



# 树兰原球茎内生细菌群落多样性及功能分析

姚娜<sup>1</sup>, 王涛<sup>2</sup>, 陈燕<sup>2</sup>, 曹晓璐<sup>1\*</sup>

1 中国林业科学研究院林业研究所 国家林业和草原局林木培育重点实验室 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091

2 国家植物园(北园) 植物迁地保护国家林业和草原局重点实验室, 北京 100093

姚娜, 王涛, 陈燕, 曹晓璐. 树兰原球茎内生细菌群落多样性及功能分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1654-1667.

YAO Na, WANG Tao, CHEN Yan, CAO Xiaolu. Diversity and functions of endophytic bacteria in protocorms of *Epidendrum* sp.[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1654-1667.

**摘要:**【目的】通过分析树兰原球茎内生细菌群落组成、多样性特征和促生功能, 探究树兰种子萌发相关的核心细菌类群及生物学功能。【方法】以树兰原球茎(树兰种子在树皮基质上共生萌发、在树叶基质上共生萌发、在 MS1 培养基上非共生萌发)和共生萌发基质(松树皮、腐熟树叶)共 5 个样本为研究材料, 采用高通量测序技术分析不同萌发条件下原球茎内生细菌的 16S rRNA 基因多样性, 比较分析细菌群落多样性和物种组成特征, 通过传统的内生细菌分离方法获得共生萌发原球茎内生细菌菌株, 并进行促生潜力评价。【结果】从 5 个研究样本中共获得 2 735 个可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 属于 41 门 453 科 876 属, 其中变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)为优势门。主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)结果表明, 树兰原球茎与萌发基质细菌群落结构存在差异, 非共生萌发原球茎与在树皮基质上共生萌发原球茎内生细菌群落结构最为接近。功能预测表明, 在树叶基质上共生萌发的原球茎内生细菌固氮功能显著高于其他萌发条件。通过分离培养, 共获得内生细菌 19 株, 分属 12 属 16 种, 其中鞭毛膨胀芽孢杆菌(*Tumebacillus flagellatus*)、*Bradyrhizobium cenepequi* 和人参腐殖土魏茨曼氏菌(*Weizmannia ginsengihumi*)为共生萌发原球茎共有种; 韩国假单胞菌(*Pseudomonas koreensis*)和 *W. ginsengihumi* 兼具有溶磷、产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)和铁载体的潜在能力。【结论】在不同环境中萌发的树兰原球茎均有丰富的内生细菌群落定殖; 从共生萌发原球茎中分离的内生细菌具有固氮、溶磷、产 IAA 和铁载体等促生功能。本研究为兰科植物种子萌发相关微生物资源挖

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(CAFYBB2019ZA001); 国家自然科学基金(31800523)

This work was supported by the Basal Research Fund of Central Public-interest Scientific Institution (CAFYBB2019ZA001) and the National Natural Science Foundation of China (31800523).

\*Corresponding author. E-mail: caoxiaolucxl@caf.ac.cn

Received: 2023-12-28; Accepted: 2024-02-04; Published online: 2024-02-08

掘及兰科植物与微生物互作研究提供科学依据。

关键词: 兰科; 种子; 共生萌发; 植物促生细菌

## Diversity and functions of endophytic bacteria in protocorms of *Epidendrum* sp.

YAO Na<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>2</sup>, CHEN Yan<sup>2</sup>, CAO Xiaolu<sup>1\*</sup>

1 State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

2 Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Plant *Ex Situ* Conservation, China National Botanical Garden (North Garden), Beijing 100093, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the community structure, diversity, and plant-growth-promoting functions of endophytic bacteria in the protocorms of *Epidendrum* sp. and mine the core bacterial groups associated with the seed germination. [Methods] We collected five samples including three types of protocorms (germinated on MS1 medium, pine bark, and rotten oak leaves) and two types of substrates (pine bark and rotten oak leaves). High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene was employed to compare the diversity and community composition of bacterial communities under different germination conditions. The conventional method was used to isolate the endophytic bacteria from the protocorms germinated on pine bark and rotten oak leaves (i.e., from symbiotic seed germination), and the growth-promoting potential of the isolates was evaluated. [Results] A total of 2 735 operational taxonomic units (OTUs) were obtained from the five samples, belonging to 876 genera, 453 families of 41 phyla, among which *Proteobacteria* and *Actinobacteria* were the dominant phyla. The results of principal coordinates analysis showed that there were differences in the bacterial community structure between the protocorms of *Epidendrum* sp. and the substrates, and the community structure of endophytic bacteria in the protocorms germinated on the MS1 medium was closest to that on pine bark. Functional prediction indicated that the endophytic bacteria in the protocorms germinated on rotten oak leaves had higher nitrogen-fixing ability than that in other types of protocorms. Nineteen isolates were obtained from protocorms germinated on pine bark and rotten oak leaves, belonging to 16 species of 12 genera. *Tumebacillus flagellatus*, *Bradyrhizobium cenepequi*, and *Weizmannia ginsengihumi* were the common species in the protocorms germinated on pine bark and rotten oak leaves. *Pseudomonas koreensis* and *W. ginsengihumi* had the potential of solubilizing phosphorus and producing indole-3-acetic acid (IAA) and siderophores. [Conclusion] The *Epidendrum* sp. protocorms germinated in different environments harbor rich endophytic bacteria. The endophytic bacteria isolated from the protocorms from symbiotic seed germination had plant growth-promoting functions, such as fixing nitrogen, solubilizing phosphorus, and producing IAA and siderophores. This study

provides a scientific basis for mining the microbial resources related to seed germination of orchids and studying the interactions between orchids and microorganisms.

**Keywords:** *Orchidaceae*; seed; symbiotic seed germination; plant growth-promoting bacteria

兰科是被子植物中的一个大家族，具有较高的观赏价值和生态价值<sup>[1]</sup>。兰科植物种子细小，不具胚乳，自然条件下萌发需要菌根真菌为之提供营养<sup>[2]</sup>。兰科植物的根内和根际定殖了丰富的微生物群落，为植株生长提供营养<sup>[3]</sup>。对于多数植物而言，除菌根真菌外，在根际<sup>[4]</sup>、根内<sup>[5]</sup>、菌丝际<sup>[6]</sup>甚至真菌内部<sup>[7]</sup>还有丰富的功能性细菌定殖；它们作为微生物生态系统的重要组成部分，在调节植物微生态平衡、促进植株生长和菌根真菌定殖、提高植物抗逆性等方面发挥着重要作用。因此，明确植物微生态系统中细菌群落结构，以及它们与菌根真菌的协同作用，对于解析植物-微生物之间的相互作用机制，筛选和开发功能菌株具有重要科学价值<sup>[8-9]</sup>。

与兰科植物菌根真菌相比，兰科植物内生细菌群落与功能解析的研究尚未引起足够重视。前期研究主要集中在根际或植物内生可培养细菌多样性分析、功能菌株筛选等；关于兰科植物共生萌发原球茎内生细菌群落结构研究鲜见报道。目前，兰科植物内生细菌常见的优势类群为：芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、泛菌属(*Pantoea*)及肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)等<sup>[10-12]</sup>；其中，类芽孢杆菌属、贪噬菌属(*Variovorax*)、芽孢杆菌属中部分菌株具有分泌吡啶乙酸、产生铁载体、抑制病原真菌等功能<sup>[13-17]</sup>。在石斛内生细菌群落研究中，高通量测序结果表明假单胞菌属(*Pseudomonas*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)和小短杆菌属(*Brachybacterium*)

为优势类群；而在细菌分离培养中，芽孢杆菌属和短小杆菌属(*Curtobacterium*)相对丰度较高<sup>[18]</sup>。因此，在兰科植物相关微生物研究中，为了更加全面地获得群落结构信息，进行功能微生物资源挖掘，需要结合高通量测序和分离培养技术。

