

研究报告

肉苁蓉内生细菌多样性及功能菌株的分离筛选

木尼热·木塔力甫¹, 艾尼江·尔斯满², 叶艺洁¹, 张芯语¹, 楚敏², 朱静², 王伟^{*1}, 张志东^{*1,2}

1 新疆农业大学 食品科学与药学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

2 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆特殊环境微生物实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091

木尼热·木塔力甫, 艾尼江·尔斯满, 叶艺洁, 张芯语, 楚敏, 朱静, 王伟, 张志东. 肉苁蓉内生细菌多样性及功能菌株的分离筛选[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4058-4074.

Munire-Mutalifu, Ainijiang-Ersiman, YE Yijie, ZHANG Xinyu, CHU Min, ZHU Jing, WANG Wei, ZHANG Zhidong. Diversity of endophytic bacteria and screening of functional strains from *Cistanche deserticola*[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4058-4074.

摘要:【背景】植物内生菌是研究微生物多样性和适应性进化的宝库。肉苁蓉(*Cistanche deserticola*)是列当科的药用植物之一,有“沙漠人参”的美誉,具有极高的药用价值。然而有关肉苁蓉内生菌的相关研究较为有限。【目的】解析不同种类肉苁蓉内生细菌群落多样性差异,并挖掘相关内生细菌资源。【方法】利用高通量测序技术,对管花肉苁蓉(GH)和荒漠肉苁蓉(HM)群落组成差异及多样性进行分析;采用传统微生物分离方法开展相关内生细菌分离培养,利用16S rRNA基因序列比对初步明确菌株的分类定位,进一步测定菌株的抗逆、促生及抑菌特性。【结果】高通量测序结果表明, GH和HM共获得内生菌OTU 1 086个,其中共有OTU为46个,仅占总数的4.24%;所获得的内生细菌OTU共涉及19个门104个目226个属及一些未分类的细菌,变形菌门(*Proteobacteria*)为共同的优势菌门,占69.46%,但两种肉苁蓉样品之间内生细菌群落结构存在明显差异。实验分离获得65株肉苁蓉内生细菌,归属于芽孢杆菌门(*Bacillota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinomycetota*)等3个门20个属34个种,其中芽孢杆菌门(*Bacillota*)占比最高,并分离筛选多株抗逆、促生及抑菌菌株。【结论】管花肉苁蓉(GH)和荒漠肉苁蓉(HM)微生物群落组成存在明显差异,实验获得一批肉苁蓉内生细菌菌株,为进一步开发利用肉苁蓉内生菌提供了前期基础。

关键词: 肉苁蓉; 内生细菌; 高通量测序; 抗逆; 促生作用; 抑菌活性

资助项目: 新疆农业科学院农业科技创新稳定支持专项(xjnkywdzc-2023005)

This work was supported by the Stability Support Found for the Agricultural Science and Technology Innovation from Xinjiang Academy of Agricultural Sciences (xjnkywdzc-2023005).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Zhidong, zhangzheedong@sohu.com; WANG Wei, ww2shz@163.com

Received: 2024-02-18; Accepted: 2024-06-11; Published online: 2024-07-10

Diversity of endophytic bacteria and screening of functional strains from *Cistanche deserticola*

Munire·Mutalifu¹, Ainijiang·Ersiman², YE Yijie¹, ZHANG Xinyu¹, CHU Min², ZHU Jing², WANG Wei^{*1}, ZHANG Zhidong^{*1,2}

1 College of Food Sciences and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

2 Xinjiang Laboratory of Special Environment Microbiology, Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Plant endophytes represent the treasure for investigating microbial diversity and adaptive evolution. *Cistanche* is a genus of medicinal plants belonging to *Orobanchaceae* and honored as “ginseng of the deserts”. However, few studies have been carried out on the endophytes of *Cistanche*. [Objective] To investigate the diversity of endophytic bacteria in different *Cistanche* species and explore the endophytic bacterial resources. [Methods] The plants of *Cistanche tubulosa* (Schrenk) R. Wight (GH) and *C. deserticola* Y.C. Ma (HM) were sampled and subjected to high-throughput sequencing. The conventional microbial isolation method was used to isolate endophytic bacteria, and the isolates were identified by 16S rRNA gene sequence alignments. Subsequently, the stress tolerance, plant growth-promoting effects, and antimicrobial activities of the strains were evaluated. [Results] The high-throughput sequencing revealed a total of 1 086 OTUs of endophytic bacteria in GH and HM samples, among which 46 (4.24%) common OTUs were shared by the two species. The OTUs belonged to 226 genera, 104 orders of 19 phyla and some uncategorized bacteria. *Proteobacteria* was the dominant phylum in both samples, accounting for 69.46%. Significant differences were observed in the community structure of endophytic bacteria between the two species. In addition, 65 strains of endophytic bacteria were isolated from the plants, belonging to 34 species, 20 genera of 3 phyla (*Bacillota*, *Proteobacteria*, and *Actinomycetota*), and *Bacillota* had the highest relative abundance. Furthermore, the stress tolerance, plant growth-promoting effects, and antimicrobial activities of the isolates were evaluated. [Conclusion] The community structure of endophytic bacteria presented significant differences between *Cistanche* species. This study isolated several endophytic bacterial strains, which provided a basis for subsequent applications.

Keywords: *Cistanche deserticola*; endophytic bacteria; high-throughput sequencing; stress tolerance; growth-promoting effect; antimicrobial activity

植物内生菌是一种在整个生命周期或部分时间寄生在植物组织内部且暂时对寄主组织并不引起明显病症的微生物，内生菌种类多样、分布广泛，是重要的微生物资源库^[1]。内生菌作为宿主植物的重要组成部分，对调节宿

主体内的微生态平衡及促进宿主植物的健康生长均发挥重要作用^[2]。目前，关于内生菌多样性的研究方法主要基于传统培养方法^[3]。然而，仅靠传统培养方法不能全面地反映植物内生菌资源。高通量测序技术因其免培养、信息

量大等优点,已广泛应用于环境微生物^[4]、肠道微生物^[5]、植物内生菌^[6]等微生物多样性及群落分析研究中。

肉苁蓉(*Cistanche deserticola*)是中国传统药用植物之一,为列当科植物。荒漠肉苁蓉或管花肉苁蓉的干燥带鳞叶的肉质茎^[7],具有抗衰老^[8]、抗氧化^[9]、润肠通便^[10]等功能。现有研究表明,肉苁蓉存在丰富的内生真菌多样性,并发现不同种植地区、采用季节及植物部位其内生真菌组成存在一定的差异性^[11]。然而,有关肉苁蓉内生细菌多样性及相关资源筛选等研究鲜有报道。

本研究对新疆维吾尔自治区吐鲁番市高昌区管花肉苁蓉(GH)和荒漠肉苁蓉(HM)进行采样,利用高通量测序技术开展多样性及群落组成分析,并开展了肉苁蓉内生细菌的分离筛选,相关菌株通过抗逆、促生、抑菌特性测定,为进一步挖掘、利用肉苁蓉内生细菌提供研究基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

供试样品管花肉苁蓉(GH)和荒漠肉苁蓉(HM)于2022年12月采自新疆维吾尔自治区吐鲁番市高昌区(E88°29'28"-89°54'33", N42°15'10"-43°35')。样品采集采用随机采样法,选用两年生的健康良好、无明显病虫害,且大小相仿的完整根茎,装入无菌的牛皮纸袋内,12 h内运回实验室,并在48 h内开展表面消毒、研磨,以及内生菌基因组提取和菌株分离筛选等。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Canidia albicans*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*

f. sp. *niveum*)、核桃腐烂病菌(*Cytospora* sp.)均由新疆微生物资源保藏管理中心(Microbiological Culture Collection Center of Xinjiang, MCCCX)提供。

1.2 培养基

MRS 培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、营养琼脂(nutritional agar, NA)培养基、营养肉汤(nutritional broth, NB)培养基、高氏培养基、固氮菌用阿须贝氏培养基、解磷细菌培养基、CAS 检测培养基、R2A 琼脂培养基、R2A 肉汤培养基、胰蛋白胍大豆琼脂(tryptone soy agar, TSA)培养基、金氏 B 培养基、无机磷培养基及解钾培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC)培养基(g/L):羧甲基纤维素钠 10.0,碳酸钠 2.0,硫酸镁 0.5,磷酸氢二钾 1.0,硫酸亚铁 0.01,氯化钾 0.5,琼脂 20.0, pH 7.2-7.4。

YMA 基础培养基(g/L):甘露醇 10.0,酵母粉 1.0,磷酸氢二钾 0.42,硫酸镁 0.41,氯化钠 0.1, pH 7.2-7.4。

1.3 主要试剂和仪器

引物和 *Taq* 酶等试剂,生工生物工程(上海)股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司。

