

油樟内生芽孢细菌的系统发育多样性

王涛¹, 游玲¹, 崔晓龙², 田文¹, 黄乃耀¹, 李欣龙¹

(¹宜宾学院, 发酵资源与应用四川省高校重点实验室, 宜宾 644000)

(²云南大学, 云南省微生物研究所, 昆明 650091)

摘要 【目的】为了解油樟产芽孢内生细菌的多样性。【方法】采用改良的牛肉膏琼脂培养基分离、去除冗余及芽孢染色, 测定所得产芽孢内生细菌的 16S rRNA 基因, 进行系统发育分析。【结果】40 株产芽孢内生细菌数量占分离得到的内生细菌总数的 38.1%, 其中根、茎、叶中分别分离得到 24 株、7 株和 9 株。16S rRNA 基因序列系统发育分析结果表明, 35 株菌可能分属于 *Bacillus*、*Lysinibacillus*、*Paenibacillus* 属的 16 个种, 还有 5 株菌的序列与数据库中典型菌株序列相似性低于 97%, 代表着潜在新类群的存在。【结论】从油樟 3 个部位分离出的产芽孢内生细菌存在明显的系统发育多样性, 而且 3 个部位分离出的产芽孢内生细菌区系既呈现出一定程度的细菌区系相似性, 又表现出器官细菌区系的特异性。

关键词: 油樟; 内生菌; 产芽孢细菌; 系统发育多样性; 16S rRNA 基因

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)05-0573-07

油樟 [*Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao] 是我国特有的天然芳香油生产树种, 油樟叶经水蒸气蒸馏得到由几十种不同沸点的化学物质组成的油樟油 (粗樟油)。油樟油的精加工产品为国防、轻工、医药等方面重要的稀有原料; 在香精香料工业中, 也占有重要的地位^[1]。来自宜宾市科技局和林业局的信息表明, 全国 65% 的油樟分布在宜宾, 宜宾樟油产量占全国总产量的 75% 左右。而且文献资料表明, 宜宾油樟几乎不发生植物病害, 从未有大面积植物病害爆发的记载。已有许多研究结果表明, 植物中的内生细菌对宿主具有抗病促生的能力^[2], 而且从植物中分离的内生细菌中, 产芽孢菌占有相当的比例^[3]。

同时, 产芽孢的细菌是一类重要的微生物类群, 在国民经济诸多方面均有重要的应用价值。特别是由于其对环境有很强适应能力, 作为生物菌剂在生

物防治方面和促进植物生长方面有着重要的应用价值, 目前已有许多关于芽孢杆菌作为生物菌剂的研究^[4-7]。虽然国内研究者做了大量芽孢杆菌的分离与鉴定工作, 但主要侧重于土壤来源芽孢杆菌, 专门针对植物源的芽孢杆菌研究开展较少。到目前为止, 虽然国内外对各种植物内生细菌的研究中基本都涉及产芽孢内生细菌, 但专门针对一种植物的产芽孢内生细菌的系统研究开展极少, 仅见陈兰等对几种药用植物内生芽孢杆菌的系统分类报道^[8]。

通过对油樟这种我国特有的产油植物的内生芽孢细菌的研究, 不仅可以获得一些有用的微生物资源, 还可以为更好地开发利用油樟这种我国特有的经济树种奠定一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目(07JY029-001); 四川省教育厅青年基金资助项目(2006 B079); 国家自然科学基金(30860013, 30660004, 30460004)

作者简介: 王涛(1973-), 男, 四川宜宾人, 讲师, 博士研究生, 主要从事微生物生态学方面的研究。Tel: +86-831-3545069; E-mail: asdfgw@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-19; 修回日期: 2009-02-23

1.1.1 样品采集 油樟采自四川宜宾县隆兴乡油樟母树繁育基地,采样时间为2007年5月下旬,采样点为该县最大的油樟母树繁育基地(宜宾县油樟数量占全国油樟总数的65%左右)。在油樟母树林中50 m²范围内,选取无明显植物病害而且树龄(胸径20 cm~30 cm)接近的油樟树20棵分别采集根、茎、叶。采集后马上回实验室进行分离。

