

## 针茅内生细菌菌株 265ZY4 的鉴定及其生物学功能

王玉琴 杨成德\* 王颖 姚玉玲 陈秀蓉

(甘肃农业大学草业学院 草业生态系统教育部重点实验室 甘肃省草业工程实验室

中-美草地畜牧业可持续发展研究中心 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**【目的】为高寒草地针茅(*Stipa capillata* L.)内生细菌的开发和利用提供理论依据,为生物菌肥的研究提供有价值的菌种资源。【方法】利用常规分离方法从针茅中分离获得菌株 265ZY4,采用平板对峙法、Salkowski 比色法和钼锑抗比色法对该内生菌进行拮抗能力测定、产 IAA 以及溶磷、固氮能力测定。根据形态学和 16S rRNA 序列分析对菌株 265ZY4 进行鉴定,确定该菌株的分类学地位。【结果】菌株 265ZY4 对 3 种马铃薯真菌病害均有较好的抑制作用,且对马铃薯炭疽病(*Colletotrichum coccodes*)的拮抗作用最明显,抑菌率为 83.03%;该菌株能分泌 IAA,在不含色氨酸的培养基中的分泌量为 9.30 mg/L,且有较好的溶解无机磷的能力,无固氮能力;通过培养性状和形态特征,结合 16S rRNA 序列分析,将菌株 265ZY4 鉴定为 *Bacillus subtilis*。【结论】菌株 265ZY4 鉴定为枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*,具有溶磷、产 IAA 等生物学功能,具有开发潜力。

**关键词:** 针茅, 内生细菌, 生物学功能, 鉴定

Identification and determination of biological functions of endophytic bacteria 265ZY4 from *Stipa capillata*

WANG Yu-Qin YANG Cheng-De\* WANG Ying YAO Yu-Ling CHEN Xiu-Rong

(Key Laboratory of Grassland Ecosystem (Gansu Agricultural University), Ministry of Education, College of Grassland, Gansu Agricultural University, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U.S. Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** [Objective] The result of this study will provide evidences for the exploration and utilization of plant endophyte from *Stipa capillata* on alpine meadow, and provide a valuable resource for the study of biological fertilizer. [Methods] This test exploited the conventional methods of separation of endophytic bacteria 265ZY4 from *Stipa capillata*, and the strain was studied by 16S rRNA sequence analysis and biological characteristics including antibacterial activities, IAA secretion, phosphate solubilization and nitrogen fixation by using *in vitro* antagonistic tests, Salkowski colorimetry and Mo-Sb colorimetry. [Results] Strain 265ZY4 demonstrated inhibitory activities to three fungal pathogens of potato, the best inhibitory rate of the strain were 83.03% against *Colletotrichum coccodes*. IAA was secreted by 265ZY4 as high as 9.30 mg/L in the King medium without addition of tryptophan, The strain also possessed the capacity of phosphate solubilization and without the capacity of nitrogen

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31160122); 草业生态系统教育部重点实验室开放课题(No. CYzs-2011011)

\*通讯作者: Tel: 86-931-7632161; ✉: yangcd@gsau.edu.cn

收稿日期: 2014-04-02; 接受日期: 2014-06-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-07-30

fixation. With the cultural and morphological characteristics, combined with 16S rRNA sequence analysis, the strain 265ZY4 was identified as *Bacillus subtilis*. **[Conclusion]** Strain 265ZY4 was preliminarily identified as *B. subtilis*, and has the good biological function. It should be an interesting isolate for developing agriculture.

**Keywords:** *Stipa*, Endophytic bacteria, Biological functions, Identification

长期以来,农业上主要通过化学农药防治植物病害,虽然见效快,但会引起植物病原抗药性、农药残留等问题,造成严重的环境污染和生态破坏<sup>[1]</sup>,因此,生物防治研究越来越受到重视,有关从土壤或植物根际土壤微生物中分离筛选植物病害生防菌积累了许多资料<sup>[2-4]</sup>。研究发现,所有健康植物体内几乎都存在内生细菌<sup>[5]</sup>,内生细菌不仅将植物作为其栖息场所,也能有效地促进植株生长以及抑制病原菌的侵染或提高宿主植物的抗病性<sup>[6]</sup>。植物内生细菌可通过分泌吲哚乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)促进植物生长,并且有利于根从土壤中吸收更多的营养物质。氮、磷是植物生长所必需的大量元素,大多植株不能直接利用自然界中的氮素,固氮细菌可以将空气中的  $N_2$  还原为可以被植物吸收利用的  $NH_4^+$ ,促进植物生长<sup>[7]</sup>;而土壤中以磷酸三钙存在的磷溶解性差,难以被植物吸收,溶磷微生物能将难溶性磷酸盐转化为植物可吸收利用的形态,能够显著改善作物的磷素营养,提高作物的产量<sup>[8]</sup>。因此,筛选并研究植物内生细菌,可为今后开发固氮、解磷、产吲哚乙酸微生物肥料提供菌株资源和筛选依据。张颖等<sup>[9]</sup>从小麦内生细菌中筛选出对小麦全蚀病菌具有拮抗作用的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) G-32,该拮抗菌可以在一定时间内定殖于植物根系,弥补利用土壤拮抗微生物对其进行生物防治而受土壤中其他微生物的竞争作用所造成的不足。李艳华等<sup>[10]</sup>筛选的抗半夏软腐病的内生拮抗放线菌 07JX3-2 和 07JX3-7,两个拮抗菌株的获得为半夏软腐病的生物防治研究和应用奠定了基础。高晓星等<sup>[11]</sup>研究了线叶嵩草内生细菌的生物学特性,发现菌株 X4 具有抑菌、产 IAA、溶磷等能力。李倍金等<sup>[12]</sup>从禾草中分离到具有高固氮酶活性的菌株 ENB47。

