

柴胡根部细菌群落的生态位富集特征与柴胡皂苷积累的关联分析

魏 桢¹, 莫传鑫¹, 王田斌², 师倩因¹, 闫明月¹, 余 马¹, 赵 军¹, 辛 超¹, 陈文帅³, 陈 华^{1*}

1. 西南科技大学生命科学与农林学院, 四川 绵阳 621010

2. 边坝县自然资源和林业草原局, 西藏 边坝 855500

3. 西藏自治区高原生物研究所, 西藏 拉萨 850000

摘要:目的 发掘与柴胡皂苷含量显著关联的关键细菌类群。方法 分别采集北柴胡 *Bupleurum chinense*、三岛柴胡 *B. falcatum* 和狭叶柴胡 *B. scorzonerifolium* 的根际和根表土壤样本及根系样本, 提取总 DNA 后进行宏基因组分析, 采用 UPLC-MS 测定 3 种柴胡根部柴胡皂苷 A (saikosaponin A, SSA)、柴胡皂苷 B₂ (saikosaponin B₂, SSB₂)、柴胡皂苷 B₄ (saikosaponin B₄, SSB₄)、柴胡皂苷 C (saikosaponin C, SSC)、柴胡皂苷 D (saikosaponin D, SSD)、柴胡皂苷 E (saikosaponin E, SSE) 和柴胡皂苷 F (saikosaponin F, SSF) 的含量, 利用 Pearson 识别柴胡药效成分与优势菌种之间的显著关系。**结果** 柴胡皂苷 D 在 7 种柴胡皂苷中含量最高, 其平均含量在北柴胡、三岛柴胡和狭叶柴胡中分别为 217.5、116.75、139.7 μg/g。柴胡皂苷 E 和 SSF 在三岛柴胡中含量最低。宏基因组测序共鉴定出 5 440 个细菌 OTUs。北柴胡的根表、根际和内生部位特有 OTUs 数量依次为 127、126 和 110; 三岛柴胡分别为 91、74 和 69; 狭叶柴胡为 43、137 和 126。固氮菌属 *Azotobacter chroococcum* 在北柴胡和狭叶柴胡的根际为优势菌, 链孢菌属 *Streptomyces* 为三岛柴胡根际核心类群。克雷伯氏菌属 *Klebsiella* sp. 与假单胞菌属 *Pseudomonas* 分别在北柴胡和三岛柴胡的根表及内生部位显著富集。相关性网络鉴定出克雷伯氏菌、纤维单胞菌 *Cellulomonas* sp. 和圆褐固氮菌与 SSA、SSB₂、SSB₄ 和 SSD 的含量呈极显著正相关。**结论** 阐明柴胡基因型可能通过生态位构建塑造特异性细菌群落, 进而促进柴胡皂苷积累。

关键词: 柴胡属; 柴胡皂苷; 根部细菌群落; 宏基因组测序; 植物-微生物互作; 柴胡皂苷 A; 柴胡皂苷 B₂; 柴胡皂苷 B₄; 柴胡皂苷 C; 柴胡皂苷 D; 柴胡皂苷 E; 柴胡皂苷 F

中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)08-3142-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.08.025

Correlation analysis of niche enrichment characteristics of root bacterial communities in *Bupleuri* genus and saikosaponins accumulation

WEI Zhen¹, MO Chuanxin¹, WANG Tianbin², SHI Qiannan¹, YAN Mingyue¹, YU Ma¹, ZHAO Jun¹, XIN Chao¹, CHEN Wenshuai³, CHEN Hua¹

1. School of Life Science and Agriculture & Forestry, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

2. Bureau of Natural Resources and Forestry & Grassland, Banba County, Banbat 855500, China

3. Institute of Plateau Biology of Xizang Autonomous Region, Lasa 850000, China

Abstract: Objective To identify key bacterial taxa associated with saikosaponins content. **Methods** Rhizosphere soil, root surface soil, and root samples of *Bupleurum chinense*, *B. falcatum*, and *B. scorzonerifolium* were collected. Total DNA was extracted for metagenomic analysis, and UPLC-MS was used to determine the contents of saikosaponin A (SSA), saikosaponin B₂ (SSB₂), saikosaponin B₄ (SSB₄), saikosaponin C (SSC), saikosaponin D (SSD), saikosaponin E (SSE), and saikosaponin F (SSF) in the roots. Pearson correlation analysis was then employed to identify significant relationships between these medicinal components and the dominant bacterial species. **Results** SSD exhibited the highest content among the seven saikosaponins analyzed, with average concentrations of 217.5 μg/g in *B. chinense*, 116.75 μg/g in *B. falcatum*, and 139.7 μg/g in *B. scorzonerifolium*. *B. falcatum* had the

收稿日期: 2025-12-02

基金项目: 西藏自治区重点研发计划 (XZ202401ZY0020); 药用植物种质资源库建设 (2021-I2M-1-032); 国家岗位产业体系专家项目 (CARS-21); 四川省区域创新合作项目 (2026YFHZ0163)

作者简介: 魏 桢, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源与分子生物学研究。E-mail: weizhen0671521@163.com

*通信作者: 陈 华, 副教授, 硕士生导师, 从事药用植物学研究。E-mail: hchen7@outlook.com

lowest content of SSE and SSF. Metagenomic sequencing identified a total of 5 440 bacterial OTUs. The numbers of unique OTUs in the root surface, rhizosphere, and endophytic compartments were 127, 126, and 110 for *B. chinense*; 91, 74, and 69 for *B. falcatum*; and 43, 137, and 126 for *B. scorzonrifolium*, respectively. *Azotobacter chroococcum* was dominant in the rhizosphere of *B. chinense* and *B. scorzonrifolium*, whereas *Streptomyces* was the core taxon in the rhizosphere of *B. falcatum*. *Klebsiella* sp. and *Pseudomonas* were significantly enriched in the root surface and endophytic niches of *B. chinense* and *B. falcatum*, respectively. The *Klebsiella* sp., *Cellulomonas* sp., and *Azotobacter chroococcum* were also a highly significant positive correlated with the contents of SSA, SSB₂, SSB₄, and SSD, among the correlation network analysis. **Conclusion** This study revealed that *Bupleurum* genotype might drive saikosaponins accumulation by niche construction of specific microbial communities.

Key words: *Bupleuri* genus; saikosaponins; root bacterial community; metagenomic sequencing; plant-microbe interaction; saikosaponin A; saikosaponin B₂; saikosaponin B₄; saikosaponin C; saikosaponin D; saikosaponin E; saikosaponin F

柴胡 *Bupleuri Radix* 是中医药理论中疏肝解郁、和解表里的关键药材, 广泛应用于感冒发热、肝郁气滞等症的治疗, 具有重要的临床价值。《中国药典》2025 年版规定其正品基原为北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭叶柴胡 *B. scorzonrifolium* Willd.^[1]。柴胡的主要药效物质为柴胡皂苷, 不同柴胡皂苷单体的组成与相对含量是衡量柴胡药材品质的核心指标。北柴胡主要分布于我国东北、华北、西北、华东和华中等地^[2]。狭叶柴胡分布区包括黑龙江、河北、山东、山西、江苏、安徽、广西、内蒙古、甘肃和四川省区^[3]。此外, 原产于日本的三岛柴胡 *B. falcatum* L. 在韩国与日本作为正品药材使用^[4]。

