

一株引起马来甜龙竹组培污染内生菌的分离与鉴定

刘绍雄 王娟 王金华 朱丽丽 熊智*

(西南林业大学 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室 云南 昆明 650224)

摘要: 【目的】对一株引起马来甜龙竹组培污染内生菌的分离与鉴定。【方法】采用改良的 NA 培养基分离纯化菌株,并通过菌体的形态结构观察、生理生化试验及其 16S rDNA 序列同源性分析对其进行鉴定。【结果】菌株 SWFU01 的形态特征及生理生化试验结果与解淀粉芽孢杆菌 [*Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) Priest et al.] 的描述基本相同; 16S rDNA 序列分析表明,该菌株与解淀粉芽孢杆菌 JS 在同一系统发育分支,其同源性为 99.28%。【结论】综合形态学特征、生理生化特征以及 16S rDNA 序列分析的研究结果,菌株 SWFU01 被鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

关键词: 牡竹属, 解淀粉芽孢杆菌, 组织培养, 16S rDNA, 污染

Isolation and identification of pollution endophyte during tissue culture of *Dendrocalamus aspera*

LIU Shao-Xiong WANG Juan WANG Jin-Hua ZHU Li-Li XIONG Zhi*

(Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: [Objective] To isolate and identify the endogenous bacteria, which caused tissue culture contamination of *Dendrocalamus aspera*. [Methods] Using the improved NA culture medium to isolate and identify the strain, then identify the bacterial species by morphology observation, physiological and biochemical tests and the sequence analysis of the 16S rDNA.

基金项目: 云南省自然科学基金面上项目资助(No. 2009CD073); 国家林业局 948 项目竹子重要性状的基因工程研究技术引进项目(No. 2008-4-30); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(No. 2010CI016); 研究西南林业大学大学生创新基金项目(No. 1138); 西南林业大学大型仪器设备共享平台资助

*通讯作者: ☒: zhix65.swfc@gmail.com

收稿日期: 2011-12-08; 接受日期: 2012-03-14

[Results] The morphological characteristics of the strain SWFU01, together with related physiological and biochemical tests, match the descriptions of *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) Priest et al.. The sequence analysis of 16SrDNA indicates that this strain has the same embranchment with the *Bacillus amyloliquefaciens* JS in the Phylogenetic tree, the homology is 99.28%. **[Conclusion]** By combining the traditional morphology observation and physiological and biochemical tests, the SWFU01 strain is identified as *Bacillus amyloliquefaciens*.

Keywords: *Dendrocalamus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, Tissue culture, 16S rDNA, Pollution

马来甜龙竹 [*Dendrocalamus aspera* (J. A. et J. H. Schult.) Backer ex Heyhe] 原产亚热带地区, 属禾本科 (Gramineae) 牡竹属 (*Dendrocalamus*) 大型丛生竹类, 一般高 15 m–20 m, 胸径 10 cm–15 cm, 茎圆满通直, 质地坚韧^[1-2], 是良好的建筑材料, 且竹笋甘甜味美, 糖分和谷氨酸含量高, 有较高的国际贸易潜力^[3], 此外, 竹笋还具清肺、化热、消疾、爽胃、助消化、除积食、防便秘的功效, 对于浮肿、腹水、急性肾炎、哮喘以及糖尿病、高血压等也有一定的疗效。马来甜龙竹是南方地区发展竹产业的速生、优良的生态竹种, 适应性广, 耐寒性强, 生长迅速, 繁殖能力强, 生态效益显著, 是江河流域保护堤岸、涵养水源的理想竹种^[4]。传统的竹子育苗方法 (如埋杆、埋节等) 成本高、效率低, 不能满足山区笋用竹林发展的需求^[5]。近年来, 随着国内外科研工作者对竹子组织培养广泛的研究, 为马来甜龙竹的快速繁殖育种提供了科学的依据。因此, 利用组织培养方法对其进行快速繁殖, 对发展马来甜龙竹及其产业化生产具有重要的意义。

