

兰阿峰,郭素芬,王 菲,等.古旱莲内生细菌多样性及产酶活性鉴定[J].江苏农业科学,2018,46(17):259-263.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.067

古旱莲内生细菌多样性及产酶活性鉴定

兰阿峰^{1,2},郭素芬¹,王 菲¹,邓百万^{1,2},刘开辉^{1,2}

(1.陕西理工大学生物科学与工程学院,陕西汉中 723001; 2.陕西省食药用药菌工程研究中心,陕西汉中 723001)

摘要:分离古旱莲(*Magnolia denudata* Dest var. *purpurascens* Rehd et Wils)内生细菌,研究其多样性及产酶活性;纯培养分离古旱莲内生细菌,纯化后对分离菌株进行分泌胞外淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶活性研究,使用 16S rRNA 系统发育分析对菌落进行鉴定;共分离出内生细菌 52 株,根据测序结果不同,将菌株归为 19 个分类单元(OTUs)。系统发育分析表明,这些菌株分属 4 个门,分别为拟杆菌门(Bacteroidetes, 占总数 7.7%),厚壁菌门(Phylum Firmicutes, 占总数 15.4%),变形菌门(Proteobacteria, 占总数 19.2%),放线菌门(Actinobacteria, 占总数 40.4%)及占总数为 17.3%的未培养细菌;产酶结果表明,22 株产蛋白酶、3 株产淀粉酶、7 株产纤维素酶、4 株产脂肪酶,还有 16 株未发现产酶活性。本研究分离到古旱莲内生细菌 52 株分为 4 门 19 个分类单元,细菌多样性及产酶活性丰富。

关键词:古旱莲;内生细菌;多样性;产酶活性;活性菌株;开发利用

中图分类号: Q939.9; S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)13-0259-05

木兰科木兰属植物古旱莲(*Magnolia denudata* Dest var. *purpurascens* Rehd et Wils)产于中国,是国家Ⅱ级重点保护野生植物^[1]。木兰科植物木兰(*Magnolia liliflora* Dest.)、玉兰(*Magnolia denudata* Desr.)、厚朴(*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.)、木莲(*Manglietia fordiana* Oliv.)、鹅掌楸(*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.)^[2]中许多种类是我国的传统药材。紫玉兰(*Magnolia liliiflora*)、玉兰(*Magnolia liliiflora*)、望春玉兰(*Magnolia biondii*)、武当木兰(*Magnolia sprengeri*)在中药中统称辛夷,其干燥花蕾有通鼻消炎、治疗妇科病及抑制真菌等作用^[3]。厚朴、凹叶厚朴(*Magnolia officinalis* sp. *Biloba*)、长喙厚朴(*Magnolia rostrata*)在中药中统称厚朴,是木兰科植物厚朴或凹叶厚朴的干燥干皮、枝皮或根皮,是我国重要的传统中药。木兰科植物的鹅掌楸属、五味子属和木兰属的厚朴、凹叶厚朴都属于国家保护植物,已被列为濒危药用植物,其资源已经非常有限。近年来,随着老药新用的提出,厚朴具有的抗病毒、抗肿瘤、抗菌、防龋、抗溃疡、镇痛抗炎等作用及其他新的药理药效不断被发现^[4-5]。目前已经从木兰科中的鹅掌楸属、五味子属和木兰属的玉兰、厚朴、凹叶厚朴中分离出大量内生真菌,但并未发现其代谢产物对多种病原菌具有很强的抑制作用^[6-10]。木兰科植物内生细菌多样性及功能鲜见研究报道。

植物内生细菌是指能够从表面消毒后的植物组织内分离到或者从植物内提取到,并且对植物不造成可见危害的细菌^[5]。陕西省汉中市勉县武侯祠的资料显示,1979 年文物普