针茅(*Stipa capillata* L.)为多年生旱生草本植物,分布于我国华北、西北、青藏高原等地,是高寒草原的主体构成部分<sup>[13]</sup>。本研究以东祁连山高寒草地针茅内生细菌菌株 265ZY4 为研究对象,对其生物学功能进行了测定,并利用 16S rRNA 序列分析,结合形态特征对其进行了鉴定,以期为高寒草地针茅内生细菌的开发和利用提供理论依据,同时也为生物菌肥的研究提供有价值的菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株:**供试菌株 265ZY4 分离自东祁连山高寒牧草针茅的叶部;病原真菌马铃薯坏疽病菌(*Phoma foveata*)、马铃薯炭疽病菌(*Colletotrichum coccodes*)和马铃薯枯萎病菌(*Fusarium avenaceum*)由甘肃农业大学草业学院提供。

**1.1.2 培养基:**肉汁胨培养基(NA)<sup>[14]</sup>、PDA 培养基<sup>[14]</sup>、金氏(King)培养基<sup>[11]</sup>、Pikovaskaia 培养基(PKO)<sup>[15]</sup>和阿须贝无氮培养基<sup>[16]</sup>,按参考文献配制。

### 1.2 方法

**1.2.1 生物学功能测定:**(1)抑制能力测定:采用平板对峙法<sup>[17]</sup>测定抑菌效果。将植物病原真菌接种于 PDA 培养基中央,距菌饼 2.5 cm 处点接菌株 265ZY4,每平板接 4 点,3 次重复,以无菌水为对照,25 °C 恒温培养,待对照病原菌长满培养皿后,测量病原菌菌落直径,计算抑菌率。

抑菌率(%)=(对照真菌菌落直径-受抑制真菌菌落直径)/(对照真菌菌落直径-0.4)×100

(2)对病原菌菌丝生长的影响:采用平板对峙法于接种后 7 d 观察病原菌菌丝形态并显微拍照。

(3)分泌 IAA 能力的测定:定性测定:采用 Salkowski 比色法<sup>[18]</sup>,PC 比色液和 S2 比色液的组

成与配方见文献[19]。定量测定：标准曲线采用纯 3-IAA 制作<sup>[20]</sup>。将经 King 培养液培养 12 d 的菌悬浮液和空白对照离心(4 °C, 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, 立即测定  $OD_{530}$  值, 以加比色液的空白对照调零, 重复 3 次。根据标准曲线计算出菌株 265ZY4 分泌 IAA 的量。

(4) 溶磷能力的测定：定性测定：采用溶磷圈法<sup>[21]</sup>。将菌株 265ZY4 点接于 Pikovaskaia 培养基 (PKO) 平板上, 每皿 4 个接菌点, 重复 3 次, 置于 28 °C 恒温培养箱培养, 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)确定溶磷能力。比值越大, 表示溶磷能力越强。定量测定：将菌株 265ZY4 接种于 PKO 培养液中, 重复 3 次, 以不接菌的培养液为对照。28 °C、160 r/min 控温摇培 10 d, 离心(4 °C, 10 000 r/min, 15 min)取上清液<sup>[9]</sup>, 采用钼锑抗比色法<sup>[22]</sup>测定有效磷增量。

(5) 固氮能力测定：供试内生细菌菌悬液 0.2 mL 接种于阿须贝无氮平板和液体培养基内, 以无菌水为对照, 3 次重复, 平板置于 28 °C 培养箱培养, 液体培养基置于 120 r/min 振荡培养, 第 7 天平板上有菌落和液体培养基变浑浊者为阳性, 继代培养 3 代仍为阳性, 则认为具有固氮能力<sup>[23]</sup>。

**1.2.2 菌株 265ZY4 的鉴定：**(1) 形态学特征：将菌株 265ZY4 纯化后接于牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基, 置于 28 °C 恒温箱中培养 3 d 后, 观察并描述菌落的形态, 将菌株 265ZY4 进行革兰氏染色<sup>[14]</sup>, 观察菌体着色和测量菌体大小(30 个), 并显微拍照。

