2017-12-25 DOI: 10.3724/SP.J.1145.2017.01005 http://www.cibj.com/
应用与环境生物学报 Chin J Appl Environ Biol 2017, 23 (6): 1028-1034

短叶对齿藓可培养内生细菌的分离及其发酵产物对宿主植物的影响*

麻 扬 胡素静 王 潇 王丽红 赵东平**
内蒙古大学生命科学学院 呼和浩特 010021

摘 要 采用传统培养法分离内蒙古黄土丘陵区生物结皮的藓类植物优势种——短叶对齿藓(*Didymodon tectorum*)的内生细菌,并观察代表菌株的发酵产物对宿主植物孢子萌发及原丝体生长的影响. 共分离出68株内生细菌,基于16S rDNA序列同源性分析及构建的系统发育树显示,它们分属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)下的7个种,其中优势种为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*). 枯草芽孢杆菌菌株DT-1和蜡样芽孢杆菌菌株DT-9的石油醚相、乙酸乙酯相和正丁醇相萃取物在1 μg/mL、10 μg/mL及100 μg/mL三种浓度下对孢子萌发均无显著影响;石油醚相萃取物在3种浓度下不同程度地抑制原丝体生长;而乙酸乙酯相和正丁醇相萃取物则促进原丝体的生长. 本研究表明苔藓植物原丝体阶段的生长发育与内生细菌的次生代谢物密切相关,可为干旱、半干旱区藓类生物结皮人工促建提供参考资料和实验依据. (图5 表1 参43)

关键词 黄土丘陵区;藓类生物结皮;苔藓植物;对齿藓属;内生细菌;发酵产物
CLC Q949.350.8

Isolation of cultivable endophytic bacteria from *Didymodon tectorum* and effects of extracts from strain fermentation broths on host plant growth*

MA Yang, HU Sujing, WANG Xiao, WANG Lihong & ZHAO Dongping**
School of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

Abstract *Didymodon tectorum*, the dominant species in a community of biological soil crusts in the hilly Loess Plateau region, was selected for investigation. Using traditional culture-dependent methods, we isolated endophytic bacteria from *D. tectorum* and examined the effects of extracts from the fermentation broth of representative strains on host spore germination and protonema growth. Sixty-eight endophytic bacteria strains were classified into *Bacillus* using 16S rDNA sequence analysis, including *B. subtilis*, *B. simplex*, *B. cereus*, *B. niacini*, *B. aryabhattai*, *B. pumilus*, and *Bacillus* sp. The dominant species was *B. subtilis*. Host spore germination was not significantly affected by petroleum ether, ethyl acetate, and *n*-butyl alcohol extracts of *B. subtilis* DT-1 and *B. cereus* DT-9 at concentrations of 1 μg/mL, 10 μg/mL, and 100 μg/mL. Host protonema growth was inhibited to differing extents by petroleum ether extract and promoted to differing extents by ethyl acetate and *n*-butyl alcohol extracts at the three investigated concentrations. These results indicate that growth and development of bryophytes at the protonema stage are closely related to the secondary metabolites of endophytic bacteria. This study provides a valuable insight into the formation of artificial moss-dominated biotic crusts in arid and semi-arid regions.

Keywords hilly Loess Plateau region; moss-dominated biotic crust; bryophyte; *Didymodon*; endophytic bacteria; fermentation product

在生态脆弱的黄土丘陵区,退耕还林(草)实施后生物结皮广为发育,其盖度可达70%以上[1],在该地区生态系统的修复与重建中起着无法替代的作用. 藓类生物结皮作为生物结皮发育演替的最高阶段[2-3],在水土保持、养分积累、物质循环以及植被恢复与重建中起着关键性的作用,是维护生态系统稳定的重要生物种群[4-5]. 前人多对形成生物结皮的藓类植物优势种土生对齿藓(*Didymodon vinealis*)、短叶对齿藓(*D. tectorum*)、扭口藓(*Barbula unguiculata*)和银叶真藓(*Bryum argenteum*)的繁殖培养、生理响应机制以及人工培养对藓类生态适应性影响进行研究[6-8],尚未见关于其内部微生物对寄主植物生长影响的研究,明确其内生细菌发酵产物对宿主植物孢子萌发及原丝体生长的影响,才能更为有效地进行藓类生物结皮的人工促建,从而达到生物防沙、固沙、以及生态修复与重建的目的. 赵小丹通过分类学研究发现,之前文献报道的黄土丘陵区形成大面积藓类生物结皮

收稿日期 Received: 2017-01-08 接受日期 Accepted: 2017-03-29
*国家自然科学基金项目(31260046)和内蒙古自治区重大基础研究开放课题(201503001)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260046) and the Open Major Basic Research Projects of Inner Mongolia, China (201503001)
**通讯作者 Corresponding author (E-mail: topalizdp@aliyun.com)

的土生对齿藓实为短叶对齿藓[9], 短叶对齿藓隶属于丛藓科（Pottiaceae）对齿藓属（*Didymodon*）[10-11], 是内蒙古鄂尔多斯黄土丘陵区藓类生物结皮中的优势种之一[12], 也是黄土丘陵区防止水土流失的重要植物类群. 基于藓类生物结皮对干旱、半干旱地区在生态修复和环境保护方面的重要作用, 同时将分类学结果应用到生产实践中, 我们开展了短叶对齿藓可培养内生细菌的分离及其发酵产物对宿主植物影响的研究.