查时,发现一棵木兰科植物古旱莲,北京林业学院专家用 ¹⁴C 测定其树龄为 400 多年,非常具有研究价值。古旱莲由于其稀有性,在内生细菌分离及产酶活性等方面还未见报到。本研究以勉县武侯祠古旱莲为研究材料,旨在探究勉县武侯祠古旱莲内生细菌的物种多样性,发掘产酶活性菌株。本研究对进一步深入研究和阐明古旱莲内生细菌的群落分布、物种多样性及其开发利用等方面具有理论意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 2015 年 11 月中旬,在陕西省汉中市勉县武侯祠的工作人员修剪 400 年生古旱莲时,采集直径约为 2 cm 的茎组织,放入无菌袋带回实验室于 4℃ 下保存,材料在 2 周内处理完毕,用于内生细菌的分离。

1.1.2 试剂 蛋白胨(纯度≥99.5%,天津市盛奥化学试剂有限公司)、酵母粉、NaCl、琼脂粉(纯度≥99.5%,北京奥博星生物技术有限责任公司),2×Taq PCR Master Mix、PCR 引物等均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 仪器 凝胶扫描成像系统(GelDoc,美国 Bio-Rad 公司)、PCR 扩增仪(Mycycler,美国 Bio-Rad 公司)、移液器系列(Eppendorf,德国 Eppendorf 公司)。

1.1.4 分离培养基 LB 培养基:蛋白胨 10.0 g、牛肉粉 5.0 g、NaCl 5.0 g、琼脂粉 12.0 g、水 1 L, pH 值自然;液体 LB 培养基:蛋白胨 10.0 g、牛肉粉 5.0 g、NaCl 10.0 g、水 1 L, pH 值自然。

1.1.5 酶活性筛选培养基

1.1.5.1 蛋白酶筛选培养基 牛肉粉 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、脱脂高蛋白奶粉 20.0 g、NaCl 5.0 g、琼脂 20.0 g、水 1 L^[11]。

1.1.5.2 淀粉酶筛选培养基 酵母粉 5.0 g、蛋白胨 5.0 g、可溶性淀粉 20.0 g、NaCl 5.0 g、琼脂 20.0 g、水 1 L。卢氏碘液^[12]。

1.1.5.3 纤维素酶筛选培养基 蛋白胨 10.0 g、酵母粉

收稿日期:2017-03-16

基金项目:陕西理工学院人才引进启动项目(编号:SLGQD-8);陕西省汉中市科技局项目(编号:2013hzzx-35)。

作者简介:兰阿峰(1978—),男,陕西延安人,博士,讲师,主要从事肠道微生物多样性、植物内生菌多样性等研究。E-mail: lanafeng2004@126.com。

通信作者:郭素芬,博士,讲师,主要从事生物多样性、昆虫生理生态等研究。E-mail:gsf0611@126.com。

10.0 g、羧甲基纤维素钠 10.0 g、 KH_2PO_4 1.0 g、 NaCl 5.0 g、琼脂 20.0 g、水 1 L^[13]。刚果红染液(1 000 mg/L), NaCl 水溶液(58 500 mg/L)。

1.1.5.4 脂肪酶筛选培养基 蛋白胨 10.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g、 K_2HPO_4 1.0 g、 KH_2PO_4 3.0 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g、 NaCl 5.0 g、琼脂 20.0 g、水 1 L, 溴甲酚紫 0.04 g^[14], PVA-橄榄油乳化液 120 mL。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离与纯化 参照文献[15]的方法, 取新鲜古旱莲茎组织, 用自来水冲洗 2 h 左右。在超净工作台, 用 75% 乙醇浸泡 30 s 后, 无菌水冲洗 5 次; 然后用 0.1% 氯化汞浸泡 3 min, 无菌水冲洗 5 次。取最后 1 次无菌水洗涤上清液 100 μL , 涂布于 LB 平板, 作 3 个空白对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1~3 d, 检测材料表面消毒是否彻底。用无菌剪刀将韧皮部切割成 0.5 cm^2 左右的小块, 接种于 LB 培养基上, 每个平皿内接种 4 个组织块。封口膜封口, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 1~3 d, 待材料周围内生细菌长出后, 选择菌落边缘部分挑取划线纯化, 接入液体 LB 培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 条件下培养 8 h, 转入离心管中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