植物内生菌 (Endophyte) 是指存活于健康植物组织内部, 而又不引发宿主植物表现出明显感染症状的微生物类群, 主要包括真菌、细菌和放线菌^[6-7]。由于植物组织中普遍存在内生菌, 传统的表面消毒方法无法完全杀死这些微生物, 因此在植物组织培养中, 这些内生细菌的生长常引起程度不一的污染, 对组培苗产生不同程度的危害。

内生细菌污染是普遍的, 如金线莲 (*Anoectochilus roxburghii*) 组培中污染率达到 50%^[8], 仙客来 (*Cyclamen persicum*) 的块茎组织内生细菌污染率达 83.0%^[9], 地黄 (*Rehmanniaglutinosa*) 由于有内生细菌的存在污染率达 100% 等^[10]。从已有的报道看, 被鉴定的种类主要有: 黄单胞菌属 (*Xanthomonas*)^[11]、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)^[12]、假单胞属 (*Pseudomonas*)^[13]、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)^[14]、葡肠杆菌属 (*Enterobacter*)、棒杆状菌属 (*Corynebacterium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、短小杆菌属 (*Curtobacterium*)^[15]、欧文氏菌属 (*Erwinia*)^[16] 等。内生菌污染是马来甜龙竹外植体培养体系构建过程中的极大障碍, 至今尚未有相关研究的报道。本研究通过对该菌株培养基的改良、菌体的形态特征观察及其 16S rDNA 序列分析等, 对一株引起马来甜龙竹外植体培养污染的内生菌进行了分离与鉴定, 为后期马来甜龙竹培养基的优化、建立快速无性繁殖技术体系提供重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料: 马来甜龙竹采自西南林业大学格林温室大棚。

1.1.2 试剂: 蛋白胨、CMC-Na、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、琼脂、细菌基因组 DNA 快速提取试剂

盒(溶液型)、 $2\times Taq$ PCR MasterMix 等,以上试剂均由昆明硕阳科技有限公司提供。16S 通用引物(27F-1492R)由上海生物工程技术服务有限公司提供。

1.2 培养基改良

该菌株在普通牛肉膏蛋白胨培养基(NA)上不能生长,考虑到该菌株的内生微环境,参照文献[17]在 NA 培养基中加入该竹子水浸液。

马来甜龙竹茎叶水浸液的制备:取健康植株茎、叶(随机选取)分别打碎后等重量混合,称取 80 g 加入 200 mL 水, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 后无菌纱布过滤。

改良牛肉膏蛋白胨培养基(NA): 1 000 mL NA 培养基中含 20 mL 无菌马来甜龙竹茎叶水浸液。

1.3 菌株的分离纯化及保藏

马来甜龙竹内生菌菌株 SWFU01 分离自被污染的马来甜龙竹的外植体。该菌株在马来甜龙竹的外植体(或继代)培养至 10–15 d 时引起严重污染(图 1A)。内生菌菌株接于改良的 NA 培养基中进行分离纯化,挑取单菌落于试管斜面中存于 4 °C 备用。

1.4 形态观察及生理生化试验

在光学显微镜下观察个体形态并测量菌体大小,参照文献[18]进行革兰氏染色和芽孢染色方法进行形态结构观察及生理生化试验。通过糖发酵试验、硫化氢产生试验、吲哚反应试验、硝酸盐还原试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、V-P 试验、接触酶试验、生长温度、生长 pH 及对氯化钠和溶菌酶耐受性测试等对菌株的生理生化指标进行测定,以《伯杰氏细菌鉴定手册》及《常见细菌系统鉴定手册》为依据对菌株进行初步鉴定。

1.5 DNA 提取和 16S rDNA 扩增

菌株 DNA 的提取采用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(溶液型)。提取菌株基因组 DNA 后,

PCR 扩增 16S rDNA。正向引物: 5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAGAACGAACGCT-3'; 反向引物: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCC C-3'^[19]。

