

香樟产芽孢内生细菌的系统发育多样性

王松¹ 游玲² 李涛³ 魏琴² 王涛^{1*}

(1. 宜宾学院生命科学与食品工程学院 四川 宜宾 644000)

(2. 宜宾学院发酵资源与应用四川省高校重点实验室 四川 宜宾 644000)

(3. 五粮液集团有限公司 四川 宜宾 644000)

摘要: 为了解香樟产芽孢内生细菌的多样性, 采用改良的 NA 培养基分离、去除冗余及芽孢染色, 得到 40 株产芽孢内生细菌, 占分离所得内生细菌总数的 29.9%, 其中根、茎、叶中分别分离到 25、5 和 10 株。16S rRNA 序列系统发育分析结果表明, 这 40 株菌分属于 *Bacillus*、*Lysinibacillus*、*Paenibacillus* 和 *Brevibacillus* 属的 12 个种; 7 株菌的 16S rRNA 部分序列与数据库中模式菌株对应序列相似性小于 97%, 代表着潜在新类群的存在。同时, 3 个部位分离出的产芽孢内生细菌既呈现出一定程度的细菌区系相似性, 又表现出细菌区系的器官特异性。

关键词: 香樟, 产芽孢内生细菌, 多样性, 16S rRNA

Phylogenetic Diversity of Spore-forming Endophytic Bacteria Isolated from *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl

WANG Song¹ YOU Ling² LI Tao³ WEI Qin² WANG Tao^{1*}

(1. College of Life Science & Food Engineering, Yibin University, Yibin, Sichuan 644000, China)

(2. Key Laboratory of Fermentation Resource and Application of Institutes of Higher Learning in Sichuan, Yibin University, Yibin, Sichuan 644000, China)

(3. Wuliangye Group Co., Ltd., Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: Improved NA medium was used to study the diversity of endophytic spore-forming bacteria of *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl. After spore staining and removing of the redundant isolates, 40 non-redundant spore-forming bacterial isolates were ascertained, which accounted for 29.9% of all the endophytic bacterial isolates, and 25 strains of the 40 were from roots, 5 strains from stems, 10 strains from leaves. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequences showed that the 40 strains attributed to 12 species of the genera *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* and *Brevibacillus*; 7 strains with under 97% sequence similarities respectively to their closely related member were presumed to be potential novel species. Furthermore, microflora of endophytic spore-forming bacteria in roots, stems and leaves of *C. camphora* showed that some bacteria distributed in different organs, others were organ-specific.

Keywords: *Cinnamomum camphora*, Spore-forming bacteria, Diversity, 16S rRNA

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目(No. 07JY029-001); 宜宾学院青年基金项目(No. 2003Q17); 国家自然科学基金资助项目(No. 30660004, 30460004)

* 通讯作者: Tel: 86-831-3545069; E: asdfgwt@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-01-08; 接受日期: 2010-04-30

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

香樟 [*Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl] 是亚热带常绿阔叶乔木, 其枝叶茂密, 树姿雄伟, 有很强的吸尘和抗煤烟能力, 能抗氯气、二氧化硫、臭氧及氟气等有害气体, 能驱蚊蝇, 是优良的绿化及环保树种。工业上, 樟树根茎、枝叶提炼出来的樟脑和樟脑油, 是制造胶卷、胶片、赛璐珞的重要原料^[1]。

产芽孢细菌是一类重要的微生物类群, 植物尤其是药用植物内生芽孢细菌定殖于植株内部, 在植物病害生物防治和促进植物生长方面有着重要的应用价值^[2], 还因其生存环境特殊, 不仅有助于植物活性成分的形成^[3-5], 还有助于植物适应并修复受到污染的环境^[6]。植物内生菌中的很多种属对宿主植物并不重要, 如热带雨林植物内生菌中的大多数对宿主植物来说都无关紧要^[7], 但多方面的研究表明产芽孢细菌无论是作为根际微生物在植物病害发生过程中起着通讯及协同免疫作用^[8], 还是作为内生菌降解植株从环境中富集到的毒素^[9], 都体现出与植物更紧密的联系, 而且产芽孢细菌抗逆性好, 多数能够在植株外人工培养, 具有较好的应用价值。通过对香樟产芽孢内生细菌的研究, 不仅可以找到香樟产芽孢内生细菌在植株各部位的定殖规律, 进一步探索产芽孢细菌与香樟的联系, 还可为更好地开发利用香樟这种我国特有的经济树种奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 香樟采自四川宜宾县隆兴乡, 采样时间为 2007 年 5 月下旬。在 50 m² 范围内, 选取无明显植物病害而且树龄(胸径 20 cm–30 cm)接近的香樟树 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 分离培养基: 改良牛肉膏蛋白胨培养基 (NA)。1000 mL NA 培养基中含 20 mL 无菌香樟根茎叶水浸液和 5 万单位制霉菌素。香樟根茎叶水浸液的制备方法为: 取健康植株的根(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 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

