

Ugan 古河道胡杨可培养内生细菌的多样性

卡依尔·玉素甫¹, 谢仁娜依·甫拉提², 玛丽帕·吐达洪¹, 马丽艳木·阿木东¹,
艾尼江·尔斯曼¹, 祖母拉提·阿布都热依木¹, 艾尔肯·热合曼^{1*}

¹新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046

²新疆师范大学生命科学学院, 乌鲁木齐 830054

摘要:【目的】为了了解塔河废弃古河道胡杨可培养内生细菌的多样性。【方法】从2棵胡杨树干部抽出其内存液, 采用3种不同的培养基对样品的内生细菌进行了分离纯化; 对它们进行16S rDNA测定和系统进化分析。【结果】分离纯化不同表型的细菌62株, 对它们的16S rDNA序列分析表明, 62株菌分别属于4个大类群; 厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、 α -变形菌纲(Alpha Proteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gamma Proteobacteria), 18个属, 32个种; 芽孢杆菌属和假单胞菌属是胡杨可培养内生细菌的优势细菌种群, 它们分别占已测种群的40.32%、16.13%。其中菌株KTH-63为葡萄球菌科的潜在的新属新种, 它与最近源菌株的16S rDNA序列相似率为92.491%; 9株菌KLH-21、KLH-1、KTH-8、KTH-14、KNA-26、KLH-18、KTH-20、KNA-3、KLH-25是潜在的新种(16S rDNA相似率为96.089%–97.769%), 胡杨树干内存液中潜在新种的发现率高达总分离检测菌株的16.13%。本研究获得的胡杨可培养内生细菌的群落结构数据给植物内生细菌新增了10个属, 18个种。【结论】胡杨具有多样性极其丰富的可培养内生细菌菌种资源, 土著新种的发现频率超出了预期, 胡杨可培养内生细菌的群落结构极大地刷新了植物内生细菌的种群记录, 极具进一步发掘的潜力。

关键词: Ugan河, 胡杨, 内生细菌, 16S rDNA, 多样性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0178-11

胡杨(*Populus euphratica* Oliv)分类学上属于杨柳科杨属, 落叶乔木, 生长在中纬度的干旱荒漠地区, 具有抗寒、抗热、抗干旱、抗风沙、耐盐碱等优良性状, 是新疆荒漠中分布最广的落叶树种, 也是特有的荒漠森林树种^[1]。塔里木河流域分布着全世界最大的一片天然胡杨林, 其面积近30万公顷^[2], 它约占全国胡杨林总面积的90%和全世界胡杨林总面积的55%以上^[2–3]。胡杨林是荒漠陆地中生产力最高, 结构与功能最完善, 最稳定的生态系

统^[1,4]。塔河中游胡杨林是衰败和破碎化程度较低, 保存较完整的原始林地^[1]。Ugan河是已断流废弃123年处于隔离状态的干枯古河道^[5], 河沿岸分布着密度较高的天然胡杨林。Ugan河沿岸存在极少数废弃的古民居、圈棚和依稀可辨的水井遗迹, 是人口稀少的罗布泊先民游牧生息的废弃地。胡杨树干内存液是胡杨对于干旱高温环境条件适应性的产物^[6], 是植物应对高蒸发量的蓄水储备, 是胡杨树利用它发达的根系吸收地下水, 通过微管组织输送

基金项目:新疆维吾尔自治区科技支疆项目(201091236); 国家自然科学基金(31060002); 新疆特殊环境微生物实验室开放课题(XJYS0203-2010-01)

* 通信作者。Tel: +86-991-8583450; E-mail: erkin1106@163.com

作者简介:卡依尔·玉素甫(1983–), 男(维吾尔族), 新疆人, 硕士研究生, 研究方向为资源微生物学。E-mail: abdukaharyusuf@163.com

收稿日期: 2010-08-18; **修回日期:** 2010-10-20

到树干、树枝及其末端的体内的蓄水。

植物内生细菌 (*Endophytic bacteria*) 是定殖在植物组织内部, 但不引起明显的病害症状的细菌类群^[7]。国际上已有许多从不同植物中分离可培养内生细菌的报道。Fiona 等从生长在 BTEX (Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene) 污染的杨树的根、茎、叶部分取样而分离了具有不同表型的 121 株内生细菌, 用 16S rDNA 序列鉴定, BOX-PCR 基因组 DNA 指纹技术来确定分离菌株的进化地位, 所有分离菌株隶属于 21 个属, 测定了分离菌株对目标污染物, 重金属, 抗生素的耐性, 揭示了杨树内生细菌在提高植物修复过程的潜在特性^[8]。Rodrigo 等从甘蔗的根际, 根内和茎部取样而分离了 154 株可培养内生细菌并鉴定 16S rDNA 序列, 结果发现所有的分离菌株隶属于 4 个属, 其中伯克霍德菌属 (*Burkholderia*) 占优势^[9]。Pious 等通过 16S rDNA 序列鉴定分离于香蕉茎尖培养物的可培养和免培养内生细菌, 这些细菌隶属于 5 个门和 20 个不同的属^[10]。Anastasia Venieraki 等从希腊不同地区的小麦根际中分离了 17 株可培养固氮菌, 隶属于 3 个属, 并且研究促进植物生长的菌株的特性^[11]。在国内河北大学生科院的 Jigang 等把毛竹根际, 根表面和根内组织作为样品使用 2 种培养基分离了 182 株菌株, 鉴定了属于 22 个属的 56 个不同的分类单元的 16S rDNA 序列^[12]。首都师范大学生科院的 Lei 等人把河北省农业试验站的水稻作为样品分离了可培养内生细菌, 克隆 192 株菌株的 16S rDNA 基因, 并鉴定了 52 个分类单元的基因序列^[13]。近年来, 从植物内生细菌中分离新的次生代谢活性物质和利用内生菌对植物病原菌进行生物防治成为了国内外研究的热点。截至到 2008 年在各种植物中发现的可培养植物内生细菌已超过 129 种, 分别属于 54 个属^[14-16], 其中分离到的新种也相当可观。

袁秀英等人 2007 年对内蒙古的胡杨根际真菌与内生真菌多样性进行了研究^[17]。塔里木大学的范君华等人对阿拉尔市果林地和胡杨林地土壤养分进行测定, 分离了细菌, 并且测定了它们的酶活性^[18]。上述研究中均使用了经典的形态表型分类法, 只是在属的范畴上进行了粗略的描述, 没能将分离菌株鉴定到种的水平。本研究室的王宁等人对塔河胡杨林特殊病灶微生物进行了分离和报道^[19]; 孜

