

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(2):189-195; 4 February 2011  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 可产生铁载体的春兰根内生细菌多样性

孙磊<sup>1</sup>, 邵红<sup>1</sup>, 刘琳<sup>1</sup>, 张瑞英<sup>1</sup>, 赵立华<sup>1</sup>, 李潞滨<sup>2</sup>, 姚娜<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 河北大学生命科学学院, 河北省微生物多样性研究与应用实验室, 保定 071002

<sup>2</sup> 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091

**摘要:**【目的】了解可产生铁载体的春兰根内生细菌的多样性,以便筛选到高效的植物促生细菌。【方法】采用 CAS 检测法测定了 189 株春兰根内生细菌产生铁载体的能力,并结合 16S rRNA 基因系统发育分析对可产铁载体的春兰根内生细菌多样性进行了研究。【结果】从 189 株春兰内生细菌中筛选到 47 株可产生铁载体的细菌,占菌株总数的 24.9%。16S rRNA 基因系统发育分析结果表明,47 株细菌分属于 4 个系统发育类群(Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria),17 个属的 31 个种。其中放线菌门为最优势类群(42.6%),芽孢杆菌属(*Bacillus*)和贪噬菌属(*Variovorax*)为优势菌属,且贪噬菌属为高产铁载体的主体菌属。另外有 2 个菌株可能代表两个不同属的新物种。【结论】春兰根中可产生铁载体的内生细菌具有丰富的多样性。

**关键词:** 内生细菌,春兰,铁载体,16S rRNA 基因

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0189-07

植物内生细菌生活在植物组织内部,不仅没有对宿主造成实质性危害<sup>[1]</sup>,还有许多可以促进植物的生长发育<sup>[2]</sup>,因此植物内生细菌被看作健康植物系统的一个标志<sup>[3]</sup>。产生铁载体是植物内生细菌促进宿主生长发育的一个重要途径。铁载体是由微生物在限铁条件下产生的一种对  $Fe^{3+}$  具有较高螯合特性的低分子量化合物<sup>[4]</sup>。不同细菌的铁载体螯合铁的能力不同,但是通常它们可以有效的竞争致病真菌对铁的需求,因为真菌铁载体对铁的螯合能力比较弱<sup>[5]</sup>。另外,植物本身一般也不会因由内生细菌所引起的铁的减少而受害,很多植物有结合细菌铁载体复合物的机制,并能在植物中运输,随后还原由铁载体释放的铁,并被植物所用。因此产生

铁载体的内生细菌可通过向寄主植物提供可利用的铁元素,或减少环境中病原菌可利用的铁而降低病原菌的竞争力,达到促进植物生长的目的。春兰(*Cymbidium goeringii*)是中国兰属的代表植物,具有悠久的栽培历史。目前对春兰植物内生细菌的研究报道还很少,本实验曾对分泌 IAA 的春兰内生细菌的多样性进行了研究<sup>[6]</sup>。本文对可产铁载体的春兰根内生细菌多样性进行研究,以期对具有产铁载体功能的植物促生细菌资源的研究、开发和利用提供一定的理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**基金项目:** 中央级公益性科研院所专项资金项目(RIF2010-16);河北省自然科学基金项目(C2009000180);河北大学引进人才专项基金(2006-088);海南省重大科技研发专项(080102)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-62888687; E-mail: nanayao215@163.com

**作者简介:** 孙磊(1971-),女,河北唐山人,副教授,研究方向:微生物系统学与生物多样性。E-mail: sunlei1018@126.com

**收稿日期:** 2010-09-18; **修回日期:** 2010-11-01

**1.1.1 菌种:**本实验室保存的分离自温室盆栽春兰根内生细菌 189 株,其中分离自 R2A 培养基的 117 株,TSA 培养基的 35 株,无氮培养基的 37 株。

**1.1.2 主要试剂及仪器:**引物由北京英骏生物技术有限责任公司合成;Taq 酶、dNTP 购自北京天根生化科技公司;721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂),PCR 仪(Biometra, Germany),电泳仪(BG-power 600, Baygene);所用其他试剂均为国产分析纯试剂。

**1.1.3 培养基及检测液:**MKB 培养基:酪蛋白氨基酸 5.0 g,甘油 15 mL,  $K_2HPO_4$  2.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g,琼脂粉 15 g,水 1000 mL,培养基的 pH 值为 7.2;CAS 检测液参照文献[7]方法配制。

