

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202107009



# 金线莲分泌 IAA 内生真菌的筛选与 鉴定及其发酵条件优化

陈科霖<sup>1</sup>, 王明元<sup>1</sup>, 尤长胜<sup>2</sup>, 刘建福<sup>1</sup>,  
林萍<sup>1</sup>, 李雨晴<sup>1</sup>, 陈文亮<sup>1</sup>

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 泉州市金胜生态农业有限公司, 福建 泉州 362000)

**摘要:** 从福建金线莲品种‘红霞’的根、茎、叶中分离内生真菌,分析优良菌株产吲哚乙酸(IAA)的特性.采用组织培养、平板划线法和 Salkowski 比色法,筛选能够产 IAA 的金线莲内生真菌,通过形态特征及内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列等方法进行菌种鉴定,并利用正交试验确定菌种产 IAA 最优条件.结果表明:从‘红霞’金线莲茎中筛选分离的内生真菌 PJ3 产 IAA 能力最强,产量高达  $106.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;经鉴定, PJ3 为角担菌属(*Ceratobasidium*)真菌. PJ3 最佳发酵培养基配方和培养条件分别为:  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸镁,  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸氢二钾,  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾,  $10.0 \text{ g}$  葡萄糖,  $15.0 \text{ g}$  酵母浸粉, 培养时间为 132 h, 培养温度为  $28^\circ\text{C}$ , 初始 pH 值为 5, 摇床转速  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 装液量(体积分数)为 28%.

**关键词:** 金线莲; 内生真菌; 吲哚乙酸; 培养优化

中图分类号: S 718.81; S 567.239

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2022)03-0348-07

## Screening and Identification of Endophytic Fungi Secreting IAA in *Anoectochilus roxburghii* and Optimization of Fermentation Conditions

CHEN Kelin<sup>1</sup>, WANG Mingyuan<sup>1</sup>, YOU Changsheng<sup>2</sup>,  
LIU Jianfu<sup>1</sup>, LIN Ping<sup>1</sup>, LI Yuqing<sup>1</sup>, CHEN Wenliang<sup>1</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Quanzhou Jinsheng Ecological Agriculture Company Limited, Quanzhou 362000, China)

**Abstract:** This study aims to analyze the characteristics of indole acetic acid (IAA) secretion in excellent strains of ‘Hongxia’ *Anoectochilus roxburghii* by isolating the endophytic fungi from the roots, stems and leaves, thus exploring the resources of excellent growth promoting strains. Endophytic fungi of ‘Hongxia’ *Anoectochilus roxburghii* that could secrete IAA were screened out by culturing, streak plate method and Salkowski colorimetric method, and then identified by observing morphological characteristics and internal transcribed spacer (ITS) sequencing. Finally, the optimal conditions of IAA secretion were determined by the orthogonal test. The results show that the endophytic fungus PJ3 isolated from the stems of ‘Hongxia’ *Anoectochilus roxburghii* presented the strongest ability to secrete IAA, and the secretion amount was up to

收稿日期: 2021-07-07

通信作者: 王明元(1980-),男,副教授,博士,主要从事香蕉资源挖掘、枯萎病生防、抗病提质微生物肥料研发等的研究. E-mail: mywang@hqu.edu.cn.

基金项目: 华侨大学高层次人才科研基金资助项目(605-50Y17068);福建省泉州市科技计划资助项目(2019N029)

106.78  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . PJ3 was identified as the *Ceratobasidium* fungus. The optimal fermentation medium formula and culture conditions of PJ3 were as follows; magnesium sulfate is 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , dipotassium hydrogen phosphate is 1.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , potassium dihydrogen phosphate is 1.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , glucose is 10.0 g, yeast extract powder is 15.0 g, culture time is 132 h, culture temperature is 28  $^{\circ}\text{C}$ , initial pH value is 5, rotation speed is 180  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , and the liquid volume (volume fraction) is 28%.

