

# 野生及温室盆栽蕙兰可培养根内生细菌的遗传多样性

王盼盼 武永秀 宋彤彤 马春玲 赵文 王瑛 孙磊\*

(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, 河北保定 071002)

**摘要:** 蕙兰(*Cymbidium faberi*)是中国兰属代表种之一, 具有很高的观赏价值和经济价值, 对其内生细菌进行研究不仅可以丰富植物内生细菌资源, 还可以为探讨兰花与微生物之间的相互作用关系提供基础数据。本研究采用分离培养方法及16S rRNA基因序列测定对天目山野生蕙兰、在温室培养1年后的蕙兰根内生细菌遗传多样性进行了研究。结果表明: 从野生蕙兰根内分离得到的97株细菌分属于变形菌门的 $\alpha$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲及厚壁菌门的13个属, 其最优势类群为 $\gamma$ -变形菌纲(86.60%), *Lelliottia* (26.80%)为最优势菌属。从温室盆栽蕙兰根内分离得到的52株细菌分属于变形菌门的 $\alpha$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲及放线菌门的9个属, 优势类群为 $\beta$ -变形菌纲(48.08%), 优势菌属为草螺菌属(*Herbaspirillum*) (34.62%), 其中菌株ehR17为潜在的新种。这些结果表明天目山野生蕙兰可培养根内生细菌多样性较其在温室培养1年后更为丰富, 同时也说明植物内生细菌的群落结构与生长环境密切相关。

**关键词:** 蕙兰, 内生细菌, 16S rRNA基因, 多样性, 分离培养方法

## Genetic diversity of culturable endophytic bacteria in the roots of wild and greenhouse *Cymbidium faberi*

Panpan Wang, Yongxiu Wu, Tongtong Song, Chunling Ma, Wen Zhao, Ying Wang, Lei Sun\*

College of Life Sciences, Hebei University, Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, Baoding, Hebei 071002

**Abstract:** *Cymbidium faberi* is a representative species of *Cymbidium* with high ornamental and economic value. Investigating the diversity of *C. faberi*'s endophytic bacteria not only enriches endophytic bacterial resources, but also provides basic data on orchid-microbe interactions. We investigated the genetic diversity of culturable endophytic bacteria in the roots of wild *C. faberi* from Tianmu Mountain, Zhejiang Province and *C. faberi* grown in a greenhouse for one year. Culture-dependent methods were used to isolate endophytic bacteria from the roots of *C. faberi*. The diversity of these bacteria was investigated using 16S rRNA gene partial sequence analysis. A total of 97 strains were isolated from the interior of wild *C. faberi* roots. Based on 16S rRNA gene sequences, the 97 isolates were affiliated with 13 genera of Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, and Firmicutes. The dominant group was Gammaproteobacteria (86.60%), and the dominant genus was *Lelliottia* (26.80%). A total of 52 endophytic strains were isolated from the roots of *C. faberi* grown in the greenhouse. Based on 16S rRNA gene sequences, the 52 isolates were grouped into 9 genera of Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Actinobacteria. The dominant group was Betaproteobacteria (48.08%), and the dominant genus was *Herbaspirillum* (34.62%). The strain ehR17 was identified as a potential novel species. For *C. faberi*, the diversity of culturable endophytic bacteria was higher from the wild Tianmu Mountain population than from plants grown in the greenhouse for one year. Community structure of endophytic bacteria was closely related to plant growth environment.