## 1.2 产铁载体的春兰根内生细菌的筛选

将活化后的细菌接种到 CAS 检测平板<sup>[7]</sup>上,对具有产铁载体能力的春兰内生细菌进行初筛。28℃ 培养 48 h,观察平板中菌落周围橙黄色晕圈的形成和大小。对经定性检测筛选到的可产铁载体的春兰根内生细菌进行定量测定。将初筛得到的功能菌株接种到 MKB 液体培养基中,28℃ 摇床(150 r/min)培养 48 h。然后将菌悬液离心,取上清液 3 mL 加入 3 mL CAS 检测液,充分混匀。1 h 后采用 721 型分光光度计测定 630 nm 波长处的吸光值( $A_s$ ),并取双蒸水作对照调零。另取 3 mL CAS 检测液与 3 mL 未接种的 MKB 液体培养基上清液充分混匀,同上测定吸光值即为参比值( $A_r$ )。按照文献[8]对铁载体活性单位的定义,根据公式:% 铁载体活性单位 =  $[(A_r - A_s)/A_r] \times 100$  计算菌株产铁载体的量。

## 1.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

菌落裂解法制备模板。采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTACCTGTTACGACTT-3' 进行扩增。

PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,54℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

## 1.4 16S rRNA 基因系统发育分析

将获得的所有可产铁载体的春兰内生细菌进行 16S rRNA 基因部分序列测定。测序结果利用 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)与 GenBank 数据库中的序列进行比对分析,选取同源性最高的且有效发表的菌株序列,利用

MEGA4.1 软件(<http://www.megasoftware.net/mega4.1.html>)进行分析,用 Clustal W 按照最大同源性的原则进行排序,采用 Kimura-2 计算核苷酸差异值,最后用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树<sup>[9]</sup>,自展数(bootstrap)为 1000。

## 2 结果

### 2.1 可产铁载体的春兰内生细菌的筛选

通过初筛发现 189 株春兰根内生细菌中有 47 株具有分泌铁载体的能力,占菌株总数的 24.9%。其中 28 株来自 R2A 培养基,占分离自 R2A 培养基菌株总数的 23.9%;7 株来自 TSA 培养基,占分离自 TSA 培养基菌株总数的 20.0%;无氮培养基平板上得到的 37 株内生细菌中有 12 株,所占比例最高为 32.4%。进一步的定量测定结果显示,8 株细菌产生铁载体的活性高于 50%,为高螯合能力铁载体,其中 7 株来自于 R2A 培养基,1 株来自于无氮培养基;17 株细菌的铁载体活性介于 10% - 50% 之间,属低螯合能力铁载体,其余 22 株细菌的铁载体活性极低(<10%)。

### 2.2 16S rRNA 基因系统发育分析

对可产铁载体的春兰根内生细菌的 16S rRNA 基因进行序列测定,并将测序结果提交 GenBank,序列接收号为 HQ219265-HQ219311。序列分析结果表明 47 株内生细菌分属于变形菌门的  $\alpha$  变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 $\beta$  变形菌纲(Betaproteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)及放线菌门(Actinobacteria)4 大类群的 17 个属 31 个种,其中包含两个潜在的新物种(表 1,图 1)。其中 20 株细菌属于放线菌门的 8 个已知属,占可产铁载体内生细菌总数的 42.6%,为最优势类群。但有 16 株细菌铁载体活性低于 10%,该类群的细菌产铁载体能力较弱。

属于变形菌门  $\beta$  变形菌纲的有 11 株,占可产铁载体内生细菌总数的 23.4%,为第二大优势类群。这 11 株细菌分别归属于贪噬菌属(*Variovorax*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、和 *Massilia* 3 个已知属。铁载体活性高于 50% 的 8 株细菌均属于这个类群,其中 6 株与贪噬菌属的已知菌相似性最高为 98% - 99%,说明贪噬菌属是春兰根内生细菌中高产铁载体的主体类群;2 株与 *Burkholderia arboris* R-24201<sup>T</sup> 序列相似性为 99%。

