

文章编号: 1674-7054(2015)03-0279-06

海南岛华石斛根部可培养的共生细菌的多样性

李 鹭 宋希强

(海南大学 园艺园林学院 / 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南 海口 570228)

摘 要: 采集3个居群的野生华石斛根系, 从中分离到130株内生细菌, 并对细菌进行16S rDNA序列谱系分析。结果表明: 华石斛根部内生细菌主要有: 芽孢杆菌属(*Bacillus*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、泛菌属(*Pantoea*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、藤黄杆菌属(*Luteibacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和西地西菌属(*Cedecea*) 7个属的15个种。其中优势类群为 *Bacillus*, 次优势类群为 *Enterobacter* 和 *Burkholderia*。优势内生细菌 *Bacillus* spp. 在3个不同的居群华石斛根部均有出现, 且频率相近。环境因子差异最大、附生宿主组成最相近的霸王岭与吊罗山之间, 华石斛根部内生细菌群落物种组成相似性最高。说明附生宿主植物差异是附生植物根部内生细菌物种组成差异的重要驱动因子。

关键词: 内生细菌; 多样性; 相似性系数; 芽孢杆菌; 华石斛居群

中图分类号: Q938.1+5 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2015.03.010

兰科植物与菌根真菌形成的共生关系受到广泛关注^[1], 但与兰科植物根共生的微生物不仅有真菌, 还有内生细菌。Rogers 于1933年首次报道了原产澳大利亚的天麻(*Gastrodia sesamoides*)的根、根状茎和芽中存在内生细菌^[1]。目前, 至少从90多种兰科植物中分离到了多样性的内生细菌^[2]。内生细菌分泌的激素如生长素、赤霉素、细胞分裂素能有效地促进兰科植物的种子萌发和植株的生长与发育^[3-4]。华石斛(*Dendrobium sinense*)为兰科石斛属多年生附生植物, 是海南特有种, 自然分布于海拔千米以上的海南中西部山区, 具有极高的药用价值和观赏价值^[5]。由于石斛属植物集药用和观赏于一体, 目前主要靠野外采挖来满足市场需求, 巨大的市场需求导致采挖过度, 致使我国野生石斛资源遭到了严重破坏, 野生华石斛资源处于濒临灭绝状态^[6]。从野生华石斛种群中分离培养内生细菌, 筛选对华石斛幼苗定居与生长具有良好促生效应的菌株, 并应用于华石斛的栽培生产, 可缓解市场对野生华石斛资源的需求压力。采用分子检测技术, 全面揭示华石斛在不同生境中的共生细菌物种组成, 是筛选高效优质菌株的第1个关键环节。全面揭示热带地区不同居群的华石斛共生细菌物种多样性与群落结构, 可以为我国热带地区的华石斛资源的迁地保护和种群恢复等保育措施提供重要的理论依据与技术支持, 并且有助于进一步揭示兰科植物-菌根真菌-细菌三位一体的共生体的种间互作的功能特性。海南岛内的野生华石斛居群主要分布在五指山、雅加大岭等山脉。本研究从位于五指山山脉的吊罗山、雅加大岭的霸王岭, 以及海南岛西南部的尖峰岭地区的野生华石斛居群采集植物根系, 分离培养内生细菌, 并采用形态结合分子检测技术, 鉴定分离到的内生细菌的种类, 以揭示海南华石斛共生细菌物种多样性与群落结构。

1 材料与方法

1.1 研究地区 海南岛地处热带北缘, 属热带季风气候, 干湿季节较明显, 5~10月份为雨季, 11月至翌年4月份是旱季^[7]。实验用野生华石斛植株分别采集于海南省东南部吊罗山国家级自然保护区(109°43′~110°03′E, 18°43′~18°58′N)、海南省西南部霸王岭自然保护区(109°05′~109°25′E, 18°50′~19°05′N)和尖峰

收稿日期: 2015-04-14

基金项目: 国家自然科学基金(31160178); 海南省自然科学基金(314051)

作者简介: 李鹭(1990-), 女, 海南大学园艺园林学院2012级硕士研究生, E-mail: liningao@126.com

通信作者: 宋希强(1972-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 园林植物资源与利用, E-mail: song.strong@163.com

