

辣椒内生细菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定

何 红^{1,2} 邱思鑫¹ 蔡学清¹ 关 雄¹ 胡方平^{1*}

(¹福建农林大学植保学院 福州 350002) (²湛江海洋大学农学院 湛江 524088)

摘 要 :以抗利福平为标记 ,用浸种、涂叶和灌根方法接种 ,测定菌株在植物体内的定殖。结果表明 ,来自辣椒体内的 BS-2 和 BS-1 菌株不仅可在辣椒体内定殖 ,也可在番茄、茄子、黄瓜、甜瓜、西瓜、丝瓜、小白菜等植物体内定殖 ,BS-2 菌株还可在水稻、小麦及豇豆等植物体内定殖 ,BS-2 菌株的内生定殖宿主范围比 BS-1 菌株的广 ;另外 BS-2 菌株可在辣椒和白菜体内较长期定殖。用常规方法、Biolog 及 16S rRNA 序列比较 ,两菌株鉴定为枯草芽孢杆菌内生亚种 (*Bacillus subtilis* subsp. *endophyticus*)。

关键词 :内生细菌 ,定殖 ,鉴定 ,枯草芽孢杆菌内生亚种

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)01-0013-06

植物病害是影响农作物高产、稳产和优质的主要因素之一。目前植物病害防治主要采用化学方法 ,但由于化学药剂长期使用不仅会杀伤天敌、引起病菌抗性增强、污染环境 ,甚至会造成危及人体健康等一系列问题。因此 ,人们一直在寻找安全、有效、无污染的植物病害防治方法 ,生物防治就是其中重要的一种。由于内生细菌存在植物体内 ,受到植物体的保护 ,不易受外界环境的影响 ,其中不仅含有大量对寄主植物具有防病、促生及生物固氮等广泛生物学作用的菌株 ,而且它们能在植物体内定殖传导 ,可长期发挥作用^[1]。为此可以认为 ,植物内生细菌是植物病虫害生物防治的天然资源菌 ,具有十分广泛的理论研究和开发应用价值 ,自 20 世纪 80 年代以来 ,已成为植物学、微生物学、生态学、植物保护学及植物育种学等多学科的热门研究课题^[2,3]。

作者从辣椒体内分离到两株细菌 ,研究表明它们对多种植物病原真菌具有强烈的拮抗作用 ,对辣椒、白菜、香蕉等多种炭疽病具有良好的防治效果 ,并对多种作物具有显著的促生作用^[4~6]。本文对这两株细菌在植物体内的定殖及其鉴定进行了研究。

1 材料和方法

1.1 供试菌株和作物

内生菌 BS-2 和 BS-1 菌株分别从辣椒叶片和茎

内分离获得。内生定殖测试作物及品种为 (1)辣椒 (保椒 2 号) (2)白菜 (翠叶小白菜) (3)番茄 (大红番茄) (4)茄子 (玫茄 1 号) (5)黄瓜 (星原 4 号) ; (6)甜瓜 (星原) (7)西瓜 (世纪巨星) (8)苦瓜 (南屿苦瓜) (9)丝瓜 (特早丝瓜) (10)豇豆 (赣丰小叶 28/2 豇豆) (11)水稻 (常规水稻) (12)小麦 (市售)。

1.2 菌株内生定殖测定

1.2.1 抗利福平 (Rif) 突变菌株的筛选 :将供试菌株转入含 0.5μg/mL Rif 的 NA 平板培养基^[7]中培养 ,挑取生长的突变体菌株 ,再接入同一 Rif 浓度的 NA 培养基 ,继代 1 次后转入含 1.0μg/mL Rif 浓度的培养基中 ,直至筛选出在含有 300μg/mL Rif 的 NA 培养基上能稳定生长、菌落形态及对病原菌的拮抗作用等保持不变的 BS-2 和 BS-1 突变体菌株。