表1 菌株的16S rRNA基因序列相似性分析

Table 1 Similarity analysis of partial 16S rRNA gene sequences of all strains

| prokaryotic group              | strain  | nearest strain (Accession)   | number of bases  | similarity /%    | siderophore unit /% |                   |
|--------------------------------|---|--|--|------------------|---------------------|-------------------|
| Alphaproteobacteria<br>(17.0%) | T19   | <i>Agrobacterium rubi</i> ICMP 11833 <sup>T</sup> (AY626395)             | 692  | 99               | 4.2 <sup>#</sup>    |                   |
|                                | R88   | <i>Alterierythrobacter marinus</i> H32 <sup>T</sup> (EU726272)           | 1333   | 95               | 10.0 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | R84-2   | <i>Paracoccus yeii</i> CDC G1212 <sup>T</sup> (AY014173)                 | 705  | 98               | 12.0 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | R136  | <i>Paracoccus yeii</i> CDC G1212 <sup>T</sup> (AY014173)                 | 704  | 98               | 6.6 <sup>#</sup>    |                   |
|                                | R72-1   | <i>Pannonibacter phragmitetus</i> C6-19 <sup>T</sup> (AJ400704)          | 1330   | 93               | 8.3 <sup>#</sup>    |                   |
|                                | R114  | <i>Sphingomonas koreensis</i> JSS-26 <sup>T</sup> (AF131296)             | 702  | 99               | 17.9 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | T21   | <i>Sphingopyxis macrogoltabida</i> 203 <sup>T</sup> (D13723)             | 705  | 99               | 14.9 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | N53   | <i>Sphingopyxis ginsengisoli</i> Gsoil 250 <sup>T</sup> (AB245343)       | 685  | 98               | 11.2 <sup>#</sup>   |                   |
| Betaproteobacteria<br>(23.4%)  | R50   | <i>Variovorax paradoxus</i> DSM 66 <sup>T</sup> (AJ420329)               | 699  | 99               | 74.9 <sup>*</sup>   |                   |
|                                | R135  | <i>Variovorax paradoxus</i> DSM 66 <sup>T</sup> (AJ420329)               | 703  | 99               | 74.0 <sup>*</sup>   |                   |
|                                | R56   | <i>Variovorax paradoxus</i> DSM 66 <sup>T</sup> (AJ420329)               | 702  | 99               | 71.1 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | R73-2   | <i>Variovorax paradoxus</i> DSM 66 <sup>T</sup> (AJ420329)               | 693  | 99               | 70.1 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | R61-2   | <i>Variovorax paradoxus</i> DSM 66 <sup>T</sup> (AJ420329)               | 703  | 99               | 54.6 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | R53   | <i>Variovorax paradoxus</i> DSM 66 <sup>T</sup> (AJ420329)               | 693  | 98               | 50.9 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | R51   | <i>Variovorax paradoxus</i> DSM 66 <sup>T</sup> (AJ420329)               | 705  | 98               | 44.0 <sup>*</sup>   |                   |
|                                | R236  | <i>Burkholderia arboris</i> R-24201 <sup>T</sup> (AM747630)              | 725  | 99               | 67.6 <sup>*</sup>   |                   |
|                                | N85   | <i>Burkholderia arboris</i> R-24201 <sup>T</sup> (AM747630)              | 700  | 99               | 66.4 <sup>*</sup>   |                   |
|                                | N20-2   | <i>Massilia niabensis</i> 5420S-26 <sup>T</sup> (EU808006)               | 737  | 98               | 25.0 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | N24-1   | <i>Massilia niabensis</i> 5420S-26 <sup>T</sup> (EU808006)               | 707  | 98               | 15.6 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | Firmicutes (17.0%)  | T20  | <i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup> (AJ831844)       | 714              | 100                 | 7.9 <sup>#</sup>  |
|                                |   | N44  | <i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 <sup>T</sup> (EF114313)     | 703              | 100                 | 11.8 <sup>#</sup> |
| N23                            |   | <i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 <sup>T</sup> (EF114313)                 | 698  | 99               | 9.6 <sup>#</sup>    |                   |
| R76-2                          |   | <i>Bacillus niabensis</i> 4T19 <sup>T</sup> (AY998119)                   | 696  | 98               | 8.1 <sup>#</sup>    |                   |