岭国家级自然保护区(108°44′~109°02′E, 18°23′~18°52′N), 采集时间为2014年8、9月。霸王岭年平均气温24.2℃, 年平均降水量1 677.1 mm^[8]; 尖峰岭年平均气温24.5℃, 年平均降水量2 030.7 mm; 吊罗山年平均气温25.3℃, 年平均降水量2 540.6 mm^[9]。

1.2 样品采集方法 从不同的附生宿主树种上采集华石斛根系为样品, 为避免细菌群落物种组成的空间自相关性, 每株附生宿主上只采集1株成年健康的华石斛植株根系。样品在编号及标注后置于封口袋中保存, 封口袋上开少量小孔。采集到的样品于当天运回实验室, 在12 h内进行细菌分离培养。对采样地区的植物群落的生境、附生宿主植物进行拍照, 并记录采样点的坐标与海拔等信息。各采样点的样品采集信息见表1。

表1 华石斛个体根系样品采集地的生境与附生宿主植物
Tab. 1 Study sites and host tree species of *Dendrobium sinense* for individual root sampling

地点 Site	附生植物 Host tree	数目 Quantity	海拔 Elevation / m	地理位置 Geographic coordinates
吊罗山	海南蕈树 <i>Altingia obovata</i>	3	1 125 ~ 1 230	N: 18°43′ E: 109°51′
	木荷 <i>Schima superba</i>	1		
	岭南青冈 <i>Cyclobalanopsis championii</i>	1		
	密脉蒲桃 <i>Syzygium chunianum</i>	1		
	万宁柯 <i>Lithocarpus elmerrillii</i>	1		
	卵叶柃 <i>Eurya ovatifolia</i>	1		
	柄果柯 <i>Lithocarpus longipedicellatus</i>	2		
尖峰岭	五列木 <i>Pentaphylax euryoides</i>	1	1 166 ~ 1 220	N: 18°43′ E: 108°51′
	杏叶柯 <i>Lithocarpus amygdalifolius</i>	1		
	乌饭树 <i>Vaccinium bracteatum</i>	1		
	线枝蒲桃 <i>Syzygium araiocladum</i>	1		
霸王岭	毛棉杜鹃 <i>Rhododendron moultmainense</i>	3	1 255 ~ 1 424	N: 19°4′ E: 109°12′
	碎叶蒲桃 <i>Syzygium buxifolium</i>	3		
	竹叶松 <i>Podocarpus imbricatus</i>	3		

1.3 内生细菌的分离 取健康野生华石斛植株的新鲜营养根, 去除表面附着物, 经自来水清洗后晾干。分别称取根质量0.1 g, 用75%乙醇消毒30 s, 再用2.5%次氯酸钠浸泡1 min, 最后用无菌水冲洗4次, 将晾干后的根切段, 约1 cm, 置于灭菌的研钵中, 加入0.9 mL无菌水和少量灭菌的石英砂后研磨。研磨后用移液枪吸取匀浆液, 经梯度稀释后, 取 10^{-2} ~ 10^{-4} 浓度的稀释液, 用移液枪各吸取50 μ L, 用灭菌涂布棒均匀涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上, 同时吸取50 μ L最后1次无菌水洗液涂抹于平板上作为根部表面灭菌是否彻底的对照, 每处理重复3次, 28℃下暗培养。待菌落形成时, 依据菌落形态的差异, 分别挑取不同的内生细菌单菌落, 纯化后于斜面培养基上4℃下保存。主要依据的菌落形态特征有: 大小、形状、颜色、透明度、光泽度、边缘齐整度、表面是否光滑以及是否存在特殊结构。

1.4 内生细菌16S rDNA的分子检测

1.4.1 细菌DNA的提取 活化细菌于平板培养基上连续划线, 28℃下培养1~2 d, 刮取1~2接种环菌苔接入100 mL牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 28℃, 220 r·min⁻¹培养过夜, 取 1.0×10^9 cfu·mL⁻¹个(1 mL菌液OD₆₀₀为1.0~1.5), 然后按照TIANGEN细菌基因组提取试剂盒(DP302)说明书提取。

