

高寒草地紫花针茅拮抗内生细菌 263ZY2 的功能测定及其鉴定

敖远,冯疆蓉,杨成德*

(甘肃农业大学植物保护学院,甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室,甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】为获得优良的紫花针茅内生细菌菌株并探究其生物功能,同时丰富高寒地区生防菌资源。【方法】采用传统微生物分离培养法,从东祁连山高寒草地紫花针茅体内分离得到一株内生细菌 263ZY2,对其抑菌、分泌吲哚乙酸(IAA)、固氮和溶磷能力进行了测定,并通过 16S rDNA 序列分析及对形态学特征进行了鉴定。【结果】菌株 263ZY2 对马铃薯坏疽病菌 *Phoma foveata*、枯萎病菌 *Fusarium avenaceum* 和炭疽病菌 *Colletotrichum coccodes* 的拮抗能力均在 60% 以上,且具有良好的固氮能力;在含和不含色氨酸的 King 氏培养基中分泌 IAA 的量分别为 10.07 mg/L 和 12.32 mg/L;在 PKO 培养基中有明显的溶磷效果,其溶磷能力达 13.46 mg/L;在 NA 培养基平板上,菌落大小为 2 mm,圆形,边缘整齐,表面光滑,干燥,中间隆起,呈奶白色,菌体杆状,大小为 $1.45 \times 0.38 \sim 3.85 \times 0.78 \mu\text{m}$,革兰氏阳性。16S rDNA 序列在 GenBank 中登录号为 KF831365.1。【结论】结合形态特征和 16S rDNA 基因序列同源性分析,将 263ZY2 鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),且其具有良好的抑菌、固氮、溶磷和分泌 IAA 能力。

关键词:高寒草地;紫花针茅;内生细菌;抑菌;溶磷;分泌 IAA

中图分类号:S812 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2023)06-0038-06

DOI:10.13817/j.cnki.cyycp.2023.06.006



植物内生细菌是指生活史的一定阶段或全部阶段生活于植物各组织器官内部或细胞间隙,但又不引起任何症状的微生物,相关研究主要强调内生细菌与植物的互惠共生关系^[1],即寄主植物与内生细菌的协同进化^[2-3]。据报道,现已发现的植物内生细菌超过 80 个属^[4],广泛存在于各类植物中,且通过多种生物学功能如固氮、溶磷、分泌 IAA 等促生作用以及拮抗作用增强寄主植物的竞争力和对逆境的抵抗力^[5],菌株本身具有开发为生物农药或肥料的潜力^[6]。如 Yasmin Khatiri^[7]报道豆科植物体内的内生细菌绿脓假单胞杆菌(*Pseudomonas pyocyaneum*)对镰孢菌(*Fu-*

sarium spp.)具有较强的抑制作用;张爱梅等^[8]从沙棘根瘤内生细菌中筛选得到了对黄芪根腐病具有较好生防效果的菌株 TT14;Abdul Munif 等^[9]从马铃薯体内获得 564 株内生细菌,经测定绝大部分内生细菌为芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)和假单胞杆菌(*Pseudomonas* spp.),对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和枯萎病菌(*Fusarium* spp.)都有较好的拮抗作用。

紫花针茅(*Stipa purpurea*)为多年生草本植物,耐旱、耐寒,富含蛋白质和脂肪,是应用于畜牧业的优良饲用植物^[10],而在高寒等特殊生境条件下的针茅内生细菌不仅在种类和数量上表现出多样性,在功能上也表现出良好的抑菌和产生 IAA 能力^[11]。目前,关于高寒草地紫花针茅内生细菌及功能鉴定除本项目组外鲜有报道^[12-14]。本试验从高寒草地紫花针茅内生细菌中筛选获得一株促生拮抗菌,对其生物功能进行研究,并利用 16S rDNA 技术进行鉴定,以期高寒草地极端生境微生物资源的开发提供依据。

收稿日期:2022-05-29;**修回日期:**2022-06-13

基金项目:国家自然科学基金(31660148)

作者简介:敖远(1997-),男,内蒙古巴彦淖尔人,硕士研究生。E-mail:980026386@qq.com

*通信作者。E-mail:yangcd@gsau.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 供试内生细菌263ZY2分离自东祁连山高寒草地紫花针茅;供试病原菌马铃薯坏疽病菌(*Phoma foveata*)、马铃薯枯萎病菌(*Fusarium avenaceum*)及马铃薯炭疽病菌(*Colletotrichum coccodes*)均由甘肃农业大学植物保护学院植物病原细菌及细菌多样性实验室提供。