1.1.2 植物组织无菌水浸液的制备 取每种植物健康植株的根(直径约1 mm~5 mm)、茎(1至2年生的枝条,直径约5 mm~10 mm)、叶(随机选取)分别打碎后等重量混合,称取80 g加入200 mL水,115℃灭菌20 min后无菌纱布过滤。

1.1.3 分离培养基 1000 mL牛肉膏蛋白胨培养基中加入20 mL无菌油樟根茎叶水浸液和5万单位制霉菌素。

1.1.4 主要试剂和仪器 PCR仪为Bio-Rad公司产品,菌株DNA提取、16S rDNA片段扩增所用的各种酶、Marker、dNTPs、Buffer等试剂为上海生物工程技术服务有限公司产品(Sangon);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 内生芽孢杆菌的分离及保藏

油樟叶内生细菌的分离:随机挑选树叶20片,洗净风干,75%乙醇浸泡60 s,无菌水冲洗6次,无菌滤纸吸干,0.1%升汞浸泡40 s,无菌水冲洗6次,加无菌石英砂研磨,梯度稀释至10⁻³,每一稀释梯度涂布10个分离平板。茎(5 g)和根(5 g)的乙醇和升汞处理的时间分别为2 min和3 min 50 s和1 min。每个样品都取最后一次无菌水洗液涂于相应平板上,以检测表面消毒是否彻底。定期观察分离平板,挑取单菌落划线纯化于牛肉膏蛋白胨斜面上。

根据菌落的颜色、大小、突起特征、边缘特征、表面光滑与否和透明度等肉眼可辨的特征对从同一分离器官内分离到的菌株去除冗余菌株。按照文献[9]的方法进行芽孢染色观察,选择出的产芽孢的培养物分别转接到甘油管存于-70℃及试管斜面存于4℃备用。

1.3 培养物DNA提取和16S rDNA PCR扩增

根据文献[10]提供的方法,并适当修改。提取培养物基因组DNA后,PCR扩增16S rDNA。细菌引物^[11]27f:5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3'和1541 r:5'-AAGGAGGTGATC CAGCCGCA-3',PCR反应体系和反应条件参照文献[9]的方法进行。

1.4 16S rDNA部分序列分析

扩增的PCR产物送上海生物工程技术服务有

限公司(Sangon)纯化并测序,测定序列长度1000 bp~1100 bp。测定的序列用EzTaxon server 2.0^[12]在线进行相似性分析。用ClustalX按照最大同源性的原则进行排序,采用Kimura-2^[13]计算核苷酸差异值,并用BioEdit 5.0.9进行检验,最后用Neighbor-Joining法^[14]构建系统进化树,自展数(bootstrap)为1000。

2 结果和分析

2.1 油樟内生芽孢杆菌的分离

从分离的过程来看,油樟各部位经过表面消毒后,最后一次冲洗的无菌水接种在相同的分离平板上均未见菌落长出,可以初步认定分离到的菌株为油樟的内生细菌。采样点选择多年生油樟树林,采集了多株植株的样品进行混合,在一定程度上避免了植物个体差异和环境条件偶然变化对结果的影响。同时,不同部位表面消毒的条件经过了优化,在一定程度上避免了表面消毒条件过于剧烈或过于温和对多样性研究的影响^[15]。而且本研究采用在分离平板中添加了分离样品汁液,尽量模拟了内生细菌在宿主中的生活环境,保证了内生细菌尽可能地被分离出来^[16]。

由于芽孢一般是细菌在营养生长不良的情形下形成,0020通常在生长后期因外源营养物质缺乏或环境条件胁迫引起。目前已经有一些报道表明一些产芽孢细菌在营养丰富的培养基上也要数天才能产生芽孢^[17]。本研究经过连续数天的检测,基本上保证了分离得到细菌中产芽孢的细菌被筛选出来。在实验过程中,也有一些产芽孢细菌在连续检测到第3天才检测到芽孢。

从根、茎、叶分离到的菌落经过肉眼可见的表观特征去除冗余后,再进行芽孢染色,结果见表1。从表1可以看出,根部分离得到的细菌数量和产芽孢细菌的数量均远高于茎和叶分离出的细菌数量和产芽孢细菌数量。而且,分离得到的细菌中,产芽孢细菌占有较高的比例,尤其是叶中分离出的产芽孢细菌占到了其总细菌菌株的45%。

