



# 高产吲哚乙酸东乡野生稻内生微杆菌 KlspL18 分离及鉴定

张志斌<sup>1</sup>, 朱晓滢<sup>1</sup>, 刘婷婷<sup>1</sup>, 张晓<sup>1</sup>, 杨慧林<sup>1</sup>, 颜日明<sup>1</sup>, 朱笃<sup>1,2\*</sup>

1 江西师范大学生命科学学院, 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022

2 江西科技师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330013

张志斌, 朱晓滢, 刘婷婷, 张晓, 杨慧林, 颜日明, 朱笃. 高产吲哚乙酸东乡野生稻内生微杆菌 KlspL18 分离及鉴定. 微生物学报, 2022, 62(11): 4108–4121.

Zhang Zhibin, Zhu Xiaotian, Liu Tingting, Zhang Xiao, Yang Huilin, Yan Riming, Zhu Du. Isolation and identification of a novel IAA high-producing endophytic strain KlspL18 from *Oryza rufipogon*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4108–4121.

**摘要:**【目的】对分离自东乡野生稻叶组织的高产吲哚乙酸菌株 KlspL18 进行分类学鉴定。【方法】采用菌株形态、生理生化指标结合 16S rRNA 基因序列同源性比对以及全基因组测序等方法, 对该菌株进行多相分类鉴定, 并采用高效液相(HPLC)法测定其产吲哚乙酸的产量。【结果】菌株 KlspL18 为革兰氏阳性、不形成孢子的棒杆状, 接触酶实验阳性, 其温度、NaCl 浓度和 pH 值生长范围分别为 15–40 °C (最适为 28 °C)、1%–10% (最适为 1%)及 6.0–11.0 (最适为 7.0), 能利用多种糖和有机酸作为碳源。菌株细胞壁氨基酸主要为鸟氨酸, 细胞壁多糖为半乳糖和甘露糖, 极性脂类为二磷脂酰甘油、磷脂酰甘油和 2 种未鉴定的糖脂, 细胞脂肪酸主要为 anteiso-C<sub>15:0</sub> (30.33%)、anteiso-C<sub>17:0</sub> (31.53%)和 iso-C<sub>16:0</sub> (14.32%), 萜醌类主要为 MK-10 和 MK-11。16S rRNA 基因序列分析表明, 该菌株与 *Microbacterium proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> 相似度为 97.64%; 全基因组测序分析显示, 其 G+C 含量 70.2%, 与近缘标准菌株核苷酸同源性(ANI)和数字 DNA-DNA 杂交值(dDDH)分别为 83.35%和 26.4%, 均低于种间同源性的临界值。菌株 KlspL18 产 IAA 可达 291.7 mg/L。【结论】菌株 KlspL18 是高产吲哚乙酸微杆菌属的一个新种, 命名为 *Microbacterium dongxiang* sp. nov., 模式菌株为 KlspL18 (=CCTCC M2022446), 具有应用于农业生产促进植物生长的潜能。

**关键词:** 微杆菌; 菌种鉴定; 全基因组测序; 吲哚乙酸

**基金项目:** 国家自然科学基金(31760160, 31960078)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760160, 31960078)

\*Corresponding author. Tel: +86-791-88121934; E-mail: zhudu12@163.com

Received: 20 July 2022; Revised: 30 August 2022; Published online: 8 September 2022

# Isolation and identification of a novel IAA high-producing endophytic strain KlspL18 from *Oryza rufipogon*

ZHANG Zhibin<sup>1</sup>, ZHU Xiaotian<sup>1</sup>, LIU Tingting<sup>1</sup>, ZHANG Xiao<sup>1</sup>, YANG Huilin<sup>1</sup>, YAN Riming<sup>1</sup>, ZHU Du<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropical Plant Resources of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

<sup>2</sup> College of Life Science, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

**Abstract:** [Objective] To confirm the taxonomic status of the novel strain KlspL18 with high yield of indole acetic acid (IAA) isolated from the leaves of *Oryza rufipogon*. [Methods] KlspL18 was identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics, phylogenetic analysis, and whole genome sequencing. The production of IAA was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). [Results] KlspL18 was Gram-positive, non-spore-forming, rod-shaped, and catalase-positive. It grew at 15–40 °C (optimum: 28 °C), pH 6.0–12.0 (optimum: 7.0), and in the presence of 0%–15% NaCl (optimum: 1.0%), and could use multiple carbohydrates and organic acids as carbon source. The main amino acid in the cell wall of KlspL18 was ornithine, and the dominant polysaccharides in the cell wall were galactose and mannose. The stain mainly had the polar lipids of diphosphatidyl glycerol, phosphatidyl glycerol, and two unidentified glycolipids, fatty acids of anteiso-C<sub>15:0</sub> (30.33%), iso-C<sub>16:0</sub> (31.53%), and anteiso-C<sub>17:0</sub> (14.32%), and naphthoquinones of MK-10 and MK-11. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence showed the highest similarity (97.64%) to the type strain of *Microbacterium proteolyticum* RZ36<sup>T</sup>. The genome of KlspL18 had the G+C content of 70.2%. The average nucleotide identity (ANI) and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) between KlspL18 and the closely related strain of *Microbacterium* were 83.35% and 26.4%, respectively, both below the threshold for species discrimination. HPLC analysis suggested that KlspL18 had high yield of IAA (291.7 mg/L). [Conclusion] KlspL18, a novel high-IAA-producing species of *Microbacterium*, was named *Microbacterium dongxiang* sp. nov., which is a model strain KlspL18 (=CCTCC M2022446). It has the potential of improving soil fertility and promoting plant growth in agricultural production.

**Keywords:** *Microbacterium*; taxonomic identification; whole genome sequencing; indole acetic acid

微杆菌属(*Microbacterium*)由 Orla-Jensen 在 1919 年定义<sup>[1]</sup>, 后由 Collins 等<sup>[2]</sup>和 Takeuchi 等<sup>[3]</sup>修订并完善, 是一类革兰氏阳性、不形成孢子的棒杆状细菌, 属于放线菌门、微杆菌科。微杆菌在盐碱地、海洋、土壤和植物等不同环境均有分布, 已有记录报道 145 种(<https://lpsn.dsmz.de/search?word=Microbacterium>), 并且近年来不断有新种报道<sup>[4-5]</sup>。微杆菌不仅能够通过固

氮、溶磷和产植物生长激素等方式促进植物生长<sup>[6]</sup>, 而且在功能酶生产<sup>[7]</sup>、污染物降解<sup>[8]</sup>、重金属耐受<sup>[9]</sup>和植物病虫害防治<sup>[10]</sup>等方面有较好的应用潜能。研究表明, 来源于野生稻的内生微杆菌 *M. laevaniformans* RS0111 不仅能产吲哚乙酸和赤霉素, 而且表现出较好溶磷解锌的活性, 可显著地提高水稻产量<sup>[11]</sup>。重金属耐受植物内生菌 *Microbacterium* sp. BXGe71 在重金属