1.1.2 培养基 牛肉膏蛋白胨(NA)培养基^[15]用于内生细菌的纯化和保存;马铃薯葡萄糖(PDA)培养基^[16]用于植物病原真菌的培养和对峙试验;King氏培养基^[17]用于分泌IAA的定量测定;阿须贝无氮培养基^[18]用于固氮能力的测定;Pikovaskaia(PKO)培养基^[19]和蒙金娜培养基^[20]用于溶磷能力的测定。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株263ZY2抑菌能力测定 采用平板对峙法测定抑菌能力^[21]。以马铃薯坏疽病菌、马铃薯枯萎病菌及马铃薯炭疽病菌为指示菌对所分离的内生细菌进行拮抗能力测定。

1.2.2 菌株263ZY2分泌吲哚乙酸(IAA)能力测定

1) 定性测定 采用Salkowski比色法对内生细菌263ZY2进行定性测定^[22]。

2) 定量测定 采用纯3-IAA制作两组标准曲线。将经King氏培养液培养12 d的菌悬浮液和空白对照离心(4℃, 10 000 r/min, 10 min), 取上清液4 mL加等量比色液, 在黑暗中静置30 min, 取出后立即测定OD₅₃₀值, 3次重复, 以加入比色液的空白对照调零。根据标准曲线计算菌株分泌IAA的量。

1.2.3 菌株263ZY2固氮能力测定 将200 μL内生细菌菌悬液分别接种在阿须贝无氮培养基制备的平板和液体培养基内, 以接种无菌水为对照, 3次重复, 在28℃下培养, 观察其生长状况, 平板上出现菌落和试管内培养基变浑浊为阳性, 将阳性内生细菌继代培养, 10代后仍为阳性, 则认为该细菌具有较稳定的固氮能力^[23]。

1.2.4 菌株263ZY2溶磷能力测定 1) 定性测定 将内生细菌263ZY2接种于NA培养基上活化, 划线培养成单菌落, 再将单菌落点接于Pikovaskaia培养基(PKO)平板或蒙金娜培养基平板上, 每皿5个接种点,

3次重复, 置于28℃恒温培养箱, 培养7 d, 观察并测量菌株在培养基平板上形成的溶磷圈大小, 根据溶磷圈直径/菌落直径(D/d值)确定内生菌的溶磷能力^[24], 比值越大, 表明溶磷能力越好。

2) 定量测定 将内生细菌263ZY2接种于PKO(或蒙金娜)培养液中(装液量为50/150 mL), 3次重复, 以不接菌的基础培养液为对照。置于28℃、160 r/min控温摇床, 培养10 d, 取出离心(4℃, 10 000 r/min, 15 min), 取上清液用钼锑抗比色法测定有效磷增量^[24-25]。

1.2.5 菌株263ZY2鉴定 1) 形态观察 将263ZY2划线接种于NA培养基上, 培养18~24 h, 观察和描述菌落形态, 然后进行革兰氏染色^[26], 在显微镜下观察菌体形态特征。

2) 16S rDNA基因序列分析 采用上海生工生物工程有限公司提供的试剂盒提取DNA并检测, 经检测后, 对具有特异性DNA条带的提取物进行PCR扩增。采用通用引物1(5'-CCGGATCCAGAGTTTGATCATG GCTCAGCA-3')和引物2(5'-CGGGATCCTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')扩增16S rDNA基因序列, 扩增条件为: 94℃预变性5 min, 94℃变性1 min, 48℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 30个循环; 最后在72℃下延伸8 min, 终止反应。反应体系: 10×buffer 5 μL, MgCl₂(25 mmol/L) 3 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 1 μL, Primer1(10 μmol/L) 1 μL, Primer2(10 μmol/L) 1 μL, Taq polymerase(2 U/μL) 0.5 μL, Target DNA(10 ng/μL) 1.2 μL, dd H₂O定容至50 μL。将经检测具特异性条带的PCR扩增产物送上海生工生物工程有限公司测序, 所测序列与GenBank数据库中序列进行同源性比对, 并用Blast与数据库中的所有序列进行比较分析^[27], 选取若干相似性较高的序列, 采用Clustal(1.8)软件和Mega(7.0)软件构建系统发育树, 确定菌株的系统发育学地位。