表1 油樟产芽孢内生细菌分离情况

Table 1 The numbers of endospore-forming endophytic bacteria			
Plant tissues	No. of endophytic bacteria	No. of endospore-forming endophytic bacteria	Percentage of endospore-forming endophytic bacteria/%
Roots	62	24	38.7
Stems	23	7	30.4
Leaves	20	9	45.0
Total	105	40	38.1

2.2 系统发育分析

对40株产芽孢细菌的16S rDNA进行测序,共得到40条有效序列(GenBank序列号见图1)。经16S rDNA序列相似性分析和系统发育分析(表2,图1),发现40株产芽孢内生细菌体现出较为丰富的系统发育多样性。

根中分离得到的24株产芽孢内生细菌可能分属于*Bacillus*属(13株)的8个种、*Lysinibacillus*属(6株)的3个种和*Paenibacillus*属(1株)的1个种。有4株菌(YG4、YG6、YG43、YG39)的序列与数据库中近缘类群典型菌株(分别为*Bacillus anthracis* ATCC 14578^T、*Bacillus megaterium* IAM 13418^T、*Bacillus atrophaeus* NCIMB 12899^T、*Paenibacillus soli* DCY03^T)序列相似性低于97%,可能代表着4个潜在新分类单位。

茎中分离得到的7株产芽孢内生细菌中,可能

分属于*Bacillus*属(4株)的3个种和*Lysinibacillus*属(2株)的2个种,有1株菌(YJ8)的序列与数据库中近缘类群典型菌株(*Paenibacillus soli* DCY03^T)序列相似性只有96%,可能代表1个新分类类群。

叶中分离得到的9株菌可能属于*Bacillus*属(5株)的5个种、*Paenibacillus*属(3株)的2个种和与*Lysinibacillus*属(1株)的1个种。由于YG39与YJ8的序列均与在GenBank中同一株典型菌株(*Paenibacillus soli* DCY03^T)的序列最为接近,且相似度都一样,且利用EzTaxon server 2.0^[12]软件对2者进行比对,发现2者序列相似性为99.5%,所以YG39和YJ8中可能同属于1个新分类单位。

综合系统发育分析并结合表2和图1可以看出,分离出的产芽孢内生细菌至少分属于3个属的16个种,其中还有5株菌代表4个潜在的新分类类群。

表2 产芽孢内生细菌的16S rDNA序列相似性分析

Table 2 Similarity analysis of partial 16S rDNA sequences of endophytic endospore-forming bacteria

Nearest related genus	Closest related type strain	roots	Similarity/%	stems	Similarity/%	leaves	Similarity /%
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus tequilensis</i> 10b ^T	3	99-100	1	99	1	99
	<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077 ^T	3	99-100				
	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 ^T	4	96-100			1	99
	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 ^T	2	96-98	2	98-99	1	99
	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	2	99-100			1	100
	<i>Bacillus atrophaeus</i> NCIMB 12899 ^T	1	96				
	<i>Bacillus lehensis</i> MLB-2 ^T	1	99				
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23350 ^T			1	99		
	<i>Bacillus drentensis</i> LMG 21831 ^T					1	99
<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> NCDO 1767 ^T	3	98	1	98		
	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i> T-10a ^T	1	98	1	99		
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> NBRC 15717 ^T	2	98-99			1	100
<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus soli</i> DCY03 ^T	1	96	1	96		
	<i>Paenibacillus lactis</i> MB 1871 ^T	1	97				
	<i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP23 ^T					2	98-99
	<i>Paenibacillus terrigena</i> A35 ^T					1	99