树兰属(*Epidendrum* L.)广泛分布于美洲地区，其花色丰富、花序醒目，具有较高的观赏价值，在我国常作切花或盆花栽培<sup>[19]</sup>。本研究模拟了树兰种子在不同基质上共生萌发过程，比较分析不同萌发条件下原球茎内生细菌群落结构，明确种子萌发过程从环境中招募的主要细菌类群；通过对原球茎内生细菌的分离培养和功能筛选，确定其在共生萌发中的潜在作用。本研究为兰科植物功能菌剂的开发提供微生物资源，也为开展濒危兰科植物种子萌发过程中植物与环境微生物群落互作研究，构建健康的种子萌发微生态环境，提高种子萌发效率，提升植株环境适应性提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

树兰栽培于中国林业科学研究院科研温室，栽培基质为松树皮基质(*Orchiata*<sup>TM</sup>)。树兰植株健康，栽培时间5-8年，温室栽培可全年开花(图 1A)。花期通过人工授粉获得树兰种子，授粉后约 120 d 种子成熟(图 1B)；2021 年 5 月收集来自不同母株的未开裂成熟硕果用于种子萌发。

树兰种子共生萌发基质为：松树皮基质(树皮基质, bark)和蒙古栎腐熟树叶基质(树叶基

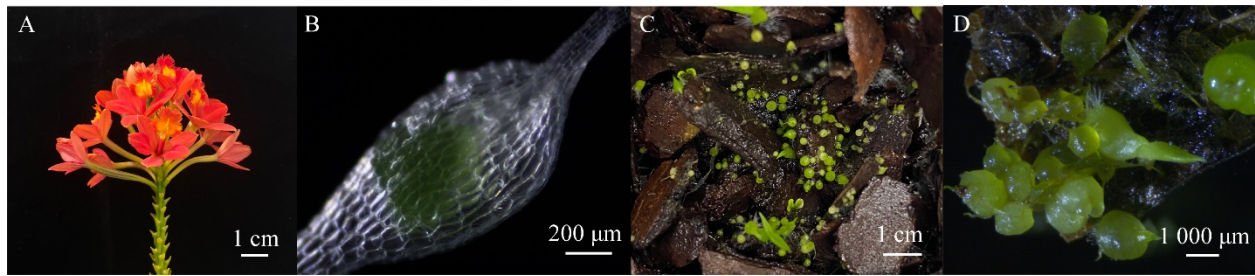


图 1 树兰的花序(A)、种子(B)和共生萌发原球茎(C, D)

Figure 1 The inflorescence, seed, and symbiotic germinated protocorms of *Epidendrum* sp. A: The inflorescence of *Epidendrum* sp. B: The seed of *Epidendrum* sp. C: Protocorms *ex situ* germinated on pine bark. D: Protocorms *ex situ* germinated on rotten oak leaf.

质, leaf)。松树皮基质为树兰常用栽培基质<sup>[20]</sup>, 用于种子共生萌发的松树皮基质收集自中国林业科学研究院科研温室, 收集前已作为树兰栽培基质使用 2-3 年; 蒙古栎为北方地区野生兰科植物的伴生物种之一<sup>[21]</sup>, 用于种子共生萌发的树叶基质为腐熟的蒙古栎落叶, 收集自吉林省长白山。所有基质于 2021 年 5 月收集, 收集后置入无菌袋中, 冰上保存运输至实验室。

树兰原球茎: 在树皮基质上共生萌发的原球茎(epibark) (图 1C)、在树叶基质上共生萌发的原球茎(epileaf) (图 1D)和在 MS1 培养基上非共生萌发的原球茎(epi)。

主要试剂及仪器: E.Z.N.A.<sup>®</sup> High Performance 植物基因组 DNA 提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; PCR 扩增引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR 试剂 2×EasyTaq PCR SuperMix, 北京全式金生物技术有限公司。PCR 仪, Bio-Rad 公司; 微量紫外-可见分光光度计, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Illumina MiSeq PE300 平台, 上海美吉生物医药科技有限公司。

## 1.2 基质预处理和种子萌发

基质准备: 240 mL 玻璃培养瓶中加入 100 mL

蒸馏水, 高温高压( $1 \times 10^5$  Pa, 60 min)灭菌 2 次; 在洁净的环境中, 分别将树皮和树叶基质转移至培养瓶中, 与无菌水充分混合后除去多余水分, 湿润的基质用于树兰种子共生萌发。

种子消毒: 对树兰果皮进行表面消毒后(75%乙醇 30 s, 无菌蒸馏水漂洗 30 s, 有效氯 1%的次氯酸钠溶液浸泡 5 min, 无菌蒸馏水漂洗 5 次后用无菌滤纸吸干果皮表面水分), 在超净工作台内用无菌手术刀将树兰果皮切开, 收集成熟种子进行表面消毒(75%乙醇 30 s, 无菌蒸馏水冲洗 5 次, 无菌滤纸吸干种子表面水分)。

播种: 将树兰种子播种在基质表面, 每种基质播种 100 瓶。另取部分种子播种在 MS1 培养基上(1/4 MS+0.4 mg/L 6-BA+10.0 g/L 蔗糖+6.0 g/L 琼脂, pH 6.3)。种子在( $25 \pm 2$ ) °C 的人工气候室内萌发, 光照 16 h/d。

## 1.3 样品收集和表面消毒

播种约 10 周后, 树兰种子可萌发至 4-5 阶段(图 1C、1D)<sup>[22]</sup>。从每个处理(在树皮基质上共生萌发、在树叶基质上共生萌发、在 MS1 培养基上非共生萌发)中随机选择 30 瓶, 收集处于 4-5 阶段的原球茎约 5.0 g, 并进行表面消毒(75%乙醇 30 s, 无菌蒸馏水漂洗 30 s, 有效氯 1%的次氯酸钠溶液浸泡 5 min, 无菌蒸馏水漂

洗 5 次后用无菌滤纸吸干原球茎表面水分), 2.0 g 原球茎用于细菌分离培养; 3.0 g 原球茎分装储存于无菌离心管中,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存, 用于细菌群落高通量测序。收集种子萌发基质, 充分混匀, 储存于无菌离心管中,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存, 作为环境样本测定萌发基质细菌群落结构。每个样本重复 3 次。

#### 1.4 基因组 DNA 的提取和扩增测序

使用 E.Z.N.A.<sup>®</sup> High Performance 植物基因组 DNA 提取试剂盒, 从所有样品中提取基因组 DNA。用超微量紫外-可见分光光度计测定 DNA 浓度和纯度。用引物 799F (5'-AACMGGA TTAGATACCCKG-3') 和 1193R (5'-ACGTCATCC CCACCTTCC-3') 扩增细菌 16S rRNA V5-V7 区<sup>[18]</sup>。委托上海美吉生物医药科技有限公司进行 PCR 扩增及产物纯化, 并基于 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序, 测序结果上传至 NCBI 数据库 (PRJNA1055733)。

#### 1.5 数据处理、内生细菌群落结构分析和功能预测

使用 Uparse (v.11) 在 97% 相似度下进行分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类; 使用 Mothur (v.1.30.2) 进行  $\alpha$  多样性分析; 使用 Qiime (v.1.9.1) 进行  $\beta$  多样性分析; 使用 FAPROTAX 对细菌群落数据进行功能注释预测。

#### 1.6 内生细菌的分离鉴定和功能筛选

称取 1 g 表面消毒的原球茎研磨, 加入 9 mL 无菌水, 150 r/min 振荡 30 min 后, 采用稀释涂布平板法分离内生细菌, 取悬浮液 10、100 和 1 000 倍稀释液各 100  $\mu\text{L}$  分别涂布于 R2A 培养基平板上,  $28^{\circ}\text{C}$  倒置培养 3-5 d。挑取不同形态、颜色及大小的单菌落划线纯化, 挑取纯化后的单菌落, 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, 参照王珊