胁迫下表现较强的代谢能力,是植物促生和环境修复的潜在菌株<sup>[12]</sup>。海洋来源的 *M. aurantiacum* FSW-25,其所产的胞外多糖显示出良好的抗氧化活性,可作为一种潜在的抗氧化剂生产菌株<sup>[13]</sup>。此外,人们还从 *Microbacterium* sp. LGMB471 分离到抗真菌活性的异黄酮类化合物<sup>[14]</sup>,从 *M. luteum* 中分离到抗氧化胡萝卜素物质等<sup>[4]</sup>,显示微杆菌属还具有活性代谢物的生物合成潜力。

本课题组前期以世界分布最北、江西特有东乡野生稻(*Oryza rufipogon*)为对象,开展了其可培养内生细菌多样性及促生潜能研究<sup>[15-16]</sup>。后续对叶组织中分离菌株 KlspL18 进行 16S rRNA 基因序列比对和促生潜能分析,初步推测菌株 KlspL18 为微杆菌属的潜在新种,该菌具有利用色氨酸合成吲哚乙酸的潜能。为了进一步确定其分类地位,本研究在 16S rRNA 基因序列比对分析基础上,开展了菌株 KlspL18 和最近模式菌株全基因组测序,计算其核苷酸同源性(average nucleotide identity, ANI)和数字 DNA-DNA 杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)值,同时结合生理生化等多相分类指标测定,确定菌株 KlspL18 为微杆菌属(*Microbacterium*)的一个新种,并命名为 *Microbacterium dongxiang* sp. nov.。同时,我们对其产吲哚乙酸的性能进行初步研究。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

东乡野生稻植株材料采自江西省东乡县岗上积镇东乡野生稻原位保护区内(28°14'N, 116°30'E)。将采集的样品置于无菌采样袋中低温保存,带到实验室后立即开展内生菌分离,分离方法详见参考文献[15]。菌株 KlspL18 采用

改动酵母膏-麦芽提取物(YIM)培养基<sup>[17]</sup>从江西东乡野生稻植株叶部分离得到,现保存于中国典型培养物保藏中心,菌种保藏编号为 CCTCC No. M2022446。

标准菌株 *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> 购自德国微生物菌种保藏中心(DSM27100<sup>T</sup>)。

#### 1.1.2 培养基

YIM 分离培养基<sup>[17]</sup>(g/L): 酵母浸膏 4.0, 葡萄糖 4.0, 麦芽糖 5.0, VB 母液 1 mL, 微量盐溶液 1 mL, 琼脂 15.0, 制霉菌素 0.05, 萘啶酮酸 0.025, H<sub>2</sub>O 1 L, pH 7.2。

分类鉴定培养基: ISP 序列培养基<sup>[18]</sup>、高氏培养基、察氏培养基和营养琼脂培养基均购于广州环凯生物科技有限公司。种子培养基为 ISP2 培养基。

发酵培养基(g/L): 色氨酸 1.0, 酵母提取物 4.0, 蛋白胨 3.0, 玉米淀粉 10.0, NaCl 0.5, KNO<sub>3</sub> 1.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, H<sub>2</sub>O 1 L, pH 7.2。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

PCR 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成; PCR 常规操作用试剂和酶, 大连 TaKaRa 公司; 常规试剂和细菌基因组提取试剂盒, 北京索莱宝生物科技有限公司; 2×Taq PCR Master Mix, 北京天根生化科技有限公司。PCR 仪(S1000)及凝胶成像系统(Gel Doc XR+), Bio-Rad 公司; 扫描电子显微镜(S-3400N), Hitachi 公司; 回旋式恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; 全自动灭菌锅, 上海博讯实业有限公司; Waters1525 高效液相色谱仪, Waters 公司; 高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验仪器开发有限公司。

### 1.2 菌株形态及培养特征

菌株 KlspL18 在 ISP2 固体培养基上 28 °C 培养 3 d, 采用光学显微镜(BA310, Motic)和扫描电镜进行细胞显微形态观察。将菌株 KlspL18

分别接种在 ISP2、察氏培养基、ISP3、ISP4、ISP5、ISP6、ISP7、PDA 和营养琼脂培养基上, 28 °C 培养 7 d, 观察菌落形态、生长状况、颜色和可溶性色素等培养特征。

### 1.3 生理生化测定

菌株 KlspL18 革兰氏染色、运动性、接触酶和氧化酶等生化指标测定参照文献[19]。厌氧生长检测是将菌株 KlspL18 接种于液体培养液(5.0 g/L 色氨酸, 5.0 g/L 酵母提取物, 氯化钠 5.0 g/L, 半胱氨酸 0.01 g/L, pH 7.2)的血清瓶中, 上层充满氮气 28 °C 培养 2 d<sup>[5]</sup>。将菌株培养在 ISP2 琼脂培养基上, 置于不同温度(5–45 °C)培养箱中进行培养, 检测其温度适应性; 将菌株接种于含不同浓度 NaCl (1%–10%)或不同 pH 值(6.0–11.0)的 ISP2 培养液中, 培养 3 d 后于波长 600 nm 处测定光密度, 以确定菌体对 NaCl 和 pH 的耐受性。

采用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统(BioMérieux)测定菌株 KlspL18 的碳源利用特性和酶活性。将培养至对数生长期菌株 KlspL18 制成细胞悬液, 然后接种在 VITEK 2 GP 和 GN 鉴定卡上培养, 利用系统软件读取数据, 确定菌株碳源利用情况和产酶活性。

### 1.4 DNA 提取、16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析

根据细菌基因组提取试剂盒说明书, 提取菌株 KlspL18 基因组 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTAC GACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25.0 μL): 12.5 μL *Taq* Buffer Mix 混合物, 正反引物各 2 μL, 1 μL DNA 模板, 7.5 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 34 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经凝胶回收试剂盒纯化后, 送生工生物工程(上

海)有限公司测序。测序结果在 Eztaxon (<http://www.eztaxon.org>)进行同源序列比对, 利用 MEGA X 软件, 采用邻接法(neighbor-joining)进行 1 000 次自展分析(bootstrap analysis), 构建基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树<sup>[20]</sup>。

将菌株 KlspL18 及 *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> 送至上海凌恩生物科技有限公司, 采用 Illumina PE150 进行基因组测序, 原始数据组装软件为 ABySS 2.2.0。

将菌株 KlspL18 的 16S rRNA 基因序列提交至 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 获得基因号 ON459609。菌株 KlspL18 及 *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> 全基因组提交至中国微生物科学数据中心 (<https://nmdc.cn>), 基因组数据编号为 NMDC60045025 和 NMDC60045040。

### 1.5 比较基因组分析及全基因组系统发育树构建

菌株 KlspL18 与相似性较高的模式菌株之间的平均核苷酸一致性值和理论计算的 DNA-DNA 杂交值分别通过 ChunLab's software 进行计算<sup>[21]</sup>。

从 NCBI 数据库下载与菌株 KlspL18 相似度高的模式菌株全基因组序列, 先用 Prokka 注释获得 gff 格式的注释文件, 接着利用 Roray 软件进行泛基因组分析, 获得核心基因比对文件, 使用 MEGAX 软件构建全基因组系统发育树。