**Keywords:** *Anoectochilus roxburghii*; endophytic fungi; indole acetic acid; culture optimization

金线莲(*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl)为兰科开唇兰属的一种多年生草本植物,具有清热凉血、除湿解毒的功效,以全草入药<sup>[1]</sup>. 金线莲含有多种生物活性化合物,如金线莲苷、多糖、黄酮和糖苷,常用于治疗肝病、糖尿病、高血脂和类风湿性关节炎<sup>[2-3]</sup>. 国内金线莲已被开发成各种不同剂型的产品,同时在临床上用于治疗手足口病和慢性肝炎<sup>[4]</sup>. 金线莲因其独特的药用和食用特性,市场需求逐年增加,但过度消费导致野生金线莲资源急剧减少. 金线莲作为一种遮荫植物,对其小气候环境有着严格的要求. 自然环境下,金线莲繁殖能力低,生存竞争力差<sup>[5-6]</sup>;而化学肥料的长期使用,会严重影响金线莲的可食性和安全性.

植物内生真菌具有改善和促进植物生长的能力<sup>[5, 7-9]</sup>,是成功定居在维管植物组织中的微生物,据报道几乎在所有植物中都有分离<sup>[10]</sup>. Berg 等<sup>[11]</sup>发现内生菌直接影响一些植物的功能性状,如叶片营养水平、叶片寿命、比叶面积和地上部与根的比例. Cipriano 等<sup>[12]</sup>在甘蔗上发现的促生菌具有固氮,促进植物激素产生的功能. 李福艳等<sup>[13]</sup>筛选的 3 株真菌通过产生吲哚-3-乙酸(IAA)直接促进玉米幼苗生长. 真菌分泌的 IAA 与内源植物的 IAA 协同反应,继而刺激植物生长.

目前,金线莲内生真菌促生菌株的研究已有报道,然而已发现的促生菌株依然有限,商业化应用菌株选择空间不多. 因此,继续挖掘金线莲促生真菌资源是非常必要与迫切. 本文从福建金线莲品种‘红霞’的茎中分离到一株产 IAA 能力较强的真菌 PJ3,通过形态学特征及内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)基因序列分析进行鉴定,确定其为角担菌属,并优化其产 IAA 的发酵条件.

# 1 实验材料与方法

## 1.1 实验材料

1.1.1 样品来源及处理 金线莲品种‘红霞’来自福建省泉州金胜生态农业有限公司金线莲林下种植基地. 从基地采集‘红霞’金线莲的完整植株,装盒,快速带回实验室,于 4  $^{\circ}\text{C}$ 下保存.

1.1.2 培养基 LB 液体培养基, pH=5.6~6.0;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA), pH=5.6~6.0;产 IAA 培养基: L-色氨酸 1 g, LB 液体培养基定容至 1 L;初始液体培养基: 蔗糖 20 g, 无水硫酸镁 0.5 g, 无水磷酸氢二钾 1.5 g, 无水磷酸二氢钾 1.5 g, 蛋白胨 10 g, 去离子水定容至 1 L, pH=5.6~6.0.

## 1.2 实验方法

1.2.1 内生真菌的分离纯化 取金线莲的根、茎、叶在流水下冲洗 60 min,超净台下剪成 0.5~1.0 cm 小段,将各组织在 75%乙醇下浸泡 1 min;用 1%升汞分别浸泡根部 8 min,茎 4 min,叶 2 min,将片段浸入 75%乙醇浸泡 1 min. 最后用无菌水清洗 3 次,并在灭菌滤纸上风干. 将切好的根、茎、叶小段分别接种于 PDA 培养基内,于 28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养,待从根、茎、叶切口处长出菌后,挑取尖端进行纯化培养<sup>[14]</sup>.

1.2.2 产吲哚乙酸(IAA)真菌的筛选及能力评估 将分离纯化后的菌株接入产 IAA 的培养基. 培养条件:温度为 28  $^{\circ}\text{C}$ ,摇床转速为 180  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,培养时间为 5~7 d. 随后将菌悬液于 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,取 2 mL 上清液,并加入等体积显示剂(Salkowski 比色液). 对照组:等体积未接种 LB 液体培养基和 Salkowski 比色液混合液为阴性对照,室温黑暗下静置 30 min,颜色不变色为阴性,不产 IAA;变成粉红色则为阳性,产 IAA,可进行 IAA 定量测定其  $D(530)$ 值,每株菌试验设置 3 个平行<sup>[15]</sup>. 分别配置 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 分析纯的 IAA 系列浓度,并绘制标准曲线,最终 IAA 含量换算公式为

$$C = C_1 V_1 / V_2.$$

上式中:  $C$  为样品吲哚乙酸浓度,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $C_1$  为标准曲线上查得的 IAA 浓度,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $V_1$  为样品

提取液体积,mL; $V_2$  为样品反应液体积,mL.