2 结果与分析

2.1 菌株263ZY2抑菌能力测定

试验结果表明, 菌株263ZY2对马铃薯坏疽病菌、马铃薯枯萎病菌和马铃薯炭疽病菌均有拮抗能力(图

1), 抑菌率分别为 63.41%、82.39% 和 75.32%, 说明内生细菌 263ZY2 对 3 种病原菌均有较强的抑制作用, 可进一步应用于马铃薯病害的防治。

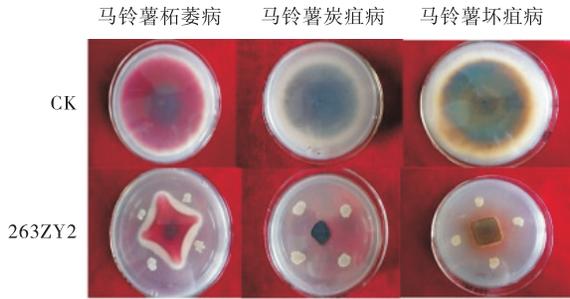


图1 菌株 263ZY2 对 3 种病原菌的拮抗作用

Fig. 1 The antagonistic effect of bacterial isolate strain 263ZY2 on three potato pathogenic fungi

2.2 菌株 263ZY2 分泌吲哚乙酸 (IAA) 能力测定

经 Salkowski 比色法初步测定, 263ZY2 加比色液变红(图 2), 表明内生细菌 263ZY2 具有分泌 IAA 的能力。定量试验结果表明, 263ZY2 在含和不含色氨酸的 King 氏培养基中产生 IAA 的量分别为 10.07 mg/L 和 12.32 mg/L(表 1), 说明具有良好的分泌 IAA 的能力, 且外源色氨酸对其合成 IAA 影响不大。

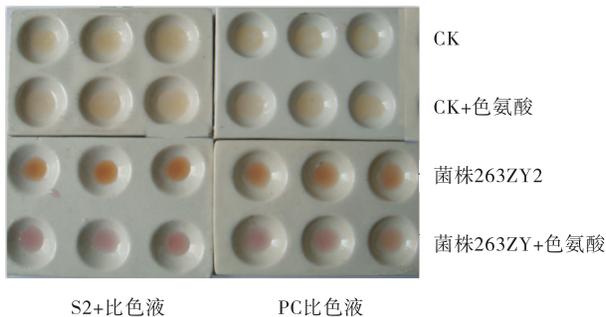


图2 菌株 263ZY2 分泌 IAA 定性测定结果

Fig. 2 Qualitative determination IAA secretion of the bacterial isolate strain 263ZY2

2.3 菌株 263ZY2 固氮能力测定

在无氮培养基上 10 代继代培养后仍可以生长, 表明内生细菌 263ZY2 具有稳定的固氮能力。

2.4 菌株 263ZY2 溶磷能力测定

经定性测定, 菌株 263ZY2 在蒙金娜培养基中的 D/d 值为 1.09, 在 PKO 中的 D/d 值为 1.08, 说明具有溶解有机磷和无机磷的能力。定量结果进一步表明, 菌株 263ZY2 在 PKO 中有效磷增量为 13.46 mg/L(表 1), 而在蒙金娜培养基中未检测到有效磷增量。

2.5 菌株 263ZY2 鉴定

2.5.1 形态观察 在 NA 培养基上, 菌株 263ZY2 菌

表 1 菌株 263ZY2 分泌 IAA 的定量测定和溶磷能力测定结果

Table 1 Quantitative determination of IAA secretion and ability to dissolve phosphorus of the bacterial isolate strain 263ZY2

	分泌 IAA 的量/ (mg·L ⁻¹)	溶磷能力	
		溶磷圈直 径/mm	有效磷增量/ (mg·L ⁻¹)
含色氨酸的 King 氏培养基	10.07	—	—
不含色氨酸的 King 氏培养基	12.32	—	—
PKO 培养基	—	2.18	13.46
蒙金娜培养基	—	2.16	未检测到

落大小为 2 mm, 圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 干燥, 中间隆起(图 3)。革兰氏染色, 镜检观察, 263ZY2 为革兰氏阳性菌, 菌体大小为 1.45×0.38 μm~3.85×0.78 μm(图 4)。



图3 菌株 263ZY2 菌落形态特征

Fig. 3 The colony morphological characteristics of bacterial isolate strain 263ZY2

