

对叶榕榕果内生细菌分离鉴定及抑菌活性的研究

朱丽丽¹ 陈吉岳^{2*} 熊智¹ 刘绍雄¹ 张静宜¹ 田荣荣¹

(1. 西南林业大学 云南 昆明 650233)

(2. 中国科学院西双版纳热带植物园 云南 昆明 650233)

摘 要:【目的】为植物-内生细菌的生态关系研究, 以及植物内生细菌资源的利用提供一定的依据。【方法】采用微生物学传统分离培养的方法从对叶榕果实中分离到内生细菌 54 株, 通过限制性酶切分析(ARDRA)共有 16 个操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs), 对 16 株代表菌株 16S rDNA 序列系统发育分析。【结果】16 个菌株都找到了与其相似性最高的菌株, 相似性达到 95%–100%。其中 6 株为芽孢杆菌 *Bacillus* 属, 为对叶榕果实内生细菌优势菌属; 3 株为 *Staphylococcus* 属, 2 株为 *Pseudomonas* 属, 1 株为 *Serratia* 属, 1 株为非培养细菌的同源菌, 1 株为 *Kocuria* 属, 1 株为 *Delftia* 属, 还有 1 株为 *Acinetobacter* 属。【结论】这 16 株内生菌在系统发育树中明显聚为两大支; 在参与抑菌试验的 14 株内生菌中, 有 13 株对受试菌有不同程度的拮抗作用。尤其是其中的芽孢菌属的 Swx15 和不动杆菌属的 Swx25 菌株, 抑菌作用较强, 且有较广的抑菌谱性。

关键词: 对叶榕, 内生细菌, 分离, 鉴定, 系统发育分析, 抑菌

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31000243); 云南省西南林业大学生物技术特色专业建设项目(No. 50116001); 西南林业大学大型仪器设备共享平台资助项目

*通讯作者: Tel: 86-871-5167696; 信箱: chenjy@xtbg.ac.cn

收稿日期: 2013-02-01; 接受日期: 2013-04-15

Isolation, identification and the inhibition effect endophytic bacteria in *Focus hispida* fruit

ZHU Li-Li¹ CHEN Ji-Yue^{2*} XIONG Zhi¹ LIU Shao-Xiong¹
ZHANG Jing-Yi¹ TIAN Rong-Rong¹

(1. Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650233, China)
(2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences,
Kunming, Yunnan 650233, China)

Abstract: [Objective] To provide a certain basis, for the relationship between the ecology of endophytic bacteria and plant as well as the resources of endophytic bacteria. **[Methods]** Use traditional cultural methods isolated 54 endophytic bacteria from the fruit of *Focus hispida* through the restriction enzyme analysis (ARDRA) told have 16 operational taxonomic units, 16S rDNA sequence system development analysis on 16 representative strains. **[Results]** The results showed that 16 strains were found the highest similarity of strains from GenBank, the identities are from 95% to 100%. Six endophytic bacteria were classed to *Bacillus* genera, the identities are from 95% to 98%, was the dominant genus among the endophytic bacteria in *Focus hispida* fruit. Three were classed to *Staphylococcus* genera, one were classed to *Pseudomonas* genus, one was similar to uncultured bacterium, one were classed to *Kocuria* genus, one were classed to *Delftia* genus. **[Conclusion]** The phylogenetic tree showed that the 16 endophytic bacteria clustered two main branches. The inhibition experiment of 14 endophytes bacteria, 13 strains have different degrees of inhibition effect. Especially the swx15 of *Bacillus* genus and the swx25 of *Acinetobacter* genus had the biggest inhibition spectrum.