1.2.2 分离菌株的系统发育分析 以细菌通用引物 27F/1492R 进行菌落 PCR, 预期扩增长度为 1 500 bp, 反应体系(30 μL): $2 \times \text{Taq PCR Mix}$ 15 μL , 上下游引物各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , ddH₂O 12 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶检测后, 由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。所得序列提交到 NCBI 数据库中, 进行 Blast 检索, 整理序列, 发往 NCBI, 获得菌株登录号。最后将序列提交到 Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 Blast 检索, 下载相似性较高的序列数据, 生成 Fasta 格式文件。用 Clustal-X^[16] 软件对所得序列进行人工校正及比对分析。利用 MEGA5.1^[17], 按照 Neighbor-Joining 法聚类, 选择 1 000 个重复做 Bootstrap 值分析, 构建系统发育树^[18]。

1.2.3 多样性指数 多样性指数(H')可以反映每种植物内生真菌的物种多样性程度, 按 Shannon-Weiner 指数计算^[19]。

$$H' = - \sum_{i=1}^k P_i \ln P_i$$

式中: P_i 指某种内生真菌的菌株数占全部内生真菌菌株数的百分数; k 表示内生真菌菌株数量。

1.3 胞外酶产生菌的筛选

1.3.1 蛋白酶筛选方法 在无菌条件下, 将膜过滤的脱脂高蛋白牛奶加入灭菌后的肉汤培养基中倒平板。穿刺接种后 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 待菌落生长到 1 cm 时测量降解圈直径。

1.3.2 淀粉酶筛选方法 使用淀粉酶筛选培养基平板, 无菌条件下穿刺接种后 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 待菌落生长 1 cm 时缓慢地将卢戈氏碘液覆盖培养基, 染色 1 min 后测量降解圈直径。

1.3.3 纤维素酶筛选方法 使用纤维素酶筛选培养基平板, 无菌条件下穿刺接种后 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 待菌落生长 1 cm 时缓慢加入刚果红染液(1 000 mg/L)覆盖培养基染色 3 min, 再用 NaCl 水溶液(58 500 mg/L)浸泡脱色 3 min 后测量降解圈直径。

1.3.4 脂肪酶筛选方法 按脂肪酶筛选培养基配制培养基, 灭菌后加入 PVA-橄榄油乳化液 120 mL 摇匀倒平板, 无菌条件下穿刺接种后 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 待菌落生长 1 cm 时, 测量黄色降解圈直径。

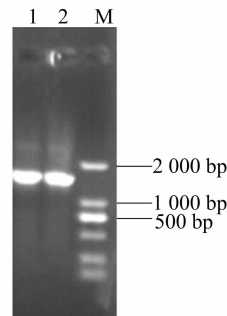
2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离

最后一次冲洗用灭菌去离子水涂布 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1~3 d, 平板上无菌落则表明经表面消毒后, 样品表面附生菌影响已消除。共分离纯化细菌 52 株, 菌种在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保藏。在陕西省汉中市勉县武侯祠采集古旱莲材料, 在 12 h 内将样品带回实验室并在 1 周内处理, 进行内生细菌的分离工作, 在一定程度上避免了因为人为因素对试验结果造成的影响, 保证内生细菌较为完全的分离。

2.2 分离菌株的系统发育分析

2.2.1 旱莲内生细菌 16S rRNA 序列特异性扩增 分离纯化旱莲内生细菌, 应用细菌 16S rRNA 序列通用引物进行特异性扩增, 得到约 1 500 bp 的目标片段, 见图 1。切胶回收目标条带可消除非特异性片段的影响。



M—DL2000 marker; 1、2—细菌 16S rRNA 基因产物
图1 古旱莲内生细菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