超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;高速冷冻离心机, Sigma 公司;生化培养箱,上海福玛实验设备有限公司;酶标仪,伯腾仪器有限公司;自动高压灭菌锅, HIRAYAMA 公司;振荡培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;电子天平,上海衡平仪器仪表厂;PCR 扩增仪,杭州博日科技有限公司。

1.4 样品的表面消毒

肉苁蓉表面消毒具体参考于晶等^[12]的方法。将新鲜健康的肉苁蓉样品用自来水冲洗表面的泥

土和其他杂质,并持续用自来水冲洗 10 min,无菌滤纸吸干水分后移入无菌超净工作台;利用无菌水整体冲洗 5–6 次,75%的乙醇漂洗 3–5 min,无菌水冲洗 4 次,再用 75%乙醇漂洗 1 min,无菌水冲洗 4 次,吸干水分,备用。收集最后一遍无菌水洗液,进行表面消毒效果验证。

1.5 基因组 DNA 的提取及扩增测序

取表面消毒后的管花肉苁蓉(GH)和荒漠肉苁蓉(HM)样品浸泡于液氮罐中,待充分冷冻后进行破碎和充分研磨,取适量的样品按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA,并使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的浓度和纯度。采用通用引物 799F (5'-AACMGGATTAGATACCKG-3')和 1193R (5'-ACGTCATCCACCTTCC-3')进行 16S rRNA 基因 V3–V4 区 PCR 扩增,PCR 反应条件和反应体系参考顾美英等^[13]和刘晓静等^[14]的方法,PCR 扩增产物经检验合格后送至北京诺禾生物信息科技有限公司进行高通量测序。

1.6 高通量测序及数据处理

先根据 barcode 进行拆分获得每个样品的原始数据,并去除 barcode 和引物,随后通过 flash 软件对 R1 和 R2 序列数据进行拼接。对拼接的 tags 进行质控,得到 clean tags,再进行嵌合体过滤,排除宿主叶绿体序列数据的干扰,得到可用于后续分析的有效数据(effective tags)。以序列 97%的一致性作为一个 OTU,各样品数据经均一化处理后进行数据分析。所有高通量测序数据已上传至国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC, <http://nmdc.cn/>),登录号为 NMDC10018872。

1.7 肉苁蓉内生细菌的分离与鉴定

1.7.1 梯度稀释法

按 1.4 所述将样品消毒后取 20.0 g 加 200 mL 无菌水于无菌研钵中碾碎成匀浆,分别稀释至

10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 这 3 个浓度梯度。分别移取稀释液 100 μ L 涂布于 MRS 琼脂、R2A 琼脂、1/3TSA、阿须贝氏、NA 营养琼脂、高氏培养基、无机磷培养基、CMC 固体培养基表面,每个梯度进行 3 个重复,于 30 $^{\circ}$ C 培养 24–96 h,每间隔 24 h 观察菌落,挑取单菌落接种至相应的固体培养基上进行分离纯化并编号记录^[15]。

1.7.2 组织切块法

使用灭菌刀片将消毒后的肉苁蓉样品在无菌条件下切成 1 cm \times 1 cm 的小块,从中随机选择不同部位的组织块,用无菌镊子放置于各类培养基上进行培养,培养纯化条件如 1.7.1 所示^[16]。

1.8 内生菌的分子生物学鉴定

从新鲜纯化后的平板挑取适量菌苔,采用菌落 PCR 方法,利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行扩增。PCR 反应体系: Master Mix 15 μ L, 27F、1492R 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板(10 ng/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 补足 30 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min^[17]。PCR 产物经检验合格后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。所得序列经人工校正和拼接后上传至 NCBI 数据库进行同源性比对,并调取相关模式菌株用 MEGA 11.0 软件 NJ 法构建系统发育树,确定分离菌株分类地位。

1.9 分离菌株抗逆特性的测定

将分离纯化的菌株分别转接到含 0%、10%、15%、20% NaCl 的 NA 培养基上划线,30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3 d,每个处理 3 个重复,观察生长情况,以确定菌株的耐盐能力^[18]。

耐旱特性采用韩梅^[19]的方法进行,将菌株接种到含 10%、15%、20% PEG6000 的 YMA

液体培养基, 28 °C、160 r/min 培养 72 h, 测定 OD_{600} , 以不加 PEG6000 作为对照, 每个处理 3 个重复。

1.10 分离菌株促生特性的测定

将纯化后的菌株接种于无机磷、阿须贝氏培养基和 CAS 检测培养基中, 于 30 °C 恒温培养 3–7 d, 观察菌落周围是否出现透明圈, 以判断该菌株有无相关特性^[20]。产 IAA 采用比色法^[21–22]: 将 200 μ L 菌悬液接种于装有 5 mL 200 mg/L 含 L-色氨酸的金氏 B 培养基和不含 L-色氨酸的金氏 B 培养基中, 30 °C 培养 3 d 后 8 000 r/min、4 °C 离心 15 min 收集上清液, 分别将等量的上清液和 Salkowski 比色液在白色陶瓷板上 1:1 混合, 室温避光静置 30 min 后观察, 以未接种菌株为空白对照, 观察反应后颜色变红程度进行判断, 颜色越深说明菌株产 IAA 能力越强。

1.11 分离菌株抑菌特性的测定

采用对峙平板法检测菌株的抑菌活性^[23]。将大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)等病原细菌培养 10 h 后稀释至 10^{-6} ($OD_{600}=0.2$), 取 100 μ L 均匀涂布到 NA 培养基上。将待测菌株发酵液于 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 用打孔器(直径 5 mm)分别在培养皿距离中心 2 cm 处打孔, 每个平板打 4 个孔。取上清液过 0.22 μ m 无菌滤膜, 取 70 μ L 测试样品加入培养皿中的孔中, 以无菌水作为对照。

将核桃腐烂病菌(*Cytospora* sp.)、棉花枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、西瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *niveum*)和白色念珠菌(*C. albicans*)等 4 种病原真菌接种于 PDA 培养基上培养 3–5 d。用无菌打孔器取相关病菌菌饼置于 PDA 培养基中心位置, 距中心 2 cm 处点接种待测菌株, 30 °C 培养, 检测菌株抑制病原真菌生长的能力^[24]。

2 结果与分析

2.1 高通量测序结果

2.1.1 细菌多样性

从管花肉苁蓉(GH)和荒漠肉苁蓉(HM)样品共测得原始序列 301 260 条, 过滤掉低质量序列并去除植物体内的线粒体、叶绿体相关序列后获得高质量有效序列 300 063 条(表 1)。 α 多样性结果显示, 不同肉苁蓉样品测序覆盖度为 99.99%, 可以较好反映样品中内生细菌的真实组成情况。Simpson 指数和 Shannon 指数在 2 种肉苁蓉样品之间差异性不显著, 而 Chao1 指数存在差异, 并且 HM 样品高于 GH 样品, 说明 GH 样品的群落丰度低于 HM 样品的群落丰度。

2.1.2 OTU 分析

分别对管花肉苁蓉(GH)和荒漠肉苁蓉(HM)所测序列以序列 97% 的一致性作为一个 OTU, 并绘制两者的韦恩图(图 1), 实验总计获得 1 086 个 OTU, 其中, GH 和 HM 样品分别检测到特有 OTU 数为 582 和 458 个, 而共有 OTU 仅有 46 个, 占 OTU 总数的 4.24%, 表明 2 种肉苁蓉内生细菌组成存在明显差异。

2.1.3 细菌群落物种分析

群落多样性结果显示, 管花肉苁蓉(GH)和荒漠肉苁蓉(HM)内生细菌共包括 19 个门 104 个目 226 个属及一些未分类的细菌。在门水

表 1 不同样品内生细菌群落的 α 多样性分析

Table 1 Alpha diversity analysis of endophytic bacterial communities in different samples

| Item | GH | HM |
|--------------------|---------------|---------------|
| Effective sequence | 137 890 | 162 173 |
| Chao1 index | 163.67±15.60b | 259.00±30.20a |
| Simpson index | 0.23±0.27a | 0.24±0.19a |
| Shannon index | 2.04±0.46a | 2.52±0.57a |
| Coverage (%) | 99.99 | 99.99 |

不同小写字母表示差异显著

Different lowercase letters indicate significant differences.

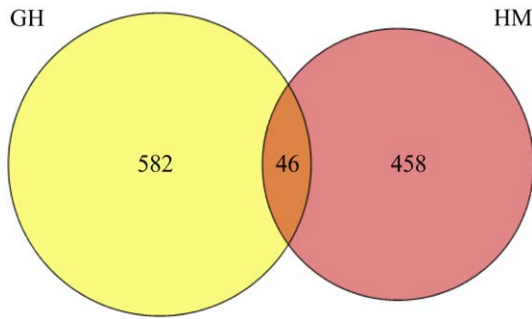


图 1 不同样品内生细菌群落 OTU 分布韦恩图
Figure 1 Venn diagram of OTUs distribution of endophytic bacterial communities in different samples.