Keywords: *Focus hispida*, Endophytic bacteria, Isolation, Identification, Phylogenetic analysis, Inhibition

对叶榕(*Focus hispida* L.)为桑科榕属植物,雌雄异株,灌木或小乔木,隐头果少有腋生或生于落叶枝上,多数生于老茎发出的下垂无叶枝上。分布在广东、海南、广西、云南及贵州,国外分布在印度、泰国、马来西亚等地^[1]。在西双版纳地区,该榕树主要分布在季节性雨林遭破坏后的荒地、城镇、村庄旁和房屋前后,是热带地区典型的先锋种^[2]。其根、叶、树皮为傣族、基诺族常用药,味甘,性凉,有清热祛湿、消积化

痰、行气散瘀等功效,主要用于痢疾、结膜炎、感冒、支气管炎、腹胀疼痛、风湿痛、跌打劳伤等的治疗^[3]。

植物内生菌是指在其生活史的一定阶段生活在活体植物组织内,不易受环境的影响,可在植株体内定殖和传导,而不引起植物明显病害与植物建立和谐联合关系的微生物,主要包括真菌、细菌和放线菌^[4-5]。健康植物体内存在大量的内生细菌,具有丰富的物种多样性和生态分布多样

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

性, 目前从经济作物中发现的拮抗内生细菌已超过 745 种隶属于 8 个属^[6]。某些内生细菌可通过产生抗生素、水解酶类等抗菌活性物质在植株体内直接或间接影响植物的生理作用, 诱导宿主植物的抗性反应长期发挥生防作用, 因此受到国内外研究者的广泛重视^[7-8]。近年来, 国内外从多种植物内生菌中筛选出具有防病或诱导抗病作用的内生菌, 例如石晶盈等^[9]从番木瓜里分离出对 10 种病原菌具有较强拮抗活性的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*); 陈敏等^[10]从黄瓜体内分离到 1 株内生拮抗菌株 HE-1 对黄瓜青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)有较好的抗菌效果。然而国内外有关榕树内生菌的研究比较少, 仅有 Suryanarayanan 和 Vijaykrishna 调查了印度孟加拉榕(*Ficus benghalensis* L.)的叶片、叶柄、空气中的气生根和靠近土壤的气生根等不同组织上内生真菌的多样性^[11]; 苏印泉等对无花果(*Ficus carica*)根、茎、叶内生真菌进行了分离、鉴定^[12], 张弘驰等(2007)对这些内生真菌的抗病原真菌活性进行了筛选试验^[13]。关于榕果内生细菌的研究尚未见报道。本研究通过对对叶榕榕果内生细菌进行分离, 并对具有广谱抗菌活性的菌株进行初步筛选, 从而为植物-内生细菌的生态关系研究以及植物内生细菌资源的利用提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 对叶榕榕果采自云南省西双版纳热带植物园, 采样时间为 2011 年 11 月中旬。在榕树园内, 选取无明显植物病害的对叶榕树 15 棵并采集健康的榕果。采集后马上回实验室进行分离。

1.1.2 供试菌株: 详见表 1。

1.1.3 分离培养基(g/L): 改良牛肉膏蛋白胨培养

表 1 供试病原菌及其来源		
Table 1 The tested pathogenies and their source		
编号	病原菌	来源
Number	Pathogenic bacteria	Source
B1	白菜黑斑病	云南农业大学
B2	稻瘟病	云南农业大学
B3	柑橘青霉菌	云南农业大学
B4	黄瓜枯萎病	云南农业大学
B5	番茄早疫病	云南农业大学
B6	梨黑星病	云南农业大学
B7	番茄灰霉病	云南农业大学

基(NA)。1 000 mL NA 培养基中含 20 mL 无菌对叶榕榕果水浸液和 5 万单位制霉菌素。对叶榕榕果水浸液的制备方法为: 取健康榕果打碎后, 称取 80 g 加入 200 mL 水, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 后用无菌纱布过滤。

1.1.4 主要试剂和仪器: 蛋白胨、NaCl、牛肉膏、琼脂、葡萄糖、细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(溶液型)、 $2 \times Taq$ PCR MasterMix 等, 购自昆明硕阳科技有限公司; 16S 通用引物(27f-1492r), 上海生物工程技术服务有限公司合成。凝胶成像系统为 T2A, PCR 仪为 MJ Mini, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 内生细菌的分离与纯化