(2) 16S rRNA 序列分析：供试菌株的基因组 DNA 提取采用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒。采用通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>[17]</sup> 扩增细菌的 16S rRNA 基因。PCR 反应体系为 10×Buffer 5 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mol/L) 3 μL, dNTPs (5 mmol/L) 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL, 引物 1 (10 μmol/L) 1 μL, 引物 2 (10 μmol/L) 1 μL, 模

板 DNA 1 μL (以加了 1 μL 双蒸水为空白对照), 补 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL。扩增条件为：94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 48 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 32 次, 72 °C 8 min。

成功扩增的产物送上海生工生物工程有限公司进行测序。将测定的序列在 GenBank 中进行 BLAST 相似性比对分析, 选取若干较高相似性的序列, 用 ClustalX 1.8 进行多重序列比较, 最后用 MEGA 4.0 的 Neighbor-Joining 构建系统发育树, 确定该菌株的系统发育学地位。

## 2 结果与分析

### 2.1 抑菌能力测定

对峙试验结果表明, 菌株 265ZY4 对马铃薯坏疽病菌、马铃薯炭疽病菌和马铃薯枯萎病菌的抑菌率分别为 78.48%、83.03%和 63.06% (图 1), 说明菌株 265ZY4 对 3 种马铃薯病原真菌均有良好的拮抗作用, 该菌株具有一菌多防的功能。

### 2.2 对多种病原菌菌丝生长的影响

镜检观察到马铃薯枯萎病菌、马铃薯炭疽病菌和马铃薯坏疽病菌菌丝被菌株 265ZY4 抑制后, 病原菌菌丝生长畸形, 胞内物质外泄, 菌丝扭曲、变形、且菌丝数量增多, 末端膨大(图 2), 说明菌株 265ZY4 可以通过使菌丝发生畸形变化来影响病菌菌丝生长。

### 2.3 分泌 IAA 能力测定

**2.3.1 定性测定：**菌株 265ZY4 在不含色氨酸的 King 培养液和含有 100 mg/L 色氨酸的 King 培养液中都变红(图 3), 说明可以分泌 IAA。

**2.3.2 测定：**采用纯 3-IAA 制作标准曲线, PC 曲线： $Y=0.042X-0.051$  ( $R^2=0.914$ )；S2 曲线： $Y=0.009X+0.719$  ( $R^2=0.989$ )。菌株 265ZY4 分别在不含色氨酸和含色氨酸的 King 培养液中培养 12 d 后, 根据 PC 和 S2 标准方程, 在不含色氨酸的 King 培养液中菌株 265ZY4 分泌 IAA 的量为 9.30 mg/L, 而在含 100 mg/L 色氨酸的 King 培养基中分泌量为 7.92 mg/L, 说明色氨酸对增加菌株 265ZY4 分泌 IAA 量的差异不显著, 说明没有外源色氨酸时, 菌株 265ZY4 仍有较强分泌 IAA 的能力。

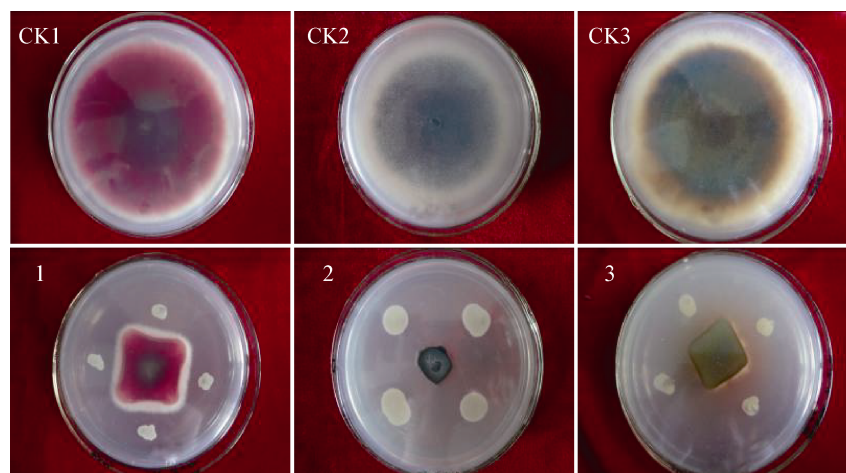


图 1 菌株 265ZY4 对 3 种病原菌的抑制效果

Figure 1 Inhibition effects of strain 265ZY4 to three kinds of pathogenic fungi

注：1：马铃薯枯萎病菌；2：马铃薯炭疽病菌；3：马铃薯坏疽病菌；CK：对照。

Note: 1: *Fusarium avenaceum*; 2: *Colletotrichum coccodes*; 3: *Phoma foveata*; CK: Contrast.

