

高寒草地珠芽蓼内生拮抗固氮菌 Z19 的鉴定及其固氮功能

杨成德¹ 李振东^{1,2} 陈秀蓉^{1*} 徐长林¹ 薛莉¹

- (1. 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)
(2. 甘肃省社会科学院农村发展研究所 甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】从东祁连山高寒草地珠芽蓼内生细菌中筛选和鉴定具有固氮能力和拮抗能力的内生细菌。【方法】采用 16S rRNA 基因序列同源性分析和生理生化指标测定方法对该菌株进行鉴定。【结果】从珠芽蓼中分离获得的 21 株内生细菌中 6 株内生菌具有固氮能力, 76.2% 具有抑菌能力, 其中 5 株内生细菌对 5 种以上的病原菌有抑制作用; 菌株 Z19 具有较强固氮能力和分解纤维素的能力, 其纤维素溶解圈直径与菌落直径比达 3.33, 产生的纤维素酶活性为 0.31 U, 且对辣椒立枯丝核病菌(*Rhizoctonia solani*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)和番茄早疫病病菌(*Alternaria solani*)具有较强拮抗能力; 经 PCR 扩增和测序, 获得了菌株 Z19 的固氮基因(*nifH*)序列和 16S rRNA 基因序列, 在 GenBank 中的登录号分别为 EU693340 和 EU236746; 菌株 Z19 呈革兰氏阳性, 杆状, 产芽孢。【结论】结合生理生化特征及 16S rRNA 基因序列同源性比较, 鉴定其为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

关键词: 内生细菌, 筛选, 鉴定, 固氮功能

Identification, pathogen inhibiting and nitrogen fixation of endophytic bacterium Z19 of *Polygonum viviparum*

YANG Cheng-De¹ LI Zhen-Dong^{1,2} CHEN Xiu-Rong^{1*} XU Chang-Lin¹ XUE Li¹

- (1. College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem (Gansu Agricultural University), Ministry of Education, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U.S. Center for Grassland Ecosystem Sustainability, Lanzhou, Gansu 730070, China)
(2. Institute of Rural Development, Gansu Academy of Social Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: [Objective] In order to screen and identify endophytic bacteria with nitrogen fixation and pathogen inhibition functions, 21 endophytic bacteria were isolated from *Polygonum viviparum* on the Eastern Qilian Mountains in the Qinghai-Tibetan Plateau, China. [Methods] Nitrogen fixation endophytic bacteria were identified by the 16S rRNA genes sequences analysis, physiological and biochemical characterization. [Results] The results show that 28.6% endophytic bacteria of *Poly-*

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(甘肃农业大学)开放课题项目(No. CYzs-2011011)

*通讯作者: ✉ chenxiurong@gsau.edu.cn

收稿日期: 2013-03-16; 接受日期: 2013-04-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

gonum viviparum could fix nitrogen and 76.2% had strong antagonistic against plant pathogen, furthermore, 23.8% endophytic bacteria inhibited more than 5 plant pathogen. Strain Z19 had strong ability of nitrogen fixation and decomposing-cellulose. The cellulase activity was 0.31 U, and ratio of the diameter of lysis zone to colony diameter was up to 3.33. Furthermore, strain Z19 inhibited pathogenic fungi, such as *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria solani*. Through PCR amplification and sequencing, the sequence of *nifH* gene and 16S rRNA gene were obtained and they were registered in GenBank (accession numbers were EU693340 and EU236746, respectively). Strain Z19 is rod, Gram-positive, and produce spore. Based on the physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, Z19 was identified as *Bacillus subtilis*. **[Conclusion]** The study provides new insights for the exploration and utilization of promoting growth and antagonistic endophytic bacteria in alpine grassland.