将新鲜、无虫害的隐头果用肥皂水刷洗, 清水冲洗干净, 沥干水分后用 75%酒精漂洗 30 s, 无菌水冲洗 3-4 次, 0.1%升汞浸泡 10 min, 无菌水冲洗 6-7 次, 以去掉表面消毒剂。加无菌石英砂研磨, 梯度稀释至 10^{-3} , 每一稀释梯度采用稀释分离法^[14]涂布 10 个分离平板。每个样品都取最后一次无菌水洗液涂于相应平板上, 以检测表面消毒是否彻底。定期观察分离平板, 挑取分离纯化好的单菌落于试管斜面中存于 4 °C 备用。

1.3 形态观察

在光学显微镜下观察个体形态并测量菌体大小; 参照文献^[15]进行革兰氏染色和芽孢染色方

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

法进行形态结构观察,以《伯杰氏细菌鉴定手册》及《常见细菌系统鉴定手册》为依据对菌株进行初步鉴定。

1.4 DNA 提取和 16S rDNA 扩增

用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(溶液型),提取菌株基因组 DNA 后,PCR 扩增 16S rDNA。细菌引物 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAGAACGAACGCT-3'和 1492r: 5'-TACGGCT ACCTTGTTACGACTTCACCCC-3'^[16]。PCR 采用 50 μ L 反应体系: 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 25 μ L, Each primer (10 μ mol/L) 2.5 μ L, DNA (20 mg/L) 1 μ L, 补足灭菌双蒸水至 50 μ L。16S rDNA-PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 30 min。PCR 产物检测: 经质量分数为 1.0%琼脂糖凝胶电泳后 4S 核酸染料染色观察,用凝胶成像仪照相。

1.5 核糖体 DNA 扩增片段限制性酶切分析 (ARDRA)

采用 *Hinf* 和 *Taq* 对上述的 16S rDNA 进行酶切,其反应体系为: *Hinf* 15 U, *Taq* 15 U, 10 $\times$ Taq Basal buffer 2 μ L, 0.1% BSA 2 μ L, DNA 10 μ L (≤ 1 μ g), 灭菌水补充到 20 μ L。37 $^{\circ}$ C 反应 2–3 h 后再于 65 $^{\circ}$ C 反应 2 h,用 4S 染料染色,用浓度为 1.5%的琼脂糖凝胶分离酶切片段。根据

ARDRA 酶切图谱的差异进行分析聚类,划分为不同的操作分类单元(Operation taxonomic unit, OTU)。并随机选取每个 OTU 中的代表性菌株进行 16S rDNA 扩增,PCR 产物送往 Invitrogen 公司测序。

1.6 抑菌试验

采用抑菌圈法^[17]对 7 种病原菌进行拮抗作用试验。配制供试病原菌悬浮液,取 2 mL 的病原菌悬浮液,分别加入到约 45 $^{\circ}$ C 18 mL 的 PDA 加牛肉浸膏和蛋白胨培养基中,混合均匀后倒成含供试病原菌的培养基平板,在平板中央移入一块直径为 5 mm 的内生细菌菌苔,在 28 $^{\circ}$ C 培养 3 d,测量抑菌圈直径。

1.7 数据处理

根据测序结果,从 GenBank 数据库中,利用 BLAST 软件搜索并选取同源性较高的序列,用 MEGA 4.1 中的 Maxmum Composite Likelihood 模式分析和构建系统发育树^[18]。