| R81-2                          |   | <i>Bacillus subtilis</i> Spizizenii CIP 106094 <sup>T</sup> (AF074970)   | 706  | 100              | 21.9 <sup>#</sup>   |                   |
| R60-1                          |   | <i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a <sup>T</sup> (AJ831841)           | 715  | 99               | 24.1 <sup>#</sup>   |                   |
| R151                           |   | <i>Bacillus tequilensis</i> 10b <sup>T</sup> (AY197613)                  | 721  | 99               | 14.3 <sup>#</sup>   |                   |
| T23                            |   | <i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077 <sup>T</sup> (D16281)            | 715  | 100              | 13.8 <sup>#</sup>   |                   |
| Actinobacteria<br>(42.6%)      |   | R78-1  | <i>Nocardioideis aquiterrae</i> GW-9 <sup>T</sup> (AF529063) | 748              | 99                  | 8.2 <sup>#</sup>  |
|                                |   | R71-3  | <i>Nocardioideis aquiterrae</i> GW-9 <sup>T</sup> (AF529063) | 707              | 99                  | 8.3 <sup>#</sup>  |
|                                | R75-2   | <i>Nocardioideis aquiterrae</i> GW-9 <sup>T</sup> (AF529063)             | 712  | 97               | 12.6 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | N35   | <i>Nocardioideis ganghwensis</i> JC2055 <sup>T</sup> (AY423718)          | 735  | 98               | 6.3 <sup>*</sup>    |                   |
|                                | N37   | <i>Nocardioideis kongjuensis</i> A2-4 <sup>T</sup> (DQ218275)            | 1410   | 97               | 8.5 <sup>*</sup>    |                   |
|                                | R71-1   | <i>Nocardioideis pyridinolyticus</i> OS4 <sup>T</sup> (U61298)           | 697  | 99               | 6.1 <sup>#</sup>    |                   |
|                                | R75-1   | <i>Mycobacterium cosmeticum</i> LTA-388 <sup>T</sup> (AY449728)          | 711  | 98               | 3.3 <sup>*</sup>    |                   |
|                                | N36   | <i>Mycobacterium cosmeticum</i> LTA-388 <sup>T</sup> (AY449728)          | 665  | 98               | 5.8 <sup>#</sup>    |                   |
|                                | R148  | <i>Mycobacterium canariense</i> 502329 <sup>T</sup> (AY255478)           | 693  | 98               | 5.7 <sup>#</sup>    |                   |
|                                | R142  | <i>Microbacterium keratanolyticum</i> ATCC 35057 <sup>T</sup> (AB004717) | 748  | 98               | 15.4 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | R82-2   | <i>Microbacterium keratanolyticum</i> ATCC 35057 <sup>T</sup> (AB004717) | 701  | 97               | 13.8 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | R146  | <i>Microbacterium keratanolyticum</i> ATCC 35057 <sup>T</sup> (AB004717) | 728  | 97               | 5.0 <sup>#</sup>    |                   |
|                                | N22   | <i>Microbacterium keratanolyticum</i> ATCC 35057 <sup>T</sup> (AB004717) | 699  | 97               | 12.7 <sup>#</sup>   |                   |
|                                | R145  | <i>Microbacterium paludicola</i> US15T <sup>T</sup> (AJ853909)           | 713  | 97               | 9.9 <sup>#</sup>    |                   |
|                                | T22   | <i>Mycobacterium neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup> (AF480593)         | 693  | 99               | 6.2 <sup>#</sup>    |                   |
|                                | N21   | <i>Citricoccus zhacaiensis</i> FS24 <sup>T</sup> (EU305672)              | 691  | 97               | 6.3 <sup>*</sup>    |                   |
|                                | N25   | <i>Micrococcus flavus</i> LW4 <sup>T</sup> (DQ491453)                    | 744  | 99               | 3.9 <sup>*</sup>    |                   |
| R110                           | <i>Solirubrobacter soli</i> Gsoil 355 <sup>T</sup> (AB245334)   | 694  | 97   | 0.2 <sup>*</sup> |                     |                   |
| T50                            | <i>Nocardioideis antarctica</i> 25-145 <sup>T</sup> (X97885)    | 692  | 98   | 1.4 <sup>#</sup> |                     |                   |
| T16                            | <i>Streptomyces albospinus</i> JCM 3399 <sup>T</sup> (AY999753) | 1417   | 97   | 9.8 <sup>#</sup> |                     |                   |

\* The relative standard deviation values were less than 5%; #The relative standard deviation values were 5 - 10%.