药材品质的形成不仅取决于遗传背景, 更受到其生长微环境, 特别是根际微生态系统的影响。植物根际是植物-微生物相互作用的枢纽, 其中定殖的根际微生物与内生菌共同构成了一个复杂的互作网络^[5]。微生物在促进植物养分吸收和增强抗逆性(如连作障碍、重金属胁迫)方面发挥着重要的作用^[6-7]。对于药用植物而言, 微生物组还能作为第二基因组, 直接或间接地调控宿主次生代谢产物的合成与积累^[8], 进而影响药材品质。例如, 三七 *Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen ex C. H. Chow 通过根系分泌物重塑根际微生物群落以缓解连作障碍下的自毒效应^[7]; 丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 与深色有隔内生真菌 (*Dark Septate Endophytes*, DSE) 互作以增强对镉胁迫的耐受性^[9]; 内生假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 能特异性激活丹参的萜类合成通路, 显著提升丹参酮I含量^[10]; 而黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的内生真菌可调控青蒿素合成关键基因的表达^[11]。

植物-微生物互作是一个跨越根际土壤、根表、内生等多个生态位的连续性动态过程^[12]。不同生

态位的微生物群落并非孤立存在, 而是通过复杂的信号交流与功能互补构成一个协同调控网络^[13]。因此, 系统解析不同生态位的微生物群落结构、功能及其互作关系, 对于全面理解药材品质的形成机制至关重要。对于柴胡这一大宗药材, 其根际和内生微生物群落的研究已取得初步进展。例如, Liu 等^[14]发现连作、间作和轮作等不同种植方式, 显著改变柴胡根际微生物群落组成、结构和多样性。刘丽等^[15]利用 16 S 测序技术, 分析了多个产地野生柴胡根际土壤细菌的多样性与群落结构, 揭示了地理因素对细菌群落动态的调控作用。柴胡根部的内生真菌群落亦表现出高度多样性, 并显示出潜在的生物防治与植物促生功能, 其组成明显受地理分布和气候条件的影响^[16-17]。现有研究多局限于单一生态位或单一功能, 缺乏对根际、根表、内生 3 大关键生态位微生物群落的系统性比较与分析。为填补这一空白, 本研究选取北柴胡、狭叶柴胡及三岛柴胡为研究对象, 通过整合宏基因组学与柴胡皂苷的关联分析, 旨在系统解析 3 种柴胡根部不同生态位的细菌群落组成与结构特征, 动态追踪其群落富集规律, 深入挖掘与柴胡皂苷含量显著关联的关键细菌类群。

1 材料

1.1 试验材料

本研究以北柴胡品种“川北柴 1 号”、狭叶柴胡品种“川红柴 1 号”和三岛柴胡 3 种柴胡属植物为研究对象。所有试验材料均由课题组提供, 其中, “川北柴 1 号”与“川红柴 1 号”均于 2015 年在四川省通过品种审定。样品由四川大学张浩教授鉴定分别为北柴胡 *B. chinense* DC.、狭叶柴胡 *B. scorzonrifolium* Willd.、三岛柴胡 *B. falcatum* L.。

1.2 仪器与试剂

Centrifuge 5418 R 型冷冻离心机(德国艾本德

股份有限公司), DYCP-32B 型琼脂糖水平电泳仪(北京六一生物科技有限公司), Gel Doc XR 型凝胶成像系统(上海伯乐生命医学产品有限公司), API 4000+型质谱仪(美国丹纳赫集团质谱技术公司), Acquity UPLC 色谱仪(美国沃世特公司)。

对照品柴胡皂苷 A (saikosaponin A, SSA) 批号 B20146, 柴胡皂苷 B₂ (saikosaponin B₂, SSB₂) 批号 B20148, 柴胡皂苷 B₄ (saikosaponin B₄, SSB₄) 批号 B25833, 柴胡皂苷 C (saikosaponin C, SSC) 批号 B20149, 柴胡皂苷 D (saikosaponin D, SSD) 批号 B20150, 柴胡皂苷 E (saikosaponin E, SSE) 批号 B24458 和柴胡皂苷 F (saikosaponin F, SSF) 批号 B20151 (质量分数均>98%) 购自上海源叶生物科技有限公司。

2 方法

2.1 田间试验及土样采集

试验于 2019 年 9 月在西南科技大学龙山研究基地(四川绵阳, 31°54'N, 104°41'E)进行种植。本试验采用完全随机区组设计, 3 种柴胡基因型各设置 3 个独立的小区重复, 共计 9 个小区。每个小区面积为 (4×4) m², 小区间距为 40 cm。每个小区内种植 10 行, 行距 30 cm, 株距 20 cm。田间管理遵循柴胡标准栽培措施^[18]。

2020 年 9 月(柴胡成熟期)进行样品采集。在每个小区内, 采用五点取样法选取 5 个 1×1 m² 的样方, 从每个样方中随机挑选 10 株生长状况一致(株高、茎粗无显著差异)的一年生健康植株。植株被挖出后, 按以下流程分离不同微生态位的微生物样品。每个小区内的样品混合为一个样品。

根际微生物(rhizosphere microbiota, 图 1): 轻抖植株去除非粘附土壤, 无菌刷收集根系紧密黏附的土壤(根际土), 过 10 目筛去除杂质。称取 0.5 g 过筛混匀的根际土于 2 mL 离心管中。加 1.5 mL 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液(Tris-EDTA buffer, TE), 涡旋震荡(其林贝尔-QL-901), 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 重复 3 次。加 1.5 mL 0.5% PVPP-NaCl 溶液, 涡旋震荡, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 重复 3 次。用 1.5 mL PBS 或无菌水清洗沉淀 1 次, 离心弃上清。所得沉淀用于根际微生物 DNA 提取^[19]。

根表微生物(rhizoplane microbiota, 图 1): 取上述收集完根际土的根系, 用无菌水快速漂洗 3 次以去除残留的根际土, 并用无菌滤纸吸干表面水

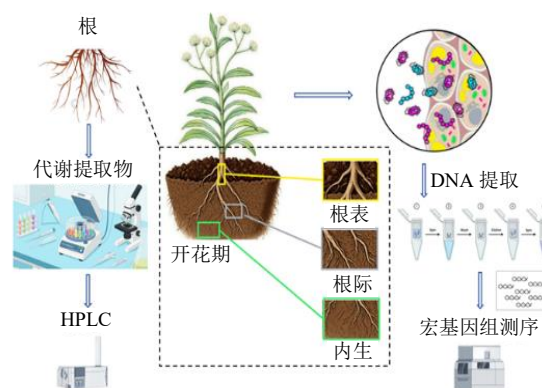


图 1 根际、根表及内生微生物样品采集与分离流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of sampling and isolation process for rhizosphere, rhizoplane, and endophytic microorganisms

分。准确称取 0.5 g 鲜质量的根系, 放入盛有 30 mL 1×PBS 缓冲液(pH 7.4)的 50 mL 离心管中, 于 180 r/min 振荡 20 min, 收集第 1 次洗涤悬浮液。将根系转移至新的离心管, 加入 30 mL 新鲜 1×PBS 缓冲液, 在冰浴条件下进行 40 kHz 超声处理 60 s, 收集第 2 次洗涤悬浮液。合并 2 次悬浮液, 于 500 r/min 离心 5 min 以去除大的土壤颗粒。收集上清液, 于 15 000 r/min 离心 15 min, 所得沉淀用于根表微生物的 DNA 提取^[20]。