香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, 其余步骤与叶内生细菌的分离相同。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常规 NA 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。按照东秀珠等^[10]的方法进行芽孢染色观察(长出明显菌落后连续染色观察 7 d, 已经观察到芽孢的菌株不再进行芽孢检测)。通过以上方法分离, 去除冗余后共获得 134 株内生细菌, 其中产芽孢内生细菌 40 株(过程略), 选择出的产芽孢的培养物分别转接到甘油管存于 -50℃ 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 Rainey 等^[11]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 27f: 5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3'和 1541 r: 5'-AAGGAGGTGATC CAGCCGCA-3'^[12]。PCR 反应体系和反应条件参照东秀珠等的方法进行。

1.4 16S rRNA 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 Biotech Co., Ltd.) 纯化并测序, 测定序列长度 1000–1100 bp。测定的序列用 EzTaxon server 2.0^[13]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^[14]计算核苷酸差异值, 并用 BioEdit 5.0.9 进行检验, 最后用 Neighbor-joining 法^[15]构建系统进化树, 自展数 (Bootstrap) 为 1000。

1.5 多样性的计算

将与该种模式菌株 16S rRNA 部分序列相似性 > 97% 的分离菌视为同种, < 97% 的视为新种, 采

用 Shannon-Weiner 公式^[16]计算产芽孢内生细菌多样性。

2 结果与分析

2.1 香樟内生芽孢杆菌的分离

从根、茎、叶分离所得菌落经表观特征去除冗余后进行芽孢染色的结果如表 1, 可以看出从根、茎、叶中分离出的产芽孢细菌数量占各自分离出细菌总数的比例大致相当。

表 1 香樟产芽孢内生细菌分离情况 Table 1 The number of spore-forming isolates			
分离部位 Plant tissue	内生细菌数量 Number of isolates	产芽孢内生细菌数量 Number of spore-forming isolates	产芽孢内生细菌所占比例 Proportion of spore-forming isolates (%)
根 Roots	84	25	29.8
茎 Stems	16	5	31.3
叶 Leaves	34	10	29.4
合计 Total	134	40	29.9

2.2 系统发育分析

对分离得到的 40 株产芽孢细菌的 16S rRNA 进行测序, 得到 40 条有效序列(全部在 GenBank 注册,

序列号见图 1)。经 16S rRNA 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多样性。

根中分离得到的 25 株产芽孢内生细菌中, 有 10 株属于 *Bacillus* 属, 其 16S rRNA 部分序列分别与该属中 6 个种的典型菌株对应序列最为接近(表 2), 其序列与模式菌株对应序列相似性高于 97%, 可视为与模式菌株同种。有 8 株属于 *Lysinibacillus* 属, 其序列分别与该属中 2 个种的典型菌株的序列相似性最高, 且相似性均在 97%以上, 所以此 8 株菌可能分属于 *Lysinibacillus* 属中的 2 个种。有 2 株菌属于 *Paenibacillus* 属, 其序列与该属中 2 个种的典型菌株相似性为 98.7%和 99.4%, 故此 2 株菌可能属于该属中的 2 个种。所以, 香樟根中分离出的 25 株产芽孢内生细菌至少可能属于 3 个属中的 10 个种。

茎中分离得到的 5 株产芽孢内生细菌中, 3 株的序列与 *Bacillus* 属中 2 个种的典型菌株对应序列最为相似(均大于 97.8%), 2 株的序列与 *Lysinibacillus* 属中 2 个种的典型菌株对应序列相似性分别为 99.3%和 99.7%, 所以茎中分离得到的产芽孢内生细菌可能分属于 *Bacillus* 属和 *Lysinibacillus* 属的 4 个种。