珊等<sup>[18]</sup>描述的方法, 以 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTAC CTTGTTACGACTT-3') 为扩增引物, 进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增, PCR 反应条件参照孙磊等<sup>[15]</sup>描述, PCR 扩增产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 测序结果与 EzBioCloud 数据库进行比对, 确定菌株的分类学地位并提交 16S rRNA 基因序列信息至 GenBank 数据库。

使用 Ashby 培养基<sup>[23]</sup>筛选固氮菌; 使用 PKO 培养基<sup>[24]</sup>和蒙金娜培养基<sup>[25]</sup>分别筛选降解无机磷和有机磷的菌株; 使用 CAS 检测培养基<sup>[15]</sup>筛选产铁载体菌株; 使用 Salkowski 比色法<sup>[26]</sup>对菌株分泌吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 能力进行定性筛选。

## 2 结果与分析

### 2.1 树兰原球茎内生细菌群落的物种组成

测序结果经过过滤, 去除嵌合体和植物序列后, 共获得 841 570 条高质量 16S rRNA 片段序列, 其中包括 2 个基质样品 (树皮基质和树叶基质) 和 3 个原球茎样品 (在树皮基质上共生萌发、在树叶基质上共生萌发、在 MS1 培养基上非共生萌发), 每个样品重复 3 次。各样品含有 35 160 (树叶基质) 条至 89 467 (在树叶基质上共生萌发原球茎) 条序列。根据最少序列数样品进行抽平, 获得 2 735 个相似性大于 97% 的 OTU, 属于 41 门 453 科 876 属。在 OTU 水平所有样品 Shannon 曲线均达到平台期, 表明每个样品的测序深度均可反映细菌群落结构信息 (图 2A)。

在门水平 (图 2B), 所有样本中优势细菌类群主要为变形菌门 (*Proteobacteria*, 28.47%–78.20%)、放线菌门 (*Actinobacteria*, 14.37%–35.28%)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*, 0.40%–15.96%) 和厚壁菌门

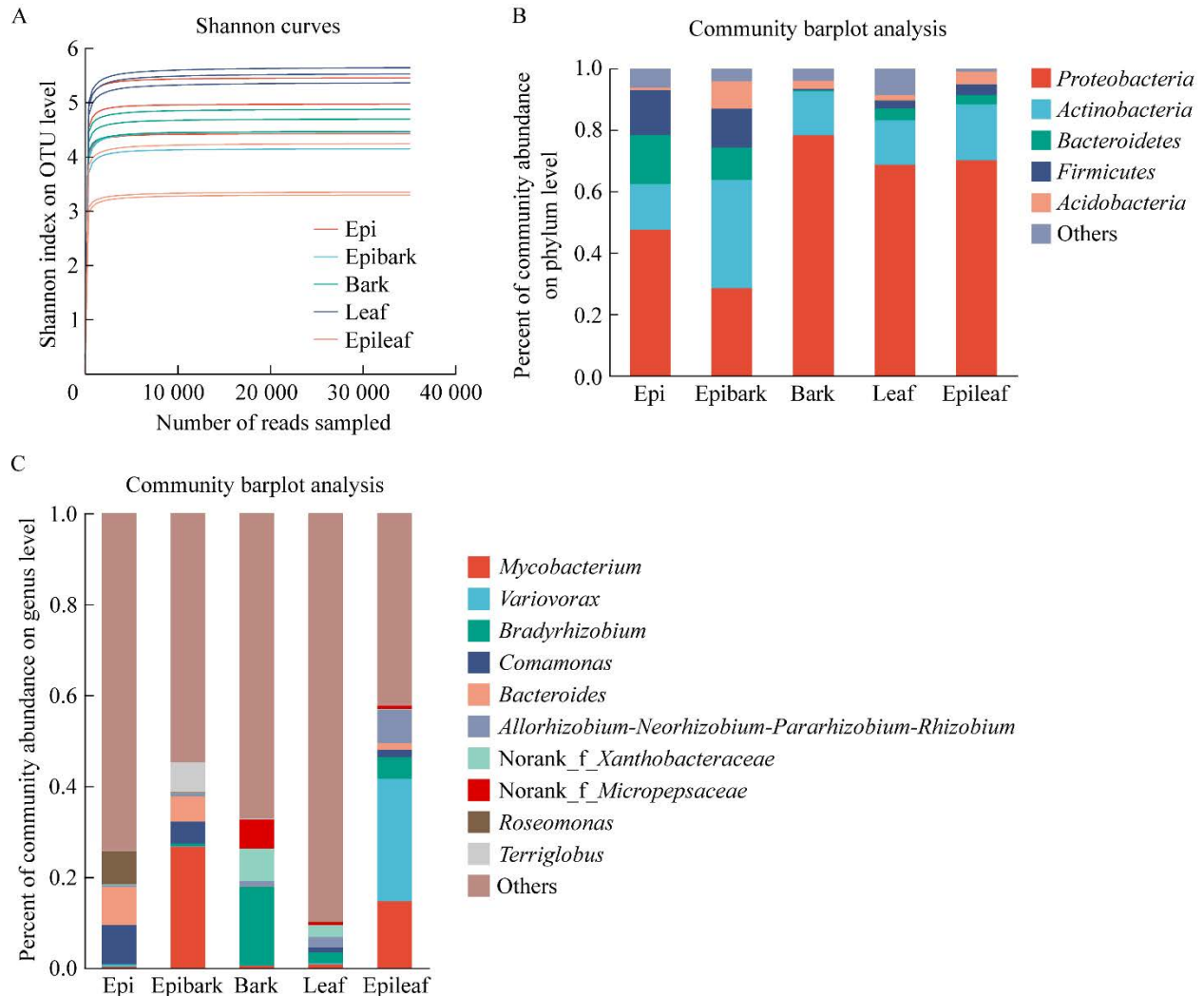


图 2 原球茎和基质样品稀释曲线和细菌群落结构

Figure 2 The rarefaction curve and the bacterial community compositions of the protocorms and substrates. A: The Shannon curves on OTU level. B: Bacterial community compositions of protocorms and substrates on phylum level. C: Bacterial community compositions of protocorms and substrates on genus level. Epi: Protocorms *in vitro* germinated on MS1 medium; Epibark: Protocorms *ex situ* germinated on pine bark; Epileaf: Protocorms *ex situ* germinated on rotten oak leaf; Bark: Pine bark substrate; Leaf: Rotten oak leaf substrate.

(Firmicutes, 0.36%–14.49%)。不同共生萌发环境的原球茎优势细菌类群存在差异, 树叶基质上共生萌发的原球茎以变形菌门为优势细菌类群(70.11%), 而树皮基质上萌发的原球茎优势类群为放线菌门(35.28%)。

在属水平(图 2C), 分枝杆菌属(*Mycobacterium*,

26.68%)、地圆形菌属(*Terriglobus*, 6.56%)和拟杆菌属(*Bacteroides*, 5.55%)为树皮共生萌发原球茎的优势属; 贪噬菌属(*Variovorax*, 26.96%)、分枝杆菌属(14.67%)和 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (7.33%)为叶片共生萌发原球茎的优势属; 非共生萌发原球茎优势



属为丛毛单胞菌属(*Comamonas*, 8.54%)、拟杆菌属(8.38%)和玫瑰单胞菌属(*Roseomonas*, 7.34%)。

## 2.2 树兰原球茎内生细菌群落多样性分析

为评估不同样本细菌群落的多样性,统计细菌群落 $\alpha$ 多样性和 $\beta$ 多样性。细菌群落 $\alpha$ 多样性在 OTU 水平上,树叶基质的细菌群落丰富度极显著高于其他样本( $P<0.001$ ) (图 3A), 3 种

