

## 白皮锦鸡儿种子内生细菌的分布与分离鉴定

时晓寒 程聪 李玉倩 安登第\*

(新疆师范大学生命科学学院 新疆 乌鲁木齐 830054)

**摘要:**【目的】了解对荒漠环境有良好适应性的白皮锦鸡儿种子可培养内生细菌的多样性。【方法】采用种子表面灭菌、种皮与种仁分离、可培养细菌分离纯化、对 pH 及盐的耐受性、16S rRNA 基因序列扩增和系统发育分析进行系统研究。【结果】从白皮锦鸡儿成熟种子种皮和种仁分别分离纯化到 6 株和 26 株内生细菌, 其中分离自种皮的菌株最适 pH 均在 9.0 以上, 且有 3 株最高可耐受 pH 14.0, 有 5 株可耐受 10% 的 NaCl; 分离自种仁的菌株 pH 耐受范围明显低于种皮, 但有 12 株对 NaCl 的耐受性可达 10%。16S rRNA 基因序列分析显示, 30 株与芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.) 接近, 相似率 95%–99%, 其中 13 株与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 的相似率为 96%–99%, 11 株与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 相似率为 95%–99%; 1 株与单孢菌属 (*Sphingomonas* sp.) 相似率为 99%, 1 株与大肠杆菌属(*Escherichia* sp.) 相似率为 98%。【结论】白皮锦鸡儿种仁内生菌数量和种类均高于种皮, 体现出其可培养内生菌在空间分布的分异性及种类的多样性, 且推测其种皮内生菌对盐碱的高度耐受性应与其环境适应性相关。

**关键词:** 内生细菌, 空间分布, 生物学特性, 分子鉴定, 白皮锦鸡儿

## Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from the seed of *Caragana leucophloea* Pojark

SHI Xiao-Han CHENG Cong LI Yu-Qian AN Deng-Di\*

(College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

**Abstract:** [Objective] This paper aimed to estimate the diversity and characterization of endophytic bacteria isolated from seed of *Caragana leucophloea* Pojark which good adaptability to desert. [Methods] The methods used in this study include seeds surface sterilization, seed coat and kernel separation, endophytic bacteria isolation, tolerance to pH and NaCl estimating, 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analyzing. [Results] With the thirty-two isolates, six and twenty-six strains were obtained from seed coat and kernel, respectively. The optimal pH for all strains that from seed coat was above pH 9.0 and the maximum was up to 14.0 for three of them, and the tolerance to salt was up to 10% NaCl for five isolates. The tolerance to pH of the strains isolated from kernel was

**Foundation item:** Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2011211A030)

\*Corresponding author: E-mail: anddi@xjnu.edu.cn

**Received:** August 08, 2015; **Accepted:** October 30, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 04, 2015  
**基金项目:** 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(No. 2011211A030)

\*通讯作者: E-mail: anddi@xjnu.edu.cn

**收稿日期:** 2015-08-08; **接受日期:** 2015-10-30; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-04

significantly lower than that from seed coat, but there's twelve strains could tolerant to salt up to 10% NaCl also. According to 16S rRNA gene sequences analysis, thirty strains belong to *Bacillus* sp. with the similarity between 95%–99%. Among them, thirteen isolates was closed to *Bacillus subtilis* with similarity 96%–99% and eleven was closed to *Bacillus licheniformis* with similarity 95%–99%. One strain belong to genus *Sphingomonas* sp. with the homology of 99%, and one belong to genus *Escherichia* sp. with the homology of 98%. **[Conclusion]** The results has showed that the diversity of endophytic bacteria of *C. leucophloea*'s kernel was higher than that of the coat, indicating their space distribution and species diversity. And we could speculate that the higher tolerance on pH and salt of the bacteria of the seed coat must have some relationship with the host environment adaptability.

