

李乐溪,李丹,张亮,等.大蒜内生菌的分离及拮抗菌株的筛选与鉴定[J].江苏农业科学,2018,46(5):97-101.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.026

大蒜内生菌的分离及拮抗菌株的筛选与鉴定

李乐溪,李丹,张亮,王军娟,杨绪勤,蒋继宏

(江苏师范大学生命科学学院/江苏省药食植物生物技术国家重点实验室培育点,江苏徐州 221116)

摘要:采用组织切块法和组织匀浆法对10种采集自全国不同地区的大蒜进行内生菌的分离,并用平板对峙法对分离得到的内生菌抗菌活性进行了筛选,根据形态学和16S rRNA等方法对有抗菌活性的菌株进行了鉴定。试验结果表明:从10种大蒜鳞茎中共分离得到大蒜内生菌102株,采用平板对峙法筛选出能同时抑制5种及以上植物病原真菌的菌株,再对筛选出的菌株进行16S rRNA测序鉴定菌种,去除重复的菌株后,得到19株抑菌活性较强的菌株。对19株大蒜内生菌进行一系列生理生化指标的检测,结果表明这些菌株的形态及生理生化特征均不相同。

关键词:大蒜;内生菌;拮抗;鉴定;抑菌活性;生物防治

中图分类号: S482.2⁺92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0097-05

植物内生菌普遍存在于植物组织内部,既能与宿主植物保持良好关系又不会引起宿主植物的病害,也不会改变宿主植物的表型特征和功能。内生菌来自于宿主植物,并在植物体内发挥一系列生防功效。许多植物内生菌能产生丰富的次级代谢产物,而且具有多种生物活性,如杀菌、杀虫、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化和促生长等^[1-2]。基于目前大量的研究,植物内生菌显示出了许多有益的生物学作用,因此植物内生菌作为一种新兴的微生物资源成为了国内外研究的热点。

植物病害,尤其是由病原真菌引起的病害,一直是农业生产中的棘手问题,给人类造成了巨大的经济损失。长期以来,人们认为用化学农药解决植物病虫害是最有效的办法,但化学农药也会带来许多危害。目前,人工合成的化学农药已有500余种,这些农药的广泛使用,不仅造成了严重的环境污染,也对人类以及动植物健康构成危害。然而,利用植物内生菌对植物病害进行生物防治的研究已相当普遍。何红等从辣椒中分离筛选出2株内生枯草芽孢杆菌,研究表明这2株菌对辣椒、白菜、香蕉等植物炭疽病具有良好的防治效果^[3-5];吴海燕等研究了大豆根瘤内生菌次级代谢产物对大豆胞囊线虫的抑制作用^[6];郑爱萍等从水稻中分离获得一株假单胞杆菌,并发现其对水稻纹枯病有防治作用^[7]。随着科学技术的不断进步,研究开发生物农药防治植物病虫害的呼声日益高涨,因此,开发利用植物内生菌的天然抗菌活性作为新型农药具有巨大的潜力。

大蒜(*Allium sativum* L.),为百合科葱属多年生草本缩根植物。大蒜不仅是生活中常见的调味品,也是一种非常重要的药用植物。大蒜的鳞茎中富含丰富的蛋白质、糖、维生素和矿物质,不仅能增强食欲、促进消化,而且根据研究表明,大蒜

对多种细菌、真菌具有很强的杀伤、抑制作用,大蒜所含挥发性物质、大蒜汁及大蒜素对多种危害人体健康的病原菌有拮抗作用^[8],因此,大蒜被誉为“天然广谱杀菌剂”,具有很高的经济价值、营养价值和医疗保健价值,在各个方面有着广泛应用。本研究以10种采集自全国不同地区的新鲜大蒜为样品进行内生菌分离,共分离得到102株大蒜内生菌,通过抑菌活性试验,从中筛选出具有拮抗作用的菌株,通过革兰氏染色试验、产生物被膜、淀粉酶活性和纤维素酶活性试验,以期获得大蒜内生菌的基本信息,为植物病虫害的生物防治提供新的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 以10种采自江苏徐州、山东金乡、云南大理、湖南常德和甘肃陇南等不同地区的大蒜种植基地、农民菜园的新鲜大蒜为样品。