2.2.2 内生细菌的分子生物学鉴定 获得分离内生细菌的登录号为 KR149373~KR149424。本研究较系统地阐述了古旱莲内生细菌的多样性, 采用传统培养方法共分离得到古旱莲内生细菌 52 株, 分子生物学归类为 18 个属。根据测序结果不同, 将菌株归为 19 个分类单元(OTUs), 这些菌株分属 4 个门, 拟杆菌门(Bacteroidetes)下属 1 个单元, 占总数的 7.7%, 鞘胺醇杆菌属(*Sphingobacterium* sp.) 4 株; 厚壁菌门(Phylum Firmicutes)下属 5 个单元, 占总数的 15.4%, 分别是游动球菌属(*Planococcus* sp.) 1 株, 葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.) 2 株, 芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.) 3 株, 类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.) 1 株, 德库菌属(*Desemzia* sp.) 1 株; 变形菌门(Proteobacteria)下属 5 个单元, 占总数的 19.2%, 分别是不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) 3 株, 假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) 1 株, 埃希氏菌属(*Escherichia* sp.) 4 株, 克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.) 1 株, 克罗诺斯菌属(*Cronobacter* sp.) 1 株; 放线菌门(Actinobacteria)下属 7 个单元, 占总数的 40.4%, 分别是库克菌属(*Kocuria* sp.) 6 株, 微球菌属(*Micrococcus* sp.) 5 株, 微杆菌属(*Microbacterium* sp.) 3 株, 短杆菌属(*Brevibacterium* sp.) 4 株, 海迪茨氏菌属(*Dietzia* sp.) 1 株, 放线菌属(*Actinobacterium* sp.) 1 株, 微球菌科(Micrococcaceae) 1 株; 未培养细菌 9 株, 占总数的 17.3%。

在门的分类上,优势菌群为放线菌门(Actinobacteria),在属的分类上,优势菌群为库克菌属(*Kocuria* sp.)。古早莲内生细菌 16S rRNA 序列同 NCBI 数据库中相关序列相似性为 82% ~100%,具体见表 1。

表 1 古早莲内生细菌 16S rRNA 基因序列多样性对比

类群	克隆数量	代表克隆	最相似菌株[登录号]	相似(%)
拟杆菌门 7.7%	4			
	4	HL-B3	鞘胺醇杆菌属[KJ563238]	100
厚壁菌门 15.4%	8			
	1	HL-B8	游动球菌属[AY538695],动性球菌	99
	2	HL-B28	葡萄球菌属[FJ613565],表皮葡萄球菌	100
	3	HL-B29	芽孢杆菌属[KM203820],芽孢杆菌	99
	1	HL-B44	类芽孢杆菌属[KJ781901],类芽孢杆菌	97
	1	HL-B54	德库菌属[KP745590]	98
变形菌门 19.2%	10			
	3	HL-B11	不动杆菌属[DQ409078],不动杆菌属	99
	1	HL-B16	假单胞菌属[KM187120],假单胞菌	99
	4	HL-B30	埃希氏菌属[GU292624],埃希氏菌	99
	1	HL-B75	克罗诺斯菌属[JF690880],阪崎肠杆菌	99
	1	HL-B65	克雷伯氏菌属[KF991498],克雷伯氏菌	99
放线菌门 40.4%	21			
	6	HL-B6	库克菌属[KR085939]	100
	5	HL-B7	微球菌属[HQ663910],云南微球菌	99
	3	HL-B14	微杆菌属[KM507679],微杆菌	99
	4	HL-B18	短杆菌属[KF295058],短杆菌	99
	1	HL-B67	海迪茨氏菌属[AB576128],迪茨氏菌	99
	1	HL-B72	放线菌属[KC887937],放线细菌	82
	1	HL-B81	微球菌科[KM885169],细球菌科	99
未培养细菌 17.3%	9			
	9	HL-B23	未培养细菌[JQ186450]	99