Keywords: Endophytic bacteria, Screening, Identification, Nitrogen fixation

化学农药和化学肥料是促进现代农业快速发展的重要因素,在现代农业发展中功不可没,但其大量使用致农药残留超标、有害生物产生抗性及环境污染等负面问题^[1]。生物防治和生物固氮可以替代化学农药和肥料的使用,有效降低其危害。植物内生细菌是指细菌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,对宿主无明显影响或互惠共生^[2],且部分内生细菌具有抑菌、固氮、产生 IAA 及溶磷等生物功能,是一个潜在巨大的微生物资源库,已成为近年来微生物资源研究的热点。Liu 等^[3]报道了内生沙雷氏细菌 G3 潜在的生防应用价值;Vetrivelkai 等^[4]报道了内生菌对根结线虫的防病潜力及对植物的促生潜力;也有文献报道从水稻^[5]、马铃薯^[6]、甘草^[7]、樟树^[8]、大花金挖耳^[9]等植物体内分离筛选到对多种植物病原真菌和细菌具有良好抑制或防治效果的内生菌;已报道的最常见植物内生固氮菌多属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)和固氮螺菌属(*Azospirillum*)等 20 多个属^[10]。珠芽蓼(*Polygonum viviparum*)为多年生草本植物,果实含有丰富的蛋白质和总糖,氨基酸种类齐全,并含有多种对人体有益的矿物质元素^[11],全草捣烂制成粉剂或溶液能防治农作物害虫,还具有抗肿瘤作用^[12]。据文献^[13]报道,内生菌能通过其抑菌等生物功能,增强宿主植物的抗病性;因此,本试验选择生长在东祁连山的珠芽蓼(*Polygonum viviparum*)内生细菌为研究对象,筛选和鉴定其中

的拮抗固氮菌,为珠芽蓼内生固氮生防菌的开发和利用提供技术依据,也为开发经济环保的生物农药和生物肥料提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试珠芽蓼:采自甘肃农业大学天祝县金强河高寒草原试验站,该站位于北纬 37°11′-37°18′、东经 102°23′-102°78′,样地海拔 2 850-3 100 m,年均温 0.8 °C,1 月和 7 月均温分别为-0.8 °C 和 12.4 °C,≥10 °C 积温为 1 026 °C;年降水量 416 mm,多集中于 7-9 月植物生长期;无绝对无霜期,冷季达 7 个月,10 月底至第 2 年 4 月为降雪期;年蒸发量 1 592 mm。

供试菌株:标准枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum* 1.178)均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;供试病原菌番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、辣椒立枯丝核病菌(*Rhizoctonia solani*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、甜瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)和玉米小斑病菌(*Bipolaria maydis*)均为甘肃农业大学植物病理实验室提供。

供试培养基:阿须贝无氮培养基^[14]用于固氮菌的筛选;肉汁胨培养基^[15](NA)用于内生菌的活

化和保存; 马铃薯葡萄糖培养基^[16](PDA)用于植物病原真菌的培养和对峙试验; 纤维素分解菌筛选培养基^[17]和纤维素酶活性测定培养基^[18]参照文献配制。

1.2 试验方法

1.2.1 内生拮抗菌的分离筛选:采用表面消毒研磨法^[15]分离内生菌; 采用平板对峙培养法测定拮抗作用。

1.2.2 固氮菌的筛选:供试菌株用肉汁胨培养基活化后配制成菌悬液, 取 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, 28 °C 培养, 液体培养基置于 120 r/min 振荡培养, 在第 7 天观察生长状况, 平板上有菌落和液体培养基变浑浊者为阳性, 将阳性内生细菌在肉汁胨培养基平板上连续转接 15 代后再接到阿须贝无氮平板, 以确定其固氮能力的稳定性。

1.2.3 *nifH* 基因序列分析:(1) 参照文献[19]设计 *nifH* 基因引物, 扩增 Z19 的 *nifH* 基因, 并测序和序列分析。*nifH* 基因引物序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 其序列为: *nifH*-34F: 5'-AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC-3'和 *nifH*-491R: 5'-TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT-3'。(2) PCR 反应体系采用 50 μ L 体系, 其组成分别为 $MgCl_2$ (25 mmol/L) 5 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, dNTPs (5 mmol/L) 1 μ L, *nifH*-491R (10 μ mol/L) 1 μ L, *nifH*-34F (10 μ mol/L) 1 μ L, *Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 模板 DNA 1 μ L (以褐球固氮菌 1.178 的 DNA 为阳性对照, 加 ddH₂O 1 μ L 为阴性对照), 补 ddH₂O 至 50 μ L。扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 59 °C 50 s, 72 °C 1 min; 94 °C 50 s, 55 °C 50 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 8 min; 经电泳检测具高纯度特异性条带(约 460 bp)的 PCR 产物送往上海生工生物工程技术服务有限公司测序。(3) 将 Z19 的 *nifH* 基因序列在 GenBank 进行 BLAST 相似性比较, 获取高相似性的 *nifH* 基因序列, 用 Clustal 1.8 进行多重序列分析, 再用 MEGA 4.0 中的邻接法(Neighbor-Joining)