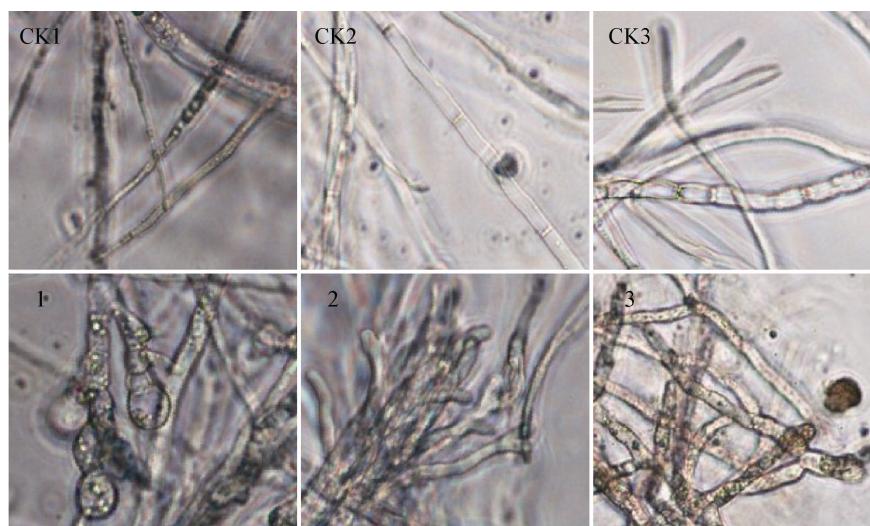


图 2 菌株 265ZY4 对病原菌菌丝的影响

Figure 2 Influence of strain 265ZY4 against the hyphae of pathogenic fungi

注：1：枯萎处理；2：炭疽处理；3：坏疽处理；CK：对照。

Note: A: Inhibit hyphae of *Fusarium avenaceum*; 2: Inhibit hyphae of *Colletotrichum coccodes*; 3: Inhibit hyphae of *Phoma foveata*; CK: Contrast.

## 2.4 磷能力的测定

定性测定结果(图 4)表明,菌株 265ZY4 在 PKO 培养基上培养 5 d 后,溶磷圈直径/菌落直径( $D/d$ )值为 1.32,即菌株 265ZY4 可在 PKO 平板培养基上形成透明圈,说明该菌株可分泌一些酸性物质,并

向周围的培养基中扩散,使菌落周围的磷酸盐  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  溶解,即该菌株具有溶磷性。定量测定结果表明,菌株 265ZY4 在 PKO 培养液中的有效磷增量为 13.646 mg/L,说明此菌对无机磷有良好的溶解能力。另外,试验结果表明该菌株无固氮能力。



图 3 菌株 265ZY4 的比色反应  
Figure 3 Strain 265ZY4 colorimetric reaction



图 4 菌株 265ZY4 在 PKO 无机磷培养基上的溶磷圈  
Figure 4 Phosphorus-solubilizing halo of phosphate-solubilizing bacteria on PKO medium of strain 265ZY4

2.5 菌株 265ZY4 的鉴定

2.5.1 形态特征：菌株 265ZY4 在牛肉膏蛋白胨平板培养基 28 °C 培养 3 d ,菌落大小为 0.3–0.4 cm ,圆形，边缘锯齿状，表面光滑、湿润、有光泽，不透明，乳白色(图 5)。革兰氏染色呈阳性(图 6)，杆状，有芽孢，菌体大小为(1.532×0.364) μm–(3.241×0.917) μm。



图 5 265ZY4 的菌落  
Figure 5 Colonies of strain 265ZY4

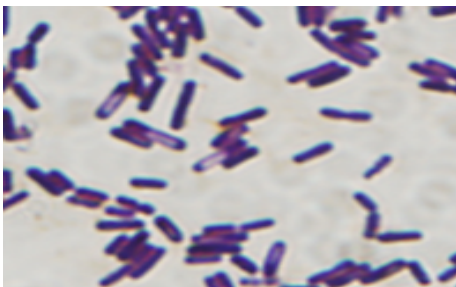


图 6 265ZY4 革兰氏染色  
Figure 6 Gram staning of strain 265ZY4

2.5.2 16S rRNA 序列分析：提取的菌株 265ZY4 的 DNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，条带清晰，且无非特异性条带，即该基因组 DNA 浓度较高，纯度较好，可用作 PCR 扩增的模板。

PCR 产物经检测得到一条约 1 500 bp 的 DNA 片段，测序后获得该菌株的 16S rRNA 片段有 1 466 个碱基，序列在 GenBank 中登录号为 KF831368。经 BLAST 相似性分析表明：菌株 265ZY4 (KF831368) 与 GenBank 中的 *Bacillus subtilis* (KC312157.1)、*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (HQ831407.1)、*Bacillus* sp. (KF956703.1) 的相似性都在 99%，下载相似性较高的序列，并用 ClustalX 1.8 软件进行多重序列比对后，再用 MEGA 4.0 软件采用邻接法构建了系统发育树(图 7)，该病原菌与 *Bacillus subtilis* (KC312157.1)聚在一起，即其亲缘关系最近，结合形态学特征，鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。