2 结果与分析

2.1 对叶榕榕果内生细菌的分离及初步鉴定

用微生物传统分离方法从对叶榕果实中分离得到内生细菌 54 株,其中除个别菌株为革兰氏阴性外,皆为革兰氏阳性;绝大部分为短杆状,个别为杆状或球杆状(图 1)。

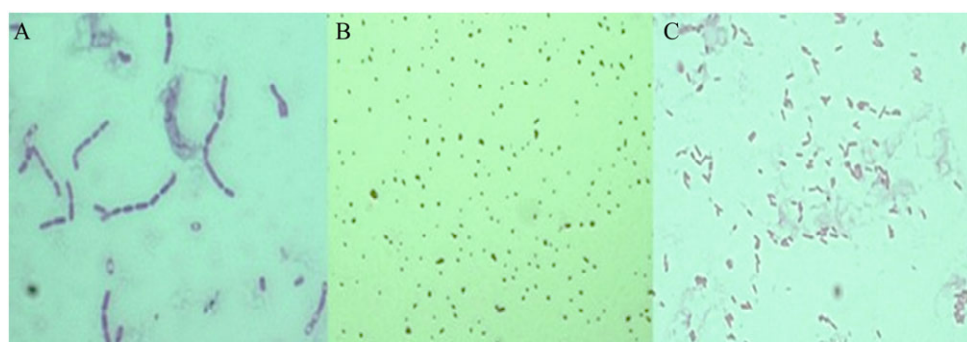


图 1 部分内生细菌革兰氏染色显微照片

Fig. 1 Microgram of part endophytic bacteria by Gram stain

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

2.2 内生细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增及限制性酶切分析(ARDRA)

根据菌株间形态学上的差异,挑选出34株形态不同的内生细菌,以其基因组DNA为模板,用引物27f和1492r,进行16S rDNA-PCR扩增。扩增出约1400 bp大小的条带(图2)。用限制性内切酶对PCR扩增产物进行酶切(图3),根据酶切图谱的差异进行聚类,发现分离出的54株菌共有16个特有的ARDRA类型。初步说明了对叶榕榕果内生细菌群落具有丰富的多样性。

2.3 内生细菌系统发育分析

利用NCBI中的BLAST软件对测序结果进行同源性比对搜索,结果54株菌株均找到了其相似性最高的菌株,其中22株属于*Bacillus*属,

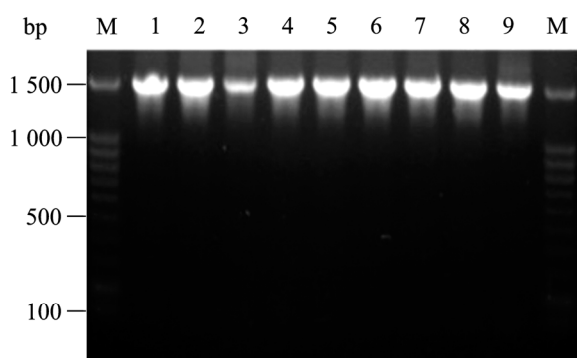


图2 部分内生细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增结果
Fig. 2 The results of 16S rDNA of some endophytic bacteria by PCR