2.2.3 细菌 16S rRNA 系统发育分析 使用细菌通用引物 27F/1492R 通过 PCR 扩增所分离细菌的 16S rRNA 序列片段,下载相似序列构建系统发育树,系统发育将 52 个种属归为 4 个门,拟杆菌门包含鞘胺醇杆菌属 1 个类群,约占总数的 7.7%;厚壁菌门包含游动球菌属,葡萄球菌属,芽孢杆菌属,类芽孢杆菌属,德库菌属 5 个类群,约占总数的 15.4%;变形菌门包含不动杆菌属,假单胞菌属,埃希氏菌属,克雷伯氏菌属,克罗诺斯菌属 5 个类群,约占总数的 11.5%;放线菌门包含库克菌属,微球菌属,微杆菌属,短杆菌属,海迪茨氏菌属,放线菌属,微球菌科 7 个类群,约占总数的 40.4%,是最优势类群;未培养细菌 9 株,占总数的 17.3%。

根据细菌 16S rRNA 序列构建系统发育树,见图 2。拟杆菌门下 1 个 OTU,鞘胺醇杆菌属的代表菌株 HL-B3 与未培养细菌的代表菌株 HL-B23 聚在一处,代表菌株与已知序列的相似度为 99%;厚壁菌门下 5 个 OTU,游动球菌属的代表菌株 HL-B8 与葡萄球菌属的代表菌株 HL-B28、芽孢杆菌属的代表菌株 HL-B29、类芽孢杆菌属的代表菌株 HL-B44、德库菌属的代表菌株 HL-B54 在进化树上聚在一处,代表菌株与已知序列的相似度在 97% 以上;变形菌门下 5 个 OTUs,不动杆菌属的代表菌株 HL-B11 与假单胞菌属的代表菌株 HL-B16、埃希氏菌属的代表菌株 HL-B30、克雷伯氏菌属的代表菌株 HL-B75、克罗诺斯菌属的代表菌株 HL-B65 在进化树上聚在一处,代表菌株与已知序列的相似度为 99%;放线菌门下 7 个 OTUs,库克菌属的代表菌株 HL-B6 与微球菌属的代表菌株 HL-B7、微杆菌属的代表菌株 HL-B14、短杆菌属的代表菌株 HL-B18、海迪茨氏菌属的代表菌株 HL-B67、放线菌属的代表菌株 HL-B72、微球菌科的代表菌株 HL-B81 在进化树上聚在一处,代表菌株与已知序列的相似度在 82% 以上。

2.2.4 古早莲内生细菌的多样性指数 根据多样性指数公式,计算古早莲内生细菌的多样性指数为 2.666 6。多样性指数越高说明物种的多样性越丰富。Klopper 等的研究采用 4 种不同的培养基分离木兰科植物内生真菌,多样性指数在 1.33 ~1.81 之间^[20],与本研究相比,古早莲内生细菌的多样性是十分丰富的。

2.3 胞外酶产生菌的筛选

产蛋白酶菌株筛选:将纯培养后的单菌落菌液穿刺接种至蛋白酶筛选培养基,37℃培养 12 h,得到分解透明圈即是产蛋白酶菌株,共 22 株。

产淀粉酶菌株筛选:将纯培养后的单菌落菌液穿刺接种至淀粉酶筛选培养基,37℃培养 12 h,使用卢氏碘液染色,可见白色透明圈即是产淀粉酶菌株,共 3 株。

产纤维素酶菌株筛选:将纯培养后的单菌落菌液穿刺接种至纤维素酶筛选培养基,37℃培养 12 h,使用刚果红(1 000 mg/L)染液染色 5 min,再用 NaCl(58 500 mg/L)脱色 5 min。得到的透明圈即是产纤维素酶菌株,共 7 株。

产脂肪酶菌株筛选:将纯培养后的单菌落菌液穿刺接种至脂肪酶筛选培养基,37℃培养 12 h,菌落产生的脂肪酶将脂肪降解为脂肪酸使溴甲基紫变为黄色,即是产脂肪酶菌株,共 4 株,结果见表 2。