2.3 油樟3个部位分离出的产芽孢内生细菌多样性

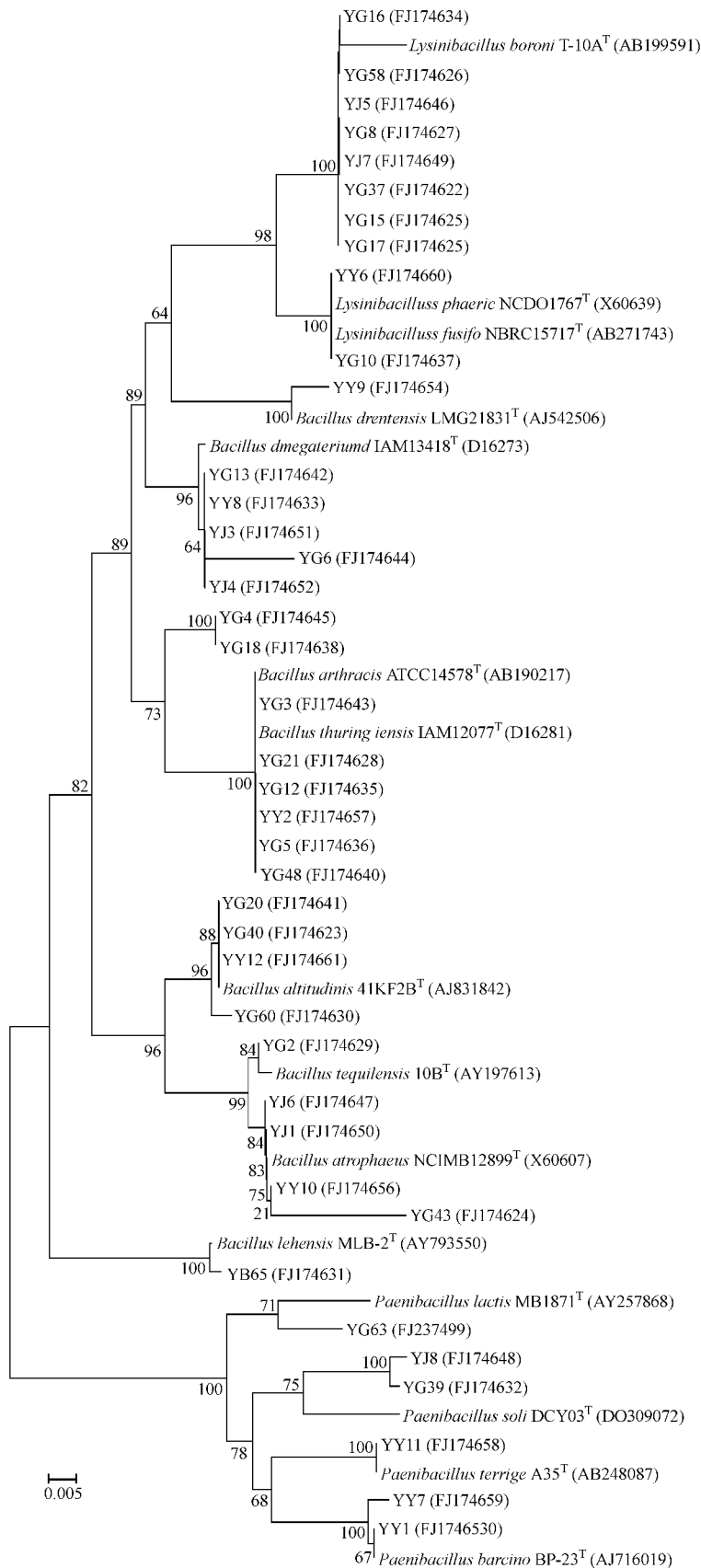
根、茎、叶中分离出的产芽孢内生细菌的Shannon指数(H)分别为2.5132、1.7479、1.7479(与典型菌株相似性低于97%的菌株按新分类类群计算)。可见从3个部位分离得到的产芽孢内生细菌的系统发育多样性来看,根最大,叶次之,而茎最小。

3个部位分离出的产芽孢内生细菌中,属于*Bacillus*的菌株均最多(根16株,占根中分离出的产芽孢内生细菌的66.7%,茎4株,占57.1%,叶5株,占55.6%)。 *Bacillus*属的细菌在棉花、黄瓜、柑橘树、马尾松等许多植物中被分离到,而且大多属于优

势属^[2,19]。根、茎、叶中分别有6株、2株和1株产芽孢内生细菌属于*Lysinibacillus*属。目前该属菌株主要从土壤和水体等环境样品中分离得到,目前尚未见从植物中分离出该属菌株的报道。根、茎、叶中分别分离出2株、1株和3株属于*Paenibacillus*属的产芽孢内生细菌,该属的细菌也在黑松^[3]和高丽人参根部被分离到^[20]。