表 2 产芽孢内生细菌的 16S rRNA 序列相似性分析 Table 2 Analysis of partial 16S rRNA sequences of spore-forming endophytic bacteria							
最接近的属 Nearest related genus	最接近的典型菌株 Closest related type strain	根 Roots	相似性 Similarity (%)	茎 Stems	相似性 Similarity (%)	叶 Leaves	相似性 Similarity (%)
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 ^T	3	98.6, 99.6			3	98.0–99.6
	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	1	99.7			1	99.7
	<i>Bacillus drentensis</i> LMG 21831 ^T	1	98.0	1	97.8		
	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 ^T			2	98.8, 99.3	1	98.5
	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRLB-41771 ^T	1	99.9				
	<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205 ^T	4	99.3–99.9				
<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> NBRC 15717 ^T	5	97.5–99.6	1	99.3		
	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9 ^T	3	99.3–99.9	1	99.7	1	99.5
<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP23 ^T					1	98.3
	<i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439 ^T	1	98.7				
	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i> IFO 15660 ^T	1	99.4				
相似度小于 97%菌株 Under 97% sequence similarity	<i>Brevibacillus brevis</i> NBRC 15304 ^T					1	98.3
	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> NRRL NRS-290 ^T					1	93.5
	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i> IFO15660 ^T	2	93.1, 96.0				
	<i>Paenibacillus terrigena</i> A35 ^T	1	94.9				
	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 ^T	1	94.2				
	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 ^T	1	93.2			1	92.3

