

四个品种烟草内生微生物的分布特征

黄晓辉^{1,2}, 杨友才¹, 谭周进^{2,*}, 张德咏³, 谢丙炎⁴, 刘 勇³

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南中医药大学基础医学院, 湖南 长沙 410128;
3. 湖南省农业科学院植物保护研究所, 湖南 长沙 410125; 4. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 10086)

摘要:对 4 个常规优质烟草品种(K326、G-80、红花大金元、净叶黄)的种子、根、茎、叶进行了内生菌的分离计数、初步分类与拮抗筛选研究。结果表明:烟草中有大量的内生菌分布,以细菌最多,放线菌次之,真菌最少,与土壤中的分布规律一致。烟草不同器官中内生菌的分布表现为根和种子中数量相当,茎次之,叶最少的规律。不同烟草品种间的分布为:种子中是 K326 和红花大金元内生菌分布较多,净叶黄次之,G-80 最少;苗期植株中 4 个品种的内生菌数没有明显差别;大田期是净叶黄烟草的内生菌数量最少。烟草中内生细菌以革兰氏阴性菌为主,而种子中内生细菌的芽胞菌数量要明显多于植株中的。通过对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌实验,从红花大金元品种中筛选到有抑菌活性的菌株 5 株,从净叶黄和 K326 中分别筛选到 1 株,体现出了 4 个品种的抗病性与拮抗菌之间的一定相关性。

关键词:烟草;内生菌;分布特征;生物多样性

文章编号:1000-0933(2009)12-6827-07 中图分类号:Q949.32 文献标识码:A

Distribution characteristic of endophytic microbes in four different tobacco species

HUANG Xiao-Hui^{1,2}, YANG You-Cai¹, TAN Zhou-Jin^{2,*}, ZHANG De-Yong³, XIE Bing-Yan⁴, LIU Yong³

1 College of Bioscience Biotechnology, Hunan Agricultural University, Hunan Changsha 410128, China

2 School of Preclinical Medicine, TCM University of Hunan, Hunan Changsha 410208, China

3 Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, China

4 Institute of Vegetable and Flower, China Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(12): 6827 ~ 6833.

Abstract: In order to understand the distribution character and the relationship of plant diseases with endophytes, studies on the quantity, classification and antagonism of endophytes from seeds, stems and leaves were conducted on four species of high-quality tobaccos. The tobaccos studied were K326, G-80, Hong Hua Da Jing Yuan and Jing Ye Huang. The results showed that the endophytic microorganisms existed widely in tobaccos. Bacteria were the most abundant followed by actinomycetes, then fungi. This reflects microbial distribution in soil. However, endophytes are not equally distributed in each organ. The root and seed contain the most, followed by stem with leaf containing the least. Among different species of tobaccos the distribution of endophytes is also variable. Endophyte distribution in the seed of K326 and Hong Hua Da Jing Yuan is the highest, with Jing Ye Huang next and G-80 containing the least. During the seedling period no obvious distinction was observed among the four species. During gruthduration after transplant Jing Ye Huang contains the least endophytes. Gram-negative bacteria are the most abundant in the all four species of tobacco and the quantity of spore bacteria in seeds is apparently higher than that of whole plants. Through antagonistic experiments of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, we isolated five strains from Hong Hua Da Jing Yuan and one each from Jing Ye Huang and K326. The results indicated antagonistic characteristics of the four species is related to the antibacterium to some extent.

基金项目:国家科技部支撑计划课题资助项目(2006BAD08A08);国家重点基础研究发展规划资助项目(No. 2009CB119200)