建立 Z19 的 *nifH* 基因的系统发育树, 其遗传距离用 Tamura-Nei 公式计算, 支长代表了分歧程度, 各支上的数字是 500 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比。

1.2.4 纤维素分解能力测定:(1) 定性能力测定。参照文献[17]进行分解纤维素能力测定, 即将活化后的 Z19 接种于培养基, 3 次重复, 以无菌水为对照, 28 °C 培养, 长出菌落后用 1 mg/L 的刚果红染色 15 min 和用 1 mol/L 氯化钠脱色 15 min, 观察有无透明圈及透明圈大小; 以透明圈与菌落直径比值表示其分解纤维素能力。(2) 纤维素酶活性测定。参照文献[18]绘制葡萄糖标准曲线和酶活的测定, 计算公式为:

酶活力(U)=[葡萄糖含量(mg) \times 稀释倍数 \times 5.56]/[反应液中酶液加入量(mL) \times 反应时间(min)]

式中, 5.56: 1 mg 葡萄糖的 μ mol 数。

1.2.5 Z19 的鉴定:(1) 形态特征的观察及生理生化测定。菌体形态观察和生理生化试验参照文献[14]进行, 以枯草芽孢杆菌为标准对照菌株。(2) 16S rRNA 序列分析。16S rRNA 扩增引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 其序列分别为: 引物 1: 5'-CCG GAT CCA GAG TTT GAT CAT GGC TCA GCA-3', 引物 2: 5'-CGG GAT CCT ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'。PCR 反应体系同 1.2.3, 扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 8 min。经电泳检测, 将具有高纯度特异性条带(约 1 500 bp)的 PCR 产物送上海生工测序, 序列的分析方法同 1.2.3。

2 结果与分析

2.1 内生拮抗固氮菌的分离筛选

从珠芽蓼的不同器官分离获得 21 株细菌分离物, 分别编号为从 Z1 到 Z21, 其中 Z6、Z7、Z8、Z9、Z19 和 Z21 在阿须贝无氮培养基上可以生长, 说明以上 6 菌株具有固氮能力, 占分离总菌株数的 28.6%; 经过与 8 种病原真菌的对峙培养试验,

76.2%的内生菌具有抑菌能力,其中 Z1、Z5、Z16、Z17 和 Z19 对 5 种以上的病原真菌有拮抗作用,占总菌株数的 23.8%,特别是菌株 Z19 对辣椒立枯丝核病菌、油菜菌核病菌、番茄灰霉病菌、小麦根腐病菌和番茄早疫病菌的抑菌率均在 50%以上,说明有较好的抑菌能力。以上结果表明,Z19 既有固氮能力,又具有较强的抑菌能力,具有进一步开发应用的潜力,因此对菌株 Z19 做了进一步研究。

2.2 *nifH* 基因系统发育分析

经电泳检测所提取的菌株 Z19 的基因组 DNA,其条带清楚并且无非特异性条带,可用作 PCR 扩增的模板。使用 *nifH* 基因特异性引物扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,空白对照没有条带出现,而菌株 Z19 和阳性对照(*A. chroococcum* 1.178)在 400–500 bp 处有一明亮的 PCR 特异性条带,且无非特异性条带,可用于测序。经测序 Z19 的 *nifH* 基因为 429 个碱基,提交 GenBank,获得登录号为 EU693340。该结果说明 Z19 具有 *nifH* 基因,是一株内生固氮菌。

经 BLAST 相似性比较,结果表明 Z19 和 *A. chroococcum* (M73020)的 *nifH* 基因达 96%的相似性,亲缘关系较近,聚在同一个分支上;在 *nifH* 基因的系统发育树上 Z19 与 *Azotobacter* sp.的遗传距离比 Z19 与 *Bacillus* sp.的遗传距离近(图 1)。

2.3 内生细菌 Z19 的纤维素分解能力

内生细菌 Z19 在纤维素分解筛选培养基上产生了溶解圈,其溶解圈与菌落直径比为 3.33,从该菌发酵液中粗提酶液,其纤维素酶活性达 0.31 U,说明 Z19 具有较强的分解纤维素的能力,有进一步开发利用的潜力。

2.4 内生细菌 Z19 的鉴定

2.4.1 形态特征观察:在肉汁胨培养基上 Z19 菌落近圆形扁平,边缘波纹状,表面淡乳白色,磨砂状(图 2),革兰氏染色阳性,产芽孢,端生,菌体杆状(图 3),菌体长×宽为(1.4–3.1) μm ×(0.7–0.8) μm 。