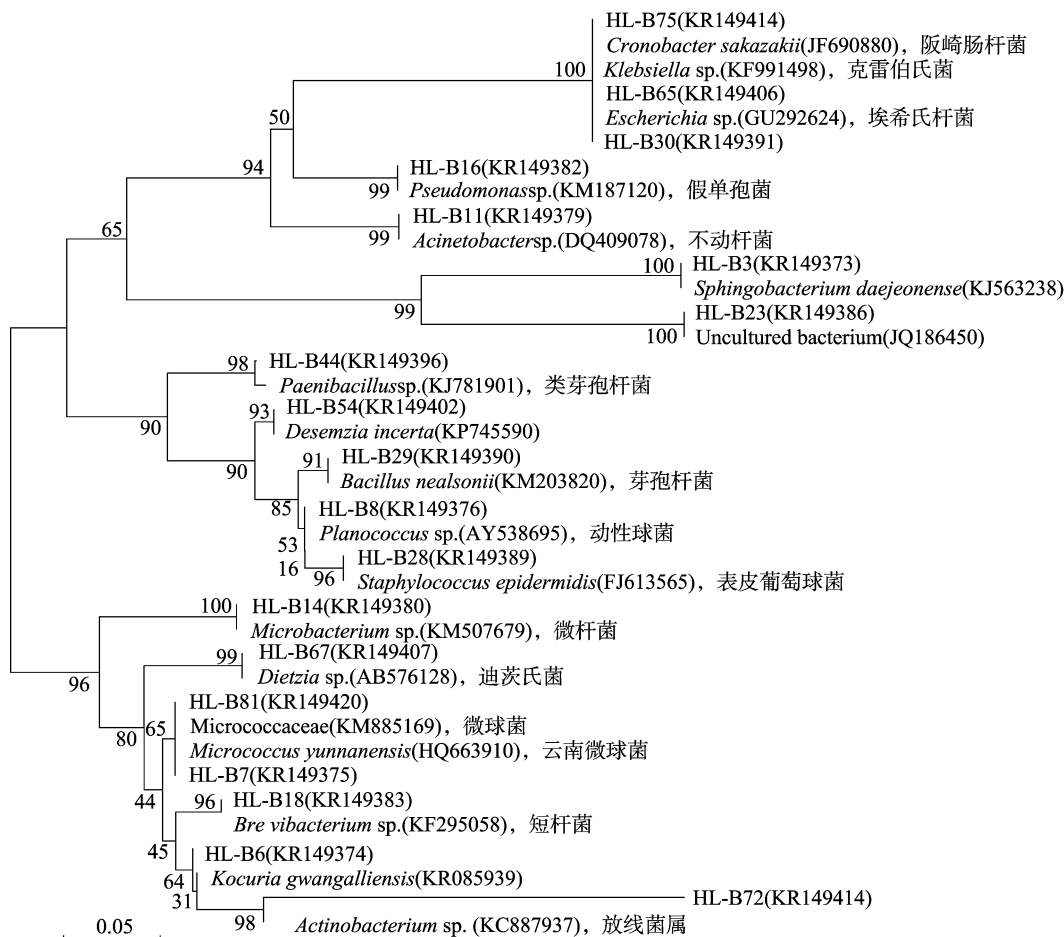


图2 古旱莲纯培养内生细菌 16S rDNA 基因序列的系统发育树

3 结论与讨论

药用植物内生细菌的研究日渐增多,如红豆杉^[20]、苦豆子^[21]、沙冬青^[22]等,但对木兰科植物内生细菌的研究依旧较少。本研究发现,古旱莲分离内生细菌 52 个株,可归为 4 个门,拟杆菌门包含鞘胺醇杆菌属 1 个类群,约占总数的 7.7%;厚壁菌门包含游动球菌属、葡萄球菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、德库菌属 5 个类群,约占总数的 15.4%;变形菌门包含不动杆菌属、假单胞菌属、埃希氏菌属、克雷伯氏菌属、克罗诺斯菌属 5 个类群,约占总数的 11.5%;放线菌门包含库克菌属、微球菌属、微杆菌属、短杆菌属、海迪茨氏菌属、放线菌属、微球菌科 7 个类群,约占总数的 40.4%,是最优势类群;未培养细菌 9 株,占总数的 17.3%。本研究分离到的细菌以放线菌为最优势类群,这可能与试验材料,培养基等因素相关。本研究分离到 9 株未培养菌,分类地位目前不明确,有待于进一步的研究。利用传统方法研究植物内生菌分离得到的内生菌数量及种类是有限的,须要结合免培养方法才能更为有效地了解植物内生菌的群落结构。目前国内外对植物内生菌资源的研究取得了一定的进展,但相对于我国丰富的药用植物资源来说,对其内生菌资源的开发和利用还是远远不够的^[23]。

