

# Diversity of Cultivable Endophytic Bacteria Isolated From Leaves of *Senecio vulgaris* L. (Asteraceae)

Jing Zhao\*, Jiaqi Yang\*, Dandan Cheng#

School of Environment, China University of Geosciences (Wuhan), Wuhan Hubei  
Email: #dan-d-cheng@163.com

Received: May 23<sup>rd</sup>, 2018; accepted: Jun. 6<sup>th</sup>, 2018; published: Jun. 13<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

*Senecio vulgaris* L. (Asteraceae) is an alien invasive plant species common in the northeast and southwest China. In order to explore the diversity of endophytic bacteria in *S. vulgaris* plants, nine healthy plants grown in greenhouse were used in the study. Isolates of endophytic bacteria were obtained from sterilized leaves of each individual plant. The phylogenetics analysis based on the 16s rDNA genes of the 68 endophytic bacteria isolates showed that the endophytic bacteria in the leaves of *S. vulgaris* plants could be classified as 7 genera belonging to Firmicutes, Actinobacteria and Proteobacteria. Naming They are: *Bacillus*, *Staphylococcus* (Firmicutes), *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium* (Actinobacteria), *Pseudomonas* and *Enhydrobacte* (Proteobacteria). Among them, the *Bacillus* was the most dominant genera (66.7%), followed by *Arthrobacter* (10.6%) and *Pseudomonas* (7.6%). These results reveal that the leaves of *S. vulgaris* plants might harbor rather high diversity of endophytic bacteria and some of the endophytic bacteria were potential probiotics facilitating plant invasion.

## Keywords

*Senecio vulgaris*, Cultivable Endophytic Bacteria, 16s rDNA Gene, Diversity

# 欧洲千里光叶片可培养内生细菌多样性分析

赵 菁\*, 杨嘉麒\*, 程丹丹#

中国地质大学(武汉)环境学院, 湖北 武汉  
Email: #dan-d-cheng@163.com

收稿日期: 2018年5月23日; 录用日期: 2018年6月6日; 发布日期: 2018年6月13日

\*共同第一作者。

#通讯作者。

## 摘要

菊科植物欧洲千里光在我国东北和西南地区是一种常见的外来入侵植物。为探究欧洲千里光可培养内生细菌的多样性,我们选择9株温室种植的健康欧洲千里光植株为研究对象。通过叶片组织表面消毒处理,将内生菌通过涂布平板法和划线分离法,在牛肉膏蛋白胨培养基上进行分离、纯化,对纯化的菌株进行16s rDNA测序。我们一共得到了68株内生菌,并且鉴定出这些菌株属于3门3纲6科8属。其中,厚壁菌门的有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*);放线菌门的有微球菌属(*Micrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、细杆菌属(*Microbacterium*);变形菌门的有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、栖水菌属(*Enhydrobacter*)。从分离出的菌株数量来看,芽孢杆菌属(*Bacillus*)所占比例较大,高达63.2%;其次为节杆菌属(*Arthrobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*),二者数量均占10.3%。本研究结果表明,欧洲千里光可培养内生细菌的多样性较为丰富,潜在的有益菌可能为欧洲千里光的入侵提供一定的帮助。

## 关键词

欧洲千里光, 可培养内生细菌, 16s rDNA基因, 多样性

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

生物入侵是指非土著种通过有意或无意引进、自然扩散进入到一个以前未曾分布的区域并且能够存活、生长、繁殖及演化成新的种群并对当地生态系统造成一定危害的现象[1],是仅次于土地利用变化而造成全球生物多样性丧失的第二大因素[2]。全球已经查明的外来入侵物种已有上万种,虽然人们已经开始采取措施来防治生物入侵,但其依旧是当今全球面临的重大生态环境问题之一[3]。入侵植物是生物入侵中的重要组成,它具备入侵范围广,生命力强且难以根除的特点,容易形成广泛的生物污染,威胁本土生物的生物多样性及农业的发展,对生态环境造成了严重影响。作为当今的研究热点,不少学者致力于研究生物入侵的机制,提出不少假说,企图成功预测生物入侵的形成并针对其特性提出有效的控制和防御措施。目前提出的假说有:“内禀优势假说”、“天敌逃逸假说”、“增强竞争力进化假说”、“新武器假说”等[4][5]。