平上, 主要涉及变形菌门(*Proteobacteria*)、芽孢杆菌门(*Bacillota*)、放线菌门(*Actinomycetota*), 酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)等 5 个菌门, 累计占各样品的 98.00%以上。其中, 变形菌门(*Proteobacteria*)为 2 种肉苁蓉的绝对优势菌门, 分别占 79.74%和 67.68%, 但其他菌门相对丰度上存在明显差异(图 2)。

在目水平上(图 3), 假单胞菌目(*Pseudomonadales*)、无胆甾原体目(*Acholeplasmatales*)、伯克氏菌目(*Burkholderiales*)、链霉菌目(*Streptomyetales*)、根瘤菌目(*Rhizobiales*)等 5 个菌目占各样品的 86.62%。其中假单胞菌目(*Pseudomonadales*)作为两种肉苁蓉中共同的优势菌目, 分别占 41.61%和 64.16%。但其他菌目的相对丰度存在明显差异, 伯克氏菌目(*Burkholderiales*)和无胆甾原体目(*Acholeplasmatales*)分别占 GH 的 32.67%和 2.50%; HM 样品中伯克氏菌目(*Burkholderiales*)和无胆甾原体目(*Acholeplasmatales*)分别占 1.86%和 29.53%。

物种的相关性热图可以直观地观察出群落菌群之间的丰度差异性、相似性和物种聚类关系, 颜色越红代表的是菌群之间丰度差异越大, 颜色越蓝代表群落丰度越小。选取 2 种肉

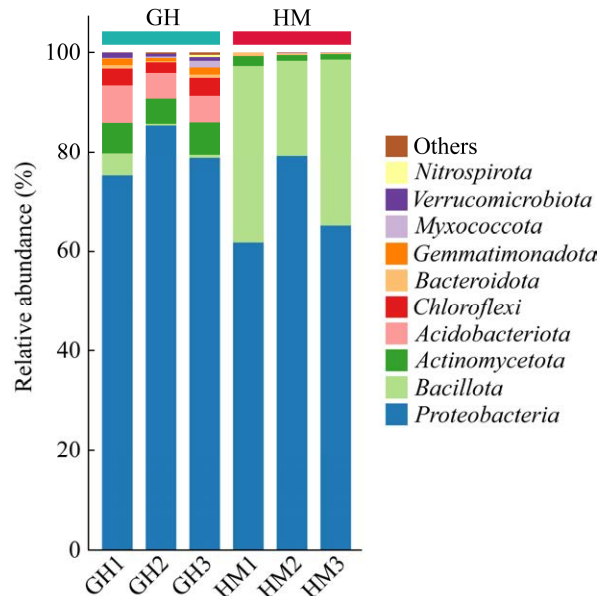


图 2 不同样品内生细菌门水平的相对丰度
GH: 管花肉苁蓉. HM: 荒漠肉苁蓉. 下同

Figure 2 Relative abundance of endophytic bacteria at the phylum level in different samples. GH: *Cistanche tubulosa* (Schrenk) R. Wight. HM: *C. deserticola* Y.C. Ma. The same below.

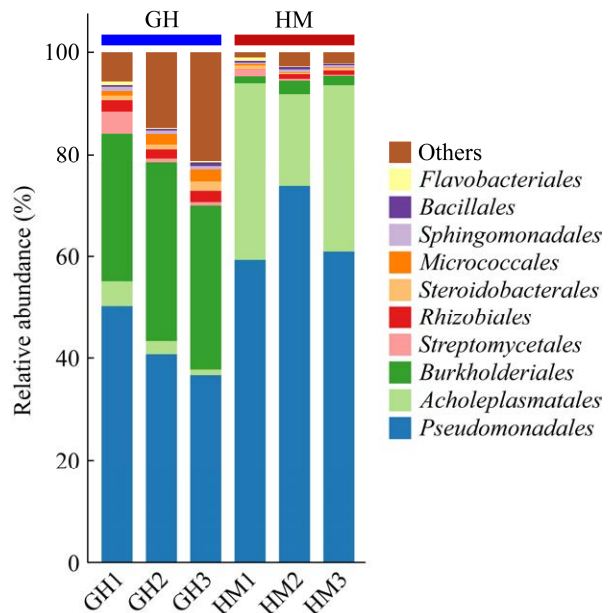


图 3 不同样品内生细菌目水平的相对丰度
Figure 3 Relative abundance of endophytic bacteria at the order level in different samples.

苁蓉属水平前 20 的内生细菌群落进行差异分析,并绘制相关性热图(图 4)。结果表明 2 种肉苁蓉样品在属水平上群落丰度存在明显差异。假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、*Candidatus* *Phytoplasma*、罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia*)、*Methyloversatilis*、链霉菌属(*Streptomyces*)等占各样品的 85.21%。其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)占比最大分别为 54.90%、50.31%。但其他菌属相对丰度存在差异,罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)和 *Candidatus* *Phytoplasma* 是 GH 样品的优势菌属,分别占 37.77%和 4.31%; HM 样品中 *Candidatus* *Phytoplasma* 和 *Methyloversatilis* 是

优势菌属,分别占 23.16%和 0.80%。

2.1.4 主成分分析

主成分分析(principal component analysis, PCA)结果表明(图 5),主成分分析 1 (PC1)和主成分分析 2 (PC2)对样品群落的贡献率分别为 31.47%和 22.56%,二者累计贡献率达到 54.03%。在主成分分析图中, HM 样品都分布在第三象限且样品间较为集中,表明群落结构差异较小,而 GH 样品分布较散且样品间距离较远,说明同种样品之间存在群落差异。同时, HM 和 GH 样品间各点分布存在明显差异,表明不同肉苁蓉群落组成存在明显差异。

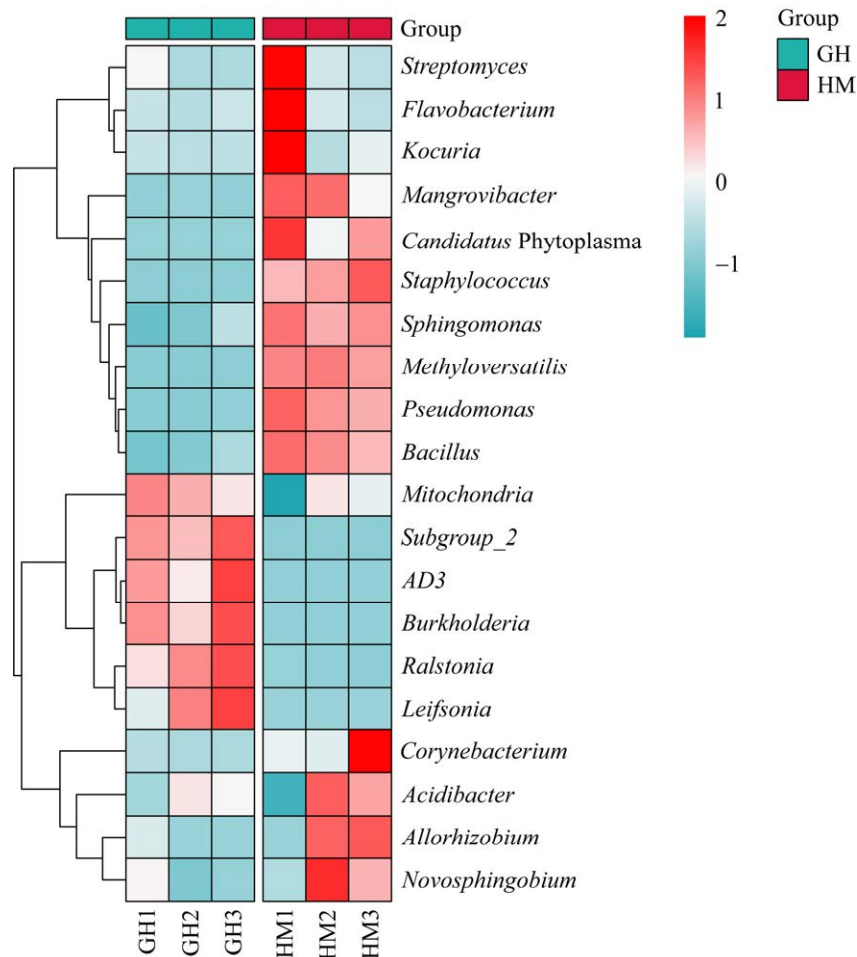


图 4 不同样品内生细菌优势属的相关性热图

Figure 4 Heat map of dominant genus correlation of endophytic bacteria in different samples.