收稿日期:2008-08-22; 修订日期:2009-08-18

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tanzhjin@sohu.com

Key Words: tobacco; endophyte; Distribution Characteristic; Biodiversity

植物内生菌(endophyte)是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部的微生物^[1],属于植物组织内的正常菌群。内生菌广泛分布于各种植物当中,它是植物微生态系统的组成部分,在不同健康植物的根、茎、叶及果实中均生活着正常微生物群。内生菌分布于植株体内,其生活环境营养充足、生长繁殖相对稳定,并与植物互作共生,它们的代谢活动及产物可促进宿主植物适应外界各种(生物、非生物)环境压力,维持生态系统平衡。迄今的研究表明,植物内生菌可与植物结瘤固氮,促进植物修复,产生生长素促进宿主生长,产生抗生素增加植物的抗病性,产生次生代谢活性物质使植物具有抗逆、抗虫、除草、他感等功能^[2]。内生菌还可以作为外源基因的载体,将带有抗性基因的内生菌转接到植株中,达到防治病害而又不给植物本身造成损害。其次内生菌能够克服以往从 PGPR(根围促生细菌)中筛选生防菌的定殖差、受环境影响大的缺点。目前在辣椒、水稻、烟草、棉花等作物中都开展了内生菌的研究,并找到了一些具有生防作用的内生菌^[3]。

烟草内生菌的研究方面,王万能等进行了烟草内生细菌防治烟草病害的相关研究,并重点对抗菌谱较广的 118 菌株防治烟草黑茎病的效果进行了研究^[4]。易有金等对内生细菌防治烟草青枯病进行了较多的研究,发现烟草内生短芽胞杆菌的生防效果要高于农用链霉素^[5]。其次烟草内生菌与烟叶品质的关系也逐渐成为近年来研究的热点,雷丽萍发现烟草内生芽胞杆菌能降低烟叶亚硝胺类物质的含量^[6]。可见烟草内生菌各个方面作用的研究正越来越多的被人们研究和利用。烟草是我国大面积种植的经济作物,也是一种模式作物。为了探讨内生菌与烟草抗病性之间的关系,同时也试图为内生生物防治的目标筛选与应用提供一些有用的依据,笔者对我国种植面积较广、抗病性不同的 4 个烟草品种(K326, G-80, 红花大金元,净叶黄)进行了不同生育期内生菌的分布规律及其特性研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的 4 个烟草品种为:K326, G-80, 红花大金元,净叶黄。烟草种子及植株由湖南农业大学中南烟草试验站提供。4 个烟草品种抗病特性如表 1。供试的 4 个烟草品种是我国种植面积广,烟叶品质佳的品种。其中 K326, G-80 在烟草抗病虫害方面表现极佳,红花大金元大和净叶黄抗性相对较弱,但其烟叶在产量和综合性状等方面表现良好,都是生产中的常见品种。

表 1 4 个烟草品种的抗病特性

Table 1 The characteristic of anti-disease of the 4 tobacco species

品种名称	黑胫病	赤星病	根结线虫病	青枯病	TMV	CMV	PVY	野火病
K326	中抗	感	中抗	中感	中感	中感	感	感
G80	抗	感	抗	中抗	感	感	感	-
红花大金元	中感	感	中感	中感	中感	感	中感	感
净叶黄	-	高抗	易感	易感	-	-	-	-

品种名称 Species name; 红花大金元 Hong hua da jing yuan; 净叶黄 Jing ye huang; 黑胫病 Black shank; 赤星病 Alternaria alternata; 根结线虫病 Root-knot nematodes; 青枯病 Pseudomonas solanacearum; TMV Tobacco mosaic virus; CMV Cytomegalovirus; PVY Potato virus Y; 野火病 Wildfire disease; 高抗 High-against; 中抗 mid-against; 抗 against; 感 infect; 中感 mid-infect; 易感 high-infect; - : No

1.2 培养基^[7]

牛肉膏蛋白胨固体培养基:用于内生细菌的分离、培养与计数;高氏 1 号培养基外加万分之三浓度的重铬酸钾:用于放线菌的分离与计数,菌种保存时不加重铬酸钾;PDA 培养基外加 4‰ 的国产硫酸庆大霉素(800 万单位):用于真菌的分离与计数,菌种保存时不加链霉素。