1.2.2 菌株内生定殖宿主范围测定接种方法 :1) 浸种接种 :用上述 BS-2 和 BS-1 突变菌株在含 300μg/mL Rif 的 NB 培养基^[7]中振荡培养 (28℃ ,180r/min) 24h 的培养液 (含菌量约为 5 × 10⁶ cfu/mL) 和无菌水分别浸泡各供试植物种子 24h 后 ,再播种于室内装有无菌土的盆钵和室外大田中。按常规方法育苗管理 ,待子叶完全展开后取其茎叶进行内生细菌分离。2) 叶片涂抹接种 :待播种于室内无菌土中和室外大田中的各供试植物苗的真叶展开后 ,用无菌药棉蘸取菌株培养液 (培养方法同上) 和无菌水分别涂抹叶片

基金项目 :国家 863 计划 (2002AA245011) ;国家自然科学基金资助项目 (30370968)

* 通讯作者。Tel 86-591-3789213 ; Fax 86-591-3768179 ; E-mail :Huf@fjau.edu.cn

作者简介 :何 红 (1963 -) 男 ,江西人 ,副教授 ,博士 ,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail :hehong893@hotmail.com

收稿日期 2003-04-19 ,修回日期 2003-06-27

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

(室内测定接种后保湿,室外测定接种后不保湿),于接种后 6d 分别取全株进行内生细菌分离。3)土壤浇灌接种:待播种于室内无菌土和室外大田中的各供试植物苗的真叶展开后,取上述菌株培养液,培养方法同上,和无菌水分别浇灌于各植株根部土壤,于接种后 6d 分别取其茎叶进行内生细菌分离。

1.2.3 BS-2 菌株在辣椒和白菜体内定殖时间测定:用 1.2.2 接种方法,测定了 BS-2 菌株在辣椒(室内盆栽)和白菜(室外种植)体内的定殖时间,各处理的取样时间及取样部位为:①浸种接种:菌液浸种辣椒,于播种出苗后的 7d(子叶出现)、10d(子叶展开)、15d(真叶出现)、20d(真叶展开)取地上部茎叶分离;菌液浸种白菜,于播种出苗后的 15d、18d、21d、30d 取叶片分离。②涂抹叶片接种:选 6~7 叶期辣椒苗,用菌液涂抹基部真叶,于接种后的 1d、3d、5d、7d、10d、15d、20d 取上部未接种叶片和茎杆分离;白菜于出苗后 8d(真叶展开时)用菌液涂抹第一真叶,接种后的 7d、10d、13d、22d(分别与浸种处理后的 15d、18d、21d、30d 同期)取上部未接种的新叶片分离。③土壤浇灌接种:辣椒出苗后真叶展开时,用菌液浇灌土壤,于接种后的 1d、3d、5d、7d、10d、15d、20d 取地上部的叶片和茎杆分离;白菜出苗后 5d(真叶出现时),用菌液浇灌土壤,于接种后的 10d、13d、16d、25d(分别与浸种处理后的 15d、18d、21d、30d 同期)取叶片分离。各接种方法均以清水处理为对照。

1.2.4 定殖菌株的回收:定殖内生细菌分离方法:称取上述各处理植株样品 0.5g,表面用 70% 酒精擦洗后,用 0.1% 升汞浸泡处理 1.5~2.0min,再用无菌水洗涤 3 次,晾干后剪碎并加入 1mL 无菌水磨碎,再静置 15min,然后分别取 200 μ L 溶液涂抹于含 300 μ g/mL Rif 的 NA 培养基平板上,每处理至少 3 次重复,27 $^{\circ}$ C 黑暗培养 24~36h,根据每皿出现菌落数,折算为每克鲜重组织中的细菌数[cfu/g(FW)]。菌株拮抗作用测定采用对峙生长法^[4],在 PDA^[7]平板上测定体内分离回收菌株和原始菌株(对照)对黄瓜枯萎病菌的拮抗作用。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 常规鉴定:参见东秀珠等^[8]的方法。