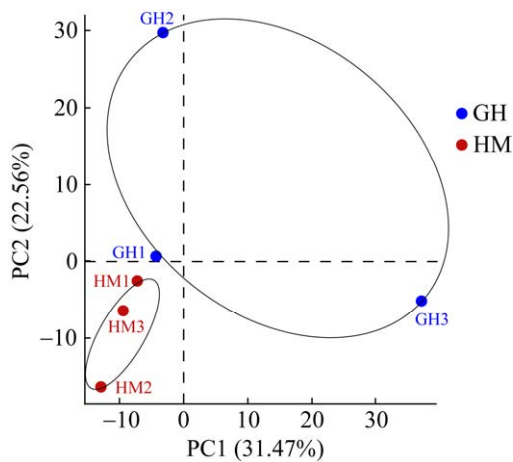


图5 不同样品内生细菌群落的主成分分析图
Figure 5 Principal component analysis plots of endophytic bacterial communities from different samples.

2.2 肉苁蓉可培养内生细菌的分离与鉴定结果

从肉苁蓉组织中共分离得到65株细菌(图6),经16S rRNA基因序列BLAST比对,结果显示,肉苁蓉内生细菌归属于3个门20个属34个种,所获菌株与已知模式菌株16S rRNA基因序列

相似性在99.04%–100%。其中,芽孢杆菌属(*Bacillus*, 9种)种类最多,其次为假单胞菌属(*Pseudomonas*, 3种)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*, 3种)、微杆菌属(*Microbacterium*, 2种)、糖丝菌属(*Saccharothrix*, 2种),其余菌属各1种。菌株的分类鉴定统计表见表2,采用MEGA 11.0软件利用NJ法构建系统发育树(图7和图8)。

2.3 菌株的抗逆及促生特性

进一步对65株内生细菌相关抗逆及促生特性进行分析(图9),大多数菌株具有较强的抗逆特性。在耐盐特性方面,所有菌株均可在3%的NaCl条件下生长,并且23.53%的菌株可在10%的NaCl条件下生长。在耐旱特性方面,69.54%的菌株可在浓度为10% PEG6000条件下生长,26.12%的菌株可在浓度20% PEG6000时生长。结果表明大部分肉苁蓉内生细菌具有较强的抗逆特性。发现芽孢杆菌(5种)、假单胞菌(1种)、亮杆菌(*Leucobacter*, 1种)及微球菌(*Micrococcus*, 1种)在不同程度上抗逆特性能力较强。

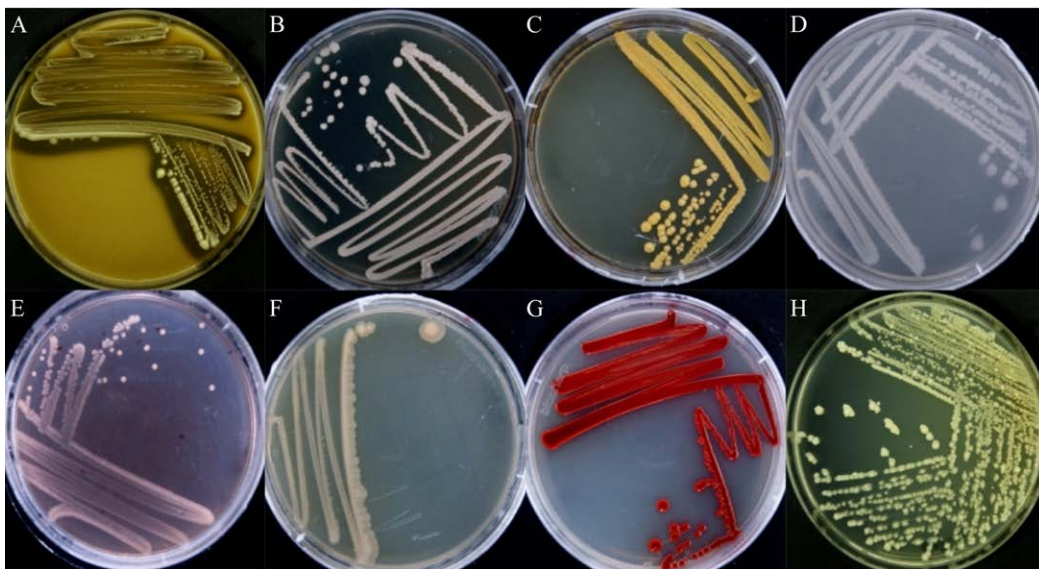


图6 部分可培养内生细菌平板照片

Figure 6 Colonies plate photograph of some culturable endophytic bacteria. A: CS-4. B: NGW-3. C: NGW-4. D: RGW-4. E: AGT-3. F: NGW-2. G: TGW-4. H: GG-13.

表 2 可培养内生细菌汇总表

Table 2 culturable endophytic bacteria summary table

| No. | Genus | Number of species | Number of strains | Ratio (%) | Strain code |
|-----|----------------------------|-------------------|-------------------|-----------|---|
| 1 | <i>Bacillus</i> | 9 | 19 | 29.23 | RGT-2, RGT-3, RGT-1, GGT-4, RGW-4, GGT-18, RGT-1, NGW-3, AGT-2, AGW-1, PT-26, GGT-23, GGT-22, MGT-4, MGT-1, MGT-2, MGT-3, GGT-13, RT-10 |
| 2 | <i>Lysinibacillus</i> | 3 | 6 | 9.23 | TGW-5, TGW-6, TGW-7, TGW-8, NGW-1, NGT-7 |
| 3 | <i>Pseudomonas</i> | 3 | 6 | 9.23 | NGT-5, NGT-6, PT-5, PT-1, PT-2, Z-TT-3 |
| 4 | <i>Saccharothrix</i> | 2 | 4 | 6.15 | AGT-3, AGT-6, AGT-7, CGW-2 |
| 5 | <i>Priestia</i> | 1 | 4 | 6.15 | AGT-5, MGW-6, MGT-7, MGW-8 |
| 6 | <i>Paenibacillus</i> | 1 | 4 | 6.15 | CGW-1, GGW-1, AGT-4, AGW-8 |
| 7 | <i>Achromobacter</i> | 1 | 3 | 4.62 | RGT-7, GGT-5, GGT-6 |
| 8 | <i>Glutamicibacter</i> | 1 | 2 | 3.08 | RGT-5, RGT-6 |
| 9 | <i>Enterobacter</i> | 1 | 2 | 3.08 | GGT-25, GGT-8 |
| 10 | <i>Delftia</i> | 1 | 2 | 3.08 | GGT-3, GGT-29 |
| 11 | <i>Brachybacterium</i> | 1 | 2 | 3.08 | RGT-9, RGT-8 |
| 12 | <i>Stenotrophomonas</i> | 1 | 2 | 3.08 | GGT-12, GGT-11 |
| 13 | <i>Microbacterium</i> | 2 | 2 | 3.08 | Z-TW-2, Z-TT-4 |
| 14 | <i>Alcaligenes</i> | 1 | 1 | 1.54 | RT-11 |
| 15 | <i>Chelatococcus</i> | 1 | 1 | 1.54 | NGT-8 |
| 16 | <i>Arthrobacter</i> | 1 | 1 | 1.54 | Z-TT-5 |
| 17 | <i>Lactiplantibacillus</i> | 1 | 1 | 1.54 | CS-4 |
| 18 | <i>Serratia</i> | 1 | 1 | 1.54 | TGW-4 |
| 19 | <i>Micrococcus</i> | 1 | 1 | 1.54 | NGW-4 |
| 20 | <i>Leucobacter</i> | 1 | 1 | 1.54 | NGW-2 |

在促生特性方面, 26.47%的菌株在解无机磷培养基和固氮培养基呈现出不同程度的透明圈, 41.18%的菌株在 CAS 培养基有明显的橙色晕圈产生, 38.24%的菌株具有产 IAA 特性, 发现芽孢杆菌(7 种)、假单胞菌(1 种)和乳酸菌(*Lactiplantibacillus*, 1 种)在不同程度上促生特性能力较强。

2.4 菌株的抑菌特性

2.4.1 抑制病原细菌的活性

进一步对菌株进行拮抗病原细菌特性的测定, 结果统计如图 10 所示, 29.41%的菌株均具有不同程度抑制枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的特性, 其中芽孢杆菌(6 种)、乳酸菌(1 种)、粪产碱杆菌(*Alcaligenes*, 1 种)

抑制病原细菌能力较强。

2.4.2 抑制病原真菌的活性

进一步对菌株进行拮抗病原真菌特性的测定, 结果统计如图 11 所示, 35.29%的菌株对西瓜枯萎病菌和棉花枯萎病菌具有抑制特性, 38.24%对核桃腐烂病菌具有抑制特性, 23.53%具有抑制白色念珠菌特性, 其中芽孢杆菌(8 种)、假单胞菌(1 种)、产碱杆菌(1 种)抑制病原真菌能力较强, 图 12 为部分菌株的抑菌效果展示。