1.3 内生菌的分离与计数

1.3.1 烟草种子内生菌的分离

每个烟草品种每次试验称取 0.2g,共进行 3 次重复试验。由于烟草种子十分细小,在表面消毒过程中容

易流失,故制作脱脂棉小袋灭菌后把烟草种子装入其中,用 75% 乙醇表面消毒 10 min,无菌水冲洗 5 次,吸取最后一次冲洗液(0.1 ml)涂布 3 种培养基平板,作为对照。然后在严格无菌条件下加 5 ml 灭菌的 PBS 缓冲液(0.05mol/L, pH 7.8, W/V = 1/2)研磨,研磨液倒入装有 45 ml 无菌水的三角瓶中,充分振荡 15 min 后,以此为原液。以原液为-1 梯度,真菌取-1、-2 梯度,放线菌取-1、-2 梯度,细菌取-2、-3 梯度涂布平板,各做 3 个重复。倒置于 28℃ 恒温培养,细菌培养 24 h、真菌培养 72 h、放线菌培养 5 d。选取适当浓度计数,并转换成 $\log(\text{cfu/g fw})$ (colony-forming units per-gram fresh weight)。以下实验中的分离计数方法相同,每次实验为同一批次样品。根据外观形态特征,挑选单个菌落作进一步纯化及初步鉴定并保存。

1.3.2 烟草苗期及旺长期植株内生细菌、真菌、放线菌的分离

(1) 苗期 从湖南农业大学烟草基地漂浮育苗盘中采取。漂浮育苗是无土育苗式工厂化育苗的一种形式,在控温,控湿的人工控制条件下培育出整齐一致的壮苗^[8]。随机拔取第 4 次剪叶后的健壮烟草整株,保鲜袋带回,样品在 3h 内处理,称取根茎叶共 5 g,筛选方法与 1.3.1 一致。

(2) 旺长期 从湖南农业大学烟草基地采集健康烟草整株,保鲜袋带回,样品在 3h 内处理,分别称取根、茎、叶各 5 g,筛选方法与 1.3.1 一致。

1.4 内生细菌的特性

常规鉴定:将挑选的单个细菌菌落纯化后,内生细菌的菌落、菌体形态观察及生理生化测定见东秀珠著《常见细菌系统鉴定手册》^[9]。参照文献^[7]进行革兰氏染色、改良的 Schaeffer 和 Fulton 氏染色,并观察菌体形状、革兰氏染色特性、芽胞的有无等特性,根据形态特征及染色反应作初步归类。

1.5 内生细菌及内生放线菌体外抑菌作用的初步研究

内生细菌采用点接法,将筛选到的菌株分别点接于检测菌平板(分别混匀有大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的牛肉膏平板)中央,27℃ 培养 24 h 后观察有无抑菌圈的产生。内生放线菌采用打菌饼法,将均匀涂布在高氏培养基培养 4 d 的放线菌打成菌饼接于检测菌平板中央,27℃ 培养 24 h 后观察有无抑菌圈的产生。对有抑菌效果的菌株进行标记,进行发酵产物抑菌效果的再次测定。

1.6 菌株抑菌功能复筛

对 1.5 中筛选出来的菌株进行液体发酵,在无菌条件下用灭菌细菌过滤器(孔径为 0.22μm)过滤发酵液,用经高温灭菌的小滤纸片(直径为 5mm)沾取无菌发酵液,置于检测菌平板中央,27℃ 培养 24 h。同时用牛肉膏培养液做对照。测定透明圈大小。

2 结果与分析

2.1 4 个烟草品种不同器官中内生细菌的分布

对 4 个品种烟草的种子、苗床期植株及旺长期植株的根、茎、叶组织中的内生细菌进行了分离和数量的测定,由表 2 可以看出,烟草各个阶段器官中均有大量的内生细菌分布,内生细菌在各器官中分布规律是:根中

表 2 4 个烟草品种不同器官中内生细菌的分布

Table 2 The distribution of endophytic bacteria in different organs of the 4 tobacco species