据统计我国药用植物有 11 146 种,药用植物作为一类特殊的植物其内生环境具有一定的特殊性^[24]。全面系统地对药用植物内生菌资源及其活性代谢产物进行研究是非常有必要

的。研究植物内生细菌的目的在于应用,自黄瓜、棉花等植物体内的细菌和宿主植物的抗病能力关系^[22]被发表以来,很多研究人员开始致力于植物体内的细菌研究,至今在植物保护方面积累了大量的植物内生细菌研究信息^[23-25]。本研究分离到的内生细菌与植物之间的关系还需要进一步深入探讨。

植物内生细菌研究的另一个热点则在生理活性物质研究领域^[26]。分离自古旱莲中的内生细菌有一部分能够分泌胞外淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶,而且有些菌株还具有同时分泌其中 2 种水解酶的能力,这种产酶特性可能与其适应独特的生活环境有关。目前已经从木兰科植物五味子中分离出内生拮抗细菌^[27-28]。本研究鉴定的 3 株高产酶活性菌株中,1 株产淀粉酶为类芽孢杆菌,2 株产蛋白酶为微杆菌,说明古旱莲内生类芽孢杆菌和微杆菌可能具有重要的工业酶开发价值。

参考文献:

- [1] 李天慧,付启芳. 旱莲繁殖试验[J]. 陕西林业科技,1986(4): 20-21.
- [2] 许元明,农娟,庞怀英. 木兰科植物的研究进展[J]. 绿色科技,2013(2):74-77.
- [3] 王永慧,叶方,张秀华. 辛夷药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国医药导报,2012,9(16):12-14.
- [4] 李娜,史彩红,车晶玉. 厚朴的药理活性与临床应用研究进展[J]. 中国医药指南,2011,9(9):191-193.

表 2 古早莲内生细菌产酶活性筛选

菌株编号	淀粉酶	蛋白质酶	纤维素酶	脂肪酶
HL-B3	-	-	+	-
HL-B6	-	-	-	-
HL-B7	++	-	-	-
HL-B8	-	-	-	++
HL-B9	-	-	-	-
HL-B10	-	-	+	-
HL-B11	-	-	+	+
HL-B14	-	-	-	-
HL-B15	-	+++	-	-
HL-B16	-	-	-	-
HL-B18	-	-	-	-
HL-B19	-	-	-	-
HL-B22	-	-	-	-
HL-B23	-	++	+	-
HL-B25	-	++	-	-
HL-B27	-	-	-	-
HL-B28	-	+	-	-
HL-B29	-	-	-	-
HL-B30	-	+	-	-
HL-B32	-	+++	-	-
HL-B33	-	-	+	-
HL-B34	-	+	-	-
HL-B41	-	-	-	-
HL-B44	+++	-	-	-
HL-B45	-	-	-	-
HL-B47	-	-	-	-
HL-B48	-	+	-	-
HL-B49	-	+	-	-
HL-B50	-	+	-	-
HL-B54	-	-	-	-
HL-B59	-	-	-	-
HL-B63	-	-	-	-
HL-B64	-	-	-	-
HL-B65	-	++	+	-
HL-B67	-	+	-	-
HL-B68	-	-	-	-
HL-B69	-	-	-	-
HL-B71	-	++	-	+
HL-B72	-	+	-	-
HL-B73	-	-	-	-
HL-B74	-	+	-	-
HL-B75	-	+	-	-
HL-B76	-	++	-	-
HL-B77	-	++	-	+
HL-B78	-	+	-	-
HL-B79	-	-	-	-
HL-B80	-	-	-	-
HL-B81	-	+	-	-
HL-B82	+	-	++	-
HL-B83	-	++	-	-
HL-B84	-	-	-	-
HL-B85	-	+	-	-