1.4.2 细菌16S rDNA的PCR扩增与测序 采用细菌16S rDNA基因序列的通用引物27f(5′-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3′)^[10]和1492r(5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)^[11]进行16S rDNA基因序列扩增。每25 μ L的PCR反应体系包含: 2.5 μ L 10×Buffer, 0.5 μ L 0.01 mol·L⁻¹ dNTP, 引物各1 μ L, 0.3 μ L (5 U· μ L⁻¹)的Taq酶和1 μ L DNA模板。PCR反应程序: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s; 55℃退火45 s; 72℃延伸90 s, 35个循环; 最后72℃延伸10 min。电泳检测呈阳性的PCR产物委托广州英捷公司进行测序。

1.4.3 细菌 16S 序列分析 将测序得到的 16S 序列汇总成本地数据库,在 BioEdit 中进行比对,根据系列之间比对的覆盖度与一致性(Coverage and identity) ,将序列划分为不同的操作分类单元(OTU) 。采用 blastn 在 GenBank (www. ncbi. nlm. nih. gov/BLAST) 中搜索与目标 OTU 序列一致性最高的序列作为参考序列。将参考序列与 15 个 OTU 的序列汇总后,在 MEGA 5 软件中用 ClustalW 对序列进行精确比对,然后再用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树^[12]。Bootstrap 值依据 1 000 次重复计算。

1.5 数据分析 比较不同居群的华石斛根系共生的内生细菌群落的物种组成相似,以及每种细菌在不同居群中出现的相对频度差异。特定华石斛居群的某种细菌频度(Relative frequency) 定义为,检测到该种细菌的附生宿主个体数占采样的附生宿主总株数的百分比。

2 结果与分析

2.1 野生华石斛根部内生细菌的组成 从海南岛吊罗山、霸王岭和尖峰岭 3 个不同居群的野生华石斛根系上共分离到 130 株细菌,对这些细菌 16S 序列扩增、测序及序列分析,将它们划分为 15 个 OTU(见表 2) 。

表 2 华石斛内生细菌代表性菌株序列相似性比较

Tab. 2 16S rDNA sequences similarity between representative strains and reference taxa of <i>D. sinense</i>			
OTUs	名称及编号 Name/code	最相似菌株 The closest NCBI match	覆盖度/% 和一致性/% Coverage/Identity
OTU1	<i>Bacillus gibsonii</i> (DL1-1-2)	<i>Bacillus gibsonii</i> (JN128249. 1)	100/100
OTU2	<i>Bacillus megaterium</i> (JF5-1-2)	<i>Bacillus megaterium</i> (KM817281. 1)	100/99
OTU3	<i>Bacillus thuringiensis</i> (BW1-3-5)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (HM032789. 1)	100/99
OTU4	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (JF2-1-7)	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (CP009458. 1)	100/99
OTU5{	<i>Burkholderia</i> sp1 (BW1-1-5)	<i>Burkholderia cepacia</i> (GQ169807. 1)	100/89
OTU6	<i>Burkholderia</i> sp2 (JF6-1-2)	<i>Burkholderia</i> sp. F4W (AJ971348. 1)	100/99
OTU7	<i>Burkholderia bryophila</i> (JF6-1-6)	<i>Burkholderia bryophila</i> (NR_042593. 1)	100/99
OTU8	<i>Burkholderia stabilis</i> (BW2-2-6)	<i>Burkholderia stabilis</i> (KF836499. 1)	99/100
OTU9	<i>Cedecea neteri</i> (DL5-1-3)	<i>Cedecea neteri</i> (CP009458. 1)	100/97
OTU10	<i>Enterobacter ludwigii</i> (DL6-1-10)	<i>Enterobacter ludwigii</i> (KC178598. 1)	100/99
OTU11	<i>Enterobacter asburiae</i> (BW2-3-11)	<i>Enterobacter asburiae</i> (KJ728676. 1)	100/99
OTU12	<i>Pantoea</i> sp. (BW3-2-1)	<i>Pantoea</i> sp. SIS12 (KF186672. 1)	100/99
OTU13	<i>Pantoea dispersa</i> (BW2-3-3)	<i>Pantoea dispersa</i> (KM019846. 1)	100/99
OTU14	<i>Luteibacter anthropi</i> (BW1-2-8)	<i>Luteibacter anthropi</i> (NR_116911. 1)	100/100
OTU15	<i>Serratia marcescens</i> (DL5-1-5)	<i>Serratia marcescens</i> (KM596774. 1)	100/100