**Keywords:** Endophytic bacteria, Space distribution, Biological characteristics, Molecular identification, *Caragana leucophloea* Pojark

白皮锦鸡儿(*Caragana leucophloea* Pojark)为豆科(Leguminosae)蝶形花亚科(Faboideae)山羊豆族(Galegeae)锦鸡儿属(*Caragana* Fabr)植物<sup>[1]</sup>, 主要分布于准格尔盆地西部山地、新疆东天山及内蒙、甘肃等地的荒漠草原<sup>[2]</sup>, 具有耐干旱、贫瘠环境等特点, 根系发达, 可作固沙植物。锦鸡儿属植物作为干旱、半干旱区重要的水土保持物种, 对荒漠生态系统有重要价值, 同时也是优良牧草, 还是良好的蜜源植物, 部分还具有药用价值<sup>[3]</sup>。

植物内生菌(Endophyte)是指那些在其生活史的一定阶段或者全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部的真菌或者细菌, 被感染的宿主植物(至少是暂时)不表现出外在症状<sup>[4]</sup>。内生菌具有增强植物耐受盐胁迫的能力<sup>[5-7]</sup>, 并且高等物种的部分功能完全由共生微生物提供, 一些植物离开共生菌就无法在逆境中生存<sup>[6]</sup>, 如在美国黄石国家公园, 禾本科二型花属植物 *Dichanthelium lanuginosum* 与其内生菌 *Curvularia protuberata* 共生可耐 65 °C 高温, 但若二者分开则任何一种都会在 38 °C 死亡<sup>[8]</sup>, 而 *C. protuberata* 耐热性需要真菌 RNA 病毒的存在, 只有这样的“三位一体共生(Three-way symbiosis)”才可耐受高温<sup>[9]</sup>。当前我国科技工作者也对植物内生菌研究给予了相当的重视, 对多种草本、木本和藤本植物的内生微生物进行了比较和分析, 也对植物内生菌在生态学、生物学、微生物的进化和物种形成、内生菌/宿主的联合代谢等领域的意义和价值进行了探讨<sup>[10]</sup>。

广泛分布于荒漠环境的白皮锦鸡儿对逆境的适应是长期进化形成的, 目前对其相关研究主要集中在系统分类及抗旱生理响应和种子萌发诱导等<sup>[11-15]</sup>。研究已证实大多数植物的抗逆特性是与其内生菌密切相关的, 但对具有典型耐受干旱的白皮锦鸡儿内生菌的类群和特性等尚未有报道。本实验以白皮锦鸡儿成熟种子为材料, 采用常规方法分离其内生细菌并对其进行生理生化和分子进化检测, 以了解白皮锦鸡儿种子内生细菌的组成及分布特点, 尝试从内生细菌特性方面对白皮锦鸡儿抗旱、耐盐碱特性进行探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 白皮锦鸡儿种子:** 白皮锦鸡儿成熟种子采自乌鲁木齐市达坂城区(N43°33'35", E87°51'45", 海拔 1 107 m)。

**1.1.2 培养基:** 牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 3、蛋白胨 10、NaCl 5, 固体培养基另加琼脂 15, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。

### 1.2 内生细菌的分离、纯化

取白皮锦鸡儿成熟种子 35 粒, 浓硫酸浸泡 5 min, 180 mL 无菌水振荡洗涤 10 min; 70%酒精浸泡 10 min, 无菌水振荡冲洗一次; 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 2 min, 无菌水振荡冲洗 6 次。以最后一次漂洗液涂布牛肉膏蛋白胨培养基平板做灭菌效果检测。预处理种子置灭菌培养皿中, 用灭菌镊子将种皮、

种仁分离, 种皮以 2 mL、种仁 8 mL 无菌水分别研磨至浆状, 分别稀释至  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  三个稀释度各取 200  $\mu$ L 涂布牛肉膏蛋白胨平板, 每个梯度 5 个重复<sup>[16]</sup>。37 °C 培养至长出单菌落, 反复划线至纯培养菌株。