苔藓植物作为植物由水生向陆生过渡的一个重要类群, 其内生细菌可能在其适应陆生环境的过程中发挥了重要的作用[13]. 近年来, 关于植物内生细菌的研究多集中于种子植物, 对苔藓植物的相关研究报道较少. 已有的研究表明, 由于苔藓植物生长发育和结构的特殊性, 以其为宿主的微生物类群具有独特的物种多样性, 同时对宿主植物还有促生、抗菌、内生固氮等多方面的生物学作用. Opelt和Berg从3种采自不同营养贫瘠生境下的山墙藓（*Tortula ruralis*）、沼泽皱缩藓（*Aulacomnium palustre*）和红叶泥炭藓（*Sphagnum rubellum*）中分离到了多种具有拮抗作用的生防细菌, 分属于9个属, 其中, 伯克氏菌属（*Burkholderia*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）和沙雷氏菌属（*Serratia*）为优势属, 结果表明植物内生菌种的多样性和丰富度是由苔藓物种决定, 其中红叶泥炭藓中含有生防作用的内生菌种数最多, 并首次使用DGGE和SSCP两种方法就苔藓植物的内生细菌进行了研究[14]. 随后, Opelt继续对泥炭藓属（*Sphagnum*）中的*S. magellanicum*和*S. fallax*内生细菌种群结构与功能进行研究, 发现伯克氏菌属为泥炭藓植物内生细菌优势属, 且该属内微生物均呈现出抗菌活性和参与固氮作用的能力, 通过HPLC-PDA对其次生代谢物进行分析, 解释了抗菌活性物质的来源, 还明确了微生物群落中物种的特异性[15]. Shcherbakov等利用共焦激光扫描显微镜（CLSM）的原位杂交技术（FISH）对两种泥炭藓植物内生细菌进行检测, 在拮抗实验中发现分离到的283株菌株中30%具有抑制植物病原菌的活性, 还有部分菌株能够促进小麦和番茄植物的根系伸长[16]. MIRA对南极洲三洋藓（*Sanionia uncinata*）的绿色上部位和棕色下部位内生细菌分布进行比较, 发现*α*-变性菌纲（Alphaproteobacteria）在上下两个部位的含量分别为2%和22.2%, 存在显著差异, 这暗示着内生细菌在植物体内的分布与环境变化相关[17]. 2014年, Liu等第一次对旱生藓高山紫萼藓（*Grimmia montana*）的内生细菌群落进行描述, 报道了4门54个属, 其中变形菌门（Proteobacteria）为优势门, 除此之外, 还发现了多种对宿主有潜在促生功能的细菌菌种[18].

我们以短叶对齿藓为研究对象, 利用传统培养法分离其内生细菌, 并观察代表菌株的发酵产物对宿主植物孢子萌发及原丝体生长的影响, 以期发现新的菌类资源和丰富苔藓内生细菌研究, 为干旱、半干旱区藓类生物结皮人工促建提供参考资料和技术支持.

1 材料与方法

1.1 短叶对齿藓的采集

2015年4月于内蒙古自治区呼和浩特市清水河县喇嘛湾（N 39°51’ 43’’, E 111°25’ 20’’）采集短叶对齿藓新鲜植物体及其成熟、未开裂孢蒴, 置于无菌袋中, 4 ℃保存备用.

1.1 短叶对齿藓内生细菌的分离纯化

依据《中国藓类植物志》（第二卷）[19]中描述的形态解剖特征, 随机挑选新鲜的短叶对齿藓, 将其表面清洗干净, 无菌操作台内进行表面灭菌: 先用70%乙醇漂洗3 min, 再用2% NaClO溶液漂洗1 min, 无菌水冲洗3-4次, 无菌滤纸片吸干水分, 放入无菌研钵内研碎, 梯度浓度稀释, 涂布于牛肉膏蛋白胨培养基（NA）上（pH = 7）, 通过在不同温度（27-37 ℃）下对生物量的测定, 最终确定以35 ℃培养4 d. 将最后一次清洗的水涂布于NA培养基中设做空白对照. 根据细胞与菌落形态、颜色、大小分别挑取表型差异的细菌, 并在上述的培养基上划线纯化, 纯化后的内生细菌用含60%甘油的NA培养基于−80 ℃保存备用.

1.2 短叶对齿藓内生细菌的16SrDNA序列分析

采用细菌基因组DNA提取试剂盒（天根）提取细菌DNA, 细菌通用引物27F和1492R进行PCR扩增[20]. PCR扩增反应体系50 μL: EasyTaq PCR SuperMix 25 μL, Forward Primer 1 μL, Reverse Primer 1 μL, 模版DNA 1 μL, ddH_2O 23 μL. PCR反应条件: 预变性 94 ℃ 5 min; 变性 94 ℃ 30 s, 退火53 ℃30 s, 延伸 72 ℃ 1 min, 共30个循环; 加尾延伸 72 ℃ 10 min. PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 选取条带清晰的PCR扩增产物送往深圳华大基因科技服务有限公司测序.

根据所获序列利用BioEdit将68株菌株划分成7组, 再从每组随机选取一个代表菌株, 将其序列在GenBank上进行Blast比对, 下载相似性高的相关序列, 利用软件Mega 6.0进行Neighbor joining（NJ）[21]分析, 并构建系统进化树. 重复运算1 000次, 获得各分支的自展支持率, 以评判树的可信度.

1.3 短叶对齿藓内生细菌发酵液不同极性萃取物的粗提取

分别将DT-1和DT-9的菌液用划线法在NA培养基上活化培养1 d, 挑取单菌落接种于装有50 mL NA培养液的250 mL三角瓶, 35 ℃ 160 r/min振荡培养4 d, 逐步扩大培养共得到10 L菌液, 35 ℃ 160 r/min震荡发酵培养4 d. 去除菌体, 发酵液用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等体积萃取, 无水Na_2SO_4干燥后减压浓缩得到得石油醚相（PE）、乙酸乙酯相（EAC）和正丁醇相（NBA）萃取物.