1.1.2 目标菌株 茄链格孢(*Alternaria solani*)、辣椒枝孢(*Cladosporium capsici*)、稻梨孢菌(*Pyricularia oryzae*)、白腐小核菌(*Sclerotium cepivorum*)、甘薯长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata*)、古巴假霜霉菌(*Pseudoperonospora cubensis*)、尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、苹果轮纹病菌(*Phytophthora piricola*)、西瓜壳二孢(*Ascochyta citrullina*)。试验所用植物病原真菌均由江苏师范大学江苏省药食植物生物技术国家重点实验室培育点提供。

1.1.3 培养基 分离和纯化培养基均采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、Luria-Bertani培养基(LB)和ISP培养基2号(ISP2)。^①PDA固体培养基配方:马铃薯200g,葡萄糖20g,去离子水1L,琼脂20g,pH值自然。^②LB固体培养基配方:胰蛋白胨10g,NaCl10g,酵母浸出粉5g,去离子水1L,琼脂20g,pH值7.0~7.2。^③ISP2固体培养基配方:葡萄糖4g,酵母浸出粉4g,麦芽浸膏粉10g,琼脂20g,去离子水1L,pH值7.0~7.2。^④富集培养基为LB液体培养基,配方:胰蛋白胨10g,NaCl10g,酵母浸出粉5g,去离子水1L,pH值7.0~7.2。^⑤淀粉酶检测培养基:可溶性淀粉10g,硫

收稿日期:2017-10-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31370646);江苏省高校自然科学基金(编号:15KJD180004)。

作者简介:李乐溪(1990—),女,江苏徐州人,硕士研究生,主要从事药用植物内生菌资源研究。E-mail:llx_0009@yeah.net。

通信作者:蒋继宏,教授,主要从事药用植物内生菌资源研究。E-mail:jhjiang@jsnu.edu.cn。

酸镁 1 g, 氯化钠 0.5 g, 磷酸氢二钾 0.3 g, 硝酸钾 1 g, 琼脂 20 g, 去离子水 1 L。⑥碘液的配制: 碘片 0.5 g, 碘化钾 1 g, 加入去离子水 150 mL。⑦纤维素酶检测培养基: 磷酸氢二钾 0.3 g, 硫酸镁 1 g, 氯化钠 0.5 g, 羧甲基纤维素钠 10 g, 硝酸钾 1 g, 酵母膏 2 g, 琼脂 20 g, 去离子水 1 L。

1.2 试验方法

1.2.1 大蒜内生菌的分离 将新鲜大蒜去皮, 用去离子水超声振荡 10 min。无菌环境下用次氯酸钠溶液浸泡 5 min, 75% 乙醇漂洗 20 s, 无菌生理盐水冲洗 2 次, 无菌水冲洗 1 次, 对大蒜进行表面消毒^[9]。从最后一次冲洗的无菌水中吸取 100 μ L 涂布在 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 d。证实无菌生长, 再进行后续试验。①组织切块法: 将经过表面消毒的大蒜样品在无菌环境下切成 0.5 cm^3 的组织块, 均匀嵌插在 PDA 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 下培养 7 ~ 10 d。②组织匀浆法^[10]: 取 10 g 表面消毒后的大蒜样品与无菌水 25 g 混合, 研磨成蒜汁, 静置 15 min。吸取蒜汁进行 10 倍梯度稀释, 得 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 浓度的组织液。分别从各梯度组织液中吸取 100 μ L 涂布于 PDA、LB、ISP2 培养基上。PDA 和 ISP2 平板放置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱培养 7 ~ 10 d, LB 平板放置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 7 ~ 10 d。分别从各分离平板上挑取菌落接种在新的纯化培养基上, 反复进行纯化培养, 直至获得单一菌株并进行常规保种备用。