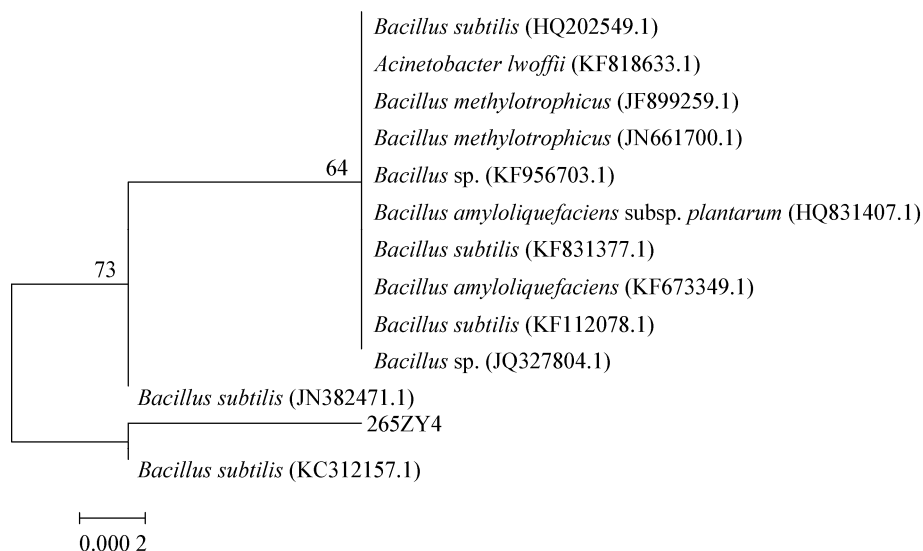


图 7 菌株 265ZY4 的 16S rRNA 系统发育树  
Figure 7 16S rRNA phylogenetic tree of strain 265ZY4

### 3 讨论

许多研究已证明,植物体内含有大量具有防病作用的内生细菌,内生细菌是植物病害生物防治的天然资源菌。从植物体内分离筛选具有防病作用的内生细菌,将具有良好的应用潜力。如崔林等<sup>[24]</sup>从马铃薯中分离筛选到多株对环腐病具有良好拮抗和防病作用的内生细菌;黎起秦等<sup>[25]</sup>从番茄中分离到对番茄青枯病具有防病效果的内生芽孢杆菌;王剑峰等<sup>[26]</sup>从半夏中分离的内生菌 L3R3-1 对胡萝卜果胶杆菌 (*Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovora* ECCB)等 9 种真菌病原菌具有拮抗作用,抑菌谱较宽。柯杨等<sup>[27]</sup>从冬凌草中分离筛选出一株对镰刀菌属(*Fusarium*)及大茎点霉属(*Macrophoma*)的病原菌具有显著拮抗作用的细菌。本试验从高寒草地针茅牧草中分离出内生细菌菌株 265ZY4,对其进行拮抗能力测定,结果表明,该菌株对马铃薯坏疽病菌、马铃薯炭疽病菌和马铃薯枯萎病菌均有良好的拮抗作用,其抑菌率分别为 78.48%、83.03% 和 63.06%,通过观察菌丝形态,表明该内生细菌可导致病原菌菌丝生长形态异常,出现膨大、扭曲现象,致使菌丝停止生长。但对于其抑菌物质以及抑

菌物质的作用机理还有待进一步研究。

植物内生细菌能产生植物促生物质,如植物激素吲哚乙酸等。假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等都能产生分泌吲哚乙酸或赤霉素,草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)还产生细胞分裂素,这些物质都能有效地促进植物的生长<sup>[28]</sup>。从墨西哥分离的 18 株重氮营养醋杆菌(*Acetobacter diazotrophicus*)<sup>[29]</sup>都有产生生长素的能力,表明重氮营养醋杆菌在与植物相互作用过程中不仅能固氮,而且还可以通过生长素的调节作用影响植物的代谢,促进植物生长。另外一项研究表明,产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)产生的生长素对水稻植株的生长和发育起着重要的调节作用<sup>[30]</sup>。刘琳等<sup>[31]</sup>从春兰根组织中共分离纯化得到的内生细菌中有 22.3%的菌株具有分泌 IAA 的能力。本研究中菌株 265ZY4 能够分泌 IAA,最大分泌量为 9.30 mg/L,处于目前报道的细菌分泌 IAA 量的范围 1.40–62.03 mg/L<sup>[32–33]</sup>。在加入色氨酸与不加色氨酸的 IAA 分泌量差异不大,说明在没有色氨酸作为前提物质存在时,该菌株仍能产生一定量的 IAA。这一发现为进一步研究内生细菌与牧草针茅之间