1.4 不同极性提取物对短叶对齿藓孢子萌发和原丝体生长的影响

挑选成熟孢蒴, 按下列条件进行表面消毒: 1% NaClO溶液漂洗75 s; 70%乙醇漂洗60 s [9], 破碎孢蒴后加入无菌水配置孢子悬浮液, 取200 μL孢子悬浮液加入20 mL Knop培养液中保存备用. 分别将DT-1和DT-9不同极性的萃取物用DMSO溶解, 并加入Knop培养液制成一定浓度的母液, 微孔滤膜（0.22 μm）过滤后以1 μg/mL、10 μg/mL、100 μg/mL三种不同浓度加入宿主短叶对齿藓孢子萌发生长的培养液, 以未加入萃取物的宿主孢子的培养液为对照. 分别吸取3 mL培养液中的底部沉淀滴于载玻片上, 利用LEICA显微成像系统测量记录各参数. 培养第4天, 孢子大量萌发, 许多已经完成第一次分裂, 还有少数已长出有4-5个细胞组成的原丝体, 此时统计

孢子的萌发率，统计时在每一瓶里随机抽取3个视野（10倍物镜下），计数30个孢子. 培养第14天，原丝体可以在显微镜下观察并测量长度，任意选取由一个孢子萌发形成的最长的一根原丝体测量其长度，每一培养瓶选取15个孢子萌发形成的原丝体进行测量.

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离与鉴定

共获得短叶对齿藓内生细菌68株，编号为DT-1 - DT-68. 根据其测序得到16S rDNA序列，在GenBank数据库中进行BLAST比对，发现一致性均大于99%，可确定菌株的分类学地位（表1），并利用MEGA 6.0软件的Neighbor-joining方法构建系统发育树（图1）. 结果显示：短叶对齿藓内生细菌属于芽孢杆菌属（*Bacillus*）的7个种，DT-1与*Bacillus subtilis*位于同一分支，其自展支持率为100，被鉴定为枯草芽孢杆菌；DY-9与*B. cereus* 被分到同一支，自展支持率为100，被鉴定为蜡样芽孢杆菌；DT-17与*B. niacini* 位于同一分支，自展支持率为86，被鉴定为烟酸芽孢杆菌；DT-18与*B. simplex*位于同一支，自展支持率为100，为简单芽孢杆菌；DT-22与*B. idriensis* 位于同一支，自展支持率为100，被鉴定为病研所芽胞杆菌；DT-23与*B. aryabhattai*位于同一分支，自展支持率为100，被鉴定为阿氏芽孢杆菌；DT-37与*B. pumilus*位于同一支，自展支持率为100，被鉴定为短小芽孢杆菌. 其中，优势种为枯草芽孢杆菌，其菌株数占短叶对齿藓总菌株数的67.6%（表1）.

2.2 代表菌株发酵液不同极性提取物对宿主植物的影响

2.2.1 枯草芽孢杆菌菌株DT-1发酵液不同极性提取物对宿主孢子萌发及原丝体生长的影响　枯草芽孢杆菌菌株DT-1的石油醚相、乙酸乙酯相和正丁醇相萃取物质量分别为0.76 g、0.84 g和3.71 g. 第4天观察不同处理组的孢子萌发情况，结果见图2. 3种提取物在本实验设置的3种浓度范围下对宿主孢子萌发并未造成显著影响，不同条件下孢子萌发率均在65%左右. 说明内生细菌DT-1菌株代谢物对宿主孢子萌发过程影响不大.

在第14天观察记录原丝体长度，结果见图3，石油醚相提取物（PE）在1 μg/mL浓度下处理后的原丝体长度与对照组相比极显著下降（$P < 0.01$），在10 μg/mL和100 μg/mL浓度下与对照相比呈显著下降（$P < 0.05$）. 说明PE在3个浓度上对宿主原丝体的伸长均起到抑制作用. 乙酸乙酯相提取物（EAC）

表1 短叶对齿藓内生细菌代表菌株与相关菌株16 SrDNA序列一致度

Table 1 The sequences identify of the representative endophytic bacteria strains from *Didymodon tectorum* with their related strains

代表菌株 Representative strain	相似序列 Closest database match	一致性 Identify (*r*/%)	菌株数 No. of strains	占总菌株数比例 Percentage (*P*/%)
DT-1	*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610^T (ABQL01000001)	99	46	67.6
DT-9	*Bacillus cereus* ATCC 14579^T (AE016877)	99	5	7.4
DT-17	*Bacillus niacini* IFO 15566^T (AB021194)	99	1	1.5
DT-18	*Bacillus simplex* NBRC 15720^T (BCVO01000086)	99	7	10.3
DT-22	*Bacillus idriensis* SMC 4352-2^T (AY904033)	99	4	5.9
DT-23	*Bacillus aryabhattai* B8W22^T (EF114313)	100	3	4.4
DT-37	*Bacillus pumilus* ATCC 7061^T (ABRX01000007)	99	2	2.9