随着研究的发展,也有不少学者认为与植物相关的微生物群落,对植物的生长发育起到了很重要的作用,可能在帮助入侵植物进行生物入侵起到了一定的作用。其中内生菌是植物微生物的重要组成部分,在其生活史的一定阶段或全部阶段,生活于健康植物的各种组织和器官的细胞间隙或细胞内并且宿主植物不表现出感染病状的一类微生物[6][7],它们种类多,数量广,能影响植物的生理代谢,产生多种生物活性物质或分泌拮抗物质,增强植物对病虫害的抵抗能力,对植物的生长起着不可或缺的重要作用[8]。具有固氮作用的内生菌能促进宿主植物对氮素的吸收与利用,产生各种能影响氮代谢的植物激素,从而直接或间接作用于宿主植物的生长。内生菌还能增强宿主抗逆性,主要是增强宿主植物对环境条件的耐受性,如祁娟[9]已经从苜蓿种子中筛选出了抗高低温、抗盐的内生根瘤菌,对改善盐碱化土壤有重要作用。部分内生菌分泌的化学物质一方面能抑制其它植物的生长,另一方面能够促进宿主植物的生长,从

而增强该内生菌的宿主植物在生态系统中的生存竞争能力。

通过对植物内生菌的不断研究,发现植物内生菌是一种有巨大利用潜力的新资源,不仅对植物自身的代谢反应以及对外界环境的适应十分重要,植物地上部分的内生菌还能通过种子传递给下一代[10],与植物建立长期共生关系,从而在一定程度上增强其与土著种的竞争能力,利于其入侵。最近几年,在入侵生态学方面,已有部分科学家关注入侵植物内生菌对入侵植物的影响,将内生菌与植物入侵机制相联系,以探寻内生菌对植物入侵起着的重要作用[11]。

欧洲千里光(*Senecio vulgaris*)是菊科一年生草本植物,以种子繁殖,种子极易扩散,且繁殖能力强[12]。作为一种入侵植物于 19 世纪侵入我国东北[13],随后在河北、湖北、贵州、云南、新疆等地分布[14]。欧洲千里光具有吡咯里西啶类生物碱,这种生物碱对食草动物和致病真菌有化学防御作用[15]。部分欧洲千里光抗除草剂[16],主要对果园、草坪、作物产生危害。目前有较多关于欧洲千里光生物碱的研究,但是针对其内生细菌资源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。因此,对欧洲千里光内生细菌进行分离鉴定、系统发育分析,可以了解欧洲千里光内生细菌的群落结构,为将来对欧洲千里光潜在有益内生细菌的功能研究以及对欧洲千里光成功入侵的作用机理上提供菌种资源和数据。同时,日后可尝试将有益内生菌的目的基因导入一些生长状况不好的、濒危的植物体内,观察是否能改善这些植物的生长情况,增强其抗性,从而提高该物种在生态系统中的竞争力,并一定程度减缓生物入侵的危害速度,达到变害为宝的目的。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 样品采集和处理

欧洲千里光种子于 2016 年 4 月采自神农架大九湖、刘家屋场、松柏镇,采集的样本由程丹丹博士鉴定。2016 年 10 月将种子萌发后,将植物栽培于温室中,2016 年 12 月随机选择 9 株健康欧洲千里光植株(记做 1~9 号植物),并采集叶子为实验材料。采样时选择无病害症状的健康叶片。样品从植株分离后立即放入无菌样品袋中,低温保鲜,在 24 h 之内进行内生细菌的分离。