1.3.2 Biolog 鉴定:用 Biolog^[8]细菌自动化鉴定仪进行。

1.3.3 分子生物学(16S rRNA)鉴定:细菌 DNA 制备:将 BS-2 和 BS-1 两菌株分别在 LB 培养基平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 10h,采用细菌单菌落直接 PCR 扩增法制备细菌 DNA,即用接种环挑取单菌落少许至

200 μ L 双蒸水中,煮沸 8min,12000r/min 离心 3min,取上清,将原液分别稀释 10、100 倍作为 PCR 扩增模板。16S rRNA 的 PCR 扩增:以上述细菌 DNA 为模板,引物采用 16(+):5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',16(-):5'-CGGCTACCTTGTACGAC-3'(引物由上海生工生物工程技术有限公司合成)。两引物间的距离约 1500bp。20 μ L 反应液中含有 10 \times PCR 缓冲液(含 25mmol/L MgCl₂)10%,dNTP 2.5mmol/L,引物各 1.2 μ g,Taq DNA 酶 1U。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 4min,94 $^{\circ}$ C 1min,50 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,循环 30 次;最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10min。反应结束后,取 8 μ L PCR 产物用 0.7% 琼脂糖凝胶在 80V 电压下电泳 1h,以 DL2000 为 Marker 进行分析。用 QIAEX II Gel Extraction Kit 回收目标 DNA 片段,操作过程按产品说明书进行。DNA 序列测定及分析:DNA 序列在宝生物工程(大连)有限公司进行测定。DNA 序列分析采用 DNA MAN 工具和 BLAST 对 BS-2 和 BS-1 菌株的 16S rRNA 序列进行比较分析。从 GenBank 中索取已登录的部分芽孢杆菌 16S rRNA 序列及其登录号分别为:*Bacillus subtilis* subsp. *endophyticus*: AF399911, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*: AF074970, *B. subtilis* var. *chungkookjang*: AY134870, *B. subtilis*: AF233579、AF318900、AJ276351, *Bacillus endophyticus*: AF295302, *B. pumilum*: AJ494732、AY112667, *B. licheniformis*: AY017347。

2 结果和分析

2.1 BS-2 和 BS-1 菌株的内生定殖宿主范围测定

用抗 Rif 标记的 BS-2 和 BS-1 菌株培养液以各种方法接种辣椒、白菜、黄瓜、豇豆等作物后,体内细菌分离结果表明(表 1),不同接种方法接种的菌株在植物体内的定殖结果有所不同,BS-2 和 BS-1 菌株在植物体内的定殖也有所不同,各对照中均未分离到细菌,说明用抗利福平为标记可以进行菌株在植物体内的定殖测定。浸种处理,除在苦瓜苗体内未回收分离到这两种细菌外,在其它测试的作物中,不论是室内盆栽,还是室外栽培,全部可以回收分离到该细菌,另外,BS-2 菌株浸种处理后,在室内盆栽和室外栽培的小麦体内及水稻体内(室内盆栽)也能回收分离到该细菌;而在番茄、黄瓜、苦瓜和豇豆中未回收分离到 BS-1 细菌。叶片涂抹和土壤浇灌接种,在测试的作物中均可回收分离到 BS-2 细菌,而叶片涂抹接种在茄子、黄瓜和豇豆中未回收到 BS-1 细菌(其中番茄、丝瓜和苦瓜未测定);土壤浇灌接种在番

茄、黄瓜、苦瓜和豇豆中未回收到 BS-1 细菌(其中甜瓜、西瓜和丝瓜未测定)。由此可见,BS-2 和 BS-1 菌株除可以在辣椒(其自然寄主)体内定殖外,还可以在其它多种植物体内定殖,但 BS-2 菌株与 BS-1 菌株的内生定殖宿主范围有所不同,BS-2 菌株的内生定殖宿主范围更广。