### 1.6 化学分类分析

菌株 KlspL18 细胞壁氨基酸和细胞壁全糖组分分析参照 Lechevalier 等<sup>[22]</sup>的方法进行。细胞脂肪酸的提取、甲基化和分析参照 MIDI 公司 Sherlock 微生物细菌鉴定系统方法进行。细菌醌的提取、纯化及醌组分采用 Kroppenstedt 的 HPLC 分析方法<sup>[23]</sup>。极性脂的提取和组成参照 Collins 等的方法<sup>[24]</sup>。

### 1.7 产 IAA 含量的比色法测定

采用 Salkowski 比色法<sup>[25]</sup>测定细菌 IAA 分泌能力：向含有 L-色氨酸(1.0 g/L)的 ISP2 液体培养基中接种纯化的内生细菌 KlspL18，28 °C 条件下培养 4 d，测定  $OD_{600}$  值，同时取 1 mL 菌悬液于 10 000 r/min 离心 10 min 后，取 400  $\mu$ L 上清液加入同体积的 Salkowski 比色液，暗处理 30 min，测定混合液在 530 nm 波长处的吸光值。

### 1.8 IAA 提取、纯化及检测

菌株 KlspL18 发酵培养液中 IAA 的分离和纯化参照 Goswami 等的方法<sup>[26]</sup>。将菌株 KlspL18 接种于 ISP2 液体培养基，在 200 r/min 摇床 28 °C 培养 4 d，离心收集上清并将发酵液调至 pH 9.0，加入等体积乙酸乙酯进行萃取，随后将乙酸乙酯相的 pH 调至 3.0，收集乙酸乙酯相并进行真空浓缩得浸膏，甲醇溶解浸膏分别进行 TLC 和 HPLC 分析。标准 IAA 和提取样品在  $G_{254}$  硅胶板上点样进行展层，TLC 展层剂的比例为正己烷：乙酸乙酯(4:6,  $V/V$ )。然后将 Salkowski 溶液喷洒到薄层板进行显色反应。将样品薄层板上与标准品  $R_f$  值相同色带的点刮下用甲醇溶解，离心去硅胶颗粒，所得样品溶液旋干后，用色谱纯甲醇溶解，微孔滤膜过滤用于 HPLC 分析和质谱检测。

提取样品中 IAA 的检测采用 HPLC 进行分析(Waters)，其色谱条件为：Sunfire- $C_{18}$  色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm，5  $\mu$ m)，柱温为 35 °C；流速

为 1.0 mL/min；进样体积 20  $\mu$ L，流动相 A：0.1% ( $V/V$ )甲酸水溶液，流动相 B：甲醇。检测波长为 280 nm。梯度分析条件：0–20 min，10% B–100% B。

采用 UPLC-HRMS (AB Sciex Triple TOF 6600+)对样品进行检测，确认 IAA 的分子量。高效液相色谱条件：流动相为 0.1%甲酸-水(A)，乙腈(B)，等度洗脱(A:B=1:1,  $V/V$ )。流速 0.2 mL/min，柱温为 35 °C，进样量为 2  $\mu$ L。质谱条件：电喷雾 ESI，正离子模式，质量扫描范围( $m/z$ ) 50–1 500。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株形态和培养特征

菌株 KlspL18 在 ISP2 琼脂培养基上 28 °C 培养 3 d，菌落呈圆形凸起、橙黄色且有光泽，直径小于 1 mm。其细胞呈革兰氏阳性、无运动、需氧、不形成孢子。扫描电镜显示细胞呈不规则棒杆状，长约 0.6–1.4  $\mu$ m，宽约 0.3–0.4  $\mu$ m (图 1)。

菌株 KlspL18 在 ISP 2、ISP 3 和 NA 培养基中生长良好，在高氏、ISP4、ISP5 和察氏培养基生长较弱，在 ISP 系列培养基菌落颜色均为橘黄(粉)色(表 1)，均不产可溶色素。结合菌落、细胞形态及生理生化特征，初步将菌株归属为短杆菌属(*Microbacterium*)。

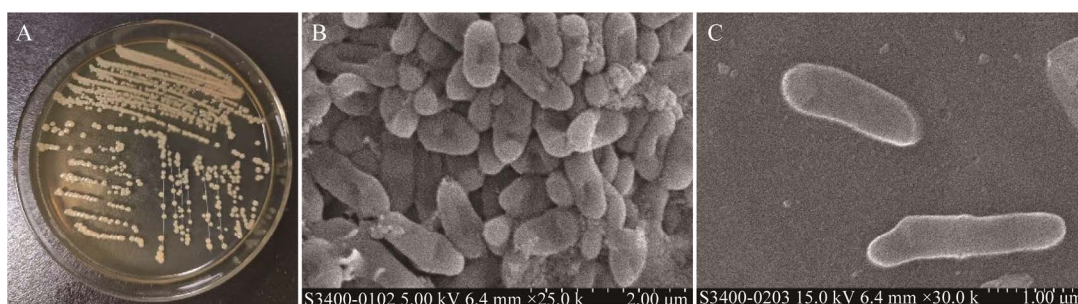


图 1 菌株 KlspL18 在 ISP2 培养基培养菌落平板(A)和扫描电镜特征(B, C)

Figure 1 Morphological characteristics of colonies (A) and scanning electron micrograph (B, C) of strain KlspL18 grown on ISP2 medium for 3 days at 28 °C.

表 1 菌株 KlspL18 的培养特征

Medium	Colony color	Growth
Gause's agar	Orange pink	Poor
ISP2	Orange yellow	Good
ISP3	Orange pink	Moderate
ISP4	Orange pink	Poor
ISP5	Orange pink	Poor
ISP6	Light yellow	Moderate
ISP7	Orange yellow	Moderate
Czapek's agar	Orange pink	Poor
Nutrient agar	Light yellow	Moderate

### 2.2 菌株 KlspL18 的 16S rRNA 基因序列及系统发育分析

菌株 KlspL18 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 446 bp, 提交获得登录号为 ON459609。将所得 16S rRNA 基因序列在 Eztaxon 数据库中进行同源性比对, 与菌株 KlspL18 相似度最高菌

株为 *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> (KM359785, 相似度 97.64%)、*M. zeae* 1204<sup>T</sup> (KM359785, 相似度 97.3%)以及 *M. enclense* NIO-1002<sup>T</sup> (KM359785, 相似度 96.94%)。16S rRNA 基因序列的系统发育分析显示, 菌株 KlspL18 与微杆菌聚在一起, 其进化距离最近的是 *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> (图 2), 提示菌株 KlspL18 可能是微杆菌属的一个潜在新种。因此, 将菌株 *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> 作为一个标准参比菌株, 与菌株 KlspL18 进行生理生化、化学分类和基因组比较分析。

### 2.3 菌株生理生化特征

菌株 KlspL18 的生长温度范围为 15–40 °C, 最适生长温度为 28 °C; NaCl 浓度范围为 1%–10%, 最适盐浓度为 1%; pH 值范围为 6.0–11.0, 最适 pH 为 7.0。菌株接触酶和淀粉酶阳性,