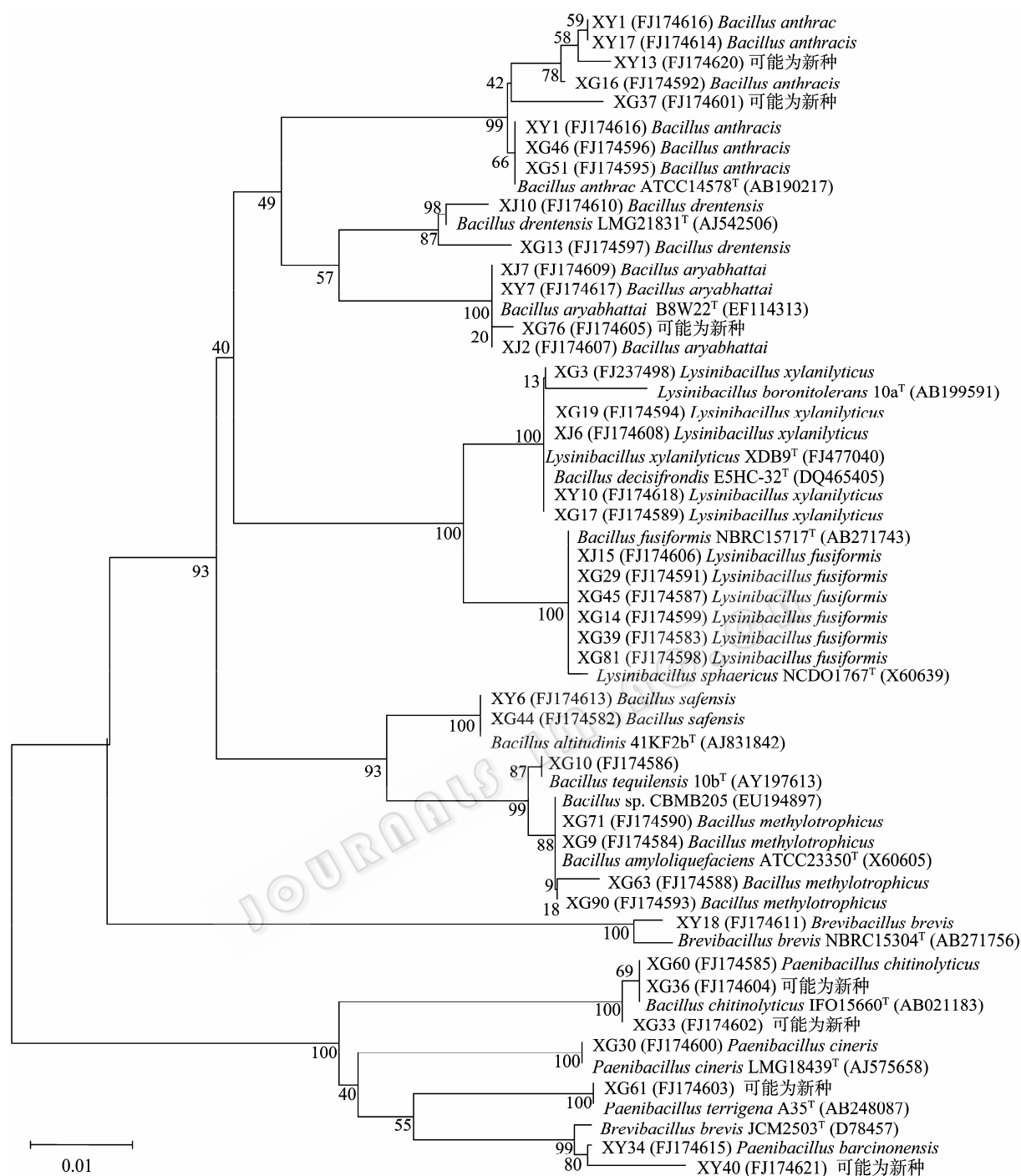


图 1 香樟产芽孢内生细菌的 16S rRNA 系统发育树

Fig. 1 Dendrogram for spore-forming endophytic bacteria isolated from *Cinnamomum longepaniculatum* based on partial 16S rRNA gene sequences

Note: Data in parentheses are the GenBank accession numbers of the isolates represented by the number out of the parentheses. The number on the node represents the similarity level of the following strain. Bootstrap value showed on the branch means the support for a specific branch.

叶中分离得到的 10 株产芽孢内生细菌中有 5 株属于 *Bacillus* 属, 其序列分别与该属中 3 个种典型菌株序列最为相似, 且相似性均在 98% 以上, 此 5 株菌可能分属于该属的 3 个种。1 株菌属于 *Paenibacillus*

属, 且与 *Paenibacillus barcinonensis* BP-23^T 的序列相似性为 98.3%, 可能属于该种; 1 株菌属于 *Lysinibacillus* 属, 与 *Lysinibacillus xylanilyticus* XDB9^T 的序列相似性为 98.5%, 加上 1 株与模式菌

株 *Brevibacillus brevis* JCM 2503^T 对应序列相似性为 98.3% 的 *Brevibacillus* 属细菌, 叶中分离出的 10 株细菌至少属于 4 个属 6 个种。

另外还有 7 株菌 (GenBank 注册号分别为 FJ174601-FJ174605、FJ174620、FJ174621) 与已知属种模式菌株对应序列的最高相似性低于 97% (表 2), 代表着可能有潜在的新分类单位。

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 4 个属的 12 个种, 其中还有 7 株菌的对比结果表明可能有潜在的新分类类群。从 3 个部位分离得到的产芽孢内生细菌的多样性来看, 根、茎、叶中分离出的产芽孢内生细菌的 Shannon 指数 (H) 分别为 -3.0147、-1.4575 和 -2.6464 (与模式菌株相似性低于 97% 的菌株按新分类类群计算), 可见根中分离到的产芽孢内生细菌多样性最大, 叶次之, 而茎最小。

从根、茎、叶产芽孢内生细菌 16S rRNA 序列与数据库中各模式菌株对应序列相似性来看, 仅有与 *Lysinibacillus xylanilyticus* 的模式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 5 株 (根 3、茎 1、叶 1), 占总数的 12.5% (占根内分离所得产芽孢内生细菌的 12%、茎的 20%、叶的 10%)。与 *Bacillus* 属的 2 个种、*Paenibacillus* 属的 2 个种模式菌株对应序列最为接近的产芽孢内生细菌只在根内分离到 7 株, 占根内分离到的产芽孢内生细菌的 28%; 与 *Paenibacillus barcinonensis*、*Brevibacillus brevis* 模式菌株序列最为接近的产芽孢内生细菌各在叶部分离到 1 株, 表明这 2 株细菌为叶独有的内生细菌。

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 10 株, 占根中分离出的产芽孢内生细菌的 40.0%; 茎 3 株, 占 60.0%; 叶 5 株, 占 50.0%)。 *Bacillus* 属细菌常用作生防菌剂及动植物益生菌, 曾在棉花、黄瓜、柑橘树、马尾松等多种植物中作为内生菌被分离到, 而且大多属于优势属^[17-18]。根中分离到的产芽孢细菌 16S rRNA 部分序列与 *Bacillus* 属多个种的模式菌株接近, 推测是由于 *Bacillus* 属细菌是土壤中的优势属, 偶然进入植株内部作为内生菌定殖下来。与常见病原菌 *Bacillus anthracis* 模式菌株对应序列相似的 3 株产芽孢内生细菌则揭示了内生菌的另一常见来源: 某些病原菌在植株内部由于某些原因失去了致病能