2.4 油樟3个部位产芽孢内生细菌区系(microflora)的相似性与特异性

从根、茎、叶产芽孢内生细菌16S rDNA序列与数据库中各典型菌株序列相似性来看,仅有与



1 油樟产芽孢内生细菌的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 Dendrogram for endophytic bacteria forming endospore isolated from *Cinnamomum longepaniculatum* based on partial 16S rDNA sequences. Data in parentheses are the GenBank accession numbers and the number of isolates represented by this strain. The scale bar indicates 5 substitutions per 1000 nucleotides of 16S rDNA sequence. Bootstrap values were showed on the branches. YG, YJ, YY mean the roots, the stems and the leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* respectively.

Bacillus tequilensis 和 *Bacillus megaterium* 典型菌株序列最为接近的产芽孢内生细菌在 3 个部位均有分布,共有 10 株(根 5、茎 3、叶 2),占总数的 25.0%(占根内分离所得产芽孢内生细菌的 20.8%、茎的 42.9%、叶的 22.2%)。而与 *Bacillus thuringiensis*、*Bacillus atrophaeus*、*Bacillus lehensis*、*Paenibacillus lactis* 典型菌株序列最为接近产芽孢内生细菌只在根部分离得到(共 6 株,占根分离产芽孢内生细菌的 25.0%)。而且与 *Bacillus atrophaeus* NCIMB 12899^T 序列最为相似的菌株(YG4)代表着新分类单位的可能性极大。而与 *Bacillus drementensis*、*Paenibacillus barcinonensis*、*Paenibacillus terrigena* 典型菌株序列最为接近的产芽孢内生细菌只在叶中分离到(共 4 株,占叶中分离产芽孢内生细菌的 44.4%)。同样,与 *Bacillus amyloliquefaciens* 典型菌株序列最为接近产芽孢内生细菌在茎部分离且只有 1 株(占茎中分离得到的产芽孢内生细菌的 14.3%)。

仅从 16S rDNA 系统发育分析来看,油樟 3 个部位分离出的产芽孢内生细菌区系呈现出相似性的同时,又表现出器官特异性。那些根茎叶共有(本研究条件下分类地位相同)的产芽孢内生细菌,在根和叶中的比例较低,而在茎中的比例较高。根、茎、叶独有的(本研究条件下分类地位不同)的产芽孢内生细菌,在根和叶中的比例高于其共有的产芽孢内生细菌所占比例,而且在叶中特别明显(分别为 22.2% 和 44.4%),而茎恰好相反。

3 讨论

在进行样品采集、内生细菌的分离、产芽孢内生细菌的确认等环节,均采取了各种措施尽量避免操作不当带来的偏差。本文分离得到的绝大多数产芽孢内生细菌,可能归属的种群在其他多种植物中均有发现^[21-23]。*Lysinibacillus* 属的细菌,在所检索的数个数据库有关内生细菌的文献中,均没有发现从植物中分离出该属菌株的报道。但本研究从油樟不同部位分离出了 9 株属于该属的菌株,关于这 9 株菌是否为油樟内生细菌,尚需开展进一步的试验加以确认。

同样,本研究中发现有 5 株菌与数据库中各典型菌株序列相似性均低于 97%,代表着潜在的新分类单位,需要开展进一步的实验来确定其分类地位。虽然 16S rDNA 由于具有许多的优点,做为当今生物系统发育的主要分子标尺,但其也存在偏保守和可能存在多操纵子等问题。所以,仅用 16S rDNA 序列

信息是无法将菌株进行准确的鉴定的。虽然,笔者就 35 株菌(除 5 株新分类地位的菌株)的形态指标和部分生理生化指标与对应属的模式菌株的相应指标进行了比较,其结果也支持 16S rDNA 序列分析结果。由于 16S rDNA 序列分析本身固有的问题,加之本研究只测定了 16S rDNA 的 1100bp 长度,尚需开展进一步的研究。对菌株的多种生理生化指标及 BOX-PCR、全序列杂交等遗传指标进行检测,已进行准确鉴定。