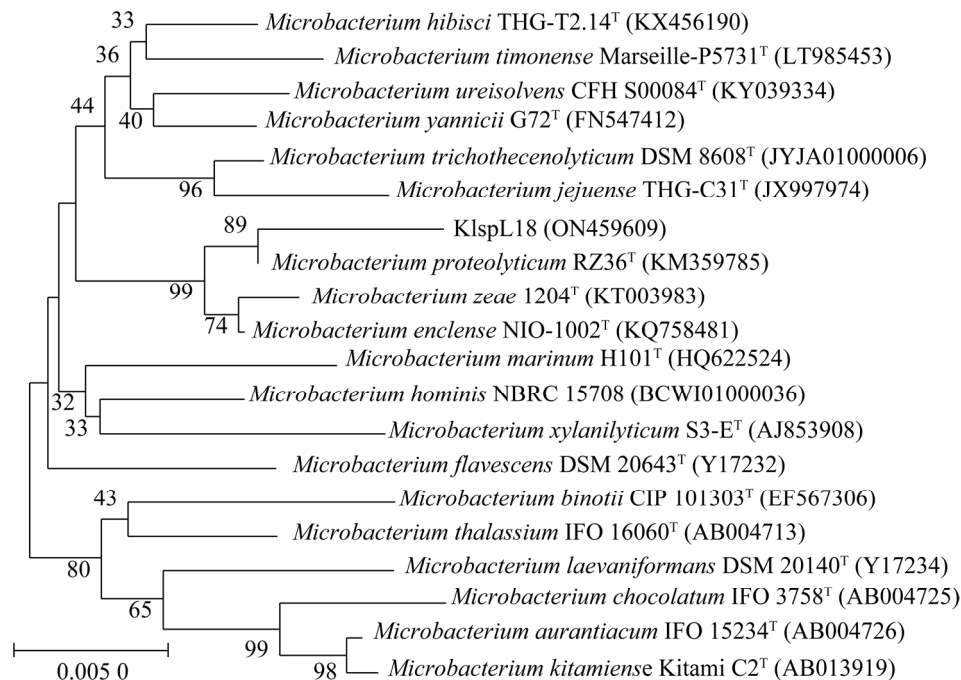


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 KlspL18 与微杆菌属相似菌株 NJ 系统发育树

Figure 2 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship between strain KlspL18 and other closely related members of *Microbacterium*. Numbers in bracket represent the sequences accession number in the GenBank. Bootstrap values from 1 000 replicates were shown at nodes. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

硝酸还原酶阴性，不产 H<sub>2</sub>S。能利用淀粉、D-麦芽糖、D-甘露醇、D-甘露糖、水杨苷、D-纤维二糖、D-葡萄糖、蔗糖、D-海藻糖、α-葡萄糖及酪氨酸；不能利用苦杏仁苷、D-木糖、糊精、D-山梨醇、D-半乳糖、D-核糖、乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖、甲基-D-葡萄糖吡喃苷和 D-棉子糖。具有 β-D-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶、α-甘露糖苷

酶、亮氨酸芳胺酶、α-半乳糖苷酶、焦谷氨酸芳胺酶、丙氨酸芳胺酶、酪氨酸芳胺酶活性；苯丙氨酸脱氨酶、L-天冬氨酸芳胺酶、β-半乳糖吡喃糖苷酶、磷酸酶、L-脯氨酸芳胺酶、β-葡萄糖醛酸酶、β-D-葡萄糖醛酸酶呈阴性。菌株 KlspL18 与其近缘模式株 *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> 的差异特征如表 2 所示<sup>[27-28]</sup>。

表 2 菌株 KlspL18 与微杆菌近缘模式株 RZ36<sup>T</sup> 和 NIO-1002<sup>T</sup> 差异特征

Table 2 Differential characteristics among strain KlspL18 and its closest phylogenetic relative *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> and *M. enclense* NIO-1002<sup>T</sup>

Characteristic	KlspL18	RZ36 <sup>T</sup>	NIO-1002
Growth temperature (range, optimum)/°C	15–40, 28	4–7	20–45, 30
NaCl tolerance (range, optimum)/(W/V)	0.5–7.0, 1	0.5–6.0	0–12
Growth pH (range, optimum)	6.0–11.0, 7.0	6.5–11.0	6.0–12.0, 7.0
Utilization of carbon			
D-raffinose	–	–	+
D-lactose	–	–	+
D-maltose	+	–	+
D-mannose	+	–	+
D-cellobiose	+	–	–
N-acetyl-D-glucosamine	–	–	+
Citric acid	–	–	/
D-sorbitol	–	–	–
L-lactate	+	–	/
L-malate	–	–	/
Acid production			
D-arabinose	–	–	+
D-ribose	–	–	+
D-galactose	–	–	/
Amygdalin	–	–	+
Salicin	+	–	+
D-trehalose	+	–	+
Enzyme production			
Urease	–	–	+
tyrosine	+	+	/
Catalase	+	+	+
hydrolysis of starch	+	+	+
α-glucosidase	+	+	–
β-glucosidase	+	+	–
Alkaline phosphatase	–	–	–
α-mannosidase	+	+	+
α-galactosidase	+	+	–
β-galactosidase	+	+	–
lipase	–	–	–
Cell-wall diamino acid	Orn	Orn	Lys
Polar lipids	PG, DPG, GL	PG, DPG, GL, PL,L	PG, DPG, PL, GL
Menaquinones	MK-10 MK-11	MK-10 MK-10(H6) MK-11 MK-12	MK-11 MK-12
G+C content/(mol%)	70.2	69.7	66.5

Data of strain *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> and *M. enclense* NIO-1002<sup>T</sup> were from Alves et al. and Mawlankar et al., respectively.

+: Positive; -: negative; /: no data.

### 2.4 菌株化学分类学特征

菌株 KlspL18 的主要极性脂质是二磷脂酰甘油(DPG)、磷脂酰甘油(PG)和 2 种未鉴定的糖脂(GL),呼吸醌类主要为 MK-10 和 MK-11,与标准参考菌株醌型基本一致(表 2)。主要脂肪酸(大于 10%)为 anteiso-C<sub>15:0</sub> (30.33%)、iso-C<sub>16:0</sub> (31.53%)和 anteiso-C<sub>17:0</sub> (14.32%), 而该菌株近缘标准菌株 *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> 的主要脂肪酸为 anteiso-C<sub>15:0</sub> (25.16%)、iso-C<sub>16:0</sub> (26.78%)和 anteiso-C<sub>17:0</sub> (18.36%), 但一些脂肪酸如 Anteiso-C<sub>14:0</sub>、C<sub>14:1</sub> W5c 和 C<sub>18:1</sub> 2OH 未在菌株 KlspL18 中检测到, 脂肪酸种类和含量差异详见表 3<sup>[28]</sup>。

**表 3 菌株 KlspL18 与微杆菌近缘模式株脂肪酸组成分析**

Table 3 Fatty acids composition of strains KlspL18 and the type strains of closely related *Microbacterium* species