1.2.2 抑菌活性筛选 采用平板对峙法对大蒜内生菌的抑菌活性进行筛选, 具体操作如下: 用 0.5 cm 打孔器分别将 9 种植物病原真菌制成菌饼, 挑取 1 块病原菌菌饼放置在 PDA 平板中心, 在距离病原菌菌饼 2.5 cm 处的 6 个点接种不同大蒜内生菌, 另以不接种内生菌的平板做对照。放置于 28 $^{\circ}$ C 下培养 5 ~ 7 d, 记录抑菌圈大小并测量抑菌圈半径。抑制率计算公式为: 抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径) \times 100%^[11]。

1.2.3 16S rRNA 的 PCR 扩增^[12] 对筛选出的抑菌活性较高的菌株提取基因组 DNA, 采用 16S rRNA 全序列通用引物进行 PCR 扩增。产物测序后将 16S rRNA 全序列在 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网站中进行 Blast 比对分析。系统发育树采用 Mega5 软件进行构建。

1.2.4 拮抗菌的形态观察及革兰氏染色 对筛选出的抑菌活性较好的菌株在 LB 培养基上采用四区划线法划出单菌落, 记录菌落的颜色、形状等, 通过显微镜观察菌落特征。采用革兰氏染色法^[11] 对有抑菌活性的内生细菌进行染色观察。

1.2.5 产生物被膜能力检测 将所有待测菌株挑取至 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜培养。将 1% 的待测菌液在无菌的加样槽中与新的 LB 液体混合; 在无菌环境下用排枪吸取 100 μ L 加入 96 孔板中, 每株菌做 8 个重复; 将 96 孔板四周用封口膜封口, 于 30 $^{\circ}$ C 下培养(细菌培养 24 h, 放线菌培养 4 ~ 5 d); 检测 96 孔板里菌液的吸光度 $D_{600\text{nm}}$ 值, 判定菌株的生长情况; 将 96 孔板菌液倒掉, 去离子水冲洗 2 遍; 吸取 150 μ L 结晶紫染液于 96 孔板中, 染色 15 min; 用去离子水将染液冲洗干净; 200 μ L 95% 乙醇加入 96 孔板中, 15 min 后测定波长 595 nm 下的吸光度 $D_{595\text{nm}}$, 通过 $D_{595\text{nm}}$ 评估菌株产生物被膜的能力。

1.2.6 淀粉酶活性检测 将待测菌株点植在检测培养基上,

30 $^{\circ}$ C 培养 4 ~ 5 d。向平板内加入碘液, 使碘液刚好没过培养基。10 min 后倾倒碘液, 用去离子水冲洗培养基表面进行脱色。根据菌落周围是否有透明圈判断菌株产淀粉酶的能力, 记录透明圈与菌落直径。

1.2.7 纤维素酶活性检测 将大蒜内生菌点植于检测培养基, 30 $^{\circ}$ C 培养 4 ~ 5 d; 向平板内加入 0.5% 刚果红溶液, 使其没过培养基。染色 10 min 后倾倒干净。向平板加入 NaCl 溶液(1 mol/L) 进行脱色; 观察菌落四周有无透明圈产生, 记录透明圈与菌落直径。

2 结果与分析

2.1 大蒜内生菌的分离结果

根据菌株的菌落大小、颜色、形态等特征, 挑取分离平板上的单菌落进行纯化, 最终从 10 种来自不同地区的新鲜大蒜鳞茎中共分离得到细菌 92 株、真菌 3 株、放线菌 7 株(表 1)。