表 1 各种方法接种 BS-2 和 BS-1 菌株在各植物体内的定殖结果

Table 1 Re-isolation of BS-2 and BS-1 from plants with inoculations		Capsicum	Cabbage	Tomato	Eggplant	Cucumber	Musk-melon	Water-melon	Loofah goard	Momordica	Cowpea
Inoculation methods	Treatments										
Seed dipping	BS-2 greenhouse	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	BS-2 in field	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	BS-1 greenhouse	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
	Water CK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leaf daubing	BS-2 greenhouse	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BS-2 in field	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BS-1 greenhouse	+	+	ND	-	-	+	+	ND	ND	-
	Water CK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Root watering	BS-2 greenhouse	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BS-2 in field	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BS-1 greenhous	+	+	-	+	-	ND	ND	ND	-	-
	Water CK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note : + .Denote the bacteria re-isolated from plants ; - .Denote the bacteria not re-isolated from plants ; ND. Denote un-tested.

2.2 BS-2 菌株在辣椒和白菜体内的定殖时间测定

为了解菌株在植株体内的定殖时间,本研究对 BS-2 菌株在辣椒和白菜体内的定殖进行了测定,结果表明(图 1-A~D),接种后在未接种的辣椒和白菜茎叶组织体内均可分离回收到 BS-2 细菌,而清水对照处理中均未分离到细菌。各种接种方法接种辣椒 20d 后仍可从未接种处理的辣椒茎叶组织体内分离回收到该细菌;白菜浸种接种后 30d、土壤浇灌接种后 25d、涂抹叶片接种后 22d,即分别为白菜播

种后的收获期,也可以在白菜叶片体内分离到该细菌。这说明 BS-2 菌株可以在辣椒体内长期定殖,并可在白菜全生育期体内定殖,同时还可以在辣椒和白菜植株体内传导。

2.3 BS-2 和 BS-1 菌株和从辣椒、白菜体内回收菌株的常规鉴定和 Biolog 鉴定

比较原始菌株与从植物分离回收的菌株的拮抗作用结果表明,上述各菌株的培养性状及对黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)等植

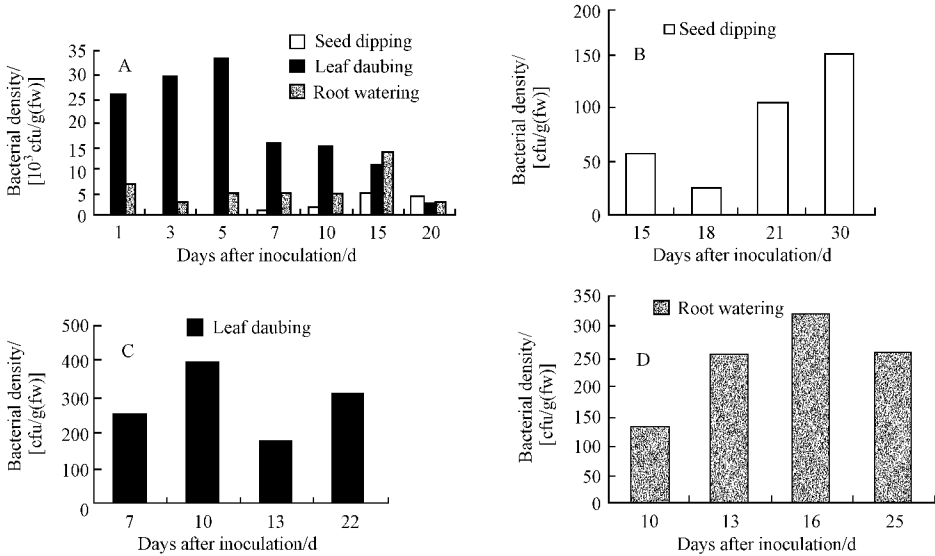


图 1 不同方法接种 BS-2 菌株在辣椒和白菜体内的定殖时间(A 辣椒 B~D 白菜)