Characteristic	KlspL18	RZ36 <sup>T</sup>	NIO-1002 <sup>T</sup>
Iso-C <sub>11:0</sub> 3OH	0.37	0.31	–
Anteiso-C <sub>11:0</sub>	–	–	–
C <sub>12:0</sub>	2.54	2.31	–
C <sub>14:0</sub>	–	0.20	1.28
Iso-C <sub>14:0</sub>	2.37	2.66	–
Anteiso-C <sub>14:0</sub>	3.08	–	–
C <sub>14:0</sub> 2OH	0.36	0.43	–
C <sub>14:1</sub> ω5c	4.55	–	–
Iso-C <sub>15:0</sub>	7.48	8.78	1.97
Iso-C <sub>15:1</sub> G	–	1.89	–
C <sub>15:1</sub> ω5c	0.25	0.48	–
Anteiso-C <sub>15:0</sub>	30.33	25.16	34.24
Anteiso-C <sub>15:1</sub> A	1.49	4.62	–
C <sub>16:0</sub>	3.46	2.56	4.26
Iso-C <sub>16:0</sub>	31.53	26.78	30.98
Iso-C <sub>16:1</sub> G	–	1.16	–
Iso-C <sub>17:0</sub>	3.12	3.28	1.41
Anteiso-C <sub>17:0</sub>	14.32	18.36	11.30
Anteiso-C <sub>17:1</sub> ω9c	0.36	0.88	1.08
C <sub>18:0</sub>	0.4	0.33	–
C <sub>18:1</sub> 2OH	0.40	–	–
C <sub>18:1</sub> ω9c	–	0.40	–

Data of strain *M. enclense* NIO-1002<sup>T</sup> were from Mawlankar et al. –: No data.

### 2.5 菌株全基因组比较分析

菌株 KlspL18 和模式菌株 RZ36 的全基因组序列上传至 NMDC, 基因组编号分别是 NMDC60045025 和 NMDC60045025。结果显示, 菌株 KlspL18 和 RZ36 的基因组分别为 4.13 Mb 和 3.43 Mb, Contig 数目分别为 59 个和 41 个, G+C 含量分别为 70.05%和 69.96%, 基因组分别包含 3 841 和 3 187 个蛋白编码基因。菌株 KlspL18 和模式菌株 RZ36<sup>T</sup> 及 NIO-1002<sup>T</sup> 之间 ANI 值分别为 83.35%和 83.03%, dDDH 值分别为 26.4%和 27.4%(表 4), 均低于物种判断的临界值 95%–96%和 70%<sup>[29–30]</sup>, 从分子水平上确定菌株 KlspL18 是微杆菌属的 1 个新种。

基于全基因组序列核心基因, 构建菌株 KlspL18 和 *Microbacterium* 内不同菌株的系统发育树, 如图 3 所示。菌株 KlspL18 在全基因组系统发育树上与 *M. enclense* NIO-1002<sup>T</sup> 和 *M. proteolyticum* RZ36<sup>T</sup> 一簇, 但单独分为一亚支, 这进一步表明 KlspL18 是微杆菌属新菌种。

**表 4 菌株 KlspL18 和近缘标准微杆菌株基因组特征**

Table 4 Genomic characteristic of strain KlspL18 and the type strains of closely related *Microbacterium* species

Genomic characteristics	KlspL18	RZ36	NIO-1002 <sup>T</sup>
Size/Mb	4.13	3.43	3.67
Number of contigs	59	41	24
N50 length/Mb	0.15	0.12	0.30
Gene of coding sequences	3841	3187	3397
Number of RNAs	53	44	54
G+C content/(mol%)	70.05	69.96	70.30
dDDH/%			
KlspL18	–	26.4	27.4
RZ36 <sup>T</sup>		–	31
NIO-1002 <sup>T</sup>			–
ANI/%			
KlspL18	–	83.35	83.03
RZ36 <sup>T</sup>		–	85.87
NIO-1002 <sup>T</sup>			–



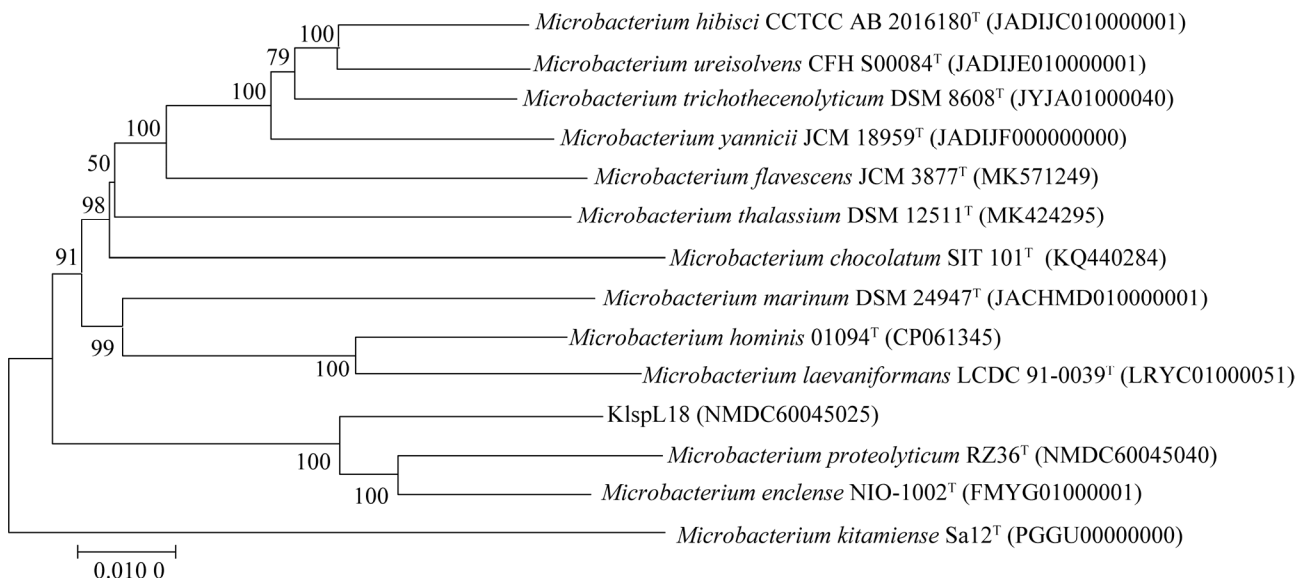


图3 基于全基因组序列构建的菌株 KlspL18 与 *Microbacterium* 模式株系统发育树

Figure 3 Whole-genome-based phylogenetic tree showing the phylogenetic relationship of strains KlspL18 and reference species in the genus *Microbacterium*. Numbers in bracket represent the whole genome accession number in the GenBank and NMDC. Bootstrap values from 1 000 replicates were shown at nodes. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