### 2.2. 内生细菌的分离培养

将欧洲千里光的叶用无菌水冲洗干净杂质,随机称取 1 g。于浓度为 70%酒精中振荡浸泡 1 min,再用有效氯含量 1%的次氯酸钠溶液振荡浸泡 1 min,无菌水冲洗 4 次。将最后一次冲洗的无菌水涂布 NA 平板,用未经使用的无菌水涂平板作为对照,28℃培养 48 h 后观察是否有菌落产生,以检测组织表面消毒是否完全。将叶片用无菌剪刀剪碎后,放入无菌研钵中研磨至匀浆,吸取 100  $\mu$ l 于牛肉膏蛋白胨平板,每个处理重复三次,倒置于 28℃培养 2~3 天,观察菌落情况。

观察记录并记录培养皿中菌落的颜色、形态、干湿、质地、边缘形状、是否透明、表面是否光滑均一等性状。针对同一培养皿中性状一致的菌落,只选取一株作为代表菌株进行划线分离,通常需分离 2~3 次,直至平板上出现单个菌落,将其移入试管斜面保存,为后续实验提供材料。

### 2.3. 内生细菌的 16S rDNA 序列扩增和测序

用试剂 Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 提取纯化的细菌基因组 DNA 作为 PCR 模板,方法参见试剂说明书。PCR 反应体系(50 $\mu$ L)组成: Premix Taq 25  $\mu$ L,引物 F27(CCTACGGGAGGCACGAG)/R1492(GTATTACCGCGGCTGCTGG) [17]各 1  $\mu$ L,模板 DNA 3  $\mu$ L,双蒸水 20  $\mu$ L。PCR 扩增流程为 94℃预变性 3 min、94℃变性 30 s、56℃退火 30 s、72℃延伸 45 s、72℃延伸 8 min,循环重复 36 次。产物经凝胶电泳检测后,送由昆泰锐(武汉)生物技术有限公司测序。使用 BIOEDIT 软件拼接正向、反向序列。通过 BLAST 在 NCBI

上比对序列, 寻找与目的序列匹配度最高的已知分类地位菌种的 16S rDNA 序列进行比较鉴定, 确定菌株的系统发育地位, 并通过 MEGA 5.0 构建系统发育树分析进化关系。针对鉴定到种的细菌, 每个种根据序列比对结果, 选取一株或多株代表菌株进行系统发育树的构建, 系统发育树的绘制选用邻接法(Neighbor-joining) [18]模型进行分析生成系统发育树, 发育树用 Bootstrap 法(1000 次重复)检验。

### 3. 结果与分析

在不同株的植物中, 分离到的内生菌数量基本一致(6~10 株), 而且都以芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势菌群, 占所分离菌株总数的 42.9%~81.8%。但是分离培养的内生菌的多样性上有差别: 从植株 2-1 中分离到的内生多样性最低, 只分离出 2 个不同属的内生菌; 而从植株 2-5 中分离出的多样性最高, 共分离出 5 个不同属的菌株。芽孢杆菌属在 9 株植物中均分离得到, 其次是假单胞菌属和节杆菌属, 分别在 6 株和 5 株植物中分离出来(表 1)。

分离得到的 68 株内生菌, 共覆盖 3 门 3 纲 6 科 8 属(表 2)。欧洲千里光叶片内生细菌种类比较丰富且主要来自于厚壁菌门(*Firmicutes*), 所占比例较高, 为 64.7%。其次为放线菌门(*Actinobacteria*)所占比例达 22.1%, 变形菌门(*Proteobacteria*)最少, 占 11.8%。在属的水平上, 发现芽孢杆菌属(*Bacillus*)细菌是欧洲千里光可培养内生细菌的优势内生菌种群, 占总菌株数目的 64.7%, 其次为节杆菌属(*Arthrobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)均占 10.3%。