收稿日期: 2014-09-15; 接受日期: 2014-12-30

基金项目: 国家自然科学基金(31100002)、河北省生物工程重点学科经费、河北大学自然科学研究计划项目(2010-195)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: sunlei1018@126.com

**Key words:** *Cymbidium faberi*, endophytic bacteria, 16S rRNA gene, diversity, culture-dependent methods

早在19世纪70年代人们就已发现植物组织内部有非共生的细菌存在,但植物内生细菌的概念是经历了长期的发展才逐渐形成的。目前,人们所普遍接受的植物内生细菌(endophytic bacteria)的概念是Kado在1991年提出的,他认为植物内生细菌是指生活在植物组织内部,没有给植物造成实质性损害,或者除了定居还从中获益的细菌(Kado, 1991)。植物内生细菌具有丰富的生物多样性、宿主植物种类多样性及功能多样性。地球上大约生存着300,000种植物,每一株植物都可作为一种或多种内生菌的宿主(Stępniewska & Kuźniar, 2013)。植物内生细菌具有促进植物生长(Compant *et al.*, 2010)、生物防治(Ardanov *et al.*, 2011)、增强宿主植物的抗逆性(Wilkinson *et al.*, 2000)、产生活性物质(Catalán *et al.*, 2007)、生物修复(Germaine *et al.*, 2006)及潜在的促进植物修复(Ryan *et al.*, 2008)等多种有益的生物学功能。

兰花是我国十大名花之一,具有很高的观赏价值和重要的经济地位。目前,对兰花微生态系统中微生物的研究主要集中在与兰花根共生的菌根真菌,而对内生细菌的研究报道还较少。尤其是对中国兰属植物内生细菌仅见刘琳等(2010)、孙磊等(2011)对温室盆栽春兰(*Cymbidium goeringii*)内生功能菌株进行了研究,武永秀等(2014)对野生春兰内生细菌进行了分离,杨娜和杨波(2011)、褚晓玲等(2010)对湖北大洪山野生蕙兰(*Cymbidium faberi*)根内生细菌进行了研究。这些工作都只是对生境相同的单一材料进行了研究。本论文采用分离方法对浙江天目山野生蕙兰及其在温室培养1年后的蕙兰根内生细菌多样性进行了比较研究,可加深对蕙兰内生细菌多样性的认识,丰富植物内生细菌资源,为内生细菌的合理利用起到积极推动作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

分别于2012年5月和2013年4月进行样品采集。2012年5月于浙江天目山(119°36'2" E, 30°109'19" N)采集蕙兰植株,空运回实验室后立即进行根内生细菌的分离。分离后的蕙兰植株栽培于中国林业科学

研究院温室。2013年4月再次采集在温室中培养1年之后的蕙兰根进行内生细菌的分离。

### 1.2 内生细菌的分离与纯化

取健康的蕙兰根,用软毛刷清洗干净后,滤纸吸干表面水分。称取1.0 g根置于无菌的烧杯中,依次用75%乙醇浸泡3 min, 3%次氯酸钠溶液浸泡2 min, 75%乙醇处理30 s,最后用无菌水清洗5次,用无菌滤纸吸干根表面水分。吸取200  $\mu$ L最后一次清洗水涂布于TSA平板,并将灭菌后的根于TSA平板上轻轻涂抹,均设置3个平行,28℃培养6 d,以检查表面灭菌效果。将表面灭菌的根置于无菌研钵中,加入9 mL无菌生理盐水及少量的无菌石英砂研磨,研磨液按1:9比例稀释,分别从 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 稀释液中吸取200  $\mu$ L涂布于R2A培养基(Difco)、TSA培养基(Difco)、Döbereiner无氮培养基(Von Bulow & Döbereiner, 1975)平板上,每个浓度重复3次,28℃培养6 d。选取合适梯度的分离平板,挑取平板上所有的菌落并进行纯化。

### 1.3 内生细菌的16S rRNA基因的PCR扩增

菌落裂解法制备PCR模板。采用细菌16S rRNA基因通用引物27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-AG-3')(Edwards *et al.*, 1989)和1492r(5'-GGTTAC-CTTGTACGACTT-3')(Lane, 1991)进行扩增。

PCR反应条件: 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。反应结束后取3  $\mu$ L PCR产物在1.0%琼脂糖凝胶电泳上检测。

### 1.4 内生细菌的16S rRNA基因的系统发育分析

PCR产物送到北京宝锐通生物科技公司进行16S rRNA基因序列测定。测序结果利用EZTaxon数据库(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)中的序列进行比对,用Clustal W按照最大同源性的原则进行排序,利用MEGA5软件,采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树(Tamura *et al.*, 2011)。代表菌株的序列提交GenBank,序列登录号为: KJ879954-KJ880029。