通过 GenBank 数据库进行同源性比对和谱系分析(表 2, 图 1)。由表 2, 图 1 可见, 海南野生华石斛群体的根系共生内生细菌至少有 7 属, 15 种, 其中, 芽孢杆菌属(*Bacillus*) 与伯克氏菌属(*Burkholderia*) 各有 4 种; 泛菌属(*Pantoea*) 与肠杆菌属(*Enterobacter*) 各有 2 种; 藤黄杆菌属(*Luteibacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*) 和西地西菌属(*Cedecea*) 各 1 种。相对频度最高的内生细菌类群是芽孢杆菌属(*Bacillus*) 在 63.5% 的华石斛植株上分离到该类细菌。相对频度最低的内生细菌是藤黄杆菌属(*Luteibacter*) 与沙雷氏菌属(*Serratia*) 仅在 1.6% 的华石斛植株上分离到该类细菌。

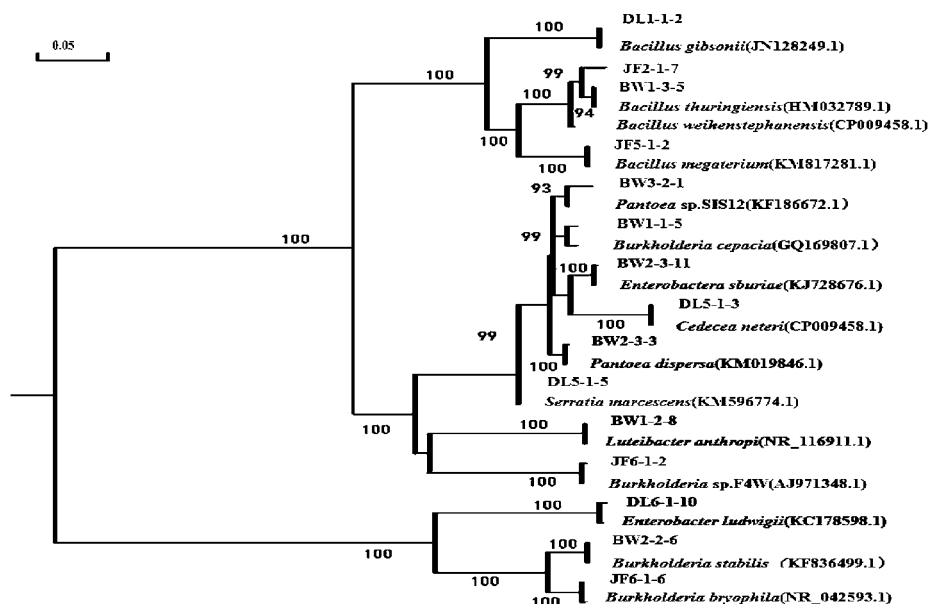


图 1 基于 16s rDNA 序列同源性的华石斛内生细菌系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of endophytic bacteria associated with roots of *D. sinense* based on 16S rDNA sequences

2.2 不同居群华石斛根部内生细菌相对频度比较 从霸王岭的华石斛居群分离到内生细菌 24 株, 略高于尖峰岭华石斛居群分离到的内生细菌株数(21 株), 吊罗山华石斛居群分离到 18 株。由图 2 可见, 内生细菌 *Bacillus* 是华石斛根系内生细菌中最高频出现的细菌类群, 主要包括 *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. gibsonii*。这 3 种细菌在 3 个居群的华石斛根系中均有出现, 并且它们在不同居群间出现的

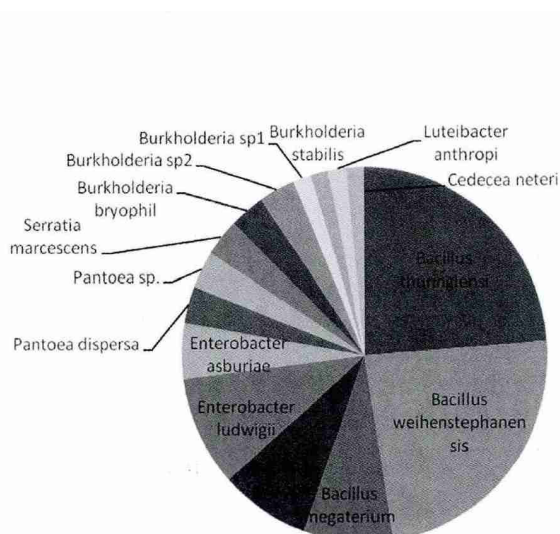


图 2 分离得到的华石斛根部不同种内生细菌的相对频度
Fig. 2 Relative frequency of endophytic bacteria species associated with *Dendrobium sinense*