内生菌(endophytic microbiota, 图 1): 取上述处理后的根系, 依次进行表面消毒: 70%乙醇浸泡 30 s, 2.5%次氯酸钠(NaClO)溶液浸泡 10 min, 最后用无菌水漂洗 3 次, 并于-80 °C超低温冰箱中保存。在验证消毒效果时, 取 200 μL 最后 1 次漂洗液涂布于 LB 固体平板(28 °C培养 7 d), 同时将表面消毒后的根系置于-80 °C超低温冰箱暂存。确认平板无菌后, 取出根系组织在液氮中研磨成细粉, 称取 0.5 g 粉末用于内生菌 DNA 提取^[21-22]。

2.2 宏基因组 DNA 提取及测序

使用 DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit(Qiagen 公司, 上海)试剂盒从根表土和根际土取 250 mg 提取总 DNA; 使用 DNeasy PowerPlant Pro Kit(QIAGEN, 德国)试剂盒进行内生菌 DNA 提取。使用超微量分光光度计(NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, 赛默飞公司, 美国)检测 DNA 浓度和纯度(A_{260}/A_{280} 介于 1.8~2.0), 并通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。合格的 DNA 样品送至上海华大基因科技股份有限公司, 在 Illumina

NovaSeq 6000 平台上进行双末端 (PE150) 测序。

2.3 生物信息学分析

生物信息学分析在本实验室浪潮英信服务器 (NF8480M5 Inspur, 中国) 中完成。原始下机数据先使用 Trimmomatic 软件^[23]进行质控, 去除适配序列及低质量碱基。经过严格质控后, 6 个低深度样本被淘汰。利用 Bowtie2 (v2.2.4)^[24]比对北柴胡参考基因组 (<https://ym-lab.vip.cpolar.cn>), 去除宿主污染。物种组成分析采用 Kraken2^[25]对测序 reads 进行物种注释, 基于 97% 的相似性对序列进行 OTU 划分, 并通过 Bracken^[26]估计物种丰度。用 R (Version 4.4.0) 语言^[27]中的 “UpSetR”^[28]包可视化韦恩图, “phyloseq”^[29]、“ggplot2”^[30]、“dplyr”^[31]、“tibble”^[32]等包可视化物种相对丰度图。基于物种丰度数据, 用 “vegan”^[33]包计算 Alpha 多样性的 Chao1、Shannon 和 Simpson 指数, 通过 Graphpad Pism9.5.0^[34]软件可视化 Alpha 多样性。为揭示不同条件下细菌群落结构的变化, 基于微科盟生科云平台 (<https://www.bioincloud.tech/task-meta>), 通过主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 和 Bray-Curtis 相异度分析评估了样本间的 Beta 多样性, 利用 LEfSe 分析鉴定了组间具有显著差异的生物标志物。

2.4 皂苷提取及 UPLC-MS 检测

2.4.1 混合对照品溶液的制备 精密称取柴胡皂苷 A、SSB₂、SSB₄、SSC、SSD、SSE 和 SSF 对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 配制成质量浓度为 200 μg/mL 的对照品溶液。精密量取各对照品母液适量, 用甲醇稀释, 配置成混合对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 取与宏基因组测序同批的柴胡根系, 液氮冷冻后研磨成粉。精密称取 500 mg 粉末于具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇水溶液 25 mL, 密塞, 称定质量。超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再次称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀。取适量提取液, 在 12 000 r/min 下离心 10 min, 上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液, 置于样品瓶中, 待 UPLC-MS 分析。

2.4.3 色谱及质谱条件 色谱分离采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 质谱分离采用电喷雾负离子化 (ESI⁻) 检测, 扫描

模式为选择反应检测模式 (SRM), 所采用的参数依据 Li 等^[35]报道。

2.4.4 线性回归方程的绘制 采用标准曲线法定量分析柴胡皂苷含量^[36]。以各柴胡皂苷对照品的质量浓度为横坐标 (X), 色谱峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归。结果表明, 7 种柴胡皂苷在 1~40 μg/mL 线性关系良好, R² 均大于 0.994, 线性回归方程见表 1。组间差异采用 GraphPad Prism 9.5.0^[34] 软件进行方差分析。

表 1 7 种柴胡皂苷标准曲线

Table 1 Standard curves of seven kinds of saikosaponins		
柴胡皂苷	线性回归方程	R ²
SSA	$Y=124\ 724 X+124\ 138$	0.996 6
SSB ₂	$Y=77\ 461 X+110\ 727$	0.994 9
SSB ₄	$Y=110\ 485 X+72\ 558$	0.998 0
SSC	$Y=67\ 283 X+48\ 232$	0.997 9
SSD	$Y=62\ 329 X+89\ 276$	0.994 0
SSE	$Y=102\ 049 X+79\ 856$	0.997 5
SSF	$Y=105\ 005 X+102\ 160$	0.997 8

2.4.5 精密度试验 取同一份柴胡皂苷提取样品溶液, 依照既定色谱条件连续进样 6 次, 记录 7 种柴胡皂苷 (SSA、SSB₂、SSB₄、SSC、SSD、SSE、SSF) 的峰面积, 计算各成分的 RSD 值, 以此评价仪器精密度。结果显示, 7 种柴胡皂苷峰面积的 RSD 为 0.88%~2.25%, 均小于 3%。

2.4.6 稳定性试验 取同一份柴胡皂苷提取样品溶液, 密封后置于室温条件下, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录各时间点 7 种柴胡皂苷的含量, 计算其 RSD 值, 考察样品溶液在 24 h 内的稳定性。7 种柴胡皂苷含量的 RSD 为 0.74%~1.78%。

2.4.7 重复性试验 取同一批柴胡皂苷样品, 依照方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样测定, 计算 7 种柴胡皂苷质量分数的 RSD 值, 评价方法的重复性。7 种柴胡皂苷质量分数的 RSD 为 0.49%~1.55%。

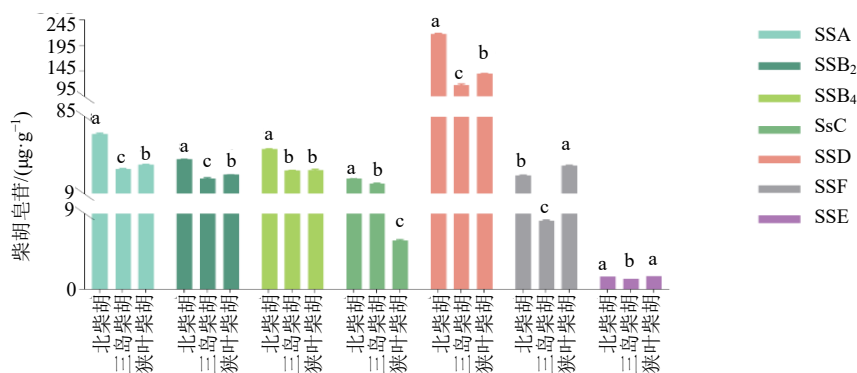
2.4.8 加样回收率试验 取已知含量的同一批柴胡皂苷样品 6 份, 精密称定, 分别按 1:1 比例加入各柴胡皂苷对照品, 依照方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算各成分的平均加样回收率及 RSD 值, 评价方法的准确度。7 种柴胡皂苷的平均回收率为 83.45%~105.13%, RSD 为 1.05%~2.32%。

3 结果与分析

3.1 3种柴胡根系中的柴胡皂苷含量分析

北柴胡、三岛柴胡及狭叶柴胡根部的7种主要柴胡皂苷成分的分差分析结果表明,所测皂苷在3种柴胡基因型中存在显著差异 ($P < 0.05$)。北柴胡根部的SSA、SSB₂、SSB₄、SSC、SSD的平均含量均显著高于三岛柴胡和狭叶柴胡 ($P < 0.05$)。在北柴胡中,SSD

的质量分数为217.50 $\mu\text{g/g}$,分别约为三岛柴胡和狭叶柴胡的1.86和1.56倍。三岛柴胡在SSA、SSB₂和SSD上的含量均为三者中最低,但SSC的含量(19.15 $\mu\text{g/g}$)显著高于 ($P < 0.05$) 狭叶柴胡(5.80 $\mu\text{g/g}$)。狭叶柴胡的SSF含量为36.65 $\mu\text{g/g}$,显著高于其他2种基因型。柴胡皂苷SSE在所有基因型中含量均较低,且北柴胡与狭叶柴胡间无显著差异(图2)。



不同的小写字母表示经单因素方差分析(ANOVA),组间在 $P < 0.05$ 水平上存在显著差异,具有相同字母的组间差异不显著。

Different lowercase letters indicate significant differences among groups at $P < 0.05$ level according to one-way ANOVA, while no significant difference is observed between groups sharing the same letter.