器官 Organ	K326	G80	红花大金元	净叶黄
种子(log(cfu/g fw))	12.93 ± 0.27aA	7.92 ± 0.78cC	13.43 ± 1.19aA	8.80 ± 0.59cC
苗床期植株	11.73 ± 0.33bB	12.27 ± 0.30bB	11.71 ± 0.44abAB	12.13 ± 0.02aA
大田期根	11.77 ± 0.30bB	13.38 ± 0.27aA	12.92 ± 0.60aAB	12.34 ± 0.61aA
大田期茎	11.19 ± 0.35cBC	13.19 ± 0.04aAB	10.41 ± 1.22bcBC	10.38 ± 0.64bB
大田期叶	11.03 ± 0.33cC	8.28 ± 0.48cC	8.93 ± 1.95cC	8.42 ± 0.36cC

种子 seeds; 苗床期植株 period of plant bed; 大田期根 roots of gruthduration after transplant; 大田期茎 stems of gruthduration after transplant; 大田期叶 leaves of gruthduration after transplant; 红花大金元 Hong hua da jing yuan; 净叶黄 Jing ye huang; 用 LSD 法分析数据 The date use the LSD analysis; Small letters mean significance at 0.05 levels; Capital letters mean significance at 0.01levels; 下同,the same below

内生菌数量最多,茎次之,叶最少。在 0.05% 水平内都表现出了显著性差异。根中内生细菌数量最多的原因是根接触土壤,土壤中的细菌首先进入到根,再由根向上传递,因而表现出了一个由根到茎到叶依次减少的过程,充分说明内生菌的进入是一个由下至上的传递过程,种子中内生细菌数量不稳定,有减少的趋势,原因可能是种子位于植株的最上端,且种子很细小,营养物质匮乏。这与马冠华^[10]进行的研究结果一致,即烟草进入成熟期,植株由营养生长转为生殖生长,内生细菌种群之间出现营养竞争或者对植株生理生态的不适应而使得种群数量减少。

内生细菌在各品种间的分布规律是:以 K326 和红花大金元品种内生细菌量较多,且数量较稳定,处于 10^5 级范围之内。G-80 种子中内生菌分布数量最少,到苗期后,内生细菌在数量和种类都表现出了一个回升的现象。主要原因可能是生长环境的改变,使 G-80 中通过世代传播的和外界进入的内生菌在种子萌发生长后大量增殖。净叶黄则菌株数量和种类都相对稳定。

2.2 4 个烟草品种不同器官中内生真菌和内生放线菌的分布

由表 3 可以看出,在 4 个品种烟草的种子及苗床期植株中均没有分离到内生真菌,直到大田期,才从各个品种中分离到内生真菌,其中以烟草根最为明显,四个品种烟根中均有分离到;品种间则是 K326 最为明显,根、茎、叶中均有分离到。

表 3 4 个烟草品种不同器官中内生真菌的分布

Table 3 The distribution of endophytic fungus in different organs of the 4 tobacco species

器官 Organ	K326	G-80	红花大金元	净叶黄
种子(log(cfu/g fw))	0cB	0bB	0cB	0bB
苗床期植株	0cB	0bB	0cB	0bB
大田期根	5.78 ± 0.90aA	3.53 ± 0.54aA	4.39 ± 0.36aA	3.30 ± 0.22aA
大田期茎	3.58 ± 0.32abA	0bB	2.16 ± 1.88bAB	0bB
大田期叶	2.19 ± 1.90bA	0bB	0bB	0bB

由表 4 可以看出,烟草内生放线菌的分离结果与表 3 相似,4 个品种种子和苗床期均没有分离到内生放线菌,到大田期后,除净叶黄外,其余 3 个品种根、茎、叶中均有分离到内生放线菌。从表 4 的结果来看,在 0.05% 水平内,根、茎、叶中内生放线菌的数量存在差异,总体是根、茎中最多,叶中最少。

表 4 4 个烟草品种不同器官中内生放线菌的分布

Table 4 The distribution of endophytic actinomycetes in different organs of the 4 tobacco species

器官 Organ	K326	G-80	红花大金元	净叶黄
种子(log(cfu/g fw))	0dC	0dC	0dC	0cB
苗床期植株	0dC	0dC	0dC	0cB
大田期根	7.38 ± 0.23aA	3.73 ± 0.62cB	7.59 ± 0.15aA	4.14 ± 0.11aA
大田期茎	6.99 ± 0.16bA	5.85 ± 0.23aA	7.14 ± 0.07bA	3.78 ± 0.38aA
大田期叶	5.14 ± 0.07cB	4.73 ± 0.10bAB	4.37 ± 0.25cB	0bB