萌发条件的原球茎之间内生细菌群落丰富度差异不显著。这表明树叶基质细菌群落丰富度的优势,并未导致在此环境中共生发芽原球茎内生细菌群落丰富度的升高。在群落多样性方面(图 3B),共生萌发原球茎之间内生细菌群落多样性差异不显著,但是在叶片基质上共生萌发原球茎的内生细菌群落多样性显著低于萌发基质( $P<0.001$ )和非共生萌发原球茎( $P<0.01$ )。

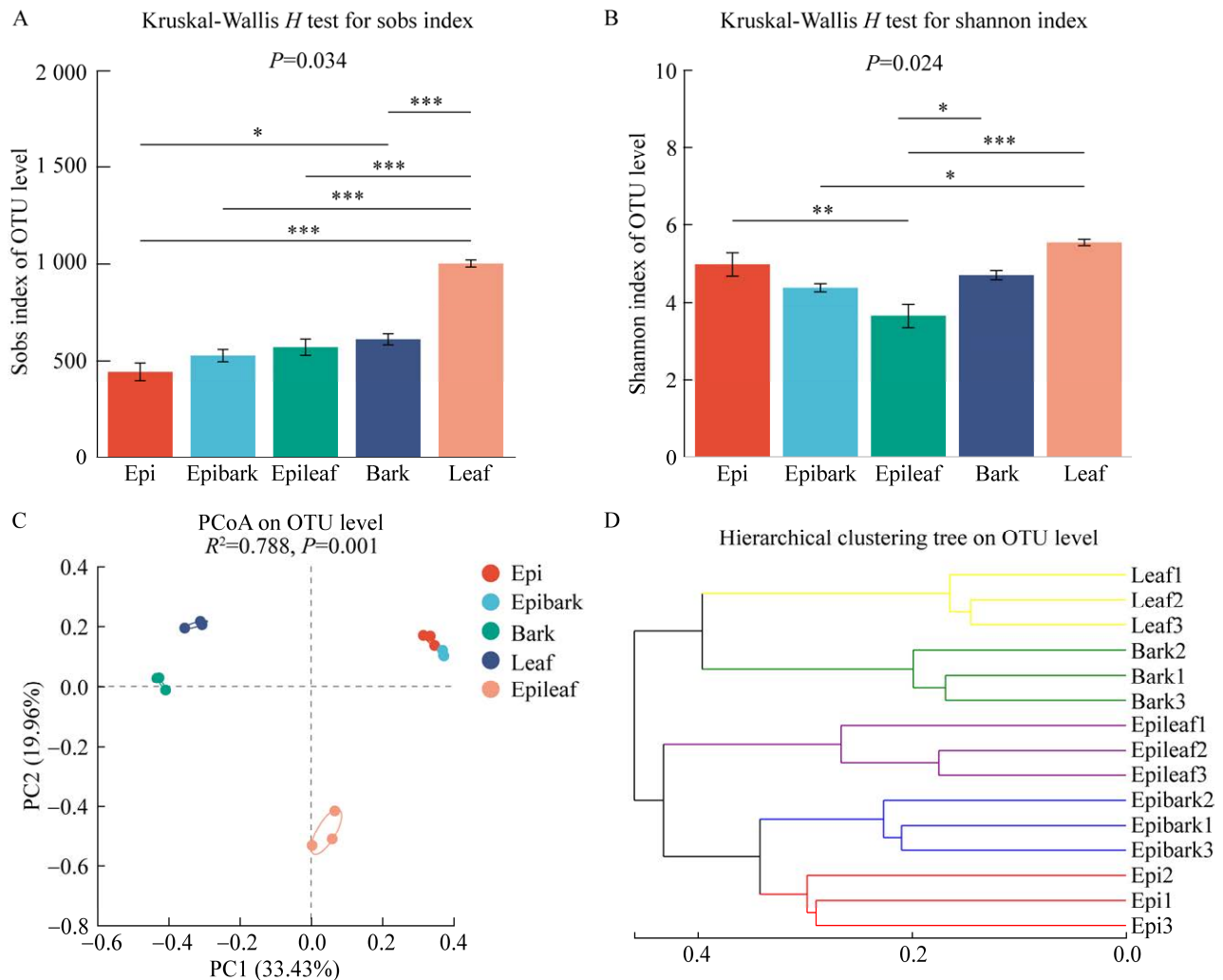


图 3 树兰原球茎和基质样品细菌群落多样性

Figure 3 The diversity of bacterial community of the protocorms and substrates. A: Sobs index on OTU level. B: Shannon index on OTU level. C: Principal coordinate analysis (PCoA) plots of bacterial community structures at the OTU level. D: Hierarchical clustering tree of the samples on OTU level. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

细菌群落  $\beta$  多样性方面, OTU 水平的 PCoA 图(图 3C)显示, 树皮共生萌发原球茎和非共生萌发原球茎之间的距离较近, 表明在这两种萌发条件下原球茎内生细菌群落组成相近; 而植物材料和环境样本的细菌群落组成具有明显差异。样本层级聚类分析表明(图 3D), 在 OTU 水平植物样本与环境样本分别位于 2 个大支, 不同萌发条件的原球茎内生细菌群落结构具有较高的相似性, 两种基质细菌群落结构相近, 但植物样本与环境样本之间差异较大; 对于植物材料, 树皮共生萌发原球茎和非共生萌发原球茎内生细菌群落聚为 1 个小支。

### 2.3 不同原球茎和基质共有细菌类群比较分析

在 3 种萌发条件下形成的原球茎中, 有 299 个内生细菌共有属(图 4A), 主要为分枝杆菌属(15.31%)、贪噬菌属(10.17%)、拟杆菌属(5.67%)、丛毛单胞菌属(5.49%)和假单胞菌属(3.23%)。

仅树皮基质上萌发的原球茎与树皮基质共有 OTU 106 个(图 4B), 主要为: OTU117 [9.50%, 黄色杆菌科(*Xanthobacteraceae*)]、OTU2635 [5.94%, 慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)]、OTU2580 [4.96%, 嗜酸杆菌属(*Acidibacter*)]、