1.2.3 菌株形态鉴定及 ITS 分子学鉴定 通过初步筛选,依据《真菌鉴定手册》<sup>[16]</sup>和《中国真菌志》<sup>[16]</sup>对促生效果最佳的菌株进行形态学鉴定,并进一步 ITS 序列分析和进化树分析. 根据真核生物 ITS 保守序列通用引物 ITS1(5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAGAG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')<sup>[18]</sup>送至北京擎科新业生物技术有限公司进行测序. 将测定所得序列与 NCBI 数据库 BLAST 同源性比对分析,选取同源性较高的模式菌株用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树.

1.2.4 菌株生长曲线绘制 在初始液体培养基上培养 156 h,装液量(体积分数)为 20%,置于 28℃,180 r·min<sup>-1</sup>下,初始 3 d 每 24 h 取样 1 次,之后每 12 h 取样 1 次,测量菌株产 IAA 能力,并绘制曲线确定取样时间.

1.2.5 菌株发酵条件优化 1) 分别选取葡萄糖、蔗糖、乳糖作为碳源和牛肉膏、蛋白胨、酵母浸粉作为氮源,置于 28℃,180 r·min<sup>-1</sup>下培养 4 d,测量其产 IAA 能力,每个处理设置 3 个重复;2) 在最佳碳源、氮源下分别添加不同质量浓度的氮源或碳源,测量其产 IAA 能力,确定最佳添加量,每个处理设置 3 个重复;3) 在优化培养基上 设置不同装液量(体积分数)、pH 值和摇床转速,分别测量其产 IAA 能力,每个处理设置 3 个重复.

1.2.6 正交试验设计 通过单因素试验,设计 5 因素 4 水平正交试验,确定菌种产 IAA 的最佳条件. 表 1 为正交试验设计表. 表 1 中: $\rho_C$ 、 $\rho_N$  分别为碳源和氮源的质量浓度; $\varphi$  为装液量(体积分数); $\omega$  为摇床转速.

表 1 正交试验因素与水平表

Tab. 1 Orthogonal test factor and level table

水平	A	B	C	D	E
	$\rho_C/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\rho_N/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\varphi/\%$	pH	$\omega/\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$
1	10	10	20	4	140
2	15	15	28	5	160
3	20	20	36	6	180
4	25	25	44	7	200

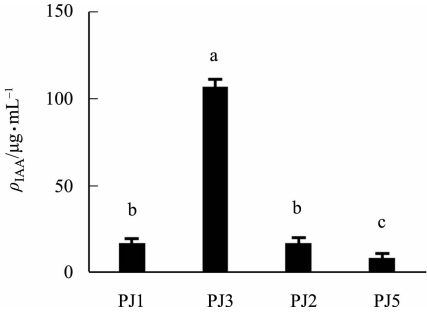


图 1 金线莲内生菌产 IAA 能力比较

Fig. 1 Comparison of IAA secretion ability of *Anoectochilus roxburghii* endophytes

## 2 实验结果与分析

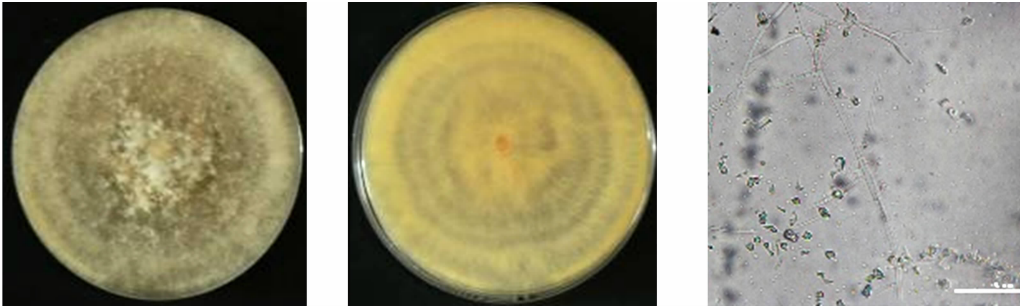
### 2.1 金线莲内生促生菌筛选

从‘红霞’金线莲的根、茎、叶中共分离 16 种内生真菌,只有 PJ1,PJ3,PY2 和 PG5 能够产 IAA,如图 1 所示. 图 1 中: $\rho_{\text{IAA}}$  为 IAA 质量浓度. 从图 1 可知:从茎中分离得到的 PJ3 产 IAA 能力最强,质量浓度达到 $(106.78\pm4.43)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,显著高于其他 3 个菌株.