出现上述结果的原因可能是:采用的培养基和培养条件不适合这些品种中内生菌的生长,有数据表明只有 1% 的微生物能够人工培养;有些细菌用一般条件根本不能分离到,因为这些细菌的内生性更强^[11]。还有可能即是烟草种子细小,营养物质匮乏,在烟草种子的成熟期很多不适合烟草种子生境的内生放线菌和内生真菌消失;加之,烟草育苗采用的是一段式漂浮育苗的方式,采取严格的消毒措施,可以有效控制烟草病害在苗床期的发生,育出健壮,整齐的烟苗,无形中也阻止了其他有益内生真菌和内生放线菌的进入。由表 3,表 4 可以看出,到大田期后,烟株接触土壤,土壤中的真菌,放线菌由烟根缓慢进入烟株。进入烟株的内生菌中,真菌数量最少,内生放线菌的进入量比内生真菌的进入约大一个数量级,内生菌在烟草植株内分布呈现出细菌最多,放线菌次之,真菌最少,与土壤中的分布规律一致。内生真菌和放线菌在各器官中的分布规律与细菌在

各器官中的分布规律一致。

2.4 烟草中内生细菌的主要类群

由图 1 可以看出:烟草种子及烟草植株中均大量内生细菌分布,均以革兰氏阴性菌为主,革兰氏阳性菌很少或者几乎没有;烟草种子筛选的菌株中芽胞杆菌数量居多,而在烟草植株中芽胞杆菌的数量大量减少,主要是芽胞杆菌能够形成芽胞,抵抗外界不良环境,这对内生菌适应植物生命周期性更替具有重要意义,如 1 年生植物的种子期和多年生植物的休眠期^[12];从烟草种子到烟草植株,内生细菌的种类发生了很大的变化,这说明烟草植株中的内生菌除了来自于世代传播以外,植物体表和根际土壤是其主要来源。

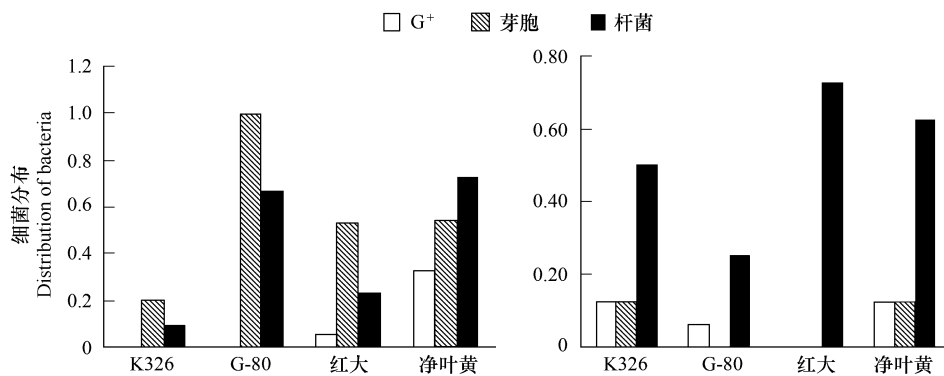


图 1 烟草种子及植株中内生细菌分布特征

Fig. 1 The distribution of endophytic bacteria in tobacco seeds and plants

G⁺ Gram positive; 芽胞 Bacillus; 杆菌 Rod bacillus; 红花大金元简为红大 Hong hua da jing yuan was short for Hong da; 以下相同 the same below