### 1.3 形态及生理生化鉴定

纯化菌株采用常规法进行革兰氏染色、过氧化氢酶、耐盐、pH 耐受、淀粉水解、纤维素水解、糖醇发酵、酯酶、酪蛋白水解等试验<sup>[17]</sup>。

### 1.4 分子鉴定

采用 CTAB 法<sup>[18]</sup>提取分离株基因组 DNA, 以通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')(北京鼎国)进行 PCR 扩增, 50  $\mu$ L 反应体系为: ddH<sub>2</sub>O 35  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer (2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 5  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 5  $\mu$ L, 27F (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, 1492R (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, Taq 酶 (5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L。PCR 扩增条件为: 94 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经纯化回收, 连接到 pTA2 载体(Toyoba, Osaka, Japan), 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 经蓝白斑筛选后测序。序列经 BLAST 进行最大相似性比对, 用 Clustal X 1.83<sup>[19]</sup>进行同源分析, MEGA 2 的 Neighbor-Joining (NJ)法<sup>[20]</sup>构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生菌的分离及纯化

种子表面灭菌处理经涂布检测灭菌彻底。由表面灭菌的白皮锦鸡儿种子种皮分离到 6 株、种仁 26 株共 32 株内生细菌。经革兰氏染色、显微镜观察, 均为 G<sup>-</sup>菌(表 1)。

### 2.2 分离株生理生化鉴定

对分离株的主要生理生化特性测定, 白皮锦鸡儿种子内生菌适应 pH 范围在 4.0–14.0 之间, 其中 14 株最适 pH 为 9.0, 2 株最适 pH 达到 10.0, 而分离自种皮的 6 株最适 pH 均在 9.0 以上且有 5 株可

耐受 10% NaCl; 25 株淀粉酶、27 株蛋白酶检测阳性, 特别是全部菌株均可耐受 5% 的 NaCl, 其中 17 株对 NaCl 的耐受度达 10% (表 1)。

### 2.3 分离株 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树构建

16S rRNA 基因序列分析表明(表 2), 32 个分离株中 30 株与芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)接近, 相似性在 95%–99%之间; 1 株与单孢菌属(*Sphingomonas* sp.)接近, 相似性为 99%; 1 株与大肠杆菌(*Escherichia* sp.)接近, 相似性为 98%。

分离株序列以 BLAST 与 GenBank 比对, 选取相似性最高的已发表菌株为参考序列, 共同用 ClustalX 1.83<sup>[19]</sup>进行相似性分析, 用 MEGA 2 以最大相邻法<sup>[20]</sup>构建系统进化树(图 1)。

由图 1 可见, 32 个分离株可分为 3 大类群。第 1 类群是芽孢杆菌属, 占 93.9%。这一类群又由 5 个次级族群组成, 第 1 族群是包含 11 个分离株的枯草芽孢杆菌类, 其最接近参考菌株 *Bacillus* sp. strain JS<sup>[21]</sup>是分离自芒草(*Miscanthus*)根际土壤的芽孢杆菌, 证实其对宿主具有促生作用并已从基因组层面获得相应证据; 第 2 族群由 7 个分离株组成, 其参考菌株为分离自施用豆饼肥料的土壤并可产生热稳定性良好的  $\beta$ -甘露聚糖酶<sup>[22]</sup>, 特殊的是这 7 株菌 pH 耐受均在 11.0 以上, 最高为分离自种皮的 ANP111 可耐受 pH 14.0, 而对 NaCl 的耐受性有 3 株为 5%、4 株为 10%, 显示来源于白皮锦鸡儿的内生菌具有较强的盐碱耐受性; 其余 3 个次级族群为地衣芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌。第 2 大类群由 1 株与大肠杆菌属接近的分离株组成。第 3 大类群是属于单孢菌属的 1 个分离株 AGR1113, 其对盐的耐受性为 5%, 而 Chen 等<sup>[23]</sup>报道分离自林地土壤的 *Sphingomonas hunanensis* 的 NaCl 耐受仅为 1%, 显示来源于不同环境的相近菌株对盐的耐受性有较大差异。由此分析可见, 白皮锦鸡儿内生细菌以芽孢杆菌为优势属, 枯草芽孢杆菌为优势种。