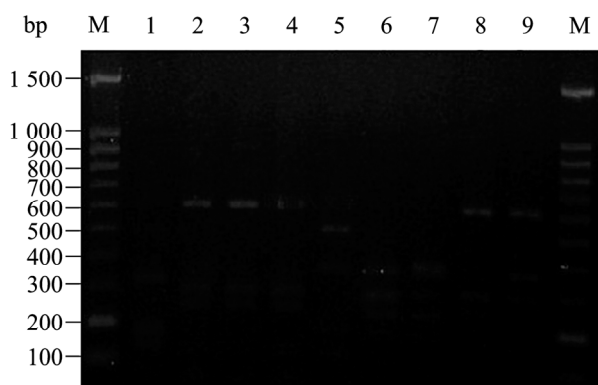


图3 部分内生细菌的 ARDRA 结果
Fig. 3 The results of ARDRA of some endophytic bacteria

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

其序列分别与该属中2个种的典型菌株的序列相似性最高,其相似度为95%和100%,所以此6株菌可能分属于*Bacillus*属中的2个种;有16株属于*Staphylococcus*属,其序列分别与该属中2个种的典型菌株的相似性达到了为99%和100%,故此3株菌可能属于该属中的2个种;5株属于*Acinetobacter*属,且与*Acinetobacter baumannii*的序列相似性为100%,可能属于该种;4株属于*Pseudomonas*属,其序列分别与该属中2个种的典型菌株的相似度均为100%,因此这4株菌可能为该属的2个种;2株属于*Serratia*属,与*Serratia marcescens*的序列相似度达到了100%,可能属于该种;1株为非培养细菌的同源菌,相似度为99%;还有2株属于*Kocuria*属,其相似度与该属中的某一种菌的相似性达到了为100%;2株为*Delftia*属,其相似度与该属中的某一种菌的相似度达到了100%。所以,榕果中分离出的54株代表菌株可分属于7个属16个种,其中有5个类型占了总菌株数的55.7%,其代表菌株分别为Swx1、Swx4、Swx10、Swx15和Swx25(表2)。

2.4 内生细菌系统发育树的建立

对16株内生细菌及其同源菌株的16S rDNA序列,利用MEGA 4.1^[19]构建出系统发育树(图4): Swx13与*Bacillus cereus*及*Bacillus thuringiensis*聚在一起,亲缘关系较近; Swx4与*Bacillus megaterium*聚在一起,亲缘关系较近; Swx8与*Bacillus tequilensis*亲缘关系较近; Swx31与*Bacillus subtilis*及*Bacillus amyloliquefaciens*亲缘关系较近; Swx10与*Staphylococcus saprophyticus*亲缘关系较近; Swx1和Swx18与*Staphylococcus* sp.及*Staphylococcus sciuri*亲缘关系较近; Swx26与*Kocuria* sp.亲缘关系较近; Swx23与Uncultured bacterium亲缘关系较近; Swx34与*Delftia* sp.亲缘关系较近; Swx5和Swx24与*Pseudomonas argentinensis*及*Pseudomonas fulva*亲缘关系较近;

表 2 16S rDNA 扩增产物序列相似性比对
Table 2 Comparison of the 16S rDNA sequence identity

代表菌株 Representative strain	最相似菌株 The closest NCBI match	相似性 Similarity (%)	菌株数 Number of strains	比例 Proportion (%)
Swx1	<i>Staphylococcus</i> sp. (AB689746.1)	99	5	9.3
Swx4	<i>Bacillus megaterium</i> (JX885486.1)	100	6	11.1
Swx5	<i>Pseudomonas fulva</i> (JN257136.1)	100	2	3.7
Swx6	<i>Bacillus cereus</i> (GQ329658.1))	95	3	5.5
Swx8	<i>Bacillus tequilensis</i> (JQ904626.1)	100	3	5.5
Swx10	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (JN644598.1)	100	9	16.7
Swx13	<i>Bacillus thuringiensis</i> (JX456174.1)	100	2	3.7
Swx15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (JX519215.1)	100	5	9.3
Swx18	<i>Staphylococcus sciuri</i> (JX134627.1)	100	2	3.7
Swx23	Uncultured bacterium clone (GQ016558.1)	99	1	1.8
Swx24	<i>Pseudomonas argentinensis</i> (JQ770188.1)	100	2	3.7
Swx25	<i>Acinetobacter baumannii</i> (HQ632003.1)	100	5	9.3
Swx26	<i>Kocuria</i> sp. (HM045839.1)	100	2	3.7
Swx31	<i>Bacillus subtilis</i> (JX524224.1)	100	3	5.5
Swx32	<i>Serratia marcescens</i> (JQ308608.1)	100	2	3.7
Swx34	<i>Delftia</i> sp. (HQ327477.1)	100	2	3.7

Swx25 和 *Acinetobacter baumannii* 亲缘关系较近; Swx32 与 *Serratia marcescens* 聚在一起, 亲缘关系较近; Swx6 和 Swx15 聚在一起, 亲缘关系较近。