2.5 烟草中内生拮抗细菌的分布特征

对所有筛选到的 84 株内生细菌进行了拮抗大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的试验,从图 2 可以看出:红花大金元品种种子及植株中的内生细菌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的拮抗率都是最高的,对大肠杆菌有拮抗作用的菌达到 20% 以上,对金黄色葡萄球菌有拮抗作用的达到了 70% 以上;而 G-80 的对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的拮抗菌筛选率都是最低的;由图可以明显的看出,筛选拮抗金黄色葡萄球菌的几率明显大于拮抗大肠杆菌的几率。与表 1 相联系可看出,G-80 和 K326 对各种烟草病害的抗性是最佳的,对烟草根部病害烟草黑茎病和烟草根结线虫病都表现出了很好的抗性。而 G-80 中分离到的内生菌数量却明显少于红大,与周刚泉^[18]的研究结果不同,原因可能是:生活在 G-80 及 K326 品种中的内生菌难于在人工培养条件下筛选及生长;供试的烟草品种中红花大金元和净叶黄为易感线虫烟草品种^[14],植物寄生线虫的存在会使内生细菌的数量提高,因为线虫造成的伤口成为细菌侵入的通道,伤口渗漏出的物质成了细菌的营养^[13]。烟草品种本身的特性及其他各方面的原因决定他们易受线虫的侵染,是否他们本身的特性也决定了,外界微生物更易于进入植株体内,从而各种微生物之间相互拮抗作用加强? Adams 和 Kloepper 研究宿主植物的基因型对棉花的内生细菌的影响时发现,宿主植物的基因型、植物形态或生理活动等影响内生细菌在植株中的生存^[19]。从红花大金元种子及后期植株筛选到的内生细菌数量及拮抗菌比例都是最高的,并且是变化的,这充分说明了植物和内生菌之间存在一个动态的相互选择的过程,而拮抗性好的品种选择性更强,进入其内部的菌株相互之间的拮抗作用小,抗性弱的品种则选择作用弱,进入其内部的菌种复杂多变,相互之间的拮抗作用也就加强,筛选到的拮抗菌种类和数量久相应的提升。

从烟草种子中筛选到编号为 H3, H5, J25 及从烟草植株中筛选到编号为 HZ1, HZ5, HZ11, KZ6 内生菌,拮抗效果明显,对两种菌的抑菌圈都超过了 7mm。其中 H3 和 KZ6 抑菌圈达到 9mm。筛选的 7 株效果明显的拮抗菌株有 5 株来自于红花大金元品种,其次还有两株分别来自于净叶黄及 K326。

3 讨论

研究表明:烟草中含有大量的内生菌,不同品种,不同部位内生菌的种类和数量都表现出了差异,但总体

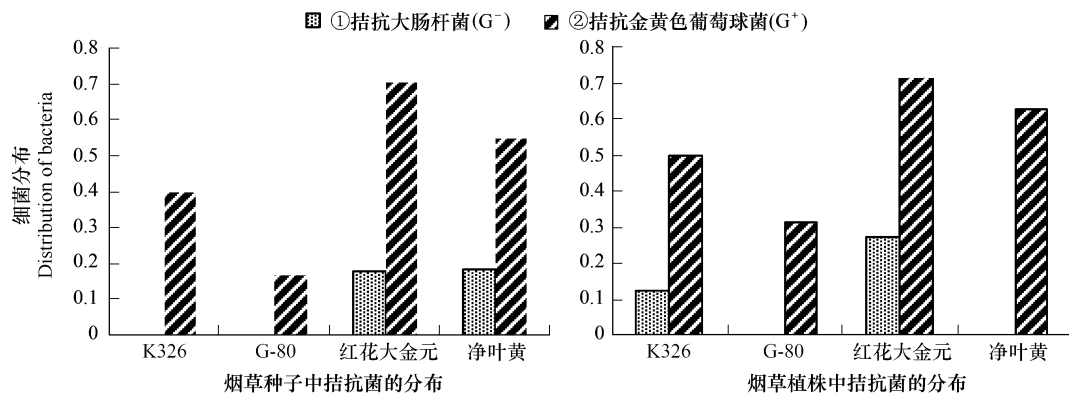


图2 烟草种子及植株中内生拮抗细菌的分布特征

Fig. 2 The distribution characteristics of endophytic antibacterial microbes in tobacco

①Percentage of anti-*E. coli* (G^-); ②Percentage of anti-*S. aureus* (G^+)