表1 分离菌株生理生化特征  
Table 1 Characteristics of the isolation from seed of *Caragana leucophloea*

菌株 Strains	革兰氏染色 Gram staining	表型 Phynotype	pH		盐耐受 Salt tolerance (NaCl, %)	产酶 Enzyme production					糖利用 Glucose utilization				
			范围 Extent	最适 Optimum		Es	Am	Pr	Ca	Ce	Cel	Cy	Rh	Tr	Ra
Seed coat															
BNP111	-	R	7.0-10.0	9.0	10	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ANP111	-	R	7.0-14.0	9.0	10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ANP131	-	R	7.0-13.0	10.0	10	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
ANP211	-	R	7.0-14.0	9.0	10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
BNP211	-	R	6.0-11.0	9.0	10	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ANP221	-	R	4.0-14.0	9.0	5	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
Seed kernel															
ANR211	-	R	7.0-14.0	10.0	10	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
BNR143	-	R	6.0-14.0	9.0	10	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
BNR141	-	R	6.0-11.0	9.0	10	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
BNR121	-	R	7.0-12.0	9.0	5	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
BNR232	-	R	4.0-11.0	8.0	10	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
BNR231	-	R	6.0-11.0	9.0	10	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
BNR222	-	R	5.0-11.0	9.0	10	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
BNR111	-	R	7.0-11.0	9.0	10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
BNR153	-	R	6.0-11.0	8.0	10	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
BNR152	-	R	6.0-11.0	9.0	10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
BNR221	-	R	5.0-11.0	9.0	10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ANR111	-	R	7.0-11.0	9.0	10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
BNR241	-	R	4.0-11.0	7.0	10	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
BGR152	-	R	6.0-12.0	7.0	5	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
BGR281	-	R	6.0-11.0	7.0	5	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
AGR112	-	R	6.0-9.0	7.0	5	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
BGR272	-	R	7.0-11.0	7.0	5	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
BGR273	-	R	6.0-12.0	7.0	5	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
BGR263	-	R	6.0-12.0	7.0	5	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
AGR111	-	R	6.0-12.0	7.0	5	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
BGR121	-	R	6.0-12.0	7.0	5	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
BGR141	-	R	6.0-10.0	6.0	5	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
BGR112	-	R	6.0-11.0	6.0	5	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
BGR261	-	R	6.0-11.0	6.0	5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
BGR151	-	R	6.0-10.0	6.0	5	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
AGR1113	-	R	6.0-9.0	6.0	5	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

注: R: 杆状; +: 阳性;-: 阴性; Es: 酯酶; Am: 淀粉水解酶; Pr: 蛋白水解酶; Ca: 过氧化氢酶; Ce: 纤维素酶; Cel: 纤维二糖; Cy: 环糊精; Rh: 鼠李糖; Tr: 海藻糖; Ra: 棉子糖。

Note: R: Rod; +: Positive; -: Negative; Es: Esterase; Am: Amylolysis; Pr: Proteolysis; Ca: Catalase; Ce: Cellulose; Cel: Cellobiose; Cy: Cyclodextrin; Rh: Rhamnose; Tr: Trehalose; Ra: Raffinose.

表2 分离菌株同最近菌株的系统发育关系  
Table 2 Phylogenetic relation to nearest neighbors of isolated strains