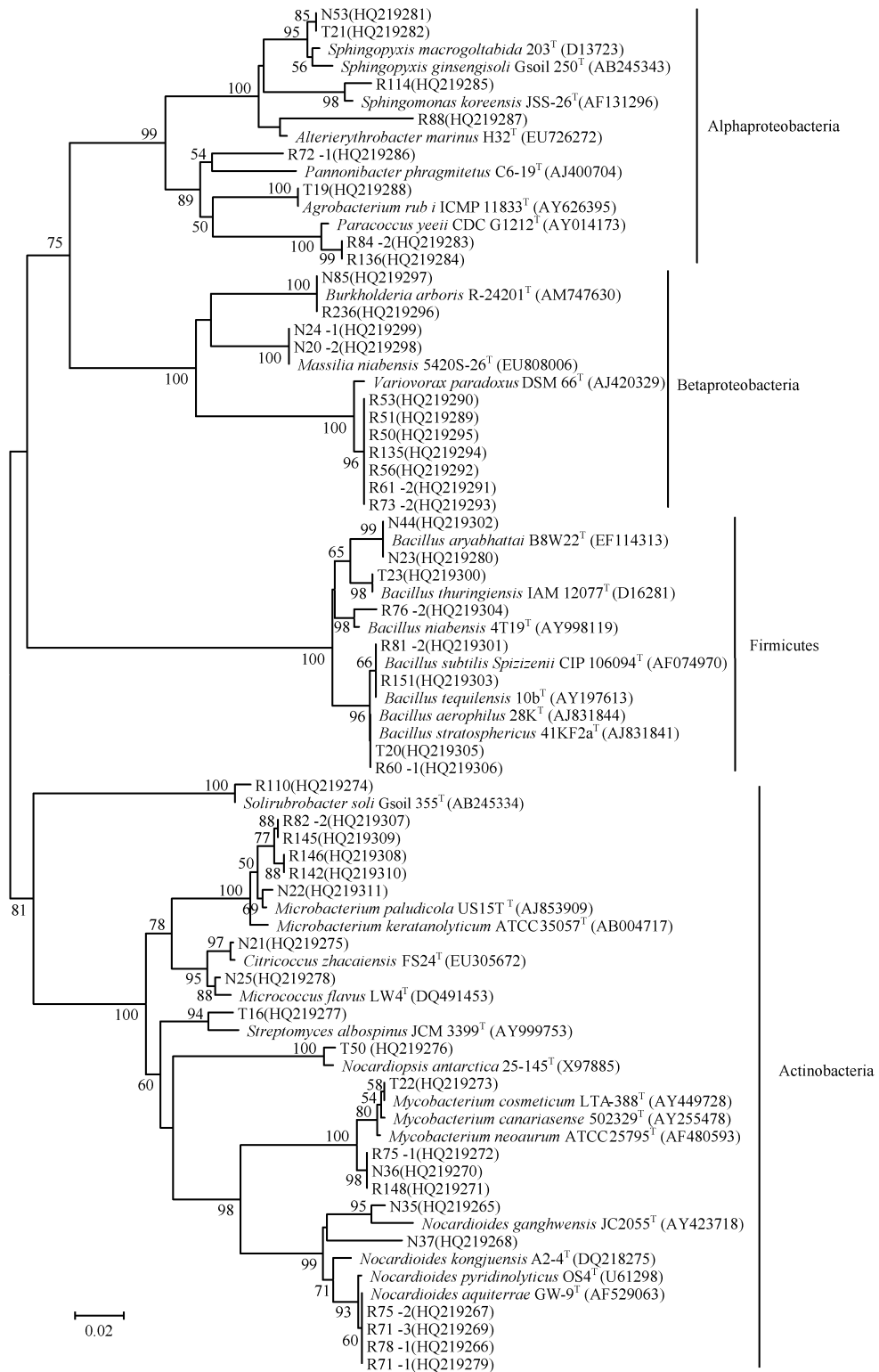


图1 根据 16S rRNA 基因部分序列构建的春兰可产铁载体内生细菌的系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene partial sequences of siderophore-producing endophytic bacteria from the roots of *Cymbidium goeringii*. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values (> 50%) based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled datasets. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bar: 2% sequence divergence.