3 讨论

内生细菌存在于各种植物中, 具有丰富的群落多样性, 但往往因植物品种、种植环境、植物部位等的不同, 导致内生菌组成结构和数

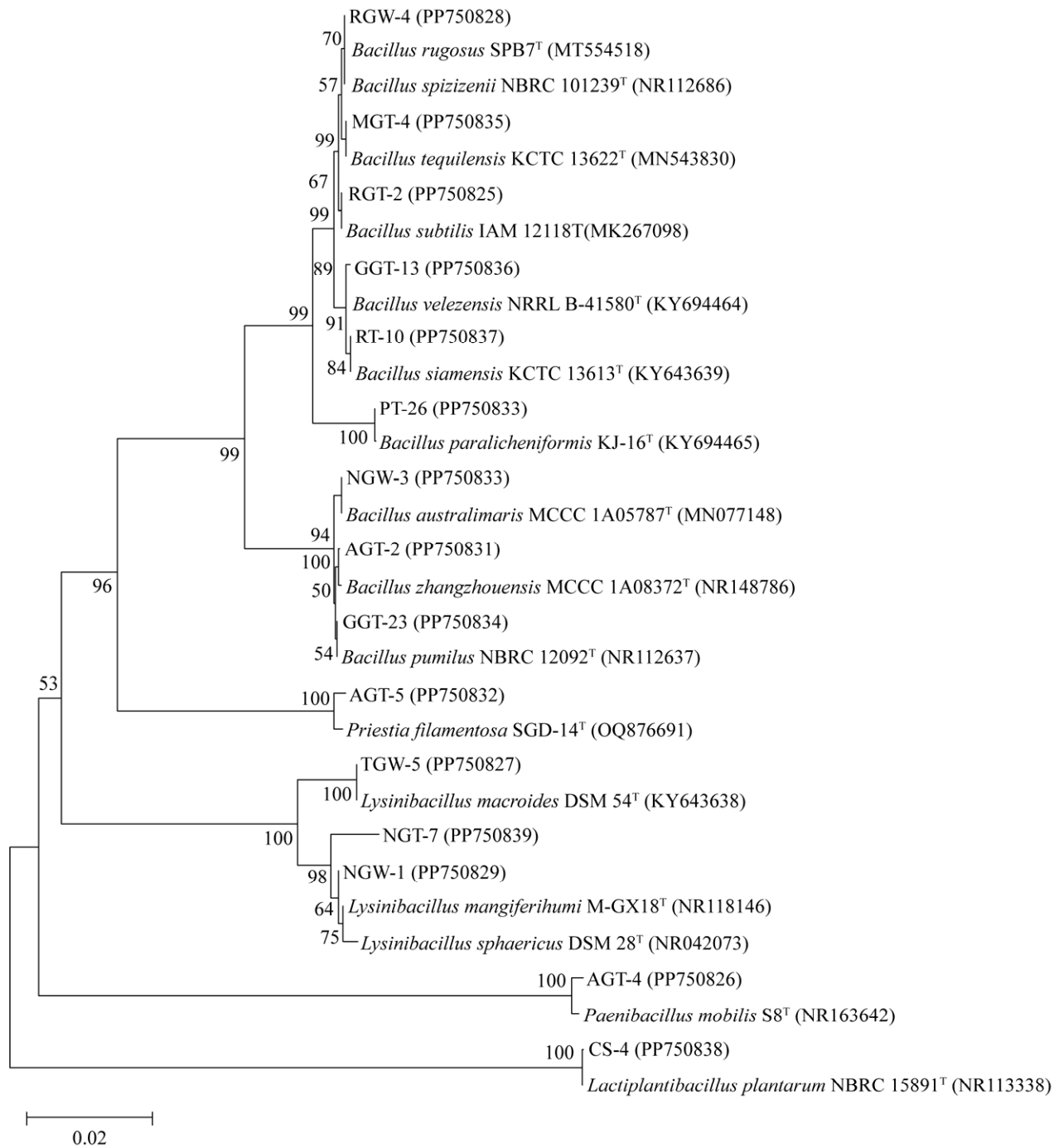


图 7 基于可培养内生细菌芽孢杆菌门菌株 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号为菌株的 GenBank 登录号; 标尺 0.02 代表序列偏差值; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类的概率

Figure 7 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence of cultivable endophytic bacteria *Bacillota*. The serial number in brackets is the GenBank accession number of the strain, and the value of 0.02 represents the sequence deviation value. The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-strapped trees.

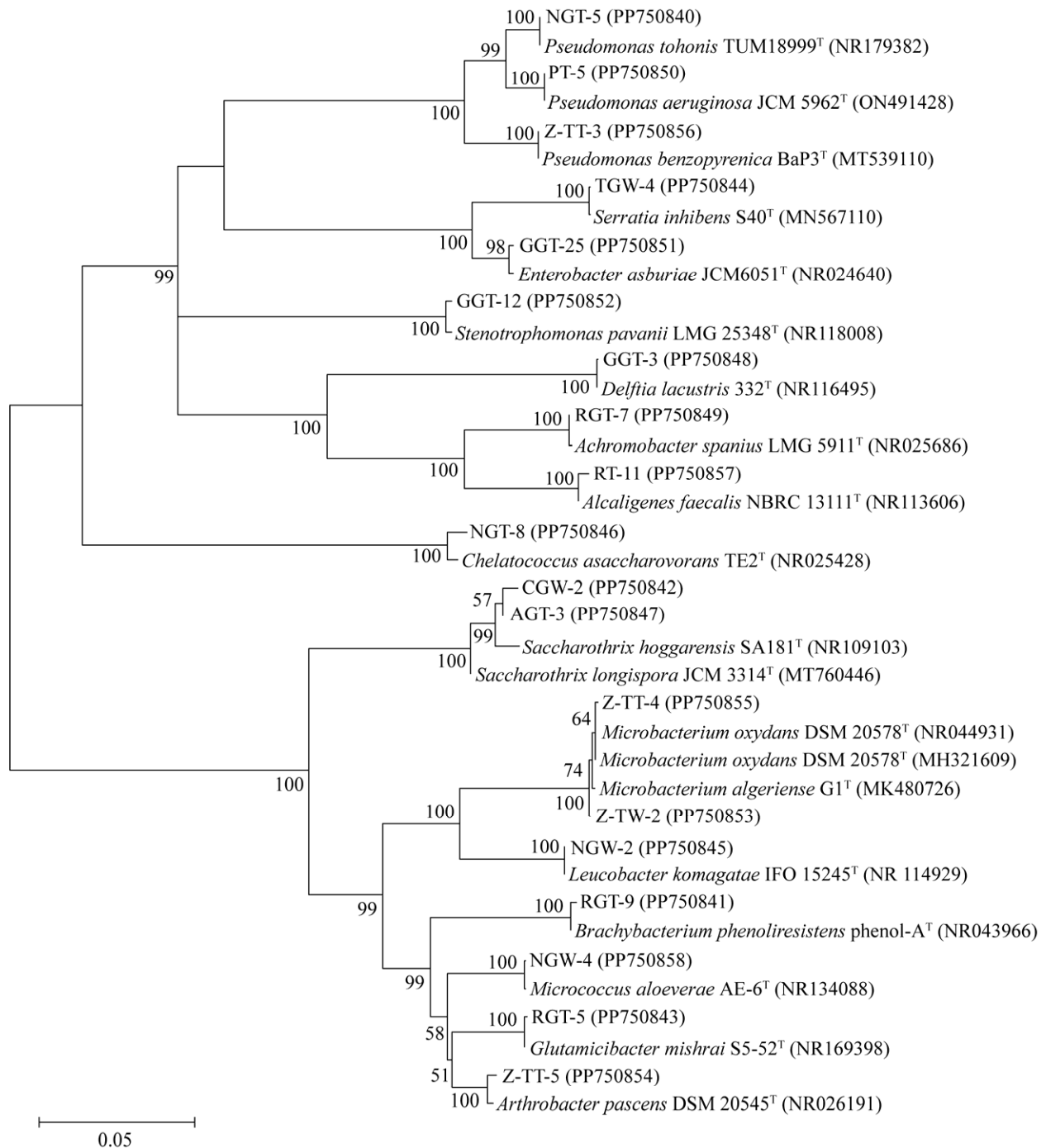


图 8 基于可培养内生细菌变形菌门和放线菌门菌株 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号为菌株的 GenBank 登录号; 标尺 0.05 代表序列偏差值; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类的概率
 Figure 8 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence of cultivable endophytic bacteria *Proteobacteria* and *Actinomycetota*. The serial number in brackets is the GenBank accession number of the strain, and the value of 0.05 represents the sequence deviation value. The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-strapped trees.