表 1 10 个不同地区大蒜的内生菌分离数量比较

品种	菌株数量(株)		
	细菌	真菌	放线菌
江苏徐州丰县紫皮蒜	1		
江苏徐州新沂市紫皮蒜	6		1
山东临沂沂南县白皮蒜	34		3
山东济宁宁乡县紫皮蒜	5		
云南大理州紫皮独头蒜	23	1	2
上海红蒜	1		
黑龙江齐齐哈尔拜泉县独头蒜	1		1
湖南常德武陵县紫皮蒜		1	
陕西宝鸡岐山县白蒜	13		
甘肃陇南成县晚蒜	8	1	

2.2 大蒜内生菌拮抗性分析

以茄链格孢、辣椒枝孢、大蒜白腐小核菌等 9 种植物病原真菌作为指示菌, 对分离到的 102 株大蒜内生菌进行抑菌活性筛选(图 1); 通过 16S rRNA 对筛选出的菌株进行菌种鉴定, 去除重复菌种后发现其中有 19 株内生菌对至少 5 种病原真菌有拮抗作用, 如表 2 所示: KLBMPGC05、KLBMPGC26、KLBMPGC31、KLBMPGC67、KLBMPGC73、KLBMPGC81、KLBMPGC90 能同时抑制 9 种病原菌。其中, 菌株 KLBMPGC90 的拮抗性最强, 对白腐小核菌的抑菌率达到 90.24%, 对其他病原菌的抑制率均在 70% 上下。

2.3 大蒜内生菌的生理生化特征

对筛选出的 19 株大蒜内生菌进行革兰氏染色、产生物被膜能力、淀粉酶活性和纤维素酶活性进行检测, 染色结果用“+”代表革兰氏阳性、“-”代表革兰氏阴性。19 株大蒜内生菌产生物被膜、淀粉酶和纤维素酶的能力大小各不相同(表 3、图 2、图 3)。

2.4 19 株大蒜内生菌的分子鉴定

根据聚类结果, 将扩增成功的 PCR 产物送至北京博迈德科技发展有限公司进行 16S rRNA 全序列测定, 测序结果及其 GenBank 登录号见表 4。测序序列用 Blast 软件与 GenBank 中已知的 16S rRNA 序列进行比对分析。选取若干同源性较高的参比菌株 16S rRNA 序列, 构建系统发育树(图 4)。