来古丽等人从塔河胡杨林样品中分离 22 个菌株, 发现其中有 3 个潜在的新种^[20]; 何香等人从新疆沙雅县的胡杨林中发现新菌种沙雅鞘氨醇杆菌 (*Spingobacterium Shayense*) 并进行了报道^[21]。针对塔河胡杨林的胡杨内生菌种资源, 在国内外文献中, 尚未见系统地进行分离和用现代细菌分类学方法进行研究的报道。

由于断流年代比较久远, Ugan 河与当今的塔河胡杨林之间早已失去利用洪水散播种子的, 通过互换种子来维系相互之间基因流畅通及借此传播内生菌的机制; 形成了在时间和空间上相互隔离封闭的生态体系。对 Ugan 河胡杨林这种极其原始独特的生态系统中的胡杨可培养内生细菌种群进行系统的分离鉴定, 构建菌种资源库并进行系统发育分析, 可以搞清胡杨可培养内生细菌的群落结构, 分离拯救一批不可多得的珍稀菌种, 为将来的科学研究和在工农业生产应用做好菌种资源的种质、数据和抗逆基因库的储备。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:新疆尉犁县卡尔曲尕乡西南部断流废弃 122 年的 Ugan 河沿岸的两颗胡杨作为采样目标 (N 41°00', E 85°04'), 见图 1, 用年轮钻在胡杨树干钻孔, 已灭菌的离心管收集内存液, 置于 4℃ 备用, 树干上的钻孔用预先准备好的特制胡杨木桩填塞严实, 以防胡杨树枯死。

1.1.2 主要试剂和仪器:PHB-8 型笔式 pH 计 (上海虹益仪器仪表有限公司); Taq DNA 聚合酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成; PCR 产物纯化试剂盒由上海生工生物工程技术服务有限公司提供; PCR 仪为 ALD. 1244 型, 购自 BIO. RAD 公司; 凝胶成像分析仪 ALPHAIMAGERTM 2200 及成像软件 AlphaEase 4.1.0, 购自 AlphaInnotech 公司; 恒温振荡摇床和恒温培养箱购自江苏省金坛市医疗仪器厂。

1.1.3 培养基:本实验中采用溶菌肉汤培养基 LB (胰蛋白胨 10 g、酵母浸粉 5 g、氯化钠 10 g), 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 TSA (胰蛋白胨 15 g、大豆蛋白胨 7.5 g、氯化钠 30 g), 牛肉膏蛋白胨培养基 NA (牛肉膏 30 g、蛋白胨 5 g、氯化钠 5 g) 3 种培养基。

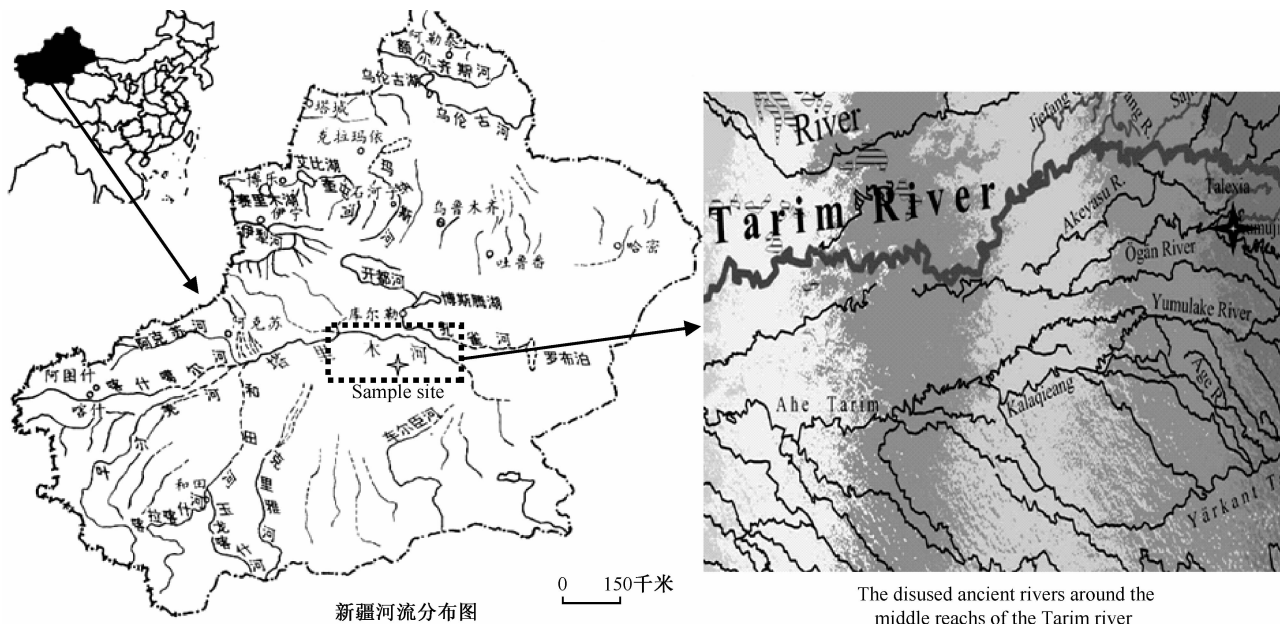


图 1 塔河中游 Ugan 古河道采样点示意图

Fig.1 Sample site in the Ugan river of the middle reaches of the Tarim River in southern Xinjiang, China. In this figure the Ugan river (right) and Ugan river is the same river, the indicate the sample site.

1.2 菌株的分离培养

把采来的两棵胡杨树茎秆液等量混合,用置于冰浴的 LB, TSA 和 NA 液体培养基稀释至 10^{-1} - 10^{-6} 倍,取 100 μ L 涂布到上述的 3 种固体培养基,分别在 28 $^{\circ}$ C - 37 $^{\circ}$ C 培养 3 - 7 d。根据细胞与菌落形态、颜色、大小分别挑取不同类型的细菌,并在上述的 3 种培养基上划线纯化,纯化后的内生细菌用含 30% 甘油的 LB 培养基于 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 培养基优势度指数

培养基优势度通过下列公式计算: $D = N/N_T$

其中 N 为各种培养基分离的内生细菌的种类数量, N_T 为分离到内生细菌的全部种类数量^[22]。

1.4 DNA 提取及 16S rDNA 的扩增

DNA 提取参照刘刚等的方法^[23] 进行。16S rDNA 扩增采用细菌通用引物^[24] 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTGTTACGACTT-3') 进行。PCR 反应体系 (50 μ L): DNA 模板约 3.0 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5.0 μ L, 10 mmol/L 的 P1 和 P2 各 1 μ L, dNTP (10 mmol/L) 4 μ L, Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, 加灭菌双蒸水至 50.0 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应结束