PCR 采用 50 μ L 反应体系: $2\times Taq$ PCR MasterMix 25 μ L, Each primer (10 μ mol/L) 2.5 μ L, 1 μ L DNA (20 ng 左右), 补足灭菌双蒸水至 50 μ L。16S rDNA-PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 3 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 30 min。PCR 产物检测: 经质量分数为 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后 EB 染色观察, 用凝胶成像仪照相。

1.6 16S rDNA 序列分析

扩增的 PCR 产物送上海美吉生物医药科技有限公司纯化并测序。从 GenBank 中获取与该菌株序列同源性较高的部分菌株序列(表 1), 用 ClustalX 按照最大同源性的原则进行排序, 并用 BioEdit 5.0.9 进行序列对齐, 最后用 MEGA 4 软件进行系统发育树构建, 以确定该菌株的系统发育地位。

2 结果与分析

2.1 形态特征观察

菌株 SWFU01(图 1)在改良的 NA 培养基上呈白色不透明菌落, 表面粗糙有隆起, 菌落边缘不规则; 菌体革兰氏染色阳性, 直杆状, (0.5–2.5) μ m \times (1.2–10) μ m, 常以成对或链状排列, 具圆端或方端, 具运动性, 形成芽孢, 芽孢囊膨大, 呈卵圆形; 兼性厌氧。

2.2 生理生化试验

主要的生理生化测试结果(表 2), 与《伯杰氏细菌鉴定手册》^[20]及《常见细菌系统鉴定手册》^[21]描述的解淀粉芽孢杆菌 [*Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) Priest et al.] 的生理生化特征基本相同, 初步鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

表 1 用于建树菌株相关信息
Table 1 Used for related information builds strains

菌株名称 Strain name	菌株编号 Strains numbers	登录号 Accession number	国家 Country
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	Nt1-7	HQ831418.1	China
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	A3-11	JF496342.1	China
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	Ns3-4	HQ831407.1	China
<i>Bacillus subtilis</i>	T429	HQ441254.1	China
<i>Bacillus licheniformis</i>	M2-3	EU882848.1	China
<i>Bacillus methylophilicus</i>	Kt9-27	JF460756.1	China
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	WA3-10	JF496478.1	China
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	R8	HQ259953.1	China
<i>Bacillus tequilensis</i>	HLJKXC34	HQ844467.1	China
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	Nk10-22	HQ831402.1	China
<i>Bacillus amyloliquefacien</i>	JS	HM055608.1	China
<i>Bacillus vallismortis</i>	/	JF912890.1	China
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	SWFU01	JQ082511.1	China

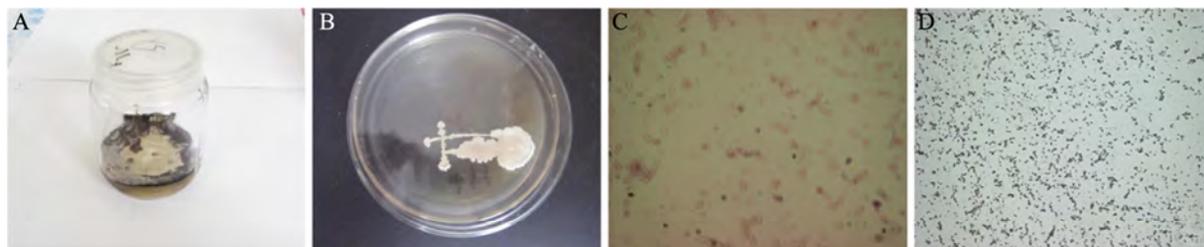


图 1 菌株 SWFU01 的形态特征

Fig. 1 The morphology of the strain SWFU01

注: A: 受菌株 SWFU01 污染的马来甜龙竹组培苗; B: 在改良 NA 培养基的菌落形态; C: 菌体的革兰氏染色; D: 菌体的芽孢染色。

Note: A: *Dendrocalamus aspera*'s cultivation seedling polluted by the strain SWFU01; B: Colony morphologies of strain on improved NA culture medium; C: Gram-stained images of strain under light microscopy (magnification, 1 000×); D: Spore morphologies of strain under light microscopy (magnification, 1 000×).