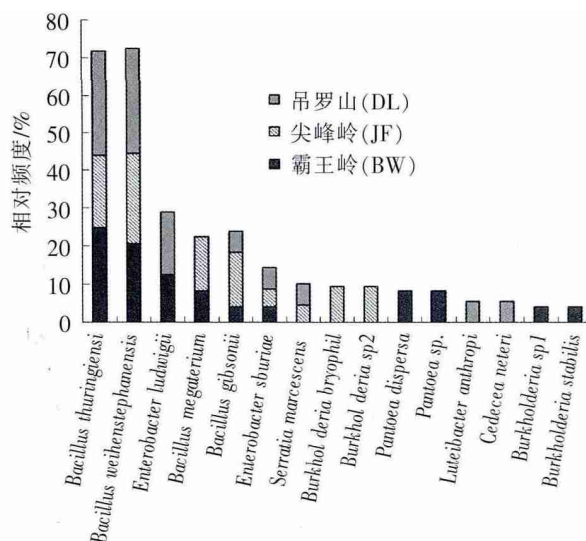


图 3 不同居群华石斛根部内生细菌种类和相对频度
Fig. 3 Relative frequency of endophytic bacteria associated with *Dendrobium sinense* in different habitats. BW: Bawangling Mountain; JF: Jianfengling Mountain; DL: Diaoluoshan Mountain

相对频度没有明显差异(图3)。与 *Bacillus* spp. 相似,内生细菌 *Enterobacter asburiae* 虽然相对频度较低,但其在3个居群华石斛根系中出现的相对频度均比较接近。*Enterobacter ludwigii* 仅出现在霸王岭与吊罗山,且相对频度接近;*B. megaterium* 仅出现在霸王岭与尖峰岭;*Serratia marcescens* 仅出现在吊罗山与尖峰岭。*B. bryophil* 和 *Burkholderia* sp2 以较低的相对频度出现在尖峰岭居群的华石斛根系中;*Pantoea* sp. , *Pantoea dispersa* , *Burkholderia* sp1 和 *Burkholderia stabilis* 以较低的相对频度出现在霸王岭居群的华石斛根系中;*Cedecea neteri* 和 *Luteibacter anthropi* 以较低的相对频度出现在吊罗山居群的华石斛根系中(图3)。

2.3 不同居群的华石斛根部内生细菌种群相似性 不同居群华石斛内生细菌群落相似性分析结果表明:霸王岭和吊罗山的华石斛根部内生细菌种群相似性最高,相似系数为0.828;相比之下,尖峰岭与吊罗山之间,以及霸王岭与尖峰岭之间的内生细菌群落相似性较低,相似系数分别为0.605与0.585。

3 讨论

本研究采用分离培养法结合细菌分子检测技术,从海南岛不同居群的野生华石斛根系分离得到130株内生细菌,隶属于7属15种。结果表明,野生种群华石斛根系内生细菌的群落具有较高的遗传多样性,兰科植物对内生细菌的低选择性可能是华石斛成为多样性的细菌群落的栖息地的重要原因^[4]。在华石斛根系上高频出现优势菌群为 *Bacillus* spp. ,次优势菌群为 *Burkholderia* spp. 和 *Enterobacter* spp. ,本实验中63.5%的华石斛植株上均分离到优势菌群,约10%的华石斛根系均检测到次优势菌群。澳大利亚、俄罗斯等地研究结果表明,*Bacillus*、*Burkholderia* 与 *Enterobacteriaceae* 是兰科植物中常见的内生细菌^[3]。华石斛内生细菌群落中,优势内生细菌 *Bacillus* spp. 在3个不同的居群中出现的频率差异极小,而一些中、低频出现的物种仅出现在1~2个居群,表明华石斛内生细菌群落中的优势菌群 *Bacillus* spp. 分布广泛。与生境适应性宽泛的内生细菌共生,可以降低因缺少内生细菌接种源而使华石斛种子不能萌发及幼苗难以定居的风险。*Bacillus* 菌体生长过程中产生的枯草菌素、多粘菌素、制霉菌素、短杆菌肽等活性物质对致病菌有明显的抑制作用;*Burkholderia* 的一些菌株对寄主植物生长具有高效促进作用,接种该菌株可以调节植物的生长发育^[13]。一些内生细菌以植物分泌的色胺酸为前体合成 IAA,可以促进兰科植物种子萌发及幼苗定居。然而,内生细菌生产 IAA 的能力因内生细菌种类不同而有差异^[4]。本研究全面揭示了海南热带地区不同居群华石斛内生细菌群落的物种组成与多样性,进一步深入研究这些内生细菌的促生潜力和促生效应,将有望从中筛选出对华石斛生长具有良好促生性的菌株。