8 株细菌属于变形菌门  $\alpha$  变形菌纲的 6 个已知属,分别为 *Sphingopyxis*、副球菌属 (*Paracoccus*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、*Pannonibacter*、*Alterierythrobacter*、农杆菌属 (*Agrobacterium*)。菌株 R72-1 与已知菌 *Pannonibacter phragmitetus* C6-19<sup>T</sup> 的序列相似性为 93%, 菌株 R88 与已知菌 *Alterierythrobacter marinus* H32<sup>T</sup> 的序列相似性为 95%, 这 2 株菌有可能为新属或新种,尚待进一步鉴定。属于该类群的 8 株细菌产铁载体能力相对较弱。此外,还有 8 株细菌属于厚壁菌门的芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 它们产铁载体的能力也相对较弱。

### 3 讨论

由于土壤中的铁溶解度较低,较难被植物吸收利用,因此铁离子往往成为限制植物生长的因素之一。植物微生态系统中的一些细菌可以通过分泌铁载体促进植物的生长发育,本文主要对春兰植物内生细菌中可分泌铁载体的功能菌群进行筛选及多样性研究。189 株春兰内生细菌中有 24.9% 的菌株具有分泌铁载体能力,16S rRNA 基因系统发育分析表明这些细菌归属于 4 大类群的 17 个属的 31 个物种,其中有一个潜在的新种和一个潜在的新属。这些结果揭示春兰根内可分泌铁载体的内生细菌具有丰富的多样性。

目前,已从多种植物,如香蕉<sup>[10-11]</sup>、马铃薯<sup>[12]</sup>、*Thlaspi goesingense*<sup>[13]</sup>、棉花<sup>[14]</sup>、贝托庭芥 (*Alyssum bertolonii*)<sup>[15]</sup> 等的根际或内部分离到可分泌铁载体的细菌。其中 Barzanti 等<sup>[15]</sup> 研究了一种可累积 Ni 的植物贝托庭芥内生细菌的特性,发现从根、叶等不同部位分离到的 83 株内生细菌中有 67 株可分泌铁载体,占分离菌株总数的 83%,这一比例远高于我们从春兰根内分离到的可分泌铁载体的内生细菌的数量。这与植物的种类、生长条件及铁载体的功能等有关。细菌分泌铁载体不仅可以通过竞争铁离子而抑制植物病原菌的生长,在某些情况下可以诱导系统抗性<sup>[16]</sup>,甚至还可以与其他重金属离子形成复

合物被植物吸收利用。有研究指出因为内生细菌往往要面对植物内部极低铁离子浓度的生存环境<sup>[15]</sup>,所以分泌铁载体可能只是植物内生细菌的一个普通表型特征<sup>[17]</sup>。

获得的 17 个属的可产铁载体的春兰植物内生细菌中,类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardopsis*)、*Solirubrobacter*、*Sphingopyxis*、*Pannonibacter*、*Alterierythrobacter* 等 6 个属的细菌还未见其可产生铁载体的报道。贪噬菌属的细菌具有多种生物功能,目前国内外对于贪噬菌属的研究主要集中在降解环境污染物上<sup>[18]</sup>,而本研究证明了贪噬菌属的菌株还可产生高活性的铁载体,但是否具有植物促生作用以及生防作用还需要进一步的研究。本研究结果进一步丰富了可产生铁载体的微生物资源。

**致谢** 感谢上海植物园韩继刚教授在实验中的协助。

### 参考文献

- [1] James EK, Olivares FL. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1998, 17 (1):77-119.
- [2] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgey M, van der Lelie D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2002, 21 (6):583-606.
- [3] Taghavi S, van der Lelie D, Hoffman A, Zhang YB, Walla MD, Vangronsveld J, Newman L, Monchy S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genetics*, 2010, 6 (5):1-15.
- [4] Buyer JS, Kratzke MG, Sikora LJ. A method for detection of pseudobactin, the siderophore produced by a plant-growth-promoting *Pseudomonas* strain, in the barley rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59 (3):677-681.