### 1.5 蕙兰根内生细菌的多样性分析

通过Shannon-Wiener多样性指数( $H'$ )和均匀度指数( $E$ )(Luo *et al.*, 2004)分析蕙兰根内生细菌的多样性。

$$H' = -\sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$
$$P_i = n_i/N$$
$$E = H/\ln S$$

(1)

(2)

(3)

$S$ 表示菌种数,  $n_i$ 表示第 $i$ 种的菌株数量,  $N$ 表示菌株数的总和,  $P_i$ 表示第 $i$ 种的多度比例。

2 结果

2.1 野生蕙兰根内生细菌的16S rRNA基因系统发育分析

从天目山野生蕙兰根内共分离纯化获得97株

细菌, 对其进行16S rRNA基因序列测定, 所得序列在EZTaxon数据库中进行比对分析, 结果见表1。根据比对分析结果构建野生蕙兰根内生细菌的系统发育树(图1A)。结果显示, 野生蕙兰根内生细菌隶属于变形菌门的 $\alpha$ -变形菌纲(2.06%)、 $\beta$ -变形菌纲(4.12%)、 $\gamma$ -变形菌纲(86.60%)及厚壁菌门(7.22%)的13个属, 优势类群为 $\gamma$ -变形菌纲。其中有26株细菌与*Lelliottia*属的相似性高于99%, 为最优势菌属。其次有21株细菌与克吕沃氏菌属(*Kluyvera*)的相似性高于99%, 为次优势菌属; 其余细菌分属于*Cedecea*、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、沙雷氏菌属

表1 野生及温室盆栽蕙兰根内生细菌16S rRNA基因序列相似性分析  
Table 1 Similarity analysis of the 16S rRNA gene partial sequences of endophytic bacteria from the roots of wild *Cymbidium faberi* and *C. faberi* in the greenhouse