68 株内生细菌所有比对序列在 GenBank 数据库中覆盖度和一致性均大于 99% (表 2), 可确定其分类单元。通过系统发育树可确定菌株的系统发育地位, 并分析进化关系。系统发育树显示, 代表内生细菌菌株与其在 NCBI 上 blast 鉴定至种的细菌序列均位于同一分支, 且聚类支持强度均高于 50%, 且甚至达到 100%。同时, 对于部分未准确鉴定到种的内生细菌通过系统发育树的构建, 也能对其的进化关系有准确的把握(图 1)。

### 4. 讨论

在开花植物中应用非培养法分析叶和根微生物群落结构的研究中, 以放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门为四个主要门类[19], 如 Ruizpérez 等[20]针对菊科高寒带标志性植物 *Espeletia hartwegiana* 叶、

**Table 1.** The isolates of bacteria from leaf endosphere of different individual *Senecio vulgaris* plants

**表 1.** 从欧洲千里光植株中分离培养得到内生菌的统计

分类		各植株分离株数									总数 Total
Classification of the isolated strains		Number of isolates from different individual plants									
门 Phylum	属 Genus	植株 1	植株 2	植株 3	植株 4	植株 5	植株 6	植株 7	植株 8	植株 9	
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0	1	0	2	1	0	1	1	1	7
	<i>Enhydrobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	9	5	4	4	4	5	3	5	5	44
	<i>Staphylococcus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	<i>unidentified</i>	0	0	1	2	0	0	0	1	0	4
Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	1	1	2	0	1	0	2	0	0	7
	<i>Micrococcus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	<i>Microbacterium</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	1	3
总数 Total		10	7	9	8	6	6	7	8	7	68

**Table 2.** The species and identification of bacteria from leaf endosphere of *Senecio vulgaris* plants  
**表 2.** 欧洲千里光叶内生菌种类及鉴定

