和产 IAA 的根际及内生细菌能显著提高受体植物对重金属的耐受能力和富集能力^[43-44]。本研究得到的所有 IAA 产生菌株至少对 3 种测试重金属具有耐受能力, 这

些菌株是微生物-植物联合修复重金属污染土壤, 特别是复合污染土壤的优良候选菌株。另一方面, 并非在某个部位、组织或结构中生长素含量越多, 对植物生长和吸收重金属便越有利^[38]。虽然从三叶鬼针草中分离到的菌株在体外培养条件下显示了高产 IAA 能力, 这些菌株是否在其宿主或其他植物体内仍能大量分泌 IAA, 以及如何与宿主协调互作使其内源 IAA 保持在一个合适的水平有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] Verma SK, Kingsley K, Bergen M, et al. Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease[J]. Plant and Soil, 2018, 422(1/2): 223-238
- [2] Chebotar VK, Malfanova NV, Shcherbakov AV, et al. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development (review)[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2015, 51(3): 271-277
- [3] Yu J, Yu ZH, Liu XB, et al. Diversity and growth promoting effects of endophytic bacteria in plant roots[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(13): 169-175 (in Chinese)
喻江, 于镇华, 刘晓冰, 等. 植物根组织内生细菌多样性及其促生作用[J]. 中国农学通报, 2015, 31(13): 169-175
- [4] Ruan DS, Zeng JH, Chao YQ, et al. Role of endophytes in plant tolerance to heavy metal stress[J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2700-2706 (in Chinese)
阮迪申, 曾加会, 晁元卿, 等. 重金属胁迫下内生菌对宿主植物的解毒机制[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2700-2706
- [5] Yan XL, Shou HY, Ma JS. The problem and status of the alien invasive plants in China[J]. Plant Diversity and Resources, 2012, 34(3): 287-313 (in Chinese)
闫小玲, 寿海洋, 马金双. 中国外来入侵植物研究现状及存在的问题[J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(3): 287-313
- [6] Ricciardi A, Blackburn TM, Carlton JT, et al. Invasion science: a horizon scan of emerging challenges and opportunities[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2017, 32(6): 464-474
- [7] White JF, Kingsley KI, Kowalski KP, et al. Disease protection and allelopathic interactions of seed-transmitted endophytic *Pseudomonas* of invasive reed grass (*Phragmites australis*)[J]. Plant and Soil, 2018, 422(1/2): 195-208
- [8] Li H, Liao D, Su JQ, et al. Diversity and function of endophytic bacteria in roots of exotic plant *Spartina*

- alterniflora[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(5): 856-862 (in Chinese)
- 李虎, 廖丹, 苏建强, 等. 外来种互花米草根内细菌多样性及功能[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(5): 856-862
- [9] Aires T, Serrão EA, Engelen AH. Host and environmental specificity in bacterial communities associated to two highly invasive marine species (Genus *Asparagopsis*)[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 559. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00559
- [10] He B, Li RY, Luo MY, et al. Effects of *Bidens pilosa* of invasive plant on soil ecological system at different developmental stages[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(5): 1953-1956 (in Chinese)
- 何兵, 李睿玉, 罗曼元, 等. 入侵植物三叶鬼针草不同发育期对土壤生态系统的影响[J]. 西南农业学报, 2013, 26(5): 1953-1956
- [11] Yan J, Zhang XY, Chen X, et al. Effects of rhizosphere soil microorganisms and soil nutrients on competitiveness of *Bidens pilosa* with different native plants[J]. Biodiversity Science, 2016, 24(12): 1381-1389 (in Chinese)
- 闫静, 张晓亚, 陈雪, 等. 三叶鬼针草与不同本地植物竞争对土壤微生物和土壤养分的影响[J]. 生物多样性, 2016, 24(12): 1381-1389
- [12] Sun YB, Zhou QX, Wang L, et al. Cadmium tolerance and accumulation characteristics of *Bidens pilosa* L. as a potential Cd-hyperaccumulator[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 161(2/3): 808-814
- [13] Chen JW, Sun YM, Wang FY, et al. Induction and accumulation of cadmium and lead by hairy root of *Bidens pilosa*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2015, 35(5): 1596-1602 (in Chinese)
- 湛金吾, 孙一铭, 王凤英, 等. 三叶鬼针草毛状根的诱导及其对重金属 Cd、Pb 蓄积[J]. 环境科学学报, 2015, 35(5): 1596-1602