菌株 Strains	登录号 Accession number	相似菌 Closest type strains		
		数据库相似菌株 Strains in GenBank database (accession number)	对比片段 Length of fragment for alignment analysis (bp)	相似性 Similarity (%)
Seed coat				
BNP111	KT166426	<i>Bacillus subtilis</i> strain K21 (JN587510)	929/949	98
ANP111	KT166427	<i>Bacillus</i> sp. B18(2008) (EU362164)	1 024/1 061	97
ANP131	KT166428	<i>Bacillus licheniformis</i> strain P79s (FJ808719)	1 034/1 045	99
ANP211	KT074451	<i>Bacillus subtilis</i> strain K21 (JN587510)	931/935	99
BNP211	KT074450	<i>Bacillus subtilis</i> strain ZLY (JX402129)	929/949	96
ANP221	KT074452	<i>Bacillus cereus</i> strain ATCC14579 (AF290547)	975/985	99
Seed kernel				
ANR211	KT074470	<i>Bacillus licheniformis</i> strain P79 (FJ808719)	825/847	97
BNR143	KT074465	<i>Bacillus licheniformis</i> strain UEB FC (HQ154527)	934/937	99
BNR141	KT074462	<i>Bacillus subtilis</i> strain MUSc-1 (GU982919)	969/977	99
BNR121	KT074456	<i>Bacillus cereus</i> strain: Acj 209 (AB480773)	786/805	98
BNR232	KT166430	<i>Bacillus subtilis</i> strain K21 (JN587510)	1 036/1 057	98
BNR231	KT074457	<i>Bacillus</i> sp. 6014 (JX566659)	682/691	99
BNR222	KT166434	<i>Bacillus subtilis</i> strain CCM 1999 (DQ207730)	1 062/1 073	99
BNR111	KT166431	<i>Bacillus licheniformis</i> strain: M1-1 (AB039328)	1 034/1 067	99
BNR153	KT074472	<i>Bacillus subtilis</i> strain BCRC 10058 (DQ993674)	931/957	97
BNR152	KT074454	<i>Bacillus subtilis</i> strain CCM 1999 (DQ207730)	510/512	99
BNR221	KT166429	<i>Bacillus subtilis</i> strain K21 (JN587510)	1 015/1 056	96
ANR111	KT074453	<i>Bacillus licheniformis</i> strain UEB FC (HQ154527)	744/753	99
BNR241	KT166432	<i>Bacillus subtilis</i> strain AP254 (JX094283)	1 045/1 079	97
BGR152	KT074471	<i>Bacillus licheniformis</i> strain: GH10 (AB301007)	817/862	95
BGR281	KT074458	<i>Bacillus licheniformis</i> strain T10 (JQ412068)	1 017/1 020	99
AGR112	KT074464	<i>Bacillus</i> sp. B18(2008) (EU362164)	856/891	96
BGR272	KT074455	<i>Bacillus subtilis</i> strain JM4 (AY728013)	798/812	98
BGR273	KT074467	<i>Bacillus licheniformis</i> strain P79 (FJ808719)	971/978	99
BGR263	KT166433	<i>Bacillus subtilis</i> strain: Acj 115 (AB480760)	1 031/1 050	98
AGR111	KT074459	<i>Bacillus</i> sp. B18(2008) (EU362164)	1 009/1 014	99
BGR121	KT166435	<i>Bacillus licheniformis</i> strain P79 (FJ808719)	1 001/1 045	99
BGR141	KT074469	<i>Bacillus licheniformis</i> strain P79 (FJ808719)	971/979	99
BGR112	KT074463	<i>Escherichia coli</i> strain 22 (GU968172)	980/986	98
BGR261	KT074466	<i>Bacillus subtilis</i> strain K21 (JN587510)	979/980	99
BGR151	KT074461	<i>Bacillus licheniformis</i> strain HPG16 (JQ291596)	922/925	99
AGR1 113	KT074460	<i>Sphingomonas</i> sp. V1 (AF324199)	980/989	99