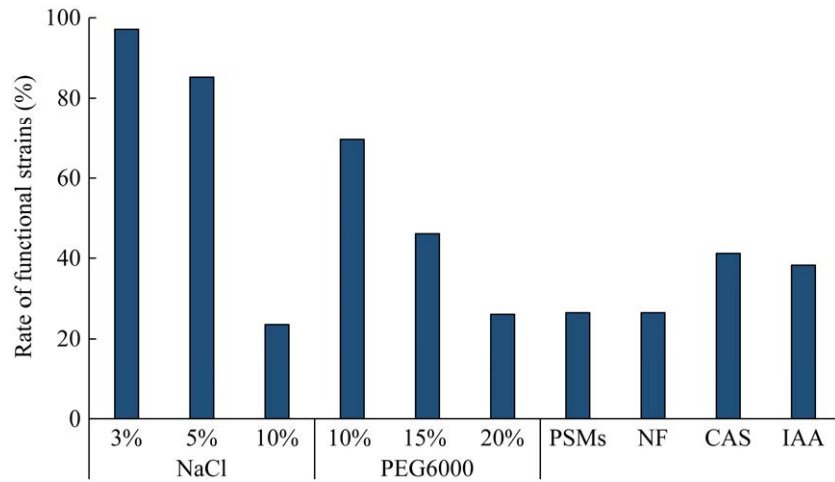


图9 可培养内生细菌的抗逆及促生特性统计 PSMs: 溶磷作用; NF: 固氮作用; CAS: 铁载体; IAA: 吲哚-3-乙酸

Figure 9 Statistics of stress-resistant and growth-promoting properties of culturable endophytic bacteria. PSMs: Phosphorus-solubilizing effect; NF: Nitrogen fixation; CAS: siderophores; IAA: Indole-3-acetic acid.

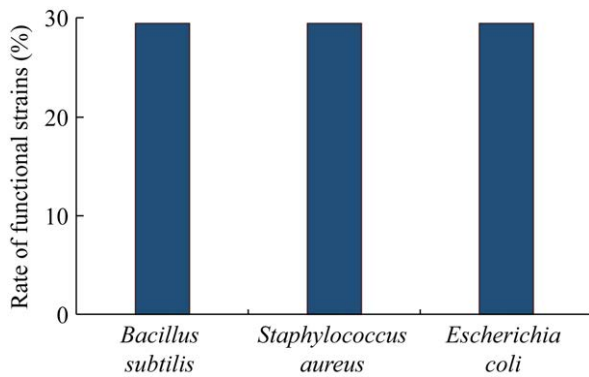


图10 内生细菌抑制病原细菌特性统计

Figure 10 Statistics of the characteristics of endophytic bacteria inhibiting pathogenic bacteria.

量存在明显差异。目前,国内外学者已对多花黄精、南瓜、黑果枸杞、人参等药用或药食同源植物进行研究,均发现含有丰富的内生菌资源。蔡媛等^[25]采用高通量测序技术分析多花黄精内生细菌的多样性分析,发现其内生菌共涉及19个门432个属。黄子粤等^[26]对相同条件下5种不同品种南瓜茎部内生细菌群落多样性分析发现内生细菌存在丰富的多样性,但不同品

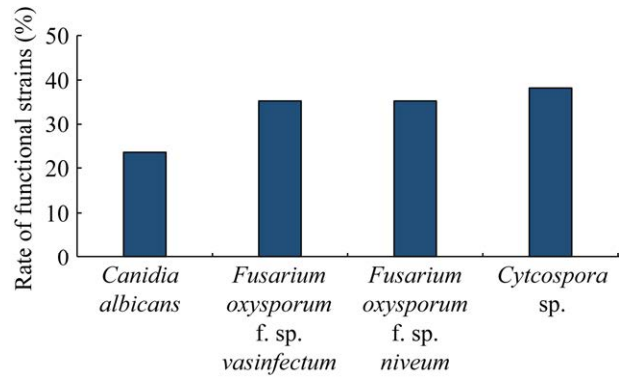


图11 内生细菌抑制病原真菌特性统计

Figure 11 Statistics of characteristics of endophytic bacteria inhibiting pathogenic fungi.

种南瓜茎中内生细菌基于不同分类水平上存在差异。顾美英等^[13]发现黑果枸杞不同组织部位内生细菌群落多样性存在明显差异,其根部的内生细菌多样性最高。郭伟强等^[27]发现野生与栽培人参内生细菌群落多样性存在差异,尽管变形菌门占据主导地位,但在优势菌属方面不管在群落组成还是种类数量方面均存在较大差异。肉苁蓉素有“沙漠人参”之称,但有关肉苁

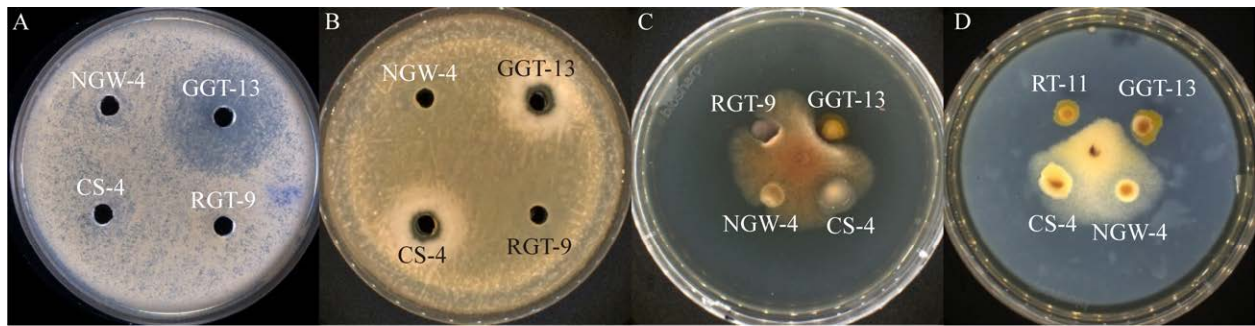


图 12 部分内生细菌的抑制细菌及真菌指示菌结果 A: 白色念珠菌. B: 枯草芽孢杆菌. C: 核桃腐烂病菌. D: 棉花枯萎病菌

Figure 12 Results of inhibitory bacterial and fungal indicators of some endophytic bacteria. A: *C. albicans*. B: *B. subtilis*. C: *Cytospora* sp. D: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

蓉内生细菌多样性和组成差异鲜有报道。本研究首次利用高通量测序方法对管花肉苁蓉(GH)和荒漠肉苁蓉(HM)样品进行群落结构多样性分析,发现两者内生细菌共涉及细菌域 19 个门 226 个属及一些未分类的细菌,变形菌门是两种肉苁蓉共同的优势菌门,其与郭伟强等报道的人参内生细菌优势菌门相一致;然而,两种肉苁蓉样品共有 OTU 数仅为 46 个,占总 OTU 的 4.24%,表明肉苁蓉根块样品内生菌组成存在明显种间差异。

目前,有关肉苁蓉内生菌资源挖掘相关报道较为有限,仅周峰^[11]从产于宁夏的荒漠肉苁蓉中分离到 618 株内生真菌,并发现不同种植地区、采收季节及植物部位其内生真菌组成存在一定的差异性。本研究对吐鲁番市高昌区肉苁蓉样品进行内生细菌分离鉴定,初步分离得到 65 株细菌,归属于 3 个门 20 个属 34 个种,其中芽孢杆菌属占比最大,为 29.34%,与前人报道的其他药用植物如骆驼刺^[28]、葛根^[29]、乌檀^[30]等结果相似。同时,本研究也分离到多种高通量测序检出的假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)等菌属,而高通量测序结果中的多种肉苁蓉优势内生菌,如罗尔斯

通氏菌属(*Ralstonia*)、*Methyloversatilis*、链霉菌属(*Streptomyces*)等菌株在此次研究中未分离获得,可能受研究中分离筛选的培养基种类、培养条件等因素的影响^[31]。同时,本研究分离获得的植物乳杆菌属(*Lactiplantibacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)等 11 个属未在高通量结果中检出,表明通过可培养方法和加强培养组学研究能进一步补充和校正高通量测序结果误差^[32]。