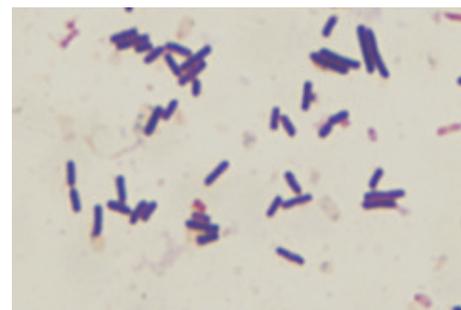


图4 菌株 263ZY2 的革兰氏染色结果

Fig. 4 The Gram staining reaction results of bacterial isolate strain 263ZY2

2.5.2 16S rDNA 序列分析 263ZY2 基因组 DNA 经检测可用作 16S rDNA PCR 扩增的模板。PCR 扩增产物送往上海生工生物工程有限公司测序后表明,

菌株 263ZY2 的 16S rDNA 基因序列有 1 456 bp, 在 GenBank 中的登录号为 KF831365. 1。经 Blast 相似性分析, 菌株 263ZY2 与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (KC352157)、芽孢杆菌 *Bacillus* sp. (KF482864. 1) 等

的相似度均达 99%; 从系统发育树来看, 263ZY2 与 KC352157 遗传距离最近(图 5)。因此, 结合形态学特征及 16S rDNA 序列分析, 鉴定菌株 263ZY2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

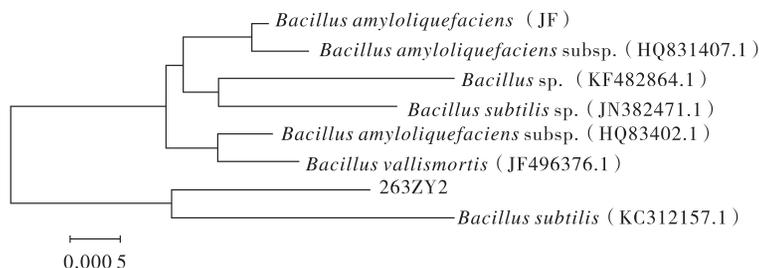


图 5 菌株 263ZY2 的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the bacterial strain strain 263ZY2

3 讨论

近年来, 由于农药在农业生产过程中的大量使用, 对环境造成了严重污染, 生态平衡遭到了严重破坏, 人畜健康受到了很大威胁, 这一系列问题促使生物防治的相关研究进一步发展^[28-30]。由于生物防治克服了化学防治易产生抗性、污染环境和危害人畜健康等缺点, 同时具有原料简单、选择性强和安全性高等优点, 其发展前景较为广阔^[31-32]。本试验从东祁连山高寒草地紫花针茅内生细菌中筛选获得一株内生拮抗菌 263ZY2, 经鉴定为枯草芽孢杆菌, 该菌来自于海拔较高, 年平均气温低等特殊生境条件下, 且表现出良好的抑菌、产 IAA 和溶磷等能力。目前, 芽孢杆菌是研究和利用较多的一类生防细菌^[33-34], 其对枯萎病(*Fusarium* spp.)^[35-36]均有较好防效, 本试验分离得到的内生细菌 263ZY2 对马铃薯枯萎病菌、炭疽病菌及坏疽病菌均有良好的抑制作用, 可进一步应用于马铃薯病害的防治。

内生细菌除具有拮抗能力外, 还可通过固氮、溶磷和产生 IAA 等作用增强宿主的抗病性和适应性。不同内生细菌分泌 IAA 的量差异较大, 如李鹏等^[37]、刘琳等^[38]和张英等^[39]报道的内生细菌分泌 IAA 的量为 0.212~114.8 mg/L, 本试验中 263ZY2 菌株分泌 IAA 的量在该范围; 王辰月等^[40]从东祁连山高寒草地线叶嵩草内分离到一株枯草芽孢杆菌, 对无机磷的溶磷能力为 28.14 mg/L, 高于 263ZY2 菌株的溶磷能力。263ZY2 菌株具有较好的溶磷能力, 但在蒙金娜培养基中未检测到有效磷增量, 可能与 263ZY2 菌株的自身特性和溶磷机制有关, 其相关机理有待进一步研究。

4 结论

紫花针茅内生细菌 263ZY2 是一株兼有抑菌、固氮、溶磷和分泌 IAA 等多种功能的促生拮抗菌, 具有开发为微生物制剂的潜力。该研究结果为高寒草地牧草内生细菌的开发利用提供了理论参考, 也为高寒草地微生物资源的开发提供了新的菌种资源。