2.4.2 生理生化特征:菌株 Z19 为好氧菌,具有运动性,能在 pH 4.5–9.5 的范围内生长(图 4);对供试的 6 种氮源(氯化铵、草酸铵、尿素、干酪素、硝酸钾和酪氨酸)和 7 种碳源(蔗糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘油、甘露醇和淀粉)均能利用;其他测试结果见表 1,所测试项目中标菌株的反应均与文献报道一致。参照文献[14]初步鉴定 Z19 为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。

2.4.3 16S rRNA 序列分析:使用特异性引物扩增,并经琼脂糖凝胶电泳检测,在约 1 500 bp 处有一明亮的 PCR 特异性条带,即为从 Z19 的基因组 DNA 中扩增出的 16S rRNA 基因序列片段,无其

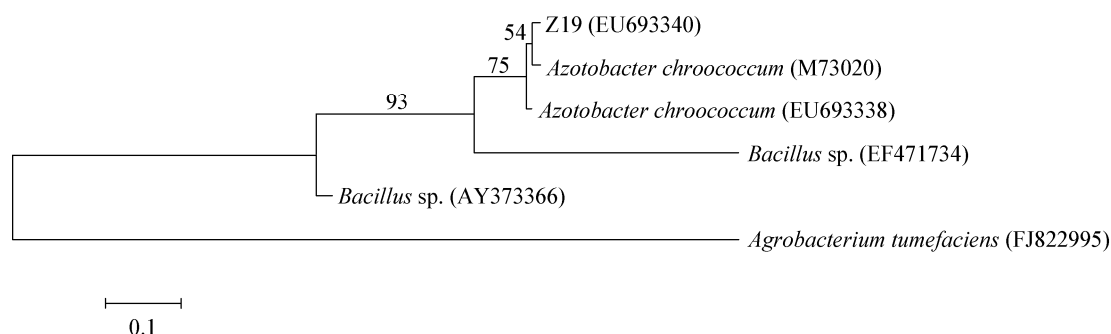


图 1 Z19 *nifH* 基因的系统发育树

Figure 1 The *nifH* gene phylogenetic tree of Z19 strain

注:括号内为 GenBank 登录号;分支点上的数字为自展值百分比;线段 0.1 为核苷酸替换率。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Line of 0.1 is the substitutions per nucleotide position.



图 2 Z19 的菌落
Figure 2 The colony of Z19



图 3 Z19 革兰氏染色
Figure 3 Gram stain of Z19

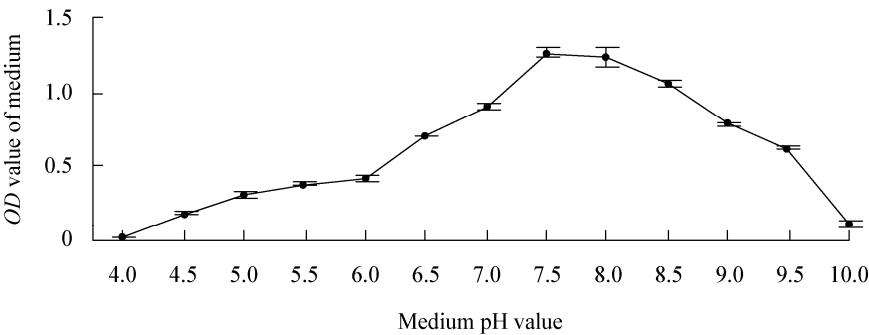


图 4 Z19 最适 pH 值
Figure 4 The optimum pH of Z19

表 1 Z19 的部分生理生化特征					
Table 1 Some of physiological and biochemical characteristics of Z19					
试验项目 Test items	Z19	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	试验项目 Test items	Z19	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>
接触酶 Catalase	+	+	葡萄糖产气 Gas production from glucose	—	—
吡啶试验 Formed indole	—	—	葡萄糖利用 Use of glucose	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	甘露醇利用 Use of manicol	+	+
V-P 试验 V-P test	+	+	木糖利用 Use of xylos	+	+
马尿酸盐利用 Benzoylglyc hydrolysis	—	—	阿拉伯糖利用 Use of arabinose	+	+
7% NaCl 生长 Growth with 7% NaCl	+	+	酪氨酸利用 Use of ganimalon	—	—
利用柠檬酸盐 Use of citrate	+	+	果胶水解 Pectin hydrolysis	—	ND
利用丙酸盐 Use of propionate	—	—	明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	酪蛋白水解 Casein hydrolysis	+	+

注：—：阴性；+：阳性；ND：未测。
Note: —: Negative; +: Positive; ND: Not test.