力, 从而作为内生菌保留下来。

根、茎、叶中分别有 8 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, 检索数个数据库中有内生细菌的文献, 均未发现从植物中分离出该属菌株的报道。但本研究从香樟 3 个部位共分离出了 11 株可能属于该属的菌株, 关于这 11 株菌是否为香樟特有内生细菌或是否为 *Lysinibacillus* 属菌株, 尚需开展进一步的试验加以确认。其中与 *Lysinibacillus xylanilyticus* 的模式菌株对应序列相似性均超过 99% 的 5 株产芽孢内生细菌在根、茎、叶中均有分布, 推测这类细菌在香樟植株内具有较好的迁移能力, 且 *Lysinibacillus xylanilyticus* 属产芽孢细菌可利用二甲酚, 曾在沼气池中分离到, 同时与 *Bacillus methylotrophicus* 对应序列相似性最高的 3 株 *Bacillus* 属芽孢杆菌也是甲基营养型, 这种巧合说明这类产芽孢细菌更容易适应香樟内环境, 与香樟植株细胞代谢可能存在某种联系, 尚待进一步研究。

根、叶中各分离到的 2 株 *Paenibacillus* 属产芽孢内生细菌也曾在黑松^[19]和高丽人参^[20]根部被分离到。与根中分离到的 2 株 *Paenibacillus* 属 16S rRNA 部分序列最接近的模式菌株所在的 4 个种当中, *P. chitinolyticus* 可产几丁质酶, 有助于植物抗真菌病害, 另一种则是土壤中常见芽孢菌。叶中分离到的 1 株 *Paenibacillus* 属细菌 16S rRNA 部分序列与模式菌株 *P. barcinonensis* 对应序列相似性最高, *P. barcinonensis* 可产木聚糖酶, 可能有助于细菌在含木聚糖的树叶中成功定殖。

在香樟叶中分离到的 *Brevibacillus* 属产芽孢内生细菌曾在多种植物中作为内生细菌被分离到^[3], 可用作动物益生菌及植物生防菌, 可在以纤维素为唯一碳源的平板上生长良好, 在香樟根、茎中均无该属细菌, 推测该菌不是来源于土壤, 而是偶然进入叶中并成功定殖成为内生菌的。

3 讨论

3.1 香樟产芽孢内生细菌的来源

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^[21],

直接或间接促进植物生长,协助植物抵抗不利环境。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^[22]。我们的研究发现根中产芽孢内生细菌明显比茎、叶中多,说明土壤是产芽孢内生细菌的主要来源,产芽孢细菌较难从环境中进入香樟茎内,茎内生菌自根、叶中迁移而来的可能性较大。此次分离得到的绝大多数产芽孢内生细菌其可能归属的种群在其他多种植物中均有发现^[23-25],说明芽孢细菌抗逆性强,更容易通过偶然途径进入植物内部并定殖成为内生菌。茎中分离到的5株内生菌中3株为根、茎共有,2株为茎、叶共有,说明茎内产芽孢细菌可能来源于根、叶,而叶独有的2株产芽孢内生细菌则可能是由空气和雨水通过气孔和昆虫等从叶表面进入植物内部。实验还发现,在以纤维素为唯一碳源的平板培养基上,多数产芽孢内生细菌都能生长,说明这些细菌能够降解利用纤维素,这显然有助于其顺利定殖于植物内部。

3.2 香樟产芽孢细菌的作用

虽然并非所有植物内生菌都对植物有贡献^[26],但对香樟等多年生木本植物来说,其内生菌与植物的联系显然更稳定,这种稳定性与芽孢的抗逆性可能有一定联系。李建勇等^[27]的研究发现香樟对多种蔬菜有较强的化感作用,樟油制品樟脑有明显驱虫作用,可见香樟林及香樟植株内环境均存在明显的选择压力,抗逆性强的产芽孢细菌在其中定殖生长,可能对香樟产樟油及抗污染能力有积极影响。香樟根、茎、叶中共有的产芽孢内生细菌可能更活跃,特别是在N、C、P、K等营养元素的代谢及维护植株内环境等方面可能有积极作用,这些推测尚待进一步研究证实。我们还发现香樟非芽孢内生细菌在未添加植物组织浸提液的普通培养基上很难生长,说明非芽孢内生细菌对香樟内环境的依赖性更大,可能对植物影响也更大,但不易人工培养,通常侧重于理论研究,如Wang等^[28]曾利用*nifH*基因特异扩增来证明内生菌的固氮作用。此次分离到的香樟产芽孢内生细菌虽然仅占首次分离到的细菌总数的29.9%,但在不断转接传代过程中,均能够生长良好,具有较好应用价值。