后,取 2 - 3 μ L PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测。PCR 产物送到上海生物工程有限公司进行 16S rDNA 完整长度测序。

1.5 系统发育分析

测序结果在 EZTAXON (EzTaxon server 2.1) 和 BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) 上进行分析。用 CLUSTAL X 进行多序列比对^[25], 系统进化矩阵根据 Kimura 模型估算^[26], 用 MEGA4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件采用邻接法 (Neighbor Joining) 聚类分析, 并构建出系统进化树^[27]。

2 结果和分析

2.1 样品特征

胡杨内存液为淡棕色的透明液体, 盐浓度较高, 偏碱性, PH 为 8.65。

2.2 菌株的分离

用 3 种不同培养基 (LB, TSA, NA) 进行培养与筛选, 通过菌落特征和显微细胞形态观察, 从胡杨茎秆内存液中分离得到 62 株细菌, 隶属于 32 个物种。从不同培养基分离效果来看, 添加 3% NaCl 的 TSA 和添加 1% NaCl 的 LB 培养基分离到的菌落最多, 菌落形态较丰富, 而添加 0.5% NaCl 的 NA 培养基

分离到的菌落较少,菌落形成单位少,且菌落形态单一。

2.3 胡杨内生细菌的群落结构与多样性

对上述 62 个菌株的 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增获得 1400 bp-1500 bp 的 DNA 片段,通过测定碱基序列,获取了所有菌株的 16S rDNA 序列信息,这些菌株的群落结构及同源性分析见表 1。研究结果显示,62 个分离菌株属于细菌域的 4 个大的系统发育类群,厚壁菌门 (*Firmicutes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、 α -变形菌纲 (*Alphaproteobacteria*)、 γ -变形菌纲 (*GammaProteobacteria*)、18 个属即芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、库克氏属 (*Kocuria*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、*Oceanobacillus*、微球菌属 (*Micrococcus*)、动性微菌属 (*Planomicrobium*)、动性球菌属 (*Planococcus*)、短杆菌属 (*Brevibacterium*)、泛菌属 (*Pantoea*)、巨型球菌属 (*Macrococcus*)、普罗威登菌属 (*Providencia*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、发光杆菌属 (*Photobacterium*)、冷杆菌属 (*Psychrobacter*)、布赫纳氏菌属 (*Brenneria*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)。其中芽孢杆菌属(25 株)是优势属占 40.32%,其次是假单胞菌属(10 株)为 16.13%。

芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的分离率最高,从两棵胡杨中总分离到 25 株该属的菌株,分别属于以下 6 个种 *Bacillus safensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus sonorensis* 和 1 个待定的潜在新种 KLH-1。其中 *Bacillus safensis* 菌株的突变品系有 11 株(KTH-49、KTH-17、KTH-3、KLH-40、KLH-37、KLH-33、KLH14、KLH-15、KNA-29、KNA-9、KNA-6),分离率最多,它们 16S rDNA 序列的变异率范围为 0 - 0.768%,菌株 KLH-1 在 GenBank 上与最相似菌株 *Bacillus anthracis* (AB190217) 的 16S rDNA 相似率为 96.797%,是潜在的新种^[28-30]。在多种植物内生细菌中分离到的芽孢杆菌属占多数^[31],胡杨内生细菌分离结果也与其一致。

假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 是分离率次之的细菌,存在于各种环境,它与多环芳烃降解有关,并直接参与降解过程^[32-34]。分离到 10 株该属的菌株,隶属于以下 1 个种 *Pseudomonas xanthomarina* 和 3

个待定的潜在新种:KTH-14、KTH-8、KNA-4。其中 KTH-14 在 GenBank 上与最相似菌株 *Pseudomonas pelagia* (EU888911) 16S rDNA 相似性为 96.559%; KTH-8 在 GenBank 上与最相似菌株 *Pseudomonas argentinensis* (AY691188) 16S rDNA 相似性为 97.473%; KNA-4、KNA-37、KNA-36、KNA-26、KNA-2、KTH-43、KTH-62 在 GenBank 上与最相似菌株 *Pseudomonas xinjiangensis* (EU286805) 16S rDNA 相似率为 97.116% - 97.730% 之间,这 7 个菌株相互间的相似率为 99.8% - 100%,是同一个潜在的新种的不同变种。

除了以上出现频率较高的优势细菌属以外,还分离到了其它 16 个属的细菌,每个属内的菌株数量虽然不多,但是能充分地反映胡杨内生细菌多样性和群落结构的特征,出现潜在新种的频率也较高。其中以下 6 个属各发现 1 株潜在的潜在新种:KTH-63 与最近源菌种 *Macrococcus brunensis* (AY119686) 的 16S rDNA 相似率仅为 92.491%,是葡萄球菌科的 1 个潜在的新属新种^[29]; *Acinetobacter* 属(4 株,2 种序列),其中 KNA-3 与 *Acinetobacter lwoffii* (X81665) 的 16S rDNA 相似率为 97.769%; *Kocuria* 属(4 株,2 种序列),其中 KLH-25 与 *Kocuria rosea* (X87756) 16S rDNA 相似率为 97.740%; *Halomonas* 属(1 株,1 种序列),KTH-20 与 *Halomonas sulfidaeris* (AF212204) 的 16S rDNA 相似率为 97.459%; *Rhizobium* 属(1 株,1 种序列),KLH-21 与 *Rhizobium rubi* (D14503) 的 16S rDNA 相似率为 96.089%; *Oceanobacillus* 属(2 株,1 种序列),KLH-18 与 *Oceanobacillus iheyensis* (BA000028) 的 16S rDNA 相似率为 97.758%; 共计分离到 10 株新的分类单元的菌株,胡杨树干内存液中潜在新种的发现率高达总分离检测菌株的 16.13%。其它 10 个属的分离菌株与已知近源菌株的 16S rDNA 相似率为 98.21% - 100%,分别简介如下: *Staphylococcus* 属(3 株,3 种序列), *Brevibacterium* 属(2 株,1 种序列), *Pantoea* 属(1 株,1 种序列), *Photobacterium* 属(1 株,1 种序列), *Psychrobacter* 属(1 株,1 种序列), *Brenneria salicis* 属(1 株,1 种序列), *Providencia* 属(1 株,1 种序列), *Micrococcus* 属(2 株,2 种序列), *Planomicrobium* 属(1 株,1 种序列), *Planococcus* 属(1 株,1 种序列)。