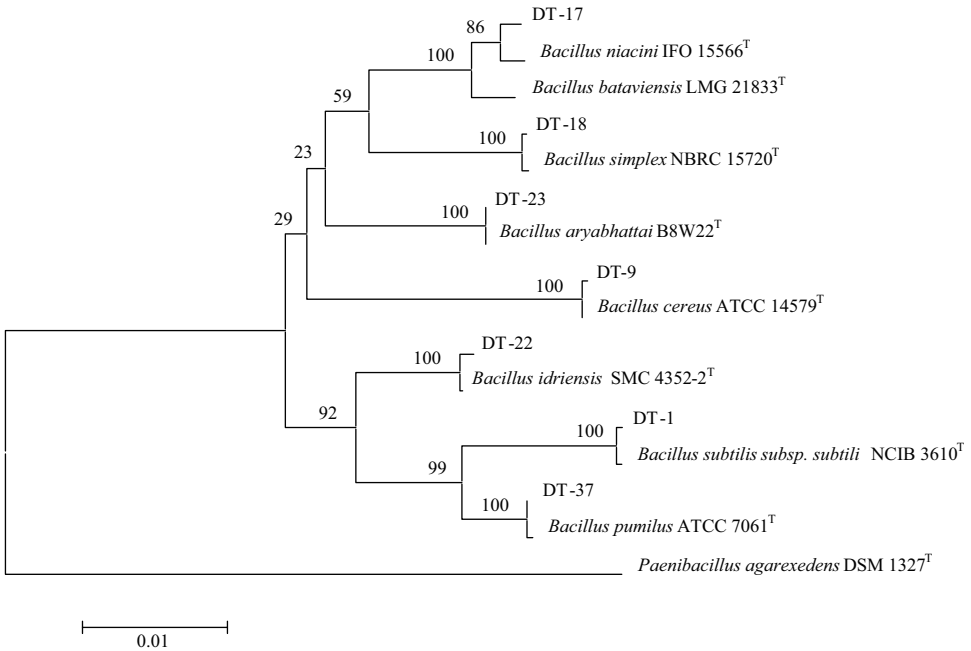


图1 基于16S rDNA 序列构建的短叶对齿藓可培养内生细菌的系统进化树.

Fig. 1 Phylogenetic tree of the cultivable endophytic bacteria from *Didymodon tectorum* based on 16S rDNA sequences.

在1 μg/mL浓度下原丝体长度极显著升高（$P < 0.01$），是对照组的1.99倍，有明显促进作用；而在10 μg/mL和100 μg/mL浓度下没有显著性影响. 正丁醇相提取物（NBA）在1 μg/mL、10 μg/mL浓度下原丝体长度显著性升高（$P < 0.05$），对宿主原丝体伸长有促进作用，在100 μg/mL高浓度下显著性下降（$P < 0.05$），抑制原丝体生长.

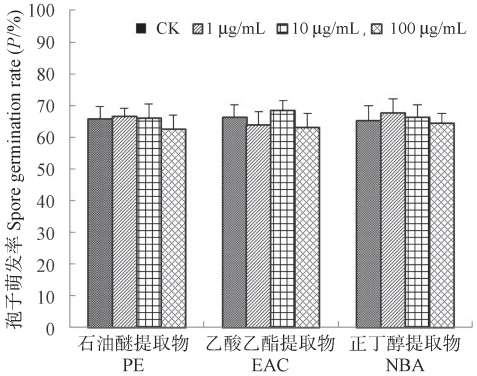


图2 DT-1不同萃取物对宿主孢子萌发的影响. CK：对照；PE：石油醚提取物；EAC：乙酸乙酯提取物；NBA：正丁醇提取物.

Fig. 2 Effect of different extractant of DT-1 on host spore germination. CK: Control; PE: Petroleum ether extracts; EAC: Ethyl acetate extracts; NBA: *n*-butyl alcohol extracts.

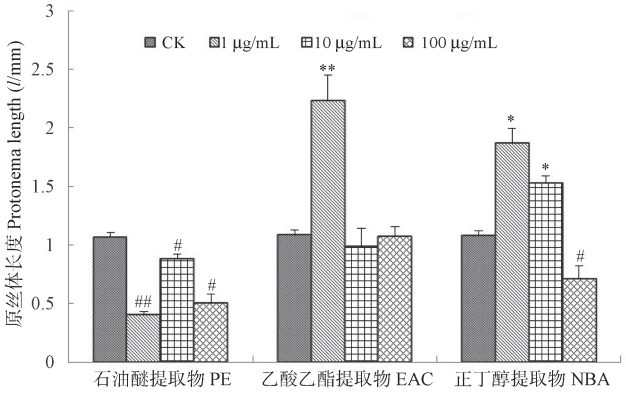


图3 DT-1不同萃取物对宿主原丝体长度的影响. CK：对照；PE：石油醚提取物；EAC：乙酸乙酯提取物；NBA：正丁醇提取物. # $P < 0.05$和## $P < 0.01$ vs CK代表下降；* $P < 0.05$和** $P < 0.01$ vs CK代表上升.

Fig. 3 Effect of different extractant of DT-1 on host protonema length. CK: Control; PE: Petroleum ether extracts; EAC: Ethyl acetate extracts; NBA: *n*-butyl alcohol extracts. # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ vs CK represent declining; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs CK represent rising.

2.2.2 蜡样芽孢杆菌菌株DT-9发酵液不同极性提取物对宿主孢子萌发及原丝体生长的影响

蜡样芽孢杆菌菌株DT-9的石油醚相、乙酸乙酯相和正丁醇相萃取物质量分别为1.78 g、0.27 g和4.04 g. 第4天观察不同处理组的孢子萌发情况，结果见图4. 蜡样芽孢杆菌菌株DT-9不同极性萃取液粗提物处理下的孢子萌发率与对照组无显著性差异，均在65%左右. 说明内生细菌DT-9菌株代谢物对宿主孢子萌发过程影响不大.