图2 3种基因型柴胡根系含量方差分析

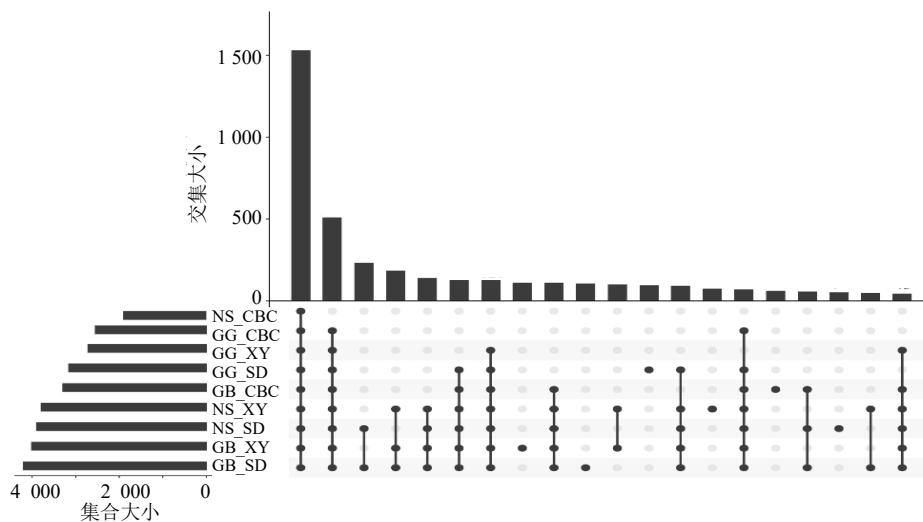
Fig. 2 Analysis of variance of contents in three *Bupleurum* genotypes

3.2 根部细菌群落组成特征

经质控处理后共获得5 263 939 206条高质量序列。基于97%相似性阈值,用Kraken2对高质量序列进行注释共鉴定出5 440个细菌OTUs。韦恩分析表明(图3),3种柴胡的根部菌群共享1个由1 531个OTUs组成的核心细菌群。同时,根际、内生和根表

微生物生态位分别拥有510、232和184个独有OTUs。

在3个基因型内部,北柴胡有137个OTUs,根表、根际和内生分别独有127、126和110个OTUs;三岛柴胡有95个OTUs,根表、根际和内生分别独有91、74和69个OTUs;狭叶柴胡有48个OTUs,根表、根际和内生分别独有43、137和126个OTUs(图3)。



CBC-北柴胡;SD-三岛柴胡;XY-狭叶柴胡;GG-根际;GB-根表;NS-内生,下同。

CBC-*Bupleurum chinense*;SD-*Bupleurum falcatum*;XY-*Bupleurum scorzonerifolium*;GG-rhizosphere;GB-root surface;NS-endophytic, same as below.

图3 北柴胡、三岛柴胡和狭叶柴胡在根际、根表和内生3个微生物生态位的差异OTU韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of distinct OTUs in rhizosphere, rhizoplane, and endosphere three microecological niches among *B. chinense*, *B. falcatum* and *B. scorzonerifolium*

同一生态位点的不同基因型中,根表不同基因型柴胡的群落独特性最为突出。北柴胡根表拥有127个独有 OTUs,其数量远超三岛柴胡和狭叶柴胡,分别为91个和43个 OTUs。在根际基因型间的差异同样明显。北柴胡根际土壤中的独有 OTUs 数量相对较少,其数量为126个,三岛柴胡和狭叶柴胡则拥有更多特有菌群,分别为74个和137个 OTUs。柴胡内生与根表相反,三岛柴胡和狭叶柴胡的内生独有 OTUs 数量显著高于北柴胡,其数量分别为69个和126个 OTUs (图3)。

在属水平上,3种柴胡根系细菌群落结构呈现明显的物种特异性及部位特异性。北柴胡中各部位均以固氮菌属 *Azotobacter* 和克雷伯氏菌属 *Klebsiella* 为优势类群,其中根际以固氮菌属为主导,占31.10%,根表以克雷伯氏菌属为主,占51.01%,内生环境中克雷伯氏菌占40.10%,固氮菌属占17.95% (图4-A)。三岛柴胡的根表与内生环境中假单胞菌属 *Pseudomonas* 均占据核心地位,占比分别为34.52%和30.94%,肠杆菌属 *Enterobacter* 和分枝杆菌属 *Mycobacterium* 在内生部位占比为8.11%和7.58%,三岛柴胡的根际细菌主要归属于链孢菌属 *Catellatospora* 和假单胞菌属,两者分别占

总体比例的26.21%和5.07% (图4-B)。狭叶柴胡的根表与内生环境中富集慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 和根瘤菌属 *Rhizobium*,占比分别为11.32%和9.05%,两者在内生环境中合计占比超过20%,狭叶柴胡的根际细菌主要归属固氮菌属、克雷伯氏菌属和链霉菌属 *Streptomyces*,占比分别为16.27%、9.53%和9.31% (图4-C)。链霉菌属在3种柴胡的所有微生境中均稳定存在,显示出其广泛的生态适应性。

3种基因型在同一生态位点的优势属的组成存在区别,在根际环境中,北柴胡以固氮菌属为优势菌属 (图4-A);三岛柴胡根际则由链孢菌属占据最高丰度,占26.21% (图4-B);狭叶柴胡中固氮菌属、克雷伯氏菌属和链霉菌属共同构成优势类群 (图4-C)。在根表环境中,北柴胡以克雷伯氏菌属为主,占51.01% (图4-A);三岛柴胡以假单胞菌属为主,占30.94% (图4-B);狭叶柴胡以慢生根瘤菌属和根瘤菌属为优势菌群 (图4-C)。内生环境中,北柴胡以克雷伯氏菌属为主,占40.10% (图4-A);三岛柴胡内生优势菌属与根表相同 (图4-B),狭叶柴胡内生优势菌属与根表相同 (图4-C)。