注: + 表示 0~2 cm; ++ 表示 2~5 cm; +++ 表示 >5 cm; - 表示无结果。

[5] 夏杰, 方芳, 赵会娜, 等. 鹅掌楸内生菌分离纯化及其抗菌活性初步研究[J]. 现代农业科学, 2009, 16(6): 10-12.

[6] 王丽娜, 肖红, 任跃英. 五味子根内生真菌的分离及其抑菌活

性的研究[J]. 菌物研究, 2010, 8(4): 226-230.

[7] 龙建友, 夏建荣. 玉兰植物内生真菌的分离筛选及活性菌株研究[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2011, 10(5): 38-42.

[8] 全保慧, 关铭. 厚朴内生真菌的分离鉴定及药理学活性的分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(7): 36-40.

[9] 陈晔, 樊有斌, 彭琴, 等. 凹叶厚朴内生真菌研究初报[J]. 菌物研究, 2006, 4(3): 52-54.

[10] 丁常宏, 都晓伟, 徐莹. 药用植物内生真菌的功能研究进展[J]. 中医药学报, 2013, 41(3): 168-171.

[11] 兰阿峰, 杨曼, 郭素芬, 等. 免培养法对大鲵肠道微生物多样性的研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1342-1349.

[12] 张蓓蓓, 宋萍, 王柱, 等. 产蛋白酶优良腐乳生产菌毛霉的分离筛选与鉴定[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(4): 92-94.

[13] 赵望峰, 周晶. 枯草芽孢杆菌产淀粉酶条件的优化[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(11): 2315-2317.

[14] 樊程, 李双江, 李成磊, 等. 大熊猫肠道纤维素分解菌的分离鉴定及产酶性质[J]. 微生物学报, 2012, 52(9): 1113-1121.

[15] 丁小维, 邓百万, 陈文强, 等. 中国红豆杉内生真菌的分离鉴定及其产紫杉醇的特性[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(2): 104-106.

[16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.

[17] 陆晓菊, 官会林, 张正芸, 等. 三七连作根际土壤微生物区系的 16S rRNA 系统遗传多样性[J]. 微生物学报, 2015, 55(2): 205-213.

[18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.

[19] 马勉娣, 黄治钰, 张秀英, 等. 葡萄叶可培养内生真菌多样性与分布特征[J]. 中国农学通报, 2014, 30(13): 118-125.

[20] Kloepper J W, Beauchamp C J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(12): 1219-1232.

[21] Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(8): 827-837.

[22] Berg G, Krechel A, Ditz M, et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 51(2): 215-229.

[23] 王志伟, 陈永敢, 王庆臻, 等. 中国植物内生微生物研究的发展和展望[J]. 微生物学通报, 2014, 41(3): 482-496.

[24] 刘宁, 张辉, 郑文, 等. 药用植物内生放线菌的生物活性及菌株 D62 的代谢产物分析[J]. 微生物学报, 2007, 97(5): 823-827.

[25] Melnick R L, Bailey B A, Backman P A. Bacterial endophytes of perennial crops for management of plant disease[M]. New York: Bacteria in Agrobiolgy, Disease Management, 2013: 49-76.

[26] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349-363.

[27] 徐丽, 严雪瑞, 傅俊范, 等. 五味子内生拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 植物保护, 2009, 35(3): 47-50.

[28] 金岩, 孙晶波, 高洁, 等. 五味子中内生拮抗活性细菌的分离与筛选[J]. 中草药, 2014, 45(7): 996-1001.