2.5 内生细菌抑菌谱的测定

对叶榕榕果内生细菌抑菌谱测定结果见表 3。对 14 株对叶榕榕果内生细菌用于抑菌谱的测定。供试内生细菌除 Swx26 菌株对这 7 种病原菌都没有抑制作用外, 其余的 13 株内生菌对于不同的病原菌表现出了不同的抑制作用, 其中 Swx15 和 Swx25 广谱性最大, 可以抑制 6 种病原菌; Swx5 和 Swx8 可以抑制 5 种病原菌; Swx1、Swx4 及 Swx10 可以抑制 4 种病原菌; Swx24、Swx31 及 Swx6 可以抑制 3 种病原菌; Swx13 和 Swx34 可以抑制 2 种病原菌; Swx18 的广谱性最低只能抑制 1 种病原菌。

3 结论与讨论

通过传统的微生物学分离培养方法从西双版纳热带植物园对叶榕的果实中共分离到 54 株内生细菌, 其中 22 株为 *Bacillus* 属, 其余分别为 *Staphylococcus* 属、*Pseudomonas* 属、*Serrata* 属、*Kocuria* 属及 *Delftia* 属, 还有 1 株为非培养细菌的同源菌。由此可知芽孢杆菌为对叶榕果实内生细菌优势菌属, 由系统发育树可知这 16 株内生细菌明显的聚为两支。本文中参与内生细菌抑菌谱测定的 14 株内生细菌中, 除 Swx26 号菌株对这 7 种病原菌都没有抑制作用外, 其余的 13 株内生菌对于不同的病原菌表现出了不同的抑制作用, 其中 Swx15 和 Swx25 号抑菌谱最大, 抑菌菌作较强, 因此具有一定的潜在应用价值。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