在第14天观察记录原丝体长度，结果见图5，石油醚相提取物（PE）在3种浓度上均显著（$P < 0.05$）抑制原丝体的伸长，抑制效果由强到弱依次为1 μg/mL、10 μg/mL、100 μg/mL，100 μg/mL的处理组抑制效果极其显著（$P < 0.001$），说明在*B. cereus* DT-9的菌液发酵物中，石油醚萃取出了抑制宿主原丝体伸长的物质. 乙酸乙酯粗提物在3个浓度梯度上均对原丝体生长起到显著促进作用，100 μg/mL差异极显著（$P < 0.01$），1 μg/mL、10 μg/mL、100 μg/mL浓度下原丝体长度分别是对照组的1.38、1.56和1.68倍. 正丁醇的3个浓度处理组中原丝体长度均显著性上升（$P < 0.05$），分别是对照组的1.19、1.28、1.22倍，说明正丁醇粗提物也可以促进原丝体的伸长，只是促生效果小于乙酸乙酯组提取物.

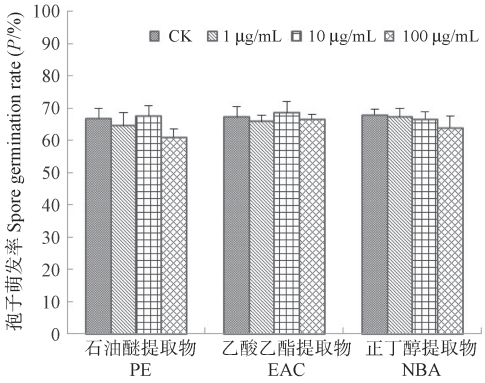


图4 DT-9不同萃取物对宿主孢子萌发的影响. CK：对照；PE：石油醚提取物；EAC：乙酸乙酯提取物；NBA：正丁醇提取物.

Fig. 4 Effect of different extractant of DT-9 on host spores germination. CK: Control; PE: Petroleum ether extracts; EAC: Ethyl acetate extracts; NBA: *n*-butyl alcohol extracts.

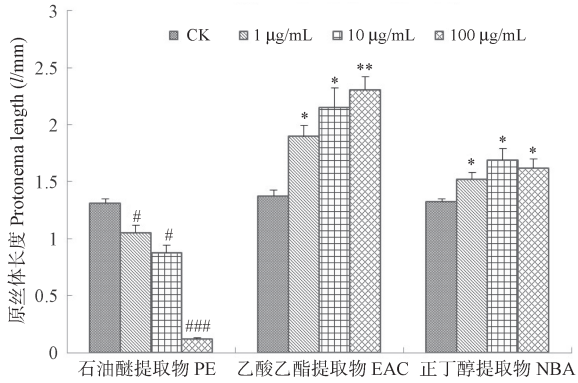


图5 DT-9不同萃取物对宿主原丝体长度的影响. CK：对照；PE：石油醚提取物；EAC：乙酸乙酯提取物；NBA：正丁醇提取物. # $P < 0.05$和## $P < 0.01$ vs CK代表下降；* $P < 0.05$和** $P < 0.01$ vs CK代表上升.

Fig. 5 Effect of different extractant of DT-9 on host protonema length. CK: Control; PE: Petroleum ether extracts; EAC: Ethyl acetate extracts; NBA: *n*-butyl alcohol extracts. # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ vs CK represent declining; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs CK represent rising.

3 讨论

3.1 内生细菌的分离与鉴定

短叶对齿藓分离得到的可培养内生细菌的研究结果显示68株内生细菌均属于芽孢杆菌属，分别为枯草芽孢杆菌、简单芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、阿氏芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和烟酸芽孢杆菌和病研所芽胞杆菌，其中，枯草芽孢杆菌为优势种. 造成这一结果的原因可能是本实验的材料采集于

黄土丘陵区，该地区的年降雨量为364.4 mm，而年蒸发量为1 699.3 mm，为降水量的4.7倍，干旱年份可达14倍[22]，而芽孢杆菌属的芽孢具有较强的抵抗外界环境压力的能力，能够抵抗所生存的环境中由于干燥、热和紫外线辐射所造成的伤害，维持自身能力不受影响，从而在缺水、营养贫瘠等极端环境下生存[23]. Liu在旱生藓类高山紫萼藓中同样筛选到芽孢杆菌[13]. Opelt的研究表明，利用多种培养基或者改变培养条件，如改变培养基pH或温度，会得到更多的内生细菌种类[9-10]. 本研究只采用了一种培养基在单一条件下进行培养，这可能也是造成属组成单一的原因之一.

传统培养法可分离得到的微生物种类仅占环境微生物的0.1%-1% [24]，近年来，植物内生细菌多样性和功能等方面的研究开始倾向使用变性梯度凝胶电泳（DGGE）、磷酸脂肪酸（PLFA）图谱、荧光原位杂交技术（FISH）和宏基因组分析等非培养法. 尽管如此，要比较全面、准确地了解植物中内生细菌多样性，最好采取分离培养和非培养的研究方法相结合. 传统的分离培养方法在以探索内生细菌与宿主之间的相互作用、寻找潜在的生产应用菌株为目的的研究中是不可缺少的.

3.2 内生细菌发酵液不同极性提取物对寄主的影响

枯草芽孢杆菌为本实验的优势种，并且其作为一种生防细菌其诱导植物抗性和促进植物生长的作用被广泛报道[25]，而蜡样芽孢杆菌也被多次报道过有促生、抗菌和抗逆作用[26]. 冻存的菌株活化后，发现DT-1和DT-9分别为枯草芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌中最先形成菌落，且生长速度较快，培养物生长量较多的菌株. 因此，本研究选取枯草芽孢杆菌菌株DT-1和蜡样芽孢杆菌菌株DT-9为代表菌株进行后续实验，探究它们的次生代谢物对宿主植物的影响，对于揭示微生物与宿主相互作用的机理会有一定帮助.