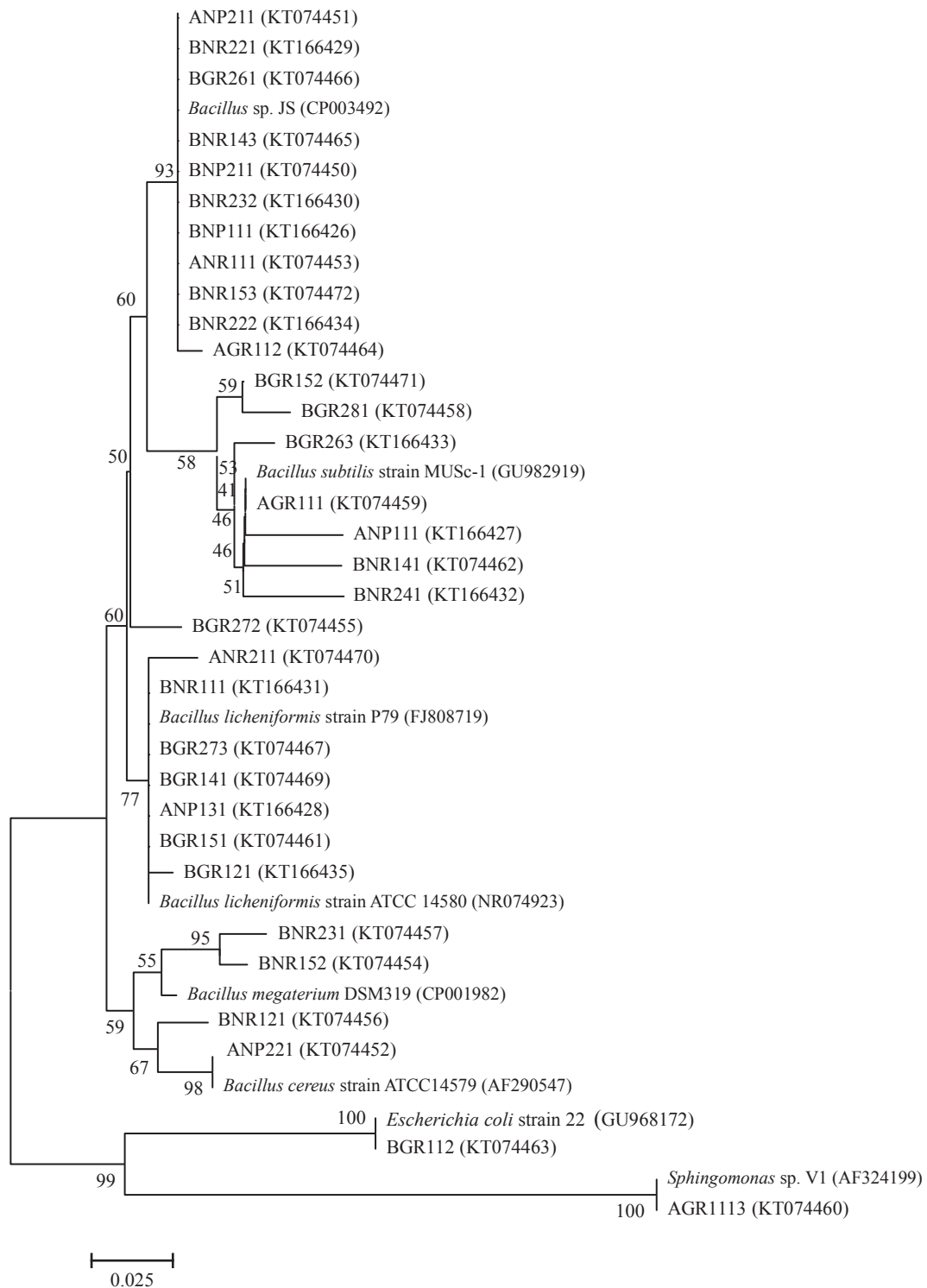


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的白皮锦鸡儿内生细菌系统发育树

Figure 1 16S rRNA gene phylogenetic tree of endophytes from *Caragana leucophloea*

Note: Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar (0.025) represents sequence divergence.