### 2.2 菌种鉴定

#### 2.2.1 形态鉴定 PJ3 菌株在 PDA 培养基上的菌落形态

和光学显微结构,如图 2 所示. 由图 2 可知: PJ3 菌株菌落覆盖密集的白色菌丝;菌落圆形,开始是白色,随后颜色逐渐加深变黄,最后为深褐色;光学显微镜下菌丝呈树枝状分布,分生孢子球形,无色透明.



(a) 菌落形态 A (b) 菌落形态 B (c) 光学显微结构

图 2 PJ3 菌株在 PDA 培养基上的菌落形态和光学显微结构

Fig. 2 Colony morphology of strain PJ3 on PDA medium and optical microstructure of strain PJ3

#### 2.2.2 PJ3 菌株 ITS 分子鉴定 PJ3 菌株的 ITS 扩增后进行测序,将序列提交 GenBank 获得登录号

KM387384. 根据数据库搜索进行 BLAST 比对. 结果表明: PJ3 菌株 ITS 基因序列与 *Ceratobasidium* sp. AG-V 具有 97.96% 的相似性. 选择已知的 20 种不同角担菌属序列, 利用 MEGA 7.0 构建 PJ3 菌株的系统发育树, 如图 3 所示. 从图 3 的结果初步鉴定, 菌株 PJ3 为角担菌属(*Ceratobasidium*)中的一员.

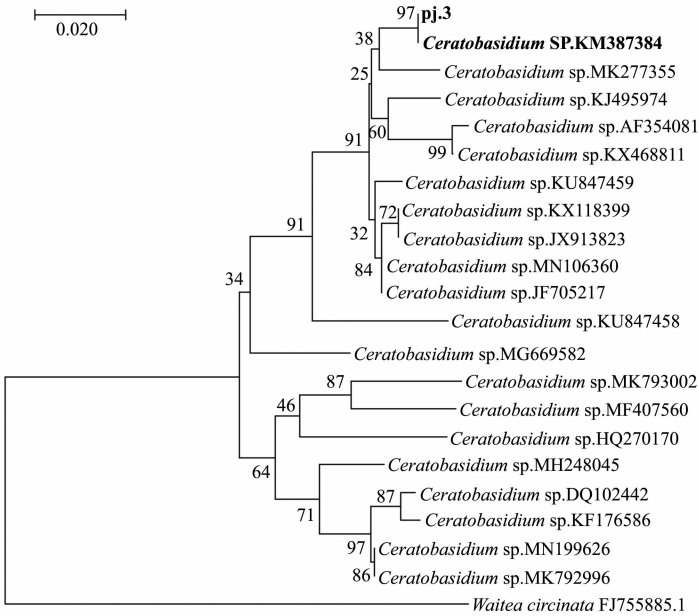


图 3 基于 ITS 基因序列构建的 PJ3 及相关菌株系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of PJ3 and other related strains based on ITS gene sequence

2.3 培养条件优化

2.3.1 培养时间 PJ3 培养时间对菌株 PJ3 分泌 IAA 的影响, 如图 4 所示. 图 4 中:  $\rho_{IAA}$  为 IAA 质量浓度;  $t$  为培养时间. 由图 4 可知: PJ3 菌株在培养过程中, IAA 质量浓度呈现先增加后稳定的趋势; 从 24 h 到 108 h, 菌株快速产 IAA; 108 h 时, PJ3 菌株产 IAA 量达到最大值, 为  $108.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 随后趋于稳定. 因此, 可以确定最佳取样时间为 132 h.