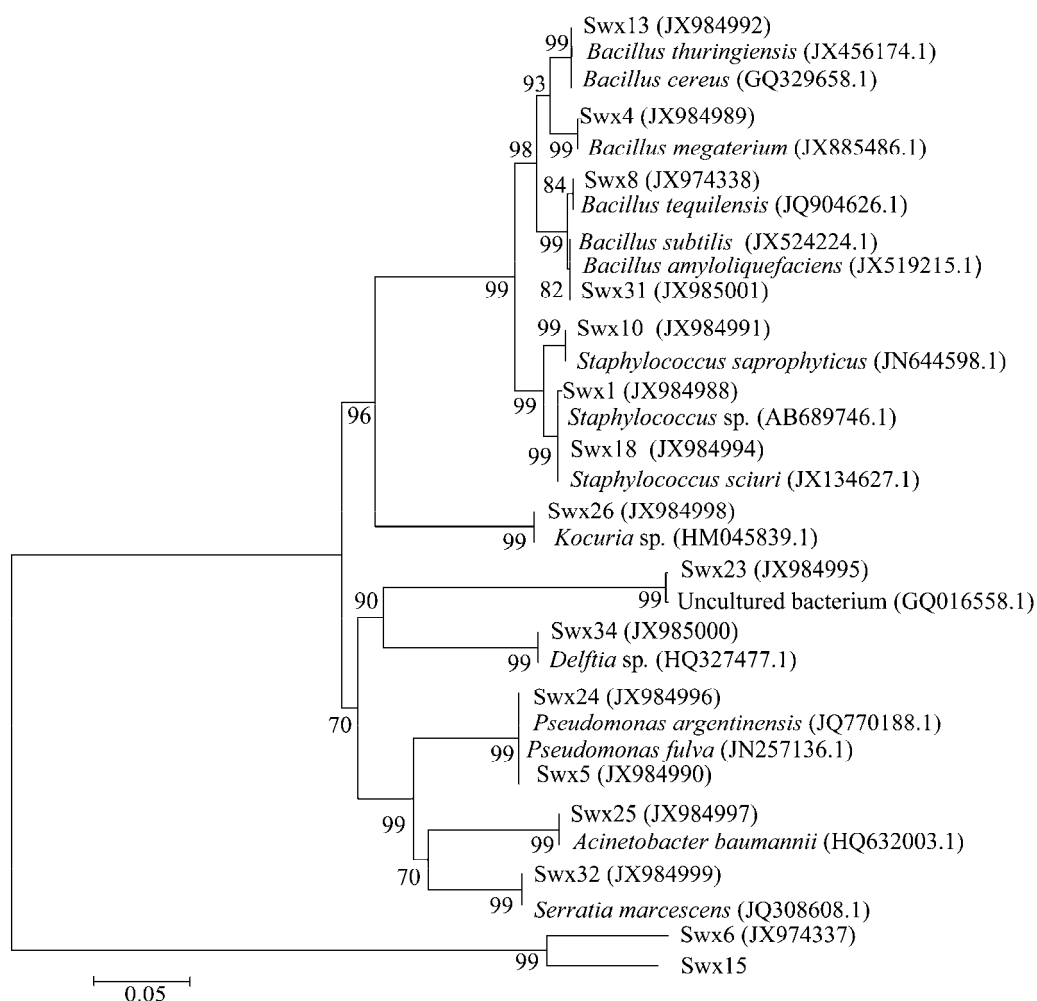


图4 内生细菌及其同源菌株给予 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA sequences of endophytic bacteria and the nearest type strains

植物内生菌的种类受植物本身生理特点及周围环境的影响很大^[20], 植物内生菌的生理及生境特殊性决定了其既有理论研究的必要性, 又有广泛的应用潜力, 在微生物新资源的开发方面潜力巨大^[21]。从植物以及一些特殊环境植物的内生菌次生代谢产物中寻找新型活性物质, 仍是内生菌研究的焦点之一^[22]。目前有关植物内生细菌的来源有 2 种假说: 一种是认为内生细菌来源于植物的表面; 另一种认为内生细菌来源于根际, 并由此进入植物组织内部^[23]直接或间接促进植物生长, 协助植物抵抗不利环境。

内生菌在植物体中的生物量是很微少的, 但植物内生菌作为植物微生态系统中的天然组成部分, 可以通过自身的代谢产物或借助信号传导作用对宿主产生影响, 现已发现内生菌对宿主植物的有益作用有: 促进宿主植物生长、抗逆境、抗病原真菌和细菌以及他感作用等。本研究分离到的培养物中有 2 株已被报道具有促生作用, 分别为 Swx15 号和 Swx31 号菌株。例如尹昭勇等^[24]研究表明, 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)对竹子根系的生长有一定的促进作用; Kavin 等^[25]通过对香蕉树幼苗期叶面喷洒荧光假

表 3 14 株对叶榕榕果内生细菌抑菌谱测定结果
Table 3 Inhibition spectra of the 14 endophytic bacteria against 10 pathogenies

菌株号 Number	抑菌圈直径 Bacteriostatic circle diameter (mm)						
	白菜黑斑病 <i>Alternaria brassicae</i>	稻瘟病 <i>Magnaporthe grisea</i>	柑橘青霉菌 <i>Penicillium digitatum</i>	黄瓜枯萎病 <i>Fusarium oxgsporum</i>	番茄早疫病 <i>Alternaria solani</i>	梨黑星病 <i>Venturia nashicola</i>	番茄灰霉病 <i>Botrytis cinerea</i>
Swx1	11	—	10	9	—	8	—
Swx4	—	15	11	11	—	14	—
Swx5	23	17	—	20	—	14	11
Swx6	—	15	—	17	—	13	—
Swx8	—	14	13	—	11	17	11
Swx10	—	12	—	8	—	15	9
Swx13	—	14	—	12	—	—	—
Swx15	15	18	21	—	14	17	22
Swx18	—	13	—	—	—	—	—
Swx24	—	11	—	10	14	—	—
Swx25	—	18	25	26	24	26	24
Swx26	—	—	—	—	—	—	—
Swx31	—	11	—	15	14	—	—
Swx34	—	—	—	10	9	—	—

注：—：没有抑菌活性。
Note: —: Positive no antibacterial activity.