| 类群 Group                                  | 菌株数 Strain numbers | 所占比例 % | 代表菌株 Representative strains | 最相近菌种(登录号) Nearest strain (accession no.)          | 相似度 Similarity (%) |
|---|--------------------|--------|-----------------------------|--|--------------------|
| 野生蕙兰 Wild <i>C. faberi</i>                |                    |        |                             |  |                    |
| $\alpha$ -变形菌纲                            | 2                  |        |                             |  |                    |
| Alphaproteobacteria (2.06%)               | 1                  | 1.03   | 6hN10                       | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AJ389904)        | 100.00             |
|   | 1                  | 1.03   | 6hR78                       | <i>Devosia riboflavin</i> (AJ549086)               | 99.85              |
| $\beta$ -变形菌纲                             | 4                  |        |                             |  |                    |
| Betaproteobacteria (4.12%)                | 4                  | 4.12   | 6hR5                        | <i>Burkholderia stabilis</i> (AF148554)            | 99.67              |
| $\gamma$ -变形菌纲                            | 84                 |        |                             |  |                    |
| Gammaproteobacteria (86.60%)              | 13                 | 13.40  | 5hR3                        | <i>Cedecea neteri</i> (AB086230)                   | 98.58              |
|   | 1                  | 1.03   | 6hR30                       | <i>Enterobacter asburiae</i> LF7a (CP003026)       | 99.09              |
|   | 4                  | 4.12   | 5hR6                        | <i>Erwinia rhapontici</i> (ERU80206)               | 98.51              |
|   | 9                  | 9.28   | 6hN2                        | <i>Klebsiella michiganensis</i> (JQ070300)         | 99.30              |
|   | 21                 | 21.65  | 6hR10                       | <i>Kluyvera cryocrescens</i> (AF310218)            | 99.34              |
|   | 26                 | 26.80  | 6hR36                       | <i>Lelliottia amnigena</i> (AB004749)              | 99.10              |
|   | 2                  | 2.06   | 6hR56                       | <i>Pantoea septic</i> (EU216734)                   | 98.86              |
|   | 8                  | 8.25   | 6hN21                       | <i>Serratia plymuthica</i> (AJ233433)              | 98.49              |
| 厚壁菌门                                      | 7                  |        |                             |  |                    |
| Firmicutes (7.22%)                        | 1                  | 1.03   | 6hR3                        | <i>Bacillus luciferensis</i> (AJ419629)            | 98.31              |
|   | 6                  | 6.19   | 6hR75                       | <i>Paenibacillus kribbensis</i> (AF391123)         | 97.62              |
| 温室盆栽蕙兰 <i>C. faberi</i> in the greenhouse |                    |        |                             |  |                    |
| $\alpha$ -变形菌纲                            | 18                 |        |                             |  |                    |
| Alphaproteobacteria (34.62%)              | 2                  | 3.85   | ehN1                        | <i>Novosphingobium rosa</i> (D13945)               | 98.26              |
|   | 6                  | 11.54  | ehN5                        | <i>Rhizobium mayense</i> (JX855172)                | 100.00             |
|   | 9                  | 17.31  | ehR13                       | <i>Rhizobium multihospitium</i> (EF035074)         | 100.00             |
|   | 1                  | 1.92   | ehR17                       | <i>Sphingomonas polyaromaticivorans</i> (EF467848) | 96.52              |
| $\beta$ -变形菌纲                             | 25                 |        |                             |  |                    |
| Betaproteobacteria (48.08%)               | 6                  | 11.54  | ehR33                       | <i>Burkholderia lata</i> (CP000150)                | 99.71              |
|   | 18                 | 34.62  | ehK14                       | <i>Herbaspirillum chlorophenolicum</i> (AB094401)  | 99.18              |
|   | 1                  | 1.92   | ehR14                       | <i>Variovorax paradoxus</i> (D88006)               | 99.56              |
| $\gamma$ -变形菌纲                            | 8                  |        |                             |  |                    |
| Gammaproteobacteria (15.38%)              | 7                  | 13.46  | ehR5                        | <i>Dyella koreensis</i> (AY884571)                 | 99.43              |
|   | 1                  | 1.92   | ehK21                       | <i>Moraxella osloensis</i> (X74897)                | 99.86              |
| 放线菌门                                      | 1                  |        |                             |  |                    |
| Actinobacteria (1.92%)                    | 1                  | 1.92   | ehT15                       | <i>Microbacterium oxydans</i> (Y17227)             | 100.00             |