黄士良等发现3种植物生长调节剂苯基噻二唑基脲（TDZ）、6-苄基腺嘌呤（6-BA）、萘乙酸（NAA）对密叶绢藓的孢子萌发的影响不显著[27]，刘丽等发现萘乙酸对葫芦藓的孢子萌发也无显著影响[28]. 本研究分别利用石油醚相、乙酸乙酯相和正丁醇相提取物的3种不同浓度溶液加入宿主植物短叶对齿藓孢子萌发的培养液中，发现每组处理中孢子萌发率与对照组比较无显著性差异. 结合前人研究结果，我们可以推断在环境因子一致的条件下，藓类植物孢子萌发主要依靠自身储存的营养物质，外界生长物质对其影响不显著，可能没有利用内生细菌的次生代谢产物.

对原丝体生长影响的结果表明，两个菌株发酵产物的石油醚相提取物具有不同程度的抑制作用. 刘先宝等在香蕉内生细菌发酵液的石油醚提取物中鉴定出18个成分，主要成分为油酸、油酸乙酯、亚麻油酸乙酯、亚油酸、棕榈酸、棕榈酸乙酯等物质[29]. 张亮等从珙桐内生真菌*Lopfiostoma* sp. 石油醚提取物中分离出不同长链及不同饱和度的脂肪酸[30]. 王佩佩等在药用拟层孔菌石油醚提取物的化学成分分析中发现脂肪族化合物中大部分种类[31]. 有相关文献报道，这些有机酸、脂肪酸及其酯类衍生物对细菌、真菌、种子和幼苗等具有抑制生长的作用[32-34]. 因此，我们推断本实验石油醚提取相中可能是这类化合物抑制了宿主植物原丝体的生长. 另一方面，乙酸乙酯相和正丁醇相粗提物在不同程度上促进了原丝体的生长. 文先发现内生真菌*Epichloe bromicola*发酵物的乙酸乙酯萃取相可以促进拟南芥幼苗的生长，通过UPLC-HRMS法对乙酸乙酯相提取物中检测到了生长素吲哚乙酸、吲哚甲醛和吲哚乙醇等物质[35]. 有报道显示，在植物细胞分裂素的分离过程中发现，其主要分配在正丁醇相，少数分配在乙酸乙酯相和乙醚相中[36]. 于飞通过液相色谱分析表明，碱蓬内生真菌JP4-1菌株发酵液的正丁醇萃取成分中含有赤霉素、生长素、脱落酸等促进植物生长的激素[37]. 内生细菌产生的吲哚乙酸、吲哚乙腈、赤霉素、细胞激动素等能够直接促进植物生长[38]，相关研究表明，芽孢杆菌属不仅普遍含有赤霉素、吲哚乙酸等，而且分泌吲哚乙酸的能力强，同时可以诱导植物体内促进生长的激素含量提高，并且可以降低脱落酸、乙烯等抑制植物生长激素的形成，还可以分泌亚精胺来诱导植物扩张蛋白相关基因上调表达来促进植物的生长[39-43]. 因此，本研究中两种菌的乙酸乙酯、正丁醇相提取物可能含有生长素、细胞分裂素、赤霉素等植物激素，从而促进了宿主原丝体生长. 综上可知，芽孢杆菌属的次生代谢物与宿主短叶对齿藓原丝体的生长密切相关. 两种菌株不同的萃取组分对原丝体的影响不同，即某一种内生细菌的次级代谢物中即含有抑制物也含有促进生长的物质，二者同时存在时究竟是以促生为主还是以抑制为主，还有待进一步研究.

种子植物内生细菌的促生实验多采用浸种法，我们在预实验中参考此法将内生细菌菌液侵染短叶对齿藓的孢子，然而孢子直径仅为11-12 μm，菌体大量繁殖以致孢子不能正常生长，原丝体不能正常形成，无法在显微镜下准确测量其生长变化. 本研究只对菌株DT-1和DT-9对短叶对齿藓孢子萌发及原丝体生长的影响进行了初步探索，可为从短叶对齿藓内生细菌资源中寻找具有促生潜力的菌株提供一定的理论依据，其内生细菌次生代谢产物的活性成分和相关促生作用机制还有待进一步研究.

参考文献 [References]

1 赵允格, 许明祥, 王全九, 邵明安. 黄土丘陵区退耕地生物结皮理化性状初报[J]. 应用生态学报, 2006, **17** (8): 1429-1434 [Zhao XG, Xu MX, Wang QJ, Shao MA. Physical and chemical properties of soil bio-crust on rehabilitated grassland in hilly Loess Plateau of China [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2006, **17** (8): 1429-1434]

2 Eldridge DJ, Greene R. Microbiotic soil crusts - a review of their roles in soil and ecological processes in the rangelands of Australia [J]. *Soil Res*, 1994, **32** (3): 389-415

3 Blahuta J, Soukup T, Čermák P. Biological soil crusts as an integral component of desert environments [J]. *Ecol Processes*, 2013, **2** (1): 1-2.

4 张元明, 曹同, 潘伯荣. 干旱与半干旱地区苔藓植物生态学研究综述[J]. 生态学报, 2002, **22** (7): 1129-1134 [Zhang YM, Cao T, Pang BR. A review on the studies of bryophye ecology in arid and semi-arid [J] *Acta Ecol Sin*, 2002, **22** (7): 1129-1134]

5 Belnap J. The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles [J]. *Hydrol Process*, 2006, **20** (15): 3159-3178

6 陈彦芹, 赵允格, 冉茂勇. 4种营养物质对藓结皮形成发育的影响[J]. 西北农林科技大学学报自然科学版, 2011 (5): 44-50 [Chen YQ, Zhao YG, Ran MY. Influnce of 4 nutrients on the development of moss crust [J]. *J NW A&F Univ (Nat Sci Ed)*, 2011 (5): 44-50]