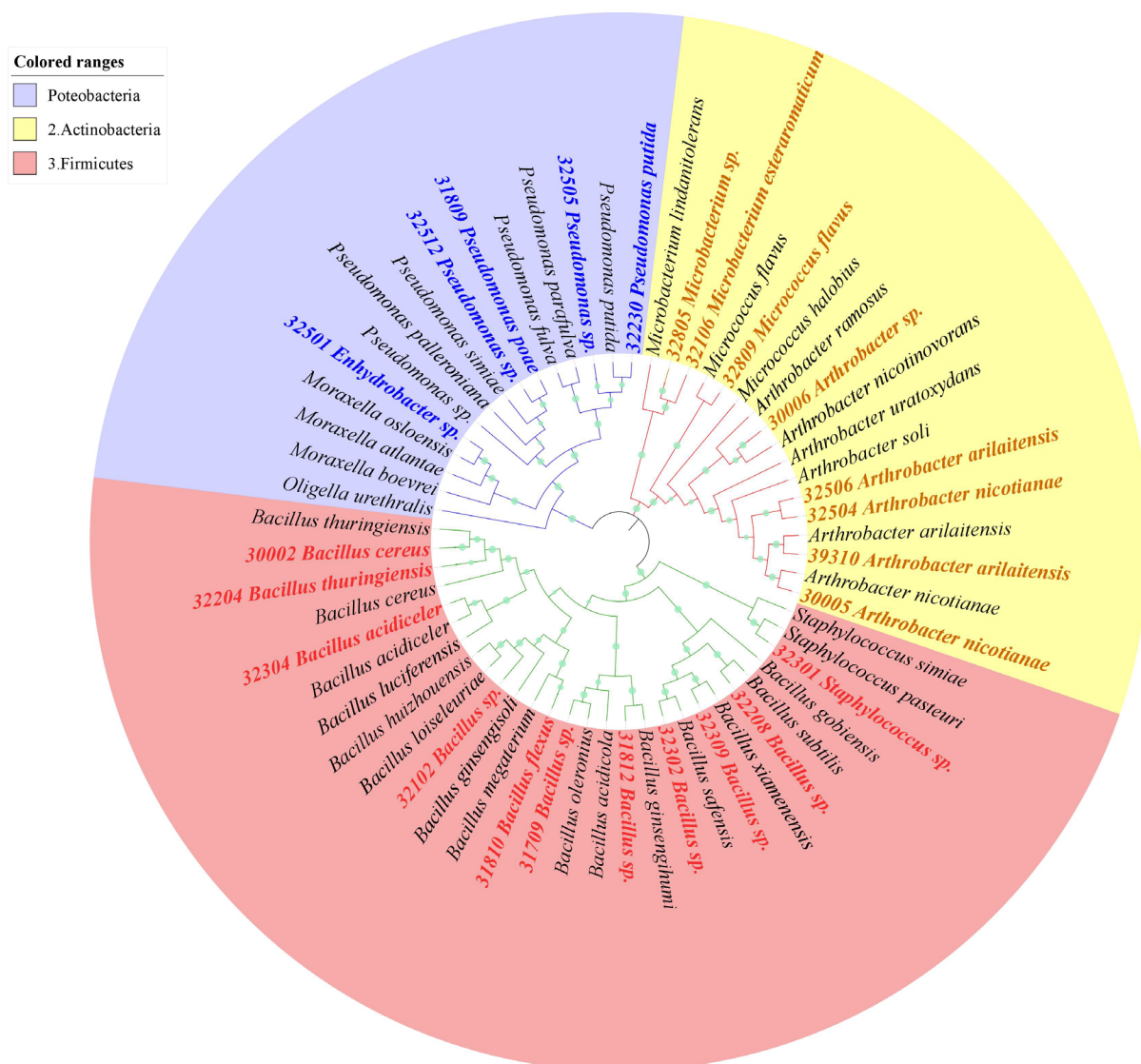
门、纲 Phylum and Class	种类 Species	序列相似性 Sequence similarity	菌株数目 Number of isolates strains
Proteobacteria $\gamma$ -proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	5
	<i>Pseudomonas putida</i>	99.9%	1
	<i>Pseudomonas poae</i>	99.5%	1
	<i>Enhydrobacte</i> sp.	100%	1
Firmicutes Bacilli	<i>Bacillus</i> sp.	99.9%~100%	40
	<i>Bacillus acidiceler</i>	99.9%	1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100%	1
	<i>Bacillus flexus</i>	100%	1
	<i>Bacillus cereus</i>	100%	1
	<i>Staphylococcus</i> sp.	100%	1
Actinobacteria Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	99.9%~100%	4
	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	99.8%~100%	4
	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	99.9%~100%	3
	<i>Micrococcus flavus</i>	100%	1
	<i>Microbacterium</i> sp.	99.3%~99.7%	2
	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	100%	1

根微生物群落结构和 Samad 等[21]针对葡萄树及其伴生植物的微生物群落结构的研究中,均以这四个门类为主要门类,这个结论与本文实验结果一致。其中芽孢杆菌属中的绝大多数种群在其他多种植物中也均有发现,芦云等从哈密瓜[22]、孔庆军等从棉花[23]、高增贵玉米[24]、陈泽斌[25]从烟草中以培养方法分离的内生细菌也均以芽孢杆菌属为主。这可能因为芽孢杆菌属细菌具有很强的抗逆性[26],同时芽孢杆菌的体积比一般的病原菌体积大几倍,且繁殖能力强,在植物内和病原菌的空间竞争上占据较大优势[27],容易通过偶然途径进入各种植物内部并定殖成为内生细菌。还能够有效抵御病原菌以及一些毒素的积累,从而有利于宿主植物的生长。

其中假单胞菌属在本次实验中也占有比较大的比例。假单胞菌属有着简单的营养需求,且适应性强,在自然界中普遍存在[28]。现已证实假单胞菌能产生有效铁载体、抗生素、胞外水解酶和 HCN 等抑菌代谢产物和诱导植物组织产生抗生[28] [29],有效地保护植物免受病原微生物侵害。