单胞菌株(*Pseudomonas fluorescens*)和枯草芽孢杆菌株(*Bacillus subtilis*)混合剂, 提高了植株生长速率以及降低了发病率; He 等^[26]也有报道假单胞 RJ10 (*Pseudomonas* sp.)和杆菌 RJ16 (*Bacillus* sp.)可提高环境中溶解态镉与铅含量, 促进植物生长。因此具有一定的潜在应用价值, 有可能会为抗菌新药的研究开发利用以及植物益生方面提供一条新的途径。今后我们将进一步确定这些内生菌的组分及相应的化学结构, 探明并评价这些内生细菌的应用前景。

参 考 文 献

[1] 吴征镒, 陈介, 陈书坤, 等. 云南植物志(第6卷)[M]. 北京: 北京科学出版社, 1995: 595-610.
[2] 翟树伟, 杨大荣, 彭艳琼, 等. 对叶榕隐头果内

佩妃延腹小蜂属两种非传粉榕小蜂的繁殖特点[J]. 昆虫学报, 2007, 50(4): 389-394.
[3] Xishuangbanna Institute of Medicine of Ethnic Minorities. Traditional medicine Pre-scriptions of Dai[M]. Yunnan: Yunnan Science & Technology Press, 1995, 85-86.
[4] 姜怡, 杨颖, 陈华红, 等. 植物内生菌资源[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 146-147.
[5] 李端, 郭利伟, 郭伟云, 等. 抗肿瘤药用植物及其内生菌活性代谢产物的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16): 7508-7509.
[6] 李春宏, 邓渊钰, 赵明文, 等. 棉花内生细菌数量动态及其对棉花黄、枯萎病菌的拮抗作用[J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1196-1202.
[7] Sturz AV, Christie BR, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production[J]. Critical Reviews in

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- Plant Sciences, 2000, 19(1): 1–30.
- [8] Redman RS, Freeman S, Clifton DR, et al. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*[J]. Plant Physiology, 1999(19): 795–804.
- [9] 石晶盈, 刘爱媛, 李雪萍, 等. 番木瓜果实内生细菌 MGP3菌株的鉴定及拮抗作用[J]. 微生物学通报, 2011, 51(9): 1240–1247.
- [10] 陈敏, 许丽君, 吴斌娟, 等. 黄瓜青枯病内生拮抗菌株 HE-1的初步鉴定及培养优化条件[J]. 科技通报, 2008, 24(4): 489–493.
- [11] Suryanarayanan TS, Vijaykrishna D. Fungal endophytes of aerial roots of ficus benghalensis[J]. Fungal Diversity, 2001(8): 155–161.
- [12] 苏印泉, 孙奎, 马养民, 等. 无花果内生真菌的分离及其鉴定[J]. 西北植物学报, 2004(24): 1281–1285.
- [13] 张弘驰, 马养民, 刘瑞, 等. 无花果内生真菌的研究 抗植物病原真菌活性的筛选[J]. 西北农业学报, 2007(16): 232–236.
- [14] 袁军, 孙福在, 田宏先, 等. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 270–274.
- [15] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 65–180.
- [16] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991(173): 697–703.
- [17] 曲宝成, 孙军德, 冯敏. 番茄灰霉病内生拮抗细菌的分离筛选初报[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 62–64.
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology Evolution, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [19] 宋培勇, 李凤华, 马莉莉. 珙桐内生细菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(1): 8–13.
- [20] 武子敬, 杨小生, 朱海燕. 植物内生真菌的研究现状[J]. 江西中医学院学报, 2007, 19(1): 98–100.
- [21] 邹文欣, 秦仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881–892.
- [22] 曾松荣, 徐倩雯, 叶保童, 等. 虎杖内生真菌的分离及产抗菌活性物质的筛选[J]. 菌物研究, 2005, 3(2): 24–26.
- [23] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 植物内生细菌研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 224–227.
- [24] 尹昭勇, 李莲芳, 王慷林, 等. 解淀粉芽孢杆菌和母竹年龄对4种竹类埋节生根的影响[J]. 竹子研究汇刊, 2011, 30(2): 28–33.
- [25] Kavino M, Harish S, Kumar N, et al. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007(39): 1087–1098.
- [26] He LY, Chen ZJ, Ren GD, et al. Increased cadmium and lead uptake of cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009(72): 1343–1348.