2.3 16Sr DNA 序列测定及系统进化分析

将菌株 SWFU01 的 16S rDNA (GenBank 登录号 JQ082511.1) 与从 GenBank 中获取与该菌株序列同源性较高的部分菌株序列, 以 16S rDNA 序列同源性为基础构建系统发育树, 确定该菌株的系统发育地位。一般来讲, 在种分类等级上, 如果两个分类单位间的 16S rDNA 序列同源性大于

97.5%, 可视为与模式菌株同种^[22-23]。系统发育树状图(图 2)表明该菌株与解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、死谷芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis*)聚在同一系统发育分支, 与解淀粉芽孢杆菌 JS 进化关系最为密切, 同源性达到了 99.28%, 说明菌株 SWFU01 为解淀粉芽孢杆菌。

表 2 菌株 SWFU01 的部分生理生化性质
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain SWFU01

测定项目 Determination project	结果 Results	测定项目 Determination project	结果 Results	测定项目 Determination project	结果 Results
D-葡萄糖 D-dextrose	+	山梨糖 Sorbose	-	硫化氢产生试验 The hydrogen sulfide produced test	-
麦芽糖 Maltose	+	D-木糖 D-xylose	+	吲哚反应试验 Indole reaction experiment	+
乳糖 Lactobiose	+	鼠李糖 Rhamnose	-	硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	-
蔗糖 Cane sugar	+	L-阿拉伯糖 L-Arabia candy	-	明胶液化试验 Gelatinliquefactiontest	+
果糖 Fructose	+	海藻糖 Trehalose	+	淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+
半乳糖 Galactose	-	棉籽糖 Raffinose	+	V-P 试验 The diacetyl test	+
甘露糖 Mannose	+	有溶菌酶时生长 Lysozyme growth	+	接触酶 Catalase	+
生长 NaCl NaCl growth	2% + 5% + 7% + 10% -	10 °C 生长温度 Growth temperature 30 °C 40 °C 50 °C	- + + -	6.8 营养肉汤 6.8 Nutrient Broth pH 值 pH value 5.7 营养肉汤 5.7 Nutrient broth	+ + + +

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应。

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

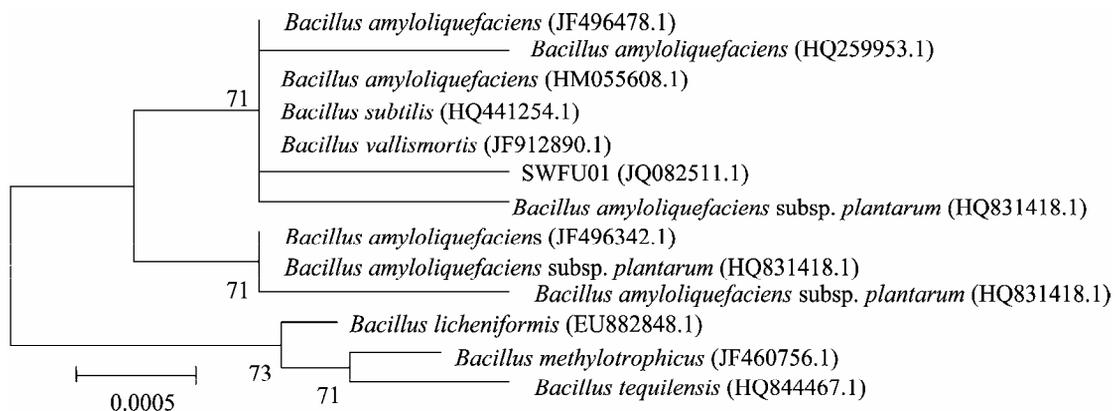


图 2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

注: 括号中的序号为 GenBank 登录号; 分支点上的数字为自展值百分比; 线段 0.000 5 为核苷酸替换率。

Note: GenBank accession numbers are shown in the parentheses. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.000 5 substitutions per nucleotide position.