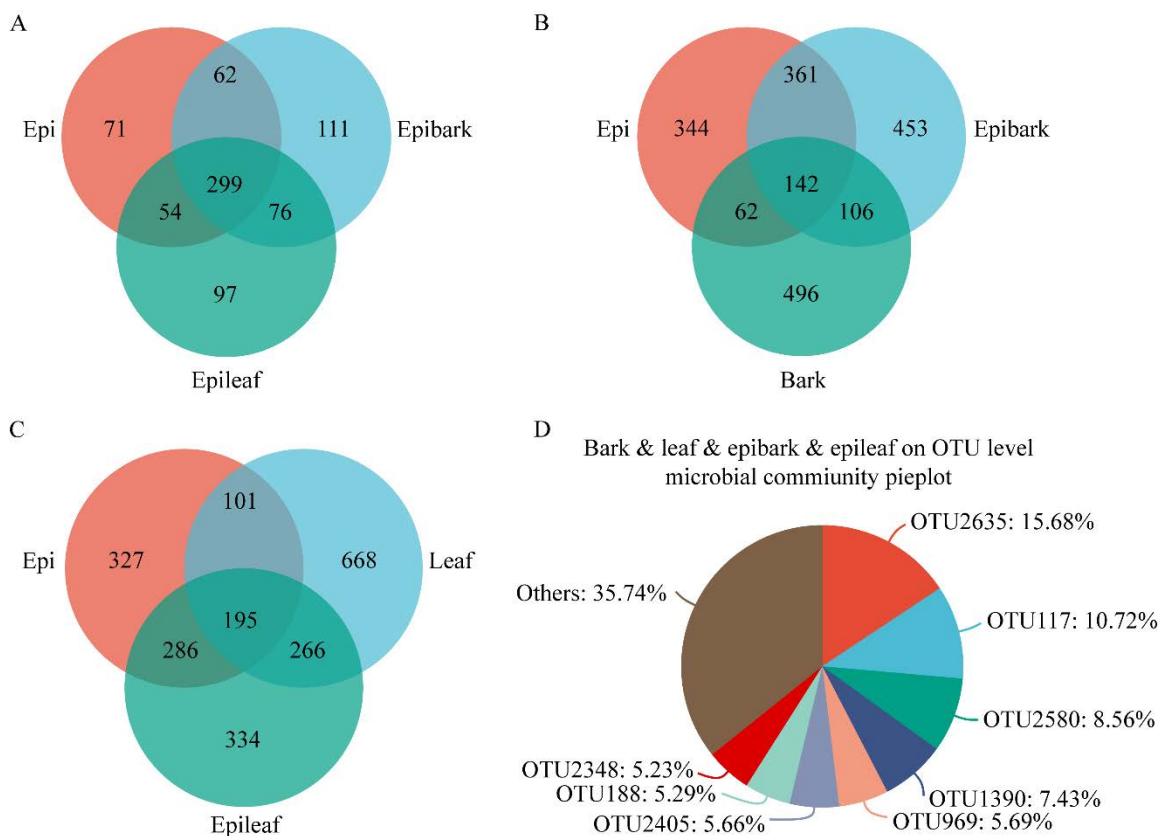


图 4 不同原球茎和基质共有细菌类群

Figure 4 Bacterial groups shared among different protocorms and substrates. A: Bacterial genera shared among three types of protocorms. B and C: Bacterial OTUs shared among protocorms *ex situ* germinated on substrate, protocorms *in vitro* germinated on MS1 medium, and the substrate. D: Bacterial OTUs shared among bark, leaf, epibark, and epileaf.



OTU224 [(4.94%, 不黏柄菌属(*Asticcacaulis*)]和 OTU188 [4.92%, 微消化菌科(*Micropepsaceae*)]；仅树叶基质上萌发的原球茎与树叶基质共有 OTU 266 个(图 4C)，主要为：OTU2635 (6.38%，*Bradyrhizobium*)、OTU2557 [4.56%，根际柄杆菌(*Caulobacter rhizosphaerae*)]、OTU1390 [4.33%，土壤红色杆形菌科(*Solirubrobacteraceae*)]、OTU2587 [3.36%，根瘤菌科(*Rhizobiaceae*)]和 OTU2045 [2.95%，鼠杆状菌科(*Muribaculaceae*)]。仅共生萌发原球茎与萌发基质之间共有 OTU 37 个(图 4D)，主要为 OTU2635 (15.68%，*Bradyrhizobium*)、OTU117 (10.72%，*Xanthobacteraceae*)、OTU2580 (8.56%，*Acidibacter*)、OTU1390 (7.43%，*Solirubrobacteraceae*)和 OTU969 [5.69%，莱朗杆菌属(*Reyranella*)]。

#### 2.4 不同原球茎内生细菌群落功能分析

利用 FAPROTAX 对 3 种原球茎内生细菌群

落组成进行生态功能预测和组间功能差异检验，结果表明差异显著功能主要集中在：化能异养、需氧化能异养、塑料降解、固氮、亚硝酸氨化作用、壳聚糖分解和暗硫化物氧化作用等( $P < 0.05$ ) (图 5A)。其中，叶片共生萌发原球茎内生细菌固氮功能显著高于树皮共生萌发和非共生萌发原球茎(图 5B)。功能预测结果文件显示，与固氮作用相关的功能主要来自慢生根瘤菌属和固氮螺形菌属(*Azospira*)。

#### 2.5 树兰原球茎内生细菌分离和功能菌株筛选

从树兰共生萌发原球茎中共分离出 46 株内生细菌，经 16S rRNA 基因序列分析和 EzBioCloud 数据库比对后，归为 12 属 16 种(表 1)；其中，芽孢杆菌属包含 3 个种；类芽孢杆菌属和根瘤菌属(*Rhizobium*)各包含 2 个种。排除重复菌株后获得 19 株细菌，从树皮共生萌发原球茎中分

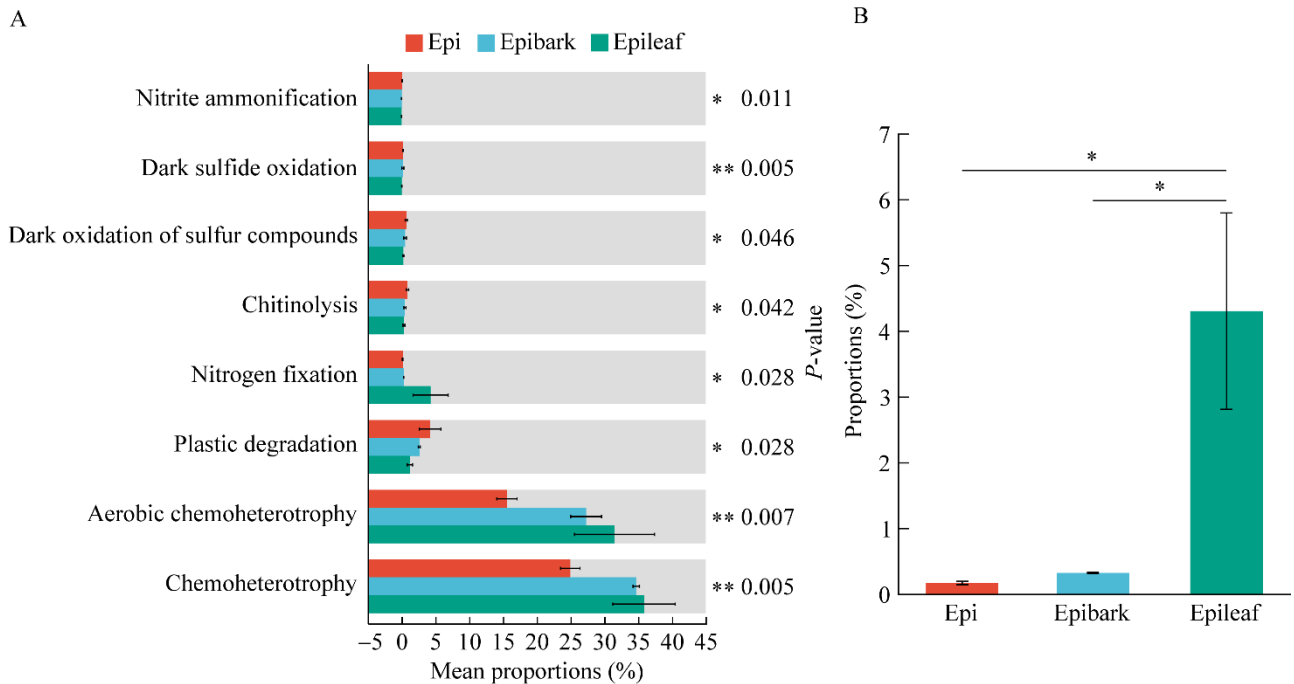


图 5 三种萌发条件下获得的原球茎内生细菌群落组间功能差异检验

Figure 5 Functional difference of endophytic bacterial community among three types of protocorms. A: Functions with significant differences. B: Nitrogen fixation. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