Fig.1 Colonization days of BS-2 in capsicum and cabbage plants with inoculations(A : Capsicum ; B ~ D : Cabbage)

物病原真菌的拮抗作用均与原始菌株基本相同(图2)形态观察和常规染色表明,BS-2 和 BS-1 原始菌株及从辣椒、白菜等体内回收菌株的菌体均为杆状;菌落乳白色、圆形、有的中央隆起,革兰氏染色阳性,周生鞭毛,产芽孢,芽孢卵圆形、在菌体中央或一端形成,兼性厌氧,接触酶阳性。参照东秀珠等^[8]的描述,为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.);经 Biolog 测定,上述菌株均鉴定为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。由此可见,本研究从辣椒体内分离获得的 BS-2 和 BS-1 菌株为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),进一步证明,以抗利福平为标记,可以进行内生细菌在寄主植物体内的定殖检测,其结果是可靠的。

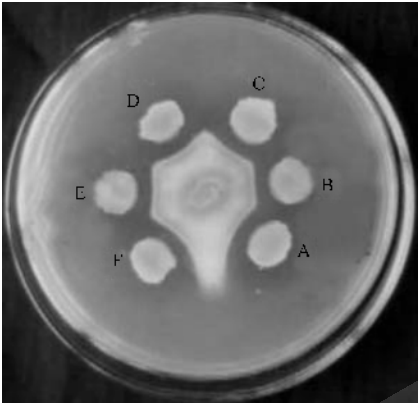


图2 BS-2 及从植物体内回收菌株对黄瓜枯萎病菌的拮抗作用

Fig.2 Antagonism to *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* of wild BS-2 and the isolates re-isolated from plants

A. Wild strain; B~F. The BS-2 re-isolated from capsicum, cabbage, tomato, cucumber, and cowpea respectively.

2.4 BS-2 和 BS-1 菌株分子生物学鉴定

以细菌通用引物和 BS-2 和 BS-1 两菌株单菌落裂解后所获得的 DNA 液直接为模板进行 PCR 扩增,2 菌株均得到一条约 1500bp 的 DNA 片段(图3),回收该片段,并进行序列测定,BS-2 菌株 16S rRNA 基因片段长度为 1459bp,BS-1 菌株 16S rRNA 基因片段长度为 1471bp。在 GenBank 中的登录号分别为 AY172513 (BS-2)和 AY172514 (BS-1)。

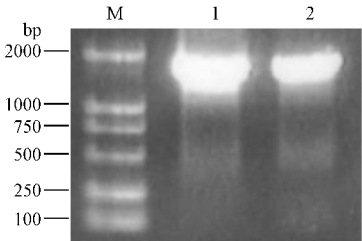


图3 菌株 16S rRNA PCR 扩增结果

Fig.3 16S rRNA PCR results of BS-1 and BS-2 strains

采用 DNA MAN 和 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站中 BLAST 工具,将 BS-2 和 BS-1 菌株的 16S rRNA 序列分别与从 GenBank 中索取已登录的部分菌株的 16S rRNA 序列相似性比较,结果发现,BS-2 与各菌株之间的 16S rRNA 序列相似性分别为:99.4% [*B. subtilis* subsp. *spizizenii*(AF074970)],99.1% [*B. subtilis* var. *chungkookjang*(AF233579)],99.0% [*B. subtilis*(AF318900)],99.6% [*B. subtilis* subsp. *endophyticus*(AF399911)],99.2% [*B. subtilis*(AJ276351)],99.3% [*B. subtilis*(AY134870)],93.5% [*B. endophyticus*(AF295302)],97.1% [*B. pumilum*(AJ494732)],97.3% [*B. pumilum*(AY112667)],97.6% [*B. licheniformis*(AY017347)];BS-1 与上述各菌株 16S rRNA 序列相似性分别为:99.6%、99.4%、99.2%、99.8%、99.4%、99.5%、97.1%、97.2%、97.6%。BS-2 和 BS-1 菌株与各枯草芽孢杆菌 16S rRNA 序列相似性均达 99% 以上。表明 BS-2 和 BS-1 菌株均为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