## 2.6 菌株 IAA 能力的检测

添加 1.0 mg/mL 色氨酸至 ISP2 培养基中, 进行菌株 KlspL18 发酵及其产 IAA 能力检测, 培养 4 d 后离心收集发酵液, 将发酵液与 Salkowski 比色溶液按照 1:2 体积混合孵育暗反应 30 min。图 4 显示培养菌株 KlspL18 变红, 初步表明菌株 KlspL18 能分泌 IAA。

对菌株 KlspL18 发酵液中 IAA 进行提取纯化, TLC 检测显示提取样品与 IAA 标准品在 254 nm 紫外检测下有  $R_f$  值为 0.64 相同斑点, Salkowski 显色在对应位置均产生粉红色的斑点(图 5A)。采用 HPLC 对菌株 KlspL18 提取纯化 IAA 样品、IAA 标品和混合样品在同样条件下进样比对分析, 结果显示提取物样品与 IAA 标品和混合样品均出现相同保留时间( $t_R=16.8$  min)的吸收峰(图 5B), 基本确定菌株 KlspL18 能产 IAA。进一步质谱检测提取物纯化样品, 在正离子模式下, 发现吲哚乙酸的 M+1 峰, 分子量

为 176.071 3 (图 5C)。通过以上检测分析, 明确菌株 KlspL18 发酵培养能产 IAA。最后通过 HPLC 定量分析, 确定菌株 KlspL18 的 IAA 产量为 291.70  $\mu\text{g/mL}$ 。

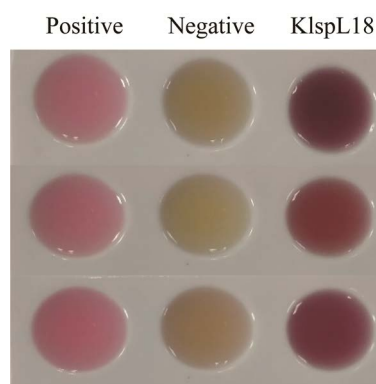


图4 菌株 KlspL18 产 IAA 定性检测

Figure 4 Detection of IAA secretion of strain KlspL18 cultured for 4 days in ISP2 liquid medium. A standard solution with 50 mg/L IAA was used as a positive control. ISP2 medium without inoculation was used as a negative control.

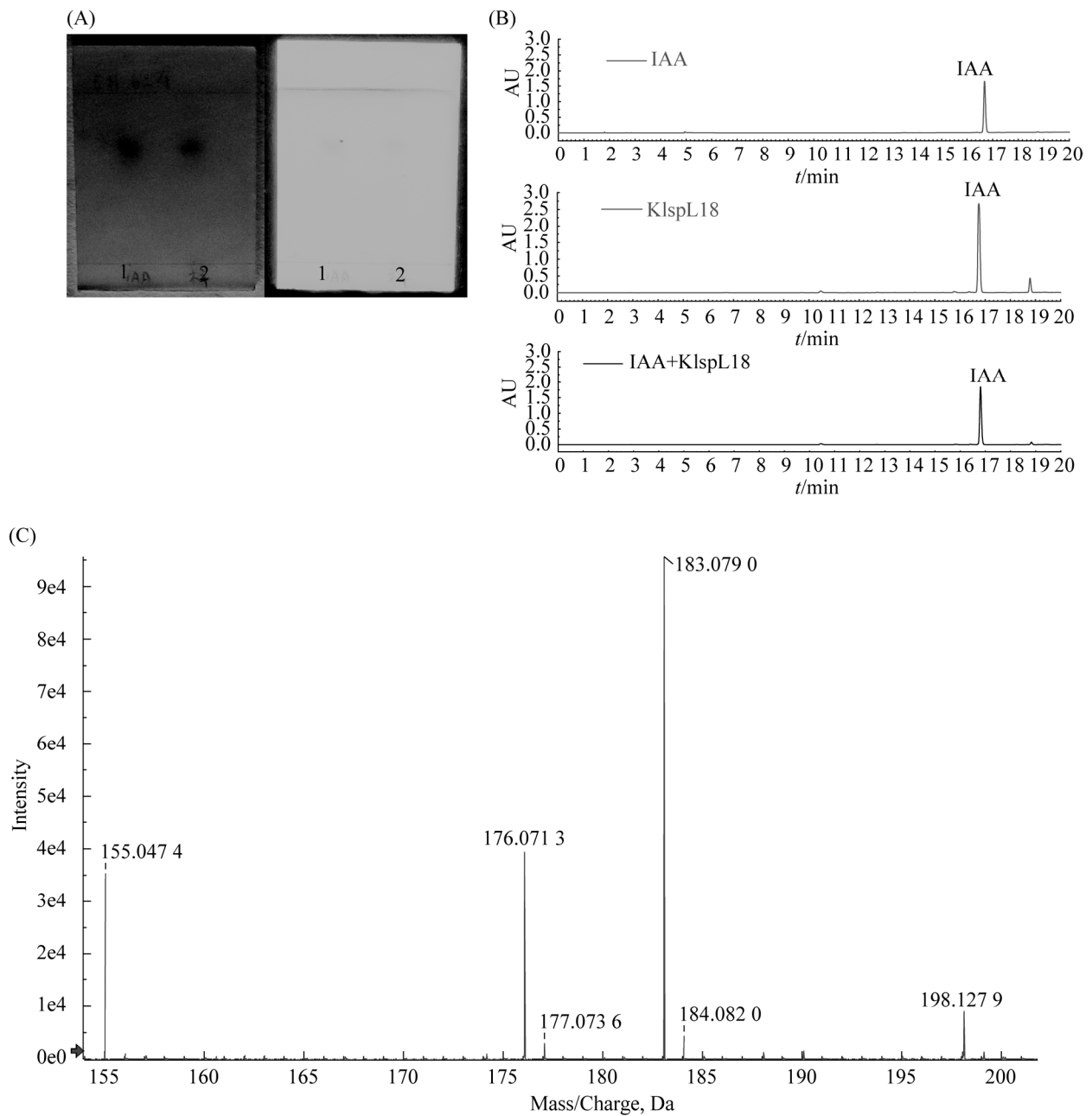


图 5 菌株 KlspL18 发酵提取物中 IAA 的检测

Figure 5 Confirmation of IAA extracted from strain KlspL18. A: TLC of IAA (1: IAA standard; 2: IAA extracted from strain KlspL18); B: determination IAA of HPLC; C: determination IAA of mass spectrometry.