目前有关植物内生细菌的来源有 2 种假说:一种是认为内生细菌来源于植物的表面;另一种认为内生细菌来源于根际,并由此进入植物组织内部^[4,6]。而且也有多项研究表明内生细菌能够在植物体内不同部位转移的^[25-26]。但本文的研究结果似乎表明,油樟中产芽孢内生细菌 2 种起源方式均存在。一方面,根茎叶共有(本研究条件下分类地位相同)的产芽孢内生细菌在根和叶中所占比例较低,而在茎中的比例较高;另一方面,根茎叶独有(本研究条件下分类地位不同)的产芽孢内生细菌种类比共有的产芽孢内生细菌多,而茎恰好相反。

针对目前的 2 种假说和一些研究报道并结合本研究的结果可以做如下推断:油樟产芽孢内生细菌一部分来自土壤,从根部进入植株,然后转移到茎,再转移至叶;一部分来自空气和雨水通过气孔和昆虫等从叶进入植株,然后到茎,再转移至根。由于根、茎、叶内部的环境有差异,无论从根还是从叶进入植株的产芽孢菌都不能完全转移,不能转移的菌株经过协同进化成为根或叶的特有菌株,能够转移的菌株成为共有菌株。而茎由于细菌较难从环境中进入,导致茎中特有的菌株很少,而共有的菌株较多(自根或叶转移而来)。

研究分离出的非芽孢菌(占 55%)除 9 株为球菌之外,其余均为杆菌,多数能够降解纤维素,可抑制多种植物病原真菌生长,少数菌还能促使油樟快速形成愈伤组织(相关实验正在进行中),说明油樟内生非芽孢菌对油樟植株也有重要影响,有待进一步深入研究。

本文首次对我国特有的产油植物——油樟中产芽孢内生细菌的 16S rDNA 的系统发育开展了研究。不仅发现油樟产芽孢内生细菌类群存在多样性(分属于 3 个属的 16 个种)和特异性(4 个潜在的新分类单位和 *Lysinibacillus* 属菌株首次在植物组织中分离到)。还发现油樟产芽孢内生细菌在植物不同部位上分布有一定的规律性,从一定程度上支持目前

关于内生细菌来源的假说。同时获得了一些微生物资源,为进一步的应用研究提供了材料。

参考文献

- [1] 魏琴,李群,罗扬,等.油樟油对植物病原真菌活性的抑制作用.中国油料作物学报(*Chinese Journal of Oil Crop Sciences*) 2006, 28(1): 63 - 66.
- [2] 卢镇岳,杨新芳,冯永君.植物内生细菌的分离、分类、定殖与应用.生命科学(*Chinese Bulletin of Life Sciences*), 2006(2): 90 - 94.
- [3] Bent E, Chanway CP. Potential for misidentification of a spore-forming *Paenibacillus polymyxa* isolate as an endophyte by using culture-based methods. *Applied and Environmental Microbiology* 2002, 68: 4650 - 4652.
- [4] 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.植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*) 2007, 33(1): 105 - 108.
- [5] 易有金,罗坤,罗宽,等.内生枯草芽孢杆菌 B-001 菌株内生定殖研究及生物学特性.核农学报(*Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*) 2007, 21(4): 349 - 352.
- [6] Rajendran G, Sing F, Desai AJ, et al. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of Bacillus strains with Rhizobium spp. *Bioresource Technology* 2008, 99(11): 4544 - 4550.
- [7] 洪永聪,范晓静,来玉宾,等.枯草芽孢菌株 TL2 在茶树体内的内生定殖.茶叶科学(*Journal of Tea Science*), 2006, 26(4): 270 - 274.
- [8] 陈兰,张小平, Kristina Lindstro.药用植物内生芽孢杆菌的多样性和系统发育研究.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*) 2008, 48(4): 432 - 438.
- [9] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社, 2001.
- [10] Rainey FA, Naomi WR, Kroppenstedt RM, et al. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996, 46: 1088 - 1092.
- [11] Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, et al. Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 1981, 148: 107 - 127.
- [12] Chun J, Lee JH, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007, 57: 2259 - 2261.
- [13] Kimura M A. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Biology* 1980, 16: 111 - 120.
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987, 4: 406 - 425.
- [15] Arnold A E, Maynard Z, Gilbert GS, et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecological Letters* 2000, 3(4): 267 - 274.
- [16] Amann R I, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* 1995, 59: 143 - 169.
- [17] 赵国辉,戴新羽,周盛琦,等.芽孢形成促进培养基的自制与初步应用.中国公共卫生(*Chinese Journal of Public Health*) 2001(2): 37.
- [18] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standard. *Microbiology Today* 2006, 33: 152 - 155.
- [19] Kye Man Cho, Su Young Hong, Sun Mi Lee, et al. Endophytic Bacterial Communities in Ginseng and their Antifungal Activity Against Pathogens. *Microbial Ecology* 2007, 54: 341 - 351.
- [20] Jeon YH, Chang SB, Hwang IG, et al. Involvement of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng. *Journal of Molecular Biology* 2003, 13: 881 - 891.
- [21] 冯永君,宋未.植物内生细菌.自然杂志(*Chinese Journal of Nature*) 2001, 23(5): 249 - 252.
- [22] 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.微生物学通报(*Microbiology*), 2007, 34(4): 700 - 704.
- [23] Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Araujo WL, et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, 73: 7259 - 7267.
- [24] 杨海莲,孙晓璐,宋未.植物内生细菌研究.微生物学通报(*Microbiology*) 1998, 25(4): 224 - 227.
- [25] 刘忠梅,王霞,赵金焕,等.有益内生细菌 B946 在小麦体内的定殖规律.中国生物防治(*Chinese Journal of Biological Control*) 2005, 21(2): 113 - 116.
- [26] Coombs J T, Franco C M M. Visualization of an endophytic streptomycetes species in wheat seed. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69(7): 4260 - 4262.