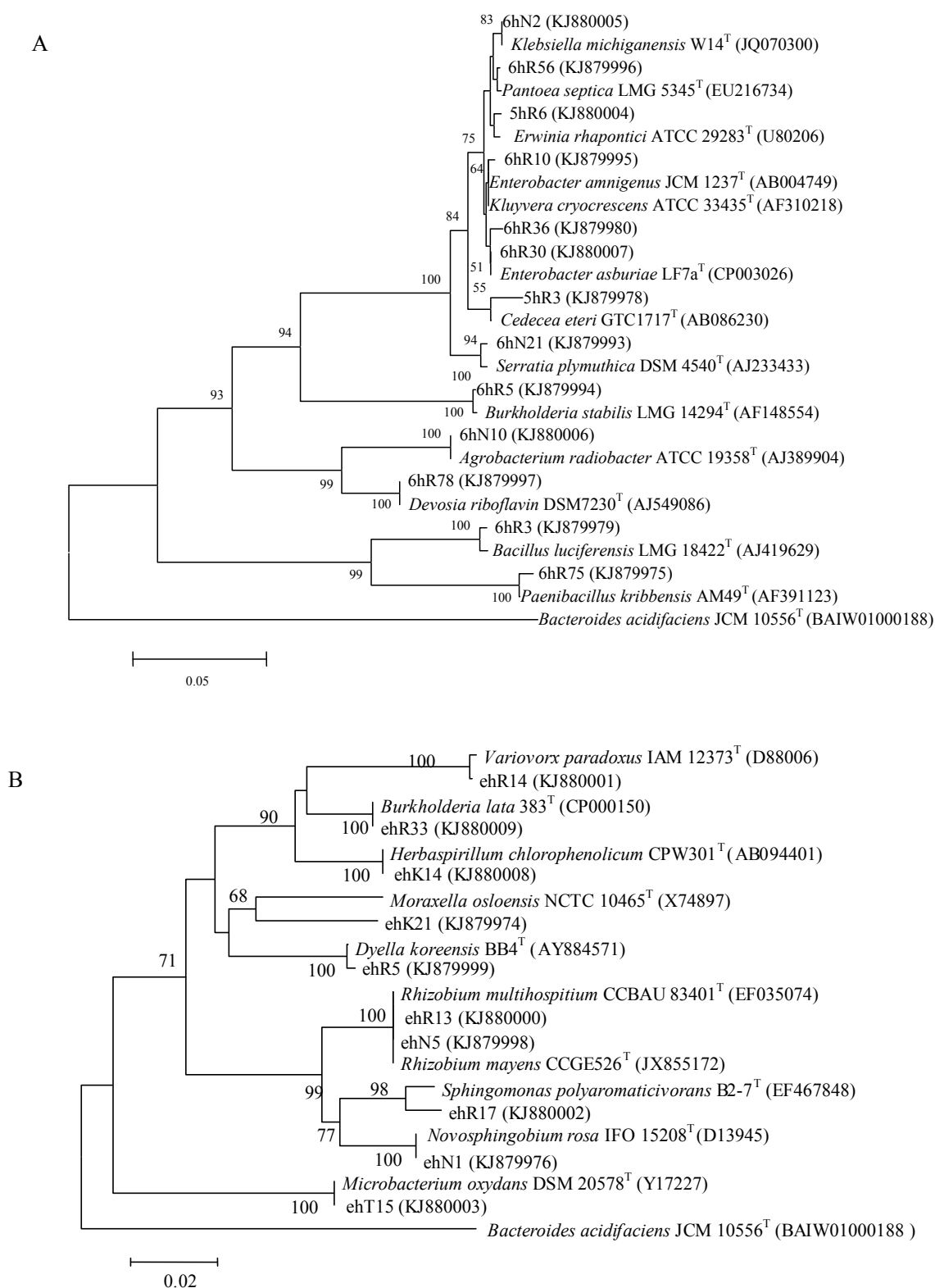


图1 蕙兰根内生细菌16S rRNA基因序列系统发育树。(A)野生蕙兰; (B)温室盆栽蕙兰。

Fig. 1 A dendrogram based on the 16S rRNA gene partial sequences of endophytic bacteria. GenBank accession numbers are given in parentheses. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values (>50%) based on 1,000 replicates. (A) A dendrogram of roots endophytic bacteria of wild *Cymbidium faberi*. (B) A dendrogram of roots endophytic bacteria of *C. faberi* in the greenhouse.

(*Serratia*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、泛菌属(*Pantoea*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、*Devosia*及芽孢杆菌属(*Bacillus*)等11个属。

2.2 盆栽蕙兰内生细菌的16S rRNA基因系统发育分析

从在温室中生长1年的蕙兰根内共分离纯化得到52株细菌, 并进行了16S rRNA基因序列测定, 所得序列在EZTaxon数据库中进行比对分析, 结果见表1。根据比对分析结果构建了系统发育树(图1B)。结果显示温室盆栽1年的蕙兰根内生细菌分别隶属于变形菌门的 $\alpha$ -变形菌纲(34.62%)、 $\beta$ -变形菌纲(48.08%)、 $\gamma$ -变形菌纲(15.38%)及放线菌门(1.92%)的9个属。优势类群为 $\beta$ -变形菌纲; 优势菌属为草螺菌属(*Herbaspirillum*), 包含18株细菌; 次优势菌属为根瘤菌属(*Rhizobium*), 共有15株细菌。其余细菌属于*Dyella*、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、莫拉氏菌属(*Moraxella*)、微杆菌属(*Microbacterium*)等7个属。菌株 ehR17 (KJ880002) 与 *Sphingomonas polyaromaticivorans* B2-7<sup>T</sup> (EF467848) 相似性为96.52%, 可能为潜在的新种。