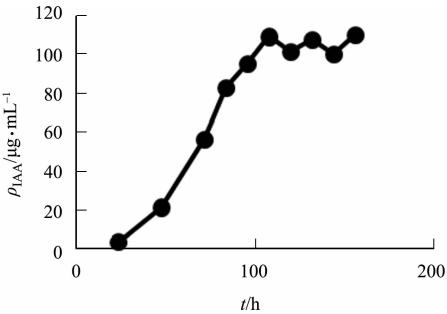
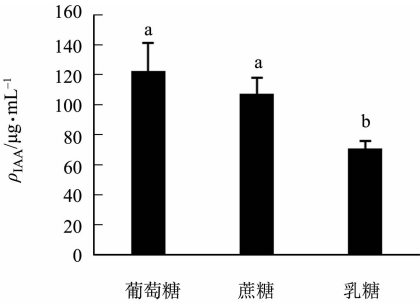


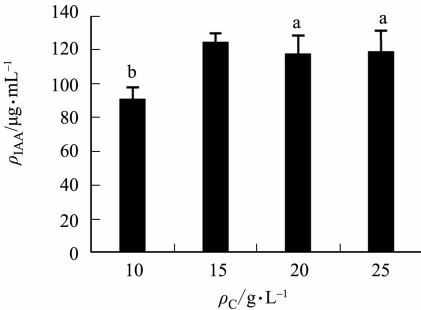
图 4 菌株产 IAA 浓度随着培养时间变化  
Fig. 4 Change curve of concentration of IAA produced by strain with culture time

2.3.2 碳源和氮源 不同碳源、氮源对菌株 PJ3 分泌 IAA 的影响, 如图 5 所示. 图 5 中:  $\rho_{IAA}$ ,  $\rho_C$ ,  $\rho_N$  分别为 IAA 和碳源(葡萄糖)、氮源(酵母浸粉)的质量浓度.

从图 5(a), (b)可知: 当碳源为葡萄糖, 其分泌 IAA 质量浓度最高, 为  $122.61 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 不同葡萄糖添加量以  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  为最佳, IAA 质量浓度高达  $124.81 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . 从图 5(c), (d)可知: 当氮源为酵母浸粉时, 其分泌 IAA 质量浓度显著高于蛋白和牛肉膏组 ( $P < 0.05$ ), 添加量为  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 最高达到  $193.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . 综上所述, 当碳源为葡萄糖, 氮源为酵母浸粉时, 菌株 PJ3 分泌 IAA 量最大.



(a) 不同碳源



(b) 碳源添加量

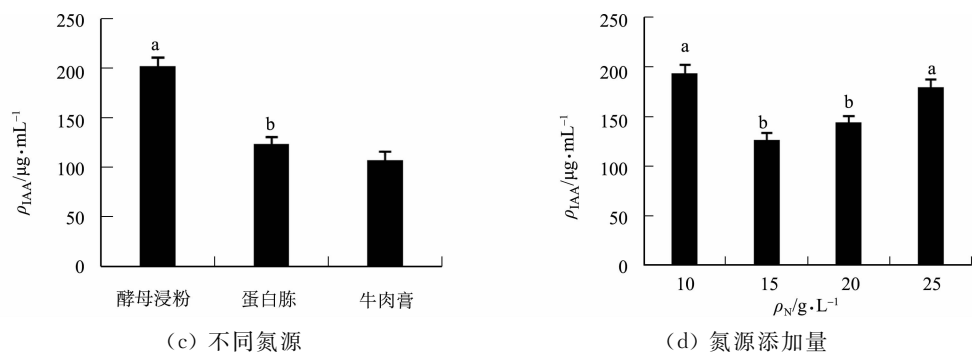


图 5 碳源和氮源对菌株 PJ3 分泌 IAA 的影响

Fig. 5 Effects of different carbon sources, nitrogen sources and additions on IAA secretion by PJ3 strain

2.3.3 PJ3 菌株发酵条件筛选 不同的装液量、pH 值、摇床转速下,PJ3 菌株分泌 IAA 能力如图 6 所示.图 6 中; $\varphi$  为装液量(体积分数); $\omega$  为摇床转速.从图 6 可知:装液量为 28%时,PJ3 菌株分泌 IAA 量显著高于其他组;pH 值为 6 时,PJ3 菌株分泌 IAA 量最佳,IAA 质量浓度为  $182.59\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;摇床转速为  $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  时,PJ3 菌株分泌 IAA 量最佳,IAA 质量浓度为  $181.62\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