Phylogenetic diversity of endophytic endospore-forming bacteria isolated from *Cinnamomum longepaniculatum* N. Chao ex H. W. Li

Tao Wang¹, Ling You¹, Xiaolong Cui², Wen Tian¹, Naiyao Huang¹, Xinglong Li¹

(¹ Key Laboratory of Fermentation Resources and Application at Universities of Sichuan Province, Yibin University, Yibin 644000, China)

(² Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: [**Objective**] In order to study the diversity of endophytic endospore-forming bacteria in *Cinnamomum longepaniculatum*. [**Methods**] We took modified nutrient agar medium for isolation and cultivation and analyzed the 16S rRNA gene sequences of the isolates. [**Results**] Forty non-redundant endospore-forming bacterial isolates were ascertained, which accounted for 38.1% of all the endophytic bacterial isolates. Of them, 24 isolates were from roots, 7 from stems and 9 from leaves. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that 35 of them belonged to 16 species of the genera *Bacillus*, *Lysinibacillus* and *Paenibacillus*, and 5 isolates with <97% sequence similarities to their closely related members were presumed to be potential novel species. [**Conclusion**] The results showed that the cultivable endospore-forming bacteria diversity was abundant and there were some potential novel strains in *Cinnamomum longepaniculatum*. The microflora of endophytic endospore-forming bacteria in individuals of *C. longepaniculatum* showed that some bacteria distributed in different organs, but the others were organ-specific bacteria.

Keywords: *Cinnamomum longepaniculatum*; endophytes; endospore-forming bacteria; phylogenetic analysis; 16S rRNA gene

(本文责编 :王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30860013, 30660004, 30460004)

* Corresponding authors. Tel : +86-831-3545069 ; E-mail : asdfgwt@yahoo.com.cn

Received : 19 November 2008 / Revised : 23 February 2009

《微生物学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要 :基本要素包括研究目的、方法、结果和结论,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围,采用的手段和方法,得出的结果和重要结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要 :包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点 :英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。要求在文中按照[Objective] [Methods] [Results] [Conclusion]顺序分项撰写。英文摘要完成后,务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的,即使学术上可以达到刊出的水平,本刊也将推迟发表。
- (1) 在英语摘要中,不要使用任何汉字字符,包括标点、括号、温度、希腊字母等。
- (2) 建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
- (3) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以免好多长句,以求简单清晰。
- (4) 摘要应当使用过去时态,语法正确,句子通顺。
- (5) 摘要中不用缩写语,除非是人人皆知的,如 :DNA, ATP等。
- (6) 句子的开头处最好不要使用数字。