2.3 内生细菌群落结构比较

根据序列比对结果, 对天目山野生蕙兰及在温室种植1年后的蕙兰根内生细菌的群落结构进行分析, 发现野生蕙兰和温室种植1年的蕙兰样品中均分离到 $\alpha$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲的细菌, 另外厚壁菌门的细菌只有在野生蕙兰分离到, 而放线菌门的细菌只有在温室盆栽蕙兰分离到。在属水平上, 两次样品分离结果存在较大差异, 从野生蕙兰根内分离到13个属的细菌, 而温室种植1年后的蕙兰样品中只分离到9个属的细菌, 只有伯克氏菌属在两次样品中均分离到, 具体比较结果见表2。

将16S rRNA基因序列同源性大于97%定义为同一种, 计算样品内生细菌群落多样性指数和均匀度指数。计算结果显示野生蕙兰及温室种植1年后的蕙兰根内生细菌的Shannon-Wiener多样性指数分别为2.084和1.868, 均匀度指数分别为0.812和0.811, 野生蕙兰根内生细菌的多样性指数明显高于温室

表2 野生蕙兰和温室盆栽蕙兰根内生细菌群落结构比较  
Table 2 Comparison of endophytic bacteria community structures in the roots from wild *Cymbidium faberi* and *C. faberi* in the greenhouse

| 类群<br>Group         | 属 Genera             |                             |
|---------------------|----------------------|-----------------------------|
|                     | 野生蕙兰<br>Wild         | 温室盆栽蕙兰<br>In the greenhouse |
| Alphaproteobacteria | <i>Agrobacterium</i> | <i>Novosphingobium</i>      |
|                     | <i>Devosia</i>       | <i>Rhizobium</i>            |
|                     | —                    | <i>Sphingomonas</i>         |
| Betaproteobacteria  | <i>Burkholderia</i>  | <i>Burkholderia</i>         |
|                     | —                    | <i>Herbaspirillum</i>       |
|                     | —                    | <i>Variovorax</i>           |
| Gammaproteobacteria | <i>Cedecea</i>       | <i>Dyella</i>               |
|                     | <i>Enterobacter</i>  | <i>Moraxella</i>            |
|                     | <i>Erwinia</i>       | —                           |
|                     | <i>Klebsiella</i>    | —                           |
|                     | <i>Kluyvera</i>      | —                           |
|                     | <i>Lelliottia</i>    | —                           |
|                     | <i>Pantoea</i>       | —                           |
|                     | <i>Serratia</i>      | —                           |
| Firmicutes          | <i>Bacillus</i>      | —                           |
|                     | <i>Paenibacillus</i> | —                           |
| Actinobacteria      | —                    | <i>Microbacterium</i>       |

盆栽蕙兰的, 二者均匀度指数相当。

3 讨论

植物内生细菌作为植物微生态系统中的重要组成部分, 已成为植物微生物学科具有挑战性的研究领域。本研究分离到的野生蕙兰根内生细菌分属为 $\alpha$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲及厚壁菌门4大类群, 其最优势类群为 $\gamma$ -变形菌纲, 与徐爱芳(2013<sup>①</sup>)采用非培养方法对同一样品进行研究的結果保持一致。但不同研究方法显示的最优势菌属结果不同, 可培养的内生细菌最优势菌属为*Lelliottia*, 该属细菌也是首次从植物内部分离得到, 而通过16S rRNA基因克隆文库构建分析得到的最优势菌属为肠杆菌属。这表明培养方法和非培养方法研究细菌群落结构具有统一性, 同时也存在一定的差异。克雷伯氏菌属(Tamura *et al.*, 2011)、芽孢杆菌属(Mehnaz *et al.*, 2010)、欧文氏菌属(Wang *et al.*, 2012)、肠杆菌属(Huang *et al.*, 2012)常作为植物促生细菌被分离得到, 本实验分离得到的多种细菌, 可以用于有益内生细菌资源的开发。