表 1 Ugan 古河道胡杨可培养内生细菌的群落结构和 16SrDNA 序列同源性

Table 1 Endophytic bacterial community of *Populus euphratica* at disused ancient Ugan river and 16S rDNA homology

Numbers of isolates	Genus	Closest species	Origin	Homology/%
KLH-14	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	99.65 *
KLH-40		<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	99.65
KNA-29		<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	99.65
KTH-3		<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	99.85 *
KTH-17		<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	99.85
KLH-15		<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	99.37
KLH-33		<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	99.79
KLH-37		<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	99.51
KTH-49		<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	99.23
KNA-6		<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	100.00
KNA-9		<i>Bacillus safensis</i> (AF234854)	Spacecraft	99.44
KNA-38		<i>Bacillus pumilus</i> (ABRX01000007)	Soil	99.72
KNA-20		<i>Bacillus pumilus</i> (ABRX01000007)	Soil	99.38
KNA-21		<i>Bacillus pumilus</i> (ABRX01000007)	Soil	99.93
KLH-31		<i>Bacillus pumilus</i> (ABRX01000007)	Soil	99.85
KTH-48		<i>Bacillus tequilensis</i> (EU138487)	Shaft-tomb	99.83
KTH-26		<i>Bacillus tequilensis</i> (EU138487)	Shaft-tomb	99.75
KTH-27		<i>Bacillus tequilensis</i> (EU138487)	Shaft-tomb	99.74
KTH-1		<i>Bacillus tequilensis</i> (EU138487)	Shaft-tomb	100.00
KNA-8		<i>Bacillus tequilensis</i> (EU138487)	Shaft-tomb	99.91
KNA-7		<i>Bacillus atrophaeus</i> (AB021181)	Soil	99.93
KTH24-2		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (EU138467)	Soil	99.83
KTH-61		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (EU138467)	Soil	100.00
KLH-26	<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus sonorensis</i> (AF302118)	Soil	98.64
KLH-1		<i>Bacillus anthracis</i> (AB190217)	Soil	96.79
KLH-3		<i>Staphylococcus pasteurii</i> (AF041361)	Animal food	99.36
KTH6-1		<i>Staphylococcus xylosus</i> (D83374)	Human skin	99.58
KTH6-2		<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>Bovis</i> (AB233327)	Cow nostril	99.03
KLH-18		<i>Oceanobacillus iheyensis</i> (BA000028)	Deep-sea	97.76
KTT-14		<i>Oceanobacillus iheyensis</i> (BA000028)	Deep-sea	98.75
KTH-39		<i>Planococcus rifietoensis</i> (AJ493659)	Algal mat	99.04
KTH-63		<i>Macrococcus brunensis</i> (AY119686)	The skin of llamas	92.49
KTH-47		<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (D55729)	sea food	98.54
KNA-26		<i>Pseudomonas xinjiangensis</i> (EU286805)	Desert sand	97.23
KNA-4		<i>Pseudomonas xinjiangensis</i> (EU286805)	Desert sand	97.25
KNA-2		<i>Pseudomonas xinjiangensis</i> (EU286805)	Desert sand	97.19
KNA-36		<i>Pseudomonas xinjiangensis</i> (EU286805)	Desert sand	97.26
KNA-37		<i>Pseudomonas xinjiangensis</i> (EU286805)	Desert sand	97.73
KTH-62		<i>Pseudomonas xinjiangensis</i> (EU286805)	Desert sand	97.12
KTH-43		<i>Pseudomonas xinjiangensis</i> (EU286805)	Desert sand	97.26
KLH-8		<i>Pseudomonas Xanthomarina</i> (AB176954)	Marine ascidian	99.03
KTH-14		<i>Pseudomonas pelagia</i> (EU888911)	Green alga	96.56
KTH-8		<i>Pseudomonas argentinensis</i> (AY691188)	Rhizospheric soil	97.47
KNA-3	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (X81665)	Root	97.77 *
KLH-24		<i>Acinetobacter lwoffii</i> (X81665)	Root	97.77
KLH-38		<i>Acinetobacter lwoffii</i> (X81665)	Root	98.89
KLH-34		<i>Acinetobacter johnsonii</i> (X81663)	Soil	99.01
KLT-27		<i>Photobacterium halotolerans</i> (AY551089)	Lake	99.30
KTH-20		<i>Halomonas sulfidaeris</i> (AF212204)	Deep-sea	97.45
KLH-28		<i>Psychrobacter pulmonis</i> (AJ437696)	Lungs of lambs	99.63

续表 1

Numbers of isolates	Genus	Closest species	Origin	Homology%
KLH-19	<i>Brenneria</i>	<i>Brenneria salicis</i> (Z96097)	Plant	99. 28
KTH-7	<i>Providencia</i>	<i>Providencia rettgeri</i> (AM040492)	Swab samples	99. 64
KTH-64	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea septica</i> (EU216734)	Maize stalk	98. 20
KLH-21	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium rubi</i> (D14503)	Root	96. 08
KNA-24	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacterium halotolerans</i> (AJ620368)	Saline soil	100. 00
KTH-57		<i>Brevibacterium halotolerans</i> (AJ620368)	Saline soil	99. 93
KLH-25	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria rosea</i> (X87756)	Saline soil	97. 74
KLH12		<i>Kocuria rosea</i> (X87756)	Saline soil	99. 85
KTH52		<i>Kocuria rosea</i> (X87756)	Saline soil	99. 23
KNA-32		<i>Kocuria rhizophila</i> (Y16264)	rhizoplane	99. 85
KTH-35	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (FJ214355)	roots	99. 36
KLH-29		<i>Micrococcus antarcticus</i> (AJ005932)	Antarctica	98. 53

* Isolate KLH-14, KLH-40 and KNA-29 have the same sequence similarities with *Bacillus safensis* (AF234854) in GenBank, but their mutual similarities were 99. 0 ~ 99. 2%. KTH-3 and KTH-17 have the same sequence similarities with *Bacillus safensis* (AF234854) in GenBank, but their mutual similarities were 99. 6%. KNA-3 and KLH-24 have the same sequence similarities with *Acinetobacter lwoffii* (X81665) in GenBank, but their mutual similarities were 97. 8%.