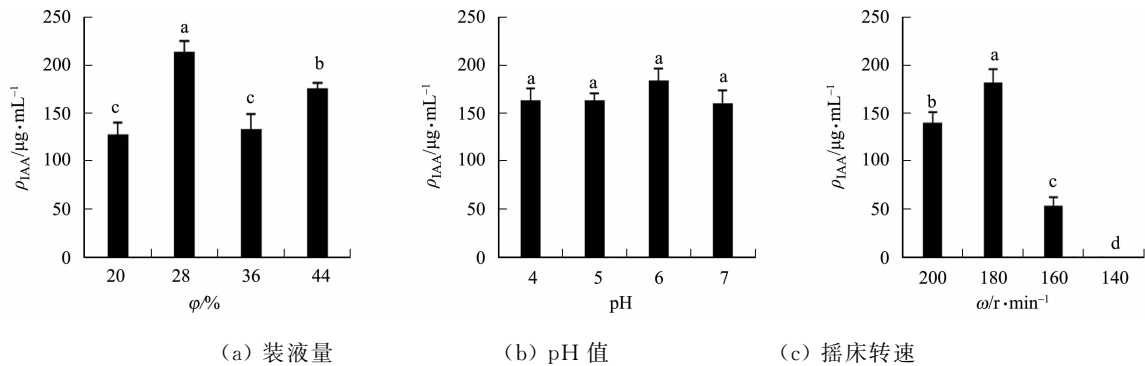


图 6 不同发酵条件对 PJ3 菌株分泌 IAA 的影响

Fig. 6 Effect of different fermentation conditions on IAA secretion by PJ3 strain

2.3.4 正交试验结果分析 表 2 为正交试验设计表,表 3 为正交试验结果的极差分析.表 2 中; $\rho_{\text{IAA}}$  为 IAA 质量浓度.从表 2,3 可知:5 个因素对 PJ3 菌株分泌 IAA 的影响顺序为  $B>C>D>E>A$ ,最佳水平组合为 A1B2C2D2E2,产量为  $193.59\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

表 2 正交试验设计表

Tab. 2 Orthogonal design table													
编号	A	B	C	D	E	$\rho_{\text{IAA}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	编号	A	B	C	D	E	$\rho_{\text{IAA}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	1	1	1	1	1	88.093	9	3	1	3	4	2	111.652
2	1	2	2	2	2	193.594	10	3	2	4	3	1	144.526
3	1	3	3	3	3	126.691	11	3	3	1	2	4	126.691
4	1	4	4	4	4	160.703	12	3	4	2	1	3	181.287
5	2	1	2	3	4	119.824	13	4	1	4	2	3	109.251
6	2	2	1	4	3	61.184	14	4	2	3	1	4	181.654
7	2	3	4	1	2	126.691	15	4	3	2	4	1	126.691
8	2	4	3	2	1	164.983	16	4	4	1	3	2	144.505

表 3 正交试验结果极差分析

Tab. 3 Range analysis of orthogonal test results											
编号	A	B	C	D	E	编号	A	B	C	D	E
K1	142.270	107.205	105.118	144.431	131.073	K4	140.525	162.870	135.293	115.058	147.218
K2	118.171	145.239	155.349	148.630	144.111	R1	24.100	55.665	50.231	33.572	27.615
K3	141.039	126.691	146.245	133.886	119.603						

IAA 产量方差分析结果,如表 4 所示.从表 4 可知:B 因素对 PJ3 菌株分泌 IAA 的影响显著高于其他几个因素.综合可知,最佳组合为 A1B2C2D2E2,即 1 L 发酵培养基中含葡萄糖 10.0 g、酵母浸粉

15.0 g、装液量(体积分数)为 28%,初始 pH 值为 5,摇床转速为 180 r · min<sup>-1</sup>.