在内生细菌群落物种组成方面,霸王岭和吊罗山的华石斛根部内生细菌群落之间的相似性最高,而尖峰岭与其他2个居群内生细菌群落相似性稍低。霸王岭位于雅加大岭山脉,吊罗山位于五指山脉,尖峰岭单独位于海南岛西南部,受山体位置与山系走向的影响,三地的气温及降雨都存在差异。年均气温为霸王岭<尖峰岭<吊罗山;年降雨量为霸王岭<尖峰岭<吊罗山^[8-9]。环境因子差异最大的霸王岭和吊罗山之间的内生细菌群落物种组成的相似性却最高,说明环境的异质性对华石斛内生细菌群落构建的影响相对较弱。本研究的3个采样地点均为热带山地雨林,海拔在1100~1400 m范围,但3个居群的植物群落物种组成具有明显差异。霸王岭以岭南青冈(*Cyclobalanopsis championii*)、海南五针松(*Pinus fen-zeliana*)、碎叶蒲桃(*Syzygium buxifolium*)和毛棉杜鹃花等为优势种^[14]。吊罗山主要以黄叶(*Xanthophyllum hainanense*)、线枝蒲桃(*Syzygium araiocladum*)、五列木和岭南青冈等为优势种^[15]。尖峰岭以海南紫荆木(*Madhuca hainanensis*)、东方琼楠(*Beilschmiedia tungfangensis*)和陆均松等为优势种^[16]。因此,霸王岭地区的华石斛附生宿主树种的物种组成与吊罗山的最相似,两地之间的华石斛内生细菌群落物种组成也最相似。这一结果说明华石斛内生细菌群落物种组成受附生宿主树种的影响大于其它的环境因子。

随着经济的高速发展,有利用价值的兰科植物面临的生存压力越来越大^[17]。如何在满足园艺与药用产品需求的同时保护与恢复野生兰科植物种群,防止物种灭绝,是当前中国生物多样性保护工作面临的一大挑战^[18]。在兰科植物园艺与药用栽培生产中,兼顾兰科植物内生细菌促生效应,通过人工接种促生效果良好的内生细菌来促进植物生长,进而缓解对野生兰科植物资源的巨大压力。本研究全面揭示了海南岛华石斛内生细菌群落的物种多样性,研究结果不仅有助于华石斛野生种群的保育与恢复,而且还将有助于揭示三位一体的华石斛-菌根真菌与内生细菌共生体的进化,以及种间互作的生态与功能特性。

致谢:海南大学郑云柯和王晓鸣同学在样品采集和实验过程中给予了支持和帮助,一并致谢!

参考文献:

- [1] CLEMENTS M. Orchid mycorrhizal associations[J]. *Lindleyana*, 1988 (3): 73-86.