它非特异性条带，将扩增产物测序，所获得 Z19 的 16S rRNA 基因为 1 468 个碱基，其 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中登录，其登录号为 EU236746。

经 BLAST 相似性分析，结果表明内生菌株

Z19 和枯草芽孢杆菌(EU233271)的相似性达 99.9%；从系统发育树来看，Z19 与枯草芽孢杆菌的遗传距离小于 0.001 2 (图 5)。综合形态特征、生理生化测定及 16S rRNA 序列分析结果确定 Z19 为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。

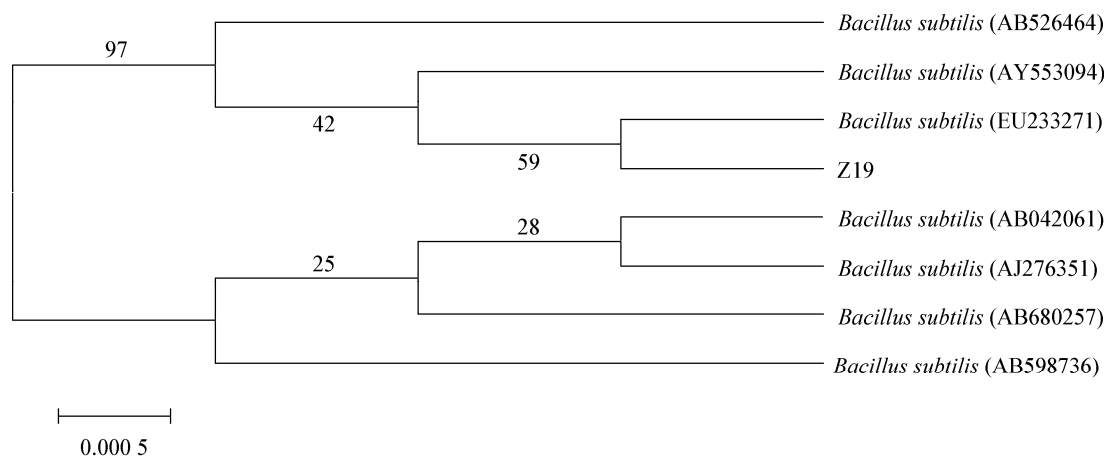


图5 Z19的16S rRNA系统发育树

Figure 5 16S rRNA phylogenetic tree of Z19

注：括号内为 GenBank 登录号；分支点上的数字为自展值百分比；线段 0.000 5 为核苷酸替换率。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Line of 0.000 5 is substitutions per nucleotide position.

3 讨论

3.1 内生固氮菌的分子鉴定

nifH 基因是固氮酶中最保守的^[20]，其常被用来作为检测固氮菌的一个分子指标^[12]。本试验通过使用 *nifH* 基因引物扩增获得了 Z19 的 *nifH* 基因片段，说明分离自高寒草地珠芽蓼内生细菌 Z19 为内生固氮菌。

在 *nifH* 基因序列系统发育树上 Z19 与 *Azotobacter* sp. 的遗传距离比 Z19 与 *Bacillus* sp. 的遗传距离小，该结果与 16S rDNA 系统发育分析结果不一致，但 Young 等^[21]报道，*nifH* 基因序列的系统发育地位与 16S rDNA 具有一致性；此结果可能与在 GenBank 中芽孢杆菌属细菌的 *nifH* 基因序列登录数较少有关，且在本试验中其相似性仅达到 96%，也可能是枯草芽孢杆菌的 *nifH* 基因本身就与 *Azotobacter* sp. 的遗传距离近，但具体有待进一步研究。

3.2 Z19 的应用潜力

Ardanov 等^[22]认为内生细菌具有激活植物基本抗病性或诱导植物系统抗病性的潜力，如马铃

薯内生细菌 *Pseudomonas* sp. 可促进马铃薯生长和增强马铃薯对软腐病的抗性；Hakeem 等^[23]也发现宿主植物与内生菌互作对病理性真菌有防御作用，如 Ahmad 等^[24]报道内生菌 *Piriformospora indica* 在番茄体内定殖能有效抑制由轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 引起的黄萎病，彭双等^[25]报道以单株植物内生细菌制备的固体菌剂对番茄根结线虫的防效在 80% 以上。因此，植物内生细菌在生物防治中潜力巨大。高寒草地作为天然牧场，没有农药和化肥的使用，牧草的健康生长除与其自身的结构有关外，与其体内的有益微生物也有一定的关系，内生细菌 Z19 对核盘菌属、丝核菌属、链格孢属、葡萄孢属和离蠕孢属的植物病原真菌具有抗性，且兼具固氮作用，可能在珠芽蓼的健康生长及在高寒草地维持其优势地位具有一定的作用，但具体还须进一步研究。内生细菌 Z19 具有较好固氮和抑菌作用，具有开发为生物菌肥 (或生物农药) 的潜力。