2.4 培养基对可培养内生细菌分离的特性

不同培养基筛选分离的细菌多样性有明显的差异,统计结果见表 2。TSA 培养基分离得到细菌多样性最高,NA 培养基分离得到细菌的多样性最低。TSA 培养基分离得到 24 株细菌,他们分属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、库克氏属(*Kocuria*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、*Oceanobacillus* 属、微球菌属(*Micrococcus*)、动性微菌属(*Planomicrobium*)、动性球菌属(*Planococcus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、泛菌属(*Pantoea*)、巨型球菌(*Macrococcus*)、普罗威登菌属(*Providencia*)、盐单胞菌属(*Halomonas*) 13 个属;LB 培养基分离得到 21 株细菌,它们分属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、库克氏属(*Kocuria*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、*Oceanobacillus*、微球菌属(*Micrococcus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、冷杆菌属(*Psychrobacter*)、布赫纳氏菌属(*Brenneria*) 11 个属;NA 培养基来分离得到 17 株细菌,分属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、库克氏属(*Kocuria*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)5 个属。培养基优势度指数计算显示(见表 2),TSA 培养基的优势度指数最高为 0. 531,其次是 LB 培养基为 0. 500,最低的是 NA 培养基,仅为 0. 281。

表 2 TSA, LB, NA3 种培养基分离菌株的多样性与优势度指数
Table 2 The diversity and dominant index of endophytic bacteria on 3 types of different cultural medium (LB, TSA and NA)

Medium	PH	Salt content	Genus	Species	Strain	Dominant index
TSA	7. 5 ~ 8	3%	13	17	24	0. 531
LB	7. 5 ~ 8	1%	11	16	21	0. 500
NA	7. 5 ~ 8	0. 5%	5	9	17	0. 281

2.5 可培养细菌的系统进化分析

鉴定的 62 个菌株隶属于 32 个物种,虽然有些物种有 2 个和 2 个以上不同的突变株,但他们在 GenBank 上有相同的模式菌株,例如:KNA-26、KAN-2、KNA-4、KNA-36、KNA-37、KTH-43、KTH-62 这 7 个菌株在 GenBank 上有相同的模式菌株(*Pseudomonas xinjiangensis* (EU286805))。因此,用 32 个物种的菌株代表所有菌株来构建系统进化树,这 32 个物种的序列已在 GenBank 注册,它们在 GenBank 上的注册号为 HM854230-HM854259、HM371419、HQ009853,见图 2。所有可培养菌聚类于 4 个大的类群,62 个菌株中厚壁菌门(*Firmicutes*)占细菌多样性的主要地位,占总菌数的 53. 23% (33/62),其次是 γ -变形菌纲(*Gamma Proteobacteria*)占总数的 32. 26% (20/62),出现频率第三是放线菌门(*Actinobacteria*)占 12. 90% (8/62),占总数比例最小的是 α -变形菌纲(*Alpha Proteobacteria*)为 1. 61% (1/62)。分析发现,许多可能的新种分散于进化树的多个不同分枝,反映了胡杨可培养内生细菌资源的丰富性和新颖性。

厚壁菌门(*Firmicutes*)分离到的菌株数量最多,多样性较高,有 6 个属(*Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Planococcus*, *Planomicrobium*, *Macrococcus*, *Staphylococcus*)。其中 3 个属即 *Oceanobacillus*, *Planococcus*, *Planomicrobium* 在所检索的数个数据库有关内生细菌的文献中^[8,12,16,35],均没有发现从植物中分离出这 3 个属菌株的报道。在厚壁菌门中,发现 1 个潜在新属新种 KTH-63 和 2 个潜在的新种菌株 KLH-1 和 KLH-18,这些新分类单元菌株的分类学地位的最终确定,将给植物内生细菌新增 4 个属,5 个种。