参考文献:

- [1] Ithayakorn P, Saisamorn L, Vijaykrishna D, *et al.* A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(4): 579-590.
- [2] 何珊, 田志宏. 植物内生细菌生物学效应的研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2020, 26(4): 20-23.
- [3] 方珍娟, 张晓霞, 马立安. 植物内生菌研究进展[J]. *长江大学学报(自科版)*, 2018, 15(10): 41-45.
- [4] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, *et al.* Endophytic bacteria and their potential applications[J]. *Critical Reviews in Plant sciences*, 2002, 21: 583.
- [5] 宋薇薇, 朱辉, 余凤玉, 等. 植物内生菌及其对植物病害的防治作用综述[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(6): 12-16.
- [6] Backman P A, Sikora R A. Endophytes: An emerging tool for biological control[J]. *Biological Control*, 2008, 46(1): 1-3.
- [7] Khatiri Y, Bahador N, Pordeli H. A study on isolated endophytic bacteria from *Glycine* sp. and their role on control of some plant pathogenic fungi[J]. *Biological Journal of Microorganism*, 2013, 2(5): 51-60.
- [8] 张爱梅, 李曦冉, 郭保民, 等. 黄芪根腐病生防菌株的筛选鉴定及其防效评价[J]. *西北农业学报*, 2021, 30(12):

- 1905—1914.
- [9] Munif A, Hallmann J, Sikora R A. Isolation of endophytic bacteria from tomato and their control activities against fungal diseases[J], *Microbiology*, 2012, 6(4): 148—156.
- [10] 赵书元. 内蒙古针茅属(*Stipa* L.) 饲用植物的初步研究[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(Z1): 238—243.
- [11] 杨成德, 崔月贞, 冯中红, 等. 内生枯草芽孢杆菌 265ZY4 对温度和紫外光胁迫下紫花针茅生化特征的影响[J]. *草业学报*, 2019, 28(6): 101—108.
- [12] 王玉琴, 薛莉, 杨成德, 等. 高寒草地针茅内生菌 265ZY3 的生物学特性研究及其鉴定[J]. *草地学报*, 2014, 22(4): 822—827.
- [13] 王玉琴, 杨成德, 王颖, 等. 针茅内生细菌菌株 265ZY4 的鉴定及其生物学功能[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(1): 101—109.
- [14] 崔月贞, 杨小利, 杨成德, 等. 拮抗马铃薯晚疫病病菌的高寒草地牧草内生细菌的鉴定及其生物学功能测定[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(5): 789—795.
- [15] 满百膺, 陈秀蓉, 李振东, 高寒牧草内生细菌分离培养条件的优化[J]. *草原与草坪*, 2008(5): 27—30.
- [16] 方中达. *植病研究法* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. *常见细菌系统鉴定手册* [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [18] 沈萍, 范秀容, 李广武. *微生物学实验* [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [19] 高亚敏, 姚拓, 李海云, 等. 高寒草甸嵩草、珠芽蓼根际优良植物根际促生菌的分离筛选及促生特性研究[J]. *草业学报*, 2019, 28(11): 114—123.
- [20] 张黎丽, 张阁, 王欣艺, 等. 土壤中降解有机磷微生物的筛选[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 50(5): 774—777.
- [21] 李枢妍, 阳黎恒, 肖雪婷, 等. 一株香蕉枯萎病拮抗菌的筛选、鉴定及生防效果研究[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(7): 1826—1834.
- [22] Glicmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 793—796.
- [23] 白洁, 姚拓, 雷杨, 等. 欧李(*Cerasus humilis*) 内生固氮细菌筛选、鉴定及特性研究[J]. *草地学报*, 2022, 30(4): 859—866.
- [24] Molla M, Microbial mineralization of organic phosphate in soil[J]. *Plant and soil*, 1991, 78(3): 56—60.
- [25] 南京农学院. *土壤农化分析* [M]. 北京: 农业出版社, 1980.
- [26] 谭啸, 章熙东. 革兰氏染色法观察与区分细菌[J]. *生物学教学*, 2019, 44(7): 71—72.
- [27] 李鹏, 陈秀蓉, 李振东, 等. 珠芽蓼溶磷内生细菌 Z14 的鉴定[J]. *甘肃农业大学学报*, 2009, 44(6): 85—87.
- [28] 王永生. 生物防治技术的意义与应用[J]. *农业工程技术*, 2021, 41(14): 49—50.
- [29] 暴可心, 罗立平, 王小艺, 等. 害虫生物防治综合效益评价方法[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(1): 38—51.
- [30] 梅小飞, 王智荣, 阚建全. 荧光假单胞菌防治果蔬病害的研究进展[J]. *微生物学报*, 2019, 59(11): 2069—2082.
- [31] 蔡奕. 我国植物病害生物防治的现状与发展策略[J]. *科技视界*, 2018(20): 149—150.
- [32] 刘晓萌, 苏振贺, 宣立峰, 等. 枯草芽孢杆菌 HMB19198 在番茄叶片上定殖能力的分子检测[J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(2): 487—494.
- [33] Thamizh V R, Joon Y Y, Hee L S, *et. al*, Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion [J], *Journal of microbiology*, 2010, 48(5): 559—565.
- [34] 李振东, 陈秀蓉, 李鹏. 紫花针茅内生细菌的分离与鉴定[J]. *草原与草坪*, 2011, 31(1): 8—12.
- [35] 孙正祥, 龙欣钰, 孟祥佳, 等. 枯草芽孢杆菌 YZU—S149 的分离鉴定及对西瓜枯萎病的生防作用[J]. *长江大学学报(自然科学版)*, 2021, 18(4): 114—120.
- [36] 张萧萧, 张心青, 杨传伦, 等. 枯草芽孢杆菌突变株 YJY19—01 抑菌效果及对番茄枯萎病防效的初步研究[J]. *山东农业科学*, 2021, 53(6): 84—88.
- [37] 李鹏, 陈秀蓉, 李振东, 等. 乳白香青分泌吡啶乙酸内生细菌的 16S rDNA 鉴定[J]. *草原与草坪*, 2009, (2): 6—9+13.
- [38] 刘琳, 孙磊, 张瑞英, 等. 春兰根中可分泌吡啶乙酸的共生细菌多样性[J]. *生物多样性*, 2010, 18(2): 195—220.
- [39] 张英, 朱颖, 姚拓, 等. 分离自牧草根际四株促生菌株 (PGPR) 互作效应研究[J]. *草业学报*, 2013, 22(1): 27—37.
- [40] 王辰月, 陈秀蓉, 杨成德, 等. 线叶嵩草内生细菌的鉴定及溶磷效果的初步研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2011, 46(3): 99—103.