表 1 分离培养菌株促生能力筛选

Table 1 Plant growth-promoting properties of the isolated strains

Strain	Substrate	Taxonomy	Similarity (%)	NCBI accession number	IPS	OPS	IP	SP	NF
Epi0928-17	Leaf	<i>Bacillus mycoides</i>	100.00	OR999871	-	-	+	-	-
Epi0908-2	Leaf	<i>Bacillus tequilensis</i>	99.93	OR999881	-	-	-	-	-
Epi0928-21	Leaf	<i>Bacillus toyonensis</i>	100.00	OR999869	-	-	-	-	-
Epi0928-16	Leaf	<i>Bradyrhizobium cenepequi</i>	99.70	PP024262	-	-	-	+	+
Epi0928-11	Bark	<i>Bradyrhizobium cenepequi</i>	99.71	OR999874	-	-	-	+	+
Epi0825-2	Bark	<i>Cohnella zeiphila</i>	98.96	OR999885	-	-	+	+	-
Epi0825-8	Leaf	<i>Cupriavidus pauculus</i>	99.93	OR999883	-	-	+	+	-
Epi0825-1	Bark	<i>Mycolicibacterium aichiense</i>	99.22	OR999886	-	-	-	+	+
Epi0928-18	Leaf	<i>Paenibacillus favisporus</i>	99.93	OR999870	-	-	+	+	-
Epi0928-2	Bark	<i>Paenibacillus taihuensis</i>	98.87	OR999877	-	-	+	-	-
Epi0928-6	Bark	<i>Priestia aryabhatai</i>	99.93	OR999876	-	+	+	+	-
Epi0825-7	Leaf	<i>Pseudomonas koreensis</i>	99.78	OR999602	+	+	+	+	+
Epi0825-5	Bark	<i>Rhizobium dioscoreae</i>	98.52	OR999884	-	-	+	+	+
Epi0908-9	Leaf	<i>Rhizobium favelukesii</i>	99.48	OR999880	-	-	-	-	+
Epi0928-8	Bark	<i>Tumebacillus flagellatus</i>	99.62	OR999875	-	-	+	+	+
Epi0928-13	Leaf	<i>Tumebacillus flagellatus</i>	99.71	OR999873	-	-	-	+	+
Epi0908-13	Leaf	<i>Variovorax paradoxus</i>	99.07	OR999878	-	-	+	+	+
Epi0908-1	Leaf	<i>Weizmannia ginsengihumi</i>	100.00	OR999882	+	+	+	+	-
Epi0928-14	Bark	<i>Weizmannia ginsengihumi</i>	100.00	OR999872	+	+	+	+	-

IPS: Inorganic phosphorus solubilizing; OPS: Organic phosphorus solubilizing; IP: IAA producing; SP: Siderophore producing; NF: Nitrogen fixation. The qualitative assays of selected strains, + represents a visible production of related substances, - represents no production of related substances.

离获得 8 株, 从树叶共生萌发原球茎中分离获得 11 株; 其中, 鞭毛膨胀芽孢杆菌(*Tumebacillus flagellatus*)、豆薯慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium jicamae*)和人参腐殖土魏茨曼氏菌(*Weizmannia ginsengihumi*)为两类共生萌发原球茎可培养内生细菌共有种。蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*) (OTU1561)、特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*) (OTU1899)、*Bradyrhizobium cenepequi* (OTU69)、鞭毛膨胀芽孢杆菌(OTU1680)和争论贪噬菌(*Variovorax paradoxus*) (OTU2451)在高通量测序中均检测到一致性达 100.00%的代表性 OTU 序列。

从 19 株细菌菌株中, 筛选获得降解无机磷菌株 3 株、降解有机磷菌株 4 株、产 IAA 菌株

12 株、产铁载体菌株 14 株和固氮菌 9 株。其中韩国假单胞菌(*Pseudomonas koreensis*)和人参腐殖土魏茨曼氏菌(*Weizmannia ginsengihumi*)同时具有溶磷、产 IAA 和铁载体的功能。

### 3 讨论

种子萌发是植物完成生活史的一个重要过程, 影响着植物的繁衍和生物多样性<sup>[27]</sup>, 微生物在种子萌发过程中也发挥着重要作用<sup>[28]</sup>; 近年来, 对种子内生微生物组的研究逐渐增加<sup>[29-30]</sup>。对于兰科植物, 这类依赖真菌共生萌发的植物, 自然状态下种子萌发尤其需要从环境中招募有益微生物, 来获取养分促进萌发<sup>[31]</sup>、抑制病原菌生长<sup>[32]</sup>。由于获得自然萌发的兰科植物幼苗

或原球茎困难, 可通过原位共生萌发获得原球茎的兰科植物也十分有限, 且萌发效率较低<sup>[33-34]</sup>; 因此关于兰科植物种子萌发过程招募微生物的类群、生态功能, 以及与种子内生微生物组之间的关系报道较少。本研究采用高通量测序技术, 分析了异位共生萌发的树兰原球茎内生细菌群落结构及生物多样性, 并对可培养内生细菌进行了功能筛选。

高通量测序结果表明, 3 种不同萌发环境下收获的树兰原球茎内均定殖了丰富的内生细菌, 然而萌发环境细菌群落丰富度的显著差异, 并未导致原球茎内生细菌群落丰富度的显著差异; 样本层级聚类结果显示, 在 OTU 水平 3 种原球茎聚为一支, 这意味着在不同环境中萌发的树兰原球茎细菌群落结构是相对保守的, 且受环境微生物群落影响较小, 这与树兰种子共生萌发过程中招募真菌群落结果一致<sup>[35]</sup>。在玉米内生细菌群落分析中也有相似结果, 即在不同基因型和不同环境条件下, 玉米木质部能够稳定地招募特异性细菌类群<sup>[36]</sup>; 在水稻相关微生物组研究中也发现, 不同地区的稻田散土对水稻内生细菌群落影响较小<sup>[30]</sup>。因此, 推测树兰种子萌发过程中从环境招募细菌是有选择性的; 在植物根际/根内微生物组研究中, 这种植物对环境微生物有选择性地招募可通过植物产生根系分泌物、识别根际微生物释放的信号物质等途径来实现<sup>[5,37]</sup>。

在细菌群落组成方面, 树兰种子在不同环境下共生萌发的原球茎内生细菌优势类群存在差异, 但多为兰科植物常见内生细菌类群。树皮共生萌发原球茎的优势属为分枝杆菌属, 该属也是石斛茎内生细菌优势属之一<sup>[18]</sup>, 具备固氮、产 IAA 和铁载体, 以及金属抗性等功能<sup>[38]</sup>。树叶共生萌发原球茎的优势属为贪噬菌属, 该属也为春兰根内可产生铁载体的优势菌属<sup>[15]</sup>,

同时贪噬菌属可通过调控生长素浓度影响植物根际微生物群落, 维持植物根部健康生长<sup>[39]</sup>; 本研究中, 从树叶共生萌发原球茎中分离获得贪噬菌属菌株, 经功能筛选发现, 该菌株具有固氮、产生 IAA 和铁载体等功能, 与前期报道一致<sup>[40]</sup>。

在萌发过程中, 部分细菌为共生萌发原球茎和萌发基质共有类群, 而在非共生萌发原球茎中未检测到, 主要包括不同萌发环境下仅共生萌发原球茎与萌发基质共有的 OTU (树皮萌发环境: 106 个 OTU; 树叶萌发环境: 266 个 OTU), 以及仅共生萌发原球茎和萌发基质共有 OTU (37 个), 表明这些共有细菌类群能够适应不同的生态位, 包括不同来源和类型的基质, 以及植物内部; 由于这些细菌类群在非共生萌发原球茎中未被检测到, 推测这些在共生萌发原球茎内富集类群来源于萌发基质, 即萌发过程中种子从环境中招募细菌类群, 然后定殖在原球茎内。

仅共生萌发原球茎和萌发基质共有的 37 个 OTU 占原球茎从树皮基质中招募 OTU 数量的 34.91% (37/106), 占原球茎从树叶基质中招募 OTU 数量的 13.91% (37/266), 慢生根瘤菌属为其中的优势类群之一; 在细菌群落功能预测中, 固氮功能也主要来自慢生根瘤菌属; 在分离培养中从两种共生萌发原球茎中均分离出慢生根瘤菌属菌株, 且具有固氮和产生铁载体的能力。慢生根瘤菌属是多分离自豆科植物<sup>[41]</sup>的固氮菌, 在兰科植物内生细菌中报道较少, 兰科植物种子无胚乳, 携带营养物质较少, 共生萌发过程中对固氮菌的招募有助于种子获得更多营养。