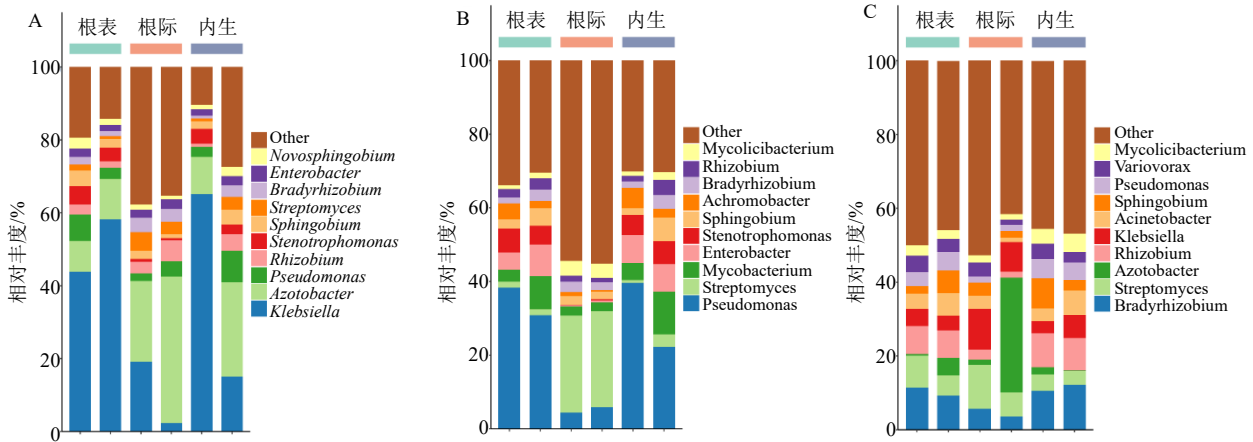


图4 北柴胡 (A)、三岛柴胡 (B) 和狭叶柴胡 (C) 根部不同取样部位细菌群落属水平分类学组成和分布

Fig. 4 Taxonomic composition and distribution of bacterial communities at genus level in different sampling compartments of roots from *B. chinense* (A), *B. falcatum* (B) and *B. scorzonrifolium* (C)

LEfSe 分析进一步揭示不同基因型的柴胡的特征微生物类群 (LDA>3) (图5)。北柴胡组共鉴定到25个特征类群,三岛柴胡组有17个,狭叶柴胡组则有20个。在北柴胡中,根际微生物以厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形菌门 (Proteobacteria) 为主,其它微生物中放线菌门占优势,包括微球菌目 (Micrococcales)、珀瑞芽孢杆菌属 *Peribacillus* 和立

克次氏体属 *Rickettsia* 等类群;根表仅富集明串珠菌属 *Leuconostoc*;其内生菌群除假肠膜明串珠菌 *Corallocooccus* 属于厚壁菌门外,其余均属于变形菌门 (图5)。三岛柴胡的根表富集了多个放线菌门和变形菌门类群,如丙酸杆菌目 (Propionibacteriales) 和亚硝化球菌属 *Nitrosococcus*;根际与内生菌群则均以变形菌门为主导 (图5)。狭叶柴胡根际富集了

蓝藻门 (Cyanobacteria) 和变形菌门中多个具固氮潜力的类群; 根表与内生部分仅分别富集了变形菌门中的短波单胞菌属 *Brevundimonas* 和放线菌门中的分枝杆菌目 (Mycobacteriales) (图 5)。

3.3 不同柴胡基因型样品的根部细菌群落多样性分析

Alpha 多样性分析表明, 微生物群落的丰富度和均匀度同时受到柴胡基因型和生态位的显著影响。在根表和内生环境中, 狭叶柴胡的 Shannon 多样性指数显著高于三岛柴胡和北柴胡 ($P < 0.05$), 群落丰富度 Chao1 指数表现出类似的基因型特异性分布模式 (图 6)。Beta 多样性分析揭示了柴胡微生物群落结构的显著差异, NMDS 与

PCoA 结果高度一致 (图 7-A、B)。PCoA 结果显示, PC1 解释了 33.93% 的方差, 主要反映了微生物生态位效应: 3 种柴胡的根表与内生菌群紧密聚集, 明显区别于各自的根际菌群, 形成独立的聚类簇。PC2 解释了 26.16% 的方差, 反映了不同柴胡基因型间的群落差异, 表明宿主基因型也对群落组成有显著影响 (图 7-B)。

3.4 根部差异细菌与柴胡皂苷相关分析

为揭示柴胡皂苷与 3 种基因型柴胡根部细菌微生物之间的潜在关系, 本研究构建了差异显著的细菌 OTUs 与 7 种柴胡皂苷含量的相关性网络 (图 8)。结果显示, 不同皂苷成分与微生物类群间呈现显著的簇状关联模式: *Pseudomonas*、*Achromobacter*

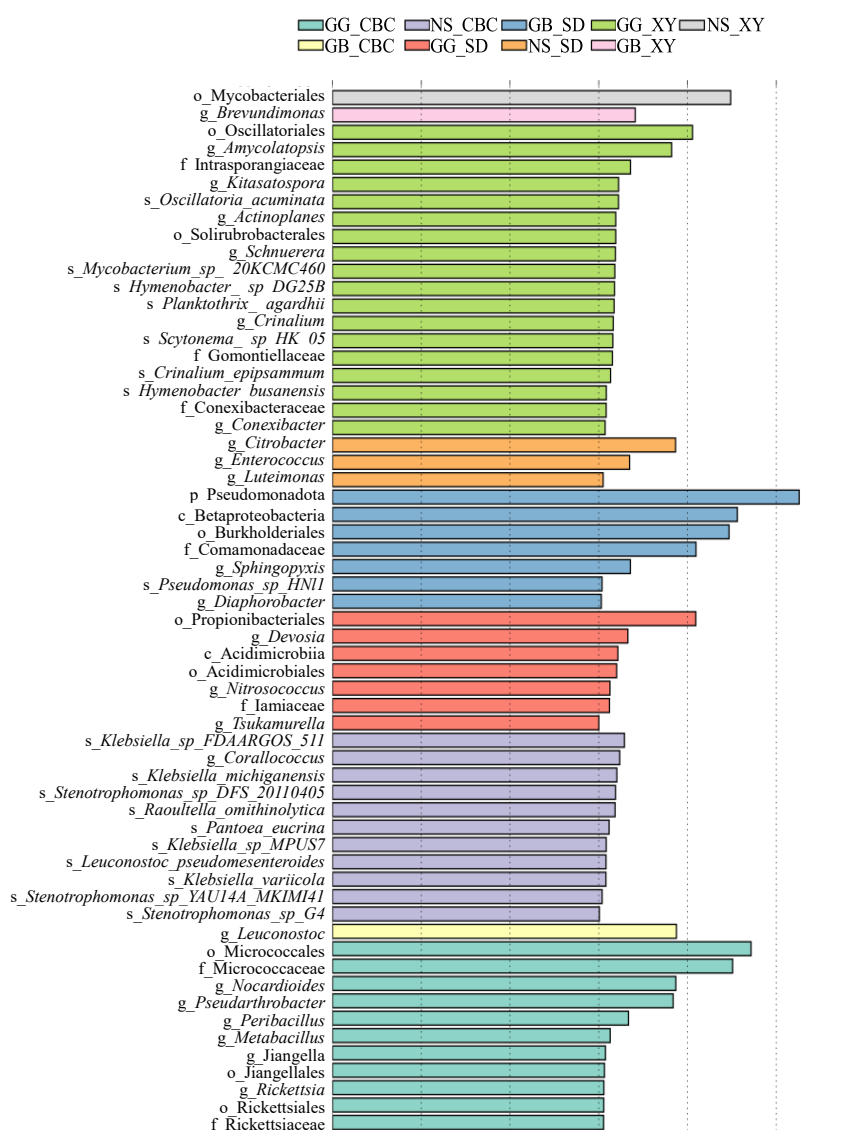


图 5 北柴胡、三岛柴胡和狭叶柴胡在根际、根表和内生细菌的 LDA scores

Fig. 5 LDA scores of rhizosphere, rhizoplane, and endosphytic bacteria in *B. chinense*, *B. falcatum* and *B. scorzonerifolium*