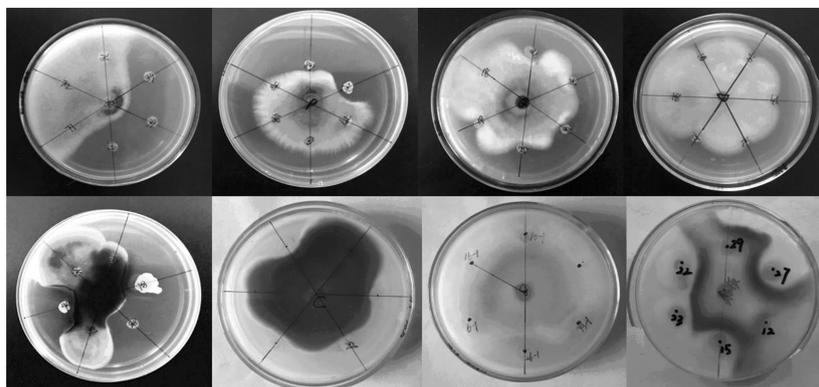


图1 大蒜内生菌抑菌活性检测

表2 内生细菌对9种病原真菌的抑菌率

菌株编号	抑菌率(%)								
	茄链格孢	辣椒枝孢	稻梨孢菌	白腐小核菌	甘薯长喙壳菌	古巴假霜霉菌	尖孢镰刀菌西瓜专化型	苹果轮纹病菌	西瓜壳二孢
KLBMPGC01	43.59	48.72	51.28	-	51.28	-	-	30.77	23.08
KLBMPGC04	47.50	45.00	42.50	-	50.00	32.50	-	-	37.50
KLBMPGC05	70.45	68.18	59.09	40.91	70.45	63.64	59.09	72.73	63.64
KLBMPGC06	47.37	42.11	36.84	-	42.11	42.11	42.11	-	-
KLBMPGC15	72.73	65.91	56.82	31.46	70.45	63.64	47.73	75.00	-
KLBMPGC20	65.91	72.73	47.73	56.81	63.64	-	50.00	72.73	45.45
KLBMPGC21	47.62	57.14	-	25.80	-	69.05	54.76	57.14	47.62
KLBMPGC23	54.55	70.45	50.00	-	47.73	-	43.18	61.36	50.00
KLBMPGC26	45.45	47.73	45.45	43.18	47.70	25.00	50.00	36.36	47.72
KLBMPGC31	70.00	47.50	42.50	47.50	47.50	37.50	45.00	82.50	47.50
KLBMPGC37	35.89	35.89	33.33	-	28.21	-	-	79.49	-
KLBMPGC66	52.27	52.27	43.18	77.27	59.09	50.00	-	45.45	43.18
KLBMPGC67	54.54	54.54	54.54	75.00	70.45	50.00	54.54	81.81	47.72
KLBMPGC68	52.27	61.36	45.45	-	56.81	50.00	-	-	43.18
KLBMPGC73	62.50	65.00	60.00	60.00	65.00	72.50	65.00	65.00	67.50
KLBMPGC78	-	56.09	68.29	58.54	60.98	-	-	65.85	-
KLBMPGC81	75.00	77.50	70	87.50	72.50	72.50	72.50	70.00	62.50
KLBMPGC85	-	28.21	58.97	-	56.41	69.23	71.79	-	69.23
KLBMPGC90	68.29	75.61	75.61	90.24	75.61	73.17	68.29	75.61	70.73

表3 大蒜内生菌的生理生化特性

编号	革兰氏染色	生物被膜	淀粉酶 (cm)	纤维素酶 (cm)
KLBMPGC01	+	-	-	0.3
KLBMPGC04	+	-	-	0.3
KLBMPGC05	-	3.235 ± 0.695	0.4	0.2
KLBMPGC06	+	-	-	-
KLBMPGC15	-	1.334 ± 0.454	-	2.4
KLBMPGC20	-	-	-	1.2
KLBMPGC21	-	0.921 ± 0.113	0.1	-
KLBMPGC23	-	-	-	1.2
KLBMPGC26	-	-	-	-
KLBMPGC31	-	0.978 ± 0.059	-	1.3
KLBMPGC37	+	0.921 ± 0.113	-	-
KLBMPGC66	-	0.964 ± 0.093	-	1.2
KLBMPGC67	-	1.217 ± 0.146	-	1.2
KLBMPGC68	+	-	0.1	1.0
KLBMPGC73	-	-	0.1	0.8
KLBMPGC78	+	-	-	-
KLBMPGC81	+	0.912 ± 0.081	1.3	2.0
KLBMPGC85	-	-	-	0.6
KLBMPGC90	+	3.188 ± 0.383	1.2	1.0