的相互作用提供了基础资料。

另外，该内生细菌还具有溶无机磷作用。溶磷细菌的筛选和溶磷能力的测定是微生物肥料研究及开发的基础，对提高土壤磷养分利用，改善土壤环境等都将产生巨大的作用。田宏等<sup>[34]</sup>从多年生草坪根际细菌中筛选出 10 株溶磷能力较强的菌株，其中，菌株 L17、X11 和 X20 在研制微生物肥料时有较大的潜力。陆瑞霞等<sup>[35]</sup>从地八角根际分离具有溶磷能力的菌株，通过溶磷圈法筛选出 7 株解磷能力较强的菌株。

菌株 265ZY4 是革兰氏阳性菌，菌体为杆状，在 PDA 培养基上为圆形，边缘锯齿状，表面光滑、湿润、有光泽，不透明，乳白色，经过 16S rRNA 基因分析，菌株 265ZY4 与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (KC312157.1) 的相似性系数达到 99%，表明在系统发育上其亲缘关系较近，因此，初步鉴定菌株 265ZY4 为枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*。枯草芽孢杆菌在抗菌活性和抗逆能力上表现出极强的优势，是具有极高开发潜能的生防菌<sup>[36-37]</sup>。菌株 265ZY4 对病原真菌有拮抗作用，且具有溶磷以及产 IAA 等生物学功能，为枯草芽孢杆菌的进一步开发利用提供了依据，也为开发利用高寒草地植物内生菌资源以及建立功能内生细菌资源库提供可靠的数据。

#### 4 结论

本研究从高寒草地针茅中分离得到内生细菌菌株 265ZY4 对 3 种马铃薯真菌病害均有较好的抑制作用，其中对马铃薯炭疽病的拮抗作用最明显，抑菌率为 83.03%；另外，该菌株能分泌 IAA，在不含色氨酸的培养基中的分泌量为 9.30 mg/L，且有较好的溶解无机磷的能力，无固氮能力；通过其形态特征和培养性状，结合 16S rRNA 序列的同源性分析，鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

#### 参 考 文 献

- [1] Yi YJ, Luo K, Liu EM. Effect of endophytic bacteria on biological control of plant disease[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2007, 21(5): 474-477 (in Chinese)  
易有金, 罗宽, 刘二明. 内生细菌在植物病害生物防治中的作用[J]. 核农学报, 2007, 21(5): 474-477
- [2] Li CS. A review on research progress of the biological control of soil-borne plant diseases with bacteria[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1992, 8(4): 168-172 (in Chinese)  
李长松. 拮抗性细菌生物防治植物土传病害的研究进展[J]. 生物防治通报, 1992, 8(4): 168-172
- [3] Wu BJ, Liang YJ, Ding YQ, et al. Study on disease-preventing and growth-promoting effects of two antifungal bacteria from tobacco rhizosphere[J]. Chinese Tobacco Science, 2013, 34(1): 66-71 (in Chinese)  
吴秉奇, 梁永江, 丁延芹, 等. 两株烟草根际拮抗菌的生防和促生效果研究[J]. 中国烟草科学, 2013, 34(1): 66-71
- [4] Li ZQ, Zhang L, Zhang Y, et al. Selection of rhizobacteria for biocontrol rhizoctonia solani damping off on mungbean[J]. Journal of Henan University (Natural Science), 2009, 39(1): 68-71 (in Chinese)  
李志强, 张莉, 张颖, 等. 绿豆立枯病根际生防细菌的筛选[J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2009, 39(1): 68-71
- [5] Luo MY, Lu XJ, Liao XL. Research advances on application of endophytic bacteria[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2010(7): 11-12 (in Chinese)  
罗茗月, 路雪君, 廖晓兰. 植物内生细菌的应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2010(7): 11-12
- [6] HE RQ. Plant endophyte becomes one of hot topics in the current microbiological study in China[J]. Microbiology, 2009, 36(1): 1 (in Chinese)  
赫荣乔. 植物内生菌成为我国当前微生物研究领域的热点[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 1
- [7] Wang KP, Zheng Y, Chu GY, et al. Screening of bacterial strains for phosphate solubilization, nitrogen fixation and IAA production and their promotive effects on plant growth[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2013, 29(6): 1352-1359 (in Chinese)  
王奎萍, 郑颖, 褚光耀, 等. 解磷、固氮、产吲哚乙酸微生物菌株的筛选及其对植物的促生效果[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(6): 1352-1359
- [8] Huang J, Sheng XF, He LY. Biodiversity of phosphate-dissolving and plant growth promoting endophytic bacteria of two crops[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(6): 710-716 (in Chinese)  
黄静, 盛下放, 何琳燕. 具溶磷能力的植物内生促生细菌的分离筛选及其生物多样性[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 710-716
- [9] Zhang Y, Wang G, Guo JW, et al. Control of wheat take-all by endophytic bacteria isolated from wheat[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 37(1): 105-108 (in Chinese)  
张颖, 王刚, 郭建伟, 等. 利用小麦内生细菌防治小麦全蚀病的初步研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 105-108
- [10] Li YH, Dong F, Hu XF. Isolation and characterization of endophytic and rhizosphere bacterial antagonists of soft rot pathogen from pinellia ternata[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2011, 28(1): 92-95 (in Chinese)  
李艳华, 董飞, 胡秀芳. 半夏软腐病内生拮抗放线菌的分离与鉴定[J]. 浙江理工大学学报, 2011, 28(1): 92-95
- [11] Gao XX, Man BY, Chen XR, et al. Identification and determination of biological characteristics of Kobresia capillifolia endophytic bacteria X4 in the East Qilian Mountain Alpine grasslands[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2013, 22(4): 137-146 (in Chinese)