本文首次对香樟中产芽孢内生细菌的16S rRNA的系统发育开展了研究。从香樟3个部位分离出的产芽孢内生细菌存在明显的遗传多样性,而且3个部位分离出的产芽孢内生细菌呈现出相似

性和器官特异性。16S rRNA 做为生物系统发育的主要分子标尺,是目前研究细菌多样性主要使用的方法,常用于对大量菌株进行快速初步鉴定。但该方法也存在偏保守和多操纵子等问题,有些16S rRNA 序列相似性大于97%的菌株仍然属于不同的分类类群^[29],如我们的研究发现图1中位于垂直线上的各株菌在外观形态、革兰氏染色,鞭毛、荚膜等方面仍存在明显差异,不宜视为同种菌,因此在此基础上,如有必要,还需结合多种生理生化指标检测及BOX-PCR、全序列杂交等遗传指标检测结果进行准确鉴定。

参考文献

- [1] 彭镇华. 樟树. 中国城市林业, 2003(2): 41-42.
- [2] 陈兰, 张小平, Kristina L. 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, 2008, 48(4): 432-438.
- [3] 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, 2007, 21(4): 349-352.
- [4] Rajendran G, Sing F, Desai AJ, et al. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp.. *Bioresour Technol*, 2008, 99(11): 4544-4550.
- [5] 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, 2006, 26(4): 270-274.
- [6] Lee AN, Charles MR. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(1): 6-8.
- [7] Gary S. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, 2006(9): 240-244.
- [8] 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, 2007, 37(1): 105-108.
- [9] Fiona PM, Tanja B, Brigitte B, et al. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006(29): 539-556.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 353-358.
- [11] Rainey FA, Naomi WR, Kroppenstedt RM. et al. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* famnov. *Int J Syst Bacteriol*, 1996(48):

- 1088–1092.
- [12] Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, *et al.* Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1981(148): 107–127.
- [13] 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. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007(57): 2259–2261.
- [14] Kimura MA. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980(16): 111–120.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987(4): 406–425.
- [16] 许钟麟. 空气洁净技术原理. 北京: 科学出版社, 2003: 456–538.
- [17] Kye MC, Su YH, Sun ML, *et al.* Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microbial Ecology*, 2007, **54**(2): 341–351.
- [18] 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*, 2006(2): 90–94.
- [19] Bent E, Chanway CP. Potential for misidentification of a spore-forming *Paenibacillus polymyxa* isolate as an endophyte by using culture-based methods. *Appl Environ Microbiol*, 2002(68): 4650–4652.
- [20] Jeon YH, Chang SB, Hwang IG, *et al.* Involvement of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng. *J Microbiol Biotechnol*, 2003(13): 881–892.
- [21] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 植物内生细菌研究. *微生物学通报*, 1998, **25**(4): 224–227.
- [22] Coombs JT, Franco CMM. Visualization of an endophytic streptomycetes species in wheat seed. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(7): 4260–4262.
- [23] 冯永君, 宋未. 植物内生细菌. *自然杂志*, 2001, **23**(5): 249–252.
- [24] 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*, 2007, **34**(4): 700–704.
- [25] 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. *Appl Environ Microbiol*, 2007(73): 7259–7267.
- [26] Elvira-Recueno M, van Vuurde JWL. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under weld conditions. *Can J Microbiol*, 2000(46): 1036–1041.
- [27] 李建勇, 杨小虎, 奥岩松. 香樟根际土壤化感作用的初步研究. *生态环境学报*, 2008, **17**(2): 763–765.
- [28] Wang ET, Tan ZY, Guo XW. Diverse endophytic bacteria isolated from a leguminous tree *Conzattia multiXora* grown in Mexico. *Arch Microbiol*, 2006(186): 251–259.
- [29] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standard. *Microbiol Today*, 2006(33): 152–155.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3 °C–5 °C 不可写成 3–5 °C; 3%–6%不可写成 3–6%等。