一般认为通过传统的分离方法鉴定的微生物只占环境微生物总数的 0.1%~10% [30],不能充分展示微生物的多样状况。而通过高通量培养方法,可以从植物根际和叶际丰度最高的前一百种 OTU 中分离培养到 64%的细菌[19]。用非培养方法对欧洲千里光叶内生菌的研究表明欧洲千里光叶内生菌菌落的核心组成超过 24 个属,覆盖 4 门 6 纲 19 科[31]。而我们从欧洲千里光叶片中分离到 3 门 3 纲 6 科 8 属,共 68 株内生菌。另外我们也注意到,我们研究的结果表明不同植株内所含有的内生细菌种类和比例是不同的,造成这种差异的原因可能有植株本身的差异,也有可能是我们的取样或者在分离培养过程的





**Figure 1.** Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences of the bacteria from leaf endosphere of *Senecio vulgaris* plants

**图 1.** 欧洲千里光部分叶内生细菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树

偏差。可以认为，我们用传统方法来研究植物内生菌的种群结构及多样性受到了极大的限制，在后续实验中应该改进植物内生菌分离和培养的方法，尝试多种分离、培养的技术，从而获得更多菌株的纯培养。

## 参考文献

- [1] 丁晖, 徐海根, 强胜, 等. 中国生物入侵的现状与趋势[J]. 生态与农村环境学报, 2011, 27(3): 35-41.
- [2] 姚成芸, 赵华荣, 夏北成. 我国外来生物入侵现状与生态安全[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(s1): 221-224.
- [3] Vitousek, P.M., D'Antonio, C.M., Loope, L.L., *et al.* (1996) Biological Invasions as Global Environmental Change. *American Scientist*, **84**, 468-478.
- [4] Torchin, M.E. and Mitchell, C.E. (2004) Parasites, Pathogens, and Invasions by Plants and Animals. *Frontiers in Ecology & The Environment*, **2**, 183-190. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0183:PPAIBP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0183:PPAIBP]2.0.CO;2)
- [5] Callaway, R.M. and Ridenour, W.M. (2004) Novel Weapons: Invasive Success and the Evolution of Increased Competitive Ability. *Frontiers in Ecology & The Environment*, **2**, 436-443.