### 3 讨论

内生菌的分离鉴定是植物与微生物共生研究的基础,是揭示微生物与植物互作、发现重要功能微生物资源的前提,历来受到科技工作者的重视<sup>[24]</sup>。本试验选取的白皮锦鸡儿是荒漠草原的建群种,具有抗干旱、抗侵蚀、耐贫瘠的特性<sup>[2,11]</sup>,由其种子分离的内生细菌也大多数属于抗性极强的芽孢杆菌类<sup>[25]</sup>,其中超过40%的菌株与枯草芽孢杆菌相似,生理特性检测发现其具有较强的盐碱耐受性,这一结果与大多数植物内生菌的优势种是枯草芽孢杆菌一致<sup>[25-27]</sup>。枯草芽孢杆菌可产生多种抗生素和一些相应酶类,因而具有抑制病原菌的功能<sup>[28]</sup>,且内生枯草芽孢杆菌可通过生态占位<sup>[29]</sup>、产生伊枯草菌素(Iturin)<sup>[30]</sup>等为宿主植物提供保护;占总数30%以上的分离株与地衣芽孢杆菌相似,其半数可耐受pH 9.0或10%的NaCl,这类芽孢杆菌可产生一些蛋白类抗菌物质<sup>[31]</sup>,如Kim等<sup>[32]</sup>在发酵大豆中发现的地衣芽孢杆菌B65-1可产生苯乙酸类抗菌物质,对大豆病原菌有良好的抑制作用。

综上所述,白皮锦鸡儿种子内生菌中占绝对优势的类群是芽孢杆菌类,其中种皮的内生菌最适pH和对盐的耐受性均较高,由此推测白皮锦鸡儿对环境的耐受性,特别是其种子在萌发阶段对干旱和盐碱的耐受应包含了这些内生菌的贡献,亦或是高盐碱环境胁迫演化了内生菌的适应性,或是兼而有之。因此,本试验分离获得的白皮锦鸡儿种子内生菌在其环境适应中的生物学效应,以及潜在的共生抗逆价值等都值得进一步研究。

### 参考文献

- [1] Gao HF. Flavonoids from *Caragana leucophloea* and their antimicrobial and antioxidant activities[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2011 (in Chinese)  
高海峰. 白皮锦鸡儿黄酮及其抗菌和抗氧化活性[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2011
- [2] Cui NR. Main Forage Plants of Xinjiang: Second Volume[M]. Urumqi: Health Science and Technology Publishing House in Xinjiang, 1994 (in Chinese)  
崔乃然. 新疆主要饲用植物志: 第2册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1994
- [3] Qiu J, Tang GG, Wan J, et al. Biological traits and ecological response of *Caragana* sp. in drought environment[J]. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology, 2014, 41(2): 45-49 (in Chinese)  
邱靖, 汤庚国, 万劲, 等. 锦鸡儿属植物对干旱环境适应的特性及其对环境干旱的生态响应[J]. 江苏林业科技, 2014, 41(2): 45-49
- [4] Chen XD. Endophytic microorganisms are valuable resources worthy to be explored deeply[J]. Microbiology China, 2012, 39(2): 282 (in Chinese)  
陈向东. 植物内生菌是有待深入开发的资源宝库[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 282
- [5] Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(38): 13386-13391
- [6] Rodriguez R, Redman R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(5): 1109-1114
- [7] Baltruschat H, Fodor J, Harrach BD, et al. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants[J]. New Phytologist, 2008, 180(2): 501-510
- [8] Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, et al. Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis[J]. Science, 2002, 298: 1581
- [9] Márquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, et al. A virus in a fungus in a plant—three way symbiosis required for thermal tolerance[J]. Science, 2007, 315(5811): 513-515
- [10] Wang ZW, Ji YL, Chen YG. Studies and biological significances of plant endophytes[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 349-363 (in Chinese)  
王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349-363
- [11] Yao H, Zhao XY, Li XM, et al. Physiological response of 3 kinds of *Caragana* plant seedlings on continuous drought[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(9): 3915-3917 (in Chinese)  
姚华, 赵晓英, 李晓梅, 等. 3种锦鸡儿属植物幼苗对持续干旱的生理响应[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(9): 3915-3917
- [12] Chinese Academy of Sciences, China Flora Editorial Board. Flora of China (Volume Forty-Second, 1)[M]. Beijing: Science press, 1993: 13-67 (in Chinese)  
中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第四十二卷, 第一分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1993: 13-67
- [13] Niu XW. The distribution and description of *Caragana* Fabr. in China[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 1999, 19(5): 107-133 (in Chinese)  
牛西午. 中国锦鸡儿属植物资源研究—分布及分种描述[J]. 西北植物学报, 1999, 19(5): 107-133
- [14] Duan YH, Niu XW, Li SQ, et al. Genetic diversity analysis of peashrub in China by RAPD[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2009, 24(1): 143-148 (in Chinese)  
段永红, 牛西午, 李素清, 等. 锦鸡儿属植物遗传多样性的RAPD分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(1): 143-148
- [15] Lin P, Wang YD, Qi LW, et al. Clone and sequence analysis of *fad2* genes from *Caragana intermedia*[J]. Molecular plant breeding, 2008, 6(1): 148-154 (in Chinese)  
林萍, 汪阳东, 齐力旺, 等. 中间锦鸡儿 *fad2* 基因克隆与序列分析[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 148-154
- [16] Li YQ, Shen Q, Liu BB, et al. Identification of endophytes from tomato seedlings and analysis of DNA fingerprints using ERIC-PCR[J]. Microbiology China, 2003, 30(5): 89-93 (in Chinese)