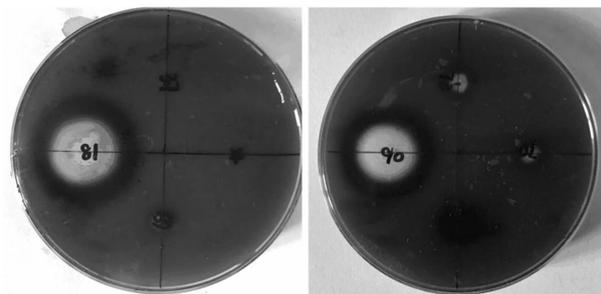


图2 大蒜内生菌产淀粉酶活性

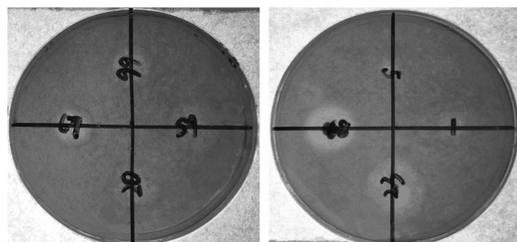


图3 大蒜内生菌产纤维素酶活性

表4 供试菌株鉴定结果及其 GenBank 登录号

编号	同源菌株	同源性 (%)	登录号	鉴定结果
KLBMPGC01	<i>Pantoea vagans</i> strain HMF2842	99	KP099965.1	成团泛菌 <i>Pantoea vagans</i>
KLBMPGC04	<i>Pantoea agglomerans</i> strain Abp2	99	HQ420252.1	泛菌属 <i>Pantoea agglomerans</i>
KLBMPGC05	<i>Acinetobacter</i> sp. strain JDMARP15	100	KX817896.1	不动杆菌 <i>Acinetobacter</i> sp.
KLBMPGC06	<i>Pantoea brenneri</i> strain + Y31	99	JX113245.1	布氏泛菌 <i>Pantoea brenneri</i>
KLBMPGC15	<i>Bacillus velezensis</i> strain NDS11	100	KX871902.1	贝莱斯芽孢杆菌 <i>Bacillus velezensis</i>
KLBMPGC20	<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain Hb - 15	89	KC139416.1	鲁氏不动杆菌 <i>Acinetobacter lwoffii</i>
KLBMPGC21	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> strain JJ143	100	KX352817.1	淡紫褐链霉菌 <i>Streptomyces enissocaesilis</i>
KLBMPGC23	<i>Geobacillus stearothermo</i> pH 值 <i>ilus</i> strain HB12265	99	KU529690.1	嗜热脂肪土芽孢杆菌 <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
KLBMPGC26	<i>Halomonas</i> sp. YT2	99	KC953093.1	中度嗜盐菌 <i>Halomonas</i> sp.
KLBMPGC31	<i>Bacillus</i> sp. strain AU3b4	100	MF612187.1	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.
KLBMPGC37	<i>StapH</i> 值 <i>ylcococcus sciuri</i> strain RCB314	99	KT260526.1	松鼠葡萄球菌 <i>StapH</i> 值 <i>ylcococcus sciuri</i>
KLBMPGC66	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BR1 - B	99	MF498503.1	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
KLBMPGC67	<i>Pseudomonas</i> sp. enrichment culture clone 21 (2012)	99	JN626197.1	假单胞杆菌 <i>Pseudomonas</i> sp.
KLBMPGC68	<i>Streptomyces</i> sp. 13 - 33 - 2	99	KM886193.1	以链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.
KLBMPGC73	<i>Streptomyces rochei</i> strain SCOS	99	KX575853.1	娄彻氏链霉菌 <i>Streptomyces rochei</i>
KLBMPGC78	<i>Micrococcaceae bacterium</i> 6_St_1	100	JX064903.1	微球菌 <i>Micrococcaceae bacterium</i>
KLBMPGC81	<i>Bacillus subtilis</i> strain IP6	99	KY621523.1	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
KLBMPGC85	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain OP3	100	KY621520.1	产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>
KLBMPGC90	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> strain Ht10 - 23	99	JF899288.1	解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp.

3 结论与讨论

本研究从采自 10 个不同地区、不同品种的大蒜蒜瓣中成功分离了大蒜内生菌。其中,以内生细菌的数量最多,说明细菌是大蒜内生菌的优势菌,但大蒜中也存在真菌和放线菌这 2 种类型的菌。试验所分离得到的多数内生细菌和内生放线菌对多种植物病原真菌具有广谱抗性,且具有不同程度的产生物被膜能力和产酶能力。通过拮抗试验的筛选,未发现有效拮抗效果的大蒜内生真菌。