来看,都以革兰氏阴性菌为主,C. xi 等构建了含有 gfp 的一系列微型 Tn5 转座子. 该转座子对革兰氏阴性菌有很强的接合作用,并用其标记了根瘤菌等^[15]。烟草作为一种模式作物,烟草中革兰氏阴性菌为主的状况正有利于烟草内生菌作为外源基因的载体在基因工程的应用。

烟草种子与植株相比,明显的表现出芽胞杆菌居多现象,这充分说明,菌株与植物之间存在一个互选的过程,能够进入细小的烟草种子,并且可以在其中长期存活,需是耐受性好的芽胞菌。在烟草种子及苗期的植株中都没有分离到内生真菌和内生放线菌,除分离培养条件等原因外,可能也符合以下原因:对于无性内生真菌,菌丝无法进入植物种子或是侵染种子的菌丝失活^[17];自然种群中内生真菌侵染对宿主而言,其“成本”和“受益”会随着空间和时间,以及环境选择压力的变化,其侵染率也会相应地发生改变^[17];樊有斌等认为植物不同部位内生真菌分布差异的原因,可能是不同部位的微环境如通气状况、酶和其他化学成分不同的影响^[16];魏宇昆等从形态学和基因水平上对内蒙古中东部草原羽茅内生真菌进行了研究发现羽茅内生真菌在形态和基因水平上都表现出较高的遗传多样性^[17]。烟草是1年生作物,短暂的生命周期使很多内生菌进入只是一个临时的过程,不能稳定的存在或遗传,尤其是外界分布相对少,定殖难的真菌。

通过对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌实验发现,拮抗效果好的7株菌株有5株来自于红花大金元品种,其中有2株筛选自红花大金元的种子,可见,烟草品种在抗性上,遗传是绝大部分的决定因素,抗性好的品种往往外界微生物不易进入到植株内部,相反,抗性弱的品种外界微生物更易进入,且进入的内生菌往往表现出多种抗性,以适应复杂的微生态环境。红花大金元品种本身自带的拮抗菌株可以使其在苗期很好的抵抗病害的侵染。但在烟株生长后期,内生菌的进入种类和数量还受植株本身的特性,土壤理化环境,以及施肥施药等多方面因素的影响。

References:

- [1] Sturz A, Christie B, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19(1):1-30.
- [2] Huang X H, Li S, Tan Z J, *et al.* Progress of Study on endophytic actinomycetes in plant. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 1:42-46.
- [3] Zhou Y, Chen Y, Yu Z Y, *et al.* Isolation of endophytic antagonistic bacterium from *Amorphophallus konjac* and research on its antibacterial metabolite. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(6):1066-1079.
- [4] Wang W N, Xiao C G. Control of black shank with endophytic bacteria of tobacco. *Tobacco Science & Technology*, 2006, 1:54-57.
- [5] Yi Y J, Yin H Q, Luo K, *et al.* Isolation and identification of endophytic *Brevibacillus brevis* and its biocontrol effect against tobacco bacterial wilt. *Acta Phytobathologica Sinica*, 2007, 37(3):301-306.
- [6] Lei L P. Reduction of tobacco specific nitrosamine in air-cured tobacco leaves by a bacterial endophyte. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2007, 20(3):515-519.