Function determination and identification of endophytic bacteria 263ZY2 from *Stipa purpurea* in Alpine Grassland

AO Yuan, FENG Jiang-rong, YANG Cheng-de*

(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract: 【Objective】 The study was made to obtain excellent endophytic bacteria strains of *Stipa purpurea* and explore their biological functions, and to enrich biocontrol bacteria resources in alpine areas. 【Method】 Endophytic bacterial strain which named 263ZY2 was isolated from *Stipa purpurea* in alpine grassland in Eastern Qilian Mountains by using traditional microbial culture method. Its functions of anti-pathogenic fungi, secretion of IAA, nitrogen-fixing and phosphate-solubility were tested. The identification was made by 16S rDNA sequence analysis and morphological characteristics. 【Result】 The result showed that 263ZY2 inhibited *Phoma foveata*, *Fusarium avenaceum* and *Colletotrichum coccodes*, and the inhibition rates were all above 60%. Besides, 263ZY2 also possessed strong abilities of nitrogen fixation. In the medium containing tryptophan or not, secretion of IAA by 263ZY2 was 10.07 mg/L and 12.32 mg/L respectively. Strain 263ZY2 had obvious phosphorus dissolving effect in PKO medium, and its phosphorus dissolving ability reached 13.46 mg/L. When strain 263ZY2 was placed on NA medium plate, the colony size was 2 mm, round, the edges were neat, the surface was smooth, dry, the middle was raised, the cell was milky white, the cell was rod shaped, the size was $1.45 \times 0.38 \sim 3.85 \times 0.78 \mu\text{m}$, and the strain was Gram positive. The 16S rDNA sequence had the entry number KF831365 in GenBank. 【Conclusion】 Based on morphological characteristics and sequence homology analysis of 16S rDNA, 263ZY2 has been identified as *Bacillus subtilis*. It has good bacteriostasis, nitrogen fixation, phosphorus solubility and IAA secretion ability.

Key words: alpine grassland; *Stipa purpurea*; endophytic bacteria; bacteriostasis; phosphorus solubility; secretion of IAA