7 白学良, 王瑶, 徐杰, 李新荣, 张景光. 沙坡头地区固定沙丘结皮层藓类植物的繁殖和生长特性研究[J]. 中国沙漠, 2003, **23** (2): 171-173 [Bai XL, Wang Y, Xu J, Li XR, Zhang JG. Study on reproduction and growth characteristics of mosses in the crust layer of fixed dune in Shapotou Area [J]. *J Desert Res*, 2003, **23** (2): 171-173]

8 杨雪伟. 黄土丘陵半干旱区优势耐干藓生态适应性[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016 [Yang XW. Ecological adaptation of dominant desiccation-tolerant mosses in semi-arid hilly loess plateau region [D]. Yanglin: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2016]

9 赵小丹. 短叶对齿藓组织培养及其复合群的分类学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2015 [Zhao XD. A morphometric and molecular study in *Didymodon tectorum* complex and the tisscu cultivation of *Didymodon tectorum* [D]. Huhhot: Inner Mongolia University, 2015]

10 胡人亮. 苔藓植物学[M]. 上海: 高等教育出版社, 1987: 1-465 [Hu RL. Bryological Bontany [M]. Shanghai: Higher Education Press, 1987: 1-465]

11 吴鹏程. 苔藓植物生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 1-357 [Wu CP. Bryological Biology [M]. Beijing: Sciense Press, 1998: 1-357]

12 杨雪伟, 赵允格, 许明祥. 黄土丘陵区藓结皮优势种形态结构差异[J]. 生态学杂志, 2016, **35** (2): 370-377 [Yang XW, Zhao YG, Xu MX. Variation of morphological structure of dominant species in moss crusts in hilly Loess Plateau region [J]. *Chin J Ecol*, 2016, **35** (2): 370-377]

13 周雯娜, 吴远双, 初龙, 李伟, 李海燕. 云南大围山四种苔藓植物内生真菌多样性[J]. 微生物学报, 2015, **55** (6): 764-771 [Zhou WN, Wu SY, Chu Long, Li W, Li HY. Endophytic fungal diversity of four bryophyte species in Dawei Mountain, Southwest of China [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2015, **55** (6): 764-771]

14 Opelt K, Berg G. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrientpo- or habitats of the Baltic Sea Coast [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** (11): 6569-6579

15 Opelt K, Chobot V, Hadacek F, Schönmann S, Eberl L, Berg G. Investigations of the structure and function of bacterial communities associated with *Sphagnum* mosses [J]. *Environ Microbiol*, 2007, **9** (11): 2795-2809

16 Shcherbakov AV, Bragina AV, Kuzmina EY, Berg C, Muntyan AN, Makarova NM, Malfanova NV, Cardinale M, Berg G, Chebotar VK, Tikhonovich IA. Endophytic bacteria of *Sphagnum* mosses as promising objects of agricultural microbiology [J]. *Microbiology*, 2013, **82** (3): 306-315

17 Park M, Lee H, Hong SG, Kim OS. Endophytic bacterial diversity of an Antarctic moss, *Sanionia uncinata* [J]. *Antarctic Sci*, 2013, **25** (1): 1-4

18 Liu XL, Liu SL, Liu M, Kong BH, Liu L, Li YH. A primary assessment of the endophytic bacterial community in a xerophilous moss (*Grimmia montana*) using molecular method and cultivated isolates [J]. *Brazilian J Microbiol*, 2014, **45** (1): 163-173

19 Li XJ, Crosby MR, He S. Moss Flora of China (Vol. 2.) [M]. Beijing, New York: Science Press & Saint Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2001: 114-249

20 Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *J Bacteriol*, 1991, **173** (2): 697-703

21 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, **4** (6): 406-425

22 孙浩峰, 陈天林. 半干旱黄土丘陵区水平阶整地规格与降雨量的关系[J]. 水土保持通报, 2013 (6): 28-31 [Sun HF, Chen TL. Relationship between specification of level-terrace preparation and rainfall in semiarid loess hill region [J]. *Bull Soil Water Conserv*, 2013 (6): 28-31]

23 Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, **64** (3): 548-572

24 Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol Rev*, 1995, **59** (1): 143-169

25 张彦杰, 罗俊彩, 武燕萍, 杨合同. 生防枯草芽孢杆菌研究进展[J]. 生命科学仪器, 2009, **7** (4): 19-23 [Zhang YJ, Luo JC, Wu YP, Yang HT. Research advancement of the biological control bacteria *B. subtilies* [J]. *Life Sci Instrum,* 2009, **7** (4): 19-23]

26 王东明. 蜡样芽胞杆菌6371的多效性及发酵条件的研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2004 [Wang DM. Biological funetion and fermentation coniditons study in *Bacillus cereus* 6371 [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2004]

27 黄士良, 李敏, 张秀萍, 赵建成, 王振杰. 三种植物生长调节剂对密叶绢藓 (*Entodon challengeri*)孢子萌发、原丝体发育及芽体发生的影响[J]. 植物科学学报, 2007, **25** (1): 65-69 [Huang SL, Li M, Zhang XP, Zhao JC, Wang ZJ. Effect of three growth regulators on spore germination, protonema development and bud differentiation in *Entodon challengeri* [J]. *J Wuhan Bot Res*, 2007, **25** (1): 65-69]

28 刘丽, 胡光珍, 王幼芳, 方芳. 萘乙酸(NAA)对葫芦藓(*Funaria hygrometrica*)孢子萌发及原丝体生长的影响[J]. 华东师范大学学报自然科学版, 2004, **12** (4): 138-141 [Liu L, Hu GZ, Wang YF, Fang F. Effect of NAA on Spore germination and protonema development in *Funaria hygrometrica* [J]. *J Eastchina Norm Univ (Nat Sci)*, 2004, **12** (4): 138-141]