大蒜是人们喜爱的食品和调味品,是十分健康的食物,具有重要的保健意义。大蒜中含有众多活性物质,一直以来研究人员将大蒜素、蒜氨酸等物质作为研究重点,在大蒜内生菌的领域进展较缓慢。人们自古以来就知道大蒜具有很强和广谱的杀菌作用,有科学家试验用大蒜汁来抑制和杀灭几种常见的污染食品的真菌,结果发现大蒜抑制腐败真菌的强度高于一些化学防腐剂,是自然界中杀菌作用最强的植物。因此,基于内生菌能够产生与其宿主植物相类似的活性物质,具有与宿主植物相类似的功能,且很多植物内生细菌的抗菌活性普遍较高的理论^[13-16],本试验成功验证了大蒜内生细菌和内生放线菌能同时抑制多种植物病原真菌的生长。目前,在我国当今社会对加强生物农药新产品研发、缓解农药残留带来的环境污染问题的呼声越来越高,这种植物内生菌“以菌治菌”的潜力将大大促进生物农药的发展。我国自古以来就是一个农业大国,农业一直是国民经济的命脉。发展生物农药,以生物农药替代化学农药,不仅可以减少使用化学农药时所带来的环境破坏和对人类身体健康的危害,也可为我国农产品的生产创造十分有利的条件,极大地增强我国农产品的国际竞争力。由于在本试验中可以看到大蒜内生菌具有较好的生防潜力^[17],下一步将通过更精确的筛选方法筛选出抑菌活性最强的菌株,进行盆栽试验和大田试验,来研究这些大蒜拮

抗内生菌对植物病害的生防效果。

参考文献:

- [1] Leuchtman A, Petrini O, George C, et al. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes[J]. *Nat Toxins*, 1992, 1(2): 150 - 162.
- [2] 王永中, 肖亚中. 植物内生菌及其活性代谢产物[J]. *生物学杂志*, 2004, 21(4): 1 - 5.
- [3] 何红, 蔡学清, 洪永聪, 等. 辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. *中国生物防治*, 2002, 18(4): 171 - 178.
- [4] 何红, 蔡学清, 陈玉森, 等. 辣椒内生枯草芽孢杆菌 BS22 和 BS21 防治香蕉炭疽病研究[J]. *福建农林大学学报*, 2002, 31(4): 441 - 443.
- [5] 何红, 蔡学清, 关雄, 等. 辣椒内生枯草芽孢杆菌 BS22 和 BS21 防治辣椒炭疽病研究[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(2): 170 - 173.
- [6] 吴海燕, 远方, 陈立杰, 等. 大豆胞囊线虫病与大豆抗胞囊线虫机制的研究[J]. *大豆科学*, 2001, 20(4): 285 - 289.
- [7] 郑爱萍, 李平, 王世全, 等. 水稻纹枯病强拮抗菌 B34 的分离与鉴定[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(1): 81 - 85.
- [8] 江苏新医学院. *中药大辞典*[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [9] 李乐溪, 嵇静静, 周亮吟, 等. 大蒜产香内生真菌的分离及挥发性成分分析[J]. *生物资源*, 2017, 1(39): 70 - 73.
- [10] 韦智钟, 刘梦雅, 李真, 等. 大蒜内生菌的分离及其抑菌作用的研究[J]. *黑龙江农业科学*, 2013(12): 5 - 9.
- [11] 欧雄常, 柳风, 何红, 等. 红树内生细菌 AmS2 对多种植物病原真菌的抑制作用[J]. *广东农业科学*, 2013, 40(5): 73 - 75.
- [12] Li X X, Zhang M L, Fu Y Y, et al. Analysis of rhizobia isolated from melilotus by 16S rDNA - RFLP[J]. *Acta Bot Boreale (Occident Sin)*, 2008, 28(3): 1569 - 1573.
- [13] 陈立军, 孙广宇, 张荣, 等. 油菜内生真菌的分离鉴定[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2004, 22(增刊1): 66 - 68.