- [14] Cole JR, Chai B, Marsh TL, et al. The ribosomal database project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(1): 442-443
- [15] Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, et al. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine[J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6669
- [16] Bian GK, Zhang YJ, Qin S, et al. Isolation and biodiversity of heavy metal tolerant endophytic bacteria from halotolerant plant species located in coastal shoal of Nantong[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(11): 1538-1547 (in Chinese)
- 卞光凯, 张越己, 秦盛, 等. 南通沿海滩涂耐盐植物重金属抗性内生细菌的筛选及生物多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(11): 1538-1547
- [17] Jiang CY. Screening of Heavy Metal-resistant strains and their biological characteristics and effects on the phytoremediation of soils contaminated with lead and cadmium[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2005 (in Chinese)
- 江春玉. 重金属铅镉抗性菌株的筛选、生物学特性及其强化植物修复铅镉污染土壤的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2005
- [18] Jiang XY, Gao JS, Xu FH, et al. Diversity of endophytic bacteria in rice seeds and their secretion of indole acetic acid[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(3): 269-275 (in Chinese)
- 姜晓宇, 高菊生, 徐凤花, 等. 水稻种子内生细菌多样性及其分泌植物生长素能力的测定[J]. 微生物学报, 2013, 53(3): 269-275
- [19] Tong R. Study on antimicrobial and antioxidant activity of *Bidens bipinnata* extracts[D]. Fujian: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2013 (in Chinese)
- 滕蓉. 鬼针草提取物抑菌及抗氧化活性研究[D]. 福建: 福建农林大学硕士学位论文, 2013
- [20] Li HQ. Development on chemical composition and analysis method of *Bidens*[J]. Shandong Chemical Industry, 2017, 46(3): 46-47, 49 (in Chinese)
- 李洪芹. 鬼针草化学成分及分析方法研究进展[J]. 山东化工, 2017, 46(3): 46-47, 49
- [21] Sun L, Qiu FB, Zhang XX, et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis[J]. Microbial Ecology, 2008, 55(3): 415-424
- [22] Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56329
- [23] Zhao S, Zhou N, Zhao ZY, et al. Endophytic bacterial diversity and dynamics in root of *Salicornia europaea* estimated via high throughput sequencing[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(6): 1000-1008 (in Chinese)
- 赵帅, 周娜, 赵振勇, 等. 基于高通量测序分析盐角草根部分内生细菌多样性及动态规律[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 1000-1008
- [24] Deng PX, Guo RR, Yu GW, et al. Characterization of endophytic bacterial communities from leaves and stems of two ecotype of *Sedum alfredii* by high-throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2017, 44(3): 533-544 (in Chinese)
- 邓平香, 郭荣荣, 余光伟, 等. 超积累和非超积累生态型东南景天茎、叶内生细菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 533-544
- [25] Huang J, Yan BF, Huang Y. Diversity of culturable actinobacteria from soils collected in Ali, Naqu and Haixi Districts on the Qinghai-Tibet Plateau[J]. Acta

- Microbiologica Sinica, 2017, 57(9): 1342-1351 (in Chinese)
黄娇, 闫兵法, 黄英. 青藏高原阿里、那曲和海西地区土壤可培养放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2017, 57(9): 1342-1351
- [26] Alvarez A, Saez JM, Costa JSD, et al. Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals[J]. Chemosphere, 2017, 166: 41-62
- [27] Bashan Y, De-Bashan LE, Prabhu SR, et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013)[J]. Plant and Soil, 2014, 378(1/2): 1-33
- [28] Gu HP, Lou J, Wang HZ, et al. Biodegradation, biosorption of phenanthrene and its trans-membrane transport by *Massilia* sp. WF1 and *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 38
- [29] Lou J, Gu HP, Wang HZ, et al. Complete genome sequence of *Massilia* sp. WG5, an efficient phenanthrene-degrading bacterium from soil[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 218: 49-50