综合形态学特征、生理生化特征以及 16S rDNA 序列分析的研究结果,菌株 SWFU01 被鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

3 讨论

解淀粉芽孢杆菌作为植物内生菌见于红树^[24]、马尾松^[25]、梨树^[26]等,但未见其在竹子中的分布,本试验的结果表明解淀粉芽孢杆菌是马来甜龙竹的内生菌,为竹子内生菌的相关研究积累了资料。目前有关植物内生细菌的来源有两种假说: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^[27],直接或间接促进植物生长,协助植物抵抗不利环境。解淀粉芽孢杆菌是一种与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 亲缘性很高的一类菌株^[28],其自身的生长过程中产生一系列有益于植物生长的代谢产物,这些代谢产物使得解淀粉芽孢杆菌具有抑制多种植物病原真菌的作用,且具有促进植物生根和地上部分生长的功能,尹昭勇等^[29]研究表明,解淀粉芽孢杆菌对竹子根系的生长有一定的促进作用。表明了解淀粉芽孢杆菌作为竹子的内生菌,可能是竹子根系的生长过程中,土壤的解淀粉芽孢杆菌吸附于根际,并由此进入竹子根的组织内部促进其生长,而解淀粉芽孢杆菌在植物体内不同部位转移^[30],内生于竹子体内。

植物外植体培养过程中往往由于内生菌的生长而导致污染,对组织培养提出了严峻的考验。然而,由于传统的竹子育苗方法不能满足林业发展的需求,如何解决竹子组培污染,提高组培育苗的效率显得尤为重要。在组培内生菌污染防治的相关报道中,多采用对外植体进行预处理^[31],如:黄化处理、热击^[32]、多次消毒、灼烧等;酸化培养基或在培养基中加入抗生素也是常用的

方法,特别是抗生素的使用具有较好的效果。因此,导致外植体污染的内生菌的分离与鉴定对抗生素的选择起到了辅助作用,可以根据菌株的生理特征进行组培培养基的优化等有针对性地防治组培中的污染菌。

本研究基于 16S rRNA 基因序列对马来甜龙竹内生细菌菌株 SWFU01 进行了系统发育分析。研究发现,SWFU01 菌株与芽孢杆菌属中的解淀粉芽孢杆菌 JS、枯草芽孢杆菌 T429、死谷芽孢杆菌形成相对独立的分支,同源性均达到了 98% 以上,并与解淀粉芽孢杆菌 JS 进化关系最为密切,同源性达到了 99.28%,因此初步确定 SWFU01 菌株为解淀粉芽孢杆菌。由此可见,基于 16S rRNA 基因序列分析的系统发育学研究有一定的局限性,在某些近缘种的鉴定中,如芽孢杆菌属中解淀粉芽孢杆菌近缘种,很难精确确定它们的分类地位。目前已有多种基因,如 *gyrA*、*gyrB*、*cheA* 等^[33-34],已经用于解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的分类研究。虽然特异性基因在分布上不如 16S rRNA 基因普遍,却可作为一些近缘种的分类研究,以弥补单个基因对细菌分类准确性的限制。因此,只有有效地将细菌经典分类学和现代分子分类学进行结合,将表型鉴定和分子生物学鉴定综合分析才能得出更为可靠的结论。

参考文献

- [1] 谭宏超,局本祥,谭汝学. 甜龙竹丰产栽培技术研究[J]. 林业科技通讯, 1997(10): 9-12.
- [2] 龚力波,郑思乡,肖龙寿,等. 马来西亚甜龙竹的组织培养繁殖试验[J]. 云南林业科技, 2003, 102(1): 1-7.
- [3] Arya S, Satsangi R, Arya ID. 通过体细胞胚胎生殖的方法大面积种植可食用的马来甜龙竹[J]. 世界竹藤通讯, 2009, 7(1): 47.
- [4] 刘荣辉,杨大应,吴晓荣. 马来甜龙竹组织培养