- [ 5 ] Loper JE, Henkels MD. Utilization of heterologous siderophores enhances level of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 ( 12 ): 5357-5363.
- [ 6 ] 刘琳, 孙磊, 张瑞英, 姚娜, 李璐斌. 春兰根中可分泌吡啶乙酸的内生细菌多样性. *生物多样性 (Biodiversity Science)*, 2010, 18 ( 2 ): 182-187.
- [ 7 ] 王平, 董飏, 李阜棣, 胡正嘉. 小麦根圈细菌铁载体的检测. *微生物学通报 (Microbiology)*, 1994, 21 ( 6 ): 323-326.
- [ 8 ] Machuca A, Milagres AMF. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36 ( 3 ): 177-181.
- [ 9 ] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [ 10 ] 潘羨心, 彭建华, 刘先宝, 蔡吉苗, 黄贵修. 一株产铁载体香蕉拮抗内生细菌的分离及鉴定. *热带农业工程 (Tropical Agricultural Engineering)*, 2009, 33 ( 4 ): 4-8.
- [ 11 ] Naik PR, Sahoo N, Goswami D, Ayyadurai N, Sakthivel N. Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana. *Microbial Ecology*, 2008, 56 ( 3 ): 492-504.
- [ 12 ] Mellado JC, Lemus JO, De Los Santos PE, Aguilar LM. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 ( 16 ): 5308-5319.
- [ 13 ] Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 ( 5 ): 2667-2677.
- [ 14 ] 朱彭玲, 杜秉海, 丁延芹, 杜志兵, 于素芳, 陈强. 新疆棉花根际土壤铁载体产生菌的遗传多样性及系统发育研究. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)*, 2009, 42 ( 5 ): 1568-1574.
- [ 15 ] Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbriellini R, Galardi F, Gonnelli C, Mengoni A. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology*, 2007, 53 ( 2 ): 306-316.
- [ 16 ] Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 ( 9 ): 4951-4959.
- [ 17 ] Sessitsch A, Reiter B, Berg G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50 ( 4 ): 239-249.
- [ 18 ] Srensen SR, Albers CN, Aamand J. Rapid mineralization of the phenylurea herbicide dinuron by *Variovorax* sp. strain SRS16 in pure culture and within a two-member consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 ( 8 ): 2332-2340.

# Diversity of siderophore-producing endophytic bacteria of *Cymbidium goeringii* roots

Lei Sun<sup>1</sup>, Hong Shao<sup>1</sup>, Lin Liu<sup>1</sup>, Ruiying Zhang<sup>1</sup>, Lihua Zhao<sup>1</sup>, Lubin Li<sup>2</sup>, Na Yao<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Hebei University, Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, Baoding 071002, China

<sup>2</sup> Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China

**Abstract:** [ **Objective** ] In order to obtain the effective plant growth-promoting bacteria, we studied the diversity of siderophore-producing endophytic bacteria in the roots of *Cymbidium goeringii*. [ **Methods** ] We screened for siderophore-producing bacteria from 189 root endophytic strains of *Cymbidium goeringii* by using chrome azurol S (CAS) agar plate assay. The diversity of siderophore-producing endophytic bacteria was investigated by 16S rRNA gene sequence analysis. [ **Results** ] We obtained 47 siderophore-producing strains (24.9% of the total strains). Sequence analysis revealed that 47 strains were members of 31 species of 17 genera in four phylogenetic groups (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria). The dominant group was Actinobacteria (42.6%), and the dominant genera were *Bacillus* and *Variovorax*. The strains of *Variovorax* produced relatively high levels of siderophore. In addition, there may be two novel taxonomic units. [ **Conclusion** ] The results show that there are abundant species diversity of siderophore-producing endophytic bacteria in the roots of *Cymbidium goeringii*.

**Keywords:** endophytic bacteria, *cymbidium goeringii*, siderophore, 16S rRNA gene

(本文责编:张晓丽)

---

Supported by the Central Scientific Institution Basal Research Fund of China (RIF2010-16), by the Natural Science Foundation of Hebei (C2009000180), by the Project of Talents of Hebei University (2006-088) and by the Important Science and Technology Specific Projects of Hainan Province (080102)

\* Corresponding author. Tel/ Fax: +86-10-62888687; E-mail: nanayao215@163.com

Received: 18 September 2010/ Revised: 1 November 2010