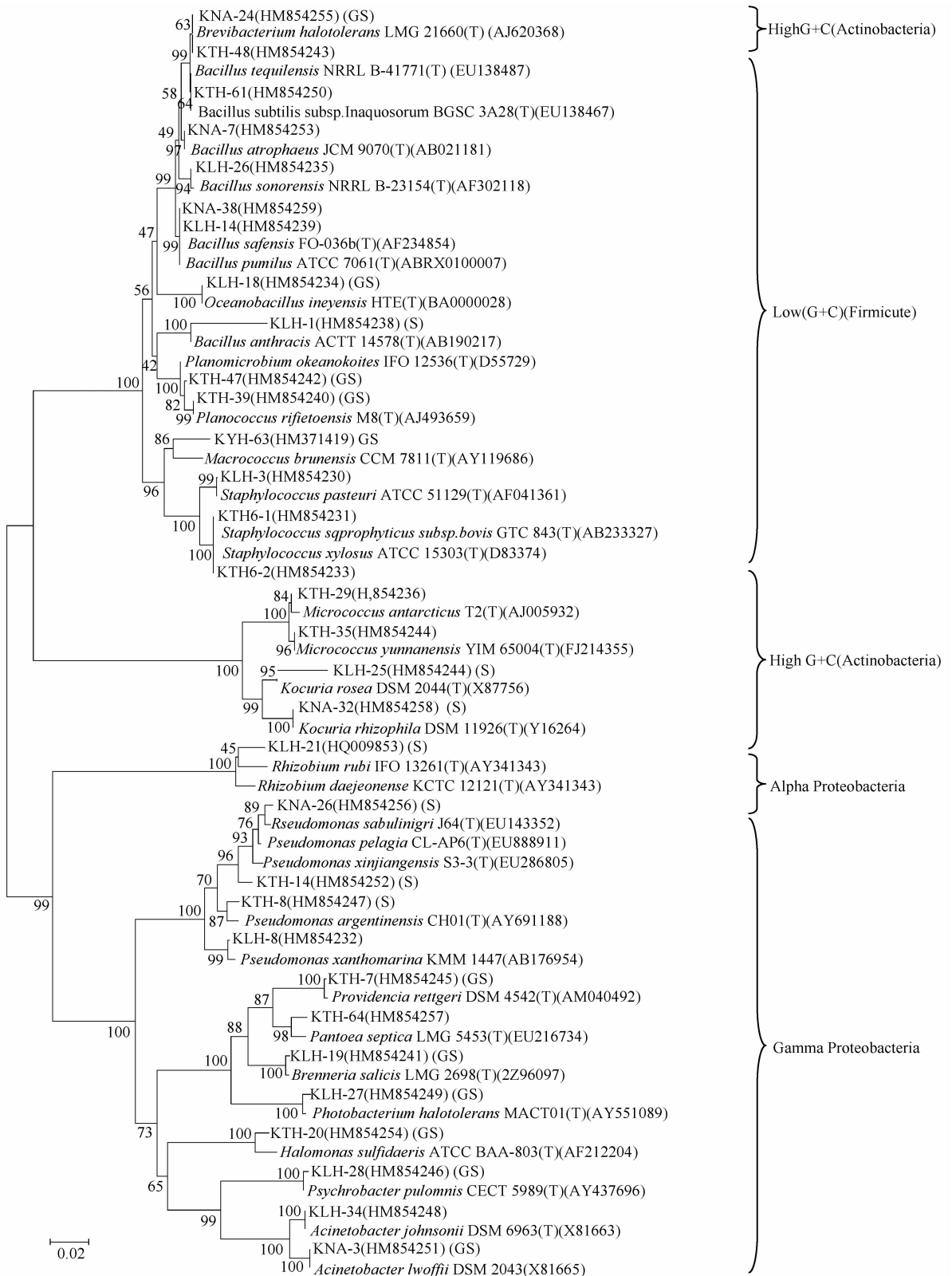


图2 胡杨可培养内生细菌的16S rDNA的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic relationships among bacterial isolates from *populus euphratica* stands based on the 16S rDNA sequences. Phylogenies were inferred using the neighbor-joining analysis; The numbers above each branch indicate bootstrap values of distance, the bootstrap values were obtained after a bootstrap test with 1,000 replications; The numbers in parentheses are accession numbers of sequences; Scale bar indicates 2% sequence divergence; S and GS in the parentheses was the species, genus and species newly added to the plant endophytic bacterial categoria by this work, respectively.

γ -变形菌亚门 (*GammaProteobacteria*) 在属水平上的多样性最为丰富, 含有 8 个不同的属 (*Pseudomonas*, *Halomonas*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Photobacterium*, *Brenneria*, *Providencia*, *Pantoea*), 其中 *Pseudomonas* 属与 *Pantoea* 属在植物内生细菌中常见, 其余 5 个属 *Halomonas*, *Psychrobacter*, *Photobacterium*, *Brenneria*, *Providencia* 在有关内生细菌的文献中^[8,12,16,35], 均没有发现从植物中分离出这 5 个属菌株的报道。 γ -变形菌亚门中潜在新种的发现率最高, 例如: 菌株 KTT-14、KTH-8、KTH-20、KNA-3、KNA-26 与其最相似菌株相似率均低于 98.00%, 是潜在的新种。该类群将给植物内生细菌新增 5 个属, 9 个种。

放线菌门 (*Actinobacteria*) 分离到 *Kocuria*, *Micrococcus*, *Brevibacterium* 这 3 个属。其中 *Brevibacterium* 属多为盐含量较高的土壤和海洋中分离的, 并且在有关植物内生细菌的文献中^[8,12,16,35], 均没有发现从植物中分离出这 1 个属菌株的报道, 该菌株给植物内生菌新增加了 1 个属 1 个种。KNA-32 与 *Kocuria rhizophila* (Y16264) 同源性达到 99.85%, 可以看作是 *Kocuria rhizophila* 的突变品系; 在有关植物内生细菌的相关文献中^[8,12,16,35], 均没有发现从植物中分离出该菌种的报道, KNA-32 给植物内生菌新增加了 1 个种。菌株 KLH-25 与 *Kocuria rosea* (X87756) 16S rDNA 相似率低于 98.00%, 是潜在的新种。本研究中分离到的放线菌门菌株将给植物内生细菌新增了 1 个属, 3 个种。

α -变形菌亚门 (*Alphaproteobacteria*) 只分离到了 1 株菌 KLH-21, 它与 *Rhizobium* 属聚类于进化树上的同一个大分支(图 2), 并且与最相似菌 *Rhizobium rubi* (D14503) 的 16S rDNA 相似率为 96.08%, 是根瘤菌类群中潜在的新种, 它给植物内生细菌新增了 1 个新种。根瘤菌是一大类群能在豆科植物结瘤固氮的细菌的统称^[36], 胡杨树干内存液中分离到了根瘤菌, 这表明从胡杨树干液中可以分离胡杨各组织器官中内生细菌, 而且胡杨根部很可能具有固氮能力。综上所述, 在本研究中分离到的胡杨内生细菌中有 10 个属和 18 个种是未见于任何有关植物内生细菌报道的。

3 讨论

Ugan 河胡杨内生菌群落结构是未受现代文明

冲击前, 近代塔河胡杨内生菌区系的缩影。本文分离鉴定的 62 株胡杨内生菌株, 隶属于 18 个属, 32 个种。芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 与假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 是优势属。分离菌株 KTH-63 与其系统发育关系最密切的模式菌株 *Macrococcus brunensis* (AY119686) 之间存在较大的遗传差异, 16S rDNA 相似率低于定属标准, 是潜在的新属新种; 9 株菌 KLH-21、KLH-1、KTH-8、KTH-14、KNA-26、KLH-18、KTH-20、KNA-3、KLH-25 与其系统发育关系最密切的模式菌株的 16S rDNA 相似率为 96.08% - 97.76%, 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最终的分类地位。在 18 个属中 9 个属即 *Brevibacterium*, *Photobacterium*, *Psychrobacter*, *Brenneria*, *Planomicrobium*, *Oceanobacillus*, *Planococcus*, *Providencia*, *Halomonas* 属在有关植物内生细菌的文献^[8,12,16,35] 中还未见报道。本研究给植物内生可培养细菌范畴新增了 10 (1 个潜在的新属 + 作为内生细菌在胡杨中首次发现的 9 个已知属) 个属, 18 (10 个潜在新种 + 作为内生细菌在胡杨中首次发现的 8 个已知种) 个种。

炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*, AB190217) 是危害性最强的致病菌, 主要是绵羊、牛等食草动物炭疽病的病原菌, 也可传染人类和食肉动物^[37]。本研究分离到的菌株 KLH-1 (HM854238) 与 *Bacillus anthracis* (AB190217) 的 16S rDNA 相似率为 96.797%, 有较高的遗传差异。菌株分离源胡杨树干液是当地人在胡杨林放牧缺水时经常应急饮用的水源, 胡杨树皮、树叶和嫩枝是牲畜的草料。从样点行政区划所属地的尉犁县卡尔区孕乡医院和畜牧站了解到: 到目前为止, 在居民和家畜中没发现任何皮肤炭疽、肠炭疽、肺炭疽等炭疽病的现象。因而基本上可以排除菌株 KLH-1 与 *Bacillus anthracis* 具有相同的致病性的可能性。

利用优势度指数分析各培养基分离到内生细菌的多样性, TSA 培养基优势度指数为 0.531, LB 培养基优势度指数为 0.500 和 NA 培养基的优势度指数为 0.281。这可能主要是因为 TSA 培养基的盐含量高, 与胡杨树干内存液的盐含量相近, 因此胡杨可培养内生细菌在 TSA 培养基上可获得较好的生存环境。