① 徐爱芳 (2013) 非培养方法对天目山春兰和蕙兰根内生和根际细菌的研究, 河北大学硕士学位论文。

温室种植1年的蕙兰根内生细菌的优势菌属为草螺菌属。草螺菌属中的一些菌株可以产生促进植物生长的次级代谢产物,也是多种禾本科经济作物的内生固氮菌,比如玉米、甘蔗、高粱、水稻、小麦(Serrato *et al.*, 2010)。根瘤菌属为次优势菌属,根瘤菌属中的细菌可固定空气中的氮,供自身及植物生长提供所需要的营养物质。*Rhizobium mayense*(JX855172)2013年首次从根瘤中被分离到(Rincón-Rosales *et al.*, 2013), 本实验首次从兰科植物中获得该菌。

褚晓玲等(2010)、杨娜和杨波(2011)分别从湖北大洪山健康的野生蕙兰根部分离到8个属和9个属的内生细菌,其优势菌属分别为伯克氏菌属和芽孢杆菌属,这两个菌属在浙江天目山的健康蕙兰根部均有分离到。本实验从天目山野生蕙兰根部分离得到13个属的内生细菌。对比上述数据表明,浙江天目山野生蕙兰可培养根内生细菌较湖北大洪山野生蕙兰具有更为丰富的多样性。本研究还发现同一样品野生的和将其在温室进行培养后,根内生细菌的群落结构存在较大差异。武永秀等(2014)曾对天目山野生春兰可培养根内生细菌进行分析,分离得到的63株内生细菌隶属于6个属,芽孢杆菌属为最优势菌属,与本研究结果存在较大差异。刘琳等(2010)对温室盆栽春兰可培养内生细菌多样性进行研究,分离得到的57株内生细菌隶属于14个属,类芽孢杆菌属为最优势菌属。本研究得到的52株温室盆栽蕙兰可培养根内生细菌隶属于9个属,优势菌属为草螺菌属。将本文研究结果与已发表的蕙兰植物内生细菌(褚晓玲等, 2010; 杨娜和杨波, 2011)、春兰植物内生细菌(刘琳等, 2010; 武永秀等, 2014)的研究结果进行比较,可初步说明植物内生细菌的群落结构在植物基因型相同的情况下,植物生长的环境因素对其的影响更为显著;而在同样生长环境中,植物的基因型对植物内生细菌的群落结构影响比较重要。