表 4 IAA 产量方差分析  
Tab.4 IAA yield analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方根	F 值	P 值
模型	56 558.294a	15.000	3 770.553	28.623	0
A	4 825.008	3.000	1 608.336	12.209	0
B	20 665.953	3.000	6 888.651	52.293	0
C	17 190.487	3.000	5 730.162	43.498	0
D	8 071.839	3.000	2 690.613	20.425	0
E	5 805.006	3.000	1 935.002	14.689	0
误差	4 215.443	32.000	131.733		
总和	942 083.056	48.000			

3 讨论

植物内生菌种类多样性取决于自身和寄主种类多样性,以及寄主不同部位分布的可选性<sup>[19]</sup>. 目前,关于金线莲内生菌分离的报道较少,研究主要集中在金线莲组织培养优化和药物成分分析上. 植物内生菌对植物本身几乎无毒,通过生物控制和生物施肥,从根系进入植物体内并行使相关功能,因此,内生菌促进植物生长将更有效<sup>[20-21]</sup>.

角担菌是一大类与陆生兰花形成共生关系的兰花菌根真菌(OMF),对于种子萌发和维持兰花的自然种群至关重要<sup>[22]</sup>. 最近,Zhang 等<sup>[22-23]</sup>发现 *Ceratobasidium* sp. AR2 菌株和野生金线莲共培养促进了金线莲生长,并增加了黄酮类化合物和糖苷积累,但在我国关于角担菌属产 IAA 的能力鲜有报道. 本研究从金线莲品种‘红霞’健康植株的茎中分离到 1 株内生真菌 PJ3,经 ITS 序列及进化树分析鉴定菌株为 *Ceratobasidium*. 因此,推测该菌株能够促进金线莲品种‘红霞’的生长,检测发现其产 IAA 的特性较好,产量为 106.78 μg · mL<sup>-1</sup>.

众多研究发现,优化促生菌发酵条件可以提高菌丝体生长量、IAA 产量及促生效果<sup>[18]</sup>. 葛春辉等<sup>[15]</sup>和李引等<sup>[24]</sup>通过正交试验发现氮源是影响菌株产 IAA 的主要因素,Shokri 等<sup>[25]</sup>也发现氮源是菌株产 IAA 的主要因素,并且当 KNO<sub>3</sub> 为氮源的 IAA 产率最高. 本研究将 PJ3 产 IAA 产量作为重要考量指标,根据单因素试验和正交设计试验对其发酵条件进行优化,确定了菌株最优发酵条件为:葡萄糖 10.0 g · L<sup>-1</sup>、酵母浸粉 15.0 g · L<sup>-1</sup>、装液量(体积分数)为 28%,初始 pH 值为 5,摇床转速为 180 r · min<sup>-1</sup>,试验结果比未优化前 IAA 产量提高了 81.30%. 此外,主要影响 PJ3 菌株产 IAA 的因素为氮源含量,本试验为金线莲的菌剂开发提供了一定的借鉴.

参考文献:

[1] 安彦峰,张雅琼,冯德强. 金线莲药理和临床研究进展[J]. 中国现代中药,2014,16(8):685-687. DOI:10.13313/j.issn.1673-4890.2014.08.020.

[2] SUN Jian,WEN Xiaoyuan,LIU Jun,*et al.* Protective effect of a polysaccharide from *Anoectochilus roxburghii* against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice[J]. Journal of Ethnopharmacology,2018,117:659-664. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.203.

[3] GUO Yaoli,YE Qi,YANG Shuling,*et al.* Therapeutic effects of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* on type II collagen-induced arthritis in rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules ,2019,122:882-892. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.015.

[4] WU Yanbin,PENG Mengchao,ZHANG Chao,*et al.* Quantitative determination of multi-class bioactive constituents for quality assessment of ten *Anoectochilus*, four *Goodyera* and one *Ludisia* species in China[J]. Chinese Herbal Medicines,2020,12(4):430-439. DOI:10.1016/j.chmed.2021.04.012.

[5] WEI Mi,ZHANG Meng,HUANG Guobing,*et al.* Coculture with two *Bacillus velezensis* strains enhances the growth of *Anoectochilus* plants via promoting nutrient assimilation and regulating rhizosphere microbial community [J]. Industrial Crops and Products,2020,154:112697. DOI:10.1016/j.indcrop.2020.112697.