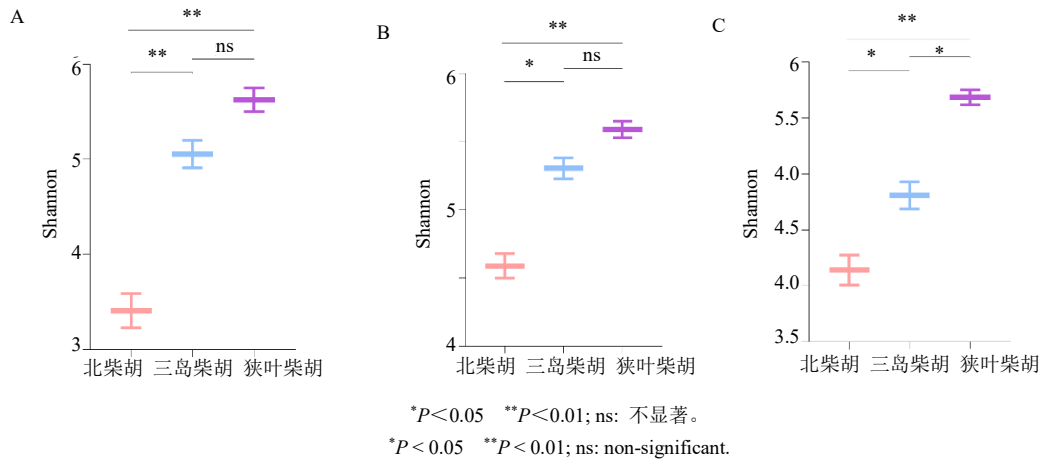


图 6 3种基因型柴胡根表 (A)、根际 (B) 和内生 (C) 微生物群落 Shannon 指数

Fig. 6 Shannon index of microbial communities in rhizoplane (A), rhizosphere (B), and endosphere (C) of three genotypes of *Bupleurum*

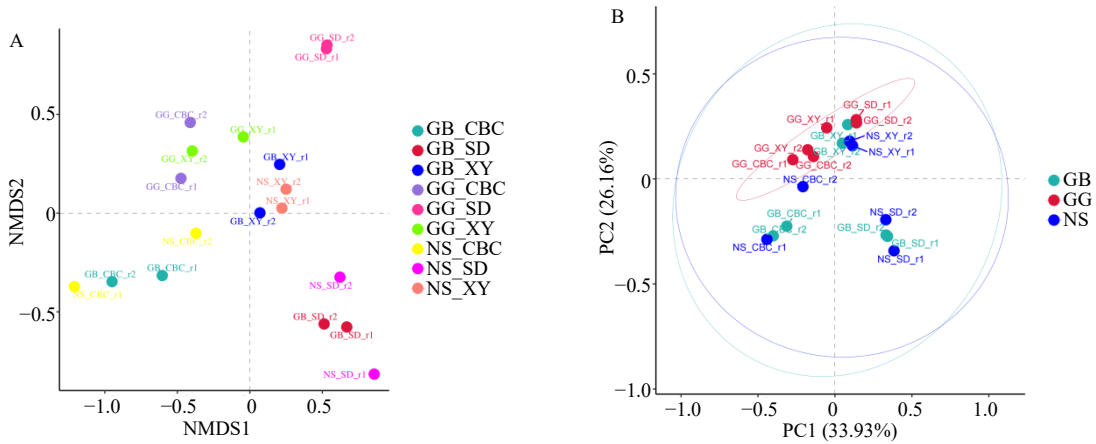


图 7 北柴胡、三岛柴胡和狭叶柴胡根际、根表和内生细菌群落 β -多样性的 NMDS (A) 和 PCoA (B) 可视化分析

Fig. 7 NMDS (A) and PCoA (B) visualization of β -diversity in bacterial communities from rhizosphere, rhizoplane, and endophytic compartments of *B. chinense*, *B. falcatum* and *B. scorzonerifolium*

和 *Bosea* 等革兰阴性菌与 SSA、SSB₂、SSB₄和 SSD 显著负相关 ($P < 0.01$, $r < -0.85$)。 *Klebsiella* sp. ($P < 0.01$, $r = 0.87 \sim 0.92$)、 *Cellulomonas* sp. ($P < 0.01$, $r = 0.89$) 和 *Azotobacter chroococcum* ($P < 0.01$, $r = 0.88$) 等菌群与 SSA、SSB₂、SSB₄和 SSD 显著正相关。其中菌株 *Streptomonospora nanhaiensis*、 *Brucella pseudogrignonensis*、 *Streptomyces* sp. 2114.2、 *Paenibacillus xylanexedens*、 *Shinella oryzae*、 *Pantoea dispersa* 和 *Bordetella* sp. 8 仅与 SSA 显著负相关 ($P < 0.01$, $r < -0.85$)。SSC 表现出独立的相关性特征: *Paraburkholderia phymatum*、 *Brevundimonas* sp. SGAir0440、 *Acidovorax* sp. 5MLIR、 *Mycobacterium* sp. Aquia 213 和 *Rhodococcus* sp. W8901 与 SSC 显著负相关 ($P < 0.05$, $r < -0.85$)。柴胡皂苷 E 和 SSF

呈现一致的的相关性和显著性, 与 *Pseudomonas azerbaijanoriensis*、 *Advenella kashmirensis*、 *Pseudomonas umsongensis*、 *Pseudomonas* sp. PP3、 *Pseudomonas* sp. S34、 *Pseudomonas* sp. WJP1、 *Ochrobactrum* sp. LM19、 *Brucella* sp. 2280、 *Sphingobacterium* sp. E70、 *Sphingobacterium* sp. UDSM-2020 和 *Acinetobacter lactucaae* 显著负相关 ($P < 0.01$, $r < -0.95$), 与 *Herbiconiux* sp. SALV-R1、 *Paraburkholderia terricola*、 *Planococcus rifietoensis*、 *Streptomyces* spp.、 *Bradyrhizobium* sp. CCBAU 53338 和 *Mesorhizobium* sp. M1E.F.Ca.ET.045.02.1.1 显著正相关 ($P < 0.01$, $r > 0.85$)。

4 讨论

适宜的环境因子与特定微生物能够通过调控

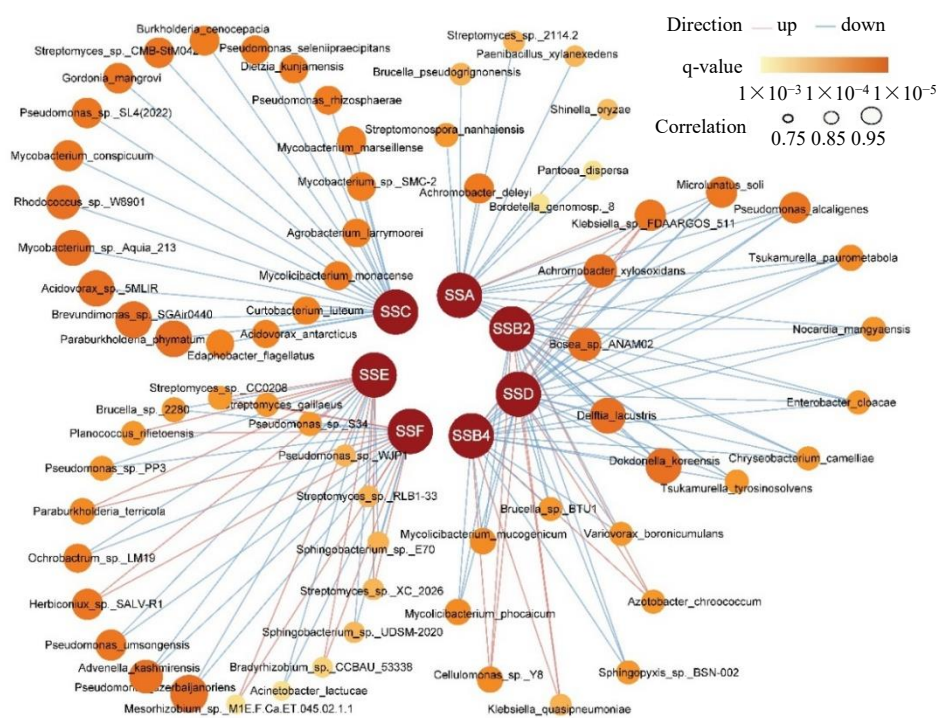


图 8 3 种柴胡基因型根部细菌微生物 (种) 与柴胡皂苷相关性分析

Fig. 8 Correlation analysis between root bacterial microorganisms (species) and saikosaponins in three *Bupleurum* genotypes