- [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0436:NWISAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0436:NWISAT]2.0.CO;2)
- [6] Campisano, A., Pancher, M., Puopolo, G., *et al.* (2015) Diversity in Endophyte Populations Reveals Functional and Taxonomic Diversity Between Wild and Domesticated Grapevines. *American Journal of Enology & Viticulture*, **66**, 12-21. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14046>
- [7] Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. (2011) Living Inside Plants: Bacterial Endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**, 435-443. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>
- [8] Liarzi, O. and Ezra, D. (2014) Endophyte-Mediated Biocontrol of Herbaceous and Non-Herbaceous Plants. Springer India, 335-369.
- [9] 祁娟, 师尚礼. 苜蓿种子内生根瘤菌抗逆能力评价与筛选[J]. 草地学报, 2007, 15(2): 137-141.
- [10] Hodgson, S., Cates, C.D., Hodgson, J., *et al.* (2014) Vertical Transmission of Fungal Endophytes is Widespread in Forbs. *Ecology & Evolution*, **4**, 1199-1208. <https://doi.org/10.1002/ece3.953>
- [11] 王莉莉, 戴志聪, 祁珊珊, 司春灿, 林英, 刘雪艳, 杜道林. 植物内生细菌及其对入侵生态学的启示[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(3): 9-12.
- [12] Moore, R. and Moore, R. (1991) The Biology of Canadian Weeds *Myriophyllum spicatum* L. *Canadian Journal of Plant Science*, **70**, 885-886.
- [13] 刘永衡. 欧洲千里光的化学成分研究[D]: [硕士学位论文]. 银川: 宁夏大学, 2010.
- [14] Cheng, D. and Xu, L. (2015) Predicting the Potential Distributions of *Senecio vulgaris* L. in China. *Peer J Preprints*, **6**, e1612v1
- [15] Cheng, D., Kirk, H., Mulder, P.P.J., *et al.* (2011) Pyrrolizidine Alkaloid Variation in Shoots and Roots of Segregating Hybrids Between *Jacobaea vulgaris* and *Jacobaea aquatica*. *New Phytologist*, **192**, 1010-1023. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03841.x>
- [16] Conard, S.G. and Radosevich, S.R. (1979) Ecological Fitness of *Senecio vulgaris* and *Amaranthus retroflexus* Biotypes Susceptible or Resistant to Atrazine. *Journal of Applied Ecology*, **16**, 171-177. <https://doi.org/10.2307/2402736>
- [17] Huo, Y., Xu, X., Wang, C., *et al.* (2008) Bacterial Diversity of the Sediment from Cangnan Large Fishing Bay. *Acta Ecologica Sinica*, **10**, 5166-5172.
- [18] Saitou, N. and Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology & Evolution*, **4**, 406-425.
- [19] Bai, Y., Müller, D.B., Srinivas, G., *et al.* (2015) Functional Overlap of the *Arabidopsis* Leaf and Root Microbiota. *Nature*, **528**, 364-369. <https://doi.org/10.1038/nature16192>
- [20] Ruizpérez, C.A., Restrepo, S. and Zambrano, M.M. (2016) Microbial and Functional Diversity within the Phyllosphere of *Espeletia* sp. in an Andean High Mountain Ecosystem. *Applied & Environmental Microbiology*, **82**, 1807-1817. <https://doi.org/10.1128/AEM.02781-15>
- [21] Samad, A., Trognitz, F., Compant, S., *et al.* (2017) Shared and Host-Specific Microbiome Diversity and Functioning of Grapevine and Accompanying Weed Plants. *Environmental Microbiology*, **19**, 1407-1424. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13618>
- [22] 芦云, 罗明. 哈密瓜内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. 石河子大学学报(自科版), 2004, 22(s1): 104-109.
- [23] 孔庆军, 王莹, 葛彬. 棉花内生菌筛选纯化及抑菌效果研究[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(17): 79-81.
- [24] 高增贵, 陈捷, 刘限, 等. 玉米品种遗传多态性与根系内生细菌种群的相互关系[J]. 生态学报, 2006, 26(6): 1920-1925.
- [25] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 等. 烟草可培养内生细菌的分离及多样性分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1347-1354.
- [26] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.
- [27] 孙卫中, 崔燕华, 白剑宇, 等. 枯草芽孢杆菌滴灌棉田防治棉花枯、黄萎病效果[J]. 农村科技, 2015(12): 39-40.
- [28] Mercado-Blanco, J. and Bakker, P.A.H.M. (2007) Interactions between Plants and Beneficial *Pseudomonas* spp.: Exploiting Bacterial Traits for Crop Protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **92**, 367-389. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9167-1>
- [29] Bischoff, K.M., Wicklow, D.T., Jordan, D.B., *et al.* (2009) Extracellular Hemicellulolytic Enzymes from the Maize Endophyte *Acremonium Zeae*. *Current Microbiology*, **58**, 499-503. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9353-z>
- [30] Tholozan, J.L., Cappelletti, J.M., Tissier, J.P., *et al.* (1999) Physiological Characterization of Viable-but-Nonculturable *Campylobacter jejuni* Cells. *Applied & Environmental Microbiology*, **65**, 1110-1116.
- [31] Cheng, D., Tian, Z., Feng, L., *et al.* (2018) Diversity Analysis and Function Prediction of Rhizo and Endophytic Bacterial Communities of *Senecio vulgaris* L. (Asteraceae) in an Invasive Range. *PeerJ Preprints*, **6**, e26701v1. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.26701v1>

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[amb@hanspub.org](mailto:amb@hanspub.org)