- [6] CHEN Qinghe, LI Benjin, LIU Peiqing, *et al.* First report of anthracnose caused by *colletotrichum gloeosporioides* on *Anoectochilus roxburghii* in China[J]. Plant Disease, 2016, 100(2): 531. DOI: 10. 1094/PDIS-08-15-0902-PDN.
- [7] 白洋, 钱景美, 周俭民, 等. 农作物微生物组: 跨越转化临界点的现代生物技术[J]. 中国科学院院刊, 2017, 32(3): 260-265. DOI: 10. 16418/j. issn. 1000-3045. 2017. 03. 006.
- [8] CARD S D, HUME D E, ROODI D, *et al.* Beneficial endophytic microorganisms of *Brassica*: A review[J]. Biological Control, 2015, 90: 102-112. DOI: 10. 1016/j. biocontrol. 2015. 06. 001.
- [9] LIOTTI R G, DA SILVA F M I, DA SILVA G F, *et al.* Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control[J]. Microbiological research, 2018, 207: 8-18. DOI: 10. 1016/j. micres. 2017. 10. 011.
- [10] FADIJI A E, BABALOLA O O. Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review[J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 170: 105860. DOI: 10. 1016/j. mimet. 2020. 105860.
- [11] BERG G, GRUBE M, SCHLOTTER M, *et al.* The plant microbiome and its importance for plant and human health [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 491. DOI: 10. 3389/fmicb. 2014. 00491.
- [12] CIPRIANO M A P, IÓRIO R F, DIMITROV M R, *et al.* Plant-growth endophytic bacteria improve nutrient use efficiency and modulate foliar N-metabolites in sugarcane seedling[J]. Microorganisms, 2021, 9(3): 479. DOI: 10. 3390/microorganisms9030479.
- [13] 李福艳, 刘晓玉, 颜静婷, 等. 三株产吡啶乙酸根际促生芽孢杆菌的筛选鉴定及其促生作用[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(5): 873-884. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-1524. 2021. 05. 13.
- [14] 谭小明, 郭顺星, 周雅琴, 等. 广西金线莲内生真菌的分离及抗菌活性研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(3): 178-181.
- [15] 葛春辉, 孟阿静, 马彦茹, 等. 一株黄瓜根际促生菌的筛选、鉴定及其发酵特性[J]. 生物技术通报, 2014(3): 94-99. DOI: 10. 13560/j. cnki. biotech. bull. 1985. 2014. 03. 027.
- [16] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [17] 刘波. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [18] 张梦君, 邱晨浩, 柴立伟, 等. 高效降解纤维素低温真菌的筛选、鉴定及发酵优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2494-2503. DOI: 10. 13344/j. microbiol. china. 180910.
- [19] KENDON J P, YOKOYA K, ZETTLER L W, *et al.* Recovery of mycorrhizal fungi from wild collected protocorms of Madagascan endemic orchid *Aerangis ellisii* (BS Williams) Schltr. and their use in seed germination *in vitro* [J]. Mycorrhiza, 2020, 30: 567-576. DOI: 10. 1007/s00572-020-00971-x.
- [20] VERGARA C, ARAUJO K E C, DE SOUZA S R, *et al.* Plant-mycorrhizal fungi interaction and response to inoculation with different growth-promoting fungi[J]. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2019, 54. DOI: 10. 1590/s1678-3921. pab2019. v54. 25140e.
- [21] HARO R, BENITO B. The role of soil fungi in K<sup>+</sup> plant nutrition[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(13): 3169. DOI: 10. 3390/ijms20133169.
- [22] ZHANG Ying, LI Yuanyuan, CHEN Xiaomei, *et al.* Combined metabolome and transcriptome analyses reveal the effects of mycorrhizal fungus *Ceratobasidium* sp. AR2 on the flavonoid accumulation in *Anoectochilus roxburghii* during different growth stages[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(2): 564. DOI: 10. 3390/ijms21020564.
- [23] ZHANG Ying, LI Yuanyuan, GUO Shunxing. Effects of the mycorrhizal fungus *Ceratobasidium* sp. AR2 on growth and flavonoid accumulation in *Anoectochilus roxburghii* [J]. Peer J, 2020, 8(2): e8346. DOI: 10. 7717/peerj. 8346.
- [24] 李引, 虞丽, 李辉信, 等. 一株花生根际促生菌的筛选鉴定及其特性研究[J]. 生态与农村环境学报, 2012, 28(4): 416-421. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4831. 2012. 04. 015.
- [25] SHOKRI D, EMTIAZI G. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by Taguchi design[J]. Curr Microbiol, 2010, 61: 217-225. DOI: 10. 1007/s00284-010-9600-y.

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 刘源岗)