次生代谢产物生物合成途径中的关键酶与转录因子，促进柴胡皂苷积累^[37-41]。植物根际促生细菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) 能够产生植物生长素等激素，提高根系生物量^[42]。

本研究发现不同基因型柴胡的根部细菌在属水平的核心标志群上，不同生态位呈现显著区别，这一现象在其他植物系统中得到了验证。在拟南芥中，尽管不同土壤会导致同一基因型的根际微生物群落有所差异，但其根内菌群最终会收敛形成与基因型相关的核心结构；而在同一土壤中，不同近等基因系的拟南芥单株招募特有的内生菌群落^[43]。对玉米的大规模田间研究也表明，在相同田块中，不同基因型能够形成具有显著差异的根际微生物群落^[44]。这种差异可能与不同生态位的筛选压力有关：根际微生物可能受到土壤性质和根系沉积物的影响^[45]；根表和内生菌群可能受到柴胡根系更严格的免疫和代谢选择^[46]。

固氮菌属在北柴胡和狭叶柴胡的根际均为优势菌；甘蔗的根系中也稳定富集固氮菌属和克雷伯氏菌属等固氮菌^[47]。这可能与固氮菌能为宿主提供

氮源的功能密切相关^[48]。三岛柴胡根际由链孢菌属主导，可能依赖于放线菌来源的抗生素或其他次级代谢产物来保护根系健康^[49]，这种依赖特定菌群进行生物防治的模式，与抗细菌性枯萎病的番茄基因型特异富集生防菌 *Bacillus* 属，从而构建抗病根际微生物组的机制相似^[50]。北柴胡的根表和内生 2 个部位富集克雷伯氏菌属，显示出对单一、高效促生菌的依赖^[51]，这种模式与水稻类似：内生于水稻的 *Klebsiella* 菌株能够通过生物固氮、分泌生长素并抑制病原菌^[52]。三岛柴胡的根表和内生部位富集假单胞菌属，该类群以其根定殖能力、抗生素产生及诱导系统抗性而闻名^[53]。在小麦中，假单胞菌能够在小麦根内定殖，通过产生抗菌物质和诱导系统抗性，为小麦根系提供生物防护^[54]。值得注意的是，狭叶柴胡的根表和内生部位显著富集慢生根瘤菌属和根瘤菌属，这 2 个属是经典的根瘤共生固氮菌。尽管柴胡是非豆科植物，但这一发现说明狭叶柴胡可能与这些根瘤菌存在着一种新型的互利共生关系，它们可能作为内生固氮菌为宿主提供氮素^[55]。这一结果为揭示非豆科植物与根瘤菌之间潜在的

固氮互作机制提供了新的证据^[56]。

相关性网络鉴定出克雷伯氏菌 *Klebsiella* sp.、纤维单胞菌 *Cellulomonas* sp. 和圆褐固氮菌 *Azotobacter chroococcum* 与 SSA、SSB₂、SSB₄ 及 SSD 皂苷呈极显著正相关,可能推动了柴胡中柴胡皂苷的积累。克雷伯氏菌在桑树中能使糖类、氨基酸和有机酸等的含量显著上升,促进桑树根系初级代谢活动,为桑树生长提供更丰富的物质和能量基础^[57],该菌株在水稻中可分泌纤维素酶降解纤维素并调控自身固氮基因固氮,实现自我供能促进水稻根系生长^[58]。纤维单胞菌可通过降解有机物改善玉米的土壤微环境,促进玉米根系生长和养分吸收^[59]。圆褐固氮菌的接种能显著提高小麦、棉花和蔬菜等多种作物的产量,产生生长素、赤霉素、细胞分裂素等植物激素,直接刺激作物根系的发育和细胞的伸长与分裂,从而促进生长^[60]。

综上所述,宿主基因型不仅影响柴胡皂苷含量,更通过招募根际、根表与内生不同生态位的特异性细菌群落,间接调控柴胡皂苷的积累模式。本研究鉴定出 *Klebsiella* sp.、*Cellulomonas* sp. 和 *Azotobacter chroococcum* 关键菌株与柴胡皂苷含量显著相关。后续研究需通过植物-微生物共培养试验,直接验证这些核心菌株对柴胡皂苷合成的具体功能与分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 四部. 2025: 25
- [2] 苏占辉. 燕山地区中药材种植与加工技术 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2020: 266.
- [3] 张耕, 马威, 徐宏峰. 常用中药毒性研究进展及应用 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2013: 798.
- [4] 邓友平, 赵力强, 尹作鸿. 三岛柴胡的栽培技术 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(4): 207-208.
- [5] Moses T, Pollier J, Almagro L, et al. Combinatorial biosynthesis of saponins and saponins in *Saccharomyces cerevisiae* using a C-16 α hydroxylase from *Bupleurum falcatum* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(4): 1634-1639.
- [6] Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch P C, et al. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(3): 392-403.
- [7] Deng L M, Luo L F, Li Y, et al. Autotoxic ginsenoside stress induces changes in root exudates to recruit the beneficial *Burkholderia* strain B36 as revealed by transcriptomic and metabolomic approaches [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(11): 4536-4549.
- [8] Rodriguez R J, White J F Jr, Arnold A E, et al. Fungal endophytes: Diversity and functional roles [J]. *New Phytol*, 2009, 182(2): 314-330.
- [9] Lin Y L, Wang Z Z, Chen W J, et al. Paraboremia selaginellae enhances *Salvia miltiorrhiza* growth and cadmium tolerance via modulating root architecture and cadmium speciation in contaminated environments [J]. *Front Plant Sci*, 2025, 16: 1540126.
- [10] Han X, Li M, Yuan Q, et al. Advances in molecular biological research of *Angelica sinensis* [J]. *Medicinal Plant Biology*, 2023, 2(1): 16.
- [11] da Silva M V N, da Silva Alexandre A, Nunez C V. Endophytic species of the genus *Colletotrichum* as a source of bioactive metabolites: A review of their biotechnological potential [J]. *Microorganisms*, 2025, 13(8): 25-36.
- [12] Ma S Q, Chen Q R, Zheng Y F, et al. A tale for two roles: Root-secreted methyl ferulate inhibits *P. nicotianae* and enriches the rhizosphere *Bacillus* against black shank disease in tobacco [J]. *Microbiome*, 2025, 13(1): 33.
- [13] Guo S, Pan R B, Zhang Y, et al. Plant-microbe interactions influence plant performance via boosting beneficial root-endophytic bacteria [J]. *Environ Microbiome*, 2025, 20(1): 18.
- [14] 刘丽, 范娅, 冯海洋, 等. 生长时间和栽培模式对柴胡根际微生物群落结构的影响 [J]. 西南农业学报, 2022, 35(1): 50-57.
- [15] 刘丽, 曹海禄, 张全芳, 等. 不同产地野生柴胡根际土壤细菌群落分析 [J]. 分子植物育种, 2025, 23(22): 7641-7647.
- [16] 杜衍, 高德民, 孙燕, 等. 北柴胡内生真菌分离鉴定及其生防促生活性分析 [J]. 山东农业科学, 2023, 55(6): 85-94.
- [17] 申小营, 姜丹, 李萌, 等. 山西省不同地区柴胡根部可培养内生真菌的多样性分析 [J]. 微生物学杂志, 2023, 43(6): 18-34.
- [18] 罗勇. 柴胡品种川北柴 1 号的生长发育调节和根腐病防治研究 [D]. 绵阳: 西南科技大学, 2024.
- [19] Zhu W H, Lomsadze A, Borodovsky M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(12): e132.
- [20] 王金斌, 赵凯, 谭芙蓉, 等. 一种用于评价植物根系微生物群落多样性的土壤 DNA 提取方法 [J]. 江西农业学报, 2010, 22(10): 1-5.
- [21] 方长旬, 林文雄, 王清水, 等. 一种土壤微生物基因组