胡杨树干内存液具有季节性的变化规律, 春季开始积累, 夏季储量达到高峰以应对烈日照射下的蒸腾, 秋季减少借此减轻负担, 冬季消失以防植物躯

干冻裂。该液中的细菌种群也自然相当于胡杨各组织器官中内生菌群落的复合体,能比较客观地展示内生细菌的多样性和群落结构,是分离筛选胡杨可培养内生细菌的高效便捷的好样品,例如 *Rhizobium rubi* 是专门在根部结瘤固氮的细菌; *Kocuria rhizophila* 与 *Acinetobacter lwoffii* 也是从根与根面分离的细菌; *Micrococcus yunnanensis* 从根和茎部分离的细菌; *Pantoea septica* 从茎内分离的细菌; *Planococcus rifietoensis*, *Pseudomonas pelagia*, *Brenneria salicis* 也都是从不同植物中分离的细菌(表1)。本研究充分展现了胡杨内生细菌的多样性和特异性,并且进一步丰富了植物内生细菌的群落结构。每个种属的内生细菌在群体结构中的作用如何,各菌种又是如何与寄主之间相互影响互惠互利的,都是有待继续深入探讨的课题。

内生细菌作为潜在的生防资源,已成为近年来生防菌剂研制开发的热点。何红等^[38]从辣椒中分离出内生芽孢杆菌,对辣椒炭疽病菌、香蕉枯萎病菌和黄瓜枯萎病菌有较强和较稳定的拮抗作用。黎起秦等^[39]从番茄中分离到对番茄青枯病具有防病效果的内生芽孢杆菌。Rauye Shwaran 等^[40]从鹰嘴豆、向日葵、辣椒植物茎内分离到枯草芽孢杆菌、假单胞杆菌等25株不同内生细菌,其中10株对镰刀菌、菌核菌、丝核菌有明显抑制作用,并且对鹰嘴豆具有促进作用。有关植物内生细菌生防作用的报道涉及棉花、马铃薯、玉米、水稻、橡树(*Zelkova spach*)等植物^[41]。多年来胡杨一直受到褐色斑点病、黑色斑点病、叶锈病、黑星病、栅锈菌病、树干腐烂病、春尺蠖等病原菌和害虫的危害,这些病害极大地加剧了胡杨林的衰败与生态体系的破碎化的进程。从胡杨中分离可培养内生细菌,检测出一批具有生物防治作用的内生菌资源,将在提高胡杨树的抗病,抗虫能力和促进胡杨林复壮等方面具有潜在的实践意义。

参考文献

- [1] 程小玲,刘淑清. 浅议塔里木胡杨保护区胡杨林的保护. 中南林业调查规划(*Central South Forest Inventory and Planning*),2004,23(1):33-35.
- [2] 王世绩. 全球胡杨林现状及保护和恢复对策. 世界林业研究(*World Forestry Research*),1996,(6):37-44.
- [3] CHEN Ya - Ning , WANG Qiang , RUAN Xiao , LIWei - Hong,CHENYa-Peng. Physiological Response of *Populus euphratica* to Artificial Water-recharge of the Lower Reaches of Tarim River. 植物学报(*Bulletin of Botany*),2004,46(12):1393-1401.
- [4] Niels Thevs. Characteristics of Ecology, Spatial Distribution, and Utilization of the Tugai Vegetation at the Middle Reaches of the Tarim River, Xinjiang, China [D]. Ernst-Moritz-Arndt-Universit? t Greifswald, Doctor Rerum Naturalium (Dr. rer. nat.),2006. 12. 07:1-144.
- [5] 黎明. 新疆渭干河流域地下水开采—生态环境保护研究. 中国地质大学博士学位论文,2005.
- [6] 刘洪贵. 伴你走进胡杨林. 阿拉善新闻网,2007,11,23.
- [7] 韩继刚,宋未. 植物内生细菌研究进展及其应用潜力. 自然科学进展(*Progress in Natural Science*),2004,14(4):374-379.
- [8] Fiona Porteous Moore, Tanja Barac, Brigitte Borremans, Licy Oeyen, Jaco Vangronsveld, Daniel van der Lelie, Colin D. Campbell, Edward R. B. Moore. 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.
- [9] Rodrigo Mendes, Aline A. Pizzirani-Kleiner, Welington L. Araujo, Jos M. Raaijmakers. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*,2007,22(73):7259-7267.
- [10] Pious Thomas, Ganiga K. Swarna, Pulak K. Roy, Prakash Patil. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell Tissue Organ Culture*,2008,93:55-63.
- [11] Anastasia Venieraki, Maria Dimou, Panagiotis Pergalis, Io Kefalogianni, Iordanis Chatzipavlidis, Panagiotis Katinakis. The Genetic Diversity of Culturable Nitrogen-Fixing Bacteria in the Rhizosphere of Wheat. *Environmental Microbiology*,2010.
- [12] Jigang Han, Dongliang Xia, Lubin Li, Lei Sun, Kai Yang, Liping Zhang. Diversity of Culturable Bacteria Isolated from Root Domains of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Microbial Ecology*,2009,58:363-373.
- [13] Lei Sun, Fubin Qiu, Xiaoxia Zhang, Xin Dai, Xiuzhu Dong, Wei Song. Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA

- Sequence Analysis. *Microbial Ecology*, 2007, 55 (3) : 415-424.
- [14] A. V. Sturz, B. R. Christie, J. Nowak. Bacterial Endophytes; Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19 (1) : 1-30.
- [15] 汪军, 黄俊生. 植物内生菌研究技术及应用研究进展. 广西热带农业 (*Guangxi Tropical Agriculture*), 2008, 118 (5) : 18-20.
- [16] 冉国华, 张志元. 植物内生细菌研究及其应用. 海南大学学报 (*Natural Science Journal of Hainan University*), 2004, 22 (4) : 365-373.
- [17] 袁秀英, 石林, 胡达古拉. 胡杨根际真菌与内生真菌多态性的研究. 西北林学院学报 (*Journal of Northwest Forestry University*), 2007, 22 (6) : 85-88.
- [18] 范君华, 刘明, 高疆生, 寇建霞. 塔里木河上游不同林地土壤养分和微生物以及酶活性变化初探. 中国农学通报 (*Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2005, 21 (1) : 184-187.
- [19] WANG Ning, SHENG Guang, DENG Aihua, WANG Ling, JI Jia, Erkin. Rahman (艾尔肯·热合曼). Isolation and Morphology Study of Pathogenic Microflora in Natural *Populus euphratica* Oliver stand of Tarim River valley. 生物技术 (*Biotechnology*), 2007, 17 (4) : 61-63.
- [20] Zilaygul. MIJIT, Xiangru MA (马相汝), Abduwaly. ABDUREHIM, Erkin. Rahman (艾尔肯·热合曼). Cultivable bacteria diversity in a small area of Natural *Populus Euphratica* Forest of Tarim River Valley, China. 生物技术 (*Biotechnology*), 2009, 19 (5) : 19-22.
- [21] Xiang He, Ting Xiao, Haiju Kuang, Xiaojun Lan, Maripat. Tudahong, Ghenijan. Osman, Chengxiang Fang and Erkin Rahman. *Sphingobacterium shayense* sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60 : 2377-2381.
- [22] 蓝江林, 朱育菁, 苏明星, 葛慈斌, 刘芸, 刘波. 水葫芦内生细菌的分离与鉴定. 农业环境科学学报 (*Journal of Agro—Environment Science*), 2008, 27 (6) : 2423-2429.
- [23] 刘刚, 翟朝阳. 一种通用的从少量培养液中快速提取细菌染色体 DNA 的方法. 西部医学 (*Medical Journal of West China*), 2004, 6 (16) : 111-113.
- [24] 霍颖异, 许学伟, 王春生, 杨俊毅, 吴敏. 浙江苍南近海沉积物细菌物种多样性. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2008, 28 (10) : 5166-5172.
- [25] Thompson JD, Gibson TJ, Plewni F. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24 (4) : 876-488.
- [26] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular evolution*, 1980, 16 : 111-120.
- [27] Saitou N, Nei M. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, (4) : 406-425.
- [28] Tackebrandt ES, Goebel BM. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44 (4) : 846-849.
- [29] Tindall BJ, Rossello'-Mo'ra R, Busse HJ, Ludwig W and Ka'mpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60 : 249-266.
- [30] 徐丽华, 李文均, 张玉琴, 姜成林. 关于细菌新分类单元描述的标准化. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2004, 31 (6) : 126-127.
- [31] 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, 18 (1) : 90-95.
- [32] Ma YF, Wang L, Shao ZZ. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degreeding bacteria isolated from Antractic soil and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 : 455-465.
- [33] Cui ZS, Lai QL, Dong CM. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degreeding bacteria from sediment of the middle Atlantic ridge. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 : 1948-1963.
- [34] 孙凤琴, 汪保江, 李光玉. 南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48 (12) : 1578-1587.
- [35] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展. 植物学报 (*Bulletin of Botany*), 2001, 43 (9) : 881-889.
- [36] 范运梁, 刘雪, 戴美学. 根瘤菌选育研究进展. 生物技术 (*Biotechnology*), 2005, 21 (6) : 93-95.
- [37] Tara Wahab, Sandra Hjalmarsson, Ralfh Wollin, Lars Engstrand. Pyrosequencing *Bacillus anthracis*. 传染病的形成 (*Emerging Infectious Disease*), 2005, 11 (10) : 1527-1531.
- [38] 何红, 蔡学清, 洪永聪. 辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选. 中国生物防治 (*Chinese Journal of Biological Control*), 2002, 18 (4) : 171-175.

- [39] 黎起秦,罗宽等. 番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2003, 33 (4):364-367.
- [40] Range shwaran R, Wasnikar A R, Prasad R D. Isolation of endophytic bacteria for biological control of wilt pathogen. *Journal of Biological Control*, 2002, 16(2):125-133.
- [41] 文才艺, 吴元, 华田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题. 生态学杂志 (*Chinese Journal of Ecology*), 2004, 23 (2):86-91.

Phylogenetic diversity of culturable endophytic bacteria Isolated from the *Populus euphratica* at the disused ancient Ugan River

Khayir Yusuf¹, Shirenay Pulat², Maripat Turdahun¹, Maryam Hamdun¹, Ghenijan Osman¹, Zumrat Abdurehim¹, Erkin Rahman^{1*}

¹ College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

² College of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China

Abstract: [**Objective**] The aim of this study was to identify the culturable endophytic bacteria recovered from the *Populus euphratica* at the disused (122 years ago) ancient Ugan river of middle reaches of Tarim river, and to understand their Phylogenetic diversity and community structure. [**Methods**] Bacteria were isolated from the storage liquid in the stem of 2 *Populus euphratica* stands by using 3 types of different cultural medium (Luria -Bertani, Trypticase Soy Agar and Nutrient Agar), followed carry out 16S rDNA identifications and analysis of their biodiversity. [**Results**] A total of 62 phenotypically different isolates were sequenced and according to their 16S rDNA sequence similarities to type strains of described organisms, they have been placed into four phylogenetic groups (1, Firmicutes; 2, Actinobacteria; 3, Alpha Proteobacteria and 4, Gamma Proteobacteria), 18 genera and 32 species. Among them, *Bacillus* and *pseudomonas* were the most widely distributed and predominant, occupied the majority of isolates 40.32% and 16.13%, respectively. Isolate KTH-63 (HM371419) formed a distinct clade with *Macrococcus brunensis* in phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence among the family *Staphylococcaceae*, so it was demonstrated that the KTH-63 represents a potential novel genus and novel species within the family *Staphylococcaceae* with 92.491% sequence similarity with the described species *Macrococcus brunensis* of this family. Isolates KLH-1, KLH-21, KLH-18, KLH-25, KNA-3, KTH-8, KTH-14, KTH-20 and KNA-26 with 96.089% - 97.769% sequence similarities to their closely related members were presumed to be potential novel species, and the discovery rate of potential novel species in the endophytic bacterial community of *Populus euphratica* was reach up to 16.13%. Furthermore, 10 genera and 18 species have been added to the plant endophytic bacterial categoria by the data obtained in this work. [**Conclusion**] The result showed that the cultivable endophytic bacterial diversity in *Populus euphratica* at Ugan river was very abundant and have high percentage of potential novel species, and it have greatly refreshed the plant endophytic bacterial records. The community structure obtained in this study also may be presumed as a miniature of the endophytic bacterial flora in the *Populus euphratica* during the recent ages before the affect of modern civilization prossessing to Tarim river valley, which deserve further study and exploitation.

Keywords: Ugan river, *Populus euphratica*, endophytic bacteria, 16S rDNA, diversity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the KJZJ foundation of Xinjiang Uyghur autonomous region (201091236), by the National Natural Science Foundation of China (31060002) and by the Open Project Program of Xinjiang Key Laboratory of Extremophiles (XJYS 0203-2010-01)

* Corresponding author. Tel: +86-991-8583450; E-mail: erkin1106@163.com

Received: 18 August 2010/Revised: 20 October 2010