- Chinese)  
李艳琴, 申泉, 刘彬彬, 等. 番茄内生菌分离及其 ERIC-PCR 指纹图谱分析[J]. 微生物学通报, 2003, 30(5): 89-93
- [17] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 349 (in Chinese)  
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349
- [18] Osborne FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology[M]. Beijing: Science and Technology Press, 2001: 36-39 (in Chinese)  
奥斯伯 FM, 布伦特 R, 金斯敦 RE, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001: 36-39
- [19] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882
- [20] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, et al. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software[J]. Bioinformatics, 2001, 17(12): 1244-1245
- [21] Song JY, Kim HA, Kim JS, et al. Genome sequence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus* sp. strain JS[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(14): 3760-3761
- [22] Summpunn P, Chaijan S, Isarangkul D, et al. Characterization, gene cloning, and heterologous expression of  $\beta$ -mannanase from a thermophilic *Bacillus subtilis*[J]. The Journal of Microbiology, 2011, 49(1): 86-93
- [23] Chen QH, Chen JH, Ruan Y, et al. *Sphingomonas humanensis* sp. nov., isolated from forest soil[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2011, 99(4): 753-760
- [24] Sun ZB, Yuan XF, Wang YX, et al. Diversity of culturable entophytic bacteria in cucumber leaves at blossoming and fruiting stages[J]. Microbiology China, 2012, 39(6): 764-772 (in Chinese)  
孙占斌, 袁行方, 王音嫻, 等. 黄瓜初花期与结瓜期叶片可培养内生细菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(6): 764-772
- [25] Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants[J]. Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2198-2208
- [26] Bai YM, D'Aoust F, Smith DL, et al. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48(3): 230-238
- [27] Hong YC. Study on endophytic bacteria (*Bacillus subtilis*) from tea plant[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2006 (in Chinese)  
洪永聪. 茶树内生枯草芽孢杆菌的研究[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2006
- [28] Meng XY. Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain B11 and construction DNA library of the strain[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2005 (in Chinese)  
蒙显英. 枯草芽孢杆菌 B11菌株分泌的拮抗物质的纯化及基因文库的构建[D]. 南宁: 广西大学硕士论文, 2005
- [29] Charles WB, Ida EY, Dorothy MH, et al. Biological Control of *Fusarium moniliforme* in Maize[J]. Environmental Health Perspectives, 2001, 109(S2): 325-332
- [30] Cho SJ, Lee SK, Cha BJ, et al. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 223(1): 47-51
- [31] Tang LJ, Ji ZL, Xu JY, et al. Mechanisms of action to *Botrytis cinerea* and antimicrobial substance of *Bacillus licheniformis* W10[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2005, 21(3): 203-205 (in Chinese)  
唐丽娟, 纪兆林, 徐敬友, 等. 地衣芽孢杆菌 W10对灰葡萄孢的抑制作用及其抗菌物质[J]. 中国生物防治, 2005, 21(3): 203-205
- [32] Kim Y, Cho JY, Kuk JH, et al. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, Chungkook-Jang[J]. Current Microbiology, 2004, 48(4): 312-317