- 高晓星, 满百膺, 陈秀蓉, 等. 东祁连山线叶嵩草内生细菌 X4 的产吲哚乙酸、解磷、抗菌和耐盐特性研究及分子鉴定[J]. 草业学报, 2013, 22(4): 137-146
- [12] Li BJ, Luo M, Zhou J, et al. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from several gramineae grasses and determination of their nitrogenase activity[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2008, 17(5): 37-42 (in Chinese)  
李倍金, 罗明, 周俊, 等. 几种禾草内生固氮菌的分离及固氮活性测定[J]. 草业学报, 2008, 17(5): 37-42
- [13] Zhao ML, Han B, Zhang HM, et al. Optimal of RAPD amplification on Stipa L.[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2003, 17(1): 96-99 (in Chinese)  
赵萌莉, 韩冰, 张红梅, 等. 针茅属植物 RAPD 条件优化[J]. 干旱区资源与环境, 2003, 17(1): 96-99
- [14] Fang ZD. The research methods on plant disease[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 110,182-183 (in Chinese)  
方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 110,182-183
- [15] Ye JS, Wu K, Yu ZM. On isolation of inorganic Phosphobacteria and its phosphate-solubilizing capacity[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(6): 333-335 (in Chinese)  
叶劲松, 吴克, 俞志敏. 一株无机磷细菌筛选及溶磷能力的测定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 333-335
- [16] Xi LQ, Yao T, Yang JJ, et al. Property of associative nitrogen-fixing bacteriaproducing IAA and its promoting growth of oat[J]. Grassland and Turf, 2005(4): 25-29 (in Chinese)  
席琳乔, 姚拓, 杨俊基, 等. 联合固氮菌株分泌能力及其对燕麦的促生效应测定[J]. 草原与草坪, 2005(4): 25-29
- [17] Li ZD, Chen XR, Yang CD. Identification of Polygonum viviparum endophytic bacteria Z17 and its capacity to antagonistic towards pathogenic fungi[J]. Pratacultural Science, 2011, 28(12): 2096-2101 (in Chinese)  
李振东, 陈秀蓉, 杨成德. 珠芽蓼内生菌 Z17 抑菌能力测定及其鉴定[J]. 草业科学, 2011, 28(12): 2096-2101
- [18] Glickmann 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
- [19] Yao T. Characteristics and biofertilizer of plant growth promoting rhizobacteria isolated from oat and wheat in Northwest China[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Gansu Agricultural University, 2002 (in Chinese)  
姚拓. 饲用燕麦和小麦根际促生菌特性研究及其生物菌肥的初步研制[D]. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2002
- [20] Wang CY, Chen XR, Yang CD. Screening of IAA-producing endophytic bacteria from Koeleria cristata and the effect on seed germination[J]. Grassland and Turf, 2013, 33(1): 21-24 (in Chinese)  
王辰月, 陈秀蓉, 杨成德. 分泌吲哚乙酸谷草内生细菌的筛选及其对种子发芽的影响[J]. 草原与草坪, 2013, 33(1): 21-24
- [21] Feng YH. Primary studies on isolation of phosphobacteria in the rhizosphere of alfalfa (Medicago Sativa) and wheat (Triticum Aestivum) and on its effect of solubilizing phosphate[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2003 (in Chinese)  
冯月红. 苜蓿和小麦根际高效解磷细菌筛选及其溶磷效果的初步研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2003
- [22] Lu RK. Agricultural chemical analysis of the soil[M]. Beijing: China's Agricultural Science and Technology Press, 2000: 166-185 (in Chinese)  
鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 166-185
- [23] Xi LQ, Li DF, Wang JF, et al. Measurement of nitrogen fixation capability and excreted IAA capability of PGPB isolated from cotton rhizosphere in salina[J]. Arid Zone Research, 2008, 25(5): 690-694 (in Chinese)  
席琳乔, 李德锋, 王静芳, 等. 棉花根际促生菌固氮和分泌生长激素能力的测定[J]. 干旱区研究, 2008, 25(5): 690-694
- [24] Cui L, Sun Z, Sun FZ, et al. Isolation of endophytic bacteria from potato and selection of antagonistic bacteria to potato ring rot disease[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(4): 353-358 (in Chinese)  
崔林, 孙振, 孙福在, 等. 马铃薯内生细菌的分离及环腐病拮抗菌的筛选鉴定[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 353-358
- [25] Li QQ, Luo K, Lin W, et al. Isolation of tomato endophytic antagonists against *Ralstonia solanacearum*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(4): 364-367 (in Chinese)  
黎起秦, 罗宽, 林纬, 等. 番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 364-367
- [26] Wang JF, Dong F, Dong D, et al. Identification and the characteristic of antagonism of endophytic antagonistic bacteria L3R3-1 from *Pinellia ternate*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2011, 38(6): 573-574 (in Chinese)  
王剑峰, 董飞, 董丹, 等. 半夏内生菌 L3R3-1 鉴定及其对植物病原菌的拮抗特性[J]. 植物保护学报, 2011, 38(6): 573-574
- [27] Ke Y, Ma Y, Shen YH, et al. Isolation and identification of entophytic bacterial strain from rhabdosis rubescens and its biocontrol effects against plant pathogens[J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(1): 20-24 (in Chinese)  
柯杨, 马瑜, 沈莹华, 等. 冬凌草内生细菌的分离鉴定及其对植物病害的生防作用[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(1): 20-24
- [28] Feng YJ, Song W. Endophytic bacteria[J]. Nature Magazine, 2001, 23(5): 249-252 (in Chinese)  
冯永君, 宋未. 植物内生细菌[J]. 自然杂志, 2001, 23(5): 249-252
- [29] Chen LM, Fan MJ, Li L, et al. Sugarcane nitrogen-fixing endophytes-basic research on nitrogen nutrition of vinegar bacteria[J]. Microbiology China, 2000, 27(1): 63-66 (in Chinese)  
陈丽梅, 樊妙姬, 李玲. 甘蔗固氮内生菌-重氮营养醋杆菌的研究进展[J]. 微生物学通报, 2000, 27(1): 63-66
- [30] Lü ZX, Song W. Determination of indole-3-acetic acid biosynthesized by klebsiella oxytoca SG-11[J]. Journal of Instrumental Analysis, 1999, 18(5): 42-44 (in Chinese)  
吕泽勋, 宋未. 产酸克雷伯氏菌 SG-11 生物合成吲哚-3-乙酸的检测[J]. 分析测试学报, 1999, 18(5): 42-44
- [31] Liu L, Sun L, Zhang RY, et al. Diversity of IAA-producing endophytic bacteria isolated from the roots of *Cymbidium goeringii*[J]. Biodiversity Science, 2010, 18(2): 195-200 (in Chinese)  
刘琳, 孙磊, 张瑞英, 等. 春兰根中可分泌吲哚乙酸的内生细菌多样性[J]. 生物多样性, 2010, 18(2): 195-200
- [32] Li FF, Ping SZ, Su BL, et al. Tn5 mutagenesis and the characteristics of indole-3-acetic acid biosynthesis in