系统发育学分析结果表明(图4),BS-2 和 BS-1 菌株与枯草芽孢杆菌内生亚种(*B. subtilis* subsp. *endophyticus*(AF399911))的序列相似性和遗传距离均最小,分别为 99.6%、99.8% 和 0.004、0.002。由此表明,BS-2 和 BS-1 两菌株可能属于枯草芽孢杆菌内生亚种(*B. subtilis* subsp. *endophyticus*)。

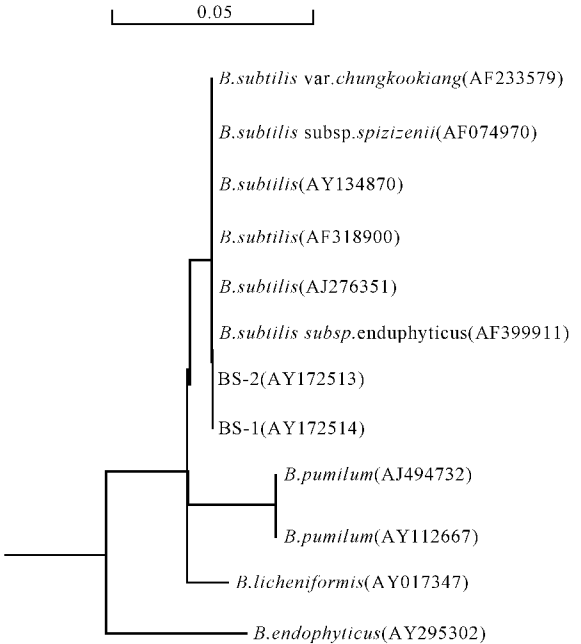


图4 芽孢杆菌系统发育树状图

Fig.4 Dendrogram of *Bacillus* phylogeny

3 讨论

研究结果表明,BS-2 和 BS-1 菌株,尤其是BS-2 菌株,不仅可以在其自然宿主(辣椒)体内定殖,还可以在茄科、葫芦科、十字花科、豆科和禾本科等植物体内定殖,同时 BS-2 菌株还可以在辣椒体内较长期(20d 以上)和在白菜全生育期体内定殖并传导。Biolog 鉴定两菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); 16S rRNA 序列分析比较发现,它们与 GenBank 登录的枯草芽孢杆菌内生亚种(登录号 AF399911)的相似性最大、遗传距离最小,在系统发育树状图中也 与该菌位于同一小分支中。因此认为,从辣椒叶片和茎秆体内分离的 BS-2 和 BS-1 菌株为枯草芽孢杆菌内生亚种(*B. subtilis* subsp. *endophyticus*)。这是目前世界第 2 例、中国首次从植物体内分离到枯草芽孢杆菌内生亚种的报道。

枯草芽孢杆菌是自然界广泛存在的、对人畜无毒无害、不污染环境、对许多植物病原生物具有拮抗作用的非病原微生物^[9],现已从土壤或植物根际土壤中分离筛选到多株具有防病、促生等生物学作用的枯草芽孢杆菌,有的已开发成商品。而植物体内枯草芽孢杆菌至今仅发现从板栗^[10]、柑桔^[11]、大豆^[12]等植物体内分离到该菌,但它们对植物的生物学作用却未见研究报道。作者在相关研究中发现,BS-2 和 BS-1 菌株对植物炭疽病等具有良好防病效果、并对辣椒和白菜等植物具有显著促生作用^[4~6]。由此可见,该两菌株具有良好的理论研究价值和应用前景,不仅可以作为研究内生细菌与宿主植物的互作及其作用机制的良好试验材料,还可用于内生生物肥料和生物杀菌剂的研制开发,同时还可能成为构建内生防病促生等多功能工程菌的良好载体,该研究正在进行中。