- [7] Zhao B, He S J. Microbiological Experiment. Beijing: Science Press House, 2002.
- [8] Lei L P, Cui G M. New tobacco produce technology of Yun Nan. Beijing: Science Press House, 2006. 16 — 18.
- [9] Dong X Z. Common bacteria identify manual. Beijing: Science Press House, 2001.
- [10] Ma G H, Xiao C G. Population dynamics of endophytic bacteria in symptom-free tobacco plants. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 24(4): 7 — 11.
- [11] Hu R X, Li S, Tan Z J, et al. Preliminary studies on the distribution characteristic of endophytic microbes in *Houttuynia cordate*. Biotechnology Bulletin, 2008, 2: 155 — 157.
- [12] Wang Y Q, Tan Z J, Zhou Q M, et al. Preliminary studies on the distribution character of endophytic bacteria in cabbage. World Sci-Tech R & D, 2006, 28(1): 59 — 61.
- [13] Lu G B, Zhang Y, Ji X X, et al. Recent advance on the approaching and colonization of endophytic bacteria. Biotechnology Bulletin, 2007, 3: 88 — 92.
- [14] Wang J, Shi J K, Zhu X C, et al. Evaluation of resistance of tobacco germplasm to root-knot nematodes. Journal of Shenyang Agricultural University, 2001, 3: 183 — 185.
- [15] Xi C, Dirix G, Hofkens J, et al. Use of dual marker transposons to identify new symbiosis genes in rhizobium. Microb Ecol, 2001, 41(4): 325 — 332.
- [16] Fan Y B, Chen Y, Liu M S, et al. Study on the population diversities of endophytic fungus in *Ginkgo biloba*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(34): 10953 — 10954.
- [17] Wei Y K, Gao Y B, Li C, et al. Genetic diversity of neotyphodium Endophytes isolated from *Achnathurum sibiricum* populations in mid-eastern inner Mongolia steppe, China. Journal of Plant Ecology, 2006, 30(4): 640 — 649.
- [18] Zhou G Q, Zhang X D, Liu Q G, et al. The dynamic of endophytic bacteria at different growth stage of tomato and biological control of Tomato Bacterial Wilt. Microbiology, 2007, 34(5): 885 — 888.
- [19] Adams P D, Kloepper J W. Structural characteristics and plant-beneficial effects of bacteria colonizing the shoots of field-grown conventional and genetically modified T4-lysozyme-producing potatoes. Plant and Soil, 2002, 240, 181 — 189.

参考文献:

- [2] 黄晓辉, 李珊, 谭周进, 等. 植物内生放线菌研究进展. 生物技术通报, 2008, 1: 42 ~ 46.
- [3] 周盈, 陈琳, 喻子牛, 等. 魔芋内生拮抗细菌的分离及其抗菌物质特性研究. 微生物学报, 2007, 47(6): 1066 ~ 1079.
- [4] 王万能, 肖崇刚. 烟草内生细菌对烟草病害的拮抗和防治作用. 烟草科技, 2006, 1: 54 ~ 57.
- [5] 易有金, 尹华群, 罗宽, 等. 烟草内生短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效. 植物病理学报, 2007, 37(3): 301 ~ 306.
- [6] 雷丽萍. 烟草内生芽孢杆菌降低烟叶亚硝酸盐类物质含量的研究. 西南农业学报, 2007, 20(3): 515 ~ 519.
- [7] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] 雷丽萍, 崔国民. 云南烤烟生产新技术. 北京: 科学出版社, 2006. 16 ~ 18.
- [9] 东秀珠. 常见细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] 马冠华, 肖崇刚. 烟草内生细菌种群动态研究. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 7 ~ 11.
- [11] 胡汝晓, 李珊, 谭周进, 等. 鱼腥草内生微生物的分布特征初探. 生物技术通报, 2008, (2): 155 ~ 157.
- [12] 王跃强, 谭周进, 周清明, 等. 白菜内生细菌的分布规律初探. 世界科技研究与发展, 2006, 28(1): 59 ~ 61.
- [13] 路国兵, 张瑶, 冀宪领, 等. 植物内生细菌的侵染定殖规律研究进展. 生物技术通报, 2007, 3: 88 ~ 92.
- [14] 王静, 石金开, 朱贤朝, 等. 烟草品种资源对根结线虫病抗病性鉴定研究. 沈阳农业大学学报, 2001, 3: 183 ~ 185.
- [16] 樊有斌, 陈晔, 柳闽生, 等. 银杏内生真菌种群多样性的研究. 安徽农业科学, 2007, 35(34): 10953 ~ 10954.
- [17] 魏宇昆, 高玉葆, 李川, 等. 内蒙古中东部草原羽茅内生真菌的遗传多样性. 植物生态学报, 2006, 30(4): 640 ~ 649.
- [18] 周刚泉, 张秀东, 刘琼光, 等. 抗感青枯病番茄的内生细菌数量动态分析及其对青枯病的生物防治. 微生物学通报, 2007, 34(5): 885 ~ 888.