- [30] Yan WZ, Zhang HQ, Yu CT, et al. Isolation of *Acinetobacter* sp. YN3 and its Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification characters[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2017, 11(7): 4419-4428 (in Chinese)
颜薇芝, 张汉强, 余从田, 等. 1 株异养硝化好氧反硝化不动杆菌的分离及脱氮性能[J]. 环境工程学报, 2017, 11(7): 4419-4428
- [31] Wang H, Wu LL, Zhou LH, et al. Identification and oil-degrading performance of *Acinetobacter* sp. isolated from North Shaanxi oil-contaminated soil[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(11): 2907-2915 (in Chinese)
王虎, 吴玲玲, 周立辉, 等. 陕北地区石油污染土壤中不动杆菌属的筛选、鉴定及降解性能[J]. 生态学报, 2014, 34(11): 2907-2915
- [32] Yoshida S, Hiradate S, Koitabashi M, et al. Phyllosphere *Methylobacterium* bacteria contain UVA-absorbing compounds[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2017, 167: 168-175
- [33] Vogel C, Bodenhausen N, Gruissem W, et al. The Arabidopsis leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health[J]. New Phytologist, 2016, 212(1): 192-207
- [34] Gong BN, Wu PX, Huang ZJ, et al. Enhanced degradation of phenol by *Sphingomonas* sp. GY2B with resistance towards suboptimal environment through adsorption on kaolinite[J]. Chemosphere, 2016, 148: 388-394
- [35] Zhu XH, Sun ZY, Jian C, et al. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* isolates[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2005, 5(6): 342-345 (in Chinese)
朱旭慧, 孙自镛, 简翠, 等. 不动杆菌属的耐药性分析[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(6): 342-345
- [36] Carvalho A, Silva J, Teixeira P. Lettuce and fruits as a source of multidrug resistant *Acinetobacter* spp.[J]. Food Microbiology, 2017, 64: 119-125
- [37] Yang Y, Gao KX, Wu Y, et al. Acid-mediated cross-kingdom signalling involved in plant-bacteria interactions[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(8): 14-21 (in Chinese)
杨扬, 高克祥, 吴岩, 等. 吲哚乙酸跨界信号调节植物与细菌互作[J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 14-21
- [38] Zhang XM, Wang HJ, Wang HB. Advances in biosynthesis and degradation of indoleacetic acid in plants under heavy metal stress[J]. Chinese Journal of Ecology, 2017, 36(4): 1097-1105 (in Chinese)
张雪梅, 王海娟, 王宏宾. 重金属对植物吲哚乙酸合成与分解影响研究进展[J]. 生态学杂志, 2017, 36(4): 1097-1105
- [39] Hąc-Wydro K, Sroka A, Jabłońska K. The impact of auxins used in assisted phytoextraction of metals from the contaminated environment on the alterations caused by lead (II) ions in the organization of model lipid membranes[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 143: 124-130
- [40] Bashri G, Prasad SM. Indole acetic acid modulates changes in growth, chlorophyll a fluorescence and antioxidant potential of *Trigonella foenum-graecum* L. grown under cadmium stress[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37: 49. DOI: 10.1007/s11738-014-1745-z
- [41] Ostrowski M, Ciarkowska A, Jakubowska A. The auxin conjugate indole-3-acetyl-aspartate affects responses to cadmium and salt stress in *Pisum sativum* L.[J]. Journal of Plant Physiology, 2016, 191: 63-72
- [42] Liu L, Sun L, Zhang RY, et al. Diversity of IAA-producing endophytic bacteria isolated from the roots of *Cymbidium goeringii*[J]. Biodiversity Science, 2010, 18(2): 182-187 (in Chinese)
刘琳, 孙磊, 张瑞英, 等. 春兰根中可分泌吲哚乙酸的内生细菌多样性[J]. 生物多样性, 2010, 18(2): 182-187
- [43] Kang SM, Waqas M, Hamayun M, et al. Gibberellins and indole-3-acetic acid producing rhizospheric bacterium *Leifsonia xyli* SE134 mitigates the adverse effects of copper-mediated stress on tomato[J]. Journal of Plant Interactions, 2017, 12(1): 373-380
- [44] Yu X, Li Y, Cui Y, et al. An indoleacetic acid-producing *Ochrobactrum* sp. MGJ11 counteracts cadmium effect on soybean by promoting plant growth[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(4): 987-996