## 4 结论

本文结合高通量测序与传统内生细菌分离技术, 对在不同基质上共生萌发的树兰原球茎

内生细菌群落结构和功能进行了比较分析。结果显示, 3 种不同萌发条件的树兰原球茎内均有丰富的内生细菌群落定殖, 但树兰原球茎与基质细菌群落结构存在差异。从树兰共生萌发原球茎中分离筛选出兼具有溶磷、产 IAA 和铁载体能力的菌株 2 株; 固氮菌 9 株, 其中包括树兰共生萌发原球茎内生细菌优势类群——慢生根瘤菌属。本研究为兰科植物种子萌发相关微生物资源开发, 以及兰科植物与微生物互作分析提供科学依据。

## 参考文献

- [1] CHASE MW, CAMERON KM, FREUDENSTEIN JV, PRIDGEON AM, SALAZAR G, van den BERG C, SCHUITEMAN A. An updated classification of *Orchidaceae*[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2015, 177(2): 151-174.
- [2] 陈艳红, 邢晓科, 郭顺星. 兰科植物与菌根真菌的营养关系[J]. *菌物学报*, 2017, 36(7): 807-819.  
CHEN YH, XING XK, GUO SX. Nutritional relationships between orchids and mycorrhizal fungi: a review[J]. *Mycosystema*, 2017, 36(7): 807-819 (in Chinese).
- [3] 单婷婷, 陈彤垚, 陈晓梅, 郭顺星, 王爱荣. 菌根真菌与兰科植物氮营养关系的研究进展[J]. *植物生态学报*, 2022, 46(5): 516-528.  
SHAN TT, CHEN TY, CHEN XM, GUO SX, WANG AR. Advance on the association between mycorrhizal fungi and *Orchidaceae* in nitrogen nutrition[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2022, 46(5): 516-528 (in Chinese).
- [4] JEON JS, RYBKA D, CARRENO-QUINTERO N, de VOS R, RAAIJMAKERS JM, ETALO DW. Metabolic signatures of rhizobacteria-induced plant growth promotion[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2022, 45(10): 3086-3099.
- [5] SANTOYO G. How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions[J]. *Journal of Advanced Research*, 2022, 40: 45-58.
- [6] ZHANG L, ZHOU JC, GEORGE TS, LIMPENS E, FENG G. Arbuscular mycorrhizal fungi conducting the hyphosphere bacterial orchestra[J]. *Trends in Plant Science*, 2022, 27(4): 402-411.
- [7] VENKATESH N, GRECO C, DROTT MT, KOSS MJ, LUDWIKOSKI I, KELLER NM, KELLER NP. Bacterial hitchhikers derive benefits from fungal housing[J]. *Current Biology*, 2022, 32(7): 1523-1533.e6.
- [8] 葛伟, 董醇波, 张芝元, 韩燕峰, 梁宗琦. 外生菌根真菌与内生细菌共生互作研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(10): 3810-3822.  
GE W, DONG CB, ZHANG ZY, HAN YF, LIANG ZQ. Symbiotic interaction between ectomycorrhizal fungi and endobacteria: a review[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(10): 3810-3822 (in Chinese).
- [9] 谭树朋, 唐超, 郭绍霞, 王维华, 刘润进. 菌根真菌与细菌的相互作用研究进展[J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2013, 30(4): 240-246.  
TAN SP, TANG C, GUO SX, WANG WH, LIU RJ. Advances in study of interactions between mycorrhizal fungi and bacteria[J]. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2013, 30(4): 240-246 (in Chinese).
- [10] 张萍, 宋希强. 兰科植物内生细菌物种多样性及其促生机理研究进展[J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(1): 92-98.  
ZHANG P, SONG XQ. Advances in diversity and promotion mechanism of endophytic bacteria associated with orchids[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2012, 20(1): 92-98 (in Chinese).
- [11] 张芳芳, 宋希强, 朱国鹏. 不同生境下五唇兰根部可培养内生细菌多样性研究[J]. *植物科学学报*, 2016, 34(1): 135-142.  
ZHANG FF, SONG XQ, ZHU GP. Diversity of culturable endophytic bacteria isolated from the root tissues of *Phalaenopsis pulcherrima* in two different habitats[J]. *Plant Science Journal*, 2016, 34(1): 135-142 (in Chinese).
- [12] 童文君, 张礼, 薛庆云, 侯北伟, 丁小余. 不同产地美花石斛内生细菌分离及促生潜力比较[J]. *植物资源与环境学报*, 2014, 23(1): 16-23.  
TONG WJ, ZHANG L, XUE QY, HOU BW, DING XY. Isolation of endophytic bacteria in *Dendrobium loddigesii* collected from different locations and comparison on their plant-growth-promoting potential[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2014, 23(1): 16-23 (in Chinese).
- [13] 赵银. 白及优质种苗繁育技术及其促生内生菌的筛选和鉴定[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2020.  
ZHAO Y. The high-quality propagation of *Bletilla striata* seedlings and screening and identification of growth-promoting endophytes[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [14] 刘琳, 孙磊, 张瑞英, 姚娜, 李潞滨. 春兰根中可分