健康植物体内含有内生细菌的概念,现已普遍接受。但关于植物内生细菌的来源,存在植物体内固有和来自体外两种不同的观点^[13,14]。本研究结果表明,BS-2 和 BS-1 菌株可通过浸种、灌根和涂叶等接种方法进入多种非自然宿主植物体内定殖,外源细菌可以通过植物体表进入植物体内定殖,植物体表(根际和叶围)细菌可能是内生细菌的主要来源。

参 考 文 献

- [1] 袁 军,孙福在,田宏先,等. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选. 微生物学报, 2002, **42**(3): 270-274.
- [2] Sturz A V, Christie B R, Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, **19**(1): 1-30.
- [3] 杨海莲,孙晓璐,宋 未. 植物根际促生细菌和内生细菌的诱导抗病性的研究进展. 植物病理学报, 2000, **30**(2): 106-110.
- [4] 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. 中国生物防治, 2002, **18**(4): 171-175.
- [5] 何 红,蔡学清,陈玉森,等. 辣椒内生枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 防治香蕉炭疽病研究. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, **31**(4): 441-443.
- [6] 何 红,蔡学清,关 雄,等. 辣椒内生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)BS-2 和 BS-1 防治辣椒炭疽病研究. 植物病理学报, 2003, **33**(2): 170-173.
- [7] 方中达. 植病研究法(第三版). 北京:中国农业出版社, 1998, 182.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 北京:科学出版社, 2001, 43-65.
- [9] David A D. The molecular biology of the *Bacilli*. Vol. 1: *Bacillus subtilis*. Academic Press, 1982.
- [10] Wilhelm E, Arthofer W, Schaffleitner R. *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). In: Cassells A C. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997, 331-337.
- [11] Vargas C, Lopes A, Hemery A. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can J Microbiol*, 2001, **47**(3): 229-236.
- [12] Bai Y, Daoust F, Smith D L, et al. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Can J Microbiol*, 2002, **48**(3): 230-238.
- [13] Van Peer R, Punte H LM, de Weger L A, et al. Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. *App Environ Microbiol*, 1990, **56**: 2462-2470.
- [14] McInroy J A, Kleopfer J W. Survey of indigenous bacterial endophytic from cotton and sweet corn. *Plant Soil*, 1995, **173**: 337-342.

Colonization in Plants and Identification of Endophytic Bacteria BS-1 and BS-2 from *Capsicum annuum*

HE Hong^{1 2} QIU Si-Xin¹ CAI Xue-Qing¹ GUAN Xiong¹ HU Fang-Ping¹

(¹ College of Plant Protection, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

(² College of Agriculture, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract : Tagged by the resistance to Rif.(300 g/mL) and inoculated by seed dipping , leaf daubing and root watering , the endophytic bacteria BS-1 and BS-2 strains , isolated from *Capsicum annuum* leaf and stem respectively , had been proved that they could live in many plants , such as capsicum , tomato , eggplant , cabbage , cucumber , muskmelon , watermelon , loofah gourd etc. , and BS-2 also colonized in rice , wheat , and cowpea . The two strains were identified as *Bacillus subtilis* subsp. *endophyticus* based on the basic properties tests , Biolog analysis and their 16S rRNA sequences phylogenetic relation .

Key words : Endophytic Bacteria , Colonization , Identification , *Bacillus subtilis* subsp. *endophyticus*

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2002AA245011) ; Chinese National Natural Science Fund (30370968)

* Corresponding author. Tel 86-591-3789213 ; Fax 86-591-3768179 ; E-mail : Huf@fjau.edu.cn

Received date 04-19-2003

致 谢

2003 年庆祝《微生物学报》创刊五十周年的活动在中国科学院微生物研究所和中国微生物学会领导的关怀下 ,得到了全国有关单位的大力支持 ,本刊编辑部对此表示衷心感谢 ! 希望今后能够继续得到您的支持 ,我们将加倍努力把《微生物学报》办得更好。

《微生物学报》编辑部