植物内生菌往往具有促进植物生长^[33]、提高植物抗逆^[34]、抗病^[35]等特性。本研究对实验所获得的菌株抗逆和促生研究表明,23.53%的菌株可在 10%的 NaCl 条件下生长;69.54%的菌株在 10%的 PEG6000 条件下均可生长,表现出较强的耐盐、耐干旱特性。内生菌可以通过如固氮、溶磷、产铁载体及产 IAA 等不同方式促进植物的生长发育^[36]。本研究发现 26.47%的肉苁蓉内生细菌具有解无机磷和固氮作用,41.18%的菌株可产生铁载体,38.24%的菌株可产 IAA。同时,本研究也获得多株芽孢杆菌、乳酸菌、假单胞菌等对不同病原细菌及病原真菌具有拮抗作用的菌株。其中,芽孢杆菌是农业微生物菌剂的重要菌株,并在植物体内多有

分布。王静怡等^[37]从棉花内生菌中获得 4 株棉花黄萎病拮抗菌，均为芽孢杆菌，并研发制备棉花黄萎病生防菌剂，发现该菌能较好地土壤中定殖，其数量与防病效果呈显著正相关。乳酸菌常应用于发酵食品加工^[38]、临床治疗^[39]及作物防治^[40]，具有调节机体免疫力^[41]、维持肠道内菌群平衡、抗菌^[42]、降解重金属^[43]和促进机体生长等功能。本研究获得一株植物源植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) CS-4，除具有较好的抑菌活性，还具有较强的抗逆促生特性。

4 结论

本研究利用高通量技术解析了管花肉苁蓉(GH)和荒漠肉苁蓉(HM)样品的内生细菌多样性，2 个样品内生细菌共涉及 19 个门 104 个目 226 个属，变形菌门是两种肉苁蓉共同的优势菌门，但两种肉苁蓉样品共有 OTU 数仅为 46 个，发现肉苁蓉根块样品内生菌群落组成存在明显种间差异。可培养分离获得肉苁蓉内生细菌 65 株，归属于 3 个门 20 个属 34 个种，其中多数菌株具有较强的耐盐、耐干旱特性，并获得多种促生、抑菌等功能菌株，为进一步研究植物内生菌多样性及分布特征提供了科学依据，并为加强肉苁蓉内生细菌资源的开发利用奠定了前期基础。

REFERENCES

- [1] AFZAL I, SHINWARI ZK, SIKANDAR S, SHAHZAD S. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants[J]. Microbiological Research, 2019, 221: 36-49.
- [2] BARRAQUIO WL, REVILLA L, LADHA JK. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice[M]//Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997: 15-24.
- [3] 黄贵修, 刘先宝. 植物内生菌[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2013.
- [4] HUANG GX, LIU XB. Endophyte[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2013 (in Chinese).
- [5] 楼骏, 柳勇, 李延. 高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(15): 256-260.
- [6] LOU J, LIU Y, LI Y. Review of high-throughput sequencing techniques in studies of soil microbial diversity[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(15): 256-260 (in Chinese).
- [7] 叶雷, 闫亚丽, 陈庆森, 赵林森, 龄南, 庞广昌. 高通量测序技术在肠道微生物宏基因组学中的应用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(7): 216-223.
- [8] YE L, YAN YL, CHEN QS, ZHAO LS, LING N, PANG GC. Application of high-throughput sequencing technology in studying matagenomics of intestinal microbiota[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(7): 216-223 (in Chinese).
- [9] BRUMFIELD KD, HUQ A, COLWELL RR, OLDS JL, LEDDY MB. Microbial resolution of whole genome shotgun and 16S amplicon metagenomic sequencing using publicly available NEON data[J]. PLoS One, 2020, 15(2): e0228899.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-四部: 2015年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 135-136.
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China (PRC) Pharmacopoeia-part IV: 2015 edition[M]. Beijing: China Medical Technology Press, 2015: 135-136 (in Chinese).
- [12] WANG NQ, JI SZ, ZHANG H, MEI SS, QIAO LM, JIN XL. *Herba cistanches*: anti-aging[J]. Aging and Disease, 2017, 8(6): 740.
- [13] PENG S, LI PY, LIU PR, YAN HZ, WANG J, LU WH, LIU CL, ZHOU YX. Cistanches alleviates sevoflurane-induced cognitive dysfunction by regulating PPAR- γ -dependent antioxidant and anti-inflammatory in rats[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, 24(2): 1345-1359.
- [14] YAN S, YUE YZ, WANG XP, DONG HL, ZHEN SG, WU BS, QIAN HH. Aqueous extracts of *Herba cistanche* promoted intestinal motility in loperamide-induced constipation rats by ameliorating the interstitial cells of Cajal[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM, 2017, 2017: 6236904.
- [15] 周峰. 肉苁蓉的内生真菌分离鉴定及其种子萌发条

- 件的初步研究[D]. 北京: 中国协和医科大学硕士学位论文, 2009.
- ZHOU F. Preliminary study on isolation and identification of endophytic fungi from *Cistanche deserticola* and the conditions for seed germination[D]. Beijing: Master's Thesis of Peking Union Medical College, 2009 (in Chinese).
- [12] 于晶, 周峰, 陈君, 王霞, 徐江, 刘同宁. 肉苁蓉内生真菌多样性研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 542-546.
- YU J, ZHOU F, CHEN J, WANG X, XU J, LIU TN. Diversity of endophytic fungi from *Cistanche deserticola*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(5): 542-546 (in Chinese).
- [13] 顾美英, 古丽尼沙·沙依木, 张志东, 朱静, 刘晓静, 唐琦勇, 欧提库尔·玛合水提, 宋素琴, 冯雷, 唐光木, 徐万里. 黑果枸杞不同组织内生细菌群落多样性[J]. 微生物学报, 2021, 61(1): 152-166.
- GU MY, Gulinisha·Shayimu, ZHANG ZD, ZHU J, LIU XJ, TANG QY, Outikuer·Maheshuiti, SONG SQ, FENG L, TANG GM, XU WL. Diversity and function analysis of endophytic bacterial community in different tissues of *Lycium ruthenicum* Murr[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(1): 152-166 (in Chinese).
- [14] 刘晓静, 朱静, 楚敏, 唐琦勇, 顾美英, 王博, 朱璇, 张志东. 库车小白杏采后内生细菌群落代谢特征及结构组成的变化[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 141-146.
- LIU XJ, ZHU J, CHU M, TANG QY, GU MY, WANG B, ZHU X, ZHANG ZD. Changes in carbon metabolism characteristics and community composition of endophytic bacteria in postharvest kuqa-grown apricot[J]. Food Science, 2018, 39(22): 141-146 (in Chinese).
- [15] SCHLOSS PD, WESTCOTT SL, RYABIN T, HALL JR, HARTMANN M, HOLLISTER EB, LESNIEWSKI RA, OAKLEY BB, PARKS DH, ROBINSON CJ, SAHL JW, STRES B, THALLINGER GG, van HORN DJ, WEBER CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [16] 刘晓静. 库车小白杏采后内生细菌群落演替与致腐的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2020.
- LIU XJ. A preliminary study on the succession of endophytic bacteria communities and the decay mechanism of postharvest kuqa apricot[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [17] 柏晓玉, 何子璇, 李雪, 朱静, 顾美英, 唐琦勇, 朱艳蕾, 张志东. 库木塔格沙漠土壤细菌多样性及具有群体感应抑制活性放线菌筛选[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4770-4783.
- BAI XY, HE ZX, LI X, ZHU J, GU MY, TANG QY, ZHU YL, ZHANG ZD. Bacterial diversity in the soil from Kumutag Desert and screening of actinomycetes with quorum sensing inhibitory activity[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4770-4783 (in Chinese).
- [18] FANG BZ, HAN MX, JIAO JY, XIE YG, ZHANG XT, LIU L, ZHANG ZT, XIAO M, LI WJ. *Streptomyces cavernae* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a Karst cave sediment sample[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(1): 120-125.
- [19] 韩梅. 蚕豆根瘤菌耐旱耐盐碱性研究[J]. 青海大学学报, 2019, 37(4): 35-41.
- HAN M. Drought and saline tolerance of *Vicia faba Rhizobium*[J]. Journal of Qinghai University, 2019, 37(4): 35-41 (in Chinese).
- [20] 罗义, 张丽娟, 黄伟, 王宁, 吾尔丽卡·买提哈斯木, 施宠, 王玮. 一株耐铀菌株的鉴定及其促生特性研究[J]. 生物技术通报, 2023, 39(5): 286-296.
- LUO Y, ZHANG LJ, HUANG W, WANG N, Wuerlika·Maitihasimu, SHI C, WANG W. Identification of a uranium-resistant strain and its growth-promoting properties[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(5): 286-296 (in Chinese).
- [21] 冯宝珍, 李培谦, 刘缙, 杨燕丽, 王晓静. 番茄内生菌的分离鉴定及菌株 FQ-G3 抗病促生特性[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 208-219.
- FENG BZ, LI PQ, LIU J, YANG YL, WANG XJ. Isolation and identification of a tomato endophyte FQ-G3 and its disease-resistant and growth-promoting properties[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 208-219 (in Chinese).
- [22] 汤蕾, 秦伟. 新疆野苹果叶片内生细菌的分离鉴定及其促生特性[J]. 经济林研究, 2023, 41(4): 228-236.
- TANG L, QIN W. Isolation, identification and promotion of endophytes in Xinjiang wild apple leaves[J]. Non-wood Forest Research, 2023, 41(4): 228-236 (in Chinese).
- [23] 郑佩瑶, 田羽, 王娟, 邓丽, 肖丹, 刘建蕊, 韩雨霏, 李祝. 金黄色葡萄球菌拮抗细菌的分离鉴定及拮抗活性分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(11): 61-66.