- 泌吡啉乙酸的内生细菌多样性[J]. 生物多样性, 2010, 18(2): 182-187.
- LIU L, SUN L, ZHANG RY, YAO N, LI LB. Diversity of IAA-producing endophytic bacteria isolated from the roots of *Cymbidium goeringii*[J]. Biodiversity Science, 2010, 18(2): 182-187 (in Chinese).
- [15] 孙磊, 邵红, 刘琳, 张瑞英, 赵立华, 李潞滨, 姚娜. 可产生铁载体的春兰根内生细菌多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 189-195.
- SUN L, SHAO H, LIU L, ZHANG RY, ZHAO LH, LI LB, YAO N. Diversity of siderophore-producing endophytic bacteria of *Cymbidium goeringii* roots[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 189-195 (in Chinese).
- [16] 苗永美, 韩朔, 苗翠苹, 张维, 徐荣华. 石豆兰内生细菌分离鉴定、发酵条件优化及对棉花枯萎病菌的抑制[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(4): 656-664.
- MIAO YM, HAN S, MIAO CP, ZHANG W, XU RH. Isolation, identification and fermentation conditions optimization of endophytes from *Bulbophyllum* sp. and its inhibitory effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*[J]. Natural Product Research and Development, 2022, 34(4): 656-664 (in Chinese).
- [17] 安忠琦, 詹伟, 吴庆珊, 方正, 王玉倩, 余天华, 翁庆北. 金钗石斛根际可培养细菌多样性及抑菌活性研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2018, 40(3): 586-602.
- AN ZQ, ZHAN W, WU QS, FANG Z, WANG YQ, YU TH, WENG QB. Diversity and antimicrobial activities of the cultivable rhizospheric bacteria from *Dendrobium nobile*[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2018, 40(3): 586-602 (in Chinese).
- [18] 王珊珊, 刘佳萌, 孙晶, 贾宁, 金诺, 刘佳妮, 范蓓, 王凤忠. 不同栽培方式的铁皮石斛根、茎中内生细菌多样性及其抑菌活性研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(12): 4006-4025.
- WANG SS, LIU JM, SUN J, JIA N, JIN N, LIU JN, FAN B, WANG FZ. Diversity and antibacterial activity of endophytic bacteria in roots and stems of *Dendrobium officinale* with different cultivation patterns[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(12): 4006-4025 (in Chinese).
- [19] 卢思聪, 张毓, 石雷, 赵世伟. 世界栽培兰花百科图鉴[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2014: 338-343.
- LU SC, ZHANG Y, SHI L, ZHAO SW. The Illustrated Encyclopedia of Cultivated Orchids[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2014: 338-343 (in Chinese).
- [20] 黄昌艳, 张自斌, 何荆洲, 邓杰玲, 李秀玲, 卜朝阳. 树兰无菌播种繁育技术规程[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(S2): 108-109.
- HUANG CY, ZHANG ZB, HE JZ, DENG JL, LI XL, BU ZY. Technical regulations for tissue culture of *Epidendrum* spp.[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(S2): 108-109 (in Chinese).
- [21] 王丹, 盖立新, 田恒玖, 蒋健, 范雅倩, 张洪亮, 吴记贵. 北京松山国家级自然保护区野生兰科植物多样性及其生存状况研究[J]. 自然保护地, 2022, 2(1): 93-101.
- WANG D, GAI LX, TIAN HJ, JIANG J, FAN YQ, ZHANG HL, WU JG. Study on biodiversity and living status of orchids in Beijing Songshan national nature reserve[J]. Natural Protected Areas, 2022, 2(1): 93-101 (in Chinese).
- [22] ZETTLER L, DELANEY TW, SUNLEY J. Seed propagation of the epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus[J]. Selbyana, 1998, 19: 249-253.
- [23] 赵廷伟, 彭轶楠, 梁燕, 王治业, 季彬. 耐盐碱微生物菌种的筛选鉴定及其功能性与促生性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4033-4047.
- ZHAO TW, PENG YN, LIANG Y, WANG ZY, JI B. Screening and identification of saline-alkali-resistant microbial strains and research on their functions and growth-promoting properties[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4033-4047 (in Chinese).
- [24] 朱培森, 杨兴明, 徐阳春, 欧阳红, 沈其荣. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 107-112.
- ZHU PM, YANG XM, XU YC, OUYANG H, SHEN QR. High effective phosphate-solubilizing bacteria: their isolation and promoting effect on corn seedling growth[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(1): 107-112 (in Chinese).
- [25] 王欢, 王敬敬, 徐松, 赵维, 韩一凡, 王兴彪, 黄志勇. 有机磷降解菌的筛选及其促生特性[J]. 微生物学报, 2017, 57(5): 667-680.
- WANG H, WANG JJ, XU S, ZHAO W, HAN YF, WANG XB, HUANG ZY. Screening and growth promoting characteristics of efficient organophosphate-degradation bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(5): 667-680 (in Chinese).
- [26] 罗兴, 邹兰, 吴清山, 张要朋, 巫荣星, 王茜, 熊伟, 戴维, 叶坤浩, 黄晶. 乌头产吡啉乙酸内生细菌遗传多样性、抗性及其对水稻幼苗生长的影响[J]. 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[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1485-1500 (in Chinese).
- [27] 彭德力, 张志强, 牛洋, 杨扬, 宋波, 孙航, 李志敏. 高山植物繁殖策略的研究进展[J]. *生物多样性*, 2012, 20(3): 286-299.  
PENG DL, ZHANG ZQ, NIU Y, YANG Y, SONG B, SUN H, LI ZM. Advances in the studies of reproductive strategies of alpine plants[J]. *Biodiversity Science*, 2012, 20(3): 286-299 (in Chinese).
- [28] 李善家, 雷雨昕, 孙梦格, 刘海锋, 王兴敏. 种子内生细菌多样性与植物互馈作用研究进展[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(4): 166-175.  
LI SJ, LEI YX, SUN MG, LIU HF, WANG XM. Research progress in the diversity of endophytic bacteria in seeds and their interaction with plants[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(4): 166-175 (in Chinese).
- [29] BZIUK N, MACCARIO L, STRAUBE B, WEHNER G, SØRENSEN SJ, SCHIKORA A, SMALLA K. The treasure inside barley seeds: microbial diversity and plant beneficial bacteria[J]. *Environmental Microbiome*, 2021, 16(1): 20.
- [30] ZHANG XX, MA YN, WANG X, LIAO KJ, HE SW, ZHAO X, GUO HB, ZHAO DF, WEI HL. Dynamics of rice microbiomes reveal core vertically transmitted seed endophytes[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 216.
- [31] ZI XM, SHENG CL, GOODALE UM, SHAO SC, GAO JY. *In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae)[J]. *Mycorrhiza*, 2014, 24(7): 487-499.
- [32] 龚莺. 铁皮石斛拮抗内生菌的分离筛选及其应用基础研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2018.  
GONG Y. Isolation, screening and application potential of endophytes from *Dendrobium officinale*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2018 (in Chinese).
- [33] 刘思思, 陈娟, 郭顺星. 兰科植物种子萌发的研究进展[J]. *种子*, 2015, 34(6): 43-50.  
LIU SS, CHEN J, GUO SX. Review on germination of orchid seeds[J]. *Seed*, 2015, 34(6): 43-50 (in Chinese).
- [34] SHAO SC, BURGESS KS, CRUSE-SANDERS JM, LIU Q, FAN XL, HUANG H, GAO JY. Using *in situ* symbiotic seed germination to restore over-collected medicinal orchids in southwest China[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 888.
- [35] YAO N, WANG T, CAO XL. *Epidendrum radicans* fungal community during *ex situ* germination and isolation of germination-enhancing fungi[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1841.
- [36] ZHANG LY, ZHANG ML, HUANG SY, LI LJ, GAO Q, WANG Y, ZHANG SQ, HUANG SM, YUAN L, WEN YC, LIU KL, YU XC, LI DC, ZHANG L, XU XP, WEI HL, HE P, ZHOU W, PHILIPPOT L, AI C. A highly conserved core bacterial microbiota with nitrogen-fixation capacity inhabits the xylem sap in maize plants[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 3361.
- [37] FENG HC, FU RX, LUO JY, HOU XQ, GAO K, SU L, XU Y, MIAO YZ, LIU YP, XU ZH, ZHANG N, SHEN QR, XUN WB, ZHANG RF. Listening to plant's Esperanto *via* root exudates: reprogramming the functional expression of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *The New Phytologist*, 2023, 239(6): 2307-2319.
- [38] 郭丽芳, 杨瑞, 孙蔚旻. 尾矿固氮菌的分离筛选及其植物促生效应研究[J]. *生态环境学报*, 2022, 31(11): 2180-2188.  
GUO LF, YANG R, SUN WM. Nitrogen-fixing bacteria isolation from mine tailings and their plant growth promoting properties[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2022, 31(11): 2180-2188 (in Chinese).
- [39] FINKEL OM, SALAS-GONZÁLEZ I, CASTRILLO G, CONWAY JM, LAW TF, TEIXEIRA PJPL, WILSON ED, FITZPATRICK CR, JONES CD, DANGL JL. A single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome[J]. *Nature*, 2020, 587: 103-108.
- [40] 刘爽, 姚佳妮, 沈聪, 代金霞. 荒漠植物柠条根际土壤 *nifH* 基因荧光定量及固氮菌多样性分析[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(12): 252-262.  
LIU S, YAO JN, SHEN C, DAI JX. Fluorescent quantitative PCR of *nifH* gene and diversity analysis of nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere soil of *Caragana* spp. of desert grassland[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(12): 252-262 (in Chinese).
- [41] KLEPA MS, HELENE LCF, O HARA G, HUNGRIA M. *Bradyrhizobium cenepequi* sp. nov., *Bradyrhizobium semiaridum* sp. nov., *Bradyrhizobium hereditatis* sp. nov. and *Bradyrhizobium australafricanum* sp. nov., symbionts of different leguminous plants of western Australia and south Africa and definition of three novel symbiovars[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2022, 72(7): 10.1099/ijsem.0.005446.