- DNA 和总 RNA 的提取方法: 中国 CN101974513B [P]. 2012-05-23.
- [22] 罗胜联, 陈亮, 陈觉梁, 等. 一种应用于群落分析的植物内生菌基因组总 DNA 提取及纯化方法: CN102174509B [P]. 2013-01-23.
- [23] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [24] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2 [J]. *Nat Meth*, 2012, 9(4): 357-359.
- [25] Wood D E, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2 [J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 257.
- [26] Lu J, Breitwieser F P, Thielen P, et al. Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data [J]. *PeerJ Comput Sci*, 2017, 3: e104.
- [27] Null R C T R, Team R, Null R C T, et al. R: A language and environment for statistical computing [J]. *Computing*, 2011, 1: 12-21.
- [28] Conway J R, Lex A, Gehlenborg N. UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties [J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(18): 2938-2940.
- [29] McMurdie P J, Holmes S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61217.
- [30] Villanueva R A M, Chen Z J. ggplot2: Elegant graphics for data analysis (2nd Ed.) [J]. *Meas Interdiscip Res Perspect*, 2019, 17(3): 160-167.
- [31] Wickham H, François R, Henry L, et al. dplyr: A grammar of data manipulation [EB/OL]. (2023-05-31) [2025-08-01]. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>.
- [32] Wickham H, François R, Müller K, et al. tibble: Simple data frames [EB/OL]. (2023-03-22) [2025-08-01]. <https://CRAN.R-project.org/package=tibble>.
- [33] Oksanen J, Simpson G L, Blanchet F G, et al. vegan: Community ecology package [EB/OL]. (2022-04-17) [2025-08-01]. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- [34] GraphPad Software. GraphPad Prism, version 9.5 [EB/OL]. (2021-02-07) [2025-9-15]. <https://www.graphpad-prism.cn/>.
- [35] Li G L, Tang Z S, Yang J, et al. Simultaneous determination of five components in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a comparative pharmacokinetic study in Baihe Zhimu Tang and Zhimu extract [J]. *Molecules*, 2015, 20(4): 6700-6714.
- [36] 赵一擎, 王艳伟, 杨元, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定乳核内消液中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁、柴胡皂苷 b₂ 和柴胡皂苷 k 的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(10): 1702-1708.
- [37] Deng W J, Du X W, Xiao Y K, et al. Strategies for increasing saikosaponins accumulation in *Bupleurum*: Insights from environmental and microbial regulation [J]. *Planta*, 2025, 262(2): 35.
- [38] Chen Q, Yu Y L, Zhang X, et al. The transcription factor *PjERF1* enhances the biosynthesis of triterpenoid saponins in *Panax japonicus* [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2021, 15(5): 597-607.
- [39] Mao Y P, Yang Y P, Li Y C, et al. Comparative transcriptome analysis provides insights into the molecular mechanism underlying the effect of MeJA treatment on the biosynthesis of saikosaponins in *Bupleurum chinense* DC [J]. *Life*, 2023, 13(2): 563.
- [40] 李思雨, 杨莉, 韩梅, 等. 不同施氮量对北柴胡质量及其土壤微生物生态影响 [J]. *中药材*, 2023, 46(1): 6-11.
- [41] Bi Y, Li M M, Wang Y, et al. Saikosaponins from *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. alleviates microglial pyroptosis in depression by binding and inhibiting P2X7 expression [J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156240.
- [42] Liu L, Cao H L, Geng Y N, et al. Response of soil microecology to different cropping practice under *Bupleurum chinense* cultivation [J]. *BMC Microbiol*, 2022, 22(1): 223.
- [43] Saleem M, Arshad M, Hussain S, et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, 34(10): 635-648.
- [44] Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota [J]. *Nature*, 2012, 488(7409): 91-95.
- [45] Peiffer J A, Spor A, Koren O, et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(16): 6548-6553.
- [46] Bai Y, Müller D B, Srinivas G, et al. Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota [J]. *Nature*, 2015, 528(7582): 364-369.
- [47] Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 807-838.
- [48] Yeoh Y K, Paungfoo-Lonhienne C, Dennis P G, et al. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application [J]. *Environ Microbiol*, 2016, 18(5): 1338-1351.
- [49] Kennedy I R, Pereg-Gerk L L, Wood C, et al. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association

- between *Azospirillum* and wheat [J]. *Plant Soil*, 1997, 194(1): 65-79.
- [50] Liu C, Yamamura H, Hayakawa M, *et al.* Plant growth-promoting and antimicrobial chloropyrroles from a rare actinomycete of the genus *Catellatospora* [J]. *J Antibiot*, 2022, 75(12): 655-661.
- [51] Kwak M J, Kong H G, Choi K, *et al.* Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato [J]. *Nat Biotechnol*, 2018. DOI:10.1038/nbt.4232.
- [52] Riggs P J, Chelius M K, Iniguez A L, *et al.* Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria [J]. *Aust J Plant Physiol*, 2001, 28(9): 829-836.
- [53] Kuang W Q, Chen W J, Lei C B, *et al.* Diversity of endophytic bacterial community in rice roots and their roles in phosphate solubilization and plant growth [J]. *Rhizosphere*, 2024, 30: 100877.
- [54] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2009, 63: 541-556.
- [55] Mavrodi O V, Mavrodi D V, Parejko J A, *et al.* Irrigation differentially impacts populations of indigenous antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere of wheat [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(9): 3214-3220.
- [56] Martínez-Hidalgo P, Hirsch A M. The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone [J]. *Phytobiomes J*, 2017, 1(2): 70-82.
- [57] Bhattacharjee R B, Singh A, Mukhopadhyay S N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: Prospects and challenges [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80(2): 199-209.
- [58] Ou T, Gao H Y, Jiang K, *et al.* Endophytic *Klebsiella aerogenes* HGG15 stimulates mulberry growth in hydro-fluctuation belt and the potential mechanisms as revealed by microbiome and metabolomics [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 978550.
- [59] Harindintwali J D, Zhou J L, Habimana I, *et al.* Biotechnological potential of cellulolytic nitrogen-fixing *Klebsiella* sp. C-3 isolated from paddy soil [J]. *Bioresour Technol Rep*, 2021, 13: 100624.
- [60] Sumbul A, Ali Ansari R, Rizvi R, *et al.* *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27(12): 3634-3640.

[责任编辑 时圣明]