- ZHENG PY, TIAN Y, WANG J, DENG L, XIAO D, LIU JR, HAN YF, LI Z. Isolation and identification of antagonistic bacteria and analysis of antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*[J]. China Brewing, 2023, 42(11): 61-66 (in Chinese).
- [24] 付亚娟, 许笑晴, 范佳宁, 樊双虎, 韩卉, 侯晓强. 拮抗黄曲霉大花杓兰内生细菌的筛选及抑菌研究[J]. 食品与发酵工业, 2023. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037588.
- FU YJ, XU XQ, FAN JN, FAN SH, HAN H, HOU XQ. Screening of endophytic bacteria from *Cypripedium macranthum* and antifungal activity against *Aspergillus flavus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2023. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037588 (in Chinese).
- [25] 蔡媛, 刘浩, 王勇庆, 谢景, 黄建华, 劳嘉, 贺炜, 张水寒. 基于 16S rRNA 基因高通量测序方法分析多花黄精内生细菌群落结构及多样性[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(7): 846-852.
- CAI Y, LIU H, WANG YQ, XIE J, HUANG JH, LAO J, HE W, ZHANG SH. Analysis of structure and diversity of endophytic bacteria community in *Polygonatum cyrtonema* and diversity based on 16S rRNA gene high-throughput sequencing[J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 2020, 40(7): 846-852 (in Chinese).
- [26] 黄子粤, 刘文君, 覃仁柳, 庞师婵, 肖健, 杨尚东. 不同品种南瓜内生细菌多样性及 PICRUSt 基因功能预测分析[J]. 中国农业科学, 2021, 54(18): 4018-4032.
- HUANG ZY, LIU WJ, QIN RL, PANG SC, XIAO J, YANG SD. Endophytic bacterial community composition and PICRUSt gene functions in different pumpkin varieties[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(18): 4018-4032 (in Chinese).
- [27] 郭伟强, 钱玮, 胡翠英, 陈子欣, 仲汇银, 鞠鑫. 宏基因组测序分析人参内生细菌组成及多样性[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(6): 37-40.
- GUO WQ, QIAN W, HU CY, CHEN ZX, ZHONG HY, JU X. Metagenomic sequencing analysis of composition and diversity of ginseng endophytic bacteria[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(6): 37-40 (in Chinese).
- [28] 马燕, 张晓波, 熊文娟, 杨珊珊, 郑倩, 陈锋, 孙玉萍. 三种培养基分离骆驼刺内生细菌效果初探[J]. 新疆医学, 2019, 49(7): 712-714.
- MA Y, ZHANG XB, XIONG WJ, YANG SS, ZHENG Q, CHEN F, SUN YP. Preliminary study on the effects of three kinds of culture media on the isolation of endophytic bacteria from *Alhagi*[J]. Xinjiang Medical Journal, 2019, 49(7): 712-714 (in Chinese).
- [29] 黄小茜, 陈翰, 李发活, 梁任繁, 肖冬, 何龙飞, 王爱勤. 广西葛根内生细菌的分离鉴定及其促生特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2017-2028.
- HUANG XX, CHEN H, LI FH, LIANG RF, XIAO D, HE LF, WANG AQ. Endophytic bacteria from *Pueraria montana* var. *lobata* in Guangxi: isolation, identification, and characterization of plant growth-promoting effect[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2017-2028 (in Chinese).
- [30] 叶云祥, 金夕雨, 郭铃. 药用植物内生菌的研究进展[J]. 生物学教学, 2023, 48(5): 5-8.
- YE YX, JIN XY, GUO L. Progress in research on endophytic fungi of medicinal plants[J]. Biology Teaching, 2023, 48(5): 5-8 (in Chinese).
- [31] 杨敬敬, 韩烁, 王霞, 赵国柱, 何湘伟. 三倍体毛白杨不同组织内生细菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3021-3036.
- YANG JJ, HAN S, WANG X, ZHAO GZ, HE XW. Diversity of endophytic bacteria in different tissues of triploid *Populus tomentosa*[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3021-3036 (in Chinese).
- [32] HE ZX, WANG YX, BAI XY, CHU M, YI YY, ZHU J, GU MY, JIANG L, ZHANG ZD. Bacterial community composition and isolation of *Actinobacteria* from the soil of flaming mountain in Xinjiang, China[J]. Microorganisms, 2023, 11(2): 489.
- [33] JIN PF, WANG HN, LIU WB, FAN YM, MIAO WG. A new cyclic lipopeptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 and safety evaluation[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2018, 147: 40-45.
- [34] STROBEL GA. Rainforest endophytes and bioactive products[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(4): 315-333.
- [35] DAWUT M, ABLIZ A, GHOPUR W, BEHTI P, OBULKHASIM B, MIJIT G. Biocontrol potentiality of active ingredients from endophytic *Bacillus subtilis* isolated from *Alhagi pseudalhagi* desv on maize spot diseases[J]. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 2016, 7(11): 382.
- [36] CHOW YY, RAHMAN S, TING ASY. Evaluating the host defense responses in oil palm to complex biocontrol endophyte-pathogen-host plant interaction via Fluidigm® real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)[J]. Biological Control, 2019, 129: 148-157.
- [37] 王静怡, 佐长庚, 牛新湘, 杨红梅, 楚敏, 王宁, 林青, 王有武, 娄恺, 史应武. 生防菌在棉田土壤中定

- 殖数量与防病作用相关性[J]. 新疆农业科学, 2023, 60(1): 178-184.
- WANG JY, ZUO CG, NIU XX, YANG HM, CHU M, WANG N, LIN Q, WANG YW, LOU K, SHI YW. The quantity and activity of biocontrol bacteria in cotton field soil and the correlation of disease prevention[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2023, 60(1): 178-184 (in Chinese).
- [38] TENEA GN, POZO TD. Antimicrobial peptides from *Lactobacillus plantarum* UTNGt2 prevent harmful bacteria growth on fresh tomatoes[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(10): 1553-1560.
- [39] CHINGWARU W, VIDMAR J. Potential of Zimbabwean commercial probiotic products and strains of *Lactobacillus plantarum* as prophylaxis and therapy against diarrhoea caused by *Escherichia coli* in children[J]. Asia Pacific Journal of Tropical Medicine (English Edition), 2017(1): 57-62.
- [40] 高鹏飞, 姚国强, 赵树平, 王晓伟, 崔景丽, 张和平. 乳酸菌在农产品种植及其质量安全中的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2014, 16(6): 143-148.
- GAO PF, YAO GQ, ZHAO SP, WANG XW, CUI JL, ZHANG HP. Research progress on lactic acid bacteria in agricultural product production and quality safety[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2014, 16(6): 143-148 (in Chinese).
- [41] 刘玉颖, 杨文涛, 赵亮, 杨桂连, 王春风. 比较滴鼻与口服植物乳杆菌 NC8 对雏鸡 T 淋巴细胞的影响[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(1): 23-26.
- LIU YY, YANG WT, ZHAO L, YANG GL, WANG CF. Comparison the Effect of intranasal and oral administration of *Lactobacillus plantarum* NC8 in chicken on T lymphocytes[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 53(1): 23-26 (in Chinese).
- [42] 陆春波, 毛银, 李国辉, 赵运英, 邓禹. 植物乳杆菌 DY6 主要抑菌代谢物的分析和鉴定[J]. 微生物学通报, 2019, 46(9): 2258-2271.
- LU CB, MAO Y, LI GH, ZHAO YY, DENG Y. Analysis and identification of main antibacterial metabolites secreted by *Lactobacillus plantarum* DY6[J]. Microbiology China, 2019, 46(9): 2258-2271 (in Chinese).
- [43] 李冉, 欧杰, 代启虎, 马晨晨. 植物乳杆菌对重金属 Pb^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Cu^{2+} 的耐受性与吸附作用相关性比较[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(1): 52-58.
- LI R, OU J, DAI QH, MA CC. Relativity comparison of tolerance and adsorption of *Lactobacillus plantarum* on heavy metals Pb^{2+} , Cr^{6+} and Cu^{2+} [J]. Journal of Microbiology, 2019, 39(1): 52-58 (in Chinese).