### 3 讨论与结论

植物内生细菌生物多样性丰富, 不仅能通过多种方式促生宿主植物生长和保护宿主免受病虫害的侵染, 而且是新菌种资源发现的重要

宝库<sup>[31-32]</sup>。迄今, *Microbacterium* 属新种不断地有分离报道, 特别是近年来植物内生微杆菌新种的报道较多, 如 Alves 等<sup>[27]</sup>从 *Halimione portulacoides* 中分离到内生微杆菌新种 *M. proteolyticum*, Zhu 等<sup>[33]</sup>从 *Suaeda aralocaspica*

中获得内生微杆菌新种 *M. suaedae*, Gao 等<sup>[34]</sup> 从玉米根中分离到内生微杆菌新种 *M. zae*。本研究从东乡野生稻叶中分离出一株内生细菌 KlspL18, 通过 16S rRNA 基因序列比对分析, 与菌株 *M. proteolyticum* RZ36 的相似度最高为 97.64%, 基于全基因计算菌株 KlspL18 与其他相似物种的 ANI 值和 DDH 值, 结果均低于 95%–96% 和 70% 的新种鉴定阈值<sup>[29–30]</sup>。同时, 其形态和生理生化特征均与相近菌株间存在明显差异。因此, 结合形态、培养特征、生理生化和多相分类特征分析, 我们将内生细菌 KlspL18 鉴定为 *Microbacterium* 属的一个新种, 命名为 *Microbacterium dongxiang* sp. nov.。

*Microbacterium dongxiang* sp. nov. 种的特征描述为: 在 ISP2 上生长旺盛, 菌落形态圆状、凸出和表面湿润, 不产可溶性色素。细胞呈棒杆状, 革兰氏阳性, 温度生长范围为 15–40 °C (最适为 28 °C), NaCl 浓度 1%–10% (最适为 1%), pH 值生长范围 6.0–11.0 (最适为 7.0)。氧化酶、接触酶、淀粉水解、明胶液化为阳性, V-P 反应、柠檬酸盐利用、苯丙氨酸脱氨酶测定、硝酸盐还原反应阴性。能利用淀粉、D-麦芽糖、D-甘露醇、D-甘露糖、水杨苷、D-纤维二糖、D-葡萄糖、蔗糖、D-海藻糖、 $\alpha$ -葡萄糖及酪氨酸。anteiso-C<sub>15:0</sub> (30.33%)、iso-C<sub>16:0</sub> (31.53%) 和 anteiso-C<sub>17:0</sub> (14.32%) 为菌株主要脂肪酸构成。极性脂含有 DPG、PG 和 2 种未鉴定的 GL, 主要酰型为 MK10 和 MK11。菌株 KlspL18 基因组 DNA 的 G+C 含量为 70.2%。

IAA 作为一种植物生长激素, 可通过调控植物细胞分裂及相关基因表达来促进植物生长, 在农业生产中具有重要作用<sup>[35]</sup>。迄今为止, 已报道的可分泌 IAA 植物内生细菌种属主要有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、

肠杆菌属 (*Enterobacter*)、泛菌属 (*Pantoea*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 等<sup>[32,36–37]</sup>。各个种属菌株 IAA 产量存在较大差异, 如来源于水稻种子的内生细菌 *Staphylococcus* sp., 其分泌 IAA 最高达 269.83 mg/L<sup>[38]</sup>; 来源于石斛、人参和乌头的内生细菌分泌 IAA 值介于 12.80–84.43 mg/L 之间<sup>[39–41]</sup>; 我们前期从东乡野生稻种子中分离到的 *Microbacterium*, 其 IAA 产量介于 7.88–54.52 mg/L<sup>[16]</sup>。本研究菌株 KlspL18 是微杆菌属的新种, 在 ISP2 培养基上 IAA 产量可达 291.70 mg/L, 是目前报道微杆菌属中产 IAA 含量最高菌株, 高产原因可能与菌株自身遗传特性相关, 后期我们可以通过基因信息分析挖掘高产 IAA 基因功能, 来揭示高产机制。微杆菌已被报道是一类能产 IAA 的内生促生菌<sup>[6,11,42]</sup>, 菌株 KlspL18 可通过定殖宿主来提高植物生长应用于农业生产, 同时也可利用基因工程技术将其改造用于工业生产菌, 为后期开发微生物来源的植物生长调节剂 IAA 的生产奠定基础。

## 致谢

感谢中山大学李文均教授课题组在菌种鉴定方面提供的帮助。

## 参考文献

- [1] Orla-Jensen S. The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen: Host and Sons, Copenhagen, 1919.
- [2] Collins MD, Jones D, Kroppenstedt RM. Reclassification of *Brevibacterium imperiale* (Steinhaus) and "*Corynebacterium laevaniformans*" (Dias and bhat) in a redefined genus *Microbacterium* (Orla-Jensen), as *Microbacterium imperiale* comb. nov. and *Microbacterium laevaniformans* nom. rev.; comb. nov.. *Systematic and Applied Microbiology*, 1983, 4(1): 65–78.
- [3] Takeuchi M, Hatano K. Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998,

- 48 (3): 739–747.
- [4] Xie FQ, Niu SW, Lin XH, Pei SX, Jiang L, Tian Y, Zhang GY. Description of *Microbacterium luteum* sp. nov., *Microbacterium cremeum* sp. nov., and *Microbacterium atlanticum* sp. nov., three novel C50 carotenoid producing bacteria. *Journal of Microbiology: Seoul, Korea*, 2021, 59(10): 886–897.
- [5] Ma QY, Kong DL, Zhang Q, Li MM, Han XY, Che J, Zhou YQ, Zhang W, Jiang X, Ruan ZY. *Microbacterium sulfonyleivorans* sp. nov., isolated from sulfonyleurea herbicides degrading consortium *Archives of Microbiology*, 2022, 204(2): 136.
- [6] Mahmood A, Kataoka R. Metabolite profiling reveals a complex response of plants to application of plant growth-promoting endophytic bacteria. *Microbiological Research*, 2020, 234: 126421.
- [7] Purohit A, Yadav SK. Genome sequencing of a novel *Microbacterium camelliasinensis* CIAB417 identified potential mannan hydrolysing enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 208: 219–229.
- [8] Salam L, Obayori OS, Campbell C, Ilori MO, Amund O. Pyrene biodegradation potentials of an actinomycete, microbacterium esteraromaticum isolated from tropical hydrocarbon-contaminated soil. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2017, 6(4): 995–1000.
- [9] Banach A, Kuźniar A, Marzec-Grządziel A, Gałązka A, Wolińska A. Phenotype switching in metal-tolerant bacteria isolated from a hyperaccumulator plant. *Biology*, 2021, 10(9): 879.
- [10] 赵晶, 邢志富, 田茂雄, 刘晓宇, 王媛媛, 刘丹, 陈立杰, 段玉玺. 微杆菌 Sneb159 杀线虫活性物质的分离与鉴定. *微生物学报*, 2020, 60(10): 2341–2349. Zhao J, Xing ZF, Tian MX, Liu XY, Wang YY, Liu D, Chen LJ, Duan YX. Isolation and identification of nematicidal compound from *Microbacterium maritopicum* Sneb159. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(10): 2341–2349. (in Chinese)
- [11] Borah M, Das S, Bora SS, Boro RC, Barooah M. Comparative assessment of multi-trait plant growth-promoting endophytes associated with cultivated and wild *Oryza* germplasm of Assam, India. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(5): 2007–2028.
- [12] Sun WH, Xiong Z, Chu L, Li W, Soares MA, White JF Jr, Li HY. Bacterial communities of three plant species from Pb-Zn contaminated sites and plant-growth promotional benefits of endophytic *Microbacterium* sp. (strain BXGe<sub>71</sub>). *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 370: 225–231.
- [13] Sran KS, Bisht B, Mayilraj S, Roy Choudhury A. Structural characterization and antioxidant potential of a novel anionic exopolysaccharide produced by marine *Microbacterium aurantiacum* FSW-25. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 343–352.
- [14] Savi DC, Shaaban KA, Gos FMW, Thorson JS, Glienke C, Rohr J. Secondary metabolites produced by *Microbacterium* sp.. *Folia Microbiologica*, 2019, 64(3): 453–460.
- [15] 陈志远, 刘珺, 杨星鹏, 刘梦, 汪涯, 张志斌, 朱笃. 东乡野生稻可培养内生细菌群落组成及多样性. *生物多样性*, 2019, 27(12): 1320–1329. Chen ZY, Liu J, Yang XP, Liu M, Wang N, Zhang ZB, Zhu D. Community composition and diversity of cultivable endophytic bacteria isolated from Dongxiang wild rice. *Biodiversity Science*, 2019, 27(12): 1320–1329. (in Chinese)
- [16] Zhang ZB, Liu TT, Zhang X, Xie J, Wang Y, Yan RM, Jiang YM, Zhu D. Cultivable endophytic bacteria in seeds of Dongxiang wild rice and their role in plant-growth promotion. *Diversity*, 2021, 13(12): 665.
- [17] Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, Xu LH, Li WJ. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(19): 6176–6186.
- [18] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16(3): 313–340.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版, 2001.
- [20] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [21] Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *International Journal of*

- Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(2): 1100–1103.
- [22] Lechevalier MP, Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1970, 20(4): 435–443.
- [23] Kroppenstedt RM. Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase (RP18) and a silver loaded ion exchanger as stationary phases. *Journal of Liquid Chromatography*, 1982, 5(12): 2359–2367.
- [24] Collins MD, Jones D. Lipids in the classification and identification of coryneform bacteria containing peptidoglycans based on 2,4-diaminobutyric acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 1980, 48(3): 459–470.
- [25] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 793–796.
- [26] Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC. Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from l-tryptophan (Trp) using HPTLC. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 110: 7–14.
- [27] Alves A, Riesco R, Correia A, Trujillo ME. *Microbacterium proteolyticum* sp. nov. isolated from roots of *Halimione portulacoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt 6): 1794–1798.
- [28] Mawlankar RR, Mual P, Sonalkar VV, Thorat MN, Verma A, Srinivasan K, Dastager SG. *Microbacterium enclense* sp. nov., isolated from sediment sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt 7): 2064–2070.
- [29] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346–351.
- [30] Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Microbiology Resource Announcements*, 2009, 106(45): 19126–19131.
- [31] Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 2016, 183: 92–99.
- [32] Zhao JJ, Zhao X, Wang JR, Gong Q, Zhang XX, Zhang GS. Isolation, identification and characterization of endophytic bacterium *Rhizobium oryzihabitans* sp. nov., from rice root with biotechnological potential in agriculture. *Microorganisms*, 2020, 8(4): 608.
- [33] Zhu ZN, Li YR, Li YQ, Xiao M, Han MX, Wadaan MAM, Hozzein WN, An DD, Li WJ. *Microbacterium suaedae* sp. nov., isolated from *Suaeda aralocaspica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(2): 411–416.
- [34] Gao JL, Sun PB, Wang XM, Lv FY, Sun JG. *Microbacterium zae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from maize stem. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(5): 697–704.
- [35] Keswani C, Singh SP, Cueto L, García-Estrada C, Mezaache-Aichour S, Glare TR, Borriss R, Singh SP, Blázquez MA, Sansinenea E. Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(20): 8549–8565.
- [36] Adeleke BS, Babalola OO, Glick BR. Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. *Rhizosphere*, 2021, 20: 100433.
- [37] Panigrahi S, Mohanty S, Rath CC. Characterization of endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MG00145 isolated from *Ocimum sanctum* with indole acetic acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities against selected crops. *South African Journal of Botany*, 2020, 134: 17–26.
- [38] 姜晓宇, 高菊生, 徐凤花, 曹艳花, 唐雪, 张晓霞. 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. *微生物学报*, 2013, 53(3): 269–275. Jiang XY, Gao JS, Xu FH, Cao YH, Tang X, Zhang XX. Diversity of endophytic bacteria in rice seeds and their secretion of indole acetic acid. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(3): 269–275. (in Chinese)
- [39] 罗兴, 邹兰, 吴清山, 张要朋, 巫荣星, 王茜, 熊伟, 戴维, 叶坤浩, 黄晶. 乌头产吲哚乙酸内生细菌遗传多样性、抗逆性及其对水稻幼苗生长的影响. *微生物学报*, 2022, 62(4): 1485–1500.

Luo X, Zou L, Wu QS, Zhang YP, Wu RX, Wang Q, Xiong W, Dai W, Ye KH, Huang J. Genetic diversity, stress resistance, and effect on rice seedling growth of indoleacetic acid-producing endophytic bacteria isolated from *Aconitum carmichaelii* Debeaux. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1485–1500. (in Chinese)

[40] 张礼, 童文君, 薛庆云, 丁小余. 细茎石斛内生和根围细菌多样性及促生能力分析. 植物资源与环境学报, 2015, 24(3): 32–40.

Zhang L, Tong WJ, Xue QY, Ding XY. Analyses on diversity and plant-growth-promoting ability of endophytic and rhizosphere bacteria of *Dendrobium moniliforme*. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2015, 24(3): 32–40. (in Chinese)

**朱笃**, 现任职于江西科技师范大学, 工学博士、二级教授、硕/博士生导师, 入选国家新世纪百千万人才工程、享受国务院特殊津贴等, 兼任江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室主任、中国生物化学与分子生物学会工业生化分会常务理事、《菌物学报》编委等。主要致力于微生物资源、生物过程工程、次级产物代谢及调控等研究。所领导的课题组发展理念是“以生态视野找资源, 用化工技术搞开发”: 即着重筛选特殊生境(特别是植物内生环境)中具有医药、工业及农业应用价值的微生物资源, 开展其天然活性产物和酶的研究, 并结合代谢工程、过程工程和代谢调控等手段进行技术研发。主持或参与绿色制造国家重点研发项目、国家科技支撑项目、国家“863”高科技项目和国家自然科学基金项目等20余项, 获国家科技进步二等奖1项、省部级科学进步一等奖5项, 在国内外核心刊物发表论文140余篇, 授权国家发明专利16项。

[41] 姜云, 田磊, 陈长卿, 张冠军, 李桐, 陈京秀, 王雪. 一株人参内生生产吲哚乙酸细菌的筛选及鉴定. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 213–217.

Jiang Y, Tian L, Chen CQ, Zhang GJ, Li T, Chen JX, Wang X. Screening and identification of indoleacetic acid producing endophytic bacterium in *Panax ginseng*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40(2): 213–217. (in Chinese)

[42] Alishahi F, Alikhani HA, Khoshkholgh-Sima NA, Etesami H. Mining the roots of various species of the halophyte *Suaeda* for halotolerant nitrogen-fixing endophytic bacteria with the potential for promoting plant growth. *International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2020, 23(3): 415–427.