- [2] TARKKA M T ,FREY-KLETT P. Mycorrhiza helper bacteria [C]//Varma A. Mycorrhiza. 3rd ed. Berlin: Springer ,2008: 113 – 132.
- [3] WILKINSON K G ,DIXON K W ,SIVASITHAMPARAM K ,et al. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria[J]. Plant Soil ,1994 ,159(2) : 291 – 295.
- [4] TSAVKELOVA E A ,CHERDYNTSEVA T A ,BOTINA S G ,et al. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin[J]. Microbiol Res. 2007 ,162(1) : 69 – 76.
- [5] 宋希强. 海南石斛属野生植物种质资源及华石斛保育生物学研究[D] . 北京: 北京林业大学 ,2005.
- [6] 姜昊颖 杨福孙 宋希强. 华石斛原生境条件下人工播种的初步探讨[J]. 热带林业 2011 39(2) : 40 – 43.
- [7] 许洋瑜 罗文 韩文涛 等. 海南岛霸王岭极小种群野生植物调查初报[J]. 热带林业 2014 42(2) : 32 – 36.
- [8] ZANG R G ,TAO J P ,LI C Y. Within community patch dynamics in a tropical montane rain forest of Hainan Island ,South China[J]. Acta Oecologica ,2005 ,28: 39 – 48.
- [9] 邱治军 邱坚锐 周光益 等. 海南吊罗山与尖峰岭热带林区气象要素对比研究[J]. 生态科学 ,2004 ,23 (4) : 338 – 341.
- [10] EDWARDS U ,ROGALL T ,BLOCKER H ,et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA[J]. Nucleic Acids Research ,1989(17) : 7843 – 7853.
- [11] LANE D J. 16S/23S rRNA sequencing [C]//Stackebrandt E ,Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. United Kingdom: Chichester ,1991: 115 – 175.
- [12] TAMURA K ,DUDLEY J ,NEI M ,et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. Molecular Biology and Evolution ,2007 ,24(8) : 1596 – 1599.
- [13] 杨娜 杨波. 蕙兰根部内生细菌多样性及季节动态变化[J]. 植物科学学报. 2011 ,29(2) : 156 – 163.
- [14] 刘广福 臧润国 丁易 等. 海南霸王岭不同森林类型附生兰科植物的多样性和分布[J]. 植物生态学报 ,2010 ,34 (4) : 396 – 408.
- [15] 李佳灵. 海南吊罗山热带雨林群落结构及物种多样性研究[D]. 海口: 海南大学 2013.
- [16] 蒋有绪 卢俊培. 中国海南岛尖峰岭热带林生态系统[M]. 北京: 科学出版社 ,1991: 35 – 156.
- [17] 刘仲健 张玉婷 王玉 等. Recent developments in the study of rapid propagation of *Dendrobium catenatum* Lindl. with a discussion on its scientific and Chinese name[J] 植物科学学报 2011 29: 763 – 772.
- [18] FERRARO G ,BRANS M. Trade-offs between environmental protection and economic development in China's fisheries policy: a political analysis on the adoption and implementation of the Fisheries Law 2000 [J]. Natural Resources Forum ,2012 ,36: 38 – 49.

Diversity of Culturable Endophytic Bacteria Isolated from the Roots of *Dendrobium sinense*(Orchidaceae) Inhabiting Hainan Island

LI Ao , SONG Xiqiang

(College of Horticulture and Landscape Architecture / Key Laboratory of Protection ,
Development and Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources , Hainan university , Haikou 571737 , China)

Abstract: Endophytic bacteria are equally important as mycorrhizal fungi for orchid plant species in the ecological process of seed germination and seedling establishment. To investigate diversity of endophytic bacteria associated with *Dendrobium sinense* , inhabiting tropical forest in Hainan Island , root samples were collected for bacterial culturing , DNA extraction , 16S rDNA amplification , and sequencing. A total of 130 strains of endophytic bacteria were isolated from the roots of *D. sinense* in Jianfengling , Bawangling and Diaoluoshan mountains. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences revealed that the roots-associated endophytic bacteria community was comprised of 15 species of 7 genera: *Bacillus* , *Burkholderia* , *Pantoea* , *Enterobacter* , *Luteibacter* , *Serratia* and *Cedecea*. Of these bacteria , *Bacillus* is the most frequently isolated endophytic bacterium , followed by *Enterobacter* and *Burkholderia*. All the *Bacillus* spp. occurred in the three habitats at a roughly equal frequency. Compositional similarity of endophytic bacterial community associated with *D. sinense* is highest in between the Bawangling and Diaoluoshan mountains , where similarity is lowest in their environmental factors but highest in their host plant species composition is highest in similarity. This suggests that the difference in host plants is responsible for the difference in endophytic bacterial species composition of the roots of the host plants.

Key words: endophytic bacteria; diversity; similarity coefficient; *Bacillus*; *Dendrobium sinense* populations