本研究结果说明蕙兰根内生细菌具有较为丰富的多样性,该研究丰富了植物内生细菌资源,为植物内生细菌的开发利用提供了基础。

## 参考文献

- Ardanov P, Ovcharenko L, Zaets I, Kozyrovska N, Pirttilä AM (2011) Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biological Control*, **56**, 43–49.
- Bulgari D, Bozkurt AI, Casati P, Çağlayan K, Quaglino F, Bianco PA (2012) Endophytic bacterial community living in roots of healthy and 'Candidatus Phytoplasma mali'-infected apple (*Malus domestica*, Borkh.) trees. *Antonie van Leeuwenhoek*, **102**, 677–687.
- Catalán AI, Ferreira F, Gill PR, Batista S (2007) Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1352–1367.
- Chu XL (褚晓玲), Yang B (杨波), Gao L (高丽), Li HL (李洪林), Hu L (胡磊), Yang N (杨娜) (2010) Species diversity of cultivable bacteria isolated from the roots of *Cymbidium faberi* Rolfe. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **28**, 199–205. (in Chinese with English abstract)
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Colonization of plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: importance, mechanisms involved and future prospects. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**, 669–678.
- Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, **17**, 7843–7853.
- Germaine KJ, Liu X, Cabellos GG, Hogan JP, Ryan D, Dowling DN (2006) Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiology Ecology*, **57**, 302–310.
- Huang G (黄盖), Gao H (高焱), Wang C (王琛), Zhao Q (赵倩), Zhang WF (张文峰), Dang J (党娟), Ma XT (马晓棠), Yan X (颜霞), Gao JP (高建平) (2013) ACC 30 strain with ACC deaminase activity: its isolation identification and growth-promoting effect. *Microbiology China* (微生物学通报), **40**, 812–821. (in Chinese with English abstract)
- Kado CI (1991) Plant pathogenic bacteria. In: *The Prokaryotes* (eds Balows A, Truper HG, Dworkin M, Schleifer KH), pp. 659–674. Springer-Verlag, New York.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (eds Stackebrandt E, Goodfellow M), pp. 115–175. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Liu L (刘琳), Sun L (孙磊), Zhang RY (张瑞英), Yao N (姚娜), Li LB (李潞滨) (2010) Diversity of IAA-producing endophytic bacteria isolated from the roots of *Cymbidium goeringii*. *Biodiversity Science* (生物多样性), **18**, 182–187. (in Chinese with English abstract)
- Luo HF, Qi HY, Zhang HX (2004) Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil. *World Journal of Microbiology and biotechnology*, **20**, 509–515.
- Mehnaz S, Baig DN, Lazarovits G (2010) Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *Journal of*

Ardanov P, Ovcharenko L, Zaets I, Kozyrovska N, Pirttilä AM (2011) Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biological*

- Microbiology and Biotechnology*, **20**, 1614–1623.
- Rincón-Rosales R, Villalobos-Escobedo JM, Rogel MA, Martínez J, Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E (2013) *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **63**, 3423–3429.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, **278**, 1–9.
- Serrato RV, Sasaki GL, Cruz LM, Carlson RW, Muszyński A, Monteiro RA, Pedrosa FO, Souza EM, Iacomini M (2010) Chemical composition of lipopolysaccharides isolated from various endophytic nitrogen-fixing bacteria of the genus *Herbaspirillum*. *Canadian Journal of Microbiology*, **56**, 342–347.
- Stepniewska Z, Kuźniar A (2013) Endophytic microorganisms—promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied Microbiology Biotechnology*, **97**, 9589–9596.
- Sun L (孙磊), Shao H (邵红), Liu L (刘琳), Zhang RY (张瑞英), Zhao LH (赵立华), Li LB (李潞滨), Yao N (姚娜) (2011) Diversity of siderophore-producing endophytic bacteria of *Cymbidium goeringii* roots. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), **51**, 189–195. (in Chinese with English abstract)
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 2731–2739.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2011) Study on mechanisms of colonization of nitrogen-fixing PGPB, *Klebsiella pneumoniae* NG14 on the root surface of rice and the formation of biofilm. *Current Microbiology*, **62**, 1113–1122.
- Von Bulow JFW, Döbereiner J (1975) Potential for nitrogen-fixation in maize genotypes in Brazil. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **72**, 2389–2393.
- Wang MX, Liu J, Chen SL, Yan SZ (2012) Isolation, characterization and colonization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacteria XG32 and DP24. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**, 1155–1162.
- Wilkinson HH, Siegel MR, Blankenship JD, Mallory AC, Bush LP, Schardl CL (2000) Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 1027–1033.
- Wu YX (武永秀), Song TT (宋彤彤), Zhang RY (张瑞英), Liu L (刘亮), Shao H (邵红), Li LB (李潞滨), Sun L (孙磊) (2014) Diversity of culturable endophytic bacteria in the roots of *Cymbidium goeringii* from Tianmu Mountain. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), **5**, 170–173. (in Chinese with English abstract)
- Yang N (杨娜), Yang B (杨波) (2011) Diversity and seasonal fluctuations of endophytic bacteria isolated from the root tissues of *Cymbidium faberi*. *Plant Science Journal* (植物科学学报), **29**, 156–163. (in Chinese with English abstract)

(责任编辑: 郭良栋 责任编辑: 时意专)