- 技术研究初探[J]. 六盘水师范高等专科学校学报, 2005, 17(6): 10-11.
- [5] 苏海, 钟明, 蔡时可, 等. 马来甜龙竹的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(4): 468.
- [6] 李端, 郭利伟, 郭伟云, 等. 抗肿瘤药用植物及其内生菌活性代谢产物的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16): 7508-7509.
- [7] 陈雪英, 都晓伟, 李滨. 内生菌与药用植物活性成分相关性研究进展[J]. 国外医药·植物药分册, 2008, 23(2): 47-52.
- [8] 许婉芳, 龚福生, 萧华山. 杀菌剂对金线莲组织培养中微生物污染的抑制作用[J]. 福建果树, 1999(4): 6-7.
- [9] Ando T, Murasaki K. *In vitro* propagation of Cyclamen by the use of etiolated petioles[J]. Technical Bulletin of Faculty of Horticulture Chiba University, 1983, 32: 1-5.
- [10] Paek KY, Yu KJ, Park SI, et al. Micropropagation of *Rehmannia glutinosa* as medicinal plant by shoot tip and root segment culture[J]. Acta Horticulturae, 1995, 390: 113-119.
- [11] 翟建中, 顾梅俏. 长春蔓组培生产中污染菌的防除[J]. 森林病虫通讯, 1999(4): 30-32.
- [12] Kneifel W, Leonhardt W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992, 29(2): 139-144.
- [13] Reed BM, Mentzer J, Tanprasert P, et al. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 52(1/2): 67-70.
- [14] 何云芳, 郭达初. 百合及半夏试管繁殖中的污染防治初报[J]. 浙江农业大学学报, 1995, 22(3): 322-324.
- [15] Mantell SH. Microbes intimately associated with tissue and cell cultures of tropical *Dioscorea* yams[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 52(1/2): 47-52.
- [16] Ruiz Sifre G, Rosa Marquez E, Flores Ortega CE. *Zantedeschia aethiopica* propagation by tissue culture[J]. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico, 1996, 80(3): 193-194.
- [17] 王梦怡, 王永华. 一种用于植物内生菌的分离方法. 中国专利: 200810181008[P]. 2009-04-08.
- [18] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 65-180.
- [19] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [20] Holt JG, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: The williams and Wickins Company, 1994: 529-551.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 62-65.
- [22] Clayton RA, Sutton G, Hinkle PS, et al. Intraspecific variation in small-subunit 16SrRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(3): 595-599.
- [23] Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens[J]. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2(3): 299-305.
- [24] 欧雄常, 柳凤, 詹儒林, 等. 拮抗辣椒疫病菌的红树内生细菌筛选及 RS261菌株鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2): 175-180.
- [25] 朱丽梅, 吴小芹, 徐旭麟. 松材线虫拮抗细菌的筛选和鉴定[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, 32(3): 91-94
- [26] 张宝俊, 张家榕, 韩巨才, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 LP-5抗菌蛋白的分离纯化及特性[J]. 植物保护学报, 2010, 37(2): 144-147.
- [27] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 植物内生细菌的研究[J].

微生物学通报, 1998, 25(4): 224-227.

- [28] 车晓曦, 李校堃. 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的研究进展[J]. 生物技术, 2010(3): 7-10
- [29] 尹昭勇, 李莲芳, 王慷林, 等. 解淀粉芽孢杆菌和母竹年龄对4种竹类埋节生根的影响[J]. 竹子研究汇刊, 2011, 30(2): 28-33.
- [30] Coombs JT, Franco CMM. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4260-4262.
- [31] 周俊辉, 周厚高, 刘花全. 植物组织培养中的内生细菌污染问题[J]. 广西植物, 2003, 23(1): 41-47.
- [32] Langens-Gerrits M, Albers M, de Klerk GJ. Hot-Water treatment before tissue culture reduces initial contamination in *Lilium* and *Acer*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 52(1/2): 75-77.
- [33] Reva ON, Dixelius C, Meijer J, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48(2): 249-259.
- [34] Wang LT, Lee FL, Tai CJ, et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(8): 1846-1850.

征订启事

2012年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订

	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 58.00 元, 年价 696 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: 010-64806142; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量。