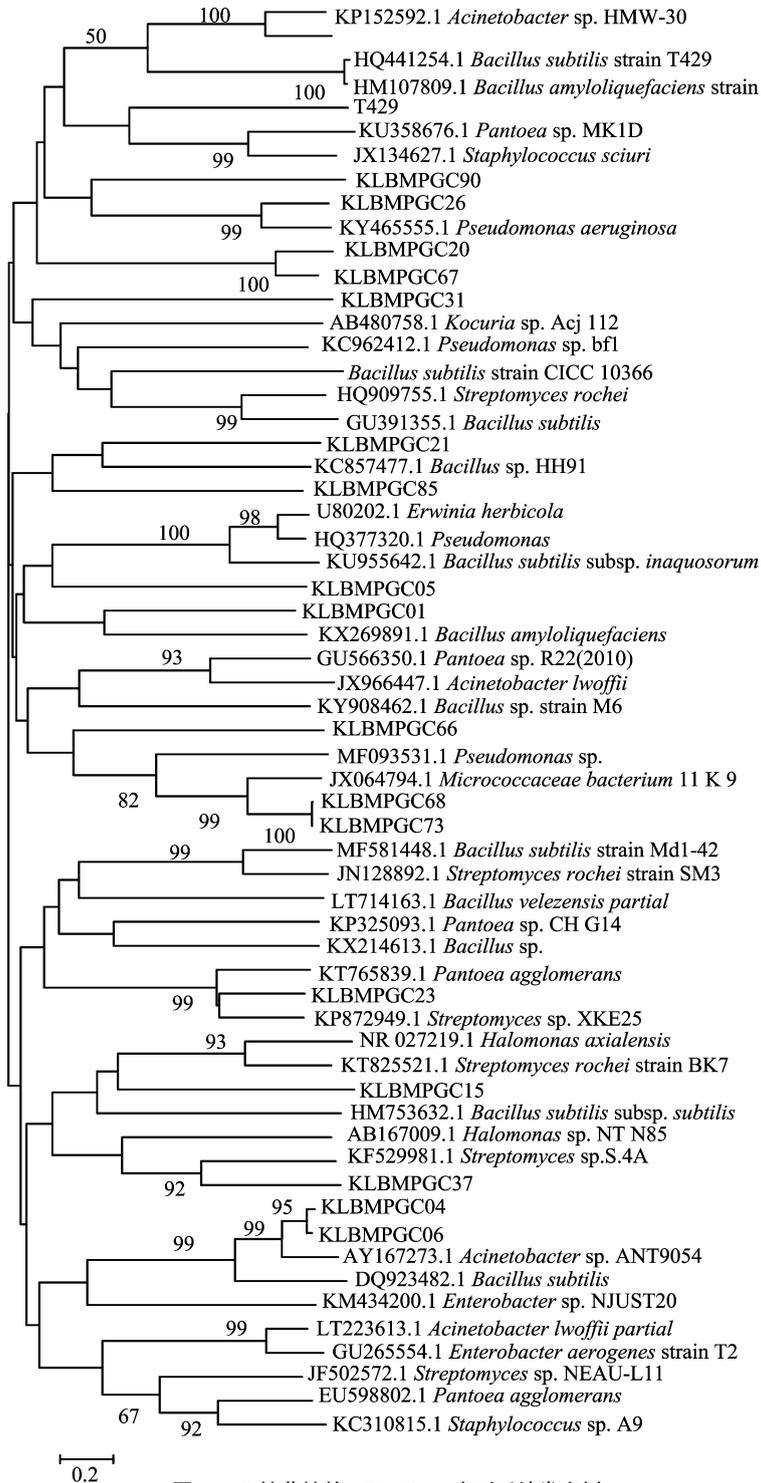


图4 19株菌株的16S rRNA序列系统发育树

[14] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91.

[15] 崔郑龙, 柴秀娟, 孔德真, 等. 棉花枯萎病菌拮抗内生菌的筛选和拮抗效果检测[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 158-163.

[16] 白明生, 石新卫, 张艳新. 一株四合木内生菌发酵产物抑制植物病原菌的活性[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 192-194.

[17] 易龙, 肖崇刚, 马冠华, 等. 防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 19-22.