29 刘先宝, 蔡吉苗, 陈奕鹏, 李超萍, 黄贵修. 一株香蕉内生细菌挥发油成分及抑菌活性研究[J]. 热带农业科学, 2015, **35** (12): 84-88 [Liu XB, Cai JM, Chen YP, Li CP, Huang HX. Volatile oil constituents and antimicrobial activity of endophytic bacteria isolated from banana [J]. *Chin J Trop Agric*, 2015, **35** (12): 84-88]

30 张亮, 刘艳辉, 罗薇, 郭志勇, 邓张双, 邹坤. 珙桐内生真菌 *Lophiostoma* sp. (X1-2)石油醚部位化学成分研究[J]. 三峡大学学报(自然科学版), 2012, **34** (1): 92-94 [Zhang L, Liu YH, Luo W, Guo ZY, Deng ZS, Zou K. Chemical constituents of petroleum ether part of endophytic fungus *Lopfiostoma* sp. (X1-2) from *Davidia involucrata* Baill [J]. *J China Three Gorges Univ (Nat Sci)*, 2012, **34** (1): 92-94]

31 王佩佩, 许培源, 王哲, 孙勇, 王力, 蒋继宏. 药用拟层孔菌石油醚提取物的GC-MS分析及各相提取物生物活性[J]. 菌物学报, 2015, **34** (3): 482-489 [Wang PP, Xu PY, Wang Z, Sun Y, Wang L, Jiang JH. Analysis of petroleum ether extracts from *Fomitopsis officinalis* by GC-MS and bioactivity investigation on different extracts [J]. *Mycosystema*, 2015, **34** (3): 482-489]

32 张志忠, 孙志浩, 陈文辉, 林文雄. 有机酸类化感物质对甜瓜的化感效应[J]. 生态学报, 2013, **33** (15): 4591-4598 [Zhang ZZ, Sun ZH, Chen WH, Lin WX. Allelopathic effects of organic acid allelochemicals on melon [J]. *Acta Ecol Sin*, 2013, **33** (15): 4591-4598]

33 王树起, 韩丽梅, 杨振明. 不同有机酸对大豆生长的化感效应[J]. 大豆科学, 2002 (4): 267-273 [Wang SQ, Han LM, Yang ZM. Allelopathy on different organic acids to sotbean growth [J]. *Soybean Sci*, 2002 (4): 267-273]

34 刘苹, 赵海军, 仲子文, 孙明, 庞亚群, 马征, 万书波. 三种根系分泌脂肪酸对花生生长和土壤酶活性的影响[J]. 生态学报, 2013, **11**: 3332-3339 [Liu P, Zhao HJ, Zhong ZW, Sun M, Pang YQ, Ma Z, Wang SB. The effects of three root exudated fatty acids on peanut (*Arachis hypogaea* L.) growth and soil enzymes activities [J]. *Acta Ecol Sin*, 2013, **11**: 3332-3339]

35 文先. 内生真菌*Epichloe bromicola*菌种分离鉴定及其发酵物对拟南芥幼苗生长的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2015 [Wen X. Isolation and identification of *Epichloe bromicola* and the effects of extracts of its fermentation broth on the gorwth of *Arabidopsis thaliana* seedlings [D]. Huhhot: Inner Mongolia University, 2015]

36 谈锋. 高效液相色谱法在植物细胞分裂素的分离和测定中的应用[J]. 色谱, 1988 (1): 27-30 [Tan F. Application of high performance liquid chromatography in the separation and determination of cytokinin [J]. *Chin J Chromatogr*, 1988 (1): 27-30]

37 于飞. 碱蓬内生真菌JP4-1的筛选、鉴定及促生活性研究[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2016 [Yu F. Study of screening, identification and growth-promotion activity of endophyte fungi JP4-1 of Suaeda salsa Abstract [D]. Shenyan: Shenyang Normal University, 2016]

38 黄晓东, 季尚宁, Bernard Glick, Bruce Greenberg, 卢林纲. 植物促生菌及其促生机理[J]. 现代化农业, 2002 (7): 13-15 [Huang XD, Jie SN, Bernard Glick, Bruce Greenberg, Lu LG. Plant growth promoting bacteria and its promoting mechanism [J]. *Modern Agric*, 2002 (7): 13-15]

39 Tang WH. Advances in Biological Control of Plant Diseases: Proceeding of the International Workshop on Biological Control of Plant Diseases [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1996

40 易龙, 张亚, 廖晓兰, 苏品, 仇佳伟. 蜡状芽孢杆菌次生代谢产物的研究进展[J]. 农药, 2013, **52** (3): 162- 164 [Yi L, Zhang Y, Liao XL, Su P, Chou JW. Advances in secondary metabolite produced by *Bacillus cereus* [J]. *Agrochemicals*, 2013, **52** (3): 162- 164]

41 ElDeeb B, Bazaid S, Gherbawy Y, Elhariry H. Characterization of endophytic bacteria associated with rose plant (*Rosa damascena* trigintipeta) during flowering stage and their plant growth promoting traits [J]. *J Plant Interact*, 2012, **7** (3): 248-253

42 蔡学清, 何红, 胡方平. 内生菌BS-2对辣椒苗的促生作用及对内源激素的影响[J]. 亚热带农业研究, 2005 (4): 51-54 [Cai XQ, He H, Hu FP. The effects of endophytic BS-2 (*Bacillus subtilis*) on grow th and interna phytohormone of capsicum [J]. *Sugarcane*, 2005 (4): 51-54]

43 Xie SS, Wu HJ, Zang HY, Wu LM, Zhu QQ, Gao XW. Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105 [J]. *Mol Plant-microbe Interact*, 2014, **27** (7): 655-663