参考文献

- [1] 胡健, 蒋勤军, 韩烈保, 等. 草坪草病原菌的抗药性现状及研究进展[J]. 草业学报, 2009, 18(2): 194-203.

- [2] Promputtha I, Lumyong S, Dhanasekaran V, et al. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(4): 579-590.
- [3] Liu X, Jia J, Atkinson S, et al. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action[J]. *World Journal Microbial Biotechnology*, 2010, 26: 1465-1471.
- [4] Vetrivelkalai P, Sivakumar M, Jonathan EI. Biocontrol potential of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* and its effect on plant growth in bhendi[J]. *Journal of Biopesticides*, 2010, 3(2): 452-457.
- [5] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未, 等. 水稻内生阴沟肠杆菌 MR12 的鉴定及其固氮和防病作用研究[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(1): 92-93.
- [6] 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.
- [7] 饶小莉, 沈德龙, 李俊, 等. 甘草内生细菌的分离及拮抗菌株鉴定[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 700-704.
- [8] 王涛, 游玲, 魏琴, 等. 油樟内生细菌的多样性及抑制植物病原菌初步研究[J]. *西北林学院学报*, 2009, 24(2): 97-100.
- [9] 郭小炜, 冯俊涛, 易晓华, 等. 大花金挖耳内生菌的分离及抑菌活性筛选[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(2): 377-383.
- [10] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未, 等. 水稻内生联合固氮细菌的筛选、鉴定及其分布特性[J]. *植物学报*, 1999, 41(9): 927-931.
- [11] 张彩霞, 胡凤祖. 珠芽蓼果实营养成分分析[J]. *天然产物研究与开发*, 2005, (5): 614-616.
- [12] 王一峰, 杨文玺, 王春霞, 等. 甘肃野生药用植物珠芽蓼[J]. *中兽医医药杂志*, 2005, 24(2): 24-26.
- [13] 黄东益, 黄小龙. 旗草内生真菌与旗草抗病性研究[J]. *草业学报*, 2009, 18(2): 39-45.
- [14] 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: 62-65, 353-412.
- [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] 张茹, 李金花, 柴兆祥, 等. 甘肃河西马铃薯根际生防木霉菌对接骨木镰刀菌的拮抗筛选及鉴定[J]. *草业学报*, 2009, 18(2): 138-145.
- [17] 高凤菊, 陈惠, 吴琦, 等. 产纤维素酶芽孢杆菌 C-36 的分离筛选及其鉴定[J]. *四川农业大学学报*, 2006, 24(2): 175-177, 213.
- [18] 赵玉萍, 杨娟. 四种纤维素酶酶活测定方法的比较[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(3): 116-118.
- [19] Rosch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. *Applied Environment Microbiology*, 2002, 68(8): 3818-3829.
- [20] 张于光, 王慧敏, 李迪强, 等. 三江源高寒草甸土固氮基因(*nifH*)的多样性和系统发育研究[J]. *微生物学报*, 2005, 45(2): 166-171.
- [21] Young JPW. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms[A]//Stacey G, Burris RH, Evans HJ. *Biological Nitrogen Fixation*[C]. New York: Chapman and Hall, 1992: 43-86.
- [22] Ardanov P, Ovcharenko L, Zaets I, et al. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. *Biological Control*, 2011, 56(1): 43-49.
- [23] Hakeem OS, Danve CM, Ross NN. Plant-endophyte interplay protects tomato against a virulent *Verticillium*[J]. *Planta*, 2009(229): 415-426.
- [24] Ahmad F, Diana RA, Susanne B, et al. Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens[J]. *Mycorrhiza*, 2010(20): 191-200.
- [25] 彭双, 杨茹, 闫淑珍, 等. 杀线虫植物内生细菌和根际放线菌对根结线虫的防效[J]. *植物保护学报*, 2012, 39(1): 63-69.