- Alcaligenes faecalis* A1501[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2000, 40(5): 551-555 (in Chinese)
- 李法峰, 平淑珍, 苏宝林, 等. 粪产碱菌的 Tn5转座诱变及吡啶乙酸生物合成特性的研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(5): 551-555
- [33] Li P, Chen XR, Li ZD, et al. Identification of two endophytic bacteria strains isolated from *Anaphalis lactea* with IAA secretion by 16S rDNA[J]. Grassland and Turf, 2009(2): 6-10 (in Chinese)
- 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): 6-10
- [34] Tian H, Li FX, Zhang DG, et al. Primary research on isolation and ability of phosphorus-solubilizing of turf phosphorus-solubilizing bacteria[J]. Prataculyural Science, 2005, 22(10): 92-96 (in Chinese)
- 田宏, 李凤霞, 张德罡, 等. 草坪草溶磷菌筛选及溶磷能力的初步研究[J]. 草业科学, 2005, 22(10): 92-96
- [35] Lu RX, Wang XL, Li XG, et al. Capability of dissolving phosphate and characteristics of phosphate-dissolving bacteria in rhizosphere of astragalus bhotanensis in Guizhou[J]. Chinese Journal of Grassland, 2012, 34(4): 101-108 (in Chinese)
- 陆瑞霞, 王小利, 李显刚, 等. 地八角根际溶磷菌溶磷能力及菌株特性研究[J]. 中国草地学报, 2012, 34(4): 101-108
- [36] Huang HC, Qiu JP. Advances in research on control plant disease with *Bacillus subtilis*[J]. Journal of ZheJiang Agricultural Sciences, 2005(3): 213-215,219 (in Chinese)
- 黄海婵, 裘娟萍. 枯草芽孢杆菌防治植物病害的研究进展[J]. 浙江农业科学, 2005(3): 213-215,219
- [37] Li J, Yang Q. Research progress on biocontrol *Bacillus subtilis*[J]. Journal of AnHui Agricultural Sciences, 2008, 36(1): 106-111,132 (in Chinese)
- 李晶, 杨谦. 生防枯草芽孢杆菌的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(1): 106-111,132